

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ФАКУЛТЕТ ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ

Милош Р. Огњановић

**Развијање површински модификованих  
наночестица на бази магнетита  
обележених радионуклидима  $^{90}\text{Y}$  и  $^{177}\text{Lu}$  за  
потенцијалну примену у магнетној  
хипертермији и радионуклидној терапији  
малигних тумора**

докторска дисертација

Београд, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Miloš R. Ognjanović

**Development of surface modified magnetite-based nanoparticles labelled with radionuclides  $^{90}\text{Y}$  and  $^{177}\text{Lu}$  for potential use in magnetic hyperthermia and radionuclide therapy of malignant tumours**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

Ментори:

1. др Љиљана Дамјановић-Василић, редовни професор  
Универзитет у Београду – Факултет за физичку хемију

---

2. др Братислав Антић, научни саветник  
Универзитет у Београду – Институт за нуклеарне науке „Винча“ - Институт од националног значаја за Републику Србију

---

Чланови комисије:

1. др Никола Цвјетићанин, редовни професор  
Универзитет у Београду – Факултет за физичку хемију

---

2. др Марко Даковић, ванредни професор  
Универзитет у Београду – Факултет за физичку хемију

---

3. др Сања-Врањеш-Ђурић, научни саветник  
Универзитет у Београду – Институт за нуклеарне науке „Винча“ - Институт од националног значаја за Републику Србију

---

Датум одбране:

---

*Експериментални део ове докторске дисертације урађен је у Лабораторији за теоријску физику и физику кондензоване материје и у Лабораторији за радиоизотопе Института за нуклеарне науке „Винча“, Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду.*

*С дубоким поштовањем се захваљујем свом ментору др Братиславу Антићу на свестраној помоћи и несебичном пружању знања током израде докторске дисертације. Његово пријатељство, вођење и конструктивни предлози су омогућили да ова дисертација буде успешно реализована.*

*Огромну захвалност дугујем и проф. Љиљани Дамјановић-Василић на помоћи, залагању и стручним саветима током процеса израде и писања ове дисертације. Хвала на разумевању и великој подршци.*

*Хвала др Сањи Врањеш-Ђурић на конструктивним саветима и огромној помоћи приликом израде ове дисертације. Захвалност дугујем и др Дрини Јанковић на помоћи и учешћу у експериментима радиообележавања.*

*Такође се захваљујем проф. Николи Цејетићанину и проф. Марку Даковићу који су добронамерним стручним саветима допринели коначном изгледу докторске дисертације.*

*Пријатељима и колегама из Института за нуклеарне науке „Винча“ велико хвала на сталној подршци, као и свима који су на било који начин допринели при изради докторске дисертације.*

*Неизмерну захвалност дугујем својој породици, мојој Сањи и мом Лазару на пруженој љубави, разумевању и стрпљењу током израде ове докторске дисертације.*

*Хвала оцу Радославу, мајци Биљани и брату Саши за пружену подршку током свог школовања.*

*Ову докторску дисертацију посвећујем Вама.*

**Милош**

# Развијање површински модификованих наночестица на бази магнетита обележених радионуклидима $^{90}\text{Y}$ и $^{177}\text{Lu}$ за потенцијалну примену у магнетној хипертермији и радионуклидној терапији малигнух тумора

## Резиме

Истраживања која су предмет докторске дисертације обухватају развијање метода синтезе магнетних наночестица одређених физичких и хемијских особина, као и испитивање њихове хипертермијске ефикасности и могућности радиообележавања. Синтетисане наночестице су оксиди гвожђа, различитих величина и морфологија, или су на бази магнетита ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) у којима су јони гвожђа делимично супституисани јонима земноалкалних и прелазних метала ( $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Co}^{2+}$ ). Примењене су следеће методе синтеза: (i) таложна, (ii) модификована таложна која се заснива на таложној методи као првој фази и накнадном хидротермалном третману у микроталасном пољу и (iii) модификована полиол метода. Подешавањем параметара у процесу синтеза добијају се наночестице одређене морфологије, величине и дистрибуције са високом вредношћу сатурационе магнетизације. Површинском модификацијом наночестица омогућено је повећање стабилности њихових колоидних дисперзија, повећање биокompatбилности, као и обезбеђивање функционалних група за везивање радионуклида и лекова. За површинску модификацију МНЧ коришћена су хидрофилна једињења: лимунска киселина, поли(акрилна киселина), поли(етилен гликол), (3-аминопропил)триетоксисилан и декстран.

Основни циљ истраживања био је да се успоставе протоколи за синтезу и површинску модификацију да би се добиле магнетне наночестице које испољавају високу хипертермијску ефикасност, као и да се везивањем радионуклида произведе потенцијални наноагенс за комбиновану хипертермијско-радионуклидну терапију и примену у тераностици. Коришћене су комплементарне технике за одређивање структурних, магнетних и колоидних особина немодификованих и површински модификованих наночестица: рендгенска структурна анализа, трансмисиона електронска микроскопија, инфрацрвена спектроскопија и магнетометрија. Познавањем микроструктуре и структуре наночестица успоставља се корелација ових особина са методом и параметрима синтезе као и са хемијским саставом наночестица. Мерењем специфичне брзине апсорпције ( $SAR$ ) у спољашњем променљивом магнетном пољу испитана је потенцијална примена синтетисаних МНЧ у магнетној хипертермији.

Магнетне наночестице са високом вредношћу  $SAR$  параметра коришћене су за даља испитивања која укључују обележавање различитим радионуклидима:  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  и  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Принос радиообележавања и *in vitro* стабилност обележених МНЧ испитани су у физиолошком раствору и хуманом серум-албумину праћењем радиохемијске чистоће помоћу танкослојне хроматографије у периоду од 96 h од обележавања радионуклидом.

**Кључне речи:** магнетне наночестице, синтеза, површинска модификација, магнетна хипертермија, радиообележавање,  $^{90}\text{Y}$  и  $^{177}\text{Lu}$

**Научна област:** Физичка хемија

**Ужа научна област:** Физичка хемија материјала

# Development of surface modified magnetite-based nanoparticles labelled with radionuclides $^{90}\text{Y}$ and $^{177}\text{Lu}$ for potential use in magnetic hyperthermia and radionuclide therapy of malignant tumours

## Abstract

The research scope of the doctoral dissertation is the development of methods for the synthesis of magnetic nanoparticles of specific physical and chemical properties, as well as the analysis of their hyperthermic efficiency and the possibility of radiolabeling.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -based nanoparticles of different sizes and morphology in which iron ions had been partially substituted by alkaline earth and transition metal ions ( $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$ ) were synthesized. Several methods of synthesis were investigated: (i) a simple precipitation method, (ii) a modified precipitation method based on the precipitation method as the first phase and hydrothermal treatment in the microwave field as the second phase and (iii) a modified polyol-mediated method. By adjusting the parameters in the synthesis process nanoparticles of a certain morphology, size, and distribution with a high value of magnetization were synthesized. After the synthesis of bare nanoparticles, the next step was their coating - surface modification in order to increase the stability of colloidal dispersions, to improve the biocompatibility of nanoparticles and to provide the functional groups for the binding of radionuclides and drugs. The following hydrophilic compounds were used for the surface modification of MNP to select the most optimal ones: citric acid, poly(acrylic acid), polyethylene glycol, (3-aminopropyl)triethoxysilane, and dextran.

The main goal of the research was to establish the protocols for synthesis and surface modification of magnetic nanoparticles that will exhibit high hyperthermic efficiency and that after further radiolabelling might be used for combined radionuclide-magnetic-hyperthermic therapy and theranostics. Complementary techniques were used to determine the structural, magnetic, and colloidal properties of bare and coated nanoparticles: X-ray structural analysis, transmission electron microscopy, infrared spectroscopy, and magnetometry. By knowing the microstructure and structure of nanoparticles the correlation of these MNP properties with the parameters of synthesis, as well as with the chemical composition of nanoparticles, can be established. The potential application of synthesized MNP in magnetic hyperthermia was investigated by measuring the specific absorption rate (*SAR*) in an external oscillating magnetic field.

Magnetic nanoparticles with a high *SAR* value were further investigated for radiolabelling with different radionuclides:  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  and  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Radiolabelling yield and *in vitro* stability of radiolabelled MNP were examined in saline and human serum by monitoring the radiochemical purity by thin-layer chromatography up to 96 h from radiolabelling.

**Key words:** magnetic nanoparticles, synthesis, surface modification, magnetic hyperthermia, radiolabelling,  $^{90}\text{Y}$  and  $^{177}\text{Lu}$

**Scientific field:** Physical Chemistry

**Scientific subfield:** Physical Chemistry of materials

# САДРЖАЈ

<b>1.</b>	<b>УВОД.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>ПРЕГЛЕД ТЕОРИЈСКИХ И ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ ИСТРАЖИВАЊА У ОБЛАСТИ МАГНЕТНИХ НАНОЧЕСТИЦА И ЊИХОВЕ ПРИМЕНЕ У БИОМЕДИЦИНИ.....</b>	<b>3</b>
2.1.	Примена магнетних наночестица у биомедицини.....	3
2.1.1.	Магнетна сепарација .....	4
2.1.2.	Циљана испорука лекова.....	4
2.1.3.	Магнетне наночестице као контрастни агенси за магнетно резонантну томографију .	5
2.1.4.	Магнетна хипертермија.....	6
2.1.4.1.	Клинички аспекти магнетне хипертермије .....	6
2.1.2.1.	Физички принципи магнетне хипертермије.....	7
2.1.2.2.	Квантитативни параметри у магнетној хипертермији .....	11
2.1.2.3.	Преглед магнетних наночестица тестираних за потенцијалне примене у магнетној хипертермији .....	14
2.1.2.4.	Клинички и истраживачки уређаји за магнетну хипертермију.....	15
2.1.5.	Садашње стање примене магнетних наночестица у медицини и перспективе .....	16
2.2.	Спинелни тип структуре .....	18
2.3.	Методe синтезе магнетних наночестица на бази магнетита.....	19
2.3.	Стабилизација и функционализација: процес облагања наночестица .....	23
2.4.	Биодистрибуција и токсичност наночестица .....	28
2.5.	Методe карактеризације магнетних наночестица.....	30
2.6.	Радионуклиди за примене у терапији и дијагностици малигних тумора.....	35
2.6.1.	Радиообележавање магнетних наночестица.....	36
<b>3.</b>	<b>ПРЕДМЕТ И ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА .....</b>	<b>38</b>
<b>4.</b>	<b>ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО.....</b>	<b>39</b>
4.1.	Синтеза магнетних наночестица .....	39
4.1.1.	Синтеза наночестица магнетита таложном методом .....	39
4.1.2.	Микроталасима потпомогнута хидротермална синтеза МНЧ на бази магнетита.....	39
4.1.3.	Полиол синтеза магнетних наночестица .....	41
4.2.	Површинска модификација наночестица .....	43
4.2.1.	Електростатичка стабилизација лимунском киселином, поли(акрилном киселином) и (3-аминопропил) триетоксисиланом.....	44
4.2.2.	Стерна стабилизација поли(етилен гликолом) и декстраном.....	45
4.3.	Карактеризација магнетних наночестица .....	45
4.4.	Поступак радиообележавања магнетних наночестица .....	48
<b>5.</b>	<b>РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>50</b>
5.1.	Магнетне наночестице добијене таложном методом.....	50
5.1.1.	Структурне, микроструктурне и магнетне особине наночестица магнетита .....	50
5.1.2.	Површинска модификација $Fe_3O_4$ наночестица и колоидне особине .....	52
5.1.3.	Мерење специфичне брзине апсорпције $Fe_3O_4$ наночестица .....	54

5.2.	Магнетне наночестице добијене микроталасима потпомогнутом хидротермалном синтезом.....	55
5.2.1.	$\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ наночестице.....	55
5.2.1.1.	Структурна и микроструктурна анализа $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ .....	55
5.2.1.2.	Магнетне особине наночестица $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ .....	58
5.2.2.	$\text{Mg}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ наночестице.....	60
5.2.2.1.	Структурна и микроструктурна карактеризација $\text{Mg}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ .....	61
5.2.2.2.	Магнетне особине наночестица $\text{Mg}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ .....	63
5.2.2.3.	Мерење специфичне брзине апсорпције $\text{Mg}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ наночестица.....	64
5.3.	Магнетне наночестице добијене полиол синтезом.....	66
5.3.1.	Наночестице добијене полиол синтезом на атмосферском притиску ( $\text{IONP}_A$ ).....	66
5.3.1.1.	Површинска модификација $\text{IONP}_A$ наночестица.....	67
5.3.1.2.	Радиообележавање $\text{IONP}_A$ са $^{177}\text{Lu}$ и <i>in vitro</i> стабилност $^{177}\text{Lu-IONP}_A$ .....	69
5.3.1.3.	Истраживања СА-, APS- и DEX-обложених наночестица за потенцијалну примену у магнетној хипертермији.....	70
5.3.2.	Наночестице добијене полиол солвотермалном синтезом ( $\text{IONP}_S$ ).....	71
5.3.2.1.	Површинска модификација $\text{IONP}_S$ наночестица.....	73
5.3.2.2.	Радиообележавање наночестица са $^{99m}\text{Tc}$ и <i>in vitro</i> стабилност $^{99m}\text{Tc-IONP}_S$ .....	74
5.3.2.3.	Радиообележавање наночестица са $^{90}\text{Y}$ и <i>in vitro</i> стабилност $^{90}\text{Y-IONP}_S$ .....	75
5.3.2.4.	Радиообележавање наночестица са $^{177}\text{Lu}$ и <i>in vitro</i> стабилност $^{177}\text{Lu-IONP}_S$ .....	76
5.3.2.5.	Магнетне особине наночестица добијених полиол солвотермалном методом.....	77
5.3.2.6.	Примена $\text{PAA@IONP}_S$ у магнетној хипертермији и тераностици.....	78
5.4.	Радиообележавање наночестица: закључци и поређење са литературом.....	80
5.5.	Магнетна хипертермија: закључци и поређење са литературом.....	81
<b>5.</b>	<b>ЗАКЉУЧАК.....</b>	<b>85</b>
<b>6.</b>	<b>ЛИТЕРАТУРА.....</b>	<b>88</b>
	БИОГРАФИЈА.....	101
	Прилог 1.....	102
	Прилог 2.....	103
	Прилог 3.....	104
	Прилог 4.....	105



## 1. УВОД

Последњих деценија наноматеријали се интензивно истражују због својих јединствених особина. Као такви налазе примене у многим модерним технологијама, а често су коришћени и као моделни системи [1–3]. Историјски рад „*There's Plenty of Room at the Bottom*“ *Richard Feynman*-а [4] и предавање које је томе претходило, а одржано на годишњем скупу Америчког друштва физичара (1959), може се сматрати почетком развоја науке о наноматеријалима. Код наноматеријала уочавају се нове физичке особине које су често последица повећања односа површина/запремина честице. Наиме, у случају нанометарских честица велики број атома се налази у површинском слоју који може бити структурно другачије уређен у односу на унутрашњост и магнетно неуређен. На наноскали магнетне особине као што су коерцитивност, реманентна магнетизација, сатурациона магнетизација и сусцептибилност зависе од величине и облика честица [5]. Предмет великог броја научних истраживања био је утицај величине честица на физичке, хемијске и друге особине наноматеријала [6–8]. Наночестице неких полупроводника (ZnS, CdSe) које су величине око 5 nm (квантне тачке) показују изразиту зависност оптичких особина од димензија. Различита величина квантних тачака утиче на уређеност зонске структуре услед које долази до апсорпције или емисије светлости различитих таласних дужина [9]. Познавање корелација између особина и величина честица, укључујући и квантне феномене на наноскали, пружају могућност дизајнирања наноматеријала са жељеним особинама.

Фундаментална истраживања базирана на феноменима на наноскали и особинама наночестица су водила ка развоју нанотехнологија, тј. ка дизајнирању и производњи физичких, хемијских и биолошких система на нивоу од атомских до субмикронских димензија, као и њихову интеграцију у веће системе. Развој нанонаука и нанотехнологија довео је до открића у области функционалних наноматеријала, наноелектронике, енергетике, информационих технологија, биотехнологије, безбедности, пољопривреде, медицине, итд. [10]. Додатно, развој ове области донео је нова теоријска сазнања, довео до развоја експерименталних метода и конструкције нових уређаја. Истраживања у области нанонаука су се проширила и на област магнетних наночестица (МНЧ). Смањењем величине наночестица испод критичне вредности (обично од 5-20 nm), формирање магнетних домена више није енергетски повољно и оне постају једнодоменске, па долази до промене магнетних особина (појава суперпарамагнетизма, промена тачке фазних прелаза, појава веома велике магнетне отпорности, магнетне релаксације). Захваљујући магнетним особинама МНЧ су погодне за најразличитије технолошке примене, од складиштења података у магнетним меморијама, преко примене у ремедијацији вода и земљишта, катализаторима, сензорима, биотехнологији, до микро- и нано-флуида, магнетних мастила и оптичких филтера [2,11].

Посебна област примене магнетних наночестица је медицина. Примена медицинских метода базираних на МНЧ довела је до развоја нове гране медицине - магнетне наномедицине. Истраживања у овој области су фокусирана на развој нових метода синтезе у циљу добијања МНЧ циљаних карактеристика, које су по димензијама упоредиве са биолошким ентитетима (субћелијским структурама, протеинима, генима итд.). МНЧ се највише истражују за примене у терапији малигнух болести, али такође и за терапију инфективних [12], неуродегенеративних [13], кардиоваскуларних [14] и других обољења. За МНЧ се могу везивати хемиотерапеутици или други лекови и могуће је спољашњим магнетним пољем манипулисати њима када се нађу у крвотоку и усмеравати их на циљана ткива. Осим што се користе као носачи у достави лекова, магнетна природа ових наночестица омогућава да се енергија магнетног поља претвара у топлотну када се оне нађу у спољашњем променљивом магнетном пољу. Та карактеристика МНЧ је искоришћена за развој магнетне хипертермије - нове методе у третману малигнух болести. Осим тога МНЧ се користе и као агенси у магнетној резонанци, MRI (енг. *Magnetic Resonance Imaging* - MRI) [15–17].

Разумевање принципа медицинских примена МНЧ је корисно и за идентификацију нових области њихове примене. У току израде докторске дисертације налазимо се у сред пандемије корона вирусом, COVID-19. Прва одобрена вакцина у Европској унији је направљена на наноносачу од стране фармацеутских компанија „Pfizer“ (Сједињене Америчке Државе) и „BioNTech SE“ (Немачка) [18]. Значај примене нанотехнологија у медицини, посебно у терапији малигнух болести, је препознат и од стране Европске комисије која је кроз програм *Horizon 2020* у пројекте који су усмерени ка третману малигнух тумора инвестирала око 1,2 милијарде евра. Такође, терапија канцера која укључује и наномедицину је једна од пет приоритетних мисија у новом *Horizon Europe* програму Европске комисије [19].

Имајући у виду значај и перспективе примене МНЧ у терапији и дијагностици болести, истраживања која су предмет ове докторске дисертације су фокусирана на развијању метода синтезе МНЧ базираних на оксидима гвожђа за потенцијалне медицинске примене, пре свега у терапији малигнух болести. Истраживања се могу поделити у две фазе. Прва фаза била је развијање изабраних метода синтезе, детаљна физичкохемијска анализа синтетисаних МНЧ и њихова површинска модификација различитим биокомпатибилним једињењима. МНЧ на бази магнетита су припремљене модификацијом три методе синтезе: (i) класичном таложном методом, (ii) микроталасима потпомогнутом хидротермалном синтезом након таложења наночестица из раствора као и (iii) полиол методом. Наночестице имају тенденцију да се агломеришу приликом дужег стајања, па је потребно истражити нове синтезе и методе њиховог облагања. Синтетисане наночестице су облагане изабраним једињењима у циљу повећања колоидне стабилности у физиолошким условима, боље биокомпатибилности, спречавања агломерације и стварања услова за даљу функционализацију преко слободних група на површини. За површинску модификацију наночестица коришћена су хидрофилна једињења: лимунска киселина (СА), поли(акрилна киселина) (РАА), поли(етилен гликол) (РЕГ), (3-аминопропил)триетоксисилан (АПС) и декстран (ДЕХ) која садрже различите површинске функционалне групе и на различите начине врше стабилизацију МНЧ. Функционализоване МНЧ су анализирани употребом више комплементарних техника којима је испитан утицај облоге на хидродинамички пречник и површинско наелектрисање МНЧ.

Друга фаза у истраживањима се састојала од испитивања потенцијалне примене површински стабилизованих наночестица у магнетној хипертермији (МХ) и радионуклидној терапији малигнух тумора. Након оптимизације метода синтезе, хемијског састава и површинске модификације, испитана је топлотна ефикасност МНЧ у спољашњем променљивом магнетном пољу при различитим условима и одређени су параметри грејања: специфична брзина апсорпције (енг. *Specific absorption rate - SAR*) и параметар унутрашњег губитка (енг. *Intrinsic loss power - ILP*). Један од главних циљева истраживања био је добијање биокомпатибилних МНЧ које у спољашњем магнетном пољу генеришу веома велику количину топлоте. Испуњењем овог циља остварио би се висок хипертермијски ефекат, што представља услов за допремање мање количине наночестица у туморско ткиво. Синтетисане МНЧ које су показале висок потенцијал за примене у магнетној хипертермији су обележаване радионуклидима у циљу њихове потенцијалне примене у радионуклидној терапији. За радиообележавање су коришћени итријум-90 ( $^{90}\text{Y}$ ), лутецијум-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ) и технецијум-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ). Радиообележавање обложених МНЧ је извршено према утврђеним протоколима Лабораторије за радиоизотопе Института за нуклеарне науке „Винча“ методом директног везивања радионуклида. Да би се користиле као магнетни радиофармацеутик неопходно је да синтетисане радиообележене наночестице,  $^{90}\text{Y}$ -МНЧ и  $^{177}\text{Lu}$ -МНЧ, поред великог приноса обележавања, буду и стабилне у довољно великом временском интервалу у коме могу постићи свој терапијски ефекат. Из тог разлога, урађени су тестови стабилности у физиолошком раствору и хуманом серум-албумину на физиолошком рН. Анализирани су потенцијал МНЧ за примене у магнетној хипертермији, радионуклидној терапији, као и у комбинованој хипертермијско-радионуклидној терапији и тераностици.

## 2. ПРЕГЛЕД ТЕОРИЈСКИХ И ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ ИСТРАЖИВАЊА У ОБЛАСТИ МАГНЕТНИХ НАНОЧЕСТИЦА И ЊИХОВЕ ПРИМЕНЕ У БИОМЕДИЦИНИ

### 2.1. Примена магнетних наночестица у биомедицини

Као једна класа наноматеријала, магнетне наночестице (МНЧ) поседују јединствене магнетне особине које се јављају на наноскали. Феримагнетне и феромагнетне честице већих димензија су вишедоменске. Када нису под утицајем спољашњег магнетног поља, магнетни моменти домена су случајно оријентисани унутар честице. Када се честице нађу у спољашњем магнетном пољу, магнетни моменти се оријентишу у смеру поља. Са смањењем величине МНЧ испод критичне (обично испод 20 nm) долази до промене из мултидоменске у једнодоменску структуру и појаве суперпарамагнетног понашања. Када се оваква честица нађе у магнетном пољу она показује велику вредност магнетизације (али значајно мању од феромагнетних) услед паралелне оријентације спинова индивидуалних атома. За разлику од феромагнетних, суперпарамагнетне супстанце не показују реманентну магнетизацију и коерцитивност изван магнетног поља [20].

МНЧ се за биомедицинске примене користе у виду магнетне наноplatforme. Она се обично састоји од два или три саставна дела: магнетног језгра (феромагнетно, феримагнетно или суперпарамагнетно) и омотача који обезбеђује биокомпатибилност и стабилност у флуидима. Поред тога, platforma може садржати и део који се односи на функционализацију (лековима, генима, радионуклидима итд.). Магнетно језгро омогућава манипулацију наночестицама применом спољашњег магнетног поља. Хемијски састав језгра зависи од жељене примене МНЧ. Од магнетних материјала који имају потенцијалну биомедицинску примену, наночестице на бази оксида гвожђа, магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) и магхемит ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), су се показале као најбољи кандидати. Америчка агенција за храну и лекове (енг. *United States Food and Drug Administration* - FDA) је још 1996. године одобрила употребу наночестица гвожђе оксида за интравенску примену. Каснија истраживања су показала да су ови оксиди безопасни материјали ако се примене у контролисаним количинама [21]. Делимичном супституцијом јона  $\text{Fe}^{2+}$  у оксидима гвожђа нпр. јонима  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  формирају се феритне наночестице које могу имати боље магнетне особине са становишта биомедицинске примене. Уколико се као језгро наноplatforme користе Co, Ni или NdFeB, магнетна својства се могу побољшати, али ови материјали често могу бити токсични, па је њихова примена ограничена [22].

МНЧ представљају све перспективнији наноматеријал за клиничку дијагностику и терапију. Да би се могле користити у биомедицини, суспензије МНЧ морају бити у форми стабилних колоида, једнаких величина, биокомпатибилне и морају бити сконцентрисане у циљаном ткиву. Ради испуњења ових захтева, површина МНЧ се модификује различитим органским или неорганским једињењима као што су: поли(етилен гликол), силан, поли(лактид-ко-гликолична киселина) (PLGA), поливинил алкохол (PVA), декстран, и друга [23–25]. Облагање утиче на величину честица, као и на интеракцију са физиолошким течностима и ћелијама. МНЧ коришћене за ове примене су најчешће суперпарамагнетне и са високом сатурационом магнетизацијом.

Површински модификоване МНЧ се могу користити као вектори (носачи), где се под утицајем магнетног поља може постићи допремање лекова у циљана места. Такође, услед понашања под дејством спољашњег магнетног поља, МНЧ су нашле примену као контрастно средство у магнетној резонанци и као агенс у магнетној хипертермији. Даље, магнетокалорични ефекат магнетних наночестица пружа нове могућности у третману тумора [26]. Разумевање физичких, хемијских и биолошких механизма на којима је базирана примена МНЧ у биомедицини је од значаја за побољшање ефеката постојећих, али и за развој нових метода. Преглед могућих биомедицинских примена МНЧ и принципа на којима се оне заснивају сажет је у даљем тексту.

### 2.1.1. Магнетна сепарација

У биомедицинским истраживањима често је потребно одвојити специфичне биолошке ентитете (ДНК, РНК, протеине, ћелије, итд.) од њиховог матичног биолошког окружења. У ту сврху примењује се имобилизација молекула од интереса на површини наночестице. Када је наночестица површински модификована одређеним лигандом са слободним функционалним групама, у непосредном окружењу МНЧ долази до „препознавања“ са циљаним молекулом и њиховог међусобног везивања. Након тога, МНЧ се дејством спољашњег магнета или електромагнета одваја из система носећи циљани молекул са собом. Да би магнетна сепарација била успешна, МНЧ треба да поседују довољно велики магнетни момент у циљу појачавања ефекта и коришћења мање количине магнетног материјала. Магнетна сепарација има низ предности у поређењу са другим методама, посебно када су циљани молекули у опсегу микрометарских величина [27].

Магнетна сепарација се примењује у дијагностичке сврхе. *In vitro* детекција биолошких молекула (биомаркера болести) је од значаја за превенцију, рану дијагностику и лечење. За магнетну сепарацију најпогодније су суперпарамагнетне МНЧ које у одсуству спољашњег поља нису намагнетисане и које се релативно лако могу дисперговати у биолошком медијуму. Након примене спољашњег магнетног поља, оне постају намагнетисане и лако их је одвојити по завршетку сепарације. Биолошки молекули се након одвајања од медијума могу даље анализирати. У раду *Pang*-а и сарадника показано је да функционализоване  $Fe_3O_4@Ag$  са великом осетљивошћу везују и детектују микроРНК и изолују га из РНК ћелија тумора [28], што је само један од примера магнетне сепарације.

Техника магнетне сепарације би потенцијално могла да се употреби и за пречишћавање крви, уклањањем токсина или вируса као што је ХИВ. За овакве примене, неопходно је МНЧ обложене специфичним лигандом интравенски убризгати у крв, након чега би се из крви одвајале хемодијализом или хемофилтрацијом [29]. Иако је примена пречишћавања крви техником магнетне сепарације још увек у раној фази развоја, представља још један пример који указује на широк спектар потенцијалних примена МНЧ у магнетног сепарацији.

### 2.1.2. Циљана испорука лекова

МНЧ могу служити и као носачи лекова и користе се како би се потребна количина лека допремила у циљано ткиво. У ту сврху потребно је у ткиво применом спољашњег магнета спровести и концентровати честице. Достава лекова у циљаном ткиву и минимизирање примењене дозе је основни задатак терапијског агенса. Сила која делује на МНЧ је сразмерна градијенту квадрата јачине магнетног поља, тако да је за допремање неопходно користити изворе високоградијентног поља. Јачина поља око магнета као и градијент зависе од облика спољашњег магнета. Од перманентних магнета најчешће се користе они на бази Nd-Fe-B легура великог енергетског производа. Ови материјали се одликују великом реманентном магнетизацијом која додатно појачава поље у околини магнета, као и високом коерцитивношћу која спречава демагнетизацију, уколико се користи систем магнета уместо једног [30,31].

Циљана испорука лекова може да реши проблеме који су тренутно повезани са системском применом лекова, као што су нежељени ефекти на здраве ћелије или интеракција са другим лековима који се користе за различите врсте болести, при чему се лек имобилише на магнетној платформи (било на површини честица, на микросфери или унутар магнетних липозома), а затим се убризгава у жељени орган (директно или кроз артерију која храни орган) и усмерава у присуству спољашњег перманентног магнета или електромагнета. Продужено задржавање магнетног носача у циљаном ткиву одлаже уклањање лекова крвотоком и смањује дозу лека потребну за терапију [32].

Употреба система за циљану испоруку се заснива на конкуренцији између хидродинамичких сила које од стране кардиоваскуларног система делују на честице и магнетних сила насталих од стране спољашњег магнетног поља. Када магнетне силе по интензитету надјачају кинетичке проузроковане линеарним брзинама протока крви у артеријама ( $10 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ) или капиларима ( $0,05 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ), МНЧ се задржавају на циљаном месту [33]. Отуда, за ову примену МНЧ, као веома важан параметар истиче се магнетофоретска покретљивост у течностима ( $\mu_m$ ). Она представља меру покретљивости магнетног носача у течном медијуму под утицајем нехомогеног магнетног поља [34]. Овај параметар зависи од вискозности медијума, вредности магнетизације и димензије честица које се користе као носачи лека.

Данас постоје бројне технике таргетирања лекова код животиња које омогућавају локализацију и до 70% примењене дозе у циљаном ткиву, уз минималну интеракцију и токсичност на околне здраве ћелије. Истраживањима магнетне испоруке на малим животињама примењено је повећање концентрације лека у ткиву чак и до осам пута након примене само трећине дозе која се иначе користи за третман. Упркос охрабрујућим резултатима, постоје одређени проблеми које треба превазићи да би се техника применила и на људе, па је употреба МНЧ за циљану испоруку лекова и даље у фази развоја [27].

### 2.1.3. Магнетне наночестице као контрастни агенси за магнетно резонантну томографију

Магнетна резонанца (МР) је неинвазивна техника која се данас рутински користи у клиничкој дијагностици. У МР се прати промена оријентације спинова протона у магнетном пољу након интеракције са радиофреквентним импулсом. Магнетни моменти протона се релаксирају у почетне положаје са карактеристичним T1 и T2 временима релаксације. T1 или спин-решетка релаксација је релаксација дуж смера z-осе која укључује губитак енергије као топлоте, док T2, спин-спин, представља релаксацију у x-y равни која представља губитак фазне кохеренције. Јачина релаксационог сигнала је директно повезана са временом релаксације. Да би се остварила значајна разлика у сигнаlima између два ткива, неопходно је да се једно значајно брже релаксира од другог, што резултује бољим контрастом у МР. Суперпарамагнетне наночестице, када се као контрастно средство акумулирају у ткиву, под утицајем примењеног магнетног поља МР скенера генеришу локалне нехомогености у магнетном пољу. Због тога долази до значајног скраћивања T2 и T2\* времена, што резултује негативним појачањем контраста. Практично то значи да региони који садрже контрастно средство на слици изгледају тамније него они без њега. На пример, приликом допремања МНЧ у јетру, здраве ћелије јетре могу да преузму МНЧ, док ћелије захваћене патологијом или некротичне ћелије то не могу. Као последица тога, на МР снимку здраве регије постају тамније, док региони са оболелим ћелијама остају светлији при чему је разлика у контрасту јасно видљива [16,35,36].

Већина комерцијалних контрастних агенса заснованих на суперпарамагнетним наночестицама оксида гвожђа представљају агрегате хидродинамичких пречника (величине честица заједно са околним хидратационим омотачем) већих од 50 nm (нпр. *Resovist*<sup>®</sup>, *Lumirem*<sup>®</sup> или *Endorem*<sup>®</sup>). Ови агенси се лако задржавају у јетри или слезини, и њихова употреба је ограничена на детекцију обољења само тих органа. Са друге стране, користе се и веома мале суперпарамагнетне наночестице гвожђе оксида мањих хидродинамичких величина (нпр. *Sinerem*<sup>®</sup> има хидродинамички пречник од око 30 nm), па могу дуже остати у циркулацији и могу имати шири спектар примена [37]. Разлика у величини МНЧ се одражава у значајним разликама у релаксационим временима. Стога је нови изазов за истраживање у овој области синтеза МНЧ са веома малим хидродинамичким пречницима. У том смислу, развијају се контрастна средства као што је *MION 46* са хидродинамичким пречником око 20 nm или *VSOP-C184* (развијен од стране немачке компаније „*Ferropharm GmbH*“) са хидродинамичким пречником мањим од 10 nm [37].

## 2.1.4. Магнетна хипертермија

Предмет истраживања у овој докторској дисертацији је био развијање метода синтезе МНЧ за потенцијалну употребу, пре свега, у магнетној хипертермији. У наредним потпоглављима је дат приказ клиничких и физичких аспеката магнетне хипертермије и дискутују се унутрашњи (зависе од особина МНЧ) и спољашњи (јачина и фреквенца примењеног спољашњег магнетног поља) параметри који утичу на хипертермијску ефикасност. Дат је и преглед литературе у вези са истраживањима МНЧ за хипертермијску примену.

### 2.1.4.1. Клинички аспекти магнетне хипертермије

Магнетна хипертермија (МХ) је једна од најважнијих потенцијалних медицинских примена МНЧ. Досадашња истраживања су показала да би ова специфична и циљана метода локализованог загревања туморског ткива могла значајно да измени клиничку праксу лечења малигнух тумора, било да се примењује као додаток радиотерапији и хемиотерапији, било као самостални вид терапије због, пре свега, недовољне ефикасности постојећих метода.

Малигни тумори се одликују неконтролисаним растом и преношењем ћелија на друге делове организма кроз крвоток или лимфни систем [38]. Након стварања малигног ткива, долази до ангиогенезе (формирања нових крвних судова) што доводи до хаотичне васкуларизације у поређењу са здравим ткивима. Као последица абнормалне перфузије крви, тумори и околна здрава ткива су у стању веома ниског рН и сниженог дотока кисеоника, у стању хипоксије. У оваквим условима хемиотерапеутици у туморска ткива доспевају у концентрацијама вишеструко нижим од терапијских доза, док радиотерапија постаје мање ефикасна. У циљу решавања и ублажавања ових проблема, развија се клиничка хипертермија - терапијски приступ којим се малигне ћелије у туморском ткиву убијају локалним повећањем температуре под утицајем магнетног поља [39,40].

МХ је метода која се заснива на загревању циљаног ткива у опсегу температура унутар ког су патолошка ткива осетљивија на промену температуре у поређењу са здравим ткивима. Обично се у литератури наводи да је температурски прозор терапијског дејства МХ између 42 °C и 46 °C што, пре свега, зависи од региона који се третира, од начина на који се грејање врши, као и од термалног одговора ткива, који је у великој мери одређен локалним факторима у непосредној близини тумора. Хипертермијска терапија генерално доводи до смањења вијабилности малигнух ћелија и повећавања њихове осетљивости на хемиотерапију и зрачење, па је почела да се примењује на неколико клиника у свету кроз синергизам (појачање ефеката) са већ постојећим терапијама канцера.

Хипертермија магнетним наночестицама је први пут примењена 1957. године као метода за загревање лимфних чворова код паса [41], након чега су започета истраживања за примену на људима [42,43]. МНЧ у интеракцији са спољашњим променљивим магнетним пољем (*ac* пољем, енг. *alternating current - ac*) генеришу топлоту у матриксу, пропорционално јачини и фреквенцији примењеног магнетног поља [17]. Хипертермија употребом МНЧ представља крупан помак у терапији јер нуди могућност циљаног загревања туморског ткива уз очување околних здравих ткива [44]. МНЧ са својим могућностима загревања ткива, заједно са напредним техникама њиховог допремања до жељених ткива и органа су у корену промениле начин на који су раније хипертермијске терапије биле засноване, што је довело до новог концепта у третману тумора хипертермијом. Предности хипертермије употребом МНЧ у односу на стандардне хипертермијске методе могу се сумирати кроз неколико чињеница:

- МХ је локализована терапија при чему долази то терапијског дејства на малој запремини ткива у које су МНЧ допремљене;
- Имајући у виду релативно малу површину дејства, термоаблације на високој температури под строго контролисаним условима постају изводљиве;

- Напредак у дизајнирању МНЧ је омогућио њихову специфичну функционализацију са активним молекулима при чему се оне могу директно усмерити на туморске ћелије;
- Недавна истраживања су показала да применом наизменично магнетног поља у третману МХ долази до локалног повећања концентрације главних хистокомпатибилних комплекса [45]. Њихова функција је излагање одређених фрагмената протеина Т лимфоцитима, што за последицу изазива реакцију имунолошког система, након чега долази до циљаног напада на ћелије тумора.

### 2.1.2.1. Физички принципи магнетне хипертермије

Када се говори о примени МНЧ у МХ, у литератури се најчешће дефинишу три региона који се односе на величину МНЧ и региона на којима се испољава ефекат МХ: (i) нано-скала, дефинисана величином магнетних честица (5-100 nm), (ii) микро-скала, коју карактеришу величине ћелијских ентитета (5-20  $\mu\text{m}$ ) и (iii) макро-скала, одређена величином циљаног ткива (обично до 20 mm) [46]. Са друге стране, зависно од магнетних особина МНЧ (да ли испољавају суперпарамагнетно или феромагнетно понашање), топлота у МХ се може генерисати следећим механизмима [47]:

- „Зрна или перле“ - загревање ткива услед отпорности средине и стварања вртложних струја (енг. *Eddy currents*);
- Загревање ткива услед хистерезисних губитака;
- Уколико се користе суперпарамагнетне наночестице, механизам конверзије енергије магнетног поља у топлотну је заснован на *Néel*-овим и *Brown*-овим релаксацијама.

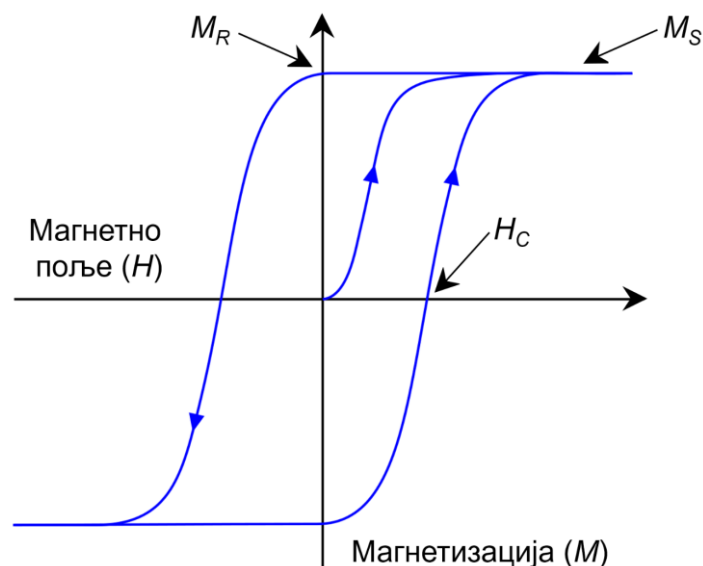
#### *Вртложне струје*

Према *Faraday-Lenz*-овом закону електромагнетне индукције, уколико се проводник нађе у променљивом магнетном пољу у њему ће се индуковати електрична струја. Када се ткиво изложи променљивом магнетном пољу у третману МХ у њему се индукују вртложне струје којима се врши расипање енергије магнетног поља у ткиво. Ипак, ниска специфична електрична проводност ткива ( $0,6 (\Omega \cdot \text{m})^{-1}$ ), која је за око осам редова величина мања него у металима [48], генерише јако мали ефекат грејања који је далеко од потребне терапијске дозе.

#### *Хистерезисни губици*

Са аспекта магнетизма, феромагнетни материјали испољавају доменску структуру. Код оваквих материјала магнетизација показује нелинеарну зависност од јачине спољашњег магнетног поља и описује се хистерезисном петљом (слика 2.1). Три главна магнетна параметра хистерезисне петље су:

- Сатурациона магнетизација или магнетизација засићења ( $M_S$ ) која представља вредност ка којој тежи магнетизација у високим пољима. Сатурација се достиже када су сви магнетни моменти у материјалу усмерени дуж правца деловања магнетног поља,
- Реманентна магнетизација ( $M_R$ ) представља заосталу магнетизацију при нултом магнетном пољу,
- Коерцитивност или коерцитивно поље ( $H_C$ ) представља вредност магнетног поља која је потребна да би се узорак потпуно демагнетизовао.



**Слика 2.1.** Хистерезисна петља са ознакама најзначајнијих магнетних параметра: сатурациона магнетизација ( $M_S$ ), реманентна магнетизација ( $M_R$ ) и коерцитивност ( $H_C$ ).

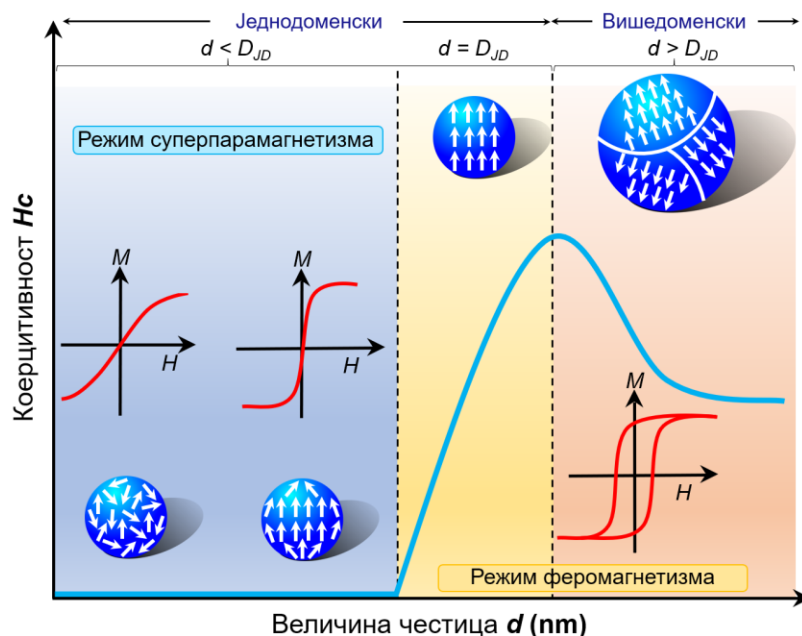
Магнетно понашање магнетних материјала строго зависи од величине честица. Прелазак из вишedomенске у једноdomенску структуру са смањивањем величине честица је приказан на **слици 2.2**. Када се вишedomенски материјал нађе у променљивом магнетном пољу у материјалу долази до апсорпције енергије магнетног поља, док након промене смера магнетног поља долази до њене дисипације. У хистерезисном циклусу два процеса доприносе хистерезисним губицима: први је померање зидова домена услед чега неки домени расту а неки ишчезавају, док други процес представља ротацију магнетних момената појединачних домена (**слика 2.2**). Енергија повезана са процесом формирања домена расте са смањењем величине честице, тако да формирање домена више није енергетски повољно када се величина честица феромагнетног материјала смањи испод критичне. Под оваквим условима, магнетна структура целокупног материјала постаје једноdomенска. Када су у питању честице са димензијама  $D_{JD}$  (**слика 2.2**) које се састоје од једног магнетног домена, губици кроз хистерезис у  $ac$  пољу су већи од било које друге врсте губитака [49]. У неким поједностављеним прорачунима показано је да интеракције између МНЧ имају изражен ефекат у хистерезисним губицима [50]. Ово је експериментално потврђено и у сагласности је са зависношћу међучестичног растојања у процесу генерисања топлоте у случају наночестица гвожђе оксида обложених декстраном [51].

Количина енергије магнетног поља коју МНЧ апсорбују ( $P_{FM}$ ) дата је изразом [17]:

$$P_{FM} = \mu_0 f \oint H dM. \quad (2.1)$$

где  $f$  је фреквенција променљивог магнетног поља,  $H$  јачина поља а  $M$  магнетизација. За примену у биомедицини, обично се користе фреквенције у опсегу  $f = 50-1200$  kHz и јачине поља у опсегу  $H = 0-5$  kA·m<sup>-1</sup> [52].  $P_{FM}$  током једног циклуса промене поља и магнетизације честице је приближно једнака површини динамичне хистерезисне петље и неповратно се претвара у топлоту. Овај начин настанка топлоте се јавља и код вишedomенских и код једноdomенских наночестица које показују хистерезисно понашање криве  $M = f(H)$ .





**Слика 2.2.** Промена коерцитивности ( $H_C$ ), спинског уређења и магнетизационе криве у зависности од величине честица. Са опадањем величине феромагнетних честица  $H_C$  расте и достиже максимум за критичну величину формирања једнодоменске честице ( $D_{JD}$ ). Са даљим смањењем величине честице  $H_C$  опада до нуле, када се испољава суперпарамагнетно понашање. У јако малим честицама у којима је унутрашње магнетно уређење кратकोдометно, крива магнетизације мења облик и приближава се линеарној [5,53].

#### Релаксациони губици

У истраживањима МХ најчешће се користе суперпарамагнетне наночестице. У одсуству спољашњег поља резултујућа магнетизација суперпарамагнетика је нула. Уколико је температура испод *Curie*-јеве ( $T_C$ ) или *Néel*-ове и ако је термална енергија већа од висине потенцијалне баријере [54], вектор магнетизације ротира око правца (преферентне) осе лаке магнетизације (енг. *Easy axis*), што представља суперпарамагнетне релаксације са карактеристичним временом  $\tau$ . Магнетно понашање наночестица одређено је вредношћу карактеристичног времена  $\tau_m$  које је повезано са дужином трајања мерења. У случају магнетометрије  $\tau_m$  је  $10^{-4}$ - $10^{-2}$  s, а код *Mössbauer*-ове спектроскопије  $\tau_m$  је реда величине  $10^{-9}$  s [55]. За дати систем наночестица, суперпарамагнетно понашање ће бити опажено ако је  $\tau < \tau_m$  и тада је релаксација магнетизације бржа од времена мерења. Ако је  $\tau_m < \tau$ , систем наночестица се налази у блокираном стању [54].

Повећање температуре у МХ је последица трансформације енергије магнетног поља у топлоту, услед реоријентације магнетизације МНЧ. Наиме, када се МНЧ изложи дејству променљивог магнетног поља, магнетни моменти се оријентишу дуж правца поља и мењају оријентацију са променом смера магнетног поља. Скуп појединачних магнетних момената атома унутар једне суперпарамагнетне МНЧ је обично представљен једним супер спином.

Са ротацијом система МНЧ суспендованих у течном медијуму повезана су два релаксациона механизма (слика 2.3). Први представља промену оријентације спинова унутар кристалне решетке наночестица и промену правца магнетизације, али не и физичку ротацију самих честица. Овај механизам је познат као *Néel*-ова релаксација. У теорији динамике наночестичних система уводи се карактеристично релаксационо време ( $\tau_N$ ) потребно за флукуацију магнетизације унутар честице и њено преусмеравање у енергетски повољнији смер (равнотежно стање). Његову температурску зависност формулисао је *Louis Néel*, па се по њему назива *Néel*-ово релаксационо време [56]:

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{E_B}{k_B T}\right), \quad (2.2)$$

где је  $k_B$  Boltzmann-ова константа, а  $E_B$  представља енергетску баријеру анизотропије која је пропорционална константи анизотропије материјала ( $K$ ) и запремини магнетне честице ( $V$ ) ( $E_B = KV$ ). Предекспоненцијални фактор  $\tau_0$  је карактеристично релаксационо време које зависи од врсте наночестица и има вредност од  $10^{-13}$ - $10^{-9}$  s.

Када је у питању други релаксациони механизам, *Brown*-ова релаксација, приликом ротације заједно са честицом ротира и вектор магнетизације. Ротација зависи од хидродинамичких параметара честице, али и од вискозности дисперзионог медијума који је или флуид или ткиво. Карактеристично време релаксације за ову врсту ротације,  $\tau_B$ , дато је једначином [57]:

$$\tau_B = \frac{3V_h \eta}{k_B T}. \quad (2.3)$$

У једначини  $V_h$  означава хидродинамичку запремину (добијену мерењем хидродинамичког пречника, који се одређује експериментима динамичког расејања светлости). Чинилац  $\eta$  представља вискозност течног дисперзионог медијума.

Оба релаксациона механизма се одвијају истовремено и зависе од различитих параметара. Време  $\tau_B$  је пропорционално хидродинамичком пречнику и вискозности средине, а  $\tau_N$  зависи од магнетне анизотропије и магнетне величине честица. Хидродинамички пречник је већи од магнетног услед постојања локалне сфере флуида, облагања и функционализације наночестица, па је однос  $\tau_B$  и  $\tau_N$  различит. *Rosensweig* је предложио модел ефективног времена релаксације ( $\tau_{eff}$ ) полазећи од  $\tau_N$  и  $\tau_B$  [58]:

$$\frac{1}{\tau_{eff}} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B}. \quad (2.4)$$

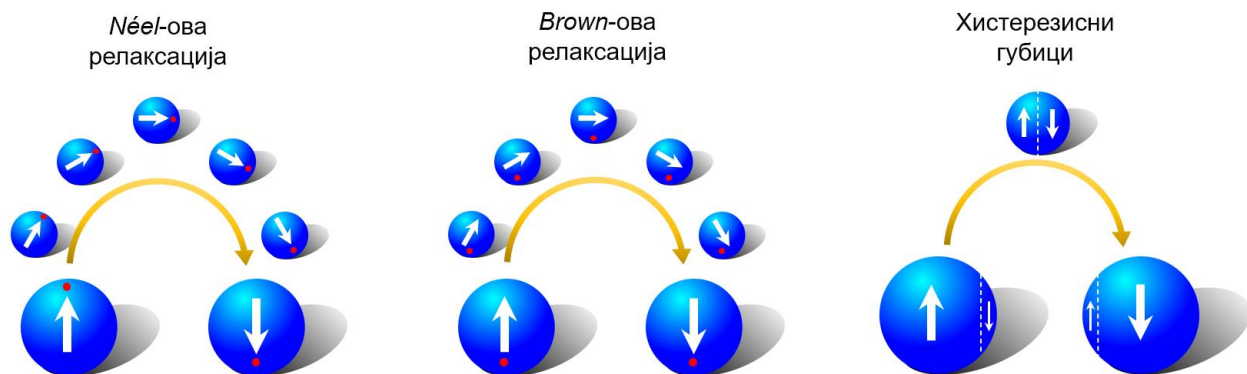
У области важења LRT (енг. *Linear response theory* - LRT), када је  $M = f(H)$  система наночестица линеарна функција јачине примењеног поља, апсорбована енергија поља износи [59]:

$$P_{spm} = \mu_0 \pi \chi_0 H \frac{2\pi f \tau_{eff}}{1 + (2\pi f \tau_{eff})^2}, \quad (2.5)$$

где је  $\chi_0$  изотермална суцептибилност.

*Néel*-ов и *Brown*-ов механизам описује релаксацију (ротацију магнетизације) једнодоменске суперпарамагнетне као и феромагнетне честице. Једина разлика између једнодоменских феромагнетних и суперпарамагнетних МНЧ је у чињеници да се смер магнетизације код суперпарамагнетних мења на случајан начин услед термалних флукуација. Модел *Néel-Brown*-ове релаксације није савршен иако се у литератури доста користи за предвиђање и тумачење различитих параметара колоидних дисперзија који су интересантни за МХ, као што су оптимална величина честице, фреквенција и јачина магнетног поља. Овакав приступ често наилази на критике услед неслагања са квалитативним и квантитативним анализама [60–62].

Иако је топлота генерисана путем хистерезисних губитака много већа од топлоте ослобођене *Néel*-овом и *Brown*-овом релаксацијом, у медицински прихватљивим опсезима фреквенција магнетног поља (50-1200 kHz) *Brown*-ово кретање МНЧ представља главни механизам грејања у МХ, па се отуда за ову примену превасходно истражују суперпарамагнетне наночестице код којих је доминантан утицај *Brown*-ове релаксације. Топлотна ефикасност МНЧ значајно зависи од структурних особина честица (величине, облика, кристаличности, итд.) и треба да буде што већа како би се доза наночестица потребна за терапију свела на минималан ниво.



**Слика 2.3.** Ротација магнетног момента унутар МНЧ што доводи до *Néel*-ових губитака (лево); механичка ротација МНЧ услед које долази до *Brown*-ових губитака (средина) и померање зидова домена у вишедоменским МНЧ што води до појаве хистерезисних губитака (десно) [63].

### 2.1.2.2. Квантитативни параметри у магнетној хипертермији

Полазећи од биолошких и техничких аспеката примене МХ у медицини од значаја је квантификовање хипертермијске ефикасности материјала и избор МНЧ. У наредном тексту приказани су параметри који имају утицај на ефикасност грејања МНЧ и који се морају разматрати при њиховом дизајнирању. Поред тога, дискутује се и о сигурносним ограничењима везаним за клиничку примену терапије МХ.

#### *Специфична брзина апсорпције и параметар унутрашњег губитка*

Магнетне наночестице интерагују са спољашњим магнетним пољем преко вектора магнетизације. Оне апсорбују енергију магнетног поља и преко физичких механизма је претварају у топлоту. Ефикасност грејања МНЧ, која означава ефикасност претварања енергије магнетног поља у топлоту се процењује преко специфичне брзине апсорпције (*SAR*), која се изражава формулом [64]:

$$SAR = (\Delta T \cdot c) \cdot t^{-1}, \quad (2.6)$$

при чему  $\Delta T$  представља пораст температуре медијума у коме су дисперговане наночестице,  $c$  специфичну топлоту наноматеријала, док је  $t$  време мерења. Уместо *SAR* вредности, у литератури се често може наћи и еквивалентан израз специфични губитак снаге - *SLP* (енг. *Specific loss power - SLP*).

Иако је употреба *SAR* параметра постала широко распрострањена међу истраживачима који се баве проценом ефикасности грејања магнетних наночестица у МХ, резултати различитих експеримената базираних на калориметрији мерени на различитим, најчешће лабораторијски конструисаним уређајима и реализовани применом различитих спољашњих поља не могу се лако упоредити. У конструисаним апаратима потребно је добром изолацијом зидова радног простора обезбедити адијабатске услове како би се сва апсорбована енергија магнетног поља претворила у топлотну и прецизно детектовао пораст температуре. Све ово указује да добијени резултати за *SAR* вредност, било у експериментима са наноматеријалима у форми флуида или у *in vitro* и *in vivo* експериментима, треба да буду пажљиво анализирани [65]. Сходно томе, предложен је нови параметар унутрашњег губитка (*ILP*), као прва апроксимација, који би омогућио директно поређење резултата мерења добијених у различитим лабораторијама и под различитим експерименталним условима (фреквенцијама и јачинама поља) [66]. *ILP* параметар је дефинисан једначином [58]:

$$ILP = \frac{SAR}{H^2 f}. \quad (2.7)$$

Строго говорећи, израчуната вредност  $ILP$  параметра је поуздана само у режимима niskих поља, па се приликом одређивања овог параметра препоручује коришћење следећих експерименталних услова: (i) фреквенције  $ac$  магнетног поља до неколико MHz, (ii) употреба поликристалних узорака са индексом полидисперзности већим од 0,1 (који је повезан са дистрибуцијом честица по величини), (iii)  $ac$  поља јачине које су знатно испод сатурационе магнетизације МНЧ и (iv) услови при којима су термодинамички губици на околинину минимални. Ипак, чак и уз непоштовање неког од ових услова,  $ILP$  је веома користан параметар за поређење ефикасности грејања различитих наночестица.

#### *Ограничења у in vivo примени магнетне хипертермије*

Као што је раније наведено, истраживања и конструкција медицинских уређаја који су усмерени ка *in vivo* примени МХ користе фреквенције  $ac$  поља у опсегу,  $f = 50-1200$  kHz и поља јачине  $H_0 = 0-5$  kA·m<sup>-1</sup> [52]. Ова ограничења вредности  $f$  и  $H_0$  су предмет честих дискусија научника и клиничара укључујући и само питање да ли треба да постоји строго дефинисана сигурносна граница за употребу  $ac$  поља у МХ, имајући у виду веома тешку клиничку слику пацијената чији је живот без адекватне терапије угрожен. Ова ограничења проистичу из чињенице да се приликом излагања наизменичним магнетним пољима високих фреквенција може појавити неспецифично загревање околних здравих ткива или други штетни ефекти. Највероватнији узрок оштећења ткива је грејање настало услед вртложних струја које се индукују као последица променљивог магнетног поља.

*Atkinson* је у својим истраживањима разматрао ефекте вртложних струја на људски организам, као и последице које би оне могле да имају при фреквенцијама и јачинама поља погодним за примену у МХ [67]. Он је проценио да је моћ апсорпције енергије по јединици запремине ткива за цилиндричну апроксимацију тела (користио је облик људске руке или торзоа) унутар дугог соленоида у коме се индукује поље, дата једначином:

$$P_{eddy} = \sigma_t (\pi \mu_0)^2 H^2 f^2 r^2. \quad (2.8)$$

У једначини  $\sigma_t$  представља електричну проводљивост ткива, а  $r$  полупречник цилиндра (тј. органа цилиндричног облика). На основу једначине (2.8) се запажа да ће ефекат грејања исте фреквенције и јачине магнетног поља на људску руку ( $r_r \approx 5$  cm) бити 16 пута мањи него на торзо ( $r_t \approx 20$  cm). *Atkinson* је извршио прелиминарне клиничке тестове толеранције користећи завојницу постављену око грудног коша здравих добровољаца и увидео да ефекти  $ac$  поља јачине до 35,8 A·m<sup>-1</sup> и фреквенције од 13,56 MHz могу бити термално толерантни за дужи временски период. Прегледом литературе није нађено да је овај тест клиничке толеранције поновљен. *Atkinson*-ови резултати се често наводе као „сигурносна граница“ за вредности фреквенције и јачине магнетног поља, под називом „*Atkinson-Brezovich*-ев критеријум“ [68], којим се наводи да производ јачине магнетног поља и фреквенције не би требало да пређе вредност 4,85·10<sup>8</sup> A·m<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>. Код примене МХ у третману малигних болести, наведена  $H \cdot f$  вредност толеранције биће различита јер ће се за конкретна туморска ткива користити другачија геометрија  $ac$  поља, где је поље примењено на мању запремину него што је грудни кош, па се очекује мањи ефекат вртложних струја и већа толеранција  $H \cdot f$  производа. Касније су *Hergt* и сарадници сугерисали примену мање строгог критеријума по ком  $H \cdot f$  производ може бити за ред величине већи,  $H \cdot f \leq 5 \cdot 10^9$  A·m<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> [69].

#### *Оптимална величина и облик магнетних честица за примене у магнетној хипертермији*

Оптимална величина честица које би се користиле у клиничкој МХ је још увек предмет многих дискусија. Углавном недостају закључци анализе предвиђених ефеката и резултата експеримената са МНЧ у *in vitro* тестовима, као и *in vivo* примена МХ на оболелим ткивима. Такође, већи број параметара наночестица утиче на SAR вредност па је веома тешко урадити анализу утицаја само величине наночестица на SAR и изнети јасан закључак.

Честице испод 100 nm се сматрају погодним за медицинске примене. За примену у МХ, најчешће се у литератури препоручује минимална величина обложених наночестица хидродинамичког пречника око 30-40 nm, при чему је оптимална величина кристалног језгара (необложених МНЧ) око 15-20 nm [70]. Код малих честица је изражено кристално и магнетно разуређење површинског слоја који се често означава као „магнетно мртав“ јер не даје допринос укупној магнетизацији честица и слаби хипертермијски ефекат. Са аспекта магнетизма потребно је постићи деликатну равнотежу унутрашњих карактеристика које произилазе из саме структуре материјала и које имају утицај на SAR вредност, према једначинама 2.2-2.5, а то су пре свега сатурациона магнетизација ( $M_S$ ) и магнетна анизотропија. У примени у МХ потребно је подесити и спољашње параметре а то су фреквенција и јачина примењеног магнетног поља [52]. С друге стране, структурне карактеристике као што је величина и облик честица, њихова расподела по величини, интеракције између честица које доводе до агрегације као и дефекти у кристалној структури имају утицај на топлотне губитке МНЧ [65]. Имајући у виду велики број параметара који утичу на SAR вредност као и да су важења теоријских модела са ограничењима, није могуће тачно предвидети и дефинисати димензије честица које су најпогодније за примене у МХ. Свакако да и промена хемијског састава индиректно утиче на особине честица, укључујући њихову величину и дистрибуцију по величини.

У литератури се могу наћи резултати различитих истраживачких група које су систематски анализирале корелацију SAR вредности са величином честица користећи различите експерименталне и теоријске приступе. Као моделни систем често се користи ансамбл суперпарамагнетних честица магнетита ( $Fe_3O_4$ ). Група научника из Института за нанонауку из Сарагосе синтетисала је серију  $Fe_3O_4$  честица са пречницима у опсегу од 3 nm до 26 nm. Показали су да су величина честица и расподела по величини главни параметри који утичу на ефикасност грејања [65]. Њихови резултати показују одсуство корелације између  $M_S$  и величине честица када су оне у суперпарамагнетном стању. Такође, показали су да је гранична оптимална величина честица она код које са смањењем величине долази до преласка из мултидоменске у једнодоменску структуру. Слични закључци се често срећу у литератури.

Утицај величине честица је испитиван и на  $Fe_3O_4$  наночестице обложене декстраном. Честице величине 4 nm нису показивале топлотни одговор, док су оне величине 19 nm довеле до значајног пораста температуре довољне за МХ терапију, примењујући спољашње *ac* поље које је безбедно за клинички третман [61].

*Hergt* и сарадници су испитивали зависност SAR вредности у широком опсегу величина честица и добили обећавајуће резултате за магнетозоме (МНЧ произведене путем магнетотактичких бактерија) величина од 30 nm до 40 nm и поредили их са другим ферофлуидима на бази гвожђе оксида [69]. Добили су SAR вредности чак од  $1 \text{ kW} \cdot \text{g}^{-1}$  при  $f = 410 \text{ kHz}$  и  $H_0 = 10 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$ , што одговара  $ILP = 24,4 \text{ nHm}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$ .

На основу *Stoner-Wohlfarth*-ове теорије за једнодоменске наночестице и *Néel-Brown*-ових релаксационих модела, *Medauroi* и сарадници су, полазећи од експерименталних резултата мерења хипертермијске ефикасности наночестица гвожђе оксида са пречницима од 5,5 nm до 28 nm, предложили теоријски модел којим се предвиђа оптимална запремина честице ( $V_{opt}$ ) [61]. У режимима слабих магнетних поља, оптимална запремина честица може се предвидети формулом:

$$V_{opt} = \frac{k_B T}{K} \ln(\pi f \tau_0), \quad (2.9)$$

где је  $K$  константа анизотропије. За јача магнетна поља, *Néel-Brown*-ов модел није применљив. Формула за  $V_{opt}$  се добија комбинацијом две једначине које се односе на оптималну вредност коерцитивности [62]:

$$\mu_0 H_C = 0,48 \mu_0 H_K (1 - \kappa^{0,8}), \quad (2.10)$$

где је  $k$  бездимензиони параметар повезан са променама коерцитивног поља при различитим брзинама мерења, а  $H_K$  поље анизотропије. Друга једначина коју аутори користе је [62]:

$$\mu_0 H_C = (0,81 \pm 0,04) \mu_0 H_{\max}, \quad (2.11)$$

при чему је  $H_{\max}$  максимална јачина магнетног поља.

Анизотропија облика наночестица утиче на вредност коерцитивности и сатурационе магнетизације, а самим тим и на хипертермијску ефикасност МНЧ и предмет је многобројних истраживања. *Gudoshnikov* и сарадници су проучавали хистерезисне губитке МНЧ различитих облика величине око 25 nm, у опсегу фреквенција од 10 kHz до 200 kHz при јачинама поља до  $32 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$ . Показали су да *SAR* вредност опада око пет пута уколико се однос дужине и ширине наночестица смањи са 11,4 на 1 [71]. У истраживању које се наводи, даје се преглед утицаја облика  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  наночестица на *SAR* које су добијене под различитим спољашњим условима и површински модификоване различитим лигандима. Октаедарске СТАВ@ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , у облику диска СТАВ@ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , кубне PEG@ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , у облику прстена mPEG@ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и сферне PVP@ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  показују значајну разлику у *SAR* вредностима. СТАВ означава цетилтриметил амонијум бромид (енг. *cetyltrimethyl ammonium bromide* - СТАВ), а PVP органски полимер поливинилпирролидон (енг. *polyvinylpyrrolidone* - PVP) који су примењивани за облагање МНЧ.

Поред величине и облика наночестица, МХ зависи и од организације МНЧ у сложеније структуре као што су цветови и различити кластери [5]. Корисно је поменути и утицај облика на *Verwey*-ев прелаз који је запажен код октаедарских  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  наночестица величине 6 nm, али не и код сферних величине 13 nm [5]. Поред утицаја на магнетне особине преко промене константи анизотропије, облик честице утиче и на начин на који оне улазе у ћелије. Показано је да HeLa ћелије (ћелије рака грлића материце) лакше апсорбују наночестице сферног облика од оних које имају облик штапића и да је однос страна штапића 1:3 резултовао бољим преузимањем МНЧ од оних са односом страна 1:5 [72].

### 2.1.2.3. Преглед магнетних наночестица тестираних за потенцијалне примене у магнетној хипертермији

Многе научне студије у области МХ посвећене су дизајну и синтези магнетних наноматеријала у циљу побољшања њихових хипертермијских особина. Постоји релативно широк спектар материјала који се истражују као кандидати за магнетну хипертермију: FePt [73], кобалт ферит [74], NdFeB [75] и други. Ипак, испред свих су оксиди гвожђа, магнетит и магхемит, који су постали чест избор због погодних особина као што су [70]:

- боља хемијска стабилност на оксидацију;
- високе вредности сатурационе магнетизације и *Curie*-јеве температуре;
- ниска цитотоксичност у клиничким тестовима;
- релативно добро познат метаболизам;
- одобрена хумана примена од стране FDA.

Сходно томе, добар део развоја МНЧ за примену у хипертермији је заснован на постојећим сазнањима на наночестицама оксида гвожђа. Синтеза наночестица магнетита и магхемита је брза, јефтина и са великим приносима. Међутим, добијање ових честица високог степена кристалног уређења, високе униформности, циљаних унутрашњих особина, занемарљивог структурног и магнетног неуређења на површини и даље представља изазов за истраживаче.

Магнетни нанокмозити на бази графен оксида (енг. *Graphene oxide* - GO) су у новије време предмет истраживања за хипертермијске примене. У раду *Sugumaran*-а и сарадника показано је да нанокмозитни систем графен оксида са наночестицама гвожђе оксида просечне величине 45 nm има високу *SAR* вредност [76]. Експерименти мерења топлотних губитака су

изведени *in vivo* на 4T1 тумор моделу код миша користећи PEG-GO-гвожђе оксид. Запажен је значајан хипертермијски ефекат у виду регресије тумора [76].

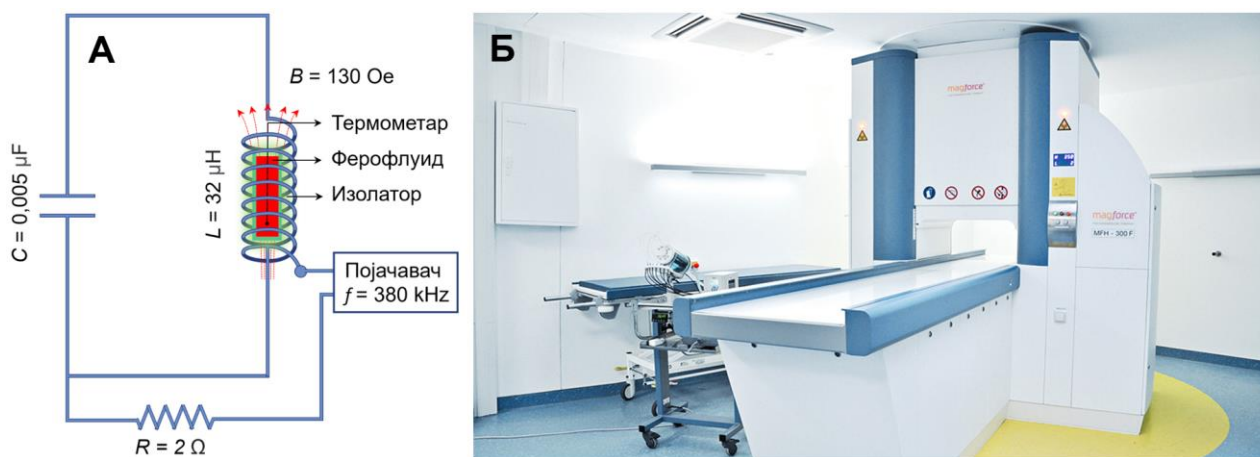
Ко што је већ речено, магнетна анизотропија је унутрашњи параметар магнетног система који доводи по виших SAR вредности. Она је веома изражена у језгро-омотач (енг. *core-shell*) структурама које су формиране од два различита магнетна материјала (би-магнетици). Магнетне особине, укључујући и магнетну анизотропију, се могу подешавати избором магнетних фаза, контролом величине језгра и омотача, као и контролом границе две фазе [77]. У циљу побољшања топлотне ефикасности МНЧ, дизајниране су различите језгро@омотач структуре. *Giustini* и сарадници су припремили Fe (језгро), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (омотач) МНЧ са потенцијалном применом не само у терапији већ и као контрастног средства у магнетној резонанци [78]. Још један пример језгро@омотач структуре са потенцијалом за хипертермијске примене је MgO@Fe [79]. Такође, феритне језгро@омотач нано структуре Zn<sub>0,4</sub>Co<sub>0,6</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@Zn<sub>0,4</sub>Mn<sub>0,6</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> показују високу вредност сатурационе магнетизације од чак 150 emu·g<sup>-1</sup> и SAR од 3886 W·g<sup>-1</sup>, што је скоро двоструко већа вредност од оне за CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> и вишеструко надмашује ону за комерцијалне *Feridex*<sup>®</sup> честице (115 W·g<sup>-1</sup>) [5]. Елементи Co, Fe и Fe-Co легуре имају високе SAR вредности, али могу бити токсични [79].

Друга класа МНЧ од интереса за МХ су наночестице код којих може да се регулише *Curie*-јева температура променом хемијског састава или величине, чиме се омогућава „гашење“ загревања средине када температура генерисана МХ достигне вредност  $T_C$ . На овај начин се избегава прегревање ткива у случају када температура пређе терапијску вредност. У тренутку када се у биолошком ткиву или у ферофлуиду постигне  $T_C$ , суперпарамагнетне наночестице постају парамагнетне и грејање се прекида. Овакве особине испољавају наночестице са структуром перовскита које садрже Sr, La, Y, Mn, Ag или Al. Ове честице због свог састава могу бити јако токсичне [79]. Сличне особине показују и феритне наночестице са спинелном структуром, као што су Zn<sub>x</sub>Fe<sub>3-x</sub>O<sub>4</sub>, (Mn,Zn)Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, MgFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> и друге [5,80–82].

#### 2.1.2.4. Клинички и истраживачки уређаји за магнетну хипертермију

Шематски приказ принципа калориметријских мерења на којима се заснивају уређаји за МХ је приказан на **слици 2.4А**. Узорак познате концентрације се у форми ферофлуида поставља унутар соленоида. Сензор за детекцију промене температуре са временом је уроњен у узорак. За генерисање јаког магнетног поља су потребне високе струје, што доводи до значајног загревања струјног кола али и самог узорака чија се ефикасност грејања испитује. Ово може у великој мери да утиче на резултате мерења, па је неопходно узорак добро изоловати. То се постиже хлађењем целокупног система (најчешће хлађење водом помоћу система са воденом пумпом), али и изоловањем система погодним материјалом као што је стиропор. Водећа компанија за производњу истраживачких уређаја за истраживања МХ је „*nB nanoScale Biomagnetics*“ из Шпаније. Међутим, већина лабораторија користи сопствене уређаје базиране на калориметријским мерењима са техничким пропустима и без адијабатских услова. Услед тога, бројне вредности SAR параметра које се могу срести у литератури треба анализирати пажљиво и са одређеном резервом.

МХ је у клиничкој пракси почела да се примењује на Универзитетској клиници у Берлину [83]. Данас се МХ користи у третману глиобластома и малигног тумора простате на неколико клиника у Немачкој и на једној клиници у Пољској које су у власништву компаније „*MagForce AG*“ [83]. Уређај за хипертермију се користи у комбинацији са магнетном резонанцом, где се поред терапије врши и радиолошка карактеризација туморских ткива. Развијени су бројни теоријски модели помоћу којих се на основу дистрибуције МНЧ, рачунарским симулацијама долази до расподеле топлоте у тумору. Први апликатор са осцилујућим магнетним пољем за клиничку примену на људима је назван *NanoActivator*<sup>®</sup> (**слика 2.4Б**).



**Слика 2.4.** (А) Шематски приказ принципа рада уређаја за магнетну хипертермију и (Б) *NanoActivator*<sup>®</sup> - уређај за клиничку магнетну хипертермију [83].

Ферофлуид који се убризгава у туморско ткиво пацијента се састоји из смеше наночестица магнетита и магхемита обложене аminosиланима (познат је под комерцијалним именом *NanoTherm*<sup>®</sup>). Прозор на уређају се може подешавати тако да се обезбеди константно магнетно поље на месту третмана, док пацијент лежи унутар примењеног магнетног поља. Тумор у коме је претходно инјектирано 3 mL магнетног ферофлуида концентрације  $2,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (Fe) се излаже магнетном пољу јачине  $10 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  при чему МНЧ генеришу топлоту од  $500 \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $ILP \approx 50 \text{ nH}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ ) у тумору запремине 10 mL и приближно  $100 \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $ILP \approx 10 \text{ nH}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ ) у тумору запремине 60 mL. У принципу, овај уређај се може користити за хипертермијски третман тумора пречника до 5 cm на свим деловима тела [83].

Поред клиничких, на тржишту постоје још два лабораторијска уређаја за истраживања примене магнетних наночестица у магнетној хипертермији: *DM100* серије, шпанске компаније „*nB NanoScale Biomagnetics*“ и уређај *magneTerm*<sup>™</sup>, енглеске компаније „*nanoTherics*“. Уређај *DM100* серије је коришћен у истраживањима при изради ове докторске дисертације.

### 2.1.5. Садашње стање примене магнетних наночестица у медицини и перспективе

Синтеза нових магнетних материјала са магнетним особинама за циљану примену строго дефинисаних морфолошких особина (пречника и уске дистрибуције по величини) је у фокусу истраживања многих научника. Међутим, за биомедицинске примене МНЧ веома важни су фармакокинетика (начин допремања МНЧ до циљаног места) и биодистрибуција (расподела МНЧ по органима након убризгавања) које зависе од површинске модификације, биокомпатибилности и колоидне стабилности суспензије МНЧ [84]. Из тог разлога, избор једињења за облагање МНЧ и успостављање успешних протокола површинске модификације су веома важни.

После убризгавања МНЧ у крвоток услед дејства имунолошког система, долази до њихове акумулације у јетри, слезини или коштаног сржи [37]. Утицај величине и облика честица, као и врста једињења за облагања на фармакокинетичку и биодистрибуцију су предмет истраживања последњих десетак година. У неким *in vivo* експериментима на лабораторијским мишевима показано је да се велике честице нагомилавају у плућима, као што је био случај у недавно објављеном истраживању Радовић и сарадника [85]. Са друге стране, веома мале МНЧ су погодне у МР дијагностици.

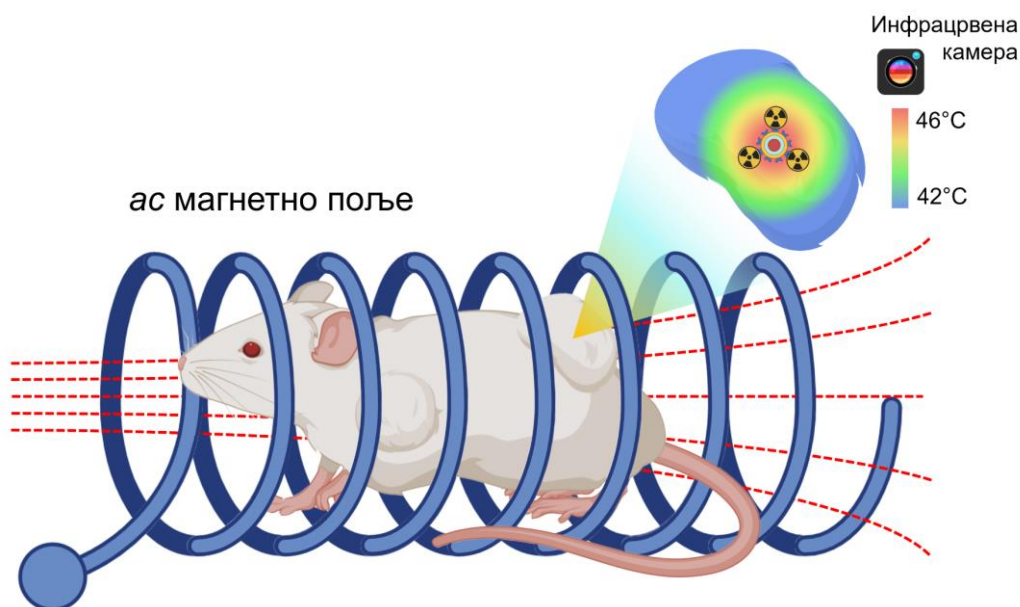
Највећи проблем у медицинској примени МНЧ је њихово слабо накупљање у циљаном ткиву. Један од начина циљаног допремања МНЧ је везивање антитела за МНЧ, које треба да препозна антиген карактеристичан за одређену врсту оболелог ткива. У потпоглављу 2.1.2 описана је метода за навођења МНЧ употребом спољашњег магнетног поља. Количина МНЧ која се интравенски допреми у ткива углавном није довољна за терапијски третман или



дијагностику. Због тога се МНЧ често инјектирају директно у туморе, уколико је тумор на површини тела [32,86].

Познато је да мултимодална терапија (истовремена примена неколико различитих терапијских процедура) појачава ефикасност терапије малигнух тумора. Недавно су публиковани резултати о побољшању ефикасности терапије до пет пута када се МХ примени у комбинацији са фототермалном терапијом [87]. Други пример је комбинација МХ са хемиотерапијом. То се може постићи применом липозома са МНЧ као језгром. Хемиотерапеутик који је везан за површину липозома се може ослободити под утицајем  $ac$  поља (хипертермијског ефекта) када се такав комплекс доведе у туморско ткиво. Отуда су сложени, мултифункционални, системи базирани на МНЧ обећавајући за вишеструке биомедицинске примене [88].

Истраживања која су предмет ове докторске дисертације су реализована као резултат активности на пројектима у Институту за нуклеарне науке „Винча“ који су фокусирани ка примени МНЧ у дуалној терапији малигнух болести, комбиновањем МХ и радионуклидне терапије. Концепт дуалне терапије на лабораторијским животињама је приказан на **слици 2.5**. Радиообележене МНЧ се интравенски или директно инјектирају у тумор, након чега се лабораторијска животиња, најчешће миш, поставља унутар завојнице апликатора уређаја за МХ у којој се индукује спољашње променљиво магнетно поље. Под утицајем магнетног поља, МНЧ генеришу топлоту и расипају је у локална туморска ткива до клинички пожељног температурског прозора (између 42 °C и 46 °C) чиме индукују апоптозу у околним малигним ћелијама. Са друге стране, радионуклид, најчешће  $\beta^-$  емитер, ћелије тумора убија емисијом високоенергетских  $\beta$  честица. Поред дуалне терапије, комбинацијом хипертермије и радионуклидне терапије могуће је постићи и синергистички ефекат појачаног дејства терапије.

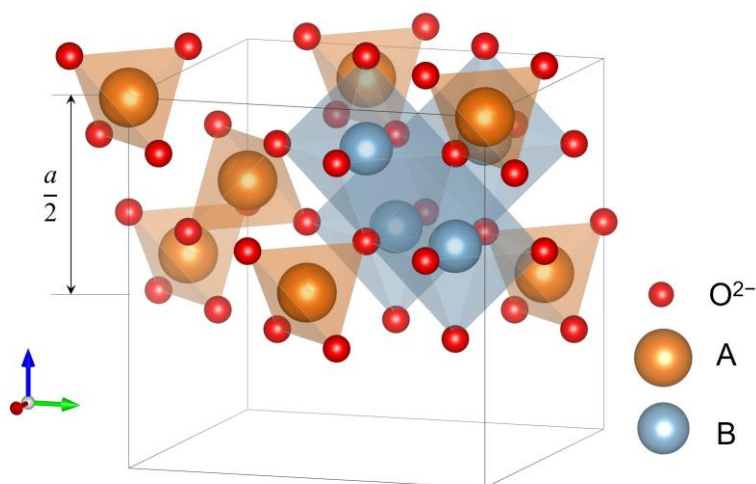


**Слика 2.5.** Концепт дуалне терапије - радионуклидно-хипертермијска терапија.

## 2.2. Спинелни тип структуре

Једињења која кристалишу у спинелном типу структуре су интензивно истраживана у прошлости и позната су дуже од једног века. Спинелна структура се описује у просторној групи  $Fd\bar{3}m$ , са површински центрираном кубном јединичном ћелијом. Основна формула једињења са спинелном структуром је  $AB_2X_4$ , при чему је осам молекула распоређено у јединичној ћелији спинела. Катјони А и В су смештени на кристалографским положајима  $8a$  и  $16d$ , редом, док су анјони распоређени у специјалне  $32e$  положаје. Спинелна структура представља густо паковање анјона у коме катјони заузимају тетраедарске ( $T_d$ ) и октаедарске шупљине ( $O_h$ ). Јединична ћелија је формирана из 32 анјона који формирају 64  $T_d$  и 32  $O_h$  шупљине. Катјонима је попуњено 8  $T_d$  и 16  $O_h$  шупљина. На слици 2.6 тетраедарски катјонски положаји су означени са А, а октаедарски са В. Јединична ћелија  $a$  се може представити са две различите групе са ивицама  $a/2$  [89].

Расподела катјона у А и В положајима утиче на физичкохемијске особине спинела. Спинелна једињења опште формуле  $A^{2+}B_2^{3+}O_4$  имају нормалну катјонску расподелу ако сви А јони заузимају  $8a$  а сви В јони  $16d$  положаје. Поред нормалне, у спинелима се често јавља и инверзна расподела у којој половина катјона В заузима  $8a$  положаје, док је остатак распоређен заједно са катјонима А у  $16d$  положајима. Много је примера у којима се расподела катјона налази између нормалне и инверзне, па се у тим случајевима може говорити о мешовитим спинелима [89]. Пример спинела са нормалном расподелом јона је  $MgAl_2O_4$ , а са инверзном  $Fe_3O_4$ . Расподела јона у манган фериту ( $MnFe_2O_4$ ) је делимично инверзна [90].



Слика 2.6. Јединична ћелија спинелне структуре.

Два оксида гвожђа која се у биомедицини најчешће користе су магнетит ( $Fe_3O_4$ ) и магхемит ( $\gamma-Fe_2O_3$ ). Магнетит је минерал црне боје, садржи гвожђе у два валентна стања,  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$ . Кристалише у структури инверзног спинела, где у површински центрираној кубној решетки катјони гвожђа попуњавају унутрашње тетраедарске  $8a$  и октаедарске положаје  $16d$  [91]. Лако се оксидује при чему се оксидацијом  $Fe^{2+}$  јона трансформише у магхемит. Фокус истраживања приказаних у овој докторској дисертацији је био на МНЧ базираним на оксидима гвожђа, магнетиту и магхемиту.

### 2.3. Методе синтезе магнетних наночестица на бази магнетита

Техника синтезе у великој мери одређује величину, расподелу по величини и морфологију наночестица, површинске особине, концентрацију структурних дефеката, нечистоћа и њихову расподелу у целокупној запремини честица, што за последицу има утицај на њихове хемијске, магнетне, оптичке и транспортне особине. За биомедицинске примене наночестице на бази магнетита се најчешће користе у облику стабилних водених суспензија (ферофлуида) услед неопходног услова компатибилности са биосистемама.

У литератури је описан велики број хемијских метода за синтезу наночестица на бази магнетита као што су термална декомпозиција, метода таложења из раствора, сол-гел, микроемулзије, полиол и друге [63]. Све ове технике се развијају у сврху добијања једнофазних наночестичних система, тј. честица што униформнијих по облику и величини (пожељно је да полидисперзност узорака буде до 20%). Код биомедицинске примене важан фактор представља колоидна стабилност честица у воденој суспензији. Из тог разлога, потребно је избећи појаву агрегације наночестица. Заједничко за све технике је да се полази од раствора прекурсора соли и да у току синтезе долази до хемијске реакције у којој се формира чврста нерастворна фаза. Као жељени производ реакције очекује се добијање једнодомених наночестица величина између 5 nm и 20 nm. Две најчешће методе за синтезу високо дисперзивних наночестица гвожђе оксида су термална декомпозиција и таложење соли гвожђа (најчешће хлорида, сулфата и нитрата) у базној воденој средини [63]. Будући да је крајњи циљ употреба наночестица у физиолошким медијумима, технике измене дисперзионог средства и пречишћавања колоида су често неопходне након синтезе термалном декомпозицијом. Са друге стране, таложном методом се као производ добијају наночестице дисперговане у води, али са неким недостацима који ће бити дискутовани у даљем тексту.

Прецизна контрола рН вредности, реакционог времена, температуре, концентрације прекурсора и таложног агенса је пресудна за добијање жељене фазе, величине и морфологије МНЧ. Један од примера је таложење  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  соли употребом натријум карбоната који успорава ток реакције и омогућава боље праћење фазних трансформација у току синтезе [92]. Пошто већина магнетних колоида показује расподелу честица по величинама у одређеном обиму, некада је потребно извршити поступак сортирања по величинама како би се даље побољшале њихове физичкохемијске карактеристике. Ако то није могуће током процеса синтезе, овај поступак се касније може обавити магнетним фракционисањем.

#### *Таложна метода*

Таложна метода се заснива на таложењу (копреципитацији) из водених раствора  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  соли помоћу базе. Под овим условима, наночестице магнетита настају агрегацијом у процесима фазне трансформације интермедијера хидроксида гвожђа (гетита ( $\alpha\text{-FeOOH}$ ), акаганеита ( $\beta\text{-FeOOH}$ ) и лепидокрокита ( $\gamma\text{-FeOOH}$ )) зависно од реакционих механизма [93]. Предност ове методе је добијање наночестица на брз, јефтин и лак начин. Честице хомогеног састава се припремају у стехиометријском односу  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} = 0,5$  такозваном *Massart*-овом методом [94]. Главни недостатак ове технике синтезе је контрола средње величине честица и контрола расподеле честица по величинама. Боља контрола величине се може постићи додатком сурфактаната или комплексирањем у току самог процеса синтезе. Међутим, њиховом употребом јављају се потешкоће приликом одвајања наночестица од полимера или површински активних супстанци. Адсорпција на површини честица разних једињења као што су разни полимери често индукује површинске ефекте који значајно утичу на магнетно понашање честица, или доводе до промена у токсикологији МНЧ. Модификације синтезе као што су промена рН, брзине мешања, температуре или јонске јачине се често користе како би се добила боља контрола величине честица. Контролисаним таложењем МНЧ из раствора се може добити релативно уска расподела величина у опсегу од 5 nm до 15 nm [95,96].

### *Метода термалне декомпозиције*

Ова техника се заснива на термалној разградњи органометалних једињења у органским растварачима који садрже стабилизујућа једињења и имају високу тачку кључања [97,98]. Уопштено говорећи, величина и облик честица се овом методом могу доста добро контролисати променом реактивности и концентрације прекурсора. Реактивност се може подешавати променом дужине ланаца и концентрације површински активних супстанци. У ту сврху, најчешће се користе масне киселине. Термичка разградња органских прекурсора омогућава синтезу узорака високог степена чистоће са одличном контролом величине, уском расподелом и високим степеном кристаличности. Наночестице синтетисане овим приступом се могу дисперговати у различитим органским растварачима, као што су хексан или толуен. Међутим, да би се честице могле дисперговати у води потребно је након синтезе извршити низ хемијских поступака измене лигананда који се још назива трансфер фазе. Површинска модификација или супституција су неке од стратегија за дисперговање наночестица у води. Један од најцитиранијих протокола синтезе методом термалне декомпозиције је развијен од стране *Sun*-а и сарадника [99]. Они су синтетисали монодисперзне  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  и  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  наночестице термалном декомпозицијом одговарајућег прекурсора ацетилацетоната у бензил етру у присуству олеиламина и олеинске киселине. Поред тога, показали су да се променом реакционих услова пречник честица може подешавати од 3 nm до 20 nm, као и да се хидрофобне МНЧ могу превести у хидрофилне додатком биполарних површински активних материја.

### *Метода микроемулзије*

Микроемулзија представља термодинамички стабилну изотропну дисперзију две немешљиве течности, где се микродомени једне или обе течности стабилишу интерфазним филмом молекула сурфактанта [100]. У микроемулзијама вода у уљу (В/У), водена фаза се распршује у облику микрокапљица (обично пречника од 1 nm до 50 nm), окружених слојем молекула сурфактаната у континуираној хидрофобној фази. Величина капљица се може подешавати варирањем односа вода/сурфактант. Приликом мешања две В/У микроемулзије које садрже жељене реактанте долази до непрестаних судара микрокапљица при чему се оне спајају и поново распршују све док се у мицелама не формира талог [101]. Такве капљице представљају нанореакторе у којима се честице формирају. Оваквим приступом синтезе се могу добити добро искристалисане МНЧ. Међутим, контрола величине, облика и природе наночестица је релативно ограничена. Штавише, у поређењу са другим методама, принос синтезе МНЧ у микроемулзијама је јако низак, без обзира што је могуће скалирање (повећавање приноса) синтезе. За припрему значајних количина материјала потребне су велике количине органских растварача, што овај поступак чини веома скупим и неколошким.

### *Метода хидротермалне синтезе потпомогнуте микроталасима*

Хидротермална синтеза представља хемијску реакцију у затвореном систему у присуству воде на температури вишој од тачке кључања воде и високом притиску. Овим поступком синтезе полазна суспензија прекурсора се излаже високим температурама до 250 °C и притиску до 100 МРа. Овакви екстремни услови директно утичу на кинетику фазних трансформација и преко процеса растварања и поновног формирања чврсте фазе омогућавају добијање нехидратисаних честица оксида гвожђа. Током хидротермалне синтезе, главни параметри (температура, притисак и време реакције) директно утичу на стварање нових фаза, раст кристала и добијање честица са строго дефинисаном величином и морфологијом [102].

Апсорпција енергије услед реоријентације перманентних дипола под утицајем спољашњег микроталасног поља је главни механизам загревања реактаната. Загревање настаје услед немогућности вектора поларизације да прати брзе измене електричног поља, тако да долази до застоја поларизационог фазора у односу на примењено поље, чиме долази до дисипације енергије у диелектричном материјалу [103]. Микроталасима потпомогнута хидротермална

синтеза значајно скраћује време потребно за синтезу. Поред тога, употребом микроталасног зрачења постиже се хомогено загревање узорка без ефекта топлотног градијента, што доводи до формирања наночестица са релативно уском расподелом по величини. Температура, као и у осталим техникама синтезе, игра кључну улогу како у кинетици формирања производа тако и у термодинамичкој стабилности система. Висок притисак током синтезе утиче на растворљивост, али и на опсег суперсатурације реактанта који директно мења процес кристализације. У поређењу са класичном хидротермалним методама, микроталасима потпомогнута хидротермална синтеза налази предности у поновљивости, брзини и енергетској ефикасности [102].

### *Полиол метода*

Полиол методом се синтетишу наночестице униформних величина и пожељних особина за потенцијалну примену у терапији и дијагностици [104]. Овај поступак је први пут примењен за синтезу племенитих метала, као што су Ru, Pd, Pt, Au, а потом и других метала, као што су Co, Ni или Cu [105,106]. Касније је метода прилагођена и за синтезу магнетних материјала на бази оксида гвожђа [107]. Фине металне честице прецизно дефинисаних величина и морфологије се могу добити редукцијом растворених соли метала, али и директним таложењем из раствора који садржи смешу полиола. У полиол методи течни полиол се понаша као растварач металних прекурсора, а у одређеним случајевима и као редукујући и комплексирајући агенс за металне катјоне. Метални прекурсор може бити и тешко растворно једињење у полиолу. Раствор прекурсора се меша и загрева на задатој температури све до достизања тачке кључања полиола. Контролом кинетике преципитације могу се добити наночестице гвожђе оксида са добро дефинисаним обликом и величином. Још боља контрола величине честица се може постићи уколико се у реакционој смеси помешају и неке „стране“ честице при чему се поспешује процес хетерогене нуклеације. На овај начин, нуклеација и раст честица постају две потпуно одвојене фазе и као производ се добијају МНЧ униформних величина.

Хемијске методе синтеза феритних МНЧ се могу груписати у хидролитичке и нехидролитичке (Табела 2.1). МНЧ за биомедицинску примену се најчешће припремају хидролитичким приступима синтеза, у којима посебно место заузимају таложне методе. Последњих година велики напор је посвећен синтезама феритних МНЧ нехидролитичким поступцима. Конкретно, избегавањем стварања хидрокси и оксихидрокси врста као интермедијера у току реакције се спречавају сложене водене хемијске равнотеже и раст кристала се постиже на другачији начин. Нехидролитичке методе се првенствено ослањају на термичку разградњу органометалних прекурсора у органској средини, што је омогућило синтезу МНЧ са добро дефинисаним магнетним својствима, захваљујући њиховој високој кристалности, контролисаној величини и уској дистрибуцији [63].

Са становишта цене и једноставности процеса, таложна метода је најприступачнија јер за овакав приступ синтезе нису потребни посебни уређаји а користе се јефтине прекурсори и растварачи. Термалном декомпозицијом и полиол методом величина и морфологија наночестица се могу најбоље контролисати. Мане ових приступа су висока цена и мали принос реакције, често недовољан за тестирања њихове потенцијалне примене у модерним технологијама. Метода синтезе у микромулзијама изискује велике количине органских растварача, па је овакав процес синтезе веома скуп и нееколошки. Микроталасима потпомогнуте хидротермалне синтезе омогућавају поновљивост применом специјализованих реактора што их чини погодним за комерцијалну производњу, али поседују ограничења када је у питању контрола облика, величине и расподеле МНЧ. Према томе, може се закључити да избор метода синтезе у великој мери зависи од жељених карактеристика наночестица, имајући у виду крајњу примену.

Табела 2.1. Упоредни приказ различитих метода синтезе МНЧ [63]

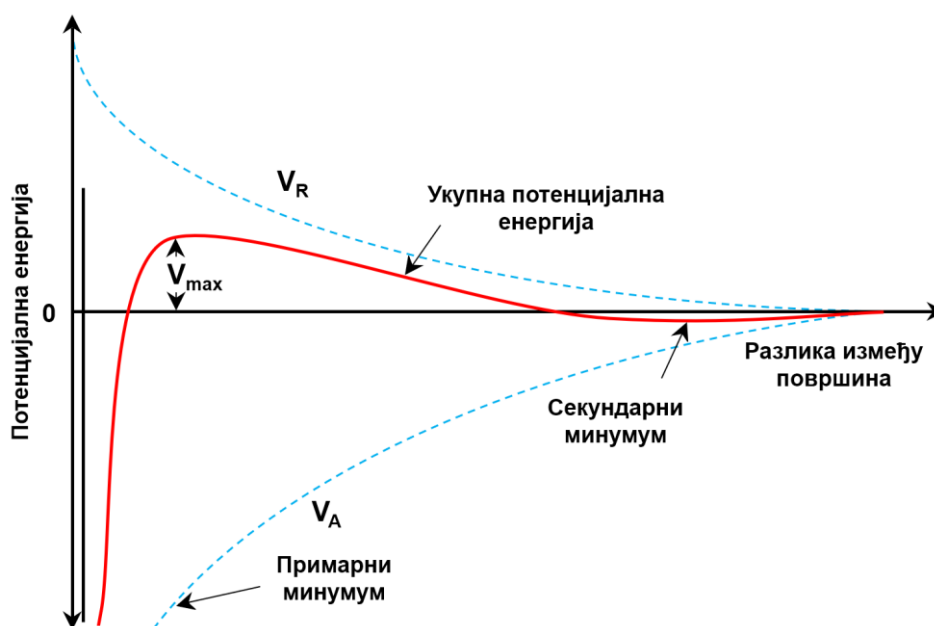
Таложна метода	Хидролитичке		Нехидролитичке
	Хидротермална копреципитација	Микроемулзије	
1 Јефтине хемикалије Благи реакциони услови Синтеза у Н <sub>2</sub> О Лака модификација површине Лако формирање ферита Лака конверзија магнетита (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) у магхемит (γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) Лако скалирање синтезе Велики принос	Побољшана контрола величине Уска расподела величина Синтеза у Н <sub>2</sub> О Подесива магнетна својства Ограничен принос	Побољшана контрола величине Уска расподела по величинама Једноставно подешавање величине Униформна магнетна својства	Уска расподела по величинама Контрола величине Висока кристалиничност Могуће подешавање величине Подесива магнетна својства
2 Широка расподела по величинама Лоша поновљивост Неконтролисана оксидација	Висока температура Безбедност реактаната	Низак принос реакције Лоша кристалиничност Тешко уклањање сурфактаната	Низак принос реакције Токсични органски растварачи Високе температуре Неопходан трансфер фаза
3 Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , MFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , MFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , MFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> , NiO, Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , MnO, Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ,
4 10-50 nm, 50-100 nm	1-0,25 μm, 15-31 nm	2-30 nm, 20-80 nm	3-500 nm
5 сфере	диск, сфере	коцкице, сфере, игле	коцкице, сфере, троуглићи, игле
6 [94,108]	[109,110]	[111,112]	[99,113–115]

Ознаке у табели: 1) предности, 2) мане, 3) хемијски састав МНЧ, 4) пречник МНЧ, 5) облик МНЧ и 6) референце.

### 2.3. Стабилизација и функционализација: процес облагања наночестица

За већину биомедицинских примена неопходно је наночестице обложити одговарајућим једињењима, како би се обезбедила и осигурала њихова биокомпатибилност и/или како би се обезбедила додатна могућност функционализације и везивања других биомолекула за њихову површину. Додатно, површинска функционализација успорава везивање протеина за МНЧ након уласка МНЧ у крвоток. За површинску модификацију наночестица најчешће се користе органски лиганди: декстран, поли(етилен гликол), хитозан, аминосилан, глукуронска и лимунска киселина. Такође, за МНЧ могу да се везују антитела и други биолошки агенси како би се оне што ефикасније допремиле до малигних ћелија и остварили терапијски или дијагностички ефекти [17].

Да би се површинска модификација наночестица могла детаљније дискутовати потребно је прво описати механизме који доводе до агрегације МНЧ у воденим дисперзијама и идентификовати силе које се јављају између наелектрисаних, међусобно интерагујућих, наночестица у течном медијуму. Ове појаве описује DLVO (енг. *Derjaguin, Landau, Verwey and Overbeek* - DLVO) теорија комбинацијом ефеката *van der Waals*-ових сила и двојног електричног потенцијала. Према DLVO теорији, енергетска баријера која је последица електростатичких одбојних сила спречава да се две честице нађу довољно близу да би дошло њиховог удруживања и агрегације (слика 2.7). Уколико дође до судара две честице које поседују довољно велику кинетичку енергију да превазиђу потенцијалну баријеру, електростатичке силе ће узроковати привлачење честица и оне ће постати иреверзибилно везане. Према томе, ако честице поседују довољно високу одбојност, дисперзија наночестица ће доминирати у односу на флокулацију и систем ће бити колоидно стабилан. У одређеним ситуацијама постоји много слабије и потенцијално реверзибилно привлачење између МНЧ који се назива секундарни минимум. У овом секундарном минимуму формиран агрегат честица су нестабилни и могу се распасти под утицајем спољашње силе, као што је на пример снажно мешање механичком мешалицом.



Слика 2.7. DLVO потенцијал: *van der Waals*-ово привлачење ( $V_A$ ), одбојни потенцијал ( $V_R$ ) и њихова комбинација у функцији растојања од површине сферне честице [116].

Реверзибилност другог минимума је кључни фактор стратегије индуковане агрегације јер се величина агрегата може подешавати тако да се добије боље фракционисање, и када се једном изолује жељену фракцију је могуће поново дисперговати до оригиналне величине.

Параметре који воде секундарном минимуму дефинише DLVO теорија. Она сугерише да је стабилност честица у раствору зависна од њихове укупне потенцијалне енергије  $V_T$ . Вредност  $V_T$  представља равнотежу неколико компететивних доприноса [117]:

$$V_T = V_A + V_R + V_S, \quad (2.12)$$

где је  $V_S$  допринос потенцијалне енергије растварача, што је најчешће занемарљиво јер представља минимални допринос укупној потенцијалној енергији. Много је важнија равнотежа између привлачних и одбојних доприноса,  $V_A$  и  $V_R$ , редом. Параметар  $V_A$  означава енергију интеракције услед дејства *van der Waals*-ових сила и уколико наночестице апроксимирамо са две сфере једнаких пречника,  $V_A$  се може изразити формулом [117]:

$$V_A = -\frac{Ar}{12x}, \quad (2.13)$$

где  $A$  представља *Hamaker*-ову константу,  $r$  је пречник, док је  $x$  растојање између честица. Са друге стране, потенцијална енергија одбијања  $V_R$  се може дефинисати релацијом:

$$V_R = 2\pi\epsilon r\zeta^2 e^{-kx}, \quad (2.14)$$

где је  $\epsilon$  диелектрична константа растварача,  $r$  је пречник честице,  $\zeta$  је зета потенцијал,  $x$  је растојање између честица и  $k$  је функција јонске јачине медијума. Променом ових фактора могуће је подешавати одбојну силу тако да се врши селективна и реверзибилна агрегација наночестица [117].

Честице у колоидној суспензији испољавају *Brown*-ово кретање и зато се често сударају једна са другом. Ова интеракција између честица током судара одређује стабилност колоида. Према DLVO теорији постоје две основне интеракције: једна је привлачна, а друга одбојна. Када привлачне силе доминирају, честице ће се слепљивати једна за другу и на крају се целокупна дисперзија може претворити у агрегате честица што доводи до таложења. Када доминирају одбојне силе, систем ће бити стабилан и остати у диспергованом стању.

Главни узрок таложења колоидних честица су *van der Waals*-ове силе. Стога се каже да је колоидна дисперзија стабилна само када се довољно јака одбојна сила супротстави привлачним *van der Waals*-овим силама. За многе колоидне системе, распон јаког *van der Waals*-овог привлачења је између 5 nm и 15 nm [118].

Када су у питању МНЧ потребно је узети у обзир и додатне магнетне дипол-дипол интеракције. Уколико се наночестица нађе у непосредној близини друге, свака од њих улази у магнетно поље суседне што резултује привлачењем и потенцијалним формирањем агрегата, што за последицу има смањену стабилност колоида [108].

Пошто се између МНЧ увек јављају привлачне силе, да би се постигла колоидна стабилност система потребно је обезбедити довољну одбојност честица. Ово одбијање би по интензитету требало да буде најмање снажно и по домету упоредиво са привлачним силама. Стабилност дисперзије МНЧ се може постићи:

- Путем електричног двослоја (електростатичка или стабилизација наелектрисања) и
- Адсорбовањем или хемијском везом полимерних молекула (стерна или просторна стабилизација).

Комбинацијом ова два механизма стабилизације колоидних дисперзија МНЧ постиже се електростерна стабилизација наночестица у колоиду [119].

#### *Електростатичка стабилизација*

Ефикасан начин да се избалансира привлачност између колоидних честица у поларним дисперзионим средствима је обезбеђивање *Coulomb*-овог одбијања. У течним дисперзионим медијумима јонске групе се могу адсорбовати на површини колоидне честице кроз различите



механизме и оне тада формирају наелектрисани слој око честице. Како би се одржала електронеутралност, једнаки број наелектрисања са супротним знаком ће окружити колоидне честице и створити двослој без наелектрисања. Електростатичка стабилизација се управо постиже међусобним одбијањем тих двоструких слојева који окружују честице, чиме се постиже колоидна стабилност дисперзије (слика 2.8А).

Дебљина двоструког слоја зависи, између осталог, од јонске јачине дисперзионог медијума. Јонска јачина се може изразити једначином [120]:

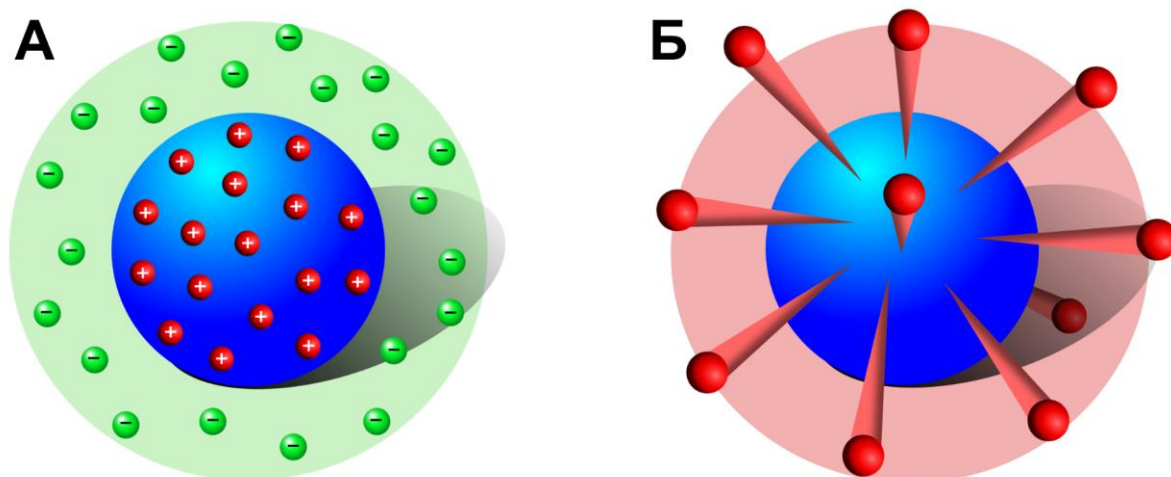
$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2, \quad (2.15)$$

где је  $c_i$  моларна концентрација јона  $i$  (М, mol·L<sup>-1</sup>), а  $z_i$  наелектрисање тог јона; сумирање је по свим јонима у раствору. За електролите типа 1:1 као што је натријум хидроксид у коме је сваки јон јединично наелектрисан, јонска јачина је пропорционална концентрацији. У даљем тексту концентрација  $c$  ће се користити за представљање јонске јачине. При ниским јонским јачинама електролита ( $c = 10^{-3}$  М) дебљина двоструког слоја износи око 5-10 nm, што је истог реда величине као и *van der Waals*-ове привлачне силе. Овим се објашњава постизање стабилизације наелектрисања у дисперзионом медијуму ниске јонске јачине. Дебљина двослоја се значајно смањује са повећањем јонске јачине. При високим јонским јачинама електролита ( $c > 10^{-1}$  М) дебљина двоструког слоја је мања од 1 nm. У том случају, дomet двослојног електростатичког одбијања обично није довољан да уравни дејство *van der Waals*-ових привлачних сила. Овим се потврђује чињеница да се већина електростатички стабилисаних дисперзија таложе при повећању јонске јачине дисперзионе средине. Отуда, недостатак електростатичке стабилизације честица је велика осетљивост на јонску јачину дисперзионог медијума. Поред тога, оваква врста стабилизације делује само у поларној течности која може растворити електролите. Међутим, због предности у једноставности, ефикасности и цени, електростатички приступ је још увек веома распрострањен за стабилизацију дисперзија у воденом медијуму.

#### Просторна стабилизација

Димензије лиганада полимера молекулских маса већих од 10 kD су упоредиве са доменом дејства привлачних *van der Waals*-ових сила. Дакле, све док могу да производе одбојност, ови полимерни молекули се могу користити за постизање колоидне стабилности.

Просторна или стерна стабилизација колоидних МНЧ се постиже везивањем макромолекула на површину наночестице или хидрофобном интеракцијом између адсорбованих полимерних ланаца. Стабилизација настала адсорпцијом слојева на диспергованим честицама се у литератури наводи као просторна или стерна стабилизација (слика 2.8Б).



Слика 2.8. Шема механизма (А) електростатичке и (Б) просторне стабилизације МНЧ.

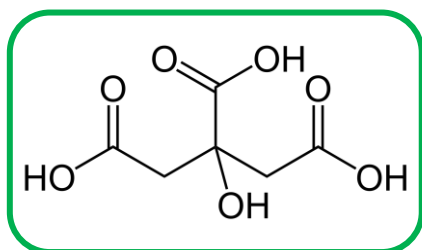
### Облагање наночестица и стабилност колоида

Као што је напред објашњено, одбојне силе између честица које се јављају као последица просторног или електростатичког одбијања представљају механизме који спречавају агрегацију и њихово таложење у колоиду. Ако се разматра биолошка примена наночестица, стабилност на физиолошкој рН вредности постаје значајно питање. Штавише, како је интравенско инјектирање наночестица најприкладнији начин за њихово распоређивање у ткивима и органима, ефикасност испоруке и присуство у васкулатури се морају узети у обзир [121]. У том контексту, један од најважнијих изазова у биомедицинској примени МНЧ је да величина агрегата остане испод 200 nm како би интравенска администрација била успешно спроведена [122].

У литератури се могу пронаћи бројни приступи решавања наведеног проблема [35]. На пример, једињења попут декстрана [123], полимера [124,125] или органских молекула и површински активних једињења [24] постају кандидати за облагање МНЧ због своје отпорности на промену јонске јачине и одржавања стабилности колоида на рН физиолошког медијума. Неоргански лиганди базирани на силицијум диоксиду [126], злату [127] и угљенику [128] су се такође показали као веома обећавајући. У неким случајевима, вишеслојне облоге се користе за модификације површине МНЧ, али и да би пружиле могућност даље функционализације. На пример, да би се постигла електростатичка стабилизација, обично се наелектрисани молекули прво вежу за површину честица а затим се те електростатички стабилисане МНЧ користе за даљу модификацију биомакромолекулима или специфичним лигандима како би се добила жељена својства [129]. Различити биолошки молекули као што су антитела, протеини или циљани лиганди се могу везати за примарни слој облоге на површини наночестица хемијским купловањем преко амидних или естарских веза како би честице постале специфичне за одређене ћелије [108].

### Лиганди коришћени за површинску модификацију магнетних наночестица

За површинску модификацију наночестица у овом раду коришћена су хидрофилна једињења: лимунска киселина, поли(акрилна киселина), поли(етилен гликол), (3-аминопропил) триетоксисилан и декстран која садрже различите функционалне групе и на различите начине врше стабилизацију МНЧ.

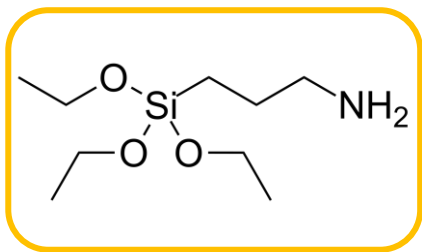


#### Лимунска киселина (СА)

- 3-карбокси-3-хидроксипентанедионска киселина
- Молекулска формула:  $C_6H_8O_7$
- Молекулска маса:  $235,07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

#### Шема 1. Структурна формула лимунске киселине

Лимунска киселина чија је структурна формула приказана на **шеми 1** је тробазна органска киселина која је присутна у многим врстама воћа. Лимунска киселина се користи као помоћни састојак у бројним лековима за оралну и интравенску примену, и као уринарни алкализатор као што је на пример *Oracit*<sup>®</sup>. Наночестице гвожђе оксида стабилизоване лимунском киселином су комерцијално доступне под називом *VSOP* (енг. *Very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles - VSOP*) [37]. Оне су производ немачке компаније “*Ferropharm*” и користе се за потребе снимања у МР.

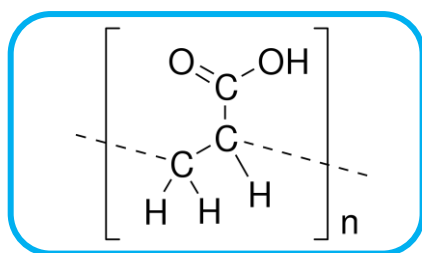


### (3-аминопропил)триетоксисилан (APS)

- 3-триетоксипропиламин
- Молекулска формула:  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$
- Молекулска маса:  $221,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

#### Шема 2. Структурна формула(3-аминопропил)триетоксисилана

(3-аминопропил)триетоксисилан је аminosилан који се користи у процесима силанизације као средство за везивање силана, **шема 2**. APS функционализује супstrate са молекулима алкоксисилана. Пуно се користи и за површинску модификацију разних наноматеријала, ковалентним везивањем органских облога за површину металних оксида. Овај молекул се такође може користити за силанизацију МНЧ и одвајање умрежених ензимских агрегација. Поред тога, пуно се користи и у стабилизацији колоидних суспензија МНЧ у физиолошким условима [130].

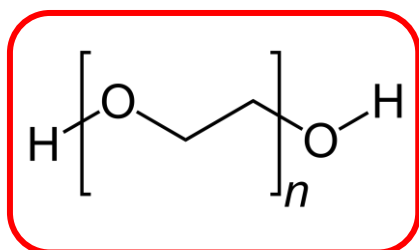


### Поли(акрилна киселина) (РАА)

- поли(1-карбоксиетилен)
- Молекулска формула:  $(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_n$
- Молекулска маса:  $\sim 1800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

#### Шема 3: Структурна формула Поли(акрилне киселине)

Поли(акрилна киселина) је синтетички полимер акрилне киселине велике молекулске масе. Њена структурна формула је приказана на **шеми 3**. Она може бити комополимер акрилне киселине или настати умрежавањем пентаеритритол алил етра, алил етра сахарозе или алил етра пропилену. У воденом раствору на неутралној рН вредности, РАА је анјонски полимер, са способношћу да апсорбује и задржава воду, као и да од своје првобитне запремине вишеструко набубри [131]. РАА је слаби полиелектролит који електростатичким силама може да ступа у интеракцију са неорганским катјонима, као што су јони гвожђа при чему формира координациона једињења са оксидима гвожђа. Поред тога, ова поликиселина је биокompatibilна што је чини погодном за примену у биомедицини и фармацији [132].



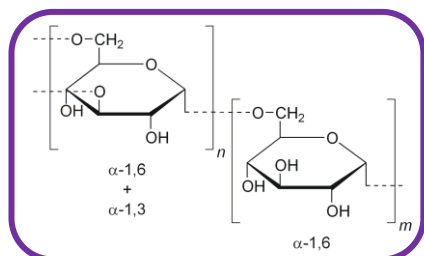
### Поли(етилен гликол) (РЕГ)

- поли(оксиетилен)
- Молекулска формула:  $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$
- Молекулска маса:  $\sim 1000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

#### Шема 4: Структурна формула поли(етилен гликола)

Поли(етилен гликол) је полиестарско једињење које налази примену у различитим областима, од индустрије до медицине (**шема 4**). РЕГ се такође користи као помоћна супстанца у многим фармацеутским производима. Надовезујући се на успех облагања протеина РЕГ-ом, као начина за продужење времена циркулације, а самим тим и ефикасније интравенске терапије, облагање МНЧ РЕГ-ом се показало као високо ефикасан приступ за побољшање системске испоруке лекова [133]. Да би се избегла интеракција са серумским протеинима и МРS ћелијама

(системом мононуклеарних фагоцита - MPS), PEG облога мора обезбедити довољно дебели слој како би стерно заштитила површину МНЧ. Сходно томе, МНЧ обложене PEG-ом повећавају време задржавања у циркулацији. Наночестице гвожђе оксида стабилизоване PEG облогом су комерцијално доступне под називом *Absolute Mag*<sup>™</sup> и производе се од стране америчке компаније „*Creative Diagnostics*“. Просечна величина честица је 20 nm при чему је органски слој дебљине око 6 nm [134]. Две најзаступљеније методе облагања PEG-ом су физичкохемијско везивање PEG-а или функционализованог PEG-а на немодификовану или прецизно модификовану (обично претходно обложену олеинском киселином) површину магнетита и хемијско везивање PEG-а, тј. *in situ* облагање у току самог таложења наночестица [23,135,136].



#### Декстран од *Leuconostoc mesenteroides* (DEX)

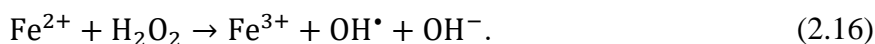
- 3-карбокси-3-хидроксипентанедионска киселина
- Молекулска формула:  $(C_6H_{10}O_5)_n$
- Молекулска маса:  $35.000-45.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**Шема 5.** Структурна формула декстрана

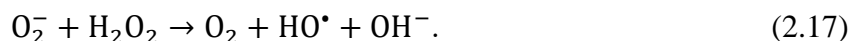
Декстран је сложен разгранати глукан (полисахарид који настаје кондензацијом глукозе). По IUPAC декстрани представљају разгранате поли- $\alpha$ -д-глукозиде микробног порекла који имају претежно C-1→C-6" гликозидне везе (**шема 5**). Ланци декстрана су различите дужине (од 3 kD до 2000 kD). Дектрани се користе као регулатори осмотског притиска, стабилизатори, кополимери, микро-носачи, средства за везивање, модификатори вискозности, итд. Поред тога, дектрани се могу користити и као дугачки хидрофилни молекули за побољшање слободне кретања коњугованих/везаних протеина [137]. Дектрани су пронашли примену и у површинској модификацији МНЧ при чему се избор облоге може повезати са начином активације комплемената, дела имунолошког система који појачава ефикасност антитела и фагоцитних ћелија у одбрани организма од патогена [138]. Комерцијално доступне *Absolute Mag*<sup>™</sup> наночестице гвожђе оксида површински модификоване декстраном су врло стабилне у већини пуферских раствора у рН од 4-10 [139]. Међутим, не могу се додатно коњуговати јер је њихова површина прекривена хидроксилним групама декстрана.

#### 2.4. Биодистрибуција и токсичност наночестица

Наночестице гвожђе оксида, као најчешће испитиване за биомедицинске примене, у организму углавном бивају преузете од стране макрофага којим се преносе у мононуклеарни фагоцитни систем јетре, слезине, лимфе или коштане сржи [140]. Дужина циркулације наночестица у крви највише зависи од њихове природе, величине, облика и од врсте облоге. Честице испод 10 nm се из организма уклањају гломеруларном филтрацијом, док се веће МНЧ уклањају путем ретикулоендотелног система (РЕС) [69]. Мање наночестице по правилу остају дуже у циркулацији и бивају преузете од стране лимфних чворова, док веће честице у циркулацији проводе краће време и најчешће се накупљају у РЕС јетре или у слезини. Када уђу у ћелије врши се трансфер до зрелих (каских) ендозома, у којима се задржавају. У неким случајевима долази до деградације наночестица [141]. Верује се да деградација магнетита *in vivo* индукује оксидативни стрес преко *Fenton*-ове реакције кроз генерисање хидроксил радикала ( $HO^\bullet$ ) [141]:



Ова реакција је уско повезана са *Haber-Weiss*-овом релацијом [142], по којој се у реакцији супероксидног радикала ( $O_2^-$ ) и водоник пероксида генерише хидроксил радикал:



Супероксидни радикали се генеришу у електрон-транспортном ланцу митохондрија као и од стране фагоцитних и васкуларних ћелија [143]. Обзиром на ниску константу брзине *Haber-Weiss*-ове реакције, већа је вероватноћа да хидроксил радикал *in vivo* настаје редукцијом  $Fe^{3+}$  јона при чему резултујући  $Fe^{2+}$  јони улазе у *Fenton*-ову реакцију:



Студије на ћелијској линији аденокарцинома дојке миша (MTG-B) су показале да се унутар првог сата након инјекције наноферита, 95% честица налази или у спољашњој плазма мембрани или у међућелијском простору [144]. Што се тиче преузимања честица од стране туморских ћелија, 50% честица бива преузето након два сата, док је целокупан процес преузимања готов након четири сата [145]. Наночестице магхемита са слободним карбоксилним групама на површини путем електростатичких интеракција имају јако висок афинитет ка ћелијској мембрани. Процењено је да је ефикасност неспецифичне адсорпције ових честица већа за око три реда величине него што је случај код неутралних честица гвожђа оксида обложеним декстраном [146].

Постоји велики број фактора који утичу на токсичност наночестица, па је њихово познавање од изузетног значаја за примену. Један од најважнијих је њихово време задржавања у организму. Извршена су и *in vitro* и *in vivo* истраживања на низу различитих наночестица [147], али одговор на то да ли би релативно дуго време задржавања било корисно није једнозначан. Хипертермијски третмани се обично примењују у више сеанси, при чему је сваки ограничен временом излагања у зависности од запремине тумора, његовог положаја или употребе одговарајућих терапија. Према томе, дуже време задржавања би било неопходно како би се концентрација МНЧ одржала на минимуму током укупног третмана. Показано је да су наночестице гвожђа оксида обложене аminosиланом присутне у организму чак и годину дана након њиховог убризгавања у простату [47]. Деградација наночестица игра важну улогу у њиховој токсичности. *Le'vu* и сарадници су реконструкцијом услова унутар ћелије у *ex vivo* експериментима поредили деградацију наночестица гвожђе оксида обложених лимунском киселином, декстраном и аминоклохолним дериватима глукозе [148]. Показали су да кристална структура и магнетна својства остају непромењена након процеса разградње.

При процени улоге *Fenton*-ове реакције у процесима оксидативног стреса катализованог облицима гвожђа који нису складиштени у протеинима попут трансферина или феритина, треба истаћи следеће: (i) константа брзине *Fenton*-ове реакције је релативно ниска (до  $\sim 6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , иако су различите константе забележене у литератури [142,149]) и одвија се веома споро за рН вредности испод 3,5 (рН лизозома) [150]; (ii) молекули који се користе за облагање наночестица ограничавају реактивност честица са околином и (iii) сваки могући ризик у вези са гвожђем се може повезати са прекорачењем дозе, што се дешава ако укупно гвожђе у телу прекорачи масу од 5 g, што је за око два реда величине веће него физиолошка вредност код одраслог мушкарца ( $50\text{-}60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ).

Илустративни пример дозе потребне за клиничку примену наночестица гвожђе оксида је контрастно средство за магнетну резонанцу *Resovist*<sup>®</sup> (*Bayer Schering Pharma AG*, Немачка) које се администрира у дозама еквивалентним 1% физиолошког садржаја гвожђа у организму. Иако су ћелијска оштећења повезана са наночестицама гвожђе оксида веома блага за здраве ћелије [147], у последње време се сугерише да само предозирање гвожђем може имати потенцијална терапијска својства обзиром на његову измењену регулацију у ћелијама канцера [151].

## 2.5. Методе карактеризације магнетних наночестица

У овом потпоглављу је дат сажет приказ експерименталних техника које су у дисертацији коришћене за анализу структурних и магнетних особина синтетисаних МНЧ, за анализу површине обложених наночестица, као и за хемијску анализу припремљених ферофлуида који су тестирани за потенцијалне биомедицинске примене.

### *Рендгенска дифракција X-зрака на праху*

Метода дифракције X-зрака на праху, XRPD (енг. *X-Ray Powder Diffraction - XRPD*), се користи за анализу кристалне структуре и микроструктуре материјала. Из дифракционих података, применом различитих софтверских пакета, могуће је одредити параметре јединичне ћелије, углове и везе између атома, термалне параметре (амплитуде вибрације атома око равнотежних положаја) и расподеле атома у нееквивалентним кристалографским местима (катјонска расподела), као и микроструктурне параметре: величину кристалита, микронапрезање и линијске дефекте. На дифрактограмима појављују се дифракциони максимуми који одговарају конструктивној интерференцији са фамилије равни. Положај дифракционих максимума је одређен са  $2\theta$  у *Bragg-Brentano*-вој геометрији и из тог податка се израчунавају параметри јединичне ћелије и међураванска растојања. Код различитих кристалита нанометарских димензија, услед несавршености кристалне грађе, максимуми са исте фамилије равни су мало померени па долази до ширења дифракционих линија.

Ширине дифракционих максимума могу дати информацију о степену кристаличности фаза. Ако су фазе кристалне (волуминозни материјали), тродимензионална периодичност није нарушена, па се јављају уски максимуми. Ако је периодичност у узорку значајно нарушена (мала величина кристалита) дифракциони максимуми су широки, посебно код аморфних узорака са ниским степеном кристаличности. Анализом ширине дифракционих максимума могу се одредити микроструктурни параметри као што су микронапрезање, величине кристалита и дислокације. Код једноставније карактеризације материјала мерењем ширине на половини висине дифракционог максимума, величина кристалита се може израчунати применом *Scherrer*-ове формуле:

$$d_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}, \quad (2.19)$$

при чему је:  $d_{hkl}$  - просечна димензија кристала (Å) израчуната из ( $hkl$ ) рефлексии,  $K$  - фактор облика (приближно једнак 0,9),  $\lambda$  - таласна дужина рендгенског зрачења (Å),  $\beta$  - ширина на половини дифракционог максимума и  $\theta$  - *Bragg*-ов угао. Код наноматеријала величина кристалита (домена кохерентног расејања) је важан параметар у анализи физичких и хемијских својстава. Идентификација кристалне фазе се најчешће врши директним поређењем дифракционих максимума испитиваног материјала са симулираним за дати кристални систем, односно просторну групу и структурни тип [152,153].

### *Трансмисиона електронска микроскопија*

Електронска микроскопија се користи за посматрање ситних објеката, тако што се формира њихова увећана слика дифракцијом убрзаних електрона високих енергија. Трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ) је једна од највише коришћених метода у морфолошкој анализи наноструктурних материјала. Са повећањем енергије електрона њихове *de Broglie*-вске таласне дужине постају знатно мање од таласних дужина видљиве светлости, па је резолуција електронских микроскопа неколико редова величина изнад класичних оптичких микроскопа. Ред величине увећања оптичког микроскопа је  $10^3$ , а електронског до  $10^8$  пута, па је помоћу TEM-а могуће посматрати објекте реда величине ангстрема ( $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$ ) [154].

Код трансмисионог електронског микроскопа слика узорка се добија дифракцијом снопа електрона који је пропуштен кроз објекат. Микроскоп се састоји из три основна система: (*i*) електронског топа у коме се генерише електронски снап и систем кондензатора који фокусира

сноп електрона на објекат. У извору електрона ужарена катода од волфрамске жице емитује електроне који се даље фокусирају. Напон између катоде и аноде је веома висок (10-100 kV), чиме се постижу велике брзине и високе енергије електрона; (ii) Електрони се сочивом усмеравају на узорак. Један део електрона се расејава у интеракцији са атомима узорка, други се апсорбује а један део пролази кроз узорак и формира се дифракциона слика, која се увећава системом сочива. Систем сочива се састоји из сочива објектива, покретног носача узорка и средишњег пројекторског сочива, и (iii) Систем за снимање слике који претвара електронске податке у слику видљиву људском оку. Он се обично састоји од флуоресцентног екрана за посматрање и фокусирање слике и дигиталне камере за трајно снимање. Поред тога, потребан је вакуумски систем, који се састоји од пумпи и њихових припадајућих мерача и вентила, као и систем напајања и рачунарска компонента за обраду података.

Микроскопи са електронским сноповима високих енергија омогућавају посматрања са највећом резолуцијом. Такви микроскопи се обично означавају са HR-ТЕМ (енг. *High resolution* - HR). Овом врстом микроскопије могу се испитивати топографије површина чврстих неиспарљивих материјала, величина и морфологија честица, дефекти кристалне структуре, структурни фазни прелази, кристална структура, итд. Поред тога, уколико је микроскоп опремљен додатком за енергетски дисперзивном спектроскопијом X-зрачења, EDS (енг. *Energy dispersive X-ray spectroscopy* - EDS), помоћу расејаног рендгенског зрачења које се формира при проласку електрона кроз узорак или детекцијом секундарних електрона, могу се добити информације о хемијском саставу посматраних делова узорка. Приликом припреме узорка за ТЕМ анализу, неопходно је обезбедити његову довољну транспарентност за пролазак снопа електрона, такву да они при проласку не губе значајан удео енергије, па је припрема узорка веома важан корак у ТЕМ анализи [154].

#### *Инфрацрвена спектроскопија са Fourier-овом трансформацијом*

Инфрацрвена спектроскопија је недеструктивна спектроскопска метода која се користи у квантитативној и квалитативној анализи узорака, одређивању уређености кристалне решетке, као и прикупљању информација о начину везивања атома, молекула и група. Анализом инфрацрвених спектра се могу прикупити подаци о ефектима облагања наночестица (идентификацијом једињења), фазним трансформацијама и друго.

Инфрацрвена спектроскопија са *Fourier*-овом трансформацијом (FT-IC) је метода којом се испитује интеракција инфрацрвеног зрачења са анализираним узорком. Сваки молекул поседује карактеристичне вибрације чије су енергије квантиране и чији прелази одговарају енергијама фотона инфрацрвеног зрачења, тако да у интеракцији анализираних узорака са инфрацрвеним зрачењем широког спектра, долази до апсорпције зрачења фреквенција које одговарају енергетским прелазима између одговарајућих вибрационих нивоа. Да би вибрација била активна у инфрацрвеном делу спектра неопходан услов је да доводи до промене диполног момента молекула. [154].

#### *Хемијска анализа*

Хемијска анализа која укључује квалитативни и квантитативни елементарни састав узорака се успешно изводи употребом аналитичке технике индуктивно спрегнуте плазме са оптичком емисионом спектрометријом (енг. *Inductively coupled plasma-optic emission spectrometry* - ICP-OES). ICP-OES анализа узорака се одвија кроз два међусобно повезана дела: (i) ICP део: увођење течне узорке у виду аеросола у зону плазме, испаравање течности из аеросолне капи, атомизација молекула и вишеатомских јона до појединачних атома и јона елемената, као и њихова екситација у зони плазме (температуре између 5500 K и 6500 K) и (ii) OES део: помоћу оптичког емисионог спектрометра (OES) сложена емисиона светлост која потиче од свих елемената који су уведени у плазму се раздваја, а потом се интензитет сваке одвојене монохроматске емитоване светлости карактеристичне и спектроскопски најпогодније емисионе линије мери помоћу дводимензионалних полупроводничких детектора најновије

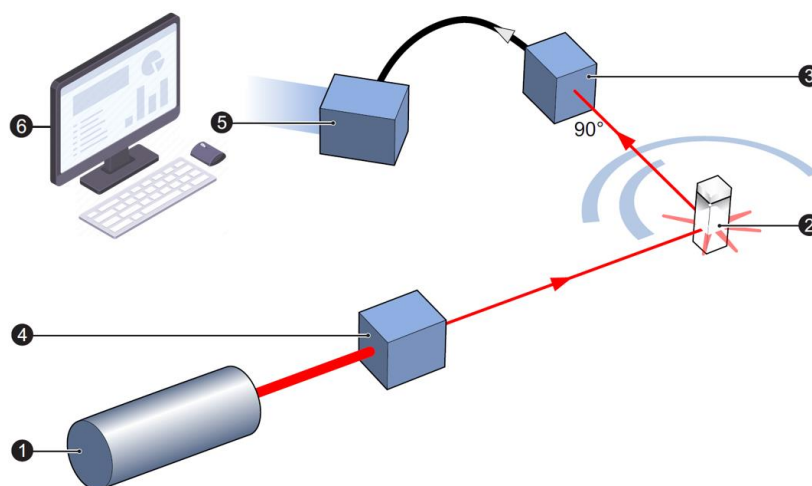
генерације (CCD и CID). Услед топлотне енергије плазме, долази до побуђивања електрона који се након почетне ексцитације враћају на ниже дозвољено енергетско стање уз пратећу емисију карактеристичних фотона.

Сваки елемент има јединствени емисиони спектар који се детектује спектрометром. Добијени интензитет светлости на датој таласној дужини се затим упоређује и анализира по спектроскопским критеријумима са калибрационим вредностима стандарда. Концентрација циљаног елемента у узорку се добија директно са калибрационе криве. Предности ICP технике су могућност истовременог одређивања елементарног састава преко 70 елемената квантитативног и квалитативног садржаја макро и микроелемената у свим врстама узорка, знатно нижи праг детекције за већину елемената у поређењу са другим аналитичким методама, па је ICP методом могуће одредити садржај елемената у траговима у најразличитијим узорцима. Такође, предности ICP-OES методе су у кратком времену потребном за анализу (око 2 min), као и мала потрошња узорка (до 5 mL) [155].

### Зета потенцијал

Зета ( $\zeta$ ) потенцијал је један од главних параметара за описивање стабилности колоидних система и представља електрокинетички потенцијал у колоидним дисперзијама. Може се објаснити као разлика потенцијала која се јавља услед релативног кретања између средњег и стационарног слоја флуида који је причвршћен за дисперговану честицу. Зета потенцијал је показатељ интеракције између честица унутар колоидних система, а његовим мерењем се може стећи увид о стабилности колоидних дисперзија. Колоиди са високим апсолутним вредностима зета потенцијала (позитивним или негативним) су електростатички стабилни, док они са ниским имају тенденцију агрегације или флокулације [156].

Најчешћа метода за мерење зета потенцијала је електрофореза. Узорак се поставља у електрично поље које индукује померање наелектрисаних честица. Електрофоретска мобилност честица зависи од јачине примењеног спољашњег електричног поља, док брзина честица у пољу зависи од јачине електричног поља, диелектричне константе и вискозности дисперзионог средства, као и од зета потенцијала [157]. Типични систем уређаја за мерење зета потенцијала састоји се из шест главних компоненти као што је приказано на **слици 2.9**.



**Слика 2.9.** Шема уређаја за мерење зета потенцијала: (1) ласерски снап, (2) мерна ћелија са узорком, (3) детектор, (4) процесор дигиталног сигнала, (5) рачунар, (6) пригушивач и (7) оптика за компензацију зрака; (А) инцидентни зрак, (Б) референтни зрак и (В) расути снап светлости [158].

### Динамичко расејање светлости

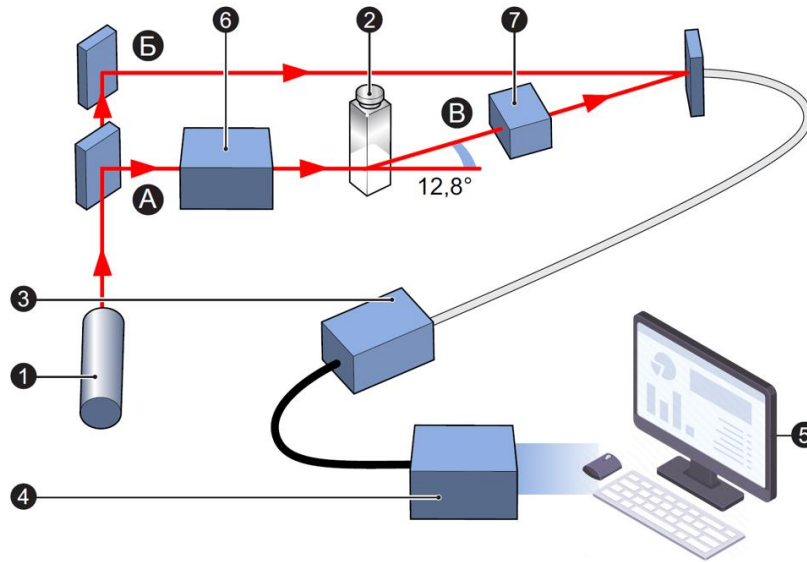
Динамичко расејање светлости, DLS (енг. *Dynamic light scattering - DLS*) је техника којом се мери интензитет брзине *Brown*-овог кретања честица у суспензији. DLS методом се на основу



брзине и корелационе функције одређују хидродинамички пречници диспергованих честица тако што се суспензија која садржи узорак осветљава ласером и анализира интензитет расуте светлости. Зависност између димензија честица и брзине услед *Brown*-овог кретања честица је описана *Stokes-Einstein*-овом једначином:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H}, \quad (2.20)$$

при чему су:  $D$  - дифузиони коефицијент,  $k$  - Болцманова константа,  $T$  - апсолутна температура,  $\eta$  - вискозност дисперзионог средства,  $R_H$  - хидродинамички пречник сферних честица. Шема уређаја за мерење хидродинамичког пречника се састоји из шест главних компоненти, као што је приказано на **слици 2.10**.



**Слика 2.10.** Шема уређаја за мерење хидродинамичког пречника честица: (1) ласерски сноп, (2) мерна ћелија са узорком, (3) детектор, (4) пригушивач, (5) корелатор и (6) рачунар [158].

### *SQUID* магнетометрија

*SQUID* магнетометрија (енг. *Superconducting Quantum Interference Device* - *SQUID*) је техника која се појавила развојем технологије суперпроводних материјала [159]. Због своје осетљивости *SQUID* магнетометар је постао један од стандардних уређаја за мерење магнетних и проводних особина материјала. Поред магнетизације, *SQUID* магнетометром је могуће мерити и магнетну анизотропију, *ac* суцептибилност као и магнетоопичке особине материјала. Главни циљ магнетометрије је мерење сопствене или индуковане магнетизације материјала. Суперпроводни квантни интерферометар представља врло осетљив магнетометар са прецизношћу мерења магнетног флукса или магнетне индукције реда величине  $B \approx 5 \cdot 10^{-14}$  Т као и напона од око  $10^{-14}$  V, што је за око шест редова величине прецизније од класичних магнетометара. Оваква осетљивост *SQUID* магнетометра се постиже применом суперпроводног прстена као сензора промене магнетног флукса.

*SQUID* се заснива на комбинацији физичких феномена квантовања магнетног флукса и *Josephson*-овог тунеловања [160]. Рад *SQUID* магнетометра базиран је на чињеници да таласни пакет којим се описује систем носилаца *Couper*-ових парова има велику дужину фазне кохеренције, што га чини фазно уређеним системом. То својство омогућава да се одреди фазна разлика ( $\Psi$ ) између тачака које се налазе на затвореној кружној контури кроз коју тече суперструја густине  $j$  као што је приказано следећом формулом:

$$\psi_{XY} = \frac{4\pi m}{\hbar n_s e} \int_X^Y j dl + \frac{4\pi e}{\hbar} \int_S \mathbf{B} d\mathbf{S}. \quad (2.21)$$

Према томе, фазна разлика зависи од густине струје  $j$  и магнетне индукције  $B$ . Параметар  $n_s$  представља електронску густину, а  $m$  масу електрона, па се мерењем укупне фазне разлике може мерити и магнетни флукс.

Мерење  $\Psi$  се у пракси изводи мерењем суперструје која пролази кроз *Josephson*-ове спојеве, танке изолаторске мембране дебљине  $10^{-9}$  m. Померај у фази који изазива присуство мембране је директно повезан са јачином суперструје која кроз њу пролази,  $J = J_c \sin \delta$  [161]. У једначини 2.21,  $J_c$  представља критичну струју која је карактеристика саме баријере. Уколико би се истовремено искористио још један идентичан спој на истој струјној контури који би се налазио ван магнетног поља, део фазне разлике који потиче само од магнетног флукса би могао бити издвојен. Ово представља основни принцип рада SQUID магнетометра као што је шематски приказано на **слици 2.11**.

Струја се у тачки А суперпроводног прстена дели на два иста дела од којих сваки садржи по један идентичан *Josephson*-ов спој. У непосредној близини једног од спојева се поставља узорак чија магнетизација мења магнетни флукс кроз дати спој што за последицу има промену фазне разлике суперструја у две гране контуре, па ће се у тачки Б фазно померене струје суперпонирати. Укупну струју чини кохерентни збир струја кроз сваки спој посебно  $J = J_a + J_b$  и дата је изразом:

$$J = 2J_c \cos \frac{2\pi e \Phi}{h} \sin \delta = J_{\max} \sin \delta. \quad (2.22)$$

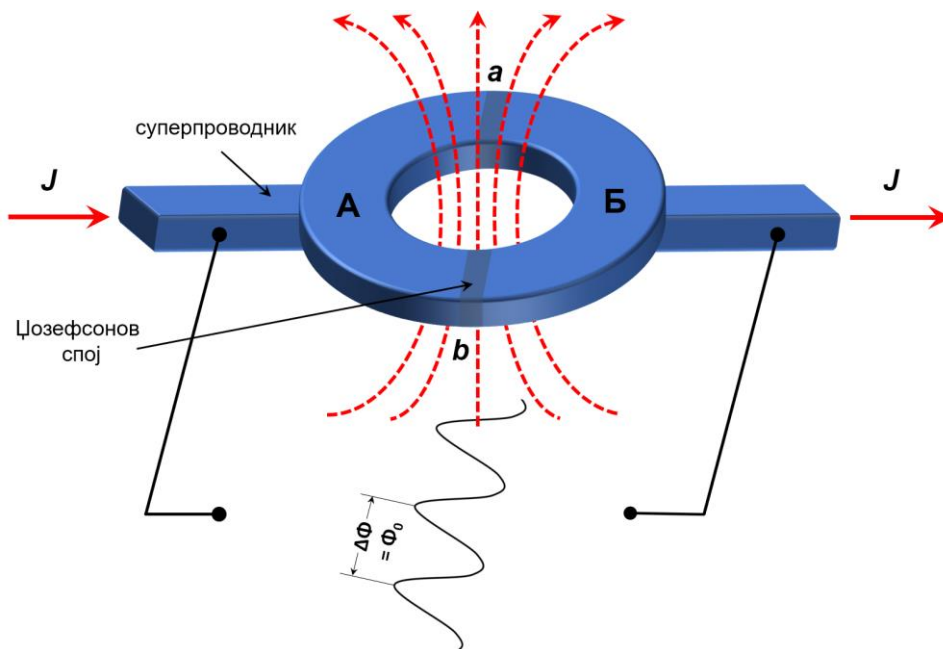
Амплитуда резултујуће суперструје  $J_{\max}$  је периодична функција магнетног флукса  $\Phi$  који потиче од магнетизације узорка, што значи да промена флукса изазива осцилаторну промену укупне струје  $J$  [162]. Она има максималну вредност када је испуњен следећи услов:

$$\frac{2\pi e}{h} \Phi = n\pi, \quad (2.23)$$

одакле је

$$\Phi = \frac{h}{2e} n = \phi_0 n. \quad (2.24)$$

У релацији 2.24 параметар  $n$  представља цео број а  $\Phi_0$  квант магнетног флукса (флуксон) који износи  $2,07 \cdot 10^{-15} \text{ T} \cdot \text{m}^2$  (1 Wb). Као вредност мерења SQUID магнетометром добија се синусоидни напонски сигнал (**слика 2.11**).



**Слика 2.11.** Шематски приказ принципа рада SQUID магнетометра [163].

Мерењем броја осцилација напона ( $n$ ) је могуће одредити укупну промену магнетног флукса услед присуства узорка. Промена напона за један период одговара промени флукса за један флуксон  $\Phi_0$ , док је укупна промена флукса дата као  $\Phi = H \cdot \Phi_0$  [163].

Приликом мерења SQUID магнетометром, неопходно је сензор одржавати на ниској температури, која се веома разликује од температуре узорка, што представља недостатак уређаја. Поред тога, проблем могу правити и спољашње сметње различитог магнетног или електромагнетног порекла што је последица високе осетљивости уређаја [163].

## 2.6. Радионуклиди за примене у терапији и дијагностици малигних тумора

Примена радионуклида у терапији малигних тумора се заснива на предавању контролисане активности одређеног радионуклида третираним ткивима или органима, па је за терапију малигних тумора неопходно изабрати радионуклид одговарајућих особина, како би се постигли максимални терапијски ефекти, а штетни ефекти по здрава ткива свели на најмању могућу меру [164]. Примена радионуклида у истраживањима која су предмет ове дисертације се односе на њихово везивање за површински модификоване МНЧ - радиообележавање. Радионуклиди емитују честице и фотоне одређених енергија и карактеришу се временом полураспада. Ове две особине радионуклида, као и врста малигних тумора утичу на планирање третмана. Радиообележавању претходи припрема МНЧ у форми стабилних колоидних суспензија које поседују довољно слободних функционалних група на површини честица. Након радиообележавања, комплекс радионуклид-МНЧ мора бити довољно дуго стабилан *in vitro* и *in vivo*, да не би дошло до ослобађања и накупљања радионуклида на нежељеним местима у организму, чиме се смањује ефекат терапије и дијагностике.

Радионуклиди који се користе у терапији треба да испуњавају следеће услове:

- да емитују што веће енергије зрачења у што краћем временском интервалу. Радионуклиди емитују честице великих енергија и кратког домета ( $\alpha$ - и  $\beta$ -емитери).
- да имају довољно дуго време полураспада које омогућава производњу и дистрибуцију радиофармацеутика и терапијски третман.
- да имају емитована енергија зрачења буде оптимална и да дистрибуција радионуклида у третираном ткиву буде равномерна. Мале енергије зрачења и нехомогена дистрибуција доводе до непотпуног третмана, док превелико зрачење може оштетити околна здрава ткива.

Примена радионуклида се у дијагностичке сврхе спроводи по дефинисаним протоколима. У ову сврху користе се углавном краткоживећи радиоизотопи везани за различита хемијска једињења - радиофармацеутици. Приликом терапије пацијенту се убризгава радиофармацеутик одређене специфичне активности након чега се врши визуализација дистрибуције радиофармацеутика у органима од интереса, која се заснива на детекцији зрачења употребом позиционо-осетљивог гама детектора.

У истраживањима представљеним у овој докторској дисертацији коришћена су три радионуклида,  $\beta$ -емитер  $^{90}\text{Y}$ ,  $\beta$ - и  $\gamma$ -емитер  $^{177}\text{Lu}$ , као и чист  $\gamma$ -емитер  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (табела 2.2) [165].  $^{90}\text{Y}$  емитује  $\beta$ -честице великих енергија од 2280 keV, максималног домета у неким ткивима до 11 mm, што га чини повољним за примену у радионуклидној терапији. Уколико се као носач радионуклида користе МНЧ, може се очекивати нехомогена дистрибуција радиообележених МНЧ, па је за терапију пожељно користити радионуклиде са великим дометом (као што су  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{188}\text{Re}$  и  $^{166}\text{Ho}$ ). Недостаци примене  $^{90}\text{Y}$  су неспецифично задржавање емитованих честица у костима, а пошто је  $^{90}\text{Y}$  чист  $\beta$ -емитер (не емитује пратеће  $\gamma$ -зрачење) отежано је праћење његове акумулације у ткивима [166]. Други наведени недостатак се може уклонити употребом  $^{177}\text{Lu}$  као радионуклида за обележавања. С друге стране, зрачење  $^{177}\text{Lu}$  са енергијом од 497 keV продире само 2 mm у ткива. За комплетан третман  $^{177}\text{Lu}$  неопходно обезбедити хомогену

дистрибуцију радиообележених наночестица у ткивима. Предност  $^{177}\text{Lu}$  у односу на  $^{90}\text{Y}$  је у емисији пратећих  $\gamma$ -фотона енергије 208 keV (11%) и 113 keV (6,4%), помоћу којих се прецизно може пратити његова акумулација у туморским ткивима. На основу наведених карактеристика  $^{177}\text{Lu}$  се може користити и у терапији и у дијагностици [167,168]. Трећи радионуклид који је коришћен за обележавање наночестица је  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , који је чист  $\gamma$ -емитер енергије зрачења од 140 keV. Велика предност  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -радиофармацеутика је доступност  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$  генератора и могућност свакодневног обележавања једињења (у виду лиофилизованог китова) пертехнетатом ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ). Радиоизотоп  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  се добија у облику  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  (натријум пертехнетата), елуирањем  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$  генератора физиолошким раствором.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  је најчешће коришћени радиоизотоп у нуклеарној медицини (више од 80% дијагностичких процедура у овој области користи неки од препарата обележених са  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ).

$^{99\text{m}}\text{Tc}$  поседује готово идеалне карактеристике зрачења за примену у дијагностици а то су [169]:

- Време полураспада од шест сати је довољно да би се испитали метаболички процеси, а опет довољно кратко да пацијент прими минималну дозу зрачења.
- Распада се „изомерним“ процесом који укључује емитовање гама зрака. Пошто не долази до високоенергетске бета емисије, доза коју пацијент прими је минимална.
- Гама зраци поседују идеалну енергију за детекцију гама камером.
- $^{99\text{m}}\text{Tc}$  може да се везује за низ биолошки активних материја, што омогућава његово специфично накупљање у циљаном ткиву или органу [170].

**Табела 2.2.** Карактеристике радионуклида коришћених у овој докторској дисертацији и начини њиховог добијања

Радионуклид	Време полураспада ( $T_{1/2}$ )	Добијање	Карактеристике $\beta^-$ зрачења			Карактеристике $\gamma$ зрачења	
			$E_{max}$ (keV)	Принос (%)	$d_{max}$ (mm)	$E_{max}$ (keV)	Принос (%)
$^{90}\text{Y}$	64,1 h	$^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ генератор $^{89}\text{Y} (n,\gamma) ^{90}\text{Y}$	2280	100	11	-	-
$^{177}\text{Lu}$	6,73 d	$^{176}\text{Yb} ^{177}\text{Lu}$ $^{176}\text{Lu} (n,\gamma) ^{177}\text{Lu}$	497,8	100	2	208	11,0
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6,03 h	$^{98}\text{Mo} (n) ^{99}\text{Mo}$ генератор $^{99}\text{Mo} (\gamma) ^{99\text{m}}\text{Tc}$	-	-	-	140,5	98,6

$E_{max}$  - максимална енергија зрачења

$d_{max}$  - максимални домет радионуклида у меким ткивима

### 2.6.1. Радиообележавање магнетних наночестица

Везивањем радионуклида за МНЧ добијају се магнетне наночестице које су носилац радиоактивности, што је од значаја за примене у МХ и радиотерапији. У поступку радиообележавања потребно је:

- Изабрати радионуклид погодних карактеристика зрачења за дату примену.
- За облагање изабрати лиганд који омогућава, са једне стране ковалентно везивање за површину МНЧ, а са друге да на површини поседује слободне функционалне групе којима ће се радионуклид комплексирати.

- Изабрати најповољније методе радиообележавања како би се добио највећи принос и *in vitro* стабилност.
- Изабрати методе пречишћавања вишка невезаног радионуклида из суспензије МНЧ.

Постоји неколико начина радиообележавања обложених МНЧ [171]. Први је обележавање преко хелатног агенса. Тривалентни катјони радиометала (између осталих  $^{90}\text{Y}$  и  $^{177}\text{Lu}$ ) су у литератури познати по томе да граде термодинамички стабилне хелатне комплексе [172]. Најчешћи лиганди који формирају јаке комплексе са овим јонима су деривати етилендиаминотетрасирћетне киселине (EDTA) [173], 1,4,7,10-тетразоциклододекантетрасирћетне киселине (DOTA) и диетилентриаминопентасирћетне киселине (DTPA) [174,175]. Други начин радиообележавања је директно везивање преко различитих слободних функционалних група ( $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$  и  $-\text{SH}_2$ ) које су након површинске модификације МНЧ бифункционалним лигандима усмерене ка дисперзионом средству [176,177].

Након поступка радиообележавања, неопходно је радионуклиде који се нису везали одвојити од радиообележених МНЧ. Пречишћавање радиообележених МНЧ се најчешће врши поступцима дијализе, јоноизмењивачке хроматографије или гел филтрације. Да би се радиообележене МНЧ могле користити у биомедицинским истраживањима, потребно је да буду радиохемијски чисте, као и да буду *in vitro* стабилне у дужем временском периоду. Након радиообележавања МНЧ неопходно је испитати радиохемијску чистоћу и *in vitro* стабилност у различитим медијумима симулацијом физиолошких услова [177].

Радиохемијска чистоћа је дефинисана као однос радиоактивности радионуклида узорка који се испитује и укупне радиоактивности. Радиохемијска чистоћа се изражава у процентима и када је у питању радиообележавања МНЧ пожељно је да буде већа од 90%. Она се одређује аналитичким методама као што су: HPLC (енг. *High-performance liquid chromatography* - HPLC), танкослојна хроматографија, електрофореза на папиру или натријум додецил сулфат полиакриламид гел електрофореза (енг. *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* - SDS-PAGE). Танкослојна хроматографија је брза и једноставна аналитичка метода којом се у оквиру различитих фракција веома брзо и лако детектује проценат невезаних радионуклида и радиообележених МНЧ и коришћена је за процену радиохемијске чистоће у овој докторској дисертацији [177,178].

*In vitro* стабилност радиообележених МНЧ представља временску евалуацију радиохемијске чистоће обележеног једињења у физиолошком раствору (ФР) или хуманом серум-албумину (ХСА).

*In vitro* стабилност се обично испитује у интервалу од једног до неколико дана од поступка радиообележавања. Висока *in vitro* стабилност указује да је обележено једињење стабилно у биолошком медијуму током терапијског дејства. *In vitro* стабилност обележених МНЧ је један од главних услова за њихова *in vivo* преคลินิกка и клиничка истраживања [177].

### 3. ПРЕДМЕТ И ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

*Предмет истраживања* ове докторске дисертације је развијање метода синтезе магнетних наночестица базираних на оксидима гвожђа које су по физичким и хемијским својствима погодне за даља испитивања њихове потенцијалне примене у терапији и дијагностици малигнух тумора. Синтетисане наночестице би требало да формирају стабилну колоидну суспензију у физиолошким условима са високом хипертермијском ефикасношћу под утицајем спољашњег променљивог магнетног поља. Поред тога, за површинску модификацију МНЧ би требало применити бифункционалне лиганде који поседују слободне функционалне групе што би у поступку радиообележавања МНЧ омогућило директно везивање радионуклида за МНЧ, у сврху њихове потенцијалне примене у радионуклидно-хипертермијској терапији тумора.

*Циљ истраживања* у овој докторској дисертацији се може приказати у пет теза:

- Испитивање утицаја различитих метода и параметара синтезе наночестица на бази магнетита, као и наночестица  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  делимично супституисаних јонима  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{Co}^{2+}$ , на структурне, микроструктурне и магнетне особине. Наночестице ће бити синтетисане једноставном таложном техником, применом двостепене технике - таложне методе која је праћена хидротермалним третманом у микроталасном пољу, као и модификацијом полиол технике синтезе.
- Одређивање утицаја површинских модификатора једињењима који различитим механизмима (електростатички или просторно) врше стабилизацију МНЧ. Испитивање утицаја облоге на магнетне и колоидне особине, као и на ефикасност даље функционализације у процесу радиообележавања.
- Одређивање специфичне брзине апсорпције (*SAR*) и параметра унутрашњег губитка (*ILP*). Испитивање примене обложених МНЧ у магнетној хипертермији и анализа унутрашњих и спољашњих параметара који утичу на топлотну ефикасност МНЧ.
- Одређивање услова за ефикасно везивање различитих радионуклида:  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  и  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Принос радиообележавања и *in vitro* стабилност у физиолошким условима радиообележених наночестица ће бити испитан, са циљем њихове потенцијалне примене у радионуклидној терапији и дијагностици малигнух тумора.
- Селекција МНЧ са структурним, магнетним, површинским, хипертермијским и особинама радиообележавања погодним за даљу *in vitro* примену и *in vivo* хипертермијско-радионуклидну терапију на малим животињама.

## 4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

### 4.1. Синтеза магнетних наночестица

За синтезу МНЧ изабране су и модификоване три методе: (i) таложна метода, (ii) микроталасима потпомогнута хидротермална синтеза након таложења МНЧ из раствора и (iii) полиол метода. Да би биле погодне за даља истраживања усмерена ка њиховој примени на туморским ћелијама (*in vitro* тестови) и на лабораторијским животињама (*in vivo* тестови), синтетисане МНЧ су облагане различитим једињењима.

Реагенси коришћени за синтезу, површинску модификацију и радиообележавање магнетних наночестица су комерцијалне производње аналитичког степена чистоће и дати су у **прилогу 1**. Поред реагенаса, у **прилогу 1** су наведени уређаји, раствори и потрошни материјал коришћени приликом израде ове докторске дисертације.

#### 4.1.1. Синтеза наночестица магнетита таложном методом

Наночестице магнетита су синтетисане модификованом *Massart*-овом методом [94]. Најпре је 43 mL 27% воденог раствора гвожђе(III) хлорида помешано са 400 mL дестиловане воде. Након тога, 10,8 g гвожђе(II) хлорида је растворено у 45 mL дестиловане воде и помешано са воденим раствором гвожђе(III) хлорида уз интензивно мешање на магнетној мешалици. У следећем кораку, добијени раствор је лагано додат у 75 mL 25% воденог раствора  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Температура суспензије је затим повећана на 90 °C на којој је систем одржаван наредних 60 min и, након грејања, остављен да се хлади 24 h уз мешање на магнетној мешалици. Након хлађења, талог је неколико пута испран дестилованом водом и издвојен употребом спољашњег перманентног магнета. Могући хидроксиди гвожђа заостали након реакције су уклоњени третманом са 30 mL 10% азотне киселине. Овај процес се назива киселински третман [107]. Након тога, у 200 mL дестиловане воде је растворено 8,25 g  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  и раствор је помешан са суспензијом МНЧ. Како би дошло до комплетне оксидације наночестица, резултујућа смеша је одржавана на тачки кључања током 30 min, а затим охлађена до собне температуре. Киселински третман је поновљен још једним додатком 30 mL 10%  $\text{HNO}_3$ . После уклањања супернатанта, талог МНЧ је испран ацетоном и издвојен спољашњим магнетом. Коначно, суспензија наночестица је концентрована упаривањем ацетона у ротационом вакуум упаривачу. Ради побољшања колоидне стабилности на физиолошкој рН вредности, површина синтетисаних наночестица је додатно модификована лимунском киселином (CA), (3-аминопропил)триетоксисиланом (APS) и декстраном (DEX).

#### 4.1.2. Микроталасима потпомогнута хидротермална синтеза МНЧ на бази магнетита

Микроталасима потпомогнутом хидротермалном синтезом, након реакције таложења на собној температури, су синтетисане две серије узорака - наночестице магнетита у којима су јони гвожђа делимично супституисани јонима магнезијума и кобалта. Количина почетних супстанци потребна за синтезу је одређена на основу стехиометријских односа у реакцији имајући у виду техничке параметре реакционог суда. Класична хидротермална синтеза или микроталасима потпомогнута хидротермална синтеза се учестало користе у комбинацији са другим методама као што је таложна метода. Микроталасима потпомогнута хидротермална синтеза се може применити самостално или као други део двостепеног процеса, при чему долази до завршне обраде преципитата добијеног таложном методом [179].

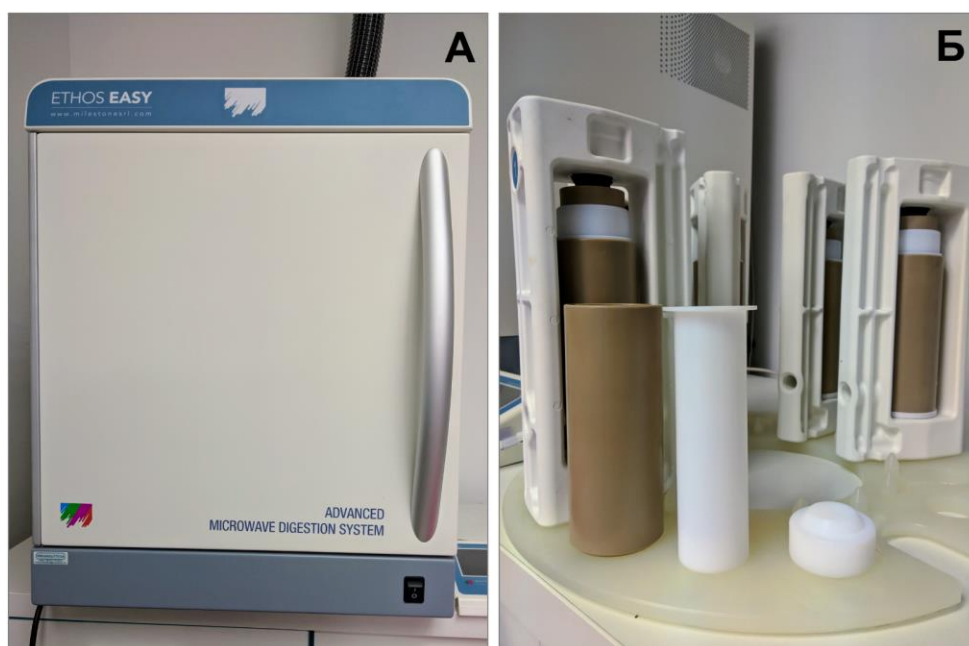
Узорци  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  су синтетисани комбинацијом таложне методе и хидротермалне синтезе потпомогнуте микроталасним зрачењем. У трогрли балон запремине 500 mL сипано је 320 mL деминерализоване воде. Дегазирање воде (пре свега отклањање раствореног кисеоника) је изведено постављањем балона у ултразвучно купатило 15 min пре почетка синтезе. Одмах након дегазирања, трогрли балон је повезан преко мањег бочног шлифа са константном

струјом гасовитог азота. Азот је путем система цевчица увођен на дно балона и константно је барботиран чиме је била обезбеђена инертна атмосфера током целокупног трајања таложења узорка. Након 15 min од почетка увођења  $N_2$  у деминерализовану воду, у балон су кроз централни најшири шлиф шаржиране соли гвожђа и кобалта које су претходно одмерене. Соли су одмерене сходно стехиометријском захтеву за добијање дефинисаног састава узорка (табела 4.1). За  $Fe_3O_4$  је то било, 4,17 g  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  и 8,11 g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ . У раствор је додат и поли(етилен гликол)-300, у концентрацији  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  реакционе смеше. Раствор је мешан механичком мешалицом (400 rpm) до потпуног растварања соли. Након потпуног растварања соли, 22,5 mL амонијум хидроксида је полако укапавано константном брзином, тако да је целокупна запремина  $NH_4OH$  у смешу соли укапана након 60 min. За укапавање амонијака је коришћена капалица са тефлонском славином која има могућност за фино подешавање протока течности. Током укапавања амонијака, реакциона смеша је константно мешана у инертној атмосфери азота. У различитим фазама таложења од почетка реакције растварања соли у води, до завршетка укапавањем амонијака као таложног реагенса, долазило је до промене боје реакционе смеше. Она је на почетку била светло наранџаста, а на крају таложења црна или тамно сива зависно од удела уграђеног кобалта у кристалну структуру циљаног наноферита. Коначна рН вредност смеше је била 10. Када је укапавање амонијум хидроксида завршено, смеша је мешана још 15 min у струји азота.

**Табела 4.1.** Преглед синтетисаних наноферита серије  $Co_xFe_{3-x}O_4$  и количина реактаната коришћених у синтези

	Синтетисани наноферит	Моларна маса наноферита* ( $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ )	Реактанти					
			$FeSO_4 \cdot 7H_2O$		$CoCl_2$		$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	
			(mol)	(g)	(mol)	(g)	(mol)	(g)
1.	$Fe_3O_4$	231,55	0,015	4,17	–	–	0,030	8,11
2.	$Co_{0,10}Fe_{2,90}O_4$	231,86	0,0135	3,75	0,0015	0,1948		
3.	$Co_{0,20}Fe_{2,80}O_4$	232,16	0,012	3,34	0,0030	0,3895		
4.	$CoFe_2O_4$	234,63	–	–	0,0150	1,9476		

\*Теоријска количина наноферита у свим синтезама је била 0,015 mol, а теоријска маса 3,47-3,61 g.



**Слика 4.1.** Уређај за хидротермалну синтезу потпомогнута микроталасима. (А) Микроталасна пећница *ETHOS EASY* и (Б) Тефлонска кивета која се поставља у ротор.



Комплетна запремина раствора (320 mL + 22,5 mL) је подељена у седам тефлонских кивета, запремине приближно 50 mL по кивети. Кивете су спаковане и затворене по прописаном протоколу и процедури и постављене у микроталасну пећницу (*ETHOS EASY, Milestone*, Италија) која је опремљена ротором модел *SK-15*. Максимални притисак на коме су кивете тестиране је био 100 bar. Температурни програм је задат тако да снага микроталасног зрачења буде од 0 до 1000 W, са строго контролисаним линеарним загревањем од собне температуре до 200 °C у трајању од 20 min. Када је достигнуто задатих 200 °C, узорак је одржаван још 20 min на тој температури. Након завршетка хидротермално-микроталасне обраде у микроталасној пећници, почетно хлађење је спроведено у самој комори током 10 min (слика 4.1).

Добијене наночестице су помоћу спољашњег перманентног магнета одвојене од супернатанта. Талог је испиран деминерализованом водом у неколико циклуса све док није показао негативну реакцију на хлориде и сулфате, а наночестице су на крају дисперговане у деминерализованој води. Након синтезе, део синтетисаног узорка је осушен преко ноћи на 60 °C. После сушења, узорак је спрашен у ахатном авану. Наночестице са различитим саставом кобалта и гвожђа су према стехиометрији полазних соли обележене на основу састава као  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ , при чему је  $x = 0, 0,1, 0,2$  и 1.

У табели 4.2 је приказана серија полазних удела соли за узорке магнетита и магнетита делимично супституисаних магнезијумом. Синтетисана је серија од седам узорака микроталасима потпомогнутом хидротермалном синтезом састава  $\text{Mg}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ , при чему је  $x = 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8$  и 1. Разлика у односу на синтезу наноферита серије  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ , поред састава, су интервал линеарног загревања микроталасне пећнице и максимална температура - загревање је вршено од собне температуре до 100 °C у интервалу од 10 min. Поред тога, температура је одржавана још 20 min и у овом случају није додат поли(етилен гликол)-300, као површински активна материја током синтезе. Остатак синтезе се не разликује од оног наведеног за наноферите састава  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ .

**Табела 4.2.** Преглед синтетисаних наноферита серије  $\text{Mg}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  и количина реактаната коришћених у синтези

	Синтетисани узорак	Моларна маса узорка ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	Реактанти					
			$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$		$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$		$\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	
			(mol)	(g)	(mol)	(g)	(mol)	(g)
1.	$\text{Fe}_3\text{O}_4$	231,55	0,015	4,17	–	–	0,030	8,11
2.	$\text{Mg}_{0,1}\text{Fe}_{2,9}\text{O}_4$	228,37	0,0135	3,75	0,0015	0,3698		
3.	$\text{Mg}_{0,2}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$	225,24	0,012	3,34	0,0030	0,7395		
4.	$\text{Mg}_{0,4}\text{Fe}_{2,6}\text{O}_4$	218,91	0,009	2,50	0,0060	1,4791		
5.	$\text{Mg}_{0,6}\text{Fe}_{2,4}\text{O}_4$	212,63	0,006	1,67	0,0090	2,2186		
6.	$\text{Mg}_{0,8}\text{Fe}_{2,2}\text{O}_4$	206,32	0,003	0,83	0,0120	2,9581		
7.	$\text{MgFe}_2\text{O}_4$	200,10	–	–	0,0150	3,6976		

#### 4.1.3. Полиол синтеза магнетних наночестица

У циљу добијања нанодимензионалних агрегата гвожђе оксида цветне морфологије различитих величина извршене су две синтезе у полиолима. Ова метода синтезе је изабрана због циљаних својстава наноструктура формираних за примене као агенса у МХ [107]. Један приступ је била солвотермална синтеза у аутоклаву (херметички затвореном тефлонском реактору) под високим притиском, док је други приступ синтеза у трогрлом балону на атмосферском притиску.

### Солвотермална синтеза у аутоклаву

На аналитичкој ваги је измерено 1,082 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  и 0,398 g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Затим је 40 g *N*-метилдиетаноламина (NMDEA) и 40 g диетилен гликола (DEG) помешано у стакленој чаши. Соли гвожђа су помешане са NMDEA и DEG-ом и суспензија је мешана на собној температури на магнетној мешалици током 60 min. Затим, измерено је 0,64 g NaOH и по 20 g DEG и NMDEA. Натријум хидроксид је диспергован у смеси NMDEA и DEG и систем је сонификован током једног сата на температури од 80 °C. Суспензије соли гвожђа и NaOH у полиолима (DEG и NMDEA) су затим сједињене.

Први део синтезе је идентичан код оба поступка, док се синтеза у аутоклаву заснива на трансферу суспензије соли гвожђа и NaOH у полиолима у тефлонски реактор запремине 125 mL, који се затим херметички затвара и поставља у пећ, претходно загрејану на 220 °C. У оваквој поставци време трајања синтезе је било 12 h на 220 °C, након чега је уследило хлађење до собне температуре унутар саме пећи (слика 4.2). Наночестице гвожђе оксида синтетисане полиол солвотермалном методом се у даљем тексту обележавају са IONPs (енг. *Iron Oxide Nanoparticles*<sub>Solvothermal</sub> - IONPs).



Слика 4.2. (А) Пећница Memert UN55 и (Б) Изглед тефлонске кивете и реактора за солвотермалну синтезу у полиолима.

Синтеза наночестица гвожђе оксида цветне морфологије на атмосферском притиску је извршена тако што је смеша соли гвожђа и течних полиола заједно са суспензијом NaOH у полиолима пребачена у трогрли балон који је претходно постављен у уљано купатило (слика 4.3). У балон је постављена сонда термопара и помоћу температурског контролера извршена прецизна контрола температуре уз задати програм. Реакциона смеша је од собне температуре до 220 °C загревана у интервалу од три сата брзином од 1,1 %/s и затим одржавана 16 h на задатој температури, уз константно механичко мешање. Оваквим приступом синтезе се поспешује процес нуклеације честица и тиме смањује коначна величина ансамбла наночестица [107]. Након синтезе, реакциона смеша је остављена да се охлади до собне температуре. Узорци су затим испрани са 150 mL раствора етанол/етил ацетата (50/50 v/v) тако што је по 30 mL раствора додавано у смешу, након чега су наночестице издвојене јаким спољашњим магнетом. Издвојени талог је третиран са 30 mL 10%  $\text{HNO}_3$  како би се ситније честице разградиле и поспешило поновни раст на већ постојећим наночестицама [107]. Суспензија је потом пребачена у двогрли балон запремине 100 mL и 8,25 g гвожђе(III) нитрата нонахидрата је додато у смешу. Балон је затим смештен у водено купатило и загрејан до 80 °C

уз 45 min механичког мешања на 600 rpm. Након тога је још једном извршен киселински третман додатком 30 mL 10% HNO<sub>3</sub>. На крају, наночестице су дисперговане у 10 mL ултрачисте (Milli-Q®) воде и филтриране кроз 0,22 μm хидрофилну полиетер сулфонску мембрану помоћу шприц филтера и коначно пребачене у стаклену боцу за даља истраживања. Наночестице синтетисане полиол методом на атмосферском притиску се у даљем тексту наводе као IONP<sub>A</sub> (енг. *Iron Oxide Nanoparticles Atmospheric* - IONP<sub>A</sub>).



**Слика 4.3.** Приказ апаратуре за полиол синтезу на атмосферском притиску у лабораторијском трогрлом балону уз константно механичко мешање.

Магнетит као оксид гвожђа садржи и двовалентне и тровалентне јоне (Fe<sup>2+</sup> и Fe<sup>3+</sup>). Fe<sup>2+</sup> јони се лако могу оксидовати па се магнетит може оксидовати у магхемит код кога су сви јони гвожђа у тровалентном стању. Између ова два оксида гвожђа постоји континуирани чврсти раствор [91]. Ово указује да се магнетит може трансформисати у магхемит пролазећи кроз широк спектар интермедијерних фаза при чему је магхемит коначни и стабилнији облик [91]. Постоје радови који указују да вишак Fe<sup>2+</sup> јона у организму генерише оксидативни стрес, највероватније кроз повећање концентрације интермедијера кисеоничних радикала у стабилном стању. Овај стрес је штетан за ћелије и узрочник је многих обољења [180,181]. Стога је пожељно извршити оксидацију остатка Fe<sup>2+</sup> јона како би се добиле стабилније МНЧ.

#### 4.2. Површинска модификација наночестица

Циљ облагања наночестица био је стабилизација њихове суспензије у воденом медијуму на физиолошком рН, као и додаток специфичних лиганда за даљу функционализацију МНЧ. У ту сврху су изабране облоге које обезбеђују активну терминалну групу (R-COOH или R-NH<sub>2</sub>) која омогућава даљу функционализацију (радиообележавање, везивање специфичних лиганда или лекова). Молекули за облагање коришћени у истраживањима при изради ове докторске дисертације имају основну структуру са терминалним карбоксилним или аминоксидним групама. Сви молекули коришћени за површинску модификацију су одобрени од стране FDA за интравенску примену.

#### 4.2.1. Електростатичка стабилизација лимунском киселином, поли(акрилном киселином) и (3-аминопропил) триетоксисиланом

##### Облагање лимунском киселином

Поступак облагања наночестица лимунском киселином је изведен на два начина. Наночестице синтетисане микроталасима потпомогнутом хидротермалном синтезом, као и полиол солвотермалном методом су обложене прецизним дозирањем лимунске киселине која је довољна за облагање одређене количине наночестица (*i*), док су наночестице синтетисане таложном методом и полиол методом на атмосферском притиску површински модификоване стандардним поступком за облагање лимунском киселином (*ii*):

*i.* Облагање је извршено тако што је прецизно одмерена количина лимунске киселине у концентрацији  $0,6 \text{ mM} \cdot \text{g}_{\text{МНЧ}}^{-1}$  након чега је систем сонификован 1 h на собној температури, према протоколу *Tombácz-a* и сарадника [182]. Значајан вишак молекула лимунске киселине у раствору избегнут је дозирањем сурфактанта што доводи до мале количине неизреагованог материјала, који је додатно елиминисан дијализом насупротив дејонизоване воде током 24 h. Добијена је стабилна суспензија наночестица гвожђе оксида при физиолошком рН. Обложени узорци су обележени као  $\text{CA}@\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  и  $\text{CA}@\text{IONPs}$ .

*ii.* Након синтезе МНЧ, примењена је стандардна процедура за облагање лимунском киселином [183,184]. Укратко, 10 mL синтетисаног узорка концентрације  $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  је заједно са 24 mL 0,1 M лимунске киселине пребачено у једногрили балон запремине 50 mL. Смеша је мешана у ротационом вакуум упаривачу на 120 rpm у претходно загрејаном воденом купатилу на 80 °C током 30 min. Затим је охлађена на собној температури и остављена 2 h до формирања талога. Након тога је 24 mL супернатанта пажљиво уклоњено аутоматском пипетом, док је преостала суспензија пребачена у 10 mL *Float-A-Lyzer*<sup>®</sup> мембрану за дијализу (100 kDa) и постављена у чашу запремине 2 L напуњену дестилованом водом. Систем је остављен преко ноћи да се лагано меша на магнетној мешалици. Након извршене дијализе, смеша МНЧ је пребачена у пластичну кивету и рН вредност је додатком 0,2 M раствора калијум хидроксида подешена на 11. Након тога је додатком 0,05 M азотне киселине рН подешен на вредност 7, при чему је добијена стабилна суспензија цитратима обложених МНЧ. Узорци су обележени као  $\text{CA}@\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{CA}@\text{IONP}_A$  и складиштени у стакленој бочици за даља истраживања.

##### Облагање поли(акрилном киселином)

Слично као код облагања лимунском киселином, одмерена је одређена количина поли(акрилне киселине) у односу на количину МНЧ ( $0,6 \text{ mM} \cdot \text{g}_{\text{МНЧ}}^{-1}$ ) и смеша је сонификована 1 h на собној температури [182]. Вишак PAA молекула у раствору је избегнут прецизним дозирањем поли(акрилне киселине). Додатно, извршена је анализа утицаја додавања PAA на површинско наелектрисање честица, мерењем зета потенцијала у функцији од количине PAA лиганда. Након овог теста није било потребе за поступком дијализе. Узорак је обележен са  $\text{PAA}@\text{IONPs}$ .

##### Облагање (3-аминопропил)триетоксисиланом

На почетку је 1,22 mL (3-аминопропил)триетоксисилана помешано са 10 mL синтетисаних МНЧ (концентрације  $19,5 \text{ mg}_{\text{Fe}} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). У суспензију МНЧ је пре мешања са APS додато 10 mL метанола. APS је затим постепено укапаван шприцом и иглом током 20 min, након чега је систем мешан на магнетној мешалици током 12 h. Метанол је уклоњен употребом ротационог вакуум упаривача. Затим су APS-обложене МНЧ испране додатком смеше ацетон:вода запреминског односа 70:30 и центрифугиране три пута по 30 min. На крају процеса облагања, наночестице су дисперговане у 10 mL дестиловане воде и рН вредност је додатком  $\text{HNO}_3$  подешена на рН 3 и коначно на подешена на рН 7, додатком KOH уз сонификацију у трајању од 10 min. Узорци су обележени као  $\text{APS}@\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{APS}@\text{IONP}_A$ .

#### 4.2.2. Стерна стабилизација поли(етилен гликолом) и декстраном

##### Облагање поли(етилен гликолом)

За облагање синтетисаних МНЧ поли(етилен гликолом) примењен је сличан протокол као у случају површинске модификације са СА и РАА. Израчуната је тачна количина једињења потребног за облагање, према методи који су развили *Illés* и сарадници [185]. Поступак облагања PEG-ом је извршен тако што је одмерено  $2 \text{ mmol}_{\text{EOU}} \cdot \text{g}^{-1}$  јединица етилен оксида (енг. *Ethylene Oxide Units* - EOU) по граму МНЧ који је затим помешан са суспензијом МНЧ, уз сонификацију на собној температури током 1 h. Након дијализе добијена је стабилна суспензија МНЧ површински модификованих поли(етилен гликолом). Узорци су означени као PEG@Co<sub>x</sub>Fe<sub>3-x</sub>O<sub>4</sub> и PEG@IONP<sub>S</sub>.

##### Облагање декстраном

Најпре су припремљена два раствора натријум хидроксида концентрације 0,5 M и 0,8 M. У једном суду је растворено 10 mg декстрана у 2,5 mL 0,5 M NaOH, док је 10 mg наночестица дисперговано у 1,6 mL 0,8 M NaOH. Раствор који садржи наночестице је лагано укапаван у раствор са декстраном који је претходно охлађен у ултразвучном купатилу. Време додавања раствора је било 20 min. Након тога, суспензија је остављена преко ноћи у ултразвучном купатилу уз константан проток хладне воде. На крају је извршена дијализа узорка током 24 h уз замену дестиловане воде три пута. Узорци су обележени као DEX@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и DEX@IONP<sub>A</sub>.

#### 4.3. Карактеризација магнетних наночестица

##### Рендгенска дифракција X-зрака на праху

Кристална структура и микроструктура су анализирани методом дифракције X-зрака на праху користећи дифрактометар високе резолуције *SmartLab*<sup>®</sup> (*Rigaku*, Јапан) и Cu K $\alpha$  зрачење таласне дужине  $\lambda = 1,542 \text{ \AA}$ . Подаци су прикупљени унутар  $2\theta$  опсега од 10-90° при брзини снимања од 0,2 °/min са дивергентним прорезом од 0,5 mm. У експериментима је коришћен радни напон од 40 kV и струја од 30 mA. Средња величина кристалита ( $d_{\text{XRD}}$ ) узорка је одређена помоћу *Scherrer*-ове формуле (једначина 2.19) користећи најинтензивније дифракционе максимуме.

##### Трансмисиона електронска микроскопија

Величина, морфологија и кристална структура наночестица су испитиване коришћењем трансмисионих електронских микроскопа JEOL JEM-2100 и JEOL JEM-2100F UHR (*Oxford*, Уједињено Краљевство) са радним напоном од 200 keV. Изабране TEM слике су анализирани мануелно употребом софтверског пакета *ImageJ* [186]. Средња величина и статистичка расподела честица по величини су процењене мерењем највећег унутрашњег пречника између 100 и 200 честица по узорку. Након тога, подаци су фитовани на нормализовану логаритамску функцију, према формули [187]:

$$y = y_0 + \frac{A}{\sqrt{2\pi}\omega x} e^{-\frac{[\ln \frac{x}{x_0}]^2}{2\omega^2}}, \quad (4.1)$$

како би се одредили средња величина честица, стандардна девијација ( $\sigma$ ) и индекс полидисперзности МНЧ (енг. *Polydispersity index* - *PdI*). Када је у питању величина честица, параметар *PdI* се сматра апсолутном грешком мерења и мера је хетерогености узорка [188].

##### Инфрацрвена спектроскопија са *Fourier*-овом трансформацијом

Присуство органских молекула на површини наночестица је испитано *Fourier*-овом трансформационом инфрацрвеном спектроскопијом (FT-IC) у региону од 4000 cm<sup>-1</sup> до

400 cm<sup>-1</sup> користећи спектрометар *Nicolet™ iS50 FT-IC (Thermo Fisher Scientific, САД)* који је опремљен Smart iTR ATR додатком за мерења ослабљене тоталне рефлексије (енг. *Attenuated total reflection - ATR*). За потребе мерења, спрашени осушени узорци су фиксирани на дијамантску плочу. Спектри позадине су измерени на чистом осушеном дијамантском кристалу пре постављања узорака и вредности апсорпције позадине су аутоматски одузете употребом пратећег *OMNIC™* софтверског пакета.

#### *Хемијска анализа*

Елементарни састав и концентрација МНЧ у воденој дисперзији су одређени помоћу аналитичке технике индуктивно спрегнуте плазме спрегнуте са оптичком емисионом спектроскопијом (ICP-OES) на уређају *iCAP 6500 Duo ICP (Thermo Fisher Scientific, САД)* са *iTEVA* операционим софтвером. Време трајања анализе је износило 2-5 min. Узорци за анализу су припремљени на следећи начин: 100 mg спрашеног узорка је пребачено у тefлонску кивету. У кивету је затим додато 10 mL 35% хлороводоничне киселине и извршена је дигестија у микроталасном дигестору (*ETHOS 1 Milestone, Италија*). Дигестија је вршена 20 min на температури 200 °C. Након хлађења, раствор из кивете је квантитативно пребачен у нормални суд и разблажен водом до одговарајуће запремине и на тај начин припремљен за даљу анализу елементарног састава. Стандардни раствори за калибрацију инструмента (екстерна калибрација), у адекватном концентрационом опсегу, припремљени су од сертификованог мултиелементарног стандардног раствора: *Multi-Element Plasma Standard Solution 4, Spersure®*, 1000 µg·mL<sup>-1</sup> (*Alfa Aesar GmbH & Co KG, Немачка*).

#### *Мерења зета потенцијала*

Вредности зета потенцијала површински модификованих МНЧ су измерене у воденим колоидним дисперзијама на 25,0 ± 0,1 °C у зета ћелијама за једнократну употребу модел *DTS1070* употребом уређаја *Nano ZS90 (Malvern, Уједињено Краљевство)*. Мерења су извршена у оптималним условима разблаживањем суспензије при коначној концентрацији ферофлуида од 0,1 g·L<sup>-1</sup>. Зета потенцијали необложених и обложених МНЧ су одређени у опсегу pH од 2-12. Мерења су извршена након инкубационог периода од 1 h. Експерименти су изведени при константној јонској јачини од 0,01 M која је претходно подешена додатком NaCl. На крају, зависности зета потенцијала од pH су фитоване на *Boltzmann*-ову сигмоидалну функцију [189]:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2. \quad (4.2)$$

#### *Мерења динамичког расејања светлости*

Мерења хидродинамичког пречника честица методом динамичког расејања светлости су извршена на уређају *Nano ZS90 (Malvern, Уједињено Краљевство)* који је опремљен He-Ne ласером снаге 4 mW таласне дужине зрачења λ = 633 nm. Основни раствор наночестица је разблажен дестилованом водом како би се добила концентрација ферофлуида од 0,1 g·L<sup>-1</sup>. Сва мерења су извршена у датом кинетичком стању које је постигнуто претходном сонификацијом током 10 s, након чега је систем остављен да се релаксира током 60 s. Просечне вредности хидродинамичких пречника су процењене након фитовања корелационих функција на бројно-тежинске величине.

#### *Магнетне особине наночестица*

Мерења магнетних особина су извршена помоћу магнетометара *MPMS-5* и *MPMS-7 (Quantum Design, САД)*. *MPMS* магнетометри су сложени системи намењени прецизним истраживањима у опсегу температура од 2 K до 400 K и магнетним пољима до 70 kOe. Поступак мерења *MPMS* магнетометрима је извршен на следећи начин: спрашени узорак се хомогенизује и након мерења масе пакује се у желатинске капсуле приближне масе 50 mg и на крају се поставља у

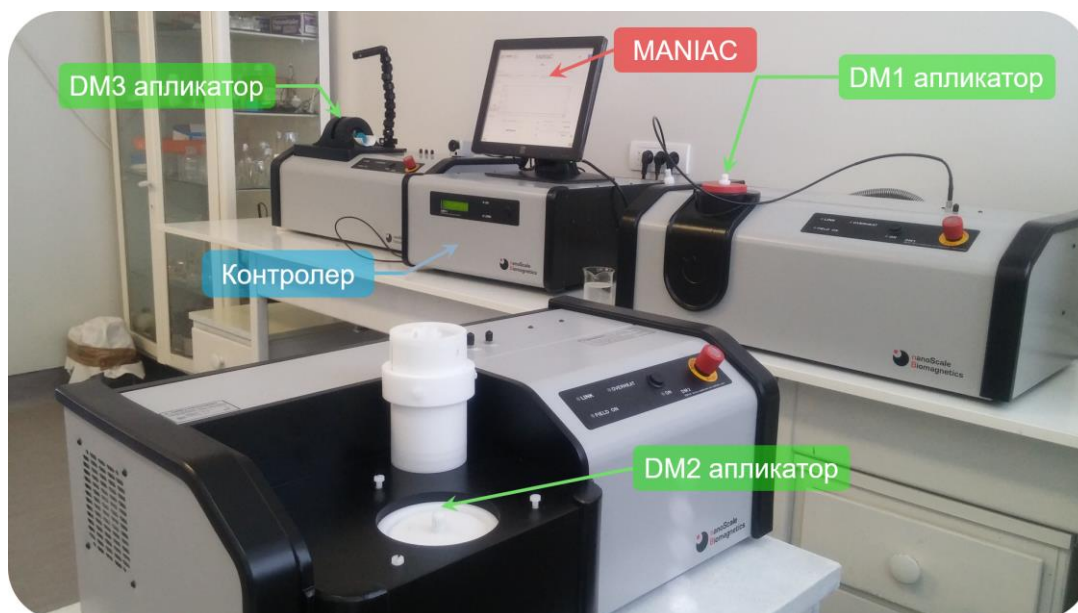
магнетометар. Криве магнетизације у зависности од јачине магнетног поља су мерене на 5 К, 250 К и 300 К при јачинама поља од  $\pm 50$  кОе и  $\pm 70$  кОе. Вредности сатурационе магнетизације су одређене за поља  $H$  која теже  $\infty$  [190] применом једначине:

$$M = M_S \left( 1 - \frac{a}{H} - \frac{b}{H^2} \right). \quad (4.3)$$

#### Магнетна хипертермија

Калориметријска мерења су извршена на комерцијалном истраживачком уређају *DM100* серије, компаније „*nV NanoScale Biomagnetics*“, Шпанија. Уређај инсталиран у Институту за нуклеарне науке „Винча“ је представљен на слици 4.4. То је уређај модуларне организације и састоји се из контролера, *MANIAC* софтверског пакета и три апликатора и може се користити за најразличитије врсте истраживања, од калориметријских до *in vitro* и *in vivo* мерења.

- Контролер је централни рачунарски систем у коме су смештени извор напајања и хардверска страна корисничког интерфејса.
- *MANIAC* (енг. *MAGnetic Nanoparticle Inductive heating Application Code - MANIAC*) представља софтверски пакет који омогућава управљањем системом којим је могуће пратити резултате експеримената, као и директно израчунавати *SAR* и термалну дозу.
- Апликатор представља генератор магнетног поља у који се у току експеримента поставља материјал, ћелијска култура или мала животиња. У њима се налазе различити типови сензора за праћење пораста температуре. Уређај *DM100* серије је опремљен са три апликатора за различите типове експеримената:
  - *DM1* апликатор је намењен калориметријским мерењима температуре магнетних колоидних узорака. Распон мерења у *DM1* је од  $-10$  °C до  $120$  °C са прецизношћу од  $\pm 0,1$  °C. Позиција на коју се сензор поставља у узорак се може регулисати калибрацијом положаја сензора који се налази на држачу узорка. Овај апликатор ради на седам различитих режима фреквенција у опсегу између  $252$  kHz и  $808$  kHz и покрива спектар јачина поља од  $48$  Gs до  $300$  Gs са прецизношћу подешавања јачине поља од  $1$  Gs.
  - *DM2* апликатор је намењен истраживањима на ћелијским културама - *in vitro* тестови.
  - *DM3* апликатор се користи за експерименте на малим лабораторијским животињама - *in vivo* тестови. Промену температуре у тумору могуће је пратити путем инфрацрвене камере, која се поставља изнад тумора.



Слика 4.4. Уређај за истраживања магнетне хипертермије *DM100* серије инсталиран у Институту за нуклеарне науке „Винча“.

За анализу суспензије МНЧ је коришћен *DMI* апликатор опремљен температурским сензором на бази оптичког влакна. Кинетичке криве грејања су снимљене у магнетном пољу јачине 200 Gs ( $15,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ) и распону фреквенција 252-577 kHz, у временском интервалу 40-120 s. Како би се одредиле SAR вредности,  $1 \text{ mL}$  наночестица концентрације  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  је постављено у кивету и заједно са њом у апликатор. Кинетичке криве су измерене употребом система оптичког влакна, чији је сензор уроњен у кивету са узорком. Температура колоидне дисперзије у току експеримента је одржавана испод  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  како би се минимизирало испаравање воде и тиме спречила дестабилизација колоида настала услед промене концентрације суспензије.

Добијене SAR вредности (мерене као  $\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$  наночестица) су процењене фитовањем кинетичких кривих на линеарну функцију у првих 20 s методом иницијалног нагиба  $(dT/dt)_0$  [191]. SAR вредности су затим израчунате из једначине:

$$SAR (\text{W}\cdot\text{g}^{-1}) = c_{NP} + \frac{\rho_1}{\rho_{NP}} \cdot c_1 \cdot \left(\frac{dT}{dt}\right)_{max}, \quad (4.4)$$

при чему је  $c_{NP}$  специфична топлота наночестица ( $\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ),  $\rho_{NP}$  густина наночестица у колоидној дисперзији ( $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ),  $\rho_1$  густина дисперзионог средства ( $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ), док  $(dT/dt)_{max}$  представља максимални градијент температурне криве колоида ( $\text{K}\cdot\text{s}^{-1}$ ). МНЧ су дисперговане у води, тако да приликом рачунања SAR вредности  $c_1$  представља специфични топлотни капацитет воде као дисперзионог средства ( $c_1 = 4,186 \text{ kJ}\cdot(\text{kgK})^{-1}$ ).

Параметар *ILP* је величина која не зависи од спољашњих параметара (фреквенције и јачине примењеног магнетног поља) и може се користити за процену ефикасности грејања магнетних наночестица. Параметар *ILP* је израчунат помоћу једначине:

$$ILP (\text{nHm}^2 \cdot \text{kg}^{-1}) = \frac{SAR}{H_0^2 f}, \quad (4.5)$$

при чему  $f$  представља фреквенцију примењеног спољашњег магнетног поља (Hz), док је  $H_0$  амплитуда поља ( $\text{A}\cdot\text{m}^{-1}$ ).

#### 4.4. Поступак радиообележавања магнетних наночестица

У овом поглављу је дат опис процеса радиообележавања магнетних наночестица које су након синтезе и физикохемијске анализе изабране за даља истраживања за потенцијалну примену у дијагностици и терапији малигних болести. За мерење активности свих узорака коришћени су  $\beta$ -калибратор доза (CRC-15, *Capintec*, САД) и гама бројач (Wizard 2480, *Perkin Elmer*, САД).

##### Радиообележавање IONPs са $^{90}\text{Y}$

Раствор  $^{90}\text{YCl}_3$  ( $0,006 \text{ mL}$ , активности приближно  $185 \text{ MBq}$ ) је додат у  $0,1 \text{ mL}$  водене суспензије наночестица површински модификованих различитим облогама: СА, РАА и РЕГ концентрације  $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  и рН вредности између 4 и 5. Након инкубације на две температуре ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$  и  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ) и два реакциона времена ( $30 \text{ min}$  и  $60 \text{ min}$ ), радиохроматографском методом на танком слоју силикагела (енг. *Instant Thin Layer Chromatography-Silica Gel* - ITLC-SG) са физиолошким раствором као мобилном фазом одређен је принос радиообележавања. Метода је изведена тако што је  $0,01 \text{ mL}$  испитиване пробе нанесено на 2 cm од доње ивице траке. Затим су траке смештене у мобилну фазу ( $0,9\% \text{ NaCl}$ ) и хроматограми су развијени на собној температури. Након развијања, SG траке су осушене на ваздуху и пресечене на делове дужине 1 cm. Расподела радиоактивности дуж траке је одређена мерењем активности сваког центиметра траке на калибратору доза и  $\text{NaI(Tl)}$  гама бројачу. Садржај сваке фракције је израчунат у односу на укупну радиоактивност траке и изражава се у процентима. У оваквом систему  $^{90}\text{Y}$ -обележене обложене IONPs су се задржале на месту наношења ( $R_f = 0,0-0,1$ ), док су невезани  $^{90}\text{Y}^{3+}$  јони мигрирали заједно са фронтом растварача ( $R_f = 0,9-1,0$ ). Приликом одређивања радиохемијске чистоће  $^{90}\text{Y}$ -обележених обложених IONPs,  $^{90}\text{Y}^{3+}$  јони се јављају као једини радиоактивни производ



деградације.  $^{90}\text{Y}$  је као чисти  $\beta^-$  емитер детектован помоћу закочног зрачења (такозваног „*bremsstrahlung*” ефекта) [192]. Сва мерења су извршена под једнаким геометријским условима.

#### *Радиообележавање IONP<sub>A</sub> и IONP<sub>S</sub> са $^{177}\text{Lu}$*

Одговарајућа запремина раствора  $^{177}\text{LuCl}_3$  (активности приближно 185 MBq) је додата у 0,1 mL обложених IONP<sub>A</sub> и IONP<sub>S</sub> (концентрације 4-5 mg·mL<sup>-1</sup>) на pH 5-6. Резултујућа суспензија је инкубирана током 10 min, 30 min и 60 min на собној температури. Принос радиообележавања је одређен ИТЛС радиохроматографском методом користећи SG траке као стационарну и физиолошки раствор као мобилну фазу. У овом систему,  $^{177}\text{Lu}^{3+}$  јони су мигрирали заједно са фронтом растварача ( $R_f = 0,8-0,9$ ), док су се  $^{177}\text{Lu}$ -обележене површински модификоване IONP<sub>A</sub> и IONP<sub>S</sub> задржале на почетку хроматографске колоне ( $R_f = 0,0-0,1$ ). Током поступка обележавања са  $^{177}\text{Lu}$  коришћене су две врсте наночестица синтетисане полиол методом, обложене са пет различитих лиганда (СА, ПАА, РЕГ, АПС и ДЕХ).

#### *Радиообележавање IONP<sub>S</sub> са $^{99m}\text{Tc}$*

Магнетне наночестице претходно површински модификоване са СА, ПАА и РЕГ облогама концентрације 5 mg·mL<sup>-1</sup> су обележене са  $^{99m}\text{Tc}$  употребом калај(II) хлорида ( $\text{SnCl}_2$ ) који учествује у редукцији  $^{99m}\text{Tc}^{+7}$  јона. Реакције радиообележавања су изведене истовременим додатком 0,1 mL  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  (активности приближно 18,5 MBq) и 0,04 mL раствора  $\text{SnCl}_2$  (који је добијен растварањем 2,5 mg·mL<sup>-1</sup> у 0,5 M HCl) у суспензију која је настала мешањем 0,02 mL површински модификованих МНЧ и 1 mL инјекционе стерилне воде. Након подешавања pH на 6, реакциона смеша је благо мешана на собној температури у временском интервалу од 30 min и 60 min.

Радиохроматографије су вршене на танком слоју силикагела, са ацетоном и смешом пиридин:сирћетна киселина:вода у запреминском односу 3:5:1,5 као мобилним фазама. Радиохроматографске анализе су изведене по два пута како би се утврдио успешан поступак радиообележавања  $^{90}\text{Y}$ -,  $^{177}\text{Lu}$ - и  $^{99m}\text{Tc}$ -обложених МНЧ [193].

#### *In vitro стабилност обложених радиообележених IONP<sub>A</sub> и IONP<sub>S</sub>*

*In vitro* стабилност површински модификованих IONP<sub>A</sub> обележених  $^{177}\text{Lu}$  и IONP<sub>S</sub> обележених радиоактивним  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  и  $^{99m}\text{Tc}$  је испитана у физиолошком раствору (ФР) и 4% раствору хуманог серум-албумина (ХСА, Институт за трансфузију крви Србије). Узорци  $^{99m}\text{Tc}$ -обележених IONP<sub>S</sub> су анализирани у различитим временским интервалима након процеса радиообележавања током 24 h при инкубацији на 37 °C и током 72 h и 96 h за  $^{90}\text{Y}$ - и  $^{177}\text{Lu}$ -обележене обложене МНЧ, одређивањем радиохемијске чистоће радиохроматографским методама (ИТЛС-SG), у систему растварача који су унапред наведени за сваки радионуклид посебно.

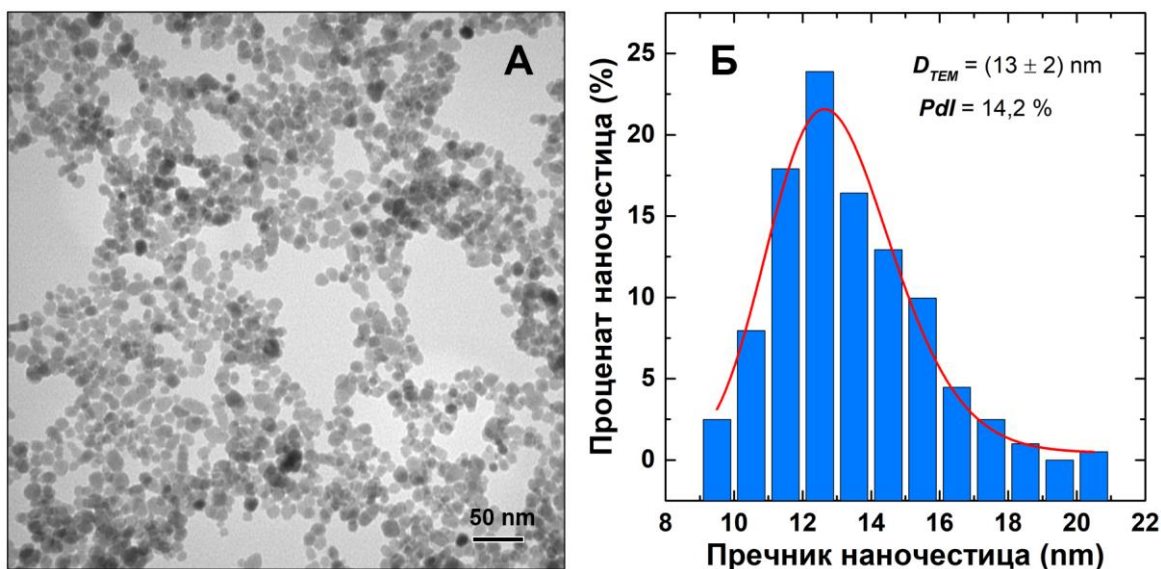
## 5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

### 5.1. Магнетне наночестице добијене таложном методом

У циљу добијања МНЧ погодних за примену у магнетној хипертермији синтетисане су наночестице магнетита методом таложења соли гвожђа из раствора, као што је описано у потпоглављу 4.1.1. Истраживања су извршена са циљем утврђивања могућности њихове потенцијалне примене у терапији, испитивањем хипертермијске ефикасности.

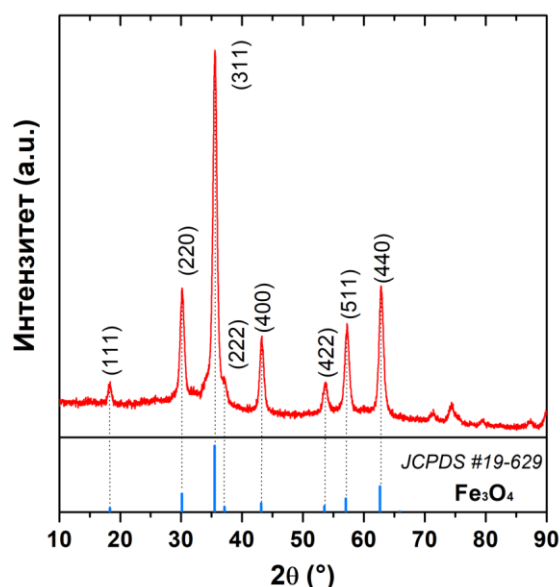
#### 5.1.1. Структурне, микроструктурне и магнетне особине наночестица магнетита

Морфолошке и микроструктурне (величина честица и дефекти) карактеристике синтетисаних наночестица су испитане помоћу ТЕМ микроскопије. Типична ТЕМ слика је приказана на слици 5.1А. Морфологија и величина честица одређени су статистичком анализом након мерења пречника око 200 честица. Да би се испитала расподела честица по величинама коришћен је софтвер *ImageJ*. Анализом ТЕМ слика утврђено је да су честице по облику псеудо сферне, да су добро дисперговане и да подлежу нормализованој логаритамској расподели по величини (слика 5.1Б), са средњом величином од  $(13 \pm 2)$  nm. Измерени индекс полидисперзности је око 14%, што представља добар резултат за таложну методу код које је полидисперзност узорака обично око 30%. Оваква вредност је постигнута захваљујући примењеном киселинском третману током синтезе. Просечни хидродинамички пречник МНЧ је одређен DLS методом и износи од 20,8 nm.



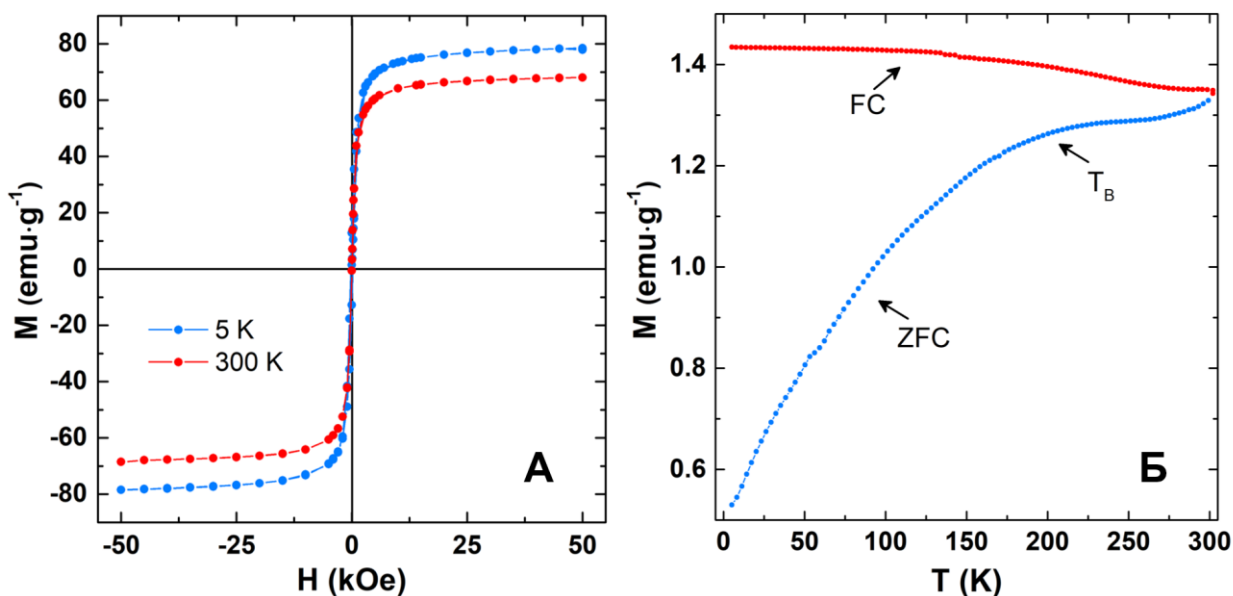
Слика 5.1. (А) ТЕМ слика МНЧ синтетисаних таложном методом и (Б) логнормална расподела по величини наночестица.

Кристална структура и микроструктура наночестица анализирана је коришћењем података дифракције X-зрака (слика 5.2). Кристалне рефлексије синтетисаних наночестица се јављају на приближно истим позицијама као и оне за магнетит са спинелном структуром, па се све рефлексије могу индексирати у просторну групу  $Fd\bar{3}m$  ( $N^{\circ}$  227). Симулирани дифракциони максимуми су добијени из података дифракције за магнетит,  $Fe_3O_4$  (JCPDS картица #19-629). Просечна величина кристалита  $D_{XRD} = 12,9$  nm, одређена је помоћу компјутерског програма који је саставни део софтвера *Rigaku* уређаја који примењује *Scherrer*-ову формулу (једначина 2.19). Упоредивањем вредности просечних величина честица  $\sim 13$  nm и величина кристалита  $\sim 13$  nm, указује да су честице сачињене од једног кристалног домена.



Слика 5.2. Дифрактограм синтетисаних наночестица. Стандардни подаци за  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (JCPDS картица #19-629) су представљени на слици за поређење.

Резултати мерења магнетизације у зависности од температуре  $M = f(T)$ , као и магнетизације у зависности од јачине магнетног поља  $M = f(H)$ , МНЧ синтетисаних таложном методом су приказани на слици 5.3. Сатурациона магнетизација на температури 300 К износи  $M_s = 67,9 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$ , док је на  $T = 5 \text{ K}$   $M_s = 77,9 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$ . Криве магнетизације пролазе кроз координатни почетак (коерцитивно поље је нула), што указује да синтетисане наночестице показују суперпарамагнетно понашање (Слика 5.3А).



Слика 5.3. (А) Хистерезисне криве на 5 К и 300 К и (Б) зависност магнетизације од температуре у  $ZFC/FC$  режиму ( $H_0 = 100 \text{ Oe}$ ).

Криве магнетизације у функцији температуре узорка хлађеног у пољу (енг. *field-cooled* - FC) и хлађеног без присуства спољашњег магнетног поља (енг. *zero-field-cooled* - ZFC) су приказане на слици 5.3Б. ZFC режим подразумева хлађење узорка у нултом магнетном пољу од собне температуре до температуре од 5 К. Након хлађења, успоставља се константно спољашње магнетно поље јачине 100 Ое а затим почиње мерење магнетизације током загревања узорка. У FC режиму узорак се прво хлади од собне температуре до 5 К, али у магнетном пољу, а затим почиње мерење магнетизације са порастом температуре у истом пољу. На ZFC кривој

уочава се максимум на  $\sim 236$  К који показује температуру на којој наночестице из суперпарамагнетног стања прелазе у блокирано или у колективно стање (енг. *Spin-glass*). Вредности магнетизације (*FC* крива) расту са снижавањем температуре и достижу плато. Овакво понашање је карактеристично за наночестичне системе у којима су присутне међучестичне интеракције [194]. За температуре испод 50 К, *ZFC* криве показују наглу промену нагиба, обично уочену за наночестице магнетита величина у опсегу 10-50 nm која је повезана са *Verwey*-јевим прелазом за  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (у волуминозном материјалу,  $T_V = 125$  К [91]). Магнетна својства на собној температури,  $M_S$  и суперпарамагнетно понашање су значајни за примену у *MX*.

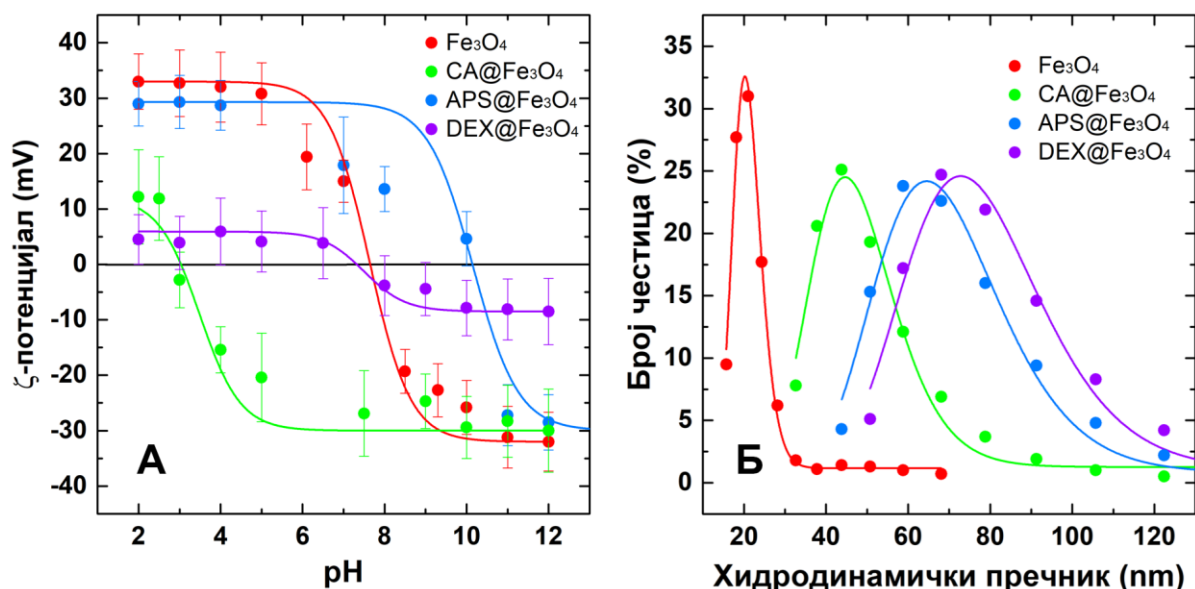
### 5.1.2. Површинска модификација $\text{Fe}_3\text{O}_4$ наночестица и колоидне особине

Оптимизован и добро контролисани поступак површинске модификације МНЧ је значајан корак ка добијању стабилних колоида. Избор једињења за облагање утиче на ефикасност грејања наночестица при *MX* зато што је дебљина облоге, а самим тим и величина обложене наночестице, параметар који утиче на вредност специфичне брзине апсорпције (*SAR*). Да би биле погодне за примену у радиотерапији наночестице морају бити обложене одговарајућим бифункционалним лигандом. Синтетисане наночестице су обложене са *CA*, *APS* и *DEX*, према протоколима који су описани у 4.2.1 и 4.2.2.

Зета потенцијал необложених и обложених водених суспензија наночестица магнетита је измерен на различитим рН вредностима (слика 5.4А). Из тих мерења одређене су вредности изоелектричних тачака, *pI*, које представљају рН вредност при којој је зета потенцијал једнак нули (енг. *Isoelectric point - pI*) (табела 5.1). Различито наелектрисање честица је последица депротоновања и протоновања хидроксилних група које се налазе на површини наночестице ( $\text{Fe}-\text{OH}$ ). У киселој средини, наночестице су позитивно наелектрисане као последица протоновања хидроксилне групе ( $\text{Fe}-\text{OH}_2^+$ ). При базним рН вредностима, површина честица постаје негативно наелектрисана услед дисоцијације  $-\text{OH}$  групе, при чему настају депротоноване хидроксилне групе  $\text{Fe}-\text{O}^-$  [195]. Измерене вредности зета потенцијала указују да је облагање МНЧ успешно изведено, јер је дошло до промене зависности  $\zeta = f(\text{pH})$  (слика 5.4А). Изоелектрична тачка необложених  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  се налази на рН 7,7, док на рН 7,4 потенцијал износи 7,3 mV. Ова вредност наелектрисања није довољна за стабилизацију необложених МНЧ па долази до њиховог таложења након дужег стајања.

Везивањем молекула лимунске киселине богате слободним карбоксилним групама за МНЧ долази до промене наелектрисања на површини. На физиолошкој рН,  $\text{CA}@Fe_3O_4$  су негативно наелектрисане са вредношћу зета потенцијала од  $-29,8$  mV, што указује да је дошло до електростатичке стабилизације наночестица након облагања. Поред тога, вредност изоелектричне тачке је померена са рН 8,3 на рН 3. Ово представља значајно удаљавање од физиолошке рН. Добијени резултати доказују присуство неутрошених карбоксилних група на површини наночестица, али и да су, као резултат ефикасног процеса облагања, неке од карбоксилних група лимунске киселине у јакој вези са  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  јонима.

Облагањем *APS* лигандом, *pI* је померена на рН 10,1 и суспензија је на рН 7,4 изразито позитивно површински наелектрисана, зета потенцијал износи 28,9 mV. На физиолошкој рН, за разлику од карбоксилне групе ( $-\text{COO}^-$ ), амино група је у протонованом стању ( $-\text{NH}_3^+$ ) па су  $\text{APS}@Fe_3O_4$  позитивно наелектрисане при физиолошким условима. Захваљујући присуству амино група на површини долази до електростатичког одбијања честица и додатне стабилизације колоидне  $\text{APS}@Fe_3O_4$  суспензије.



Слика 5.4. (А) Вредност зета потенцијала на различитим рН и (Б) хидродинамички пречник немодификованих Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и CA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, APS@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и DEX@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> МНЧ.

Везивањем молекула декстрана за површину, површинско наелектрисање наночестица је значајно смањено као и вредност зета потенцијала ( $-0,9 \text{ mV}$ ), а  $pI$  је померена на рН 7,3, што је јако близу физиолошкој рН вредности. Имајући у виду величину DEX молекула (молекулска маса  $35000\text{-}45000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) и резултате мерења зета потенцијала, стабилизација суспензије наночестица овим лигандом је искључиво стерне природе, пошто не долази до интензивнијег електростатичког одбијања честица.

Табела 5.1. Мерења зета потенцијала и хидродинамичких пречника необложених и CA-, APS- и DEX-обложених Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> наночестица

		Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	CA@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	APS@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	DEX@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
$\xi$ потенцијал	Изоелектрична тачка, $pI$ (pH)	7,8	3,0	10,1	7,3
	Потенцијал на рН 7,4 (mV)	7,3	-29,8	28,9	-0,9
DLS метода	Хидродинамички пречник, $D_H$ (nm)	20,8	46,9	68,1	76,6
	Полидисперзност, $PdI$ (%)	16,4	22,3	23,3	22,5

Вредности хидродинамичких пречника честица водених суспензија на рН 7 су одређене DLS методом (слика 5.4Б). Хидродинамички пречник за необложене наночестице износи 20,8 nm, док за CA-обложене износи 46,9 nm. Вредности хидродинамичких пречника за суспензије APS@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и DEX@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> износе 68,1 nm и 76,6 nm, редом. Ова разлика је последица тога да вредност  $D_H$  укључује величину честица у хидратисаном стању, заједно са ланцима полимера који се од површине честице протежу у водену фазу тиме чинећи омотач око честице значајно већим од величине саме честице. За разлику од DLS-а, полимерни ланци се не могу видети микроскопским методама услед слабог контраста у односу на сигнал позадине, као последица ниске густине електрона. Наведени резултати указују на везивање лимунске киселине и ланаца декстрана и (3-аминопропил)триетоксисилана за површину синтетисаних МНЧ.

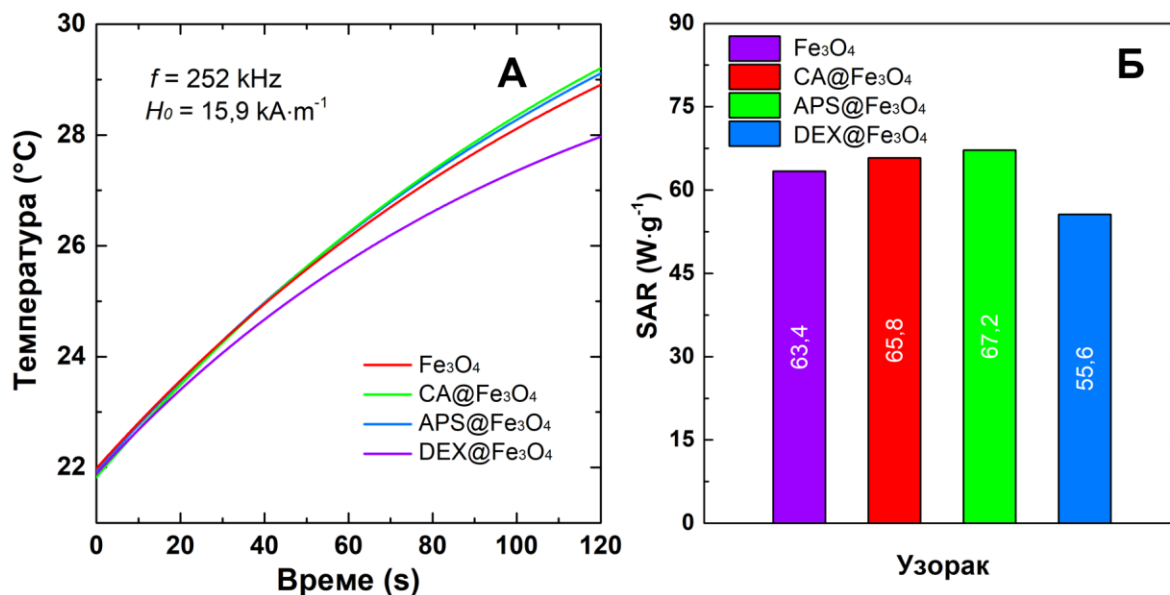
Измерене вредности хидродинамичких пречника су у доброј корелацији са молекулском масом лиганда за функционализацију, јер се величина честица повећава током процеса облагања. Вредности  $D_H$  наночестица обложених APS-ом, а посебно DEX-ом су значајно веће од вредности  $D_{TEM}$ , што може указивати на одређени степен агрегације честица што доводи до нежељене дестабилизације колоидне суспензије током дужег стајања.

### 5.1.3. Мерење специфичне брзине апсорпције $Fe_3O_4$ наночестица

Ефикасност синтетисаних МНЧ да електромагнетну енергију спољашњег поља конвертују у топлоту анализирана је рачунањем SAR вредности, након калориметријских мерења. Експерименти су извршени у сврху испитивања хипертермијске ефикасности синтетисаних наночестица.

Кинетичке криве грејања необложених  $Fe_3O_4$ , као и  $CA@Fe_3O_4$ ,  $APS@Fe_3O_4$  и  $DEX@Fe_3O_4$  су измерене у спољашњем променљивом магнетном пољу јачине  $H_0 = 15,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  и фреквенције,  $f = 252 \text{ kHz}$ , користећи комерцијални уређај *DM100* серије (слика 5.5А). Да би се испитао утицај различитих површинских модификатора на способност загревања околине од стране МНЧ, израчунате су SAR вредности за необложене  $Fe_3O_4$ , као и за три површински модификована узорка (слика 5.5Б). Уочена је мала разлика у ефикасности грејања. Са SAR вредности од  $55,6 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ , декстраном обложене наночестице су једине које су изгубиле део грејног потенцијала необложених честица. SAR вредности  $APS@Fe_3O_4$  и  $APS@Fe_3O_4$  ( $67,2 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$  и  $65,8 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ ), у поређењу са необложеним  $Fe_3O_4$  ( $63,4 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ ) су само незнатно више. Да би се објасниле добијене SAR вредности потребно је размотрити факторе који утичу на ефикасност грејања. Више SAR вредности за  $CA@Fe_3O_4$  и  $APS@Fe_3O_4$  су добијене у суспензијама веће колоидне стабилности (видети табелу 5.2). Већа стабилност суспензије представља важан циљ процеса површинске модификације. Макроскопске промене у колоидима, попут индуковане агрегације честица модификацијом површине применом модификатора веће молекулске масе, могу имати значајан утицај на МХ [196]. Дебљина слоја облоге одређује хидродинамички пречник и директно утиче на *Brownian*-ске губитке [196]. Сходно томе, са смањењем дебљине површинске облоге, од  $DEX@Fe_3O_4$  до немодификованих  $Fe_3O_4$ , SAR вредност би требало да расте. Такође, фактор који утиче на SAR је сатурациона магнетизација која зависи од врсте облоге (модификатора). Са повећањем дебљине слоја облоге и молекулске масе површинског модификатора,  $M_S$  ће се смањивати а последично и топлотна ефикасност. Услед добре колоидне стабилности и хидродинамичког пречника у опсегу погодном за медицинску примену (видети потпоглавље 2.1.4.3), APS као и CA се могу предложити за површинску модификацију магнетита за хипертермијску примену.

У клиничкој примени МНЧ потребно је обратити пажњу и на физиолошка ограничења када су у питању спољашњи параметри (фреквенција и јачина примењеног поља) [197]. Магнетно поље високих фреквенција и јачина може услед појаве вртложних струја изазвати загревање околних здравих ткива у којима се не налазе МНЧ. У експериментима МХ при изради ове докторске дисертације, вредност спољашњих параметара (параметра поља) је била,  $H\cdot f = 4,5 \cdot 10^9 \text{ A}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (примењена фреквенција  $252 \text{ kHz}$  и магнетно поље јачине  $15,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ) што је у наведеним границама за потенцијалну клиничку примену и спада у опсег *Hergt*-овог ограничења. Веће вредности фреквенција ( $397 \text{ kHz}$  и  $577 \text{ kHz}$ ) су коришћене само ради поређења ефикасности грејања како би се потврдила колоидна стабилност наночестица, поређењем SAR и *ILP* вредности, из разлога што се мање стабилне суспензије МНЧ додатно агрегирају по утицајем јачих магнетних поља. Осим клиничких, потребно је посебно обратити пажњу и на техничка ограничења уређаја за МХ, из разлога што је већина хипертермијских истраживања на биолошким ткивима извршена у веома уском опсегу примењених фреквенција и поља [197].



Слика 5.5. (А) Кинетичке криве грејања мерене у магнетном пољу јачине од  $15,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  и фреквенције од  $252 \text{ kHz}$  и (Б) SAR вредности одређене из нагиба кинетичких кривих.

## 5.2. Магнетне наночестице добијене микроталасима потпомогнутом хидротермалном синтезом

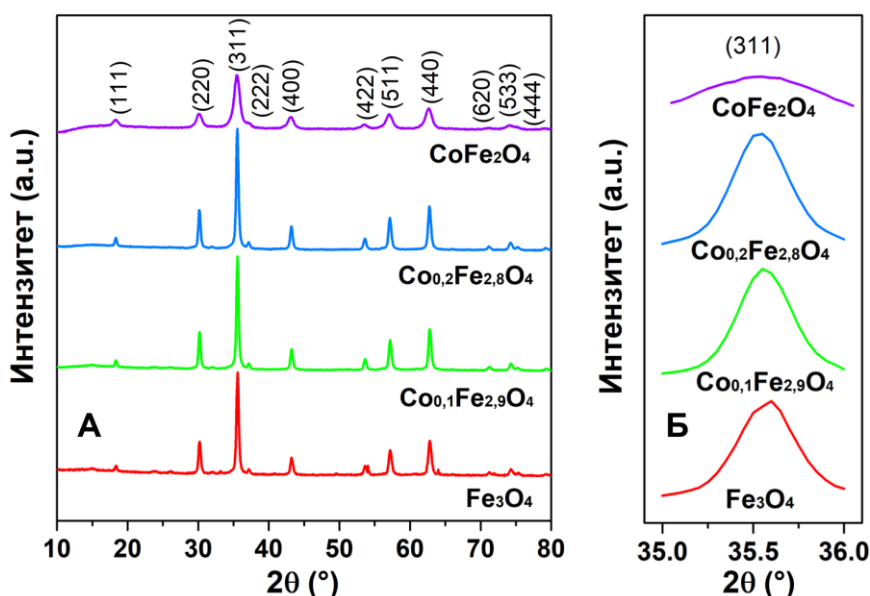
### 5.2.1. Co<sub>x</sub>Fe<sub>3-x</sub>O<sub>4</sub> наночестице

Микроталасима потпомогнутом хидротермалном синтезом након реакције таложења на собној температури, синтетисане су кобалтом супституисане наночестице магнетита (4.1.2).

#### 5.2.1.1. Структурна и микроструктурна анализа Co<sub>x</sub>Fe<sub>3-x</sub>O<sub>4</sub>

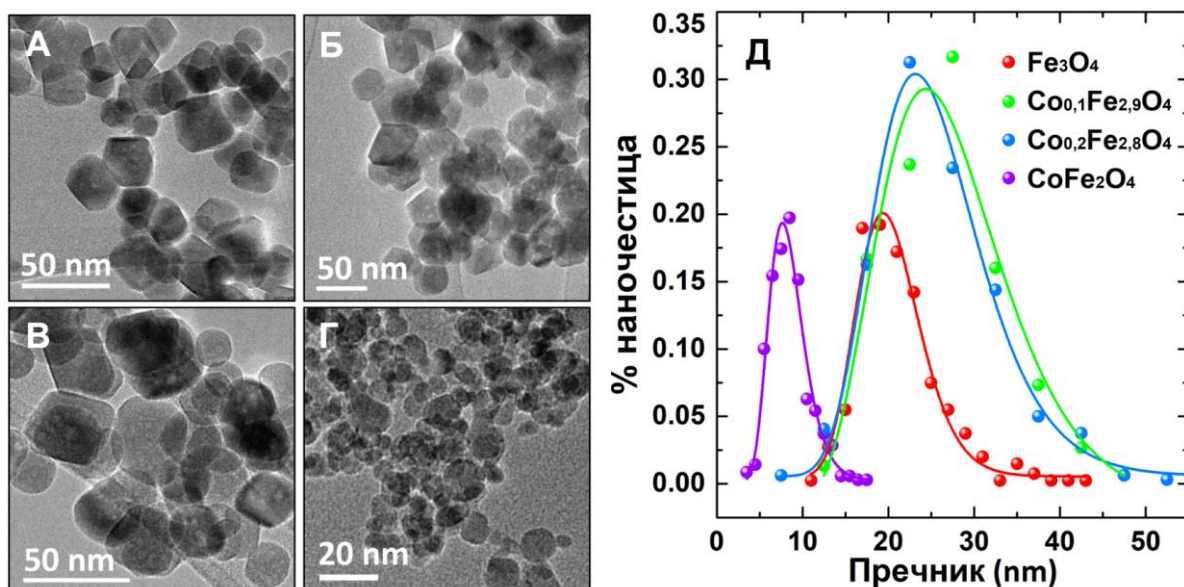
Дифрактограми Co<sub>x</sub>Fe<sub>3-x</sub>O<sub>4</sub> наночестица су приказани на слици 5.6. Све рефлексије је могуће индексирати у кубичном типу спинелне структуре (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, PDF #221086). Ужи дифракциони максимуми указују на високу кристаличност наночестица. Израчунате вредности параметара решетке за серију Co<sub>x</sub>Fe<sub>3-x</sub>O<sub>4</sub> биле су у распону између  $8,36 \text{ \AA}$  и  $8,38 \text{ \AA}$ , и оне су блиске литературним подацима за кобалт ферит ( $a \approx 8,37 \text{ \AA}$ ) [198]. Промена параметра решетке Co<sub>x</sub>Fe<sub>3-x</sub>O<sub>4</sub> наночестица се може приписати утицају јонских радијуса саставних јона. У процесу грађења мешовитих оксида долази до замене јона Fe<sup>2+</sup> ( $0,77 \text{ \AA}$ ) у магнетиту мањим јонима Co<sup>2+</sup> ( $0,70 \text{ \AA}$ ), што има за последицу промене катјон-анјон растојања у тетраедарским (8a) и октаедарским (16d) положајима у спинелном типу структуре, а самим тим и промену параметара решетке са променом концентрације једног од катјона. Узимајући у обзир да су октаедарски положаји просторно већи од тетраедарских, већа заузетост октаедарских мањим металним катјонима кобалта ће довести до смањења параметра решетке. Добијени подаци за параметар решетке указују на супституцију јона гвожђа јонима кобалта на октаедарским положајима, односно да јони кобалта имају преференцију ка тим положајима.

Повећавање концентрације јона Co<sup>2+</sup> у узорцима је условило померање најинтензивније (311) рефлексије ка нижим  $2\theta$  угловима, слика 5.6Б. Овај резултат указује на пораст параметра решетке. Средња величина кристалита испитиваних узорака ( $D_{XRPD}$ ) одређена је применом Scherrer-ове формуле (једначина 2.19) и приказана је у табели 5.2. Као што се може запазити, вредности кристалита су јако сличне за магнетит, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и кобалтом супституисан магнетит са саставом  $x = 0,1$  и  $0,2$ , док је за CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> величина кристалита значајно нижа. Добијени резултат указује на утицај хемијског састава на микроструктурне параметре, у случају Co<sub>x</sub>Fe<sub>3-x</sub>O<sub>4</sub> наночестица на величину кристалних домена. Кобалт има упоредив јонски радијус са гвожђем



Слика 5.6. (А) Дифрактограми  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  наночестица и (Б) постепено померање положаја (311) рефлексije при промени концентрације кобалта.

(0,70 Å и 0,77 Å за  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$  у октаедарској координацији [199]), па промена величине кристалита није директно последица величине радијуса катјона  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{2+}$ . Сличан резултат је добијен и за наночестице цинк-ферита где је показано да се величина кристалита мења у зависности од састава [200]. Детаљна структурна анализа узорака која укључује и дистрибуцију катјона у два нееквивалентна кристалографска положаја није извршена. Расподела катјона вероватно има удела на величину кристалита, мада, највероватније је да највећи утицај има хемијски састав. Може се претпоставити да са повећањем концентрације кобалта нуклеација постаје спонтана и величина честица се смањује, док ниска концентрација прекурсора кобалта успорава процес нуклеације честица а тиме и ток реакције, што доводи до раста кристала.



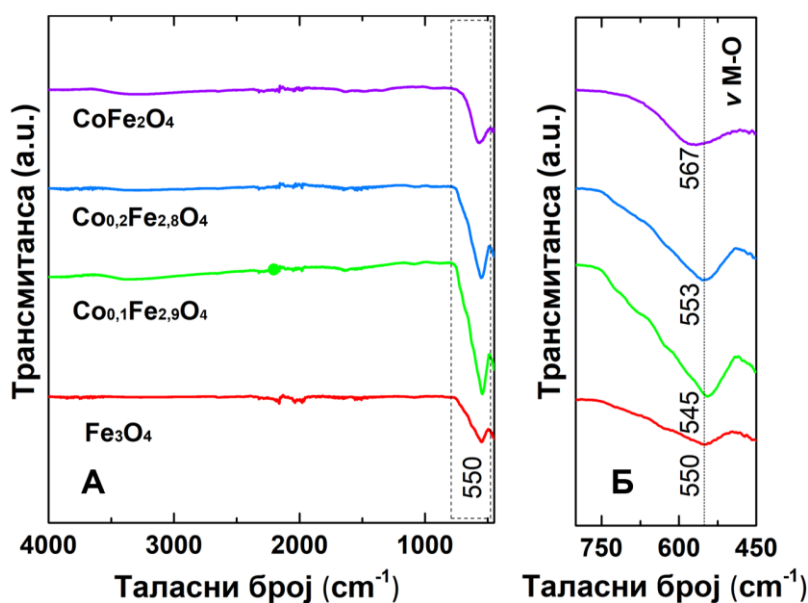
Слика 5.7. ТЕМ слике узорка (А)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; (Б)  $\text{Co}_{0,1}\text{Fe}_{2,9}\text{O}_4$ ; (В)  $\text{Co}_{0,2}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$ ; (Г)  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  и (Д) логнормална расподела честица по величини.

Додатно, поред анализе величине кристалних домена из података дифракције X-зрака, величина честица синтетисаних узорака је одређена трансмисионом електронском микроскопијом. Изабране ТЕМ слике су приказане на слици 5.7А-Г. За сваки од узорака анализирано је око 200 честица у циљу утврђивања њихове дистрибуције по величини.



Расподеле честица су приказане на **слици 5.7Д**. Ужа расподела је нађена у случају бинарних узорака, док су код тернарних узорака расподеле шире и скоро идентичне, мада је хемијски састав ова два узорка веома сличан. Величине честица одређене из анализе ТЕМ слика ( $D_{TEM}$ ) су дате у **табели 5.2**. Најмање честице су за  $CoFe_2O_4$  ( $8 \pm 2$ ) nm док су значајно веће код остала три узорка. Резултат ТЕМ анализе указује да концентрација кобалта (тј. однос Fe/Co јона) у узорцима утиче на раст и коначну величину честица, што је у сагласности са резултатима добијеним из података дифракције X-зрака. Ако се упореде резултати за величину кристалита и величину честица, може се рећи да су честице састављене у просеку од једног до два кристалита. Додатно је анализирана морфологија честица. Облик наночестица је сферан за магнетит, док се код осталих узорака запажа комбинација хексагоналних и октагоналних облика, **слика 5.7**.

FT-IC спектри синтетисаних узорака, снимани у региону од  $4000\text{ cm}^{-1}$  до  $400\text{ cm}^{-1}$ , не показују присуство остатака органских фаза (**слика 5.8А**). У спектрима се у такозваном региону отиска прста уочава трака која потиче од истежуће вибрације метал-кисеоник, Me-O (Me = Co, Fe) везе, као што је приказано на **слици 5.8Б**. Из ових спектра се може закључити да је са порастом концентрације кобалта дошло до померања трака које потичу од истежућих вибрација метал-кисеоник веза на тетраедарским ( $8a$ ) и октаедарским ( $16d$ ) положајима ка већим вредностима таласних бројева. Вредност истежуће вибрације метал-кисеоник фазе за магнетит ( $Fe_3O_4$ ) износи  $550\text{ cm}^{-1}$ , док је за кобалт ферит вредност  $567\text{ cm}^{-1}$ . Узимајући у обзир вредности које су у литератури наведене за несупституисани магнетит ( $570\text{ cm}^{-1}$ ) и кобалт ферит ( $575\text{ cm}^{-1}$ ) [201], може се закључити да ова промена настаје као последица постепене супституције јона гвожђа јонима кобалта унутар кристалне решетке магнетита.



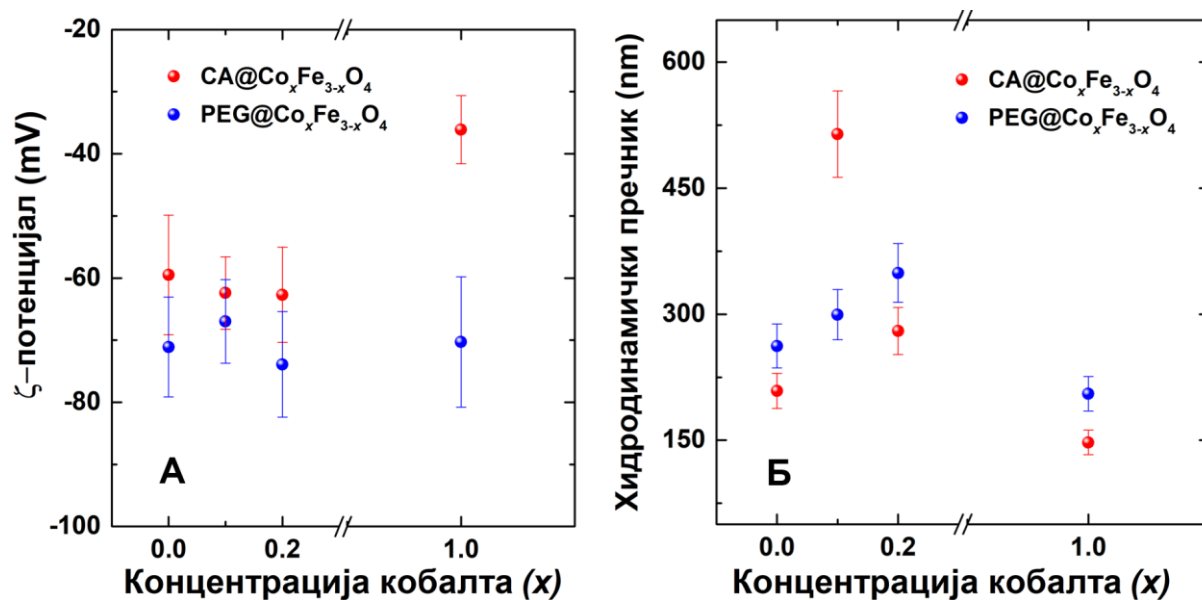
**Слика 5.8.** (А) FT-IC спектри узорака  $Co_xFe_{3-x}O_4$  и (Б) увећање региона отиска прста FT-IC спектра који показује траку која потиче од истежуће вибрације метал-кисеоник везе.

**Табела 5.2.** Подаци о хемијском саставу, величини кристалита ( $D_{XRPD}$ ), параметру решетки ( $a$ ), величини честица ( $D_{TEM}$ ), хидродинамичког пречника ( $D_h$ ) и индексима полидисперзности ( $\sigma_{TEM}$  и  $\sigma_h$ ) за  $Co_xFe_{3-x}O_4$  наночестице

Узорак	Хемијски састав (ICP-OES)	$D_{XRPD}$ (nm)	$a$ (Å)	$D_{TEM}$ (nm)	$\sigma_{TEM}$ (%)	$D_h$ (nm)	$\sigma_h$ (%)
$Fe_3O_4$	$Fe_3O_4$	17,1(0)	8,374(9)	20,1	19	268	25,2
$Co_{0,1}Fe_{2,9}O_4$	$Co_{0,10}Fe_{2,90}O_4$	18,7(7)	8,360(5)	26,5	30	304	16,6
$Co_{0,2}Fe_{2,8}O_4$	$Co_{0,20}Fe_{2,80}O_4$	17,5(6)	8,366(7)	24,8	26	335	11,8
$CoFe_2O_4$	$Co_{0,98}Fe_{2,02}O_4$	6,6(8)	8,371(9)	8,2	26	205	36,5

Испитиване  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  наночестице су облагане лимунском киселином и поли(етилен гликолом) у циљу њихове стабилизације у течном медијуму. Вредности зета потенцијала на рН 7 површински модификованих наночестица су мањи од  $-30$  mV, **слика 5.9А**. Како су необложене наночестице позитивно наелектрисане на физиолошком рН (видети потпоглавље 5.1.2), овакви резултати могу указати да је успешно извршена електростатичка стабилизација колоидне суспензије СА и PEG лигандима.

Величина честица у хидратисаном стању је у припремљеним колоидима одређена DLS методом (**слика 5.9Б**) и износи између 200 nm ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) и 330 nm ( $\text{Co}_{0,2}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$ ). Поређењем резултата добијених TEM и DLS мерењима (**табела 5.2**) може се уочити да је просечна величина честица добијена TEM мерењима вишеструко мања од вредности DLS мерења. Овакве вредности би се могле очекивати имајући у виду да се мерењем хидродинамичког пречника DLS методом узима у обзир и додата хидратисана сфера растварача или молекула који се користи за површинску модификацију, док се TEM мерењима добијају информације о величини кристалне фазе и евентуално аморфног танког слоја на површини. Осим тога, потребно је нагласити да се DLS мерењима могу добити информације и о величини агрегата, док се TEM техником мере индивидуалне честице у осушеном стању. Високе вредности хидродинамичког пречника понекад указују да долази до спонтаног организовања наночестица у агломерате, што доводи до дестабилизације суспензије наночестица. У таквим случајевима МНЧ су непогодне за медицинске примене где се захтева висока стабилност колоида [202].



**Слика 5.9.** (А) Зависност зета потенцијала од концентрације Co у  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  за различите облоге и (Б) Хидродинамички пречник у зависности од садржаја кобалта за  $\text{CA@Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  и  $\text{PEG@Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  ( $x = 0; 0,1; 0,2$  и  $1$ ).

### 5.2.1.2. Магнетне особине наночестица $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$

Да би одредили основне магнетне карактеристике синтетисаних  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  наночестица, измерена је магнетизација на собној температури у пољу од  $-30$  kOe до  $+30$  kOe ( $M = f(H)$ ), као и зависност магнетизације од температуре  $M = f(T)$  у пољу до 100 Oe у температурском опсегу од 5 K до 300 K. Резултати мерења су приказани на **слици 5.10**. Све  $M = f(H)$  криве показују хистерезисно понашање без појаве аномалних облика. Вредности сатурационе магнетизације, коерцитивности и реманентне магнетизације су приказане у **табели 5.3**. Може се уочити да вредности  $M_s$ ,  $H_C$  и  $M_R$  достижу максимум за  $\text{Co}_{0,2}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$ .

Може се претпоставити да се повећање вредности магнетних параметара за  $\text{Co}_{0,2}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$  може приписати ефектима катјонске расподеле јона  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$ . Од расподеле катјона по

кристалографским положајима зависе јачине суперизменских интеракција између јона у оквиру истих кристалографских положаја (8a и 16d) и између јона који се налазе у поменутиим нееквивалентним кристалографским положајима. Истраживања катјонске расподеле уобичајено се раде утачњавањем кристалне структуре из података дифракције на праху користећи различите софтверске пакете (најчешће *Topas*, *Fullprof*, *WPPM* и *PDFfit*), или из података *Mössbauer*-ове спектроскопије [203]. Детаљна структурна анализа која укључује и расподелу катјона није предмет тренутних истраживања. Са становишта потенцијалне медицинске примене наночестица, важно је синтетисати наночестице високе вредности сатурационе магнетизације [204] јер је то један од параметара који утиче на *SAR* вредност, а значајан је и приликом навођења наночестица спољним магнетима на циљана места у *in vivo* применама. Достицањем високе  $M_S$  вредности смањила би се неопходна количина материјала потребна за постизање жељеног магнетног одговора, тј. количина материјала коју треба унети у туморско ткиво у случају примене наночестица у терапији. Резултати мерења указују (табела 5.3) да се ефективно повећање  $M_S$  може постићи синтезом мешовитих ферита са више јона различитих валенци у структури.

Утицај концентрације кобалта у  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  на вредност магнетних параметара је показан од стране *Burne*-а и сарадника [205]. Добијене вредности магнетних параметара су биле значајно ниже у поређењу са овде синтетисаним наночестицама  $\text{Co}_{0,2}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$ . *Burne*-а и сарадници су за  $H_C$   $\text{Co}_{0,2}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$  добили вредност 390 Ое, која је порасла са 50 Ое код  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Код сатурационе магнетизације забележен је пад вредности за око  $6,7 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$  за  $\text{Co}_{0,2}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$  у поређењу са  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , док је реманентна магнетизација порасла за око  $7,2 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$ . Као што се може видети из табеле 5.3, поређењем магнетних особина магнетита и  $\text{Co}_{0,2}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$ ,  $H_C$  је са 91 Ое порасла на 1070 Ое. Поред тога, забележен је и пораст сатурационе магнетизације за  $4,5 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$  као и реманентне магнетизације за чак  $21,9 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$  код мешовитог узорка у поређењу са магнетитом. Мада је вредност  $M_S$  код  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  нижа у односу на  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , у литератури се наводи и другачији случај.

**Табела 5.3.** Коерцитивно поље ( $H_C$ ), реманентна магнетизација ( $M_R$ ), сатурациона магнетизација ( $M_S$ ) и редукована реманентна магнетизација ( $M_R/M_S$ ) за  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  на 300 К

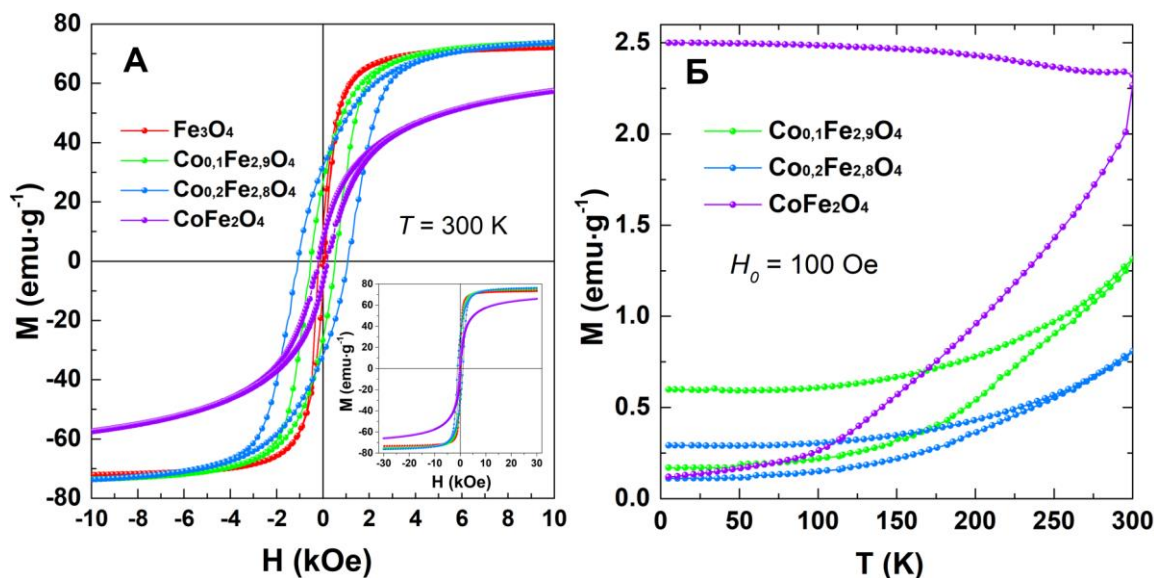
Узорак	$H_C$ (Ое)	$M_R$ ( $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$M_S$ ( $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$M_R/M_S$
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	$91 \pm 1$	$9,98 \pm 0,02$	$73,3 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,02$
$\text{Co}_{0,1}\text{Fe}_{2,9}\text{O}_4$	$526 \pm 5$	$26,44 \pm 0,02$	$76,2 \pm 0,1$	$0,35 \pm 0,02$
$\text{Co}_{0,2}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$	$1070 \pm 10$	$31,86 \pm 0,02$	$77,8 \pm 0,3$	$0,41 \pm 0,07$
$\text{CoFe}_2\text{O}_4$	$189 \pm 2$	$7,10 \pm 0,02$	$71,7 \pm 0,1$	$0,10 \pm 0,02$

На основу података из табеле 5.3 израчуната је вредност редуковане реманентне магнетизације ( $M_R/M_S$ ) и она за  $\text{Co}_{0,1}\text{Fe}_{2,9}\text{O}_4$  износи 0,35, док је за  $\text{Co}_{0,2}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$  0,41. Теоријска вредност редуковане реманенције је 0,5 за систем неинтерагујућих честица. Снижење ове вредности настаје услед међучестичних интеракција и микронапрезања [206]. Иако су 0,41 и 0,35 далеко од вредности која се очекује за кубну анизотропију (теоријска вредност износи 0,83), добијени резултати указују да постепена супституција јона  $\text{Co}^{2+}$  доводи до стварања мешовитих кубичних и једноосних анизотропних наночестица, док наночестице на крају серије,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , поседују једноосну анизотропију [207].

Добијени подаци сугеришу да се уградњом јона  $\text{Co}^{2+}$  у кристалну решетку магнетита повећава вредност сатурационе магнетизације у поређењу са несупституисаним наночестицама магнетита. Међутим, код кобалт ферита ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) је примећено значајно смањење сатурационе магнетизације као и снижавање анизотропије. Осим редуције  $M_S$  вредности уочава се и приближавање суперпарамагнетном стању са порастом концентрације кобалта (нижа вредност  $H_C$  у поређењу са  $\text{Co}_{0,1}\text{Fe}_{2,9}\text{O}_4$  и  $\text{Co}_{0,2}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$ ). Ефекат се може приписати и смањењу величине честица  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  на  $(8 \pm 2) \text{ nm}$ , што резултује већом вредношћу односа

површине и запремине (енг. *Surface/Volume* -  $S/V$ ) појединачних честица и већег степена магнетне неуређености на површини - површински ефекти [208].

Информације о температури блокирања ( $T_B$ ) (односно температури прелаза у *spin-glass* стање) су добијене испитивањем магнетизације узорака хлађеног у пољу јачине 100 Ое и хлађеног без присуства спољашњег магнетног поља. Резултати приказани на **слици 5.10Б** показују да је код свих узорака из серије  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  температура блокирања изнад собне, зато што се не запажа видљиви максимум испод 300 К.



**Слика 5.10.** (А) Магнетизација у зависности од јачине поља на 300 К у областима ниских поља и (Б) Зависност магнетизације од температуре у  $ZFC/FC$  режиму мерења. Уметнута слика на 5.10А је  $M = f(H)$  крива у областима високих поља.

На основу добијених резултата може се закључити да концентрација кобалта у  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  има велику улогу на еволуцију величине честица као и на магнетне особине синтетисаних материјала. Највећу вредност коерцитивности од 1070 Ое и сатурационе магнетизације од  $77,8\text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$  су показале наночестице хемијског састава  $\text{Co}_{0.2}\text{Fe}_{2.8}\text{O}_4$ . Резултати указују да коришћена метода синтезе нуди могућност контролисане промене микроструктуре и магнетних особина наночестица кроз модификацију хемијског састава и услова синтезе, па се може сматрати добром за даља истраживања ка постављеном циљу ове докторске дисертације. Узорци састава  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  нису тестирани за примене у МХ, али сâм метод синтезе је даље развијан и по сличном принципу су синтетисане наночестице  $\text{Mg}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ . Подаци из литературе указују да садржај кобалта у  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  има значајан ефекат на топлотну ефикасност. Нађено је да је оптималан садржај кобалта за  $x = 0,6$ , када се постиже вредност  $SAR$  од  $117,12\text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$  [209]. Концентрација кобалта има утицај на константу анизотропије која значајно утиче на ефикасност грејања наночестица. Код наночестица  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  ( $x = 0-1$ ) просечне величине 8,0-8,5 nm примећен је значајан пораст  $SAR$  вредности за  $x = 0,2$  у поређењу са чистим магнетитом [210].

### 5.2.2. $\text{Mg}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ наночестице

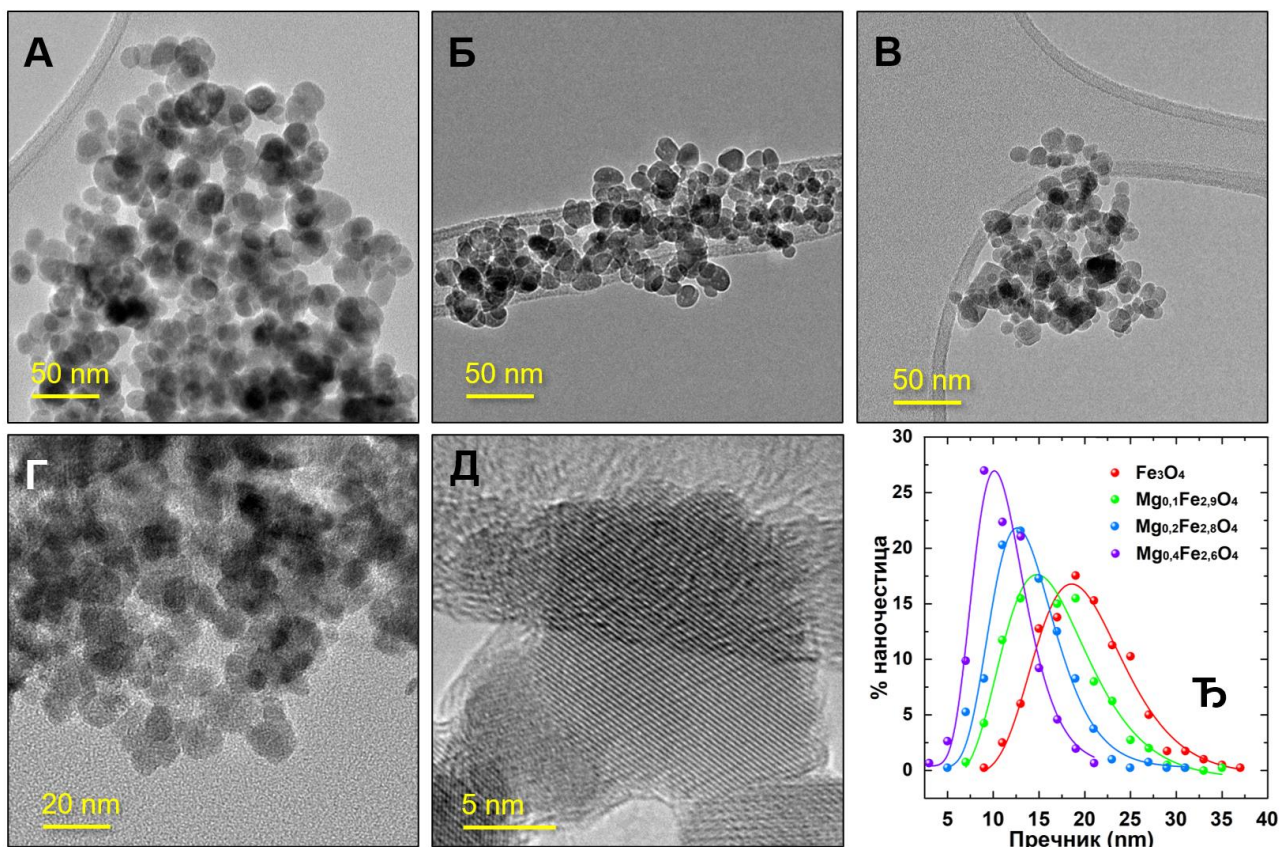
Даљи развој методе хидротермално-микроталасне синтезе односио се на испитивање утицаја замене јона гвожђа јонима магнезијума у магнетиту. Магнезијум има сличан јонски радијус као гвожђе, па је било за очекивати замену у широком опсегу концентрација, без издвајања нежељених фаза. Узорци  $\text{Mg}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  ( $x = 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8$  и 1) су припремљени користећи протокол синтезе који је дат у потпоглављу 4.1.2.

### 5.2.2.1. Структурна и микроструктурна карактеризација $Mg_xFe_{3-x}O_4$

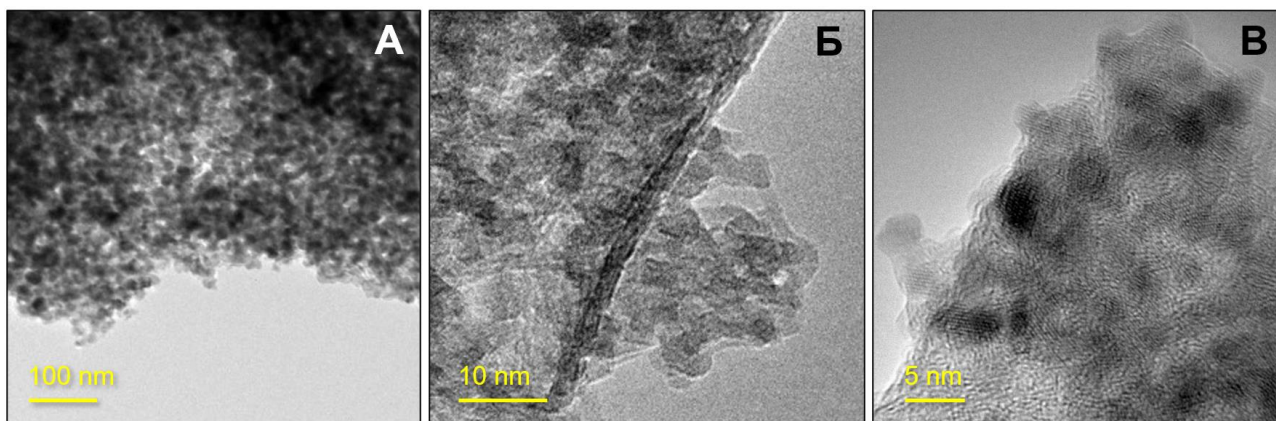
Изабране ТЕМ слике серије узорак  $Mg_xFe_{3-x}O_4$  са концентрацијама магнезијума  $x = 0; 0,1; 0,2$  и  $0,4$  приказане су на слици 5.11. Анализом већег броја честица магнетита ( $x = 0$ ) утврђено је да су оне псеудо-сферне морфологије и подлежу логнормалној расподели са просечним пречником од  $19,8 \text{ nm}$  и индексом полидисперзности од  $26,1\%$  (слика 5.11А).

Променом хемијског састава, тј. са повећањем концентрације магнезијума, пречник честица се смањивао од  $16,3 \text{ nm}$  за  $Mg_{0,1}Fe_{2,9}O_4$ , преко  $13,6 \text{ nm}$  за  $Mg_{0,2}Fe_{2,8}O_4$ , све до  $10,9 \text{ nm}$  за  $Mg_{0,4}Fe_{2,6}O_4$ . Дисперзија величина честица је благо порасла од  $27,8\%$  до  $32,1\%$  (табела 5.4). Са становишта морфологије, честице су задржале облик осим код  $Mg_{0,4}Fe_{2,6}O_4$  где се примећује прелазак у хексагоналну форму, слика 5.11Д. Идентичан тренд са порастом концентрације магнезијума је запажен и у случају промене величине кристалита (одређен из података дифракције X-зрака), табела 5.4. Уочава се да су и вредности величине честица и величине кристалита сличне, што указује да су честице углавном састављене из појединачних кристалита. Одсуство дефеката је уочено анализом наночестица  $Mg_{0,4}Fe_{2,6}O_4$  (слика 5.11Д). Расподела честица по величини је приказана на слици 5.11Ђ. Уочава се да са повећањем концентрације магнезијума ( $x$  у формули  $Mg_xFe_{3-x}O_4$ ) расподела постаје ужа и смањује се средња вредност пречника честица.

ТЕМ слике узорак  $Mg_xFe_{3-x}O_4$  са  $x$  вредностима  $0,6; 0,8$  и  $1$  су приказане на слици 5.12. Запажа се да су честице мале, агломерисане и слабо кристалне, па се може закључити да примењени поступак омогућава синтезу узорак за мање концентрације магнезијума, док се за веће концентрације (укључујући и  $MgFe_2O_4$ ) добијају слабо кристални или аморфни узорци. У примењеном протоколу, додаток магнезијума ограничава раст честица и формирање кристалне фазе, па се за  $x = 0,4$  може говорити о граничној концентрацији за синтезу кристалних узорак.



Слика 5.11. ТЕМ слике узорак  $Mg_xFe_{3-x}O_4$  са вредношћу  $x$ : (А)  $0$ ; (Б)  $0,1$ ; (В)  $0,2$ ; (Г)  $0,4$  и (Д) Увећана  $Mg_{0,4}Fe_{2,6}O_4$  наночестица (Ђ) логнормална расподела честица по величини.

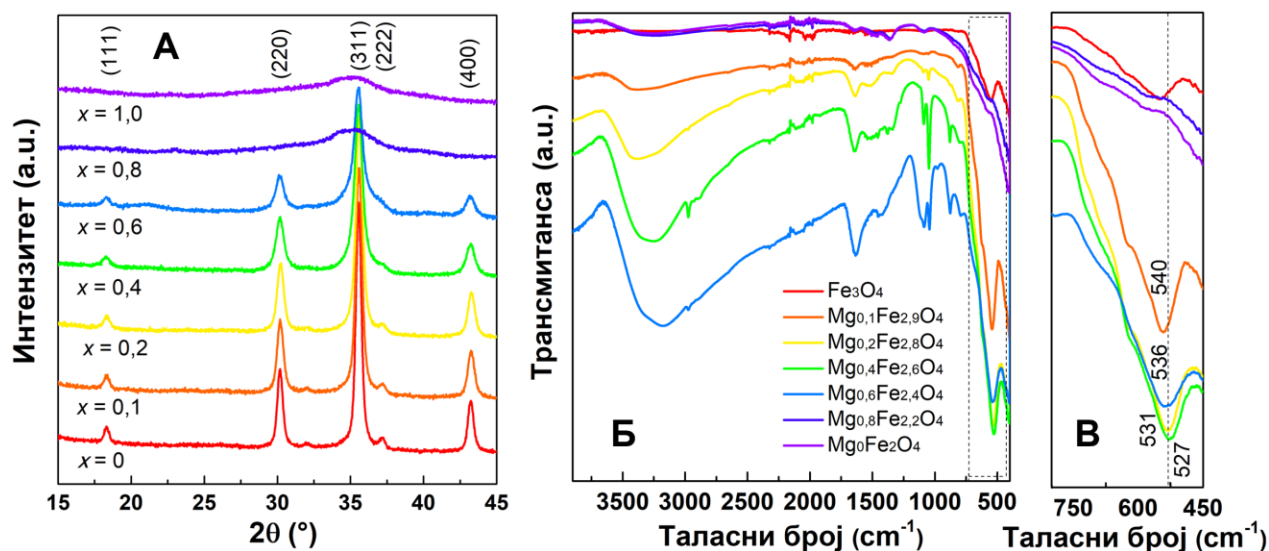


Слика 5.12. ТЕМ слике узорака  $Mg_xFe_{3-x}O_4$  са саставом  $x$ : (А) 0,6; (Б) 0,8 и (В) 1.

Анализом података дифракције Х-зрака на праху (слика 5.13А) су добијени дифрактограми наночестица  $Mg_xFe_{3-x}O_4$ . Дифрактограми су индексирани користећи стандардну ICDD картицу #73-2410 која одговара магнезијум-фериту ( $MgFe_2O_4$ ) (енг. *International Centre for Diffraction Data - ICDD*). Као што се може видети, долази до ширења дифракционих максимума са повећањем концентрације  $Mg^{2+}$  јона што сугерише на прогресивно смањење величине кристалита и/или повећање микронапрезања, слика 5.13А. Применом Scherrer-ове формуле (једначина 2.19) израчуната је величина кристалита користећи рефлексије у опсегу  $10-45^\circ$  у  $2\theta$  и резултати су приказани у табели 5.4. Величина кристалита од 15,5 nm за  $Fe_3O_4$  се смањује за узорке са већим садржајем магнезијума, тако да износи само 2,2 nm за  $MgFe_2O_4$ . Код два узорка са највећом концентрацијом магнезијума,  $Mg_{0,8}Fe_{2,2}O_4$  и  $MgFe_2O_4$ , на дифрактограмима се уочавају веома широке рефлексије ниског интензитета, што указује да су узорци слабо кристални или аморфни. Овај резултат је потврђен ТЕМ и FT-IC анализом (видети слике 5.12 и 5.13). Може се закључити да концентрација магнезијума у структури спинела има кључну улогу у формирању кристалне фазе и величине домена кохерентног расејања (кристалита). Величина кристалита се смањује са порастом концентрације магнезијума у узорцима и постаје јако мала за  $x = 0,8$  и 1 (2,4 nm и 2,0 nm). Приликом уградње јона  $Mg^{2+}$  у периодичну кристалну решетку магнетита ( $Fe_3O_4$ ) долази до индукције микронапрезања унутар кристалне решетке. Ширење дифракционих максимума са повећањем концентрације  $Mg^{2+}$  јона сугерише на прогресивно смањење величине кристалита и повећање микронапрезања. Један од могућих разлога за смањење величине кристалита и честица уградњом јона магнезијума је чињеница да је јонски радијус јона  $Mg^{2+}$  (0,57 Å) мањи у поређењу са јонским радијусом јона  $Fe^{2+}$  чија вредност износи 0,63 Å. Такође, овакво понашање може бити и последица расподеле јона по кристалографским положајима. Међутим, у великој мери метода синтезе може утицати на коначну величину честица. Сличне ефекте при супституцији  $Mg^{2+}$  јона у магнетиту су запазили и *Lv* и сарадници [211]. Овакви резултати могу бити јако важни за оптимизацију величине честица и кристалита као и за прецизну контролу физичких особина које су повезане са величином честица, као што су магнетне и електричне.

Табела 5.4. Величина кристалита ( $D_{XRD}$ ), параметри решетке ( $a$ ), величина честица ( $D_{TEM}$ ) и индекс полидисперзности ( $\sigma_{TEM}$ ) наночестица  $Mg_xFe_{3-x}O_4$  ( $x = 0,0; 0,1; 0,2$  и  $0,4$ ). Просечна величина кристалита  $D_{XRD}$  је дата као средња вредност добијена из различитих рефлексија

Хемијски састав	$D_{XRD}$ (nm)	$a$ (Å)	$D_{TEM}$ (nm)	$\sigma_{TEM}$ (%)
$Fe_3O_4$	15,5(3)	8,367(2)	19,8	26,1
$Mg_{0,1}Fe_{2,9}O_4$	13,2(4)	8,361(5)	16,3	32,1
$Mg_{0,2}Fe_{2,8}O_4$	12,6(2)	8,359(6)	13,6	27,8
$Mg_{0,4}Fe_{2,6}O_4$	9,3(4)	8,359(1)	10,9	28,1



**Слика 5.13.** (А) Дифрактограми  $Mg_xFe_{3-x}O_4$  наночестица; (Б) FT-IC спектри са најинтензивнијим вибрационим модовима и (В) увећан регион отиска прста FT-IC спектра који показује истезање метал-кисеоник везе.

Резултати FT-IC анализе су коришћени да би се потврдило присуство молекула заосталих након синтезе МНЧ. Приликом синтезе, испирање је извршено у више фаза како би се уклонили споредни производи реакције. Код свих FT-IC спектра се појављују вибрациони модови у опсегу IC зрачења између  $2000\text{ cm}^{-1}$  и  $2300\text{ cm}^{-1}$ , што представља артефакт инструмента, па се могу занемарити. Анализом FT-IC спектра  $Mg_{0,2}Fe_{2,8}O_4$ ,  $Mg_{0,4}Fe_{2,6}O_4$  и  $Mg_{0,6}Fe_{2,4}O_4$  уочени су вибрациони модови  $=S=O$  група који су типични за остатке сулфата у узорцима (слика 5.13Б). FT-IC анализом се могу добити и информације о неорганској фази, као нпр. о истежућим модовима метал-кисеоник везе у спинелним структурама који упадају у опсег отиска прста. Истежући мод тетраедарске везе метала и кисеоника ( $\nu_1$ ) између  $Fe^{3+}$  и  $O^{2-}$  је померен према нижим вредностима таласних бројева када се концентрација магнезијума повећава [212]. Вредност се са  $540\text{ cm}^{-1}$  за  $Mg_{0,1}Fe_{2,9}O_4$  смањила на  $527\text{ cm}^{-1}$  за узорак  $Mg_{0,4}Fe_{2,6}O_4$  (слика 5.13В). Као и код серије  $Co_xFe_{3-x}O$ , овакав тренд се може протумачити као постепена супституција јона гвожђа јонима магнезијума унутар кристалне решетке. Вредности добијених вибрационих модова  $\nu_1$   $Mg_xFe_{3-x}O_4$  су у складу са вредностима за  $MgFe_2O_4$  раније забележеним у литератури [213].

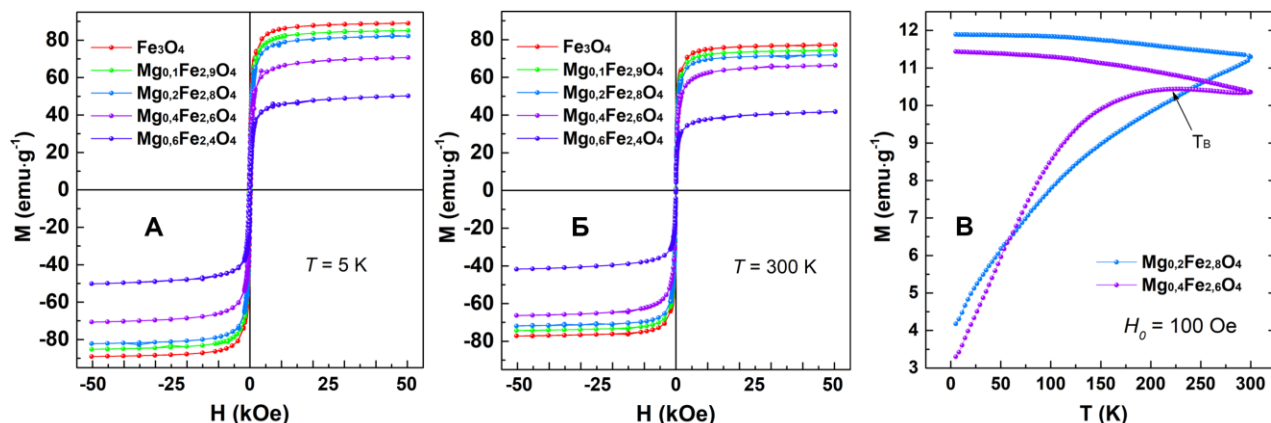
#### 5.2.2.2. Магнетне особине наночестица $Mg_xFe_{3-x}O_4$

У циљу одређивања магнетних карактеристика синтетисаних честица, мерена је магнетизација на 5 К и 300 К у пољу од  $-50\text{ kOe}$  до  $+50\text{ kOe}$  ( $M = f(H)$ ), као и зависност магнетизације од температуре  $M = f(T)$  у пољу од 100 Oe у температурском опсегу од 5 К до 300 К, за два изабрана узорка. Резултати мерења су приказани на сликама 5.14А, Б. Све  $M = f(H)$  криве показују хистерезисно понашање без појаве аномалних облика. Вредности сатурационе магнетизације, коерцитивности и реманентне магнетизације су сумиране у табели 5.5. Може се уочити да је вредност  $M_S$  највиша за магнетит, док замена јона гвожђа у магнетиту јоном магнезијума доводи до смањења сатурационе магнетизације, са њеним значајним падом почев од  $Mg_{0,4}Fe_{2,6}O_4$ .

Ово се може објаснити заменом магнетног јона гвожђа немагнетним јоном магнезијума. Значајан утицај на вредност  $M_S$  има и расподела јона магнезијума и гвожђа у спинелној структури. Познато је да магнетне интеракције јона унутар тетраедарских (8a) и октаедарских положаја (16d) и између та два положаја одређују у значајној мери вредност магнетизације. Осим тога, на површини наночестица катјон-анјон везе које постоје у унутрашњости су нарушене и често се кристална симетрија површинског слоја разликује од унутрашњости

наночестице [214]. Површина наночестица се одликује магнетним разуређењем, и овај ефекат на магнетизацију је све израженији са смањењем величине наночестица [206].

Информације о температури блокирања су добијене испитивањем магнетизације узорка хлађеног у пољу јачине 100 Oe и хлађеног без присуства спољашњег магнетног поља. Резултати приказани на **слици 5.14В** показују да је код узорка  $Mg_{0,2}Fe_{2,8}O_4$  температура блокирања изнад 300 K, док је код узорка  $Mg_{0,4}Fe_{2,6}O_4$  температура блокирања на око 225 K. У овој дискусији је претпостављено да ансамбл наночестица из суперпарамагнетног стања прелази у блокирано стање.



**Слика 5.14.** (А) Магнетизација у зависности од јачине поља на 5 K; (Б) Магнетизација у зависности од јачине поља на 300 K и (В) Зависност магнетизације од температуре у ZFC/FC режиму за  $Mg_{0,2}Fe_{2,8}O_4$  и  $Mg_{0,4}Fe_{2,6}O_4$ .

**Табела 5.5.** Коерцитивно поље ( $H_C$ ), сатурациона магнетизација ( $M_S$ ) и реманентна магнетизација ( $M_R$ ) за  $Mg_xFe_{3-x}O_4$  наночестице на температури 5 K и 300 K

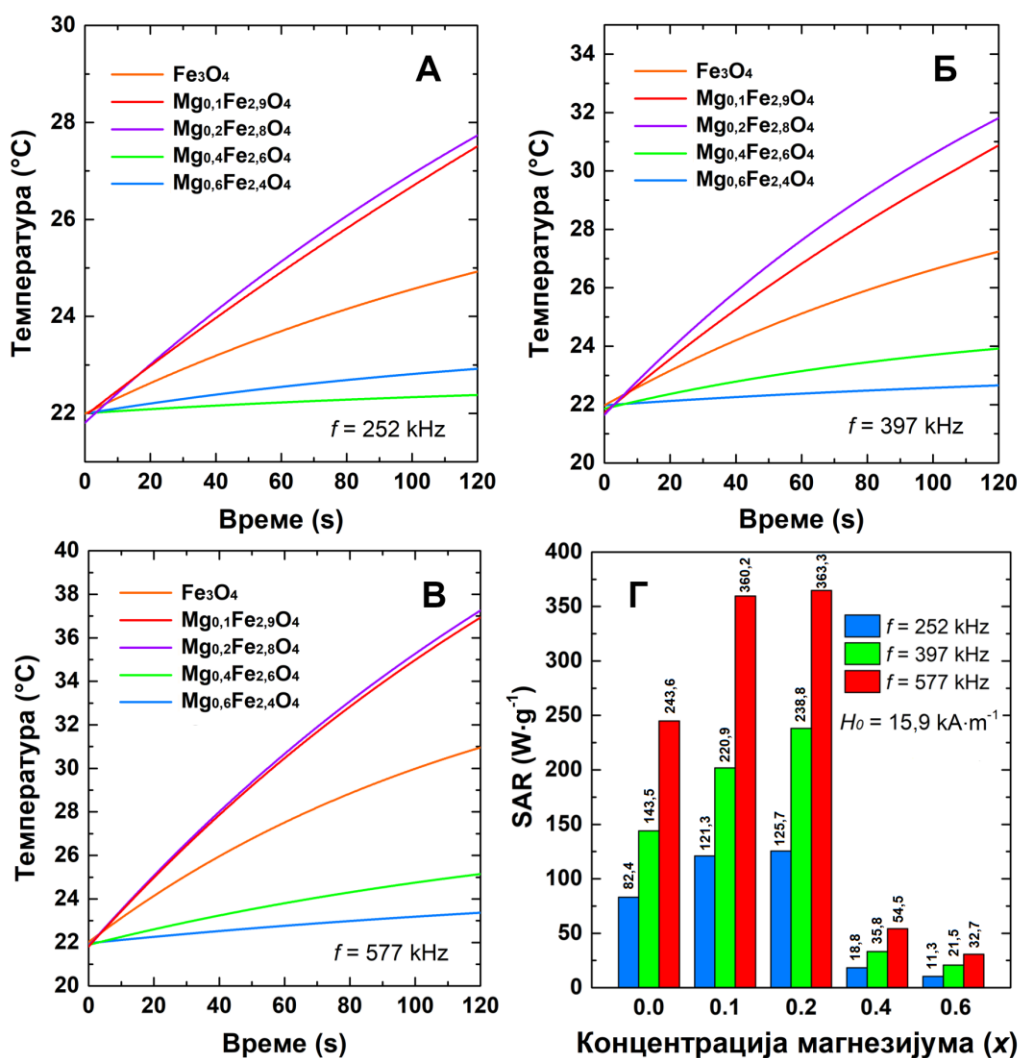
Узорак	$T = 5 \text{ K}$			$T = 300 \text{ K}$		
	$M_S$ ( $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$H_C$ (Oe)	$M_R$ ( $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$M_S$ ( $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$ )	$H_C$ (Oe)	$M_R$ ( $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$ )
$Fe_3O_4$	$89,0 \pm 0,1$	$260 \pm 5$	$22,10 \pm 0,05$	$77,3 \pm 0,1$	$8 \pm 1$	$1,25 \pm 0,05$
$Mg_{0,1}Fe_{2,9}O_4$	$85,2 \pm 0,1$	$170 \pm 5$	$19,10 \pm 0,05$	$74,4 \pm 0,1$	$9 \pm 1$	$1,20 \pm 0,05$
$Mg_{0,2}Fe_{2,8}O_4$	$82,5 \pm 0,1$	$185 \pm 5$	$17,10 \pm 0,05$	$71,9 \pm 0,1$	$6 \pm 1$	$0,60 \pm 0,05$
$Mg_{0,4}Fe_{2,6}O_4$	$70,7 \pm 0,1$	$170 \pm 5$	$16,00 \pm 0,05$	$66,4 \pm 0,1$	$1 \pm 1$	$0,12 \pm 0,05$
$Mg_{0,6}Fe_{2,4}O_4$	$50,3 \pm 0,1$	$235 \pm 5$	$13,50 \pm 0,05$	$41,8 \pm 0,1$	$9 \pm 1$	$0,55 \pm 0,05$

### 5.2.2.3. Мерење специфичне брзине апсорпције $Mg_xFe_{3-x}O_4$ наночестица

Топлотна ефикасност водених суспензија  $Mg_xFe_{3-x}O_4$  наночестица у спољашњем променљивом магнетном пољу је одређена мерењем SAR вредности.

Криве грејања су измерене на три различите фреквенције ( $f = 252, 397$  и  $597 \text{ kHz}$ ) при јачини магнетног поља  $H_0 = 15,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  калориметријским поступком (**слика 5.15А-В**). Израчунате вредности SAR и ILP параметара за серију  $Mg_xFe_{3-x}O_4$  су приказане у **табели 5.6**. Добијене SAR и ILP вредности указују да се узорци са саставом  $Mg_{0,1}Fe_{2,9}O_4$  и  $Mg_{0,2}Fe_{2,8}O_4$  потенцијално могу користити као агенси за *in situ* магнетну хипертермију, уз претходну површинску модификацију биокompatibilним једињењима (**слика 5.15Г**). Њихова топлотна ефикасност је на нивоу комерцијално доступних Feridex<sup>®</sup> наночестица [215].





Слика 5.15. Криве грејања при спољашњем пољу од  $15,9 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$  и фреквенцијама: (А) 252 kHz; (Б) 397 kHz; (В) 577 kHz и (Г) Израчунате SAR вредности за  $\text{Mg}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  наночестице на три различите фреквенције при магнетном пољу јачине  $15,9 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$ .

Може се доћи до неколико закључака из резултата истраживања узорака  $\text{Mg}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ . Применом брзог и јефтиног приступа, слично као код серије магнетита у коме је део јона гвожђа замењен јонима кобалта, таложном методом праћеном хидротермалним третманом у микроталасном пољу, синтетисана је серија  $\text{Mg}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  наночестица. Са променом хемијског састава (параметра  $x$ ), праћена је промена морфолошких, микроструктурних и магнетних особина синтетисаних МНЧ и испитана је њихова способност грејања у циљу потенцијалне примене у МХ. Примењеним методом могуће је прецизно подесити параметре, тако да се добију МНЧ са својствима за циљану примену. Када се говори о медицинској примени наночестица потребно је даљим истраживањима испитати протоколе површинске модификације. Curie-ева температура ферита спинелне структуре зависи од јачина суперизменских интеракција између магнетних момената јона на тетраедарским и октаедарским положајима, а самим тим могла би бити подешавана променом хемијског састава и катјонске расподеле. Ово је значајно у примени МНЧ у клиничкој МХ, јер се контролом  $T_C$  обезбеђује заштита од прегревања ткива. Наночестице  $\text{Mg}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  су погодне за даља истраживања која се односе на везу  $T_C$  и дистрибуције јона по кристалографским положајима, са циљем да се у процесу синтезе контролише катјонска расподела. Пример из литературе је  $\text{Mn}_{0,8}\text{Zn}_{0,2}\text{Fe}_2\text{O}_4$  величине 20-25 nm са  $T_C$  која припада у опсег клинички пожељне температуре за МХ (42-46 °C) [216].

**Табела 5.6.** Вредности *SAR* и *ILP* наночестица  $Mg_xFe_{3-x}O_4$  на три различите фреквенције при јачини магнетног поља од  $15,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$

Хемијски састав	$H_0 = 15,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$					
	$f = 252 \text{ kHz}$		$f = 397 \text{ kHz}$		$f = 577 \text{ kHz}$	
	<i>SAR</i> ( $\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<i>ILP</i> ( $\text{nHm}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ )	<i>SAR</i> ( $\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<i>ILP</i> ( $\text{nHm}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ )	<i>SAR</i> ( $\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<i>ILP</i> ( $\text{nHm}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ )
$Fe_3O_4$	82,4	1,29	143,5	1,42	243,6	1,67
$Mg_{0,1}Fe_{2,9}O_4$	121,3	1,90	220,9	2,19	360,2	2,46
$Mg_{0,2}Fe_{2,8}O_4$	125,7	1,97	238,8	2,37	363,3	2,48
$Mg_{0,4}Fe_{2,6}O_4$	18,8	0,29	35,8	0,35	54,5	0,37
$Mg_{0,6}Fe_{2,4}O_4$	11,3	0,18	21,5	0,21	32,7	0,22

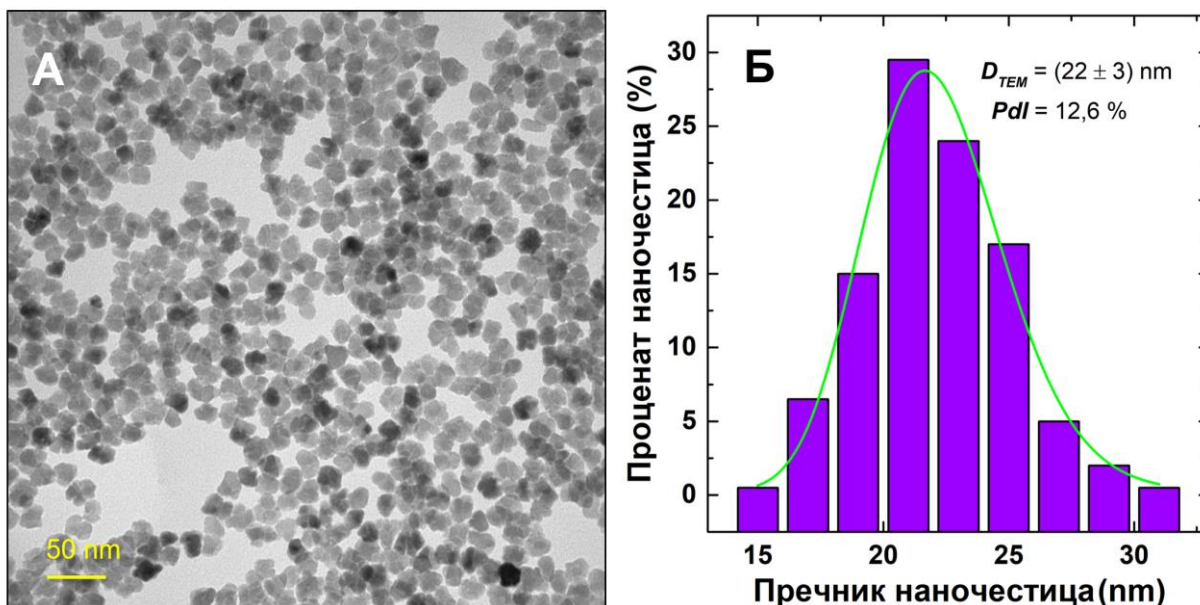
### 5.3. Магнетне наночестице добијене полиол синтезом

У циљу добијања наноагрегата цветне морфологије различитих величина синтетисане су наночестице гвожђе оксида на тачки кључања полиола, употребом два различита приступа. Први је синтеза у лабораторијском балону, док је други солвотермална синтеза у тefлонском реактору, уз сличне услове синтезе, као што је детаљно описано у 4.1.3. У наредном потпоглављу ће бити приказани резултати физичкохемијске анализе наночестица синтетисаних полиол методом на атмосферском притиску ( $IONP_A$ ).

#### 5.3.1. Наночестице добијене полиол синтезом на атмосферском притиску ( $IONP_A$ )

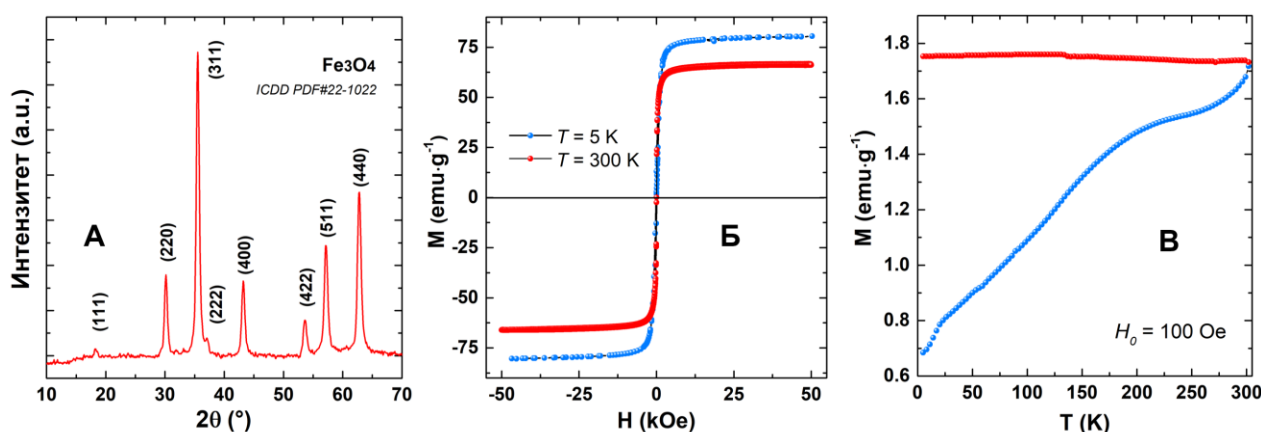
Величина и морфологија  $IONP_A$  су испитане трансмисионом електронском микроскопијом. На **слици 5.16А** је приказана типична ТЕМ слика наночестица. Наночестице су претежно у форми агломерата који имају облик цветова. Расподела величина агломерата (наноцветова) је веома уска са индексом полидисперзности од 12,6%. Просечна величина цвета је  $(22 \pm 3) \text{ nm}$ . Наноцветови су састављени од појединачних честица просечне величине 8,7 nm и подлежу нормализованој логаритамској расподели по величини (**слика 5.16Б**). Сами наноцветови су делимично агломерисани услед недостатка одговарајућег површинског модификатора који би спречио спонтано удруживање и флокулацију, што може значајно утицати на ефикасност у магнетној хипертермији.

Анализом дифрактограма приказаног на **слици 5.17А** и поређењем са референтном базом података (ICDD PDF#22e1012), утврђено је да узорак кристалише у спинелном структурном типу, без присуства неких других фаза и аномалија. Уочене су карактеристичне рефлексије за спинелну структуру: (111), (220), (311), (222), (400), (422), (511) и (440), које по позицијама одговарају просторној групи  $Fd\bar{3}m$  ( $N^{\circ} 227$ ) и идентичне су рефлексијама магнетита. Међутим, треба имати у виду да се додатне рефлексије које би указале на структурну фазу магхемита тешко уочавају у наночестичним узорцима. Из ове анализе не може се са сигурношћу тврдити да ли је синтетисани узорак магнетит или магхемит. С друге стране, тамно браон боја узорка указује на доминантну фазу магхемита, па се неорганска фаза узорка синтетисана овом методом може сматрати магхемитом, што је у сагласности са литературним подацима [217]. На основу досадашњих искустава, узорак највероватније представља мешу магнетита и магхемита, па ће се надаље означавати као наночестице гвожђе оксида.



Слика 5.16. (А) ТЕМ слика синтетисаних  $IONP_A$  и (Б) логнормална расподела наночестова по величини.

Магнетне особине  $IONP_A$  су одређене на основу вредности магнетизације у зависности од примењеног магнетног поља (хистерезисне криве), слика 5.17Б. Наночестице синтетисане оваквим поступком показују суперпарамагнетне особине на 300 К и имају мању сатурациону магнетизацију у поређењу са другим синтетисаним узорцима. Вредност  $M_S$  износи  $66,5 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$ . Експериментални подаци указују на хистерезисно понашање на 5 К (вредности коерцитивног поља и сатурационе магнетизације износе 165 Ое и  $80,5 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$ , редом). Спајање  $ZFC/FC$  кривих на слици 5.17В је последица експерименталних услова (артефакт), а не физички ефекат [218].



Слика 5.17. (А) Дифрактограм синтетисаних  $IONP_A$ ; (Б) Хистерезисне криве на 5 К и 300 К и (В) Зависност магнетизације  $IONP_A$  од температуре у  $ZFC/FC$  режиму.

### 5.3.1.1. Површинска модификација $IONP_A$ наночестица

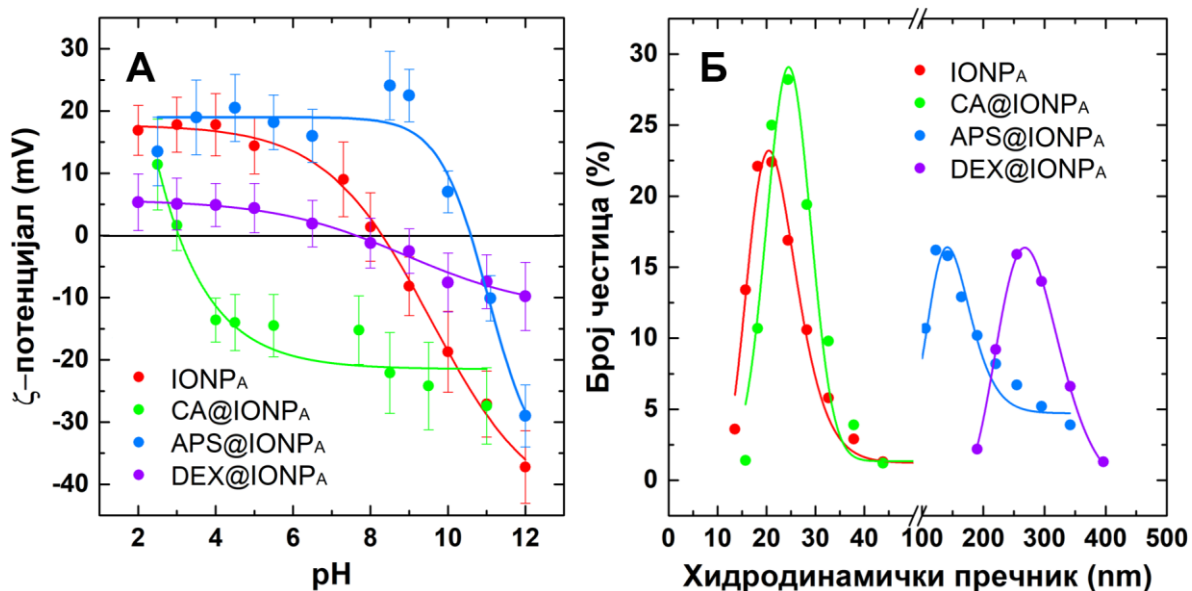
Наелектрисање површине необложених и обложених  $IONP_A$  је одређено мерењем зета потенцијала водених суспензија на различитим рН вредностима (слика 5.18А) након чега су одређене вредности изоелектричних тачака,  $pI$  (табела 5.7). Измерене вредности зета потенцијала показују да су  $IONP_A$  успешно обложене и да формирају стабилне колоиде (слика 5.18А). Изоелектрична тачка за необложене  $IONP_A$  је на рН 8,3, док при рН 7,4 потенцијал износи 8,7 mV. Везивањем молекула лимунске киселине богате слободним карбоксилним групама за површину  $IONP_A$  долази до промене наелектрисања на површини честица. На

физиолошкој рН  $CA@IONP_A$  су негативно наелектрисане са вредношћу зета потенцијала од  $-14,5$  mV. Вредност изоелектричне тачке је померена са рН 8,3 на рН 3, што представља значајно удаљавање од физиолошке рН вредности. Облагањем наночестица APS лигандом,  $pI$  је померена на рН 10,5 и суспензија је на рН 7,4 изразито позитивно површински наелектрисана, зета потенцијал износи  $16,9$  mV. Везивањем молекула декстрана за честице, наелектрисање на површини се значајно смањује и вредност зета потенцијала износи  $1,9$  mV, а  $pI$  се помера на рН 7,6. Као што је и раније примећено, стабилизација суспензије наночестица овим лигандом је искључиво стерне природе, пошто не долази до значајног електростатичког одбијања честица.

Вредности хидродинамичких пречника честица водених суспензија на рН 7 су одређене DLS методом (слика 5.18Б). Хидродинамички пречник за необложене наночестице износи  $22,6$  nm, док за  $CA$ -обложене износи  $23,9$  nm. Величина наночестица цветне морфологије одређена TEM анализом износи  $22 \pm 3$  nm. Ово слагање између  $D_H$  и  $D_{TEM}$  је резултат колоидне стабилности узорка и потврда успешног облагања лимунском киселином, који као релативно мали молекул само незнатно повећава вредност хидродинамичког пречника у односу на необложене наночестице. Вредности хидродинамичких пречника за узорке  $APS@IONP_A$  и  $DEX@IONP_A$  износе  $149,1$  nm и  $277,1$  nm, редом.

**Табела 5.7.** Хидродинамички пречници добијени DLS методом и зета потенцијали на изоелектричној тачки ( $pI$ ) и на рН 7,4 необложених и  $CA$ -,  $APS$ - и  $DEX$ -обложених  $IONP_A$

		$IONP_A$	$CA@IONP_A$	$APS@IONP_A$	$DEX@IONP_A$
$\zeta$ - потенцијал	Изоелектрична тачка, $pI$ (рН)	8,2	3,0	10,5	7,6
	Потенцијал на рН 7,4 (mV)	8,8	-14,5	16,9	1,9
DLS метода	Хидродинамички пречник, $D_H$ (nm)	22,6	23,9	149,1	277,1
	Полидисперзност, $PdI$ (%)	23,7	17,1	23,2	18,6



**Слика 5.18.** (А) Вредност зета потенцијала на различитим рН и (Б) хидродинамички пречници необложених  $IONP_A$  и обложених  $CA@IONP_A$ ,  $APS@IONP_A$  и  $DEX@IONP_A$ .

Може се закључити да код већих честица (<20 nm) просторна стабилизација суспензије није довољна, већ се наночестице морају додатно стабилизovati и електростатички јер је утицај гравитационе силе на њих знатно већи него код мањих наночестица. Измерене DLS вредности су у корелацији са молекулском масом молекула коришћених за облагање. Вредности хидродинамичких пречника наночестица обложених APS и DEX облогама су много веће од  $D_{TEM}$  што може указивати и на одређени степен агрегације честица у суспензији.

### 5.3.1.2. Радиообележавање IONPA са $^{177}\text{Lu}$ и *in vitro* стабилност $^{177}\text{Lu}$ -IONPA

У циљу добијања радиоактивних МНЧ за потенцијалну примену у радионуклидној терапији коришћени су протоколи радиообележавања који се развијају у Лабораторији за радиоизотопе Института „Винча“ (поглавље 4.4). Веома је важно применити поступак којим се радионуклид иреверзибилно везује за обложену наночестицу да би се избегла његова акумулација изван циљаног ткива или органа и на тај начин смањили радиотоксични ефекти на остале делове организма. Везивање радионуклида за наночестице може бити путем процеса адсорпције, ковалентним везивањем или индиректно преко бифункционалног лиганда који представља директну везу између МНЧ и радионуклида.

За обележавање радионуклидом  $^{177}\text{Lu}$  коришћена је директна метода која подразумева инкубацију наночестица са  $^{177}\text{Lu}$  на одређеној температури и за одређено време без примене хелатног агенса.  $^{177}\text{Lu}$  се везује за обложене IONPA преко површинских функционалних група грађењем ковалентне везе. Принос обележавања  $^{177}\text{Lu-CA@IONPA}$ ,  $^{177}\text{Lu-APS@IONPA}$  и  $^{177}\text{Lu-DEX@IONPA}$  је утврђен мерењем радиохемијске чистоће, радиохроматографском анализом тј. методом танкослојне хроматографије на силикагел-SG тракама (ITLC-SG) као стационарном фазом у 0,9% NaCl који се користи као мобилна фаза. При одређивању радиохемијске чистоће,  $^{177}\text{Lu}^{3+}$  се јавља као једини производ ослобађања из  $^{177}\text{Lu}$ -обложених IONPA. У овом систему слободни  $^{177}\text{Lu}^{3+}$  јони се померају са фронтом растварача ( $R_f = 0,9-1,0$ ), док  $^{177}\text{Lu}$ -обложене IONPA остају на месту наношења узорка ( $R_f = 0,0-0,1$ ).

У **табели 5.8** су приказани приноси обележавања  $^{177}\text{Lu}$ -IONPA при константној концентрацији наночестица  $4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  на рН 5 и при различитој температури и реакционом времену радиообележавања, одређени ITLC-SG методом.

Приноси обележавања су већ при почетним условима обележавања на  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  и након реакционог периода од 10 min били веома високи (>93%). Продужавањем трајања реакције на 30 min и 60 min примећен је само благи пораст приноса до максималних 98,4% за  $^{177}\text{Lu-CA@IONPA}$  (**табела 5.8**).

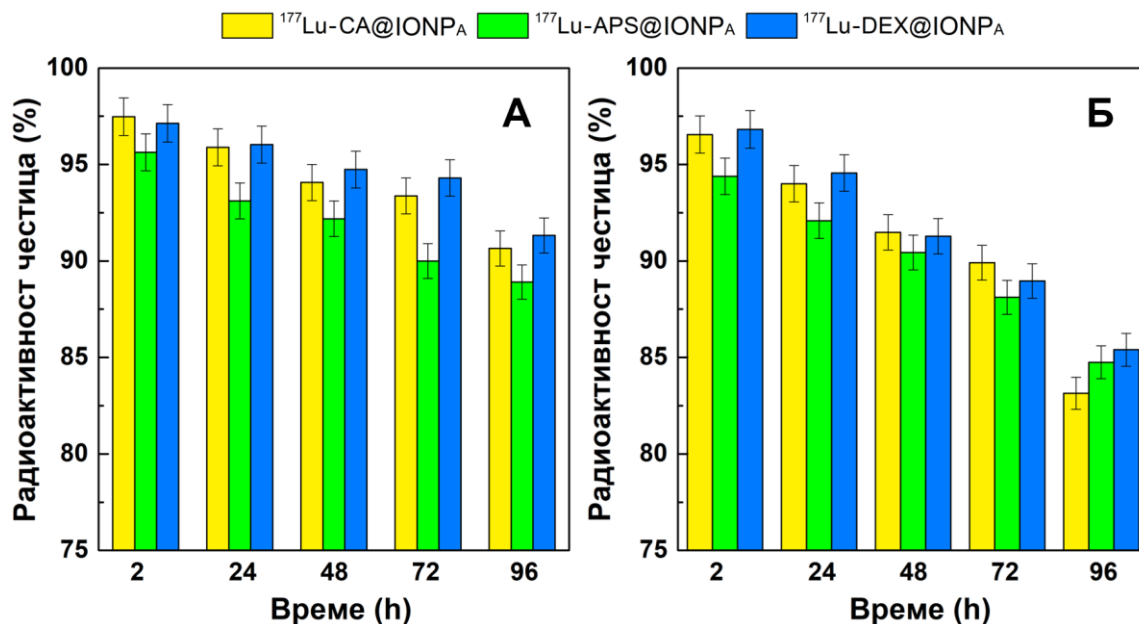
**Табела 5.8.** Приноси обележавања  $^{177}\text{Lu}$ -обложених IONPA

Узорак	Принос радиообележавања (%)		
	$T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min	$T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 min	$T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ 60 min
$^{177}\text{Lu-CA@IONPA}$	95,0	98,4	98,3
$^{177}\text{Lu-APS@IONPA}$	93,2	96,5	96,5
$^{177}\text{Lu-DEX@IONPA}$	94,9	97,8	98,0

Испитивање *in vitro* стабилности  $^{177}\text{Lu}$ -обележених наночестица у физиолошком раствору (ФР) и 4% раствору хуманог серум-албумина (ХСА) на  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  је праћено у временском интервалу од 96 h након обележавања. Радиохемијска чистоћа је одређена ITLC-SG радиохроматографском методом на силикагел-SG тракама као стационарном фазом и 0,9% NaCl као мобилном фазом.

Испитивања *in vitro* стабилности радиообележених наночестица у физиолошким условима показала су да чак >89%  $^{177}\text{Lu}$  остаје везано 96 h након радиообележавања, инкубацијом

$^{177}\text{Lu-CA@IONP}_A$ ,  $^{177}\text{Lu-APS@IONP}_A$  и  $^{177}\text{Lu-DEX@IONP}_A$  у физиолошком раствору и >83% након радиообележавања, инкубацијом у хуманом серум-албумину (слика 5.19). Сви наведени резултати указују на успешност радиообележавања испитаних наночестица и њихову погодност за тестирања у циљу *in vivo* примене.



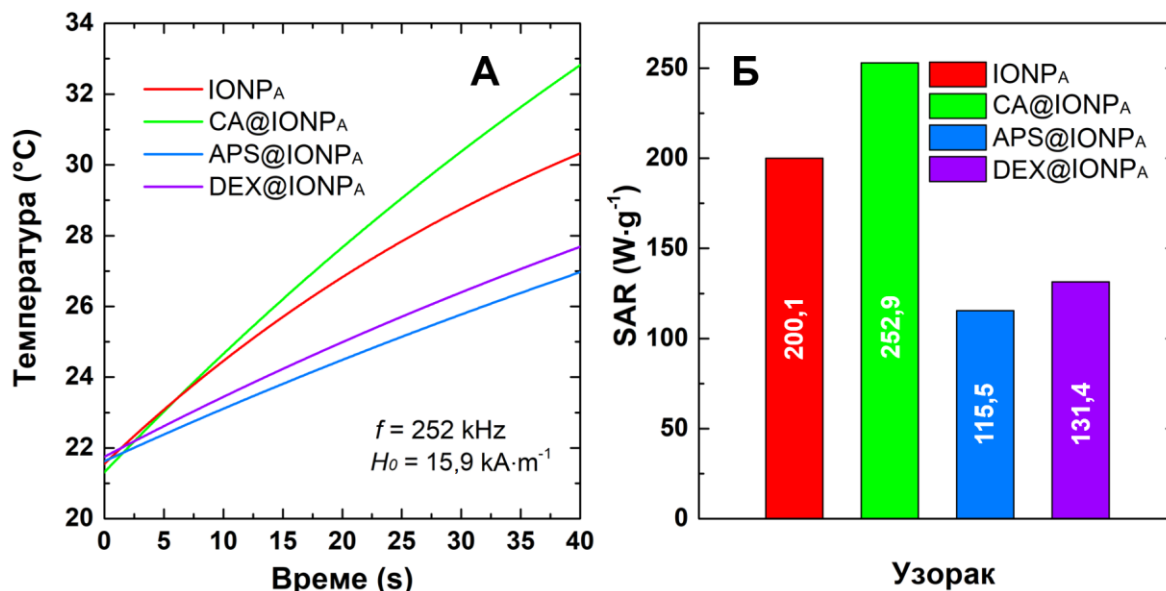
Слика 5.19. *In vitro* стабилност  $^{177}\text{Lu}$ -обложених  $\text{IONP}_A$  у: (А) физиолошком раствору и (Б) хуманом серум-албумину на  $37^\circ\text{C}$  у интервалу од 96 h.

### 5.3.1.3. Истраживања СА-, APS- и DEX-обложених наночестица за потенцијалну примену у магнетној хипертермији

Криве грејања (слика 5.20А) необложених, као и СА-, APS- и DEX-обложених  $\text{IONP}_A$  су добијене при јачини спољашњег магнетног поља  $H_0 = 15,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  и на фреквенцији  $f = 252 \text{ kHz}$ . Израчунате вредности SAR-а биле су у распону између  $115,5 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$  и  $252,9 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$  што указује на утицај једињења којим се облаже наночестица. Разлике у ефикасности грејања су значајне, при чему су честице обложене цитратима једине у којима је топлотна ефикасност побољшана у поређењу са необложеним  $\text{IONP}_A$ . Пораст SAR вредности ( $252,9 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ ) у односу на необложене наночестице ( $200,1 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ ) се може објаснити већом стабилношћу суспензије ферофлуида (видети табелу 5.7). Разлози због којих се јавља велика разлика у топлотној ефикасности се могу приписати и ефектима материјала коришћеним за облагање који су у вези са преносом топлотне енергије из језгра у околину или са променом наелектрисања што доводи до различите интеракције са молекулима воде у околини. Поред тога, макроскопске промене, као што су изазивање агрегације површинском модификацијом лигандима са већом молекулском масом могу имати значајан утицај, што показују резултати на слици 5.20Б. Овај резултат је од значаја јер указује на утицај површинског модификатора на хипертермијску ефикасност.

Додатно, модификација површине има значајну улогу у самоорганизацији колоидних МНЧ што утиче на њихове магнетне интеракције и на SAR вредност. Запремина наночестица и хидродинамички пречник зависе од врсте облоге и модификује *Brown*-ове релаксационе процесе, при чему се мења ефикасност загревања околног медијума. Дебљина слоја облоге и смањење стабилности суспензије МНЧ су највероватније главни разлози за деградацију ефикасности грејања која је примећена код APS- и DEX-обложених наночестица. Дебљина слоја облоге одређује хидродинамички пречник и директно утиче на губитке путем *Brown*-ових релаксационих процеса [196].

Према томе, након успешног постизања стабилне колоидне суспензије и са хидродинамичким пречником погодним за биомедицинску примену ( $\sim 24$  nm), лимунска киселина се може предложити као материјал за облагање  $\text{IONP}_A$ , а  $\text{CA@IONP}_A$  се може даље испитивати за примене у МХ.

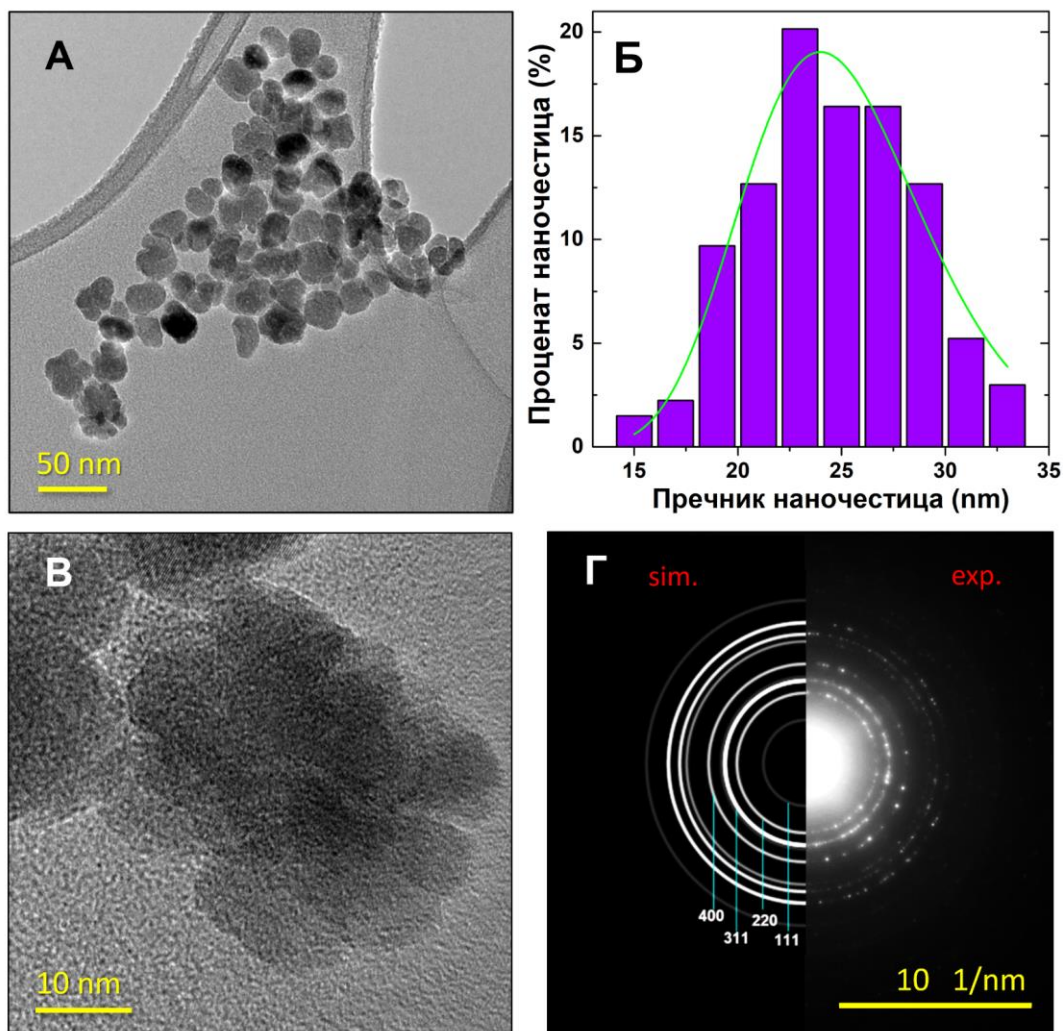


**Слика 5.20.** (А) Кинетичке криве грејања необложених и СА-, APS- и DEX-обложених  $\text{IONP}_A$  на фреквенцији од 252 kHz и магнетном пољу јачине  $15,9$  kA·m<sup>-1</sup> и (Б) SAR вредности добијене мерењем почетног нагиба кривих грејања за необложене и обложене  $\text{IONP}_A$ .

### 5.3.2. Наночестице добијене полиол солвотермалном синтезом ( $\text{IONPs}$ )

Наночестице гвожђе оксида су синтетисане солвотермалном синтезом у херметички затвореном тefлонском реактору у полиолима на повишеном притиску ( $\text{IONPs}$ ). Детаљан опис синтезе је дат у 4.1.3.

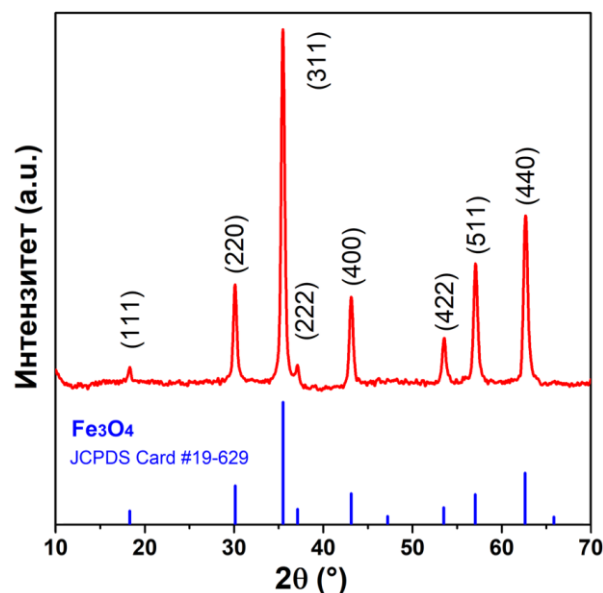
Микроструктурне особине  $\text{IONPs}$  синтетисаних у полиолима су одређене анализом слика добијених трансмисионом електронском микроскопијом. Једна типична ТЕМ слика приказана је на **слици 5.21А**. Анализом ТЕМ слика закључено је да су честице приближне величине ( $13 \pm 1$ ) nm, да формирају веће агломерате величине ( $25 \pm 4$ ) nm са полидисперзношћу од 18% (**слика 5.21Б**). На **слици 5.21В** је приказано груписање ансамбла наночестица у форму наноцветова [107,219]. Уочава се да је облик  $\text{IONPs}$  сферан или је облика заобљених коцкица. Кристална структура  $\text{IONPs}$  је одређена из података електронске дифракције, поређењем експерименталних података и симулираних података за спинелни тип структуре [220], **слика 5.21Г**. Резултати анализе SAED (енг. *Selected area electron diffraction* - SAED) података указују да наночестице гвожђе оксида кристалишу у просторној групи  $\text{Fd}\bar{3}m$  и спинелном типу структуре, што се види из поклапања најинтензивнијих дифракционих максимума. Међутим, из SAED анализе не може се са сигурношћу тврдити да је узорак магнетит ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), а не магхемит ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ).



**Слика 5.21.** (А) ТЕМ слика синтетисаних IONPs; (Б) Нормализована логаритамска расподела честица по величинама; (В) Увећана слика која показује једну честицу цветне морфологије и (Г) SAED подаци, експериментални и симулирани према  $Y_{0.15}Fe_{2.85}O_4$ : PDF картица #04-014-1397.

Такође, кристална структура и микроструктура (величина кристалита) синтетисаних IONPs су анализирани из података дифракције X-зрака која се може сматрати комплементарном методом SAED анализе. Карактеристични дифрактограм је приказан на **слици 5.22**. Положаји рефлексија на дифрактограму се поклапају са оним за  $Fe_3O_4$  из литературних података. Ово указује да се све рефлексије могу индексирати у  $Fd\bar{3}m$  ( $N^o$  227) просторној групи, кубичне структуре, спинелног типа (JCPDS картица #19-629). Применом сличног поступка синтезе, кроз једну интегралну студију структуре, показано је да је узорак по структури магхемит ( $\gamma-Fe_2O_3$ ) [217]. На основу резултата XRPD и SAED анализе, као и досадашњег искуства, синтетисане наночестице највероватније представљају мешавину обе фазе (магнетита и магхемита). Узимајући у обзир добијене резултате као и резултате аутора који су детаљно анализирали кристалну структуру наночестица добијених сличним поступком, може се закључити да су честице највероватније представљају смешу магнетита и магхемита. Из дифракционих података одређен је параметар решетке који износи  $a = 8.382(3) \text{ \AA}$ , што је у складу са вредностима забележеним за магнетит-магхемит наночестице [221].



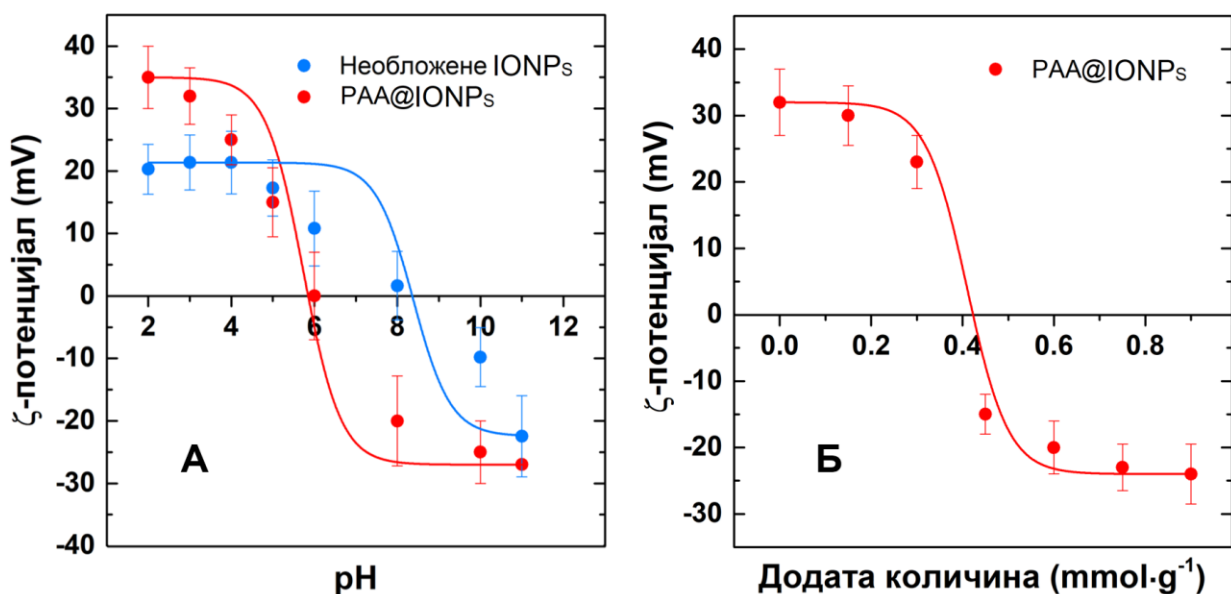


Слика 5.22. Дифрактограм синтетисаних IONPs (*goFe*) и симулирани дифрактограм за Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (JCPDS #19-629) (*доле*).

### 5.3.2.1. Површинска модификација IONPs наночестица

Да би се показао утицај облоге на параметре од интереса за примену као што је магнетна хипертермија и радионуклидна терапија, синтетисане IONPs површински су модификоване користећи три различита молекула: лимунску киселину (СА), поли(акрилну киселину) (РАА) и поли(етилен гликол) (РЕГ). Након облагања испитиване су колоидне особине изабраног флуида са РАА@IONPs. Измерена је зависност зета потенцијала од рН како за необложене тако и за РАА@IONPs и вредности су приказане на слици 5.23. Резултати указују да РАА облога поспешује стабилизацију ферофлуида одбојним силама услед смањења површинског наелектрисања, и то са  $\zeta = 14 \text{ mV}$  на  $\zeta = -26 \text{ mV}$  при рН 7,4, при чему обезбеђује дугорочну стабилност на физиолошкој рН вредности. Ефекат облагања је и померање изоелектричне тачке (*pI*) ка нижим рН што је још једна потврда успешне модификације IONPs лигандом РАА који је богат негативно наелектрисаним карбоксилним групама.

У процесу облагања, додаток различите количине РАА на рН ~6,5 и јонској јачини  $I = 0,01 \text{ M}$ , имао је јако изражен ефекат на зета потенцијал, слика 5.23Б. Карбоксилне групе поли(акрилне киселине) доводе до негативног наелектрисања на површини честица неутралишући позитивно наелектрисање које потиче од Fe<sup>2+/3+</sup> на површини. На површини честица јављају се некомпензована наелектрисања па су необложене честице позитивно наелектрисане на физиолошким рН вредностима. Додатак  $0,4 \text{ mM} \cdot \text{g}_{\text{IONPs}}^{-1}$  РАА лиганда богатог -COO<sup>-</sup> групама, које се везују за површину честица доводи до неутрализације позитивног површинског наелектрисања. Даљим додатком РАА и адсорпцијом негативно наелектрисаних -COO<sup>-</sup> група индукује се негативно површинско наелектрисање честица, при чему се минимум потенцијала постиже при концентрацији од  $\sim 0,6 \text{ mM} \cdot \text{g}_{\text{IONPs}}^{-1}$  [182]. Додатком РАА изнад концентрације  $0,6 \text{ mM} \cdot \text{g}_{\text{IONPs}}^{-1}$  током поступка облагања не долази до значајнијег пада потенцијала, па је непотребно да у раствору буде више молекула РАА. На основу овог резултата, облагања наночестица РАА лигандом су вршена додатком  $0,6 \text{ mM} \cdot \text{g}_{\text{IONPs}}^{-1}$ , па су тиме избегнути додатни поступци пречишћавања суспензије од вишка неутрошених молекула лиганда коришћеног за облагање.



Слика 5.23. (А) Зависност зета потенцијала од рН за необложене IONPs и PAA@IONPs и (Б) Зависност зета потенцијала од количине PAA током поступка облагања наночестица на рН 6,5. Криве зета потенцијала показују облик *Boltzmann*-ове сигмоидне функције.

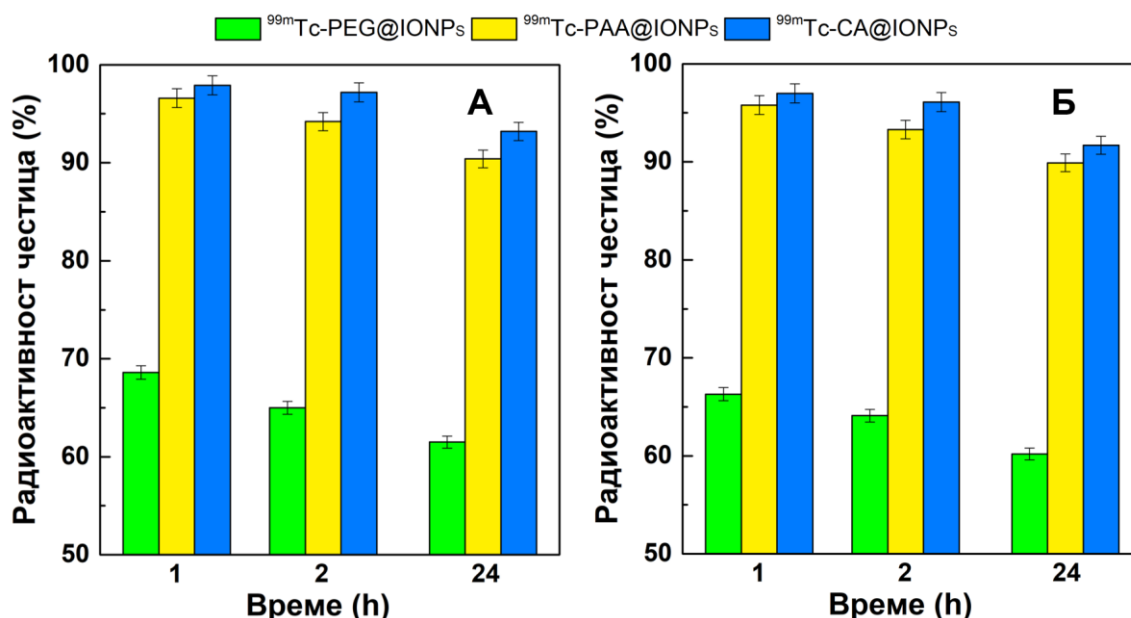
### 5.3.2.2. Радиообележавање наночестица са <sup>99m</sup>Tc и *in vitro* стабилност <sup>99m</sup>Tc-IONPs

За експерименте радиообележавања коришћене су IONPs претходно обложене СА, PAA и PEG лигандима. У поступку обележавања примењена су три различита радионуклида, <sup>90</sup>Y, <sup>177</sup>Lu и <sup>99m</sup>Tc. Способност радионуклида да ствара стабилне комплексе са различитим функционалним групама на лигандима који су везани за површину наночестица је узета у обзир приликом планирања експеримента. У ту сврху, наночестице су облагане једињењима која имају слободне функционалне групе и најпре су испитивани благи услови у виду амбијенталне температуре и кратког времена обележавања [222–224].

Протокол обележавања наночестица радионуклидом <sup>99m</sup>Tc је базиран на директном везивању радионуклида за облогу наночестица, што се постиже додатком киселог раствора калај(II) хлорида (SnCl<sub>2</sub>) који се користи за редукцију <sup>99m</sup>Tc<sup>7+</sup> до нижих оксидационих стања која су неопходна за стварање <sup>99m</sup>Tc комплекса. Добијени приноси радиообележавања <sup>99m</sup>Tc-PAA@IONPs и <sup>99m</sup>Tc-CA@IONPs, одређени ИТLC-SG радиохромографијом, су били веома високи (97,5% и 98,5%, редом), док је принос радиообележавања за <sup>99m</sup>Tc-PEG@IONPs био 69,2%. Према примењеном протоколу радиообележавања је трајало 30 min, на собној температури и неутралном рН. Повећавањем реакционог времена на 60 min принос радиообележавања је само незнатно побољшан (табела 5.9). Наночестице обележене са <sup>99m</sup>Tc могу наћи примену у дијагностици [225], док се исти протокол радиообележавања може ефикасно користити и за обележавања ренијумом-188 (<sup>188</sup>Re) због сличних хемијских особина. МНЧ обележене <sup>188</sup>Re могу се користити у терапији као  $\beta$  емитери ( $E_{\beta} = 2,12$  MeV) [226,227].

Табела 5.9. Приноси радиообележавања обложених IONPs радионуклидима <sup>90</sup>Y, <sup>177</sup>Lu и <sup>99m</sup>Tc на  $T = 25$  °C у току 30 min и 60 min

Узорак	Принос радиообележавања (%)					
	са <sup>99m</sup> Tc		са <sup>90</sup> Y		са <sup>177</sup> Lu	
	$T = 25$ °C		$T = 25$ °C		$T = 25$ °C	
	30 min	60 min	30 min	60 min	30 min	60 min
PEG@IONPs	69,2	68,3	99,8	99,4	99,8	99,4
PAA@IONPs	97,5	97,1	99,5	99,5	99,5	99,5
CA@IONPs	98,5	98,4	99,2	99,3	99,2	99,3



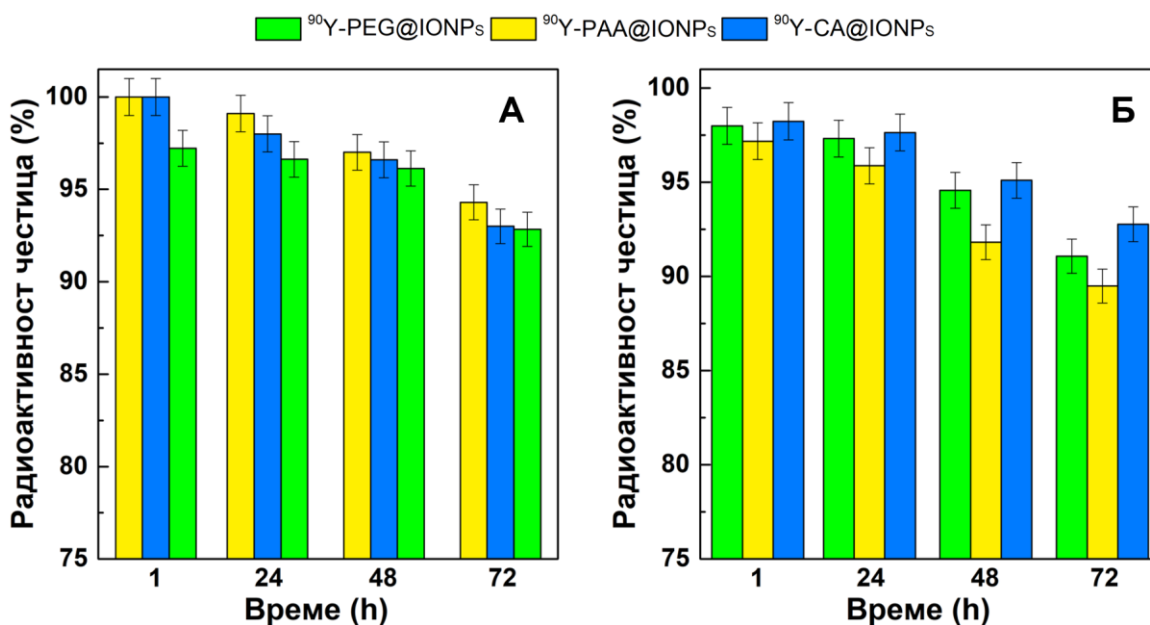
Слика 5.24. *In vitro* стабилност  $^{99m}\text{Tc-PEG@IONPs}$ ,  $^{99m}\text{Tc-PAA@IONPs}$  и  $^{99m}\text{Tc-CA@IONPs}$  у (А) физиолошком раствору и (Б) хуманом серум-албумину на 37 °C током 24 h инкубације.

*In vitro* стабилност  $^{99m}\text{Tc}$ -обложених IONPs је испитивана у ФР и 4% раствору ХСА на 37 °C у периоду од 24 h након радиообележавања (слика 5.24). Узорци су анализирани ИТЛС методом у одређеним временским размацама након радиообележавања (1 h, 2 h и 24 h). Након 24 h од радиообележавања, све три групе радиоактивно обележених наночестица су показале високу стабилност у ФР са мање од 10% слободног радионуклида  $^{99m}\text{Tc}$  (слика 5.24А). Највећи проценат неvezаног радионуклида запажен је у првом сату након радиообележавања. Слична стабилност радиообележавања је добијена и у раствору ХСА примењујући идентичан поступак тестирања (слика 5.26Б).

### 5.3.2.3. Радиообележавање наночестица са $^{90}\text{Y}$ и *in vitro* стабилност $^{90}\text{Y-IONPs}$

Веома висок принос радиообележавања (>99%) са  $^{90}\text{Y}$  је добијен за све три површински модификоване IONPs, при радиообележавању на 25 °C у току 30 min, док се продужавањем времена реакције на 60 min принос радиообележавања разликује само у границама експерименталне грешке (табела 5.9).

Резултати *in vitro* стабилности  $^{90}\text{Y}$ -обложених IONPs у ФР и 4% раствору ХСА на 37 °C током 72 h од обележавања су приказани на слици 5.25. Обележене наночестице су показале веома добру стабилност са мање од 10% слободних јона  $^{90}\text{Y}$ , како у ФР тако и у ХСА, чак и након 3 дана од радиообележавања.

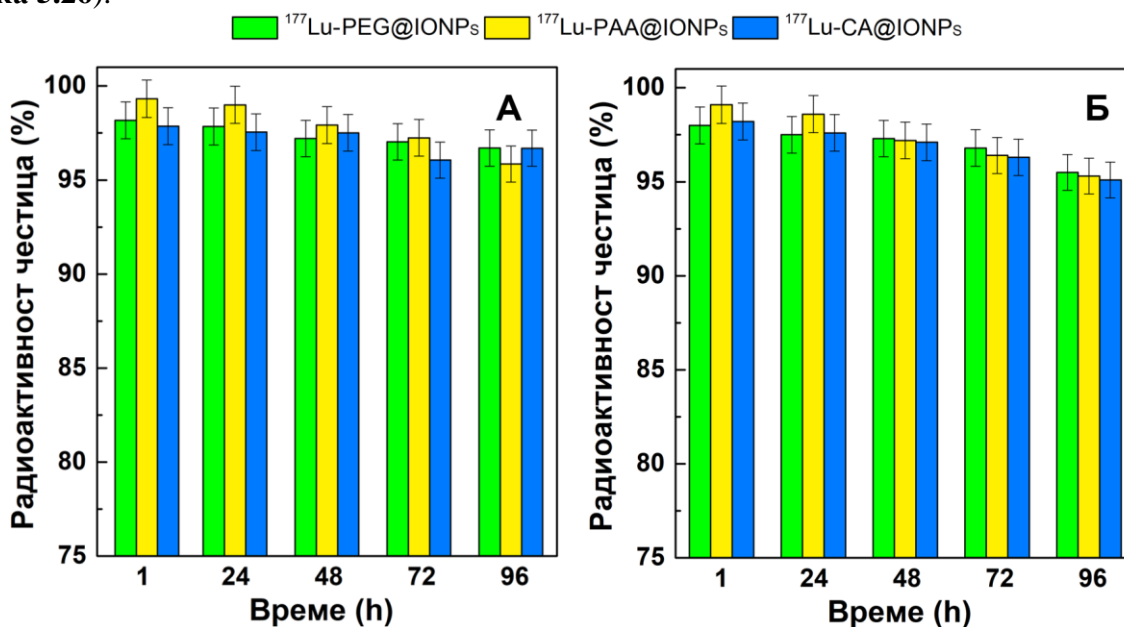


Слика 5.25. *In vitro* стабилност  $^{90}\text{Y}$ -PEG@IONPs,  $^{90}\text{Y}$ -PAA@IONPs и CA@IONPs у (А) физиолошком раствору и (Б) хуманом серум-албумину током 72 h инкубације на 37 °C.

#### 5.3.2.4. Радиообележавање наночестица са $^{177}\text{Lu}$ и *in vitro* стабилност $^{177}\text{Lu}$ -IONPs

Обележавање површински модификованих наночестица радионуклидом  $^{177}\text{Lu}$  на 25 °C 30 min је било са високим приносима (>98%). Слично, као и при обележавању са  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  и  $^{90}\text{Y}$ , продужавањем реакционог времена на 60 min примећен је само благи пораст приноса обележавања (табела 5.9).

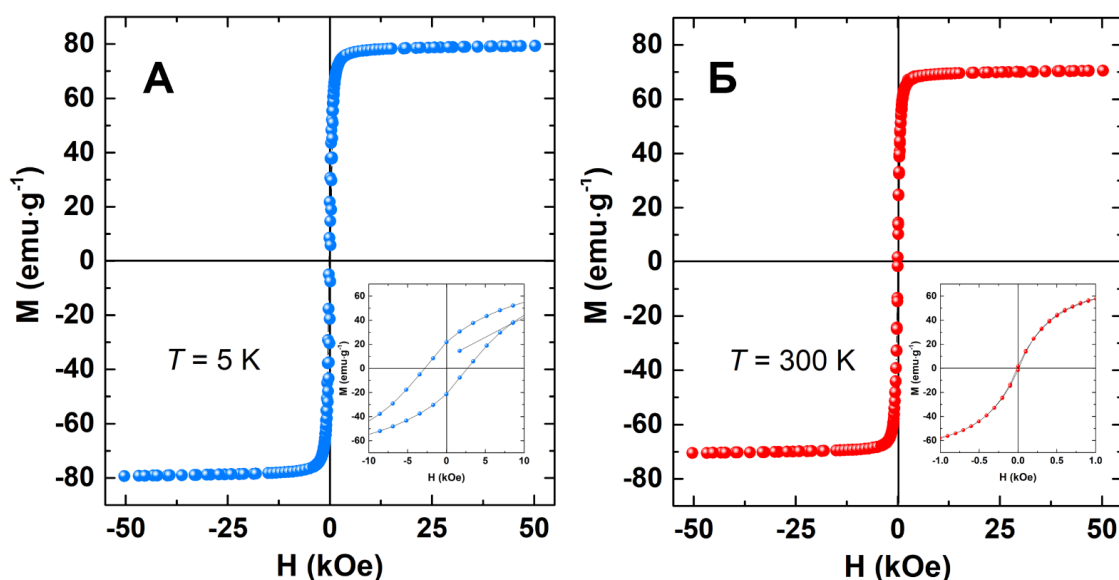
*In vitro* стабилност  $^{177}\text{Lu}$ -CA-,  $^{177}\text{Lu}$ -PAA- и  $^{177}\text{Lu}$ -PEG-наночестица испитивана је у ФР и ХСА током три дана од тренутка радиообележавања. Резултати мерења показују више од 95% радиообележених наночестица, чак и 96 h након радиообележавања. На основу резултата високе *in vitro* стабилности  $^{177}\text{Lu}$ -IONPs може се закључити да су услови обележавања правилно одређени и да се метода радиообележавања може даље примењивати јер су добијене радиоактивне МНЧ изузетно стабилне у испитаним физиолошким условима (слика 5.26).



Слика 5.26. *In vitro* стабилност  $^{177}\text{Lu}$ -PEG@IONPs,  $^{177}\text{Lu}$ -PAA@IONPs и  $^{177}\text{Lu}$ -CA@IONPs у (А) физиолошком раствору и (Б) хуманом серум-албумину на 37 °C након 96 h инкубације.

### 5.3.2.5. Магнетне особине наночестица добијених полиол солвотермалном методом

У циљу одређивања основних магнетних својстава синтетисаних IONPs, извршена су изотермална мерења зависности магнетизације од примењеног магнетног поља на 5 K и 300 K у магнетном пољу опсега  $\pm 50$  kOe (слика 5.27). Уметнуте слике на слици 5.27 представљају хистерезисне петље у области ниских поља. Вредност сатурационе магнетизације на 5 K износи  $\sim 77 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$ , док на 300 K та вредност износи  $70,5 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$ , што је нешто нижа од резултата мерења на наночестицама синтетисаним сличним поступком ( $M_S = 79,7 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$ ) [217], и нешто виша у односу на наноцветове припремљене у балону ( $M_S = 66,5 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Крива магнетизације пролази кроз координатни почетак (коерцитивно поље је нула), што указује да су синтетисане наночестице у суперпарамагнетном стању на собној температури, док на 5 K вредност коерцитивног поља износи 2,9 kOe (слика 5.27А). Може се приметити да промена у величини појединачних честица које сачињавају агрегате наноцветова значајно утиче на вредност сатурационе магнетизације. Као што је речено, појединачна језгра наноцветова синтетисаних солвотермалном полиол методом просечне величине 13,5 nm показују сатурациону магнетизацију од  $70,5 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$ , док мање честице синтетисане у полиолима на атмосферском притиску (величине појединачних језгара од 8,7 nm) показују нижу сатурациону магнетизацију од  $66,5 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$ . Узрок овоме може бити магнетна неуређеност површинског слоја наночестице, који као такав не доприноси укупној магнетизацији. Осим тога, структурне особине као што је расподела јона гвожђа  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  између нееквивалентних кристалографских места  $8a$  и  $16d$  у спинелној структури значајно утичу на вредности суперизменских интеракција и на вредности магнетних параметара. У анализи  $M_S$  вредности треба имати у виду да микроструктурни параметри, микронапрезање и величина кристалита, морфологија и дефекти директно утичу на магнетна својства. Интеракције између наночестица у агрегату имају значајан допринос на вредност сатурационе магнетизације [206]. Интеракције између честица постају израженије у случају формирања одређених архитектура или било ког удруживања и агрегиривања.



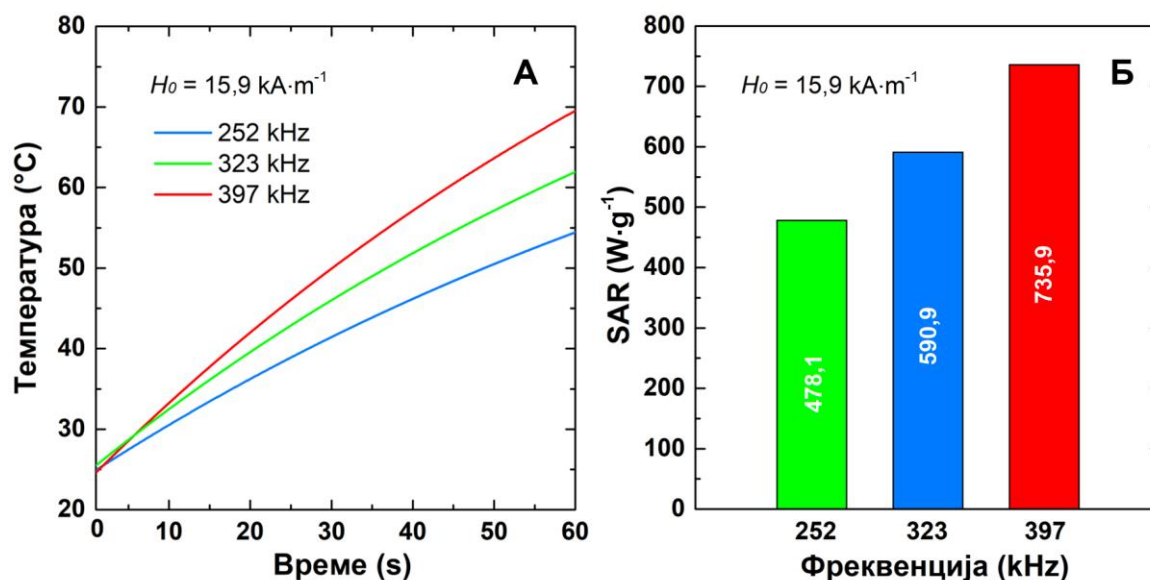
Слика 5.27. Криве зависности магнетизације IONPs у функцији примењеног спољашњег магнетног поља на (А) 5 K и (Б) 300 K.

Цветне структуре које су предмет истраживања се састоје из индивидуалних наночестица. У тако формираним структурама долази до снажних интеракција између наночестица. Може се претпоставити да долази до појаве колективног понашања и до интеракције спинова у површинском слоју што доводи до њиховог уређења. Као резултат ових појава, јавља се смањење површинске анизотропије, пораст магнетизације и температуре блокирања [228].

### 5.3.2.6. Примена PAA@IONPs у магнетној хипертермији и тераностици

Ефикасност грејања PAA@IONPs у променљивом магнетном пољу је испитивана у циљу њихове потенцијалне примене у магнетној хипертермији. Пораст температуре колоидних суспензија наночестица обложених поли(акрилном киселином) током времена, под утицајем спољашњег променљивог магнетног поља, приказан је на **слици 5.28**. Ефекат генерисања топлоте у воденој суспензији наночестица је испитан при константној јачини магнетног поља,  $H_0 = 15,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ , док је у различитим мерењима фреквенција поља варирана између 252 kHz и 397 kHz (**слика 5.28А**). Приликом избора параметара  $ac$  поља узет је у обзир лимит  $Hf$  производа који је од значаја за медицинску примену наночестица. Да би се квантитативно проценила способност грејања наночестица у суспензији, из нагиба кинетичких кривих су израчунате  $SAR$  вредности (**слика 5.28Б**). Када се ове вредности поделе са  $H^2\cdot f$  производом, добија се  $ILP$  вредност која износи  $7,3 \pm 0,2 \text{ nHm}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ . Чињеница да је добијена приближно иста  $ILP$  вредност на више различитих фреквенција указује да је суспензија PAA@IONPs у форми стабилног колоида при различитим фреквенцијама и јачинама магнетног поља и да не долази до формирања додатних агрегата и таложења наночестица са порастом јачине магнетног поља. Добијена  $ILP$  вредност је значајно већа у поређењу са већином литературних података, где су објављене вредности у опсегу  $0,2\text{-}4,4 \text{ nHm}^2\cdot\text{kg}^{-1}$  [66]. Када се пореде ефикасности грејања наночестица преко вредности  $ILP$  параметра мора се имати у виду узак домен важења за однос  $SAR$  и  $H^2\cdot f$  [62]. Поред тога, да би се упоредили резултати између различитих система, морају се разматрати и слични термодинамички губици у околини. Међутим, чак и поред свих недостатака теоријског модела,  $ILP$  се сматра довољно добром апроксимацијом за поређење хипертермијских ефикасности различитих система. Висока резултујућа  $SAR$  вредност за PAA@IONPs,  $478,1 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$  при  $H_0 = 15,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  и  $f = 252 \text{ kHz}$  је највероватније последица специфичне организације и агрегације појединачних језгара унутар индивидуалних честица (наноцветова), као и саме величине честица од 13,5 nm које се групишу у структуре цветне морфологије, што је у складу са недавним резултатима [29].

*Bender* и сарадници су детаљно испитали утицај магнетних својстава наночестица, интеракције између њих и динамике релаксације на ефикасност грејања сличног система наночестица цветне морфологије просечне величине око 39 nm [107,229,230]. Показали су да је добијена висока  $ILP$  вредност ( $\sim 7 \text{ nHm}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ ) у складу са вредношћу очекиваном према теорији линеарног одговора [107,229,230]. Измерене  $ILP$  вредности су независне од вискозности околног медијума, што указује на чињеницу да топлота генерисана агрегатима у облику наноцветова доминантно зависи од унутрашњих особина наночестица, а мање од *Brown*-овог доприноса. *Bender* и сарадници су у овом истраживању дошли до закључака да је доминантан механизам загревања наноцветова унутрашња релаксација магнетних момената и да неуређеност магнетних момената у наноструктурама доприноси ефекту грејања [107,229,230]. *Nicules* и сарадници су топлотну ефикасност МНЧ у МХ побољшали дизајнирањем асиметричног удруживања кубних наночестица гвожђа оксида [164]. Аутори су показали да контролисано груписање наночестица у виду нанокластера састављених од две или три честице кубне морфологије (димера или тримера) значајно повећава  $SAR$  вредност у односу на индивидуалне наночестице, док формирање централно-симетричних кластера које имају више од четири наночестице води до смањења  $SAR$  вредности. Мерењем сатурационих магнетизација дизајнираних система установили су да се  $M_s$  мењала по сличном правилу, али су након рачунских симулација дошли до закључака да су за промене  $SAR$  вредности најзаслужнији магнетни диполни ефекти индуковани специфичном уређеношћу нанокоцкица у димере, тримере и централно-симетричне кластере [164]. Овакви и слични резултати дају идеју за синтезу МНЧ груписаних у различите анизотропне структуре у циљу повећања хипертермијске ефикасности.



**Слика 5.28.** (А) Кинетичке криве грејања PAA@IONPs под утицајем спољашњег магнетног поља јачине  $15,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  на три различите фреквенције и (Б) SAR вредности PAA@IONPs у зависности од фреквенције примењеног магнетног поља.

У даљем тексту се наводи кратак закључак истраживања IONPs цветне морфологије синтетисаних у полиолима и површински модификованих са три биокомпатибилна лиганда, СА, PAA и PEG. Циљ облагања био је спречавање агрегације и добијање стабилних колоидних суспензија. Директно обележавање радионуклидама  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  и  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  преко негативно наелектрисаних функционалних група СА-, PAA- и PEG-облога је представљало адекватан приступ и омогућило висок принос радиообележавања. Од испитиваних узорака, наночестице PAA@IONPs су показале највеће приносе радиообележавања ( $>97,5\%$ ), као и највећу *in vitro* стабилност. Након 24 h од радиообележавања, мање од 10% слободних радионуклида је при физиолошким условима остало у раствору. Испитивањем ефикасности МХ грејања IONPs, добијена је једна од највећих *ILP* вредности за IONPs, која износи  $7,49 \text{ nHm}^2\cdot\text{kg}^{-1}$  [231]. На основу резултата радиообележавања и мерења хипертермијске активности показало се да су IONPs цветне морфологије кандидат за даља *in vitro* и *in vivo* истраживања у сврху примене у дијагностици и терапији. Резултати радиообележавања показују да се за IONPs успешно везују и дијагностички и терапеутски радионуклиди.  $^{90}\text{Y}$ -IONPs је наноплатформа за дуалну хипертермијско-радионуклидну терапију.  $^{177}\text{Lu}$ -IONPs, осим примене у дуалној терапији, има потенцијал да буде дијагностичко средство, па самим тим и да буде тераностички агенс (агенс за истовремено или секвенцијално дијагностиковање и лечење медицинских стања), док је  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IONPs првенствено дијагностички агенс. Испитивање токсичности је извршено на необложеним IONPs. Показано је да концентрације испод  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  IONPs нису биле токсичне за ћелије карцинома дебелог црева миша (СТ-26). Међутим, веће дозе су показале значајнију цитотоксичност, достигавши  $\text{IC}_{50}$  при концентрацији IONPs од  $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $\text{IC}_{50}$  - потребна концентрација наночестица за 50% инхибиције ћелија *in vitro*). Мало је вероватно да се тако висока концентрација постигне у експериментима *in vivo*, па се може констатовати да добијене IONPs нису токсичне на физиолошки достижним концентрацијама. Посматрање IONPs у култури ћелија под оптичким микроскопом је показало накупљање IONPs у ћелијама, што вероватно доприноси примењеној токсичности. Међутим, након *in vitro* МХ третмана на СТ-26 ћелијама, примећен је значајан ефекат разарања ћелија. Ефекат је био сразмеран јачини примењеног спољашњег магнетног поља и дужине трајања хипертермијског третмана [231], што додатно потврђује високи потенцијал PAA@IONPs наночестица у терапији МХ.

#### 5.4. Радиообележавање наночестица: закључци и поређење са литературом

На основу резултата радиообележавања наночестица  $\text{IONP}_A$  и  $\text{IONP}_S$ , може се доћи до следећих закључака. Везивање радионуклида за површину честица је било успешно за све радионуклиде ( $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{90}\text{Y}$  и  $^{177}\text{Lu}$ ) и за сва једињења која су коришћена за облагање наночестица (СА, APS, DEX, PAA и PEG), изузев везивања  $^{99m}\text{Tc}$  за наночестице обложене поли(етилен гликолом),  $^{99m}\text{Tc}\text{-PEG@IONP}_S$ . Механизам везивања је базиран на постојању позитивно наелектрисаних јона радионуклида који се везују за негативно наелектрисане карбоксилне групе на површини  $\text{CA@IONP}_A$ ,  $\text{CA@IONP}_S$  и  $\text{PAA@IONP}_S$ , као и за хидроксилне групе присутне на површини  $\text{PEG@IONP}_S$ .

Хидроксилне групе PEG-а нису биле у стању да у високом проценту вежу јоне  $^{99m}\text{Tc}$ , па је из тог разлога за добијање већих приноса обележавања неопходно укључити и додатни хелатор са вишим афинитетом према  $^{99m}\text{Tc}$ . У истраживањима потенцијалних примена магнетних наночестица у медицини, PEG је често коришћен за облагање. PEG обезбеђује хидрофилни слој који поспешује бољу дисперзију магнетних наночестица у води чинећи их међусобно удаљенијим једне од других, што додатним стерним ефектом спречава њихову агломерацију.

За облагање наночестица користе се једињења која након облагања поседују слободне функционалне групе које омогућавају везивање радионуклида, а притом одржавају стабилност суспензије. Примењени PAA лиганд је нарочито погодан за обележавање са разним радионуклидима због присуства великог броја функционалних група које су доступне за активацију. СА поседује веома високу ефикасност везивања радионуклида, посебно  $^{90}\text{Y}$  и  $^{177}\text{Lu}$ , па је потребно елиминисати слободне молекуле лимунске киселине који су присутни у суспензији наночестица а нису везани за наночестице, јер се за њих веома лако могу везати радионуклиди чија је улога обележавање наночестица.

Након анализе обележених наночестица, PAA-обложене наночестице су изабране као најбољи кандидат за даља истраживања која се односе на тестирања за примену у МХ. Поред високог приноса радиообележавања и *in vitro* стабилности, главна предност  $\text{PAA@IONP}_S$  се огледа у томе што након поступка површинске модификације нема потребе за додатним пречишћавањем суспензије, што резултује једноставним и брзим приступом облагања и радиообележавања.

Улога модификатора површине наночестица је веома значајна у *in vivo* применама. У раду Радовић и сарадника [223] тестирана је биодистрибуција необложених  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  наночестица и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -обложених поли(етилен гликол)-600 диацидом ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600}$ ), након њиховог радиообележавања са  $^{90}\text{Y}$  и интравенског иницирања у здравог пацова. Показана је већа акумулација необложених наночестица у плућима услед *in vivo* агломерације. Насупрот томе, обложене наночестице су показале одсуство агломерације и преференцију депоновања у јетри. Честице већих димензија, као што су магнетне микросфере које су добијене инкорпорирањем наночестица магнетита у ХСА, су се акумулирале у плућима [232]. Може се закључити да врста облоге преко промене хидродинамичког пречника честица директно утиче на њихову биодистрибуцију, а такође и на могућу агломерацију наночестица у организму.

Постоји све веће интересовање за употребу комбинације терапијских радионуклида и наноматеријала у циљу развоја нових радиофармацеутика. Типично, један или неколико радионуклида се везује за биомолекуле (антитела, пептиди), док је за наночестице могуће је везати већи број радионуклида и транспортовати их до жељеног места.  $^{90}\text{Y}$  обележене наночестице су коришћене у претклиничким студијама. Липидне наночестице које садрже хемиотерапеутик доксорубицин су обележаване  $^{90}\text{Y}$  и тестиране на ћелијској линији CNE1 (епителиоидног карцинома назофаринкса човека) у сврху комбиноване терапије малигнух тумора [233]. Честице су биле додатно функционализоване фолном киселином и примењене *in vivo* на малим животињама. Ефекат супресије тумора је био евидентан. Магнетне наночестице су биле обележаване са  $^{90}\text{Y}$  и за примене у би-модалној терапији (фототермална-



радиотерапија) [233]. Са  $^{177}\text{Lu}$  су обележаване наночестице злата које су претходно модификоване антителима и које су показале ефекат на ћелијама малигног тумора плућа (EGFR) [233]. Избор материјала за облагање је важан и за фармакокинетику. Један од изазова у радионуклидној терапији је везивање терапеутика и дијагностичких средстава за исту честицу која постаје тераностички агенс. Неки терапијски изотопи ( $\beta$  емитери) су истовремено и  $\gamma$  емитери ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$  и  $^{188}\text{Re}$ ), па тако обележене наночестице поседују потенцијалан тераностички ефекат.

Различити  $\gamma$  емитери су коришћени за развој дијагностичких агенаса базираних на наноматеријалима за PET или SPECT томографију. Такође, радиообележене честице гвожђе оксида су примењене као би-модални контрастни агенси за PET/MRI [234]. Честице гвожђе оксида величине  $<4$  nm се користе као T2 контрастно средство за примене у MR. Уколико се додатно обележе радионуклидима као што су  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  или  $^{111}\text{In}$  оне истовремено могу наћи примену у SPECT томографији [234]. Најчешће коришћен радионуклид за SPECT је  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Резултати истраживања примене  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IONPs указују на могућност њиховог коришћења и као мултимодалног агенса [234].

Избор молекула за облагање МНЧ које се користе за радиообележавање је од великог значаја. Употребом  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  радиообележене су МНЧ претходно обложене молекулима са слободним фосфатним функционалним групама метилен дифосфонатом (енг. *methylene diphosphonate* - MDP) и 1-хидроксиетан-1,1-дифосфонатом (енг. *1-hydroxyethane-1,1-diphosphonate* - HEDP) [225]. Присуство бифосфоната на површини МНЧ омогућило је њихову биокомпатибилност, колоидну стабилност, висок принос обележавања (95% за  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -MDP и 97% за  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -HEDP) и *in vitro* стабилност  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -бифосфоната у физиолошком раствору и раствору хуманог серум-албумина до 24 h. Резултати *in vitro* и *in vivo* истраживања указују да радиообележене МНЧ бифосфоната имају дијагностички и терапијски потенцијал. Поред тога, запажено је да избор молекула за облагање значајно утиче на могућност и стабилност радиообележавања [231]. Молекули облоге богати слободним -COOH функционалним групама (СА и PAA) су се показали као бољи агенси за везивање  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  него PEG молекули.

У закључку радиообележавања МНЧ може се рећи да је у литератури описана широка палета медијатора и метода које се користе за обележавање МНЧ са великим бројем радионуклида [235]. Стога је, услед велике разноликости, тешко дефинисати једну методу као „златни стандард“ за најефикасније радиообележавање. У почетку, главне стратегије су биле засноване на хелатним агенсима као што су DTPA (енг. *diethylene triamine pentaacetic acid*), DOTA (енг. *1,4,7,10-tetraazacyclododecane-tetraacetic acid*) и NOTA (енг. *1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid*) везаних за површину МНЧ. Временом су развијене методе без посредства хелатора. У оквиру описаних стратегија које се заснивају на директним методама, хемијска адсорпција и ковалентно везивање су најчешћи процеси за радиообележавање МНЧ [235].

#### 5.4.1. Магнетна хипертермија: закључци и поређење са литературом

На почетку истраживања представљених у овој докторској дисертацији синтетисане су наночестице магнетита таложном методом. Користећи микроталасима потпомогнуту хидротермалну методу припремљене су серије узорака кобалтом и магнезијумом супституисаног магнетита ( $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  и  $\text{Mg}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ ), док су полиол методом на атмосферском притиску и солвотермалном полиол методом синтетисана два узорка  $\text{IONP}_A$  и  $\text{IONP}_S$  (који су вероватно смеша структурно сличних  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Након синтезе, честице су површински модификоване употребом различитих лиганата. Главни циљ истраживања био је добијање МНЧ на бази магнетита различитог састава, морфологије, величине и магнетних својстава погодних за потенцијалну примену у МХ и комбинованој хипертермијско-радионуклидној терапији малигнух тумора, при чему је акценат стављен на високу топлотну ефикасност у спољашњем променљивом магнетном пољу.

У **табели 5.10** су приказани резултати мерења МХ испитиваних узорака. Осим *SAR* и *ILP* вредности, дате су и просечне величине честица ( $D_{TEM}$ ). Наночестице синтетисане таложном методом су у променљивом магнетном пољу генерисале топлоту са *SAR* вредностима између  $55,6 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$  (DEX@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) и  $67,2 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$  (APS@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), уз веома мале разлике у грејању. Наночестице састава Mg<sub>x</sub>Fe<sub>3-x</sub>O<sub>4</sub> просечних величина између 10,9 nm и 19,8 nm су показале ефикасност грејања у распону од  $18,9 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$  за Mg<sub>0,4</sub>Fe<sub>2,6</sub>O<sub>4</sub> до  $125,7 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$  за Mg<sub>0,2</sub>Fe<sub>2,8</sub>O<sub>4</sub>. Просечна величина честица Mg<sub>0,2</sub>Fe<sub>2,8</sub>O<sub>4</sub> добијена ТЕМ анализом износи 13,6 nm. Израчунат *ILP* има вредност од  $2,0 \text{ nHm}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ .

Узорци припремљени полиол методом у балону (IONP<sub>A</sub>) просечних величина наноцветова око 22 nm (сачињених од агломерата честица просечне величине ~9 nm), су ослобађали топлоту са *SAR* вредностима између  $131,4 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$  и  $252,9 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ . Значајан утицај на *SAR* су имали молекули површинских модификатора (CA, APS и DEX). Између њих, наночестице обложене лимунском киселином, CA@IONP<sub>A</sub>, су показале највећу хипертермијску ефикасност са *SAR* =  $252,9 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$  и *ILP* =  $4,0 \text{ nHm}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ .

Од свих синтетисаних узорака, највећу топлотну ефикасност имају МНЧ синтетисане солвотермалном-полиол методом (PAA@IONP<sub>S</sub>) са *SAR* вредношћу од чак  $478,1 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$  при  $H_0$  од  $15,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  и  $f$  од 252 kHz (*ILP* ≈  $7,5 \text{ nHm}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Добијена *ILP* вредност је упоредива са највишим литературним вредностима (видети **слику 5.29**). Последњи резултат указује да су PAA@IONP<sub>S</sub> погодне за даља *in vitro* и *in vivo* хипертермијска истраживања. Може се уочити да, иако је просечна величина наноцветних агломерата слична за оба узорка добијена на два начина полиол синтезе (22,0 nm и 24,8 nm), појединачне честице у оквиру агломерата се знатно разликују по величини. Оне су 13,5 nm код IONP<sub>S</sub>, у поређењу са 8,7 nm код IONP<sub>A</sub>, што највероватније има велики утицај на међусобне интеракције појединачних честица-језгара, и што је довело је до двоструке топлотне ефикасности IONP<sub>S</sub>, у односу на IONP<sub>A</sub>.

**Табела 5.10.** Приказ синтетисаних узорака са вредностима  $D_{TEM}$ , као и *SAR* и *ILP* под утицајем спољашњег магнетног поља јачине  $15,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  на фреквенцији 252 kHz

Узорак	$D_{TEM}$ (nm)	<i>SAR</i> ( $\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$ )	<i>ILP</i> ( $\text{nHm}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ )
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	13,0	63,4	1,0
CA@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	13,0	65,8	1,0
APS@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	13,0	67,2	1,1
DEX@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	13,0	55,6	0,9
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	19,8	84,2	1,3
Mg <sub>0,1</sub> Fe <sub>2,9</sub> O <sub>4</sub>	16,3	121,3	1,9
Mg <sub>0,2</sub> Fe <sub>2,8</sub> O <sub>4</sub>	13,6	125,7	2,0
Mg <sub>0,4</sub> Fe <sub>2,6</sub> O <sub>4</sub>	10,9	18,9	0,3
IONP <sub>A</sub>	22,0 (8,7*)	200,1	3,1
CA@IONP <sub>A</sub>	22,0 (8,7*)	252,9	4,0
APS@IONP <sub>A</sub>	22,0 (8,7*)	115,5	1,8
DEX@IONP <sub>A</sub>	22,0 (8,7*)	131,4	2,1
PAA@IONP <sub>S</sub>	24,8 (13,5*)	478,1	7,5

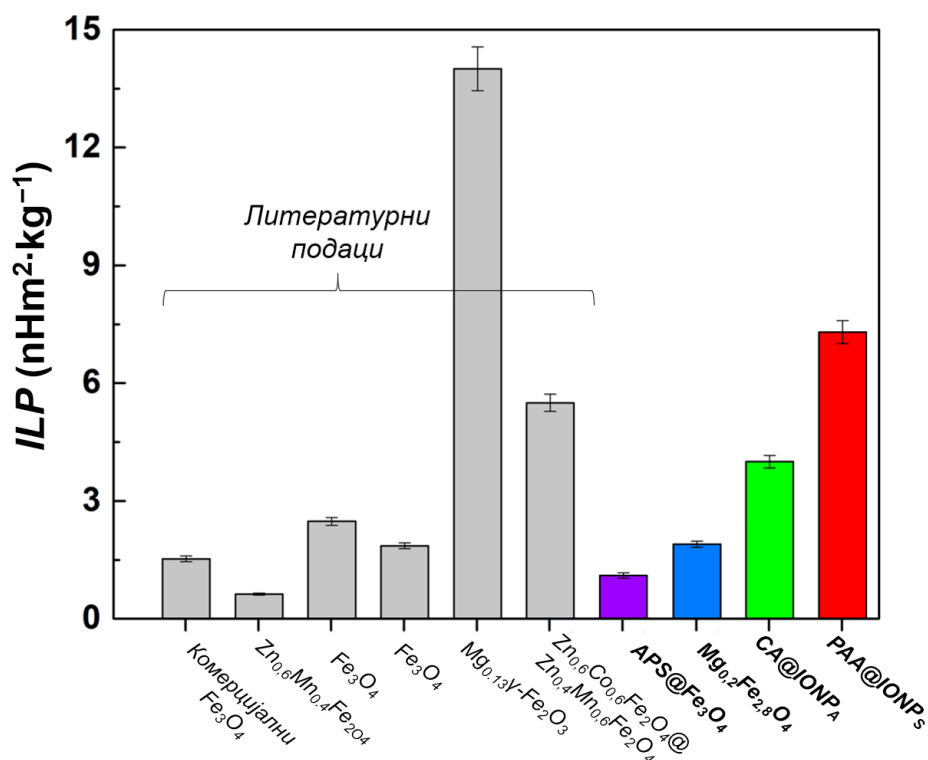
\*Величина једне честице у агломерату.

На слици 5.29 су приказани резултати MX за четири узорка са највећим *ILP* који су припремљени различитим поступцима синтезе. Вредности *ILP* износе: 1,1 nNm<sup>2</sup>·kg<sup>-1</sup> за APS@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, 2,0 nNm<sup>2</sup>·kg<sup>-1</sup> за Mg<sub>0,2</sub>Fe<sub>2,8</sub>O<sub>4</sub>, 4,0 nNm<sup>2</sup>·kg<sup>-1</sup> за CA@IONP<sub>A</sub> и 7,5 nNm<sup>2</sup>·kg<sup>-1</sup> за PAA@IONP<sub>S</sub>. Наночестице синтетисане таложном методом (APS@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) показују скромне хипертермијске способности у поређењу са недавним истраживањима MX, па је било потребно утврдити друге начине синтезе у циљу добијања већих *SAR* и *ILP* вредности.

Наночестице које су по саставу магнезијумом супституисани магнетит (Mg<sub>0,2</sub>Fe<sub>2,8</sub>O<sub>4</sub>) могу се даље испитати у циљу потенцијалне примене у хипертермијској терапији. Вредност *ILP* за комерцијалне Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> са називом *Feridex*<sup>®</sup> [215] је приказана за поређење. Имајући у виду да је у научним радовима објављен већи број синтетисаних МНЧ које имају *ILP* и до неколико пута већи од Mg<sub>0,2</sub>Fe<sub>2,8</sub>O<sub>4</sub>, развијање нових метода синтезе у циљу добијања наночестица са већим *ILP* је био изазов. Микроталасима потпомогнута хидротермална синтеза је погодна за синтезу МНЧ за хипертермијску примену, али само до одређене границе, будући да је први корак синтезе мање ефикасна таложна метода, са слабијом контролом величине и облика МНЧ.

Наночестице синтетисане полиол методом на атмосферском притиску (IONP<sub>A</sub>) су се показале као добар агенс за примену у MX. Применом одговарајућих протокола површинске модификације, ефикасност грејања се може побољшати тако да постаје упоредива или већа од већине недавно забележених резултата, при чему је достигнута скоро три пута већа *ILP* вредност од комерцијалних *Feridex*<sup>®</sup> наночестица.

Наночестице синтетисане солвотермалном полиол методом (IONP<sub>S</sub>) показују одличне топлотне ефикасности. Након успешног облагања PAA лигандом, постизањем биокompatibilности и стабилне колоидне суспензије, измерена *ILP* вредност PAA@IONP<sub>S</sub> је чак једанаест пута већа у поређењу са Zn<sub>0,6</sub>Mn<sub>0,4</sub>F<sub>2</sub>O<sub>4</sub> наночестицама [215] и око пет пута већа у односу на *Feridex*<sup>®</sup> наночестице [215]. Прегледом литературних података, само је неколицина примера са вишим *ILP* вредностима. *Jang* и сарадници су недавно синтетисали наночестице у којима су јони магнезијума имплементирани у вакантну γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> структуру (Mg<sub>0,13</sub>γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) [236]. Аутори су објавили веома високе *ILP* које износе око 14 nNm<sup>2</sup>·kg<sup>-1</sup>.



Слика 5.29. Поређење *ILP* вредности из литературе са *ILP* вредностима МНЧ синтетисаних у току израде докторске дисертације.

Литературни подаци за *SAR* и *ILP* изабраних суперпарамагнетних наночестица су упоређени са резултатима добијеним током израде ове докторске дисертације (табела 5.11). Мора се напоменути да ово поређење не може бити у потпуности тачно јер није извршена стандардизација методе МХ. Како се применом различитих експерименталних уређаја базираних на калориметријским мерењима (од којих су многи конструисани у лабораторијским условима и нису комерцијално доступни) значајно мењају услови мерења услед непостојања великог распона магнетног поља и фреквенција, као и лоше термичке изолације, долази до варијације добијених резултата. Према томе, оваква поређења треба да се посматрају само као апроксимативна, све док се не изврши планирана стандардизација методе.

Имајући у виду велике приносе радиообележавања испитиваних наночестица различитим радионуклидима, може се рећи да узорци синтетисани полиол методом показују велики потенцијал за могућу примену у комбинованој хипертермијско-радионуклидној терапији и дијагностици тумора. Посебно се истичу два узорка припремљена полиол методом,  $CA@IONP_A$  и  $PAA@IONP_S$ .

**Табела 5.11.** Поређење литературних података за *SAR* и *ILP* вредности и резултата добијених током израде ове докторске дисертације

Материјал	Величина $D_{TEM}$ (nm)	Фреквенција $f$ (kHz)	Јачина поља $H_0$ (kA·m <sup>-1</sup> )	<i>SAR</i> (W·g <sup>-1</sup> )	<i>ILP</i> (nHm <sup>2</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	Реф.
Комерцијални Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ( <i>Feridex</i> <sup>®</sup> )	15	500	37,7	115	1,6	[215]
Zn <sub>0,6</sub> Mn <sub>0,4</sub> F <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	15	500	37,7	432	0,63	[215]
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	10	300	15	168	2,48	[237]
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	14	400	24,5	447	1,86	[238]
Mg <sub>0,13</sub> γ-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	7	110	11,14	201	14,0	[236]
Zn <sub>0,4</sub> Co <sub>0,6</sub> Fe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> @ Zn <sub>0,4</sub> Mn <sub>0,6</sub> Fe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	15	500	37,7	3886	5,5	[239]
APS@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	13,0	252	15,9	67,2	1,09	[240]
Mg <sub>0,2</sub> Fe <sub>2,8</sub> O <sub>4</sub>	13,4	252	15,9	125	1,97	[241]
CA@IONP <sub>A</sub>	22,2(8,7*)	252	15,9	253	3,96	[242]
PAA@IONP <sub>S</sub>	24,8(13,5*)	252	15,9	478	7,49	[231]

\*Величина једне честице у агломерату.

## 5. ЗАКЉУЧАК

Основни циљ истраживања био је да се примене и модификују методе за синтезу магнетних наночестица на бази оксида гвожђа, при чему би оне по својим физикохемијским својствима биле погодне за даља истраживања њихове потенцијалне примене у терапији и дијагностици малигних болести. Синтетисане наночестице треба да су у форми стабилних колоида са високом топлотном ефикасношћу, површински модификоване бифункционалним лигандима који поседују слободне групе што би омогућило даљу функционализацију, односно везивање радионуклида у процесу радиообележавања.

Синтеза МНЧ на бази магнетита је извршена модификацијом три методе: таложне, микроталасима потпомогнуте хидротермалне синтезе након реакције таложења соли гвожђа на собној температури и полиол методе. Таложном методом синтетисан је магнетит. Хидротермалном синтезом у микроталасном пољу су синтетисане серије узорака кобалтом и магнезијумом супституисаног магнетита ( $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  и  $\text{Mg}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ ), док су полиол солвотермалном и синтезом у полиолима на атмосферском притиску синтетисана два узорка оксида гвожђа који највероватније представљају мешавину магнетита и магхемита.

Од синтетисаних узорака, највећу вредност сатурационе магнетизације  $M_S = 77,8 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$  су имале наночестице  $\text{Co}_{0,2}\text{Fe}_{2,8}\text{O}_4$  октагоналне морфологије и просечне величине 24,8 nm. Најнижу вредност,  $M_S = 41,8 \text{ emu} \cdot \text{g}^{-1}$  су показале наночестице  $\text{Mg}_{0,6}\text{Fe}_{2,4}\text{O}_4$  припремљене хидротермалном синтезом у микроталасном пољу. Вредност  $M_S$  утиче на Néel-ово релаксационе време, а самим тим и на хипертермијску ефикасност. У материјалима на наноскали 3d јони могу заузимасти оба кристалографска положаја у спинелном типу структуре, па од њихове расподеле зависе суперизменске интеракције и магнетни момент наночестица, односно магнетизација узорка. Избором метода и параметара синтезе, може се утицати и донекле контролисати расподела јона. Примећено је да однос катјона у мешовитим узорцима има велики утицај на величину честица. Са променом пречника честице могу се контролисати Brown-ово и Néel-ово релаксационо време а тиме и хипертермијска ефикасност. У случају Néel-овог времена релаксације величина честица је од интереса са становишта магнетизма. Код изузетно малих честица јавља се магнетно неуређени површински слој који снижава сатурациону магнетизацију. Такође, кристална и магнетна неуређеност унутар малих честица утиче на укупну магнетизацију. Добијени резултати указују да се наночестицама на бази магнетита може контролисати величина честица, а тиме и магнетне особине, тако што се  $\text{Fe}^{2+}$  јони супституишу јонима 3d елемената.

За примене у биомедицини наночестице се облажу различитим органским и неорганским једињењима. При изради ове дисертације као молекули за облагање коришћени су СА (лимунска киселина), PAA (поли(акрилна киселина)), PEG (поли(етилен гликол)), DEX (декстран) и APS ((3-аминопропил)триетоксисилан). Полазећи од литературних протокола и њиховом даљом модификацијом урађена је површинска модификација МНЧ молекулима са различитом структуром и различитим механизмима површинске стабилизације суспензије наночестица (електростатички или просторно). Облагањем наночестица смањена је њихова агрегација и формиране су стабилне колоидне суспензије (ферофлуиди) на физиолошким рН вредностима. Повећана је биокомпатибилност МНЧ, да би се потенцијално могле користити у даљим *in vitro* и *in vivo* истраживањима. Њихова нетоксичност је потврђена у оквиру испитивања цитотоксичности, која нису била предмет ове дисертације [231,242].

Карактеристични параметри за колоидне суспензије, хидродинамички пречник ( $D_H$ ) и зета потенцијал ( $\xi$ ) су од значаја за хипертермијску ефикасност, радиотерапијске примене, као и друге *in vivo* примене. Избором једињења за облагање наночестица могуће је контролисати и хидродинамички пречник и зета потенцијал а самим тим и оптимизовати услове који су

потребни за тражену примену. Код честица синтетисаних таложном методом  $D_H$  износе:  $21 \pm 4$  nm за  $Fe_3O_4$ ,  $47 \pm 11$  nm за  $CA@Fe_3O_4$ ,  $68 \pm 16$  nm за  $APS@Fe_3O_4$  и  $77 \pm 17$  nm за  $DEX@Fe_3O_4$ . Код честица серије  $Co_xFe_{3-x}O_4$  површински модификованих CA и PEG-ом,  $D_H$  су у опсегу од 150-500 nm. Када су у питању  $IONP_A$  цветне морфологије синтетисане полиол методом у балону,  $D_H$  износе:  $23 \pm 5$  nm за  $IONP_A$ ,  $24 \pm 4$  nm за  $CA@IONP_A$ ,  $149 \pm 35$  nm за  $APS@IONP_A$  и  $277 \pm 50$  nm за  $DEX@IONP$ . Ови резултати показују значајан утицај облоге на вредност  $D_H$ , а самим тим и на остале карактеристике које зависе од хидродинамичког пречника.

Стабилност колоидних дисперзија на рН 7,4 је неопходан услов за њихове примене како у магнетној хипертермији тако и у било којој *in vivo* примени. Она је анализирана мерењем зета потенцијала у зависности од рН вредности, при чему се под утицајем примењене облоге значајно мењало наелектрисање синтетисаних обложених наночестица. Резултати указују да долази до промене изоелектричне тачке са рН  $8,0 \pm 0,2$  за необложене МНЧ, на  $3,0 \pm 0,1$  за CA-обложене,  $10,3 \pm 0,2$  за обложене APS-ом,  $7,4 \pm 0,2$  за обложене DEX-ом и на  $5,9 \pm 0,1$  за МНЧ обложене PAA лигандом. Избором једињења и успешном модификацијом површине се постиже електростатичка стабилизација при чему су МНЧ значајно наелектрисане на физиолошком рН, изузев  $DEX@IONP_A$  код којих је мерењима зета потенцијала показано да је стабилизација извршена стерним механизмом.

Резултати истраживања магнетне хипертермије показују да најбољу топлотну ефикасност у *ac* магнетном пољу јачине  $H_0 = 15,9$  kA·m<sup>-1</sup> и фреквенције  $f = 252$  kHz имају честице припремљене солвотермалном синтезом у полиолима, PAA@ $IONP_S$  ( $SAR = 478,1$  W·g<sup>-1</sup>,  $ILP = 7,49$  nHm<sup>2</sup>·kg<sup>-1</sup>), затим цитратима обложене наночестице припремљене полиол синтезом у балону на атмосферском притиску, CA@ $IONP_A$  ( $SAR = 252,9$  W·g<sup>-1</sup>,  $ILP = 3,96$  nHm<sup>2</sup>·kg<sup>-1</sup>). Ефикасност грејања наночестица је значајано већа од комерцијално доступних *Feridex*<sup>®</sup> МНЧ код којих је  $ILP = 1,60$  nHm<sup>2</sup>·kg<sup>-1</sup>. Наночестице на бази  $Fe_3O_4$ , синтетисане таложном методом и двостепеном методом (таложна која је праћена хидротермалном у микроталасном пољу) показују ниже  $SAR$  вредности па нису даље радиообележаване и тестиране за комбиновану хипертермијско-радионуклидну терапију. Може се закључити да наночестице синтетисане полиол техником, уз пажљиво подешавање параметара синтезе и избора протокола површинске модификације могу бити веома успешно примењене као агенси за *in vitro* и *in vivo* магнетну хипертермију. Са друге стране, наночестице синтетисане микроталасима потпомогнутом хидротермалном синтезом, уз претходну прецизну контролу састава и делимичном супституцијом јона у кристалној решетки магнетита, се могу дизајнирати тако да достижу  $SAR$  и  $ILP$  вредности комерцијално доступних МНЧ за хипертермијске примене.

Захваљујући присуству негативно наелектрисаних слободних  $-COO^-$  и  $-OH^-$ , као и позитивних  $-NH_3^+$  функционалних група на површини обложених наночестица, могућа је даља функционализација лековима за примене у хемиотерапији и/или радионуклидима у радионуклидној терапији малигних тумора. У ту сврху, испитивана је могућност везивања радионуклида и стабилност радиообележавања у физиолошким медијумима. За разлику од примене у хемиотерапији у којој је неопходно одвојити лек са површине наночестице да би он био ефикасан, у радионуклидној терапији је потребно да радионуклид буде чврсто везан за наночестицу и да се као такав допреми до циљаног ткива. Негативно површинско наелектрисање које потиче од молекула богатим  $-COO^-$  и  $-OH^-$  функционалним групама којим су облагане наночестице омогућава везивање радионуклида  $^{90}Y$  и  $^{177}Lu$  који се у суспензији налазе у облику својих тровалентних јона ( $^{90}Y^{3+}$  и  $^{177}Lu^{3+}$ ), као и радионуклидом  $^{99m}Tc$  који се у раствору налази у облику седмовалентног јона ( $^{99m}Tc^{7+}$ ).

Високи приноси обележавања радионуклидима  $^{90}Y$  и  $^{177}Lu$  ( $\geq 99,2\%$ ) су постигнути за CA-, PAA- и PEG-обложене  $IONP_S$  добијене у полиолима захваљујући грађењу хемијске везе

са слободним дисосованим карбоксилним и хидроксилним групама. Принос радиообележавања  $^{99m}\text{Tc}$  је најнижи код  $\text{PEG@IONPs}$  и износио је 69,2%, док је код  $\text{CA@IONPs}$  и  $\text{PAA@IONPs}$  принос износио  $\geq 97,5\%$ . Очигледно је да хидроксилне групе присутне на површини  $\text{PEG}$ -а нису биле у могућности да довољно снажно вежу јоне  $^{99m}\text{Tc}^{7+}$  да би се постигао високи принос, па је неопходно укључити и додатни хелатор за остваривање виших приноса. За биомедицинске примене потребна су радиообележена једињења која показују високу стабилност *in vivo* што се прво испитује *in vitro* методама при физиолошким условима. Веома добру *in vitro* стабилност у физиолошком раствору и хуманом серум-албумину су показале све обложене магнетне наночестице са мање од 10% слободног радионуклида  $^{99m}\text{Tc}$  након 24 h, односно  $^{90}\text{Y}$  након 72 h и  $^{177}\text{Lu}$  након 96 h од радиообележавања. Највећи проценат ослобађања радионуклида био је у првом сату након поступка радиообележавања. Након пречишћавања од вишка неvezаног радионуклида, преостали радионуклиди су чврсто везани за облогу наночестица и оне се потенцијално могу користити за примене *in vitro* и *in vivo*.

Високи приноси обележавања и одговарајућа *in vitro* стабилност током целог инкубационог периода у физиолошким условима указују на могућност примене испитаних МНЧ у радионуклидној терапији тумора (ако се за радиообележавање користе  $^{90}\text{Y}$  и  $^{177}\text{Lu}$ ), као и примене у дијагностици, ако се користи дијагностички радионуклид  $^{99m}\text{Tc}$ . Поред тога,  $\text{PAA@IONPs}$  синтетисане солвотермалном полиол техником поседују одличну топлотну ефикасност и резултовале су високим *ILP*, што указује на њихов велики хипертермијски потенцијал. Овакве особине  $\text{PAA@IONPs}$  издвајају као кандидата за примену у комбинованој хипертермијско-радионуклидној терапији и дијагностици малигнух тумора, специфичним дизајнирањем система радиообележена-обложена магнетна наночестица.

$\text{PAA@IONPs}$  након обележавања различитим радионуклидима имају велики потенцијал као тераностички агенс. Наиме, овако дизајнирана радиообележена магнетна наночестица се истовремено може користити у терапији, на пример као агенс у магнетној хипертермији или хипертермијско-радионуклидној терапији (ако се обележи радионуклидима  $^{90}\text{Y}$  и  $^{177}\text{Lu}$ ), али и као дијагностички агенс обележена радионуклидом  $^{99m}\text{Tc}$ . Истраживања која се надовезују на ову докторску дисертацију су показала значајан цитотоксични ефекат *in vitro*  $^{90}\text{Y}$ - $\text{PAA@IONPs}$  у комбинованој хипертермијско-радионуклидној терапији на СТ-26 ћелијама тумора дебелог црева миша [231], док су  $^{90}\text{Y}$ - $\text{CA@IONPs}$  имале значајан терапијски ефекат у дуалној хипертермијско-радионуклидној *in vivo* нанобрахитерапији ксенографта СТ-26 и 4Т1 (малигнуог тумора дојке) тумора миша, након интратуморске инјекције [242].

## 6. ЛИТЕРАТУРА

1. Roduner, E. Size Matters: Why Nanomaterials Are Different. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 583.
2. Tartaj, P. Nanomagnets-From Fundamental Physics to Biomedicine. *Curr. Nanosci.* **2006**, *2*, 43–53.
3. Whitesides, G. Nanoscience, Nanotechnology, and Chemistry. *Small* **2005**, *1*, 172–179.
4. Feynman, R.P. There's Plenty of Room at the Bottom. *Eng. Sci.* **1959**, *23*, 22–36.
5. Mohapatra, J.; Xing, M.; Liu, J.P. Inductive Thermal Effect of Ferrite Magnetic Nanoparticles. *Materials* **2019**, *12*, 3208.
6. Vucinic-Vasic, M.; Bozin, E.S.; Bessais, L.; Stojanovic, G.; Kozmidis-Luburic, U.; Abeykoon, M.; Jancar, B.; Meden, A.; Kremenovic, A.; Antic, B. Thermal Evolution of Cation Distribution/Crystallite Size and Their Correlation with the Magnetic State of Yb-Substituted Zinc Ferrite Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 12358–12365.
7. Kolhatkar, A.; Jamison, A.; Litvinov, D.; Willson, R.; Lee, T. Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 15977–16009.
8. Kutvonen, A.; Rossi, G.; Puisto, S.R.; Rostedt, N.K.J.; Ala-Nissila, T. Influence of Nanoparticle Size, Loading, and Shape on the Mechanical Properties of Polymer Nanocomposites. *J. Chem. Phys.* **2012**, *137*, 214901.
9. Chan, W.C. Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science* **1998**, *281*, 2016–2018.
10. Bhushan, B. Introduction to nanotechnology. In *Springer handbook of nanotechnology*; Springer, **2017**, 1–19.
11. Huber, D. Synthesis, Properties, and Applications of Iron Nanoparticles. *Small* **2005**, *1*, 482–501.
12. Williams, H.M. The Application of Magnetic Nanoparticles in the Treatment and Monitoring of Cancer and Infectious Diseases. *Biosci. Horiz. Int. J. Stud. Res.* **2017**, *10*.
13. Riggio, C.; Calatayud, M.P.; Giannaccini, M.; Sanz, B.; Torres, T.E.; Fernández-Pacheco, R.; Ripoli, A.; Ibarra, M.R.; Dente, L.; Cuschieri, A.; et al. The Orientation of the Neuronal Growth Process Can Be Directed via Magnetic Nanoparticles under an Applied Magnetic Field. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2014**, *10*, 1549–1558.
14. Yilmaz, A.; Bietenbeck, M.; Florian, A.; Faber, C.; Sechtem, U. Remote Magnetic Targeting of Iron Oxide Nanoparticles for Cardiovascular Diagnosis and Therapeutic Drug Delivery: Where Are We Now? *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *11*, 3191–3203.
15. Moghimi, S.M.; Hunter, A.C.; Murray, J.C. Nanomedicine: Current Status and Future Prospects. *FASEB journal.* **2005**, *19*, 311–330.
16. Mornet, S.; Vasseur, S.; Grasset, F.; Duguet, E. Magnetic Nanoparticle Design for Medical Diagnosis and Therapy. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2161.
17. Pankhurst, Q.A.; Connolly, J.; Jones, S.K.; Dobson, J. Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine. *J. Phys. Appl. Phys.* **2003**, *36*, R167–R181.
18. Sahin, U.; Muik, A.; Derhovannessian, E.; Vogler, I.; Kranz, L.M.; Vormehr, M.; Baum, A.; Pascal, K.; Quandt, J.; Maurus, D.; et al. COVID-19 Vaccine BNT162b1 Elicits Human Antibody and TH1 T Cell Responses. *Nature* **2020**, *586*, 594–599.
19. Mission Area: Cancer Доступно: [https://ec.europa.eu/info/horizon-europe/missions-horizon-europe/cancer\\_en](https://ec.europa.eu/info/horizon-europe/missions-horizon-europe/cancer_en) (приступљено 6. априла 2021. године).
20. Frenkel, J.; Doefman, J. Spontaneous and Induced Magnetisation in Ferromagnetic Bodies. *Nature* **1930**, *126*, 274–275.
21. Ahmadi, M. Iron oxide nanoparticles for delivery purposes. In *Nanoengineered Biomaterials for Advanced Drug Delivery*; Elsevier, **2020**, 373–393, ISBN 978-0-08-102985-5.
22. Vatta, L.L.; Sanderson, R.D.; Koch, K.R. Magnetic Nanoparticles: Properties and Potential Applications. *Pure Appl. Chem.* **2006**, *78*, 1793–1801.



23. Roca, A.G.; Costo, R.; Rebolledo, A.F.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Tartaj, P.; González-Carreño, T.; Morales, M.P.; Serna, C.J. Progress in the Preparation of Magnetic Nanoparticles for Applications in Biomedicine. *J. Phys. Appl. Phys.* **2009**, *42*, 224002.
24. Srinivasan, B.; Huang, X. Functionalization of Magnetic Nanoparticles with Organic Molecules: Loading Level Determination and Evaluation of Linker Length Effect on Immobilization. *Chirality* **2008**, *20*, 265–277.
25. Cardoso, V.F.; Francesko, A.; Ribeiro, C.; Bañobre-López, M.; Martins, P.; Lanceros-Mendez, S. Advances in Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7*, 1700845.
26. Xue, P.; Sun, L.; Li, Q.; Zhang, L.; Guo, J.; Xu, Z.; Kang, Y. PEGylated Polydopamine-Coated Magnetic Nanoparticles for Combined Targeted Chemotherapy and Photothermal Ablation of Tumour Cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *160*, 11–21.
27. Jeong, U.; Teng, X.; Wang, Y.; Yang, H.; Xia, Y. Superparamagnetic Colloids: Controlled Synthesis and Niche Applications. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 33–60.
28. Pang, Y.; Wang, C.; Wang, J.; Sun, Z.; Xiao, R.; Wang, S. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ag Magnetic Nanoparticles for MicroRNA Capture and Duplex-Specific Nuclease Signal Amplification Based SERS Detection in Cancer Cells. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *79*, 574–580.
29. Herrmann, I.K.; Schlegel, A.A.; Graf, R.; Stark, W.J.; Beck-Schimmer, B. Magnetic Separation-Based Blood Purification: A Promising New Approach for the Removal of Disease-Causing Compounds? *J. Nanobiotechnology* **2015**, *13*, 49.
30. Dobson, J. Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery. *Drug Dev. Res.* **2006**, *67*, 55–60.
31. Wu, M.; Huang, S. Magnetic Nanoparticles in Cancer Diagnosis, Drug Delivery and Treatment (Review). *Mol. Clin. Oncol.* **2017**, *7(5)*, 738–746.
32. Arruebo, M.; Fernández-Pacheco, R.; Ibarra, M.R.; Santamaría, J. Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery. *Nano Today* **2007**, *2*, 22–32.
33. Joubert, J.C. Magnetic Micro Composites as Vectors for Bioactive Agents: The State of Art. *An. Química* **1997**, *93*, 70–76.
34. Chalmers, J.J.; Zhao, Y.; Nakamura, M.; Melnik, K.; Lasky, L.; Moore, L.; Zborowski, M. An Instrument to Determine the Magnetophoretic Mobility of Labeled, Biological Cells and Paramagnetic Particles. *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *194*, 231–241.
35. Geraldes, C.F.G.C.; Laurent, S. Classification and Basic Properties of Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Contrast Media Mol. Imaging* **2009**, *4*, 1–23.
36. Sosnovik, D.E.; Nahrendorf, M.; Weissleder, R. Magnetic Nanoparticles for MR Imaging: Agents, Techniques and Cardiovascular Applications. *Basic Res. Cardiol.* **2008**, *103*, 122–130.
37. Corot, C.; Robert, P.; Idee, J.; Port, M. Recent Advances in Iron Oxide Nanocrystal Technology for Medical Imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1471–1504.
38. J. Gabriel *The Biology of Cancer*; John Wiley & Sons Ltd., Chichester, **2007**, ISBN 9780470057599.
39. van der Zee, J. Heating the Patient: A Promising Approach? *Ann. Oncol.* **2002**, *13*, 1173–1184.
40. Issels, R.D. Hyperthermia Adds to Chemotherapy. *Eur. J. Cancer* **2008**, *44*, 2546–2554.
41. Gilchrist, R.K.; Medal, R.; Shorey, W.D.; Hanselman, R.C.; Parrott, J.C.; Taylor, C.B. Selective Inductive Heating of Lymph Nodes: *Ann. Surg.* **1957**, *146*, 596–606.
42. Medal, R. Controlled Radio-Frequency Generator for Production of Localized Heat in Intact Animal: Mechanism and Construction. *AMA Arch. Surg.* **1959**, *79*, 427.
43. Gilchrist, R.K.; Shorey, W.D.; Hanselman, R.C.; Depeyster, F.A.; Yang, J.; Medal, R. Effects of Electromagnetic Heating on Internal Viscera: A Preliminary to the Treatment of Human Tumors. *Ann. Surg.* **1965**, *161*, 890–896.
44. Maier-Hauff, K.; Ulrich, F.; Nestler, D.; Niehoff, H.; Wust, P.; Thiesen, B.; Orawa, H.; Budach, V.; Jordan, A. Efficacy and Safety of Intratumoral Thermotherapy Using Magnetic Iron-Oxide Nanoparticles Combined with External Beam Radiotherapy on Patients with Recurrent Glioblastoma Multiforme. *J. Neurooncol.* **2011**, *103*, 317–324.

45. Ito, A.; Honda, H.; Kobayashi, T. Cancer Immunotherapy Based on Intracellular Hyperthermia Using Magnetite Nanoparticles: A Novel Concept of “Heat-Controlled Necrosis” with Heat Shock Protein Expression. *Cancer Immunol. Immunother.* **2006**, *55*, 320–328.
46. Rabin, Y. Is Intracellular Hyperthermia Superior to Extracellular Hyperthermia in the Thermal Sense? *Int. J. Hyperthermia* **2002**, *18*, 194–202.
47. Johannsen, M.; Thiesen, B.; Wust, P.; Jordan, A. Magnetic Nanoparticle Hyperthermia for Prostate Cancer. *Int. J. Hyperthermia* **2010**, *26*, 790–795.
48. W. Andra and H. Nowack *Magnetism in Medicine. A Handbook*; eds. R. Hergt and W. Andra, **2007**, ISBN 978-3-527-61017-4.
49. Hergt, R.; Andra, W.; d’Ambly, C.G.; Hilger, I.; Kaiser, W.A.; Richter, U.; Schmidt, H.-G. Physical Limits of Hyperthermia Using Magnetite Fine Particles. *IEEE Trans. Magn.* **1998**, *34*, 3745–3754.
50. Burrows, F.; Parker, C.; Evans, R.F.L.; Hancock, Y.; Hovorka, O.; Chantrell, R.W. Energy Losses in Interacting Fine-Particle Magnetic Composites. *J. Phys. Appl. Phys.* **2010**, *43*, 474010.
51. Dennis, C.L.; Jackson, A.J.; Borchers, J.A.; Hoopes, P.J.; Strawbridge, R.; Foreman, A.R.; van Lierop, J.; Grüttner, C.; Ivkov, R. Nearly Complete Regression of Tumors via Collective Behavior of Magnetic Nanoparticles in Hyperthermia. *Nanotechnology* **2009**, *20*, 395103.
52. Rodrigues, H.F.; Capistrano, G.; Bakuzis, A.F. *In Vivo* Magnetic Nanoparticle Hyperthermia: A Review on Preclinical Studies, Low-Field Nano-Heaters, Noninvasive Thermometry and Computer Simulations for Treatment Planning. *Int. J. Hyperthermia* **2020**, *37*, 76–99.
53. Mohapatra, J.; Liu, J.P. Rare-Earth-Free Permanent Magnets: The Past and Future. In *Handbook of Magnetic Materials*; Elsevier, **2018**, *27*, 1–57, ISBN 978-0-444-64161-8.
54. Bedanta, S.; Kleemann, W. Supermagnetism. *J. Phys. Appl. Phys.* **2009**, *42*, 013001.
55. D. Ortega *Magnetic Nanoparticles: From Fabrication to Biomedical and Clinical Applications*; ed. N. T. K. Thanh, CRC Press, **2011**, ISBN 9780367507923.
56. L. Néel *Théorie Du Trainage Magnétique Des Ferromagnétiques En Grains Fins Avec Applications Aux Terres Cuites. Ann. Geophys.* **1949**, *5*, 99–136.
57. Brown, W.F. Thermal Fluctuations of a Single-Domain Particle. *Phys. Rev.* **1963**, *130*, 1677–1686.
58. Rosensweig, R.E. Heating Magnetic Fluid with Alternating Magnetic Field. *J. Magn. Magn. Mater.* **2002**, *252*, 370–374.
59. Spirou, S.; Basini, M.; Lascialfari, A.; Sangregorio, C.; Innocenti, C. Magnetic Hyperthermia and Radiation Therapy: Radiobiological Principles and Current Practice. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 401.
60. Hergt, R.; Dutz, S.; Zeisberger, M. Validity Limits of the Néel Relaxation Model of Magnetic Nanoparticles for Hyperthermia. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 015706.
61. Mehdaoui, B.; Meffre, A.; Carrey, J.; Lachaize, S.; Lacroix, L.-M.; Gougeon, M.; Chaudret, B.; Respaud, M. Optimal Size of Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia: A Combined Theoretical and Experimental Study. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 4573–4581.
62. Carrey, J.; Mehdaoui, B.; Respaud, M. Simple Models for Dynamic Hysteresis Loop Calculations of Magnetic Single-Domain Nanoparticles: Application to Magnetic Hyperthermia Optimization. *J. Appl. Phys.* **2011**, *109*, 083921.
63. Colombo, M.; Carregal-Romero, S.; Casula, M.F.; Gutiérrez, L.; Morales, M.P.; Böhm, I.B.; Heverhagen, J.T.; Prospero, D.; Parak, Wolfgang.J. Biological Applications of Magnetic Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4306.
64. Zirix, J.M.; Smith, K.I.; Nelson, D.A.; Ryan, K.L.; Gajsek, P.; D’Andrea, J.A.; Walters, T.J.; Hurt, W.D.; Mason, P.A. Effects of Frequency, Permittivity, and Voxel Size on Predicted Specific Absorption Rate Values in Biological Tissue during Electromagnetic-Field Exposure. *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* **2000**, *48*, 2050–2058.

65. Goya, G.F.; Lima, E.; Arelaro, A.D.; Torres, T.; Rechenberg, H.R.; Rossi, L.; Marquina, C.; Ibarra, M.R. Magnetic Hyperthermia With Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles: The Influence of Particle Size on Energy Absorption. *IEEE Trans. Magn.* **2008**, *44*, 4444–4447.
66. Kallumadil, M.; Tada, M.; Nakagawa, T.; Abe, M.; Southern, P.; Pankhurst, Q.A. Suitability of Commercial Colloids for Magnetic Hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1509–1513.
67. Atkinson, W.J.; Brezovich, I.A.; Chakraborty, D.P. Usable Frequencies in Hyperthermia with Thermal Seeds. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **1984**, *BME-31*, 70–75.
68. Brezovich, I. A. Low Frequency Hyperthermia: Capacitive and Ferromagnetic Thermoseed Methods. Medical Physics Monograph. *Med. Phys. Monogr.* **1988**, *16*, 82–111.
69. Hergt, R.; Dutz, S.; Müller, R.; Zeisberger, M. Magnetic Particle Hyperthermia: Nanoparticle Magnetism and Materials Development for Cancer Therapy. *J. Phys. Condens. Matter* **2006**, *18*, S2919–S2934.
70. Barry, S.E. Challenges in the Development of Magnetic Particles for Therapeutic Applications. *Int. J. Hyperthermia* **2008**, *24*, 451–466.
71. Gudoshnikov, S.A.; Liubimov, B.Ya.; Usov, N.A. Hysteresis Losses in a Dense Superparamagnetic Nanoparticle Assembly. *AIP Adv.* **2012**, *2*, 012143.
72. Chithrani, B.D.; Ghazani, A.A.; Chan, W.C.W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 662–668.
73. Seehra, M.S.; Singh, V.; Dutta, P.; Neeleshwar, S.; Chen, Y.Y.; Chen, C.L.; Chou, S.W.; Chen, C.C. Size-Dependent Magnetic Parameters of Fcc FePt Nanoparticles: Applications to Magnetic Hyperthermia. *J. Phys. Appl. Phys.* **2010**, *43*, 145002.
74. E. Pollert, K.Z. *Magnetic Nanoparticles: From Fabrication to Clinical Applications*; ed N. T. K. Thanh, CRC Press, Boca Raton, **2012**, ISBN 978-1-4398-6932-1.
75. Périgo, E.A.; Silva, S.C.; de Sousa, E.M.B.; Freitas, A.A.; Cohen, R.; Nagamine, L.C.C.M.; Takiishi, H.; Landgraf, F.J.G. Properties of Nanoparticles Prepared from NdFeB-Based Compound for Magnetic Hyperthermia Application. *Nanotechnology* **2012**, *23*, 175704.
76. Sugumaran, P.J.; Liu, X.-L.; Herng, T.S.; Peng, E.; Ding, J. GO-Functionalized Large Magnetic Iron Oxide Nanoparticles with Enhanced Colloidal Stability and Hyperthermia Performance. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 22703–22713.
77. Obaidat, I.M.; Narayanaswamy, V.; Alaabed, S.; Sambasivam, S.; Muralee Gopi, C.V.V. Principles of Magnetic Hyperthermia: A Focus on Using Multifunctional Hybrid Magnetic Nanoparticles. *Magnetochemistry* **2019**, *5*, 67.
78. Zhang, G.; Liao, Y.; Baker, I. Surface Engineering of Core/Shell Iron/Iron Oxide Nanoparticles from Microemulsions for Hyperthermia. *Mater. Sci. Eng. C* **2010**, *30*, 92–97.
79. Giustini, A.J.; Petryk, A.A.; Cassim, S.M.; Tate, J.A.; Baker, I.; Hoopes, P.J. magnetic nanoparticle hyperthermia in cancer treatment. *Nano LIFE* **2010**, *01*, 17–32.
80. Oumezzine, E.; Hcini, S.; Baazaoui, M.; Hlil, E.K.; Oumezzine, M. Structural, Magnetic and Magnetocaloric Properties of Zn<sub>0.6-x</sub>Ni<sub>x</sub>Cu<sub>0.4</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Ferrite Nanoparticles Prepared by Pechini Sol-Gel Method. *Powder Technol.* **2015**, *278*, 189–195.
81. Srivastava, M.; Alla, S.K.; Meena, S.S.; Gupta, N.; Mandal, R.K.; Prasad, N.K. Zn<sub>x</sub>Fe<sub>3-x</sub>O<sub>4</sub> (0.01 ≤ x ≤ 0.8) Nanoparticles for Controlled Magnetic Hyperthermia Application. *New J. Chem.* **2018**, *42*, 7144–7153.
82. Ferik, G.; Drogenik, M.; Lisjak, D.; Hamler, A.; Jagličić, Z.; Makovec, D. Synthesis and Characterization of Mg<sub>1+x</sub>Fe<sub>2-2x</sub>Ti<sub>x</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles with an Adjustable Curie Point. *J. Magn. Magn. Mater.* **2014**, *350*, 124–128.
83. Thiesen, B.; Jordan, A. Clinical Applications of Magnetic Nanoparticles for Hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* **2008**, *24*, 467–474.
84. Arami, H.; Khandhar, A.; Liggitt, D.; Krishnan, K.M. In Vivo Delivery, Pharmacokinetics, Biodistribution and Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8576–8607.

85. Radović, M.; Vranješ-Đurić, S.; Nikolić, N.; Janković, D.; Goya, G.F.; Torres, T.E.; Calatayud, M.P.; Bruvera, I.J.; Ibarra, M.R.; Spasojević, V.; et al. Development and Evaluation of <sup>90</sup>Y-Labeled Albumin Microspheres Loaded with Magnetite Nanoparticles for Possible Applications in Cancer Therapy. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 24017.
86. Gholami, A.; Mousavi, S.M.; Hashemi, S.A.; Ghasemi, Y.; Chiang, W.-H.; Parvin, N. Current Trends in Chemical Modifications of Magnetic Nanoparticles for Targeted Drug Delivery in Cancer Chemotherapy. *Drug Metab. Rev.* **2020**, *52*, 205–224.
87. Espinosa, A.; Kolosnjaj-Tabi, J.; Abou-Hassan, A.; Plan Sangnier, A.; Curcio, A.; Silva, A.K.A.; Di Corato, R.; Neveu, S.; Pellegrino, T.; Liz-Marzán, L.M.; et al. Magnetic (Hyper)Thermia or Photothermia? Progressive Comparison of Iron Oxide and Gold Nanoparticles Heating in Water, in Cells, and In Vivo. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1803660.
88. Yang, R.; Tang, Q.; Miao, F.; An, Y.; Li, M.; Han, Y.; Wang, J.; Liu, P.; Chen, R.; Wang, X. Inhibition of Heat-Shock Protein 90 Sensitizes Liver Cancer Stem-like Cells to Magnetic Hyperthermia and Enhances Anti-Tumor Effect on Hepatocellular Carcinoma-Burdened Nude Mice. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, *10*, 7345.
89. Wohlfarth, E.P., *Handbook of Magnetic Materials*. North Holland **1982**, *3(1)*, ISBN 9780444863782.
90. Novák, P. Transition Metal Oxides: Magnetism. In *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*; Buschow, K.H.J., Cahn, R.W., Flemings, M.C., Ilshner, B., Kramer, E.J., Mahajan, S., Veysière, P., Eds.; Elsevier: Oxford, **2001**, 9397–9402, ISBN 978-0-08-043152-9.
91. Paterson, E. The Iron Oxides. Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses. *Clay Miner.* **1999**, *34*, 209–210.
92. Blanco-Andujar, C.; Ortega, D.; Pankhurst, Q.A.; Thanh, N.T.K. Elucidating the Morphological and Structural Evolution of Iron Oxide Nanoparticles Formed by Sodium Carbonate in Aqueous Medium. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 12498.
93. Ahn, T.; Kim, J.H.; Yang, H.-M.; Lee, J.W.; Kim, J.-D. Formation Pathways of Magnetite Nanoparticles by Coprecipitation Method. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 6069–6076.
94. Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans. Magn.* **1981**, *17*, 1247–1248.
95. Si, S.; Kotal, A.; Mandal, T.K.; Giri, S.; Nakamura, H.; Kohara, T. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles in the Presence of Polyelectrolytes. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 3489–3496.
96. Lee, D.C.; Smith, D.K.; Heitsch, A.T.; Korgel, B.A. Colloidal Magnetic Nanocrystals: Synthesis, Properties and Applications. *Annu. Rep. Sect. C Phys. Chem.* **2007**, *103*, 351.
97. Hyeon, T.; Lee, S.S.; Park, J.; Chung, Y.; Na, H.B. Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Magnetite Nanocrystallites without a Size-Selection Process. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12798–12801.
98. Sun, S.; Zeng, H. Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8204–8205.
99. Sun, S.; Zeng, H.; Robinson, D.B.; Raoux, S.; Rice, P.M.; Wang, S.X.; Li, G. Monodisperse MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 273–279.
100. Langevin, D. Micelles and Microemulsions. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1992**, *43*, 341–369.
101. Okoli, C.; Sanchez-Dominguez, M.; Boutonnet, M.; Järås, S.; Civera, C.; Solans, C.; Kuttuva, G.R. Comparison and Functionalization Study of Microemulsion-Prepared Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Langmuir* **2012**, *28*, 8479–8485.
102. Hu, L.; Percheron, A.; Chaumont, D.; Brachais, C.-H. Microwave-Assisted One-Step Hydrothermal Synthesis of Pure Iron Oxide Nanoparticles: Magnetite, Magnetite and Hematite. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2011**, *60*, 198–205.
103. Sun, J.; Wang, W.; Yue, Q. Review on Microwave-Matter Interaction Fundamentals and Efficient Microwave-Associated Heating Strategies. *Materials* **2016**, *9*, 231.

104. Sugimoto, T. *Fine Particles: Synthesis, Characterization, and Mechanisms of Growth*; Marcel Dekker: New York; Basel, **2000**, ISBN 978-0-8247-0001-0.
105. Viau, G.; Ravel, F.; Acher, O.; Fiévet-Vincent, F.; Fiévet, F. Preparation and Microwave Characterization of Spherical and Monodisperse Co<sub>20</sub>Ni<sub>80</sub> Particles. *J. Appl. Phys.* **1994**, *76*, 6570–6572.
106. Fievet, F.; Lagier, J.; Blin, B.; Beaudoin, B.; Figlarz, M. Homogeneous and Heterogeneous Nucleations in the Polyol Process for the Preparation of Micron and Submicron Size Metal Particles. *Solid State Ion.* **1989**, *32–33*, 198–205.
107. Hugounenq, P.; Levy, M.; Alloyeau, D.; Lartigue, L.; Dubois, E.; Cabuil, V.; Ricolleau, C.; Roux, S.; Wilhelm, C.; Gazeau, F.; et al. Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers for Highly Efficient Magnetic Hyperthermia. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 15702–15712.
108. Gupta, A.K.; Gupta, M. Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995–4021.
109. Niederberger, M.; Krumeich, F.; Hegetschweiler, K.; Nesper, R. An Iron Polyolate Complex as a Precursor for the Controlled Synthesis of Monodispersed Iron Oxide Colloids. *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 78–82.
110. Ge, S.; Shi, X.; Sun, K.; Li, C.; Uher, C.; Baker, J.R.; Banaszak Holl, M.M.; Orr, B.G. Facile Hydrothermal Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Tunable Magnetic Properties. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 13593–13599.
111. Hochepped, J.F.; Pileni, M.P. Magnetic Properties of Mixed Cobalt–Zinc Ferrite Nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **2000**, *87*, 2472–2478.
112. Lee, Y.; Lee, J.; Bae, C.J.; Park, J.-G.; Noh, H.-J.; Park, J.-H.; Hyeon, T. Large-Scale Synthesis of Uniform and Crystalline Magnetite Nanoparticles Using Reverse Micelles as Nanoreactors under Reflux Conditions. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 503–509.
113. Park, J.; An, K.; Hwang, Y.; Park, J.-G.; Noh, H.-J.; Kim, J.-Y.; Park, J.-H.; Hwang, N.-M.; Hyeon, T. Ultra-Large-Scale Syntheses of Monodisperse Nanocrystals. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 891–895.
114. Casula, M.F.; Floris, P.; Innocenti, C.; Lascialfari, A.; Marinone, M.; Corti, M.; Sperling, R.A.; Parak, W.J.; Sangregorio, C. Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents Based on Iron Oxide Superparamagnetic Ferrofluids. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 1739–1748.
115. Corti, M.; Lascialfari, A.; Micotti, E.; Castellano, A.; Donativi, M.; Quarta, A.; Cozzoli, P.D.; Manna, L.; Pellegrino, T.; Sangregorio, C. Magnetic Properties of Novel Superparamagnetic MRI Contrast Agents Based on Colloidal Nanocrystals. *J. Magn. Magn. Mater.* **2008**, *320*, e320–e323.
116. Cao G. *Nanostructures and Nanomaterials. Synthesis, Properties and Applications*; Imperial College Press, London, **2004**, SBN 1-86094-415-9.
117. Parfitt G.D. *Dispersions of Powders in Liquids, with Special Reference to Pigments*; Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York, **1969**.
118. Luo, Y.; Zhao, R.; Pendry, J.B. Van Der Waals Interactions at the Nanoscale: The Effects of Nonlocality. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 18422–18427.
119. Yeap, S.P.; Ahmad, A.L.; Ooi, B.S.; Lim, J. Electrosteric Stabilization and Its Role in Cooperative Magnetophoresis of Colloidal Magnetic Nanoparticles. *Langmuir* **2012**, *28*, 14878–14891.
120. Sastre de Vicente, M.E. The Concept of Ionic Strength Eighty Years after Its Introduction in Chemistry. *J. Chem. Educ.* **2004**, *81*, 750.
121. Port, M.; Corot, C. ; Raynal, I. and Rousseaux, O. Nouvelles compositions de particules magnétiques recouvertes de dérivés gem-bisphosphonates. FR patent FR, **2004**, 2848850.
122. Hoshyar, N.; Gray, S.; Han, H.; Bao, G. The Effect of Nanoparticle Size on *in Vivo* Pharmacokinetics and Cellular Interaction. *Nanomed.* **2016**, *11*, 673–692.
123. Bautista, M.C.; Bomati-Miguel, O.; Zhao, X.; Morales, M.P.; González-Carreño, T.; Alejo, R.P. de; Ruiz-Cabello, J.; Veintemillas-Verdaguer, S. Comparative Study of Ferrofluids Based

- on Dextran-Coated Iron Oxide and Metal Nanoparticles for Contrast Agents in Magnetic Resonance Imaging. *Nanotechnology* **2004**, *15*, S154–S159.
124. Kohler, N.; Sun, C.; Fichtenholtz, A.; Gunn, J.; Fang, C.; Zhang, M. Methotrexate-Immobilized Poly(Ethylene Glycol) Magnetic Nanoparticles for MR Imaging and Drug Delivery. *Small* **2006**, *2*, 785–792.
  125. Thünemann, A.F.; Schütt, D.; Kaufner, L.; Pison, U.; Möhwald, H. Maghemite Nanoparticles Protectively Coated with Poly(Ethylene Imine) and Poly(Ethylene Oxide)-*block*-Poly(Glutamic Acid). *Langmuir* **2006**, *22*, 2351–2357.
  126. Tartaj, P.; Morales, M. a del P.; Veintemillas-Verdaguer, S.; González-Carretero, T.; Serna, C.J. The Preparation of Magnetic Nanoparticles for Applications in Biomedicine. *J. Phys. Appl. Phys.* **2003**, *36*, R182–R19.
  127. Lo, C.K.; Xiao, D.; Choi, M.M.F. Homocysteine-Protected Gold-Coated Magnetic Nanoparticles: Synthesis and Characterisation. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 2418.
  128. Sevilla, M.; Valle-Vigón, P.; Tartaj, P.; Fuertes, A.B. Magnetically Separable Bimodal Mesoporous Carbons with a Large Capacity for the Immobilization of Biomolecules. *Carbon* **2009**, *47*, 2519–2527.
  129. McCarthy, J.; Weissleder, R. Multifunctional Magnetic Nanoparticles for Targeted Imaging and Therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1241–1251.
  130. Bini, R.A.; Marques, R.F.C.; Santos, F.J.; Chaker, J.A.; Jafelicci, M. Synthesis and Functionalization of Magnetite Nanoparticles with Different Amino-Functional Alkoxysilanes. *J. Magn. Magn. Mater.* **2012**, *324*, 534–539.
  131. Ritthidej, G.C. Nasal Delivery of Peptides and Proteins with Chitosan and Related Mucoadhesive Polymers. In *Peptide and Protein Delivery*; Elsevier, **2011**, 47–68, ISBN 978-0-12-384935-9.
  132. Khutoryanskiy, V.V.; Staikos, G. *Hydrogen-Bonded Interpolymer Complexes: Formation, Structure and Applications*; World Scientific, **2009**, ISBN 978-981-270-977-6.
  133. Suk, J.S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L.M. PEGylation as a Strategy for Improving Nanoparticle-Based Drug and Gene Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99*, 28–51.
  134. Absolute Mag™ Azide Magnetic Dextran Nanoparticles, PEG-Coated, 20 nm-CD Bioparticles Доступно:[https://www.cd-bioparticles.com/p/Azide-Magnetic-Particles\\_20\\_193\\_216\\_807.html](https://www.cd-bioparticles.com/p/Azide-Magnetic-Particles_20_193_216_807.html) (приступљено 3. фебруара 2021. године).
  135. Veiseh, O.; Gunn, J.W.; Zhang, M. Design and Fabrication of Magnetic Nanoparticles for Targeted Drug Delivery and Imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 284–304.
  136. Thong-On, B.; Rutnakornpituk, B.; Wichai, U.; Rutnakornpituk, M. Magnetite Nanoparticle Coated with Amphiphilic Bilayer Surfactant of Polysiloxane and Poly(Poly(Ethylene Glycol) Methacrylate). *J. Nanoparticle Res.* **2012**, *14*, 953.
  137. Silva, S.S.; Fernandes, E.M.; Pina, S.; Silva-Correia, J.; Vieira, S.; Oliveira, J.M.; Reis, R.L. 2.11 Polymers of Biological Origin. In *Comprehensive Biomaterials II*; Ducheyne, P., Ed.; Elsevier: Oxford, **2017**, 228–252, ISBN 978-0-08-100692-4.
  138. Coty, J.-B.; Eleamen Oliveira, E.; Vauthier, C. Tuning Complement Activation and Pathway through Controlled Molecular Architecture of Dextran Chains in Nanoparticle Corona. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532*, 769–778.
  139. Absolute Mag™ Plain Magnetic Nanoparticles, Dextran Coated, 100 nm Доступно: <https://www.cd-bioparticles.com/product/absolute-mag-plain-magnetic-nanoparticles-dextran-coated-100-item-whm-g114-953.html>. (приступљено 3. фебруара 2021. године).
  140. Jordan, A.; Rheinländer, T.; Waldöfner, N.; Scholz, R. Increase of the Specific Absorption Rate (SAR) by Magnetic Fractionation of Magnetic Fluids. *J. Nanoparticle Res.* **2003**, *5*, 597–600.
  141. Sharifi, S.; Behzadi, S.; Laurent, S.; Laird Forrest, M.; Stroeve, P.; Mahmoudi, M. Toxicity of Nanomaterials. *Chem Soc Rev* **2012**, *41*, 2323–2343.
  142. Radak, Z.; Radák, Z. *Free Radicals in Exercise and Aging*; Human Kinetics, **2000**, ISBN 978-0-88011-881-1.

143. Burkitt, M.J. Chemical, Biological and Medical Controversies Surrounding the Fenton Reaction. *Prog. React. Kinet. Mech.* **2003**, 28, 75–104.
144. Grüttner, C.; Müller, K.; Teller, J.; Westphal, F.; Foreman, A.; Ivkov, R. Synthesis and Antibody Conjugation of Magnetic Nanoparticles with Improved Specific Power Absorption Rates for Alternating Magnetic Field Cancer Therapy. *J. Magn. Magn. Mater.* **2007**, 311, 181–186.
145. Giustini, A.J.; Ivkov, R.; Hoopes, P.J. Magnetic Nanoparticle Biodistribution Following Intratumoral Administration. *Nanotechnology* **2011**, 22, 345101.
146. Wilhelm, C.; Billotey, C.; Roger, J.; Pons, J.N.; Bacri, J.-C.; Gazeau, F. Intracellular Uptake of Anionic Superparamagnetic Nanoparticles as a Function of Their Surface Coating. *Biomaterials* **2003**, 24, 1001–1011.
147. Szalay, B.; Tátrai, E.; Nyíró, G.; Vezér, T.; Dura, G. Potential Toxic Effects of Iron Oxide Nanoparticles in in Vivo and in Vitro Experiments: Potential Toxic Effects of Magnetite Nanoparticles. *J. Appl. Toxicol.* **2012**, 32, 446–453.
148. Lévy, M.; Lagarde, F.; Maraloiu, V.-A.; Blanchin, M.-G.; Gendron, F.; Wilhelm, C.; Gazeau, F. Degradability of Superparamagnetic Nanoparticles in a Model of Intracellular Environment: Follow-up of Magnetic, Structural and Chemical Properties. *Nanotechnology* **2010**, 21, 395103.
149. Kremer, M.L. The Fenton Reaction. Dependence of the Rate on PH. *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 1734–1741.
150. Huang, X. Iron Overload and Its Association with Cancer Risk in Humans: Evidence for Iron as a Carcinogenic Metal. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2003**, 533, 153–171.
151. Foy, S.P.; Labhasetwar, V. Oh the Irony: Iron as a Cancer Cause or Cure? *Biomaterials* **2011**, 32, 9155–9158.
152. Karanović, L.; Poleti, D. *Rendgenska Strukturna Analiza; Zavod za udžbenike i nastavna sredstva: Beograd*, **2003**, ISBN 86-17-10736-7.
153. Karanović, L. *Primenjena Kristalografija; Univerzitetski udžbenik: Beograd*, **1996**.
154. S. Mentus, U. Mioč, S.M. *Odabrane Metode Fizičkohemijske Analize; Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd*, **1993**.
155. Michael Thompson *Handbook of Inductively Coupled Plasma Spectrometry; Second.; Springer US*, **1989**, ISBN 978-1-4613-0697-9.
156. Jose Chirayil, C.; Abraham, J.; Kumar Mishra, R.; George, S.C.; Thomas, S. Instrumental Techniques for the Characterization of Nanoparticles. In *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization; Elsevier*, **2017**, 1–36, ISBN 978-0-323-46139-9.
157. Charcosset, C. Electrophoretic Mobility. *Encycl. Membr.* **2016**, 658–659.
158. Zetasizer Nano ZS90 Particle Size & Zeta Potential Measurement - Product Support Malvern Panalytical. Доступно: <https://www.malvernpanalytical.com/en/support/product-support/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs90> (приступљено 12. фебруара 2021. године).
159. D. M. Petrović, S. R. *Eksperimentalna Fizika Kondenzovane Materije; Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad*, **2000**.
160. R. P. Gifford, J. C. Gallop, B. W. Petley *Progress in Quantum Electronics; Pergamon Press*, **1976**, 4.
161. C. Gallop *SQUID, Josepshon Effect and Superconducting Electronics; Adam Hilger, Bristol*, **1991**, ISBN ISBN 0-7503-0051-5.
162. L. P. Levi *Magnetism and Superconductivity; Springer, Berlin*, **2000**, ISBN 978-3-540-66688-2.
163. Tadić M. *Sinteza i Magnetne Osobine  $\alpha$ -,  $\gamma$ - i  $\varepsilon$ - Feri-Oksidnih Nanokompozita; Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad*, **2008**.
164. Vučina Jurij, Han Ruben *Primena Radionuklida u Terapiji.* **2001**, 54, 245–250.

165. Yeong, C.-H.; Cheng, M.; Ng, K.-H. Therapeutic Radionuclides in Nuclear Medicine: Current and Future Prospects. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2014**, *15*, 845–863.
166. Rowlinson-Busza, G.; Snook, D.; Epenetos, A.A. <sup>90</sup>Y-Labeled Antibody Uptake by Human Tumor Xenografts and the Effect of Systemic Administration of EDTA. *Int. J. Radiat. Oncol.* **1994**, *28*, 1257–1265.
167. Maqsood, M.H.; Tameez Ud Din, A.; Khan, A.H. Neuroendocrine Tumor Therapy with Lutetium-177: A Literature Review. *Cureus* **2019**, *11(1)*, e3986.
168. Ghodsirad, M.A.; Pirayesh, E.; Akbarian, R.; Javanmard, B.; Kaghazchi, F.; Tavakoli, M.; Fattahi, K. Diagnostic Utility of Lutetium-177 (Lu 177) Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) Scintigraphy In Prostate Cancer Patients With PSA Rise And Negative Conventional Imaging. *Urol. J.* **2020**.
169. Papagiannopoulou, D. Technetium-99m Radiochemistry for Pharmaceutical Applications. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2017**, *60*, 502–520.
170. Rao, D.V.; Howell, R.W. Time-Dose-Fractionation in Radioimmunotherapy: Implications for Selecting Radionuclides. *J. Nucl. Med.* **1993**, *34*, 1801–1810.
171. Gansow, O.A. Newer Approaches to the Radiolabeling of Monoclonal Antibodies by Use of Metal Chelates. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B* **1991**, *18*, 369–381.
172. A. E. Martell, R. M. Smith, *Critical Stability Constants*; Springer Science, **1982**, 5.
173. Sundberg, M.W.; Meares, C.F.; Goodwin, D.A.; Diamanti, C.I. Selective Binding of Metal Ions to Macromolecules Using Bifunctional Analogs of EDTA. *J. Med. Chem.* **1974**, *17*, 1304–1307.
174. Wagner, S.J.; Welch, M.J. Gallium-68 Labeling of Albumin and Albumin Microspheres. *J. Nucl. Med.* **1979**, *20*, 428–433.
175. Krejcarek, G.E.; Tucker, K.L. Covalent Attachment of Chelating Groups to Macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *77*, 581–585.
176. HÄfeli, U. Radioactive Microspheres for Medical Applications. In *Physics and Chemistry Basis of Biotechnology*; De Cuyper, M., Bulte, J.W.M., Eds.; Focus on Biotechnology; Springer Netherlands: Dordrecht, **2000**, 213–248, ISBN 978-0-306-46891-9.
177. Radović M. *Magnetne Nanočestice Na Bazi Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Obeležene Radioaktivnim Itrijumom Za Mogućnu Primenu u Hipertermijsko-Radionuklidnoj Terapiji Tumora*; Doktorska disertacija, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, **2017**.
178. Potamianos S, Varvarigou AD, Archimandritis SC Radioimmunosintigraphy and Radioimmunotherapy in Cancer: Principles and Application. - Abstract - Europe PMC. *Anticancer Research* **2000**, *20*, 925–948.
179. Yang, G.; Park, S.-J. Conventional and Microwave Hydrothermal Synthesis and Application of Functional Materials: A Review. *Materials* **2019**, *12*, 1177.
180. Areias, F.M.; Rego, A.C.; Oliveira, C.R.; Seabra, R.M. Antioxidant Effect of Flavonoids after Ascorbate/Fe<sup>2+</sup>-Induced Oxidative Stress in Cultured Retinal Cells. **Abbreviations**: BME, Basal Medium of Eagle; DCFH<sub>2</sub>, 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein; LDH, Lactate Dehydrogenase; PC, Partition Coefficient; Rf, Retardation Factor; ROS, Reactive Oxygen Species; TBA, Thiobarbituric Acid; and TBARS, Thiobarbituric Acid-Reactive Substances. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *62*, 111–118.
181. Goswami, T.; Rolfs, A.; Hediger, M.A. Iron Transport: Emerging Roles in Health and Disease. *Biochem. Cell Biol.* **2002**, *80*, 679–689.
182. Tombácz, E.; Tóth, I.Y.; Nesztor, D.; Illés, E.; Hajdú, A.; Szekeres, M.; L.Vékás Adsorption of Organic Acids on Magnetite Nanoparticles, PH-Dependent Colloidal Stability and Salt Tolerance. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2013**, *435*, 91–96.
183. Gutiérrez, L.; Costo, R.; Grüttner, C.; Westphal, F.; Gehrke, N.; Heinke, D.; Fornara, A.; Pankhurst, Q.A.; Johansson, C.; Veintemillas-Verdaguer, S.; et al. Synthesis Methods to Prepare Single- and Multi-Core Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 2943–2952.



184. Martina, M.-S.; Fortin, J.-P.; Ménager, C.; Clément, O.; Barratt, G.; Grabielle-Madelmont, C.; Gazeau, F.; Cabuil, V.; Lesieur, S. Generation of Superparamagnetic Liposomes Revealed as Highly Efficient MRI Contrast Agents for in Vivo Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10676–10685.
185. Illés, E.; Szekeres, M.; Kupcsik, E.; Tóth, I.Y.; Farkas, K.; Jedlovszky-Hajdú, A.; Tombácz, E. PEGylation of Surfacted Magnetite Core–Shell Nanoparticles for Biomedical Application. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, *460*, 429–440.
186. Caroline A Schneider, Wayne S Rasband, Kevin W Eliceiri NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675.
187. Wang, D.; Fan, L.-S. Particle characterization and behavior relevant to fluidized bed combustion and gasification systems. In *Fluidized Bed Technologies for Near-Zero Emission Combustion and Gasification*; Elsevier, **2013**, 42–76, ISBN 978-0-85709-541-1.
188. Muscas, G.; Singh, G.; Glomm, W.R.; Mathieu, R.; Kumar, P.A.; Concas, G.; Agostinelli, E.; Peddis, D. Tuning the Size and Shape of Oxide Nanoparticles by Controlling Oxygen Content in the Reaction Environment: Morphological Analysis by Aspect Maps. *Chem. Mater.* **2015**, *27*, 1982–1990.
189. Ravindran, S.; Williams, M.A.K.; Ward, R.L.; Gillies, G. Understanding How the Properties of Whey Protein Stabilized Emulsions Depend on PH, Ionic Strength and Calcium Concentration, by Mapping Environmental Conditions to Zeta Potential. *Food Hydrocoll.* **2018**, *79*, 572–578.
190. Morrish, A. H *The Physical Principles of Magnetism*; John Wiley&Sons.; New York, **1965**;
191. Wildeboer, R.R.; Southern, P.; Pankhurst, Q.A. On the Reliable Measurement of Specific Absorption Rates and Intrinsic Loss Parameters in Magnetic Hyperthermia Materials. *J. Phys. Appl. Phys.* **2014**, *47*, 495003.
192. Manjunatha, H.C.; Rudraswamy, B. Exposure of Bremsstrahlung from Beta-Emitting Therapeutic Radionuclides. *Radiat. Meas.* **2009**, *44*, 206–210.
193. Psimadas, D.; Bouziotis, P.; Georgoulas, P.; Valotassiou, V.; Tsoதாகos, T.; Loudos, G. Radiolabeling Approaches of Nanoparticles with <sup>99m</sup>Tc: radiolabeling of nanoparticles with <sup>99m</sup>Tc. *Contrast Media Mol. Imaging* **2013**, *8*, 333–339.
194. Antic, B.; Kremenović, A.; Nikolic, A.S.; Stoiljkovic, M. Cation Distribution and Size-Strain Microstructure Analysis in Ultrafine Zn–Mn Ferrites Obtained from Acetylacetonato Complexes. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 12646–12651.
195. Yu, S.; Chow, G.M. Carboxyl Group (–CO<sub>2</sub>H) Functionalized Ferrimagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Potential Bio-Applications. *J Mater Chem* **2004**, *14*, 2781–2786.
196. Liu, X.L.; Fan, H.M.; Yi, J.B.; Yang, Y.; Choo, E.S.G.; Xue, J.M.; Fan, D.D.; Ding, J. Optimization of Surface Coating on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles for High Performance Magnetic Hyperthermia Agents. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 8235.
197. Deatsch, A.E.; Evans, B.A. Heating Efficiency in Magnetic Nanoparticle Hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* **2014**, *354*, 163–172.
198. Thang, P.D.; Rijnders, G.; Blank, D.H.A. Spinel Cobalt Ferrite by Complexometric Synthesis. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *295*, 251–256.
199. Shannon, R.D.; Prewitt, C.T. Effective Ionic Radii in Oxides and Fluorides. *Acta Crystallogr. B* **1969**, *25*, 925–946.
200. Ognjanović, M.; Stanković, D.M.; Ming, Y.; Zhang, H.; Jančar, B.; Dojčinović, B.; Prijović, Ž.; Antić, B. Bifunctional (Zn,Fe)<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles: Tuning Their Efficiency for Potential Application in Reagentless Glucose Biosensors and Magnetic Hyperthermia. *J. Alloys Compd.* **2019**, *777*, 454–462.
201. White, W.B.; DeAngelis, B.A. Interpretation of the Vibrational Spectra of Spinel. *Spectrochim. Acta Part Mol. Spectrosc.* **1967**, *23*, 985–995.
202. Vujačić, A. *Kinetika i Mehanizam Adsorpcije Natrijum(Z)-3-(5-Hlor-2-((5-Hlor-3-(3-Sulfonatopropil)Benzotiazol-2(3H)-Iliden)Metil)Benzotiazol-3-Ium-3-Il)Propan-1 Sulfonata*

*Na Koloidne Čestice Zlata Različitih Svojstava i Veličine*; Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, **2013**.

203. Saidani, M.; Belkacem, W.; Mliki, N. Chemical Charge Neutrality Coupled to Low Temperature Magnetic Measurements Method to Estimate the Cationic Distribution for Spinel Ferrites. *J. Alloys Compd.* **2017**, *729*, 1177–1182.
204. Ling, D.; Lee, N.; Hyeon, T. Chemical Synthesis and Assembly of Uniformly Sized Iron Oxide Nanoparticles for Medical Applications. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 1276–1285.
205. J. M. Byrne, V. S. Coker, S. Moise, P. L. Wincott, D. J. Vaughan, F. Tuna, E. Arenholz, G. van der Laan, R. A. D. Pattrick, J. R. Lloyd, N. D. Telling Controlled Cobalt Doping in Biogenic Magnetite Nanoparticles. *J. R. Soc. Interface* **2013**, *10*, 20130134.
206. Antic, B.; Perovic, M.; Kremenovic, A.; Blanusa, J.; Spasojevic, V.; Vulic, P.; Bessais, L.; Bozin, E.S. An Integrated Study of Thermal Treatment Effects on the Microstructure and Magnetic Properties of Zn–Ferrite Nanoparticles. *J. Phys. Condens. Matter* **2013**, *25*, 086001.
207. Walker, M.; Mayo, P.I.; O’Grady, K.; Charles, S.W.; Chantrell, R.W. The Magnetic Properties of Single-Domain Particles with Cubic Anisotropy. I. Hysteresis Loops. *J. Phys. Condens. Matter* **1993**, *5*, 2779–2792.
208. Issa, B.; Obaidat, I.; Albiss, B.; Haik, Y. Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 21266–21305.
209. Gahrouei, Z.E.; Labbaf, S.; Kermanpur, A. Cobalt Doped Magnetite Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Optimization and Suitability Evaluations for Magnetic Hyperthermia Applications. *Phys. E Low-Dimens. Syst. Nanostructures* **2020**, *116*, 113759.
210. Fantechi, E.; Innocenti, C.; Albino, M.; Lottini, E.; Sangregorio, C. Influence of Cobalt Doping on the Hyperthermic Efficiency of Magnetite Nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **2015**, *380*, 365–371.
211. Lv, Z.; Wang, Q.; Bin, Y.; Huang, L.; Zhang, R.; Zhang, P.; Matsuo, M. Magnetic Behaviors of Mg- and Zn-Doped Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Estimated in Terms of Crystal Domain Size, Dielectric Response, and Application of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Carbon Nanotube Composites to Anodes for Lithium Ion Batteries. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 26128–26142.
212. Bamzai, K.K.; Kour, G.; Kaur, B.; Arora, M.; Pant, R.P. Infrared Spectroscopic and Electron Paramagnetic Resonance Studies on Dy Substituted Magnesium Ferrite. *J. Magn. Magn. Mater.* **2013**, *345*, 255–260.
213. Chhantbar, M.C.; Trivedi, U.N.; Tanna, P.V.; Shah, H.J.; Vara, R.P.; Joshi, H.H.; Modi, K.B. Infrared Spectral Studies of Zn-Substituted CuFeCrO<sub>4</sub> Spinel Ferrite System. *Indian J. Phys.* **2004**, *78A*, 321–326.
214. Vucinic-Vasic, M.; Kremenovic, A.; Nikolic, A.S.; Colombar, P.; Mazzerolles, L.; Kahlenberg, V.; Antic, B. Core and Shell Structure of Ytterbium Sesquioxide Nanoparticles. *J. Alloys Compd.* **2010**, *502*, 107–111.
215. Jang, J.; Nah, H.; Lee, J.-H.; Moon, S.H.; Kim, M.G.; Cheon, J. Critical Enhancements of MRI Contrast and Hyperthermic Effects by Dopant-Controlled Magnetic Nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1234–1238.
216. Jadhav, S.V.; Kim, B.M.; Lee, H.Y.; Im, I.C.; Rokade, A.A.; Park, S.S.; Patil, M.P.; Kim, G.D.; Yu, Y.S.; Lee, S.H. Induction Heating and in Vitro Cytotoxicity Studies of MnZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles for Self-Controlled Magnetic Particle Hyperthermia. *J. Alloys Compd.* **2018**, *745*, 282–291.
217. Gavilán, H.; Sánchez, E.H.; Brollo, M.E.F.; Asín, L.; Moerner, K.K.; Frandsen, C.; Lázaro, F.J.; Serna, C.J.; Veintemillas-Verdaguer, S.; Morales, M.P.; et al. Formation Mechanism of Maghemite Nanoflowers Synthesized by a Polyol-Mediated Process. *ACS Omega* **2017**, *2*, 7172–7184.
218. Antic, B.; Jovic, N.; Pavlovic, M.B.; Kremenovic, A.; Manojlović, D.; Vucinic-Vasic, M.; Nikolić, A.S. Magnetization Enhancement in Nanostructured Random Type MgFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Spinel Prepared by Soft Mechanochemical Route. *J. Appl. Phys.* **2010**, *107*, 043525.

219. Caruntu, D.; Caruntu, G.; O'Connor, C.J. Magnetic Properties of Variable-Sized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Synthesized from Non-Aqueous Homogeneous Solutions of Polyols. *J. Phys. Appl. Phys.* **2007**, *40*, 5801–5809.
220. Dojčinović, B.P.; Jančar, B.; Bessais, L.; Kremenović, A.S.; Jović-Jovičić, N.P.; Banković, P.T.; Stanković, D.M.; Ognjanović, M.; Antić, B.V. Differently Shaped Nanocrystalline (Fe,Y)<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Its Adsorption Efficiency toward Inorganic Arsenic Species. *Nanotechnology* **2019**, *30*, 475702.
221. Cervellino, A.; Frison, R.; Cernuto, G.; Guagliardi, A.; Masciocchi, N. Lattice Parameters and Site Occupancy Factors of Magnetite–Maghemite Core–Shell Nanoparticles. A Critical Study. *J. Appl. Crystallogr.* **2014**, *47*, 1755–1761.
222. Bouziotis, P.; Psimadas, D.; Tsotakos, T.; Stamopoulos, D.; Tsoukalas, C. Radiolabeled Iron Oxide Nanoparticles As Dual-Modality SPECT/MRI and PET/MRI Agents. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 2694–2702.
223. Radović, M.; Calatayud, M.P.; Goya, G.F.; Ibarra, M.R.; Antić, B.; Spasojević, V.; Nikolić, N.; Janković, D.; Mirković, M.; Vranješ-Đurić, S. Preparation and *in Vivo* Evaluation of Multifunctional <sup>90</sup>Y-Labeled Magnetic Nanoparticles Designed for Cancer Therapy: Preparation and Evaluation of <sup>90</sup>Y-Labeled Magnetic Nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2015**, *103*, 126–134.
224. Monteiro, L.O.F.; Fernandes, R.S.; Castro, L.C.; Cardoso, V.N.; Oliveira, M.C.; Townsend, D.M.; Ferretti, A.; Rubello, D.; Leite, E.A.; de Barros, A.L.B. Technetium-99 m Radiolabeled Paclitaxel as an Imaging Probe for Breast Cancer *in Vivo*. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *89*, 146–15.
225. Mirković, M.; Radović, M.; Stanković, D.; Milanović, Z.; Janković, D.; Matović, M.; Jeremić, M.; Antić, B.; Vranješ-Đurić, S. <sup>99m</sup>Tc–Bisphosphonate–Coated Magnetic Nanoparticles as Potential Theranostic Nanoagent. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *102*, 124–133.
226. Wu, T.-J.; Chiu, H.-Y.; Yu, J.; Cautela, M.P.; Sarmiento, B.; das Neves, J.; Catala, C.; Pazos-Perez, N.; Guerrini, L.; Alvarez-Puebla, R.A.; et al. Nanotechnologies for early diagnosis, *in situ* disease monitoring, and prevention. In *Nanotechnologies in Preventive and Regenerative Medicine*; Elsevier, **2018**, 1–92, ISBN 978-0-323-48063-5.
227. Boschi, A.; Uccelli, L.; Pasquali, M.; Duatti, A.; Taibi, A.; Pupillo, G.; Esposito, J. <sup>188</sup>W/<sup>188</sup>Re Generator System and Its Therapeutic Applications. *J. Chem.* **2014**, *2014*, 1–14.
228. Mohapatra, J.; Nigam, S.; Gupta, J.; Mitra, A.; Aslam, M.; Bahadur, D. Enhancement of Magnetic Heating Efficiency in Size Controlled MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = Mn, Fe, Co and Ni) Nanoassemblies. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 14311–14321.
229. Niculaes, D.; Lak, A.; Anyfantis, G.C.; Marras, S.; Laslett, O.; Avugadda, S.K.; Cassani, M.; Serantes, D.; Hovorka, O.; Chantrell, R.; et al. Asymmetric Assembling of Iron Oxide Nanocubes for Improving Magnetic Hyperthermia Performance. *ACS Nano* **2017**, *11*, 12121–12133.
230. Bender, P.; Fock, J.; Frandsen, C.; Hansen, M.F.; Balceris, C.; Ludwig, F.; Posth, O.; Wetterskog, E.; Bogart, L.K.; Southern, P.; et al. Relating Magnetic Properties and High Hyperthermia Performance of Iron Oxide Nanoflowers. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122*, 3068–3077.
231. Ognjanović, M.; Radović, M.; Mirković, M.; Prijović, Ž.; Puerto Morales, M. del; Čeh, M.; Vranješ-Đurić, S.; Antić, B. <sup>99m</sup>Tc-, <sup>90</sup>Y-, and <sup>177</sup>Lu-Labeled Iron Oxide Nanoflowers Designed for Potential Use in Dual Magnetic Hyperthermia/Radionuclide Cancer Therapy and Diagnosis. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 41109–41117.
232. Radović, M.; Vranješ-Đurić, S.; Nikolić, N.; Janković, D.; Goya, G.F.; Torres, T.E.; Calatayud, M.P.; Bruvera, I.J.; Ibarra, M.R.; Spasojević, V.; et al. Development and Evaluation of <sup>90</sup>Y-Labeled Albumin Microspheres Loaded with Magnetite Nanoparticles for Possible Applications in Cancer Therapy. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 24017.
233. Jeon, J. Review of Therapeutic Applications of Radiolabeled Functional Nanomaterials. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2323.

234. Ai, F.; Ferreira, C.A.; Chen, F.; Cai, W. Engineering of Radiolabeled Iron Oxide Nanoparticles for Dual-Modality Imaging: Engineering of Radiolabeled Iron Oxide Nanoparticles. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2016**, *8*, 619–630.
235. Pellico, J.; Gawne, P.J.; T. M. de Rosales, R. Radiolabelling of Nanomaterials for Medical Imaging and Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 3355–3423.
236. Jang, J.; Lee, J.; Seon, J.; Ju, E.; Kim, M.; Kim, Y.I.; Kim, M.G.; Takemura, Y.; Arbab, A.S.; Kang, K.W.; et al. Giant Magnetic Heat Induction of Magnesium-Doped  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Superparamagnetic Nanoparticles for Completely Killing Tumors. *Adv. Mater.* **2018**, *30*.
237. Pradhan, P.; Giri, J.; Samanta, G.; Sarma, H.D.; Mishra, K.P.; Bellare, J.; Banerjee, R.; Bahadur, D. Comparative Evaluation of Heating Ability and Biocompatibility of Different Ferrite-Based Magnetic Fluids for Hyperthermia Application. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2007**, *81B*, 12–22.
238. Gonzales-Weimuller, M.; Zeisberger, M.; Krishnan, K.M. Size-Dependant Heating Rates of Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Fluid Hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321*, 1947–1950.
239. Lee, J.-H.; Jang, J.; Choi, J.; Moon, S.H.; Noh, S.; Kim, J.; Kim, J.-G.; Kim, I.-S.; Park, K.I.; Cheon, J. Exchange-Coupled Magnetic Nanoparticles for Efficient Heat Induction. *Nat. Nanotechnol.* **2011**, *6*, 418–422.
240. Ognjanović, M.; Stanković, D.M.; Jaćimović, Ž.K.; Kosović-Perutović, M.; Dojčinović, B.; Antić, B. The Effect of Surface-Modifier of Magnetite Nanoparticles on Electrochemical Detection of Dopamine and Heating Efficiency in Magnetic Hyperthermia. *J. Alloys Compd.* **2021**, *Under review*.
241. Ognjanović, M.; Spasojević, I.; Stanković, D.M.; Ming, Y.; Jančar, B.; Dojčinović, B.; Spasojević, V.; Antić, B. Enhancing Analytical Performance of (Mg,Fe)<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Glassy Carbon Electrodes by Tailoring Chemical Composition of (Mg,Fe)<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2019**, *19*, 4205–4213.
242. Vukadinović, A.; Ognjanović, M.; Janković, D.; Radović, M.; Mirković, M.; Mihajlović, Z.; Karageorgou, M.-A.; Bouziotis, P.; Vranješ-Đurić, S.; Antić, B.; et al. <sup>90</sup>Y-CA@SPIONs for Dual Hyperthermia-Radionuclide Nanobrachytherapy: *In Vivo* Behavior and Antitumor Effect in Mice. *Nanomedicine* **2021**, *Under review*.

## БИОГРАФИЈА

Милош Огњановић је рођен 02.12.1989. године у Крушевцу, Република Србија. Основну и средњу медицинску школу (смер фармацеутски техничар) је завршио у Крушевцу. Факултет за физичку хемију Универзитета у Београду, је уписао 2009. године, а дипломирао октобра 2014. са просечном оценом 9,30, након чега уписује мастер академске студије на истом факултету. Мастер студије је завршио у новембру 2015. године са просечном оценом 10. На докторске академске студије на Факултету за физичку хемију се уписао 2015. године.



Од фебруара 2016. године запослен је у Институту за нуклеарне науке „Винча”, у Лабораторији за теоријску физику и физику кондензоване материје, као истраживач на међународном ФП7 пројекту МагБиоВин „Јачање истраживачког и иновационог тима МагБиоВин за развој нових приступа терапије тумора на бази наноструктурних материјала“, а од децембра 2018. године на пројекту “Магнетни и радионуклидима обележени наноструктурни материјали за примене у медицини” бр. ИИИ45015.

Његова истраживања припадају области Физичке хемије материјала и односе се на синтезу и структурну анализу наночестица на бази оксида гвожђа, њихову површинску модификацију и обележавања различитим радионуклидима у циљу примене у комбинованој радионуклидно-хипертермијској терапији тумора. Други део истраживања се односи на модификацију електрода оксидима метала за примену у електроаналитичкој хемији и биосензорима. Научно-истраживачки рад Милоша Огњановића се одвија под менторством др Братислава Антића, научног саветника Института за нуклеарне науке „Винча“ и др Љиљане Дамјановић-Василић, редовног професора Факултета за физичку хемију, Универзитета у Београду.

Аутор је 31 рада у истакнутим међународним часописима, као и преко 20 саопштења са међународних и домаћих научних скупова.

## ПРИЛОЗИ

### Прилог 1.

#### Реагенси:

- Гвожђе (II) сулфат хептахидрат ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99,0\%$ ), Sigma Aldrich, САД,
- Кобалт (II) хлорид ( $\text{CoCl}_2$ ,  $\geq 98,0\%$ ), Sigma Aldrich, САД,
- Магнезијум (II) сулфат хептахидрат ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99,0\%$ ), Sigma Aldrich, САД,
- Гвожђе (II) хлорид тетрахидрат ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $99,9\%$ ), Sigma Aldrich, САД,
- Гвожђе (III) хлорид хексахидрат ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99,0\%$ ), Sigma Aldrich, САД,
- Гвожђе (III) нитрат нонахидрат ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99,95\%$ ), Sigma Aldrich, САД,
- Диетилен гликол ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_3$ ,  $99\%$ ), Sigma Aldrich, САД,
- *N*-метилдиетаноламин ( $\text{CH}_3\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$ ,  $\geq 99\%$ ), Sigma Aldrich, САД,
- Етил ацетат ( $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ ,  $99,8\%$ ), Sigma Aldrich, САД,
- Натријум хидроксид ( $\text{NaOH}$ ,  $\geq 98\%$ ), Sigma Aldrich, САД,
- Калијум хидроксид ( $\text{KOH}$ ,  $90\%$ ), Sigma Aldrich, САД,
- Азотна киселина ( $\text{HNO}_3$ ,  $70\%$ ), Sigma Aldrich, САД,
- Хлороводонична киселина ( $\text{HCl}$ ,  $37\%$ ), Sigma Aldrich, САД,
- Лимунска киселина ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ,  $\geq 99,5\%$ ), Sigma Aldrich, САД,
- Поли(акрилна киселина) ( $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$ )<sub>n</sub>,  $M_w \sim 1800 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), Sigma Aldrich, САД,
- Поли(етилен гликол) ( $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ ,  $M_w \sim 300 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), Merck, САД
- Поли(етилен гликол) ( $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ ,  $M_w \sim 1000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), Merck, САД,
- (3-аминопропил)триетоксисилан ( $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ ,  $\geq 98\%$ ), Sigma Aldrich, САД,
- Декстран *Leuconostoc mesenteroides* ( $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ ,  $M_w \sim 40000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), Sigma Aldrich, САД,
- Метанол ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $99,8\%$ ), Sigma Aldrich, САД,
- Хумани серум-албумин 20% - “Завод за трансфузију крви”, Београд, Србија,
- Технецијум пертехнетат ( $\text{TcO}^{-4}$ ) - елуиран из Винчиног генератора  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ ,
- Лутецијум хлорид ( $^{177}\text{LuCl}_3$ ,  $240,6 \text{ GBq} \cdot \text{cm}^{-3}$  у  $0,05 \text{ M HCl}$ ), Polatom, Пољска,
- Итријум хлорид ( $^{90}\text{YCl}_3$ ,  $74,9 \text{ GBq} \cdot \text{cm}^{-3}$  у  $0,05 \text{ M HCl}$ ), Polatom, Пољска,
- Дестилована и ултрачиста Milli-Q<sup>®</sup> вода.

#### Апарати:

- рН метар, inoLab (WTW, Немачка) са комбинованом стакленом електродом (SenTix 41<sup>®</sup>).
- Центрифуга Beckman Avanti J-20 J-20, САД.
- NaI(Tl) гама бројач, Wizard 2480, Perkin Elmer, САД.
- $\beta$ -калибратор доза, Capintec CRC-15, САД.

#### Раствори:

- Раствор гвожђе(III) хлорида (27% у воденом раствору), VWR International, САД.
- Водени раствор амонијум хидроксида ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , 28,0-30,0%  $\text{NH}_3$  базе), Sigma Aldrich, САД.
- Физиолошки раствор ( $\text{NaCl}$ , 0,9%), Хемофарм, Србија.
- 4,6% раствор хуманог серум-албумина: одмерено је 1,84 mL 20% раствора у 6,16 mL  $\text{H}_2\text{O}$ .
- Мултиелементарни стандардни раствор: Multi-Element Plasma Standard Solution 4, Specpure<sup>®</sup>,  $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Alfa Aesar GmbH & Co KG, Немачка

#### Потрошни материјал:

- Whatman 1 mm траке, Merck, Dormstadt, Немачка.
- ITLC/SG траке, Gelman instrument company, Ann Arbor, САД.
- Целулозна мембрана за дијализу, просечне ширине 33 mm, Sigma Aldrich, САД.

## Прилог 2.

### Изјава о ауторству

Потписани Милош Р. Огњановић

број индекса 308/2015

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Развијање површински модификованих наночестица на бази магнетита обележених радионуклидима  $^{90}\text{Y}$  и  $^{177}\text{Lu}$  за потенцијалну примену у магнетној хипертермији и радионуклидној терапији малигних тумора

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, \_\_\_\_\_

Потпис докторанда

Милош Огњановић

### Прилог 3.

#### Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милош Р. Огњановић

Број индекса 308/2015

Студијски програм докторске академске студије физичке хемије

Наслов рада Развијање површински модификованих наночестица на бази магнетита обележених радионуклидима  $^{90}\text{Y}$  и  $^{177}\text{Lu}$  за потенцијалну примену у магнетној хипертермији и радионуклидној терапији малигнух тумора

Ментори др Љиљана Дамјановић-Василић, редовни професор и  
др Братислав Антић, научни саветник

Потписани Милош Р. Огњановић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

Милош Огњановић

У Београду, \_\_\_\_\_



## Прилог 4.

### Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Развијање површински модификованих наночестица на бази магнетита обележених радионуклидима  $^{90}\text{Y}$  и  $^{177}\text{Lu}$  за потенцијалну примену у магнетној хипертермији и радионуклидној терапији малигних тумора

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

**③. Ауторство – некомерцијално – без прераде**

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда



У Београду, \_\_\_\_\_

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.