

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU**

Magdalena Ž. Radović

**Magnetne nanočestice na bazi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$   
obeležene radioaktivnim itrijumom za  
mogućnu primenu u hipertermijsko-  
radionuklidnoj terapiji tumora**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY**

Magdalena Ž. Radović

**Magnetic nanoparticles based on  $\text{Fe}_3\text{O}_4$   
labeled with radioactive yttrium for  
possible use in hyperthermia-  
radionuclide therapy of tumors**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

Mentori:

**1. dr Šćepan Miljanić, redovni profesor u penziji**

Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju

---

**2. dr Sanja Vranješ-Đurić, naučni savetnik**

Univerzitet u Beogradu – Institut za nuklearne nauke “Vinča”

---

Članovi komisije:

**1. dr Bratislav Antić - naučni savetnik**

Univerzitet u Beogradu – Institut za nuklearne nauke “Vinča”

---

**2. dr Marko Daković – docent**

Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju

---

**3. dr Ljiljana Damjanović – vanredni profesor**

Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju

---

Datum odbrane:

---

*Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za radioizotope Instituta za nuklearne nauke Vinča i Instituto de Nanociencia de Aragon, Saragosa, Španija.*

*Najpre želim da izrazim posebnu zahvalnost mentoru dr Sanji Vranješ-Đurić na ukazanom poverenju i svestranu pomoć tokom izrade ovog rada. Njeno angažovanje u svim fazama ovog rada, poznavanje problematike, pružena velika pomoć, posvećeno vreme kao i korisni predlozi omogućili su uspešnu realizaciju ove doktorske disertacije.*

*Veliku zahvalnost dugujem mentoru prof. dr Šćepanu Miljaniću na korisnim savetima, sugestijama i velikoj stručnoj pomoći u toku pisanje teze.*

*Želim da se zahvalim dr Bratislavu Antiću na svestranoj pomoći i podršci prilikom izrade ove disertacije.*

*Dr Marku Dakoviću se zahvaljujem na korisnim savetima i sugestijama tokom pisanja teze.*

*Zahvaljujem se prof. dr Ljiljani Damjanović koja mi je svojim konstruktivnim primedbama pomogla da se izbegnu greške i nejasnoće tokom pisanja ove disertacije.*

*Ovom prilikom se zahvaljujem i svim kolegama iz Instituta za nuklearne nauke Vinča i Instituto de Nanociencia de Aragon koji su mi pomogli u realizaciji eksperimentalnog dela doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se svojoj porodici suprugu Nebojši, ćerkama Ani i Sofiji na pruženom razumevanju, strpljenu i podršci tokom izrade ove disertacije.*

*Neizmernu zahvalnost na velikoj ljubavi, pomoći i podršci tokom celog mog školovanja izražavam ocu Životi, majci Ružici i sestri Marini koji su uvek bili uz mene.*

# Magnetne nanočestice na bazi $\text{Fe}_3\text{O}_4$ obeležene radioaktivnim itrijumom za mogućnu primenu u hipertermijsko-radionuklidnoj terapiji tumora

## Rezime

U ovoj disertaciji su opisane magnetne nanočestice (MNČ) na bazi oksida gvožđa ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) sintetisane pomoću dve metode: oksidacionom hidrolizom i taloženjem iz vodenih rastvora. Za površinsku modifikaciju MNČ-a su korišćena hidrofilna jedinjenja: polietilen glikol *bis*(karboksimetil) etar (PEG600), limunska kiselina (CA), 2,3-dikarboksipropan-1,1-difosfonat (DPD) i albumin iz humanog seruma (HSA), koja sadrže različite funkcionalne grupe. Oblaganje MNČ-a povećava koloidnu stabilnost i sprečava aglomeraciju nanočestica, omogućava vezivanje radionuklida  $^{90}\text{Y}$  za različite funkcionalne grupe na površini MNČ-a i obezbeđuje *in vivo* stabilnost MNČ-a. Jedinjenje DPD do sada nije korišćeno za oblaganje MNČ-a, pa je ispitivanjem funkcionalizovanih MNČ-a utvrđen uticaj obe funkcionalne grupe DPD-a (fosfonatne i karboksilne) na modifikaciju površine MNČ-a. Funkcionalizacija pomoću CA i DPD-a je izvršena nakon sinteze MNČ-a, dok je funkcionalizacija pomoću PEG600 urađena *in situ*, tj. u toku procesa sinteze MNČ-a. Za sintezu MNČ-a u HSA matriksu (magnetne mikrosfere humanog albumina - MMSHA) je korišćena modifikovana emulzifikaciona metoda (voda u ulju - v/u). MMSHA stabilisane su putem denaturacije albumina na visokoj temperaturi.

Karakterizacija sintetisanih MNČ-a je izvršena pomoću rendgenske difrakcije na prahu, elektronske mikroskopije, termogravimetrijske analize, Furijeove transformacione infracrvene spektroskopije, dinamičkog rasejanja svetlosti i SQUID magnetometrije. Merenjem specifične apsorpcije MNČ-a je ispitana njihova potencijalna primena u magnetnoj hipertermiji.

Biološko ponašanje okarakterisanih biokompatibilnih MNČ-a u *in vitro* i *in vivo* sistemima je ispitano primenom MNČ-a obeleženih radionuklidom  $^{90}\text{Y}$ . *In vitro* stabilnost MNČ-a obeleženih  $^{90}\text{Y}$  u fiziološkom rastvoru i humanom serumu je praćena ispitivanjem njihove radiohemijske čistoće tankoslojnom hromatografijom u toku

određenog vremenskog perioda. Podaci vezani za biodistribuciju i *in vivo* stabilnost, su dobijeni merenjem radioaktivnosti po organima u toku određenog vremenskog perioda, nakon intravenske aplikacije MNČ-a obeleženih radionuklidom u zdravim laboratorijskim životinjama (Wistar pacovima).

**Ključne reči:** magnetne nanočestice, radionuklidna terapija, itrijum, hipertermija,

**Naučna oblast:** Fizička hemija

**Uža naučna oblast:** Radiohemija i nuklearna hemija

**UDK broj:**

# **Magnetic nanoparticles based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> labeled with radioactive yttrium for possible use in hyperthermia-radionuclide therapy of tumors**

## **Abstract**

The synthesis of magnetic nanoparticles (MNP) based on iron oxide (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) using two methods: oxidation hydrolysis and coprecipitation is presented in this dissertation. Hydrophilic compounds: polyethylene glycol *bis*(carboxymethyl) ether (PEG600), citric acid (CA), 2,3-dicarboxypropane-1,1-diphosphonate (DPD) and human serum albumin (HSA), with different functional groups, were used for the surface modification of MNPs. The coating of MNPs increased their colloidal stability and prevented agglomeration, allowed the binding of the radionuclide <sup>90</sup>Y for the functional groups on the surface of MNPs and increased the stability of MNPs *in vivo*. DPD has not been used for coating of MNPs so far and the results of the study on functionalized MNPs showed that both carboxyl and phosphonate groups had influence on the modification of the surface of MNP. Functionalization of the MNPs using CA and DPD was performed after synthesis, while functionalization of the MNPs using PEG600 was performed *in situ*. MNPs in the HSA matrix (magnetic microspheres of human albumin-MMSHA) were synthesized using a modified emulsification method (water in oil - w/o). MMSHA were stabilized by denaturation of the albumin at high temperature.

Characterization of MNPs was performed using X-ray powder diffraction, electron microscopy, thermogravimetric analysis, Fourier transform infrared spectroscopy, dynamic light scattering and SQUID magnetometry. Specific absorption rate of MNPs determined their potential use for magnetic hyperthermia.

The characterized biocompatible MNPs were labeled with radionuclide <sup>90</sup>Y and their biological behavior *in vitro* and *in vivo* were examined. *In vitro* stability of <sup>90</sup>Y-MNP in saline and human serum was followed by investigation of their radiochemical purity during a certain period of time using thin layer chromatography. Data regarding the biodistribution and *in vivo* stability were obtained by measuring the radioactivity per organs during a certain period of time, after intravenous application of <sup>90</sup>Y-MNP in healthy laboratory animals (Wistar rats).

**Keywords:** magnetic nanoparticles, radionuclide therapy, yttrium, hyperthermia

**Scientific Field:** Physical Chemistry

**Scientific discipline:** Radiochemistry and Nuclear Chemistry

**UDK number:**



## Sadržaj

Sadržaj.....	v
1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DEO.....	4
2.1. Magnetne nanočestice na bazi Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> i njihova mogućna primena u hipertermijsko-radionuklidnoj terapiji tumora .....	4
2.2. Sinteza MNČ-a .....	7
2.3. Funkcionalizacija površine MNČ-a.....	10
2.4. Magnetne osobine nanočestičnih materijala.....	13
2.4.1. Osnove magnetizma i podela magnetika.....	13
2.4.2. Superparamagnetizam .....	16
2.5. Metode karakterizacije MNČ-a .....	20
2.5.1. Rendgenska difrakcija na prahu (XRPD).....	20
2.5.2. Elektronska mikroskopija.....	21
2.5.3. Termogravimetrijska analiza (TGA).....	22
2.5.4. Furijeova transformaciona infracrvena spektroskopija (FTIC).....	23
2.5.5. Dinamičko rasejanje svetlosti (DLS) .....	24
2.5.6. SQUID magnetometrija .....	24
2.5.7. Magnetna hipertermija .....	26
2.6. Radionuklidi za primenu u terapiji tumora.....	30
2.7. Obeležavanje MNČ-a radionuklidima.....	33
2.8. Fizičko-hemijska ispitivanja MNČ-a obeleženih radionuklidom .....	34
2.9. Biološka ispitivanja MNČ-a obeleženih radionuklidom .....	35
3. PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA .....	37
4. EKSPERIMENTALNI DEO .....	38
4.1. Sinteza MNČ-a .....	38
4.1.1. Sinteza Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> MNČ-a .....	39
4.1.2. Sinteza Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA MNČ-a .....	41
4.1.3. Sinteza Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -PEG600 MNČ-a .....	41

4.1.4.	Sinteza Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DPD MNČ-a.....	42
4.1.5.	Sinteza Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA MNČ-a u HSA matriksu (MMSHA) .....	43
4.2.	Uređaji i metode .....	44
4.3.	Optimizacija uslova obeležavanja MNČ-a sa <sup>90</sup> Y .....	48
4.4.	In vitro stabilnost <sup>90</sup> Y-MNČ-a.....	50
4.5.	Biodistribucija <sup>90</sup> Y-MNČ-a i <sup>90</sup> Y-MMSHA u Wistar pacovima .....	50
5.	REZULTATI I DISKUSIJA .....	52
5.1.	Sinteza i funkcionalizacija Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> MNČ-a.....	52
5.2.	Karakterizacija Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> MNČ-a.....	55
5.2.1.	Karakterizacija XRPD metodom.....	55
5.2.2.	Karakterizacija TEM metodom.....	56
5.2.3.	Karakterizacija DLS metodom.....	63
5.2.4.	Karakterizacija FTIC metodom .....	66
5.2.5.	Karakterizacija TGA metodom .....	71
5.3.	Magnetne osobine sintetisanih MNČ-a .....	73
5.3.1.	Magnetne osobine Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> MNČ-a .....	73
5.3.2.	Magnetne osobine obloženih Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> MNČ-a.....	75
5.3.3.	Magnetna hipertermija .....	80
5.4.	Obeležavanje MNČ-a sa <sup>90</sup> Y .....	83
5.5.	In vitro stabilnost <sup>90</sup> Y-MNČ-a i <sup>90</sup> Y-MMSHA.....	85
5.6.	Biodistribucija <sup>90</sup> Y-MNČ-a i <sup>90</sup> Y-MMSHA u Wistar pacovima .....	86
6.	ZAKLJUČAK .....	94
7.	LITERATURA.....	98
	BIOGRAFIJA .....	112
	Prilog 1.....	113
	Prilog 2.....	114
	Prilog 3.....	115

## 1. UVOD

Značajan napredak u nanonauci i nanotehnologiji uticao je na razvoj novih nanostrukturnih materijala koji zbog svojih povoljnih fizičko-hemijskih osobina mogu imati značajnu biomedicinsku primenu. Nastajanjem novih disciplina kao što je nanomedicina, omogućen je revolucionarni pristup u dijagnozi i terapiji nekih fatalnih bolesti. Prednost primene nanostrukturnih materijala u medicini zasniva se na njihovoj veličini uporedivoj sa biološkim entitetima (ćelije, proteini, geni i sl.), tako da se terapija može ostvariti neposredno na ćelijskom i sub-ćelijskom (molekulskom) nivou [1].

U oblasti nanomedicine, magnetne nanočestice (MNČ) su među najperspektivnijim nanomaterijalima za kliničku dijagnostiku i terapijsku primenu. U te svrhe one moraju biti pre svega biokompatibilne, sa povoljnim magnetnim osobinama, ali i određenih fizičko-hemijskih karakteristika (veličine i površine pogodne za dalju funkcionalizaciju).

Primena MNČ-a u hipertermiji, koja se zasniva na zagrevanju tkiva na mestu injektovanja MNČ-a pod uticajem spoljašnjeg magnetnog polja, pokazala je veliki potencijal, posebno pri terapiji teško dostupnih tumora [2]. Radionuklidna terapija je klinički potvrđena metoda u terapiji, ali nedovoljno efikasna i toksična je po zdravo tkivo. Istraživanja pokazuju da hipertermija kao vid terapije značajno povećava efikasnost radionuklidne terapije i hemioterapije [3].

Istraživanja u okviru doktorske disertacije se sastoji iz dva dela. Prvi deo obuhvata sintezu i karakterizaciju MNČ-a obloženih biokompatibilnim materijalima. MNČ na bazi oksida gvožđa ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) su sintetisane pomoću dve metode: oksidacionom hidrolizom i taloženjem iz vodenih rastvora. Površinska modifikacija MNČ-a različitim hidrofilnim jedinjenjima urađena je u cilju povećanja rastvorljivosti u fiziološkim uslovima, smanjenja toksičnosti, kontrole veličine čestica radi dejstva u određenim organima produženja vremena u cirkulaciji i smanjenja dejstva retikuloendotelnog sistema. Za oblaganje nanočestica korišćeni su različiti materijali: polietilen glikol *bis*(karboksimetil) etar, Mn ~ 600 (PEG600), limunska kiselina (CA), 2,3-dikarboksipropan-1,1-difosfonat (DPD) i albumin iz humanog seruma (HSA). MNČ su obložene sa CA i DPD nakon njihove sinteze, dok je oblaganje pomoću PEG600

vršeno *in situ*, tj. tokom procesa sinteze MNČ-a. Za sintezu MNČ-a u HSA matriksu tj. magnetnih mikrosfera humanog albumina (MMSHA) korišćena je emulzifikaciona metoda (voda u ulju - v/u). MMSHA su stabilisane putem denaturacije proteina na visokoj temperaturi. Sintetisane i funkcionalizovane MNČ ispitane su primenom različitih metoda kojima je utvrđen uticaj modifikacije površine MNČ-a na veličinu čestica, morfologiju, površinsko naelektrisanje i magnetne osobine.

Drugi deo obuhvata optimizaciju uslova obeležavanja prethodno okarakterisanih biokompatibilnih MNČ-a radionuklidom  $^{90}\text{Y}$ .  $^{90}\text{Y}$  je beta emiter sa povoljnim karakteristikama za primenu u radionuklidnoj terapiji:  $E_{\max\beta} = 2,2$  MeV, vreme poluraspada je 64,1 h, a srednji/maksimalni domet čestica pri kome se može prouzrokovati razaranje ćelija u mekim tkivima je 3,6/11mm [4]. U okviru ovog dela ispitan je postupak radioobeležavanja, kojim se radionuklid  $^{90}\text{Y}$  ireverzibilno vezuje za MNČ, čime se sprečava njegovo oslobađanje i nakupljanje u zdravim tkivima i organima. Osim obeležavanja, posebna pažnja je posvećena prečišćavanju, s obzirom da oba postupka moraju da budu brza, zbog kratkog vremena poluraspada  $^{90}\text{Y}$ , i istovremeno bezbedna, da ne bi došlo do kontaminacije. Nije poznato da postoje literaturni podaci o obeležavanju MNČ-a obloženih PEG-om 600 i DPD-om, itrijumom-90. Takođe, ovi rezultati ukazuju na mogućnost primene  $^{90}\text{Y}$ -DPD u terapijske svrhe.

Nakon sinteze potencijalnog radiofarmaceutika, u vidu MNČ-a obeleženih  $^{90}\text{Y}$ , ispitane su njegove fizičko-hemijske i biološke osobine. Neophodno je da sintetisani kompleks MNČ-radionuklid kao potencijalni radiofarmaceutik bude stabilan u toku vremena u kome se postiže terapijski efekat. Najveći nedostatak radiofarmaceutika koji su u kliničkoj primeni je radioliza, odnosno otpuštanje radionuklida iz radiofarmaceutika koji u slobodnom obliku može prouzrokovati neželjene efekte u zdravom tkivu. Stabilnost radiofarmaceutika praćena je u toku određenog perioda ispitivanjem njegove radiohemijske čistoće i *in vitro* stabilnosti u fiziološkom rastvoru i humanom serumu. Radiohemijska čistoća je ispitana metodom tankoslojne hromatografije primenom odgovarajuće stacionarne i mobilne faze. U slučaju MNČ-a obeleženih  $^{90}\text{Y}$ , kao najbolji izbor pokazale su se silika gel (SG) trake sa 0,9 % NaCl kao mobilnom fazom, jer se u tom sistemu  $^{90}\text{Y}$  pomera sa frontom rastvarača, dok  $^{90}\text{Y}$ -MNČ ostaju na startu. Stabilnost MNČ-a obeleženih radionuklidom u fiziološkim

uslovima se može razlikovati od one u jednostavnom model sistemu koji sadrži samo MNČ i elektrolite. U tom cilju je ispitana *in vitro* stabilnost MNČ-a obeleženih radionuklidom u humanom serumu u kome one moraju ostati nepromenjene duži vremenski period ukoliko se žele primeniti *in vivo*.

Biodistribucija i *in vivo* stabilnost MNČ-a obeleženih radionuklidom praćeni su merenjem radioaktivnosti po organima, nakon njihove intravenske aplikacije u zdravim laboratorijskim životinjama (Wistar pacovima). Poređenjem rezultata biodistribucije MNČ-a obeleženih radionuklidom u toku određenog vremenskog perioda sa rezultatima biodistribucije samog nevezanog  $^{90}\text{Y}$  koji se dominantno akumulira u kostima, dobijeni su podaci o njihovoj *in vivo* stabilnosti.

## 2. TEORIJSKI DEO

### 2.1. Magnetne nanočestice na bazi $\text{Fe}_3\text{O}_4$ i njihova mogućna primena u hipertermijsko-radionuklidnoj terapiji tumora

Mogućnost kontrolisane sinteze MNČ-a, u cilju dobijanja materijala određenih fizičko-hemijskih, a pre svega magnetnih karakteristika, čini nanočestične magnetne materijale veoma interesantnim i pogodnim za naučna istraživanja i primenu [5, 6]. Poslednjih desetak godina posebna pažnja je usmerena na nanočestične okside gvožđa zbog njihove potencijalne primene u oblasti biomedicine. Prednost korišćenja Fe-oksidnih nanočestica u odnosu na nanočestice čistih metala i druge magnetne materijale, je u njihovoj hemijskoj stabilnosti i niskoj toksičnosti po ljudski organizam [7, 8]. Dva najčešće korišćena ferimagnetna materijala u biomedicini su magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) i maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) zbog povoljnih magnetnih osobina (kao što je visoka magnetna saturacija), biološke kompatibilnosti, hemijske stabilnosti i niske cene proizvodnje [9]. Magnetit je mineral crne boje, koji sadrži gvožđe u dva valentna stanja,  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ . Strukturno, magnetit je inverzni spinel sa kiseonikom koji formira površinski centriranu kubnu rešetku i  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  katjonima koji zauzimaju unutrašnje tetraedarske i oktaedarske pozicije. Osetljiv je na oksidaciju – lako se transformiše u maghemit oksidacijom  $\text{Fe}^{2+}$  jona [10]. Za primenu u biomedicini potrebno je da MNČ imaju visoku magnetizaciju i uniformnu veličinu čestica manju od 100 nm. Primena MNČ-a u biomedicini zahteva njihovu prethodnu funkcionalizaciju i oblaganje, čime se obezbeđuje biokompatibilnost i omogućava ciljano dostava MNČ-a u određene organe i tkiva. MNČ dispergovane u odgovarajućem rastvaraču formiraju koloidne rastvore koji se nazivaju magnetni ferrofluidi. Vodene koloidne disperzije MNČ-a imaju posebnu važnost zbog njihove kompatibilnosti sa biosistemima [11].

Zahvaljujući osobini da interaguju sa spoljašnjim magnetnim poljem MNČ su našle primenu kao kontrastni agensi u magnetnoj rezonanci (*MRI - magnetic resonance imaging*), u ciljanoj dostavi lekova, magnetnoj separaciji i magnetnoj hipertermiji [12, 13]. Magnetna hipertermija se zasniva na efektu da magnetne čestice pri izlaganju naizmeničnom magnetnom polju (AMF) određene jačine i frekvencije lokalno oslobađaju toplotu zagrevajući tumorsko tkivo [14]. Za primenu u magnetnoj

hipertermiji, pored navedenih osobina poželjno je da se MNČ u velikom procentu nakupljaju u tumorskom tkivu, ali i da imaju visoku vrednost specifične apsorpcije (*SPA - specific power adsorption*<sup>1</sup>) koja ukazuje na mogućnost njihove primene za zagrevanje tumorskog tkiva u naizmeničnom magnetnom polju. Primenom ove metode moguće je zagrevanje isključivo regije tela gde se nalazi tumor, bez oštećenja okolnog zdravog tkiva. Postoje dva tipa zagrevanja: umerena (mild) hipertermija koja se odvija u temperaturnom opsegu 41 °C - 46 °C izazivajući odgovor imunog sistema i termoablacija koja se odvija iznad 46 °C (uz povećanje temperature do 56 °C) dovodeći do uništenja tumora direktnom ćelijskom nekrozom, koagulacijom i karbonizacijom [15]. Istraživanja u toku 70-tih godina prošlog veka, potvrdila su da temperature u opsegu od 42 °C do 45 °C oštećuju ćelije tumora, sprečavaju njihov rast ili ih potpuno uništavaju [16]. Zagrevanje ćelija tumora uzrokuje nedostatak kiseonika, što rezultira preteranom acidifikacijom zagrejanih ćelija i nedostatkom hranjivih materija u ćelijama tumora. Metabolički procesi u ćelijama su sprečeni, što dovodi do smrti ćelija tumora (apoptoze) [17]. Dejstvo toplote indukuje proizvodnju “proteina toplotnog stresa” na površini tretiranih ćelija, što čini da imuni sistem, inicijalno “neprepoznatljive” ćelije tumora, prepozna i započne borbu protiv njih [18].

Postizanje terapijskog efekta zavisi od prirode i količine MNČ-a koje su dostavljene u ciljno mesto, osobina primenjenog magnetnog polja, kao i od prirodne sposobnosti hlađenja tkiva putem protoka krvi. Gilchrist i saradnici [19] su prvi eksperimentalno ispitali hipertermiju kao vid terapije, zagrevanjem različitih tkiva pomoću  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> čestica veličine 20-100 nm koristeći magnetno polje jačine 16-19,2 kA/m i frekvenciju 1,2 MHz. Od tada, mnoga istraživanja su pokazala mogućnost primene hipertermije kao alternativnog načina terapije tumora [20].

Radionuklidna terapija zahteva primenu  $\alpha$  ili  $\beta$ -emitera koji nakon specifične lokalizacije u tumorskom tkivu, prouzrokuju razaranje ciljanih tumorskih ćelija. Jedan od vidova radionuklidne terapije je radioembolizaciona terapija pri kojoj se mikrosfere (MS) veličine iznad 10  $\mu$ m obeležene pogodnim radionuklidom, intraarterijski ili direktno intratumorski injektiraju, čime se postiže visok stepen selektivne akumulacije u ciljanim tkivima i organima. Pri direktnom injektovanju u arteriju koja vodi do

---

<sup>1</sup> Specifična apsorpcija predstavlja količinu energije po jedinici mase nanočestice koja se konvertuje u toplotu.

tumora, MS se zbog svoje veličine “zaglave” u kapilarnoj mreži tumora otpuštajući lokalno radiotoksičnu dozu, koja je do 20-30 puta veće od one koja se postiže spoljašnjom radijacionom terapijom, dok je toksičnost po okolno zdravo tkivo zanemarljiva [21]. Ovaj pristup terapije prvi su razvili *Muller* i *Rossier* [22] u Švajcarskoj korišćenjem  $^{65}\text{Zn}$ - i  $^{198}\text{Au}$ -MS. Za ovu primenu urađena su istraživanja sa MS na bazi smole (*resin microspheres*) obeleženim  $^{166}\text{Ho}$  i silikatnim MS (*glass microspheres*) obeleženim  $^{186}\text{Re}/^{188}\text{Re}$ . Danas postoje dva komercijalno dostupna preparata na bazi  $^{90}\text{Y}$ -MS koji se koriste za selektivnu unutrašnju radioterapiju (*SIRT - selective internal radiation treatment*) [23] primarnih i metastaziranih tumora jetre: silikatne  $^{90}\text{Y}$ -mikrosfere prosečne veličine 22  $\mu\text{m}$  (TheraSphere, MDS Nordion, Canada) [24] i  $^{90}\text{Y}$ -mikrosfere na bazi smole prosečne veličine 35  $\mu\text{m}$  (SirSpheres, Sirtex Medicals Inc., Australia) [25]. Ove  $^{90}\text{Y}$ -mikrosfere se uvode kroz hepaticnu arteriju, s obzirom na činjenicu da se tumori u jetri snabdevaju krvlju većinom iz arterijske cirkulacije za razliku od normalnog tkiva koje se snabdeva krvlju većinom iz portalne vene [26].

Poslednjih decenija albuminske mikrosfere zauzimaju posebnu pažnju kao efikasni nosači lekova zbog jednostavne pripreme, mogućnosti kontrolisane promene veličine čestica variranjem uslova sinteze, kao i zbog prisustva reaktivnih grupa (amino i karboksilnih) na svojoj površini, koje se mogu koristiti za vezivanje radionuklida, helatnih agenasa i antitela. Pored netoksičnosti i imunokompatibilnosti, glavna prednost ovih MS je biodegradibilnost na prirodne produkte [27]. MS humanog albumina (MSHSA) su zbog visoke mehaničke i hemijske stabilnosti, otporne na hidrolizu i radiolizu [28]. Albuminske mikrosfere, kao nosači dijagnostičkih i terapijskih radionuklida, već imaju značajnu kliničku primenu. Obeležene  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  one se rutinski koriste za perfuzionu scintigrafiju pluća [29], dok obeležene  $^{188}\text{Re}$  mogu biti korišćene za radioterapiju [30].

Takođe, istraživanja su pokazala da MNČ obložene silikom [31], HAS [32] i poliakril amidom [33], i obeležene  $\beta$ -emiterom  $^{188}\text{Re}$ , imaju mogućnu primenu u radionuklidnoj terapiji. Ipak, njihova upotreba u terapiji je ograničena, uglavnom usled neselektivnog nakupljanja u zdravim tkivima. Kako veličina čestice značajno utiče na nakupljanje MNČ u određenom organu, selektivno nakupljanje može biti poboljšano primenom uniformnih čestica određene veličine [34] ili korišćenjem velikog gradijenta



magnetnog polja koje zadržava MNČ unutar i oko ciljane lokacije [12]. Inkapsuliranje MNČ-a u mikrosferama takođe može uticati na njihovo selektivno nakupljanje i zadržavanje mikrosfera u određenim tkivima i poboljšani terapijski efekat radioembolizacije.

Sinergijski efekat radioterapije i hipertermije se zasniva na tome da toplotni efekat hipertermije može učiniti neke tumorske ćelije osjetljivijim na jonizujuće zračenje ili uništiti tumorske ćelije na koje radionuklidna terapija ne deluje [35, 36]. Hipoksične (siromašne kiseonikom) tumorske ćelije su rezistentnije na zračenje, a senzitivnije na zagrevanje u odnosu na euoksične (bogate kiseonikom) ćelije. Kombinovanjem metoda, hipertermijom se povećava perfuzija (prokrvljenost) tumorskog tkiva čime se povećava lokalna koncentracija kiseonika, i na taj način je omogućeno efikasnije razaranje hipoksičnih tumorskih ćelija pod uticajem jonizujućeg zračenja [37]. Jonizujuće zračenje oštećuje DNK, dok hipertermija inhibira reparativne proteine odgovorne za popravku DNK molekula [15]. U temperaturskom intervalu umerene hipertermije 41 °C - 46 °C oštećenja normalnog tkiva su reverzibilna dok se tumorske ćelije ireverzibilno oštećuju, zbog čega se najčešće umerena hipertermija kombinuje sa radio- ili hemo-terapijom.

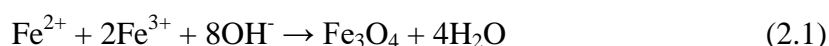
## **2.2. Sinteza MNČ-a**

Cilj sinteze nanočestica je dobijanje jednofaznih uzoraka, tj. čestica što uniformnijih po veličini i obliku jer od toga dalje zavise fizičke i biološke karakteristike. Poželjno je da veličine čestica variraju u opsegu manjem od 20 %. Kod sinteze nanočestica potrebno je izbeći njihovu aglomeraciju jer ima nepovoljan uticaj na fizičke osobine nanočestica i njihovu primenu. Najčešće korišćene metode za sintezu nanočestičnih magnetnih materijala su: taloženje iz rastvora (koprecipitacija), termalna dekompozicija, emulzifikaciona, sonohemijska, solvotermalna, sol-gel, mehanohemijska, glicin-nitratna, sprej piroliza i hidrotermalna metoda [38-42].

U literaturi je opisan određen broj metoda za sintezu Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a u rastvoru (sol-gel metoda, taloženje iz rastvora, metoda reverznih micela, oksidaciona hidroliza) [43-47] koje se mogu svrstati u hemijske metode. Zajedničko za sve njih je da se polazi od rastvora hemijskog prekursora, a da u toku sinteze dolazi do hemijske reakcije u kojoj

nastaje nerastvorno jedinjenje tj. formira se čvrsta faza. Ove metode su fokusirane na sintezu jednodomenskih nanočestica veličine 2-20 nm sa superparamagnetnim osobinama na sobnoj temperaturi. U našim eksperimentima korišćene su dve metode sinteze MNČ-a: taloženje iz rastvora i oksidativna hidroliza. Za sintezu MNČ-a u HSA matriksu (MMSHA) korišćena je emulzifikaciona metoda (voda u ulju - v/u).

Metoda taloženje iz rastvora se smatra jednom od najjednostavnijih hemijskih metoda sinteze gvožđe oksidnih nanočestica i nakon opisa metode pre više od trideset godina od strane Massarat-a [48], ova metoda je pretrpela brojne modifikacije. Metoda se zasniva na taloženju magnetita u baznom rastvoru (pH od 8 do 14)  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  jona koji se nalaze u molarnom odnosu 1:2 (jednačina 2.1).



Postupak dobijanja magnetita metodom taloženja iz rastvora može se podeliti u nekoliko faza. Prvo se u destilovanoj vodi rastvaraju određene količine metalnih soli (najčešće se koriste hloridi, sulfati i nitrati) pri čemu usled disocijacije dolazi do oslobađanja metalnih jona. Koncentracije metalnih soli u rastvoru određuju se na osnovu željene stehiometrije gvožđe-oksidnih nanočestica. Tako pripremljen rastvor meša se sa bazom, najčešće rastvorom NaOH ili  $\text{NH}_4\text{OH}$ , koji utiče na izdvajanje nanočestičnog gvožđe-oksida u vidu taloga. Smeša rastvora se određeno vreme intenzivno meša, pod kontrolisanim uslovima (temperatura, pritisak, pH vrednost smeše) kako bi se postigla bolja homogenizacija uzorka. Konačno, dobijeni gvožđe-oxid, se u vidu taloga izdvaja iz rastvora, ispira i suši [49]. Zbog osetljivosti magnetita na oksidaciju, tokom sinteze se uvodi inertni gas, kako bi se sprečila transformacija magnetita u maghemit i hematite [50].

Broj i veličina nastalih primarnih čestica zavisi od brzine nukleacije i brzine rasta nastalih jezgara. Da bi se dobile primarne čestice uniformnije raspodele potrebno je da reakcije nukleacije i rasta budu razdvojene, tj. da prvo nastanu jezgra, pa da se onda akumulacijom preostalog materijala odvija njihov rast. Procesi nukleacije i rasta nastalih nukleusa su kinetički kontrolisani tako da nastale primarne čestice ne moraju biti i termodinamički stabilne pa u procesu starenja nastale suspenzije može doći do

njihovog rasta, odnosno agregacije, što vodi promeni morfologije nastalih čestica. Takođe, može doći i do kristalizacije amorfnih čestica ili do rekristalizacije već nastale kristalne faze, a sve u cilju postizanja bolje termodinamičke stabilnosti [51, 52].

Prednost ove metode je relativna jednostavnost i pristupačnost polaznih komponenti, niska temperatura pri kojoj se odvija sinteza (do ~150 °C), kao i dobijanje veće količine magnetnih nanočestica (do 40 g po sintezi). Glavni nedostatak je teško obezbeđivanje željene stehiometrije dobijenog uzorka i slaba kontrola veličine sintetisanih nanočestica [53]. Veličina nanočestica, morfologija, magnetne osobine mogu biti kontrolisane u zavisnosti od pH rastvora, jonske jačine, temperature, vremena reakcije i tipova soli [49].

Oksidativna hidroliza je metoda u kojoj se  $\text{Fe}^{2+}$  joni u baznoj sredini delimično oksiduju različitim oksidacionim sredstvima ( $\text{KNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [54], pri čemu nastaju  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ veličine 30-100 nm. Koncentracija  $\text{Fe}^{2+}$  jona je odgovorna za mehanizam rasta čestica pa direktno utiče na veličinu čestica i njihovu morfologiju [55]. Najuniformnije čestice se dobijaju kada postoji mali višak koncentracije  $\text{Fe}^{2+}$  jona u odnosu na koncentraciju  $\text{OH}^-$  jona iz baze. Parametri koji ne utiču na veličinu MNČ-a su izbor baze ( $\text{KOH}$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}(\text{CH}_3)\text{OH}$ ) i koncentracija oksidacionog sredstva.

Emulzifikaciona metoda koja se koristi za sintezu MMSHA podrazumeva postojanje dvofaznog sistema u kome je tečan ili čvrst materijal dispergovan u nemešljivoj tečnosti. Ovakav sistem se naziva suspenzija ili emulzija u zavisnosti od prirode disperzne faze (čvrste ili tečne). Proces sinteze MMSHA podrazumeva formiranje malih kapljica vodenog rastvora albumina u nemešljivoj tečnosti (uljana faza), očvršćavanje ovih kapljica kovalentnim umrežavanjem i izdvajanje dobijenih stabilisanih MS. Materijal koji se želi inkapsulirati u MS može biti rastvoren ili dispergovan u osnovni rastvor albumina. Sinteza albuminskih mikrosfera zasniva se na principu termičke ili hemijske stabilizacije. Oba načina stabilizacije podrazumevaju unakrsno povezivanje (umrežavanje) albumina bilo pomoću povišene temperature (95 °C - 170 °C) ili pomoću hemijskih agenasa (formaldehid, glutaradelhid). Budući da hemijski stabilisane albuminske mikrosfere pokazuju neuniformnost u veličini i manju

stabilnost od termički stabilisanih MS, u ovom radu je korišćena stabilizacija MS na visokoj temperaturi građenjem amidnih veza između proteinskih lanaca.

Kada se emulzifikacione tehnike koriste za pripremu mikrosfera, brojni procesni parametri utiču na finalnu strukturu mikrosfera, na primer, izbor rastvarača i surfaktanta, fazni viskozitet, odnos dispergovane prema kontinualnoj fazi, brzina mešanja, temperatura i vreme procesiranja [56]. Pažljivom modifikacijom procesnih uslova mogu se dobiti sferne čestice u širokom opsegu veličina, od submikronskih do mikronskih.

### **2.3. Funkcionalizacija površine MNČ-a**

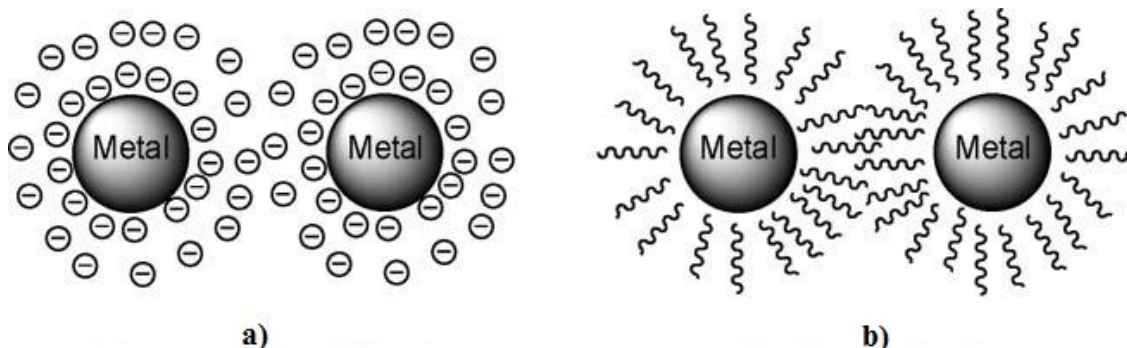
Magnetne nanočestice imaju hidrofobne površine sa velikim odnosom površine i zapremine i samim tim velike površinske energije. Da bi smanjile ukupnu površinsku energiju, MNČ imaju tendenciju da stvaraju aglomerate. Na to dodatno utiče njihova magnetna priroda koja dovodi do snažnih dipolarnih privlačnih interakcija između čestica [11]. Ove pojave vode ka destabilizaciji njihovih koloidnih disperzija i mogu uticati na neke od osobina, kao što je superparamagnetno ponašanje.

Odgovarajuća funkcionalizacija površine MNČ-a i izbor rastvarača su ključni za postizanje odbojnih sila između čestica koje sprečavaju aglomeraciju i utiču na stvaranje termodinamički stabilnih koloidnih rastvora MNČ-a [57]. Stabilizacija koloidnih rastvora se vrši održavanjem međusobnog rastojanja između čestica iznad kritične vrednosti pri kojoj dolazi do aglomeracije i može biti [58]:

- elektrostatička - adsorpcija anjona (npr.  $\text{Cl}^-$ , citrati<sup>-</sup> itd.) na površini nanočestice izaziva elektrostatičko odbijanje, ili
- sterna - adsorpcija polimera (polivinilpirolidin (PVP), polivinilalkohol (PVA), i sl.) održava rastojanje između nanočestica na vrednosti pri kojoj je energija interakcije pozitivna (odbojna) (slika 2.1).

Koloidna stabilizacija omogućava biokompatibilnost MNČ-a i prisustvo različitih funkcionalnih grupa na njihovoj površini preko kojih se mogu vezivati različiti ligandi i jedinjenja [59]. Najčešći načini modifikacije površine MNČ-a su preko oblaganja

različitim jedinjenjima ili inkapsulacijom (ubacivanjem) MNČ-a u odgovarajući matriks (HSA, PLGA, silikat, smola itd.) [60].



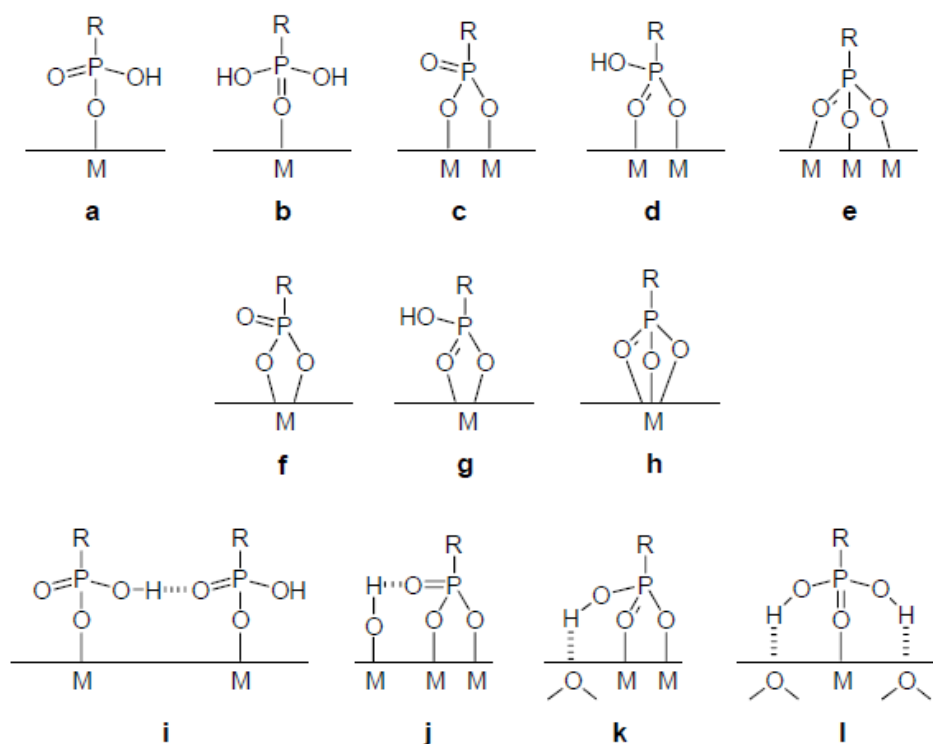
*Slika 2.1: Šematski prikaz a.) elektrostatičke i b.) sterne stabilizacije dispergovanih magnetnih nanočestica [61]*

Različita jedinjenja, kao što su silani [62], fosfonati [63], fosfati [64], hidrofilni polimeri (polietilen glikol-PEG [65] i polietilen oksid-PEO [66]), albumin [67] i dekstran [68] se koriste za stabilizaciju MNČ-a, interagujući sa njihovom površinom.

Limunska kiselina (CA) je mali, biokompatibilni organski molekul koji ima tri karboksilne i jednu hidroksilnu grupu i vrlo često se koristi za sintezu stabilnih vodenih suspenzija MNČ-a kao i za njihovu konjugaciju sa biomolekulima i lekovima preko nekoordinisanih/slobodnih karboksilnih grupa na površini čestica [69]. Takođe, slobodne karboksilne grupe na površini MNČ-a omogućavaju elektrostatičko odbijanje između čestica čime se postiže veća stabilnost ferofluida [70, 71]. Utvrđeno je da se dodavanjem limunske kiseline u različitim fazama procesa dobijanja nanočestica i pri različitim temperaturama, može podešavati veličina jezgra nanočestica i kontrolisati njihov hidrodinamički radijus [72]. Kako je molekul limunske kiseline mali, hidrodinamička veličina njome obloženih nanočestica se ne uvećava mnogo, što može biti od značaja u različitim terapijskim primenama [73].

Korišćenje fosfonata za oblaganje površine MNČ-a ima poseban značaj zbog snažne interakcije između gvožđa i fosfonatne grupe, kao i njihove dokazane biokompatibilnosti, zbog čega se mogu koristiti u medicinske svrhe [63, 74]. Takođe, vezivanjem fosfonata za  $Fe_3O_4$  MNČ postiže se njihova rastvorljivost u vodenim rastvorima. Fosfonati su jedinjenja koja sadrže jednu ili više  $R-PO(OH)_2$  Lewis-ovih kiselih grupa. U fosfonatnoj grupi postoje tri atoma kiseonika - jedan iz fosforil grupe

(P=O) i dva iz hidroksilne grupe (P-OH) [75]. S obzirom da se do tri atoma kiseonika mogu vezati za površinu MNČ, načini vezivanja fosfonatne kiseline za površinu metalnih oksida mogu biti mono-, bi- ili tri-dentatni [76]. Prilikom vezivanja svakog atoma kiseonika iz fosfonatne kiseline za različite atome metala pravi se bidentatna ili tridentatna (*bridging*) veza. Vezivanjem dva ili tri atoma kiseonika iz fosfonatne kiseline za isti atom metala gradi se helatna veza. Mogući načini vezivanja fosfonatnih kiselina za površinu metalnih oksida predstavljeni su na slici 2.2 [76].



**Slika 2.2:** Načini vezivanja fosfonatnih kiselina za površinu metalnih oksida, gde je M - metal. a. i b.) Monodentatno vezivanje, c. i d.) Bidentatno binuklearno (*bridging*) vezivanje, e.) Tridentatno vezivanje, f. i g.) Helatno bidentatno vezivanje, h.) Helatno tridentatno vezivanje, i.-l.) dodatne interakcije građenjem vodonične veze [76]

U biološkom medijumu elektrostatički stabilisane MNČ sklone su aglomeraciji usled neutralizacije površinskog naelektrisanja [77]. Zbog toga se polimeri često koriste kao stabilisajući agensi jer omogućavaju sternu stabilizaciju, koja za razliku od elektrostatičke stabilizacije, smanjuje uticaj jonske jačine na koloidnu stabilnost [78]. U fiziološkim uslovima, funkcionalizacija polimerima smanjuje aglomeraciju MNČ-a

izazvanu adsorpcijom proteina. Takođe, smanjuje se reakcija retikuloendotelnog sistema i produžava se vreme zadržavanja MNC-a u krvi [79, 80].

Ubacivanjem MNC-a u odgovarajući matriks nastaju mikrosfere. Mikrosfere sintetisane od albumina koji potiče iz humanog seruma su manje i uniformnije veličine u odnosu na mikrosfere sintetisane od ovalbumina, usled bolje rastvorljivosti humanog albumina [81]. Takođe, HSA mikrosfere imaju prednost u odnosu na MS napravljene od drugih materijala jer se prilikom biodegradacije razlažu na prirodne produkte [82]. Zbog visoke mehaničke i hemijske stabilnosti, HSA mikrosfere su otporne na hidrolizu i radiolizu [83].

## 2.4. Magnetne osobine nanočestičnih materijala

### 2.4.1. Osnove magnetizma i podela magnetika

Svi materijali u izvesnom stepenu poseduju magnetna svojstva i u skladu sa njima interaguju sa spoljašnjim magnetnim poljem. Promene u većini materijala nestaju sa uklanjanjem spoljašnjeg polja, dok se kod određene grupe materijala promene delimično zadržavaju i posle prestanka dejstva spoljašnjeg polja [84].

Unošenjem supstancija u magnetno polje u njima dolazi do nastajanja magnetnog momenta<sup>2</sup>, koji se najčešće izražava po jedinici zapremine date supstancije i naziva magnetizacijom -  $M$ . Magnetna susceptibilnost -  $\chi$  predstavlja se odnosom magnetizacije -  $M$  i jačine spoljašnjeg magnetnog polja -  $H$ . Proučavajući zavisnost magnetizacije od spoljašnjeg magnetnog polja -  $M(H)$ , kao i zavisnost magnetizacije od temperature -  $M(T)$ , možemo odrediti kojoj grupi magnetnih materijala pripada ispitivani materijal. Tako materijale, prema njihovim magnetnim svojstvima, možemo podeliti na [85-87]:

- (1) slabe magnetike (dijamagnetici i paramagnetici) kod kojih ne postoji spontana uređenost magnetnih momenata;
- (2) jake magnetike (fero-, antifero- i ferimagnetici) kod kojih postoji spontana uređenost magnetnih momenata (bez prisustva magnetnog polja).

---

<sup>2</sup> Magnetni moment atoma jednak je vektorskom zbiru orbitalnih i spinskih magnetnih momenata.

Dijamagnetni materijali ne pokazuju magnetni moment sve dok se ne nađu u spoljašnjem magnetnom polju. U spoljašnjem magnetnom polju, zbog njegovog delovanja na orbitalno kretanje elektrona u atomu, dolazi do indukovanja magnetnog momenta. Indukovani magnetni moment, po Lencovom pravilu, postavlja se suprotno od spoljašnjeg magnetnog polja, tako da dijamagnetne materijale karakteriše negativna susceptibilnost, koja ne zavisi od jačine primenjenog spoljašnjeg polja, niti od temperature. Dijamagnetizam je univerzalno svojstvo jer se indukovani magnetni moment javlja kod svih supstancija, bez obzira na magnetno uređenje [85-87].

Paramagnetni materijali su građeni od atoma koji sadrže nesparene elektrone, tj. od atoma koji imaju stalni magnetni dipolni moment. Orijehtacija magnetnih momenata atoma paramagnetika je, ukoliko se oni ne nalaze u spoljašnjem magnetnom polju, zbog termičkog kretanja haotična. Međutim, u spoljašnjem magnetnom polju magnetni momenti paramagnetika se orijentišu većinom u pravcu i smeru spoljašnjeg magnetnog polja, tako da je njihova susceptibilnost pozitivna. Step en ove orijentacije zavisi od temperature, pa je magnetna susceptibilnost paramagnetika funkcija temperature. S obzirom na to da se orijentacija magnetnih momenata atoma kod paramagnetnih materijala održava dejstvom spoljašnjeg magnetnog polja, po prestanku ovog dejstva uređenost ubrzo prestaje i postaje haotična [85-87].

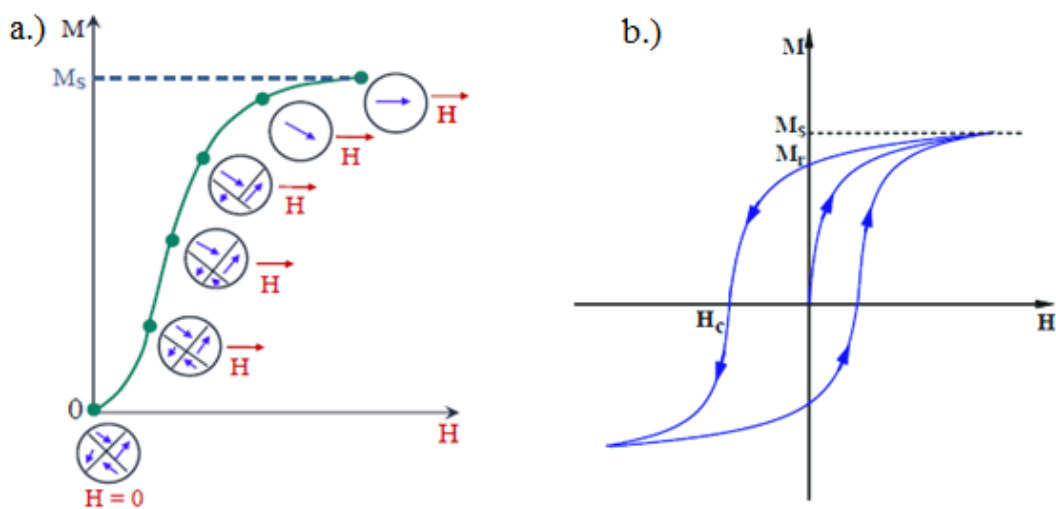
Feromagnetni materijali poseduju stalni magnetni dipolni moment i karakteriše ih spontana magnetizacija (uređenost magnetnih dipolnih momenata atoma van spoljašnjeg magnetnog polja ispod karakteristične temperature) koja je najveća na niskim temperaturama (bliskim 0 K). Povišavajući temperaturu spontana magnetizacija se smanjuje zato što dipolni momenti sve više odstupaju od paralelne orijentacije. Kad temperatura feromagnetika dostigne ili prevaziđe Curie-jevu temperature ( $T_C$ ), materijal gubi svoju preostalu magnetizaciju i postaje paramagnetik. Ispod Curie-jeve temperature, magnetni momenti su orijentisani i materijal je feromagnetik. Iznad Curie-jeve temperature, dominantno je termičko kretanje koje uzrokuje proizvoljnu orijentaciju momenata [88].

Feromagnetni materijali su podeljeni na oblasti homogene magnetizacije, tzv. domene. Unutar jednog domena svi dipolni momenti su skoro potpuno usmereni u istom pravcu. Domeni različitih orijentacija magnetnih momenata su međusobno razdvojeni granicama domena, domenskim zidovima (*Bloch*-ovim zidovima).



Domenska struktura materijala predstavlja jedan od načina da se trošenjem energije na stvaranje granica između domena postigne stanje sa minimalnom energijom [86, 87, 89].

U spoljašnjem magnetnom polju dolazi do promena oblika i veličina domena [90]. Proces magnetizovanja feromagnetnog materijala pod dejstvom spoljašnjeg magnetnog polja (na temperaturi ispod *Curie*-jeve tačke) odvija se u više faza. U prvoj fazi, dok je magnetno polje još slabo, dolazi do povećanja onih domena čiji rezultujući magnetni moment zaklapa najmanji ugao sa spoljašnjim magnetnim poljem i to na račun onih domena čija je orijentacija manje povoljna. Druga faza se dešava u jačim poljima gde dolazi do rotacije magnetnih momenata domena u smeru spoljašnjeg magnetnog polja. Kad se vektori magnetnih dipolnih momenata svih domena postave u smeru spoljašnjeg magnetnog polja, magnetizacija -  $M$  postiže svoju maksimalnu vrednost -  $M_s$  (saturaciona magnetizacija). Pri isključivanju magnetnog polja, posle postizanja saturacione magnetizacije, magnetizacija ne postiže vrednost nula nego ima neku konačnu vrednost -  $M_r$  (remanentna magnetizacija), a uzrok je zaustavljanje domenskih zidova u nekim metastabilnim položajima. Tek nakon primenjivanja magnetnog polja u suprotnom smeru -  $H_c$  (koercitivno polje) magnetizacija pada na nulu. Daljim povećanjem polja postiže se maksimalna vrednost magnetizacije u suprotnom smeru. Ponovnim smanjivanjem polja do vrednosti nula i povećanjem polja u suprotnom smeru proces magnetizacije uzorka teče slično praveći histerezisnu petlju (slika 2.3).



**Slika 2.3:** a.) Šematski prikaz rasta domena u magnetnom polju, b.) Histerezisna petlja [88]

Ferimagnetni materijali kao i antiferomagnetni imaju magnetne momente koji su antiparalelni. Za razliku od antiferomagnetika, kod ferimagnetika oni se ne kompenzuju u potpunosti jer su različitih vrednosti. Zbog toga ovakve supstancije raspolažu spontanom magnetizacijom, slično feromagneticima. Pod dejstvom spoljašnjeg magnetnog polja ferimagnetici se ponašaju slično feromagneticima (histerezisna petlja slika 2.3.b). Spontana uređenost magnetnih momenata se narušava iznad *Curie*-jeve temperature, kao kod feromagnetika [86, 87].

U antiferomagnetnim materijalima uzajamno dejstvo između atoma koji poseduju permanentne magnetne momente može da bude takvo da se magnetni momenti susednih atoma orijentišu antiparalelno jedan u odnosu na drugi ali su jednaki po intezitetu tako da je rezultujući magnetni moment jednak nuli. Slično feromagneticima, pomenuta magnetna uređenost postoji samo u određenom temperaturnom intervalu, od apsolutne nule do neke kritične temperature. Ta temperatura se naziva antiferomagnetna *Curie*-jeve tačka ili *Néel*-ova temperatura ( $T_N$ ). Za njih, kao i za feromagnetne i ferimagnetne materijale, iznad ove karakteristične temperature narušava se spontana uređenost magnetnih momenata i oni imaju paramagnetne osobine [86, 87].

#### **2.4.2. Superparamagnetizam**

Superparamagnetizam se javlja kod nanočestičnih magnetnih materijala koji pokazuju ponašanje slično paramagnetizmu na temperaturama ispod *Curie*-jeve ili *Néel*-ove temperature (feromagnetici, ferimagnetici i antiferomagnetici) [91, 92]. Na temperaturama iznad *Curie*-jeve ili *Néel*-ove temperature termalna energija je dovoljna da prouzrokuje da atomski magnetni momenti fluktuiraju neuređeno, tj. da više nema bilo kakvog magnetnog uređenja i materijal pokazuje paramagnetno ponašanje. Ukoliko je ispitivani materijal na temperaturi ispod *Curie*-jeve ili *Néel*-ove temperature, tj. ako termalna energija nije dovoljna da nadvlada izmenske interakcije između susednih atoma, dovoljna je da promeni pravac magnetizacije cele čestice. Materijal se ponaša na sličan način kao paramagnetik, osim što umesto magnetnog momenta svakog individualnog atoma, magnetni moment cele nanočestice teži da se orijentiše u pravcu spoljašnjeg magnetnog polja. Energija koja je potrebna za promenu pravca magnetizacije u nanočesticama naziva se energija anizotropije. Energija

anizotropije jednodomenske čestice, u prvoj aproksimaciji proporcionalna je zapremini čestice  $V$  tj. zavisi od osobina materijala i od veličine nanočestica. Za najjednostavniji slučaj jednoosne simetrije, energija magnetne anizotropije može se predstaviti u pojednostavljenom obliku [93]:

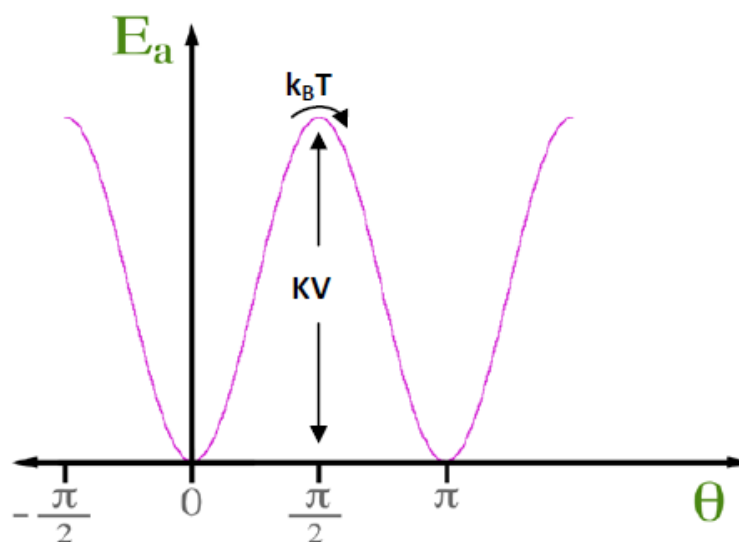
$$E_a = KV \sin^2 \theta \quad (2.2)$$

gde je

$K$  - konstanta anizotropije koja se izražava u jedinicama  $\text{J m}^{-3}$

$\theta$  - ugao između vektora magnetizacije  $M$  i pravca ose lake magnetizacije.

Proizvod  $KV$  zapravo predstavlja potencijalsku barijeru koja se suprotstavlja reorijentaciji vektora magnetizacije i koja razdvaja dve ravnotežne orijentacije određene minimumom energije anizotropije za  $\theta = 0$  i  $\theta = \pi$  (slika 2.4). Za  $\theta = \pi/2$  energija anizotropije imaće maksimalnu vrednost. U slučaju dovoljno malih čestica,  $KV$  postaje uporedivo sa termalnom energijom  $k_B T$  ( $k_B$  – Bolcmanova konstanta) tako da termalne fluktuacije mogu da izazovu reorijentaciju magnetnog momenta čestice, kao što je to slučaj kod atomskih spinova paramagnetika.



*Slika 2.4: Energija anizotropije u zavisnosti od ugla koji vektor magnetizacije zaklapa sa osom lake magnetizacije [88]*

Već je napomenuto da u slučaju dovoljno malih čestica i na dovoljno visokoj temperaturi visina potencijalske barijere  $KV$  postaje uporediva sa termalnom energijom što izaziva superparamagnetnu relaksaciju odnosno spontane fluktuacije magnetnog momenta čestice između dva suprotna smera duž ose lake magnetizacije. Nakon što je uklonjeno magnetno polje, remanentna magnetizacija će se smanjivati prema eksponencijalnoj zavisnosti [94]:

$$M_r(t) = M_S \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (2.3)$$

gde je

$M_S$  – saturaciona magnetizacija

$t$  – vreme proteklo nakon što je uklonjeno spoljašnje polje

$\tau$  – karakteristično relaksaciono vreme

Dakle, termalno ekscitovane fluktuacije magnetnog momenta se dešavaju sa frekvencijom  $f$  odnosno sa karakterističnim vremenom relaksacije. Kvantitativan izraz za superparamagnetno relaksaciono vreme (vreme za koje se dogodi reorijentacija magnetnog momenta) dobija se na osnovu *Neel-Brown*-ovog modela [95, 96]:

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right) \quad (2.4)$$

Magnetno ponašanje sistema određeno je vrednošću karakterističnog vremena merenja  $\tau_m$  koje zavisi od upotrebene eksperimentalne tehnike. U slučaju SQUID magnetometrije  $\tau_m$  iznosi 100 s dok u slučaju npr. *Mössbauer*-ove spektroskopije karakteristično vreme merenja je reda veličine  $10^{-9}$  s. Ukoliko je vreme merenja mnogo veće u poređenju sa vremenom relaksacije  $\tau_m \gg \tau$ , relaksacija magnetizacije je brža od orijentacije magnetizacije u posmatranoj eksperimentalnoj tehnici, što dozvoljava sistemu da dostigne termodinamičku ravnotežu. Ansambl nanočestica se tada ponaša kao paramagnetni sistem i nalazi se u superparamagnetnom stanju. Sa druge strane, ako je vreme merenja mnogo manje od vremena relaksacije  $\tau \gg \tau_m$ , relaksacija sistema se odvija sporo i tada se zapažaju kvazistatične osobine koje su karakteristične za uređene magnetne sisteme. Nanočestice se tada nalaze u tzv. blokiranom režimu i tokom

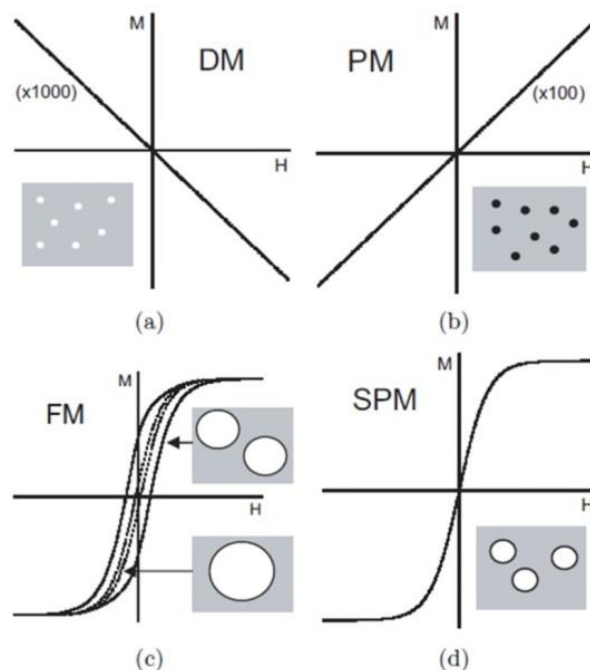
merjenja se ne registruje relaksacioni proces. Temperatura koja razdvaja ova dva stanja (superparamagnetno i blokirano) označava se kao temperatura blokiranja  $T_B$  i definiše se kao temperatura na kojoj je superparamagnetno relaksaciono vreme  $\tau$  jednako vremenskoj skali (vremenu posmatranja/merjenja) eksperimentalne tehnike  $\tau_m$ . Treba napomenuti da proces blokiranja ne predstavlja fazni prelaz već označava kontinuiranu promenu vremena relaksacije magnetizacije  $\tau$  sa temperaturom. Temperatura blokiranja nije jednoznačno određena već se definiše u zavisnosti od primenjene eksperimentalne tehnike. Imajući u vidu da je vreme merjenja magnetizacije na SQUID magnetometru  $\tau_m \approx 100$  s, temperatura blokiranja može se izračunati na osnovu izraza [97]:

$$T_B = \frac{KV}{k_B \ln\left(\frac{\tau_m}{\tau_0}\right)} \quad (2.5)$$

odnosno

$$T_B \approx \frac{KV}{25k_B} \quad (2.6)$$

Ponašanje dijamagnetika, paramagnetika, feromagnetika i superparamagnetika u spoljašnjem magnetnom polju prikazano je na slici 2.5 [98].



**Slika 2.5:** Šematski prikaz ponašanja dijamagnetika, paramagnetika, feromagnetika i superparamagnetika u spoljašnjem magnetnom polju [98]

Kod dijamagnetnih materijala pri povećanju polja, magnetizacija se smanjuje (slika 2.5a). S druge strane, magnetizacija paramagnetnih materijala je veća sa povećanjem spoljašnjeg polja (slika 2.5b). Feromagnetne materijale karakteriše histerezisna petlja (slika 2.5c). Za jednodomenske čestice, petlja je uža (isprekidana linija), dok je za višedomenske čestice ona šira (puna linija). Zavisnost magnetizacije od spoljašnjeg magnetnog polja kod superparamagnetika prikazana je na slici 2.5d. Oblik krive je sigmoidalni. U ovom slučaju koercitivno polje i remanentna magnetizacija imaju nultu vrednost.

## 2.5. Metode karakterizacije MNČ-a

### 2.5.1. Rendgenska difrakcija na prahu (XRPD)

Rendgenska difrakcija na polikristalnom materijalu (prahu) je nedestruktivna metoda koja ima široku primenu za karakterizaciju kristalnih materijala, jer se pomoću nje određuje struktura ispitivanih materijala i vrši identifikacija kristalnih faza koje su prisutne u uzorcima. Takođe, primenom rendgenostrukturalne analize precizno se može izračunati veličina kristalita sintetisanih čestica. Princip se zasniva na interakciji X-zraka sa česticama uzorka, njihovom detekcijom, a daljom obradom se dobijaju difraktogrami predstavljeni kao funkcija intenziteta od ugla rasejanja zraka ( $2\theta$ ) nakon interakcije sa uzorkom [99].

U osnovi, difrakciona slika kristala određena je dvema osnovnim karakteristikama: položajem difrakcionih maksimuma i njihovim intenzitetom. Položaj maksimuma zavisi od *Bragg*-ovog uslova<sup>3</sup>, dok njihov intenzitet zavisi od većeg broja različitih faktora vezanih za atomski sadržaj kristalografskih ravni i karakteristike samog uzorka. Na difraktogramu faze niskog stepena kristaliniteta (nanočestični materijali) lako se prepoznaju po karakterističnim širokim difrakcionim maksimumima. Što je stepen kristaliniteta niži, maksimumi na dijagramu praha će biti širi. Zbog toga se širine

---

<sup>3</sup> *Bragg*-ov uslov za refleksiju je dat jednačinom:  $2d \sin \theta = n\lambda$ , gde je  $n$  - ceo broj,  $\lambda$  - talasna dužina upadnog X-zračenja,  $d$  - rastojanje između dve susedne ravni u kristalu,  $\theta$  - ugao pod kojim upadni snop pada na kristal.

maksimuma mogu koristiti za određivanje stepena kristaliniteta, tj. dimenzija kristalnih regiona u kojima struktura nije bitno narušena. Širina difrakcione linije se meri na polovini visine maksimuma i naziva se širina na poluvisini. Veličina kristalita se može odrediti iz širine maksimuma na difraktogramu pomoću *Scherrer-ove* formule (2.7) [100]:

$$d_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (2.7)$$

gde je

$d_{hkl}$ -prosečna dimenzija kristalita u pravcu normalnom na niz ravni sa kojih difraktuju rendgenski zraci (nm),

$K$ -faktor oblika (približno 1),

$\lambda$ -talasna dužina upotrebljenog rendgenskog zračenja (nm),

$\beta$ -širina difrakcione linije nastala samo usled strukturnih faktora (širina na polovini maksimuma)

$\theta$ -*Bragg-ov* ugao.

Iz difraktograma praha najčešće se vrši identifikacija kristalne faze poređenjem difraktograma ispitivanog materijala sa difraktogramima poznatih monofaznih uzoraka.

## 2.5.2. Elektronska mikroskopija

### a.) Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Skenirajuća elektronska mikroskopija jedna je od najviše korišćenih metoda u karakterizaciji površine materijala. SEM uređaji vrše uvećanja od 10 do preko 500.000 puta, a osim morfologije ispitivanog materijala (topografija) u mogućnosti su da pruže preciznu informaciju o hemijskom sastavu materijala na njegovj površini [101].

Skaniirajuća elektronska mikroskopija koristi fokusirani elektronski snop visokoenergetskih elektrona, tj. njihovu difrakciju sa površine uzorka, za dobijanje uveličane slike posmatranog uzorka. Signal koji se dobija kao posledica interakcije elektronskog snopa sa uzorkom pruža informacije o morfologiji čestica i izgledu

njegove površine. Kombinacija SEM uređaja sa energetske-disperzivnim spektrometrom koji meri broj i energiju X-zraka koji su emitovani iz uzorka, predstavlja osnov za metodu energetske disperzije X-zraka (EDX ili EDS) koja je u velikom broju slučajeva, sastavni deo skenirajućeg elektronskog mikroskopa. Ova metoda se koristi za ispitivanje hemijskog sastava na izabranoj površini uzorka [101].

Osnovni uslovi koji moraju biti ispunjeni da bi se dati uzorak mogao snimati skenirajućom elektronskom mikroskopijom su da je uzorak neisparljiv kako bi bilo moguće postići i održati visoki vakuum unutar mikroskopa i da je uzorak elektroprovodljiv. Da bi se uzorci koji imaju malu elektroprovodljivost mogli snimati neophodno ih je najpre napariti nekim od provodnih materijala kao što su zlato, ugljenik ili neki drugi provodni metal ili legura. FE SEM (skenirajuća elektronska mikroskopija na principu emisije elektrona pod uticajem polja) mikroskopi koji rade u oblasti grubih vakuuma ne zahtevaju posebno naparavanje i pripremu uzoraka [101].

### ***b.) Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM)***

Transmisiona elektronska mikroskopija ima izuzetno veliki opseg uvećanja od 50 do  $10^6$  puta i mogućnost dobijanja slike unutrašnjosti tankih uzoraka materijala u veoma visokoj rezoluciji, zajedno sa elektronskim difrakcionim podacima.

Kod TEM mikroskopa slika uzorka dobija se difrakcijom elektrona koji prolaze kroz uzorak. Zahvaljujući maloj talasnoj dužini elektrona omogućena je hiljadu puta veća rezolucija od rezolucije optičkog mikroskopa, pa je pomoću TEM-a moguće posmatrati objekte veličine nekoliko nm. Transmisionom elektronskom mikroskopijom moguće je dobiti dve vrste informacija o uzorku: a) uveličanu sliku uzorka, i b) difrakcionu sliku. Prilikom posmatranja uzorka TEM-om potrebno je omogućiti dovoljnu transparentnost uzorka za snop elektrona, pa je sama priprema uzorka veoma važna [101].

### **2.5.3. Termogravimetrijska analiza (TGA)**

Termogravimetrijska analiza je metoda termijske analize u kojoj se posmatra veličina i brzina promene mase uzorka u funkciji temperature ili vremena u kontrolisanoj atmosferi. Posebne tehnike TGA su izotemska ili statička



termogravimetrija, kada se masa uzorka posmatra pri konstantnoj temperaturi u toku vremena i kvazistatična termogravimetrija, kada se masa uzorka posmatra na nekoliko rastućih konstantnih temperatura u toku vremena dok se ne postigne konstantna masa ostatka. Zbog toga primena termogravimetrije ima smisla kod materijala koji pri zagrevanju menjaju masu, bilo da oslobađaju volatilne produkte, bilo da reaguju sa gasovima iz atmosfere. Takođe, ona predstavlja važnu analitičku metodu koja omogućava praćenje najrazličitijih vidova transformacije uzorka vezane za promenu mase, kao što su gubitak adsorbovane ili srtukturne (kristalne) vode, termička razlaganja uz oslobađanje gasovitih ili tečnih isparljivih produkata, sagorevanje u atmosferi vazduha ili vezivanje gasova iz atmosfere u neisparljive produkte. Fundamentalni rezultati termogravimetrijske analize su: temperatura početka i završetka reakcije i promena mase uzorka koja se obično izražava u procentima od polazne mase uzorka [102].

#### **2.5.4. Furijeova transformaciona infracrvena spektroskopija (FTIC)**

Furijeova transformaciona infracrvena spektroskopija je spektroskopska metoda kojom se istovremeno mere sve frekvencije infracrvenog zračenja koja interaguju sa ispitivanim uzorkom u kome se jedan deo infracrvenog zračenja odgovarajuće frekvencije apsorbuje, a drugi reflektuje ili propušta. Pošto svaki molekul odlikuje karakteristično vibraciono kretanje čije su energije kvantirane i čiji prelazi odgovaraju fotonima infracrvenog zračenja, to će se u kontaktu uzorka sa infracrvenim zračenjem širokog spektra frekvencija apsorbovati zračenje frekvencija koje odgovaraju energetskim prelazima između odgovarajućih vibracionih nivoa.

Infracrvena spektroskopija predstavlja nedestruktivnu metodu koja se može koristiti u cilju kvalitativne i kvantitativne analize uzorka, određivanja kristalne strukture molekula, tj. uređenja atoma u kristalnoj rešetki molekula, ispitivanja globalne geometrije i detalja o načinu vezivanja atoma u molekulu. Na osnovu IC spektara mogu se dobiti podaci o mehanizmima odigravanja procesa, faznim transformacijama, o dinamici protona i protonskih vrsta u različitim materijalima, mogu se odrediti termodinamičke veličine i dr.

Osnovni uslov koji mora biti ispunjen da bi data vibracija bila aktivna u IC delu spektra jeste da proizvodi promenu dipolnog momenta. To praktično znači da bi molekul mogao da emituje ili apsorbuje infracrveno zračenje on mora posedovati različita naelektrisanja na krajevima veze oko koje osciluje [101].

### 2.5.5. Dinamičko rasejanje svetlosti (DLS)

Dinamičko rasejanje svetlosti je metoda kojom se meri intenzitet brzine *Brown*-ovog kretanja čestica suspendovanih u tečnosti. Potom se indirektno na bazi brzine određuju dimenzije dispergovanih čestica. To se postiže laserskim osvetljavanjem dispergovanih čestica i analiziranjem intenziteta fluktuacija rasute svetlosti. Manje čestice se kreću brže u odnosu na veće, pa će usled toga intenzitet fluktuacija rasute svetlosti nad manjim česticama biti veći od inteziteta fluktuacija nad većim česticama [103]. Zavisnost između dimenzije čestica i njihove brzine usled *Brown*-ovog kretanja definisano je *Stokes-Einstein*-ovom jednačinom (2.8):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (2.8)$$

gde je:

$D$  - koeficijent difuzije,

$k$  - *Boltzman*-ova konstanta,

$T$  - temperatura,

$\eta$  - viskoznost medijuma,

$R_H$  - hidrodinamički radijus sfernih čestica

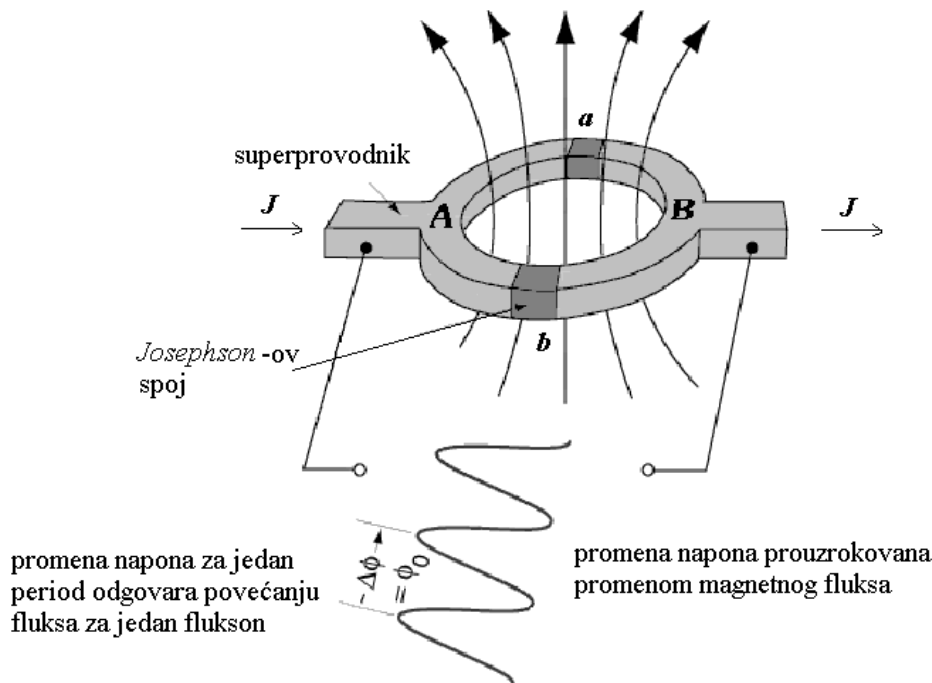
### 2.5.6. SQUID magnetometrija

Glavni cilj magnetometrije je merenje magnetizacije materijala, sopstvene ili indukovane. Magnetizacija se može meriti na više načina pomoću različitih magnetnih fenomena. Superprovodni kvantni interferometar SQUID (*Superconducting QUantum Interference Device*) predstavlja veoma osetljiv magnetometar koji detektuje promene u primenjenom magnetnom fluksu. Promene fluksa mogu se koristiti za određivanje

fizičkih veličina koje su povezane sa fluksom kao što su magnetno polje, napon, magnetna susceptibilnost itd., tako da je SQUID našao svoju primenu kao uređaj za vrlo precizno merenje magnetnih veličina [104]. SQUID uređaji se danas komercijalno koriste u mernoj tehnici visoke rezolucije, jer mogu meriti sve veličine koje su mogu svesti na merenje magnetnog fluksa čiji je kvant (tzv. flukson)  $\Phi_0 = h/2e \approx 10^{-15}$  Wb, tako da se ovim uređajem mogu meriti i magnetne indukcije reda veličine  $B \approx 10^{-14}$  T, kao i naponi od oko  $10^{-14}$  V, što je milion puta veća preciznost od klasičnih uređaja ranije korišćenih u tim oblastima merne tehnike.

Osnova funkcionisanja SQUID-a leži u činjenici da kvantno-mehaničko stanje (talasni paket) kojim se opisuje sistem nosilaca superstruje tj. Kuperovih parova ima veliku dužinu fazne koherencije, što ga čini fazno uređenim sistemom (slično laserskom zraku u optici). To dopušta mogućnost da se odredi fazna razlika između dve tačke koje se nalaze na jednoj zatvorenoj kružnoj konturi kojom teče superstruja gustine  $j$ . Pomenuta fazna razlika u prisustvu spoljašnjeg magnetnog polja zavisiće od gustine struje  $j$  i magnetne indukcije  $B$ , tako da se merenjem ukupne fazne razlike može meriti i magnetni fluks. Merenje fazne razlike izvodi se u praksi merenjem superstruje kroz tanke izolatorske membrane ( $10^{-9}$  m), tzv. Džozefsonove spojeve. Pomeraj u fazi koji izaziva prisustvo membrane direktno je vezan sa jačinom superstruje koja prolazi kroz nju  $J_C = J_C \sin \delta$  gde je  $J_C$  tzv. kritična struja koja karakteriše samu barijeru. Ukoliko bi se istovremeno iskoristio još jedan identičan spoj na istoj strujnoj konturi (a koji bi bio van magnetnog polja), mogao bi se izdvojiti deo fazne razlike koji potiče od samog magnetnog fluksa. To je osnovni princip rada SQUID-a, tj. superprovodnog prstena sa dva Džozefsonova spoja, kao što je prikazano na slici 2.6.

U praksi, kao izlaznu veličinu SQUID-a dobijamo sinusoidni naponski signal (slika 2.6). Pomoću broja oscilacija ( $N$ ) napona na izlazu SQUID-a moguće je odrediti ukupnu promenu magnetnog fluksa usled prisustva uzorka. Promena napona za jedan period odgovara promeni fluksa za jedan flukson  $\Phi_0$ . Ukupna promena fluksa onda je data kao  $\Phi = N\Phi_0$ . Precizno merenje promene fluksa izazvane prisustvom uzorka čini ovu metodu danas najosetljivijom za merenje jačine polja, magnetizacije i susceptibilnosti. Njeni nedostaci su potreba da se senzor održava na niskoj i konstantnoj temperaturi, i kao kod svih visokoosetljivih metoda, značajan problem je zaštita od spoljašnjih smetnji.

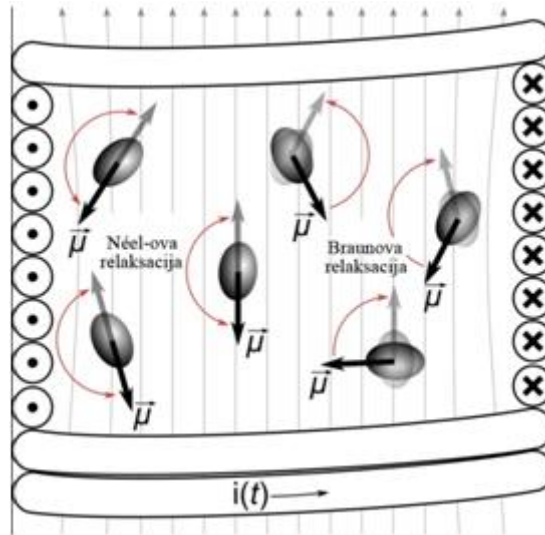


*Slika 2.6: Princip rada SQUID-a [88]*

### 2.5.7. Magnetna hipertermija

Primena MNČ-a u medicini odnosi se najčešće na ferrofluide, tj. superparamagnetne nanočestice suspendovane u vodi. Izučavanje relaksacione dinamike nanočestičnih magnetnih momenata u magnetnim ferrofluidima od ključne je važnosti u primeni nanočestica u magnetnoj hipertermiji [105,106]. Magnetna relaksacija (ili relaksacija magnetizacije) podrazumeva postizanje stanja termodinamičke ravnoteže magnetnog sistema nakon promene spoljašnjih uslova (primenjenog magnetnog polja ili temperature). Relaksacioni procesi okarakterisani su vremenom relaksacije  $\tau$ , koje se odnosi na vreme neophodno da magnetizacija sistema postigne svoju ravnotežnu vrednost [107]. U nanočestičnim sistemima, proces relaksacije podrazumeva obrtanje/rotaciju magnetnih momenata čestica [91]. Kada se na ferrofluid primeni spoljašnje magnetno polje, dolazi do relaksacije magnetnih momenata do položaja duž primenjenog polja tokom čega se oslobađa termalna energija u okolinu. Promenom smera polja dolazi do ponovne relaksacije i oslobađanja toplote [108]. Relaksacija se može odigravati fizičkom rotacijom samih čestica (*Brown-ova relaksacija*) ili rotacijom

spregnutih atomskih magnetnih momenata unutar svake čestice (*Neel-ova* relaksacija) (slika 2.7) [109].



*Slika 2.7: Mehanizmi konverzije magnetne energije u toplotu [109]*

Svaki od ovih procesa je okarakterisan vremenom relaksacije:

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{KV_M}{kT}} \quad (2.9)$$

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{kT} \quad (2.10)$$

$$\tau = \frac{\tau_B \tau_N}{\tau_B + \tau_N} \quad (2.11)$$

gde je

$\tau_N$  – *Neel-ovo* vreme relaksacije,

$\tau_B$  – *Brown-ovo* vreme relaksacije,

$\tau$  – efektivno vreme relaksacije kada se oba procesa dešavaju u isto vreme,

$\tau_0 = 10^{-9}$ s,

$K$  – konstanta anizotropije,

$V_M$  – zapremina čestice,

$k$  – *Boltzmann-ova* konstanta,

$T$  – temperatura,

$\eta$  – koeficijent viskoznosti,

$V_H$  – hidrodinamička zapremina čestice (zapremina čestice sa oblogom).

*Brown*-ovo vreme relaksacije zavisi od hidrodinamičkih osobina fluida dok, *Neel*-ovo vreme relaksacije zavisi od energije anizotropije. Oba vremena relaksacije zavise od veličine čestice. Oba mehanizma generisanja toplote mogu da se pojave istovremeno, a koji će mehanizam biti dominantan zavisi od toga kojem mehanizmu je vreme relaksacije kraće [110].

Kod multidomenskih fero i ferimagnetnih čestica, toplota se oslobađa pretežno zbog histerezisnih gubitaka, nastalih usled pomeranja zidova magnetnih domena. Histerezisni gubici dominiraju kod velikih čestica (>100 nm), ali su čestice ovih dimenzija prevelike za mnoge kliničke upotrebe (ne formiraju stabilni koloid i ne prodiru lako unutar tumora). *Neel*-ova i *Brown*-ova relaksacija su relevantni mehanizmi zagrevanja superparamagnetnih nanočestica oksida gvožđa koja se najviše istražuju za kliničke primene [111]. Aproksimativno, *Brown*-ova relaksacija je značajna za čestice veće od 20 nm, a *Neel*-ova relaksacija je najznačajnija u česticama manjim od 20 nm [110].

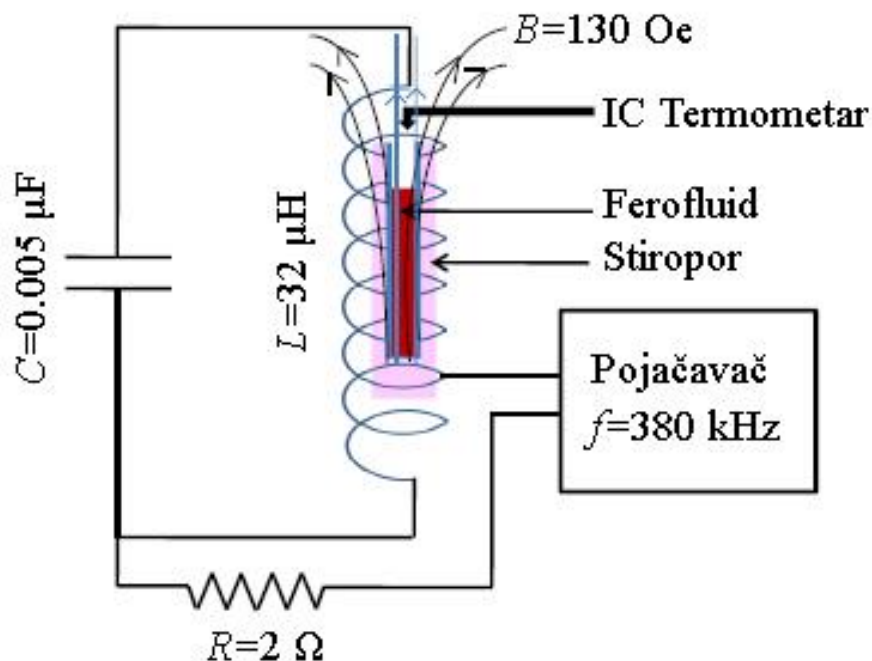
Za datu pobudnu frekvenciju, postoji “idealna” veličina čestica ferofluida, koja omogućava maksimalnu SPA vrednost. Da bi se minimizovala masa ferofluida koja je neophodna za terapijski tretman određene zapremine ciljnog tkiva (tumora), potrebno je ostvariti usku raspodelu veličine čestica oko idealne. Osim minimizovanja ubrizgane količine MNČ, to kod kliničkih primena omogućava i finu kontrolu predaje toplote obolelom području, uz minimalno oštećenje okolnog zdravog tkiva. Velika SPA vrednost podrazumeva i kraće vreme izlaganja celog organizma spoljašnjem pobudnom polju [112].

SPA merenja niza  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ-a, sa prosečnim veličinama u rasponu od 3 do 26 nm, pokazala su značajnu zavisnost SPA od veličine čestica, što sugerise da je neophodno koristiti takve metode sinteze MNČ-a koje omogućavaju podešavanje veličine čestica za date eksperimentalne uslove [113]. Pokazano je da je optimalan prečnik  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  čestica koji omogućava maksimalanu SPA vrednost oko kritične dimenzije za prelaz iz jedno- u višedomenski režim, ali nije uočena jaka korelacija između magnetne

saturacije  $M_S$  i SPA vrednosti za superparamagnetne MNC [110]. Za superparamagnetne čestice srednje veličine, SPA se povećava sa frekvencijom, a od amplitude polja zavise po kvadratnom zakonu. Histerezisni gubici u feromagnetnim česticama, od frekvencije zavise linearno [114].

Zbog velikog broja parametara koji utiču na SPA (veličina, raspodela veličine, oblik, hemijski sastav i kristalna struktura čestice, amplituda i frekvencija pobudnog magnetnog polja, mehanizam apsorpcije snage, itd...) teško je teorijski odrediti izraz za SPA koji bi važio u širokom opsegu svih pomenutih parametara, pa su eksperimentalna merenja od suštinske važnosti.

Na slici 2.8 je prikazana šema aparature za hipertermiju. Oko uzorka se nalazi sloj izolacije, a termometar je ubačen direktno u uzorak pomoću kojeg je moguće pratiti promenu temperature sa vremenom. Visoke struje potrebne za generisanje jakog magnetnog polja dovode do znatnog zagrevanja kola. Posledica ovoga je zagrevanje i samog uzorka, što utiče na merenje. U tom slučaju nije moguće razdvojiti generisanu toplotu fluida koja potiče od uređaja i toplotu od zagrevanja usled magnetne hipertermije. Rashladni sistemi uređaja su bazirani na protoku vode [115].



**Slika 2.8:** Šematski prikaz principa rada uređaja za magnetnu hipertermiju [115]

## 2.6. Radionuklidi za primenu u terapiji tumora

Osnovni princip na kome se zasniva primena radionuklida u terapiji je selektivna depozicija određenih doza zračenja u tkivima ili organima koji se tretiraju [116].

Da bi se minimizirali štetni efekti tretmana na zdravo tkivo, neophodan je pravi izbor radionuklida kojim se obeležavaju MNČ. Faktori koji su važni pri izboru odgovarajućeg radionuklida za obeležavanje MNČ-a su: fizičko-hemijske osobine radionuklida od kojih zavisi način vezivanja za MNČ, vrsta i energija čestica i fotona koje radionuklid emituje, vreme poluraspada radionuklida i metoda obeležavanja. Za rutinsku primenu od važnosti su i dostupnost i cena radionuklida. Tehnika obeležavanja predstavlja važan parametar jer dobijene MNČ obeležene radionuklidom moraju biti *in vitro* i *in vivo* stabilne. Iz nedovoljno stabilnih kompleksa radionuklidi se oslobađaju i deponuju na neželjenim mestima u organizmu što može uticati na neefikasnu dijagnostiku i terapiju.

Za razliku od radionuklida za primenu u dijagnostici poželjno je da radionuklidi koji se koriste u terapiji nakon specifične lokalizacije u određenom tumoru, što većom radijacionom dozom prouzrokuju razaranje ciljanih tumorskih ćelija u što kraćem periodu.  $\alpha$ - i  $\beta$ -emiteri, zahvaljujući velikim energijama i malom dometu emitovanih čestica koje imaju visok linearni transfer energije (LET)<sup>4</sup> čime se postiže veći transfer energije ciljanim malignim ćelijama i minimalno ozračivanje zdravog okolnog tkiva, su idealni radionuklidi za terapiju. Prolazeći kroz tkiva,  $\beta$ -čestice interaguju sa atomima, uglavnom u molekulima vode, gube svoju energiju i stvaraju ekscitovane i jonizovane atome i slobodne radikale koji su odgovorni za jednostruki prekid DNK lanca u ćelijama [117]. “Čistih”  $\beta$ -emitera, kao što su <sup>32</sup>P, <sup>90</sup>Y i <sup>69</sup>Er, nema mnogo. Primena radionuklida u terapiji koji imaju propratno  $\gamma$ -zračenje dovodi do određenog oštećenja zdravog tkiva, ali  $\gamma$ -zračenje energija do 200 keV, pogodno za scintigrafska ispitivanja, omogućava vizuelno praćenje terapije [118].

Vreme poluraspada radionuklida značajno utiče na terapijski efekat MNČ-a obeleženih radionuklidom. Idealno vreme poluraspada trebalo bi da bude dovoljno dugo da omogući proizvodnju, distribuciju, obeležavanje odgovarajućeg jedinjenja i

---

<sup>4</sup> LET (*Linear Energy Transfer*) predstavlja srednji gubitak energije zračenja na jediničnoj dužini puta.



terapijski tretman, ali sa druge strane kratko radi smanjenja radiotoksičnosti, uključujući i radiotoksičnosti potomaka, za zdrava tkiva. Osim toga, da bi se dobio maksimalan efekat neohodno je postići balans između biolokalizacije i dejstva MNČ-a u ciljanom tkivu i klirensa radioaktivnosti iz zdravog tkiva. Ukoliko se obeležene MNČ sporo lokalizuju u tumoru, a vreme poluraspada radionuklida je kratko, radionuklidi će se raspasti do dolaska do ciljanog tkiva, tako da će najveći procenat radioaktivnog zračenja dejstvovati na organe koji nisu ciljani. Suprotno tome, dugo vreme poluraspada radionuklida utiče na povećanje primljene radijacione doze ne samo u ciljanom tkivu, već i u organima sa metaboličkom funkcijom. Takođe, proizvod raspada “idealnog” radioterapeutika treba da bude stabilan nuklid. Ako pak proizvod raspada takođe ima terapijski potencijal, kao što je to slučaj kod  $^{166}\text{Ho}$  koji nastaje raspadom  $^{166}\text{Dy}$ , ovakav par može da se koristi kao *in vivo* generator. Uslov je da potomak ostane na mestu primene.

Energija čestica koje emituju radionuklidi mora biti kompatibilna sa mikrodistribucijom MNČ-a u ciljanom, ali i u zdravom tkivu. Mala energija čestica u kombinaciji sa nehomogenom distribucijom MNČ-a može rezultovati u nepotpunom ozračivanju ciljanog tkiva. Ukoliko je dozet čestica isuviše velik u odnosu na veličinu ciljanog tkiva, mala doza će doći do ciljanog tkiva, ali je ozračivanje zdravog tkiva znatno. Ukoliko je obližnje tkivo radiosenzitivno (kao što je npr. koštana srž) ovakav efekat limitira primenu radionuklida velikog dometa [119]. Energija  $\beta$ -čestica je manja u odnosu na  $\alpha$ -čestice koje emituju radionuklidi od terapijskog interesa, dok im je dozet u tkivu znatno veći. LET  $\beta$ -čestica iznosi od 0,2 do 1,0 keV/ $\mu\text{m}$ , sa većim vrednostima za manje energije. Većina klinički primenjenih  $\beta$ -emitujućih radionuklida sposobna je da indukuje razaranje DNK u ćelijama u okviru radijusa od 2,4 mm (za  $^{131}\text{I}$ ) do 11 mm (za  $^{90}\text{Y}$ ). U tabeli 2.1 su date osnovne karakteristike radionuklida  $\beta$ -emitera povoljnih karakteristika za primenu u terapiji kao i nuklearne reakcije za njihovo dobijanje.

Efekat terapije kao i odabir odgovarajućeg radionuklida zavise osim od njegovih fizičko-hemijskih osobina takođe i od veličine, prirode i lokacije tretiranog tumora. Idealne karakteristike MNČ-a obeleženih radionuklidom poželjne za primenu u radionuklidnoj terapiji su: brzo nakupljanje u tumoru, relativno dugo efektivno vreme u tumoru, kratko efektivno vreme zadržavanja u celom organizmu i visoko nakupljanje u ciljanom u odnosu na zdravo tkivo [120]. Kod terapije, za razliku od dijagnostike kod

koje je  $^{99m}\text{Tc}$  praktično neprikosновен, ne postoji dominantan radionuklid koji bi bio primenjiv u svim indikacijama.

U disertaciji za obeležavanje MNČ-a korišćen je čist  $\beta$ -emiter  $^{90}\text{Y}$ . Kratko vreme poluraspada i emisija  $\beta$ -čestica velikog dometa, čine ga povoljnim za primenu u radionuklidnoj terapiji. Maksimalni domet od 11 mm u mekim tkivima je pogodan za terapiju solidnih tumora. Takođe, zbog nehomogene distribucije radioobeleženih MNČ-a u određenom tkivu ili organu, obeležavanje sa dugodometnim  $\beta$ -emiterima, kao što su  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{166}\text{Ho}$  i  $^{188}\text{Re}$ , je značajno za postizanje terapijskog efekta. Najveći nedostaci  $^{90}\text{Y}$  su nespecifično zadržavanje u kostima, kao i nedostatak prpratnog  $\gamma$ -zračenja čime je otežano praćenje njegove akumulacije u tumorskom tkivu [121].

**Tabela 2.1:** Radionuklidi  $\beta$ -emiteri za primenu u terapiji [122]

Radionuklid	Vreme poluraspada ( $T_{1/2}$ )	Dobijanje	Karakteristike $\beta^-$ - zračenja radionuklida			Karakteristike $\gamma$ - zračenja radionuklida	
			$E_{max}$ (keV)	Prinos (%)	Maks domet u tkivu (mm)	$E_{max}$ (keV)	Prinos (%)
$^{90}\text{Y}$	64,1 h	$^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ generator $^{89}\text{Y} (n,\gamma) ^{90}\text{Y}$	2280	100	11,0	-	-
$^{186}\text{Re}$	3,72 d	$^{185}\text{Re} (n,\gamma) ^{186}\text{Re}$	1070	92,5	3,6	137	9,4
$^{188}\text{Re}$	17,0 h	$^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generator	2120	100	11,0	155	15,1
$^{166}\text{Ho}$	28,8 h	$^{165}\text{Re} (n,\gamma) ^{166}\text{Re}$	1854		9,0	81	6,7
$^{131}\text{I}$	8,02 d	$^{130}\text{Te} (n,\gamma,\beta^-)$ $^{235}\text{U} (n,\text{fisija})$	606	89,3	2,4	364,5	81,7
$^{177}\text{Lu}$	6,73 d	$^{176}\text{Yb} (n,\gamma,\beta^-)$ $^{177}\text{Lu}$ $^{176}\text{Lu} (n,\gamma) ^{177}\text{Lu}$	497,8	100	1,7	208	11,0
$^{169}\text{Er}$	9,4 d	$^{165}\text{Ho} (p,n) ^{169}\text{Er}$	350		1,0	84	0,16
$^{153}\text{Sm}$	46,5 h	$^{152}\text{Sm} (n,\gamma)$ $^{153}\text{Sm}$	808,2	100	3,1	103,2	29,8

## 2.7. Obeležavanje MNČ-a radionuklidima

*In vivo* primena radioobeleženih MNČ-a je moguća samo ako postoje jednostavne, brze i efikasne metode obeležavanja praćene visokim prinosom obeleženih MNČ-a. Da bi se MNČ obeležile, a da pri tom budu pogodne za primenu u radionuklidnoj terapiji, neophodno je:

- izvršiti izbor radionuklida pogodnih fizičko-hemijskih karakteristika
- dizajnirati i sintetisati odgovarajući bifunkcionalni ligand koji će se uspešno kovalentno vezati za MNČ i kompleksirati metal (radionuklid) ili izvršiti površinsku modifikaciju MNČ-a sa funkcionalnim grupama koje će se koristiti za vezivanje radionuklida
- odrediti najpogodnije uslove obeležavanja MNČ-a radionuklidom
- i ispitati metode prečišćavanja od viška nevezanog radionuklida.

Postoji nekoliko načina obeležavanja MNČ-a odgovarajućim radionuklidom nakon njihove sinteze. Obeležavanjem MNČ-a radiometalima preko helatnog agensa se stvara jaka veza između radionuklida i MNČ-a pri čemu se dobijaju *in vitro* i *in vivo* stabilne radioaktivne MNČ [123]. Ukoliko je kompleks nestabilan i metaboliše se u organizmu, stepen i mesto redistribucije radioaktivnosti zavisiće od hemijske prirode samog radionuklida. Izbor metala koji se koristi za obeležavanje MNČ-a ograničen je na trovalentne katjone, metale, za koje je poznato da grade helatne komplekse zadovoljavajuće termodinamičke i kinetičke stabilnosti [124]. U grupu trovalentnih radionuklida pogodnih fizičko-hemijskih osobina za primenu u dijagnostici i terapiji spadaju  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{213}\text{Bi}$  i  $^{149}\text{Tb}$ . Ligandi za koje se očekuje da formiraju jake komplekse sa trovalentnim jonima metala su etilendiaminotetrasirćetna kiselina (EDTA) [125, 126], dietilentriaminotetrasirćetna kiselina (DTPA) [127, 128], 1,4,7,10-tetrazociklododekantetrasirćetna kiselina (DOTA) i njihovi modifikovani derivati. DTPA se vezuje za albuminske mikrosfere preko amidne veze koristeći jednu od svojih karboksilnih grupa i na taj način je omogućeno obeležavanje MS većim brojem radionuklida:  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{166}\text{Ho}$  kao i mnogim drugim lantanoidima. Radioobeležavanje preko helatne grupe na površini mikrosfera zahteva inkubaciju sa

odgovarajućim radionuklidom u toku 5-60 minuta na temperaturi od 20-100 °C. Obeležavanje DOTA i DTPA sa  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$  i drugim trovalentnim jonima odigrava se direktno na optimalnim pH vrednostima, dok obeležavanje pertehnetatom ili perrenatom zahteva prisustvo redukujućeg agensa u cilju redukcije tehnecijuma i renijuma do +V ili +IV oksidacionih stanja [129].

Drugi način vezivanja radionuklida za MNČ je preko različitih funkcionalnih grupa, kao što su  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$  i  $-\text{COOH}$ , koje se nalaze na njihovoj površini. Ovaj metod se primenjuje kod proteinskih MS, koje sadrže veći broj različitih funkcionalnih grupa. Obeležavanje  $^{90}\text{Y}^{3+}$  MS dobijenih iz polilaktične kiseline (PLA) se odvija preko karboksilnih grupa, dok je za obeležavanje polistiren MS sa  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  neophodna dodatna funkcionalizacija MS karboksilnim grupama primenom poliakrilne kiseline. MS se mogu obeležiti sa  $^{188}\text{Re}$  nakon njegove prethodne redukcije Sn(II) jonima. MS na bazi jonoizmenjivačke smole (*ion-exchange resins*) se obeležavaju radionuklidima u jonskom obliku direktnom inkubacijom u fiziološkom rastvoru ili vodi sa prinosom obeležavanja i do 95 % [129].

Posebno treba voditi računa pri obeležavanju sa  $^{90}\text{Y}$  koji se u jonskom obliku ( $^{90}\text{Y}^{3+}$ ), nakon intravenske aplikacije nakuplja u koštanoj srži gde ostaje do kraja raspada i ispoljava značajnu toksičnost. Zbog toga je od velikog značaja omogućiti stabilno vezivanje radionuklida za česticu koja se obeležava i time spečiti oslobađanje  $^{90}\text{Y}$  *in vivo* [130].

Nakon obeležavanja, neophodno je izvršiti prečišćavanje obeleženih MNČ-a, odnosno odvojiti nevezani radionuklid od radioobeleženih MNČ-a. Radionuklid se, ukoliko već nije u slobodnoj formi, može osloboditi *in vivo*, i akumulirati u nekom od zdravih tkiva. Većina slobodnih metala će se vezati za transferin i u tom obliku transportovati do određenog organa. Za prečišćavanje viška nevezanog radionuklida, najčešće se koristi neka od sledećih metoda: jonoizmenivačka hromatografija, gel filtracija, dijaliza ili HPLC (visokoefikasna tečna hromatografija).

## 2.8. Fizičko-hemijska ispitivanja MNČ-a obeleženih radionuklidom

*Radionuklidna čistoća* se definiše kao udeo željenog radionuklida u ukupnoj radioaktivnosti uzorka [131]. Radionuklidna čistoća radionuklida koji se koriste za

obeležavanje određena je tehnologijom proizvodnje radionuklida. Minimalne promene u uslovima proizvodnje mogu značajno uticati na stepen radionuklidne čistoće krajnjeg proizvoda, tako da su za proizvodnju radionuklida neophodni provereni i standardizovani protokoli. Radionuklidna čistoća određuje se  $\gamma$  - spektrometrijskom analizom pogodnim detektorom: Ge(Li), HPGe ili NaI(Tl). Ova vrsta merenja neophodna su da bi pokazala da li je radionuklidna čistoća u okviru prihvatljivog nivoa za obeležavanje jedinjenja i kasniju primenu [132].

*Radiohemijska čistoća* se definiše kao odnos radioaktivnosti ispitivanog radionuklida prisutnog u uzorku u deklarisanom hemijskom obliku, i ukupne radioaktivnosti radionuklida u uzorku (izražena u procentima). Poželjno je da radiohemijska čistoća obeleženih MNČ-a bude veća od 90 %. Za ispitivanje radiohemijske čistoće neophodno je izabrati brze i jednostavne analitičke metode kao što su: hromatografija na hartiji, tankoslojna hromatografija, HPLC, elektroforeza na papiru i natrijum dodecil sulfat poliakrilamid gel (SDS-PAGE) elektroforeza. Njima se ispituje prinos obeležavanja MNČ-a obeleženih radionuklidom pre samog prečišćavanja [133]. Tankoslojna hromatografija je najjednostavnija i veoma brza analitička metoda za ispitivanje radiohemijske čistoće. Iako nema visoku rezoluciju i osetljivost kao HPLC, ona ipak omogućava da se celokupna radioaktivnost naneta na traku, a razdvojena u okviru različitih frakcija, detektuje. Ovom metodom je moguće veoma brzo i lako razdvajanje nevezanih radionuklida od obeleženih MNČ-a.

*In vitro* stabilnost MNČ-a obeleženih radionuklidom u fiziološkom rastvoru ili humanom serumu, moguće je pratiti ispitivanjem radiohemijske čistoće obeleženog jedinjenja u toku vremena. Visoka radiohemijska čistoća obeleženog jedinjenja u toku dužeg vremenskog perioda ukazuje na *in vitro* stabilno jedinjenje, nepromenjenih fizičko-hemijskih osobina i biološkog ponašanja. Ovakva stabilna jedinjenja su primenljiva za dalja *in vivo* ispitivanja i kasniju kliničku upotrebu.

## **2.9. Biološka ispitivanja MNČ-a obeleženih radionuklidom**

MNČ u zdravom tkivu imaju različito biološko ponašanje u odnosu na tumorsko tkivo što je iskorišćeno u terapiji tumora sa MNČ. Ukoliko su fizičko-hemijska ispitivanja MNČ-a obeleženih radionuklidom pokazala visok stepen radionuklidne i

radiohemijske čistoće, slede biološka ispitivanja. Zadovoljavajuća radiohemijska čistoća MNČ-a obeleženih radionuklidom važan je preduslov za njihovu maksimalnu akumulaciju u ciljnom organu i minimalno nakupljanje u organima karakterističnim za akumulaciju radiohemijskih nečistoća. U okviru bioloških ispitivanja MNČ-a obeleženih radionuklidom, određuje se *in vivo* stabilnost i biološko ponašanje MNČ-a obeleženih radionuklidom u toku maksimalnog vremenskog intervala na eksperimentalnim životinjama, najčešće na miševima i pacovima i to zdravim i tumor indukovanim. Biodistribucija MNČ-a obeleženih radionuklidom definiše se i izražava kao procenat injektirane doze po gramu tkiva ili procenat injektirane doze po organu. One mogu biti isporučene u tumorsko tkivo pasivnim dopremanjem koje se zasniva na tzv. efektu povećane propustljivosti i zadržavanja (EPR efekat) samo u izmenjenom tumorskom tkivu. Zavisno od tipa tumora, brzine njegovog rasta i mikrookoline, tokom svog rasta procesom angiogeneze na krvnim sudovima tumora se stvaraju otvori veličine čak i do 400-800 nm čime se postiže povećana propustljivost i ulazak čestica u tumorsko tkivo [27]. Ovaj efekat se može primeniti i za čestice na bazi gvožđa koje mogu dostići vrlo visoku magnetizaciju, tako da se nakon ulaska u tkivo tumora može postići njihova efikasna imobilizacija pomoću spoljašnjeg magnetnog polja.

### 3. PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA

Raspon primena MNČ-a u biomedicini zavisi od njihove stabilnosti u rastvorima pri fiziološkim pH vrednostima, i stepena do kog se njihove površine mogu funkcionalizovati. Hemijski sastav, veličina, oblik, hidrofobnost/hidrofilnost i površinsko naelektrisanje MNČ-a su pri tome od velikog značaja [134].

MNČ se pod uticajem spoljašnjeg magnetnog polja ponašaju kao "izvori (thermoseeds)" za indukovanje hipertermije [135], dok su radionuklidi radioterapijski agensi. Iako je poznato da bi istovremena primena hipertermije i radionuklidne terapije dovela do sinergijskog delovanja, kombinovana metoda je i dalje slabo ispitana zbog nepostojanja pogodnog terapijskog agensa.

**Predmet ispitivanja** ove doktorske disertacije je sinteza, funkcionalizacija i fizičko-hemijska karakterizacija MNČ-a na bazi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , kao i optimizacija uslova obeležavanja sintetisanih MNČ-a beta emiterom visoke energije i velikog dometa u tkivu,  $^{90}\text{Y}$ , za mogućnu primenu u kombinovanoj hipertermijsko-radionuklidnoj terapiji.

**Cilj istraživanja ovog rada može se predstaviti sledećim tezama:**

- ❖ Sintetisanje biokompatibilnih MNČ odgovarajućih fizičko-hemijskih i magnetnih osobina; koje su istovremeno pogodne i za radioobeležavanje;
- ❖ Ispitivanje uticaja različitih jedinjenja za oblaganje na fizičko-hemijske i magnetne osobine MNČ-a; kao i njihov uticaj na obeležavanje radionuklidom  $^{90}\text{Y}$  i *in vivo* biodistribuciju;
- ❖ Određivanje specifične apsorpcije MNČ-a i ispitivanje mogućnosti upotrebe MNČ-a u magnetnoj hipertermiji;
- ❖ Određivanje uslova radioobeležavanja pri kojima se radionuklid  $^{90}\text{Y}$  ireverzibilno vezuje za MNČ;
- ❖ Biološko ispitivanje različitih *in vivo* stabilnih MNČ-a obeleženih  $^{90}\text{Y}$  na zdravim Wistar pacovima.

## 4. EKSPERIMENTALNI DEO

### 4.1. Sinteza MNČ-a

Reagensi korišćeni za sintezu MNČ-a su komercijalni proizvodi najveće čistoće, osim DPD-a koji je sintetisan u Laboratoriji za radioizotope po proceduri Razumenić i saradnici (1986) [136].

Reagensi:

- Gvožđe (II) sulfat heptahidrat,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich
- Gvožđe (III) sulfat monohidrat,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \times \text{H}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich
- Anhidrovani gvožđe (III) hlorid,  $\text{FeCl}_3$ , Fluka
- Gvožđe (II) hlorid tetrahidrat,  $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich
- Amonijum hidroksid 25 %, Zorka Pharma Hemija, Srbija
- Natrijum hidroksid,  $\text{NaOH}$ , Sigma-Aldrich
- Kalijum nitrat,  $\text{KNO}_3$ , Sigma-Aldrich
- Sulfatna kiselina,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Sigma-Aldrich
- Limunska kiselina, Zorka Pharma Hemija, Srbija
- Polietilen glikol *bis*(karboksimetil) etar, Mn = 600 (PEG600), Sigma-Aldrich
- Destilovana voda
- Tetraetil metilendifosfonat,  $\text{CH}_2[\text{P}(\text{O})(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2]_2$ , Epsilon Chimie, Francuska
- Dietil maleat,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OCOCH}=\text{CHCOOC}_2\text{H}_5$ , Merck, Nemačka
- Etanol,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , Merck
- Dietil-etar,  $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ , Baker, Holandija
- Koncentrovana hlorovodonična kiselina,  $\text{HCl}$ , Merck
- Glacijalna sirćetna kiselina,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , Merck
- Aktivni ugalj, Merck-Alkaloid, Skoplje, Makedonija
- Laneno ulje, Beohemik, Srbija
- Humani serum albumin 20 % - "Zavod za transfuziju krvi", Beograd, Srbija
- 0,9 %  $\text{NaCl}$
- Tris-HCl pufer, Sigma-Aldrich



- $^{90}\text{YCl}_3$  (29,64 GBq/cm<sup>3</sup> u 0,05 M HCl), Polatom, Poljska

Rastvori:

- 4,6 % rastvor humanog seruma albumina: odmereno je 1,84 mL 20% rastvora u 6,16 mL H<sub>2</sub>O

Potrošni materijal:

- Whatman 1 mm trake, Merck, Dormstadt, Nemačka
- ITLC/SG traka, Gelman instrument company, Ann Arbor, Michigan
- Creva za dijalizu prečnika 15 mm, širine 23 mm, Sigma-Aldrich

Aparati:

- Centifuga Beckman Avanti J-20
- NaI(Tl) gama brojač, Wallac Compu Gamma Counter LKB, Finska
- $\beta$ -doze kalibrator, Capintec CRC-15

#### 4.1.1. Sinteza Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a

##### a.) Sinteza Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a oksidacionom hidrolizom

Potrebni rastvori:

1.) 0,486 g NaOH	9,0 x 10 <sup>-2</sup> M
1,364 g KNO <sub>3</sub>	0,1 M
135 mL H <sub>2</sub> O	
<hr/>	
2.) 0,308 g FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	7,4 x 10 <sup>-2</sup> M
15 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,01 M

Ovaj metod se bazira na taloženju Fe<sup>2+</sup> soli (FeSO<sub>4</sub>) u baznoj sredini (NaOH) u prisustvu oksidacionog sredstva (KNO<sub>3</sub>) [9]. Pre sinteze kroz oba rastvora uvodi se N<sub>2</sub> konstantnom brzinom u toku 2 h. Zatim se rastvor FeSO<sub>4</sub> dodaje u kapima u bazni

rastvor 1 uz konstantno mešanje. Kada je taloženje završeno, N<sub>2</sub> se uvodi još 5 min a zatim se suspenzija u vidu crnog taloga zagreva do 90 °C i na toj temperaturi stari 24 h. Vreme starenja u toku 24 h je fiksno u cilju postizanja uslova najbližih ravnoteži. Nakon toga, rastvor se hladi do sobne temperature pomoću ledenog kupatila i talog se u vidu magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a) razdvaja taloženjem pomoću spoljašnjeg magneta i ispira nekoliko puta sa destilovanom vodom. Pomoću spoljašnjeg magneta talog se zadržava na dnu balona, a supernatant dekantuje i odbacuje. Deo taloga se suši na 50 °C, 24 h, dok se drugi deo zadržava u vidu vodene suspenzije MNČ-a. MNČ sintetisane ovom metodom su označene kao Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> oh.

#### ***b.) Sinteza Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a taloženjem iz rastvora***

Magnetit se priprema taloženjem iz rastvora, dodatkom baze u vodeni rastvor Fe<sup>2+</sup> i Fe<sup>3+</sup> soli u molskom odnosu 1:2, po proceduri koju je razvio Massarat [137]. Naprave se vodeni rastvori Fe<sup>2+</sup> i Fe<sup>3+</sup> soli (tabela 4.1), koji se zatim prenesu u stakleni balon i zagrevaju do 50 °C uz konstantno mešanje. Kada se postigne data temperatura u vodeni rastvor Fe<sup>2+</sup> i Fe<sup>3+</sup> soli se dodaje 25 % NH<sub>4</sub>OH do postizanja pH = 10–11, a zatim se data mešavina ostavi još 1 h na 50 °C uz konstantno mešanje. Kao rezultat dodatka baze nastaje crni talog Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a. Talog se ispira destilovanom vodom nekoliko puta metodom taloženja pomoću spoljašnjeg magneta, sve dok se ne postigne pH ~ 7. MNČ sintetisane taloženjem iz rastvora sa hloridima su obeležene kao Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> th, a sa sulfatima kao Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ts.

***Tabela 4.1: Sinteza Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a taloženjem iz rastvora***

Soli gvožđa	Rastvori soli gvožđa	Molaritet rastvora	Zapremina dodatog NH <sub>4</sub> OH
FeCl <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O	1,0 g / 15 mL H <sub>2</sub> O	0,3 M	20-25 mL
FeCl <sub>3</sub>	1,46 g / 15 mL H <sub>2</sub> O	0,6 M	
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	0,405 g / 15 mL H <sub>2</sub> O	0,1 M	25-30 mL
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> × H <sub>2</sub> O	1,2 g / 15 mL H <sub>2</sub> O	0,2 M	

#### 4.1.2. Sinteza Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA MNČ-a

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA MNČ su sintetisane u dva koraka. Prvo je sintetisan magnetit taloženjem iz rastvora Fe<sup>2+</sup> i Fe<sup>3+</sup> soli amonijum hidroksidom, nakon čega je usledila stabilizacija limunskom kiselinom (CA) [57]. Pripreme se vodeni rastvori 0,1 M FeCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O (0,4 g/20 mL H<sub>2</sub>O) i 0,2 M FeCl<sub>3</sub> (0,65 g/20 mL H<sub>2</sub>O), a zatim se prenesu u stakleni balon i zagrevaju do 80 °C uz konstantno mešanje. Kada se postigne data temperatura u rastvor Fe<sup>2+</sup> i Fe<sup>3+</sup> hlorida, dodaje se 25 % NH<sub>4</sub>OH (~18 mL) do postizanja pH = 10. Nakon dodatka baze data smeša se ostavi još 30 min na 80 °C uz konstantno mešanje. Crni talog u vidu magnetita se ispira destilovanom vodom nekoliko puta metodom taloženja pomoću spoljašnjeg magneta do postizanja pH ~ 7. Zatim se u talog magnetita, sintetisanom u prethodnom koraku, doda 2 mL 1 M limunske kiseline (0,5 g/ 2 mL H<sub>2</sub>O). Suspenzija magnetita i CA se zagreva do 90 °C i na toj temperaturi se konstantno meša 90 min. Zbog postizanja koloidne stabilnosti nakon dodatka CA, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA MNČ se ne izdvajaju u vidu taloga pa je njihovo ispiranje od viška soli urađeno postupkom dijalize. Suspenzija se unese u creva za dijalizu i stavi na dijalizu naspram destilovane vode preko noći na sobnoj temperaturi uz mešanje. Kao rezultat nastaje stabilna vodena suspenzija MNČ-a obloženih CA, nazvana citratni ferofluid.

#### 4.1.3. Sinteza Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG600 MNČ-a

MNČ obložene polimerom PEG600 se pripremaju taloženjem iz rastvora, dodatkom baze u vodeni rastvor Fe<sup>2+</sup> i Fe<sup>3+</sup> soli u molskom odnosu 1:2, u koju je dodata određena količina polimera [138]. Pripreme se vodeni rastvori 0,3 M FeCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O i 0,6 M FeCl<sub>3</sub>, a zatim se u njihovu smešu doda PEG600 tako da odnos magnetit:polimer bude 1:1 i 1:2 (tabela 4.2) i rastvor se zagreva do 50 °C uz konstantno mešanje. Kada se postigne data temperatura, dodaje se 25 % NH<sub>4</sub>OH (20 mL) do postizanja pH ~ 10–11. Nakon dodatka baze, vodena suspenzija se zagreva još 1 h na 50 °C uz konstantno mešanje. Talog u vidu Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG600 MNČ-a se ispira destilovanom vodom nekoliko puta (do postizanja pH ~ 7) centrifugiranjem na 20000 obr/min 30 min. Vodena suspenzija Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG600 MNČ-a se čuva na 4 °C.

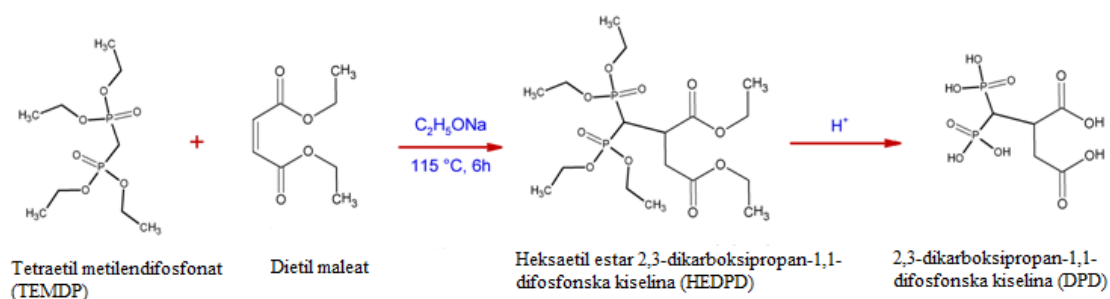
**Tabela 4.2:** Sinteza  $Fe_3O_4$ -PEG600 MNČ-a taloženjem iz rastvora

Soli gvožđa	Rastvori soli gvožđa	Molaritet rastvora	Rastvor polimera PEG600	Odnos magnetit/PEG600
$FeCl_2 \times 4H_2O$ $FeCl_3$	1,0 g / 15 mL $H_2O$ 1,46 g / 15 mL $H_2O$	0,3 M 0,6 M	25 mL 10 % PEG600 (2,5 g / 25 mL $H_2O$ )	1:2
$FeCl_2 \times 4H_2O$ $FeCl_3$	1,0 g / 15 mL $H_2O$ 1,46 g / 15 mL $H_2O$	0,3 M 0,6 M	25 mL 5 % PEG600 (1,25 g / 25 mL $H_2O$ )	1:1

#### 4.1.4. Sinteza $Fe_3O_4$ -DPD MNČ-a

##### a.) Sinteza 2,3-dikarboksipropan-1,1-difosfonata (DPD)

2,3-dikarboksipropan-1,1-difosfonat (DPD) je sintetisan po proceduri Razumenić i saradnici (1986) [136]. Sinteza se sastoji iz dve faze. Šema sinteze prikazana je na slici 4.1.



**Slika 4.1:** Šematski prikaz sinteze DPD

##### b.) Sinteza $Fe_3O_4$ -DPD MNČ-a

$Fe_3O_4$  MNČ su dobijene taloženjem iz rastvora  $Fe^{2+}$  i  $Fe^{3+}$  soli (u molskom odnosu 1:2), dodatkom baze, nakon čega su oblagane DPD-om. Pripreme se vodeni rastvori 0,1 M  $FeSO_4 \times 7H_2O$  (0,405 g/15 mL  $H_2O$ ) i 0,2 M  $Fe_2(SO_4)_3 \times H_2O$  (1,2 g/15 mL  $H_2O$ ) a zatim se prenesu u stakleni balon i zagrevaju do  $50\text{ }^\circ\text{C}$  uz konstantno mešanje. Zatim se u zagrejani vodeni rastvor  $Fe^{2+}$  i  $Fe^{3+}$  sulfata dodaje 25 %  $NH_4OH$  (~20 mL) do

postizanja pH = 10. Nakon dodatka baze data smeša se ostavi još 1 h na 50 °C uz konstantno mešanje. Crni talog u vidu magnetita se ispira destilovanom vodom nekoliko puta metodom taloženja pomoću spoljašnjeg magneta sve dok se ne postigne pH ~ 7. Zatim se u 1/3 taloga magnetita, doda rastvor DPD (0,25 g/ 2 mL H<sub>2</sub>O) kako bi odnos magnetit:DPD bio 1:1. Nakon dodatka DPD, pH smeše se podesi na pH = 9–10 pomoću 6 M NaOH. Suspenzija magnetita i DPD se konstantno meša na 25 °C u toku 24 h. Ispiranje Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DPD MNČ-a od viška soli je urađeno postupkom dijalize tako što se suspenzija unese u crevo za dijalizu i stavi na dijalizu naspram destilovane vode, preko noći na sobnoj temperaturi uz mešanje. Kao rezultat nastaje stabilna vodena suspenzija MNČ-a obloženih DPD.

#### **4.1.5. Sinteza Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA MNČ-a u HSA matriksu (MMSHA)**

MNČ stabilisane limunskom kiselinom, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA, u obliku ferrofluida korišćene su za sintezu magnetnih mikrosfera humanog albumina iz seruma- MMSHA. MMSHA su sintetisane modifikovanom emulzifikacionom metodom [139]. Kao uljana faza korišćeno je laneno ulje, a kao vodena faza korišćena je smeša humanog albumina (20 % HSA) i citratnog ferrofluida. Količine potrebnih komponenti kao i uslovi pri kojima se sinteza odvija prikazani su u tabeli 4.3. Opšta procedura podrazumeva lagano dodavanje u kapima smeše HSA-ferofluid u određenu zapreminu lanenog ulja na sobnoj temperaturi uz mešanje pri konstantnoj brzini. Za dodavanje HSA-ferofluid smeše korišćen je špric sa iglom 21G (0,8 x 40 mm). Njihova stabilizacija se postiže na visokoj temperaturi, na kojoj dolazi do brzog isparavanja postojeće vode i ireverzibilne denaturacije proteina-albumina. Kao rezultat toplotne stabilizacije nastaju čvrste mikrosfere humanog albumina sa inkapsuliranim MNČ-a. Sintetisane MMSHA se filtriraju na filter papiru Whatman No.5 i ispiraju sa etrom kako bi se odvojile od uljane faze. Nakon ispiranja pod vakuumom, suše se u eksikatoru preko noći i čuvaju se na 4 °C.

**Tabela 4.3:** Uslovi sinteze MMSHA modifikovanom emulzifikacionom metodom\*

MMSHA	Uljana faza	Vodena faza	optimizacija	Brzina mešanja	Stabilizacija
1	Laneno ulje 40 mL	1 mL 20% HSA 0,5 mL Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA	$T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $t = 30\text{ min}$	200 rpm	$T = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $t = 30\text{ min}$
2	Laneno ulje 80 mL	2 mL 20% HSA 0,5 mL Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA	$T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $t = 1\text{ h}$	200 rpm	$T = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $t = 2\text{ h}$
3	Laneno ulje 80 mL	2 mL 20% HSA <b>1 mL Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA</b>	$T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $t = 1\text{ h}$	200 rpm	$T = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $t = 2\text{ h}$
4	Laneno ulje 80 mL	2 mL 20% HSA 0,5 mL Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA	$T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $t = 1\text{ h}$	200 rpm	<b><math>T = 160\text{ }^{\circ}\text{C}</math></b> , $t = 2\text{ h}$
5	Laneno ulje 80 mL	2 mL 20% HSA 0,5 mL Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA	$T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $t = 1\text{ h}$	<b>800 rpm</b>	$T = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , $t = 2\text{ h}$

\* U tabeli su naznačeni parametri (koncentracija citratnog ferrofluida, temperatura i brzina mešanja) koji su menjani prilikom sinteze MMSHA

## 4.2. Uredaji i metode

### a.) Rendgenska difrakcija na prahu (XRPD)

Snimanje difraktograma izvršeno je na sobnoj temperaturi na difraktometru za prah Phillips PW 1710, sa Brag-Brentanovom fokusirajućom geometrijom, radi identifikacije faza. Kao izvor X-zraka korišćeno je zračenje bakarne antikatode  $K\alpha$ , talasnih dužina  $\lambda_1 = 0,15405\text{ nm}$  i  $\lambda_2 = 0,15443\text{ nm}$  uz upotrebu Ni filtera i scintilacionog detektora zračenja. Snimanje je izvršeno u intervalu  $10^{\circ} \leq 2\theta \leq 70^{\circ}$ , sa korakom  $0,06^{\circ}$  i ekspozicijom 15 s po koraku.

### b.) Elektronska mikroskopija

Veličina magnetnih nanočestica, distribucija po veličinama i morfologija određene su pomoću transmisiona elektronske mikroskopije (TEM) na FEI Tecnai T20 mikroskopu sa ubrzavajućim naponom od 200 kV i visoko-rezolucione transmisiona elektronske mikroskopije (HRTEM) korišćenjem FEI Tecnai F30 mikroskopa sa ubrzavajućim naponom od 300 kV. Uzorci u vidu kapljica vodenih suspenzija MNČ-a su nanošeni na bakarni nosač obložen ugljenikom i ostavljeni da rastvarač ispari na

sobnoj temperaturi. Za proučavanje veličine i morfologije MMSHA korišćen je visoko rezolucioni skenirajući elektronski mikroskop (FESEM), Jeol JSM-7600F sa Šotkijevim emiterom kao izvorom elektrona i ubrzavajućim naponom od 1,5 kV. Identifikacija hemijskog sastava MMSHA je izvršena pomoću sistema rendgenske energodisperzivne spektroskopije (EDX) koji je integrisan u sistem skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM). Unutrašnja struktura MMSHA analizirana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom spregnutom sa sistemom sa fokusiranim jonskim zrakom (SEM/FIB) na uređaju DualBeam SEM/FIB (Nova™ 200 NanoLab, FEI Company).

#### ***c.) Termogravimetrijska analiza (TGA)***

Termijsko ponašanje obloženih MNČ-a je ispitano primenom instrumenta TGA/DCD 1 (Mettler Toledo). Termijske krive su snimane u opsegu od sobne temperature do 900 °C, sa brzinom grejanja od 10 °C/min u uslovima konstantnog strujanja azota. TGA analiza MMSHA je urađena na SDT Q600 TGA/DCD zagrevanjem uzorka od 30 do 1000 °C, pri brzini zagrevanja od 20 °C/min u atmosferi vazduha sa protokom od 100 cm<sup>3</sup>/min.

#### ***d.) Furijeova transformaciona infracrvena spektroskopija (FTIC)***

FTIC spektroskopska analiza obloženih MNČ-a urađena je na sobnoj temperaturi na FTIC spektrometru Thermo Nicolet 380, u spektralnom opsegu od 4000 do 400 cm<sup>-1</sup> i rezolucijom od 4 cm<sup>-1</sup>. Spektri su snimani u modulu atenuirane totalne refleksije. Za datu analizu korišćeni su prahovi obloženih MNČ-a sušeni na 50 °C tokom 24 h.

#### ***e.) Dinamičko rasejanje svetlosti (DLS)***

Veličine čestica je određena metodom DLS na uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Velika Britanija). Ovaj instrument sadrži laser kao izvor svetlosti (talasne dužine oko 633 nm) koja interaguje sa česticama koje su u stalnom kretanju zahvaljujući *Brown*-ovom efektu. Svetlost se rasipa sa česticama u svim pravcima. Pod

uglom od  $173^\circ$  u odnosu na pravac upadne svetlosti nalazi se detektor koji detektuje fluktuacije inteziteta rasute svetlosti. Nakon toga se izračunava translacioni difuzioni koeficijent, nakon čega se primenom *Stokes-Einstein*-ove jednačine određuje hidrodinamički dijametar. Zetasizer Nano ZS meri  $\zeta$ -potencijal čestica primenom *Doppler*-ovog efekta gde svetlost lasera interaguje sa česticama koje se kreću po principu elektroforeze. Merni opseg instrumenta je od 6 nm do 6  $\mu\text{m}$ . Urađeno je po deset merenja za svaki uzorak, na sobnoj temperaturi. Uzorci su razblaženi bidestilovanom vodom (10  $\mu\text{L}$  uzorka je razblaženo sa 4990  $\mu\text{L}$  bidestilovane vode), a zatim su mereni u odgovarajućim kvarcnim kivetama sa kapilarama. Isti instrument se koristio i za određivanje zeta potencijala, koji karakteriše naelektrisanje na površini MNČ-a, tehnikom elektroforetske pokretljivosti.

#### ***f.) Magnetna merenja***

Magnetna merenja su urađena na Quantum Design SQUID magnetometru, MPMS-XL5. Ovaj magnetometar je složen sistem namenjen preciznim istraživanjima magnetizma u opsegu temperature od 2 K do 400 K i magnetnim poljima do 5 T. Superprovodnom tehnologijom omogućeno je stvaranje velikih i stabilnih polja i precizno merenje promena u polju. Područje merenja magnetnog dipolnog momenta je  $\pm 2$  emu ( $\pm 2 \cdot 10^{-3}$  A m<sup>2</sup>), dok je osetljivost ovog instrumenta  $10^{-8}$  emu. Na uzorcima su obavljena dva tipa merenja:

- uticaj jačine magnetnog polja na veličinu magnetizacije (histerezisne krive) pri konstantnoj temperaturi na 5 K i 300 K;
- uticaj temperature na promene magnetizacije pri konstantnoj jačini magnetnog polja od 100 Oe u temperaturnom intervalu od 2 K do 300 K.

Pri merenju uticaja temperature na promenu magnetizacije rađene su dve vrste merenja koja predstavljaju ZFC (*zero-field-cooling*) i FC (*field-cooling*) merenja. Pri ZFC merenju uzorak se najpre ohladi od sobne temperature do 2 K bez primene magnetnog polja, a zatim se u prisustvu magnetnog polja meri magnetizacija uzorka u temperaturnom intervalu 2 K – 300 K. Pri FC merenju, uzorak se hladi od sobne



temperature do 2 K u prisustvu magnetnog polja, nako čega se obavlja merenje magnetizacije od 2 K do 300 K u polju konstantne jačine.

**g.) Merenja specifične apsorpcije**

Ispitivanje mogućnosti zagrevanja nekog uzorka se sastoji u primeni promenljivog magnetnog polja na određenoj frekvenciji što je omogućeno uređajima DM100 serije (nB nanoScale Biomagnetic, Saragosa, Španija). Ovaj sistem poseduje modularnu organizaciju, a njegove komponente su:

**Kontroler** - jezgro sistema u kome je smešten kontrolni sistem, izvor napajanja i fizička podrška korisničkog interfejsa.

**MANIAC** (*MAgnetic Nanoparticle Inductive heating Application Code*) - softver instaliran na kontroleru koji omogućava korisniku da upravlja sistemom, da obavlja testove i da izvrši naknadnu analizu rezultata.

**Aplikator** – u njemu se nalaze sam uzorak, generator magnetnog polja i različiti senzori koji vrše merenja tokom testa. Funkcije aplikatora su da generiše polje na uzorku i da izvrši željena merenja.

U zavisnosti od željenog eksperimenta primenjuje se određeni aplikator DM100 serije:

DM1 – namenjen kalorimetrijskim ispitivanjima magnetnih nanočestica u obliku fluida;

DM2 – namenjen je pre svega ispitivanjima magnetnih nanočestica u kulturi ćelija;

DM3 – aplikator za *in vivo* eksperimente na malim laboratorijskim životinjama.

Za analizu MNČ na bazi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  je korišćen DM1 aplikator. DM1 aplikator je opremljen senzorom u obliku sonde sa optičim vlaknom. Senzor je specifično dizajniran za merenja temperature magnetnih koloidnih uzoraka. Raspon merenja senzora je od  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  do  $120\text{ }^\circ\text{C}$  sa preciznošću od  $\pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$ . DM1 radi u sedam različitih režima frekvencija i sa jačinom magnetnog polja do 300 Gauss (23,850 kA/m) (Tabela 4.4) [140].

**Tabela 4.4:** Režimi rada DMI aplikatora [140]

Režim	Početna frekvencija (kHz)	Korekcija frekvencije (%)	Min <i>B</i> (Gauss)	Maks <i>B</i> (Gauss)	Korekcija polja (%)
1	252	<1%	48	300	<2%
2	323	<1%	48	300	<2%
3	397	<1%	48	300	<2%
4	472	<1%	48	300	<2%
5	577	<1%	48	300	<2%
6	728	<1%	48	252	<2%
7	808	<1%	48	252	<2%

### 4.3. Optimizacija uslova obeležavanja MNČ-a sa <sup>90</sup>Y

Postupak obeležavanja: U suspenzije MNČ-a i MMSHA određenih pH vrednosti se doda rastvor <sup>90</sup>YCl<sub>3</sub> aktivnosti 37-370 MBq. Zatim se data smeša inkubira određen vremenski interval na datoj temperaturi uz konstantno mućkanje. Sastav neradioaktivnih i radioaktivnih komponenti proba, kao i uslovi obeležavanja (temperatura i vreme) prikazani su u tabeli 4.5.

**Tabela 4.5:** Neradioaktivne i radioaktivne komponente proba i reakcioni uslovi obeležavanja sa <sup>90</sup>Y

proba	Neradioaktivna komponenta	Radioaktivna komponenta	Reakcioni uslovi
1	0,5 mL Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> pH = 6,5	1 μL <sup>90</sup> YCl <sub>3</sub> 37 MBq	25 °C, 30 min
			80 °C, 30 min
2	0,5 mL Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -PEG600 pH = 5,5	1 μL <sup>90</sup> YCl <sub>3</sub> 37 MBq	25 °C, 30 min
			80 °C, 30 min
3	0,5 mL Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DPD pH = 5	1 μL <sup>90</sup> YCl <sub>3</sub> 37 MBq	25 °C, 30 min
			60 °C, 30 min
4	0,5 mL Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA pH = 4,5	1 μL <sup>90</sup> YCl <sub>3</sub> 37 MBq	25 °C, 30 min
			60 °C, 30 min
5	10 mg MMSHA/1 mL H <sub>2</sub> O pH = 4,2	5 μL <sup>90</sup> YCl <sub>3</sub> 370 MBq	25 °C, 30 min
			80 °C, 30 min

Postupak prečišćavanja:  $^{90}\text{Y}$  obeležene MNC i MMSHA se prečišćavaju od viška nevezanog  $^{90}\text{Y}$  metodom taloženja pomoću spoljašnjeg magneta, tako što obeležene čestice talože, dok nevezani  $^{90}\text{Y}$  ostaje u supernatantu. Talog u vidu  $^{90}\text{Y}$ -MNC i  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA se ispira destilovanom vodom nekoliko puta. Nakon ispiranja i odvajanja nevezanog  $^{90}\text{Y}$ , finalna zapremina  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA je resuspendovana u 2 mL 0,9 % NaCl i kao takva je korišćena u daljem eksperimentu.

Postupak određivanja prinosa obeležavanja: Prinos obeležavanja  $^{90}\text{Y}$ -MNC-a se izračunava (nakon ispiranja metodom taloženja pomoću spoljašnjeg magneta) kao:  $[\text{aktivnost taloga} / (\text{aktivnost taloga} + \text{aktivnost supernatanta})] \times 100$ . Prinos obeležavanja  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA se određuje kao odnos izračunate aktivnosti u talogu nakon magnetne separacije i poznate aktivnosti korišćene prilikom obeležavanja. Zbog mogućnosti odlivanja i  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA prilikom dekantovanja supernatanta, aktivnost taloga se izračunava merenjem aktivnosti 0,1 mL supernatanta i aktivnosti ostatka uzorka ( $^{90}\text{Y}$ -MMSHA i 1,9 mL supernatanta). Na osnovu ove metode, aktivnost u talogu  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA se izračunava kao razlika aktivnosti ostatka uzorka i aktivnosti 0,1 mL supernatanta x 1,9. Drugi način određivanja prinosa obeležavanja  $^{90}\text{Y}$ -MNC i  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA je određivanjem radiohemijske čistoće  $^{90}\text{Y}$ -obeležanih ispitivanih čestica nakon obeležavanja. Ispitivanje se vrši radiohromatografskom analizom tj. metodom tankoslojne hromatografije na silika gel - SG trakama (ITLC-SG) kao stacionarnom fazom u 0,9 % NaCl kao mobilnom fazom. Metoda se izvodi tako što se na 2 cm od donje ivice trake, nanosi 0,01 mL ispitivane probe. Zatim se trake stave u mobilnu fazu (0,9 % NaCl) i hromatogrami se razvijaju na sobnoj temperaturi. Nakon razvijanja, SG trake se suše na vazduhu i seku na podeoke dužine 1 cm. Raspodela radioaktivnosti duž trake se određuje merenjem radioaktivnosti svakog cm trake. S obzirom da je  $^{90}\text{Y}$  čist beta emiter, njegova detekcija je jedino moguća putem merenja zakočnog zračenja (*Bremsstrahlung* efekta) na doze kalibratoru i NaI(Tl) gama brojaču. Sadržaj svake frakcije računa se u odnosu na ukupnu radioaktivnost trake i izražava u procentima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje tri vrednosti merenja  $\pm$  standardna devijacija.

#### 4.4. *In vitro* stabilnost $^{90}\text{Y}$ -MNC $\check{c}$ -a

Stabilnost MNC $\check{c}$ -a i MMSHA obeleženih radionuklidom prati se ispitivanjem njihove radiohemijske čistoće i *in vitro* stabilnosti u fiziološkom rastvoru i humanom serumu u toku određenog vremenskog perioda. *In vitro* stabilnost se prati inkubiranjem 0,2 mL suspenzije  $^{90}\text{Y}$ -MNC $\check{c}$ -a (2 mg) odnosno 2 mg  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA u 2 mL 0,9 % NaCl (pH = 7,3) odnosno u 2 mL humanog seruma na 37 °C tokom 72 h. U određenim vremenskim intervalima (0,5; 1; 24; 48 i 72 h) talog  $^{90}\text{Y}$ -MNC $\check{c}$ -a i  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA se pomoću spoljašnjeg magneta odvaja od supernatanta sa oslobođenim  $^{90}\text{Y}$ , nakon čega se meri aktivnost 0,1 mL supernatanta i aktivnost ostatka uzorka ( $^{90}\text{Y}$ -MMSHA i 1,9 mL supernatanta). Aktivnost  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA se izračunava kao razlika aktivnosti ostatka uzorka i aktivnosti 0,1 mL supernatanta x 1,9.

Ovi rezultati se porede sa rezultatima ITLC-SG metode kojom se ispituje njihova radiohemijska čistoća u različitim vremenskim intervalima.

#### 4.5. Biodistribucija $^{90}\text{Y}$ -MNC $\check{c}$ -a i $^{90}\text{Y}$ -MMSHA u Wistar pacovima

Biodistribucija  $^{90}\text{Y}$ -MNC $\check{c}$ -a i  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA je ispitana samo sa *in vitro* stabilnim česticama.  $^{90}\text{Y}$  obeležene MNC $\check{c}$ -a i MMSHA injektirane su u zdrave Wistar pacove starosti 4–5 nedelja, težine 100–150 g (Laboratorija za molekularnu biologiju i endokrinologiju, INN “Vinča”). Za svaki eksperiment korišćene su po tri ogledne životinje. Rad sa oglednim životinjama odobrila je etička komisija INN “Vinča” (02-2013) u skladu sa postojećim Pravilnikom za rad sa oglednim životinjama.

Suspenzije  $^{90}\text{Y}$ -MNC $\check{c}$ -a u fiziološkom rastvoru (0,1 mL) približne aktivnosti 1,85 MBq se intravenski injektiraju u repnu venu pacova. Za injektiranje  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA korišćena je suspenzija 0,1 mL (~0,1 mg  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA) približne aktivnosti 2,5 MBq. Životinje se zatim žrtvuju dislokacijom kičmenog stuba u različitim vremenskim intervalima (0,5; 1; 24; 48 i 72 h) nakon injektiranja. Uzorak krvi (1 mL) i organi od interesa (srce, pluća, jetra, slezina, bubrezi, želudac, creva, mišić i kost-femur) se izdvoje i izmere težine. Zatim se izabrani organi homegenizuju u 0,1 M Tris-HCl puferu do zapremine od 10 mL (5 mL) kao bi se postigla identična geometrija i približno ista gustina svake probe pri merenju aktivnosti  $^{90}\text{Y}$  putem zakočnog zračenja.

Radioaktivnost organa se meri u odnosu na standard koji predstavlja aktivnost one zapremine uzorka (0,1 mL) koja je injektirana u životinju. Iz odnosa injektirane (radioaktivnost standarda) i izmerene radioaktivnosti organa izračunava se raspodela radioaktivnosti u procentima u organima i krvi. Ukupna krv i mišići računaju se kao 6,7 % i 40 % od celokupne mase [141]. Merenja radioaktivnosti izvršena su na  $\beta$ -doze kalibratoru i NaI(Tl) gama brojaču. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri vrednosti merenja  $\pm$  standardna devijacija.

## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1. Sinteza i funkcionalizacija Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a

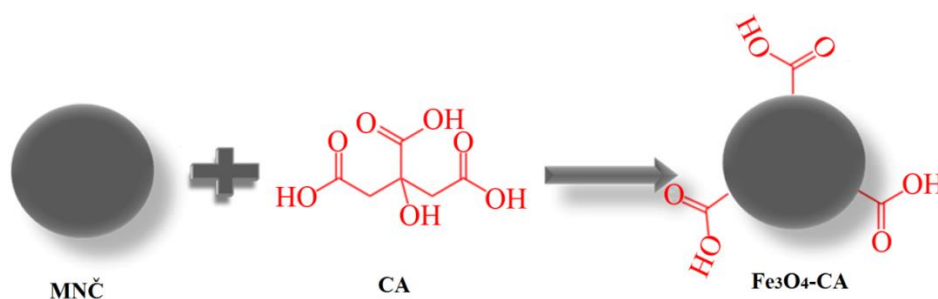
Prilikom sinteze MNČ-a veliki izazov predstavlja kontrolisanje njihove veličine, oblika i dispergovanosti u određenom rastvaraču. Hemijske metode sinteze Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a pokazale su se kao vrlo jednostavne sa velikom mogućnošću kontrolisanja osobina MNČ-a promenom uslova sinteze. U tabeli 5.1 su prikazane sve MNČ sintetisane odgovarajućom metodom u okviru ove doktorske disertacije, čiji postupci sinteze su opisani u poglavlju 4.1.

**Tabela 5.1:** Sinteza MNČ-a na bazi Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Magnetne nanočestice na bazi Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Metode sinteze
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> oh	Oksidaciona hidroliza
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> th	Taloženje iz rastvora sa hloridima Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup>
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ts	Taloženje iz rastvora sa sulfatima Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup>
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA	Taloženje iz rastvora sa hloridima Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup>
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -PEG600	Taloženje iz rastvora sa hloridima Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup>
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DPD	Taloženje iz rastvora sa sulfatima Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup>
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA u HAS matriksu (MMSHA)	Emulzifikaciona metoda

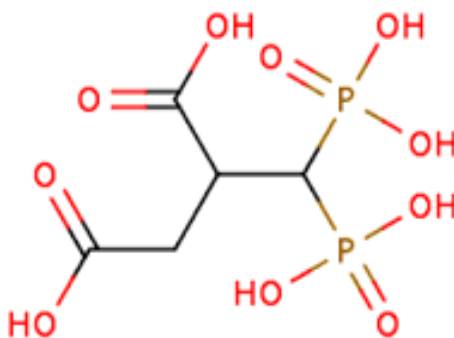
Od hemijskih osobina grupa na površini MNČ-a zavisi adsorpcija proteina, veličina, oblik i naelektrisanje obloženih MNČ-a pa samim tim i *in vivo* distribucija [142]. Glavni razlozi funkcionalizacije gvožđe oksidnih nanočestica koje se koriste u biomedicinske svrhe su: postizanje stabilnosti koloidnih suspenzija MNČ-a i sprečavanje aglomeracije, duže vreme zadržavanja u cirkulaciji i smanjeno dejstvo retikuloendotelnog sistema [143]. Na taj način se povećava njihova stabilnost i rastvorljivost u biološkim uslovima, biokompatibilnost, kao i mogućnost vezivanja drugih molekula ili radionuklida za MNČ [144].

Funkcionalizacija MNČ-a limunskom kiselinom i DPD ligandom je usledila nakon sinteze magnetita. Ova jedinjenja imaju karboksilne i fosfonatne reaktivne grupe zbog čega imaju sposobnost da grade stabilne i jake komplekse sa prelaznim metalima u vodenim rastvorima i visok afinitet vezivanja za površinu metalnih oksida (posebno za okside Al i Fe). Adsorpcija CA na površini MNČ-a se odvija koordiniranjem  $\equiv \text{Fe-OH}$  grupa sa jednom ili dve karboksilne grupe u zavisnosti od prostorne raspoloživosti i zakrivljenosti površine. Najmanje jedna karboksilna grupa ostaje slobodna i izložena rastvaraču i upravo je ona odgovorna za površinsko naelektrisanje i hidrofilnost MNČ-a, kao i dalju funkcionalizaciju sa radionuklidom [145]. Postupak funkcionalizacije  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$  MNČ-a je šematski predstavljen na slici 5.1 [146].



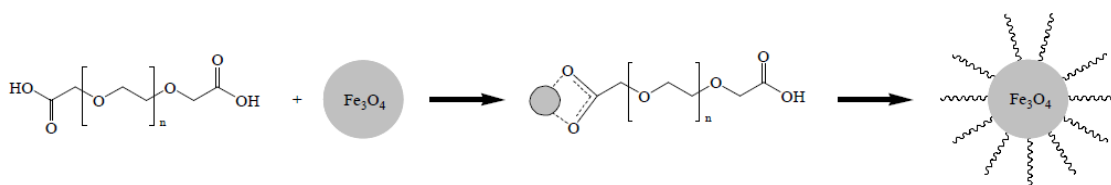
*Slika 5.1: Šematski prikaz funkcionalizacije MNČ-a limunskom kiselinom-CA [146]*

Struktura difosfonatnog liganda, DPD-a, koji se koristi za sintezu  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD}$  MNČ-a je prikazana na slici 5.2. DPD se kompleksira za površinu MNČ-a preko fosfonatnih i karboksilnih grupa. Ostatak slobodnih funkcionalnih grupa na površini MNČ-a dovodi do elektrostatičkog odbijanja i stabilizacije  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD}$  ferrofluida i služi za kovalentno vezivanje sa  $^{90}\text{Y}$ .



*Slika 5.2: Šematski prikaz strukture DPD*

U slučaju sinteze MNČ-a obloženih hidrofilnim polimerom polietilen glikolom ( $M_n=600$ ) sa dve terminalne karboksilne grupe ( $Fe_3O_4$ -PEG600), funkcionalizacija se odigrala *in situ* (tokom procesa taloženja). PEG600 je korišćen za funkcionalizaciju  $Fe_3O_4$  MNČ-a zahvaljujući visokom afinitetu karboksilnih kiselina za okside metala [147, 148]. Funkcionalizacija površine MNČ-a se odigrava građenjem koordinacione veze između elektronskog para karboksilne grupe iz PEG600 i atoma gvožđa iz  $Fe_3O_4$  MNČ-a. Polimerni lanac stvara dimenzionalnu zaštitu i smanjuje mogućnost agregacije između čestica, a njegove hidrofilne grupe čine  $Fe_3O_4$  MNČ dispergovane u vodi stvarajući stabilan vodeni ferrofluid [149]. Pored postizanja biokompatibilnosti oblaganjem MNČ-a PEG600-om, prisustvo karboksilnih grupa služi za kovalentno vezivanje  $Fe_3O_4$ -PEG600 MNČ-a i  $^{90}Y$ . Šematski prikaz interakcije između polimerne kiseline PEG600 i  $Fe_3O_4$  MNČ-a prikazan je na slici 5.3 [150].



**Slika 5.3:** Šematski prikaz funkcionalizacije MNČ-a polimerom PEG600 [150]

Korišćenje albumina iz humanog seruma za funkcionalizaciju MNČ-a podrazumeva njihovu inkapsulaciju u HSA matriks. Njihova stabilizacija se postiže na visokoj temperaturi, denaturacijom proteina.

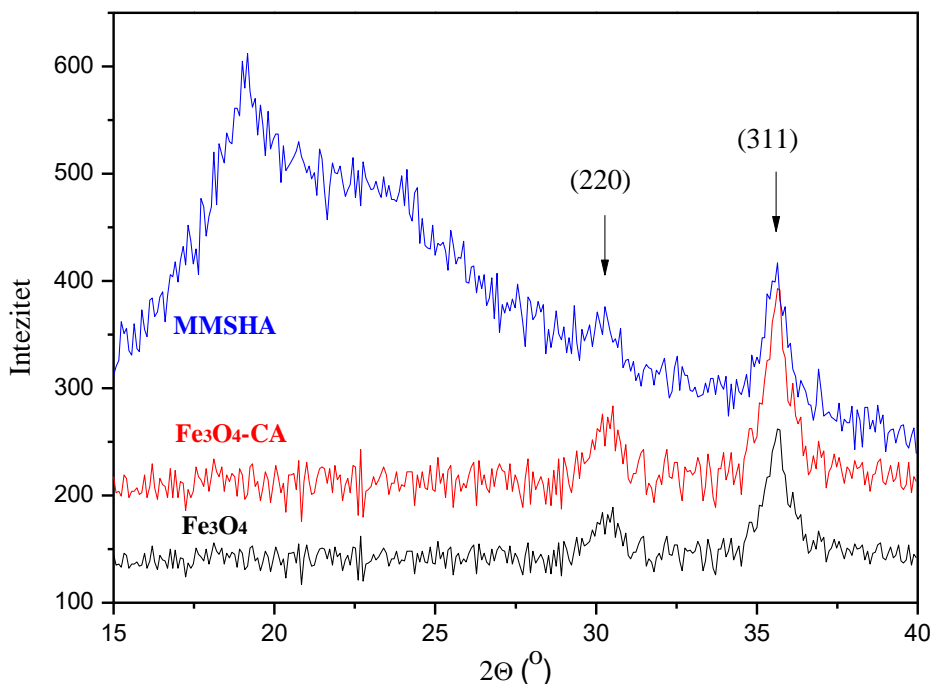
Za medicinsku primenu,  $Fe_3O_4$  MNČ se najčešće koriste u obliku ferrofluida [11], zbog čega je neophodna stabilnost njihovih vodenih suspenzija. U tom cilju vizuelno je praćena koloidna stabilnost sintetisanih ferrofluida ( $Fe_3O_4$ -CA,  $Fe_3O_4$ -PEG600 i  $Fe_3O_4$ -DPD) 3-6 meseci nakon sinteze. Sintetisani ferrofluidi su tamno-braon do crne boje sa vidljivim magnetnim osobinama u prisustvu (permanentnog) magneta. Koloidne karakteristike zadržavaju i do nekoliko meseci nakon sinteze sa vrlo malim stepenom sedimentacije.



## 5.2. Karakterizacija Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a

### 5.2.1. Karakterizacija XRPD metodom

Kristalna struktura sintetisanih MNČ-a je ispitana metodom difrakcije X-zraka na prahu. Odgovarajući difraktogrami za Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> th, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA MNČ i MMSHA prikazani su na slici 5.4. Analizom difraktograma za sva tri uzorka i poređenjem sa bazom podataka (JCPDS#19-629) potvrđeno je da svi uzorci kristališu u spinelnom tipu strukture, bez prisustva neke druge faze. Karakteristične refleksije spinelne strukture (220) i (311), uočene su na datim difraktogramima, odgovaraju prostornoj grupi  $Fd\bar{3}m$ , tj. odgovaraju refleksijama magnetita i maghemita. Izrazito crna boja uzoraka ukazuje na dominantnu fazu magnetita, pa se neorganska faza u uzorcima razmatra kao magnetit. Na difrakcionoj slici MMSHA postoji visoka bazna linija (*background*) koja ukazuje na postojanje amornog materijala u ovom uzorku (HSA). Srednja veličina kristalita za sva tri uzorka određena je pomoću Scherrer-ove jednačine (2.7) i iz karakteristika (311) refleksije na  $2\theta \sim 36^\circ$ . Dobijena vrednost za veličinu kristalita je oko 11 nm.

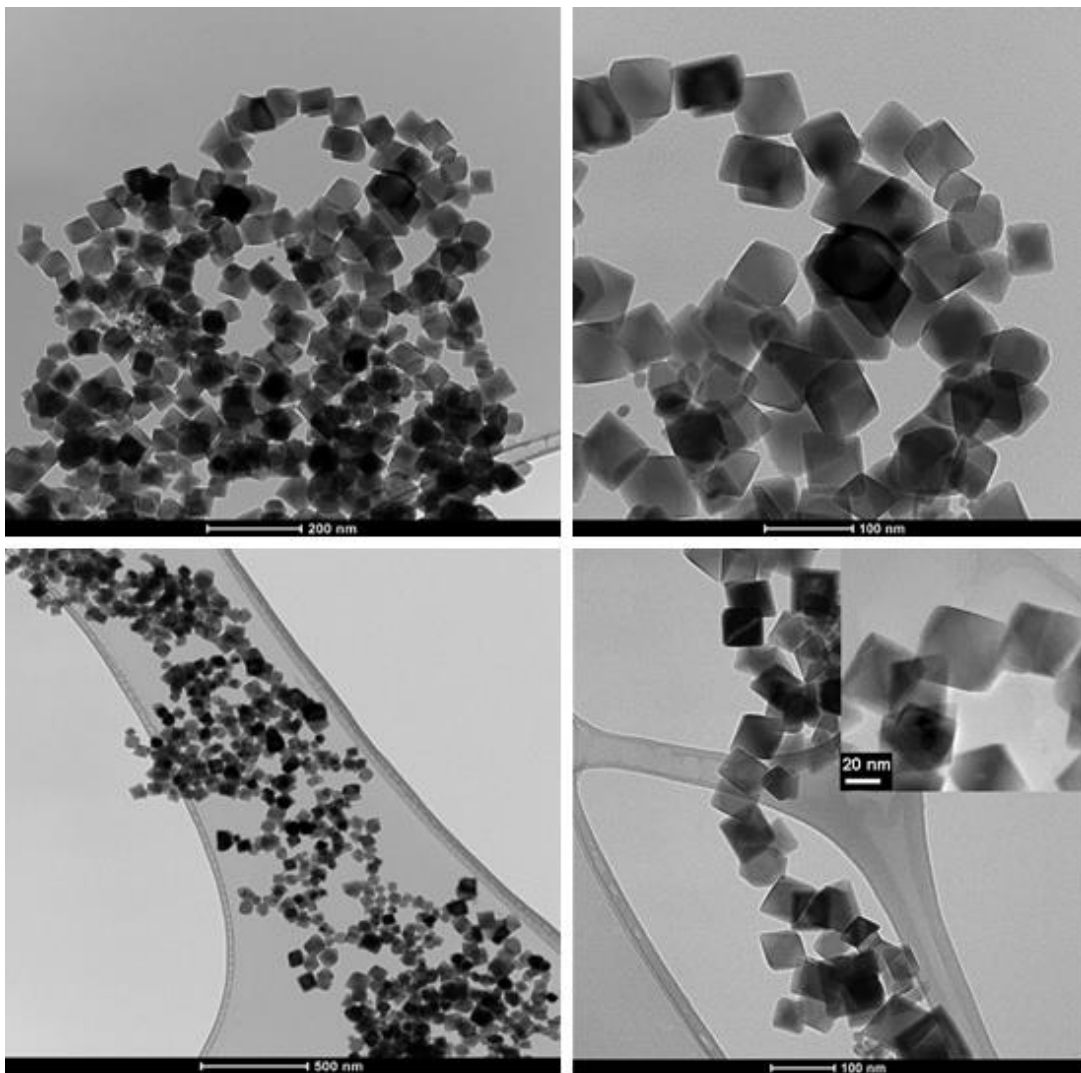


Slika 5.4: Difraktogrami Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA MNČ i MMSHA

### 5.2.2. Karakterizacija TEM metodom

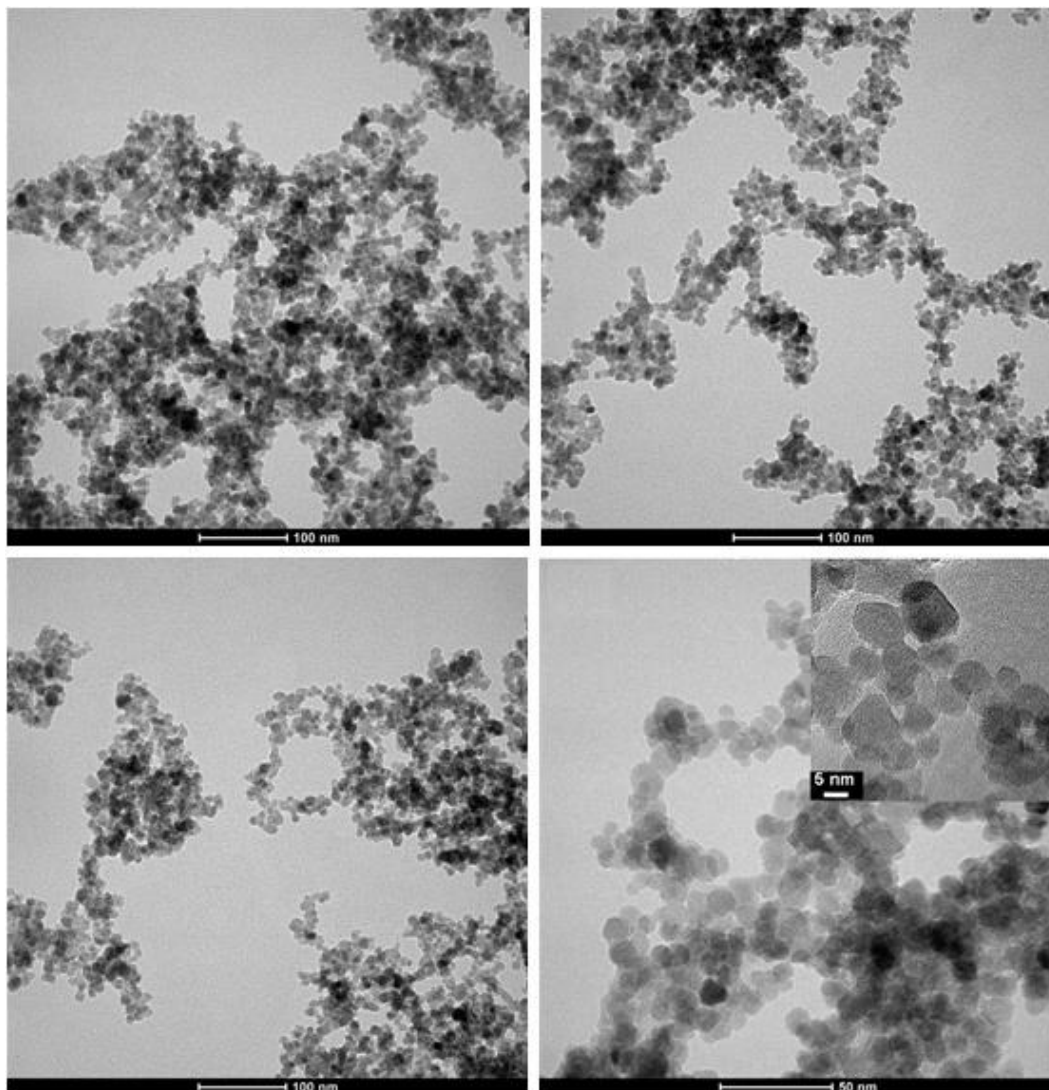
Veličina (prečnik,  $d$ ) i oblik (morfologija) MNČ-a su ispitani transmissionom elektronskom mikroskopijom visoke rezolucije (HRTEM). Mikrografije dobijene HRTEM-om prikazane su na slikama 5.5-5.8.

Na slici 5.5 prikazane su HRTEM mikrografije  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ-a dobijenih metodom oksidacione hidrolize koje su pretežno oktagonalnog oblika i prosečne veličine 80 nm. Može se primetiti da je došlo do aglomeracije MNČ usled nepostojanja odgovarajućeg omotača koji ima funkciju da spreči njihovo slepljivanje zbog postojanja privlačnih sila.



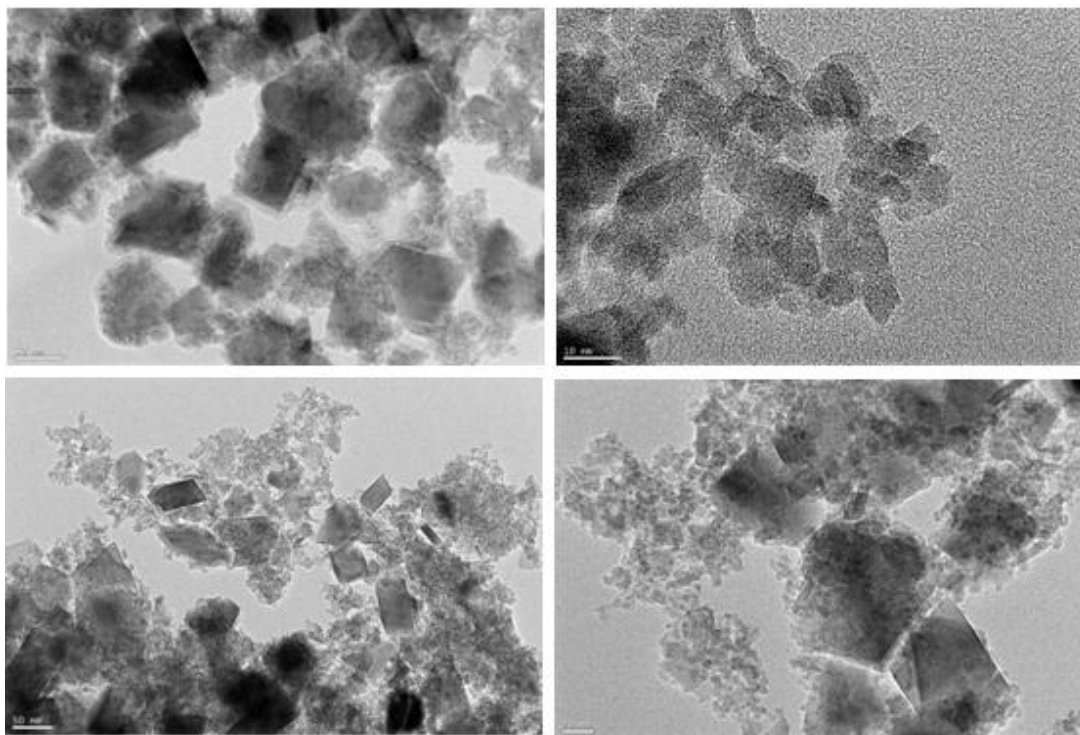
Slika 5.5: HRTEM mikrografije  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ-a

MNČ obložene PEG600-om i sintetisane taloženjem iz vodenog rastvora sa hloridima  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ , prikazane na slici 5.6, su više sfernog oblika i prosečne veličine 10 nm. Mogu se primetiti delovi u kojima je došlo do aglomeracije nanočestica, kao i delovi u kojima su one jasno razdvojene.



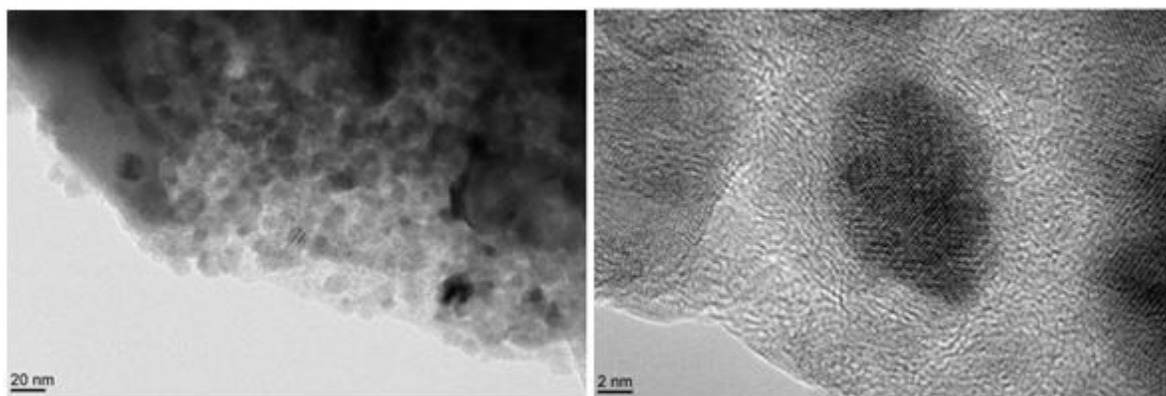
*Slika 5.6: HRTEM mikrografije  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNČ-a*

Na slici 5.7 su prikazane HRTEM mikrografije  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNČ-a dobijene metodom taloženja iz rastvora sa sulfatima  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ , na kojima se uočavaju čestice oblika kvadra. Prosečna veličina čestica je 6 nm. Kao i kod  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNČ-a, vide se delovi u kojima je došlo do aglomeracije nanočestica, kao i delovi u kojima su one jasno razdvojene.



*Slika 5.7: HRTEM mikrografije  $Fe_3O_4$ -DPD MNČ-a*

Nanočestice magnetita stabilisanog limunskom kiselinom, dobijene taloženjem iz vodenog rastvora sa hloridima  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ , su uglavnom uniformne, sfernog oblika sa prosečnom veličinom 8-11 nm i malim stepenom aglomeracije (slika 5.8). Veličina i morfologija  $Fe_3O_4$ -CA MNČ, određena na osnovu HRTEM-a, je u skladu sa rezultatima dobijenim XRPD metodom.

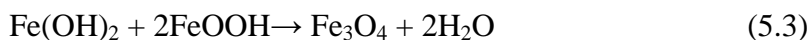


*Slika 5.8: HRTEM mikrografije  $Fe_3O_4$ -CA*

Na osnovu rezultata dobijenih HRTEM metodom, može se zaključiti da korišćenje različitih metoda sinteze MNČ-a, tj. različiti mehanizmi nastajanja MNČ-a, utiču na njihovu veličinu i oblik. Magnetit sintetisan taloženjem iz rastvora ima prosečnu veličinu 6-11 nm, dok magnetit sintetisan oksidacionom hidrolizom ima značajno veće dimenzije 70-80 nm.

Oksidaciono stanje Fe soli koje se koriste u sintezi Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a utiče na njihovu veličinu [151]. Kada se za sintezu koriste Fe<sup>2+</sup> i Fe<sup>3+</sup> joni, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanočestice se formiraju odmah nakon dodatka baze. S druge strane, rastvor koji sadrži samo Fe<sup>2+</sup> jone nakon mešanja sa bazom stvara tamno-zeleni talog koji postepeno prelazi u crni, ukazujući da se neke intermedijarne vrste stvaraju pre formiranja Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a. To je posledica postojanja dva različita mehanizma reakcije pri stvaranju Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a koji mogu uticati na njihovu veličinu [151]. Nastanak crnog taloga odmah nakon mešanja rastvora Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> soli sa bazom, ukazuje na neposredno taloženje Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> jona prema jednačini (2.1). Rezultat reakcije predstavljene jednačinom (2.1) su Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ prosečne veličine 6-11 nm.

Sinteza Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a samo u prisustvu Fe<sup>2+</sup> jona izaziva drugačiji mehanizam reakcije usled čega nastaju veće Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ sa prečnikom 70-80 nm. Uzrok sinteze većih MNČ-a može biti stvaranje intermedijarnih vrsta prema jednačinama [152, 153]:

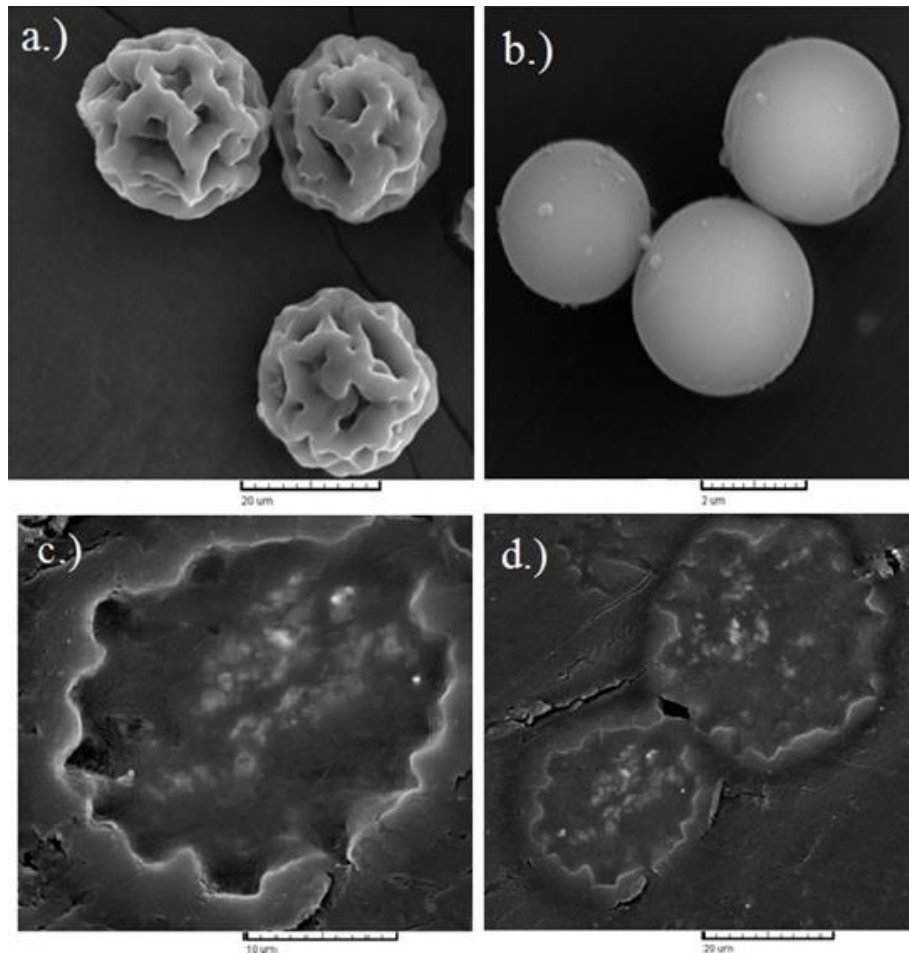


Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ nastaju kao rezultat reakcije dehidratacije Fe(II)-hidroksida i Fe(III)-oksihidroksida (5.3) koji nastaju delimičnom oksidacijom Fe(II)-hidroksida (5.2). Intermedijarne vrste koje nastaju, Fe(II) hidroksid (5.1) i Fe(III) hidroksid (5.2) su odgovorne za porast veličine čestica preko hidroksilacije [55, 154].

Oblaganjem MNČ-a različitim jedinjenjima postiže se bolje razdvajanje nanočestica sa malim stepenom aglomeracije. Takođe, oblaganje neorganskih jezgara (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) polimerima ili malim organskim molekulima smanjuje efekte na površini, kao što su

oksidacija ili formiranje kompleksa sa jonima iz rastvora koji mogu da utiču na njihove osobine.

Morfološke karakteristike MMSHA su ispitane skenirajućom elektronskom mikroskopijom.

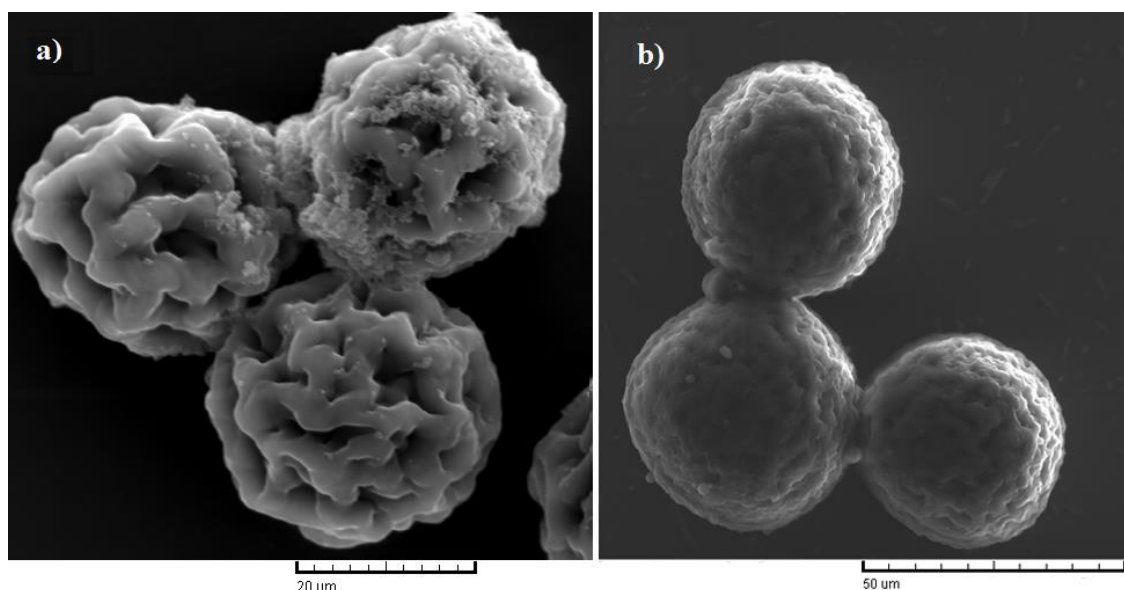


**Slika 5.9:** SEM mikrografije a.) MSHA sa magnetitom; b.) MSHA bez magnetita; c.) i d.) poprečni presek MMSHA

Na osnovu SEM mikrografija vidi se da MSHA sa inkapsuliranim magnetitom imaju neravnu površinu (slika 5.9a) za razliku od MSHA sintetisanih bez magnetita koje imaju glatku površinu (slika 5.9b). Obe vrste MSHA su sintetisane pod istim uslovima (120 °C, 200 rpm). Na slici 5.9c i 5.9d prikazan je poprečni presek MMSHA na kome se vidi da su  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA MNČ uspešno inkapsulirane unutar mikrosfera. Citratni ferofluid ima najmanju veličinu MNČ ( $d_H = 25 \text{ nm}$ ) zbog čega je korišćen za sintezu

MMSHA radi lakše inkapsulacije u HSA matriks. Takođe, pojedinačne razdvojene MNČ bolje se inkapsuliraju u mikrosfere humanog albumina nego njihovi aglomerati.

Pri izradi mikrosfera na bazi humanog albumina emulzifikacionom tehnikom, menjani su različiti parametri kako bi se ispitaio njihov uticaj na veličinu i raspodelu veličina mikrosfera. Na slici 5.10a su prikazane MMSHA sintetisane na 160 °C i 200 rpm, a na slici 5.10b su prikazane MMSHA sintetisane na 120 °C i 800 rpm.



*Slika 5.10: SEM mikrografije a.) MMSHA sintetisane pri 160 °C i 200 rpm; b.) MMSHA sintetisane pri 120 °C i 800 rpm*

Temperatura na kojoj se postiže stabilizacija MS je jedan od ključnih faktora koja utiče na veličinu i oblik mikrosfera. Stabilizacijom albuminskih MS bez inkapsuliranog magnetita na nižim temperaturama (100 °C -105 °C) dobijene su MS nepravilnih površina za razliku od MS stabilizovanih na višim temperaturama (170 °C -175 °C) koje karakteriše više glatka površina. Razlog tome je što u procesu proizvodnje albuminskih MS, vodena faza albumina v/u emulzije gotovo odmah očvršćava na visokim temperaturama i konstantnim brzinama mešanja [155]. MMSHA sintetisane na 120 °C i 160 °C imaju neravne površine, što ukazuje da povećanje temperature prilikom procesa sinteze ne utiče na njihovu morfologiju najverovatnije zbog prisustva magnetita koji zajedno sa HSA čini vodenu fazu prilikom sinteze MMSHA.

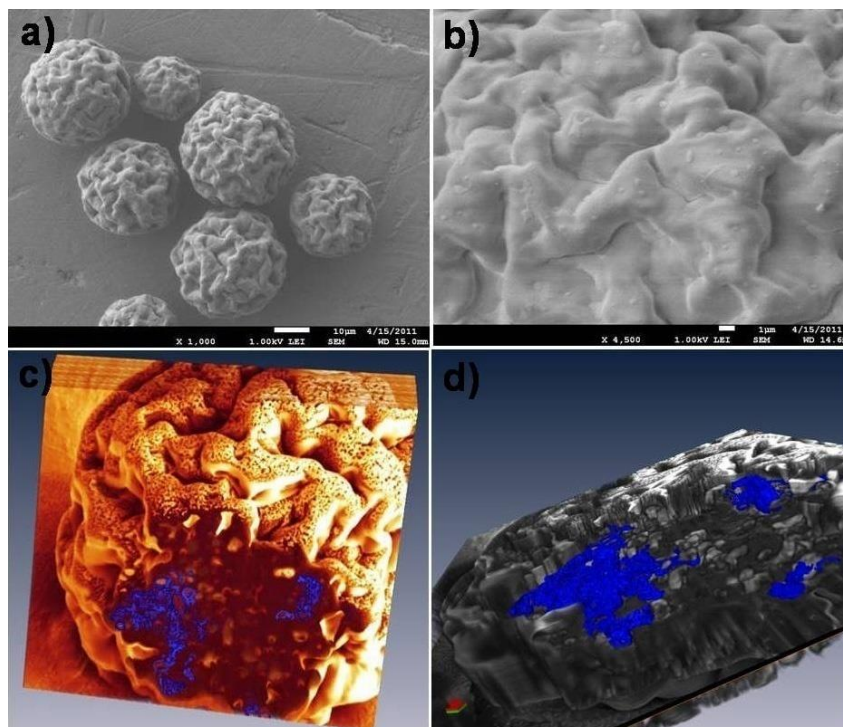
Ispitivanjem uticaja brzine mešanja na morfologiju i veličinu mikrosfera, primećeno je da se veličina MS smanjuje sa povećanjem brzine mešanja. Ovakvo ponašanje se i



očekuje iz razloga što velike brzine mešanja obezbeđuju smicajnu silu koja je neophodna za razbijanje uljane faze na manje kapi. Pri brzini od 200 rpm, dobijene čestice su sfere prosečne veličine 35  $\mu\text{m}$ , dok sa povećanjem brzine na 800 rpm, nastaju MMSHA veličine  $\sim 20 \mu\text{m}$ .

Količina magnetnog materijala koji se inkapsulira u MS je važna zbog njihovih magnetnih karakteristika i moguće primene u hipertermiji. Maksimalna količina MNČ koja je uspešno inkapsulirana u HSA matriks je 0,5 mL  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$ /2 mL HSA, odnosno  $\sim 100 \text{ mg}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$ . Masa  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$  MNČ-a određena je sušenjem 0,5 mL citratnog ferofluida u sušnici 24 h na  $50^\circ\text{C}$ .

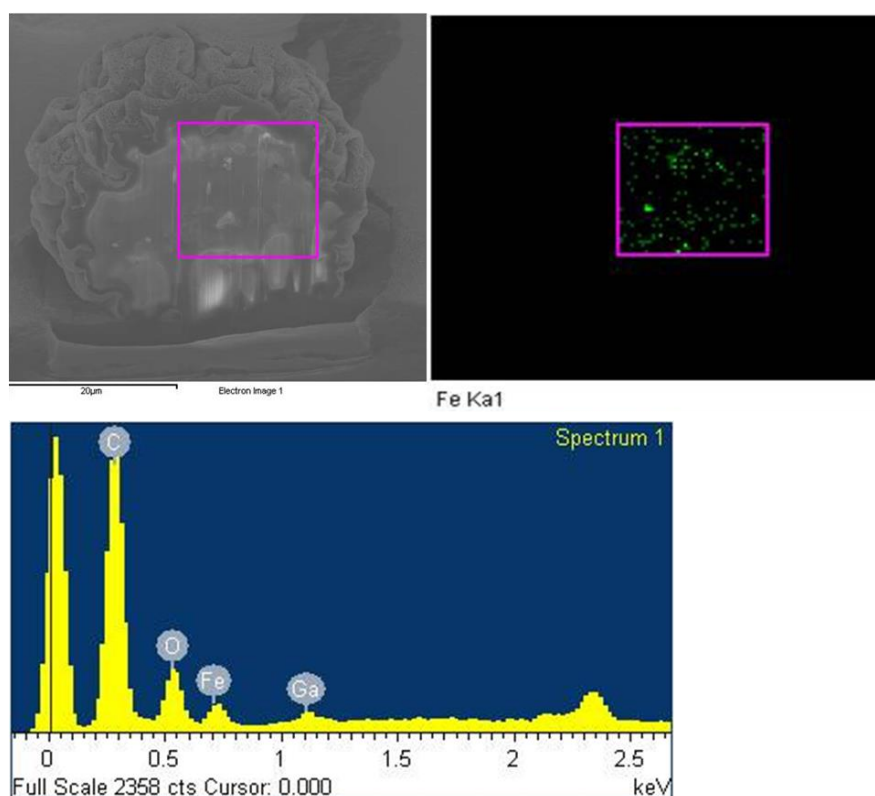
Slike 5.11 i 5.12 predstavljaju morfologiju i unutrašnji sastav MMSHA ispitanih FESEM i SEM/FIB mikroskopijom. Na slici 5.11 a.) i b.) se takođe vidi sferni oblik MMSHA neravne površine veličine u opsegu od 10 do 70  $\mu\text{m}$  od kojih najveći broj mikrosfera ima veličinu 20  $\mu\text{m}$ . Unutrašnja 3D raspodela MNČ-a na poprečnom preseku jedne MMSHA, analizirana pomoću SEM/FIB, je prikazana na slici 5.11 c.) i d.).



*Slika 5.11: a.) i b.) FESEM mikrofografije MMSHA-a i c.) i d.) FIB/SEM mikrofografije MMSHA-a*



EDX analizom potvrđeno je prisustvo gvožđa unutar mikrosfera (slika 5.12) što dokazuje da su MNČ uspešno inkapsulirane u MMSHA. Na EDX spektru, tj. rendgenskoj mapi raspodele elemenata odabranog dela poprečnog preseka MMSHA, gvožđe i kiseonik su glavne komponente, a njihovi atomski odnosi su u saglasnosti sa odnosom očekivanim od uslova sinteze. Dodatni pikovi u EDX spektru se javljaju zbog načina pripreme uzorka za EDX analizu.



*Slika 5.12: Poprečni presek MMSHA i odgovarajući EDX spektar odabrane oblasti*

### 5.2.3. Karakterizacija DLS metodom

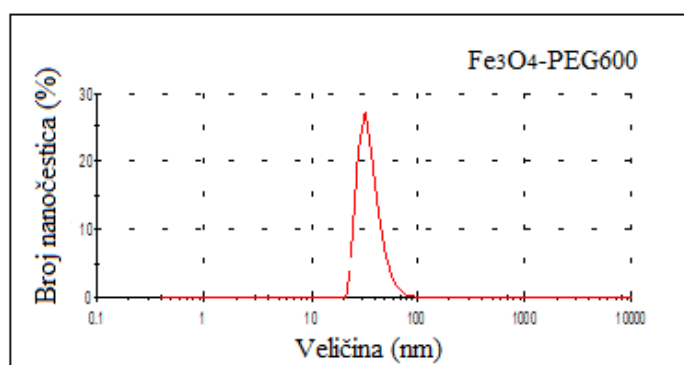
Veličine čestica sintetisanih magnetnih ferrofluida, kao i raspodela veličina čestica po broju, je određena DLS metodom. Za razliku od TEM merenja, srednja vrednost prečnika nanočestica koja se dobija DLS merenjima ( $d_H$ ), predstavlja hidrodinamički prečnik tj. prečnik čestice sa hidratacionim omotačem koja ima istu zapreminu kao čestica i predstavlja srednju vrednost prečnika svih merenih čestica. Poređenje rezultata dobijenih TEM i DLS merenjima (tabela 5.2) je pokazalo da su veličine čestica

dobijene TEM merenjima manje od istih dobijenih DLS merenjima, pošto se kod merenja veličine čestice DLS metodom uzima u obzir i dodati rastvarač ili stabilizator koji se kreće zajedno sa česticom, dok kod TEM-a analiziramo kristalnu fazu. Osim toga, potrebno je naglasiti da DLS metodom često dobijamo informacije koje se odnose na veličinu agregata pre nego na prečnik individualne nanočestice [156].

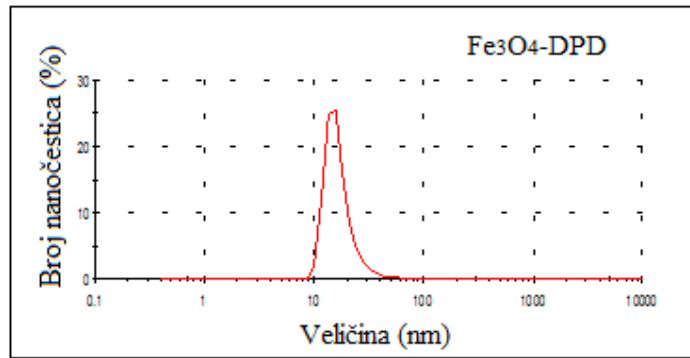
**Tabela 5.2:** Prečnici MNČ-a dobijeni TEM i DLS metodom i odgovarajući  $\zeta$ -potencijali

Metoda	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> oh	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -CA	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -PEG600	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DPD	MMSHA
TEM	80 nm	11 nm	10 nm	6 nm	20 $\mu$ m
DLS	-	25 nm	46 nm	29 nm	-
$\zeta$ -potencijal	-15 mV	-25,5 mV	-28 mV	-50,9 mV	-35 mV

Vrednost hidrodinamičkog prečnika za Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG600 MNČ iznosi 46 nm, dok veličina čestica Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG600 MNČ određena TEM-om iznosi 10 nm. Ova razlika se javlja zato što se DLS-om meri veličina čestica u hidratisanom stanju, koja uključuje slobodne lance polimera koji se šire sa površine polimera u vodenu sredinu. Za razliku od DLS-a, polimerni lanci se ne mogu videti na TEM-u zbog slabog kontrasta u odnosu na pozadinu koji je rezultat niske gustine elektrona [157]. Ovi rezultati potvrđuju vezivanje PEG600 za Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ. Hidrodinamički prečnici za Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA i Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DPD MNČ iznose 25 nm i 29 nm. Ovo je u skladu sa očekivanjima, jer se pri funkcionalizaciji površine nanočestica magnetita uvećava hidrodinamički prečnik ovih nanočestica. Za ilustraciju su kao primer dati DLS grafici raspodele veličine čestica (PSD), zasnovani na merenju rasejanja svetlosti po broju nanočestica za Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG600 i Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DPD MNČ (slike 5.13 i 5.14).

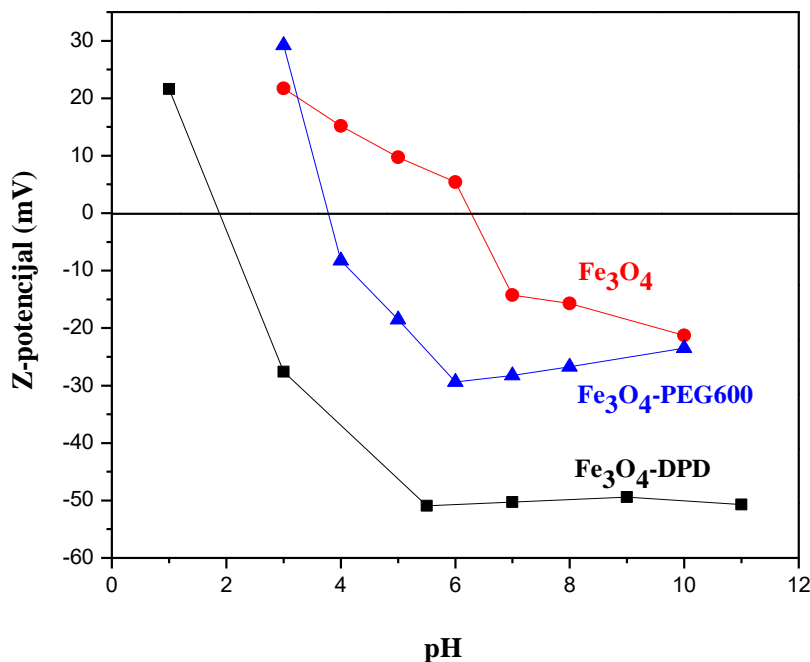


**Slika 5.13:** Raspodela veličine Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG600 MNČ-a po broju nanočestica



*Slika 5.14: Raspodela veličine Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DPD MNČ-a po broju nanočestica*

Površinsko naelektrisanje MNČ-a je određeno merenjem ζ-potencijala njihovih vodenih suspenzija na različitim pH vrednostima (slika 5.15).



*Slika 5.15: Zavisnost ζ-potencijala od pH za Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> oh i Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG600 i Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DPD MNČ*

Različito površinsko naelektrisanje Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a u vodenoj sredini u funkciji pH može se objasniti protonovanjem i deprotonovanjem površinskih hidroksilnih grupa (Fe-OH). U baznoj sredini, površina Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a pokazuje negativno naelektrisanje usled disocijacije Fe-OH i nastajanja deprotonovanih hidroksilnih grupa Fe-O<sup>-</sup>, dok pozitivno naelektrisanje nastaje usled protonovanja hidroksilne gupe Fe-OH<sub>2</sub><sup>+</sup> u kiseloj

sredini [158]. Izoelektrična tačka (IEP - pH vrednost na kojoj je ukupno površinsko naelektrisanje MNČ-a jednako nuli) za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ je izmerena na  $\text{pH} = 6,2$ , dok  $\zeta$ -potencijal na  $\text{pH} = 7$  iznosi  $-14,26$  mV. Ovo površinsko naelektrisanje nije dovoljno za postizanje stabilne koloidne suspenzije budući da se  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ vrlo brzo talože iz svojih vodenih suspenzija na  $\text{pH} = 7$ .

Vezivanje polimerne kiseline, PEG600, za površinu MNČ-a dovodi do izrazito negativnog površinskog naelektrisanja  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNČ-a,  $-28,3$  mV na  $\text{pH} = 7$ , što ujedno dokazuje prisustvo karboksilnih grupa na njihovoj površini. Takođe, poređenjem IEP za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ (6,2), IEP za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNČ je smanjena na 3,8. Smanjenje IEP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNČ-a ukazuje da su neke od karboksilnih grupa PEG600 snažno koordinirane za katjone Fe na njihovoj površini i da je došlo do uspešnog oblaganja MNČ-a ovim polimerom.

Oblaganje MNČ-a DPD ligandom snižava IEP na 1,9 i dovodi do izrazito negativnog površinskog naelektrisanja,  $-50,41$  mV, na  $\text{pH} = 7$ . Najniža vrednost  $\zeta$ -potencijala za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNČ u odnosu na  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  i  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNČ je posledica prisustva većeg broja funkcionalnih grupa, karboksilnih i fosfonatnih, na njihovoj površini. Zahvaljujući njihovom prisustvu dolazi do elektrostatičkog odbijanja između čestica i postizanja stabilne koloidne suspenzije  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNČ na  $\text{pH} = 7$ .

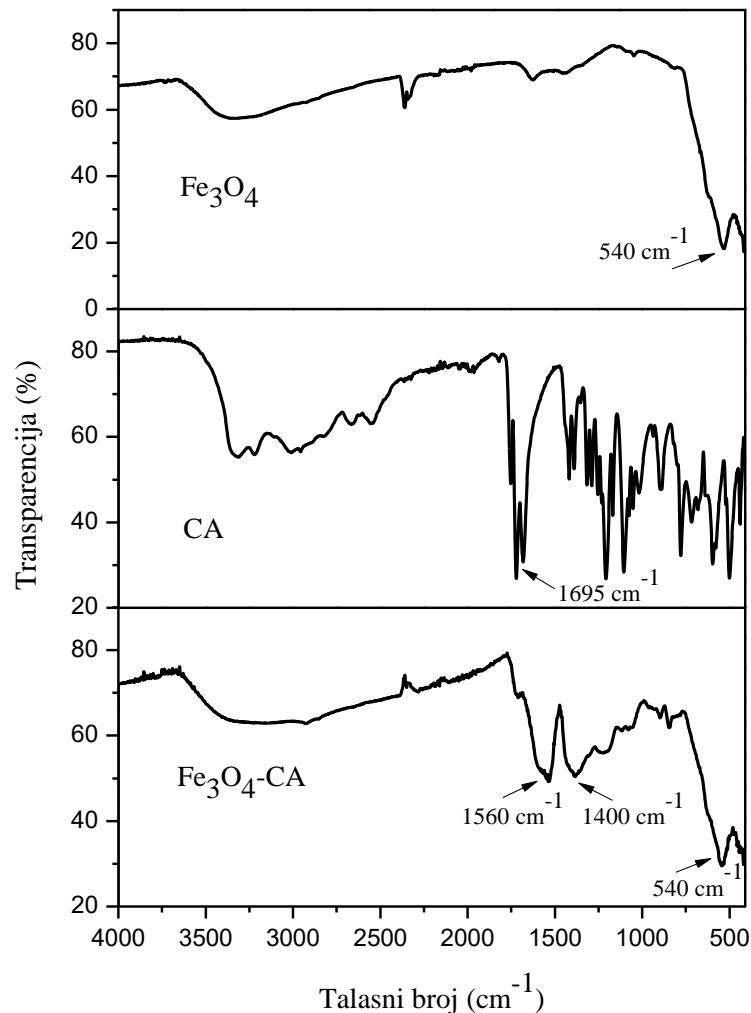
#### 5.2.4. Karakterizacija FTIC metodom

Da bi se bolje razumela interakcija različitih jedinjenja i MNČ-a, snimani su ATR FTIC spektri MNČ-a obloženih različitim jedinjenjima i upoređivani sa istim za samo jedinjenje i čist magnetit.

Jedinjenja kojima su oblagane MNČ imaju karboksilne i fosfonatne grupe. Indikacija prisustva karboksilne grupe vrši se na osnovu dve karakteristične trake koje se javljaju u IC području. Protonovana karboksilna grupa daje apsorpcione grupe koje odgovaraju  $\nu(\text{C}=\text{O})$  traci između  $1690$  i  $1760$   $\text{cm}^{-1}$  i  $\nu(\text{C}-\text{OH})$  traci između  $1210$  i  $1320$   $\text{cm}^{-1}$ . Prilikom deprotonovanja, traka  $\nu(\text{C}=\text{O})$  se pomera ka nižim talasnim brojevima (energijama) pošto njen vibracioni mod postaje kuplovan sa vibracijom drugog kiseonika karboksilatnog anjona i daje asimetričnu traku između  $1640 - 1650$   $\text{cm}^{-1}$ . Takođe,  $\delta(\text{O}-\text{H})$  se pomera ka većim talasnim brojevima (energijama) prilikom

deprotonovanja, što daje simetričnu traku karboksilatnog anjona između 1300 i 1420  $\text{cm}^{-1}$  [159].

Na slici 5.16 su prikazani ATR FTIC spektri  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA i limunske kiseline.

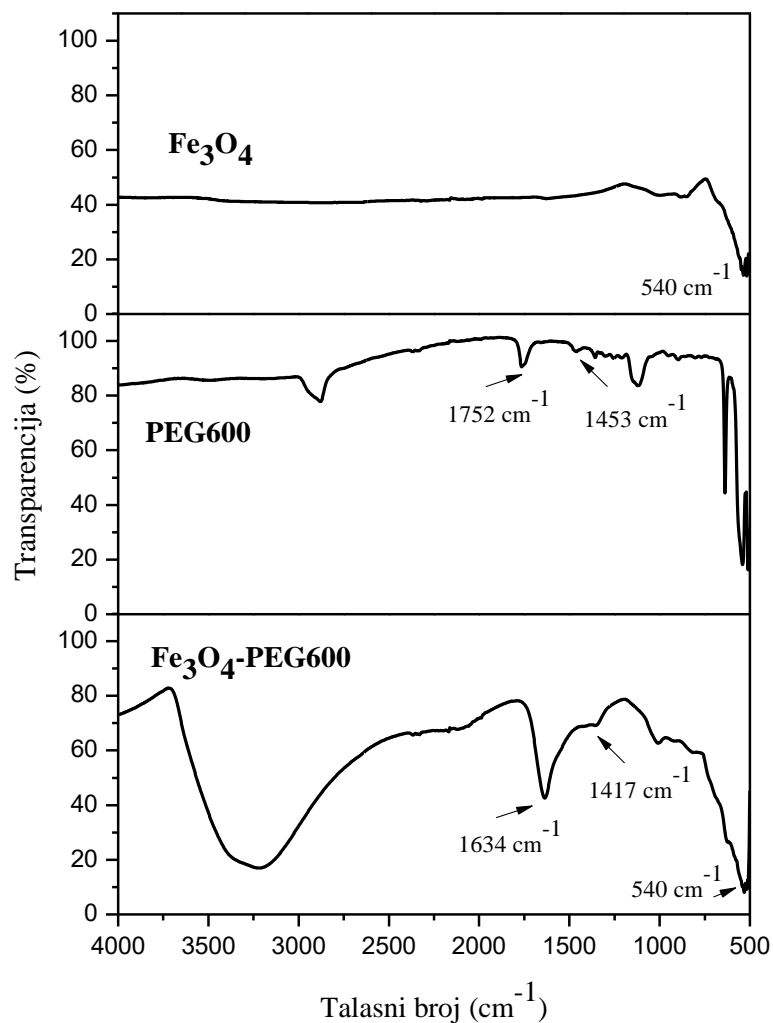


**Slika 5.16:** FTIC spektri  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA MNČ-a i CA

Oblaganje površine MNČ-a limunskom kiselinom potvrđeno je prisustvom dve trake na  $1560 \text{ cm}^{-1}$  i  $1400 \text{ cm}^{-1}$  u spektru  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA MNČ-a, koje odgovaraju asimetrično i simetrično istežućoj vibraciji C-O grupe [57]. Traka na  $1695 \text{ cm}^{-1}$  u spektru CA koja pripada C=O asimetrično-istežućoj vibraciji iz COOH grupe, je pomerena na  $1560 \text{ cm}^{-1}$  u spektru  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA, ukazujući na vezivanje CA za površinu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  hemisorpcijom karboksilatnih jona [160]. Poznato je da karboksilna grupa CA gradi kompleks sa Fe na površini MNČ-a čineći vezu C=O delimično jednostrukom, slabijom i pomerenom ka nižim talasnim brojevima [11, 145]. Široka i intezivna traka na  $3200 \text{ cm}^{-1}$  potiče od

strukturnih OH grupa kao i od tragova molekula vode, dok traka na  $540\text{ cm}^{-1}$  koja se javlja u oba spektra pripada Fe-O istežućoj vibraciji [161].

ATR FTIC spektri  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  i  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNČ-a kao i čistog PEG600 polimera prikazani su na slici 5.17.

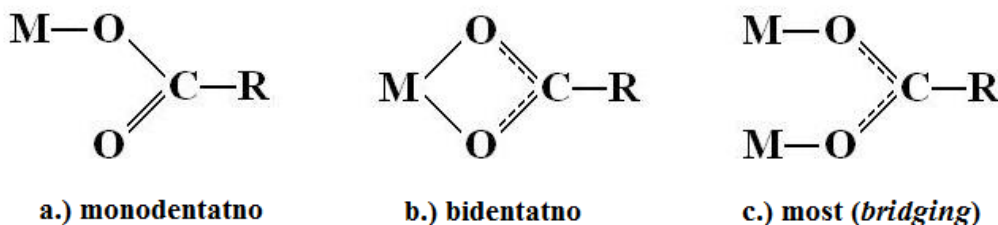


*Slika 5.17: FTIC spektri  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  i  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNČ-a kao i čistog PEG600 polimera*

Vibracione trake na  $1752\text{ cm}^{-1}$  i  $1453\text{ cm}^{-1}$  u spektru čistog PEG600 polimera odgovaraju istežućoj vibraciji C=O i savijajućoj vibraciji O-H iz COOH grupe. U spektru  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600, ove trake su pomerene ka nižim talasnim brojevima,  $1634\text{ cm}^{-1}$  i  $1417\text{ cm}^{-1}$ , ukazujući na stvaranje koordinativne veze između karboksilne grupe PEG600-a i atoma Fe na površini MNČ-a. Iz ovoga se može zaključiti da su vibracione

trake C=O i O-H grupe izjednačene sa asimetrično istežućom vibracijom C=O grupe na  $1634\text{ cm}^{-1}$  i simetrično istežućom vibracijom C=O grupe na  $1417\text{ cm}^{-1}$  [69, 162].

Na osnovu IC spektra mogu se identifikovati načini koordinacije karboksilnog jona za metal prikazanih na slici 5.18 [163]. To se može zaključiti iz separacionog talasnog broja,  $\Delta$ , koji predstavlja razliku talasnih brojeva između asimetrične i simetrične istežuće vibracije karboksilne grupe. Ako je  $\Delta > 200\text{ cm}^{-1}$ , karboksilna grupa se vezuje kao monodentatni ligand, a ako je  $\Delta < 110\text{ cm}^{-1}$  u pitanju je bidentatni ligand [164]. Dobijeni rezultati,  $\Delta = 217\text{ cm}^{-1}$  za  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600}$  MNČ-a ukazuju na monodentno vezivanje za površinu MNČ-a.



*Slika 5.18: Načini koordinacije karboksilnog jona [163]*

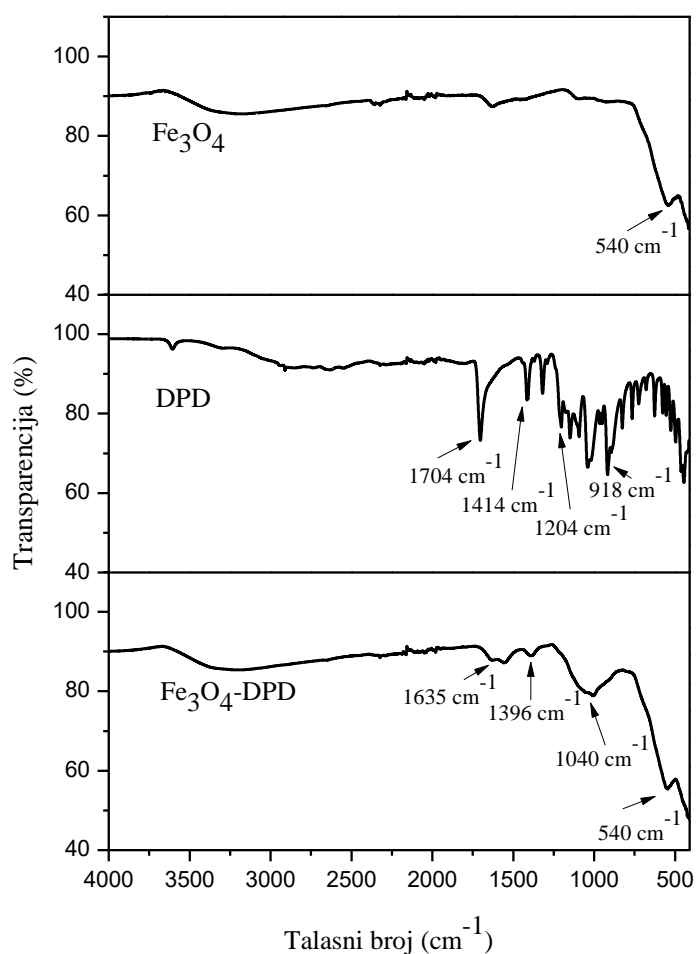
Široka i intezivna traka na  $3209\text{ cm}^{-1}$  u spektrima može poticati od OH grupa kao i od tragova molekula vode u uzorcima. Takođe, u spektrima  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600}$  i spektru  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  javlja se intezivna traka na  $540\text{ cm}^{-1}$  koja se može prepisati vibraciji Fe-O veze i koja potvrđuje prisustvo  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [165].

Na osnovu položaja vibracionih traka karboksilne grupe koje se javljaju u FTIC spektrima, kao i pomeranjima i smanjenjima intenziteta apsorpcije tih traka kod  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600}$  i  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$  u odnosu na spektre PEG600 i CA, pretpostavlja se da dolazi do interakcije između atoma Fe na površini MNČ-a i karboksilnih grupa iz PEG600 i CA, tj. da se funkcionalizacija površine MNČ-a ovim jedinjenjima odigrava preko -COOH grupe.

U literaturi postoji nekoliko zapažanja u vezi vezivanja fosfonatnih kiselina za površinu metalnih oksida i građenja P-O-M veze. Traka koja ukazuje na P-O-M vezu je obično široka (zbog delokalizacije elektrona) i generalno se nalazi u opsegu  $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  [166]. Postoje dva tipa P-O-M interakcije. Prvi tip je formiranje koordinativne veze između metala i fosforil grupe (P=O). Ovaj tip se nalazi u oblasti vibracija

frekvencije  $1167\text{--}1132\text{ cm}^{-1}$ . Drugi tip interakcije je kovalentno vezivanje atoma kiseonika za atom fosfora i atom metala (P-O-M). U spektru građenje P-O-M veze može biti praćeno nestankom P=O i P-O-H veza, u zavisnosti od načina vezivanja koje može biti mono-, bi- ili tridentatno (slika 2.2). Na primer, tridentatni način vezivanja fosfonatne kiseline rezultira širokom trakom u opsegu  $900\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$  i potpunim nestankom P=O i P-O-H veza. Prisustvo neke od ovih veza ukazuje na mono ili bidentatno vezivanje ili kombinaciju oba [166].

Na slici 5.19 su prikazani ATR FTIC spektari  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , DPD-a i  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNČ-a. DPD je ligand koji ima dve vrste funkcionalnih grupa, karboksilne i fosfonatne sa podjednako visokim afinitetom vezivanja za metale. Njegovo vezivanje za površinu MNČ-a odigrava se preko obe funkcionalne grupe, što dovodi do značajnih promena u oblasti vibracija karakterističnih za karboksilnu i fosfonatnu kiselinu u spektru  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNČ-a.



**Slika 5.19:** FTIC spektri  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  i  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNČ-a i čistog DPD-a



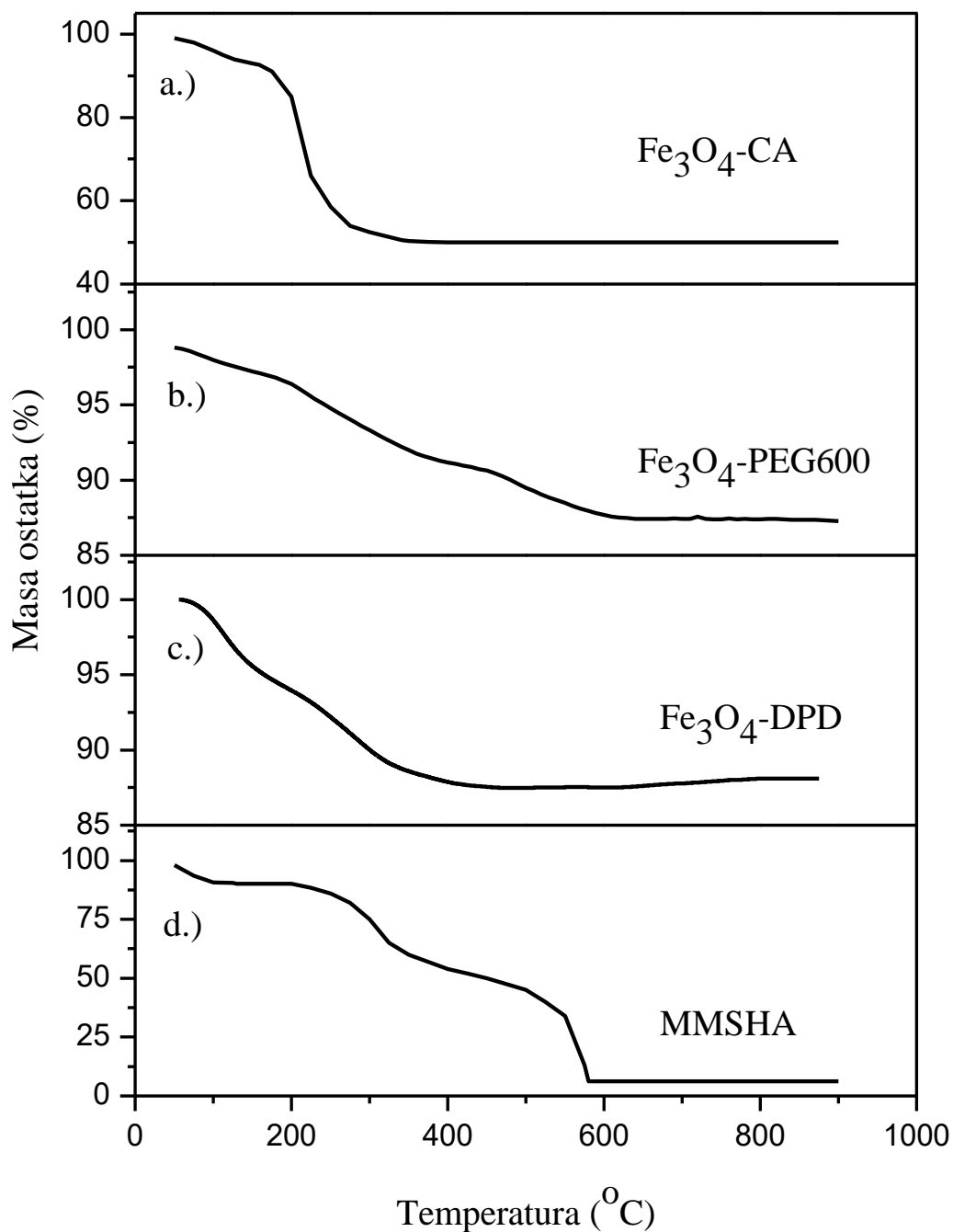
Jaka interakcija između fosfonatnih grupa i površine MNČ-a se primećuje u oblasti 900-1200  $\text{cm}^{-1}$ . U spektru DPD-a, u oblasti istežućih vibracija P-O grupe, uočavaju se vibracione trake na 1204  $\text{cm}^{-1}$  i 918  $\text{cm}^{-1}$  koje pripadaju P=O i P-OH grupi [167]. Nestanak ovih traka u spektru  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNČ-a i pojava široke vibracione trake centrirane na 1040  $\text{cm}^{-1}$  koja pripada  $\text{PO}_3^{2-}$  grupi [168], ukazuje na tridentatni način vezivanja fosfonatne grupe DPD za površinu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ-a.

U spektru DPD-a dve karakteristične trake na 1704 i 1414  $\text{cm}^{-1}$  koje pripadaju  $\nu(\text{C}=\text{O})$  i  $\nu(\text{C}-\text{OH})$  vibraciji iz COOH grupe, u spektru  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNČ-a su pomerene ka nižim talasnim brojevima, 1635  $\text{cm}^{-1}$  i 1396  $\text{cm}^{-1}$ . Na osnovu vrednosti separacionog talasnog broja,  $\Delta=239 \text{ cm}^{-1}$ , može se zaključiti da se karboksilna grupa vezuje kao monodentatni ligand tj., jedna karboksilna grupa iz DPD-a učestvuje u vezivanju za površinu MNČ-a, a druga ostaje slobodna. U spektrima  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  i  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNČ-a, traka na 540  $\text{cm}^{-1}$  potiče od Fe-O vibracije i potvrđuje prisustvo  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanočestica.

Poređenjem spektra DPD-a sa spektrom  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNČ-a, uočavaju se značajne promene u oblasti P-O istežućih vibracija ukazujući na snažnu interakciju fosfonatnih grupa sa  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  površinom, kao i promene u oblasti istežućih vibracija COOH grupe, kao dokaz vezivanja obe funkcionalne grupe iz DPD za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -MNČ.

### 5.2.5. Karakterizacija TGA metodom

Termijska analiza daje značajne informacije o procesima dehidracije, dehidroksilacije i termijske stabilnosti MNČ-a. Termogravimetrijske (TGA) krive za MNČ funkcionalizovane sa CA, DPD, PEG600 i MMSHA prikazane su na slici 5.20a-d. Početni gubitak mase za neobložene  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ do 200 °C najverovatnije nastaje usled gubitka površinskih hidroksilnih grupa i adsorbovane vode na površini, dok gubitak mase na višim temperaturama nastaje usled razlaganja amorfnih Fe-hidroksida pri čemu nastaju oksidi gvožđe [169].



**Slika 5.20:** TGA krive za a.) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA MNČ, b.) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG600 MNČ, c.) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DPD MNČ i d.) MMSHA

Termogravimetrijska analiza Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA MNČ-a (slika 5.20a) ukazuje na postojanje kontinualnog gubitka u masi uzoraka koji se odigrava u niz koraka pri zagrevanju od sobne temperature do 900 °C. Početni gubitak mase od 6,1 % odigrava se do 127 °C i ukazuje na isparavanje adsorbovane vode. U sledećem koraku koji se odigrava do 159 °C, gubitak mase je 1,3 %. Glavni korak termičkog razlaganja uzorka odigrava se u

intervalu 159-341 °C sa gubitkom mase od 42 %. Iznad 341 °C nije primećen gubitak mase. Iz ovih podataka je utvrđeno da zagrevanjem Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CA MNČ-a od sobne temperature do 900 °C ukupan gubitak u masi je 49,4 %. Krajnji proizvod termičkog razlaganja je neka od faza gvožđe-oksida kao i ugljenični ostaci.

Kontinuirani gubitak mase za Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG600 MNČ (slika 5.20b) u temperaturskom opsegu 200-600 °C iznosi 12 % i nastaje usled termičkog razlaganja organskih komponenti, u ovom slučaju polimerne kiseline PEG600. Iznad 600 °C nije primećen gubitak mase ukazujući na potpuno razlaganje polimera kojim su obložene MNČ.

Gubitak mase za Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DPD MNČ (slika 5.20c) odigrava se u temperaturskom opsegu 200-450 °C i nastaje usled termičkog razlaganja organskih komponenti, DPD-a. U ovom opsegu ukupan gubitak mase je 12,5 %. Iznad 450 °C nije primećen gubitak mase ukazujući na potpuno razlaganje DPD-a kojim su obložene MNČ.

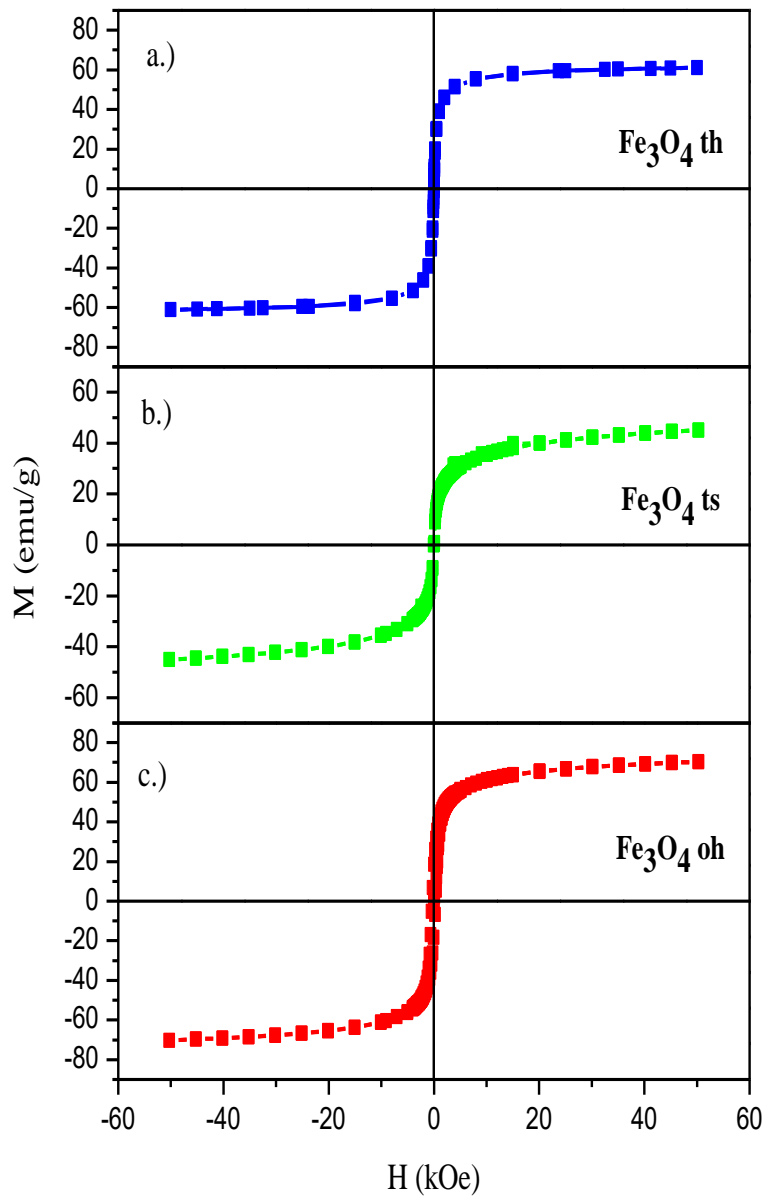
TGA kriva za MMSHA (slika 5.20d) pokazuje da se termičko razlaganje odigrava u tri koraka. Prvi korak koji podrazumeva dehidraciju odigrava se do 130 °C sa gubitkom mase od 9,8 %. Gubici mase koji se odigravaju u drugom (200-383 °C) i trećem (do 580 °C) koraku su 33 % i 51 %. Ukupan gubitak u masi u intervalu od sobne temperature do 900 °C za MMSHA je 93,8 %.

Rezultati TGA analize pokazuju da su Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ uspešno obložene različitim jedinjenjima koji se razlikuju u količini kojom funkcionalizuju površinu MNČ-a.

## **5.3. Magnetne osobine sintetisanih MNČ-a**

### **5.3.1. Magnetne osobine Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a**

Magnetne osobine Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a određene su na osnovu vrednosti magnetizacije u različitim poljima (histerezisne krive) pri konstantnoj temperaturi od 300 K. Vrednosti saturacione magnetizacije i koercitivnog polja (slika 5.21a-c) prikazani su u tabeli 5.3, kao i vrednosti dijametra Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ-a određenih TEM analizom.



**Slika 5.21:** Histerezisne krive za  $Fe_3O_4$  MNČ na  $T=300\text{ K}$

**Tabela 5.3:**  $M_s$  i  $H_c$  na  $300\text{ K}$  za  $Fe_3O_4$  MNČ različitih dijametara ( $d$ ), sintetisane iz različitih Fe-soli

Fe soli korišćene u sintezi $Fe_3O_4$ MNČ-a	$M_s$ (emu/g)	$d$ (nm)
$FeSO_4$ ( $Fe_3O_4$ oh)	73	80
$FeCl_2/FeCl_3$ ( $Fe_3O_4$ th)	62	10
$FeSO_4/Fe_2(SO_4)_3$ ( $Fe_3O_4$ ts)	47	6

Saturaciona magnetizacija za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ sintetisane samo sa  $\text{Fe}^{2+}$  solima metodom oksidacione hidrolize ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  oh) je 73 emu/g dok su saturacione magnetizacije za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ sintetisane sa  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  solima metodom taloženja iz rastvora 47 emu/g za sulfate ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ts) i 62 emu/g za hloride ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  th). Veličina sintetisanih  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ-a značajno utiče na vrednost saturacione magnetizacije. Iz tabele 5.4, se vidi da magnetna saturacija (47, 62 i 73 emu/g) raste sa porastom veličine MNČ-a (6, 10 i 80 nm). Razlike u veličini MNČ-a su posledica različitih mehanizama reakcije pri stvaranju  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ-a.

Uticaj površine u slučaju magnetnih nanočestica može biti presudan za magnetno ponašanje sistema. Smanjenje veličine dovodi do smanjenja kristalne simetrije na površini koja zajedno sa raskinutim vezama prisutnim na površini čestice može proizvesti razlike u magnetnom ponašanju između površinskog sloja i unutrašnje magnetne structure, i pri tome, izmeniti ukupni odziv nanočestičnog sistema na primenjeno spoljašnje magnetno polje [170].

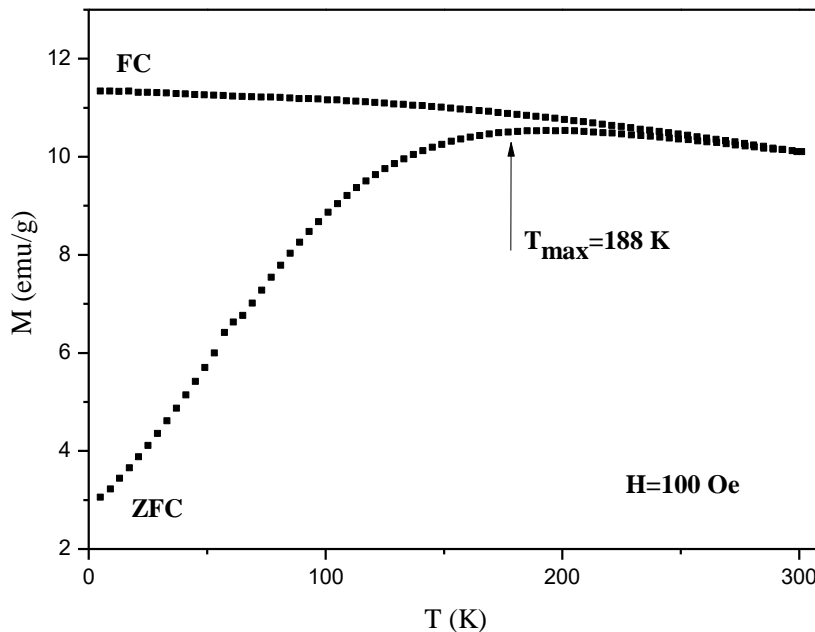
Niže vrednosti  $M_S$  za sva tri uzorka u odnosu na čist magnetit (92 emu/g) nastaju zbog adsorbovane vode i antiferomagnetnih amorfnih Fe-hidroksida, kao i zbog površinskih i drugih efekata [171]. Efekat površine ima značajnu ulogu pri proučavanju magnetnih osobina nanočestičnih materijala. Što je čestica manja veći je odnos broja atoma površine i zapremine, te su efekti površine izraženiji. Zbog manjeg broja suseda magnetni joni u tankom sloju površine, slabije interaguju međusobno, usled čega dolazi do nepotpune orijentacije njihovih magnetnih momenata u pravcu spoljašnjeg magnetnog polja, odnosno do pojave ukošavanja spinova, koji se ne mogu usmeriti čak ni kada se primeni jako polje [172].

Sva tri uzorka  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ pokazuju niske vrednosti koercitivnog polja što je karakteristika superparamagnetnih nanočestičnih sistema.

### 5.3.2. Magnetne osobine obloženih $\text{Fe}_3\text{O}_4$ MNČ-a

Magnetne osobine  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNČ najpre su ispitivane na osnovu eksperimentalno određenih temperaturnih zavisnosti magnetizacije uzorka, pri konstantnom magnetnom polju. Merenja su izvršena u magnetnom polju jačine  $H=100$

Oe, u temperaturnom intervalu 1,8–300 K, primenom ZFC i FC režima rada. Rezultati ZFC i FC merenja u primenjenom magnetnom polju 100 Oe su prikazani na slici 5.22.

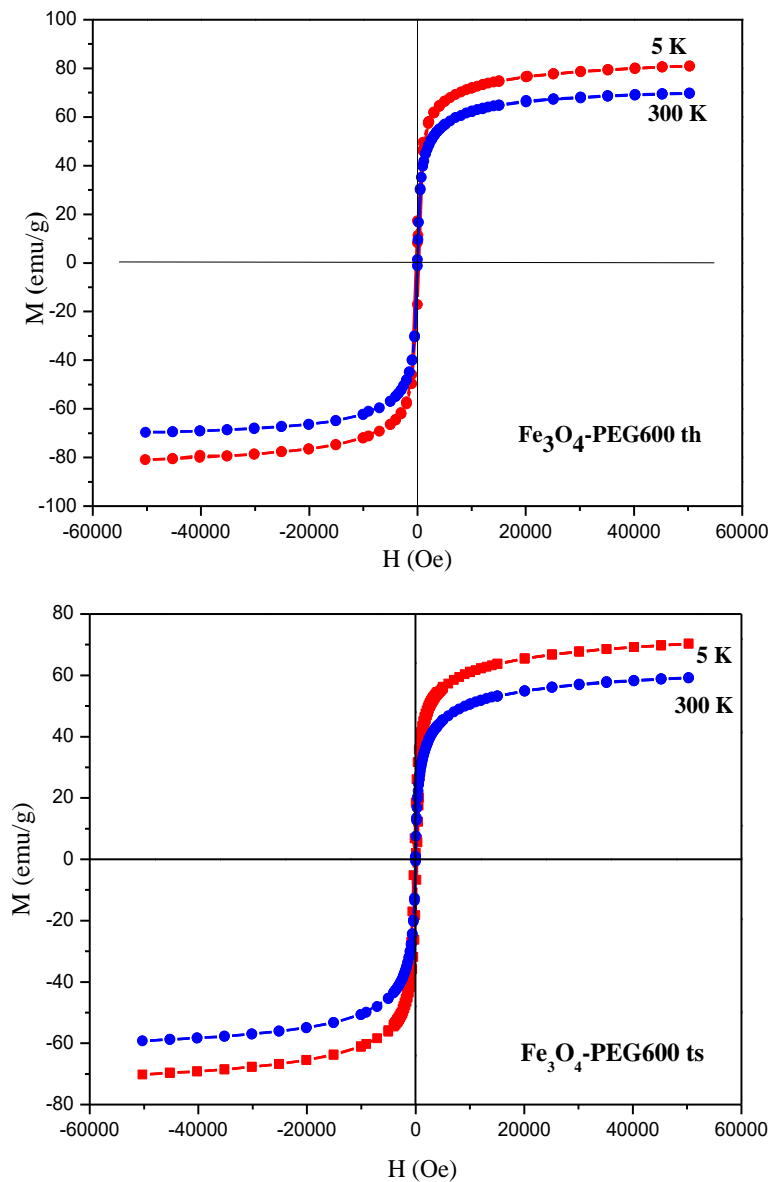


*Slika 5.22: Zavisnost magnetizacije od temperature  $Fe_3O_4$ -PEG600 MNČ-a (ZFC i FC merenja) u magnetnom polju jačine 100 Oe*

ZFC kriva magnetizacije pokazuje rast do temperature 188 K, gde se nalazi širok maksimum koji odgovara temperaturi blokiranja  $T_B$ , posle koje magnetizacija počinje da opada. Na temperaturama nižim od  $T_B$ , magnetni momenti čestica su blokirani duž pravca ose lake magnetizacije pojedinačnih nanočestica, sistem je slabo osetljiv na spoljašnje polje i magnetizacija izazvana spoljšnjim poljem je mala. Povećavajući temperaturu na kojoj se uzorak nalazi, pri konstantnom polju (100 Oe), magnetni momenti čestica počinju da se poklapaju sa osama lake magnetizacije nanočestica, tj. termalna energija postaje veća od energije anizotropije i omogućava magnetnim momentima nanočestica da se postave u pravcu spoljašnjeg magnetnog polja (odblokiraju se) i magnetizacija raste. Na  $T_B$ , magnetni moment nanočestica su odblokirani (slobodno se kreću u svim pravcima kao kod paramagnetika), tj. mogu se postaviti u smeru spoljašnjeg magnetnog polja i magnetizacija ima maksimalnu vrednost. Povišavajući  $T$  iznad  $T_B$  magnetizacija opada i ponaša se u skladu sa Curie-jevom zakonom za paramagnetne materijale, tako da  $T$  na kojoj se javlja maksimalna

magnetizacija u ZFC krivoj predstavlja temperaturu blokiranja. Ispod temperature blokiranja ZFC i FC magnetizacione krive se značajno razdvajaju: ZFC magnetizacija oštro opada, dok FC magnetizacija konstantno raste. Konvergencija ZFC i FC kriva na višim temperaturama i njihovo razdvajanje na nižim temperaturama je tipično za superparamagnetizam.

Zavisnost magnetizacije od primenjenog magnetnog polja (histerezisne krive) pri konstantnim temperaturama od 5 K i 300 K za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNC prikazani su na slici 5.23.



**Slika 5.23:** Histerezisne krive na temperaturama  $T=5$  K i  $T=300$  K za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNC dobijene taloženjem iz rastvora sa hloridima ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 th) i sulfatima ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 ts)

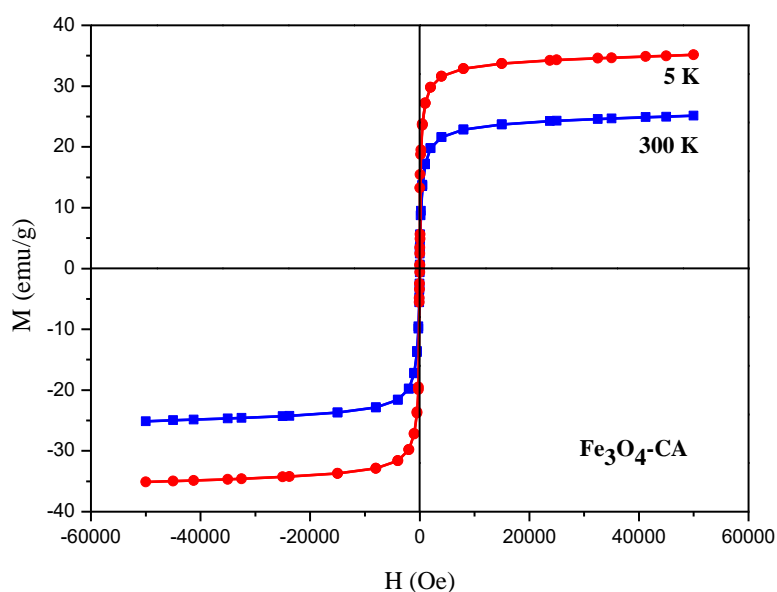
Vrednosti saturacionih magnetizacija su određene ekstrapolacijom magnetizacije  $M$  u zavisnosti od  $1/H$  i dobijene vrednosti  $M_s$  na  $T=300$  K su  $70$  emu/g za  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600 th}$  i  $59$  emu/g za  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600 ts MNČ}$ . U tabeli 5.4 su prikazane saturacione magnetizacije za  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600 th}$  i  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600 ts MNČ}$  na  $T=5$  K i  $T=300$  K.

**Tabela 5.4:** Saturaciona magnetizacija za  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600 th}$  i  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600 ts MNČ}$  na  $T=5$  K i  $T=300$  K

MNČ	$M_s$ (emu/g) $T=5$ K	$M_s$ (emu/g) $T=300$ K
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600 th}$	81	70
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600 ts}$	70	59

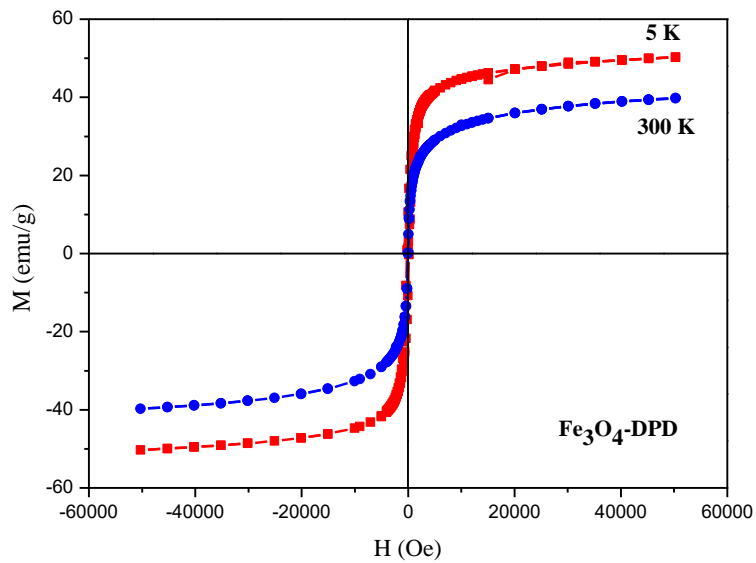
Na temperaturi  $300$  K magnetizacione krive pokazuju neznatno koercitivno polje  $H_C < 25$  Oe i remanentnu magnetizaciju jednaku nuli, što je karakteristika za superparamagnetno stanje [173].

Histerezisne krive na  $T = 5$  K i  $T = 300$  K za  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$  i  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD MNČ}$  prikazane su na slikama 5.24 i 5.25. Vrednosti saturacionih magnetizacija na  $T = 5$  K i  $T = 300$  K za  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$  i  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD}$  u odnosu na  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  th i  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ts MNČ prikazani su u tabeli 5.5.



**Slika 5.24:** Histerezisne krive na  $T = 5$  K i  $T = 300$  K za  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$





**Slika 5.25:** Histerezisne krive na  $T=5\text{ K}$  i  $T=300\text{ K}$  za  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD}$

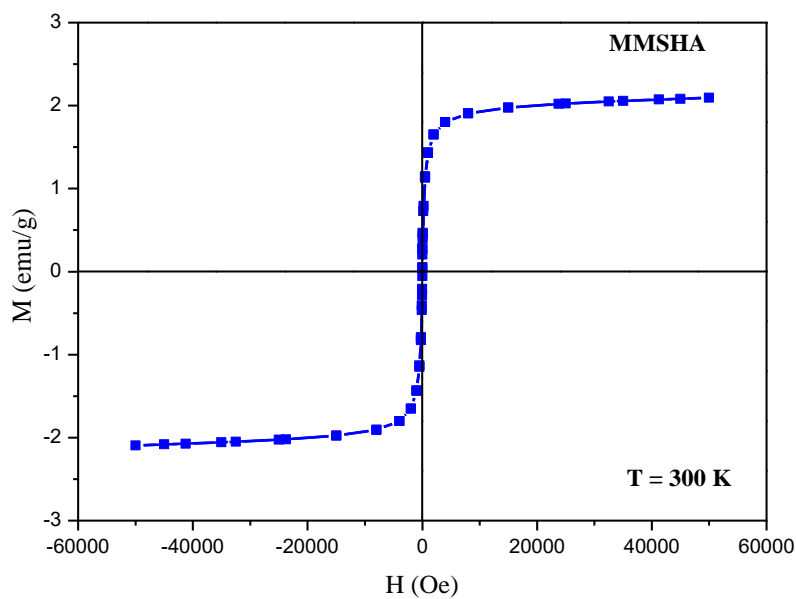
**Tabela 5.5:** Saturaciona magnetizacija za  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA}$  u odnosu na  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  th i  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD}$  u odnosu na  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ts MNC-a na  $T = 5\text{ K}$  i  $T = 300\text{ K}$

MNČ	$M_s$ (emu/g) $T=5\text{ K}$	$M_s$ (emu/g) $T=300\text{ K}$
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA th}$	35	25
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ th}$	71	62
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD ts}$	50	42
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ ts}$	58	49

Vrednosti  $M_s$  očitanih sa krivih  $M(H)$  na sobnoj temperaturi za  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA th}$  i  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD ts}$  su 25 i 42 emu/g. Niže vrednosti izmerene  $M_s$  za  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-CA th}$  i  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD ts}$  u odnosu na neobložene  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ th}$  i  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{ ts}$  MNC su usled nemagnetnog monosloja koji se nalazi na njihovoj površini. Na osnovu TGA analize, CA čini deblji sloj (49,4 %) kojim su obložene  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNC u poređenju sa DPD-om (12,5 %), što smanjuje sadržaj  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  i samim tim se dobija niža vrednost  $M_s$ . Takođe, nije isključena oksidacija MNC-a tokom procesa reakcije, što dovodi do formiranja nekih ne magnetnih Fe-oksida [174]. Osim toga, razlika u magnetizaciji između obloženih i neobloženih  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNC-a, može se pretpostaviti da potiče i od promene spinske konfiguracije, koja potiče od Fe–O–C veza koje se formiraju između površinskih Fe atoma i karboksilnih grupa iz CA. Karboksilati na površini MNC-a mogu da prouzrokuju promene u kristalnoj i magnetnoj strukturi, uključujući i promene u

orijentaciji magnetnih momenata (“spin canting”) što može imati za posledicu smanjenje vrednosti saturacione magnetizacije [175]. Vrednosti remanentne magnetizacije i koercitivnog polja bliske nuli ukazuju na superparamagnetno ponašanje MNČ-a.

Na slici 5.26 je prikazana zavisnost magnetizacije od primenjenog magnetnog polja za MMSHA na  $T = 300$  K. Niska vrednost  $M_S$  za MMSHA,  $M_S = 2$  emu/g je posledica male koncentracije nanočestica u HSA matriksu.



*Slika 5.26: Histerezisna kriva na  $T = 300$  K za MMSHA*

### 5.3.3. Magnetna hipertermija

Efikasnost zagrevanja MNČ-a određena je merenjem specifične apsorpcije - SPA u naizmeničnom magnetnom polju određene jačine i frekvencije, kako bi se ispitala mogućnost njihove upotrebe u magnetnoj hipertermiji. Određivanjem nagiba ( $\Delta T/\Delta t$ ) sa krivih promena temperature ferofluida sa vremenom, vrednost SPA se računa prema sledećoj relaciji:

$$SPA = \frac{c_c \rho_c \left(\frac{\Delta T}{\Delta t}\right)}{\Phi} \quad (5.4)$$

gde je:

$C_c$  – specifični kapacitet zagrevanja rastvarača<sup>5</sup>

$\rho_c$  – gustina rastvarača

$\Phi$  – koncentracija MNČ-a

Vrednosti specifične apsorpcije za MNČ kao i za komercijalno dostupne MNČ – MAGNO (nB nanoScale Biomagnetics, Španija) prikazane su u tabeli 5.6. Merenja su rađena na jačini magnetnog polja od 23,87 kA/m (300 G) i frekvenciji od 580 kHz.

**Tabela 5.6:** *Specifična apsorpcija MNČ-a pri  $H = 23,8$  kA/m i  $f = 580$  kHz*

MNČ	Specifična apsorpcija, SPA (W/g)
MMSHA	22
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DPD	76
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -PEG600	200
MAGNO	210

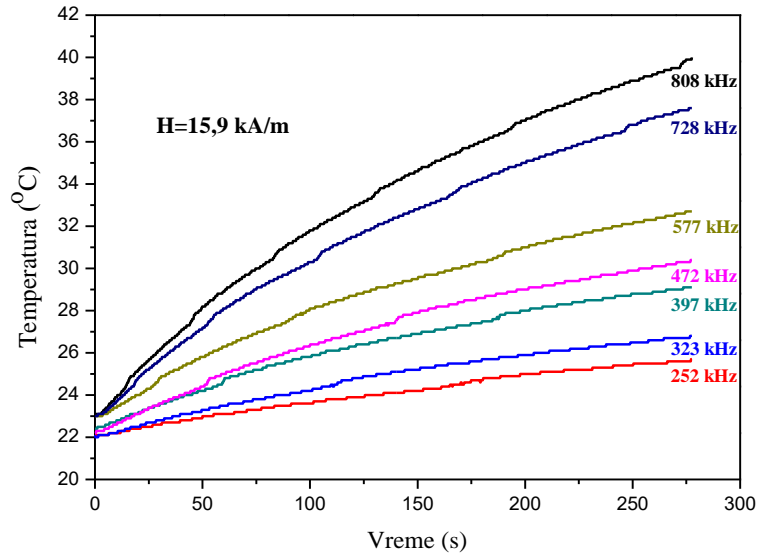
Određene SPA vrednosti za prikazane MNČ ukazuju da se one mogu koristiti kao agensi za *in situ* magnetnu hipertermiju. Za Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNČ nije određena SPA vrednost zbog nestabilnosti uzoraka. Vrednost specifične apsorpcije za Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-PEG600 ferofluid je najbliža komercijalno dostupnim MNČ – MAGNO [176].

Na slici 5.27 je prikazana zavisnost promene temperature Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DPD ferofluida od vremena izlaganja spoljašnjem polju na različitim frekvencijama pri konstantnoj jačini polja od 15,92 kA/m (200 G). Za isti ferofluid, prikazana je zavisnost temperature od vremena na različitim jačinama polja (15,92 i 23,87 kA/m) za  $f = 252$  kHz i  $f = 577$  kHz (slika 5.28).

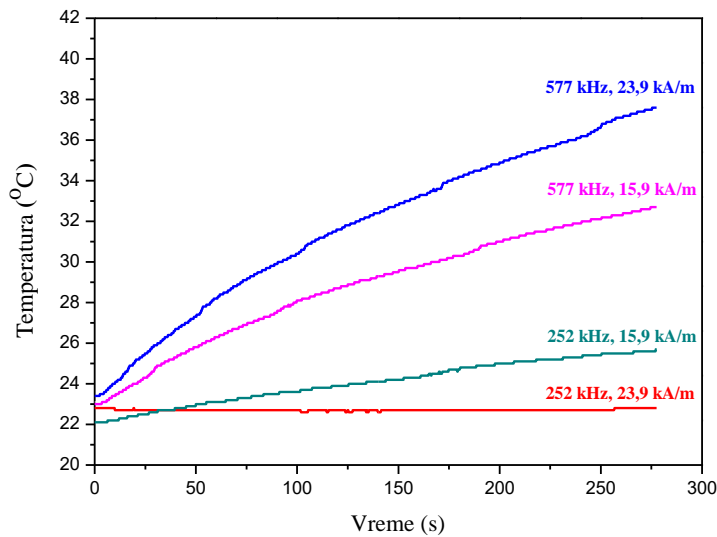
U kliničkoj upotrebi magnetne hipertermije treba imati u vidu i fiziološka ograničenja. Magnetno polje visoke frekvencije može izazvati lokalno zagrevanje u delu tkiva u kome se ne nalaze magnetne čestice usled vrtložnih struja. Osim kliničkih

<sup>5</sup> Sintetisane MNČ su dispergovane u vodi (ferofluidi), tako da  $C_c$  predstavlja specifični toplotni kapacitet vode,  $C_c = 4,186$  kJ kg<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>

ograničenja treba imati u vidu i tehnička ograničenja, zato što se većina istraživanja hipertermije na biološkim tkivima odvijaju na vrlo uskom opsegu frekvencija [111].



*Slika 5.27: Temperaturni profili za  $Fe_3O_4$ -DPD MNC na različitim frekvencijama i konstantnoj jačini polja*



*Slika 5.28: Temperaturni profili za  $Fe_3O_4$ -DPD MNC na frekvencijama 252 i 577 kHz na različitim jačinama polja*

## 5.4. Obeležavanje MNČ-a sa $^{90}\text{Y}$

Radionuklidi se mogu koristiti za ispitivanje fizičko-hemijskih svojstava i biodistribucije novih, neispitanih nano i mikro čestica. U cilju dobijanja stabilnih *in vivo* radioobeleženih čestica, neophodan korak u njihovoj pripremi je optimizacija uslova obeležavanja. Usled *in vivo* biodegradacije i reverzibilnog vezivanja  $^{90}\text{Y}$  za MNČ dolazi do njegovog oslobađanja i nakupljanja u zdravim tkivima i organima [129]. Nevezani  $^{90}\text{Y}$  se u jonskom obliku nakuplja u kostima gde ostaje do kraja raspada i izaziva značajnu toksičnost (mijelosupresiju). Zbog toga je vrlo važno ispitati postupak radioobeležavanja kojim se radionuklid  $^{90}\text{Y}$  ireverzibilno vezuje za MNČ. Takođe, zbog kratkog vremena poluraspada  $^{90}\text{Y}$ , proizvodni proces je vremenski ograničen i otežan zbog rizika od kontaminacije. Prednost korišćenja radionuklida za ispitivanje bioloških osobina novih materijala je što proces radioobeležavanja ne utiče na strukturu i osobine nanočestica. Radioobeležavanje magnetita pruža mogućnosti određivanja vrlo malih količina MNČ u složenim biološkim sistemima. Vezivanje radionuklida za čestice može biti preko procesa adsorpcije, kovalentnim vezivanjem ili indirektno preko bifunkcionalnog liganda koji predstavlja sponu između MNČ i radionuklida. Za obeležavanje MNČ radionuklidom  $^{90}\text{Y}$  korišćena je direktna metoda koja podrazumeva inkubaciju MNČ sa  $^{90}\text{Y}$  na određenoj temperaturi i vremenu.  $^{90}\text{Y}$  se vezuje za MNČ preko površinskih funkcionalnih grupa građenjem kovalentne veze.

U tabeli 5.7 su prikazani prinosi obeležavanja  $^{90}\text{Y}$ -MNČ-a, obeleženi pri različitim uslovima, određeni ITLC-SG metodom.

**Tabela 5.7:** Prinosi obeležavanja  $^{90}\text{Y}$ -MNČ-a određeni ITLC-SG metodom

$^{90}\text{Y}$ -MNČ	Prinos obeležavanja na $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 min (ITLC-SG)	Prinos obeležavanja na $T=80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 min (ITLC-SG)
$^{90}\text{Y}$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ MNČ	65,5 %	67,5 %
$^{90}\text{Y}$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNČ	96,4 %	97,2 %
$^{90}\text{Y}$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNČ	98,8 %	99,4 %
$^{90}\text{Y}$ -MMSHA	71,3 %	75,7 %

Kao što je pomenuto, u vodenim rastvorima Fe atomi stvaraju koordinativnu vezu sa vodom, čijom disocijacijom površina  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ ostaje funkcionalizovana u obliku Fe-OH. U zavisnosti od pH rastvora, površina magnetita je pozitivna ili negativna [78]. U kiseljoj sredini, hidroksilne grupe na površini MNČ-a su protonovane ( $\equiv\text{FeOH}_2^+$ ) čineći površinu MNČ-a pozitivnom, dok u baznoj sredini tj. iznad IEP magnetita (pH=6,2) hidroksilne grupe su deprotonovane ( $\equiv\text{FeO}^-$ ) čineći površinu MNČ-a negativno naelektrisanom [158].<sup>154</sup> Na osnovu ovoga pretpostavlja se da se negativno naelektrisane  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ obeležavaju sa  $^{90}\text{Y}^{3+}$  na pH iznad 6,2. Uspešno obeležavanje  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ-a sa  $^{90}\text{Y}^{3+}$  postignuto je na pH ~ 6,5. Dodatak vrlo male zapremine  $^{90}\text{YCl}_3$  (1  $\mu\text{L}$ ) u rastvor  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ-a ne utiče značajno na promenu pH, a samim tim i osobine  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ su obeležene radionuklidom  $^{90}\text{Y}$  sa prinosom obeležavanja od 67,5 % usled prisustva deprotonovanih hidroksilnih grupa ( $-\text{FeO}^-$ ) na njihovoj površini [158].

Zahvaljujući prisustvu karboksilnih i fosfonatnih funkcionalnih grupa na površini MNČ-a koje potiču od dodatih jedinjenja za oblaganje, sintetisane MNČ imaju izrazito negativno naelektrisanu površinu na pH = 5–6 što je veoma povoljno radi njihove dalje funkcionalizacije sa  $^{90}\text{Y}$  koji se nalazi u obliku trovalentnog  $^{90}\text{Y}^{3+}$  jona. Vrednost zeta potencijala za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 na pH=5,5 iznosi -24,3 mV, dok je vrednost zeta potencijala za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNČ na pH=5, -50,9 mV. Zahvaljujući prisustvu disosovanih karboksilnih grupa ( $-\text{COO}^-$ ) na površini  $^{90}\text{Y}$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNČ-a, prinos obeležavanja je veći od 96 %. U vezivanju DPD za površinu MNČ-a učestvuju i karboksilne i fosfonatne grupe. Određen broj karboksilnih i fosfonatnih grupa DPD-a ostaje slobodan za dalju funkcionalizaciju sa  $^{90}\text{Y}$ . Veći broj funkcionalnih grupa na površini  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNČ utiče na veći prinos obeležavanja  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNČ u odnosu na  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNČ (tabela 5.7).

Definisana primarna struktura i visok sadržaj naelektrisanih amino kiselina, čine albuminske čestice pogodne za elektrostatičku adsorpciju pozitivno (ganciclovir) [177] ili negativno (oligonukleotid) [178] naelektrisanih molekula bez potrebe za prisustvom drugih jedinjenja. Takođe, *Schiller* i saradnici [179] su uspešno obeležili albuminske mikrosfere sa  $^{86}\text{Y}$  bez DOTA helatora, što ukazuje na mogućnost obeležavanja direktnim vezivanjem  $^{90}\text{Y}$  za površinu mikrosfera. Maksimalni prinos obeležavanja za  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA, određen ITLC-SG metodom je 75,7 %. Metodom taloženja pomoću

spoljašnjeg magneta određena vrednost prinosa obeležavanja (77 %) je u saglasnosti sa prethodnim rezultatom.

### 5.5. *In vitro* stabilnost $^{90}\text{Y}$ -MNC-a i $^{90}\text{Y}$ -MMSHA

Ispitivanje *in vitro* stabilnosti  $^{90}\text{Y}$ -MNC-a i  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA na sobnoj temperaturi u fiziološkom rastvoru (FR) i humanom serumu (HS), praćeno je u toku 72 h od trenutka obeležavanja određivanjem radiohemijske čistoće ITLC-SG radiohromatografskom metodom (tabele 5.8 i 5.9). Pri određivanju radiohemijske čistoće,  $^{90}\text{Y}^{3+}$  se javlja kao jedini radioaktivni produkt degradacije  $^{90}\text{Y}$ -MNC i  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA. U ovom sistemu  $^{90}\text{Y}^{3+}$  se pomera sa frontom rastvarača ( $R_f = 0,9-1,0$ ), dok  $^{90}\text{Y}$ -MNC i  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA ostaju na mestu nanošenja uzorka ( $R_f = 0,0-0,1$ ).

Nakon inkubacije od 72 h u FR i HS,  $^{90}\text{Y}$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNC pokazuju najmanju stabilnost (81 i 79 %) u odnosu na  $^{90}\text{Y}$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNC (94 i 93 %) i  $^{90}\text{Y}$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNC (95 i 94 %). Veća stabilnost kod  $^{90}\text{Y}$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 i  $^{90}\text{Y}$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNC-a je usled vezivanja  $^{90}\text{Y}^{3+}$  za negativno naelektrisane karboksilne i fosfonatne grupe koje se nalaze na površini MNC-a. Prisustvo funkcionalnih grupa na njihovoj površini omogućava elektrostatičko odbijanje između MNC-a i njihovu odličnu rasvorljivost i stabilnost u FR i HS. Kod  $^{90}\text{Y}$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNC-a je primećena aglomeracija na fiziološkom pH, dok  $^{90}\text{Y}$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 i  $^{90}\text{Y}$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNC ostaju stabilne bez vidljive aglomeracije više od 60 dana.

Na osnovu rezultata *in vitro* stabilnosti  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA-a u FR i HS nakon 72 h (82 i 79 %) može se zaključiti da  $^{90}\text{Y}$  ostaje vezan za MMSHA dovoljno dugo za mogućnu *in vivo* primenu, iako ne postoji dodatna funkcionalizacija površine mikrosfera u vidu odgovarajućih helatnih liganada (DTPA, EDTA, DOTA). Može se pretpostaviti da  $^{90}\text{Y}$  nije zakačen samo za površinu MMSHA već se nalazi i unutar njih, zakačen za slobodne karboksilne grupe citratnog ferrofluida. Takođe, *in vitro* stabilnost  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA u HS nakon 1 h (90 %) ukazuje na sporije odvajanje  $^{90}\text{Y}$  sa površine MMSHA, pa se može zaključiti da se on ne vezuje samo za njihovu površinu već je delom zarobljen i u HSA matriksu.

**Tabela 5.8:** *In vitro* stabilnost  $^{90}\text{Y}$ -MNC $\check{c}$ -a i  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA u fiziološkom rastvoru na 37 °C tokom 72 h

$^{90}\text{Y}$ -MNC $\check{c}$	Radiohemijska čistoća (%)				
	Vreme				
	0,5 h	1 h	24 h	48 h	72 h
$^{90}\text{Y}$ -Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> MNC $\check{c}$	92	87	85	84	81
$^{90}\text{Y}$ -Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -PEG600 MNC $\check{c}$	97	97	97	97	94
$^{90}\text{Y}$ -Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DPD MNC $\check{c}$	98	97	96	96	95
$^{90}\text{Y}$ -MMSHA	97	94	86	84	82

**Tabela 5.9:** *In vitro* stabilnost  $^{90}\text{Y}$ -MNC $\check{c}$ -a i  $^{90}\text{Y}$ -MMSHA u humanom serumu na 37 °C tokom 72 h

$^{90}\text{Y}$ -MNC $\check{c}$	Radiohemijska čistoća (%)				
	Vreme				
	0,5 h	1 h	24 h	48 h	72 h
$^{90}\text{Y}$ -Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> MNC $\check{c}$	91	84	82	80	79
$^{90}\text{Y}$ -Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -PEG600 MNC $\check{c}$	97	97	95	94	93
$^{90}\text{Y}$ -Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DPD MNC $\check{c}$	98	97	95	95	94
$^{90}\text{Y}$ -MMSHA	96	90	83	82	79

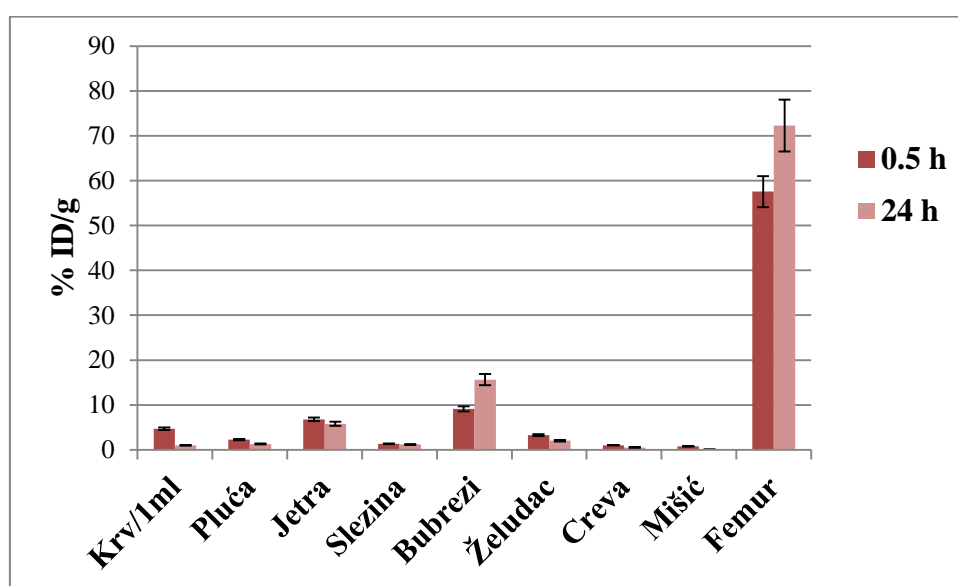
## 5.6. Biodistribucija $^{90}\text{Y}$ -MNC $\check{c}$ -a i $^{90}\text{Y}$ -MMSHA u Wistar pacovima

Mnoga istraživanja posebnu pažnju poklanjaju objašnjenju ponašanja MNC $\check{c}$ -a nakon ulaska u krvotok. U cirkulaciji čestice interaguju sa proteinima krvne plazme, što vodi ka njihovoj opsonizaciji. Činjenica je da se adsorpcija proteina povećava pri povećanju površinskog naelektrisanja, veličine čestica i hidrofobnosti. Osim toga, adsorbovanjem proteina povećava se fagocitoza čestica od strane ćelija retikuloendotelnog sistema – RES (deo imunog sistema), i njihovo odlaganje u RES organima (jetri, slezini i koštanoj srži) čime je sprečeno njihovo dopremanje krvotokom do ciljanih ćelija. Takođe, zbog velikog odnosa površine i zapremine kao i hidrofobnog karaktera, usled *van der Waals*-ovih interakcija između pojedinačnih MNC $\check{c}$ -a, one vrlo lako agregiraju. Iz gore navedenih razloga stabilizacija Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> MNC $\check{c}$  je ključna za njihovu biomedicinsku primenu radi postizanja stabilnosti koloidnih suspenzija MNC $\check{c}$ -a i njihovog dužeg zadržavanja u cirkulaciji.



Biodistribucija nanočestica nakon injektiranja je pod velikim uticajem interakcija čestica sa biološkom sredinom i zavisi od fizičko-hemijskih svojstava čestica kao što su: veličina, površinsko naelektrisanje, morfologija, hidrofilnost itd. Među ovim faktorima, veličina čestica ima primarni značaj [180]. Čestice veće od 10  $\mu\text{m}$  se nakupljaju u plućima, dok se submikronske odstranjuju od strane RES-a pa se čestice veće od 100 nm najviše nakupljaju u jetri i slezini (0,2-3  $\mu\text{m}$ ), dok čestice manje od 30 nm imaju tendenciju nakupljanja u koštanoj srži [181, 182].

Podaci vezani za *in vivo* stabilnost i farmakokinetiku MNČ-a su dobijeni radiotraserskom metodom. Na slici 5.29 su prikazani rezultati biodistribucije  $^{90}\text{YCl}_3$  (izraženi u procentima injektirane doze po gramu tkiva) u zdravim Wistar pacovima, 30 min i 24 h nakon intravenskog (i.v.) injektiranja.  $^{90}\text{YCl}_3$  se vrlo brzo uklanja iz cirkulacije, a nakon 24 h ostaje samo 1 %. Najveće nakupljanje  $^{90}\text{YCl}_3$  je u jetri, bubrezima i kostima. Maksimalno nakupljanje je u jetri 24 h nakon i.v. injektiranja (5,80 % ID/g). To se može objasniti prisustvom koloidne forme  $\text{YCl}_3$  u krvi koju odmah preuzimaju fagocitne ćelije i prenose u jetru. Nakupljanje  $^{90}\text{Y}$  u bubrezima ukazuje na značajnu ulogu bubrega u eliminaciji katjona  $^{90}\text{Y}^{3+}$ . Očekivano nakupljanje  $^{90}\text{Y}$  je u kostima gde koncentracija raste tokom vremena: 57,56 % ID/g za prvih 30 min nakon intravenskog injektiranja i 72,26 % ID/g nakon 24 h, dok se smanjuje u ostalim organima. U tabeli 5.10 je su prikazani rezultati biodistribucije  $^{90}\text{YCl}_3$  u organima sa maksimalnom akumulacijom.

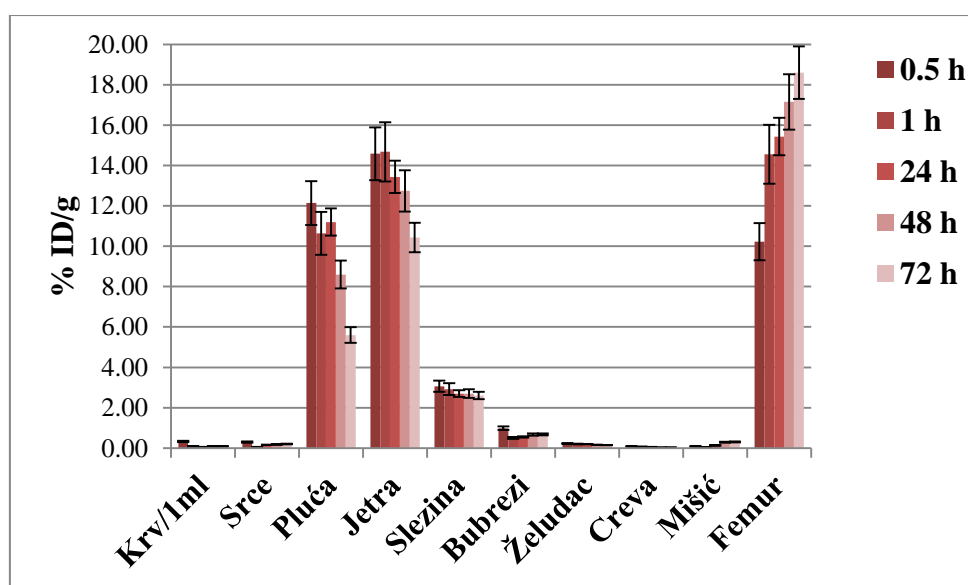


Slika 5.29: Biodistribucija  $^{90}\text{YCl}_3$  (% ID/g)

**Tabela 5.10: Biodistribucija  $^{90}\text{YCl}_3$  u organima sa najvećim nakupljanjem (% ID/g)**

Organ	% ID/g	
	Vreme	
	0,5 h	24 h
Jetra	6,80 ±0,75	5,80±0,45
Bubrezi	9,12±0,78	15,65±1,03
Femur	57,56±4,46	72,26±5,34

Biodistribucija  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4$  MNČ u zdravim Wistar pacovima prikazana je na slici 5.30. Sa grafika se može videti da se  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4$  MNČ najviše nakupljaju u jetri (14,58 % ID/g za prvih 30 min nakon intravenskog injektiranja i 10,43 % ID/g nakon 72 h) sa značajnim nakupljanjem i u plućima (12,14 % ID/g nakon 30 min i 5,35 % ID/g nakon 72 h). Njihovo nakupljanje u plućima može se objasniti veličinom čestica koje usled velikog odnosa površine i zapremine imaju tendenciju da se aglomerišu u mikrometarske aglomerate. Zbog hidrofobne površine najčešće bivaju zahvaćene od strane Kupferovih ćelija u jetri. Takođe, veliki odnos površine i zapremine kao i adsorpcija proteina iz plazme dovodi do brzog uklanjanja  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4$  MNČ-a iz cirkulacije (0,33 % ID/g nakon 0,5 h). U tabeli 5.11 je prikazana biodistribucija u organima sa maksimalnim nakupljanjem  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4$  MNČ-a.

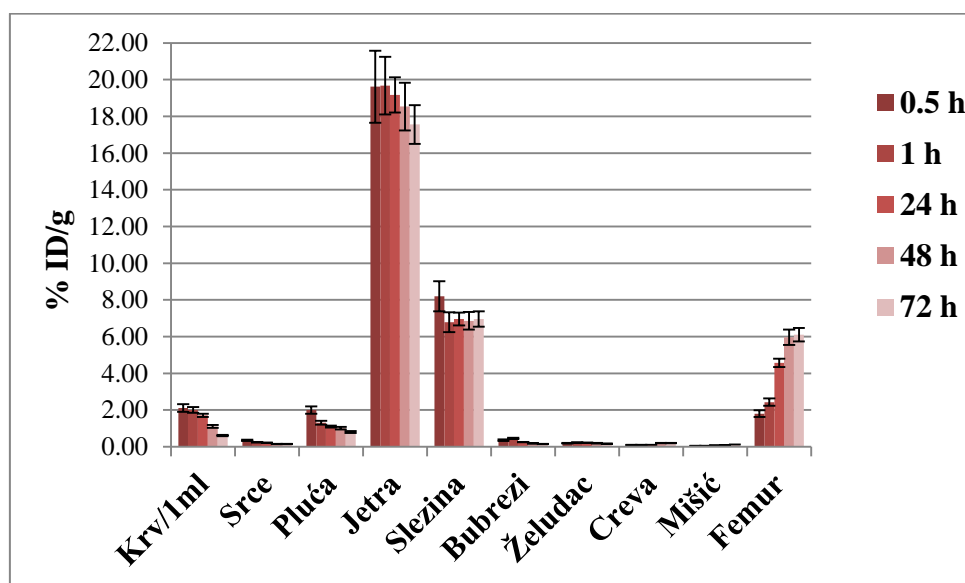


**Slika 5.30: Biodistribucija  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4$  (% ID/g)**

**Tabela 5.11: Biodistribucija  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4$  MNČ u organima sa najvećim nakupljanjem (% ID/g)**

Organ	% ID/g				
	Vreme				
	0,5 h	1 h	24 h	48 h	72 h
Pluća	12,14±0,96	10,64±0,95	11,20±1,02	8,60±0,80	5,60±0,48
Jetra	14,58±1,32	14,68±1,23	13,44±1,15	12,74±1,09	10,43±0,96
Slezina	3,06±0,25	2,92±0,19	2,70±0,21	2,70±0,19	2,60±0,22
Femur	10,23±0,96	14,56±1,32	15,43±1,46	17,15±1,65	18,6±1,78

Biodistribucija  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600}$  MNČ-a (slika 5.31) pokazuje da se one najviše nakupljaju u jetri (19,61 % ID/g nakon 30 min od injektiranja i 17,56 % ID/g nakon 72 h), zatim u slezini (8,20 % ID/g nakon 30 min i 6,96 % ID/g nakon 72 h) i u plućima (2,00 % ID/g nakon 30 min i 0,80 % ID/g nakon 72 h). Posebno treba istaći da ove MNČ pokazuju dugo vreme zadržavanja u jetri: 19,17 % ID/g nakon 24 h i 17,56 % ID/g nakon 72 h od i.v. injektiranja. Prisustvo hidrofilnog polimera PEG600 na površini MNČ-a sprečava njihovu aglomeraciju u mikrometarske čestice zbog čega je i značajno smanjeno nakupljanje u plućima u odnosu na  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4$  MNČ. Takođe, oblaganjem  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ-a polimerom produženo je vreme zadržavanja u krvi: 2,12 % ID/g u odnosu na 0,33 % ID/g za  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4$  MNČ nakon 0,5 h. U tabeli 5.12 je prikazana biodistribucija u organima sa najvećom akumulacijom  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600}$  MNČ.

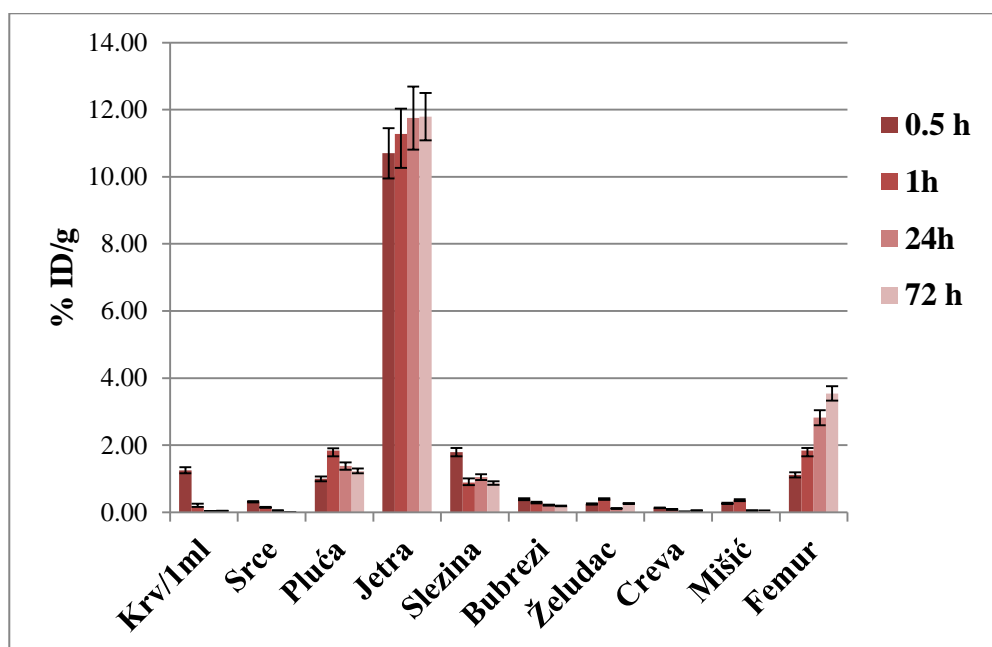


**Slika 5.31: Biodistribucija  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600}$  MNČ-a (% ID/g)**

**Tabela 5.12:** Biodistribucija  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600}$  MNČ u organima sa najvećim nakupljanjem (% ID/g)

Organ	% ID/g				
	Vreme				
	0,5 h	1 h	24 h	48 h	72 h
Pluća	2,00±0,16	1,30±0,12	1,10±0,09	1,00±0,08	0,80±0,07
Jetra	19,61±1,86	19,68±1,90	19,17±1,88	18,54±1,80	17,56±1,69
Slezina	8,20±0,79	6,78±0,65	6,96±0,60	6,86±0,61	6,96±0,59
Femur	1,80±0,14	2,43±0,21	4,56±0,38	5,96±0,55	6,10±0,56

Biodistribucija  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD}$  MNČ-a prikazana je na slici 5.32. Najveće nakupljanje  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD}$  MNČ-a je u jetri, 10,70 % ID/g nakon 30 min i 11,79 % ID/g, nakon 72 h od i.v. injektiranja. Oblaganjem  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ-a DPD ligandom produženo je vreme zadržavanja u krvi (1,25 % ID/g nakon 0,5 h) u odnosu na  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4$  MNČ (0,33 % ID/g nakon 0,5 h). Mali procenat radioaktivnosti u femuru nakon 72 h (3,54 % ID/g) ukazuje na slabo otpuštanje  $^{90}\text{Y}$  sa površine MNČ-a i njihovu dobru *in vivo* stabilnost. U tabeli 5.13 je prikazana biodistribucija u organima sa najvećom akumulacijom  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD}$  MNČ-a.

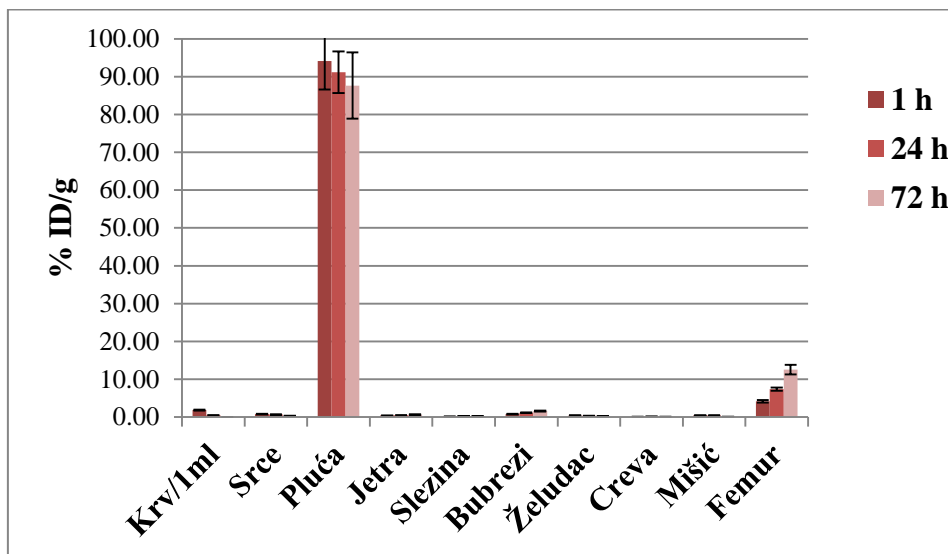


**Slika 5.31:** Biodistribucija  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD}$  MNČ-a (% ID/g)

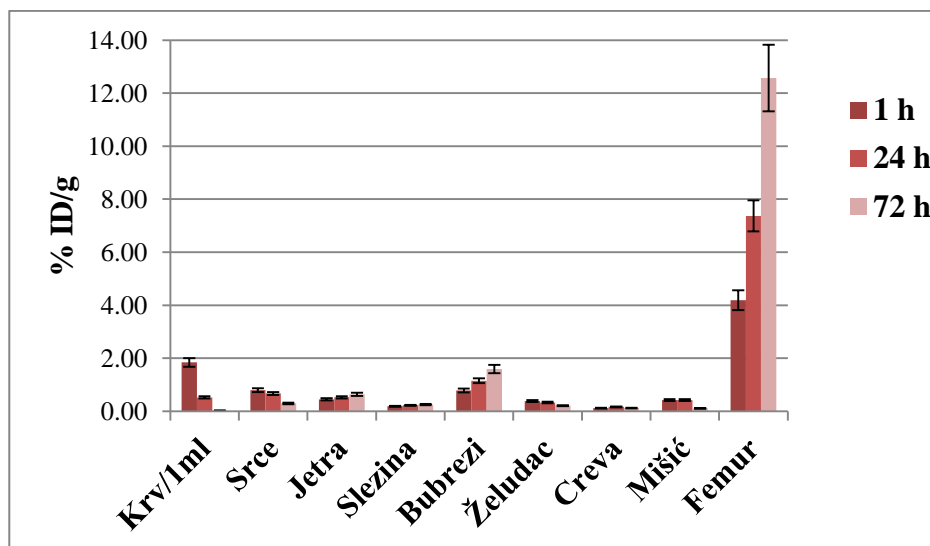
**Tabela 5.13:** Biodistribucija  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD MNČ}$  u organima sa najvećim nakupljanjem (% ID/g)

Organ	%ID/g			
	Vreme			
	0,5 h	1 h	24 h	72 h
Pluća	1,00±0,087	1,83±0,16	1,38±0,11	1,23±0,10
Jetra	10,70±0,098	11,28±1,10	11,75±1,12	11,79±1,13
Slezina	1,79±0,15	0,88±0,07	1,04±0,09	0,87±0,07
Femur	1,11±0,10	1,84±0,17	2,82±0,22	3,54±0,31

Najveće nakupljanje  $^{90}\text{Y-MMSHA}$  je u plućima, 94,13 % ID/g 1 h posle i.v. injektiranja (slika 5.33). Ovako visok stepen nakupljanja u plućima je zahvaljujući njihovoj veličini od 20  $\mu\text{m}$ . Poznato je da se mikrosfere humanog albumina (HSA MS) veličine 5-30  $\mu\text{m}$  većinom nakupljaju u plućima, nakon intravenske administracije i prolaska kroz pulmonarnu arteriju [183-185]. Na osnovu izmerene radioaktivnosti u plućima nakon određenog vremena (24 i 72 h) mogu se dobiti podaci za *in vivo* stabilnost  $^{90}\text{Y-MMSHA}$ . Rezultati biodistribucije u plućima nakon 72 h (87,64 % ID/g), ukazuju na zadovoljavajuću *in vivo* stabilnost  $^{90}\text{Y-MMSHA}$  koja je u saglasnosti sa *in vitro* rezultatima. Takođe, dokaz njihove *in vivo* stabilnosti je mali procenat radioaktivnosti u kostima (12,57 % ID/organ nakon 72 h) što ukazuje na slabo otpuštanje  $^{90}\text{Y}$  sa površine MMSHA. Rezultati biodistribucije  $^{90}\text{Y-MMSHA}$  nakon 1 h pokazuju mali procenat radioaktivnosti i u drugim organima (0,45 % ID/g jetra, 0,11 % ID/g creva, 0,78 % ID/g bubrezi i 0,19 % ID/g slezina) (slika 5.34). Dominatno nakupljanje  $^{90}\text{Y-MMSHA}$  u jednom organu, plućima, je u saglasnosti sa FESEM rezultatima na osnovu kojih je pokazano da većina čestica ima uniformnu veličinu  $\sim 20$   $\mu\text{m}$ . Pretpostavlja se da se nakon degradacije MMSHA, MNČ koje se nalaze unutar njih eliminišu preko bubrega (1,59 % ID/g nakon 72 h). U tabeli 5.14 prikazan je procenat injektirane doze po gramu tkiva u kojima je došlo do najvećeg nakupljanja  $^{90}\text{Y-MMSHA}$ -a.



Slika 5.33: Biodistribucija <sup>90</sup>Y-MMSHA u svim organima (% ID/g)



Slika 5.34: Biodistribucija u organima sa smanjenim nakupljanjem <sup>90</sup>Y-MMSHA (% ID/g)

Tabela 5.14: Biodistribucija <sup>90</sup>Y-MMSHA u organima sa najvećim nakupljanjem (% ID/g)

Organ	% ID/g		
	Vreme		
	1 h	24 h	72 h
Pluća	94,13±8,67	91,18±9,02	87,64±8,12
Jetra	0,45±0,03	0,53±0,05	0,64±0,05
Slezina	0,19±0,01	0,22±0,01	0,25±0,01
Femur	4,19±0,35	7,37±0,71	12,57±1,11

Različiti *in vivo* profil MNČ-a ukazuje na važnost funkcionalizacije površine MNČ-a, u ovom slučaju sa polimerom PEG600 i ligandom DPD, koji poboljšavaju hidrofilitnost površine MNČ-a sprečavajući njihovu aglomeraciju. Takođe, funkcionalizacijom površine MNČ-a povećava se *in vivo* stabilnost, kao i duže vreme zadržavanja MNČ-a u jednom organu što je veoma bitno za upotrebu MNČ-a u terapijske svrhe. Stavljanjem MNČ-a u HSA matriks, nastaju MMSHA koje zahvaljujući svojoj veličini mogu da se koriste za lokalnu radionuklidnu terapiju različitih vrsta tumora.

## 6. ZAKLJUČAK

- Za sintezu MNČ-a na bazi  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  korišćene su dve metode sinteze, taloženje iz rastvora i oksidaciona hidroliza, sa ciljem dobijanja MNČ-a različitih oblika, morfologije i magnetnih osobina. Najveću vrednost  $M_S$ , 73 emu/g, imaju  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  oh MNČ koje su oktagonalnog oblika i veličine 80 nm. Vrednosti  $M_S$  za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  th sfernog oblika i veličine 10 nm i  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ts oblika kvadra i veličine 6 nm su 62 emu/g i 47 emu/g, redom.
- Oblaganjem MNČ-a jedinjenjima različitim po strukturi i hemijskom sastavu sintetisane su biokompatibilne MNČ koje mogu da se koriste *in vivo*. Takođe, smanjena je aglomeracija nanočestica i dobijene su stabilne koloidne suspenzije - ferofluidi.
- Različiti načini sinteze obloženih MNČ-a su uticali na njihove magnetne osobine, iz razloga što metod sinteze utiče na strukturne i mikrostrukturne osobine, a samim tim i na ostale fizičke osobine. Najbolje magnetne osobine imaju  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNČ sintetisane *in situ* taloženjem iz rastvora sa hloridima (70 emu/g) i sulfatima (59 emu/g), u poređenju sa  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD (42 emu/g) i  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA (25 emu/g) MNČ-a, čije oblaganje je urađeno nakon sinteze magnetita.
- Osim modifikacije površine  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ-a oblaganjem različitim jedinjenjima, urađena je i inkapsulacija MNČ-a u HSA matriks, pri čemu nastaju MMSHA prosečne veličine 20  $\mu\text{m}$ . Biodistribucija ovih čestica se zbog njihovih mikrometarskih veličina značajno razlikuje od biodistribucije MNČ-a veličine do 100 nm koje ulaze u njihov sastav. Zbog male količine inkapsuliranog magnetita u odnosu na količinu HSA, ove MMSHA imaju slabe magnetne osobine ( $M_S = 2$  emu/g).
- Prema poziciji refleksionih maksimuma i relativnih inteziteta na difraktogramima za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  th,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA MNČ i MMSHA, kao i po izrazito crnoj boji, može se zaključiti da su sintetisane nanočestice magnetiti.
- Hidrodinamički prečnici mereni DLS metodom (25 nm za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA, 29 nm za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD i 46 nm za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNČ) su veći u odnosu na veličinu čestica dobijenu TEM-om (11 nm za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA, 6 nm za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD i 10 nm za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -



PEG600 MNČ), jer se uzima u obzir i dodato jedinjenje za oblaganje MNČ-a. Ovi rezultati dokazuju da su MNČ obložene datim jedinjenjima.

- Uspešno oblaganje tj. funkcionalizacija površine MNČ-a potvrđena je i metodama FTIC spektroskopije i termogravimetrijske analize. FTIC spektroskopijom je ispitana interakcija jedinjenja za oblaganje i  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ-a, dok je TGA analizom određena količina jedinjenja vezanog za površinu MNČ-a. Na osnovu položaja vibracionih traka karboksilne grupe koje se javljaju u FTIC spektrima CA i PEG600, kao i pomeranjima i smanjenjima intenziteta apsorpcije tih traka kod  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA i  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNČ-a, pretpostavlja se da dolazi do interakcije između atoma Fe na površini MNČ-a i karboksilnih grupa iz PEG600 i CA, tj. da se funkcionalizacija površine MNČ-a ovim jedinjenjima odigrava preko  $-\text{COOH}$  grupe. U FTIC spektru DPD, nalaze se trake karakteristične za prisustvo fosfonatnih i karboksilnih grupa. Poređenjem spektra DPD-a sa spektrom  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNČ-a, uočavaju se značajne promene u oblasti P-O istežućih vibracija, što ukazuje na snažnu interakciju fosfonatnih grupa sa  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  površinom, kao i na promene u oblasti istežućih vibracija COOH grupe kao dokaz vezivanja obe vrste funkcionalnih grupa iz DPD za MNČ. Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da se mehanizam interakcije ovih jedinjenja sa površinom MNČ-a razlikuje. CA i PEG600 se vezuju preko karboksilnih grupa, dok DPD koristi i karboksilne i fosfonatne grupe za vezivanje za površinu MNČ-a.
- Količina jedinjenja kojim su obložene MNČ značajno utiče na njihove magnetne osobine s obzirom da deblji nemagnetni sloj umanjuje udeo magnetita. Ukupni gubici mase, koji se odnose na količinu nemagnetnog sloja, dobijeni na osnovu TGA analize su 12 % za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 th, 12,5 % za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD, 49,4 % za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA i 93,8 % za MMSHA. Ovi rezultati su u saglasnosti sa dobijenim vrednostima za saturacionu magnetizaciju (70 emu/g za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 th, 42 emu/g za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD, 25 emu/g za  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -CA i 2 emu/g za MMSHA).
- Istraživanja vezana za magnetnu hipertermiju pokazuju da najbolju SPA vrednost imaju  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNČ (200 W/g), koja je najbliža vrednosti komercijalno dostupnih MNČ - MAGNO. Ostale sintetisane MNČ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNČ (76 W/g) i MMSHA-a (22 W/g) mogu se koristiti kao agensi za *in situ* magnetnu hipertermiju, ali niska vrednost specifične apsorpcije je nedovoljna za praktičnu *in vivo* primenu.

- Površinsko naelektrisanje MNČ-a određeno je merenjem  $\zeta$ -potencijala. Zahvaljujući prisustvu određenih funkcionalnim grupa na površini MNČ-a koje potiču od dodatih jedinjenja za oblaganje, MNČ imaju izrazito negativno naelektrisanu površinu na pH = 7 zbog čega su sintetisani ferrofluidi stabilni pri fiziološkim uslovima. Negativno naelektrisanje površine na pH = 5-6 je veoma povoljno radi njihovog daljeg obeležavanja radionuklidom  $^{90}\text{Y}$  koji se nalazi u obliku pozitivnog trovalentnog jona ( $^{90}\text{Y}^{3+}$ ). Visoki prinosi obeležavanja postignuti su kod  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600}$  (97,2 %) i  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD}$  MNČ-a (99,4 %) zahvaljujući prisustvu disusovanih karboksilnih ( $-\text{COO}^-$ ) i fosfonatnih grupa ( $\text{PO}_3^{2-}$ ) na njihovoj površini. Na osnovu prinosa obeležavanja (75,7 %) kod  $^{90}\text{Y-MMSHA}$  i njihove *in vitro* stabilnost u HS nakon 1 h (90 %) može se pretpostaviti da  $^{90}\text{Y}$  nije vezan samo za površinu MMSHA već se nalazi i unutar njih, vezan za slobodne karboksilne grupe citratnog ferrofluida, kao i da je delom zarobljen u HSA matriksu.
- Najbolju *in vitro* stabilnost u humanom serumu nakon 72 h imaju  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD}$  MNČ (95 %) i  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600}$  MNČ (93 %), usled vezivanja  $^{90}\text{Y}^{3+}$  za negativno naelektrisane karboksilne i fosfonatne grupe koje se nalaze na njihovoj površini.  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4$  MNČ pokazuju najmanju stabilnost (79 %).
- Odgovarajuća hemija omotača na površini MNČ-a utiče na adsorpciju proteina, veličinu, oblik i naelektrisanje obloženih MNČ-a, pa samim tim i na *in vivo* distribuciju. Osnovni razlog različite biodistribucije MNČ-a i MMSHA-a je razlika u veličini čestica.  $^{90}\text{Y-MMSHA}$  pokazuju visok stepen nakupljanja u plućima (94,13 %ID/g nakon 1 h) zahvaljujući veličini od 20  $\mu\text{m}$ , dok  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4$ ,  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD}$  i  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600}$  MNČ se najviše nakupljaju u jetri (14,68 %ID/g, 11,28 %ID/g i 19,68 %ID/g nakon 1 h).  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4$  MNČ pokazuju i značajno nakupljanje u plućima (10,64 %ID/g nakon 1 h) jer zbog velikog odnosa površine i zapremine imaju tendenciju da se aglomerišu i stvaraju mikrometarske aglomerate. Funkcionalizacijom površine MNČ-a povećava se *in vivo* stabilnost, kao i duže vreme zadržavanja datih MNČ-a u jednom organu što je veoma bitno za upotrebu MNČ-a u terapijske svrhe.
- Dokaz *in vivo* stabilnosti radioobeleženih MNČ-a je mali procenat radioaktivnosti u femuru: kod  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4\text{-PEG600}$  (6,10 %ID/g nakon 72 h) i  $^{90}\text{Y-Fe}_3\text{O}_4\text{-DPD}$  MNČ-a (3,54 %ID/g nakon 72 h), što ukazuje na slabo otpuštanje  $^{90}\text{Y}$  sa površine MNČ-a

- pa samim tim i oštećenje okolnog tkiva bi bilo neznatno. Najmanje stabilne su  $^{90}\text{Y}$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$  MNČ sa najvećim otpuštanjem  $^{90}\text{Y}$  u toku vremena (18,6 %ID/g nakon 72 h).
- Visoki prinosi obeležavanja i zadovoljavajuća *in vivo* stabilnost  $^{90}\text{Y}$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 i  $^{90}\text{Y}$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -DPD MNČ-a ukazuju na mogućnost njihove primene u radionuklidnoj terapiji tumora. Pored toga,  $^{90}\text{Y}$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -PEG600 MNČ imaju najveću SPA vrednost što ukazuje na njihov značajan potencijal u kombinovanoj hipertermijsko-radionuklidnoj terapiji tumora.

## 7. LITERATURA

- [1] A. Mitra, A. Nan, B. R. Line, H. Ghandehari, Nanocarriers for nuclear imaging and radiotherapy of cancer, *Curr. Pharm. Des.* 12(36) (2006) 4729-4749.
- [2] M. Shinkai, Functional magnetic particles for medical application, *J. Biosci. Bioeng.* 94(6) (2002) 606-613.
- [3] P. K. Sneed, B. Stea, Thermoradiotherapy and thermochemotherapy, M. H. Seegenschmiedt, P. Fessenden, C. C. Veron (Eds.), Springer, Berlin, 1996.
- [4] U. O. Hafeli, Radiolabeled and Magnetic Particulates in: *Medicine and Biology*, Citrus Books, London, 2001.
- [5] Industrial application of nanomaterials-chances and risk, W. Luther (Ed.), *Future Technologies Division*, Dusseldorf, 54, 2004.
- [6] M. A. Kastner, Artificial Atoms, *Phys. Today* 46 (1993) 24.
- [7] R. Zboril, M. Mashlan, D. Petridis, Iron(III) Oxides from Thermal Processes-Synthesis, Structural and Magnetic Properties, Mössbauer Spectroscopy Characterization, and Applications, *Chem. Mater.* 14 (2002) 969-982.
- [8] P. Tartaj, M. del Puerto Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. Gonzales-Carreno, C. J. Serna, The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 (2003) R182-R197.
- [9] C. Riggio, M. P. Calatayud, C. Hoskins, J. Pinkernelle, B. Sanz, T. E. Torres, M. R. Ibarra, L. Wang, G. Keilhoff, G. F. Goya, V. Raffa, A. Cuschieri, Poly-l-lysine-coated magnetic nanoparticles as intracellular actuators for neural guidance, *Int. J. Nanomed.* 7 (2012) 3155-3166.
- [10] R. R. Baker, J. G. Mather, J. H. Kennaugh, Magnetic bones in human sinuses, *Nature* 301 (1983) 79-80.
- [11] Y. Sahoo, A. Goodarzi, M. T. Swihart, T. Y. Ohulchansky, N. Kaur, E. P. Furlani, P. N. Prasad, Aqueous ferrofluid of magnetite nanoparticles: fluorescence labelling and magnetophoretic control, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 3879-3885.
- [12] M. A. Gonzalez-Fernandez, T. E. Torres, M. Andres-Verges, R. Costo, P. de la Presa, C. J. Serna, M. R. Morales, C. Marquina, M. R. Ibarra, G. F. Goya, Magnetic Nanoparticles for Power Absorption: optimizing size, shape and magnetic properties, *J. Solid State Chem.* 182 (2009) 2779-2784.
- [13] I. Marcos-Campos, L. Asin, T. E. Torres, C. Marquina, A. Tres, M. R. Ibarra, G. F. Goya, Cell death induced by the application of alternating magnetic fields to nanoparticle-loaded dendritic cells, *Nanotechnology* 22 (2011) 205101.

- [14] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 (2003) R167-R181.
- [15] A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, H. Fahling, R. Felix, Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles, *J. Magn. Magn. Mater.* 201 (1999) 413-419.
- [16] K. Overgaard, J. Overgaard, Investigations on the possibility of a thermic tumor therapy: II. Action of combined heat-roentgen treatment on a transplanted mouse mammary carcinoma, *Eur. J. Cancer* 8 (1972) 65-78.
- [17] P. Moroz, S. K. Jones, B. N. Gray, Status of hyperthermia in the treatment of advanced liver cancer, *J. Surg. Oncol.* 77 (2001) 259-269.
- [18] A. J. Giustini, A. A. Petryk, S. M. Cassim, J. A. Tate, I. Baker, P. J. Hoopes, Magnetic nanoparticle hyperthermia in cancer treatment, *Nano Life* 1 (2010) 1-23.
- [19] R. K. Gilchrist, R. Medal, W. D. Shorey, R. C. Hanselman, J. C. Parrott, C. B. Taylor, Selective Inductive Heating of Lymph Nodes, *Ann. Surg.* 146(4) (1957) 596-606.
- [20] P. I. Soares, I. M. Ferreira, R. A. Igreja, C. M. Novo, J. P. Borges, Application of hyperthermia for cancer treatment: recent patents review, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* 7(1) (2012) 64-73.
- [21] V. R. Sinha, V. Goyel, A. Trehan, Radioactive microspheres in therapeutics, *Pharmazie*, 59 (2004) 419-426.
- [22] J. H. Muller, P. H. Rossier, A new method for the treatment of cancer of the lungs by means of artificial radioactivity, *Acta Radiol.* 35 (1951) 449-468.
- [23] S. A. Gulec, Y. Fong, Yttrium 90 microsphere selective internal radiation treatment of hepatic colorectal metastases, *Arch. Surg.* 142(7) (2007) 675-682.
- [24] J. E. Dancy, F. A. Shepherd, K. Paul, K. W. Sniderman, S. Houle, J. Gabrys, A. L. Hendler, J. E. Goin, Treatment of nonresectable hepatocellular carcinoma with intrahepatic <sup>90</sup>Y-microspheres, *J. Nucl. Med.* 41 (2000) 1673-1681.
- [25] I. M. Ariel, G. T. Pack, Treatment of inoperable cancer of the liver by intra-arterial radioactive isotopes and chemotherapy, *Cancer* 20(5) (1967) 793-804.
- [26] B. Lambert, C. Van de Wiele, Treatment of hepatocellular carcinoma by means of radiopharmaceuticals, *Eur. J. Nucl. Mol. Imaging* 32 (2005) 980-989.
- [27] V. Schafer, H. Briesen, H. Rubsamen-Waigman, A. M. Steffan, C. Royer, J. Kreuter, Phagocytosis and degradation of human serum albumin microspheres and nanoparticles in human macrophages, *J. Microencapsul.* 11 (1994) 261-269.

- [28] H. C. Ni, C. Y. Yu, S. J. Chen, L. C. Chen, C. H. Lin, W. C. Lee, C. H. Chuang, C. L. Ho, C. H. Chang, T. W. Lee, Preparation and imaging of rhenium-188 labeled human serum albumin microsphere in orthotopic hepatoma, *Appl. Radiat. Isot.* 99 (2015) 117-121.
- [29] B. A. Rhodes, H. S. Stern, J. A. Buchanan, I. Zolle, H. N. Jr. Wagner, Lung scanning with <sup>99m</sup>Tc-microspheres, *Radiology* 99 (1971) 613-621.
- [30] G. Wunderlich, H. Hartmann, M. Andreeff, J. Kotzerke, A semi-automated system for concentration of rhenium-188 for radiopharmaceutical applications, *Appl. Radiat. Isot.* 66 (2008) 1876-1880.
- [31] J. Cao, Y. Wang, J. Yu, J. Xia, C. Zhang, D. Yin, U. O. Hafeli, Preparation and radiolabeling of surface-modified magnetic nanoparticles with rhenium-188 for magnetic targeted radiotherapy, *J. Magn. Magn. Mater.* 277 (2004) 165-174.
- [32] Z. Chunfu, C. Jinquan, Y. Duanzhi, W. Yongxian, F. Yanlin, T. Jiaju, Preparation and radiolabeling of human serum albumin (HSA)-coated magnetite nanoparticles for magnetically targeted therapy, *Appl. Radiat. Isot.* 61 (2004) 1255-1259.
- [33] C. Zhang, H. Sun, J. Xia, J. Yu, S. Yao, D. Yin, Y. Wang, Synthesis of polyacrylamide modified magnetic nanoparticles and radiolabeling with <sup>188</sup>Re for magnetically targeted radiotherapy, *J. Magn. Magn. Mater.* 293 (2005) 193-198.
- [34] V. K. Varadan, L. Chen, J. Xie, *Nanomedicine: Design and Applications of Magnetic Nanomaterials, Nanosensors and Nanosystems*, John Wiley & Sons, Ltd, United Kingdom, 2008.
- [35] P. Wust, B. Hildebrandt, G. Sreenivasa, B. Rau, J. Gellermann, H. Riess, R. Felix, P. M. Schlag, Hyperthermia in combined treatment of cancer, *Lancet Oncol.*, 3 (2002) 487-497.
- [36] W. Rao, Z. S. Deng, J. Liu, A review of hyperthermia combined with radiotherapy/chemotherapy on malignant tumors, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 38(1) (2010) 101-116.
- [37] K. G. Hofer, Hyperthermia and cancer, *Eur. Cell. Mater.* 3(2) (2002) 67-69.
- [38] P. Tartaj, M. P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. Gonzales-Carreno, C. J. Serna, Synthesis, properties and biomedical applications of magnetic nanoparticles in; *Handbook of Magnetic Materials*, K. H. J. Buschow (Ed.), Elsevier Science, 9, 2006.
- [39] A. K. Gupta, M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials* 26 (2005) 3997-4001.
- [40] I. Abarkan, T. Doussineau, M. Smaïhi, Tailored microstructural properties of colloidal silica nanoparticles via microemulsion preparation, *Polyhedron* 25 (2006) 1763-1770.

- [41] S. F. Chin, S. C. Pang, C. H. Tan, Green Synthesis of Magnetite Nanoparticles (via Thermal Decomposition Method) with Controllable Size and Shape, *J. Mater. Environ. Sci.* 3 (2011) 299-302.
- [42] J. Park, K. An, Y. Hwang, J. G. Park, H. J. Noh, J. Y. Kim, J. H. Park, N. M. Hwang, T. Hyeon, Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals, *Nat. Mater.* 3 (2004) 891-895.
- [43] L. L. Hench, J. K. West, The Sol-Gel Process, *Chem. Rev.* 90 (1990) 33-72.
- [44] H. Itoh, S. Utamapanya, J. V. Stark, K. J. Klabunde, J. R. Schlup, Nanoscale Metal Oxide Particles as Chemical Reagents. Intrinsic Effects of Particle Size on Hydroxyl Content and on Reactivity and Acid/Base Properties of Ultrafine Magnesium Oxide, *Chem. Mater.* 5 (1993) 71-77.
- [45] E. Matijević, Uniform Inorganic Colloid Dispersions. Achievements and Challenges, *Langmuir* 10 (1994) 8-16.
- [46] B. Ginzberg, S. A. Bilmes, Titania sols and gels synthesized from reverse micelles, *Progr. Colloid Polym. Sci.* 102 (1996) 51-56.
- [47] A. Demortiere, P. Panissod, B. P. Pichon, G. Pourroy, D. Guillon, B. Donnio, S. Begin-Colin, Size-dependent properties of magnetic iron oxide nanocrystals, *Nanoscale* 3 (2011) 225-232.
- [48] R. Massart, Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media, *IEEE Trans. Magn.* 17 (1981) 1247-1248.
- [49] E. V. Gopalan, K. A. Malini, S. Saravanan, D. S. Kumar, Y. Yoshida, M. R. Anantharaman, Evidence for polaron conduction in nanostructured manganese ferrite, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 41 (2008) 185005.
- [50] R. M. Cornell, U. Schwertmann, *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2000, 55-60.
- [51] J.-P. Jolivet, *Metal Oxide Chemistry and Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 2000.
- [52] R. Boistelle, J. P. Astier, Crystallization Mechanisms in Solutions, *J. Cryst. Growth* 90 (1988) 14-30.
- [53] V. Srdic, *Procesiranje novih keramickih materijala*, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, 2004.
- [54] M. Andres Verges, R. Costo, A. G. Roca, J. F. Marco, G.F. Goya, C. J. Serna, M. P. Morales, Uniform and water stable magnetite nanoparticles with diameters around the monodomain-multidomain limit, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 41 (2008) 134003.

- [55] T. Sugimoto, E. Matijević, Formation of uniform spherical magnetite particles by crystallization from ferrous hydroxide gels, *J. Colloid Interf. Sci.* 74 (1) (1980) 227-243.
- [56] H. Zhao, J. Gagnon, U. O. Häfeli, Process and formulation variables in the preparation of injectable and biodegradable magnetic microspheres, *Biomagn. Res. Technol.* 5 (2007) 1-11.
- [57] R. A. Frimpong, J. Dou, M. Pechan, J. Z. Hilt, Enhancing remote controlled heating characteristics in hydrophilic magnetite nanoparticles via facile co-precipitation, *J. Magn. Magn. Mater.* 322(3) (2010) 326-331.
- [58] W. Agarwal, M. Bajpai, Stability issues related to nanosuspensions: a review, *Pharm. Nanotechnol.* 1(2) (2013) 85-92.
- [59] N. Mizutani, T. Iwasaki, S. Watano, T. Yanagida, T. Kawai, Size control of magnetite nanoparticles in hydrothermal synthesis by coexistence of lactate and sulfate ions, *Curr. Appl. Phys.* 10 (2010) 801-806.
- [60] F. Caruso, Nanoengineering of Particle Surfaces, *Adv. Mater.* 13 (2001) 11-22.
- [61] A. Gual, C. Godard, S. Castellón, C. Claver, Soluble transition-metal nanoparticles-catalysed hydrogenation of arenes, *Dalton Trans.* 39 (2010) 11499-11512.
- [62] F. Yan, H. Xu, J. Anker, R. Kopelman, B. Ross, A. Rehemtulla, R. Reddy, Synthesis and characterization of silica-embedded iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 4(1-2) (2004) 72-76.
- [63] Y. Lalatonne, C. Paris, J. M. Serfaty, P. Weinmann, M. Lecouvey, L. Motte, Bisphosphonates–ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a platform towards diagnosis and therapy, *Chem. Commun.* 22 (2008) 2553-2555.
- [64] Y. Sahoo, H. Pizem, T. Fried, D. Golodnitsky, L. Burstein, C. N. Sukenik, G. Markovich, Alkyl Phosphonate/Phosphate Coating on Magnetite Nanoparticles: A Comparison with Fatty Acids, *Langmuir* 17(25) (2001) 7907-7911.
- [65] N. Kohler, G. E. Fryxell, M. Zhang, A Bifunctional Poly(ethylene glycol) Silane Immobilized on Metallic Oxide-Based Nanoparticles for Conjugation with Cell Targeting Agents, *J. Am. Chem. Soc.* 126(23) (2004) 7206-7211.
- [66] S. Chen, Y. Li, C. Guo, J. Wang, J. Ma, X. Liang, L. R. Yang, H. Z. Liu, Temperature-responsive magnetite/PEO-PPO-PEO block copolymer nanoparticles for controlled drug targeting delivery, *Langmuir* 23 (2007) 12669-12676.
- [67] Z. G. Peng, K. Hidajat, M. S. Uddin, Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles, *J. Colloid Interf. Sci.* 271(2) (2004) 277-283.



- [68] A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, H. Schirra, T. Schiestel, H. Schmidt, R. Felix, Endocytosis of dextran and silan-coated magnetite nanoparticles and effect of intracellular hyperthermia on human mammary carcinoma cells in vitro, *J. Magn. Mater.* 194(1-3) (1999) 185-196.
- [69] S. Nigam, K. C. Barick, D. Bahadur, Development of citrate-stabilized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications, *J. Magn. Mater.* 323 (2011) 237-243.
- [70] A. Bee, R. Massart, S. Neveu, Synthesis of very fine maghemite particles, *J. Magn. Mater.* 149 (1995) 6-9.
- [71] P. C. Morais, R. L. Santos, A. C. M. Pimenta, R. B. Azevedo, E. C. D. Lima, Preparation and characterization of ultra-stable biocompatible magnetic fluids using citrate-coated cobalt ferrite nanoparticles, *Thin Solid Films* 515 (2006) 266-270.
- [72] L. Li, K. Y. Mak, C. W. Leung, K. Y. Chan, W. K. Chan, W. Zhong, P. W. T. Pong, Effect of Synthesis Conditions on the Properties of Citric-Acid Coated Iron Oxide Nanoparticles, *Microelectron. Eng.* 110 (2013) 329-334.
- [73] M. E. De Sousa, M. B. F. van Raap, P. C. Rivas, P. M. Zélis, P. Girardin, G. A. Pasquevich, J. L. Alessandrini, D. Muraca, F. H. Sánchez, Stability and Relaxation Mechanisms of Citric Acid Coated Magnetite Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia, *J. Phys. Chem. C* 117 (2013) 5436-5445.
- [74] D. Portet, B. Denizot, E. Rump, J. J. Lejeune, P. Jallet, Nonpolymeric coatings of iron oxide colloids for biological use as magnetic resonance imaging contrast agents, *J. Colloid Interf. Sci.* 238(1) (2001) 37-42.
- [75] P. J. Hotchkiss, The design, synthesis, and use of phosphonic acids for the surface modification of metal oxides, Doctoral thesis, Georgia Institute of Technology, 2008.
- [76] F. Brodard-Severac, G. Geurrero, J. Maquet, P. Florian, C. Gervais, P. H. Mutin, High-field <sup>17</sup>O MAS NMR investigation of phosphonic acid monolayers on titania, *Chem. Mater.* 20 (2008) 5191-5196.
- [77] C. Fang, N. Bhattarai, C. Sun, M. Zhang, Functionalized nanoparticles with long-term stability in biological media, *Small* 5 (2009) 1637-1641.
- [78] S. Gill, E. Castro, J. F. Mano, Synthesis and characterization of stable dicarboxylic pegylated magnetite nanoparticles, *Mater. Lett.* 100 (2013) 266-270.
- [79] H. Lee, E. Lee, D. K. Kim, N. K. Jang, Y. Y. Jeong, S. Jon, Antibiofouling polymer-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as potential magnetic resonance contrast agents for in vivo cancer imaging, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 7383-7389.

- [80] Z. Li, L. Wei, M. Y. Gao, H. Lei, One-pot reaction to synthesize biocompatible magnetite nanoparticles, *Adv. Mater.* 17(8) (2005) 1001–1005.
- [81] I. Zolle, B. A. Rhodes, H. N. Wagner, Preparation of metabolizable radioactive human serum albumin microspheres for studies of the circulation, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 21 (1970) 155-167.
- [82] V. Schafer, H. von Briesen, H. Rubsamen-Waigman, A. M. Steffan, C. Royer, J. Kreuter, Phagocytosis and degradation of human serum albumin microspheres and nanoparticles in human macrophages, *J. Microencapsul.* 11 (1994) 261-269.
- [83] H. C. Ni, C. Y. Yu, S. J. Chen, L. C. Chen, C. H. Lin, W. C. Lee, C. H. Chuang, C. L. Ho, C. H. Chang, T. W. Lee, Preparation and imaging of rhenium-188 labeled human serum albumin microsphere in orthotopic hepatoma, *Appl. Radiat. Isot.* 99 (2015) 117-121.
- [84] G. I. Epifanov, *Solid State Physics*, Mir Publisher, Moscow, 1979.
- [85] R. C. O'Handley, *Modern Magnetic Materials: Principles and Applications*, J. Wiley and Sons, New York, 2000.
- [86] D. M. Petrović, S. R. Lukić, *Eksperimentalna fizika kondenzovane materije*, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 2000.
- [87] C. Kittel, *Uvod u fiziku čvrstog stanja*, Savremena administracija, Beograd, 1970.
- [88] Nada Čitaković, *Sinteza, morfologija, mikrostruktura i magnetne osobine nanočestičnog hematita*, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Fizički fakultet, 2012.
- [89] J. Dojčilović, *Fizika čvrstog stanja*, Univerziteta u Beogradu, Fizički fakultet, Beograd, 2007.
- [90] C. Caizer, I. Hrianca, Dynamic magnetization of  $\gamma$ - nanoparticles isolated in an amorphous matrix, *Eur. Phys. J. B* 31 (2003) 391-400.
- [91] *Magnetic properties of fine particles*, J. L. Dormann, D. Fiorani (Eds.), North-Holland, Amsterdam, 1992.
- [92] *Nanoscale Materials in Chemistry*, K. J. Klabunde, R. M. Richards (Eds.), Wiley-Interscience, New York, 2001.
- [93] S. Bedanta, W. Kleemann, Supermagnetism, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 42 (2009) 013001.
- [94] W. A. de Heer, *Nanomagnetism in: Characterisation of Nanophase Materials*, Z. L. Wang (Ed.), Wiley-VCH, Weinheim, 2000.

- [95] J. L. Dormann, D. Fiorani, E. Tronc, Magnetic relaxation in fine-particle systems, *Adv. Chem. Phys.* 98 (1997) 283–494.
- [96] D. Kechrakos, Magnetic Nanoparticle Assemblies, *Handbook of Nanophysics*, K. Sattler (Ed.), Taylor&Francis, 3(22), 2010.
- [97] P. Jönsson, Anisotropy, disorder and frustration in magnetic nanoparticle systems and spin glasses, *Acta Universitatis Upsaliensis*, Uppsala, 2002.
- [98] B. D. Plouffe, S. K. Murthy, L. H. Lewis, Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: A review, *Rep. Prog. Phys.* 78 (2015) 016601 (38pp).
- [99] S. Rakić, D. Lazar, Ž. Cvejić, A. Kapor, *Osnove rendgenostrukturne analize monokristala i polikristalnih prahova*, Novi Sad, 2013.
- [100] A. Guinier, *X-ray Diffraction*, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1963.
- [101] S. Mentus, U. Mioč, *Odabrane metode fizičko-hemijske analize*, Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju, 1993.
- [102] *Principles of Thermal Analysis and Calorimetry*, P. J. Haines (Ed.), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2002.
- [103] Zetasizer Nano Series User Manual, Malvern Instruments Ltd., 2004 ([http://www.biozentrum.unibas.ch/fileadmin/redaktion/Forschung/Research\\_Groups/BF/instruments/zetasizer\\_manual.pdf](http://www.biozentrum.unibas.ch/fileadmin/redaktion/Forschung/Research_Groups/BF/instruments/zetasizer_manual.pdf) (preuzeto 27.01.2017.))
- [104] R. Kleiner, D. Koelle, F. Ludwig, J. Clarke, Superconducting quantum interference devices: state of the art and applications, *P. IEEE* 90 (2004) 1534-1548.
- [105] R. Zboril, L. Machala, M. Mashlan, J. Tucek, R. Muller, O. Schneeweiss, Magnetism of amorphous Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopowders synthesized by solid-state reactions, *Phys. Stat. Sol.* 1(12) (2004) 3710-3716.
- [106] J. L. Dormann, D. Fiorani, R. Cherkaoui, E. Tronc, F. Lucari, F. D’Orazio, L. Spinu, M. Nogues, H. Kachkachi, J. P. Jolivet, From pure superparamagnetism to glass collective state in  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles assemblies, *J. Magn. Magn. Mater.* 203 (1999) 23-27.
- [107] *Relaxation phenomena: Liquid Crystals, Magnetic Systems, Polymers, High-Tc Superconductors, Metallic Glasses*, W. Haase, S. Wrobel (Eds.), Springer, Berlin, 2003.
- [108] C. S. Kumar, F. Mohammad, Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63(9) (2011) 789–808.

- [109] R. C. Cámara, Synthesis and characterization of ultrasmall iron oxide magnetic colloids for biomedical applications, Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Madrid, 2010.
- [110] A. G. Kolhatkar, A. C. Jamison, D. Litvinov, R. C. Willson, T. R. Lee, Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 15977-16009.
- [111] A. E. Deatsch, B. A. Evans, Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia, *J. Mag. Mag. Mat.* 354 (2014) 163–172.
- [112] E. Lima, T. E. Torres, L. M. Rossi, H. R. Rechenberg, T. S. Berquo, A. Ibarra, C. Marquina, M. R. Ibarra, G. F. Goya, Size Dependence of The Magnetic Relaxation and Specific Power Absorption in Iron Oxide Nanoparticles, *J. Nanopart. Res.* 15 (2013) 1654-1666.
- [113] G. F. Goya, V. Grazú, M. R. Ibarra, Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy, *Curr. Nanosci.* 4 (2008) 1-16.
- [114] R. Hergt, S. Dutz, R. Muller, M. Zeisberger, Magnetic Particle Hyperthermia: Nanoparticle Magnetism And Materials Development for Cancer Therapy, *J. Phys.: Condens. Matter* 18 (2006) 2919-2934.
- [115] <http://www.physics.wayne.edu/~glawes/biomedical.pdf> (preuzeto 17.01.2017.)
- [116] J. Vučina, R. Han, Primena radionuklida u terapiji, *Med. Pregl.* 54(5-6) (2001) 245-250.
- [117] D. T. Goodhead, Initial Events in the Cellular Effects of Ionizing Radiations: Clustered Damage in DNA, *Int. J. Radiat. Biol.* 65(1) (1994) 7-17.
- [118] M. Chinol, R. Franceschini, G. Paganelli, A. Pecorale, A. Paiano, Simple production of yttrium-90 in a chemical form suitable to clinical grade radioconjugates in: *Radioactive Isotopes in Clinical Medicine and Research XXII*, H. Bergmann, A. Kroiss, H. Sinzinger (Eds.), Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 1997, 327-332.
- [119] W. A. Volkert, W. F. Goeckeler, G. J. Ehrhardt, A. R. Ketring, Therapeutic radionuclides: production and decay property considerations, *J. Nucl. Med.* 32(1) (1991) 174-185.
- [120] D. V. Rao, R. W. Howell, Time-dose-fractionation in radioimmunotherapy: implications for selecting radionuclides, *J. Nucl. Med.* 34 (1993) 1801-1810.
- [121] G. Rowlinson-Busza, D. Snook, A. A. Epenetos, <sup>90</sup>Y-Labeled antibody uptake by human tumor xenografts and the effect of systemic administration of EDTA, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 28 (5) (1994) 1257-1265.

- [122] C.-H. Yeong, M. Cheng, K.-H. Ng, Review: Therapeutic radionuclides in nuclear medicine: current and future prospects, *Zhejiang Univ.-Sci. B (Biomed. Biotechnol.)* 15(10) (2014) 845-863.
- [123] O. A. Gansow, Newer approaches to the radiolabeling of monoclonal antibodies by use of metal chelates, *Nucl. Med. Biol.* 18 (1991) 369-381.
- [124] A. E. Martell, R. M. Smith, *Critical Stability Constants*, Springer Science, 5, 1982.
- [125] M. W. Sundberg, C. F. Meares, D. A. Goodwin, C. I. Diamanti, Selective binding of metal ions to macromolecules using bifunctional analogs of EDTA, *J. Med. Chem.* 17 (1974) 1304-1307.
- [126] S. M. Yeh, D. G. Sherman, C. F. Meares, A new route to "bifunctional" chelating agents: Conversion of aminoacids to analogues of ethylenedinitroltetraacetic acid, *Anal. Biochem.* 100 (1979) 152-159.
- [127] G. E. Krejcarek, K. L. Tucker, Covalent attachment of chelating groups to macromolecules, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77 (1977) 581-585.
- [128] S. J. Wagner, M. J. Welch, Gallium-68 labeling of albumin and albumin microspheres, *J. Nucl. Med.* 20 (1979) 428-433.
- [129] U. Häfeli, Radioactive microspheres for medical applications in: *Physics and Chemistry Basis of Biotechnology*, M. De Cuyper, J. W. M. Bulte (Eds.), Kluwer Academic Publishers, 2001, 213-248.
- [130] P. A. Schubiger, H. F. Beer, L. Geiger, H. Rosler, A. Zimmermann, J. Triller, D. Mettler, W. Schilt, <sup>90</sup>Y-resin particles—Animals experiments on pigs with regard to the introduction of superselective embolization therapy, *Nucl. Med. Biol.* 18(3) (1991) 205-311.
- [131] N. Vanlić-Razumenić, *Radiofarmaceutici: sinteza, osobine i primena*, Velarta, Beograd, 1998.
- [132] H. Vera-Ruiz, C. S. Marcus, H. H. Coenen, J. S. Fowler, G. J. Meyer, P. H. Kox, W. Vaalburg, R. Cantineau, F. Helus, R. M. Lambrecht, Report of an international atomic energy agency's advisory group meeting on Quality control of cyclotron-produced radiopharmaceuticals, *Nucl. Med. Biol.* 17 (1990) 445-456.
- [133] S. Potamianos, A. D. Varvarigou, S. C. Archimandritis, Radioimmunosintigraphy and radioimmunotherapy in cancer: Principles and application, *Anticancer Res.* 20 (2000) 925-948.
- [134] M. J. Pitkethly, Nanoparticles as Building Blocks?, *Mater. Today* 6(12) (2003) 36-42.

- [135] J. van der Zee, Heating the patient: a promising approach?, *Ann. Oncol.* 13 (2002) 1173-1184.
- [136] N. Vanlić-Razumenić, N. Vukićević, The synthesis and physico-chemical properties of 2,3-dicarboxypropane-1,1-diphosphonic acid, a ligand for preparing the <sup>99m</sup>Tc-labelled skeletal imaging agent, *J. Serb. Chem. Soc.* (1986) 5163-5166.
- [137] R. Massart, V. Cabuil, Effect of some parameters on the formation of colloidal magnetite in alkaline medium, *J. Chim. Phys.* 84 (1987) 967-973.
- [138] M. Radović, M. P. Calatayud, G. F. Goya, M. R. Ibarra, B. Antić, V. Spasojević, N. Nikolić, D. Janković, M. Mirković, S. Vranješ-Đurić, Preparation and in vivo evaluation of multifunctional <sup>90</sup>Y-labeled magnetic nanoparticles designed for cancer therapy, *J. Biomed. Mater. Res Part A* 103(1) (2015) 126-134.
- [139] M. Radović, S. Vranješ-Đurić, N. Nikolić, D. Janković, F. G. Goya, T. E. Torres, M. P. Calatayud, I. J. Bruvera, M. R. Ibarra, V. Spasojević, B. Jančar, B. Antić, Development and evaluation of <sup>90</sup>Y-labeled albumin microspheres loaded with magnetite nanoparticles for possible applications in cancer therapy, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 24017-24025.
- [140] <http://www.nbnanoscale.com/dm-100-series/> (preuzeto 17.01.2017.)
- [141] K. Kothari, M. R. Pillai, P. R. Unni, H. H. Shimpi, O. P. Noronha, A. M. Samuel, Preparation of [<sup>186</sup>Re]Re-DMSA and its bio-distribution studies, *Appl. Radiat. Isot.* 51 (1999) 43-49.
- [142] P. Decuzzi, R. Pasqualini, W. Arap, M. Ferrari, Intravascular delivery of particulate systems: does geometry really matter?, *Pharm. Res.* 26(1) (2009) 235-243.
- [143] M. Mahmoudi, A. Simchi, M. Imani, Recent advances in surface engineering of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *J. Iran. Chem. Soc.* 7(2) 2010 S1-S27.
- [144] S. Bucak, D. A. Jones, P. E. Laibinis, T. A. Hatton, Protein separations using colloidal magnetic nanoparticles, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 477-484.
- [145] A. Goodarzi, Y. Sahoo, M. T. Swihart, P. N. Prasad, Aqueous ferrofluid of citric acid coated magnetite particles, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 789(6) (2004) N6.6.1-N6.6.6.
- [146] E. Cheraghipour, S. Javadpour, A. R. Mehdizadeh, Citrate capped supermagnetic iron oxide nanoparticles used for hyperthermia therapy, *J. Biomed. Sci. Eng.* 5 (2012) 715-719.
- [147] L. A. Harris, J. D. Goff, A. Y. Carmichael, J. S. Riffle, J. J. Harburn, T. G. St. Pierre, M. Saunders, Magnetite nanoparticle dispersions stabilized with triblock copolymers, *Chem. Mater.* 15 (2003) 1367-1377.

- [148] A. Ulman, Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers, *Chem. Rev.* 96 (1996) 1533-1554.
- [149] H. Zhang, R. Wang, G. Zhang, B. Yang, A covalently attached film based on poly(methacrylic acid)-capped  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles, *Thin Solid Films* 429 (2003) 167-173.
- [150] Y.-F. Zhou, L.-R. Du, C. Zhou, T.-Y. Fan, Preparation and characterization of ferromagnetic fluids modified by carboxyl PEG, *J. Chin. Pharm. Sci.* 21 (2012) 50–56.
- [151] H. Iida, K. Takayanagi, T. Nakanishi, T. Osaka, Synthesis of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles with various sizes and magnetic properties by controlled hydrolysis, *J. Colloid Interf. Sci.* 314 (2007) 274-280.
- [152] P. Refait, J. M. R. Génin, The oxidation of ferrous hydroxide in chloride-containing aqueous-media and pourbaix diagrams of green rust one, *Corros. Sci.* 34 (1993) 797-819.
- [153] A. A. Olowe, J. M. R. Genin, The influence of concentration on the oxidation of ferrous hydroxide in acidic sulphated aqueous medium: Particle size analysis of lepidocrocite, *Corros. Sci.* 32 (1991) 1021-1028.
- [154] M. Tada, S. Hatanaka, H. Sanbonsugi, N. Matsushita, M. Abe, Method for synthesizing ferrite nanoparticles ~30 nm in diameter on neutral pH condition for biomedical applications, *J. Appl. Phys.* 93 (2003) 7566.
- [155] G. V. Patil, Biopolymer Albumin for Diagnosis and in Drug Delivery, *Drug Develop. Res.* 58 (2003) 219-247.
- [156] A. Vujačić, 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, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, 2013.*
- [157] H. Tan, J. M. Xue, B. Shuter, X. Li, J. Wang, Synthesis of PEOlated  $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$  nanoparticles via bioinspired silification for magnetic resonance imaging, *Adv. Funct. Mater.* 20 (2010) 722-731.
- [158] S. Yu, G. M. Chow, Carboxyl group ( $-\text{CO}_2\text{H}$ ) functionalized ferromagnetic iron oxide nanoparticles for potential bio-applications, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 2781-2786.
- [159] I. Kostić, Interakcija M(II) jona metala prelazne serije elemenata sa O-donor vezivnim mestima huminskih kiselina i njihovih model supstanci, *Doktorska disertacija, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za Hemiju, 2013.*

- [160] N. Kallay, E. Matijević, Adsorption at solid/solution interfaces 1. Interpretation of surface complexation of oxalic and citric acids with hematite, *Langmuir*, 1(2), 1985 195-201.
- [161] M. Răcuciu, D. E. Creangă, A. Airinei, Citric-acid-coated magnetite nanoparticles for biological applications, *Eur. Phys. J. E* 21 (2006) 117-121.
- [162] A. K. Gupta, S. Wells, Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies, *IEEE T. Nanobiosci.* 3(1) (2004) 66-73.
- [163] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B: Applications in Coordination, Organometallic and Bioinorganic Chemistry*, V izdanje, Wiley-Interscience, 1997.
- [164] F. Söderlind, H. Pedersen, R. M. Jr. Petoral, P. O. Käll, K. Uvdal, Synthesis and characterisation of Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocrystals functionalised by organic acids, *J. Colloid Interf. Sci.*, 288(1) (2005) 140-148.
- [165] M. Sundrarajan, M. Ramalakshmi, Novel Cubic Magnetite Nanoparticle Synthesis Using Room Temperature Ionic Liquid, *E-J. Chem.* 9(3) (2012) 1070-1076.
- [166] L. C. Thomas, *The Identification of Functional Groups in Organophosphorus Compounds*, New York: Academic Press, 1974.
- [167] R. D. Peacock, The intensities of lanthanide f-f transitions, *Struct. Bond.* 22 (1975) 83-122.
- [168] E. Podstawka, R. Borszowska, M. Grabowska, M. Drąg, P. Kafarski, L. M. Proniewicz, Investigation of molecular structures and adsorption mechanisms of phosphonodipeptides by surface-enhanced Raman, Raman, and infrared spectroscopies, *Surf. Sci.* 599 (2005) 207-220.
- [169] F. S. Yen, W. C. Chen, J. M. Yang, C. T. Hong, Crystallite Size Variations of Nanosized Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Powders during  $\gamma$ - to  $\alpha$ - Phase Transformation, *Nano Lett.* 2 (2002) 245-252.
- [170] R. H. Kodama, Magnetic nanoparticles, *J. Magn. Magn. Mater.* 200 (1999) 359-372.
- [171] B. Martinez, X. Obradors, L. Balcells, A. Rouanet, C. Monty, Low Temperature Surface Spin-Glass Transition in  $\gamma$  - Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticles, *Phys. Rev. Lett.* 80 (1998) 181-184.
- [172] R. H. Kodama, A. E. Berkowitz, E. J. McNiff Jr., S. Foner, Surface Spin Disorder in NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles, *Phys. Rev. Lett.* 77 (1996) 394-397.



- [173] S. F. Si, C. H. Li, X. Wang, D. P. Yu, Q. Peng, Y. D. Li, Magnetic Monodisperse Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles, *Cryst. Growth Des.* 5 (2005) 391-393.
- [174] B. Feng, R. Y. Hong, L. S. Wang, L. Guo, H. Z. Li, J. Ding, Y. Zheng, D. G. Wei, Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/APTES/PEG diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging, *Colloid Surface A: Physicochem. Eng. Aspects* 328 (2008) 52-59.
- [175] T. J. Daou, J.-M. Greneche, S.-J. Lee, S. Lee, C. Lefevre, S. Begin-Colin, G. Pourroy, Spin Canting of Maghemite Studied by NMR and In-Field Mossbauer Spectrometry, *J. Phys. Chem. C* 114 (2010) 8794–8799.
- [176] <http://www.nbnanoscale.com/magno-magnetic-colloid/> (preuzeto 27.01.2017.)
- [177] M. Merodio, A. Arnedo, M. J. Renedo, J. M. Irache, Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties, *Eur. J. Pharm. Sci.* 12 (2001) 251-259.
- [178] X. Ming, K. Carver, L. Wu, Albumin-based nanoconjugates for targeted delivery of therapeutic oligonucleotides, *Biomaterials*, 34 (2013) 7939-7949.
- [179] E. Schiller, R. Bergmann, J. Pietzsch, B. Noll, A. Sterger, B. Johannsen, G. Wunderlich, H. J. Pietzsch, Yttrium-86-labelled human serum albumin microspheres: relation of surface structure with in vivo stability, *Nucl. Med. Biol.* 35 (2008) 227-232.
- [180] J. Tan, W. M. Saltzman, Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure, *Biomaterials* 25 (2004) 3593-3601.
- [181] D. Janković, T. Maksin, D. Đokić, S. Milonjić, N. Nikolić, M. Mirković, S. Vranješ-Đurić, Particle size analysis: <sup>90</sup>Y and <sup>99m</sup>Tc-labelled colloids, *J. Microsc.* 232(3) (2008) 601-604.
- [182] S. Jurisson, D. Berning, W. Jia, D. Ma, Coordination compounds in nuclear medicine, *Chem. Rev.* 93(3) (1993) 1137-1156.
- [183] S. Kuckelhaus, V. A. P. Garcia, L. M. Lacava, R. B. Azevedo, Z. G. M. Lacava, E. C. D. Lima, F. Figueiredo, A. C. Tedesco, P. C. Morais, Biological investigation of a citrate-coated cobalt–ferrite-based magnetic fluid, *J. Appl. Phys.* 93(10) 2003 6707-6708.
- [184] J. F. W. Nijsen, A. D. van het Schip, W. E. Hennink, D. W. Rook, P. P. van Rijk, J. M. H. de Klerk, Advances in Nuclear Oncology: Microspheres for Internal Radionuclide Therapy of Liver Tumours *Curr. Med. Chem.* 9 (2002) 73-82.
- [185] A. Delgado, I. Soriano, E. Sanchez, M. Oliva, C. Evora, Radiolabelled biodegradable microspheres for lung imaging, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 227-236.

## BIOGRAFIJA

Magdalena Radović (rođ. Lazarević) rođena je 03.09.1983. godine u Beogradu. Osnovnu i srednju medicinsku školu (smer farmaceutskog tehničara) je završila u Beogradu. Diplomirala je na Fakultetu za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu 03.04.2008. god. sa prosečnom ocenom tokom studiranja 8,77. Tema diplomskog rada bila je: “Termička stabilnost i kristalizacija amorfnе legure gvožđa  $\text{Fe}_{89,8}\text{Ni}_{1,5}\text{Si}_{5,2}\text{B}_3\text{C}_{0,5}$ ”. Diplomске akademske studije – master završila je 30.09.2009. god. na Fakultetu za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu sa prosečnom ocenom na master studijama 10 (deset). Tema master rada bila je: “Modifikacija uslova obeležavanja bioaktivnih jedinjenja izotopom  $^{131}\text{I}$  za primenu u nuklearnoj medicini i njihova karakterizacija”.

Od 01.05.2009. god. zaposlena je na Institutu za nuklearne nauke Vinča, u laboratoriji za radioizotope, gde radi na radnom mestu istraživač saradnik. Zadužena je za rad na proizvodnji i kontroli  $^{131}\text{I}$  obeleženih bioaktivnih jedinjenja. Naučno-istraživačka aktivnost Magdalene Radović usmerena je ka sintezi i fizičko-hemijskoj karakterizaciji magnetnih nanočestica, kao i optimizaciji uslova obeležavanja organskih liganada sa raznim radioizotopima za potrebe nuklearne medicine.

Magdalena Radović je bila učesnik na projektu Ministarstva nauke i zaštite životne sredine iz oblasti osnovnih istraživanja: ev. br. OI 142004: “Sinteza, karakterizacija i primena koloidnih disperzija neorganskih materijala nanometarskih veličina” u periodu 2009-2010. godine. Takođe je bila učesnik na Međunarodnom koordinisanom istraživačkom projektu sa Instituto de Nanociencia de Aragon iz Saragose, Španija: "Multifunctional magnetic nanoparticles for diagnosis and therapy in biomedicine, using MRI, PET and magnetic hyperthermia" u periodu 2010-2012. godine. Sada je učesnik na projektima Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije iz oblasti integralnih i interdisciplinarnih istraživanja: ev. br. III 45015 pod nazivom “Magnetni i radionuklidima obeleženi nanostrukturni materijali za primenu u medicini” i ev. br. III 43009 pod nazivom „Nove tehnologije za monitoring i zaštitu životnog okruženja od štetnih hemijskih supstanci i radijacionog opterećenja”. Učesnik je međunarodnog projekta: FP7-ERACHairs-PilotCall-2013, MAGBIOVIN — Strengthening of the MagBioVin Research and Innovation Team for Development of Novel Approaches for Tumour Therapy based on Nanostructured Materials (2014-2018. godine).

Autor ili koautor je 4 rada od čega su 3 publikovana u vrhunskim međunarodnim časopisima (kategorije M21), 1 u istaknutom međunarodnom časopisu (kategorije M22); 2 rada u časopisima nacionalnog značaja (M51 i M52), 9 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima (kategorije M33 i M34); 2 saopštenja na domaćim naučnim skupovima (kategorije M64); 1 poglavlja u knjizi istaknutog međunarodnog izdavača (kategorije M14).

**Prilog 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани-а Магдалена Радовић

број индекса 307/09

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

Магнетне наночестице на бази  $Fe_3O_4$  обележене радиоактивним итријумом за  
могућну примену у хипертермијско-радионуклидној терапији 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/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

Магдалена Радовић

У Београду, 03.02.2017.

**Prilog 2.**

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

Име и презиме аутора Магдалена Радовић

број индекса 307/09

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада Магнетне наночестице на бази  $Fe_3O_4$  обележене радиоактивним итријумом за могућну примену у хипертермијско-радионуклидној терапији тумора

Ментори редовни професор у пензији др Шћепан Милјанић и научни саветник др Сања Врањеш-Ђурић

Потписани/а Магдалена Радовић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла 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**

*Магдалена Радовић*

У Београду, 03.02.2017.

### Prilog 3.

## Изјава о коришћењу

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

Магнетне наночестице на бази  $Fe_3O_4$  обележене радиоактивним итријумом за могућну примену у хипертермијско-радионуклидној терапији тумора \_\_\_\_\_

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла 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/ла.

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  
Маријанка Рагоботи

У Београду, 03.02.2017.