

„Wytwarzanie oraz charakterystyka nanocząstek tlenków żelaza w aspekcie zastosowań w hipertermii magnetycznej”

STRESZCZENIE

Tendencja do miniaturyzacji materiałów jak i systemów technologicznych spowodowała intensywny rozwój dziedziny, jaką jest nanotechnologia. Szczególne właściwości nanomateriałów zyskują obecnie szerokie spektrum zastosowań. W medycynie są one wykorzystywane w celu zwiększenia czułości i dokładności metod diagnostycznych. Na przykład nanocząstki magnetyczne z powodzeniem stosowane są w diagnostyce obrazowej za pomocą rezonansu magnetycznego MRI, testach immunologicznych, czy też w ciągle udoskonalanej metodzie dostarczania leków (ang. *drug delivery system*). Praca wielu ośrodków badawczych przynosi widoczne postępy dokonywane w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego w skali nanometrycznej. Stosunkowo prosty sposób otrzymywania nanocząstek magnetycznych tlenków żelaza w dużych ilościach oraz ich niska cytotoxiczność, czynią je obiecującymi materiałami dla nanomedycyny. Możliwość potencjalnego klinicznego zastosowania tych materiałów do aplikacji medycznych może mieć kolosalny wpływ na rozwój nowoczesnej terapii celowanej wspomagającej leczenie chorób nowotworowych.

W dziedzinie terapii nowotworowych jednym z ważniejszych biomedycznych aplikacji nanocząstek tlenków żelaza jest ich wykorzystanie jako czynnik w hipertermii magnetycznej (ang. *magnetic hyperthermia*). Jest to stosunkowo nowa metoda terapeutyczna, będąca obecnie w fazie intensywnego rozwoju. W leczeniu onkologicznym metoda hipertermii magnetycznej rozumiana jest jako planowa i kontrolowana technika polegająca na nagrzewaniu zmian zdeformowanych (komórka nowotworowa) w celu zmniejszenia ich stadium, bądź zahamowania ich wzrostu. W praktyce klinicznej zewnętrzną hipertermię magnetyczną stosuje się w leczeniu skojarzonym z radioterapią, chemioterapią, bądź terapią immunologiczną.

Niniejsza rozprawa została podzielona na dwie części – przegląd piśmiennictwa oraz część doświadczalną. W poszczególnych rozdziałach części teoretycznej zestawiłem pojęcia oraz definicje, które mają charakter wprowadzający w podstawowe zagadnienia potrzebne do zrozumienia idei tej pracy. Uwagę skupiłem na materiałach, które dzięki swoim wyjątkowym właściwościom zyskały w obecnym czasie szczególnie istotne znaczenie naukowe. Redagując

pracę starałem się także rzetельnie usystematyzować obecny stan wiedzy obejmujący problematykę chorób nowotworowych. Część doświadczalna to zestawienie i analiza otrzymanych wyników badań przeprowadzonych w ramach realizacji pracy. Omówione zostały badania wpływu wytwarzania nanocząstek Fe_3O_4 na ich właściwości fizyczne oraz możliwość ich potencjalnego wykorzystania w aspekcie hipertermii magnetycznej. Przeprowadzono badania wpływu stężenia nanocząstek magnetycznych oraz wartości indukcji zewnętrznego pola magnetycznego na szybkość zmian temperatury w roztworze gliceryny. Eksperymenty przeprowadzane były dla dyspersji nanocząstek 5% wag. oraz 2% wag. wszystkich badanych próbek. Badaniom poddano próbki bezpośrednio po ich wytworzeniu oraz nanocząstki przechowywane w środowisku wodnym w różnym czasie do 18 miesięcy. Przeprowadzanie badań w różnym czasie miało na celu określenie wpływu środowiska w jakim nanocząstki były przechowywane, jak i czasu przechowywania na wydajność materiału jako czynnika grzewczego. W ramach pracy zostało zaprojektowane stanowisko pomiarowe, które umożliwiło pomiar wpływu zmiennego pola magnetycznego na rozkład uzyskanej temperatury w objętości fantomu. Na tej podstawie zostały ustalone optymalne parametry nagrzewania indukcyjnego dyspersji nanocząstek magnetycznych. Efekt termiczny SLP (ang. *specific loss power*) mierzono za pomocą zestawu zbudowanego w Katedrze Fizyki Politechniki Częstochowskiej. Układ działa w naprzemiennym polu magnetycznym o różnych amplitudach od 2 do 4 kA/m i częstotliwości 100 Hz. Badania SLP pozwoliły mi ocenić perspektywę zastosowania nanocząstek magnetytu w hipertermii magnetycznej. Badane próbki wytworzono metodą współstrącania nanocząstek Fe-O poprzez alkaliczną hydrolizę soli żelaza (II) i soli żelaza (III). Do wytwarzania nanocząstek zastosowano również technikę opartą na zastosowaniu metody aerozolowej. Otrzymane wyniki badań TEM i DLS wykazały powstawanie małych aglomeratów nanocząstek. Powstałe nanocząstki mają właściwości hydrofilowe, tworzące jednorodne dyspersje w wodzie. Udoskonalenie warunków wytwarzania doprowadziło do otrzymania dyspersji nanocząstek magnetytu o średnicach mniejszych od limitu superparamagnetycznego. Nanocząstki były stabilizowane w wodzie poprzez powleczenie oleinianem trietanolaminy (TEA – oleinian). Przeprowadzono analizę składu fazowego poszczególnych próbek z wykorzystaniem dyfrakcji rentgenowskiej (XRD), mikroskopii elektronowej oraz spektroskopii móssbauerowskiej. Pomiary dyfraktogramów rentgenowskich zostały przeprowadzone przy użyciu dyfraktometru Bruker D8 Advance wyposażonego w półprzewodnikowy detektor pozycyjnie czuły typu LynxEye oraz lampa z antykatodą miedzianą. Analiza fazowa przeprowadzona dla większości próbek po wytworzeniu wykazała obecność jednej fazy krystalicznej, czyli magnetytu. W celu udokładnienia

parametrów komórek elementarnych oraz określenia wielkości ziaren fazy krystalicznej została przeprowadzona analiza Rietvelda. Analizy przeprowadzano za pomocą oprogramowania DIFFRAC TOPAS 4.2 firmy Bruker. Kalibracji dyfraktogramu dokonano przy użyciu próbki wzorcowej NIST LaB₆ serii 660, w celu wyznaczenia doświadczalnej funkcji instrumentalnej do opisu kształtu pików, jak również do opisu profilu emisyjnego lampy rentgenowskiej.

Badania Mössbauerowskie przeprowadzono przy zastosowaniu źródła ⁵⁷Co w matrycy Rh o aktywności 50 mCi. Analizę widm przeprowadzono stosując oprogramowanie WinNormos for Igor. Badania te pozwoliły na określenie charakterystyki właściwości magnetycznych oraz struktury fazowej badanych próbek. Badania Mössbauerowskie sugerują wzajemne oddziaływanie prowadzące do wytworzenia właściwości ferrimagnetycznych aglomeratów nanocząstek.

Badania żywotności komórek rakowych wykazały niską cytotoxiczność użytych do badań nanocząstek stabilizowanych oleinianem trietanolaminy. Obecność nanocząstek nie spowodowała wzrostu liczby komórek apoptotycznych w hodowli ludzkich fibroblastów skóry i stymulowała proliferację tych komórek. Ujawnia to duży potencjał aplikacyjny nanocząstek magnetycznych w medycynie regeneracyjnej.

ABSTRACT

The tendency to miniaturize materials and technological systems has resulted in the intensive development of nanotechnology. The special properties of nanomaterials gain a wide spectrum of applications in contemporary medicine to increase the sensitivity and accuracy of diagnostic methods. For example, magnetic nanoparticles are successfully used in magnetic resonance imaging (MRI), immunological tests, or in the constantly improved drug delivery system. The work of many research centers brings visible progress in magnetic resonance imaging on the nanometer scale. A relatively simple method of obtaining magnetic nanoparticles of iron oxides in large quantities and their low cytotoxicity make them promising materials for nanomedicine. The possibility of potential clinical use of these materials for medical applications may have a tremendous impact on the development of modern targeted therapy supporting the treatment of cancer.

In the field of cancer therapy, one of the most important biomedical applications of iron oxide nanoparticles is their use as an agent in magnetic hyperthermia. It is a relatively new therapeutic method, currently under intensive development. In oncological treatment, the method of magnetic hyperthermia is understood as a planned and controlled technique consisting in heating deformed lesions (cancer cells) to reduce their stage or inhibit their growth. In clinical practice, external magnetic hyperthermia is used in combination with radiotherapy, chemotherapy or immunological therapy.

This dissertation has been divided into two parts - a literature review and an experimental part. In the individual chapters of the theoretical part, I have compiled concepts and definitions that introduce the basic issues needed to understand the idea of this work. I focused my attention on materials that, due to their unique properties, have currently gained particularly significant scientific importance. When editing the work, I also tried to reliably systematize the current state of knowledge covering the issues of cancer. The experimental part is a compilation and analysis of the results of the research carried out as part of the work. Studies on the impact of the production of Fe_3O_4 nanoparticles on their physical properties and the possibility of their potential use in the aspect of magnetic hyperthermia were discussed. Furthermore, the influence of the concentration of magnetic nanoparticles and the value of the external magnetic field induction on the rate of temperature changes in the glycerol solution was studied. Experiments were carried out for the dispersion of nanoparticles of 5 wt.% and 2 wt.% of all tested samples. Samples immediately after their production and nanoparticles kept in an aqueous environment for up to 18 months were tested. The studies were also aimed to

determine the impact of the environment in which the nanoparticles were stored, as well as the storage time on the performance of the material as a heating medium. As a part of my study, the measurement unit allowing the studies of the influence of the alternating magnetic field on the temperature distribution in the measuring phantom volume were performed. It allowed optimization of the heating parameters for phantoms of various densities containing dispersions of nanoparticles. The thermal effect SLP (*specific loss power*) was measured using a setup built at the Department of Physics, Częstochowa University of Technology. The system works in an alternating magnetic field of different amplitudes from 2 to 4 kA/m and frequencies of 100 Hz. SLP studies allowed me to assess the prospect of using magnetite nanoparticles in magnetic hyperthermia. The tested samples were prepared by co-precipitation of Fe-O nanoparticles by alkaline hydrolysis of iron (II) and iron (III) salts. The technique of producing magnetite nanoparticles using the aerosol method was also used to obtain magnetite NPs. The TEM and DLS studies showed the formation of small nanoparticle agglomerates. The resulting nanoparticles have hydrophilic properties, forming homogeneous dispersions in water. Improvement of the manufacturing conditions led to obtaining dispersion of magnetite nanoparticles with the average particle sizes, lower than the superparamagnetic limit. To make the obtained nanoparticles stable in water, they were coated with triethanolamine oleate (TEA - oleate) [3]. The phase composition of individual samples was analyzed using X-ray diffraction (XRD), electron microscopy and Mössbauer spectroscopy. X-ray diffraction measurements were carried out using a Bruker D8 Advance diffractometer equipped with a semiconductor LynxEye position-sensitive detector and Cu anti-cathode tube. Phase analysis carried out for most of the samples after synthesis showed the presence of only one crystalline phase, i.e. magnetite. To refine the parameters of the unit cell and to determine the average grain sizes of the crystalline phase, the Rietveld refinement was performed. Analyzes were done using Bruker's DIFFRAC TOPAS 4.2 software. The diffraction pattern was calibrated using NIST 660 series LaB₆ reference sample to determine experimentally the instrumental function of the shape of the peaks, as well as to describe the emission profile of the X-ray tube.

Mössbauer studies were carried out using a ⁵⁷Co source in the Rh matrix with an activity of 50 mCi. Spectral analysis was performed using WinNormos for Igor software. These tests allowed determining the characteristics of the magnetic properties and the phase structure of the tested samples. The Mössbauer studies indicate the existence of interactions between nanoparticles leading to the formation of ferrimagnetic properties of their agglomerates.

Studies of cancer cell viability showed low cytotoxicity of magnetite nanoparticles stabilized with the triethanolammonium oleate. The presence of the nanoparticles did not increase the number of apoptotic cells in cultured human skin fibroblasts and stimulated the proliferation of these cells. This reveals the great application potential of magnetic nanoparticles in regenerative medicine.