

Miskolci Egyetem
Műszaki Anyagtudományi Kar
Kerpely Antal Anyagtudományok- és Technológiák Doktori Iskola



Magnetit nanorészecskék szintézise, karakterizálása és biokompatibilis bevonatolása

Ph.D. értekezés téziszülete

Készítette:

Juhászné Szalai Adrienn

okleveles biológus

Tudományos vezetők:

Prof. Dr. Fodor Bertalan

egyetemi tanár

Prof. Dr. Kaptay György

egyetemi tanár, az MTA levelező tagja

Miskolc

2021.

1. Bevezetés és célkitűzés

Az utóbbi évtizedben a tudomány szemléletváltáson megy keresztül. Felismerték, hogy az anyagok tulajdonságai - többek között - méretfüggőek. A legszembevetőbb változás akkor történik, amikor elérjük a nanomérettartományt (10^{-7} – 10^{-10} m). Ebben a tartományban lényegi változás tapasztalható az anyagok viselkedésében, ami főleg a megnövekedett fajlagos felszínüknek köszönhető [1]. A nanoméretű anyagoknak a térfogatukhoz viszonyítva hatalmasra növekedett felszíne megnöveli a nanorészecskék kémiai aktivitását. Általában 100 nm alatti részecskéket tekintjük nanorészecskének [2]. A csökkenő mérettel megjelenő új tulajdonságok (pl. megváltozott oldhatóság, forráspont, mágneses viselkedés stb.) kutatása a XXI. század eddigi egyik legdinamikusabban fejlődő tudományterületévé tette a nanotechnológiát. Az élet számos területén alkalmazzák ma már az autógyártástól a vegyiparig. Még az orvostudomány is használja vívmányait, mely önálló alterületet, a nanomedicina tudományát hozta létre. Leggyakrabban gyógyszerhordozó rendszerként történő alkalmazásuk képezi a vizsgálatok tárgyát, amely során olyan nanorendszereket fejlesztenek, amelyek megoldást nyújthatnak a célzott, sejtszintű terápia kivitelezésére, vagy a jóval kisebb hatóanyag dózis használatára [3].

A nanorészecskék speciális tulajdonságai elsősorban méretükből fakadnak. A nanomérettartomány az élő szervezetek anyagcsere folyamatainak is színtere. A kis méret emellett nagyobb fajlagos felülettel (A_s, ϕ) jár együtt [1] (1.1 képlet), ami több molekulát jelent a felszínen, így nagyobb biológiai aktivitást is.

$$A_s, \alpha \equiv \frac{A\alpha}{V\alpha} \quad (1.1)$$

Az (1.1) egyenlet szerint nemcsak a méret, hanem az alak is számít. Azonos térfogat esetén a legkisebb a gömb alakú szemcsék fajlagos felülete.

Ez azt jelenti, hogy a nanorészecskék aktívan be tudnak lépni az életfolyamatokba, ami magában foglalja az immunrendszer aktiválását is. Viszont a nagy fajlagos felület együtt jár a nanorendszer instabilitásával is, mivel a természetes folyamatok ugyanazon térfogat esetén a több apró részecske helyett a kevesebb, de nagyobb

részecskék keletkezésének kedveznek, melyek fajlagos felülete kisebb [1]. Tehát a nanorendszerek fokozott aggregációs hajlamot mutatnak.

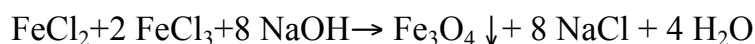
A vizsgálataim középpontjában a szuperparamágneses vas-oxid nanorészecskék fejlesztése került, melyek alkalmazhatók MRI kontrasztanyagként, de használhatók a daganatok hipothermiás kezelésére, bioszenzorként, gyógyszerhordozó rendszerként egyaránt.

Az szakirodalom áttanulmányozását követően kutatási célkitűzésem olyan nanoméretű magnetit nanorészecskék szintézise és karakterizálása lett, melyek biokompatibilis bevonatolást követően elsősorban terápiás célt szolgálnak, tehát az élő rendszerekben minél kevesebb válaszreakciót váltanak ki, és ez lehetővé teszi a hatékonyabb alkalmazásukat. A magnetit szintézise és a koprecipitációs módszert alkalmazva a keletkező célok megvalósítását tűztem ki:

- 1.1 Munkám során azt vizsgáltam, milyen hatással van a keletkező szemcsék tulajdonságaira – elsősorban a méret és zéta-potenciál tekintetében - az, hogy a bevonatként alkalmazandó polimer a szintézis megkezdése előtt, vagy annak befejezése után kerül-e a nanorendszerbe.
- 1.2 Munkám során keresem a választ arra, hogy a centrifuga és a mágnes használata a szeparálási eljárás során, van-e hatással a keletkező szemcsék hidrodinamikai átmérőjének változására. Vizsgáltam a bevonat nélküli szemcsék esetét, illetve a különböző mennyiségű zselatin bevonat hatását.
- 1.3 Munkám során keresem a választ arra, hogy a centrifuga és a mágnes használata a szeparálási eljárás során, van-e hatással a keletkező szemcsék a felszíni töltésére. Vizsgáltam a bevonat nélküli szemcsék esetét, illetve a különböző mennyiségű zselatin bevonat hatását.
- 1.4 Célul tűztem ki, hogy a különböző típusú biokompatibilis stabilizátorok együttes hatását vizsgáljam. Kutatásomban a szacharóz és a zselatin együttes, illetve csak a zselatin alkalmazásával stabilizált magnetit szemcsék jellemzőit hasonlítom össze.
- 1.5 Vizsgálni szándékoztam a polimer adszorpciónak az elektromos kettősrétegre gyakorolt hatását.

2. Kísérletek, elvégzett vizsgálatok rövid összefoglalása

A magnetit nanoszemcsék szintéziséhez a koprecipitációs módszert használtam. A szintézis eredeti receptje a Szegedi Tudományegyetem Vizes Kolloidok Kutatócsoportjától származik, amelyet Ar gáz oldaton való átbuborékolásával egészítettem ki, illetve a mosási folyamat elválasztási fázisait külön alkalmaztam. Az eljárás során vas(III)-klorid oldatot vas(II)-klorid oldatot kevertem össze, majd nátrium-hidroxid oldat segítségével beindítottam a csíráképződést és végül magnetit nanoszemcséket kaptam. A folyamat során végig erős mechanikus keverést és argon atmoszférát alkalmaztam.



Ezt követően a következő tisztítási lépésben a kész szemcséket több lépcsőben mostam. A mosási fázisok között vagy mágneses vagy centrifugális szeparálási eljárást használtam. Ezt követően dializáltam és öregítettem a szuszpenziót.

Ezt követően különböző bevonatokkal láttam el a magnetit szemcséket.

In situ esetben: a különböző koncentrációjú zselatin oldatot a kiindulási vas-klorid oldatokkal együtt adagoltam a szintézis megkezdése előtt.

Ex situ esetben: a zselatin, a szacharóz+zselatin, valamint a polivinil-pirrolidon (PVP) oldatot a kész magnetit szemcsékhez adagoltam különböző koncentrációkban a szintézist követően (1. táblázat).

1. táblázat Az különböző módszerek során alkalmazott stabilizátorok

Hozzáadott stabilizátor	zselatin		3,33 M szacharóz + zselatin	PVP
Stabilizálási módszer	<i>in situ</i>	<i>ex situ</i>	<i>ex situ</i>	<i>ex situ</i>
Stabilizátor mennyisége (mg/L)	0,15; 0,31; 0,52; 0,78; 0,93; 1,14; és 1,3	0,15; 0,31; 0,52; 0,78; 0,93; 1,14; és 1,3	0,15; 0,31; 0,52; 0,78; 0,93; 1,14; és 1,3	100, 250, 300, 400, 500, 600, 750, 900, 1000 és 2000

A kísérletek eredményeit több módszerrel is vizsgáltam. A keletkezett szemcsék fázisösszetételét röntgen pordiffraktometriával, a méretét transzmissziós elektronmikroszkóppal valamint dinamikus fényszórás elvén működő eszközzel végeztem. Vizsgáltam a részecskék felszíni töltését is, valamint Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiát alkalmaztam a bevonatként alkalmazott anyagok részecskék felszínéhez való kapcsolódását.

3. Eredmények rövid összefoglalása

A vizsgálataim középpontjába a magnetit nanoszemcséket, illetve azok PVP-vel és zselatinnal bevont változatait helyeztem. Az irodalom áttekintése után feltárt tudáshiányok alapján arra kerestem a választ, hogy a bevonó anyagok hozzáadása a szintézis különböző pontjain hatással van-e a keletkező szemcsék jellemzőire, elsősorban a méreteloszlására és rendszerstabilitásra. Emellett tanulmányoztam a szintézis egyik kritikus pontjának, a mosási elválasztási lépésnek is a hatását a szemcseméret alakulására, mivel az irodalomban vagy a centrifugális, vagy a mágneses elválasztást alkalmazzák, illetve ritkán előfordul, hogy mindkettőt együtt. Eddig a két technika összehasonlítása még nem történt meg. Az eredmények azt mutatják, hogy a szintézis elején (*in situ*) adagolt bevonó anyag nagyobb szemcseméretet eredményez mindkét szeparálási technika alkalmazása esetén. Ebben az esetben a szemcsék a polidiszperzitási index értékei alapján feltehetően aggregálódtak. Viszont azok a magnetit szemcsék, amelyek mágneses szeparálással készült szuszpenzióban jöttek létre, kisebb méretűek és – majdnem minden esetben – olyan zéta-potenciál értékekkel rendelkeztek, amelyek megfelelnek a stabil kolloidrendszer értékeinek. Az utólagos stabilizálási technika esetén (*ex situ*) a koprecipitációs módszerrel előállított bevonat nélküli szemcsékhez adagolt különböző koncentrációjú zselatin hatására a bevonattal rendelkező szemcsék kisebbek lettek az *in situ* módszerrel előállított szemcsékhez képest, mindkét szeparálási technika alkalmazása esetén. A vizsgálataim alapján zselatin bevonat használata esetén a leghatékonyabban működő technika a mágneses elválasztás, és az *ex situ* módszerrel történő stabilizálás együtt

alkalmazása volt. A PVP-vel történő stabilizálás esetén azt tapasztaltam, hogy az irodalmi adatoknak megfelelően, annak adszorpciója megnöveli a magnetit részecskék hidrodinamikai átmérőjét. Az elektromos kettősréteg jellemzői növekvő mennyiségű PVP jelenlétében úgy változtak meg, hogy a magnetit iep.-ja a nagyobb pH-értékek felé tolódott, vagyis az adszorbeálódó PVP réteg elmozdította a hasadási síkot az oldat felé, azaz csökkentette a részecskék zéta-potenciálját. Magasabb a polimer koncentráció és adszorpció esetén vastagabb polimer réteg jöhet létre, ezért alacsonyabb a zéta-potenciál abszolút értéke.

A fenti eljárásokkal készített magnetit szuszpenziókat biokompatibilitási vizsgálatoknak is alávettem, hogy potenciális medicinális alkalmazásuk alátámasztható legyen. A kísérleteket a Miskolci Egyetem Egészségügyi Karán, a Nanobiotechnológiai laboratórium munkatársainak segítségével végeztük el. A tesztek magukban foglaltak különböző haemokompatibilitási vizsgálatokat a bevonat nélküli és a zselatinnal bevont magnetit nanoszemcsékre vonatkoztatva, úgy mint az emberi vörösvérsejtek pusztulásának vizsgálata azok hemolízisének megfigyelésével a nanoszemcsékkel történt kezelés hatására. Valamint vizsgáltuk a fehérvérsejtek egy csoportjának (limfocita sejtek) életképességének változását különböző koncentrációjú magnetit, valamint zselatinnal bevont magnetit szuszpenzióval történt kezelés hatására. Emellett tanulmányoztuk, hogy változik-e a magnetittel kezelt vérminták esetén a vörösvérsejtek szedimentációjának sebessége (ESR- erythrocyte sedimentation rate) a nanoszemcsék adagolásának hatására. Az eredmények részletes bemutatása jelen értekezésnek nem tárgya, de röviden összefoglalva a vizsgálatok eredményeit megállapítható volt, hogy a különböző koncentrációjú bevonat nélküli és zselatinnal bevont magnetit szuszpenziók a humán eredetű vörösvérsejtek és fehérvérsejtek életképességét nem befolyásolták. Nem indukáltak sejtpusztulást, és nem változtatták meg a kezelt vér normális vérsülyyedési jellemzőit sem *in vitro* körülmények között. Tehát a magnetit nanoszemcsékkel kezelt sejtek nem mutattak toxikus hatásra utaló jeleket, hanem hasonlóan viselkedtek, mint a kezeletlen sejtek.

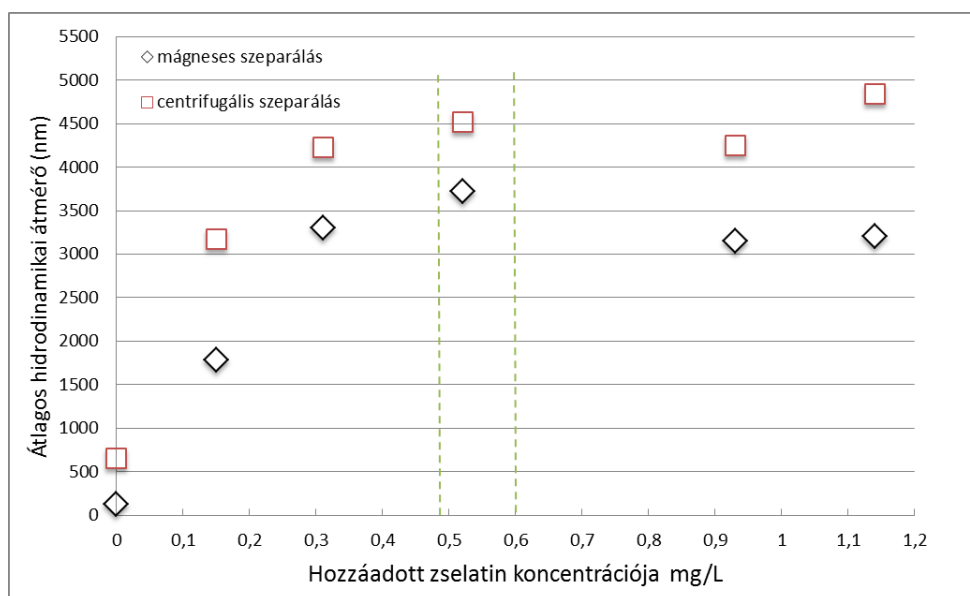
A fenti eredmények alapján mind a zselatinnal, mind a PVP-vel bevont magnetit nanoszemcsék optimális jelöltek lehetnek medicinális területen, mint

gyógyszerhordozó jelöltek, vagy akár mint MR kontrasztanyagok. Előállításuk során azonban a legcélszerűbb, ha figyelembe vesszük a kísérleteim megállapított optimális előállítási technikát, vagyis a mágneses elválasztást a koprecipitációs előállítás során, majd az ezt követő *ex situ* stabilizálás alkalmazását.

4. Új tudományos eredmények

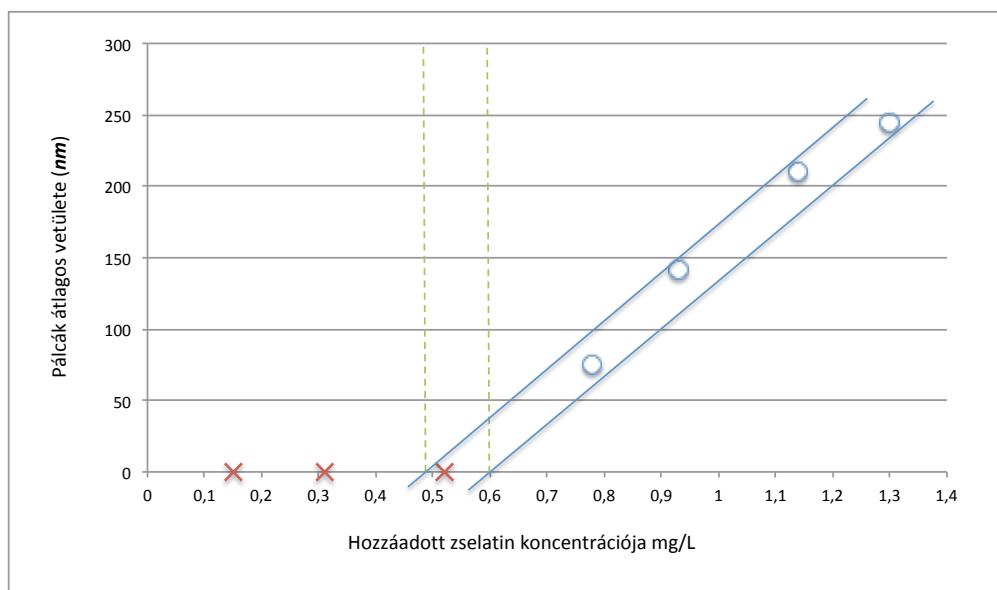
1. Tézis A magnetit nanorészecskék szintézise során bevonatként használt stabilizáló anyagok hatékonysága függ attól, hogy a szintézis folyamatának mely pontján kerülnek a rendszerbe. Megállapítottam, hogy a zselatinnal végzett *ex situ* vagy *in situ* stabilizálásban a legnagyobb különbség a magnetit részecskék méreteloszlásában van.

1.a Zselatin adagolása esetén úgy találtam, hogy a mágnesesen szeparált magnetit átlagos szemcsemérete lényegesen kisebb lesz akkor, ha a zselatint a koprecipitációs reakció után, a kész szemcsékhez adagolom (*ex situ*), szemben az *in situ* módszerrel, amikor a zselatint a reakció elején adtam a rendszerhez (2T/1.a. ábra).



1 T/1. ábra Az *in situ* módszerrel előállított magnetit szemcsék hidrodinamikai átmérőjének változása az elválasztási technika és a hozzáadott zselatin mennyiségének függvényében

1.b Emellett az *in situ* kísérletek során megállapítottam, hogy létezik egy optimális zselatin koncentráció: a 0,49-0,60 mg/L közötti zselatin adagolás esetén feltételezhetően már elegendő a hozzáadott zselatin a magnetit szemcsék teljes bevonásához, de még nem adagoltam túl a zselatint, mert nem tapasztaltam a zselatin pálcák megjelenését. Ebben a koncentráció tartományban a rendszer eléri a stabil kolloid rendszerre jellemző zéta-potenciál értéket is mindkét szeparálási technika esetén (1T/1 és 2. ábra).

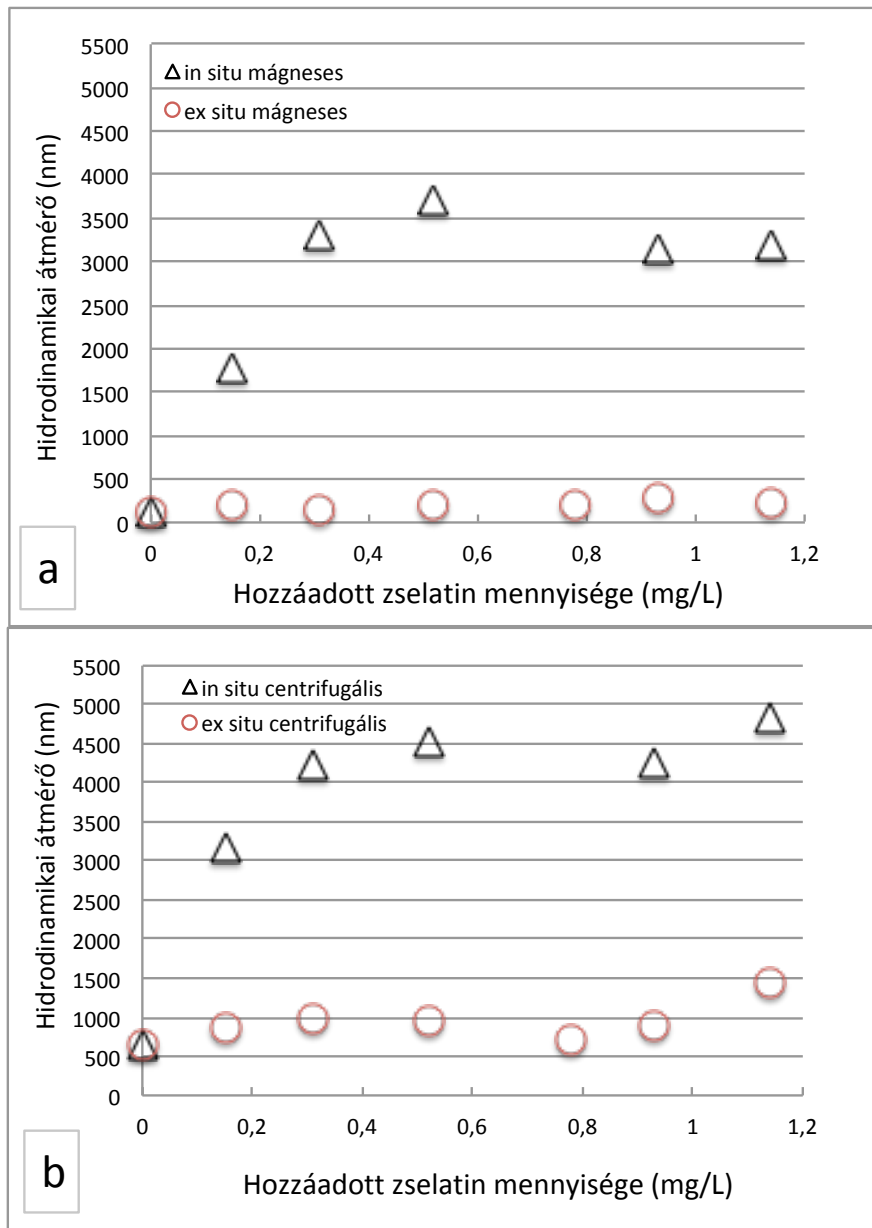


1 T/2.ábra A zselatin pálcák átlagos hossz-vetületének alakulása a zselatin mennyiségének függvényében mágneses szeparálást alkalmazva

2.Tézis A magnetit nanorészecskék szintézisét követő tisztítási folyamat során alkalmazott szeparációs technika jellege (mágneses, vagy centrifugális) lényegi hatással van a keletkező szemcsék méretére.

Kimutattam, hogy a mágneses szeparálást alkalmazva kisebb átmérőjű szemcséket kapunk az elkészült szuszpenzióban, mint amikor centrifugális szeparálást használtam mind *in situ*, de különösen *ex situ* zselatinos stabilizálás mellett. A keletkező szemcsék méreteloszlása pedig az *ex situ* módszer esetén egyenletesebb a mágneses szeparálás használatával a különböző zselatin koncentrációk

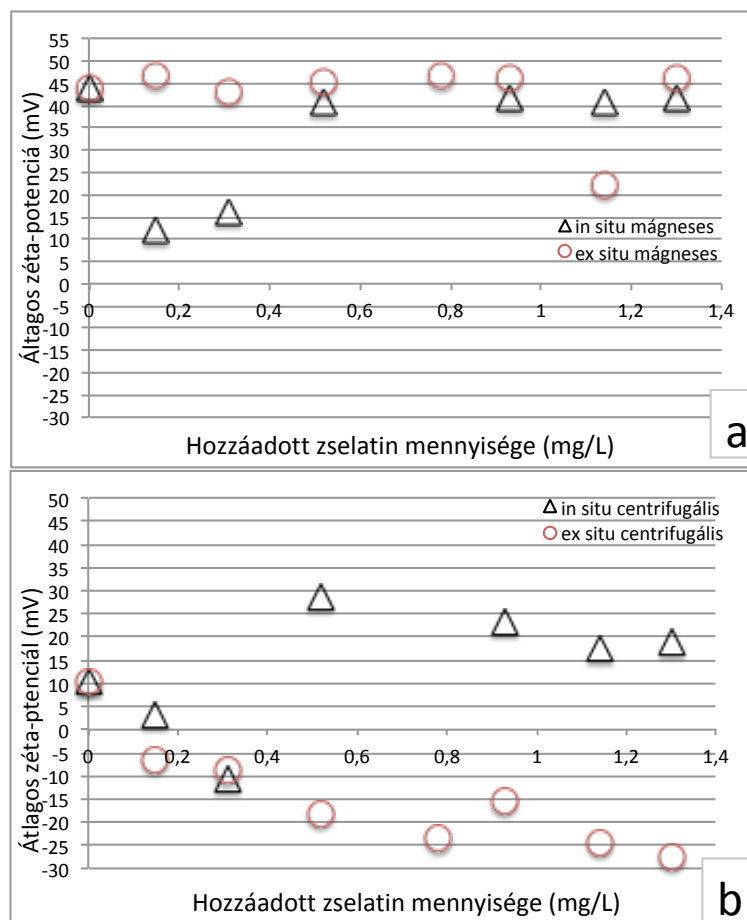
alkalmazása mellett is. Az eltérés a két elválasztási módszer között meghúzódó különböző mechanizmusokkal magyarázható. A centrifugával történő elválasztás során fellépő erős centrifugális erő hatására a részecskék összetapadása következhet be. A mágneses elválasztás viszont a magnetit nanorészecskék szuperparamágneses tulajdonságán alapszik. A mágneses elválasztás a mágneses részecskék ülepedését gyorsítja meg.



2T/ 1. ábra A magnetit szemcsék hidrodinamikai átmérőjének összehasonlítása előállítási módszer szerint mágneses (a) és centrifugális (b) elválasztást alkalmazva

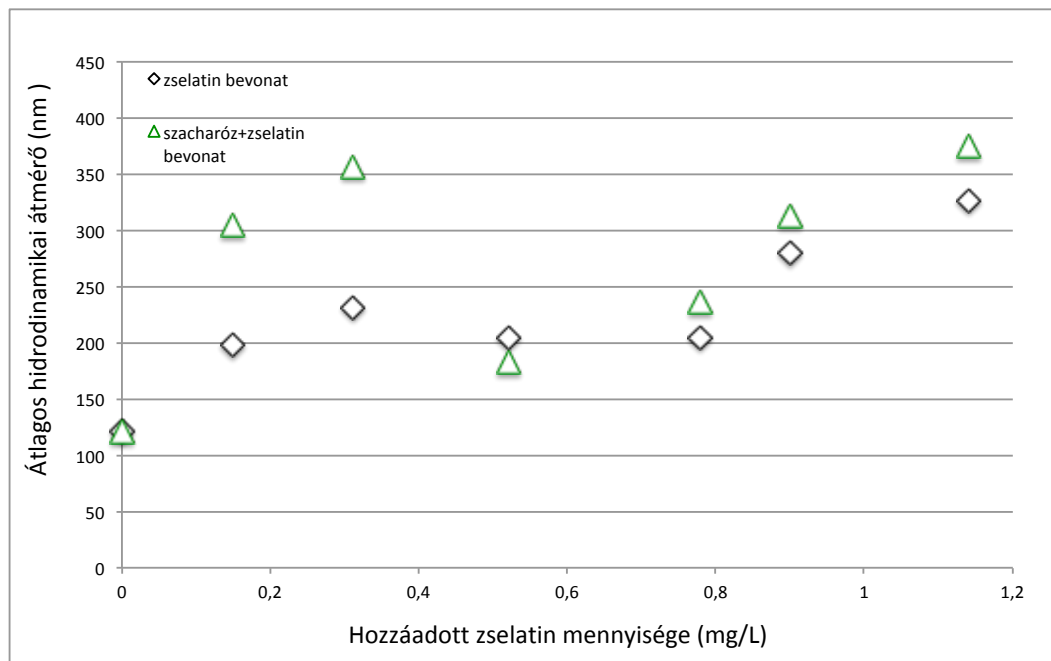
3. Tézis: A különböző szeparálási technika hatással van a keletkező részecskék felszíni töltésére is.

A mágneses szeparálás esetén zselatinnal történt *in situ* stabilizálás után a töltésértékek pozitív tartományban voltak minden hozzáadott zselatin koncentráció mellett. A centrifugális szeparálás esetén viszont azt tapasztaltam, hogy alacsony zselatinkoncentráció mellett negatív felszíni töltés jellemző, majd a részecskék felszíni töltöttsége átvált pozitív értékekre 0,52 mg/L hozzáadott zselatin koncentrációtól. A változás iránya viszont mindkét esetben hasonló. *Ex situ* stabilizálás esetén mágneses szeparálást használva, viszont az értékek – egy kivétellel – ugyanabban a stabil kolloidállapokra jellemző és pozitív tartományban voltak. A centrifugális szeparálás esetén viszont a töltésértékek minden zselatin koncentráció mellett negatív tartományban maradtak (3T 1. ábra).

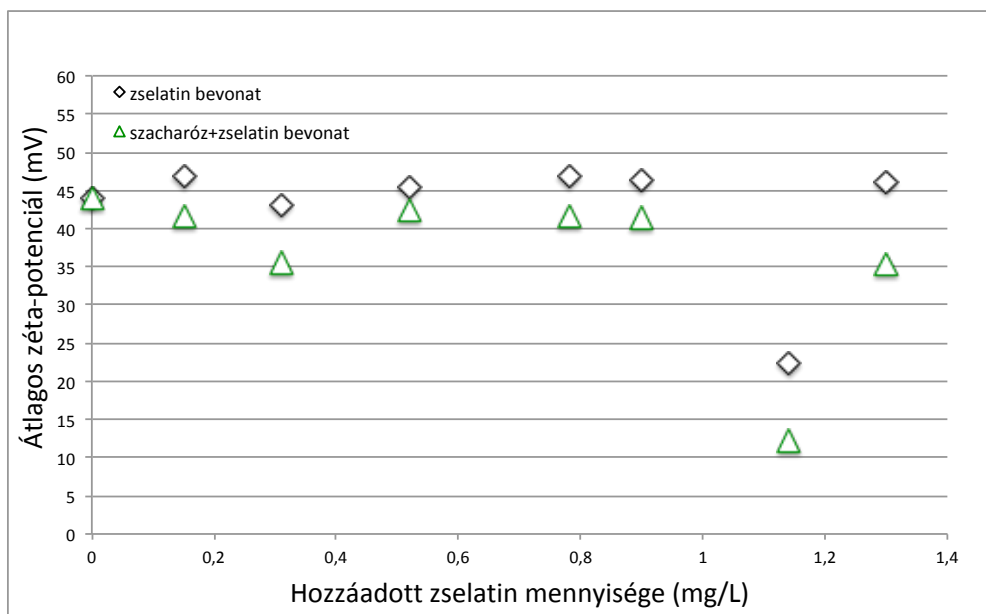


3T/ 1.ábra A magnetit szemcsék zéta-potenciáljának összehasonlítása előállítási módszer szerint mágneses (a) és centrifugális (b) elválasztást alkalmazva

4. Tézis A bevonatként használt anyagok anyagi minősége is hatással volt a keletkező bevonatos szemcsék alakjára. A szacharóz bevonat előzetes alkalmazása a szemcsék méretét kissé megnöveli, viszont a méret értékei ugyanazt a tendenciát követik, amit a csak zselatinnal bevont minták esetén tapasztaltam. Viszont a szacharóz és a zselatin együttes alkalmazása mellett a szemcsék – még a nagyobb zselatin koncentrációk mellett is – megtartották a gömbszimmetrikus alakjukat, nem tapasztaltam pálcák kialakulását egyetlen alkalmazott zselatin koncentráció esetén sem. A zéta-potenciál értékek stabil kolloid rendszerre utaltak, vagyis a zselatin javított a szemcsék tulajdonságain (4T/1. és 2. ábra).

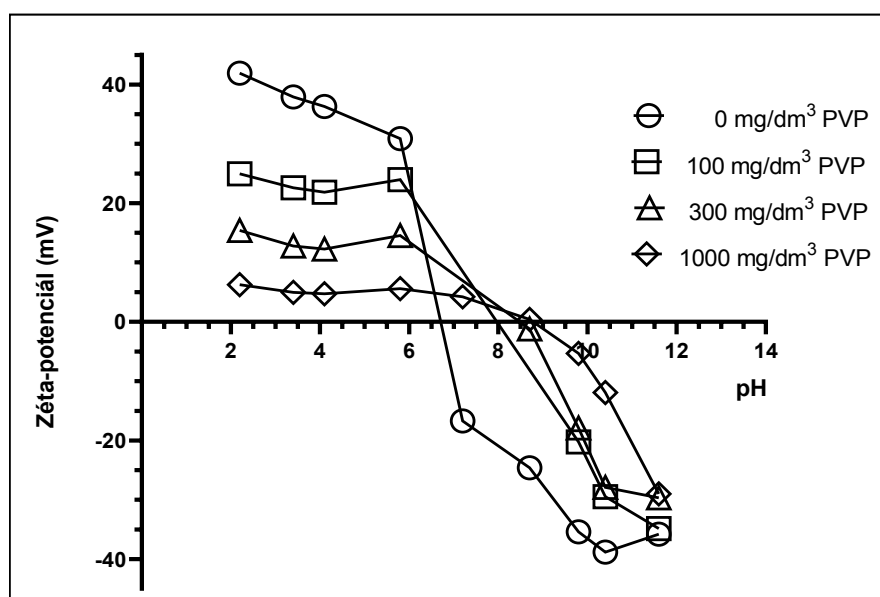


4T/1. ábra A szacharóz és zselatin bevonat együttes alkalmazásának hatása a hidrodinamikai átmérő változására a zselatinnal bevont magnetit szemcsék méretéhez képest



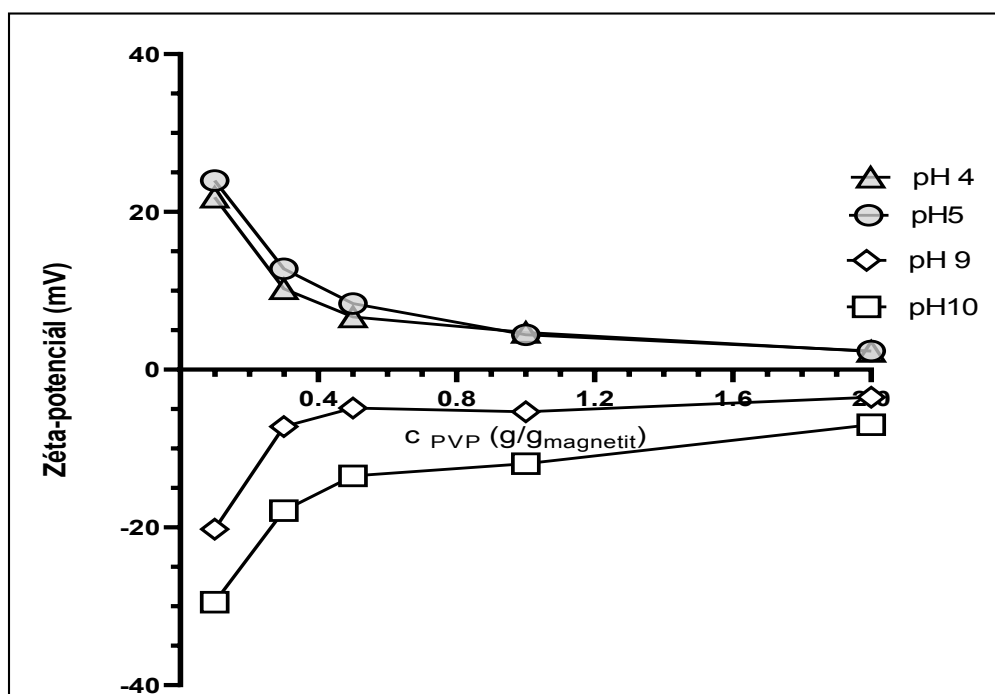
4T/2. ábra A szacharóz és zselatin bevonat együttes alkalmazásának hatása a felszíni töltés változására a csak zselatinnal bevont szemcsék méretéhez képest

5. Tézis A polivinil-pirrolidon (PVP) adagolása eltolja a magnetit izoelektromos pontját nagyobb pH értékek felé, ami a polimer lánc felülethez való kapcsolódása során jelentős számú kötéspont létrejöttének közvetett bizonyítéka. Az eltolás mértéke fokozatosan csökken a PVP koncentráció növelésével, feltehetőleg azért, mert a felület fokozatosan telítődik az adszorbeált PVP molekulákkal (5T/1. ábra).



5T/1. ábra A magnetit nanorészecskék zéta-potenciáljának változása a pH függvényében különböző mennyiségű PVP adagolását követően

6. Tézis A PVP koncentrációjának növelése adott pH-n a pozitív (pH=4 és pH=5) és a negatív (pH=9 és pH=10) felszíni töltéssel rendelkező részecskék zéta-potenciáljának abszolút értékét egyaránt csökkenti. Ez annak a következménye lehet, hogy meglehetősen vastag adszorbeált polimer rétegek képződnek a felszínen, bennük pedig valószínűleg immobilizált vizes rétegek találhatóak. Ez a réteg elmozdítja a hasadási síkot az oldat felé, vagyis csökkenti a részecskék zéta-potenciálját (6T/1. ábra).



6T/1. ábra A magnetit nanorészecskék zéta-potenciáljának változása a PVP koncentrációjának függvényében különböző pH értékeken 10^{-2} M KCl oldatban

5. Az értekezés anyagához kapcsolódó saját publikációk

5.1 Doktori témához kapcsolódó saját közlemények:

5.1.1 **A. J. Szalai**, N. Manivannan, G. Kaptay. Super-paramagnetic magnetite nanoparticles obtained by different synthesis and separation methods stabilized by biocompatible coatings. *Colloids Surfaces A* 568 (2019) 113-122. (2018-IF = 3.131, 2018-Scimago = Q2 in “Colloid and Surface Chemistry”). Független hivatkozások száma: 14

5.1.2 **A. J. Szalai**, G. Kaptay. S. Barany. Electrokinetic potential and size distribution of magnetite nanoparticles stabilized by polyvinyl pyrrolidone. *Colloid Journal* 81 (2019) 773-778. (2018-IF = 0.966, Q3 in 2018 in Physical and Theoretical Chemistry).

5.1.3 **Juhászné Szalai Adrienn**, Baumli Péter: Vas-oxid nanorészecskék előállítási lehetőségei kloridokból. *Anyagmérnöki Tudományok*, 37. Kötet, 1. Szám (2012), Pp. 157–164.

5.2 További közlemények

5.2.1. **Juhászné, Sz. A.**, Kiss-Tóth É. Dojcsákné, Z Lovrity, J Emmer, and B Fodor. 2012. “A Szuperparamágneses Vas-Oxid Biológiai Alkalmazási Lehetőségei.” *Egészségtudományi Közlemények: A Miskolci Egyetem Közleménye* 2 (2): 99–105.

5.2.2 **A, Juhász Szalai**, Dojcsák Kiss-Tóth É, Koska P, Szebeni J, and Fodor B. 2012. “Characteristic Features of Carbon Nanotubes and Their Application in Living Systems.” *Egészségtudományi közlemények: a Miskolci Egyetem közleménye* 2 (1): 105–111.

5.2.3 **Juhászné, Szalai Adrienn**, Kiss-Tóth Éva Dojcsákné, Péter Koska, Emőke Kiss-Tóth, János Szebeni, and Bertalan Fodor. 2011. “A Jövő Terápiája: nanoméretű gyógyszerhordó rendszerek.” *Egészségtudományi Közlemények: A Miskolci Egyetem Közleménye* 1 (1): 43–48.

5.3. Doktori témához kapcsolódó konferencia poszterelőadás

5.3.1 **Juhászné Szalai Adrienn**, dr. Fodor Bertalan, dr. Kaptay György: Különböző koncentrációjú polivinil-pirrolidon oldat alkalmazásának hatása a szuperparamágneses magnetit szemcsék hidrodinamikai átmérőjére. X. Országos Anyagtudományi Konferencia, 2015. Október 11-13.

5.4 További konferencia közlemények

5.4.1. M. R. Zákányiné, G. G. Varga, **S. A. Juhászné**, and S. Bárány, “Bentonitok zéta potenciál változásának vizsgálata sóoldatok jelenlétében,” in *Műszaki Tudomány az Észak-Kelet Magyarországi Régióban 2018*, 2018, p. 423.

5.4.2. K.-T. É. Dojcsákné, **S. A. Juhászné**, and B. Fodor, “Lipid alapú nanorészecskék fejlesztése mint a személyre szabott terápia egyik lehetősége,” in *MultiScience - XXXI. microCAD International Multidisciplinary Scientific Conference*, 2017.

5.4.3. **S. A. Juhászné**, K.-T. É. Dojcsákné, P. Koska, Z. Lovrity, J. Emmer, and B. Fodor, “A gyógyászati alkalmazásra fejlesztett nanoanyagok vizsgálati módszerei,” in *microCAD 2012, S section: Medical and Health Science*, 2012.

Felhasznált irodalom:

[1] Kaptay G.: **On the size and shape dependence of the solubility of nanoparticles in solutions**. *Int. J. Pharmaceutics*, 2012. 430, 253-257.

[2] Jacobs J.F, Van De Poel I., Osseweijer P.: **Sunscreens with Titanium Dioxide (TiO₂) Nano-Particles:A Societal Experiment**. *Nanoethics*, 2010. 4, 103–113.

[3] Kim B.Y.S., Rutka J. T., Chan W. C.W.: **Nanomedicine** , *N Engl J Med* 2010. 363, (25) 2034-2443.