

Szuperparamágneses vas-oxid nanorészecskék (SPIONs) teranosztikai célú fejlesztése

TOMBÁ CZ Etelka^{a,*}, SZEKERES Márta^a, ILLÉS Erzsébet^a, JEDLOVSZKY-HAJDÚ Angéla^b, TÓTH Y. Ildikó^a, NESZTOR Dániel^a és SZABÓ Tamás^a

^aVizes Kolloidok Kutatócsoport, Szegedi Tudományegyetem, Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék, 6720 Szeged, Aradi vértanúk tere 1.

^bNanokémiai Kutatócsoport, Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, 1089 Budapest, Nagyvárad tér 4.

1. Bevezetés

A szuperparamágneses vasoxid nanorészecskék (superparamagnetic iron oxide nanoparticles - SPIONs) különleges tulajdonságai révén – rejtelmeket már több mint egy évtizede kutatjuk – egyedi lehetőségek nyílnak orvosi biológiai alkalmazásukra. Segítségükkel megvalósítható a terápiával kapcsolt diagnosztika (teranosztika), mivel igen hatékony MRI kontraszt ágensek és lokális hipertermiás kezelésre is alkalmasak, valamint a SPION nanoszerkezetekkel a hatóanyag szállítás is lehetővé válik. A teranosztikai álmot megvalósító készítményeknek azonban szigorú kritériumoknak, pl. a toxicitás, a kémiai stabilitás, az egységes méret és diszperzió stabilitás kell megfelelniük. A mágneses nanorészecskék közül a magnetit/maghemit a leginkább kutatott, ennek oka valószínűleg az, hogy élőszervezetekben a vasoxidok előfordulnak, metabolizmusuk ismert. Az orvosi biológiai alkalmazásuknál kizáró az aggregáció bioreleváns (főleg az adott pH, só- és fehérjetartalom) közegben, inhomogén mágneses térben, mivel a nanorészecskék összetapadása nagy aggregátumokat hoz létre, ami elzárja a véredet, így végzetes következményekkel járna *in vivo*.

A mágneses nanorészecskék orvosi biológiai alkalmazásához kapcsolódó kutatások napjainkban igen népszerűek. A legtöbb megjelent áttekintő cikkek közül csak néhányat említve, amelyekben összefoglalják a magnetit nanorészecskék szintézisének és stabilizálásának lehetőségeit,¹ a multifunkciós mágneses nanorészecskékkel a célzott hatóanyag szállítási,² a modern teranosztikai^{3,4,5} és a hipertermiás⁶ alkalmazáshoz kapcsolódó újabb eredményeket, kutatási irányokat, a lehetőségeket és kihívásokat⁴, az *in vivo* és *in vitro* orvosi biológiai alkalmazások mellett az *in silico* tanulmányokat⁷. A mesterségesen előállított mágneses nanorészecskék környezeti alkalmazásai, főleg a szennyezés akkumuláció és mágneses szeparáció mellett az orvosi biológiai lehetőségeket, mint a hatóanyag szállítás, a hipertermia, a rádióterápia és a gén manipuláció, valamint a kapcsolódó fizikai-kémiai tulajdonságokat, úgymint a méretet, az alakot és a mágneses arculatot, továbbá az részecske aggregációt és ennek megelőzését, azaz a kolloid stabilitás növelés újabb módszereit is tárgyalják.⁸ A közelmúltban az együttműködő partnereinkkel közösen mi is írtunk egy áttekintést a mágnesesen érzékeny nanorendszerek tervezésének és szintézisének újabb irányzatairól.⁹

Hol és mikor kapcsolódtunk a SPIONs teranosztikai célú nemzetközi kutatásához? Természetes polikarboxilátok (huminsavak) adszorpcióját vizsgáltuk agyagásvány és oxid, köztük vasoxid nanorészecskéken, valamint a felületmódosítás részecske aggregációra gyakorolt hatását tisztáztuk összetett környezet-releváns modell rendszerekben. 2002-ben Miskolcon a Bárány Sándor által szervezett nemzetközi IAP (Interfaces Against Pollution) konferencián a magnetit huminsav kölcsönhatást bemutató poszter¹⁰ egyik képén Vékás László (Magnetic Fluid Laboratory, Romanian Academy-Timisoara, Romania) felfedezte, hogy mágneses folyadékot állítottunk elő. Könnyű volt Neki, hiszen Ő akkor már a mágneses folyadékok klasszikusának számított nemzetközi szinten. Számára csupán az volt érdekes, hogy nekünk vizes közegben sikerült olyan tökéletesen diszpergálni a magnetit nanorészecskéket, hogy inhomogén mágneses térben az egyedi részecskék nem, csak a sokaságuk mozdul el; azaz külső mágneses térrel manipulálható a szuperparamágneses vasoxid nanorészecskéket (SPIONs) homogén eloszlásban tartalmazó folyadék, azaz a mágneses folyadék. A környezeti rendszerekhez kötődő nemzetközi szinten elismert kutatásaimat csak 2 évvel később adtam fel a 10. Mágneses folyadék konferencián Braziliában (10th International Conference on Magnetic Fluids, Guarujá, São Paulo, Brazil - August 02 - 06 - 2004), ahová szerencsésen egy 2 az 1-ben utazással jutottam el, mivel egy hét elcsúszással Sao Paulo-hoz közel volt egy huminsavas konferencia (12th Meeting of International Humic Substance Society, Sao Pedro, Brazil - July 26-30, 2004) is, ahová teljes költségtérítéssel meghívtak (akkor az IHSS International Board-jának a választott tagja voltam). Szóval Guarujá-ban az óceán partján sétálva, a szakma kiválóságaival beszélgetve világosodott meg, hogy a vizes rendszerek kolloid stabilitása területén felhalmozott ismereteimet kiválóan tudom hasznosítani e területen. Mivel a huminsavak kémiaiailag rosszul definiáltak, más stabilizáló ágens kellett keresni. A korábbi határfelületi egyensúlyi koncepciókn¹¹ és a fémoxid részecskék felületi komplexálására vonatkozó tapasztalataink^{12,13} alapján a polikarboxilátokra esett a választás. A felületi megkötődés mennyiségét adszorpcióss¹⁴, minőségét pedig felületi spektroszkópia (FTIR-ATR, XPS)^{15,16,17} mérésekkel jellemeztük.

* Jelenlegi cím: Élelmiszer-mérnöki Intézet, Mérnöki Kar, Szegedi Tudományegyetem, 6725 Szeged, Moszkvai krt. 5-7. e-mail: tombacz@chem.u-szeged.hu

Meddig jutottunk? Felhívtuk a figyelmet, hogy a kolloid stabilitás *in vivo* körülmények között elvárt szintre növelése csak elektrosztatikus stabilizálással lehetséges és hogy érdemes a kolloid stabilitást koagulálás kinetikai mérésekkel jellemezni a költséges *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok előtt¹⁸. A SPIO nanorészecskék felületén sok ponton kémiai kötött makromolekulás védőréteg óvja meg a részecskéket az aggregációtól, biztosítja az elvárt kémiai és kolloid stabilitást bioreleváns körülmények között^{15,17,19}. A részecskék nem közvetlenül, hanem a felületükön lévő védőrétegen keresztül érintkeznek a környezetükkel, kialakul az adott szerkezetű bionano határfelület,²⁰ amittől függ a kölcsönhatásuk a bioentitásokkal, főleg fehérjékkel, sejt membránokkal. A mesterséges nanoanyagok tervezett vénás adminisztrációja esetén (pl. MRI kontrasztanyagok) a hemokompatibilitásuk vizsgálata elengedhetetlen, amit több cikkünkben is bemutatunk.^{15,18,19} Ami a SPIONs teranostikai potenciálját illeti, az orvosi biológiai alkalmazások a mágneses mag, vagy a mag és burkolat, vagy főleg a védőréteg tulajdonságaitól függenek. Így például a mágneses mag tulajdonságaitól függ a hipertermiás hatékonyság, viszont a burkolat hidrofilitása által is befolyásolt a kontraszt fokozó hatás az MR képzéskorban, csak a burkolat kémiai állapotától függ azonban a hatóanyag szállítása (pl. hidrofób réteg képes vízben rosszul oldódó molekulákat – doxorubicint – szolubilizálni) és a biofunkció graftolása (pl. felületi –COOH csoportokhoz észter, vagy amid kötésen keresztül).

A vas-oxid nanorészecskék orvosi biológiai alkalmazását célzó intenzív kutató-fejlesztő munkánk célja volt szuperparamágneses, főleg magnetit és maghemit részecskék szintetizálása és polianionos védőréteggel való borítása annak érdekében, hogy biológiai mátrixokban (pl. vérben) is stabilis, diagnosztikai (MRI) és terápiás (hipertermia és hatóanyagszállítás) célokra alkalmas biokompatibilis mágneses folyadékot (MF) állítsunk elő. Jelen cikkben néhány érdekes részletet idézünk fel korábbi munkáinkból.

2. Biokompatibilis szuperparamágneses vas-oxid nanorészecskék (SPIONs) előállítása és jellemzése

2.1. Mágneses vas-oxid részecskék szintetizálása: méretfüggés a nano mérettartományban

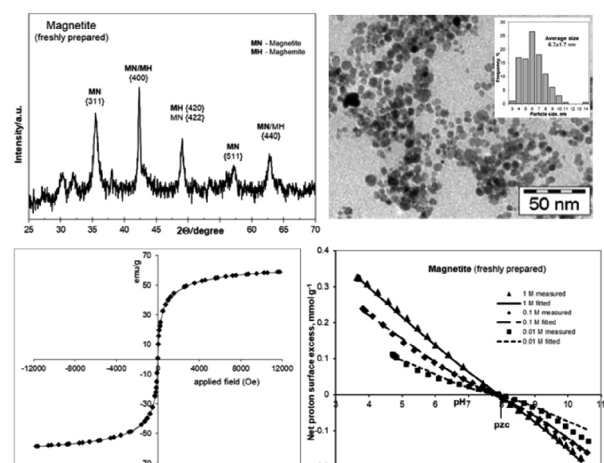
A magnetit (Fe_3O_4) II-es és III-as oxidációs állapotú vas-ionokat is tartalmazó ferrimágneses vas-oxid, oxidációval spontán maghemitté ($-\text{Fe}_2\text{O}_3$) alakul, a legelterjedtebb mágneses vas-oxidok.²¹ A ~20 nm-nél kisebb magnetit nanorészecskék szuperparamágneses tulajdonságúak, előállításukra sokféle (fizikai, nedves kémiai és mikrobiológiai) szintézis módszer ismert, pl. egy mostanában megjelent áttekintő cikk⁵ szerint. A nedves kémiai eljárások (ko-precipitáció, hőbomlás, hidrotermális, mikroemulziós, szonokémiai, mikrohullámmal támogatott)⁵ közül legelterjedtebb a vas(II)- és (III)-sók sztöchiometriai keverékének ($\text{Fe}^{2+} + 2\text{Fe}^{3+} + 4\text{OH}^- \rightarrow \text{Fe}_3\text{O}_4 + 4\text{H}^+$) ko-precipitációja. Ez utóbbi 3-17 nm-es jól kristályosodott magnetit nanorészecskék nagy mennyiségű előállítására alkalmas, a részecskék azonban viszonylag széles mérettartományban keletkeznek, a rendszer polidiszperz. A szintézis módszert Zrinyi Miklós (Lágy anyagok Laboratóriuma, Budapesti Műszaki Egyetem) korábban már

hasznalta mágneses hidrogélek előállítására, munkatársaitól vettük át. Kidolgoztunk egy ultrahangos kezeléssel intenzifikált hidrotermális öregítési eljárást, amellyel sikerült a részecskék méretét növelni és a minták polidiszperzitását csökkenteni.²² Az újabb trendeket, különös tekintettel az egy- és többmagvú (single- and multicore) SPIO nanorészecskék képződésére kritikusán elemeztük a mostanában megjelent áttekintő cikkünkben.⁹ A szintézisek tervezésénél fontos, hogy milyen felhasználásra szánjuk a részecskéket. A többmagvú SPIONs kitűnnek nagy hipertermiás hatékonyságukkal.²³

A koprecipitációs módszerrel magnetit szintetizáltunk. A frissen előállított nanorészecskék magnetit kristályszerkezetét XRD módszerrel azonosítottuk, méretét és morfológiáját TEM képpel jellemeztük (1. ábra). A részecskék szuperparamágneses tulajdonságát a VSM módszerrel mért magnetizációs görbék reverzibilitása (hiszterézis mentessége) mutatja (1. ábra). Vizes közegben a magnetit nanorészecskék felületi aktív helyei (Fe-OH) a pH-tól függően protonálódnak $\text{Fe-OH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Fe-OH}_2^+$ és deprotonálódnak $\text{Fe-OH} \rightarrow \text{Fe-O}^- + \text{H}^+$ vagy $\text{Fe-OH} + \text{OH}^- \rightarrow \text{Fe-O}^- + \text{H}_2\text{O}$. A kialakult felületi töltéssűrűséggel arányos nettó felületi proton többlet pH-függés kísérleti pontjait és a felületi komplexálási modellel²⁴ illesztett²⁵ függvényeit²⁶ az 1. ábrán mutatom be.

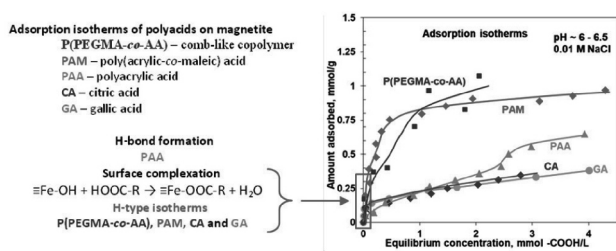
2.2. A SPIONs utólagos burkolása polikarboxilátokkal

A csupasz SPION részecskék aggregálódnak épp a biológiai rendszerekben leggyakrabban előforduló pH intervallumban (pl. pH~7,3-7,4 a vérben). Ezért és a felületi aktív helyeik reaktivitása, valamint a biológiai funkciók kapcsolása érdekében a részecskék felületét be kell fedni, ill. módosítani kell. Az irodalom szerint lehetséges a szintézis során spontán létrejövő felületi réteg kialakulás (in situ coating), a szintézis utáni (post-coating) adszorpció, ill. a funkcionális molekulák kötése (grafting).⁴ Mi az előbbi preferáltuk, a jól definiált SPION részecskék felületét különféle szerves polisavakkal burkoltuk.



1. Ábra A szintetikus magnetit nanorészecskék kristályszerkezeti azonosítása (röntgen diffraktogram – bal oldal fent), méret és morfológiai (TEM kép – jobb oldal fent), mágneses (magnetizációs görbe – bal oldal lent), valamint pH-függő felületi töltéssűrűség jellemzése (nettó proton felületi többlet pH-függés – jobb oldal lent).²⁶ A magnetizációs mérések L. Vekas laboratóriumában (Magnetic Fluid Laboratory, Romanian Academy-Timisoara, Romania) készültek.

A SPIONs szintézise, tisztítása és fentebb ismertett jellemzése után a kereskedelemben kapható kis és nagy molekulájú, sok karboxilcsoportot tartalmazó szerves vegyületek, valamint Iván Béla akadémikus Polimerkémiai csoportjában (MTA TTK, Budapest) szintetizált, etoxi- és karboxil csoportot tartalmazó fésűs kopolimerek adszorpcióját vizsgáltuk (2. ábra). Feltételeztük, hogy a felületi kötés a polisavak karboxil csoportjain keresztül jön létre, ezért a makromolekulák koncentrációját azok -COOH csoportjainak moláris mennyiségére vonatkoztattuk, ami például poliakrilsav esetén megfelel a monomerek moláris koncentrációjának. Az adszorpciós izotermák nagy affinitásúak, a kis molekulák (CA- citromsav, GA- galluszsav) a felület heterogén katalitikus hatására polimerizálódnak.²⁷



2. Ábra Polisavak adszorpciója magnetiten.^{14,17} A mennyiségi összehasonlíthatóság érdekében a nagy molekulájú polisavak egyensúlyi koncentrációját és adszorbeált mennyiségét is karboxilcsoport tartalmuk anyagmennyiségére vonatkoztattuk.

A szerves anyagok főleg -COOH csoportjaikon keresztül létrejött felületi kötéseit FTIR-ATR (néhány példa a sáv eltolódásokra az 1. táblázatban látható) azonosítottuk. A szerves anyagok jelenlétét XPS spektroszkópiával is bizonyítottuk,²⁷ valamint azt is, hogy a kimagaslóan hidrofíll P(PEGMA-co-AA) fésűs kopolimer (amit poli(etilén glikol) metil éter metakrilát (PEGMA) makromonomer és akrilsav (AA) kis molekulájú monomer kémiai kapcsolásával szintetizáltak) a magnetit felületen a víz molekulák teljes kiszorításával adszorbeálódik.¹⁷ Az XPS spektrumokat Kolozsváron Rodica Turcu (National Institute R&D for Isotopic and Molecular Technologies, Cluj-Napoca, Romania) mérte és értékelte ki.

1. Táblázat. A karboxilcsoportok IR sávjainak eltolódása a polisavak magnetiten történő adszorpciója (pH~6.5, I=0.01 M) következtében.^{15,16,30}

Abszorpciós sáv (cm ⁻¹)		$\Delta\nu$ (v _{adszorbeált} - v _{izibed}), cm ⁻¹			
		CA	GA	PAA	PAM
COOH	C=O (~1700)	-	-	17	23
	C-OH (~1280)	-	-	0	0
COO ⁻	aszim. (~1600)	58	0	0	7
	szim. (~1400)	9	-11	0	4

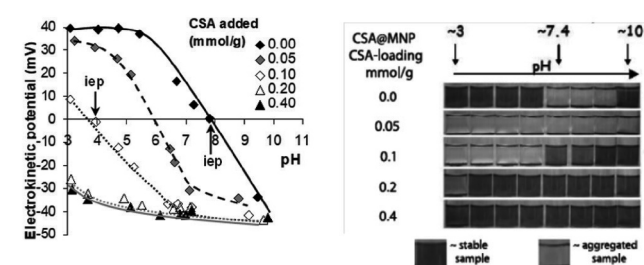
2.3. A polikarboxilátokkal burkolt SPIONs fizikai-kémiai és koloid karakterizálása

Az orvosbiológiai felhasználáshoz szükséges, de nem elégséges, hogy a vas-oxid részecskék ne legyenek toxikusak; kémiai és koloid stabilitással kell bírniuk *in vivo* és kompatibilisnek kell lenniük az adott test folyadékkal,

szóval. Például MRI kontrasztanyag célra történő fejlesztésnél a vérrel való kompatibilitás az elvárt, tekintettel az intravénás adminisztrációra. Fizikai-kémiai szempontból a vér adott pH-jú, fiziológiás só, valamint változatos fehérje és sejt tartalmú folyadék. Így javasoltuk ezen paraméterek hatásának laboratóriumi vizsgálatát a SPION részecskék modell diszperzióiban, mielőtt még a drága *in vitro* tesztek elvégzésére sor kerülne.¹⁸

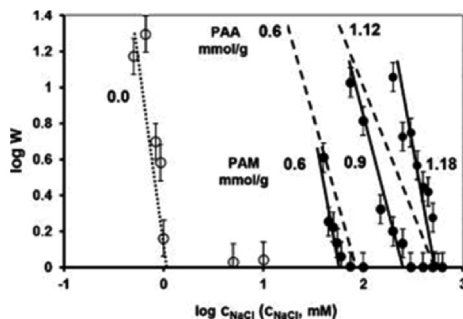
A *kémiai stabilitása* a SPION részecskéknek már laboratóriumi körülmények között sem megfelelő citromsav jelenlétében. Ez utóbbi, noha látszólag jó koloidstabilitást biztosít, korrozív hatású, mivel elősegíti a vas-ionok kioldódását; a makromolekulás védőrétegek viszont gátolják az oldódást, passzíválják a részecskéket.¹⁸

A polisavak adszorpciója a SPION részecskék felületén spontán folyamat. Növekvő mennyiségük jelenlétében a magnetit *pH-függő részecske töltése és a koloidstabilitása* jellegzetesen változik. Példaként egy érdekes anyagra, amit magnészes hialuronát hidrogélek előállítására használtunk,²⁸ a kondroitin-szulfátra vonatkozó eredményeket mutatom be a 3. ábrán.²⁹ A csupasz magnetit töltésmentes állapota - izoelektromos pontja (iep) - pH~8 körül van kitűnő egyezésben az 1. ábrán lévő pzc (point of zero charge) értékkel. Ennek környezetében a részecskék elektrosztatikus taszítás hiányában ütközésükkor összetapadnak és kiülednek. A részecskék pozitív töltést hordoznak az iep-nél kisebb pH-kon az Fe-OH helyek protonálódása miatt, míg nagyobbaknál deprotonálódnak és negatív töltésűek lesznek. Nyomnyi mennyiségű (0.05 mmol/g) CSA-t hozzáadva a pH<8 tartományban pozitív töltésű magnetit részecskék felületén a polianionok foltokban kötődnek meg és az ellentétes töltésű felületrészek ütközéskor összetapadnak, a minták a teljes vizsgált pH-tartományban aggregálódnak (3. ábra, jobb oldal a 2. sor üvegcsei). A növekvő mennyiségű CSA a savas pH-k felé tolja el az iep-t, így az aggregációs zónát is, majd a 0,2 mmol/g mennyiségnél nagyobb CSA hozzáadása már elegendő a részecskék teljes beburkolásához, így azok egységesen negatív töltéshordozóvá válnak a teljes vizsgált pH tartományban. A kialakult polianios réteg a sztérikus védő hatás mellett elektrosztatikusan is stabilizálja a SPION részecskéket. A különböző polisav/SPION rendszereknél analóg viselkedést tapasztaltunk.^{14,15,30}



1. Ábra A növekvő mennyiségű kondroitin-szulfát A (CSA) jelenlétében 10 mM NaCl oldatban 24 óra állás után mért pH-függő elektrokinetika potenciál (bal oldal) és koloidstabilitás (jobb oldal).²⁹ A hozzáadott CSA a dimer egységek 1 g magnetitre vonatkoztatott anyagmennyisége. A mintatartó üvegcsekben a jól stabilizált magnetit részecskék homogén eloszlásúak, nem ülepednek (sötét folyadék), míg az aggregáltak kiüledtek (átlátszó folyadék, vékony fekete üledék) az 1 nap alatt.

A diszpergált kolloidrészecskék hőmozgást végeznek, ütközéseik során összetapadnak, koagulálnak, ha nincs közöttük elektrosztatikus és/vagy sztérikus taszítás. A kolloid tudományokban jól ismert, hogy a diszperziók kolloidstabilitása, elektrolitok növekvő koncentrációjával szembeni ellenállása (sótűrő-képessége) koagulálás kinetikai mérésekkel jellemezhető,³¹ amit viszont nem vagy csak elvétve alkalmaznak az orvosi biológiai célokra fejlesztett SPIONs esetén. A 4. ábrán bemutatom a gyors és lassú koagulálás sebességi állandója hányadosaként definiált és a koagulálás kezdeti szakaszára jellemző DLS részecskeméret növekedési sebességekből számolt stabilitási hányadosok³² só koncentráció függését. A rajzot vonalak (pontosított, szaggatott, folytonos) rendre az egyes rendszerek (csupasz MNP, PAA@MNP, PAM@MNP) lassú koagulálás tartományában mért pontjaihoz illeszkednek, míg a log w=0 tengelyre eső vizont már a gyors koaguláláshoz rendelhetők.



4. Ábra Kolloid stabilitás: a stabilitási hányados logaritmus (log W) a só koncentráció logaritmusának (log cNaCl) függvényében ábrázolva a csupasz (üres jelölő) és a különböző fajlagos mennyiségben (PAA: 0,6 és 1,12 valamint PAM: 0,6; 0,9 és 1,18 mmol COOH/g magnetit) hozzáadott polisavakat tartalmazó magnetit szolok esetén pH~6,5-nél.¹⁵

A gyors koagulálás beindulásához szükséges minimális elektrolit koncentráció, a kritikus koaguláló elektrolit koncentráció (critical coagulation concentration - CCC), amit a gyors és lassú koagulálás tartományára illesztett egyenesek metszéspontja ad meg.

2. Táblázat A csupasz és polisavakkal burkolt magnetit részecskéket tartalmazó szolok CCC értékei pH~6,5-n koagulálás kinetikai mérésekkel meghatározva

Polisavak@MNP	Hozzáadott mennyiség ^a , mmol/g	CCC, NaCl mM	Cikk
Csupasz MNP	0	1	30
CA@MNP	0,3	70	18
GA@MNP	2	20 ^b	14
OA@MNP ^c	~2	208	43
PEG-OA@MNP ^d	~2	225	43
PAA@MNP	1,12	500	30
PAM@MNP	1,18	500	15
HA@MNP	1,5	500	14
PGA@MNP	2	500 ^e	14

^aA PAA, PAM és HA hozzáadott mennyisége a polimer COOH csoportmolekulákban megadott mennyiségére van vonatkoztatva.

^bA GA hozzáadásától számított 1 óra állás mért.

^cOA – olajsav, OA@MNP olajsav kettősréteggel stabilizált magnetit.

^dplusz 5 mmol EO/g PEG1000 hozzáadás.

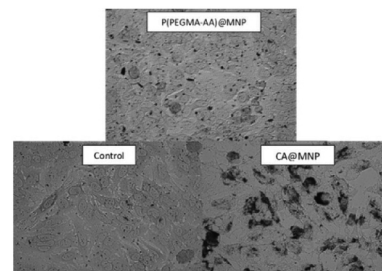
^eA GA hozzáadása után 2 hét állás után mért (GA felületi polimerizációja).

A 2. táblázatban mutatunk be néhány jellemző CCC adatot a polisavakkal burkolt SPION részecskékre. Összehasonlításként a csupasz magnetit, azonos pH-n mért CCC értéket is megadjuk. Az CCC értékek kétséget kizáróan bizonyítják, hogy a fiziológiás körülmények között, pl. vérben csak a nagy molekulájú polisavak által elektrosztérikus stabilizált SPION részecskék képesek megtartani egyediségüket, a többi, köztük a széles körben kutatott citromsavval burkolt (CA@MNP) magnetit tartalmazó minta is, gyors koagulálással destabilizálódik. A képződő aggregátumok a laboratóriumi kísérletekben csak kiülepednek, a véredényeket viszont elzárják, ami végzetes lenne. Így ennek a korrekt kolloid stabilitási vizsgálatnak is be kellene kerülni a nanorészecskék részletes fizikai-kémiai elemzéseit, a szabványosítandó tesztelési és karakterizálási módszerei közé; ez csökkentené a különböző laboratóriumok eredményei közötti ellentmondásokat, ami ma a nanotoxikológia egyik legnagyobb kihívása.³³

2.4. A polisavakkal burkolt SPION készítmények biokompatibilitása

A nanorészecskék toxicitását in vitro sejtes kísérletekben, ahol a sejtek életképességét, azaz a citotoxicitást, az oxidatív stresszt, a gyulladási reakciókat és a genotoxicitást vizsgálják csaknem kizárólagosan.⁷ Gyakran jellemzik a nanorészecskék kölcsönhatását a sejtekkel, a részecskék bekebelezését különféle egészséges és rákos sejtvonalakon, talán leggyakrabban HeLa sejteken.

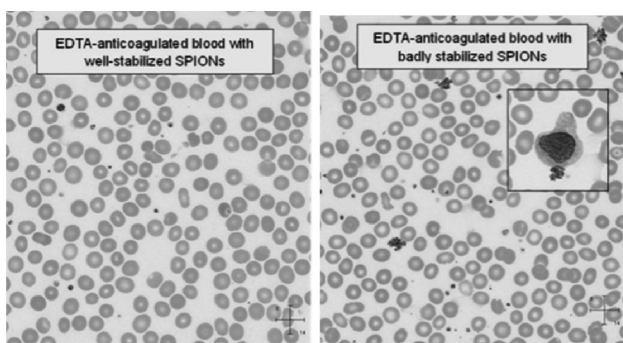
Együttműködő partnerek segítségével MTT tesztekkel (Zupkó István Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet) bizonyítottuk, hogy a sejtek életképességét a SPIONs jelenléte szignifikánsan nem befolyásolja.^{15,16} *Berlini két festéssel* vizualizáltuk, hogy a csak kissé eltérő polikarboxilát burkolatok különbözően hatnak kölcsön a HeLa sejtekkel, a SPION részecskék behatolnak a sejtek belsejébe (döntően a PAA@MNP) és/vagy megkötődnek (CA@MNP, PAM@MNP) a sejtek felületén,¹⁸ a pegilált fedőrétegek (P(PEGMA-co-AA@MNP)) viszont megakadályozzák a sejt membránnal való kölcsönhatást,¹⁷ amint az az 5. ábrán látható. Az Erlangeni Klinikai Egyetemen Christina Janko (Prof. Christoph Alexiou, University Hospital Erlangen, Section for Experimental Oncology and Nanomedicine - SEON) áramlásos citometriával Jurkat sejt tenyésztésben bizonyította, hogy a poligalláttal burkolt SPION részecskék (PGA@MNP) megőrzik az *antioxidáns hatást*, ami a GA esetén közismert.³⁴



5. Ábra He-La sejt tenyésztés Berlini-kék festéssel (vas kimutatás). A sejteket tovább tenyésztették karboxilált SPION részecskék nélkül (control) és azok (14,7 mg/L CA@MNP és 10 mg/L P(PEGMA-AA@MNP) jelenlétében. A CA@MNP minta esetén a kék szemcsék a vasoxid részecskéket mutatják a He-La sejtekben és azok felszínén. A sötét foltok a control és a P(PEGMA)@MNP tartalmú sejtenyésztésekben Berlini kék festék maradványok.¹⁷

A vérrel való kompatibilitás elvégzésének szükségességére egyik cikkünk¹⁵ bírálója hívta fel a figyelmünket. Javaslatára a vér diagnosztikai rutinban alkalmazott ülepedési vizsgálatokat végeztük el különböző koncentrációjú karboxilált SPION (PAM@MNP) jelenlétében a Szegedi Tudományegyetem, Laboratóriumi Medicina Intézetében Farkas Katalin segítségével, aki később bevezette a kenetek vizsgálatát is.³⁴ Az intézet igazgatója, Földesi Imre támogatta a kutatást és javasolta további vizsgálatok (így a hemolízis, a fehér és vörös vérszám, valamint a humán szérum fehérjékkel való kölcsönhatása) elvégzését. A *hemokompatibilitási* tesztek a hígítás hatásától eltekintve semmilyen, pl. aggregációra utaló eltérést nem mutattak a kontrollhoz képest az orvosbiológiai alkalmazásra kifejlesztett, fiziológiás körülmények között kolloidálisan stabil karboxilált SPION mintáink esetén. Azt viszont, hogy a nem megfelelően stabilizált részecskék aggregálódnak a kenetek látványosan bizonyították (6. ábra), ami az Interface Focus RSC folyóirat 2016-ban megjelent 'Multifunctional nanostructures for diagnosis and therapy of diseases' tematikus kötetének címlapjára is került.

Ha a szintetikus nanorészecskék biológiai környezetbe kerülnek, pl. vérrel érintkeznek, felületükön azonnal protein korona képződik, ami idővel átrendeződik.³⁵ Humán plazmával végzett kísérletekben protein korona képződést a csoportunkban szintetizált karboxilált SPION részecskéken Kenneth Dawson laboratóriumában (Centre for Bionano Interactions, University College of Dublin, Dublin, Ireland) Hajdú Angéla vizsgálta először,³⁶ majd itthon is elkezdjük.³⁷ A várakozásainknak megfelelően a polikarboxilált réteggel fedett SPION részecskék hasonlóan viselkedtek, a citráttal és olajsav kettősréteggel stabilizáltak viszont eltérést mutattak. Az utóbbiakon preferált volt a lipoproteinek adszorpciója,³⁶ míg kicsi plazma koncentrációknál a CA@MNP részecskék aggregálódtak.³⁷



6. Ábra. EDTA antikoagulált vérből SPION minták jelenlétében készített festett vérkenetek optikai mikroszkópos képei: jól (bal oldal) és rosszul (jobb oldal) stabilizált SPION minták, ez utóbbin jól látszódnak a SPION részecskék aggregált halmazai (barna foltok) mind az eredeti, mind a nagyított képen egy monocitához tapadva. (Festés: May-Grünwald-Giemsa módszer, automata rendszer (Sysmex SP4000i), CellaVision™ DM96 analízis.)¹⁹

3. Teranosztikai kilátások

A SPION készítményeink diagnózis területén való alkalmazhatóságát tekintve kérdés, hogy az *MR képalkotásban kontrasztfokozó* ágensként ígéresek-e. SPION részecskék esetén általánosan ismert,³⁸ hogy a lokális mágneses tér lényegesen megnöveli a víz molekulák

protonjainak r_2 relaxivitását (részecskék körüli és a vizes fázisban lévő protonok kémiai cseréjére jellemző), így tipikusan negatív kontrasztot ad, sötétíti a T2 súlyozott képek érintett területeit. A vizsgálatokat 1,5 T klinikai MRI készülékkel Babos Magor (a Szegedi Tudományegyetemen működő Euromedic Diagnostics Szeged Ltd. fizikusa) indította el, ettől kisebb és jóval nagyobb mágneses tereken a relaxivitás méréseket pedig Bányai István (Debreceni Egyetem, Kolloid- és Környezetkémia Tanszék) végezte el.³⁹ Későbbi méréseinket a klinikai MRI készüléken Kaszás Imre operátor (DIAGNOSCAN Magyarország Kft.) segítette. Az azonos mágneses magokat (~10 nm magnetit) különböző karboxilált védőréteggel fedett termékeinket tesztelve megállapíthatjuk, hogy a vastag, hidrofil, polikarboxilát rétegek jelenléte miatt nagy r_2 értékek jellemzik a SPION termékeinket (3. táblázat).

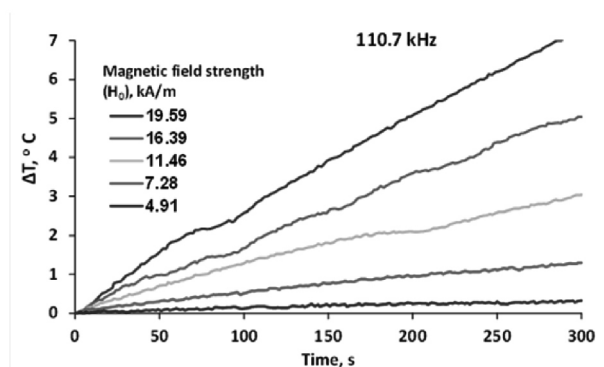
3. Táblázat Karboxilált SPION készítmények MRI kontrasztfokozó hatására jellemző r_2 relaxivitás értékei klinikai készülékben (GE Excite HDxt, GE Medical Systems, Milwaukee, WI), konvencionális spin echo képalkotó szekvenciát alkalmazva 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180 and 240 ms echo idővel, 1.5 T mágneses térben mérve.

Karboxilált SPION minta	r_2 relaxivitás, $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$	Cikk
CA@MNP	156	³⁹
PGA@MNP	387	³⁴
PAA@MNP	396	³⁹
OA@MNP	437	⁴³
PEG-OA@MNP	398	⁴³
Resovist (dextrán@MNP)	306	³⁹

A daganatok monitorozásában növelhető a SPION részecskék MRI kontraszt hatékonysága, ha tumor biomarker molekulákat rögzítünk kovalens kötésekkel a részecskékhez, amelyek a tumorhoz irányítják és ott felhalmozják a mágneses részecskéket, így a daganat állapotában bekövetkező változások az MR képeken követhetők.³⁸ Ilyen molekulákat még nem sikerült rögzíteni az általunk szintetizált karboxilált SPION részecskéken. Az Erlangeni Egyetemen Prof. Christoph Alexiou SEON csoportjával kooperálva viszont egy igen érdekes *hatóanyagszállítás*t valósítottunk meg. Egy rekombináns szöveti plazminogén aktivátort (tPA, Actilyse®) kapcsoltunk a PAM@MNP részecskék szabad -COOH csoportjaihoz, amely ezáltal mágnesesen irányíthatóvá, szállíthatóvá vált, ezzel lényegesen megnövelhető az erekben lévő plakkok közelében a tPA koncentráció, azaz a plakkok feloldásának hatékonysága. A kovalensen kötött SPION-tPA megőrizte aktivitását, reaktivitása és hosszú távú stabilitása is igen jó volt.⁴⁰ A rákgyógyászatban kiterjedt kutatások folynak a bio- és kemoterápiás hatóanyagok mágneses célba juttatással való lokalizált alkalmazása, valamint ezek más terápiás lehetőségekkel, pl. mágneses hipertermiával való kombinált terápiája területén a rákellenes szerek súlyos mellékhatásainak csökkentése érdekében.³⁸

A SPION mag-héj rendszerek terápiás alkalmazásai közül a mágneses mag tulajdonságaiból adódó *mágneses hipertermia* a legígéretesebb. Mágneses folyadékokat külső váltakozó mágneses térbe helyezve a részecskék vagy csak mágneses momentumaik elfordulnak, relaxációjuk (Brown vagy Néel) hőt termel.^{41,42} SPION részecskéket szövetekbe juttatva (pl. közvetlen injektálással vagy a tumort ellátó artérián keresztül) azok lokálisan felmelegíthetők. Ennek

mértékétől és időtartamától függően bekövetkezik elsősorban a rákos sejtek nekrozisa, mivel ezek az egészségesekhez viszonyítva fokozottan hőérzékenyek, kevésbé viselik el a magasabb (>42 °C) hőmérsékletet. A különféle SPION minták hőtermelő képessége laboratóriumi mérésekkel tesztelhető. A méréseket Szalay István (Pannon Egyetem, Fizikai Intézet) segítségével indítottuk el. Példaként a 7. ábrán bemutatok egy 110,7 kHz frekvencián, különböző erősségű váltakozó mágneses térben mért görbesereget.



7. Ábra. Mágneses hipertermia kísérletek: P(PEGMA-co-AA)@MNPs mágneses folyadékok melegedési görbéi 110,7 kHz frekvencián, különböző erősségű váltakozó mágneses térben mérve.¹⁷

Az ábrán látható, hogy az adott (5 g/L) SPION tartalmú mágneses folyadék, ~110 kHz frekvenciánál 5 perc alatt csak 17 kA/m-nél nagyobb mágneses terek esetén éri el az *in vivo* elvárt minimum 5 °C emelkedést. Töményebb mágneses folyadékok melegedése intenzívebb, a mágneses térerősség és a frekvencia növelésével hasonló hatás érhető el. Ez utóbbit azonban korlátozza elektromágneses hullámok *in vivo* alkalmazásának empirikus limitje (Brezovich kritérium: térerő frekvencia < 4.85 10⁸ A/ms), amit általában nem vesznek figyelembe a minták laboratóriumi tesztelésénél. Ez utóbbira nincs egységesen elfogadott mérési protokoll, így a különféle laboratóriumokban, különféle műszerekkel meghatározott adatok jelentős eltéréseket mutatnak. Példaként saját eredményeiket mutatjuk be: a melegedési görbék meredekségéből számolható SAR (specific absorption rate – fajlagos elnyelés) érték a P(PEGMA-co-AA)@MNP mágneses folyadékra 50.3 W/g (323 kHz és 15.9 kA/m) a DM10 (nBnanoscale Biomagnetics, Zaragoza, Spain), míg 17.44 W/g (329 kHz és 13.13 kA/m) a magneTherm készülékben mérve; a különbség majdnem háromszoros, jóval meghaladja a térerők különbségével indokolható mértéket. A mágneses hipertermiával foglalkozó RADIOMAG transzdiszciplináris COST akció (COST TD1402, <http://www.cost-radiomag.eu/>) felismerte ezt a problémát, egyik célja egy javaslat kidolgozása a mágneses hipertermiás mérések standardizálására.

A SPION részecskék teranostikai potenciáljától az alkalmazásig igen hosszú és rögös az út, nagyon sok drága *in vitro* majd még drágább *in vivo* vizsgálat elvégzésén keresztül vezet. Ezek értékeléséhez elengedhetetlen a SPION termékek egységes fizikai-kémia karakterizálása, amitől ma még távol állunk. A nanorészecskék tesztelési és jellemzési eljárásainak szabványosítása, valamint fizikai-kémiai tulajdonságaik részletes elemzése és átláthatóvá tétele csökkentené a különböző laboratóriumok kutatási eredményei közötti eltéréseket, ami napjainkban a nanotoxikológia egyik legnagyobb kihívása.³⁸

4. Összefoglalás

Az elmúlt két évtizedben a szuperparamágneses vas-oxid nanorészecskék (SPIONs) terápiás és diagnosztikai (teranostikai) célú fejlesztése nagy előrelépést mutatott. A mag-héj termékekben a mágneses mag MRI kontraszt ágensként, mágneses hipertermiában hőforrásként működik, alkalmas mágneses hatóanyag szállításra, a polimer védőréteggel pedig elérhető a biokompatibilitás, növelhető a keringésben töltött idő és lehetővé válik funkcionális bio- és kemoterápiás, valamint célzó molekulákkal. A Vizes Kolloidok Kutatócsoportban nemzetközi együttműködéssel több mint egy évtizeden át dolgoztunk a SPIONs teranostikai célú fejlesztésén. Sikeresen szintetizáltunk SPION nanorészecskéket, majd biokompatibilis polikarboxilát védőréteggel stabilizáltuk (mag-héj nanoszerkezet). Széles pH-tartományban stabilis, megnövelt sótűrő képességű, újszerű mágneses folyadékokat fejlesztettünk ki, amelyek nem aggregálódnak fiziológiás körülmények között, így nem okoznak elzáródást a véredényekben pl. intravénás alkalmazás esetén. A SPION készítményeink toxicitását, hemokompatibilitását, MRI kontrasztfokozó és hipertermiás hatásukat hazai és nemzetközi együttműködésben teszteltük. Néhány készítményünk MRI kontrasztfokozó hatása kimagasló, a polikarboxilát védőréteg reaktív csoportjai pedig alkalmasak biológiailag aktív molekulák és kemoterápiás hatóanyagok kapcsolására.

Köszönetnyilvánítás

A közleményben említett hazai és külföldi partnereink (Babos Magor, Farkas Katalin, Földesi Imre, Iván Béla, Szalay István, Zrínyi Miklós, Zupkó István és Christoph Alexiou, Rodica Turcu, Ladislau Vékás) közreműködése, az OTKA anyagi (A7 69109, NK 84014) és a RADIOMAG COST Action (TD1402) szellemi támogatása nélkül eredményeink nem valósulhattak volna meg.

Hivatkozások

- Kydralieva, K. A.; Dzhardimalieva, G. I.; Yurishcheva, A. A.; Jorobekova, S. J. *J. Inorg. Organomet. Polym.* **2016**, *26*, 1212–1230. <https://doi.org/10.1007/s10904-016-0436-1>
- Ulbrich, K.; Hlač, K.; Šubr, V.; Bakandritsos, A.; Tuc'ek, J.; Zbor'íl, R. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 5338–5431. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00589>
- Angelakeris, M. *BBA-Gen. Subjects* **2017**, *1861*, 1642–1651. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.02.022>
- Laurent, S.; Saei, A. A.; Behzadi, S.; Panahifar, A.; Mahmoudi, M. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2014**, *11*, 1449–70. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.924501>
- Kandasamy, G.; Maity, D. *Int. J. Pharm.* **2015**, *496*, 191–218. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.058>
- Hedayatnasab, Z.; Abnisa, F.; Daud; W. M. A. W. *Mater. Des.* **2017**, *123*, 174–196. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.03.036>
- Nedyalkova, M.; Donkova, B.; Romanova, J.; Tzvetkov, G.; Madurga, S.; Simeonov, V. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *249*, 192–212. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.003>
- Mohammed, L. Gomaa, H. G.; Ragab, D.; Zhu, J.; *Particuology*, **2017**, *30*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2016.06.001>
- Tombácz, E.; Turcu, R.; Socoliuc, V.; Vékás, L. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **2015**, *468*, 442–453. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.030>
- Illés, E.; Tombácz, E. *In Interfaces Against Pollution Book of Abstracts*; Bárány, S., Ed.; Miskolc, Hungary, **2002**, p.119.
- Tombácz, E. *In Adsorption: Theory, Modeling, and Analysis*; Tóth J., Ed.; Marcel Dekker, New York, **2002**; pp. 711–742. ISBN: 0-8247-0747-8
- Tombácz, E. *In The Role of Interfaces in Environmental Protection*; Bárány, S., Ed.; Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, **2003**; pp. 397–424. ISBN: 978-94-010-0183-0 https://doi.org/10.1007/978-94-010-0183-0_24
- Tombácz, E.; Libor, Zs.; Illés, E.; Majzik, A.; Klumpp, E. *Org. Geochem.* **2004**, *35*, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2003.11.002>
- Tombácz, E.; Tóth, I. Y.; Nesztor, D.; Illés, E.; Hajdú, A.; Szekeres, M.; Vékás, L. *Colloid Surface A* **2013**, *435*, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.01.023>
- Tóth, I. Y.; Illés, E.; Bauer, R. A.; Nesztor, D.; Zupkó, I.; Szekeres, M.; Tombácz, E. *Langmuir* **2012**, *28*, 16638–16646. <https://doi.org/10.1021/la302660p>
- Tombácz, E.; Illés, E.; Hajdú, A.; Tóth, I. Y.; Bauer, R. A.; Nesztor, D.; Szekeres, M.; Zupkó, I.; Vékás, L. *Period. Polytech., Chem. Eng.* **2014**, *58* (S), 3–10. <https://doi.org/10.3311/PPch.7285>
- Illés, E.; Szekeres, M.; Tóth, I. Y.; Szabó, Á.; Iván, B.; Turcu, R.; Vékás, L.; Zupkó, I.; Jaics, Gy.; Tombácz, E. *J. Magn. Magn. Mater.* **2018**, *451*, 710–720. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2017.11.122>
- Szekeres, M.; Tóth, I. Y.; Illés, E.; Hajdú, A.; Zupkó, I.; Farkas, K.; Oszlanczi, G.; Tiszlavicz, L.; Tombácz, E. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 14550–14574. <https://doi.org/10.3390/ijms140714550>
- Tombácz, E.; Szekeres, M.; Illés, E.; Tóth, I. Y.; Nesztor, D.; Szabó, T. *Interface Focus* **2016**, *6*, 20160068. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2016.0068>
- Nel, A. E.; Mäddler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasundaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. *Nature Materials* **2009**, *8*, 543–557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>
- Cornell, R. M.; Schwertmann, U. *The iron oxides*, VCH: Weinheim, **1996**. ISBN: 3527285768
- Tóth I. Doktori értekezés, Szegedi Tudományegyetem 2013.
- Blanco-Andujar, C.; Ortega, D.; Southern, P.; Pankhurst, Q. A.; Thanh, N. T. K. *Nanoscale* **2015**, *7*, 1768–1775. <https://doi.org/10.1039/C4NR06239F>
- James, R. O.; Parks, G. A. *In Surface and Colloid Science*; Matijevic, E. Ed.; Plenum: New York, **1982**, Vol. 12, pp. 119–216. ISBN: 978-1-4613-3204-6 https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3204-6_2
- Herbelin, A. L.; Westall, J. C. FITEQL v.3.2., Oregon State University, 1996.
- Tombácz, E.; Illés, E.; Majzik, A.; Hajdú, A.; Rideg, N.; Szekeres, M. *Croat. Chem. Acta* **2007**, *80*, 503–515.
- Tóth, I. Y.; Szekeres, M.; Turcu, R.; Sáring, Sz.; Illés, E.; Nesztor, D.; Tombácz, E. *Langmuir* **2014**, *30*, 15451–15461. <https://doi.org/10.1021/la5038102>
- Tóth, I. Y.; Veress, G.; Szekeres, M.; Illés, E.; Tombácz, E. *J. Magn. Magn. Mater.* **2015**, *380*, 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.10.139>
- Tóth, I. Y.; Illés, E.; Szekeres, M.; Tombácz, E. *J. Magn. Magn. Mater.* **2015**, *380*, 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.09.080>
- Hajdú, A.; Szekeres, M.; Tóth, I. Y.; Bauer, R. A.; Mihály, J.; Zupkó, I.; Tombácz, E. *Colloid Surface B* **2012**, *94*, 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.042>
- Hunter, R. J. *Foundations of Colloid Science, Volume I*, Clarendon Press: Oxford, **1989**.
- Kretzschmar, R.; Holthoff, H.; Sticher, H. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *202*, 95–103. <https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5440>
- Saei, A. A.; Yazdani, M.; Lohse, S. E.; Bakhtiary, Z.; Serpooshan, V.; Ghavami, M.; Asadian, M.; Mashaghi, S.; Dreaden, E. C.; Mashaghi, A.; Mahmoudi, M. *Chem. Mater.* **2017**, *29*, 6578–6595. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b01979>
- Szekeres, M.; Illés, E.; Janko, C.; Farkas, K.; Tóth, I. Y.; Nesztor, D.; Zupkó, I.; Földesi, I.; Alexiou, C.; Tombácz, E. *J. Nanomed. Nanotechnol.* **2015**, *5*, 6. <https://doi.org/10.5772/60069>
- Monopoli, M. P.; Aberg, C.; Salvati, A.; Dawson, K. A. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 779–786. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.207>
- Jedlovsky-Hajduš, A.; Baldelli Bombelli, F.; Monopoli, M. P.; Tombácz, E.; Dawson, K. A. *Langmuir* **2012**, *28*, 14983–14991. <https://doi.org/10.1021/la302446h>
- Szekeres, M.; Tóth, I. Y.; Turcu, R.; Tombácz, E. *J. Magn. Magn. Mater.* **2017**, *427*, 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.11.017>
- Revia, R. A.; Zhang, M. *Mater. Today* **2016**, *19*, 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.08.022>
- Jedlovsky-Hajdú, A.; Tombácz, E.; Bányai, I.; Babos, M.; Palkó, A. *J. Magn. Magn. Mater.* **2012**, *324*, 3173–3180. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2012.05.031>
- Friedrich, R. P.; Zaloga, J.; Schreiber, E.; Tóth, I. Y.; Tombácz, E.; Lye, S.; Alexiou, C. *Nanoscale Res. Lett.* **2016**, *11*, 297. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1521-7>
- Perigo, E. A.; Hemery, G.; Sandre, O.; Ortega, D.; Garaio, E.; Plazaola, F.; Teran, F. J. *Appl. Phys. Rev.* **2015**, *2*, 041302. <https://doi.org/10.1063/1.4935688>
- Ortega, D.; Pankhurst, Q. A.; *In Nanoscience: Volume I: Nanostructures through Chemistry*, O'Brien, P., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, **2013**; pp. 60–88. <https://doi.org/10.1039/9781849734844-00060>
- Illés, E.; Szekeres, M.; Kupcsik, E.; Tóth, I. Y.; Farkas, K.; Jedlovsky-Hajdú, A.; Tombácz, E. *Colloid Surface A* **2014**, *460*, 429–440. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.01.043>

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for theranostic purposes

The development of superparamagnetic iron-oxide nanoparticles (SPIONs) for therapeutic and diagnostic (theranostic) use has shown great progress over the past two decades. In the core-shell products, the magnetic core acts as an MRI contrast agent, heat source for magnetic hyperthermia, suitable for magnetic drug delivery, and the polymeric protective shell achieves biocompatibility, increases circulation time and allows for functionalization with bio- and chemotherapeutic and targeting moieties. The Aqueous Colloids Research Group with international cooperation has been working for more than a decade to develop SPION products for biomedical use. SPION nanoparticles were successfully synthesized and stabilized with a biocompatible polycarboxylate protective layer (core-shell nanostructure). We have developed novel magnetic fluids stabilized in a wide range of pH that cannot aggregate under physiological conditions and so will not cause blockage in blood vessels in case of e.g., intravenous administration. The toxicity, hemocompatibility, MRI contrast and hyperthermic effects of our SPION products were tested in domestic and international cooperation. Some of our products have noteworthy MRI contrast enhancing effect, and the reactive groups in their polycarboxylate protective shell are suitable for grafting biologically active molecules and chemotherapeutic agents.

In the point 2.1, the size-dependent synthesis of magnetic iron oxide particles in the nanosize range is shown. Fig. 1. Identification of the crystal structure of synthetic magnetite nanoparticles (XRD pattern – top left side), characterization of size and morphology (TEM image – top right side), magnetic (magnetization curve – bottom left side), and pH-dependent surface charge density (net proton surface excess as a function of pH – bottom right side).²⁶ The magnetization curves were measured in the laboratory of L. Vekas (Magnetic Fluid Laboratory, Romanian Academy – Timisoara, Romania).

The point 2.2 describes the post-coating of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) by polycarboxylates. Fig. 2. Adsorption of polyacids on magnetite.^{14,17} (The amount of the macromolecular polyacids is related to the moles of acidic groups. The lines are drawn to guide the eyes.) Table 1. The shift of the IR bands of COOH groups due to the adsorption of polyacids on magnetite (pH~6.5, I = 0.01 M).^{15,16,30}

In the point 2.3, we show the physicochemical and colloidal characterization of polycarboxylated SPIONs. Fig. 3.

pH-dependent electrokinetic potential (left side) and colloidal stability (right side) of the SPION dispersions containing different amounts of chondroitin-sulfate (CSA) at 10 mM NaCl after standing for 24 h. Pictures were taken a day after the pH setting between 3 and 10.²⁹ The moles of added CSA dimers are related to 1 g magnetite. In the vials, the well-stabilized magnetite particles are homogeneously dispersed, do not settle down (dark liquid), while the aggregated particles are deposited (transparent liquid and thin black sediment) during 1 day. Fig. 4. Colloidal stability: the logarithm of stability ratio ($\log W$) is plotted as a function of the logarithm of salt concentration ($\log c_{\text{NaCl}}$) for magnetite sols in the absence of polyacids (open symbols) and in the presence of PAA and PAM (0.6, 1.12 and 0.6; 0.9, 1.18 mmol COOH/g magnetite, respectively) (filled symbols) measured at pH ~ 6.5.¹⁵ Table 2 summarizes the CCC values for naked and polycarboxylated magnetite sols at pH ~ 6.5, determined by coagulation kinetics.

In the point 2.4, biocompatibility of polycarboxylated SPION products is described. Fig. 5. Prussian blue staining of He-La cell culture. The cells were further cultured in the presence of MNPs at 10 (P(PEGMA-AA)@MNP) and 14.7 mg/L (CA@MNP) concentrations, the latter used as a positive stain reference. The dark dots in the control and P(PEGMA)@MNP containing cell cultures are the residuals of not fully dissolved Prussian blue crystals.¹⁷ Fig. 6. Pictures of blood smears prepared from EDTA-anticoagulated blood with well-stabilized (left side) and badly stabilized (right side) SPION products. The aggregated SPIONs can be easily identified as brown spots on the original picture and attached to a monocyte (inset on the right side). (Staining: May-Grünwald-Giemsa method by automated slide preparation system (Sysmex SP4000i); analysis: CellaVision™ DM96.)¹⁹

In the point 3, the theranostic prospects are explained. Table 3. The r_2 relaxivities of SPION products with different surface coatings determined at 1.5 T and 20 °C. A conventional spin echo sequence with 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180 and 240 ms echo time was used in a clinical apparatus (GE Excite HDxt, GE Medical Systems, Milwaukee, WI). Fig. 7. Magnetic hyperthermia experiments: heating curves of P(PEGMA-co-AA)@MNP magnetic fluids measured at 110.7 kHz frequency, in different AC magnetic fields.¹⁷