



UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

PRACA DOKTORSKA

Tomasz Kubiak

Badanie metodą EPR

funkcjonalizowanych nanocząstek magnetytu

w surowicy i pełnej krwi ludzkiej

Promotor: prof. dr hab. Ryszard Krzyminiewski

Promotor pomocniczy: dr Bernadeta Dobosz

Wydział Fizyki UAM

Poznań, 2016

PODZIĘKOWANIA

Pragnę wyrazić gorące podziękowania mojemu promotorowi pracy doktorskiej, Panu prof. dr hab. Ryszardowi Krzyminiewskiemu z Wydziału Fizyki Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu za inspirację do podjęcia pracy badawczej, wieloletnią naukową opiekę, cenne rady oraz okazaną mi życzliwość i wsparcie.

Dziękuję również mojemu promotorowi pomocniczemu, dr Bernadecie Dobosz za życzliwość i wsparcie podczas przygotowywania rozprawy doktorskiej.

Wyrażam podziękowanie prof. dr hab. Grzegorzowi Schroederowi oraz dr Joannie Kurczewskiej z Wydziału Chemii UAM za przygotowane przez nich funkcjonalizowane nanocząstki, które zostały przeze mnie wykorzystane w pomiarach metodą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego.

Dziękuję ponadto dr Magdalenie Hałupce-Bryl z Centrum NanoBioMedycznego w Poznaniu za syntezę nanocząstek z doksorubicyną oraz dr n. med. Ewie Leporowskiej z Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu za udostępnienie próbek pełnej krwi i surowicy ludzkiej.

Na koniec wyrażam wdzięczność moim Rodzicom, którzy zawsze we mnie wierzyli, a przede wszystkim zaszczepili tak potrzebny w życiu etos pracy.

Tomasz Kubiak
Zakład Fizyki Medycznej UAM
w Poznaniu

Spis treści

Streszczenie	5
Summary.....	6
Wykaz symboli oraz wartości stałych fizycznych.....	7
Wykaz skrótów:.....	8
Wstęp:.....	9
1 Część teoretyczna:.....	10
1.1 Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR):.....	10
1.2 Nanocząstki tlenku żelaza.....	16
1.3 Biokompatybilne pokrycia nanocząstek	22
1.4 Znacznik spinowy TEMPO i jego rola w badaniu nanocząstek	26
1.5 Podstawowe informacje o pełnej krwi ludzkiej i centrach paramagnetycznych w niej występujących.....	36
1.6 Interakcje nanocząstek tlenku żelaza z białkami występującymi we krwi	42
2 Materiały:	44
2.1 Nanocząstki magnetytu:.....	44
2.2 Próbkki surowicy i pełnej krwi ludzkiej:	45
2.3 Próbkki nanocząstek w surowicy i pełnej krwi ludzkiej.....	46
3 Metodyka pomiarów:	47
3.1 Pomiary krwi i surowicy przed dodaniem nanocząstek:.....	47
3.2 Pomiary nanocząstek magnetytu:.....	48
3.3 Metoda szacowania niepewności pomiarowych:	50
3.4 Sposób przeprowadzania symulacji widm EPR:	51
3.5 Zastosowanie metody CREM:	51
4 Wyniki:	53
4.1 Pomiary surowicy i pełnej krwi ludzkiej przed dodaniem nanocząstek	53
4.2 Pomiary nanocząstek n53 pokrytych polimerem na bazie PEG z dołączonym lekiem przeciwnowotworowym - doksorubicyną.....	55
4.3 Pomiary nanocząstek n65b pokrytych silanem.....	65
4.4 Pomiary nanocząstek n66b pokrytych silanem i znakowanych 4-amino-TEMPO.....	71
4.5 Pomiary nanocząstek n58 pokrytych silanem i znakowanych 4-amino-TEMPO.....	77

4.6	Pomiary nanocząstek n64 pokrytych silanem i dekstranem oraz znakowanych 4-amino-TEMPO	85
5	Dyskusja wyników:	89
6	Wnioski końcowe:	100
7	Bibliografia:	102

Streszczenie

Celem pracy było zbadanie metodą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego właściwości funkcjonalizowanych powierzchniowo nanocząstek magnetytu w roztworach wodnych, surowicy i pełnej krwi ludzkiej. W eksperymentach wykorzystano 5 typów nanocząstek magnetytu, które różniły się sposobem modyfikacji powierzchni, zarówno pod względem pokrycia (PEG albo silan) jak i dołączonych ligandów (doksorubicyna albo znacznik spinowy 4-amino-TEMPO).

Pomiary przeprowadzone metodą EPR udowodniły wpływ środowiska na właściwości nanocząstek Fe_3O_4 . Pokazano, że parametry szerokiej linii EPR od magnetytowych rdzeni nanocząstek nie tylko silnie zależą od temperatury, ale różnią się w zależności od funkcjonalizacji powierzchni nanocząstek i ośrodka w jakim się one znajdują. Zastosowanie metody komputerowego zwiększania rozdzielczości sygnałowej (CREM) pozwoliło ponadto wyodrębnić z szerokiego sygnału EPR od rdzeni nanocząstek wąską linię z $g = 1,99$, której występowanie ma związek z powierzchnią rdzenia nanocząstek.

W pracy pokazano również, że anizotropia ruchu dołączonego do nanocząstek znacznika spinowego 4-amino-TEMPO odzwierciedla właściwości ośrodka, w jakim znajdują się nanocząstki oraz sposób przyłączenia rodnika do ich powierzchni. Wyznaczono czasy korelacji rotacyjnej znaczników dołączonych do nanocząstek w wodzie, surowicy i krwi. Dla widm znaczników wolno rotujących w niskich temperaturach przeprowadzono symulacje w programie EasySpin.

Dodatkowo w pracy zidentyfikowano centra paramagnetyczne występujące w próbkach surowicy i pełnej krwi przed dodaniem nanocząstek.

Summary

The aim of the study was to investigate the properties of the surface-functionalized magnetite nanoparticles in aqueous solutions, serum and human whole blood by means of electron paramagnetic resonance spectroscopy. Five types of magnetite nanoparticles, which differ both in terms of coating (PEG or silane) and attached ligands (doxorubicin or a spin label 4-amino-TEMPO) were used in experiments.

EPR measurements proved the impact of the environment on the properties of Fe_3O_4 nanoparticles. Research showed that the parameters of a broad EPR line from the core of magnetite nanoparticles not only strongly depend on temperature but also vary due to the functionalization of the surface of particles and the medium in which they are dispersed.

The use of the Computer Resolution Enhancement Method (CREM) allowed to extract a narrow line with $g = 1.99$ from a broad EPR signal from the core of nanoparticles. The presence of this narrow component is related to the phenomena occurring on the surface of the core of nanoparticles.

The study showed also that the anisotropy of the motion of the spin label 4-amino-TEMPO reflects the properties of the medium and the manner of the attachment of the radical to the surface of nanoparticles. Values of rotational correlation time of spin label were determined for nanoparticles in water, plasma and blood. EasySpin simulations were made for the slow-motional EPR spectra of spin label in low temperature.

Moreover, the paramagnetic centers present in serum and whole blood prior to the addition of nanoparticles were identified.

Wykaz symboli oraz wartości stałych fizycznych¹:

B_a - pole wewnętrzne związane z anizotropią
 B_r - wartość pola rezonansowego
 ΔB_{pp} - szerokość (pik-pik) linii EPR
 d - odległość między cząstkami
 E - energia
 f_m - częstotliwość drugiej modulacji pola magnetycznego
 g - współczynnik rozszczepienia spektroskopowego
 g_e - współczynnik g dla swobodnego elektronu; $g_e = 2,0023$
 g_N - czynnik g dla jądra
 h - stała Plancka ($h = 6,626069 \cdot 10^{-34}$ [J s])
 I - spin jądra
 k_B - stała Boltzmanna ($k_B = 1,380649 \cdot 10^{-23}$ [J/K])
 K_{ef} - efektywna stała anizotropii magnetycznej
 K_S - składowa anizotropii związana z powierzchnią
 m_s - magnetyczna spinowa liczba kwantowa
 M_S - magnetyzacja nasycenia
 ϕ - średnica rdzenia nanocząstki
 r - promień cząstki
 R - współczynnik asymetrii linii EPR
 S - spin elektronu
 V - objętość cząstki
 V_h - objętość hydrodynamiczna
 T - temperatura
 T_B - temperatura blokowania
 T_N - temperatura Néela
 T_V - temperatura przejścia Verwey'a
 γ_0 - stosunek żyromagnetyczny
 η - lepkość ośrodka
 μ_B - magneton Bohra ($\mu_B = 9,274009 \cdot 10^{-24}$ [J/T])
 μ_N - magneton jądrowy ($\mu_N = 5,050783 \cdot 10^{-27}$ [J/T])
 μ_S - moment magnetyczny związany ze spinem elektronu
 ν - częstotliwość
 τ_L - czas precesji Larmora
 τ_R - czas korelacji rotacyjnej znacznika spinowego
 τ_R - czas relaksacji Néela
 τ_{Brown} - czas relaksacji dla rotacji Browna

¹ Wartości stałych fizycznych na podstawie Tablic fizyczno- astronomicznych pod. red. W. Mizerskiego, Wydawnictwo Adamantan, Warszawa 2005.

Wykaz skrótów:

- CREM - Computer Resolution Enhancement Method, czyli metoda komputerowego zwiększania rozdzielczości sygnałów.
- DOX - dokсорubicyna
- EPR - elektronowy rezonans paramagnetyczny
- FC - field cooling (zamrażanie próbki w obecności zewnętrznego pola magnetycznego)
- HbO₂ - oksyhemoglobina
- metHB - methemoglobina
- PCMS - poli(chlorometylostyren)
- PEG - poli(glikol etylenowy)
- ROS - reaktywne formy tlenu (ang. Reactive oxygen species)
- TEM - transmisyjny mikroskop elektronowy
- TEMPO - (2,2,6,6-Tetramethyl-piperidin-1-yl)oxyl
- TEMPOL - 4-hydroxy TEMPO, czyli: 2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxy-piperidin-1-oxyl
- TEMPONE - 4-oxo-TEMPO, czyli 4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl
- ZFC - zero field cooled (zamrażane próbki bez pola magnetycznego)

Wstęp:

Zastosowanie superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza w medycynie otwiera nowe perspektywy w diagnostyce i terapii. Hipertermia magnetyczna, detoksykacja płynów biologicznych, biosensory, magnetyczna separacja komórek nowotworowych, wzmacnianie kontrastu w obrazowaniu rezonansem magnetycznym to tylko przykładowe pola eksploatacji nanocząstek magnetytu [1,2,3]. Najbardziej obiecujące wydaje się jednak użycie ich jako nośników leków w terapii celowanej nowotworów. Dołączanie do powierzchni nanocząstek ligandów kierujących a nawet bezpośrednio sterowane czy ogniskowane nanocząstek za pomocą zewnętrznego pola magnetycznego stwarza nadzieję na precyzyjne dostarczanie chemioterapeutyków w rejon guza i tym samym wyraźne ograniczenie ich skutków ubocznych [4,5].

Wprawdzie nanocząstki magnetytu posiadają szereg korzystnych właściwości, ale dopiero pokrycie ich odpowiednią osłoną polimerową jest w stanie zapewnić stabilność oraz biokompatybilność, rozumianą nie tylko jako brak toksyczności i niewywoływanie reakcji alergicznych, ale przede wszystkim zdolność do pełnienia swojej funkcji po wprowadzeniu do organizmu [6]. Kluczowym wyzwaniem jest zatem zbadanie i doprecyzowanie, jakie właściwości posiadają nanocząstki w środowisku biologicznym. Na etapie poprzedzającym kliniczne wykorzystanie superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza jako nośników leków niezbędne jest określenie ich interakcji z pełną krwią ludzką, tym bardziej, że to właśnie poprzez krwiobieg nanocząstki mają docierać do miejsca przeznaczenia [7,8].

Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego jest bardzo dobrym narzędziem do badania nanocząstek Fe_3O_4 , gdyż pozwala uzyskać dane zarówno o właściwościach wnętrza magnetytowego rdzenia nanocząstek, jak i jego powierzchni [9,10]. Dodatkowo w przypadku nanocząstek znakowanych spinowo z wykorzystaniem pochodnych TEMPO spektroskopia EPR może dostarczyć informacji o środowisku rodnika nitroksylowego, np. lepkości jego otoczenia a także procesach zachodzących na styku powierzchni i ośrodka [11,12].

Celem pracy było zbadanie metodą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego właściwości funkcjonalizowanych powierzchniowo nanocząstek magnetytu w roztworach wodnych, surowicy i pełnej krwi ludzkiej.

1 Część teoretyczna:

1.1 Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR):

Podstawowy podział materiałów ze względu na ich właściwości magnetyczne, który bazuje na wartości ich względnej przenikalności magnetycznej μ_r , wyróżnia diamagnetyki ($\mu_r < 1$), paramagnetyki ($\mu_r > 1$) i ferromagnetyki ($\mu_r \gg 1$) [13]. Diamagnetyki nie posiadają trwałego momentu magnetycznego, a ich podatność magnetyczna jest ujemna $\chi < 0$. Natomiast podatność magnetyczna paramagnetyków jest dodatnia $\chi > 0$. Po przyłożeniu zewnętrznego pola magnetycznego początkowo chaotycznie zorientowane momenty magnetyczne porządkują się zgodnie z kierunkiem pola magnetycznego, co wzmacnia w sposób naturalny jego wartość [13]. Do paramagnetyków należą atomy, cząsteczki i kompleksy molekularne o nieskompensowanym spinie, czyli, np. wolne rodniki, jony metali przejściowych czy defekty w dielektrykach i węglu [14]. Spektroskopia EPR pozwala na badanie próbek posiadających niesparowane elektrony. Umieszczenie ich w zewnętrznym polu magnetycznym sprawia, iż następuje rozszczepienie poziomów energetycznych zwane zjawiskiem Zeemana. Energia poszczególnych poziomów zależy od orientacji spinu S i związanego z nim momentu magnetycznego μ_s . Spin elektronu ulega kwantowaniu względem kierunku wektora indukcji zewnętrznego pola magnetycznego B , zatem jego rzut na kierunek tego pola przyjmuje tylko dyskretne wartości określone przez magnetyczną spinową liczbę kwantową m_s . Spinowy moment magnetyczny elektronu jest antyrównoległy do wektora spinu [14]:

$$\mu_s = -g\mu_B S \quad (1)$$

Składowa momentu magnetycznego μ wzdłuż kierunku pola B (przyjmijmy, że jest to kierunek osi z) przyjmuje wartość:

$$\mu_z = -g\mu_B m_s \quad (2)$$

W powyższych wyrażeniach μ_B - oznacza magneton Bohra ($\mu_B = 9,274009 \cdot 10^{-24}$ [J/T]); g - współczynnik zeemanowskiego rozszczepienia; natomiast m_s to magnetyczna spinowa liczba kwantowa o wartościach z przedziału $m_s = (-S, -S+1, \dots, S-1, S)$.

Znajomość wzoru na energię E dipola magnetycznego w stałym polu B :

$$E = -\mu \cdot B = -\mu B \cos \alpha(\mu, B) = -\mu_z B \quad (3)$$

pozwala wyznaczyć wzór na energię stanu spinowego:

$$E_m = g\mu_B m_s B \quad (4)$$

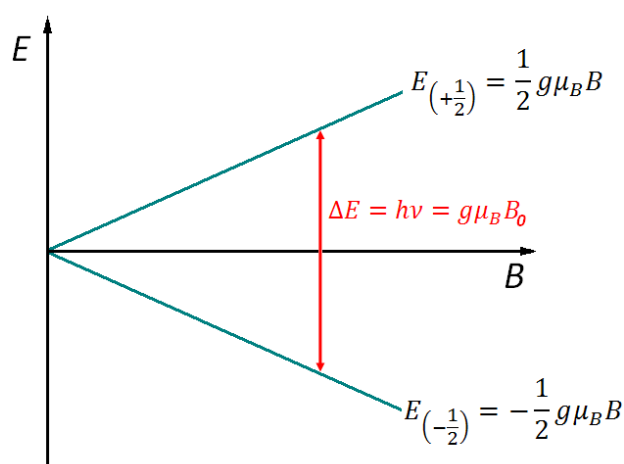
Energia układu spinów w zewnętrznym polu magnetycznym jest zatem skwantowana. W najprostszym przypadku pojedynczego elektronu o spinie $S = 1/2$ mamy dwie wartości magnetycznej liczby kwantowej $m_s = \pm 1/2$ i dwa zeemanowskie poziomy energetyczne:

$$E_{+1/2} = \frac{1}{2} g\mu_B B \quad (5)$$
$$E_{-1/2} = -\frac{1}{2} g\mu_B B$$

Różnica energii między tymi poziomami wynosi:

$$\Delta E = g\mu_B B \quad (6)$$

a zatem rośnie wraz z polem magnetycznym B , co przedstawiono na rys.1:



Rys. 1 Proporcjonalne do indukcji zewnętrznego pola magnetycznego rozszczepienie poziomów energetycznych niesparowanego elektronu.

Gdy dostarczymy do układu kwanty promieniowania elektromagnetycznego o częstotliwości mikrofalowej i energii kwantu $h\nu$, równej co do wartości różnicy energii ΔE między rozszczepionymi poziomami, spełniony będzie warunek rezonansu:

$$\Delta E = h\nu \quad (7)$$

$$h\nu = g\mu_B B_r \quad (8)$$

gdzie:

ν - częstotliwość mikrofal,

h - stała Plancka; $h = 6,626069 \cdot 10^{-34}$ [J s],

B_r - wartość pola rezonansowego.

Zaobserwujemy wtedy absorpcję energii towarzyszącą zmianie orientacji spinów elektronów w zewnętrznym polu magnetycznym, co wiąże się z przeniesieniem ich na najbliższy poziom wzbudzony. Warto nadmienić, iż pomiar w spektroskopii EPR jest przeprowadzany na dużym zespole spinów w próbce, a względne obsadzenie stanów energetycznych $E_{+1/2}$ i $E_{-1/2}$ w polu magnetycznym w równowadze termodynamicznej opisuje rozkład Boltzmann [15]:

$$\frac{n_{+1/2}}{n_{-1/2}} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{k_B T}\right) \quad (9)$$

gdzie: $n_{+1/2}$ - obsadzenie stanu o wyższej energii ($m_s = +1/2$), $n_{-1/2}$ - obsadzenie stanu o niższej energii ($m_s = -1/2$), T - temperatura, k_B - stała Boltzmann.

W celu identyfikacji konkretnych linii występujących w widmie EPR można wyznaczyć dla nich wartość współczynnika g :

$$g = \frac{h\nu}{\mu_B B_r} \quad (10)$$

Jeżeli częstość podstawimy w [GHz], a B_r w [mT], to g wyliczymy ze wzoru:

$$g = 71,447731 \left[\frac{\text{mT}}{\text{GHz}} \right] \cdot \frac{\nu \left[\frac{\text{GHz}}{\text{mT}} \right]}{B_r \left[\frac{\text{mT}}{\text{mT}} \right]} \quad (11)$$

Warto dodać, że ze względu na udział orbitalnego momentu magnetycznego oraz występowanie pól wewnętrznych, wyznaczana w eksperymencie wartość g odbiega od wartości g_e dla swobodnego elektronu [14,16]. Jeśli niesparowany elektron znajduje się na orbitalu o określonej symetrii i współczynnik g zależy od kąta, jaki tworzy wektor B z osią symetrii pola lokalnego, wtedy należy rozpatrywać tensor \hat{g} . Elektronowy człon zeemanowski wyraża się wówczas hamiltonianem spinowym, który uwzględnia również operator spinu elektronowego \hat{S} :

$$\hat{H}_{EZ} = \mu_B B \hat{g} \hat{S} \quad (12)$$

W układzie współrzędnych związanym z centrum paramagnetycznym tensor \hat{g} ma trzy, leżące na diagonalu składowe, które odpowiadają wartościom głównym współczynnika zeemanowskiego rozszczepienia w kierunkach osi głównych x, y, z [14]:

$$\hat{g} = \begin{bmatrix} g_x & 0 & 0 \\ 0 & g_y & 0 \\ 0 & 0 & g_z \end{bmatrix} \quad (13)$$

Jeśli ze względu na symetrię osiową wartości g_x oraz g_y są takie same, wtedy możemy posługiwać się wartością prostopadłą $g_{\perp} = g_x = g_y$ oraz wartością równoległą $g_{\parallel} = g_z$ do osi symetrii [17].

Dla cząsteczek znajdujących się w ciekłych roztworach wartości główne tensora uśredniają się na skutek szybkiej reorientacji molekularnej, a współczynnik g przyjmuje wartość izotropową równą $\frac{1}{3}$ śladu macierzy.

$$g_{izo} = \frac{g_x + g_y + g_z}{3} \quad (14)$$

W przypadku, gdy atomy występujące w badanym związku są aktywne magnetycznie, posiadając spin jądrowy $I \neq 0$, na niesparowany elektron działa nie tylko zewnętrzne pole magnetyczne, ale także pole magnetyczne pochodzące od jądra. Spin jądrowy w polu magnetycznym może przyjmować $2I+1$ orientacji danych przez magnetyczną jądrową liczbę kwantową m_I , przy czym $m_I = (-I, -I+1, \dots, I-1, I)$. Jądrowy moment magnetyczny wyraża się:

$$\mu_N = g_N \mu_N I \quad (15)$$

gdzie: g_N - czynnik g dla jądra, μ_N - magneton jądrowy.

Momenty magnetyczne elektronu μ_s i jądra μ_I oddziałują ze sobą, tworząc wypadkowy moment magnetyczny μ_F , a oddziaływanie to nazywamy nadsubtelnym. W jego wyniku następuje rozczepienie pojedynczej linii rezonansowej na multiplet struktury nadsubtelnej [16]. Z sytuacją taką mamy do czynienia dla znacznika spinowego TEMPO, gdzie elektron o spinie $S = \frac{1}{2}$ oddziałuje z jądrem azotu ^{14}N o spinie $I = 1$. Mamy wówczas sześć stanów spinowych $|m_S, m_I\rangle$:

$$\begin{aligned} \varphi_1 &= |\frac{1}{2}, 1\rangle, & \varphi_2 &= |\frac{1}{2}, 0\rangle, & \varphi_3 &= |\frac{1}{2}, -1\rangle, \\ \varphi_4 &= |-\frac{1}{2}, -1\rangle, & \varphi_5 &= |-\frac{1}{2}, 0\rangle, & \varphi_6 &= |-\frac{1}{2}, 1\rangle \end{aligned} \quad (16)$$

Odpowiada im sześć wartości energii. Jeśli nie przyłożymy zewnętrznego pola magnetycznego te sześć stanów jest zdegenerowane i zakłada się, że ich energie są równe zero. Przyłożenie pola magnetycznego rozszczepia poziomy energetyczne [18]. Gdy $B_r \gg A$ energia poszczególnych

rozczeplonych poziomów może być wyznaczona ze wzoru ogólnego zawierającego człony zeemanowskie i część opisującą oddziaływanie nadsubtelne:

$$E_{|m_s m_l\rangle} = m_s g \mu_B B - m_l g_N \mu_N B + A m_s m_l \quad (17)$$

Wartości energii dla poszczególnych poziomów:

$$E_{|\frac{1}{2}, 1\rangle} = \frac{1}{2} g \mu_B B - g_N \mu_N B + \frac{A}{2} \quad (18)$$

$$E_{|\frac{1}{2}, 0\rangle} = \frac{1}{2} g \mu_B B \quad (19)$$

$$E_{|\frac{1}{2}, -1\rangle} = \frac{1}{2} g \mu_B B + g_N \mu_N B - \frac{A}{2} \quad (20)$$

$$E_{|-\frac{1}{2}, -1\rangle} = -\frac{1}{2} g \mu_B B + g_N \mu_N B + \frac{A}{2} \quad (21)$$

$$E_{|-\frac{1}{2}, 0\rangle} = -\frac{1}{2} g \mu_B B \quad (22)$$

$$E_{|-\frac{1}{2}, 1\rangle} = -\frac{1}{2} g \mu_B B - g_N \mu_N B - \frac{A}{2} \quad (23)$$

Z obowiązujących w EPR reguł wyboru [16]:

$$\Delta m_s = \pm 1 \quad \Delta m_l = 0 \quad (24)$$

Wynika, iż między poziomami możliwe są trzy dozwolone przejścia:

$$E_{|\frac{1}{2}, 1\rangle} \leftrightarrow E_{|-\frac{1}{2}, 1\rangle}; E_{|\frac{1}{2}, 0\rangle} \leftrightarrow E_{|-\frac{1}{2}, 0\rangle} \quad \text{i} \quad E_{|\frac{1}{2}, -1\rangle} \leftrightarrow E_{|-\frac{1}{2}, -1\rangle} \quad (25)$$

W widmie EPR obserwujemy zatem trzy równoodległe linie. Sytuację na przykładzie znacznika spinowego TEMPO przedstawiono na rys.2.

Generalnie w przypadku oddziaływania niesparowanego elektronu z n jądrami równocennymi magnetycznie w widmie EPR pojawia się N równoodległych linii:

$$N = 2nI + 1 \quad (26)$$

Gdy poszczególne jądra znajdują się coraz dalej od niesparowanego elektronu, ich wpływ na rozszczepienie spinowych poziomów energetycznych się zmniejsza. Przyczynę od pola struktury nadsubtelnej do całkowitego pola działającego na elektron zależy bowiem nie tylko od wartości μ_l , ale także od odległości dzielącej elektron i jądro [16].

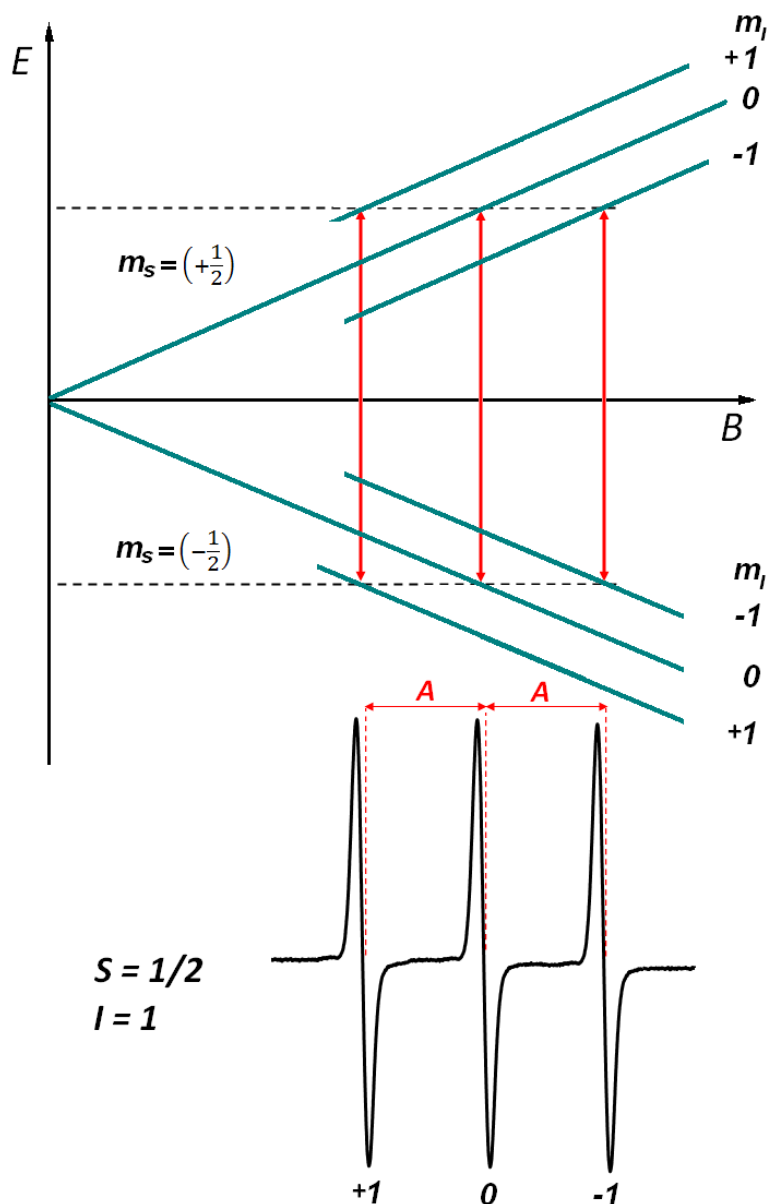
Jeśli energia oddziaływania nadsubtelnego w cząsteczce lub kryształce zależy od orientacji danego centrum w polu magnetycznym B wykorzystuje się Hamiltonian opisujący oddziaływanie nadsubtelne:

$$\hat{H}_{HF} = \hat{I} \hat{A} \hat{S} \quad (27)$$

gdzie: \hat{A} – tensor oddziaływania nadsubtelnego, \hat{I} – operator spinu dla sprzężonego jądra.

Wartości główne tensora A_x , A_y i A_z leżą na głównej przekątnej, natomiast wartość izotropową wyraża się jako:

$$A_{izo} = \frac{A_x + A_y + A_z}{3} \quad (28)$$

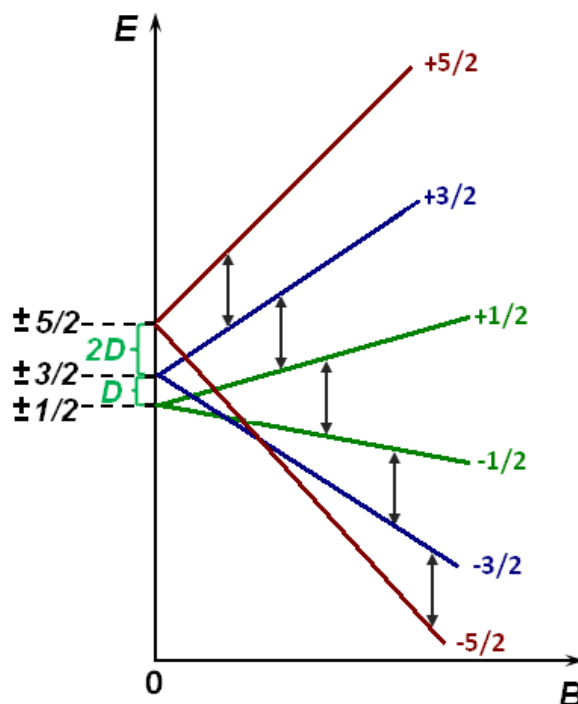


Rys. 2 Schemat poziomów energetycznych (rozszczenie Zeemana i nadsubtelne) z zaznaczonymi przejściami dozwolonymi dla znacznika spinowego TEMPO oraz korespondujące widmo EPR.

W przypadku centrów paramagnetycznych zawierających więcej niż jeden niesparowany elektron, czyli dla układów dla których $S \geq 1$, pojawia się dodatkowo wzajemne oddziaływanie między sąsiednimi spinami elektronowymi. Przykładowo taka interakcja może być obserwowana dla jonów w konfiguracji elektronowej d^5 (np. Fe^{3+}), d^6 (np. Fe^{2+}) a także dla kompleksów wielocentrowych i wielorodników [14]. W przypadku spinu $S = 3/2$ rozszczepienie w polu krystalicznym (w polu ligandów), czyli tzw. rozszczepienie w polu zerowym daje dwa dublety Kramersa $\pm 3/2$ i $\pm 1/2$, natomiast dla $S = 5/2$ mamy trzy dublety: $\pm 5/2$, $\pm 3/2$, $\pm 1/2$ [19]. Z tym ostatnim przypadkiem mamy do czynienia, np. dla jonu Fe^{3+} (konfiguracja $3d^5$), co przedstawiono na rys.3. W polu magnetycznym każdy dublet kramersowski rozszczepia się na dwa podpoziomy [19]. Człon hamiltonianu spinowego dla struktury subtelnej przyjmuje postać:

$$H_{SS} = \hat{S}\hat{D}\hat{S} \quad (29)$$

gdzie: \check{D} - oznacza tensor oddziaływania subtelnego, opisujący wielkość rozczepienia w polu zerowym i jego zależność kątową. Zawiera on też informacje o symetrii i naturze wiązania chemicznego [20].



Rys. 3 Rozszczepienie poziomów energetycznych w polu krystalicznym i w obecności zewnętrznego pola magnetycznego dla jonu Fe^{3+} . Rysunek na podstawie [19].

Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego, oprócz klasycznych zastosowań w badaniu centrów paramagnetycznych, jest również uznanym narzędziem badawczym dla różnych materiałów magnetycznych także tych ferro- i antyferromagnetycznych czy szkieł spinowych [21].

1.2 Nanocząstki tlenku żelaza

Idea zastosowania nanocząstek magnetycznych w medycynie obejmuje ich wykorzystanie do transportu leków, hipertermii magnetycznej, detoksykacji płynów biologicznych, magnetycznej separacji komórek nowotworowych, obrazowania rezonansem magnetycznym czy jako biosensorów [10,22]. Zawiesiny koloidalne nanocząstek magnetycznych w cieczy nośnej nazywane są często cieczami magnetycznymi lub ferrocieczami [23]. Nanocząstki są z reguły syntetyzowane metodą współstrącania (koprecypitacji) lub mikroemulsji [24]. Podczas tworzenia nanocząstek w mikroemulsji wodna faza roztworu metalu jest uwięziona w mikro-kropli, która jest stabilizowana surfaktantem i zawieszona w ciągłej fazie olejowej. Taki micelarny zespół stabilizujący ogranicza aglomerację cząstek i determinuje ich rozmiar [24]. Nanocząstki magnetytu przeznaczone do zastosowań medycznych często syntetyzuje się metodą koprecypitacji, która polega na współstrącaniu stechiometrycznej mieszaniny soli żelazowych (Fe^{III}) i żelazowych (Fe^{II}) w środowisku wodnym w warunkach zasadowych bez obecności tlenu [25]. Do celów badawczych najczęściej syntetyzuje się cząstki o średnicach od kilku do kilkunastu nanometrów. Tak niewielkie rozmiary przekładają się istotnie na właściwości cząstek, gdyż procesy relaksacji magnetyzacji są ściśle zależne od temperatury i wielkości obiektów [23]. Wraz ze zmniejszeniem średnicy cząstek zwiększa się udział frakcji atomów powierzchniowych w stosunku do frakcji atomów rdzenia. Najlepiej obrazuje to porównanie nanocząstek $\varnothing \approx 100$ nm, dla których frakcja powierzchniowa stanowi 6% całkowitej liczby atomów, z nanocząstkami $\varnothing \approx 5$ nm, gdzie osiąga ona już ok. 78% wszystkich atomów [24]. Spiny powierzchniowe odgrywają ważną rolę w strukturze i dynamicznym zachowaniu nanocząstek a anizotropia powierzchniowa może nawet zdominować anizotropię objętościową [23]. Na powierzchni nanocząstek obserwowano już nieuporządkowane struktury magnetyczne przypominające fazę szkła spinowego [23,26]. Własności magnetyczne nanocząstek tlenku żelaza wciąż stanowią zatem przedmiot zainteresowania naukowców. Warto przypomnieć, że w badaniach magnetycznych faza ferrimagnetyczna ma dobrze zdefiniowane namagnesowanie szczytkowe i pole koercji, faza superparamagnetyczna nie posiada ani remanencji ani koercji, faza paramagnetyczna wykazuje natomiast liniową zależność namagnesowania od przyłożonego pola magnetycznego [27]. W układach posiadających magnetyzację szczytkową silne oddziaływania dipol-dipol lub sprzężenie magnetyczne mogą skutkować występowaniem w temperaturze pokojowej silnych i szerokich sygnałów przypisywanych rezonansowi ferromagnetycznemu [22]. Zachowanie ferromagnetyczne nanocząstek obserwowane jest zazwyczaj poniżej temperatury blokowania T_B , natomiast powyżej tej temperatury fluktuacje termiczne przeważają nad anizotropowymi oddziaływaniami magnetycznymi i momenty magnetyczne nanocząstek wykazują zachowanie superparamagnetyczne [28]. Z literatury wiadomo, iż wartość T_B wyznaczana dla nanocząstek magnetytu różni się w zależności od techniki ich syntezy i rozmiarów, przykładowe wartości to $T_B=134\text{K}$ dla cząstek ($\varnothing = 11$ nm) i 150K ($\varnothing = 6$ nm) [29]. Badania metodą ESR nanocząstek magnetycznych $\text{Zn}_{0,7}\text{Ni}_{0,3}\text{Fe}_2\text{O}_4$ o średnim rozmiarze 8 nm wykazały występowanie w zakresie temperatur 100-500K trzech faz magnetycznych [27]. W niskich temperaturach ($T < 140\text{K}$) obserwowano fazę ferrimagnetyczną charakteryzującą się

niskim polem rezonansowym i szeroką asymetryczną linią, w temperaturach umiarkowanych fazę superparamagnetyczną, natomiast w wysokich ($T > 360\text{K}$) stan paramagnetyczny z wąską, symetryczną linią i wysokim polem rezonansowym [27]. Wykonane w zakresie od 3,5 do 500 K pomiary osadzonych w matrycy z polietylenu nanocząstek tlenku żelaza pozwoliły zarejestrować linię od rezonansu superparamagnetycznego, która w niskich temperaturach przechodziła w szeroki sygnał FMR [21]. Z punktu widzenia fizyki interesujący wydaje się fakt, iż w przedziale temperatur 90-120K w magnetycie obserwowano przejście fazowe Verwey'a [22,30]. Postuluje się, iż w przejściu fazowym Verwey'a struktura krystalograficzna magnetytu zmienia się z kubicznej na jednoskośną [22,31,32]. W temperaturach $T > T_V$, gdzie T_V oznacza temperaturę przejścia Verwey'a, magnetyt posiada strukturę kubiczną spinelu $\text{Fe(A)Fe(B)}_2\text{O}_4$ [30]. Jest to spinel typu odwróconego co oznacza, że tetraedryczne pozycje (A) są zajmowane przez Fe^{3+} , podczas gdy dwukrotnie liczniejsze pozycje oktaedryczne (B) są losowo zajęte przez Fe^{2+} i Fe^{3+} [33,34]. Poniżej temperatury Néela ($T_N = 851\text{K}$) magnetyt lity wykazuje ferrimagnetyzm, ponieważ momenty magnetyczne jonów żelaza w pozycjach A i B są ustawione antyrównolegle, dając wypadkowy moment magnetyczny odpowiadający Fe^{2+} [33,31]. Z kolei dla $T < T_V$ pojawia się uporządkowanie z równą liczbą jonów Fe^{2+} i Fe^{3+} w pozycjach B, czyli tzw. uporządkowanie ładunkowe [30]. W badaniach EPR cząstek magnetytu w zakresie temperatur odpowiadającym przejściu Verwey'a obserwowano gwałtowną zmianę szerokości linii [22]. Z kolei wykonanie dekonwolucji i symulacji widm mikrocząstek magnetytu pozwoliło w zakresie temperatur 85 K-125K wydzielić dwa szerokie ($g_{ef} = 2,4$ i $4,1$) i dwa wąskie sygnały EPR ($g_{ef} = 2,8$ i $3,4$) [30]. Nietypowe zachowanie widm nanocząstek tlenku żelaza zaobserwowano również w temperaturze około 25 K i uznano za dowód na występowanie w nanocząstkach stanu szkła spinowego [21]. Generalnie jednak sygnał EPR od rdzenia superparamagnetycznych nanocząstek ma postać szerokiej linii, np. dla zmodyfikowanych kwasami karboksylowymi i 4-amino TEMPO nanocząstek Fe_3O_4 ($\phi = 8.9\text{-}14.5$ nm)) w wodzie $\Delta B = 100$ mT w 298K [35]. Warto zastanowić się, z czego wynikają właściwości i zachowanie nanocząstek.

Do opisu zachowania superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza zazwyczaj stosuje się teorię Langevina, przypisując każdej cząstce moment magnetyczny μ [36]. Przydatne jest też zdefiniowanie magnetyzacji:

$$M = \frac{1}{\Delta V} \sum_{i=1}^N \mu_i \quad (30)$$

jako sumy momentów magnetycznych N cząstek zgromadzonych w jednostce objętości V . Przy braku zewnętrznego pola magnetycznego ze względu na ruchy Browna kierunek momentów magnetycznych cząstek jest przypadkowy i w skali makroskopowej magnetyzacja jest zerowa [36]. Natomiast po umieszczeniu w zewnętrznym polu magnetycznym cząstki zaczną się orientować, co będzie skutkowało pojawieniem się wypadkowej magnetyzacji wzdłuż kierunku pola [11]. Początkowo zwiększanie natężenia pola magnetycznego będzie prowadzić do gwałtownego wzrostu magnetyzacji, ale w momencie, gdy większość cząstek ustawi się wzdłuż

jego kierunku wartość magnetyzacji zbliży się do nasycenia [36]. Należy dodać, iż każda superparamagnetyczna nanocząstka traktowana jest jako pojedyncza domena [10,11].

Jeśli cząstki znajdują się w stanie równowagi termicznej w statycznym polu magnetycznym wektory B i M mają ten sam kierunek, natomiast dla pola zmiennego w czasie wektor magnetyzacji podąża za polem z określonym opóźnieniem [36]. Pod wpływem pola magnetycznego może nastąpić obrót całej nanocząstki (rotacja Browna) albo jedynie zmiana kierunku momentu magnetycznego (rotacja Néela) [36].

Nieoddziałujące jednodomenowe cząstki magnetyczne wykazujące właściwości superparamagnetyczne charakteryzuje się zazwyczaj poprzez czas relaksacji Néela τ_{rel} , który zależy od temperatury:

$$\tau_{rel} = \tau_0 \exp\left(\frac{K_{ef}V}{k_B T}\right) \quad (31)$$

gdzie: K_{ef} - efektywna stała anizotropii magnetycznej, V - objętość rdzenia cząstki, τ_0 - jest rzędu 10^{-13} - 10^{-10} s [21,28,37]. Natomiast czas relaksacji dla rotacji Browna, który jest zależny od lepkości ośrodka η i objętości hydrodynamicznej V_h cząstki, można określić ze wzoru:

$$\tau_{Brown} = \frac{3\eta V_H}{k_B T} \quad (32)$$

Wartość temperatury blokowania T_B odpowiada temperaturze, w której czas relaksacji τ_{rel} momentów magnetycznych jest równy czasowi pomiaru τ_m :

$$\tau_m = \tau_{rel} = \tau_0 \exp\left(\frac{K_{ef}V}{k_B T_B}\right) \quad (33)$$

Czas $\tau_m \approx 1/\nu$ dla pomiarów EPR w paśmie X wynosi $\approx 10^{-10}$ s [28]. Warto dodać, iż w przypadku superparamagnetycznych nanocząstek o zróżnicowanej objętości spadek temperatury będzie w pierwszej kolejności blokował największe cząstki a dopiero później mniejsze [28]. W opisie uwzględniającym oddziaływania międzycząsteczkowe, które mogą odgrywać istotną rolę w układzie cząstek magnetycznych, zamiast prawa Néela-Arrheniusa wykorzystuje się prawo Vogel-Fulchera:

$$\tau_{rel} = \tau_0 \exp\left(\frac{K_{ef}V}{k_B(T-T_0)}\right) \quad (34)$$

gdzie: T_0 - to charakterystyka temperatura porządkowania, która wynika z oddziaływań w układzie i wzrasta wraz z siłą tych oddziaływań [37,38]. Przykładowo dla magnetycznych nanocząstek $Mn_{0,5}Zn_{0,5}Fe_2O_4$, stosując powyższy model otrzymano $T_0 = 67$ K i $\tau_0 = 10^{-9}$ s.

W zależności od rozmiarów cząstek magnetycznych cztery podstawowe rodzaje anizotropii są odpowiedzialne za występowanie pól wewnętrznych, które dodając się do zewnętrznego pola spektrometru, tworzą pole efektywne B_{ef} [22]. Anizotropia magnetokrystaliczna wynika ze struktury krystalograficznej, anizotropia struktur domenowych bierze pod uwagę względną orientację pola mikrofalowego w stosunku do ścian domen, anizotropia kształtu jest spowodowana przez interakcję wektora magnetyzacji z polem demagnetyzującym ziarna, natomiast anizotropia wymiany to skutek oddziaływań między

cząstkami magnetycznymi [22]. Anizotropia wymiany może mieć też swoje źródło w sprzężeniu wymiennym na granicy dwóch faz różniących się uporządkowaniem magnetycznym, a w przypadku nanocząstek fazy takie są zazwyczaj związane z wnętrzem rdzenia i jego powierzchnią [39]. Dla niesferycznych cząstek magnetytu o rozmiarach mniejszych od 20 μm dominuje anizotropia kształtu, natomiast dla cząstek większych przeważa anizotropia magnetokrystaliczna [22]. Warto przypomnieć, iż dla układów o symetrii kubicznej energia anizotropii magnetokrystalicznej na jednostkę objętości (E_{AM}) rozwinięta do drugiego rzędu dana jest wyrażeniem:

$$E_{AM} = K_0 + K_1(\alpha_1^2\alpha_2^2 + \alpha_2^2\alpha_3^2 + \alpha_3^2\alpha_1^2) + K_2(\alpha_1\alpha_2\alpha_3)^2 \quad (35)$$

gdzie: K_1 i K_2 to stałe anizotropii, α_1 , α_2 , α_3 - kosinusy kierunkowe wektora magnetyzacji w stosunku do każdej osi krystalograficznej [40]. Energia anizotropii magnetokrystalicznej w magnetycie pochodzi głównie od Fe^{II} [22]. Wartości stałych K_1 i K_2 dla magnetytu zależą od temperatury a stała anizotropii K_2 dla magnetytu jest ujemna. Powyżej punktu izotropowego magnetytu $|111|$ jest kierunkiem łatwego namagnesowania (tzn. $K_1 < 0$ i $0 < K_2 < 1,2 \cdot K_1$) [40]. Dla litego maghemitu $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ objętościowa stała anizotropii magnetokrystalicznej $K_1 = -4,7 \cdot 10^4 \text{ erg/cm}^3$ a kierunek łatwego namagnesowania odpowiada osi $|110|$ [23]. Natomiast dla litego magnetytu w temperaturze pokojowej $K_1 \approx -1,1 \cdot 10^5 \text{ erg/cm}^3$ [41]. W przypadku nanocząstek Fe_3O_4 stała anizotropii wyznaczana na podstawie widm rezonansowych może być większa z uwagi na fakt, iż jony magnetyczne znajdujące się bliżej powierzchni wykazują zupełnie inne oddziaływania magnetyczne od jonów z wnętrza cząstki [41]. Inne anizotropie, np. kształtu czy powierzchni, mogą przeważać nad anizotropią magnetokrystaliczną [23]. Ustalono, iż dla magnetytu bardzo istotna jest anizotropia kształtu [42].

Efektywne pole magnetyczne widziane przez nanocząstkę będącą pojedynczą domeną magnetyczną może być wyrażone jako pierwsza pochodna gęstości energii swobodnej E cząstki po kierunku wektora magnetyzacji, jaki odpowiada stanowi równowagi:

$$B_{ef} = - \left. \frac{\partial E}{\partial M} \right|_{eq} \quad (36)$$

W tym przypadku na całkowitą energię składają się przyczynki od energii Zeemanowskiej, energii wymiany, energii anizotropii magnetokrystalicznej i energii magnetostatycznej (demagnetyzacji):

$$E = -M \cdot B_{zew} + E_{AM} + E_{wym} + \frac{1}{2}\mu_0 M \cdot N \cdot M \quad (37)$$

gdzie: M - wektor magnetyzacji, N - tensor demagnetyzacji [28].

Pole efektywne można zatem przedstawić, uwzględniając pole zewnętrzne spektrometru B_{zew} oraz pola wewnętrzne B_{wew} :

$$B_{ef} = B_{zew} + B_{wew} \quad (38)$$

Przy czym do pól wewnętrznych wpływających na magnetyzację oprócz pól związanych z anizotropią B_A i demagnetyzacją B_{dm} zalicza się również pole związane z wymianą B_{wym} [27].

$$B_{wew} = B_A + B_{dm} + B_{wym} \quad (39)$$

Pole demagnetyzacji zależy od kształtu próbki i może być opisane równaniem:

$$B_{dm} = -\Delta N \cdot M \quad (40)$$

gdzie:

$$\Delta N = N_{\parallel} - N_{\perp} \quad (41)$$

gdzie: N_{\parallel} i N_{\perp} - to wartości główne tensora demagnetyzacji, spełniające warunek $N_{\parallel} + 2N_{\perp} = 1$ [42]. Wartość ΔN ma związek z kształtem cząstek: jest dodatnia dla spłaszczonej elipsoidy obrotowej, ujemna dla elipsoidy wydłużonej oraz równa zero dla sfery [21].

Dla bardzo małych cząstek przyczynki od anizotropii magnetycznej i demagnetyzacji są uśredniane na skutek termicznych fluktuacji momentów magnetycznych, co powoduje zwięźnienie linii rezonansowej (sygnał rezonansu superparamagnetycznego) [43]. Jeśli energia anizotropii jest bardzo mała w porównaniu z $k_B T$, czas reakcji momentów magnetycznych τ_{sp} związany z losowymi siłami termicznymi można w przybliżeniu wyznaczyć ze wzoru:

$$\tau_{sp} \approx \frac{M_s V}{\gamma_0 k_B T} = \frac{M_s V \tau_L B_r}{2\pi k_B T} \quad (42)$$

gdzie: γ_0 - stosunek żyromagnetyczny, M_s - magnetyzacja nasycenia, τ_L - czas precesji Larmora. Dla cząstek superparamagnetycznych $\tau_{sp} \ll \tau_L$, zatem wpływ anizotropii magnetokrystalicznej jest ruchowo uśredniony, co można w przybliżeniu wyrazić poprzez tzw. współczynnik zwięźnienia linii κ [26,41]:

$$\kappa = \frac{\tau_{sp}}{\tau_L} = \frac{M_s V B_r}{2\pi k_B T} \quad (43)$$

Można zatem wnioskować, iż szerokość linii EPR powinna być proporcjonalna do objętości cząstek [41]. W kontekście powyższych wzorów warto dodać, iż magnetyzacja nasycenia dla magnetytu litego wynosi $M_s = 480 \text{ emu/cm}^3$ [29]. Natomiast dla maghemitu litego odnotowano $M_s = 420 \text{ emu/cm}^3$ [44]. Transformacja magnetytu w maghemit w nanocząstkach może zatem być odpowiedzialna za spadek średniej magnetyzacji nasycenia [29]. Inną przyczyną niższej M_s dla nanocząstek w porównaniu do materiału litego może być niekolinearność spinów (*spin canting*) w warstwach powierzchniowych [29].

W nanostrukturach nieciągłość oddziaływania magnetycznego między poszczególnymi spinami znajdującymi się na powierzchni cząstek skutkuje występowaniem anizotropii powierzchniowej [23]. Rozważając zatem energię anizotropii dla cząstek o średnicy kilku nm oprócz składowej związanej z częścią litą należy uwzględnić składową związaną z powierzchnią K_s :

$$K_s = \left(\frac{6}{\phi}\right) k_s \quad (44)$$

Zależy ona od średnicy cząstki ϕ i współczynnika anizotropii powierzchniowej k_s [26]. Dla nanocząstek maghemitu o średnicy 10 nm na podstawie pomiarów FMR efektywną stałą anizotropii powierzchniowej w temp 3,5K oszacowano na $K_s = 2,7 \cdot 10^{-2} \text{ erg/cm}^2$ [23]. Przewiduje się, że w przypadku nanocząstek o średnicy 2 nm wkład składowej powierzchniowej

będzie bardziej znaczący [26]. Podejście Néela zakłada, iż anizotropia ma charakter jednoosiowy z osią lokalnie prostopadłą do powierzchni, a jej wpływ zaznacza się, gdy kształt cząstek odbiega od idealnej sfery [23]. Dodatkowy przyczynek do anizotropii mogą wносить też defekty powierzchni czy wspomniane wcześniej nieuporządkowanie spinów powierzchniowych [23].

W kontekście rozważań istotny jest fakt, iż efekty powierzchniowe, w tym zmiany wywołane utlenianiem, znajdują odzwierciedlenie w widmie ESR nie tylko w przypadku najmniejszych cząstek. Ciekawy wydaje się eksperyment wykonany na próbkach tlenku żelaza pochodzenia litogenicznego [22]. W temperaturze pokojowej sygnały EPR od tych próbek zdominowane były przez szeroką ($\Delta B_{pp} = 122$ mT) linię z $g_{ef} = 2,119$. Natomiast potraktowanie materiału środkiem chemicznym, który rozpuszcza tlenki żelazowe (Fe^{III}), skutkowało przesunięciem g_{ef} do wyższej wartości $g_{ef} = 2,29$ i poszerzeniem linii ($\Delta B_{pp} = 161$ mT). Zmiany te tłumaczono wzrostem anizotropii magnetokrystalicznej w wyniku usunięcia z próbek maghemitu. Maghemit pojawił się bowiem w magnetytowych próbkach w wyniku utleniania Fe^{II} na ich powierzchni [22]. Dla dużych ziaren magnetytu (wielodomowych) zaobserwowano ponadto efekt naskórkowy, który sprawiał, że wpływ regionów powierzchniowych i przypowierzchniowych na rejestrowane widmo FMR był większy [22]. W kontekście pomiarów spektroskopowych warto nadmienić, iż widmo rezonansowe jest też wrażliwe na zawartość żelaza w próbce, co udowodniono, badając nanocząstki magnetyczne o zawartości Fe od 1-50% procentów wagowych [21].

1.3 Biokompatybilne pokrycia nanocząstek

Nanocząstki, które mają duży stosunek powierzchni do objętości, wykazują tendencję do aglomerowania na skutek silnych oddziaływań dipolowych między cząsteczkami [10]. Gdy nanocząstki znajdują się w zgrupowaniu ściśle upakowanym, pole magnetyczne związane z oddziaływaniami dipolowymi B_{dip} może być obliczone:

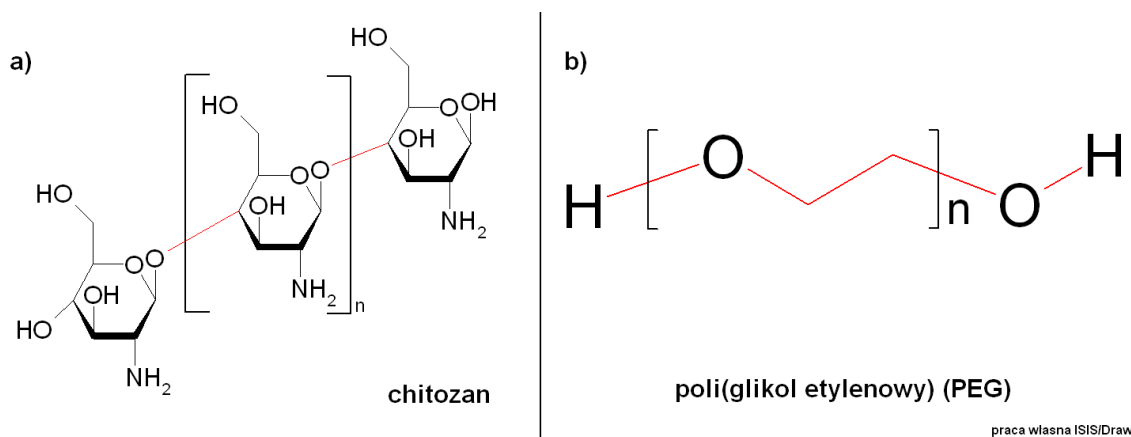
$$B_{dip} = \frac{E_{dip}}{M_s V} = 0,54\mu_0 M_s \frac{\varnothing^3}{(\varnothing+d)^3} \quad (45)$$

gdzie: E_{dip} - energia magnetostatycznych oddziaływań dipolowych, d - odległość między dwoma sąsiednimi nanocząstkami [45]. Poprzez oddziaływania dipolowe oddziaływać mogą również nanocząstki znajdujące się w matrycy dielektrycznej [21].

Sposobem na zmniejszenie sił przyciągających między cząstkami i przeciwdziałanie ich aglomeracji jest powleczenie ich surfaktantem [10]. Nanocząstki przeznaczone do zastosowań w biologii i medycynie muszą nie tylko zachowywać stabilność w wodzie i w krwiobiegu, ale również przejawiać szeroko pojętą biokompatybilność [6]. Oznacza to, że oprócz braku toksyczności i niewywoływania reakcji alergicznych lub odrzucających po wprowadzeniu do organizmu powinny zachować zdolność do spełnienia swej funkcji w środowisku biologicznym [46, 47]. Ważne jest, aby nanocząstki, mające być nośnikami chemioterapeutyków w terapii celowanej nowotworów docierały i efektywnie gromadziły się w miejscu docelowym a transportowany przez nie lek był uwalniany miejscowo. Aby to osiągnąć do powierzchni cząstek dołącza się często polipeptydy, aptamery i inne ligandy kierujące. Swoją rolę spełniają one jedynie wówczas, gdy specyficzne interakcje dołączonego ligandu z receptorem w miejscu docelowym przewyższają niespecyficzne oddziaływanie nanocząstek z komórkami i organellami [48].

Zmodyfikowanie nanocząstek obojętnym polimerem pomaga, poprzez zmianę właściwości powierzchniowych rdzenia, zoptymalizować oddziaływanie nanocząstek z środowiskiem biologicznym. Materiał z jakiego tworzy się pokrycia musi być ponadto biodegradowalny a produkty jego rozkładu łatwo eliminowane z organizmu. Do opłaszczania nanostruktur często wykorzystuje się poli(glikol etylenowy) (PEG) i chitozan ze względu na ich dostępność oraz pożądane właściwości [6].

Chitozan to liniowy amino-polisacharyd i naturalny polimer posiadający strukturę opartą na powtarzających się jednostkach N-acetyloglukozoaminy i D-glukozaaminy połączonych wiązaniem β -(1-4) glikozydowym [47, 49]. Wytwarza się go poprzez niecałkowitą deacetylację chityny z udziałem zasady [6]. Strukturę chitozanu przestawiono na rysunku nr 4a). Polimer ten ma charakter kationowy i wykazuje właściwości mukoadhezyjne [50].



Rys. 4 Ogólna struktura chitozanu a) i poli(glikolu etylenowego) b)

Za zdolność przylegania polimeru pokrywającego nanocząsteczkowy nośnik do warstwy śluzu na powierzchniach nabłonkowych odpowiadają oddziaływania jonowe pomiędzy dodatnio naładowanymi grupami aminowymi w chitozanie a ujemnie naładowanymi resztami kwasu sialowego w śluzie [47,51]. Należy zwrócić uwagę, iż właściwości chitozanu takie, jak rozpuszczalność, biokompatybilność czy biodegradowalność zależą od jego masy molowej oraz stopnia deacetylacji [49,52]. Dla przykładu mniej deacetylowane chitozany przejawiają tendencję do szybszej degradacji, mają też lepszy profil cytotoxyczności [49]. Biokompatybilność opłaszczonych chitozaniem nanocząstek tlenku żelaza wykazano w stosunku do osteoblastów a istotne zmniejszenie ich cytotoxyczności w porównaniu do cząstek niepokrytych polimerem potwierdzono również dla innych linii komórkowych [53,54]. Pokrycie nanocząstek chitozaniem zwiększa zatem szansę, aby w organizmie spełniły one przewidziane dla nich zadania bez wywoływania miejscowych bądź ogólnoustrojowych skutków ubocznych.

Innym polimerem często wykorzystywanym do pokrywania rdzeni nanocząstek jest poli(glikol etylenowy) otrzymywany poprzez polimeryzację tlenku etylenu z udziałem wody, monoetylenoglikolu albo glikolu dietylenowego w reakcji katalizowanej zasadowo [55]. Strukturę PEG przedstawia rysunek 4b). Do powierzchni nanocząstek poliglikol może być dołączony na skutek fizycznej adsorpcji albo kowalencyjnie, przy czym gęstość szczeplenia ma wpływ na konformację jaką łańcuchy polimeru przyjmują na powierzchni nanocząstek [6]. Efekty steryczne związane z mobilnością molekuł PEG na powierzchni nanocząstek przeciwdziałają agregacji nanocząstek, zwiększając ich stabilność koloidalną [46,56]. Dzięki zmodyfikowaniu poliglikolem powierzchni superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza można utrzymać ich stabilność w roztworach wodnych przynajmniej przez miesiąc [57]. PEG nie tylko tłumi agregację, ale przede wszystkim wydłuża czas krążenia nanocząstek w krwiobiegu, co jest niezwykle ważne w kontekście zastosowań medycznych [46,58]. Po podaniu dożylnym nieosłonięte nanocząstki zostałyby bowiem pokryte przez obecne w osoczu opsoniny (immunoglobuliny bądź białka dopełniacza) a w ten sposób prezentowane jako ciała obce i szybko eliminowane przez fagocyty (z układu fagocytów jednojądrzastych) występujące w wątrobie, śledzionie i szpiku kostnym [56,59]. Hydrofilowa otoczka z poliglikolu osłania nanocząstki przed działaniem układu siateczkowo-śródbłonkowego, ograniczając adsorpcję

białek do powierzchni nanocząstek. Zbliżające się białka zmniejszają bowiem objętość dostępną dla każdego segmentu polimeru, powodując tym samym utratę swobody konformacyjnej łańcuchów PEG, co skutkuje pojawieniem się siły odpychającej [60]. Z drugiej strony należy pamiętać, że pokrycie poprawiające właściwości antyopsonizacyjne cząstek nie powinno ograniczać ich zdolności do efektywnego wiązania się z celem, dlatego jego gęstość musi być odpowiednio dobrana [6]. Generalnie jednak pożądane właściwości poli(glikolu etylenowego) sprawiają, że jest on często wykorzystywany do opłaszczania superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza, także tych niezwykle małych ($\varnothing = 1,7$ nm), które mogą migrować przez ściany naczyń włosowatych [57]. Bardziej szczegółowe informacje na temat wykorzystania pokryć z poli(glikolu etylenowego) i chitozanu do zapewnienia biokompatybilności nanocząstkom w aplikacjach biomedycznych autor niniejszej rozprawy przedstawia w pracy [6].

Wśród polimerów organicznych wykorzystywanych do zapewnienia stabilności koloidalnej nanocząstek magnezytu na uwagę zasługuje dekstran. Jest to zbudowany z jednostek glukozy naturalny polisacharyd, który pozyskuje się z bakterii kwasu mlekowego: *Leuconostoc mesenteroides* i *Streptococcus mutans* [61]. Dekstran posiada właściwości polikationowe i hydrofilowe a pokryte nim nanocząstki tlenku żelaza wykazują biokompatybilność. Pokazano to m.in. dla nanocząstek magnezytu testowanych jako przenośniki kurkuminy lub środki kontrastujące w obrazowaniu magnetycznym rezonansem jądrowym (MRI) [61,62]. Warto wspomnieć, iż kilka typów nanocząstek z rdzeniem z tlenku żelaza i powłoką z dekstranu zostało zaaprobowanych przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA) do zastosowań na ludziach i w postaci komercyjnie dostępnych preparatów są wykorzystywane jako środki kontrastujące w badaniach MRI [1]. Nie mniej jednak należy pamiętać, iż dekstran może wpływać na proces krzepnięcia krwi a zrobione z niego otoczki nanocząstek zostać szybko rozłożone przez enzymy (dekstranazy) [63].

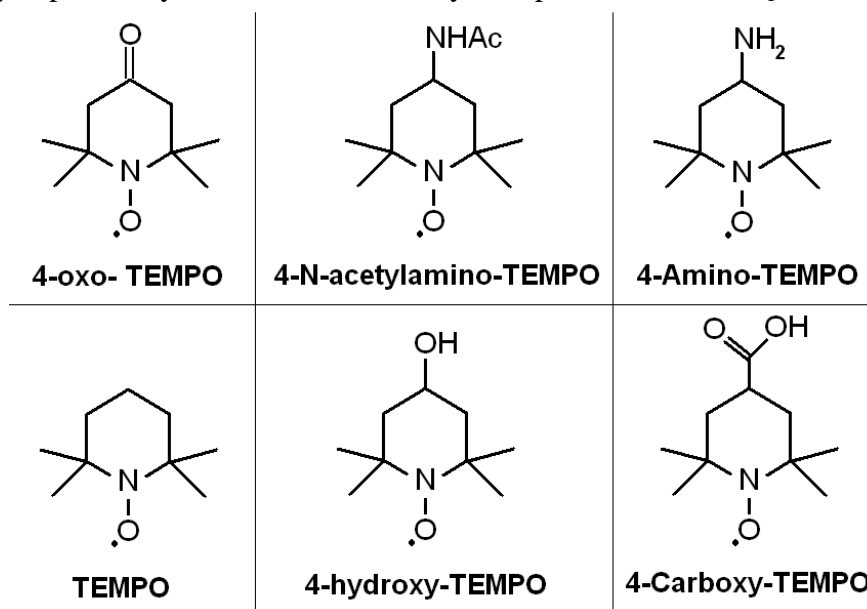
Do funkcjonalizowania nanocząstek często wykorzystuje się również krzemionki i silany. Stwierdzono, iż pokrycie nanocząstek otoczkami krzemionkowymi (SiO_2) nie zmienia struktury krystalicznej i stopnia utlenienia żelaza w rdzeniach nanocząstek [64]. Poprawia natomiast stabilność cząstek i zmniejszą ich skłonność do agregacji [65,66]. Postuluje się również, że otoczka z krzemionki przyczynia się do spowolnienia procesu eliminacji cząstek z krwiobiegu i ogranicza ewentualne niekorzystne oddziaływanie żelaza na organizm [64]. Z drugiej strony zaobserwowano, iż grube powłoki z ditlenku krzemu wpływają na właściwości magnetyczne nanocząstek, pogarszając ich efektywność jako środka kontrastowego w MRI [67]. Niemniej jednak powierzchnie pokryte krzemionką są uważane za bardzo biokompatybilne i łatwo funkcjonalizowalne [67]. Grupy silanolowe Si-OH powodują wzrost hydrofilowości powierzchni wskutek jej zwilżania oraz nadają jej charakter kwasowy ze względu na możliwość odczepienia protonu [68]. Reaktywność wspomnianych grup przydaje się w kolejnych funkcjonalizacjach cząstek, gdyż tworzą kowalencyjne wiązania Si-O-Si z silanami [65]. Silany są z kolei powszechnie wykorzystywane jako grupy kotwiczące ligandy na powierzchni nanocząstek magnetycznych [66]. Umożliwiają efektywne przyłączanie cząsteczek biologicznych takich, jak

przeciwiała czy inne białka [65]. Dla przykładu nanocząstki maghemitu pokryte podwójną powłoką z krzemionki i organo-silanu służyły już jako przenośniki enzymów, w tym oksydazy cholesterolowej [67]. Komercyjnie dostępny amino-silan pozwolił unieruchomić albuminę surowicy wołowej (BSA) na superparamagnetycznych nanosferach magnetytowych [65]. Nanocząstki Fe_3O_4 opłaszczone mezoporowatym SiO_2 i funkcjonalizowane oktadecylotrimetoksylanem ($\text{C}_{21}\text{H}_{46}\text{O}_3\text{Si}$) były również wykorzystane jako sorbenty doustnych leków przeciwcukrzycowych z osocza ludzkiego metodą magnetycznej ekstrakcji do fazy stałej [69]. Należy pamiętać, że do powierzchni nanocząstek oprócz leków i ligandów kierujących można dołączać również znaczniki spinowe, które są bardzo przydatne zarówno w spektroskopii, jak i w obrazowaniu metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego [11].

1.4 Znacznik spinowy TEMPO i jego rola w badaniu nanocząstek

Oddziaływanie magnetyczne pomiędzy niesparowanym elektronem a spinem jądra azotu ^{14}N ($I=1$) w rodnikach nitroksylowych skutkuje rozszczepieniem nadsubtelnym i rejestrowanym widmem EPR w postaci trzech linii [70]. W roztworze wartość izotropowej stałej oddziaływania nadsubtelnego zależy od struktury rodnika, właściwości ośrodka i jest określona przez odległość sąsiednich składowych widma EPR [71]. Warto dodać, iż niesparowany elektron może być zlokalizowany na orbitalu p_z atomu azotu, na atomie tlenu albo zdelokalizowany w strukturze pierścienia rodników nitroksylowych. Dlatego rodniki te są bardzo wrażliwe na małe zmiany gęstości ładunku wywołane przez otaczające cząsteczki [70].

Spośród nitroksydów wykorzystywanych jako znaczniki i sondy spinowe najbardziej popularne są pochodne TEMPO (2,2,6,6-Tetramethyl-piperidin-1-yl)oxyl. Rodnik 4-oxo-TEMPO, który jest używany jako materiał startowy do otrzymania takich dostępnych komercyjnie nitroksydów, jak TEMPO czy 4-N-acetylamino-TEMPO, został wprowadzony już w 1959 r. przez Lebedeva i Kazarnovsky'ego [72]. Na rys. 5 przedstawiono strukturę najpopularniejszych pochodnych TEMPO stosowanych w pomiarach metodą EPR.



Rys. 5 Przykładowe nitroksydy stosowane w badaniach EPR. Na podstawie [72,73].

Jednym z kluczowych zastosowań spektroskopii EPR jest badanie dynamiki molekularnej znaczników spinowych w cieczach izotropowych czy fazach uporządkowanych, takich jak błony biologiczne, a także dołączonych do różnych cząsteczek [74]. Pomiar EPR nie tylko dostarcza informacji o mikrośrodowisku nitroksydu, polarności i lepkości jego otoczenia, ale w przypadku znaczników unieruchomionych na powierzchni materiału stałego mogą zapewnić użyteczne informacje o procesach zachodzących na granicy faz [75]. Technika ukierunkowanego znakowania spinowego jest z powodzeniem stosowana do badania struktury i dynamiki konformacyjnej białek znajdujących się w różnych ośrodkach, także tych zanurzonych w dwuwarstwie lipidowej [76]. Określenie odległości między dwoma łańcuchami bocznymi znacznika spinowego w białku może odbyć się poprzez ilościowe zbadanie interakcji spin-spin, na które składają się: statyczne oddziaływanie dipolowe, modulacja oddziaływania dipolowego

przez resztkowy ruch łańcuchów bocznych znacznika oraz oddziaływania wymiany. Dla przykładu statyczne oddziaływanie dipolowe prowadzi do znacznego poszerzenia widma EPR fali ciągłej, gdy odległość między spinami jest mniejsza niż 2 nm [76].

W ostatnich latach znaczniki spinowe są również z powodzeniem wykorzystywane w badaniach nanocząstek metodą EPR. Stabilny rodnik 4-hydroxy TEMPO użyty został jako paramagnetyczny sensor w badaniu nanocząstek magnetytu ($\varnothing = 12\text{nm}$) w roztworach wodnych oraz wysuszonych filmach żelatynowych [71]. Wykazano, że w zakresie temperatur 278-368 K wartości g i szerokości linii EPR TEMPOLu są wrażliwe na lokalne pole magnetyczne nanocząsteczek. Wzrost stężenia nanocząstek magnetytu w roztworze wodnym prowadził do poszerzenia linii rodnikowego trypletu oraz spadku wartości współczynnika g ($g = 2,004\text{--}2,0057$), natomiast wzrost stężenia samego sensora skutkowało tylko poszerzeniem linii TEMPOLu bez istotnego wpływu na wartość g . Zwiększona koncentracja nanocząstek w zestalonych matrycach żelatynowych również zmniejszała wartość g i poszerzała linie sygnału rodnikowego. Za główną przyczynę poszerzenia w obu przypadkach uznano oddziaływania dipolowe, nie zaobserwowano natomiast oddziaływań wymiennych pomiędzy nanocząstkami magnetytu a niesparowanym elektronem rodnika [71]. Również badanie domieszkowanych TEMPOm cieczone magnetycznych zawierających nanocząstki magnetytu ($\varnothing = 9,4\text{ nm}$) o różnych pokryciach powierzchni wykazało poszerzenie linii oraz liniowy wzrost wartości pola rezonansowego nitroksydu wraz ze zwiększaniem stężenia nanocząstek w próbce [77]. Udowodniono ponadto, że to rdzenie nanocząstek a nie ich otoczka wpływają na wartości g TEMPOLu. Pokrycie może jednak wywierać wpływ na szerokość linii, gdyż w zależności od gęstości rodnika na powierzchni magnetycznych nanocząstek obserwujemy albo poszerzenie linii na skutek oddziaływań dipolowych między sondami paramagnetycznymi, albo zwężenie wymienne świadczące o efektywniejszej adsorpcji [77]. Badanie znakowanych spinowo nanocząstek złota ($\varnothing \approx 2,2$ i $1,5\text{ nm}$) pokazało, iż w przypadku małej gęstości pokrycia 4-amino-TEMPO widmo EPR składało się z trzech wąskich linii o kształtach prawie Lorentzowskich, natomiast wraz ze wzrostem liczby znaczników przyłączonych do powierzchni ujawniał się wpływ nakładającej się szerokiej linii, która mogła zostać opisana krzywą Voigta [12]. Ten komponent pochodził od uśrednienia wielu sygnałów EPR, a jego szerokość, związana z odległościami pomiędzy rodnikami zaadsorbowanymi do powierzchni cząstek, malała na skutek oddziaływań wymiennych przy coraz większym pokryciu [12]. Kolejna praca dotycząca znakowanych spinowo nanocząstek złota pokazała, że w przypadku nanocząstek o średnicy 2,4 nm obserwowano jedynie tryplet od TEMPO, natomiast dla cząstek o większej średnicy (3,2 nm; 5,6 nm oraz 6,7 nm) widmo nitroksydu zdominowała szeroka linia o ΔB równym odpowiednio 1,35 mT; 1,65 mT i 1,15 mT [78]. Zwiększanie średnicy nanocząstek prowadziło do zmniejszenia promienia ich krzywizny, co skutkowało uzyskaniem większej gęstości rodników na powierzchni. Stopień pokrycia znalazł odzwierciedlenie w szerokości linii EPR, przy czym dla najgęstszych zaobserwowano zwężenie wymienne. Ciekawy jest fakt, że wspomniane badania były pierwszymi pomiarami EPR znakowanych spinowo nanocząstek, które pozwoliły zaobserwować przejście wzbronione $\Delta m_s = 2$ w polu $\approx 170\text{ mT}$ w temp. 140K [78].

Porównanie widm EPR znacznika spinowego 4-amino-TEMPO dołączonego kowalencyjnie do dużych polimerowych nanocząstek (60-280 nm) z widmami sondy spinowej niekowalently wprowadzonej w matrycę polimeru wykazało różnice w kształcie, symetrii oraz szerokościach linii [79]. Widma sondy posiadały cechy sugerujące występowanie dwóch różnych populacji cząstek paramagnetycznych zlokalizowanych w obszarach o różnej dynamice molekularnej, natomiast struktura widm TEMPO dołączonego do nanocząstek wskazywała na silnie utrudniony ruch znacznika [79]. Warto wspomnieć, iż sondy spinowe często wykorzystywane są do określania budowy, właściwości oraz dynamiki molekularnej, uporządkowanych polimerowych układów micelarnych [80].

W przypadku znakowanych spinowo nanocząstek niezwykle ważną kwestią jest badanie dynamiki dołączonych rodników w zależności od zastosowanego pokrycia nanocząstek czy ośrodka w jakim się one znajdują. We wspomnianej pracy dotyczącej nanocząstek złota pokazano, że zanurzenie znacznika głębiej w warstwę organicznego pokrycia istotnie zwalnia jego ruch [12]. Dynamikę znaczników spinowych dołączonych do pokrytych chitozanem nanocząstek magnetytu badano także w Zakładzie Fizyki Medycznej UAM a szczegóły można znaleźć w pracach [11,81].

Do najważniejszych parametrów określających dynamikę cząstek paramagnetycznych takich jak nitroksydy należy czas korelacji rotacyjnej τ_R . Czas korelacji jest definiowany zazwyczaj jako stała zaniku wykładniczego funkcji autokorelacji, która charakteryzuje czasowe fluktuacje obserwabli spektroskopowych [82]. Odnosi się do reorientacji osi nitroksydu, ale niektórzy wiążą go z tempem rotacji wokół wielkocząsteczkowej osi dyfuzji, co zgadza się tylko w przypadku ruchu izotropowego [82]. Bardziej intuicyjnie określa się czas korelacji jako średni czas, w którym centrum paramagnetyczne pozostaje w pewnej orientacji [83]. Zakres czasów korelacji rotacyjnej, które mają widoczny wpływ na kształt linii EPR rozciąga się pomiędzy $\tau_R \approx 10^{-12}$ s (szybki ruch) a 10^{-5} s (wolny ruch), przy czym w górnych i dolnych granicach tego przedziału zmiana czasu korelacji nie modyfikuje już więcej widma [83]. Ruchliwość rotacyjna znacznika znajduje odzwierciedlenie w szerokości i kształcie sygnału [84]. Z szybką rotacją mamy do czynienia, gdy znacznik znajduje się w ośrodku o małej gęstości i niskiej lepkości (np. wodzie) a próbka jest w stanie ciekłym. Wówczas rotacje całkowicie uśredniają parametry magnetyczne nitroksydu ($A_{xx}=A_{yy}=A_{zz}=1/3 \cdot Tr \hat{A}$ i $g_{xx}=g_{yy}=g_{zz}=1/3 \cdot Tr \hat{g}$) oraz anizotropowe wkłady do szerokości linii, stąd linie trypletu mają prawie równe intensywności i szerokości [71,84,85]. Widmo EPR może być wówczas taktowane jako superpozycja linii lorentzowskich, a czas korelacji rotacyjnej ($\tau_R < 10^{-10}$ s) szacuje się na podstawie pomiaru szerokości i amplitudy linii [84]. W przypadku znaczników nitroksylowych, dołączonych do znacznie większych cząsteczek, mamy do czynienia zarówno z rotacją cząstki jak i znacznika, przy czym ogólny czas rotacji cząsteczki jest względnie wolny, a obserwowany kształt linii EPR wynika tylko z ruchu znacznika w swoim środowisku lokalnym [86].

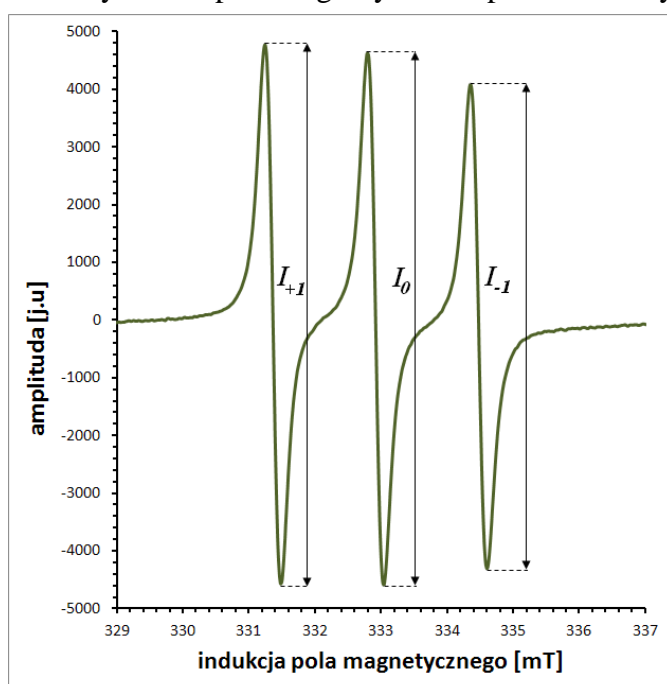
Czas korelacji rotacyjnej dla nitroksydów w reżimie szybkiej rotacji (10^{-10} s $<$ τ_R $<$ 10^{-9}) wyznacza się wzorem:

$$\tau_R = 6,51 \cdot 10^{-10} \cdot \Delta B_0 \left(\sqrt{\frac{I_0}{I_{-1}}} - 1 \right) \quad (46)$$

gdzie: ΔB_0 - szerokość centralnej linii (wyrażona w Gausach, 1 Gs = 10^{-4} T), I_0 - intensywność linii centralnej, I_{-1} - intensywność linii przy wysokim polu [86,87]. W przypadku znaczników dołączonych do nanocząstek często wykorzystuje się wzór w postaci:

$$\tau_R = 6,51 \cdot 10^{-10} \Delta B_0 \left(\sqrt{\frac{I_0}{I_{+1}}} + \sqrt{\frac{I_0}{I_{-1}}} - 2 \right) \quad (47)$$

gdzie: ΔB_0 - szerokość centralnej linii (wyrażona w Gausach), I_0 - szerokość centralnej linii, I_{+1} i I_{-1} - amplitudy linii odpowiednio przy niskim i wysokim polu [11,12,81]. Widmo EPR znacznika spinowego TEMPO dołączonego do nanocząstek (reżim szybkiej rotacji) wraz ze sposobem wyznaczania intensywności poszczególnych linii przedstawia rys. 6.



Rys. 6 Widmo EPR znacznika spinowego TEMPO dołączonego do nanocząstek Fe_3O_4 . Zaznaczono sposób wyznaczania amplitud poszczególnych linii dla sygnału zarejestrowanego dla szybkiej rotacji.

Na podstawie czasu korelacji rotacyjnej oszacować można mikrolepkość η_{mi} środowiska nitroksydu, korzystając z równania Stokesa- Einsteina-Debye'a:

$$\tau_R = \frac{V\eta_{mi}}{k_B T} = \frac{4\pi\eta_{mi}r^3}{3k_B T} \quad (48)$$

gdzie: r - promień cząsteczki sondy, który dla TEMPONE na podstawie pomiarów wiskozymetrycznych oszacowano na 0,26 nm [87]. Równanie to wykorzystywano również do wyznaczania czasów korelacji izotropowej dyfuzji rotacyjnej dla znakowanej spinowo hemoglobiny w wodnym roztworze glicerolu, udowadniając przy okazji, że białko z którym znacznik jest sztywno związany zachowuje się z punktu widzenia hydrodynamiki jak sztywna sfera [82].

Ruchliwość rotacyjna znacznika nie zależy od jego stężenia, natomiast widma roztworu TEMPO o dużym stężeniu są znacznie poszerzone w porównaniu z widmami zarejestrowanymi w przypadku mniejszych stężeń [84]. Widma EPR nitroksydów dołączonych do nanocząstek czy białek często posiadają zniekształconą linię przy wysokim polu ze względu na utrudnioną rotację i towarzyszący wzrost τ_R [12,86]. Taki ograniczony ruch znacznika skutkuje niepełnym uśrednianiem anizotropowych składowych tensorów \hat{A} i \hat{g} [78]. Widma EPR zależą od orientacji znacznika w stosunku do osi dyfuzji. Jeżeli główna oś nitroksydu jest w przybliżeniu równoległa do osi dyfuzji, wpływ na widmo będzie znacznie mniejszy niż wtedy, gdy jest prawie prostopadła [82]. Widma EPR w przypadku rotacji jednoosiowej różnią się znacznie kształtem od widm dla rotacji izotropowej, przy czym rotacja jednoosiowa zazwyczaj wpływa bardziej na środek widma niż na jego skrzydła, zwłaszcza gdy rotacja odbywa się wokół osi z nitroksydu [82]. W reżimie szybkiej rotacji informację o anizotropii ruchu znacznika można uzyskać poprzez analizę względnych intensywności linii EPR i wyznaczenie bezwymiarowego parametru ε wprowadzonego przez Kuzniecowa [88]:

$$\varepsilon = \frac{\sqrt{\frac{I_0}{I+1}} - 1}{\sqrt{\frac{I_0}{I-1}} - 1} \quad (49)$$

W większości widm EPR nitroksydów dołączonych do nanocząstek amplitudy linii trypletu maleją w kierunku od niskiego do wysokiego pola, zatem $\varepsilon < 0$; zdarza się jednak, iż to środkowa linia ma największą amplitudę ($\varepsilon > 0$) albo dwie pierwsze linie mają równe wysokości ($\varepsilon = 0$) [88]. Z tym ostatnim przypadkiem mamy do czynienia, gdy rotacja jest izotropowa, natomiast gdy zwiększa się anizotropia rotacji d , to parametr ε staje się coraz bardziej ujemny [12].

$$d = \frac{D_{R\parallel}}{D_{R\perp}} \quad (50)$$

gdzie: $D_{R\parallel}$ i $D_{R\perp}$ to współczynniki anizotropowej dyfuzji rotacyjnej równoległej i prostopadłej do osi rodnika. Gdyby dyfuzja rotacyjna była izotropowa, wówczas $D_{R\parallel} = D_{R\perp} = D_R$ [89]. Dla znaczników spinowych dołączonych do nanocząstek ujemna wartość ε wskazuje, że rotacja wzdłuż osi równoległej do wiązania N-O rodnika jest najmniej utrudniona, czyli najszybciej rotuje on wzdłuż osi prostopadłej do powierzchni nanocząstki [12].

Dla czasów korelacji rotacyjnej ($\tau_R = 10^{-11} - 10^{-9}$ s), gdy linie EPR znacznika są wąskie, w analizie widm stosuje się teorię Redfielda, a modulowanie anizotropii magnetycznych wyraża za pomocą funkcji autokorelacji [89]. Szerokość linii lorentzowskich zależy wówczas od spinowej liczby kwantowej jądra ^{14}N :

$$\Delta B_{pp}(m_I) = A + Bm_I + Cm_I^2 \quad (51)$$

gdzie: $m_I = -1, 0, 1$ odpowiednio dla linii przy wysokim, centralnym i niskim polu [89]. Popularne programy symulacyjne typu Easyspin czy Bruker Simfonia wykorzystują teorię Redfielda przy symulacjach widm nitroksydów w roztworach w przypadku nie w pełni uśrednionej anizotropii (gdy jest ona mała w porównaniu z częstotliwością mikrofalową) [90,91].

Dla znaczników przyłączonych do dużych molekuł ruch nitroksydu może być silnie anizotropowy i w analizie widm stosuje się w pełni stochastyczne równanie Liouville'a a czas korelacji rotacyjnej szacuje metodą Freeda [84,89,91].

W reżimie sztywnym (*rigid limit*), gdy w niskich temperaturach mobilność molekularna jest zamrożona, często wykonywane są pomiary parametrów magnetycznych [84]. Opis właściwości magnetycznych znacznika wiąże się z podaniem trzech składowych tensora g , trzech składowych tensora oddziaływań nadsubtelnych A oraz charakterystyki linii rezonansowej (szerokości i kształtu opisanego przez funkcję Lorentza, Gaussa bądź splot obu tych funkcji tworzących tzw. profil Voigt'a). Zatem w reżimie sztywnym kształt sygnału EPR opisany jest równaniem:

$$F(B) = \frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^\pi f(B, g, A, \theta, \varphi) \sin\theta d\theta \quad (52)$$

gdzie: kąty θ i φ oznaczają kierunki pola magnetycznego w układzie współrzędnym związanym z centrum paramagnetycznym, natomiast $f(B, g, A, \theta, \varphi)$ to kształt pojedynczej linii rezonansowej [84]. Dla izotropowego rozkładu znaczników spinowych zewnętrzne ekstrema nadsubtelne cechują się kształtem od prawie doskonale Lorentzowskiego do pośredniego pomiędzy Lorentzowskim a Gaussowskim i wywodzą się od rodników, dla których orbital 2p π atomu azotu jest prawie równoległy do kierunku przyłożonego pola magnetycznego [92]. Ustalono, iż średnie wartości szerokości połówkowych $2\Delta^{SZ}$ dla dwóch zewnętrznych ekstremów widma w reżimie sztywnym można przybliżyć jako:

$$\text{dla linii przy niskim polu: } 2\Delta_n^{SZ} = 1,59 \cdot \delta \quad (53)$$

$$\text{dla linii przy wysokim polu: } 2\Delta_w^{SZ} = 1,81 \cdot \delta \quad (54)$$

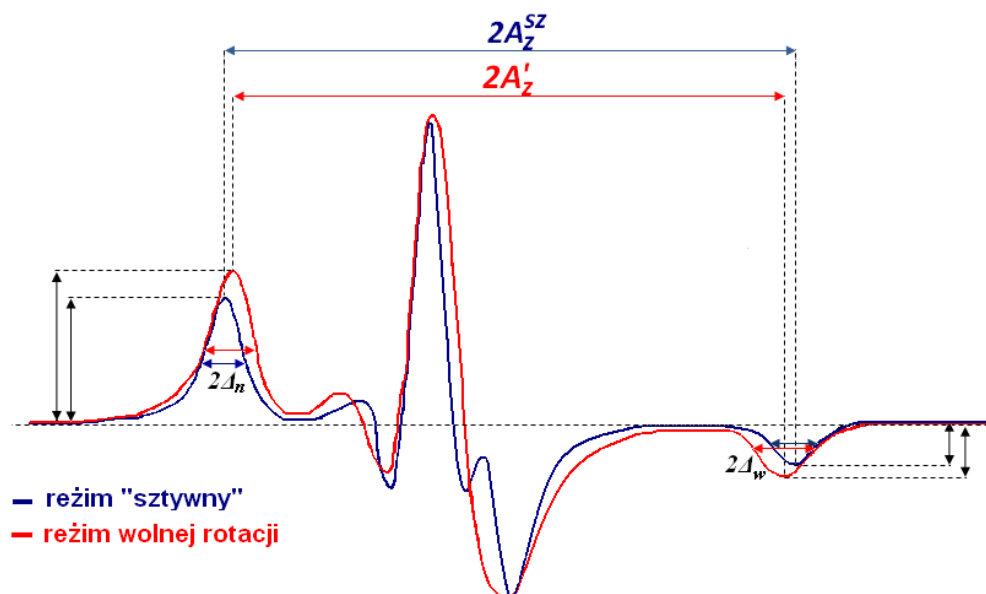
δ - szerokość pik-pik lorentzowskiej linii użytej w symulacjach komputerowych widma w reżimie sztywnym [86,92]. Przy symulacjach widm w tym reżimie konieczne jest określenie współrzędnych tensorów magnetycznych, nie trzeba natomiast uwzględniać dynamiki [74]. Rozdzielenie nadsubtelne i szerokość linii pierwszej pochodnej absorpcji są bowiem niezależne od ruchu molekularnego, jeśli czas korelacji jest większy od 10^{-7} s.

W lepkich ośrodkach bądź w obniżonych temperaturach mamy do czynienia z wolną rotacją (*slow motion*), co odpowiada przedziałowi czasów korelacji rotacyjnej 10^{-6} - 10^{-9} s [84,93]. Analiza widm EPR jest wówczas trudna ze względu na fakt, iż częściowe uśrednianie widma przez ruch molekularny oraz dynamikę spinów może przejawiać się w skomplikowanych i nieregularnych kształtach linii wymagających symulacji [74]. Podczas ich przeprowadzania uwzględnia się zarówno parametry związane z tensorami magnetycznych, jak te odnoszące się do dynamiki. Typowe widmo nitroksydu przy wolnej rotacji ma dwa dobrze odseparowane zewnętrzne ekstrema nadsubtelne oraz nakładający się region centralny, a jeśli przyjmiemy, że oś z wskazuje kierunek wzdłuż orbitalu 2p- π azotu, oś x wzdłuż wiązania N-O, natomiast oś y jest do nich prostopadła, to $A_z \gg A_x \approx A_y$ [93]. Wartości czasu korelacji rotacyjnej dla wolnego ruchu znacznika rodnika nitroksylowego często szacuje się właśnie metodami bazującymi na

pomiarze przesunięć ekstremów linii nadsubtelnych w stosunku do wartości dla reżimu ciała sztywnego [86,92]. W praktyce wyznacza się parametr²:

$$Z = \frac{A_z'}{A_z^{sz}} \quad (55)$$

gdzie: A_z' - koresponduje z połową rozdzielenia między zewnętrznymi ekstremami, A_z^{sz} - jest wyznaczane analogicznie, ale dla widma w reżimie ciała sztywnego (patrz rys. 7) [92,93].



Rys. 7 Widma EPR nitroksydu w reżimie wolnej rotacji (kolor czerwony) oraz w reżimie „sztywnym” (kolor granatowy) z zaznaczeniem sposobu wyznaczania parametrów A_z , Δ_n i Δ_w przydatnych do szacowania czasu korelacji rotacyjnej metodą Freeda. Rysunek na podstawie [92].

Pokazano, iż Z jest monotonicznie rosnącą funkcją τ_R [93]. Dlatego na podstawie Z szacuje się czas korelacji rotacyjnej:

$$\tau_R = a(1 - Z)^b \quad (56)$$

Parametry a , b są przypisywane na podstawie szerokości pik-pik pochodnych linii lorentzowskich przy założeniu określonego modelu dyfuzji, ich wartości dla wyznaczonej szerokości można znaleźć w tabeli w pracy [89]. Wprawdzie wybór modelu rotacji spośród dyfuzji Brownowskiej, dyfuzji swobodnej (*free-diffusion*) albo dyfuzji dużych skoków (*strong jump diffusion*) ma istotny wpływ na kształt symulowanego widma, ale ustalono, że w reżimie wolnego ruchu widma nitroksydów dołączonych do większych cząsteczek w roztworze przejawiają kształty bardziej charakterystyczne dla dyfuzji Brownowskiej [93].

Należy jednak wspomnieć, iż powyższa metoda staje się bardzo mało czuła dla ruchów o czasie korelacji rotacyjnej $> 10^{-7}$ s [92]. Aby rozszerzyć zakres mierzalnych τ_R do $< 5 \cdot 10^{-6}$ zaproponowano inną technikę bazującą na pomiarze zmian szerokości linii zewnętrznych ekstremów widma. Wprowadzono bezwymiarowy parametr W :

² W literaturze parametr ten oznacza się zwyczajowo przez S , ale w niniejszej pracy S - oznacza spin, dlatego przypisano mu inny symbol.

$$W - 1 = \frac{\Delta_i - \Delta_i^{SZ}}{\Delta_i^{SZ}} \quad (57)$$

gdzie i - może wskazywać na linię przy niskim bądź wysokim polu. Parametr W jest jednak wrażliwy na zniekształcenie linii na skutek zbyt dużej amplitudy modulacji czy nasycenia mocą mikrofalową [92]. $W-1$ zależy również od wartości δ , czyli parametru, który może być dobrany na podstawie widma zarejestrowanego w limicie sztywnym (równania 53 i 54).

Czas korelacji rotacyjnej można oszacować na podstawie wyrażenia:

$$\tau_R = a(W - 1)^{-b} \quad (58)$$

Wartości współczynników a , b , wyznaczone z użyciem modeli dyfuzji Brownowskiej albo swobodnej dyfuzji znaleźć można w pracach [89,92].

W pewnych przypadkach widmo EPR może być złożeniem dwóch sygnałów od znaczników szybko rotujących i unieruchomionych, co można wykazać na drodze symulacji. Sposobem oceny względnego udziału tych składowych jest podzielenie amplitudy środkowej linii (która jest wspólna dla wolnego i szybkiego składnika) przez wysokość komponentu związanego z powolnym ruchem. Pokazano, iż wyznaczony w ten sposób stosunek składowych zwiększa się wraz z polarnością i lepkością rozpuszczalnika [75].

Warto dodać, iż translacyjna mobilność molekularna cząsteczek paramagnetycznych również wpływa na widmo EPR a oszacowanie współczynników dyfuzji translacyjnej może odbywać się na podstawie analizy poszerzenia sygnału EPR [84]. W niskich temperaturach, gdy ruchliwość translacyjna jest utrudniona, główną przyczyną poszerzenia widma są oddziaływania dipol-dipol paramagnetycznych cząsteczek. Natomiast w wysokich temperaturach intensywne ruchy translacyjne uśredniają oddziaływania dipolowe rodników, zwiększając jednocześnie oddziaływania wymienne Heisenberga [84]. Generalnie szerokość linii nitroksydu w roztworze można wyrazić jako:

$$\Delta B = \Delta B_0 + \Delta B_{dip} + \Delta B_{wym} \quad (59)$$

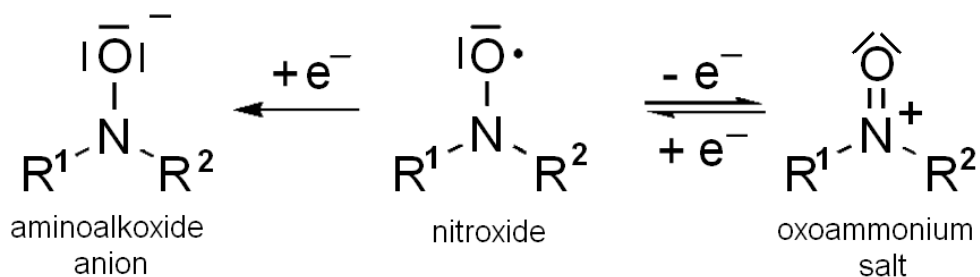
gdzie: ΔB_0 - suma przyczynków niezależnych od stężenia (niejednorodne poszerzenie linii, anizotropia oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych, itp.); ΔB_{dip} - wkład od oddziaływań dipol-dipol pomiędzy cząstkami, ΔB_{wym} - wpływ międzyrodnikowej wymiany spinów [71]. Oddziaływanie wymienne są bardzo krótko zasięgowe, dlatego mogą zostać wykorzystane do liczenia zderzeń molekularnych i dzięki temu badania ruchu translacyjnego. Współczynnik dyfuzji translacyjnej jest bowiem wprost proporcjonalny do częstotliwości wymiany [89].

Rozszczepienie widmowe rodnika nitroksylowego jest wrażliwe nie tylko na ruch molekularny, a tym samym mikrolepkość otoczenia, ale także na polarność bezpośredniego otoczenia. Badanie polarności mikrośrodowiska znacznika spinowego ułatwia fakt, iż znajduje ona odzwierciedlenie w składowej A_{zz} tensora oddziaływania nadsubtelnego i składowej g_{xx} tensora g . Zwiększona wartość A_{zz} i zmniejszona wartość g_{xx} wskazuje, że znacznik znajduje się w środowisku bardziej polarnym [76]. Ciecze polarne, np. woda, sprzyjają bowiem istnieniu form mezomerycznych z niesparowanym elektronem na atomie azotu, generując wyższe stałe rozszczepienia nadsubtelnego w porównaniu do płynów apolarnych, np. oleju [70]. Jeśli

cząsteczka (np. białko) posiada regiony hydrofilowe i hydrofobowe należy mieć na uwadze, że środowisko dołączonego znacznika spinowego może zmieniać swą polarność na skutek wywołanych temperaturą zmian konformacyjnych tej molekuly [85]. Warto przypomnieć, iż w przypadku widm EPR zarejestrowanych w paśmie X dla próbek zamrożonych wartość A_z może być wyznaczona bezpośrednio (rys.7), natomiast wartość g_x ustala się wykonując symulację widma, ewentualnie posiłkując się pomiarami wykonywanymi przy wyższych częstotliwościach mikrofalowych, np. w paśmie W [76]. Rekomendowane jest jednak wyznaczenie na drodze symulacji pełnych tensorów \hat{A} i \hat{g} dla znacznika, co pozwoli oddzielić efekty związane z polarnością od tych spowodowanych ruchem libracyjnym znacznika [85]. Libracje to nisko amplitudowe ograniczone ruchy oscylacyjne, które modulują oddziaływania magnetyczne w częściowo unieruchomionych układach anizotropowych [83]. W przypadku różnic w polarności środowiska nitroksydu obserwowana zmiana rozdzielienia nadsubtelnego A_{zz} jest powiązana ze zmianą śladu tensora \hat{A} ($\text{Tr}\hat{A}$), inaczej niż w przypadku ruchu libracyjnego, który nie wpływa na ślad tensora [85]. Dla libracji o małej amplitudzie wokół osi x obowiązuje relacja między wyznaczaną na podstawie widma składową A'_{zz} a średnio kwadratową amplitudą kąta libracji $\langle \alpha^2 \rangle = \langle \sin^2 \alpha \rangle$ [83]:

$$A'_{zz} = A_{zz}^{sz} - (A_{zz}^{sz} - A_{yy}^{sz})\langle \alpha^2 \rangle \quad (60)$$

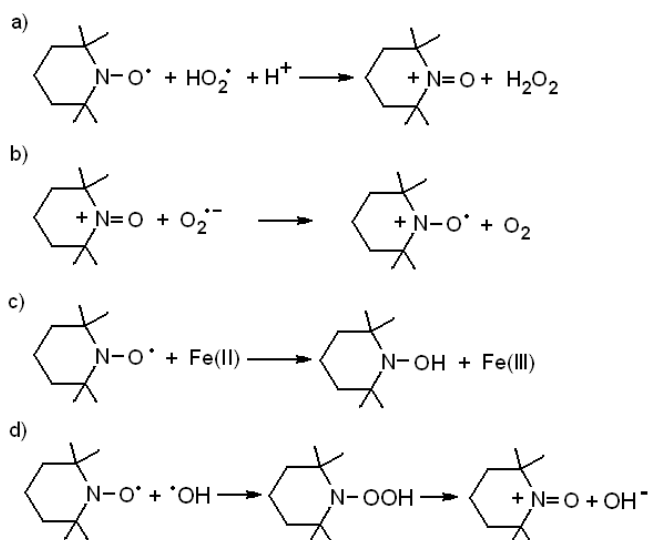
Warto zwrócić również uwagę na właściwości elektrochemiczne nitroksydów. Wiele z nich może w sposób odwracalny utleniać się do odpowiednich soli oksoamoniowych (rys.8). Potencjał oksydacyjny nitroksydu zależy od jego struktury, dla TEMPO wynosi około 0,64 V, dla 4-oxo-TEMPO 0,67 V, natomiast dla 4-hydroxy-TEMPO 0,48 V [72]. Znanym procesem jest również redukcja rodnika nitroksyloвого do odpowiadającego anionu aminoalkotlenku, która jest nieodwracalna [72].



Rys. 8 Odwracalne utlenianie i nieodwracalna redukcja nitroksydów [72].

W układach biologicznych w wyniku komórkowych procesów metabolicznych i reakcji nieenzymatycznych nitroksydy mogą zostać zredukowane do hydroksyloamin albo utlenione do kationów oksoamoniowych [94]. Pod wpływem związków endogennych takich, jak kwas askorbinowy czy glutation pochodne TEMPO łatwo ulegają redukcji, co objawia się zanikiem sygnału EPR [95]. Postuluje się, że trwałe rodniki nitroksyloвого są silnymi przeciwutleniaczami a nawet należą do skutecznych radioprotektorów, pomimo iż reagują z rodnikami hydroksyloowymi wolniej niż związki fenolowe czy tiolowe [94]. Spośród reakcji pokazujących antyoksydacyjną aktywność TEMPO warto przytoczyć: katalityczną eliminację nadtlenu (rys. 9 a i b); zapobiegające reakcji Fentona utlenianie metali przejściowych (rys.9c) czy też

utlenianie nitroksydu przez rodnik hydroksylowy do kationu oksoamoniowego z występującym adduktem pośrednim (rys.9d).

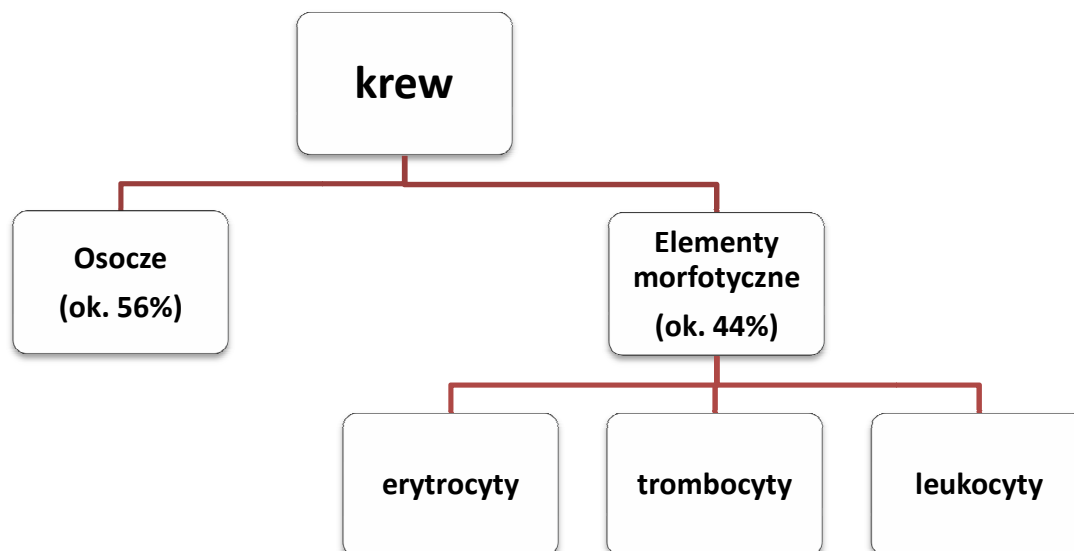


Rys. 9 Przykładowe reakcje pokazujące antyoksydacyjną aktywność nitroksydów na podstawie [94].

Kiedy TEMPOL w roztworze soli fizjologicznej został dodany do pełnej krwi szczura sygnał EPR od rodnika zmniejszył się o 60% w ciągu 1 godziny i całkowicie zniknął w ciągu 6 godzin od momentu podania [95]. Pokazano, iż 4-hydroksyTEMPO ulega internalizacji do zdrowych komórek krwi: erytrocytów i płytek krwi, a reakcje redoks inicjowane przez nitroksyd w mitochondriach mogą prowadzić do produkcji ROS i dysfunkcji tych organelli komórkowych [95]. W eksperymentach zaobserwowano zmniejszoną żywotność komórek jelita grubego poddanych działaniu TEMPO o niskiej masie cząsteczkowej i amino-TEMPO, przy czym występowanie grup aminowych skutkowało większą toksycznością [96]. Oprócz niespecyficznego akumulacji w zdrowych tkankach problemem jest też preferencyjny klirens nerkowy pochodnych TEMPO. W próbkach pełnej krwi pobranych od myszy po 2 min od dożylnego podania im roztworu TEMPOLu nie zaobserwowano prawie żadnego sygnału EPR od tego rodnika, a okres półtrwania wolnego TEMPO w krwiobiegu oszacowano się na około 15 s [96]. Sposobem na wyeliminowanie powyższych problemów okazuje się być kompartmentacja nitroksydów wewnątrz nanocząstek pokrytych otoczką polimerową. Za przykład mogą służyć nanocząstki typu rdzeń - powłoka zbudowane z amfifilowego kopolimeru blokowego zawierającego hydrofilowe segmenty PEG oraz hydrofobowe PCMS z TEMPO jako łańcuchem bocznym [95,96]. W temperaturze pokojowej sygnał EPR od takich nanocząstek w próbkach krwi jest widoczny przez dłuższy czas (po 6h zmniejsza się tylko w niewielkim stopniu), co świadczy, że rodnik nitroksylowy jest dobrze chroniony [95]. W krwiobiegu myszy okres półtrwania rodnika zamkniętego w nanocząstkach jest ponad 60 razy dłuższy w porównaniu z wolnym TEMPOLem [96]. Najciekawszy wydaje się fakt, iż mimo zamknięcia TEMPO wewnątrz nanocząstek, jego aktywność w kierunku zmiatania wolnych rodników, została zarejestrowana na zewnątrz komórek krwi. Nanocząstki zawierające trwale rodniki nie tylko nie wnikały do zdrowych komórek krwi, ale dodatkowo tłumiły hemolizę wywołaną przez anion nadadtlenkowy [95].

1.5 Podstawowe informacje o pełnej krwi ludzkiej i centrach paramagnetycznych w niej występujących

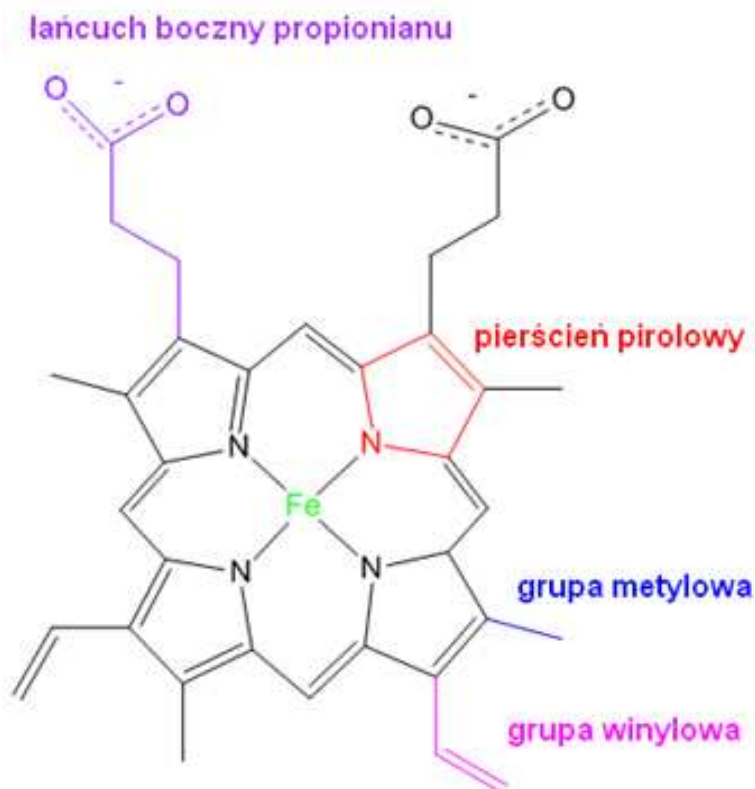
Pełna krew ludzka złożona jest z części płynnej, czyli osocza oraz zawieszonych w nim elementów komórkowych, co ilustruje schemat na rys. 10. Krwinki białe (granulocyty, limfocyty i monocyty) uczestniczą w reakcjach obronnych organizmu. Płytki krwi biorą udział w procesie krzepnięcia krwi. Natomiast erythrocyty to najliczniejsze z elementów morfotycznych krwi [97]. Ich funkcja polega na dostarczaniu tkankom tlenu i odbieraniu CO₂ oraz roli w utrzymaniu równowagi kwasowo- zasadowej organizmu.



Rys. 10 Skład pełnej krwi ludzkiej

Krwinki czerwone mają średnicę 6,6 - 7,5 μm i kształt obustronnie wklęsłego dysku. Ich dojrzała postać nie posiada jądra a także rybosomów i mitochondriów [98]. Około 94% substancji stałej erythrocytu stanowi hemoglobina, złożona z grupy prostetycznej (hemu) i części białkowej (globiny). To właśnie hemoglobina jest odpowiedzialna za czerwony kolor krwi. W krwinkach czerwonych zawarte są też białka niehemoglobinowe, w większości enzymy katalizujące różne reakcje biochemiczne [98]. U osób dorosłych 97% wszystkich rodzajów hemoglobin stanowi ludzka hemoglobina A₁. W HbA₁ można wyodrębnić 4 podjednostki (dwa 141 aminokwasowe łańcuchy polipeptydowe α i dwa 146 aminokwasowe β , połączone wiązaniami jonowymi). Każdy z łańcuchów obejmuje osiem α -helis i zawiera niekowalencyjnie dołączoną prostetyczną grupę hemową, zatem hemoglobina może wiązać jednocześnie cztery cząsteczki tlenu [99]. Hem zbudowany jest z protoporfiryny i centralnie położonego jonu żelazawego Fe²⁺, co przedstawia rys. 11. Na protoporfirynę składa się pierścień tetrapiolowy, tworzony przez cztery pierścienie pirolowe połączone mostkami metinowymi oraz przyłączone do niego cztery grupy metylowe, dwie winylowe i dwa łańcuchy boczne propionianu [100]. Jon Fe²⁺ wiąże się z czterema atomami azotu pierścieni pirolowych, może też tworzyć dwa dodatkowe wiązania, każde po innej stronie płaszczyzny hemu [100]. Piąte miejsce koordynacyjne zajęte jest przez pierścień imidazolowy reszty histydyny, natomiast do szóstego dołączany jest tlen. W deoksyhemoglobinie pozostaje ono puste, a jon żelaza jest wysunięty poza płaszczyznę

porfiryny o 40 pm. W płucach hemoglobina ulega wysyceniu tlenem. Związanie cząsteczki tlenu zmienia układ elektronów w obrębie żelaza, które przesuwa się w płaszczyznę porfiryny, co inicjuje przekształcenia strukturalne cząsteczki [100]. Jon Fe^{2+} w hemoglobinie posiada bowiem konfigurację elektronową $Ar(3d^6)$ i dwa możliwe stany spinowe. W krwi żyłnej, w deoksyhemoglobinie Fe^{2+} jest w stanie wysokospinowym ($S = 2$), natomiast w krwi tętniczej w oksyhemoglobinie w stanie niskospinowym ($S = 0$) [101]. Przejście z paramagnetycznego stanu wysoko spinowego do diamagnetycznego niskospinowego skutkuje zmniejszeniem promienia jonu żelaza tak, że może on wsunąć się w pierścień porfirynowy [102].



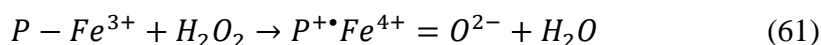
Rys. 11 Schemat prostetycznej grupy hemowej na podstawie [100].

Interesujący wydaje się fakt, iż hemoglobina jest białkiem allosterycznym, co oznacza, że wiązanie O_2 przez jedną z podjednostek wywołuje zmiany strukturalne przekazywane do sąsiednich, zwiększając ich powinowactwo względem tlenu [99].

Warto dodać, iż inną formą prawidłowej hemoglobiny jest HbA_2 , która stanowi około 2,5% całkowitej hemoglobiny we krwi osób dorosłych. We krwi płodu przeważa natomiast HbF , czyli hemoglobina płodowa mająca większe powinowactwo do tlenu [98].

Zarówno oksyhemoglobina jak i hemoglobina odtlenowana pod wpływem różnych czynników mogą przekształcić się w methemoglobinę, w której żelazo znajduje się na +3 stopniu utlenienia. Powstawaniu tej formy białka zapobiega obecna w erytrocytach reduktaza methemoglobiny, nie mniej jednak u zdrowego człowieka zawsze znajduje się niewielka jego ilość (miedzy 0,7- 1,7%) [98]. Wyższe stężenie (1,5 g/dL) powoduje methemoglobinemię-chorobę, której towarzyszy sinica [103]. Obecność methemoglobiny jest często ujawniana

w badaniach krwi metodą EPR poprzez zarejestrowanie sygnału z $g_{\perp} = 6$ oraz $g_{\parallel} = 2$ od wysokospinowej formy Fe^{3+} [104-106]. Przeprowadzone metodą spektroskopii EPR badania krwi wykazały podwyższony poziom methemoglobiny u ludzi narażonych na różne rodzaje promieniowania [101]. Nadmierna obecność tego białka jest niekorzystna, tym bardziej, że w wyniku jego reakcji z nadtlenkiem wodoru powstają we krwi wolne rodniki [104,105]. Gdy trójwartościowe żelazo w hemie reaguje z H_2O_2 albo innym nadtlenkiem, hem utlenia się do formy oksyferylowej ($Fe^{4+} = O$), a H_2O_2 redukuje do H_2O , akceptując dwa elektrony. Jeden z nich pochodzi z przekształcenia Fe^{3+} w Fe^{4+} , drugi natomiast z globiny, w której generowany jest kationorodnik P^{\bullet} na bazie porfiryny [104].



Spektroskopia EPR wykazała powstawanie w methemoglobinie rodników z reszt tryptofanu ($g = 2,033$) oraz rodników tyrozylowych ($g = 2,005$) [104,105]. Rodniki te są bardzo toksyczne, gdyż mogą wywołać utlenianie lipidów, kwasów nukleinowych i aminokwasów przez oderwanie atomów wodoru, powodują też destrukcje hemu. Udowodniono jednak, iż askorbinian obecny w osoczu może zmiatać wolne rodniki powstałe na skutek działania H_2O_2 . W wyniku oddania elektronu askorbinian przekształca się w rodnik askorbylowy $A^{\bullet-}$, który jest jednak znacznie mniej reaktywny [104]. Ponadto askorbinian jako przeciwutleniacz skutecznie zapobiega powstawaniu uszkodzeń oksydacyjnych czynników krzepnięcia krwi, w tym fibrynogenu [107].

Wynaczyniona krew zaczyna krzepnąć po około 4 minutach, po czym tworzy galaretowaty skrzep. Za proces ten odpowiedzialne jest rozpuszczone we krwi białko fibrynogen, które przekształca się w nierozpuszczalną, wytrącającą się fibrynę (włóknik) [97]. Dlatego krew do badań pobiera się najczęściej z naczyń żylnych bezpośrednio do probówek z antykoagulantem. W zależności od przeznaczenia stosuje się wodny roztwór cytrynianu sodu (hemostaza), heparynę (gazometria) albo wersenian potasu (morfologia, badania genetyczne) [108]. W temperaturze pokojowej krew pełną można przechowywać wiele dni, ale przydatność diagnostyczna krwi trzymanej w warunkach chłodniczych jest znacznie dłuższa, przy czym krew zamrożona ($-70^{\circ}C$) może być badana nawet po dwóch latach od pobrania [108].

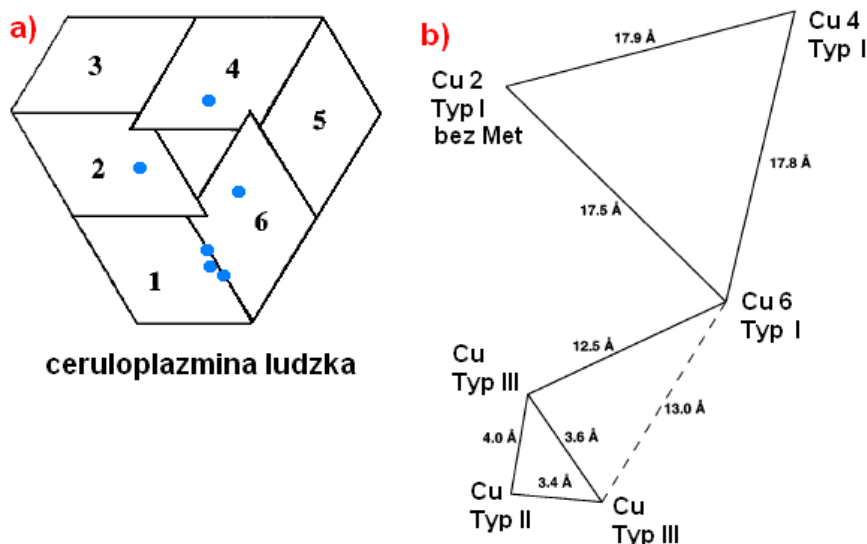
Osocze stanowiące ok. 56% krwi uzyskuje się poprzez odwirowanie krwi pełnej. Warto dodać, iż ono również ulega krzepnięciu. W jego skład oprócz wody (90- 92%) wchodzi substancje stałe, w większości białka (6- 8%) a także sole mineralne (np. NaCl), lipidy (ich nierozpuszczalne cząsteczki są związane z białkiem, tworząc lipoproteiny) oraz glukoza [97]. Surowica różni się od osocza brakiem fibrynogenu [97]. Wprawdzie w osoczu występuje bardzo wiele różnych typów białek, ale w badaniach EPR szczególnie istotne są: transferyna i ceruloplazmina.

Transferyna ludzka (Tf) to białko, którego stężenie w osoczu wynosi 2- 3 g/l [109]. Chociaż jej główną rolą jest transport żelaza oraz dostarczanie go do komórek, ma też udział w proliferacji, różnicowaniu, wzroście i apoptozie komórek [109]. Transferyna jest częścią systemu zapobiegającego występowaniu wolnego żelaza w organizmie, co autor niniejszej rozprawy omawia bardziej szczegółowo w pracach [110,111]. Transferyna krąży we krwi

przenosi dwa atomy żelaza na cząsteczkę, a szybkość jej syntetyzowania w wątrobie może być modulowana poziomem tego metalu w organizmie.

Transferyna przyjmuje tylko jony Fe^{3+} , z których każdy wiąże się w specjalnej wnęce z czterema resztami aminokwasowymi: dwoma tyrozynami, jedną histydyną i kwasem asparaginowym a także z dwoma atomami tlenu pochodzącymi z synergistycznych anionów węglanowych [112]. Owa synergia oznacza, że przyłączenie żelaza wymaga równoczesnego dołączenia anionu węglanowego lub dwuwęglanowego. Żelazo jest związane w zaburzonej ośmiościennej koordynacji [112,113]. Jony Fe^{3+} mają konfigurację elektronową $\text{Ar}(3d^5)$ i występują w transferynie w stanie wysokospinowym $S = 5/2$. Dlatego podczas badania pełnej krwi ludzkiej obserwuje się charakterystyczny sygnał EPR z $g = 4,2$ [114-116]. Ten złożony sygnał jest związany z przejściami z środkowego dubletu Kramersa [117]. Oprócz niego pomiary w paśmie X ujawniły jeszcze dwa piki przy niskim polu ($g \approx 8 - 9$), które odpowiadają przejściom pomiędzy poziomami najniższego dubletu Kramersa [118]. Natomiast apotransferyna, czyli transferyna niewysyciona żelazem nie daje sygnałów EPR [104]. Krąży ona w krwiobiegu do momentu napotkania wolnego żelaza w okolicy jelit albo żelaza z uszkodzonej hemoglobiny w makrofagach (komórkach siateczkowo - śródbłonkowych) [110]. Wówczas wiąże żelazo i transportuje je do komórek, gdzie łączy się z receptorem transferyny (TfR). Należy jednak podkreślić, iż transferyna może przyjąć tylko jony Fe^{3+} , utlenienie Fe^{2+} jest zatem niezbędne przed związaniem przez nią żelaza. Reakcję tę przeprowadza ceruloplazmina dzięki swej aktywności jako ferroksoydaza.

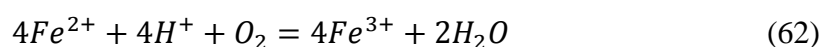
Ceruloplazmina ludzka (hCP) to występująca w osoczu krwi glikoproteina, której poziom u zdrowych osób wynosi około 300 $\mu\text{g/ml}$ [119]. W cząsteczkach ceruloplazminy syntetyzowanych głównie w wątrobie zawarte jest 95% całkowitej miedzi w organizmie, którą jednak nie jest łatwo uwolnić z wnętrza białka [116]. Cząsteczka hCP zawiera sześć domen białkowych ułożonych w trójkątnej orientacji i wiąże sześć atomów miedzi. Trzy z nich tworzą klaster zlokalizowany na styku domen 1 i 6, a pozostałe rozmieszczone są pojedynczo w domenach 2, 4 i 6 [120]. Wzajemne rozmieszczenie jonów miedzi w ceruloplazminie ludzkiej przedstawiono na rys.12.



Rys. 12 Wzajemne rozmieszczenie domen białkowych oraz atomów miedzi różnych typów w cząsteczce ceruloplazminy ludzkiej. Na podstawie [120].

Każdy z trzech pojedynczych atomów miedzi (Cu typu I) wiąże się z cysteiną i dwoma resztami histydyny, a Cu w domenach 4 i 6 również z resztami metioniny. W domenie 2 metionina jest zastąpiona przez niepolarną resztę leucyny [121]. Z kolei dwa atomy miedzi z klastra (Cu typu III) wiążą się z trzema histydynami, natomiast trzeci (Cu typu II), położony najdalej od domeny 6, tylko z dwoma. Atomy miedzi typu I są paramagnetyczne i dają bardziej złożone widmo EPR niż atom Cu typu II. Natomiast para antyferromagnetycznie połączonych jonów miedzi typu III jest niewidoczna w EPR [119]. Dokładne scharakteryzowanie kompleksów miedziowych w ceruloplazminie możliwe jest poprzez analizę sygnału EPR od białka wyizolowanego z osocza. Widmo EPR puryfikowanej ceruloplazminy zarejestrowane w 77 K zostało wyjaśnione jako nałożenie trzech sygnałów. Wyróżniono jedno centrum Cu typu II ($g_{\parallel} = 2,25$ i $A_{\parallel} = 18$ mT) i dwa rodzaje centrów Cu typu I posiadających zbliżone wartości współczynnika g ($g_{\parallel} = 2,20$ i $2,21$), ale odmienną wartość stałej oddziaływania nadsubtelnego ($A_{\parallel} = 7,2$ mT i $A_{\parallel} = 9$ mT) [122]. Duże rozczepienie nadsubtelne dla centrum typu II jest charakterystyczne dla tetragonalnie skoordynowanych kompleksów miedziowych, natomiast parametry widma dla centrów typu I są zgodne ze zniekształconą koordynacją tetraedryczną ligandów wokół metalu [122,123]. W widmie EPR pełnej krwi ludzkiej wyraźnie widać linię przy $g_{\perp} = 2,049$, której pochodzenie przypisano Cu^{2+} typu II w ceruloplazminie [115,122]. Konfigurację jonu Cu^{2+} można przedstawić jako $\text{Ar}(3d^9)$. Jeśli w stanie podstawowym wypadkowy spin klastra $S = \frac{1}{2}$, to paramagnetyzm jest zlokalizowany na centrum typu II [123].

Pomimo, iż ceruloplazmina to wielofunkcyjny enzym jej podstawową rolę w komórkach ssaków jest aktywność ferooksydazy, czyli utlenianie Fe^{2+} do Fe^{3+} , które jest niezbędne, aby żelazo zostało wychwycone i załadowane do apotransferyny.



Utlenianiu żelaza towarzyszy czteroelektronowa redukcja cząsteczki tlenu do wody bez uwalniania O^{2-} i H_2O_2 . Ceruloplazmina pośredniczy w tym wieloetapowym procesie, a jej

jednostka katalityczna do redukcji O_2 do H_2O potrzebuje przynajmniej 4 atomów miedzi [119]. Podczas utleniania żelaza Cu^{2+} jest redukowana do niewidocznej w EPR Cu^+ [116]. Postuluje się, że reoksydacja jonów miedzi następuje przy udziale NO [124].

W kontekście ceruloplazminy warto wspomnieć, że prowadzono badania mające ocenić przydatność tej glikoproteiny jako potencjalnego markera choroby nowotworowej. Nefelometryczny pomiar poziomu ceruloplazminy w osoczu pacjentów ze złośliwymi, litymi, guzami przeprowadzony przed rozpoczęciem leczenia wykazał istotnie podwyższone stężenie tego białka u chorych z zaawansowanymi nowotworami w porównaniu do osób zdrowych [125]. Ustalono nawet graniczne wartości stężenia ceruloplazminy w osoczu, powyżej których mamy wskazanie na nowotwór: 358 mg/l dla mężczyzn i 383 mg/l dla kobiet [125]. Również pomiary EPR krwi chorych na nowotwory złośliwe, prowadzone w temperaturze $-180^\circ C$, wykazały istotny statystycznie wzrost średniej wartości sygnału dla $g = 2,049$ w stosunku do grupy kontrolnej, przy czym największą różnicę zanotowano dla nowotworów piersi [126]. Fakt, że pacjentki z aktywnym nowotworem piersi mają wyraźnie podwyższony poziom ceruloplazminy w porównaniu do ludzi zdrowych czy kobiet z łagodnymi zmianami potwierdzono także w innych eksperymentach [127]. Odmienne rezultaty przyniosła analiza centrów paramagnetycznych w surowicy krwi u psów cierpiących na chłoniaka złośliwego przeprowadzona metodą EPR. Psy z chłoniakiem wykazywały niższy poziom paramagnetycznej miedzi w ceruloplazminie (-22%) i żelaza w transferynie (-33%) w stosunku do zdrowych zwierząt [128]. Podanie im doksorubicyny, silnego leku cytostatycznego używanego w leczeniu wielu typów nowotworów, spowodowało dalszy spadek stężenia Fe^{3+} (-13%) oraz Cu^{2+} (-18%). Postuluje się, iż doksorubicyna może wchodzić w bezpośrednie interakcje z centrami paramagnetycznymi metali, obniżając aktywność ceruloplazminy jako ferrokasydazy, uwalniając żelazo z transferyny a nawet tworząc kompleksy doksorubicyna - żelazo [128]. Ponadto doksorubicyna wpływa znacząco na wewnątrzkomórkową dystrybucję żelaza, hamując jego uwalnianie z ferrytyny [129].

Zarówno u osób zdrowych jak i u chorych na nowotwory pomiary EPR ujawniły występowanie w pełnej krwi jeszcze innych centrów paramagnetycznych, w tym niskospinowych kompleksów żelaza III z porfiryną ($g = 2.21 - 2.91$) oraz cytochromów ($g = 3,03 - 3,27$) [115]. W surowicy pacjentów z homozygotyczną beta-talasemią zidentyfikowano dodatkowo sygnał od wysokospinowego żelaza z methemalbuminy ($g \approx 6$), która powstaje, gdy hem pochodzący z methemoglobiny uwolnionej z erytrocytów zwiąże się z albuminą [130]. Precyzyjna identyfikacja wszystkich sygnałów występujących w widmach EPR pełnej krwi ludzkiej u pacjentów z różnymi chorobami wciąż jednak sprawia pewne trudności.

1.6 Interakcje nanocząstek tlenku żelaza z białkami występującymi we krwi

Oddziaływanie nanocząstek z środowiskiem biologicznym zależy od wielu ich właściwości, np. rozmiaru, kształtu, stopnia krystaliczności, ładunku powierzchniowego, hydrofobowości, zwilżalności, itp. [131]. Nanocząstki tlenku żelaza, ze względu na potencjalne zastosowania medyczne, bada się pod kątem zachowania we krwi i wchodzenia w interakcje z białkami w niej występującymi. Eksperymenty *in vivo* pokazały, że przyłożenie zewnętrznego pola magnetycznego w pobliżu miejsca docelowego wydłuża czas krążenia nanocząstek w krwiobiegu i zwiększa ich gromadzenie we wskazanym narządzie. Zaobserwowano to m.in. u myszy, którym podano nanocząstki magnetytu ($\phi = 24 \pm 19$ nm) w obecności pola 210 mT o gradientzie 200 mT/cm [8]. Efekt ten wystąpił także u szczurów z glejakiem, którym wstrzyknięto nanocząstki magnetytu ($\phi = 30-40$ nm) i przyłożono zewnętrzne pole magnetyczne (75 mT, gradient 18 mT/cm) w rejonie mózgu przez 10 min [7]. Ciekawy wydaje się fakt, iż w tym ostatnim przypadku odnotowano również wzrost stężenia żelaza w transferynie we krwi [7]. Fakt ten kontrastuje z rezultatami eksperymentu przeprowadzonego *in-vitro*, w którym nanocząstki magnetytu inkubowane z wysycaną żelazem transferyną przez 2h wywoływały nieodwracalne zmiany w jej konformacji i powodowały uwalnianie związanego z nią żelaza [131]. Należy jednak pamiętać, iż wyniki doświadczeń *in-vitro* przeprowadzanych z użyciem roztworów białek czy rozcieńczonego wodą osocza mogą znacznie odbiegać od tych bazujących na naturalnym osoczu czy krwi pełnej [132]. Kolejną kwestią nurtującą badaczy jest ustalenie w jakim stopniu nanocząstki mogą być internalizowane przez elementy morfotyczne krwi. Zaobserwowano, iż superparamagnetyczne nanocząstki magnetytu w postaci aglomeratów były wyłapywane przez monocyty, natomiast w przypadku nefagocytujących limfocytów i erytrocytów nanocząstki pozostawały na powierzchni komórek [133]. Przeprowadzone metodą $^{133}\text{Cs}^+$ NMR badanie stabilizowanych krótkołańcuchowymi kopolimerami blokowymi superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza ($\phi = 10 - 15$ i $20 - 25$ nm) inkubowanych ze świeżymi erytrocytami człowieka nie potwierdziło, aby nanocząstki wnikały do wnętrza erytrocytów w temperaturze 37°C [134]. Pokazano natomiast, że nanocząstki mogą przeniknąć do jąder limfocytów znajdujących się w naczyniach włosowatych [8].

Metodą EPR badano interakcje pomiędzy nanocząstkami magnetytu o średnicy 17 nm a białkami: fibrynogenem i albuminą, które występują w osoczu [135]. W tym celu wykorzystano dołączone do białek znaczniki spinowe a także sondy spinowe dodane do badanego roztworu. W obliczeniach posługiwano się równaniem Andersona, które pomogło określić poszerzenie linii EPR δB na skutek oddziaływań dipolowych między rodnikami a nanocząstkami:

$$\delta B = \frac{4\pi\langle\mu_z\rangle}{3\sqrt{3}d^3} \quad (63)$$

gdzie: d - to odległość między znacznikiem a nanocząstką, natomiast $\langle\mu_z\rangle$ to średni moment magnetyczny nanocząstek magnetytu ($4 \cdot 10^{-16}$ Gs \cdot cm 3) [135]. (Należy zwrócić uwagę, że

w powyższym wzorze wykorzystano alternatywnie zdefiniowany moment magnetyczny³. Obliczenia pokazały, że gdy rodniki i nanocząstki magnetytu znajdują się od siebie w odległości mniejszej niż 40 nm, szerokość linii drastycznie wzrasta a amplituda maleje. W oparciu o różnice w intensywności sygnału EPR od znacznika spinowego oceniono adsorpcję białek do powierzchni nanocząsteczek magnetycznych i stwierdzono, że fibrynogen może do niej przywierać, tworząc warstwy [135]. Fakt ten wydaje się istotny w kontekście badań nad wpływem nanocząstek na aktywację białek układu krzepnięcia krwi i ewentualne indukowanie zakrzepów. Odnotowano bowiem przypadek, gdzie nanocząstki magnetytu ($\phi = 4-6$ nm) po podaniu myszom w stężeniach 0,4; 2 i 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ miały efekt prozakrzepowy w tętniczkach i żyłach [136]. Poza łańcuchami fibrynogenu do powierzchni superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza w osoczu mogą adsorbować także inne białka np. immunoglobuliny, $\alpha 1$ antytrypsyna, transtyretyna czy wspomnianą już transferyna [137,138]. Adsorpcja zależy nie tylko od charakterystyki nanocząstek, ale również właściwości białek oraz ośrodka. Jest wspomagana przez różne oddziaływania: wiązania wodorowe, siły solwatacji czy Van der Waalsa [137]. Badania kinetyki adsorpcji białek z osocza na powierzchni nanocząstek tlenku żelaza ($\phi = 7.8 \pm 1.9$ nm) nie potwierdziły występowania typowego efektu Vromana dla tych nanocząstek [138]. Warto przypomnieć, iż Efekt Vromana polega na kompetycyjnej adsorpcji białek, co oznacza, że do powierzchni początkowo przyłączają się białka o dużej mobilności, które następnie mogą zostać zastąpione przez inne o większym powinowactwie. Należałoby zatem oczekiwać, że albuminy jako białka najliczniej występujące w osoczu będą najszybciej wchodzić w interakcje, co mogłoby być korzystne ze względu na ich właściwości antyopsonizacyjne [138]. Eksperymenty z nanocząstkami tlenku żelaza pokazały jednak, że albuminy przyłączały się do ich powierzchni tylko w niewielkich ilościach, na wszystkich etapach adsorpcji dominowały natomiast immunoglobuliny a ilość fibrynogenu zwiększała się wraz z wydłużeniem czasu inkubacji [138]. Z drugiej strony dla nanocząstek maghemitu ($\phi = 7$ nm) zaobserwowano, iż stopień ich oddziaływania z albuminą zależał od zastosowanej otoczki, np. dla cytrynianu adsorpcja tego białka powodowała wzrost promienia hydrodynamicznego cząstek [132]. Inne badania pozwoliły na szczegółowe określenie białek, które w surowicy adsorbują do superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza pokrytych poli(alkoholem winylowym) i dekstranem [139].

Można zatem dojść do konkluzji, iż nieosłonięte nanocząstki we krwi są pokrywane w większości białkami promującymi ich szybką eliminację z krwiobiegu, natomiast nanocząstki, których powierzchnia została zmodyfikowana (np. biokompatybilnym polimerem) mogą wykazywać inne zachowanie.

³ Standardowo określony moment magnetyczny wyraża się w jednostkach J/T, natomiast w niektórych publikacjach można spotkać moment magnetyczny zdefiniowany w sposób alternatywny, jako iloczyn „równikowego” pola magnetycznego i sześcienu odległości, przy czym „równikiem” magnesu określa się płaszczyznę normalną do momentu magnetycznego magnesu przechodzącą przez jego środek, o czym pisze J. B. Tatum w rozdziale „Magnetic dipole moment” dostępnym <http://astrowww.phys.uvic.ca/~tatum/elmag/em17.pdf> (dostęp 9 V 2016).

2 Materiały:

2.1 Nanocząstki magnetytu:

W pomiarach metodą EPR wykorzystano nanocząstki magnetytu przygotowane w Zakładzie Chemii Supramolekularnej na Wydziale Chemii UAM przez dr Joannę Kurczewską z zespołu prof. Grzegorza Schroedera oraz nanocząstki syntetyzowane w Centrum NanoBiomedycznym UAM przez dr Magdalenę Hałupkę-Bryl. Wykaz próbek bazowych wraz z przypisanymi im numerami i charakterystyką przedstawiono w tabeli 1.

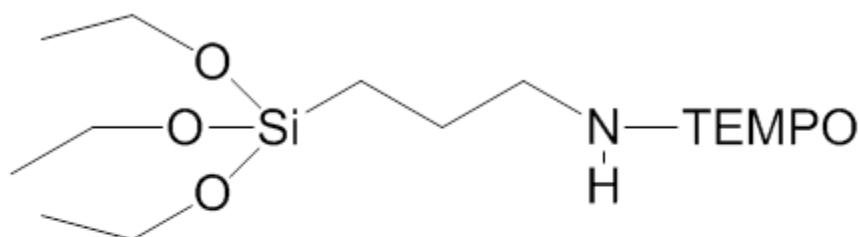
Tabela 1 Charakterystyka nanocząstek wykorzystanych w pomiarach:

Nr próbki	miejsce syntezy	rdzeń	Średnica rdzenia [nm]	pokrycie	Stężenie próbki podstawowej [mg/ml]
n53	Centrum NanoBiomedyczne	Fe ₃ O ₄	8-12	PEG + DOX	1
n58	Wydział Chemii UAM	Fe ₃ O ₄	5	silan + TEMPO-NH ₂ .	0,1
n64	Wydział Chemii UAM	Fe ₃ O ₄	5	silan + TEMPO-NH ₂ +dekstran	0,1
n65b	Wydział Chemii UAM	Fe ₃ O ₄	5	silan	0,1
n66b	Wydział Chemii UAM	Fe ₃ O ₄	5	silan + TEMPO-NH ₂ .	0,1

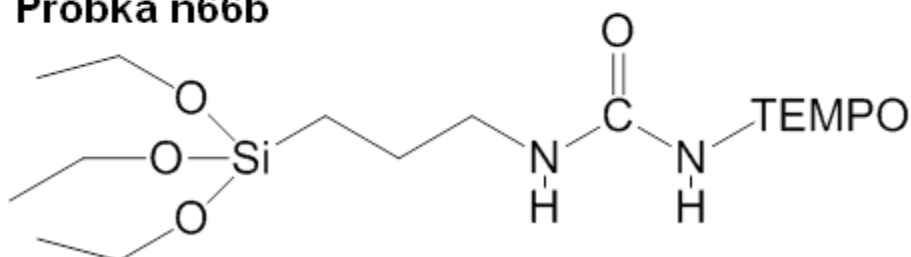
Próbki n58, n64, n65b i n66b zostały przygotowane na wydziale Chemii UAM na bazie nanocząstek Fe₃O₄ zakupionych od Sigma-Aldrich (średni rozmiar rdzenia 5 nm z pomiarów TEM). Nanocząstki pokryto silanem, stosując metodę przedstawioną w pracy [20]. Rolą silanu było stworzenie powłoki ochronnej rdzenia oraz wprowadzenie reaktywnych grup funkcyjnych. W przypadku próbek n58, n64 i n66b grupy te umożliwiły kowalencyjne dołączenie do powierzchni nanocząstek znacznika spinowego TEMPO z grupą aminową. Sposób dołączenia H₂N-TEMPO do silanu przedstawia rys. 13.⁴ Podczas funkcjonalizacji nanocząstek n58 i n64 najpierw dołączano do nich silan z grupą funkcyjną -Cl. W kolejnym etapie reagował on z TEMPO-NH₂. Nanocząstki n64 były przenoszone do roztworów wodnych z dodatkiem dekstranu. Polimer ten tworzył dodatkową powłokę mającą chronić nitroksydy znajdujące się na powierzchni nanocząstek. W przypadku próbki n66b zastosowano natomiast silan z inną grupą funkcyjną [(3-izocyjanopropyl)-trietoksylo-silan]. Silan ten najpierw łączono z amino-TEMPO a dopiero później z rdzeniem nanocząstek.

⁴ Schemat przyłączenia znacznika spinowego amino-TEMPO do silanu otrzymany dzięki uprzejmości dr Joanny Kurczewskiej z Wydziału Chemii UAM.

Próbki n58 i n64



Próbka n66b



Rys. 13 Sposób dołączenia znacznika H₂N-TEMPO do silanu na powierzchni nanocząstek magnetytu. W przypadku nanocząstek n66b zastosowano (3-izocyjanopropyl)-trietoksyilan.

Nanocząstki n53 syntetyzowane były w CentrumNanoBiomedycznym UAM metodą koprecypitacji soli żelazowych w środowisku zasadowym. Zostały one pokryte kopolimerem blokowym na bazie poli(glikolu etylenowego) w celu uzyskania biokompatybilności. Dodatkowo dołączono do nich lek przeciwnowotworowy - dokсорubicynę (DOX), czyli antybiotyk z rzędu antracyklin o działaniu cytostatycznym. Informacje o procedurze syntezy nanocząstek pokrywanych polimerem na bazie PEG można znaleźć w pracach [140,141]. Na podstawie analizy obrazów z TEM oszacowano rozmiary rdzeni nanocząstek n53 na 8-12 nm.

2.2 Próbki surowicy i pełnej krwi ludzkiej:

Próbki pełnej krwi (zawierającej zarówno elementy upostaciowane jak i osocze) oraz surowicy ludzkiej pozyskano z Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu dzięki uprzejmości dr n. med. Ewy Leporowskiej. Krew pełna została pobrana od 13 osób, z których u 8 stwierdzono występowanie nowotworu. Zastosowano antykoagulant wersenian potasu, aby zapobiec jej krzepnięciu i umożliwić przechowywanie. Próbkom krwi i surowicy przypisano numery, które oznaczają przynależność do konkretnego pacjenta.

Charakterystykę próbek krwi pełnej wraz z wynikami badania ogólnego przedstawia tabela 2. Kolorem czerwonym oznaczono w niej wartości odbiegające od uznanych za prawidłowe. Wartości norm dla badania hematologicznego zamieszczono natomiast w tabeli 3. U sześciu pacjentów z nowotworami zanotowano zbyt niskie stężenie żelaza, któremu towarzyszyło obniżenie hematokrytu oraz poziomu hemoglobiny we krwi.

Tabela 2 Podstawowe dane dotyczące próbek pełnej krwi ludzkiej wraz z wynikami badania morfologicznego. Symbole K i M oznaczają odpowiednio kobietę i mężczyznę, kolorem czerwonym oznaczono wartości odbiegające od norm przedstawionych w tabeli 3.

Nr	Płeć	Wiek	Eryt. [T/L]	Hb [mmol/L]	Ht [L/L]	MCV [fL]	MCH [fmol]	MCHC [mmol/L]	Fe [µg/dl]	Status
12	M	52	4,93	8,7	0,413	83,8	1,77	21,1	83	bez nowotworu
59	K	63	4,6	8,8	0,417	90,7	1,91	21,1	91	bez nowotworu
61	K	35	4,55	8	0,385	84,6	1,76	20,8	89	bez nowotworu
280	M	18	4,75	8,8	0,41	86,3	1,85	21,5	23	bez nowotworu
333	K	75	4,66	7,9	0,38	81,5	1,70	20,8	42	bez nowotworu
20	K	29	4,28	7,6	0,369	86,2	1,78	20,6	79	rak tarczycy
142	M	72	4,32	7,6	0,381	88,2	1,76	19,9	39	rak trzustki
155	M	76	5,23	9,2	0,457	87,4	1,76	20,1	134	rak prostaty
296	M	81	2,41	4,5	0,220	91,3	1,87	20,5	33	rak prostaty
215	K	69	3,54	6,3	0,312	88,1	1,78	20,2	46	rak woreczka żółc.
266	K	64	4,17	7,4	0,366	87,8	1,78	20,2	48	rak piersi
273	M	46	3,58	6,1	0,302	84,4	1,70	20,2	21	rak jelita grubego
311	M	61	2,74	5,5	0,255	93,1	2,01	21,6	27	rak nerki

Tabela 3 Normy badania hematologicznego na podstawie [142]. Skróty: Hb - hemoglobina, Ht- hematokryt, MCV - średnia objętość krwinek czerwonych, MCH - zawartość hemoglobiny w krwince czerwonej, MCHC - średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej.

Normy:	kobiety	mężczyźni	jednostka
erytrocyty	3,6-5	4,2-5,4	[T/l]
Hb	7,4 - 9,9	8,0 - 11,1	[mmol/L]
Ht	0,37-0,47	0,4-0,54	[L/L]
MCV	80-94		[fL]
MCH	1,7-2,2		[fmol]
MCHC	20-21		[mmol/L]
Fe	70-180		[µg/dL]

2.3 Próbkę nanocząstek w surowicy i pełnej krwi ludzkiej

Próbki do pomiarów metodą EPR przygotowywano, mieszając przez 20 minut 30 µl roztworu nanocząstek z 30 µl odpowiednio: wody dejonizowanej, surowicy albo pełnej krwi ludzkiej. Następnie pobierano 55 µl tak przygotowanego roztworu cząstek do fiolki lub w przypadku pomiarów w temperaturze pokojowej napełniano jednorazową kapilarę pomiarową. W pracy laboratoryjnej wykorzystywano jednokanałowe pipety automatyczne, które cechują się niepewnością pomiarową na poziomie 0,8-1,6%.

3 Metodyka pomiarów:

Pomiary EPR przeprowadzono z użyciem spektrometru fali ciągłej Bruker EMX-10, który pracuje w paśmie mikrofalowym X (częstość ok. 9,4 GHz). W urządzeniu tym dioda Gunna stanowi źródło mikrofal, natomiast dioda Schottky'ego detektor ilości promieniowania odbitego od wnęki rezonansowej [143]. Badane próbki umieszczano w standardowym rezonatorze prostokątnym ER 4102ST (mod TE₁₀₂) zlokalizowanym pomiędzy nabiegownikami elektromagnesu. Podczas pomiarów stosowano drugą modulację pola magnetycznego, co oznacza, że było ono nie tylko liniowo zmieniane w czasie, ale dodatkowo modulowane przez specjalne cewki z częstością $f_m = 100$ kHz. Dlatego po wzmacnieniu i przeprowadzeniu detekcji synchronicznej sygnału otrzymywano widma EPR będące pierwszą pochodną krzywej absorpcji.

Pomiary w niskich temperaturach wykonano dzięki zastosowaniu cyfrowego systemu kontroli temperatury ER 4131VT. Medium chłodzące stanowił gazowy N₂, uzyskiwany w wyniku podgrzania ciekłego azotu, zgromadzonego w 10 l dewarze i doprowadzonego do wrzenia za pomocą umieszczonej wewnątrz grzałki. Pary o określonej temperaturze były dostarczane rurką do umieszczonego we wnęce rezonansowej dewaru kwarcowego, w którym umieszczano fiolkę bądź kapilarę z badaną próbką. Temperaturę w jej sąsiedztwie kontrolowano z użyciem termopary i automatycznie stabilizowano z dokładnością do 0,1 K.

Przed zarejestrowaniem widm dobierano odpowiednie parametry pracy spektrometru (pole centralne, zakres przemiatań, tłumienie mikrofal, wzmacnienie, amplitudę modulacji, stałą czasową i czas skanowania, liczbę akumulacji), aby uzyskać optymalne sygnały od badanych próbek. Kontrolę wszystkich ustawień umożliwiał program WIN- EPR Acquisition.

Podczas rejestracji widm nanocząstek zastosowano wzorec w postaci kryształu rubinu umieszczonego w specjalnym uchwycie, aby zachować stałą pozycję kryształu ($g \approx 4,3$). Analiza sygnału od wzorca pozwoliła sprawdzić, czy zachowane są stałe warunki pomiaru. Na widmach zamieszczonych w pracy sygnał od wzorca został odjęty, aby nie zaburzać czytelności rysunków.

3.1 Pomiary krwi i surowicy przed dodaniem nanocząstek:

W pierwszym etapie zbadano łącznie 26 próbek krwi i surowicy, aby zidentyfikować występujące w nich centra paramagnetyczne. Odmierzano zawsze tę samą objętość 100 μ l substancji. Pomiary wykonywano w 200K. Zastosowano następujące nastawy spektrometru: częstotliwość drugiej modulacji 100 kHz, amplituda modulacji 0,5 mT, tłumienie 14 dB (moc mikrofalowa $\approx 7,9$ mW), wzmacnienie $2 \cdot 10^5$, stała czasowa 20,48 ms, czas przemiatań 20,972 s. Pomiary wykonywano w zakresach przemiatań 650 mT (centrum 333,5 mT) oraz 100 mT (centrum 140 mT). Sygnały EPR od surowicy i pełnej krwi ludzkiej były stosunkowo słabe, dlatego podczas badania próbek przeprowadzano akumulację widm w celu poprawienia stosunku sygnału do szumu. W przypadku spektrometru Bruker EMX-10 proces ten polegał na wielokrotnej akwizycji i dodawaniu otrzymanych widm do siebie, bez późniejszego uśrednienia [143]. Sygnał EPR rósł proporcjonalnie do liczby wykonanych skanów, oznaczonej przez n ,

wzrost szumu był natomiast proporcjonalny do \sqrt{n} . Stosunek sygnału do szumu SNR wzrastał zatem jak:

$$SNR = \frac{\text{sygnał}}{\text{szum}} = \frac{n}{\sqrt{n}} = \sqrt{n} \quad (64)$$

W pomiarach próbek krwi i surowicy wykonywano po 25 akumulacji, a widma zarejestrowane w wąskim zakresie przemiatania poddano dodatkowo filtracji filtrem dolnoprzepustowym (*low pass FFT filter* w programie Origin), dobierając częstotliwość odcięcia w taki sposób, aby widma nie zostały zniekształcone.

3.2 Pomiary nanocząstek magnetytu:

Próbki przygotowywano poprzez zmieszanie 30 μl wodnego roztworu nanocząstek z 30 μl odpowiednio wody dejonizowanej, surowicy bądź pełnej krwi ludzkiej. W danej sesji pomiarowej używano próbek krwi i surowicy pochodzących od tego samego dawcy, czyli oznaczonych tym samym numerem. Z reguły dla określonego typu nanocząstek pomiary powtarzano, wykorzystując próbki krwi i surowicy od innych pacjentów. Dla przykładu nanocząstki n53 przebadano we krwi nr 12 i 20 oraz odpowiadającej surowicy nr 12 i 20.

Wszystkie rodzaje nanocząstek przebadano w obniżonych temperaturach. Do fiolek pobierano jednakowe objętości 55 μl roztworów nanocząstek we wspomnianych ośrodkach. Próbki zamrażano, ustalając docelową temperaturę za pomocą cyfrowego systemu kontroli. Nastawy spektrometru podczas pomiarów w niskich temperaturach przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4 Nastawy spektrometru przy pomiarach zamrożonych próbek nanocząstek:

nr próbki	zakres przemiatania [mT]	wzmocnienie	amplituda modulacji [mT]	stała czasowa [ms]	tłumienie [dB]
n53	650	$1,12 \cdot 10^3$	0,5	20,48	14
n58	650	$6,32 \cdot 10^3$	0,5	20,48	14
n58 (TEMPO)	20	$6,32 \cdot 10^3$	0,1	20,48	14
n64	650	$6,32 \cdot 10^3$	0,5	20,48	10
n64 (TEMPO)	20	$6,32 \cdot 10^3$	0,1	20,48	10
n65b	650	$6,32 \cdot 10^3$	0,5	40,96	14
n66b	650	$6,32 \cdot 10^3$	0,5	40,96	14
n66b (TEMPO)	20	$6,32 \cdot 10^3$	0,1	40,96	14

Dla nanocząstek n53, n65b i n66b w badanych ośrodkach zastosowano procedurę field cooling. Ciekłą próbkę trzymano w polu magnetycznym 500 mT przez 5 min a następnie zamrażano w tym polu. Pomiar odbywał się z użyciem goniometru dla orientacji próbki 0° i 90° względem kierunku zewnętrznego pola magnetycznego (dla nanocząstek n65b również 180°).

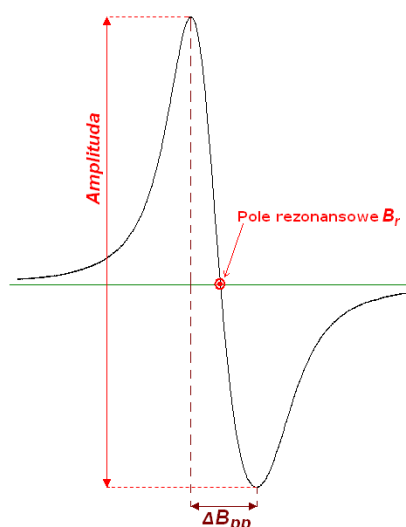
Standardową temperaturą pomiarów było 230K. Nanocząstki n66b przebadano dodatkowo w 255 i 260K, natomiast nanocząstki n53, n58 i n64 w szerokich zakresach temperatur, odpowiednio: 121-265K, 123-265K, 155-250K.

Nanocząstki z dołączonym znacznikiem spinowym (n58 i n66b) w wodzie, surowicy i pełnej krwi ludzkiej badano również w postaci ciekłej w jednorazowych kapilarach. Zastosowane nastawy spektrometru przedstawia tabela 5. Próbkę nanocząstek n58 po zmierzeniu w 293K przechowano w temperaturze pokojowej i po 8 dniach ponownie zarejestrowano ich widma EPR w tej samej temperaturze i przy tych samych nastawach spektrometru. Dodatkowo dla próbki n58 w surowicy zarejestrowano sygnał z 10x zwiększonym wzmocnieniem.

Tabela 5 Nastawy spektrometru przy pomiarach ciekłych próbek nanocząstek w kapilarach:

Nr próbki	Zakres przemiatania [mT]	Wzmocnienie	Amplituda modulacji [mT]	Stała czasowa [ms]	tłumienie [dB]
n58	650	10^4	0,5	20,48	14
n58 (TEMPO)	10	10^4	0,05	20,48	14
n58 (TEMPO) (po 8 dniach)	10	10^4	0,05	20,48	14
n66b	650	$6,32 \cdot 10^3$	0,5	40,96	14
n66b (TEMPO)	20	$6,32 \cdot 10^3$	0,05	40,96	14

Analizę widm doświadczalnych przeprowadzono w programach Origin (OriginLab Corporation) i Excel (Microsoft Corporation). Sposób wyznaczania podstawowych parametrów sygnału EPR (pola rezonansowego B_r , szerokości pik-pik ΔB_{pp} oraz amplitudy) obrazuje rys. 14.



Rys. 14 Sposób wyznaczania podstawowych parametrów linii EPR.

Wartości współczynników g obliczano ze wzoru (11). Dla widm dołączonego do nanocząstek znacznika spinowego w reżimie szybkiej rotacji wyznaczano ponadto: stałe oddziaływania nadsubtelnego (patrz rys. 2), czas korelacji rotacyjnej, korzystając z formuły (47) oraz

współczynnik anizotropii ze wzoru (49). Opis ruchu znacznika wolnorotującego wymagał natomiast przeprowadzenia symulacji (patrz podrozdział 3.4).

Przy analizie wyników pomiarów nanocząstek przeprowadzono również analizę CREM (szczegółowe informacje w podrozdziale 3.5).

3.3 Metoda szacowania niepewności pomiarowych:

Przy ocenie niepewności wyników pomiarów bezpośrednich (np. temperatury) uwzględniano niepewność działki przyrządu oraz ewentualną niepewność obserwatora.

Do oszacowania niepewności pomiarów pośrednich zastosowano metodę losowej oceny niepewności systematycznej wielkości mierzonej pośrednio. Metoda ta nie prowadzi do przesadnie pesymistycznej oceny niepewności (tak jak ma to miejsce w przypadku niepewności maksymalnej) i jest często stosowana w praktyce [144].

Przy obliczaniu złożonej niepewności wykorzystano prawo przenoszenia niepewności pomiarowych [145]. W przypadku funkcji wielu zmiennych $y = f(x_1, \dots, x_n)$, niepewność złożoną $S_c(y)$ wyznaczano poprzez obliczenie różniczek cząstkowych dla kolejnych zmiennych i utworzenie z nich sumy geometrycznej [146]. Dlatego stosowany wzór ogólny na niepewność przybierał postać:

$$S_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left[\frac{\partial y}{\partial x_i} S(x_i) \right]^2} \quad (65)$$

gdzie:

$S(x_i)$ - oznacza niepewność pomiaru wielkości x_i .

Dla przykładu, oznaczając niepewność pomiaru częstotliwości jako \overline{S}_v i niepewność wyznaczenia pola rezonansowego jako \overline{S}_{B_r} , wzór na niepewność pomiaru dla współczynnika g przedstawiał się następująco:

$$\overline{S}_g = \sqrt{\left(\frac{\partial g}{\partial B_r} \cdot \overline{S}_{B_r} \right)^2 + \left(\frac{\partial g}{\partial v} \cdot \overline{S}_v \right)^2} \quad (66)$$

Po obliczeniu odpowiednich pochodnych, wykonaniu przekształceń i uwzględnieniu, że wartość współczynnika g wyraża się wzorem (10) formułę na niepewność pomiaru pośredniego współczynnika g można przedstawić również jako:

$$\overline{S}_g = |g| \cdot \sqrt{\left(\frac{\overline{S}_{B_r}}{B_r} \right)^2 + \left(\frac{\overline{S}_v}{v} \right)^2} \quad (67)$$

W pomiarach spektrometrem Bruker EMX-10 niepewność pomiaru częstotliwości przyjęto jako $\overline{S}_v = 0,001$ [GHz], natomiast niepewność wyznaczenia pola rezonansowego: \overline{S}_{B_r} zależała od stosowanego zakresu przemiatania przy 1024 krokach próbkowania pola.

3.4 Sposób przeprowadzania symulacji widm EPR:

Symulacje widm EPR znacznika spinowego 4-amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek wykonano w programie EasySpin. Jest to działający w środowisku Matlab zestaw narzędzi symulacyjnych EPR stworzony przez Stefana Stolla wraz ze współpracownikami. Program EasySpin sprawdza się przy symulacjach widma znaczników spinowych. W zależności od skali czasowej dynamiki rotacji znacznika w symulacjach stosuje się różne funkcje: „pepper” dla reżimu sztywnego (*rigid limit*), „chili” dla znacznika wolno rotującego (*slow motion*), natomiast „garlic” dla szybkiego ruchu znacznika (*fast motion*) [91].

W niniejszej pracy symulowano sygnały EPR dołączonego do nanocząstek znacznika spinowego 4-amino-TEMPO dla temperatur 125 i 230K, posługując się funkcją „chili”. Dodatkowo dzięki zastosowaniu funkcji „esfit” i sympleksowej metody spadku Neldera-Meada program mógł w sposób dynamiczny zmieniać wartości parametrów symulacji aż do momentu uzyskania optymalnej zgodności widm symulowanego i eksperymentalnego. Należy dodać, że symulacje wykonywano na podstawie widm zarejestrowanych w zakresie przemieszczenia 20 mT. W przypadku, gdy w widmie doświadczalnym sygnał od znacznika 4-amino-TEMPO występował na tle fragmentu (na zboczach) szerokiej linii od magnetytowego rdzenia nanocząstek, podkład ten odejmowano, dopasowując do niego krzywą określoną wielomianem trzeciego stopnia. Dzięki temu widma odniesienia posiadały dobrze skorygowaną linię bazową.

Przeprowadzenie symulacji umożliwiło wyznaczenie dla widm wolno rotujących znaczników takich parametrów, jak: czas korelacji rotacyjnej τ_R , szerokość linii, wartości składowych tensorów: \check{g} (g_x, g_y, g_z) oraz \check{A} (A_x, A_y, A_z).

3.5 Zastosowanie metody CREM:

Widma EPR dołączonego do nanocząstek znacznika spinowego TEMPO (próbki n58 i n64 w badanych ośrodkach) oraz sygnały od magnetytowych rdzeni nanocząstek (próbki n53, n65b) poddano procedurze numerycznego zwiększania rozdzielczości z użyciem specjalnego programu komputerowego RKU. Metoda zwiększania rozdzielczości sygnałowej złożonych widm EPR fali ciągłej, nazywana również CREM (akronim od *computer resolution enhancement method*), pomaga w interpretacji sygnałów składających się z wielu nakładających się linii rezonansowych o różnych szerokościach [147]. Opis metody oraz jej przykładowe aplikacje w spektroskopii EPR znaleźć można w pracach [9,147-149], natomiast szczegółowy opis teoretyczny w artykule [150].

Podczas analizy CREM widmo EPR traktuje się jako splot dwóch funkcji:

$$F(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} K(x - x') \Psi(x') dx' \quad (68)$$

gdzie: $\Psi(x')$ określa pozycję i intensywności poszczególnych linii w widmie, a $K(x - x')$ to tzw. rdzeń, czyli funkcja opisująca kształt i szerokość pojedynczej linii.

W pierwszym etapie procedury funkcję $F(x)$ poddaje się transformacji Fouriera:

$$\tilde{F}(y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} F(x) \exp(-ixy) dx \quad (69)$$

Następnie wyznacza się również transformatę rdzenia $\tilde{K}(y)$.

Przy zwiększaniu rozdzielczości rzeczą kluczową jest wyznaczenie funkcji $\Psi(x')$:

$$\Psi(x') = (2\pi)^{-1/2} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\tilde{F}(y)}{\tilde{K}(y)} \exp(-ix'y) dy \quad (70)$$

W praktyce mamy do czynienia ze skończonym ciągiem próbek sygnału, więc korzystamy ze wzorów w postaci dyskretnej. Dodatkowo konieczne jest ustalenie kształtu funkcji opisującej linię rezonansową (Gausa albo Lorentza) oraz dobór określonej szerokości rdzenia. Zazwyczaj dla danego widma obliczenia powtarza się dla różnych szerokości rdzenia, aby znaleźć wartość optymalną, czyli taką, dla której widmo jest najlepiej rozdzielone a amplitudy sygnału absorpcji przyjmują nieujemne wartości [147].

W eksperymencie analizy CREM widm zarejestrowanych w określonej temperaturze dla nanocząstek n53 i n65b w różnych ośrodkach przeprowadzono przy tej samej, optymalnie dobranej szerokości rdzenia (20 pkt), aby można było porównać rezultaty. Kształt linii ustalono jako Lorentzowski. Dla zarejestrowanych w wąskim zakresie przemiatania sygnałów od znaczników spinowych dołączonych do nanocząstek n58 i n64 szerokość funkcji rdzenia ustalono natomiast na 25 pkt.

4 Wyniki:

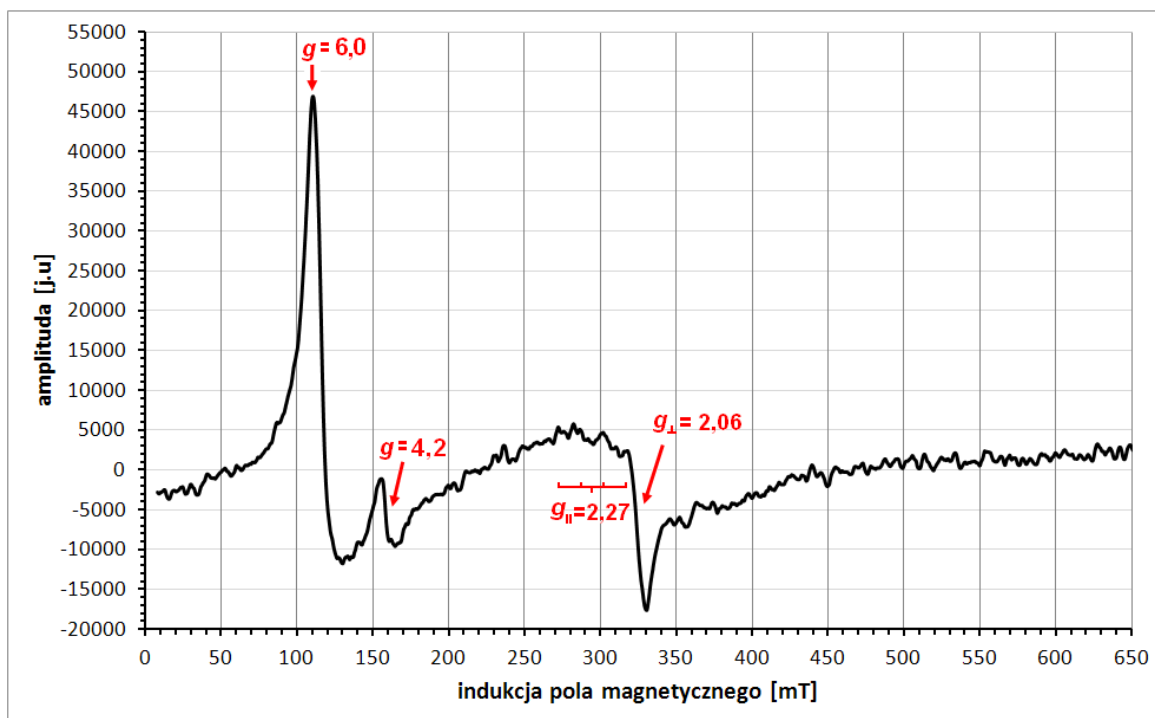
4.1 Pomiary surowicy i pełnej krwi ludzkiej przed dodaniem nanocząstek

Metodą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego przebadano 13 próbek krwi pełnej i 13 próbek surowicy.⁵ Próbki krwi pełnej pochodzące zarówno od osób zdrowych jak i pacjentów z nowotworami wykazywały charakterystyczne ciemne zabarwienie (rys. 15).



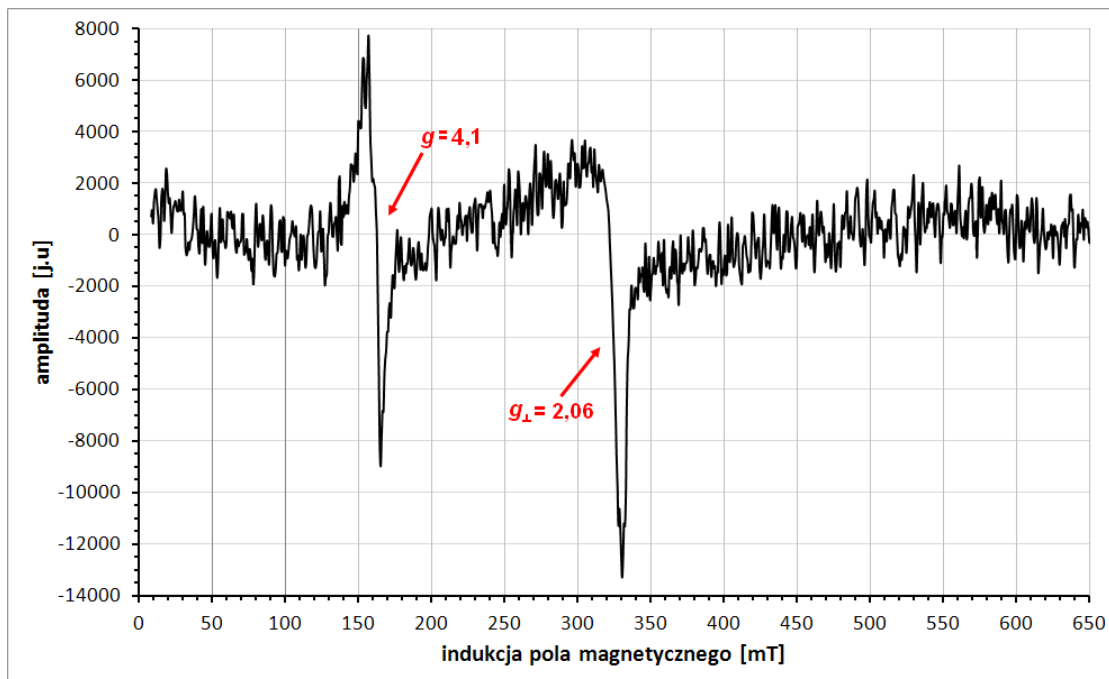
Rys. 15 Próbki krwi pełnej przebadane w eksperymencie posiadały charakterystyczne ciemne zabarwienie.

We wszystkich widmach pełnej krwi ludzkiej uzyskanych w szerokim zakresie przemiatań, tj. 650 [mT], występowały trzy wyraźne sygnały EPR. Przykład stanowi wynik pomiaru próbki nr 155 (krew pacjenta z rakiem prostaty) przedstawiony na rys. 16. W widmie tym dominuje linia $g = 6,0$. Znacznie mniejszą intensywność przejawia linia $g = 4,2$ oraz złożony sygnał $g_{\parallel} = 2,27$ oraz $g_{\perp} = 2,06$, który charakteryzuje się strukturą nadsubtelną $A_{\parallel} = 15 \pm 0,9$ mT.



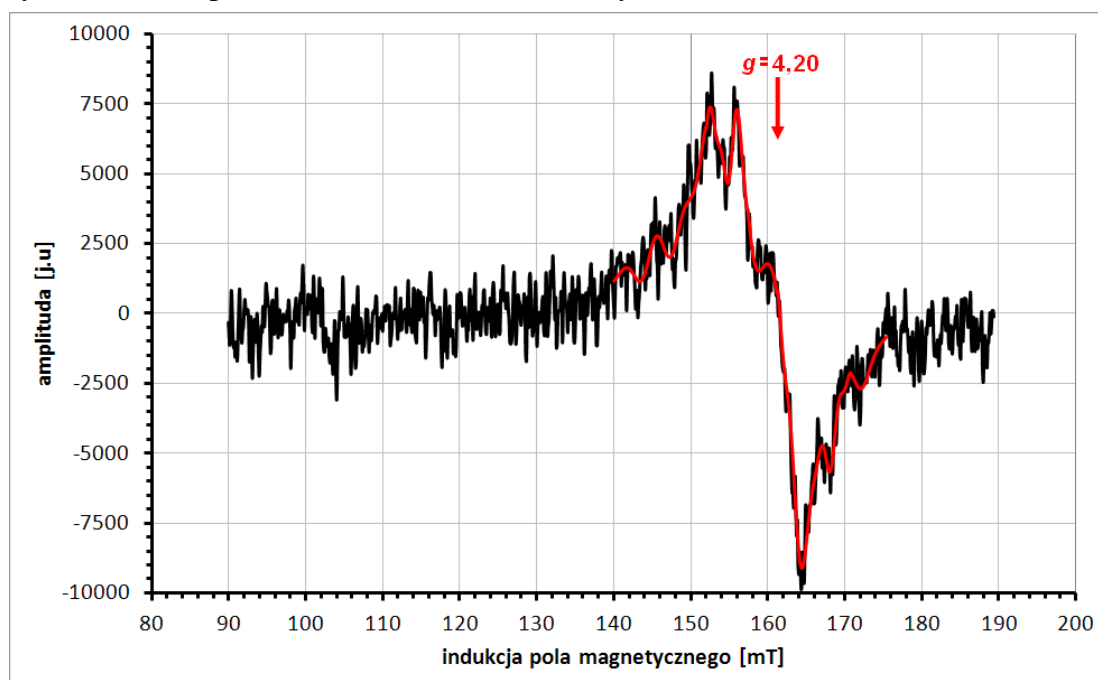
Rys. 16 Widmo EPR pełnej krwi ludzkiej (próbka nr 155 - krew pacjenta z rakiem prostaty) z zaznaczeniem wartości współczynników g dla poszczególnych linii.

⁵ Ponad 40 próbek krwi pełnej pobranych od pacjentek z rakiem piersi autor przebadał dodatkowo już podczas przygotowywania pracy magisterskiej pt. „Badanie metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego pełnej krwi pacjentek z rakiem piersi leczonych radioterapią”. Część otrzymanych wyników można znaleźć w pracy [114].



Rys. 17 Widmo EPR surowicy ludzkiej, próbka nr 155 (pacjent z rakiem prostaty). Zaznaczono wartości współczynników g dla dwóch wyraźnie widocznych linii.

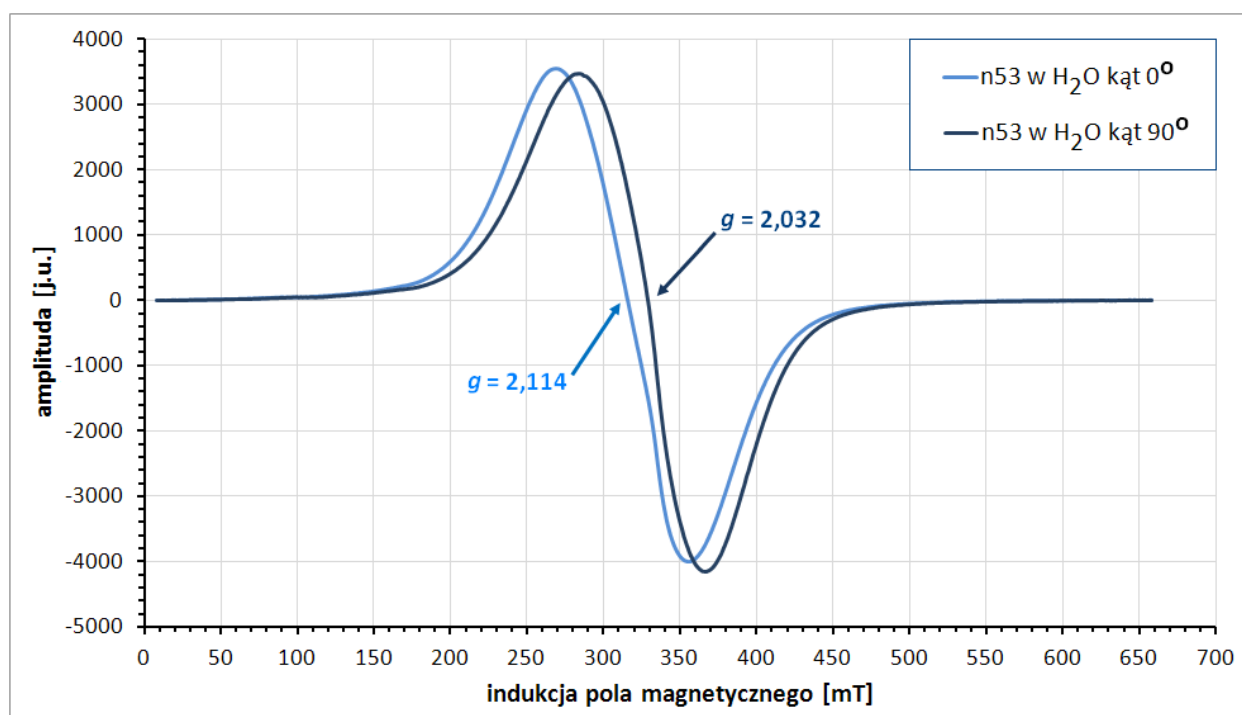
Dla porównania w widmie EPR surowicy nr 155 pochodzącej od tego samego pacjenta na tle szumu wyraźnie uwidaczniają tylko dwa sygnały $g = 4,2$ oraz $g_{\perp} = 2,06$ (rys.17). Występują one dla wszystkich przebadanych próbek. W widmach EPR surowicy ludzkiej nie pojawia się natomiast linia z $g = 6$. Zapisy przeprowadzone w węższym zakresie przemiatania 100 mT dokładniej oddają charakter sygnału EPR z $g = 4,2$. Posiada on charakterystyczny kształt i jest złożony z trzech komponentów, co zobrazowano na rys. 18.



Rys. 18 Widmo EPR surowicy ludzkiej (próbka nr 155 pacjent z rakiem prostaty) zarejestrowane w zakresie przemiatania 100 mT uwidacznia szczegóły sygnału z $g = 4,2$. Kolorem czerwonym pokazano sygnał po zastosowaniu filtra dolnoprzepustowego.

4.2 Pomiary nanocząstek n53 pokrytych polimerem na bazie PEG z dołączonym lekiem przeciwnowotworowym - doksorubicyną.

Nanocząstki n53 pokryte polimerem na bazie PEG z dołączonym cytostatykiem doksorubicyną badano w wodzie dejonizowanej, surowicy i krwi pełnej. Zastosowano procedurę field cooling (5 min w polu 500 mT). Pomiar przeprowadzono z użyciem goniometru dla dwóch orientacji próbek, tj. 0° i 90° w stosunku do kierunku przyłożonego pola magnetycznego. Porównanie widm zarejestrowanych w temp. 230K dla kątów 0° i 90° dla nanocząstek n53 w wodzie, surowicy nr 20 i krwi nr 20 przedstawiają kolejno rysunki 19-21. Widma te mają postać pojedynczej szerokiej linii. Należy zauważyć, że wartość zewnętrznego pola rezonansowego silnie zależy od orientacji próbki i jest większa dla kąta 90° .

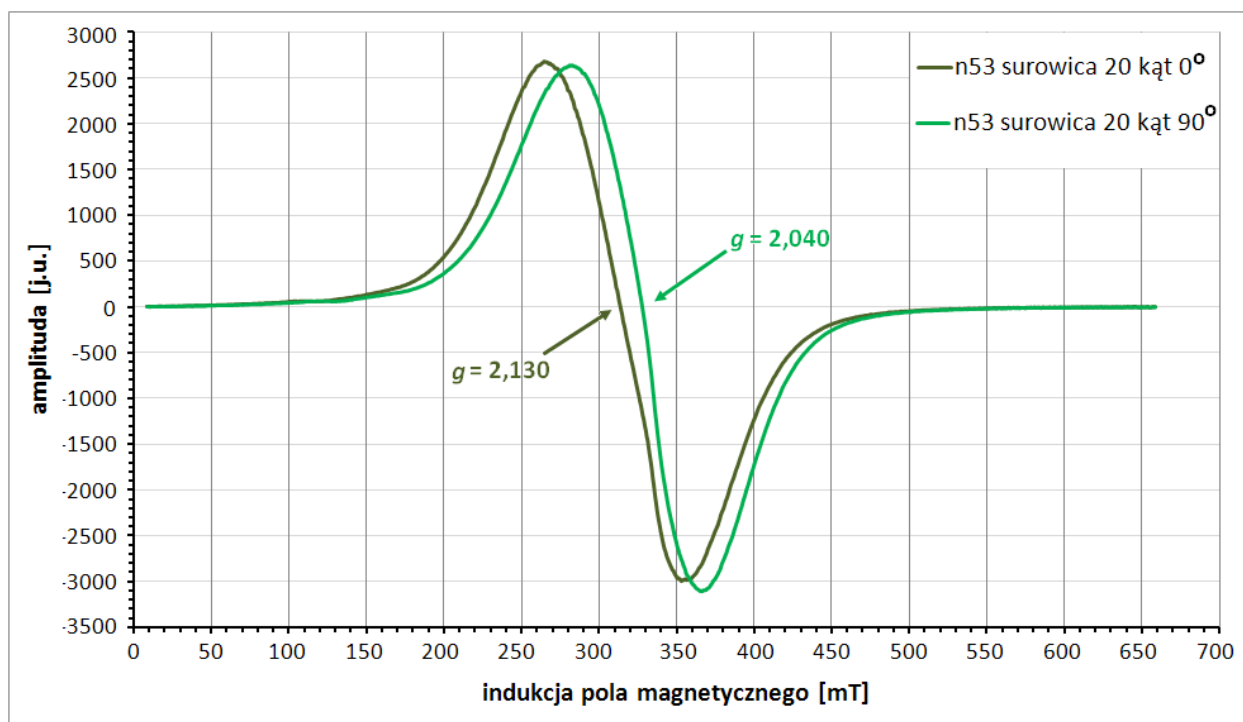


Rys. 19 Porównanie widm EPR nanocząstek n53 w wodzie w temp. 230K dla orientacji 0° i 90° w stosunku do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego.

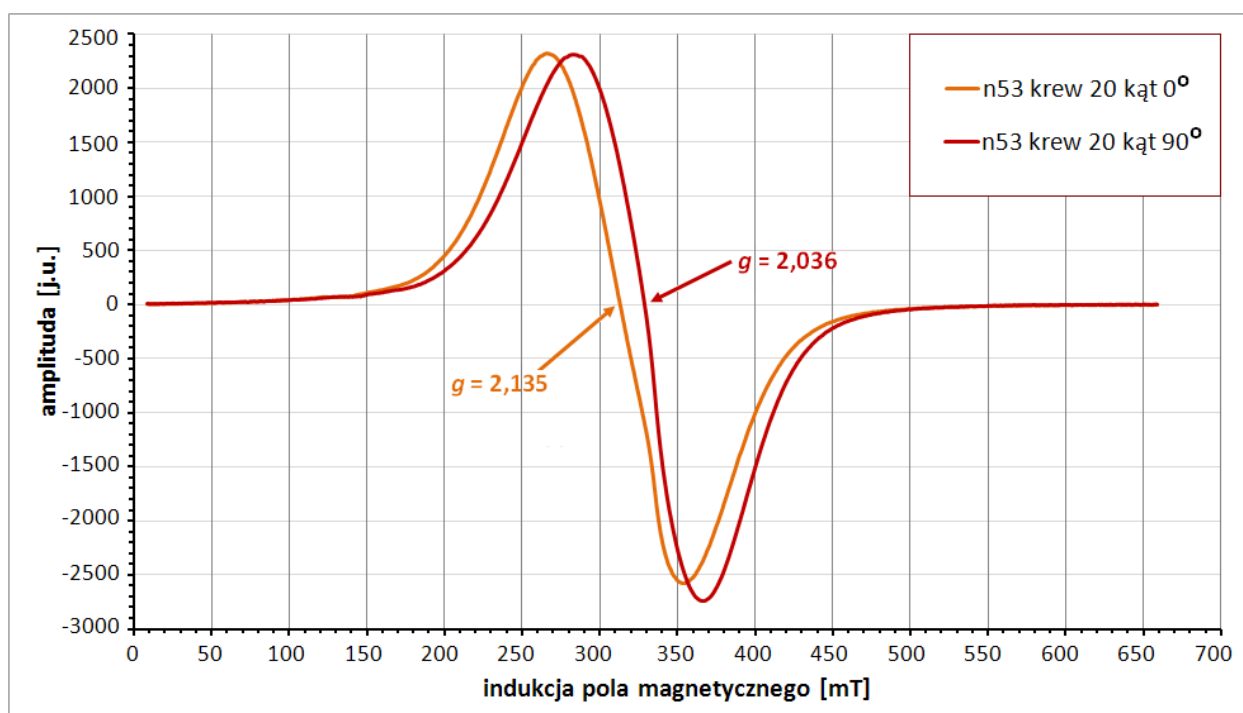
W tabelach nr 6 i 7 zestawiono obliczone wartości współczynników g i szerokości linii dla nanocząstek n53 w wodzie, surowicy (próbki nr 12 i 20) oraz pełnej krwi ludzkiej (próbki 12 i 20) dla temperatur odpowiednio 230 i 200K.

Tabela 6 Obliczone wartości szerokości linii ΔB_{pp} oraz współczynników g wraz z niepewnościami δg dla nanocząstek n53 w badanych ośrodkach w temperaturze 230K dla orientacji próbki 0° i 90° .

Próbka	kąt 0°			kąt 90°		
	g	δg	ΔB_{pp} [mT]	g	δg	ΔB_{pp} [mT]
n53 w H ₂ O	2,114	0,004	87,0 ±0,9	2,032	0,004	83,9 ±0,9
n53 surowica 20	2,130	0,004	88,3 ±0,9	2,040	0,004	85,1 ±0,9
n53 surowica 12	2,131	0,004	88,3 ±0,9	2,036	0,004	83,2 ±0,9
n53 krew 20	2,135	0,004	88,3 ±0,9	2,036	0,004	83,2 ±0,9
n53 krew 12	2,131	0,004	87,7 ±0,9	2,040	0,004	85,1 ±0,9



Rys. 20 Porównanie widm EPR nanocząstek n53 w surowicy nr 20 w temp. 230K dla orientacji 0° i 90° w stosunku do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego.



Rys. 21 Porównanie widm EPR nanocząstek n53 we krwi nr 20 w temp. 230K dla orientacji 0° i 90° w stosunku do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego.

Analiza danych pozwala stwierdzić, że wartości współczynników g dla nanocząstek n53 w surowicy i pełnej krwi ludzkiej są większe niż w przypadku nanocząstek w roztworze wodnym, przy czym różnica jest wyraźniejsza dla kąta 0° . Dla danej orientacji nie zaobserwowano natomiast istotnych różnic w szerokościach linii dla nanocząstek w różnych

ośrodkach. Ważne jest natomiast, iż dla nanocząstek we wszystkich ośrodkach szerokość linii EPR dla orientacji 0° jest większa niż dla 90° .

Tabela 7 Obliczone wartości szerokości linii ΔB_{pp} oraz współczynników g wraz z niepewnościami δg dla nanocząstek n53 w badanych ośrodkach w temperaturze 200K dla orientacji próbki 0° i 90° .

Próbka	kąt 0°			kąt 90°		
	g	δg	ΔB_{pp} [mT]	g	δg	ΔB_{pp} [mT]
n53 w H ₂ O	2,140	0,004	93,4 ± 0,9	2,048	0,004	89,6 ± 0,9
n53 surowica 20	2,157	0,004	94,0 ± 0,9	2,059	0,004	88,3 ± 0,9
n53 surowica 12	2,153	0,004	93,4 ± 0,9	2,056	0,004	88,3 ± 0,9
n53 krew 20	2,161	0,004	92,8 ± 0,9	2,056	0,004	88,9 ± 0,9
n53 krew 12	2,153	0,004	92,1 ± 0,9	2,060	0,004	88,9 ± 0,9

Tabela 8 przedstawia wartości zewnętrznych pól rezonansowych wraz z ich różnicą w temperaturze 230K dla nanocząstek n53 w badanych ośrodkach dla kątów 0° i 90° .

Tabela 8 Wartości zewnętrznego pola rezonansowego dla nanocząstek n53 w wodzie, surowicy i pełnej krwi ludzkiej dla orientacji próbek 0° i 90° oraz obliczone przesunięcie pola $B_r(90^\circ) - B_r(0^\circ)$ dla wybranych ośrodków w 230K. Wartości pola anizotropii i efektywnej stałej anizotropii magnetycznej obliczono na podstawie pomiarów field cooling.

Próbka	kąt 0°	kąt 90°	$B_r(90^\circ) - B_r(0^\circ)$ [mT]	B_a [mT]	K_{ef} [erg/cm ³]
	B_r [mT]	B_r [mT]			
n53 w H ₂ O	316,6 ± 0,6	329,4 ± 0,6	12,8 ± 0,9	8,5 ± 0,6	2,04 · 10 ⁴
n53 surowica 20	313,5 ± 0,6	328,1 ± 0,6	14,6 ± 0,9	9,7 ± 0,6	2,33 · 10 ⁴
n53 surowica 12	314,1 ± 0,6	328,7 ± 0,6	14,6 ± 0,9	9,7 ± 0,6	2,33 · 10 ⁴
n53 krew 20	313,5 ± 0,6	328,7 ± 0,6	15,2 ± 0,9	10,1 ± 0,6	2,42 · 10 ⁴
n53 krew 12	314,1 ± 0,6	328,1 ± 0,6	14,0 ± 0,9	9,3 ± 0,6	2,23 · 10 ⁴

Nanocząstki n53 w wodzie cechuje większe pole rezonansowe niż nanocząstki we krwi i surowicy. Natomiast różnica pomiędzy wartościami pól rezonansowych dla orientacji 0° i 90° dla nanocząstek w wodzie jest mniejsza niż dla nanocząstek w pozostałych ośrodkach.

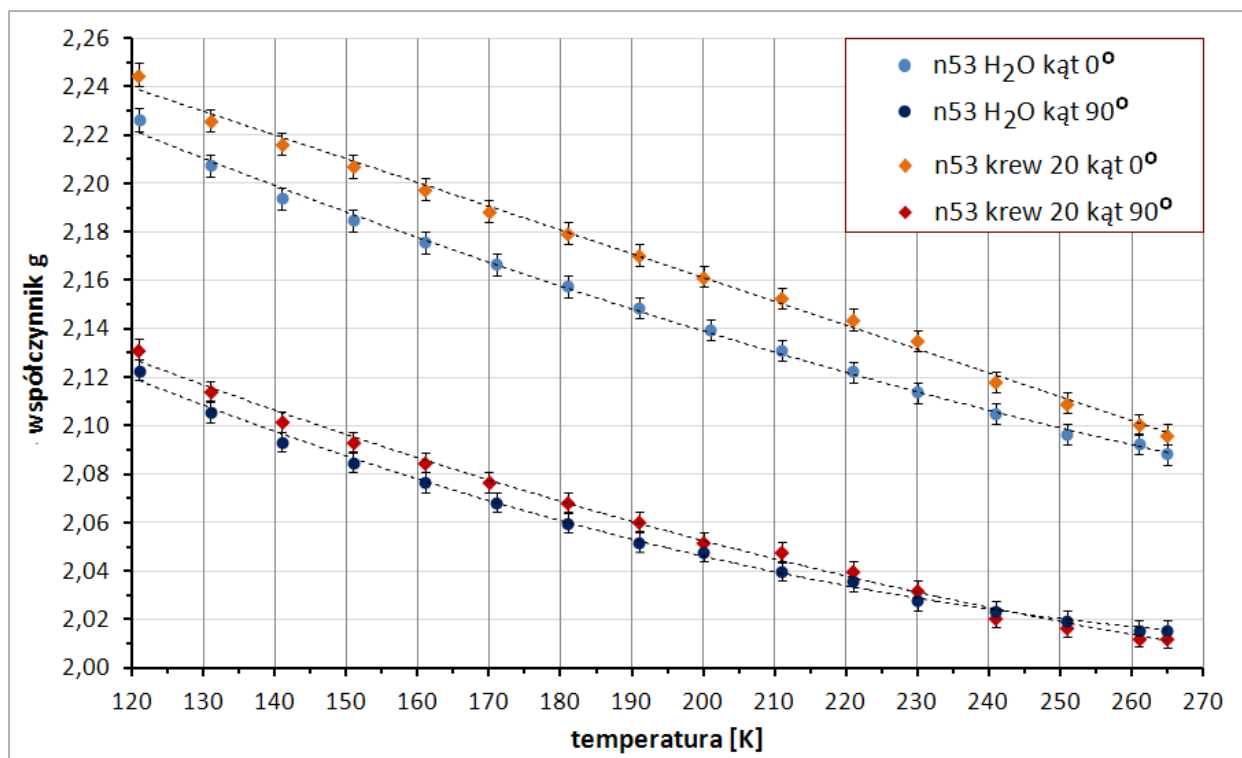
W oparciu o znane z literatury [23,151-153] zależności:

$$B_r(90^\circ) - B_r(0^\circ) = 1,5 \cdot B_A \quad (71)$$

$$B_a = \frac{2K_{ef}}{M_S} \quad (72)$$

przyjmując wartość magnetyzacji nasycenia dla magnetytu litego równą⁶ $M_s = 480 \text{ emu/cm}^3$ ($480 \text{ erg}/(\text{Gs}\cdot\text{cm}^3)$) [154,155], oszacowano wartości pola anizotropii B_a i efektywnej stałej anizotropii K_{ef} , które zamieszczono w tabeli 8. Zarówno pole anizotropii, jak i efektywna stała anizotropii są większe dla nanocząstek we krwi i surowicy w porównaniu do nanocząstek w wodzie.

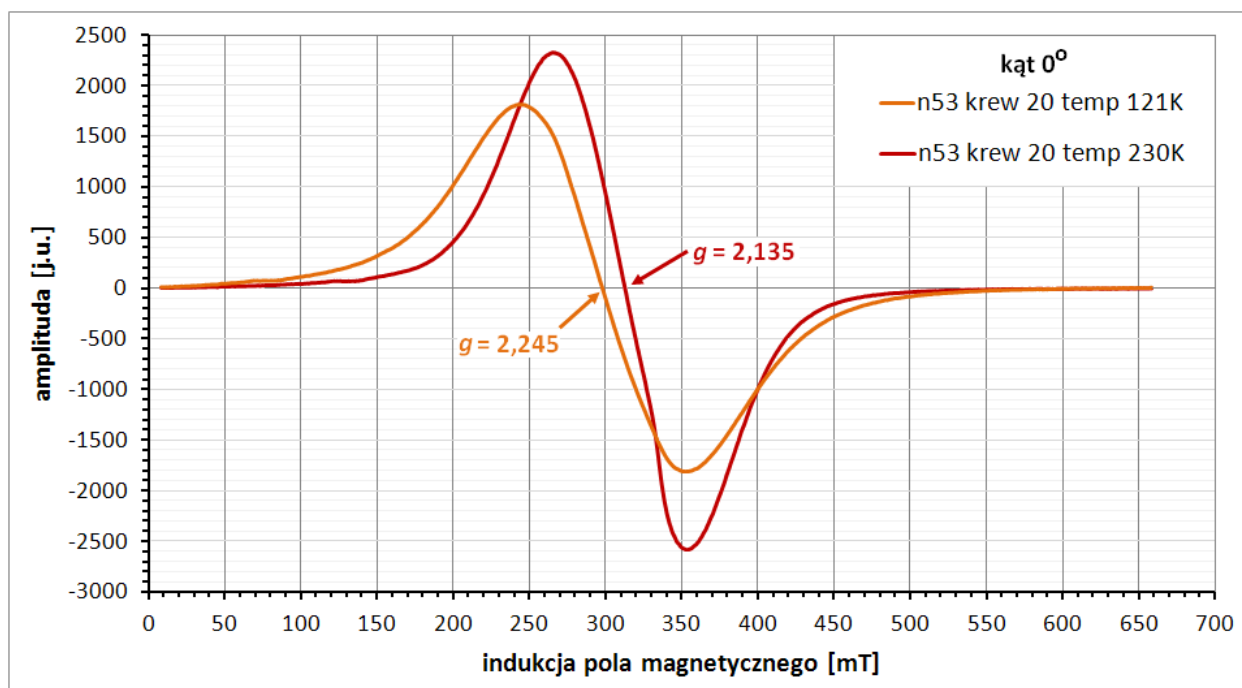
W eksperymencie ustalono również, jak parametry linii EPR (wartości współczynników g , szerokości ΔB_{pp} i amplitud) zależą od temperatury w zakresie 121-265K. Na rys. 22 porównano obliczone wartości g dla nanocząstek w wodzie i pełnej krwi ludzkiej (nr 20) dla orientacji 0° i 90° względem kierunku zewnętrznego pola magnetycznego. Widać, że wartości współczynników g maleją wraz ze zwiększaniem temperatury, czyli linie przesuwały się w stronę wyższych pól rezonansowych. Ponadto wartości współczynników g dla nanocząstek n53 pokrytych polimerem na bazie PEG we krwi są większe niż wartości g dla tych nanocząstek w wodzie, przy czym różnica między tymi ośrodkami jest istotna dla orientacji próbek 0° . Dla obu próbek w całym zakresie temperatur wartości współczynników g dla kąta 0° są wyraźnie większe niż dla 90° .



Rys. 22 Zależność wartości współczynnika g od temperatury dla nanocząstek n53 w wodzie i krwi nr 20 dla orientacji 0° i 90° w stosunku do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego.

Na rys. 23 porównano linie EPR nanocząstek n53 we krwi nr 20 zarejestrowane w temperaturach 121 i 230K dla orientacji próbki 0° . Widmo w 121K ma wyraźnie wyższą wartość g .

⁶ W literaturze nadal często stosuje się jednostki z układu CGS: $1 \text{ erg} = 10^{-7} \text{ J}$; $\text{emu} = 1 \text{ erg}/\text{Gs} = 10^{-3} \text{ J/T}$; $\text{Gs} = 10^{-4} \text{ T}$. Sposób przeliczania według tabel: <http://users.ox.ac.uk/~sjb/magnetism/units.pdf> (dostęp: 19 VI 2016).



Rys. 23 Widma EPR nanocząstek n53 we krwi w temperaturach 121 i 230K przy orientacji próbki 0°.

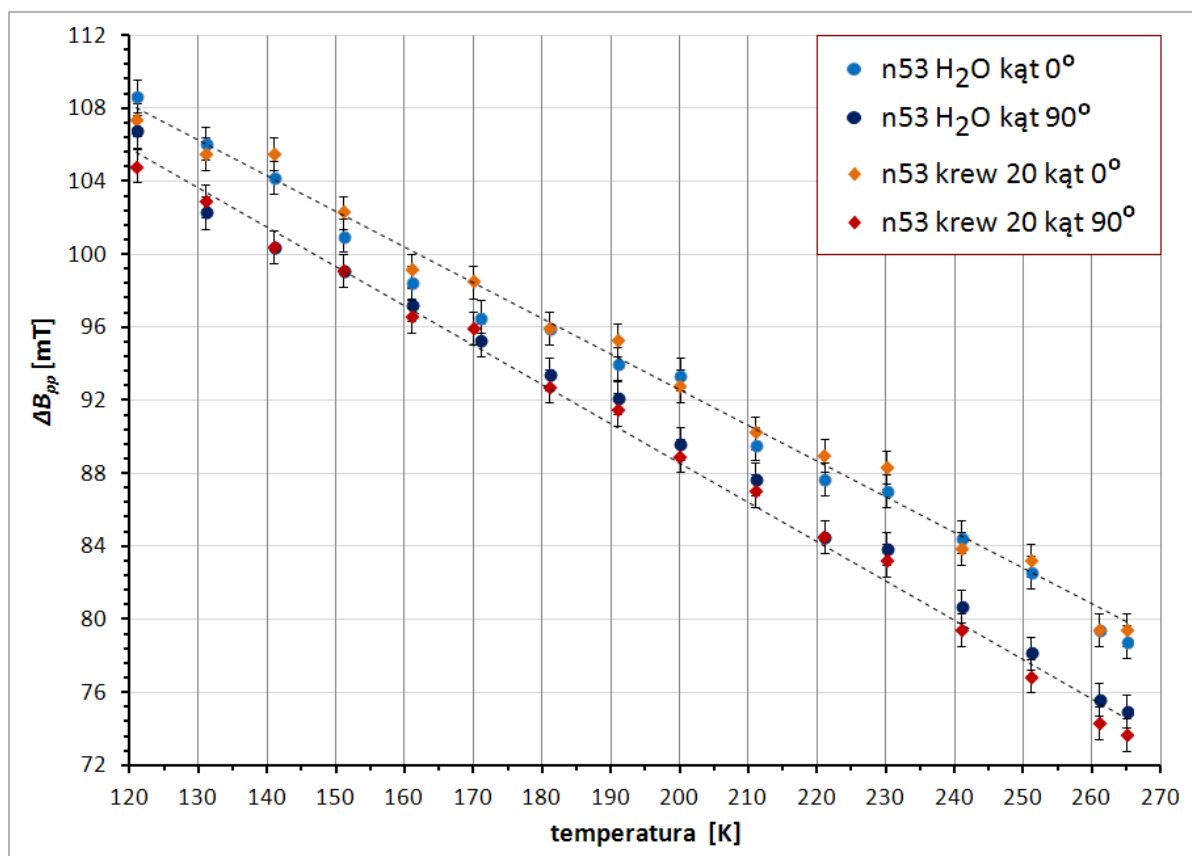
Szerokie linie EPR w niskich temperaturach są prawie symetryczne (co widać na rys. 23), natomiast wraz ze wzrostem temperatury rośnie ich asymetria. W tabeli 9 przedstawiono współczynniki asymetrii R obliczone jako iloraz wysokości dodatniego i ujemnego pik (wysokości ustalane odpowiednio od maksimum albo minimum do linii bazowej). Wartość $R = 1$ oznaczałaby idealną symetrię.

Tabela 9 Wartości współczynników asymetrii R obliczonych jako iloraz wysokości dodatniego i ujemnego pik widma EPR od rdzeni nanocząstek n53 w wodzie i krwi pełnej nr 20.

	121K		170K		200K		230K		265K	
	$R(0^\circ)$	$R(90^\circ)$	$R(0^\circ)$	$R(90^\circ)$	$R(0^\circ)$	$R(90^\circ)$	$R(0^\circ)$	$R(90^\circ)$	$R(0^\circ)$	$R(90^\circ)$
n53 H ₂ O	0,998 ±0,005	0,930 ±0,004	0,957 ±0,003	0,883 ±0,003	0,925 ±0,003	0,859 ±0,003	0,887 ±0,003	0,836 ±0,002	0,851 ±0,002	0,822 ±0,002
n53 krew 20	0,999 ±0,005	0,916 ±0,005	0,958 ±0,004	0,880 ±0,004	0,931 ±0,004	0,859 ±0,004	0,901 ±0,004	0,841 ±0,003	0,839 ±0,005	0,810 ±0,004

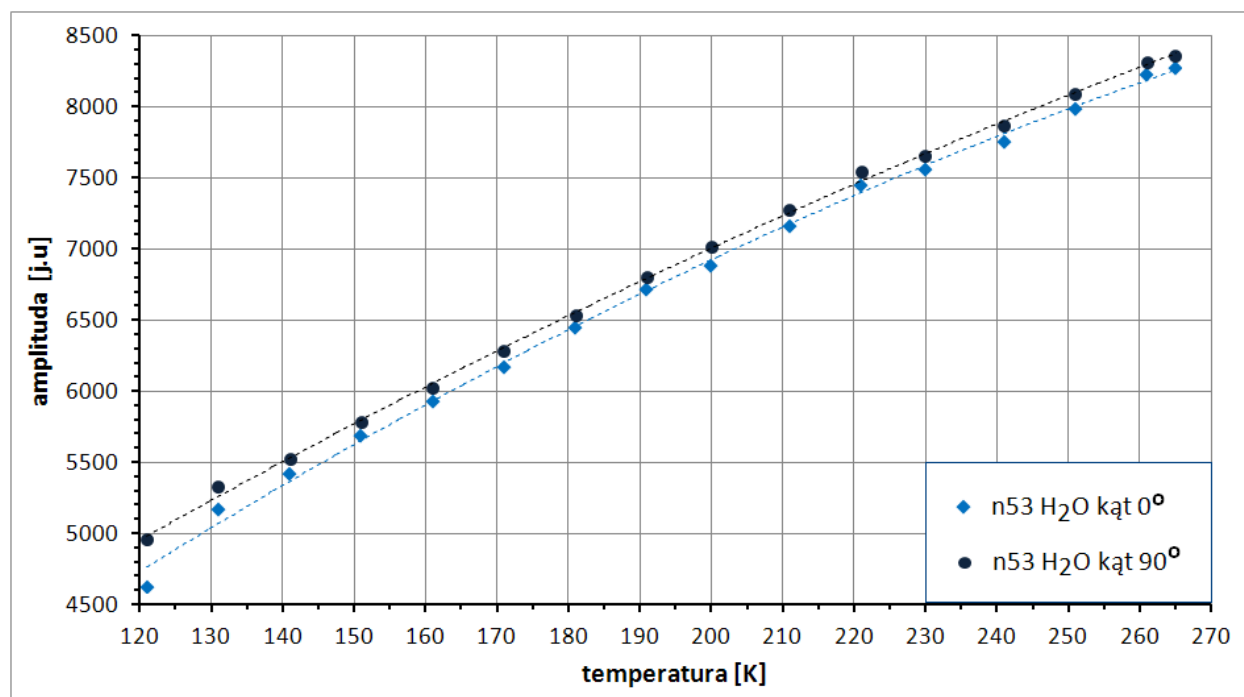
Dla badanych próbek $R < 1$, co oznacza, że ujemna część widma przeważa, jeśli chodzi o wysokość (ale równocześnie należy zauważyć, że jest węższa niż pik dodatni). Dla badanych ośrodków dla kąta 90° linia EPR jest bardziej asymetryczna niż dla kąta 0°.

Dla nanocząstek n53 wyznaczono także zależność szerokości linii od temperatury w zakresie 121 - 265K. Analiza rys. 24 pozwala stwierdzić, że linia EPR od nanocząstek poszerza się wraz z obniżaniem temperatury. Dodatkowo szerokość linii przy orientacji próbki 0° jest większa niż przy orientacji 90°. Dla tej samej orientacji próbki w określonej temperaturze różnice szerokości linii dla nanocząstek n53 we krwi, surowicy i wodzie mieszczą się natomiast w granicach niepewności pomiarowych.



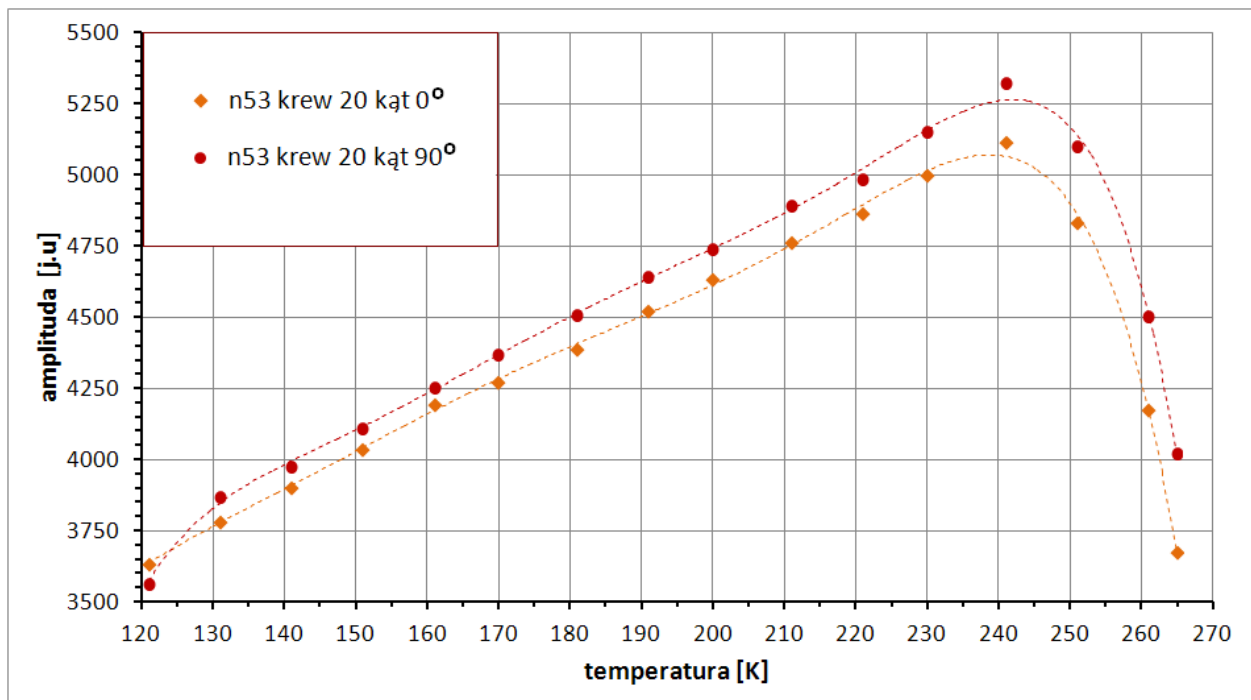
Rys. 24 Zależność szerokości pik-pik linii EPR od temperatury dla nanocząstek n53 w wodzie i pełnej krwi nr 20

Zbadano również, jak zmienia się amplituda linii EPR nanocząstek n53 od temperatury, co zobrazowano na rys. 25-27.



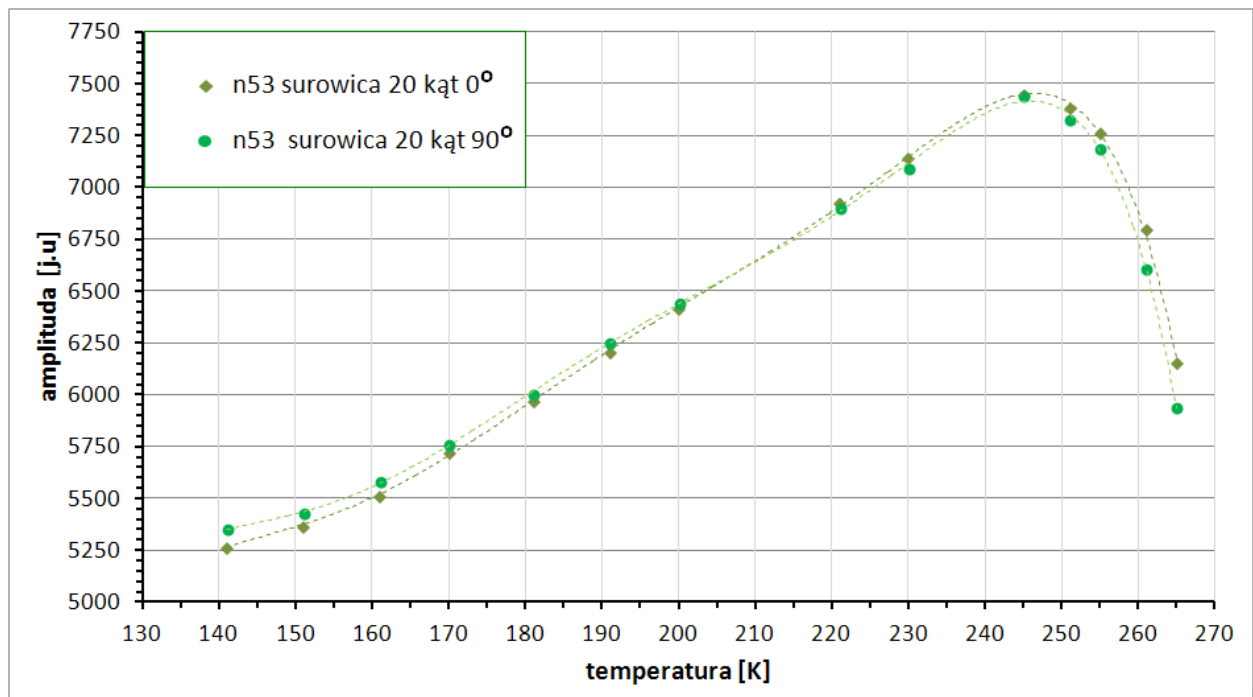
Rys. 25 Zależność amplitudy linii EPR od temperatury dla nanocząstek n53 w wodzie

Dla nanocząstek n53 w H₂O (rys. 25) amplituda linii EPR rosła wraz ze zwiększaniem temperatury, przy czym amplituda linii przy orientacji 90° była większa niż dla 0°.



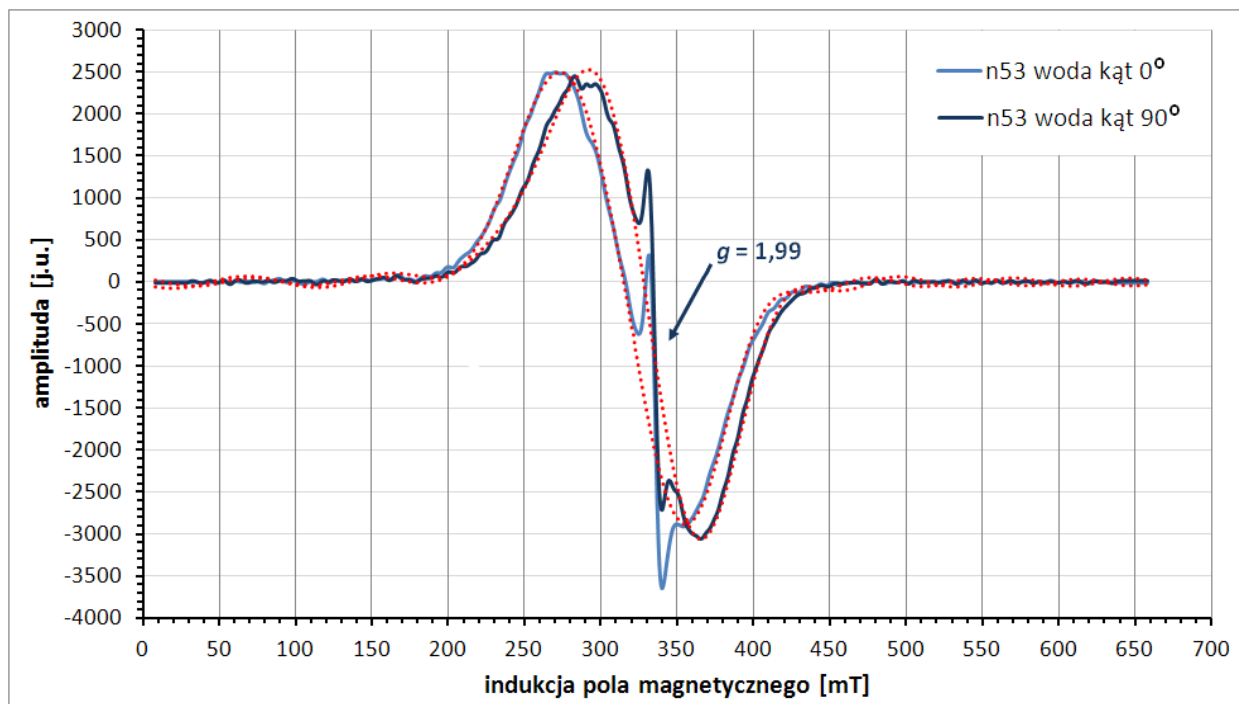
Rys. 26 Zależność amplitudy linii EPR od temperatury dla nanocząstek n53 w pełnej krwi nr 20

Dla nanocząstek we krwi i surowicy nr 20 amplituda linii również rosła wraz ze zwiększaniem temperatury, ale tylko do $\approx 240-245\text{K}$, a następnie zaczynała maleć, co widać na rys. 26-27.

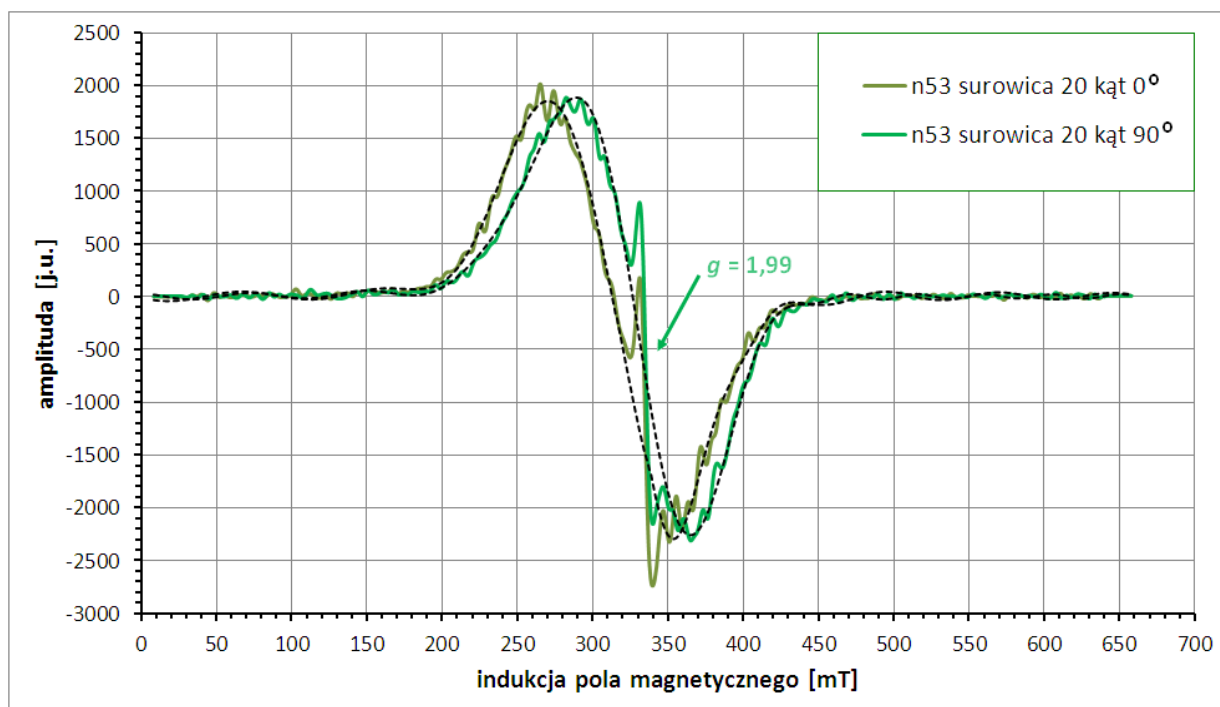


Rys. 27 Zależność amplitudy linii EPR od temperatury dla nanocząstek n53 w surowicy nr 20

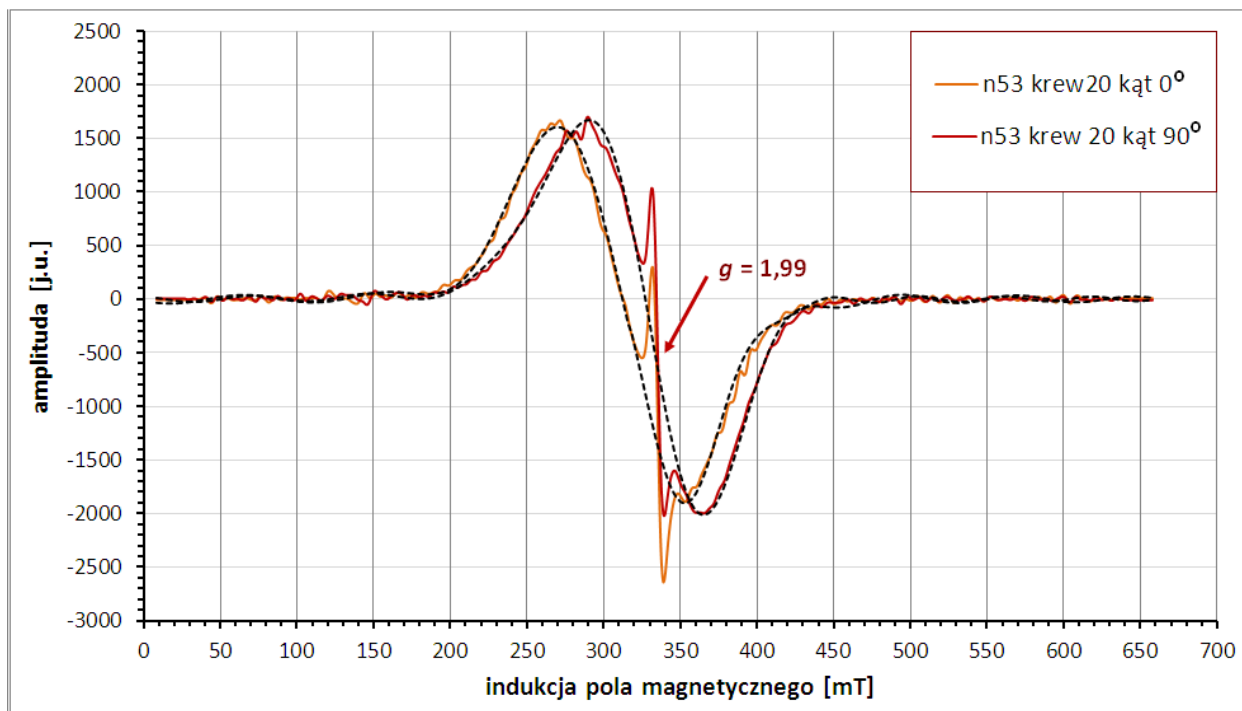
Kształt zarejestrowanych dla nanocząstek n53 sygnałów EPR wskazywał, że mają one złożoną strukturę, dlatego przeprowadzono analizę CREM. Jej wyniki dla widm zarejestrowanych w 230K przedstawiono na rys. 28-30.



Rys. 28 Porównanie wyników analizy CREM dla widm EPR nanocząstek n53 w H₂O dla orientacji próbki 0° i 90° w stosunku do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego (temp. 230K). W obu widmach widoczna wąska linia $g = 1,99$. Czerwone przerywane linie stanowią dopasowanie przebiegu szerokich składowych widma.



Rys. 29 Porównanie wyników analizy CREM dla widm EPR nanocząstek n53 w surowicy nr 20 dla orientacji próbki 0° i 90° w stosunku do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego (temp. 230K). W obu widmach widoczna wąska linia $g = 1,99$. Czarne przerywane linie stanowią dopasowanie przebiegu szerokiego komponentu.



Rys. 30 Porównanie wyników analizy CREM dla widm EPR nanocząstek n53 we krwi nr 20 dla orientacji próbki 0° i 90° w stosunku do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego (temp. 230K). W obu widmach widoczna wąska linia $g = 1,99$. Czarne przerywane linie stanowią dopasowanie przebiegu szerokiego komponentu.

Numeryczne zwiększenie rozdzielczości widm EPR przy założonej szerokości rdzenia 20 pkt pozwoliło wyodrębnić we wszystkich widmach nanocząstek n53 wąską linię $g = 1,99$ występującą na tle szerokiego sygnału. Położenie tej linii jest stałe i niezależne od orientacji próbki względem pola magnetycznego, co widać na rys. 28-30. Ponadto linia ta ma stałą wartość g dla wszystkich próbek bez względu na ośrodek w jakim znajdowały się nanocząstki.

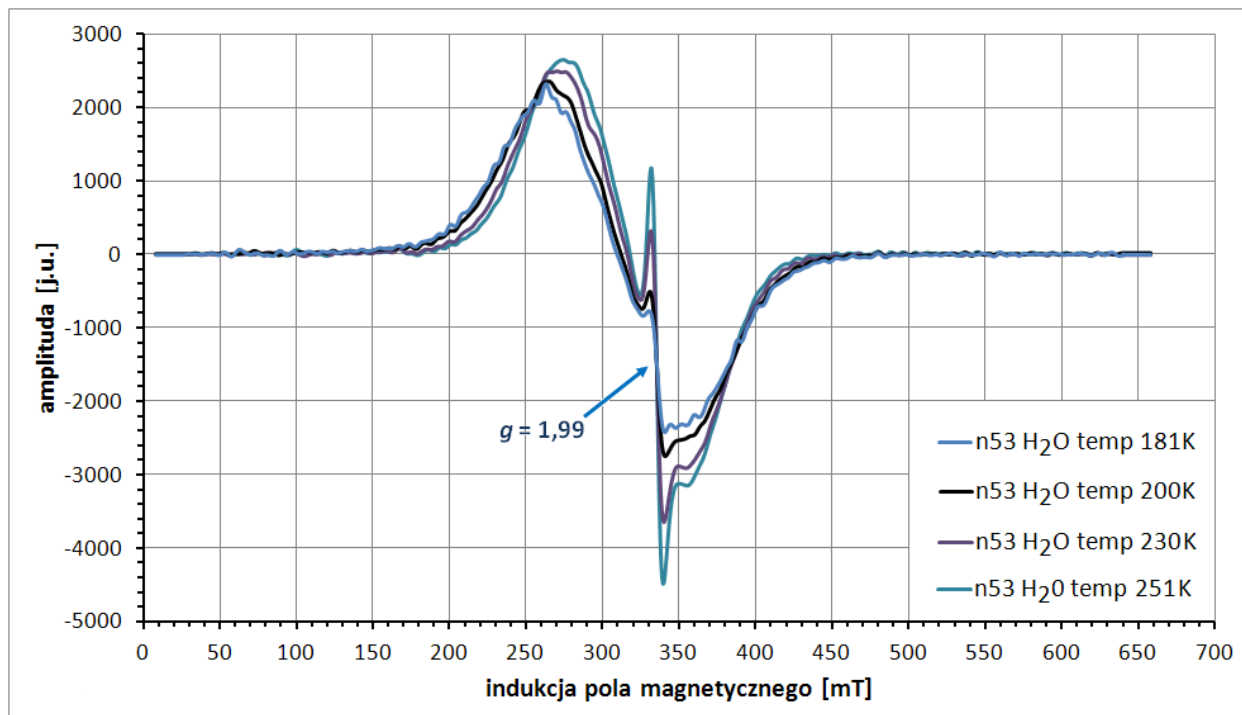
W tabeli 10 przedstawiono obliczone stosunki amplitud wąskiej linii ($g = 1,99$) do szerokiej linii dla nanocząstek w badanych ośrodkach w temperaturze 230K.

Tabela 10 Wyznaczone stosunki amplitud wąskiej I_w do szerokiej I_{sz} linii EPR dla nanocząstek n53 w zależności od ośrodka i orientacji próbki względem pola magnetycznego w temperaturze 230K.

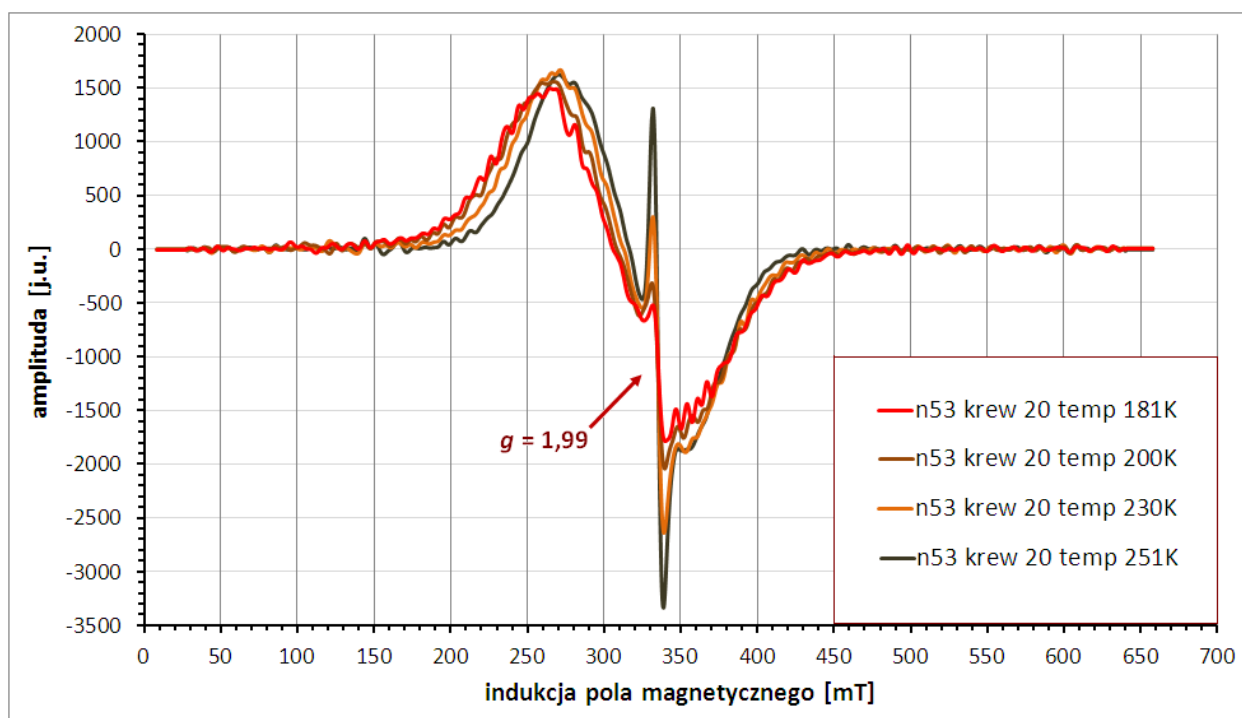
Próbka	I_w/I_{sz} (orientacja 0°)	I_w/I_{sz} (orientacja 90°)
n53 H ₂ O	$0,73 \pm 0,02$	$0,72 \pm 0,02$
n53 surowica nr 20	$0,70 \pm 0,03$	$0,73 \pm 0,03$
n53 krew nr 20	$0,83 \pm 0,04$	$0,83 \pm 0,03$

Z danych w tabeli wynika, że dla nanocząstek n53 we krwi udział wąskiej linii jest większy niż w przypadku nanocząstek w wodzie i surowicy. Na rys 31 i 32 pokazano natomiast rezultaty analizy CREM odpowiednio dla nanocząstek w wodzie i pełnej krwi ludzkiej dla czterech wybranych temperatur 181, 200, 230 i 251K (orientacja próbki 0°) Widać, że amplituda wąskiej linii ($g = 1,99$) wyraźnie rośnie wraz ze wzrostem temperatury. Dodatkowo dla nanocząstek we krwi stosunek amplitud wąskiej i szerokiej linii jest większy niż dla cząstek w wodzie. Porównanie szerokości wąskiej linii w temp. 181K ($\Delta B_{pp} = 8,3 \pm 0,9$ dla n53 we krwi i $\Delta B_{pp} = 9,5$

$\pm 0,9$ dla n53 w H₂O) oraz 251K ($\Delta B_{pp} = 7,0 \pm 0,9$ dla n53 we krwi i $\Delta B_{pp} = 7,6 \pm 0,9$ dla n53 w H₂O) wskazuje, że wąska linia w niewielkim stopniu poszerza się w niskich temperaturach.



Rys. 31 Porównanie wyników analizy CREM dla widm EPR nanocząstek n53 w wodzie dla orientacji próbki 0° dla temperatur 181, 200, 230 i 251K.



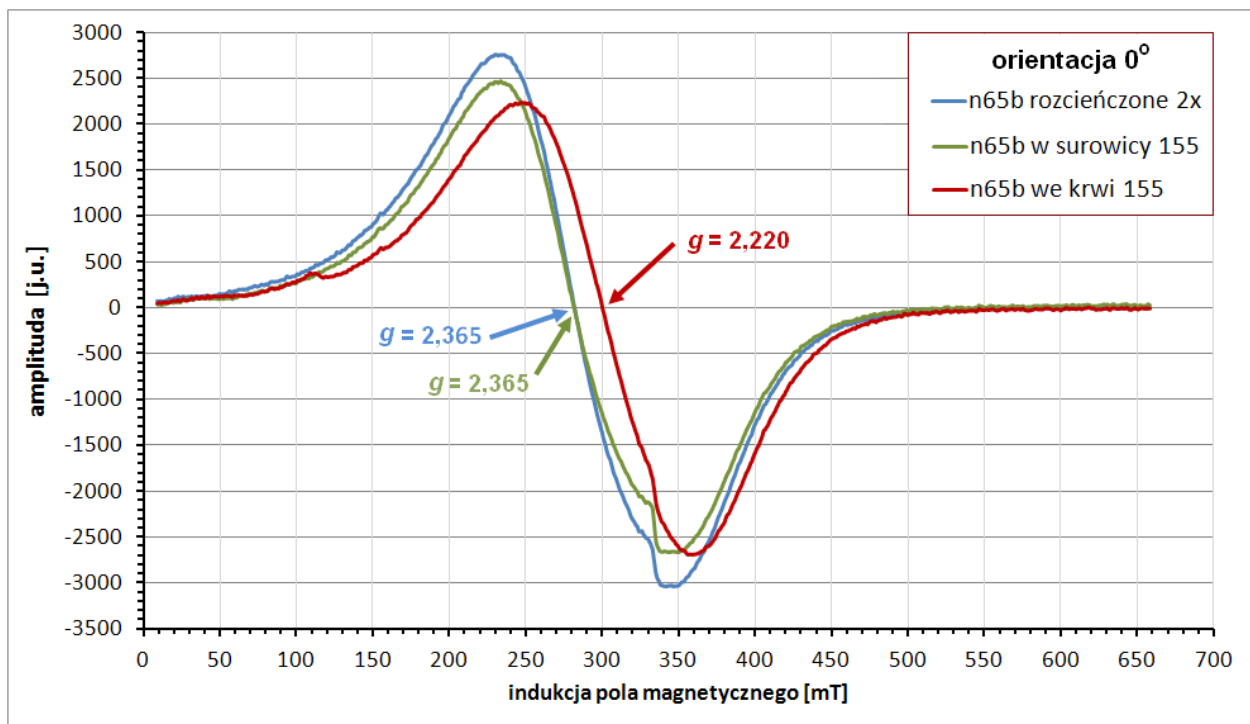
Rys. 32 Porównanie wyników analizy CREM dla widm EPR nanocząstek n53 we krwi nr 20 dla orientacji próbki 0° dla temperatur 181, 200, 230 i 251K.

4.3 Pomiary nanocząstek n65b pokrytych silanem

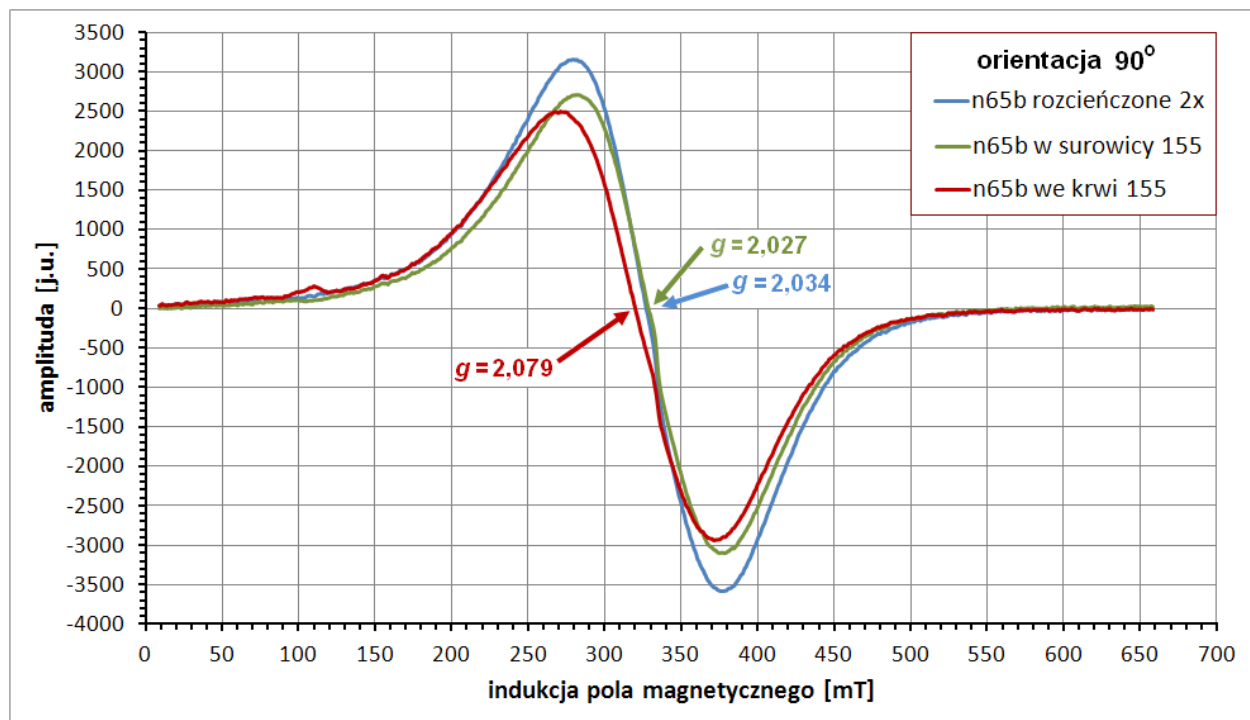
Nanocząstki magnetytu pokryte silanem (n65b) badano w wodzie dejonizowanej, surowicy i pełnej krwi ludzkiej. W tym przypadku również zastosowano procedurę field cooling (5 min w polu 500 mT). Widma rejestrowano dla orientacji próbek 0°, 90° i 180° względem kierunku zewnętrznego pola magnetycznego. Rys. 33 przedstawia porównanie widm nanocząstek w wodzie, surowicy nr 155 i pełnej krwi nr 155 zarejestrowanych w temperaturze 230K dla kąta 0°, natomiast rys. 34 dla kąta 90°. Tabela 11 zawiera zestawienie wartości współczynników g i szerokości linii ΔB_{pp} dla szerokich sygnałów pochodzących od rdzeni nanocząstek w wodzie, surowicy (próbki nr 155 i 296) oraz pełnej krwi (próbki nr 155 i 296) dla orientacji 0, 90 i 180°. Analiza danych wskazuje, że dla orientacji próbki 0° i 180° nanocząstki n65b we krwi charakteryzują się wyraźnie mniejszą wartością g niż nanocząstki w surowicy i wodzie. Dla kąta 90° sytuacja jest odmienna, tzn. nanocząstki we krwi posiadają zdecydowanie większą wartość g niż nanocząstki w wodzie i surowicy. Nanocząstki w wodzie i surowicy dla danego kąta pomiaru cechują bardziej zbliżone wartości g . Znotowano także niewielkie różnice w wartościach g pomiędzy próbkami nanocząstek dla danego typu środka (np. pomiędzy nanocząstkami n65b w surowicy 155 i 296).

Tabela 11 Obliczone wartości szerokości linii ΔB_{pp} oraz współczynników g wraz z niepewnościami δg dla nanocząstek n65b w badanych ośrodkach w temperaturze 230K dla orientacji próbki 0°, 90° i 180°.

Próbka	kąt 0°			kąt 90°			kąt 180°		
	g	δg	ΔB_{pp} [mT]	g	δg	ΔB_{pp} [mT]	g	δg	ΔB_{pp} [mT]
n65b w H ₂ O	2,365	0,005	113 ±0,9	2,034	0,004	98 ±0,9	2,360	0,005	112 ±0,9
n65b surowica 155	2,365	0,005	114 ±0,9	2,027	0,004	96 ±0,9	2,359	0,005	114 ±0,9
n65b surowica 296	2,344	0,005	115 ±0,9	2,038	0,004	96 ±0,9	2,344	0,005	115 ±0,9
n65b krew 155	2,220	0,005	111 ±0,9	2,079	0,004	102 ±0,9	2,219	0,005	111 ±0,9
n65b krew 296	2,200	0,005	111 ±0,9	2,079	0,004	103 ±0,9	2,201	0,005	112 ±0,9



Rys. 33 Porównanie widm EPR nanocząstek n65b w trzech ośrodkach: wodzie, surowicy (próbka nr 155) oraz krwi (próbka nr 155) dla orientacji 0° w stosunku do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego.



Rys. 34 Porównanie widm EPR nanocząstek n65b w trzech ośrodkach: wodzie, surowicy (próbka nr 155) oraz krwi (próbka nr 155) dla orientacji 90° w stosunku do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego.

Porównanie widm zarejestrowanych dla kątów 0 i 90° uwidacznia, że dla danej próbki zewnętrzne pole rezonansowe jest zawsze większe dla kąta 90° . Obliczone wartości

współczynnika g są zatem większe dla kąta 0° są niż dla kąta 90° . Wartości współczynnika g nie różnicują się natomiast dla kątów 0 i 180° .

Tabela 12 przedstawia wartości zewnętrznych pól rezonansowych odpowiednio dla kątów 0° i 90° wraz z ich różnicą. Można zauważyć, iż przesunięcie pola rezonansowego przy obrocie próbki jest zdecydowanie większe w przypadku nanocząstek w wodzie i surowicy niż w przypadku nanocząstek we krwi. Podobnie jak w przypadku nanocząstek n53 dla nanocząstek n65b oszacowano wartości pola anizotropii B_a i efektywnej stałej anizotropii K_{ef} , korzystając z równań (71) i (72). Za magnetyzację nasycenia przyjęto wartość $M_s = 480 \text{ emu/cm}^3$ [154,155]. Wartości pola anizotropii i efektywnej stałej anizotropii dla nanocząstek n65b w pełnej krwi są niższe w porównaniu z nanocząstkami w surowicy i wodzie.

Tabela 12 Wartości zewnętrznego pola rezonansowego dla nanocząstek n65b w wodzie, krwi i surowicy dla orientacji próbek 0° i 90° oraz obliczone przesunięcie pola $B_r(90^\circ) - B_r(0^\circ)$ dla wybranych ośrodków. Wartości pola anizotropii i efektywnej stałej anizotropii magnetycznej obliczono na podstawie pomiarów field cooling.

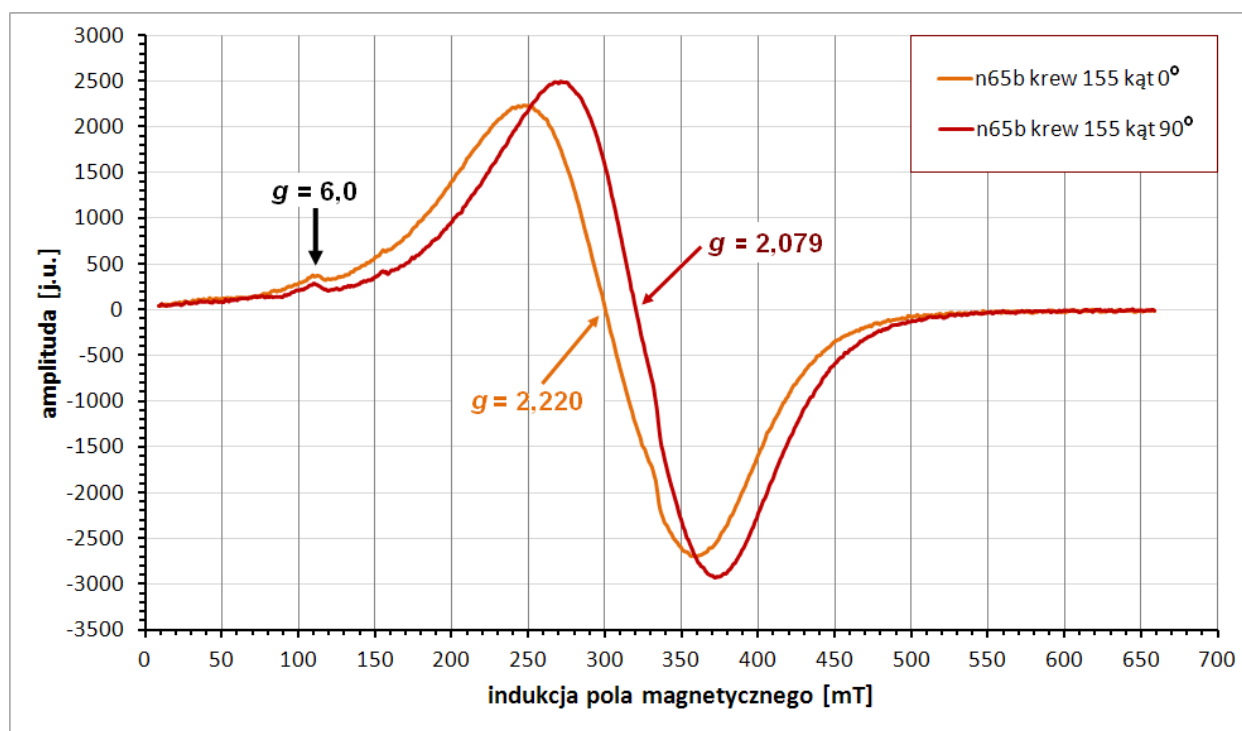
Próbka	kąt 0°	kąt 90°	$B_r(90^\circ) - B_r(0^\circ)$ [mT]	B_a [mT]	K_{ef} [erg/cm ³]
	B_r [mT]	B_r [mT]			
n65b w H ₂ O	$281,6 \pm 0,6$	$327,3 \pm 0,6$	$45,7 \pm 0,9$	30,5	$7,32 \cdot 10^4$
n65b surowica 155	$281,6 \pm 0,6$	$328,6 \pm 0,6$	$47,0 \pm 0,9$	31,3	$7,51 \cdot 10^4$
n65b surowica 296	$284,1 \pm 0,6$	$326,7 \pm 0,6$	$42,6 \pm 0,9$	28,4	$6,82 \cdot 10^4$
n65b krew 155	$300,0 \pm 0,6$	$320,3 \pm 0,6$	$20,3 \pm 0,9$	13,5	$3,24 \cdot 10^4$
n65b krew 296	$302,6 \pm 0,6$	$320,3 \pm 0,6$	$17,7 \pm 0,9$	11,8	$2,83 \cdot 10^4$

W tabeli 13 przedstawiono współczynniki asymetrii R obliczone jako iloraz wysokości dodatniego i ujemnego pikę (wysokości ustalane odpowiednio od maksimum albo minimum do linii bazowej). Dla badanych próbek $R < 1$. Dla nanocząstek w wodzie i surowicy dla orientacji próbki 90° linia EPR jest bardziej asymetryczna niż dla orientacji 0° . Natomiast dla nanocząstek we krwi linia jest bardziej asymetryczna dla kąta 0° . Ponadto asymetria widma EPR jest bardziej wyraźna dla nanocząstek n65b we krwi niż dla nanocząstek w wodzie i surowicy.

Tabela 13 Wartości współczynników asymetrii R obliczonych jako iloraz wysokości dodatniego i ujemnego pikę widma EPR od rdzeni nanocząstek n65b w 230K.

	n65b w H ₂ O	n65b surowica 155	n65b surowica 296	n65b krew 155	n65b krew 296
$R(0^\circ)$	0,908 $\pm 0,003$	0,909 $\pm 0,003$	0,906 $\pm 0,004$	0,831 $\pm 0,003$	0,826 $\pm 0,004$
$R(90^\circ)$	0,880 $\pm 0,003$	0,872 $\pm 0,003$	0,862 $\pm 0,003$	0,848 $\pm 0,003$	0,838 $\pm 0,003$

Rys. 35 przedstawia widma EPR nanocząstek n65b we krwi nr 155 dla orientacji 0° i 90° w stosunku do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego. Oprócz szerokiej linii pochodzącej od rdzenia nanocząstek widoczny jest również charakterystyczny sygnał $g = 6$ mający swoje źródło w krwi pełnej (nie pojawia się on w przypadku próbek w surowicy i wodzie).



Rys. 35 Porównanie widm EPR nanocząstek n65b we krwi nr 155 zarejestrowanych dla orientacji próbki 0° i 90° w stosunku do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego.

Na rys. 33 - 35 widać, iż na tle szerokiego sygnału od nanocząstek pojawia się inna, słabo zarysowana linia. Dlatego dla widm nanocząstek n65b w wodzie, krwi pełnej i surowicy przeprowadzono analizę CREM. Numeryczne zwiększenie rozdzielczości widm EPR przy założonej szerokości rdzenia 20 pkt. pozwoliło, podobnie jak miało to miejsce dla nanocząstek n53, wyodrębnić wąską linię $g = 1,99$, występującą na tle szerokiego sygnału od rdzenia nanocząstek. Dla nanocząstek n65b linia ta ma stałą wartość g dla wszystkich próbek niezależnie od ośrodka i orientacji próbki, co widać na rys. 36 - 38.

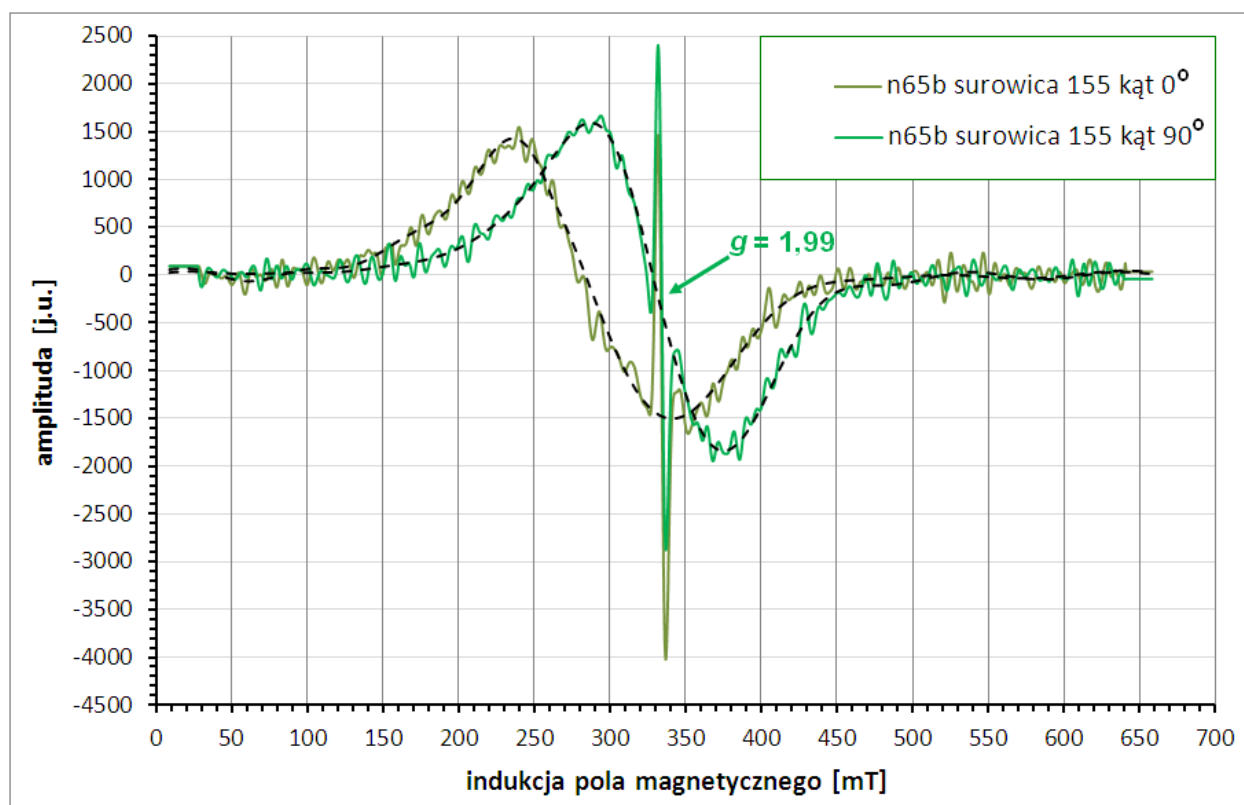
W tabeli 14 przedstawiono obliczone stosunki amplitud wąskiej linii ($g = 1,99$) do szerokiej linii dla nanocząstek w wodzie, surowicy i pełnej krwi w 230K. Dla nanocząstek w surowicy odnotowano większą różnicę w wielkościach amplitud w porównaniu z pozostałymi ośrodkami.

Tabela 14 Wyznaczone stosunki amplitud wąskiej I_w do szerokiej I_{sz} linii EPR w zależności od ośrodka i orientacji próbki względem pola magnetycznego dla nanocząstek n65b temperaturze 230K.

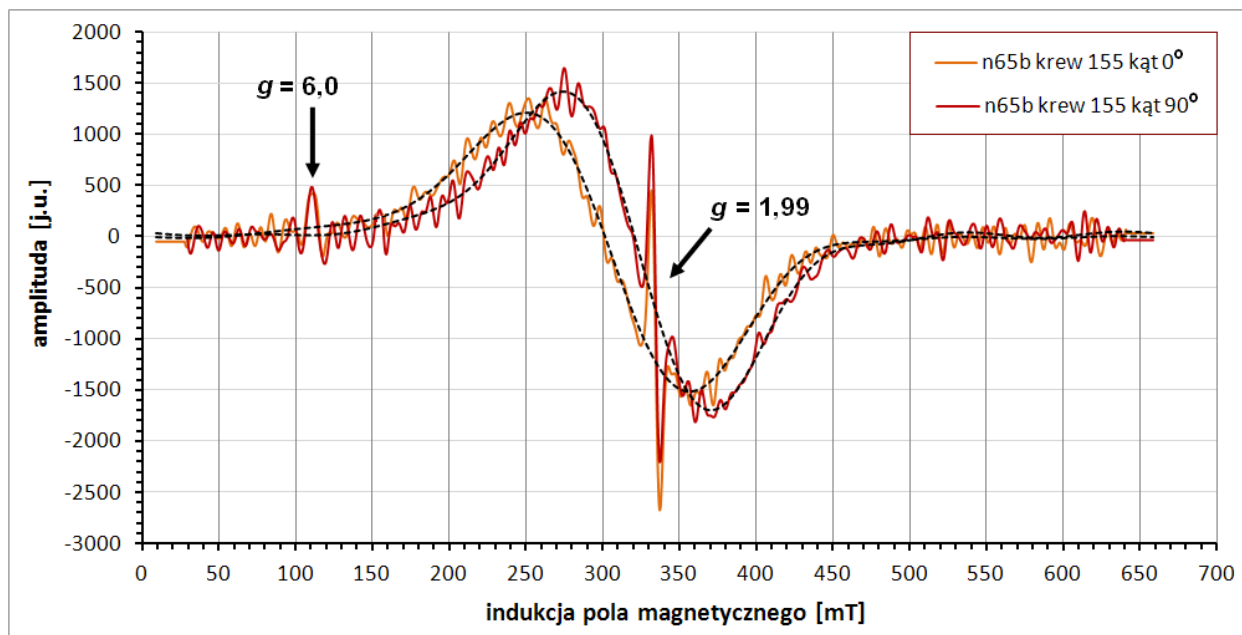
Próbka	I_w/I_{sz} (orientacja 0°)	I_w/I_{sz} (orientacja 90°)
n65b H ₂ O	$1,13 \pm 0,04$	$1,00 \pm 0,04$
n65b surowica nr 155	$1,77 \pm 0,09$	$1,54 \pm 0,07$
n65b surowica nr 296	$1,78 \pm 0,09$	$1,53 \pm 0,07$
N65b krew nr 155	$1,15 \pm 0,06$	$1,02 \pm 0,04$
n65b krew nr 296	$1,23 \pm 0,06$	$1,16 \pm 0,06$



Rys. 36 Porównanie wyników analizy CREM dla widm EPR nanocząstek n65b w H₂O dla orientacji próbki 0° i 90° w stosunku do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego (temp. 230K). W obu widmach widoczna wąska linia $g = 1,99$. Czerwone przerywane linie stanowią dopasowanie przebiegu szerokich składowych widma.



Rys. 37 Porównanie wyników analizy CREM dla widm EPR nanocząstek n65b w surowicy nr 155 dla orientacji próbki 0° i 90° w stosunku do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego (temp. 230K). W obu widmach widoczna wąska linia $g = 1,99$. Czarne przerywane linie stanowią dopasowanie przebiegu szerokich składowych widma.

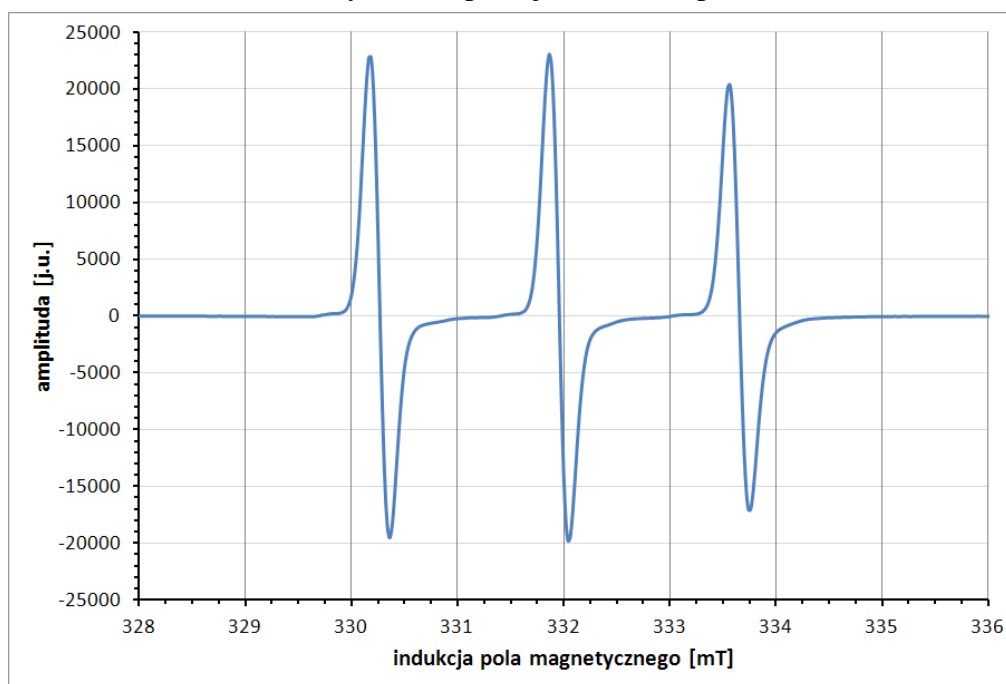


Rys. 38 Porównanie wyników analizy CREM dla widm EPR nanocząstek n65b we krwi nr 155 dla orientacji próbki 0° i 90° w stosunku do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego (temp. 230K). W obu widmach widoczna wąska linia $g = 1,99$. Czarne przerywane linie stanowią dopasowanie przebiegu szerokich składowych widma.

4.4 Pomiary nanocząstek n66b pokrytych silanem i znakowanych 4-amino-TEMPO.

Nanocząstki magnetytu n66b pokryte (3-izocyjanopropylo)-trietoksysilanem i znakowane 4-amino-TEMPO badano w wodzie dejonizowanej, surowicy (nr 142) i krwi (nr 142). Wykonano pomiar próbek ciekłych w kapilarach w temp. 283K oraz próbek zamrożonych po field coolingu (5 min w polu 500 mT).

Na widmo EPR znakowanych spinowo nanocząstek n66b składa się szeroka linia od ich magnetytowych rdzeni oraz sygnał od nitroksydu. W temperaturze 283K sygnał EPR od 4-amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek stanowi wąski tryplet. Rys. 39 - 41 przedstawiają widma EPR znacznika amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek n66b znajdujących się odpowiednio: w wodzie, w surowicy oraz w pełnej krwi w temp. 283K.



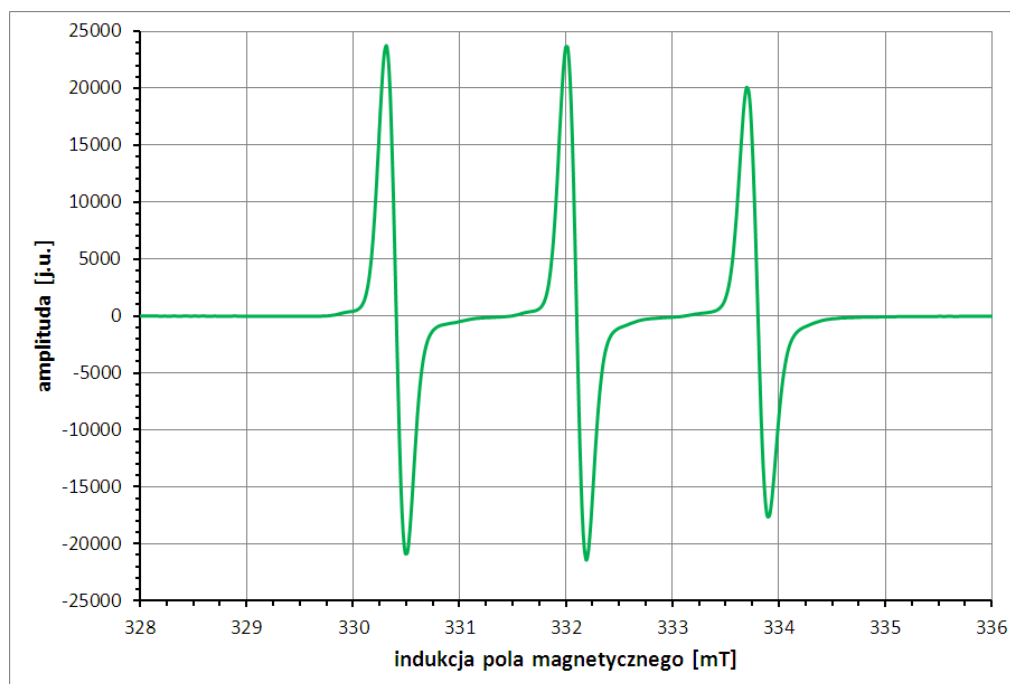
Rys. 39 Zarejestrowane w temp. 283K widmo znacznika 4-amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek n66b w roztworze wodnym

Tabela 15 zawiera obliczone parametry widm znacznika spinowego dołączonego do nanocząstek w badanych ośrodkach (próbki ciekłe, temperatura 283K) wraz z niepewnościami pomiarowymi.

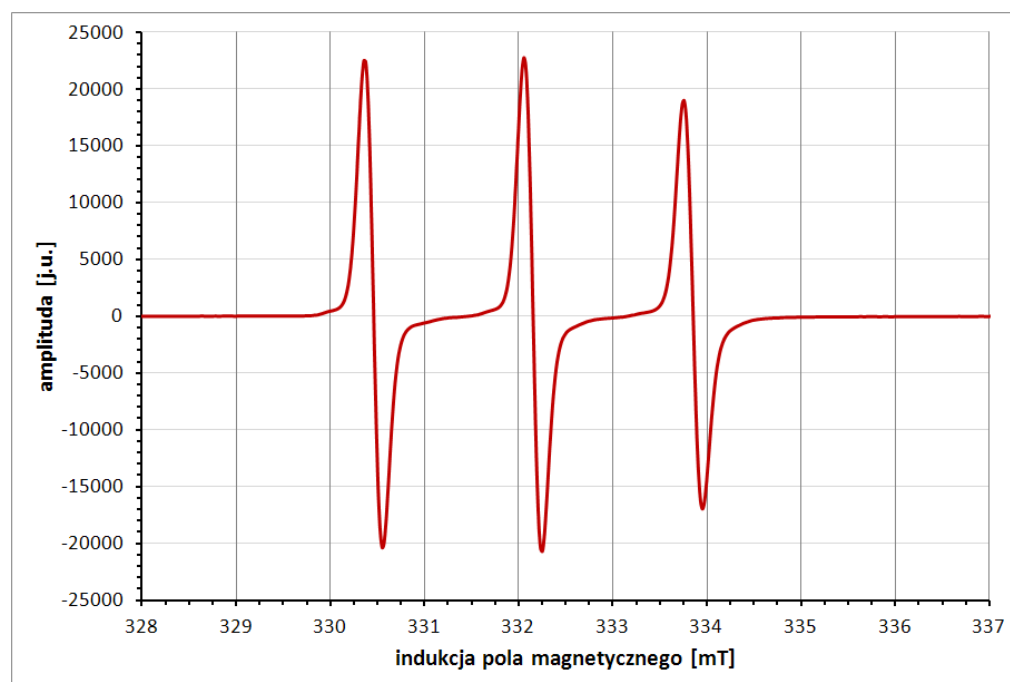
Tabela 15 Obliczone wartości współczynników g , stałej oddziaływania nadsubtelnego A_{izo} (z niepewnością δA_{izo}), czasu korelacji rotacyjnej τ_R (z niepewnością $\delta \tau_R$) oraz współczynnika anizotropii ε (z niepewnością $\delta \varepsilon$) dla znacznika spinowego dołączonego do nanocząstek n66b w wodzie, surowicy i krwi pełnej w temperaturze 283K.

Próbka	g	A_{izo} [mT]	δA_{izo} [mT]	τ_R [s]	$\delta \tau_R$ [s]	ε	$\delta \varepsilon$
n66b w H ₂ O	2,0058 (±0,0002)	1,701	0,028	$8,02 \cdot 10^{-11}$	$1,28 \cdot 10^{-11}$	0,083	0,008
n66b surowica 142	2,0059 (±0,0002)	1,681	0,028	$1,13 \cdot 10^{-10}$	$1,81 \cdot 10^{-11}$	0,057	0,007
n66b krew 142	2,0058 (±0,0002)	1,701	0,028	$1,35 \cdot 10^{-10}$	$1,95 \cdot 10^{-11}$	0,068	0,008

Wartości czasów korelacji rotacyjnej oraz współczynników anizotropii obliczono, korzystając odpowiednio ze wzorów (47) i (49) dedykowanych dla znaczników szybko rotujących.

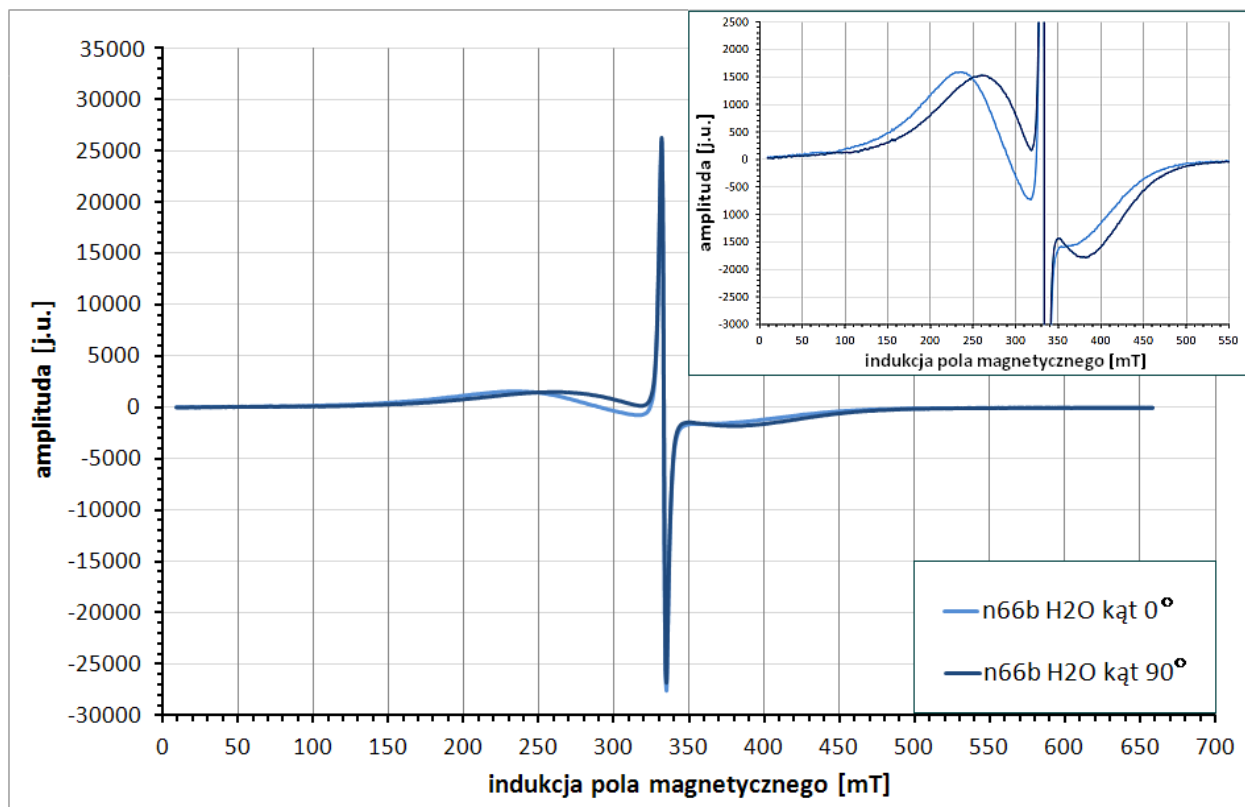


Rys. 40 Zarejestrowane w temp. 283K widmo znacznika 4-amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek n66b w surowicy (próbka nr 142).



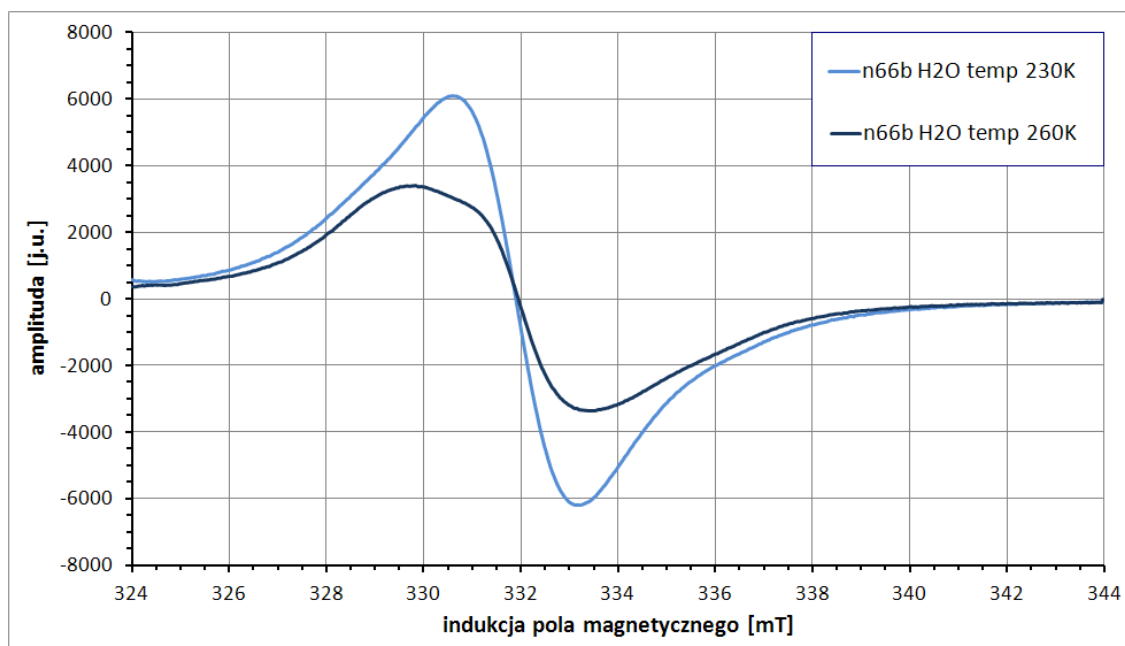
Rys. 41 Zarejestrowane w temp. 283K widmo znacznika 4-amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek n66b w krwi pełnej (próbka nr 142).

Widma EPR nanocząstek n66b w trzech ośrodkach rejestrowano także w temperaturach 230 i 260K w zakresach przemiatania 650 i 20 mT dla orientacji próbki 0° i 90° w stosunku do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego. Szerokiej linii od rdzeni nanocząstek towarzyszył silny sygnał od dołączonego nitroksydu, co dla nanocząstek w wodzie zobrazowano na rys. 42.



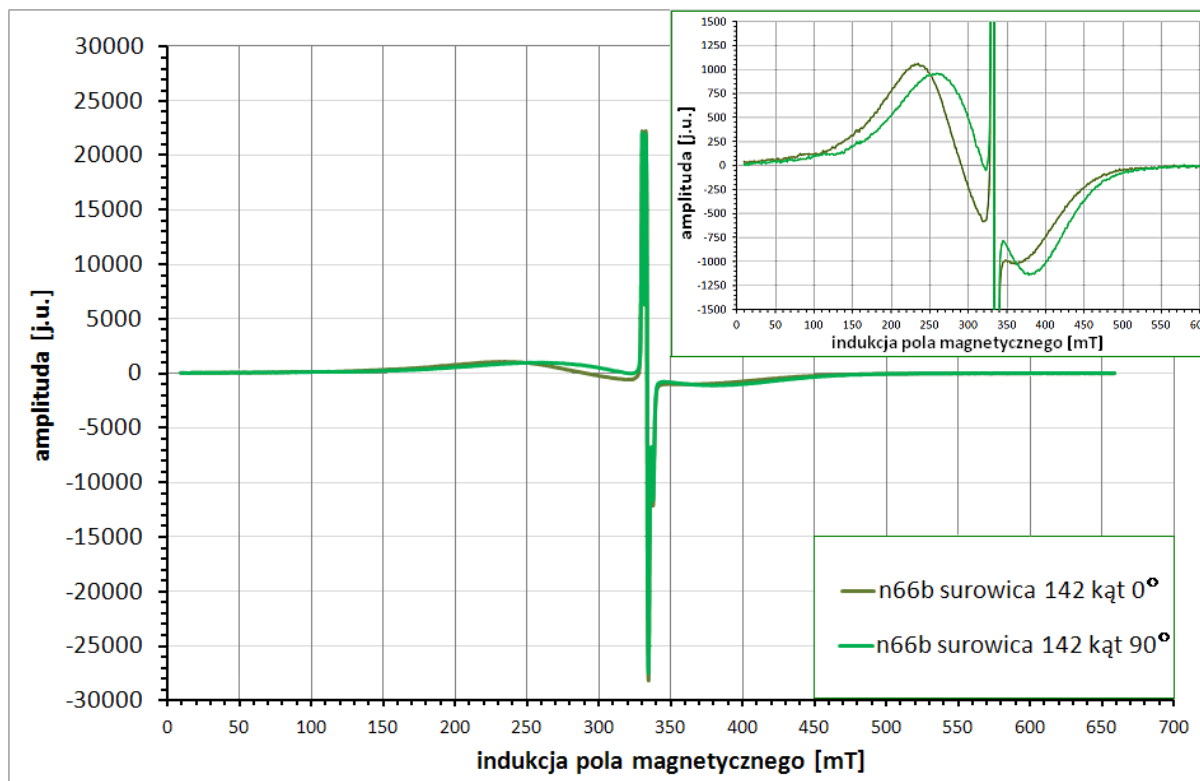
Rys. 42 Zestawienie widm EPR zarejestrowanych w zakresie przemiatania 650 mT w temperaturze 230K po field coolingu dla nanocząstek n66b w wodzie dla orientacji 0° i 90° w stosunku do zewnętrznego pola magnetycznego. W okienku w prawym górnym rogu przedstawiono zbliżenie szerokiej linii od rdzeni nanocząstek.

Orientacja próbki w stosunku do zewnętrznego pola magnetycznego miała istotny wpływ tylko na położenie szerokiej linii. Dla kąta 90° linia ta przesuwiała się w stronę wyższych pól. Orientacja próbki nie wpływała natomiast na zewnętrzne pole rezonansowe dla znacznika 4-amino-TEMPO (rys. 43).

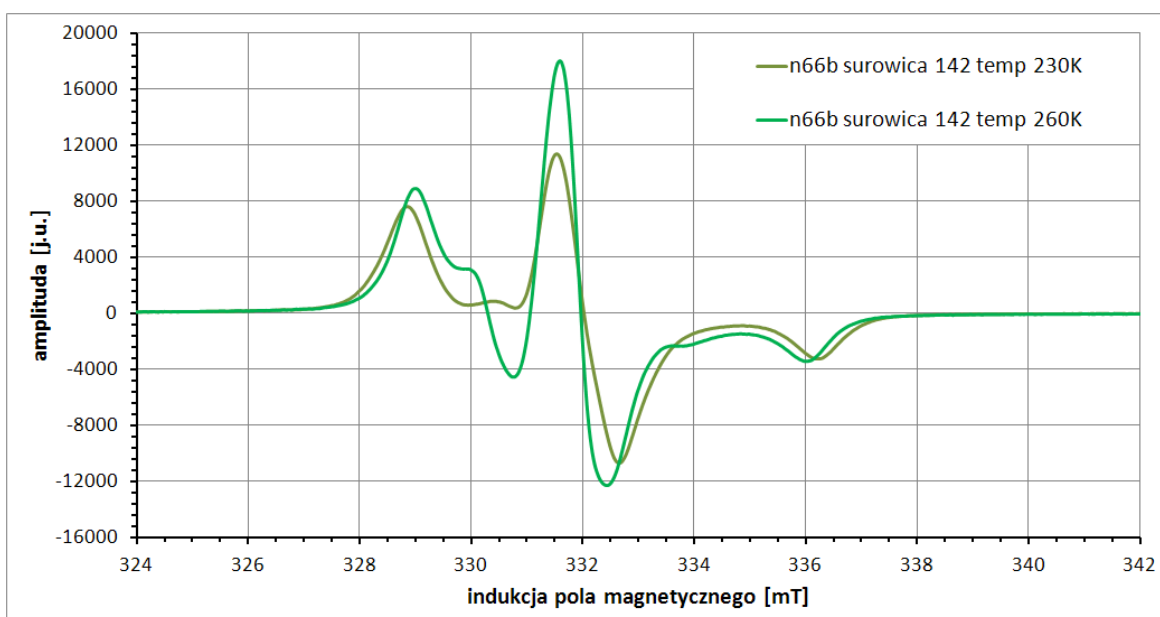


Rys. 43 Porównanie widm EPR znacznika spinowego 4-amino-TEMPO dołączanego do nanocząstek n66b w wodzie dla temperatur 230K i 260K.

W 230K dla nanocząstek n66b w wodzie sygnał od nitroksydu miał nietypową formę pojedynczej linii: $g = 2,0065 \pm 0,0003$; $\Delta B_{pp} = 2,52 \pm 0,03$ mT (rys. 43). Natomiast sygnał zarejestrowany w temperaturze 260K ($g = 2,0063 \pm 0,0003$) ujawniał bardziej złożoną strukturę. W analogicznych zakresach nanocząstki n66b przebadano w surowicy, co ukazują rys. 44 i 45.

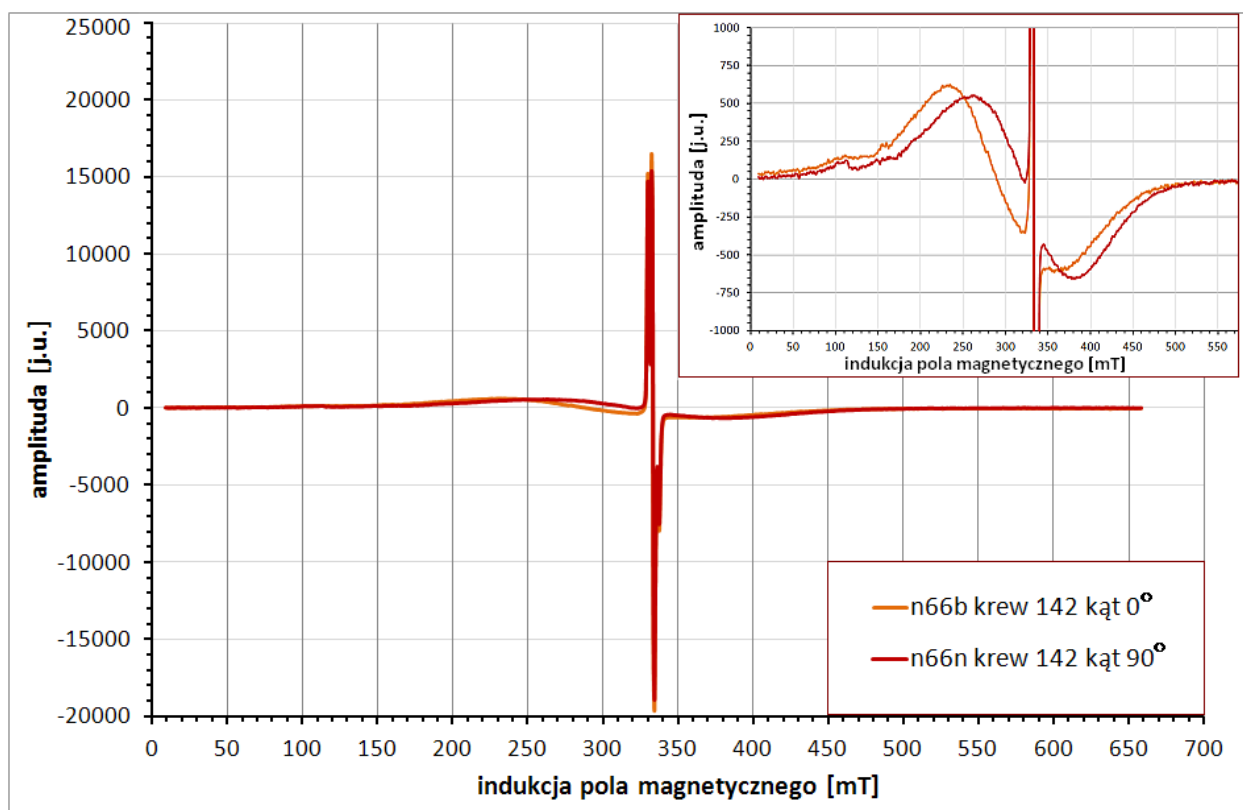


Rys. 44 Zestawienie widm EPR zarejestrowanych w zakresie przemiatania 650 mT w temperaturze 230K po field coolingu dla próbki n66b w surowicy nr 142 dla orientacji 0° i 90° w stosunku do zewnętrznego pola magnetycznego. W okienku w prawym górnym rogu przedstawiono zbliżenie szerokiej linii od rdzeni nanocząstek.

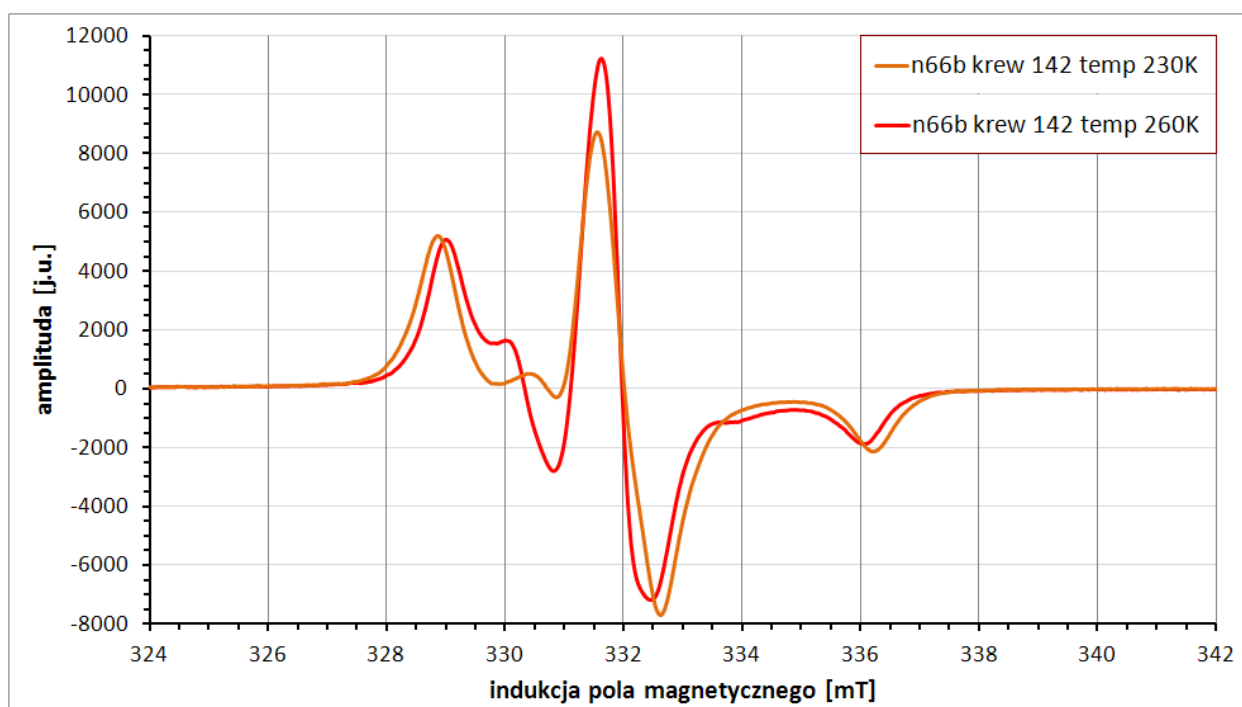


Rys. 45 Porównanie widm EPR znacznika spinowego 4-amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek n66b znajdujących się w surowicy nr 142. Widma zarejestrowano w temperaturach 230K i 260K

Procedurę field cooling zastosowano również podczas badania nanocząstek n66b w pełnej krwi ludzkiej. Widma otrzymane w 230 i 260K obrazują rys. 46 i 47.



Rys. 46 Porównanie widm EPR zarejestrowanych w zakresie przemiatania 650 mT w temperaturze 230K po field coolingu dla próbki n66b we krwi nr 142 dla orientacji 0° i 90° w stosunku do zewnętrznego pola magnetycznego. W okienku w prawym górnym rogu przedstawiono zbliżenie szerokiej linii od rdzeni nanocząstek.



Rys. 47 Zarejestrowane w temperaturach 230K i 260K widma EPR znacznika spinowego 4-amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek n66b znajdujących się we krwi nr 142.

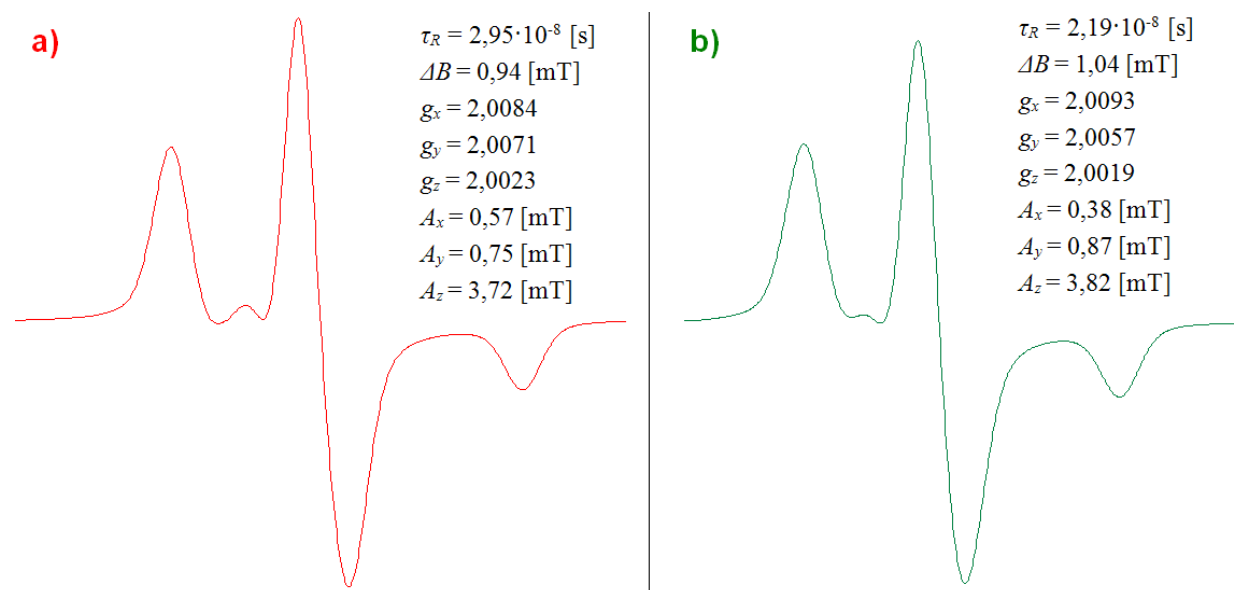
Szerokości pik-pik linii EPR od magnetytowych rdzeni nanocząstek dla trzech badanych ośrodków dla orientacji 0° i 90° w stosunku do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego i temperatur 230 i 260K zestawiono w tabeli 16.

Tabela 16 Szerokości pik-pik sygnału EPR od rdzenia nanocząstek n66b w temperaturach 230 i 260K dla orientacji próbki 0° i 90° w stosunku do zewnętrznego pola magnetycznego.

próbka	Temp [K]	$\Delta B_{pp} (0^\circ)$ [mT]	$\Delta B_{pp} (90^\circ)$ [mT]
n66b H ₂ O	230	$125,8 \pm 3,6$	$120,7 \pm 3,6$
n66b H ₂ O	260	$104,8 \pm 3,6$	$102,3 \pm 3,6$
n66b surowica 142	230	$127,1 \pm 3,6$	$122,6 \pm 3,6$
n66b surowica 142	260	$106,7 \pm 3,6$	$103,5 \pm 3,6$
n66b krew 142	230	$125,8 \pm 3,6$	$122,6 \pm 3,6$
n66b krew 142	260	$105,5 \pm 3,6$	$104,2 \pm 3,6$

Szerokość pik-pik w temperaturze 230K jest większa niż w temp 260K, co potwierdza, (zaobserwowany również dla pozostałych próbek) fakt poszerzania się linii wraz z obniżaniem temperatury. Szerokość linii dla orientacji 90° jest ponadto nieco mniejsza niż dla orientacji 0° . Nie zaobserwowano natomiast, aby w danej temperaturze, przy określonej orientacji próbki szerokości linii od magnetytowego rdzenia różniły się w sposób istotny pomiędzy ośrodkami.

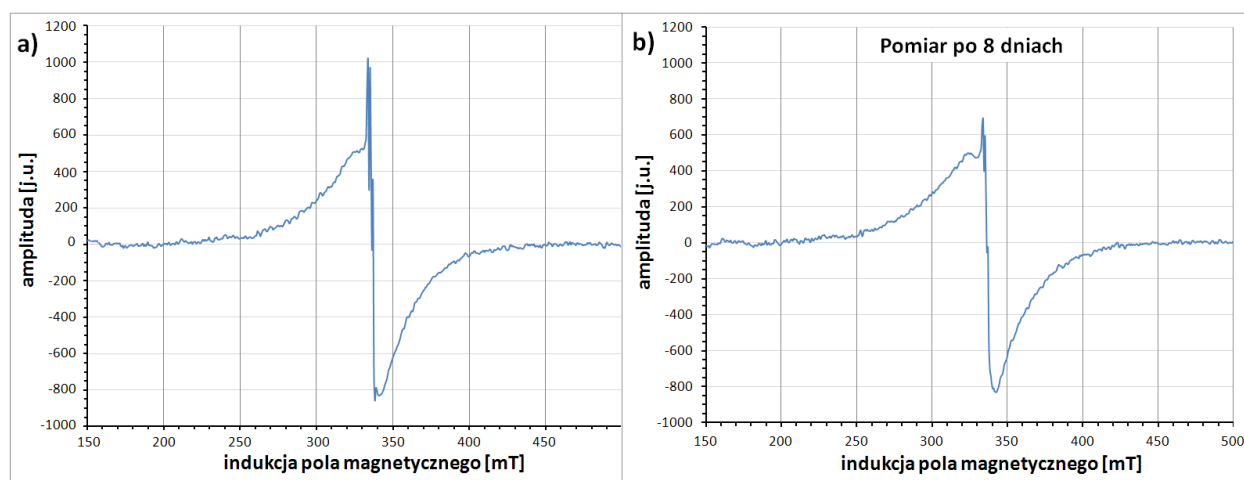
Kształt sygnału od 4-amino-TEMPO w 230K i 260K dla nanocząstek n66b we krwi pełnej i surowicy wskazywał, że ruch znacznika jest silnie utrudniony. Przy użyciu programu EasySpin przeprowadzono symulacje, które pozwoliły wyznaczyć wartości czasu korelacji rotacyjnej τ_R , składowych g_x , g_y i g_z tensora \tilde{g} ; A_x , A_y i A_z tensora oddziaływania nadsubtelnego \tilde{A} oraz szerokości linii. Rys. 48 przedstawia wyniki symulacji dla widm EPR znacznika dołączonego do nanocząstek n66b znajdujących się w pełnej krwi ludzkiej i surowicy w 230K.



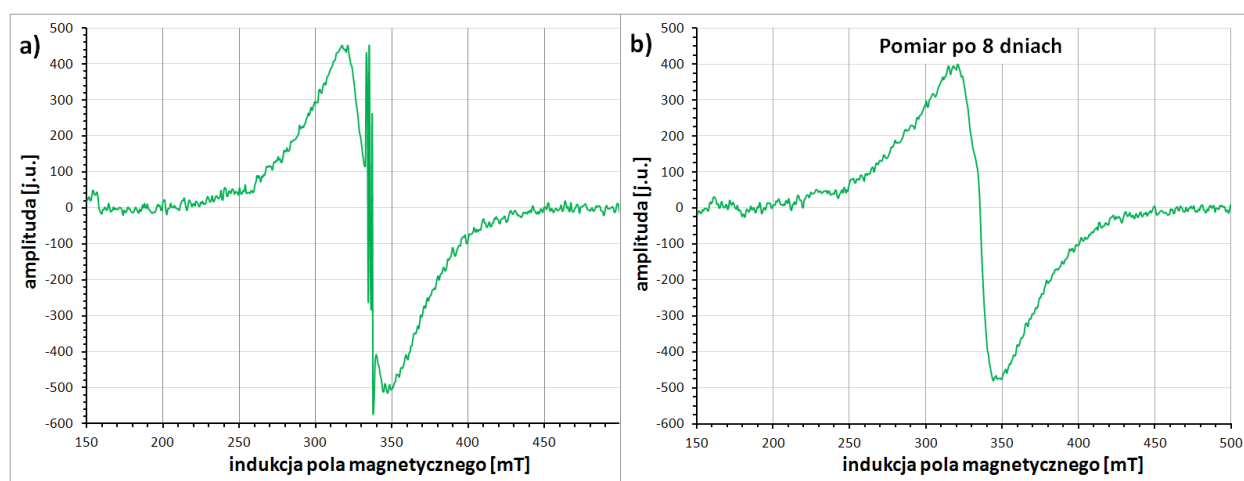
Rys. 48 Wsymulowane widma EPR znacznika spinowego 4-amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek n66b w pełnej krwi ludzkiej nr 142 (a) oraz surowicy nr 142 (b) w temperaturze 230K. Na rysunkach przedstawiono wartości parametrów otrzymanych w rezultacie symulacji.

4.5 Pomiary nanocząstek n58 pokrytych silanem i znakowanych 4-amino-TEMPO

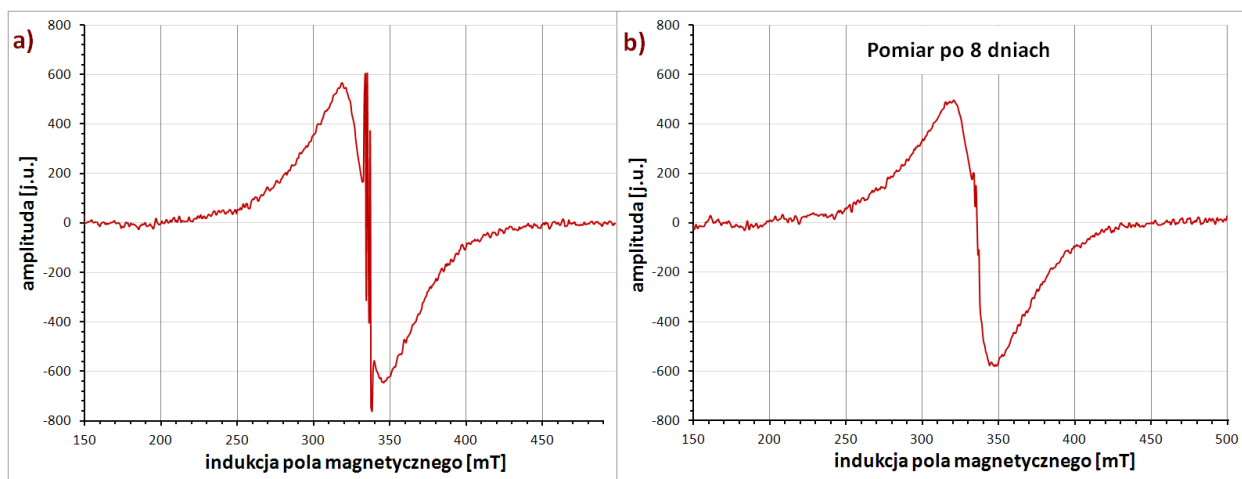
Nanocząstki magnetytu n58 pokryte silanem i znakowane 4-amino-TEMPO w pierwszej kolejności zbadano w wodzie dejonizowanej, surowicy nr 59 i pełnej krwi nr 59 w temperaturze pokojowej ($\approx 293\text{K}$) w kapilarach pomiarowych. Na widmo EPR takich nanocząstek składała się szeroka linia od magnetytowych rdzeni i charakterystyczny tryplet od nitroksydu. Widma otrzymane w szerokim zakresie przemiataania przedstawiono w części a) rys. 49-51. W części b) wspomnianych rycin pokazano natomiast widma tych samych próbek zarejestrowane po 8 dniach przy analogicznych nastawach spektrometru.



Rys. 49 Widmo EPR nanocząstek n58 w wodzie w temperaturze pokojowej (a) oraz widmo tej samej próbki zarejestrowane po 8 dniach w tych samych warunkach i przy analogicznych nastawach spektrometru (b).

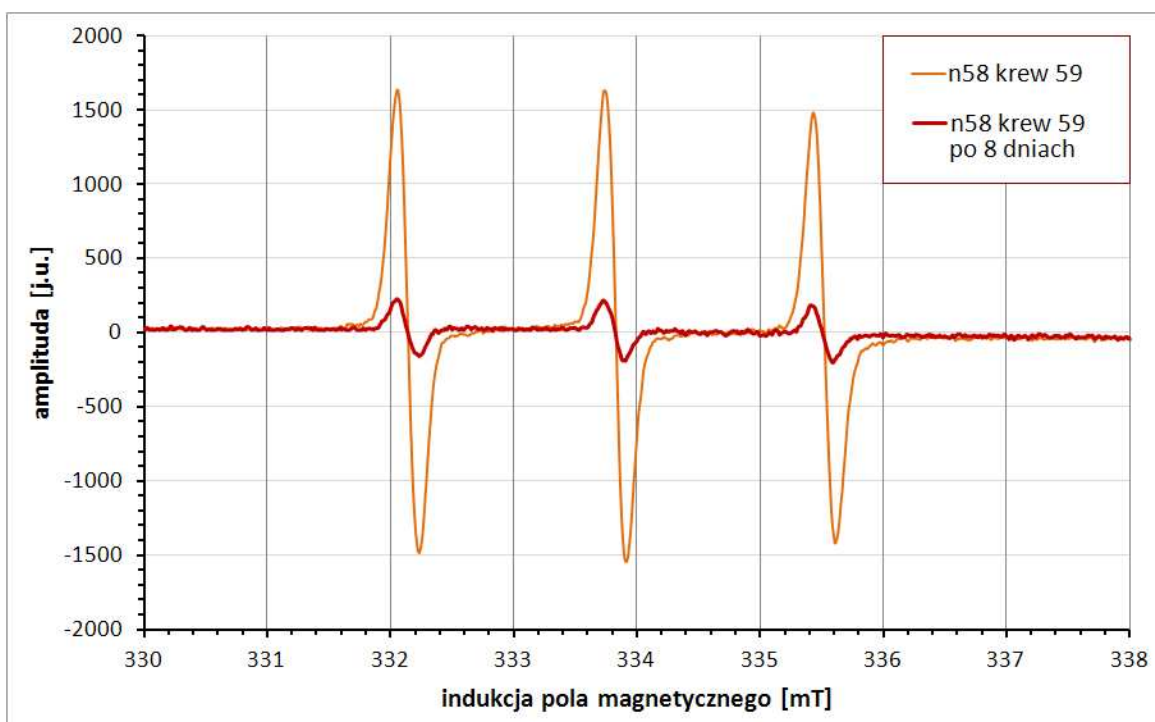


Rys. 50 Widmo EPR nanocząstek n58 w surowicy nr 59 w temperaturze pokojowej (a) oraz widmo tej samej próbki zarejestrowane po 8 dniach w tych samych warunkach i przy analogicznych nastawach spektrometru (b).



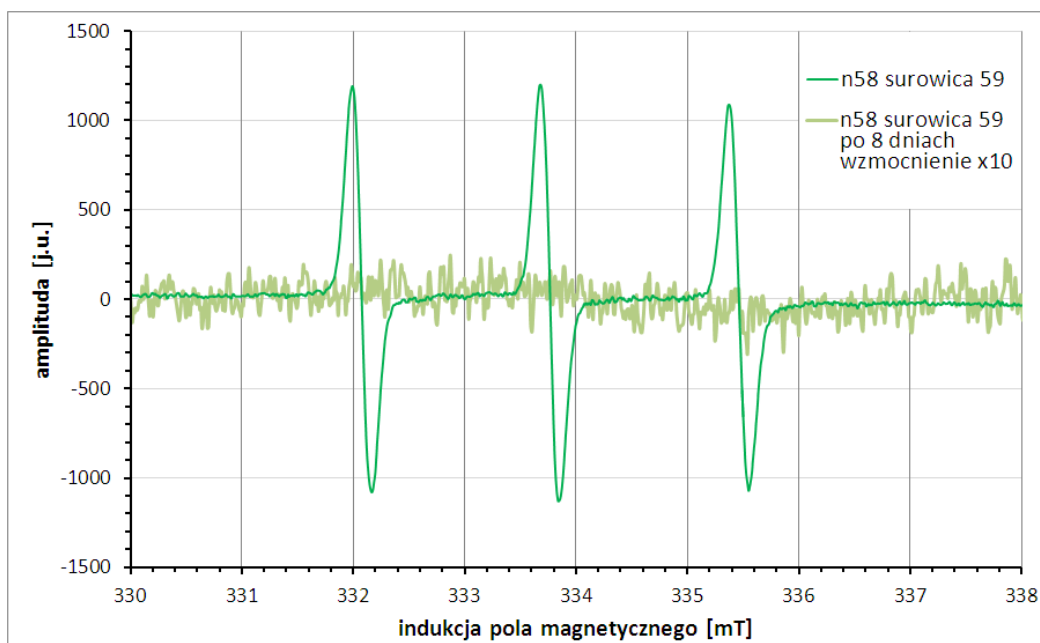
Rys. 51 Widmo EPR nanocząstek n58 we krwi nr 59 w temperaturze pokojowej (a) oraz widmo tej samej próbki zarejestrowane po 8 dniach w tych samych warunkach i przy analogicznych nastawach spektrometru (b).

Analizę sygnału EPR znacznika spinowego dołączonego do nanocząstek w badanych ośrodkach przeprowadzono na podstawie widm zarejestrowanych w zakresie przemiatania 10 mT. Rys. 52 stanowi porównanie widm znacznika spinowego dołączonego do nanocząstek n58 znajdujących się we krwi pełnej dla świeżo przygotowanej próbki z widmami zarejestrowanymi dla tej próbki po 8 dniach.



Rys. 52 Porównanie widma EPR znacznika spinowego amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek n58 we krwi nr 59 z widmem tej samej próbki zarejestrowanym po 8 dniach (pomiar w temperaturze pokojowej).

Pomiar po 8 dniach pokazał, że w przypadku nanocząstek we krwi 59 i w wodzie intensywność sygnału EPR od znacznika spinowego znacznie zmalała. Dla nanocząstek w wodzie spadek intensywności sygnału był około 2,4-krotny, natomiast dla nanocząstek w pełnej krwi ponad 8,4-krotny. Dla nanocząstek w surowicy sygnał po 8 dniach zanikł natomiast całkowicie i nie udało się go wyodrębnić nawet po zwiększeniu wzmocnienia spektrometru (rys. 53).



Rys. 53 Porównanie widma EPR znacznika spinowego amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek n58 w surowicy nr 59 z widmem tej samej próbki zarejestrowanym po 8 dniach (pomiar w temperaturze pokojowej).

Dla nanocząstek n58 w temp. 293K wyznaczono współczynniki g oraz stałe oddziaływania nadsubtelnego A_{izo} . Bezwymiarowy parametr anizotropii ε oszacowano, korzystając z formuły (49), natomiast wartości czasów korelacji rotacyjnej τ_R , stosując wzór (47) dedykowany dla znaczników spinowych w reżimie szybkiej rotacji. Wyniki zebrano w tabelach 17 i 18.

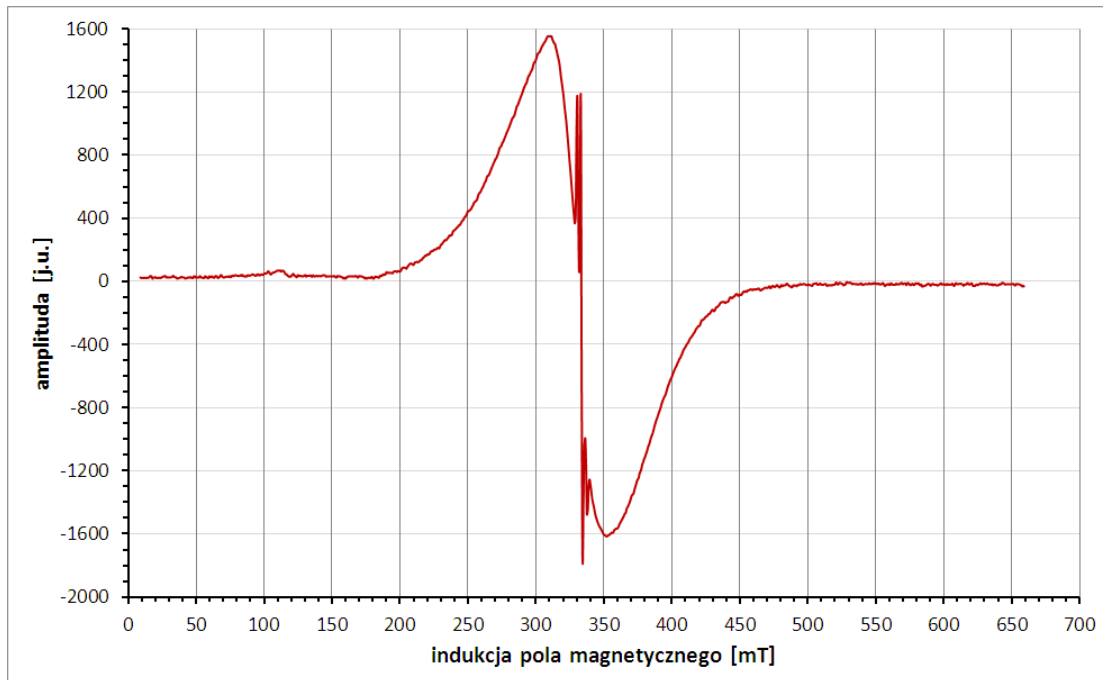
Tabela 17 Obliczone wartości współczynników g , stałej oddziaływania nadsubtelnego A_{izo} (wraz z niepewnością δA_{izo}), czasu korelacji rotacyjnej τ_R (z niepewnością $\delta \tau_R$) oraz współczynnika anizotropii ε (z niepewnością $\delta \varepsilon$) dla 4-amino-TEMPO z nanocząstek n58 w temperaturze pokojowej w wodzie, surowicy i krwi pełnej (świeża próbka).

Próbka	g	A_{izo} [mT]	δA_{izo} [mT]	τ_R [s]	$\delta \tau_R$ [s]	ε	$\delta \varepsilon$
n58 w H ₂ O	2,0058 $\pm 0,0002$	1,691	0,014	$3,8 \cdot 10^{-11}$	$0,4 \cdot 10^{-11}$	0,59	0,05
n58 surowica 59	2,0058 $\pm 0,0002$	1,691	0,014	$5,2 \cdot 10^{-11}$	$0,5 \cdot 10^{-11}$	0,32	0,03
n58 krew 59	2,0059 $\pm 0,0002$	1,681	0,014	$6,3 \cdot 10^{-11}$	$0,6 \cdot 10^{-11}$	0,18	0,02

Tabela 18 Wartości g , A_{izo} , τ_R i ε (wraz z niepewnościami) dla 4-amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek n58 (pomiar po 8 dniach przechowywania próbki w temperaturze pokojowej).

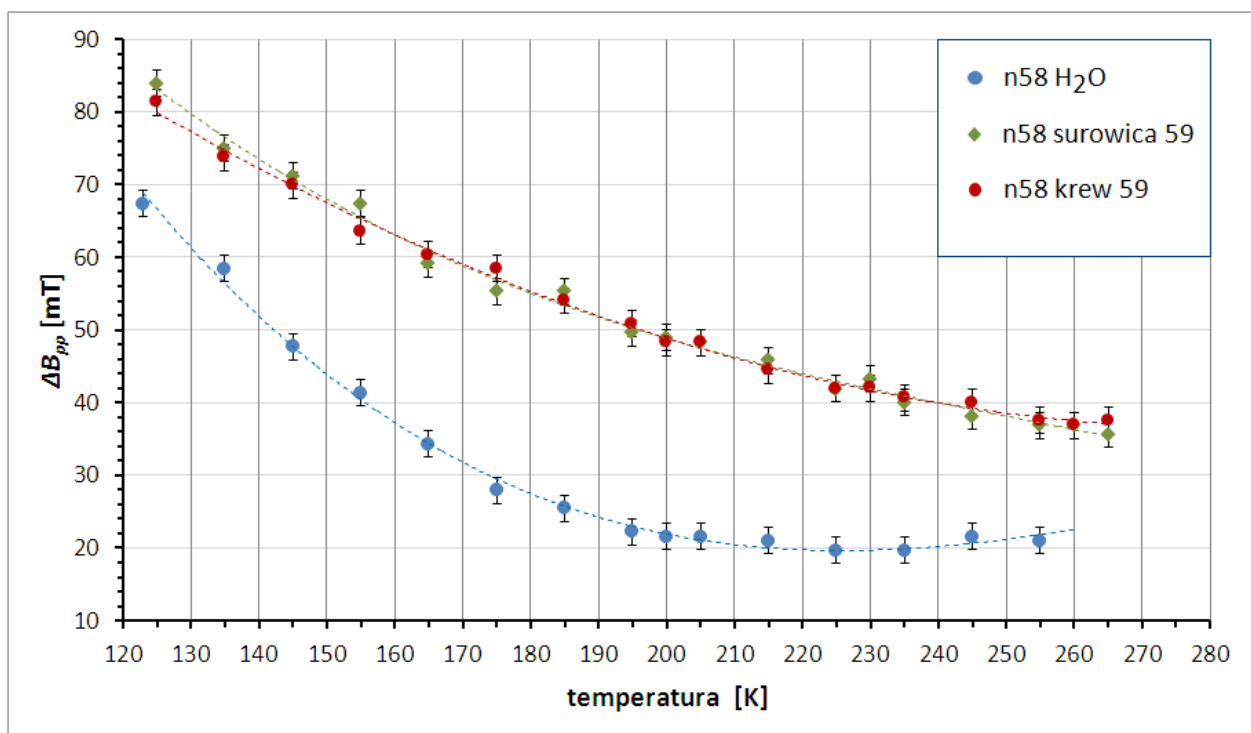
Próbka	g	A_{izo} [mT]	δA_{izo} [mT]	τ_R [s]	$\delta \tau_R$ [s]	ε	$\delta \varepsilon$
n58 w H ₂ O	2,0057 $\pm 0,0002$	1,692	0,014	$4,2 \cdot 10^{-11}$	$0,8 \cdot 10^{-11}$	2,59	0,30
n58 krew 59	2,0058 $\pm 0,0002$	1,682	0,014	$6,4 \cdot 10^{-11}$	$1,8 \cdot 10^{-11}$	1,28	0,28

Dla nanocząstek n58 przeprowadzono również pomiary próbek zamrożonych w szerokim zakresie temperatur w wodzie, surowicy nr 59 i pełnej krwi nr 59. Przykładowe widmo nanocząstek n58 we krwi pełnej zarejestrowane w temperaturze 230K przedstawia rys. 54.

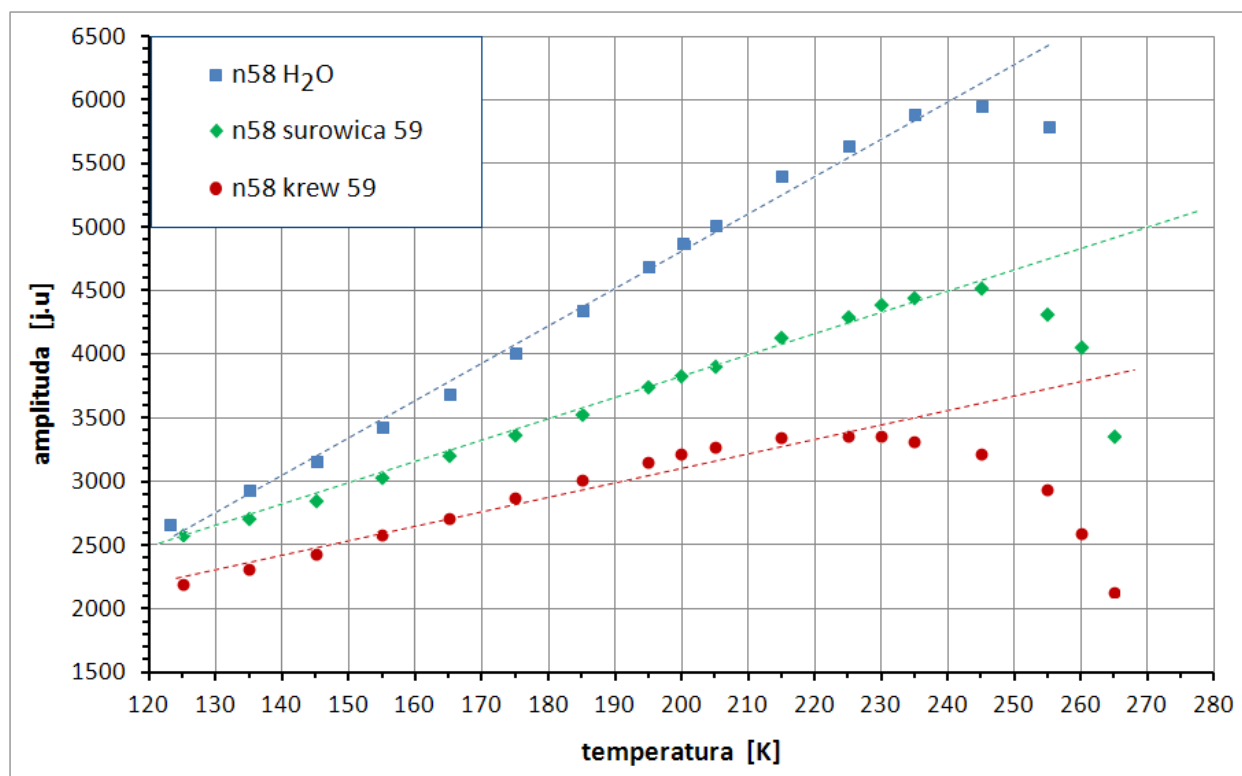


Rys. 54 Widmo EPR nanocząstek n58 we krwi nr 59. Pomiar w 230K. Sygnał od znacznika 4-amino-TEMPO widoczny jest na tle szerokiej linii od rdzenia magnetytowych cząstek.

Dla szerokiej linii pochodzącej od rdzenia nanocząstek wyznaczono zależności szerokości pik - pik ΔB_{pp} oraz amplitudy od temperatury, co ilustrują kolejno rys. 55 i 56.



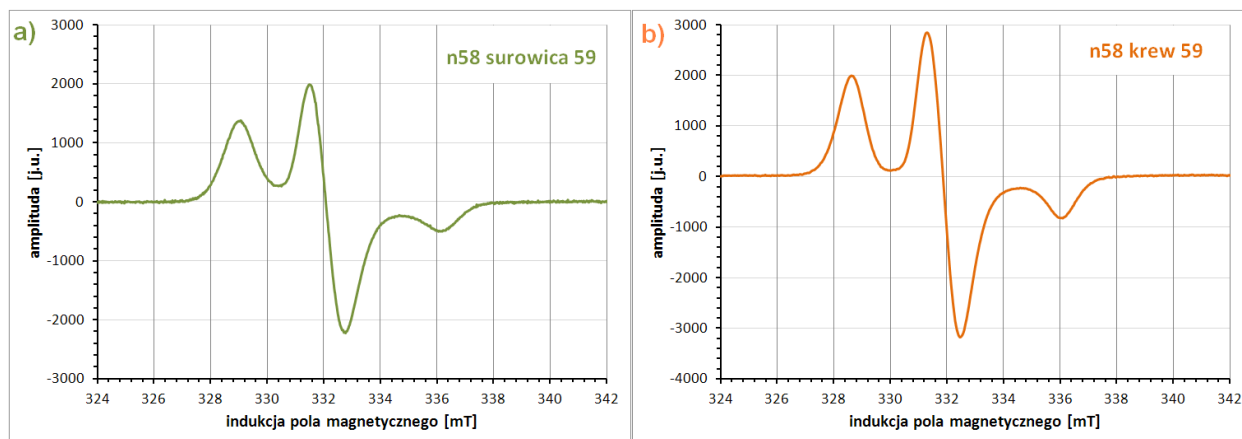
Rys. 55 Zależność ΔB_{pp} od temperatury dla szerokiej linii od rdzenia nanocząstek n58 w trzech badanych ośrodkach.



Rys. 56 Zależność amplitudy szerokiej linii od temperatury dla nanocząstek n58 w trzech badanych ośrodkach

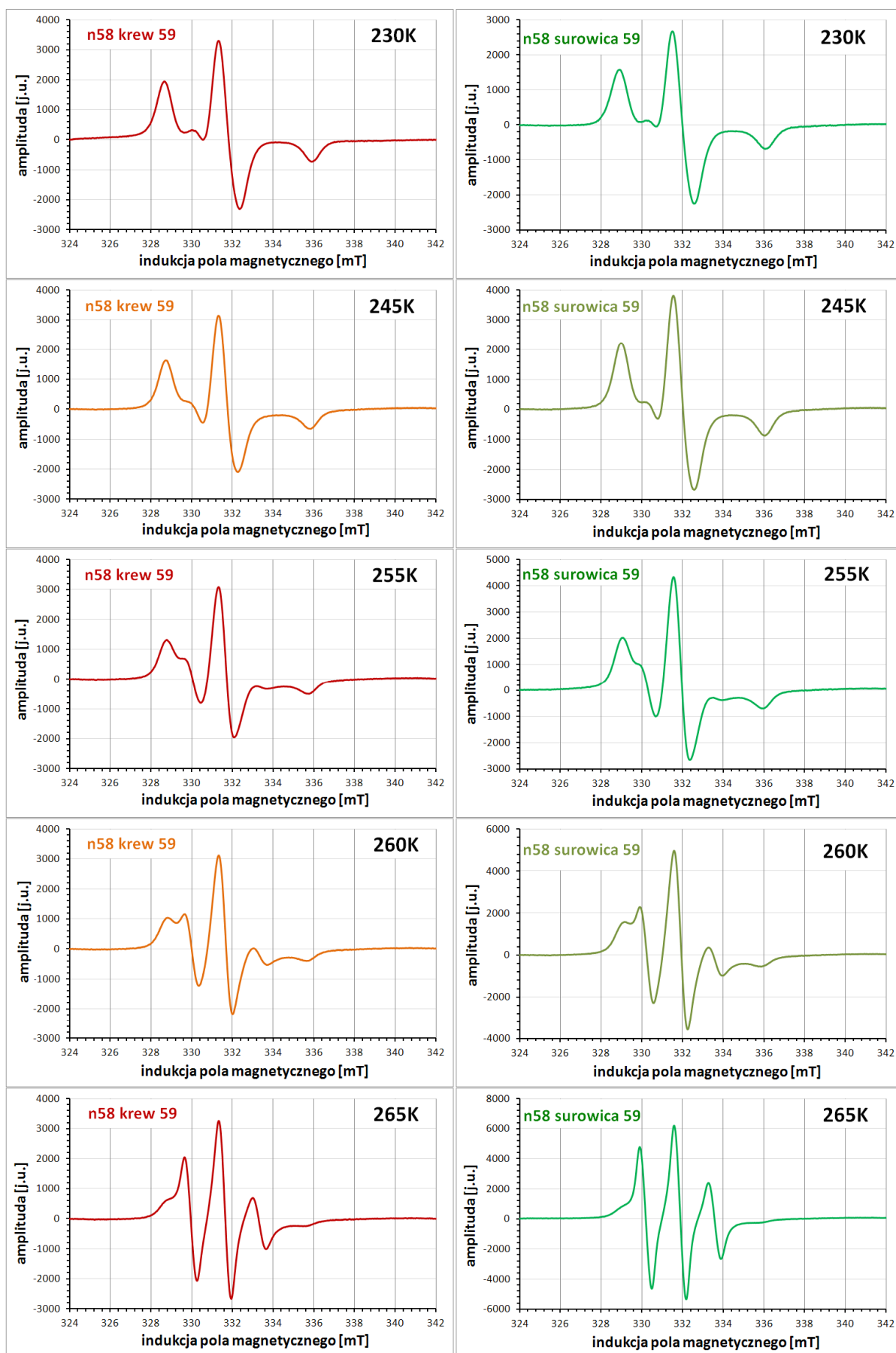
Linia EPR od magnetywowego rdzenia poszerza się wraz z obniżaniem temperatury. Należy jednak zauważyć, że ΔB_{pp} dla nanocząstek n58 w wodzie jest wyraźnie mniejsza niż dla cząstek w surowicy i pełnej krwi ludzkiej. Amplituda szerokiej linii EPR rośnie wraz ze zwiększaniem temperatury do około 235K (dla nanocząstek w wodzie i surowicy) albo 230 (dla cząstek we krwi pełnej) a następnie zaczyna maleć.

Kształt sygnału EPR od znacznika 4-amino-TEMPO dla nanocząstek n58 w badanych ośrodkach w niskich temperaturach wskazuje, że ruch znacznika jest znacznie utrudniony. Na rys. 57 przedstawiono porównanie widm EPR znacznika w surowicy i krwi nr 59 w 125K.



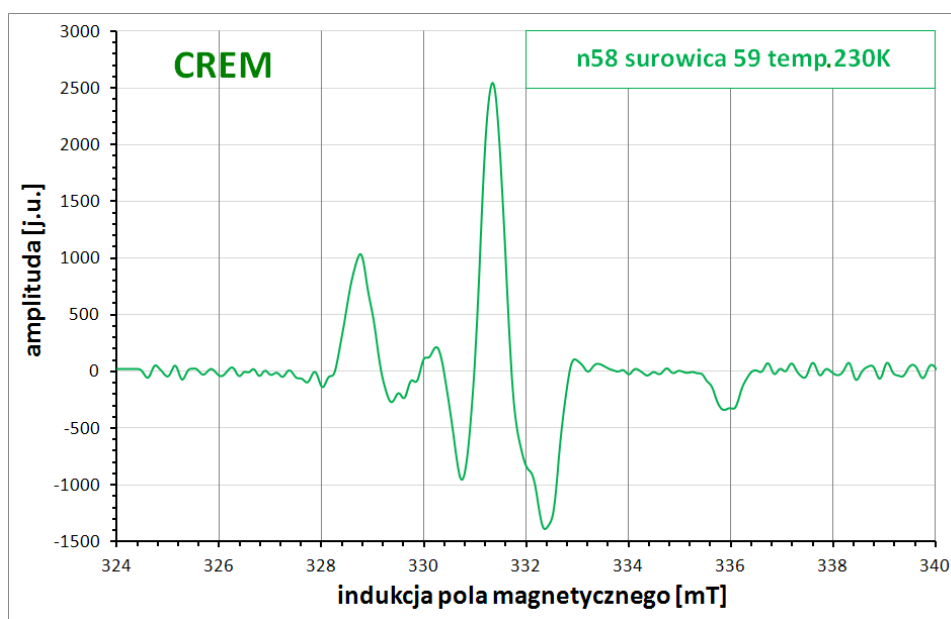
Rys. 57 Widma EPR znacznika spinowego 4-amino-TEMPO dla nanocząstek n58 w surowicy (a) i krwi pełnej (b).

Pomiary przeprowadzone z zakresie 125-265K pozwoliły zobrazować, jak zmienia się sygnał EPR od znacznika spinowego wraz ze zwiększaniem temperatury pomiaru. Na rys. 58 zestawiono widma otrzymane w eksperymencie w temperaturach 230, 245, 255, 260 i 265K dla nanocząstek n58 w surowicy i pełnej krwi ludzkiej nr 59. Widać, że wraz ze wzrostem temperatury zmienia się dynamika ruchu znacznika spinowego.

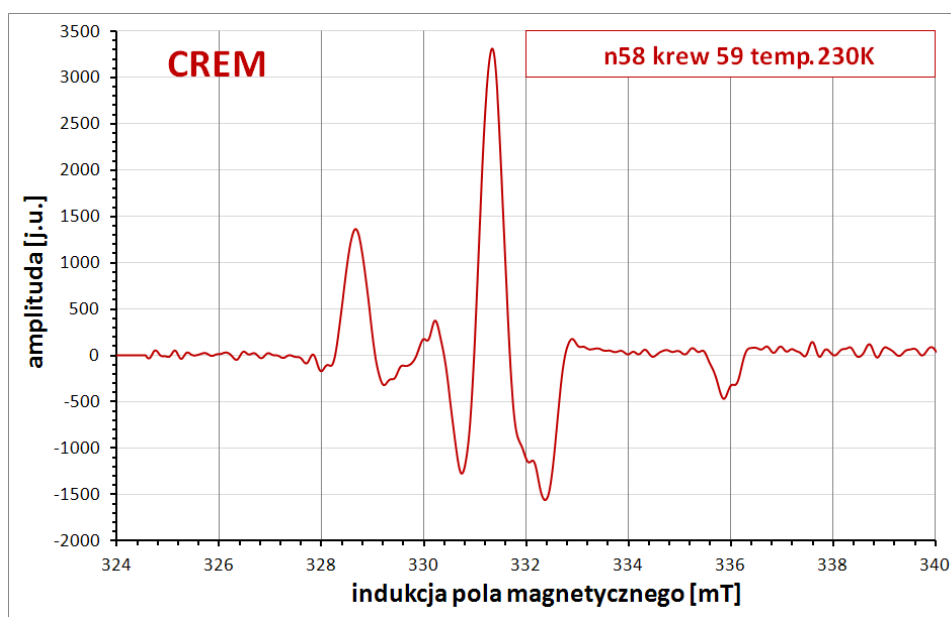


Rys. 58 Zestawienie widm EPR znacznika spinowego 4-amino-TEMPO dla nanocząstek n58 we krwi nr 59 (strona lewa) i surowicy nr 59 (strona prawa) dla temperatur 230-265K.

Dynamika ruchu znacznika różni się ponadto w zależności od ośrodka, co widać szczególnie dla wyższych temperatur, np. 260K. Dla widm wolno rotującego znacznika z dobrze odseparowanymi zewnętrznymi ekstremami można w sposób bezpośredni wyznaczyć A_z' (analogicznie jak na rys.7 w części teoretycznej). Dla nanocząstek n58 we krwi $A_z' = 3,76 \pm 0,04$ mT (125K); $A_z' = 3,69 \pm 0,04$ mT (230K); $A_z' = 3,55 \pm 0,04$ mT (245K). Dla nanocząstek n58 w surowicy: $A_z' = 3,59 \pm 0,04$ (125K); $A_z' = 3,57 \pm 0,04$ mT (230K); $A_z' = 3,53 \pm 0,04$ mT (245K). Wyznaczone A_z' jest zatem większe dla nanocząstek n58 we krwi. W obu ośrodkach rozdzielenie zewnętrznych ekstremów maleje wraz ze wzrostem temperatury. Dla widm znacznika spinowego dołączonego do nanocząstek n58 badanych w surowicy i krwi pełnej przeprowadzono analizę CREM. Jej wyniki dla temperatury 230K przy przyjętej szerokości funkcji rdzenia 25 pkt pokazano na rys. 59 i 60.



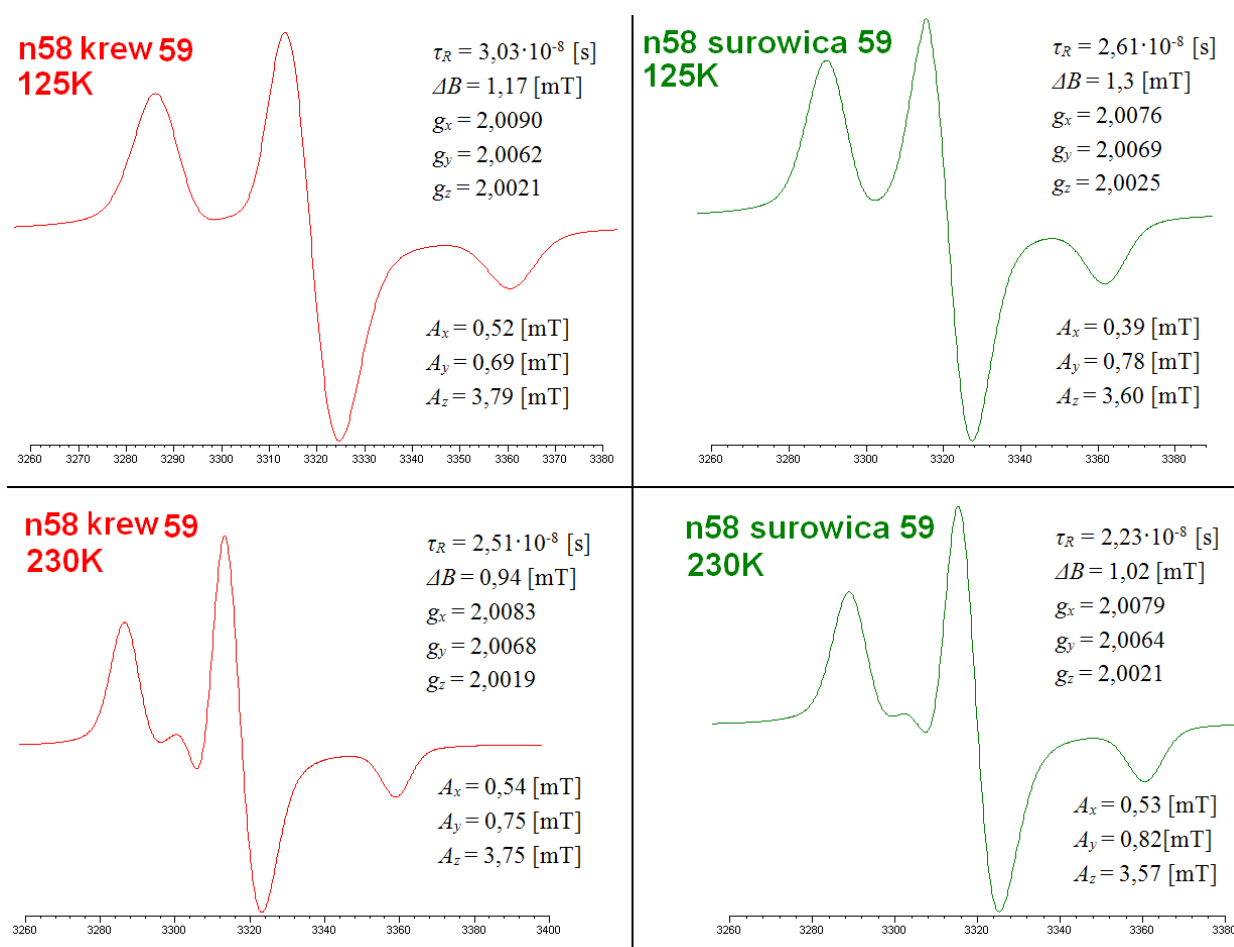
Rys. 59 Wynik analizy CREM widma EPR nitroksydu dołączonego do nanocząstek n58 w surowicy nr 59 (pomiar w 230K). Zastosowano szerokość funkcji rdzenia 25 pkt.



Rys. 60 Wynik analizy CREM widma EPR nitroksydu dołączonego do nanocząstek n58 we krwi nr 59 (pomiar w 230K). Zastosowano szerokość funkcji rdzenia 25 pkt.

Porównanie rezultatów analizy CREM (rys. 59 i 60) z widmami otrzymanymi bezpośrednio w eksperymencie (rys. 58) wskazuje, że procedura cyfrowego zwiększenia rozdzielczości sygnału pozwala uwidocznić dodatkowe szczegóły w widmie wolno rotującego znacznika. Ułatwiają one przeprowadzenie symulacji widm.

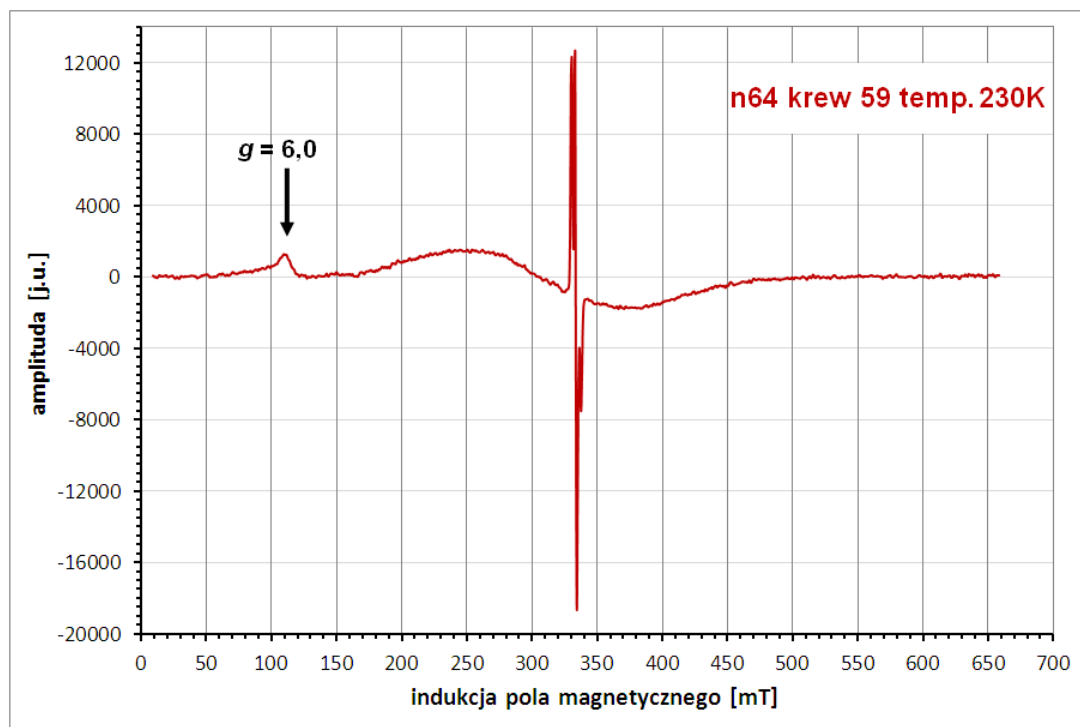
Symulację widm rodnika nitroksylowego dołączonego do nanocząstek n58 przeprowadzono w programie EasySpin. Wyznaczono wartości czasu korelacji rotacyjnej τ_R , składowych g_x , g_y i g_z tensora \check{g} ; A_x , A_y i A_z tensora oddziaływania nadsubtelnego \check{A} oraz szerokości linii. Rys. 61 przedstawia wysymulowane widma znacznika dołączonego do nanocząstek w wodzie i surowicy w temp. 125 i 230K.



Rys. 61 Wsymulowane widma EPR znacznika spinowego 4-amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek n58 w pełnej krwi ludzkiej nr 59 oraz surowicy nr 59 dla temperatur 125 i 230K. Na rysunkach przedstawiono wartości parametrów otrzymanych w rezultacie symulacji.

4.6 Pomiary nanocząstek n64 pokrytych silanem i dekstranem oraz znakowanych 4-amino-TEMPO

Pokryte silanem nanocząstki magnetytu n64 oprócz dołączonego znacznika 4-amino-TEMPO posiadały dodatkową powłokę z dekstranu. Zbadano je w zakresie temperatur 155 - 250K w wodzie i pełnej krwi ludzkiej nr 59. Podobnie jak dla wcześniej badanych próbek w tym przypadku szeroka linia od magnetytowego rdzenia nanocząstek n64 również zwężała się wraz ze zwiększaniem temperatury pomiaru. Przykładowe widmo EPR zarejestrowane w zakresie 650 mT dla nanocząstek n64 w pełnej krwi w temperaturze 230K przedstawiono na rys. 62.

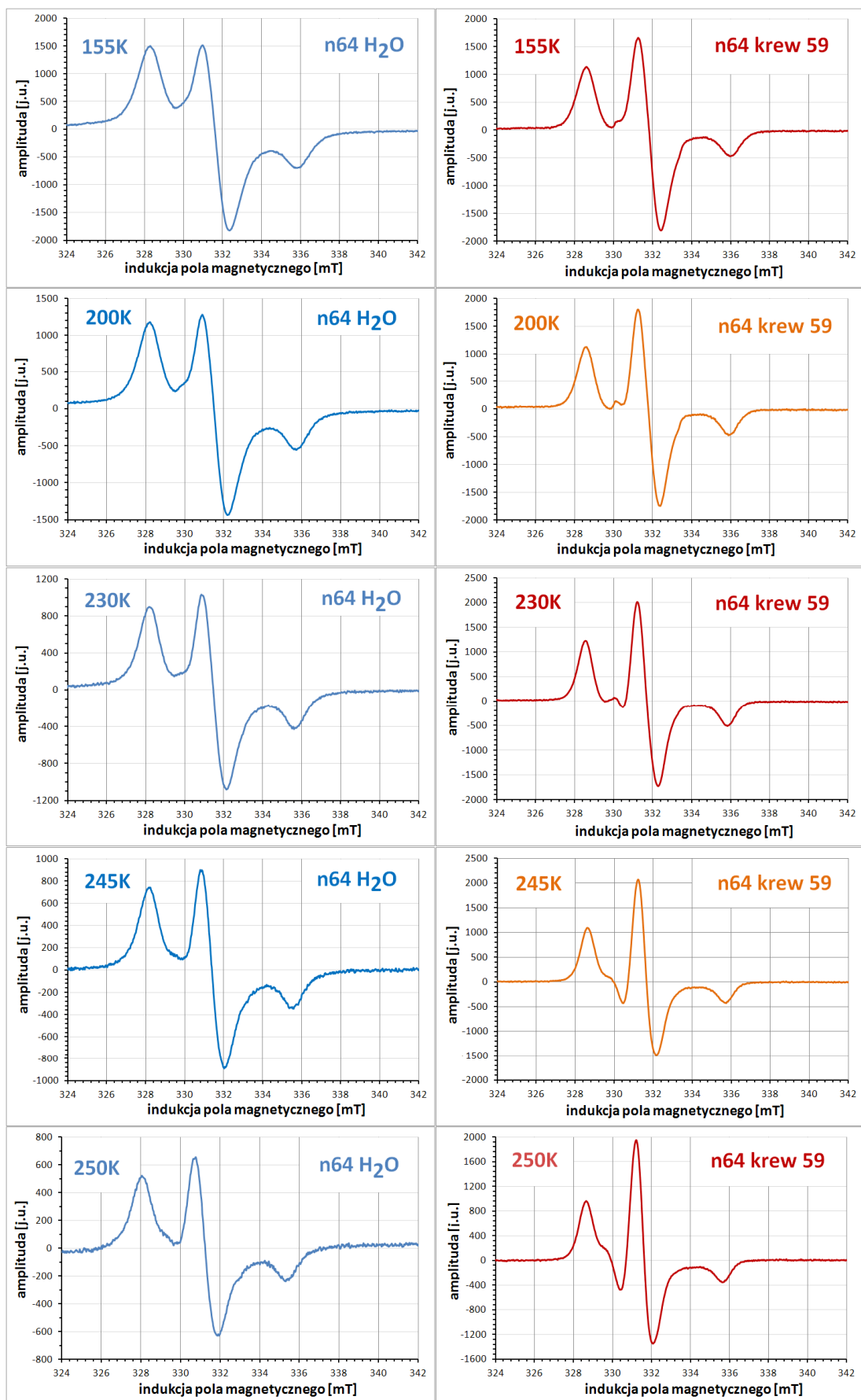


Rys. 62 Widmo EPR nanocząstek n64 w pełnej krwi ludzkiej (próbka 64) w temperaturze 230K.

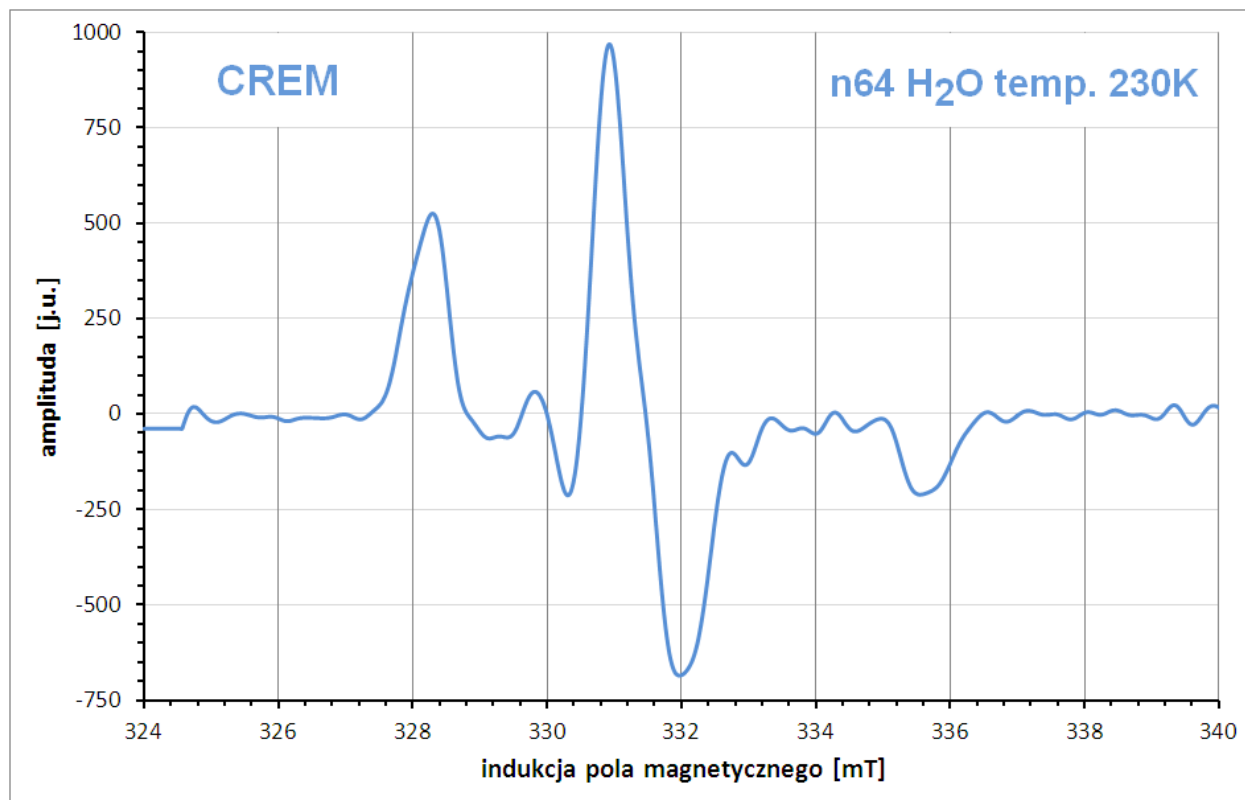
Na rys. 62 oprócz szerokiej linii od rdzenia nanocząstek ($g = 2,171 \pm 0,008$; $\Delta B_{pp} = 125 \pm 1,8$ mT) oraz silnego sygnału od rodnika nitroksylowego widać dodatkową linię $g = 6,0$. Jej amplituda rośnie, gdy obniżamy temperaturę. Sygnał ten ma swoje źródło we krwi pełnej i nie występuje w przypadku nanocząstek w wodzie.

Kształt sygnału od 4-amino-TEMPO dla nanocząstek n64 w badanych ośrodkach w niskich temperaturach wskazuje, że ruch znacznika jest znacznie utrudniony. Na rys. 63 zestawiono widma rodnika nitroksylowego otrzymane w eksperymencie w temperaturach 155, 200, 230, 245 i 250K dla nanocząstek n64 w wodzie i pełnej krwi ludzkiej nr 59 (250K to maksymalna temperatura w jakiej udało się zarejestrować widmo dla próbek zamrożonych). Wraz ze wzrostem temperatury zmienia się dynamika ruchu znacznika spinowego przy czym w widmach doświadczalnych zmiany te są wyraźniej widoczne dla nanocząstek we krwi pełnej. Aby uwidocznić dodatkowe szczegóły w widmach wolno rotujących znaczników w obu ośrodkach przeprowadzono analizę CREM. Jej wyniki dla temperatury 230K przy przyjętej szerokości funkcji rdzenia 25 pkt pokazano na rys. 64 i 65.

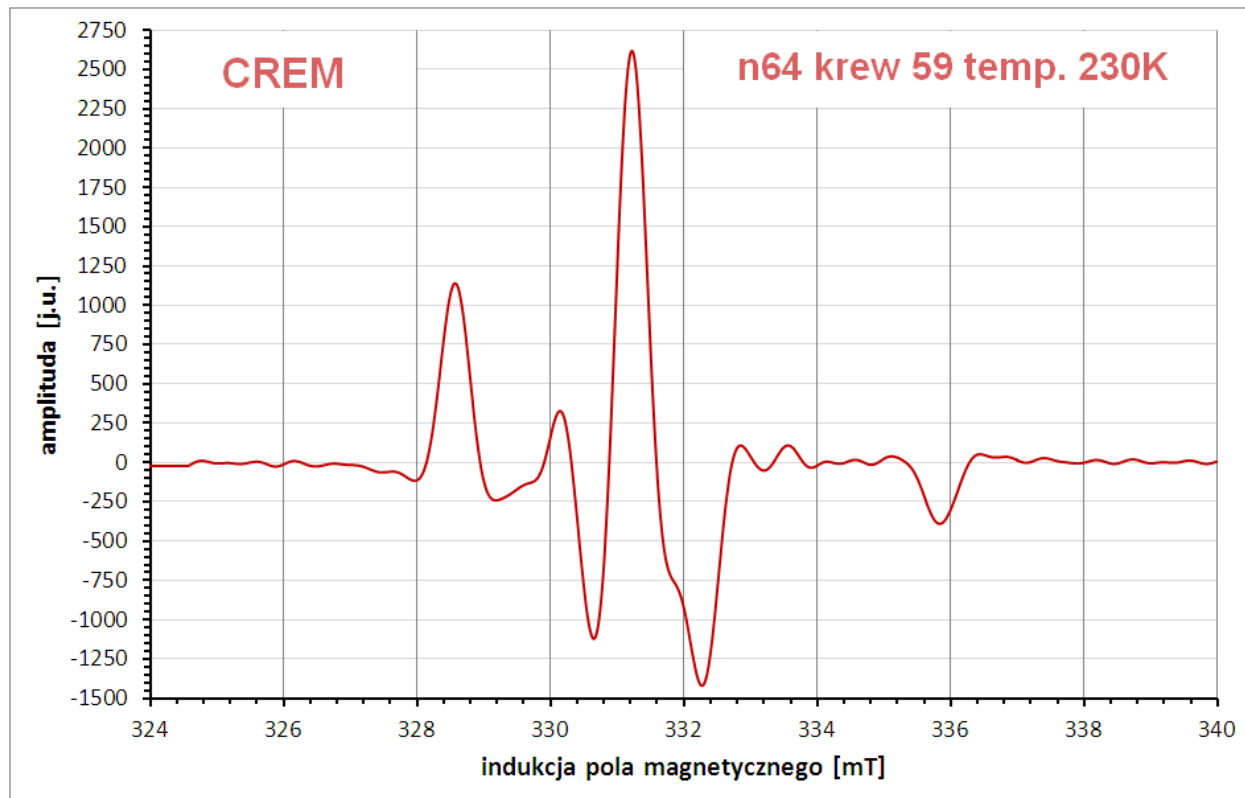
Symulację widm dołączonego do nanocząstek n64 rodnika nitroksylowego przeprowadzono w programie EasySpin. Wyznaczono składowe g_x , g_y i g_z tensora \check{g} ; A_x , A_y i A_z tensora oddziaływania nadsubtelnego \check{A} , wartości czasu korelacji rotacyjnej τ_R oraz szerokości linii. Wyniki symulacji widm znacznika spinowego dołączonego do nanocząstek n64 w roztworze wodnym i krwi pełnej w temp. 230K przedstawia rys. 66.



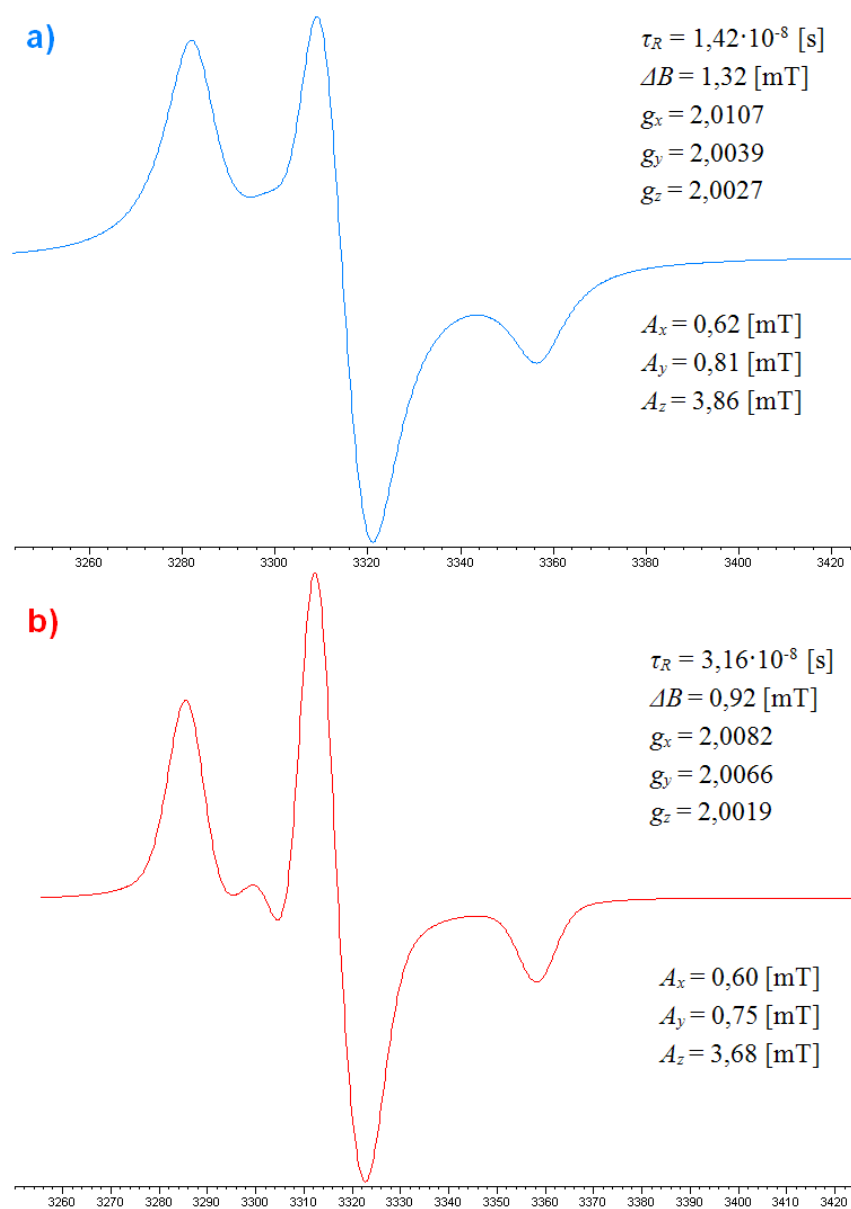
Rys. 63 Zestawienie widm EPR znacznika spinowego 4-amino-TEMPO dla nanocząstek n64 w wodzie (strona lewa) i pełnej krwi nr 59 (strona prawa) dla wybranych temperatur z przedziału 155-250K.



Rys. 64 Wynik analizy CREM widma EPR znacznika spinowego 4-amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek n58 we wodzie (pomiar w 230K). Zastosowano szerokość funkcji rdzenia 25 pkt.



Rys. 65 Wynik analizy CREM widma EPR znacznika spinowego 4-amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek n58 w krwi pełnej nr 59 (pomiar w 230K). Zastosowano szerokość funkcji rdzenia 25 pkt.



Rys. 66 Wsymulowane widma EPR znacznika spinowego 4-amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek n64 w wodzie (a) oraz pełnej krwi ludzkiej nr 59 (b). Na rysunkach przedstawiono wartości parametrów otrzymanych w rezultacie symulacji.

5 Dyskusja wyników:

Zarejestrowane w toku badań widma EPR pełnej krwi ludzkiej przed dodaniem do niej nanocząstek zdominowane były przez linię $g = 6$ o dużej intensywności, co przykładowo obrazuje rys. 16. Sygnał ten występował dla wszystkich 13 przebadanych próbek krwi, a w przypadku, gdy posiadał dużą intensywność zauważalny był również po dodaniu do nich nanocząstek (rys. 35 i 62). Jak już wspomniano w części teoretycznej sygnał $g_{\perp} = 6$ jest charakterystyczny dla wysokospinowej ($S = 5/2$) formy trójwartościowego żelaza w methemoglobinie (metHb) [104-106]. Pochodzenie zaobserwowanego w eksperymencie sygnału od jonów Fe^{3+} w metHb we krwi potwierdza również fakt, iż nie występował on dla próbek surowicy, która jest pozbawiona elementów morfotycznych. Obecności methemoglobiny w badanych próbkach krwi pełnej świadczy dodatkowo ich ciemne zabarwienie, co ilustruje rys. 15. Z literatury wiadomo bowiem, iż krew żylna pobrana od pacjentów z podwyższonym stężeniem methemoglobiny jest wyraźnie ciemniejsza niż krew osób bez methemoglobinemii [103]. Normalnie w zdrowym organizmie tylko niewielka część ($\approx 1\%$) HbO_2 ulega samoutlenianiu do methemoglobiny. Z drugiej strony we krwi, która opuściła organizm dochodzi do utleniania oksyhemoglobiny (HbO_2) do methemoglobiny i hemichromu [156]. Ten ostatni to niskospinowa forma metHb powstała na skutek denaturacji hemoglobiny. Spektroskopia EPR może być wykorzystana do oceny wieku śladów krwi na podstawie sygnałów od zdenaturowanych hemoprotein [157]. Zewnętrznym symptomem utleniania HbO_2 jest natomiast zmiana koloru płam krwi wraz z upływem czasu od jaskrawej czerwieni do ciemnego brązu [156]. Powyższe informacje skłaniają do zastanowienia się, czy obecność silnych sygnałów od methemoglobiny we wszystkich przebadanych próbkach krwi pełnej nie wiąże się z procesami utlenienia hemoglobiny, które zaszły już po pobraniu krwi.

Przeprowadzone pomiary wykazały występowanie charakterystycznego sygnału $g = 4,2$ (rys. 18) we wszystkich widmach EPR, zarówno krwi pełnej jak i surowicy. W oparciu o dane literaturowe należy upatrywać jego pochodzenie od wysokospinowego, niehemowego żelaza w transferynie [114-116]. Taka wartość g jest typowa dla Fe^{3+} w centrum o symetrii rombowej [158]. Dla $S = 5/2$ na skutek rozszczepienia w polu zerowym (ang. *zero-field splitting ZFS*) występują 3 dublety Kramersa [159]. Dla Fe^{3+} w transferynie ZFS jest większe od energii kwantu promieniowania mikrofalowego w pasmie X [159]. Dlatego aby uzyskać szczegółowe informacje o miejscu wiązania żelaza w białku, należałoby stosować spektrometr EPR pracujący przy wyższych częstotliwościach mikrofal, np. 275 GHz.

W przedstawionych w pracy widmach krwi pełnej i surowicy pojawiał się również złożony sygnał, którego dominującym elementem była linia $g_{\perp} = 2,06$. Bazując na literaturze, można wnioskować, że pochodzi ona od jonów Cu^{2+} w ceruloplazminie [115,116,126]. Doprecyzowując komponent struktury nadsubtelnej z $g_{\perp} = 2,05$ wywodzi się od Cu typu II [122]. Pomimo iż w eksperymentach każdorazowo wykonywano 25 akumulacji pozostałe linie od tego sygnału, ze względu na małą intensywność oraz duży szum były trudno dostrzegalne. Niemniej jednak równoległą składową tensora g udało się wyznaczyć, np. dla widma EPR pełnej krwi ludzkiej nr 155 (rys. 16 w części 4.1), gdzie wynosiła $g_{\parallel} = 2,27$. Oszacowana dodatkowo

wartość $A_{\parallel} = 15 \pm 0,9$ mT pozwala przypuszczać, że mamy do czynienia z sygnałem od Cu^{2+} typu IIb. Z literatury wiadomo bowiem, że w ceruloplazminie $g_{\parallel} = 2,26$ i $A_{\parallel} = 18$ mT charakteryzuje Cu^{2+} typu IIa, natomiast $g_{\parallel} = 2,27$ i $A_{\parallel} = 14,5$ mT Cu^{2+} typu IIb [17]. W przypadku puryfikowanej ceruloplazminy dla Cu typu II pojawiają się wartości $g_{\parallel} = 2,25$ i $A_{\parallel} = 18$ mT [122]. Warto przypomnieć, że duże rozczepienie nadsubtelne dla centrum typu II jest charakterystyczne dla tetragonalnie skoordynowanych kompleksów miedziowych [122]. Należy pamiętać, że na widmo EPR od ceruloplazminy składają się jeszcze złożone sygnały od paramagnetycznej miedzi typu I. Ich zarejestrowanie jest jednak bardzo trudne ze względu na niską amplitudę i możliwe wystąpienie w widmie EPR pełnej krwi ludzkiej dodatkowych sygnałów od niskospinowych kompleksów żelaza.

Dla wszystkich przebadanych w eksperymentach próbek nanocząstek sygnał EPR od ich magnetytowego rdzenia miał postać szerokiej linii. Jest ona charakterystyczna dla nanocząstek, stanowiących pojedyncze domeny magnetyczne [160]. Cząstki użyte w eksperymentach posiadały średnie wymiary rdzenia 5 nm (próbki n58, n64, n65b i n66b) albo 8-12 nm (próbka n53). Według literatury graniczna wartość średnicy, dla której sferyczne cząstki magnetytu, są jednodomenowe to ≈ 48 nm [161].

Parametry linii zarejestrowanych w toku badań różniły się w zależności od próbki. Przykładowo w temperaturze 230K dla orientacji próbki 0° dla cząstek n53 w H_2O : $g = 2,114$ oraz $\Delta B_{pp} = 87,0 \pm 0,9$ (tabela 6), natomiast dla cząstek n65b w H_2O : $g = 2,365$, $\Delta B_{pp} = 113 \pm 0,9$ (tabela 11). Próbki n53 i n65b różnią się zarówno pokryciem jak i wymiarami rdzenia. Bezdyskusyjny wydaje się fakt, iż średnica rdzenia cząstek magnetycznych wpływa na ich widmo EPR. Z literatury wiemy bowiem, że nie tylko pole rezonansowe, ale również szerokość linii zmieniają się wraz z rozmiarami ziaren. Przykładowo badania nanocząstek Fe_3O_4 o średnicach 1,1 - 11 nm udowodniły, że pole rezonansowe maleje (342,6 do 299,9 mT) a szerokość linii rośnie (38,5 mT-81,7 mT) wraz ze zwiększaniem rozmiarów cząstek [162]. Dla większych nanocząstek mniej zauważalny jest bowiem wpływ efektów powierzchniowych (nieuporządkowanych spinów, które są w stanie przypominającym szkło spinowe), co sprawia, że całkowita magnetyzacja jest większa, a cząstki wchodzą w rezonans przy niższym polu [162].

W eksperymencie nanocząstki n53 o większych rozmiarach rdzenia charakteryzowały się jednak węższą linią i niższym g w porównaniu z mniejszymi cząstkami n65b (patrz tabele 6 i 11). Zatem przyczyn różnic nie należy upatrywać w średnicy pojedynczych cząstek, raczej w ich funkcjonalizacji. Literatura dostarcza dowodów na silny wpływ pokrycia nanocząstek na parametry ich widma EPR. Dla przykładu w temperaturze pokojowej sygnał EPR od nanocząstek Fe_3O_4 pokrytych oleinianem sodu charakteryzował się szerszą linią (66,4 mT) i mniejszą wartością współczynnika g ($g = 2,0839$) w porównaniu z sygnałem od nanocząstek nieopłaszczonych ($g = 2,1884$, $\Delta B_{pp} = 57,3$ mT) [10]. Wzrost pola rezonansowego i szerokości linii uzyskano również po pokryciu superparamagnetycznych nanocząstek magnetytu metoksy PEGiem [163]. W piśmiennictwie odnotowano jednak też przypadki, że zabezpieczone surfaktantem nanocząstki posiadały węższą linią EPR w porównaniu do nieopłaszczonych

odpowiedników, co tłumaczono zmniejszaniem oddziaływań dipolowych między cząstkami [164].

Dla parametrów rejestrowanego widma nie bez znaczenia jest także dołączony lek - dokсорubicyna. Znany jest przypadek, gdzie dla nanocząstek magnetyt + PEG + DOX zaobserwowano wyższe wartości g i szerszą linię EPR niż dla cząstek magnetyt + PEG [141].

Biorąc pod uwagę zaprezentowane powyżej informacje, wydaje się, że niższa wartość g i węższa linia obserwowana podczas badań dla cząstek n53 ma związek z lepszą ochroną powierzchni przez polimer na bazie PEG, który skuteczniej zapobiega aglomeracji cząstek. Mimo, iż pokryte silanem nanocząstki n65b posiadały mniejszą średnicę rdzenia, wykazywały większą tendencję do aglomeracji, co zaobserwowano także podczas eksperymentów. Oddziaływania dipolowe między cząstkami mogły wówczas skutkować poszerzeniem linii.

Dla zbadanych próbek wartości współczynnika g widm EPR różnią się także w zależności od ośrodka, w jakim znajdują się nanocząstki. Zaobserwowano bowiem, że wartości g w przypadku nanocząstek n53 (funkcjonalizacja PEG + DOX) we krwi pełnej i surowicy są większe niż dla nanocząstek n53 w wodzie (tabele 6 i 7). Dla próbki n65b (pokrycie silan) w 230K wyższą wartość g zanotowano tylko dla nanocząstek we krwi dla orientacji 90° . Wartości g dla nanocząstek w wodzie i surowicy były porównywalne (rys. 34). Natomiast dla kąta 0° wartość g dla cząstek n65b w wodzie i surowicy była wyraźnie większa niż dla tychże cząstek we krwi (rys. 33, tabela 11).

W tym miejscu warto wspomnieć, że już wcześniej autor badał m. in. pokryte poliglikolem nanocząstki magnetytu o średnicy rdzenia 10 nm (próbka n47) w roztworze wodnym i pełnej krwi ludzkiej [165]. Zaobserwowano wówczas, że w zakresie temperatur 135-190 K wartości współczynnika g dla nanocząstek we krwi były większe niż w przypadku nanocząstek w roztworze wodnym, natomiast w temperaturach powyżej 190 K to współczynniki g dla nanocząstek w H_2O osiągały wyższe wartości (w omawianym przypadku nie stosowano procedury *field cooling*) [165]. W ramach badań funkcjonalizowanych nanocząstek autor niniejszej rozprawy przeprowadził też pomiar stabilizowanych chitozanem cząstek tlenku żelaza z dołączonym lekiem amoksycyliną w 77K [166]. Zanotowano wówczas większe wartości g dla cząstek we krwi pełnej.

Różnice w wartościach g mogą wynikać z interakcji nanocząstek z ośrodkiem. We krwi i surowicy nanocząstki otaczane są bowiem „koroną” białkową a stopień adsorpcji protein zależy od zastosowanego surfaktantu. Z literatury wiemy, że we krwi cząstki oddziałują dodatkowo z elementami morfotycznymi, w tym erytrocytami [133], a pole rezonansowe w widmach EPR może ulec przesunięciu na skutek przyłączenia molekuł biologicznych. Przykładowo dla nanocząstek maghemitu ($\phi = 8$ nm) pole rezonansowe wynosiło 302,9 mT, natomiast dla tych nanocząstek w obecności krwinek czerwonych uległo zmniejszeniu do 299,2 mT [167].

Zmniejszanie pola rezonansowego we krwi może wiązać się również z faktem, iż w tym ośrodku nanocząstki bardziej aglomerują. Łańcuchy PEG stanowią stosunkowo dobrą ochronę cząstek przed opsonizacją i agregowaniem, co mogłoby tłumaczyć mniejsze zmiany właściwości pokrytych nim rdzeni nanocząstek.

Kolejną istotną kwestią w przeprowadzonych badaniach jest silna zależność parametrów linii EPR magnetytowych rdzeni nanocząstek od temperatury. Dla badanych nanocząstek zaobserwowano przede wszystkim spadek wartości pola rezonansowego (wzrost g) oraz poszerzanie się linii wraz ze schładzaniem próbki (rys. 22, 23, 24, 55, tabela 16). Takie zachowanie się linii EPR jest charakterystyczne dla nanocząstek tlenku żelaza. Poszerzanie się linii EPR i przesuwanie B_r do niższych wartości wraz z obniżaniem temperatury autor obserwował już wcześniej dla nanocząstek magnetytu stabilizowanych chitozaniem i poliglikolem [11,165]. Przegląd literatury pozwala stwierdzić, że efekty te obserwowano dla nanocząstek Fe_3O_4 znajdujących się w różnych ośrodkach (wodzie, metanolu, toluenie) oraz posiadających różne pokrycia (chitozan, PEG, oleinian sodu [10,32,81]). Analogiczne zachowywały się również widma nanocząstek maghemitu ($\gamma-Fe_2O_3$) rozproszonych w diamagnetycznej matrycy [23,28].

Obserwowany w eksperymencie spadek wartości zewnętrznego pola rezonansowego w niskich temperaturach dla nanocząstek magnetytu w wodzie, surowicy i krwi pełnej można tłumaczyć wzrostem pól wewnętrznych. Z literatury wiadomo, że istnieją dwa przyczynki do pól wewnętrznych: anizotropowy i izotropowy. Pierwszy z nich związany jest m.in. z objętościową anizotropią magnetokrystaliczną, natomiast drugi z efektami powierzchniowymi [23]. Warto przypomnieć, że pole rezonansowe B_r dla sferycznych cząstek zazwyczaj określa się formułą:

$$B_r = B_{ef} - B_{dm} - B_A \quad (73)$$

gdzie: B_{ef} to efektywne pole magnetyczne, natomiast B_{dm} i B_A to odpowiednio pola wewnętrzne związane z demagnetyzacją i anizotropią.

$$B_r = B_{ef} - B_{dm} - \frac{2(K+K_s)}{M_s} \quad (74)$$

Temperaturowa zależność pola rezonansowego zależy głównie od pola anizotropii B_A a dokładniej efektywnej anizotropii K_{ef} [168]. Na gęstość K_{ef} składają się gęstości energii anizotropii związane z częścią lity K oraz z powierzchnią K_s [44,168]. Wpływ powierzchni jest większy dla małych cząstek. Dodatkowo fluktuacje spinów powierzchniowych spowalniają, gdy próbka jest ochładzana, co prowadzi do zamrożenia ich nieuporządkowania w niskich temperaturach [23].

Analiza wyników pomiarów wskazuje, iż zmniejszaniu się wartości zewnętrznego pola rezonansowego wraz z obniżaniem temperatury towarzyszy wzrost szerokości linii EPR, co widać np. na rys. 55. Warto zastanowić się nad fizycznymi podstawami powyższej obserwacji. Przede wszystkim w świetle literatury warunki rezonansu dla cząstek jednodomenowych zależą od orientacji ich osi anizotropii w odniesieniu do pola magnetycznego [23]. Jeśli w makroskopowo izotropowej próbce nanocząstki są zorientowane losowo, kątowa zależność ich pól rezonansowych skutkuje poszerzeniem widma [43]. Taki losowy rozkład osi anizotropii uwydatnia się właśnie w niskich temperaturach, kiedy to efekt poszerzenia sygnału jest szczególnie widoczny [24]. Można zatem przyjąć, że szeroki sygnał jest złożeniem wielu linii różniących się polem rezonansowym na skutek obecności anizotropii magnetokrystalicznej [27].

Porównanie zależności temperaturowych dla przebadanych próbek n53 ($\varnothing = 8 - 12$ nm)

i n58 ($\phi = 5$ nm) uwidacznia ponadto, że różnice pomiędzy skrajnymi wartościami szerokości (tzn. tymi zarejestrowanymi dla temperatur 121 i 265K) w badanych ośrodkach są istotnie większe dla próbki n58 o mniejszych średnich wymiarach rdzenia (rys. 24 i 55). Ta obserwacja znajduje potwierdzenie w literaturze, gdzie można znaleźć informację, iż dla nanocząstek magnetytu zmiany szerokości linii (jej zwięźanie się wraz z podgrzewaniem próbek) są wyraźniejsze dla cząstek o mniejszej średnicy [26].

Badania wskazują, iż temperaturowym zmianom szerokości sygnału EPR od magnetytowych rdzeni nanocząstek towarzyszą również zmiany jego amplitudy. Zazwyczaj tendencja jest taka: gdy linia EPR się zwięża, to jej amplituda rośnie. Dla przykładu dla nanocząstek n53 w H₂O amplituda linii rosła wraz ze zwiększaniem temperatury (rys. 25), podczas gdy jej szerokość malała (rys. 24). Dla nanocząstek n53 we krwi i surowicy amplituda linii wzrastała tylko do ≈ 240 -245K, a następnie zaczynała maleć (rys. 26 i 27). Dla cząstek n58 amplituda szerokiej linii EPR rosła wraz ze zwiększaniem temperatury do około 235K (dla nanocząstek w wodzie i surowicy) albo 230 (dla cząstek we krwi pełnej) a potem zaczynała maleć (rys. 56). Jakkolwiek wzrost amplitudy wraz z towarzyszącym zwiężaniem linii jest charakterystyczny dla próbek superparamagnetycznych nanocząstek przy podgrzewaniu, spadek amplitudy w wyższych temperaturach można wiązać z topnieniem próbki i współwystępowaniem faz stałej oraz ciekłej. Próbki nanocząstek w zależności od stosowanego ośrodka posiadały różną temperaturę zamarzania. Z literatury wiemy bowiem, że temperatura zamarzania krwi jest niższa niż wody, gdyż wynosi $-0,52^{\circ}\text{C}$ [169]. Często rozpatruje się tzw. spadek temperatury zamarzania (ang. *freezing point depression*), który dla pełnej krwi wynosi $0,557$ - $0,577^{\circ}\text{C}$, natomiast dla osocza i surowicy $0,512$ - $0,568^{\circ}\text{C}$ [170]. Dodatkowo stwierdzono też, że temperatura krzepnięcia (zamarzania) krwi pełnej po hemolizie jest wyższa niż w przypadku osocza i tej samej krwi przed hemolizą [171]. Powyższe informacje wydają się tłumaczyć, dlaczego amplituda widm nanocząstek we krwi pełnej i surowicy po uzyskaniu wartości maksymalnej zaczynała spadać wcześniej niż w przypadku cząstek w wodzie.

Ze względu na fakt, że informacje o efektywnej anizotropii nanocząstek można uzyskać z pomiarów field cooling, dla próbek n53 i n65b w badanych ośrodkach przeprowadzono procedurę FC w polu 0,5 T. Wartość taką uznano za optymalną na podstawie informacji literaturowej, że dla pól wyższych niż 400 mT większość osi anizotropii w nanocząstkach nie odstaje od kierunku przyłożonego pola o więcej niż 20° a dalsze zwiększanie pola zmienia warunki rezonansu tylko w bardzo niewielkim stopniu [23]. Umieszczenie ciekłych próbek nanocząstek w polu magnetycznym spowodowało zorientowanie ich momentów magnetycznych. Ze względu na rotacyjne stopnie swobody osie łatwe cząstek mogły obracać się wraz z momentami magnetycznymi μ w odpowiedzi na przyłożone pole B_{zew} . Po jego wyłączeniu ruch termiczny zniszczyłby orientacyjny porządek w ciągu kilku milisekund, dlatego w celu zachowania makroskopowej anizotropii układu próbkę zamrażano. Pomiar z użyciem goniometru wskazały, że zarówno dla nanocząstek n53 jak i n65b we wszystkich badanych ośrodkach (wodzie, surowicy i krwi pełnej) wartości zewnętrznego pola rezonansowego silnie zależą od orientacji próbki i są większe dla kąta 90° (tabele 8 i 12). Wartości współczynników g

wyznaczone ze wzoru (10) dla kąta 0° są zatem większe niż dla 90° (tabele 6, 7, 11; rys. 19, 20, 21, 23, 35) i jest to regułą w całym zakresie temperatur (rys. 22). Parametry widma dla kątów 0° i 180° (tabela 11) są natomiast takie same (ewentualne różnice wynikają z niepewności pomiarowych).

W superparamagnetycznych nanocząstkach zamrażanych bez obecności zewnętrznego pola magnetycznego (co określane jest często jako ZFC od ang. *zero field cooled*) osie anizotropii magnetycznej byłyby zorientowane przypadkowo, natomiast dla cząstek FC wykazywały orientację wzdłuż pola przyłożonego podczas schładzania. Warto wspomnieć, że już wcześniejsze badania nanocząstek magnetytu pokrytych chitozanem prowadzone m.in. przez autora pokazały, że największe pole rezonansowe obserwuje się dla kąta 90° , najmniejsze dla kąta 0° , natomiast dla próbek ZFC wartość pośrednią [11].

Dla widm FC nanocząstek n53, n65b i n66 we wszystkich ośrodkach widać również, że szerokość linii EPR dla orientacji 0° jest większa niż dla 90° (tabele 6,7,11,16). Amplituda linii jest z reguły przeważająca dla 90° . Większa ΔB_{pp} dla widm zarejestrowanych dla kąta 0° wskazuje, że sygnały te można traktować jako superpozycję linii od nanocząstek zorientowanych wzdłuż kierunku pola i tych, dla których orientacja momentu magnetycznego odbiega od kierunku przyłożonego pola.

W pomiarach FC ważną informację dostarcza nam różnica pól rezonansowych obserwowanych dla orientacji próbki 0° i 90° po FC. Należy zauważyć, że różnice $B_r(90^\circ) - B_r(0^\circ)$ są bardziej wyraźne dla nanocząstek n65b w porównaniu z cząstkami n53 (tabele 8 i 12). Warto przypomnieć, że cząstki n53 posiadają większy rdzeń niż n65b. W literaturze odnotowano natomiast, iż różnica pól rezonansowych dla nanocząstek tlenku żelaza w glicerolu malała wraz ze zmniejszaniem średnicy cząstek, co wyjaśniano faktem, że dla cząstek o niewielkich rozmiarach zwiększa się rozkład kierunkowy osi anizotropii i coraz więcej osi łatwych tworzy kąt ponad 20° w stosunku do kierunku pola w jakim cząstki są zamrażane [23]. Prawdopodobnie cząstki n65b mimo mniejszej średnicy w badanych ośrodkach aglomerowały, tworząc klaster o większych rozmiarach, co mogłoby wyjaśnić ich nietypowe zachowanie. Dodatkowo sytuację można rozpatrywać w kontekście poszczególnych ośrodków. W przypadku próbki n53 różnica pomiędzy wartościami pól rezonansowych dla orientacji 0° i 90° dla nanocząstek w wodzie jest mniejsza niż dla nanocząstek we krwi i surowicy (tabela 8). Z kolei dla próbki n65b jest ona zdecydowanie najmniejsza dla cząstek we krwi (tabela 12). Wydaje się, że interpretacja tego typu rozbieżności w zachowaniu cząstek w badanych ośrodkach oprócz uwzględniania możliwej aglomeracji powinna również brać pod uwagę odmienne właściwości powierzchni rdzenia (inne pokrycie polimerowe, które pociąga za sobą odmienne oddziaływania z otoczeniem).

Warto również dodać, że na podstawie $B_r(90^\circ) - B_r(0^\circ)$ w eksperymencie oszacowano dla nanocząstek n53 i n65b wartości pola anizotropii i efektywnej stałej anizotropii, korzystając z równań (71) i (72). Wyniki zamieszczone w tabelach 8 i 12 wskazują na większą anizotropię dla cząstek n65b, które posiadały mniejszą średnicę rdzenia. Tutaj pomiary są jednak opatrzone niepewnością ze względu na fakt, iż w obliczeniach stosowano (podobnie jak czyni się to w wielu pracach) wartość magnetyzacji charakterystyczną dla magnetytu litego.

Należy również wspomnieć, że eksperymentalne widma ESR nanocząstek n53 i n65b wykazują asymetrię. Symetria linii zmienia się wraz z temperaturą, a w większości przypadków linia EPR dla kąta 90° jest bardziej asymetryczna niż dla kąta 0° (tabele 9 i 13). Z literatury wiadomo, że kształt widma FC jest bardzo wrażliwy na współistnienie różnych wkładów od anizotropii, staje się bardziej asymetryczny, gdy zwiększa się średnia wielkość cząstek z powodu względnego zwiększenia udziału anizotropii krystalicznej a zanikającego przyczynku od anizotropii powierzchni [152]. Dodatkowo wyraźna asymetria kształtu linii pojawia się zwykle w przypadku makroskopowo izotropowych układów nanocząstek charakteryzujących się rozrzutem wielkości [43]. Obserwowana asymetria zarejestrowanych w eksperymentach linii może też częściowo wynikać z faktu, że sygnał od rdzeni nanocząstek ma złożoną strukturę.

Zastosowanie metody komputerowego zwiększania rozdzielczości sygnałów, czyli CREM pozwoliło wyodrębnić z sygnału od magnetytowych rdzeni nanocząstek n53 (pokrycie PEG) i n65b (pokrycie silan) wąską linię z $g = 1,99$. Analiza przeprowadzona dla wyników pomiarów FC pokazała, że wspomniana wartość współczynnika g jest niezależna od orientacji próbki względem pola magnetycznego oraz od ośrodka, w którym znajdują się cząstki (rys. 28-30 oraz 36-38). W zależności od ośrodka dla danego typu cząstek zmieniał się natomiast stosunek amplitudy wąskiego komponentu do szerokiej linii (tabele 10 i 14). Generalnie udział wąskiej linii był nieco większy w przypadku nanocząstek we krwi w porównaniu do nanocząstek w wodzie. Ponadto dla próbki n65b w surowicy analiza CREM pozwoliła wydzielić wąską linię o wyraźnie większej intensywności niż dla pozostałych ośrodków.

W pracy zaobserwowano także, iż amplituda wąskiej linii wyraźnie rośnie, natomiast szerokość minimalnie maleje wraz ze wzrostem temperatury (rys. 31 i 32). Należy jednak brać pod uwagę, że ze względu na złożoność procesu cyfrowej analizy sygnałów w metodzie CREM oraz współwystępowanie dwóch nakładających się sygnałów znacznie różniących się szerokością dokładne ustalenie, jak zmienia się szerokość wąskiej linii od temperatury może być problematyczne. Wcześniej wykorzystywano już bowiem tę metodę do analizy widm nanocząstek tlenku żelaza pokrytych dekstranem i kwasem oleinowym w wodzie [9].

Z literatury wiadomo, że wąska linia, która współwystępowała z szerokim sygnałem była w kilku przypadkach obserwowana również w standardowych eksperymentach ESR z nanocząstkami magnetytu i maghemitu [24,41,43,172]. Dla nanocząstek Fe_2O_3 wąska linia uwidaczniała się dla silnie rozcieńczonych próbek, jej intensywność spadała w niskich temperaturach, ale kształt i szerokość praktycznie się nie zmieniały [172].

Występowanie wąskiego sygnału tłumaczy się na wiele sposobów. Początkowo przypisywano go bardzo małym nanocząstkom superparamagnetycznym [41]. Według innych teorii sygnał z $g \approx 2$ miał pochodzić od kompleksów wolnego Fe^{3+} w ferrocieczy [151]. Bardziej prawdopodobne jest jednak, że sygnał ten ma związek ze zjawiskami zachodzącymi w zewnętrznej warstwie rdzenia. Postuluje się, że zachowanie się wąskiej linii jest związane z izotropowym wkładem od pola wewnętrznego związanego z powierzchnią nanocząstek [24]. Przyczynę ten maleje w niskich temperaturach, co jest zgodne z faktem zanikania wąskiej linii wraz z ochładzaniem próbki. Fluktuacje spinów na powierzchni zwalniają bowiem, gdy

temperatura jest obniżana, co prowadzi do zamrożenia nieuporządkowania spinów powierzchniowych. W piśmiennictwie odnotowano występowanie na powierzchni małych cząstek nieuporządkowanych struktur magnetycznych, tworzących fazę przypominającą szkło spinowe [23]. Defekty strukturalne związane z obecnością jonów Fe^{3+} na skutek utleniania warstwy powierzchniowej cząstek magnetytu również są upatrywane jako przyczyna obecności wąskiej linii w widmie EPR nanocząstek magnetytu [9]. Warto wspomnieć, iż sygnały z $g = 1,99$ w literaturze obserwowano też dla izolowanych jonów Fe^{3+} w szklach zawierających Fe_2O_3 oraz domieszkowanych żelazem nanocząstek TiO_2 ($\text{TiO}_2/\text{Fe}^{3+}$) [173,174]. Z drugiej strony w pracy, gdzie stosowano model nieuwzględniający efektów związanych z powierzchnią, wygenerowane komputerowo widma superparamagnetycznych nanocząstek maghemitu również miały formę superpozycji szerokiego sygnału i wąskiej, symetrycznej linii, która pojawiała się tylko przy stosunkowo dużym rozrzucie wielkości cząstek a wraz ze wzrostem ich najbardziej prawdopodobnej średnicy była stopniowo zastępowana przez szeroki komponent [43].

W eksperymencie stosunek amplitud wąskiej i szerokiej linii był wyraźnie większy dla nanocząstek n65b niż dla n53 (tabele 10 i 14). Przypomnijmy, że nanocząstki n65b miały mniejszą średnicę rdzenia ($\phi = 5\text{nm}$) niż n53 ($\phi = 8\text{-}12\text{ nm}$). Mniejsza średnica oznacza większy udział powierzchni w stosunku do objętości. Większy udział powierzchni korespondujący z wyraźniejszym udziałem wąskiej linii w widmie EPR zdaje się potwierdzać związek tego sygnału ze zjawiskami zachodzącymi na powierzchni cząstek.

Stosunkowo trudno jest natomiast jednoznacznie wyjaśnić większy udział wąskiej linii w widmach nanocząstek we krwi pełnej (oraz surowicy w przypadku próbki n65b) w porównaniu do nanocząstek w wodzie. Z literatury wiadomo jedynie, że amplituda wąskiej linii w widmie nanocząstek magnetytu spada wraz ze wzrostem ich koncentracji, dodatkowo komponent ten poszerza się przy wyższych stężeniach na skutek oddziaływań dipolowych oraz ewentualnej agregacji cząstek [24,172]. Badane w eksperymencie próbki ze względu na sposób przygotowania posiadały jednak takie samo stężenie nanocząstek w każdym z ośrodków (w granicach niepewności pomiarowych). Mimo to dla nanocząstek w wodzie wąska linia była minimalnie szersza, co może wskazywać na większą aglomerację cząstek. Z drugiej strony prawdopodobny jest większy wpływ ośrodka jakim jest krew czy surowica na interakcje z powierzchnią cząstek. Efekt ten należałoby też rozpatrywać w kategorii stosowanego pokrycia silan versus PEG. Poli(glikol etylenowy) znany jest z dobrej ochrony powierzchni cząstek, co również mogłoby tłumaczyć mniejszy udział wąskiej linii w przypadku cząstek n53.

Dla cząstek magnetytu znakowanych 4-amino-TEMPO widma EPR dostarczają nie tylko informacji o właściwościach rdzenia (szeroka linia), ale także o dynamice nitroksydu w badanym ośrodku. Samo dołączenie znacznika również wpływa na właściwości cząstek. Dla przykładu znakowane 4-amino-TEMPO nanocząstki n66b w temperaturze 230K posiadały szerszą linię od magnetytowych rdzeni w porównaniu z nanocząstkami n65b, które nie miały dołączonego znacznika (tabele 11 i 16). Warto dodać, że obie próbki wyjściowe rdzeni nanocząstek pochodziły z tej samej partii, różniły się tylko funkcjonalizacją powierzchni (n65b silan; n66b silan + 4-amino-TEMPO). Z kolei znakowane 4-amino-TEMPO cząstki n58 posiadały znacznie

węższą linię od rdzenia w porównaniu z cząstkami n66b (tabela 16 i rys. 55). Należy pamiętać, że sposób funkcjonalizacji powierzchni i przyłączenia znacznika różnił się dla obu próbek i zapewne we właściwościach powierzchniowych należy upatrywać przyczyn zaobserwowanych różnic. Temat ten wymaga jednak dalszych badań.

Widma EPR znacznika spinowego dołączonego do nanocząstek zarejestrowane dla próbek ciekłych mają postać trzech charakterystycznych linii (rys. 39-41, 52,53). Dla rodników nitroksylowych obserwujemy bowiem rozszczepienie nadsubtelne, wynikające z oddziaływania magnetycznego pomiędzy niesparowanym elektronem a spinem jądra azotu ^{14}N ($I=1$). Należy jednak zauważyć, że intensywności poszczególnych linii trypletu dla ciekłych próbek nanocząstek różnią się, co oznacza, że anizotropowe składowe tensorów \hat{A} i \hat{g} nie w pełni się uśredniały. Wprawdzie stosunki intensywności linii różnią w zależności od próbki i ośrodka, ale generalna tendencja jest taka, że składowa przy wysokim polu ma najniższą amplitudę, natomiast linia środkowa największą. Z literatury wiadomo, że widma EPR nitroksydów dołączonych do nanocząstek często posiadają zniekształconą linię przy wysokim polu ze względu na utrudnioną rotację i towarzyszący wzrost τ_R [12].

Aby uzyskać dokładniejszą informację o ruchu znacznika w eksperymencie wyznaczono bezwymiarowy parametr ε metodą Kuzniecowa (tabele 15,17,18). Dla znaczników dołączonych do cząstek n58 i n66b środkowa linia trypletu ma największą amplitudę, stad $\varepsilon > 0$. Dodatkowo wartości ε dla nanocząstek n66b są mniejsze niż dla cząstek n58. Możemy zatem wnioskować, że dynamika ruchu znacznika dla tych próbek jest inna na skutek odmiennego sposobu dołączenia nitroksydu do silanu na powierzchni nanocząstek. Przypomnijmy, że w przypadku próbki n66b do przyłączania znacznika zastosowano silan z inną grupą funkcyjną [(3-izocyjanopropylo)-trietoksysilan] (rys. 13). Wartości ε dla znaczników dołączonych do nanocząstek n58 i n66b różnią się również w porównaniu do rezultatów otrzymanych przez autora w przeszłości dla znakowanych spinowo nanocząstek pokrytych chitozanem. Wówczas amplitudy kolejnych linii trypletu malały, a współczynnik Kuzniecowa przyjmował ujemne wartości, co wskazywało, że znacznik najszybciej rotował wzdłuż osi prostopadłej do powierzchni nanocząstek [11]. Prawdopodobnie dla cząstek n66 i n58 ten kierunek rotacji nie jest już tak wyraźnie wyróżniony. Ponadto porównanie wartości ε dla nanocząstek w badanych ośrodkach wskazuje, że parametr ten przyjmuje mniejsze wartości dla nanocząstek we krwi i surowicy w porównaniu z cząstkami w wodzie (tabele 15 i 17). Obserwowane różnice odzwierciedlają zmiany w ruchliwości rotacyjnej znacznika. Dynamika ruchu znacznika dołączonego do nanocząstek różni się bowiem w zależności od ośrodka.

Widma nitroksydów zarejestrowane dla próbek ciekłych n66b i n58 w reżimie szybkiej rotacji pozwoliły na bezpośrednie oszacowanie wartości czasów korelacji rotacyjnej (tabele 15,17,18) na podstawie pomiarów intensywności poszczególnych pików. Generalnie można podsumować, że τ_R (w H_2O) < τ_R (w surowicy) < τ_R (we krwi). Czynnikiem istotnie wpływającym na obserwowane wartości czasów korelacji jest lepkość ośrodka, gdyż ośrodku lepkiem znacznik wolniej rotuje. Z danych literaturowych wiadomo, że lepkość krwi jest 3-4,7 razy większa niż lepkość wody destylowanej, przy czym jej wartość zależy nie tylko od

temperatury, ale też od liczby krwinek [98]. Zmniejszenie lepkości krwi obserwowane jest w niedokrwistości, natomiast zwiększenie w erytrocytozie. Lepkość osocza jest 1,9-2,3 razy większa od lepkości wody destylowanej. Lepkość surowicy przewyższa lepkość wody 1,7-2,1 krotnie, przy czym wartość ta zależy od liczby białek [98]. Wykonane pomiary EPR potwierdzają, że mikrolepkość otoczenia nanocząstek we krwi jest największa a w wodzie najmniejsza.

Porównanie widm znacznika spinowego dołączonego do nanocząstek n58 w świeżo przygotowanych próbkach z widmami zarejestrowanymi dla tych próbek po 8 dniach przechowywania w temperaturze pokojowej (rys. 49-53) wskazuje, że dla cząstek we krwi i w wodzie intensywność sygnału EPR od nitroksydu po 8 dniach znacznie zmalała, natomiast w surowicy sygnał ten przestał być widoczny (rys. 53). Przyczyny należy upatrywać w fakcie, że pod wpływem związków endogennych występujących we krwi i surowicy (np. kwasu askorbinowego czy glutationu) pochodne TEMPO łatwo ulegają redukcji, co objawia się zanikiem sygnału EPR [95]. Rodnik nitroksylowy redukuje się do odpowiadającego anionu aminoalkotlenku [72]. Z literatury wiadomo również, że zamknięcie nitroksydu w nanocząstkach znacznie wydłuża okres jego półtrwania we krwi w porównaniu z wolnym TEMPOem [95,96]. W eksperymencie dla próbek n58 tryplet od 4-amino-TEMPO we krwi widoczny był jeszcze po 8 dniach (rys. 52), zatem należy uznać, że pokryte silanem nanocząstki stanowiły pewnego rodzaju ochronę dla znacznika. Z drugiej strony warto pamiętać, że eksperyment odbywał się w warunkach in-vitro. W żywym organizmie trzeba by dodatkowo wziąć pod uwagę preferencyjny klirens nerkowy TEMPO.

W przypadku zamrożonych próbek n58, n64 i n66b nieregularny kształt sygnałów od 4-amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek wskazuje, że ruch znacznika jest silnie utrudniony (rys. 45,47,57,63). Takie widma są charakterystyczne dla tzw. reżimu wolnego ruchu (ang. *slow motion*). W pracy przeprowadzono symulacje widm znaczników zarejestrowanych w temperaturze 230K (dla cząstek n58 również 125K), posługując się programem EasySpin. Uwzględniono zarówno parametry związane z tensorami magnetycznymi, jak te odnoszące się do dynamiki. Wyznaczone na podstawie symulacji wartości czasu korelacji rotacyjnej dla temperatury 230K (dane na rys. 48, 61, 66) są rzędu 10^{-8} s. Dla porównania dla znaczników w ciekłych próbkach w reżimie szybkiej rotacji τ_R posiadały rząd wielkości 10^{-11} s, były zatem znacznie krótsze. Obniżanie temperatury od 230K do 125K spowodowało dalszy wzrost τ_R , ale w obrębie tego samego rzędu wielkości (rys. 61).

Symulacje widm zarejestrowanych w niskich temperaturach potwierdziły prawidłowość, że τ_R (we krwi) > τ_R (w surowicy) > τ_R (w H₂O), co obrazują dane przedstawione na rys. 48, 61, 66. Właściwości ośrodka wpływają zatem na dynamikę znacznika także w niskich temperaturach, gdy ruch molekularny jest częściowo zamrożony. Czas korelacji rotacyjnej w 230K różnicuje się ponadto w zależności od próbki. Przykładowo dla cząstek n64, dla których rodnik był dodatkowo chroniony powłoką z dekstranu jego ruch we krwi pełnej był bardziej ograniczony, o czym świadczy dłuższy τ_R w porównaniu z próbkami n58 i n66b w tym samym ośrodku.

W zależności od środowiska zmienia się też wartość szerokości linii otrzymana w rezultacie symulacji. W 230K ΔB najmniejszą wartość przyjmuje dla 4-amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek we krwi, większą, gdy ośrodkiem jest surowica, największą w przypadku roztworów wodnych. Należy jednak doprecyzować, że widmo znacznika 4-amino-TEMPO dla nanocząstek w wodzie symulowano jedynie dla próbki n64, gdyż w przypadku próbek n58 i n66b sygnał od rodnika nitroksylowego w 230K przyjmował dość nietypową formę pojedynczej linii, co można zobaczyć na rys. 43. Z literatury wiemy, że główną przyczyną poszerzenia widma rodnika nitroksylowego w niskich temperaturach, gdy jego ruchliwość jest utrudniona, są oddziaływania dipol-dipol między paramagnetycznymi cząsteczkami znacznika [84]. W publikacjach opisano też przypadki, gdy sygnał od dołączonego do nanocząstek rodnika nitroksylowego przyjmował postać pojedynczej szerokiej linii opisanej krzywą Voigt'a [12,78]. Takie widmo tłumaczy się uśrednianiem wielu linii EPR, zachodzącym w przypadku, gdy rodniki znajdują się blisko siebie przy powierzchni nanocząstek.

Pomiary temperaturowe pozwoliły zobrazować, jak zmienia się sygnał EPR od znacznika spinowego dołączonego do nanocząstek podczas podgrzewania próbki. Wyniki dla próbek n66b, n58 i n64, przedstawione kolejno na rysunkach 47, 58 i 63 pokazują, że wraz ze wzrostem temperatury stopniowo zwiększa się dynamika rotacji rodnika nitroksylowego. Analiza rysunków pozwala ponadto potwierdzić, że na ruch znacznika spinowego w danej temperaturze istotny wpływ mają także właściwości środowiska.

6 Wnioski końcowe:

Praca przedstawia wyniki badań superparamagnetycznych nanocząstek Fe_3O_4 w trzech ośrodkach: wodzie, surowicy i pełnej krwi ludzkiej. Metodą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego zbadano 5 typów nanocząstek z magnetytowym rdzeniem i różną funkcjonalizacją powierzchni: nanocząstki n53 pokryte polimerem na bazie poli(glikolu etylenowego) z dołączonym cytostatykiem doskorubicyną; nanocząstki n65b pokryte silanem; nanocząstki n58 pokryte silanem i znakowane spinowo 4-amino-TEMPO; nanocząstki n64 pokryte silanem, znakowane amino-TEMPO i stabilizowane dodatkową powłoką z dekstranu oraz nanocząstki n66b ze znacznikiem 4-amino-TEMPO dołączonym z wykorzystaniem silanu z inną grupą funkcyjną tj. (3-izocyjanopropylo)-trietoksysilanu. Przebadano także 13 próbek pełnej krwi ludzkiej i 13 odpowiadających próbek surowicy w celu identyfikacji występujących w nich centrów paramagnetycznych.

Najważniejsze wnioski płynące z analizy otrzymanych rezultatów przedstawiają się następująco:

- 1) We wszystkich próbkach pełnej krwi ludzkiej zbadanych przed dodaniem nanocząstek zidentyfikowano następujące centra paramagnetyczne: wysokospinowe trójwartościowe żelazo w methemoglobinie, wysokospinowe niehemowe żelazo w transferynie oraz jony Cu^{2+} w ceruloplazminie. Dla próbek surowicy występowały tylko sygnały EPR od Fe^{3+} w transferynie i paramagnetycznej miedzi w ceruloplazminie.
- 2) Sygnał EPR od rdzeni superparamagnetycznych nanocząstek Fe_3O_4 w wodzie, surowicy i krwi pełnej ma postać szerokiej linii, której parametry silnie zależą od temperatury (linia poszerza się i przesuwają w stronę mniejszych pól rezonansowych a jej amplituda maleje, gdy próbka jest ochładzana). W niskich temperaturach wzrasta udział pól wewnętrznych, które mają związek nie tylko z objętościową anizotropią magnetokrystaliczną, ale również z nieuporządkowaniem spinów na powierzchni rdzenia nanocząstek.
- 3) Parametry szerokiej linii EPR od magnetytowych rdzeni nanocząstek różnią się w zależności od rozmiarów tych rdzeni, ale istotną rolę odgrywa też funkcjonalizacja ich powierzchni.
- 4) Wartości współczynnika g wyznaczone dla szerokiej linii od magnetytowych rdzeni nanocząstek zależą również od ośrodka, w jakim znajdują się nanocząstki, co może wskazywać na różny stopień interakcji powierzchni nanocząstek ze środowiskiem: wodą, surowicą albo pełną krwią ludzką.
- 5) Różnica w wartościach pól rezonansowych obserwowanych dla orientacji próbki 0° i 90° po zastosowaniu procedury *field cooling* pozwoliła wyznaczyć pole anizotropii oraz efektywne stałe anizotropii dla nanocząstek w badanych ośrodkach.
- 6) Zastosowanie metody komputerowego zwiększania rozdzielczości sygnałowej (CREM) pozwoliło wyodrębnić z sygnału EPR od magnetytowych rdzeni nanocząstek n53 i n65b wąską linię z $g = 1,99$. Udział tej linii w widmie EPR zależy od wielkości i funkcjonalizacji nanocząstek a także ośrodka w jakim się znajdują. Pochodzenie wąskiej linii najprawdopodobniej ma związek z zewnętrzną warstwą rdzenia i defektami strukturalnymi związanymi z obecnością jonów Fe^{3+} na skutek utleniania powierzchni.

- 7) Dynamika ruchu znacznika spinowego 4-amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek różni się w zależności od środowiska w jakim się one znajdują. Czas korelacji rotacyjnej przyjmuje największe wartości dla znacznika przyłączonego do nanocząstek znajdujących się we krwi, mniejsze dla cząstek w surowicy a najmniejsze, gdy ośrodkiem jest woda destylowana. Czynniki istotnie wpływającymi na obserwowane wartości czasów korelacji rotacyjnej są: temperatura oraz lepkość ośrodka.
- 8) Sposób dołączenia rodnika nitroksylowego do powierzchni nanocząstek również znajduje odzwierciedlenie w anizotropii jego ruchu. Przyłączenie znacznika 4-amino-TEMPO do powierzchni nanocząstek za pomocą silanów z różnymi grupami funkcyjnymi zmienia dynamikę jego ruchu, co wpływa na oddziaływania nanocząstek z środowiskiem.
- 9) Dla próbek przechowywanych w temperaturze pokojowej sygnał EPR od znacznika spinowego 4-amino-TEMPO dołączonego do nanocząstek znajdujących się w surowicy i pełnej krwi ludzkiej zanika szybciej niż w przypadku znacznika w wodzie. Przyczyną jest redukcja rodnika nitroksylowego zachodząca pod wpływem związków endogennych występujących we krwi i surowicy.

7 Bibliografia:

- [1] C. Tassa, S.Y. Shaw, R. Weissleder, Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles: A Versatile Platform for Targeted Molecular Imaging, Molecular Diagnostics and Therapy, *Accounts of Chemical Research* 44(10) (2011), 842-852.
- [2] A. Coene, G. Crevecoeur, L. Dupré, Magnetic nanoparticle imaging using multiple electron paramagnetic resonance activation sequences, *Journal of Applied Physics* 117 (2015), 17D105.
- [3] H. Xu, Z.P. Aguilar, L. Yang, M. Kuang, H. Duan, Y. Xiong, H. Wei, A. Wang, Antibody conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for cancer cell separation in fresh whole blood, *Biomaterials* 32 (2011), 9758-9765.
- [4] Wahajuddin, S. Arora, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers, *International Journal of Nanomedicine* 7 (2012), 3445-3471.
- [5] A. Nacev, C. Beni, O. Bruno, B. Shapiro, Magnetic nanoparticle transport within flowing blood and into surrounding tissue, *Nanomedicine* 5(9) (2010), 1459-1466.
- [6] T. Kubiak, Wykorzystanie pokryć z poli(glikolu etylenowego) i chitozanu do zapewnienia biokompatybilności nanocząstkom w aplikacjach biomedycznych, *Polimery w Medycynie* 44(2) 2014, 119-127.
- [7] O. Mykhaylyk, A. Cherchenko, A. Ilkin, N. Dudchenko, V. Ruditsa, M. Novoseletz, Yu. Zozulya, Glial brain tumor targeting of magnetite nanoparticles in rats, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 225 (2001), 241-247.
- [8] O. Mykhaylyk, N. Dudchenko, A. Dudchenko, Doxorubicin magnetic conjugate targeting upon intravenous injection into mice: High gradient magnetic field inhibits the clearance of nanoparticles from the blood, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293 (2005), 473-482.
- [9] B. Dobosz, R. Krzyminiewski, M. Koralewski, M. Hałupka-Bryl, Computer enhancement of ESR spectra of magnetite nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 40 (2016), 114-121.
- [10] Y. Köseoglu, F. Yildiz, D.K. Kim, M. Muhammed, B. Aktas, EPR studies on Na-oleate coated Fe₃O₄ nanoparticles, *Physica Status Solidi (c)* 1 (2004), 3511-3515.
- [11] R. Krzyminiewski, T. Kubiak, B. Dobosz, G. Schroeder, J. Kurczewska, EPR spectroscopy and imaging of TEMPO-labeled magnetite nanoparticles, *Current Applied Physics*, 14(5), 2014, 798-804.
- [12] V. Chechik, H.J. Wellsted, A. Korte, B. C. Gilbert, H. Caldararu, P. Ionita, A. Caragheorgheopol, Spin-labelled Au nanoparticles, *Faraday Discussions* 125 (2004), 279-291.
- [13] Henryk Rawa, Pole magnetyczne w ferromagnetykach [w:] Elektryczność i magnetyzm w technice, PWN, Warszawa 2001, s. 300-333.
- [14] J. Stankowski, W. Hilczer, Wstęp do spektroskopii rezonansów magnetycznych, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.

- [15] M. J. N. Junk, *Electron Paramagnetic Resonance Theory [w:] Assessing the Functional Structure of Molecular Transporters by EPR Spectroscopy*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2012, 7-52.
- [16] R. Kirmse, J. Stach, *Spektroskopia EPR. Zastosowania w chemii*, Uniwersytet Jagielloński, Kraków 1994.
- [17] C. Mailer, H. M. Swartz, M. Konieczny, S. Ambegaonkar, V.L. Moore, Identity of the Paramagnetic Element Found in Increased Concentrations in Plasma of Cancer Patients and Its Relationship to Other Pathological Processes, *Cancer Research* 34 (1974), 637-642.
- [18] J. S. Hwang, G.A. Oweimreen, Relating Static Shifts in the ESR Spectra of a Nitroxide Radical in Solution to Second Order Perturbation Theory, *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 30(6) (2007), 349-357.
- [19] *Elektronowy rezonans paramagnetyczny [w:] Fizyka Chemiczna. Dynamika molekuł na tle różnych metod badawczych*, pod red. J.M. Janik, PWN, Warszawa 1989 r. , s. 353-358.
- [20] W. Wu, Q. He, C. Jiang, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies, *Nanoscale Research Letters* 3 (2008), 397-415.
- [21] Yu. A. Koksharov, S. P. Gubin, I. D. Kosobudsky, M. Beltran, Y. Khodorkovsky, A. M. Tishin, Low temperature electron paramagnetic resonance anomalies in Fe-based nanoparticles, *Journal of Applied Physics* 88 (2000), 1587.
- [22] H. Fischer, J. Luster, A. U. Gehring, EPR evidence for maghemitization of magnetite in a tropical soil, *Geophysical Journal International* 169 (2007), 909-916.
- [23] F. Gazeau, J.C. Bacri, F. Gendron, R. Perzynski, Y.L. Raikher, V.I. Stepanov, E. Dubois, Magnetic resonance of ferrite nanoparticles: evidence of surface effects, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 186 (1998) 175-187.
- [24] G. Vázquez-Victorio, U. Acevedo-Salas, R. Valenzuela, Microwave Absorption in Nanostructured Spinel Ferrites [w:] *Ferromagnetic Resonance - Theory and Applications* pod red. O. Yalcina, InTech, Rijeka, 2013, s.169-194.
- [25] A. Shrifian-Esfahni, M. Taghi Salehi, M. Nasr-Esfahni, E. Ekramian, Superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza modyfikowane chitozanem: projektowanie, wytwarzanie, opis i działanie przeciwbakteryjne, *Chemik* 69 (2015), 19-32.
- [26] K. H. Hsu, J. H. Wu, Y. Y. Huang, L. Y. Wang, H. Y. Lee, J. G. Lin, Critical size effects on the magnetic resonance in Fe₃O₄ nanoparticles, *Journal of Applied Physics* 97 (2005), 114322.
- [27] Y. Flores-Arias, G. Vazquez-Victorio, R. Ortega-Zempoalteca, U. Acevedo-Salas, S. Ammar, Raul Valenzuela, Magnetic phase transitions in ferrite nanoparticles characterized by electron spin resonance, *Journal of Applied Physics* 117 (2015), 17A503.
- [28] R. Berger, J.C. Bissey, J. Kliava, H. Daubric, C. Estournes, Temperature dependence of superparamagnetic resonance of iron oxide nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 234 (2001), 535-544.

- [29] T. Ozkaya, M. S. Toprak, A. Baykala, H. Kavas, Y. Köseoğlu, B. Aktaş, Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles at 100°C and its magnetic characterization, *Journal of Alloys and Compounds* 472 (2009), 18-23.
- [30] J. Stankowski, W. Kempinski, S. Łoś, W. Bednarski, S. Wapłak, R. Micnas, Two paramagnetic iron states at the Verwey phase transition in magnetite, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 301 (2006), 88-93.
- [31] P. Piekarz, K. Parlinski, A. M. Oleś, Origin of the Verwey transition in magnetite: Group theory, electronic structure, and lattice dynamics study, *Physical Review B* 76 (2007), 165124.
- [32] L. Radu, D. Caruntu, M. White, J. Wiley, C.J. O'Connor, P. Hanson, Ligand dependent changes in the SPR of magnetic nanoparticles, *NSTI-Nanotech 2* (2006), 279-282.
- [33] S. Klotz, G. Steinle-Neumann, Th. Strässle, J. Philippe, Th. Hansen, M. J. Wenzel, Magnetism and the Verwey transition in Fe₃O₄ under pressure, *Physical Review B* 77 (2008), 012411.
- [34] O. Rahman, S.C. Mohapatra, S. Ahmad, Fe₃O₄ inverse spinal super paramagnetic nanoparticles, *Materials Chemistry and Physics* 132 (2012), 196-202.
- [35] H. Zhao, Z. Zhang, Z. Zhao, R. Yu, Y. Wan, M. Lan, Preparation and characterization of novel spin labeled magnetic nanoparticles, *Advanced Materials Letters* 2(3) (2011), 172-175.
- [36] T. Knopp, T. M. Buzug, Magnetic particle imaging. An Introduction to Imaging Principles and Scanner Instrumentation, Springer, Berlin Heidelberg 2012, s. 11-25.
- [37] K. Parekh, R. V. Upadhyay, Static and dynamic magnetic properties of monodispersed Mn_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ nanomagnetic particles, *Journal of Applied Physics* 107 (2010), 053907.
- [38] R.W. Chantrell, E.P. Wohlfarth, Dynamic and static properties of interacting fine ferromagnetic particles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 40 (1983), 1-11.
- [39] A.E. Berkowitz, K. Takano, Exchange anisotropy - a review, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 200 (1999), 552-570.
- [40] R. Aragón, Cubic magnetic anisotropy of nonstoichiometric magnetite, *Physical Review B* 46(9) (1992), 5334-38.
- [41] V.K. Sharma, F. Waldner, Superparamagnetic and ferrimagnetic resonance of ultrafine Fe₃O₄ particles in ferrofluids, *Journal of Applied Physics* 48 (1977), 4298.
- [42] M.I Shliomis, V.I Stepanov, Theory of the dynamic susceptibility of magnetic fluids [w:] *Advances in Chemical Physics*, tom 87: Relaxation Phenomena in Condensed Matter, pod red. W. T. Coffey, John Wiley & Sons, New York, 1994, s. 1-31.
- [43] J. Kliava, R. Berger, Size and shape distribution of magnetic nanoparticles in disordered systems: computer simulations of superparamagnetic resonance spectra, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 205 (1999), 328-342.
- [44] L.C. Figueiredo, B.M. Lacava, K. Skeff Neto, F. Pelegrini, P.C. Morais, Magnetic resonance study of maghemite-based magnetic fluid, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 320 (2008), e347-e350.

- [45] H. Kura, T. Ogawa, R. Tate, K. Hata, M. Takahashi, Size effect of Fe nanoparticles on the high-frequency dynamics of highly dense selforganized assemblies, *Journal of Applied Physics* 111(2012), 07B517.
- [46] S. Naahidi, M. Jafari, F. Edalat, K. Raymond, A. Khademhosseini, P. Chen, Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery, *Journal of Controlled Release* 166 (2013), 182-194.
- [47] S. Rodrigues, M. Dionisio, C.R López, A. Grenha, Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery, *Journal of Functional Biomaterials* 3(2012), 615-641.
- [48] G. Sahay G., D.Y Alakhova, A.V Kabanov, Endocytosis of nanomedicines, *Journal of Controlled Release* 145 (2010), 182-195.
- [49] M. Huang, E. Khor, L.Y Lim, Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation, *Pharmaceutical Research* 21(2004), 344 -353.
- [50] M. Zhang, X.H Li, Y.D Gong, N.M Zhao, X.F Zhang, Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG, *Biomaterials* 23 (2002), 2641-2648.
- [51] N.G.M. Schipper, K.M Varum, P. Artursson, Chitosans as Absorption Enhancers for Poorly Absorbable Drugs 1: Influence of Molecular Weight and Degree of Acetylation on Drug Transport Across Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells, *Pharmaceutical Research* 13 (1996), 1686-1692.
- [52] G. Molinaro, J.C Leroux, J. Damas, A. Adam, Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels an in vivo experimental approach to injectable biomaterials, *Biomaterials* 23 (2002), 2717-2722.
- [53] S.F. Shi, J.F. Jia, X.K. Guo, Y.P. Zhao, D.S. Chen, Y.Y. Guo, T. Cheng, X.L. Zhang, Biocompatibility of chitosan-coated iron oxide nanoparticles with osteoblast cells, *International Journal of Nanomedicine* 7 (2012), 5593-5602.
- [54] S. Shukla, A. Jadaun, V. Arora, R. K. Sinha, N. Biyani, V.K. Jain, In vitro toxicity assessment of chitosan oligosaccharidecoated iron oxide nanoparticles, *Toxicology Reports* 2 (2015), 27-39.
- [55] T. Henning, Polyethylene glycols (PEGs) and the pharmaceutical industry, *PharmaChem* 1 (2002), 57-59.
- [56] Y. Zhang, N. Kohler, M. Zhang, Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake, *Biomaterials* 23 (2002), 1553-1561.
- [57] J.Y. Park, P. Daksha, G.H. Lee, S. Woo, Y. Chang, Highly water-dispersible PEG surface modified ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles useful for target-specific biomedical applications, *Nanotechnology* 19 (2008), 365-603.
- [58] K. Park, To PEGylate or not to PEGylate, that is not the question. *Journal of Controlled Release* 142 (2010), 147-148.
- [59] H. Chen, H. Paholak, M. Ito, K. Sansanaphongpricha, W. Qian, Y. Che, D. Sun, Living PEGylation on gold nanoparticles to optimize cancer cell uptake by controlling targeting ligand and charge densities, *Nanotechnology* 24 (2013), 355101.

- [60] N.A. Alcantar, E.S. Aydil, J.N. Israelachvili, Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces, *Journal of Biomedical Materials Research* 51 (2000), 343-351.
- [61] M. Khalkhali, S. Sadighian, K. Rostamizadeh, F. Khoeni, M. Naghibi, N. Bayat, M. Habibizadeh, M. Hamidi, Synthesis and characterization of dextran coated magnetite nanoparticles for diagnostics and therapy, *BioImpacts* 5(3) 2015, 141-150.
- [62] E.A Osborne, T.M Atkins, D.A Gilbert, S.M Kauzlarich, K. Liu, A.Y. Louie, Rapid microwave-assisted synthesis of dextran-coated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging, *Nanotechnology* 23 (2012), 215602.
- [63] L. Santiago-Rodríguez, M.M. Lafontaine, C. Castro, J. Méndez-Vega, M. Latorre-Esteves, E. J. Juan, E. Mora, M. Torres-Lugo, C. Rinaldi, Synthesis, stability, cellular uptake and blood circulation time of carboxymethyl-inulin coated magnetic nanoparticles, *Journal of Materials Chemistry B* 1 (2013), 2807-2817.
- [64] K. Schneider, J. Przewoźnik, J. Żukrowski, M. Sikora, C. Kapusta, D. Zając, M. Rękas, A. Świerczyna, A. Urbanik, Nowe nanomateriały magnetyczne do zastosowań w MRI, *Polish Journal of Radiology* 75(1) (2010), 1-5.
- [65] Liu X, Ma Z, Xing J, Liu H: Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 270 (2004), 1-6.
- [66] T.S. Anirudhan, P.L. Divya, J. Nima, Synthesis and characterization of silane coated magnetic nanoparticles/glycidylmethacrylate-grafted-maleated cyclodextrin composite hydrogel as a drug carrier for the controlled delivery of 5-fluorouracil, *Materials Science and Engineering C* 55 (2015), 471-481.
- [67] F. Sulek, M. Drogenik, M. Habulin, Z. Knez, Surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles for covalent attachment of cholesterol oxidase, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 322 (2010), 179-185.
- [68] A. Krysztafkiewicz, B. Rager, M. Maik, Wpływ modyfikacji powierzchni na właściwości fizykochemiczne krzemionki strącanej, *Fizykochemiczne Problemy Mineralurgii* 28 (1994), 177-186.
- [69] K.C de Souza, G.F Andrade, I Vasconcelos, I.M de Oliveira Viana, C Fernandes, E.M de Sousa, Magnetic solid-phase extraction based on mesoporous silica-coated magnetic nanoparticles for analysis of oral antidiabetic drugs in human plasma, *Materials Science and Engineering C* 40 (2014), 275-280.
- [70] S. Kempe, H. Metz, K. Mäder, Application of Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy and imaging in drug delivery research - Chances and challenges, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 74 (2010) 55-66.
- [71] A.L. Kovarski, O. N. Sorokina, Study of local magnetic fields and magnetic ordering in fluid and solid matrices containing magnetite nanoparticles using TEMPOL stable radical, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311 (2007), 155-161.
- [72] L. Tebben, A. Studer, Nitroxides: Applications in Synthesis and in Polymer Chemistry, *Angewandte Chemie International Edition* 50 (2011) , 5034- 5068.

- [73] TEMPO Derivatives, <http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemistry-products.html?TablePage=16280169>, dostęp z 30 III 2016.
- [74] D.E. Budil, S. Lee, S. Saxena, J.H. Freed, Nonlinear-Least-Squares Analysis of Slow-Motion EPR Spectra in One and Two Dimensions Using a Modified Levenberg-Marquardt Algorithm, *Journal of Magnetic Resonance A* 120 (1996), 155-189.
- [75] M. Tudose, T. Constantinescu, A. T. Balaban, P. Ionita, Synthesis and electron paramagnetic resonance study of a nitroxide free radical covalently bonded on aminopropyl-silica gel, *Applied Surface Science*, 254 (2008), 1904-1908.
- [76] J.P. Klare, H.J Steinhoff, Spin labeling EPR, *Photosynthesis Research* 102 (2009), 377-390.
- [77] P.C. Morais, A. Alonso, O. Silva, N. Buske, Electron paramagnetic resonance of nitroxide-doped magnetic fluids, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 252 (2002), 53-55.
- [78] V. Lloveras, E. Badetti, V. Chechik, J. Vidal-Gancedo, Magnetic Interactions in Spin-Labeled Au Nanoparticles, *Journal of Physical Chemistry C* 118 (2014) , 21622-21629.
- [79] A.V. Hubina, A.A. Pogodaev, V.V. Sharoyko, E.G. Vlakh, T.B. Tennikova, Self-assembled spin-labeled nanoparticles based on poly(amino acids), *Reactive and Functional Polymers* 100 (2016), 173-180.
- [80] A.M Wasserman, Spin probes in micelles, *Russian Chemical Reviews* 63 (5) (1994), 373-382.
- [81] B. Dobosz, R. Krzyminiewski, G. Schroeder, J. Kurczewska, Electron paramagnetic resonance as an effective method for a characterization of functionalized iron oxide, *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 75 (2014), 594-598.
- [82] D.D. Thomas, Rotational diffusion of membrane proteins [w:] *Techniques for the analysis of membrane proteins*, pod. red. C. I. Ragan and R. J. Cherry, Chapman and Hall, Londyn 1988, s. 377-431.
- [83] N.P. Benetis, Dynamical effects in CW and pulsed EPR [w:] *EPR of Free Radicals in Solids* pod red. A Lund i M. Shiotani, Springer Science+Business Media 2003, Dordrecht, s. 95-152.
- [84] A.K. Vorobiev, N.A. Chumakova, Simulation of Rigid-Limit and Slow-Motion EPR Spectra for Extraction of Quantitative Dynamic and Orientational Information [w:] *Nitroxides -Theory, Experiment and Applications* pod red. A. I. Kokorina, Intech, s. 57-112.
- [85] H.J. Steinhoff, A simple method for determination of rotational correlation times and separation of rotational and polarity effects from EPR spectra of spin-labeled biomolecules in a wide correlation time range, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 17(4) (1988), 237-247.
- [86] S.F. Oppenheim a, G.R. Buettner b, V.G.J. Rodgers, Relationship of rotational correlation time from EPR spectroscopy and protein-membrane interaction, *Journal of Membrane Science* 118 (1996), 133-139.
- [87] S. Lüsse, K. Arnold, Water Binding of Polysaccharides NMR and ESR Studies, *Macromolecules* 31 (1998), 6891-6897.

- [88] A. N. Kuznetsov, *Metoda sondy spinowej (Метод спинового зонда)*, Nauka, Moskwa, 1976, p. 54.
- [89] D. Marsh, *Experimental Methods in Spin-Label Spectral Analysis [w:] Biological Magnetic Resonance tom 8, Spin Labeling Theory and Applications*, pod red. L. J. Berliner i J. Reuben, Plenum Press, New York, 255-298.
- [90] R.T. Weber, *WIN-EPR SimFonia manual*, Bruker Instruments, Billerica, 1995.
- [91] S. Stoll, A. Schweiger, *Easy spin: simulating cw ESR spectra*, [w:] *Biological magnetic resonance*, tom 27: *ESR spectroscopy in membrane biophysics*, pod red. M.A Hemminga, L.J Berliner, Springer, Nowy Jork (2007), s. 299-321.
- [92] R.P. Mason, J.H. Freed, *Estimating Microsecond Rotational Correlation Times from Lifetime Broadening of nitroxide Electron Spin Resonance Spectra Near the Rigid Limit*, *The Journal of Physical Chemistry* 78(13) (1974), 1321-1323.
- [93] S. A. Goldman, G. V. Bruno, J. H. Freed, *Estimating Slow-Motional Rotational Correlation Times for Nitroxides by Electron Spin Resonance*, *The Journal of Physical Chemistry* 76(15) (1972), 1858-1860.
- [94] A. Samuni, S. Goldstein, A. Russo, J. B. Mitchell, M. C. Krishna, P. Neta, *Kinetics and Mechanism of Hydroxyl Radical and OH-Adduct Radical Reactions with Nitroxides and with Their Hydroxylamines*, *Journal of the American Chemical Society* 124 (2002), 8719-8724.
- [95] M. Shimizu, T. Yoshitomi, Y. Nagasaki, *The behavior of ROS-scavenging nanoparticles in blood*, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 54(3) (2014), 166-173.
- [96] T. Yoshitomi, R. Suzuki, T. Mamiya, H. Matsui, A. Hirayama, Y. Nagasaki, *pH-Sensitive Radical-Containing-Nanoparticle (RNP) for the L-Band-EPR Imaging of Low pH Circumstances*, *Bioconjugate Chemistry* 20 (2009), 1792-1798.
- [97] A. Michajlik, W. Ramotowski, *Krew*, w: *Anatomia i fizjologia człowieka*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2007, s. 435- 460.
- [98] *Fizjologia krwi. Wybrane zagadnienia* pod red. Z. Dąbrowskiego, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998, s. 13-20, 114-143.
- [99] B.D Hames, N.M Hooper, *Aminokwasy i białka [w:] Biochemia. Krótkie wykłady*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007, s. 23-74.
- [100] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Strategie regulacyjne: enzymy i hemoglobina [w:] Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007, s. 269- 274.
- [101] M. Polakovs, N. Mironova-Ulmane, A. Pavlenko, A. Aboltins, *Determination of methemoglobin in human blood after ionising radiation by EPR*, *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 77 (2015), 012028.
- [102] *Coordination Compounds in Biological Systems [w:] Physical Chemistry for the Biosciences* pod red. Raymond Chang, Sausalito, California USA, 2005, s.477-480.
- [103] Y.S. Hamirani, W. Franklin, R.G Grifka, R.F. Stainback, *Methemoglobinemia in a Young Man*, *Texas Heart Institute Journal* 35(1) (2008), 76-77.

- [104] J. Dunne, A. Caron, Ascorbate removes key precursors to oxidative damage by cell- free haemoglobin in vitro and in vivo, *Biochemical Journal* 399 (2006), 513- 524.
- [105] D.A. Svistunenko, J. Dunne M. Fryer , P. Nicholls, B.J. Reeder, M.T Wilson, M.G Bigotti, F. Cutruzzolà, C.E. Cooper, Comparative Study of Tyrosine Radicals in Hemoglobin and Myoglobins Treated with Hydrogen Peroxide, *Biophysical Journal* 83 (2002), 2845- 2855.
- [106] M.K. Pulatova, V.L. Sharygin, T.G. Shlyakova, A. E. Sipyagina, A.M. Wasserman, Use of EPR Spectroscopy to Check the Changes in Organism Radioresistance. Clinical Results, *Biophysics* 54(2) (2009), 223- 231.
- [107] J. Parkkinen, O. Vääränen, E. Vahtera, Plasma ascorbate protects coagulation factors against photooxidation, *Thrombosis and Haemostasis* 75(2) (1996), 292-297.
- [108] A. Raszeja-Specht, J. Golański, Postępowanie przedanalizyczne w laboratoryjnej diagnostyce zaburzeń hemostazy, *Diagnostyka laboratoryjna* 50(1) (2014), 65-70.
- [109] P.T. Gomme, K.B. McCann, Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions, *Drug Discovery Today* 10(4) (2005), 267- 73.
- [110] T Kubiak, Rola transferyny w przeciwdziałaniu stresowi oksydacyjnemu indukowanemu wolnym żelazem w organizmie i jej potencjalne związki z rozwojem nowotworów, *Kosmos* 62(4) (2013), 501-505.
- [111] T Kubiak, Związki metabolizmu żelaza z rozwojem raka piersi u kobiet przed i po menopauzie, *Przegląd Menopauzalny (Menopause Review)* 17(4) (2013), 339- 342.
- [112] T.E. Adams, A.B. Mason, Q.Y. He, P.J Halbrooks, S.K Briggs, V.C Smith, R.T MacGillivray, S.J Everse, The Position of Arginine 124 Controls the Rate of Iron Release from the N- lobe of Human Serum Transferrin, *The Journal of Biological Chemistry*, 278(8) (2003), 6027- 6033.
- [113] T. Sakajiri, H. Yajima, T. Yamamura, Density Functional Theory Study on Metal-Binding Energies for Human Serum Transferrin-Metal Complexes, *ISRN Biophysics*, (2012), 124803.
- [114] R. Krzyminiewski, Z. Kruczyński, B. Dobosz, A. Zając, A. Mackiewicz, E. Leporowska, S. Folwaczna, EPR Study of Iron Ion Complexes in Human Blood, *Applied Magnetic Resonance* 40 (2011), 321- 330.
- [115] T. Kubiak, R. Krzyminiewski, B. Dobosz, EPR Study of Paramagnetic Centers in Human Blood, *Current Topics in Biophysics*, 36, (2013), 7-13.
- [116] Y. Hirota, M. Haida, F. Mohtarami, K. Takeda, T. Iwamoto, S. Shioya, C Tsuji, K Hasumi, H Nakazawa., Implication of ESR signals from ceruloplasmin (Cu^{2+}) and transferrin (Fe^{3+}) in pleural effusion of lung diseases, *Pathophysiology* 7, (2000), 41- 45.
- [117] A. Yang, B. J. Gaffney, Determination of relative spin concentration in some high- spin ferric proteins using E/D- distribution in electron paramagnetic resonance simulations, *Biophysical Journal* 51(1987), 55- 67.
- [118] B. Gaffney, B. Maguire, R. T. Weber, G. G. Maresch, Disorder at Metal Sites in Proteins: a High Frequency EMR Study, *Applied Magnetic Resonance* 16 (1999), 207- 221.

- [119] J. Healy, K. Tipton, Ceruloplasmin and what it might do, *Journal of Neural Transmission* 114 (2007), 777- 781.
- [120] I. Zaitseva, V. Zaitsev, G. Card, K. Moshkov, B. Bax, A. Ralph, P. Lindley, The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: nature of the copper centres, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 1 (1996), 15- 23.
- [121] I. Bento, C. Peixoto, V.N Zaitsev, P.F Lindley, Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation- binding sites, *Acta Crystallographica D* 63 (2007), 240- 248.
- [122] F. Kouoh Elombo, M. Radosevich, M. Poulle, J. Descamps, S. Chtourou, T. Burnouf, J.P. Catteau, J.L Bernier, N. Cotelle, Purification of human ceruloplasmin as a by- product of C1-inhibitor, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 23(12) (2000), 1406-1409.
- [123] G. Musci, M.C. Bonaccorsi di Patti, L. Calabrese, The state of the copper sites in human ceruloplasmin, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 306(1) (1993), 111-118.
- [124] J.Torres, M. T. Wilson, The reactions of copper proteins with nitric oxide, *Biochimica et Biophysica Acta* 1411 (1999), 310-322.
- [125] A. Senra Varela, J. J. Bosco Lopez Saez, D. Quintela Senra, Serum ceruloplasmin as a diagnostic marker of cancer, *Cancer Letters* 121 (1997), 139- 145.
- [126] M.A. Foster, T. Pocklington, J.D.B. Miller, J. R. Mallard, A study of electron spin resonance spectra of whole blood from normal and tumour bearing patients, *British Journal of Cancer* 28 (1973), 340- 348.
- [127] Ö. Özyilkan, E. Baltali, E. Özyilkan, G. Tekuzman, A. Kars, D. Firat, Ceruloplasmin level in women with breast disease, *Acta Oncologica* 31(8) (1992), 843- 846.
- [128] L. Gille, M. Kleiter, M. Willmann, H. Nohl, Paramagnetic species in the plasma of dogs with lymphoma prior to and after treatment with doxorubicin. An ESR study, *Biochemical Pharmacology* 64(12) (2002), 1737-1744.
- [129] X. Xu, H. L. Persson, D. R. Richardson, Molecular Pharmacology of the Interaction of Anthracyclines with Iron, *Molecular Pharmacology* 68(2) 2005, 261-271.
- [130] E.A. Preoteasa, G. Schianchi, D. Camillo Giori, O.G Dului, A. Butturini, G. Izzi, Unexpected Detection of Low- and High-Spin Ferrihemoglobin Derivatives in Blood Serum of Polytransfused Patients with Homozygous - Thalassemia under Chelation Therapy. An EPR Study, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 8(2) (2013), 469-499.
- [131] M. Mahmoudi, M.A. Shokrgozar, S. Sardari, M.K. Moghadam, H. Vali, S. Laurent, P.Stroeve, Irreversible changes in protein conformation due to interaction with superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Nanoscale* 3 (2011) , 1127-1138.
- [132] L. Lartigue, C. Wilhelm, J. Servais, C. Factor, A. Dencausse, J.C Bacri, N. Luciani, F. Gazeau, Nanomagnetic Sensing of Blood Plasma Protein Interactions with Iron Oxide Nanoparticles: Impact on Macrophage Uptake, *ACS Nano* 6(3) 2012, 2665-2678.
- [133] B. Díaz, C. Sánchez-Espinel, M. Arruebo, J. Faro, E. de Miguel, S. Magadán, C. Yagüe, R. Fernández-Pacheco, M.R Ibarra, J. Santamaría, A. González-Fernández, Assessing

- Methods for Blood Cell Cytotoxic Responses to Inorganic Nanoparticles and Nanoparticle Aggregates, *Small* 4(11) (2008), 2025-2034.
- [134] B.T Pham, N. Jain, P.W. Kuchel, B.E. Chapman, S.A. Bickley, S.K. Jones, B.S.Hawkett, The interaction of sterically stabilized magnetic nanoparticles with fresh human red blood cells, *International Journal of Nanomedicine* 10 (2015), 6645-6655.
- [135] A.V. Bychkova, O.N. Sorokina, A.L. Kovarskii, V.B. Leonova, M.A. Rozenfel'd, Interaction between Blood Plasma Proteins and Magnetite Nanoparticles, *Colloid Journal* 72(5) (2010), 696-702.
- [136] A. Nemmar, S. Beegam, P. Yuvaraju, J. Yasin, S. Tariq, S. Attoub, B. H. Ali, Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles acutely promote thrombosis and cardiac oxidative stress and DNA damage in mice, *Particle and Fibre Toxicology* 13(1) (2016), 22.
- [137] S.R. Saptarshi, A. Duschl, A.L. Lopata, Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle, *Journal of Nanobiotechnology* 11 (2013), 26.
- [138] M. Jansch, P. Stumpf, C. Graf, E. Rühl, R.H. Müller, Adsorption kinetics of plasma proteins on ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics* 428 (2012), 125- 133.
- [139] U. Sakulku, M. Mahmoudi, L. Maurizi, J. Salaklang, H. Hofmann, Protein Corona Composition of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Various Physico-Chemical Properties and Coatings, *Scientific Reports* 4 (2014), 5020.
- [140] M. Hałupka-Bryl, K. Asai, S. Thangavel, M. Bednarowicz, R. Krzyminiewski, Y. Nagasaki, Synthesis and in vitro and in vivo evaluations of poly(ethylene glycol)-block-poly(4-vinylbenzylphosphonate) magnetic nanoparticles containing doxorubicin as a potential targeted drug delivery system, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 118 (2014), 140-147.
- [141] M. Hałupka-Bryl, M. Bednarowicz, B. Dobosz, R. Krzyminiewski, T. Zalewski, B. Wereszczyńska, G. Nowaczyk, M. Jarek, Y. Nagasaki, Doxorubicin loaded PEG-b-poly(4-vinylbenzylphosphonate) coated magnetic iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 384 (2015), 320-327.
- [142] S. Pawelski, Normy hematologiczne [w:] Choroby wewnętrzne pod. red. A. Wojtczaka, PZWL, Warszawa 1995, s. 506-518.
- [143] R.T. Weber, J.J Jiang, D. P. Barr, EMX user's manual, Bruker Instruments, Billerica, 1998.
- [144] H. Szydlowski, Pomiary fizyczne i ich niepewności, [w:] Pracownia Fizyczna, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1994.
- [145] W. Salejda, R Poprawski, Podstawy analizy niepewności pomiarowych w studenckim laboratorium podstaw fizyki, Politechnika Wroclawska, Wrocław, 2009.
- [146] A. Zięba, Opracowanie danych pomiarowych, [w:] Pracownia fizyczna Wydziału Fizyki i Techniki Jądrowej AGH, cz. 1, Wydawnictwo AGH, Kraków 2002.
- [147] R. Krzyminiewski, R. M. Kowalczyk, A. Bielewicz -Mordalska, Z. Pająk, P. Czarnecki, Computer enhancement of CW-EPR experimental spectra resolution as a new method in

- investigation of molecular dynamics in pyridinium tetrafluoroborate, *Journal of Molecular Structure* 471 (1998), 243-249.
- [148] B. Dobosz, R. Krzyminiewski, Linear transformation of EPR spectra as a method proposed for improving identification of paramagnetic species in ceramic, *Applied Radiation and Isotopes* 65 (2007), 392-396.
- [149] R. Krzyminiewski, Computer enhancement of complex spectroscopic spectra resolution, *Molecular Physics Reports* 6 (1994), 174-179.
- [150] A. Koper, R. Krzyminiewski, Analysis of resonance excitations by linear transformation technique theory, *Acta Magnetica II* (1985), 3-23.
- [151] R.V. Upadhyay, D. Srinivas, R.V. Mehta, Magnetic resonance in nanoscopic particles of a ferrofluid, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 214 (2000), 105-111.
- [152] J.M. Vargas, E. Lima, R.D. Zysler, J.G.S. Duque, E. De Biasi, M. Knobel, Effective anisotropy field variation of magnetite nanoparticles with size reduction, *The European Physical Journal B* 64 (2008), 211-218.
- [153] V.N. Nikiforov, Y.A. Koksharov, S.N. Polyakov, A.P. Malakho, A.V. Volkov, M.A. Moskvina, G.B. Khomutov, V.Y. Irkhin, Magnetism and Verwey transition in magnetite nanoparticles in thin polymer film, *Journal of Alloys and Compounds* 569 (2013), 58-61.
- [154] G. B. Khomutov, Y. A. Koksharov, Magnetic properties of organized ensembles of magnetic nanoparticles [w:] *Magnetic Nanoparticles* pod. red S. P. Gubin, Wiley-VCH, Weinheim, s. 177.
- [155] W. Q. Liu, Y. B. Xu, P. K. J. Wong, N. J. Maltby, S. P. Li, X. F. Wang, J. Du, B. You, J. Wu, P. Bencok, R. Zhang, Spin and orbital moments of nanoscale Fe₃O₄ epitaxial thin film on MgO/GaAs(100), *Applied Physics Letters* 104 (2014), 142407.
- [156] R.H. Bremmer, D.M. de Bruin, M. de Joode, W.J. Buma, T.G. van Leeuwen, M.C.G. Aalders, Biphasic Oxidation of Oxy-Hemoglobin in Bloodstains, *PLoS ONE* 6(7) (2011), e21845.
- [157] Y. Fujita, K. Tsuchiya, S. Abe, Y. Takiguchi, S. Kubo, H. Sakurai, Estimation of the age of human bloodstains by electron paramagnetic resonance spectroscopy: Long-term controlled experiment on the effects of environmental factors, *Forensic Science International* 152 (2005), 39-43.
- [158] S. Farnaud, C. Rapisarda, T. Bui, A. Drake, R. Cammack, R. W. Evans, Identification of an iron-hepcidin complex, *Biochemical Journal* 413 (2008), 553-557.
- [159] G. Mathies, P. Gast, N.D. Chasteen, A.N. Luck, A.B. Mason, E.J.J. Groenen, Exploring the Fe(III) binding sites of human serum transferrin with EPR at 275 GHz, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 20 (2015), 487-496.
- [160] L.F. Gamarra, W.M. Pontuschka, E. Amaro Jr., A.J. Costa-Filho, G.E.S. Brito, E.D. Vieira, S.M. Carneiro, D.M. Escriba, A.M.F. Falleiros, V.L. Salvador: Kinetics of elimination and distribution in blood and liver of biocompatible ferrofluids based on Fe₃O₄ nanoparticles: an EPR and XRF study, *Materials Science and Engineering C* 28 (2008), 519-525.

- [161] D.L. Griscom, Ferromagnetic Resonance of Precipitated Phases In Natural Glasses, *Journal of Non-Crystalline Solids* 67 (1984), 81-118.
- [162] Y. Köseoglu, H. Kavas, Size and Surface Effects on Magnetic Properties of Fe₃O₄ Nanoparticles, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 8 (2008), 584-590.
- [163] Y. Köseoglu, Effect of surfactant coating on magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles: ESR study, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 300 (2006), 327-330.
- [164] H. Kavas, N Kasapoglu, A. Baykal, Y. Köseoglu, Characterization of NiFe₂O₄ nanoparticles synthesized by various methods, *Chemical Papers* 63 (4) (2009), 450-455.
- [165] T. Kubiak, R. Krzyminiewski, B. Dobosz, G. Schroeder, J. Kurczewska, M. Hałupka-Bryl, Badanie nanocząstek magnetytu w pełnej krwi ludzkiej za pomocą elektronowego rezonansu paramagnetycznego, *Acta Bio-Optica et Informatica Medica Inżynieria Biomedyczna*, 21(1) (2015), 9-15.
- [166] T. Kubiak, R. Krzyminiewski, B. Dobosz, EPR study of TEMPO-labeled magnetite nanoparticles [w:] IX International Workshop on EPR (ESR) in Biology and Medicine, Kraków 2013, s. 88.
- [167] M.F. Da Silva, F. Gendron, J.C. Bacri, J. Roger, J.N. Pons, M. Robineau, D. Sabolovic, A. Halbreich, Quantification of maghemite nanoparticles in biological media by ferromagnetic resonance and its alteration by conjugation with biological substances [w:] Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers pod red. U. Häfeli i inni, Springer, New York, 1997, s. 171-176.
- [168] P.C. Morais, E. C. D. Lima, D. Rabelo, A.C. Reis, F. Pelegrini, Magnetic Resonance of Magnetite Nanoparticles Dispersed in Mesoporous Copolymer Matrix, *IEEE Transactions on Magnetics* 36(5) (2000), 3038-3040.
- [169] Thermodynamics of pharmaceutical systems, pod red. K.A. Connors, S. Mecozzi, Wiley, New Jersey, 2010, s. 178.
- [170] S.M. Slack, Properties of biological fluids [w:] Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine pod red. B.D. Ratner i inni, Elsevier, Oxford 2013, s. 1479.
- [171] The red blood cell, tom II pod red. D.M Surgenor, Academic Press, Nowy Jork, 1975, s. 624-625.
- [172] N. Noginova, F. Chen, T. Weaver, E. P. Giannelis, A. B. Bourlinos, V.A. Atsarkin, Magnetic resonance in nanoparticles: between ferro- and paramagnetism, *Journal of Physics: Condensed Matter* 19 (2007), 246208.
- [173] O. Cozar, D. A. Magdas, N. Vedeanu, I. Ardelean, EPR Study of Some Iron-Lead-Phosphate Glasses, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* 10(12)(2008), 3202-3204.
- [174] X. Li, P. Yue, C. Kutal, Synthesis and photocatalytic oxidation properties of iron doped titanium dioxide nanosemiconductor particles, *New Journal of Chemistry* 27 (2003) , 1264-1269.