

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«ΜΑΓΝΗΤΟΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ: ΜΕΛΕΤΗ ΕΓΚΑΨΥΛΙΩΣΗΣ
ΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ»**

Για την απόκτηση του
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην κατεύθυνση
«Βιομηχανική Φαρμακευτική - Νανοτεχνολογία»

ΑΛΕΞΑΚΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
ΠΑΤΡΑ 2021

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«ΜΑΓΝΗΤΟΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ: ΜΕΛΕΤΗ ΕΓΚΑΨΥΛΙΩΣΗΣ
ΜΑΓΝΗΤΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΣΕ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ»

Για την απόκτηση του
Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην κατεύθυνση
«Βιομηχανική Φαρμακευτική - Νανοτεχνολογία»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σοφία Αντιμησιάρη (επιβλέπουσα)

Καθηγήτρια Τμήματος Φαρμακευτικής Πανεπιστημίου Πατρών

Πάυλος Κλεπετσάνης

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Φαρμακευτικής Πανεπιστημίου Πατρών

Γεωργία Σωτηροπούλου

Καθηγήτρια Τμήματος Φαρμακευτικής Πανεπιστημίου Πατρών

ΑΛΕΞΑΚΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΠΑΤΡΑ 2021

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης στην κατεύθυνση «Βιομηχανική Φαρμακευτική - Νανοτεχνολογία» κατά τα έτη 2015-2017.

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς την επιβλέπουσα καθηγήτρια Δρ. Σοφία Γ. Αντιμησιάρη, Καθηγήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών, για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη βοήθεια της και την στήριξη καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος και της εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω, για όλες τις γνώσεις και συμβουλές που μου προσέφεραν, τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Δρ. Παύλο Κλεπετσάνη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών και τη Δρ. Γεωργία Σωτηροπούλου, Καθηγήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Πατρών.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπόλοιπη ερευνητική ομάδα και τα μέλη του εργαστηρίου της Δρ. Σοφίας Γ. Αντιμησιάρη, για όλες τις γνώσεις εργαστηριακού εξοπλισμού, τεχνικών και μεθόδου έρευνας που μου προσέφεραν. Πιο συγκεκριμένα την υποψήφια διδάκτορα Δήμητρα Τζαβάρα, το Δρ. Αθανάσιο Σκούρα, τη Δρ. Κωνσταντίνα Παπαδιά, το Δρ. Κωνσταντίνο Παχή και το μεταδιδάκτορα Δρ. Σπυρίδωνα Μουρτά.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ινστιτούτο Επιστημών Χημικής Μηχανικής (ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ) καθώς και το εργαστήριο του Δρ. Αριστείδη Μπακανδρίτσου, με τον Δρ. Αργύρη Κολοκυθά-Ντούκα του Τμήματος Επιστήμης των Υλικών, για τη χρήση των οργάνων και των υλικών που μου παρείχαν.

Αφιερώνεται,

στον εκλιπόντα φίλο Βασίλη Βαλκανά.

Μια μέρα θα είναι απλά ένα καλοκαιρινό ζώδιο...

Περίληψη

Στον τομέα της φαρμακευτικής νανοτεχνολογίας υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για τους υβριδικούς μαγνητικούς νανοφορείς με βάση οξειδία σιδήρου, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν, είτε για διάγνωση είτε για μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών σε συγκεκριμένες περιοχές. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, έγινε σύνθεση και χαρακτηρισμός μαγνητικών υβριδικών νανοσωματιδίων με σκοπό τη μελέτη της σταθερότητας τους και τον εγκλωβισμό τους σε λιποσωμικές μορφές, για την παρασκευή μαγνητολιποσωμάτων. Στόχος της εργασίας είναι η παρασκευή, μελέτη και χαρακτηρισμός μαγνητολιποσωμάτων, τα οποία θα προσδίδουν στα μαγνητικά νανοσωματίδια που εγκλωβίζουν, αυξημένη σταθερότητα σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Πιο αναλυτικά, παρασκευάστηκαν μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου (MNΣ) με τη μέθοδο της υδρολυτικής αλκαλικής καταβύθισης μιας πρόδρομης ένωσης σιδήρου, υπό την παρουσία τυχαίου συμπολυμερούς πολυ(ακρυλικό οξύ-co-μηλεϊνικό οξύ). Μελετήθηκαν διάφοροι παράγοντες κατά τη σύνθεση που θα μπορούσαν να έχουν επίδραση στις ιδιότητες του τελικού προϊόντος. Ακολούθησε φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των MNΣ, μελέτη της σταθερότητας τους με χρήση της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) τόσο εντός PBS όσο και κατά τη λυοφιλοποίηση. Λόγω της μη τροποποιημένης επιφάνειας τους αποδείχτηκε πως δεν είναι σταθερά. Μελετήθηκε επίσης και μια ήδη σταθεροποιημένη με PEG σύνθεση, με πολύ καλές μαγνητικές ιδιότητες η οποία εμφάνισε σταθερότητα τόσο σε PBS όσο και στη λυοφιλοποίηση παρουσία δεξτρώζης ως κρυοπροστατευτικό.

Ο εγκλωβισμός των MNΣ για την παρασκευή μαγνητολιποσωμάτων έγινε με τις τεχνικές της ενυδάτωσης λιπιδικού υμενίου (TFH) και των αφυδατωμένων ανασυσταμένων κυστιδίων (DRV). Για το λιπόσωμα επιλέχθηκε η σταθερή λιπιδική σύνθεση φωσφατιδυλοχολίνης αυγού με χοληστερόλη σε αναλογία δύο προς ένα μαζί με 4% PEG-2000. Στη μέθοδο TFH ο εγκλωβισμός έγινε είτε με ενυδάτωση MNΣ απευθείας στο λιπιδικό υμένιο, είτε με επαναδιασπορά τους σε μεθανόλη και προσθήκη τους στο οργανικό διάλυμα. Στη μέθοδο DRV ο εγκλωβισμός έγινε με ενυδάτωση των αφυδατωμένων λιποσωμάτων μετά τη λυοφιλοποίηση. Στις μελέτες εγκλωβισμού χρησιμοποιήθηκε επίσης και η ήδη

σταθεροποιημένη σύνθεση με PEG ΜΝΣ. Ακολούθησε φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των μαγνητολιποσωμάτων, μελέτη της σταθερότητας τους σε PBS για μεγάλο χρονικό διάστημα και μελέτη της μορφολογίας τους με χρήση SEM. Όλες οι τεχνικές δώσανε παρόμοιους εγκλωβισμούς με πολύ καλή σταθερότητα στο χρόνο. Η DRV τεχνική με χρήση των σταθεροποιημένων ΜΝΣ εμφάνισε το μεγαλύτερο εγκλωβισμό αλλά η περιορισμένη διαθέσιμη ποσότητα της, δεν επέτρεψε περισσότερες μελέτες.

Abstract

In the field of nanotechnology there is a growing research interest in the development of magnetic hybrid nanocarriers based on iron oxide nanoparticles which can be used either for diagnosis and/or for delivering drugs to specific areas. In the present thesis, magnetic hybrid nanocarriers were developed and characterized, to investigate their stability and entrapment capability in liposomal forms for the preparation of magnetoliposomes, which will endow them with increased stability in different environmental conditions.

More specifically, magnetic iron oxide nanoparticles (MNP) were prepared with the method of alkaline hydrolytic precipitation of a precursor compound of Fe, in the presence of random copolymer of poly(acrylic acid-co-maleic acid). Various factors were investigated during the synthesis procedure that could influence the properties of the final product. Physicochemical characterization of the MNP followed, stability studies using dynamic light scattering (DLS) both in PBS and during lyophilization. Due to their unmodified surface, they turned out to be not stable. An already stabilized PEG synthesis with very good magnetic properties was also studied which showed stability in both PBS and lyophilization in the presence of dextrose as a cryoprotectant.

For the preparation of magnetoliposomes, MNP encapsulation was performed by the techniques of lipid thin film hydration (TFH) and dehydrated reconstituted vesicles (DRV). The liposomal form that was selected, was the stable lipid synthesis of egg phosphatidylcholine with cholesterol in a ratio of two to one together with 4% PEG-2000. In the TFH method the entrapment was performed by either hydrating with the MNP directly onto the lipid film, or by redispersing MNP in methanol and adding them from the beginning in the organic solution. In the DRV method the entrapment was performed by hydrating with the MNP the dehydrated liposomes after lyophilization. An already stabilized PEG MNP synthesis was also used in the encapsulation studies. This was followed by physicochemical characterization of magnetoliposomes, stability studies in PBS for a long time and studies of their morphology using SEM. All techniques gave similar encapsulation ratios with very good stability over time. The DRV technique using the PEG stabilized MNP showed the greatest entrapment, but its limited available quantity did not allow for further studies.

Περιεχόμενα

Πρόλογος	v
Περίληψη	vii
Abstract	ix
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.2 Μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου	2
1.2.1 Εισαγωγή στα μαγνητικά νανοσωματίδια και άλλοι τύποι νανοφορέων	3
1.2.2 Εφαρμογές.....	5
1.2.3 Μαγνητισμός.....	5
1.2.4 Απόκριση σε μαγνητικά πεδία	11
1.2.5 Σταθεροποίηση και επιφανειακή τροποποίηση.....	12
1.3 Μαγνητολιποσώματα.....	15
1.3.1 Είδη μαγνητολιποσωμάτων και μέθοδοι παρασκευής τους	16
1.3.2 Πλεονεκτήματα και διαφορές	19
1.3.3 Εγκλωβισμός με φάρμακο.....	20
1.3.4 Εφαρμογές (in vivo).....	22
Στόχος εργασίας.....	27
2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	29
2.1 Υλικά και όργανα	29
2.1.1 Υλικά.....	29
2.1.2 Όργανα	31
2.2 Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων	32
2.2.1 Σύνθεση μαγνητικού υβριδικού κολλοειδούς (υδρολυτική αλκαλική καταβύθιση μιας πρόδρομης ένωσης σιδήρου).....	33
2.3 Μέθοδοι παρασκευής μαγνητολιποσωμάτων.....	35
2.3.1 Μέθοδος ενυδάτωσης λεπτού υμενίου (TFH).....	36
2.3.1.1 Ενυδάτωση λιπιδικού υμενίου με ΜΝΣ.....	37
2.3.1.2 Επαναδιασπορά των ΜΝΣ σε MeOH και ενυδάτωση λιπιδικού υμενίου	38
2.3.2 Με τη μέθοδο αφυδατωμένων - ανασυσταμένων κυστιδίων (DRV).	39
2.4 Διαχωρισμός και καθαρισμός των MLIP	41
2.5 Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός.....	42
2.5.1 Μελέτη μεγέθους και πολυδιασποράς σωματιδίων	42
2.5.2 Μελέτη Z δυναμικού	46

2.5.3 Μέτρηση συγκέντρωσης σιδήρου.....	50
2.5.4 Μέτρηση συγκέντρωσης φωσφολιπιδίων.....	53
2.5.5 Μελέτη μεγέθους μαγνητικού πυρήνα.....	56
2.5.6 Μελέτη σταθερότητας	58
2.5.7 Μελέτη μορφολογίας.....	59
3 Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	63
3.1 Σύνθεση ΜΝΣ.....	63
3.1.1 Επίδραση ποσότητας βάσης στην αντίδραση σύνθεσης.....	64
3.1.2 Επίδραση χρόνου κλασματοποίησης.....	65
3.1.3 Μέγεθος μαγνητικού πυρήνα των ΜΝΣ.....	66
3.2 Παρασκευή μαγνητολιποσωμάτων και διαχωρισμός.....	67
3.2.1 Μέθοδος ενυδάτωσης λιπιδικού υμενίου.....	69
3.2.1.1 Μέθοδος ενυδάτωσης λιπιδικού υμενίου με ΜΝΣ.....	69
3.2.1.2 Μέθοδος ενυδάτωσης λιπιδικού υμενίου με ΜΝΣ σε MeOH.....	71
3.2.2 Μέθοδος αφυδατωμένων - ανασυσταμένων κυστιδίων	72
3.2.3 Σύγκριση μεθόδων παρασκευής μαγνητολιποσωμάτων.....	73
3.3 Μελέτες σταθερότητας.....	75
3.3.1 Μαγνητικά νανοσωματίδια.....	75
3.3.1.1 Σταθερότητα σε PBS	75
3.3.1.2 Σταθερότητα μετά από λυοφιλοποίηση	77
3.3.1.3 Δεξτρόζη κατά τη λυοφιλοποίηση σαν κρυοπροστατευτικό	78
3.3.2 Μαγνητολιποσώματα.....	80
3.3.2.1 Σταθερότητα σε PBS	80
3.4 Μορφολογική εκτίμηση SEM.....	81
4 Συμπεράσματα.....	85
4.1 Μαγνητικά νανοσωματίδια	85
4.2 Μαγνητολιποσώματα	86
5 Βιβλιογραφία.....	89

Συντομογραφίες και ξενόγλωσσοι όροι

MNS: Μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου

MN: Μαγνητικά νανοσωματίδια

MLIP: Μαγνητολιπόσωμα

LIP: Λιπόσωμα

CHOL: Χοληστερόλη

PC: Phosphatidylcholine, Φωσφατιδυλοχολίνη

PEG: Polyethyleneglycol, Πολυαιθυλενογλυκόλη

PAA-co-MA: πολυ(ακρυλικό οξύ-co-μηλεϊνικό οξύ)

ζ: Zeta Potential, ζ-δυναμικό

D_h: Υδροδυναμική διάμετρος

PBS: Phosphate buffer saline, Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

DRV: Dehydrated-Rehydrated Vesicle, Αφυδατωμένο-επανενυδατωμένο κυστίδιο

TFH: Thin Film Hydration, Ενυδάτωση λεπτού υμενίου

EI: Ethanol Injection, Έγχυση αιθανόλης

RPE: Reverse-Phase Evaporation, Εξάτμιση ανάστροφης φάσης

DE: Double Emulsion, Διπλού γαλακτώματος

SUV: Sma Unilamellar Vesicles, Μικρά μονοστιβαδικά κυστίδια

LUV: Large Unilamellar Vesicles, Μεγάλα μονοστιβαδικά κυστίδια

MLV: Multi-Lamellar Vesicles, Πολυστιβαδικά κυστίδια

AML: Aquatic Magneto-Liposomes, Υδατικά μαγνητολιποσώματα

SML: Solid Magneto-Liposomes, Στερεά μαγνητολιποσώματα

T_m: Transition temperature, Θερμοκρασία μετάπτωσης

RPM: Στροφές ανά λεπτό

XRD: X-Ray Diffraction, Περίθλαση ακτίνων X

MRI: Magnetic Resonance Imaging, Απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού

UV Vis: Φασματοφωτομετρία υπεριώδους – ορατού

DLS: Dynamic Light Scattering, Δυναμική σκέδαση φωτός

ΕΜΠ: Εναλλασσόμενο Μαγνητικό Πεδίο

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή

Η πρόοδος των τελευταίων χρόνων στους τομείς της φαρμακευτικής και της νανοτεχνολογίας, έχει οδηγήσει σε ένα διευρυμένο επιστημονικό ερευνητικό πεδίο, όπου τα νανοϋλικά συναντούν τη νανοϊατρική και γενικότερα τη βιοϊατρική. Έτσι, ανοίγονται νέοι ορίζοντες για τη θεραπεία ασθενειών που μέχρι και σήμερα παραμένουν αθεράπευτες λόγω των περιορισμών αλλά και των μειονεκτημάτων των συμβατικών τρόπων χορήγησης φαρμάκων [Agrawal et al, 2017]. Προς αυτή την κατεύθυνση, δραστικό ρόλο στο μέλλον αναμένεται να παίζει η εμφάνιση των πολλά υποσχόμενων νανοσυστημάτων.

Ο όρος νανοφορέας (nanocarrier), αναφέρεται σε κολλοειδή σωματίδια, το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται συνήθως από 50 έως 200 nm. Η έννοια αυτή, μπορεί να περιλαμβάνει πολυμερικά νανοσωματίδια, λιποσώματα, μικκύλια, δενδριμερή, νιοσώματα, νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων [Torchilin, 2006] και υβριδικούς νανοφορείς. Η νανοϊατρική σαν όρος ενέχει τις εφαρμογές νανοτεχνολογιών στον τομέα της υγείας, είναι δηλαδή ένα ευρύ ερευνητικό πεδίο, το οποίο περιλαμβάνει νανοσωματίδια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση, τη θεραπεία και την παρακολούθηση διαφόρων ασθενειών [Moghimi et al, 2005]. Στηρίζεται στις βελτιωμένες και συχνά νέες φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες των νανοδομημένων υλικών. Το συγκρίσιμο μέγεθος των συνθετικών αυτών δομών με φυσικές λειτουργικές μονάδες (βιομόρια και κύτταρα) επιτρέπει την άμεση αλληλεπίδραση τους με τους ζωντανούς οργανισμούς. Στόχος των νανοσυστημάτων αυτών είναι η βελτίωση τόσο της διαγνωστικής ιατρικής (έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση) όσο και της θεραπευτικής ιατρικής (π.χ. βελτιωμένες φαρμακευτικές ουσίες, συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων) καθώς και η ανάπτυξη μεθόδων για τη συστηματική ιατρική παρακολούθηση (π.χ. της εξέλιξης των ασθενειών, της αποτελεσματικότητας της φαρμακευτικής αγωγής κτλ).

Η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στην ιατρική έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μίας νέας γενιάς διαγνωστικών εργαλείων τα οποία παρέχουν ακριβή βιολογικά δεδομένα, σύντομα και με απλό τρόπο. Ταυτόχρονα η έρευνα για την

ανάπτυξη φορέων με διαφορετικές ιδιότητες και λειτουργίες (χρήσεις), αλλά και νέων συσκευών για την ελεγχόμενη αποδέσμευση των φαρμάκων αποτελούν έναν σημαντικό τομέα της νανοϊατρικής. Τέλος η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στην αναγεννητική ιατρική υπόσχεται μια εντελώς διαφορετική προσέγγιση στην αντιμετώπιση των ασθενειών [Κυπαρισσίδης et al, 2008].

Η πρόοδος που έγινε τις τελευταίες δεκαετίες στους τομείς της συνθετικής και φαρμακευτικής χημείας, έδωσε τη δυνατότητα στο σχεδιασμό, σύνθεση και ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ουσιών [Potoski, 2005]. Ωστόσο για την πλήρη αξιοποίηση των ιδιοτήτων τους και τον περιορισμό των παρενεργειών τους, απαιτείται και η ανάπτυξη νέων συστημάτων χορήγησης και αποδέσμευσης τους, στις επιθυμητές περιοχές-στόχους. Αυτή η στοχευμένη δράση των φαρμάκων είναι ένας από τους βασικότερους στόχους των ερευνητών. Οι εξελίξεις στην επιστήμη και τεχνολογία των νανοϋλικών [Antimisiaris et al, 2021], έκανε δυνατή την αποδέσμευση των φαρμακευτικών ουσιών απευθείας μέσα στην πάσχουσα περιοχή, με μια προκαθορισμένη διαδικασία, ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στην κάθε περιοχή [Hoffman, 2008].

1.2 Μαγνητικά νανოსωματίδια οξειδίου του σιδήρου [Cornell et al, 2003], [Salazar et al, 2011]

Ένας πολλά υποσχόμενος τομέας της νανοτεχνολογίας, είναι τα μαγνητικά νανოსωματίδια (MN) και πιο συγκεκριμένα αυτά των οξειδίων του σιδήρου (MNΣ). Τα οξείδια του σιδήρου συναντώνται σε διάφορες μορφές είτε ως μαγνητίτης (Fe_3O_4) ή μαγκεμίτης ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ή τις περισσότερες φορές σαν συνδυασμός και των δυο. Αυτές οι δύο μορφές είναι και οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες σε εφαρμογές.

Ο μαγνητίτης είναι ένα από τα κυριότερα μεταλλεύματα του σιδήρου (μαζί με τον αιματίτη Fe_2O_3 και το βουσίτη FeO) και ανήκει στους φερρίτες, μια κατηγορία κεραμικών οξειδίων. Είναι μέλος της ομάδας των σπινελίων και παρουσιάζει τις μεγαλύτερες μαγνητικές ιδιότητες από κάθε άλλο οξείδιο. Η πιο σημαντική του ιδιότητα είναι πως διαθέτει και δισθενή αλλά και τρισθενή ιόντα σιδήρου με αποτέλεσμα να μπορεί να λειτουργεί σα μέσο και οξειδωτικά και

αναγωγικά. Ο μαγνητίτης έχει μεταλλική λάμψη, χρώμα σκούρο προς μαύρο και κρυσταλλώνεται σε ολοεδρία κατά το κυβικό σύστημα.

Ο μαγκεμίτης έχει παρόμοια δομή με τον μαγνητίτη με τη διαφορά πως μόνο τα 5/6 των συνολικών τετραεδρικών και οκταεδρικών θέσεων καταλαμβάνονται από άτομα του σιδήρου. Ουσιαστικά ο μαγκεμίτης αποτελεί μια μορφή οξειδωσης του μαγνητίτη που σε θερμοκρασία δωματίου οξειδώνεται με αργό ρυθμό και οδηγεί τελικά σε πιο ασθενή μαγνητισμό. Η μεγάλη διαφορά των δύο αυτών οξειδίων είναι πως ο μαγκεμίτης έχει όλα τα κατιόντα σιδήρου σε τρισθενή κατάσταση.

1.2.1 Εισαγωγή στα μαγνητικά νανοσωματίδια και άλλοι τύποι νανοφορέων

Ένα τυπικό νανοςύστημα μαγνητικών σωματιδίων αποτελείται από ένα μαγνητικό πυρήνα που προσφέρεται για σκιαγράφιση (MRI) και στόχευση, ένα κέλυφος πολυμερούς που προσδίδει σταθερότητα και βιοσυμβατότητα, και συχνά, μόρια ενσωματωμένα ή δεσμευμένα στην επιφάνεια, που προσδίδουν την ικανότητα στόχευσης συγκεκριμένων κυττάρων ή/και άλλες λειτουργίες [Iyer et al, 2006].

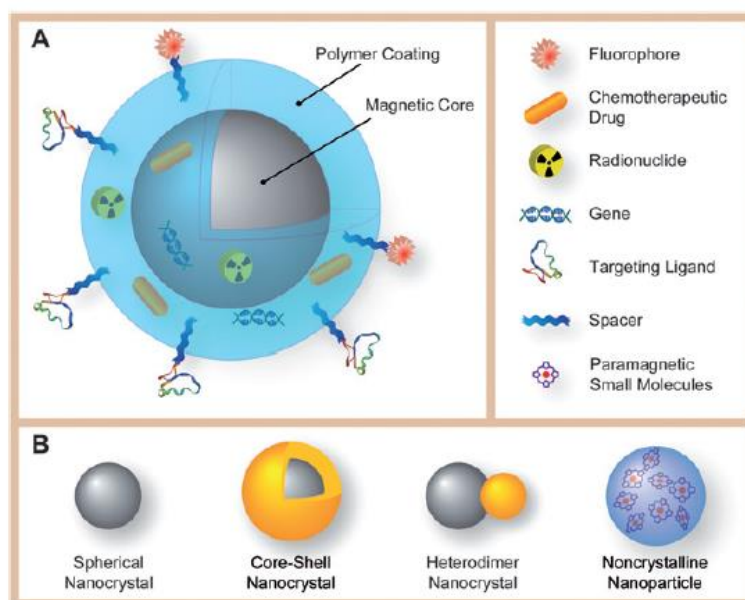
Τα μαγνητικώς στοχευόμενα συστήματα χορήγησης φαρμάκων με νανοσωματίδια περιλαμβάνουν την ένωση (δέσιμο) ενός φαρμάκου με MN, όπως για παράδειγμα τα MNΣ. Λόγω του ελεγχόμενου μεγέθους τους (που κυμαίνεται από 10 έως 100 nm) και της ικανότητάς τους να μεταφέρουν μια φαρμακευτική ουσία κοντά στην περιοχή στόχο, ανοίγουν πολλές προοπτικές στο πεδίο της μεταφοράς και χορήγησης φαρμάκων.

Για τις βιοϊατρικές εφαρμογές, οι μαγνητικοί νανοφορείς πρέπει να είναι υδατοδιαλυτοί, να είναι βιοσυμβατοί, μη τοξικοί και να μην προκαλούν ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Διάφοροι μαγνητικοί νανοφορείς που χρησιμοποιούνται είναι το νικέλιο (Ni), το κοβάλτιο (Co), ο σίδηρος (Fe) και ο μαγνητίτης (Fe_3O_4). Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο είναι το οξείδιο του σιδήρου, λόγω της βιοδιασπώμενης φύσης του, της βιοσυμβατότητάς του, της υπερπαραμαγνητικής συμπεριφοράς του [Jiang et al, 2011] και της

ικανότητας του να χρησιμεύει ως σκιαγραφικό μέσο στη μαγνητική τομογραφία. [Mishra et al, 2010].

Τα MN για την επίτευξη καλύτερης διασποράς δύναται να επικαλυφθούν με οργανικά υλικά (όπως το PEG) [Voulgari et al, 2016], οξείδια (όπως η αλουμίνα) και με ανόργανα μέταλλα (όπως ο χρυσός).

Αν και ο αριθμός των διαφορετικών ειδών νανοφορέων αυξάνεται συνεχώς, οι δύο βασικές κατηγορίες που μπορούν να χωριστούν είναι οι οργανικοί και οι υβριδικοί. Η πρώτη κατηγορία περιέχει οργανικά μόρια ως βασικό συστατικό της δομής τους, όπως είναι τα λιποσώματα, τα δενδριμερή ή οι νανοσωλήνες άνθρακα και η δεύτερη ανόργανα συστατικά. Οι υβριδικοί μπορεί να αποτελούνται από συνδυασμό οργανικών και ανόργανων συστατικών ώστε να διατηρούν ιδιότητες και των δύο φάσεων των συστατικών τους. Τα λιποσώματα για παράδειγμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εγκλωβισμό και μεταφορά βιοδραστικών ουσιών ενώ τα MN για μεταφορά με ενεργή στόχευση σε έναν ιστό στόχο.



Σχήμα 1.1: (A) Γραφική απεικόνιση της δομής ενός πολυλειτουργικού MN και (B) διάφορα είδη μαγνητικών πυρήνων. [Fang and Zhang, 2009]

1.2.2 Εφαρμογές

Συστήματα MN αποτελούν άριστα εργαλεία τόσο στον τομέα της διάγνωσης όσο και της θεραπείας, με πολλές πιθανές μελλοντικές εφαρμογές.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [Estelrich et al, 2015] τα MN εμφανίζουν πληθώρα μοναδικών μαγνητικών φαινομένων με εφαρμογές σε πολλούς τομείς της βιοϊατρικής. Ο κυριότερος τομέας χρήσης τους είναι ως ουσίες σκιαγράφησης του εσωτερικού ενός οργανισμού, για διαγνωστικούς σκοπούς, στην απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MRI).

Ένας άλλος τομέας εφαρμογής τους είναι η υπερθερμία. Κατά την εφαρμογή ενός υψηλής συχνότητας εναλλασσόμενου εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, τα MN μπορούν να παράξουν θερμότητα.

Στην επιφάνεια των MN μπορούν επίσης να ακινητοποιηθούν μόρια που εμφανίζουν συγγένεια προς έναν επιθυμητό στόχο, για να προσδώσουν την ικανότητα στόχευσης συγκεκριμένων κυττάρων, με σκοπό τον μαγνητικό διαχωρισμό. Σε περιπτώσεις σύνδεσης τους με αντισώματα μπορούν να διαχωρίσουν και να ποσοτικοποιήσουν αντιγόνα.

Με την καθοδήγηση ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, τα MN βρίσκουν χρήσεις και στη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων, απελευθερώνοντας επιλεκτικά ένα φάρμακο σε συγκεκριμένες περιοχές του ανθρώπινου σώματος [Tingli et al, 2012].

1.2.3 Μαγνητισμός

Βασικές αρχές μαγνητισμού [Χρυσουλάκης et al, 1996]

Το φαινόμενο που εμφανίζουν αρκετά υλικά και φορτισμένα ή κινούμενα σωματίδια, να ασκούν δηλαδή ελκτικές και απωστικές δυνάμεις, όπως και ροπές σε άλλα υλικά ή σωματίδια ονομάζεται μαγνητισμός. Ο μαγνητισμός σα φαινόμενο παρουσιάζει διπολική φύση, θα έχει πάντα δηλαδή ένα βόρειο (B) και ένα νότιο (N) μαγνητικό πόλο ή κέντρο πεδίου, σε καθορισμένη απόσταση μεταξύ τους, ακόμα και σε μικροσκοπικό επίπεδο. Οι πόλοι ονομάστηκαν έτσι

από τον τρόπο που συμπεριφέρεται ένας μαγνήτης υπό την επήρεια του μαγνητικού πεδίου της Γης.

Για να χαρακτηριστεί ένα υλικό ως μαγνητικό (μαγνήτης) θα πρέπει να έχει μαγνητική ροπή μεγαλύτερη του μηδενός. Γνωστά υλικά που εμφανίζουν εύκολα μαγνητικές ιδιότητες είναι ο σίδηρος (Fe), το νικέλιο (Ni), το γαδολίνιο (Gd), το κοβάλτιο (Co) καθώς και τα κράματα αυτών. Ωστόσο, όλα τα υλικά επηρεάζονται, άλλα σε μικρότερο βαθμό και άλλα σε μεγαλύτερο από ένα μαγνητικό πεδίο, και αυτά τα φαινόμενα οφείλονται στην τροχιακή κίνηση και την ιδιοπεριστροφή των ηλεκτρονίων (σπιν). Ως γνωστόν η κίνηση ενός ηλεκτρικού φορτίου δημιουργεί μαγνητικό πεδίο και έτσι τα ηλεκτρόνια είτε ιδιοπεριστρεφόμενα, είτε περιφερόμενα γύρω από τον πυρήνα δημιουργούν μαγνητικά δίπολα.

Η κίνηση ενός ηλεκτρονίου γύρω από τον πυρήνα του ατόμου δημιουργεί μια ενδογενή μαγνητική ροπή. Κάθε συμπληρωμένη εσωτερική ηλεκτρονιακή στιβάδα ή υποστιβάδα, δε συμβάλλει μόνο στη συνολική τροχιακή μαγνητική ροπή του ατόμου, η οποία οφείλεται στα εξωτερικά τροχιακά που έχουν άθροισμα μαγνητικών κβαντικών αριθμών διάφορο του μηδενός. Η περιστροφή ενός ηλεκτρονίου γύρω από τον εαυτό του (σπιν) γέννα επίσης μια μαγνητική ροπή. Η συνισταμένη μαγνητική ροπή του ατόμου είναι αποτέλεσμα της τροχιακής μαγνητικής ροπής και της μαγνητικής ροπής λόγω σπιν.

Η αντίδραση ενός υλικού, κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση μαγνητικής επαγωγής, η οποία αναπαριστά την ένταση του μαγνητικού πεδίου στο εσωτερικό του υλικού λόγω της διευθέτησης των μαγνητικών ροπών των ατόμων του υλικού παράλληλα στο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Η σχέση μεταξύ έντασης και μαγνητικής επαγωγής είναι:

$$B = \mu_0 (H + M) \quad (1.1)$$

όπου B η μαγνητική επαγωγή, μ_0 η μαγνητική διαπερατότητα του κενού, H η ένταση του μαγνητικού πεδίου και M η μαγνήτιση του υλικού. Η M αναπαριστά τη μαγνητική ροπή (ανά μονάδα όγκου) προσανατολισμένη στη διεύθυνση του H .

$$M = \frac{m}{V} \quad (1.2)$$

Για πολλά υλικά η M συνδέεται με την H μέσω της παρακάτω σχέσης:

$$M = \chi H \quad (1.3)$$

όπου χ η μαγνητική επιδεκτικότητα του υλικού.

Η σχετική μαγνητική διαπερατότητα μ_r των υλικών, δίνεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\mu_r = \frac{\mu}{\mu_0} = 1 + \chi \quad (1.4)$$

όπου μ η μαγνητική διαπερατότητα του μέσου.

Σύμφωνα με την τιμή του μ_r τα υλικά μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες, τα διαμαγνητικά υλικά (με $\mu_r \leq 1$), τα παραμαγνητικά υλικά (με $\mu_r \geq 1$) και τα σιδηρομαγνητικά ή φερρομαγνητικά υλικά (με $\mu_r \gg 1$).

Διαμαγνητισμός [Χρυσουλάκης et al, 1996]

Κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, τα τροχιακά των ηλεκτρονίων τροποποιούνται, καθώς ένα ηλεκτρικό φορτίο σε κίνηση εντός μαγνητικού πεδίου αποκλίνει της πορείας του σύμφωνα με το νόμο του Laplace. Η τροποποίηση αυτή των τροχιακών γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε το παραγόμενο μαγνητικό πεδίο να αντισταθεί στις μεταβολές του εξωτερικού σύμφωνα με το νόμο του Lenz. Κάτω από την επίδραση ενός μεταβαλλόμενου εξωτερικού πεδίου, οι επαγόμενες μαγνητικές ροπές τείνουν να εξαλείψουν τις μεταβολές αυτές. Αυτές οι μαγνητικές ροπές είναι αντιστρεπτές, δηλαδή εξαφανίζονται όταν μηδενισθεί το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Ουσιαστικά το εσωτερικό μαγνητικό πεδίο αντισταθεί του εξωτερικού και επομένως η σχετική διαπερατότητα είναι λίγο μικρότερη της μονάδας. Συνέπεια τούτου είναι η άπωση των διαμαγνητικών υλικών από κάποιο μόνιμο μαγνήτη.

Όλα τα υλικά επηρεάζονται επομένως από το φαινόμενο του διαμαγνητισμού, μιας και αυτό οφείλεται στην παραμόρφωση που υφίστανται τα ατομικά τροχιακά από ένα εξωτερικό πεδίο. Για ένα μεγάλο όμως αριθμό υλικών, το φαινόμενο του διαμαγνητισμού κρύβεται πίσω από άλλα δυνατότερα φαινόμενα, τον παραμαγνητισμό και τον σιδηρομαγνητισμό. Τα αδρανή αέρια και ορισμένα στερεά (π.χ. βισμούθιο, χαλκός, αντιμόνιο, μαγνησία, διαμάντι)

είναι διαμαγνητικά. Η διαμαγνητική τους επιδεκτικότητα είναι ανεξάρτητη της θερμοκρασίας και της έντασης του πεδίου.

Παραμαγνητισμός [Χρυσουλάκης et al, 1996]

Η σχετική μαγνητική διαπερατότητα για πολλά υλικά είναι λίγο ανώτερη της μονάδας. Αυτά τα υλικά ονομάζονται παραμαγνητικά. Η μαγνητική τους επιδεκτικότητα είναι λίγο μεγαλύτερη του μηδενός επειδή η συνολική μαγνητική ροπή, το άθροισμα δηλαδή των ροών τροχιακών και σπιν, είναι διάφορη του μηδενός. Κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, αυτές οι στοιχειώδεις μαγνητικές ροπές τείνουν να παραλληλισθούν κατά τη διεύθυνση και φορά του πεδίου, με αποτέλεσμα την αύξηση, τοπικά, της έντασης του ασκούμενου μαγνητικού πεδίου. Τα παραμαγνητικά υλικά έλκονται ελαφρά από ένα μόνιμο μαγνήτη.

Όπως ο διαμαγνητισμός, έτσι και ο παραμαγνητισμός είναι ένα ασθενές φαινόμενο. Η επιδεκτικότητα των παραμαγνητικών σωμάτων μεταβάλλεται με τη θερμοκρασία σύμφωνα με το νόμο Curie:

$$\chi = C(T - T_c)^{-1} \quad (1.5)$$

Η σταθερά C ονομάζεται σταθερά Curie και η θερμοκρασία T_c ονομάζεται θερμοκρασία παραμαγνητισμού Curie και είναι η θερμοκρασία εκείνη στην οποία η επιδεκτικότητα παίρνει τη μέγιστη τιμή της.

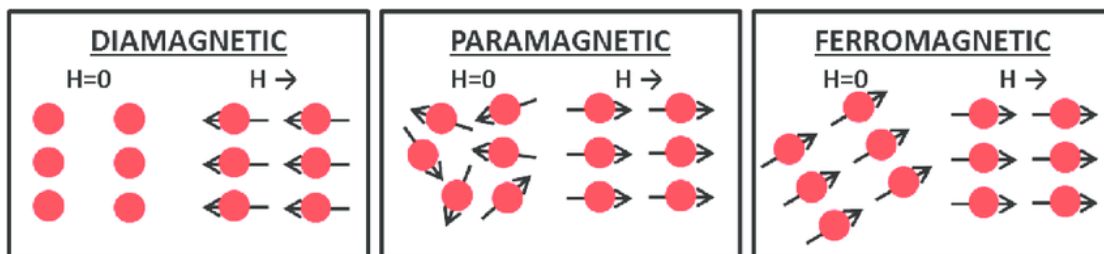
Παραμαγνητικά υλικά θεωρούνται τα στοιχεία των ομάδων 1 και 2 του περιοδικού συστήματος, τα περισσότερα μεταβατικά στοιχεία, το οξυγόνο και τα περισσότερα άλατα σιδήρου.

Σιδηρομαγνητισμός ή φερρομαγνητισμός [Χρυσουλάκης et al, 1996]

Η επιδεκτικότητα διαφόρων στοιχείων του περιοδικού συστήματος (σίδηρος, κοβάλτιο, νικέλιο, γαδολίνιο, τέρβιο, δυσπρόσιο, όλμιο, θούλιο), καθώς και πολλών κραμάτων και συστατικών τους είναι πολύ αυξημένη. Κατά συνέπεια, η σχετική μαγνητική τους διαπερατότητα είναι πολύ πάνω από τη μονάδα, σε θερμοκρασίες μικρότερες της κρίσιμης (T_c), δηλαδή της θερμοκρασίας σιδηρομαγνητισμού Curie. Αυτά τα σιδηρομαγνητικά στοιχεία και συστατικά παρουσιάζουν αυθόρμητη μαγνήτιση. Η εξήγηση του φαινομένου του σιδηρομαγνητισμού βασίζεται στην κβαντική θεωρία.

Ο σιδηρομαγνητισμός είναι αποτέλεσμα της κίνησης του συνόλου των ατόμων, τα οποία προσανατολίζουν τις μαγνητικές τους ροπές προς κοινή διεύθυνση. Τα σιδηρομαγνητικά υλικά έλκονται έντονα από μαγνήτη. Η αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί τη θερμική κινητικότητα των ατόμων με αποτέλεσμα την καταστροφή της ευθυγράμμισης των μαγνητικών τους ροπών. Μόλις η θερμοκρασία φθάσει μια κρίσιμη τιμή T_c , οι μαγνητικές ροπές αποπροσανατολίζονται και παρατηρείται μετάβαση από τον σιδηρομαγνητισμό στον παραμαγνητισμό.

Στα σιδηρομαγνητικά υλικά, χωρίς την εξωτερική παρουσία ενός μαγνητικού πεδίου τα άτομα παρουσιάζουν πολύ ισχυρές μαγνητικές ροπές. Αυτές οι ροπές συσχετίζονται και δημιουργούν τμήματα μαγνητικών περιοχών με ομόρροπα σπιν, τις λεγόμενες περιοχές Weiss, σε διάφορα μεγέθη ή σχήματα. Η προηγούμενη μαγνητική κατάσταση του υλικού καθορίζει και τις διαστάσεις που θα έχουν αυτές οι περιοχές. Η ολική μαγνήτιση του υλικού παρόλα αυτά, είναι μηδενική μακροσκοπικά, καθώς οι περιοχές αυτές έχουν τυχαίο προσανατολισμό και έχουμε αλληλοαναιρέση των μαγνητικών ροπών των ατόμων. Με την εφαρμογή όμως ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, αυξάνεται συνολικά η μαγνήτιση. Με την απομάκρυνση όμως αυτού του πεδίου, οι διάφορες μαγνητικές ροπές των ατόμων κρατάνε τον προσανατολισμό τους και παραμένει έτσι μια μόνιμη ολική μαγνήτιση. Διαπιστώνουμε μολαταύτα πως σε ένα σιδηρομαγνητικό υλικό έχουμε διαφορετική μαγνήτιση μακροσκοπικά αφού απομακρυνθεί το εξωτερικό πεδίο, καθώς μαγνητικά η κατάσταση του εξαρτάται από την κατάσταση που βρισκόταν προηγουμένως.

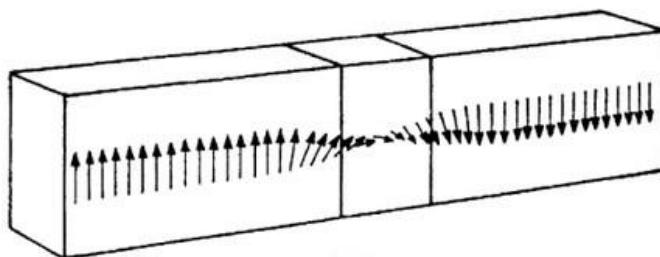


Σχήμα 1.2: Σχηματική αναπαράσταση μικροσκοπικών δομών διαμαγνητικών, παραμαγνητικών και σιδηρομαγνητικών υλικών σε ηρεμία και παρουσία μαγνητικού πεδίου [Iacovacci et al, 2016].

Μαγνητικές περιοχές Weiss [Mercier et al, 2003]

Σε έναν κρύσταλλο οι μαγνητικές ιδιότητες προκύπτουν από την αλληλεπίδραση των μαγνητικών ροπών. Αυτό οφείλεται στον αριθμό σπιν των ηλεκτρονίων και στην κίνηση αυτών γύρω από τον πυρήνα στο τροχιακό τους. Όμως στην μακροσκοπική παρατήρηση είναι πάλι περίπλοκη η εικόνα του κρυστάλλου. Μπορούμε να θεωρήσουμε πως ένας κρύσταλλος χωρίζεται τμηματικά σε μαγνητικά κομμάτια, που τα ονομάζουμε περιοχές Weiss. Κάθε τέτοια περιοχή, δίνει συνολικά μόνο ένα σπιν, καθώς όλα τους έχουν διευθετηθεί παράλληλα. Το συνολικό αυτό σπιν, είναι τυχαία διευθετημένο. Τα όρια μέσα στις μαγνητικές αυτές περιοχές ονομάζονται τοιχώματα Bloch. Στα όρια αυτών των τοιχωμάτων έχουμε συνεχόμενη και σταδιακή αλλαγή της διεύθυνσης των μαγνητικών ροπών. Στο Σχήμα 1.3 παρουσιάζεται αυτή η εναλλαγή της διεύθυνσης των σπιν ανάμεσα σε δύο περιοχές Weiss και του τοιχώματος Bloch.

Η διεύθυνση των σπιν των ηλεκτρονίων έχει την τάση να διευθετηθεί παράλληλα διότι λόγω της επικάλυψης των τροχιακών δέχονται αλληλεπιδράσεις ανταλλαγής. Ανταγωνιστικά σε αυτές δρουν οι αλληλεπιδράσεις των μαγνητικών διπόλων, οι οποίες διευθετούν τα σπιν αντιπαράλληλα. Εντός μαγνητικού πεδίου το υλικό μαγνητίζεται και οι περιοχές έχουν την τάση να διευθετηθούν παράλληλα με αυτό. Οι μηχανισμοί με τους οποίους συμβαίνει αυτό είναι δύο. Στον πρώτο μηχανισμό η μετατόπιση των τοιχωμάτων Bloch αυξάνει τον όγκο στα σημεία όπου η μαγνητική ροπή και η διεύθυνση του πεδίου σχηματίζουν μικρότερη γωνία, οδηγώντας σε αύξηση του μαγνητισμού. Με τον δεύτερο μηχανισμό, η αύξηση συμβαίνει από την περιστροφή των ροπών στις περιοχές Weiss.

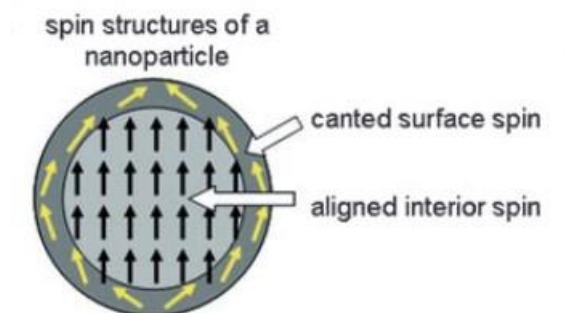


Σχήμα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση ενός τοιχώματος Bloch, ανάμεσα σε δύο περιοχές Weiss [Mercier et al, 2003]

1.2.4 Απόκριση σε μαγνητικά πεδία

Στις εφαρμογές των νανοκολλοειδών παίζει σημαντικό ρόλο η μαγνητική ροπή. Το μέγεθος των MN συνήθως κυμαίνεται στα 10nm και σε αυτές τις τάξεις μεγεθών τα περισσότερα άτομα βρίσκονται στην επιφάνεια των σωματιδίων. Εκεί ωστόσο εμφανίζεται μια δυσκολία ευθυγράμμισης του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και των σπιν των ηλεκτρονίων, εμφανίζοντας έτσι μια απόκλιση, σε αντιδιαστολή με τα σπιν εσωτερικά στα άτομα (Σχήμα 1.4). Αυτό το φαινόμενο οδηγεί σε μια μείωση της συνολικής μαγνήτισης του νανοσωματιδίου, καθώς δημιουργείται στην επιφάνεια ένα στρώμα μη ευθυγραμμισμένων σπιν [Jun et al, 2008]. Η μείωση αυτή αποτελεί τροχοπέδη στην προσπάθεια για εξωτερικό έλεγχο της κίνησης ενός συστήματος MN σε έναν οργανισμό για χρήσεις ενεργητικής στόχευσης.

Μία λύση για την αύξηση της μαγνητικής τους ροπής θα ήταν να μεγαλώσει σημαντικά το μέγεθός τους. Αυτό όμως έχει ως αποτέλεσμα να επηρεαστεί ο υπερπαραμαγνητισμός που εμφανίζουν οι νανοδομές, συνήθως στα 10-20nm, μια συμπεριφορά των σωματιδίων σιδηρομαγνητικών υλικών να φέρονται σαν παραμαγνητικά υλικά, αλλά με πολύ μεταλύτερες ροπές [Γκίνη, 2009]. Η αύξηση αυτή λοιπόν θα σήμαινε μετάβαση στη σιδηρομαγνητική συμπεριφορά και θα δημιουργούσε πρόβλημα στην αποτελεσματική διασπορά του κολλοειδούς.



Σχήμα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση της διαταραχής της ευθυγράμμισης των επιφανειακών σπιν υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου [Jun et al, 2008]

Η σύνθεση κolloειδών πλειάδων μαγνητικών νανοκρυσταλλιτών (colloidal clusters) φέρεται να λύνει αυτό το πρόβλημα, εξασφαλίζοντας έτσι την αύξηση της μαγνητικής ροπής ανά σωματίδιο του κolloειδούς, χωρίς να επηρεάζεται η υπερπαραμαγνητική συμπεριφορά του. Η μαγνητική απόκριση ενός σωματιδίου μέσα σε ένα μαγνητικό πεδίο δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$\vec{F} = (V_t M_s \cdot \nabla) \vec{B} \quad (1.6)$$

όπου με F συμβολίζουμε τη δύναμη μαγνητικά που δέχεται το υλικό, με V_t συνολικά τον όγκο του υλικού που εμπεριέχεται σε κάθε σωματίδιο, με B τη μαγνητική επαγωγή και τέλος M_s είναι η μαγνήτιση κόρου. Άρα αυτό που θα καθορίσει το πως θα αποκριθεί ένα σωματίδιο, είναι η ποσότητα του μαγνητικού υλικού σε κάθε πλειάδα.

1.2.5 Σταθεροποίηση και επιφανειακή τροποποίηση

Ο έλεγχος του μεγέθους της διασποράς των υπερπαραμαγνητικών νανοσωματιδίων είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας, καθώς οι ιδιότητες των νανοκρυστάλλων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη διάσταση των νανοσωματιδίων. Τα MNΣ με την κατάλληλη τροποποίηση της επιφάνειάς τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πολλές *in vivo* εφαρμογές. Αυτές οι βιοϊατρικές εφαρμογές όμως, απαιτούν τα νανοσωματίδια να έχουν υψηλές τιμές μαγνήτισης, μέγεθος μικρότερο από 100nm και μικρό δείκτη πολυδιασποράς μεγέθους. Οπότε είναι αναγκαία μια ειδική επιφανειακή επίστρωση, η οποία οφείλει να είναι μη τοξική, βιοσυμβατή και επίσης να επιτρέπει τη χορήγηση με ενεργητική στόχευση σε μια συγκεκριμένη περιοχή. Αυτά τα MN δύναται να συνδεθούν με φάρμακα, πρωτεΐνες, ένζυμα, αντισώματα ή και νουκλεοτίδια ώστε να μπορούν να κατευθυνθούν σε ένα όργανο, ιστό ή όγκο χρησιμοποιώντας ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο.

Σταθεροποίηση MN [Laurent et al, 2008]

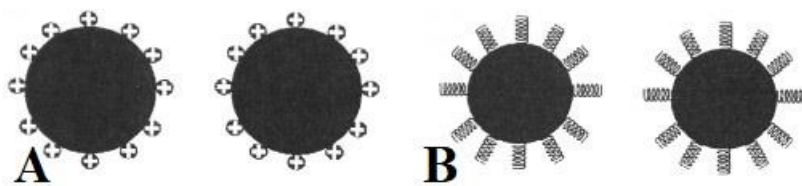
Η σταθεροποίηση των MNΣ είναι ζωτικής σημασίας για την παρασκευή μαγνητικών κolloειδών, που είναι σταθερά και δε συσσωματώνονται, τόσο μέσα σε ένα βιολογικό μέσο όσο και σε ένα μαγνητικό πεδίο. Η σταθερότητα ενός μαγνητικού κolloειδούς προκύπτει από την ισορροπία μεταξύ ελκτικών και

απωστικών δυνάμεων. Θεωρητικά, τέσσερα είδη δυνάμεων μπορούν να συμβάλλουν στο διασωματιδιακό δυναμικό ενός συστήματος. Οι δυνάμεις van der Waals προκαλούν ισχυρές ισοτροπικές έλξεις μικρής εμβέλειας. Οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις μπορούν να καλυφθούν εν μέρει με την προσθήκη άλατος. Η θεωρητική περιγραφή αυτών των δύο δυνάμεων είναι γνωστή ως η θεωρία Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) και αναλύεται περισσότερο στο κεφάλαιο 2.5.2.

Για τα μαγνητικά κολλοειδή, θα πρέπει να προστεθούν και οι μαγνητικές διπολικές δυνάμεις μεταξύ δύο σωματιδίων. Αυτές οι δυνάμεις προκαλούν ανισότροπες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες είναι ελκτικές, εάν το ανισότροπο διασωματιδιακό δυναμικό ενσωματωθεί σε όλες τις κατευθύνσεις. Τέλος, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη και οι στερικές απωστικές δυνάμεις για «μη γυμνά» σωματίδια.

Η σταθεροποίηση των MN μπορεί να επιτευχθεί ρυθμίζοντας τη μία ή και τις δύο απωστικές δυνάμεις, την ηλεκτροστατική και τη στερική άπωση (Σχήμα 1.5). Ο έλεγχος της ισχύος αυτών των δυνάμεων είναι μια βασική παράμετρος για την παρασκευή σωματιδίων με καλή σταθερότητα. Η στερική δύναμη είναι δύσκολο να προβλεφθεί και να ποσοτικοποιηθεί. Στα πολυμερή ωστόσο θεωρητικά έχει περιγραφεί αρκετά. Εξαρτάται, μεταξύ άλλων παραμέτρων, από το μοριακό βάρος του πολυμερούς και την πυκνότητά του. Η ηλεκτροστατική άπωση μπορεί να παρακολουθηθεί μέσω της γνώσης του δυναμικού διάχυσης που μπορεί να είναι πολύ κοντά στο ζήτη δυναμικό και του μήκους Debye-Huckel που εξαρτάται κυρίως από την ιοντική ισχύ και το pH του διαλύματος.

Στα ΜΝΣ, τα επιφανειακά άτομα του σιδήρου δρουν ως οξέα κατά Lewis και συντονίζονται με μόρια που δίνουν ηλεκτρόνια μονού ζεύγους. Επομένως, σε υδατικά διαλύματα, τα άτομα του σιδήρου συμπλέκονται με αυτά του νερού, το οποίο διασπάται εύκολα, και αφήνει την επιφάνεια των οξειδίων του σιδήρου υδροξυλιωμένη. Αυτές οι υδροξυλομάδες είναι αμφοτερικές και μπορεί να αντιδράσουν με οξέα ή βάσεις. Ανάλογα με το pH του διαλύματος, η επιφάνεια του μαγνητίτη θα είναι θετική ή αρνητική. Το ισοηλεκτρικό σημείο παρατηρείται σε pH 6.8. Γύρω από αυτό το σημείο, το σημείο μηδενικού φορτίου (PZC), η επιφανειακή πυκνότητα φορτίου είναι πολύ μικρή και τα σωματίδια δεν είναι πλέον σταθερά στο νερό και κροκιδώνονται.



Σχήμα 1.5: Σωματίδια σταθεροποιημένα με άπωση (A) ηλεκτροστατική και (B) στερική [Laurent et al, 2008].

Επιφανειακή τροποποίηση [Laurent et al, 2008]

Διάφοροι επιφανειακοί τροποποιητές μπορούν επίσης να φέρουν αλλαγές στην ηλεκτροστατική και στερεοχημική συμπεριφορά των ΜΝΣ, που είναι πιθανό να οδηγήσει στη σταθεροποίηση τους. Τρεις βασικές κατηγορίες είναι οι μονομερείς σταθεροποιητές, τα ανόργανα υλικά και οι πολυμερείς σταθεροποιητές.

Οι μονομερείς σταθεροποιητές είναι λειτουργικές ομάδες, που μπορούν να συνδεθούν με την επιφάνεια του μαγνητίτη, όπως καρβοξυλικές, φωσφορικές και θεικές ομάδες. Αυτή η σταθεροποίηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για δυνατότητα διασποράς τους μέσα σε φορείς ελαίου/υδρογονανθράκων ή υδατικά μέσα.

Ανόργανα υλικά όπως το πυρίτιο, ο χρυσός ή το γαδολίνιο μπορούν να επίσης να επικαλύψουν ΜΝΣ. Αυτές οι επικαλύψεις όχι μόνο παρέχουν σταθερότητα στα νανοσωματίδια μέσα στο διάλυμα αλλά επίσης βοηθούν στη δέσμευση διαφόρων βιολογικών προσδετών στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Αυτά τα νανοσωματίδια έχουν έναν εσωτερικό πυρήνα οξειδίου του σιδήρου με ένα εξωτερικό μεταλλικό κέλυφος από ανόργανα υλικά.

Στην κατηγορία των πολυμερών σταθεροποιητών, έχουν αναπτυχθεί αρκετές προσεγγίσεις για την επίστρωση των νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου, συμπεριλαμβανομένων *in situ* επικαλύψεων και επικαλύψεων μετά τη σύνθεση. Στην πρώτη προσέγγιση, τα νανοσωματίδια επικαλύπτονται κατά τη διάρκεια της σύνθεσης, όπως για παράδειγμα, σε μια διαδικασία συγκαταβύθισης παρουσία δεξτράνης. Η μέθοδος επικάλυψης μετά τη σύνθεση συνίσταται στον

εμβολιασμό του πολυμερούς στα μαγνητικά σωματίδια μόλις συντεθούν (πολυμερικά τασιενεργά). Στη βιβλιογραφία, οι πιο κοινές είναι η δεξτράνη, η καρβοξυμεθυλιωμένη δεξτράνη, η καρβοξυδεξτράνη, το άμυλο, η αραβινογαλακτάνη, η γλυκοζαμινογλυκάνη, το σουλφονωμένο στυρόλιο-διβινυλοβενζόλιο, η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), η πολυβινυλική αλκοόλη (PVA), τα πολοξαμερή και οι πολυοξαμίνες.

Πιο συγκεκριμένα, στην κατηγορία των πολυμερών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το PEG, ένα υδρόφιλο, υδατοδιαλυτό, βιοσυμβατό πολυμερές. Αρκετές έρευνες [Laurent et al, 2008] έχουν αναφέρει τη χρήση PEG για την αύξηση της βιοσυμβατότητας των διασπορών του οξειδίου του σιδήρου και την αύξηση του χρόνου κυκλοφορίας στο αίμα. Τα επικαλυμμένα με PEG νανοσωματίδια εμφανίζουν εξαιρετική διαλυτότητα και σταθερότητα σε υδατικό διάλυμα καθώς και σε φυσιολογικό ορό.

1.3 Μαγνητολιποσώματα

Τα λιποσώματα (LIP) είναι κολλοειδείς διασπορές σωματιδίων σφαιρικού σχήματος που αποτελούνται από μία ή περισσότερες λιπιδικές διπλοστιβάδες, μέσα σε ένα υδατικό μέσο. Τα κυστίδια αυτά σχηματίζονται αυθόρμητα όταν διασπαρούν αμφίφιλα λιπίδια σε υδατικό περιβάλλον και συνήθως το μέγεθος τους κυμαίνεται από μερικές δεκάδες νανόμετρα έως και αρκετά μικρόμετρα. Τα LIP μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για τον εγκλωβισμό υδρόφιλων μορίων στο εσωτερικό τους, όσο και λιπόφιλων μέσα στην διπλοστιβάδα τους. Η επιφανειακή τροποποίηση τους επίσης, δίνει τη δυνατότητα χρήσης τους και στη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων. Η πολύ καλή βιοσυμβατότητα και βιοαποικοδόμηση τους, τα καθιστούν αποτελεσματικά σωματίδια για βιοϊατρικές χρήσεις.

Τα συμβατικά LIP αρκετές φορές εμφανίζουν αργή και ανεξέλεγκτη απελευθέρωση φαρμάκου. Επιπλέον, για τη διασφάλιση της σωστής στόχευσης δεν είναι πάντα αρκετή η διερεύνηση του φαινομένου ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης (EPR effect). Το πορώδες των αγγείων σε έναν όγκο καθώς και ο βαθμός αγγείωσης του, δεν είναι κάτι παρατηρείται πάντα σε όλα τα είδη όγκων. Έτσι, η ανάγκη για τη μείωση των παρενεργειών των

φαρμάκων και για την αποτελεσματικότερη θεραπεία, οδήγησε στο συνδυασμό LIP με MN σε νανοδομές που βασίζονται σε λιπόσωμα και ονομάζονται μαγνητολιποσώματα (MLIP).

Ο συνδυασμός MN και LIP παρέχει ένα μέσο για την ανάπτυξη πολυτροπικών και πολυλειτουργικών θεραπευτικών-διαγνωστικών παραγόντων που επιτρέπουν την κατ' απαίτηση απελευθέρωση φαρμάκου [Skouras et al, 2018] και την παρακολούθηση της θεραπείας σε πραγματικό χρόνο. Τα MLIP αποκτούν αυξανόμενο ενδιαφέρον ως συστήματα χορήγησης, καθώς ξεπερνούν πολλούς περιορισμούς που σχετίζονται με τα λιποσώματα. Πολλές δομές MLIP εμφανίζουν αποτελεσματικότερη μεταφορά και παροχή θεραπευτικών ουσιών, βελτιώνοντας παράλληλα τις μαγνητικές ιδιότητες. Επιπλέον, έχουν εισαχθεί νέες τεχνικές για τη βελτίωση της απελευθέρωσης κατ' απαίτηση, καθώς και για την επίτευξη διαδοχικής απελευθέρωσης διαφορετικών θεραπευτικών παραγόντων.

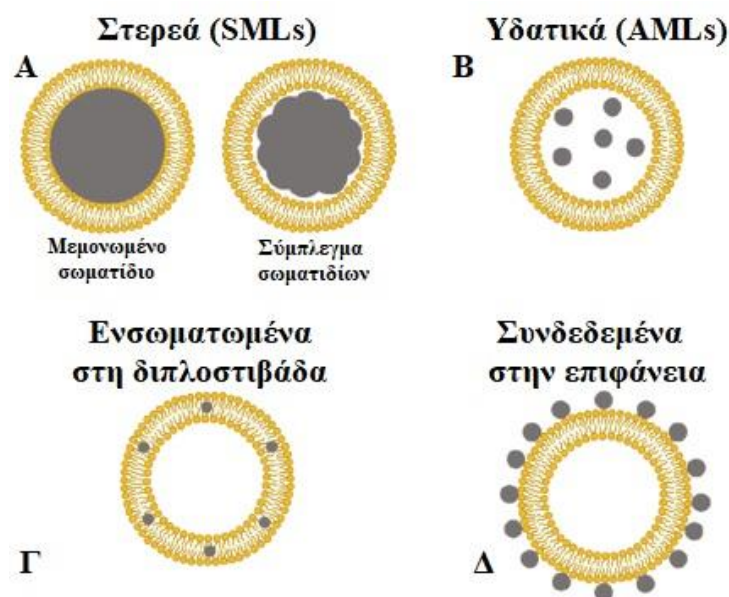
1.3.1 Είδη μαγνητολιποσωμάτων και μέθοδοι παρασκευής τους

Κατηγορίες των MLIP [Veloso et al, 2021]

Τα MLIP ανάλογα με την κατανομή των MN στη δομή των LIP μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κύριες κατηγορίες, τα στερεά MLIP (SMLs) τα οποία είτε αποτελούνται από ένα μεμονωμένο σωματίδιο ή ένα σύμπλεγμα MN επικαλυμμένα από μια μεμβράνη λιπιδικής διπλοστιβάδας, τα υδατικά MLIP (AMLs) στα οποία τα MN διασπείρονται στην εσωτερική υδατική κοιλότητα των LIP, MN ενσωματωμένα στη μεμβράνη λιπιδικής διπλοστιβάδας και τέλος MN που συνδέονται με την επιφάνεια των LIP.

Επιπλέον, πρόσφατα αναφέρθηκε η κατηγορία των πλασμονικών MLIP, η οποία συνάδει τόσο με τη μαγνητική όσο και με τη φωτοθερμική προσέγγιση. Αυτά τα συστήματα μπορούν να κατασκευαστούν είτε μέσω AML που ενθυλακώνουν μαγνητικά/πλασμονικά νανοσωματίδια (πυρήνας/κέλυφος), είτε μέσω της ενσωμάτωσης πλασμονικών και MN σε διαφορετικά διαμερίσματα των λιποσωμάτων (π.χ. MN στον εσωτερικό υδατικό αυλό και πλασμονικά νανοσωματίδια συνδεδεμένα με την επιφάνεια του λιποσώματος). Το Σχήμα 1.6

συννοψίζει τις κύριες αρχιτεκτονικές των MLIP. Άλλες λιγότερο κοινές δομές περιλαμβάνουν, τα πλασμονικά MLIP και συγκροτήματα κυστιδίων.



Σχήμα 1.6: Κατηγορίες μαγνητολιποσωμάτων: (Α) στερεά, (Β) υδατικά, (Γ) με ενσωμάτωση MN στη λιπιδική διπλοστιβάδα και (Δ) με σύνδεση MN στην επιφάνεια τους [Veloso et al, 2021].

Μέθοδοι παρασκευής MLIP [Veloso et al, 2021]

Η κατασκευή ενός συστήματος MLIP, συνήθως περιλαμβάνει και τη σύνθεση των MN, η οποία μπορεί να είναι είτε *in-situ* ή *ex-situ*. Η *in situ* μέθοδος συνιστάται στη χρησιμοποίηση κυστιδίων φωσφολιπιδίων ως νανοαντιδραστήρες (περιορίζοντας το μέγεθος του σωματιδίου στο μέγεθος του λιποσώματος), η οποία μπορεί να δώσει SML ενός σωματιδίου. Αντίθετα, η μέθοδος *ex-situ* απαιτεί αρχικά την σύνθεση των MN και στη συνέχεια το συνδυασμό τους με φωσφολιπίδια/λιποσώματα για την τελική παρασκευή των MLIP.

Τα ΜΝΣ είναι μια κατηγορία μείζονος βιοϊατρικού ενδιαφέροντος λόγω των καλών μαγνητικών ιδιοτήτων τους, της σταθερότητας, της βιοσυμβατότητας και της ευελιξίας στη χημικής τους τροποποίησης. Η σύνθεση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω διαφορετικών προσεγγίσεων, αλλά κατά προτίμηση χρησιμοποιούνται μέθοδοι οι οποίες περιλαμβάνουν χημικές στρατηγικές όπως η

συγκαταβύθιση, η θερμική αποσύνθεση, η sol-gel, η υδροθερμική και διαλυτοθερμική σύνθεση, καθώς και η σύνθεση μικρογαλακτώματος. Ειδικότερα, η συγκαταβύθιση προσφέρει έναν εύκολο και προσιτό τρόπο παραγωγής νανοσωματιδίων με διαφορετικές χημικές συστάσεις. Για παράδειγμα, μέσω συγκαταβύθισης μπορεί να γίνει σύνθεση MNΣ διαφόρων συστάσεων με πρόσμιξη μαγγανίου, ασβεστίου, μαγνήσιου και νικελίου, τα οποία ακολούθως μορφοποιούνται σε MLIP. Ωστόσο, αν λάβουμε υπόψη την εγγενή τοξικότητα των μετάλλων μετάπτωσης και το ότι οι φερρίτες είναι επιρρεπείς στη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), προτιμάται η χρήση ασβεστίου και μαγνησίου ως υποκατάστατα των κοινώς χρησιμοποιούμενων μετάλλων μετάπτωσης, για τη βελτίωση της βιοσυμβατότητας [Pereira et al, 2019].

Όσον αφορά την ανάπτυξη των MLIP, κοινές τεχνικές περιλαμβάνουν την έγχυση αιθανόλης (Ethanol Injection - EI), την ενυδάτωση λεπτού υμενίου (Thin Film Hydration - TFH), την εξάτμιση ανάστροφης φάσης (Reverse-Phase Evaporation - RPE) και τη μέθοδο διπλού γαλακτώματος (Double Emulsion - DE).

Η μέθοδος EI έχει αποδειχθεί ότι είναι μια απλή, χαμηλού κόστους και με επαναληψιμότητα μέθοδος για την παρασκευή ομοιογενών AMLs. Συνίσταται στην έγχυση ενός διαλύματος λιπιδίων σε αιθανόλη, μέσα σε υδατικό διάλυμα νανοσωματιδίων, πάνω από τη θερμοκρασία μετάπτωσης τους, υπό έντονη ανακίνηση.

Η μέθοδος TFH συνίσταται αρχικά στο σχηματισμό ενός λεπτού υμενίου (φιλμ) λιπιδίων, με ξήρανση ενός οργανικού διαλύματος λιπιδίων, και στη συνέχεια ενυδάτωση του με υδατικό διάλυμα νανοσωματιδίων, μείωση του μεγέθους τους μέσω υπερήχων και εξώθησης, για την παραγωγή MLIP ομοιόμορφου μεγέθους.

Ομοίως, στη μέθοδο RPE, ένα οργανικό διάλυμα λιπιδίων αρχικά αναμιγνύεται με ένα υδατικό διάλυμα νανοσωματιδίων και υποβάλλεται σε υπερήχους για να σχηματιστεί ένα γαλάκτωμα νερού σε έλαιο. Ακολούθως, ο οργανικός διαλύτης εξατμίζεται για να σχηματίσει μια φάση γέλης και ενυδατώνεται με ένα κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα.

Στη μέθοδο DE, τα νανοσωματίδια διαλύονται σε υδατική φάση, η οποία γαλακτωματοποιείται εντός μιας πτητικής οργανικής φάσης στην οποία έχουν διαλυθεί τα λιπίδια. Στη συνέχεια, το μείγμα που προέκυψε γαλακτωματοποιείται εντός υδατικής φάσης και ακολουθεί η ήπια εξάτμιση του οργανικού διαλύτη.

Ωστόσο, αποδείχθηκε πρόσφατα [Ghazanfari et al, 2017], χρησιμοποιώντας τη μέθοδο TFH, ότι διαφορετικές παράμετροι επηρεάζουν την απόδοση εγκλωβισμού των υδρόφιλων νανοσωματιδίων, όπως ο τύπος του ρυθμιστικού διαλύματος, η συγκέντρωση, το pH, η λιπιδική σύνθεση των LIP και η στοιχειομετρία των συστατικών. Η μέθοδος TFH είναι πιο αποτελεσματική όταν χρησιμοποιείται Egg-PC παρά λιπίδια DPPC. Η ένεση αιθανόλης παρά το ότι έχει χαμηλότερη απόδοση ενθυλάκωσης από την TFH, επιλέγεται μερικές φορές για την ευκολότερη διαδικασία της.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο εσωτερικός όγκος του LIP είναι μόνο ένα μικρό κλάσμα του συνολικού όγκου του δείγματος, τα παρασκευασμένα MLIP πρέπει να καθαριστούν. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω μαγνητικού διαχωρισμού, χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγέθους, φυγοκέντρισης και συσσωμάτωσης που προκαλείται από άλατα. Ο μαγνητικός διαχωρισμός ωστόσο, μπορεί να αδυνατεί να διαχωρίσει σωστά τα μη εγκλωβισμένα από τα ενθυλακωμένα νανοσωματίδια. Εάν χρησιμοποιηθούν υδρόφοβα νανοσωματίδια, η αυτοσυναρμολόγηση της λιπιδικής διπλοστιβάδας μπορεί να οδηγήσει στην κατασκευή MLIP με ενσωματωμένα νανοσωματίδια στη μεμβράνη της διπλοστιβάδας.

1.3.2 Πλεονεκτήματα και διαφορές [Velooso et al, 2021]

Οι αρχιτεκτονικές που αναφέρθηκαν προηγουμένως, πρέπει να επιλέγονται ανάλογα με την επιθυμητή εφαρμογή, καθώς η καθεμία παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Για παράδειγμα, η υψηλή αναλογία σιδήρου προς λιπίδιο των SMLs, επιτρέπει την υψηλή κυτταρική πρόσληψη σιδήρου και παρόμοιες μαγνητικές ιδιότητες με τα γυμνά MN. Ωστόσο, αυτό το σύστημα επιτρέπει μόνο την ενθυλάκωση υδρόφοβων ενώσεων καθώς δεν περιέχει εσωτερική υδατική κοιλότητα, ενώ τα AMLs μπορούν να μεταφέρουν τόσο υδρόφοβα όσο και υδρόφιλα φάρμακα.

Το κύριο μειονέκτημα των AMLs οφείλεται στην επιπλέον μάζα νερού, που προκαλεί μειωμένες μαγνητικές ιδιότητες, ενώ μπορεί επίσης να επηρεάσει και τη θερμική μετάπτωση, καθώς απαιτεί τη θέρμανση όλου του συστήματος. Επιπλέον το σύστημα αυτό απαιτεί καταλλήλως σταθεροποιημένα MN καθώς αυτά θα μπορούσαν να αντιδράσουν με τη λιπιδική διπλοστιβάδα και να προκαλέσουν μια ανεπιθύμητη διαρροή. Η ενσωμάτωση MN στη μεμβράνη ξεπερνά αυτούς τους περιορισμούς των AMLs, καθώς μπορεί να επιτρέψει την άμεση θέρμανση της μεμβράνης, αν και η απόδοση της εγκλωβισμού των νανοσωματιδίων θα περιοριστεί, εξ αιτίας του μεγέθους των MN.

Αν και λιγότερο εξερευνημένη, η πρόσδεση των MN στην επιφάνεια των MLIP καθιστά διαθέσιμη για φόρτωση φαρμάκου ολόκληρη την εσωτερική κοιλότητα των λιποσωμάτων. Αυτό, πέρα από την πιθανή χρήση τους για μαγνητική υπερθερμία και φωτοθερμία, παρέχει και τη δυνατότητα υψηλότερης αποτελεσματικότητας στην απελευθέρωση φαρμάκου.

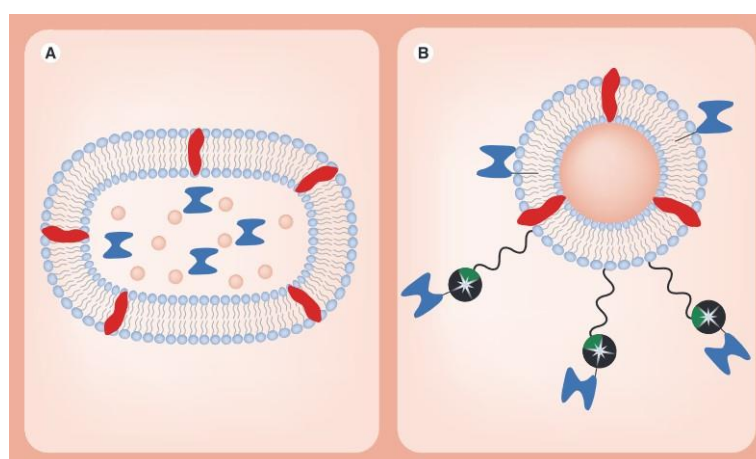
1.3.3 Εγκλωβισμός με φάρμακο [Al-Jamal et al, 2007]

Η ενσωμάτωση των MN σε LIP ανοίγει μεγάλες δυνατότητες στο πεδίο των έξυπνων συστημάτων χορήγησης φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένης της μαγνητικά καθοδηγούμενης, της καθοδηγούμενης με εικόνα χορήγησης φαρμάκου και της ελεγχόμενης εξωτερικά απελευθέρωσης, με χρήση υπερθερμίας ή εναλλασσόμενων μαγνητικών πεδίων. Στον τομέα της μεταφοράς φαρμάκων, τα MLIP λόγω της πολύ καλής βιοδιαθεσιμότητάς τους, της αμφίφιλης φύσης τους και της σχετικά απλής επιφανειακής τους τροποποίησης και του μεγέθους τους, αποτελούν εξαιρετικά συστήματα νανοφορέων.

Τα MLIP, τόσο τα υδατικά όσο και τα στερεά, έχουν τη δυνατότητα μεταφοράς και λιπόφιλων αλλά και υδρόφιλων φαρμάκων, με τα υδρόφιλα να εγκλωβίζονται στο εσωτερικό και τα λιπόφιλα στη λιπιδική διπλοστιβάδα τους (Σχήμα 1.7). Ωστόσο για τη μεταφορά υδρόφιλων ουσιών, προτιμάται η χρήση των υδατικών, καθώς είναι πιο εύκολος ο εγκλωβισμός της ουσίας μέσα στην εσωτερική κοιλότητα τους κατά τη διαδικασία παρασκευής τους. Για τα στερεά MLIP, λόγω της έλλειψης υδατικής φάσης είναι απαραίτητη η χημική τροποποίηση της υπό εγκλωβισμό ουσίας, ώστε να καταστεί υδρόφοβη. Αυτή η

διαδικασία βέβαια θα μπορούσε να προκαλέσει μεταβολές στην υδροδυναμική διάμετρο αλλά και στο ζήτα δυναμικό του σωματιδίου, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη οψωνοποίηση και το μικρότερο κατ' επέκταση χρόνο κυκλοφορίας στο αίμα. Η ενσωμάτωση αλυσίδων PEG θα μπορούσε να αυξήσει περαιτέρω το χρόνο κυκλοφορίας στο αίμα, αλλά υπάρχει πάντα η πιθανότητα, όλες αυτές οι τροποποιήσεις, να παρεμποδίσουν τη διείσδυση των MLIP στους ιστούς, οπότε απαιτούν πειραματικά καλύτερη διερεύνηση πριν την εφαρμογή δυσκολεύοντας ως ένα βαθμό το σχεδιασμό τους.

Η απελευθέρωση του φαρμάκου από τα MLIP, μόλις φτάσουν στην περιοχή στόχο, μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους. Από τους πιο διαδεδομένους είναι η τοπική αύξηση της θερμοκρασίας, που μπορεί να συμβεί είτε με χρήση θερμοευαίσθητων λιποσωμάτων είτε με χρήση λιπιδίων των οποίων η θερμοκρασία μετάπτωσης είναι λίγο μεγαλύτερη της θερμοκρασίας του σώματος, αλλά χαμηλότερης του ορίου υπερθερμίας. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε συνδυασμό με τη θεραπευτική χρήση υπερθερμίας σε καρκινικούς όγκους (Σχήμα 1.8). Άλλη στρατηγική απελευθέρωσης υδρόφιλου φαρμάκου είναι με χρήση λέιζερ εγγύς υπέρυθρου σε φωτοευαίσθητα MLIP [Babincova, 1999]. Επίσης η επιφανειακή τροποποίηση των MLIP ώστε να καταστούν ευαίσθητα στις διαφορές μεταξύ pH αίματος και όγκου μπορεί επίσης να οδηγήσει τοπικά σε ελεγχόμενη αποδέσμευση της ουσίας [Simoes et al, 2004].



Σχήμα 1.7: Σχηματική αναπαράσταση μεταφοράς αμφίφιλων (κόκκινο) και υδρόφιλων (μπλε) φαρμάκων σε (Α) υδατικά και (Β) στερεά MLIP [Soenen et al, 2009].

1.3.4 Εφαρμογές (in vivo)

Τα μαγνητολιποσώματα συνδυάζουν τα μοναδικά χαρακτηριστικά τόσο των μαγνητικών κolloειδών όσο και των λιποσωμικών μορφών, για αυτό και μπορούν να αξιοποιηθούν σε μια μεγάλη σειρά βιοτεχνολογικών και βιοϊατρικών εφαρμογών, όπως είναι η μαγνητική τομογραφία, η θεραπευτική αγωγή καρκίνου με υπερθερμία και η χορήγηση φαρμάκων.

Απεικόνιση Μαγνητικού Συντονισμού (Magnetic Resonance Imaging - MRI)

[Soenen et al, 2011]

Η μαγνητική τομογραφία έχει αναδειχθεί ως μια ισχυρή, μη επεμβατική μέθοδος στον τομέα της μοριακής και κυτταρικής απεικόνισης. Οι εικόνες MR βιολογικών δειγμάτων παράγονται συνήθως από άτομα υδρογόνου (ακριβέστερα από πρωτόνια) κινητών μορίων όπως το νερό και τα λιπίδια. Για τη μοριακή και κυτταρική απεικόνιση MR, χρησιμοποιούνται σκιαγραφικοί παράγοντες.

Η έρευνα στη βιοϊατρική απεικόνιση κατευθύνεται προς την ανάπτυξη και χρήση παραγόντων απεικόνισης, όπου οι οντότητες στόχευσης, οι τρόποι απεικόνισης και οι θεραπευτικοί παράγοντες είναι όλοι παρόντες σε ένα ενιαίο νανোসύστημα. Τα MLIP προσφέρουν μια ενδιαφέρουσα πλατφόρμα, όπου μικρά ΜΝΣ και άλλοι υδρόφιλοι απεικονιστικοί ή θεραπευτικοί παράγοντες μπορούν να συνδυαστούν μέσα στην υδατική κεντρική κοιλότητα λιποσωμάτων ή στην περίπτωση των υδρόφοβων ενώσεων, θα ενσωματωθούν στη διπλοστοιβάδα λιπιδίων των MLIP. Αυτά τα σωματίδια προσφέρουν ενδιαφέρουσες δυνατότητες χρήσης στη θεραπεία και την απεικόνιση του καρκίνου.

Η χρήση σκιαγραφικών παραμαγνητικών παραγόντων όπως το γαδολίνιο Gd ή των ΜΝΣ είναι μια κοινή πρακτική για την ενίσχυση των ορίων αντίχρευσσης και της οπτικοποίησης στοχευόμενων οργάνων ή κυττάρων. Λόγω της υψηλής τοξικότητας που σχετίζεται όμως με το Gd, η χρήση χηλικών ενώσεων και η αποτελεσματική νεφρική κάθαρση των σκιαγραφικών παραγόντων είναι ιδιαίτερα επιθυμητή. Για πειράματα in vitro επισημάνσης κυττάρων ή μακροχρόνιες in vivo μελέτες παρακολούθησης κυττάρων, η κάθαρση των σωματιδίων θα πρέπει να είναι πολύ χαμηλότερη, γεγονός που εμποδίζει τη

χρήση παραγόντων που βασίζονται στο Gd για αυτούς τους σκοπούς. Για αυτούς τους τύπους μελετών, τα MNΣ χρησιμοποιούνται συχνότερα.

Καθώς τα MNΣ θα βρεθούν όμως σε βιολογικό περιβάλλον, η επιφάνεια των πυρήνων τους πρέπει να είναι προσεκτικά προσαρμοσμένη ώστε να αποτραπεί η συσσωμάτωση των νανοπυρήνων, κάτι που θα μπορούσε να τους καταστήσει λιγότερο κατάλληλους για τις περισσότερες βιοϊατρικές εφαρμογές. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ευρεία ποικιλία πιθανών υλικών επικάλυψης όπως η δεξτράνη, κιτρικά πολύ μικρά σωματίδια οξειδίου του σιδήρου, πολυστυρόλιο/διβινυλοβενζόλιο, πυρίτιο, χρυσός, διμερκαπτοηλεκτρικό οξύ, λειτουργική πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) ή λιπίδια (μαγνητολιπόσωμα).

Όσον αφορά τις MRI ιδιότητες, τα μικρά MLIP φαίνεται να είναι ανθεκτικά στην pH-ευαίσθητη αποδόμηση σε αντίθεση με τα άλλα υλικά επικάλυψης σωματιδίων. Αυτό οφείλεται στην υψηλή σταθερότητα και την ισχυρή σύνδεση του εσωτερικού στρώματος της λιπιδικής διπλοστιβάδας με τον πυρήνα των οξειδίων σιδήρου, που ουσιαστικά τα προστατεύει αποτελεσματικά. Επιπλέον, το εξωτερικό λιπιδικό στρώμα των MLIP μπορεί εύκολα να αποδομηθεί, αφήνοντας το εσωτερικό στρώμα εκτεθειμένο και τα MLIP με μια υδρόφοβη επιφάνεια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενδοκυτταρική συσσώρευση των MLIP. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν τα μικρά MLIP πολύ χρήσιμα για μακροπρόθεσμη απεικόνιση επισημασμένων κυττάρων.

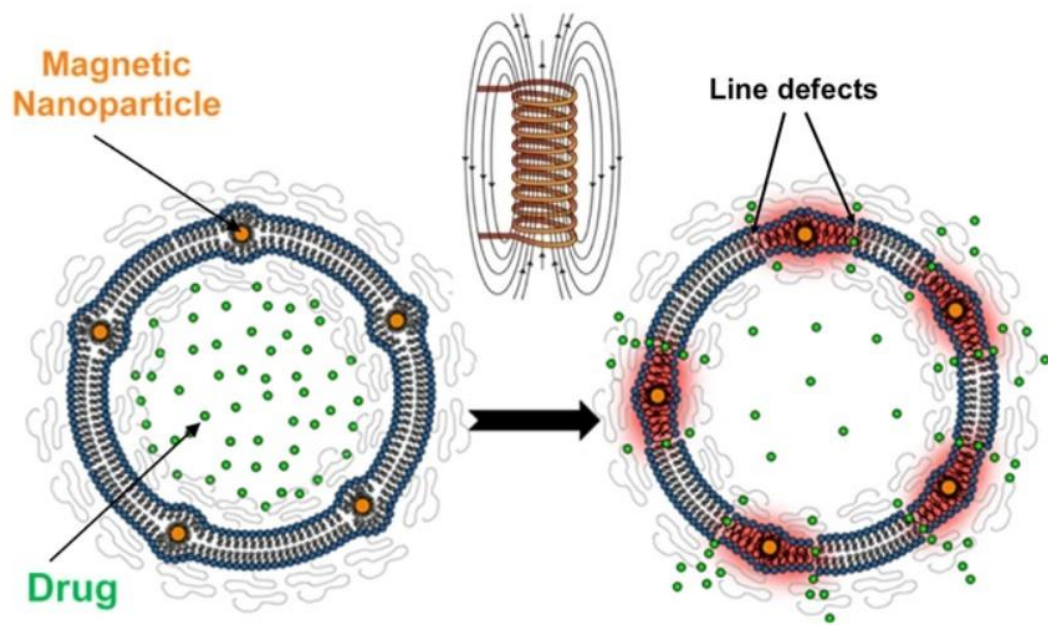
Υπερθερμία

Η υπερθερμία του μαγνητικού κολλοειδούς περιλαμβάνει την έγχυση MLIP απευθείας σε συγκεκριμένο ιστό ή όργανο (π.χ. λεμφαδένες) και την επακόλουθη έκθεση του σε ένα εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο (ΕΜΠ) για να θερμάνει την εν λόγω περιοχή στους 45-47°C. Οι θερμοκρασίες αρκετά επάνω από τις φυσιολογικές τιμές μπορεί να οδηγήσουν σε εκτεταμένη νέκρωση, πήξη ή ανάλογα με τη θερμοκρασία ακόμη και απανθράκωση. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον ως συμπληρωματική θεραπεία της ακτινοβολίας ή της χημειοθεραπείας με κίνητρο να καταστήσει τα κύτταρα ενός όγκου πιο ευαίσθητα στην κύρια θεραπεία. Η μέθοδος συνδέεται με το μέγεθος των MN, τα οποία όταν εκτίθενται σε ένα ΕΜΠ διαχέουν τη θερμότητα μέσω απωλειών αποδιέγερσης. Συνήθως, το δυναμικό θέρμανσης των MN εξαρτάται

από το ίδιο το υλικό, τη συγκέντρωση και το μέγεθός του. Η διάχυση ενέργειας συμβαίνει είτε μέσω της φυσικής περιστροφής των MN στο ρευστό (κίνηση Brown) είτε μέσω της περιστροφής των ατομικών μαγνητικών ροπών μέσα στο ίδιο το σωματίδιο (αποδιέγερση Néel). Σύμφωνα με το θεωρητικό μοντέλο για τον ογκομετρικό ρυθμό διασποράς ενέργειας που αναπτύχθηκε από τον Rosensweig, ο ρυθμός διασποράς ενέργειας (δηλαδή, το δυναμικό θέρμανσης) αυξάνεται με το εφαρμοζόμενο ΕΜΠ, δηλαδή το πλάτος και τη συχνότητά του. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι ένα ισχυρό ΕΜΠ μπορεί να οδηγήσει σε μη ειδική θέρμανση λόγω των δινορευμάτων [Monnier et al, 2014].

Ανάλογα με την ένταση και τη συχνότητα του πεδίου, η ποσότητα της παραγόμενης θερμότητας μπορεί να ρυθμιστεί. Όταν αυτά τα σωματίδια βρίσκονται εντός των καρκινικών κυττάρων, η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο. Όταν οι θερμοκρασίες είναι αυξημένες στους 41-46°C, έχουμε την ήπια υπερθερμία, η οποία μπορεί να διεγείρει την ανοσολογική απόκριση για μη ειδική ανοσοθεραπεία καρκίνων. Η θερμική κατάλυση συμβαίνει όταν οι θερμοκρασίες είναι πάνω από 46°C έως 56°C, γεγονός που οδηγεί σε καταστροφή του όγκου, για παράδειγμα με άμεση κυτταρική νέκρωση. Για την παροχή μιας ισχυρής αντικαρκινικής θεραπείας, είναι επιτακτική η στοχευμένη μεταφορά των σωματιδίων στα κύτταρα του όγκου χωρίς να προκαλέσει παρενέργειες στον περιβάλλοντα υγιή ιστό. Όπως και με τη χρήση των MLIP ως φορέων φαρμάκων (περιεγράφηκε νωρίτερα στο 1.3.3), η μεγάλη ευελιξία στην επιφανειακή τροποποίηση των MLIP επιτρέπει την εύκολη προσάρτηση μιας μεγάλης ποικιλίας συνδετών στόχευσης. Ένας άλλος εναλλακτικός τρόπος παροχής σωματιδίων περιλαμβάνει την άμεση ένεση MLIP εντός του όγκου.

Η θεραπεία με υπερθερμία, μπορεί επίσης να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων καρκινικών όγκων των οστών, όπως στη θεραπεία μεταστατικών βλαβών των οστών, και πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση του καρκίνου του προστάτη. Ένα άλλο θέμα που επί του παρόντος λαμβάνει μεγάλη προσοχή είναι η ανάπτυξη εξελιγμένων συνδυασμένων θεραπευτικών μεθόδων, όπως η αντιμετώπιση του κακοήθους μελάνωματος με υπερθερμία χρησιμοποιώντας MLIP, που περιείχαν ειδικό για το μελάνωμα φάρμακο [Soenen et al, 2009].



Σχήμα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση χρήσης της υπερθερμίας με παραγωγή θερμότητας τοπικά από ΜΝΣ εντός της διπλοστιβάδας σε MLIP, μέσω της χαλάρωσης Néel και την απελευθέρωση του φαρμάκου [Shaghasemi et al, 2017].

Στόχος εργασίας

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η παρασκευή, ανάπτυξη και μελέτη μαγνητολιποσωμάτων, τα οποία θα προσδίδουν στα μαγνητικά νανοσωματίδια που εγκλωβίζουν, αυξημένη σταθερότητα σε περιβαλλοντικές συνθήκες που προσομοιάζουν αυτές του ανθρώπινου σώματος, ώστε να μπορούν να έχουν δυνητικές εφαρμογές στη διάγνωση και θεραπεία.

Για το σκοπό αυτό η εργασία χωρίστηκε σε δύο μέρη. Στο κομμάτι της σύνθεσης, χαρακτηρισμού και μελέτης σταθερότητας των μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίων του σιδήρου και στο κομμάτι της παρασκευής των μαγνητολιποσωμάτων που θα εγκλωβίσουν αυτά τα σωματίδια, με τον επακόλουθο χαρακτηρισμό και μελέτη σταθερότητας τους.

Κατά τη σύνθεση των μαγνητικών νανοσωματιδίων, επιθυμητή είναι μια υδροδυναμική διάμετρος κάτω των 100nm, που να παρουσιάζει κρυσταλλικότητα, καλές μαγνητικές ιδιότητες και σταθερότητα. Για αυτό το λόγο επιλέχθηκε η μέθοδος της υδρολυτικής αλκαλικής καταβύθισης μιας πρόδρομης ένωσης σιδήρου.

Κατά την παρασκευή των μαγνητολιποσωμάτων, επιθυμητός είναι ο μεγαλύτερος δυνατός εγκλωβισμός των μαγνητικών νανοσωματιδίων, σε όσο το δυνατό μικρότερο μέγεθος μαγνητολιποσωμάτων. Αμέσως επόμενος στόχος είναι η σταθερότητα αυτών των μαγνητολιποσωμάτων στο χρόνο, η οποία διερευνάται μετρώντας τη μέση υδροδυναμική τους διάμετρο, το ζήτα δυναμικό και τον δείκτη πολυδιασποράς τους για εύλογο χρονικό διάστημα.

2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά και όργανα

2.1.1 Υλικά

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά ανά κατηγορία:

Διαλύτες

- Τριχλωρομεθάνιο ACS stabilized για υγρή χρωματογραφία, της Burdick & Jackson
- Μεθανόλη ACS gradient grade για υγρή χρωματογραφία, της Burdick & Jackson
- Απεσταγμένο νερό

Λιπίδια

- L-α-φωσφατιδυλοχολίνη Egg PC, της Avanti Polar Lipids
- 1,2-διστεαρύλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοαιθανολαμίνη-N-[μεθοξύ (πολυαιθυλενογλυκόλη)-2000] (άλας αμμωνίου) PEG-2000PE της Avanti Polar Lipids
- Χοληστερόλη $\geq 95\%$ GC, της Sigma Aldrich

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για το αντιδραστήριο Stewart για τη μέτρηση συγκέντρωσης λιπιδίου

- Εξαένυδρος τριχλωριούχος σίδηρος $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, της Merck
- Θειοκυανιούχο αμμώνιο NH_4SCN , της Merck

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για το ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών «PBS»

- Χλωριούχο νάτριο NaCl , της Merck

- Χλωριούχο κάλιο KCl, της Merck
- Οξινο φωσφορικό νάτριο Na_2HPO_4 , της Sigma Aldrich
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 , της Sigma Aldrich
- Νατραζίδιο NaN_3 , της Sigma Aldrich

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των μαγνητικών νανοσωματιδίων

- PAA-co-MA, της Sigma Aldrich
- Επταένυδρος θειικός σίδηρος $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, της Sigma Aldrich
- Υδροξείδιο του νατρίου NaOH, της Sigma Aldrich

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση συγκέντρωσης σιδήρου με τη μέθοδο KSCN

- Θειοκυανιούχο κάλιο KSCN, της Merck
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 , της Sigma Aldrich
- Υδροχλωρικό οξύ HCl 37% (w/w) SG analytical reagent grade, της Fisher Chemical

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση συγκέντρωσης σιδήρου με τη μέθοδο φαινανθρολίνης

- Υδροχλωρική υδροξυλαμίνη $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl} \geq 96.0\%$ ACS reagent grade, της Sigma Aldrich
- Μονοϋδρική 1,10-φαινανθρολίνη reagent grade, της Sigma Aldrich
- Υδροχλωρικό οξύ HCl 37% (w/w) SG analytical reagent grade, της Fisher Chemical
- Οξικό νάτριο $\text{CH}_3\text{COONa} \geq 99.0\%$ ACS reagent grade, της Sigma Aldrich

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το διαχωρισμό μέσω χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού

- Sepharose 2B Cross Linked, της Cytiva

Υλικά για τις μελέτες SEM

- Καλυπτρίδες Borosilicate cover glass Ø 13mm Thickness No. 1 της VWR

2.1.2 Όργανα

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα όργανα και συσκευές:

- Φασματοφωτόμετρο UV mini 1240 UV-Vis Spectrometer της Shimadzu
- Φυγόκεντρος (μικρή) Spectrofuge 16M (1000-14000rpm) της Labnet
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας AB204-S/Fact της Mettler Toledo
- Καταψύκτης Forma 700 Series της Thermo Fisher Scientific
- Μηχανικός αναδευτήρας στροβιλισμού Vortex Genie 2 της Scientific Industries
- Συλλέκτης κλασμάτων RediFrac της Pharmacia Biotech
- Κλίβανος Digitheat της JP Selecta
- Λυοφιλοποιητής FreeZone 1 της Labconco Corporation με αντλία κενού RV8 της Edwards
- Φυγόκεντρος (μεσσαία) Labofuge 200 Heraeus (1600-5300rpm) της Kendro Laboratory
- Φυγόκεντρος (μεγάλη) Model 2800 (300-4000rpm) της Kubota
- Λουτρό υπερήχων Ultrasonic Cleaner Branson 2510EDTH της Branson
- Ακίδα υπερήχων CV33 και επεξεργαστής Vibra Cell VC750 της Sonics & Materials
- Πλάκα θέρμανσης με μαγνητικό αναδευτήρα ARE Heating Magnetic Stirrer της VELP Scientifica
- Περιστρεφόμενος εξατμιστήρας Rotovapor R-200, με υδατόλουτρο ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας Heating Bath B-490 και ρυθμιστή κενού Vacuum Controller V-800 της Büchi με αντλία κενού Laboport Series της KNF Neuberger
- Απαγωγός Equip

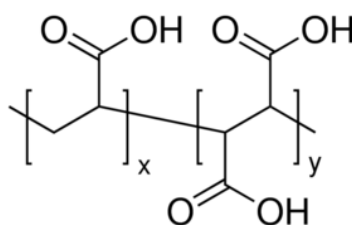
- Εξωθητήρας LiposoFast-Basic με φίλτρα Polycarbonate Membrane Ø 9mm διαμέτρου πόρων 400nm της Avestin και σύριγγες Gastight #1001 1mL της Hamilton Company Reno
- Πιπέτες Labmate Soft LM20 2-20μL, LM200 20-200μL, LM1000 100-1000μL της HTL
- Πιπέτα autoclavable BioPette 20-200 μL της Labnet International
- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης Zeiss Supra 40 VP EICN με Gemini Column
- Μετρητής μεγέθους σωματιδίων Zeta-Sizer Nano-ZS της Malvern Instruments
- ΡΗμετρο P902 της Consort με ηλεκτρόδιο HI 1230 της Hanna Instruments
- Μηχανικός αναδευτήρας Overhead Stirrer HT50DX, με πλάκα θέρμανσης και μαγνητικό αναδευτήρα WiseStir MSH-20D της Wids Laboratory Instruments
- Οσμόμετρο Löser Micro-Digital Osmometer MOD200 Plus της Camlab
- Περιθλασίμετρο ακτίνων X D8 Advance της Bruker

2.2 Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων

Για τα μαγνητικά νανοσωματίδια MNΣ, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της υδρολυτικής αλκαλικής καταβύθισης μιας πρόδρομης ένωσης σιδήρου καθώς και μια μη δημοσιευμένη σύνθεση, με πολύ καλές μαγνητικές ιδιότητες, η ανάπτυξη της οποίας πραγματοποιήθηκε από την υποψήφια διδάκτορα Δήμητρα Τζαβάρα [Τζαβάρα, 2014], του εργαστηρίου της Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών.

2.2.1 Σύνθεση μαγνητικού υβριδικού κολλοειδούς (υδρολυτική αλκαλική καταβύθιση μιας πρόδρομης ένωσης σιδήρου) [Chin et al. 2007]

Η μέθοδος της υδρολυτικής αλκαλικής καταβύθισης σε μια πρόδρομη ένωση σιδήρου, ακολουθήθηκε για τη δημιουργία των μαγνητικών νανοκρυσταλλιτών, παρόντος του πολυμερούς πολυ(ακρυλικό οξύ-co-μηλεϊνικό οξύ) (PAA-co-MA) [50% κ.β. σε H₂O], ως επιφανειακού τροποποιητή [Bakandritsos et al, 2008]. Το PAA-co-MA είναι ένας ασθενής πολυηλεκτρολύτης, η χημική του δομή του οποίου δίνεται στο Σχήμα 2.1.



Σχήμα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση της χημικής δομής του PAA-co-MA [Sigma-Aldrich, 2011].

Ο βαθμός διάστασης των καρβοξυλομάδων του δίνεται από τη σχέση:

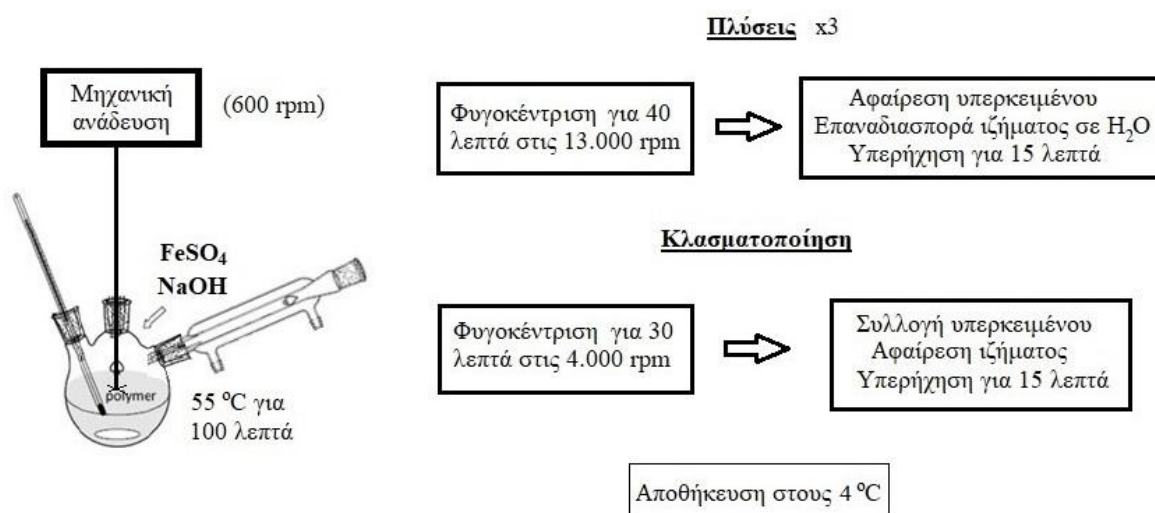
$$\alpha = \frac{[-\text{COO-}]}{[-\text{COO-}] + [-\text{COOH}]} \quad (2.1)$$

Κάθε επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα του, περιέχει τρεις καρβοξυλομάδες, δύο εκ των οποίων ανήκουν στο μηλεϊνικό οξύ και μία στο ακρυλικό οξύ και είναι ικανές να συμπλεχθούν με τα επιφανειακά άτομα Fe των αναπτυσσόμενων νανοσωματιδίων.

Αρχικά, παρασκευάζεται το υδατικό διάλυμα άλατος ένυδρου δισθενούς σιδήρου σε όξινες συνθήκες (πυκνό υδροχλωρικό οξύ 37%), διαλύοντας 720mg FeSO₄·7H₂O σε 10mL H₂O με προσθήκη 60μL HCl, υπό μαγνητική ανάδευση. Παράλληλα, ετοιμάζεται το υδατικό διάλυμα του πολυμερούς, προσθέτοντας 150mg PAA-co-MA σε 30mL H₂O, αναδεύοντας μηχανικά (στις 600rpm) σε τρίταιμη σφαιρική φιάλη. Μόλις το διάλυμα του πολυμερούς PAA-co-MA φτάσει στη θερμοκρασία των 40 °C, προστίθεται το διάλυμα του άλατος του

σιδήρου, υπό θέρμανση και ανάδευση, και στη συνέχεια προστίθεται η ποσότητα της βάσης (10mL NaOH). Η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά μέχρι τους 55 °C η οποία και παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης (Σχήμα 2.2 και Φωτογραφία 2.1). Στη συνέχεια η φιάλη αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολούθως το κολλοειδές, καθαρίζεται μέσω τριών διαδοχικών φυγοκεντρίσεων (13,000rpm) των 40 λεπτών και το ίζημα συλλέγεται και επαναδιασπείρεται σε H₂O. Στη συνέχεια ακολουθεί ανάδευση και υποβολή του προϊόντος σε λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά, με σκοπό να μειωθούν τα συσσωματώματα που δημιουργήθηκαν κατά τη φυγοκέντρωση. Για την καλύτερη απομάκρυνση των παραπροϊόντων, η διαδικασία της έκπλυσης μπορεί να επαναληφθεί όσες φορές χρειαστεί. Τέλος, ακολουθεί η κλασματοποίηση, με ήπια φυγοκέντρωση (4,000rpm) για 30 λεπτά, για την απομάκρυνση μεγαλύτερων συσσωματώσεων και λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά στο υπερκείμενο. Το κολλοειδές στη συνέχεια αποθηκεύεται στο ψυγείο (στους 4 °C).



Σχήμα 2.2: Σχηματική απεικόνιση της συνθετικής πορείας των νανοκολοειδών με μηχανική ανάδευση.

Για τη διερεύνηση της επίδρασης διαφορετικών παραμέτρων κατά τη διάρκεια της σύνθεσης στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, ελέγχθηκαν παράμετροι όπως ο τρόπος της ανάδευσης (μηχανική ή υπέρηχοι), η ποσότητα της προστιθέμενης βάσης αλλά και ο χρόνος κλασματοποίησης που ακολούθησε

της σύνθεσης. Άλλοι παράμετροι όπως το είδος του άλατος σιδήρου, η διαδοχή των αντιδραστηρίων, η θερμοκρασία της αντίδρασης, ο χρόνος παραμονής στη θέρμανση και ανάδευση καθώς και το είδος της βάσης, είχαν διερευνηθεί σε προηγούμενο χρόνο από την υποψήφια διδάκτορα Δήμητρα Τζαβάρα [Τζαβάρα, 2014].

Ακολούθησαν μετρήσεις της συγκέντρωσης σιδήρου με δύο χρωματομετρικές μεθόδους, μέτρηση της υδροδυναμικής διαμέτρου, του ζήτα δυναμικού καθώς και του μεγέθους του μαγνητικού πυρήνα.



Εικόνα 2.1: Φωτογραφική απεικόνιση της διάταξης για τη σύνθεση των ΜΝΣ αποτελούμενη από μηχανικό αναδευτήρα, θερμόμετρο, ψυκτήρα και ελαιόλουτρο σε θερμαντική πλάκα.

2.3 Μέθοδοι παρασκευής μαγνητολιποσωμάτων

Για την παρασκευή των μαγνητολιποσωμάτων MLIP χρησιμοποιήθηκαν ΜΝΣ με πολυμερικό φλοιό PAA-co-MA μαζί με λιποσώματα LIP, αρχικά πολυστιβαδιακής και στη συνέχεια μονής δομής. Για την παρασκευή των LIP χρησιμοποιήθηκε λιπιδική σύσταση φωσφατιδυλοχολίνης αυγού (egg-PC), χοληστερόλης (CHOL) και πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG-2000) σε αναλογίες PC:Chol 2:1 + 4% PEG-2000 (επί των moles του PC) [Pradhan et al, 2007],

συγκέντρωσης 11mg/mL. Ακολούθησε εγκλωβισμός των ΜΝΣ στα LIP με τρεις διαφορετικές τεχνικές, παρουσία ισότονου υδατικού μέσου (PBS) και τέλος διαχωρισμός τους με χρήση χρωματογραφίας γέλης.

2.3.1 Μέθοδος ενυδάτωσης λεπτού υμενίου (TFH) [Zhang, 2017]

Η μέθοδος της ενυδάτωσης λεπτού λιπιδικού υμενίου (Thin Film Hydration -TFH) είναι μια τεχνική παρασκευής πολυστιβαδικών λιποσωμάτων (MLV) που βασίζεται στην εξάτμιση ενός οργανικού λιπιδικού διαλύματος μέσα σε μια σφαιρική κωνική φιάλη. Η φιάλη τοποθετείται μέσα σε ένα υδατόλουτρο, σε θερμοκρασία άνω της θερμοκρασίας μετάπτωσης φάσης του λιπιδίου, και κάτω από ένα περιστρεφόμενο εξατμιστήρα (rotary evaporator) για την απομάκρυνση και συλλογή των οργανικών διαλυτών. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη, η φιάλη τοποθετείται κάτω από ρεύμα αζώτου για την απομάκρυνση της περίσσειας οργανικού διαλύτη από το λεπτό υμένιο που έχει σχηματιστεί στα τοιχώματα της φιάλης (Εικόνα 2.2). Ακολουθεί η ενυδάτωση του λιπιδικού υμενίου με την επιθυμητή για εγκλωβισμό ουσία ή υδατικό διάλυτη, πάλι σε θερμοκρασία μεγαλύτερης από αυτής της μετάπτωσης.



Εικόνα 2.2: Σχηματισμός λεπτού λιπιδικού υμενίου στα τοιχώματα της σφαιρικής φιάλης.

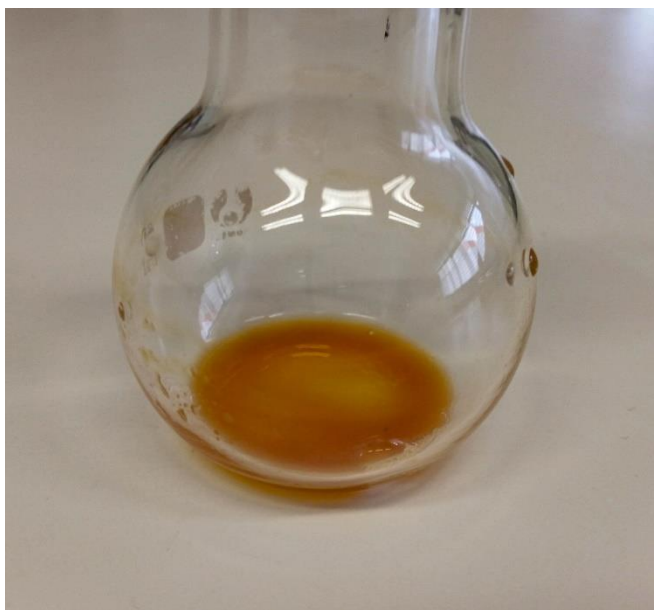
Η αποκόλληση του λιπιδικού υμενίου από τη σφαιρική φιάλη γίνεται μηχανικά με ανάδευση στροβιλισμού (vortex), δίνοντας ένα θολερό προϊόν που είναι ουσιαστικά μια MLV διασπορά μεγάλου μεγέθους. Για τη μείωση του μεγέθους της αλλά και δημιουργίας καλύτερης ομοιογένειας, το προϊόν τοποθετείται αρχικά σε λουτρό υπερήχων.

Αναλόγως της πειραματικής διαδικασίας που θα ακολουθηθεί, το προϊόν μπορεί να τοποθετηθεί είτε σε ακίδα υπερήχων (probe sonicator) για τη δημιουργία μικρών μονοστιβαδιακών λιποσωμάτων (SUV) ή υφίσταται εξώθηση μέσω φίλτρων ή μεμβρανών (extrusion) προκαθορισμένου μεγέθους πόρων, για τη δημιουργία μεγάλων μονοστιβαδιακών λιποσωμάτων (LUV). Στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί η ακίδα υπερήχων, το προϊόν θα χρειαστεί ένα επιπλέον στάδιο φυγοκέντρησης (14,000rpm) για την απομάκρυνση των μεταλλικών ρινισμάτων της ακίδας. Τέλος, η λιποσωμική διασπορά τοποθετείται για ανόπτηση (annealing) σε υδατόλουτρο, άνω της θερμοκρασίας μετάπτωσης, για την ολοκλήρωση και μορφολογική ομαλοποίηση της δομής τους.

2.3.1.1 Ενυδάτωση λιπιδικού υμενίου με MNΣ

Σε σφαιρική κωνική φιάλη μεταφέρθηκαν οι απαιτούμενες ποσότητες λιπιδίων, που είχανε διαλυθεί αρχικά σε διάλυμα χλωροφορμίου και μεθανόλης. Πιο συγκεκριμένα, 750μL φωσφολιπιδίου PC από αρχικό διάλυμα 20mg/mL, 382μL CHOL από αρχικό διάλυμα 10mg/mL και 221μL PEG-2000 από αρχικό διάλυμα 10mg/mL. Η φιάλη τοποθετήθηκε στον περιστρεφόμενο εξατμιστήρα σε θερμοκρασία υδατόλουτρου 40°C μέχρι να εξατμιστεί πλήρως ο οργανικός διαλύτης και δημιουργηθεί το λιπιδικό υμένιο. Ακολούθως, με εφαρμογή ροής αζώτου, απομακρύνθηκαν πιθανά υπολείμματα του από τα τοιχώματα της φιάλης.

Η ενυδάτωση του λιπιδικού υμενίου έγινε σταδιακά με προσθήκη 100μL MNΣ, 100μL PBS και τέλος 800μL PBS, για τελικό όγκο 1mL MLIP (Εικόνα 2.3). Στη συνέχεια ακολούθησε εξώθηση των MLIP από φίλτρα 400nm και αφέθηκαν για ανόπτηση στους 40 °C για τουλάχιστον 30 λεπτά.

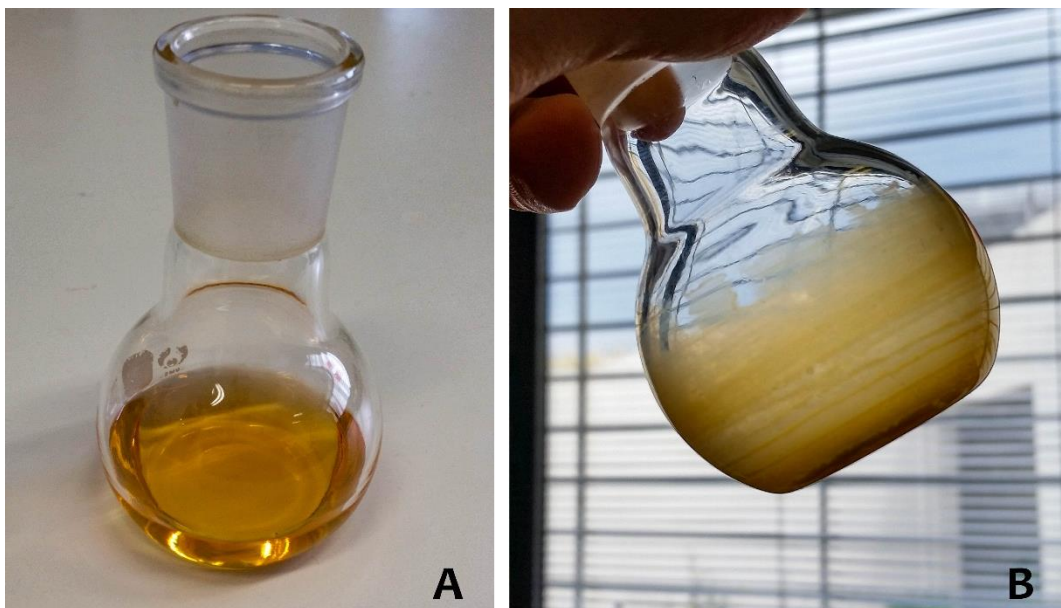


Εικόνα 2.3: Ενυδάτωση λεπτού λιπιδικού υμενίου με MNΣ.

2.3.1.2 Επαναδιασπορά των MNΣ σε MeOH και ενυδάτωση λιπιδικού υμενίου

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε επαναδιασπορά 100μL MNΣ σε μεθανόλη, με φυγοκέντρωση και αφαίρεση του υπερκειμένου. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη των MNΣ σε σφαιρική κωνική φιάλη μαζί με τις απαιτούμενες ποσότητες λιπιδίων, που είχανε διαλυθεί αρχικά σε διάλυμα χλωροφορμίου και μεθανόλης (Εικόνα 2.4 Α). Πιο συγκεκριμένα, προστέθηκαν 750μL φωσφολιπιδίου PC από αρχικό διάλυμα 20mg/mL, 382μL CHOL από αρχικό διάλυμα 10mg/mL και 221μL PEG-2000 από αρχικό διάλυμα 10mg/mL και 100μL MNΣ σε μεθανόλη. Η φιάλη τοποθετήθηκε στον περιστρεφόμενο εξατμιστήρα σε θερμοκρασία υδατόλουτρου 40°C μέχρι να εξατμιστεί πλήρως ο οργανικός διαλύτης και δημιουργηθεί το μαγνητολιπιδικό υμένιο (Εικόνα 2.4 Β). Ακολούθως, με εφαρμογή ροής αζώτου, απομακρύνθηκαν πιθανά υπολείμματα του από τα τοιχώματα της φιάλης.

Η ενυδάτωση του μαγνητολιπιδικού υμενίου που προέκυψε, έγινε σταδιακά με προσθήκη 100μL PBS, 100μL PBS και τέλος 800μL PBS, για τελικό όγκο 1mL MLIP. Στη συνέχεια ακολούθησε εξώθηση των MLIP από φίλτρα 400nm και αφέθηκαν για ανόπτηση στους 40 °C για τουλάχιστον 30 λεπτά.



Εικόνα 2.4: (Α): Προσθήκη των MeOH- MNΣ στη φιάλη μαζί με τα λιπίδια.
(Β): Σχηματισμός μαγνητολιπιδικού υμενίου στα τοιχώματα της φιάλης.

2.3.2 Με τη μέθοδο αφυδατωμένων - ανασυσταμένων κυστιδίων (DRV) [Antimisiaris, 2010]

Η μέθοδος των αφυδατωμένων – ανασυσταμένων κυστιδίων (Dried Reconstituted Vesicles - DRV), χρησιμοποιεί μια διασπορά άδειων SUV που υφίσταται λυοφιλοποίηση (freeze drying), παρουσία διαλύματος της ουσίας προς εγκλωβισμό. Λόγω της πολύ καλής οργάνωσης του λιπιδίου των SUV στη δομή των μεμβρανών των λιποσωμάτων, με την προσθήκη του υδατικού διαλύτη σχηματίζονται λιποσώματα υψηλής ικανότητας εγκλωβισμού. Η απλότητα της μεθόδου, οι ήπιες συνθήκες χρήσης, η υψηλή ικανότητα εγκλωβισμού μεγάλου εύρους ουσιών, η δυνατότητα διακοπής της διαδικασίας κατά τα διάφορα στάδια της και η ταχεία ανασύσταση του λυοφιλοποιημένου προϊόντος, καθιστούν την τεχνική αυτή σημαντική για τη φαρμακευτική βιομηχανία. Το μειονέκτημα της ανομοιογένειας μεγέθους στα ανασυσταμένα λιποσώματα, λύνεται εύκολα με τη χρήση φίλτρων, για την παραγωγή επαναλήψιμων πειραματικών αποτελεσμάτων.

Η παρασκευή λιποσωμάτων με τη μέθοδο DRV [Skouras et al, 2011], ακολουθεί τη διαδικασία παραγωγής SUV λιποσωμάτων με τη μέθοδο TFH και τη χρήση ακίδας υπερήχων, με τη διαφοροποίηση πως η αρχική ενυδάτωση της φιάλης γίνεται με διάλυμα PBS 10%. Στη συνέχεια η λιποσωμική διασπορά μπορεί να αναμειχθεί με την προς εγκλωβισμό ουσία και να λυοφιλοποιηθεί, είτε σε μια παραλλαγή της μεθόδου να λυοφιλοποιηθεί μόνο η λιποσωμική διασπορά και η προσθήκη της προς εγκλωβισμό ουσίας να γίνει στο πρώτο βήμα της επανασύστασης. Ακολουθεί η επανασύσταση των λιποσωμάτων με σταδιακή προσθήκη 100μL H₂O (ή στην περίπτωση της παραλλαγής, με την ουσία), 100μL PBS και 800μL PBS με ενδιάμεση ανόπτηση 30 λεπτών για κάθε προσθήκη, σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από αυτή της μετάπτωσης του λιπιδίου. Τέλος ακολουθεί εξώθηση μέσω φίλτρων για τη μείωση της υδροδυναμικής διαμέτρου σε επιθυμητά επίπεδα και εκ νέου ανόπτηση για τουλάχιστον 30 λεπτά.

Για την παραγωγή MLIP με τη μέθοδο DRV, ακολουθήθηκε η ίδια αρχική διαδικασία με την TFH τεχνική. Σε σφαιρική κωνική φιάλη μεταφέρθηκαν 750μL φωσφολιπιδίου PC από αρχικό διάλυμα 20mg/mL, 382μL CHOL από αρχικό διάλυμα 10mg/mL και 221μL PEG-2000 από αρχικό διάλυμα 10mg/mL. Η φιάλη τοποθετήθηκε στον περιστρεφόμενο εξατμιστήρα σε θερμοκρασία υδατόλουτρου 40 °C μέχρι να εξατμιστεί πλήρως ο οργανικός διαλύτης και δημιουργηθεί το λιπιδικό υμένιο. Ακολούθως, με εφαρμογή ροής αζώτου, απομακρύνθηκαν πιθανά υπολείμματα του από τα τοιχώματα της φιάλης.

Η ενυδάτωση του λιπιδικού υμενίου έγινε σταδιακά με προσθήκη 100μL PBS 10%, 100μL PBS 10% και τέλος 800μL PBS 10%, για τελικό όγκο 1mL LIP. Στη συνέχεια η διασπορά τοποθετήθηκε σε ακίδα υπερήχων έντασης 28% για 10 λεπτά και ακολούθησε φυγοκέντριση στις 14,000rpm, με συλλογή του υπερκείμενου για την απομάκρυνση των μεταλλικών ρινισμάτων της ακίδας. Μετά η λιποσωμική διασπορά τοποθετήθηκε για ανόπτηση στους 40 °C για τουλάχιστον 30 λεπτά. Τέλος, το προϊόν αφέθηκε για αργή ψύξη στους -20 °C για 24 ώρες.

Την επόμενη μέρα, τα παγωμένα πλέον LIP αφέθηκαν στο λυοφιλοποιητή (freeze dryer) για 24 ώρες. Η ανασύσταση της λιποσωμικής διασποράς έγινε με προσθήκη 100μL MNΣ στο αποξηραμένο προϊόν ενώ ακολούθησε ανόπτηση στους 40 °C για 30 λεπτά. Η διαδικασία επαναλήφθηκε στη συνέχεια με

προσθήκη 100μL PBS και τέλος 800μL PBS, πάντα με ενδιάμεση ανόπτηση, για τελικό όγκο 1mL MLIP. Τέλος, ακολούθησε η εξώθηση των MLIP από φίλτρα 400nm πριν αφεθούν ξανά για ανόπτηση στους 40 °C για τουλάχιστον 30 λεπτά.

2.4 Διαχωρισμός και καθαρισμός των MLIP

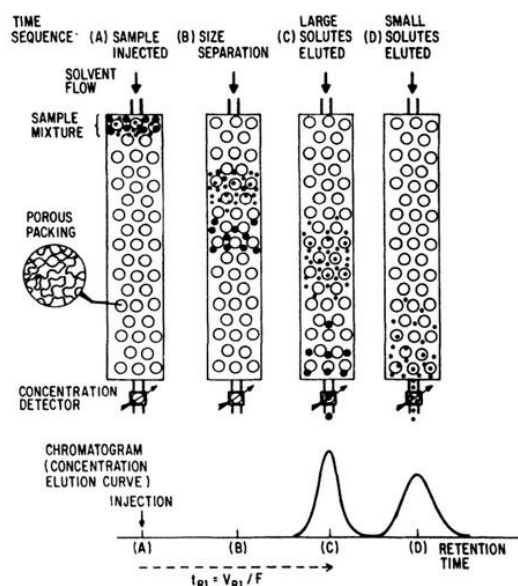
Υγρή χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

Για τον διαχωρισμό των μη εγκλωβισμένων ΜΝΣ από τα LIP αλλά και για τον καθαρισμό των MLIP, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού. Στη χρωματογραφία γέλης, τα μοριακά συστατικά ενός μείγματος, με την υποστήριξη μιας υγρής κινητής φάσης, μετακινούνται εσωτερικά στο δίκτυο πόρων της στατικής φάσης, όπου και επέρχεται διαχωρισμός με βάση το μέγεθος τους. Η στατική φάση με το δικτυωτό της πλέγμα, επιτρέπει την είσοδο στο εσωτερικό της μόνο των μορίων ή ιόντων το μέγεθος των οποίων μικρότερο από αυτό των πόρων της. Έτσι ουσίες με μεγαλύτερο μέγεθος, δεν εισέρχονται στο δίκτυο αυτό και παρασυρόμενες από την κινητή φάση, εκλύονται πρώτες από τη γέλη. Οι ουσίες που εισέρχονται στο δίκτυο της, κατανέμονται στη στατική φάση αναλόγως του μεγέθους τους και εκλύονται από τη γέλη κατά σειρά μεγέθους.

Για τη διεξαγωγή των μελετών χρησιμοποιήθηκε ως κινητή φάση ρυθμιστικό διάλυμα PBS και ως σταθερή σεφαρόζη (Sephacrose CL-2B), μια γέλη αραρόζης. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκε ένα παράγωγο διασταυρωμένης (cross linked) αραρόζης 2% που είναι χημικά και φυσικά πιο σταθερό και ανθεκτικό, με την ίδια επιλεκτική ποιότητα και καλύτερη δυνατότητα ροής από την απλή αραρόζη [GE Healthcare, 2006].

Η σεφαρόζη παρέχεται ήδη διογκωμένη σε ένα διάλυμα αιθανόλης 20%, για αυτό και είναι απαραίτητο να προηγηθούν διαδοχικές πλύσεις και απαερώσεις με PBS πριν την τοποθέτηση στη στήλη και χρήση της. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία της προετοιμασίας, η πλήρωση και πακετάρισμα της στήλης με γέλη γίνεται με συνεχή ροή PBS, με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγεται η δημιουργία κενών και φυσαλίδων. Μόλις ολοκληρωθεί και το πακετάρισμα της, είναι αναγκαίος ο κορεσμός της με μια λιποσωμική διασπορά, ώστε να καλυφθούν

διάφορα κενά που μπορεί να υπάρχουν. Σημαντικό ρόλο στην ικανότητα διαχωρισμού της στήλης παίζουν και οι διαστάσεις αυτής, για αυτό και επιλέχτηκε στήλη ύψους 77cm και διαμέτρου 1cm, συνολικού όγκου 60.5mL. Ο όγκος των δειγμάτων προς διαχωρισμό ορίστηκε στα 800μL και των κλασμάτων ορίστηκε στο 1mL.



Σχήμα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση του διαχωρισμού με βάση το μέγεθος των μορίων ενός δείγματος σε στήλη [Yau et al, 2009].

2.5 Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός

2.5.1 Μελέτη μεγέθους και πολυδιασποράς σωματιδίων

Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering - DLS)

Η έννοια της σκέδασης του φωτός πάνω σε σωματίδια, έχει να κάνει με την αλληλεπίδραση σωματιδίων με το φως που χτυπά πάνω τους, που έχει ως αποτέλεσμα την εκτροπή μιας ποσότητας φωτός από την αρχική του κατεύθυνση. Μια μεγάλη ποικιλία από οπτικά φαινόμενα που σχετίζονται με αυτό, είναι γενικά γνωστά ως σκέδαση. Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός, σε οποιαδήποτε γωνία, εξαρτάται από το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός, το μέγεθος και το σχήμα των σωματιδίων, τις οπτικές ιδιότητες των σκεδαστών, καθώς και τη γωνία παρατήρησης. Επιπλέον, κάτω από ορισμένες συνθήκες, η λειτουργική σχέση μεταξύ αυτών των μεταβλητών είναι γνωστή, τουλάχιστον για σφαιρικά

σωματίδια και άλλες γεωμετρίες. Με την εφαρμογή αυτών των σχέσεων σε πειράματα σκέδασης φωτός, μπορεί να εξαχθούν πληροφορίες σχετικά με τα υπεύθυνα για τη σκέδαση σωματίδια.

Η σκέδαση του φωτός μπορεί να ταξινομηθεί σε στατική ή δυναμική ανάλογα με το πώς μετρείται η ένταση. Στη στατική σκέδαση φωτός (Static Light Scattering) η μέση χρονική συνολική ένταση μετράται ως συνάρτηση της γωνίας σκέδασης. Για ορισμένα συστήματα, με τη στατική σκέδαση φωτός, μπορεί να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος και η γυροσκοπική ακτίνα. Επιπλέον, μπορεί να εξαχθούν πληροφορίες σχετικά με την εσωτερική δομή και τα σχήματα των σωματιδίων, με την καταγραφή της εξάρτησης της έντασης από τη γωνία. Αντίθετα, στη δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering) η χρονική μεταβολή της έντασης μετράται και εκφράζεται μέσω της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης έντασης. Από τέτοιες μετρήσεις μπορεί να προκύψουν οι συντελεστές διάχυσης των σωματιδίων, το μέγεθος των σωματιδίων και η κατανομή μεγέθους. Υπάρχουν πολλές παραλλαγές της δυναμικής σκέδασης φωτός και διαφορετικά ονόματα που χρησιμοποιούνται στην βιβλιογραφία (π.χ., Intensity Fluctuation Spectroscopy, Quasi-Elastic Light Scattering, κλπ.) ανάλογα με το τι και πώς μετράται.

Σε γενικές γραμμές, η ένταση σε ένα πείραμα σκέδασης εξαρτάται και από το χρόνο, δεδομένου ότι τα κέντρα σκέδασης βρίσκονται σε συνεχή τυχαία κίνηση λόγω της κινητικής τους ενέργειας. Η διακύμανση της έντασης συναρτήσει του χρόνου, κατά συνέπεια, περιέχει πληροφορίες σχετικά με την τυχαία κίνηση των σωματιδίων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση του συντελεστή διάχυσης των σωματιδίων. Αυτός ο συντελεστής διάχυσης, μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για να καθοριστεί το μέγεθος του σωματιδίου. Σήμερα, το DLS είναι μια συνήθης εργαστηριακή τεχνική για τη μέτρηση συντελεστών διάχυσης, του μεγέθους των σωματιδίων και των κατανομών μεγέθους των σωματιδίων σε κolloειδή διασπορών, με χρήση της σχέσης Stokes-Einstein (Σχήμα 2.1) [Hiemenz, 1997], [Malvern Panalytical, 2018].

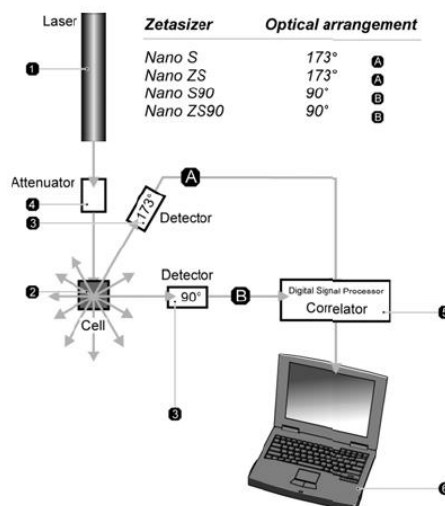
$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}$$

Σχήμα 2.1: Σχέση Stokes-Einstein, όπου D είναι ο συντελεστής διάχυσης, k η σταθερά του Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία, π η σταθερά π , η το ιξώδες του διαλύματος και R η υδροδυναμική ακτίνα του σωματιδίου [EMBL, 2004].

Η μετρούμενη ακτίνα με αυτήν την τεχνική, ονομάζεται υδροδυναμική ακτίνα (R_H) και κατ' επέκταση υπολογίζεται η διάμετρος (D_H) μιας νοητής σφαίρας, με συντελεστή διάχυσης (D) αυτόν των μετρούμενων σωματιδίων. Η θερμοκρασία παίζει ρόλο στο ιξώδες του διαλύτη, που κατ' επέκταση επηρεάζει τη διασπορά του φωτός του λέιζερ, οπότε οι μετρήσεις γίνονται υπό σταθερή και γνωστή θερμοκρασία.

Ένα τυπικό σύστημα DLS αποτελείται από έξι κύρια τμήματα (Σχήμα 2.2). Αρχικά, ένα λέιζερ παρέχει μια πηγή φωτός. Ένας ανιχνευτής χρησιμοποιείται για να μετρήσει το σκεδαζόμενο φως. Στο Zetasizer Nano Series, η θέση του ανιχνευτή θα είναι είτε σε θέση 173° ή 90° , ανάλογα με το συγκεκριμένο μοντέλο.

Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός πρέπει να είναι μέσα σε ένα συγκεκριμένο εύρος για να μετρηθεί με επιτυχία από τον ανιχνευτή. Ο συσχετιστής συγκρίνει την ένταση σκέδασης σε διαδοχικά χρονικά διαστήματα για τον υπολογισμό του ρυθμού με τον οποίο η ένταση μεταβάλλεται. Η μεταβολή της έντασης επηρεάζεται από την ταχύτητα διάχυσης και η οποία με τη σειρά της από την υδροδυναμική διάμετρο, και η οποία υπολογίζεται με αυτόν τον τρόπο [Malvern Instruments, 2014].



Σχήμα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση μιας διάταξης DLS. Όπου: (1) η συσκευή λέιζερ, (2) η κυψελίδα, (3) ο ανιχνευτής, (4) ο εξασθενιστής, (5) ο συσχετιστής και (6) ο ηλεκτρονικός υπολογιστής [Malvern Instruments, 2014].

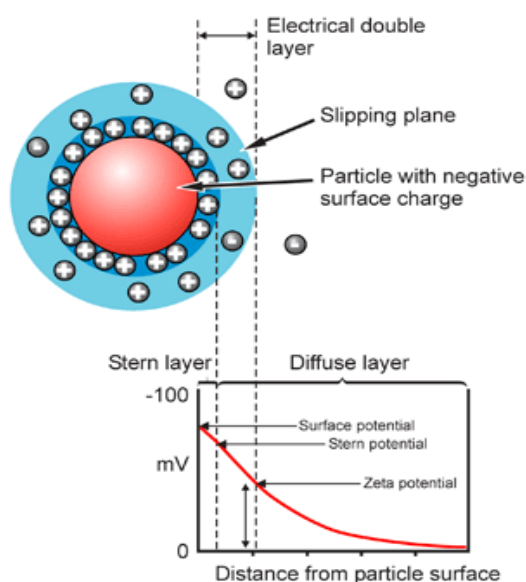
Για τον υπολογισμό της μέσης D_H και του δείκτη πολυδιασποράς PDI στο μηχάνημα Nano-ZS τα εναιωρήματα των λιποσωμάτων αραιώθηκαν σε PBS ώστε η επιθυμητή συγκέντρωση λιπιδίου να κυμαίνεται σε 0.2-0.4mg/mL. Μετρήθηκαν σε θερμοκρασία 25 °C με $\theta=173^\circ$, ενώ επιλέχτηκε το λάτεξ πολυστυρενίου. Για τα μαγνητικά νανοσωματίδια η επιθυμητή συγκέντρωση σιδήρου κυμαίνεται σε 0.5-0.07mg/mL και το υλικό επιλογής ήταν ο μαγνητίτης. Η μέτρηση του κάθε δείγματος ορίστηκε στις 11 φορές με 3 μετρήσεις ανεξάρτητα και το αποτέλεσμα κάθε δείγματος είναι ο μέσος όρος τους.

Ως μέτρο της ομοιογένειας των κolloειδών διασπορών χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης PDI, με εύρος τιμών μεταξύ 0 και 1. Σε γενικές γραμμές στα κolloειδή συστήματα, διασπορές με PDI χαμηλότερο από 0.250 θεωρούνται καλά δείγματα με μικρή διασπορά μεγέθους. Η βελτιωμένη ευαισθησία αυτής της μεθόδου (οπισθοσκεδαζόμενη ακτινοβολία) αποτελεί και το βασικό πλεονέκτημα της, καθώς ο επεξεργαζόμενος από το σύστημα όγκος είναι δεκαπλάσιος από τον αντίστοιχο με τη μέθοδο 90°. Η ακτίνα λέιζερ δεν είναι αναγκαίο να διαπεράσει όλο το δείγμα, οπότε μετρώντας τα σωματίδια που βρίσκονται πλησίον των άκρων της κυψελίδας, το φως διαπερνά με πιο μικρό μήκος την κυψελίδα, περιορίζοντας ή εξαφανίζοντας έτσι την πολλαπλή σκέδαση, δηλαδή της

σκέδασης της ίδιας ακτίνας και από άλλα σωματίδια. Η προετοιμασία για μέτρηση είναι πιο απλή και τα σωματίδια σκόνης επιδρούν λιγότερο καθώς αυτά σκεδάζουν πιο πολύ φως σε άλλη διεύθυνση. Η θέση της μέτρησης μέσα στο NanoZS ρυθμίζεται με αυτόματο τρόπο για τη διευθέτηση των απαιτήσεων της ευαισθησίας και της συγκέντρωσης [Malvern Instruments, 2014].

2.5.2 Μελέτη Z δυναμικού

Στην επιφάνεια των σωματιδίων, η ανάπτυξη φορτίου επηρεάζει την ιοντική κατανομή της διεπιφανειακής περιοχής, αυξάνοντας συνεπώς τη συγκέντρωση αντισταθμιστικών, αντίθετου δηλαδή φορτίου ιόντων από εκείνο στο σωματίδιο, κοντά στο εξωτερικό μέρος. Υπάρχει δηλαδή μια ηλεκτρική διπλή στιβάδα πέριξ του κάθε σωματιδίου. Η υγρή στιβάδα γύρω από το σωματίδιο υπάρχει αφενός ως μια περιοχή εσωτερικά (στρώμα Stern) όπου τα ιόντα αλληλοεπιδρούν ισχυρά και αφετέρου ως μια διάχυτη εξωτερικά περιοχή με λιγότερο σταθερή σύνδεση. Μέσα στο διάχυτο στρώμα υπάρχει ένα όριο όπου ιόντα και σωματίδια βρίσκονται σε μια ενιαία οντότητα. Το δυναμικό σε αυτό το όριο (επιφάνεια της είναι το ζήτα δυναμικό (Σχήμα 2.3).



Σχήμα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση του ζήτα δυναμικού [NanoComposix, 2020].

Οι Derjaguin, Verwey, Landau και Overbeek ανέπτυξαν μια θεωρία στη δεκαετία του 1940 η οποία ασχολήθηκε με τη σταθερότητα των κolloειδών συστημάτων. Η θεωρία DVLO υποδηλώνει ότι η σταθερότητα ενός σωματιδίου σε διάλυμα, εξαρτάται από τη συνολική συνάρτηση δυναμικού ενέργειας V_T . Αυτή η θεωρία αναγνωρίζει ότι η V_T είναι η ισορροπία πολλών ανταγωνιστικών συνεισφερόντων παραγόντων:

$$V_T = V_A + V_R + V_S \quad (2.2)$$

Όπου V_S είναι η δυναμική ενέργεια λόγω του διαλύτη, που συνήθως έχει μόνο μια οριακή συμβολή στη συνολική δυναμική ενέργεια κατά τη διάρκεια των λίγων τελευταίων νανομέτρων του διαχωρισμού. Πολύ πιο σημαντική είναι η ισορροπία μεταξύ των ελκτικών (V_A) και απωστικών (V_R) συνεισφορών. Δυστυχώς, μπορούν να είναι πολύ μεγαλύτερες και λειτουργούν σε πολύ μεγαλύτερη απόσταση:

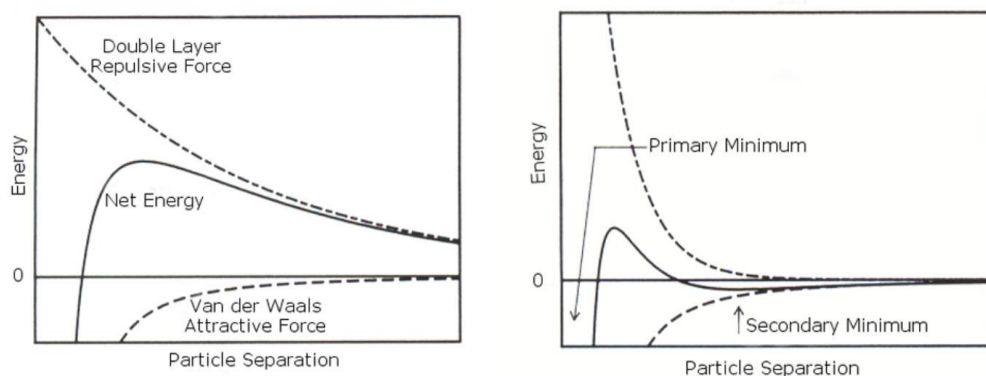
$$V_A = -\frac{A}{12 \pi D^2} \quad (2.3)$$

όπου A είναι η σταθερά Hamaker και D είναι ο διαχωρισμός των σωματιδίων. Το απωστικό δυναμικό V_R είναι μια πολύ πιο σύνθετη λειτουργία.

$$V_R = 2 \pi \epsilon a \zeta^2 e^{-\kappa D} \quad (2.4)$$

όπου a είναι η ακτίνα των σωματιδίων, π είναι η διαπερατότητα του διαλύτη, κ είναι μία συνάρτηση της ιοντικής σύνθεσης και ζ είναι το ζήτα δυναμικό.

Η θεωρία DVLO προτείνει ότι η σταθερότητα ενός κolloειδούς συστήματος προσδιορίζεται από το άθροισμα αυτών των ελκτικών Van Der Waals δυνάμεων (V_A) και των απωστικών ηλεκτρικών δυνάμεων διπλής στιβάδας (V_R) που υφίστανται μεταξύ των σωματιδίων καθώς πλησιάζει το ένα στο άλλο, λόγω της κίνησης Brown που υποβάλλονται. Αυτή η θεωρία προτείνει ότι ένα ενεργειακό φράγμα, που προκύπτει από την απωστική δύναμη, αποτρέπει δύο σωματίδια από το να πλησιάσουν το ένα το άλλο και να κολλήσουν μεταξύ τους (Σχήμα 2.4 α). Αν όμως τα σωματίδια συγκρούονται με αρκετή ενέργεια ούτως ώστε να ξεπεραστεί αυτό το φράγμα, η ελκτική δύναμη θα τα φέρει σε επαφή, και θα προσκολληθούν ισχυρά και αμετάκλητα μεταξύ τους [Malvern Instruments, 2014].



Σχήμα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση της διακύμανσης της ελεύθερης ενέργειας της θεωρίας DVLO, συναρτήσει του διαχωρισμού σωματιδίων σε (A) ουδέτερα διαλύματα και (B) σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (δημιουργία δευτερεύοντος ελαχίστου) [Malvern Instruments, 2014].

Ως εκ τούτου, εάν τα σωματίδια εμφανίζουν επαρκώς ισχυρές απωστικές αλληλεπιδράσεις, η διασπορά θα αντισταθεί στην κροκίδωση και το κολλοειδές σύστημα θα είναι σταθερό. Ωστόσο, εάν δεν υπάρχει ένας μηχανισμός απόθησης τότε θα λάβει χώρα συσσώματωση. Το ζήτα δυναμικό αποτελεί μια ένδειξη του πόσο σταθερό μπορεί να είναι το κολλοειδές σύστημα. Εφόσον τα σωματίδια του εναιωρήματος έχουν ένα μεγάλο αρνητικό ή θετικό ζήτα δυναμικό, τότε θα τείνουν να απωθούνται και δεν θα υπάρχει τάση για τα σωματίδια να πλησιάσουν. Ωστόσο, εάν τα σωματίδια έχουν χαμηλές τιμές ζήτα δυναμικού, τότε θα απουσιάζει η δύναμη για να αποτρέψει τα σωματίδια από το να πλησιάσουν και θα αρχίσει η κροκίδωση. Το σημείο όπου η καμπύλη ζήτα δυναμικού μπορεί να περνά από το μηδέν, ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο και είναι συνήθως το σημείο όπου το κολλοειδές σύστημα είναι λιγότερο σταθερό.

Για να προσδιοριστεί η τιμή του ζήτα δυναμικού ενός διαλύματος, αυτό τοποθετείται ανάμεσα σε δύο ηλεκτρόδια ώστε τα φορτισμένα σωματίδια να τεθούν σε κίνηση με την εφαρμογή ενός ηλεκτρικού πεδίου. Με την εναλλαγή του φορτίου ανάμεσα στα ηλεκτρόδια, τα σωματίδια αρχίζουν μια παλινδρομική κίνηση ανάλογα με το επιφανειακό τους φορτίο, το δυναμικό που εφαρμόζεται αλλά και τη διηλεκτρική σταθερά που έχει το μέσο και το ιζώδες αυτού. Η

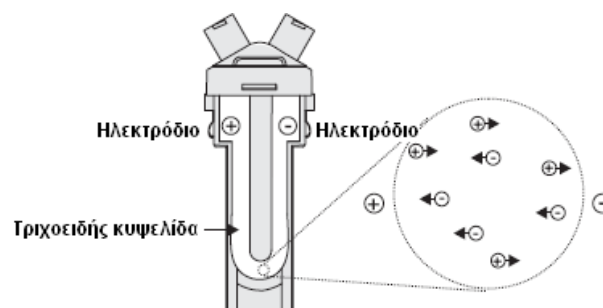
ταχύτητα τους είναι ανάλογη αυτών των παραγόντων και είναι γνωστή ως ηλεκτροφορητική κινητικότητα.

Οι ηλεκτροφορητικοί προσδιορισμοί του ζήτα δυναμικού συνηθίζονται να μετρούνται σε υδατικά μέσα και σε μια μεσαία ηλεκτρολυτική συγκέντρωση. Η τιμή αυτή υπολογίζεται από την προσέγγιση Smoluchowski:

$$\zeta = \frac{u\eta}{E\varepsilon} \quad (2.5)$$

όπου, ζ το ζήτα δυναμικό, u η ταχύτητα μετακίνησης του νανοσωματιδίου (cm/sec), η το ιξώδες, E η ένταση του δυναμικού (V/cm) και ε η διηλεκτρική σταθερά του μέσου.

Για τη μέτρηση χρησιμοποιείται μία κυψελίδα τριχοειδούς μορφής που φέρει ηλεκτρόδια σε κάθε είσοδό της. Η κυψελίδα γεμίζει με το δείγμα που είναι να μετρηθεί και γίνεται εφαρμογή δυναμικού στα ηλεκτρόδια αυτής (Σχήμα 2.5). Τα σωματίδια ανάλογα με το φορτίο τους θα κινηθούν προς το αντίθετο από αυτά ηλεκτρόδιο. Η ταχύτητά της κίνησης υπολογίζεται με χρήση του φαινομένου Doppler (Laser Doppler Velocimetry, LDV) και θα εκφραστεί ως κινητικότητα. Η LDV είναι μια τεχνική που εφαρμόζεται στη μηχανική για την μελέτη της ροής ενός ρευστού σε διάφορες καταστάσεις. Δίνει αποτελέσματα ανεξαρτήτως των συνθηκών του περιβάλλοντος και είναι μη-επεμβατική. Με κατάλληλη τροποποίηση μπορεί να δώσει μετρήσεις της ταχύτητας σε δύσκολες συνθήκες και έχει μεγάλο εύρος εφαρμογής όπως θερμικές κινήσεις αλλά και υπερηχητικές ταχύτητες.



Σχήμα 2.5: Τυπική τριχοειδής κυψελίδα. [Κολοκυθάς, 2012]

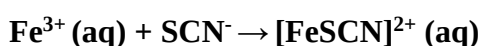
Για τον υπολογισμό του ζήτη δυναμικού στο μηχάνημα Nano-ZS τα εναιωρήματα των λιποσωμάτων αραιώθηκαν, όπως και για τη μέτρηση μεγέθους, σε PBS ώστε η επιθυμητή συγκέντρωση λιπιδίου να κυμαίνεται σε 0.2-0.4mg/mL. Μετρήθηκαν σε θερμοκρασία 25 °C με την προσέγγιση κατά Smoluchowski, ενώ το υλικό επιλογής στις ρυθμίσεις ήταν το λάτεξ πολυστυρένιου. Για τα μαγνητικά νανοσωματίδια η επιθυμητή συγκέντρωση σιδήρου κυμαίνεται σε 0.5-0.07mg/mL και το υλικό επιλογής ήταν ο μαγνητίτης. Το αποτέλεσμα κάθε δείγματος είναι ο μέσος όρος 50 μετρήσεων.

2.5.3 Μέτρηση συγκέντρωσης σιδήρου

Η περιεκτικότητα σε σίδηρο των ΜΝΣ και ΜΛΙΡ κατά τη διάρκεια των μελετών μετρήθηκε με δύο διαφορετικούς χρωματομετρικούς τρόπους, εκ των οποίων βγήκε ένας μέσος όρος.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης σιδήρου με τη χρωματομετρική μέθοδο συμπλοκοποίησης με θειοκυανιούχα ανιόντα

Η τεχνική αυτή είναι βασισμένη στην αντίδραση του τρισθενούς σιδήρου Fe(III) με θειοκυανιούχα ιόντα μέσα σε υδατικό διάλυμα και τον σχηματισμό ενός έντονα ερυθρού συμπλόκου [Owen et al, 1984]:



και πιο αναλυτικά

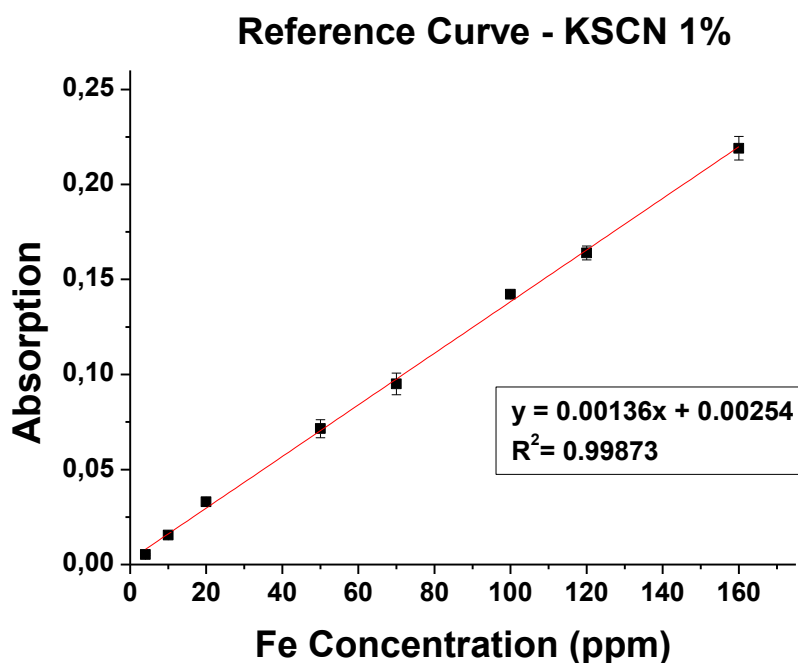


Εκτός από την ποιοτική ανάλυση σιδήρου, η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ποσοτική καθώς η ένταση του χρωματισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του σιδήρου.

Για τις μετρήσεις, 100μL του δείγματος με τα ΜΝΣ τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκαν 200μL πυκνού υδροχλωρικού οξέος HC1 37%. Στη συνέχεια αφέθηκε 15 λεπτά σε θερμοκρασία 80 °C για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της χώνεψης. Ακολούθως αφού κρυώσει ο σωλήνας έγινε προσθήκη 10μL υπεροξειδίου του υδρογόνου H₂O₂ προς οξείδωση του σιδήρου σε τρισθενή

Fe(III) και αφέθηκε για 5 λεπτά σε ηρεμία. Τέλος έγινε η προσθήκη 1mL θειοκυανιούχου καλίου KSCN (1%) για το σχηματισμό του συμπλόκου. Η οπτική απορρόφηση του δείγματος μετρήθηκε με φασματογραφία UV/VIS στα 480nm.

Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε με διαφορετικά διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε εξάενδρος τριγλωριούχος σίδηρος $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.1. Η ακρίβεια αυτής της μεθόδου επαληθεύτηκε και με τη μέθοδο της φαινανθρολίνης.



Διάγραμμα 2.1: Πρότυπη καμπύλη με θειοκυανιούχα ανιόντα.

Πίνακας 2.1: Τιμές απορρόφησης πρότυπης καμπύλης με θειοκυανιούχα ανιόντα.

α/α	Συγκέντρωση (ppm)	Μέτρηση Απορρόφησης
1.	4	0.005 ± 0.001
2.	10	0.016 ± 0.002
3.	20	0.033 ± 0.003
4.	50	0.074 ± 0.002
5.	70	0.093 ± 0.005
6.	100	0.143 ± 0.001
7.	120	0.163 ± 0.003
8.	160	0.219 ± 0.008

Προσδιορισμός συγκέντρωσης σιδήρου με τη χρωματομετρική μέθοδο συμπλοκοποίησης με φαινανθρολίνη

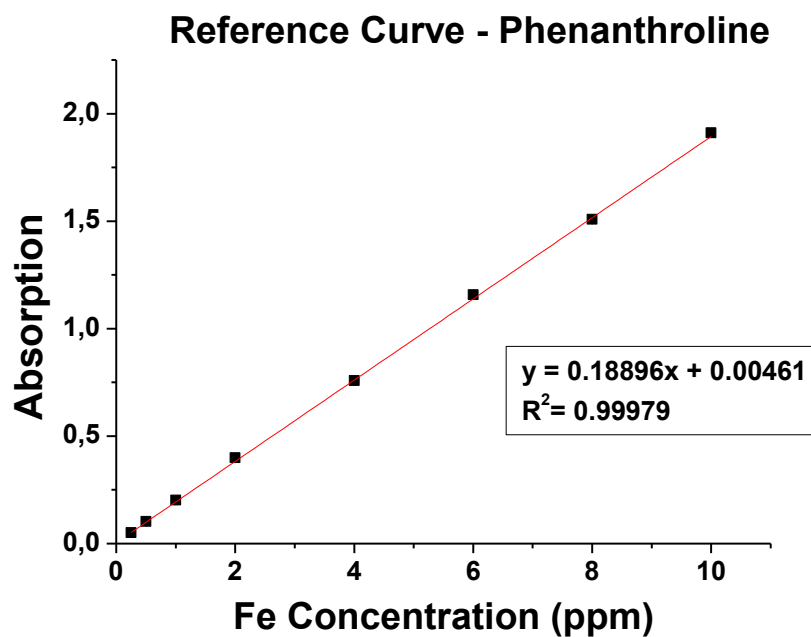
Η τεχνική αυτή είναι βασισμένη στην αντίδραση του δισθενούς σιδήρου F(II) με την ο-φαινανθρολίνη μέσα σε υδατικό διάλυμα και τον σχηματισμό ενός έντονα ερυθρού συμπλόκου [Kiwada et al, 1986]:



Εκτός από την ποιοτική ανάλυση σιδήρου, η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ποσοτική καθώς η ένταση του χρωματισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του σιδήρου.

Για τις μετρήσεις, κατά τη διάρκεια των μελετών 100μL του δείγματος που εμπεριείχε τα ΜΝΣ τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκαν 200μL πυκνού υδροχλωρικού οξέος HCl 37%. Στη συνέχεια ο σωλήνας αφέθηκε 15 λεπτά σε θερμοκρασία 80 °C για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της χώνεψης. Ακολούθως έγινε αραίωση του δείγματος σε τελικό όγκο 10 mL με απεσταγμένο νερό H₂O. Στη συνέχεια, αναλόγως του πόσο έντονο ήταν το κίτρινο χρώμα, πάρθηκαν 1-5 mL δείγματος και έγινε προσθήκη 100 μL υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης NH₂OH-HCl για την αναγωγή των τρισθενών ιόντων σιδήρου σε δισθενή Fe(II), 1 mL φαινανθρολίνης για το σχηματισμό συμπλόκου, 1 mL οξικού νατρίου CH₃COONa σε ρυθμιστικό διάλυμα και τέλος συμπληρώθηκε απεσταγμένο νερό H₂O σε τελικό όγκο 10 mL. Ο σωλήνας αφέθηκε για 10 λεπτά σε ηρεμία στο σκοτάδι. Η οπτική απορρόφηση του δείγματος μετρήθηκε με φασματογραφία UV/VIS στα 510nm.

Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε με διαφορετικά διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε επταένυδρος θειϊκός σίδηρος FeSO₄·7H₂O σε συγκεντρώσεις που φαίνονται στον Πίνακα 2.2. Η ακρίβεια αυτής της μεθόδου επαληθεύτηκε και με τη μέθοδο της φαινανθρολίνης.



Διάγραμμα 2.2: Πρότυπη καμπύλη με φαινανθρολίνη.

Πίνακας 2.1: Τιμές απορρόφησης πρότυπης καμπύλης με φαινανθρολίνη.

a/a	Συγκέντρωση (ppm)	Απορρόφηση
1.	0.25	0.051 ± 0.001
2.	0.5	0.103 ± 0.002
3.	1	0.202 ± 0.004
4.	2	0.400 ± 0.006
5.	4	0.758 ± 0.006
6.	6	1.158 ± 0.009
7.	8	1.508 ± 0.005
8.	10	1.911 ± 0.022

2.5.4 Μέτρηση συγκέντρωσης φωσφολιπιδίων

Προσδιορισμός συγκέντρωσης λιπιδίου με τη χρωματομετρική μέθοδο Stewart

Η μέθοδος Stewart χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό με ακρίβεια της συγκέντρωσης λιπιδίου σε δείγματα λιποσωμάτων. Η χρωματομετρική αυτή

μέθοδος βασίζεται στο ότι τα φωσφολιπίδια έχουν την τάση να συμπλοκοποιούνται με το σιδηρο-θειο-κυανιούχο αμμώνιο σε οργανικό διάλυμα [Stewart, 1980]. Το πλεονέκτημα της είναι ότι προσδιορίζεται άμεσα ο οργανικός φώσφορος ενώ η παρουσία ανόργανου φωσφόρου δεν προκαλεί παρεμποδίσσεις στην ανάλυση. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης γίνεται συσχετίζοντας τις ληφθείσες τιμές απορρόφησης με την ποσότητα του φωσφολιπιδίου, μέσω μιας καμπύλης αναφοράς. Στην ακόλουθη παράγραφο περιγράφεται η διαδικασία παρασκευής του αντιδραστηρίου Stewart.

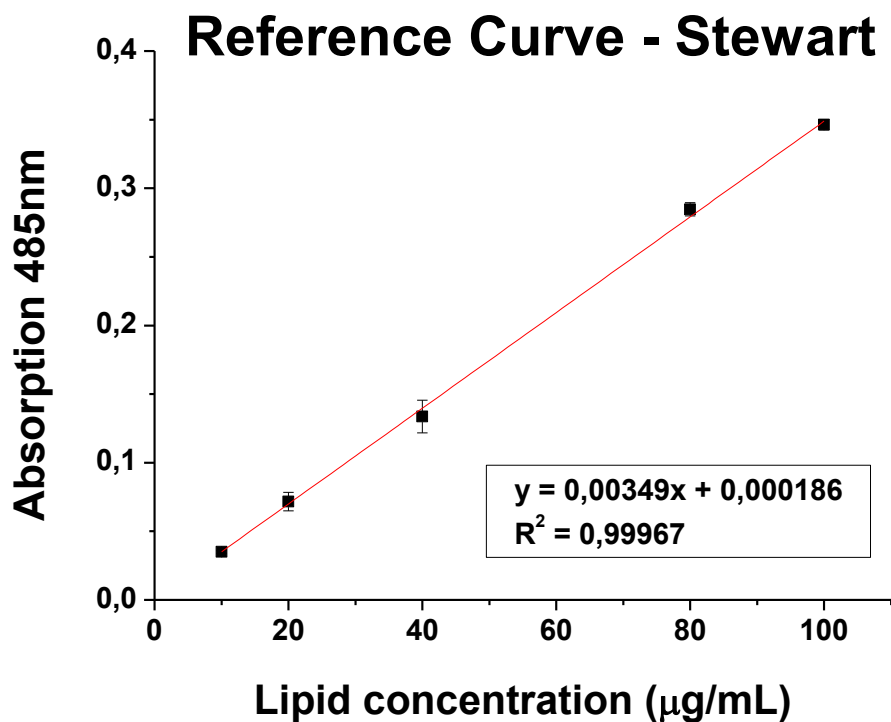
Για την παρασκευή 1L αντιδραστηρίου Stewart, σε απεσταγμένο νερό προστέθηκαν 27.03g εξάενδρου τριχλωριούχου σιδήρου ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) και 30.40g θειοκυανιούχου αμμωνίου (NH_4SCN). Για την πλήρη διάλυση των υλικών το διάλυμα αφέθηκε υπό μαγνητική ανάδευση για δύο ώρες. Στη συνέχεια μετρήθηκε με ογκομετρική φιάλη σε τελικό όγκο 1L και αποθηκεύτηκε σε γυάλινο δοχείο με σκοτεινά τοιχώματα. Το διάλυμα παραμένει σταθερό σε θερμοκρασία δωματίου για αρκετό καιρό (μήνες), υπό την προϋπόθεση της φύλαξης σε σκιερό μέρος.

Για κάθε παρασκευή αντιδραστηρίου Stewart απαιτείται και η κατασκευή αντίστοιχης πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Για την προετοιμασία των πρότυπων διαλυμάτων και δειγμάτων της καμπύλης, αρχικά παρασκευάζονται 10mL διαλύματος φωσφολιπιδίου PC σε χλωροφόρμιο με συγκέντρωση 0.1mg/mL, από διάλυμα αρχικής συγκέντρωσης 20mg/mL. Τα πρότυπα διαλύματα ετοιμάζονται σε σωλήνες των 10mL, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.1. Στη συνέχεια, γίνεται ισχυρή ανακίνηση των δειγμάτων με περιδίνηση (vortex) για 1 λεπτό. Ακολούθως τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία για 10 έως 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου για το διαχωρισμό των φάσεων. Τέλος, αφαιρείται προσεκτικά η υπερκείμενη υδατική φάση με τη χρήση αντλίας κενού και γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης της οργανικής φάσης σε φασματοφωτόμετρο στα 485nm.

Πίνακας 2.3: Δημιουργία δειγμάτων για την πρότυπη καμπύλη της μεθόδου Stewart.

<i>a/a</i>	Ποσότητα λιπιδίου (μg)	Πρότυπο διάλυμα λιπιδίου (mL)	Χλωροφόρμιο (mL)	Αντιδραστήριο Stewart (mL)
1.	10	0.1	1.9	2.0
2.	20	0.2	1.8	2.0
3.	40	0.4	1.6	2.0
4.	80	0.8	1.2	2.0
5.	100	1.0	1.0	2.0

Για τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης, απαιτείται αρχικά προθέρμανση της λυχνίας του UV/VIS φασματοφωτόμετρου για τουλάχιστον 30 λεπτά. Το μήκος κύματος ρυθμίζεται στα 485nm και ακολουθεί μηδενισμός με χλωροφόρμιο (τυφλό). Στη συνέχεια ξεκινά η μέτρηση των δειγμάτων, από το πιο αραιό προς το πιο πυκνό. Μέσω της καμπύλης αναφοράς που θα προκύψει (Πίνακας 2.2 και Διάγραμμα 2.1), γίνεται αρχικά υπολογισμός της ποσότητας λιπιδίου (σε μg) και εν τέλει της συγκέντρωσης του λιπιδίου (σε mg/mL) των δειγμάτων. Βάσει της παρούσας διαδικασίας υπολογίστηκε αναλυτικά η συγκέντρωση του λιπιδίου σε όλα τα δείγματα. Για τη μέτρηση των δειγμάτων, σε ποσότητα λιποσωμικών εναιωρημάτων (20μL) προστέθηκαν 2mL CHCl₃ και 2mL αντιδραστήριου Stewart. Στις περιπτώσεις πυκνών δειγμάτων, όπου οι ποσότητες λιπιδίου ξεπερνούσαν τα όρια της πρότυπης καμπύλης, έγινε κατάλληλη αρραίωση.



Διάγραμμα 2.3: Πρότυπη καμπύλη μεθόδου Stewart.

Πίνακας 2.4: Τιμές απορρόφησης πρότυπης καμπύλης μεθόδου Stewart.

α/α	Ποσότητα λιπιδίου (µg)	Πρότυπο διάλυμα λιπιδίου (mL)	Μέτρηση Απορρόφησης
1.	10	0.1	0.014 ± 0.012
2.	20	0.2	0.054 ± 0.046
3.	40	0.4	0.114 ± 0.010
4.	80	0.8	0.272 ± 0.030
5.	100	1.0	0.317 ± 0.019

2.5.5 Μελέτη μεγέθους μαγνητικού πυρήνα

Περίθλαση Ακτίνων X (X-Ray Diffraction - XRD) [Skoog et al, 1997]

Οι τεχνικές σκέδασης ακτίνων X είναι μια οικογένεια μη καταστρεπτικών τεχνικών ανάλυσης που αποκαλύπτουν πληροφορίες για την κρυσταλλική δομή, τη χημική σύνθεση και τις φυσικές ιδιότητες των υλικών.

Η διαδικασία της περίθλασης ακτίνων X σε σκόνη, χρησιμοποιεί τις ακτίνες X για να ερευνήσει και να ποσοτικοποιήσει την κρυσταλλική φύση των υλικών με τη μέτρηση της περίθλασης των ακτίνων X στα επίπεδα των ατόμων

στο εσωτερικό του υλικού. Είναι ευαίσθητη τόσο στο είδος όσο και στη σχετική θέση των ατόμων του υλικού καθώς και στην κλίμακα μήκους στην οποία υφίσταται η κρυσταλλική τάξη. Μπορεί, επομένως, να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της κρυσταλλικής περιεκτικότητας των υλικών, τον προσδιορισμό των κρυσταλλικών φάσεων που είναι παρούσες και να καθορίσει την απόσταση μεταξύ των πλεγματικών επιπέδων και την κλίμακα μήκους στην οποία υφίστανται. Επί της ουσίας, ανιχνεύει κλίμακες μήκους από υπό-angstrom έως και μερικά nm.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ του ηλεκτρικού διανύσματος της ακτινοβολίας X και των ηλεκτρονίων της ύλης, μέσω της οποίας διέρχεται, προκαλεί σκέδαση. Όταν οι ακτίνες X σκεδάζονται στο οργανωμένο περιβάλλον του κρυστάλλου, συμβαίνει συμβολή (ενισχυτική ή καταστρεπτική) των σκεδαζόμενων ακτίνων, επειδή οι αποστάσεις μεταξύ των κέντρων σκέδασης είναι του ίδιου μεγέθους με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Αποτέλεσμα αυτού του τύπου σκέδασης είναι η περίθλαση της ακτινοβολίας.

Όταν μια δέσμη ακτίνων X προσκρούει στην επιφάνεια ενός κρυστάλλου με κάποια γωνία θ , ένα τμήμα της σκεδάζεται από το επιφανειακό στρώμα των ατόμων. Το μη σκεδαζόμενο τμήμα της δέσμης εισέρχεται στο δεύτερο στρώμα των ατόμων, όπου και πάλι ένα τμήμα σκεδάζεται και το υπόλοιπο εισέρχεται στο τρίτο στρώμα. Το αθροιστικό αποτέλεσμα της σκέδασης αυτής από τα τακτικά χωροθετημένα κέντρα του κρυστάλλου είναι η περίθλαση της δέσμης, όπως περίπου συμβαίνει κατά την πρόσπτωση ορατής ακτινοβολίας σε ένα περιθλαστικό φράγμα. Για περίθλαση των ακτίνων X πρέπει οι αποστάσεις μεταξύ των στρωμάτων των ατόμων να είναι περίπου ίδιες με το μήκος κύματος ακτινοβολίας και τα κέντρα σκέδασης πρέπει να κατανέμονται στο χώρο με υψηλή κανονικότητα.

Η συνθήκη που δίνει την ενισχυτική συμβολή μιας δέσμης για γωνία θ ορίζεται από την εξίσωση του Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin\theta \quad (2.6)$$

όπου n είναι ένας ακέραιος, λ το μήκος κύματος της δέσμης, d η απόσταση των επιπέδων (στρωμάτων) του κρυστάλλου και θ η γωνία πρόσπτωσης. Για να εμφανιστούν όμως οι ακτίνες X θα πρέπει και η γωνία

πρόσπτωσης να ικανοποιεί την παρακάτω σχέση, αλλιώς σε κάθε άλλη θ η συμβολή θα είναι καταστρεπτική:

$$\sin\theta = \frac{n\lambda}{2d} \quad (2.7)$$

Τα δείγματα για ανάλυση συνήθως είναι στη μορφή λεπτής σκόνης, αλλά περίθλαση μπορεί επίσης να επιτευχθεί και από επιφάνειες, εφόσον αυτές είναι σχετικά επίπεδες και όχι πάρα πολύ σκληρές. Επιπλέον, τα υλικά μπορεί να ανήκουν σε ένα ευρύ φάσμα ειδών, συμπεριλαμβανομένων των ανόργανων, οργανικών, πολυμερών, μετάλλων ή σύνθετων και οι πιθανές εφαρμογές καλύπτουν σχεδόν όλους τους τομείς της έρευνας, π.χ. μεταλλουργία, φαρμακευτικά προϊόντα, επιστήμες της γης, πολυμερή και σύνθετα υλικά, τη μικροηλεκτρονική και τη νανοτεχνολογία. Η XRD σκόνης μπορεί επίσης να εφαρμοστεί για τη μελέτη της ψευδο-κρυσταλλικής δομής των μεσοπορώδων υλικών και κολλοειδών κρυστάλλων υπό την προϋπόθεση ότι οι κλίμακες μήκους είναι στο σωστό σύστημα.

Η προετοιμασία του δείγματος για τη μέτρηση γίνεται με αποξήρανση ποσότητας ΜΝΣ σε επιφάνεια γυάλινου πλακιδίου, σε φούρνο στους 80 °C. Στη συνέχεια το δείγμα συλλέγεται και λειοτριβείται σε σκόνη για να πετύχουμε όσον το δυνατόν μικρότερα σωματίδια με τυχαίο προσανατολισμό κρυσταλλογραφικών επιπέδων. Η σκόνη ακολουθώς τοποθετείται σε βάση πυριτίου όπου και απλώνεται ομοιόμορφα με χρήση αιθανόλης και τοποθετείται για την μέτρηση με περίθλαση ακτίνων Χ.

2.5.6 Μελέτη σταθερότητας

Εκτός του φυσικοχημικού χαρακτηρισμού της σύστασης των ΜΝΣ και των MLIP, σημαντική είναι και η σταθερότητα τους σε διάφορες συνθήκες. Το μέγεθος της υδροδυναμικής διαμέτρου καθώς και η τιμή του ζήτα δυναμικού, αποτελούν ένα μέτρο της σταθερότητας τους με την πάροδο του χρόνου. Επιθυμητή είναι η διατήρηση μιας μικρής υδροδυναμικής διαμέτρου με καλό δείκτη πολυδιασποράς, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα διαπέρασης μεμβρανών αλλά ταυτόχρονα αρκετά μεγάλης ώστε να εμφανίζει καλές μαγνητικές ιδιότητες.

Για τις *in vivo* εφαρμογές είναι απαραίτητο να εξασφαλίζεται η σταθερότητα τους στο χρόνο, παρουσία χλωριούχου νατρίου αλλά και θερμοκρασίας. Για το λόγο αυτό, εξετάστηκε η σταθερότητα των ΜΝΣ στο χρόνο με επαναδιασπορά τους σε PBS στους 4 °C και με επώαση στους 37 °C.

Για εφαρμογές στοχευμένης χορήγησης φαρμάκων, είναι επίσης επιθυμητό τα συστήματα ΜΝΣ να μπορούν διατηρούν τη σταθερότητα τους στα διάφορα στάδια μιας διαδικασίας παραγωγής. Για το σκοπό αυτό, εξετάστηκε η δυνατότητα επαναδιασποράς των ΜΝΣ τόσο σε νερό όσο και σε PBS μετά από λυοφιλοποίηση καθώς και η χρήση κρυοπροστατευτικών παραγόντων όπως η δεξτρόζη.

Τέλος εξετάστηκε και η σταθερότητα των MLIP μετά την παρασκευή τους σε PBS για ένα χρονικό διάστημα αρκετών ημερών ώστε να βεβαιωθεί η σταθερότητα των νέων δομών.

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS

Για την παρασκευή 1L ισότονου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS), σε απεσταγμένο νερό προστέθηκαν 0.2g χλωριούχου καλίου (KCl), 1.44g μονόξινου φωσφορικού νατρίου (Na_2HPO_4), 0.24g δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) και 0.2g νατραζιδίου (NaN_3). Το νατραζίδιο έχει τη χρήση του συντηρητικού, για την αποτροπή ανάπτυξης μικροοργανισμών και μπορεί να παραληφθεί η προσθήκη του για τη χρήση του διαλύματος σε κύτταρα. Για την πλήρη διάλυση των υλικών το διάλυμα αφέθηκε υπό μαγνητική ανάδευση για μία ώρα. Στη συνέχεια μετρήθηκε με ογκομετρική φιάλη σε τελικό όγκο 1L, ρυθμίστηκε το pH του στο 7.4 και αποθηκεύτηκε στους 4 °C.

2.5.7 Μελέτη μορφολογίας

Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy - SEM) [Skoog et al, 1997], [Kellner et al, 1998]

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης αποτελεί μια σύγχρονη και ευέλικτη αναλυτική μέθοδο με πλήθος εφαρμογών. Η λειτουργία της είναι αντίστοιχη με την οπτική μικροσκοπία με την διαφορά πως αντί για ακτίνα φωτός χρησιμοποιεί μια δέσμη ηλεκτρονίων η οποία προσπίπτει στην επιφάνεια του

δείγματος. Η θέση της δέσμης ελέγχεται από πηνία που βρίσκονται πίσω από τον φακό και επιτρέπουν τη σάρωση του δείγματος, το οποίο βρίσκεται τοποθετημένο σε μια βάση, ενώ η λειτουργία προϋποθέτει συνθήκες κενού. Η κυματική φύση των ηλεκτρονίων τους επιτρέπει να εστιάζουν σε μικρή επιφάνεια. Η σάρωση παρέχει πληροφορίες για τα άτομα των στοιχείων του δείγματος, καθώς τα άτομα εκπέμπουν είτε δευτερογενή ή οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια αλλά και ακτίνες Χ.

Οι θεμελιώδεις διατάξεις συστήματος ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης είναι το σύστημα παραγωγής της ηλεκτρονιακής δέσμης, το σύστημα που κατευθύνει τη δέσμη, το σύστημα ανάλυσης των πληροφοριών και τέλος το σύστημα δημιουργίας και ελέγχου του κενού. Κατά την λειτουργία, αρχικά η πηγή παράγει την δέσμη η οποία μέσω θετικού ηλεκτρικού δυναμικού, επιταχύνεται με κατεύθυνση το δείγμα. Στη συνέχεια με την χρήση μεταλλικών οπών, φακών και με την βοήθεια πηνίων σάρωσης, σχηματίζεται μια μονοχρωματική δέσμη. Η δέσμη σαρώνει την επιφάνεια και οι ανιχνευτές καταγράφουν τις αλληλεπιδράσεις, μετατρέποντάς τις σε εικόνα. Ως πηγή χρησιμοποιείται νήμα βολφραμίου (κάθοδος) μέσα από το οποίο διέρχεται ρεύμα, και εκπέμπονται ηλεκτρόνια με κατεύθυνση προς την άνοδο. Ο αριθμός ηλεκτρονίων εντός δέσμης αποκαλείται ρεύμα εκπομπής και εξαρτάται από την απόσταση νήματος και οπής πριν από το φακό. Η επιτάχυνση των ηλεκτρονίων και η διέλευση από ηλεκτρομαγνητικό φακό παράγει την δέσμη, η διάμετρος της οποία εξαρτάται από την ισχύ του φακού. Οι συνθήκες κενού κατά την χρήση του SEM ωφελεί στην παραγωγή και διατήρηση της ακτίνας, καθώς αποτρέπονται οι συγκρούσεις ηλεκτρονίων με μόρια αέρα.

Το δείγμα ακτινοβολείται με μια προσεκτικά εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων και η περιοχή όπου γίνεται η αλληλεπίδραση ηλεκτρονίων/στερεού ονομάζεται όγκος αλληλεπίδρασης. Οι παράμετροι από τις οποίες εξαρτάται η διείσδυση της δέσμης εντός του δείγματος είναι ο αριθμός των ηλεκτρονίων της δέσμης, η διάμετρος αυτής, η ταχύτητα ή ενέργεια των ηλεκτρονίων και το είδος του υπό εξέταση δείγματος.

Οι αλληλεπιδράσεις δείγματος και δέσμης είναι η φόρτιση και η ελαστική σκέδαση. Κατά τη φόρτιση συσσωρεύεται φορτίο ηλεκτρονίων στο δείγμα και για την αποφυγή της, συνιστάται η σύνδεση μη αγωγίμων δειγμάτων με γείωση,

ειδάλλως πρέπει να γίνεται χρήση χαμηλού δυναμικού επιτάχυνσης. Η ελαστική σκέδαση είναι μια διεργασία κατά την οποία προκύπτουν είτε ελαστικά σκεδαζόμενα ηλεκτρόνια δέσμης τα οποία είναι μη ανιχνεύσιμα ή οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια. Κατά την έλευση στην επιφάνεια του υπό εξέταση στοιχείου, διεισδύουν σε βάθος άμεσα εξαρτώμενο από τον ατομικό αριθμό του στοιχείου. Κατά τη διέλευσή τους από το εξεταζόμενο δείγμα συμβαίνουν ελαστικές συγκρούσεις με τους πυρήνες των ατόμων με αποτέλεσμα να σκεδάζονται προς κάθε κατεύθυνση με μικρές ενεργειακές απώλειες. Οπισθοσκεδαζόμενα είναι τα ηλεκτρόνια που σκεδάζονται με γωνία 180° . Ποσοστιαία τα εκπεμπόμενα με οπισθοσκέδαση ηλεκτρόνια κυμαίνονται περί του 6% και 50% του συνόλου για τα ελαφρά και βαρέα στοιχεία αντιστοίχως. Άρα η ποσοστιαία διαφοροποίηση των οπισθοσκεδαζομένων ηλεκτρονίων μεταβάλλει την εικόνα συναρτήσει του ατομικού αριθμού, με αποτέλεσμα οι βαρύτερες φάσεις να είναι πιο "φωτεινές" συγκριτικά με τις ελαφρύτερες, γεγονός που μας οδηγεί σε πληροφορίες σχετικά με τη σύσταση του δοκιμίου. Τέλος η ανίχνευση γίνεται με την χρήση ημιαγωγού στερεάς κατάστασης, προσαρμοσμένου στην έξοδο, ο οποίος μετρά τις προσπτώσεις ηλεκτρονίων στον ανιχνευτή και εμφανίζει την αντίστοιχη εικόνα.

Κατά την σύγκρουση ηλεκτρονίων δέσμης με ατομικά ηλεκτρόνια, μερικά από τα ασθενέστερα συγκρατούμενα ηλεκτρόνια μπορούν να διαφύγουν. Αυτά αποκαλούνται δευτεροταγή, είναι χαμηλής ενέργειας, περί των 50eV και εκπέμπονται πλησίον της επιφάνειας του δείγματος. Τα ηλεκτρόνια που εκπέμπονται από βαθύτερες περιοχές απορροφώνται ευκολότερα, συνεπώς τα δευτερογενή είναι εξαιρετικά χρήσιμα στην διαδικασία επιφανειακής απεικόνισης. Παράγονται κατά την είσοδο της δέσμης στην επιφάνεια ή κατά την έξοδο της οπισθοσκεδαζόμενης δέσμης από την επιφάνεια, και η ανίχνευσή τους γίνεται με ένα πλέγμα θετικού δυναμικού το οποίο ονομάζεται συλλέκτης. Οι διαφορές εντάσεων των ηλεκτρονίων αναπαρίστανται σε καθοδικό σωλήνα, παράγοντας εικόνα της επιφάνειας.

Κατά την ανελαστική σκέδαση ηλεκτρονίου σε αλληλεπίδραση με τον πυρήνα ατόμου, αυτό επιβραδύνεται, και ένα μέρος της απολεσθείσας ενέργειας παράγει ακτίνες X. Παράγεται συνεπώς ένα ευρύ φάσμα το οποίο όμως δεν χρησιμεύει γιατί δεν είναι χαρακτηριστικό ως προς το στοιχείο. Το

χαρακτηριστικό φάσμα ακτίνων X παράγεται όταν κατά την απώλεια ηλεκτρονίου εσωτερικής στοιβάδας, ένα ηλεκτρόνιο ανώτερης καλύπτει το κενό πέφτοντας στην χαμηλότερη. Η εν λόγω ενέργεια είναι χαρακτηριστική της μετάπτωσης συνεπώς και του ίδιου του ατόμου. Για την ανίχνευση χρησιμοποιείται κρύσταλλος Si/Li που μεταβάλλει την αντίσταση σύμφωνα με την απορρόφηση ενέργειας ακτίνων X.

Η προετοιμασία των δειγμάτων για μέτρηση, έγινε με ξήρανση μικρής ποσότητας MNΣ, LIP και MLIP σε επιφάνεια γυάλινου πλακιδίου, το οποίο αφέθηκε για ξήρανση τουλάχιστον 24 ωρών, σε προστατευμένο περιβάλλον για την αποφυγή επικαθίσεων σκόνης. Στη συνέχεια ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις των λιποσωμικών δειγμάτων με απεσταγμένο H_2O ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα του PBS για την αποφυγή παρεμποδίσεων και την πιο καθαρή απεικόνιση. Τέλος το δείγμα πριν τοποθετηθεί στο ηλεκτρικό μικροσκόπιο υφίσταται επίστρωση με χρυσό και εφαρμόζονται συνθήκες κενού για τη μέτρηση του.

3 Αποτελέσματα - Συζήτηση

3.1 Σύνθεση ΜΝΣ

Όπως περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος, παρασκευάστηκαν ΜΝΣ με τη μέθοδο της υδρολυτικής αλκαλικής καταβύθισης. Η διερεύνηση παραγόντων, όπως η μέθοδος ανάδευσης, η ποσότητα της βάσης και ο χρόνος κλασματοποίησης που θα μπορούσαν να επηρεάσουν το τελικό προϊόν φαίνονται στον Πίνακα 3.1. Κάθε στάδιο της συνθετικής πορείας ακολουθούσε και ο πλήρης φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των ΜΝΣ, τα συνοπτικά αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.1: Παράμετροι σύνθεσης των ΜΝΣ.

a/a	Όνομα	Είδος Ανάδευσης	Άλας Σιδήρου	Βάση	Κλασματοποίηση
1.	ΜΝΣ 1	Μηχανική	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10mL NaOH	30 min
	ΜΝΣ 2				
2.	ΜΝΣ 3	Υπερήχων	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10mL NaOH	30 min
	ΜΝΣ 4				
3.	ΜΝΣ 5	Υπερήχων	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5mL NaOH	30 min
	ΜΝΣ 6				

Πίνακας 3.2: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των συνθέσεων ΜΝΣ.

a/a	Όνομα	Υδροδυναμική Διάμετρος (nm)	Ζήτα Δυναμικό (mV)	Δείκτης Πολυδιασποράς	Συγκέντρωση Σιδήρου (mg/mL)
1.	ΜΝΣ 1	66.46 ± 5.02	-40.1 ± 6.63	0.165 ± 0.033	6.84 ± 0.33
	ΜΝΣ 2	56.83 ± 0.65	-51.3 ± 1.46	0.180 ± 0.017	7.90 ± 0.25
2.	ΜΝΣ 3	60.95 ± 0.65	-48.3 ± 2.33	0.141 ± 0.031	1.93 ± 0.09
	ΜΝΣ 4	61.96 ± 0.62	-38.6 ± 6.16	0.135 ± 0.012	2.65 ± 0.13
3.	ΜΝΣ 5	60.43 ± 1.90	-47.3 ± 4.04	0.149 ± 0.019	6.68 ± 0.33
	ΜΝΣ 6	61.43 ± 1.17	-49.4 ± 4.58	0.155 ± 0.021	6.44 ± 0.16

Με κριτήρια επιλογής τη μικρότερη υδροδυναμική διάμετρο, το μεγαλύτερο (σε απόλυτη τιμή) ζήτα δυναμικό και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σιδήρου, χρησιμοποιήθηκε τελικά το προϊόν της σύνθεσης ΜΝΣ 2 στις μελέτες.

Στις μελέτες επίσης χρησιμοποιήθηκε και η μη δημοσιευμένη σύνθεση σταθεροποιημένων, με επιφανειακή τροποποίηση PEG, ΜΝΣ της Δ. Τζαβάρα τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της οποίας δίνονται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των σταθεροποιημένων ΜΝΣ-PEG.

Όνομα	Υδροδυναμική Διάμετρος (nm)	Ζήτα Δυναμικό (mV)	Δείκτης Πολυδιασποράς	Συγκέντρωση Σιδήρου (mg/mL)
ΜΝΣ-PEG	70.50 ± 2.10	-22.2 ± 1.1	0.207 ± 0.013	7.17 ± 0.35

Η υδροδυναμική διάμετρος της σύνθεσης αυτής, λόγω της επιφανειακής τροποποίησης και της χημικής διεργασίας που μεσολάβησε, παρουσιάζεται αυξημένη, όπως και το ζήτα δυναμικό μειωμένο σε σχέση με τις προηγούμενες απλές συνθέσεις. Η συγκέντρωση του σιδήρου παρουσιάζεται στα ίδια επίπεδα, καθώς ουσιαστικά η πρότερη διαδικασία σύνθεσης που ακολουθήθηκε μέχρι την τροποποίηση είναι η ίδια με αυτή της μηχανικής ανάδευσης.

3.1.1 Επίδραση ποσότητας βάσης στην αντίδραση σύνθεσης

Η πρώτη παράμετρος σύνθεσης που διερευνήθηκε κατά τα αρχικά της στάδια, ήταν η επίδραση της ποσότητας NaOH στην υδροδυναμική διάμετρο και στη συγκέντρωση σιδήρου των ΜΝΣ. Τα αποτελέσματα της διερεύνησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.4.

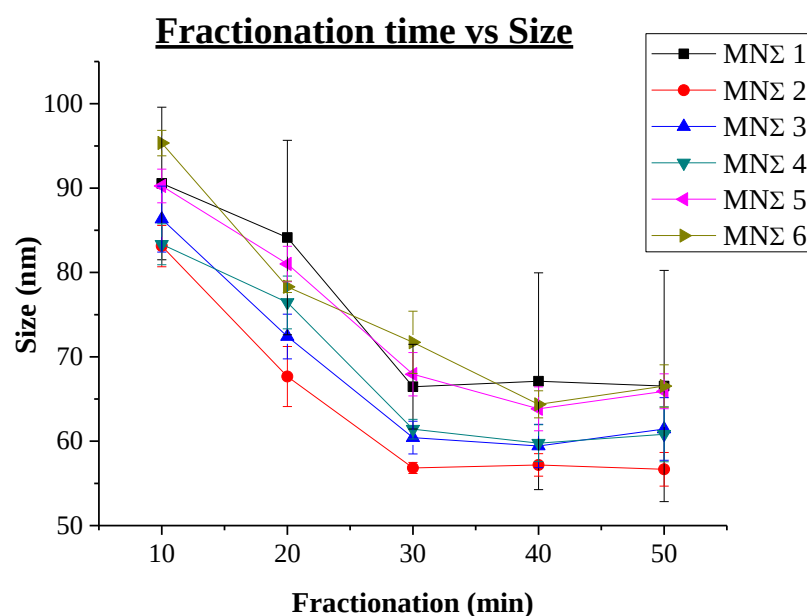
Πίνακας 3.4: Ποσότητα βάσης και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ΜΝΣ.

α/α	Όνομα	Ποσότητα Βάσης (mL)	Υδροδυναμική Διάμετρος (nm)	Συγκέντρωση Σιδήρου (mg/mL)
1.	ΜΝΣ 1	10	66.46 ± 5.02	6.84 ± 0.33
	ΜΝΣ 2		56.83 ± 0.65	7.90 ± 0.25
2.	ΜΝΣ 3	10	60.95 ± 0.65	1.93 ± 0.09
	ΜΝΣ 4		61.96 ± 0.62	2.65 ± 0.13
3.	ΜΝΣ 5	5	60.43 ± 1.90	6.68 ± 0.33
	ΜΝΣ 6		61.43 ± 1.17	6.44 ± 0.16

Η διερεύνηση της ποσότητας βάσης στην αντίδραση σύνθεσης, οδήγησε στην επιλογή των 10mL για την περίπτωση της μηχανικής ανάδευσης και των 5mL στην ανάδευση υπερήχων, καθώς δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στο μέγεθος των ΜΝΣ. Ωστόσο η ποσότητα των 10mL στην περίπτωση της ανάδευσης υπερήχων οδήγησε σε σημαντικά μειωμένη συγκέντρωση σιδήρου καθώς παρουσιάστηκε καταβύθιση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

3.1.2 Επίδραση χρόνου κλασματοποίησης

Για κάθε έναν από τους τρόπους σύνθεσης μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου κλασματοποίησης, κατά το τελευταίο στάδιο της σύνθεσης, ως προς το μέγεθος της υδροδυναμικής διαμέτρου του τελικού προϊόντος. Τα συνοπτικά αποτελέσματα δίνονται στο διάγραμμα 3.1.



Διάγραμμα 3.1: Επίδραση του χρόνου κλασματοποίησης κατά τη σύνθεση στο μέγεθος της υδροδυναμικής διαμέτρου των ΜΝΣ.

Η διερεύνηση του χρόνου κλασματοποίησης, κατέληξε πως χρόνος φυγοκέντρισης πέραν των 30 λεπτών στο τελευταίο στάδιο της σύνθεσης, δεν

επέφερε καμία επίδραση στην επιπλέον μείωση της υδροδυναμικής διαμέτρου των ΜΝΣ.

3.1.3 Μέγεθος μαγνητικού πυρήνα των ΜΝΣ

Ο προσδιορισμός, με χρήση XRD, του μέσου μεγέθους του μαγνητικού πυρήνα των ΜΝΣ, έγινε μέσω της εμπειρικής σχέσης Scherrer (Εξίσωση 3.1), η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του μέσου μεγέθους των νανοκρυσταλλινών των ΜΝΣ, από τη διαπλάτυνση των κορυφών του διαγράμματος περίθλασης. Εμπεριέχει ωστόσο μια πιθανότητα σφάλματος, η οποία όμως είναι μικρή για τις τάξεις μεγέθους των δειγμάτων μας, δηλαδή κάτω των 20nm. Για την εφαρμογή της εξίσωσης επιλέχθηκε η ανάκλαση των επιπέδων (311), με τη μεγαλύτερη ένταση.

$$t = \frac{K \lambda}{B \cos \theta_B} \quad (3.1)$$

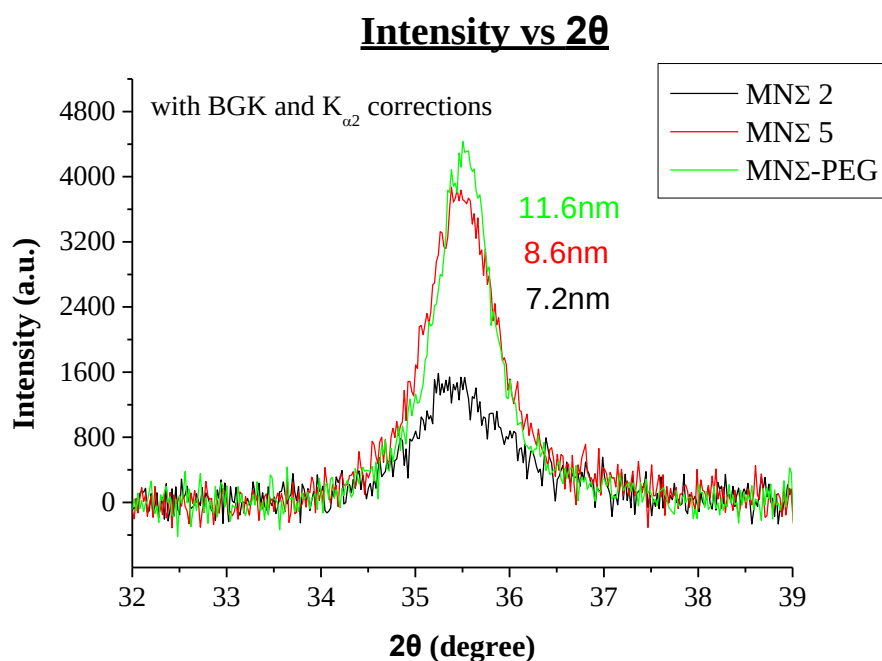
όπου t είναι η μέση διάμετρος των νανοκρυσταλλινών, K η σταθερά που εξαρτάται από το σχήμα των νανοκρυσταλλινών, λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, B το εύρος της κορυφής στο μέσο του ύψους της και θ_B η γωνία Bragg.

Για τις μετρήσεις του μαγνητικού πυρήνα επιλέχθηκε από την κάθε μέθοδο ανάδευσης η σύνθεση ΜΝΣ με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σιδήρου και το μικρότερο μέγεθος υδροδυναμικής διαμέτρου, αυτές ήταν οι ΜΝΣ 2 και ΜΝΣ 5. Επίσης μετρήθηκε και η σταθεροποιημένη σύνθεση ΜΝΣ-PEG. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 3.5 και στο Διάγραμμα 3.2 μετά από διόρθωση background και $K_{\alpha 2}$.

Πίνακας 3.5: Μεγέθη μαγνητικών πυρήνων των ΜΝΣ.

Όνομα	Μέσο Μέγεθος Μαγνητικού Πυρήνα (nm)
ΜΝΣ 2	7.2
ΜΝΣ 5	8.6
ΜΝΣ-PEG	11.6

Οι συνθέσεις ΜΝΣ 2 και 5 έδωσαν σχεδόν παρόμοια μεγέθη μαγνητικών πυρήνων, της τάξεως των 7-8nm, ενώ στη σταθεροποιημένη σύνθεση ΜΝΣ-PEG το μέγεθος ήταν κατά 4-5nm μεγαλύτερο τους. Μεγαλύτερο μέγεθος μαγνητικού πυρήνα σχετίζεται με καλύτερες μαγνητικές ιδιότητες.



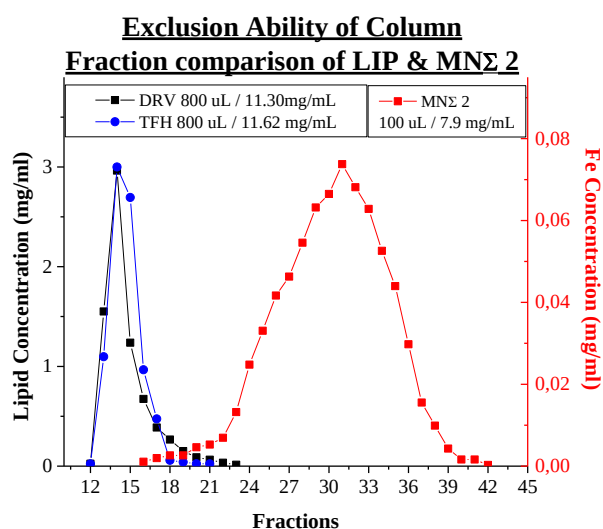
Διάγραμμα 3.2: Σύγκριση διαπλάτυνσης της κορυφής (311) για τα δείγματα των ΜΝΣ.

3.2 Παρασκευή μαγνητολιποσωμάτων και διαχωρισμός

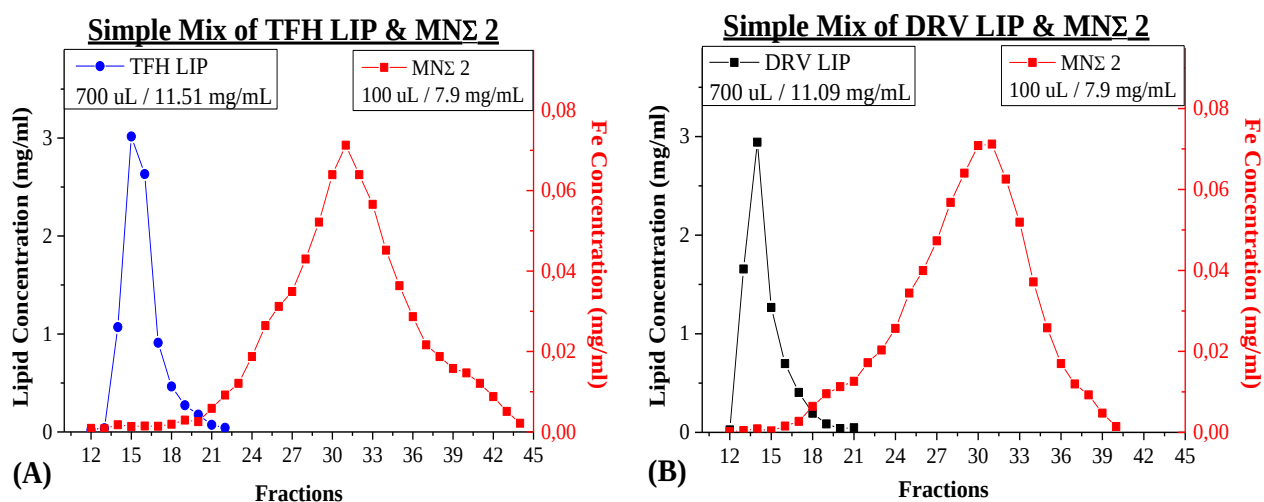
Για την παρασκευή των MLIP χρησιμοποιήθηκε η σύνθεση ΜΝΣ 2: MagpAcMaFeSO₄x7H₂O 7/1.5 10NaOH συγκέντρωσης 7.9mg/mL και η LIP σύνθεση: PC:Chol 2:1 + 4% PEG-2000 (επί των moles του PC) σε συγκέντρωση ~11mg/mL. Όπως περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος, ο εγκλωβισμός των ΜΝΣ στα LIP πραγματοποιήθηκε με δύο κύριες μεθόδους και τρεις διαφορετικές τεχνικές, ακολουθούμενος από εξώθηση των MLIP από φίλτρα 400nm.

Για τον καθαρισμό των MLIP και τον διαχωρισμό τους από τα μη εγκλωβισμένα ΜΝΣ, χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού με κινητή φάση PBS και σταθερή φάση Sepharose CL-2B. Για να αξιολογηθεί η διαχωριστική της ικανότητα, ελέγχθηκαν αρχικά ξεχωριστά οι χρόνοι έκλυσης ελεύθερων ΜΝΣ και LIP και των δύο μεθόδων (TFH και DRV),

τα οποία είχαν περαστεί προηγουμένως από φίλτρα 400nm, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 3.3. Η διερεύνηση έγινε σε όγκους 100μL για τα ΜΝΣ και 800μL για τα LIP και συγκεντρώσεις ανάλογες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες εγκλωβισμού. Επίσης για να αποκλειστεί τυχόν αλληλεπίδραση των ΜΝΣ με τα άδεια LIP, επαναλήφθηκε ο έλεγχος με απλή ανάμιξη 100μL ΜΝΣ και 700μL LIP και των δύο μεθόδων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.4.



Διάγραμμα 3.3: Συγκριτικό διάγραμμα έκλυσης ελεύθερων ΜΝΣ και άδειων LIP.



Διάγραμμα 3.4: Διαγράμματα έκλυσης απλής ανάμιξης ελεύθερων ΜΝΣ με άδεια (A) TFH LIP και (B) DRV LIP.

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.3 υπάρχει ικανοποιητικός διαχωρισμός ανάμεσα στα ελεύθερα ΜΝΣ και στα άδεια LIP και των δύο μεθόδων, τα οποία εκκλούνται και σε παρόμοιους χρόνους. Επιπλέον, από τα Διαγράμματα 3.4 (Α) και (Β), δεν προέκυψε καμία αλληλεπίδραση από την ανάμιξη ελεύθερων ΜΝΣ και άδειων LIP, ούτε υπήρξε συσσωμάτωση τους εντός της στήλης.

3.2.1 Μέθοδος ενυδάτωσης λιπιδικού υμενίου

Όπως περιγράφηκε και στο πειραματικό μέρος, παρασκευάστηκαν MLIP χρησιμοποιώντας τη μέθοδο TFH με δύο τεχνικές. Η πρώτη περιλαμβάνει τη σταδιακή ενυδάτωση του λιπιδικού υμενίου με ΜΝΣ και PBS, ενώ η δεύτερη την επαναδιασπορά των ΜΝΣ σε μεθανόλη και προσθήκη τους στο λιπιδικό μίγμα, εξάτμιση του διαλύτη και τη σταδιακή ενυδάτωση του μαγνητολιπιδικού υμενίου με PBS. Και τα δύο MLIP περάστηκαν με εξώθηση από φίλτρα 400nm πριν τον τελικό καθαρισμό τους με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Ακολούθησε ο πλήρης χαρακτηρισμός των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των MLIP και οι παρασκευές αυτές επαναλήφθηκαν τέσσερις φορές για να επιβεβαιωθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

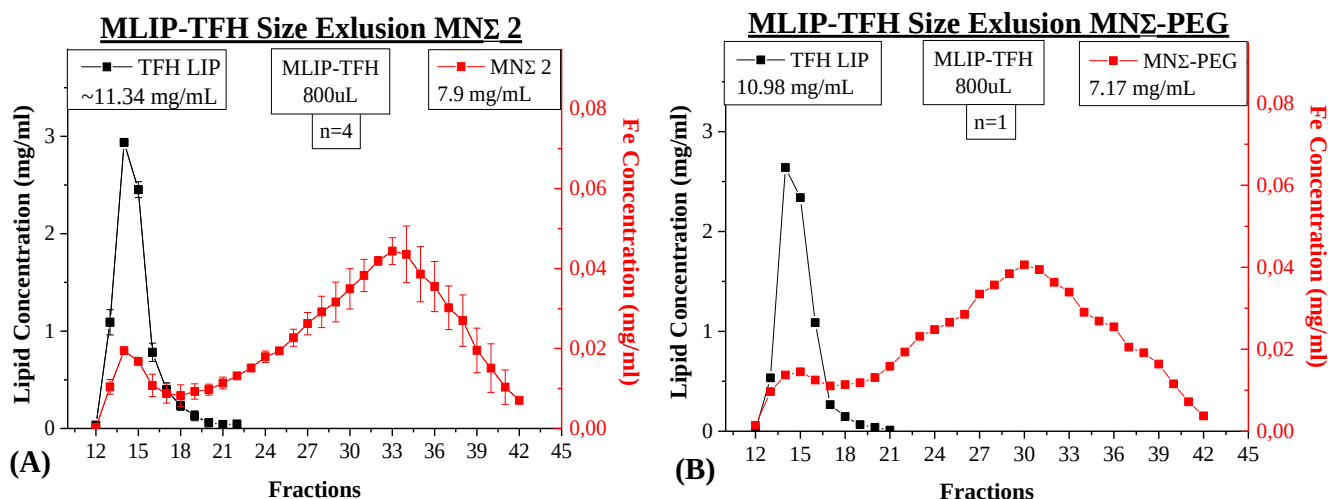
3.2.1.1 Μέθοδος ενυδάτωσης λιπιδικού υμενίου με ΜΝΣ

Στην ενυδάτωση λιπιδικού υμενίου με ΜΝΣ για την παρασκευή των MLIP χρησιμοποιήθηκε η σύνθεση ΜΝΣ 2. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα του διαχωρισμού των τεσσάρων παρασκευών MLIP-TFH δίνονται στο Διάγραμμα 3.5 και ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των MLIP στον Πίνακα 3.6. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και η σταθεροποιημένη σύνθεση ΜΝΣ-PEG για μία όμως παρασκευή, λόγω μειωμένης διαθέσιμης ποσότητας δείγματος.

Πίνακας 3.6: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των συνθέσεων MLIP-TFH.

α/α	Λόγος Σιδήρου προς Λιπίδιο (mol)	Υδροδυναμική Διάμετρος (nm)	Ζήτα Δυναμικό (mV)	Δείκτης Πολυδιασποράς
1.	0.092	238.9 ± 9.1	-3.2 ± 0.2	0.231 ± 0.009
2.	0.096	240.5 ± 8.7	-2.9 ± 0.3	0.249 ± 0.024
3.	0.095	243.1 ± 12.7	-2.7 ± 0.2	0.232 ± 0.015
4.	0.086	248.5 ± 6.5	-3.8 ± 0.3	0.241 ± 0.014
M.O.	0.092 ± 0.004	242.8 ± 9.2	-3.2 ± 0.3	0.238 ± 0.015
MLIP-PEG	0.071	249.9 ± 11.7	-2.5 ± 0.1	0.223 ± 0.007

Η τεχνική ενυδάτωσης του λιπιδικού υμενίου με τα ΜΝΣ 2 έδωσε MLIP-TFH μέσου μεγέθους $242.8\text{nm} \pm 9.2$ και ζήτα δυναμικού $-3.2\text{mV} \pm 0.3$, με μέσο εγκλωβισμό (Fe/Lipid) $0.092\text{mol} \pm 0.004$ σε τέσσερις επαναλήψεις. Η χρήση των ΜΝΣ-PEG έδωσε παρόμοια αποτελέσματα μεγέθους στα $249.9\text{nm} \pm 11.7$ και $-2.5\text{mV} \pm 0.1$, με μικρότερο μέσο εγκλωβισμό 0.071mol , με μία επανάληψη ωστόσο. Και στις δύο περιπτώσεις, η μείωση του ζήτα δυναμικού στα μαγνητολιποσωμικά κλάσματα σε σχέση με τις τιμές των ελεύθερων ΜΝΣ αποτελεί μια ένδειξη εγκλωβισμού.



Διάγραμμα 3.5: Διαγράμματα διαχωρισμού των MLIP-TFH από τα μη εγκλωβισμένα (A) ΜΝΣ 2 και (B) ΜΝΣ-PEG.

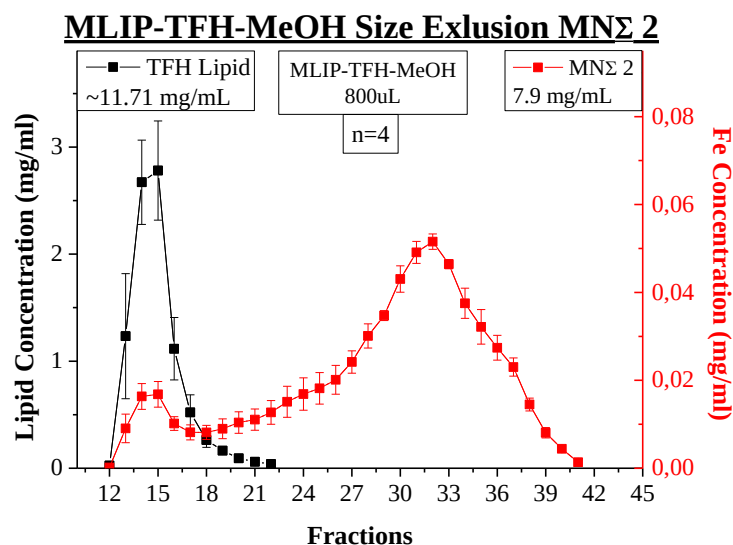
3.2.1.2 Μέθοδος ενυδάτωσης λιπιδικού υμενίου με ΜΝΣ σε MeOH

Για την παρασκευή των MLIP με αυτή την παραλλαγή της TFH χρησιμοποιήθηκε η σύνθεση ΜΝΣ 2 που είχε επαναδιασπαρεί προηγουμένως σε μεθανόλη, όπως έχει περιγραφεί στο πειραματικό μέρος. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από το διαχωρισμό των τεσσάρων παρασκευών MLIP-TFH-MeOH δίνονται στο Διάγραμμα 3.6 και ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των MLIP στον Πίνακα 3.7.

Πίνακας 3.7: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των συνθέσεων MLIP-TFH-MeOH.

α/α	Λόγος Σιδήρου προς Λιπίδιο (mol)	Υδροδυναμική Διάμετρος (nm)	Ζήτα Δυναμικό (mV)	Δείκτης Πολυδιασποράς
1.	0.077	231.2 ± 5.5	-2.7 ± 0.2	0.260 ± 0.018
2.	0.097	236.6 ± 4.1	-2.4 ± 0.4	0.275 ± 0.038
3.	0.081	236.1 ± 7.6	-2.6 ± 0.3	0.244 ± 0.015
4.	0.083	224.7 ± 2.9	-2.3 ± 0.3	0.280 ± 0.010
M.O.	0.085 ± 0.009	232.2 ± 5.3	-2.5 ± 0.3	0.265 ± 0.020

Η τεχνική ενυδάτωσης του λιπιδικού υμενίου με τα ΜΝΣ 2 σε μεθανόλη έδωσε MLIP-TFH-MeOH μέσου μεγέθους $232.2\text{nm} \pm 5.3$ και ζήτα δυναμικού $-2.5\text{mV} \pm 0.3$, με μέσο εγκλωβισμό (Fe/Lipid) $0.085\text{mol} \pm 0.009$ σε τέσσερις επαναλήψεις. Όπως και προηγουμένως, η μείωση του ζήτα δυναμικού στα κλάσματα των MLIP σε σχέση με τις τιμές των ελεύθερων ΜΝΣ αποτελεί μια ένδειξη εγκλωβισμού.



Διάγραμμα 3.6: Διάγραμμα διαχωρισμού των MLIP-TFH-MeOH από τα μη εγκλωβισμένα MNΣ 2.

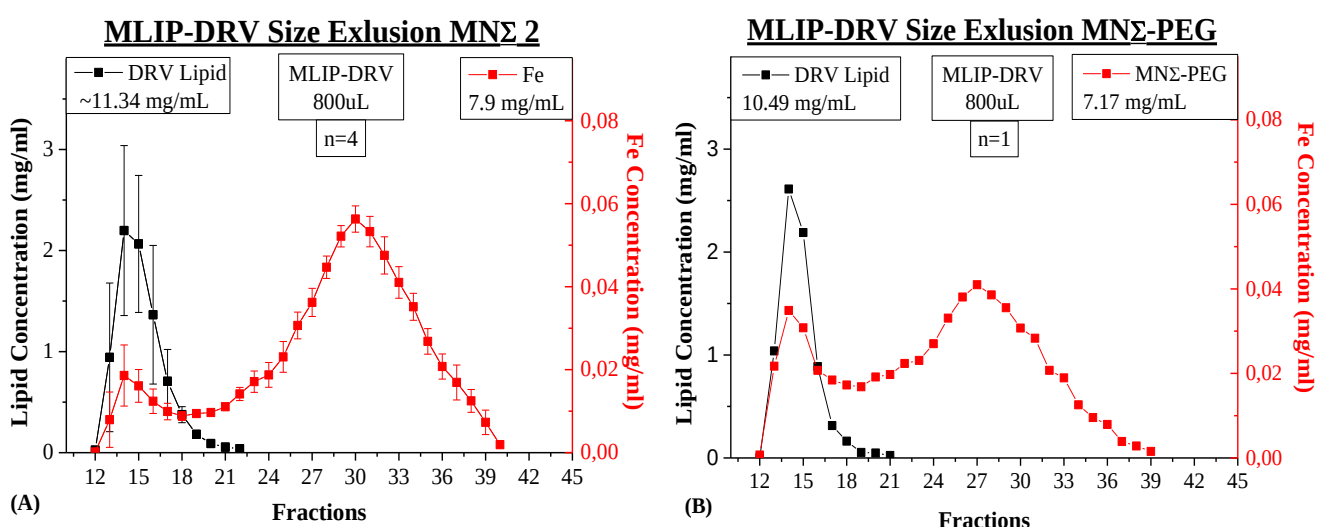
3.2.2 Μέθοδος αφυδατωμένων - ανασυσταμένων κυστιδίων

Στην μέθοδο DRV, χρησιμοποιήθηκε η σύνθεση MNΣ 2, με την προσθήκη των MNΣ για την παρασκευή των MLIP να γίνεται μετά τη λυοφιλοποίηση. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα του διαχωρισμού των τεσσάρων παρασκευών MLIP-DRV δίνονται στο Διάγραμμα 3.7 και ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των MLIP στον Πίνακα 3.8. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και η σταθεροποιημένη σύνθεση MNΣ-PEG για μία όμως παρασκευή, λόγω της μειωμένης διαθέσιμης ποσότητας του δείγματος.

Πίνακας 3.8: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των συνθέσεων MLIP-DRV.

a/a	Λόγος Σιδήρου προς Λιπίδιο (mol)	Υδροδυναμική Διάμετρος (nm)	Ζήτα Δυναμικό (mV)	Δείκτης Πολυδιασποράς
1.	0.102	212.0 ± 9.1	-3.1 ± 0.9	0.243 ± 0.017
2.	0.101	226.1 ± 4.3	-3.2 ± 0.3	0.249 ± 0.016
3.	0.110	215.3 ± 8.4	-3.2 ± 0.3	0.243 ± 0.020
4.	0.126	223.6 ± 6.3	-4.6 ± 0.4	0.231 ± 0.011
M.O.	0.110 ± 0.012	219.3 ± 7.0	-3.5 ± 0.5	0.242 ± 0.016
MLIP-PEG	0.186	256.0 ± 11.7	-1.9 ± 0.1	0.204 ± 0.012

Η τεχνική αφυδατωμένων-ανασυσταμένων κυστιδίων με την προσθήκη των ΜΝΣ 2 μετά τη λυοφιλοποίηση έδωσε MLIP-DRV μέσου μεγέθους $219.3\text{nm} \pm 7.0$ και ζήτα δυναμικού $-3.5\text{mV} \pm 0.5$, με αυξημένο μέσο εγκλωβισμό (Fe/Lipid) $0.110\text{mol} \pm 0.012$ σε τέσσερις επαναλήψεις. Η χρήση των ΜΝΣ-PEG έδωσε MLIP μέσου μεγέθους $256.0\text{nm} \pm 11.7$ και $-1.9\text{mV} \pm 0.1$, με αρκετά μεγαλύτερο μέσο εγκλωβισμό 0.186mol ωστόσο, σε μία όμως επανάληψη. Όπως και στις προηγούμενες δύο τεχνικές, η μείωση του ζήτα δυναμικού στα κλάσματα των MLIP σε σχέση με τις τιμές των ελεύθερων ΜΝΣ αποτελεί μια ένδειξη εγκλωβισμού.



Διάγραμμα 3.7: Διαγράμματα διαχωρισμού των MLIP-DRV από τα μη εγκλωβισμένα (A) ΜΝΣ 2 και (B) ΜΝΣ-PEG.

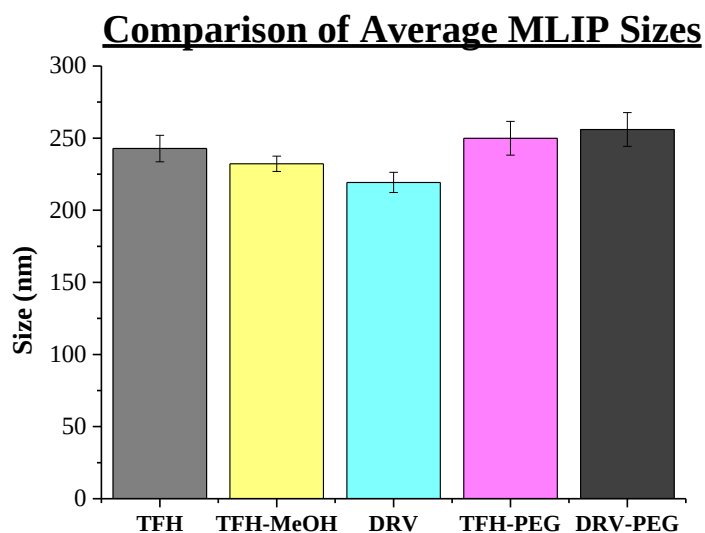
3.2.3 Σύγκριση μεθόδων παρασκευής μαγνητολιποσωμάτων

Συνοψίζοντας τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των μεθόδων που μελετήθηκαν στον Πίνακα 3.9, βλέπουμε πως όλες σχεδόν οι τεχνικές δίνουν παρόμοιες τιμές μεγέθους (Διάγραμμα 3.8) και ζήτα δυναμικού, όπως επίσης και παρόμοιους εγκλωβισμούς. Η μόνη μέθοδος που παρουσιάζει υψηλότερο λόγο σιδήρου/λιπίδιο, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 3.9, είναι η DRV με την προσθήκη της σταθεροποιημένης σύνθεσης ΜΝΣ-PEG μετά τη λυοφιλοποίηση, για την οποία ωστόσο δεν υπήρχε δυνατότητα επανάληψης λόγω περιορισμένης ποσότητας δείγματος. Αντίθετα χειρότερη οπτική εικόνα είχε ο εγκλωβισμός των

MLIP που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο TFH και επαναδιασπορά των ΜΝΣ σε μεθανόλη, κάτι που επιβεβαιώνεται και από το σχετικά χαμηλότερο λόγο σιδήρου/λιπίδιο που εμφανίζουν.

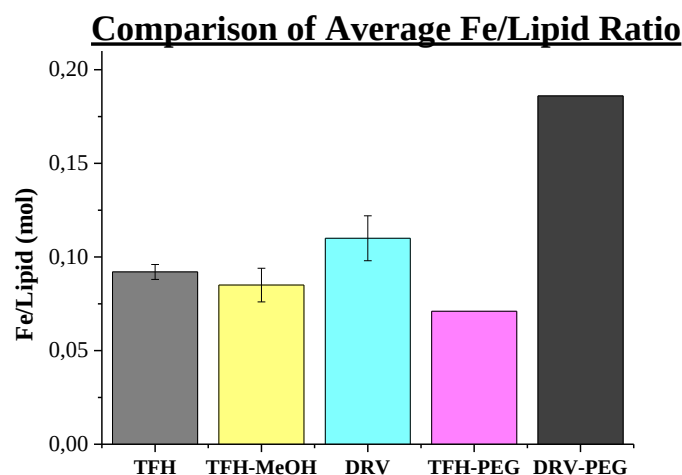
Πίνακας 3.9: Συγκριτικός πίνακας χαρακτηριστικών των μεθόδων MLIP.

Μέθοδος Παρασκευής MLIP	Λόγος Σιδήρου προς Λιπίδιο (mol)	Υδροδυναμική Διάμετρος (nm)	Ζήτα Δυναμικό (mV)	Δείκτης Πολυδιασποράς
TFH	0.092 ± 0.004	242.8 ± 9.2	-3.2 ± 0.3	0.238 ± 0.015
TFH-MeOH	0.085 ± 0.009	232.2 ± 5.3	-2.5 ± 0.3	0.265 ± 0.020
DRV	0.110 ± 0.012	219.3 ± 7.0	-3.5 ± 0.5	0.242 ± 0.016
TFH-PEG	0.071	249.9 ± 11.7	-2.5 ± 0.1	0.223 ± 0.007
DRV-PEG	0.186	256.0 ± 11.7	-1.9 ± 0.1	0.204 ± 0.012



Διάγραμμα 3.8: Σύγκριση μεγεθών MLIP των διάφορων τεχνικών.

Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 3.8, η μέση διάμετρος όλων των τεχνικών, κυμαίνεται από τα 219nm έως και τα 256nm. Συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθόδους στα μη σταθεροποιημένα ΜΝΣ, η μέθοδος DRV έδωσε τη μικρότερη μέση υδροδυναμική διάμετρο και ταυτόχρονα εμφάνισε τον υψηλότερο εγκλωβισμό, χαρακτηριστικά που είναι και επιθυμητά στα MLIP. Πολλά υποσχόμενος φαίνεται και ο συνδυασμός της μεθόδου DRV με τα σταθεροποιημένα με PEG ΜΝΣ, αλλά για να βγουν ασφαλή συμπεράσματα, χρειάζονται περαιτέρω μελέτες.



Διάγραμμα 3.9: Σύγκριση εγκλωβισμού των MLIP από τις διάφορες τεχνικές.

3.3 Μελέτες σταθερότητας

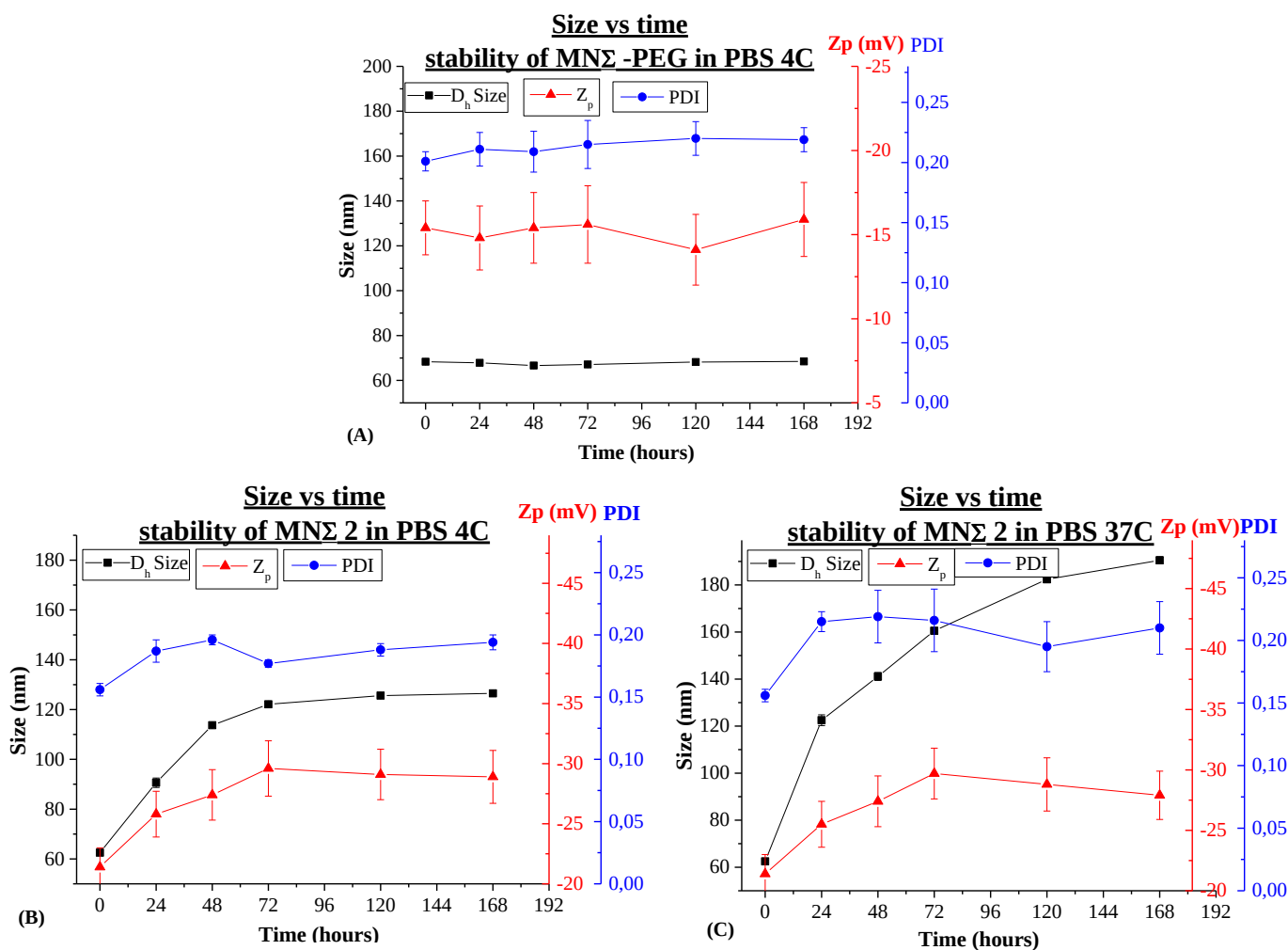
Μετά τη σύνθεση των ΜΝΣ αλλά και την παρασκευή των MLIP, ήταν απαραίτητη η συνεχής παρακολούθηση των φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών ώστε να παρατηρηθούν τυχόν αλλαγές που θα μπορούσαν να εμφανιστούν και να επηρεάσουν τη σταθερότητα των προϊόντων. Για αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενες μετρήσεις της υδροδυναμικής διαμέτρου και του ζήτα δυναμικού με τη μέθοδο του DLS σε διάφορα περιβάλλοντα, αναλόγως το προϊόν, για ένα συνεχόμενο χρονικό διάστημα.

3.3.1 Μαγνητικά νανοσωματίδια

3.3.1.1 Σταθερότητα σε PBS

Στα κολλοειδή νανοσωματίδια είναι επιθυμητός ο συνδυασμός μιας μικρής υδροδυναμικής διαμέτρου, ώστε να μπορούν να διαπερνούν με ευκολία μεμβράνες, αλλά ταυτόχρονα αρκετά μεγάλης ώστε να εμφανίζει καλές μαγνητικές ιδιότητες. Στη σύνθεση ΜΝΣ 2 εξετάστηκε η σταθερότητα τους σε PBS στους 4 °C και στους 37 °C ώστε να διερευνηθεί η ασφάλεια τους σε μια

πιθανή in vivo χρήση. Το ίδιο έγινε και για τη σταθεροποιημένη σύνθεση ΜΝΣ-PEG στους 4 °C. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.10.



Διάγραμμα 3.10: Διαγράμματα μελέτης σταθερότητας σε PBS των (Α) ΜΝΣ-PEG στους 4 °C και των ΜΝΣ 2 στους (Β) 4 °C και (C) 37 °C, συναρτήσει του χρόνου.

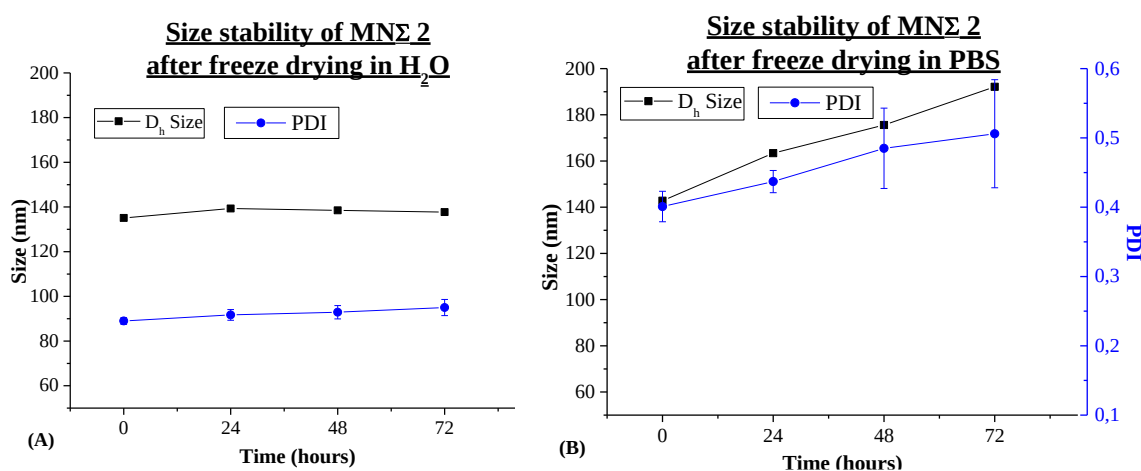
Η επαναδιασπορά των ΜΝΣ 2 σε διάλυμα PBS έδειξε πως η σύνθεση δεν παραμένει σταθερή και τα νανοσωματίδια συσσωματώνονται αυξάνοντας το μέσο μέγεθος της υδροδυναμικής διαμέτρου της διασποράς. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.8, αμέσως μετά την επαναδιασπορά σε PBS η D_h αυξήθηκε από τα 56nm στα 62nm. Στους 4 °C μέσα σε 24 ώρες έφτασε τα 90nm και μετά τις 72 ώρες φάνηκε να σταθεροποιείται κοντά στα 120nm, σχεδόν διπλασιασμένη. Στους 37 °C η D_h διπλασιάστηκε μέσα σε 24 ώρες στα 122nm

και για τις επόμενες ώρες η συσσωμάτωση συνεχίστηκε με αυξητικές τάσεις. Οι τιμές του ζήτα δυναμικού και στις δύο περιπτώσεις μειώθηκαν (κατά απόλυτη τιμή) στα -25mV με -30mV λόγω της ιοντικής ισχύς του PBS. Αντίθετα, στην ήδη σταθεροποιημένη σύνθεση ΜΝΣ-PEG, η D_h παρέμεινε σταθερή στα 68nm με 70nm, ενώ το ζήτα δυναμικό εμφάνισε μια μείωση περίπου 10mV. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την επιτακτική ανάγκη επιφανειακής τροποποίησης των ΜΝΣ για την περαιτέρω σταθεροποίηση τους.

3.3.1.2 Σταθερότητα μετά από λυοφιλοποίηση

Η μέθοδος DRV λόγω των πλεονεκτημάτων χρήσης της είναι μια σημαντική τεχνική για τη φαρμακευτική βιομηχανία. Χρησιμοποιεί μια διασπορά άδειων SUV που υφίσταται λυοφιλοποίηση, παρουσία διαλύματος της προς εγκλωβισμό ουσίας. Για τον εγκλωβισμό των ΜΝΣ με την τεχνική αυτή, χρειάστηκε προηγουμένως να ερευνηθεί η σταθερότητα τους, μετά τη λυοφιλοποίηση και να επιβεβαιωθεί η ικανότητα τους για ανασύσταση, διατηρώντας τα προηγούμενα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά. Για το σκοπό αυτό, 1mL της ΜΝΣ 2 αφέθηκε για λυοφιλοποίηση και ακολούθησε ανασύσταση της με επαναδιασπορά της μισής ποσότητας σε H_2O και της άλλης μισής σε PBS. Τις επόμενες μέρες ακολούθησαν μετρήσεις της D_h με τη μέθοδο του DLS και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3.11.

Z

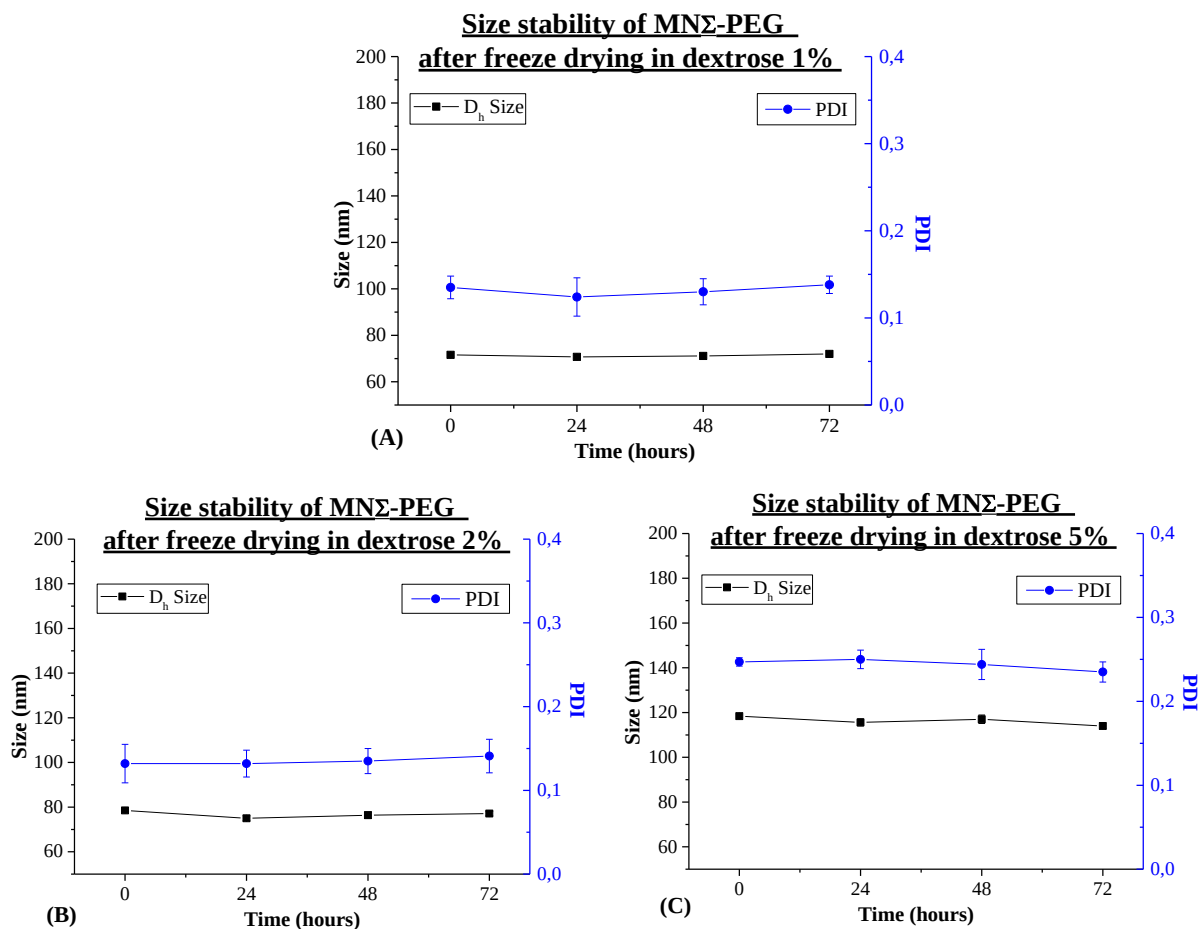


Διάγραμμα 3.11: Διαγράμματα μελέτης σταθερότητας των ΜΝΣ 2 μετά από λυοφιλοποίηση σε (Α) H_2O και (Β) PBS, συναρτήσεως του χρόνου.

Η επαναδιασπορά των ΜΝΣ 2 τόσο σε H₂O όσο και σε PBS μετά τη λυοφιλοποίηση δεν ήταν επιτυχής, καθώς τόσο οπτικά, όσο και φυσικοχημικά όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 3.9 υπήρξε συσσωμάτωση. Η μέση D_h των ανασυσταμένων ΜΝΣ από τα 56nm πριν τη λυοφιλοποίηση, έφτασε στα 135nm στο H₂O και παρέμεινε σε αυτό το μέγεθος ενώ στο PBS έφτασε τα 143nm και για τις επόμενες ώρες η συσσωμάτωση συνεχίστηκε με αυξητικές τάσεις. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν την ανάγκη για επιφανειακή τροποποίηση των ΜΝΣ με ταυτόχρονη χρήση κρυοπροστατευτικών παραγόντων. Αυτή η περίπτωση μελετήθηκε στη συνέχεια με την ήδη τροποποιημένη σύνθεση ΜΝΣ-PEG. Σε διαφορετική περίπτωση, θα χρειαστεί η τροποποίηση της τεχνικής DRV με προσθήκη των ΜΝΣ μετά τη λυοφιλοποίηση. Αυτή ήταν και η επιλογή που ακολουθήθηκε στα επόμενα στάδια της πειραματικής διαδικασίας, λόγω της απλότητας της, για τον εγκλωβισμό των μη επιφανειακά τροποποιημένων ΜΝΣ στα MLIP.

3.3.1.3 Δεξτρόζη κατά τη λυοφιλοποίηση σαν κρυοπροστατευτικό

Κατόπιν της αδυναμίας επαναδιασποράς των ΜΝΣ 2 μετά τη λυοφιλοποίηση, μελετήθηκε η σταθεροποιημένη σύνθεση ΜΝΣ-PEG της Δ. Τζαβάρα παρουσία δεξτρόζης ως προστατευτικό. Έγινε επαναδιασπορά 100μL της σύνθεσης σε διαλύματα δεξτρόζης 1%, 2% και 5% αντίστοιχα και αφέθηκαν για λυοφιλοποίηση. Ακολούθησε η επανασύστασή τους σε PBS και τις επόμενες μέρες έγιναν μετρήσεις της D_h με τη μέθοδο του DLS και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3.12.



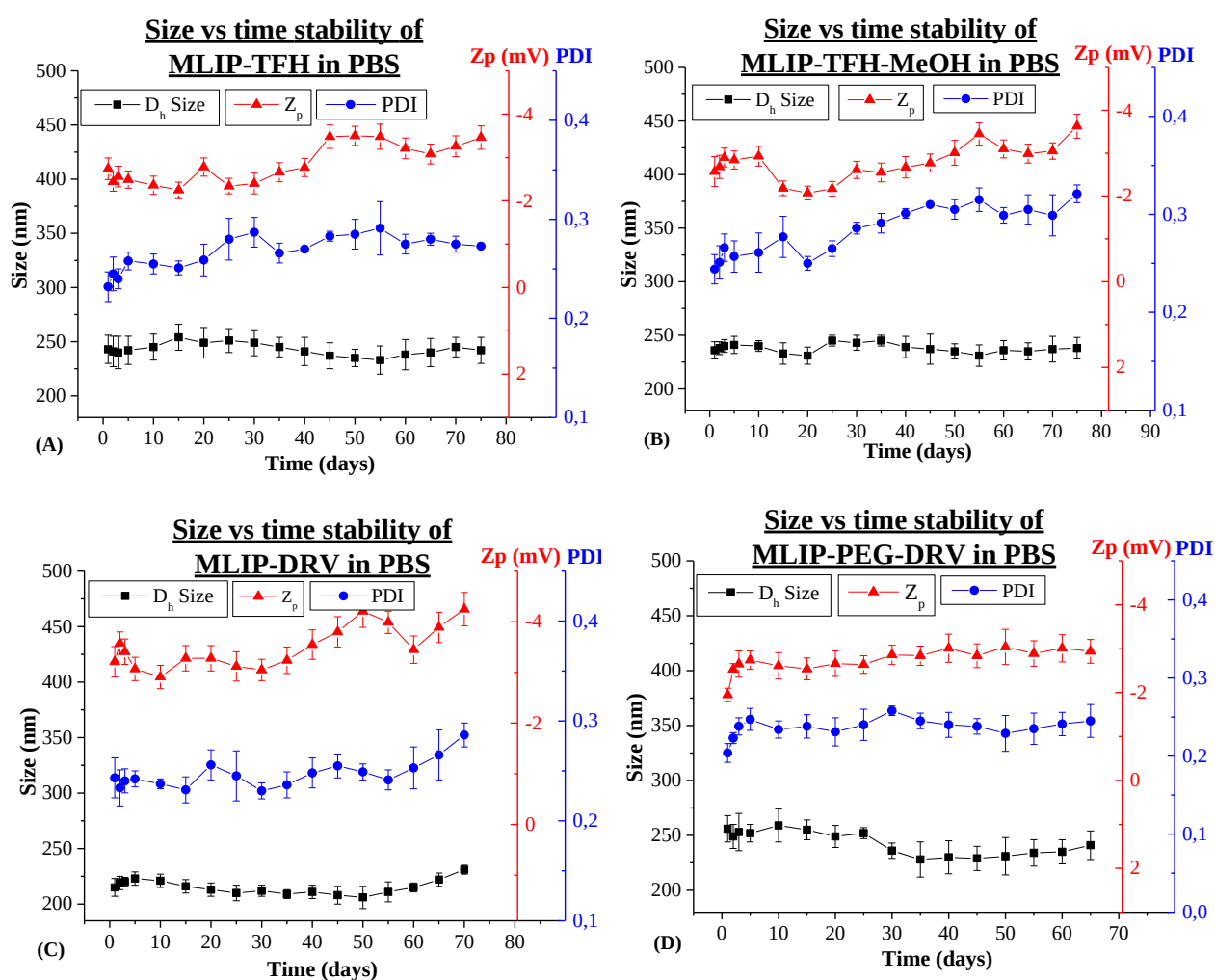
Διάγραμμα 3.12: Διαγράμματα μελέτης σταθερότητας των MNΣ-PEG μετά από λυοφιλοποίηση με Δεξτρόζη (A) 1% (B) 2% και (C) 5%, συναρτήσεως του χρόνου.

Όπως προκύπτει και από τα παραπάνω διαγράμματα (3.10), η επανασύσταση των MNΣ-PEG μετά τη λυοφιλοποίηση ήταν επιτυχής. Η μέση D_h των MNΣ-PEG ήταν στα 70nm πριν τη λυοφιλοποίηση, ενώ μετά την ανασύσταση η μέση D_h με δεξτρόζη 1% έφτασε στα 71nm, με 2% στα 78nm και με 5% στα 118nm. Όλες παραμείνανε σταθερές στα ίδια μεγέθη στις μετρήσεις των επόμενων ημερών. Ωστόσο η περιεκτικότητα σε δεξτρόζη 1% κρίνεται η πιο αποδοτική, καθώς προκάλεσε τη μικρότερη έως καθόλου μεταβολή στην υδροδυναμική διάμετρο των MNΣ-PEG.

3.3.2 Μαγνητολιποσώματα

3.3.2.1 Σταθερότητα σε PBS

Τα MLIP που παρασκευάστηκαν με τις προηγούμενες μεθόδους και τεχνικές είναι σημαντικό να διατηρούν σταθερά τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά με την πάροδο του χρόνου. Για αυτό το λόγο αποθηκεύτηκαν δείγματα και από τις τέσσερις διαφορετικές παρασκευές στους 4 °C σε PBS και τις ακόλουθες μέρες έγιναν μετρήσεις της D_h και του Z_p με τη μέθοδο του DLS. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στο διάγραμμα 3.13.



Διάγραμμα 3.13: Διαγράμματα μελέτης σταθερότητας των MLIP συναρτήσει του χρόνου. (A) MLIP-TFH, (B) MLIP-TFH-MeOH, (C) MLIP-DRV και (D) MLIP-PEG-DRV.

Όπως φαίνεται και στα διαγράμματα, όλες οι MLIP μορφές σε PBS εμφανίζουν εξαιρετική σταθερότητα τόσο στη διατήρηση της μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου, όσο και στο ζήτα δυναμικό και την πολυδιασπορά τους για ένα διάστημα τουλάχιστον δύο μηνών μετά την παρασκευή τους. Πιο συγκεκριμένα τα MLIP της μεθόδου TFH διατηρούν σταθερή μέση υδροδυναμική διάμετρο της τάξεως των ~240nm, της τεχνικής TFH με επαναδιασπορά σε MeOH ~245nm, της μεθόδου DRV στα ~220nm και της DRV με τη σύνθεση MNΣ-PEG στα ~245nm.

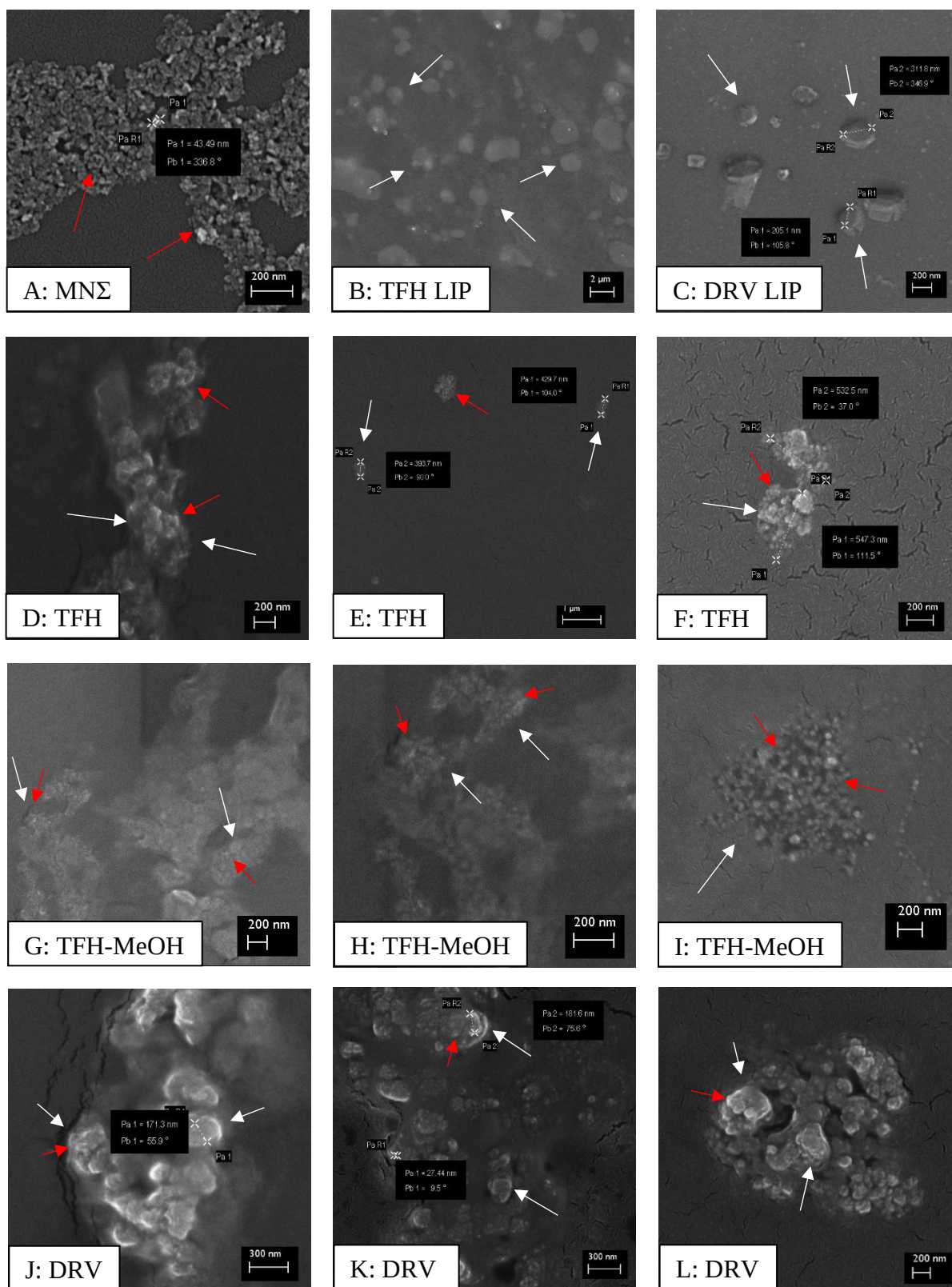
3.4 Μορφολογική εκτίμηση SEM

Για τη λήψη πληροφοριών σχετικά με τη μορφολογία των MLIP που προέκυψαν από τις τεχνικές TFH, TFH-MeOH και DRV, αλλά και για τη σύγκριση αυτών χρησιμοποιήθηκε το SEM. Για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων χαρακτηρίστηκαν εκτός από τις τρεις παρασκευές MLIP τόσο τα ελεύθερα MNΣ όσο και τα άδεια LIP των αντίστοιχων μεθόδων. Στον Πίνακα 3.10 παρατίθενται τα χαρακτηριστικά τους.

Πίνακας 3.10: Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά δειγμάτων στο SEM.

Μέθοδος Παρασκευής MLIP	Λόγος Σιδήρου προς Λιπίδιο (mol)	Υδροδυναμική Διάμετρος (nm)	Ζήτα Δυναμικό (mV)	Δείκτης Πολυδιασποράς
TFH	0.086	241 ± 9	-3.8 ± 0.3	0.249 ± 0.024
TFH-MeOH	0.083	222 ± 2	-2.7 ± 0.2	0.239 ± 0.016
DRV	0.126	224 ± 6	-4.6 ± 0.4	0.231 ± 0.011
MNΣ	-	57 ± 1	-51.3 ± 1.5	0.180 ± 0.017
TFH LIP	-	254 ± 1	-3.3 ± 0.3	0.247 ± 0.014
DRV LIP	-	228 ± 8	-4.3 ± 0.3	0.254 ± 0.024

Στην Εικόνα 4.1 παρουσιάζεται ο επιφανειακός μορφολογικός χαρακτηρισμός μέσω SEM των παραπάνω δειγμάτων, χωρίς ωστόσο να έχουμε εικόνα για τον εσωτερικό τους λόγω της φύσης του SEM.



Εικόνα 4. 1: Μορφολογική απεικόνιση SEM:

(A): ελεύθερα MNΣ 2, (B): άδεια TFH-LIP, (C): άδεια DRV-LIP
 (D-F): MLIP με TFH, (G-I): MLIP με TFH-MeOH, (J-L): MLIP με DRV.

Στην απεικόνιση του SEM (Εικόνα 4.1) και πιο συγκεκριμένα στην (Α) φαίνεται η προτίμηση της σύνθεσης ΜΝΣ 2 για οργάνωση των νανοκρυστάλλων σε πλειάδες (clusters). Υπάρχει μεγάλη τάση δηλαδή για αυτό-συνάθροιση των νανοκρυσταλλιτών προς συγκεκριμένες δομές. Διακρίνονται μεμονωμένα σωματίδια που με τη βοήθεια λογισμικού υπολογίστηκαν στα 40nm με 60nm, μέγεθος που συνάδει και με τις μετρήσεις στο DLS. Στις εικόνες (Β) και (C) διακρίνονται μεμονωμένα άδεια λιποσώματα, με τη μέθοδο TFH και DRV αντίστοιχα, διαφόρων μεγεθών.

Στις εικόνες (D), (E) και (F), φαίνονται MLIP μεγέθους 40nm έως 550nm που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο TFH, το ίδιο συμβαίνει και στη (B) όπου διακρίνονται άδεια LIP της ίδιας μεθόδου, μεγέθους 50nm έως 600nm. Η μέθοδος TFH, δίνει σύμφωνα με τις μετρήσεις, MLIP μέσου μεγέθους ~240nm. Συγκρίνοντας τις εικόνες των εγκλωβισμένων TFH MLIP με αυτή (B) των άδειων TFH LIP, παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση στη μορφολογία των εγκλωβισμένων, από τα άδεια LIP. Στις πιο κοντινές (F) διακρίνονται μάλιστα μικρότερες μορφές, παρόμοιες και σε σχήμα αλλά και σε μέγεθος με αυτό των ΜΝΣ (Α), που στην αντίστοιχη εικόνα των άδειων (B), δεν υπάρχουν. Στο δείγμα δεν παρατηρήθηκαν πουθενά ελεύθερα ΜΝΣ σωματίδια, οπότε η συγκέντρωση του σιδήρου που μετρήθηκε, είναι αυτή των εγκλωβισμένων MLIP.

Στις εικόνες (G), (H) και (I), διακρίνονται MLIP μεγέθους 50nm έως 300nm που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο TFH-MeOH. Η μέθοδος TFH-MeOH δίνει, σύμφωνα με τις μετρήσεις, MLIP μέσου μεγέθους ~230nm. Συγκρίνοντας τις εικόνες αυτές με την εικόνα (B) των άδειων TFH λιποσωμάτων, παρατηρείται όπως και με την προηγούμενη μέθοδο, σημαντική διαφοροποίηση ανάμεσα στην εικόνα των εγκλωβισμένων, με τα άδεια λιποσώματα. Στην πιο κοντινή εικόνα (I), διακρίνονται παρόμοια σχήματα με τους ΜΝΣ της (Α) στα MLIP. Η γενική εικόνα των MLIP με την TFH-MeOH μέθοδο ήταν λιγότερο καθαρή και με μικρότερη παρουσία ΜΝΣ, και ο σχετικά μικρότερος λόγος σιδήρου/λιπίδιο πιθανόν να οφείλεται στην πιο δύσκολη εξάτμιση της μεθανόλης και στον κατ' επέκταση δυσκολότερο σχηματισμό λιποσωμάτων και εγκλωβισμό, λόγω πιθανής παρουσίας μεθανόλης στο υμένιο.

Στις εικόνες (J), (K) και (L), βλέπουμε MLIP μεγέθους 170nm έως 350nm που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο DRV, η οποία δίνει MLIP μέσου μεγέθους

~220nm. Συγκρίνοντας τις εικόνες των εγκλωβισμένων MLIP με την (C) των άδειων DRV μεγέθους 200 έως 700nm, παρατηρείται όπως και με τις προηγούμενες μεθόδους, σημαντική διαφοροποίηση ανάμεσα στην εικόνα των εγκλωβισμένων, με τα άδεια λιποσώματα DRV. Στις πιο κοντινές εικόνες, διακρίνονται όπως και πριν παρόμοια σχήματα με τους ΜΝΣ της (Α) στα MLIP. Η γενική εικόνα του δείγματος έδειξε απουσία συστάδων συσσωματωμένων ΜΝΣ που συνηγορεί πως η συγκέντρωση του σιδήρου που μετρήθηκε, είναι αυτή των εγκλωβισμένων MLIP. Η εικόνα αυτής της τεχνικής ήταν παρόμοια με την εικόνα του δείγματος της TFH.

Δυστυχώς λόγω προβλήματος του EDX κατά τη διάρκεια των μετρήσεων στο SEM, δε ήταν δυνατό να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη σιδήρου σε αυτά τα σχήματα διαφοροποιήσεων.

4 Συμπεράσματα

4.1 Μαγνητικά νανοσωματίδια

Υβριδικοί μαγνητικοί νανοφορείς οξειδίων του σιδήρου (MNΣ) παρασκευάστηκαν επιτυχώς με τη μέθοδο υδρολυτικής αλκαλικής καταβύθισης μιας πρόδρομης ένωσης σιδήρου, παρουσία του πολυμερούς πολυ(ακρυλικό οξύ-co-μηλεϊνικό οξύ), ως πολυμερική επικάλυψη.

Η διερεύνηση διαφόρων παραγόντων κατά τη διάρκεια της σύνθεσης κατέληξαν πως οι βέλτιστες συνθήκες όσον αφορά την ποσότητα βάσης ήταν τα 10ml NaOH για τη μηχανική ανάδευση και τα 5ml για την ανάδευση υπερήχων. Όσον αφορά την κλασματοποίηση, ιδανικός χρόνος αποδείχτηκαν τα 30 λεπτά, καθώς φυγοκέντριση για περισσότερο χρόνο, δεν οδήγησε σε περαιτέρω μείωση της υδροδυναμικής διαμέτρου, ενώ αντίθετα λιγότερος χρόνος φυγοκέντρισης οδηγεί σε μεγαλύτερο μέσο μέγεθος σωματιδίων.

Στις βέλτιστες αυτές συνθήκες, δεν παρουσιάστηκαν διαφορές ως προς το μέγεθος και το ζήτα δυναμικό των σωματιδίων, ή το μέγεθος του μαγνητικού πυρήνα, ανεξαρτήτως του είδους ανάδευσης (μαγνητική είτε υπερήχων). Οι συνθέσεις με μαγνητική ανάδευση είχανε ελαφρώς μεγαλύτερη συγκέντρωση σιδήρου.

Οι μελέτες σταθερότητας μεγέθους σε PBS, δείχνανε πως η σύνθεση δεν είναι σταθερή σε διάλυμα PBS. Μέσα σε διάστημα λίγων ωρών επέρχεται συσσωμάτωση που οδηγεί σε αύξηση της υδροδυναμικής τους διαμέτρου. Στους 4 °C, μέσα σε 24h είχαμε αύξηση μεγέθους κατά 25nm και μέσα σε 7 ημέρες το μέγεθος διπλασιάστηκε. Στους 37 °C ο διπλασιασμός μεγέθους επήλθε σε διάστημα 24h και στις 7 ημέρες είχε τριπλασιαστεί. Αντίθετα η σταθεροποιημένη με PEG σύνθεση MNΣ εμφάνισε μεγάλη σταθερότητα.

Τέλος, τα MNΣ φάνηκε πως μετά από λυοφιλοποίηση, δε μπορούν να επαναδιασπαρούν ούτε σε H₂O ούτε σε PBS. Αντίθετα στα μαγνητικά νανοσωματίδια με επικάλυψη PEG, η επαναδιασπορά ήταν επιτυχής σε διάλυμα δεξτρόζης 1%, που λειτούργησε σαν κρυοπροστατευτικό κατά τη λυοφιλοποίηση.

4.2 Μαγνητολιποσώματα

Για την παρασκευή των μαγνητολιποσωμάτων (MLIP) προτιμήθηκε η σταθερή λιποσωμική (LIP) σύνθεση PC:Chol 2:1 + 4% PEG-2000 επί των mole του PC. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες με δύο βασικές τεχνικές, τη μέθοδο ενυδάτωσης λιπιδικού υμενίου (TFH) και τη μέθοδο αφυδατωμένων - ανασυσταμένων κυστιδίων (DRV). Απλή ανάμιξη LIP και ΜΝΣ, δεν έδειξε καμιά αλληλεπίδραση.

Η τεχνική TFH με 100μL ΜΝΣ στην ενυδάτωση έδωσε MLIP με μέσο μέγεθος $242.8\text{nm} \pm 9.2$ και μέσο εγκλωβισμό (Fe/Lipid) $0.092\text{mol} \pm 0.004$. Αντίθετα η προσθήκη 100μL ΜΝΣ, που είχαν επαναδιασπαρεί σε μεθανόλη, εντός της φλάσκας, μαζί με τα λιπίδια και η ενυδάτωση του σιδηρολιπιδικού υμενίου (MeOH-TFH) έδωσε λιποσώματα ελαφρώς μικρότερου μέσου μεγέθους $232.2\text{nm} \pm 5.3$ και με το μικρότερο μέσο εγκλωβισμό $0.085\text{mol} \pm 0.009$. Η τεχνική της προσθήκης 100μL ΜΝΣ μετά τη λυοφιλοποίηση των λιποσωμάτων (DRV), έδωσε τα μικρότερα μέσα μεγέθη $219.3\text{nm} \pm 7.0$ και ταυτόχρονα τον υψηλότερο εγκλωβισμό $0.110\text{mol} \pm 0.012$.

Η εικόνα των μετρήσεων SEM ήταν η πιο καθαρή, με τα MLIP-DRV να εμφανίζουν διαφορετική εικόνα από τα άδεια DRV, με εμφανή αυξημένη παρουσία ΜΝΣ. Όσον αφορά τα MLIP-TFH, οι μετρήσεις SEM έδειξαν σημαντική διαφοροποίηση ανάμεσα στην εικόνα των άδειων TFH λιποσωμάτων από τα εγκλωβισμένα. Αντίθετα, η εικόνα των MLIP με την MeOH-TFH μέθοδο ήταν λιγότερο καθαρή και με μικρότερη παρουσία ΜΝΣ, που πιθανόν να οφείλεται στην πιο δύσκολη εξάτμιση της μεθανόλης και στον κατ' επέκταση δυσκολότερο σχηματισμό λιποσωμάτων και εγκλωβισμό.

Τέλος, τα ΜΝΣ-PEG δείχνανε πως η τεχνική DRV με την προσθήκη 100μL ΜΝΣ-PEG μετά τη λυοφιλοποίηση έδωσε το μεγαλύτερο μέσο μέγεθος $256.0\text{nm} \pm 11.7$ και εγκλωβισμό 0.186mol . Αντίθετα η τεχνική TFH έδωσε μέσο μέγεθος $249.9\text{nm} \pm 11.7$ και το μικρότερο εγκλωβισμό 0.071mol . Καθώς η ποσότητα των ΜΝΣ-PEG ήταν περιορισμένη, δεν υπήρξε η δυνατότητα επανάληψης των μετρήσεων και η επιβεβαίωση τους, οπότε χρειάζεται περεταίρω διερεύνησή τους.

Οι μελέτες σταθερότητας μεγέθους στις παρασκευές MLIP δείχνανε αυξημένη σταθερότητα τόσο για το μέγεθος, όσο και για το ζήτα δυναμικό και το δείκτη πολυδιασποράς για διάστημα τουλάχιστον 60 ημερών στα DRV-PEG και τουλάχιστον 75 ημερών για τα MLIP με την TFH, MeOH-TFH και DRV τεχνική.

5 Βιβλιογραφία

[Al-Jamal W. T., Kostarelos K., "Liposome-nanoparticle Hybrids for Multimodal Diagnostic and Therapeutic Applications", Nanomedicine, 2\(1\), 85–98 \(2007\)](#)

[Agrawal M., Ajazuddin, Tripathi D. K., Saraf S., Saraf S., Antimisiaris S.G., Mourtas S., Udenaes M.H., Alexander, A., "Recent advancements in liposomes targeting strategies to cross blood-brain barrier \(BBB\) for the treatment of Alzheimer's disease", J. Control. Release, 260, 61–77 \(2017\)](#)

[Antimisiaris S.G., Marazioti A., Kannavou M., Natsaridis E., Gkartziou F., Kogkos G., Mourtas S., "Overcoming barriers by local drug delivery with liposomes", Adv Drug Deliv Rev, 174:53-86 \(2021\)](#)

[Antimisiaris S.G., "Preparation of DRV liposomes", Methods Mol Biol, 51-75 \(2010\)](#)

[Babincova M., "Targeted and controlled release of drugs using magnetoliposomes", Ceska Slov Farm, 48\(1\):27-9 \(1999\)](#)

[Bakandritsos A., Bouropoulos N., Zboril R., Iliopoulos K., Boukos N., Chatzikyriakos G., Couris S., "Optically Active Spherical Polyelectrolyte Brushes with a Nanocrystalline Magnetic Core", Adv. Funct. Mater., 18, 1694-1706 \(2008\)](#)

[Chin A. B., Yaacob I. I. J., "Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure", Mater. Process. Technol., Volume 191, Issues 1-3, 1, 235-237 \(2007\)](#)

Cornell R. M., Schwermann U., "The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses" - 2nd Completely Revised and Extended Edition (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003)

["Molecule Diffusion", embl.de, EMBL, Web. 2 Jun. 2004.](#)

[<https://www.embl.de/eamnet/frap/html/molecule_diffusion.html>](https://www.embl.de/eamnet/frap/html/molecule_diffusion.html)

[Estelrich J, Escribano E, Queralt J. and Busquets M. A, "Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically-Guided and Magnetically-Responsive Drug Delivery", Int. J. Mol. Sci, 8070-101 \(2015\)](#)

[Fang C. and Zhang M., "Multifunctional Magnetic Nanoparticles for Medical Imaging Applications", J Mater Chem, 6258-6266 \(2009\)](#)

[Ghazanfari M. R., Jaafari M. R., Shams S. F., Kashefi M., "Design and fabrication of multifunctional temperature-sensitive magnetoliposomal nanostructures", Mater. Today Commun., 13, 102-111 \(2017\)](#)

Hiemenz P. C., Rajagopalan R., "Principles of Colloid and Surface Chemistry" - 3rd Edition Revised and Expanded (Marcel Dekker Inc, New York, 1997)

[Hoffman A. S., "The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems", Journal of Controlled Release, 132, 153-163 \(2008\)](#)

[Jun Y., Lee J., Cheon J., "Chemical Design of Nanoparticle Probes for High-Performance Magnetic Resonance Imaging", Angew Chem Int Ed Engl, 47, 5122-5135 \(2008\)](#)

[Iacovacci V., Lucarini G., Ricotti L., Menciasci A., "Magnetic Field-Based Technologies for Lab-on-a-Chip Applications. Lab-on-a-Chip Fabrication and Application", Intech, 3 \(2016\)](#)

[Iyer A. K., Khaled G., Fang J. and Maeda H., "Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting", Drug Discov Today, 812-8 \(2006\)](#)

[Jiang W., Lai K.L., Hu H., Zeng X.B., Lan F., Liu K.X., Wu Y., Zhong W.G., "The effect of \$\[\text{Fe}^{3+}\]/\[\text{Fe}^{2+}\]\$ molar ratio and iron salts concentration on the properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the water/ethanol/toluene system", J. Nanoparticle Res., 13\(10\), 5135–5145](#)

Kellner R., Mermet J., Otto M., Widmer H. M., Willey-VCH, "Analytical Chemistry" (American Chemical Society Publications, New York, 1998)

[Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Vander E. L., Muller R. N., "Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications", Chem. Rev., 108\(6\), 2064–2110 \(2008\)](#)

["Dynamic Light Scattering: An introduction in 30 minutes", DLS technical note, Malvern Instruments \(2014\)](#)

["Zeta potential: An introduction in 30 minutes"](#), Z potential technical note, Malvern Instruments (2014)

["Dynamic light scattering for size characterization"](#), malvernpanalytical.com, Malvern Panalytical, Web. 6 Mar. 2018.

<<https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>>

Mercier J. P., Zambelli G., Kurz W., "Introduction to Materials Science" - 1st Edition (Elsevier Science, Paris, 2003)

[Mishra B., Patel B. B. and Tiwari S., "Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery"](#), Nanomedicine, 9-24 (2010)

[Moghimi S. M., Hunter A. C. and Murray J. C., "Nanomedicine: current status and future prospects"](#), FASEB Journal, 311-30 (2005)

[Monnier C. A., Burnand D., Rothen-Rutishauser B., Lattuada M., Petri-Fink A., "Magnetoliposomes: opportunities and challenges"](#), Eur. J. Nanomed., 6(4), 201-215 (2014)

["General: Characterization Techniques"](#), nanocomposix.com, nanoComposix, Web. 24 Sep. 2020 <https://nanocomposix.com/pages/nanoparticle-characterization-techniques#target>

[Pereira D. S. M., Cardoso B. D., Rodrigues A. R. O., Amorim C. O., Amaral V. S., Almeida B. G., Queiroz M-J. R. P., Martinho O., Baltazar F., Calhelha R. C., Ferreira I. C. F. R., Coutinho P. J. G., Castanheira E. M. S., "Magnetoliposomes Containing Calcium Ferrite Nanoparticles for Applications in Breast Cancer Therapy"](#), Pharmaceutics, 11(9), 477 (2019)

[Pradhana P., Girib J., Banerjee R., Bellarea J., Bahadur D., "Preparation and characterization of manganese ferrite-based magnetic liposomes for hyperthermia treatment of cancer"](#), J. Magn. Magn. Mater., Volume 311, Issue 1, 208-215 (2007)

[Potoski J., "Timely synthetic support for medicinal chemists"](#), Drug Discov Today, 115-20 (2005)

[Poly\(acrylic acid-co-maleic acid\) solution](https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/product/aldrich/416053), sigmaaldrich.com, Sigma-Aldrich, Web. 12 Nov. 2011

<<https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/product/aldrich/416053>>

[Salazar J. S., Perez L., De Abril O., Phuoc L. T., Ihiawakrim D., Vazquez M., Greneche J-M, Sylvie Begin-Colin, "Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in 10-40 nm Range: Composition in Terms of Magnetite/Maghemite Ratio and Effect on the Magnetic Properties"](#), Chem. Mater., 23, 1379-1386 (2011)

["Sephacrose Gel Filtration Media"](#), Sepharose and Sepharose CL Instructions, GE Healthcare Biosciences (2006)

[Shaghasemi S. B., Virk M. M., Reimhult E., "Optimization of Magneto-thermally Controlled Release Kinetics by Tuning of Magnetoliposome Composition and Structure"](#), Sci Rep 7(1), 7474 (2017)

[Simoes S., Moreira J. N., Fonseca C., Duzgunes N., Pedroso de Lima M. C., "On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times"](#), Adv Drug Deliv Rev., 56(7), 947–965 (2004)

Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A., "Principles of Instrumental Analysis" - 5th Edition (Harcourt Brace College Publishers, Philadelphia, 1997)

[Soenen S. J., Hodenius M., De Cuyper M., "Magnetoliposomes: versatile innovative nanocolloids for use in biotechnology and biomedicine"](#), Nanomedicine, 4(2), 177-191 (2009)

[Soenen S. J., Velde G. V., Ketkar-Atre A., Himmelreich U., De Cuyper M., "Magnetoliposomes as magnetic resonance imaging contrast agents"](#), Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol., 3(2), 197-211 (2011)

[Skouras A., Mourtas S., Markoutsas E., De Goltstein M.-C., Wallon C., Catoen S., & Antimisiaris S. G. "Magnetoliposomes with high USPIO entrapping efficiency, stability and magnetic properties"](#), Nanomedicine, 7(5), 572–579 (2011)

[Skouras A., Papadia K., Mourtas S., Klepetsanis P., Antimisiaris S.G., "Multifunctional doxorubicin-loaded magnetoliposomes with active and magnetic targeting properties"](#), Eur. J. Pharm. Sci., 123, 162–172 (2018)

- [Stewart J. C., "Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate", Anal. Biochem., 10-4 \(1980\)](#)
- [Tingli L., Tao C. Wang, Yufan M., Zhang, "Influence of polymer size, liposomal composition, surface charge, and temperature on the permeability of pHsensitive liposomes containing lipid-anchored poly\(2-ethylacrylic acid\)", Int. J. Nanomed., 7:4917-26 \(2012\)](#)
- [Torchilin V. P., "Multifunctional nanocarriers", Adv. Drug Deliv. Rev., 58, 1532-1555 \(2006\)](#)
- [Veloso S. R., Andrade R. G. D., Castanheira E. M. S., "Magnetoliposomes: recent advances in the field of controlled drug delivery", Expert Opin. Drug Deliv., 18\(10\), 1323-1334 \(2021\)](#)
- [Voulgari E., Bakandritsos A., Galtsidis S., Zoumpourlis V., "Synthesis, characterization and in vivo evaluation of a magnetic cisplatin delivery nanosystem based on PMAA-graft-PEG copolymers", JCR, 243, 342-356 \(2016\)](#)
- Yau W. W., Kirkland J. J., Bly D. D., Striegel A., "Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography" - 2nd Edition (John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2009)
- [Zhang H., "Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation", Methods Mol Biol, 17-22 \(2017\)](#)
- [Γκίνη Θ., "Ανάπτυξη, χαρακτηρισμός και τεχνολογική αξιοποίηση μαγνητικών νανοσωματιδίων", Διπλωματική Εργασία \(Τμήμα Φυσικής, Θεσσαλονίκη, 2009\)](#)
- [Τζαβάρα Π. Δ., "Παρασκευή, χαρακτηρισμός και μελέτη τοξικότητας υβριδικών νανοκολλοειδών μαγνητίτη", Διπλωματική Εργασία \(Τμήμα Φαρμακευτικής, Πάτρα, 2014\)](#)
- [Κολοκυθάς-Ντούκας Α., "Σύνθεση και μελέτη μαγνητικών νανοκολλοειδών για βιοϊατρικές εφαρμογές", Διπλωματική Εργασία \(Τμήμα Επιστήμης των Υλικών, Πάτρα, 2012\)](#)
- Κυπαρισσίδης Κ., Καμμώνα Ο., Χαϊτίδου Σ., "Εφαρμογές Νανοτεχνολογίας στην Ιατρική - Μια Υπόσχεση για το Μέλλον", Intellectum (2008)

Χρυσουλάκης Γ. Δ., Παντελής Δ. Ι., "Επιστήμη και Τεχνολογία των
Μαγνητικών Υλικών" (Παπασωτηρίου, Αθήνα 1996)