



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΑΤΡΩΝ**
UNIVERSITY OF PATRAS

ΣΧΟΛΕΣ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑΤΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

**«ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Παρασκευή και χαρακτηρισμός μαγνητικών νανοσωματιδίων για τη
θεραπεία της νόσου Alzheimer με αναστολείς κινασών»**

Σοφία Ανδρικοπούλου

Χημικός

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Αυγουστάκης, Καθηγητής

Πάτρα, 2020

Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήματα Χημείας, Φαρμακευτικής, Ιατρικής

Σοφία Ανδρικοπούλου

© 2020 – Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΠΑΤΡΩΝ
UNIVERSITY OF PATRAS

**SCHOOLS OF NATURAL AND HEALTH SCIENCES
DEPARTMENTS OF CHEMISTRY, PHARMACY, MEDICINE**

**INTER-DEPARTMENTAL POSTGRADUATE PROGRAM
«MEDICINAL CHEMISTRY: DRUG DISCOVERY AND DESIGN»**

MASTER'S THESIS

**«Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles for the
treatment of Alzheimer's disease with kinase inhibitors»**

Sofia Andrikopoulou

Chemist

Supervisor: Konstantinos Avgoustakis, Professor

Patras, 2020

University of Patras, Departments of Chemistry, Pharmacy, Medicine

Sofia Andrikopoulou

© 2020 – All rights reserved

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κωνσταντίνος Αυγουστάκης

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

(Επιβλέπων)

Πάυλος Κλεπετσάνης

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Σοφία Χατζηαντωνίου

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

EXAMINERS COMMITTEE

Konstantinos Avgoustakis

Professor, Department of Pharmacy, University of Patras

(Supervisor)

Pavlos Klepetsanis

Associate Professor, Department of Pharmacy, University of Patras

Sophia Hatziantoniou

Assistant Professor, Department of Pharmacy, University of Patras

Η παρούσα ΜΔΕ αφιερώνεται στην οικογένειά μου.

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Πανεπιστημίου Πατρών, στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Ιατρική Χημεία: Σχεδιασμός και Ανάπτυξη Φαρμακευτικών Προϊόντων» των τμημάτων Χημείας, Φαρμακευτικής και Ιατρικής κατά τα έτη 2017-2020.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους με βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Αρχικά, τον επιβλέποντα Καθηγητή του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Πανεπιστημίου Πατρών, κ. Κωνσταντίνο Αυγουστάκη για την ανάθεση του θέματος, τις χρήσιμες συμβουλές και τη συνεχή και πολύτιμη καθοδήγηση του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Πανεπιστημίου Πατρών κ. Παύλο Κλεπετσάνη και την Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Πανεπιστημίου Πατρών, κ. Σοφία Χατζηαντωνίου για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και την καλή συνεργασία.

Τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια, του Εργαστηρίου Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Πανεπιστημίου Πατρών, Αθηνά Αγγελοπούλου για την επίβλεψη και σημαντική βοήθεια κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων και συγγραφής της εργασίας. Τον υποψήφιο διδάκτορα του Τμήματος Επιστήμης των Υλικών, του Πανεπιστημίου Πατρών, Αργύρη Κολοκυθά-Ντούκα για την επίβλεψη και τις σημαντικές συμβουλές κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, που διεξήχθησαν στο Τμήμα Επιστήμης των Υλικών. Επίσης, τη διδάκτορα κ. Κόλλια Μαρία για τη λήψη των μικρογραφημάτων TEM στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας και Μικροανάλυσης του Πανεπιστημίου Πατρών.

Όλα τα μέλη των εργαστηρίων και τους συμφοιτητές μου για τη συνεργασία και πολύτιμη βοήθειά τους σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη συνεχή στήριξη σε κάθε μου προσπάθεια.

Περίληψη

Στη παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία μελετήθηκαν υβριδικά μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων σιδήρου, τα οποία σχεδιάστηκαν με σκοπό τη χρήση τους ως σύστημα χορήγησης του πεπτιδικού αναστολέα TDZD-8, της κινάσης GSK3-β. Η GSK-3β είναι μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης, υπεύθυνη για τη ρύθμιση κυτταρικών διεργασιών και τον έλεγχο διαδρομών σηματοδότησης στον εγκέφαλο. Η δυσλειτουργία της GSK-3β σχετίζεται με τη νόσο Alzheimer, γεγονός που την καθιστά έναν θεραπευτικό στόχο μεγάλου ενδιαφέροντος σε μελέτες, οι οποίες ασχολούνται με τη θεραπεία της νόσου.

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων σιδήρου συντέθηκαν με τη μέθοδο της της υδρολυτικής αλκαλικής καταβύθισης. Η αντίδραση έγινε παρουσία άλατος νατρίου αλγινικού οξέος, το οποίο επικάλυψε τον πυρήνα των οξειδίων σιδήρου και τα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά ως προς την υδροδυναμική διάμετρο, το ζ δυναμικό, το PDI, τις μαγνητικές τους ιδιότητες και την περιεκτικότητά τους στα επιμέρους τους συστατικά. Για την επίτευξη βιοσυμβατότητας, αλλά και σταθερότητας του κολλοειδούς συστήματος των νανοσωματιδίων σε διαλύματα με αυξημένη ιοντική συγκέντρωση, πραγματοποιήθηκε επικάλυψη τους με αλυσίδες του πολυμερούς mPEG-NH₂, μέσω του σχηματισμού αμιδικού δεσμού με το αλγινικό οξύ. Ακολούθησε προσδιορισμός των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων, καθώς και μελέτες σταθερότητας τους σε διάφορα μέσα διασποράς, τα αποτελέσματα των οποίων κρίθηκαν ικανοποιητικά για τη συνέχεια των πειραμάτων.

Η αλληλεπίδραση των μαγνητικών νανοσωματιδίων με το φάρμακο TDZD-8 μελετήθηκε ως προς την ικανότητα φόρτωσης του φαρμάκου στα νανοσωματίδια με προσρόφηση, αλλά και τον ρυθμό αποδέσμευσης του από αυτά. Παρατηρήθηκε καλή ικανότητα φόρτωσης και παρατεταμένη αποδέσμευση του φαρμάκου. Περαιτέρω μελέτη των ιδιοτήτων των μαγνητικών νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε με την διεξαγωγή πειραμάτων αιμόλυσης, στα οποία τα νανοσωματίδια δεν προκάλεσαν αιμόλυση και κυτταροτοξικότητας σε φυσιολογικούς ινοβλάστες, που βρέθηκε χαμηλή. Η κυτταροτοξικότητα φορτωμένων με φάρμακο νανοσωματιδίων καθώς και η πρόσληψη νανοσωματιδίων επισημασμένων με Rhodamine 6G μελετήθηκε σε κύτταρα της ανθρώπινης σειράς νευροβλαστώματος SH-SY5Y. Τα αποτελέσματα από τα

πειράματα των μαγνητικών νανοσωματιδίων είναι ενθαρρυντικά, για την περαιτέρω μελέτη τους ως σύστημα ελεγχόμενης χορήγησης του TDZD-8.

Λέξεις κλειδιά: Μαγνητικά νανοσωματίδια, Οξείδια σιδήρου, Αναστολέας κινασών TDZD-8, Κινάση GSK-3β, Νόσος Alzheimer.

Abstract

In the present Master's Thesis hybrid magnetic iron oxide nanoparticles were synthesized and studied, in order to be used as a delivery system for the TDZD-8 peptide inhibitor of GSK-3 β kinase. GSK-3 β is a serine/threonine protein kinase, responsible for regulating cellular processes and controlling signaling pathways in the brain. GSK-3 β dysfunction is associated with Alzheimer's disease, which makes it a therapeutic target of great interest in studies dealing with the treatment of the disease.

Magnetic iron oxide nanoparticles were synthesized, using the method of hydrolytic alkaline precipitation. The reaction was carried out in the presence of sodium alginate, which coated the iron oxide core, and the nanoparticles were physicochemically characterized in terms of their composition, hydrodynamic diameter, ζ potential, PDI and their magnetic properties. To achieve biocompatibility, but also stability of the colloidal system of nanoparticles in solutions with increased ionic concentration, the nanoparticles were coated with polymeric chains of mPEG-NH₂, through conjugation with alginic acid by forming an amide bond. The physicochemical properties of the pegylated nanoparticles were determined, and stability studies were carried out in various dispersants, the results of which were considered satisfactory for the continuation of the experiments.

The loading capacity of the nanoparticles for the drug TDZD-8 was studied, as well as the rate of TDZD-8 release from the nanoparticles. Good loading capacity and prolonged drug release were observed. Further study of the properties of magnetic nanoparticles was carried out by performing experiments of hemolysis, in which the nanoparticles did not cause hemolysis, and cytotoxicity against normal fibroblasts, where low toxicity rates were observed for the nanoparticles. The cytotoxicity of drug-loaded nanoparticles as well as the cellular uptake of Rhodamine 6G-labelled nanoparticles were studied in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. The results obtained were encouraging and justify further study of the functionalized magnetic nanoparticles synthesized here as a controlled delivery system of TDZD-8.

Keywords: Magnetic nanoparticles, Iron oxides, Kinase inhibitor TDZD-8, GSK-3 β kinase, Alzheimer's disease.

Συντμήσεις και όροι

BBB: Blood–brain barrier, Αιματοεγκεφαλικός φραγμός

ΚΝΣ: Κεντρικό νευρικό σύστημα

DDS: Drug delivery systems, Συστήματα ελεγχόμενης χορήγησης φαρμάκων

PEG: Poly(ethylene glycol), Πολυ(αιθυλενογλυκόλη)

PVA: Poly(vinyl alcohol), Πολυ(βινυλική αλκοόλη)

PAM: Poly(acrylamide), Πολυ(ακρυλαμίδιο)

PLA: Poly(lactic acid), Πολυ(γαλακτικό οξύ)

PGA: Poly(glycolic acid), Πολυ(γλυκολικό οξύ)

RES: Reticuloendothelial system, Δικτυοενδοθηλιακό σύστημα

MNPs: Magnetic nanoparticles, Μαγνητικά νανοσωματίδια

AD: Alzheimer’s disease, Νόσος Alzheimer

Aβ: Πρωτεΐνη β αμυλοειδούς

NFTs: Neurofibrillary tangles, Νευροϊνιδιακά πλέγματα

APP: Amyloid precursor protein, Πρόδρομη πρωτεΐνη αμυλοειδούς

GSK-3: Glycogen synthase kinase-3, Κινάση-3 της συνθετάσης του γλυκογόνου

MRI: Magnetic Resonance Imaging, Απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού

UV: Ultraviolet, Υπεριώδες

Vis: Visible, Ορατό

IR: Infrared, Υπέρυθρο

ATR FT-IR: Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Φασματοσκοπία IR μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση

DLS: Dynamic light scattering, Δυναμική σκέδαση φωτός

TGA: Thermogravimetric analysis, Θερμοσταθμική ανάλυση

TEM: Transmission electron microscopy, Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης

ZP: ζ potential, ζ δυναμικό

RBC: Red blood cells, Ερυθρά αιμοσφαίρια

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	1
<i>1.1 Χορήγηση φαρμάκων</i>	<i>1</i>
1.1.1 Εισαγωγή	1
1.1.2 Ανατομικές οδοί χορήγησης φαρμάκων.....	2
1.1.2.1 Χορήγηση από το στόμα	3
1.1.2.2 Παρεντερική χορήγηση	4
1.1.2.3 Άλλες μορφές χορήγησης.....	5
<i>1.2 Συστήματα ελεγχόμενης χορήγησης και αποδέσμευσης φαρμάκων</i>	<i>7</i>
1.2.1 Εισαγωγή	7
1.2.2 Συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης	10
1.2.2.1 Συστήματα προκαθορισμένου ρυθμού αποδέσμευσης.....	11
1.2.2.2 Συστήματα ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης	13
1.2.2.3 Συστήματα στα οποία η αποδέσμευση ελέγχεται από μηχανισμό ανάδρασης	15
1.2.2.4 Συστήματα στόχευσης	15
<i>1.3 Νανοφορείς στα συστήματα ελεγχόμενης χορήγησης φαρμάκων.....</i>	<i>16</i>
1.3.1 Εισαγωγή	16
1.3.2 Μέθοδοι σύνθεσης και χαρακτηρισμού νανοφορέων φαρμάκων	17
1.3.3 Λιποσώματα	19
1.3.4 Πολυμερικά μικκύλια	20
1.3.5 Δενδριμερή	20
1.3.6 Πολυμερικά νανοσωματίδια.....	21
1.3.7. Κβαντικές κουκίδες	22
<i>1.4 Μαγνητικά νανοσωματίδια.....</i>	<i>22</i>
1.4.1 Εισαγωγή	22
1.4.2 Μαγνητισμός	23
1.4.3 Ταξινόμηση μαγνητικών υλικών	24
1.4.4 Μέθοδοι σύνθεσης μαγνητικών νανοσωματιδίων.....	27
1.4.5 Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων και η σημασία της επικάλυψής τους.....	29

1.4.6 Κατανομή μαγνητικών νανοσωματιδίων στον οργανισμό	31
1.4.7 Εφαρμογές μαγνητικών νανοσωματιδίων στη βιοϊατρική	32
<i>1.5 Μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων σιδήρου επικαλυμμένα με αλγινικό οξύ και PEG</i>	<i>34</i>
1.5.1 Εισαγωγή	34
1.5.2 Μαγνητίτης και μαγκεμίτης	35
1.5.3 Αλγινικό οξύ.....	36
1.5.4 Πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEG)	36
1.5.5 Σταθερότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων	37
<i>1.6 Χορήγηση μαγνητικών νανοσωματιδίων στον εγκέφαλο</i>	<i>40</i>
1.6.1 Εισαγωγή	40
1.6.2 Αιματοεγκεφαλικός φραγμός και τρόποι διέλευσης των νανοσωματιδίων ..	40
1.6.3 Χρήση εξωτερικής μαγνητικής δύναμης για την στόχευση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού	43
<i>1.7 Ο αναστολέας TDZD-8 της κινάσης GSK-3β και ο ρόλος τους στη νόσο Alzheimer</i>	<i>45</i>
1.7.1 Εισαγωγή	45
1.7.2 Η κινάση GSK-3β και ο ρόλος της στη νόσο Alzheimer	45
1.7.3 TDZD-8: Ο αναστολέας της κινάσης GSK-3β.....	46
<i>1.8 Τεχνικές χαρακτηρισμού.....</i>	<i>48</i>
1.8.1 Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)	48
1.8.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR).....	49
1.8.3 Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)	51
1.8.4 Θερμοσταθμική ανάλυση (Thermogravimetric Analysis, TGA)	53
1.8.5 Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM)	54
<i>1.9 Σκοπός της μεταπτυχιακής εργασίας</i>	<i>55</i>
2. Πειραματικό Μέρος.....	56
2.1 Όργανα.....	56
2.2 Υλικά.....	56

2.2.1 Υλικά σύνθεσης των μαγνητικών νανοσωματιδίων και των τεχνικών χαρακτηρισμού τους.....	56
2.2.2 Υλικά φόρτωσης και αποδέσμευσης του αναστολέα TDZD-8.....	57
2.2.3 Υλικά φόρτωσης και διαρροής της χρωστικής Rhodamine 6G	58
2.2.4 Υλικά δοκιμασίας αιμόλυσης.....	58
2.2.5 Υλικά μελέτης κυτταροτοξικότητας σε φυσιολογικούς ινοβλάστες.....	58
2.2.6 Υλικά μελέτης κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα SH-SY5Y	58
2.2.7 Υλικά μελέτης πρόσληψης των επισημασμένων μαγνητικών νανοσωματιδίων από κύτταρα SH-SY5Y	59
2.3 Πειραματικές διαδικασίες	59
2.3.1 Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg.....	59
2.3.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ιόντων σιδήρου.....	60
2.3.3 Προσδιορισμός υδροδυναμικής διαμέτρου, ζ δυναμικού και PDI.....	61
2.3.4 Προσδιορισμός ποσοστού πολυμερούς.....	61
2.3.5 Μελέτη μαγνητικών ιδιοτήτων.....	62
2.3.6 Πρόσδεση α-μεθοξυ-ω-αμινο-πολυ(αιθυλενογλυκόλης) (mPEG-NH ₂) στα μαγνητικά νανοσωματίδια	63
2.3.7 Μελέτες σταθερότητας των μαγνητικών νανοσωματιδίων	65
2.3.8 Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM)	65
2.3.9 Φόρτωση και αποδέσμευση του φαρμάκου TDZD-8	66
2.3.10 Φόρτωση και διαρροή της χρωστικής Rhodamine 6G.....	67
2.3.11 Δοκιμασία αιμόλυσης.....	69
2.3.12 Μελέτη κυτταροτοξικότητας σε φυσιολογικούς ινοβλάστες	70
2.3.13 Μελέτη κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα SH-SY5Y	71
2.3.14 Μελέτη πρόσληψης μαγνητικών νανοσωματιδίων επισημασμένων με τη χρωστική Rhodamine 6G από κύτταρα SH-SY5Y.....	72
3. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	73
<i>3.1 Αποτελέσματα σύνθεσης και φυσικοχημικού χαρακτηρισμού των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg.....</i>	<i>73</i>
3.1.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ιόντων σιδήρου.....	73
3.1.2 Προσδιορισμός υδροδυναμικής διαμέτρου, ζ δυναμικού και PDI.....	73
3.1.3 Προσδιορισμός ποσοστού αλγινικού.....	74
3.1.4 Μελέτη μαγνητικών ιδιοτήτων	74

3.2 Αποτελέσματα αντίδρασης πρόσδεσης του πολυμερούς <i>mPEG-NH₂</i> και φυσικοχημικού χαρακτηρισμού των μαγνητικών νανοσωματιδίων <i>MagAlg-Peg</i>	75
3.2.1 Προσδιορισμός υδροδυναμικής διαμέτρου, ζ δυναμικού και PDI.....	76
3.2.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ιόντων σιδήρου.....	77
3.2.3 Προσδιορισμός ποσοστού της PEG	77
3.2.4 Αποτελέσματα μελέτης σταθερότητας των μαγνητικών νανοσωματιδίων ...	78
3.2.5 Αποτελέσματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (TEM).....	86
3.2.6 Φασματοσκοπία υπερύθρου	88
3.3 Αποτελέσματα φόρτωσης και αποδέσμευσης του φαρμάκου <i>TDZD-8</i>	90
3.4 Αποτελέσματα φόρτωσης και διαρροής της χρωστικής <i>Rhodamine 6G</i>	91
3.5 Δοκιμασία αιμόλυσης	92
3.6 Αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας σε φυσιολογικούς ινοβλάστες.....	93
3.7 Αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα <i>SH-SY5Y</i>	94
3.8 Αποτελέσματα πρόσληψης των μαγνητικών νανοσωματιδίων επισημασμένων με τη χρωστική <i>Rhodamine 6G</i> από κύτταρα <i>SH-SY5Y</i>	95
4. Συμπεράσματα	97
5. Βιβλιογραφία.....	99

1. Εισαγωγή

1.1 Χορήγηση φαρμάκων

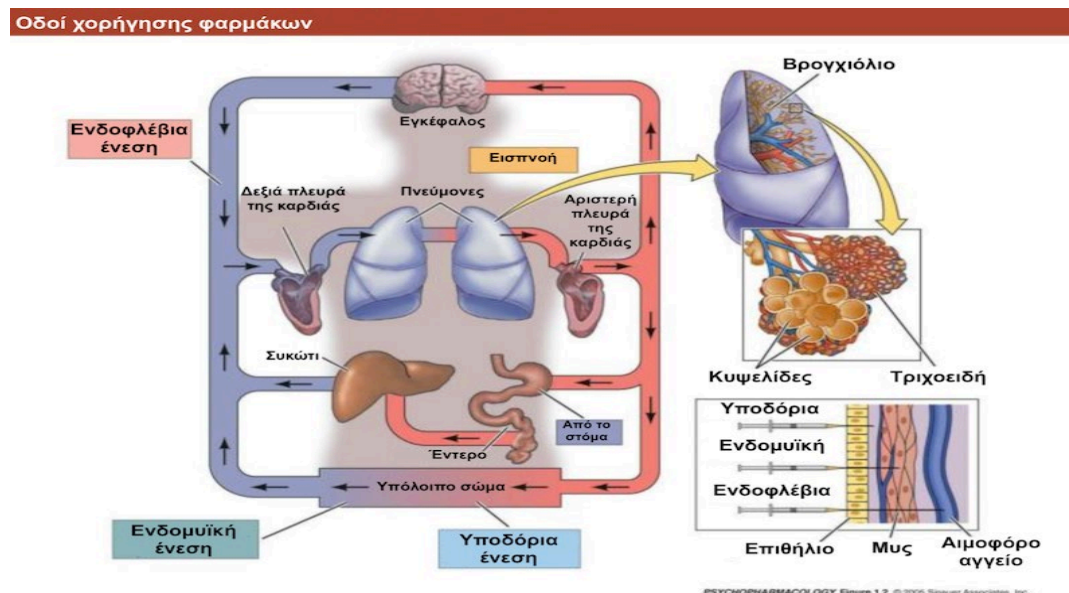
1.1.1 Εισαγωγή

Η μέθοδος ή η διαδικασία χορήγησης φαρμακευτικών ενώσεων για την επίτευξη θεραπευτικού αποτελέσματος σε ανθρώπους ή ζώα ονομάζεται χορήγηση φαρμάκων. Η χορήγηση φαρμάκων έχει αλλάξει δραματικά τις τελευταίες δεκαετίες, ενώ μεγάλη πρόοδος έχει επιτευχθεί στην κατανόηση των φυσιολογικών φραγμών για την αποτελεσματική χορήγηση φαρμάκων, όπως η μεταφορά στο κυκλοφορικό σύστημα και η κίνηση του φαρμάκου μέσω των κυττάρων και των ιστών. Παρ' όλα αυτά πολλά φάρμακα, ακόμη και εκείνα που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας μερικές από τις πιο προηγμένες μεθόδους, παρουσιάζουν σοβαρές παρενέργειες λόγω του ότι το φάρμακο αλληλεπιδρά όχι μόνο με τους παθολογικούς ιστούς αλλά και με υγιή μέρη του σώματος, που δεν αποτελούν τον αρχικό του στόχο. Οι παρενέργειες αυτές περιορίζουν την αποτελεσματικότητα φαρμάκων για πολλές ασθένειες όπως ο καρκίνος, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες και οι μολυσματικές ασθένειες.

Τα φάρμακα μπορούν να χορηγηθούν μέσω διαφόρων ανατομικών οδών για τη θεραπεία μιας ασθένειας ή για προληπτικούς σκοπούς. Σε πολλές περιπτώσεις, το φάρμακο μπορεί να χορηγηθεί με τη μορφή απλής ταμπλέτας ή κάψουλας με κατάποση (χορήγηση από το στόμα), στη συνέχεια απελευθερώνεται από τη στερεά μορφή στο στομάχι και απορροφάται ταχέως μέσω του εντέρου στην κυκλοφορία του αίματος. Ορισμένα φάρμακα δρουν πιο αποτελεσματικά κατά την χορήγησή τους με άμεση εισαγωγή στο αίμα (ενδοφλέβια χορήγηση) ή στους ιστούς (υποδόρια, ενδομυϊκά). Λόγοι προτίμησης της ενέσιμης χορήγησης μπορεί να είναι η απαίτηση για άμεση έναρξη δράσης του φαρμάκου, ή επειδή η στοματική οδός χορήγησης είναι απαγορευτική όταν το φάρμακο είναι ασταθές στην γαστρεντερική οδό ή/και απορροφάται ελάχιστα από το έντερο. Τα φάρμακα μπορούν επίσης να χορηγηθούν στις κοιλότητες του σώματος και άλλα όργανα (στους οφθαλμούς, στους πνεύμονες),

για τοπικά αποτελέσματα ή απορρόφηση στην κυκλοφορία του αίματος (συστηματική χορήγηση) (Davis, 2000).

1.1.2 Ανατομικές οδοί χορήγησης φαρμάκων



Εικόνα 1: Οδοί χορήγησης φαρμάκων και μέθοδοι με τις οποίες επιτυγχάνεται η μεταφορά στη συστηματική κυκλοφορία. Τροποποιημένη και μεταφρασμένη εικόνα από (Meyer & Quenzer, 2005)

Η εισαγωγή φαρμάκων στο ανθρώπινο σώμα είναι δυνατό να γίνει μέσω διαφόρων ανατομικών οδών (Εικόνα 1), ανάλογα με το αν προορίζονται για συστηματικά αποτελέσματα ή για στόχευση συγκεκριμένων οργάνων. Παράγοντες όπως το είδος της ασθένειας, το επιθυμητό αποτέλεσμα και το διαθέσιμο φάρμακο επηρεάζουν την επιλογή της οδού χορήγησης που θα προτιμηθεί. Συνεπώς, τα φάρμακα μπορούν να χορηγηθούν απευθείας σε ένα συγκεκριμένο όργανο που επηρεάζεται από μία ασθένεια ή χορηγούνται αρχικά συστηματικά, στοχεύοντας στη συνέχεια στο άρρωστο όργανο. Οι μέθοδοι συστηματικής χορήγησης φαρμάκων μέσω διαφόρων ανατομικών οδών ταξινομούνται όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 (Jain, 2014).

Πίνακας 1: Μέθοδοι συστηματικής χορήγησης φαρμάκων μέσω διαφορετικών ανατομικών οδών.

ΟΔΟΙ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	
ΕΝΤΕΡΙΚΗ	Από το στόμα (per os, p.o.)

ΟΔΟΙ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	
ΕΝΤΕΡΙΚΗ	Υπογλώσσια χορήγηση
	Από το ορθό
ΠΑΡΕΝΤΕΡΙΚΗ	Υποδόρια χορήγηση (subcutaneous, S.C.)
	Ενδομυϊκή χορήγηση (intramuscular I.M.)
	Ενδοφλέβια χορήγηση (intravenous, I.V.)
	Ενδοαρτηριακή
	Ενδοδερμική
ΆΛΛΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ	Με εισπνοή
	Διαδερμική
	Τοπική
	Ενδοραχιαία
	Ενδορινική

1.1.2.1 Χορήγηση από το στόμα

Η στοματική οδός παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα στη χορήγηση φαρμάκων, με τα πιο σημαντικά να είναι η ευκολία χορήγησης του φαρμάκου αλλά και η μεγάλη αποδοχή από τους ασθενείς. Για του λόγους αυτούς η χορήγηση από το στόμα είναι η πιο διαδεδομένη οδός χορήγησης για τις συμβατικές αλλά και σύγχρονες μεθόδους μεταφοράς φαρμάκων. Υπάρχουν όμως και περιορισμοί για την χορήγηση φαρμάκων από το στόμα, οι οποίοι είναι οι εξής:

- Το όξινο περιβάλλον της πεπτικής οδού και η παρουσία πεπτικών ενζύμων μπορεί να οδηγήσει σε αποικοδόμηση κάποιων φαρμάκων πριν ακόμα περάσουν στην κυκλοφορία του αίματος και φτάσουν στη θέση δράσης τους.
- Πολλά φάρμακα είναι αδιάλυτα στα χαμηλά επίπεδα pH που απαντώνται στον πεπτικό σωλήνα, γεγονός που μπορεί να μειώσει σημαντικά την βιοδιαθεσιμότητά τους μιας και μόνο η διαλυτή μορφή του φαρμάκου μπορεί να απορροφηθεί στην κυκλοφορία του αίματος.
- Το φάρμακο μπορεί να αδρανοποιηθεί στο ήπαρ στην πορεία του προς τη συστηματική κυκλοφορία (μεταβολισμός πρώτης διόδου).
- Ορισμένα φάρμακα ερεθίζουν τον γαστρεντερικό σωλήνα.

- Η λήψη φαρμάκων από το στόμα για συστηματική χορήγηση οδηγεί σε μεταβλητό ρυθμό απορρόφησης και συγκέντρωσης του φαρμάκου στον ορό του αίματος, προκαλώντας ανεπιθύμητες παρενέργειες στον οργανισμό, αφού οι μεταβολές στα επίπεδα του φαρμάκου είναι απότομες και ξεπερνούν τα επιτρεπτά όρια. Αυτό έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη συστημάτων παρατεταμένης και ελεγχόμενης αποδέσμευσης.

Παρά τα μειονεκτήματα που αναφέρθηκαν μεγάλο βάρος δίνεται ακόμα στη μελέτη της βελτιστοποίησης της δράσης φαρμάκων που χορηγούνται μέσω της στοματικής οδού. (Jain, 2014).

1.1.2.2 Παρεντερική χορήγηση

Με τον όρο παρεντερική χορήγηση περιγράφεται η χορήγηση φαρμάκων και άλλων ενώσεων στον οργανισμό μέσω οδών διαφορετικών από τον γαστρεντερικό σωλήνα. Σε αυτή τη μέθοδο χορήγησης η εισαγωγή της φαρμακευτικής ουσίας στο σώμα γίνεται με ένεση υποδόρια, ενδομυϊκά, ενδοφλέβια και ενδοδερμικά. Η παρεντερική χορήγηση φαρμάκων είναι μια επεμβατική μέθοδος χορήγησης, η οποία χρησιμοποιείται συχνά στην ιατρική αφού πολλά φάρμακα χορηγούνται μόνο παρεντερικά. Τα πλεονεκτήματα της παρεντερικής χορήγησης είναι τα ακόλουθα:

- Ταχεία έναρξη της δράσης.
- Η βιοδιαθεσιμότητα είναι υψηλή και μπορεί να προβλεφθεί .
- Δεν χρησιμοποιείται η γαστρεντερική οδός και έτσι αποφεύγονται τα προβλήματα χορήγησης από το στόμα.
- Δυνατότητα χορήγησης φαρμάκων σε βαριά άρρωστους και σε κωματώδη κατάσταση ασθενείς, όταν δεν είναι δυνατή η λήψη φαρμάκων από το στόμα.

Τα κύρια μειονεκτήματα της παρεντερικής χορήγησης είναι τα ακόλουθα:

- Τα ενέσιμα φάρμακα δεν προτιμώνται από τους ασθενείς λόγω του φόβου τους για τις βελόνες και για τυχόν πόνο που μπορεί να επιφέρουν.
- Υπάρχει πιθανότητα μόλυνσης στο σημείο της ένεσης.
- Η ενέσιμη χορήγηση πρωτεϊνικών φαρμακευτικών προϊόντων παρουσιάζει αρκετούς περιορισμούς, ιδιαίτερα για τα προϊόντα που απαιτούν διατήρηση των επιπέδων συγκέντρωσής τους στον οργανισμό (Jain, 2014).

1.1.2.3 Άλλες μορφές χορήγησης

Υπάρχουν πολλές ακόμα μορφές χορήγησης φαρμάκων μέσω διαφορετικών ανατομικών οδών, οι οποίες παρουσιάζουν επίσης πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η επιλογή της καταλληλότερης κάθε φορά μεθόδου χορήγησης γίνεται κατόπιν αξιολόγησης διαφόρων παραμέτρων όπως το είδος του φαρμάκου, τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά κάθε ασθένειας και η κατάσταση του ασθενούς.

Η **διαδερμική χορήγηση** φαρμάκων είναι μια προσέγγιση, που χρησιμοποιείται για τη χορήγηση φαρμάκων μέσω του δέρματος ως εναλλακτική λύση στη χορήγηση από το στόμα, το βλεννογόνο, ενδοαγγειακά και υποδόρια. Παρουσιάζει πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεθόδους, αφού χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου το φάρμακο μεταβολίζεται πρόωρα κατά τη διάρκεια της πρώτης διέλευσης μέσω του ήπατος, δεν είναι επίπονη, είναι μη επεμβατική, η αποδέσμευση του φαρμάκου μπορεί να συνεχίζεται για μεγάλο χρονικό διάστημα (έως και μια εβδομάδα) και είναι σχετικά οικονομική. Ίσως η μεγαλύτερη πρόκληση για τη διαδερμική χορήγηση είναι ότι ένας περιορισμένος αριθμός φαρμάκων είναι δυνατό να χορηγηθεί μέσω αυτής της οδού (Prausnitz & Langer, 2008). Με τις μέχρι τώρα εξελίξεις στη χορήγηση φαρμάκων, τα φάρμακα που μπορούν να χορηγηθούν διαδερμικά έχουν μοριακή μάζα μόνο μερικών εκατοντάδων Daltons, είναι πολύ λιπόφιλα, ενώ η δόση που μπορεί να χορηγηθεί είναι μικρή, της τάξης των mg ανά ημέρα ή και λιγότερο (Prausnitz, Mitragotri, & Langer, 2004), (Prausnitz & Langer, 2008).

Η **ενδορινική χορήγηση** είναι μια πιθανή εναλλακτική οδός για συστηματική χορήγηση φαρμάκων, όπως τα πεπτιδικά και πρωτεϊνικά φάρμακα και εμβόλια, τα οποία περιορίζονται στην ενδοφλέβια χορήγηση. Μέσω της ενδορινικής οδού φάρμακα μπορούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Blood–Brain Barrier, BBB) και στη συνέχεια να φτάσουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) (Gizurarson, 2012). Πιστεύεται γενικά ότι τα φάρμακα περνούν από τη ρινική κοιλότητα στο ΚΝΣ μέσω του οσφρητικού επιθηλίου, παρακάμπτοντας έτσι τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Πλεονεκτήματα της χρήσης της ρινικής οδού για την χορήγηση φαρμάκων είναι η εύκολη πρόσβαση και η μη χρήση βελονών, η καλή διείσδυση των ιδιαίτερα λιπόφιλων και χαμηλού μοριακού βάρους φαρμάκων στο ρινικό βλεννογόνο, η ταχεία απορρόφηση και έναρξη δράσης του φαρμάκου, η αποφυγή χημικής και ενζυματικής αποικοδόμησης φαρμάκων στο γαστρεντερικό σωλήνα και του μεταβολισμού κατά την πρώτη διέλευση από το ήπαρ. Μειονεκτήματα που παρουσιάζονται είναι η ενζυματική

αποικοδόμηση των φαρμάκων και η περιορισμένη ρινική απορρόφηση των πολικών φαρμάκων και ιδιαίτερα των πολικών φαρμάκων με μεγάλα μοριακά βάρη όπως πεπτίδια και πρωτεΐνες, λόγω της χαμηλής διαπερατότητας της μεμβράνης (Jadhav, Gambhire, Shaikh, Kadam, & Pisal, 2007). Υπάρχει σημαντικός περιορισμός της χορηγούμενης δόσης λόγω της σχετικά μικρής περιοχής που είναι διαθέσιμη για την απορρόφηση του φαρμάκου, ενώ ο διαθέσιμος χρόνος απορρόφησης είναι επίσης μικρός (Jain, 2014).

Μια ελκυστική οδός για τη χορήγηση φαρμάκων είναι οι πνεύμονες. Ευνοούν τη **χορήγηση μέσω εισπνοής** φαρμάκων με τοπική δράση (μέσω αερολυμάτων) για τη θεραπεία ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος όπως το βρογχικό άσθμα. Παράλληλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για συστηματική θεραπεία (όπως κατά τη χορήγηση εργοταμίνης κατά της ημικρανίας), αφού οι πνεύμονες παρέχουν πολύ μεγάλη επιφάνεια απορρόφησης και ελεγχόμενο περιβάλλον με σχετικά χαμηλή ενζυμική δράση. Για να είναι οι πνεύμονες μέσο τοπικής ή συστηματικής δράσης ενός φαρμάκου και να επιτευχθεί θεραπευτικό αποτέλεσμα θα πρέπει το φάρμακο να φτάσει σε αυτούς στη κατάλληλη ποσότητα, διαπερνώντας τη στοματοφαρυγγική κοιλότητα (Labiris & Dolovich, 2003). Μερικά πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η χορήγηση θεραπείας στους πνεύμονες είναι η μεγάλη επιφάνεια που είναι διαθέσιμη για απορρόφηση, η αποφυγή μεταβολισμού κατά την πρώτη διέλευση από το ήπαρ και οι μικρότερες δόσεις που χορηγούνται συγκριτικά με την στοματική οδό, οι οποίες οδηγούν σε ανάλογα θεραπευτικά αποτελέσματα. Μειονεκτήματα που παρουσιάζονται είναι το γεγονός ότι μόνο το 10-40% του φαρμάκου που χορηγεί μια συμβατική συσκευή εισπνοής συνήθως εναποτίθεται στους πνεύμονες, ενώ συγχρόνως για να υπάρξει επαρκής απόθεση του φαρμάκου, αυτό θα πρέπει πρώτα να διαπεράσει ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό αεροδυναμικό φίλτρο που φέρουν οι πνεύμονες (Jain, 2014).

Χορήγηση φαρμάκων μπορεί να γίνει και στο **καρδιαγγειακό σύστημα**. Αυτή η οδός χορήγησης διαφέρει σε σχέση με άλλες οδούς λόγω την ανατομίας και φυσιολογίας τους αγγειακού συστήματος, μέσω του οποίου αίμα και θρεπτικά συστατικά μεταφέρονται στα διάφορα μέρη και όργανα του σώματος. Η χορήγηση φαρμάκων στο καρδιαγγειακό σύστημα μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην επιτυχή θεραπεία μιας ποικιλίας νόσων συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης και άλλων τύπων μικροαγγειακών παθήσεων (Geldenhuys, Khayat, Yun, & Nayeem, 2017). Τα φάρμακα μπορούν να εισαχθούν στο αγγειακό σύστημα για συστηματική

δράση, ενώ δυνατή είναι και η χορήγηση για τοπική δράση που στοχεύει σε ένα όργανο. Η θεραπεία αρκετών καρδιαγγειακών διαταραχών επιτυγχάνεται με τη χρήση συσκευών. Η εισαγωγή των συσκευών στο σώμα είναι δυνατό να γίνει είτε μέσω χειρουργικών επεμβάσεων, είτε μέσω λιγότερο επεμβατικών διαδικασιών, οι οποίες περιλαμβάνουν καθετηριασμό (Jain, 2014).

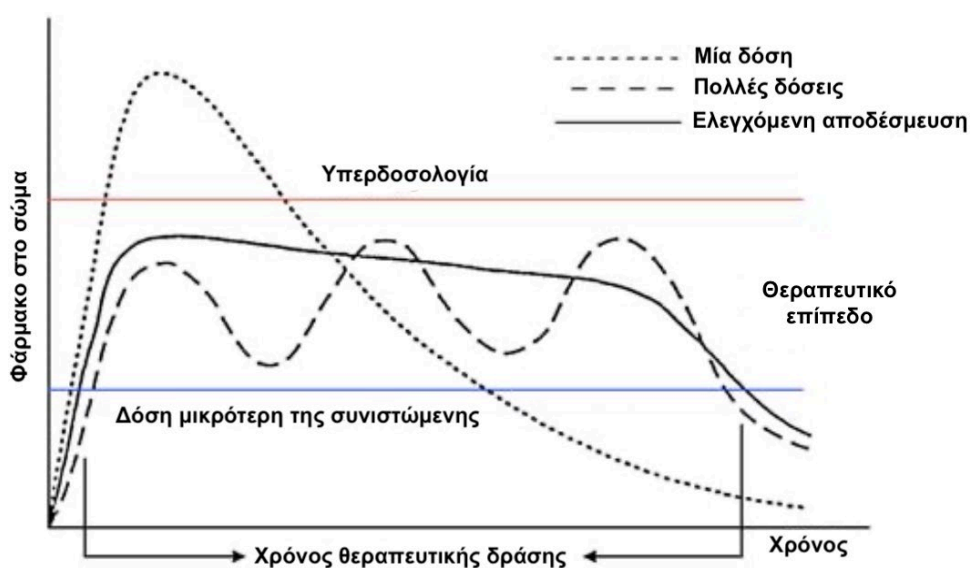
Η θεραπεία διαταραχών του ΚΝΣ χαρακτηρίζεται κυρίως από την ανάγκη για χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών στον **εγκέφαλο**. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός, ο οποίος ρυθμίζει και ελέγχει την μετάβαση ουσιών στον εγκέφαλο, δρα συνήθως σαν εμπόδιο στην είσοδο φαρμακευτικών ουσιών από το αίμα στον εγκέφαλο και το ΚΝΣ. Έτσι οι ίδιοι μηχανισμοί που προστατεύουν τον εγκέφαλο από διάφορες τοξικές χημικές ουσίες μπορούν επίσης να αποτρέψουν και την είσοδο θεραπευτικών ουσιών σε αυτόν. Πολλά υπάρχοντα φαρμακευτικά προϊόντα καθίστανται αναποτελεσματικά στη θεραπεία εγκεφαλικών ασθενειών, λόγω της αδυναμίας που παρουσιάζεται τόσο για την αποτελεσματική χορήγησή τους, όσο και για την διατήρηση των θεραπευτικών επιπέδων μέσα στον εγκέφαλο (Misra, Ganesh, Shahiwala, & Shah, 2003). Στο παρελθόν η θεραπεία ασθενειών του ΚΝΣ γινόταν κυρίως με φάρμακα συστηματικής δράσης, η οποία συνεχίζεται και σήμερα. Η ανακάλυψη φαρμάκων και σκευασμάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης παρουσιάζει όμως όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον για τη θεραπεία διαταραχών του ΚΝΣ. Παραδείγματα από σύγχρονες και ανερχόμενες στρατηγικές για τη διαπέραση του φραγμού και τη χορήγηση φαρμάκων στον εγκέφαλο είναι η χρήση νανοφορέων και η μεταφορά φαρμάκων με τη βοήθεια στοχευμένων υπερήχων (Hersh, et al., 2016).

1.2 Συστήματα ελεγχόμενης χορήγησης και αποδέσμευσης φαρμάκων

1.2.1 Εισαγωγή

Η συμβατική χορήγηση φαρμάκων αποτελεί μέχρι και σήμερα έναν από τους κυριότερους τρόπους θεραπείας μιας ασθένειας. Με τη συμβατική χορήγηση η θεραπεία ενός ασθενούς μπορεί να περιλαμβάνει τη χορήγηση του φαρμάκου πολλές φορές μέσα στη διάρκεια της ημέρας. Έτσι, δημιουργείται το πρόβλημα των συχνών μεταβολών της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα. Οι μεταβολές αυτές δεν είναι επιθυμητές αφού μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές παρενέργειες στον ασθενή.

Το παραπάνω πρόβλημα οδήγησε στον σχεδιασμό συστημάτων ελεγχόμενης χορήγησης φαρμάκων. Ως σύστημα ελεγχόμενης χορήγησης φαρμάκου (Drug Delivery System, DDS) ορίζεται ένα σκεύασμα ή μια συσκευή μέσω των οποίων μια θεραπευτική ουσία εισέρχεται στο σώμα. Με τα συστήματα αυτά η χορήγηση γίνεται με πιο ασφαλή και αποτελεσματικό τρόπο, αφού μπορεί να ρυθμιστεί η ποσότητα του φαρμάκου που φτάνει στο πάσχον όργανο αλλά και πότε το φάρμακο θα αρχίσει να αποδεσμεύεται από το σύστημα (Εικόνα 2). Τα συστήματα χορήγησης φαρμάκων ελέγχουν τον ρυθμό ή τη θέση απελευθέρωσης ενός φαρμάκου στο σώμα. Ορισμένα συστήματα μπορούν να ελέγξουν και τα δύο (Jain, 2014).



Εικόνα 2: Γραφική παράσταση συγκέντρωσης φαρμάκου στο σώμα σε συνάρτηση με τον χρόνο για διαφορετικές μεθόδους χορήγησης του. Μεταφρασμένη εικόνα από (Coelho, et al., 2010).

Το σύστημα χορήγησης που θα επιλεγεί για την αποτελεσματική θεραπεία μιας ασθένειας εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Αυτοί περιλαμβάνουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου, τη χορηγούμενη δόση, την ασθένεια, την περιοχή δράσης του φαρμάκου, τον τρόπο χορήγησης και το κόστος (Davis, 2000).

Όλο και πιο εξελιγμένα συστήματα χορήγησης απαιτούνται για έναν αυξανόμενο αριθμό φαρμάκων. Ο κύριος στόχος είναι να χορηγηθούν ενεργές ενώσεις σε έναν επιθυμητό στόχο χωρίς να αποικοδομούνται κατά την διάρκεια της διαδικασίας χορήγησης. Κάποια φάρμακα πρέπει να χορηγούνται στο σώμα με σταθερό τρόπο για παρατεταμένη χρονική περίοδο, που μπορεί να κυμαίνεται από χορήγηση από το στόμα

μία φορά ημερησίως, έως χορήγηση μέσω εμφυτευμάτων που μπορούν να σχεδιαστούν για να αποδεσμεύουν το φάρμακο μέσα σε χρονική περίοδο μερικών εβδομάδων.

Ένα σύστημα χορήγησης φαρμάκων είναι πιο πιθανό να χρησιμοποιηθεί σε κάποια θεραπεία αν είναι βιοσυμβατό, ανθεκτικό, εύκολο στη χρήση για τον ασθενή, επιτυγχάνει υψηλή φόρτωση φαρμάκων, παρεμποδίζει την τυχαία απελευθέρωση του φαρμάκου, είναι εύκολο στη σύνθεση, στη χορήγηση και στην αφαίρεση (Bhowmik, Gopinath, Kumar, Duraivel, & Kumar, 2012).

Πλεονεκτήματα των συστημάτων χορήγησης φαρμάκων, σε σχέση με τη συμβατική χορήγηση είναι (Robinson & Mauger, 1991), (Bhowmik, Gopinath, Kumar, Duraivel, & Kumar, 2012):

- η ικανότητα χορήγησης ενός φαρμάκου πιο επιλεκτικά σε μια συγκεκριμένη περιοχή
- η ευκολότερη, ακριβέστερη και λιγότερο συχνή δοσολογία
- η μειωμένη μεταβλητότητα στις συγκεντρώσεις φαρμάκων συστηματικής δράσης με αποτέλεσμα τη διατήρηση της συγκέντρωσής τους σε επιθυμητά επίπεδα
- η μείωση των τοξικών μεταβολιτών
- η μείωση παρενεργειών από τη λήψη υπερβολικής δόσης
- η παράταση της δράσης και βιοδιαθεσιμότητας των φαρμάκων μέσω του ελέγχου της αποδέσμευσης τους στον οργανισμό
- η βελτίωση της σταθερότητας δραστικών ουσιών
- η ελαχιστοποίηση της αποικοδόμησης του φαρμάκου.

Τα συστήματα χορήγησης φαρμάκων εκτός από πλεονεκτήματα έχουν και μειονεκτήματα όπως:

- η ύπαρξη επιβλαβών προϊόντων αποικοδόμησης των υλικών κατασκευής του συστήματος χορήγησης
- η πιθανότητα ανάγκης χειρουργικής επέμβασης για την εφαρμογή ή την αφαίρεση ενός συστήματος χορήγησης
- η δυσανασχέτιση ασθενών σχετικά με τη χρήση εμφυτευμάτων
- η αύξηση του τελικού κόστους του προϊόντος
- η πιθανή απόρριψη του φαρμάκου από τον νανοφορέα

- η πιθανή απόρριψη του συστήματος χορήγησης από τον οργανισμό (ιδιαίτερα σε περιπτώσεις εμφυτευμάτων).

1.2.2 Συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης

Ο όρος ελεγχόμενη αποδέσμευση είναι ένας γενικότερος όρος, ο οποίος χαρακτηρίζει την έναρξη ή/και τον ρυθμό αποδέσμευσης του δραστικού συστατικού μιας φαρμακομορφής τροποποιημένης αποδέσμευσης. Η επίτευξη ενός παρατεταμένου θεραπευτικού αποτελέσματος, η δυνατότητα πρόβλεψης της κινητικής αποδέσμευσης ενός φαρμάκου αλλά και η χορήγηση του φαρμάκου σε προκαθορισμένο ρυθμό αποτελούν μερικά από τα κυριότερα πλεονεκτήματα των συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης.

Εκτός από αυτά όμως, τα συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης μπορεί να παρουσιάζουν και ανεπιθύμητες ιδιότητες, οι οποίες περιορίζουν σε έναν βαθμό την ευκολία χρήσης τους. Αυτές είναι η μείωση της συστηματικής διαθεσιμότητας του φαρμάκου, η αυξημένη πιθανότητα τοξικότητας, η δυσκολία ανάκτησης του συστήματος χορήγησης σε περίπτωση τοξικότητας ή αλλεργικής αντίδρασης, καθώς και το γεγονός ότι υπάρχουν διάφοροι περιορισμοί για τα φάρμακα που μπορούν να χορηγηθούν μέσω συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης.

Χαρακτηριστικά που μπορεί να καθιστούν ένα φάρμακο μη συμβατό για τη χορήγηση από το στόμα μέσω συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης είναι (Bhowmik, Gopinath, Kumar, Duraivel, & Kumar, 2012):

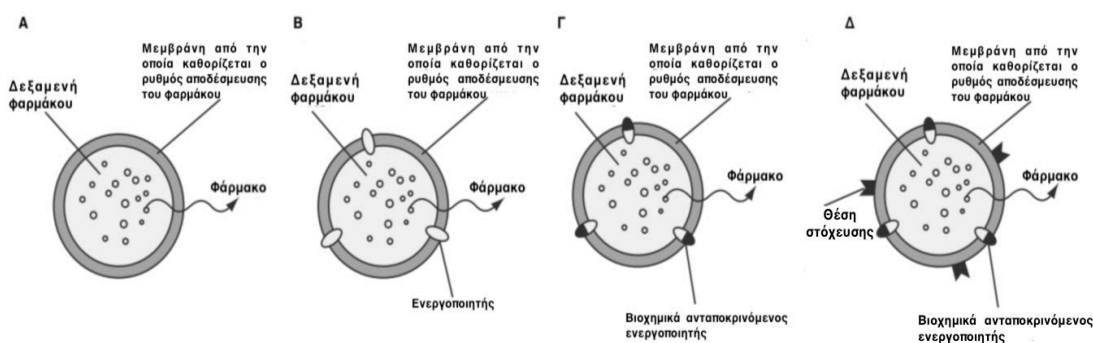
- ο μικρός χρόνος ημιζωής (<2h)
- ο μεγάλος χρόνος ημιζωής (>8h)
- ο στενός θεραπευτικός δείκτης
- η χαμηλή ή αργή απορρόφηση
- η πιθανότητα αυξημένου μεταβολισμού πρώτης διόδου, δηλαδή της σημαντικής μείωσης της συγκέντρωσης του φαρμάκου πριν αυτό φτάσει στη συστηματική κυκλοφορία, που έχει ως αποτέλεσμα μικρότερη βιοδιαθεσιμότητα.

Τα συστήματα τροποποιημένης αποδέσμευσης μπορούν να διακριθούν στα συστήματα παρατεταμένης αποδέσμευσης και καθυστερούμενης αποδέσμευσης. Συστήματα παρατεταμένης αποδέσμευσης είναι εκείνα στα οποία το φάρμακο

αποδεσμεύεται μόλις το σύστημα εισαχθεί στον οργανισμό και η αποδέσμευση γίνεται με ρυθμό που καθορίζεται από τα διάφορα χαρακτηριστικά τους. Η χρήση τέτοιων συστημάτων μπορεί να υποδιπλασιάσει τη συχνότητα χορήγησης της δόσης σε σχέση με τα συμβατικά συστήματα χορήγησης. Ως συστήματα καθυστερούμενης αποδέσμευσης χαρακτηρίζονται τα συστήματα με τα οποία η αποδέσμευση του φαρμάκου δεν γίνεται αμέσως αλλά κάποιο διάστημα μετά τη χορήγηση τους.

Τα συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης μπορούν να ταξινομηθούν στις τέσσερις παρακάτω κατηγορίες (Εικόνα 3) ως εξής (Swarbrick, 2007):

- συστήματα προκαθορισμένου ρυθμού αποδέσμευσης (rate-preprogrammed DDS)
- συστήματα ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης (activation-modulated DDS)
- συστήματα στα οποία η αποδέσμευση ελέγχεται από μηχανισμό ανάδρασης (feedback-regulated DDS)
- συστήματα στόχευσης (site-targeting DDS).

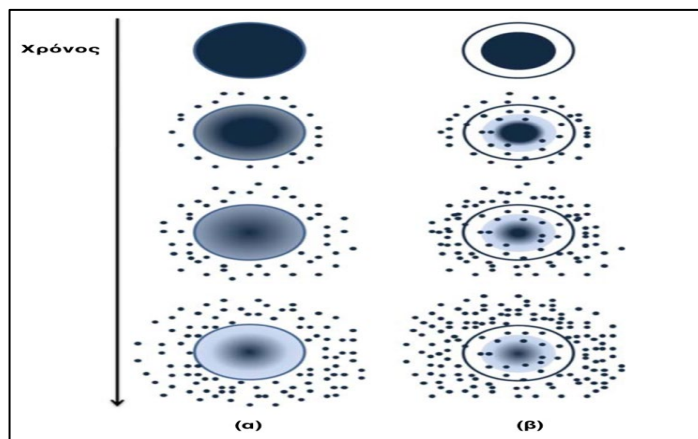


Εικόνα 3: Απεικόνιση συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης: Α) συστήματα προκαθορισμένου ρυθμού αποδέσμευσης, Β) συστήματα ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης, Γ) συστήματα στα οποία η αποδέσμευση ελέγχεται από μηχανισμό ανάδρασης, Δ) συστήματα στόχευσης. Μεταφρασμένη εικόνα από (Swarbrick, 2007).

1.2.2.1 Συστήματα προκαθορισμένου ρυθμού αποδέσμευσης

Στην κατηγορία συστημάτων προκαθορισμένου ρυθμού αποδέσμευσης η αποδέσμευση του φαρμακευτικού μορίου από το σύστημα έχει ρυθμιστεί να συμβαίνει εκ των προτέρων με καθορισμένο ρυθμό. Το σύστημα δηλαδή ελέγχει τη διάχυση των φαρμακευτικών μορίων στον διαλύτη, που υπάρχει γύρω από αυτό. Τα παραπάνω

συστήματα μπορούν να ταξινομηθούν στα συστήματα δεξαμενής (reservoir) και τα συστήματα τύπου μήτρας (matrix) (Εικόνα 4) (Coelho, et al., 2010).



Εικόνα 4: Προφίλ διάχυσης φαρμάκου σε συστήματα α) μήτρας και β) δεξαμενής. Μεταφρασμένη εικόνα από (Coelho, et al., 2010).

Στα συστήματα δεξαμενής το μέρος στο οποίο περιέχεται η φαρμακευτική ουσία (στερεής ή υγρής μορφής) διαχωρίζεται από το περιβάλλον με την βοήθεια μιας πολυμερικής μεμβράνης. Η πολυμερική μεμβράνη δημιουργείται από μη πορώδες υλικό ή από ημιδιαπερατή μεμβράνη. Το πάχος και η διαπερατότητα της πολυμερικής μεμβράνης και η διάχυση του φαρμάκου μέσω αυτής καθορίζουν τον χρόνο της αποδέσμευσης, η οποία θα πρέπει να γίνεται με σταθερό ρυθμό.

Στα συστήματα τύπου μήτρας το μέρος το οποίο περιέχει το φάρμακο παράγεται από την διασπορά του φαρμάκου είτε σε λιπόφιλη, είτε σε υδρόφιλη πολυμερική μήτρα. Η διασπορά του φαρμάκου στη πολυμερική μήτρα επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους:

- με τη δημιουργία ταμπλέτας, η οποία προκύπτει από την συμπίεση του φαρμάκου με το πολυμερές
- με διάλυση του πολυμερούς και του φαρμάκου σε διαλύτη, ακολουθούμενη από εξάτμιση του διαλύτη
- με ενσωμάτωση του φαρμάκου στο πολυμερές
- με πολυμερισμό μονομερούς παρουσία διαλυμένου ή διεσπαρμένου φαρμάκου.

Ο ρυθμός αποδέσμευσης του φαρμάκου εξαρτάται από τον χρόνο, την αρχική φόρτωση του φαρμάκου, τη διαλυτότητα του στο πολυμερές και τη διάχυση των σωματιδίων του φαρμάκου στην πολυμερική μήτρα. Παρατηρείται μείωση του ρυθμού

αποδέσμευσης του φαρμάκου από το σύστημα με την πάροδο του χρόνου, αφού αρχικά αποδεσμεύονται πιο εύκολα τα σωματίδια που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια του πολυμερούς, ενώ στη συνέχεια τα σωματίδια που βρίσκονται βαθύτερα στο πολυμερές, τα οποία πρέπει να διανύσουν μεγαλύτερη απόσταση ώστε να αποδεσμευτούν (Swarbrick, 2007).

1.2.2.2 Συστήματα ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης

Στα συστήματα ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης, η αποδέσμευση γίνεται λόγω της δράσης ενός παράγοντα ενεργοποίησης φυσικής, χημικής ή βιολογικής προέλευσης ή λόγω μιας εξωτερικής ενέργειας. Τα συστήματα ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης ταξινομούνται σε κατηγορίες όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 (Swarbrick, 2007).

Πίνακας 2: Είδη εφαρμοζόμενων μεθόδων ενεργοποίησης συστημάτων ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης.

Είδος μεθόδου	Τρόπος ενεργοποίησης συστήματος
Φυσικές μέθοδοι	Ωσμωτική πίεση
	Υδροδυναμική πίεση
	Πίεση ατμών
	Μηχανική ενέργεια
	Μαγνητική ενέργεια
	Ιοντοφόρηση
	Υπέρηχοι
	Ενυδάτωση
Χημικές μέθοδοι	Υδρόλυση
	Μεταβολή pH
	Μεταβολή συγκέντρωσης ιόντων
Βιολογικές μέθοδοι	Ένζυμα
	Βιοχημικές αντιδράσεις

Στα συστήματα αποδέσμευσης τα οποία ελέγχονται από οσμωτική πίεση, η δεξαμενή του φαρμάκου περιβάλλεται από μία ημιπερατή μεμβράνη της οποίας η

διαπερατότητα στο νερό ελέγχεται. Ο ρυθμός αποδέσμευσης διατηρείται σταθερός και καθορίζεται από την διαπερατότητα στο νερό και την κλίση της οσμωτικής πίεσης. Στα συστήματα τα οποία ενεργοποιούνται μέσω υδροδυναμικής πίεσης, η δεξαμενή του φαρμάκου περιβάλλεται από ένα άκαμπτο περίβλημα. Ανάμεσα στη δεξαμενή και το περίβλημα υπάρχει ένα πολυμερικό στρώμα ικανό να απορροφά γαστρεντερικό υγρό και να διογκώνεται, με αποτέλεσμα τη δημιουργία υδροδυναμικής πίεσης μέσα στο σύστημα. Αυτό οδηγεί στον περιορισμό του όγκου της δεξαμενής και στην αποδέσμευση του φαρμάκου. Τα συστήματα που ενεργοποιούνται από πίεση ατμών περιέχουν ένα υγρό, το οποίο εξατμίζεται σε θερμοκρασία σώματος και έτσι δημιουργείται πίεση ατμών μέσα στο σύστημα. Αυτό αναγκάζει το φάρμακο να αποδεσμευτεί από το σύστημα με σταθερό ρυθμό.

Συστήματα ενεργοποιούμενα από μηχανική δύναμη αποτελούνται από ένα δοχείο εφοδιασμένο με αντλία, η οποία ενεργοποιείται μηχανικά. Τα συστήματα αυτά παρέχουν τη δυνατότητα χορήγησης συγκεκριμένης δόσης φαρμάκου, όταν υπάρξει ενεργοποίηση της αντλίας. Η μαγνητική δύναμη ενεργοποιεί συστήματα τα οποία μέσα σε πολυμερική μήτρα περιέχουν το φάρμακο μαζί με έναν μικρό μαγνήτη. Εξωτερικό μαγνητικό πεδίο ενεργοποιεί τον μαγνήτη και αυξάνει τον ρυθμό αποδέσμευσης του φαρμάκου από το σύστημα. Συστήματα τα οποία χρησιμοποιούν σαν κινητήριο δύναμη υπερήχους κατασκευάζονται από αποικοδομήσιμα και μη πολυμερή. Οι υπέρηχοι ενεργοποιούν την αποδέσμευση του φαρμάκου από το σύστημα. Στα συστήματα όπου η ενεργοποίηση γίνεται μέσω ιοντοφόρησης, αυξάνεται η διάχυση ιοντισμένων μορίων μέσω βιολογικών μεμβρανών με τη χρήση ηλεκτρικού πεδίου. Σε συστήματα που ενεργοποιούνται μέσω ενυδάτωσης το φάρμακο βρίσκεται σε μια πολυμερική μήτρα, η ενυδάτωση και διόγκωση της οποίας ενεργοποιεί την αποδέσμευση του φαρμάκου.

Σε ό,τι αφορά τα συστήματα που ενεργοποιούνται από υδρόλυση, η αποδέσμευση του φαρμάκου οφείλεται στην αποικοδόμηση των αλυσίδων πολυμερούς του συστήματος λόγω της υδρόλυσης τους. Συστήματα που ενεργοποιούνται λόγω του pH αποδεσμεύουν το φάρμακο όταν η πολυμερική μεμβράνη που το περικλείει διαλυθεί σε υγρό μιας συγκεκριμένης τιμής pH. Φάρμακα ιοντικής μορφής σχηματίζουν σύμπλοκα με ιονανταλλακτικές ρητίνες δημιουργώντας συστήματα αποδέσμευσης που ενεργοποιούνται από μεταβολή ιόντων. Διάχυση ιόντων εντός του συστήματος οδηγεί στη διάσπαση του συμπλόκου φαρμάκου-ρητίνης και στην απελευθέρωση του φαρμάκου από το σύστημα.

Τέλος, στα συστήματα που ενεργοποιούνται από ένζυμα, το φάρμακο αποδεσμεύεται λόγω της υδρόλυσης των βιοπολυμερών του συστήματος, η οποία γίνεται από ένζυμα στην περιοχή του σώματος που δρα το σύστημα (Swarbrick, 2007).

1.2.2.3 Συστήματα στα οποία η αποδέσμευση ελέγχεται από μηχανισμό ανάδρασης

Η ενεργοποίηση των συστημάτων στα οποία η αποδέσμευση ελέγχεται από μηχανισμό ανάδρασης γίνεται μέσω ενός βιοαισθητήρα. Ο βιοαισθητήρας αναγνωρίζει και ανιχνεύει έναν παράγοντα ενεργοποίησης και έτσι ρυθμίζεται η αποδέσμευση του φαρμάκου από το σύστημα.

Τα συστήματα αυτά ενεργοποιούνται με διάφορους τρόπους και έτσι κατηγοριοποιούνται σε συστήματα ρυθμιζόμενα μέσω βιοδιάσπασης (bioerosion-regulated DDS), βιοαποκρινόμενα συστήματα (bioresponsive DDS) και αυτορυθμιζόμενα συστήματα (self-regulating DDS).

Η αρχή λειτουργίας ενός συστήματος ρυθμιζόμενου μέσω **βιοδιάσπασης** βασίζεται στη διάσπαση του υλικού από το οποίο αποτελείται η μήτρα του συστήματος, η οποία οδηγεί στην αποδέσμευση του φαρμάκου. Η διάσπαση του υλικού οφείλεται στη χημική αντίδραση του με μία ουσία στην περιοχή δράσης του συστήματος (Heller & Trescony, 1979). Στα **βιοαποκρινόμενα** συστήματα το φάρμακο διαχέεται μέσω μιας βιοαποκρινόμενης μεμβράνης λόγω της ύπαρξης ενός βιοχημικού παράγοντα στον ιστό όπου θα δράσει το σύστημα. Στα **αυτορυθμιζόμενα** συστήματα η αποδέσμευση του φαρμάκου ενεργοποιείται όταν ένας βιοχημικός παράγοντας του ιστού, όπου δρα το σύστημα, διεισδύει στη μεμβράνη η οποία περιβάλλει το φάρμακο (Swarbrick, 2007).

1.2.2.4 Συστήματα στόχευσης

Σκοπός της χρήσης συστημάτων στόχευσης είναι η μεταφορά και συγκέντρωση μιας φαρμακευτικής ουσίας σε συγκεκριμένο ιστό/κύτταρα του σώματος και η μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στους υπόλοιπους ιστούς. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα και περιορισμός των παρενεργειών.

Η επιλογή του κατάλληλου συστήματος μεταφοράς θα πρέπει να γίνεται λαμβάνοντας υπόψη τη θέση δράσης του φαρμάκου και τα φαρμακολογικά χαρακτηριστικά αυτού. Επίσης το σύστημα μεταφοράς θα πρέπει να ξεφεύγει από μηχανισμούς του σώματος που μπορεί να το καταστρέψουν, ώστε να παραμένει στην

κυκλοφορία του αίματος και να μεταφέρεται τελικά στη θέση στόχο, όπου θα απελευθερώνει το φάρμακο σε συγκεκριμένο χρόνο για αποτελεσματικότερη θεραπεία. Ανάλογα με τη διαδρομή που πρέπει να ακολουθηθεί κάθε φορά και τη θέση δράσης επιλέγεται το κατάλληλο σύστημα χορήγησης.

Η στόχευση φαρμάκων στο επιθυμητό όργανο/ιστό γίνεται μέσω: παθητικής στόχευσης και ενεργητικής στόχευσης (Mishra, et al., 2016).

Στην **παθητική** στόχευση δίνεται βάση σε διαφορετικά παθολογικά χαρακτηριστικά που μπορεί να εμφανίζει κάθε φορά ένας μη φυσιολογικός ιστός, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στους όγκους. Λαμβάνοντας υπόψιν τα χαρακτηριστικά αυτά και συγκρίνοντάς τα με την δομή και τη λειτουργία αντίστοιχων υγιών ιστών, μπορούν να εξαχθούν σημαντικά συμπεράσματα τα οποία συμβάλλουν στη δημιουργία αποτελεσματικών συστημάτων παθητικής στόχευσης (Βούλγαρη, 2013).

Κατά την **ενεργητική** στόχευση παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός υποδοχέα στα κύτταρα στόχο και ενός μορίου στόχευσης, ανιχνεύσιμου από τον υποδοχέα. Τα συστήματα ενεργητικής στόχευσης φέρουν το μόριο στόχευσης, ενώ ο υποδοχέας βρίσκεται στη θέση δράσης του φαρμάκου (Mishra, et al., 2016).

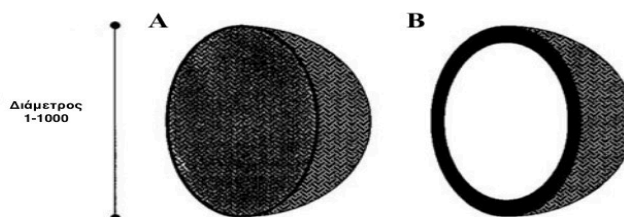
1.3 Νανοφορείς στα συστήματα ελεγχόμενης χορήγησης φαρμάκων

1.3.1 Εισαγωγή

Νανοτεχνολογία είναι η κατασκευή και ο χειρισμός υλικών και συσκευών στην κλίμακα των νανομέτρων. Τα υλικά που κατασκευάζονται σε αυτή την κλίμακα εμφανίζουν συχνά διακριτές φυσικές και χημικές ιδιότητες. Τα νανοσωματίδια είναι μικρά κolloειδή σωματίδια για την κατασκευή των οποίων χρησιμοποιούνται βιοαποικοδομήσιμα και μη υλικά. Στην νανοϊατρική πιο συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια προτιμάται να είναι μικρότερα των 200nm, ώστε να μπορούν να κυκλοφορούν μέσω των τριχοειδών αγγείων και να μπορούν να εξαγγειώνονται στους ιστούς. Η νανοϊατρική αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους κλάδους της νανοτεχνολογίας, ο οποίος ασχολείται ενεργά με την εξέλιξη και βελτίωση των συστημάτων χορήγησης φαρμάκων.

Τα πολυμερικά νανοσωματίδια μπορούν να διακριθούν σε δύο γενικούς τύπους: τις νανοσφαίρες, οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των συστημάτων μήτρας και τις

νανοκάψουλες, οι οποίες είναι συστήματα δεξαμενής αποτελούμενα από έναν πυρήνα γύρω από τον οποίο υπάρχει μια πολυμερική μεμβράνη (Εικόνα 5) (Mishra, Patel, & Tiwari, 2010). Νανοσωματίδια κατασκευασμένα από βιοαποικοδομήσιμα πολυμερικά υλικά μελετώνται για τη μεταφορά φαρμάκων και σκοπός των μελετών είναι η στόχευση συγκεκριμένων ιστών, η προστασία των φαρμάκων από τη χημική και ενζυμική αποικοδόμηση και η μείωση των παρενεργειών που παρουσιάζουν τα φάρμακα.



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση της δομής μιας α) νανοσφαίρας και β) νανοκάψουλας. Στις νανοσφαίρες όλο το σωματίδιο αποτελείται από ένα πολυμερικό δίκτυο. Οι νανοκάψουλες παρουσιάζουν μια δομή πυρήνα-κελύφους. Μεταφρασμένη εικόνα από (Swarbrick, 2007).

Τα φάρμακα τα οποία ενσωματώνονται σε νανοφορείς, οι οποίοι έχουν πρόσβαση σε ολόκληρη τη συστηματική κυκλοφορία απεκκρίνονται λιγότερο γρήγορα από τα αντίστοιχα ελεύθερα φάρμακα. Για την αποφυγή των φυσιολογικών αμυντικών διεργασιών του οργανισμού, οι οποίες απομακρύνουν ξένα σωματίδια από το αίμα, τα νανοσωματίδια επικαλύπτονται από ειδικά υλικά όπως τα πολυ(αιθυλενο-οξείδια). Κατάλληλα επικαλυμμένα νανοσωματίδια έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένη οψωνινοποίηση και απομάκρυνσή τους από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (Reticuloendothelial system, RES) και αυξημένους χρόνους ημιζωής των νανοσωματιδίων και των φαρμάκων (Swarbrick, 2007).

1.3.2 Μέθοδοι σύνθεσης και χαρακτηρισμού νανοφορέων φαρμάκων

Οι συνθετικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη νανοτεχνολογία μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία η διαδικασία ξεκινά με ένα μεγαλύτερο αντικείμενο και συνεχίζεται με τη διάσπασή του σε νανοδομές μέσω τεχνικών όπως η χάραξη ή η λείανση. Η μέθοδος αυτή μπορεί να είναι χρονοβόρα και συχνά δημιουργεί πολύ μεγαλύτερη κατανομή μεγέθους σωματιδίων από την επιθυμητή. Η δεύτερη κατηγορία αφορά τη σύνθεση που βασίζεται σε διάταξη ατόμου-ατόμου ή μορίου-μορίου με ελεγχόμενο τρόπο, οι οποία ελέγχεται από θερμοδυναμικά

μέσα. Στη διαδικασία αυτή χημικές αντιδράσεις που γίνονται είτε σε αέρια, είτε σε υγρή φάση οδηγούν στη δημιουργία πυρήνων και την ανάπτυξη συμπαγών νανοσωματιδίων, τα οποία παραμένουν άθικτα κατά την ανασύσταση. Μερικά παραδείγματα μεθόδων σύνθεσης διαφορετικών τύπων νανοφορέων είναι: μέθοδοι ομογενοποίησης υψηλής πίεσης (high-pressure homogenization methods), μέθοδοι συνάθροισης (complex coacervation methods), μέθοδος καταβύθισης (co-precipitation method) και η μέθοδος γαλακτωματοποίησης-διάχυσης (solvent emulsification-diffusion method) (Mishra, Patel, & Tiwari, 2010).

Τα νανοσωματίδια όπως και τα πολυμερικά κολλοειδή συστήματα χαρακτηρίζονται χρησιμοποιώντας διάφορες φυσικοχημικές τεχνικές. Για τη χρήση τους στη χορήγηση φαρμάκων και άλλες εφαρμογές, τα νανοσωματίδια θα πρέπει να εξετάζονται μεταξύ άλλων ως προς το σχήμα, το μέγεθος, τις επιφανειακές ιδιότητες, την πυκνότητα και την συγκέντρωσή τους. Το μέγεθος και η κατανομή μεγέθους πρέπει να καθορίζονται για την ασφαλή ενδοφλέβια χορήγηση των νανοσωματιδίων, ενώ οι επιφανειακές ιδιότητες και η ειδική έκταση επιφάνειας των νανοσωματιδίων για τις αλληλεπιδράσεις τους με το περιβάλλον.

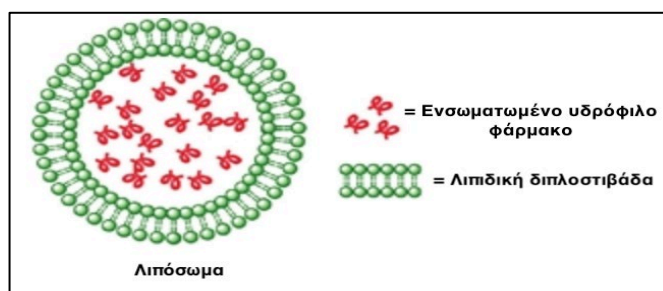
Απεικόνιση των νανοσωματιδίων μπορεί να γίνει με χρήση τεχνικών μικροσκοπίας όπως ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM), ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) και μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM). Μετρήσεις του μεγέθους και της κατανομής μεγέθους απαιτούν τον προσδιορισμό της διαμέτρου των νανοσωματιδίων και μπορούν να γίνουν με τη χρήση λογισμικών ανάλυσης εικόνας. Το μέσο μέγεθος και η κατανομή μεγέθους προσδιορίζονται μέσω της φασματοσκοπίας συσχέτισης φωτονίων (Photon Correlation Spectroscopy, PCS). Στη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται ο μεταφορικός συντελεστής διάχυσης των νανοσωματιδίων και στη συνέχεια υπολογίζεται μέσω του νόμου Stokes Einstein η υδροδυναμική διάμετρος των νανοσωματιδίων (d_H) (Stetefeld, McKenna, & Patel, 2016), (Swarbrick, 2007).

Ένα από τα κυριότερα επιφανειακά χαρακτηριστικά νανοσωματιδίων που λαμβάνονται υπόψη είναι το φορτίο. Το επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων προσδιορίζεται συνήθως με τη μέτρηση του ζ δυναμικού (ζ Potential), και παρέχει πληροφορίες για το συνολικό φορτίο της επιφάνειας των σωματιδίων και τις αλλαγές

που αυτό παρουσιάζει όταν το περιβάλλον των νανοσωματιδίων μεταβληθεί (Swarbrick, 2007).

1.3.3 Λιποσώματα

Τα λιποσώματα είναι μικρού μεγέθους φωσφολιπιδικά κυστίδια, τα οποία σχηματίζονται από αμφίφιλα φωσφολιπίδια και χοληστερόλη. Η δομή τους περιλαμβάνει μία ή περισσότερες ομόκεντρες λιπιδικές διπλοστιβάδες, στο κέντρο των οποίων υπάρχει ένας υδατικός πυρήνας (Εικόνα 6). Τα λιποσώματα είναι από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους και καλά μελετημένους νανοφορείς στα συστήματα στοχευμένης χορήγησης φαρμάκων. Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων είναι ότι μπορούν να παγιδεύουν τόσο λιπόφιλες, όσο και υδρόφιλες ενώσεις επιτρέποντας τον εγκλεισμό μεγάλου αριθμού φαρμάκων μέσα σε αυτά. Τα υδρόφοβα μόρια εισάγονται στη μεμβράνη λιπιδικής διπλοστιβάδας, ενώ υδρόφιλα μόρια μπορούν να παγιδευτούν στον υδατικό πυρήνα.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση λιποσώματος στο οποίο έχει ενσωματωθεί υδρόφιλο φάρμακο. Μεταφρασμένη εικόνα από (Xu, Kambhampati, & Kannan, 2013).

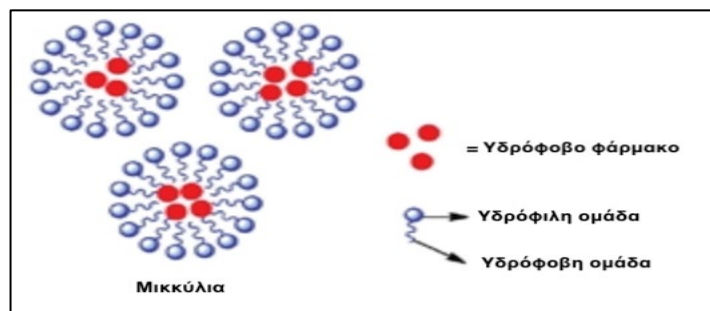
Τα λιποσώματα ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: α) πολυστιβαδιακά κυστίδια (MLV), β) μεγάλα μονοστιβαδιακά κυστίδια (LUV) και γ) μικρά μονοστιβαδιακά κυστίδια (SUV). Η ταξινόμηση γίνεται με βάση το μέγεθος, το οποίο καθορίζει τον χρόνο ημιζωής τους στο κυκλοφορικό σύστημα και τις διπλοστιβάδες τους.

Ως συστήματα χορήγησης φαρμάκων τα λιποσώματα παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα όπως: η βιοσυμβατότητα, η δυνατότητα τροποποίησης ενός μεγάλου εύρους φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών και η ικανότητα προστασίας των φορτωμένων φαρμάκων από πρόωμη αποικοδόμηση *in vivo*. Ωστόσο, μπορεί να παρουσιάζουν κάποια μειονεκτήματα όπως η μικρή σταθερότητα και η ανεπαρκής φόρτωση του φαρμάκου (Mishra, Patel, & Tiwari, 2010). Για να βελτιωθεί η σταθερότητα των λιποσωμάτων και να αυξηθεί ο χρόνος κυκλοφορίας τους στο αίμα,

δημιουργήθηκαν τα στερικά σταθεροποιημένα λιποσώματα. Το υδρόφιλο πολυμερές πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEG) αποτελεί μια από τις καλύτερες επιλογές για τη λήψη στερικά σταθεροποιημένων λιποσωμάτων (Sercombe, et al., 2015).

1.3.4 Πολυμερικά μικκύλια

Τα πολυμερικά μικκύλια είναι νανοδομές πυρήνα-κελύφους, οι οποίες σχηματίζονται από αμφίφιλα συμπολυμερή σε υδατικό περιβάλλον (Εικόνα 7). Το μέγεθός τους ξεκινά από 10nm και φτάνει έως τα 100nm. Ο υδρόφοβος πυρήνας σταθεροποιεί το σύστημα και σε αυτόν γίνεται η ενσωμάτωση φαρμάκων, πρωτεϊνών ή DNA. Το υδρόφιλο κέλυφος και το μικρό του μέγεθος επιτρέπει στον ναυοφορέα να μην αναγνωρίζεται από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα του οργανισμού και να παραμένει στη κυκλοφορία του αίματος για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση μικκυλίων στα οποία έχει ενσωματωθεί υδρόφοβο φάρμακο. Μεταφρασμένη εικόνα από (Xu, Kambhampati, & Kannan, 2013).

Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό των πολυμερικών μικκυλίων έχει να κάνει με την ευκολία μεταβολής της δομής τους, ώστε να είναι συμβατή με τις φυσικοχημικές ιδιότητες κάθε φαρμάκου που θα ενσωματωθεί και τις ανάγκες αλληλεπίδρασης του συστήματος με ερεθίσματα και συγκεκριμένους μοριακούς στόχους στη θέση δράσης του. Υπάρχουν τρεις διαφορετικές κατηγορίες πολυμερικών μικκυλίων στη χορήγηση φαρμάκων, οι οποίες είναι τα πολυμερικά μικκύλια για ενεργή στόχευση, για παθητική στόχευση και τα πολυλειτουργικά πολυμερικά μικκύλια (Mahmud, Xiong, Aliabadi, & Lavasanifar, 2007).

1.3.5 Δενδριμερή

Τα δενδριμερή είναι διακλαδισμένα, καλά οργανωμένα μόρια. Παρουσιάζουν χαμηλό δείκτη πολυδιασποράς και μελετώνται και χρησιμοποιούνται συχνά στον τομέα της νανοϊατρικής. Χαρακτηριστικά τα οποία καθιστούν τα δενδριμερή ικανά

συστήματα ελεγχόμενης χορήγησης φαρμάκων είναι: η βιοσυμβατότητα, η δυνατότητα προσδιορισμού του ακριβούς μοριακού τους βάρους και η εύκολη απέκκρισή τους από τον οργανισμό.

Ένα τυπικό δενδριμερές αποτελείται από τρία μέρη: έναν πυρήνα, ένα εσωτερικό στρώμα (περιγραφόμενο ως γενεές), το οποίο περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενες ομάδες ακτινικά συνδεδεμένες με τον πυρήνα και πολλές περιφερειακές λειτουργικές ομάδες. Οι τερματικές ομάδες μπορεί να είναι θετικά, αρνητικά ή ουδέτερα φορτισμένες. Τα δενδριμερή που φέρουν κατιονικές τερματικές ομάδες παρουσιάζουν παρενέργειες μέσα σε έναν οργανισμό όπως η κυτταροτοξικότητα και η αιμόλυση. Το θετικό φορτίο μπορεί να εξουδετερωθεί με τροποποίηση της επιφάνειας του δενδριμερούς. Οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης των δενδριμερών με τα φαρμακευτικά μόρια που ενσωματώνονται σε αυτά είναι τρεις: η ενθυσάλκωση, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και οι ομοιοπολικές συζεύξεις (Madaan, Kumar, Poonia, Lather, & Pandita, 2014).

1.3.6 Πολυμερικά νανοσωματίδια

Τα πολυμερικά νανοσωματίδια ανήκουν στη κατηγορία των κολλοειδών συστημάτων. Έχουν μέγεθος 10nm-1μm και αποτελούνται από φυσικά ή συνθετικά πολυμερή. Μερικά σημαντικά χαρακτηριστικά τους για τη χρήση τους ως ναοφορείς φαρμάκων είναι: η βιοσυμβατότητα, η μη-ανοσογονικότητα, η χαμηλή τοξικότητα και η ικανότητα βιοδιάσπασης (El-Say & El-Sawy, 2017). Η χρήση βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών στα πολυμερικά νανοσωματίδια οδηγεί στη βελτίωση της συμβατότητας τους με τους ιστούς και τον περιορισμό της κυτταροτοξικότητας (Mishra, Patel, & Tiwari, 2010). Μερικά από τα φυσικά πολυμερή που χρησιμοποιούνται πιο συχνά στην σύνθεση πολυμερικών νανοσωματιδίων είναι: το αλγινικό νάτριο, η αλβουμίνη και η ζελατίνη. Σε ότι αφορά τα συνθετικά πολυμερή συχνά χρησιμοποιούνται: η πολυ(βινυλική αλκοόλη) (PVA), το πολυ(ακρυλαμίδιο) (PAM), η πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEG), το πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA) και τα συμπολυμερή του με το πολυ(γλυκολικό οξύ) (PGA) ή την PEG κ.α. (El-Say & El-Sawy, 2017).

Οι μέθοδοι προετοιμασίας των πολυμερικών νανοσωματιδίων εμπίπτουν σε δύο γενικές κατηγορίες: τον πολυμερισμό μονομερών και τη διασπορά πολυμερών (Mishra, Patel, & Tiwari, 2010). Τα μόρια που μπορούν να ενσωματωθούν σε πολυμερικά νανοσωματίδια είναι υδρόφιλα, υδρόφοβα και αμφίφιλα. Τα πολυμερικά

νανοσωματίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μεγάλο εύρος εφαρμογών όπως στην απεικόνιση ιστών *in vivo* με την χρήση εκπομπής εγγύς υπερύθρου, ως συστήματα ενσωμάτωσης πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και διαγνωστικών παραγόντων και ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων τα οποία εφαρμόζονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στην θεραπεία του καρκίνου αλλά και στη γονιδιακή θεραπεία (El-Say & El-Sawy, 2017).

1.3.7. Κβαντικές κουκίδες

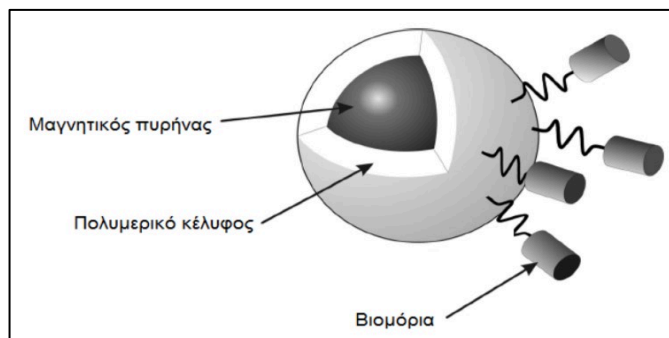
Οι κβαντικές κουκίδες (ή τελείες) (Quantum dots) είναι κolloειδείς ημιαγώγιμοι νανοκρύσταλλοι μεγέθους 2 έως 10nm, οι οποίοι παρουσιάζουν οπτικές και φθορίζουσες ιδιότητες. Οι κβαντικές κουκίδες που χρησιμοποιούνται συχνότερα κατασκευάζονται από σεληνιούχο κάδμιο (CdSe), τελλουριούχο κάδμιο (CdTe) και αρσενικούχο ίνδιο (InAs). Τα συστήματα αυτά αλληλεπιδρούν με φωτόνια, ενεργοποιούνται και εκπέμπουν ενέργεια στις περιοχές του υπεριώδους (UV), του ορατού (Visible) ή του εγγύς υπερύθρου (Near IR) (Mishra, Patel, & Tiwari, 2010). Για να ενισχυθεί η υδατοδιαλυτότητα και η φωτοσταθερότητα τους, απαραίτητη είναι η τροποποίηση των ιδιοτήτων της επιφάνειάς τους μέσω της επικάλυψης της με πολυμερή όπως η PEG ή με δένδριμερή. Οι κβαντικές κουκίδες μεταξύ άλλων χρησιμοποιούνται ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, πρωτεϊνών, DNA αλλά και ως αισθητήρες βιολογικών μορίων (Matea, et al., 2017).

1.4 Μαγνητικά νανοσωματίδια

1.4.1 Εισαγωγή

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια (MNPs) αποτελούν μια σημαντική κατηγορία νανοϋλικών, τα οποία παρουσιάζουν ιδιότητες αξιοποιήσιμες στον τομέα της βιοϊατρικής. Τα κolloειδή και βιοσυμβατά μαγνητικά νανοσωματίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο στη διάγνωση (ανίχνευση, απεικόνιση), όσο και στη θεραπεία ασθενειών (υπερθερμία, μαγνητική στόχευση, χορήγηση φαρμάκων) (El-Boubbou, 2018). Τρία κύρια μέρη από τα οποία συνήθως αποτελούνται τα υβριδικά μαγνητικά νανοσωματίδια είναι (Εικόνα 8): ο μαγνητικός πυρήνας, ένα πολυμερικό κέλυφος (στρώμα) γύρω από την επιφάνεια του πυρήνα και διάφορα βιομόρια, τα οποία

τροποποιούν την επιφάνεια των νανοσωματιδίων για την επίτευξη καλύτερης βιοσυμβατότητας και σταθερότητας του συστήματος στον οργανισμό.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση μαγνητικών νανοσωματιδίων (Βούλγαρη, 2013).

Μερικά χαρακτηριστικά που καθιστούν τα μαγνητικά νανοσωματίδια κατάλληλα για την χρήση τους ως συστήματα χορήγησης φαρμάκων είναι: το μικρό μέγεθος, οι σχετικά εύκολες μέθοδοι παρασκευής τους, η βιοσυμβατότητα, η σταθερότητα σε βιολογικά συστήματα, η χαμηλή τοξικότητα, η δυνατότητα ικανοποιητικής φόρτωση φαρμάκων και εύκολης τροποποίησης της επιφάνειάς τους και η ανταπόκριση τους στην επίδραση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (El-Boubbou, 2018).

Μαγνητικά νανοσωματίδια που αποτελούνται από οξείδια του σιδήρου αποτελούν τους πιο κοινούς και ευρέως διαδεδομένους τύπους μαγνητικών νανοσωματιδίων που μελετώνται σε βιοϊατρικές εφαρμογές, λόγω των εξαιρετικών μαγνητικών ιδιοτήτων τους. Τα μαγνητικά νανοσωματίδια κοβαλτίου δεν χρησιμοποιούνται ευρέως εξαιτίας της τοξικότητας που παρουσιάζει το κοβάλτιο. Τέλος, υπάρχουν μαγνητικά νανοσωματίδια νικελίου τα οποία αποτελούνται είτε από νανοκρυστάλλους Ni και Ni₃C, είτε από έναν πυρήνα Ni και ένα στρώμα από NiO στην επιφάνεια (Kudr, et al., 2017).

1.4.2 Μαγνητισμός

Η προέλευση του μαγνητισμού έγκειται στις τροχιακές και τις περιστροφικές κινήσεις των ηλεκτρονίων των ατόμων ενός υλικού, καθώς και στην αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων μεταξύ τους.

Γενικά, ένα μαγνητικό πεδίο παράγεται κάθε φορά που υπάρχει κίνηση ηλεκτρικού φορτίου. Τα ατομικά ηλεκτρόνια δρουν ως μαγνήτες, αφού είναι κινούμενα φορτισμένα σωματίδια και επομένως παράγουν μαγνητικό πεδίο. Τα άτομα εμφανίζουν

μαγνητική συμπεριφορά εξαιτίας τόσο της τροχιακής στροφορμής αλλά και της ιδιοστροφορμής (spin) των ηλεκτρονίων τους. Και οι δυο μορφές στροφορμής εμφανίζουν μαγνητική διπολική ροπή. Με τον όρο μαγνητική ροπή χαρακτηρίζεται το διανυσματικό μέγεθος της έντασης ενός μαγνητικού πεδίου και η συνισταμένη μαγνητική ροπή ενός ατόμου ορίζεται ως το διανυσματικό άθροισμα των μαγνητικών ροπών του συνόλου των ηλεκτρονίων.

Όταν ένα υλικό τοποθετηθεί μέσα σε μαγνητικό πεδίο, παρατηρείται μεταβολή της τιμής $\vec{B}_0$ του μαγνητικού πεδίου, η οποία μετριέται σε Tesla. Αν $\vec{B}_0$ είναι το μαγνητικό πεδίο απουσία ύλης, τότε αν σε αυτό εισαχθεί ένα υλικό, το $\vec{B}_0$ πολλαπλασιάζεται με έναν παράγοντα μ , ο οποίος ονομάζεται μαγνητική διαπερατότητα του υλικού. Έτσι, $\vec{B}_m$ είναι το μαγνητικό πεδίο που παράγεται λόγω της μαγνήτισης του υλικού ($\vec{B}_m = \mu\vec{B}_0$) και $\vec{B}$ είναι το συνολικό μαγνητικό πεδίο παρουσία ύλης, το οποίο δίνεται από την εξίσωση (1):

$$\vec{B} = \mu_0 (\vec{H} + \vec{M}) \quad (1)$$

Όπου, μ_0 είναι η μαγνητική διαπερατότητα του κενού ($\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7}$ V sec/A m), $\vec{H}$ το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο (μαγνητίζον πεδίο) με μονάδες μέτρησης Ampere/meter και $\vec{M}$ η μαγνήτιση με μονάδες μέτρησης Ampere/meter. Ως μαγνήτιση ορίζεται η μαγνητική ροπή m ανά μονάδα όγκου ($M = m/V$). Για μαγνητικά υλικά, όπως τα διαμαγνητικά και τα παραμαγνητικά, η μαγνήτιση είναι ανάλογη του μαγνητίζοντος πεδίου, όπως φαίνεται στην εξίσωση (2):

$$\vec{M} = \chi \vec{H} \quad (2)$$

Όπου, το χ είναι η μαγνητική επιδεκτικότητα του υλικού και εκφράζει τον βαθμό μαγνήτισης του όταν βρίσκεται σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Η μαγνητική επιδεκτικότητα δείχνει αν ένα υλικό έλκεται ή απωθείται από ένα μαγνητικό πεδίο και τα μαγνητικά υλικά ταξινομούνται με βάση την επιδεκτικότητά τους (Πρίκας, 2008) (Τραχανάς, 2013).

1.4.3 Ταξινόμηση μαγνητικών υλικών

Όλα τα άτομα είναι μαγνητικά, αφού αποτελούνται από κινούμενα φορτία. Για να μπορεί να χαρακτηριστεί ένα αντικείμενο ως μαγνήτης θα πρέπει τα μαγνητικά πεδία των ατόμων του να ευθυγραμμιστούν μεταξύ τους, γεγονός που είναι εφικτό όταν τα

άτομα κινούνται ελεύθερα. Όμως, σε πολλά υλικά τα άτομα κρατούνται πολύ σταθερά στη θέση τους. Εάν τα μαγνητικά πεδία όλων των ατόμων είναι τυχαία προσανατολισμένα τότε ακυρώνουν το ένα το άλλο και το υλικό δεν έχει μαγνητικό πεδίο. Γενικά, οι αντίθετες μαγνητικές ροπές της περιστροφικής κίνησης και της ιδιοπεριστροφής συζευγμένων ηλεκτρονίων αλληλοεξουδετερώνονται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα στα άτομα με πλήρως συμπληρωμένες τις ηλεκτρονιακές στιβάδες, οι μαγνητικές ροπές να αλληλοεξουδετερώνονται τελείως. Αντίθετα, άτομα με μερικώς συμπληρωμένες τις ηλεκτρονιακές στιβάδες παρουσιάζουν μαγνητική ροπή με ένταση ανάλογη του αριθμού των ασύζευκτων ηλεκτρονίων.

Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες μαγνητικών υλικών, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετικές μαγνητικές ιδιότητες. Μία από τις κατηγορίες αυτές είναι τα **διαμαγνητικά** υλικά. Τα υλικά αυτά παρουσιάζουν σχετική μαγνητική διαπερατότητα μικρότερη της μονάδας και αρνητική μαγνητική επιδεκτικότητα συνεπώς, απωθούνται από μαγνητικά πεδία. Η συνολική μαγνητική ροπή τους είναι μηδέν όταν σε αυτά δεν επιδρά κάποιο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, ενώ η εφαρμογή εξωτερικού πεδίου επάγει μαγνητικά δίπολα στα άτομα και το νέο μαγνητικό πεδίο που δημιουργείται είναι αντίθετης φοράς από τη φορά του εξωτερικού. Παραδείγματα διαμαγνητικών υλικών αποτελούν το ξύλο, μέταλλα όπως ο χαλκός και βαριά μέταλλα όπως ο χρυσός και το βισμούθιο.

Άλλη κατηγορία μαγνητικών υλικών αποτελούν τα **παραμαγνητικά** υλικά. Σε αυτά, η σχετική μαγνητική διαπερατότητα είναι μεγαλύτερη ή ίση της μονάδας και η μαγνητική επιδεκτικότητα είναι θετικού προσήμου και κυμαίνεται στα όρια $10^{-5} \leq \chi \leq 10^{-3}$. Συνεπώς, σε αντίθεση με τα διαμαγνητικά υλικά τα παραμαγνητικά έλκονται ελαφρώς από εξωτερικά εφαρμοζόμενα μαγνητικά πεδία. Τα άτομα των παραμαγνητικών υλικών εμφανίζουν μαγνητική διπολική ροπή διάφορη του μηδενός. Όταν βρεθούν μέσα σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο τείνουν να ελαχιστοποιήσουν τη δυναμική τους ενέργεια, προσανατολίζοντας την μαγνητική τους ροπή στην κατεύθυνση του μαγνητικού πεδίου. Ως αποτέλεσμα, δημιουργείται ένα νέο πεδίο το οποίο έχει την ίδια κατεύθυνση με το εξωτερικό. Οι μαγνητικές ιδιότητες των παραμαγνητικών υλικών δεν διατηρούνται όταν πάψει η εφαρμογή του μαγνητικού πεδίου και οφείλονται στην ύπαρξη ασύζευκτων ηλεκτρονίων στις ηλεκτρονιακές στιβάδες των ατόμων. Παραδείγματα τέτοιων υλικών είναι ο λευκόχρυσος και το μαγνήσιο.

Η τρίτη κατηγορία μαγνητικών υλικών βασίζεται στο φαινόμενο του σιδηρομαγνητισμού και τα υλικά ονομάζονται **σιδηρομαγνητικά**. Η μαγνητική τους επιδεκτικότητα είναι πολύ μεγαλύτερη της μονάδας με τιμές που κυμαίνονται από 50 έως και 10000. Τα σιδηρομαγνητικά υλικά έλκονται ισχυρά από εξωτερικά εφαρμοζόμενα μαγνητικά πεδία, ενώ έχουν την ικανότητα να διατηρούν την μαγνήτισή τους ακόμα και μετά την αφαίρεση του πεδίου. Τα σιδηρομαγνητικά υλικά αποτελούνται από άτομα με ηλεκτρονιακές στιβάδες μερικώς συμπληρωμένες και η παρουσία των ασύζευκτων spin των ηλεκτρονίων δημιουργεί μαγνητικές ροπές.

Ωστόσο, μέσα στα υλικά αυτά δημιουργούνται ξεχωριστές, μικρές περιοχές (μαγνητικές περιοχές ή περιοχές Weiss) με ηλεκτρόνια των οποίων τα spin ευθυγραμμίζονται. Οι περιοχές αυτές διαχωρίζονται με τοιχώματα, στα οποία η κατεύθυνση των διπόλων εναλλάσσεται σταδιακά. Όταν τα υλικά είναι στην χαμηλότερη ενεργειακή τους κατάσταση, τα ατομικά δίπολα των περιοχών αυτών δεν είναι ομόρροπα και συνεπώς αλληλοαναιρούνται, ενώ η μαγνήτιση του υλικού είναι μικρή. Αυτό αλλάζει όταν το υλικό τοποθετηθεί μέσα σε μαγνητικό πεδίο, όπου τα δίπολα μερικών ή και όλων των μαγνητικών περιοχών ευθυγραμμίζονται με το πεδίο και παραμένουν στην ίδια κατάσταση δημιουργώντας μία μόνιμη μαγνήτιση. Όσες περισσότερες περιοχές ευθυγραμμιστούν τόσο πιο ισχυρό είναι το μαγνητικό πεδίο που σχηματίζεται στο υλικό. Σιδηρομαγνητικά υλικά αποτελούνται συχνά από σίδηρο, κοβάλτιο και νικέλιο.

Υπάρχουν μαγνητικά υλικά τα οποία χαρακτηρίζονται ως **σιδηριμαγνητικά**. Η κρυσταλλική δομή ιοντικών ενώσεων μπορεί να οδηγήσει σε πολύπλοκες μορφές μαγνητικής διάταξης. Οι μαγνητικές ροπές των μεμονωμένων ατόμων των υλικών αυτών ευθυγραμμίζονται αυθόρμητα. Κάποια από τα άτομα παρουσιάζουν μαγνητικές ροπές παράλληλες μεταξύ τους (όπως στον σιδηρομαγνητισμό) και άλλα αντιπαράλληλες. Λόγω όμως του ότι οι μαγνητικές ροπές όλων των διαφορετικών ιόντων δεν είναι ισοδύναμες, ο αυθόρμητος μαγνητισμός που παρατηρείται στα υλικά διατηρείται. Ο σιδηριμαγνητισμός εμφανίζεται στους φερρίτες, υλικά αποτελούμενα από οξείδια του σιδήρου και μέταλλα όπως το βάριο, το νικέλιο και ο ψευδάργυρος.

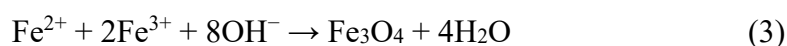
Ο αντισιδηρομαγνητισμός είναι το φαινόμενο μαγνήτισης, το οποίο χαρακτηρίζει τα **αντισιδηρομαγνητικά υλικά**. Τα γειτονικά ιόντα τέτοιων υλικών, τα οποία συμπεριφέρονται ως μικροσκοπικοί μαγνήτες, παρουσιάζουν αντιπαράλληλες μαγνητικές ροπές, οι οποίες αλληλοαναιρούνται. Έτσι, τα υλικά αυτά παρουσιάζουν

μηδενική εσωτερική μαγνητική ροπή. Παραδείγματα τέτοιων υλικών αποτελούν οι ενώσεις στοιχείων μετάπτωσης όπως το χρώμιο και το μαγγάνιο, κράματα (σιδήρου-μαγγανίου) και οξείδια (οξείδιο του νικελίου) (O'Handley, 2000) (Βούλγαρη, 2013) (Λιαροκάκης).

1.4.4 Μέθοδοι σύνθεσης μαγνητικών νανοσωματιδίων

Η επιλογή της μεθόδου σύνθεσης των μαγνητικών νανοσωματιδίων μπορεί να επηρεάσει τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος όπως το σχήμα, το μέγεθος, την κατανομή μεγέθους και τη μαγνήτισή τους. Οι μέθοδοι σύνθεσης μαγνητικών νανοσωματιδίων με την επιθυμητή μικρή κατανομή μεγέθους για χρήση σε βιοϊατρικές εφαρμογές μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες: τις χημικές, τις φυσικές και τις βιολογικές. Η απλούστερη χημική μέθοδος είναι η καταβύθιση των μαγνητικών νανοσωματιδίων από ένα διάλυμά τους. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να συμβεί αναγωγή νανοσωματιδίων μετάλλων και κραμάτων, όσο και οξείδωση των οξειδίων μετάλλων από τα διαλυτά άλατά τους (Staniland, et al., 2014).

Μαγνητικά νανοσωματίδια μαγνητίτη (Fe_3O_4) παρασκευάζονται με διάφορους τρόπους. Ο πιο κοινός από αυτούς πραγματοποιείται με την χρήση υδατικών διαλυμάτων ιόντων Fe^{2+} και Fe^{3+} . Η μέθοδος περιλαμβάνει την συγκαταβύθιση ιόντων Fe^{2+} και Fe^{3+} (σε αναλογία 1/2) από αλκαλικά διαλύματα, όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω αντίδραση:



Γενικά, δεν είναι εύκολη η λήψη καθαρού μαγνητίτη με κατάλληλο μέγεθος, κατανομή μεγέθους, σχήμα και μορφολογία. Παράγοντες όπως η συγκέντρωση, η μοριακή αναλογία των αντιδραστηρίων, το pH και η θερμοκρασία μπορούν να βοηθήσουν στον έλεγχο του μεγέθους των σωματιδίων (Valenzuela, et al., 2009). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα νανοσωματίδια μαγνητίτη μπορούν να οξειδωθούν μέσα σε διάλυμα και να μετατραπούν σε μαγκεμίτη ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (Staniland, et al., 2014).

Η μερική οξείδωση του υδροξειδίου του σιδήρου παράγει πιο μεγάλα σωματίδια μαγνητίτη σε σύγκριση με την μέθοδο της συγκαταβύθισης. Κατά την διάρκεια της μεθόδου το υδροξείδιο του σιδήρου σχηματίζεται σε υδατικό διάλυμα από ένα σιδηρούχο άλας και μετά οξειδώνεται μερικώς, με χρήση νιτρικών ιόντων στους 90 °C. Μίγματα υδροξειδίων τρισθενούς και δισθενούς σιδήρου σχηματίζουν μαγνητίτη.

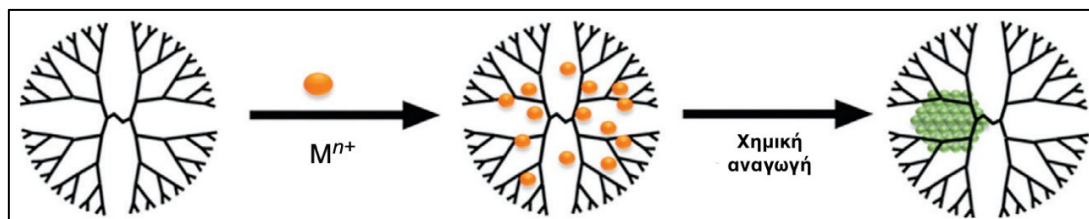
Η μέθοδος θερμικής αποδόμησης οδηγεί στη σύνθεση υψηλής ποιότητας μαγνητικών νανοσωματιδίων με δυνατότητα ελέγχου του μεγέθους και του σχήματος τους. Στη μέθοδο αυτή παρατηρείται θερμική αποδόμηση οργανομεταλλικών ενώσεων σιδήρου μέσα σε οργανικό διαλύτη υψηλού σημείου βρασμού (π.χ. φαινυλαιθέρας) με τη παρουσία επιφανειοδραστικών ουσιών. Έτσι, παράγονται νανοσωματίδια μερικών nm και διαφόρων σχημάτων. Η μέθοδος παρουσιάζει και κάποια αρνητικά χαρακτηριστικά αφού η σύνθεση είναι συνήθως μικρής κλίμακας, ενώ οι συνθήκες και τα υλικά που χρησιμοποιούνται δεν είναι φιλικά προς το περιβάλλον (Staniland, et al., 2014).

Η σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων με χρήση ανάστροφων μικκυλίων είναι ευρέως διαδεδομένη. Τα ανάστροφα μικκύλια είναι σταγόνες νερού σταθεροποιημένες σε μια υγρή υδρόφοβη φάση, λόγω του σχηματισμού μιας επιφανειοδραστικής στιβάδας επί της επιφανείας τους. Το κέντρο των μικκυλίων, όπου πραγματοποιείται η αντίδραση σχηματισμού των νανοσωματιδίων, είναι υδρόφιλο. Η συγκεκριμένη ποσότητα μεταλλικών ενώσεων που περιέχεται στο εσωτερικό κάθε μικκυλίου, δίνει τη δυνατότητα ελέγχου της σύστασης και του μέσου μεγέθους των σωματιδίων, αλλά και λήψης δειγμάτων με μικρή κατανομή μεγέθους.

Στην κλασική μέθοδο θερμικής εξάτμισης ένα δείγμα μετάλλου ή κράματος, θερμαίνεται παρουσία αδρανούς αερίου αργού ή ηλίου. Τα άτομα του εξατμισμένου μετάλλου χάνουν την κινητική τους ενέργεια, εξαιτίας των συγκρούσεών τους με τα άτομα του αδρανούς αερίου, συγκεντρώνονται σε συστάδες και συμπυκνώνονται. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την παρασκευή ετερομεταλλικών μαγνητικών νανοσωματιδίων της μορφής Fe-M (όπου M = Ni, Mn, Pt, Cr) (Gubin, Koksharov, Khomutov, & Yurkov, 2005).

Η χρήση πολυμερών και πιο συγκεκριμένα δενδριμερών στην παρασκευή μικρών μεταλλικών μαγνητικών νανοσωματιδίων παράγει νανοσωματίδια μικρότερα από 3 nm. Δενδριμερή πολυ(αμιδοαμίνης) (PAMAM) χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση μεταλλικών μαγνητικών νανοσωματιδίων, ώστε να ελέγχεται το μέγεθος, η σταθερότητα και η διαλυτότητά τους. Η διαδικασία συνίσταται από δύο στάδια: (1) τη φόρτωση των μεταλλικών ιόντων στο εσωτερικό του δενδριμερούς και την αλληλεπίδραση τους με τις υπάρχουσες εσωτερικές ομάδες αμίνης και (2) την χημική αναγωγή ώστε να παραχθούν άτομα μετάλλου μηδενικού σθένους, τα οποία καταρρέουν και σχηματίζουν τα νανοσωματίδια (Εικόνα 9). Η αναγωγή των

μεταλλικών ιόντων συμβαίνει συνήθως με χρήση περίσσειας βοροϋδριδίου του νατρίου (Staniland, et al., 2014).



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της φόρτωσης μεταλλικών ιόντων στο εσωτερικό δενδριμερών, ακολουθούμενη από τη χημική αναγωγή τους για την παραγωγή ατόμων μηδενικού σθένους, τα οποία καταρρέουν και σχηματίζουν μεταλλικά μαγνητικά νανοσωματίδια. Μεταφρασμένη εικόνα από (Staniland, et al., 2014).

1.4.5 Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων και η σημασία της επικάλυψής τους

Βασικές απαιτήσεις για τη χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων σε βιοϊατρικές εφαρμογές είναι τα νανοσωματίδια να είναι βιοαποικοδομήσιμα ή η απέκκριση του μαγνητικού πυρήνα από τον οργανισμό να γίνεται ενώ ο πυρήνας παραμένει άθικτος. Για παράδειγμα, μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου θεωρούνται βιοαποικοδομήσιμα, αφού ο σίδηρος μπορεί να επαναχρησιμοποιείται/ανακυκλώνεται από τα κύτταρα, τα οποία χρησιμοποιούν βιοχημικές οδούς για τον μεταβολισμό του. Για τα μαγνητικά νανοσωματίδια με μη βιοαποικοδομήσιμους μαγνητικούς πυρήνες απαιτείται μια ειδική επικάλυψη, ώστε να σταθεροποιηθούν χημικά έναντι της αποικοδόμησης που συμβαίνει λόγω της οξείδωσης. Γενικά, οι επικαλύψεις σε μαγνητικά νανοσωματίδια εξυπηρετούν σκοπούς όπως η προστασία του πυρήνα τους, αλλά και η αύξηση της σταθερότητά τους σε περιβάλλον με ελαφρώς αλκαλικό pH ή σημαντική συγκέντρωση ιόντων (Arruebo, Fernández-Pacheco, Ibarra, & Santamaría, 2007). Η επικάλυψη των μαγνητικών πυρήνων και κατ' επέκταση η τροποποίηση της επιφάνειας και των ιδιοτήτων τους μπορεί να γίνει με διάφορες κατηγορίες υλικών όπως (Estelrich, Escribano, Queralt, & Busquets, 2015):

- οργανικά πολυμερή (δεξτράνη, χιτοζάνη, PEG)
- οργανικές επιφανειοδραστικές ουσίες
- ανόργανα μέταλλα (χρυσός)
- ανόργανα υλικά (διοξείδιο του πυριτίου)
- βιοδραστικά μόρια και δομές (λιποσώματα, πεπτίδια και υποδοχείς).

Για να μπορούν τα μαγνητικά νανοσωματίδια να προσεγγίζουν και να αλληλεπιδρούν με βιολογικά μόρια, πρέπει να είναι σε θέση να αποφύγουν το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (RES). Αμέσως μετά την είσοδό τους στην κυκλοφορία του αίματος, ξεκινά η επικάλυψη των μαγνητικών νανοσωματιδίων από πρωτεΐνες του πλάσματος. Αυτή η διαδικασία, γνωστή ως οψωνινοποίηση, διευκολύνει την αναγνώριση και αργότερα απομάκρυνση των νανοσωματιδίων από τα φαγοκύτταρα. Η επικάλυψη των μαγνητικών νανοσωματιδίων με ουδέτερο και υδρόφιλο πολυμερές με εύκαμπτες αλυσίδες (π.χ. PEG, πολυσακχαρίτες κλπ.) αυξάνει τον χρόνο ημιζωής τους στο κυκλοφορικό σύστημα από μερικά λεπτά, σε ώρες ή και ημέρες. Τα υδρόφιλα μαγνητικά νανοσωματίδια μπορούν να αντισταθούν στην οψωνινοποίηση, αυξάνοντας την πιθανότητα να φθάσουν στα κύτταρα-στόχους τους (Issa, Obaidat, Albiss, & Haik, 2013).

Η επικάλυψη των νανοσωματιδίων δίνει επίσης τη δυνατότητα σύνδεσης φαρμάκων και άλλων βιομορίων σε αυτά μέσω προσρόφησης ή και σχηματισμού χημικών δεσμών. Επιφανειοδραστικές ουσίες και πολυμερή που φέρουν καρβοξυλομάδες, υδροξυλομάδες, αμινομάδες, καρβονυλομάδες, σουλφονομάδες κ.α., μπορούν να προσροφηθούν φυσικά στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων και να σχηματίσουν χημικούς δεσμούς με αυτά (Bychkova, Sorokina, Rosenfeld, & Kovarski, 2012). Στη συνέχεια, οι ομάδες αυτές είναι κατάλληλες για αλληλεπίδραση με διάφορα βιομόρια όπως φάρμακα και πρωτεΐνες, ώστε να επιτευχθεί η φόρτωσή τους στα νανοσωματίδια (Arruebo, Fernández-Pacheco, Ibarra, & Santamaría, 2007).

Η επικάλυψη των νανοσωματιδίων με πολυμερή μεγάλου μοριακού βάρους οδηγεί στην τροποποίηση των επιφανειακών τους ιδιοτήτων. Σαν αποτέλεσμα παρατηρείται αύξηση του υδροδυναμικού μεγέθους των σωματιδίων, μείωση των ιδιοτήτων διάχυσης και έτσι μεταβολή των ιδιοτήτων μεταφοράς και βιοκατανομής. Η επικάλυψη συμβάλλει στην κολλοειδή σταθερότητα των σωματιδίων, αφού μέσω του περιορισμού των δυνάμεων διπόλου-διπόλου μεταξύ των νανοσωματιδίων μειώνονται και τα φαινόμενα καθίζησης. Μερικές από τις πιο ευρέως διαδεδομένες πολυμερικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την επικάλυψη των νανοσωματιδίων είναι τα παράγωγα δεξτράνης, η PVA, η PEG και το PLA (Issa, Obaidat, Albiss, & Haik, 2013).

1.4.6 Κατανομή μαγνητικών νανοσωματιδίων στον οργανισμό

Η κατανομή των μαγνητικών νανοσωματιδίων στο σώμα εξαρτάται από αρκετούς φυσικοχημικούς παράγοντες όπως: το μέγεθος, η τοξικότητα, το φορτίο, η ικανότητα προσρόφησης πρωτεϊνών, η υδροφιλικότητα, η σταθερότητα, τα ειδικά χαρακτηριστικά επιφάνειας και το μοριακό βάρος. Πέραν όμως από τα χαρακτηριστικά των ίδιων των νανοσωματιδίων, σημαντικό ρόλο στην πορεία τους μέσα στον οργανισμό παίζει η δόση και η μέθοδος χορήγησής τους. Η χορήγησή τους μπορεί να γίνει από το στόμα ή και παρεντερικά, συμπεριλαμβανομένων μεθόδων όπως η ενδοφλέβια, η πνευμονική και η διαδερμική χορήγηση. Σε ό,τι αφορά την ενδοφλέβια χορήγηση, με την είσοδο των νανοσωματιδίων στη ροή διαδικασίες οψωνινοποίησης ενεργοποιούν το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα, με αποτέλεσμα τα νανοσωματίδια να αναγνωρίζονται και να οδηγούνται μέσω μονοπύρηνων φαγοκυττάρων σε διάφορα όργανα του σώματος π.χ. στο ήπαρ, στον σπλήνα και τον μυελό των οστών. Ένα μέρος των νανοσωματιδίων φιλτράρεται από τα νεφρά και αποβάλλεται με τα ούρα.

Γενικά, τα μικρότερα νανοσωματίδια απεκκρίνονται από τα νεφρά, ενώ τα μεγαλύτερα προσλαμβάνονται από το ήπαρ, τον σπλήνα και τον μυελό των οστών. Η απομάκρυνση των μικρών σωματιδίων γίνεται με τη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης από κύτταρα όπως τα Β και Τ λεμφοκύτταρα, ενώ τα μεγάλα σωματίδια αφαιρούνται με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης από μακροφάγα ή δενδριτικά κύτταρα. Τα βιοαποικοδομήσιμα μαγνητικά νανοσωματίδια μπορούν να απορροφηθούν από οποιοδήποτε κύτταρο μετά την αποικοδόμησή τους, μέσω της διαδικασίας της πινοκυττάρωσης (pinocytosis) (Arruebo, Fernández-Pacheco, Ibarra, & Santamaría, 2007).

Όσο πιο μεγάλα σε μέγεθος είναι τα νανοσωματίδια, τόσο λιγότερο παραμένουν στο αίμα. Για σωματίδια μικρότερα από 4μm η πρόσληψη και η απομάκρυνση γίνεται από κύτταρα κυρίως στο ήπαρ κατά 60-90% και τον σπλήνα κατά 3-10%. Μικρά σωματίδια με μέγεθος έως και 100nm απομακρύνονται μέσω φαγοκυττάρωσης από κύτταρα του ήπατος, ενώ σωματίδια μεγέθους μεγαλύτερου των 200nm απομακρύνονται από τον σπλήνα (Εικόνα 10) (Neuberger, Schöpf, Hofmann, Hofmann, & von Rechenberg, 2005).



Εικόνα 10: Ποιοτικό διάγραμμα εξάρτησης του χρόνου παραμονής σωματιδίων στο αίμα με το μέγεθος τους. Μεταφρασμένη εικόνα από (Arruebo, Fernández-Pacheco, Ibarra, & Santamaría, 2007).

1.4.7 Εφαρμογές μαγνητικών νανοσωματιδίων στη βιοϊατρική

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορους τομείς της βιοϊατρικής εξαιτίας σημαντικών ιδιοτήτων τους όπως η δυνατότητα ελέγχου της κίνησή τους χρησιμοποιώντας ένα εξωτερικό σταθερό μαγνητικό πεδίο και η δυνατότητα θέρμανσής τους με χρήση εναλλασσόμενου μαγνητικού πεδίου. Τα μαγνητικά νανοσωματίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση ασθενειών μέσω της μεθόδου απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού (ή μαγνητική τομογραφία, Magnetic Resonance Imaging, MRI), αλλά και τη θεραπεία ασθενειών μέσω της υπερθερμίας και της χορήγησης φαρμάκων και γονιδίων σε ιστούς και κύτταρα (Bychkova, Sorokina, Rosenfeld, & Kovarski, 2012).

Στη μέθοδο της **μαγνητικής υπερθερμίας** μαγνητικά νανοσωματίδια αυξάνουν τη θερμοκρασία καρκινικών ιστών στους ~43 °C δρώντας ως πηγές θερμότητας, μιας και τα κύτταρα όγκων παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στη θερμότητα από ότι τα υγιή (Issa, Obaidat, Albiss, & Haik, 2013). Η μέθοδος βασίζεται στην απελευθέρωση θερμότητας από τα νανοσωματίδια, κατά την απορρόφηση ενέργειας από ένα εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο (Bychkova, Sorokina, Rosenfeld, & Kovarski, 2012). Η θερμοκρασία άνω των 41 °C ωθεί τα καρκινικά κύτταρα προς την οξέωση (μείωση

του κυτταρικού pH), η οποία μειώνει τη βιωσιμότητα του κυττάρου, επηρεάζει την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, πιθανώς οδηγώντας σε απόπτωση. Εκτεταμένες έρευνες διεξάγονται για τη μελέτη των επιδράσεων της υπερθερμίας στη θεραπεία του καρκίνου σε συνδυασμό με άλλες μορφές θεραπείας όπως η χημειοθεραπεία ή η ακτινοθεραπεία (Issa, Obaidat, Albiss, & Haik, 2013).

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια όπως έχει ήδη αναφερθεί μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σαν συστήματα ελεγχόμενης **χορήγησης φαρμάκων**, αφού είναι δυνατή η φόρτωση διαφόρων φαρμακευτικών ουσιών σε αυτά. Οι μαγνητικοί νανοφορείς εισάγονται στον οργανισμό μέσω του κυκλοφορικού συστήματος με ενδοφλέβια ή ενδοαρτηριακή χορήγηση. Η εφαρμογή ενός ισχυρού εξωτερικού μαγνητικού πεδίου οδηγεί στη στόχευση και συγκέντρωση του μαγνητικού νανοφορέα στον ιστό-στόχο (Issa, Obaidat, Albiss, & Haik, 2013). Ανάλογα με την εφαρμογή, η αποδέσμευση του φαρμάκου από τα νανοσωματίδια μπορεί να γίνει είτε με απλή διάχυση, ή μέσω μηχανισμών που απαιτούν ενζυματική δράση ή μεταβολή του pH, της ωσμωτικής πίεσης και της θερμοκρασίας. Η αποδέσμευση του φαρμάκου μπορεί να γίνει επίσης με την ενεργοποίηση του συστήματος χορήγησης από την εφαρμογή μαγνητικού παλμού (Arruebo, Fernández-Pacheco, Ibarra, & Santamaría, 2007).

Οι περιορισμοί που παρουσιάζει η χορήγηση φαρμάκων με μαγνητικά νανοσωματίδια είναι η πιθανότητα συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων μέσα στα αιμοφόρα αγγεία, αλλά και το γεγονός ότι μετά την αποδέσμευση το φάρμακο δεν μπορεί να ελεγχθεί πλέον από το μαγνητικό πεδίο (Issa, Obaidat, Albiss, & Haik, 2013). Το επιθυμητό μικρό μέγεθος των μαγνητικών νανοσωματιδίων για την ασφαλή χορήγηση τους στον οργανισμό οδηγεί συχνά σε μικρότερη απόκριση στο μαγνητικό πεδίο. Σε συνδυασμό με την δράση που έχει η ροή του αίματος στα μαγνητικά σωματίδια, καθίσταται δυσκολότερη η καθοδήγηση των σωματιδίων και η διατήρησή τους στον ιστό-στόχο. Η στόχευση του συστήματος νανοσωματιδίων σε έναν συγκεκριμένο ιστό είναι πιο πιθανό να έχει καλύτερα αποτελέσματα σε περιοχές με βραδύτερη ροή αίματος (Arruebo, Fernández-Pacheco, Ibarra, & Santamaría, 2007).

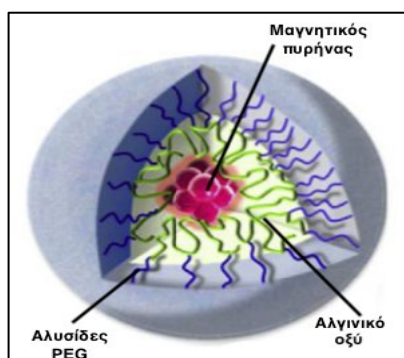
Επιφανειακά τροποποιημένα μαγνητικά νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται ως παράγοντες αντίθεσης στην **απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού** για ταυτόχρονη διάγνωση και θεραπεία ασθενειών. Τα μαγνητικά νανοσωματίδια τα οποία χρησιμοποιούνται πιο συχνά ως παράγοντες αντίθεσης του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού είναι τα νανοσωματίδια οξειδίων σιδήρου, ενώ σωματίδια κοβαλτίου και

νικελίου χρησιμοποιούνται πιο σπάνια (Bychkova, Sorokina, Rosenfeld, & Kovarski, 2012).

1.5 Μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων σιδήρου επικαλυμμένα με αλγινικό οξύ και PEG

1.5.1 Εισαγωγή

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία αποτελούνται από έναν μαγνητικό πυρήνα οξειδίων σιδήρου και είναι επικαλυμμένα με δύο πολυμερή, το αλγινικό οξύ και αλυσίδες PEG (Sarigiannis, et al., 2016). Το σύστημα αυτό έχει διάταξη πυρήνα-κελύφους με τον μαγνητικό πυρήνα να περιβάλλεται από ένα πολυμερικό κέλυφος (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση μαγνητικών νανοσωματιδίων επικαλυμμένων με αλγινικό οξύ και PEG. Τροποποιημένη εικόνα από (Sarigiannis, et al., 2016).

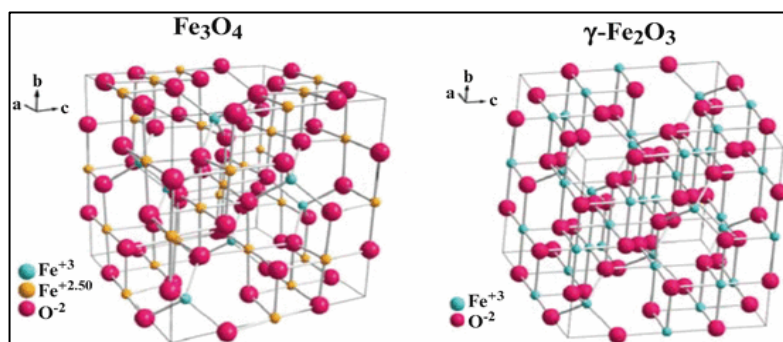
Τα μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων σιδήρου έχουν υπερπαραμαγνητικές ιδιότητες και είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα στις βιοϊατρικές εφαρμογές, αφού πληρούν σημαντικές προϋποθέσεις όπως η χημική σταθερότητα, η χαμηλή τοξικότητα και η υψηλή μαγνήτιση. Η επικάλυψη των νανοσωματιδίων με πολυμερή προσδίδει σε αυτά σημαντικές ιδιότητες έναντι των απλών νανοσωματιδίων. Μερικές από τις ιδιότητες αυτές είναι η καλύτερη διαλυτότητα και βιοσυμβατότητα, η καλύτερη θερμική και χημική σταθερότητα σε διάφορα μέσα, καθώς επίσης η ικανότητα για αποτελεσματικότερη σύζευξη με βιοενεργά μόρια (Estelrich, Escribano, Queralt, & Busquets, 2015).

1.5.2 Μαγνητίτης και μαγκεμίτης

Ο μαγνητίτης (επιτεταρτοξείδιο του σιδήρου, Fe_3O_4) είναι ένα σημαντικό ορυκτό του σιδήρου, το οποίο βρίσκει εφαρμογή σε διάφορους εμπορικούς και ερευνητικούς τομείς συμπεριλαμβανομένης της διαδικασίας ελεγχόμενης χορήγησης και αποδέσμευσης φαρμάκων. Παρουσιάζει μοναδικές μαγνητικές ιδιότητες, ενώ είναι επίσης καλός αγωγός του ηλεκτρισμού.

Ο μαγνητίτης κρυσταλλώνεται στο κυβικό σύστημα και παρουσιάζει αντίστροφη δομή σπινελίου (Εικόνα 12). Περιέχει 32 ιόντα O^{2-} , 16 ιόντα Fe^{3+} και 8 ιόντα Fe^{2+} . Η ύπαρξη τόσο δισθενούς όσο και τρισθενούς σιδήρου καθιστά τον μαγνητίτη ισχυρό μέσο οξείδωσης και αναγωγής. Κάποια από τα τρισθενή ιόντα σιδήρου καταλαμβάνουν τις τετραεδρικές θέσεις (Td) και τα δισθενή ιόντα σιδήρου μαζί με τα υπόλοιπα τρισθενή καταλαμβάνουν τις οκταεδρικές θέσεις (Oh). Παρουσία οξυγόνου ο μαγνητίτης οξειδώνεται σε μαγκεμίτη ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), δηλαδή τα δισθενή ιόντα σιδήρου οξειδώνονται σε τρισθενή (Estelrich, Escibano, Queralt, & Busquets, 2015). Όσο η οξείδωση συνεχίζεται η αναλογία $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ μειώνεται και ο μαγνητίτης ονομάζεται μη στοιχειομετρικός ή μερικώς οξειδωμένος. Ο μαγκεμίτης είναι κρυσταλλογραφικά ισόμορφος με τον μαγνητίτη, όμως αποτελείται μόνο από Fe^{3+} .

Η στοιχειομετρία του μαγνητίτη, δηλαδή η αναλογία $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των σωματιδίων. Μερικές από τις ιδιότητες αυτές είναι το δυναμικό αναγωγής, η αγωγιμότητα και η κρυσταλλική δομή. Γενικά, ο μαγκεμίτης παρουσιάζει ασθενέστερο μαγνητισμό σε σχέση με τον μαγνητίτη (Gorski & Scherer, 2010).



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής του μαγνητίτη και του μαγκεμίτη (Reichel & Faivre, 2017).

1.5.3 Αλγινικό οξύ

Το αλγινικό οξύ είναι ένα γραμμικό, μη διακλαδιζόμενο πολυμερές, το οποίο σχηματίζεται από τους μονοσακχαρίτες: β(1,4) D-μαννουρονικό οξύ (M) και α(1,4) L-γουλουρονικό οξύ (G). Το αλγινικό οξύ προέρχεται από καφέ φύκια, στα οποία βρίσκεται στα κυτταρικά τοιχώματα με την μορφή αλάτων αλγινικού ασβεστίου, νατρίου και μαγνησίου. Το αλγινικό νάτριο είναι βιοσυμβατό και έχει ευρεία χρήση σε έναν μεγάλο αριθμό βιομηχανιών, συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων και των φαρμάκων. Τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα του αλγινικού οξέος συνοψίζονται ως εξής: είναι βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές, έχει ελεγχόμενο πορώδες, δεν είναι τοξικό, μπορεί να συνδέεται με άλλα βιοδραστικά μόρια και είναι ένα υδρόφιλο μόριο με σχετικά χαμηλό κόστος (Niekraszewicz & Niekraszewicz, 2009).

Η επικάλυψη των μαγνητικών νανοσωματιδίων με το αλγινικό οξύ προσδίδει σε αυτά νέες ιδιότητες με σημαντικότερη τη δυνατότητα περαιτέρω τροποποίησής τους. Κάθε μονάδα γουλουρονικού και μαννουρονικού οξέος του πολυμερούς φέρει ένα καρβοξύλιο, το οποίο δίνει την δυνατότητα σχηματισμού δεσμών με μεγάλο αριθμό μορίων ή και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με αυτά. Έτσι, στα νανοσωματίδια μπορεί να προστεθούν μόρια στόχευσης, φάρμακα, πεπτίδια, πρωτεΐνες και ενώσεις που θα ενισχύσουν περαιτέρω την επικάλυψή τους. Επιπλέον, αν και η επιφάνεια των μαγνητικών νανοσωματιδίων είναι υδρόφοβη, με την επικάλυψή της με αλγινικό οξύ τα νανοσωματίδια καθίστανται υδρόφιλα και υδατοδιαλυτά (Estelrich, Escribano, Queralt, & Busquets, 2015).

1.5.4 Πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEG)

Η PEG είναι ένας υψηλής βιοσυμβατότητας πολυ(αιθέρας) με πολλές εφαρμογές, από την βιομηχανική παραγωγή έως την ιατρική. Είναι διαλυτή στο νερό και σε οργανικούς διαλύτες και η δομή της είναι $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$. Τα πολυμερή PEG παρασκευάζονται μέσω της πολυσυμπύκνωσης αιθυλενογλυκόλης παρουσία όξινων ή βασικών καταλυτών, με αποτέλεσμα ένα προϊόν χαμηλότερου μοριακού βάρους. Η χρήση του αιθυλενοξειδίου ως πρόδρομη ένωση για τον πολυμερισμό PEG υψηλού μοριακού βάρους, οδηγεί στην παραγωγή βαρύτερων μορίων πολυμερούς.

Η χαμηλή τοξικότητα και μη ανοσογονικότητα της PEG οδηγούν στη συχνή χρήση του πολυμερούς για την επιφανειακή τροποποίηση βιοϋλικών, νανοσωματιδίων και μικκυλίων. Η διαλυτότητα της PEG τόσο σε υδατικούς, όσο και σε οργανικούς

διαλύτες διευκολύνει τη σύζευξη της με χημικούς δεσμούς σε μια ποικιλία βιολογικών μορίων κάτω από ήπιες συνθήκες. Η διαδικασία σύζευξης της PEG με το εκάστοτε επιθυμητό μόριο ονομάζεται πεγκυλίωση και πραγματοποιείται μέσω αντίδρασης μεταξύ των δύο μορίων, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού. Η διαδικασία απαιτεί την τροποποίηση και ενεργοποίηση της PEG, η οποία πραγματοποιείται με την αντικατάσταση ενός ή και των δύο τερματικών υδροξυλίων της από μία ποικιλία δραστικών λειτουργικών ομάδων. Οι λειτουργικές ομάδες καθορίζονται από τον τύπο των διαθέσιμων λειτουργικών ομάδων που φέρει το βιολογικό μόριο, στο οποίο πρόκειται να συζευχθεί η PEG (Ivanova, Bazaka, & Crawford, 2014).

Η PEG είναι υδατοδιαλυτή και ηλεκτροστατικά ουδέτερη, συνεπώς, παρεμποδίζει τη συσσωμάτωση και καθίζηση των πεγκυλιωμένων νανοσωματιδίων και την ηλεκτροστατική προσρόφηση πρωτεϊνών του πλάσματος σε αυτά, συμβάλλοντας στην σταθερότητα του κολλοειδούς συστήματος των νανοσωματιδίων. Τα επικαλυμμένα με PEG νανοσωματίδια παρουσιάζουν καλύτερη βιοσυμβατότητα και υψηλή διαλυτότητα και σταθερότητα σε διαλύματα μεγάλου εύρους τιμών pH και συγκεντρώσεων άλατος (Lee, Kim, & Cheon, 2013).

Ένα ακόμα πλεονέκτημα της χρήσης της PEG είναι η επιβράδυνση της ανίχνευσης και πρόσληψης των νανοσωματιδίων από τα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Η αποφυγή της ανίχνευσης από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα μπορεί να αποδοθεί στην χαμηλή προσρόφηση πρωτεϊνών που παρουσιάζουν οι πεγκυλιωμένες επιφάνειες, γεγονός που οφείλεται στη χαμηλή ενέργεια επιφάνειας τους στο νερό και στο φαινόμενο της στερικής σταθεροποίησης (Arruebo, Fernández-Pacheco, Ibarra, & Santamaría, 2007). Τέλος, η επικάλυψη της επιφάνειας νανοσωματιδίων με PEG μπορεί να μειώσει την τοξικότητα αυτών στο αίμα. Απαιτείται πυκνή επίστρωση με αλυσίδες της PEG για να ελαχιστοποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νανοσωματιδίων και των ερυθροκυττάρων (Suk, Xu, Kim, Hanes, & Ensign, 2016).

1.5.5 Σταθερότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων

Η κολλοειδής σταθερότητα των νανοσωματιδίων σχετίζεται με την ικανότητά τους να αντιστέκονται στην συσσωμάτωση και αποτελεί σημαντική προϋπόθεση για τη χρήση τους σε ένα βιολογικό περιβάλλον.

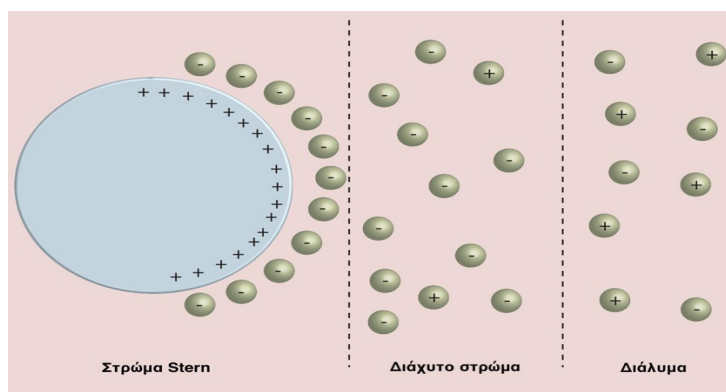
Η συχνότητα των συγκρούσεων των νανοσωματιδίων ενός εναιωρήματος σχετίζεται σημαντικά με την σταθερότητα αυτού. Ο αριθμός των συγκρούσεων επηρεάζεται από την κίνηση Brown και την συγκέντρωση των νανοσωματιδίων. Η αποτελεσματικότητα των συγκρούσεων αυτών καθορίζεται από ελκτικές και απωστικές δυνάμεις, με την συσσωμάτωση να συμβαίνει όταν οι ελκτικές δυνάμεις υπερσχύουν έναντι των απωστικών. Η θεωρία Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), η οποία είναι πολύ σημαντική στην πρόβλεψη της συμπεριφοράς συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων σε υδατικά κolloειδή εναιωρήματα, σχετίζεται με τις δυνάμεις van der Waals (ελκτικές) και τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις (απωστικές) (Champagne, Westwick, Bouthillier, & Sawan, 2018). Η σταθερότητα επικαλυμμένων με πολυμερή νανοσωματιδίων επηρεάζεται σημαντικά και από στερικές δυνάμεις, ενώ στα μαγνητικά κolloειδή συμπεριλαμβάνονται και οι μαγνητικές αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου (Bychkova, Sorokina, Rosenfeld, & Kovarski, 2012).

Η κίνηση Brown αναφέρεται στη φαινομενικά τυχαία κίνηση μικρών σωματιδίων σε έναν διαλύτη, η οποία προκαλείται από τις συγκρούσεις τους με μόρια του περιβάλλοντός τους. Όσο περισσότερο κινούνται τα νανοσωματίδια, τόσο αυξάνεται ο ρυθμός των συγκρούσεων γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε σχηματισμό συσσωματωμάτων. Ωστόσο, η κινητική ενέργεια που δημιουργείται από τις συγκρούσεις συνήθως ευνοεί τη διάσπαση αδύναμα σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων. Η κίνηση Brown επηρεάζεται από παράγοντες όπως: το μέγεθος του σωματιδίου, το ιξώδες του διαλύτη και η θερμοκρασία του περιβάλλοντος.

Οι δυνάμεις van der Waals είναι μη ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μόνιμων και επαγόμενων δίπολων των νανοσωματιδίων. Όταν η απόσταση μεταξύ των σωματιδίων μεταβάλλεται, μεταβάλλονται και οι δυνάμεις van der Waals. Όσο πιο κοντά βρίσκονται τα νανοσωματίδια, τόσο ισχυρότερες είναι οι δυνάμεις. Μεταξύ παρόμοιων νανοσωματιδίων οι δυνάμεις van der Waals είναι ελκτικές, ενώ αντιπροσωπεύουν μια εγγενή ιδιότητα των υλικών και έτσι ασκούνται πάντα μεταξύ των σωματιδίων.

Σε ό,τι αφορά της ηλεκτροστατικές δυνάμεις, αυτές απωθούν όμοια φορτισμένα νανοσωματίδια σε ένα πολικό μέσο όπως το νερό, οδηγώντας έτσι σε καλύτερη κolloειδή σταθερότητα. Γενικά, γύρω από τα φορτισμένα νανοσωματίδια δημιουργείται ένα διπλό στρώμα ιόντων του διαλύτη. Στο εσωτερικό στρώμα (στρώμα Stern) παρατηρούνται ιόντα τα οποία συνδέονται ισχυρά με τα σωματίδια εξαιτίας του

διαφορετικού (αντίθετου) φορτίου που φέρουν. Στο εξωτερικό στρώμα (διάχυτο στρώμα), το οποίο περιέχει ιόντα ίδιου και αντίθετου φορτίου με τα νανοσωματίδια, τα αντίθετα ιόντα κινούνται πιο ελεύθερα (Εικόνα 13). Η διαφορά τάσης που δημιουργείται εξαιτίας του διπλού στρώματος ιόντων γύρω από το νανοσωματίδιο, ελαττώνεται όσο η απόσταση από το νανοσωματίδιο αυξάνεται.



Εικόνα 13: Απεικόνιση του διπλού στρώματος ιόντων που σχηματίζεται γύρω από ένα φορτισμένο σωματίδιο, όταν αυτό κινείται σε πολικό διαλύτη. Μεταφρασμένη εικόνα από (Champagne, Westwick, Bouthillier, & Sawan, 2018).

Στο διάχυτο στρώμα υπάρχει το επίπεδο ολίσθησης μέσα στα όρια του οποίου τα ιόντα κινούνται μαζί με το νανοσωματίδιο, καθώς αυτό κινείται. Το ηλεκτρικό δυναμικό μεταξύ του επιπέδου ολίσθησης και του διαλύτη καλείται ζήτα (ζ) δυναμικό και είναι ενδεικτικό του φορτίου της επιφάνειας των φορτισμένων σωματιδίων. Υψηλό κατά απόλυτη τιμή ζ δυναμικό συνεπάγεται καλύτερη σταθερότητα ενός κολλοειδούς συστήματος, λόγω των ισχυρών απωστικών δυνάμεων που αναπτύσσονται. Σημαντικές συγκεντρώσεις ιόντων στον διαλύτη ενός συστήματος νανοσωματιδίων ευνοούν τη συσσωμάτωση, αφού η περίσσεια των ιόντων μπορεί να εξουδετερώσει το υπάρχον φορτίο στο επίπεδο ολίσθησης, μειώνοντας έτσι το ζ δυναμικό και τις απωστικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις.

Η σταθερότητα επικαλυμμένων νανοσωματιδίων μπορεί να επιτευχθεί με την αύξηση του επιφανειακού τους φορτίου (ηλεκτροστατικές δυνάμεις), αλλά και μέσω στερικής άπωσης. Οι στερικές δυνάμεις προέρχονται από την αλληλοεπίδραση των πολυμερών τα οποία επικαλύπτουν τα νανοσωματίδια, όταν αυτά αποτελούνται από μόρια μακράς αλυσίδας. Όταν τα νανοσωματίδια πλησιάζουν, τα στρώματα αλυσίδων πολυμερούς που τα περιβάλλουν συμπίεζονται και η εντροπία του συστήματος μειώνεται. Η μείωση της εντροπίας δεν είναι επιτρεπτή από τον 2^ο θερμοδυναμικό νόμο και έτσι δημιουργούνται απωστικές δυνάμεις. Γενικά, τα πολυμερή που επιλέγονται για

την επικάλυψη νανοσωματιδίων πρέπει να είναι διαλυτά στο μέσο διασποράς τους, αλλιώς ευνοείται η συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων, ώστε όσο το δυνατόν μικρότερη επιφάνεια του πολυμερούς να έρχεται σε επαφή με τον διαλύτη (Champagne, Westwick, Bouthillier, & Sawan, 2018).

1.6 Χορήγηση μαγνητικών νανοσωματιδίων στον εγκέφαλο

1.6.1 Εισαγωγή

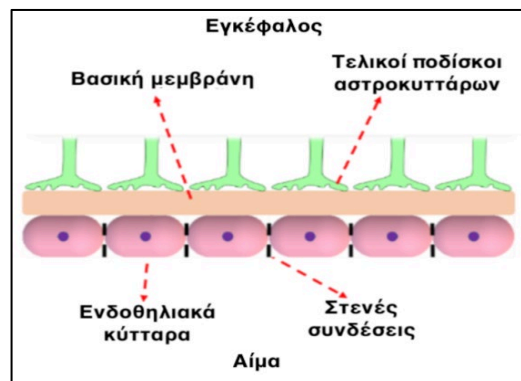
Η θεραπεία νευρολογικών ασθενειών όπως οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, αποτελεί μία από τις πιο δύσκολες προκλήσεις στην ιατρική. Μεταξύ των νευρολογικών διαταραχών η νόσος Alzheimer και άλλες μορφές άνοιας εκτιμάται ότι αποτελούν το 2,84% των συνολικών θανάτων. Επί του παρόντος, δεν υπάρχουν αποτελεσματικές θεραπείες για αρκετές νευρολογικές ασθένειες, με αποτέλεσμα πολλές παθολογικές διαταραχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) να παραμένουν αθεράπευτες.

Το βασικό πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι υπάρχουσες θεραπείες είναι ότι τα φάρμακα έχουν μειωμένη ή μηδενική αποτελεσματικότητα λόγω της ανεπαρκούς πρόσβασης τους στο ΚΝΣ. Αυτό οφείλεται στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Blood-Brain Barrier, BBB), ο οποίος περιορίζει τη μετάβαση ουσιών από το αίμα στον εγκέφαλο. Η τεχνολογία των νανοσωματιδίων, συμπεριλαμβανομένων των μαγνητικών, έχει προταθεί ως ένα δυνητικά χρήσιμο εργαλείο για την ενίσχυση της μεταφοράς φαρμάκων μέσω του BBB. Η πολυλειτουργική επιφάνεια των νανοσωματιδίων μπορεί να προάγει ταυτόχρονα την στόχευση του BBB και τη μεταφορά του φαρμάκου μέσω του φραγμού. Η μεταφορά φαρμάκων στον εγκέφαλο με χρήση νανοσωματιδίων πλεονεκτεί, διότι η διέλευση του φαρμάκου από τον BBB εξαρτάται κυρίως από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νανοφορέα, τα οποία μπορούν να προσαρμοστούν ανάλογα τις ανάγκες κάθε θεραπείας (Masserini, 2013).

1.6.2 Αιματοεγκεφαλικός φραγμός και τρόποι διέλευσης των νανοσωματιδίων

Ο BBB είναι μια δομή που σχηματίζεται από ποδίσκους αστροκυττάρων και τα ενδοθηλιακά κύτταρα τριχοειδών αγγείων του εγκεφάλου, τα οποία αλληλοσυνδέονται με στενές και στεγανές συνδέσεις (Εικόνα 14). Η δομή αυτή εμποδίζει την ελεύθερη

διέλευση των περισσότερων κυττάρων και μορίων που μεταφέρονται μέσω του κυκλοφορικού συστήματος στον εγκέφαλο. Γενικά, μικρότερου μεγέθους μόρια όπως το νερό, αέρια και μερικές λιποδιαλυτές ενώσεις μπορούν εύκολα να διαπεράσουν τον BBB μέσω της διαδικασίας της παθητικής διακυτταρικής διάχυσης. Αντίθετα, μεγάλα μόρια με υψηλό ηλεκτρικό φορτίο και υδροφιλικότητα (όπως τα περισσότερα φάρμακα) διαπερνούν το φραγμό μέσω ενεργών οδών μεταφοράς με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών.



Εικόνα 14: Απεικόνιση βασικών δομικών στοιχείων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Τροποποιημένη και μεταφρασμένη εικόνα από (Zhou, Peng, Seven, & Leblanc, 2018).

Διάφορες στρατηγικές αναπτύχθηκαν προκειμένου να χορηγηθούν αποτελεσματικά τα φάρμακα στον εγκέφαλο. Οι στρατηγικές αυτές περιλαμβάνουν την χημική τροποποίηση φαρμάκων και προφαρμάκων, την προσωρινή αύξηση της διαπερατότητας των στενών συνδέσεων του φραγμού, την τοπική χορήγηση στον εγκέφαλο μέσω της νευροχειρουργικής και τη χορήγηση με χρήση συστημάτων νανοσωματιδίων.

Η διέλευση του BBB μπορεί να γίνει μέσω ενεργών και παθητικών οδών μεταφοράς. Οι παθητικές οδοί μεταφοράς είναι διαδικασίες ενεργειακά ανεξάρτητες, όπως είναι η απλή διάχυση. Αντίθετα, οι ενεργές οδοί μεταφοράς περιλαμβάνουν διαδικασίες ενδοκυττάρωσης με τη μεσολάβηση υποδοχέα ή διαδικασιών προσρόφησης και διαδικασίες μεταφοράς με τη μεσολάβηση φορέα. Στις διεργασίες αυτές απαιτείται η υδρόλυση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (Adenosine triphosphate, ATP) (Zhou, Peng, Seven, & Leblanc, 2018). Τα νανοσωματίδια όπως και όλα τα υπόλοιπα μόρια θα πρέπει να πληρούν κάποιες πολύ συγκεκριμένες προϋποθέσεις, ώστε να διαπεράσουν τον BBB και να έχουν πρόσβαση στον εγκέφαλο. Μερικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την αποτελεσματικότερη διέλευση στον εγκέφαλο μέσω του BBB είναι:

- η παροδική αύξηση της διαπερατότητας του BBB. Με τη διάσπαση των στενών συνδέσεων που υπάρχουν μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων κάνοντας χρήση υπερήχων/μικροφυσάλιδων και ωσμωτικής πίεσης, αυξάνεται τοπικά η διαπερατότητα του BBB και διευκολύνεται η είσοδος των νανοσωματιδίων. Η μέθοδος αυτή μπορεί πιθανά να οδηγήσει σε εγκεφαλική τοξικότητα λόγω της ανεξέλεγκτης εισόδου ενώσεων στον εγκέφαλο, ακόμα και αν αυτό συμβαίνει για μικρά χρονικά διαστήματα.
- Η διαδικασία της διακυτταρικής μεταφοράς. Εδώ, τα νανοσωματίδια δεσμεύονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικούς μηχανισμούς: α) τη διακυτταρική μεταφορά με προσρόφηση, όπου οι κατάλληλες επιφανειακές ιδιότητες των νανοσωματιδίων διευκολύνουν τη σύνδεση τους στην εσωτερική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, β) τη διακυτταρική μεταφορά με μεσολάβηση υποδοχέα, όπου η ενδοκυττάρωση γίνεται με την πρόσδεση των συνδετών, τους οποίους φέρουν τα νανοσωματίδια στην επιφάνεια τους, με συγκεκριμένους υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων. Παράδειγμα τέτοιου υποδοχέα είναι η τρανσφερίνη (Tf).

Η διακυτταρική μεταφορά ξεκινά με τη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης, κατά την οποία τμήμα της μεμβράνης αναδιπλώνεται προς το εσωτερικό του κυττάρου, συνενώνεται στα δύο άκρα του και αποκόπτεται, δημιουργώντας ένα ενδοκυτταρικό κυστίδιο. Έτσι, επιτρέπεται η ενσωμάτωση εξωκυτταρικών ουσιών στα κύτταρα.

Οι δύο κύριες οδοί ενδοκυττάρωσης είναι: α) η ενδοκυττάρωση με τη μεσολάβηση κλαθρίνης, η οποία πραγματοποιείται σε περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης πλούσιες σε κλαθρίνη και στην οποία σχηματίζονται ενδοκυτταρικά κυστίδια μέγιστου μεγέθους 200 nm και β) η ενδοκυττάρωση με τη μεσολάβηση καβεολίνης, η οποία πραγματοποιείται μέσω μικρών εσοχών της μεμβράνης, οι οποίες περιέχουν τη μεμβρανική πρωτεΐνη καβεολίνη. Το κυστίδιο που δημιουργείται ονομάζεται καβεόσωμα και είναι μεγέθους περίπου 80 nm.

Η αξιοποίηση των παραπάνω μηχανισμών ενδοκυττάρωσης από ένα σύστημα νανοσωματιδίων μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη διαπέραση του BBB μέσω διακυτταρικής μεταφοράς. Από τις διάφορες μελέτες που αφορούν τη μεταφορά νανοσωματιδίων μέσω του BBB αλλά και με βάση φυσιολογικά χαρακτηριστικά και τη δομή του BBB, έχουν προκύψει διάφορα συμπεράσματα σχετικά με το ποια είδη νανοσωματιδίων περνούν μέσω του φραγμού με μεγαλύτερη επιτυχία. Μερικά

χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων που φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο είναι το μέγεθος, το ηλεκτρικό τους φορτίο αλλά και η ικανότητα τροποποίησης της επιφάνειάς τους.

Γενικά τα μικρότερα νανοσωματίδια έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να διαπεράσουν το φραγμό. Πιο συγκεκριμένα όμως νανοσωματίδια μεγέθους έως και 200nm θα μπορούσαν να διαπεράσουν τον φραγμό μέσω της ενδοκυττάρωσης με μεσολάβηση κλαθρίνης, μιας και σε αυτή τη διαδικασία τα κυστίδια που σχηματίζονται για την ενδοκυττάρωση των μορίων φτάνουν τα 200nm σε μέγεθος. Σχετικά με το ηλεκτρικό φορτίο των νανοσωματιδίων, τα ουδέτερα και αρνητικά φορτισμένα νανοσωματίδια φαίνεται να έχουν περισσότερες πιθανότητες να φτάσουν στον εγκέφαλο, καθώς η μειωμένη απορρόφηση πρωτεϊνών που παρουσιάζουν τους επιτρέπει να παραμένουν στο αίμα για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, χωρίς να απομακρύνονται από τους αμυντικούς μηχανισμούς του οργανισμού. Τα θετικά φορτισμένα νανοσωματίδια διαπερνούν τον φραγμό μέσω προσρόφησης πιο εύκολα από άλλα σωματίδια, αλληλοεπιδρώντας με τα αρνητικά φορτία των ενδοθηλιακών κυττάρων του φραγμού. Τέλος, νανοσωματίδια που φέρουν στην επιφάνειά τους μόρια στόχευσης κάποιου υποδοχέα των κυττάρων του φραγμού, είναι κατάλληλα για την διακυτταρική μεταφορά με μεσολάβηση υποδοχέα. Νανοσωματίδια που φέρουν ειδικά ενδοδιεισδυτικά πεπτίδια μπορούν να περάσουν στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων χωρίς την διαδικασία της ενδοκυττάρωσης (Ceña & Játiva, 2018).

1.6.3 Χρήση εξωτερικής μαγνητικής δύναμης για την στόχευση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού

Η εφαρμογή εξωτερικής μαγνητικής δύναμης μπορεί να μεταβάλει τη διαδικασία διέλευσης του BBB. Έχει παρατηρηθεί ότι υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια είναι ικανά να διαπεράσουν ένα *in vitro* μοντέλο του BBB με την βοήθεια εξωτερικού μαγνήτη (Thomsen, et al., 2013). Θεωρητικά, ο μαγνήτης τοποθετείται κοντά στον εγκέφαλο και η ελκτική δύναμη που ασκείται από αυτόν, έχει ως αποτέλεσμα να έλκονται τα μαγνητικά νανοσωματίδια μέσω του BBB και να εισέρχονται τελικά στην εγκεφαλική μικροκυκλοφορία (Thomsen, Thomsen, & Moos, 2015). Η ελκτική δύναμη που ασκείται από έναν εξωτερικό μαγνήτη προς τα νανοσωματίδια εξαρτάται από την απόσταση μεταξύ του μαγνήτη και του σωματιδίου.

Η χρήση υπερπαραμαγνητικών νανοσωματιδίων στον άνθρωπο απαιτεί νανοσωματίδια υψηλής μαγνητικής ευαισθησίας, ώστε να εξασφαλίζεται η απόκριση τους σε μεγάλες αποστάσεις.

Διάφορες ερευνητικές μελέτες έχουν ασχοληθεί με τη σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων και τη μετέπειτα χρήση τους σε *in vitro* και *in vivo* εφαρμογές, με σκοπό να αποδείξουν την ικανότητα τους να διαπερνούν τον BBB και να εισέρχονται στον εγκέφαλο. Χαρακτηριστικά, μια μελέτη (Thomsen, et al., 2013) κατά την οποία υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια μεγέθους 117nm προστέθηκαν σε ενδοθηλιακά κύτταρα, έδειξε ότι η ικανότητα των νανοσωματιδίων να εισέλθουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα ήταν πολύ μεγαλύτερη παρουσία μαγνητικού πεδίου έντασης 0,39 Tesla. Η μαγνητική δύναμη δεν προκάλεσε βλάβη στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Γενικά, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας για το ευρύ κοινό το ασφαλές όριο συνεχούς έκθεσης σε μαγνητικό πεδίο είναι 40 mTesla, ενώ ασθενείς κατά την διάρκεια θεραπείας μπορούν να εκτεθούν σε πιο ισχυρά μαγνητικά πεδία μεταξύ 0,2 και 3 Tesla.

Σε άλλη εφαρμογή (Kong, et al., 2012), μαγνητικές νανοσφαίρες πολυστυρενιού μεγέθους περίπου 100nm ήταν ικανές να διαπεράσουν τον BBB ποντικών μετά από ενδοφλέβια ένεση, με τη βοήθεια ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου μαγνήτη έντασης 0,1 Tesla. Η εφαρμογή του μαγνήτη αύξησε την παραμονή των μαγνητικών σωματιδίων εντός του εγκεφάλου περίπου 25 φορές, ενώ παρατηρήθηκε μόνο ελάχιστη νευροτοξικότητα. Όταν το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο εφαρμόστηκε, τα νανοσωματίδια δεν εισήχθησαν μόνο στα ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου αλλά πέρασαν και στο παρέγχυμα του εγκεφάλου. Είναι σημαντικό ότι δεν παρατηρήθηκαν ιστολογικές αλλαγές, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα αιμοφόρα αγγεία στα οποία βρέθηκαν τα σωματίδια ήταν άθικτα.

Σε ένα ακόμα παράδειγμα εφαρμογής μαγνητικών νανοσωματιδίων (Amin, et al., 2017), φθορίζοντα μαγνητικά νανοσωματίδια χορηγήθηκαν ενδοφλέβια σε φυσιολογικούς ποντικούς κάνοντας παράλληλη χρήση μαγνητικού πεδίου, το οποίο παραγόταν από ηλεκτρομαγνητικά πηνία. Τα νανοσωματίδια έφθασαν επιτυχώς στον εγκέφαλο σε λίγα λεπτά μετά την χορήγησή τους, γεγονός που απέδειξε την ικανότητα των μαγνητικών νανοσωματιδίων να διαπερνούν τον BBB. Υπό τις ίδιες συνθήκες μαγνητικού πεδίου, επικαλυμμένα με δεξτράνη μαγνητικά νανοσωματίδια Fe_3O_4 , στα οποία φορτώθηκε η πρωτεΐνη ωσμωτίνη, χορηγήθηκαν ενδοφλέβια σε ποντικούς με τελικό σκοπό την αναστροφή συμπτωμάτων της νόσου Alzheimer. Τα νανοσωματίδια

μαζί με την ωσμωτίνη μεταφέρθηκαν επιτυχώς στους εγκεφάλους των ποντικών, στους οποίους είχε γίνει ένεση με το πεπτιδίο Αβ₁₋₄₂. Σε σύγκριση με την απλή χορήγηση ωσμωτίνης, το σύστημα μαγνητικού νανοφορέα-ωσμωτίνης κατάφερε να αναστρέψει διάφορες παρενέργειες που προκαλεί η χορήγηση του πεπτιδίου Αβ₁₋₄₂, όπως η συσσώρευση β-αμυλοειδούς και η υπερφωσφορυλίωση των πρωτεϊνών tau.

1.7 Ο αναστολέας TDZD-8 της κινάσης GSK-3β και ο ρόλος τους στη νόσο Alzheimer

1.7.1 Εισαγωγή

Η νόσος Alzheimer (AD) είναι μια νευροεκφυλιστική διαταραχή, η οποία περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1906 από τον ψυχίατρο Alois Alzheimer. Ως επί το πλείστον οι λόγοι εκδήλωσης της νόσου είναι άγνωστοι, ωστόσο θεωρείται ότι πολλοί παράγοντες συμμετέχουν στη παθοφυσιολογία της. Η νόσος του Alzheimer χαρακτηρίζεται από προοδευτική απώλεια επεισοδιακής μνήμης και από διαταραχές στην γνωστική ικανότητα και συμπεριφορά των ασθενών. Τα πιο σημαντικά ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά που παρατηρούνται στη νόσο Alzheimer είναι οι εξωκυτταρικές νευριτικές ή γεροντικές πλάκες οι οποίες σχηματίζονται από την πρωτεΐνη β αμυλοειδούς (Αβ) και τα νευροϊνιδιακά πλέγματα (NFTs). Η υπερφωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης tau ευθύνεται κυρίως για τα NFTs, ενώ οι νευριτικές πλάκες προέρχονται από την πρωτεολυτική διάσπαση της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (APP) (Llorens-Martín, Jurado, Hernández, & Avila, 2014).

1.7.2 Η κινάση GSK-3β και ο ρόλος της στη νόσο Alzheimer

Η κινάση της συνθετάσης του γλυκογόνου (Glycogen synthase kinase-3, GSK-3) είναι μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία απομονώθηκε αρχικά από σκελετικούς μυς το 1980. Στα θηλαστικά δύο είδη της GSK-3 κωδικοποιούνται από δύο γονίδια, με αποτέλεσμα την ύπαρξη της GSK-3α και GSK-3β κινάσης. Η δράση της GSK-3β στον εγκέφαλο συμπεριλαμβάνει τη ρύθμιση πολλών κρίσιμων κυτταρικών διεργασιών και τον έλεγχο πολλών διαδρομών σηματοδότησης. Η GSK-3β παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη θεραπειών, αφού η δυσλειτουργία της σχετίζεται με την νόσο Alzheimer και άλλες ασθένειες όπως ο διαβήτης και η σχιζοφρένεια.

Η αυξημένη δραστηριότητα της GSK-3β κινάσης συνδέεται με την παθογένεια της νόσου Alzheimer, λόγω της επίδρασης της κινάσης στον σχηματισμό της Αβ πρωτεΐνης και της φωσφορυλιωμένης tau πρωτεΐνης. Έχει διαπιστωθεί ότι η αναστολή της GSK-3β κινάσης μειώνει την παθολογία της νόσου.

Η επίδραση της GSK-3β κινάσης στον σχηματισμό της Αβ πρωτεΐνης, γίνεται μέσω της πρόδρομης πρωτεΐνης APP (Amyloid Precursor Protein) και της δυνατότητας της κινάσης να παρεμβαίνει στις διαδικασίες διάσπασης της APP πρωτεΐνης. Η ύπαρξη της Αβ πρωτεΐνης έχει αναφερθεί ότι ενεργοποιεί την σηματοδότηση της GSK-3β κινάσης, αποτρέποντας την ανασταλτική φωσφορυλίωση της. Η παθολογική ενεργοποίηση της GSK-3β κινάσης από την Αβ πρωτεΐνη οδηγεί στη μη ομαλή επεξεργασία της APP και σε συναπτική δυσλειτουργία.

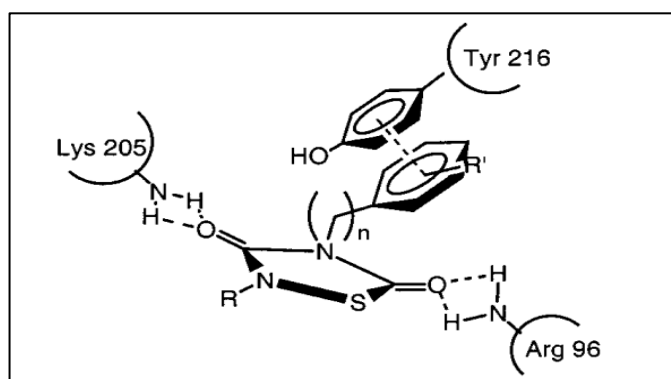
Η αποκατάσταση των φυσιολογικών επιπέδων δράσης της GSK-3β έχει βρεθεί ότι μεταξύ άλλων μειώνει την υπερφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης tau. Η υπερφωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη tau έχει μορφή ελικοειδών νηματίων και αποτελεί το κύριο συστατικό των NFTs, τα οποία σχετίζονται με την απώλεια νευρώνων στη νόσο Alzheimer. Η πρωτεΐνη tau ανήκει στην κατηγορία πρωτεϊνών MAPs (Microtubule Associated Proteins), οι οποίες ρυθμίζουν τον σχηματισμό και τη σταθερότητα του δικτύου μικροσωληνίσκων. Το δίκτυο μικροσωληνίσκων έχει ιδιαίτερη σημασία στην υποστήριξη της λειτουργίας του νευρικού συστήματος. Η πρωτεΐνη tau είναι μια εύκαμπτη πρωτεΐνη, ενώ η υπερφωσφορυλιωμένη μορφή της είναι αδιάλυτη. Κατά τη δημιουργία των NFTs, έχει παρατηρηθεί ότι η tau σταδιακά παίρνει μια άκαμπτη μορφή (Llorens-Martín, Jurado, Hernández, & Avila, 2014), (Avila, et al., 2012).

1.7.3 TDZD-8: Ο αναστολέας της κινάσης GSK-3β

Η συμμετοχή της κινάσης GSK-3β στην παθολογία πολλών νευροεκφυλιστικών ασθενειών έχει οδηγήσει στη διεξαγωγή πολλών μελετών για την ανάπτυξη νέων θεραπειών, οι οποίες θα βασίζονται στην αναστολή της. Μεγάλη σημασία θα πρέπει να δοθεί στην ανάπτυξη εκλεκτικών αναστολέων που θα ρυθμίζουν τη δραστηριότητα αυτής της κινάσης με ασφαλή τρόπο, μιας και η GSK-3β είναι απαραίτητη για την ομαλή λειτουργία των κυττάρων. Σημαντική κατηγορία αναστολέων είναι οι μη ATP - ανταγωνιστικοί αναστολείς της GSK-3β, οι οποίοι είναι επιλεκτικοί και εμφανίζουν μικρή τοξικότητα. Στην κατηγορία αυτών των αναστολέων ανήκει και ο TDZD-8 (4-βενζυλ-2-μεθυλ-1, 2, 4-θειαδιαζολιδιν-3, 5-διόνη), μια μικρή ετεροκυκλική

θειαδιαζολιδινόνη (Llorens-Martín, Jurado, Hernández, & Avila, 2014), (Martinez, Alonso, Castro, Pérez, & Moreno, 2002).

Σε μελέτη που έγινε το 2002 (Martinez, Alonso, Castro, Pérez, & Moreno, 2002) σχετικά με τις ανασταλτικές ιδιότητες της οικογένειας αναστολέων TDZD και ειδικά του TDZD-8, προτάθηκε ένας υποθετικός μηχανισμός αλληλεπίδρασης μεταξύ του TDZD και της κινάσης GSK-3β (Εικόνα 15). Έχει βρεθεί ότι η κινάση GSK-3β φέρει μια θέση δέσμευσης ανιόντων οξυγόνου, ενώ είναι απαραίτητη η σύγκλιση των βασικών της αμινοξέων Arg96, Arg80 και Lys205 για τον σχηματισμό της ενεργούς της διαμόρφωσης. Έτσι σύμφωνα με τον προτεινόμενο μηχανισμό, το αρνητικό φορτίο του ετεροκυκλικού δακτυλίου που φέρει ο TDZD μπορεί να συμβάλλει στη διαδικασία αναγνώρισης της θέσης δέσμευσης της κινάσης GSK-3β. Επίσης, οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Arg96 και Lys205 της GSK-3β κινάσης και τα καρβονύλια του αναστολέα είναι πιθανό να αλληλεπιδρούν. Σημαντικές μπορεί να είναι επίσης οι π-π μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της αρυλο-ομάδας του αναστολέα με την πλευρική αλυσίδα του αμινοξέος Tyr216 της GSK-3β κινάσης.



Εικόνα 15: Αναπαράσταση του προτεινόμενου τρόπου αλληλεπίδρασης του αναστολέα TDZD με την κινάση GSK-3β (Martinez, Alonso, Castro, Pérez, & Moreno, 2002).

Στην παραπάνω μελέτη προέκυψε ότι η τιμή IC_{50} (μM) του αναστολέα TDZD-8, η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του TDZD-8 που αναστέλλει το 50% της λειτουργίας της κινάσης GSK-3β, είναι ίση με 2 μM . Συγκριτικά με την τιμή IC_{50} του TDZD-8 για την αναστολή της κινάσης GSK-3β, οι τιμές IC_{50} του TDZD-8 για την αναστολή άλλων πρωτεϊνικών κινασών όπως η PKA (Protein Kinase A), PKC (Protein Kinase C), CK-II (Casein Kinase II) και Cdk-1/cyclin B (cyclin dependent kinase 1) βρέθηκε ότι ήταν μεγαλύτερες των 100 μM . Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν την μεγάλη εκλεκτικότητα που παρουσιάζει η ανασταλτική δράση του TDZD-8 ως προς

την GSK-3β κινάση, σε σχέση με άλλες πρωτεϊνικές κινάσες (Martinez, Alonso, Castro, Pérez, & Moreno, 2002).

1.8 Τεχνικές χαρακτηρισμού

1.8.1 Φασματοφωτομετρία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)

Η φασματοφωτομετρία UV-Vis σχετίζεται με την απορρόφηση μονοχρωματικής ακτινοβολίας από ένα δείγμα στην περιοχή UV (190-400nm) και την περιοχή Vis (400–800nm) (Χατζηϊωάννου & Κουμπάρης, 2014). Ένα μόριο απορροφά στην ορατή ή υπεριώδη περιοχή, όταν ακτινοβολία προκαλεί μια ηλεκτρονιακή μετάβαση μέσα στη δομή του. Η ενέργεια που παρέχεται ωθεί τα ηλεκτρόνια από τα τροχιακά της θεμελιώδους κατάστασης σε υψηλότερης ενέργειας διεγερμένα τροχιακά ή αντιδεσμικά τροχιακά (Shah, Shah, Pawar, & Gayakar, 2015).

Όταν από ένα διάλυμα μιας ουσίας, η οποία απορροφά, διέρχεται μονοχρωματική ακτινοβολία, τότε παρατηρείται μείωση της ισχύος της ακτινοβολίας λόγω της απορρόφησής της από την ουσία. Η απορρόφηση της ακτινοβολίας εκφράζεται με το νόμο Lambert-Beer μέσω της σχέσης:

$$A = \log(P_0/P) = -\log T = abc_{g/L} = \epsilon bc_{mol/L} \quad (4)$$

Όπου, A είναι η απορρόφηση, P_0 η ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, P η ισχύς της ακτινοβολίας που δεν απορροφήθηκε από το δείγμα, T η διαπερατότητα, a η απορροφητικότητα, b το μήκος διαδρομής μέσα στο διάλυμα, ε η μοριακή απορροφητικότητα και τέλος c η συγκέντρωση της ουσίας που προσδιορίζεται στο διάλυμα.

Γενικά, παρατηρούνται αποκλίσεις από τον νόμο του Beer, οι οποίες μπορεί να είναι θετικές ή αρνητικές, πραγματικές ή φαινομενικές και παρουσιάζονται κυρίως σε δείγματα με υψηλές συγκεντρώσεις. Για τις πραγματικές αποκλίσεις θα πρέπει να αναφερθεί ότι ο νόμος του Beer δεν ισχύει σε πυκνά διαλύματα (πάνω από 0,01M), αφού σε αυτά επηρεάζεται η κατανομή φορτίου των σωματιδίων του διαλύματος και η ικανότητά τους να απορροφούν ακτινοβολία.

Στις φαινομενικές αποκλίσεις συμπεριλαμβάνονται οι οργανολογικές αποκλίσεις και οι χημικές. Οργανολογικές αποκλίσεις προκύπτουν λόγω

πολυχρωματικής ακτινοβολίας, αφού ο νόμος του Beer ισχύει μόνο για μονοχρωματική ακτινοβολία αλλά και λόγω παράσιτης ακτινοβολίας, η οποία ορίζεται ως οι ακτινοβολίες που δεν έχουν επιλεγεί από τον μονοχρωμάτορα και φθάνουν στον ανιχνευτή. Σε ό,τι αφορά τις χημικές αποκλίσεις αυτές προκύπτουν όταν η ουσία που απορροφά αντιδρά με τον διαλύτη και τα προϊόντα που δημιουργούνται απορροφούν σε διαφορετικό μήκος κύματος από αυτό που απορροφά η αρχική ουσία.

Η οργανολογία των φασματοφωτομέτρων UV-Vis περιλαμβάνει α) μια πηγή ακτινοβολίας με σταθερή ισχύ, β) έναν μονοχρωμάτορα ώστε να απομονώνεται η κατάλληλη ακτινοβολία, γ) κυψελίδες για τα δείγματα, δ) έναν ανιχνευτή ακτινοβολίας και ε) ένα σύστημα μετρήσεως με ενισχυτή σήματος μαζί με μια συσκευή ανάγνωσης αποτελεσμάτων.

Ως **πηγές ακτινοβολίας** στην υπεριώδη περιοχή χρησιμοποιούνται λυχνίες εκκενώσεως υδρογόνου (ή δευτερίου) και η λυχνία ξένου, η οποία χρησιμοποιείται και στην περιοχή του ορατού. Στην ορατή περιοχή χρησιμοποιείται επίσης λυχνία πυρακτώσεως βολφραμίου. Γενικά, οι **μονοχρωμάτορες** που χρησιμοποιούνται αποτελούνται από μια σχισμή εισόδου, έναν κατευθυντήρα (φακό ή κάτοπτρο), ένα στοιχείο διασποράς, έναν φακό εστίασης και μια σχισμή εξόδου. Το υλικό κατασκευής της **κυψελίδας** που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να είναι διαπερατό από την ακτινοβολία. Χρησιμοποιείται χαλαζίας για μετρήσεις δειγμάτων στο υπεριώδες και ύαλος ή πλαστικό για μετρήσεις δειγμάτων στο ορατό. Οι **ανιχνευτές** στα φασματοφωτόμετρα UV-Vis είναι συνήθως φωτοδιόδοι, φωτολυχνίες και φωτοπολλαπλασιαστές (Χατζηϊωάννου & Κουμπάρης, 2014).

1.8.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου (IR)

Η φασματοσκοπία IR είναι μία μη καταστροφική τεχνική η οποία δίνει πληροφορίες για τις χαρακτηριστικές ομάδες που φέρει ένα μόριο, αλλά και για τον προσανατολισμό τους στο χώρο. Η περιοχή του υπέρυθρου εκτείνεται από 700 nm έως 1000 μm . Η απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα μόριο προκαλεί διεγέρσεις μεταξύ διαφόρων ενεργειακών σταθμών δόνησεως και περιστροφής του μορίου, ενώ αυτό βρίσκεται στη θεμελιώδη ηλεκτρονιακή κατάσταση. Ένα μόριο απορροφά υπέρυθρη ακτινοβολία μόνο όταν παρατηρείται μεταβολή της διπολικής του ροπής κατά την δόνηση και για μια μεγαλύτερη μεταβολή της διπολικής ροπής παρατηρείται μεγαλύτερη απορρόφηση.

Ο θεωρητικός αριθμός βασικών δονήσεων για ένα μόριο με N αριθμό ατόμων μπορεί να υπολογισθεί με τον τύπο $3N-6$ (για μη γραμμικό μόριο) και $3N-5$ (για γραμμικό μόριο). Η εμφάνιση διαφορετικού αριθμού δονήσεων από τον αναμενόμενο στο φάσμα υπέρυθρου μια ουσίας μπορεί να οφείλεται μεταξύ άλλων σε ανενεργές και εκφυλισμένες δονήσεις. Γενικά, οι δονήσεις ταξινομούνται σε δονήσεις τάσεως (stretching vibrations, ν) και δονήσεις κάμψεως (bending vibrations, δ). Η ισχύς ενός δεσμού και οι μάζες των ατόμων που συμμετέχουν σε αυτόν επηρεάζουν τις συχνότητες των δονήσεων.

Τα φασματοφωτόμετρα υπέρυθρου αποτελούνται από μια πηγή ακτινοβολίας, κυψελίδες, έναν μονοχρωμάτορα, έναν ανιχνευτή και ένα όργανο αναγνώσεως. Αντίθετα με τα φασματοφωτόμετρα UV-Vis, το δείγμα τοποθετείται πριν τον μονοχρωμάτορα με στόχο τη μείωση της παράσιτης ακτινοβολίας και την προστασία του ανιχνευτή. Οι πηγές υπέρυθρης ακτινοβολίας είναι κυρίως λυχνίες πυρακτώσεως Nernst ($0,4-20\mu\text{m}$) και Globar ($1-10\mu\text{m}$). Ως επιλογείς μήκους κύματος χρησιμοποιούνται ανακλαστικά φράγματα και κοίλα κάτοπτρα. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται για τη φασματοσκοπία υπέρυθρου είναι θερμικοί (θερμοζεύγος) ή φωτοαγωγάμοι (Χατζηϊωάννου & Κουμπάρης, 2014).

Τα φασματοφωτόμετρα υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) αποτελούν μια νέα κατηγορία φασματοφωτομέτρων, τα οποία λειτουργούν χωρίς μονοχρωμάτορα. Τα τρία βασικά μέρη των οργάνων αυτών είναι η πηγή της υπέρυθρης ακτινοβολίας, το συμβολόμετρο και ο ανιχνευτής υπέρυθρου. Η χρήση του συμβολόμετρου επιτρέπει να κατευθύνονται στον ανιχνευτή όλες οι συχνότητες ταυτόχρονα και όχι μόνο μία τη φορά, αντιμετωπίζοντας έτσι τους περιορισμούς των συμβατικών φασματοφωτομέτρων διασποράς (Κουή, Αβδελίδης, Θεοδωρακέας, & Χειλάκου, 2015). Πλεονεκτήματα της φασματοσκοπίας FT-IR είναι η χρήση της και στο άπω IR, ο αυξημένος λόγος σήματος προς θόρυβο, η μεγάλη διακριτική ικανότητα και ο μικρότερος χρόνος καταγραφής του φάσματος (Χατζηϊωάννου & Κουμπάρης, 2014).

Η τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance, ATR) είναι μια μη καταστρεπτική τεχνική η οποία συνδυάζεται με την τεχνική FT-IR. Σημαντικό πλεονέκτημα της είναι ότι το δείγμα δεν χρειάζεται επεξεργασία πριν την μέτρησή του. Το δείγμα τοποθετείται σε κρύσταλλο διαπερατού υλικού με υψηλό δείκτη διάθλασης. Η ακτινοβολία προσπίπτοντας στον κρύσταλλο υφίσταται ολική

ανάκλαση στη διεπιφάνεια κρυστάλλου-δείγματος και εισέρχεται στο δείγμα σε μήκος μερικών μm . Η ακτινοβολία που εισέρχεται στο δείγμα ονομάζεται φθίνον κύμα, το οποίο εξασθενεί στις περιοχές του φάσματος IR όπου το δείγμα απορροφά ενέργεια. Όταν η ακτινοβολία προσπίπτει υπό κατάλληλη γωνία υφίσταται πολλαπλές ανακλάσεις μετά από τις οποίες εξέρχεται από τον κρύσταλλο και κατευθύνεται στον ανιχνευτή (Κουή, Αβδελίδης, Θεοδωρακέας, & Χειλάκου, 2015).

1.8.3 Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Η δυναμική σκέδαση φωτός ή φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων είναι μια γρήγορη, μη επεμβατική, ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για τον προσδιορισμό της υδροδυναμικής διαμέτρου των νανοσωματιδίων. Στη δυναμική σκέδαση φωτός μετράται η εξάρτηση των διακυμάνσεων της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας με τον χρόνο (Bhattacharjee, 2016). Οι διακυμάνσεις είναι αποτέλεσμα της κίνησης Brown των σωματιδίων, δηλαδή της τυχαίας κίνησης των σωματιδίων λόγω του βομβαρδισμού τους από τα μόρια του διαλύτη που τα περιβάλλει, ενώ συνδέονται με τον μεταφορικό συντελεστή διάχυσης και το μέγεθος των νανοσωματιδίων. Η κίνηση Brown εξαρτάται από τη θερμοκρασία και έτσι γίνεται κατανοητό ότι για πειράματα που βασίζονται στη δυναμική σκέδαση φωτός θα πρέπει η θερμοκρασία να παραμένει σταθερή (Stetefeld, McKenna, & Patel, 2016).

Η υδροδυναμική διάμετρος που υπολογίζεται με την τεχνική DLS είναι ίση με τη διάμετρο μιας σφαίρας με μεταφορικό συντελεστή διάχυσης ίσο με αυτόν του σωματιδίου που χαρακτηρίζεται. Η υδροδυναμική διάμετρος είναι μια υποθετική μέτρηση, διότι στην πραγματικότητα τα διεσπαρμένα σωματίδια που μετρούνται ενυδατώνονται και μαζί με την κορώνα τους συχνά δεν είναι σφαιρικά. Η σύνθεση της κορώνας και κατά κύριο λόγο της μαλακής κορώνας μεταβάλλεται ανάλογα με την ιοντική ισχύ, το είδος των μορίων που υπάρχουν στο διάλυμα και τη φύση των διαλυτών. Επομένως, το DLS δίνει σαν αποτέλεσμα ένα ενδεικτικό μέγεθος ενός συστήματος κολλοειδών.

Στα περισσότερα όργανα που χρησιμοποιούνται στη δυναμική σκέδαση φωτός, συμπεριλαμβανομένης και της σειράς Zetasizer Nano της Malvern που χρησιμοποιήθηκε σε αυτήν την εργασία, υπάρχουν τρία βασικά τμήματα: το λέιζερ, η θέση τοποθέτησης του δείγματος και ο ανιχνευτής φωτός. Το λέιζερ που χρησιμοποιείται στα όργανα Malvern Zetasizer είναι λέιζερ ηλίου-νέου, οι κυψελίδες

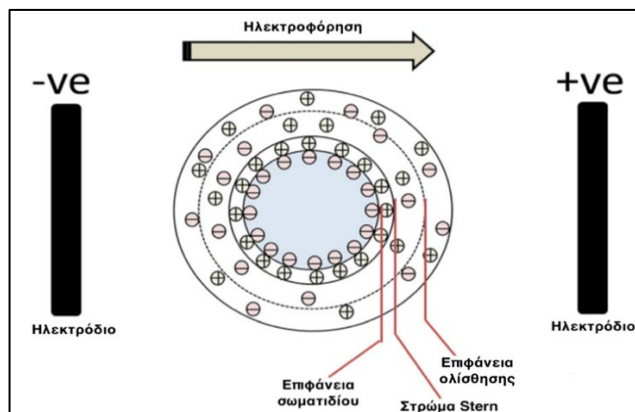
είναι πλαστικές με ενσωματωμένα ηλεκτρόδια ώστε να είναι δυνατή και η μέτρηση του ζ δυναμικού, ενώ στα σύγχρονα όργανα DLS τοποθετούνται ανιχνευτές στιβάδας φωτοδιόδων (Avalanche Photo Diode, APD). Κάποια όργανα έχουν επίσης τη δυνατότητα ανίχνευσης των πληροφοριών σκέδασης σε γωνία 173° , μια διαδικασία γνωστή και ως ανίχνευση οπισθοσκέδασης. Η διαδικασία αυτή παρουσιάζει πλεονεκτήματα αφού το λέιζερ δεν αλληλεπιδρά με όλο το δείγμα και έτσι περιορίζεται το πρόβλημα της πολλαπλής σκέδασης. Αποκλίσεις στα αποτελέσματα λόγω σωματιδίων σκόνης περιορίζονται, αφού συνήθως τα σωματίδια αυτά σκεδάζουν την ακτινοβολία προς τα μπροστά, όπου το σύστημα οπισθοσκέδασης δεν μπορεί να ανιχνεύσει ακτινοβολίες.

Η σκέδαση του φωτός αξιοποιείται επίσης και στον προσδιορισμό του ζ δυναμικού σωματιδίων. Το ζ δυναμικό είναι το δυναμικό ενός κολλοειδούς σωματιδίου που κινείται μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο. Αντικατοπτρίζει τη διαφορά δυναμικού μεταξύ του διπλού στρώματος ιόντων των κινούμενων φορτισμένων σωματιδίων και του στρώματος διαλύτη που τα περιβάλλει στο επίπεδο ολίσθησης (Bhattacharjee, 2016).

Σε διασπορά, γύρω από ένα φορτισμένο σωματίδιο σχηματίζεται ένα διπλό στρώμα αντισταθμιστικών ιόντων. Το εσωτερικό στρώμα Stern αποτελείται κυρίως από ιόντα με αντίθετο φορτίο σε σχέση με το φορτίο του σωματιδίου. Γύρω από το στρώμα Stern δημιουργείται ένα διάχυτο στρώμα ιόντων, τα οποία φέρουν φορτία ίδια και αντίθετα από αυτά του στρώματος Stern. Στο διάχυτο στρώμα υπάρχει το επίπεδο ολίσθησης, το οποίο είναι το επίπεδο επαφής των κινούμενων σωματιδίων και του στρώματος του διαλύτη που τα περιβάλλει. Το ζ δυναμικό είναι η τιμή του δυναμικού σε αυτή τη διεπαφή σωματιδίων-διαλύτη (Swarbrick, 2007), (Bhattacharjee, 2016).

Όταν διεσπαρμένα φορτισμένα σωματίδια βρεθούν μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, παρατηρείται κίνησή τους προς το ηλεκτρόδιο με το αντίθετο φορτίο (Εικόνα 16). Για την μέτρηση του ζ δυναμικού γίνεται εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου και μετράται η ηλεκτροφορητική κίνηση των σωματιδίων σύμφωνα με τη μέθοδο ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός. Κατά τη διάρκεια της μεθόδου αυτής η προσπίπτουσα στα κινούμενα σωματίδια ακτίνα λέιζερ σκεδάζεται. Η συχνότητα του φωτός που σκεδάζεται μεταβάλλεται ανάλογα με την ταχύτητα των σωματιδίων (μετατόπιση Doppler). Η σκεδαζόμενη ακτινοβολία συνδυάζεται με μία δέσμη αναφοράς για τον προσδιορισμό της μετατόπισης Doppler. Από τη μετατόπιση Doppler προσδιορίζεται η ταχύτητα των σωματιδίων και το ζ δυναμικό. Για τη μέτρηση του ζ

δυναμικού τα δείγματα τοποθετούνται σε κυψελίδες με ενσωματωμένα ηλεκτρόδια χαλκού επικαλυμμένα με χρυσό (Bhattacharjee, 2016).



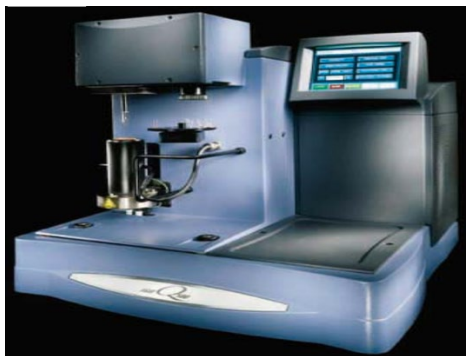
Εικόνα 16: Απεικόνιση της κίνησης ενός αρνητικά φορτισμένου σωματιδίου προς ένα θετικό ηλεκτρόδιο κατά τη διάρκεια ηλεκτροφόρησης και του ηλεκτρικού διπλού στρώματος ιόντων που το περιβάλλει. Μεταφρασμένη εικόνα από (Bhattacharjee, 2016).

1.8.4 Θερμοσταθμική ανάλυση (Thermogravimetric Analysis, TGA)

Η θερμοσταθμική ανάλυση είναι μια τεχνική στην οποία προσδιορίζονται οι ποσοτικές μεταβολές στη μάζα ενός δείγματος, καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία του σε ελεγχόμενο περιβάλλον. Η τεχνική αυτή μπορεί να χαρακτηρίσει υλικά τα οποία παρουσιάζουν μεταβολές στο βάρος τους λόγω φαινομένων όπως η απορρόφηση ή η εκρόφηση, η διάσπαση, η οξείδωση και η αναγωγή. Έτσι, οι μετρήσεις έχουν σαν αποτέλεσμα τον προσδιορισμό της σύνθεσης υλικών και της σταθερότητας τους σε σχέση με τη θερμοκρασία (Mohomed, 2016). Το περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιείται μια μέτρηση θερμοσταθμικής ανάλυσης είναι ελεγχόμενο και η ατμόσφαιρα ελέγχεται με τη χρήση αδρανούς ή δραστικού αερίου.

Κατά τη διάρκεια μιας μέτρησης TGA δημιουργείται ένα συνεχές διάγραμμα μάζας συναρτήσει της μεταβολής της θερμοκρασίας ή του χρόνου, το οποίο λέγεται είτε θερμογράφημα (thermograph) είτε καμπύλη θερμικής διάσπασης (thermal decomposition curve). Ένα όργανο θερμοσταθμικής ανάλυσης αποτελείται από έναν αναλυτικό ζυγό, έναν φούρνο, ένα σύστημα καθαρισμού παροχής αερίου για την διατήρηση είτε αδρανούς είτε δραστικής ατμόσφαιρας και έναν μικροεπεξεργαστή ή μικροϋπολογιστή (Πολύζου, 2017). Γενικά, ένα όργανο θερμοσταθμικής ανάλυσης (Εικόνα 17) πρέπει να ελέγχει τον ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας του δείγματος με μεγάλη ακρίβεια και να μετρά τη μεταβολή της θερμοκρασίας και της μάζας στο

δείγμα, όσο αυτό θερμαίνεται ή βρίσκεται σε ισοθερμική θερμοκρασία (Mohomed, 2016).



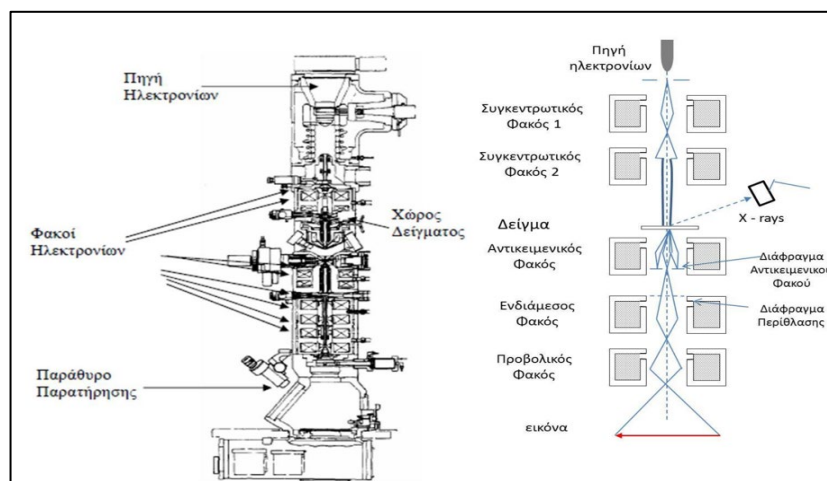
Εικόνα 17: Όργανο θερμοσταθμικής ανάλυσης το οποίο χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία (Q500, TA Instruments) (Mohomed, 2016).

1.8.5 Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης είναι μια μέθοδος απεικόνισης. Με τη μέθοδο αυτή καθίσταται δυνατή η απεικόνιση των δομικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών της επιφάνειας ενός σωματιδίου με υψηλή διακριτική ικανότητα (Αναστασοπούλου, Δρίτσα, Θεοφανίδης, Υφαντής, & Υφαντής, 2015). Το TEM είναι μια τεχνική μικροσκοπίας στην οποία μια δέσμη ενεργών ηλεκτρονίων περνά μέσω ενός δείγματος και αλληλεπιδρά με αυτό, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας εικόνας.

Στην ηλεκτρονική μικροσκοπία τα δείγματα που αναλύονται είναι λεπτά με αποτέλεσμα τα ταχέως κινούμενα ηλεκτρόνια (πρωτογενή), τα οποία εισέρχονται στο δείγμα και αλληλεπιδρούν με αυτό να σκεδάζονται ελάχιστες φορές. Γενικά, η πιθανότητα σκέδασης εξαρτάται από την μέση ελεύθερη διαδρομή των ηλεκτρονίων (Κυριακίδης & Μπίνας, 2014). Τα δείγματα πρέπει να επεξεργάζονται πριν την διαδικασία παρατήρησης τους με διαδικασίες όπως η αφυδάτωση και η χρώση (Αναστασοπούλου, Δρίτσα, Θεοφανίδης, Υφαντής, & Υφαντής, 2015).

Για να μπορέσει ένα μικροσκόπιο TEM να απεικονίσει τη δομή ενός δείγματος θα πρέπει αυτό να είναι λεπτό ($\sim 500\text{\AA}$), ώστε το 50-90% των ηλεκτρονίων που προσπίπτουν στο δείγμα να διέρχονται μέσα από αυτό. Ένα όργανο TEM αποτελείται από μία πηγή ηλεκτρονίων στο πάνω άκρο, ένα σύστημα παρακολούθησης (οθόνη ή φωτογραφική πλάκα) στο κάτω άκρο, μία βάση για την τοποθέτηση του δείγματος και έναν κατάλληλο συνδυασμό φακών (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης και της πορείας της δέσμης ηλεκτρονίων κατά τη λειτουργία του (Κυριακίδης & Μπίνας, 2014).

Τα ηλεκτρόνια εκπέμπονται από μία πηγή ηλεκτρονίων στο πάνω μέρος του μικροσκοπίου. Με τη βοήθεια συγκεντρωτικών μαγνητικών φακών μπορεί να προσδιοριστεί η περιοχή που θα φωτίζεται και η εστίαση της δέσμης των ηλεκτρονίων. Η δέσμη εστιάζεται σε μία περιοχή μεγέθους ελάχιστων μm^2 στο επίπεδο του αντικειμένου. Αφού τα ηλεκτρόνια αλληλεπιδράσουν με το δείγμα, οδηγούνται μέσω συγκεντρωτικών φακών (μαγνητικού τύπου) σε μία φθορίζουσα οθόνη για την απεικόνιση του δείγματος (Κυριακίδης & Μπίνας, 2014).

1.9 Σκοπός της μεταπτυχιακής εργασίας

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η παρασκευή και ο χαρακτηρισμός υβριδικών μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίων του σιδήρου, τα οποία φέρουν πολυμερική επικάλυψη αλγινικού οξέος και είναι φορτωμένα με τον αναστολέα TDZD-8 της GSK-3 β κινάσης. Η σύνθεση των νανοσωματιδίων έγινε με τη διαδικασία της υδρολυτικής αλκαλικής καταβύθισης. Για την επίτευξη καλύτερης σταθερότητας και βιοσυμβατότητας των νανοσωματιδίων τροποποιήθηκε η επιφάνειά τους με τη σύζευξη αλυσίδων PEG. Στα μαγνητικά νανοσωματίδια φορτώθηκε το φάρμακο TDZD-8 και μελετήθηκε η αποδέσμευσή του σε διάστημα 24 ωρών. Η περαιτέρω αξιολόγηση των μαγνητικών νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε με πειράματα αιμόλυσης και *in vitro* κυτταρικά πειράματα σε φυσιολογικούς ινοβλάστες και στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος SH-SY5Y.

2. Πειραματικό Μέρος

2.1 Όργανα

Για την εκτέλεση των πειραματικών διαδικασιών αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας (Mettler, AE 166 Deltarange)
- Μηχανικός αναδευτήρας και θερμαντική πλάκα (Stuart, SB-162-3)
- Φυγόκεντρος (Hermle, Z32HK)
- Λουτρό υπερήχων (Powersonic, 405 series)
- pH-μετρο (Hanna, HI207)
- Μηχανικός αναδευτήρας vortex (Labinco, L46)
- Όργανο θερμοσταθμικής ανάλυσης TGA (TA Instruments, Q500)
- Όργανο δυναμικής σκέδασης φωτός DLS (Malvern, Nano Zeta Sizer)
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis (Shimadzu, UV-1800)
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis (Hitachi Digilab U-2800)
- Φασματοφωτόμετρο υπερύθρου ATR FT-IR (Digilab, FTS 3000 Excalibur Series με PIKE MIRacle adapter για το ATR)
- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης TEM (JEOL, JEM-2100)
- Επωαστικός θάλαμος (Bioline Scientific)
- Λυοφιλοποιητής (Labconco, Freezone 1)
- Συσκευή κυτταρομετρίας ροής (FACS) (Coulter, Epics XL-MCL)
- Συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκων (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Συνεστιακό μικροσκόπιο (Leica SP5, Γερμανία)

2.2 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών παρατίθενται παρακάτω:

2.2.1 Υλικά σύνθεσης των μαγνητικών νανοσωματιδίων και των τεχνικών χαρακτηρισμού τους

- Επταένυδρος θειικός σίδηρος ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Chem Lab NV)
- Αλγινικό νάτριο (viscosity of 2% solution at 25 °C: ~250 cps) (Sigma-Aldrich)

- Υδροχλωρικό οξύ HCl 37% (Carlo Erba)
- Υδατικό διάλυμα αμμωνίας NH₄OH 30% (Carlo Erba)
- Απεσταγμένο νερό (dH₂O)
- Υδατικό διάλυμα υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης (NH₂OH-HCl) 100g/l (Alfa Aesar)
- Υδατικό διάλυμα 1,10-φαινανθρολίνης 1g/l (Alfa Aesar)
- Υδατικό διάλυμα οξικού νατρίου (CH₃COONa) 1,2 M (Alfa Aesar)
- α-μεθοξυ-ω-αμινο-πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (mPEG-NH₂) μοριακού βάρους 2000 (Rapp Polymere)
- N,N'-διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (DIC) (Sigma-Aldrich)
- Άνυδρο 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο (HOBt) (Sigma-Aldrich)
- N,N-διϊσοπροπυλαιθυλαμίνη (DIPEA) (Merck Chemicals)
- N,N-διμεθυλφορμαμίδιο (DMF) anhydrous, amine free, 99,9% (Alfa Aesar)
- Χλωριούχο νάτριο NaCl (Merck Chemicals)
- Πλάσμα αίματος
- Θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)
- Μεμβράνες διαπίδυσης
- Μαγνητάκια
- Μαγνήτες νεοδυμίου

2.2.2 Υλικά φόρτωσης και αποδέσμευσης του αναστολέα TDZD-8

- Διάλυμα 4-βενζυλ-2-μεθυλ-1, 2, 4-θειαδιαζολιδιν-3, 5-δiónης TDZD-8 (Sigma-Aldrich) (1mg TDZD-8 διαλυμένο σε 1ml ACN:dH₂O (70:30))
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer, PB) 1mM, pH=7,4. (Παρασκευάζονται διαλύματα: α) 17,42g K₂HPO₄ (Lach-Ner) σε 100ml dH₂O και β) 13,61g KH₂PO₄ (Lach-Ner) σε 100ml dH₂O. 8,02ml από το α διάλυμα και 1,98ml από το β αναμιγνύονται και αραιώνονται με dH₂O σε τελικό όγκο 1000ml. Ρύθμιση pH: 0,4g NaOH (Lach-Ner) σε 100ml dH₂O))
- Ακετονιτρίλιο (ACN) (Fischer Chemical)
- Διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂) (Fischer Chemical)
- Απεσταγμένο νερό (dH₂O)
- Μεμβράνες διαπίδυσης

2.2.3 Υλικά φόρτωσης και διαρροής της χρωστικής Rhodamine 6G

- Διάλυμα Rhodamine 6G (N-(2-Aminoethyl)rhodamine 6G-amide bis(trifluoroacetate)) (Sigma-Aldrich) (1mg ροδαμίνης/ml dH₂O)
- Υδροχλωρικό άλας 1-αιθυλ-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλ)καρβοδιϊμιδίου (EDC) (Alfa Aesar)
- Sulfo-NHS (N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt) > 98% (Sigma-Aldrich)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer, PB) pH=7,4
- Απεσταγμένο νερό (dH₂O)
- Μεμβράνες διαπίδυσης

2.2.4 Υλικά δοκιμασίας αιμόλυσης

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffered Saline, PBS) (Sigma-Aldrich) pH=7,4
- Φυσιολογικός ορός
- Δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O)

2.2.5 Υλικά μελέτης κυτταροτοξικότητας σε φυσιολογικούς ινοβλάστες

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffered Saline, PBS) (Sigma-Aldrich) pH=7,4
- Θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)
- Ιωδιούχο προπίδιο (Sigma-Aldrich)
- Θρυψίνη (Trypsin-EDTA solution) (Sigma-Aldrich)
- Φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων

2.2.6 Υλικά μελέτης κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα SH-SY5Y

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffered Saline, PBS) (Sigma-Aldrich) pH=7,4
- Θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)
- 10% βόειος εμβρυϊκός ορός (Fetal Bovine Serum, FBS) (Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα MTT (άλας βρωμίου του 3-(4,5-διμεθυλ-θειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλ-τετραζολίου) (5 mg/ml σε PBS, pH 7,4) (Sigma-Aldrich)
- Διάλυμα οξινισμένης ισοπροπανόλης (0,33ml HCl σε 100ml ισοπροπανόλης (Sigma-Aldrich))

2.2.7 Υλικά μελέτης πρόσληψης των επισημασμένων μαγνητικών νανοσωματιδίων από κύτταρα SH-SY5Y

- Αποστειρωμένες καλυπτρίδες (Borosilicate Glass, VWR)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffered Saline, PBS) (Sigma-Aldrich) pH=7,4
- Αντισώματα anti-Tuj-1 και anti-TOM20 (Sigma-Aldrich)
- Χρωστική TO-PRO-3
- Διάλυμα Mowiol 4-88 (Sigma-Aldrich)

2.3 Πειραματικές διαδικασίες

Οι πειραματικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν στην παρούσα εργασία περιγράφονται παρακάτω.

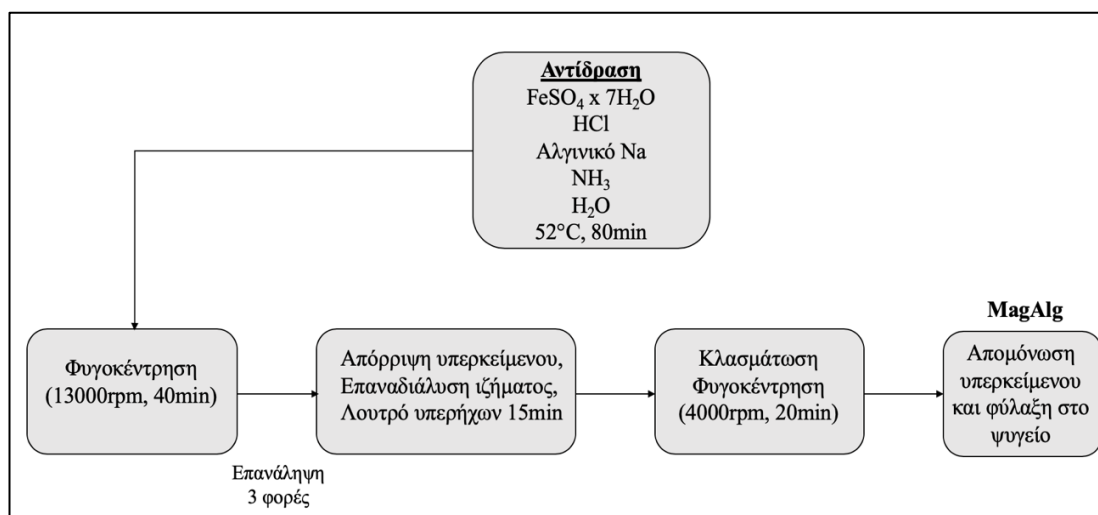
2.3.1 Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg

Η σύνθεση των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της υδρολυτικής αλκαλικής καταβύθισης μιας πρόδρομης ένωσης σιδήρου παρουσία του πολυμερούς αλγινικό νάτριο. Με τη σύνθεση αυτή πραγματοποιείται σχηματισμός οξειδίων σιδήρου μη στοιχειομετρικού μαγνητίτη (μαγκεμίτη/μαγνητίτη).

Επταένυδρος θειϊκός σίδηρος $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,7209g) διαλύεται σε 10ml dH_2O , στο οποίο ήδη έχουν προστεθεί 30μl πυκνό HCl (37%). Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη, η οποία έχει τοποθετηθεί σε υδατόλουτρο, προστίθενται 30ml dH_2O και το πολυμερές αλγινικό νάτριο (0,15g) και αφήνονται υπό μαγνητική ανάδευση και θέρμανση στους $\sim 52^\circ\text{C}$, έως ότου διαλυθεί το πολυμερές. Μετά την διάλυση του πολυμερούς στην τρίλαιμη φιάλη προστίθενται 2,5ml υδατικού διαλύματος αμμωνίας (30%, 0,892g/ml) και μετά από 3min προστίθεται και το υδατικό διάλυμα του Fe. Η αντίδραση διαρκεί 80 λεπτά και πραγματοποιείται στους $\sim 52^\circ\text{C}$ υπό μαγνητική ανάδευση (970rpm) (Εικόνα 19).

Μετά το τέλος της αντίδρασης, η φιάλη με το κολλοειδές αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν εκπλύσεις οι οποίες γίνονται με φυγοκέντρηση (13000rpm, 40min) και επαναδιάλυση των ιζημάτων σε dH_2O για την απομάκρυνση παραπροϊόντων της αντίδρασης. Το προϊόν τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 15min για τη διάσπαση συσσωματωμάτων που τυχόν έχουν σχηματισθεί. Η διαδικασία

των εκπλύσεων επαναλαμβάνεται 3 φορές συνολικά. Ακολουθεί κλασμάτωση με ήπια φυγοκέντρωση (4000rpm, 20min) για την απομάκρυνση των μεγαλύτερων συσσωματωμάτων. Απομονώνεται το μεγαλύτερο μέρος του υπερκείμενου που προέκυψε από τη φυγοκέντρωση, στο οποίο περιέχεται το MagAlg χωρίς τα συσσωματώματα. Το υπερκείμενο χωρίς καμία περαιτέρω επεξεργασία αποθηκεύεται στο ψυγείο.



Εικόνα 19: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας σύνθεσης των μαγνητικών νανοσωματιδίων.

2.3.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ιόντων σιδήρου

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ιόντων σιδήρου Fe^{2+} στα μαγνητικά νανοσωματίδια με χρήση φασματοφωτομέτρου UV-Vis (Hitachi Digilab U-2800). Ο σίδηρος που υπάρχει σε ένα δείγμα ποσοτικοποιείται με την αντίδραση του σιδήρου Fe^{2+} με 1,10-φαινανθρολίνη. Η αντίδραση έχει σαν προϊόν ένα σύμπλοκο του οποίου η απορρόφηση μετράται. Ο νόμος του Beer μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης. Για να σχηματιστεί το παραπάνω σύμπλοκο, ο σίδηρος Fe^{3+} πρέπει πρώτα να αναχθεί σε Fe^{2+} μέσω της αντίδρασής του με υδροχλωρική υδροξυλαμίνη.

Αρχικά, ποσότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων (50μl) αναμιγνύεται με 100μl π. HCl (37%) στους 37°C για 20 λεπτά, με σκοπό τη διάσπαση των μαγνητικών νανοσωματιδίων σε ιόντα σιδήρου. Το δείγμα αποκτά κίτρινη απόχρωση και στη συνέχεια αραιώνεται σε τελικό όγκο 10ml dH₂O. Σε ποσότητα 1-5ml (ανάλογα με το πόσο έντονο είναι το κίτρινο χρώμα που προέκυψε) από το διάλυμα αυτό προστίθενται 100μl υδροχλωρικής υδροξυλαμίνης ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) (100g/l), 1ml 1,10-φαινανθρολίνης (1g/l) και 1,5ml οξικού νατρίου (CH_3COONa) (1,2 M). Το νέο διάλυμα αραιώνεται με

dH₂O σε τελικό όγκο 10 ml και αφήνεται στο σκοτάδι για 10 λεπτά. 3ml του διαλύματος μεταφέρονται σε κυψελίδα και γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο στα 510 nm. Τέλος, η συγκέντρωση των ιόντων σιδήρου υπολογίζεται με την βοήθεια πρότυπης καμπύλης και εκφράζεται ως % w/v σε Fe₂O₃.

2.3.3 Προσδιορισμός υδροδυναμικής διαμέτρου, ζ δυναμικού και PDI

Η υδροδυναμική διάμετρος, το ζ δυναμικό και το PDI των μαγνητικών νανοσωματιδίων μετρήθηκαν σε όργανο δυναμικής σκέδασης φωτός (Malvern, Nano Zeta Sizer). Για τη μέτρηση παρασκευάζεται αραιό διάλυμα μαγνητικών νανοσωματιδίων συγκέντρωσης 0,02% w/v Fe₂O₃ και ~700μl από αυτό τοποθετούνται σε κυψελίδα. Οι τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, του ζ δυναμικού και του PDI αποτελούν τον μέσο όρο τριών μετρήσεων. Για τον προσδιορισμό του ζ δυναμικού γίνεται χρήση της LDV (Laser Doppler Velocimetry).

2.3.4 Προσδιορισμός ποσοστού πολυμερούς

Το ποσοστό του πολυμερούς των υβριδικών μαγνητικών νανοσωματιδίων προσδιορίστηκε με χρήση της τεχνικής θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA). Οι μετρήσεις έγιναν σε ατμόσφαιρα αζώτου.

Μικρή ποσότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων (~100μl) τοποθετείται σε ειδικό δειγματοφορέα (pan holder) και εισάγεται στον φούρνο του μηχανήματος TGA. Κατά τη διαδικασία θέρμανσης του δείγματος, η θερμοκρασία αυξάνεται με σταθερό ρυθμό 10°C/min από θερμοκρασία δωματίου έως τους 110°C, όπου παραμένει σταθερή για 30 λεπτά. Σε αυτό το σημείο της μέτρησης επιτυγχάνεται πλήρης εξάτμιση του νερού που υπάρχει στο δείγμα. Στη συνέχεια, κατά τη διάρκεια αύξησης της θερμοκρασίας έως τους 700°C με σταθερό ρυθμό, παρατηρείται μείωση της μάζας του δείγματος, η οποία οφείλεται στην αποικοδόμηση του πολυμερούς.

Για τον υπολογισμό του ποσοστού του πολυμερούς θα πρέπει να υπολογιστεί η % υπολειμματική μάζα του δείγματος στο τέλος της μέτρησης. Γενικά, ο υπολογισμός της % υπολειμματικής μάζας για κάθε χρονική στιγμή της μέτρησης γίνεται κάνοντας χρήση των δεδομένων απώλειας μάζας του δείγματος μέσω του τύπου:

$$\% \text{ Υπολειμματική μάζα} = \frac{\text{Μάζα (t}_0\text{)} - (\text{Μάζα (t}_0\text{)} - \text{Μάζα (t)})}{\text{Μάζα (t}_0\text{)}} \times 100\% \quad (5)$$

Όπου, μάζα (t_0) είναι η μάζα του δείγματος σε χρόνο t_0 και μάζα (t) είναι η μάζα του δείγματος σε χρόνο t . Ως χρόνος t_0 ορίζεται το σημείο της μέτρησης στο οποίο έχει εξατμιστεί το νερό του δείγματος και ως χρόνος t κάθε χρονική στιγμή της μέτρησης μετά τον χρόνο t_0 . Αφαιρώντας την % υπολειμματική μάζα του δείγματος στο τέλος της μέτρησης από τη συνολική μάζα που είχε το δείγμα (100%) στο σημείο ολικής εξατμίσσης του νερού βρίσκουμε την % απώλεια μάζας του δείγματος. Συνυπολογίζοντας την % υπολειμματική μάζα του σκέτου πολυμερούς (αλγινικού) μετά από αντίστοιχη μέτρηση TGA, προκύπτει το % ποσοστό του πολυμερούς των νανοσωματιδίων.

2.3.5 Μελέτη μαγνητικών ιδιοτήτων

Η μελέτη των μαγνητικών ιδιοτήτων των μαγνητικών νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της μαγνητοφόρησης. Στη μέθοδο αυτή 3ml διαλύματος μαγνητικών νανοσωματιδίων συγκέντρωσης 0,0125% w/v Fe_2O_3 προστίθενται σε κυψελίδα, η οποία τοποθετείται σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis (Hitachi Digilab U-2800). Δίπλα στην κυψελίδα τοποθετείται μαγνήτης νεοδυμίου και η μέτρηση της απορρόφησης ξεκινά. Κατά τη διάρκεια της μέτρησης τα μαγνητικά νανοσωματίδια έλκονται προς τον μαγνήτη με αποτέλεσμα η συγκέντρωση τους στη κυψελίδα να μειώνεται και συνεπακόλουθα μειώνεται και η τιμή της απορρόφησης. Μεγαλύτερη μείωση της απορρόφησης υποδεικνύει και καλύτερη απόκριση των νανοσωματιδίων στο μαγνητικό πεδίο. Η απορρόφηση μετράται συνεχώς για τουλάχιστον 6000 δευτερόλεπτα στα 450nm. Από τα αποτελέσματα υπολογίζεται ο δείκτης απορρόφησης της μαγνητοφόρησης (Magnetophoresis absorbance index) των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg ο οποίος προκύπτει από τον τύπο:

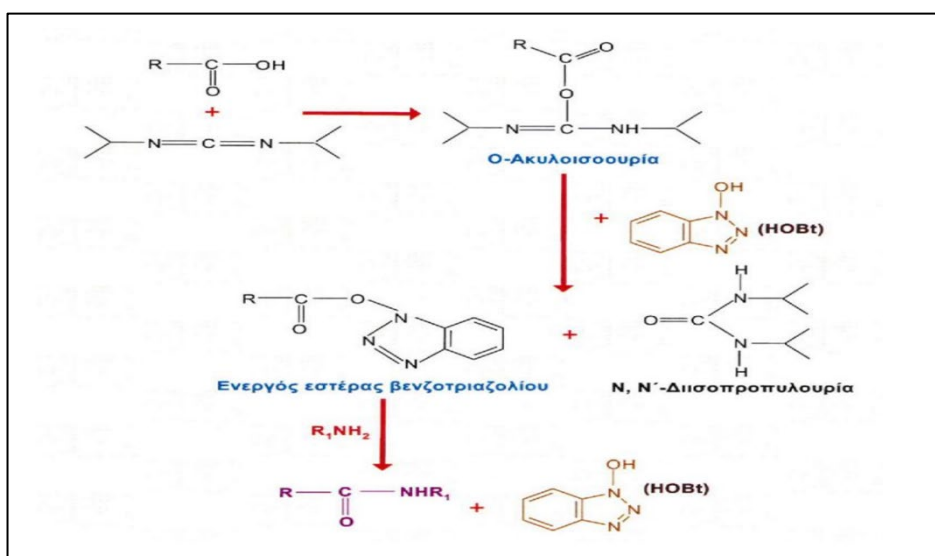
$$\text{Δείκτης απορρόφησης μαγνητοφόρησης} = \frac{\text{Απορρόφηση (i)} - \text{Απορρόφηση (f)}}{\text{Απορρόφηση (i)}} \quad (6)$$

Όπου, απορρόφηση (i) είναι η τιμή της απορρόφησης σε χρόνο 2000 δευτερόλεπτα, όπου η μείωση της απορρόφησης είναι πλέον πιο ομαλή και απορρόφηση (f) είναι η τιμή της απορρόφησης στα 6000 δευτερόλεπτα.

2.3.6 Πρόσδεση α-μεθοξυ-ω-αμινο-πολυ(αιθυλενογλυκόλης) (mPEG-NH₂) στα μαγνητικά νανοσωματίδια

Στα μαγνητικά νανοσωματίδια προσδέθηκε το πολυμερές α-μεθοξυ-ω-αμινο-πολυ(αιθυλενογλυκόλης) (mPEG-NH₂). Η πρόσδεση πραγματοποιήθηκε με τον σχηματισμό αμιδικού δεσμού μεταξύ της αμινομάδας της mPEG-NH₂ και των καρβοξυλομάδων του αλγινικού οξέος. Για τον σχηματισμό του αμιδικού δεσμού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος καρβοδιϊμιδίων και συγκεκριμένα τα αντιδραστήρια σύζευξης N,N'-διϊσοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο (DIC) και το 1-υδροξυβενζοτρίαζόλιο (HOBt), το οποίο δρα σαν βοηθητικό πυρηνόφιλο.

Η αντίδραση σύζευξης αρχικά περιλαμβάνει τον σχηματισμό του ενεργού ενδιάμεσου της O-ακυλο-ισοουρίας, που προκύπτει με την αντίδραση του καρβοδιϊμιδίου με την καρβοξυλομάδα του αλγινικού (Εικόνα 20). Η μέθοδος των καρβοδιϊμιδίων παρουσιάζει δύο σημαντικά μειονεκτήματα. Το πρώτο είναι ο ενδομοριακός σχηματισμός των παραγώγων της N-ακυλο-ουρίας, τα οποία προκύπτουν από την O-ακυλο-ισοουρία. Το δεύτερο μειονέκτημα είναι η ρακεμοποίηση. Τα μειονεκτήματα αυτά περιορίζονται με τη χρήση πυρηνόφιλων αντιδραστηρίων, όπως είναι το 1-υδροξυ-βενζοτρίαζόλιο (HOBt) για τη δημιουργία ενεργών εστέρων. Το HOBt προσβάλλει την O-ακυλο-ισοουρία και σχηματίζει ένα πολύ ισχυρό ακυλιωτικό μέσο, τον ενεργό εστέρα του βενζοτρίαζολίου, ο οποίος αντιδρά ταχύτατα με την αμινομάδα του αμινο-συστατικού για τη δημιουργία αμιδικού δεσμού (Montalbetti & Falque, 2005).



Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση αντίδρασης σχηματισμού αμιδικού δεσμού με χρήση των αντιδραστηρίων DIC/HOBt (Τζούμπα, 2015).

Η διαδικασία πρόσδεσης της mPEG-NH₂ στην επιφάνεια των μαγνητικών νανοσωματιδίων ξεκινά με την προσθήκη 1ml MagAlg σε μεμβράνη διαπίδυσης. Η μεμβράνη τοποθετείται σε 1 λίτρο dH₂O, στο οποίο έχει γίνει προσθήκη HCl, ώστε το pH να ρυθμιστεί στο 4,3-4,5. Μετά από ~4 ώρες γίνεται αλλαγή του νερού και το pH ρυθμίζεται ξανά. Σε διάρκεια 48 ωρών το νερό ανανεώνεται τουλάχιστον 3 φορές. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με σκοπό την πρωτονίωση των καρβοξυλομάδων του αλγινικού των νανοσωματιδίων. Μετά το τέλος της διαδικασίας το δείγμα MagAlg φυγοκεντρείται (15000rpm, 20min), το υπερκείμενο απορρίπτεται και γίνεται προσθήκη 1ml N,N-διμεθυλφορμαμιδίου (DMF). Ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος σε λουτρό υπερήχων και φυγοκέντρωση (15000rpm, 20min). Η παραπάνω διαδικασία (φυγοκέντρωση, επαναδιάλυση) επαναλαμβάνεται 2 ακόμα φορές. Μετά την τρίτη επαναδιάλυση σε DMF τα νανοσωματίδια είναι έτοιμα για την αντίδραση.

Οι αναλογίες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται είναι -COOH : mPEG-NH₂= 1:3 και mPEG-NH₂ : DIC,HOBt=1:4. Η διαδικασία της αντίδρασης ξεκινά με τη διάλυση των απαραίτητων ποσοτήτων της mPEG-NH₂ και του HOBt σε DMF. Στο MagAlg προστίθεται το διάλυμα της mPEG-NH₂ και ακολουθεί ανάμιξη σε vortex για ~20 λεπτά. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για την προσθήκη 10μl N,N-διϊσοπροπυλαιθυλαμίνης (DIPEA), του διαλύματος HOBt και του DIC. Μετά την προσθήκη του τελευταίου αντιδραστηρίου η αντίδραση πραγματοποιείται στο vortex για ~24 ώρες. Ακολουθούν εκπλύσεις για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων, οι οποίες γίνονται με φυγοκέντρωση (15000rpm, 20min) και επαναδιάλυση σε 1ml DMF. Η διαδικασία των εκπλύσεων επαναλαμβάνεται ακόμα δύο φορές. Η αντίδραση επαναλαμβάνεται τρεις φορές συνολικά.

Μετά την τρίτη επανάληψη της αντίδρασης πραγματοποιούνται δύο εκπλύσεις των μαγνητικών νανοσωματιδίων σε DMF και ακόμα δύο εκπλύσεις σε dH₂O. Τα πεγκυλιωμένα νανοσωματίδια (MagAlg-Peg) αποθηκεύονται στο ψυγείο.

Ακολουθεί προσδιορισμός της υδροδυναμικής διαμέτρου, του ζ δυναμικού, του PDI και της συγκέντρωσης των ιόντων σιδήρου των μαγνητικών νανοσωματιδίων. Επίσης, προσδιορίζεται το ποσοστό της PEG που προστέθηκε στα μαγνητικά νανοσωματίδια μέσω της τεχνικής της θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA). Για την επιβεβαίωση της πρόσδεσης της mPEG-NH₂ στα νανοσωματίδια πραγματοποιήθηκε μελέτη δειγμάτων (σε μορφή σκόνης) νανοσωματιδίων MagAlg και MagAlg-Peg και του πολυμερούς mPEG-NH₂ με φασματοσκοπία υπερύθρου (ATR FT-IR).

2.3.7 Μελέτες σταθερότητας των μαγνητικών νανοσωματιδίων

Στα πεγκυλιωμένα νανοσωματίδια έγιναν μελέτες σταθερότητας στον χρόνο, σε NaCl, πλάσμα αίματος και θρεπτικό υλικό RPMI. Η σταθερότητα προσδιορίστηκε με μελέτη της υδροδυναμικής διαμέτρου, του ζ δυναμικού και του PDI των νανοσωματιδίων σε όργανο δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS).

Σταθερότητα στο χρόνο. Για τον προσδιορισμό της σταθερότητας στον χρόνο σε θερμοκρασία 8°C (ψυγείο) μετρήθηκε η υδροδυναμική διάμετρος, το ζ δυναμικό και το PDI αραιών διαλυμάτων νανοσωματιδίων MagAlg και MagAlg-Peg, σε διάστημα 30 και 90 ημερών από την ημέρα παρασκευής τους. Οι τιμές συγκρίνονταν με τις αντίστοιχες τιμές που είχαν ληφθεί την ημέρα παρασκευής των νανοσωματιδίων.

Σταθερότητα σε NaCl. Ο προσδιορισμός της σταθερότητας σε NaCl πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη μικρής ποσότητας (~50μl) νανοσωματιδίων MagAlg-Peg σε υδατικά διαλύματα NaCl διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,01M-1M). Τα δείγματα παρέμεναν σε επωαστικό θάλαμο για μία ώρα στους 37°C. Μετά το τέλος της επώασης προσδιορίζονταν οι τιμές της υδροδυναμικής διαμέτρου, του ζ δυναμικού και του PDI των δειγμάτων και συγκρίνονταν με τις τιμές του αρχικού δείγματος MagAlg-Peg.

Σταθερότητα σε πλάσμα αίματος και θρεπτικό υλικό RPMI. Για τον προσδιορισμό της σταθερότητας σε πλάσμα και RPMI έγινε προετοιμασία δειγμάτων, με προσθήκη μικρής ποσότητας νανοσωματιδίων MagAlg-Peg σε διαλύματα πλάσματος (50% v/v πλάσμα και 50% v/v dH₂O) και RPMI αντίστοιχα. Τα δείγματα παρέμεναν σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 1, 6, 24 και 48 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης γινόταν μια ήπια φυγοκέντρωση (3000rpm, 5min) προκειμένου να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες του πλάσματος. Στη συνέχεια προσδιορίζονταν οι τιμές της υδροδυναμικής διαμέτρου, του ζ δυναμικού και του PDI των δειγμάτων και συγκρίνονταν με τις τιμές του αρχικού δείγματος MagAlg-Peg.

2.3.8 Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM)

Τα μικρογραφήματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης πραγματοποιήθηκαν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης TEM (JEOL, JEM-2100), το οποίο διαθέτει σύστημα υψηλής διακριτικής ικανότητας. Το μικροσκόπιο έχει διακριτικό όριο σημείου 0,23nm και πλέγματος ίσο με 0,14nm. Για τη μέτρηση

παρασκευάστηκαν αραιά διαλύματα νανοσωματιδίων MagAlg και MagAlg-Peg συγκέντρωσης 0,02 % w/v Fe₂O₃.

2.3.9 Φόρτωση και αποδέσμευση του φαρμάκου TDZD-8

Φόρτωση. Η φόρτωση του φαρμάκου TDZD-8 έγινε σε πυκνό δείγμα νανοσωματιδίων MagAlg-Peg (3,5mg/ml). 1ml νανοσωματιδίων τοποθετείται στο λουτρό υπερήχων για 30 λεπτά. 100μl διαλύματος TDZD-8 (1mg TDZD-8 διαλυμένο σε 1ml ACN:dH₂O (70:30)) προστίθενται στάγδην στα νανοσωματίδια. Το δείγμα αφήνεται στο λουτρό υπερήχων για 20 λεπτά και στη συνέχεια τοποθετείται σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 4 εικοσιτετράωρα υπό ανάδευση.

Μετά το τέλος της διαδικασίας γίνεται φυγοκέντρωση (15000rpm, 35min) για την απομόνωση του φαρμάκου που δεν φορτώθηκε στα νανοσωματίδια. Στο υπερκείμενο που προκύπτει περιέχεται το φάρμακο που δεν φορτώθηκε στα νανοσωματίδια (ελεύθερο), ενώ στο ίζημα περιέχονται τα νανοσωματίδια μαζί με το φάρμακο που έχει φορτωθεί σε αυτά. Απομονώνεται το υπερκείμενο στο οποίο γίνεται μαγνητικός διαχωρισμός για ένα εικοσιτετράωρο. Ο μαγνητικός διαχωρισμός γίνεται για την απομάκρυνση μιας πολύ μικρής ποσότητας μαγνητικών νανοσωματιδίων, η οποία παραμένει στο υπερκείμενο μετά τη φυγοκέντρωση, ώστε αυτά να μην επηρεάσουν τη μέτρηση του ελεύθερου φαρμάκου στο UV-Vis που ακολουθεί. Την επόμενη μέρα γίνεται λυοφιλοποίηση και ανασύσταση σε 1ml ACN:dH₂O (70:30).

Ο προσδιορισμός του φαρμάκου που φορτώθηκε στα μαγνητικά νανοσωματίδια γίνεται έμμεσα, υπολογίζοντας αρχικά την ποσότητα του ελεύθερου φαρμάκου που δεν φορτώθηκε σε αυτά. Για τη μέτρηση του ελεύθερου φαρμάκου χρησιμοποιείται η φασματοφωτομετρία UV-Vis (Shimadzu, UV-1800). Το υπερκείμενο (1ml) τοποθετείται σε κυψελίδα και η μέτρηση γίνεται στα 241nm. Από την απορρόφηση του δείγματος και με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης υπολογίζεται η ποσότητα του ελεύθερου φαρμάκου. Στη συνέχεια η ποσότητα του φορτωμένου φαρμάκου υπολογίζεται αφαιρώντας από το συνολικό φάρμακο που προστέθηκε στα νανοσωματίδια το ελεύθερο φάρμακο. Για τον προσδιορισμό της φόρτωσης του φαρμάκου χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

$$\% \text{ Φόρτωση} = \frac{\text{Μάζα φορτωμένου φαρμάκου}}{\text{Μάζα φορτωμένου φαρμάκου} + \text{Μάζα μαγνητικών νανοφορέων}} \times 100\% \quad (7)$$

Αποδέσμευση. Η διαδικασία αποδέσμευσης ξεκινά με τη διασπορά των φορτωμένων μαγνητικών νανοσωματιδίων σε 1ml dH₂O και την προσθήκη του δείγματος σε μεμβράνη διαπίδυσης. Η μεμβράνη διαπίδυσης τοποθετείται σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C, αφού πρώτα προστεθεί σε φιαλίδιο το οποίο περιέχει 5ml ρυθμιστικού διαλύματος PB. Η λήψη δειγμάτων γίνεται 30 λεπτά, 1, 2, 4, 6 και 24 ώρες μετά την τοποθέτηση της μεμβράνης στο PB. Μετά τη λήψη κάθε δείγματος και τη φύλαξή του σε γυάλινες φιάλες (vial), προστίθενται 5ml PB στο φιαλίδιο για την επόμενη δειγματοληψία.

Με την ολοκλήρωση της λήψης των δειγμάτων ακολουθεί η διαδικασία αλλαγής του διαλύτη των δειγμάτων από PB σε διάλυμα ACN/dH₂O, έτσι ώστε να γίνει η μέτρηση τους σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 3ml διχλωρομεθάνιο (DCM). Ακολουθεί ανάμιξη σε vortex για 3min και τα δείγματα αφήνονται σε ηρεμία για 30 λεπτά για διαχωρισμό των φάσεων. Η οργανική φάση από κάθε vial αφαιρείται και φυλάσσεται στον φούρνο έως την επόμενη μέρα για την εξάτμιση του διαλύτη. Τα δείγματα αφαιρούνται από τον φούρνο και όταν έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου προστίθενται σε όλα 0,7ml ακετονιτρίλιο (ACN). Γίνεται ανάμιξη σε vortex και λουτρό υπερήχων. Τέλος, γίνεται προσθήκη 0,3ml dH₂O και ανάμιξη σε vortex.

Τα δείγματα μετρούνται σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος 241nm. Από την απορρόφηση των δειγμάτων αυτών υπολογίζεται με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης η ποσότητα φαρμάκου που αποδεσμεύεται από τα μαγνητικά νανοσωματίδια σε διάρκεια 24 ωρών.

2.3.10 Φόρτωση και διαρροή της χρωστικής Rhodamine 6G

Φόρτωση. Η φόρτωση της χρωστικής Rhodamine 6G στα μαγνητικά νανοσωματίδια MagAlg-Peg έγινε μέσω σχηματισμού αμιδικού δεσμού μεταξύ της αμινομάδας της χρωστικής και των καρβοξυλομάδων του αλγινικού, κάνοντας χρήση των αντιδραστηρίων σύζευξης EDC και s-NHS.

Οι αναλογίες των αντιδραστηρίων της αντίδρασης είναι COOH : EDC,s-NHS = 1:5, με την τελική συγκέντρωση του EDC στο διάλυμα της αντίδρασης να μην ξεπερνά τα 10mM. Η φόρτωση γίνεται σε πυκνό δείγμα νανοσωματιδίων MagAlg-Peg (3,5mg/ml). 1ml νανοσωματιδίων τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 30 λεπτά. Στα νανοσωματίδια προστίθενται 100μl διαλύματος Rhodamine 6G (1mg Rhodamine 6G/ml

dH₂O) και συνεχίζεται η ανάμιξη στο λουτρό υπερήχων για 10min. Τα αντιδραστήρια EDC και s-NHS διαλύονται σε 100μl dH₂O το καθένα ακριβώς πριν την προσθήκη τους στην αντίδραση. Πρώτα γίνεται η προσθήκη του EDC και στη συνέχεια του s-NHS. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε vortex για ~24 ώρες.

Μετά το τέλος της αντίδρασης γίνεται φυγοκέντρηση (15000rpm, 35min) για την απομόνωση της χρωστικής που δεν φορτώθηκε στα νανοσωματίδια. Στο υπερκείμενο που προκύπτει περιέχεται η χρωστική που δεν φορτώθηκε στα νανοσωματίδια (ελεύθερη), ενώ στο ίζημα περιέχονται τα νανοσωματίδια μαζί με τη χρωστική που έχει προσδεθεί σε αυτά. Απομονώνεται το υπερκείμενο, στο οποίο γίνεται μαγνητικός διαχωρισμός για ένα εικοσιτετράωρο σε σκοτεινό μέρος, επειδή η χρωστική είναι φωτοευαίσθητη. Ο μαγνητικός διαχωρισμός γίνεται για την απομάκρυνση μιας πολύ μικρής ποσότητας μαγνητικών νανοσωματιδίων που παραμένει στο υπερκείμενο μετά τη φυγοκέντρηση, ώστε αυτά να μην επηρεάσουν τη μέτρηση της ελεύθερης χρωστικής στο UV-Vis που ακολουθεί. Την επόμενη ημέρα γίνεται λυοφιλοποίηση στο υπερκείμενο και ανασύσταση σε 1ml PB.

Ο προσδιορισμός της χρωστικής που φορτώθηκε στα μαγνητικά νανοσωματίδια γίνεται έμμεσα, υπολογίζοντας αρχικά την ποσότητα της ελεύθερης χρωστικής που δεν προσδέθηκε σε αυτά. Για τη μέτρηση της ελεύθερης χρωστικής χρησιμοποιείται η φασματοφωτομετρία UV-Vis (Shimadzu, UV-1800). Το υπερκείμενο (1ml) τοποθετείται σε κυψελίδα και η μέτρηση γίνεται στα 529nm. Από την απορρόφηση του δείγματος και με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης υπολογίζεται η ποσότητα της ελεύθερης χρωστικής. Στη συνέχεια η ποσότητα της φορτωμένης χρωστικής υπολογίζεται αφαιρώντας από τη συνολική ποσότητα χρωστικής που προστέθηκε στα νανοσωματίδια την ελεύθερη χρωστική. Για τον υπολογισμό της φόρτωσης της χρωστικής χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

$$\% \text{ Φόρτωση} = \frac{\text{Μάζα φορτωμένης χρωστικής}}{\text{Μάζα φορτωμένης χρωστικής} + \text{Μάζα μαγνητικών νανοφορέων}} \times 100 \% \quad (8)$$

Διαρροή. Η διαδικασία διαρροής γίνεται όπως ακριβώς περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο για την αποδέσμευση του φαρμάκου. Μετά την ολοκλήρωση λήψης των δειγμάτων, 1ml από κάθε δείγμα μετريέται σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis σε μήκος κύματος 529nm. Από την απορρόφηση των δειγμάτων αυτών υπολογίζεται με

τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης η ποσότητα χρωστικής που διαρρέει από τα μαγνητικά νανοσωματίδια σε διάρκεια 24 ωρών.

2.3.11 Δοκιμασία αιμόλυσης

Αιμόλυση είναι η διαδικασία διάσπασης των ερυθρών αιμοσφαιρίων του αίματος, η οποία συνοδεύεται από την απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης. Η αιμόλυση μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητα αποτελέσματα στην υγεία ενός οργανισμού. Η δοκιμασία αιμόλυσης είναι μια αξιολόγηση της αιμοσυμβατότητας των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg και εφαρμόστηκε για τον καθορισμό της ύπαρξης ή μη αιμολυτικών ιδιοτήτων των μαγνητικών νανοσωματιδίων.

Για τη διεξαγωγή του πειράματος λαμβάνεται αίμα από υγιή δότη, το οποίο συντηρείται στους 2-6°C. Γίνεται προετοιμασία ενός διαλύματος μαγνητικών νανοσωματιδίων (συγκέντρωση 3,5mg/ml) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS και με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάζονται δείγματα μαγνητικών νανοσωματιδίων συγκεντρώσεων 0,35mg/ml, 0,44mg/ml, 0,88mg/ml, 1,75mg/ml και 3,5mg/ml.

Γίνεται φυγοκέντρηση (750rcf, 10min) σε 0,5ml αίματος έτσι ώστε να απομονωθούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια (Red Blood Cells, RBC). Ακολουθεί επαναιώρηση των RBC σε φυσιολογικό ορό σε τελικό όγκο 2ml. Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές ακόμα. Το θετικό control το οποίο αντιστοιχεί σε αιμόλυση παρασκευάζεται με επαναιώρηση ποσότητας RBC σε ddH₂O (double distilled water) και το αρνητικό control με επαναιώρηση ποσότητας RBC σε PBS.

Ίσοι όγκοι διαλύματος RBC σε φυσιολογικό ορό και μαγνητικών νανοσωματιδίων σε PBS αναμιγνύονται σε τελικό όγκο 2ml. Τα δείγματα τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για δύο ώρες. Στη συνέχεια, φυγοκεντρώνονται (750rcf, 10min). Στο υπερκείμενο γίνεται μαγνητικός διαχωρισμός για την απομάκρυνση μαγνητικών νανοσωματιδίων. Ακολουθεί μέτρηση του υπερκείμενου σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis (Shimadzu, UV-1800) σε μήκος κύματος 570nm. Για τον υπολογισμό του ποσοστού % αιμόλυσης χρησιμοποιείται ο τύπος:

$$\% \text{ Αιμόλυση} = \frac{\text{Απορρόφηση δείγματος}}{\text{Απορρόφηση θετικού control}} \times 100\% \quad (9)$$

2.3.12 Μελέτη κυτταροτοξικότητας σε φυσιολογικούς ινοβλάστες

Για τα μαγνητικά νανοσωματίδια MagAlg-Peg πραγματοποιήθηκε μελέτη της τοξικότητά τους σε φυσιολογικούς ινοβλάστες από υγιή ποντίκια. Η σειρά κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε είναι η NIH-3T3. Τα κύτταρα φυλάσσονται στους -80°C και η διαδικασία καλλιέργειάς τους γίνεται σε φλάσκες.

Η διαδικασία απόψυξης των κυττάρων ξεκινά με τη μεταφορά του φιαλιδίου με τα παγωμένα κύτταρα στο υδατόλουτρο, το οποίο έχει ήδη ρυθμιστεί στους 37°C . Το φιαλίδιο παραμένει στο υδατόλουτρο υπό ήπια ανακίνηση, έως ότου ξεπαγώσει το $\sim 80\%$ των κυττάρων. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε falcon μαζί με θρεπτικό υλικό σε τελικό όγκο 10ml. Γίνεται φυγοκέντρηση (3500rpm, 5min), το υπερκείμενο αποχύνεται, γίνεται επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10ml θρεπτικό υλικό και μεταφορά του σε φλάσκα. Η φλάσκα τοποθετείται στον επωαστήρα.

Η διαδικασία αποκόλλησης των κυττάρων από την φλάσκα περιλαμβάνει την αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και την πλύση με 5ml PBS. Προστίθενται 3ml θρυψίνης, η οποία παραμένει στη φλάσκα για 2-3 λεπτά μέχρι να ξεκολλήσουν τα κύτταρα. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 3ml θρεπτικού υλικού για την απενεργοποίηση της θρυψίνης. Το θρεπτικό υλικό μαζί με τα κύτταρα συλλέγονται, φυγοκεντρώνονται (3500rpm, 5min) και γίνεται ανασύσταση του ιζήματος σε 3ml θρεπτικού υλικού. Το 1/3 των κυττάρων τοποθετείται σε νέα φλάσκα, η οποία περιέχει 12 ml θρεπτικό υλικό και γίνεται στρώση των υπόλοιπων 2/3. Μετά τη στρώση τα κύτταρα παραμένουν σε επωαστήρα για 24 ώρες. Η διαδικασία συνεχίζεται με την προσθήκη στα κύτταρα ποσοτήτων μαγνητικών νανοσωματιδίων και φαρμάκου, οι οποίες αντιστοιχούσαν σε συγκεντρώσεις 0,1, 1, 5, 10 και $20\mu\text{M}$ του φαρμάκου TDZD-8. Ακολουθεί επώαση για 24 ώρες.

Μετά την ολοκλήρωση της επώασης προσδιορίζεται το ποσοστό των νεκρών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής. Για τον προσδιορισμό χρησιμοποιείται ιωδιούχο προπίδιο (Propidium iodide, PI) το οποίο είναι ένας παράγοντας φθορισμού. Η χρώση με PI αποτελεί μια κοινή μέθοδο για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας κυττάρων σε μελέτες που εφαρμόζουν κυτταρομετρία ροής. Το PI φθορίζει όταν δεσμεύεται με DNA. Δέσμευση του PI με DNA μπορεί να συμβεί μόνο σε νεκρά κύτταρα, στα οποία μπορεί να διαχέεται λόγω της πορώδους μεμβράνης τους. Το PI δεν μπορεί να εισαχθεί σε ζωντανά κύτταρα (Kainz, et al., 2017).

Η διαδικασία ξεκινάει με την αφαίρεση του υπερκείμενου από κάθε well. Στη συνέχεια, γίνεται πλύση με 500μl PBS, το διάλυμα φωσφορικών αφαιρείται και γίνεται προσθήκη 100μl θρυψίνης και μεταφορά στον επωαστήρα για 2 λεπτά. Παράλληλα σε σωλήνες κυτταρομετρίας ροής προστίθενται 200μl PBS και 4μl διαλύματος PI σε PBS (1mg PI/ ml PBS). Η απενεργοποίηση της θρυψίνης γίνεται με προσθήκη 200μl θρεπτικού υλικού σε κάθε well. Γίνεται μεταφορά του περιεχομένου κάθε well στους σωλήνες κυτταρομετρίας ροής και άμεση μέτρηση στον κυτταρομετρητή ροής.

2.3.13 Μελέτη κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα SH-SY5Y

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της κυτταροτοξικότητας που προκαλούν δείγματα κενών μαγνητικών νανοσωματιδίων (blank), μαγνητικών νανοσωματιδίων φορτωμένων με φάρμακο TDZD-8 και του ελεύθερου φαρμάκου TDZD-8 σε κύτταρα SH-SY5Y. Τα κύτταρα SH-SY5Y αποτελούν μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος, η οποία χρησιμοποιείται σαν *in vitro* μοντέλο της λειτουργίας και της διαφοροποίησης νευρώνων. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία MTT. Η δοκιμασία MTT (άλας βρωμίου του 3-(4,5-διμεθυλ-θειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλ-τετραζολίου) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων. Το MTT είναι μια κίτρινη χρωστική, την οποία μόνο τα ζωντανά κύτταρα μπορούν να ανάγουν μέσω μιτοχονδριακών ενζύμων σε φορμαζάνη, ένα προϊόν μπλε χρώματος. Η ποσότητα φορμαζάνης είναι ανάλογη του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων (Wachsmann & Lamprecht, 2012).

Γίνεται στρώση των κυττάρων σε πλάκες των 24-well (24-well plates), με πυκνότητα 10.000 κύτταρα ανά well σε 500μl RPMI-1640 εμπλουτισμένου με 10% βόειο εμβρυϊκό ορό. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την στρώση ποσότητες διαλύματος TDZD-8 σε νερό, κενών νανοσωματιδίων και νανοσωματιδίων φορτωμένων με TDZD-8 (διαλυμένα σε νερό), οι οποίες αντιστοιχούσαν σε συγκεντρώσεις 1, 5, 10, 20 και 50μM του φαρμάκου TDZD-8, προστέθηκαν στα well. Μετά από προκαθορισμένες χρονικές περιόδους (24 ώρες) επώασης στους 37°C, 50μl διαλύματος MTT (5 mg/ml σε PBS, pH 7,4) προστέθηκαν σε κάθε well και οι πλάκες επώαστηκαν στους 37°C για 2 ώρες. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και 200μl οξυνισμένης ισοπροπανόλης (0,33ml HCl σε 100ml ισοπροπανόλης) προστέθηκαν σε κάθε well. Ακολούθησε ανάδευση για την διάλυση των κρυστάλλων φορμαζάνης.

Το διάλυμα από κάθε well μεταφέρθηκε σε πλάκες των 96-well και έγινε αμέσως ανάγνωση σε συσκευή ανάγνωσης μικροπιακών, σε μήκος κύματος 490 nm. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτες και επαναλήφθηκαν τρεις φορές. Η κυτταροτοξικότητα εκφράστηκε ως η % μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, η οποία υπολογίστηκε από την αναλογία μεταξύ του αριθμού των κυττάρων που επεξεργάστηκαν με τα διαφορετικά δείγματα που περιείχαν το TDZD-8 και των μη επεξεργασμένων κυττάρων (control).

2.3.14 Μελέτη πρόσληψης μαγνητικών νανοσωματιδίων επισημασμένων με τη χρωστική Rhodamine 6G από κύτταρα SH-SY5Y

Η μελέτη της πρόσληψης των μαγνητικών νανοσωματιδίων από τα κύτταρα της σειράς SH-SY5Y πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας συνεστιακή μικροσκοπία. Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν μαγνητικά νανοσωματίδια επισημασμένα με τη φθορίζουσα χρωστική Rhodamine 6G.

Τα κύτταρα SH-SY5Y αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες, οι οποίες είχαν στρωθεί σε πλάκες των 6-well. Αποστειρωμένες καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε κάθε well και ακολούθησε η προσθήκη κυτταρικών εναιωρημάτων (4×10^5 κύτταρα/ml). Μετά από 24 ώρες, στα κύτταρα προστέθηκαν τα επισημασμένα με Rhodamine 6G νανοσωματίδια (100μg/ml) και ακολούθησε επώση για 24 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα πλύθηκαν τρεις φορές με PBS και έγινε χρώση με αντισώματα anti-Tuj-1 ή anti-TOM20. Ακολούθησε πλύση των κυττάρων με PBS και οι πυρήνες των κυττάρων χρωματίστηκαν με τη φθορίζουσα χρωστική TO-PRO-3. Αφαιρέθηκε η περίσσεια του ρυθμιστικού και της χρωστικής από τις καλυπτρίδες και έγινε προσθήκη διαλύματος Mowiol 4-88. Τα ληφθέντα δείγματα απεικονίστηκαν με τη βοήθεια συνεστιακού μικροσκοπίου, χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα φίλτρα για τις χρωστικές.

3. Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 Αποτελέσματα σύνθεσης και φυσικοχημικού χαρακτηρισμού των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg

Αρχικά, παρασκευάστηκαν μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων σιδήρου με πολυμερική επικάλυψη αλγινικού οξέος (MagAlg), μέσω της μεθόδου υδρολυτικής αλκαλικής καταβύθισης. Μετά την σύνθεση ακολούθησε ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός του προϊόντος.

3.1.1 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ιόντων σιδήρου

Τα αποτελέσματα προσδιορισμού της συγκέντρωσης ιόντων σιδήρου των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg έδειξαν ότι η συγκέντρωση ήταν ίση με ~0,52% w/v Fe_2O_3 . Κάθε επανάληψη της σύνθεσης των μαγνητικών νανοσωματιδίων έδινε ποσοστό οξειδίων σιδήρου ίσο με 0,5-0,52% w/v, γεγονός που αποδεικνύει την επαναληψιμότητα της μεθόδου σύνθεσης.

3.1.2 Προσδιορισμός υδροδυναμικής διαμέτρου, ζ δυναμικού και PDI

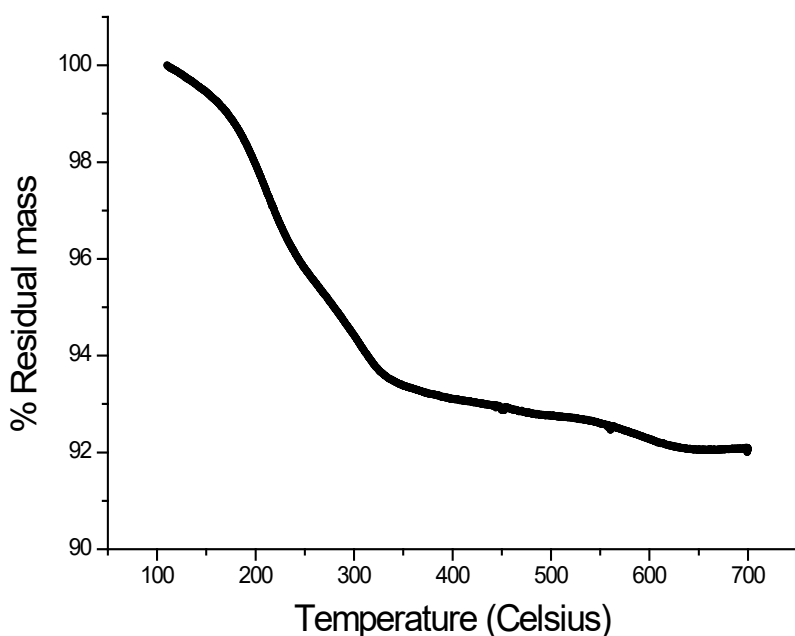
Μετά την σύνθεση των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg, έγινε προσδιορισμός της υδροδυναμικής διαμέτρου, του ζ δυναμικού και του PDI. Σε ό,τι αφορά την υδροδυναμική διάμετρο οι τιμές κυμαίνονταν από ~80-90nm, το PDI ήταν ίσο με ~0,19 ενώ το ζ δυναμικό ήταν ίσο με ~ -40mV, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3. Τα αποτελέσματα αφορούν διαφορετικές παρτίδες σύνθεσης και αποδεικνύουν ότι η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα τόσο για την υδροδυναμική διάμετρο, όσο και για το ζ δυναμικό και το PDI των νανοσωματιδίων.

Πίνακας 3: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, ζ δυναμικού και PDI τριών συνθέσεων μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg.

MagAlg	Υδροδυναμική διάμετρος (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
1 ^η σύνθεση	89,74 (+/- 0,6)	0,18 (+/- 0,01)	-47,3 (+/- 0,6)
2 ^η σύνθεση	81,13 (+/- 0,5)	0,21 (+/- 0,01)	-39,7 (+/- 1,65)
3 ^η σύνθεση	92,13 (+/- 0,4)	0,17 (+/- 0,004)	-37,6 (+/- 1,56)

3.1.3 Προσδιορισμός ποσοστού αλγινικού

Με τη βοήθεια μετρήσεων TGA έγινε ο προσδιορισμός του ποσοστού αλγινικού, το οποίο προστέθηκε στα μαγνητικά νανοσωματίδια MagAlg. Μέσω της τεχνικής TGA είναι δυνατό να υπολογιστεί το ποσοστό οργανικής ύλης που φέρουν τα μαγνητικά νανοσωματίδια. Η απώλεια μάζας που παρατηρείται κατά την διάρκεια του πειράματος στο δείγμα των νανοσωματιδίων (Διάγραμμα 1), η οποία οφείλεται στην αποικοδόμηση της οργανικής ύλης, σε συνδυασμό με την % υπολειμματική μάζα του σκέτους πολυμερούς (αλγινικού), οδηγούν στον υπολογισμό του ποσοστού του πολυμερούς που φέρουν τα νανοσωματίδια (Sarigiannis, et al., 2016). Για τα μαγνητικά νανοσωματίδια MagAlg το ποσοστό πολυμερούς ήταν ~9%.

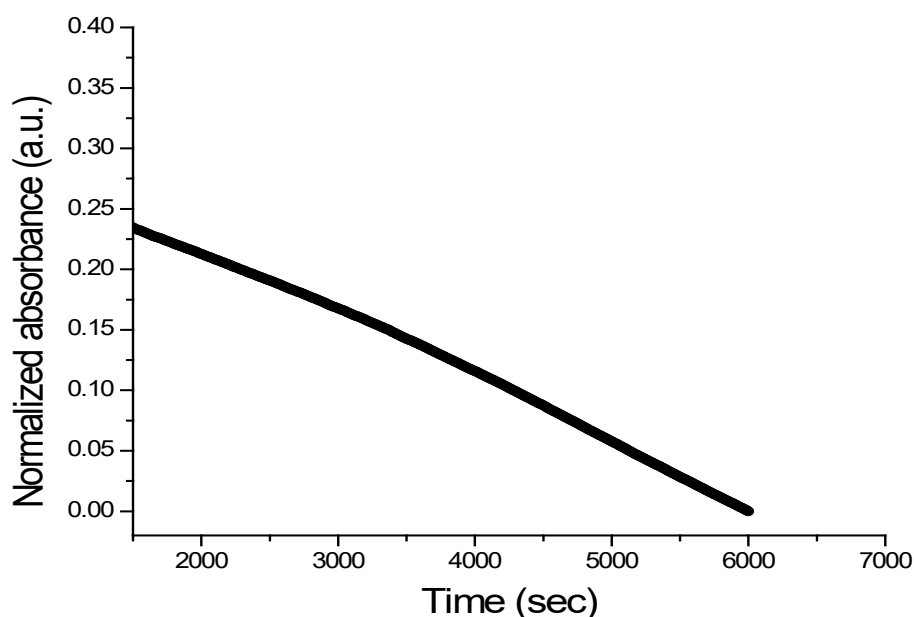


Διάγραμμα 1: Θερμογράφημα μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg με ποσοστό πολυμερούς ~9%.

3.1.4 Μελέτη μαγνητικών ιδιοτήτων

Η μελέτη των μαγνητικών ιδιοτήτων των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της μαγνητοφόρησης. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν κατάλληλα για την δημιουργία ενός κανονικοποιημένου διαγράμματος, το οποίο παρατίθεται παρακάτω (Διάγραμμα 2). Το πόσο απότομη είναι η μείωση της απορρόφησης, σχετίζεται με τη μείωση της συγκέντρωσης των

μαγνητικών νανοσωματιδίων στην κυψελίδα κατά τη διάρκεια της μέτρησης, λόγω της έλξης τους από το μαγνητικό πεδίο. Έτσι, όσο πιο μεγάλη είναι η μείωση της συγκέντρωσης, τόσο καλύτερη είναι η απόκριση των μαγνητικών νανοσωματιδίων στο μαγνητικό πεδίο. Ο δείκτης απορρόφησης της μαγνητοφόρησης των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg είχε τιμή 0,21, ενώ η ενδεικτική τιμή για τέτοιου είδους νανοσωματίδια (MagAlg) με παρόμοια υδροδυναμική διάμετρο είναι 0,24. Έτσι η τιμή 0,21 θεωρήθηκε ικανοποιητική.



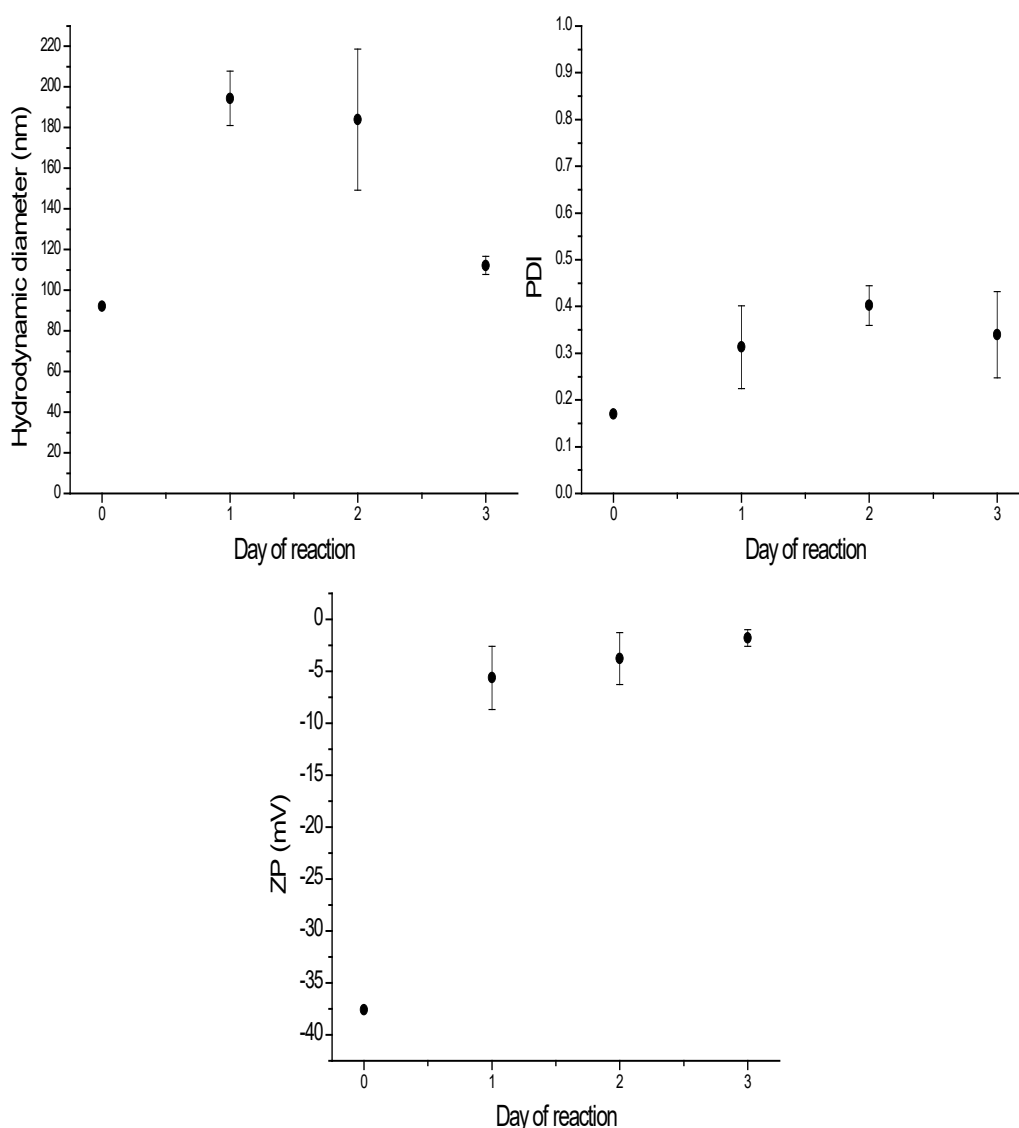
Διάγραμμα 2: Διάγραμμα κανονικοποιημένης απορρόφησης σε συνάρτηση με τον χρόνο, της μέτρησης μαγνητοφόρησης των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg.

3.2 Αποτελέσματα αντίδρασης πρόσδεσης του πολυμερούς mPEG-NH₂ και φυσικοχημικού χαρακτηρισμού των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg

Μετά τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό των μαγνητικών νανοσωματιδίων, ακολούθησε η διαδικασία πρόσδεσης του πολυμερούς mPEG-NH₂ σε αυτά, αλλά και ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός τους. Η πρόσδεση του πολυμερούς έγινε με τον σχηματισμό αμιδικού δεσμού μεταξύ των αμινομάδων της mPEG-NH₂ και των καρβοξυλομάδων του αλγινικού.

3.2.1 Προσδιορισμός υδροδυναμικής διαμέτρου, ζ δυναμικού και PDI

Η αντίδραση πρόσδεσης της mPEG-NH₂ στα νανοσωματίδια επαναλαμβανόταν συνολικά τρεις φορές για την λήψη του τελικού προϊόντος. Μετά το τέλος κάθε επανάληψης γινόταν λήψη μιας μικρής ποσότητας προϊόντος με σκοπό τον προσδιορισμό της υδροδυναμικής διαμέτρου, του ζ δυναμικού και του PDI. Όπως παρουσιάζεται και στο Διάγραμμα 3, η υδροδυναμική διάμετρος των μαγνητικών νανοσωματιδίων μειωνόταν με κάθε επανάληψη της αντίδρασης μετά την πρώτη αντίδραση, το ζ δυναμικό (κατά απόλυτη τιμή) μειωνόταν επίσης, ενώ μια μικρή αύξηση παρατηρήθηκε για το PDI των νανοσωματιδίων.



Διάγραμμα 3: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, ζ δυναμικού και PDI μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg μετά το τέλος κάθε ημέρας επανάληψης της αντίδρασης πεγκυλίωσης.

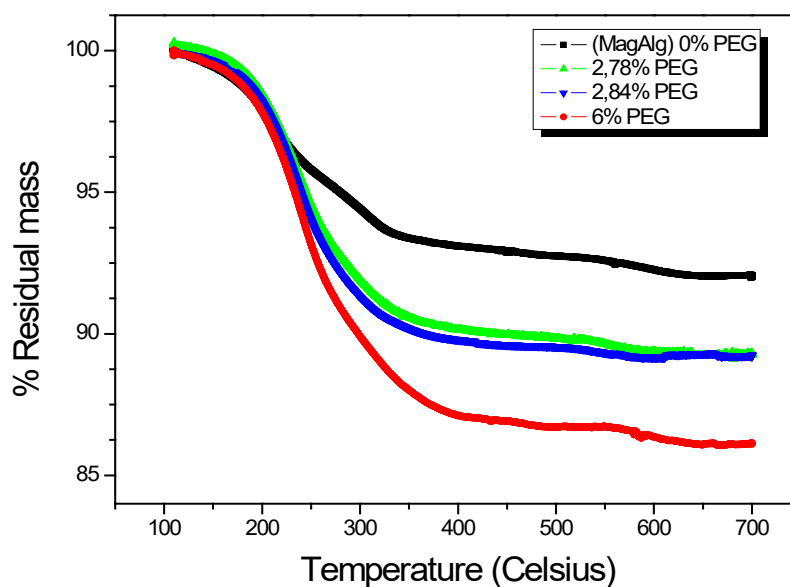
Όπως έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Sarigiannis, et al., 2016) η επανάληψη της αντίδρασης προσδίδει μεγαλύτερη κολλοειδή σταθερότητα και πυκνή επικάλυψη των νανοσωματιδίων από το πολυμερές. Έτσι η υδροδυναμική διάμετρος των νανοσωματιδίων μειώνεται λόγω της αυξημένης σταθερότητάς τους, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων, ενώ το ζ δυναμικό τους μειώνεται λόγω της πυκνότερης επικάλυψης του αρνητικού φορτίου των ελεύθερων καρβοξυλομάδων των νανοσωματιδίων από την mPEG-NH₂.

3.2.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης ιόντων σιδήρου

Λόγω των πολλαπλών εκπλύσεων που γίνονταν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πρόσδεσης της mPEG-NH₂ στα μαγνητικά νανοσωματίδια, αναμενόμενη ήταν και η απώλεια μέρους των ιόντων σιδήρου που περιέχονταν στο τελικό προϊόν της αντίδρασης. Για τον λόγο αυτό έγινε ξανά προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ιόντων σιδήρου του δείγματος. Η νέα τιμή συγκέντρωσης για κάθε νέα αντίδραση ήταν ίση με 0,4% w/v Fe₂O₃ (+/- 0,02) γεγονός που αποδεικνύει και την απώλεια ορισμένης ποσότητας ιόντων σιδήρου από το αρχικό δείγμα, το οποίο είχε συγκέντρωση ίση με ~0,52% w/v.

3.2.3 Προσδιορισμός ποσοστού της PEG

Με τη μέθοδο θερμοσταθμικής ανάλυσης έγινε ο προσδιορισμός του ποσοστού της PEG που προσδέθηκε στα μαγνητικά νανοσωματίδια MagAlg-Peg. Η απώλεια μάζας που παρατηρείται κατά τη διάρκεια του πειράματος (Διάγραμμα 4) οφείλεται στην αποικοδόμηση του αλγινικού και της PEG. Είναι εμφανής η αυξημένη απώλεια μάζας των πεγκυλιωμένων νανοσωματιδίων MagAlg-Peg συγκριτικά με τα μη πεγκυλιωμένα νανοσωματίδια MagAlg. Γνωρίζοντας ήδη το ποσοστό του αλγινικού που αποικοδομήθηκε κατά τη διάρκεια της μέτρησης των νανοσωματιδίων MagAlg, μπορούμε να υπολογίσουμε το ποσοστό της PEG, αφαιρώντας από το % ποσοστό απώλειας μάζας των νανοσωματιδίων MagAlg-Peg, το % ποσοστό απώλειας μάζας των νανοσωματιδίων MagAlg. Το ποσοστό PEG το οποίο προσδενόταν στα μαγνητικά νανοσωματίδια MagAlg-Peg κυμαινόταν από ~2,8 έως 6%.

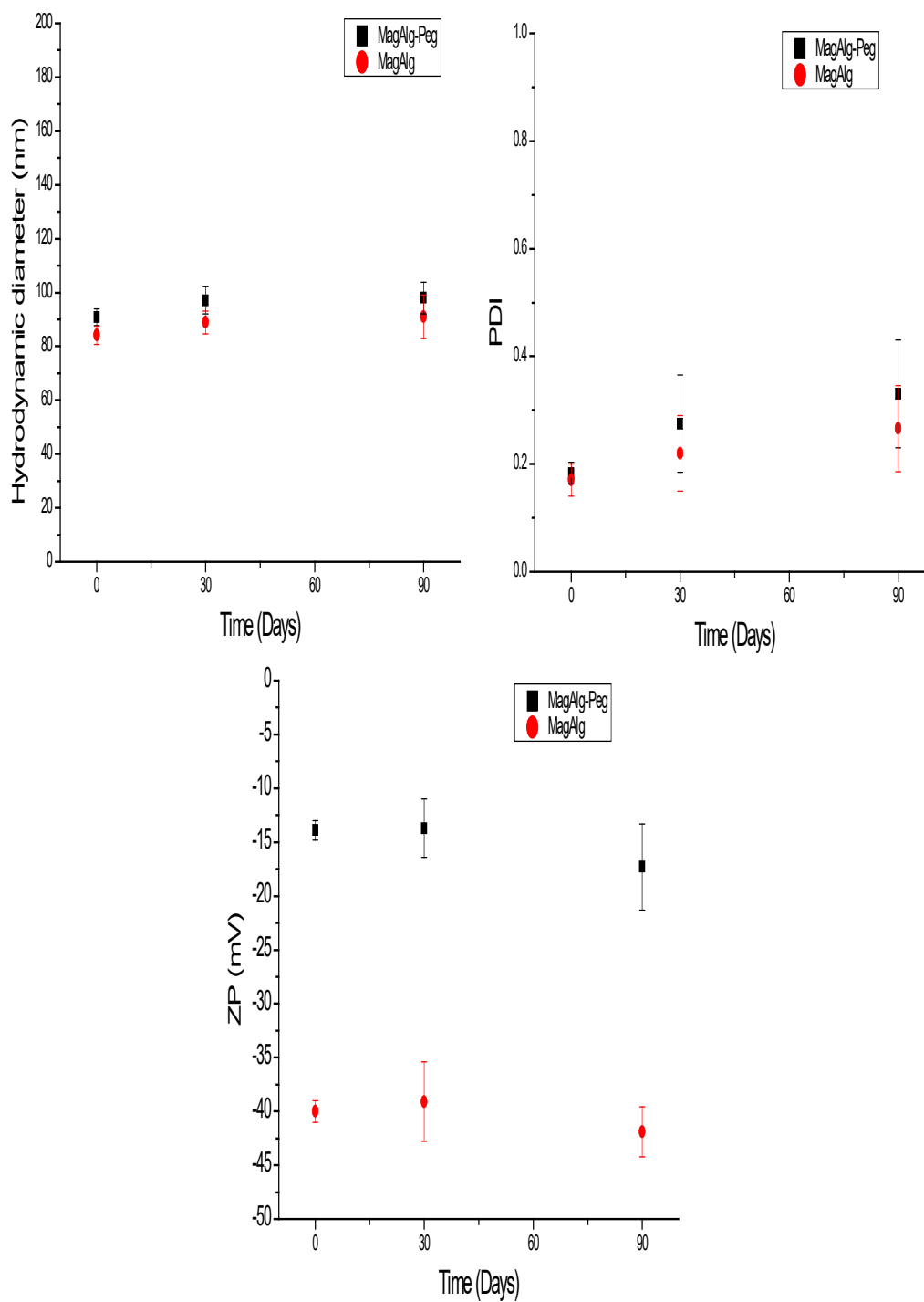


Διάγραμμα 4: Θερμογράφημα των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg και τριών διαφορετικών δειγμάτων μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg, τα οποία φέρουν ποσοστά PEG από ~2,8-6%.

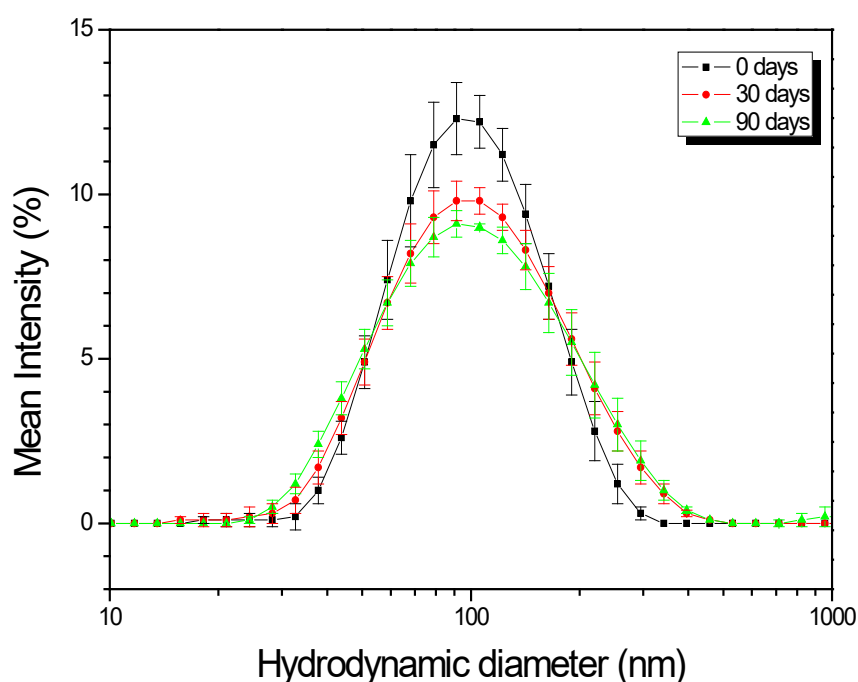
3.2.4 Αποτελέσματα μελέτης σταθερότητας των μαγνητικών νανοσωματιδίων

Η σταθερότητα των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg μελετήθηκε τόσο στο χρόνο όσο και παρουσία NaCl, πλάσματος και RPMI. Για τον προσδιορισμό της σταθερότητας μελετήθηκαν οι μεταβολές στην υδροδυναμική διάμετρο, το ζ δυναμικό και το PDI των πεγκυλιωμένων νανοσωματιδίων.

Η σταθερότητα των νανοσωματιδίων στο χρόνο μελετήθηκε για διατήρηση μέχρι 3 μήνες σε θερμοκρασία 8°C (ψυγείο). Στα παρακάτω διαγράμματα (Διαγράμματα 5,6) παρουσιάζονται οι τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, ζ δυναμικού και PDI δειγμάτων νανοσωματιδίων MagAlg-Peg και MagAlg. Παρατηρείται μια πολύ μικρή μεταβολή στις τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, ζ δυναμικού και PDI και για τα δύο δείγματα γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα νανοσωματίδια παρέμειναν σταθερά για την περίοδο 3 μηνών που εξετάστηκε.

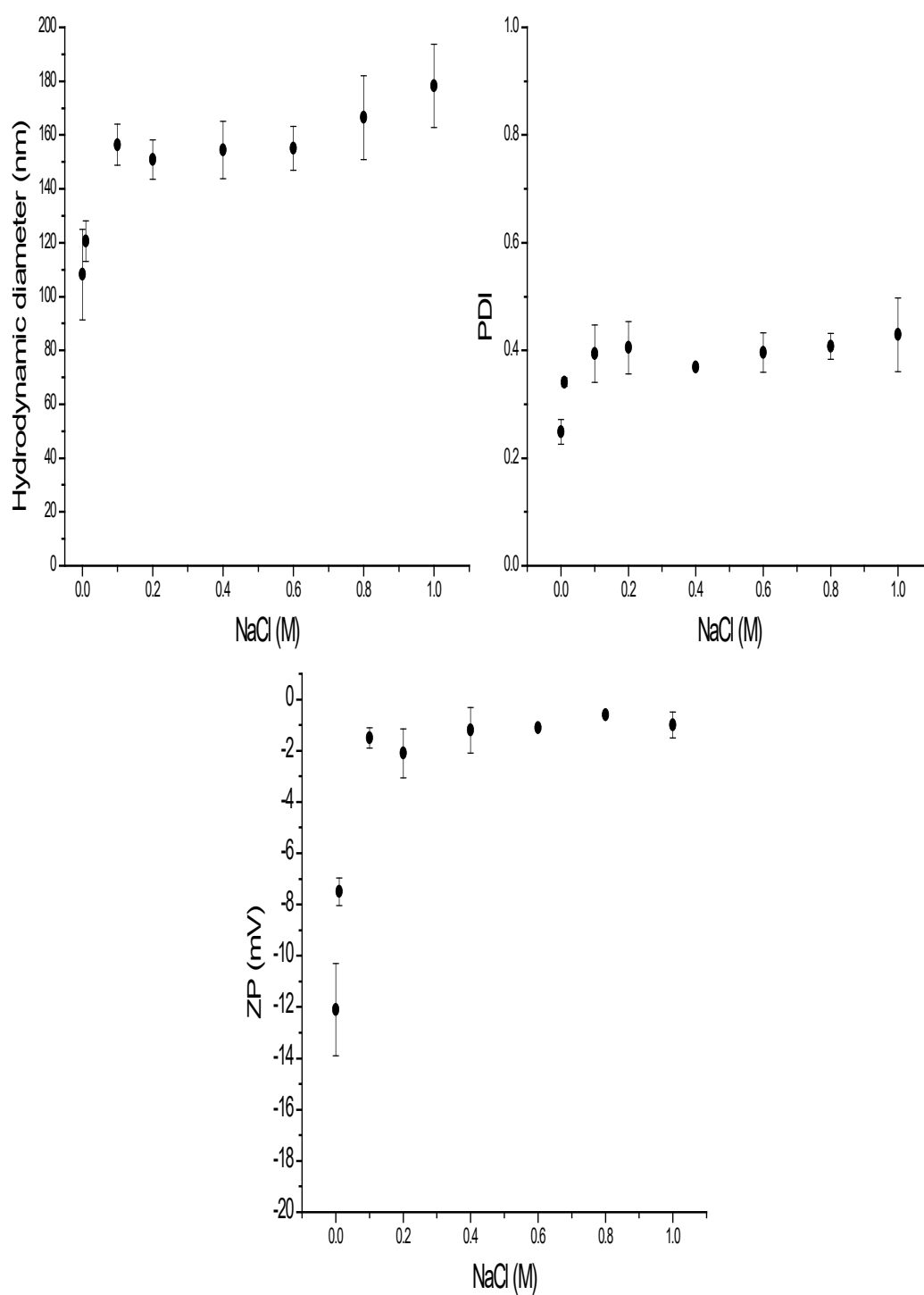


Διάγραμμα 5: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, ζ δυναμικού και PDI μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg και MagAlg σε μελέτη σταθερότητας διάρκειας τριών μηνών σε θερμοκρασία 8°C.

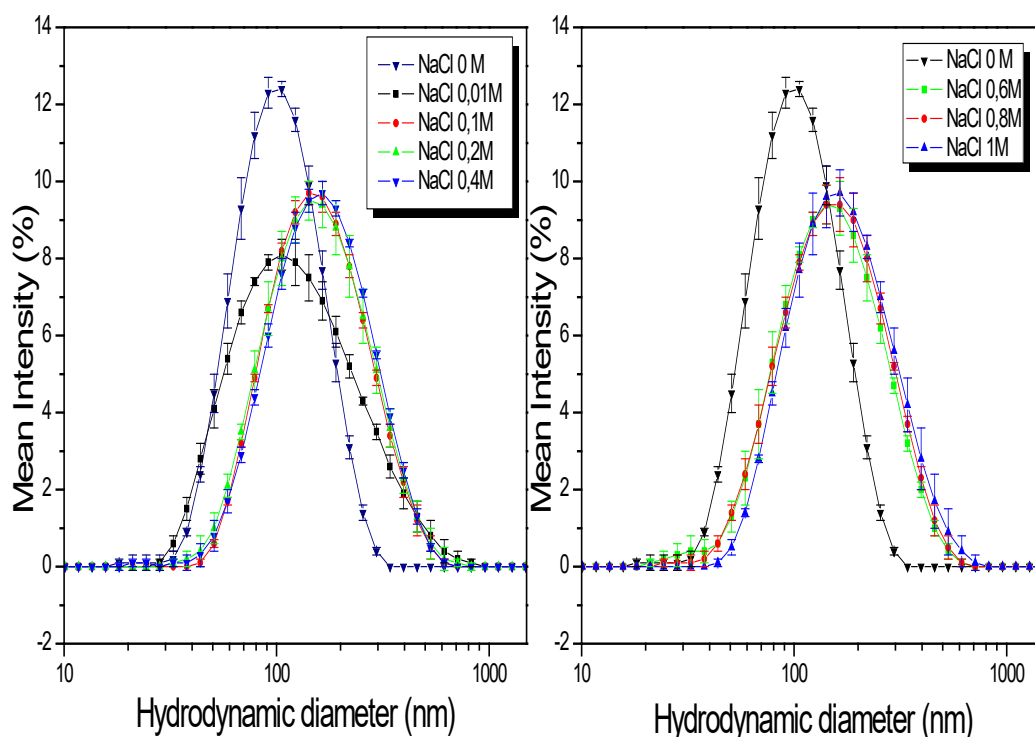


Διάγραμμα 6: Υδροδυναμικές διαμέτροι μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg σε μελέτη σταθερότητας διάρκειας τριών μηνών σε θερμοκρασία δωματίου.

Πραγματοποιήθηκαν επίσης μετρήσεις της υδροδυναμικής διαμέτρου, του ζ δυναμικού και του PDI δειγμάτων νανοσωματιδίων σε διαλύματα NaCl συγκέντρωσης 0,01-1M. Η συγκέντρωση άλατος στο ανθρώπινο αίμα είναι ίση με 0,135M και για αυτό το λόγο μελετήθηκε η κολλοειδής σταθερότητα των νανοσωματιδίων σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από αυτή, ώστε να αξιολογηθεί η συμπεριφορά τους σε συνθήκες που προσομοιάζουν με αυτές που επικρατούν *in vivo*. Τα νανοσωματίδια εμφανίζουν σταθερότητα (δεν εμφάνισαν συσσωμάτωση και καθίζηση), με αυξανόμενες όμως τιμές της υδροδυναμικής διαμέτρου και του PDI και μείωση του ζ δυναμικού (κατά απόλυτη τιμή) όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του NaCl, όπως φαίνεται στα Διαγράμματα 7,8.



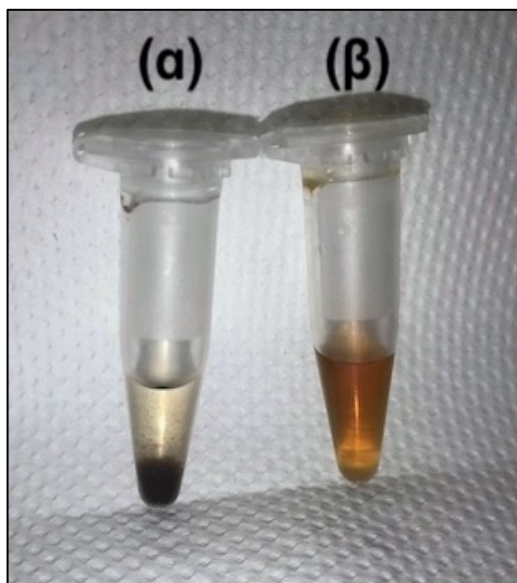
Διάγραμμα 7: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, ζ δυναμικού και PDI μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg σε διαλύματα NaCl συγκεντρώσεων 0,01-1M μετά από επώαση μιας ώρας στους 37°C.



Διάγραμμα 8: Υδροδυναμικές διαμέτροι μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg σε μελέτη σταθερότητας σε διαλύματα NaCl συγκεντρώσεων 0,01-1M.

Η αυξανόμενη συγκέντρωση ιόντων στα διαλύματα πιθανώς οδηγεί σε μικρή συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων και αύξηση της υδροδυναμικής διαμέτρου. Αυτό οφείλεται στη μείωση των απωστικών ηλεκτροστατικών δυνάμεων που ασκούνται μεταξύ των νανοσωματιδίων, εξαιτίας της μείωσης του δυναμικού. Η μείωση του ζ δυναμικού οφείλεται στην εξουδετέρωση του αρνητικού φορτίου των καρβοξυλομάδων των νανοσωματιδίων από τα θετικά φορτισμένα ιόντα Na του NaCl.

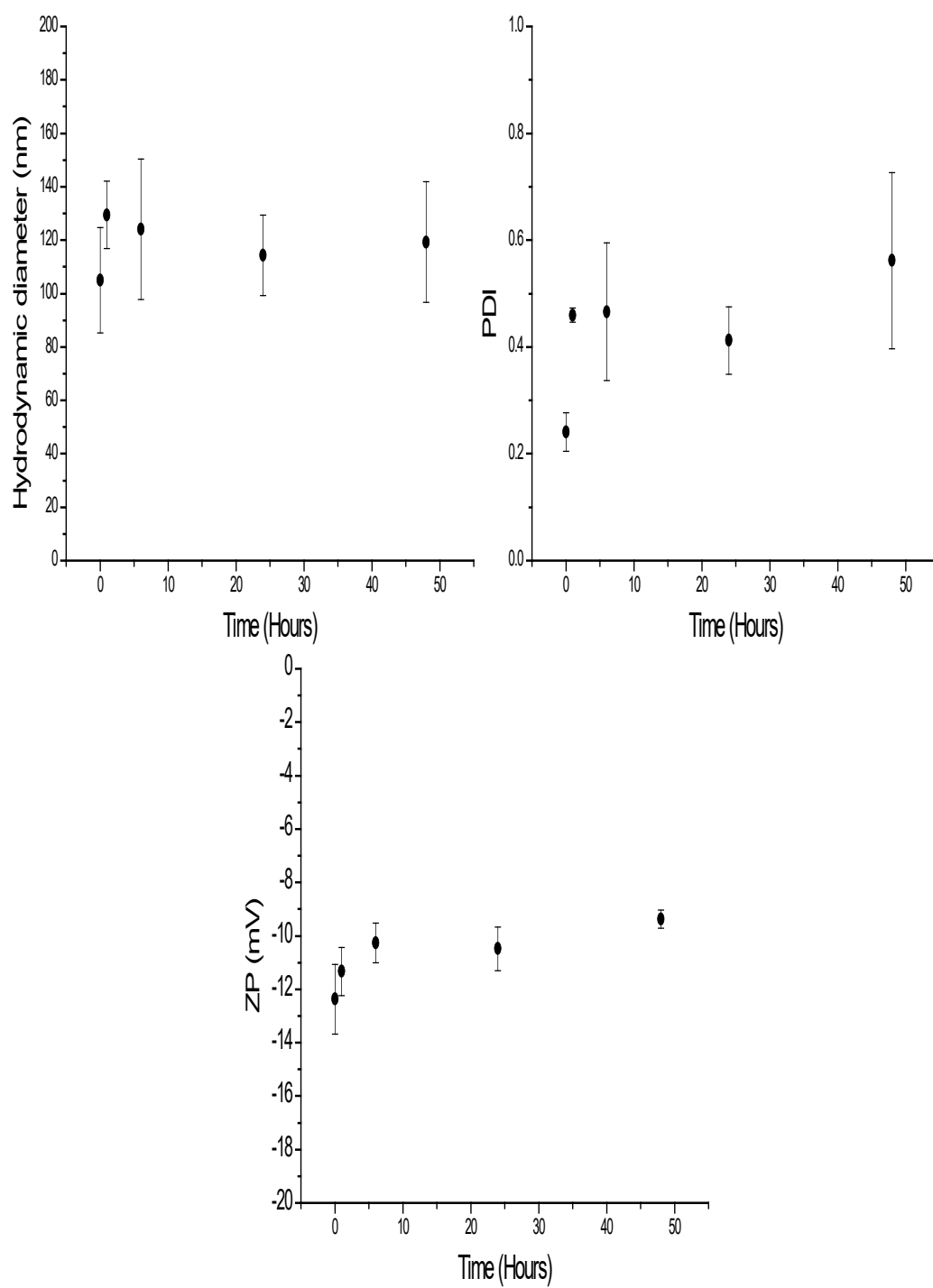
Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 21) φαίνεται η διαφορά στη σταθερότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg και MagAlg-Peg σε διάλυμα NaCl 0,3M. Στο αριστερό εppendorf (α) παρατηρείται η συσσωμάτωση και καθίζηση των νανοσωματιδίων που δεν φέρουν αλυσίδες PEG, σε αντίθεση με το εppendorf στα δεξιά (β), στο οποίο τα επικαλυμμένα με PEG νανοσωματίδια παραμένουν διεσπαρμένα.



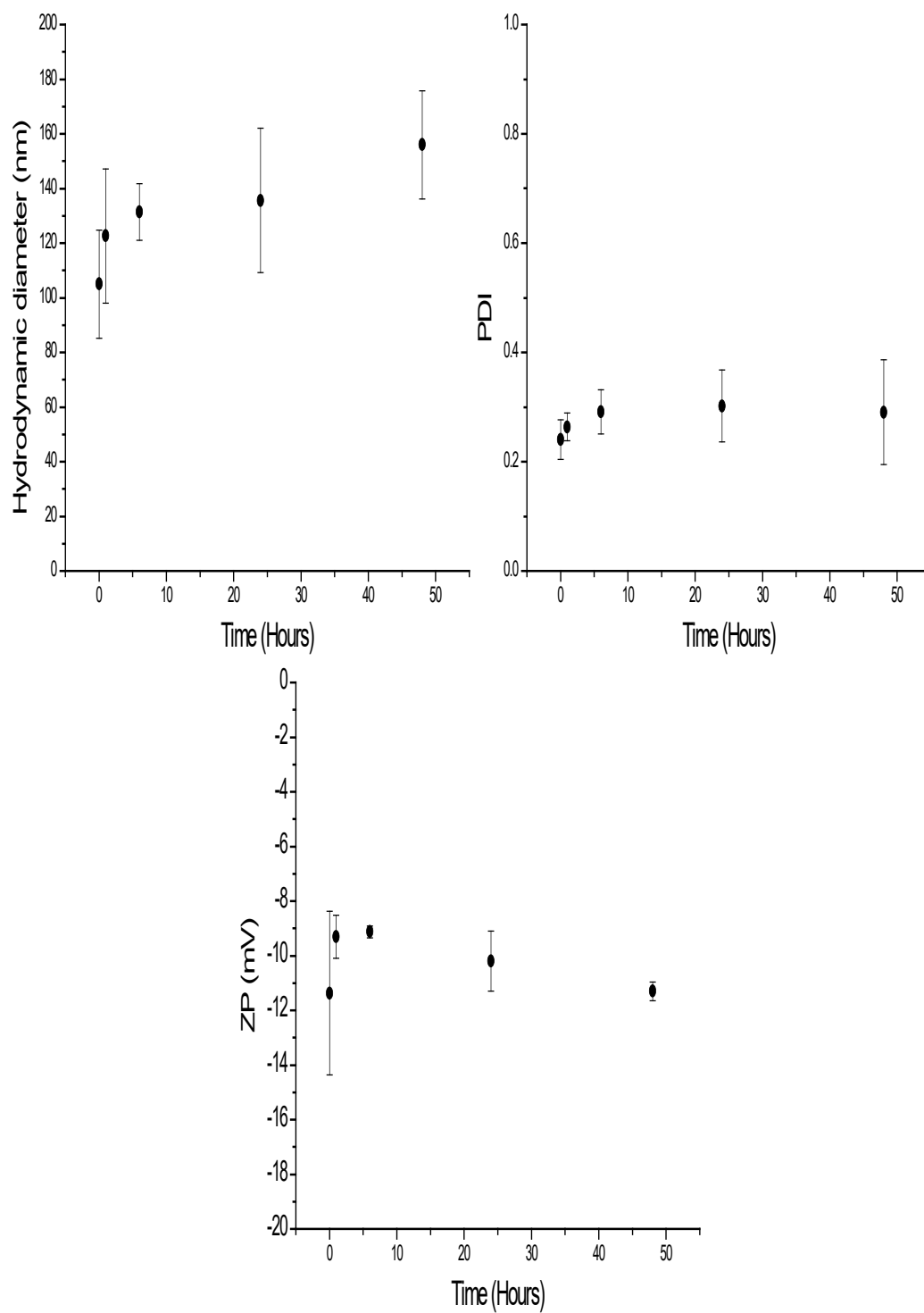
Εικόνα 21: Απεικόνιση σταθερότητας δείγματος μαγνητικών νανοσωματιδίων (α) MagAlg και (β) MagAlg-Peg σε διάλυμα NaCl 0,3M.

Ο περαιτέρω έλεγχος της σταθερότητας των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg πραγματοποιήθηκε σε πλάσμα αίματος και θρεπτικό υλικό RPMI. Μετρήθηκαν η υδροδυναμική διάμετρος, το ζ δυναμικό και το PDI των νανοσωματιδίων μετά από 1, 6, 24 και 48 ώρες από την προσθήκη τους στο πλάσμα και στο RPMI και επώαση στους 37°C.

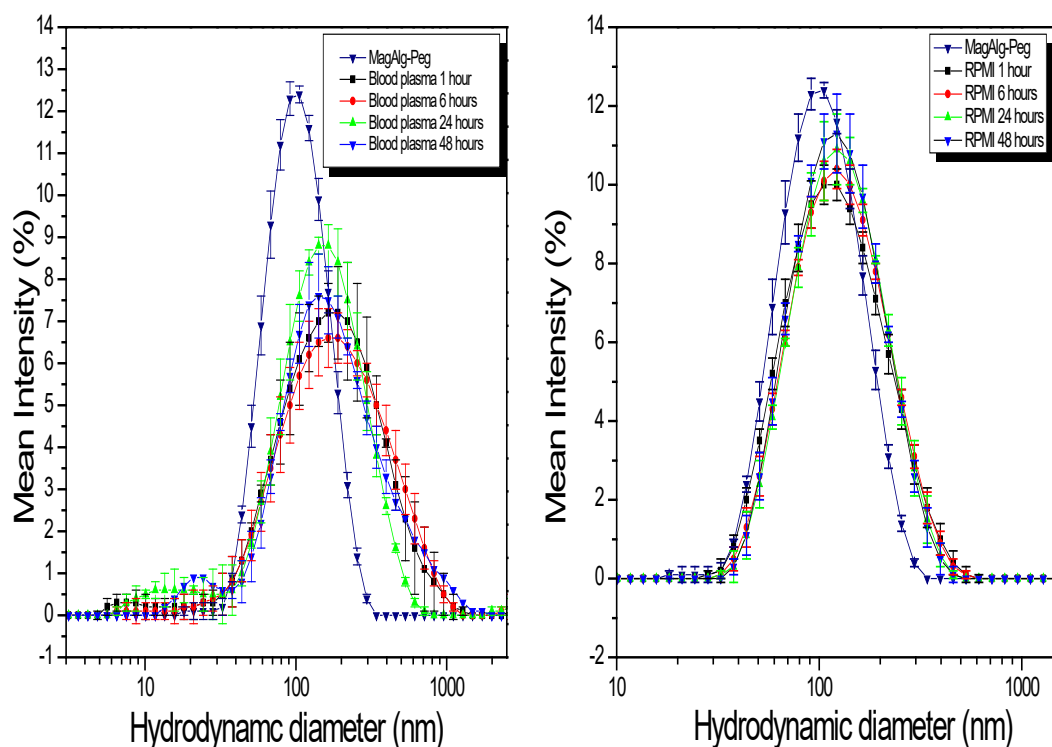
Τόσο για το πλάσμα αίματος όσο και για το RPMI τα νανοσωματίδια εμφανίζονται σταθερά με μία μικρή αύξηση της υδροδυναμικής διαμέτρου και μικρή μείωση του ζ δυναμικού (κατά απόλυτη τιμή), όπως φαίνεται και στα παρακάτω διαγράμματα (Διαγράμματα 9,10,11). Οι τιμές του PDI στο πλάσμα παρουσίασαν μια μικρή αύξηση σε σύγκριση με τις τιμές του PDI στο RPMI, όπου η αύξηση ήταν πολύ μικρότερη.



Διάγραμμα 9: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, ζ δυναμικού και PDI μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg, 1, 6, 24 και 48 ώρες μετά την προσθήκη τους σε πλάσμα αίματος και επώαση στους 37°C.



Διάγραμμα 10: Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου, ζ δυναμικού και PDI μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg, 1, 6, 24 και 48 ώρες μετά την προσθήκη τους σε RPMI και επώαση στους 37°C.



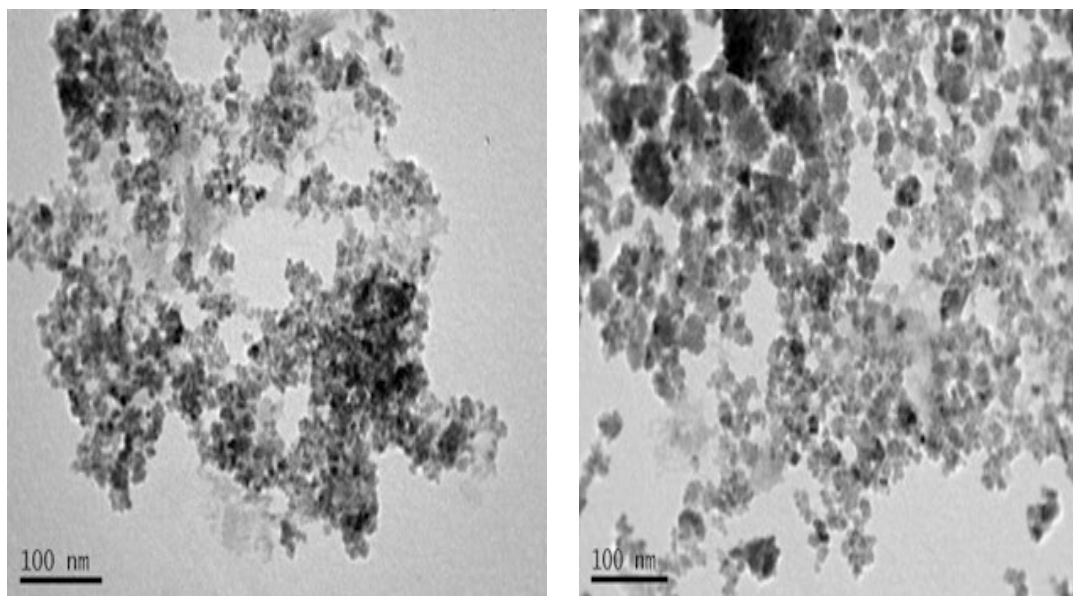
Διάγραμμα 11: Υδροδυναμικές διάμετροι μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg σε μελέτη σταθερότητας σε πλάσμα αίματος (αριστερά) και σε RPMI (δεξιά).

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια MagAlg-Peg μπορούν να χαρακτηρισθούν σταθερά στον χρόνο, σε NaCl, πλάσμα αίματος και RPMI. Η επικάλυψη των μαγνητικών νανοσωματιδίων με αλυσίδες PEG εμποδίζει την συσσωμάτωσή τους αλλά και την ηλεκτροστατική προσρόφηση πρωτεϊνών του πλάσματος από αυτά. Η PEG συμβάλλει στην σταθερότητα του κολλοειδούς συστήματος των νανοσωματιδίων περιορίζοντας έτσι σημαντικές μεταβολές των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους (Issa, Obaidat, Albiss, & Haik, 2013).

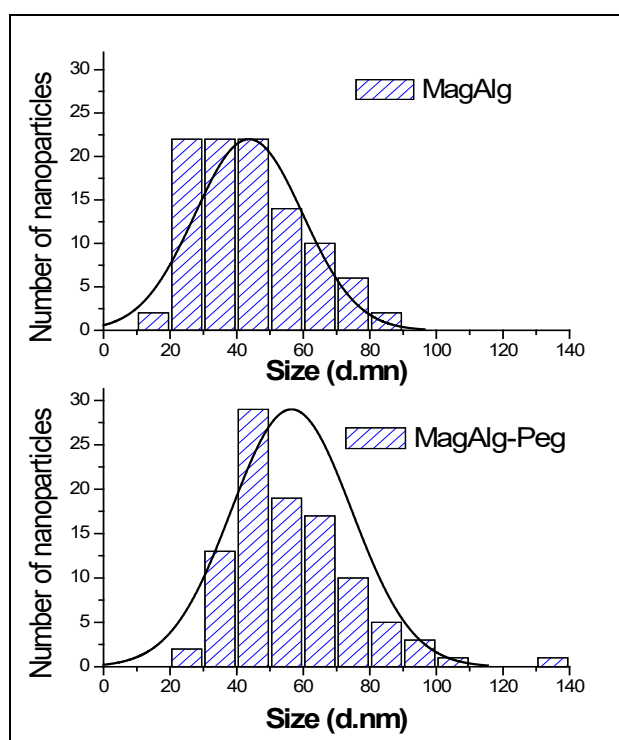
3.2.5 Αποτελέσματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (TEM)

Περαιτέρω χαρακτηρισμός των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg και MagAlg πραγματοποιήθηκε με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης. Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνα 22) παρουσιάζονται μικρογραφήματα δειγμάτων MagAlg-Peg και MagAlg νανοσωματιδίων. Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν την οργάνωση του συστήματος των κολλοειδών νανοκρυσταλλιτών και τη διευθέτησή τους σε πλειάδες (clusters). Από τα μικρογραφήματα υπολογίστηκε το μέσο μέγεθος των

νανοσωματιδίων. Παρακάτω παρατίθενται διαγράμματα κατανομής μεγέθους σύμφωνα με τα δεδομένα που προέκυψαν από τις εικόνες TEM (Εικόνα 22) (Διάγραμμα 12).



Εικόνα 22: Εικόνες TEM των δειγμάτων MagAlg (αριστερά) και MagAlg-Peg (δεξιά).



Διάγραμμα 12: Κατανομή μεγέθους για νανοσωματίδια MagAlg μέσου μεγέθους 44nm (πάνω) και για νανοσωματίδια MagAlg-Peg μέσου μεγέθους 56,5nm (κάτω).

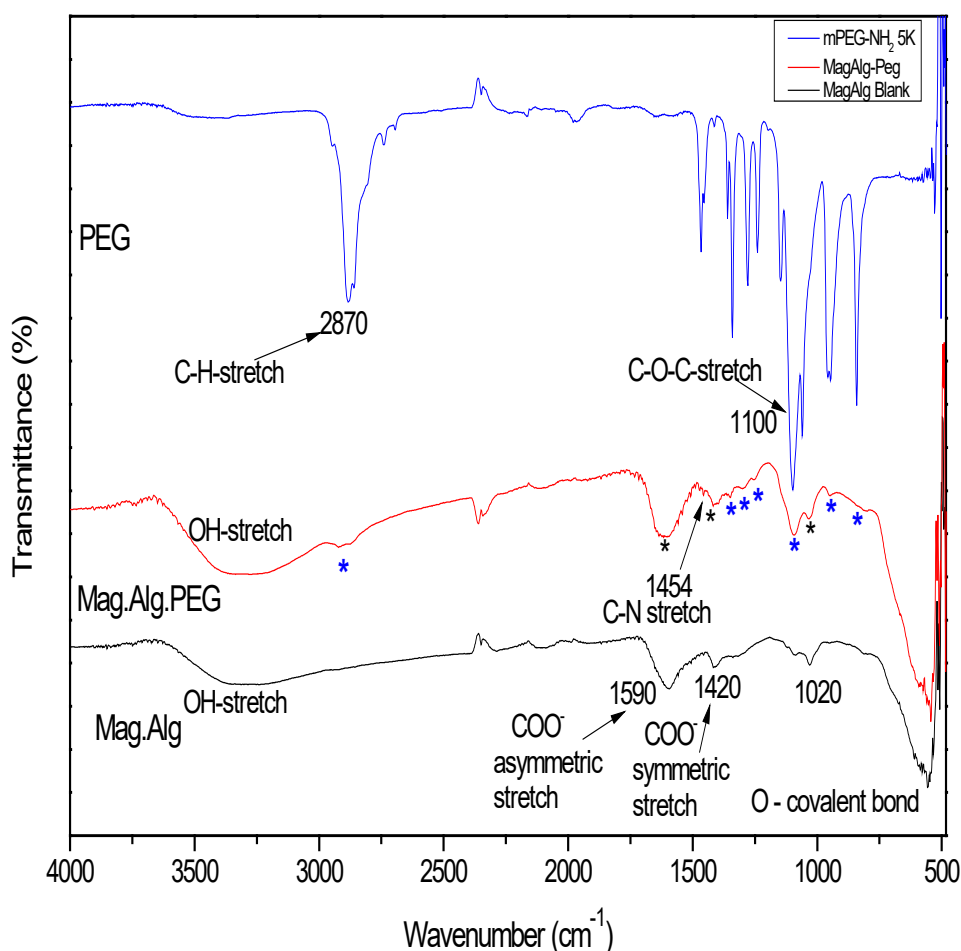
Γενικά, παρατηρείται διαφορά στο μέσο μέγεθος που προέκυψε από το TEM και στην υδροδυναμική διάμετρο των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg και MagAlg (Πίνακας 4). Λόγω της προσθήκης ενός ακόμα πολυμερούς τα νανοσωματίδια MagAlg-Peg φαίνεται να είναι λίγο μεγαλύτερα από τα MagAlg. Επίσης το μέγεθος που προκύπτει από τη μικροσκοπία είναι μικρότερο συγκριτικά με την υδροδυναμική διάμετρο, η οποία προκύπτει από το DLS. Το DLS μετρά την υδροδυναμική διάμετρο διεσπαρμένων σωματιδίων, ενώ το TEM παρέχει την εικόνα της επιφάνειας των σωματιδίων ανάλογα με το πόσα από τα προσπίπτοντα ηλεκτρόνια μεταδίδονται μέσω του δείγματος. Ως εκ τούτου, το μέγεθος που λαμβάνεται από το DLS είναι συνήθως μεγαλύτερο από το TEM (Bhattacharjee, 2016).

Πίνακας 4: Συγκριτικά αποτελέσματα μέσου μεγέθους και υδροδυναμικής διαμέτρου μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg και MagAlg-Peg.

	Μέσο μέγεθος (nm) TEM	Υδροδυναμική διάμετρος (nm) DLS
MagAlg	44 (+/- 16,1)	87,7 (+/- 5,8)
MagAlg-Peg	56,5 (+/- 18)	92,8 (+/- 4,1)

3.2.6 Φασματοσκοπία υπερύθρου

Για τον έλεγχο της πρόσδεσης του πολυμερούς mPEG-NH₂ στα μαγνητικά νανοσωματίδια MagAlg χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία υπερύθρου ATR FT-IR. Το πολυμερές mPEG-NH₂ χρησιμοποιήθηκε για την τροποποίηση της επιφάνειας των μαγνητικών νανοσωματιδίων και η πρόσδεση του στο πολυμερικό τους κέλυφος έγινε με την αντίδραση πεγκυλίωσης και τον σχηματισμό αμιδικού δεσμού. Για την διεξαγωγή συμπερασμάτων μελετήθηκαν δείγματα μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg, πεγκυλιωμένων μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg και του ελεύθερου πολυμερούς mPEG-NH₂, έτσι ώστε να γίνει σύγκριση των φασμάτων τους.



Διάγραμμα 13: Φάσμα υπέρυθρου ATR FT-IR των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg, MagAlg-Peg και του πολυμερούς mPEG-NH₂.

Στο Διάγραμμα 13 παρουσιάζονται συγκριτικά τα τρία φάσματα υπέρυθρου. Η κορυφή στην περιοχή 2800-2900 cm⁻¹ του ελεύθερου πολυμερούς mPEG-NH₂, η οποία οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού C-H, εμφανίζεται επίσης στο φάσμα των νανοσωματιδίων MagAlg-Peg με μειωμένη ένταση, ενώ δεν εμφανίζεται στο φάσμα των νανοσωματιδίων MagAlg, τα οποία δεν περιέχουν mPEG-NH₂. Η κορυφή στα 1100 cm⁻¹ οφείλεται στη χαρακτηριστική ομάδα C-O-C του πολυμερούς mPEG-NH₂ και εμφανίζεται στα φάσματα των MagAlg-Peg και mPEG-NH₂. Λόγω του αλγινικού που περιέχουν τα νανοσωματίδια, παρατηρούμε τις κορυφές στα 1590 cm⁻¹ και 1420 cm⁻¹ οι οποίες οφείλονται σε δονήσεις τάσης των καρβοξυλομάδων του πολυμερούς και εμφανίζονται στα φάσματα των MagAlg και MagAlg-Peg νανοσωματιδίων (Soares, Santos, Chierice, & Cavaleiro, 2004). Η κορυφή στα 1454 cm⁻¹ στο φάσμα του MagAlg-Peg αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού C-N, ο οποίος προέρχεται από

την πρόσδεση του πολυμερούς mPEG-NH₂ στα νανοσωματίδια με την αντίδραση πεγκυλίωσης.

3.3 Αποτελέσματα φόρτωσης και αποδέσμευσης του φαρμάκου TDZD-8

Η μελέτη της φόρτωσης του φαρμάκου TDZD-8 στα μαγνητικά νανοσωματίδια MagAlg-Peg πραγματοποιήθηκε για ποσότητα 100ppm φαρμάκου. Γενικά, η φόρτωση εκφράσθηκε με τρεις τρόπους ως:

- η μάζα του φορτωμένου φαρμάκου, προς το άθροισμα της μάζας των μαγνητικών νανοσωματιδίων και της μάζας του φορτωμένου φαρμάκου, επί 100% (Loading Capacity %)
- η αρχική μάζα του φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκε, προς το άθροισμα της μάζας των μαγνητικών νανοσωματιδίων και της μάζας του φορτωμένου φαρμάκου, επί 100% (Theoretical Loading %).
- η μάζα του φορτωμένου φαρμάκου, προς την αρχική μάζα του φαρμάκου που χρησιμοποιήθηκε, επί 100% (Entrapment Efficiency %).

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα Loading Capacity %, Theoretical Loading % και Entrapment Efficiency %.

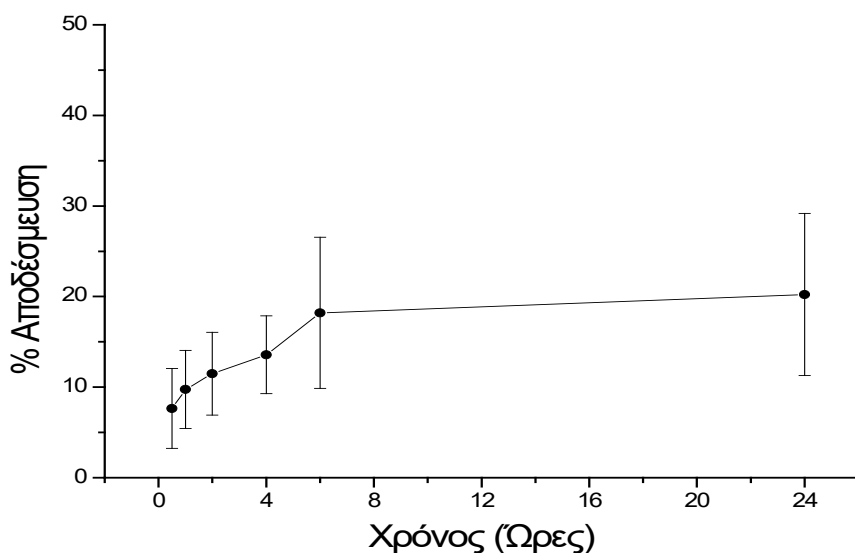
Πίνακας 5: Αποτελέσματα φόρτωσης 100ppm φαρμάκου στα μαγνητικά νανοσωματίδια MagAlg-Peg.

Loading Capacity %	2,6 ($\pm$ 0,2)
Theoretical Loading %	2,9 ($\pm$ 0,3)
Entrapment Efficiency %	89,4 ($\pm$ 3,5)

Η % φόρτωση (Loading Capacity %) του φαρμάκου στα μαγνητικά νανοσωματίδια ήταν 2,6% και η % θεωρητική φόρτωση (Theoretical Loading %) είχε τιμή 2,9%. Η μέση τιμή της % απόδοσης της παγίδευσης του φαρμάκου (Entrapment Efficiency %) ήταν υψηλή και έφτασε σε ποσοστό 89,4%.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η αποδέσμευση του φορτωμένου φαρμάκου από τα μαγνητικά νανοσωματίδια. Στο Διάγραμμα 14 παρουσιάζεται η καμπύλη αποδέσμευσης σε διάρκεια 24 ωρών για όλες τις δοκιμές αποδέσμευσης που πραγματοποιήθηκαν. Το % ποσοστό αποδέσμευσης του φαρμάκου ορίζεται ως: η μάζα του φαρμάκου που αποδεσμεύτηκε προς τη μάζα του φαρμάκου που φορτώθηκε στα νανοσωματίδια, επί

100%. Η μέγιστη αποδέσμευση έφτασε σε ποσοστό 30% στις 24 ώρες και η μέση αποδέσμευση όλων των δοκιμών σε ποσοστό 20% στις 24 ώρες. Γενικά, η μεγαλύτερη ποσότητα φαρμάκου αποδεσμευόταν στις πρώτες έξι ώρες της διαδικασίας, ενώ μετά ο ρυθμός αποδέσμευσης μειωνόταν.



Διάγραμμα 14: Καμπύλη αποδέσμευσης του φαρμάκου TDZD-8 από τα μαγνητικά νανοσωματίδια MagAlg-Peg σε διάρκεια 24 ωρών.

3.4 Αποτελέσματα φόρτωσης και διαρροής της χρωστικής Rhodamine 6G

Η φόρτωση της χρωστικής Rhodamine 6G πραγματοποιήθηκε με την δημιουργία αμιδικού δεσμού μεταξύ της χρωστικής και του αλγινικού οξέος των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg. Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα Loading Capacity %, Theoretical Loading % και Entrapment Efficiency %.

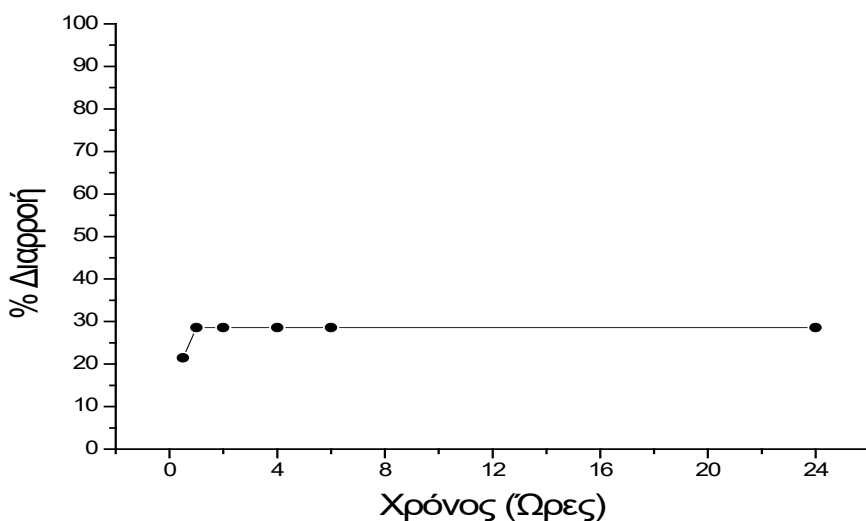
Πίνακας 6: Αποτελέσματα φόρτωσης 100ppm της χρωστικής Rhodamine 6G στα μαγνητικά νανοσωματίδια MagAlg-Peg.

Loading Capacity %	1,8
Theoretical Loading %	2,8
Entrapment Efficiency %	63,6

Η % φόρτωση (Loading Capacity %) για 100ppm χρωστικής στα μαγνητικά νανοσωματίδια ήταν 1,8% και η % θεωρητική φόρτωση (Theoretical Loading %) είχε

τιμή 2,8%. Η % απόδοση της παγίδευσης της χρωστικής (Entrapment Efficiency %) ήταν 63,6%.

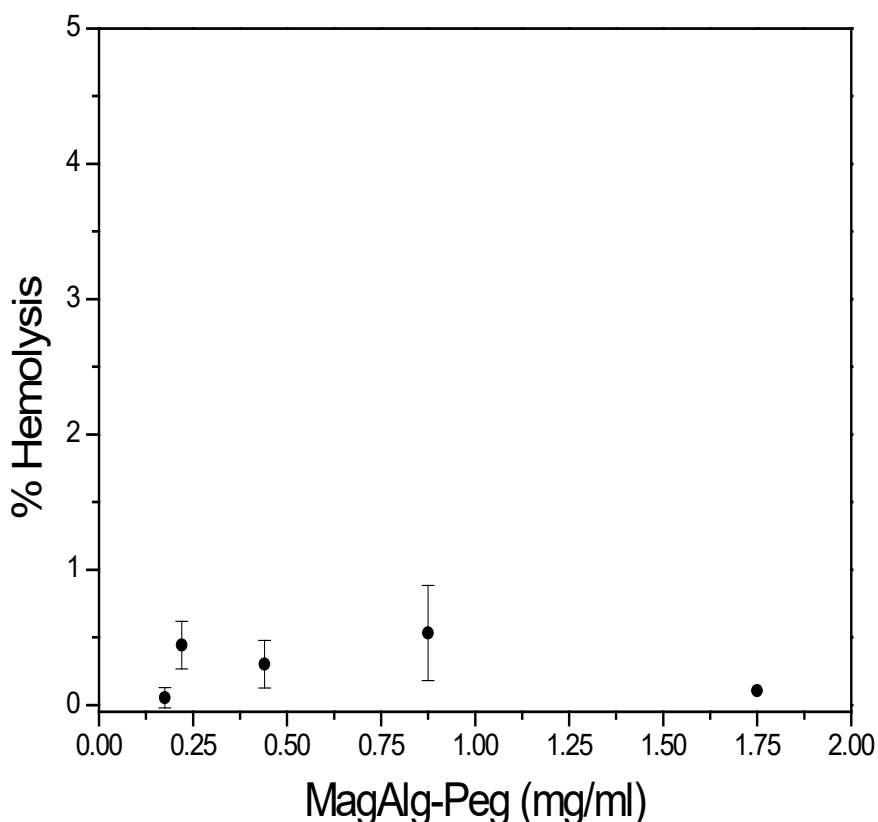
Τα αποτελέσματα διαρροής της φορτωμένης χρωστικής από τα μαγνητικά νανοσωματίδια παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 15. Το % ποσοστό διαρροής της χρωστικής ορίζεται ως: η μάζα της χρωστικής που διέρρευσε προς τη μάζα της χρωστικής που φορτώθηκε στα νανοσωματίδια, επί 100%. Διαρροή χρωστικής συνέβη μόνο στην πρώτη ώρα της διαδικασίας σε ποσοστό 28,5%, ενώ από εκεί και έπειτα η διαρροή ήταν μηδενική.



Διάγραμμα 15: Καμπύλη διαρροής της χρωστικής Rhodamine 6G από τα μαγνητικά νανοσωματίδια MagAlg-Peg σε διάρκεια 24 ωρών.

3.5 Δοκιμασία αιμόλυσης

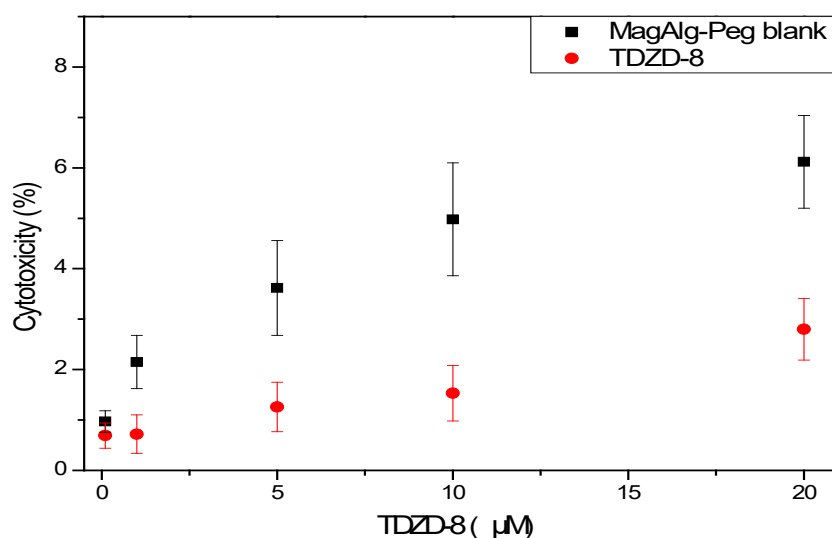
Για την αξιολόγηση της συμπεριφοράς των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg παρουσία ερυθρών αιμοσφαιρίων πραγματοποιήθηκε δοκιμασία αιμόλυσης για δείγματα νανοσωματιδίων αυξανόμενων συγκεντρώσεων. Τα αποτελέσματα εκφράσθηκαν ως % ποσοστό αιμόλυσης και παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 16. Για καμία από τις συγκεντρώσεις μαγνητικών νανοσωματιδίων δεν παρατηρήθηκε αιμόλυση πάνω από 1%. Το ποσοστό αυτό είναι πολύ χαμηλό και αποτελεί μια πρώτη ένδειξη για την πιθανότητα χορήγησης των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg με ασφάλεια σε μελέτες *in vivo*.



Διάγραμμα 16: Ποσοστά % αιμόλυσης των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg.

3.6 Αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας σε φυσιολογικούς ινοβλάστες

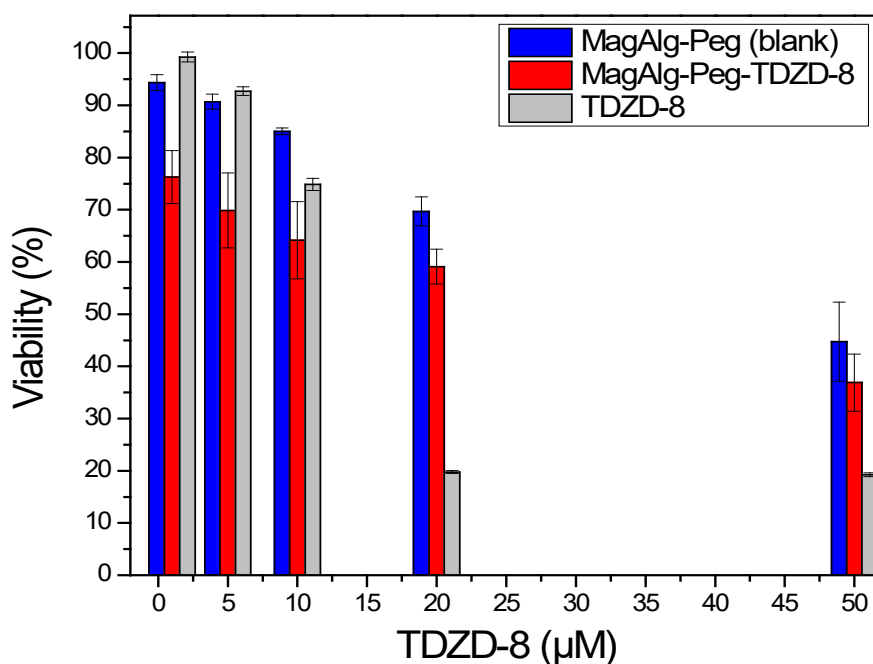
Σε επόμενο στάδιο, μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα που προκαλούν τα κενά μαγνητικά νανοσωματίδια MagAlg-Peg (blank) καθώς και το φάρμακο TDZD-8 σε φυσιολογικούς ινοβλάστες της σειράς NIH-3T3 μετά από 24 ώρες επώασης. Στο Διάγραμμα 17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εκφρασμένα ως % ποσοστό κυτταροτοξικότητας τόσο για το φάρμακο, όσο και για τα νανοσωματίδια. Σε ό,τι αφορά το φάρμακο, αυτό παρουσιάζει μέγιστη κυτταροτοξικότητα σε ποσοστό 2,8% σε συγκέντρωση 20μM. Η συγκέντρωση των κενών μαγνητικών νανοσωματιδίων που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση φαρμάκου 20μM παρουσιάζει μέγιστη κυτταροτοξικότητα σε ποσοστό 6,1%. Συνεπώς, η κυτταροτοξικότητα τόσο των blank νανοσωματιδίων, όσο και του φαρμάκου σε φυσιολογικά κύτταρα είναι πολύ μικρή υποδεικνύοντας την βιοσυμβατότητα τους, η απόδειξη της οποίας όμως απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.



Διάγραμμα 17: Ποσοστά κυτταροτοξικότητας των κενών μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg (blank) και του φαρμάκου TDZD-8 σε φυσιολογικούς ινοβλάστες.

3.7 Αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα SH-SY5Y

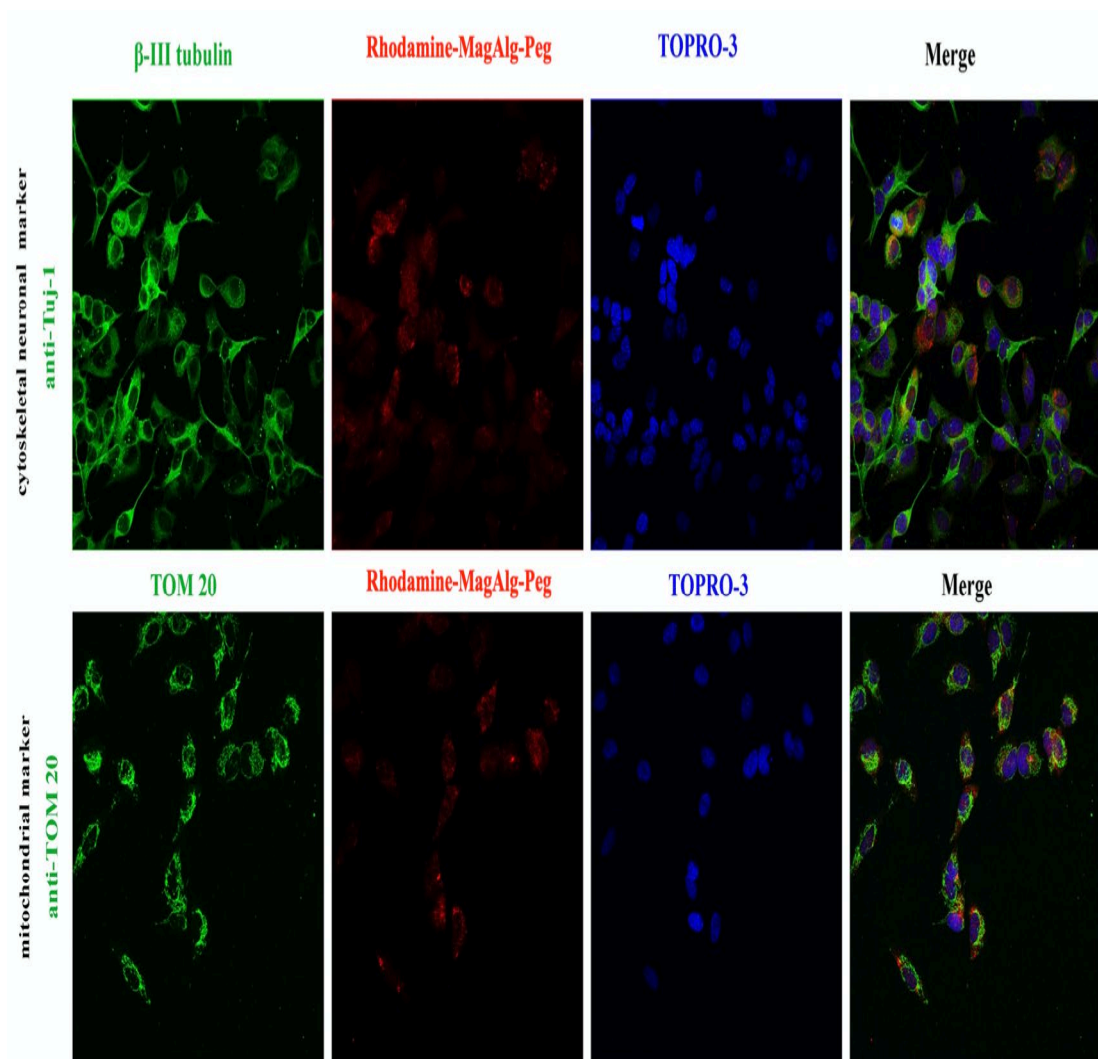
Μελέτη κυτταροτοξικότητας πραγματοποιήθηκε και σε κύτταρα της σειράς SH-SY5Y. Τα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν κενά μαγνητικά νανοσωματίδια (blank), μαγνητικά νανοσωματίδια φορτωμένα με φάρμακο TDZD-8 και το ελεύθερο φάρμακο TDZD-8. Στο Διάγραμμα 18 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εκφρασμένα ως % βιωσιμότητα μετά από 24 ώρες επώασης. Η βιωσιμότητα των κυττάρων για το δείγμα MagAlg-Peg-TDZD-8 με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση φαρμάκου (50μM) ήταν 37%, ενώ η βιωσιμότητα των κυττάρων για την αντίστοιχη ποσότητα κενών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg (blank) ήταν 45%. Η βιωσιμότητα των κυττάρων έφτασε σε ποσοστό 20% για δείγματα του φαρμάκου TDZD-8 συγκεντρώσεων 20μM και 50μM. Για όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν τα κενά νανοσωματίδια παρουσίασαν μικρότερη τοξικότητα από τα φορτωμένα με φάρμακο νανοσωματίδια. Έως και τα 10μM φαρμάκου η τοξικότητα που παρουσίασαν τα φορτωμένα νανοσωματίδια ήταν μεγαλύτερη της τοξικότητας του φαρμάκου, ενώ από τα 20μM και μετά το φάρμακο παρουσίασε την μεγαλύτερη τοξικότητα από όλα τα δείγματα.



Διάγραμμα 18: Ποσοστά βιωσιμότητας των κυττάρων SH-SY5Y μετά από επώαση 24 ωρών με δείγματα MagAlg-Peg (blank), MagAlg-Peg-TDZD-8 και φαρμάκου TDZD-8.

3.8 Αποτελέσματα πρόσληψης των μαγνητικών νανοσωματιδίων επισημασμένων με τη χρωστική Rhodamine 6G από κύτταρα SH-SY5Y

Μελετήθηκε η πρόσληψη των μαγνητικών νανοσωματιδίων MagAlg-Peg επισημασμένων με τη χρωστική Rhodamine 6G από κύτταρα της σειράς SH-SY5Y μετά από 24 ώρες επώασης. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε συνεστιακή μικροσκοπία. Έγινε χρώση του πυρήνα των κυττάρων με μπλε φθορίζουσα χρωστική TO-PRO-3 και του κυτταροσκελετού και των μιτοχονδρίων των κυττάρων με αντισώματα anti-Tuj-1 και anti-TOM20 αντίστοιχα (πράσινο χρώμα) (Εικόνα 23). Από τα αποτελέσματα της Εικόνας 23 νανοσωματίδια παρατηρούνται στην περιοχή του πυρήνα, στον κυτταροσκελετό και στα μιτοχόνδρια των κυττάρων.



Εικόνα 23: Εικόνες της πρόσληψης των μαγνητικών νανοσωματιδίων επισημασμένων με Rhodamine 6G από κύτταρα SH-SY5Y μετά από 24 ώρες επώασης. Με πράσινο έχει βαφεί στην πάνω σειρά ο κυτταροσκελετός και στην κάτω σειρά τα μιτοχόνδρια των κυττάρων. Ο πυρήνας των κυττάρων έχει βαφεί με μπλε φθορίζουσα χρωστική TO-PRO-3.

4. Συμπεράσματα

Στη παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε σύνθεση υβριδικών μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίων σιδήρου με τη μέθοδο της υδρολυτικής αλκαλικής καταβύθισης, παρουσία άλατος νατρίου αλγινικού οξέος. Για τη βελτίωση της σταθερότητας του κολλοειδούς συστήματος των νανοσωματιδίων αλλά και της βιοσυμβατότητας τους έγινε επικάλυψη της εξωτερικής επιφάνειας τους με αλυσίδες του πολυμερούς mPEG-NH₂. Στα νανοσωματίδια έγινε φόρτωση του αναστολέα TDZD-8 της GSK3-β κινάσης.

Με βάση τα αποτελέσματα που λήφθηκαν εξάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Τα πεγκυλιωμένα μαγνητικά νανοσωματίδια MagAlg-Peg παρουσιάζουν ικανοποιητικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και κολλοειδή σταθερότητα σε διαφορετικά υδατικά μέσα διασποράς (ηλεκτρολύτες) και βιο-σχετικά μέσα διασποράς. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενθαρρυντικά για την πιθανή ενδοφλέβια χορήγηση των νανοσωματιδίων.
- Τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν καλή ικανότητα φόρτωσης του φαρμάκου στο πολυμερικό τους υπόστρωμα. Η μελέτη του προφίλ αποδέσμευσης του φαρμάκου από τα νανοσωματίδια σε διάρκεια 24 ωρών οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αποδέσμευση του είναι παρατεταμένη, με το μεγαλύτερο ποσοστό φαρμάκου να αποδεσμεύεται τις πρώτες 6 ώρες.
- Από τα πειράματα αιμόλυσης των νανοσωματιδίων συμπεραίνουμε ότι τα νανοσωματίδια δεν προκαλούν αιμόλυση ακόμα και σε πολύ πυκνές συγκεντρώσεις. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια σημαντική πρώτη ένδειξη ότι τα νανοσωματίδια είναι ασφαλή για χρήση *in vivo*.
- Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας των κενών μαγνητικών νανοσωματιδίων (blank) σε φυσιολογικούς ινοβλάστες έδειξε ότι τα νανοσωματίδια δεν εμφανίζουν τοξικότητα, γεγονός που σε συνδυασμό με την απουσία αιμόλυσης υποδεικνύει τη βιοσυμβατότητα τους, η οποία όμως θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.
- Η μελέτη της κυτταροτοξικότητας των φορτωμένων με φάρμακο νανοσωματιδίων και του ελεύθερου φαρμάκου στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος SH-SY5Y έδειξε ότι για ορισμένες συγκεντρώσεις

του φαρμάκου, τα φορτωμένα νανοσωματίδια παρουσιάζουν μικρότερη κυτταροτοξικότητα σε σχέση με αυτή του ελεύθερου φαρμάκου.

- Από τα αποτελέσματα πρόσληψης των επισημασμένων με Rhodamine 6G νανοσωματιδίων από κύτταρα της σειράς SH-SY5Y προκύπτει ότι τα νανοσωματίδια εντοπίζονται μετά από 24ωρη επώαση στον κυτταροσκελετό, στα μιτοχόνδρια και στην περιοχή του πυρήνα των κυττάρων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτή τη μεταπτυχιακή εργασία, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα μαγνητικά νανοσωματίδια που συντέθηκαν είναι κατάλληλα για την περαιτέρω διερεύνηση των ιδιοτήτων τους *in vitro* και ιδιαίτερα *in vivo*, με τελικό στόχο τη χρήση τους ως φορείς ελεγχόμενης χορήγησης του φαρμάκου TDZD-8 για την αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer.

5. Βιβλιογραφία

- Αναστασοπούλου, Ι., Δρίτσα, Β., Θεοφανίδης, Θ., Υφαντής, Δ., & Υφαντής, Κ. (2015). Εφαρμογες Βιοϋλικών. Στο *Βιοϋλικά - Εφαρμογές* (σσ. 133-162). Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών.
- Βούλγαρη, Ε. (2013). *Υβριδικά μαγνητικά νανοσωματίδια για τη στοχευμένη χορήγηση σισπλατίνης σε καρκινικούς όγκους*. Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία. Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Φαρμακευτικής.
- Κουή, Μ., Αβδελίδης, Ν., Θεοδωρακέας, Π., & Χειλάκου, Ε. (2015). Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση. Στο *Μη καταστρεπτικές και φασματοσκοπικές μέθοδοι εξέτασης των υλικών* (σσ. 190-215). Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών.
- Κυριακίδης, Γ., & Μπίνας, Β. (2014). *Εισαγωγή στην Ηλεκτρονική Μικροσκοπία*. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Τμήμα Φυσικής.
- Λιαροκάκης, Ε. (χ.χ.). *Κεφάλαιο 7: Μαγνητικά Υλικά και Ιδιότητες I (Σημειώσεις)*. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών .
- Πολύζου, Α. (2017). *Φυσικοχημική Μελέτη Κονιαμάτων και Επιχρισμάτων από την Μινωική Κυδωνία Χανίων*. Διπλωματική εργασία. Πολυτεχνείο Κρήτης, Τμήμα Μηχανικών Ορυκτών Πόρων.
- Πρίκας, Α. (2008). *Φυσική Γενική & Σύγχρονη*. Εκδόσεις Ζήτη.
- Τζούμπα, Ο. (2015). *Σύνθεση και ανοσολογική μελέτη επιτόπων της γλυκοπρωτεΐνης GP41 του HIV – I*. Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Χημείας.
- Τραχανάς, Σ. (2013). *Κβαντομηχανική I*. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Χατζηϊωάννου, Θ., & Κουμπάρης, Μ. (2014). *Ενόργανη Ανάλυση*. Αθήνα: Δ. Μαυρομμάτη.
- Amin, F., Hoshier, A., Do, T., Noh, Y., Shah, S., Khan, M., . . . Kim, M. (2017). Osmotin-loaded magnetic nanoparticles with electromagnetic guidance for the treatment of Alzheimer's disease. *Nanoscale*, 9(30), 10619-10632.

- Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M., & Santamaría, J. (2007). Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nanotoday*, 2(3), 22-32.
- Avila, J., León-Espinosa, G., García, E., García-Escudero, V., Hernández, F., & DeFelipe, J. (2012). Tau Phosphorylation by GSK3 in Different Conditions. *Int J Alzheimers Dis.*, 2012.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351.
- Bhowmik, D., Gopinath, H., Kumar, B., Duraivel, S., & Kumar, K. (2012). Controlled Release Drug Delivery Systems. *The Pharma Innovation Journal*, 1(10), 24-32.
- Bychkova, A., Sorokina, O., Rosenfeld, M., & Kovarski, A. (2012). Multifunctional biocompatible coatings on magnetic nanoparticles. *Russian Chemical Reviews*, 81(11), 1026-1050.
- Ceña, V., & Játiva, P. (2018). Nanoparticle crossing of blood–brain barrier: a road to new therapeutic approaches to central nervous system diseases. *Nanomedicine (Lond.)*, 13(13), 1513-1516.
- Champagne, P., Westwick, H., Bouthillier, A., & Sawan, M. (2018). Colloidal stability of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the central nervous system: a review. *Nanomedicine (Lond.)*, 13(11), 1385-1400.
- Coelho, J., Ferreira, P., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A., Góis, J., & Gil, M. (2010). Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA Journal*, 1(1), 164–209.
- Davis, S. (2000). Drug delivery systems. *Interdisciplinary Science Reviews*, 25(3), 175-183.
- El-Boubbou, K. (2018). Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: preparation, conjugation and delivery. *Nanomedicine (Lond.)*, 13(8), 929-952.
- El-Say, K., & El-Sawy, H. (2017). Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. *Int J Pharm.*, 528(1-2), 675–691.
- Estelrich, J., Escribano, E., Queralt, J., & Busquets, M. (2015). Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically-Guided and Magnetically-Responsive Drug Delivery. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 8070-8101.

- Geldenhuys, W. J., Khayat, M. T., Yun, J., & Nayeem, M. A. (2017, Feb). Drug Delivery and Nanoformulations for the Cardiovascular System. *Res Rev Drug Deliv.*, 1(1), 32–40.
- Gizurarson, S. (2012, Nov;). Anatomical and Histological Factors Affecting Intranasal Drug and Vaccine Delivery. *Curr Drug Deliv.*, 9(6), 566–582.
- Gorski, C., & Scherer, M. (2010). Determination of nanoparticulate magnetite stoichiometry by Mössbauer spectroscopy, acidic dissolution, and powder X-ray diffraction: A critical review. *American Mineralogist*, 95, 1017-1026.
- Gubin, S., Koksharov, Y., Khomutov, G., & Yurkov, G. (2005). Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties. *Russian Chemical Reviews*, 74(6), 489-520.
- Heller, J., & Trescony, P. (1979). Controlled drug release by polymer dissolution. II: Enzyme-mediated delivery device. *J. Pharm. Sci.*, 68 (7), 919–921.
- Hersh, D., Wadajkar, A., Roberts, N., Perez, J., Connolly, N., Frenkel, V., . . . Kim, A. (2016). Evolving Drug Delivery Strategies to Overcome the Blood Brain Barrier. *Curr Pharm Des.*, 22(9), 1177-1193.
- Issa, B., Obaidat, I., Albiss, B., & Haik, Y. (2013). Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(11), 21266-21305.
- Ivanova, E., Bazaka, K., & Crawford, R. (2014). Advanced synthetic polymer biomaterials derived from organic sources. In *New functional biomaterials for medicine and healthcare*. Woodhead Publishing.
- Jadhav, K. R., Gambhire, M. N., Shaikh, I. M., Kadam, V. J., & Pisal, S. S. (2007). Nasal Drug Delivery System-Factors Affecting and Applications. *Current Drug Therapy*, 2(1), 27-38.
- Jain, K. K. (2014). Current Status and Future Prospects of Drug Delivery Systems. In K. K. Jain (Ed.), *Drug Delivery System* (Vol. 1141, pp. 1-55). New York: Springer Science+Business Media.
- Kainz, K., Tadic, J., Zimmermann, A., Pendl, T., Carmona-Gutierrez, D., Ruckenstein, C., Eisenberg, T., & Madeo, F. (2017). Methods to Assess Autophagy and Chronological Aging in Yeast. In Colowick, S.P., & Kaplan, N.O., *Methods in Enzymology* (Vol. 588, pp. 367-394). Elsevier.

- Kong, S., Lee, J., Ramachandran, S., Eliceiri, B., Shubayev, V., Lal, R., & Jin, S. (2012). Magnetic targeting of nanoparticles across the intact blood–brain barrier. *Journal of Controlled Release*, 164(1), 49-57.
- Kudr, J., Haddad, Y., Richtera, L., Heger, Z., Cernak, M., Adam, V., & Zitka, O. (2017). Magnetic Nanoparticles: From Design and Synthesis to Real World Applications. *Nanomaterials (Basel)*, 7(9), 243.
- Labiris, N. R., & Dolovich, M. B. (2003, Dec). Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol*, 56(6), 588–599.
- Lee, J., Kim, J., & Cheon, J. (2013). Magnetic Nanoparticles for Multi-Imaging and Drug Delivery. *Molecules and Cells*, 35(4), 274-284.
- Llorens-Martín, M., Jurado, J., Hernández, F., & Avila, J. (2014). GSK-3 β , a pivotal kinase in Alzheimer disease. *Front Mol Neurosci.*, 7(46), 1-11.
- Madaan, K., Kumar, S., Poonia, N., Lather, V., & Pandita, D. (2014, Jul-Sep). Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues. *J Pharm Bioallied Sci.*, 6(3), 139–150.
- Mahmud, A., Xiong, X., Aliabadi, H., & Lavasanifar, A. (2007, Nov). Polymeric micelles for drug targeting. *J Drug Target.*, 15(9), 553-584.
- Martinez, A., Alonso, M., Castro, A., Pérez, C., & Moreno, F. (2002). First Non-ATP Competitive Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β) Inhibitors: Thiadiazolidinones (TDZD) as Potential Drugs for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.*, 45(6), 1292-1299.
- Masserini, M. (2013). Nanoparticles for Brain Drug Delivery. *ISRN Biochem*.
- Matea, C., Mocan, T., Tabaran, F., Pop, T., Mosteanu, O., Puia, C., . . . Mocan, L. (2017). Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. *Int J Nanomedicine*.(12), 5421–5431.
- Meyer, J. S., & Quenzer, L. F. (2005). *Psychopharmacology: Drugs, the Brain, and Behavior, Second Edition*. Sinauer Associates.
- Mishra, B., Patel, B., & Tiwari, S. (2010). Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine: NBM*(6), 9-24.

- Mishra, N., Pant, P., Porwal, A., Jaiswal, J., Samad, M., & Tiwari, S. (2016). Targeted Drug Delivery: A Review. *Am. J. PharmTech Res.*, 6(1).
- Misra, A., Ganesh, S., Shahiwala, A., & Shah, S. P. (2003, May-Aug). Drug delivery to the central nervous system: a review. *J Pharm Pharm Sci.*, 6(2), 252-273.
- Mohomed, K. (2016). *Thermogravimetric Analysis (TGA) Theory and Applications*. Retrieved from: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=5876b5fbcdb5c2fe1c4be189&assetKey=AS%3A449492081221632%401484178671185>
- Montalbetti, C.A.G.N., Falque, V. (2005). Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, 61, 10827–10852.
- Neuberger, T., Schöpf, B., Hofmann, H., Hofmann, M., & von Rechenberg, B. (2005). Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293(1), 483-496.
- Niekraszewicz, B., & Niekraszewicz, A. (2009). The structure of alginate, chitin and chitosan fibres. In S. Eichhorn, *Handbook of Textile Fibre Structure*. Woodhead Publishing 2009.
- O'Handley, R. (2000). *Modern Magnetic Materials: Principles and Applications*. John Wiley and Sons, INC.
- Prausnitz, M. R., & Langer, R. (2008, Nov). Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol.*, 26(11), 1261–1268.
- Prausnitz, M. R., Mitragotri, S., & Langer, R. (2004). Current Status And Future Potential Of Transdermal Drug Delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(2), 115-124.
- Reichel, V., & Faivre, D. (2017). Magnetite Nucleation and Growth. Στο Van Driessche, A., Kellermeier, M., Benning, L., & Gebauer, D., *New Perspectives on Mineral Nucleation and Growth*. Springer, Cham.
- Robinson, D., & Mauger, J. (1991, Oct). Drug delivery systems. *Am J Hosp Pharm*, 48(10 Suppl 1), 14-23.
- Sarigiannis, Y., Kolokithas-Ntoukas, A., Beziere, N., Zboril, R., Papadimitriou, E., Avgoustakis, K., . . . Bakandritsos, A. (2016). Synthesis and evaluation of

- condensed magnetic nanocrystal clusters with in vivo multispectral optoacoustic tomography for tumour targeting. *Biomaterials*, 91, 128-139.
- Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S., Sood, A., & Hua, S. (2015, Dec). Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front Pharmacol.*, 1(6), 286.
- Shah, R., Shah, R., Pawar, R., & Gayakar, P. (2015). Uv-Visible Spectroscopy- A Review. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*, 5(5), 490-505.
- Soares, J., Santos, J., Chierice, G., Cavaleiro, E. (2004). Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclet. Quím.*, 29(2).
- Staniland, S., Rawlings, A., Bramble, J., Tolosa, J., Wilson, O., García-Martínez, J., & Binns, C. (2014). Novel Methods for the Synthesis of Magnetic Nanoparticles. *Frontiers of Nanoscience*, 6, 85-128.
- Stetefeld, J., McKenna, S., & Patel, T. (2016, Dec). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev.*, 8(4), 409–427.
- Suk, J., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., & Ensign, L. (2016). PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.*, 99, 28-51.
- Swarbrick, J. (Επιμ.). (2007). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Third Edition*. Informa Healthcare USA, Inc.
- Thomsen, L., Linemann, T., Pondman, K., Lichota, J., Kim, K., Pieters, R., . . . Moos, T. (2013). Uptake and Transport of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles through Human Brain Capillary Endothelial Cells. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(10), 1352-1360.
- Thomsen, L., Thomsen, M., & Moos, T. (2015). Targeted drug delivery to the brain using magnetic nanoparticles. *Therapeutic Delivery*, 6(10), 1145-1155.
- Valenzuela, R., Fuentes, M., Parra, C., Baeza, J., Duran, N., Sharma, S., . . . Freer, J. (2009). Influence of stirring velocity on the synthesis of magnetite nanoparticles (Fe₃O₄) by the co-precipitation method. *Journal of Alloys and Compounds*, 488(1), 227-231.

- Wachsmann, P., Lamprecht, A. (2012). Polymeric Nanoparticles for the Selective Therapy of Inflammatory Bowel Disease. In Düzgüneş, N., *Methods in Enzymology* (Vol. 508, pp. 377-397). Elsevier.
- Xu, Q., Kambhampati, S., & Kannan, R. (2013). Nanotechnology approaches for ocular drug delivery. *Middle East African Journal of Ophthalmology*, 20(1), 26-37.
- Zhou, Y., Peng, Z., Seven, E., & Leblanc, R. (2018). Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 270, 290-303.