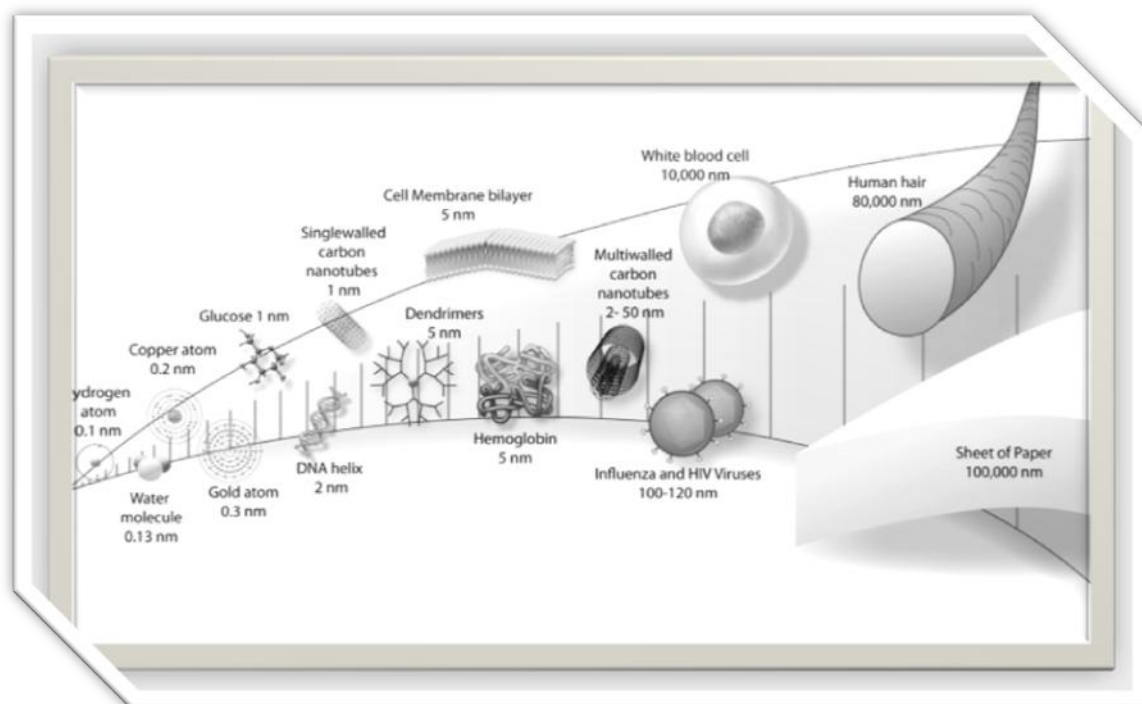




**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΙΙΙ: ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ**  
**ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ**

**Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας:**  
**Τοξικότητα Νανοδομημάτων**



**ΒΛΑΧΟΥ ΝΙΚΟΛΕΤΤΑ**

**Επιβλέπων καθηγητής : Κ.Α. Χαριτίδης, Καθηγητής Ε.Μ.Π.**

**ΑΘΗΝΑ 2013**

*Εγκρίθηκε από την τριμελή επιτροπή:*

**Ι. Ζιώμας, Καθηγητής Ε.Μ.Π.....(Υπογραφή)**

**Α. Καραντώνης, Λέκτορας Ε.Μ.Π.....(Υπογραφή)**

**Κ. Χαριτίδης, Καθηγητής Ε.Μ.Π.....(Υπογραφή)**

**ΑΘΗΝΑ 2013**

*Copyright © Βλάχου Νικολέττα, 2013*

*Με επιφύλαξη κάθε δικαιώματος. All rights reserved.*

“There is plenty of room at the bottom”

Richard P. Feynman



# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Τοξικότητα Νανοσωματιδίων» εκπονήθηκε σε συνεργασία της Σχολής Χημικών Μηχανικών, Τομέας Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών (Τομέας ΙΙΙ) με το εργαστήριο SOL-GEL του Ινστιτούτου Επιστήμης Υλικών Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος.

Πρώτο απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή Κ. Α. Χαριτίδη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου ένα καινούργιο και δύσκολο θέμα σε παγκόσμιο επίπεδο καθώς και την ερευνητική του ομάδα η οποία με εφοδίασε με πλούσιο και ιδιαίτερα χρήσιμο βιβλιογραφικό υλικό.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Ευθυμιάδου Ελένη, η οποία εργάζεται ως μεταδιδακτορική ερευνήτρια στο εργαστήριο SOL-GEL, για την επικουρία της διπλωματικής εργασίας, τις διορθώσεις στο κείμενο και την παροχή δεδομένων από προγενέστερα πειράματα του εργαστηρίου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο του εργαστηρίου SOL-GEL στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος» Ερευνητή Α' κ. Γ. Κόρδα.

Ευχαριστώ θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής (Καθηγητή Ι. Ζιώμα και Λέκτορα Α. Καραντώνη) για την συμμετοχή τους στην επιτροπή και τα σχόλιά τους.

**Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και γενικότερα όλους όσους με στήριξαν στις δυσκολίες που παρουσιάστηκαν κατά τη διάρκεια της τελευταίας μου και πιο σημαντικής εργασίας για την απόκτηση του πτυχίου.**

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση των, μέχρι τώρα, γνωστών παραγόντων που διέπουν την τοξικότητα των νανοϋλικών και μετατρέπουν ανενεργά υλικά σε άκρως επικίνδυνα υλικά για τον άνθρωπο και το περιβάλλον γενικότερα, με το μόνο το οποίο αλλάζει να είναι τουλάχιστον η μια τους διάσταση. Η σημαντικότερη αιτία για αυτό, αποτελεί το γεγονός ότι στη νανοκλίμακα κυρίαρχο ρόλο στην επεξήγηση των φαινομένων που λαμβάνουν χώρα έχει η κβαντομηχανική φυσική και όχι η κλασσική φυσική. Έτσι, ότι μέχρι στιγμής μπορούσε να θεωρηθεί δεδομένο, πρέπει να τεθεί ξανά υπό διερεύνηση. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι μοναδικές ιδιότητες που κάνουν την χρήση νανοϋλικών τόσο ελκυστική, για διάφορες εφαρμογές σε ποικίλους τομείς, είναι οι ίδιες που πρέπει να τεθούν υπό μικροσκόπιο για τη διερεύνηση των συνεπειών που μπορούν να έχουν σε όλα τα οικοσυστήματα. Η συγκεκριμένη εργασία περιορίστηκε μόνο σε ό,τι αφορά άμεσα τον άνθρωπο χωρίς να γίνουν άμεσα αναφορές για επιπτώσεις στο περιβάλλον.

Αρχικά, παραθέτετε μια κατηγοριοποίηση των νανοϋλικών, ανάλογα με τη διέλευση και τη σύνθεσή τους. Στη συνέχεια, αναλύονται οι μηχανισμοί με τους οποίους μπορούν να εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό γενικότερα και στο εσωτερικό των κυττάρων ειδικότερα. Στο δεύτερο κεφάλαιο, γίνεται μια διερεύνηση των παραγόντων που συνήθως προσδιορίζονται για τον χαρακτηρισμό των νανοϋλικών και οι οποίοι και έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην εμφάνιση τοξικών συνεπειών στον άνθρωπο. Παράλληλα, γίνεται μια διάκριση των ειδών τοξικότητας σε επιθυμητή, όπως είναι περιπτώσεις που νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται για ιατρικούς σκοπούς στην εξάλειψη ασθενειών, και μη επιθυμητή. Έτσι δεν θα μπορούσαν να μην αναφερθούν και οι τρόποι που χρησιμοποιούνται για την μετρίαση ή στόχευση αυτών των συνεπειών για περιπτώσεις που σχετίζονται με τη χρήση νανοσωματιδίων ως θεραπευτική αγωγή για διάφορες ασθένειες όπως αυτή των διαφόρων ειδών καρκίνου. Τελειώνοντας το δεύτερο κεφάλαιο συγκρίνονται οι διάφορες μέθοδοι που υπάρχουν σήμερα για την αξιολόγηση της τοξικότητας ή μη των νανοσωματιδίων που χρησιμοποιούνται για θεραπευτικές αγωγές.

Στα επόμενα δύο κεφάλαια περιγράφηκε η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον *in vitro* προσδιορισμό της τοξικότητας νανοσφαιρών PMMA με εγκλεισμένο αντικαρκινικό φάρμακο (Doxorubicin) σε κύτταρα καρκίνου του μαστού. Παραθέτετε ο τρόπος σύνθεσης αυτών των νανοσωματιδίων, η διαδικασία του εγκλεισμού του φαρμάκου, ο χαρακτηρισμός τους με διάφορες τεχνικές ανάλυσης όπως επίσης και η βιολογική τους αξιολόγηση με τη διαδικασία MTT.

Στο παράρτημα που ακολουθεί, αναφέρονται τα παγκόσμια πρότυπα (ISO) που υπάρχουν αυτή τη στιγμή για τον τομέα των νανοτεχνολογιών όπως επίσης και τα χρηματοδοτούμενα ευρωπαϊκά προγράμματα σχετιζόμενα με τη νανοτεχνολογία και ειδικά

με την αξιολόγηση των κινδύνων και της τοξικότητας των νανοϋλικών. Τέλος, συγκρίνονται ποσοτικά και παραθέεται το ποσοστό των ερευνών που σχετίζονται με τα νάνο-ασφάλεια (nanosafety) σε σύγκριση με το ερευνητικό ποσοστό που ασχολείται είτε με την κατασκευή νανοϋλικών είτε με κάποια καινούργια εφαρμογή τους και σχολιάζονται τα αποτελέσματα.

Η έρευνα για τον τυχαίο και μη στοχευόμενο τρόπο εισαγωγής των νανοσωματιδίων στον ανθρώπινο οργανισμό θα συνεχιστεί με την αξιολόγηση όχι μόνο των κινδύνων/συνεπειών που μπορεί να προκαλέσουν αλλά και της πιθανότητας να λάβει χώρα ένα τέτοιο γεγονός ή ακόμα και κάποιο ατύχημα.



# ABSTRACT

Nanotechnology is the first major worldwide research initiative of the 21st century. Nanotechnologies are general purpose technologies that act as both the basis for technology solutions across a range of industrial problems or as a nexus for the convergence of other enabling technologies like biotechnologies, computational sciences, physical sciences, communication technologies, cognitive sciences, social psychology and other social sciences. However, there is currently great concern that engineered nanoparticles may exert unexpected toxicities and pose a threat to human health and the environment; on the other hand, nanoparticles may be exploited for targeted drug delivery and could reduce the adverse bystander effects of conventional drugs, including chemotherapeutic drugs. This thesis' goal is to determine all the factors that have crucial role in the appearance of toxicity effects in living organisms due to the use of nanomaterials. An analytical research of their effect has been made and presented, followed by a majority of examples and figures in order to better understand not only the potential consequences of their interactions with human, especially, but also to comprehend the toxic mechanisms that take place. Also it is provided a full knowledge of the current status of all the research programs funded by the European Union (FP6 & FP7) as well as some statistic data that concern the amount of projects regarding nanotoxicity compared to the number of projects that refer to nanotechnology in general and some conclusions are following.

In the first chapter it is mostly provided a great piece of information that concern the categorization of nanomaterials as well as the possible ways of nanomaterials' entrance in human organism. In order to understand properly the toxic effects that nanomaterials may exhibit, it is very important to comprehend first how they entered the human body in the first place, as this also plays an important role in their toxicity apart from their physicochemical properties. The possible routes of exposure that have been discussed are the inhalation, via the skin, through intestinal tract and finally via forced entry for pharmaceutical uses such as their injection. It is also been analyzed all the possible mechanisms that a substance may follow to penetrate a cell's membrane and it is mentioned which of this is more possible to follow the nanomaterials. This is also important for the toxicology assessment as it depicts the first interactions between nanomaterials and cells that will afterwards domain the cells' fate.

The second chapter is sacrificed in the understanding of all the physicochemical parameters that toxic effects depend on. Every single property that is known to cause toxicity is analyzed, providing a great amount of combined information that exists in various researches. Moreover toxicity it is divided into separate categories; the first refers to toxic effects that caused by accidentally interactions with nanomaterials and the second

one refers to controlled toxic effects that are desirable in order to cure diseases like cancer. So the properties that are mentioned are not only the ones that may cause serious health problems by accident but also some that many researchers are currently using in order to fight various types of cancer. It is also presented all the assays that are currently used to determine the cytotoxicity of such cures with the MTT assay to be analyzed as this one it is used in the experimental of this thesis.

The two following chapters are related to the experimental procedure that has been followed in order to determine whether the drug loaded PMMA nanoparticles with doxorubicin are effective enough for breast cancer cells. The characterization of those specific nanoparticles is mentioned and the results are presented among with some conclusions that accrued. Those results concern the optic characterization of nanoparticles, using the scanning electron microscope and the transmission electron microscope, the confirmation of nanoparticles' loading with the anticancer drug doxorubicin, using the infrared spectrometry, the calculation of drug loading from results of ultraviolet spectrometry and finally the determination of cytotoxic efficacy via MTT assay.

The last chapter summarizes the above and mentions some conclusions regarding all those information. As it will be fully understand no one currently could conduct any definite conclusions about the sophisticated issue of nanotoxicity. The suggested challenges that need to be addressed are to name but a few the generation of standardized, validated in vitro assays for nanosafety testing including a set of reference materials; the establish ex vivo models relevant for the specific routes of administration of nanomedicines; the development of in silico modeling approaches to predict the biological and toxicological responses of nanomedicines; the development of an understanding of the absorption, distribution, metabolism, and excretion of nanomaterials in vivo and the establishment of a paradigm for the understanding of factors that dictate nanomaterial interactions with living systems. It is also been referred to personal future objectives for research that concern this domain.

In the appendixes that follow are presented various tables as extra information to the above mentioned. Moreover, it has been gathered all the ISO standards that exist nowadays concerning the nanotechnology in order to observe the current lack of knowledge and standardization, something that has to be outreached. In the end, it is presented all the current EU projects among with some statistic data that refer to them so as to observe that a few have been done till now and a lot is needed to be done in order to fully understand the complex issue of nanotoxicity so as to be able to luxuriate all the potential benefits that nanotechnology can provide us. As Richard P. Feynman says:

***”There is plenty of room at the bottom”***



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ.....	5
1.2.1 ΦΥΣΙΚΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ (NATURAL NANOPARTICLES).....	6
1.2.2 ΑΝΘΡΩΠΟΓΕΝΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ (ANTHROPOGENIC NANOPARTICLES).....	6
1.2.3 ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ (ENGINEERED NANOPARTICLES).....	8
1.3. ΤΡΟΠΟΙ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ.....	13
1.3.1 ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ.....	14
1.3.2 ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	16
1.3.3 ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	18
1.3.4 ΜΕΣΩ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΕΚ ΠΡΟΘΕΣΕΩΣ.....	19
1.4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ.....	20
1.4.1. ΕΝΕΡΓΗΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ.....	20
1.4.2. ΠΑΘΗΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ.....	22
1.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 1 <sup>ΟΥ</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ.....	24

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	27
2.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ	
2.2.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ.....	32
2.2.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ.....	36
2.2.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ.....	38
2.2.3.1. ΦΟΡΤΙΟ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ.....	39
2.2.3.2. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ.....	41
2.2.3.2.a ΕΠΙΚΑΛΥΨΗ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ.....	42
2.2.3.2.b ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΜΙΚΡΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΤΟΧΕΥΣΗΣ.....	46
2.2.3.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ.....	51
2.2.3.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ.....	52

2.2.3.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ.....	52
2.3. ΤΡΟΠΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	53
2.4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 2 <sup>ΟΥ</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ.....	55
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ</b>	
3.1. ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΑΝΟΣΦΑΙΡΩΝ.....	60
3.2. ΕΠΙΚΑΛΥΨΗ ΝΑΝΟΣΦΑΙΡΩΝ.....	60
3.3. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	
3.3.1. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΤΙΚΗΣ ΔΕΣΜΗΣ (SEM) & ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΗΣ ΔΕΣΜΗΣ (TEM).....	60
3.3.2. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ (IR) .....	61
3.3.3. ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ (ULTRAVIOLET SPECTROMETRY).....	61
3.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ	
3.4.1. ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΦΑΡΜΑΚΟΥ (LADING AND RELEASE).....	61
3.4.2. MTT ASSAY.....	62
3.5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 3 <sup>ΟΥ</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ.....	63
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ</b>	
4.1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ	
4.1.1. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΤΙΚΗΣ ΔΕΣΜΗΣ (SEM) & ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΔΙΕΡΧΟΜΕΝΗΣ ΔΕΣΜΗΣ (TEM).....	64
4.1.2. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ (IR) .....	65
4.1.3. ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ (ULTRAVIOLET SPECTROMETRY).....	66
4.2. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ	
4.2.1. ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΦΑΡΜΑΚΟΥ (LADING AND RELEASE).....	67
4.2.2. MTT ASSAY.....	67
4.3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 4 <sup>ΟΥ</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ.....	69
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....</b>	<b>70</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.....</b>	<b>72</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2.....</b>	<b>78</b>



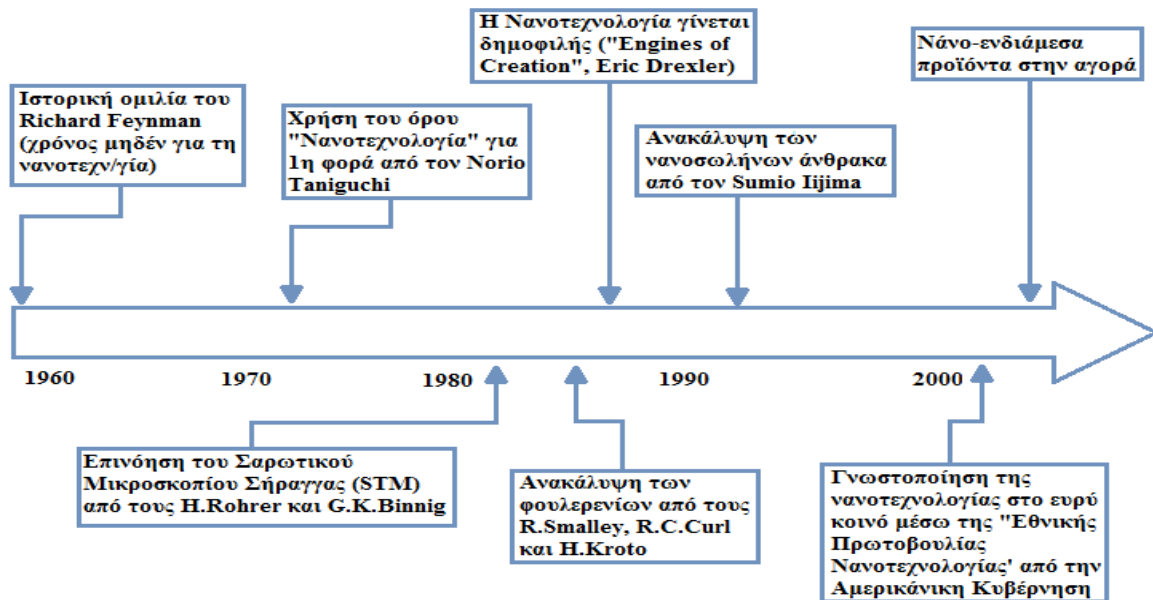
# Νανοσωματίδια

## 1.1 Εισαγωγή

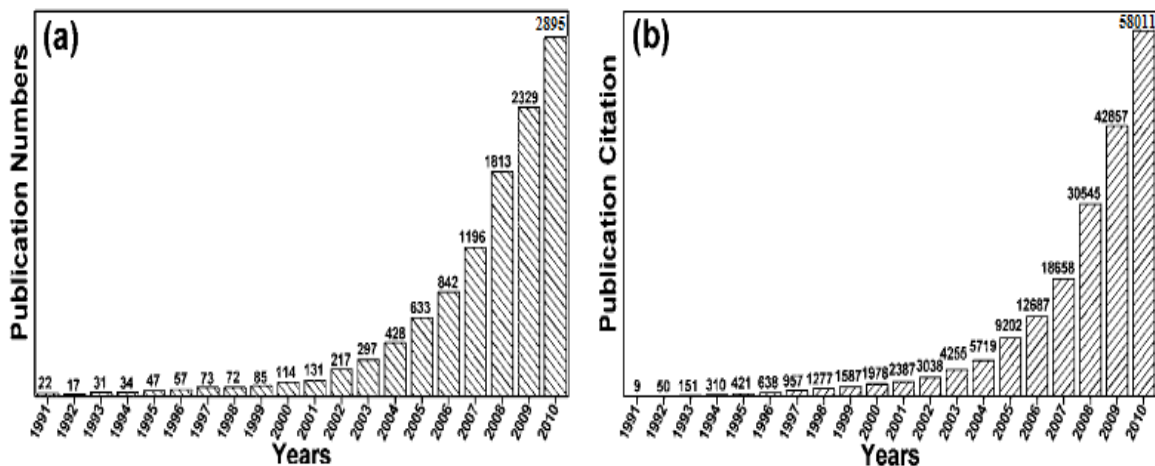
Αν και μόλις πρόσφατα θεμελιώθηκαν πολλοί από τους ορισμούς στη νανοτεχνολογία, εξασφαλίζοντας έτσι μια κοινή “γλώσσα” για την επιστημονική και τη βιομηχανική κοινότητα, όσον αφορά τους κανονισμούς και τη νομοθεσία, πολλοί από τους όρους δεν αποτελούν ουσιαστικά κάτι καινούργιο. Μόλις το 2008 εκδόθηκε το πρώτο ISO standard το οποίο επικεντρώνεται στην έννοια των νάνο-αντικειμένων (ISO/TS 27687:2008) ενώ έπειτα ακολούθησαν σειρές από πρότυπα τα οποία καλύπτουν τις έννοιες όπως “νανοτεχνολογία”, “νανοκλίμακα” και “νανοϋλικά” και πολλά πρότυπα βρίσκονται μέχρι και σήμερα υπό ανάπτυξη (Παράρτημα 1 - Πρότυπα ISO

Π.Π. ). Παρόλα αυτά αξίζει να αναφερθεί μια σύντομη περιγραφή της πορείας της νανοτεχνολογίας από την αρχή μέχρι σήμερα, η οποία συνοψίζεται σχηματικά στην Εικόνα 1. Πρώτος ο Richard Feynman [1] πρότεινε την γενική ιδέα της νανοτεχνολογίας στην περίφημη ομιλία του “There is plenty of room at the bottom” κατά τη διάρκεια της απονομής του βραβείου Nobel το 1965. Παρόλα αυτά, μετά την εφεύρεση του σαρωτικού μικροσκοπίου σήραγγας, γνωστό και ως STM, ενός συστήματος απεικόνισης και χειραγώγησης ατόμων και μορίων, ο συγκεκριμένος τομέας βρέθηκε σε σπουδαία ευημερία και στο κέντρο του ενδιαφέροντος. Τα πρώτα νανοϋλικά που ανακαλύφθηκαν και τα οποία παρουσιάζουν σημαντική χρησιμότητα σε ηλεκτρονικές εφαρμογές, λόγω της αγωγιμότητάς τους, ήταν τα φουλερένια και οι νανοσωλήνες άνθρακα. Στη συνέχεια τα νανοσωματίδια άρχισαν να εισάγονται και σε διάφορους άλλους τομείς, λόγω των μοναδικών και ποικίλων ιδιοτήτων που παρουσιάζουν (Πίνακας 1), όπως είναι για παράδειγμα η ιδέα της μεταφοράς τοξικών φαρμάκων που πρωτοεισήχθη το 1978 από τον J.J. Marty και τους συνεργάτες του. Σήμερα τα νανοϋλικά είναι ήδη μέρος αρκετών προϊόντων εμπορίου, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τα νανοσωματίδια  $TiO_2$ , τα οποία αποτελούν συστατικά για διάφορα προϊόντα περιποίησης, όπως είναι τα αντηλιακά. Εξίσου αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια τα νανοϋλικά βρίσκονται στον πυρήνα των επιστημονικών ερευνών, τόσο ως προς την σύνθεση τους όσο και ως προς την δυνητική χρήση τους για ποικίλες εφαρμογές. Μόνο στον τομέα των ιατρικών εφαρμογών το 2010 τα άρθρα που εκδόθηκαν είναι περίπου 2900 (Εικόνα 2), γεγονός που αποτελεί στοιχείο ότι πλέον η νανοτεχνολογία είναι στο κέντρο του ενδιαφέροντος, ανατρέποντας πολλά στοιχεία του παρελθόντος και αποτελώντας ίσως μια δεύτερη βιομηχανική επανάσταση. Όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 3, το ενδιαφέρον

για την νανοτεχνολογία δεν περιορίζεται γεωγραφικά αλλά ούτε και οικονομικά, αν ληφθεί υπόψιν ότι βάση του 7<sup>ου</sup> πλαισίου προγράμματος της Ευρωπαϊκής Ένωσης (European Union's 7th Framework Programme ) έχει εγκρίνει, για τα έτη 2007-2013, το ποσό χρηματοδότησης των 3,45 δισεκατομμυρίων € για έρευνες σχετικά με νανοεπιστήμες, υλικά και τεχνολογίες νέας παραγωγής.



Εικόνα 1 Συνοπτική παρουσίαση ιστορικής αναδρομής νανοτεχνολογίας – Γεγονότα σταθμοί [2].

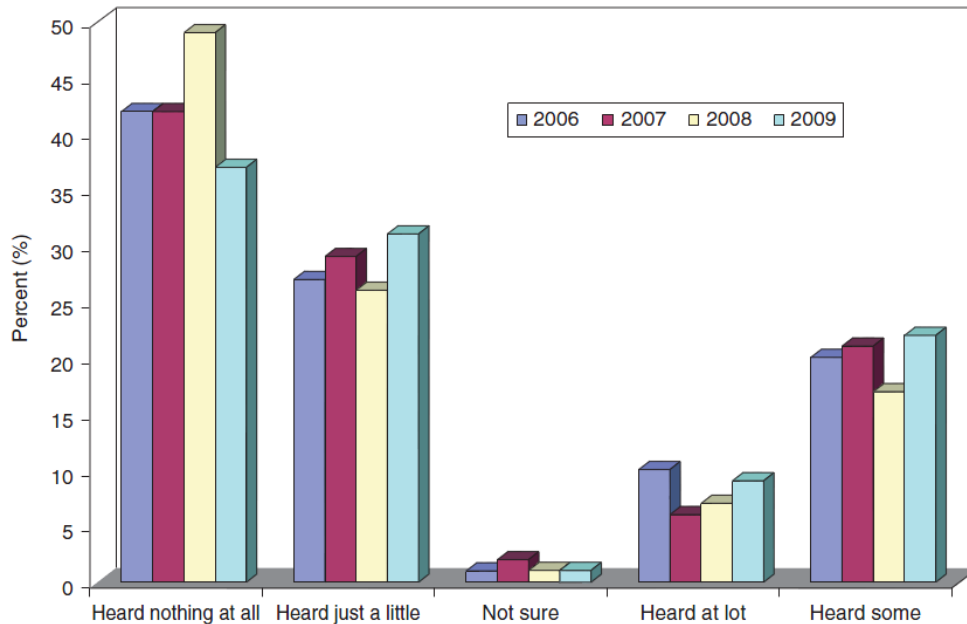


Εικόνα 2 Απεικόνιση του ενδιαφέροντος για την έρευνα σχετικά με θεραπείες, που χρησιμοποιούν νανουλικά, για τα τελευταία 20 χρόνια ως, (a) αριθμοί δημοσιεύσεων και (b) αναφορές δημοσιεύσεων, αντίστοιχα [27].

Οι αρχές της νανοτεχνολογίας βρίσκουν εφαρμογές σε όλους τους τομείς, από την ηλεκτρονική μέχρι την ιατρική, προσφέροντας εφαρμογές που μέχρι πριν κάποιες δεκαετίες θεωρούνταν επιστημονική φαντασία, με ορισμένες να αναφέρονται στον



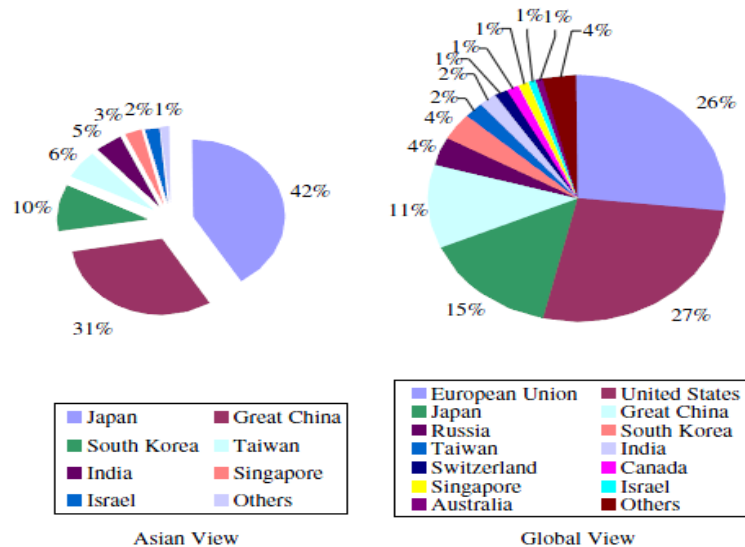
Πίνακας 1. Ήδη έχουν αρχίσει και εισάγονται νανοϋλικά σε αρκετά εμπορεύσιμα προϊόντα, όπως το παράδειγμα του  $TiO_2$  που αναφέρθηκε παραπάνω. Παρόλα αυτά, τουλάχιστον μέχρι το 2009, ένα μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού δεν ήταν ενημερωμένο σχετικά με τη νανοτεχνολογία, όπως παρατηρείται από το Διάγραμμα 1.



Διάγραμμα 1 Επίγνωση του κοινού σχετικά με τη νανοτεχνολογία. Η έρευνα διεξήχθη για τα έτη 2006, 2007, 2008, 2009 [3].

Τα πρώτα standards, όσον αφορά την τοξικότητα, μόλις το 2011 πήραν μορφή (βλ. Παράρτημα 1 - Πρότυπα ISO

Π.Π. ) ενώ δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμα ποιοι ακριβώς παράγοντες επηρεάζουν την τοξικότητα και με τι τρόπο όπως επίσης και πως επηρεάζει ο τρόπος και ο μηχανισμός εισαγωγής τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Πρόκειται λοιπόν για ένα ανοιχτό πεδίο έρευνας με όλο και περισσότερο αυξανόμενο ενδιαφέρον σε παγκόσμιο επίπεδο.



Εικόνα 3 Παγκόσμια εικόνα έκδοσης επιστημονικών άρθρων σχετικά με τη νανοτεχνολογία [2].

Πίνακας 1 Περιοχές εφαρμογών της νανοτεχνολογίας [37].

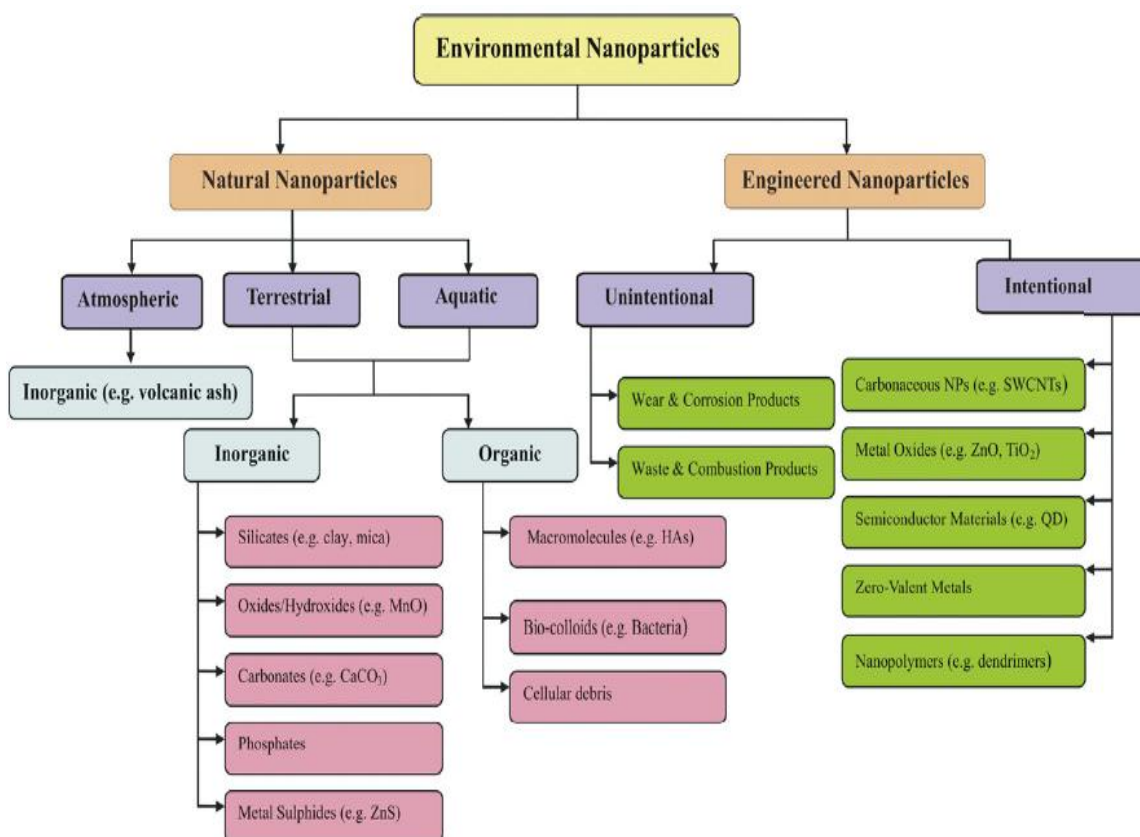
Τομείς	Εφαρμογές
Αυτοκινητοβιομηχανία	Ελαφριές κατασκευές, καταλύτες, βαφή, ελαστικά, αισθητήρες, προφυλακτήρες
Κατασκευές	Υλικά, μόνωση, επικαλύψεις επιφανειών, ασβεστοκονίαμα, επιβραδυντικά φωτιάς
Ηλεκτρονικά	Κάρτες μνήμης, οθόνες, οπτικές ίνες, δίοδοι laser, οπτικοί διακόπτες, φίλτρα, αγωγίμες επικαλύψεις, αντιστατικές επικαλύψεις, transistors
Μηχανική	Προστατευτικές επικαλύψεις για εργαλεία, μηχανές, ρουλεμάν άνευ λιπαντικών
Τρόφιμα	Συσκευασία, αισθητήρες για διάρκεια αποθήκευσης, πρόσθετα
Ιατρική	Συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, σκιαγραφικό, γρήγορα συστήματα ελέγχου, πρόσθετα και εμφυτεύματα, διαγνωστικά συστήματα in vivo
Κλωστοϋφαντουργία	“έξυπνα” ρούχα (αντιζαρωτικά, αντίσταση σε λεκέδες, έλεγχο θερμοκρασίας)
Χημικά	Πληρωτικά για χρώματα, σύνθετα υλικά, εμπότιση χαρτιού, κόλλες, μαγνητικά ρευστά
Καλλυντικά	Αντηλιακά, κρέμες, οδοντόπαστες
Ενέργεια	Ηλιακές κυψέλες, μπαταρίες, κυψέλες καυσίμου, πυκνωτές
Περιβάλλον	Αισθητήρες τοξικών, πράσινη χημεία, αποκατάσταση εδάφους και υπογείων υδάτων
Αθλητισμός	Ρακέτες τένις, μπαλάκια τένις, αντιθολωτικές επικαλύψεις για γυαλιά
Στρατιωτικός	Αλεξίσφαιρη προστασία, υλικά εξουδετέρωσης χημικών όπλων

Στις υποενότητες που ακολουθούν θα αναπτυχθούν οι κατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται τα νανοσωματίδια, μια συγκεκριμένη κατηγορία νανοϋλικών, οι τρόποι εισαγωγής τους στον ανθρώπινο οργανισμό καθώς και οι μηχανισμοί εισαγωγής τους οι οποίοι λαμβάνουν χώρα, είτε ανεξέλεγκτα και με τυχαίο τρόπο είτε με χορήγηση τους για ιατρικούς σκοπούς.

## 1.2 Κατηγορίες νανοσωματιδίων

Τα νανοσωματίδια, όσον αφορά τη χημική τους σύσταση μπορεί να είναι οργανικά, όπως τα δενδριμερή ή άλλα πολυμερικά νανοσωματίδια, ανόργανα, όπως είναι τα νανοσωματίδια χρυσού και γενικά σωματίδια οξειδίων μετάλλων ή μεταλλικών ιόντων με τουλάχιστον τη μια τους διάσταση στη νανοκλίμακα [11] ή και τα δύο, παραδείγματος χάριν νανοσωματίδια χρυσού επικαλυμμένα με κάποιο πολυμερές. Τα ανόργανα νανοσωματίδια συνήθως συντίθενται χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως πυρηνοποίηση (nucleation) και στρατηγικές ελεγχόμενης ανάπτυξης (arrested growth) σε ένα διάλυμα [21].

Όσον αφορά την πηγή προέλευσής τους, τα διακρίνουμε στις παρακάτω κατηγορίες: φυσικά (natural), ανθρωπογενή (anthropogenic) και συνθετικά (man-made or artificial). Ανάλογα με το προς μελέτη αντικείμενο μπορεί να υφίστανται περαιτέρω κατηγοριοποίηση όπως για παράδειγμα τα συνθετικά μπορούν να διακριθούν σε οργανικά ή ανόργανα, τα ανόργανα νανοσωματίδια, ανάλογα με τη μορφή τους στο χώρο, σε νανοσωλήνες, νανόςυρματα, φουλερένια, νανόσφαιρες κτλ. Στις επόμενες υποενότητες θα γίνει αναλυτική περιγραφή των κατηγοριών με ιδιαίτερη έμφαση στα συνθετικά νανοσωματίδια καθώς αυτά παρουσιάζουν περισσότερο τεχνολογικό ενδιαφέρον.

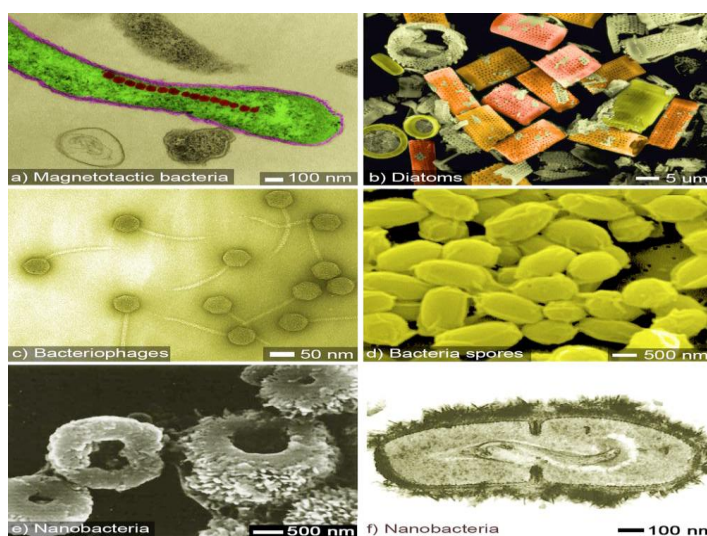


Εικόνα 4 Κατηγορίες νανοσωματιδίων που βρίσκονται στο περιβάλλον [38].

### 1.2.1 Φυσικά Νανοσωματίδια (Natural nanoparticles)

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα πρώτα σωματίδια νάνο-κλίμακας με τα οποία έχει έρθει σε επαφή ο άνθρωπος και το φυσικό περιβάλλον. Έχουν ως πηγή προέλευσης τη φύση και δεν έχει υπάρξει ανθρώπινη παρέμβαση στη δημιουργία τους [4]. Παράγονται από φυσικές διαδικασίες όπως είναι οι φωτοχημικές αντιδράσεις, η διάβρωση, οι ηφαιστειακές εκρήξεις, οι πυρκαγιές, κτλ. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν και ορισμένοι μικροοργανισμοί όπως οι ιοί (10-400 nm) και ορισμένα βακτήρια (30 nm-700 μm), σαν αυτά της εικόνα 5 [24].

Σε περίπτωση που εισπνευσθούν, επειδή λόγω μεγέθους η ρινική κοιλότητα αδυνατεί να τα συγκρατήσει, μπορεί να φτάσουν και να φράξουν τις πνευμονικές κυψελίδες προκαλώντας δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία. Ειδικά από την βιομηχανική επανάσταση και μετά, όπου οι καύσεις αυξήθηκαν κατά πολύ λόγω της βιομηχανικής δραστηριότητας του ανθρώπου [6] και την όλο και περισσότερο διαδεδομένη χρήση του αυτοκινήτου, οι επιπτώσεις άρχισαν να γίνονται πιο αισθητές προκαλώντας την ανησυχία. Αποτέλεσμα όλων αυτών είναι η δημιουργία μιας νέας κατηγορίας νανοσωματιδίων, η οποία συμβάλλει στην επιβάρυνση του ανθρώπινου οργανισμού, των ανθρωπογενών νανοσωματιδίων (anthropogenic nanoparticles).



**Εικόνα 5** Οργανισμοί ή παραγόμενα στερεά απορρίμματα τους σε νανοκλίμακα. α) εικόνα από TEM του βακτηρίου *Aquaspirillum magnetotacticum*, β) εικόνα από SEM διατομικού πυριτίου, γ) εικόνα από SEM βακτηριοφάγων, δ) εικόνα από SEM “σποριών” του βακτηρίου *Bacillus anthracis*, ε) εικόνα από SEM καλλιέργειας βακτηρίων, στ) χωριζόμενα βακτήρια επικαλυμμένα με τριχοειδής άνω στρώμα [25].

### 1.2.2 Ανθρωπογενή Νανοσωματίδια (Anthropogenic nanoparticles)

Όπως προαναφέρθηκε, σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα νανοσωματίδια τα οποία αποτελούν κυρίως (παρα)προϊόντα καύσης και η παραγωγή τους οφείλεται στην βιομηχανική δραστηριότητα του ανθρώπου όπως είναι οι συγκολλήσεις ή οι στιλβώσεις. Σε αυτή την κατηγορία θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν και τα σωματίδια που προέρχονται από μηχανές εσωτερικής καύσης πετρελαίου ή παραγώγων του [4]. Ειδικά τα

καυσαέρια που παράγονται από καύση diesel ή βενζίνης αποτελούν την κύρια πηγή ατμοσφαιρικών νάνο- και μικρο-σωματιδίων σε αστικές περιοχές (τα περισσότερα σωματίδια που εκπέμπονται από μηχανές καύσης diesel κυμαίνονται στην περιοχή 20-130 nm ενώ αυτά που παράγονται από τους βενζινοκινητήρες στην περιοχή 20-60 nm) [24].



**Εικόνα 6** Παραγωγή καυσαερίων (στα οποία εμπεριέχονται σωματίδια της τάξης των 20-60 nm) από βενζινοκινητήρες.

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν επίσης και τα σωματίδια που παράγονται από εσωτερικές δραστηριότητες όπως είναι καύσεις (κεριά, τζάκι, κτλ), κάπνισμα, μαγείρεμα, κτλ [24]. Στον πίνακα 2 φαίνονται ορισμένα παραδείγματα προέλευσης φυσικών και ανθρωπογενών νανοσωματιδίων, ενώ στον πίνακα 3 παρουσιάζονται κάποιες από τις δυσμενείς επιπτώσεις που δύναται να προκαλέσουν στην ανθρώπινη υγεία.

**Πίνακας 2** Μερικές από τις φυσικές και ανθρωπογενείς πηγές νανοσωματιδίων [6].

Ανθρωπογενή (Anthropogenic)		
Φυσικά (Natural)	Ακούσια	Εκ προθέσεως
Μετατροπή αερίων σε σωματίδια	Μηχανές εσωτερικής καύσης	Μέταλλα, Άνθρακας, Πολυμερή, Ημιαγωγοί, κτλ.
Πυρκαγιές	Κλίβανοι	Νάνο-σφαίρες, Νανοσωλήνες, Νάνο-σύρματα, κτλ.
Ηφαίστεια	Συγκολλήσεις	Ελεγχόμενου μεγέθους &
Ιοί	Ηλεκτρικές μηχανές	σχήματος, σχεδιασμένα για
Μικροσωματίδια (<100 nm ενεργά κύτταρα)	Αναθυμιάσεις	συγκεκριμένη λειτουργία

**Πίνακας 3** Σωματιδιακά σχετιζόμενες δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία εξαιτίας συμβατικών σωματιδίων.

Σωματίδια	Δυσμενείς Επιπτώσεις	
	Αναπνευστικές	Έξω-αναπνευστικές
<b>Αμίαντος (Asbestos)</b>	Ενδιάμεση ίνωση, βρογχογενές καρκίνωμα, πλευρικό μεσοθηλίωμα, πλευρική ίνωση, πλευρικές πληγές.	Περιτοναϊκό μεσοθηλίωμα, αυτοάνωση ασθένεια.
<b>Χαλαζίας (Quartz)</b>	Κομβώδης ίνωση, ασθένεια μικρών αεραγωγών, βρογχογενές καρκίνωμα, πλευρική ίνωση.	Αυτοάνωση ασθένεια.
<b>Αιωρούμενα Σωματίδια (PM<sub>10</sub>)</b>	Αυξημένος κίνδυνος για καρκίνο των πνευμόνων Παροξύνσεις της COPD <sup>(a)</sup> Ανάπτυξη COPD Παροξύνσεις άσθματος	Θάνατοι και νοσηλίες για καρδιαγγειακές ασθένειες.

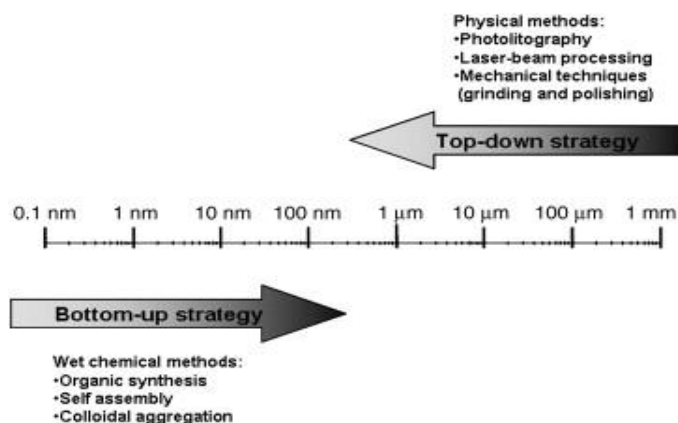
Σημειώσεις:

(a) COPD = Χρόνια Αποφρακτική Ασθένεια του Αναπνευστικού Συστήματος (Chronic Obstructive Pulmonary Disease)

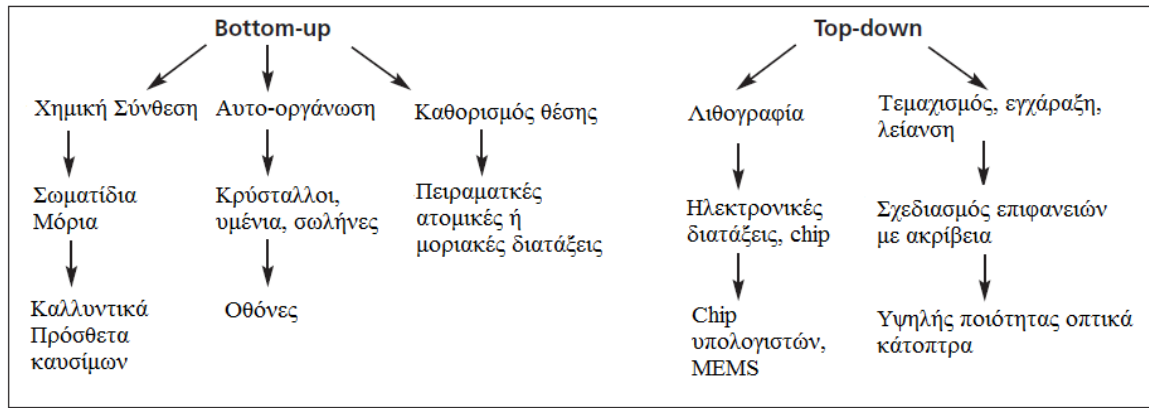
Πηγή: Donaldson et al. (2009)

### 1.2.3 Συνθετικά Νανοσωματίδια (Engineered nanoparticles)

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα νανοσωματίδια τα οποία αποτελούν προϊόντα κατασκευής του ανθρώπου, δεν αποτελούν δηλαδή παραπροϊόντα των δραστηριοτήτων του. Συνήθως παράγονται με διαδικασίες από κάτω προς τα πάνω (bottom-up) ή από πάνω προς τα κάτω (top-down) όπως είναι η εναπόθεση ατμών (vapor deposition), η σύνθεση υγρής φάσης (liquid phase synthesis) και η αυτό-οργάνωση (self-assembly) [5]. Έχουν όσο το δυνατόν πιο συγκεκριμένη φυσικοχημική σύνθεση και δομή, ανάλογα με την εφαρμογή για την οποία προσδιορίζονται, με σκοπό την εκμετάλλευση ιδιοτήτων και λειτουργιών συνδεδεμένες με τις διαστάσεις τους [15].

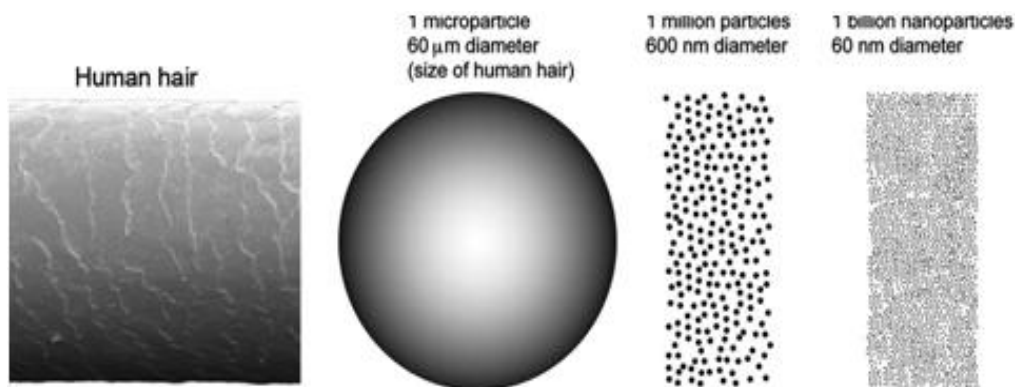


**Εικόνα 7** Από πάνω προς τα κάτω (top-down) και από κάτω προς τα πάνω (bottom-up) στρατηγικές σύνθεσης νανοσωματιδίων [34].



Εικόνα 8 Χρήση των τεχνικών bottom-up και top-down στην βιομηχανία [Royal academy of engineering].

Η παραγωγή και χρήση νανοϋλικών έγκειται στις μοναδικές ιδιότητες που παρουσιάζουν τα υλικά αυτά λόγω της αυξημένης ελάττωσης του μεγέθους τους. Η ειδική επιφάνειά τους ανά μονάδα μάζας είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα υλικά όγκου για αυτό και τα νανοϋλικά είναι εξαιρετικά πιο δραστικά. Για παράδειγμα, αν συγκρίνουμε μικροσωματίδια άνθρακα με διάμετρο 60  $\mu\text{m}$  τα οποία έχουν μάζα 0,3  $\mu\text{g}$  και επιφάνεια 0,01  $\text{mm}^2$  με ίδιας μάζας νανοσωματιδιακής μορφής άνθρακα, καθένα με διάμετρο 60 nm, τα τελευταία έχουν επιφάνεια 11,3  $\text{mm}^2$  και αποτελούνται από  $1 \times 10^9$  νανοσωματίδια. Παρατηρείται, λοιπόν ότι η αναλογία της επιφάνειας ανά μονάδα όγκου ή μάζας για τα σωματίδια με διάμετρο 60 nm είναι 1000 φορές μεγαλύτερη από τα σωματίδια με διάμετρο 60  $\mu\text{m}$ . Αυτή η σύγκριση φαίνεται καλύτερα στην εικόνα 9, που ακολουθεί.

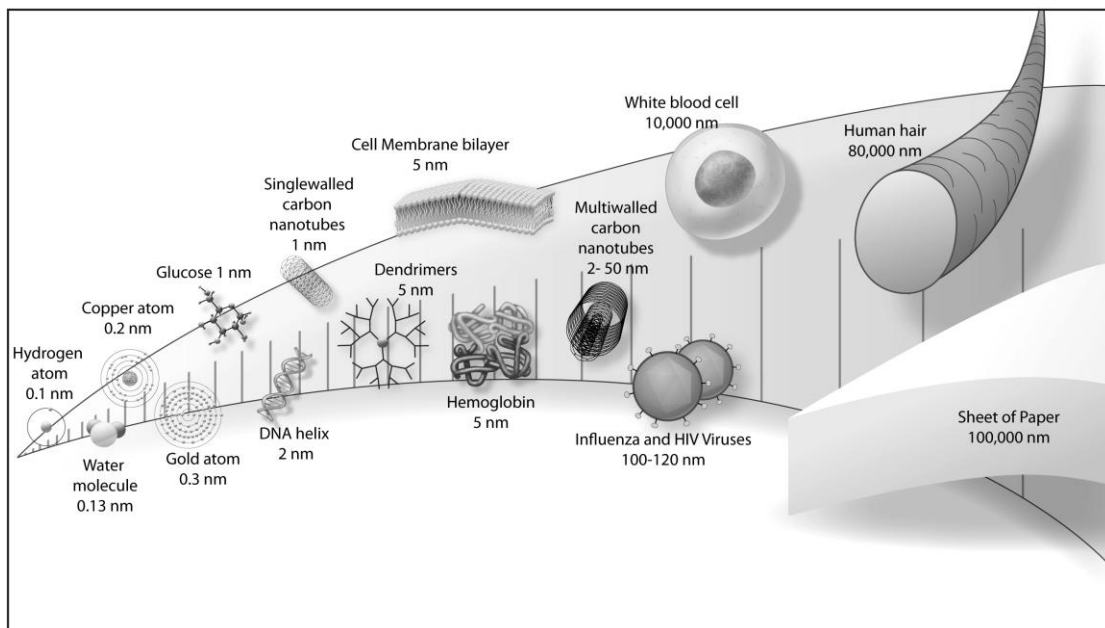


Εικόνα 9 Σχηματική αναπαράσταση ενός μικροσωματιδίου με διάμετρο 60  $\mu\text{m}$ , περίπου στο μέγεθος μιας ανθρώπινης τρίχας όπως φαίνεται στα αριστερά σε κλίμακα, και του αριθμού των σωματιδίων με διαμέτρους 600 και 60 nm τα οποία έχουν την ίδια μάζα με το μικροσωματίδιο (60  $\mu\text{m}$ ) [25].

Έτσι, παρόλο που η χημική σύσταση παραμένει κοινή με τα υλικά όγκου, μεταβάλλονται αρκετά διάφορες ιδιότητες τους. Γενικά, δύο κυρίως παράγοντες κάνουν τα νανοϋλικά να διαφέρουν από τα υλικά όγκου: τα *επιφανειακά φαινόμενα*, τα οποία προκαλούν την κλιμάκωση των ιδιοτήτων εξαιτίας των κλασμάτων ατόμων στην επιφάνεια τους και τα *κβαντικά φαινόμενα*, εξαιτίας των οποίων υπάρχει μια ασυνέχεια στη συμπεριφορά των υλικών λόγω των μετατοπιζόμενων ηλεκτρονίων τους [25]. Λόγω των παραπάνω βρίσκουν ποικίλες εφαρμογές σε διάφορους τομείς όπως η ναυπηγεία ή η ιατρική, δρώντας ως καταλύτες, στρώματα επικάλυψης ή φορείς φαρμάκων, για παράδειγμα. Σήμερα υπάρχουν >1000 προϊόντα που περιέχουν νανοσωματίδια, όπως αυτά του χρυσού, του ασημιού, του άνθρακα, του τιτανίου ή/και του πυριτίου. Οι σύγχρονες εφαρμογές τους καθώς και άλλες οι οποίες προβλέπονται στο μέλλον βασίζονται στις ηλεκτρομαγνητικές, καταλυτικές, φαρμακοκινητικές και φυσικοχημικές (ακαμψία, μείωση του βάρους και αντοχή σε αμυχές) ιδιότητες τους [5].

Επειδή η συγκεκριμένη κατηγορία είναι αυτή που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του ότι χρησιμοποιείται, ή καλύτερα θα χρησιμοποιηθεί ευρέως τα επόμενα χρόνια, αφού αυτή δύναται να κατασκευαστεί με συγκεκριμένες, ελεγχόμενες ιδιότητες και χαρακτηριστικά από τον άνθρωπο, αξίζει να αναφερθούν οι κατηγορίες στις οποίες διακρίνεται με βάση τη φύση των νανοσωματιδίων. Η ίδια διάκριση θα μπορούσε να γίνει και στις άλλες κατηγορίες (φυσικά και ανθρωπογενή νανοσωματίδια) αλλά το εν λόγω κείμενο εστιάζει στην κατηγορία των συνθετικών νανοσωματιδίων.

Με βάση τη φύση τους, λοιπόν, τα συνθετικά νανοσωματίδια διακρίνονται σε οργανικά, ανόργανα (ή μη οργανικά) και βιολογικά.



Εικόνα 10 Το μέγεθος και το σχήμα συνθετικών νανοσωματιδίων συγκρινόμενα με πιο γνωστά υλικά [5].



### ☆ **Βιολογικά Νανοσωματίδια (Biological Nanoparticles)**

Η ιδέα για την χρήση νανοσωματιδίων για θεραπευτικούς σκοπούς (θεραπεία με φάρμακα ή γονιδιακή θεραπεία), είναι πιθανό να ξεκίνησε από την παρατήρηση των βιολογικών νανοσωματιδίων. Ο άνθρωπος, αυτό που προσπαθεί να κάνει μέσω της τεχνολογίας είναι να μιμηθεί την φύση και τους μηχανισμούς της καθώς έχει αποδειχτεί με τον χρόνο ότι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί. Έτσι, παρατηρώντας τους ιούς και το πώς μπορούν να ανταλλάξουν γενετικό υλικό με τα κύτταρα του ξενιστή οργανισμού αρκούσε για να γεννηθεί η ιδέα της χρήσης τους για ελεγχόμενο τώρα από τον άνθρωπο ανταλλαγή γενετικού υλικού (γονιδιακή θεραπεία). Στην πράξη, όμως αποδείχτηκε ότι η χρήση ιών προξενεί δυνητικά αρκετά προβλήματα καθώς ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί του ανοσοποιητικού συστήματος με αποτέλεσμα ο τροποποιημένος ιός να μην καταφέρνει πάντα να φτάσει στο στόχο του. Οπότε άρχισε να γίνεται αναγκαία η εύρεση άλλων τρόπων για την επίτευξη του ίδιου αποτελέσματος με την περίπτωση χρήσης ιών. Έτσι, τα τελευταία χρόνια, γίνονται μελέτες για τη χρήση των δύο άλλων κατηγοριών: των ανόργανων και των οργανικών νανοσωματιδίων, πολλές φορές συνδυάζοντάς τα με βιολογικά νανοσωματίδια όπως είναι διάφορες πρωτεΐνες, τα οποία ναι μεν δεν παρουσιάζουν τόσο μεγάλη απόδοση όπως οι ιοί όμως εμφανίζουν χαμηλότερη τοξικότητα και μπορούν να “κρύβονται” από τα φαγοκύτταρα. Επιπλέον, με τροποποιήσεις μπορούν να επιτύχουν εξίσου καλά αποτελέσματα θεραπείας με τους ιούς.

Άλλα βιολογικά σωματίδια, εκτός από τους ιούς, είναι τα λιποσώματα, το DNA, οι φερριτίνες, τα κολλοειδή σωματίδια (micelles), τα διάφορα είδη RNA, κτλ. ενώ χρησιμοποιούνται και πρωτεΐνες ή αμινοξέα για επικάλυψη, συνήθως ανόργανων νανοσωματιδίων, με στόχο την αύξηση της βιοσυμβατότητας τους και την αποφυγή της αναγνώρισης και απομάκρυνσης τους από τα μακροφάγα και τα άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

### ☆ **Οργανικά Νανοσωματίδια (Organic Nanoparticles)**

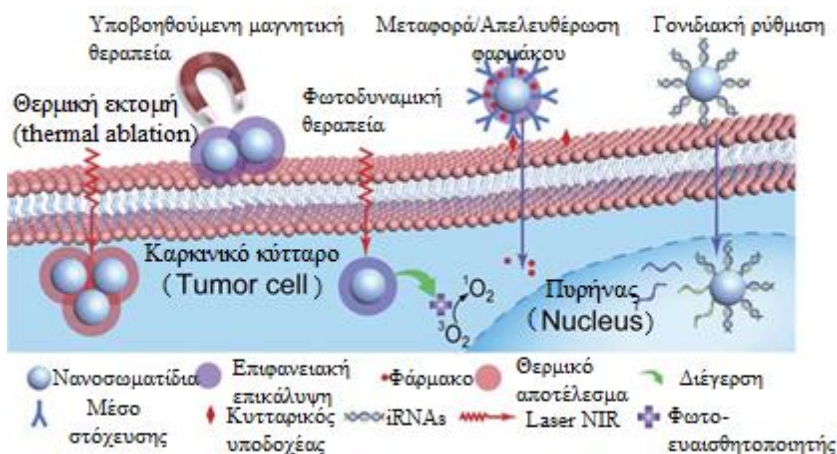
Σε αυτή την κατηγορία, όπως γίνεται κατανοητό, ανήκουν τα οργανικής φύσεως νανοσωματίδια. Αυτά που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, ειδικά σε ιατρικές εφαρμογές είναι τα λιποσώματα, διάφορα γαλακτώματα, τα δενδριμερή και άλλα πολυμερικά νανοσωματίδια. Χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για την επικάλυψη ανόργανων νανο- ή μικρο-σωματιδίων ή ακόμα και για τον εγκλεισμό φαρμάκων για στοχευμένη μεταφορά τους σε κύτταρα-στόχους.

### ☆ **Ανόργανα (ή μη οργανικά) Νανοσωματίδια (Inorganic Nanoparticles)**

Πρόκειται για νανοσωματίδια μετάλλων ή οξειδίων τους. Η συγκεκριμένη κατηγορία βρίσκει εφαρμογές σε διάφορους τομείς λόγω των μοναδικών ηλεκτρικών, μαγνητικών, οπτικών κτλ. ιδιοτήτων που παρουσιάζουν σε σχέση με τα υλικά όγκου από τα οποία προέρχονται.

Για αυτό το λόγω τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές έρευνες οι οποίες εκμεταλλεύονται κάποιες από αυτές τις ιδιότητες σε διάφορες ιατρικές εφαρμογές.

Συγκεκριμένα, τα ανόργανα νανοσωματίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επίτευξη ελεγχόμενης και στοχευόμενης φαρμακευτικής θεραπείας. Ήδη έχουν γίνει αναφορές για χρήση οξειδίων διαφόρων μετάλλων, φορέων διαφόρων φαρμάκων τα οποία κατευθύνονται με τη βοήθεια ισχυρού μαγνητικού πεδίου σε συγκεκριμένα σημεία (κύτταρα) στο σώμα. Άλλες μέθοδοι θεραπείας με τη χρήση ανόργανων νανοσωματιδίων είναι, όπως φαίνονται και στην εικόνα 11, η υπερθερμία, η γονιδιακή θεραπεία και η φωτοδυναμική θεραπεία.



Εικόνα 11 Υπάρχοντα είδη θεραπείας με τη χρήση νανοσωματιδίων [27].

Επιπλέον, εκτός από τους διάφορους τρόπους θεραπείας, η συγκεκριμένη κατηγορία βρίσκει εφαρμογές και στη διάγνωση διαφόρων ασθενειών. Τέτοιες εφαρμογές αποτελούν η απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (Magnetic Resonance Imaging, MRI), η χρήση ακτίνων X, η υπολογιστική τομογραφία σάρωσης (computed tomography scans, CT), η τομογραφία σάρωσης με εκπομπή ποζιτρονίων (positron emission tomography scans, PET), η μαγνητική τομογραφία (MRI), και η συνδυαζόμενη σάρωση PET/CT [28]. Ο τρόπος με τον οποίο συμβάλλουν στη διάγνωση ασθενειών μπορεί να γίνει κατανοητός με το παράδειγμα των κβαντικών σημείων (quantum dots) τα οποία είναι πιο φωτοσταθερά και λαμπερά στο φως σε σύγκριση με βαμμένα οργανικά μόρια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να ανιχνεύονται πιο εύκολα. Ένα μόνο νανοσωματίδιο αρκεί για να ανιχνευτεί και να απεικονιστεί [29]. Επομένως, δεν προσφέρουν απλά in situ μεθόδους ανίχνευσης, αλλά και ιδιαίτερα ευαίσθητους.

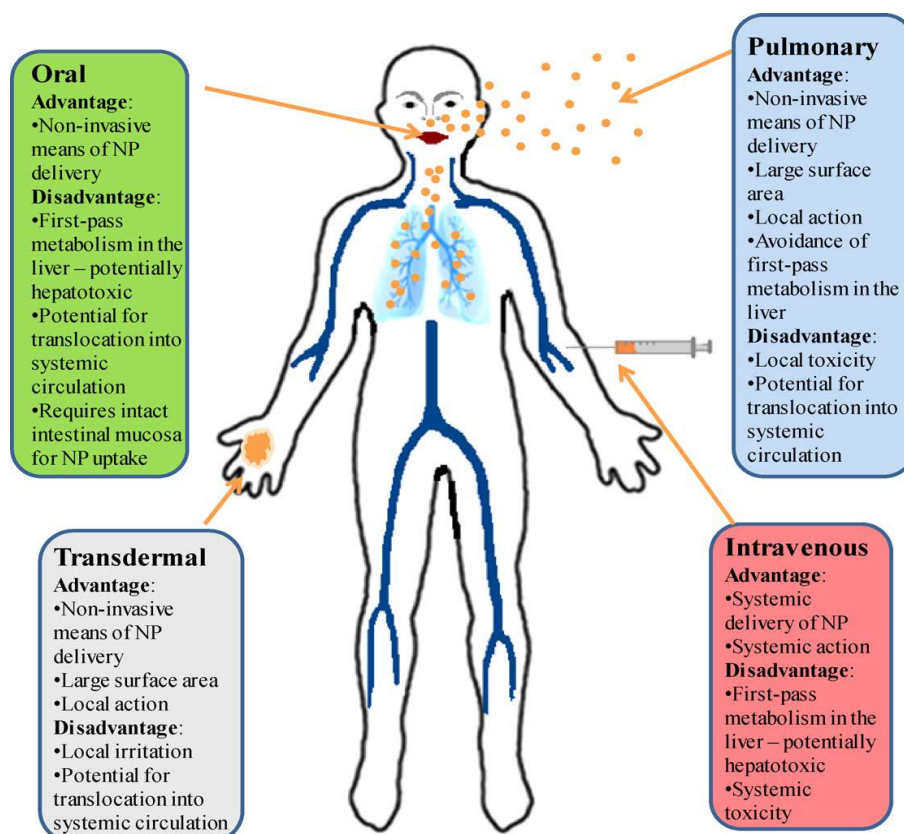
Πανάκεια είναι και η συμβολή τους στον τομέα της γενετικής μηχανικής (tissue engineering) και την αναδόμηση των ιστών (tissue repair). Σε περίπτωση επίτευξης τελικά του στόχου αυτού θα έχει λυθεί ένα σημαντικό πρόβλημα όσον αφορά τη συμβατότητα μοσχευμάτων. Δότης θα είναι ο ίδιος ο δέκτης, ο οποίος με τη συμβολή των νανοσωματιδίων θα βρίσκει θεραπεία χωρίς να χρειάζεται να υπόκεινται στη διαδικασία της αναμονής και στην αβεβαιότητα του αποτελέσματος.

Τέλος, ίσως το πιο σημαντικό, είναι η επίτευξη του συνδυασμού όλων των παραπάνω με τον σχεδιασμό ναοσυστημάτων τα οποία θα πραγματοποιούν ταυτόχρονα διάγνωση και έναρξη της θεραπείας για την συγκεκριμένη, κάθε φορά, ασθένεια που εξετάζεται.

### **1.3 Τρόποι εισαγωγής των ναοσωματιδίων στον ανθρώπινο οργανισμό**

Γενικά, ενώσεις ή υλικά μπορούν να εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό είτε από “φυσικές πύλες” όπως το δέρμα, τον γαστρεντερικό και αναπνευστικό σωλήνα, από εκ προθέσεως διανομή με ένεση, ενδοφλέβια, ενδοπεριτονιακή ή ενδομυϊκή [8] ή από κατάποση δισκίων ή/και τροφών. Όσον αφορά τις “φυσικές πύλες” εισόδου, παρότι αποτελούν εμπόδια για την προσπέλαση των ναοσωματιδίων λόγω των μηχανισμών άμυνας που διαθέτουν, μπορεί να μην λειτουργήσουν αποτελεσματικά εναντίον τους και έτσι τα ναοϋλικά να προκαλέσουν πιθανές βλάβες στον άνθρωπό [20].

Όσον αφορά την εκ προθέσεως εισαγωγή, ανάλογα με τον στόχο/ασθένεια κάθε φορά, πρέπει να ακολουθείται και διαφορετική δίοδος. Για παράδειγμα, δεν θα χρησιμοποιηθεί ποτέ ενδοφλέβια χορήγηση ναοσωματιδίων για θεραπεία καρκίνου των πνευμόνων γιατί το πιο πιθανό είναι τα ναοσωματίδια να μην φτάσουν ποτέ τον στόχο τους αφού υφίστανται μεταβολισμό πρώτης δόδου στο συκώτι, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να προκαλέσουν επιπλέον προβλήματα στον οργανισμό δεδομένου ότι είναι δυνητικά ηπατοτοξικά. Ένας ακόμα καθοριστικός παράγοντας είναι η ταχύτητα με την οποία είναι επιθυμητό να φτάσουν στον στόχο τα χορηγηθέντα σωματίδια. Συγκεκριμένα, με την ενδοφλέβια χορήγηση ή με αυτή από το στόμα επιτυγχάνεται πιο γρήγορη συστηματική δράση σε σύγκριση με την επιδερμική. Μέχρι στιγμής καμία ανασκόπηση δεν έχει επικεντρωθεί στη συσχέτιση μιας πιθανής εμφάνισης τοξικότητας με τον τρόπο εισαγωγής των ναοσωματιδίων στον ανθρώπινο οργανισμό ενώ όλα τα πειράματα διεξάγονται με χορήγηση αρκετά μεγάλης ποσότητας/δόσης ναοσωματιδίων με σκοπό την μελέτη των επιδράσεων σε σύντομο χρονικό διάστημα, κάτι που όμως απέχει αρκετά από την πραγματικότητα. Τις περισσότερες φορές οι αρνητικές επιδράσεις είναι αποτέλεσμα χρόνιας εισχώρησης μικρών δόσεων ναοσωματιδίων στον οργανισμό κάτι που είναι δύσκολο να διεκπεραιωθεί πειραματικά. Στην εικόνα 12 φαίνονται, συνοπτικά, οι κυριότεροι τρόποι εισαγωγής ναοσωματιδίων στον ανθρώπινο οργανισμό καθώς και ορισμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά τους.



Εικόνα 12 Τρόποι χορήγησης νανοσωματιδίων στον ανθρώπινο οργανισμό [33].

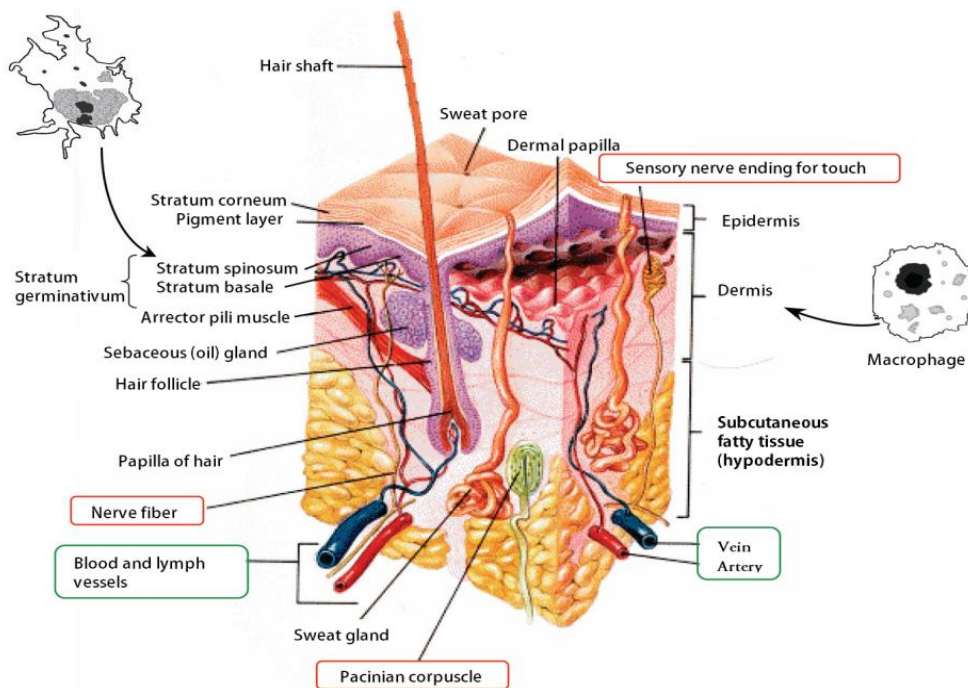
### 1.3.1. Μέσω του δέρματος

Το δέρμα δρα ως αυστηρό σύνορο ανάμεσα στο σώμα και το περιβάλλον. Δεν υπάρχει πρόσληψη των ουσιωδών στοιχείων από αυτό, με εξαίρεση την ηλιακή ακτινοβολία η οποία είναι απαραίτητη για την παραγωγή της βιταμίνης D [8]. Είναι ένα σημαντικό εμπόδιο που προστατεύει από την προσβολή του περιβάλλοντος. Παρόλα αυτά, λόγω της μεγάλης εκτεθειμένης επιφάνειας (περίπου  $18,000 \text{ cm}^2$ ) αποτελεί την κύρια πύλη εισόδου των νανοσωματιδίων από το περιβάλλοντα χώρο στο εσωτερικό του οργανισμού [9]. Δομείται σε τρία στρώματα/επίπεδα: την επιδερμίδα (epidermis), το δέρμα (dermis) και το υποδόριο στρώμα (subcutaneous layer). Το εξωτερικό στρώμα της επιδερμίδας (epidermis), που ονομάζεται κεράτινη στιβάδα (stratum corneum, SC), είναι περίπου 10  $\mu\text{m}$  παχύ [9], καλύπτει ολόκληρο το εξωτερικό του σώματος, αποτελείται από νεκρά κύτταρα, ισχυρά κερατινοποιημένα, καλυμμένα δηλαδή με ένα υδρόφοβο στρώμα λιπιδίων [13] και είναι δύσκολο να διαπεραστεί από ιοντικές ενώσεις ή διαλυμένα στο νερό μόρια [10]. Ποσοτικά, η μετατόπιση δια μέσω του δέρματος θα είναι ως εκ τούτου ελάχιστη ή ανύπαρκτη υπό κανονικές συνθήκες αλλά θα αυξάνεται σε περιοχές ευκαμψίας (Tinkle et al. 2003) και τραυματισμού του δέρματος. Άλλοτε στο δέρμα (dermis), η απορρόφηση από τις λέμφους είναι η κύρια οδός μετατόπισης, πιθανώς διευκολυμένη από απορρόφηση από τα δενδριτικά κύτταρα (epidermis) και τα μακροφάγα. Άλλες πιθανές οδοί μπορεί να αποτελούν τα πυκνά δίκτυα της κυκλοφορίας του αίματος και οι νευρικοί αισθητήρες στο δέρμα (dermis) [6].

Τα περισσότερα θηλαστικά είδη καλύπτονται από τρίχες στα περισσότερα σημεία του σώματος. Επίσης η επιφάνειά του είναι μικροδομημένη σε σημαντικό βαθμό, έχοντας λεπιδωτή εμφάνιση, πόρους για τον ιδρώτα και λιπώδης αδένες. Στα σημεία όπου αναπτύσσονται τα θυλάκια των τριχών, η ικανότητα του δέρματος να λειτουργεί σαν φράγμα διαφέρει ελαφρώς από τα “κανονικά” στρώματα της επιδερμίδας (epidermis), εκεί δηλαδή όπου δεν υπάρχει τέτοια ανάπτυξη. Αυτό γίνεται καλύτερα κατανοητό από το πείραμα των Bennat και Müller-Goyman (2000) [9] οι οποίοι εναπόθεσαν νανοσωματίδια  $TiO_2$  σε ανθρώπινο δέρμα είτε σαν υδατικό διάλυμα είτε με μορφή γαλακτώματος και εκτίμησαν την διεισδυτική ικανότητα χρησιμοποιώντας την μέθοδο "ταινία απογύμνωσης" (tape stripping). Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι με τη μορφή γαλακτώματος η διείσδυση γίνεται σε μεγαλύτερο βάθος όπως και ότι είναι μεγαλύτερη σε τριχώδη περιοχή γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι η διείσδυση γίνεται μέσω των θυλακίων ή των πόρων. Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν την διείσδυση υλικών μέσα στο δέρμα έχουν εστιάσει στο κατά πόσο φάρμακα περνούν μέσα στο δέρμα χρησιμοποιώντας διαφορετικούς σχηματισμούς όπως χημικούς και/ή σωματίδια υλικών σαν “οχήματα”. Τα κυριότερα είδη τέτοιων σωματιδίων είναι τα λιποσώματα, στερεά με μικρή διαλυτότητα στο νερό για παράδειγμα το  $TiO_2$ , σωματίδια πολυμερών και γαλακτώματα σωματιδίων πολύ μικρών διαστάσεων (μικρότερα της τάξης των μικρόμετρων). Κάποια από αυτά τα είδη θα αναλυθούν σε επόμενο κεφάλαιο. Συνοπτικά, από την υπάρχουσα αλλά περιορισμένη βιβλιογραφία σχετικά με τη διέλευση των νανοσωματιδίων μέσα από το δέρμα μπορούν να διεξαχθούν τα εξής συμπεράσματα:

- 1) Η διείσδυση εξαρτάται από το μέγεθος - τα νανοσωματίδια έχουν περισσότερες πιθανότητες να εισέλθουν σε μεγαλύτερου βάθους στρώματα σε σχέση με μεγαλύτερα σωματίδια.
- 2) Διαφορετικά είδη σωματιδίων έχουν βρεθεί σε βαθιά στρώματα του δέρματος και πλέον μπορούμε να προβλέψουμε τη συμπεριφορά ενός σωματιδίου μέσα στο δέρμα.
- 3) Υλικά τα οποία μπορούν να διαλυθούν ή διηθηθούν από ένα σωματίδιο, για παράδειγμα ένα σωματίδιο μετάλλου, υπάρχει πιθανότητα να εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος [8]. Βέβαια δεν έχει βρεθεί καμία άμεση ένδειξη ότι όλα τα σωματίδια που εισέρχονται μέσω του δέρματος καταλήγουν στην κυκλοφορία του αίματος. Η φαγοκύτωση των σωματιδίων από τα μακροφάγα ή άλλου είδους κύτταρα είναι απλά μια πιθανή οδός προς την ευαισθητοποίηση του δέρματος [10].

Υπάρχει έλλειψη δεδομένων, ακόμα και σήμερα, για το αν τα νανοσωματίδια απορροφώνται από το άνω στρώμα του δέρματος (SC) ή αν συστηματικά χορηγούμενα νανοσωματίδια συσσωρεύονται στο δερματικό ιστό. Η τάση των νανοσωματιδίων να διασχίζουν το δέρμα είναι καθοριστική για το ενδεχόμενο τοξικότητας στο δέρμα. Δηλαδή, τα νανοϋλικά ή νανοσωματίδια πρέπει να διαπεράσουν το ανώτατο στρώμα της κεράτινης στιβάδας (SC) για να εισέλθουν στην “ζωντανή” επιδερμίδα και να προκαλέσουν τοξικά αποτελέσματα στα χαμηλότερα στρώματα κυττάρων [9].



**Εικόνα 13** Η επιδερμίδα (epidermis) αντιπροσωπεύει ένα συμπαγές εμπόδιο ενάντια στα νανοσωματίδια [6].

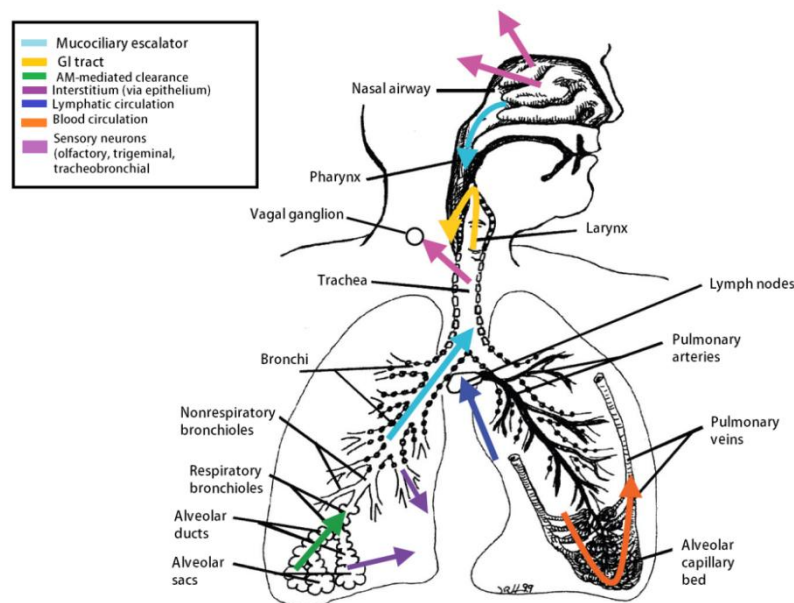
### 1.3.2. Μέσω του αναπνευστικού συστήματος

Το αναπνευστικό σύστημα αποτελείται από τρία διαφορετικά μέρη: τη μύτη (nose), τους αεραγωγούς οι οποίοι μεταφέρουν τον αέρα μέσα και έξω από τους πνεύμονες (airways) και τις κυψελίδες, οι οποίες αποτελούν περιοχές ανταλλαγής αέρα (alveoli). Η μύτη και οι αεραγωγοί αποτελούν σχετικά εύρωστα εμπόδια αφού περιέχουν ενεργά επιθήλια προστατευόμενα με ένα ιξώδες στρώμα βλέννας. Στην περιοχή ανταλλαγής αέρα (airways) τα εμπόδια ανάμεσα στις κυψελίδες και τα τριχοειδή αγγεία είναι πολύ λεπτά (απέχουν μόλις 500 nm από τη ροή του αίματος). Οι κυψελίδες (alveoli) είναι περισσότερο ευαίσθητες και ευπαθείς αφού παρουσιάζουν πολύ μεγάλη επιφανειακή περιοχή (140 m<sup>2</sup> στους ενήλικες).

Γενικά, η εναπόθεση στερεών υλικών στο αναπνευστικό σύστημα εξαρτάται από τα φυσικά χαρακτηριστικά των υλικών, όπως είναι το μέγεθός και το σχήμα τους, και από την ανατομία του αναπνευστικού συστήματος, δηλαδή την διάμετρο των αεραγωγών, τις γωνίες των διακλαδώσεων κτλ. Για παράδειγμα, σφαιρικά στερεά υλικά μπορούν να εισπνευσθούν όταν η αεροδυναμική τους διάμετρο είναι μικρότερη από 10 μm. Όσο πιο μικρά είναι τα σωματίδια τόσο πιο βαθιά μπορούν να “ταξιδέψουν” στον πνεύμονα, ενώ σωματίδια με αεροδυναμική διάμετρο μικρότερη από 2,5 μm μπορούν να φτάσουν μέχρι και τις κυψελίδες (alveoli). Βέβαια διάφορα μοντέλα έχουν δείξει ότι η αποτελεσματικότητα εναπόθεσης στις διάφορες περιοχές του αναπνευστικού συστήματος που αναφέρθηκαν δεν είναι γραμμική συνάρτηση του μεγέθους των σωματιδίων· σωματίδια 5-50 nm εναποτίθενται κυρίως στις κυψελίδες των πνευμόνων ενώ μεγαλύτερα

ή μικρότερα σωματίδια εναποτίθενται με περισσότερη αποτελεσματικότητα σε “υψηλότερες” περιοχές του αναπνευστικού συστήματος [8]. Όπως γίνεται κατανοητό, υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα νανοσωματίδια και τα σωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους όσον αφορά την εναπόθεση και την απομάκρυνση τους από το αναπνευστικό σύστημα.

Ο κύριος μηχανισμός εναπόθεσης των εισπνεόμενων νανοσωματιδίων είναι η διάχυση λόγω εκτόπισης μετά από τη σύγκρουσή τους με τα μόρια του αέρα. Αυτό που παίζει σημαντικό ρόλο στη διάχυσή τους είναι η θερμοδυναμική τους διάμετρος. Στη νανοκλίμακα, η αεροδυναμική διάμετρος δεν ελέγχει πλέον την εναπόθεση των σωματιδίων, αφού η καθίζηση λόγω της πρόσκρουσης και της βαρύτητας γίνεται αμελητέα ενώ η κίνηση τους οφείλεται κατά κύριο λόγο στη διάχυση. Έτσι, σωματίδια των 100 nm θα εναποτεθούν στην αναπνευστική οδό, με περίπου 20% αυτών να καταλήξουν στις κυψέλες της και 5% στην τραχειοβρογχική περιοχή. Με κράτημα της αναπνοής, η εναπόθεση μπορεί να ενισχυθεί, αφού δίνεται με αυτόν τον τρόπο περισσότερος χρόνος ώστε να λάβει μέρος η διάχυση των νανοσωματιδίων. Αντίθετα, όταν τα νανοσωματίδια υπάρχουν σε μορφή μικρό-μεγέθους συσσωματώματα, θα εναποτεθούν σύμφωνα με την αεροδυναμική τους διάμετρο στους αεραγωγούς. Σε αυτό το σημείο τα συσσωματώματα αυτά μπορεί να διαχωριστούν σε νανοσωματίδια [35]. Υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί εναπόθεσης όπως η αδρανειακή πρόσκρουση (inertial impaction), δεν συμβάλλουν όμως τόσο στην περίπτωση των νανοσωματιδίων όσο στα μεγαλύτερα σωματίδια [6].



**Εικόνα 14** Εναλλακτικοί δρόμοι απομάκρυνσης (εναπόθεσης) των σωματιδίων εντός και εκτός του αναπνευστικού συστήματος. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των νανοσωματιδίων και των μεγαλύτερων σωματιδίων για κάποιους από αυτούς τους “δρόμους” [6].

Η απομάκρυνση των σωματιδίων από τους πνεύμονες γίνεται κυρίως με δύο ξεχωριστούς μηχανισμούς, ανάλογα με την περιοχή εναπόθεσής τους. Στη μύτη και τους αεραγωγούς η απομάκρυνση γίνεται με τη βοήθεια της βλέννας και του σάλιου που εκρήγνυται από τα επιθήλια των αεραγωγών, ενώ στην περιοχή των κυψελίδων με φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα. Εξαρτάται και από την συνολική ποσότητα σωματιδίων που έχει εισπνευσθεί όπως επίσης και από το μέγεθός τους και την επιφάνειά τους. Γενικά, όμως, η απομάκρυνση τους από τους πνεύμονες είναι αρκετά δύσκολη ιδιαίτερα όσο περισσότερο εισέρχονται σε βάθος του ιστού [19].

Το αντίκτυπο των εισπνεόμενων σωματιδίων σε άλλα όργανα έχει αναφερθεί σε αρκετές επιδημιολογικές μελέτες. Αυτό είναι σημαντικό για δύο διαφορετικούς λόγους:

- 1ο. Είναι σημαντικό να γνωρίζουμε πως επηρεάζουν τα σωματίδια και τα άλλα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού και
- 2ο. Τα νανοσωματίδια σε πολλές περιπτώσεις αποφεύγουν την φαγοκυττάρωση και καταφέρνουν να εισέλθουν στα τριχοειδή αγγεία. Έτσι μεταφέρονται και σε άλλα σημεία/όργανα του ανθρώπινου σώματος [12]. Το γεγονός αυτό έχει αποκτήσει ενδιαφέρον για ιατρικούς σκοπούς καθώς αποτελεί ένα μη επώδυνο τρόπο χορήγησης φαρμάκων. Παράδειγμα αποτελεί η χορήγηση ινσουλίνης σε μορφή αεροζόλ [8]. Μόνο τα νανοσωματίδια βέβαια φαίνεται να έχουν αυτή την ιδιότητα καθώς σωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους δεν καταφέρνουν να μεταναστεύουν σε άλλα όργανα [6].

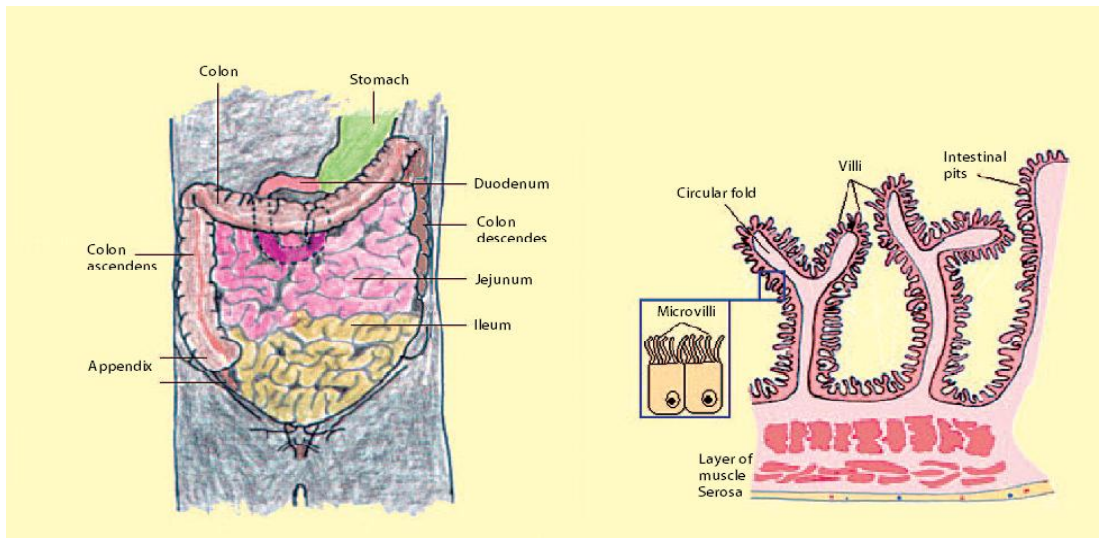
### **1.3.3. Μέσω του γαστρεντερικού συστήματος**

Η πρόσληψη των νανοσωματιδίων κατά μήκος της γαστρεντερικής βλεννογόνου καθορίζεται από την περίπλοκη δομή, τη λειτουργία και την τμηματική ετερογένεια του επιθηλίου που καλύπτει το έντερο [14]. Το έντερο δεν επιτρέπει μόνο την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών, ηλεκτρολυτών και υγρών, αλλά λειτουργεί επίσης και σαν εμπόδιο για την αποτροπή της ελεύθερης ανάμιξης των ανωτέρω με τοξικά συστατικά και έτσι προβλέπει την απορρόφηση δυνητικά επιβλαβών ουσιών ή/και την είσοδο παθογόνων [17].

Ενώ η στοματική κοιλότητα, ο φάρυγγας και ο οισοφάγος αποτελούνται από διατεταγμένες σε στρώματα πλάκες επιθηλίων, ο εντερικός σωλήνας είναι καλυμμένος από ένα μόνο στρώμα κυττάρων. Είναι ιδιαίτερα ανοσοποιητικά ενεργός λόγω του γεγονότος ότι οι βλεννογόνοι ιστοί “αντικρίζουν” το εξωτερικό, από τον οργανισμό, περιβάλλον. Πράγματι, έχει διαπιστωθεί ότι ο γαστρεντερικός σωλήνας περιέχει περισσότερα αντισώματα, τα οποία παράγουν Β λεμφοκύτταρα, από οποιοδήποτε άλλο όργανο στο σώμα συμπεριλαμβανομένων της σπλήνας, του θύμου αδένου [14] και του μυελού των οστών. Γενικά, ο γαστρεντερικός σωλήνας θεωρείται σημαντικός τρόπος έκθεσης σε νανοσωματίδια. Αυτό οφείλεται στους πολλούς, διαφορετικούς τρόπους κατάληξης των νανοσωματιδίων σε αυτόν όπως είναι η επαφή χειρών-στόματος στο χώρο εργασίας, μέσω της τροφής, του νερού, των φαρμάκων. Επιπρόσθετα, τα νανοσωματίδια που απομακρύνονται από το αναπνευστικό σύστημα μέσω της βλέννας μπορούν ακολούθως να χωνευθούν στον γαστρεντερικό σωλήνα [8]. Ακολουθώντας την πρόσληψη



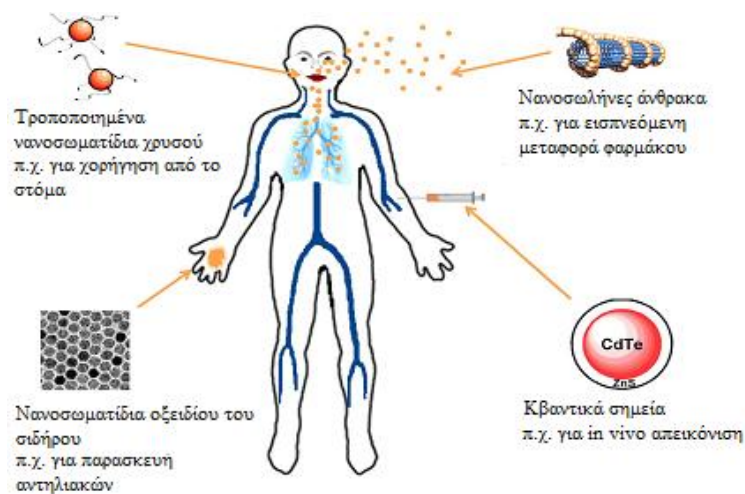
από τον γαστρεντερικό σωλήνα, τα νανοσωματίδια μπορούν να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος και να διασπαρθούν σε όλο το σώμα [18].



**Εικόνα 15** Δομή του ανθρώπινου γαστρεντερικού συστήματος σε γενική επισκόπηση (αριστερά) και σε μεγέθυνση (δεξιά) [23].

#### 1.3.4. Μέσω εισαγωγής εκ προθέσεως

Αυτού του είδους η εισαγωγή των νανοσωματιδίων στον ανθρώπινο οργανισμό αποτελεί έναν τεχνητό τρόπο εισαγωγής καθώς ο ίδιος ο άνθρωπος επεμβαίνει και επιθυμεί την είσοδό τους για κυρίως ιατρικούς σκοπούς (χορήγηση φαρμάκων ή/και νανοσωματιδίων με θεραπευτικές, διαγνωστικές ιδιότητες). Σε αυτή την περίπτωση η εισαγωγή γίνεται με ένεση, με κατάποση δισκίων, με εισπνοές, κτλ. Στην παρακάτω εικόνα φαίνονται ορισμένα παραδείγματα εκ προθέσεως εισαγωγής για διάφορες εφαρμογές, όπως είναι η μεταφορά φαρμάκων ή η *in vivo* απεικόνιση [32].



**Εικόνα 16** Εκ προθέσεως εισαγωγή διαφόρων νανοσωματιδίων [33].

Η χορήγηση ουσιών (φάρμακα ή/και νανοσωματίδια) με ένεση ονομάζεται παρεντερική και συνήθως είναι ενδομυϊκή, ενδοφλέβια και υποδόρια. Σπανίως υπάρχει ανάγκη για ενδοδερμική, ενδορραχιαία, ενδοπλευρική, ενδαρθρική ή ενδαρηριακή ένεση αν και υπάρχει και αυτή η δυνατότητα [22]. Γενικά, η μετατόπιση των νανοσωματιδίων (καθώς αυτά μελετούνται στο εν λόγω κείμενο) εξαρτάται από το που γίνεται η ένεση: τα νανοσωματίδια που εισέρχονται στον οργανισμό ενδοφλεβίως γρήγορα διαδίδονται στο κυκλοφορικό σύστημα με επακόλουθη διάδοση σε διάφορα όργανα όπως το συκώτι και ο σπλήνας. Η ενδοδερμική ένεση οδηγεί σε πρόσληψη των νανοσωματιδίων από τους λεμφαδένες, ενώ η ενδομυϊκή ένεση ακολουθείται από την πρόσληψη τους στο νευρικό και λεμφικό σύστημα. Βέβαια, σε περίπτωση κατά την οποία τα νανοσωματίδια είναι επικαλυμμένα με διάφορους τύπους και συγκεντρώσεις επιφανειοδραστικών ουσιών η διανομή τους στα διάφορα μέρη/όργανα του σώματος επηρεάζεται. Για παράδειγμα, η επικάλυψη με πολυαιθυλενογλυκόλη σχεδόν εξ ολοκλήρου προλαμβάνει τον εντοπισμό στο ήπαρ και τον σπλήνα [24]. Ως παρεντερική χορήγηση θεωρείται επίσης και η τοπική εφαρμογή στο δέρμα και τους βλεννογόνους (εκτός του εντερικού συστήματος). Εκτός από την κατάποση δισκίων υπάρχουν και τα δισκία, τα υπόθετα, τα σιρόπια, οι αλοιφές και γενικά οποιαδήποτε μορφή είναι γνωστή για τη χορήγηση φαρμάκων. Επίσης, μπορεί να γίνει εκ προθέσεως εισαγωγή δια μέσου του αναπνευστικού συστήματος με εισπνοές, αφού έχει αεριοποιηθεί το φάρμακο ή το σύστημα νανοσωματιδίων-φάρμακο [22].

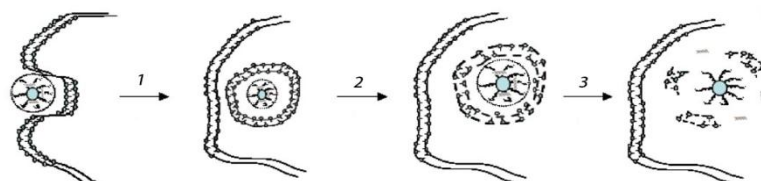
#### 1.4 Μηχανισμοί εισαγωγής των νανοσωματιδίων κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης

Αφού τα νανοσωματίδια εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό, για να αρχίσουν τη δράση τους θα πρέπει να βρεθούν μέσα στο κύτταρο ή/και στον πυρήνα του κυττάρου, αν πρόκειται για γονιδιακή θεραπεία. Έτσι, είναι πολύ σημαντική η μελέτη των τρόπων διέλευσης των διαφόρων μεμβρανών που διαθέτει ένα κύτταρο διότι αν τα νανοσωματίδια δεν καταφέρουν να εισέλθουν σε αυτό θα έχει αποτύχει η οποιαδήποτε χορήγηση φαρμάκου και άρα η θεραπεία.

Υπάρχουν δύο ειδών μηχανισμοί διέλευσης των μεμβρανών ενός κυττάρου: οι ενεργητικοί και οι παθητικοί. Οι παρακάτω μηχανισμοί είναι ανάλογοι και για την περίπτωση των νανοσωματιδίων.

##### 1.4.1 Ενεργητικοί Μηχανισμοί

Ως ενεργητικούς χαρακτηρίζουμε την διευκολυνόμενη διάχυση, την ενεργητική μεταφορά και την ενδοκύτωση.



Εικόνα 17 Σχηματική απεικόνιση των πιθανών δρόμων ενδοκύτωσης λειτουργικών ανόργανων νανοσωματιδίων [27].

### ☆ Διευκολυνόμενη Διάχυση

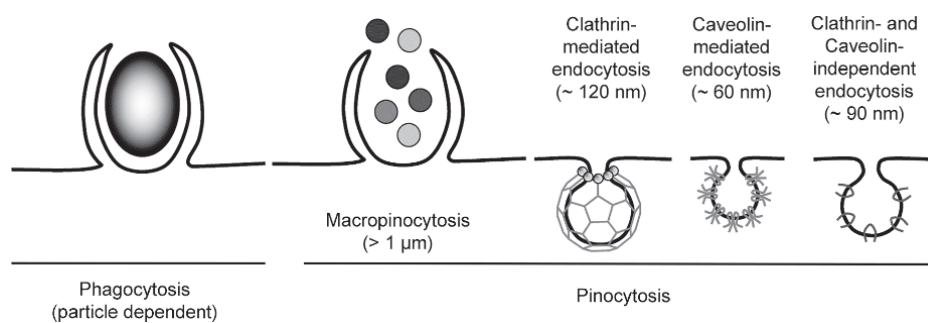
Τον μηχανισμό αυτό τον ακολουθούν κυρίως υδατάνθρακες, αμινοξέα καθώς επίσης και τα φάρμακα που είναι παράγωγά τους. Απαιτεί κατανάλωση ενέργειας από το κύτταρο καθώς δεν ακολουθείται η βαθμίδα της συγκέντρωσης και είναι απαραίτητη η παρουσία ενός ειδικού μεμβρανικού φορέα όπου θα μεταφέρει την “ξένη” για το κύτταρο ουσία στο εσωτερικό του.

### ☆ Ενεργητική μεταφορά

Απαιτεί ενέργεια σαν λειτουργία, η οποία προσφέρεται συνήθως δια μέσου του ενζύμου  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  παρόλο που πάντα ακολουθείται η βαθμίδα συγκέντρωσης του φαρμάκου. Είναι απαραίτητη η παρουσία ενός λιποδιαλυτού μορίου στη μεμβράνη το οποίο θα δράσει ως υποδοχέας και φορέας για το φάρμακο. Κάθε φορά που μεταφέρει κάτι στο εσωτερικό του κυττάρου ο φορέας ελευθερώνεται και ξαναγυρίζει στην εξωτερική επιφάνεια για να παραλάβει εκ νέου κάτι άλλο. Αποτελεί σημαντικό μηχανισμό απορρόφησης, για περιπτώσεις υδατοδιαλυτών φαρμάκων (άρα και υδατοδιαλυτών νανοσωματιδίων), ιδιαίτερα στο εντερικό επιθήλιο, όπως επίσης και απέκκρισης στη χολή και στα ούρα.

### ☆ Ενδοκύτωση

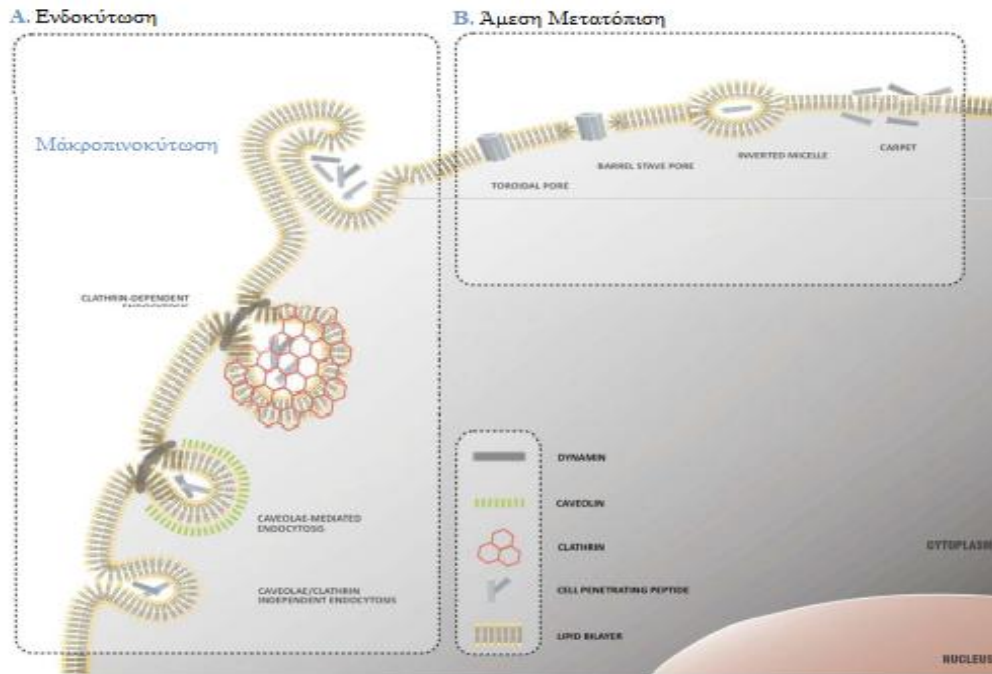
Ονομάζεται και πινοκύτωση ή φαγοκύτωση (όταν η μεταφερόμενη ουσία είναι στερεά και μεγαλύτερη από 500 nm [26]). Στην εικόνα που ακολουθεί γίνεται κατανοητή αυτή η διάκριση ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων.



Εικόνα 18 Ενδοκύτωση σε κύτταρα θηλαστικού [33].

Αποτελεί πολύπλοκο μηχανισμό, που απαιτεί επίσης ενέργεια. Αφορά την απορρόφηση μεγαλομοριακών ουσιών, κυρίως πρωτεϊνικής φύσης και αποτελεί ίσως τον κυρίαρχο μηχανισμό με τον οποίο νανοσωματίδια εισέρχονται στην εσωτερική επιφάνεια του κυττάρου. Ο μηχανισμός αυτός αποτελείται, όπως φαίνεται και στην εικόνα 18, από το στάδιο της εγκόλπωσης της ουσίας στον εξωκυτταρικό χώρο από ένα μικρό τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης και από το στάδιο της αποκοπής του τμήματος αυτού με την εισαγωγή του περιεχομένου μέσα στο κύτταρο [22]. Μπορεί να αποτελέσει διαδικασία μεσολάβησης ή μη υποδοχέα ή ακόμα και να προωθηθεί από ορισμένες λειτουργικότητες στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Βέβαια ορισμένες φορές οι διάφορες τροποποιήσεις

της επιφάνειας των νανοσωματιδίων μπορεί να οδηγήσουν σε προσκόλληση αυτών στον υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης και έτσι να σταματήσουν την είσοδό τους στο κύτταρο [26]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η απομάκρυνση νανοσωματιδίων με φαγοκύτωση, από μακροφάγα, στις κυψελίδες του πνεύμονα [24].



**Εικόνα 19** Μηχανισμοί εισαγωγής νανοσωματιδίων κατά μήκος κυτταρικής μεμβράνης Α. μέσω ενδοκύτωσης και Β. με απευθείας εισαγωγή [16].

### 1.4.2 Παθητικοί Μηχανισμοί

Ως παθητικούς χαρακτηρίζουμε τη διάχυση και τη διήθηση. Αποτελεί τον σημαντικότερο τρόπο με τον οποίο η πλειοψηφία των φαρμάκων διέρχεται μέσα στο κύτταρο.

#### ☆ Διάχυση

Ίσως ο πιο κοινός τρόπος διακίνησης μορίων δια μέσου των κυτταρικών μεμβρανών. Σε αντίθεση με τους παραπάνω τρόπους της ενεργητικής εισαγωγής μορίων στο κύτταρο, ο συγκεκριμένος δεν απαιτεί την πρόσδοση ενέργειας. Επιπλέον, ακολουθεί το νόμο του Fick:

$$\dot{m}_{\text{διαχ}} = D \cdot A \cdot \frac{\Delta C}{d} \quad , \quad \text{όπου} \quad \dot{m}_{\text{διαχ}} : \text{βαθμός διάχυσης}$$

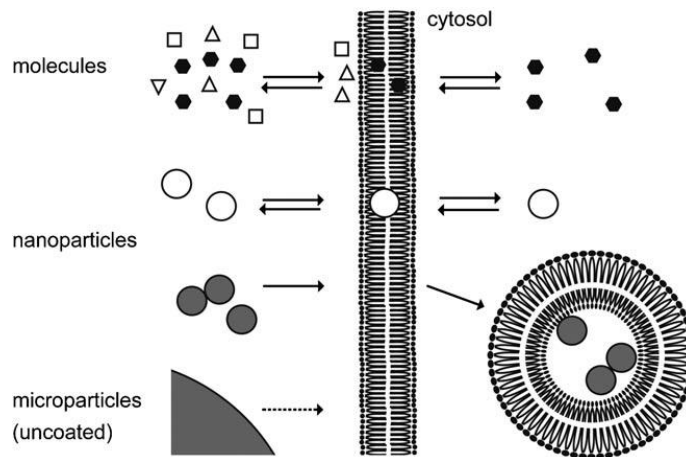
D : σταθερά διάχυσης

A: επιφάνεια της μεμβράνης που συμμετέχει στη διάχυση

#### d: πάχος της μεμβράνης

Επειδή η σταθερά διάχυσης στην περίπτωση των μεμβρανών, εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το μοριακό βάρος, τη μοριακή δομή, τη λιποδιαλυτότητα και το βαθμό ιονισμού συμπεραίνεται ότι και ο μηχανισμός της διάχυσης θα εξαρτάται άμεσα από αυτούς τους παράγοντες. Συγκεκριμένα, ουσία με  $M.B > 1000$  πολύ δύσκολα μπορεί να διαχυθεί δια μέσου των μεμβρανών. Επιπλέον, η διάχυση είναι ευθέως ανάλογη με τη λιποδιαλυτότητα και αντιστρόφως ανάλογη από το βαθμό διάστασης του μορίου.

Συγκεκριμένα νανοσωματίδια μπορεί να εισέλθουν δια μέσου των μεμβρανών και να διαχυθούν μέσα σε κάποιο κύτταρο, ανάλογα με την επιφάνειά τους. Τα περισσότερα υδρόφιλα (οξειδία) νανοσωματιδίων βρίσκονται προσδεμένα σε “οχήματα” μέσα στα κύτταρα. Τα μη επικαλυμμένα μικροσωματίδια σπανίως εισάγονται σε μη-φαγοκυτταρικά κύτταρα [25]



**Εικόνα 20** Οι βιολογικές μεμβράνες αποτελούν τα πρωταρχικά εμπόδια για κάποια ξένη ουσία σε όλους τους οργανισμούς. Ιδιαίτερα τα λιπόφιλα μόρια, διαχέονται δια μέσου διπλοστοιβάδων λιπιδίων [25].

#### ☆ Διήθηση

Κατά τον μηχανισμό της διήθησης υδατοδιαλυτές ουσίες διέρχονται μέσα από τους πόρους της μεμβράνης λόγω βαθμίδας υδροστατικής ή ωσμωτικής πίεσης [22]. Ακόμα και μη λιποδιαλυτά φάρμακα μικρού, όμως, μοριακού βάρους μπορούν να ακολουθήσουν τον συγκεκριμένο μηχανισμό καθώς παρασυρόμενα από το υπάρχον άφθονο νερό μπορούν τελικά να διέλθουν δια μέσου των υδατικών πόρων των μεμβρανών. Με διήθηση διέρχονται τις βιολογικές μεμβράνες ανόργανοι και οργανικοί ηλεκτρολύτες και ιονισμένες σουλφοναμίδες. Γενικά, ο συγκεκριμένος μηχανισμός εξαρτάται κυρίως από τη διαφορά υδροστατικής πίεσης μεταξύ του εξωτερικού και εσωτερικού διαμερίσματος, το πάχος της μεμβράνης, τον αριθμό των πόρων και το τυχόν ηλεκτρικό τους φορτίο. Συγκεκριμένα, αυτόν τον μηχανισμό ακολουθούν τα αυστηρά ενδοθηλιακά εμπόδια όπως τα αιματοεγκεφαλικού φραγμού ενδοθηλιακά κύτταρα (blood-brain barriers, BBB) όταν επιτρέπουν την διέλευση νανοσωματιδίων [30].

## 1.5 Βιβλιογραφία

- [1] Richard P. Feynman, There is plenty of room at the bottom, Caltech's Engineering and Science Magazine, 1960, 3-9.
- [2] Kumiko Miyazaki, Nazrul Islam, Nanotechnology systems of innovation—An analysis of industry and academia research activities, Technovation, 27, 2007, 661–675.
- [3] Hart Research Associates. Nanotechnology, Synthetic Biology, & Public Opinion. A report of fundings. Based on a national survey among adults. Conducted on behalf of Project on Emerging Nanotechnologies. 2009. Available at: [http://www.nanotechproject.org/process/assets/files/8286/nano\\_synbio.pdf](http://www.nanotechproject.org/process/assets/files/8286/nano_synbio.pdf). Accessed 29 Αυγούστου, 2012.
- [4] Oleg V. Salata, Applications of nanoparticles in biology and medicine, J. Nanobiotechnol. 2004, σελ. 2,3.
- [5] Robert A. Yokel, Robert C. MacPhail, Engineered nanomaterials: exposures, hazards and risk prevention, Journal of Occupational Medicine and Toxicology 2011, 6:7, σελ. 2-4, 6, 12.
- [6] Günter Oberdörster, Eva Oberdörster, Jan Oberdörster, Nanotoxicology An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles, Environmental Health Perspectives. Volume 113:7, Ιούνιος 2005, σελ. 823,829.
- [7] Kai Savolainen, Harri Alenius, Hannu Norppa, Lea Pylkkänen, Timo Tuomi, Gerhard Kasper, Risk Assessment of ENP & Nanotechnologies- A Review, Elsevier Ireland Ltd, 2010, σελ. 93-95, 100.
- [8] Peter H. M. Hoet, Irene Brüske-Hohlfeld, Oleg V. Salata, Possible Health Impact of Nanomaterials, Nanotechnologies for the life sciences Vol.5, 2006, σελ. 56-61.
- [9] Yuliang Zhao, Bing Wang, Weiyue Feng, Chunli Bai, Nanotoxicology: Toxicological and Biological Activities of Nanomaterials, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), σελ.17.
- [10] Peter H. M. Hoet, Irene Brüske-Hohlfeld, Oleg V. Salata, Nanoparticles-known and unknown health risks, Journal of Nanobiotechnology, 2004, 2:12, σελ. 10.
- [11] Bengt Fadeel, Alfouso E. Gareia-Bennett, Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications, Elsevier- Advanced Drug Delivery Reviews 62, 2010, σελ. 363.
- [12] Anna A. Shvedova, Tina Sager, Ashley R. Murray, Elena Kisiu, Pale W. Porter, Stephen S. Leonard, Diane Schwegler-Berry, Victor A. Robinson, Vincent Castranova, Critical Issues in the Evaluation of Possible Adverse Pulmonary Effects Resulting from Airborne Nanoparticles, Informa Healthcare, 2007, σελ. 228.
- [13] The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, Possible adverse health, environmental and safety impacts, Nanoscience and Nanotechnologies, Ιούλιος 2004, σελ. 37-38.
- [14] Alison Elder, Sadasivan Vidyasagar, Lisa DeLouise, Physicochemical factors that effect metal and metal oxide nanoparticles passage across epithelial barriers, John Willey & Sons, Inc, 2009, σελ.3-5.
- [15] Günter Oberdörster, Andrew Maynard, Ken Donaldson, Vincent Castranova, Julie Fitzpatrick, Kevin Ausman, Janet Carter, Barbara Karn, Wolfgang Kreyling, David Lai, Stephen Olin, Nancy Monteiro-Riviere, David Warheit, Houg Youtg, Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy, Particle and Fibre Toxicology, 2005, 2:8, σελ.3.

- [16] Sara Trabulo, Ana Luisa Cardoso, Miguel Mano, Maria C. Pedroso de Lima, Cell-Penetrating Peptides-Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems, *Pharmaceuticals*, 2010, 3, 961-993, σελ. 964.
- [17] Gilles Pouchel, Juan-Manuel Irache, Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract, Elsevier, *Advanced Drug Delivery Reviews* 34, 1998, σελ. 193.
- [18] C. Medina, MJ Santos-Martinez, A.Radomski, OI Corrigan and MW Radonski, Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance, *British Journal of Pharmacology*, 2007, 150, σελ. 556.
- [19] R. D. Handy & B. J. Shaw, Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials; Implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology, *Health, Risk & Society*, Ιούνιος 2007; 9(2):125-144, σελ.136.
- [20] Yoon-Sik Lee, Mymg-Haing Cho, Application of Nanotechnology into Life Science: Benefit or Risk, *Biomedical Nanostructures*, John Willey & Sons, Inc. 2008, σελ. 497.
- [21] Larken E. Euliss, Julie A. DuPont, Stephanie Gration, Joseph DeSimone, Imparting size, shape and composition control of materials for nanomedicine, *The Royal Society of Chemistry* 2006, 35, 1095-1104, σελ. 1095.
- [22] Μ. Μαρσέλος, Συνοπτική Φαρμακολογία, Τόμος 1, Ιωάννινα 2006, σελ. 2-5
- [23] Myrtill Simko, Michael Nentwich, André Gzásó, Ulrich Fiedeler, How nanoparticles enter the human body and their effects there, nanotrust dossiers, No 003en, Νοέμβριος 2010.
- [24] Cristina Buzea, Ivan I. Pacheco, Kevin Robbie, Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity, *Biointerphases* 2 (4), Δεκέμβριος 2007, σελ. 28, 33.
- [25] Wendelin J. Stark, Nanoparticles in Biological Systems, *Nanomedicine*, 2011, σελ. 1246.
- [26] Zhi Ping Xu, Qing Hua Zeng, Gao Qing Lu, Ai Bing Yu, Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery, *Chemical Engineering Science*, 61, 2006, 1027-1040.
- [27] Xuejia Xue, Feng Wang, Xiaogang Lin, Emerging functional nanomaterials for therapeutics, *J. Mater. Chem.*, 2011, 21, 13107.
- [28] Kumerash S. Soppimatch, Guru V. Beageri, Nanostructures for Cancer Diagnostics and Therapy, *Biomedical Nanostructures*, ch.16, 2007.
- [29] Amit Agrawal, May Dongmei Wang, Shuming Nie, Bioconjugated Nanoparticles for Ultrasensitive Detection of Molecular Biomarkers and Infectious Agents, *Biomedical Nanostructures*, ch.08, Willey 2007.
- [30] Omid Veisesh, Jonathan W. Gunn, Miqin Zhang, Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 2010, 284-304.
- [31] Mark D. Hoover, Aleksandr B. Stefaniak, Gregory A. Day, Charles L. Geraci, Exposure Assessment Considerations for Nanoparticles in the workplace, Informa Healthcare, Νέα Υόρκη, 2007.
- [32] Lara Yildirimer, Nguyen T. K. Thanh, Marileua Loizidou, Alexander M. Seifalian, Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles, *Nanotoday*, 2011, 6, 585-607.
- [33] Huaizhong Pan, Jindřich Kopeček, Multifunctional water-soluble polymers for drug delivery, *Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers*, 2008.
- [34] Yon Ju-Nam, Jamie R. Lead, Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications, *Science of the total environment*, 400, 2008, 396-414.

- [35] Jian Zhang, Libo Wu, Hak-Kim Chan, Wiwik Watanabe, Formation, characterization and fate of inhaled drug nanoparticles, *Nanodrug Particles and Nanoformulations of Drug Delivery*, Vol.63, Issue 6, 2011, 441-455.
- [36] Christiane Beer, Rasmus Foldbjerg, Yuya Hayashi, Duncan S. Sutherland, Herman Autrup, Toxicity of silver nanoparticles—Nanoparticle or silver ion? , *Toxicology Letters*, 208, 2012, 286– 292.
- [37] Danail Hristozov, Ineke Malsch, Hazards and Risks of Engineered Nanoparticles for the Environment and Human Health, *Sustainability*,1, 2009, 1161-1194.
- [38] Indu Bhatt, Bhumi Nath Tripathi, Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment, *Chemosphere*, 2011, 82.



# 2

## Τοξικότητα

### 2.1 Εισαγωγή

Γενικά, τα νανοσωματίδια αποτελούν μια ενδιάμεση κατάσταση ύλης μεταξύ των υλικών όγκου και των μοριακών υλικών, γεγονός που τα κάνει να διαφέρουν ιδιαίτερα και από τα πρώτα και από τα δεύτερα. Στην πράξη είναι τόσο διαφορετικά που μπορεί να σκεφτεί κανείς ότι πρόκειται για τελείως διαφορετικά υλικά από τα αντίστοιχα υλικά όγκου τους. Αυτό είναι που τα κάνει τόσο επιθυμητά σε διάφορες εφαρμογές αλλά ταυτόχρονα και επικίνδυνα. Υλικά όπως ο άργυρος που δεν είναι γνωστός για την τοξική του συμπεριφορά σαν υλικό όγκου και χρησιμοποιείται κατά κόρον σε διάφορες εφαρμογές με δημοφιλέστερη την κατασκευή κοσμημάτων, στη ναυοκλίμακα παρουσιάζει αντιβακτηριδιακή δράση σε τέτοιο βαθμό που μπορεί να επηρεάσει την φυσική ισορροπία ενός οικοσυστήματος. Παρόλα αυτά, όπως παρατηρείται και στα διαγράμματα που ακολουθούν, η νανοτεχνολογία γενικότερα και τα νανοσωματίδια ειδικότερα, αποτελούν πλέον μέρος της καθημερινότητας, με πολλά νανοδομημένα αντικείμενα να βρίσκονται ήδη στο εμπόριο ακόμα και αν υπάρχει έλλειψη προτύπων αλλά και κενό γνώσης όσον αφορά τους παράγοντες (φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και συγκέντρωση) που ελέγχουν και καθορίζουν την τοξικότητα. Η έλλειψη προτύπων έχει αρχίσει από το 2011 να αντιμετωπίζεται (Παράρτημα 1 - Πρότυπα ISO

Π.Π. ) όμως όσον αφορά τους παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα όπως επίσης και ο τρόπος που την επηρεάζουν είναι ένα πρόβλημα το οποίο είναι αρκετά πολύπλοκο ως προς τη λύση του. Και αυτό γιατί συνήθως η τοξικότητα ελέγχεται από τον συνδυασμό των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών κάτι που είναι αρκετά επίπονο ως προς τη μελέτη λόγω των πολλών δυνατών συνδυασμών ενώ δεν έχει καθιερωθεί ακόμα ο καταλληλότερος τρόπος έκφρασης της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων. Έτσι γίνεται δύσκολη η σύγκριση διαφόρων ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί (Πίνακας 1) ενώ τα αποτελέσματά τους δεν προσφέρουν πρακτικά τις πληροφορίες που θα έπρεπε. Κρίσιμα βήματα στην εκτίμηση του κινδύνου των νανοσωματιδίων είναι:

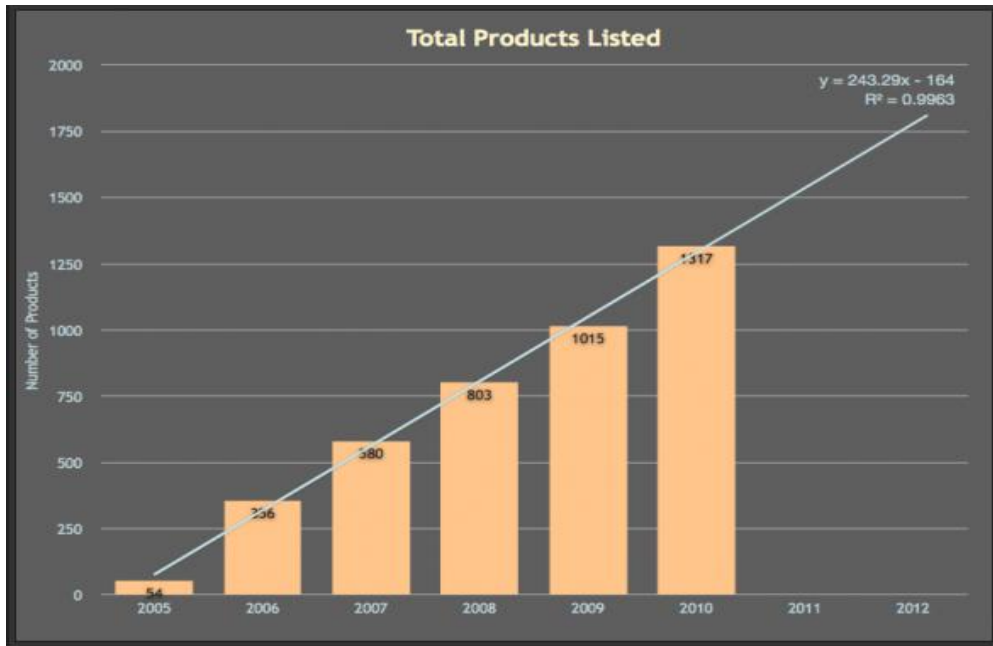
1. Η αναγνώριση των ιδιοτήτων που μπορούν να προκαλέσουν κινδύνους στην υγεία,
2. Ο χαρακτηρισμός του κινδύνου, ο οποίος απαιτεί τον προσδιορισμό της ποσότητας σε νανοσωματίδια που μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε ευαίσθητα όργανα και κύτταρα, των

μηχανισμών της τοξικότητας, της πιθανότητας των διαφορετικών νανοσωματιδίων να αντιδρούν με συστατικά των κυττάρων όπως είναι τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες, την αξιολόγηση της ικανότητάς τους να διασχίζουν τα εσωτερικά εμπόδια όπως είναι τα αιματοεγκεφαλικά φράγματα (blood-brain barriers), τα φράγματα αίματος-πλακούντα (blood-placental barriers), τα φράγματα αίματος-όρχεων (blood-testicular barriers) και πολλά άλλα.

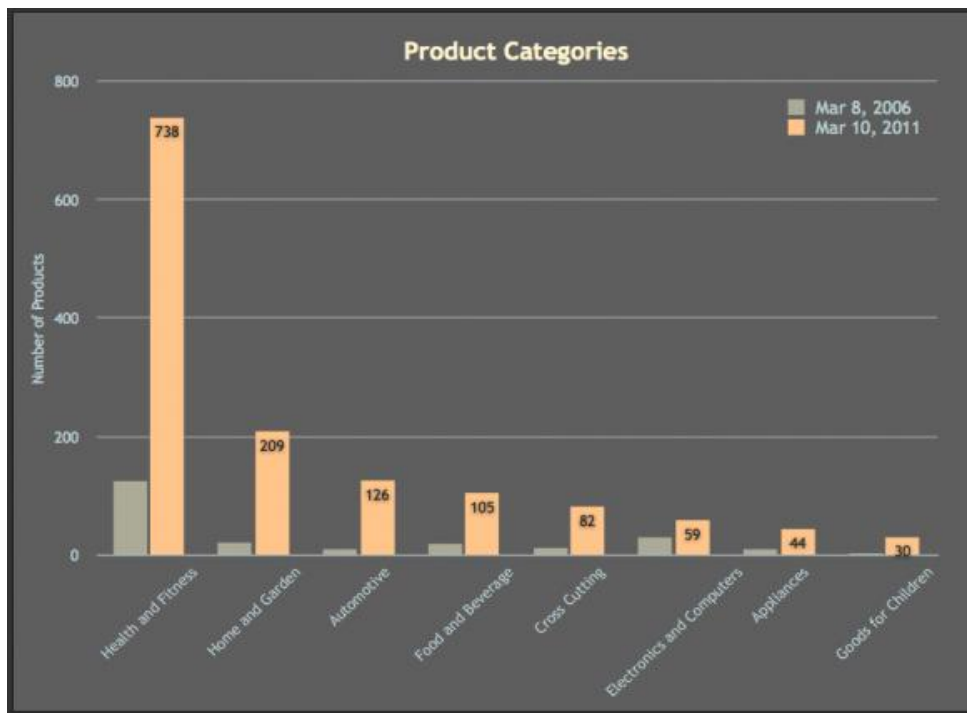
3. Η κατανόηση των διαδικασιών μεταφοράς τους από την πηγή στον άνθρωπο-δέκτη και των μεταβολών που μπορεί να επιφέρουν οι διαδικασίες αυτές στα χαρακτηριστικά τους [64].

Ο προσδιορισμός, λοιπόν, της τοξικότητας είναι επιτακτική ανάγκη για δύο λόγους. Ο προφανής λόγος είναι το γεγονός ότι σε ένα ήδη επιβαρυνμένο περιβάλλον από τις διάφορες ανθρώπινες δραστηριότητες δεν είναι σφώρων να προσθέσουμε επιπλέον επιβαρυντικούς παράγοντες για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία. Ο μη προφανής λόγος είναι η κατανόηση των μηχανισμών τοξικότητας με σκοπό χρήση αυτής για ιατρικούς σκοπούς όπως είναι η στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων, η γονιδιακή θεραπεία και η χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων για άμεση διάγνωση ασθενειών. Βέβαια στην πράξη πρόκειται για πολύ πιο σύνθετο πρόβλημα αφού λόγω της αυξημένης δραστηριότητας που παρουσιάζουν τα νανοσωματίδια δημιουργεί τις κατάλληλες προϋποθέσεις για την αλληλεπίδρασή τους με διάφορα υγρά του ανθρώπινου σώματος, όπως είναι ο ορός του αίματος (serum) ή η βλέννα (mucus), κάνοντάς τα δυνητικά πολύ πιο “ενεργά” συγκρινόμενα με μεγαλύτερα σωματίδια [65]. Επιπλέον, υπάρχουν διάφορα εμπόδια που πρέπει να ξεπεραστούν στη διαδρομή τους προς το στόχο της θεραπείας (φυσική άμυνα του οργανισμού) και για αυτό το λόγο χρειάζεται η επέμβαση για τη μετατροπή τους σε βιοσυμβατά. Τέλος, είναι σημαντικό να βιοαποικοδομούνται και με συγκεκριμένο τρόπο ώστε να επιτευχθεί σωστή και αποτελεσματική θεραπεία.

Αρκετές έρευνες και πειράματα έχουν γίνει για την χρήση της τοξικότητας των νανοσωματιδίων σαν πλεονέκτημα κατά του καρκίνου. Για να χρησιμοποιηθεί όμως τέτοιου είδους θεραπεία θα πρέπει να είναι δυνατός ο έλεγχος της τοξικότητας ώστε να μην προκληθούν προβλήματα σε γειτονικά, υγιή κύτταρα. Γατί ακόμα και αν υπάρχουν βελτιώσεις σχετικά με την σταθερότητα και τη διαλυτότητα πολλά προβλήματα, που σχετίζονται κυρίως με την αντίδραση του οργανισμού στην εισβολή ξένων σε αυτόν ουσιών, είναι ακόμα υπαρκτά και όχι πλήρως κατανοητά, όσον αφορά τον μηχανισμό τους [66]. Έτσι, είναι δύο τα είδη της τοξικότητας που χρήζουν έρευνα και είναι πραγματικά αξιοσημείωτο το γεγονός ότι στο μέλλον θα έχει επιτευχθεί το μειονέκτημα μιας επαναστατικής τεχνολογίας να γίνει πλεονέκτημα για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών που μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν ικανοποιητικές θεραπείες, με κυρίαρχη ίσως της νούμερο ένα αιτίας θανάτου παγκοσμίως με πάνω από μισό εκατομμύριο υπολογιζόμενους θανάτους λόγω των διαφόρων ειδών καρκίνου μόνο για το έτος 2010 [69].



Διάγραμμα 1 Λίστα εγγεγραμμένων προϊόντων τα έτη 2005-2010. Πηγή: <<http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer>>.



Διάγραμμα 2 Κατηγορίες ναυοδομημένων προϊόντων του εμπορίου για τα έτη 2006 (γκρι χρώμα) και 2011 (πορτοκαλί χρώμα). Πηγή: <<http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer>>.

**Πίνακας 1** Βιβλιομετρία από αξιόλογα άρθρα που έχουν εκδοθεί σχετικά με διάφορες πτυχές της επικινδυνότητας των νανοσωματιδίων σύμφωνα με τον Thomson Reuters ISI Web of Science για τα έτη 1980–2010. Η έρευνα διεξήχθη στις 27.01.2010.

Λέξη-Κλειδί	Αριθμός Επιστημονικών Άρθρων	H-index *	Περισσότερο Αναφερόμενα Επιστημονικά Άρθρα
<b>Nanoparticles</b>	96,440	Πολλά δεδομένα για την συγκεκριμένη έρευνα	
<b>Nanoparticles + toxic</b>	2674	75	Gupta and Gupta, <i>Biomaterials</i> 26 (2005), 3995–4021 (655)
<b>Nanoparticles + health</b>	620	38	Moghimi et al., <i>FASEB J.</i> 19 (2005), 311–330 (262)
<b>Nanoparticles + occupational</b>	87	13	Lam et al., <i>Rev. Toxicol.</i> 36 (2006) 189–217 (157)
<b>Nanoparticles + epidemiology</b>	58	13	Stoeger et al., <i>Environ. Health Perspect.</i> 114 (2006), 328–333 (71)
<b>Nanoparticles + hazard</b>	73	15	Lam et al., <i>Rev. Toxicol.</i> 36 (2006) 189–217 (157)
<b>Nanoparticles + ecotoxic</b>	79	18	Nowack and Bucheli, <i>Environ. Pollut.</i> 150 (2007), 5–22 (94)
<b>Nanoparticles + life cycle assessment</b>	20	5	Müller and Nowack, <i>Environ. Sci. Technol.</i> 42 (2008), 4447–4453 (44)
<b>Nanoparticles + ecosystem</b>	16	4	Boxall et al., <i>Nanomedicine</i> 2 (2007), 919–927 (16)

Σημειώσεις:

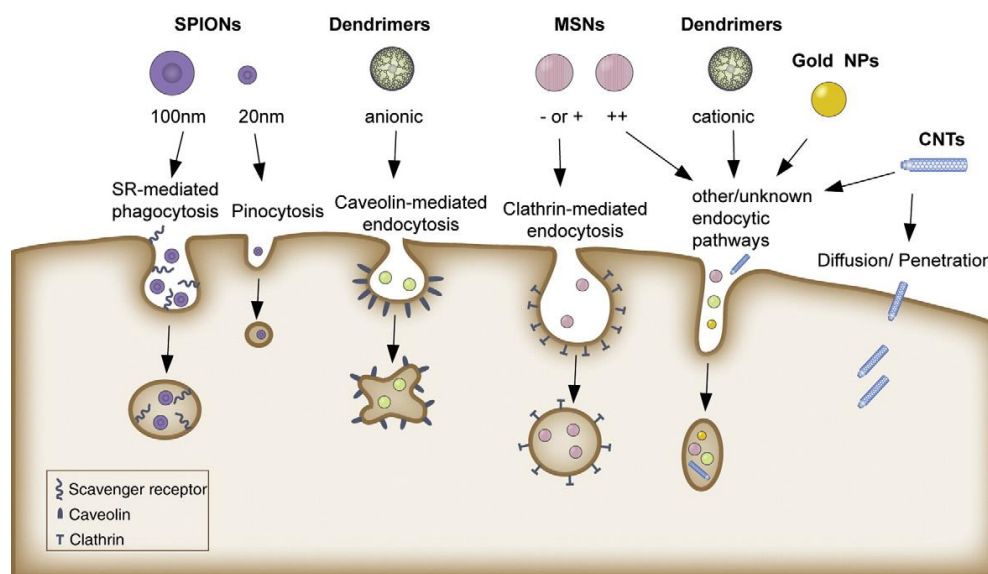
\*H-index. Παράδειγμα: H-index 75 για τον συνδυασμό *Nanoparticles + toxic* σημαίνει ότι στη βάση δεδομένων ISI υπάρχουν 75 επιστημονικά άρθρα σχετικά με την τοξικότητα των νανοσωματιδίων στα οποία σε όλα έχει γίνει αναφορά περισσότερες από 75 φορές.

Πηγή: *Toxicology* 269 (2010,) 89–91

Το παρόν κεφάλαιο πραγματεύεται το δεύτερο είδος τοξικότητας που αναφέρθηκε, την επιθυμητή τοξικότητα για ιατρικούς σκοπούς. Αναλύονται οι φυσικοχημικοί παράγοντες που έχουν δείχθει ότι συμβάλλουν στην εμφάνιση τοξικότητας και παρουσιάζεται μια σειρά δοκιμών που χρησιμοποιούνται κατά κόρον για την αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας με περαιτέρω ανάλυση του τρόπου αξιολόγησης που χρησιμοποιήθηκε στο πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

## 2.2 Επίδραση των νανοσωματιδίων στον ανθρώπινο οργανισμό

Η επίδραση των νανοσωματιδίων στον ανθρώπινο οργανισμό μπορεί να ποικίλει και εξαρτάται ισχυρά από παράγοντες όπως είναι οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες (μέγεθος, σχήμα, επιφανειακό φορτίο), η ποσότητα και η συχνότητα εισαγωγής τους σε αυτόν όπως επίσης και από τους διαφορετικούς δρόμους που μπορούν να ακολουθήσουν μετά την εισαγωγή τους, εφόσον είναι δυνατό να μετατοπιστούν ακόμα και σε απομακρυσμένα μέρη μέσα στο σώμα. Η φαρμακοκινητική και η πρόσληψη των νανοσωματιδίων *in vivo*, συμπεριλαμβάνοντας και την αποφυγή των βιολογικών εμποδίων, εξαρτώνται από το μέγεθος, την επιφάνεια, το φορτίο της επιφάνειας αυτής, το σχήμα τους, την τάση που έχουν να συσσωματωθούν και διάφορες άλλες ιδιότητες της επιφανείας τους [7].

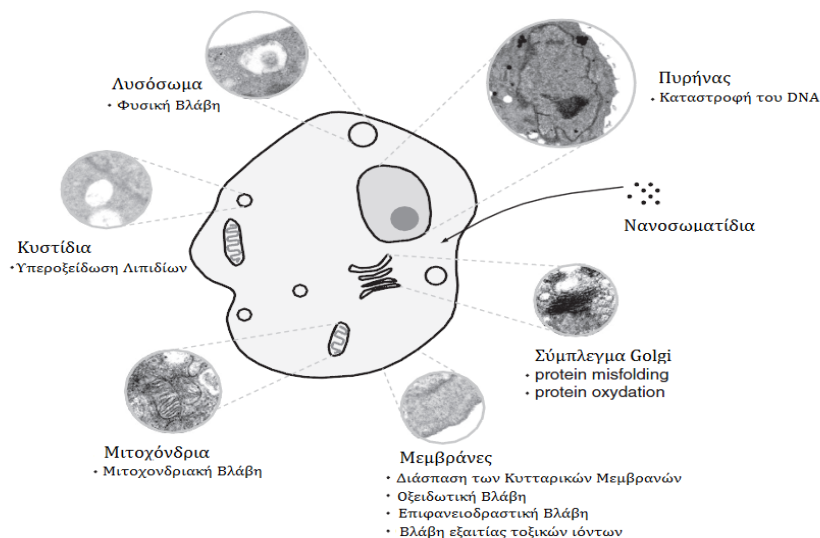


**Εικόνα 1** Τρόποι κυτταρικής πρόσληψης νανοσωματιδίων και νανοδομών (δενδριμερή, CNTs:

νανοσωλήνες άνθρακα, MSN: μεσοπορώδει νανοσωματίδια πυριτίου, SPION: υπερμαγνητικά οξείδια σιδήρου) ανάλογα με το μέγεθος, τις επιφανειακές ιδιότητες, τη φύση τους όπως επίσης και την κατάσταση ενεργοποίησης του κυττάρου στο οποίο εισέρχονται (μακροφάγο, ενδοθηλιακό κύτταρο, κ.τ.λ.) [14].

Ιδιαίτερα σε μελέτες νανοτοξικότητας, αυτό που πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψιν είναι η ποσότητα η οποία εισάγεται στον ανθρώπινο οργανισμό. Αν και έχει προκαλέσει αρκετές διαφωνίες η εύρεση κατάλληλης μέτρησης της ποσότητας [51], θα μπορούσε αυτή να απευθύνεται στην αρχική συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στην οποία εκτίθενται τα κύτταρα αλλά και στον ακριβή αριθμό νανοσωματιδίων τα οποία προσλαμβάνονται ανά κύτταρο, ανά μονάδα επιφάνειας. Επιπλέον, σε τέτοιες μελέτες, είναι πολύ σημαντική η εύρεση και κατανόηση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης των διεπιφανειών νανοσωματιδίων-κυττάρων. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορεί να είναι είτε χημικοί είτε φυσικοί. Οι πρώτοι αποτελούνται από την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), την απελευθέρωση τοξικών ιόντων, την διαταραχή των ηλεκτρονίων/ιόντων των δραστηριοτήτων μεταφοράς της κυτταρικής μεμβράνης, την υπεροξείδωση λιπιδίων ή των επιφανειοδραστικών ιδιοτήτων. Οι δεύτεροι αποτελούν αποτέλεσμα του μεγέθους των σωματιδίων και των επιφανειακών τους ιδιοτήτων και επηρεάζουν κυρίως τις δραστηριότητες των κυτταρικών μεμβρανών, τις ίδιες τις

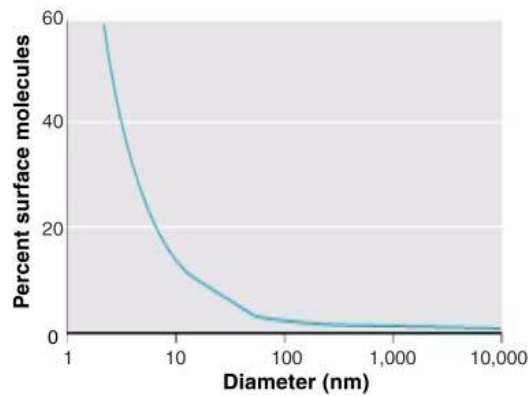
μεμβράνες και τη διαμόρφωση των πρωτεϊνών [50]. Όσο διαφορετικοί, όμως, και αν είναι όλοι αυτοί οι μηχανισμοί έχουν κοινό αποτέλεσμα/επίπτωση στα κύτταρα: τον θάνατό τους.



**Εικόνα 2** Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων των νανοσωματιδίων με τα κύτταρα: ενδοκυτταρικοί στόχοι και νανοτοξικολογικοί μηχανισμοί [50].

### 2.2.1 Επίδραση του μεγέθους

Το μέγεθος των νανοσωματιδίων παίζει σημαντικό ρόλο στις τελικές ιδιότητές τους γι' αυτό και χρησιμοποιείται σαν παράμετρος-κλειδί για την αξιολόγηση της φυσικής σταθερότητάς τους [23]. Αποτελεί τον πιο διερευνημένο παράγοντα τοξικότητας εφόσον δεν επηρεάζει μόνο τις τοξικές ιδιότητες των νανοϋλικών αλλά επίσης την διανομή, την πρόσληψη, την απομάκρυνσή τους από την κυκλοφορία του αίματος και την αλληλεπίδρασή τους με τα κύτταρα [1], [7]. Επιπλέον, επηρεάζει την επιφανειακή πίεση στις κυτταρικές μεμβράνες όπως και τις δυνάμεις προσκόλλησης [50]. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι με την ελάττωση του μεγέθους αλλάζει το ποσοστό των ατόμων στην επιφάνεια του υλικού (παρατηρείται αύξηση των ατόμων) σε σύγκριση με το εσωτερικό του (κβαντικά φαινόμενα, quantum effects) [2], [10], [13]. Έτσι, πολλές ιδιότητες των υλικών όγκου, όπως είναι η πυκνότητα, η ηλεκτρική αντίσταση, ο μαγνητισμός, η διηλεκτρική σταθερά, ακόμα και το σημείο τήξης και η διαλυτότητα [54], μεταβάλλονται στη νανο-κλίμακα [18].



*Εικόνα 3* Σχέση μεταξύ ποσοστού επιφανειακών μορίων και διαμέτρου σωματιδίων [3].

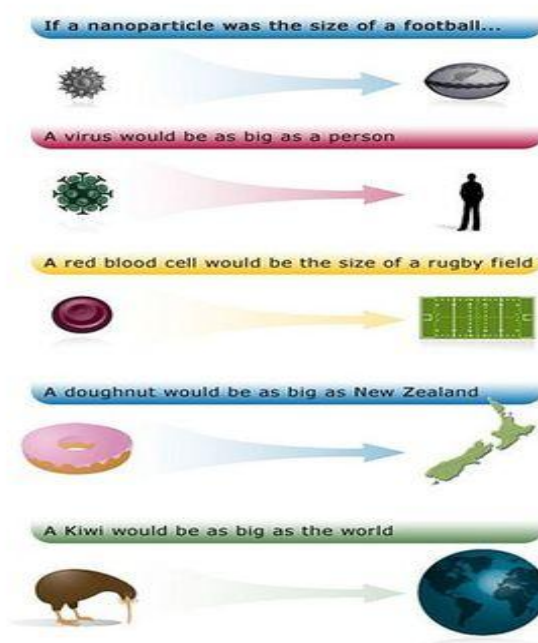
Όπως παρατηρείται στο διάγραμμα, σωματίδια διαμέτρου 100 nm παρουσιάζουν αντιστρόφως ανάλογη σχέση με τον αριθμό μορίων της επιφάνειάς του (εκφρασμένα σε ποσοστό επί τοις % του συνολικού αριθμού των μορίων στην επιφάνεια). Όσο μειώνεται η διάμετρος, π.χ. στα 30 nm παρατηρείται αύξηση του αριθμού των μορίων στην επιφάνεια (10% στα 30 nm). Για ακόμα μικρότερη διάμετρο, π.χ. 10 και 3 nm παρατηρείται ακόμα μεγαλύτερη αύξηση του ποσοστού των μορίων στην επιφάνεια (20% και 50% αντίστοιχα) [3]. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το σώμα να αντιδράσει διαφορετικά με την ίδια ποσότητα μάζας σωματιδίων των οποίων η επιφάνεια αποτελείται από δισεκατομμύρια νανοσωματίδια σε σύγκριση με σωματίδια των οποίων η επιφάνεια αποτελείται από ορισμένα μικρο-σωματίδια.

Μεγαλύτερη επιφάνεια οδηγεί σε αυξημένη ενεργότητα και σε αυξημένη πηγή δραστικών ειδών οξυγόνου (increased source of reactive oxygen species). Όσο πιο μεγάλη είναι η δραστική επιφάνεια των νανοσωματιδίων (δηλαδή όσο μικρότερο είναι το μέγεθός τους) τόσο μαζικότερες είναι οι οξειδωτικές ικανότητές τους [19] που μπορούν να οδηγήσουν μέχρι και σε οξείδωση του δεσοξυ-ριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) προκαλώντας βλάβη στο γενετικό υλικό των κυττάρων [13] ή ακόμα και οξείδωση των κυτταρικών μεμβρανών με αποτέλεσμα την καταστροφή τους [50]. Η δημιουργία, αυτή, των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) μπορεί να αποτελεί αποτέλεσμα διαφόρων μηχανισμών: (1) Άμεση δημιουργία ROS σαν αποτέλεσμα έκθεσης σε όξινο περιβάλλον, όπως αυτό των λυσοσωμάτων, είτε από την επιφάνεια των νανοσωματιδίων ή από διαρροή ιόντων κατά την υποβάθμιση των νανοσωματιδίων στα λυσοσώματα, (2) εξαιτίας της αλληλεπίδρασης των νανοσωματιδίων με κυτταρικά οργανίδια, όπως είναι τα μιτοχόνδρια η οποία μπορεί να επηρεάσει την λειτουργικότητα των τελευταίων, (3) λόγω πιθανής αλληλεπίδρασης με οξειδοαναγωγικά ενεργές πρωτεΐνες όπως είναι η NADPH οξειδάση και (4) με την αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με τους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων και την ενεργοποίηση των ενδοκυττάρων οδών σηματοδότησης που έχει σαν αποτέλεσμα την έκφραση γονιδίων που αποκρίνονται σε περιπτώσεις πίεσης/στρες (stress response genes) και αυξάνουν την δημιουργία των ROS [19].

Ο πίνακας που ακολουθεί αναφέρει κάποια παραδείγματα νανοσωματιδίων, την τοξικότητα που παρουσιάζουν ανάλογα με το μέγεθός τους και κάποιες ιατρικές τους εφαρμογές.

Πίνακας 3 Μεγέθη νανοσωματιδίων, τοξικότητα, πειραματική φάση και εφαρμογές τους.

Nanoparticle	Size	Toxicity	Status	Application
Liposome	100-200nm	Low	Clinical use	Delivery
Small polymer	200kDa	Low	Research	Delivery
Dendrimer	2-6nm depending on generation number	Variable depending on cell type	Phase I	Delivery
Virus	30-100nm	High	Phase II	Delivery
Hybrid System				
QD-Virus	Variable	-	Research	Imaging Delivery
Metal core dendrimers	2-4nm for gold	-	Research	Delivery
Nanoshells	60-400nm	Non-Toxic	Research	Imaging, treatment
Quantum Dots	2-10nm	Toxic	Commercial	Sensing, imaging
Carbon Nanotubes		Expected to be non-toxic	Research	Delivery, sensing
Single-walled	1-2nm diameter, variable length			
Multi-walled	20-25nm diameter, variable length			
Nanowires	Variable length/diameter	NA	Research	Sensing



Εικόνα 21 [University of Waikato]

Στην περίπτωση της στοχευόμενης χορήγησης φαρμάκων (targeting drug delivery) με χρήση υποκαταστατών (ligands), όσο πιο δραστική είναι η επιφάνειά τους, τόσο πιο εύκολη είναι η πρόσδεση των υποκαταστατών. Τα νανοσωματίδια με μέγεθος <math><100\text{nm}</math>, παρουσιάζουν υψηλότερη σταθερότητα σε κολλοειδή αιωρήματα και βελτιωμένη διάχυση δια μέσου των ιστών [4].

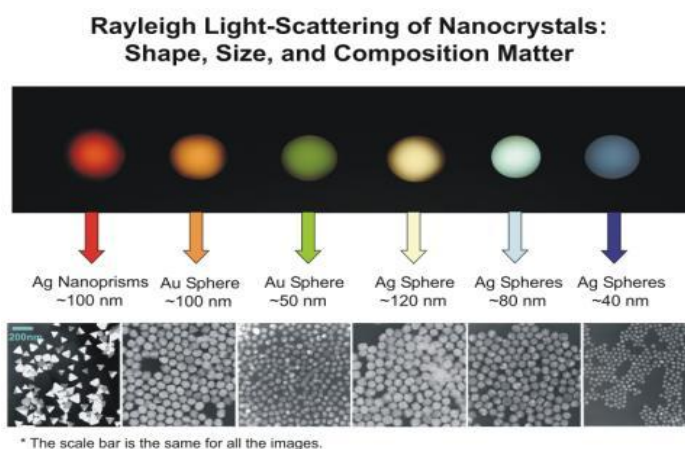


Επιπλέον, το μέγεθος των νανοσωματιδίων ελέγχει το προφίλ της συγκέντρωσής τους στα αγγεία και μεσολαβεί στη διαπερατότητα τους εκτός των αγγείων [4], [7]. Όπως έχει αναφερθεί, το μέγεθος με το συνδυασμό και άλλων παραγόντων, επηρεάζει το μηχανισμό απομάκρυνσης τους. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι νανοσωματίδια με μέγεθος <20 nm απεκκρίνονται μέσω των νεφρών, ενώ με μεσαίο μέγεθος (30-150 nm) συσσωρεύονται στο μυελό των οστών, την καρδιά, το στομάχι και με μεγάλο μέγεθος (150-300 nm) στο συκώτι και τον σπλήνα [7], [66].

Μικρού μεγέθους σφαιρικά νανοσωματίδια παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά διάχυσης, επομένως αυξημένη συγκέντρωση στο κέντρο των αιμοφόρων αγγείων, περιορίζοντας έτσι την αλληλεπίδραση τους με τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τοιχωμάτων των αγγείων και παρατείνοντας το χρόνο κυκλοφορίας/παραμονής τους στο αίμα [4].

Επίσης, το μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι πολλές φορές αυτό που καθορίζει το πόσο γρήγορα θα προσληφτούν αυτά από τα κύτταρα. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί για παράδειγμα ότι σφαιρικά νανοσωματίδια της τάξης των 50 nm προσλαμβάνονται πιο γρήγορα σε σχέση με μικρότερου ή μεγαλύτερου μεγέθους στην κλίμακα από 10 έως 100 nm [27]. Τα νανοφάρμακα τα οποία χορηγούνται συστηματικά πρέπει να έχουν εύρος διαμέτρων από 10 έως 200 nm. Αυτό το εύρος μεγέθους καθορίζεται από την ανθρώπινη ανατομία. Τα νανοϋλικά πρέπει να είναι μεγαλύτερα από 10 nm στη διάμετρο ώστε να αποφύγουν τον πρώτο κίνδυνο αποβολής τους από τα νεφρά και μικρότερα από 200 nm ώστε να αποφύγουν την κατάσχεση τους από τον σπλήνα και το συκώτι. Σε περίπτωση που προορίζονται να φτάσουν σε άλλα μέρη του σώματος, όπως για παράδειγμα στον εγκέφαλο, ίσως να χρειάζονται μεγαλύτερες απαιτήσεις [5]. Παρόλα αυτά είναι μέχρι στιγμής άγνωστο ποιο είναι το κατάλληλο μέγεθος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κυτταρική πρόσληψη, χωρίς να διαταραχθεί η δομή και η χημεία του κυτταροσκελετού των ανθρώπινων ιστών [6] και αυτό συμβαίνει διότι παίζουν ρόλο και άλλοι παράγοντες, οι οποίοι θα αναφερθούν στη συνέχεια.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο όρος “μέγεθος” αναφέρεται πολύ συχνά σε μεμονωμένα σωματίδια και όχι σε συσσωματώματα αυτών που είναι δυνατόν να δημιουργηθούν κατά τον χειρισμό, την αποθήκευση ή τη σύνθεσή τους [1].



*Εικόνα 22* Σκέδαση του φωτός νανοκρυστάλλων

[<http://chemgroups.northwestern.edu/mirkingroup/BioNanomaterials2003rev1.htm>]

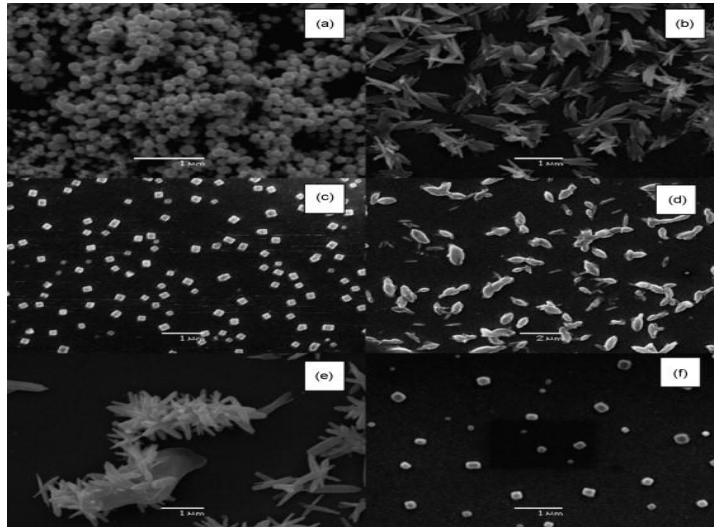
Τέλος, όπως παρατηρείται και στην εικόνα 25 οι φυσικοχημικές ιδιότητες του υλικού δεν είναι ανεξάρτητες, αλλά μπορεί να επηρεάζουν η μια την άλλη, όπως για παράδειγμα η σκέδαση του φωτός, δηλαδή σε ποια περιοχή της ορατής ακτινοβολίας εκπέμπουν τα νανοσωματίδια, δεν επηρεάζεται από το μέγεθος αλλά και το σχήμα τους.

### 2.2.2 Επίδραση του σχήματος

Τα νανοσωματίδια μπορούν να διακριθούν με βάση το σχήμα-μορφή τους, όπως διακρίνεται και στην εικόνα 23, κυρίως σε σφαιρικά, βελονοειδή, σωληνοειδή, ρομβοειδή και πεταλοειδή. Ο παράγοντας σχήμα, μπορεί να επηρεάσει, κυρίως:

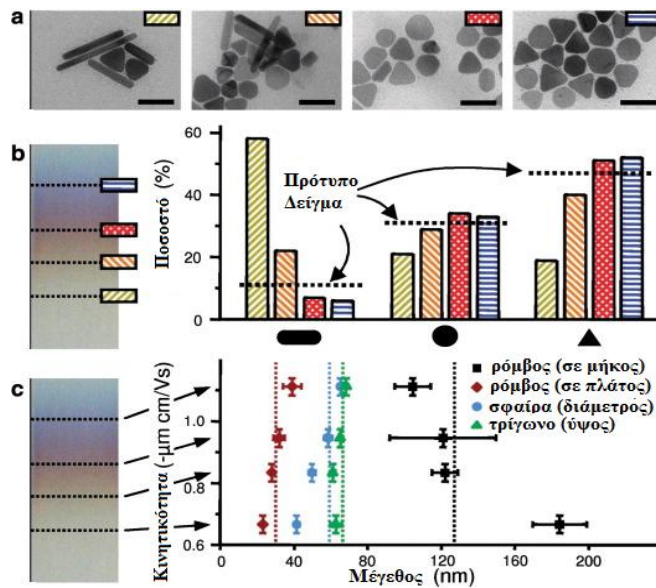
1. Σε διάλυμα και υπό μορφή αεροζόλ, την ποικιλία της υδροδυναμικής ακτίνας ανάμεσα σε σφαιρικά νανοσωματίδια και σε επιμηκυμένα (μεγαλύτερα από τα προηγούμενα) με την ίδια μάζα, που προκαλεί διαφοροποίηση στην κινητικότητά και στη διάχυσή τους στις δύο φάσεις (αέρια και υγρή).
2. Την εναπόθεση και την κινητική προσρόφηση σε βιολογικά μέσα, αφού οι μηχανισμοί παρεμπόδισης των ιοντικών διαύλων στα κυτταρικά τοιχώματα φαίνεται να είναι εξαρτώμενοι από το σχήμα των σωματιδίων [1].
3. Την κυκλοφορία στα αιμοφόρα αγγεία [40].

Έχει προταθεί ότι τα ανισότροπα σχήματα, για παράδειγμα τα κυλινδρικά, τα ραβδοειδή, τα ημισφαιρικά και τα νανοσωματίδια σε σχήμα δίσκου [9], [7], [19], μπορούν να αποφύγουν την βιο-διάσπαση ευκολότερα από τα συμμετρικά σφαιρικά νανοσωματίδια, παρουσιάζουν λιγότερη τοξικότητα και μειωμένη πρόσληψη, όμως είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε μακροπρόθεσμα αποτελέσματα όπως σε ίνωση ή σε καρκίνο των πνευμόνων, στην περίπτωση των νάνο-ινών [Peto et al., 1977]. Φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στο λόγο των διαστάσεων (μήκος-πλάτος) των νανοδομών και στον χρόνο κυκλοφορίας στο κυκλοφορικό σύστημα. Αύξηση του πρώτου φαίνεται να προκαλεί αύξηση του δεύτερου. Έτσι, υψηλής αναλογίας διαστάσεων νανοσωματίδια συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα σφαιρικά ομόλογα, παρουσιάζουν ενισχυμένους χρόνους κυκλοφορίας στο αίμα [7]. Αυτό συμβαίνει για το λόγο ότι απαιτείται επιπλέον χρόνος για την πρόσληψη των επιμηκυμένων σωματιδίων [21]. Επιπλέον, τα ανισότροπα σχήματα παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα να ρέουν μέσα από τα τριχοειδή αγγεία και να κολλάνε στα τοιχώματά τους [9]. Στην εικόνα 27 φαίνεται σε διάγραμμα η κινητικότητα, ανάλογα με το σχήμα και το μέγεθος, νανοσωματιδίων αργύρου.



**Εικόνα 23** Εικόνες SEM νανοσωματιδίων  $\text{TiO}_2$  διαφόρων σχημάτων που έχει συνδυαστεί με διάφορα υλικά: a.  $\text{Ti}(\text{OBu})_4$  με DBS b.  $\text{Ti}(\text{OBu})_4$  με HPMC c.  $\text{Ti}(\text{OBu})_4$  με SDS d.  $\text{TiCl}_4$  με DBS e.  $\text{TiCl}_4$  με HPMC f.  $\text{TiCl}_4$  με SDS. Η κλίμακα είναι  $1\ \mu\text{m}$ .

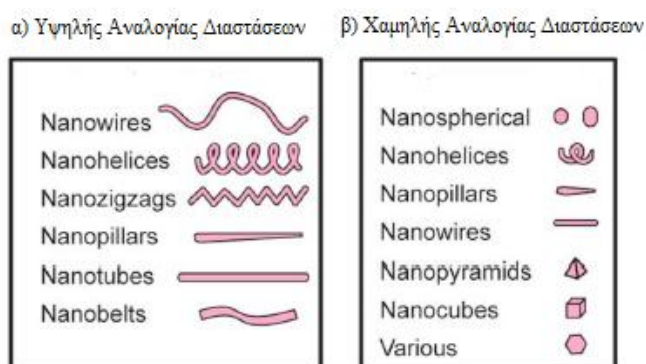
Το μέγεθος συμβάλλει σημαντικά και στην πρόσληψη των νανοσωματιδίων από τα κύτταρα, εκτός από τον χρόνο κυκλοφορίας τους στα αιμοφόρα αγγεία. Συγκεκριμένα, Ο Yang Qiu και οι συνεργάτες του [24], σε πείραμα που διεξήχθη με σκοπό τη μελέτη της κυτταρικής πρόσληψης νανοράβδων χρυσού (Au nanorods), παρατήρησαν ότι όσο μεγαλύτερο ήταν το μήκος των νανοράβδων, τόσο μικρότερη ήταν η εσωτερίκευσή τους από τα κύτταρα. Παρόλα αυτά, η εταιρία NanopartzTM, η οποία κατασκευάζει νανοράβδους για χρήση τους ως “οχήματα” φαρμάκων, έχει αποδείξει ότι οι νανοράβδοι χρυσού, συγκεκριμένα, απορροφούν καλύτερα την υπέρυθη ακτινοβολία σε σύγκριση με σφαιρικά νανοσωματίδια χρυσού και έτσι η θέρμανση των καρκινικών όγκων μέσω της ακτινοβολίας να γίνεται αποτελεσματικότερη [71].



**Εικόνα 24** (a) Εικόνες TEM διαφορετικών σχημάτων νανοσωματιδίων αργύρου. Η κλίμακα αντιστοιχεί σε  $100\ \text{nm}$ .

Επιπλέον, φαίνεται ότι το σχήμα των νανοσωματιδίων δεν επηρεάζει μόνο τους παράγοντες που προαναφέρθηκαν αλλά επηρεάζει και την ικανότητα πρόσδεσης σε αυτά υποκαταστατών για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων, όπως υποδεικνύεται από τον S. C. Glotzer [53]. Συγκεκριμένα, υπάρχουν ενδείξεις ότι επίπεδα σωματίδια παρουσιάζουν αποτελεσματικότερη πρόσδεση σε σύγκριση με τα κυρτά.

Παρ' όλες τις ενδείξεις, όμως, σχετικά με το ποιο σχήμα συμβάλλει καλύτερα στην ενδοκύτωση ή αν όντως ο παράγοντας αυτός επηρεάζει την διαδικασία αυτή, και επομένως την πρόσληψή τους από τα κύτταρα και την απομάκρυνση τους από τον οργανισμό, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για την διεξαγωγή τελικών συμπερασμάτων.

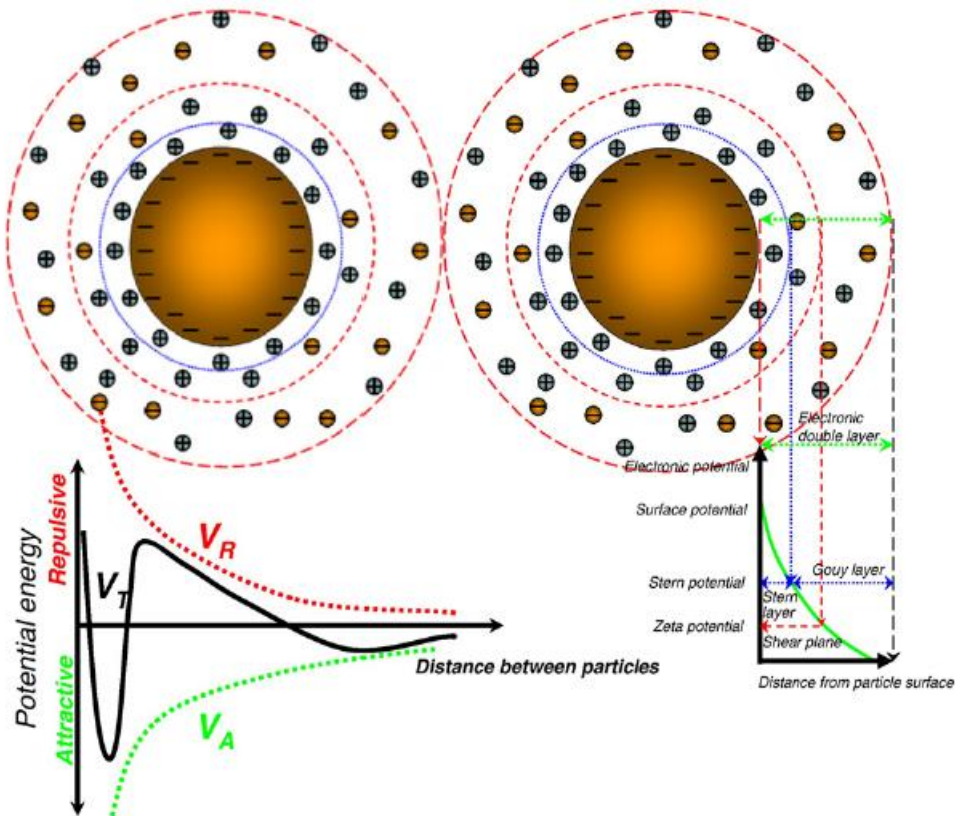


Εικόνα 25 Συγκεντρωτική παρουσίαση των πιθανών σχημάτων/μορφολογιών νανοϋλικών [13].

### 2.2.3 Επίδραση της επιφάνειας

Ακόμα ένας παράγοντας που παίζει σημαντικό ρόλο, στο αν τελικά τα νανοσωματίδια θα παρουσιάσουν τοξικές συνέπειες στον οργανισμό, αποτελεί η επιφάνειά τους. Γενικά, τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας, όπως η χημεία, το φορτίο, η μορφολογία, η τραχύτητα ή τυχόν μόλυνση [68], επηρεάζουν την σταθερότητα των νανοσωματιδίων, τον χρόνο κυκλοφορίας τους στο αίμα καθώς και την οψωμοποίηση τους ή την δέσμευσή τους από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [5] όπως επίσης και την βιολογική επίδραση που έχουν [68]. Για παράδειγμα, όσο πιο ουδέτερη και υδρόφιλη είναι η επιφάνεια των νανοσωματιδίων, τόσο αυξάνεται ο χρόνος κυκλοφορίας τους χωρίς να παρεμποδίζονται από το πλάσμα [14]. Επίσης, επηρεάζονται σημαντικά και ιδιότητες όπως είναι η διασπορά, οι οπτικές ιδιότητες, η αγωγιμότητα και η καταλυτική συμπεριφορά των υλικών [20].

Λόγω της αυξημένης ειδικής επιφάνειας ανά μονάδα όγκου, ενισχύονται οι ενδοσωματιδιακές έλξεις (ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, δυνάμεις London και Wan der Waals) με αποτέλεσμα τα νανοσωματίδια να έχουν την τάση να δημιουργούν συσσωματώματα [1], κάτι που είναι ανεπιθύμητο καθώς γίνονται δυσκίνητα και χάνουν τα πλεονεκτήματα της νανοκλίμακας. Για την αποφυγή των φαινομένων συσσωμάτωσης, τα νανοσωματίδια σταθεροποιούνται με τη χρήση ειδικών επικαλύψεων.



Εικόνα 26 Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων (ελκτικών ή απωθητικών) μεταξύ των νανοσωματιδίων [23].

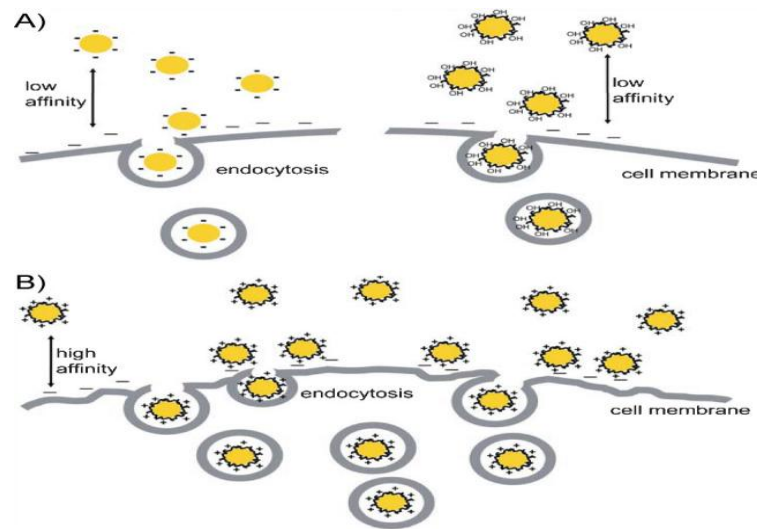
Έτσι, οι παράγοντες όπως είναι το φορτίο, η χημεία της επιφάνειας όπως και η οποιαδήποτε τυχόν επικάλυψη ή αντισώματα που προστίθενται στην βιολογική διεπιφάνεια των νανοσωματιδίων, όπως γίνεται στην στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων, είναι σημαντικό να μελετώνται πριν την οποιαδήποτε χρήση τους.

### 2.2.3.1 Φορτίο της επιφάνειας (Surface Charge)

Όταν τα νανοσωματίδια διασπείρονται σε κάποιο υδατικό μέσο, είναι δυνατό να φέρουν κάποιο ηλεκτρικό φορτίο στην επιφάνειά τους. Το φορτίο αυτό (θετικό ή αρνητικό) εξαρτάται από τη φύση των σωματιδίων και του περιβάλλοντος μέσου. Μαζί με το μέγεθος, αποτελούν τους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά διασποράς τους, την απορρόφηση των ιόντων και γενικά τον τρόπο με τον οποίο θα αλληλεπιδράσουν με τα κύτταρα του οργανισμού. Επίσης, επηρεάζουν την βιολογική απόκριση (φαγοκύτωση, γονοτοξικότητα και φλεγμονή) [1], [17], την σύνδεση με τις πρωτεΐνες του ορού όπως επίσης και τη μη συγκεκριμένη κυτταρική προσκόλληση [40].

Το επιφανειακό φορτίο μπορεί επίσης να επηρεάσει την τοξικότητα των νανοσωματιδίων αφού επηρεάζει άμεσα τις αλληλεπιδράσεις τους με τα κύτταρα [19]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση των νανοσωματιδίων χρυσού (Au NPs). Αρνητικά φορτισμένα νανοσωματίδια Au παρουσιάζουν πολύ λιγότερη τοξικότητα σε σύγκριση με θετικά φορτισμένα νανοσωματίδια Au [10]. Όπως παρατηρείται και στην εικόνα 27, τα θετικά φορτισμένα σωματίδια έλκονται ισχυρά από το αρνητικό φορτίο της

εξωκυτταρικής μεμβράνης σε αντίθεση με τα αρνητικά ή ουδέτερα φορτισμένα σωματίδια τα οποία δεν αλληλεπιδρούν τόσο ισχυρά με την κυτταρική μεμβράνη αλλά παρόλα αυτά γίνεται πρόσληψή τους στο εσωτερικό του κυττάρου [21], [66].

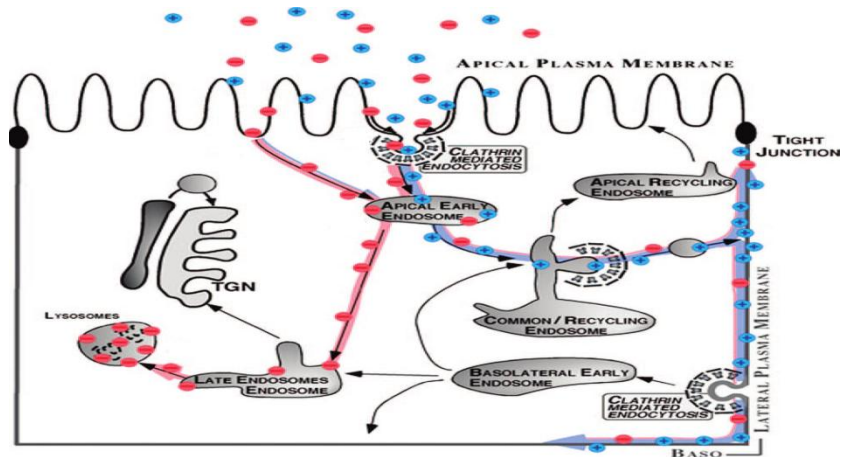


Εικόνα 27 A) Αρνητικά φορτισμένα και ουδέτερα νανοσωματίδια χρυσού B) θετικά φορτισμένα νανοσωματίδια χρυσού [21].

Γενικά, τα θετικά φορτισμένα νανοσωματίδια παρουσιάζουν μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα, ακόμα και σε μικρότερες συγκεντρώσεις από ανιοντικά ή ουδέτερα νανοσωματίδια [27], καθώς έχουν μεγαλύτερη τάση να αλληλεπιδρούν με βιολογικά συστατικά και είναι περισσότερο ασταθής. Βέβαια όσον αφορά την μεμβράνη του πλάσματος, τα αρνητικά νανοσωματίδια αλληλεπιδρούν ισχυρά και όχι συγκεκριμένα με αυτή σε αντίθεση με τα θετικά φορτισμένα σωματίδια τα οποία προσδένονται σε αρνητικά φορτισμένες ομάδες στην κυτταρική επιφάνεια [27], [21] και μπορούν να διέρχονται δια μέσου αυτής [21]. Μειώνοντας τον αριθμό των θετικών φορτίων επιτυγχάνεται αποτελεσματικότερη κυτταρική πρόσληψη ενώ ταυτόχρονα ελαττώνεται και η τοξικότητα [19], [21].

Επιπλέον, όπως παρατηρείται και στην εικόνα 28, τα κατιοντικά νανοσωματίδια ακολουθούν διαφορετικά ενδοκυτταρικά “μονοπάτια” [27], κάτι που ίσως επηρεάζει επιπρόσθετα την διαφορετική συμπεριφορά τοξικότητάς τους.

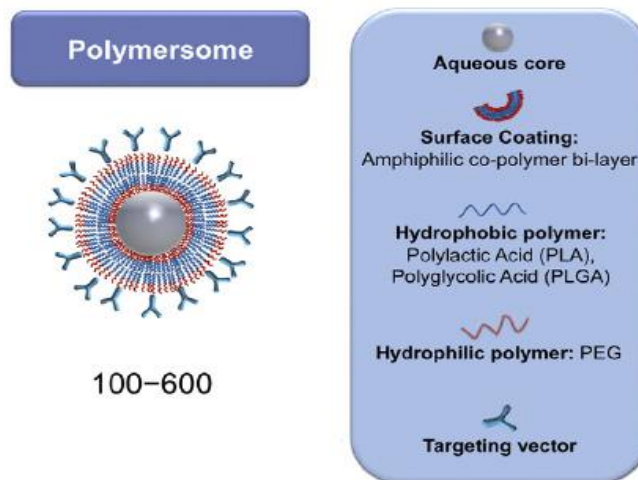
Παρόλα αυτά, είναι σημαντικό να βρεθεί η κατάλληλη ισορροπία διότι με την ελάττωση του φορτίου δεν ελαττώνεται μόνο η τοξικότητα αλλά και το ποσοστό πρόσληψής τους αφού επηρεάζεται η ενδοκύτωση [66], κάτι που είναι ανεπιθύμητο, ειδικά σε ιατρικές εφαρμογές [19]. Επιπλέον, το φορτίο από μόνο του έχει μεγάλη σημασία στον καθορισμό της σταθερότητας των κolloειδών των νανοσωματιδίων και στην αποφυγή της συσσωμάτωσης [19].



Εικόνα 28 Τα κατιοντικά και τα ανιονικά νανοσωματίδια ακολουθούν διαφορετικά ενδοκυτταρικά μονοπάτια σε πολωμένα κύτταρα Madin-Darby canine kidney (MDCK) [17].

### 2.2.3.2 Τροποποιήσεις της επιφάνειας (Surface Modifications)

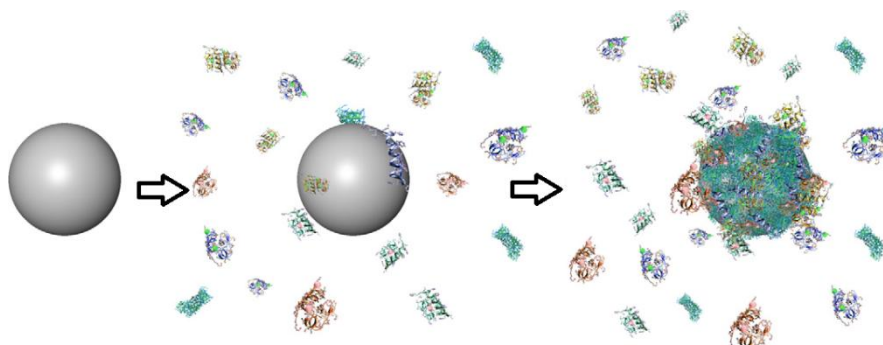
Υπάρχουν δύο ειδών τροποποιήσεις επιφάνειας οι οποίες μπορούν να πραγματοποιηθούν σε νανοσωματίδια, η επικάλυψη των νανοσωματιδίων και η προσθήκη μικρών μορίων, όπως είναι τα αντισώματα, διάφορα μικρά οργανικά μόρια ή και μόρια που λειτουργούν σαν μόρια στόχευσης. Οι στόχοι, σε κάθε περίπτωση, είναι διαφορετικοί αλλά και τα δύο αυτά είδη έχουν σκοπό να βελτιώσουν τις ιδιότητες των νανοσωματιδίων μετά την εισαγωγή τους σε έναν έμβιο οργανισμό (πρόσληψη, χρόνο κυκλοφορίας, κατεύθυνση, τοξική επίδραση και άφιξη σε συγκεκριμένα κύτταρα/στόχους).



Εικόνα 29 Σχηματική απεικόνιση νανοσωματιδίων με πολυμερική βάση [40].

### 2.2.3.2.a. Επικάλυψη των νανοσωματιδίων (nanoparticles coating)

Γενικά, η χημεία της επιφάνειας του υλικού είναι ζωτικής σημασίας για την επιρροή της αλληλεπίδρασης των νανοσωματιδίων με τα βιομόρια [25], [26]. Ιδιαίτερα ενεργές ομάδες στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων επηρεάζουν σημαντικά την αλληλεπίδρασή τους με τα βιολογικά συστήματα [58]. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, όσο μειώνεται ο μέγεθος των σωματιδίων, τόσο αυξάνεται η (χημική) δραστηριότητάς τους. Επομένως, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στο εξωτερικό υλικό (surface material) που καλύπτει την επιφάνεια των νανοσωματιδίων, και άρα στις κατάλληλες επιφανειακές ιδιότητες του εν λόγω υλικού, παρά στο υλικό του πυρήνα (core material), αφού αυτό τελικά θα καθορίσει την αλληλεπίδραση των σωματιδίων με το βιολογικό σύστημα. Κάτι που επίσης πρέπει να διασαφηνιστεί, είναι το γεγονός ότι από την στιγμή της εισαγωγής των νανοσωματιδίων (χωρίς επικάλυψη) σε βιολογικό ή περιβαλλοντικό περιεχόμενο είναι πρακτικά αδύνατο να παραμείνουν “γυμνά”. Από την επαφή τους με ένα οποιοδήποτε ετερογενές σύστημα, μικρότερες δομές όπως μόρια, άτομα ή και μακρομόρια προσκολλούνται στην επιφάνεια των σωματιδίων με ισχυρούς ή ασθενείς δεσμούς (Εικόνα 30). Ιδιαίτερα σε ένα βιολογικό περιβάλλον όπου οι δομές αυτές είναι βιομόρια, το επιφανειακό στρώμα που τείνει να δημιουργηθεί στην εξωτερική επιφάνεια των “γυμνών” νανοσωματιδίων ονομάζεται corona και είναι αυτό τελικά που θα καθορίσει τις ιδιότητες του συμπλέγματος νανοσωματιδίων- corona [50]. Έχει παρατηρηθεί ότι η επικάλυψη των νανοσωματιδίων, ιδιαίτερα με υδρόφιλα πολυμερή όπως είναι το PEG και τα παράγωγά του βοηθάει στην αποφυγή της απορρόφησης πρωτεϊνών στην επιφάνειά τους όπως αυτή περιγράφηκε πρωτύτερα με αποτέλεσμα την καθυστέρηση του ανοσοποιητικού “καθαρισμού” [66]. Έτσι, είναι σημαντική η κατανόηση, όχι μόνο των νανοσωματιδίων αλλά και του περιβάλλοντος μέσα στο οποίο βρίσκονται για μια ολοκληρωμένη μελέτη η οποία αφορά την τοξικότητα τους.

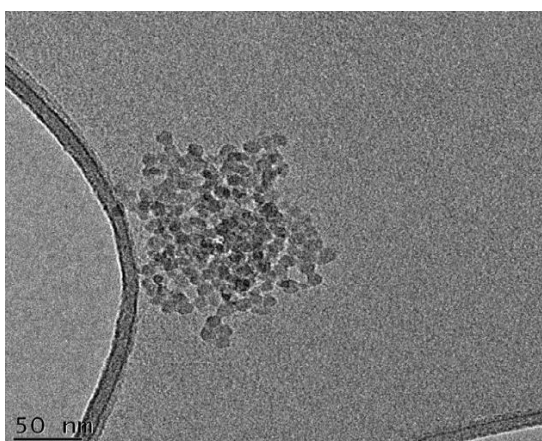


**Εικόνα 30** Σχηματική αναπαράσταση του σταδιακού σχηματισμού επιφανειακού στρώματος στην εξωτερική επιφάνεια ενός “γυμνού” νανοσωματιδίου [50].

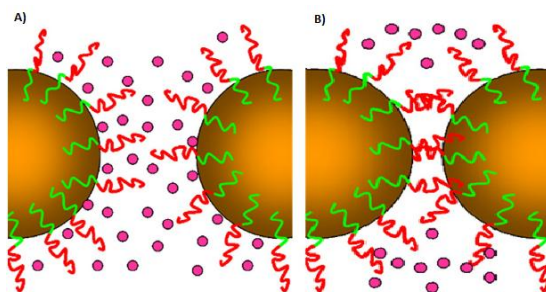
Όσον αφορά συστήματα που προορίζονται για ιατρικές θεραπείες, υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερις πιθανοί στόχοι που έχει μια επικάλυψη. Ο πρώτος είναι να αυξήσει τη διάρκεια ζωής του συζεύγματος και να αποτρέψει ή τουλάχιστον να καθυστερήσει την απομάκρυνση του συστήματος (νανοσωματίδια-επικάλυψη) από το δίκτυο-ενδοθλιακού



συστήματος (RES). Ένας ακόμα στόχος είναι η κατάλληλη σύνδεση του επιθυμητού “στόχου” με τα θεραπευτικά μόρια. Ένας τρίτος στόχος είναι η σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων προς αποφυγήν τυχόν δημιουργίας συσσωματωμάτων (Εικόνα 31), καθώς με τη δημιουργία τέτοιων σχηματισμών δεν χάνεται μόνο η λειτουργικότητα των σωματιδίων αλλά επιπλέον μπορούν εύκολα να απομακρυνθούν από τα μακροφάγα πριν προλάβουν να φτάσουν τον στόχο τους [26], [29].



**Εικόνα 31** Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (TEM) συσσωματωμένων νανοσωματιδίων. Κλίμακα 50nm [28].



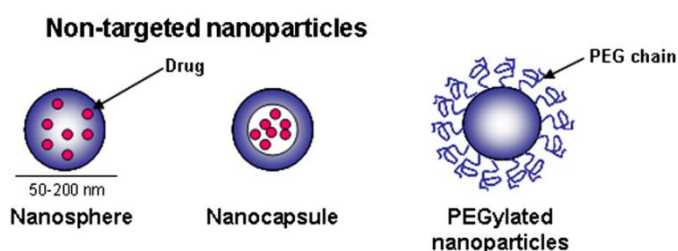
**Εικόνα 32** A) Νανοσωματίδια τα οποία παρουσιάζουν σταθερότητα, B) Δημιουργία συσσωματώματος [23].

Τέλος, επειδή η αρχική επιφάνεια (πριν την επικάλυψη) των νανοσωματιδίων σε ορισμένες περιπτώσεις είναι κυτταροτοξική λόγω κάποιων υποκαταστατών που υπάρχουν στο άνω όριο της, όπως για παράδειγμα σε ορισμένα νανοσωματίδια χρυσού (νανοράβδους, nanorods), μπορεί να κριθεί απαραίτητο να γίνει τροποποίηση της επιφάνειας με κάποια επικάλυψη [26].

Ιδιαίτερα ελκυστικές ιδιότητες παρουσιάζουν διάφορα πολυμερή, λόγω της καλής βιοσυμβατότητας και βιοσταθερότητας που έχει παρατηρηθεί ότι προσδίδουν στα νανοσωματίδια. Ειδικά στην περίπτωση του εγκλεισμού φαρμάκου, αυτό μπορεί να γίνει με δύο τρόπους: Πρώτον, με φυσικό εγκλωβισμό, όπως γίνεται κατά τη χρήση του πολυλακτικού οξέος (PLA) [32], και δεύτερον με ομοιοπολικό δεσμό στο πολυμερικό πλέγμα [33]. Γενικά, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την επικάλυψη νανοσωματιδίων, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε μεθόδους που βασίζονται σε

ομοιοπολικούς και σε μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να παρέχουν ενδιαφέρουσες συνδεσμολογίες νανοσωματιδίων με βιομόρια αλλά, όπως είναι γνωστό, οι ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις είναι κατά πολύ ισχυρότερες. Βέβαια, η ισχυρή σταθερότητα των ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως είναι η μη αποτελεσματική απελευθέρωση των ωφέλιμων φορτίων φαρμάκου στον επιθυμητό στόχο [26] ή/και η μερική απώλεια της δραστηριότητας του φαρμάκου [32].

Αν και υπάρχουν εκατοντάδες φυσικά ή τεχνητά πολυμερή, ένα μικρό σύνολο μόνο έχει χρησιμοποιηθεί σαν φορέας φαρμάκων [16]. Τα κυριότερα, που έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μελέτες ως επικάλυψη και τα οποία θα αναλυθούν στη συνέχεια, είναι η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) και ορισμένα συμπολυμερή της, το πολυλακτικό οξύ (PLA) και το πολυλακτικό-συ-γλυκολικό οξύ poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA).



Εικόνα 33 Σχηματική απεικόνιση μη στοχευμένων νανοσωματιδίων [35].

### ✓ Πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG)

Ο αμφίφιλος χαρακτήρας της πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG), διασφαλίζει ότι τα επικαλυμμένα, με αυτή, σωματίδια έχουν υψηλό βαθμό βιοσυμβατότητας και συγγένειας με τις κυτταρικές μεμβράνες. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι τα επικαλυμμένα με PEG νανοσωματίδια χρυσού εμφανίζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στην κυτταρική πρόσληψη συγκρινόμενα με τα μη τροποποιημένα [26]. Επιπλέον, η επικάλυψη με PEG, ή και με άλλα πολυμερή, αποτρέπει την συσσωμάτωση σε περιβάλλον με υψηλή ιοντική δύναμη και την οξείδωση [26], [30], ενώ προωθεί την μεγαλύτερη κυκλοφορία τους στον οργανισμό *in vivo* [26], αφού μειώνει τις μη ειδικές αλληλεπιδράσεις (non-specific interactions) τους με πρωτεΐνες του πλάσματος [30]. Έχει βρεθεί ότι οι επικαλυμμένες, με PEG, επιφάνειες είναι μη ανοσογόνες (nonimmunogenic), μη αντιγονικές (nonantigenic) και πρωτεϊνικά ανθεκτικές (protein resistant) [29], [30]. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι το PEG δεν είναι βιοδιασπώμενο, αλλά παρόλα αυτά απεκκρίνεται από το ανθρώπινο σώμα, σχηματίζοντας μη τοξικούς μεταβολίτες, μέσω των νεφρών ή του συκωτιού [38].

Εκτός από τις βασικές λειτουργίες που επιτελεί το PEG, σαν όλες τις επικαλύψεις, που προαναφέρθηκαν, είναι απαραίτητο να διαθέτει ενεργά λειτουργικές ομάδες ικανές να συνδέονται με τους κατάλληλους targeting agents [29]. Μπορεί να συνδυαστεί και με άλλα (υδρόφοβα συνήθως) πολυμερή δημιουργώντας σύμπλοκα, όπως π.χ. με το PLA, με διάφορα αντιγόνα, με φολικό οξύ και με αρκετά αντικαρκινικά φάρμακα όπως είναι το paclitaxel και το doxorubicin. Ειδικά στην περίπτωση συνδυασμού του με υδρόφοβα

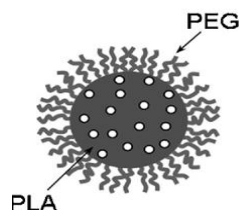
πολυμερή, η μορφολογία, το σχήμα και άλλες από τις τελικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων που προκύπτουν, κυριαρχούνται από το ποσοστό του υδρόφοβου πολυμερούς στο υδρόφιλο PEG [40].

Ένα βασικό μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι τα καρβοξύλια ή οι αμίνες PEG που είναι διαθέσιμα είναι αρκετά ακριβά, ενώ λόγω των μεγάλων μοριακών βαρών που έχουν και της αστάθειας που παρουσιάζουν είναι πιθανό να ανασταλεί η μονοστρωματική αυτοοργάνωση του στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Πολλές φορές παρουσιάζουν ακαταλληλότητα για χρήση σε νανοδιατάξεις ή νανοσυστήματα λόγω του μεγάλου μοριακού τους βάρους [29].

#### ✓ Πολυλακτικό οξύ (PLA)- Πολυλακτικό-συ-γλυκολικό οξύ (PLGA)

Η χρήση προσχηματισμένων πολυεστέρων, όπως είναι το πολυλακτικό οξύ ή το πολυλακτικό-συ-γλυκολικό οξύ, γίνεται συνήθως προς αποφυγή αντίδρασης του φαρμάκου με το μονομερές κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού (περίπτωση ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων) και των μειονεκτημάτων που διέπουν τον συγκεκριμένο τρόπο φόρτωσης φαρμάκου. Οι πολυεστέρες έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι βιοσυμβατοί, βιοδιασπάσιμοι αφού η υδρόλυσή τους οδηγεί σε μεταβολίσιμα, μη τοξικά μονομερή, με ξεχωριστές ικανότητες ελεγχόμενης απελευθέρωσης του εγκλεισμένου φαρμάκου [34], ενώ τα σωματίδια που έχουν σα βάση του αναφερθέντες πολυεστέρες, χρησιμοποιούνται ήδη στο εμπόριο αφού έχει εγκριθεί η χρήση τους από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration, FDA) και τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicine Agency, EMA), κάτι που υποδεικνύει υψηλό βαθμό γνώσης για τη συγκεκριμένη οικογένεια πολυμερών [32]. Επίσης, έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία εκτενώς και η καταλληλότητα των συγκεκριμένων πολυεστέρων για εγκλεισμό μακρομορίων όπως νουκλεϊκού οξέων, πρωτεϊνών και πυρηνικού ριβονουκλεϊκού οξέος (siRNA) εκτός από φαρμάκων [32], [34].

Δύο σημαντικά μειονεκτήματα είναι η χρήση οργανικών διαλυτών κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού των παραπάνω εστέρων και η όξυνση που επέρχεται με την διάσπαση των εστέρων [32], η οποία μπορεί να επηρεάσει το pH των κυττάρων και άρα τις διάφορες λειτουργίες τους. Ένα ακόμα σημαντικό μειονέκτημα, που περιορίζει τη χρήση του PLA είναι ο πολύ αργός ρυθμός διάσπασής του. Έχει αναφερθεί ότι η διάσπαση του *in vivo* μπορεί να διαρκέσει μέχρι και χρόνια (Bergsma JE et al.). Τέλος, η υδροφοβικότητα του και η έλλειψη δραστικών πλευρικών ομάδων περιορίζουν τη χρήση του ως έχει [37] ενώ ταυτόχρονα εξηγούν το γεγονός ότι συνήθως συνδυάζεται με το προαναφερθέν PEG, το οποίο δεν απαιτεί την ύπαρξη δραστικών ομάδων, σχηματίζοντας σύμπλοκα (εικόνα 34).



Εικόνα 34 Σχηματική απεικόνιση συμπλόκου PEG-PLA [39].

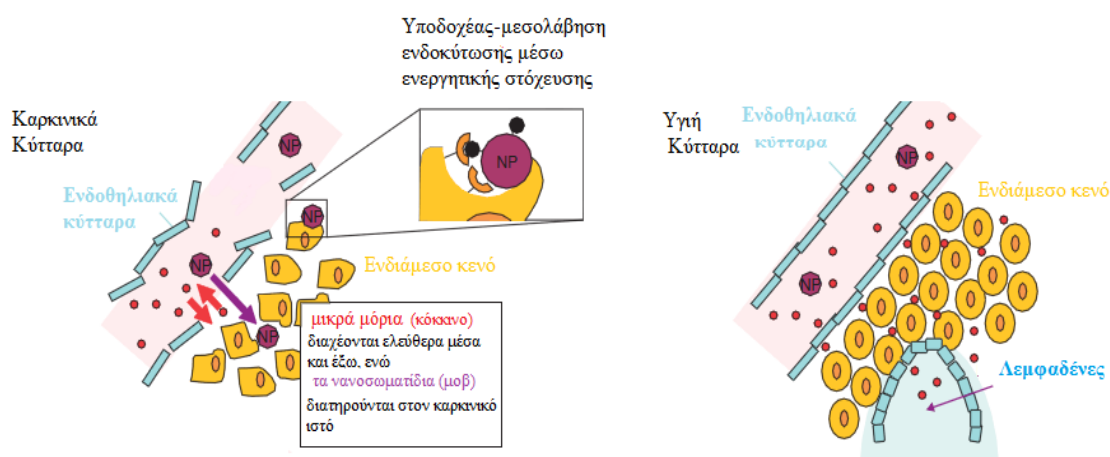
### 2.2.3.2.b. Προσθήκη μικρών μορίων στόχευσης (Ligands-Stimuli)

Η ιδέα της στοχευμένης χορήγησης φαρμάκων προτάθηκε για πρώτη φορά τον εικοστό αιώνα από τον Paul Ehrlich, ο οποίος επινόησε τον όρο “μαγική σφαίρα”, αναφερόμενος σε μια θεωρητική ουσία η οποία αποτελείται από ένα θεραπευτικό μέρος συνδεδεμένο σε συστατικό ικανό να αναγνωρίζει τα ασθενή κύτταρα-στόχους, παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο ακρίβεια στη μεταφορά του φαρμάκου [67]. Ειδικά στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων, είναι απαραίτητη η στοχευμένη θεραπεία για δύο κυρίως λόγους:

1ο. Με την στοχευμένη χορήγηση καρκινικών φαρμάκων περιορίζονται οι παρενέργειες και η καταστροφή των γειτονικών υγιή κυττάρων ενώ

2ο. επιτυγχάνεται αποτελεσματικότερη θεραπεία καθώς όλη η ποσότητα του φαρμάκου συγκεντρώνεται στα κύτταρα-στόχους και όχι μέρος της.

Γενικά, η στρατηγική της στόχευσης μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε τέσσερις κατηγορίες, τη παθητική (passive targeting), την ενεργητική (active targeting), την αντίστροφη (inverse targeting) και την συνδυαζόμενη (combined targeting) [67]. Κυρίως οι δυο πρώτες κατηγορίες χρησιμοποιούνται κατά κόρον στην προσπάθεια στοχευμένης θεραπείας για την περίπτωση του καρκίνου.

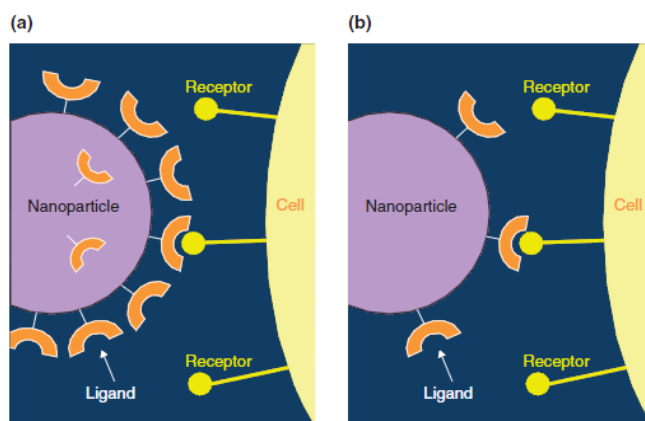


Εικόνα 35 Σχηματική απεικόνιση ενεργητικής και παθητικής στόχευσης και ταυτόχρονη σύγκριση με υγιή κύτταρα [5].

Αρχικά, υπήρχε η πεποίθηση ότι για να στοχευθούν τα καρκινικά κύτταρα, έπρεπε τα νανοσωματίδια-φορείς των αντικαρκινικών φαρμάκων να φέρουν στην επιφάνειά τους, συγκρατούμενα με χημικό δεσμό, αντισώματα, πεπτίδια ή άλλα μικρά μόρια, τα οποία εφάρμοζαν στους μοναδικούς υποδοχείς των καρκινικών κυττάρων με μια σχέση κλειδιού-κλειδαριάς (active targeting). Σύγχρονες μελέτες, όμως, έχουν δείξει ότι τα νανοσωματίδια ή τα συζευγμένα, με φάρμακα, πολυμερή παρουσιάζουν παρατεταμένη κυκλοφορία στο αίμα και σχηματίζουν συσσωματώματα στους καρκινικούς ιστούς, ακόμα και με την απουσία υποκαταστατών στην επιφάνειά τους (passive targeting). Το φαινόμενο της παθητικής στόχευσης ονομάζεται και φαινόμενο αυξημένης διαπερατότητας και διατήρησης (EPR effect), παρατηρείται σε στερεούς καρκινικούς ιστούς (αρχικοί όγκοι και όχι καρκινικά κύτταρα που έχουν μεταναστέψει σε άλλα σημεία του οργανισμού), ενώ δεν έχει διευκρινισθεί ακόμα το κατάλληλο μέγεθος σωματιδίων το οποίο μπορεί να

συσσωρευτεί σε έναν όγκο μέσω του φαινομένου EPR. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι το φαινόμενο EPR εξαρτάται από διάφορους παράγοντες και δεν είναι πάντα εύκολο να συμβεί. Ο ακρογωνιαίος λίθος για να λάβει χώρα είναι η διαπερατότητα των αγγείων η οποία συνήθως μεταβάλλεται κατά την εξέλιξη των όγκων [41]. Γενικά, στους όγκους κυριαρχεί ετερογένεια ως προς την ροή του αίματος, το ποσοστό της λεμφικής παροχέτευσης όπως και η ανατομία γενικά του όγκου, τα οποία δυσκολεύουν την μεταφορά των φαρμάκων σε ολόκληρο τον όγκο [42]. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο έχουν και οι φυσικοχημικές ιδιότητες του πολυμερούς που χρησιμοποιείται [41]. Τέλος, σε ορισμένους τύπους στερεών όγκων, συμπεριλαμβανομένου αυτού στον εγκέφαλο, προστατεύονται από πιο περιοριστικά αγγεία τα οποία δεν επιτρέπουν στα παθητικά στοχευμένα νανοσωματίδια να φτάσουν τον στόχο τους, ενώ δεν μπορούν να αλληλεπιδράσουν με μεταστατικούς όγκους, τα κύτταρα δηλαδή που έχουν μεταναστεύσει από τον αρχικό όγκο [42].

Αντίθετα, η ενεργητική στόχευση, η οποία είναι αρκετά πιο διαδεδομένη [67], βασίζεται είτε στην αυξημένη επιφανειακή συγκέντρωση ορισμένων πρωτεϊνών που υπάρχουν και στα υγιή κύτταρα (tumor-associated antigens) είτε στην έκφραση άλλων πρωτεϊνών που υπάρχουν αποκλειστικά στα καρκινικά κύτταρα (tumor-specific antigens). Η προσθήκη ομάδων-στόχων δεν περιορίζει μόνο τις παράπλευρες απώλειες υγιή κυττάρων αλλά διευκολύνει και την κυτταρική πρόσληψη μέσω της σύνδεσής τους με τους κατάλληλους υποδοχείς, απαιτώντας μικρότερη βαθμίδα συγκέντρωσης στην μεμβράνη του πλάσματος σε σύγκριση με την απλή ενδοκύτωση [41]. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για μεταστατικούς όγκους, καθώς οι περιορισμοί της παθητικής στόχευσης δεν ισχύουν εδώ, αφού ο στόχος τώρα είναι άμεσα υπαρκτός, σε αντίθεση με πριν. Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι για τη σύνδεση με τους υποδοχείς των κυττάρων-στόχων δεν παίζει ρόλο η ποσότητα των αντισωμάτων αλλά μάλλον η απόσταση των υποδοχέων, όπως γίνεται εμφανές στην εικόνα 36.



**Εικόνα 36** Σχηματική απεικόνιση της σύνδεσης αντισωμάτων με τους διάφορους υποδοχείς των καρκινικών κυττάρων [5]

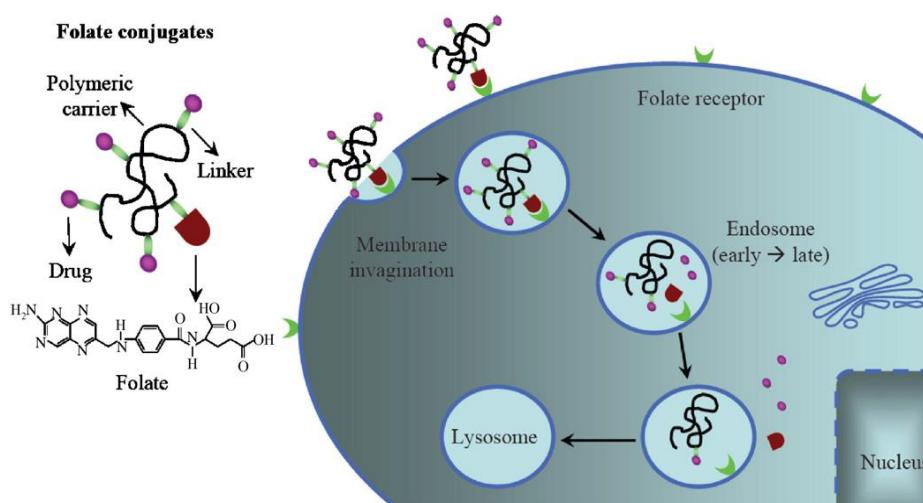
Αύξηση των αντισωμάτων δεν συνεπάγεται απαραίτητα την πλεονεξία σύνδεσης με τους υποδοχείς, καθώς η στερεοταξία των υποδοχέων μπορεί να εμποδίζει τη σύνδεση με περισσότερους του ενός υποδοχείς. Έτσι, παρόλο που στην περίπτωση (a) υπάρχουν περισσότερα αντισώματα από ότι στην περίπτωση (b), μόνο ένας υποδοχέας μπορεί τελικά να συνδεθεί αποτελεσματικά.

Ακολουθεί η ανάλυση ορισμένων ομάδων που λειτουργούν ως ομάδες-στόχους (targeting groups) ώστε να γίνει περισσότερο κατανοητός ο μηχανισμός της ενεργητικής στόχευσης. Στον πίνακα 3 του παραρτήματος συνοψίζονται και άλλα μόρια που χρησιμοποιούνται σαν στόχοι.

✓ **Φολικό Οξύ (Folate ligands)**

Γενικά, το φολικό οξύ ή βιταμίνη B<sub>9</sub> είναι απαραίτητο για την αναπαραγωγή των κυττάρων (υγιή και μη). Αυτό που έχει ενδιαφέρον και είναι ο λόγος ότι έχουν γίνει αρκετές μελέτες πάνω σε αυτό, είναι το γεγονός ότι στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων υπάρχει υπερέκφραση αυτού. Το φολικό οξύ και ο κύκλος του είναι ζωτικής σημασίας για την γρήγορη αναπαραγωγή κυττάρων και ιστών και υποδηλώνει προχωρημένο στάδιο καρκίνου. Η ενδοκυτταρική απόκτηση του φολικού οξέος γίνεται μέσω διαφόρων υποδοχέων οι οποίοι βρίσκονται στην εξωκυτταρική μεμβράνη των κυττάρων, όπως φαίνεται και στην εικόνα 41. Οι υποδοχείς αυτοί, αναφέρονται στην βιβλιογραφία ως υποδοχείς φολικού οξέος άλφα, βήτα και γάμμα (folate receptors alpha, beta, gamma) ή FOLR-1, FOLR-2 και FOLR-3 αντίστοιχα. Συνήθως όταν κάποιος ή κάποιοι από αυτούς τους υποδοχείς είναι σημαντικά υπερεκφραζόμενοι υποδηλώνεται καρκίνος στον συγκεκριμένο ιστό [43], [45]. Για παράδειγμα, στην περίπτωση καρκίνου του μαστού ή των ωοθηκών, υπερεκφράζονται οι υποδοχείς FOLR-1 και FOLR-3, ενώ στην περίπτωση λευχαιμίας του μυελού των οστών υπερεκφράζεται ο FOLR-2. Η έκφραση των FOLRs συχνά συνδέεται τη μη ελπιδοφόρα έκβαση του ασθενή, ενώ η ύπαρξή τους υποδηλώνει κακοήθεια του όγκου [43].

Εκτός από την διάγνωση κακοήθειας έχουν γίνει αρκετές μελέτες εκμετάλλευσης αυτών των υποδοχέων για στοχευμένη θεραπεία. Συζευγνύοντας στους φορείς των φαρμάκων (πολυμερή- νανοσωματίδια) φολικό οξύ, αυτό πάει και συνδέεται με τους υποδοχείς των καρκινικών κυττάρων, ακριβώς όπως φαίνεται στην εικόνα 37, ακολουθεί η ενδοκύτωση και η αποικοδόμηση με ταυτόχρονη απελευθέρωση του φαρμάκου στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων.

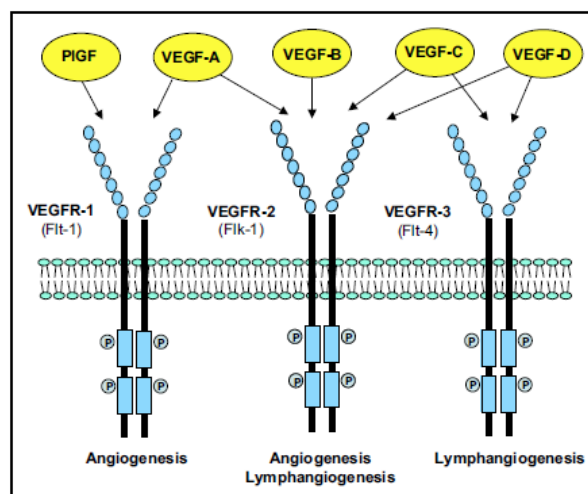


**Εικόνα 37** Υποδοχείς ενδοκυττάρωσης συζευγμένων φαρμάκων με φολικό οξύ. Οι υποδοχείς φολικού οξέος αναγνωρίζουν τα συζυγή, τα οποία εν συνεχεία υποβάλλονται σε ενδοκύτωση. Καθώς το ενδοσωματικό διαμέρισμα οξίνεται, απελευθερώνεται το φάρμακο στο κυτταρόπλασμα [41].

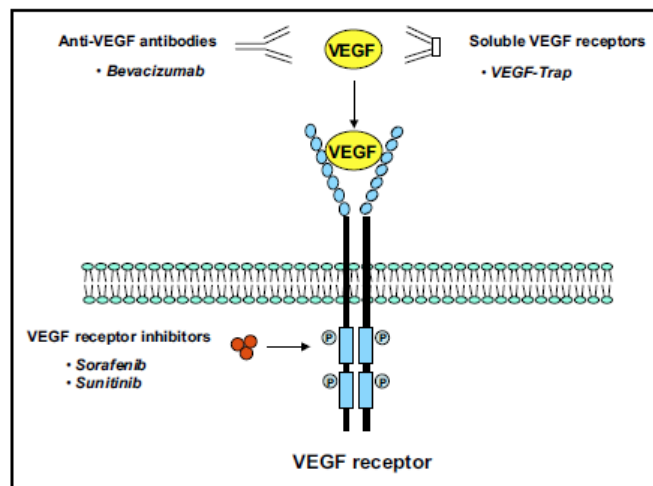
Τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων με φολικό οξύ παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα. Δεν ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα, έχουν μικρό μοριακό βάρος και είναι συμβατά με τους οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται κατά την διαδικασία προετοιμασίας τους [43]. Οι υποδοχείς δεσμεύουν το φολικό οξύ με ιδιαίτερα υψηλή συγγένεια, γεγονός που εγγυάται την επιλεκτικότητα της θεραπείας. Επιπλέον, τα σωματίδια-φέροντες του φολικού οξέος εσωτερικεύονται γρήγορα στα καρκινικά κύτταρα και έτσι περιορίζεται η έκθεσή τους σε δυσμενείς συνθήκες [44] όπως για παράδειγμα το υψηλό pH που επικρατεί στο εξωτερικό των όγκων (~6 με 7) [46]. Τέλος, μπορούν να συζευχθούν με φολικό οξύ, εκτός από τους φορείς φαρμάκων, και μόρια όπως είναι τα σωματίδια MRI για πιο γρήγορη διάγνωση του καρκίνου και του σταδίου εξέλιξής του.

### ✓ Αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας ανάπτυξης (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας ανάπτυξης ή VEGF είναι ο κύριος μεσολαβητής για την αγγειογένεση [47]. Η αγγειογένεση είναι η διαδικασία δημιουργίας νέων αγγείων και αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα για την ανάπτυξη, τη διάδοση και τη μετάσταση κακοήθων όγκων. Γενικά, η ανάπτυξη του καρκίνου απαιτεί θρεπτικά συστατικά για τα ανεξέλεγκτα αναπαραγόμενα κύτταρα, συνεπώς η σταθερή και συνεχής τροφοδοσία αίματος είναι ζωτικής σημασίας. Ανάμεσα στους πολλούς προ-αγγειογενετικούς παράγοντες, ο VEGF αποτελεί τον πιο σημαντικό, συνεπώς δεν είναι καθόλου περίεργο το γεγονός ότι πολλές θεραπείες στοχεύουν στον περιορισμό του παράγοντα αυτού (anti- VEGF therapies) [48]. Γενικά, η οικογένεια VEGF αποτελεί πολυπεπτίδια αυξητικών παραγόντων ενώ σε διαφορετικά κύτταρα εκφράζονται διαφορετικοί παράγοντες VEGF. Δηλαδή, για παράδειγμα στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζεται κυρίως ο παράγοντας VEGF-1 ενώ ο παράγοντας VEGF-3 κυριαρχεί στην λεμφοαγγειογένεση [48]. Οι αντίστοιχοι υποδοχείς που βρίσκονται στην εξωκυτταρική μεμβράνη ονομάζονται VEGFR. Αποτελεί πολλά υποσχόμενος παράγοντας στόχευσης, ιδιαίτερα για περιπτώσεις καρκίνου του μαστού, του παχέως εντέρου, των πνευμόνων και του εγκεφάλου [69].

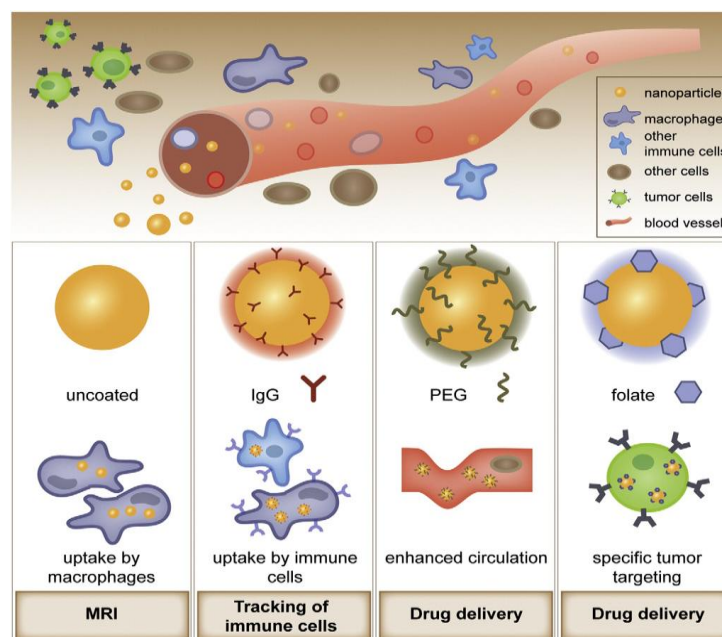


**Εικόνα 38** Παραστατική απεικόνιση της οικογένειας VEGF, των αντίστοιχων VEGFR και των κυττάρων στα οποία κυριαρχούν [49].



Εικόνα 39 Οι διάφοροι μηχανισμοί παρεμπόδισης της λειτουργίας της οικογένειας VEGF [49].

Ανακεφαλαιώνοντας, υπάρχουν πολλά είδη επικαλύψεων και στόχευσης, ανάλογα με τη χρήση κάθε φορά, δηλαδή τον τελικό στόχο όπως επίσης και τα κύτταρα-στόχους. Για παράδειγμα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, υπάρχουν “εξειδικευμένοι” υποδοχείς οι οποίοι είναι παρόντες αποκλειστικά και μόνο σε κάποια κύτταρα ενώ σε άλλα εκλείπουν. Επίσης, όπως διακρίνεται και στην εικόνα 40, ανάλογα με το αν υπάρχει επικάλυψη και τι είδους, και το αντίσωμα που δύναται να υπάρχει, ακολουθούνται διαφορετικοί δρόμοι εσωτερίκευσης των νανοσωματιδίων από τα κύτταρα. Τα μη επικαλυμμένα νανοσωματίδια συνήθως εσωτερικεύονται από τα μακροφάγα ενώ αυτά τα οποία έχουν αντισώματα στην εξωτερική τους επιφάνεια, από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.



Εικόνα 40 Συνοπτική παρουσίαση των αλληλεπιδράσεων με κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος για διάφορες από τις επικαλύψεις που αναφέρθηκαν [14].

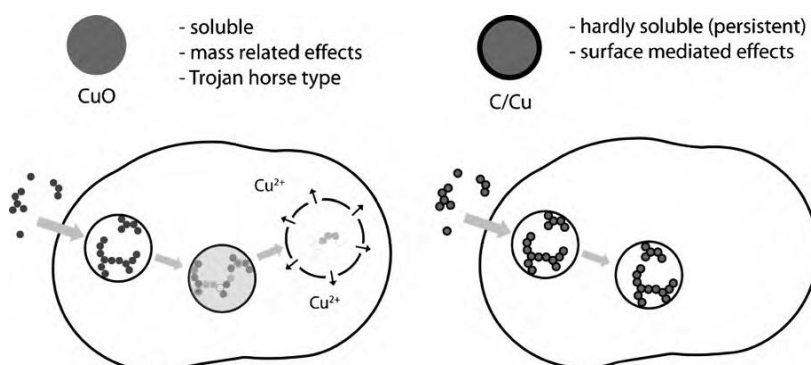


### 2.2.3.3 Επίδραση της διαλυτότητας

Το ποσοστό της διαλυτότητας των νανοσωματιδίων αποτελεί επίσης έναν σημαντικό παράγοντα σχετικά με τα κατά πόσο θα είναι βιοσυμβατά τα νανοσωματίδια με τον οργανισμό, δεδομένου ότι το περισσότερο ποσοστό του ανθρώπινου οργανισμού και άρα και των κυττάρων, αποτελείται από νερό. Γενικά, η διαλυτότητα των νανοσωματιδίων εξαρτάται από φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όπως είναι το μέγεθος, το σχήμα και η πυκνότητα [70].

Γενικά, όσο πιο δυσδιάλυτο είναι ένα νανοσωματίδιο τόσο μεγαλύτερη τοξικότητα παρουσιάζει. Οι υδρόφοβες ομάδες στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων επιφέρουν τη δημιουργία συσσωματωμάτων οι οποίες απομακρύνονται γρήγορα από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (RES) [7].

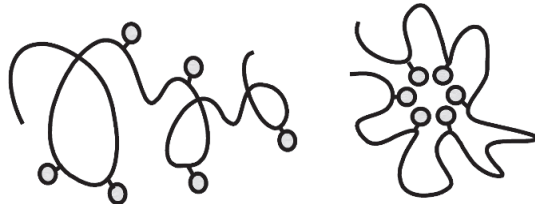
Όπως διακρίνεται στην εικόνα 41, όταν εισάγονται ευδιάλυτα νανοσωματίδια στο εσωτερικό του κυττάρου αυτά μπορούν εύκολα να “χωνευτούν” και να διασπαστούν μη έχοντας αρνητικές συνέπειες στη σωστή λειτουργία του κυττάρου. Εν αντιθέσει, τα δυσδιάλυτα νανοσωματίδια πρέπει να ελεγχθούν με επιφανειακές διαδικασίες (ROS, προσρόφηση) ώστε να περιοριστεί η τοξικότητά τους.



**Εικόνα 41** Σχηματική αναπαράσταση μηχανισμών πρόσληψης ευδιάλυτων και δυσδιάλυτων νανοσωματιδίων στο εσωτερικό του κυττάρου [15].

Όπως παρατηρείται, λοιπόν, ανάλογα με τη διαλυτότητα λαμβάνουν χώρα διαφορετικοί μηχανισμοί πρόσληψης και τα νανοσωματίδια έχουν διαφορετική μοίρα στη συνέχεια.

Πολλά από τα νανοσωματίδια που χρησιμοποιούνται όπως και αρκετά φάρμακα, παρ' όλες τις ευεργετικές τους ικανότητες, έχουν μικρή διαλυτότητα με αποτέλεσμα να μην είναι βιοσυμβατά. Αυτό το πρόβλημα έχει λυθεί από τη χρήση βιο-συμβατών επικαλύψεων, συνήθως πολυμερών. Τα νανοσωματίδια ως υδρόφοβα εγκλείονται στο εσωτερικό των υδρόφιλων επικαλύψεων και έτσι τους παρέχεται προστασία από το υδατικό περιβάλλον και αποφεύγεται η δέσμευσή τους από τους ανασταλτικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Η επικάλυψη, δηλαδή, χρησιμεύει ως καμουφλάζ που επιτρέπει στα νανοσωματίδια να φτάσουν στον στόχο τους.



**Εικόνα 42** Ενδομοριακές ενώσεις μεταξύ υδρόφοβων νανοσωματιδίων και πλευρικών αλυσίδων ενός υδρόφιλου πολυμερούς [16].

Τα πολυμερή με εγκλείσματα φαρμάκων γίνονται όλο και περισσότερο ελκυστικά λόγω της διαδικασίας παραγωγής του η οποία είναι εύκολη και επαναλήψιμη, των ελεγχόμενων φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, του χαμηλού κόστους τους και του εύρους των βιοδιασπόμενων πολυμερών τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν και των ήδη κερκτιμένων γνώσεων που υπάρχουν για αυτά [32].

Τα πιο συνηθισμένα πολυμερή (συγκεκριμένα πολυεστέρες) που χρησιμοποιούνται σαν επικάλυψη λόγω της καλής βιοσυμβατότητας που παρουσιάζουν, είναι η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) και τα συμπολυμερή της, τα συμπολυμερή του κ-(2-υδρόξυπρόπυλ)μεθακρυλαμίδιο (HPMA) [16], το πολυλακτικό-συ-γλυκολικό οξύ poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) [31] και το πολυλακτικό οξύ (PLA).

#### 2.2.3.4 Επίδραση της χημικής σύστασης

Η χημική σύσταση, από την άποψη της στοιχειακής σύστασης και χημικής δομής, αποτελεί μια εγγενή ιδιότητα όλων των υλικών και κατά συνέπεια των νανοσωματιδίων ενώ ταυτόχρονα αποτελεί μια σημαντική παράμετρο για την κατανόηση της βιολογικής συμπεριφοράς τους [1].

Γενικά τα νανοσωματίδια μπορούν να έχουν πολύ διαφορετική σύσταση, από τελείως ανόργανη όπως είναι τα νανοσωματίδια μετάλλων (σιδήρου, χρυσού, τιτανίου) ή/και οξειδία μετάλλων (οξείδιο του τιτανίου, οξείδιο του πυριτίου, οξείδια του σιδήρου), μέχρι τελείως οργανική όπως είναι τα νανοπολυμερή, τα φουλερένια, διάφορα βιομόρια και οι νανοσωλήνες άνθρακα. Κάποια παρουσιάζουν υβριδική δομή πυρήνα-κέλυφους (“core-shell” structure) όπως για παράδειγμα τα κβαντικά σημεία (quantum dots) [1]. Ακόμα και η χημική καθαρότητα, δηλαδή η παρουσία προσμίξεων ή όχι, αποτελεί σημαντικό παράγοντα που πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν. Συγκεκριμένα, η παρουσία μεταλλικών προσμίξεων, για παράδειγμα προσμίξεις σιδήρου (Fe), νικελίου (Ni) και κοβαλτίου (Co) μπορεί να επηρεάσει την βιολογική απόκριση με αποτέλεσμα την συγκάλυψη της συμπεριφοράς των νανοσωματιδίων με την εγγενή τοξικότητα τους [1]. Για παράδειγμα, η καθαρότητα των νανοσωλήνων άνθρακα έχει δείξει να αποτελεί τον κύριο παράγοντα για την εμφάνιση ή μη κυτταροτοξικότητας [22].

#### 2.2.3.5 Επίδραση της κρυσταλλικής δομής

Η εμφάνιση τοξικότητας εξαρτάται και από την κρυσταλλική δομή του υλικού/σωματιδίου, όπως γίνεται αντιληπτό και από το πείραμα του Saber M. Hussain και των συνεργατών του [11] οι οποίοι απέδειξαν επιπλέον ότι και ο μηχανισμός θανάτου των κυττάρων ποικίλει ανάλογα με την κρυσταλλική δομή των νανοσωματιδίων. Για

παράδειγμα, οι κρυσταλλικές δομές ρουτιλίου και ανατασίου έχουν την ίδια χημική σύσταση, αλλά η διαφορετική αυτή κρυσταλλική δομή μπορεί να προκαλέσει διαφορετικά επίπεδα τοξικότητας, σε συγκεντρώσεις της τάξης των 5–50 Ig/mL. Ακόμα, τα μεν πρώτα οδηγούν σε απόπτωση των κυττάρων λόγω της δημιουργίας ενεργών ειδών οξυγόνου (ROS) ενώ τα δεύτερα οδηγούν σε νέκρωση των κυττάρων, ανεξαρτήτου μεγέθους. Ο J. R. Guir και οι συνεργάτες του [12], σε πείραμά τους έδειξαν ότι νανοσωματίδια με δομή ρουτιλίου (200 nm σε διάμετρο) προκαλούσαν οξειδωτική βλάβη στο DNA απουσία φωτός ενώ νανοσωματίδια με δομή ανατασίου, ίδιου μεγέθους, δεν προκαλούσαν καμία βλάβη στο DNA. Τα πιο δημοφιλή νανοσωματίδια, τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα τοξικότητας ανάλογα με την κρυσταλλική τους δομή, είναι αυτά του διοξειδίου του τιτανίου TiO<sub>2</sub> [10]. Τέλος, πολύ σημαντικό ρόλο στο κομμάτι της τοξικότητας φαίνεται να έχει ο βαθμός συσσωμάτωσης που παρουσιάζουν ορισμένα υλικά με χαρακτηριστικό παράδειγμα τους νανοσωλήνες άνθρακα [68].

### 2.3 Τρόποι αξιολόγησης της κυτταροτοξικότητας

Αν και μέχρι στιγμής δεν έχει καθιερωθεί κάποιο συγκεκριμένο πρωτόκολλο για τη βιολογική αξιολόγηση των διαφόρων νανοσωματιδίων, υπάρχουν αρκετές χημικές διαδικασίες που ήδη χρησιμοποιούνται κατά κόρον για την πειραματική αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας, ανάλογα με την περίπτωση κάθε φορά, και που συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί, με την πιο δημοφιλή όλων να είναι η βιολογική αξιολόγηση με MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Καθώς στην παρούσα εργασία, η βιολογική αξιολόγηση της θνησιμότητας των κυττάρων μετά από την χορήγηση φαρμάκου, έγινε με τη βοήθεια του MTT, αξίζει να αναλυθεί ο τρόπος με τον οποίο δρα και παραπέμπει σε σημαντικά συμπεράσματα για την κυτταροτοξικότητα.

Αρχικά αναφέρεται ότι πρόκειται για ένα άλας τετραζολίου (tetrazolium), το οποίο αναγόμενο σχηματίζει φορμαζάνη, δεχόμενο ηλεκτρόνια από ισοδύναμα κυτταρικής αναγωγής όπως είναι τα NADH, NADPH. Υποδεικνύεται έτσι ότι η αναγωγή του MTT βασίζεται στην κυτταρική οξειδοαναγωγική δραστηριότητα, δηλαδή στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα [56]. Παρόλα αυτά, ο Juan C. Stockert και οι συνεργάτες του [57], βασιζόμενοι σε μια σειρά πειραμάτων, υποστηρίζουν ότι η αναγωγή του MTT δεν λαμβάνει χώρα στο οξειδωτικό περιβάλλον των μιτοχονδρίων. Μέχρι στιγμής, δηλαδή, δεν έχει αποσαφηνιστεί εντελώς που ακριβώς λαμβάνει χώρα η αναγωγή του MTT σε φορμαζάνη, αλλά παρόλα αυτά η αναγωγή του αποδεικνύει την επιβίωση των κυττάρων και αποτελεί εύκολη διαδικασία με την οποία εξετάζεται η επίδραση διαφόρων φαρμάκων ή νανοσωματιδίων στην ζωτικότητα τους.

**Πίνακας 4** Συνοπτική παρουσίαση των διαφόρων χημικών δοκιμών βιολογικής αξιολόγησης [55, 59].

Χημική Δοκιμή (assay)	Χρωστική ουσία (Stain/dye)	Δράση	Ποσοτικός Προσδιορισμός
Trypan blue exclusion assay (TB)	Μπλε χρωστική χρωματίζει τα νεκρά κύτταρα	Κυτταρική Μembrάνη	Μικροσκόπιο
Calcein AM (CAM)	Φθορίζουσα πράσινη χρωστική χρωματίζει τα επιβιώνοντα κύτταρα	Κυτταρική Μembrάνη	Μικροσκόπιο ή Φασματοφωτόμετρο
Live/Dead® (LD)	Φθορίζουσα πράσινη χρωστική χρωματίζει τα επιβιώνοντα κύτταρα ενώ τα νεκρά χρωματίζονται με φθορίζουσα κόκκινη χρωστική	Κυτταρική Μembrάνη (ζωντανά κύτταρα) Νουκλεϊκό οξύ (νεκρά κύτταρα)	Μικροσκόπιο ή Φασματοφωτόμετρο
Neutral red (NR)	Πρόσληψη από τα λυσοσώματα των ζωντανών κυττάρων	Λυσοσωμική Μembrάνη	Φασματοφωτόμετρο υψηλής απόδοσης
MTT	Μετατροπή του τετραζολίου σε αδιάλυτη μοβ φορμαζίνη στα ζωντανά κύτταρα	Μεταβολισμός στα μιτοχόνδρια	Φασματοφωτόμετρο υψηλής απόδοσης
CellTiter 96® AQueous One (96 AQ)	Μετατροπή του MTS σε διαλυτή μοβ φορμαζίνη στα ζωντανά κύτταρα	Μεταβολισμός κυττάρων	Φασματοφωτόμετρο υψηλής απόδοσης
alamar Blue® (aB)	Αναγωγή του Resazurin στη φθορίζουσα κόκκινη βαφή resorufin (ζωντανά κύτταρα)	Μεταβολισμός κυττάρων	Φασματοφωτόμετρο υψηλής απόδοσης
CellTiter-Blue® (CTB)	Ατομικό είδος του aB	Μεταβολισμός κυττάρων	Φασματοφωτόμετρο υψηλής απόδοσης
CytoTox One™ Homogeneous Membrane Integrity (CTO)	Το LDH ενζυμικά αναγάγει την resazurin σε resorufin	Κυτταρική Μembrάνη	Φασματοφωτόμετρο υψηλής απόδοσης
Κυτταρομετρία LD	Φθορίζουσα πράσινη χρωστική χρωματίζει τα επιβιώνοντα κύτταρα ενώ τα νεκρά χρωματίζονται με φθορίζουσα κόκκινη χρωστική	Κυτταρική Μembrάνη (ζωντανά κύτταρα) Νουκλεϊκό οξύ (νεκρά κύτταρα)	Αυτόματος μετρητής υψηλής απόδοσης
Caspase	Φθορισμομετρική ανίχνευση δραστηριότητας των Caspase-3	Αναστολή Caspase-3	Συσκευή ανάγνωσης φθορισμού [60]
Stress response DCF	Σβέση φθορισμού	Φθορισμομετρική ανίχνευση παραγωγής ROS	Φασματοφωτόμετρο σάρωσης (scanning multiwell spectrophotometer) [61]
Inflammatory Response ELISA	Χρωματική ανίχνευση έκκρισης κυτταροκινών	Απορρόφηση κυτταροκινών / Μειωμένη ένδειξη συγκέντρωσης κυτταροκινών	Συσκευή ανάγνωσης ELISA (ASYS Expert plus) [62]
Annexin V/ propidium iodide	Φθορισμομετρική ανίχνευση της έκθεσης φωσφατιδυλοσερίνης (σημάδι απόπτωσης) Χρώση του DNA με propidium iodide (σημάδι νέκρωσης)	Χρωματίνη (αποπτωτικά κύτταρα) Διευρυμένος Πυρήνας (νεκρά κύτταρα)	Κυτταρομετρία Ροής (Flow cytometry) [63]

## 2.4 Βιβλιογραφία

- [1] Stefano Zuin, Giulio Pojana, Antonio Marcomini, *Effect-Oriented Physicochemical Characterization of Nanomaterials*, Informa Healthcare USA, 2007.
- [2] C. L. Tran, K. Donaldson, V. Stones, T. Fernandez, A. Ford, N. Christofi, J. G. Ayres, M. Steinez, J. F. Hurley, R. J. Aitken, A. Seaton, A scoping study to identify hazard data needs for addressing the risks presented by nanoparticles and nanotubes, *Institute of Occupational Medicine*, Δεκέμβριος 2005, 1-113.
- [3] Andre Nel, Tiam Xia, Lutz Mädler, Ning Li, Toxic Potential of materials at the Nanolevel, *Science*, Vol. 311, 2006, 622-627.
- [4] Sudeshna Chandra, K. C. Barick, D. Bahadur, Oxide and hybrid nanostructures for the therapeutic applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011.
- [5] Pavan P. Adisheshaiah, Jennifer B. Hall, Scott E. McNeil, Nanomaterial standards for efficacy and toxicity assessment, *Nanomed Nanobiotechnol*, Vol. 2, 2009.
- [6] Zhi Ping Xu, Qing Hua Zeng, Gao Qing Lu, Ai Bing Yu, Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery, *Chemical Engineering Science*, 61, 2006, 1027-1040.
- [7] Omid Veischi, Jonathan W. Gunn, Miqin Zhang, Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 2010, 284-304.
- [8] Christie M. Sayes, David B. Warheit, Characterization of nanomaterials for toxicity assessment, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, Vol.1, 2009, 660-670.
- [9] Sandrine Dufort, Lucie Sancey, Jean-Luc Coll, Physico-chemical parameters that govern nanoparticles fate also dictate rules for their molecular evolution, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011.
- [10] Amanda M. Schrand, Mohammad F. Rahman, Saber M. Hussain, John J. Schlager, David A. Smith, Ali F. Syed, Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, Vol.2, 2010, 544-568.
- [11] Laura K. Braydich-Stolle, Nicole M. Schaeublin, Richard C. Murdock, Jingkun Jiang, Pratim Biswas, John J. Schlager, Saber M. Hussain, Crystal structure mediates mode of cell death in TiO<sub>2</sub>, *J Nanopart Res.*, 11, 2009, 1361–1374.
- [12] R. Guir, Alexander S. S. Wang, Chien-Hung Chen, Kun-Yan Jan, Ultrafine TiO<sub>2</sub> particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells, *Toxicology* 213, 2005, 66-73.
- [13] Cristina Buzea, Ivan I. Pacheco, Kevin Robbie, Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity, *Biointerphases* 2 (4), 2007, 18-65.
- [14] Andrea Kunzmann, Britta Andersson, Tina Thurnherr, Harald Krug, Annika Scheynius, Bengt Fadeel, Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810, 2011, 361-373.
- [15] Andreas M. Studer, Ludwig K. Limbach, Lun Van e, Frank Knimeich, Evangelos K. Athanasiou, Lukas C. Gerber, Holger Moch, Wendelin J. Stark, Nanoparticle cytotoxicity

- depends on intracellular solubility: Comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles, *Toxicology letters*, 197, 2010, 169-174.
- [16] Huaizhang Pan, Jindřich Kopeček, Multifunctional water-soluble polymers for drug delivery, *Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers*, 2008, 4, 81-142.
- [17] Oshrat Harush-Frenkel, Eva Rozentur, Simon Benita, Yoram Altschuler, Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells, *Biomacromolecules*, 2008, 9, 435-443.
- [18] Yon Ju-Nam, Jamie R. Lead, Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications, *science of the total environment*, 400, 2008, 394-414.
- [19] Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation, *NanoToday*, 6, 2011, 446-465.
- [20] Indu Bhatt, Bhumi Nath Tripathi, Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment, *Chemosphere*, 2011, 82.
- [21] A. Verma, F. Stellacci, Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions, *small* 2010, 6, No. 1, 12–21.
- [22] Bianco A., Wu W., Pastorin G. et al., Carbon nanotube-based vectors for delivering immunotherapeutics and drugs. In: Kummar Challa SSR, ed. *Nanomaterials for medical diagnosis and therapy. Nanotechnologies for life sciences*, 10, Weinheim: Wiley-VCH, 2007, 85-142.
- [23] Libo Wu, Jian Zhang, Wiwik Watanabe, Physical and chemical stability of drug nanoparticles, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 2011, 456–469.
- [24] Yang Qiu, Ying Liu, Liming Wang, Ligeng Xu, Ru Bai, Yinglu Ji, Xiaochun Wu, Yuliang Zhao, Yufeng Li, Chunying Chen, Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods, *Biomaterials*, 31, 2010, 7606-7619.
- [25] Yan-Juan Gu, Jinping Cheng, Chun-Chi Lin, Yun Wah Lam, Shuk Han Cheng, Wing-Tak Wong, Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles, *Toxicology and Applied Pharmacology* 237, 2009, 196–204.
- [26] Dakrong Pissuwan, Takuro Niidome, Michael B. Cortie, The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 149, 2011, 65–71.
- [27] Catherine J. Murphy, Anand M. Gole, John W. Stone, Patrick N. Sisco, Alaaldin M. Alkilany, Edie C. Goldsmith, Sarah C. Baxter, Gold nanoparticles in biology: Beyond toxicity to cellular imaging, *Accounts of chemical research*, 41, No 12, 2008, 1721-1730.
- [28] Virginie Rabolli, Leen C. J. Thomasseu, Francine Uwambayinema, Jonathan A. Marteus, Dominique Lison, The cytotoxic activity of amorphous silica nanoparticles is mainly influenced by surface area and not by aggregation, *Toxicology letters*, 206, 2011, 197-203.

- [29] Nathan Kohler, Glen E. Fryxell, Miqin Zhang, A. bifunctional poly(ethylene glycol) silane immobilized on metallic oxide-based nanoparticles for conjugation with cell targeting agents, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 2004, 7206-7211.
- [30] Huirui Zhou, Ke Tao, Jing Ding, Zhaofeng Zhang, Kong Sun, Weibin Shi, A general approach for providing nanoparticles water-dispersibility by grinding with poly(ethylene glycol), *colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 389, 2011, 18-26.
- [31] Sarbari Acharya, Sanjeeb K. Sahoo, PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect, *Advanced Drug Delivery Reviews* 63, 2011, 170–183.
- [32] Sandy Vrignaud, Jean-Pierre Benoit, Patrick Saulnier, Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles, *Biomaterials*, 32, 2011, 8593-8604.
- [33] Zhuo (Georgia) Chen, Small-molecule delivery by nanoparticles for anticancer therapy, *Trends in Molecular Medicine*, December 2010, Vol. 16, No. 12, 594-602.
- [34] Dongmei Cun, Ditte Krohn Jensen, Morten Jonas Maltesen, Matthew Bunker, Paul Whiteside, David Scurr, Camilla Foged, Hanne Mørck Nielsen, High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: Quality by design optimization and characterization, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77, 2011, 26–35.
- [35] Fabienne Danhier, Eduardo Ansorena, Joana M. Silva, Régis Coco, Aude Le Breton, Véronique Prétat, PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications, *Journal of Controlled Release*, 161, 2012, 505–522.
- [36] Bergsma JE, De Bruijn WC, Rozema FR, Bos RRM, Boering G. Late, Degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws, *Biomaterials*, 16, 1995, 25-31.
- [37] Rahul M. Rasal, Amol V. Janorkar, Douglas E. Hirt, Poly(lactic acid) modifications, *Progress in Polymer Science*, 35, 2010, 338–356.
- [38] E. K. Efthimiadou, C. Tapeinos, P. Bilalis, G. Kordas, New approach in synthesis, characterization and release study of pH-sensitive polymeric micelles, based on PLA-Lys-b-PEGm, conjugated with doxorubicin, *J Nanopart Res*, 13, 2011, 6725–6736.
- [39] Tsutomu Ishihara, Miyuki Takahashi, Megumu Higaki, Yutaka Mizushima, Tohru Mizushima, Preparation and characterization of a nanoparticulate formulation composed of PEG-PLA and PLA as anti-inflammatory agents, *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 2010, 170–175.
- [40] Chacko AM, Hood ED, Zern BJ, Muzykantov VR., Targeted Nanocarriers for Imaging and Therapy of Vascular Inflammation, *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 16(3), 2011, 215–227.
- [41] Jae Hyung Park, Seulki Lee, Jong-Ho Kim, Kyeongsoon Park, Kwangmeyung Kim, Ick Chan Kwon, Polymeric nanomedicine for cancer therapy, *Prog. Polym. Sci.*, 33, 2008, 113–137.
- [42] Omid Veis, Forrest Kievit, Richard G. Ellenbogen, Miqin Zhang, Cancer Cell Invasion: Treatment and Monitoring Opportunities in Nanomedicine, *Adv Drug Deliv Rev.*, 18; 63(8), 2011, 582–596.
- [43] Alfonso Garcia-Bennett, Matthias Nees, Bengt Fadeel, In search of the Holy Grail: Folate-targeted nanoparticles for cancer therapy, *Biochemical Pharmacology*, 81, 2011, 976–984.

- [44] Xiaojun Yu, Chandra M. Valmikinathan, Amanda Rogers, Junping Wang, Nanotechnology and Drug Delivery, *Biom. Nanostr.*, ch.05, 2007.
- [45] Subinoy Rana, Avinash Bajaj, Rubul Mout, Vincent M. Rotello, Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 2012, 200–216.
- [46] Emanuel Fleige, Mohiuddin A. Quadir, Rainer Haag, Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: Concepts and applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 2012, 866–884.
- [47] Maja Patricia Smerdel, Karina Dahl Steffensen, Marianne Waldstrøm, Rikke Fredslund Andersen, Dorte Aalund Olsen, Ivan Brandslund, Anders Jakobsen, VEGF in the Development of Ovarian Malignancy, *Clinical Ovarian Cancer*, Vol. 4, No. 1, 2011, 19-25.
- [48] Weihua Fu, Elena Madan, Marla Yee, Hongtao Zhang, Progress of molecular targeted therapies for prostate cancers, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1825, 2012, 140–152.
- [49] Faina Gurevich, MD, Mark A. Perazella, MD, Renal Effects of Anti-angiogenesis Therapy: Update for the Internist, *The American Journal of Medicine*, Vol 122, No 4, 2009, 322-328.
- [50] Andreas Elsaesser, C. Vynyan Howard, Toxicology of nanoparticles, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 2012, 129-137.
- [51] Bengt Fadeel, Alfonso E. Garcia-Bennett, Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 2010, 362–374.
- [52] Peto J. Doll R., Howard SV, Kinlen LJ, Lewinsohn HC, A mortality study among workers in an English asbestos factory, *Brit. Ind. Med.*, 34, 1977, 169-173.
- [53] Sharon C. Glotzer, Nanotechnology: Shape matters, *Nature*, 481, 2012, 450-452.
- [54] Kai Savolainen, Harri Alenius, Hannu Norppa, Lea Pylkkänen, Timo Tuomi, Gerhard Kasper, Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies- A review, *Toxicology*, 269, 2010, 92-104.
- [55] N.A. Monteiro-Riviere, A.O. Inman, L.W. Zhang, Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234, 2009, 222–235.
- [56] Shinichi Takahashi, Takato Abe, Jun Gotoh, Yasuo Fukuuchi, Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons, *Neurochemistry International*, 40, 2002, 441-448.
- [57] Juan C. Stockert, Alfonso Blázquez-Castro, Magdalena Cañete, Richard W. Horobin, Ángeles Villanueva, MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, *Acta Histochemica*, 2012.
- [58] Peter HM Hoet, Irene Brüske-Hohlfeld, Oleg V Salata, Nanoparticles – known and unknown health risks, *Journal of Nanobiotechnology*, 2:12, 2004.



- [59] Alexandra Kroll, Mike H. Pillukat, Daniela Hahn, Jürgen Schnekenburger, Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72, 2009, 370–377.
- [60] Jin Xu, Lin-Dan Ji, Li-Hong Xu, Lead-induced apoptosis in PC 12 cells: Involvement of p53, Bcl-2 family and caspase-3, *Toxicology Letters*, 166, 2006, 160–167.
- [61] Emil Rudolf, Miroslav Cervinka, Stress responses of human dermal fibroblasts exposed to zinc pyrithione, *Toxicology Letters*, 204, 2011, 164–173.
- [62] Siddharth Banerjee, P.V. Mohanan, Inflammatory response to pyrogens determined by a novel ELISA method using human whole blood, *Journal of Immunological Methods*, 369, 2011, 146–153.
- [63] Xing-yu Liu, Zhi-hua Yang, Xiu-jie Pan, Mao-xiang Zhu, Jian-ping Xie, Crotonaldehyde induces oxidative stress and caspase-dependent apoptosis in human bronchial epithelial cells, *Toxicology Letters*, 195, 2010, 90–98.
- [64] Kai Savolainen, Harri Alenius, Hannu Norppa, Lea Pylkkänen, Timo Tuomi, Gerhard Kasper, Risk Assessment of ENP & Nanotechnologies- A Review, Elsevier Ireland Ltd, 2010, σελ. 93-95, 100.
- [65] Christiane Beer, Rasmus Foldbjerg, Yuya Hayashi, Duncan S. Sutherland, Herman Autrup, Toxicity of silver nanoparticles—Nanoparticle or silver ion? , *Toxicology Letters*, 208, 2012, 286– 292.
- [66] Jin-Wook Yoo, Nishit Doshi, Samir Mitragotri, Adaptive micro and nanoparticles: Temporal control over carrier properties to facilitate drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 2011, 1247–1256.
- [67] Silvia Muro, Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 2012, 1-13.
- [68] Gregory Morose, The 5 principles of “Design for Safer Nanotechnology”, *Journal of Cleaner Production*, 18, 2010, 285–289.
- [69] Deboshri Banerjee, Shiladitya Sengupta, Nanoparticles in Cancer Chemotherapy, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Vol. 104, 2011, 489-507.
- [70] Jose R. Peralta-Videa, Lijuan Zhao, Martha L. Lopez-Moreno, Guadalupe de la Rosa, Jie Hong, Jorge L. Gardea-Torresdey, Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008–2010, *Journal of Hazardous Materials* 186, 2011, 1–15.
- [71] <http://understandingnano.com/nanomedicine-nanorod-targeted-drug-delivery.html>

# Πειραματική Διαδικασία

## 3.1 Σύνθεση Νανοσφαιρών

Οι νανόσφαιρες πολυμεθακρυλικού μεθυλεστέρα (PMMA) συντέθηκαν με πολυμερισμό γαλακτώματος σε σφαιρικό δοχείο των 250 ml υπό συνεχή παροχή αζώτου. 2.0 ml μεθακρυλικού μεθυλεστέρα προστίθεται σε 175 ml απεσταγμένου νερού και το μίγμα αφήνεται προς ανάδευση με συνεχή παροχή αζώτου στους 80 °C και μετά από 40 min ανάδευσης προστίθενται 200 mg υπερθειικού καλίου (9.3 wt% μονομερούς και 5.0 ml υδατικό διάλυμα) ως εκκινητής του πολυμερισμού. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε μετά από 20 ώρες και το προϊόν διαχωρίστηκε με φυγοκέντριση και εκπλύθηκε με νερό (10.000 rpm για 10 min × 3 φορές).

## 3.2 Επικάλυψη Νανοσφαιρών

Σε σφαιρική φιάλη των 250 mL προστίθεται 0.5 gr των πολυμερικών μικροσφαιρών και διασπείρονται σε μίγμα H<sub>2</sub>O/Αιθανόλης (68:2 mL). Το μίγμα αφήνεται σε λουτρό υπερήχων με σκοπό την ομοιόμορφη διασπορά των μικροσφαιρών. Στη συνέχεια προστίθεται 1.066 mL του μεθυλ - μεθακρυλικού εστέρα (MMA) και 0.213 mL ακρυλικού οξέος (AA) για 2 ώρες στους 80 °C. Μετά την ανάδευση του μίγματος προστίθενται 0.5 mL του διβινυλο-βενζόλιου (DVB) και το μίγμα αφήνεται για επιπλέον 2 ώρες. 68 mg του υπερθειικού καλίου προστίθενται στο μίγμα και γίνεται η έναρξη του πολυμερισμού. Το μίγμα αφήνεται προς αντίδραση για 24 ώρες και οι μικρόσφαιρες που προέκυψαν καθαρίζονται μέσο φυγοκέντρωσης και εκπλαίνονται με νερό (3 × 7000 rpm – 5 min).

## 3.3 Εξοπλισμός

### 3.3.1 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σαρωτικής Δέσμης (Scanning Electron Microscope, SEM) & Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διερχόμενης Δέσμης (Transmission Electron Microscope, TEM)

Το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Electron Microscope, SEM) βασίζεται στη δευτερογενή εκπομπή ηλεκτρονίων (δευτερεύοντα & οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια) και χρησιμοποιείται κατά κόρον για την παρατήρηση των επιφανειών δειγμάτων προσφέροντας εικόνες με τυπική ανάλυση 1 έως 10 nm με σκοπό τον μορφολογικό

χαρακτηρισμό των δειγμάτων. Η μικροσκοπία (TEM, Transmission Electron Microscopy) διέλευσης βασίζεται στη διερχόμενη δέσμη ηλεκτρονίων καθώς και στις περιθλώμενες δέσμες και προσφέρει περισσότερες πληροφορίες για την μορφολογία των μικροσφαιρών.

### **3.3.2 Φασματομετρία υπέρυθρου (Infrared Spectrometry, IR)**

Η μέθοδος βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης, τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Το φάσμα απορρόφησης που προκύπτει αποτελεί μια θεμελιώδη ιδιότητα κάθε μορίου (δακτυλικό αποτύπωμα ουσίας) και χρησιμεύει κυρίως στην ποιοτική ανάλυση, για τη διαλεύκανση της δομής μιας ένωσης (φύση ατόμων, διάταξη στο χώρο). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση του υποστρώματος και της επικάλυψης του. Το φάσμα εξασφαλίστηκε από το φασματόμετρο Perkin Elmer Spectrum 100, ενώ σαρώθηκε στην περιοχή  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ .

### **3.3.3 Υπεριώδης Φασματομετρία (UltraViolet Spectrometry)**

Χρησιμοποιείται για τη μελέτη μορίων μιας διαλυμένης ουσίας και βασίζεται στις ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις που υφίστανται αυτά. Προσφέρει ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες και στην εν λόγω μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του φαρμάκου υδροχλωρική δοξορουμπικίνη (Doxorubicin hydrochloride) που εγκλείστηκε στις νανόσφαιρες. Το φάσμα απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας στο μήκος κύματος των 200-800 nm εξασφαλίστηκε από το φασματόμετρο Jusco V-650.

## **3.4 Βιολογική Αξιολόγηση**

### **3.4.1 Εγκλωβισμός και Απελευθέρωση Φαρμάκου (Loading and Release)**

Η διαδικασία ενσωμάτωσης μιας φαρμακευτικής ένωσης (της δοξορουμπικίνης εδώ) σε ένα πολυμερικό δίκτυο (PMMA@MMA-DVB-AA) ή ακόμα και σε μια κάψουλα ονομάζεται εγκλωβισμός φαρμάκου (Drug Loading) και χρησιμοποιείται με την πρόθεση του εγκλωβισμού μιας δυνητικά επικίνδυνης ουσίας στον πυρήνα ενός λιγότερου τοξικού υλικού [3]. Η αντίστροφη διαδικασία, η απελευθέρωση δηλαδή του φαρμάκου υπό ορισμένες συνθήκες, καλείται απελευθέρωση του φαρμάκου (Drug Release). Η πρώτη διαδικασία μπορεί να γίνει είτε κατά τη σύνθεση των νανοσωματιδίων ή με επώαση των νανοσωματιδίων σε διάλυμα του φαρμάκου που επιθυμείται να εγκλωβιστεί στο εσωτερικό τους. Ανάλογα με το ποια από τις δυο μεθόδους επιλέγεται, καθορίζεται ο μηχανισμός καθώς και η ταχύτητα απελευθέρωσης του φαρμάκου. Η δεύτερη διαδικασία λαμβάνει χώρα, όπως αναφέρθηκε, σε συγκεκριμένες συνθήκες. Αυτές οι συνθήκες μπορεί να είναι το διαφορετικό pH ή/και η διαφορετική θερμοκρασία. Βασίζεται δηλαδή στο γεγονός ότι στην περιοχή καρκινικών κυττάρων επικρατούν διαφορετικές συνθήκες σε σχέση με τα υγιή κύτταρα. Με αυτό τον τρόπο το φάρμακο απελευθερώνεται με εκλεκτικό τρόπο προστατεύοντας έτσι τα γειτονικά υγιή κύτταρα και επομένως μειώνοντας τις παρενέργειες που προκαλούν οι χημειοθεραπείες και άλλες συμβατικές θεραπείες κατά του καρκίνου. Οι δυο αυτές διαδικασίες όπως είναι κατανοητό συνδέονται άμεσα και

επηρεάζονται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων (μέγεθος, μοριακό βάρος, πορώδες, δραστικές ομάδες), του φαρμάκου (υδροφοβικότητα/ υδροφιλικότητα, δραστικές ομάδες) καθώς και από την επίδραση του περιβάλλοντος (pH, θερμοκρασία, ιοντική ισχύς, οξειδοαναγωγικό περιβάλλον).

Η μελέτη εγκλωβισμού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της υδροχλωρική δοξορουμπικίνη (Doxorubicin hydrochloride) ως φάρμακο-μοντέλο (αντικαρκινικό φάρμακο). 10 mg-μικρόσφαιρων διασπείρονται σε 10 ml ισοτονικού διαλύματος (0,9 % NaCl), το οποίο έχει αποστειρωθεί πριν από τη χρήση του. Στη συνέχεια προστίθενται 5 mg φαρμάκου (Doxorubicin hydrochloride) και το μίγμα αναδεύεται για 48 ώρες σε 25 °C. Έπειτα το δείγμα φυγοκεντρείται (3 φορές σε 12000 rpm και μετά ξεπλένεται ξανά με νερό) ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του φαρμάκου η οποία βρίσκεται στο υπερκείμενο διάλυμα. Ο προσδιορισμός του εγκλωβισμένου φαρμάκου πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία Ορατού- υπεριώδους (Ultra Violet spectroscopy, UV) σύμφωνα με πρότυπη καμπύλη αναφοράς η οποία κατασκευάζεται από διάφορες συγκεντρώσεις φαρμάκου σε διάλυμα Dox/NaCl (0.9 wt %) και χρησιμοποιώντας το NaCl σαν τυφλό δείγμα. Η συγκέντρωση του φορτωμένου Dox υπολογίστηκε από τη διαφορά της συγκέντρωσης του υπερκείμενου προς την αρχική, μετά το φόρτωμα. Τα νανοδοχεία στα οποία έχει εγκλωβιστεί το φάρμακο μοιράστηκαν σε κλάσματα, λυοφιλοποιήθηκαν και διατηρήθηκαν σε ψυχρές συνθήκες πριν τη χρήση τους.

### 3.4.2 MTT assay

Για τις ανάγκες των πειραμάτων που διεξήχθησαν χρησιμοποιήθηκε η σειρά μονόστιβων κυττάρων MCF-7 (καρκινικά κύτταρα μαστού/Human breast adenocarcinoma cells) με χρόνο διπλασιασμού τις 48 ώρες και συχνότητα ανακαλλιέργειας ανά 4 ημέρες. Για τις κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν ως θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης κυττάρων DMEM εμπλουτισμένο με 2 mM γλουταμίνης, 0.85 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM HEPES, 10% FBS (Fetal Bovine Serum) σε 6.8 < pH < 7.20.02%. Ως διάλυμα διαχωρισμού κυττάρων, δηλαδή για την αποκόλληση και το διαχωρισμό των μονόστιβων καλλιιεργειών, χρησιμοποιήθηκε EDTA, 0.2% w/v στρεπτομυκίνη, 2×10<sup>3</sup> U/mL πενικιλίνη, σε PBS (1×). Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από την καλλιέργεια και το ταπήτιο εκπλύνεται με PBS για την απομάκρυνση νεκρών κυττάρων. Στη φλάσκα προστίθεται 1.5 mL θρυψίνης και αφήνεται στους 37 °C για 5 min, προκειμένου να γίνει αποκόλληση του ταπητίου και διαχωρισμός των κυττάρων. Τέλος, προστίθεται θρεπτικό υλικό διαλύματος DMEM και τα κύτταρα φυλάσσονται σε περιβάλλον 37 °C και 5% CO<sub>2</sub> προς ανάπτυξής τους.

Η διαδικασία MTT χρησιμοποιήθηκε με στόχο τη διερεύνηση της ζωτικότητας των κυττάρων καρκίνου του μαστού έπειτα από 48 ώρες επώασης του φαρμάκου DOX, των μικρόσφαιρων PMMA@MMA-DVB-AA καθώς και του συνδυασμού PMMA@MMA-DVB-AA-Dox, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Αρχικά, 5×10<sup>5</sup> κύτταρα τοποθετήθηκαν σε 96 πηγάδια πλακιδίου για 48 ώρες σε συγκεντρώσεις 10, 1, 0.1 και 0.01 μM κάθε δείγματος και έπειτα επώαστηκαν στους 37°C, παρουσία 5% CO<sub>2</sub>. Το MTT που προστέθηκε είχε τελική συγκέντρωση 0.5 mg/ml και τα κύτταρα επώαστηκαν για επιπλέον 4 ώρες (μετά την προσθήκη MTT) στις ίδιες συνθήκες ώστε να είναι δυνατή η μέτρηση

του μετασχηματισμού του MTT (κίτρινο χρώμα) σε κρυστάλλους φορμαζάνης (μωβ χρώμα) από τα επιζώντα κύτταρα. Οι κρύσταλλοι φορμαζάνης διαλυτοποιούνται για 4 ώρες με την προσθήκη DMSO και επωάζονται στους 37°C. Η απορρόφηση του κυτταρολύματος μετρείται με φασματόμετρο UV σε μήκος κύματος 540 nm (το μήκος κύματος αναφοράς είναι στα 640 nm). Τα αποτελέσματα από τη δοκιμή MTT, που παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 4, βασίζονται σε απορροφήσεις στα  $540 \pm SD$ , χρησιμοποιώντας δεδομένα από δύο διαφορετικά πειράματα.

### 3.5 Βιβλιογραφία

- [1] Efthimiadou, E. K.; Thomadaki, H.; Sanakis, Y.; Raptopoulou, C. P.; Katsaros, N.; Scorilas, A.; Karaliota, A.; Psomas, G. *Journal of inorganic biochemistry* 2007, 101, (1), 64-73.
- [2] Katsarou, M. E.; Efthimiadou, E. K.; Psomas, G.; Karaliota, A.; Vourloumis, D. *Journal of medicinal chemistry* 2008, 51, (3), 470-8.
- [3] Gregory Morose, The 5 principles of “Design for Safer Nanotechnology”, *Journal of Cleaner Production*, 18, 2010, 285–289.

# 4

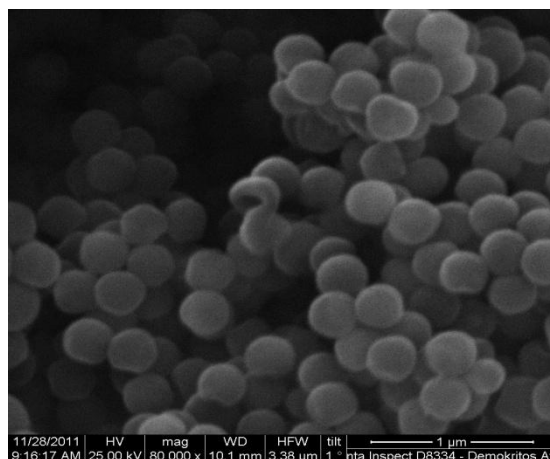
## Αξιολόγηση

## Αποτελεσμάτων

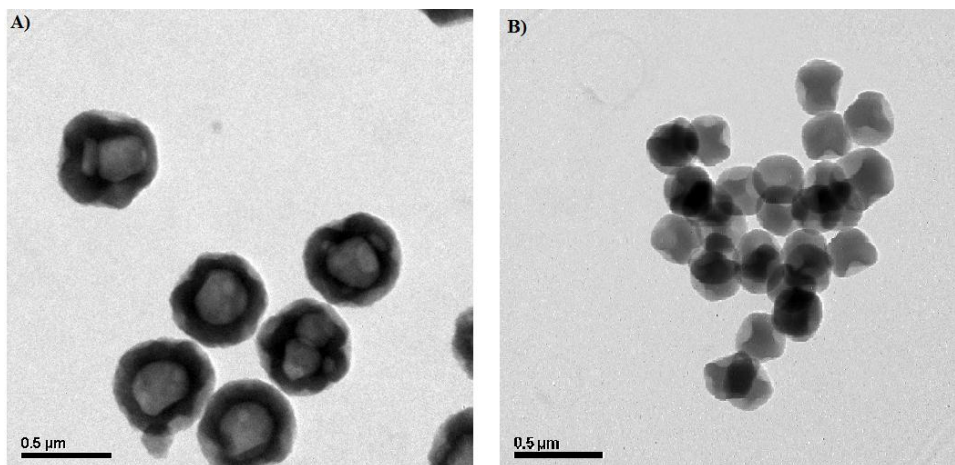
### 4.1 Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων

#### 4.1.1 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σαρωτικής Δέσμης (Scanning Electron Microscope, SEM) Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διερχόμενης Δέσμης (Transmission Electron Microscope, TEM)

Στις παρακάτω εικόνες απεικονίζονται οι μικρόσφαιρες PMMA @ P(MMA-co-DVB-co-AA). Το μέγεθός τους είναι περίπου  $400 \pm 30$  nm. Το σχήμα τους είναι σφαιρικό ενώ είναι κοίλες. Αυτές οι επιφανειακές κοιλότητες μπορούν να αποδοθούν στις εσωτερικές κοιλότητες που δημιουργήθηκαν κατά τη διάρκεια της δημιουργίας του κελύφους, όπως φαίνεται από τις εικόνες TEM (Εικόνα 2 A&B) [1].



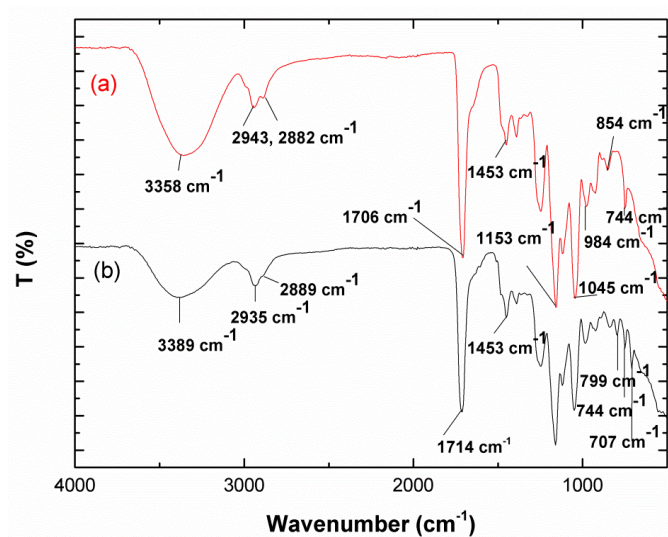
Εικόνα 1 Εικόνα SEM μικρόσφαιρων PMMA@P(MMA-co-DVB-co-AA).



Εικόνα 2 Εικόνα TEM μικρόσφαιρων PMMA@P(MMA-co-DVB-co-AA).

#### 4.1.2 Φασματομετρία υπέρυθρου (Infrared Spectrometry, IR)

Οι μικρόσφαιρες PMMA@P(MMA-co-DVB-co-AA) (Εικ.3) παρουσιάζουν τη χαρακτηριστική κορυφή δόνησης κάμψης του δεσμού C-H του εποξειδικού δακτυλίου στα  $744\text{ cm}^{-1}$ . Η κορυφή απορρόφησης στα  $1269\text{--}1153\text{ cm}^{-1}$  μπορεί να αποδοθεί στην δόνηση τάσης του εστερικού δεσμού C-O. Επιπλέον, στην περιοχή των  $1706\text{ cm}^{-1}$  η χαρακτηριστική δόνηση τάσης της εστερικής ομάδας παρατηρείται ότι σχετίζεται με την καρβονυλική ομάδα του μεθακρυλικού τμήματος (C=O). Το φάσμα FT-IR μετά την κατασκευή του κελύφους επιβεβαιώνει την επιτυχή επικάλυψη. Είναι εμφανές ότι υπάρχει μια ευδιάκριτη ζώνη απορρόφησης από τα  $1153\text{ cm}^{-1}$  στα  $1250\text{ cm}^{-1}$ , η οποία μπορεί να αποδοθεί στη δόνηση τάσης του δεσμού C–O–C του μεθακρυλίου. Οι δύο κορυφές στα  $1388\text{ cm}^{-1}$  και στα  $744\text{ cm}^{-1}$  μπορούν να αποδοθούν σε δονήσεις της ομάδας *a*-methyl. Η κορυφή στα  $984\text{ cm}^{-1}$  αποτελεί την χαρακτηριστική δόνηση απορρόφησης του PMMA, μαζί με τις κορυφές στα  $1045\text{ cm}^{-1}$  και στα  $854\text{ cm}^{-1}$ . Η κορυφή στα  $1714\text{ cm}^{-1}$  απεικονίζει την παρουσία της μεθακρυλικής καρβονυλομάδας. Η κορυφή στα  $1453\text{ cm}^{-1}$  μπορεί να αποδοθεί στη δόνηση κάμψης του δεσμού C–H της ομάδας –CH<sub>3</sub>. Οι δύο κορυφές στα  $2943\text{ cm}^{-1}$  και στα  $2882\text{ cm}^{-1}$  αποδίδονται στις δονήσεις τάσεων των δεσμών C–H των ομάδων –CH<sub>3</sub> and –CH<sub>2</sub>, αντίστοιχα. Ακόμα, υπάρχουν δύο αδύναμες κορυφές απορρόφησης στα  $3358\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1641\text{ cm}^{-1}$  (Sh), οι οποίες αποδίδονται σε δονήσεις τάσεων και κάμψεων της ομάδας–OH, αντίστοιχα. Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι το παρασκευασθέν πολυμερές όντως αποτελείται από PMMA. Το φάσμα FT-IR των μικρόσφαιρων PGMA@P(MMA-co-DVB-co-AA) εμφανίζει μια κορυφή στα  $799\text{ cm}^{-1}$  λόγω της δόνησης της φαινυλομάδας του DVB και του τμήματος του καρβοξυλικού οξέος (AA) αντίστοιχα. Εξαιτίας της παρουσίας και των δύο, του MMA και του AA δηλαδή, η κορυφή για έκαστη καρβονυλομάδα επικαλύπτεται και μετατοπίζεται στα  $1714\text{ cm}^{-1}$ . Είναι γνωστό ότι ο εποξειδικός δακτύλιος μπορεί να υδρολυθεί υπό όξινες ή βασικές συνθήκες. Αυτή η υδρόλυση είναι δυνατόν να λάβει χώρα κατά την κατασκευή της επικάλυψης ("καβουκιού"). Αυτή η υπόθεση προκύπτει από την κορυφή δόνησης του C–O (της ομάδας –OH) στην περιοχή των  $3389\text{ cm}^{-1}$ .



Εικόνα 43 Φάσμα IR των μικρόσφαιρων PMMA@P(MMA-co-DVB-co-AA).

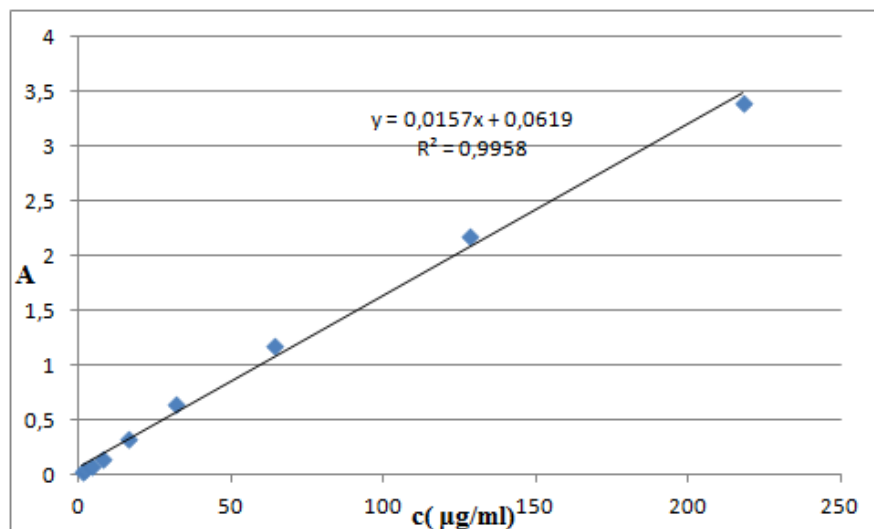
#### 4.1.3 Υπεριώδης Φασματομετρία (UltraViolet Spectrometry)

Χρησιμοποιώντας την φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους, προέκυψαν οι απορροφήσεις που φαίνονται στον πίνακα 1. Έπειτα με βάση την καμπύλη αναφοράς (διάγραμμα 1), η οποία κατασκευάστηκε με μετρήσεις απορρόφησης πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Βασιζόμενοι στον νόμο Lambert-Beer  $A = \epsilon \times b \times c$ , και γνωρίζοντας ότι η συγκέντρωση του φαρμάκου είναι ανάλογη της απορρόφησης, υπολογίστηκε η ποσότητα του φαρμάκου που εγκλωβίστηκε σε κάθε δείγμα.

Πίνακας 1 Αποτελέσματα υπεριώδους φασματομετρίας

Δείγμα	Απορρόφηση
1 <sup>ο</sup>	0,205
2 <sup>ο</sup>	0,184
3 <sup>ο</sup>	0,108
4 <sup>ο</sup>	0,150





Διάγραμμα 1 Καμπύλη Αναφοράς.

## 4.2 Βιολογική Αξιολόγηση

### 4.2.1 Εγκλωβισμός και Απελευθέρωση Φαρμάκου (Loading and Release)

Η ικανότητα εγκλωβισμού (Loading Capacity) και η αποδοτικότητα εγκλωβισμού (Encapsulation Efficiency) υπολογίστηκαν κάνοντας χρήση των παρακάτω εξισώσεων.

$$\text{Ικανότητα εγκλωβισμού (\%)} = \frac{\text{μάζα εγκλωβισμένου φαρμάκου}}{\text{ολική μάζα νανοσφαιρών}} \times 100 \quad (1)$$

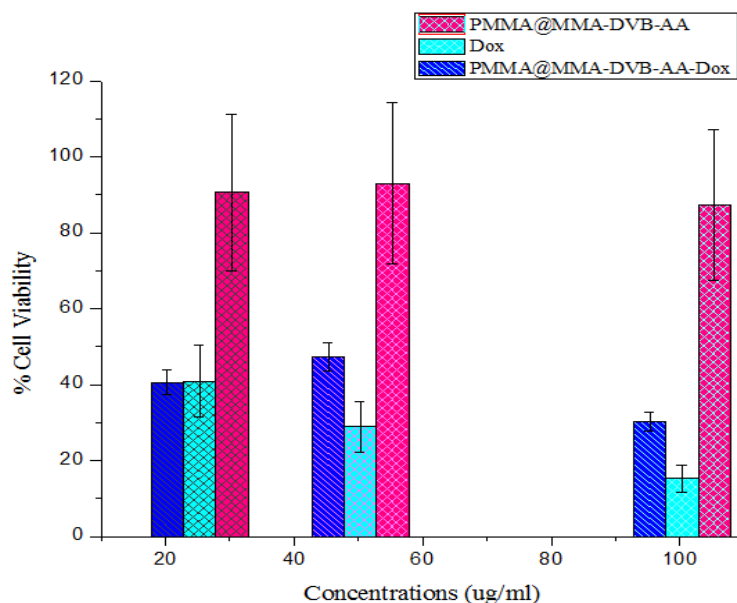
$$\text{Αποδοτικότητα εγκλωβισμού (\%)} = \frac{\text{μάζα εγκλωβισμένου φαρμάκου}}{\text{μάζα ολικού φαρμάκου}} \times 100 \quad (2)$$

Χρησιμοποιώντας ίδιες συνθήκες pH, έγινε έλεγχος των συντιθέμενων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκου. Η ικανότητα εγκλωβισμού των κενών μικρόσφαιρων βρέθηκε ότι είναι 86,78 % και η αποτελεσματικότητα εγκλεισμού επίσης 86,78 %.

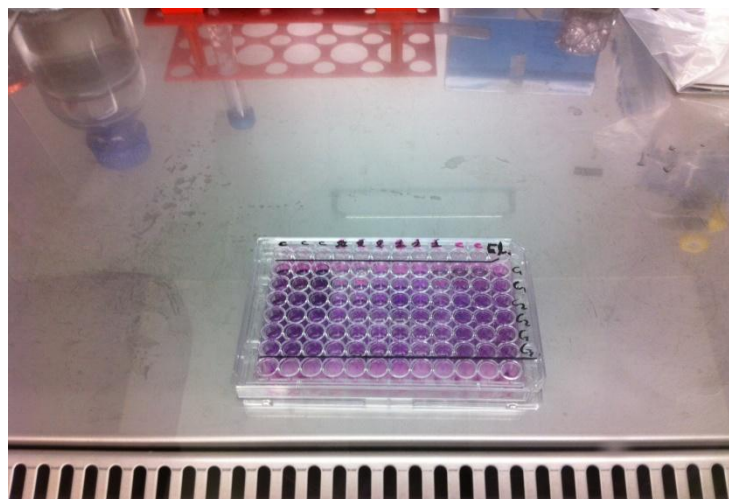
### 4.2.2 MTT assay

Η δοκιμή MTT χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση της ζωτικότητας των κυττάρων έπειτα από 48 ώρες επώασης του πολυμερικού υλικού, του πολυμερούς με εγκλωβισμένο Dox και του ελεύθερου φαρμάκου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (10 μM, 1 μM, 0.1 μM, 0.01 μM). Όπως παρατηρείται στο διάγραμμα 2, το ελεύθερο φάρμακο σε μεγάλη συγκέντρωση (10 μM) παρουσιάζει μικρό ποσοστό ζωτικότητας κυττάρων ενώ το ποσοστό αυτό αυξάνεται με μείωση της συγκέντρωσης, όπως αναμενόταν. Οι ίδιες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν και στις περιπτώσεις του πολυμερούς και του εγκλωβισμένου φαρμάκου. Το πολυμερές δεν εμφανίζει τοξικότητα, γεγονός που συμφωνεί με την βιοσυμβατότητα που αναμενόταν με βάση τη βιβλιογραφία. Το σύμπλεγμα φαρμάκου-πολυμερούς εμφανίζει ικανοποιητικό ποσοστό τοξικότητας,

ιδιαίτερα σε μεγάλη συγκέντρωση (10  $\mu\text{M}$ ), ενώ σε μικρή συγκέντρωση (0.01  $\mu\text{M}$ ) παρουσιάζει ίδια συμπεριφορά με το ελεύθερο φάρμακο.



*Διάγραμμα 2* Αποτελέσματα ζωτικότητας κυττάρων για διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυμερούς με εγκλωβισμένο φάρμακο, ελεύθερου φαρμάκου και πολυμερούς αντίστοιχα.



*Εικόνα 4* Δοκιμή MTT μετά την επώαση των κυττάρων με το σύμπλεγμα πολυμερούς, του πολυμερούς και του ελεύθερου φαρμάκου.

Στην εικόνα 4 παρατηρούνται ποιοτικά τα αποτελέσματα που προαναφέρθηκαν. Στα αριστερά με το σκούρο, έντονο χρώμα είναι τα πλακίδια που χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο των κυττάρων και τα οποία περιέχουν μόνο κύτταρα και θρεπτικό υλικό. Στα δεξιά, οι τελευταίες τρεις στήλες περιέχουν το πολυμερές και επιβεβαιώνεται και ποιοτικά η βιοσυμβατότητά του. Όπως παρατηρείται και εδώ, σε υψηλές συγκεντρώσεις το ελεύθερο

και δεσμευμένο φάρμακο παρουσιάζουν αρκετά χαμηλό ποσοστό ζωτικότητας (αποχρωματισμένα πλακίδια δυο πρώτων σειρών στο κέντρο).

### **4.3 Βιβλιογραφία**

- [1] Lv, H., Lin, Q., Zhang, K., Yu, K., Yao, T., Zhang, X., Zhang, J., Yang, B., Facile fabrication of monodisperse polymer hollow spheres, *Langmuir* 2008, 24, (23), 13736-41.
- [2] Lee, H.; Kim, S.; Choi, B. H.; Park, M. T.; Lee, J.; Jeong, S. Y.; Choi, E. K.; Lim, B. U.; Kim, C.; Park, H. J. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2011, 27, (7), 698-707.
- [3] Liu, G. Y.; Wang, H.; Yang, X. L. *Polymer* 2009, 50, (12), 2578-2586.

## Εμφεράματα - Μελλοντικές Προοπτικές

Η αξιολόγηση των κινδύνων και η πρόβλεψη της συμπεριφοράς των (συνθετικών) νανοϋλικών, όταν αυτά εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό ή απελευθερωθούν στο περιβάλλον, είναι ίσως το πιο πολυπαραγοντικό ζήτημα που έχει ποτέ αντιμετωπίσει η επιστημονική κοινότητα. Οι παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε τοξικότητα είναι πολλοί και ίσως να επηρεάζουν ακόμα περισσότεροι. Έτσι είναι εύκολο κανείς να καταλάβει πόσο δύσκολη είναι μια τέτοια μελέτη. Επιπλέον, υπάρχει μεγάλη ποικιλία νανοϋλικών, κάτι που κάνει τη μελέτη ακόμα πιο επίπονη. Χρειάζονται πάρα πολλά χρόνια διεπιστημονικής έρευνας για την ταξινόμηση και τον πλήρη χαρακτηρισμό όλων των νανοϋλικών που έχουν προοπτικές σύνθεσης και ευρείας χρήσης σε ποικίλες εφαρμογές. Έπειτα, σε μια μελέτη κινδύνου και επικινδυνότητας πρέπει να ληφθεί υπόψη και το γεγονός ότι ήδη ερχόμαστε σε επαφή καθημερινά με υλικά χαμηλών διαστάσεων τα οποία παράγονται αναπόφευκτα από μηχανές εσωτερικής καύσης, για παράδειγμα. Αυτό το γεγονός επιβαρύνει επιπλέον την ανθρώπινη υγεία και δεν είναι κάτι που μπορεί να αγνοηθεί.

Το δεύτερο σημαντικό ζήτημα που μπορεί να διεξαχθεί σαν συμπέρασμα είναι ότι ο όρος "τοξικότητα" έχει δύο σκέλη έρευνας. Το πρώτο σχετίζεται με την έρευνα των κινδύνων που μπορεί να προκαλέσουν τα νανοϋλικά αν έρθουν σε επαφή με τα διάφορα είδη οργανισμών που υπάρχουν. Το δεύτερο σχετίζεται με την επιθυμητή και ελεγχόμενη τοξικότητα για διάφορες εφαρμογές όπως είναι η χρήση νανοσωματιδίων με αντιβακτηριδιακή δράση, για παράδειγμα. Η πιο απαιτητική εφαρμογή της δεύτερης κατηγορίας, που αποτελεί τα τελευταία χρόνια αντικείμενο έρευνας πολλών επιστημόνων, είναι η χρήση των τοξικών ιδιοτήτων διαφόρων συνθετικών νανοϋλικών για θεραπεία ποικίλων ασθενειών όπως αυτή του καρκίνου. Έχοντας αντιμετωπίσει αρκετές δυσκολίες στη χρήση ανενεργών ιών για στοχευμένη χορήγηση φαρμακευτικών ή γονιδιακών θεραπειών, η επιστημονική κοινότητα έχει ήδη αρχίσει να στρέφεται στη μελέτη της χρήσης νανοσωματιδίων - φορέων, φαρμάκων ή γονιδίων, με μεγάλη αποτελεσματικότητα αν λάβουμε υπόψη μας ότι αρκετές τέτοιες θεραπείες έχουν ήδη περάσει στο επόμενο στάδιο. Και σε αυτή την περίπτωση βέβαια υπάρχουν ακόμα πολλά εμπόδια που πρέπει να ξεπεραστούν όπως είναι η σύνθεση νανοσωματιδίων με βιοσυμβατικό χαρακτήρα, με

κατάλληλα μόρια – στόχους στην εξωτερική τους επιφάνεια και με καλή αποτελεσματικότητα χωρίς να βλάπτουν τα γειτονικά υγιή κύτταρα.

Ένα ακόμα σημαντικό ζήτημα είναι η έλλειψη προτύπων τόσο στην σύνθεση όσο και στον χαρακτηρισμό των ναουλικών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παράγονται κάθε χρόνο αναρίθμητες επιστημονικές έρευνες χωρίς όμως τη δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων τους ή τη δυνατότητα διεξαγωγής γενικών συμπερασμάτων. Για παράδειγμα, η δοκιμασία MTT, που χρησιμοποιείται κατά κόρον λόγω της ευκολίας της για τον χαρακτηρισμό της τοξικότητας υλικών χαμηλών διαστάσεων, να μεν δίνει αποτελέσματα και ποιοτικά και ποσοτικά για την επίδραση των ναοσωματιδίων σε ζωντανά κύτταρα στερείται όμως της δυνατότητας σύγκρισης με άλλης παραπλήσιας μελέτης καθώς δεν δίνει καμία πληροφορία για την ποσότητα των ναοσωματιδίων (δόση) που χρησιμοποιείται για κάθε κύτταρο ή για κάθε ταπήτιο. Ίσως το πιο σημαντικό πρόβλημα, λοιπόν, είναι η μη εύρεση μέχρι στιγμής κατάλληλου μετρικού συστήματος και η ατυχής χρήση των μέχρι τώρα μετρητικών συστημάτων που δεν κάνει εύκολη τη σύγκριση των ναουλικών. Για παράδειγμα, όταν έχουμε να χειριστούμε τόσο μικρές μονάδες ύλης με τόσο διαφορετικούς νόμους να τις διέπουν δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιούμε δοσιμετρικές μονάδες όπως αυτή της μάζας για να περιγράψουμε την ποσότητα τους. Πιθανόν μονάδες μέτρησης της δόσης όπως αυτή της επιφάνειας ή του αριθμού των σωματιδίων ανά μονάδα επιφάνειας να είναι καταλληλότερες και πιο εύστοχες για τη συγκεκριμένη περίπτωση υλικών.

Τέλος, ένα γενικό συμπέρασμα είναι ότι η ναοτεχνολογία δεν έχει μόνο πολλές προοπτικές εφαρμογής αλλά είναι ίσως ο πρώτος τομέας που κάνει την διεπιστημονική έρευνα επιτακτική ανάγκη. Επιστήμονες διαφόρων τομέων επιβάλλεται να συνεργαστούν για καλύτερα και πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Είναι δηλαδή ένας τομέας που μπορεί να απορροφήσει πολλές αν όχι τις περισσότερες ειδικότητες.

Στο μέλλον, είναι επιθυμητή η μελέτη και ανάλυση των κινδύνων και της επικινδυνότητας (risk and hazard assessment) τέτοιων υλικών, κατασκευάζοντας, αν είναι δυνατόν, αλγόριθμο πρόβλεψης της μοίρας των ναουλικών σε εργασιακούς χώρους ή υπολογιστικό μοντέλο για την πρόβλεψη της συμπεριφοράς τους. Ένα ακόμα ενδιαφέρον κομμάτι που θα άξιζε να ασχοληθεί κανείς είναι ο πλήρης χαρακτηρισμός διαφόρων ναοσωματιδίων (φυσικών και τοξικών ιδιοτήτων) με σκοπό την κατασκευή βάσης δεδομένων και ταξινόμησης αυτών, κάτι που ήδη έχει αρχίσει να γίνεται τα τελευταία χρόνια σε επιδοτούμενα προγράμματα της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

# Παράρτημα 1

## Π.1.1. Πίνακες

Π.Π. 1 Φυσικοχημικές ιδιότητες σχετικές με την τοξικότητα. Πηγή: C. M. Sayes/ WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology, Vol.1 (2009) 660-670.

Ιδιότητα (Property)	Ορισμός (Definition)	Τεχνική (Technique)
Κατανομή Μεγέθους Σωματιδίων (Particle size distribution)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Η ποικιλία σωματιδίων ως προς το μέγεθος μέσα σε ένα δείγμα</li> <li>• Συνήθως αναφέρεται με το ακρόνυμο PSD</li> <li>• Τέτοιου είδους μετρήσεις δίνουν μια ένδειξη για το βαθμό συγκέντρωσης/συσσωμάτωσης</li> <li>• Η επιφάνεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό του PSD σε νανοσωματίδια, μόνο ξηρής κατάστασης</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)</li> <li>• Ηλεκτρονική Μικροσκοπία (TEM και SEM)</li> <li>• Οπτική αναφορά /διάκρεια ζώης</li> <li>• Ειδική Επιφάνεια (SSA BET)</li> </ul>
Μορφολογία (Morphology)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Το σχήμα και τα δομικά χαρακτηριστικά που κυριαρχούν σε ένα δείγμα σωματιδίων</li> <li>• Πληροφορίες για την αναλογία αναφέρονται μόνο σε μη σφαιρικά σωματίδια, η κρυσταλλική δομή για τα κρυσταλλικά υλικά και οι αλλοτροπικές μορφές για τα υλικά όμοιας χημικής σύστασης</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Περίθλαση ακτίνων X (XRD)</li> <li>• Περίθλαση ηλεκτρονίων (ED)</li> <li>• Φωτοηλεκτρική φασματοσκοπία ακτίνων X (XPS) γνωστή και ως ESCA–Φασματοσκοπία ηλεκτρονίων για χημική ανάλυση</li> </ul>
Χημική Σύσταση (Chemical Composition)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αναφέρεται στα στοιχεία από τα οποία αποτελείται το υλικό</li> <li>• Είναι δυνατή η προσκόμιση πληροφοριών σχετικά με την χημική τοξικότητα των εγγενών υλικών</li> <li>• Περιέχονται πληροφορίες σχετικά με τη σύσταση όχι μόνο του πυρήνα του υλικού αλλά και της επιφάνειάς του</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Φωτοηλεκτρική φασματοσκοπία ακτίνων X (XPS)</li> <li>• Φασματοσκοπία Raman</li> <li>• Φασματοσκοπία επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος ατομικής εκπομπής (ICP-AES)</li> <li>• Διαφορική θερμική ανάλυση (DTA)</li> <li>• Περίθλαση ακτίνων X (XRD)</li> <li>• Φωτοηλεκτρική φασματοσκοπία ακτίνων X (XPS) γνωστή και ως ESCA–Φασματοσκοπία ηλεκτρονίων για χημική ανάλυση</li> <li>• Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)</li> <li>• Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)</li> </ul>
Διαλυτότητα (Solubility)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Μέτρο του κατά πόσο ένα δοθέν υλικό μπορεί να διαλυθεί σε κάποιο υγρό</li> <li>• Συνήθως μετράται σε μάζα ανά μονάδα όγκου</li> <li>• Μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την υδροφιλικότητα, υδροφοβικότητα και λιποφιλικότητα</li> <li>• Η χημεία της επιφάνειας ενός σωματιδίου επηρεάζει άμεσα τη διαλυτότητα του</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Οπτική διαμόρφωση με την πάροδο του χρόνου</li> <li>• Μετρήσεις αγωγιμότητας</li> </ul>
Επιφανειακή Χημεία και Δραστικότητα (Surface Chemistry and Reactivity)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Η χημεία της επιφάνειας του υλικού</li> <li>• Πληροφορίες σχετικά με το στερεό σωματίδιο και τον υγρό διαλύτη είναι δυνατό να επιτευχθεί</li> <li>• Συχνά είναι αναγκαία περισσότερες της μιας δοκιμής για τον χαρακτηρισμό</li> <li>• Το φορτίο της επιφάνειας αποτελεί χρήσιμη μέτρηση</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Φωτοδιάσπαση του υδατικού Congo Red</li> <li>• Δυναμικό Ζ</li> <li>• Ισοηλεκτρικό σημείο (IEP)</li> <li>• Δοκιμή βιταμίνης C</li> <li>• Αιμολυτικό δυναμικό (Hemolytic potential)</li> <li>• Μαγνητικός συντονισμός ηλεκτρονίων (ESR) ή συντονισμός ζεύγους ηλεκτρονίων (EPR)</li> </ul>

Π.Π. 2 Κάποιοι παραστατικοί στόχοι που χρησιμοποιούνται σε φαρμακευτική αγωγή μέσω υποκαταστάτη.

Μόρια-Στόχοι	Μονάδα συνάφειας	Τοποθεσία Στόχου	Μεταφορά Στόχου	Εφαρμογή	Αναφορές
ACE	Ab	Επιφάνεια κυττάρου & caveoli	Μη καθορισμένη	Τραυματισμός ενδοθηλίων πνεύμονα	Biochem. J. 362 (Pt 3) (2002) 585–595 Int. Immunol. 6 (8) (1994) 1153–1160
Αμινοπεπτιδάση N	Πεπτιδίο NGR	Επιφάνεια κυττάρου & caveoli	Ενδοκύτωση Caveolar	Αγγεία στερών όγκων	Cancer Res. 60 (3) (2000) 722–727
Αμινοπεπτιδάση P	Ab και Ab-συμπληρωματικά πεπτιδία	Caveoli	Ενδοκύτωση Caveolar	Ενδοθήλια πνευμόνων	Nat. Biotechnol. 25 (3) (2007) 327–337
Αντιγόνο CD20 Β-λεμφοκυττάρου	Αντίσωμα (Rituxan*, Zevalin*, Bexxar*)	Επιφάνεια κυττάρου & αφθονία λιπιδίων	Επιφανειακή Εύρεση	Λέμφωμα Β-κυττάρων	Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 85 (2001) 161–166 Int. J. Pharm. 331 (2) (2007) 190–196
ErbB2	Ab (Herceptin*) & απταμερή	Επιφάνεια κυττάρων	Επιφάνεια κυττάρων & διαφορετικά “μονοπάτια”	Καρκίνος μαστού & ωοθηκών	Drugs 59 (4) (2000) 753–767
Υποδοχέας Φολικού Οξέως	Φολικό Οξύ	Επιφάνεια κυττάρου, caveoli	Μη καθορισμένη	Καρκίνος & φλεγμονή	J. Med. Chem. 53 (19) (2010) 6811–6824
gp60	Αλβουμίνη & Ab	Caveoli	Ενδοκύτωση Caveolar & διακυττάρωση	Αγγειακή στόχευση	J. Biol. Chem. 272 (41) (1997) 25968–25975
Υποδοχέας IGF-1	Ab και Ab-συμπληρωματικά πεπτιδία	Επιφάνεια κυττάρων	Ενδοκύτωση clathrin & διακυττάρωση	Καρκίνος	J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 13 (4) (2008) 471–483
Υποδοχέας LHRH	Πεπτιδία (Lupron*, Zoladex*)	Επιφάνεια κυττάρων	Ενδοκύτωση clathrin	Καρκίνος προστάτη	Prostate 45 (2) (2000) 158–166
MUC1	Ab & απταμερή	Επιφάνεια κυττάρων	Ενδοκύτωση clathrin	Καρκίνος μαστού & ουροδόχου κύστης	Cancer Cell 5 (2) (2004) 163–175
VCAM-1	Ab, Ab-συμπληρωματικά πεπτιδία & απταμερή	Επιφάνεια κυττάρων	Ενδοκύτωση clathrin	Όγκος αγγείων, φλεγμονή και αθηροσκλήρωση	JACC Cardiovasc. Imaging 2 (10) (2009) 1213–1222
Υποδοχέας VEGF	Ab (Avastin*), πεπτιδία & απταμερή	Επιφάνεια κυττάρων	Ενδοκύτωση clathrin	Αγγεία στερών όγκων	Cancer Res. 60 (18) (2000) 5117–5124 EMBO J. 19 (7) (2000) 1525–1533

Πηγή: Silvia Muro, *Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems*, *Journal of Controlled Release* 2012

Σημειώσεις: Ab=αντίσωμα, ACE=αντιγόνα σε μετατροπή ενζύμων, Απταμερή=μόνο μόρια συνάφειας βασιζόμενα σε νουκλεϊκό οξύ έχουν δείχθει, gp60=υποδοχέας αλβουμίνης (σιελο)γλυκοπρωτεΐνης 60, IGF-1=παράγοντας ανάπτυξης τύπου ινσουλίνης, LHRH=luteinizing hormone-releasing hormone; MUC1=βλεννίνη 1, VCAM-1=μόριο αγγειακής συνάφειας κυττάρων 1, VEGF= Αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας ανάπτυξης. \*=Εμπορικό όνομα Ab.

## Π.1.2. Πρότυπα ISO

Π.Π. 3 Υπάρχοντα πρότυπα σχετικά με τη νανοτεχνολογία.

ISO standard	Αντικείμενο	Κατάσταση
ISO/TS 27687:2008	Ορολογίες & ορισμοί για νανοαντικείμενα- Νανοδομημένα, νανοϊνες & νανόπλακες	Εκδόθηκε το 2008
ISO/TS 80004-3:2010	Λίστα ορισμών που σχετίζεται με νανοαντικείμενα άνθρακα	Εκδόθηκε στις 19/04/2010
ISO/TR 11360:2010	Μεθοδολογία για την κατηγοριοποίηση και ταξινόμηση των νανοϋλικών	Εκδόθηκε στις 12/07/2010
ISO 29701:2010	Δοκιμή ενδοτοξινών σε νανοϋλικό δείγμα σε βιολογικά συστήματα in vitro χρησιμοποιώντας τη δοκιμή “Limulus amoebocyte lysate (LAL)”	Εκδόθηκε στις 03/09/2010
ISO/TS 10867:2010	Χαρακτηρισμός μονοφλοιικών νανοσωλήνων άνθρακα χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία φωτοφωταύγειας εγγύς υπεριώθρου	Εκδόθηκε στις 15/09/2010
ISO/TS 80004-1:2010	Ορισμοί βασικών όρων στο πεδίο της νανοτεχνολογίας	Εκδόθηκε στις 06/10/2010
ISO/TR 12802:2010	Καθορίζει τις βασικές έννοιες για τη νανοτεχνολογία σε μοντέλο ταξινομικού πλαισίου με σκοπό να διευκολύνει την επικοινωνία και την προώθηση της κοινής κατανόησης	Εκδόθηκε στις 15/11/2010
ISO/TS 11251:2010	Καθορίζει μια μέθοδο για τον χαρακτηρισμό των πτητικών συστατικών σε δείγματα μονοφλοιικών νανοσωλήνων άνθρακα χρησιμοποιώντας εξελιγμένη μέθοδο ανάλυσης αερίων/αέρια χρωματογραφία φασματοσκοπίας μάζας ( EGA/GCMS)	Εκδόθηκε στις 22/11/2010
ISO 10801:2010	Περιγράφονται οι απαιτήσεις και συστάσεις για την παραγωγή μεταλλικών νανοσωματιδίων ως αερολύματα κατάλληλα για δοκιμές τοξικότητας μέσω της εισπνοής με τη μέθοδο εξάτμισης/συμπύκνωσης. Η εφαρμογή περιορίζεται σε μέταλλα όπως είναι ο χρυσός και ο άργυρος.	Εκδόθηκε στις 02/12/2010
ISO 10808:2010	Καθορίζει τις απαιτήσεις και παρέχει καθοδήγηση σχετικά με το χαρακτηρισμό νανοσωματιδίων σε θαλάμους έκθεσης εισπνοής με σκοπό τοξικές μελέτες σε σχέση με τη μάζα, την κατανομή μεγέθους, τη συγκέντρωση σε αριθμό και τη σύνθεση των νανοσωματιδίων.	Εκδόθηκε στις 02/12/2010
ISO/TS 10798:2011	Καθορίζει τις μεθόδους για τον χαρακτηρισμό της μορφολογίας και τον προσδιορισμό της χημικής σύστασης καταλυτών και άλλων ανόργανων προσμίξεων σε σκόνη ή υμένα ακατέργαστων και καθαρών μονοφλοιικών/πολυφλοιικών νανοσωλήνων άνθρακα, χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης και φασματοσκοπία διασκεδαζόμενων ακτίνων X.	Εκδόθηκε στις 14/07/2011
ISO/TS 10868:2011	Παρέχει κατευθυντήριες γραμμές για τον χαρακτηρισμό ουσιών που περιέχουν μονοφλοιικούς νανοσωλήνες άνθρακα, με οπτική φασματοσκοπία απορρόφησης.	Εκδόθηκε στις 17/08/2011
ISO/TS 80004-7:2011	Αναφέρεται σε όρους νανοτεχνολογιών που σχετίζονται με τον τομέα υγείας (διάγνωση/ θεραπεία)	Εκδόθηκε στις 29/09/2011
ISO/TS 13278:2011	Προσδιορισμός στοιχειακών ακαθαρσιών στους νανοσωλήνες άνθρακα με τη χρήση φασματοσκοπίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος.	Εκδόθηκε στις 31/10/2011



Π.Π. 4 Υπάρχοντα πρότυπα σχετικά με τη ναυοτεχνολογία (συνέχεια).

ISO standard	Αντικείμενο	Κατάσταση
ISO/TS 12805:2011	Περιλαμβάνει οδηγίες σχετικά με τον καθορισμό φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών κατασκευασμένων νανοαντικειμένων, που ενδέχεται να επηρεάσουν τις επιδόσεις ή την περαιτέρω επεξεργασία τους.	Εκδόθηκε στις 08/11/2011
ISO/TS 11308:2011	Παρέχει κατευθυντήριες γραμμές για τον χαρακτηρισμό δειγμάτων που περιέχουν μονοφλοιικούς νανοσωλήνες άνθρακα με χρήση TGA σε περιβάλλον αέρα.	Εκδόθηκε στις 08/11/2011
ISO/TS 11888:2011	Περιγράφει μεθόδους για τον χαρακτηρισμό παραγόντων μεσοσκοπικών σχημάτων νανοσωλήνων πολλαπλών τοιχωμάτων με τις τεχνικές του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης, του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διερχόμενης δέσμης, της ιξωδομετρίας και της ανάλυσης σκέδασης φωτός.	Εκδόθηκε στις 08/11/2011
ISO/TS 80004-5:2011	Παρέχει όρους και ορισμούς που έχουν σκοπό τη διασύνδεση νανούλικών και βιολογίας για διευκόλυνση της διεπιστημονικής επικοινωνίας.	Εκδόθηκε στις 21/11/2011
ISO/TS 80004-4:2011	Παρέχει όρους για υλικά όπου ένα ή περισσότερα συστατικά τους βρίσκονται στη νανοκλίμακα και οι ιδιότητες που παρουσιάζουν οφείλονται στην παρουσία αυτών των περιοχών νανοκλίμακας.	Εκδόθηκε στις 21/11/2011
ISO/TR 10929:2012	Προσδιορίζει τις βασικές ιδιότητες πολυφλοιικών νανοσωλήνων και το περιεχόμενο των προσμίξεων που χαρακτηρίζουν δείγματα όγκου πολυφλοιικών νανοσωλήνων και υπογραμμίζει τις κύριες μεθόδους μέτρησης που διατίθενται στη βιομηχανία για τον καθορισμό αυτών των παραμέτρων.	Εκδόθηκε στις 20/01/2012
ISO/TR 13014:2012	Οδηγίες για τον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό τεχνητών νανούλικών για τοξικολογική αξιολόγηση.	Εκδόθηκε στις 08/05/2012
ISO/TS 10797:2012	Χαρακτηρισμός μονοφλοιικών νανοσωλήνων χρησιμοποιώντας το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.	Εκδόθηκε στις 29/05/2012
ISO/TR 13014:2012/Cor 1:2012	Δεν είναι διαθέσιμο	Εκδόθηκε στις 13/07/2012
ISO/TR 11811	Οδηγίες σχετικά με νάνο- και μικρο-τριβιολογικών μετρήσεων.	Σε εξέλιξη
ISO/DTS 11931-1	Νάνο-ανθρακικό ασβέστιο/Μέρος 1: Χαρακτηριστικά και μέθοδοι μέτρησης.	Σε εξέλιξη
ISO/DTS 11937-1	Νάνο-διοξείδιο του τιτανίου/Μέρος 1: Χαρακτηριστικά και μέθοδοι μέτρησης.	Σε εξέλιξη
ISO/DTS 12025	Ποσοτικοποίηση απελευθέρωσης νανοαντικειμένων από σκόνες μέσω της δημιουργίας αερολυμάτων.	Σε εξέλιξη
ISO/DTS 12901-1	Επαγγελματική διαχείριση των κινδύνων που διέπουν τα κατασκευασμένα νανούλικά-Μέρος 1: Αρχές και προσεγγίσεις.	Σε εξέλιξη
ISO/NP TS 12901-2	Επαγγελματική διαχείριση των κινδύνων που διέπουν τα κατασκευασμένα νανούλικά-Μέρος 2: Χρήση προσέγγισης ελέγχου “ζωνών” (banding).	Σε εξέλιξη

Π.Π. 5 Υπάρχοντα πρότυπα σχετικά με τη нанοτεχνολογία (συνέχεια).

ISO standard	Αντικείμενο	Κατάσταση
ISO/DTR 13329	Προετοιμασία δεδομένων ασφάλειας υλικών (MSDS)	Σε εξέλιξη
ISO/PRF TS 13830	Οδηγίες σχετικά με την επισήμανση μεταποιημένων ναοαντικειμένων και προϊόντων που περιέχουν τεχνητά ναοαντικείμενα.	Σε εξέλιξη
ISO/DTS 14101	Χαρακτηρισμός της επιφάνειας ναοσωματιδίων χρυσού για συγκεκριμένο έλεγχο τοξικότητας ναουλικών. Μέθοδος FT-IR.	Σε εξέλιξη
ISO/AWI TR 14786	Πλαίσιο για μοντέλα ονοματολογίας ναοαντικειμένων.	Σε εξέλιξη
ISO/DTS 16195	Οι γενικές απαιτήσεις για τα υλικά αναφοράς για την ανάπτυξη μεθόδων δοκιμών για τα χαρακτηριστικά, τον έλεγχο της απόδοσης και δοκιμές ασφαλείας για τα ναοσωματίδια και τις σκόνες ναοϊνών.	Σε εξέλιξη
ISO/NP TR 16196	Οδηγίες σχετικά με τις μεθόδους προετοιμασίας και εκτιμήσεις δοσιμετρίας για τα τεχνητά ναουλικά.	Σε εξέλιξη
ISO/NP 16550	Προσδιορισμός του μουραμικού οξέως (muramic acid) ως βιοδείκτη για τη δραστηριότητα των ναοσωματιδίων αργύρου.	Σε εξέλιξη
ISO/DTS 17200	Ναοσωματίδια σε μορφή σκόνης-Χαρακτηριστικά και μετρήσεις.	Σε εξέλιξη
ISO/NP TR 17302	Πλαίσιο για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης λεξιλογίου για τις εφαρμογές της ναοτεχνολογίας στον τομέα της ανθρώπινης υγείας.	Σε εξέλιξη
IEC/CD TS 62607-2-1	Ναοκατασκευές-Βασικά χαρακτηριστικά ελέγχου για την εφαρμογή υμενίων ναοσωλήνων άνθρακα-Ειδική αντίσταση.	Σε εξέλιξη
IEC/DTS 62622	Τεχνητά φράγματα που χρησιμοποιούνται στη ναοτεχνολογία- Περιγραφή και μετρήσεις των παραμέτρων ποιότητας που σχετίζονται με τις διαστάσεις.	Σε εξέλιξη
ISO/DTS 80004-6	Λεξιλόγιο-Μέρος 6: Μετρήσεις στη ναοκλίμακα και όργανα μέτρησης.	Σε εξέλιξη
ISO/NP TS 80004-8	Λεξιλόγιο-Μέρος 8: Διαδικασίες παραγωγής ναοσωματιδίων.	Σε εξέλιξη

## II.2.1. EUROPEAN UNION (EU) CLUSTERS AND PROJECTS FOR NANOSAFETY

### II.2.1.a EU CLUSTERS

The European clusters have as an objective to categorize all the potentials of nanotechnology. Specifically, scientific projects are grouped in distinctive clusters reflecting the main field of their research application or supporting policy-making. The clusters that exist today in nanotechnology are the latter that are described in the following table.

*Table 1* Existing clusters in the field of nanotechnology.

<b>CLUSTER</b>		<b>DEFINITION</b>
<b>Agrifood</b>		Creation of nano bio-industrial products, from nano-sensors that can measure water stress and plant diseases to those that can reduce the amount of fertilizers and pesticides used on crops, all the way to detecting bacterial pathogen contamination during food processing and post-harvest.
<b>Coordination &amp; Support Actions</b>		Coordinating nanotechnology research activities and policies, and those aimed at contributing to the implementation of the Framework Programmes and the preparation of future policies. Sharing and generating new knowledge in the nanotechnology field and promote innovation that will enable the manufacturing of new high value, competitive products.
<b>Nanomedicine</b>	<b>Diagnostics</b>	Pinpointing diseases with greater accuracy than ever before
	<b>Drug Delivery</b>	A whole range of different nano-vectors for drug encapsulation, guiding techniques to latch them onto their target and multifunctional nanotherapeutics are being developed
	<b>Regenerative Medicine</b>	Restoring, maintaining and repairing tissues & organ functions. Nanopatterning of biomaterial surfaces aimed at eliciting certain biological responses from the host tissue
<b>Environmental &amp; Human Safety (EHS)</b>		Contribution to civil security through novel detection, protection and identification methods
<b>Electronics, Information &amp; Communication Technologies(ICT)</b>		Miniaturized supercomputers, ultra-fast semiconductors and microprocessors and low voltage and high brightness displays. This field would quickly exploit all the potential applications of thin film transistors, molecular electronics and nanolithography

**Table 2** Existing clusters in the field of nanotechnology (continuing).

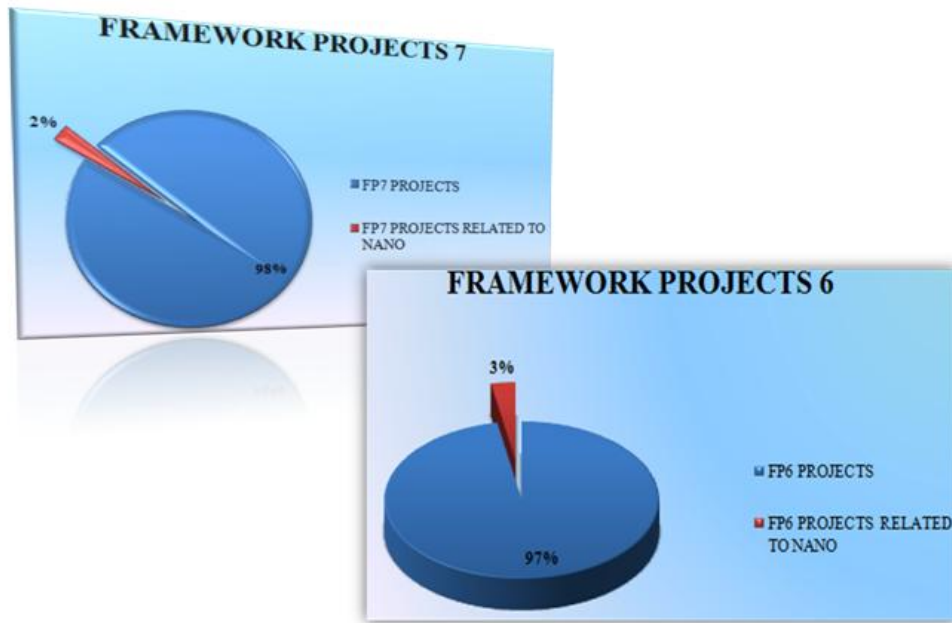
<b>CLUSTER</b>	<b>DEFINITION</b>
<b>ELSA (Ethical, Legal Social Aspects)</b>	Acceptance of NT developments by the general public after careful consideration of all their ethical, legal and social aspects
<b>Energy &amp; Environment</b>	Cheap and powerful renewable energy generation and clean water supplies are some of the main prospected benefits of this cluster
<b>Industrial Applications</b>	Some of the main production areas involving NT span from ultra-lightweight, highstrength, precision-formed materials to nano-composite polymers for structural, medical and electronic applications
<b>Nanomaterials</b>	Carbon-based nanomaterials, metal-based materials, dendrimers and nanocomposites use the properties of materials at the nanoscale
<b>Outreach &amp; Education</b>	Information about nanotechnology developments and future perspectives is being closely followed by public dialogue and social engagement about nanotechnology acceptance
<b>Security</b>	Nanotechnology can give a significant contribution to civil security through novel detection, protection and identification methods
<b>Textiles</b>	Antibacterial, MRSA-resistant bandages for medical applications or stain-resistant fabrics

\*Source: [http://ec.europa.eu/research/industrial\\_technologies/pdf/ec-nanotechnology-research-mapping\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/pdf/ec-nanotechnology-research-mapping_en.pdf)

Mapping Portal for Nanotechnology Research: FP6/7 Projects

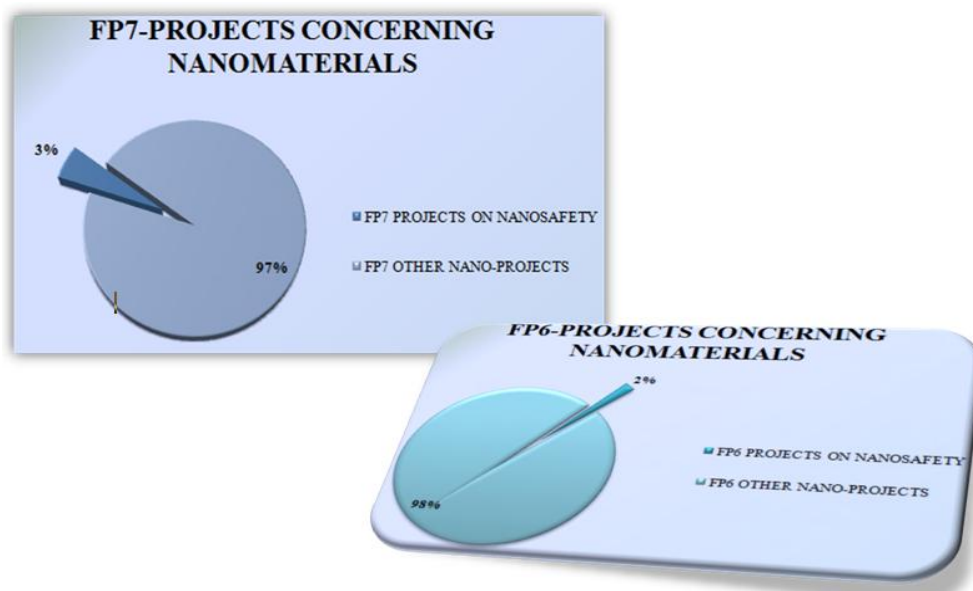
### **II.2.1.b EU NANOSAFETY PROJECTS**

The fast-pacing development of nanosciences and nanotechnologies is due to their great potential in improving the quality of life and in creating novel knowledge-based sustainable processes. This unprecedented "nano-pollution" may in fact pose risks to human, not only the manufacturers but also the end-users, animal health and the environment in general that we cannot evaluate at present because of the complete lack of appropriate instruments and bioassays. For that purpose, EU supports financially various projects that targeting the comprehension of these toxicological potentials of various nanomaterials. EU started by funding research for potential applications of nanomaterials and now has focused on toxicology research, as it can be shown in the figures that follow, in order to finally understand those complicated systems and successfully use them for their unique properties. However, there are a lot to be done if we want to safely introduce nanomaterials into market.

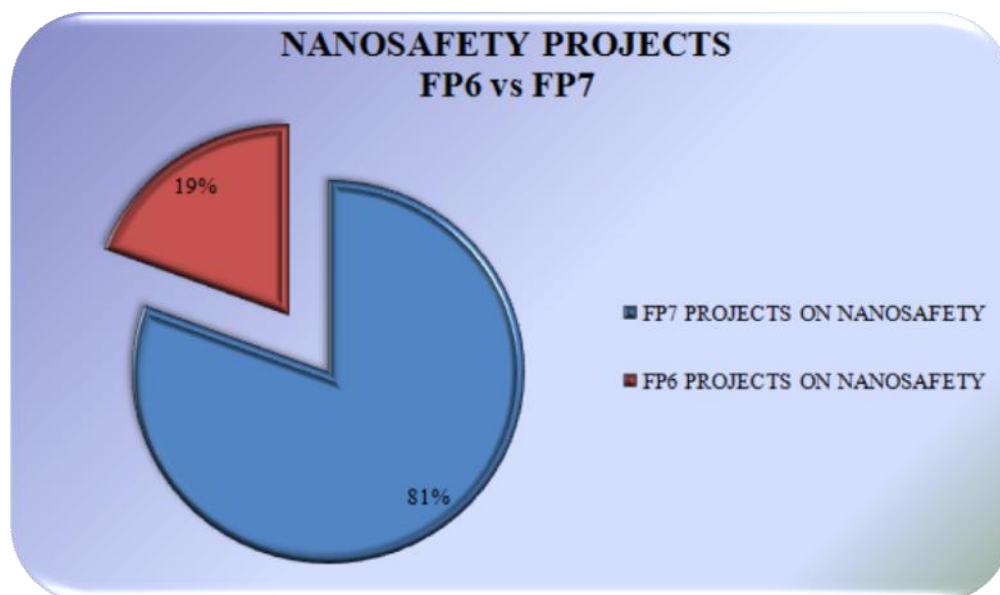


**Figure 1** FP6 and FP7 projects in comparison with projects related to nanomaterials and nanotechnologies.

It appears that during FP6 there are more projects concerning nanotechnology and nanomaterials than FP7. It should be mentioned that the majority of those projects concern the manufacturing of nanomaterials or/and nanodevices, the potential applications that may have in the domains of medicine and optoelectronics and less are regarding nanosafety issues such as toxicology assessment. That also is clearer from the following graphs. During FP7 new types of projects' fields appear such as network activities concerning nanotechnology or projects that have as objective the briefing of stakeholders about the risks and hazards of nanomaterials.



**Figure 2** Quantitative presentation of nanosafety projects in comparison with nano-projects in general.



**Figure 3** FP6 versus FP7 projects on nanosafety.

From the above figures, it is obvious that the interest in nanomaterials and in nanosafety especially, has been increased. It appears that during FP6 projects the nanosafety projects are much more than during FP7, however we should consider that during FP6 the number of funded projects are much less and that is the reason for that confusion.

To continue with, all the projects (FP6 and FP7) are presented in detail regarding their objectives as well as their workpackages in order to justify the above consumptions.

#### **5.5.2.1. CELLNANOTOX (FP6)**

The present proposal targets at the development of innovative multidisciplinary sets of tests and indicators for toxicological profiling of nanoparticles (NPs) as well as unraveling the correlation between the physicochemical characteristics of NPs and their toxic potential on various organs of the human body. For a comprehensive understanding of the complex data to be obtained on toxicology of NPs, based on in-vitro and ex-vivo studies, it will be employed conventional toxicology combined with the methodologies of toxicogenomics, metabonomics, Knowledge Discovery from Data (KDD-an organized process of identifying valid and novel models) and Data Mining (DM-the core of the KDD process, involving inferring algorithms that explore the data, develop the model and discover previously unknown patterns). This research program is focused towards understanding the relation of size and surface chemistry on the deposition, uptake, translocation, and toxicity of a few selected industrially important NPs as well as novel synthesized NPs, whose size and surface chemistry will be methodically modified. Here, the difficult part is the intentionally modification of those, as the total control of nanoparticles' chemical composition, size and surface state is still difficult to obtain. Since it was shown that the penetration of NPs into the human body proceeds principally through inhalation or orally,

whereas penetration through healthy skin is restricted, it has been chosen lung and intestine as the primary interacting tissues/organs with NPs, while liver, kidney and the immunological system have been selected to be the secondary major sites of interaction, following the penetration of NPs into the blood circulation. The interaction of the NPs with these different target organs will be studied by making use of alternative methods to animal experimentation by employing in-vitro cell systems as well as ex-vivo studies based on precision-cut slices of lung, liver and kidney. The various cellular systems showed somewhat different susceptibility towards the exposure to NPs, though the overall trend of the toxicological response was similar. The toxicological response depended on the cellular model as well as on the duration of exposure to NPs. Longer exposure time resulted in higher toxicity than a short one. Large part of the observed toxicity could be attributed to the effect of ions which leached from the NPs into the extracellular milieu whereas the problem is that the current methods for the detection of those free ions are colorimetric or atomic absorption which are restricted to relatively high concentrations. One of the consequences of being exposed to NPs was an oxidative stress imposed on the cells and an inflammatory response of the cells to NPs. It was finally verified, by using different methods, that NPs were able to internalize different cells. The present proposal addresses the needs of the European society for assessing the risk of occupational and general population exposure to industrially manufactured NPs. It will generate new knowledge on potential health risk or the absence of it, providing objective arguments for recommendations and regulations.

#### **5.5.2.2. DIPNA (FP6)**

The DIPNA project aims at creating and validating instruments and bioassays, and to propose to the EU and international communities' new parameters for detection of nanopollution and evaluation of occupational nanotoxicology, in order to promote prevention and nanosafety in manufacturing and handling. It divided into 6 workpackages, the production and physico-chemical characterisation of nanoparticles, the evaluation of NP interaction with human defence cells: selection of representative cell systems, the evaluation of one-to-one NP-cell interaction (definition of threshold and dose-dependent effects), the evaluation of chronic and repeated exposure (eco-nanotoxicity), the field validation and development platform, and the coordination, management, training, and public awareness. More specific, DIPNA project's aim was to provide knowledge about the impact of four different NPs (cobalt, gold, cerium and iron oxide) applied in wet suspension and in dry state on different types of cells (human immortalised THP-1, HepG2, CaCo-2 and A549 cell lines, murine 3T3, human CD34-derived Dendritic cells (DC), and human monocytes). The project developed also technological solutions concerning the set-up of singlet NP / cell interaction with sensors to evaluate the effects, a device for an automatic evaluation of the toxicological impact of nanoparticles, and instruments for field analysis of nanopollution in occupational sites. The results of the biological tests, carried out following the conditions of toxicological tests to assess the risks of molecules and ions, indicate that none of the NPs tested, either in dry or in wet conditions, affected the viability and capacity of proliferation of various cell types in

culture. No signs of apoptosis were detected. The immunological biomarkers selected, such as cytokines, chemokines and TLR expression, were not affected in a dose-dependent fashion in the time frame of the *in vitro* tests. A dose-dependent increase in the production of reactive oxygen species could be observed only for cobalt NPs. Also the expression of inflammation-related genes, such as IL-18Ra, TIR8 and caspase-1, was not modulated by NPs, either upon acute administration or when given in chronic or cumulative fashion over 15 days of cell culture. In the same conditions, silver NPs (used as control) likewise did not induce any relevant toxic effect nor could affect innate / inflammatory parameters. The finding that only cobalt NPs seem to have toxic effects is explained as follows. Cobalt NPs can corrode in the culture medium and release cobalt ions. The toxicity of cobalt ions is well known. They are not in an equilibrium state and can readily combine with other ionic species present in the medium or in cells, and affect cell functions. Thus, toxicity of cobalt NPs can be indirectly due to the release of cobalt ions, rather than the consequence of NP-cell interaction. The identification of cobalt phosphate particles after chronic exposure of cells to cobalt NPs suggests that NP corrosion and ion release is indeed occurring. Different systems were constructed to simulate singlet NP / cell interaction. Chips were built to monitor membrane changes by single cell impedance spectroscopy. A nanodispenser was devised for depositing NPs deposition in array format on cell culture supports. Microinjection techniques and Raman spectroscopy have been successfully combined with Principal component analysis (PCA) to detect the single cell / (few) NPs interaction. The singlet NP / cell interaction did not cause any measurable effect except for the appearance of signals in Raman spectroscopy. Such signals are due to phosphate groups present in NP-microinjected cells (but not in solvent-injected control cells), suggesting that microinjection of few NPs in a single cell affected the cellular phosphate metabolism. An interesting system was developed for the repeated spraying of dry NPs in air and in a liquid medium containing cells. The system works very well in air but not in the medium. An automated system was designed and constructed to measure the possible toxicity of NPs. The breadboard system consists of a small incubator with in-built controllers for CO<sub>2</sub>, temperature and humidity, a fluidic system with pump and valves to transport reagents and samples, and two optical detection units, for optical absorption measurement and for refractive index measurement respectively. The system detects the proliferation of A549 cells (untreated versus exposed to NPs) based on Alamar blue staining.

### **5.5.2.3. ENNSATOX (FP7)**

The use of engineered nanoparticles in cosmetics, pharmaceuticals, sensors and many other commercial applications has been growing exponentially over the past decade. EU and Member State's research into the environmental impact of these materials, particularly in aquatic systems, is at an early stage. ENNSATOX addresses this deficit through a, comprehensive investigation relating the structure and functionality of well characterized engineered nanoparticles, initially ZnO and later SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> and other metal oxides of varying morphology and dimension, to their biological activity in environmental aquatic systems. An integrated approach will assess the activity of the particles in a series of



biological models of increasing complexity. Parallel environmental studies will take place on the behavior of the nanoparticles in natural waters and how they modify the particles' chemical reactivity, physical form and biological activity. An integrated theoretical model will be developed describing the environmental system as a series of biological compartments where particles transport between a) compartments by advection-diffusion and b) between phases by a transfer function. Following optimization of the transfer functions a generic predictive model will be derived for the environmental impact of each class of nanoparticle in aqueous systems. A generalized understanding of the dependence of the nanoparticle biological activity on its structure and functionality will be obtained including the role and interaction of the biological membranes within organisms using biological models such as supported phospholipid membranes of increasing complexity, in vitro models of cell and tissue culture and in vivo models of several different species of key indicator organisms. ENNSATOX will generate exploitable IP (devices and ecotoxicology predictive software package), a set of standard protocols for assay of nanoparticle biological activity which can be later accredited, some global dissemination of results, the creation of an EU laboratory service, and tools combined with data to inform EU Regulation and the EC's code of conduct for responsible nanosciences and nanotechnologies research.

#### **5.5.2.4. ENPRA (FP7)**

The ENPRA (RISK ASSESSMENT OF ENGINEERED NANOPARTICLES) project is a major new European Framework 7 project to develop and implement a novel integrated approach for engineered nanoparticle (ENP) risk assessment. With an estimated economic impact of \$292 billion by 2010 across industrial, consumer and medical products, nanotechnology is already one of the key industries within Europe and worldwide. Key to its long term growth and sustainability is establishing end-user confidence that the technologies developed are safe. ENPRA (Engineered NanoParticle Risk Assessment) aims to support long-term growth and sustainability of nanotechnologies by expanding the classic exposure-dose-response paradigm of risk assessment, to develop an effective approach for the assessment and management of potential health risks from exposure to engineered nanoparticles. ENPRA consists of 7 complementary Work Packages (WP). The principal aim of ENPRA is to develop and implement a novel integrated approach for ENP Risk Assessment (ENPRA). This approach is based on the Exposure-Dose-Response Paradigm for ENP. This paradigm states that exposure to ENP of different physico-chemical characteristics via inhalation, ingestion or dermal exposure is likely to lead to their distribution, beyond the portal-of-entry organ to other body systems. The cumulative dose in a target organ will eventually lead to an adverse response in a dose-response manner. ENPRA's approach will adapt the traditional Risk Assessment approach to ENP and will cover: Hazard Identification; Dose-Response Assessment; Exposure Assessment, Risk Assessment and Risk Management. The specific objectives of ENPRA are:

- (i) for *Hazard Identification*: To characterize a panel of commercially available ENP carefully chosen to address the relevant hazards, properties and potential mechanisms<sup>1</sup>;

(ii) for *Dose-response Assessment*: To assess the hazards of these ENP by means of in vitro toxicology tests based on five body systems: (1) pulmonary; (2) hepatic; (3) renal; (4) cardio-vascular and (5) developmental, and five endpoints: (a) oxidative stress; (b) inflammation and immune-responses; (c) genotoxicity; (d) fibrogenicity and (e) developmental toxicity; (iii) To verify the in vitro findings with in vivo models;

(iii) for *Exposure and Risk Assessment*: To use data from this project and other sources (including US data) to: (1) model exposure and the exposure-dose- response relationships by means of mathematical modeling such as PBPK and QSAR-like methods, and extend these deterministic models into probabilistic models (2) to conduct the risk assessment with uncertainty analysis;

(iv) for *Risk Management*: To develop and implement a strategy for dissemination to maximize the anticipated high impact of findings.

#### **5.5.2.5. ENRHES (FP6)**

The overall aim of the ENRHES project is to perform a comprehensive scientific review of the health and environmental safety of fullerenes, CNTs, metal and metal oxide nanomaterials. The review considered sources, pathways of exposure, the health and environmental outcomes of concern, in the context informing the regulation of the potential risks of engineered nanoparticles. It has employed a standardized information management strategy and a matrix approach to maximize the gain to partners and beneficiaries involved with the review. The specific objectives will be to review information on: (a) production, use and exposure to the target engineered nanomaterials, (b) persistence, bioaccumulation and interactions of the engineered nanoparticles in living & environmental systems, (c) differences in toxicity posed by variations in size, type and chemical composition. The report includes an illustration of the state-of-the-art as well as on-going work, while identifying knowledge gaps in the field. Prioritized recommendations have been developed and set in the context of informing policymakers in the development of methods to address exposure as it relates to the potential hazards posed by engineered nanoparticles, and in the development of appropriate regulation. The review provides context for the materials chosen, in term of the production techniques, applications and market value. This is supplemented with the findings of an industry survey carried out in an attempt to gather up to date information on the quantities of various types of nanomaterials produced and used, the type of products in which they are used, any exposure data gathered and risk assessment practices employed. The review highlights the essential role which nanoparticle characterization plays in a variety of overlapping contexts ranging from fundamental and applied research, through process and product quality control and commercialization, to health and environmental protection. In the context of exposure assessment, the review shows that there is, in general, a paucity of published data. A wide range of instruments and approaches were used and exposures were reported in terms of number, mass and surface area concentrations, as totals and differentiated as a function of size. Similarly, the review highlights the general paucity of data in the area of environmental fate and behavior, which represents a major obstacle in developing a holistic view of the fate and

transport of nanomaterials within the environment and therefore environmental exposure. A substantial appraisal of the toxicity of nanoparticles is presented for each nanomaterial class, identifying the underlying mechanisms driving each of their toxicities, and determining whether any generalizations can be made regarding nanomaterials as a whole. When appraising the available epidemiology and human studies, the paucity of data relating to CNT, fullerene, metal and metal oxide nanoparticles, has required a broader approach. This draws upon the depth and breadth of knowledge available for a small number of nanoparticles which have been manufactured at the industrial scale for decades. The review of the literature on the ecotoxicity of nanoparticles has addressed aquatic toxicity, terrestrial toxicity, bioaccumulation, and degradability. A special effort has been put into translating the effects, found in the reviewed papers, into the terminology traditionally used in risk assessment, e.g. EC<sub>x</sub>- and LC<sub>x</sub>-values and NOEC/LOEC-values. The penultimate chapter presents a basic risk assessment, inspired by the REACH guidance, for the four types of nanomaterials under review based on the information provided by preceding chapters of the review. In conclusion, the review's findings strongly supports the further development of thorough characterization (including proper considerations of agglomeration/aggregation) of the nanoparticles in exposure media when conducting exposure assessment, as well as in the generation of data for determining exposure to both humans and the environment as well as assessing hazardous properties. Further testing strategies are required to be established to cover all relevant endpoints needed for a risk assessment. At present, carrying out risk assessment of nanoparticles can only sensibly be done on a case-by-case basis. Only when more data becomes available may it be possible to group nanomaterials according to their physical, chemical and/or biological properties or mode of action, so that testing could be done for representatives of each group.

#### **5.5.2.6. EURO - NANOTOX**

The basis of EURO – NANOTOX is the development, implementation and execution of standardized in vitro and in vivo methods for studying the toxicity of nano-structured materials. This is to create a virtual center, which on the one hand, nanostructured materials systematically examined for potential toxicological effects, and on the other hand, a mechanistic study on the toxicity of these materials is carried out. As a result of science and industry is at an early stage in product development offered the opportunity to explore a potential toxicity of their existing materials. By incorporating this knowledge, the appropriate materials specifically improve and their potential risks to the environment are reduced. Through the use of standardized methods in a quality assured environment can such expensive mistakes and a potential danger can be prevented at a later use. So the EURO – NANOTOX project also assists in the establishment of international standards which is very important for the scientific community as it allows the comparison of existing and future datas in a common basis. Furthermore, EURO – NANOTOX is setting up a European-wide network of national hubs for nanotoxicology in collaboration with already existing platforms. This network will help to interchange recent developments and developed methods between different European countries and promote the development of

European standards to help ensuring the successful development of nanotechnologies as a key for European growth. EURO – NANOTOX actively contributes to European projects dealing with regulatory aspects of nanotechnology (e.g. NANOFORCE) and plans to enlarge its initiative in this field in future projects.

#### **5.5.2.7. ENVNANO (FP7)**

The objective of the project Environmental Effects and Risk Evaluation of Engineered Nanoparticles (EnvNano) is to elucidate the particle specific properties that govern the ecotoxicological effects of engineered nanoparticles and in this way shift the paradigm for environmental risk assessment of nanomaterials. While current activities in the emerging field of nano-ecotoxicology and environmental risk assessment of nanomaterials are based on the assumption that the methodologies developed for chemicals can be adapted to be applicable for nanomaterials, EnvNano has a completely different starting point: The behaviour of nanoparticles in suspension is fundamentally different from that of chemicals in on solution. Therefore, all modifications of existing techniques that do not take this fact into account are bound to have a limited sphere of application or in the worst case to be invalid. By replacing the assumption of dissolved chemicals with a particle behaviour assumption, the traditional risk assessment paradigm will be so seriously impaired that a shift of paradigm will be needed. EnvNano is based on hypotheses such as that the ecotoxicity and bioaccumulation of engineered nanoparticles will be a function of specific physical and chemical characteristics of the nanoparticles, the environmental hazards of engineered nanoparticles cannot be derived from hazard identifications of the material in other forms and that existing regulatory risk assessment procedures for chemicals will not be appropriate to assess the behaviour and potential harmful effects of engineered nanoparticles on the environment. These research hypotheses will be addressed in the four interacting research topics of EnvNano: Particle Characterization, Ecotoxicity, Bioaccumulation, and Framework for Risk Evaluation of Nanoparticles aimed to form the foundation for a movement from coefficient-based to kinetic-based environmental nanotoxicology and risk assessment.

#### **5.5.2.8. HINAMOX (FP7)**

HINAMOX is a 7th Framework project that has started in October 2009 and is dedicated to the study of metal and metal oxide nanoparticles (NPs) such as TiO<sub>2</sub>, ZnO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CeO<sub>2</sub>, as potentially hazard to biological organisms. HINAMOX will accomplish an advanced work in the field of in vivo and in vitro studies of NPs. The importance of this work lays on the fact that will set the basis for proper dose relation quantifications and distribution studies both at cellular and body level. This represents indeed a milestone for the future definition of nanosafety regulations, standards definitions and for the assessment of the health effects of NPs on humans. Research in HINAMOX focuses on the correlation of materials properties to their toxicological endpoints. HINAMOX will provide knowledge on the biodistribution and biological fate of metal oxide NPs. To achieve this goal procedures for NP radiolabelling are being developed to allow for the application of PET and SPECT techniques. In parallel to the in vivo studies the work in HINAMOX will

be paramount in establishing quantitative data and practical procedures to determine the concentration and distribution of NPs at cellular level applying Ion Beam Microscopy, Confocal Raman Microscopy and Transmission Electron Microscopy techniques. The consortium generates new knowledge on the cytological and pathological response to NPs, targeting innovative work of the inflammatory response of the alveoli as a possible vehicle for the introduction of NPs in the body. Detailed analysis of NP leaching and dissolution for the assessment of NP biodegradability and residence times in tissue and lung-lining fluids will be developed. All together, these studies will make an important contribution to a deeper understanding of NP toxicology and will be fundamental on defining regulations where dose effect relation are required both at the cellular and body level. The project is coordinated by the Centro de Investigación Cooperativa en Biomateriales - CIC BiomaGUNE in Spain. During the first year of the project work activities have focused on the synthesis of metal oxide nanoparticles (NPs) that will be employed throughout the entire duration of the project:  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Y}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{CeO}_{2-x}$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . NPs have been characterised regarding, shape, size, size distribution and crystalline structure (phase identification). Zeta potential, stability and aggregation in relevant physiological conditions have been studied as well. NPs have been radiolabelled for biodistribution studies. A new approach has been followed based on 'cold' synthesis of NPs suitable for further activation in the cyclotron. NPs were synthesised using Oxygen-18 instead of natural Oxygen. A protocol for the enrichment of NPs with Oxygen-18 has been developed, which has been applied for the synthesis of  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs. Oxygen-18 was transformed into Fluorine-18 by bombardment with 18 MeV protons. The uptake, localization of NPs and their intracellular fate were studied applying a battery of experimental techniques: confocal Raman microscopy, transmission electron microscopy, ion beam microscopy and confocal laser scanning microscopy. Confocal Raman microscopy has been applied to study the uptake of metal oxide NPs in HepG2 cell lines employing the Raman signals of both the NPs and of the components of the cell to visualize the NPs in the cell interior. Time dependent experiments to visualize the uptake and localization of NPs within cells have been performed with transmission electron microscopy. Ion beam microscopy has also been employed to study localization of NPs in cells and their association with other elements present in the cells. Highest NP uptake has been measured for ZnO NPs. Initial work has been undertaken in the study of the immune response and cytotoxicity 'in vitro' in presence of NPs. Cell viability studies in A549, SK-MES-1, HELA cells and ATII cells show a toxicological effect of ZnO NPs at concentrations over 30  $\mu\text{g/ml}$  while Cell viability studies in the same cell lines with  $\text{FeO}_x$ ,  $\text{TiO}_x$  and  $\text{CeO}_2$  NPs show a non toxic effect for these NPs.

### 5.5.2.9. IMPART (FP6)

Nanotechnology is finding increased application in today's society and is being hailed as the next industrial revolution. Companies around the world are beginning to mass-produce nanoparticles (particles less than 100 nm in size) for use in everything from sunscreens to soil reclamation. The production of anthropogenically-derived nanoparticles will inevitably result in the introduction of these materials to the environment. However, despite rapid advances in nanotechnology, knowledge of the potential risks of nanoparticles to human health and the environment is limited. There is a concern that size matters with respect to toxicity, irrespective of the chemical composition. There are fears that materials that are biologically inert in bulk tend to become harmful in ultrafine particle form. Analogies have been drawn, for example, on the similarity of the structure of carbon nanotubes to asbestos fibres, whose detrimental effects on human health are well documented. There is a need to encourage greater understanding of the short and long term implications of nanotechnology for health and the environment. The primary aim of this CA is to prevent knowledge of the health and environmental implications of nanoparticles from lagging behind the technological advances. IMPART fostered communication links between a number of regional, national and international initiatives in order to reduce duplication of effort, pool expertise and facilitate co-operation between networks. This resulted in an improvement in the understanding of the potential impact of nanoparticles on human health and the environment. The 'Improving the understanding of the impact of nanoparticles on human health and the environment' (IMPART) project was started February 1, 2005 with CHALEX Ltd. as coordinator. Work package 1 (Project management) and work package 2 (Coordination of initiatives' activities) began in month 1 of the project, while work packages 3 (Risk assessment of the effect of nanoparticles on health and the environment) and 4 (Dissemination and knowledge transfer) began in months 14 and 13, respectively. The network web site went online in the first month of the project: <http://www.impart-nanotox.org>. This site includes a project summary, diary of events, details of the project consortium, discussion forum and a members' area for communication between partners. Once completed, a database of initiatives and activities in the field of nanotechnologies and health and environmental implications will be published online and updated regularly. Minutes of meetings and reports are published in the members' area of this web site and members are informed when additional content is made available. The project kick-off meeting was held in Brussels, Belgium in month 2 of the project. The first coordination seminar was held alongside the kick-off meeting. The aim of this seminar was to increase awareness of the consortium partners of other work being carried out in the field, such that they are able to adapt their own projects and make recommendations to minimise duplication of research efforts. The second seminar took place in Karlsruhe, Germany in Month 11. Expert group leaders were appointed during the kick-off meeting in Brussels and the first meeting of the expert groups was held alongside the first coordination seminar in Brussels. People from the consortium were split into expert groups according to experience and field of work. Members were divided into four agreed subdivisions of the topics materials for consideration, implications for human health and exposure and finally impact on the environment and resulting legislative

measures. The report of the deliberations from these meetings has been disseminated amongst consortium members and published online for the benefit of all those involved. The second meeting of the expert groups was held alongside the second coordination seminar and involved general discussion about the project and status of the work of the expert groups. Progress of work was discussed and gaps identified. Further specialization of topics was performed, with each major subject divided into subprojects. These contributions will sum up to an extended report from the expert meeting. After the first year, CHALEX was not able to provide all the necessary documents to the EC on time. Due to this situation the EC decided to suspend the project per June 14, 2006. Due to a TEMAS initiative an internal review meeting was held on September 12, 2006 in Zurich. At the meeting several actions were planned and decisions taken to reach the lifting of the suspension of the project as soon as possible. In order to reactivate the project and to bring it to a successful end, a new strong team under the new coordinator TEMAS with previous and new partners was established. Five out of twenty partners left the consortium and five new partners joined it for phase 2. In order to secure the main objectives of IMPART a new project planning, and new annex 1 for phase 2 (June 2007 - October 2008) has been elaborated. The key deliverables have been defined as an input report for phase 2 as summary IMPART phase 1 and the NanoTox project (Working report on the status quo of nanomaterials impact on health and environment), the assessment of existing and identification of missing data, the recommendation and guidelines for legislation policy makers, research policy makers, industry, public and other stakeholders (Guidance booklet) and the dissemination and knowledge transfer: project website, nano safety and risk database, main conference for policymakers, conference with opinion leaders, national workshops. The main exploitable results of IMPART include the database on nano safety and risk publications. In addition, four important reports emerged from the project the working report on the status quo of nanomaterials impact on health and environment, the recommendations and guidelines for legislation policy makers, the recommendations and guidelines for research policy makers and a guidance booklet on safe handling of nanoparticles for industry, public and other stakeholders.

#### **5.5.2.10. INLIVETOX (FP 7)**

In Europe and the United States, governments, non-governmental organisations (NGOs), and others have expressed concern that the number of consumer products incorporating nanomaterials is increasing, and that the safety of many of these materials has not been demonstrated. It is essential to investigate the hazard (toxicology) of engineered nanoparticles (NPs) in different formulations and at different points in their life cycle, in relation to different routes of exposure, target organs and tissues. INLIVETOX focuses on the impact of NP exposure via ingestion, in the healthy and diseased gastrointestinal (GI) tract, vascular endothelium and liver. Exposure via ingestion has largely been neglected in studies to date and is particularly relevant due to the inclusion of NPs in food, food packaging and oral medicines. The key questions that need to be answered and this study is involved with are first of all how do these tissues individually respond to NPs and how do the interactions between the different tissues modulate their

responses. Then how does inflammation affect the toxicity of NPs and their ability cross the intestinal barrier and which physico-chemical characteristics of NPs influence their uptake by intestinal epithelial cells and their subsequent interactions with endothelial and liver cells. The major innovative aspect of the INLIVETOX project is the implementation of biological tissue models in a modular fluidics system which allows multiple cell types to be addressed and interrogated in a single device, the INLIVETOX system. This system will be much more convenient and ethically less questionable than animal testing, as well as more relevant than the single / co-culture cell in vitro models currently used. The main objectives that this project has are to develop and validate a novel model for assaying ingested NP toxicity: the INLIVETOX system and to gain new insights into NP toxicity by ingestion. In the first reporting period, the project has produced a modular fluidics system for the connected culture of three different in vitro tissue models. An essential part of this system is the newly-developed ILT1 bioreactor. Much progress has also been made in the cell culture models to be studied using the INLIVETOX system. Common culture conditions have been defined that allow all three tissue models to be maintained under flow conditions and in a common culture medium. In addition, protocols for the assay of the viability and functionality of the tissue models within the fluidics system have been established. First results are now coming in on a two tissue model (vascular endothelium and liver) and the maintenance of a model intestinal epithelium within the ILT1 bioreactor has been demonstrated. Novel data about NP ingestion has also been obtained in in vivo biokinetics studies on the effects of exposure to gold NPs of different sizes by both ingestion and injection. These studies in rats have been completed by investigations of the hepatobiliary excretion of gold NPs. The expected final results and impact are a microfluidics INLIVETOX system, a protocol manual to construct, maintain and use the INLIVETOX system to assess the toxicity of NPs, uptake and toxicity data pertaining to the ingestion of a variety of NPs, an assessment of the new microfluidics system as an alternative to animal testing and as an improvement on mono-culture systems. These deliverables are in accordance with the long-term objectives of INLIVETOX which are to ensure the safe development and use of NPs for commercial applications and to commercialize a test system to screen NPs for their toxicity.

#### **5.5.2.11. MODNANOTOX (FP7)**

ModNanoTox is a small project that designed to develop a number of well-documented and technically advanced models describing the behavior of engineered nanoparticles in organisms and the environment. Background to these models will be a thoroughly documented database, constructed based on an advanced evaluation of physicochemical properties of nanoparticles and in silico modeling of their reactivity and on an assessment of the characterization methodologies as well as toxicity protocols used to develop biological responses in toxicological studies. At the next level whole datasets will be evaluated for internal consistency and then compared with other relevant sets. The evaluation stage will be followed by development of toxicity models based at the individual organism level, using statistical and mechanistic models, in parallel with models predicting environmental fate. The toxicity and fate models will be integrated in



mechanistic models to predict the long term risks of engineered nanoparticles for populations under realistic environmental conditions. The risk assessment models will be developed in close collaboration with appropriate stakeholders and end users to ensure their suitability for practical use in relevant legislative contexts. The key hypothesis for this is first of all that the toxicity of nanoparticles is the result of physicochemical properties and this has been documented reliably in completed/ongoing studies. Properties found to be relevant include size, surface area, structure and composition (WP1, 2). Also that nanoparticles' reactivity can be modelled computationally and can be linked to toxicity (WP1) and toxic responses from cell culture studies and whole organisms can be correlated and rationalized and can be translated into tools useful for model development (WP2). Furthermore, that bioaccumulation into cells or whole organisms can be characterized and modeled using biodynamic principles (i.e. by characterizing uptake rate constants from food and water as well as loss rate constants) (WP3) and toxic responses from cell culture studies and whole organisms can be modelled reliably by QSAR type approaches (WP4). Subsequently, that exposure concentrations can be assessed reliably and incorporated in appropriate models (WP5) and last but not least that the mechanistic effect models can be developed by extrapolation from ecological and (eco)toxicological observations and can be built into risk assessment models (WP6).

#### **5.5.2.12. NANEX (FP7)**

The aim of the NANEX project was to develop a catalogue of generic and specific (occupational, consumer and environmental release) exposure scenarios for MNMs taking account of the entire lifecycle of these materials. NANEX collected and reviewed available exposure information, focussing on high aspect ratio nanomaterials - HARNs) (e.g. carbon nanotubes), mass-produced nanomaterials (e.g. ZnO, TiO<sub>2</sub>, carbon black) and specialised nanomaterials that are currently only produced on a small scale (e.g. Ag)). The exposure information included both quantitative (measurement results) and qualitative contextual exposure information (risk management measures). It was also reviewed the applicability of existing models for occupational and consumer exposure assessment and for environmental release from these scenarios. A small number of specific case illustrations and a gap analysis of the available knowledge and data was carried out. Finally, project knowledge was disseminated to relevant stakeholders, taking into account other relevant activities that are taking place in this field. The NANEX project had as objectives to describe generic requirements for the development of exposure scenarios for MNMs, to collect and review exposure data, exposure metrics, risk management measures and existing models for the development of occupational exposure scenarios for HARNs, mass-produced MNMs and specialised MNMs, to collect and review exposure data, exposure metrics, risk management measures, and existing models for the development of consumer exposure scenarios for HARNs, mass-produced MNMs and specialised MNMs and data on environmental release, risk management measures, and existing models for estimating environmental release and exposure during the various life cycle stages of MNMs for HARNs, mass-produced MNMs and specialized MNMs. Also, to carry out a number of case illustrations collecting, in the context of REACH, detailed exposure

information for occupational, consumer and environmental release/exposure scenarios for specific MNMs (HARNs, mass-produced MNMs and/or specialised MNMs), to develop a catalogue database containing generic and specific exposure scenarios based on information collected during the project, to identify gaps in knowledge/regulation/standardisation with respect to development of exposure scenarios for REACH, exposure assessment and risk management measures and define research needs for occupational, consumer and environmental release/exposure scenarios and finally to disseminate information to stakeholders.

#### **5.5.2.13. NANOMMUNE (FP7)**

The NANOMMUNE project, funded by the European Commission through the Seventh Framework Programme, was launched on 1 September 2008 run for three years. The NANOMMUNE consortium is coordinated by Karolinska Institutet, one of the leading medical universities in Europe. A total of 13 principal investigators belonging to 10 different partner institutes are included in the consortium (Karolinska Institutet (KI)- Bengt Fadeel and Annika Scheynius, the Royal Institute of Technology (KTH)- Mamoun Muhammed, the Uppsala University (UU)- Maria Stromme, the University of Cologne (UCO)- Sanjay Mathur, the University of Turku (UT)- Riitta Lahesmaa, the Swiss Federal Laboratories for Materials Testing and Research (EMPA)- Harald Krug, the Institute of Occupational Medicine (IOM)- Lang Tran, the University of Pittsburgh (UP)- Valerian Kagan, Alexander Star, the National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)- Anna Shvedova and the North Carolina State University (NCSU)- Nancy Monteiro-Riviere and Jim Riviere). The management office (WP1) was set up at Karolinska Institutet and a project website has been constructed (see <http://www.NANOMMUNE.eu> online). Kick-off and consortium meetings were also held. For the scientific work during the first 18 months, the main activities were concentrated to WP2 (material synthesis and characterisation) and WP3 (in vitro assessment of ENs). To date, nanomaterials of 15 different systems have been studied. A number of standard operating procedures (SOPs) were established for material synthesis and characterisation, and for in vitro assessment of nanomaterials. Several original and review articles were published, including one review in Annual Review of Pharmacology and Toxicology, the leading journal in the field. Previous studies on macrophage recognition of apoptotic cells have revealed that the exposition of the phospholipid, phosphatidylserine (PS) on the surface of apoptotic cells serves as an important recognition signal for phagocytic cells. Four NANOMMUNE partners in Europe and the United States have now shown that coating of single-walled carbon nanotubes (SWCNT) with the 'eat-me' signal, PS makes nanotubes recognizable by macrophages, including primary human monocyte-derived macrophages and dendritic cells (Konduru et al., PLoS-ONE, 2009). Furthermore, project partners at the University of Pittsburgh reported on horseradish peroxidase-catalysed degradation of SWCNT (Allen et al., J. Am. Chem. Soc., 2009). These results mark a promising possibility for carbon nanotubes to be degraded in the environment. In addition, two NANOMMUNE partner institutes have reported on the interactions between mesoporous silica particles with human monocyte-derived

macrophages (Witasp et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., 2009). These findings are relevant to the development of mesoporous materials for drug delivery and other biomedical applications. Finally, several partners have played an active role in the dissemination of project results (WP7). The multidisciplinary approach of the current project contributed to the elucidation of the hazardous effects of ENs on the immune system, and enable reliable and sound assessment of the risks to human health posed by these materials. This studies benefit citizens, because we address issues related to human health, researchers because of the new knowledge in material production and on mechanisms of interaction of nanomaterials with biological systems and finally the industry (including SMEs), because it is planned to incorporate the characterization protocols into a quality handbook, which can provide support to interested parties.

#### **5.5.2.14. NANOPUZZLES (FP7)**

Following the recommendations by the EU REACH system and regarding ethical aspects, the risk assessment procedures should be performed with possible reduction of living animal use. The main objective of the NanoPuzzles project is to create new computational methods for comprehensive modeling the relationships between the structure, properties, molecular interactions and toxicity of engineered nanoparticles. The methods will be based on the Quantitative Structure - Activity Relationship approach, chemical category formation and read-across techniques. Those methods have been widely used in risk assessment of other groups of priority chemicals. But, because of some specific reasons, they cannot be applied directly to nanoparticles. We will be developing novel methods within four complimentary areas ("puzzles"), namely evaluation of physico-chemical and toxicological data available for nanoparticles (NanoDATA), developing novel descriptors of nanoparticles' structure (NanoDESC), investigating interactions of nanoparticles with biological systems (NanoINTER), and quantitative structure - activity relationships modelling (NanoQSAR). Developed methods will be tested and verified for their technical viability by the collaborating industry representative. By implementing the NanoPuzzles methods, extensive animal testing would be significantly reduced. Moreover, the project will deliver the basis for categorizing nanoparticles based on potential exposure, phys-chemical, structural and toxicological properties. To maximize its impact, the project is going to cooperate with other project as ModNanoTox, NanoTransKinetics, NanoSafety Cluster and NanoMedicine ETP.

#### **5.5.2.15. NANORETOX (FP7)**

NANORETOX aims to investigate the potential risks of engineered nanomaterials to the environment and human health by comprehensively addressing key questions such as how does the environment affect the physicochemical properties and the bioreactivity of nanoparticles, how does this impact on their ability to interact with and / or penetrate organisms and cells and will bioavailability result in toxicity, is there a pattern of cellular reactivity and / or toxicity related to physicochemical properties, what combination of conditions are most likely to pose a risk to human health and the environment and how can

this information be incorporated in a risk assessment model. A team of experts from across the European Union and the United States are working together to address these questions in depth. A description of each group involved can be found at <http://www.nanorettox.eu>. The specific scientific and technical objectives are to synthesize and fully characterize a set of engineered nanoparticles with a range of physicochemical properties using industrial and laboratory methods, to study the abiotic reactivity (transformations) of the synthesized nanoparticles in simulated environmental and biological media, to investigate in vivo uptake of nanoparticles by aquatic species and study mechanisms and paths of internalization, to investigate in vitro uptake and reactivity of nanoparticles and to discover putative mechanisms of toxicity, to consider the genotoxicity and carcinogenicity of metal nanoparticles, to determine whether cellular responses between human cells, mammalian cells, cell lines and invertebrate cells or whole organisms are comparable or different with relevance to screening models and to establish universal approaches to risk assessment model and risk communication. The key achievements during the project's first 18 months were specifically the development of a series of reference collection nanomaterials with reliable, reproducible and relevant properties. These 'model' nanoparticles were tailor-made for toxicity studies with well-controlled size, as well as other properties (e.g. same composition and shape, but different sizes, same size, different surface functionalisation). Furthermore the model particles were made available in a form suitable for (eco)toxicity experiments (e.g. excluding toxic surfactants, in stable aqueous forms). Along with these, industrially produced (plasma synthesis and milling) particles were also made available, as well as 'standard' particles where appropriate and bulk analogues. All particles delivered to (eco)toxicology partners were thoroughly characterized (Particle synthesis), preliminary indications of ecotoxicity, as a function of nanoparticle properties were demonstrated for some key nanoparticles from the reference collection (CuO, Ag, Au, TiO<sub>2</sub>). Other significant preliminary findings were: bioaccumulation by some organisms, even of aggregated nanoparticles in seawater, demonstration that metal containing nanoparticles yield bioavailable metals, more so than bulk particles and establishing of interspecies differences in bioaccumulation (Ecotoxicology) and preliminary results that suggest a size effect on toxicity of nanoparticles, with nanosized particles being more toxic than bulk analogues; furthermore, toxicity is nanoparticle specific, but also cell specific (e.g. in the case of Au nanoparticles) (Toxicology). The project results per work package are the following:

*WP1* has produced a range of well-characterised sets of ZnO, CuO, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, Ag, Au and CdS nanoparticles. Some of the particles were produced by the industry partners and some tailored to show properties that vary systematically, so that robust links to toxicity can be made. Reproducible protocols for all the syntheses have been developed and the produced sets of nanoparticles were thoroughly characterised and tested in a variety of (eco)toxicity experiments in subsequent Work packages (WPs).

*WP2* tested the stability of the above particles in a variety of conditions, with the aim to understand their behaviour in biological / environmental media, as well as their overall physicochemical response to changes of conditions such as temperature, pH and ionic strength. Major findings include: a) dissolution results, which indicated increased ion

release of metal ions from CuO and ZnO nanoparticles compared to their bulk counterparts, while TiO<sub>2</sub> remains relatively insoluble; b) the effect of temperature which appears to be reversible, i.e. an increase in size is observed while the samples are heated, suggesting agglomeration, but temperature decrease is sufficient to redisperse the particles; c) the behaviour of nanoparticles in different media shows different patterns depending on the composition of the nanoparticles and the type of stabilisation; however a common feature is aggregation even at modest increases in ionic strength; the presence of organics, humic acid or albumin, induces moderate aggregation.

*WP3* and *WP4* have tested nanoparticle toxicity on a selection of organisms: bivalve molluscs (*Scrobicularia plana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Macoma balthica*), a gastropod (*Peringia ulvae*), two species of polychaetes (*Nereis diversicolor*, *Capitella teleta*) as representatives of the estuarine and marine environment and two freshwater species, the gastropod (*Potamopyrgus antipodarum*) and the zebrafish (*Danio rerio*), under in vivo and in vitro (isolated mussel hemocytes and gill cells) conditions respectively. A number of particles from a variety of sources were tested (CuO, Ag, Au, CdS, TiO<sub>2</sub>, ZnO, SiO<sub>2</sub>) and produced an extensive set of ecotoxicity results for a range of nanoparticles and organisms, as a function of nanoparticle properties, demonstrating bioaccumulation by some organisms, even of aggregated nanoparticles in seawater, higher than bulk bioavailability, interspecies differences in bioaccumulation and nano-specific toxicity effects. Some trends can be generalised from the data available to date: a) bioavailability of metal nanoparticles and toxicity is generally similar or lower than that of dissolved metal but higher than bulk, thus indicating a specific nanoeffect; b) no evidence of toxicity, despite bioavailability, from SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, and ZnO, but some evidence of toxicity from CuO, to the organisms tested and at the environmentally relevant concentrations tested; c) variations observed between species may reflect differences in their habitat or biological functionality (e.g. digestive system) and need to be explored further.

*WP5* and *WP6* used in vitro models to examine cellular responses to nanoparticles and carcinogenicity / genotoxicity respectively. The work was based on the hypothesis that the cellular reactivity of the particles will critically depend both on the target tissue and the function of the cell type within that tissue. Cellular and molecular reactivity of selected metal nanoparticles were investigated in a) primary mammalian and human cells and b) in a panel of established human cell lines. A relatively wide range of tissue sources was covered, to include the lung, skin, immune blood cells, gut, kidney and liver. In general, both TiO<sub>2</sub> and Au nanoparticles were found to have no toxic effect, regardless of size, with the exception of the smallest (5 nm) Au nanoparticles, which caused a (striking in some models) dose-related toxicity. Of interest is that cells derived from the key detoxifying organs in the body, lung and liver, are most resistant to even the smallest Au nanoparticles. However all tested gold nanoparticles (AuNP) were able to interfere with cell proliferation and to induce genotoxic effects, often with a significant dose-effect relationship, while the carcinogenic potential was not statistically significant for any of the AuNPs tested.

WP7 began the work of comparing and contrasting the findings from all previous WPs and looking into setting up a re-usable database of the project discoveries, which could be exported to other EU-funded projects (for example modelling projects).

WP8 started the work by reviewing three major pieces of European chemicals legislation (REACH, the Water Framework Directive and the Cosmetics Regulation) in order to evaluate 1) the extent to which risk assessments under these pieces of legislation are suitable for risk assessment of Engineered nanoparticles (ENPs) or 2) whether nanospecific adaptations to the risk assessment frameworks should be recommended. REACH and the Cosmetics Regulation were chosen since they regulate some of the most important uses of ENPs (e.g. cosmetics and industrial products). The Water Framework Directive aims to protect aquatic environments in the EU, and is thus essential for effective environmental risk assessment. The criteria for this evaluation are based on the experimental outputs of the project. Under NANORETOX, a substantial amount of data regarding fate, toxicity and ecotoxicity of selected metal ENPs was generated. The empirical approach allows to evaluate the risk assessment frameworks with regard to very specific criteria and thus gives the analysis another dimension compared to an analysis that would have been based solely on theoretical considerations.

In conclusion, NANORETOX has created a large and significant set of ecotoxicity findings. The importance of the produced work lies in the fact that the same sets of nanoparticles were studied in a variety of in vitro and in vivo models and nanoparticle properties (dry and / or in suspensions) were monitored to ensure no changes occurred during experimentation and thus give confidence to the toxicity studies. This has created a very important internally consistent and reproducible set of data that we are now working to complete, harmonize, summarize, publish and / or make available to other researchers to maximize the project impact.

#### **5.5.2.16. NANOSAFE 2 (FP7)**

The rapidly developing field of nanotechnologies presents many opportunities and benefits for new materials with significantly improved properties as well as revolutionary applications in the fields of energy, environment, medicine, etc. The industrial production and use of nanoparticles will be the driving force for the emerging new materials industry of the 21st century. In terms of economics, analysts have estimated that the worldwide market for nanomaterials will be 700-1000 billion Euro in 2011. However, the potential impact of these new materials on human health and the environment is viewed with apprehension. This new industry can only develop dynamically if these preoccupations are satisfactorily allayed.

This IP project follows up the first study supported by EC through the accompanying measure NANOSAFE funded under the 5th framework program. NANOSAFE2 project **had not the pretension to solve all the problems related to nanoparticle safety** but intended to treat thoroughly a limited number of reference particles and situations in order to bring the first effective industrial solutions. This project was complementary and necessary for future and running programs on nanomaterials such as: NANODERM,

NANOKER, etc. NANOSAFE2 addressed the whole chain of nanoparticles including *production, conditioning, storage, transportation, transformation into final product, during product life and at the end of product life* (disposal). NANOSAFE2 developed innovative detection, traceability and characterization techniques for engineered nanoparticles. Both air and liquid media were investigated. NANOSAFE2 created a data base on toxicology related to nanoparticles in order to collect and organize all the available knowledge from literature. Industrials had been solicited for sharing data or supporting toxicological tests for specific nanoparticles, they provided knowledge to the consortium regarding internal test results. A methodology, based on an innovative generic technology for analyzing toxicity of such nanoparticles, was the second major deliverable of SP2. It also developed advanced technologies to limit both exposition to nanoparticles and leaks to environment by designing safe production equipment, handling automation, dynamic confinement, individual protection devices, filtration, etc. New procedures developed in this program will then be qualified at three industrial sites in the frame of the global risk management strategy proposed in NANOSAFE2. Moreover it evaluated both societal and environmental impacts and contributed indirectly to new legislation and standardization measures relevant for nanoparticles, by involving regulatory bodies (HSL, HVBG-BIA which are members of CEN). This project insured a large dissemination of knowledge on nanoparticle safety by organizing workshops with worldwide standards organizations, promote population awareness, academic and professional training activities. To achieve those ambitious goals, NANOSAFE2 brought together during 4 years European industry leaders and innovative SME's which shared their expertise in production and integration of nanoparticles for various application fields. They were supported by research centers of internationally recognized excellence. Seven EU countries, including Slovenia, were represented within the consortium.

In a nutshell, NANOSAFE2 reaches the critical mass required to overcome the technical barriers for breakthrough innovation in securing all the industrial nanoparticle chain and reach social acceptability of this promising industrial domain.

#### **5.5.2.17. NANOSH (FP6)**

The present research project focused on occupational exposure to nanoparticles and their health effects. One goal of the research was to characterize the levels of exposure to specific engineered nanoparticles. Exposure levels were evaluated both under laboratory conditions and during the manufacture of the particles. The particles were characterized with respect to their morphology and particle-size distribution, surface activity, and potential for agglomerate formation. The overall goal of the project was to delineate the health effects of selected nano-sized particles relevant to the occupational environment. The health effects studied included genotoxicity, pulmonary inflammatory responses, and effects on the vasculature. The information gathered together with the state-of-the-art technology utilized in these studies increase our knowledge on nanoparticles and help to create a reliable basis for the evaluation of possible health risks associated with these new materials. This project brought together expertise from different research areas highly relevant for assessing the safety of nanoparticles and will thereby significantly promote the

formation of new centres of excellence and a competitive European Research Area (ERA) in this rapidly evolving area. The findings of the project have also a significant socio-economic impact on European capability of conducting research and innovation in the area of nanotechnology. Assuring the safety of new nanomaterials is a crucial prerequisite for successful promotion of nanotechnological innovations and their applications in the future. This research creates a reliable and sound foundation for the assessment of safety of the chosen nano-sized particles and products containing nanoparticles and in this way encourages nanotechnological advances to support European national economies and the prosperity and wellbeing of citizens in the EU Member States. The project provides essential information which can be used on a wider basis for assessing occupational and other safety risks associated with the production and use of nanoparticles. Essential products that serve these scientific and technological goals are means and methods to characterize particle properties, ways to carry out reliable exposure assessments and models for assessing key-health effects - all important components of the safety evaluation of engineered nanoparticles. The consortium developed models for a thorough characterization of nanoparticles and their dispersions, which were used in the toxicity tests performed during the project. The models have been published and can be utilized by others, as well. A number of nanomaterials were selected for the NANO ATLAS database (available both in printed and electronic form), providing examples of the most relevant nanomaterials used in commercial applications such as carbon nanotubes, fullerenes, metal particles, metal oxide particles, quantum dots and some experimental nanoparticles. Furthermore a strategy for assessing exposure to ENPs in a range of workplaces was developed. Solutions for background discrimination were explored. A decision logic for determining whether workers were likely to be exposed to ENPs was developed. Measurements were carried out in many types of workplaces from university research laboratories to large-scale production plants, where a wide range of ENPs are produced or handled. The nucleus for a database was developed where results of workplace measurements are stored with the aim to be accessible for anyone to use and add data to. Methods were developed for genotoxicity assessment of nanomaterials in vitro and in vivo. Most nanoparticles were able to damage DNA in vitro and for TiO<sub>2</sub> this seemed to be due to primary oxidative DNA damage. No induction of malondialdehyde DNA adducts was seen, suggesting that secondary genotoxic effects due to lipid peroxidation were not involved. Mesothelial cells were more sensitive than bronchial epithelial cells to the DNA-damaging effect of nanoparticles. Some nanomaterials were also capable of increasing chromosome damage in vitro, zinc oxide showing the clearest effect. In human lymphocytes, structural chromosomal aberrations were only obtained by a prolonged in vitro treatment. Inhalation of TiO<sub>2</sub> did not affect the level of DNA or chromosome damage in mice. These findings were presented in a number of scientific publications. Also assessed was the toxicity and immune activation ability of five nanomaterials on antigen presenting cells that are the first responders of the immune defence and showed an induction of macrophage activation after exposure to all the materials studied. In vivo tests showed that healthy mice elicited pulmonary neutrophilia accompanied by chemokine CXCL5 expression when exposed to nanosized TiO<sub>2</sub>. Asthmatic mice showed remarkable suppression of most mediators and signs of allergic asthma when exposed to either



nanosized or coarse TiO<sub>2</sub>. We could see that levels of leucocytes, cytokines, chemokines and antibodies relevant in allergic asthma as well as airway hyperresponsiveness were all decreased or even returned to a level normal in healthy mice. Our results suggest that repeated airway exposure to TiO<sub>2</sub> particles modulates the airway inflammation depending on the allergic status of the exposed mice. Interestingly, the level of lung inflammation could not be explained by the surface area of the particles, their primary or agglomerate particle size, or radical formation capacity, but was rather associated with the surface coating. Findings emphasize that it is vitally important for risk assessment to take into account that modifications, e.g. by surface coating, may drastically change the toxicological potential of nanoparticles. The findings were published in the scientific literature. These in vitro and in vivo findings strongly corroborate the view that, in addition to size and shape, the surface chemistry of nanomaterials strongly affects their fate as well as their biological effects in vitro and in vivo and thus is a crucial parameter to be considered with regard to their toxicity but also concerning potential biomedical applications. The results obtained were reported in several original articles.

#### **5.5.2.18. NANOTOX (FP6)**

As nano-particles size crosses the barrier of 100 nm, many of the traditional laws break down and other effects and properties start dominating (quantum size effects, extremely high surface energy etc). This raises questions regarding the suitability of traditional methods, such as in-vitro test kits and in-vivo animal models used to evaluate their potential toxicity. It is therefore essential to understand the cell - nano-particle interaction at a fundamental molecular level in complex or simplified biological environments in order to assess their potential toxicity. Further on this foundation the modulation of the nano-particle properties will allow for optimal performance in drug delivery, bio-imaging, medical device coatings, bio-sensors, biochip development, bio-fouling protection and mitigate nano-toxicology. The major aim of this research endeavor is to study and understand the interactions that take place at the nano-bio interface, as a function of the particle size and the proteins from the biological environment that have been adsorbed on the surface of the particle. To achieve that we propose the utilization of two state of the art surface sensitive techniques, i.e. the Atomic Force Microscope and the Acoustic Biosensors, that will be used either separately or in combination for the study of the interaction force and the structural changes that occur. Initially these interactions will be studied on a simplified membrane model, to avoid complex interactions, a supported lipid bilayer, in order to understand the foundation of these interactions, and later transition to an in-vitro model, an actual cell, to study the interaction in a natural, more realistic environment. In this project, also will be documented potential methods of dispersal and contamination by nanoparticles and agglomerated nanocrystals (e.g. sorption, desorption, transport, aggregation, deposition, bio-uptake). The review will also address issues such as the physical and chemical properties of different types of nanoparticles and agglomerated nanocrystals, the manufacturing and use the human health effects including side effects, animal toxicology, the environmental impacts, the mutagenicity/genotoxicity, metabolism/pharmacokinetics, standards for safe use, safe laboratory methods etc. Current

research and development activities in Europe will be mapped and entered onto an on-line European database, which will be linked to existing web sites and databases of specialist groups. Standards, legislation, ethical issues, policies and codes of practice, at international and European level, which have been put in place or are under development, will be assessed and reviewed. Their implications and effectiveness will be discussed. Ways in which existing legislation is applied to the macroscale counterparts of nanoparticles will also be examined. Guidelines and recommendations for the institution of future European standards, legislation, ethics, policies, and codes of practise, for the safe production and use of nanoparticles will be produced. All potential impacts revealed by this SSA will be documented in the final report and disseminated via the specialised webpages on the Nanoforum & Nanotox websites.

#### **5.5.2.19. NEPHH (FP7)**

The purpose of this project is to identify and rate important forms of nanotechnology-related environmental pollution and health hazards that could result from activities involved in involved in silicon-based polymer nanocomposites throughout their life cycle, and to suggest means that might reduce or eliminate these impacts. Besides the positive multipurpose nano-reinforcement in materials and expanded devices applications, little is known about the environmental and health risks of certain manufactured nanomaterials. Initial research has indicated that nanomaterials can have a negative impact on human health and environmental pollution. For instance, carbon nanotubes may be more toxic than other carbon particles or quartz dust when being absorbed into the lung tissue. However, specific detailed research is required. More importantly, and fundamental to the success of nanotechnology, is the perceived safety of the technology by the public. To date, most of the research activities related with toxicological evaluation of nanotechnology based products have been focused on engineered nanoparticles as directly supplied from manufacturers. NEPHH project accounts that engineered nanoparticles, for most applications, are surface modified and generally embedded in the final product and therefore do not come into direct contact with consumers or the environment. So the interaction pathways of consumers or the environment with modified and embedded nanoparticles could very much differ from those with nanoparticles as directly supplied from manufacturers. Generated knowledge contributes to better understanding the human health and environmental impacts of the selected nanomaterials. Project's results set a basis for the establishment of required actions for the efficient management and minimization of risks. NEPHH also contributes to the acceptance of nanotechnology by the wide public, thus assuring its sustainable introduction into market.

During the first year of NEPHH, within *work package (WP)1*, working procedures for the production, storage and transference of samples have been developed. WP1 has developed and implemented a technological surveillance system to capture, evaluate and disseminate information released about a number of topics related to nanotechnologies and, more specifically, materials of interest within NEPHH including: health and environmental implications, sampling and sample preparation methods, physicochemical and

toxicological characterisation, protective systems and working practices when manipulating NMs, regulation and standardization in nanotechnologies, new uses and applications of NMs and events. Also in the frame of WP1, NEPHH has evaluated of in force health and safety procedures currently set in place for the minimization or elimination of such potential risks provides a global picture of the awareness of manufacturing companies, Research and development (RTD) laboratories and centres towards this specific issue. This evaluation has been carried out by the execution of an international survey whose main results can be obtained from NEPHH webpage. Finally, the consortium has defined the envisaged procedure for samples production, collection, storage, labelling and transference amongst partners. Such procedure is a relevant highlight of NEPHH, as it represents a first trial for the standardization of the testing approaches inside project consortium that could be later replicated at a major scale. Present document must be regarded as a living document that is periodically updated according to the outcomes generated within NEPHH and decisions undertaken. Outcomes of present research give detailed information on the actual position of key entities related with nanotechnology towards the safety and protection of their labor force and point out the current lack of information and knowledge about the risks associated to nanomaterials handling and the urgent need of high quality research and legislation development. Finally, a technological surveillance system has been designed, established and implemented.

During *WP2*, selected engineered nanomaterials have been synthesized and macro-scale structural specimens have been manufactured. Combinations of well characterized industrial and laboratory modified silicon based nano-particles and engineering matrixes have been carried out for the fabrication of macrostructural specimens. The production of macro-scale structural specimens involved a number of steps such as the selection and characterisation of silicon-based nanoparticles (nano)silica (SiO<sub>2</sub>), layered silicates (MMT), glass (nano)fibres (GF) and foam-glass-crystal (FGC) materials to be used as nano-reinforcing agents the selection and characterisation of engineering polymeric matrixes polyamides (PA) and polypropylenes (PP) as bulk materials and polyurethane (PU) as a foamed matrix and polymer nanocomposites preparation by using polymers and nanoparticles described in previous steps. Nanocomposites of PP and PA6 included four types of fillers: organically modified montmorillonite, nanosilica, FGC material and GF have been obtained by direct melt mixing in twin-screw extruders. In order to maintain high dispersibility of nanofillers in both apolar (PP) and polar (PA6) matrix selected nanofillers were used with proper surface functionalisation and macromolecular compatibiliser addition providing good compatibility with both types of polymers - nonpolar polypropylene and polar PA-6. On the basis of literature review and laboratory results eight different compositions (PP / MMT, PP / SiO<sub>2</sub>, PP / FGCM, PP / GFs, PA6 / MMT, PA6 / SiO<sub>2</sub>, PA6 / FGCM and PA6 / GFs) containing 5 % of nanofiller were selected as a suitable material for preparation of macrosamples that would be further examined in the scheduled physical tests and leaching experiments. Selected filler concentration provided the highest content of additive in the form of well distributed and not agglomerated nanoparticles. No other additives, e.g. thermal stabiliser, processing aids were used in order to avoid their influence on material's toxicity. Macrosamples for

physical processing were prepared by compression moulding technique. PU foam (PUR) was synthesized in a three-step process comprising the preparation of polyol premix with auxiliary components and nanoadditives, the introduction of blowing agent into polyol premix and the addition of isocyanate component. High-speed mechanical mixer was applied in order to enhance dispersion of nanoadditives and ensure proper mixing of reagents in the course of synthesis of PURs. Four types of nanoinduced PURs were prepared: PUR / montmorillonite (MMT), PUR / SiO<sub>2</sub>, PUR / Foam-glass crystal material (PUR / FGCM) and PUR / GF with 5 % of nanofiller. Reference samples of all the three engineering polymeric matrixes were manufactured without nanofiller content. Injection moulding bars of nanocomposites and foams have been examined in terms of structure, morphology and thermal properties by Wide-angle X-ray scattering (WAXS), SAXD, Thermal analysis (TA), Differential scanning calorimetry (DSC), Scanning electron microscope (SEM), POLM and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) methods.

In the execution of *WP3*, the nanoreinforced structures were impacted via low velocity impact testing and fractured dust specimens were obtained and sampled in a dedicated crash chamber. The characterisation of generated nanodust, clearly showed that the nanoparticle which was integrated in the polymeric matrix could be re-found in nanodust, but furthermore a hybrid particle of engineering matrix / nanoparticle could be detected. Mainly due to the fact that the potential exposure in high performance structures (aerospace, automotive) is deemed to increase when material fracture occurs, *WP3* focuses on potential exposures in the transport vehicles accidents, recycling centres, milling, sawing, machining, manufacture and testing of nanoreinforced composites. Ageing protocols are also being performed to evaluate the effects of silicon-based NMs on recycling and reclamation at the end of the final product life cycle. Furthermore, protocols for the evaluation and characterisation of nanoparticles release in incineration processes are being performed so that a holistic and integrated perspective of the different life-cycle scenarios of silicon based nanocomposites are investigated. Nanoparticles have been generated by impacting PU nanocomposites with different nanofillers via low velocity impact testing. Additionally, nanoparticles from PP and PA nano and fibre reinforced panels have been generated by mechanical drilling, as impacting of these materials generated low quantities of dust. Both these processes have been performed in special designed chambers. Released particles have been sampled and extracted by suspending them in solution. The solution has been filtrated in several steps and the physical and chemical properties have been characterised by means of SEM, Transmission electron microscopy (TEM) measurements and Dynamic light scattering (DLS) technique and nanosight (NS). The results show that by different processing methods nanoparticles can be generated. Moreover the characterisation has revealed that the physicochemical properties of the generated particles significantly vary depending on filler and matrix material.

NEPHH's *WP4* and *WP5*, run in parallel, asses the health and environmental implications of the selected engineered nanomaterials. They determine the potential impacts that released nanoparticles pose towards human health and the environment in comparison with alternative formulations excluding NMs. Such information if correlated

with models for NP release can be considered key contributions of NEPHH for NMs risk assessment. Results obtained in the frame of NEPHH illustrate new insight into nanoparticle behaviour and advice on a new dimension for NMs risk assessment, since the actual release of embedded NPs has been confirmed but, furthermore, hybrid particles comprising engineering matrixes and selected nanofillers have been detected. The main target of *WP4* is to assess the toxicological mechanisms and health impacts of selected NMs and to collaborate in establishing reliable and useful in vitro methodologies for the regulatory demands of the safety assessment of nanotechnological products. So far it is focused on assessing the in vitro toxicity of raw NPS -SiO<sub>2</sub> and MMT and NP released from PA, PU and PP polymer and polymer-silicon composites during mechanical processes, which represent typical scenarios of product application. Methods and protocols have been developed for NP toxicity assessment in a number of human cells. The toxicity of both NP released from polymer-composites and raw NPs has been demonstrated in some in vitro models. A number of methods and protocols for assessing NMs toxicity in vitro using different cell lines have been well established, which can be applied to toxicity assessment of NMs from other sources. In general the toxicological assessment of NPs released by means of mechanical processing (drilling, crashing) from polymer-silicon nanocomposites and collected and distributed by Cranfield University (two sets of samples have been produced including liquid suspensions and dry dusts) have shown no significant toxicological response in the different cell lines evaluated if compared with the non-reinforced reference materials. On the contrary, selected Silicon based materials (nanosilica and MMT) have shown a toxicological response. Additional work is on progress for the generation of novel sets of samples to be evaluated in terms of toxicity potential. The main objective of *WP5* is the assessment of the environmental life-cycle impacts of selected NMs as alternatives to conventional materials. This analysis also intends to provide a baseline Life-cycle assessment (LCA) of the alternative NMs. This evaluation involves studying the persistence, bioaccumulation, toxicity and ecotoxicity of such nanoparticles and, the analysis of their risks and hazards in different abiotic media. In general the ecotoxicological assessment of NPs released by means of mechanical processing (drilling, crashing) from polymer-silicon nanocomposites and collected and distributed by Cranfield University (two sets of samples have been produced including liquid suspensions and dry dusts) have shown no significant ecotoxicological response. In fact, none of the samples were toxic except the PA - SiO<sub>2</sub> but only at the highest concentration (90 % dilution V / V particle concentration estimated by CNRS= 35 mg / L). The intrinsic toxicity of targeted Raw NPs is actually under assessment. Additional work is on progress for the generation of novel sets of samples to be evaluated in terms of ecotoxicity potential. In the LCA field the most significant result is that life cycle stages not generally covered are being addressed, as it is the case of end of life and usage phases. Novel experiments are being set in place for the simulation realistic scenario that will also be used for an Ecological Risk Assessment specifically focused towards end of life, where main gaps of information currently exist for NMs (in general) and nanotechnology based products. Particularly in the FGC area, the evaluation of bioaccumulation and toxicity of FGC as an alternative to conventional insulation building materials has been carried out. FGC is a volumetric material, incorporating nanoscale structural elements, produced by heat treatment (approximately

800-850 degrees of Celsius) of amorphous matrix containing crystalline phase in the form of SiO<sub>2</sub>, when the crystalline phase in the foaming process is reduced to nano size. This estimate has provided an analysis of environmental risks and hazards of FGC in non-residential buildings. To identify environmental hazards logic and graphical analysis methods such as 'tree of failures' and 'tree of events' have been used. The studies indicate that FGC products meet European standards for health protection and preservation the environment at all the stages of their production and application which allows using this material in construction, ensuring the absence of toxic substances and possible danger to human health.

NEPHH's *WP6*, actually on progress, aims to make available the understanding of the safety, environmental and health implications of NMs in order to define the appropriate measures and minimize the exposure of workers. Guidelines for responsible management of waste NMs are also being developed. During the first year of NEPHH both these work packages have optimized and the adequacy of envisaged testing strategies and protocols by the use of NanoSilica (raw nanoparticle) has been verified. Adequate management and dissemination activities have been carried out, thus assuring the successful execution and dissemination of NEPHH.

In conclusion, NEPHH will contribute to ensure the generation of quantitative data on ENM toxicology and ecotoxicology and to close the knowledge gap, providing the basis for meeting regulatory requirements for responsible and sustainable development of nanotechnology. Validated testing strategies for novel materials are envisaged.

#### **5.5.2.20. NEURONANO (FP7)**

Considering the rapidly ageing European population and the resulting increase in the incidence of neurodegenerative diseases, there is an urgent need to address the risk presented by nanoparticles towards neurodegenerative diseases. It is believed that nanoparticles can pass through the blood-brain barrier. Once in the brain, nanoparticles have two potential major effects. They can induce oxidative activity (production of Reactive Oxygen Species), and can induce anomalous protein aggregation behavior (fibrillation). There are multiple disease targets for the nanoparticles, including all of the known fibrillation diseases (e.g. Alzheimer s and Parkinson s diseases). The factors that determine which nanoparticles enter the brain are not known. Nanoparticle size, shape, rigidity and composition are considered important, and under physiological conditions, the nature of the adsorbed biomolecule corona (proteins, lipids etc.) determines the biological responses. The NeuroNano project will investigate the detailed mechanisms of nanoparticle passage through the blood-brain barrier using primary cell co-cultures and animal studies. Using nanoparticles that are shown to reach the brain, it will be determined the mechanisms of ROS production and protein fibrillation, using state-of-the-art approaches such as redox proteomics and isolation/characterisation of the critical pre-fibrillar species. Animal models for Alzheimer's diseases will confirm the effects of the nanoparticles in

vivo. At all stages the exact nature of the nanoparticle biomolecule corona will be determined.

#### **5.5.2.21. NHECD (FP7)**

NHECD aims at building a free access, robust and sustainable web based information system including a knowledge repository on the impact of nanoparticles on health, safety and the environment. It includes a robust content management system (CMS) as its backbone, to hold unstructured data (e.g. scientific papers and other relevant publications). It also includes a mechanism for automatically updating its knowledge repository, thus enabling the creation of a large and developing collection of published data on environmental and health effects following exposure to nanoparticles. NHECD is based on text mining methods and algorithms that make possible the transition from metadata (such as author names, journals, keywords) to more sophisticated metadata (such as whether the paper contains graphs) and to additional information extracted from the scientific papers itself. These methods and algorithms were implemented to specifically extract pertinent information from large amount of documents. NHECD created a systematic domain model of concepts and terms (i.e. a wide set of domain taxonomies) to support the categorization of published papers and the information extraction process within this project. The unique features of NHECD should allow different user groups - academics, industry, public institutions and the public at large - to easily access, locate and retrieve information relevant to their needs. The creation of the NHECD knowledge repository enriches public understanding of the impact of nanoparticles on health and the environments. It will support a safe and responsible development and use of engineered nanoparticles and it will represent a useful instrument for the implementation of relevant regulatory measures and law making.

NHECD has achieved, to date, its major goals. At the end of month 18 (the end of the first period of the project) NHECD has by now achieved a backend system based on a robust content management system and its accompanying modules such as classification, full text search and more, a rich set of computer based taxonomies related to the NHECD target areas, a crawling system intended to navigate selected websites in order to obtain (automatically) all the relevant published material related to NHECD, a body of classified knowledge consisting of scientific papers related to in-vivo/in-vitro, ecotox and occupational nanotoxicology and an annotation and validation systems used to train the system to automatically extract information, as well as to build and maintain the above body of knowledge. Furthermore, it has been achieved an information extraction (IE) algorithms and methods especially crafted to create a layer of comments (in the context of NHECD the comments are an information layer on top of the scientific paper itself) to enhance the knowledge found on NHECD's body of knowledge (IE currently works at an acceptable recall and precision level), the first version (currently at test stage) of NHECD frontend, the interface of NHECD to the three communities targeted for it, namely nanotox scientists, regulators and the public, the frontend was designed to allow users to search for relevant information using a state-of-the-art graphical user interface (GUI) matching diverse types of users (regular users, sophisticated users and more), the GUI allows for

taxonomic search, simple/advanced search, full-text search and any combination of the above search methods, the initial management infrastructure for the backend, frontend and all related components such as the crawling module, the taxonomies and the classification module and at last a working relationship with groups of nanotox related people, including outstanding scientists and regulators. NHECD, soon to be at the end of the initial development phase, is now starting its second stage, aiming at the dissemination of the assets already obtained, while pushing forward towards the achievement of the objectives NHECD aims at.

This database will be automatically and manually updated with state-of-the-art information, which will be automatically understood and extracted into a relational database and data warehouse that can be accessed by the public and agencies through the internet. These three tiers (information gathering, deep analysis, and presentation) will keep the database updated and easily used for complex queries. The database will serve a variety of communities, from regulators to scientists, companies, new activities and the general public with all aspects of toxicity from nano particles. The database and the internet site will also serve for expert information cooperation and exchange and for dissemination of information in this evolving domain, which has huge potential applications, where toxicity should be considered in advance.

#### **5.5.2.22. NANOFATE (FP7)**

NANOFATE has been conceived to fill knowledge and methodological gaps currently impeding sound assessment of environmental risks posed by engineered nano-particles (ENPs). The objective is to assess environmental fate and risk of ENPs from high-volume products for which recycling is not an option, such as fuel additive, personal care and antibacterial products. Two market ENPs from each product (CeO<sub>2</sub>, ZnO, Ag of varying size, surface and core chemistries) will be followed through their post-production life cycles i.e. from environmental entry as spent product, through waste treatment to their final fates and potential toxic effects. This will test the applicability of current fate and risk assessment methods and identify improvements required for a scientific assessment of ENPs at an early stage. The specific objectives are at first the design, tagging and manufacture of ENPs and the analysis of ENP interactions with abiotic and biotic entities. Then, the generating predictive models for ENP exposure in waters and sludge-amended soils, the studying of both ENPs' fate and behavior through wastewater treatment and the determining acute and chronic ecotoxicity. Furthermore, some also important objectives of NANOFATE are the assessing effects of physico-chemical properties on ENP bioavailability, the defining mechanisms of uptake, internal trafficking, and toxicity, the developing spatial RA model(s) and the improving understanding of ENP risks Methodology. The work plan is designed to progress beyond the state-of-the-art through focused work packages. While some objectives are delivered in single WPs, good cross WP integration will secure the key objectives of delivering new methods for quantifying ENP risks. To conclude, NANOFATE will provide robust tools, techniques and knowledge needed by stakeholders to understand and communicate risks associated with different ENPs, including their environmental interactions and toxicity.



#### **5.5.2.23. MARINA (FP7)**

The aim of MARINA is to develop specific reference methods for all the main steps in managing the potential risk of ENM. MARINA will address the four central themes in the risk management paradigm for ENM: Materials, Exposure, Hazard and Risk. The methods developed by MARINA will be based on beyond-state-of-the-art understanding of the properties, interaction and fate of ENM in relation to human health and the quality of the environment and will either be newly developed or adapted from existing ones but ultimately, they will be compared/validated and harmonized/standardized as reference methods for managing the risk of ENM. MARINA will develop a strategy for Risk Management including monitoring systems and measures for minimizing massive exposure via explosion or environmental spillage. The specific objectives of MARINA are, *for Materials*, to obtain reference nanomaterials for testing, to develop validated methods for characterizing the physicochemical properties of ENM as pristine materials, in biological matrices, in environmental samples and field detection and to isotope-label ENM for their use in bio-distribution studies. *For Exposure*, to conduct exposure assessment in the workplace throughout the life-cycle of a ENM, developing different exposure scenarios. To assess the fate and behavior of ENM in soil/sediment/water. To characterize the actually released ENM (aged ENM) and compare them to the pristine ENM and to evaluate, as part of a performance assessment, different approaches to conduct exposure assessment for use in the MARINA integrated risk assessment. *For Hazard*, to address the knowledge gap, especially in areas of non-genomic toxic mechanisms, toxicogenomics, proteomics and metabolomics by developing new test systems, to develop reference methods for in vitro toxicology tests (including and fully incorporating those developed in other FP projects) by means of a scientific validation strategy, to implement in vivo dose-response models of healthy and susceptible subjects exposed through repeated dosing to ENM via inhalation, ingestion, intravenous injection and dermal exposure and to develop and scientifically validate in vitro and in vivo tests for soil/sediment/aquatic toxicity and secondary poisoning. *For Risk*, to combine all the above phases in developing reference methods for assessing the health and environmental risk posed by ENM and to develop a strategy for Risk Management including monitoring systems and measures for minimizing massive exposure via explosion or environmental spillage. MARINA is to achieve the objectives described above in 48 months.

#### **5.5.2.24. NANOMICEX (FP7)**

The main aim of NANOMICEX project is to reduce the potential risk upon workers exposure to the engineered nanoparticles employed in the operative conditions of the inks and pigments industry, by addressing at the health and environmental consequences associated with the inclusion of nano-additives within all stages of nanotechnology based products (production, use and disposal). To achieve it, new surface modifiers will be designed and developed to obtain less hazardous and more stable nanoparticles. The proposed work will focus on a selected set of nanoparticles relevant to the ink and pigment sector. Full characterisation will be carried out, followed by an exposure measurement in order to characterize and quantify any potential particle release in the production and

processing activities. A comprehensive hazard assessment will allow the evaluation of effects on human and environmental models with comparisons between simple and modified nanoparticles carried out. Results from the assessment studies will be used to compile a risk assessment of the use of nanoparticles in the ink and pigment industry, and comparisons will be made with surface-modified nanoparticles. An evaluation of the effectiveness of risk management measures will be undertaken in order to select and design practical and cost effective strategies, which will be easy to implement in the real operative conditions. As part of this assessment, we will conduct a life cycle assessment, by evaluating their impacts during the whole process of manufacture, use and disposal of these products.

The project results will involve industrial partners, providing an integrated strategy to mitigate the risk of workers dealing with nanoparticles, considering all relevant worker exposure scenarios. Furthermore, NANOMICEX will provide industrial stakeholders and the general public with appropriate knowledge on the risks of nanoparticles and nano-products, establishing synergies with the EU nano-safety infrastructure.

#### **5.5.2.25. NANOPOLYTOX (FP7)**

NANOPOLYTOX project will include the monitoring of the chemical and physical properties of the nanomaterials (NMs) included in polymer nanocomposites and their toxicity from the synthesis, processing, aging and recycling to their end of life (disposal) covering their migration or release to the environment during their life cycle. The biological and environmental fate of these NMs will be established taking into account the physical-chemical properties and the toxicological data obtained during NANOPOLYTOX. The theoretical analysis of the data obtained during the project will lead to the development of predictive models for the impact of NMs on human health and environment. Moreover, the overall human health and environmental impact will be assessed by Life cycle analysis (LCA) specifically designed for NMs. Additionally, three recycling strategies will be considered in order to give solutions for the disposal of both toxic and innocuous NMs. For this purpose, exhaustive evaluations including the selection of adequate digestion and extraction methods to separate the NMs from the polymeric matrix will be developed. The strategies proposed for the recycling process will be the direct mechanical recycling of nanocomposites (NCs), the recycling of NMs and polymers obtained by novel chemical separation techniques based on nanofiltration using tailored nanofibre-based filters and the recycling of polymers and immobilisation of toxic NMs in inert matrices. The specific objectives of the project are the preparation of eighteen highly pure and monodisperse NMs from three different families (carbon nanotubes, nanoclays and metal oxide nanoparticles) including adequate tailoring for their inclusion in three selected polymeric hosts widely used in several industrial sectors, the generation of 18 samples of NCs by processing in double screw extruders and further injection in test specimen, the weathering of the raw NMs and the 18 NCs test specimens in climatic chambers, the full characterisation (physical and chemical properties) of all the samples (raw NMs and NCs) during their life cycle to obtain an exhaustive overview of the evolution (physical and chemical degradation) of nanomaterials' properties along their life

cycle, the collection of (eco)toxicological data (in vitro and in vivo) for selected samples (NMs at the different stages of their life cycle) in order to evaluate the risks associated with their manufacturing, use and disposal and the development of predictive models based on the data obtained for the evolution of the properties and toxicity of the NMs along their life cycle, in order to contribute to nanomaterial risk assessments. Also, the detection and quantification of possible migrations and/or releases of the nanofillers from the polymeric matrices, establishing a relationship between weathering cycles and migration/release of NMs, the mechanical and chemical recycling for innocuous and toxic NMs including the development of a new, efficient and cost effective chemical recycling technology based on specific metal oxide nanofibre filters, the development of new solutions for the disposal of toxic NMs as complement for recycling processes based on the inclusion of specific metal oxide nanofibre filters (containing the toxic NMs) in xerogel matrices by sol-gel processes and sintering and the evaluation of the human health and environmental impact of NMs that are highly used in many industrial sectors during their life cycle by Life cycle inventory analysis (LCIA) specifically amplified by the data obtained during this and other European projects related to nanosafety.

In the first period of the project 18 NMs of three different families were synthesized, namely Carbon nanotubes (CNT), nanoclays and metal oxide NPs. In the case of CNT three different MWCNT including pristine and functionalized MWCNT. Nanoclays were functionalized by incorporating different modifiers in between the layers of these materials. Furthermore, nanoclays with different size distributions, which include the same modifiers, were produced. Three types of metal oxide nanoparticles (NP) were synthesized: TiO<sub>2</sub>, ZnO and SiO<sub>2</sub> and these NP were further functionalized (TiO<sub>2</sub>-OH, TiO<sub>2</sub>-Octyl, ZnO-OH, ZnO-Octyl, SiO<sub>2</sub>-OH, SiO<sub>2</sub>-Propyl) to facilitate their incorporation on different polymeric matrices. The 18 NMs were fully characterized using a variety of analytical techniques. All the characterisation data generated for each nanomaterial was organized in 18 different technical cards in which all the data is compiled. The cards have been uploaded into the partner's area of the NANOPOLYTOX website for enabling online addition and editing of the characterisation data for each nanomaterial. These cards were design for all the stages of the life cycle since the project will generate characterisation and (eco) toxicological data at different stages of the nanomaterial life cycle. The synthesised NMs were incorporated in different polymeric matrices. These matrices were selected based on studies done NC market in the latest years and their future projection in different fields of application. NCs of the three selected polymers (polypropylene (PP), polyamide 6 (PA6), ethylene vinyl acetate (EVA)) including 3 % of nanoclays, multi-wall carbon nanotubes and metal oxideNPshave been prepared via extrusion and injection moulding. The functionalities of the NMs have been selected taking into account the nature of the polymeric matrices (PP-hydrophobic, EVA-slightly hydrophilic, PA6-hydrophilic). The physical-chemical properties of specimens generated for each NC were characterised using different analytical techniques. Thermogravimetric analysis (TGA) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) were used to determine the percentage of nanomaterial in each NC and the thermal stability of the NC generated. DSC, heat deflection temperature (HDT) and Vicat, and dynamic mechanical analysis (DMA) were used to obtain the

mechanical properties and further the physical characterisation of NC materials. All these data combined with some microscopy analyses of the different NCs led to the identification of the NC with enhanced properties being related to the degree of dispersion of the NM in the matrix and the compatibility between the matrix and the nanomaterial. The NC generated in the project will be submitted to accelerated aging conditions in order to simulate their use as materials that will be exposed to external climatic conditions. Conventional climatic chambers have been modified in order to obtain a set-up that allows the collection of nanomaterial released during the aging process. The aging studies have been started with the 18 NMs in powder form exposed to ultraviolet irradiation and rain cycles simulating a real exposure time of one year. The aging of NMCs in the powder form was considered to establish the transformation as risks associated to these NMs when they are released to the environmental compartment during their production or distribution. The results showed that the changes in physical-chemical properties are not significant for most of the nanomaterials studied. However, further characterisation should be carried out and the toxicological evaluation is in progress. Some polymeric NCs have been aged and their characterisation is in progress, as well as the identification and quantification of the NM release during the aging process. The effects of processing (extrusion and injection moulding) on nanomaterials properties will be checked by extracting the NMs from the polymeric matrices under mild conditions. Therefore, these studies were initiated by selecting mild conditions that are able to dissolve the studied polymeric matrices (PP, PA6 and EVA). Furthermore, raw nanomaterials were submitted to these conditions in order to evaluate the effects of the dissolution methods selected on NMs properties. The change in the properties of NMs caused by the treatment with the selected conditions was identified and the highest effects were observed in ZnO NP when treated under mild acidic conditions. ZnO NPs are easily dissolved by acid treatment at room temperature, therefore ZnO-PA6 NCs cannot be dissolved under the established conditions, and alternative methods will be studied. Further work has been done in the fabrication of nanofibre-based filters. Optimization of these filters and description of the conventional separation techniques (nanofiltration and centrifugation) are in progress. The optimized methods will be used for the separation of NMs out of the dissolved mixture NM-polymer. The toxicity of raw NMs has been evaluated in a battery of human cell lines and in a fish embryo test and the toxicity evaluation of the aged NMs is now ongoing. A series of mechanistic assays, such as apoptosis induction, cell proliferation and cell internalization, have also been performed. The results show considerable differences in toxic potential and mechanisms of toxicity among the NMs of the project, but relatively good correspondence between the toxic potential in fish embryos and in human cell lines. The physicochemical characterisation data was generated for the nanomaterials' dispersions in relevant assay media, allowing the establishment of correlations between the nanomaterials' properties and their biological activity. Several ongoing studies are further investigating the toxicity and the environmental fate of the NMs. These studies include in vitro and in vivo ADME studies, terrestrial toxicity, bioaccumulation in fish, and adsorption-desorption studies. The project also includes the establishment of properties-activity relationships, and an LCA. Although a considerable amount of data has been already generated in the project, the information is still partial, and has not allowed much progress on the first section.

Regarding the second section, the progress consisted on the definition of the goal and scope, functional unit, and system boundaries, and on the data collection for the synthesis, functionalization, and NC manufacturing. In addition, the methodology to generate the characterisation factors for the relevant impacts associated to the NPs released into the environment (i.e. human toxicity and ecotoxicity) has been established. Finally, the project will include a study of the mechanical and chemical recycling of polymer nanocomposites. The separation methodology established earlier in the project, based on nanofibre-based filtration, will be applied to chemical recycling of NCs by separating the NMs from the polymeric hosts and use the recovered materials in new applications.

In conclusion, the NANOPOLYTOX project investigates the health impact of NPs in polymeric applications on humans and the environment. Moreover, a theoretical model on the evolution of nanofillers toxicities over their complete life cycle (processing - ageing - recycling) will be developed including also valuable results of migration and release in environment. This model will support the minimization of exposures to workers, consumers and environment. The NANOPOLYTOX project will provide crucial data on hazard and exposure by performing toxicity tests directly in human cell lines and in-vivo, expanding the NMs toxicity data pool. It is expected that NANOPOLYTOX, by means of the generated knowledge, will contribute to the establishment of directives and guidelines concerning the use and exposure to NMs. Directly related with human safety and risk is the application of NMs in packaging. Studies on nanotoxicity, regulation and risk-and-benefit analysis are necessary to fill the knowledge-gaps and to promote the sustainable growth of the food industry, while at the same time avoiding any unpredictable health hazard to the consumers. NANOPOLYTOX will contribute to gathering toxicological data which represent fundamental steps for the establishment of regulation to prevent unpredictable safety problems and risks. The impact of the NANOPOLYTOX project in economic terms is related to the handling of waste, recycling and recovery strategies, namely by improvement and development of new waste managing processes, the cost reduction related with waste processing, environmental remediation by the improvement of recycling and recovery methodologies and the significant manufacture cost reduction by allowing the reuse of recovered NM (recovery vs. recycling). The toxicological characterisation over the entire life cycle will be accompanied by the LCIA studies, which allow the monitoring of the environmental impact, together with the fate of NPs upon release on the environment. This thorough characterisation of NPs predicted in this project will allow the tracing of any possible changes of the toxicological profile on the lifetime course of the materials. NANOPOLYTOX focuses on NMs which along their entire lifecycle might come in contact with living organisms under different forms (aggregated, as a composite material or under particulate form) and will provide data from the study of physiochemical properties of the NMs about their environmental fate, their environmental and mammalian toxicology, the emission and exposure thresholds and in general about nanomaterials' safety datasheets and safety labeling.

#### 5.5.2.26. NANOVALID (FP7)

The proposed project will mobilize the critical mass of international scientific knowledge and technical expertise required to address these questions. Current analytical and toxicity test methods and models will be put to test and subjected to rigorous intercalibration and validation. Where necessary, methods and test materials will be modified, adapted and validated, and new reliable reference methods developed, in cooperation with international standardization bodies and the concerned industry, to support both pre and co-normative activities and to make the applicability of existing RA and LCA schemes to ENPs more reliable. The feasibility of validated measurement, characterization and test methods will be assessed by selected case studies to help the significant improvement of the performance of existing exposure monitoring systems as well as the development of new risk management and reduction strategies. The core idea and concept for the project is based on the observation that physicochemical properties of nano-sized particles, and hence their biological activity, are often unique and distinct from those of the same bulk materials and often unpredictable and the existing standard methods for measuring and testing that have been developed for macro- and micro-scale material properties may not be applicable to nanoparticles. These points taken together explain why many current analytical and toxicology protocols developed for bulk materials, may not be suitable for dealing with ENMs, and why a large proportion of the published data may be inaccurate in the context of ENMs and may lead to the drawing of scientifically invalid conclusions.

NanoValid will develop and use highly sensitive EN labeling and tracing methods and will design and use a controlled atmosphere dispersion chamber that allows a more precise and reliable monitoring of the behavior of selected nanoparticles. Initial test materials will include those listed below, although final prioritization will be made in close coordination with relevant standardization bodies and programs and with projects included in the Nanosafety Cluster (in particular with the EU FP7 MARINA, QNANO and NanoDevice project). The first nanomaterials that have priority to be labelled are metal oxides (SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO, CuO), metals (Ag, Au and Pd), CNTs (SWCNTs and MWCNTs) and fullerenes. Secondly, quantum dots (CdSe, CdS, CeO<sub>2</sub>), salts (Ca-phosphates, PbS), nanocellulosic materials, polystyrene, dendrimers, ceramics and nanoclays will be also labelled.

In general, the NANOVALID's objectives are the test, compare and validate current methods to measure and characterize physicochemical properties of selected ENMs, the monitoring and controlling their dispersion and stability in various test media and environmental matrices by novel labeling methods and the panels' generation of well-characterized and reproducibly synthesized ENMs, engineered nanoparticles (ENPs) and associated products, designed for further (eco-) toxicological testing. Also the test, compare and validate current in vitro and in vivo methods (for toxicity and ecotoxicity testing) to early identify potential hazards, assess human health effects, including acute and chronic toxicity (oral, inhalation, dermal), and effects to the environment, the development of a standard test panel according to the mode of action and interaction of ENMs and ENPs with experimental media as used in OECD and other standardized tests and the

identification responsive biomarkers for potential cytotoxic, genotoxic and immunotoxic effects. Moreover, the development of further validated methods and materials to reference methods and materials, including Certified Reference Materials (CRMs), for more reliable risk and life cycle assessment (RA and LCA), the feasibility's demonstration of validated and established reference methods by means of case studies to assess and improve the performance of methods and systems both during normal operations and for management of accidental risks, evaluation of risk reduction strategies and field detection systems, and for monitoring hazard and exposure to ENPs, the establishment of a database on hazard properties of selected ENPs that could be used to support the REACH hazard assessment system, the building of a comprehensive knowledge hub and database to improve existing models on transport and fate of ENPs in the environment, including bioaccumulation, persistence, bioavailability and life cycle impacts onto all forms of biota and in the end the initiation and supporting of focused efforts to achieve international standardization in cooperation with national (e.g. DIN) and international (e.g. OECD WGMN) organizations.

#### **5.5.2.27. QNANO (FP7)**

Nano-scale objects interact with living organisms in a fundamentally new manner, ensuring that a fruitful marriage of nanotechnology and biology will long outlast short term imperatives. Therefore, investment in an infrastructure to drive scientific knowledge of the highest quality will have both immediate benefits of supporting the safety assessment of legacy nano-materials, as well as pointing towards future (safe) applications with the lasting benefits to society. There are immediate priorities, for few doubts that serious damage to confidence in nanotechnology, unless averted, could result in missed opportunities to benefit society for a generation, or more. QNano will materially affect the outcome, at this pivotal moment of nanotechnology implementation. The overall vision of QNano is the creation of a 'neutral' scientific & technical space in which all stakeholder groups can engage, develop, and share scientific best practice in the field. Initially it will harness resources from across Europe and develop efficient, transparent and effective processes. Thereby it will enable provision of services to its Users, and the broader community, all in the context of a best-practice ethos. This will encourage evidence-based dialogue to prosper between all stakeholders. It will push beyond the state of the art in nanomaterials processing, labeling and identification and characterisation in situ. However, QNano will also pro-actively seek to drive, develop and promote the highest quality research and practices via its JRA, NA and TA functions, with a global perspective and mode of implementation. QNano will also look to the future, beyond the current issues, and promote the growth and development of the science of nano-scale interactions with living organisms. By working with new and emerging scientific research communities from medicine, biology, energy, materials and others, it will seek to forge new directions leading to new (safe, responsible, economically viable) technologies for the benefit of European society. QNano will also look to the future, beyond the current issues, and promote the growth and development of the science of nanoscale interactions with living organisms. By working with new and emerging scientific research communities from medicine, biology, energy, materials and others, it will seek to forge new directions leading to new (safe,

responsible, economically viable) technologies for the benefit of European society. The QNano project commenced on 1st February 2011 and will run for 48 months.

#### **5.5.2.28. SANOWORK (FP7)**

The SANOWORK project is built around the promotion, development and implementation of “Elimination/Substitution” control strategies and proposes to fill the gaps that already delay their diffusion. The main goal of Sanowork project is to identify a safe occupational exposure scenario by exposure assessment in real conditions and at all stages of nano-materials (NM) production, use and disposal. In order to address this and more specifically the issues introduced by NMP.2011.1.3-2 call, it is intended to contain hazard and worker exposure potential by developing exposure mitigation strategy based on Prevention through Design approach, implement a rigorous exposure assessment in the workplace in order to evaluate the effectiveness of existing and proposed exposure reduction strategies, perform risk analysis off line and on site in order to identify substance product properties and operational condition that ensure a safer worker exposure scenario and assess COST/ EFFICIENCY of the proposed strategies on the basis of risk analysis results, materials/properties efficiency, risk transfer to insurance underwriter community. The Sanowork proposed risk remediation strategy will be applied to nano-material properties. The representative pool of NM and nano-products have been selected are TiO<sub>2</sub> and Ag (ceramic or textile photocatalytic/antibacterial surfaces), CNTs (polymeric nano-composites) and organic/inorganic nano-fibers (nano-structured membranes for water depuration system). The strategy is addressed to mitigate risk by decreasing adverse health hazard and emission potential of nano-materials, setting back processes of transport to the point of entry. A sound balance between exposure and health hazards data, before and after the introduction of existing and proposed risk remediation strategies, will allow to evaluate the effectiveness of existing and proposed exposure reduction strategies. The cooperation with industrial key partners such as Plasmachem, Elmarco, GEA Niro, Colorobbia, Bayer will guarantee an accurate exposure assessment in the workplace.

#### **5.5.2.29. SCAFFOLD (FP7)**

SCAFFOLD is an industrial oriented idea specifically addressed to provide practical, robust, easy-to-use and cost effective solutions for the European construction industry, regarding current uncertainties about occupational exposure to MNMs particularly addressed to SMEs. This will be achieved by introducing a new paradigm to improve workers protection against NMs in construction, based on a novel holistic Risk Management approach (RMM). The aim of the SCAFFOLD project is to develop, test, validate and disseminate a new holistic, consistent and cost effective Risk Management Model (RMM) to manage occupational exposure to MNMs in the construction sector. This will be done by integration of a set of innovative strategies, methods and tools developed by the project into consistent state-of-the-art safety management systems (OHSAS 18001 and ISO31000). The SCAFFOLD project has specific objectives like to assess effectiveness of existing risk reduction strategies, methods and equipments (confinement of



processes, PPEs, filtration, etc) in construction scenarios, the development of novel methods leading to the formation of less risk-posing MNMs (safer concentrated dispersions of metal oxide nanoparticles for concrete manufacturing), the proposition of safer process alternatives for nanocomposites / coatings production jointly with safer nanocomposites and coatings formulations (minimizing emissions in machining / spraying tasks or in case of fire), the production of novel strategies and methods for exposure assessment (inhalation and dermal) and modeling adapted to the real sector scenarios, jointly with exposure data in the sector and a decision making strategy for risk assessment. Also, the development of novel risk protection strategies for the sector, including a proposed method for ISO standardization and a decision making strategy for PPEs selection and the adaption of the Control Banding approach to the sector, and the testing of it. Furthermore, another objective is to construct a robust and cost-effective model (RMM) for risk management of occupational exposure to MNMs along the life cycle. This will include a set of innovative tools (Toolkit) to support implementation and customized applications for SMEs of the construction sector, to test and validate the RMM and associated tools in construction industry (Industrial Use Cases in Large companies and SMEs) and to deploy a strategy to promote implementation of the SCAFFOLD approach in the European construction industry. In the end, to coordinate dissemination actions with the European Nanocluster to maximize the project's impact, to strengthen synergies among MNMs research groups in Europe, Canada and the USA and to produce pre-standardization and pre-regulation documentation addressed to standardization Technical Committees and regulators regarding construction nanoproducts, PPEs and OHS management issues.

#### **5.5.2.30. SIINN (FP7)**

The primary aim of the SIINN ERA-NET is to promote the rapid transfer of the results of nano-science and nanotechnology (N&N) research into industrial application by helping to create reliable conditions. In order to strengthen the European Research Area and to coordinate N&N-related R&D work, the project has the aim of bringing together a broad network of ministries, funding agencies, academic and industrial institutions to create a sustainable transnational programme of joint R&D in N&N. The commercial application of nano-materials (NMs) products is increasing rapidly, but one important question, the safety of NMs, still represents a barrier to their wide innovative use. Therefore the first priority of SIINN is to focus on developing a consolidated framework to address nano-related risks and the management of these risks for humans and the environment by investigating the toxicological behavior of NMs. European R&D activities in N&N remain largely uncoordinated and fragmented, resulting in the sub-optimal use of available resources, such as human resources, research equipment and funding. Since available data on their toxicological behavior is often scant, unreliable or contradictory, the SIINN Project will focus on ways of remedying this situation. After defining the criteria important for NM toxicology, the environmental health and safety (EHS) information currently available to Europe will be examined. Liaisons will strategically be established and maintained. They will network with organizations looking into the EHS of NMs within Europe and abroad with the aim of continually exchanging information with these. Available information will

be examined for their reliability in respect of the assessment of the risks of NMs towards human health and to the environment and major knowledge gaps identified. At least two joint, transnational calls will be organized during the initial lifetime of SIINN in order to fill these gaps. SIINN's activities will be undertaken in close cooperation with various national and international networks, organisations and groupings, including the NanoSafety Cluster, the QNano infrastructure, the OECD Working Party on Nanomaterials (WPNM), the NANO futures ETIP and NanoImpactNet.

The overall strategic concept of SIINN when applied to the example of nanosafety is to first catalogue which information is available to researchers and what state is it in (e.g. is the available data specified for a particular, defined NM in a defined system?). This is the central task of *Workpackage 1 (WP1)*. Parallel to this, *Workpackage 2 (WP2)* will establish close liaisons with organisations working in the EHS risk assessment of NMs, both within Europe and elsewhere, in order to form a close network and to exchange information. This cooperation will also include various strategically important tasks such as the identification of best practices, synergy potentials and the elaboration of recommendations for future collaborations on the strategic and operational level addressing NM EHS including precautionary measures, pre-normative work, steps towards regulations, common actions and projects. Together with this information, WP2 will also develop a roadmap to describe these future activities necessary in the risk assessment of NM. Starting a little later than the first two WPs, *WP3* will closely look at the EHS risk assessment of NM and (following on from WP1) will establish the reliability of the available data. Noting any irregularities or deficiencies, this WP will set down a list of research objectives which will be used as input to WP4, the WP charged with establishing the joint transnational research programme and carrying out tenders for R&D projects to assess these deficiencies. For the first time in the nanomaterials sector in Europe, joint transnational calls will be carried out in *WP4* to overcome identified deficiencies in current nanosafety knowledge for assessing the risks of NM and NM-containing products. All the stages associated with the carrying out of a research call will be undertaken in this WP, which will also have a “fast-track” mechanism which will allow for some small projects to be quickly undertaken in order to obtain critical results rapidly (rather than under normal project funding conditions). *WP5* will be responsible for the dissemination of information both within the project itself as well as to external recipients and stakeholders such as government bodies, industry, research organizations, standardization bodies and importantly, the public at large. Finally, *WP6* will oversee the complete work of the SIINN project and ensure that the tasks and deliverables are undertaken according to timetable and within the scopes required for the success of the project. WP6 will thus undertake the technical and administrative management of the project and will also include any horizontal issues such as Quality Management.

### 5.5.2.31. PRENANOTOX (FP7)

Since experimental toxicological testing of NPs, especially in vivo animal studies is costly and time-consuming, it is necessary to develop a novel research field and associated methods and tools to reach the goal of predictive nanotoxicology. The PreNanoTox consortium addresses three currently missing critical elements needed to develop a platform for predictive nanotoxicology and our suggested approach of providing them:

- (1) There is a current lack of unified large database We suggest to form this database by applying cutting edge information extraction tools on large repository of scientific articles;
- (2) There is a need for better understanding the underlying mechanisms of the primary interaction of NP with the cell membrane We suggest to apply appropriate theory and simulation assuming that the surface chemistry of a NP (affecting NPs surface reactivity, hydrophobicity, or surface electrostatics) as well as its other physical properties (e.g. size and shape) determine the strength of the non-specific adsorption of NPs to a cell surface, leading beyond a certain adhesion-strength threshold, to efficient uptake of the NPs;
- (3) There is a need to extend the traditional QSAR paradigm to the field of nanotoxicology This will be carried out by linking appropriate NP descriptors, with emphasis on those which determine the strength of adsorption of NPs to cells, with biological responses.

The PreNanoTox consortium is made up of four research groups (from three scientific organizations), which lead in information technology, soft matter modeling, computational chemistry and in-vitro toxicology, yielding a synergetic output. This project will assist in safe designing of new engineered NPs as well as reducing the extent needed for empirical testing of toxicity.

## TABLE OF EUROPEAN NANOSAFETY PROJECTS

ACRONYM	TITLE	FRAMEWORK PROGRAMM	START DATE	END DATE	STATUS	TOTAL COST	EU CONTRIBUTION
<b>CELLNANOTOX</b>	Cellular Interaction and Toxicology with Engineered Nanoparticles	FP6	2006-11-01	2010-04-30	<i>Completed</i>	3.651.500 €	2.600.000 €
<b>DIPNA</b>	Development of an Integrated Platform for Nanoparticle Analysis to verify their possible toxicity and the ecotoxicity.	FP6	2006-11-01	2009-10-31	<i>Completed</i>	4.535.199 €	2.793.235 €
<b>ENNSATOX</b>	Engineered Nanoparticle Impact on Aquatic Environments: Structure, Activity and Toxicology	FP7	2009-07-01	2012-06-30	<i>Execution</i>	3.655.315 €	2.816.500 €
<b>ENPRA</b>	Risk Assessment of Engineered Nanoparticles	FP7	2009-05-01	2012-10-31	<i>Completed</i>	5.269.000 €	3.700.000 €
<b>ENRHES</b>	Engineered Nanoparticles: Review of Health and Environmental Safety	FP6	2008-09-01	2009-08-31	<i>Completed</i>	279.659 €	199.938 €
<b>HINAMOX</b>	Health Impact of Engineered Metal and Metal Oxide Nanoparticles: Response, Bioimaging and Distribution at Cellular and Body Level	FP7	2009-10-01	2012-09-30	<i>Execution</i>	2.927.078 €	2.297.337 €
<b>IMPART</b>	Improving the understanding of the impact of nanoparticles on human health and the environment	FP6	2005-02-01	2008-10-31	<i>Completed</i>	699.913 €	699.913 €
<b>INLIVETOX</b>	Intestinal, Liver and Endothelial Nanoparticle Toxicity Development and evaluation of a novel tool for high-throughput data generation	FP7	2009-05-01	2012-07-31	<i>Completed</i>	3.420.762 €	2.399.989 €

## TABLE OF EUROPEAN NANOSAFETY PROJECTS (CONTINUING)

ACRONYM	TITLE	FRAMEWORK PROGRAMM	START DATE	END DATE	STATUS	TOTAL COST	EU CONTRIBUTION
<b>MODNANOTOX</b>	<i>Modeling Nanoparticle Toxicity : Principles, Methods, Novel Approaches</i>	FP7	2011-11-01	2013-10-31	Execution	1.279.137 €	999.899 €
<b>NANOMMUNE</b>	<i>Comprehensive assessment of hazardous effects of engineered nanomaterials on the immune system</i>	FP7	2008-09-01	2011-08-31	Completed	4.310.500 €	3.358.500 €
<b>NANOPUZZLES</b>	<i>Modelling properties, interactions, toxicity and environmental behaviour of engineered nanoparticles</i>	FP7	2013-01-01	2015-12-31	Accepted	1.169.800 €	976.810 €
<b>NANOSAFE2</b>	<i>Safe production and use of nanomaterials</i>	FP6	2005-04-01	2009-03-31	Completed	12.402.348 €	6.999.837 €
<b>NANORETOX</b>	<i>The reactivity and toxicity of engineered nanoparticles: risks to the environment and human health</i>	FP7	2008-12-01	2012-11-30	Execution	5.186.154 €	3.191.900 €
<b>NANOSH</b>	<i>Inflammatory and genotoxic effects of engineered nanomaterials</i>	FP6	2006-11-01	2009-10-31	Completed	3.995.225 €	2.399.234 €
<b>NANOTOX</b>	<i>Nanoparticle - Cell Interactions, a Pathway for Understanding Nanotoxicity: from a Model System to in-vitro System.</i>	FP6	2011-09-01	2015-08-31	Execution	100.000 €	100.000 €
<b>NANOFATE</b>	<i>Nanoparticle Fate Assessment and Toxicity in the Environment</i>	FP7	2010-04-01	2014-03-31	Execution	3.251.134 €	2.497.100 €
<b>NANOMICEX</b>	<i>Mitigation of risk and control of exposure in nanotechnology based inks and pigments</i>	FP7	2012-04-01	2015-03-31	Execution	4.799.593 €	3.535.290 €
<b>ENVNANO</b>	<i>Environmental Effects and Risk Evaluation of Engineered Nanoparticles</i>	FP7	2011-12-01	2015-11-30	Execution	1.196.260 €	1.196.260 €
<b>NANEX</b>	<i>Development of Exposure Scenarios for Manufactured Nanomaterials</i>	FP7	2009-12-01	2010-11-30	Completed	1.005.897 €	951.876 €

## TABLE OF EUROPEAN NANOSAFETY PROJECTS (CONTINUING)

ACRONYM	TITLE	FRAMEWORK PROGRAMM	START DATE	END DATE	STATUS	TOTAL COST	EU CONTRIBUTION
<b>NANOPOLYTOX</b>	<i>Toxicological impact of nanomaterials derived from processing, weathering and recycling of polymer nanocomposites used in various industrial applications</i>	FP7	2010-05-01	2013-04-30	Execution	3.297.287 €	2.433.555 €
<b>NANOVALID</b>	<i>Development of reference methods for hazard identification, risk assessment and LCA of engineered nanomaterials</i>	FP7	2011-11-01	2015-10-31	Execution	13.362.843 €	9.598.816 €
<b>NEPHH</b>	<i>Nanomaterials-related environmental pollution and health hazards throughout their life-cycle</i>	FP7	2009-09-01	2012-08-31	Completed	3.096.159 €	2.428.496 €
<b>NHECD</b>	<i>Nano health-environment commented database</i>	FP7	2008-12-01	2012-11-30	Execution	1.619.808 €	1.448.228 €
<b>NEURONANO</b>	<i>Do nanoparticles induce neurodegenerative diseases? Understanding the origin of reactive oxidative species and protein aggregation and mis-folding phenomena in the presence of nanoparticles</i>	FP7	2009-02-01	2012-01-31	Completed	4.823.050 €	2.498.000 €
<b>MARINA</b>	<i>Managing Risks of Nanoparticles</i>	FP7	2011-11-01	2015-10-31	Execution	12.481.840 €	8.999.924 €
<b>QNANO</b>	<i>A pan-European infrastructure for quality in nanomaterials safety testing</i>	FP7	2011-02-01	2015-01-31	Execution	9.256.856 €	7.000.000 €
<b>SANOWORK</b>	<i>Safe Nano Worker Exposure Scenarios</i>	FP7	2012-03-01	2015-02-28	Execution	4.787.694 €	3.409.185 €
<b>SCAFFOLD</b>	<i>Innovative strategies, methods and tools for occupational risks management of manufactured nanomaterials (MNMs) in the construction industry</i>	FP7	2012-05-01	2015-04-30	Execution	3.710.014 €	2.537.000 €
<b>SINN</b>	<i>Safe Implementation of Innovative Nanoscience &amp; Nanotechnology</i>	FP7	2011-08-01	2014-07-31	Execution	2.034.439 €	1.499.493 €
<b>PRENANOTOX</b>	<i>Predictive toxicology of engineered nanoparticles</i>	FP7	2013-01-01	2015-12-31	Acception	1.289.902 €	997.734 €

