



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας



**«ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΥΔΡΟΦΟΒΩΝ
ΦΘΑΛΟΚΥΑΝΙΝΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ
ΒΙΟΔΙΑΣΠΩΜΕΝΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ, ΜΕ
ΧΡΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ DoE»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Δανάη Μποκή

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: Δρ. Αναστασία Δέτση
(Επίκουρος καθηγήτρια Ε.Μ.Π.)

ΑΘΗΝΑ 2016

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο τμήμα Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2015 – 2016.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα, Δρ Αναστασία Δέτση, Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΜΠ, για την άψογη συνεργασία, την καθοδήγησή της, τις γνώσεις που μου μετέδωσε, αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τόσο κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Σταματίνα Βουγιούκα, Επίκουρη καθηγήτρια Ε.Μ.Π., για την πολύτιμη βοήθειά της και τις χρήσιμες συμβουλές της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας, καθώς και τον Καθηγητή Ε.Μ.Π. κ. Δ.Χατζηαβραμίδα, για τη συνεισφορά του στην οργάνωση του πειραματικού σχεδιασμού και τις συμβουλές του για την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως την Ελένη Καβέτσου, Υποψήφια Διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ, για το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας, και τη συμπαράσταση που μου έδειξε σε κάθε βήμα της ερευνητικής αυτής εργασίας. Την Ανδρομάχη Τζάνη, υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας ΕΜΠ, για την άψογη συνεργασία κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων. Τον Δημήτριο Κουκουζέλη, Υποψήφιο Διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ και την Καλλιόπη Χατζηζαχαριά, Υποψήφια Διδάκτορα του Εργαστηρίου Σύνθεσης κι Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών, για την καθοδήγηση και τις γνώσεις τους στον τομέα του πειραματικού σχεδιασμού.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευαγγελία Παυλάτου, για τις μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και τον Επίκουρο καθηγητή ΕΜΠ Ευάγγελο Τόπακα, για τη διάθεση της φυγοκέντρου.

Ευχαριστώ επίσης θερμά όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για το φιλικό κλίμα και την ομαδικότητα που έδειξαν, καθιστώντας ευκολότερη τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου και τους φίλους μου, για τη συνεχή στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου για την εκπόνηση της εργασίας αυτής.

Στη μνήμη της γιαγιάς μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι φθαλοκυανίνες (PCs) ανήκουν στην κατηγορία των αζαπορφυρινικών αναλόγων και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έρευνα υλικών υψηλής τεχνολογίας. Οι ηλεκτρονικές και οπτικές τους ιδιότητες, καθιστούν τις φθαλοκυανίνες χρήσιμες σε πολλούς και διαφορετικούς τομείς. Η χημική τους σύνθεση παρουσιάζει ευελιξία, επιτρέποντας την παραγωγή διαφορετικών μορφολογιών, αλλά και την σύζευξη με διαφορετικά μόρια, προσδίδοντας διαφορετικές τελικές ιδιότητες. Τα χρωμοφόρα αυτά μόρια, τις τελευταίες δεκαετίες έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, στη χρήση τους ως φωτοευαίσθητοποιητές, δηλαδή ως ουσίες που παρουσιάζουν υψηλό συντελεστή απορρόφησης σε συγκεκριμένη περιοχή του φάσματος ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα την εκκίνηση αλληλουχιών αντιδράσεων. Η πολύ μικρή διαλυτότητά τους στο νερό, σε συνδυασμό με την τάση να σχηματίζουν διμερή σε υδατικό περιβάλλον, έχει ως αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι φωτοφυσικές και φωτοευαίσθητοποιητικές ικανότητές τους, καθώς και η φωτοδυναμική τους δράση.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η μελέτη εγκλεισμού φθαλοκυανινών σε νανοσωματίδια βιοδιασπώμενου πολυμερούς πολυγαλακτικού οξέος (PLA NPs), με στόχο την τροποποίηση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των μορίων, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε υδατικά διαλύματα χωρίς να επηρεάζεται η φωτοδυναμική τους δράση, αλλά και η στοχευμένη δράση κατά την εφαρμογή τους κυρίως στη φωτοδυναμική θεραπεία, μέσω διείσδυσης σε κυτταρικούς ιστούς. Το πολυμερές που επιλέχθηκε είναι το πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA) καθώς είναι βιοσυμβατό/βιοδιασπώμενο και θεωρείται κατάλληλο για εγκλεισμούς υδρόφοβων μορίων.

Οι εγκλεισμοί πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη. Τα σωματίδια χαρακτηρίστηκαν αναφορικά με το μέγεθος, το ζ-δυναμικό και τον δείκτη πολυδιασποράς τους, μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS), ενώ τα θερμικά τους χαρακτηριστικά προσδιορίστηκαν μέσω διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC). Το μέγεθος των νανοσωματιδίων δεν ξεπερνούσε σε μέσο όρο τα 300nm, με χαμηλή διασπορά και μέσο μέγεθος ζ-δυναμικού, ενώ η απόδοση του εγκλεισμού κυμάνθηκε (EE%) στα 90% και προσδιορίστηκε έμμεσα, με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

Χρησιμοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός με χρήση του υπολογιστικού προγράμματος «design-expert», με στόχο την ανάδειξη σημαντικών παραμέτρων της πειραματικής διαδικασίας εγκλεισμού, τυχόν αλληλεπιδράσεων, αλλά και βελτιστοποίησή τους, με το μικρότερο δυνατό αριθμό πειραμάτων.

ABSTRACT

Pthalocyanines (PCs) refer to a group of azaporphyrin analogs acknowledged in the scientific world for their high tech applications. Their outstanding electronic and optical properties render them applicable in several aspects. Their chemical composition shows relevant flexibility, thus enabling the production of different chemical morphologies, as well as conjunctions with multiple molecules, allowing them to achieve certain properties. These chromophores have raised interest over the past few years as possible photosensitizers, to wit substances that present high absorption rate in certain wavelengths. This triggers several chain reactions leading to new technological applications. Although, PCs' exhibit low solubility in aqua medium, leading to the formation of aggregations, which prevent their potent photophysical and photosensitizing activity.

The current study demonstrates the encapsulation of PCs in nanoparticles (NPs) of biodegradable polymer, aiming to improve the physicochemical characteristics of PCs, in order to eliminate the influence of aggregation in PCs' photodynamic action and also to achieve increased cellular penetration for uses in photodynamic therapy treatments. The chosen polymer is poly-lactic acid (PLA) as it has been extensively studied, is well known for its biocompatibility and is considered appropriate for encapsulation of hydrophobic compounds.

The encapsulation was performed using the emulsion-solvent evaporation method. The produced NPs were characterized considering their, z-potential and polydispersity index (pdi) by Dynamic Light Scattering technique (DLS), while their thermal behavior was determined using differential scanning calorimetry (DSC). The NPs' size did not exceed 300 nm on average, combined with low distributions and z-potential, while the encapsulation efficiency (EE%) ranged about 90% according to indirect UV-Vis spectrometry measurements.

The overall process was submitted to experimental design (design of experiments DoE), in order to indicate the most important variables or interactions affecting the encapsulation process with prospect to optimize the process, while conducting the least number of experiments for a reliable outcome.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	2
ABSTRACT.....	3
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	4
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο : ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο : ΘΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ	10
2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	10
2.1.1 Εισαγωγή στον πειραματικό σχεδιασμό.....	10
2.1.2. Στρατηγικές πειραματισμού	11
2.2 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ	19
2.2.1 Εισαγωγή	19
2.2.2 Είδη νανοσωματιδίων	19
2.2.3 Τεχνικές παρασκευής νανοσωματιδίων	21
2.2.4 Μηχανισμός δημιουργίας νανοσωματιδίων	34
2.2.5. Τεχνικές ανάλυσης- χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων.....	36
2.3 ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	41
2.3.1 Φυσιολογία υγείων και καρκινικών κυττάρων.....	41
2.3.2 Εισαγωγή στη φωτοδυναμική θεραπεία (PDT- Photodynamic Therapy)	43
2.3.3 Φωτοευαισθητοποιητές.....	47
2.4 ΦΘΑΛΟΚΥΑΝΙΝΕΣ.....	50
2.4.1. Εισαγωγή	50
2.4.2. Χαρακτηριστικές ιδιότητες	51
2.4.3. Εφαρμογές φθαλοκυανινών.....	54
2.5 ΒΙΟΔΙΑΣΠΩΜΕΝΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ.....	56
2.5.1 Εισαγωγή	56
2.5.2 Μηχανισμοί αποικοδόμησης.....	56
2.5.3 Πολύ-γαλακτικό οξύ (PLA).....	58
2.6 ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗ ΔΡΑΣΤΙΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ (drug release)	60

ΜΟΝΤΕΛΑ-ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ:.....	64
<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i>	68
3.1 ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ	68
3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ	70
3.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΡΝΑ.....	72
3.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ ..	73
3.5 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ	74
3.6 ΞΗΡΑΝΣΗ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ.....	76
3.7 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	78
3.7.1 Μέτρηση μεγέθους, ζ-δυναμικού και δείκτη πολυδιασποράς νανοσωματιδίων	78
3.7.2 Φάσμα απορρόφησης φωτοευαισθητοποιητή	79
3.7.3 Προσδιορισμός θερμικών χαρακτηριστικών	80
3.8 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ.....	81
3.9 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ	82
<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</i>	84
4.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ	84
4.1.1 Μέτρηση μεγέθους, ζ-δυναμικού και δείκτη πολυδιασποράς.....	84
4.1.2 Αποτελέσματα φασματομετρίας UV-vis.....	86
4.1.3 Θερμικά χαρακτηριστικά.....	87
4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ	90
4.3 ΞΗΡΑΝΣΗ	93
4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ	94
4.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ	96
<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</i>	97
<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο : ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ- ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ</i>	99
<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο : ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</i>	101
<i>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</i>	106

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<i>Εικόνα 1</i> σχηματική απεικόνιση νανοσφαίρας και νανοκάψουλας	21
<i>Εικόνα 2</i> σχηματική απεικόνιση μύλου	22
<i>Εικόνα 3</i> τυπικό παράδειγμα χημικού αντιδραστήρα παραγωγής νανοσωματιδίων	26
<i>Εικόνα 4</i> διαδικασία σχηματισμού κι αύξησης πυρήνων νανοσωματιδίων.....	27
<i>Εικόνα 5</i> μεταβολή της επιφανειακής τάσης	29
<i>Εικόνα 6</i> τριαδικό διάγραμμα φάσεων	29
<i>Εικόνα 7</i> σχηματική απεικόνιση τεχνικής γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη.....	30
<i>Εικόνα 8</i> σχηματική απεικόνιση τεχνικής μετατόπισης διαλύτη και διεπιφανειακής απόθεσης (στη δεύτερη υπάρχει και προσθήκη επιπλέον λιπαρής ουσίας)	31
<i>Εικόνα 9</i> σχηματική απεικόνιση ESD τεχνικής	32
<i>Εικόνα 10</i> μείωση μεγέθους σταγονιδίων γαλακτώματος με το πέρας της εξάτμισης διαλύτη του πολυμερούς	35
<i>Εικόνα 11</i> σχηματική απεικόνιση DLS	37
<i>Εικόνα 12</i> σχηματική απεικόνιση α) φασματομέτρου b) με θέση για δείγμα αναφοράς-τυφλό ..	39
<i>Εικόνα 13</i> σήμανση πιθανών θέσεων υποκατάστασης στο μόριο της φθαλοκυανίνης	51
<i>Εικόνα 14</i> διαμορφώσεις φθαλοκυανινών τύπου I (a-g) και τύπου II (h-m).....	52
<i>Εικόνα 15</i> δομή και μετατόπιση του φάσματος απορρόφησης, με την εισαγωγή μετάλλων στο μόριο της φθαλοκυανίνης	53
<i>Εικόνα 16</i> παράδειγμα σχηματισμού PCs σε στήλες, μέσω λιπόφιλων υποκαταστατών	53
<i>Εικόνα 17</i> οπτικά ισομερή γαλακτικού οξέος.....	59
<i>Εικόνα 18</i> σύνθεση πολυ(γαλακτικού οξέος).....	59
<i>Εικόνα 19</i> ποιοτική σχηματική απεικόνιση αποδέσμευσης δραστικής ουσίας	61
<i>Εικόνα 20</i> επιλογή είδους πειραματικού σχεδιασμού	71
<i>Εικόνα 21</i> ορισμός μεταβλητών DoE	71
<i>Εικόνα 22</i> ορισμός αποκρίσεων DoE	71
<i>Εικόνα 23</i> σύνοψη πειραματικού σχεδιασμού	72
<i>Εικόνα 24</i> διάγραμμα TGA και DSC για AICIPc	81
<i>Εικόνα 25</i> διάγραμμα TGA και DSC για PLA	81
<i>Εικόνα 26</i> διάγραμμα TGA και DSC για δείγμα ξηρών νανοσωματιδίων PLA-AICIPc.....	81
<i>Εικόνα 27</i> διάγραμμα DLS μεγέθους κενών νανοσωματιδίων PLA	84
<i>Εικόνα 28</i> διάγραμμα DLS μεγέθους νανοσωματιδίων AICIPc-PLA	85
<i>Εικόνα 29</i> διάγραμμα DLS ζ-δυναμικού κενών νανοσωματιδίων PLA	85
<i>Εικόνα 30</i> διάγραμμα DLS ζ-δυναμικού νανοσωματιδίων AICIPc-PLA	85
<i>Εικόνα 31</i> καμπύλη αναφοράς	86
<i>Εικόνα 32</i> DSC γράφημα AICIPc	88
<i>Εικόνα 33</i> DSC γράφημα PLA	88
<i>Εικόνα 34</i> DSC γράφημα νανοσωματιδίων AICIPc-PLA.....	89
<i>Εικόνα 35</i> TGA γράφημα AICIPc	89
<i>Εικόνα 36</i> TGA γράφημα PLA	89
<i>Εικόνα 37</i> TGA γράφημα νανοσωματιδίων AICIPc-PLA.....	90
<i>Εικόνα 38</i> καταγραφή τιμών μεταβλητών κι αποκρίσεων στο υπολογιστικό φύλλο	90
<i>Εικόνα 39</i> προτεινόμενος βέλτιστος σχεδιασμός διεργασίας	92

<i>Εικόνα 40</i> πιθανές διεργασίες κι αποκρίσεις.	93
<i>Εικόνα 41</i> σχηματική απεικόνιση αποδέσμευσης.	95
<i>Εικόνα 42</i> απεικόνιση AFM πυκνού δείγματος διασποράς νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένη AICIPc.	101
<i>Εικόνα 43</i> απεικόνιση AFM αραιού δείγματος διασποράς νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένη AICIPc.	101
<i>Εικόνα 44</i> υπόδειγμα γραφικής απεικόνισης πιθανών τιμών σύμφωνα με τις προδιαγραφές του υπολογιστικού προγράμματος "design expert".	102
<i>Εικόνα 45</i> υπόδειγμα επιθυμητών προδιαγραφών ανά πιθανή δοκιμή, σε μορφή ιστογράμματος, κατά τις υποδείξεις του υπολογιστικού προγράμματος "design expert".	102
<i>Εικόνα 46</i> βέλτιστες πειραματικές συνθήκες και πιθανές τιμές αποκρίσεων σύμφωνα με τις υποδείξεις του υπολογιστικού προγράμματος "design expert".	103
<i>Εικόνα 47</i> διαλύματα πολυγαλακτικού οξέος χωρίς (αριστερά) και με προσθήκη (δεξιά) φθαλοκανίνης αλουμινίου-χλωρίου.	103
<i>Εικόνα 48</i> παρασκευή νανοσωματιδίων σε ήπια περιστροφή σε συσκευή rotary.	104
<i>Εικόνα 49</i> συσκευή φυγοκέντρωσης.	104
<i>Εικόνα 50</i> ξηρό δείγμα PLA-NPs με εγκλεισμένη AICIPc.	105

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<i>Πίνακας 1</i> Χαρακτηριστικά καλοήθων και κακοήθων νεοπλασμάτων.	43
<i>Πίνακας 2</i> μήκη και γωνίες δεσμών σε πιθανές θέσεις υποκατάστασης των PCs 51	51
<i>Πίνακας 3</i> παραδείγματα βιοδιασπώμενων πολυμερών.....	58
<i>Πίνακας 4</i> αποτελέσματα αποδέσμευσης.....	61
<i>Πίνακας 6</i> εφαρμογή πειραματικού σχεδιασμού 74	74
<i>Πίνακας 7.</i> Αποτελέσματα μετρήσεων DLS.....	85
<i>Πίνακας 8</i> δεδομένα καμπύλης αναφοράς.	86
<i>Πίνακας 9</i> αποτελέσματα UV-Vis.	87
<i>Πίνακας 10</i> δεδομένα ζήρασης.....	94
<i>Πίνακας 11</i> μάζες κατά την αποδέσμευση AICIPc 94	94
<i>Πίνακας 12</i> δεδομένα αποδέσμευσης AICIPc 95	95

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο εγκλεισμός ενεργών συστατικών, κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο, ιδίως στις βιομηχανίες των φαρμάκων. Πρόκειται για μια τεχνολογία που χρησιμοποιείται για να εγκλωβιστούν βιοδραστικά μόρια σε μία πολυμερική δομή με σκοπό να παρέχει προστασία στην εγκλεισμένη δραστική ουσία, αλλά και να διαφοροποιήσει κατάλληλα ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως η λιποφιλικότητα ή υδροφοβικότητα κ.α. Οι φθαλοκυανίνες ως μόρια τις τελευταίες δεκαετίες έχουν εμφανίσει σημαντικές προοπτικές σε ιατρικές και μη εφαρμογές, όπως η χρήση τους ως ευαισθητοποιητές κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε κλινικές εφαρμογές, όπως σε περιπτώσεις αντικαρκινικών θεραπειών.

Επιστέγασμα των όποιων επιστημονικών ερευνών, αποτελεί η οργάνωση του τρόπου διεξαγωγής των πειραμάτων, καθώς και η ανάλυση των αποτελεσμάτων, η οποία με τη σειρά της εξελίσσεται με την πάροδο των χρόνων και την διεπιστημονική αλληλεπίδραση. Έτσι, παρουσιάζονται σύγχρονα εργαλεία, που δρουν επικουρικά στην επιστημονική έρευνα με εφαρμογή στατιστικών προτύπων, έχοντας ως στόχο την καλύτερη οργάνωση των πειραματικών διαδικασιών, για εξοικονόμηση χρόνου και υλικών, εξάλειψη πειραματικών σφαλμάτων και μεγαλύτερη αξιοπιστία αποτελεσμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Κατά την εφαρμογή των φθαλοκυανινών ως φωτοευαισθητοποιητές στη φωτοδυναμική θεραπεία κατά του καρκίνου, ανακύπτουν δύο βασικά προβλήματα. Αρχικά, η υδρόφοβη συμπεριφορά των φθαλοκυανινών σε υδατικά διαλύματα, οδηγεί στη δημιουργία συσσωματωμάτων, τα οποία περιορίζουν την ομοιόμορφη διασπορά αλλά και τη φωτοδυναμική δράση των φθαλοκυανινών. Επιπλέον, ανακύπτει το σύνθητες πρόβλημα των αντικαρκινικών θεραπειών της στοχευμένης δράσης, ώστε να επικεντρωθεί η κυτταροτοξική απόκριση των δραστικών ουσιών στην περιοχή του όγκου και να ελαττωθεί η επίδρασή τους σε παρακείμενους υγιείς ιστούς.

Ο εγκλεισμός αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για την αποφυγή ανάπτυξης συσσωματωμάτων, καθώς η δραστική ουσία αποδεσμεύεται σταδιακά, με αποτέλεσμα να μην προλαβαίνουν να αναπτυχθούν συσσωματώματα. Σε συνδυασμό με το μικρό μέγεθος των παραγόμενων νανοσωματιδίων, δύναται να επιτευχθεί διείσδυση του φωτοευαισθητοποιητή σε μεγαλύτερο βάθος στους κυτταρικούς ιστούς, με αποτέλεσμα στοχευμένη αντικαρκινική δράση. Η στοχευμένη δράση μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω με χρήση κατάλληλων πρωτεϊνικών μορίων στο περίβλημα των νανοσωματιδίων με στόχο την πρόσδεσή τους στα καρκινικά κύτταρα.

Συνεπώς, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο σχηματισμός νανοσωματιδίων (PLA) με εγκλεισμένη δραστική ουσία φθαλοκυανίνης (AICIPc), με τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης εξάτμισης διαλύτη και χρήση πειραματικού σχεδιασμού. Στόχος της εργασίας είναι ο σχηματισμός σταθερών νανοσωματιδίων που να εμποδίζουν τη δημιουργία συσσωματωμάτων, ενώ παράλληλα θα διαθέτουν ικανοποιητικά χαρακτηριστικά μεγέθους και διασποράς, για την εφαρμογή τους ως φωτοευαισθητοποιητές στη φωτοδυναμική θεραπεία κατά του καρκίνου.

Προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η διεργασία εγκλεισμού και να περιοριστεί ο αριθμός των απαιτούμενων πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Πειραματικού Σχεδιασμού (Design of Experiments, DoE), μέσω του οποίου αναμένεται μια γενική εκτίμηση των βασικών παραμέτρων που επηρεάζουν τη διεργασία και ο βαθμός επίδρασής τους στη διαδικασία παρασκευής των νανοσωματιδίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΘΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

2.1.1 Εισαγωγή στον πειραματικό σχεδιασμό

Τα τελευταία χρόνια σε πολλούς τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας, όπως επιστήμες ή βιομηχανία, αποζητείται αναβάθμιση και διερεύνηση της γνώσης. Κεντρικό ρόλο στην βελτίωση των διεργασιών αλλά και της ποιότητας των τελικών προϊόντων, έχουν ορισμένες ελεγχόμενες μεταβλητές (ποσοτικές και ποιοτικές), οι οποίες ονομάζονται παράγοντες. Καθορισμένοι δε συνδυασμοί αυτών (των ποσοτικών παραγόντων) και κατηγοριών ή καταστάσεων (των ποιοτικών παραγόντων) χρησιμοποιούνται για να παρατηρηθούν οι επιδράσεις που έχουν σε ένα ή περισσότερα χαρακτηριστικά του προϊόντος που εξετάζεται, τα οποία (χαρακτηριστικά) ονομάζονται μεταβλητές απόκρισης. Με τον όρο διεργασία υποδηλώνεται ένα σύνολο καταστάσεων ή συνθηκών λειτουργίας, που συνδυάζονται για να μετασχηματίσουν εισερχόμενα δεδομένα, σε χρήσιμα εξερχόμενα. Κατά τη διάρκεια μιας διεργασίας μπορούν να ανακύψουν προβλήματα, συγκεκριμένα, κάθε εξερχόμενο παρουσιάζει κάποια μεταβλητότητα, η οποία διακρίνεται σε μεταβλητότητα κοινών ή συνήθων αιτιών και μεταβλητότητα ειδικών αιτιών. Η πρώτη, επηρεάζει όλα τα προϊόντα της διεργασίας και αποδίδεται στις κανονικές-συνήθεις συνθήκες λειτουργίας της διεργασίας. Αυτές οι συνθήκες λειτουργίας προκύπτουν από τον σχεδιασμό της διεργασίας και προξενούν μεταβλητότητα κάποιου βαθμού η οποία όμως μπορεί, στο μεγαλύτερο μέρος της να προβλεφθεί. Αντίθετα, η μεταβλητότητα ειδικών αιτιών είναι ένα μη προβλεπόμενο από τον σχεδιασμό συμβάν, που συχνά συνδέεται με δυσλειτουργία του συστήματος. Έτσι, σε κάθε διεργασία κρίνεται σκόπιμο να αναγνωρίζεται αν είναι ελεγχόμενη ή μη (συχνά με χρήση διαγραμμάτων ελέγχου) και να απαλείφονται αν είναι δυνατόν τα ειδικά αίτια μεταβλητότητας. Στη συνέχεια, η βελτίωση μιας ελεγχόμενης διεργασίας συνίσταται στη μείωση της μεταβλητότητας κοινών αιτιών, μέσω πειραμάτων και σημαντικό ρόλο έχει στο σημείο αυτό ο πειραματικός σχεδιασμός.

Πειράματα μπορούν να διεξαχθούν σε οποιοδήποτε ερευνητικό πεδίο, αποσκοπώντας στην κατανόηση της δομής ή δράσης μιας διαδικασίας ή ενός συστήματος. Τα πειράματα αποτελούνται από μία ή περισσότερες σειρές μετρήσεων, κατά τις οποίες μεταβάλλονται ορισμένες παράμετροι του προς εξέταση συστήματος, επιφέροντας αντίστοιχες αποκρίσεις. Ο κατάλληλος σχεδιασμός, η διεξαγωγή των πειραμάτων αλλά και η ανάλυση των αποτελεσμάτων, είναι αρωγοί στο έργο ενός μηχανικού όσον αφορά το σχεδιασμό προϊόντων, την παραγωγική διαδικασία, αλλά και τη λειτουργία και βελτιστοποίηση ορισμένων διεργασιών. Κάθε πειραματιστής έχει να

εξετάσει κάποια πρωταρχικά ερωτήματα, όσον αφορά το προς εξέταση σύστημα, όπως ενδεικτικά:

- Πιο είναι το σύνολο των δυνατών επιλογών λειτουργίας για το σύστημα;
- Πόσοι και ποιοι παράγοντες επηρεάζουν και με ποιόν τρόπο το σύστημα;
- Πόσα δείγματα-μετρήσεις πρέπει να εξετασθούν ώστε να επέλθει ένα αξιόπιστο συμπέρασμα;
- Με ποιόν τρόπο πρέπει να διεξαχθεί η συλλογή κι ανάλυση των δεδομένων;
- Ποια μέθοδος ανάλυσης πρέπει να χρησιμοποιηθεί;

Κάθε σύστημα που εξετάζεται μπορεί να αποδοθεί από τον πειραματιστή ως ένα μοντέλο, που προσομοιάζει το εκάστοτε σύστημα με έναν ορισμένο συνδυασμό υλικών πόρων (μηχανών, πρώτων υλών), μεθόδων επεξεργασίας, ανθρώπινου δυναμικού και άλλων παραμέτρων, που επιδρούν ως μεταβλητές εισόδου στο σύστημα δίνοντας μία ή περισσότερες αποκρίσεις. Οι μεταβλητές ενδέχεται να είναι ελεγχόμενες ή μη, με αποτέλεσμα ο πειραματιστής να οφείλει να αναγνωρίσει επιπλέον:

- Ποιές μεταβλητές έχουν τη μεγαλύτερη επίδραση στο σύστημα;
- Ποιες μπορεί να θεωρήσει ως ελεγχόμενες και σε ποιες τιμές πρέπει να τις περιορίσει, έτσι ώστε να λάβει αποκρίσεις σε ένα επιθυμητό πεδίο τιμών, ελαχιστοποιώντας παράλληλα την επίδραση των μη ελεγχόμενων μεταβλητών αλλά και τη μεταβλητότητα του μοντέλου.

2.1.2. Στρατηγικές πειραματισμού

Ως στρατηγική πειραματισμού καλείται η γενικότερη προσέγγιση του σχεδιασμού και της διεξαγωγής των πειραμάτων και υπάρχουν διάφορες στρατηγικές που μπορεί να επιλέξει ο κάθε πειραματιστής.

I. ΔΟΚΙΜΗ ΚΑΙ ΣΦΑΛΜΑ/ ΚΑΛΥΤΕΡΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ

Μία συνηθισμένη προσέγγιση του πειραματικού σχεδιασμού είναι να επιλεχθούν τυχαία συνδυασμοί παραγόντων, να εξετασθούν και να αναδειχθεί ένα αποτέλεσμα. Με βάση αυτό το αποτέλεσμα ο πειραματιστής μπορεί στη συνέχεια να σχεδιάσει μία νέα σειρά πειραμάτων με προσθήκη νέων παραγόντων ή συνδυασμών. Αυτή η στρατηγική βασίζεται στην καλύτερη εκτίμηση του πειραματιστή για το εξεταζόμενο μοντέλο και συχνά επιφέρει εύλογα αποτελέσματα, δεδομένου ότι οι πειραματιστές διαθέτουν ένα καλό θεωρητικό υπόβαθρο και έχουν τις τεχνικές γνώσεις που τους επιτρέπουν να κατανοήσουν το εκάστοτε μοντέλο σε βάθος. Ωστόσο υπάρχει το ενδεχόμενο η αρχική εκτίμηση να μην επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα αλλά και να πρέπει να εξετασθούν νέοι πειραματικοί συνδυασμοί, που χρονοτριβούν τη

διαδικασία. Επιπλέον η εν λόγω στρατηγική δεν επιβεβαιώνει στον πειραματιστή ότι η εκτίμηση που έκανε, ακόμα κι αν του έδωσε ικανοποιητικές αποκρίσεις, ότι είναι και το βέλτιστο μοντέλο λειτουργίας.

II. ΕΝΑΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΗ ΦΟΡΑ.

Σε αυτή την στρατηγική προσέγγιση, επιλέγεται ένα σημείο αναφοράς ή μια κατευθυντήρια γραμμή για κάθε παράγοντα χωριστά, όπου στη συνέχεια ο κάθε παράγοντας μεταβάλλεται εντός των προδιαγεγραμμένων ορίων τους (όπως αυτά καθορίζονται αυθαίρετα από τον πειραματιστή ή τις πειραματικές συνθήκες), ενώ οι υπόλοιποι παράγοντες παραμένουν αμετάβλητοι. Έτσι καταλήγει ο πειραματιστής να συμπεράνει την επίδραση του κάθε παράγοντα στην τελική απόκριση του συστήματος. Ωστόσο ένα μεγάλο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η αδυναμία να προβλέψει αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα. Καθώς μία επιθυμητή τιμή ενός παράγοντα μπορεί να δρα ανασταλτικά σε κάποιον άλλο παραγοντα, γεγονός που παραβλέπεται συχνά και παρατηρείται ευρεία εφαρμογή αυτής της μεθόδου στην πράξη.

III. ΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η στρατηγική αυτή προσέγγιση της πειραματικής διαδικασίας φαίνεται να είναι η καταλληλότερη στην περίπτωση που εξετάζονται παράλληλα αρκετοί παράγοντες ως προς ένα σύστημα. Σε αυτή τη περίπτωση οι διάφοροι παράγοντες μεταβάλλονται παράλληλα κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων. Αν επί παραδείγματι επιλεγεί να μελετηθούν δύο παράγοντες με δύο πιθανές τιμές ο καθένας, θα δημιουργηθεί ένας παραγοντικός σχεδιασμός πειραμάτων 2^2 , με τέσσερις δυνατούς συνδυασμούς μεταξύ των παραγόντων. Δίνεται με αυτό τον τρόπο η δυνατότητα να εξετασθούν όχι μόνο η επίδραση του κάθε παράγοντα αλλά και η επίδραση μίας πιθανής αλληλεπίδρασής τους σε σχέση με το τελικό αποτέλεσμα. ο σχεδιασμός μπορεί να παρασταθεί με τέσσερα σημεία γραφικά σχηματίζοντας ένα τετράγωνο, όπου οι άκρες θα αποτελούν τις τέσσερις τιμές των παραγόντων, η οριζόντια και κάθετη μετακίνηση επί των ακμών θα υποδεικνύει την επίδραση του εκάστοτε παράγοντα χωριστά επί της τελικής απόκρισης, ενώ οι πιθανές αλληλεπιδράσεις θα αναπαρίστανται γραφικά από τις διαγώνιους του τετραγώνου.

Με ανάλογο τρόπο μπορούν να μελετηθούν n – παράγοντες, οι οποίοι αν διαθέτουν δύο πιθανές ακραίες τιμές, θα δώσουν ένα παραγοντικό σχεδιασμό 2^n πειραμάτων, τα οποία θα επιφέρουν τη καλύτερη δυνατή επεξεργασία κι αξιοποίηση των πειραματικών δεδομένων.

Σε περιπτώσεις που οι προς εξέταση παράγοντες υπερβαίνουν τους τέσσερις με πέντε, κρίνεται άσκοπο να διεξαχθούν τα πειράματα όλων των δυνατών συνδυασμών και οδηγούμαστε σε μία νέα μέθοδο, που καλείται κλασματική παραγοντική μεθοδολογία.

IV. ΚΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Πρόκειται για παραλλαγή της βασικής παραγοντικής μεθόδου, κατά την οποία διεξάγεται μόνο ένα υποσύνολο πειραμάτων από όσα υπαγορεύει ο αρχικός παραγοντικός σχεδιασμός. Με αυτό τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα στον πειραματιστή να εξάγει ικανοποιητικά αποτελέσματα, εξοικονομώντας χρόνο και πόρους, γεγονός που συμβάλει θετικά στην βιομηχανική πρακτική.

2.1.3 Βασικές έννοιες και αρχές του πειραματικού σχεδιασμού

Μεταβλητή απόκρισης: η μεταβλητή απόκρισης (ή απόκριση) δείχνει το αποτέλεσμα που μετριέται ή παρατηρείται σε μία πειραματική κατάσταση. Σε ένα πείραμα είναι δυνατόν να καθορισθούν περισσότερες από μία μεταβλητές απόκρισης, ενώ στον καθορισμό της είναι χρήσιμο να συμπεριλαμβάνεται κι ένας σύντομος και σαφής τρόπος μέτρησης της μεταβλητής.

Παράγοντας: πρόκειται για μία μεταβλητή της οποίας οι τιμές ή οι καταστάσεις μεταβάλλονται προμελετημένα, ώστε να μετρηθεί η επίδραση κάθε μεταβολής στη μεταβλητή απόκρισης. Ο παράγοντας μπορεί να είναι ποσοτικός ή ποιοτικός.

Επίπεδο (στάθμη): ένα επίπεδο κάποιου παράγοντα είναι μία συγκεκριμένη τιμή ή κατάσταση του παράγοντα στην οποία θέλουμε να μετρήσουμε ή να παρατηρήσουμε τη μεταβλητή απόκρισης. Τα επίπεδα ενός ποσοτικού παράγοντα επιλέγονται συνήθως ώστε να αντανakλούν το εύρος τιμών που ενδιαφέρει να εξετασθεί για τον εκάστοτε παράγοντα. Αν ένας παράγοντας είναι ποιοτικός, τα επίπεδα μπορεί να είναι είτε όλες οι δυνατές καταστάσεις που ενδιαφέρουν να εξετασθούν, είτε ένα τυχαίο δείγμα που επιλέγεται από ένα σύνολο καταστάσεων.

Δοκιμή: μια δοκιμή είναι ένας συνδυασμός πειραματικών συνθηκών, κάτω από τις οποίες πρόκειται να μελετηθεί μία μεταβλητή απόκρισης. Έτσι, αν εξετάζονται σε ένα πείραμα πολλοί παράγοντες, μία δοκιμή ή θεραπεία είναι ένας συγκεκριμένος συνδυασμός επιπέδων των παραγόντων.

Επίδραση στη μεταβλητή απόκρισης: είναι η παρατηρούμενη ή μετρούμενη μεταβολή στη μεταβλητή απόκρισης, καθώς μεταβάλλονται οι συνδυασμοί πειραματικών συνθηκών,.

Πειραματική (δειγματοληπτική) μονάδα: είναι το αντικείμενο πάνω στο οποίο παρατηρείται ή μετριέται η μεταβλητή απόκρισης για μία δεδομένη δοκιμασία.

Μεταβλητή πλαισίου (background variable) ή ομαδοποίησης (blocking): μεταβλητή πλαισίου είναι μία μεταβλητή που μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στην απόκριση και είναι γνωστό στον ερευνητή εξ αρχής, πρέπει ωστόσο να τεθεί ως παράγοντας ώστε να μη θολώνει την ανάλυση. Μπορεί να τεθεί υπό έλεγχο είτε με σταθεροποίησή της σε όλη τη διάρκεια του πειράματος ή με την παρατήρηση της απόκρισης σε ομάδες που αντιπροσωπεύουν διαφορετικές τιμές ή καταστάσεις της

μεταβλητής πλαισίου. Αν δεν είναι κάτι τέτοιο εφικτό, τότε μπορεί απλώς να ληφθεί υπόψη η επίδρασή της στην απόκριση, με καταγραφή της τιμής της για κάθε πειραματική μονάδα. Συχνές μεταβλητές πλαισίου είναι ο χρόνος, ο χειριστής, η μηχανή, η βάρδια ή η παρτίδα υλικών.

Μεταβλητή θορύβου: είναι μία άγνωστη μεταβλητή (μη αναγνωρισμένη κατά τον χρόνο του πειράματος), η οποία μπορεί να επηρεάσει τη μεταβλητή απόκρισης.

Πειραματικό (τυχαίο) σφάλμα: είναι η μεταβλητότητα στη μεταβλητή απόκρισης που δεν μπορεί να αποδοθεί σε αλλαγή δοκιμασίας ή σε μεταβολή της κατάστασης μιας μεταβλητής ομαδοποίησης. Πρόκειται δηλαδή για το συνδυασμένο αποτέλεσμα στη μεταβλητή απόκρισης των μεταβλητών θορύβου. Για να περιορισθεί το σφάλμα, βασική αρχή στον πειραματικό σχεδιασμό είναι να γίνεται κατάλληλη συλλογή πειραματικών δεδομένων, ώστε να ελαχιστοποιείται η τυχαία μεταβλητότητα, με έλεγχο όσο το δυνατόν περισσότερων αναγνωρίσιμων αιτίων. Για το λόγο αυτό συχνά κρίνεται σκόπιμος ο διαχωρισμός της ολικής μεταβλητότητας της απόκρισης, σε επιμέρους τμήματα, μέσω της τυχαιοποίησης, ομαδοποίησης και επανάληψης.

Η **τυχαιοποίηση** επιτυγχάνεται κατανέμοντας τυχαία τις πειραματικές μονάδες στις εξεταζόμενες ομάδες και δοκιμασίες, επιμερίζοντας έτσι τις επιδράσεις των μη ελεγχόμενων μεταβλητών στη μεταβλητή απόκριση, ισομερώς στις διάφορες δοκιμασίες.

Η **ομαδοποίηση** είναι ο έλεγχος των επιπέδων μιας μεταβλητής πλαισίου. Επιτρέπει την απομόνωση μέρους της μεταβλητότητας απόκρισης και καταλογισμό του στις επιδράσεις μεταβλητών πλαισίου.

Επανάληψη είναι η επαναληπτική παρατήρηση της μεταβλητής απόκρισης για κάθε δοκιμασία που ερευνάται, δίνοντας τη δυνατότητα μέτρησης του μεγέθους του πειραματικού σφάλματος.

Για να υπάρξει πρόβλεψη των αποτελεσμάτων στην πράξη, με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα είναι σκόπιμο να εκτελούνται τα πειράματα σε ένα εύρος συνθηκών, όσο το δυνατόν πλησιέστερα στις συνθήκες που αναμένονται στην πράξη. Στη σωστή εκτίμηση των αποτελεσμάτων συμβάλει η χρήση διαγραμμάτων και στατιστικών μέτρων περιγραφής των δεδομένων.

Με τον όρο **παραγοντικά πειράματα**, όπως προαναφέρθηκε, αναφέρονται πειράματα στα οποία υπεισέρχονται δύο ή περισσότεροι παράγοντες και όλα τα επίπεδα ενός παράγοντα συνδυάζονται με όλα τα επίπεδα όλων των υπόλοιπων παραγόντων, για να παρατηρηθεί η απόκριση σε κάθε συνδυασμό. Αν επί παραδείγματι διερευνάται η επίδραση δύο παραγόντων, ένας με τέσσερα κι ο άλλος με τρία επίπεδα, θα προκύψουν δώδεκα δοκιμές. Οι παράγοντες σε ένα παραγοντικό πείραμα χαρακτηρίζονται και ως διασταυρούμενοι (cross factors). Η φυσική σημασία κάθε επιπέδου ενός διασταυρούμενου παράγοντα δεν μεταβάλλεται, ανεξάρτητα από τα επίπεδα των άλλων παραγόντων με τα οποία θα συνδυαστεί για να παρατηρηθεί η

απόκριση, με εξαίρεση περιπτώσεις δενδροειδών σχεδιασμών. Στις περιπτώσεις με σταθερούς παράγοντες (συγκεκριμένα επίπεδα), το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στις μέσες τιμές της απόκρισης, που αντιστοιχούν στους συνδυασμούς των επιπέδων, δηλαδή στις επιδράσεις των παραγόντων. Σε περιπτώσεις τυχαίων παραγόντων, το ενδιαφέρον επικεντρώνεται πρωτίστως στην ανάλυση διασποράς της απόκρισης σε επιμέρους όρους κι εκτίμηση των συνιστωσών διασποράς.

Οι επιδράσεις των παραγόντων σε ένα παραγοντικό πείραμα είναι οι μέσες μεταβολές της απόκρισης που αντιστοιχούν σε αλλαγές των δοκιμασιών. Για τον ορισμό τους περιοριζόμαστε αρχικά σε παραγοντικά πειράματα με σταθερούς παράγοντες, θεωρώντας αρχικά δύο παράγοντες Α και Β με a και b πλήθος επιπέδων και $a \times b$ πλήθος δοκιμασιών. Συμβολίζεται μ_{ij} η μέση απόκριση για το i επίπεδο του Α και j επίπεδο του Β, $\mu_{i.}$ η μέση απόκριση για το i επίπεδο του Α και $\mu_{.j}$ η μέση απόκριση για το j επίπεδο του Β, ενώ μ είναι η γενική μέση τιμή της μεταβλητής απόκρισης. Οι τιμές συνδέονται μεταξύ τους με τις ακόλουθες σχέσεις:

$$\mu_{i.} = \frac{\sum_{j=1}^b \mu_{ij}}{b}, \quad \mu_{.j} = \frac{\sum_{i=1}^a \mu_{ij}}{a}, \quad \mu = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \mu_{ij}}{ab},$$

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^a \mu_{i.}}{a}, \quad \mu = \frac{\sum_{j=1}^b \mu_{.j}}{b}$$

Για την επίδραση κάθε παράγοντα χωριστά στην απόκριση, χρησιμοποιείται η «κύρια επίδραση» του παράγοντα Α ή Β, που για το επίπεδο i του Α ορίζεται:

$$\alpha_i = \mu_{i.} - \mu$$

Μπορούν να εκτιμηθούν οι λεγόμενες «δειγματικές» ή «προσαρμοσμένες κύριες επιδράσεις», σύμφωνα με τις μετρήσεις των αποκρίσεων κάθε δοκιμασίας. Συμβολίζοντας $\acute{y}_{ij.}$ το μέσο του δείγματος των y_{ijk} παρατηρήσεων που αντιστοιχούν στην θεραπεία (i,j) , με n παρατηρήσεις για έναν ισορροπημένο σχεδιασμό, αλλά και $\acute{y}_{i..}$, $\acute{y}_{.j.}$, $\acute{y}_{...}$, τη δειγματική μέση τιμή όλων των παρατηρήσεων που αντιστοιχούν στο i επίπεδο του Α, j επίπεδο του Β και το γενικό μέσο όλων των παρατηρήσεων, προκύπτουν:

$$\acute{y}_{ij.} = \frac{\sum_{k=1}^n y_{ijk}}{n} \quad (i=1,2, \dots, a, j=1,2, \dots, b)$$

$$\acute{y}_{i..} = \frac{\sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n y_{ijk}}{bn} \quad (i=1,2, \dots, a)$$

$$\acute{y}_{.j.} = \frac{\sum_{i=1}^a \sum_{k=1}^n y_{ijk}}{an} \quad (j=1,2, \dots, b)$$

$$\text{Και } \acute{y}_{...} = \frac{\sum_{j=1}^b \sum_{i=1}^a \sum_{k=1}^n y_{ijk}}{abn}$$

Επομένως η δειγματική κύρια επίδραση για το Α στο i επίπεδο είναι

$$\hat{a}_i = \bar{y}_{i..} - \bar{y}_{...}$$

Σε περιπτώσεις ενός παράγοντα με δύο μόνο επίπεδα συνήθως θεωρείται ότι ο παράγοντας έχει μία κύρια επίδραση, έστω a^* , η οποία ορίζεται ως:

$$a^* = \mu_{1.} - \mu_{2.}, \hat{a}^* = \bar{y}_{1..} - \bar{y}_{2..}$$

από όπου προκύπτουν: $a_1 = a^*/2, a_2 = -a^*/2, \hat{a}_1 = \hat{a}^*/2, \hat{a}_2 = -\hat{a}^*/2$.

Γραφικά, στο διάγραμμα μέσης απόκρισης κι επιπέδων ενός παράγοντα η επίδραση του παράγοντα B, παριστάνεται με δύο παράλληλες ευθείες για απουσία αλληλεπιδράσεων, ενώ όταν υπάρχει αλληλεπίδραση οι ευθείες μπορεί να έχουν διαφορετική κλίση ή και να τέμνονται.

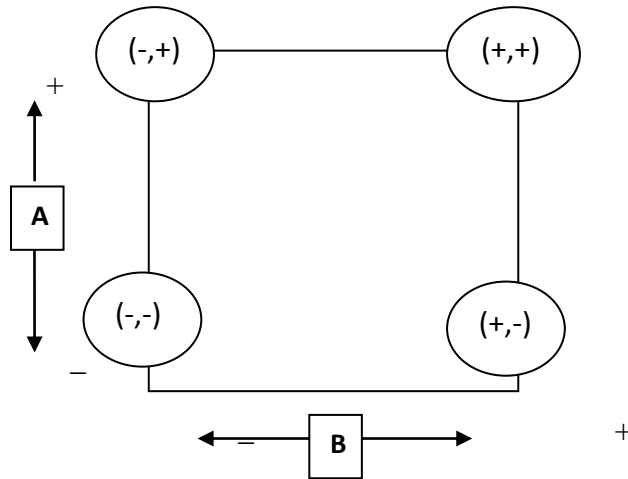
Μαθηματικά η απουσία αλληλεπίδρασης αποδίδεται ως $\mu_{ij} = \mu + a_i + b_j$, για κάθε συνδυασμό επιπέδων (i, j). Η ύπαρξη αλληλεπιδράσεων AB μπορεί να αποδοθεί με $a_i b_j$ όρους, ενώ το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης AB για κάθε (i, j) δοκιμασία, ορίζεται ως η διαφορά της $\mu + a_i + b_j$ από τη μέση μ_{ij} , δηλαδή:

$$(\alpha\beta)_{ij} = \mu_{ij} - (\mu + a_i + b_j) = \mu_{ij} - \mu_{i.} - \mu_{.j} + \mu$$

Ανάλογα ορίζεται κι η δειγματική (προσαρμοσμένη) αλληλεπίδραση των AB στην (i, j) θεραπεία:

$$(\alpha\beta)_{ij} = \bar{y}_{ij.} - (\bar{y}_{...} + a_i + b_j) = \bar{y}_{ij.} - \bar{y}_{i..} - \bar{y}_{.j.} + \bar{y}_{...}$$

2^f παραγοντικά: συχνά τα πειράματα f παραγόντων θεωρούν για ευκολία ότι κάθε παράγοντας έχει δύο επίπεδα, έτσι με μικρό σχετικά αριθμό δοκιμών μπορούν να διερευνηθούν οι επιδράσεις μεγάλου αριθμού παραγόντων. Είναι συνήθης πρακτική να καλούνται τα δύο επίπεδα «χαμηλό» και «υψηλό» και να συμβολίζονται με τα πρόσημα - και + αντίστοιχα, ενώ συνήθως οι διάφοροι συνδυασμοί, απεικονίζονται με μικρά λατινικά γράμματα, των αντίστοιχων παραγόντων, που βρίσκονται σε «υψηλό» επίπεδο. Σε αυτή την κατηγορία ως επίδραση λαμβάνεται η διαφορά της δειγματικής μέσης απόκρισης που αντιστοιχεί στο χαμηλό επίπεδο, από την δειγματική μέση απόκριση στο υψηλό. Σε περιπτώσεις όπου $f=2$, έχουμε τέσσερις δοκιμασίες επί η επαναλήψεις, οι αποκρίσεις (ή οι μέσες τιμές των αποκρίσεων των οποίων) απεικονίζονται ως κορυφές τετραγώνου.



Για το 2^3 παραγοντικό σχεδιασμό, έχουμε τρεις παράγοντες, δύο επιπέδων, με n επαναλήψεις, δηλαδή $8n$ δοκιμές- παρατηρήσεις. Τα δεδομένα αυτής της μορφής πειραμάτων δίνονται ως οχτώ κορυφές κύβου. Οι επιδράσεις λαμβάνονται ως η διαφορά της δειγματικής μέσης απόκρισης υψηλού και χαμηλού επιπέδου:

$$A = \bar{y}_{A+} - \bar{y}_{A-} = \frac{a+ab}{2n} - \frac{(1)+b}{2n}, \text{ όπου } (1) = (-, -)$$

Κι αντίστοιχα για τις υπόλοιπες επιδράσεις.

Γενική περίπτωση 2^f παραγοντικού: οι παρατηρήσεις λαμβάνονται ως γραμμικοί συνδυασμοί της μορφής:

$$L = \sum_{l=1}^p c_l T_l$$

Όπου T είναι οι αθροιστικές αποκρίσεις των δοκιμασιών, με $c=+1$ ή -1 και κάθε άθροισμα της παραπάνω μορφής καλείται «αντιδιαστολή». Ο υπολογισμός της αντιδιαστολής κάθε επίδρασης προηγείται για την διεξαγωγή επιδράσεων, και συχνά χρησιμοποιούνται σε αυτό το σημείο πίνακες αλγεβρικών προσήμων. Έτσι υπολογίζονται στη συνέχεια τα χρήσιμα μεγέθη της επίδρασης E και το άθροισμα τετραγώνων SSE:

$$E = \frac{1}{n2^{f-1}} L$$

$$SSE = \frac{1}{n2^f} L^2$$

Σε περιπτώσεις $n > 1$ επαναλήψεων η αξιολόγηση γίνεται με ελέγχους υποθέσεων, με χρήση πίνακα ανάλυσης διασποράς. Σε περιπτώσεις που δεν υπάρχουν επαναλήψεις, χρησιμοποιούνται στη θέση του πειραματικού σφάλματος κάποιες από τις αλληλεπιδράσεις υψηλής τάξης, θεωρώντας τις τελευταίες αλληλεπιδράσεις αμελητέες. Μια μέθοδος αξιολόγησης παραγοντικών επιδράσεων, με ύπαρξη ή όχι επαναλήψεων, που μειώνει το ενδεχόμενο ύπαρξης σημαντικών αλληλεπιδράσεων

υψηλής τάξης, είναι η γραφική αναπαράσταση των επιδράσεων σε κανονικό διάγραμμα πιθανότητας. Στο διάγραμμα αυτό προσαρμόζεται μία νοητή ευθεία στα σημεία επιδράσεων, με τιμές κοντά στο μηδέν, ενώ οι επιδράσεις που αντιστοιχούν σε σημεία μακριά από τη γραμμή κρίνονται ως σημαντικές. Πέρα από την εκτίμηση και την αξιολόγηση των επιδράσεων, είναι χρήσιμο να προσδιορίζεται κι ένα εμπειρικό πρότυπο, για την πρόβλεψη ή εκτίμηση της μέσης απόκρισης, για ενδιάμεσες τιμές επιπέδων των παραγόντων, στο εύρος τιμών που έχει οριστεί. Το εμπειρικό πρότυπο κατασκευάζεται με χρήση της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων και τη διαδικασία της πολλαπλής παλινδρόμησης. Για παράδειγμα στο 2^2 παραγοντικό πείραμα με δύο ποσοτικούς παράγοντες A και B, προσαρμόζεται πρότυπο αλληλεπίδρασης της μορφής:

$$y = \beta_0 + \beta_1\chi_1 + \beta_2\chi_2 + \beta_3\chi_1\chi_2 + \varepsilon$$

Όπου χ_1, χ_2 κωδικοποιημένες μεταβλητές για τιμές των παραγόντων (-1 ή +1). Ενώ το προσαρμοσμένο πρότυπο παλινδρόμησης έχει τη μορφή:

$$\hat{y} = \hat{y}_{\dots} + \frac{A}{2}\chi_1 + \frac{B}{2}\chi_2 + \frac{AB}{2}\chi_1\chi_2$$

με A, B, AB τις παραγοντικές επιδράσεις, όπου αν η αλληλεπίδραση δεν βρεθεί σημαντική δεν περιλαμβάνεται στον τύπο. Η ανωτέρω ανάλυση, θεωρεί τις επιφάνειες απόκρισης ως επίπεδα, προϋποθέτοντας γραμμικό συσχετισμό απόκρισης και μεταβλητών τιμών των εκάστοτε παραγόντων. Σε περιπτώσεις καμπυλότητας ωστόσο, χρησιμοποιούνται διαφορετικοί σχεδιασμοί μοντελοποίησης, όπως κεντρικά συνδυασμένοι σχεδιασμοί, ενώ συχνά υπολογίζεται και η μεταβλητότητα της απόκρισης ως προς τις επιδράσεις των παραγόντων. (συνήθως ως μέτρο μεταβλητότητας λαμβάνεται ο φυσικός λογάριθμος της δειγματικής διασποράς $\sim \ln s^2$).

Κλασματικά παραγοντικά πειράματα: Τα πειράματα αυτά χρησιμοποιούνται όταν λόγω οικονομικών, χρονικών ή άλλων περιορισμών, δεν είναι εφικτή η διενέργεια ενός πλήρους παραγοντικού πειράματος. Τα κλασματικά παραγοντικά πειράματα, περιλαμβάνουν ένα μέρος (κλάσμα) κατάλληλα επιλεγμένων δοκιμών από το σύνολο των δοκιμών του παραγοντικού σχεδιασμού. Η πρακτική αυτή αιτιολογείται καθώς με την επιλογή κατάλληλου κλάσματος, μπορούν να εκτιμηθούν οι βασικές ιδιότητες που ίσως ενδιαφέρουν, όπως κύριες επιδράσεις και κι αλληλεπιδράσεις. Κατά αυτόν τον τρόπο μελετώνται $\frac{1}{2^P}$ κλάσματα των 2^f παραγοντικών πειραμάτων, που ονομάζονται 2^{f-p} κλασματικά παραγοντικά. Σημαντική έννοια σε αυτά τα πειράματα είναι η «σύγχυση» (confounding), ο συνδυασμός παραγοντικών επιδράσεων και ομαδοποίησης, που μπορεί να γίνει και σκόπιμα ή και όχι, χωρίς να επιτρέπει την απόδοση της επίδρασης σε ένα παράγοντα, στην αλληλεπίδραση ή σε ομαδοποίηση. Συχνά, για να αποφεύγεται η σύγχυση των επιδράσεων, γίνεται «σκόπιμη σύγχυση» κατά τον σχεδιασμό, για τον σκοπό αυτό επιλέγεται συχνά συσχετισμός κάποιας αλληλεπίδρασης υψηλής τάξης, (όπως ABC) και συνδυάζεται με την ομαδοποίηση.

Μία ακόμη σημαντική ιδιότητα κάθε κλασματικού σχεδιασμού είναι η διακριτική του ικανότητα (design resolution), η οποία αποδίδει τη δυνατότητα του σχεδιασμού να μη συγχέει τις κύριες επιδράσεις κι αλληλεπιδράσεις των παραγόντων. Συγκεκριμένα ένας σχεδιασμός έχει διακριτική ικανότητα R, όταν οι επιδράσεις των οποίων η συμβολική γραφή περιέχει p παράγοντες, δε συγχέονται με επιδράσεις των οποίων η συμβολική γραφή περιέχει λιγότερους από R-p παράγοντες. Γενικά για την κατασκευή ενός κλασματικού 2^{f-p} σχεδιασμού, απαιτείται αρχικά η επιλογή p ανεξάρτητων γεννητριών (αλληλεπιδράσεις που δεν αποτελούν γινόμενα άλλων) με τυχαία πρόσημα. Στη συνέχεια δημιουργείται ένας πίνακας αλγεβρικών προσήμων με f στήλες, όπου οι πρώτες f-p στήλες είναι οι στήλες των επιδράσεων των f-p πρώτων παραγόντων και κάθε μία από τις τελευταίες p στήλες προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό, σε κάθε σειρά, των προσήμων των επιδράσεων των παραγόντων που περιέχονται στη συμβολική γραφή μιας γεννήτριας και του προσήμου της γεννήτριας. [1] [2] [3]

2.2 ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ

2.2.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια η νανοτεχνολογία εξελίσσεται ραγδαία, βρίσκοντας σημαντικές εφαρμογές σε τομείς όπως οι χημικές αναλύσεις, η ιατρική διάγνωση και θεραπείες πλήθους παθήσεων. Τα εξεταζόμενα και σχεδιαζόμενα νανοσωματίδια παρουσιάζουν ποικιλία στη μορφολογία τους, αλλά και μεγάλο εύρος δράσης, όπως παράγοντες στοχευμένης δράσης, διαγνωστικά στοιχεία, θεραπευτικοί και αντιμικροβιακοί παράγοντες, φορείς σταδιακής αποδέσμευσης δραστικών ουσιών, καθώς και πλήθος άλλων βιοϊατρικών εφαρμογών. Τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν συγκεκριμένες ιδιότητες, οι οποίες κερδίζουν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, όπως ασυνήθιστες οπτικές ιδιότητες, σταθερότητα στη συμπεριφορά, βιοσυμβατότητα, μειωμένη τοξικότητα, ελεγχόμενη μορφολογία, διασπορά μεγέθους και επιφανειακή δραστηριότητα. Τα προαναφερθέντα, συνηγορούν στη μεγάλη αύξηση παραγωγής καινοτόμων νανοσωματιδίων, με υψηλή εκλεκτικότητα κι ευαισθησία κατά τη χρήση τους σε βιοϊατρικές εφαρμογές [4].

Με τον όρο νανοτεχνολογία περιγράφεται ο σχεδιασμός, χαρακτηρισμός, κατασκευή κι εφαρμογή σωματιδίων, ορισμένης μορφολογίας και διαστάσεων, που βρίσκονται στη νανομετρική κλίμακα. Τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν πλήθος μορφολογιών, όπως νανοσωλήνες, λιποσώματα, δενδριμερή, κβαντικά στοιχεία, και πολλά άλλα, όπως παρουσιάζονται στη συνέχεια. Μεγάλη ποικιλία εμφανίζουν κι οι μέθοδοι χορήγησής τους, από διαδερμική, στοματική, παρεντερική έως οφθαλμική [4].

2.2.2 Είδη νανοσωματιδίων

ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ: Τα λιποσώματα είναι σφαιρικά νανοσωματίδια, αποτελούμενα από ένα περίβλημα λιπιδίων και συνήθως υδατικό περιεχόμενο, ωστόσο μπορούν να εμφανιστούν -με μία ή και περισσότερες μεμβράνες. Οι δραστικές ουσίες μπορούν να ενσωματωθούν τόσο στο εσωτερικό τους, κυρίως για υδατοδιαλυτές ενώσεις, όσο και στο περίβλημα των λιπιδίων ανάλογα με την εξεταζόμενη εφαρμογή [4].

NANOΠΟΡΩΔΕΣ: οι νανοπόροι παρουσιάζουν αυξημένη πυκνότητα πόρων (<20nm), περιορίζοντας τη μεταφορά ουσιών. Επιτρέπουν τη διέλευση γλυκόζης και οξυγόνου αλλά εμποδίζουν την ανοσοσφαιρίνη, έτσι βρίσκουν εφαρμογή ως συστήματα προστασίας ιστών μεταμόσχευσης, έναντι του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Σε τροποποιημένες δομές, συμβάλουν επίσης στη διαφοροποίηση της αλληλουχίας DNA και πουρινών [4].

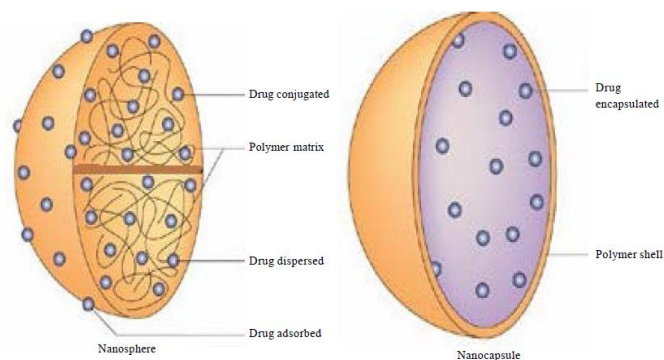
NANΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ: εμφανίζονται σε δομές με μονά ή πολλαπλά τοιχώματα, ομόκεντρων σωλήνων, με πλήθος εφαρμογών, όπως η στοχευμένη δράση λόγω ισχυρής πρόσφυσης σε κύτταρα [4].

ΚΒΑΝΤΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ: αποτελούνται από έναν ανόργανο πυρήνα κι ένα υδατικό οργανικό περίβλημα, συζευγμένο με βιολογικά μόρια, με στόχο να προσδεθεί σε συγκεκριμένους βιολογικούς δείκτες. Παρουσιάζουν χρήσιμες οπτικές, ηλεκτρικές αλλά και ιδιότητες φθορισμού, ιδανικές για περιπτώσεις στοχευμένης δράσης αλλά και διάγνωσης [4].

ΚΕΛΥΦΟΣ: έχουν αναφερθεί σε αντικαρκινικές εφαρμογές και πρόκειται για ένα πυρήνα από σιλικόνη, με λεπτή μεταλλική επικάλυψη. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί ότι εφαρμόζοντας υπέρυθρη ακτινοβολία, η θερμοκρασία των νανοσωματιδίων κελύφους αυξάνεται, με αποτέλεσμα να έχουν καταστροφικές συνέπειες σε καρκινικά κύτταρα, αφήνοντας ωστόσο τους παρακείμενους υγιείς ιστούς ανεπηρέαστους [4].

ΦΥΣΑΛΙΔΕΣ: πρόκειται για μία ακόμα μορφή που απαντάται σε αντικαρκινικές θεραπείες κατά την οποία, η δραστική ουσία εγκλείεται στο εσωτερικό φυσαλίδων, το μέγεθος των οποίων δεν ξεπερνά την κλίμακα του νάνο. Οι φυσαλίδες παρουσιάζουν σταθερότητα σε θερμοκρασία δωματίου, ωστόσο με τη θέρμανση διαρρηγνύονται και μεταπίπτουν σε νέες φυσαλίδες στην μικροκλίμακα. Αυτή η συμπεριφορά χρησιμοποιείται για τη στόχευση καρκινικών κυττάρων, με παράλληλη χρήση υπερήχων [4].

NANΟΣΦΑΙΡΕΣ ΚΑΙ NANOKΑΨΟΥΛΕΣ: πρόκειται για ειδικά σχεδιασμένες δομές, για τον εγκλεισμό θεραπευτικών παραγόντων, προστατεύοντάς τους από πιθανή ενζυματική ή χημική αποδόμηση. Στην περίπτωση της νανοκάψουλας, η δραστική ουσία εγκλείεται σε μία κοιλότητα υπενδεδυμένη από μία πολυμερική μεμβράνη, ενώ στην περίπτωση της νανοσφαίρας, δημιουργείται ένα σύστημα μήτρας που συμπεριλαμβάνει τη δραστική ουσία και διασπείρεται ομοιόμορφα σχηματίζοντας σφαιρίδια. Σε αυτή την κατηγορία βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή νανοσωματίδια από βιοδιασπώμενα πολυμερή, με στόχο την ελεγχόμενη αποδέσμευση της εγκλεισμένης δραστικής ουσίας [4].



Εικόνα 1 σχηματική απεικόνιση νανοσφαίρας και νανοκάψουλας.

ΠΑΡΑΜΑΓΝΗΤΙΚΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ: πρόκειται για νανοσωματίδια με μαγνητικές ιδιότητες, που χρησιμεύουν σε θεραπείες υπερθερμίας και φωτοθερμίας, σε κυτταρική διαλογή, σε μαγνητικές απεικονίσεις και άλλες εφαρμογές, ειδικά αν συζευχθούν με κατάλληλους παράγοντες, όπως αντισώματα [4].

ΔΕΝΔΡΙΜΕΡΗ: πρόκειται για διακλαδισμένες δομές, που προκύπτουν συνήθως κατά την διαδικασία πολυμερισμού και συχνά συνδυάζονται με άλλες δομές νανοσωματιδίων, δίνοντας βελτιωμένες ιδιότητες [4].

ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ: δεν αφορά μία συγκεκριμένη δομή, αλλά λόγω της πολύ διαδεδομένης χρήσης των πολυμερών στην παρασκευή νανοσωματιδίων απαντώνται ως ξεχωριστή κατηγορία. Ποικιλία πολυμερών και τεχνικών πολυμερισμού κι εγκλεισμού συνδυάζονται για να προσφέρουν διαφορετικά νανοσωματίδια, με βελτιωμένες ιδιότητες και σταθερότητα στη δομή τους, που δύνανται κατά περίπτωση να αυξήσουν τη διαλυτότητα, τη διαπερατότητα και εκλεκτικότητα ουσιών. Παρουσιάζουν αυξημένη σταθερότητα συγκριτικά με άλλα είδη, όπως τα δενδριμερή και παρέχουν πολλές δυνατότητες για στοχευμένη δράση, καθώς μπορούν να συνδυαστούν με μεγάλο αριθμό μορίων, μεταβάλλοντας κατάλληλα τις επιφανειακές ιδιότητες αλλά και την καθολική συμπεριφορά τους [4].

ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΧΡΥΣΟΥ: ο χρυσός παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον στη φυσική, τη χημεία και τη βιολογία, καθώς διαθέτει εξέχουσες οπτικές, ηλεκτρικές και άλλες σημαντικές ιδιότητες. Έτσι ανάλογα με τη μορφολογία τους, τα νανοσωματίδια χρυσού χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Συνήθως διαμορφώνονται κατάλληλα σε δομές, που συνδυάζουν κι άλλα μόρια, όπως υδατάνθρακες, πεπτίδια, χημειοθεραπευτικούς παράγοντες [4].

2.2.3 Τεχνικές παρασκευής νανοσωματιδίων

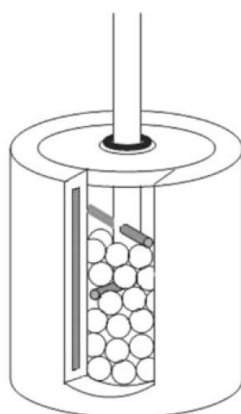
Υπάρχει μεγάλος αριθμός στις διαθέσιμες τεχνικές παρασκευής διαφορετικών μορφών νανοσωματιδίων, όπως κολλοειδών, συμπλεγμάτων, πούδρας, σωλήνων, ράβδων, φιλμ. Η επιστημονική κοινότητα εργάζεται, σε διεπιστημονικό επίπεδο

διαρκώς, προς τη βελτίωση των ήδη εφαρμοζόμενων μεθόδων αλλά και για την ανάπτυξη νέων καινοτόμων τεχνικών. Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι, φυσικοί, χημικοί, βιολογικοί κι υβριδικοί, για την παρασκευή των νανοσωματιδίων, στις οποίες γίνεται ακολούθως μια σύντομη αναφορά. Η τεχνική που θα επιλεγεί κάθε φορά, εξαρτάται από το εξεταζόμενο σύστημα και συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του, όπως το υλικό κατασκευής, το είδος του νανοσωματιδίου, αλλά και τις διαστάσεις, το μέγεθος και την ποσότητά του [5].

1. ΜΕ ΦΥΣΙΚΕΣ-ΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

ΜΕ ΥΨΗΛΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑ ΣΕ ΣΦΑΙΡΑ ΑΝΑΜΙΞΗΣ (high energy ball mixing):

πρόκειται για μία από τις πιο απλοϊκές τεχνικές παρασκευής νανοσωματιδίων, κυρίως μετάλλων και κραμάτων. Χρησιμοποιούνται διαφορετικού τύπου μύλοι, πλανητικοί, δόνησης, ραβδόμυλοι, ανατροπής, στους οποίους εισάγονται σκληρές μπάλες από χάλυβα ή καρβίδια βολφραμίου και το επιθυμητό κατά περίπτωση υλικό (ακόμα και υγρό), σε μία ενδεικτική αναλογία 2:1. Το χρησιμοποιούμενο υλικό μπορεί να έχει ακανόνιστη μορφή, όπως φλοίδες ή σκόνη, ωστόσο είναι σημαντικό να πληρούται σε μεγάλο βαθμό ο χώρος του μύλου, ώστε να μην ενσωματωθούν φυσαλίδες αέρα στα τελικά νανοσωματίδια. Στην ενλόγο τεχνική ενέχει ο κίνδυνος δημιουργίας ακαθαρσιών από τις μπάλες άλεσης αλλά και από πιθανή δημιουργία αερίων. Κατά τη διαδικασία συχνά απαντάται θερμοκρασιακή αύξηση που κυμαίνεται από 100-1100°C, ενώ συχνά χρησιμοποιούνται και δοχεία ψύξης. Οι μύλοι περιστρέφονται γύρω από έναν ή περισσότερους άξονες σε μεγάλες ταχύτητες της τάξης των εκατοντάδων rpm [5].



Εικόνα 2 σχηματική απεικόνιση μύλου [5].

ΑΝΑΜΙΞΗ ΤΗΓΜΑΤΟΣ (melt mixing): είναι δυνατός ο σχηματισμός νανοσωματιδίων σε υαλώδη μορφή, δηλαδή σε δομή άμορφου στερεού, όπου εκλείπει η περιοδική διάταξη ατόμων ή μορίων. Όταν ένα υγρό ψυχθεί κάτω από μία ορισμένη για κάθε υλικό θερμοκρασία (T_m), αποκτά μία κρυσταλλική ή άμορφη δομή. Πέρα από τη θερμοκρασία, ο ρυθμός ψύξης και η τάση πυρήνωσης, συμβάλουν

καθοριστικά στη δημιουργία ή όχι υαλώδους ή κρυσταλλικής δομής. Σχηματίζονται αυθόρμητα πυρήνες, ομογενείς και μη, οι οποίοι σταδιακά αυξάνονται δημιουργώντας κρυσταλλικές δομές, αν η ψύξη γίνει ταχύτατα, τότε δημιουργούνται περισσότερο άμορφες δομές. Η τεχνική χρησιμοποιείται κυρίως σε μέταλλα, στα οποία για να διατηρήσουν την άμορφη δομή τους, προστίθενται στοιχεία όπως B,P, Si. Τα νανοσωματίδια μπορούν να παραχθούν αναμιγνύοντας τα ρεύματα των μετάλλων αυτών, σε υψηλή ταχύτητα και τυρβώδη ροή. Η ετερογένεια των τηγμάτων στοιχείων και υλικών, συμβάλει στο σχηματισμό υαλώδους δομής. Υπάρχουν και υλικά που έχουν φυσική προδιάθεση για σχηματισμό υαλώδους δομής, όπως τα πυριτικά άλατα, όπου σε μορφή πυραμίδας έχουν ένα κεντρικό άτομο σιλικόνης, που περιβάλλεται από άτομα οξυγόνου, και με συμπλέγματα και με άλλα στοιχεία βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στη νανοτεχνολογία [5].

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΞΑΤΜΙΣΗΣ: υπάρχει μεγάλη ποικιλία τεχνικών παρασκευής νανοσωματιδίων που βασίζονται σε εξάτμιση υλικών από κάποιο υπόστρωμα. Οι τελικές μορφές που προκύπτουν ποικίλουν από φιλμ, πολυστρωματικά και μη, φιλμ νανοσωματιδίων, έως αέρια συμπλέγματα, αποτεθειμένα σε συγκεκριμένα υποστρώματα. Η εξάτμιση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί με ποικίλους τρόπους, όπως με ηλεκτρικές αντιστάσεις, ή ηλεκτρόδια αλλά και λέιζερ, ωστόσο είναι σημαντικό να λαμβάνεται μέριμνα ώστε η εξάτμιση να πραγματοποιείται σε ειδικά σχεδιασμένα συστήματα κενού, ώστε να αποφεύγεται η οξείδωση των χρησιμοποιούμενων υλικών κι η πιθανή διείδυση ακαθαρσιών στο σύστημα. Το κενό υποβοηθά επίσης και την ίδια τη διαδικασία εξάτμισης. Τα προς εξάτμιση υλικά συνήθως θερμαίνονται αρχικά σε κάποιο σκεύος- χωνευτήρι, για περιπτώσεις απόθεσης υλικού, απαιτείται θέρμανση για παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ατμού. Ο ρυθμός εξάτμισης ενός υγρού περιγράφεται σε γενική μορφή από την εξίσωση Hertz-Knudsen ως εξής [5]:

$$\frac{dN}{dt} = Aa(2\pi mkT)^{-\frac{1}{2}}(p^* - p)$$

Όπου N είναι ο αριθμός των μορίων ή ατόμων που φεύγουν από την υγρή ή στερεή φάση, A είναι η επιφάνεια εξάτμισης, a ο συντελεστής εξάτμισης, m η μάζα των εξατμιζόμενων ατόμων, k η σταθερά Boltzmann, T η θερμοκρασία, p^* η πίεση ισορροπίας και p η υδροστατική πίεση της επιφάνειας. Όπως φαίνεται η θερμοκρασία έχει σημαντικό ρόλο καθώς δηλώνει ότι η εξάτμιση θα πραγματοποιηθεί με συγκεκριμένο ρυθμό. Επιπλέον πρέπει να τονισθεί ότι η διαδικασία εξάτμισης περιπλέκεται όταν το σύστημα περιλαμβάνει περισσότερες ενώσεις, στερεά ή κράματα. Ωστόσο, είναι σημαντικό το προς εξάτμιση υλικό να φτάνει κατά προσέγγιση την πίεση $\sim 10^{-1}$ Pa, ώστε να εξασφαλισθεί εύκολα, επαρκής τάση ατμών για το σύστημα εξάτμισης [5].

ΦΥΣΙΚΗ ΑΠΟΘΕΣΗ ΑΤΜΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗ: αυτή η τεχνική περιλαμβάνει τα προς εξάτμιση υλικά, κάποιο αδρανές αέριο, έναν ψυχρό δακτύλιο πάνω στον οποίο μπορούν να συμπυκνωθούν και να σχηματισθούν τα

συσσωματώματα και νανοσωματίδια και μία ξύστρα για την αποκόλλησή τους, καθώς κι ένα πιστόνι για τη συμπίεση της παραγόμενης σκόνης νανοσωματιδίων [5].

ΙΟΝΙΖΟΥΣΑ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗ: η διάταξη αυτής της μεθόδου αποτελείται από μία πηγή εξάτμισης, ένα ακροφύσιο που διαχέει τους ατμούς στο θάλαμο, μια δέσμη ηλεκτρονίων που ιονίζουν το σχηματιζόμενο σύμπλεγμα, έναν επιταχυντή των συσσωματωμάτων κι ένα υπόστρωμα στο οποίο επικάθονται τα σχηματιζόμενα νανοσωματίδια. Όλη η διάταξη περιέχεται σε θάλαμο κενού. Η προς εξάτμιση ουσία εισάγεται σε μορφή τήγματος, η πίεση στο ακροφύσιο προκαλεί εξάτμιση, ενώ τα ηλεκτρόδια συμβάλουν στη δημιουργία κροκίδωσης και συσσωματώματα κατευθύνονται επιταχυνόμενα προς το υπόστρωμα, όπου θα αποθεθούν [5].

ΕΞΑΤΜΙΣΗ ΜΕ ΛΕΪΖΕΡ- ΠΥΡΟΥΛΥΣΗ ΜΕ ΛΕΪΖΕΡ: με παρόμοιο τρόπο με τα προαναφερθέντα γίνεται χρήση λέιζερ για την εξάτμιση των υλικών, τα οποία στη συνέχεια συσσωματώνονται με άτομα αδρανούς αερίου, ενώ παράλληλα ψύχονται σχηματίζοντας νέες συμπαγείς μάζες. Το μέγεθος και η διασπορά των σωματιδίων καθορίζεται από την εφαρμοζόμενη πίεση, ενώ η μέθοδος χρησιμοποιείται ευρύτατα στην παραγωγή νανοσωλήνων άνθρακα [5].

ΕΝΑΠΟΘΕΣΗ ΚΑΘΟΔΙΚΗΣ ΔΙΑΣΚΟΡΠΙΣΗΣ: πρόκειται για μία μέθοδο που χρησιμοποιείται κυρίως στην παραγωγή φιλμ νανοσωματιδίων. Με τη μέθοδο αυτή ιόντα αδρανούς αερίου προσπίπτουν στα προς εξέταση άτομα με μεγάλη ενέργεια. Ανάλογα με το λόγο μαζών ιόντων και ατόμων, λαμβάνει χώρα ένα πολύπλοκο φαινόμενο κατά το οποίο τα ιόντα χάνουν το φορτίο τους επιφανειακά, αλλά ορισμένα λόγω της υψηλής ενέργειας που διαθέτουν δημιουργούν μια σειρά αλυσιδωτών δράσεων, παράγουν φωτόνια και συσσωματώματα, με κενές θέσεις, που απορροφούν σταδιακά άτομα και σχηματίζουν την τελική μορφή νανοσωματιδίων. Τα συσσωματώματα σε αυτή τη μέθοδο, συχνά παράγονται με χρήση ηλεκτρικού ρεύματος DC, μαγνητικού πεδίου, μικροκυμάτων και τεχνολογία πλάσματος ECR (electron cyclotron resonance) [5].

ΧΗΜΙΚΗ ΑΠΟΘΕΣΗ ΑΤΜΩΝ (CVD- chemical vapor deposition): πρόκειται για μία μέθοδο που κάνει χρήση χημικών στην αέρια φάση και χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή επικαλύψεων οργανικών κι ανόργανων ουσιών. Προτιμάται ως μέθοδος καθώς έχει σχετικά απλή διάταξη, μπορεί να εφαρμοσθεί με μεγάλο πλήθος υλικών και είναι σχετικά οικονομική διαδικασία. Αν και υπάρχουν διαφοροποιήσεις στην εφαρμογή της μεθόδου, η βασική διαδικασία αφορά τη μεταφορά των ατμών ή αέριων αντιδραστηρίων σε ένα υπόστρωμα, όπου διατηρούνται σε ορισμένη θερμοκρασία έως ότου δημιουργηθούν ρωγμές και παραχθούν νέα προϊόντα τα οποία διαχέονται στην επιφάνεια, υποβάλλονται σε νέες αντιδράσεις, δημιουργούν πιθανά σημεία πυρήνων που αυξάνονται, σχηματίζοντας τελικά την επιθυμητή μεμβράνη. Τα παραπροϊόντα για να απομακρυνθούν πρέπει να μεταφερθούν και πάλι στην αέρια φάση. Η διαδικασία μπορεί να διεκπεραιωθεί και σε ψυχρά ή θερμά τοιχώματα αντιδραστήρων [5].

ΕΝΑΠΟΘΕΣΗ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΤΟΞΟ: πρόκειται για μία ευρέως διαδεδομένη μέθοδο, που χρησιμοποιείται για μαζική παραγωγή νανοσωλήνων άνθρακα και φουλλερενίων. Αποτελείται από ένα θάλαμο κενού, με ψυχρά τοιχώματα και δυο ηλεκτρόδια, που δημιουργούν το τόξο, με το θετικό ηλεκτρόδιο να είναι συνήθως το

υλικό παραγωγής νανοσωματιδίων, το οποίο με τη δημιουργία του τόξου εξατμίζεται. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και καταλύτες ή αδρανή αέρια, εφόσον το απαιτεί το επεξεργαζόμενο σύστημα [5].

ΔΕΣΜΗ ΙΟΝΤΩΝ: υπάρχει πληθώρα παραδειγμάτων όπου χρησιμοποιούνται ιόντα υψηλού ή χαμηλού ενεργειακού περιεχομένου, για την παραγωγή νανοσωματιδίων. Τα ιόντα τροφοδοτούνται προς ένα θερμαινόμενο υπόστρωμα με ένα πιστόνι, το οποίο τα επιταχύνει ανάλογα με το ενεργειακό περιεχόμενο που επιδιώκεται να αποκτήσουν. Συχνά η χρήση της δέσμης ιόντων συνδυάζεται και με άλλες μεθόδους αλλά και άλλα υλικά, ώστε να επιτευχθούν οι τελικές επιθυμητές ιδιότητες των νανοσωματιδίων [5].

ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΕΣΜΗ (MBE- molecular beam epitaxy): η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την απόθεση στοιχείων ή κι ενώσεων, σε μορφή κβαντικών σημείων, μεμβρανών ή συρμάτων, κατά αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο. Απαιτούνται ειδικές πηγές παραγωγής μοριακής δέσμης από το χρησιμοποιούμενο υλικό, γνωστές ως κελιά διάχυσης ή Knudsen, τα οποία αποθέτουν υλικό με χαμηλό ρυθμό, ενώ η θερμοκρασία διατηρείται υψηλή [5].

II. ΜΕ ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Οι χημικοί μέθοδοι που εξετάζονται, πραγματοποιούνται κυρίως σε υγρή φάση. Συχνά τα νανοσωματίδια σε αυτές τις μεθόδους έχουν τη μορφή κολλοειδών σωματιδίων, τα οποία λαμβάνονται με διήθηση από το διάλυμα, ξηραίνονται και λαμβάνονται τελικά σε μορφή σκόνης. Ορισμένα πλεονεκτήματα αυτών των μεθόδων παρουσιάζονται επιγραμματικά [5]:

- Απλή στη λειτουργία μεθοδολογία,
- Οικονομική διαδικασία, με απλή συγκριτικά διάταξη παρασκευής,
- Δεν απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες ή πιέσεις,
- Είναι δυνατή η ενσωμάτωση επιπλέον ατόμων, στοιχείων ή ενώσεων κατά τη σύνθεση,
- Μπορούν να παραχθούν άμεσα μεγάλες ποσότητες νανοσωματιδίων,
- Υπάρχει δυνατότητα παραγωγής νανοσωματιδίων διαφορετικών μεγεθών και μορφής,
- Τα τελικά προϊόντα, μπορούν εύκολα να μετατραπούν από την υγρή μορφή τους, σε μορφή σκόνης, ή και φιλμ.

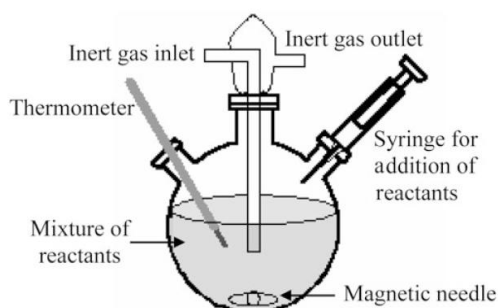
ΚΟΛΛΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΚΟΛΛΟΕΙΔΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ: πρόκειται για συστήματα όπου δύο ή περισσότερες φάσεις (στερεή, υγρή ή αέρια) συνυπάρχουν, με τις διαστάσεις τουλάχιστον μίας φάσης να μην ξεπερνά τη μικροκλίμακα, ενώ στην περίπτωση των κολλοειδών νανοσωματιδίων, η μία τουλάχιστον διάσταση θα πρέπει να βρίσκεται στη νανοκλίμακα. Καθώς τα κολλοειδή συστήματα αποτελούνται από μεγάλες

επιφάνειες ως προς τον όγκο τους, υπάρχει μεγάλος αριθμός ατόμων, στοιχείων και σωματιδίων στην επιφάνειά τους, τα οποία δημιουργούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε αντιδράσεις ή συσσωματώματα. Θεωρώντας την πιο απλή μορφή συστήματος, που αποτελείται από σφαιρικά κολλοειδή σωματίδια, ίδιων διαστάσεων διαλυμένα σε υγρό μέσο, παρατηρείται μία κινητικότητα, γνωστή ως κίνηση Brown. Αυτή η κίνηση είναι τυχαία, προκαλώντας αύξηση της θερμοκρασίας αλλά και συγκρούσεις σωματιδίων. Η μέση απόσταση που διανύουν τα σωματίδια προκύπτει προσεγγιστικά από την εξίσωση:

$$\Delta R^2 = \left(\frac{kT}{3\pi\eta r} \right) \Delta t$$

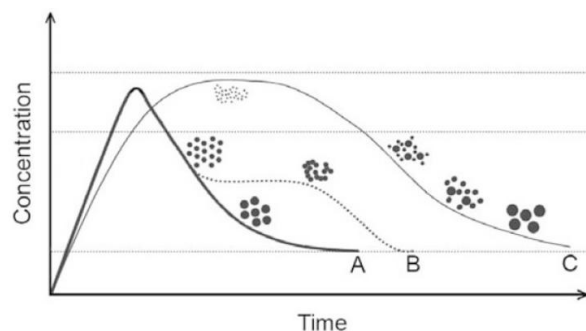
Όπου R είναι η απόσταση που διανύει ένα σωματίδιο σε χρόνο t, k η σταθερά του Boltzmann, T η θερμοκρασία του υγρού μέσου, r η ακτίνα του σωματιδίου και η το ιξώδες του μέσου. Η πιο απλή μορφή αλληλεπίδρασης είναι η Van der Waals, που μπορεί να εμφανισθεί ως έλξη ή άπωση των σωματιδίων.

Έτσι, τα κολλοειδή συστήματα αποτελούνται από σωματίδια διαφορετικών σχημάτων, διεσπαρμένα σε ένα μέσο, που μένουν σταθεροποιημένα χάρη σε δυνάμεις Coulomb, μεταξύ των σωματιδίων. Νανοσωματίδια παρατηρούνται και σε τέτοιου είδους συστήματα, με τη διαφορά ότι το μέγεθος τους είναι κατά εκατοντάδες φορές μικρότερο από το συνηθισμένο. Η δε σύνθεση τους αποτελεί μία γνωστή μέθοδο εδώ και πολλά χρόνια, παρέχοντας σταθερά κολλοειδή συστήματα. Η χημική σύνθεση των συστημάτων αυτών λαμβάνει χώρα συνήθως σε γυάλινους αντιδραστήρες, η διάταξη συνήθως διαθέτει υποδοχές για εισαγωγή θερμομέτρου, αερίων, pHμετρου αλλά κι εξόδους για την αφαίρεση παραπροϊόντων, ενώ συχνά υπάρχει και ειδικό εξάρτημα για ανάδευση του συστήματος, ενώ προτιμάται το σύστημα να βρίσκεται σε αδρανή ατμόσφαιρα, για έλεγχο των αντιδράσεων [5].



Εικόνα 3 τυπικό παράδειγμα χημικού αντιδραστήρα παραγωγής νανοσωματιδίων [5].

Η δημιουργία των σωματιδίων γίνεται σταδιακά, μέσω της δημιουργίας αρχικών πυρήνων, οι οποίοι αυξάνονται με το χρόνο.



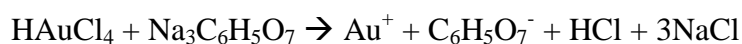
Εικόνα 4 διαδικασία σχηματισμού κι αύξησης πυρήνων νανοσωματιδίων (διάγραμμα LaMer) [5].

Ο σχηματισμός των πυρήνων μπορεί να συμβεί αυθόρμητα, ομογενώς μεταξύ των αντιδρώντων σωματιδίων, ή ετερογενώς, σε επιφάνειες πρόσθετων σωματιδίων ή τοιχωμάτων που υποβοηθούν τη διεργασία. Η διαδικασία μπορεί να ακολουθήσει διαφορετικές οδούς, ανάλογα με τη θερμοδυναμική κατάσταση του εκάστοτε συστήματος, η οποία προσεγγίζεται με τη σχέση:

$$\Delta G_r = \frac{3}{4}\pi r^3 \Delta G_v + 4\pi r^2 \gamma_{SL}$$

Όπου r η ακτίνα των αρχικών πυρήνων, ΔG_v η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας ανά μονάδα όγκου ανάμεσα σε υγρό και στερεό, και γ_{SL} διεπιφανειακή ελεύθερη ενέργεια υγρού και στερεού. Η θερμοκρασία του συστήματος παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία αύξησης πυρήνων [5].

ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΜΕΣΩ ΚΟΛΛΟΕΙΔΟΥΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ: η δημιουργία των μεταλλικών νανοσωματιδίων πραγματοποιείται συνήθως με διάσπαση μεταλλικού άλατος ή οξέως, ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αντίδραση παραγωγής σωματιδίων χρυσού:



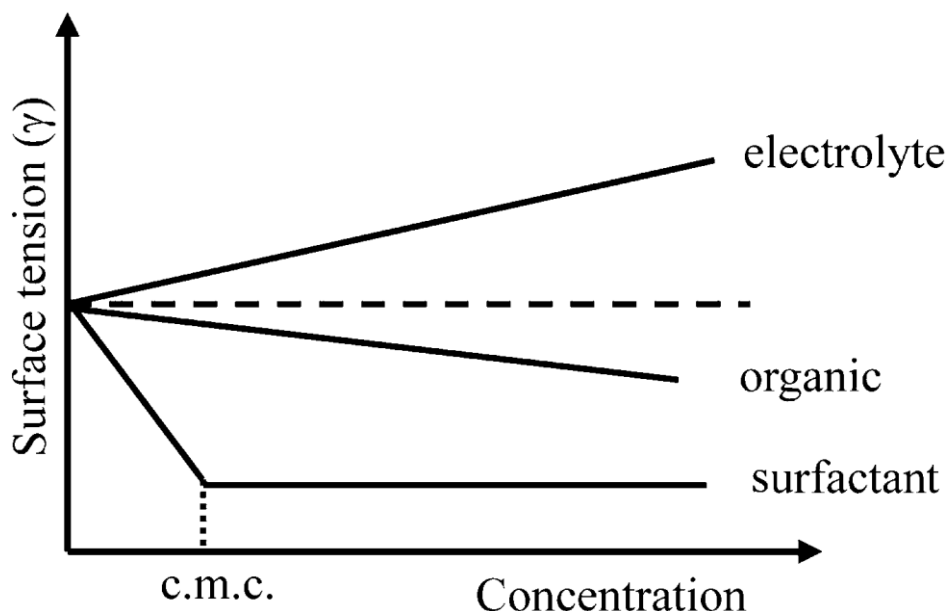
Ακολουθεί μία επεξεργασία σταθεροποίησης των νανοσωματιδίων, ενώ με παρόμοιο τρόπο μπορούν να παραχθούν και νανοσωματίδια άλλων μετάλλων, όπως αργύρου, παλλαδίου και χαλκού, ρυθμίζοντας κατάλληλα κάθε φορά τις συνθήκες λειτουργίας της διάταξης. Αντίστοιχα παράγονται και ημιαγώγιμα νανοσωματίδια. Πρέπει να σημειωθεί ότι συχνά τα σωματίδια κρίνεται αναγκαίο να παθητικοποιούνται επιφανειακά, δηλαδή να εμποδίζεται ο σχηματισμός συσσωματωμάτων ή αλλοιώσεων, λόγω πιθανών ηλεκτροστατικών ή άλλων δυνάμεων έλξης που ενδέχεται να δημιουργηθούν και να τα αποσταθεροποιήσουν. Έτσι, χρησιμοποιείται ευρέως η χημική επικάλυψη των νανοσωματιδίων, με χρήση διαφορετικών υλικών και τεχνικών, παρέχοντας σταθερά νανοσωματίδια, με διαφορετικές μορφές και σε μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος. Επειδή συχνά το μέγεθος των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων παρουσιάζει μεγάλη διασπορά, συχνά χρησιμοποιείται μία τεχνική εκλεκτικής καθίζησης, βάση μεγέθους. Στη συγκεκριμένη τεχνική γίνεται χρήση ζευγών διαλύτη-αντιδιαλύτη, όπως χλωροφόρμιο-μεθανόλη και

διμεθυλοσουλφοξείδιο- διεθυλαιθέρας. Αναλυτικά, τα νανοσωματίδια διασπείρονται στον διαλύτη τους, σχηματίζοντας ένα διαυγές σύστημα διασποράς, ενώ στη συνέχεια προστίθεται ο αντιδιαλύτης, προκαλώντας κροκιδώση του συστήματος. Το υπερκείμενο και κροκιδωμένο μέρος μπορούν εύκολα να διαχωριστούν με φυγοκέντρηση, από την οποία τα νανοσωματίδια παραλαμβάνονται σε μορφή ιζήματος, τα οποία παρουσιάζουν αρχικά αυξημένες διαστάσεις, ωστόσο με επαναλήψεις της διαδικασίας μπορούν σταδιακά να ληφθούν και μικρότερα νανοσωματίδια. Η συγκεκριμένη μέθοδος βρίσκει πολύ μεγάλο εύρος εφαρμογών καθώς διαθέτει το πλεονέκτημα των ήπιων λειτουργικών συνθηκών, μπορεί να παρασκευάσει σταθερά μόρια για μεγάλο χρονικό διάστημα, ανάλογα πάντα και με το εξεταζόμενο σύστημα, ενώ δίνεται η δυνατότητα ενσωμάτωσης κι άλλων στοιχείων ή ενώσεων στα νανοσωματίδια, τα οποία μπορούν να βελτιώσουν περαιτέρω τις τελικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων [5].

ΜΕΘΟΛΟΣ LANGMUIR- BLODGETT: πρόκειται για μία τεχνική που πήρε το όνομά της από τους επιστήμονες που την ανέπτυξαν και αφορά τη μεταφορά οργανικών επιστρώσεων από διεπιφάνειες αερίου- υγρού, σε στερεό υπόστρωμα. Η τεχνική διαχειρίζεται αμφιφιλικά μόρια, μεγάλης μοριακής αλυσίδας, τα οποία παρουσία νερού συγκεντρώνουν τα υδρόφοβα τμήματά τους στην αέρια επιφάνεια. Συχνά χρησιμοποιούνται και επιφανειοδραστικές ουσίες, δηλαδή οργανικά μακρομόρια (με γενική μορφή $[CH_3(CH_2)_nCOOH]$ και $n > 14$), που διαθέτουν ένα πολικό- υδρόφιλο άκρο κι ένα υδρόφοβο- μη πολικό. Χρησιμοποιώντας εξωτερικούς φραγμούς είναι δυνατό να συμπιεστούν τα μακρομόρια αυτά, δημιουργώντας κατ'αυτό τον τρόπο στοιβάδες, με ευθυγραμμισμένες τις υδρόφοβες άκρες τους. Οι σχηματιζόμενες στοιβάδες λοιπόν είναι δυνατό να αποτεθούν σε κάποιο στερεό υπόστρωμα, όπως γυαλί ή σιλικόνη, με απλή εμβάπτιση του στερεού στο σύστημα της σχηματισμένης στοιβάδας, ενώ με διαδοχικές εμβάπτσεις είναι δυνατή η δημιουργία πολυστρωματικών επικαλύψεων των στερεών υποστρωμάτων [5].

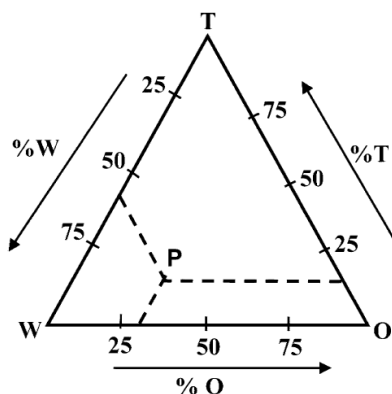
ΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ: η παραγωγή νανοσωματιδίων με γαλακτώματα είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική. Βασικό πλεονέκτημά της είναι η βιοσυμβατότητα και βιοαποικοδομησιμότητα των παραγόμενων υλικών, βρίσκοντας έτσι χρήση σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Η τεχνική βασίζεται στην τάση μη αναμίξιμων ρευστών να σχηματίζουν φυσαλίδες, όταν αναμιχθούν κι αναδευτούν μηχανικά. Οι σχηματιζόμενες φυσαλίδες έχουν μέγεθος που κυμαίνεται από 100 nm έως και mm, ενώ το γαλάκτωμα εμφανίζει συνήθως θολερότητα. Στις περιπτώσεις μικρογαλακτωμάτων οι σχηματιζόμενες φυσαλίδες έχουν διαστάσεις της τάξης ~1-100nm, όπως απαιτείται και για τη σύνθεση νανοσωματιδίων. Όταν βρεθούν αμφιφιλικά μόρια σε υδατικό περιβάλλον, διατάσσονται στη διεπιφάνεια αέρα- διαλύματος με τέτοιο τρόπο, ώστε το υδρόφοβο μέρος να βρίσκεται στην αέρια επιφάνεια, αυτά τα μόρια ονομάζονται επιφανειακά δραστικά. Κατά παρόμοιο τρόπο συμπεριφέρονται και υδρογονανθρακικά μόρια όταν βρεθούν σε υδατικό μέσο. Όταν προστίθενται επιφανειοδραστικά μόρια σε υδατικά διαλύματα, έχουν την τάση να

σχηματίζουν τις λεγόμενες δομές μικκυλίων κι αντίστροφων μικκυλίων, με την ανάμιξή τους σε έλαια, με το υδρόφοβο τμήμα στο εσωτερικό κι εξωτερικό του μικκυλίου αντίστοιχα. Η δε επιφανειακή τάση των ρευστών, μπορεί να μεταβληθεί ανάλογα με την προσθήκη επιπλέον μορίων όπως φαίνεται και στο ακόλουθο διάγραμμα, όπου για την περίπτωση των επιφανειοδραστικών ουσιών, φαίνεται πως η τάση μειώνεται μέχρι μιας κρίσιμης τιμής συγκέντρωσης μικκυλίων [5].



Εικόνα 5 μεταβολή της επιφανειακής τάσης [5].

Στα μικρογαλακτώματα, οι επιφανειοδραστικές ουσίες χρησιμεύουν για να δώσουν σταθερότητα στο σύστημα. Όταν ένα οργανικό ρευστό ή έλαιο (O), υγρό (W) και επιφανειοδραστικό (T) αναμιχθούν, σε κατάλληλες αναλογίες, σχηματίζονται λοιπόν μικκύλια, η σύσταση των οποίων μπορεί να καθορισθεί με χρήση τριαδικού διαγράμματος φάσεων όπως φαίνεται στο ακόλουθο διάγραμμα [5].



Εικόνα 6 τριαδικό διάγραμμα φάσεων, όπου π.χ. το σημείο P έχει σύσταση 60% W, 26% O, 14% T [5].

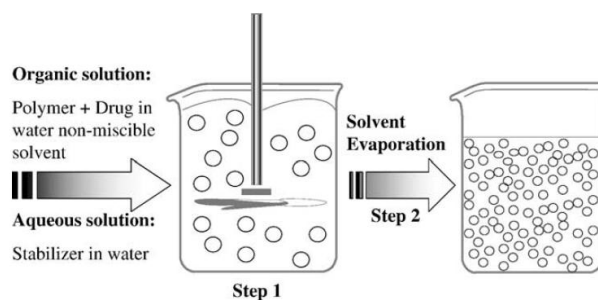
Οι επιφανειοδραστικές ουσίες, χωρίζονται κυρίως σε τέσσερις κατηγορίες, κατιόντα, ανιόντα, μη ιοντικές και επαμφοτερίζουσες και έχουν στόχο να μειώσουν την

επιφανειακή τάση του υδατικού μέσου, μέχρι ένα κρίσιμο σημείο και να παραμείνει εκεί σταθερό παρά την αύξηση της συγκέντρωσης των οργανικών διαλυτών. Οι αναλογίες των συστατικών είναι που θα καθορίσουν και το τελικό μέγεθος των σχηματιζόμενων μικκυλίων, φυσαλίδων και εν τέλει νανοσωματιδίων [5].

Γαλακτωματοποίηση- εξάτμιση διαλύτη: η τεχνική περιλαμβάνει δύο φάσεις υδατική κι οργανική και παρατηρούνται δύο βήματα. Αρχικά γίνεται γαλακτωματοποίηση του οργανικού διαλύματος πολυμερούς (ή και διαλύματος δραστικής ουσίας σε περιπτώσεις εγκλεισμών) σε μία υδατική φάση. Σε δεύτερο στάδιο γίνεται εξάτμιση διαλύτη και σχηματισμός νανοσωματιδίων. Το διάλυμα του πολυμερούς διασκορπίζεται σε σταγονίδια σε ένα μέσο διασποράς, συνήθως έναν μη διαλύτη του συστήματος, με χρήση επιφανειοδραστικού παράγοντα ή ομογενοποιητή υψηλής ενέργειας. Ακολουθεί η εξάτμιση του διαλύτη του πολυμερούς, με αποτέλεσμα τη συμπύκνωση του πολυμερούς και το σχηματισμό νανοσωματιδίων, στα οποία διαχέεται η δραστική ουσία. Η εξάτμιση του διαλύτη μπορεί να πραγματοποιηθεί με αύξηση της θερμοκρασίας υπό κενό, ή με παρατεταμένη ανάδευση. Το μέγεθος των παραγόμενων νανοσωματιδίων ενδέχεται να επηρεαστεί από:

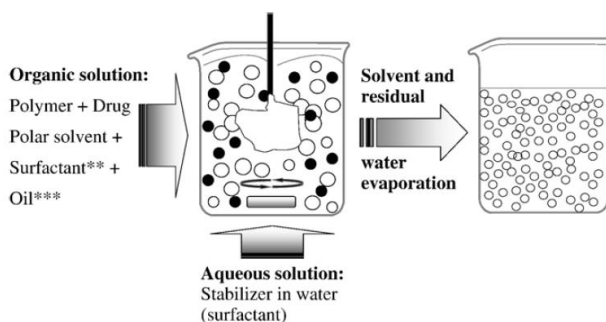
- Τον ρυθμό ανάδευσης,
- Τον τύπο και την ποσότητα της επιφανειοδραστικής ουσίας και διαλυτών,
- Το ιξώδες οργανικής και υδατικής φάσης,
- Τον λόγο υδατικής κι οργανικής φάσης,
- Το pH του γαλακτώματος,
- Το μοριακό βάρος του πολυμερούς,
- Συγκέντρωση διαλύτη και πολυμερούς,
- Τη θερμοκρασία.

Πιο διαδεδομένη μορφή γαλακτωμάτων είναι αυτή της οργανικής/υδατικής μορφής (oil/water), καθώς χρησιμοποιείται νερό ως μη διαλύτης, γεγονός που απλοποιεί τη διεργασία, καθώς δεν απαιτείται ανάκτηση διαλύτη, απαλείφοντας στάδια έκπλυσης και πιθανά συσσωματώματα. Ωστόσο μπορεί συχνά να προκύψουν προβλήματα περιορισμών στα συστήματα εγκλεισμού, τα οποία πρέπει να είναι λιποδιαλυτής φύσης, ενώ συχνά η αύξηση της παραγωγής (scale up), μπορεί να επιφέρει ενεργειακούς περιορισμούς κατά την ομογενοποίηση του γαλακτώματος.



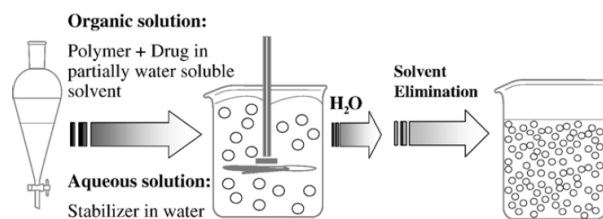
Εικόνα 7 σχηματική απεικόνιση τεχνικής γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη.

Μετατόπιση διαλύτη και διεπιφανειακή απόθεση: πρόκειται για μία συναφή μέθοδο παρασκευής νανοσωματιδίων με χρήση γαλακτώματος. Πραγματοποιείται ταχύτατα γαλακτωματοποίηση της οργανικής φάσης πολυμερούς και δραστικής ουσίας, με την προσθήκη τους σε μία υδατική φάση. Η μετατόπιση διαλύτη πραγματοποιείται με κατακρήμνιση του πολυμερούς και διάχυση του οργανικού διαλύτη στην υδατική φάση, παρουσία ή όχι επιφανειοδραστικού. Το πολυμερές διαλύεται σε διαλύτη, υδατικά αναμίξιμο, μεσαίας πολικότητας που θα οδηγήσει στην επιθυμητή κατακρήμνιση, με μορφή νανοσφαιρών. Αυτή η φάση προστίθεται με ένεση στην αναδευόμενη υδατική φάση, η οποία περιέχει την επιφανειοδραστική ουσία. Η εναπόθεση πολυμερούς στη διεπιφάνεια υδατικής φάσης κι οργανικού διαλύτη, λόγω ταχείας διάχυσης του διαλύτη, δημιουργεί εναιώρημα πολυμερούς. Για τη δημιουργία του κολλοειδούς αυτού συστήματος, απαιτείται χρήση κατάλληλων διαλυτών, όπου θα είναι αναμίξιμοι μεν με το νερό αλλά όχι διαλύτες του πολυμερούς. Ο εγκλεισμός ουσιών γίνεται με προσθήκη δραστικών ουσιών (κυρίως λιπόφιλων ουσιών). Στην περίπτωση της διεπιφανειακής απόθεσης, χρησιμοποιείται μία ακόμη ουσία λιπαρής φύσης (oil), αναμίξιμη με το πολυμερές αλλά όχι με το τελικό μίγμα. Έτσι το πολυμερές αποτίθεται στην επιφάνεια των λιπαρών σταγονιδίων σχηματίζοντας νανοσωματίδια. Σε αυτή την περίπτωση το πολυμερές και η δραστική ουσία διαλύονται στο ίδιο οργανικό διάλυμα.



Εικόνα 8 σχηματική απεικόνιση τεχνικής μετατόπισης διαλύτη και διεπιφανειακής απόθεσης (στη δεύτερη υπάρχει και προσθήκη επιπλέον λιπαρής ουσίας).

Γαλακτωματοποίηση/ διάχυση διαλύτη (ESD = emulsification solvent diffusion): η μέθοδος ξεκίνησε με χρήση μόνο οργανικών διαλυτών κι επεκτάθηκε σε τεχνική εξαλάτωση; (salting out procedure). Το πολυμερές διαλύεται σε μερικώς υδατικό διαλύτη, στη συνέχεια εξασφαλίζεται θερμοδυναμική σταθερότητα με κορεσμό του διαλύματος σε νερό. Η κορεσμένη φάση γαλακτωματοποιείται σε υδατικό διάλυμα, επιφανειοδραστικής ουσίας, με αποτέλεσμα να επέρχεται διάχυση του διαλύτη του πολυμερούς στην εξωτερική υδατική φάση και ταυτόχρονος σχηματισμός νανοσωματιδίων. Εν τέλει ο διαλύτης απαλείφεται από το σύστημα με εξάτμιση ή φιλτράρισμα, ανάλογα με το σημείο ζέσεως.



Εικόνα 9 σχηματική απεικόνιση ESD τεχνικής.

ΜΕΘΟΔΟΣ Sol-Gel: πρόκειται για μία μέθοδο που χρησιμοποιεί δύο διαφορετικά είδη υλικών, όπως φανερώνει και το όνομά της. Παρουσιάζει συγκριτικό πλεονέκτημα σε μέθοδος λόγω των χαμηλών ενεργειακών απαιτήσεων, καθώς απαιτεί χαμηλές θερμοκρασίες. Ο όρος ‘sol’ αναφέρεται σε στερεά σωματίδια, στο εσωτερικό ρευστών συστημάτων, δηλαδή αφορούν μία υποκατηγορία κολλοειδών συστημάτων. Τα “gels” είναι δίκτυα σωματιδίων τα οποία διαθέτουν πορώδες για τη διάχυση του ρευστού. Η μέθοδος ‘sol-gel’ λοιπόν αφορά την κατασκευή των αρχικών στερεών σωματιδίων στο ρευστό, τα οποία στη συνέχεια ενώνονται σε δίκτυο, σχηματίζοντας πλέγματα. Με την εξάτμιση του ρευστού είναι εφικτό να παραληφθούν τα παραγόμενα σωματίδια σε διαφορετικές μορφές, όπως σκόνη ή φιλμ. Κατά την σύνθεση των “sol-gels” πραγματοποιούνται διαδοχικά, υδρόλυση πρόδρομων ενώσεων, συμπύκνωση ή πολυσυμπύκνωση για ζελατινοποίηση και τελικώς ξήρανση. Ως πρόδρομες χημικές ενώσεις, χρησιμοποιούνται ουσίες που σχηματίζουν εύκολα πηκτώματα, συνήθως αλκοξείδια ή άλατα μετάλλων [5].

ΥΔΡΟΘΕΡΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ: η μέθοδος αυτή προτιμάται σε περιπτώσεις παραγωγής νανοσωματιδίων μεγάλης κλίμακας. Αναλυτικά, ορισμένες πρόδρομες ενώσεις τοποθετούνται σε μεταλλικά συνήθως δοχεία (αυτόκλειστα), υπόκεινται σε υψηλές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης (έως 300°C και 100 bar), και επέρχεται τελικά διάλυση των ενώσεων. Χρησιμοποιείται κυρίως σε δυσδιάλυτες για συνθήκες περιβάλλοντος ενώσεις, αλλά κι ενώσεις που κοντά στο σημείο τήξης τους, εμφανίζουν υψηλή τάση ατμών ή ασταθείς κρυσταλλικές φάσεις. Μία παραλλαγή της μεθόδου είναι γνωστή ως εξαναγκασμένη υδρόλυση [5].

ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (sonochemical): σε αυτή την τεχνική αυξάνεται η δραστηριότητα των πρόδρομων ενώσεων, χάρη στην ενέργεια που εκλύουν φυσαλίδες όταν διαρρηγνύονται, οι οποίες έχουν αρχικά σχηματισθεί με τη βοήθεια υπερήχων. Τα υπερηχητικά κύματα σε συχνότητες ~20 kHz–2 MHz διαπερνούν το ρευστό δημιουργώντας τις φυσαλίδες. Σημαντικό ρόλο στην τεχνική παίζει η επιλογή κατάλληλου διαλύτη για το σύστημα [5].

ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ: με τη χρήση μικροκυμάτων παράγεται θερμότητα καθώς τα μόρια των διαλυμάτων προσπαθούν να προσανατολισθούν ανάλογα με τα επιβαλλόμενα ηλεκτρομαγνητικά πεδία. Έτσι, μέσω της ταλάντωσης των μορίων παράγεται θερμότητα, η οποία χρησιμοποιείται για την παραγωγή οξειδίων, σουλφιδίων και ποικιλίας νανοσωματιδίων, με διαφορετικά σχήματα και μεγέθη, σε αρκετά σύντομο χρονικό διάστημα [5].

ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΙΚΡΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ (Lab-On-Chip): αφορά μία νέα μέθοδο παρασκευής νανοσωματιδίων σε μικρές ωστόσο ποσότητες. Χρησιμοποιεί κατάλληλα υποστρώματα τα οποία διαθέτουν κανάλια, παρόμοια με ηλεκτρικά κυκλώματα, με περιοχές για ανάδευση και βαλβίδες για ρύθμιση της ροής. Το περίβλημα του υποστρώματος πρέπει να είναι αδρανές με το σύστημα, ενώ μπορεί να εφαρμοστεί και θερμότητα αν είναι απαραίτητο. Τα υποστρώματα με μορφή μικροτσίπ, μπορεί να μην ξεπερνούν σε μέγεθος τα $\sim 10\text{cm}^2$, ενώ έχουν δυνατότητα παραγωγής ποικιλίας νανοσωματιδίων, στα οποία μπορούν και να εγκλεισθούν διάφορες δραστικές ουσίες. Τα συγκεκριμένα συστήματα είναι σχετικά σύγχρονη κι ευαίσθητη τεχνολογία, αλλά πολλά υποσχόμενη [5].

ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΣ: τα πολυμερικά, κυρίως βιοδιασπώμενα νανοσωματίδια, μπορούν να διακριθούν ως μία ξεχωριστή κατηγορία, λόγω του μεγάλου αριθμού προϊόντων και τεχνικών παρασκευής τους. Τα νανοσωματίδια που δημιουργούνται κατά τον πολυμερισμό, μπορεί να προέρχονται τόσο από συνθετικά όσο κι από φυσικά μονομερή- μακρομόρια.

Πολυμερισμός γαλακτώματος: πρόκειται για μία ταχύτατη μέθοδο παρασκευής, με δυνατότητα αύξησης (scale up) της παραγωγής. Αρχικά παρασκευάζεται μία οργανική φάση με διασπορά μονομερούς σε γαλάκτωμα, ή σε μη διαλύτη του πολυμερούς, συχνά με χρήση κάποιου επιφανειοδραστικού. Παρόμοια μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συνεχής φάση υδατικό διάλυμα. Η αντίδραση πολυμερισμού μπορεί να λάβει χώρα μέσω ιόντων ή με ελεύθερες ρίζες, ενώ για την εκκίνηση του πολυμερισμού συχνά γίνεται ακτινοβόληση του συστήματος (γ-ακτινοβολία, υπεριώδης ή ορατή). Ο διαχωρισμός των σωματιδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί και πριν την ολοκλήρωση του πολυμερισμού. Επίσης μπορεί να γίνει ταυτόχρονα κι εγκλεισμός δραστικών μορίων κατά την διαδικασία πολυμερισμού.

Διεπιφανειακός πολυμερισμός: στην εν λόγω μέθοδο, γίνεται συνεκβολή πολυμερούς και δραστικής ουσίας, ενώ η άκρη του εκβολέα έχει προσαρμοσμένη βελόνα, που οδηγεί το προϊόν σε αναδευόμενο υδατικό διάλυμα, που περιέχει επιφανειοδραστικό ή και κάποιο οργανικό διαλύτη. Το αιώρημα που προκύπτει μπορεί να συμπυκνωθεί στη συνέχεια με εξάτμιση υπό κενό. Η παρασκευή νανοσωματιδίων μπορεί να γίνει και με διεπιφανειακή πολυσυμπύκνωση, με χρήση λιπόφιλου κι υδρόφιλου μονομερούς, σε οργανικό διαλύτη τους, υπό την παρουσία ή όχι επιφανειοδραστικού.

III. ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ:

Στη φύση απαντάται συχνά η παραγωγή ανόργανων υλικών κι ιχνοστοιχείων, σε πολύ μικρά μεγέθη. Πολλά από τα υλικά που παράγει η φύση σε μικροοργανισμούς, είναι δυνατό να παραχθούν κι εργαστηριακά, αποτελώντας μάλιστα έναν πολλά υποσχόμενο τομέα, που καλείται οικολογική ή πράσινη σύνθεση. Οι επιστήμονες μιμούμενοι την παρασκευή νανοσωματιδίων από τη φύση, παράγουν ανόργανες κυρίως ενώσεις, κάνοντας χρήση βιοϋλικών όπως ενζύμων, DNA και μεμβρανών.

Συγκεκριμένα η βιολογική σύνθεση νανοσωματιδίων μπορεί να διακριθεί σε τρεις κατηγορίες [5]:

- Με βάση τη χρήση μικροοργανισμών, όπως μύκητες, ευκαρυωτικοί, προκαρυωτικοί οργανισμοί ή βακτήρια.
- Χρήση φυτικών εκχυλισμάτων ή ενζύμων,
- Χρήση υποστρώματων όπως DNA, μεμβρανών ή ιών.

ΑΥΘΟΡΜΗΤΟΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΙ: Όπως προδιαθέτει και το όνομα της μεθόδου, πρόκειται για μία τεχνική παραγωγής σχηματισμών, με κινητήρια δύναμη την ιδιότητα των φυσικών συστημάτων, να οδεύουν προς διαμορφώσεις χαμηλότερης ενέργειας. Οι αυθόρμητοι σχηματισμοί είναι αποτέλεσμα δυνάμεων όπως van der Waals, δεσμών υδρογόνου, στατικών, μαγνητικών και άλλων αλληλεπιδράσεων. Οι σχηματισμοί που προκύπτουν είναι αντιστρεπτοί, με τοπικές διαμορφώσεις οι οποίες σταθεροποιούνται θερμοδυναμικά. Οι σχηματισμοί μπορούν να δημιουργηθούν αυθόρμητα, αλλά και να υποβοηθηθούν με εξωτερικές δυνάμεις όπως θερμοκρασία, πίεση και ηλεκτρομαγνητικά πεδία, ενώ τα παραγόμενα σωματίδια καλούνται στατικοί και δυναμικοί σχηματισμοί αντίστοιχα. Μία περαιτέρω διάκριση είναι σε ιεραρχικά, κατευθυνόμενα και συνδυασμένα συστήματα αυθόρμητων σχηματισμών. Όπου στην πρώτη περίπτωση συμμετέχει ένα μόνο είδος σωματιδίων μεταξύ των οποίων αναπτύσσονται αλληλεπιδράσεις, στη δεύτερη τα δομικά σωματίδια καταλαμβάνουν προ-σχεδιασμένες θέσεις σε υποστρώματα όπως μεμβράνες ή πορώδη υλικά, ενώ στην τελευταία κατηγορία, διαφορετικοί σχηματισμοί, υφίστανται αλληλοεπιδράσεις οδηγώντας σε νέες διαμορφώσεις, με συνδυασμό των προγενέστερων δομικών μονάδων. Στην πράξη χρησιμοποιούνται οργανικά κι ανόργανα μόρια, καθώς και βιολογικά συστήματα ώστε να κατευθύνουν την αυθόρμητη δημιουργία δομών, οι οποίες βρίσκουν πλήθος εφαρμογών, όπως υλικά με κενές θέσεις φωτονίων, αισθητήρες, λέιζερ, φωτοβολταϊκά κελιά, αλλά και διαμορφώσεις με χρήση DNA, οι οποίες αξιοποιούνται σε νανοδομές ηλεκτρονικών συσκευών και υπολογιστών [5].

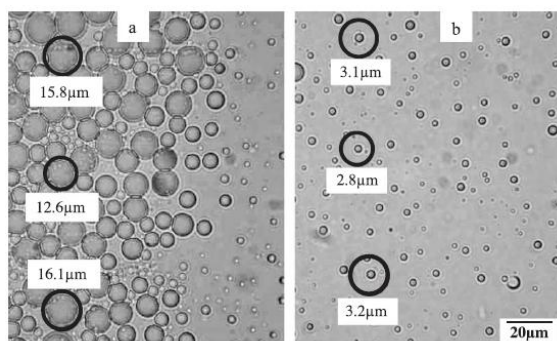
2.2.4 Μηχανισμός δημιουργίας νανοσωματιδίων

Στις τεχνικές εξάτμισης διαλύτη όπου εστιάζουμε, τα τελικά σωματίδια φαίνεται να δημιουργούνται κατά την εξαγωγή του διαλύτη από τα αρχικά σταγονίδια του όποιου κολλοειδούς συστήματος, μέσω κάποιας υδατικής φάσης. Η διαδικασία ελέγχεται από τη διάχυση του διαλύτη του πολυμερούς. Η διαδικασία ξεκινά με την απομάκρυνση του διαλύτη κι επιταχύνεται δημιουργώντας κατακρήμνιση του πολυμερούς, η οποία συμβάλει στην περαιτέρω εξάλειψη του διαλύτη και την τελική δημιουργία των σωματιδίων. Στις συνηθέστερες περιπτώσεις συγκέντρωσης πολυμερών (1-10% w/v), παρατηρείται σημαντική συρρίκνωση των αρχικών

σταγονιδίων του γαλακτώματος, με αποτέλεσμα τα τελικά σωματίδια να έχουν αρκετά μικρότερη διάμετρο, όπως είναι αναμενόμενο. Έχει ορισθεί ο συντελεστής συρρίκνωσης (a_t) κι έχει προσδιορισθεί πειραματικά από τον Iosif Daniel Rosca και την ομάδα του, ως ο λόγος διαμέτρου της σταγόνας του γαλακτώματος και της τελικής διαμέτρου σωματιδίων, μετά την εξάτμιση του διαλύτη. Γνωρίζοντας την αρχική συγκέντρωση του διαλύτη ισχύουν οι σχέσεις:

$$a_t = \frac{d_i}{d_f} = \left(\frac{V_p + V_s}{V_p}\right)^{1/3} = \left(1 + \frac{100\rho_p}{C_p}\right)^{1/3}$$

Όπου: d_i – η διάμετρος της σταγόνας του γαλακτώματος, d_t - η διάμετρος των σωματιδίων μετά την εξάτμιση του διαλύτη, V_p - ο όγκος του πολυμερούς, V_s - ο όγκος του διαλύτη, ρ_p - η πυκνότητα του πολυμερούς (g/ml), C_p - η συγκέντρωση του πολυμερούς (% w/v). Πρέπει να αναφερθεί ότι η συγκέντρωση του διαλύτη του πολυμερούς στην υδατική φάση συμβάλει στο τελικό μέγεθος των σωματιδίων καθώς και στην κατανομή μεγέθους τους. Για τον ομοιογενή σχηματισμό σωματιδίων κρίνεται κατάλληλο, η συγκέντρωση οργανικού διαλύτη στην υδατική φάση να είναι όσο το δυνατόν πλησιέστερα στο σημείο κορεσμού.



Εικόνα 10 μείωση μεγέθους σταγονιδίων γαλακτώματος με το πέρας της εξάτμισης διαλύτη του πολυμερούς.

Το μέγεθος της επικάλυψης του νανοσωματιδίου, συσχετίζεται άμεσα με τον μηχανισμό σχηματισμού των σωματιδίων. Μετά την επιλογή των κατάλληλων συνθηκών απομάκρυνσης του διαλύτη, πραγματοποιείται κατακρήμνιση του πολυμερούς στην επιφάνεια σταγονιδίων γαλακτώματος και υδατικής φάσης, τείνοντας στον σχηματισμό συνεχούς επικάλυψης της αρχικής σταγόνας γαλακτώματος. Με την ταυτόχρονη εξάτμιση του διαλύτη ωστόσο, επέρχεται η συρρίκνωση με αποτέλεσμα η επικάλυψη να κατακεραματίζεται, δημιουργώντας ποικιλομορφία σχηματισμών και πάχους. Η ταχύτητα της συρρίκνωσης επηρεάζει και την απόδοση του εγκλεισμού, καθώς η δραστική ουσία ξηραίνεται-αποστραγγίζεται, ταυτόχρονα με την έξοδο του διαλύτη του πολυμερούς. Στην βελτίωση της απόδοσης φαίνεται να συμβάλει η υψηλή συγκέντρωση πολυμερούς, λόγω μικρότερης συρρίκνωσης αλλά και οι περισσότερες περιπλοκές σχηματισμών των πολυμερικών αλυσίδων. [6] [7]

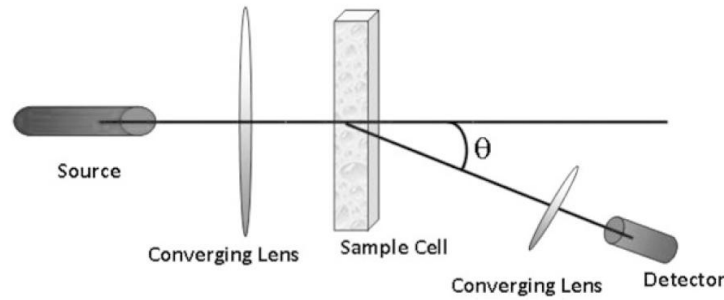
2.2.5. Τεχνικές ανάλυσης- χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων

Υπάρχει ποικιλία τεχνικών για τον χαρακτηρισμό νανοσωματιδίων σε μορφή κolloειδών συστημάτων διασποράς, μορφή σκόνης ή και φιλμ. Η επιλογή της τεχνικής συνήθως σχετίζεται με το χρησιμοποιούμενο υλικό και το είδος της πληροφορίας που θέλουμε να εκλάβουμε. Μεγάλο ενδιαφέρον έχουν στις τεχνολογίες νανοσωματιδίων ιδιότητες όπως μέγεθος, σύσταση, κρυσταλλική μορφή, αλλά και άλλες οπτικές και μαγνητικές ιδιότητες, ανάλογα και με το εξεταζόμενο κατά περίπτωση σύστημα. Θα επικεντρωθούμε στην ανάλυση μόνο όσων τεχνικών κρίνεται σκόπιμο για την εξεταζόμενη εφαρμογή. Για την κατανόηση της μορφής του κύριου όγκου των σωματιδίων γίνεται χρήση τεχνικών περίθλασης, όπως η δυναμική σκέδαση φωτός [5].

ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ (Dynamic Light Scattering): η τεχνική υπολογίζει το «υδροδυναμικό» μέγεθος των σωματιδίων, δηλαδή το επικρατέστερο μέγεθος ανάμεσα σε σωματίδια ακανόνιστου σχήματος, τα οποία βρίσκονται σε διασπορά σε υγρό μέσο, κι αντιστοιχεί στο πραγματικό μέσο μέγεθος σε περιπτώσεις γνωστού σχήματος σωματιδίων, όπως σφαιρικό. Η τεχνική βασίζεται στις παρατηρούμενες διακυμάνσεις της έντασης του ορατού φωτός, που σκεδάζεται από τα νανοσωματίδια, τα οποία εκτελούν τυχαία κίνηση Brown, διεσπαρμένα σε υγρό μέσο. Κατά τη μέτρηση, μία δέσμη μονοχρωματικής ακτινοβολίας κατευθύνεται μέσω λέιζερ σε μικρό όγκο υγρού, η ένταση του φωτός που σκεδάζεται, ανιχνεύεται στη συνέχεια από αισθητήρα, τοποθετημένο σε ορισμένη γωνία, σε σχέση με τη γωνία της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, το μήκος κύματος του φωτός και του δείκτη διάθλασης του μέσου διασποράς. Το διάνυσμα της σκέδασης δίνεται από τη σχέση [5]:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$$

Μία απλοποιημένη σχηματική απεικόνιση είναι η ακόλουθη:



Εικόνα 11 σχηματική απεικόνιση DLS [5].

Για να περιορισθεί ο αριθμός των ανακλώμενων ακτίνων, εξετάζεται συνήθως κάποιο αραιωμένο αντιπροσωπευτικό δείγμα. Η σταθερά διάχυσης για τα σωματίδια με μέση ακτίνα R δίνεται από τη σχέση Stokes – Einstein:

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

Όπου k η σταθερά Boltzmann, T η θερμοκρασία του μέσου και η το ιξώδες. Καθώς τα σωματίδια κινούνται με τυχαίο τρόπο, παρατηρούνται διακυμάνσεις στην ένταση των ανακλώμενων ακτινοβολιών, καθώς η μετρούμενη ένταση εξαρτάται από τη θέση των σωματιδίων. Για το λόγο αυτό, έχει μεγάλη σημασία και το χρονικό διάστημα διεξαγωγής της μέτρησης, ώστε η θέση των σωματιδίων να μην προλάβει να μεταβληθεί αισθητά. Ο συσχετισμός με το μέγεθος των σωματιδίων μειώνεται εκθετικά με το χρόνο σύμφωνα με τη σχέση:

$$g^1(t) = \exp(-q^2 D t)$$

Όπου με $g^1(t)$ συμβολίζεται η πρώτη τάξης σχέση κανονικοποιημένου συσχετισμού μεταξύ του διανύσματος περίθλασης q και της σταθεράς διάθλασης D . Με διεξαγωγή πολλαπλών μετρήσεων σε διαφορετικές γωνίες, προκύπτει ένας γραμμικός συνδυασμός από $g^1(t)$ και q^2 από τον οποίο προκύπτει ο δείκτης διάθλασης σε περιπτώσεις μονοδιάσπαρτων σωματιδίων, αλλιώς προκύπτει ο δείκτης διάθλασης για κάθε συστατικό i ως:

$$g^1(t) = \sum_{i=1}^n \exp(-q^2 D_i) A_i$$

Όπου D_i ο δείκτης διάχυσης του κάθε συστατικού με βάρος ή ποσότητα A_i . Έτσι, σε περιπτώσεις πολυδιάσπαρτων συστημάτων η σχέση ανάγεται στην τελική μορφή

$$g^1(t) = \exp(-q^2 D_i) (1 + K_1 + K_2 + \dots)$$

Όπου K_1, K_2, \dots τα αθροίσματα των συστατικών. Τα μηχανήματα δυναμικής σκέδασης φωτός δίνουν άμεσα την πληροφορία του μεγέθους των συστατικών, για ένα μεγάλο εύρος διαστάσεων που κυμαίνεται από $\sim 1\text{nm}$ έως $\sim 10\mu\text{m}$. Ο δείκτης πολυδιασποράς PDI (polydispersity index) στη συνέχεια καθορίζει το πλάτος της διασποράς μεγέθους

των σωματιδίων. Συγκεκριμένα κυμαίνεται από 0 έως 1, με το 0 να καταδεικνύει μονοδιάσπαρτα συστήματα και το 1 πολυδιασπορά. Ο χαρακτηρισμός του ζ-δυναμικού, πραγματοποιείται με μία τεχνική που ονομάζεται ανάλυση φάσεως με σκέδαση φωτός. Κατά την μέτρηση δέσμη φωτός, με χρήση λέιζερ, διαπερνά το δείγμα, με σκοπό την καταγραφή της ταχύτητας κίνησης των σωματιδίων, κατά την επιβολή ορισμένης ηλεκτρικής τάσης στο διάλυμα, ενώ στη συνέχεια τα αποτελέσματα επεξεργάζονται με βάση τη μεθοδολογία Smoluchowski για πολικούς διαλύτες. Το μετρούμενο φορτίο στις επιφάνειες των σωματιδίων προσφέρει αυξημένες ηλεκτροστατικές δυνάμεις που διατηρούν το σύστημα σε διασπορά, με αποτέλεσμα αυξημένη σταθερότητα του συστήματος στο χρόνο, όσο αυξάνεται η απόλυτη τιμή του επιφανειακού δυναμικού [5] [8] [9].

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ UV-vis: Η φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού αναφέρεται σε ποιοτικές και ποσοτικές αναλύσεις, χάρη στην απορρόφηση μονοχρωματικής ακτινοβολίας από τα συστατικά δείγματος, στην περιοχή 190-780nm, προσδιορίζοντας χρήσιμες πληροφορίες για χρωμοφόρες ομάδες των μορίων, χάρη σε ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις μοριακών τροχιακών. Η φασματοσκοπία απορρόφησης χρησιμοποιεί το ενεργειακό κενό που δημιουργείται σε ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος, με στόχο τον χαρακτηρισμό πλήθους υλικών. Συγκεκριμένα, σε ορισμένη ενέργεια φωτονίων παρατηρείται διέγερση των ηλεκτρονίων και μετάπτωση από τη στοιβάδα σθένους σε κάποια ανώτερη στοιβάδα αγωγιμότητας. Η ένταση της απορροφούμενης ή ανακλώμενης ακτινοβολίας, σε σχέση με το μήκος κύματος της διέγερσης, είναι χαρακτηριστική των επιμέρους συστατικών του υλικού και χρησιμεύει στην κατανόηση της δομής του. Οι παρατηρούμενες κορυφές εξαρτώνται από το μέγεθος των σωματιδίων των εξεταζόμενων ενώσεων, για το λόγο αυτό με τη μείωση του μεγέθους σε νανοσωματίδια, παρατηρείται μία μετατόπιση των κορυφών προς μικρότερα μήκη κύματος, γνωστή ως «blue shift». Το πλάτος των κορυφών εξαρτάται από το μέγεθος, αλλά και τη κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων. Η αρχή λειτουργίας είναι αρκετά απλή. Απαιτείται μία λάμπα εκπομπής υψηλής έντασης ακτινοβολίας, της περιοχής UV-vis, ενώ με τη βοήθεια μονοχρωμάτορα, για την επιλογή του συγκεκριμένου μήκους κύματος που απαιτείται για την κατά περίπτωση ένωση, καταλήγει η ακτινοβολία στο δείγμα, το οποίο είναι τοποθετημένο σε κυβέτα ορισμένων διαστάσεων ανάλογα με το όργανο μέτρησης. Στη συνέχεια το δείγμα ανάλογα με τις ιδιότητές του απορροφά ή ανακλά μέρος της ακτινοβολίας. Η ένταση της ακτινοβολίας που λαμβάνεται από το δείγμα, ανιχνεύεται από έναν αισθητήρα και δίνει το σήμα σε ηλεκτρονική μορφή. Συχνά τοποθετούνται δύο δείγματα, ένα τυφλό, χωρίς προσθήκη νανοσωματιδίων παρά μόνο διαλύτη και το εξεταζόμενο δείγμα, ή γίνεται μία αρχική μέτρηση βαθμονόμησης («zero base») στο τυφλό δείγμα, ώστε να επαλειφθούν τυχόν σφάλματα από ουσίες του διαλύτη ή της κυβέτας. Στη φασματοφωτομετρία απορρόφησης μετρείται είτε η απορρόφηση (A) είτε η διαπερατότητα (T) του δείγματος και με βάση τις μετρήσεις αυτές επιτελείται η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. Για την μελέτη των δειγμάτων χρησιμοποιείται ο νόμος απορρόφησης των Lambert-Beer:

$$A = -\log T = -\log \frac{P}{P_0} = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

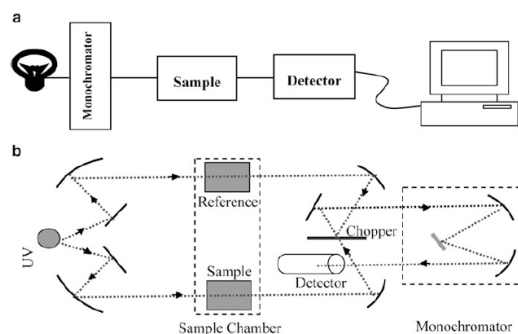
Όπου:

- A= η απορρόφηση (absorbance)
- T= η % διαπερατότητα (transmittance) του δείγματος (εκφράζει το κλάσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που εξέρχεται από το δείγμα P/P_0 ; 100%)
- P_0 = η ισχύς της μονοχρωματικής ακτινοβολίας που προσπίπτει στο διάλυμα,
- P = η ισχύς της ακτινοβολίας που εξέρχεται από το διάλυμα,
- b = το μήκος της διαδρομής της ακτινοβολίας στο διάλυμα,
- c = η συγκέντρωση της ουσίας που αναλύεται,
- ε = η μοριακή απορροφητικότητα της ουσίας.

Η απεικόνιση του A ή T ως προς το μήκος κύματος (λ) ονομάζεται φάσμα απορρόφησης. Για την ποσοτική ανάλυση γίνεται επιλογή της περιοχής του φάσματος όπου η απορρόφηση γίνεται μέγιστη (λ_{\max}), εκεί εμφανίζεται μέγιστη ευαισθησία, ενώ η σχέση απορρόφησης – συγκέντρωσης έχει μεγάλη γραμμική περιοχή και μπορεί να εφαρμοσθεί ο νόμος Lambert – Beer. Ο νόμος των Lambert – Beer ισχύει υπό τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

1. η ακτινοβολία είναι μονοχρωματική,
2. ο μόνος μηχανισμός αλληλεπίδρασης που λαμβάνει χώρα είναι η απορρόφηση,
3. τα σωματίδια απορροφούν ακτινοβολία ανεξάρτητα το ένα από το άλλο,
4. η απορρόφηση γίνεται σε όγκο διαλύματος ομοιόμορφης διατομής,

ενώ δεν ισχύει για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0,01 M. [5] [10].



Εικόνα 12 σχηματική απεικόνιση α) φασματομέτρου β) με θέση για δείγμα αναφοράς-τυφλό [5].

DSC: (differential scanning calorimetry) ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ: Οι θερμικές αναλυτικές μέθοδοι ανάλυσης αποτελούν σημαντικό εργαλείο στη φαρμακευτική βιομηχανία. Πρόκειται για ακριβείς τεχνικές, που χωρίς πολλές απαιτήσεις δειγμάτων, δίνουν αξιόπιστα αποτελέσματα. Η μέτρηση παρέχει ποσοτικές πληροφορίες για την ικανότητα ενδόθερμων, εξώθερμων αλλά και όποιας θερμικής μεταβολής του υποστρώματος, συναρτήσει της θερμοκρασίας ή του χρόνου,

καταγράφοντας ενεργειακές διαφορές μεταξύ του δείγματος κι ενός στοιχείου αναφοράς. Η διάταξη αποτελείται από ένα θάλαμο-φούρνο, όπου τοποθετούνται το δείγμα και το δείγμα αναφοράς, μέσα σε ειδικά δισκία, όπου τροφοδοτείται αδρανές αέριο για αποφυγή οξειδώσεων και μολύνσεων του δείγματος, διαθέτει αισθητήρες συνδεδεμένους με τον υπολογιστή για ευκολή επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Η συνολική ροή θερμότητας περιλαμβάνει την κινητική συνιστώσα και τη συνιστώσα θερμοχωρητικότητας. Καθώς μεταβάλλεται η ροή θερμότητας σε κάθε κύκλο μέτρησης, η θερμοχωρητικότητα καθορίζεται διαιρώντας το πλάτος της ροής θερμότητας προς το πλάτος του ρυθμού ροής θερμότητας. Το θερμοκρασιακό εύρος και η μετρούμενη ροή θερμότητας, συγκρίνονται με την καμπύλη του δείγματος αναφοράς της ίδιας συχνότητας. Η κινητική συνιστώσα, προσδιορίζεται από τη διαφορά της συνολικής ροής θερμότητας και της συνιστώσας θερμοχωρητικότητας. Είναι απαραίτητη η προσεκτική προετοιμασία του δείγματος για αποφυγή μολύνσεων ενώ απαιτείται μικρή ποσότητα δείγματος από 1-5mg. Είναι καλό να έχει προηγηθεί βαθμονόμηση του οργάνου μισή ώρα πριν την μέτρηση, ενώ πρέπει να εξετασθούν τα όρια μέτρησης, δηλαδή η αρχική και τελική θερμοκρασία, αλλά και ο ρυθμός των μετρήσεων. Επειδή στις αρχικές και τελικές θερμοκρασίες, παρατηρούνται αποκλίσεις λόγω αδυναμίας των οργάνων να διατηρήσουν τις συνθήκες σταθερές, εμφανίζονται διακυμάνσεις στις μετρήσεις, γνωστές ως φαινόμενο “start up loop”, για την αποφυγή του, κρίνεται σκόπιμη η οριοθέτηση 30K κάτω από την αρχική και 10K τουλάχιστον από την τελική θερμοκρασία, σε σχέση με την εξεταζόμενη θερμοκρασία μετάπτωσης. Τα εξεταζόμενα συστατικά, θεωρώντας τα ως καθαρές ουσίες, μπορούν να παρουσιάσουν τις ακόλουθες θερμικές μεταπτώσεις: τήξη, κρυστάλλωση, ζέση, εξάχνωση, αφυδάτωση, αποδιαλυτοποίηση, μεταπτώσεις στερεού-στερεού, υαλώδεις μεταπτώσεις καθώς και πολυμορφισμό. Οι μεταπτώσεις μπορεί να απεικονισθούν κατά τη μέτρηση ως ενδόθερμες ή εξώθερμες κορυφές, αλλά και ισοθερμοκρασιακές καμπύλες. Για τον χαρακτηρισμό των ουσιών, απαιτείται ο καθορισμός του αρχικού και τελικού σημείου της μέτρησης, την κορυφή της μέτρησης ή το μέσο των ακραίων σημείων, αλλά και ο ρυθμός των μετρήσεων. Με την διαφορική ολοκλήρωση των κορυφών, προκύπτουν και τα ενεργειακά αποτελέσματα των μετρήσεων. Συχνά καθορίζεται και η καθαρότητα των συστατικών όταν αυτή κυμαίνεται στο 98-99,5% και δίνεται από την εξίσωση Van't Hoff:

$$T_s = T_c - \frac{RT_s^2 X}{\Delta H_0 F_i}$$

Όπου T_s η θερμοκρασία του δείγματος (K), T_c η θερμοκρασία τήξης (K) του καθαρού συστατικού, R η σταθερά των αερίων (8,314 J/mol/K), X το μοριακό κλάσμα των προσμίξεων, ΔH_0 η ενθαλπία τήξης (J/mol) της καθαρής ουσίας και F_i το κλάσμα του τηγμένου δείγματος στην T_s . Γίνεται εξακρίβωση και του βαθμού κρυσταλλικότητας των ουσιών, μέσω μιας χαρακτηριστικής εξώθερμης κορυφής, αλλά και το αντίστοιχο άμορφο μέρος και το ποσοστό που δεν επανακρυσταλλώνει. Ενώ πλήθος κορυφών γύρω από τη θερμοκρασία κρυστάλλωσης είναι χαρακτηριστικά πολυμορφισμού. Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης αποτυπώνεται με αλλαγή της κλίσης της

καμπύλης, ενώ στα άμορφα υλικά παρατηρείται κάποια κινητικότητα κάτω από το σημείο υαλώδους μετάπτωσης, όπου και παρατηρείται μετατόπιση στο αναμενόμενο σημείο κλίσης, γνωστό ως φαινόμενο χαλάρωσης. Το φαινόμενο διακρίνεται σε χαλάρωση όγκου ή ενθαλπίας κι εξαρτάται από το θερμικό ιστορικό του δείγματος, ενώ συχνά οφείλεται και στη μικρή διάσταση των υλικών (όπως σε περιπτώσεις μικρο- ή νάνο- κλίμακας). Σε περιπτώσεις άμορφων μιγμάτων, το DSC χρησιμοποιείται για να καθορίσει την αναμιξιμότητα των συστατικών. Σε περιπτώσεις που δεν παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις, το μίγμα παρουσιάζει θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης μεταξύ των αντίστοιχων θερμοκρασιών των συστατικών του. Σε περιπτώσεις αλληλεπιδράσεων έχουν προταθεί διάφορες εξισώσεις προσδιορισμού του σημείου υαλώδους μετάπτωσης όπως αυτές των Gordon-Taylor και Fox-Flory:

$$T_{gmix} = \frac{(w_1 T_{g1} + w_2 T_{g2})}{(w_1 + w_2)}, K = \frac{\rho_1 T_{g1}}{\rho_2 T_{g2}}$$

$$\frac{1}{T_{gmix}} = \frac{1}{T_{g1}} + \frac{1}{T_{g2}}$$

Όπου w_1, w_2 το κλάσμα μάζας των συστατικών ρ_1, ρ_2 οι πυκνότητές τους και T_{g1}, T_{g2} οι αντίστοιχες θερμοκρασίες υαλώδους μετάπτωσης των επιμέρους συστατικών (K). αποκλίσεις από τις εξισώσεις αυτές έχουν αποδοθεί σε φαινόμενα αλληλεπιδράσεων τύπου άλατος-διπόλου ή ιόντων. [11]

2.3 ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

2.3.1 Φυσιολογία υγείων και καρκινικών κυττάρων

Ο όρος νεοπλασία σηματοδοτεί ουσιαστικά μία «ανώμαλη» μάζα ιστού, η ανάπτυξη της οποίας είναι υπερβολική και ασύμβατη σε σύγκριση με εκείνη των φυσιολογικών ιστών, εμμένει δε με τον ίδιο τρόπο, ακόμα και μετά την εξάλειψη των ερεθισμάτων που προκάλεσαν τη μεταβολή. Τα νεοπλασματικά κύτταρα θεωρούνται εξαλλαγμένα, καθώς συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται αγνοώντας τις ρυθμιστικές επιδράσεις που ελέγχουν την αύξηση του φυσιολογικού κυττάρου. Διαθέτουν κατά αυτόν τον τρόπο μία μορφή αυτονομίας, μερικά νεοπλάσματα απαιτούν ωστόσο ενδοκρινική υποστήριξη, που συχνά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την εξάλειψή τους, ενώ όλα τα νεοπλάσματα εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τον ξενιστή για τη θρέψη και την αιμάτωσή τους. Έχει επικρατήσει τα νεοπλάσματα να αναφέρονται ως όγκοι και η μελέτη τους ονομάζεται ογκολογία. Σύμφωνα με την εκτίμηση της κλινικής συμπεριφοράς τους, τα νεοπλάσματα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, καλοήθη και κακοήθη. Ένας όγκος ονομάζεται καλοήθης όταν τα μικροσκοπικά και μακροσκοπικά χαρακτηριστικά του θεωρούνται σχετικά «αθώα», παραμένει δηλαδή

εντοπισμένος και είναι αρκετά επιδεκτικός χειρουργικής αφαίρεσης. Ωστόσο ακόμα και οι καλοήθεις όγκοι ενδέχεται να προκαλέσουν την εμφάνιση νόσου πέρα από την τοπική διόγκωση. Γενικά οι καλοήθεις όγκοι προσδιορίζονται με την κατάληξη –ώμα στον τύπο των κυττάρων από τον οποίο προέρχονται όπως λόγου χάρη χόνδρωμα, ενώ σε περιπτώσεις επιθηλιακών καλοήθων όγκων περιπλέκεται η ονομασία όπως αδένωμα, θηλώματα, κυσταδενώματα. Οι κακοήθεις όγκοι αναφέρονται συλλογικά ως καρκίνοι, προερχόμενο από την λατινική ρίζα του κάβουρα, καθώς προσκολλώνται σε έναν ξενιστή, με τρόπο παρόμοιο με τις δαγκάνες ενός κάβουρα. Ο όρος κακοήθης υπαινίσσεται ότι η αλλοίωση μπορεί να διηθήσει και να καταστρέψει παρακείμενες δομές, καθώς και να επεκταθεί (μετάσταση), με ορισμένους να είναι αρκετά επιθετικοί. Η ορολογία των κακοήθων όγκων ακολουθεί παρόμοια λογική, με ορισμένες προσθήκες κι εξαιρέσεις. Έτσι κακοήθη νεοπλάσματα από τον μεσεγχυματικό ιστό ή παράγωγά του ονομάζονται σαρκώματα. Τα κακοήθη νεοπλάσματα του επιθηλίου καλούνται καρκινώματα. Τα νεοπλάσματα είναι μονοκλωνικής προέλευσης, όπου σε μερικές περιπτώσεις, τα κύτταρα του όγκου μπορούν να υποστούν διαφοροποίηση, δημιουργώντας τους καλούμενους μικτούς όγκους.

Όλοι οι τύποι όγκων-νεοπλασμάτων αποτελούνται από κάποια κύρια συστατικά:

- Το παρέγχυμα, που αποτελείται από εξαλλαγμένα ή νεοπλασματικά κύτταρα και
- Το υποστηρικτικό, μη νεοπλασματικό στρώμα του ξενιστή, που αποτελείται από συνδετικό ιστό, αιμοφόρα αγγεία και φλεγμονώδη κύτταρα προερχόμενα από τον ξενιστή.

ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ: η πρόοδος στην έρευνα έχει προσφέρει σημαντική γνώση στην κατανόηση των μηχανισμών του ανοσολογικού συστήματος και στη συσχέτισή του με την άμυνα ενάντια στον καρκίνο. Παρά το γεγονός ότι διαφορετικοί κυτταρικοί πληθυσμοί φαίνεται να συμμετέχουν στην άμυνα έναντι του καρκίνου, οι ανοσοποιητικοί μηχανισμοί που δραστηριοποιούνται μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κύριες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αντιπροσωπεύεται κυρίως από ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα, τα οποία κατ'οπιν αλληλεπίδρασης με τα καρκινικά κύτταρα (πιθανόν μέσω αναγνώρισης καρκινικών κυτταρικών αντιγόνων ΚΚΑ) ενεργοποιούνται και τροποποιούν τη δράση των κυτταροτοξικών εκτελεστικών κυττάρων, τα οποία ανήκουν στη δεύτερη κατηγορία. Στα κύτταρα αυτά συμπεριλαμβάνονται μία ομάδα από T-λεμφοκύτταρα και κύτταρα φυσικοί φορείς (natural killer cells, NK). Το λειτουργικό πρόγραμμα των κυττάρων αυτών μπορεί να επηρεασθεί ποικιλόμορφα από την παρουσία αυτόλογων καρκινικών κυττάρων. Έτσι η ελαττωμένη αντιγονικότητα των καρκινικών κυττάρων (πιθανόν λόγω χαμηλής ή ελλιπούς έκφρασης των ΚΚΑ) αναστέλλει τη διέγερση βοηθητικών και κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων και κατά συνέπεια αναχαιτίζει την ειδική ανοσολογική απάντηση εναντίον αυτών. Επίσης η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να παράγουν ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες ή να συντελούν στην επαγωγή ενεργοποιημένων

κατασταλτικών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την άμεση ή έμμεση αντίστοιχα καταστολή κάθε αναπτυσσόμενης ειδικής ανοσολογικής απόκρισης. [12] [13]

Πίνακας 1 Χαρακτηριστικά καλοήθων και κακοήθων νεοπλασμάτων.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΚΑΛΟΗΘΗΣ	ΚΑΚΟΗΘΗΣ
ΚΛΙΝΙΚΑ		
Αύξηση	Αργή	Ταχεία
Εξέλκωση	Ασυνήθης	Συχνή
Αιμορραγία	Ασυνήθης	Συχνή
Στοιχεία μετάστασης	όχι	Συχνά
ΜΑΚΡΟΣΚΟΠΙΚΑ		
Όρια όγκου	Ομαλά λόγω επεκτατικής ανάπτυξης, μπορεί να περιβάλλεται από κάψα	Ανώμαλα, εξαιτίας διηθητικής ανάπτυξης
Επιφάνεια διατομής	Μονότονη, ομοιογενής	Ποικίλουσα, εξαιτίας αιμορραγίας και νέκρωσης μέσα στον όγκο
Στοιχεία δευτερογενούς διασποράς	όχι	Οι επιχώριοι λεμφαδένες ή οι παρακείμενες δομές μπορεί να είναι εμφανώς διηθημένα
ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΑ		
Ομοιότητα με ιστό προέλευσης	Καλή	Συχνά φτωχή
Μέγεθος και σχήμα κυττάρων	Σχετικά ομοιόμορφο	Έντονη ποικιλία (πολυμορφία)
Πυρηνοκινήσεις	Λίγες και φυσιολογικές	Συχνά άφθονες, ανώμαλες
Διήθηση αγγείων/ λεμφαγγείων/ περινευρικών χώρων	Όχι	Συχνή παρουσία
Δυσπλασία σε παρακείμενους ιστούς	Όχι	Ορισμένες φορές

2.3.2 Εισαγωγή στη φωτοδυναμική θεραπεία (PDT- Photodynamic Therapy)

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι μία θεραπευτική τεχνική, η οποία βασίζεται στη χορήγηση ενός φωτοευαίσθητου παράγοντα, που ενεργοποιείται με τοπική ακτινοβόληση σε ορισμένο μήκος κύματος, προκαλώντας σειρά βιοχημικών και φωτοχημικών αντιδράσεων. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται παρουσία οξυγόνου και παράγουν κυταροτοξικά προϊόντα οξυγόνου, τα οποία καταστρέφουν ενδοκυτταρικά οργάνδια, βρίσκοντας έτσι ευρεία εφαρμογή σε βιοϊατρικές θεραπείες όπως του καρκίνου ή μυκητιάσεις και βακτηριδιακές μολύνσεις. Συγκεκριμένα στην περίπτωση του καρκίνου η PDT δρα μέσω νέκρωσης, απόπτωσης αλλά και μέσω αυτοφαγοκυτταρικών μηχανισμών, εμποδίζοντας την παροχή θρεπτικών συστατικών σε καρκινικά κύτταρα,κι ενεργοποιώντας παράλληλα την ανοσοποιητική απόκριση των κυττάρων. Παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, καθώς είναι μία μη επεμβατική μέθοδος, με χαμηλή τοξικότητα, εστιασμένη δράση, οικονομική και με δυνατότητα για γρήγορη θεραπεία των ασθενών, ακόμα και σε εξωτερικά ιατρεία. Η

PDT μπορεί να επαναληφθεί αρκετές φορές, μόνη της αλλά και ως συμπληρωματική στις κλασικές αντικαρκινικές θεραπευτικές μεθόδους. Ως μέθοδος έχει λάβει έγκριση για κλινική εφαρμογή σε αρκετές χώρες, ωστόσο η χρήση είναι ακόμα περιορισμένη. Ο μηχανισμός δράσης της, παρότι δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως, σχετίζεται με τη φύση του φωτοευαισθητοποιητή, τη φωτοδυναμική δόση (συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιητή και δόση ακτινοβολίας), την παρουσία οξυγόνου, αλλά και τον κυτταρικό γονότυπο και την ενδοκυτταρική θέση του φωτοευαισθητοποιητή [14] [15].

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ: τρία είναι τα κύρια σημεία δράσης της PDT, ο φωτοευαισθητοποιητής, που χορηγείται τοπικά ή συστηματικά, η ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος κατά περίπτωση και τα προϊόντα οξυγόνου, που όταν συνδυαστούν δίνουν το επιθυμητό κυτταροτοξικό αποτέλεσμα. Αναλυτικά, μετά τη χορήγησή του, ο φωτοευαισθητοποιητής, μεταπίπτει από τη μονήρη σε μία βραχύβια διεγερμένη κατάσταση, μέσω απορρόφησης φωτονίων από την ακτινοβολία. Ο διεγερμένος φωτοευαισθητοποιητής, μπορεί είτε να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση με νέα εκπομπή φωτονίων - φθορισμό (η οποία χρησιμοποιείται συνήθως σε περιπτώσεις φωτοδυναμικής διάγνωσης με απεικόνιση φθορισμού), ή να μεταπέσει σε μία άλλη διεγερμένη κατάσταση, με σχετικά μεγαλύτερο χρόνο ζωής (triplet state). Από τη νέα αυτή διεγερμένη φάση προκύπτουν δύο σειρές φωτοχημικών δράσεων, τύπου I και τύπου II. στις αντιδράσεις τύπου I, λαμβάνει χώρα μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του διεγερμένου φωτοευαισθητοποιητή, στην τριπλή κατάσταση και του κυτταρικού υποστρώματος, προς σχηματισμό ριζών και ιόντων, τα οποία αντιδρούν με το οξυγόνο, παράγοντας ρίζες υδροξυλίου, ανιόντα υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Στις αντιδράσεις τύπου II, υπάρχει άμεση μεταφορά ενέργειας μεταξύ φωτοευαισθητοποιητή τριπλής κατάστασης και μοριακού οξυγόνου, προς σχηματισμό μονήρους οξυγόνου. Αν και οι περισσότερες αντιδράσεις θεωρείται ότι ανήκουν στην δεύτερη κατηγορία, και οι δύο μηχανισμοί μπορούν να πραγματοποιούνται παράλληλα, σε διαφορετικές αναλογίες [14]. Οι πλειοψηφία των φωτοευαισθητοποιητών στη θεμελιώδη τους κατάσταση έχουν δύο ηλεκτρόνια αντίθετου σπιν στην εξωτερική τους στοιβάδα. Η απορρόφηση της ακτινοβολίας οδηγεί στην μετατόπιση ενός ηλεκτρονίου σε στοιβάδα υψηλότερης ενέργειας. Τα διεγερμένα αυτά σωματίδια, μπορούν όπως προαναφέρθηκε είτε να επανέλθουν στη θεμελιώδη κατάσταση, με εκπομπή φωτονίου ή θερμότητας, είτε να υποστούν διασταυρώσεις σχηματίζοντας ένα πιο ευσταθές διεγερμένο μόριο, τριπλής κατάστασης με αντεστραμμένο σπιν του διεγερμένου ηλεκτρονίου, το οποίο με τη σειρά του είτε θα επανέλθει στη θεμελιώδη κατάσταση σταδιακά, είτε θα μεταφέρει ενέργεια σε ένα μόριο οξυγόνου O_2 , σχηματίζοντας μονοσθενές οξυγόνο 1O_2 (αντίδραση τύπου II). Στις αντιδράσεις τύπου I, το διεγερμένο μόριο τριπλής κατάστασης, αντιδρά απευθείας με οργανικά μόρια από το ενδοκυτταρικό περιβάλλον, προσλαμβάνοντας ένα άτομο υδρογόνου ή ένα ηλεκτρόνιο και σχηματίζοντας ρίζες, ταυτόχρονα παράγονται και ρίζες οξυγόνου $O_2^{\cdot-}$, υδροξυλίου HO^{\cdot} και υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 , τα λεγόμενα δραστικά προϊόντα οξυγόνου ROS (reactive oxygen species), στα οποία οφείλεται κι η αντικαρκινική δράση [16]. Συχνά μπορεί να

ακολουθήσει κι ένας ακόμα μηχανισμός, που αναφέρεται ως τύπου III, δεν απαιτεί την παρουσία οξυγόνου και πρόκειται για την άμεση καταστροφή του ιστού από τον διεγερμένο φωτοευαισθητοποιητή. Το φωτοευαισθητοποιητής, μπορεί σε κάθε περίπτωση να μην ακολουθήσει και κανένας τύπο αντίδρασης, και να επανέλθει στην θεμελιώδη του κατάσταση, εκπέμποντας την πλεονάζουσα ενέργειά του με τη μορφή φθορισμού, ο οποίος αποτελεί σημαντικό κλινικό και δοσιμετρικό χαρακτηριστικό της θεραπείας [17]. Η εξάλειψη των μεταλλαγμένων ή κατεστραμμένων κυττάρων είναι μέρος της βιολογικής διαδικασίας αναγέννησης των κυττάρων. Ο κυτταρικός αυτός θάνατος μπορεί να ταξινομηθεί ως αποπτωτικός και μη (ο οποίος διακρίνεται περαιτέρω σε φαγοκυττάρωση και νέκρωση). Ανάλογα με το μηχανισμό, που ακολουθεί ο κυτταρικός θάνατος, παρατηρούνται διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως επί παραδείγματι στην απόπτωση παρατηρείται σμίκρυνση (πύκνωση) των σωματιδίων, αύξηση της συγκέντρωσης της χρωματίνης, κατακερματισμός του DNA, ή και σχηματισμός αποπτωτικών σωματιδίων χωρίς κάποια φλεγμονώδη αντίδραση, στην αυτοφαγία παρατηρούνται τα αυτοφάγα στο κυτταρόπλασμα, ενώ στη νέκρωση παρατηρείται διόγκωση και διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης. Και οι τρεις περιπτώσεις παρατηρούνται κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία, ανάλογα κάθε φορά με τη βιοχημική σύσταση του φωτοευαισθητοποιητή, τις συνθήκες ακτινοβολήσης, αλλά και τον στοχευόμενο κυτταρικό ιστό. Συγκεκριμένα, η απόπτωση μπορεί να λάβει χώρα με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς, τον εγγενή (μιτοχονδριακή σηματοδότηση) κι εξωγενή σηματοδότηση αποπτωτικών υποδοχέων), ενώ αποτελεί την επιθυμητή μέθοδο κυτταρικού θανάτου για τη φωτοδυναμική, αλλά και άλλες θεραπείες. Ο μηχανισμός δράσης που θα ακολουθηθεί, σχετίζεται άμεσα και με το σημείο συσσώρευσης κι εναπόθεσης του φωτοευαισθητοποιητή [14], αυτό οφείλεται στο ότι ο χρόνος ζωής του μονοσθενούς οξυγόνου $^1\text{O}_2$, είναι ελάχιστος (10-320 nanoseconds), με αποτέλεσμα η διάχυση του να περιορίζεται σε διάμετρο 10-55nm από την περιοχή εναπόθεσης.

ΓΕΝΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ: Η γενική αντίδραση των κυττάρων, παρουσία μονήρους οξυγόνου, είναι η ενεργοποίηση μηχανισμών προστασίας, με φαγοκύτταρα για τα κατεστραμμένα οργανίδια και μεταβολές στη διαδικασία μεταβολισμού, με παραγωγή ορισμένων πρωτεϊνών όπως HSP, με στόχο την επουλώση των κυττάρων. Σε αυτό το σημείο αν οι αλλαγές καταφέρουν να επουλώσουν τα κύτταρα δημιουργείται αντίσταση στη δράση της PDT, όπως συμβαίνει και σε άλλες μορφές θεραπειών. Με τη PDT προκαλείται διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών κατά την αποδόμηση των κυττάρων, η οποία οδηγεί στην περαιτέρω απελευθέρωση χαρακτηριστικών ουσιών, οι οποίες μπορεί να είναι με τη σειρά τους τοξικές για το εξωκυττάριο περιβάλλον, όπως μιτοχονδριακά ένζυμα, αλλά και μη τοξικά σηματοδοτικά μόρια, όπως το ασβέστιο, που οδηγεί στην παραγωγή φωσφολιπασών κι αραχιδονικού οξέος, που με τη σειρά τους καταστρέφουν τις κυτταρικές μεμβράνες και αποκόπτουν την αιμάτωση της περιοχής, αλλά και η πρωτεΐνη κB, που προωθεί την απόπτωση ενώ ταυτόχρονα διεγείρει μια ανοσοποιητική απόκριση με τη βοήθεια ιντερλευκινών. Οι κατεστραμμένοι ιστοί

ενεργοποιούν επιπλέον ένα σηματοδοτικό δίκτυο όπως της οικογένειας τυροσίνης – κινάσης, με παρατηρούμενη αναστολή του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR. Η ανοσοαπόκριση αυξάνει τοπικά την παρουσία λευκών αιμοσφαιρίων τα οποία παράγουν κυττοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη, οι οποίες οδηγούν στη νέκρωση των κυττάρων. Οι κυτοκίνες ρυθμίζουν την αιμάτωση της περιοχής και τη φλεγμονή, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε απότομη ογκοκατασταλτική απόκριση, αλλά και ελέγχουν την κυτταρική διαπερατότητα, ανάλογα πάντα και με την ηλικία του ασθενούς. Τα διερρηγμένα κύτταρα εμφανίζουν υποξία, οδηγώντας στην καταστροφή τους, την οποία ακολουθεί διάχυση υγρών στο περιβάλλον, αν δεν είναι σταδιακή κι ελεγχόμενη η διαδικασία αυτή, η δράση των κυττοκινών και τα παραγόμενα υγρά ενδέχεται να αποβούν μοιραία για τον ασθενή [18].

ΕΙΔΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ: στην περίπτωση που δεν υπάρχει αντίσταση κι επούλωση των κατεστραμμένων κυττάρων ακολουθείται ο κυτταρικός θάνατος, προγραμματισμένος (αποπτωτικός) και μη (νεκρωτικός), οι οποίοι μπορεί να πραγματοποιούνται παράλληλα, αλλά και φαγοκυττάρωση. Συγκεκριμένα, σε περιπτώσεις νέκρωσης, οι οποίες απαντώνται σε περιπτώσεις υψηλής εντάσεως ακτινοβολήσης, η φωτοδυναμική απόκριση περιλαμβάνει άμεση καταστροφή κυτταρικών και υποκυτταρικών μεμβρανών, με διάχυση του περιεχομένου τους στο παρακείμενο περιβάλλον. Η διάχυση των ενδοκυττάρων υγρών μπορεί να αποβεί έτσι καταστροφική και για γειτονικούς υγιείς ιστούς, για το λόγο αυτό η δόση του ευαισθητοποιητή κρίνεται σκόπιμο να είναι όσο το δυνατόν πιο περιορισμένη. Η διαδικασία της απόπτωσης είναι πιο σταδιακή, οδηγώντας σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, ο οποίος στην PDT φαίνεται να ενεργοποιείται μέσω έκρισης μιτοχονδριακών κυτοχρωμάτων, τα οποία ενεργοποιούν κασπάσες και αποπτομάσες, καταστρέφοντας έτσι τις μεμβράνες και προκαλώντας τον κυτταρικό θάνατο.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟ ΑΓΓΕΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ: οι φωτοευαισθητοποιητές ενδέχεται να εντοπισθούν και στο αγγειακό σύστημα του όγκου, ενώ μάλιστα το πιο πρόσφατα δημιουργημένο σύστημα του όγκου παρουσιάζει και μεγαλύτερη συσσώρευση φωτοευαισθητοποιητή. Γίνεται εμφανές, ότι η υποξία που παρατηρείται με τη PDT, εμφανίζεται και στο αγγειακό σύστημα αιμάτωσης του όγκου, προκαλώντας αντίστοιχα καταστροφή των κυττάρων, τόσο με απόπτωση αλλά και νέκρωση. Η άμεση καταστροφή του αγγειακού συστήματος, μπορεί να επιφέρει ταχύτερη συρρίκνωση των όγκων, ενώ η σταδιακή καταστροφή του αγγειακού συστήματος, μπορεί να δώσει χρόνο στον οργανισμό να προστατευθεί ενάντια στη PDT. Η καταστροφή του αγγειακού συστήματος, έχει ως συνέπεια την αναστολή αιμάτωσης της περιοχής του όγκου. Επιπλέον, ενδέχεται να παρατηρηθεί και διαρροή τοξικών μεταβολικών προϊόντων από το αγγειακό σύστημα, συμβάλλοντας στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Η αντίδραση του αγγειακού συστήματος των όγκων, φαίνεται να διαφέρει, ανάλογα με το είδος του χρησιμοποιούμενου φωτοευαισθητοποιητή, αλλά και τον χρόνο που μεσολαβεί από τη χορήγηση του έως την ακτινοβολήση DLI (drug light interval).

ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ: η εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος οδηγεί κατά ομοφωνία σε δημιουργία νέων όγκων και μεταστάσεων. Η καλούμενη ανοσοθεραπεία, είναι μία νέα μορφή θεραπείας κατά του καρκίνου, που στοχεύει στην εξάλειψη των όγκων, μέσω ενίσχυσης του ανοσοποιητικού. Η PDT παρουσιάζει ανοσοδιεγερτική δράση και έχει κερδίσει το ενδιαφέρον και ως ανοσοθεραπευτική μέθοδος, πέραν της άμεσης δράσης ενάντια στους όγκους. Με το πέρας της PDT και την καταστροφή του όγκου αλλά και του αγγειακού συστήματος, πραγματοποιείται μια σειρά δράσεων, οι οποίες ενεργοποιούν κι τονώνουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Συγκεκριμένα, είτε με τον προγραμματισμένο είτε με τον μη προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, παρατηρείται έκκριση πρωτεϊνών αλλά και σωματίδια του αίματος από την καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών, τα οποία ενεργοποιούν φωσφολιπάσες, υπεύθυνες για τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, σε συνδυασμό με έκκριση κι υπερέκφραση κυτοκινών κι αυξητικών παραγόντων στην περιοχή. Αυτές οι ενώσεις δρουν στη συνέχεια ως ανοσοδιεγέρτες των T βοηθητικών λεμφοκυττάρων και κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, αλλά και ως σηματοδοτικά μόρια μακροφάγων, τα οποία ενδέχεται να καταστρέψουν μέρος του όγκου. Με αυτό τον τρόπο υπάρχει αύξηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού στην περιοχή του όγκου, αλλά ταυτόχρονα υπάρχει και πιθανότητα δημιουργίας αντισωμάτων, τα οποία μπορεί να συμβάλουν στην πρόληψη μελλοντικής υποτροπής της νόσου [18].

2.3.3 Φωτοευαισθητοποιητές

Ως φωτοευαισθητοποιητές (PS) καλούνται μόρια, που δρουν ως μέσο απορρόφησης ακτινοβολίας, ορισμένου μήκους κύματος και τη μετατρέπουν σε ωφέλιμη ενέργεια. Στη φωτοδυναμική θεραπεία, ο συνδυασμός φωτοευαισθητοποιητή, ακτινοβολίας και μοριακού οξυγόνου, οδηγούν στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, μέσω παραγωγής κυτταροτοξικών προϊόντων. Ο ιδανικός φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να είναι μια καθαρή χημική ένωση, με πρόσληψη από συγκεκριμένους κυτταρικούς ιστούς, ελάχιστη τοξικότητα στο σκοτάδι (να ενεργοποιείται μόνο με ακτινοβολία), υψηλή φωτοδραστικότητα (υψηλή απόδοση προϊόντων οξυγόνου), άμεση εξάλειψη από τον οργανισμό προς αποφυγή παρενεργειών, καθώς και ισχυρή απορρόφηση σε μεγάλα μήκη κύματος (~630-800nm). Έχει παρασκευασθεί ένα μεγάλο ποσοστό συνθετικών και φυσικών φωτοευαισθητοποιητών με τις επιθυμητές ιδιότητες, ενώ αρκετοί έχουν λάβει έγκριση για κλινικές και πρακτικές εφαρμογές [14]. Πιο αναλυτικά κάποια χαρακτηριστικά των φωτοευαισθητοποιητών χρήζουν περαιτέρω προσοχής, με στόχο την βελτίωση της χημικής τους δράσης. Συγκεκριμένα, κύριο χαρακτηριστικό είναι η φωτοδυναμική δραστηριότητα που προκαλούν, η οποία έχει ταυτισθεί με την ικανότητα των φωτοευαισθητοποιητών να ενεργοποιούν τις αντιδράσεις τύπου II. Για το σκοπό αυτό απαιτείται οξυγόνο, το οποίο συχνά εκλείπει, σε περιοχές όγκων με υποξία, οι οποίες ανθίστανται ακόμα και στην

κλασική χήμειο/ άκτινο - θεραπεία. Σε αυτές τις περιπτώσεις, υπάρχει πιθανότητα η φωτοδυναμική αντίδραση, μέσω μηχανισμού τύπου III, να δράσει στο ίδιο το DNA, αναιρώντας τις ανεπιθύμητες μεταλλάξεις, ωστόσο, μπορεί να δημιουργήσει και νέες. Η εναπόθεση του φωτοευαισθητοποιητή αποτελεί ένα ακόμη κύριο χαρακτηριστικό του, το οποίο μπορεί να έχει σημαντικές προεκτάσεις στην κλινική πράξη. Καθώς η μέγιστη συσσώρευση του φωτοευαισθητοποιητή εντοπίζεται ενδοκυττάρια και στην εγγύς περιφέρεια, στην ίδια περιοχή περιορίζεται και η όποια φωτοδυναμική αντίδραση. Έτσι παρατηρείται διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών, ακολουθούμενη από διασπορά του ενδοκυττάριου περιεχομένου, όπως τοξικών μιτοχονδριακών παραγώγων, τα οποία μπορούν με τη σειρά τους να εντείνουν τον κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων, αλλά ενδέχεται και να επηρεάσουν δυσμενώς τους παρακείμενους υγιείς ιστούς, καθώς και πλεονάσματος φωτοευαισθητοποιητή, ο οποίος παρουσία ακτινοβολίας μπορεί να επανενεργοποιηθεί σε άλλη περιοχή δράσης. Ανάλογα με την περιοχή δράσης του ευαισθητοποιητή μπορεί να ενεργοποιηθούν διαφορετικοί μηχανισμοί, όπως νέκρωση ή απόπτωση, δίνοντας είτε στοχευμένη δράση, είτε μία γενική αντίδραση ισοδύναμη με εμβολιασμό, κάθε μία από τις οποίες είναι επιθυμητή ανάλογα με τις ανάγκες του ασθενούς [17]. Η κυτταρική πρόσληψη και διασπορά του φωτοευαισθητοποιητή εξαρτάται με τη σειρά της από τρεις παραμέτρους, το φορτίο, την λιποφιλικότητα και την τρισδιάστατη δομή του [19]. Η αμφιφιλική συμπεριφορά του φωτοευαισθητοποιητή αποτελεί εξίσου σημαντικό χαρακτηριστικό, καθώς η υδροφιλικότητα δίνει πλεονέκτημα στην εύκολη μεταφορά του μέσω του κυκλοφορικού συστήματος, ενώ η λιποφιλικότητα βελτιώνει την πρόσδεση και πρόσληψη του φωτοευαισθητοποιητή, από τα καρκινικά κύτταρα και το αγγειακό τους σύστημα. Ο φθορισμός του φωτοευαισθητοποιητή είναι ένα ακόμα καίριο χαρακτηριστικό, που αφορά το ποσό ενέργειας, που δύναται να απορροφήσει αλλά και να προσδώσει στη συνέχεια ο φωτοευαισθητοποιητής. Το χαρακτηριστικό αυτό μπορεί να επιτρέψει την οπτικοποίηση-σκιαγράφιση του όγκου, που δρα επικουρικά σε περιπτώσεις που προηγείται της PDT, απομάκρυνση του όγκου. Επιπλέον ο φθορισμός μπορεί να αποτελέσει και μία πρακτική μεταβλητή δοσιμετρίας για την στοχευμένη δράση του PS κατά την κλινική εφαρμογή, καθώς και ένα διαγνωστικό εργαλείο, αντίστοιχο της ιστολογικής διάγνωσης. Η δοσιμετρία του φωτοευαισθητοποιητή αποτελεί ένα παραγκωνισμένο χαρακτηριστικό, το οποίο στην πράξη καλύπτεται από τον συνδυασμό της φαρμακευτικής δόσης, της δόσης του φωτός και το μεσοδιάστημα από την χορήγηση του φαρμάκου έως την ακτινοβόληση, όπως υπαγορεύει το εκάστοτε πρωτόκολλο PDT. Ωστόσο, ο φωτοευαισθητοποιητής κατά αυτό τον τρόπο δεν παρουσιάζει εξατομικευμένη δράση, για το λόγο αυτό θα έπρεπε ένας ιδανικός φωτοευαισθητοποιητής να δίνει ανατροφοδότηση για το ποσοστό PS που έχει αποτεθεί σε καρκινικό ή υγιή ιστό, ελαχιστοποιώντας την περιφερειακή τοξικότητα. Από τη σκοπιά του ασθενούς αλλά και της βιομηχανικής παραγωγής, οι φωτοευαισθητοποιητές ως προϊόντα προστιθέμενης αξίας θα πρέπει να διαθέτουν ορισμένα επιπρόσθετα χαρακτηριστικά, τα οποία θα διευκολύνουν την άμεση εμπορική τους διάθεση στο κοινό. Όσον αφορά την παραγωγή τους, θα πρέπει η σύνθεσή τους να γίνεται αποδοτικά κι αξιόπιστα, με υψηλή απόδοση και

ομοιόμορφη κατανομή προϊόντος ανά παρτίδα. Το προϊόν θα δύναται να μεταφερθεί εύκολα διατηρώντας αναλλοίωτα τα χαρακτηριστικά του, πρέπει να μην παρουσιάζει δυσκολία στη χορήγηση, όπως τοξικότητα ή και πόνο, έχοντας όσο το δυνατόν στοχευμένη δράση, αλλά και έναν χρόνο ημιζωής κατάλληλο για άμεση αποβολή του με το πέρας της θεραπείας, χωρίς ανάγκη για επανάληψη της θεραπείας, αλλά και με ορισμένο χρονικό όριο δράσης, που θα αποτρέπει παρενέργειες παρατεταμένης φωτοευαισθησίας. Το κόστος αποτελεί μία ύψιστη παράμετρο για την ιατρική περίθαλψη, με αποτέλεσμα οι PS να χρειάζεται να είναι οικονομικοί, αλλά και να μπορούν να εφαρμοσθούν από εξωτερικά ιατρικά κέντρα, χωρίς απαίτηση για νοσηλεία και παρακολούθηση του ασθενούς [17].

ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΩΝ:

Η κατηγοριοποίηση των φωτοευαισθητοποιητών μπορεί να γίνει με ποικίλους τρόπους. Γεγονός που καταδεικνύει τόσο την ευρεία χρήση κι εφαρμογή τους, όσο κι ένα ενδεχόμενο διεπιστημονικό χάσμα, ερευνητών, κλινικών ιατρών και βιομηχανιών.

- **ΓΕΝΙΕΣ ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΩΝ:** Η πρώτη γενιά φωτοευαισθητοποιητών έχει ως βάση για την παραγωγή τους τις πορφυρίνες, όπως η αιματοπορφυρίνη και τα παράγωγά της (HpD – Hematoporphyrin Derivatives). Ωστόσο λόγω παρενεργειών όπως η παρατεταμένη φωτοευαισθησία των ασθενών και τα μικρά μήκη κύματος απορρόφησης, δημιουργήθηκαν οι φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς. Η παραγωγή τους γίνεται με μετατροπή τετραπυρολικών ενώσεων (πορφυρινών), όπως η βενζοπορφυρίνη, αλλά και παράγωγα χλωροφύλλης ή και βαφές, οι οποίες έχουν απορρόφηση σε υψηλότερα μήκη κύματος. Όσον αφορά την τρίτη γενιά φωτοευαισθητοποιητών, περιλαμβάνουν φωτοευαισθητοποιητές προηγούμενων γενεών συνδυασμένους με κατάλληλα μόρια όπως αντισώματα ή νανοσωματίδια, προς βελτιστοποίηση των ιδιοτήτων τους και συγκεκριμένα για μεγαλύτερη συγκέντρωση των φωτοευαισθητοποιητών στις καρκινικές περιοχές και όχι στις υγιείς [20] [17].
- **ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑ:** από την πλευρά των χημικών και φαρμακευτικών εταιρειών, έχει προέλθει ένας άτυπος διαχωρισμός των φωτοευαισθητοποιητών με βάση την καθαρότητα τους, χωρίς ωστόσο αυτό να συνεπάγεται ότι ενώσεις που εμπεριέχουν ποικιλία συστατικών, είναι κι υποδεέστερες των καθαρών ουσιών στην κλινική εφαρμογή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα παράγωγα πορφυρινών, τα οποία παρότι διαθέτουν ποικιλία συστατικών, μπορούν να παρασκευαστούν μαζικά, οικονομικά, με εξαιρετική επαναληψιμότητα και αξιοπιστία κατά την χρήση τους.

- **ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΔΡΑΣΗ:** ένας ακόμη διαχωρισμός των φωτοευαισθητοποιητών γίνεται με βάση την περιοχή συσσώρευσής τους, καθώς άλλοι παρουσιάζουν αυξημένη συγκέντρωση στους ιστούς και άλλοι παραμένουν στο αγγειακό σύστημα. Ωστόσο, επειδή όλοι οι όγκοι περιβάλλονται από το δικό τους αγγειακό σύστημα, αυτός ο διαχωρισμός στην κλινική πράξη δε φαίνεται να είναι τόσο σημαντικός. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η στοχευμένη δράση του εκάστοτε PS, όπως κυτταρική ή υποκυτταρική μεμβράνη, μιτοχόνδρια ή άλλη περιοχή. Οι φθαλοκυανίνες και μικρά μόρια PSs φαίνεται να συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια, ενώ μεγάλα μόρια παρουσιάζουν φαγοκυττάρωση, ή τα βενζοπορφυρινο- παράγωγα εντοπίζονται στο σύμπλεγμα Golgi, ενώ το αμινολεβουλινικό οξύ (ALA) διέρχεται από τις κυτταρικές μεμβράνες έως και τα μιτοχόνδρια και λυσοσώματα. Η σύζευξη των φωτοευαισθητοποιητών με συγκεκριμένους φορείς, όπως νανοσωματίδια, μπορεί να επιφέρει σημαντικές μεταβολές στην περιοχή συσσώρευσης και δράσης τους.
- **ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ:** πρόκειται για μία ακόμη κατηγοριοποίηση, που χαίρει αποδοχής από τους χημικούς επιστήμονες, αλλά δεν φαίνεται επωφελής στην κλινική εφαρμογή. Ο Fisher μάλιστα πρότεινε και μία σειρά ονοματολογίας όμοια της IUPAC-IUB. Οι φωτοευαισθητοποιητές, προέρχονται κατά βάση από κυκλικές τετραπυρρόλες, και αποτελούν παράγωγα των πορφυρινών, χλωρινών και βακτηριοχλωρινών. Μέσω καθαρισμού και χημικής επεξεργασίας, οι αρχικές αυτές δομές μπορούν να αποτελέσουν εξαιρετικά υποστρώματα για την παραγωγή φωτοευαισθητοποιητών. Ωστόσο, οι τροποποιήσεις στη δομή, λόγω προσθήκης, αφαίρεσης ή υποκατάστασης αλυσίδων μπορούν να βελτιώσουν τη δραστηριότητα των PSs, αλλά και να παράγουν τοξικά προϊόντα [17].

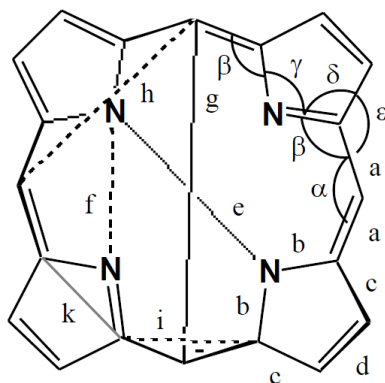
2.4 ΦΘΑΛΟΚΥΑΝΙΝΕΣ

2.4.1. Εισαγωγή

Οι πρώτες παρατηρήσεις συσχετισμού των νεοπλασματικών ιστών με τις φθαλοκυανίνες, χρονολογούνται πάνω από εξήντα χρόνια. Ωστόσο, μόνο τις τελευταίες δεκαετίες έχουν ερευνηθεί διεξοδικά κι έχουν ανακύψει ως ιδανικοί φωτοευαισθητοποιητές. Οι φθαλοκυανίνες είναι δισδιάστατα 18-π ηλεκτρονίων, αρωματικά συνθετικά ανάλογα πορφυρίνης, που μαζί με τα παράγωγα μετάλλων τους, έχουν κερδίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον, όχι μόνο ως βαφές, αλλά και ως δομικά υλικά, για σύνθεση περιπλοκότερων τεχνολογικά μορίων. Οι ηλεκτρονικές και οπτικές τους ιδιότητες, καθιστούν τις φθαλοκυανίνες χρήσιμες σε πολλούς και διαφορετικούς τομείς.

2.4.2. Χαρακτηριστικές ιδιότητες

Η χημική σύνθεση των φθαλοκυανινών παρουσιάζει ευελιξία, επιτρέποντας την παραγωγή διαφορετικών μορφολογιών, αλλά και την σύζευξη με διαφορετικά μόρια, προσδίδοντας διαφορετικές τελικές ιδιότητες. Οι πυρολικές ομάδες τους, επεκτείνονται μέσω συμπυκνώσεων με επιπλέον βενζολικούς δακτυλίους, ενώ σχηματίζονται και γέφυρες αζώτου. Μπορούν να συνδυαστούν με περισσότερα από εβδομήντα διαφορετικά άτομα μετάλλων, ενσωματώνοντάς το άτομο του μετάλλου στο εσωτερικό του σχηματιζόμενου δακτυλίου τους. Τα συζευγμένα αυτά χρωμοφόρα μόρια, παρουσιάζουν υψηλό συντελεστή απορρόφησης στην περιοχή των 675-800 nm, ενώ οι ναφθαλοκυανίνες με τα επιπρόσθετα βενζόλια στην περιφέρεια του δακτυλίου, εμφανίζουν απορρόφηση, κοντά στα 750 nm. Ωστόσο, ως αποτέλεσμα της τάσης των υδρόφοβων περιοχών τους όταν έρθουν σε επαφή με το νερό, οι φθαλοκυανίνες παρουσιάζουν κατά τη διάλυσή τους στο νερό, φαινόμενα συσσωμάτωσης, τα οποία δυσχεραίνουν τις εφαρμογές τους. Τα συσσωματώματα αυτά, αποτυπώνονται στο φάσμα απορρόφησης ως υπερ- ή υποχρωματισμός.



Εικόνα 13 σήμανση πιθανών θέσεων υποκατάστασης στο μόριο της φθαλοκυανίνης.

Πίνακας 2 μήκη και γωνίες δεσμών σε πιθανές θέσεις υποκατάστασης των PCs

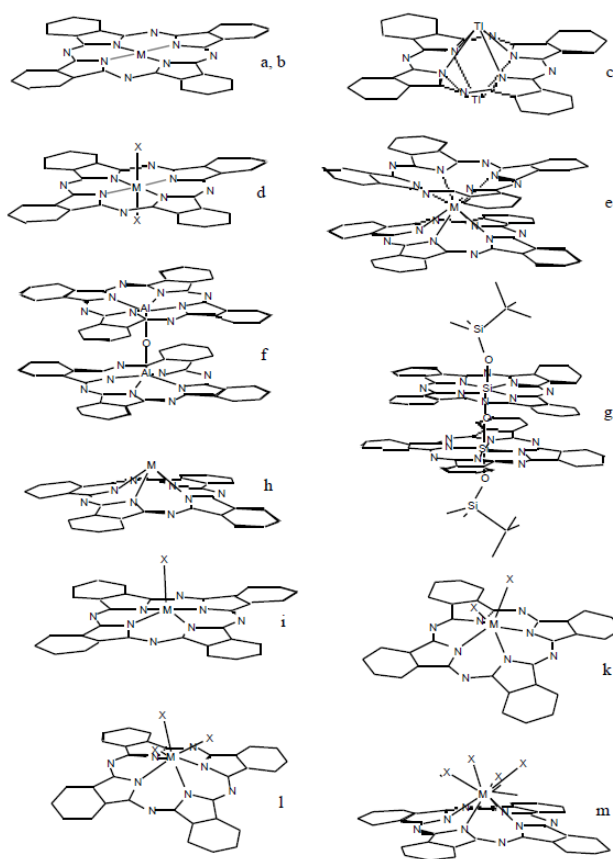
Macrocycle	Bond Length / [Å]								Angle/deg		
	a	b	c	d	e	f	g	h	α	β	γ
Phthalocyanines	1.32 - 1.34	1.36 - 1.37	1.40 - 1.50	1.37 - 1.42	3.8 - 4.0	2.7 - 2.9	6.7 - 6.8	4.7 - 4.8	120 - 124	126 - 128	107 - 110

Από την πληθώρα συνδυασμών που παρουσιάζουν οι φθαλοκυανίνες, οι ομάδα των υποκατεστημένων φθαλοκυανινών αργιλίου-χλωρίου φαίνεται να έχουν αναδειχθεί

ως φωτοευαίσθητοποιητές. Ο συνδυασμός της φθαλοκυανίνης με διαμαγνητικά υλικά, όπως το αργίλιο, προσδίδει μεγαλύτερο χρόνο παραμονής στην τριπλή διεγερμένη φάση, με επικείμενη αυξημένη φωτοτοξικότητα. Το είδος του υποκαταστάτη έχει αντίκτυπο και στην τελική απορρόφησή του από συγκεκριμένους ιστούς, για το λόγο αυτό και πρέπει να εξετάζεται κατά περίπτωση.

Οι ναφθαλοκυανίνες, φαίνεται να είναι έως και χίλιες φορές λιγότερο σταθερές στην ακτινοβολία, από τις υπόλοιπες, με αποτέλεσμα να μην είναι τόσο δραστικές, αλλά να αποβάλλονται ταχύτερα από τον οργανισμό, χωρίς να εμφανίζουν παρατεταμένη φωτοευαίσθησία [21].

Οι φθαλοκυανίνες, παρουσιάζουν κρυσταλλικές δομές ως μόρια, σχηματίζοντας δύο βασικές διαμορφώσεις, γνωστές ως τύπου I και τύπου II. Η πρώτη παρουσιάζεται σαν ένα επίπεδο μόριο με δύο πανομοιότυπες πλευρές, ενώ η δεύτερη δημιουργεί ένα κοίλο κι ένα κυρτό επίπεδο.

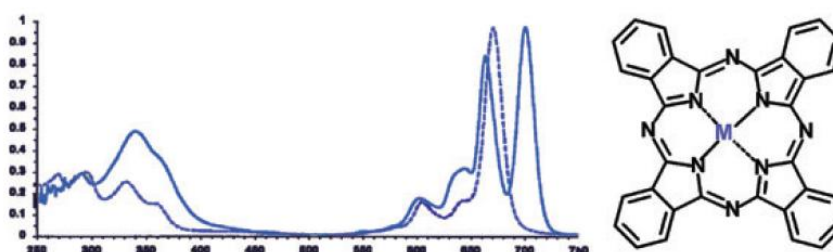


Εικόνα 14 διαμορφώσεις φθαλοκυανινών τύπου I (a-g) και τύπου II (h-m).

Οι φθαλοκυανίνες έχουν μελετηθεί αρκετά ως αγωγία και ημιαγωγία υλικά. Η αγωγιμότητα που παρουσιάζουν, ιδιαίτερα οι μεταλλοφθαλοκυανίνες είναι αποτέλεσμα πιθανών εγγενών ιδιοτήτων αλλά και την μοριακής διάταξής τους, αφήνοντας τροχιακά κενά στη ζώνη αγωγιμότητας. Μερικές φθαλοκυανίνες

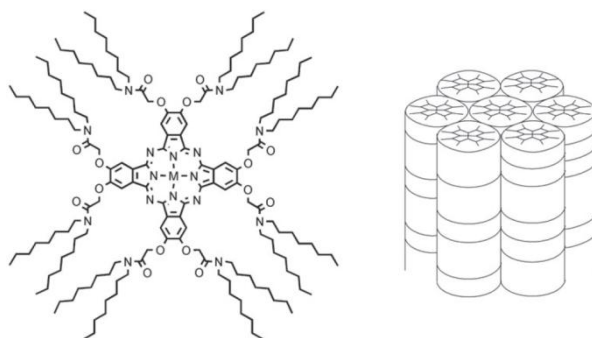
παρουσιάζουν συμπεριφέρονται ως οργανικά ημιαγώγιμα μόρια. Συγκεκριμένα, φθαλοκυανίνες λουτεσίου και λιθίου, παρουσιάζουν αγωγιμότητες $6 \times 10^{-5} \text{ S cm}^{-1}$ και $2 \times 10^{-5} \text{ S cm}^{-1}$ αντίστοιχα, με θερμική ενέργεια ενεργοποίησης της τάξεως των 0,64eV, και εφαρμόζονται σε ηλεκτρονικά τρανζίστορ, ανιχνευτές αερίων.

Η χωροταξική διεύθυνση των φθαλοκυανινών είναι ένα ακόμα χαρακτηριστικό τους γνώρισμα. Συγκεκριμένα μπορούν να διευθετήσουν τα μόριά τους σε στήλες, αυξάνοντας τις ιδιότητες αγωγιμότητάς τους. Συγκεκριμένα, η αντιδιαμετρική σύνταξη, επιτρέπει την ανταλλαγή ηλεκτρονίων, μέσω π-π τροχιακών επικαλύψεων. Διακρίνονται διαφορετικές διαμορφώσεις, που δημιουργούνται φυσικά όπως φιλμ ή δισκοειδείς υγροί κρύσταλλοι, αλλά και χημικά, όπως οξειδωτική σύζευξη, οι οποίες μπορούν να μετατρέψουν την ηλεκτρική αγωγιμότητα των φθαλοκυανινών από $10^{-11} \text{ S cm}^{-1}$ έως $10^{-1} \text{ S cm}^{-1}$.



Εικόνα 15 δομή και μετατόπιση του φάσματος απορρόφησης, με την εισαγωγή μετάλλων στο μόριο της φθαλοκυανίνης.

Μια ακόμη χαρακτηριστική ιδιότητα είναι η ικανότητα των φθαλοκυανινών να απορροφούν ακτινοβολία (Q-band). Όπως προαναφέρθηκε, τα συζευγμένα συστήματα φθαλοκυανινών, παρουσιάζουν έντονες κορυφές στα φάσματα απορρόφησης. Στην πλειοψηφία τους οι φθαλοκυανίνες παρουσιάζουν ένα ισχυρό φάσμα απορρόφησης στην ορατή περιοχή των 650 – 670 nm. Η ισχυρή αυτή απορρόφηση που εμφανίζεται περίπου σε $10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, είναι και η αιτία του έντονου χρώματος των φθαλοκυανινών.



Εικόνα 16 παράδειγμα σχηματισμού PCs σε στήλες, μέσω λιπόφιλων υποκαταστατών.

Οι μεταλλοφθαλοκυανίνες παρουσιάζουν μονή κορυφή, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα υποστρώματά τους, που παρουσιάζουν διπλές κορυφές, κι αυτό οφείλεται στη θερμοδυναμική σταθερότητα που προσδίδουν τα ιόντα μετάλλων, με τη συμμετρία που προσδίδουν. Συχνά μπορεί να παρατηρηθεί μετατόπιση της κορυφής απορρόφησης έως 100nm, ανάλογα με το μέγεθος, τον συντονισμό και τον αριθμό οξειδωσης των μετάλλων. Οι υποκαταστάτες των φθαλοκυανινών, μετατρέπουν τα τελικά μόρια σε δέκτες ή δότες ηλεκτρονίων και αυτό αποτυπώνεται στο φάσμα απορρόφησης με μεταβολή της κορυφής συνήθως προς την ερυθρή περιοχή για τους δέκτες ηλεκτρονίων, ανάλογα κάθε φορά με τη δομή και τον υποκαταστάτη.

Μία ακόμη αιτία μετατόπισης των κορυφών είναι και η δημιουργία ολιγομερών συσσωματωμάτων, όπου ανάλογα με τη γωνία πόλωσης, παρατηρείται μετατόπιση της κορυφής στην περιοχή ερυθρού ή υπεριώδους. Τα φαινόμενα της συσσωμάτωσης δεν εμφανίζονται σε αραιές συγκεντρώσεις των 10^{-6} με 10^{-5} mol L⁻¹, όπου επικρατούν μονομερή, ενώ πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και η επίδραση του διαλύτη, με πιθανές επιδράσεις στη μοριακή δομή των φθαλοκυανινών, που ενδέχεται να επιφέρει μετατοπίσεις στο φάσμα απορρόφησης.

Η διάταξη των φθαλοκυανινών σε νανοκλιμακα ωστόσο, φαίνεται να επιδρά στις φυσικές τους ιδιότητες και συγκεκριμένα στην ικανότητα μεταφοράς φορτίου κατά την ακτινοβόλησή τους. Οι φωτοφυσικές ιδιότητες των συστημάτων δέκτη-δότη ηλεκτρονίων, που δημιουργούν οι φθαλοκυανίνες σχετίζονται άμεσα με τις αλληλεπιδράσεις των χρωμοφόρων μονάδων. Τα φορτία εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα στη στερεή φάση, με μεγαλύτερο χρόνο ζωής, ενώ η μορφολογία των συζευγμένων δομών, έχει εξέχουσα σημασία όσον αφορά το φορτίο που φέρουν, για το λόγο αυτό και είναι απαραίτητη η γνώση των σχηματισμών των φθαλοκυανινών ακόμα και σε νανοκλίμακα, παρότι ο έλεγχος κι η σταθεροποίηση των μορίων αυτών είναι ένα δύσκολο εγχείρημα [22, 23].

2.4.3. Εφαρμογές φθαλοκυανινών

Οι φθαλοκυανίνες χρησιμοποιούνται επί ετών ως χρωστικές, ωστόσο ορισμένες ιδιότητές τους καθώς επίσης κι η ίδια τους η δομή, προσελκύει όλο και περισσότερο το επιστημονικό ενδιαφέρον, με στόχο την διεύρυνση των εφαρμογών τους. Η χημική ευελιξία που παρουσιάζει η συγκεκριμένη κατηγορία ενώσεων, επιτρέπει την παρασκευή μεγάλου εύρους παραπλήσιων δομών, με αποτέλεσμα την επίτευξη συγκεκριμένων κι επιθυμητών κατά περίπτωση ηλεκτρικών κι οπτικών ιδιοτήτων, καθώς επίσης και μεταβολής της διεργασίας παρασκευής τους. Οι περιφερικές υποκαταστάσεις δομικών μονάδων των φθαλοκυανινών, καθώς κι η ενσωμάτωση κυρίως ατόμων μετάλλου στο μόριό τους, σε συνδυασμό με τις στερεοχημικές μορφοποιήσεις τους και τη σταθερότητα τους, είναι χαρακτηριστικές περιπτώσεις που καταδεικνύουν το εύρος μεταβολής των ιδιοτήτων και κατά συνέπεια των εφαρμογών

τους. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει στόχος για χρήση σε ηλεκτρονικές κατασκευές, τρανζίστορ, αισθητήρες, συσκευές εκπομπής φωτός (Laser), φωτοευαίσθητοποιητές PDT, σε φωτοβολταϊκά συστήματα, κβαντική αποθήκευση πληροφοριών, ενώ ο κλάδος της νανοτεχνολογίας έχει ήδη συμπεριλάβει τις φθαλοκυανίνες στις εφαρμογές του.

Λόγω των εγγενών ιδιοτήτων τους αλλά και της ποικιλομορφίας που παρουσιάζουν σε μοριακούς σχηματισμούς, λόγω τροχιακών επικαλύψεων, εμφανίζουν χαρακτηριστικά ημιαγωγών. Παράδειγμα αποτελούν οι κρυσταλλικές δομές από φθαλοκυανίνες λιθίου, με αγωγιμότητα $6 \times 10^{-5} \text{ S cm}^{-1}$ με θερμική ενέργεια ενεργοποίησης στα 0,064 eV. Οι π-π επικαλύψεις μοριακών τροχιακών, δημιουργούν στοιβάξεις φθαλοκυανινών, σε μορφή στήλης με ανάλογες εφαρμογές ως αγωγών, χάρη στην τάση να δίνουν ηλεκτρόνια, ενώ με χημικές παρεμβάσεις μπορούν να παρασκευασθούν κι άλλες μορφές, όπως φιλμ.

Η δυνατότητα των φθαλοκυανινών για απορρόφηση κι εκρόφηση αερίων, αλλά κι ενσωμάτωση χημικών μορίων στο εσωτερικό τους, χρησιμοποιείται κατάλληλα σε εφαρμογές τους ως χημικοί αισθητήρες. Η ανταλλαγή ηλεκτρονίων, στοχείων αλλά και μορίων μεταξύ φθαλοκυανινών και περιβαλλοντικών παραγόντων συμβάλει σημαντικά στην ανίχνευση χημικών ουσιών.

Το φάσμα απορρόφησης των φθαλοκυανινών είναι άλλη μία ιδιότητα στην οποία οφείλονται πολλές εφαρμογές τους. Οι περισσότερες ενώσεις φθαλοκυανινών παρουσιάζουν απορρόφηση στα 650-670 nm μήκος κύματος, εμφανίζοντας μία (κυρίως σε ενώσεις με μέταλλα) ή δύο κορυφές στο αντίστοιχο φάσμα. Οι αποκλίσεις από τις κορυφές συγκριτικά με τις ελεύθερες φθαλοκυανίνες σχετίζονται, με το φορτίο, το μέγεθος και το είδος του στοιχείου που προσδέεται στην μακροκυκλική δομή της φθαλοκυανίνης, μεταβάλλοντας κατά περίπτωση τις ηλεκτρικές της ιδιότητες. Έχουν αναφερθεί πάνω από εβδομήντα μέταλλα που μπορούν να ενσωματωθούν στο μόριο της φθαλοκυανίνης, με σημαντικά αποτελέσματα και στη διαλυτότητα τους η οποία φαίνεται να ακολουθεί τη σειρά $\text{Cu} > \text{H} > \text{Fe} > \text{VO} > \text{Zn} \gg \text{Al}$, με αποτέλεσμα οι φθαλοκυανίνες αργιλίου να εμφανίζονται σε μονομερή μορφή, δημιουργώντας όσο το δυνατόν λιγότερα συσσωματώματα και καλύτερη διαλυτότητα ως επακόλουθο. Σε συνδυασμό με τα φαινόμενα δότη-δέκτη ηλεκτρονίων που παρουσιάζουν, βρίσκουν χρήση σε ενεργειακές εφαρμογές, ή διαδικασίες μεταφοράς φορτίου. Έχει γίνει κατανοητό ότι η στερεοχημική διάταξη των φθαλοκυανινών επιδρά στις ιδιότητές τους, προσδίδοντας τους μεγαλύτερη σταθερότητα όταν βρίσκονται σε στερεή μορφή και όχι σε διαλύματα. Το ίδιο ισχύει και σε διαμορφώσεις νανοκλίμακας, όπου η μορφολογία είναι πιο δύσκολο να ελεγχθεί αλλά παραμένει ένας σημαντικός παράγοντας επιρροής στις ιδιότητες των φθαλοκυανινών. Μεγάλη έρευνα διεξάγεται προς αξιοποίηση των προαναφερθέντων ιδιοτήτων των φθαλοκυανινών στα φωτοβολταϊκά κελιά, όπου με διαφορετικές δομές, σύμπλοκα, πολυμερικά νανοσωματίδια, παρουσιάζουν ικανοποιητική μετατροπή της ηλιακής ενέργειας.

Η κβαντική μηχανική χρησιμοποιεί τις φθαλοκυανίνες ως κβαντικά σημεία, ή σύμπλοκα με κβαντικά σημεία (quantum dots QDs). Έτσι οι φθαλοκυανίνες βρίσκουν περαιτέρω εφαρμογές ως φωτοευαίσθητοποιητές στη φωτοδυναμική θεραπεία (PDT), προσδεδεμένα σε κατάλληλα κύτταρα, για στοχευμένη δράση. Η χρήση τους ως κβαντικά σημεία επεκτείνεται και σε οπτική μεταγωγή σημάτων, χρήση σε συσκευές laser, αξιοποίηση σε φωτισμούς LED, ακόμη και σε αποθηκευτικά μέσα νανοκρυστάλλων σε κβαντικούς υπολογιστές. [24] [25]

2.5 ΒΙΟΔΙΑΣΠΩΜΕΝΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ

2.5.1 Εισαγωγή

Πρόκειται για μία κατηγορία πολυμερών υλικών, όπου το βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ότι τα παραγόμενα προϊόντα κατά την αποικοδόμησή τους απομακρύνονται πλήρως από βιολογικούς ιστούς, μέσω της μεταβολικής οδού, καθιστώντας τα συμβατά με τη φυσιολογία του ανθρώπινου σώματος. Η χρήση των βιοδιασπώμενων πολυμερών σε ιατρικές εφαρμογές αυξάνεται διαρκώς, ενώ η μορφολογία τους ποικίλει. Τα νανοσωματίδια βιοδιασπώμενων πολυμερών, αποτελούν δομές που αναπτύσσονται κι ενσωματώνονται σε φαρμακευτικές εφαρμογές, κυρίως ως φορείς φαρμακευτικά δραστικών μορίων. Με τα νανοσωματίδια επιδιώκεται η στοχευμένη δράση σε συγκεκριμένους ιστούς, καθώς και η ελεγχόμενη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας.

Ορισμένες επιπλοκές που έχουν εντοπισθεί κατά τη χρήση βιοδιασπώμενων πολυμερών σε βιολογικούς ιστούς είναι η τοπική μείωση του pH αλλά και η πιθανή αλλοίωση του μικροπεριβάλλοντος των κυττάρων, επηρεάζοντας την αποδοτικότητα των εκάστοτε εφαρμογών.

2.5.2 Μηχανισμοί αποικοδόμησης

Η ύπαρξη τελικών προϊόντων σε τοξικές συγκεντρώσεις στον οργανισμό καθιστά τα βιοδιασπώμενα πολυμερή μη βιοσυμβατά. Είναι σκόπιμο λοιπόν να λαμβάνεται υπόψη ο μηχανισμός αποικοδόμησης του κάθε πολυμερούς. ο μηχανισμός αποικοδόμησης εξαρτάται από τη χημική δομή, τη μορφολογία και το μοριακό βάρος του κάθε πολυμερούς, καθώς κι από εξωτερικούς παράγοντες, όπως το pH και η θερμοκρασία.

1. Υδρόλυση

Κατά την υδρόλυση, σπάνε ασθενείς δεσμοί από την κύρια ή πλευρικές αλυσίδες του πολυμερούς κατά την αλληλεπίδραση με μόρια νερού. Χαρακτηριστικά

παραδείγματα ομάδων πολυμερών που αποικοδομούνται με υδρόλυση είναι πολυεστέρες, πολυαμίδια, πολυουρεθάνες. Σημαντική επίδραση στην διαδικασία ενδέχεται να επιφέρουν το φορτίο των ατόμων άνθρακα, η ύπαρξη πλευρικών ομάδων ή συζευγμένα μόρια, η διηλεκτρική σταθερά αλλά και η διαλυτότητα του νερού. Η υδρόλυση προκαλεί διάρρηξη της πολυμερικής μήτρας. Αν η διείσδυση των υδατικών μορίων στην πολυμερική μήτρα προκαλεί ομοιόμορφη διάβρωση η διαδικασία αναφέρεται ως «bulk erosion», ειδικά, αν παρατηρείται απώλεια μάζας στην επιφάνεια του πολυμερούς, η αποικοδόμηση αναφέρεται ως «surface erosion». Ο συνδυασμός και των δύο μηχανισμός μπορεί να επιταχύνει τη διαδικασία αποικοδόμησης.

2. Οξειδωση

Η φλεγμονώδης αντίδραση των κυττάρων παράγει τα λεγόμενα δραστικά προϊόντα οξυγόνου (reactive oxygen species), τα οποία μπορούν επίσης να προκαλέσουν την αποικοδόμηση των πολυμερών μέσω ελευθέρων ριζών. Παραδείγματα πολυμερών που αποικοδομούνται μέσω οξειδωσης είναι πολυαιθυλένιο, πολυαιθέρες και πολυουρεθάνες. Αρχικά γίνεται παραγωγή ελευθέρων ριζών είτε από τους κυτταρικούς ιστούς, είτε μέσω κάποιας θερμικής, φωτοχημικής δράσης ή ακτινοβόλησης. Στη συνέχεια οι ελεύθερες ρίζες πολλαπλασιάζονται μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων με οξυγόνο, τα προϊόντα των οποίων αντιδρούν με το πολυμερές προκαλώντας ρήξη της πολυμερικής αλυσίδας και δημιουργία θραυσμάτων με μικρότερο μήκος αλύσου.

3. Ενζυματική αποικοδόμηση

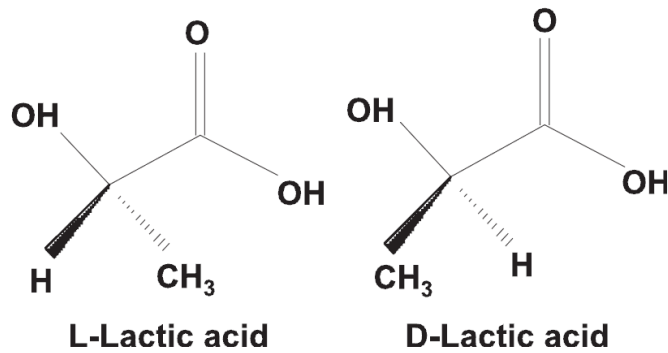
Η ενζυματική αποικοδόμηση αφορά την υδρόλυση που καταλύεται από ένζυμα, τις καλούμενες υδρολάσες (πρωτεάσες, γλυκοσιδάσες, φωσφατάσες). Ο συγκεκριμένος μηχανισμός πραγματοποιείται μέσω επιφανειακής διάβρωσης, κατά την οποία αντιδρά το εξωτερικό μέρος της πολυμερικής μήτρας, μειώνοντας τη μάζα του πολυμερούς σταδιακά. Η διαδικασία επηρεάζεται από πιθανές διεπιφανειακές αντιδράσεις του πολυμερούς, αλλά και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του κάθε υλικού, πολυμερούς ή ενζύμου, καθώς και από περιβαλλοντικές συνθήκες όπως pH και θερμοκρασία και ύπαρξη εκκινητών στο σύστημα. [26]

Πίνακας 3 παραδείγματα βιοδιασπώμενων πολυμερών

Origin	Subclassification	Examples		
Synthetic	Hydrolyzable backbones	Polyesters	Poly(glycolic acid)	
			Poly(lactic acid)	
	Poly(caprolactone)			
	Poly(lactic-co-glycolic acid)			
	Poly(butylene succinate)			
	Poly(trimethylene carbonate)			
	Poly(p-dioxanone)			
	Poly(butylene terephthalate)			
	Poly(ester amide)s		Hybrane [®] S1200	
	Polyurethanes		DegraPol	
	Polyanhydrides	Poly[(carboxyphenoxy)propane-sebacic acid]		
	Polyphosphoesters	Poly[bis(hydroxyethyl)terephthalate-ethyl orthophosphorylate/terephthaloyl chloride]		
		Carbon backbones (hydrolysis cannot occur)	Poly(ortho esters)	Poly(ortho esters)
				Poly(ortho esters) II
	Poly(ortho esters) III			
Poly(ortho esters) IV				
Poly(alkyl cyanoacrylates)	Poly(butyl cyanoacrylate)			
Polyether	Poly(ethylene glycol)			
Poly(amino acids)	Tyrosine derived polycarbonate			
Semisynthetic	Microbial polyesters	Poly(β -hydroxyalkanoate)s		
		Poly(hydroxybutyrate)		
		Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)		
Natural	Proteins	Animal source	Collagen	
			Albumin	
	Vegetable source	Polysaccharides	Animal source	Chitosan
				Hyaluronate
	Vegetable source	Polysaccharides	Vegetable source	Cellulose
				Alginate
				Starch

2.5.3 Πολύ-γαλακτικό οξύ (PLA)

Το πολύ-γαλακτικό οξύ (PLA: poly(lactic acid)) είναι ένα θερμοπλαστικό, βιοδιασπώμενο πολυμερές, που έχει συγκεντρώσει το επιστημονικό ενδιαφέρον ως ένα καινοτόμο υλικό, σε πλήθος εφαρμογών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκεντρώνει για τις ιατρικές του εφαρμογές, καθώς κατά την αποικοδόμησή του προκύπτει το γαλακτικό οξύ, το οποίο είναι αβλαβές για τον ανθρώπινο οργανισμό. Το PLA παράγεται από τον πολυμερισμό του μονομερούς γαλακτικού οξέος ($\text{HOCH}_2\text{CHCOOH}$) το οποίο απαντάται σε δύο εναντιομερή το L- και D- γαλακτικό οξύ (ανάλογα με το αν πολώνει το φως δεξιόστροφα ή αριστερόστροφα, αντίστοιχα).

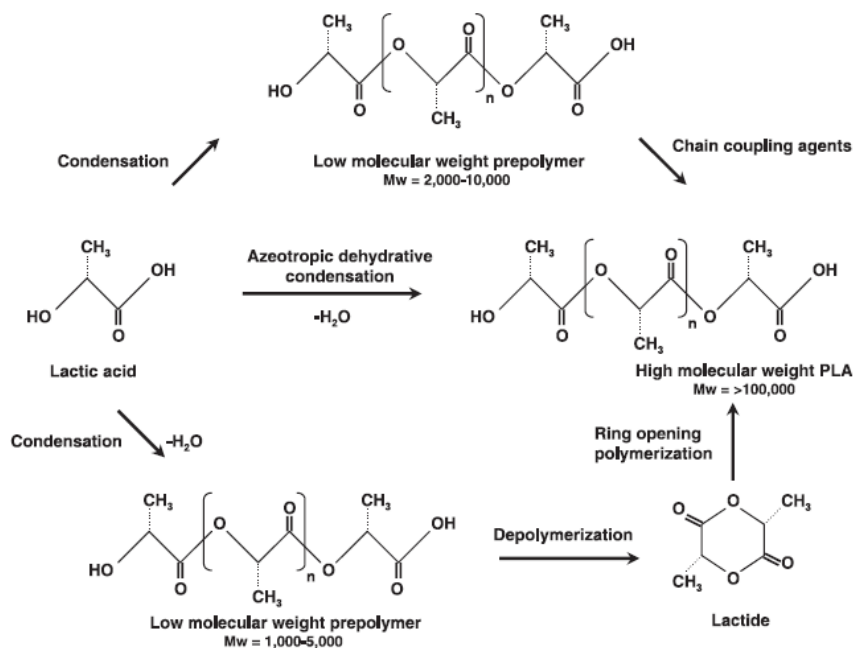


Εικόνα 17 οπτικά ισομερή γαλακτικού οξέος

Το γαλακτικό οξύ παράγεται στους μύες των θηλαστικών κατά τη διαδικασία γλυκογονόλυσης και λαμβάνει μέρος στον κύκλο του Krebs κατά τον μεταβολισμό των κυττάρων. Η παραγωγή του γίνεται είτε μέσω πετροχημικών αποθεμάτων, είτε μέσω ζύμωσης η οποία και προτιμάται.

Ο πολυμερισμός του γαλακτικού οξέος πραγματοποιείται κυρίως με δύο μεθόδους:

- Άμεση συμπύκνωση, όπου χρησιμοποιείται διαλύτης υπό υψηλό κενό και θερμοκρασίες, για την αφαίρεση του παραγόμενου νερού κατά τη διαδικασία.
- Απουσία διαλύτη, με σχηματισμό ενός ενδιάμεσου κυκλικού διμερούς μορίου. Το ενδιάμεσο μόριο παραλαμβάνεται μέσω απόσταξης, πραγματοποιείται καταλυτικά διάνοιξη του κυκλικού δακτυλίου και πολυμερισμός της ένωσης, καταλήγοντας στο πολύ-γαλακτικό οξύ.

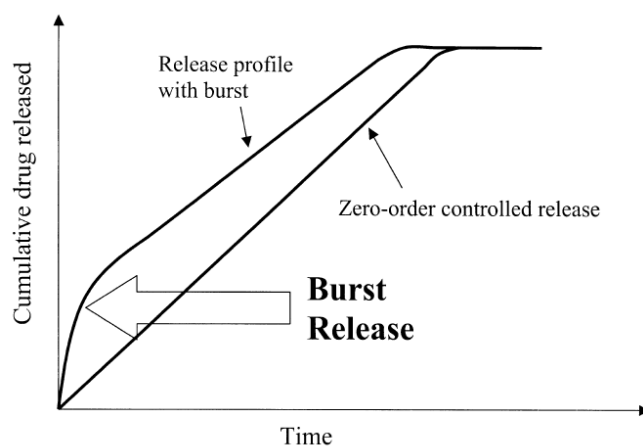


Εικόνα 18 σύνθεση πολυ(γαλακτικού οξέος)

Τα πλεονεκτήματα του πολύ-γαλακτικού οξέος είναι ότι είναι βιοσυμβατό και βιοδιασπώμενο, μπορεί να επιμερισθεί σε μικρότερες δομικές μονάδες μέσω υδρόλυσης, μπορεί να παραχθεί από ανανεώσιμες πηγές (καλαμπόκι), αλλά κυρίως επιδέχεται τροποποιήσεις που μπορούν να επιφέρουν επιδιωκόμενες τελικές ιδιότητες. Είναι ένα σχετικά σκληρό υλικό με θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) να κυμαίνεται στους 60-70°C και σημείο τήξης (T_m) 170-180°C. [27]

2.6 ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗ ΔΡΑΣΤΙΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ (drug release)

Τα συστήματα σταδιακής αποδέσμευσης δραστικών ουσιών κερδίζουν όλο και μεγαλύτερο επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια κι αξιοποιούνται σε μεγάλο βαθμό στη φαρμακευτική βιομηχανία. Συχνά παρατηρείται ένα στάδιο ταχείας αποδέσμευσης, που ενδεχομένως επιζητείται, αλλά αν δεν έχει προβλεφθεί και μελετηθεί κατάλληλα για την εκάστοτε εφαρμογή, μπορεί να επιφέρει αρνητικές επιπτώσεις, δημιουργώντας φαρμακευτικά επικίνδυνες καταστάσεις αλλά κι οικονομικά ασύμφορες. Η αποδέσμευση δραστικών ουσιών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διάστημα ωρών/ ημερών έως και μηνών, κατά περίπτωση. Τα συστήματα σταδιακής αποδέσμευσης καθιστούν εφικτή τη μείωση της ποσότητας δραστικής ουσίας ανά εφαρμογή, με ταυτόχρονη βελτίωση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων, παρέχοντας λιγότερες δόσεις φαρμάκων, συχνά ευκολότερη χορήγηση αλλά και βελτιωμένα αποτελέσματα. Έχουν κατασκευασθεί πλήθος συστημάτων με διαφορετικά επιμέρους χαρακτηριστικά το καθένα. Μία γενική εικόνα της αποδέσμευσης ωστόσο είναι το σύστημα μετά την χορήγησή του, να παρουσιάζει μία αρχικά αυξημένη αποδέσμευση (burst release) και στη συνέχεια σταδιακά ελεγχόμενη ροή δραστικής ουσία. Η αυξημένη αρχική αποδέσμευση απαιτεί ιδιαίτερη μελέτη και σχεδιασμό, καθώς ενδέχεται να απαιτείται εξάλειψή της από το σύστημα, καθώς ανάλογα με την τελική εφαρμογή του συστήματος μπορεί να είναι τόσο απαραίτητη όσο και επικίνδυνη.



Εικόνα 19 ποιοτική σχηματική απεικόνιση αποδέσμευσης δραστικής ουσίας

Πίνακας 4 αποτελέσματα αποδέσμευσης.

ΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΤΑΧΕΙΑΣ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ	ΔΥΣΜΕΝΕΙΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΑΧΕΙΑΣ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ
Επούλωση τραυμάτων	Τοπική ή συστηματική τοξικότητα δραστικής ουσίας
Εγκλεισμός αρωματικών υλών	Μειωμένη ημίσεια ζωή ή οξείδωση δραστικής ουσίας
Στοχευμένη δράση	Οικονομική και φαρμακευτική σπατάλη ουσιών
Παλμική μορφή αποδέσμευσης	Μειωμένη διάρκεια θεραπείας κι απαίτηση για συχνότερη χορήγηση

Όσον αφορά τα συστήματα νανοσωματιδίων, επιδιώκουν τη μέγιστη δυνατότητα χωρητικότητας δραστικής ουσίας, με μειωμένη ποσότητα κατά το δυνατόν του εξωτερικού περιβλήματος. Η ενσωμάτωση της δραστικής ουσίας επιτυγχάνεται, όπως προαναφέρθηκε, είτε κατά την παρασκευή των νανοσωματιδίων, είτε με επεξεργασία ήδη σχηματισμένων νανοσωματιδίων. Η αποδέσμευση της δραστικής ουσίας σχετίζεται όπως είναι λογικό με τις συνθήκες παρασκευής των νανοσωματιδίων, όπως η ταχύτητα μείωσης της διαμέτρου, σε κολλοειδή συστήματα των αρχικά σχηματιζόμενων σταγονιδίων.

Κατά τον εγκλεισμό ουσιών λαμβάνουν χώρα πλήθος δράσεων, που θα συμβάλουν στην τελική αποδέσμευση των ουσιών, για το λόγο αυτό κρίνεται σκόπιμη η ανίχνευση και κατανόησή τους. Κατά τον εγκλεισμό ουσιών σε νανοσωματίδια κυρίως πολυμερών, παρατηρείται διάλυση πολυμερούς και δραστικής ουσίας, διασπορά δραστικής ουσίας στο πολυμερές, απορρόφηση ουσίας στην επιφάνεια του πολυμερούς, αλλά και πιθανή χημική ή μηχανική αλληλεπίδραση-πρόσθεση δραστικής ουσίας και πολυμερούς. το ποσό της δεσμευμένης δραστικής ουσίας αλλά και το είδος αλληλεπίδρασης, εξαρτώνται από τη χημική δομή πολυμερούς και δραστικής ουσίας, καθώς κι από τις συνθήκες διεξαγωγής του εγκλεισμού. Για τον

καθορισμό του είδους της αλληλεπίδρασης έχει προταθεί η παρακολούθηση της θερμοκρασίας της διαδικασίας εγκλεισμού, ώστε μέσω ισοθερμοκρασιακών καμπυλών, να προσδιορισθεί η προσρόφηση ή αντίδραση της δραστικής ουσίας, και κατ' επέκταση η απόδοση του εγκλεισμού. Η γραμμική απεικόνιση ρόφησης είναι χαρακτηριστική διαλυμάτων στερεών, ενώ οι ισοθερμοκρασιακές καμπύλες Langmuiror s-τύπου, χαρακτηρίζουν επιφανειακή προσρόφηση. Επειδή τα νανοσωματίδια εξετάζονται σε κολλοειδή συστήματα, ο ακριβής προσδιορισμός του περιεχομένου της δραστικής ουσίας αποτελεί δύσκολο εγχείρημα. Έτσι, έχουν προταθεί αρκετές φασματομετρικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της απόδοσης του εγκλεισμού. Αρκετά αξιόπιστη φαίνεται να είναι για τον διαχωρισμό νανοσωματιδίων από παρακείμενα διαλύματα, η υπερφυγοκέντριση κι η διήθηση γέλης. Με όποια διαδικασία κι αν ακολουθηθεί το τελικό αποτέλεσμα απόδοσης εγκλεισμού (encapsulation efficiency) προκύπτει από την σχέση :

$$EE = \frac{\text{εγκλεισμένη ποσότητα δραστικής ουσίας}}{\text{συνολική ποσότητα δραστικής ουσίας για την παρασκευή των νανοσωματιδίων}}$$

Εξίσου σημαντικοί με τους μηχανισμούς σχηματισμού των νανοσωματιδίων, είναι κι οι μηχανισμοί αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας. Έχουν προταθεί πέντε πιθανοί μηχανισμοί για την αποδέσμευση της δραστικής ουσίας:

1. Εκρόφηση της προσδεδεμένης δραστικής ουσίας από την επιφάνεια του νανοσωματιδίου,
2. Διάχυση από την πολυμερική μήτρα,
3. Διάχυση από την μεμβράνη του νανοσωματιδίου,
4. Διάρρηξη του τοιχώματος του νανοσωματιδίου,
5. Συνδυασμένη δράση.

Η κινητική ανάλυση του μηχανισμού αποδέσμευσης μπορεί να εκφραστεί με μία εκθετική συνάρτηση γενικής μορφής:

$$C = Ae^{-at} + Be^{-bt}$$

Όπου C συμβολίζεται η συγκέντρωση του εναπομείναντος φαρμάκου στο νανοσωματίδιο σε χρόνο t, A, a και B, b χαρακτηριστικές σταθερές του συστήματος (A χρησιμοποιείται για μηχανισμούς ελεγχόμενους από διάχυση και B για διάρρηξη τοιχώματος νανοσωματιδίου). Γενικά η αποδέσμευση εξαρτάται από τη διαλυτότητα των συστατικών, τη διάχυση, την βιοαποικοδόμηση του πολυμερούς, αλλά και από την απόδοση του εγκλεισμού και το μέγεθος των σωματιδίων. Τα μεγαλύτερα σωματίδια παρουσιάζουν μικρότερη κορυφή αποδέσμευσης. Η δυνατότητα εγκλεισμού σχετίζεται άμεσα με την αποδέσμευση και τον ρυθμό της. Σε περιπτώσεις νανοσφαιρών όπου επικρατεί ομοιόμορφη κατανομή δραστικής ουσίας, η αποδέσμευση πραγματοποιείται μέσω διάχυσης ή διάρρηξης της μεμβράνης, ανάλογα με το χρόνο που απαιτείται για τη διάρρηξη των τοιχωμάτων υπερσχύει κι ο αντίστοιχος μηχανισμός. Οι περιπτώσεις ταχείας αποδέσμευσης δραστικών ουσιών αποδίδονται σε ασθενή πρόσδεση δραστικής ουσίας και νανοσωματιδίου ή και σε

μηχανισμούς προσρόφησης στην επιφάνεια του νανοσωματιδίου. Έχει παρατηρηθεί ότι η αποδέσμευση παρατείνεται, με μείωση του μέσου ιξώδους, μοριακού βάρους της πολυμερικής μεμβράνης των νανοσωματιδίων. Αντίστοιχα, μειώνονται και φαινόμενα ταχείας αρχικής αποδέσμευσης δραστικής ουσίας (initial burst release). Κάποιες ενδεικτικές μέθοδοι μελέτης της αποδέσμευσης δραστικής ουσίας in vitro είναι:

- Παράλληλες κυτταρικές καλλιέργειες για διάχυση, με χρήση συνθετικών ή βιολογικών μεμβρανών,
- Ασκός διάλυσης, με μελέτη διάχυσης,
- Αντίστροφη διάλυση,
- Υπερδιήθηση,
- Φυγοκέντρηση και διήθηση.

Παρά την πρόοδο στον τομέα αυτό, υπάρχουν ακόμη αρκετά προβλήματα στην in vitro μελέτη της αποδέσμευσης δραστικών ουσιών, κυρίως λόγω της δυσκολίας διαχωρισμού νανοσωματιδίων κι απελευθερωμένης ουσίας. Σε κάθε περίπτωση ωστόσο, το μοντέλο της αποδέσμευσης που παρατηρείται, εξαρτάται από τη φύση του εξεταζόμενου συστήματος νανοσωματιδίων και δραστικών ουσιών, καθώς επίσης φαίνεται να σχετίζεται και με τη μέθοδο παρασκευής των νανοσωματιδίων εγκλεισμένων ουσιών. [28] [29]

Σύμφωνα με μελέτες πάνω σε νανοσωματίδια πολυμερών με μονομερή γαλακτικού οξέως, φαίνεται ότι υπάρχουν αρκετοί παράμετροι που δρουν συνεργατικά στην αποδέσμευση της δραστικής ουσίας. Εν γένει η αποικοδόμηση του πολυμερούς κι ο ρυθμός αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας αυξάνονται με την αύξηση της υδροφιλικότητας στην αλυσίδα ή τις ακραίες ομάδες του μονομερούς, καθώς και με μείωση της κρυσταλλικότητας του πολυμερούς και μεγαλύτερη διάμετρο των νανοσωματιδίων. Πρέπει να λαμβάνονται υπόψη πλήθος παραγόντων για τη σφαιρική προσέγγιση, κατανόηση κι έλεγχο του μηχανισμού αποδέσμευσης από νανοσωματίδια. Με μία γενικευμένη προσέγγιση, για συστήματα μικρής διάρκειας αποδέσμευσης (έως ένα μήνα) προτιμάται ένα άμορφο πολυμερές με υψηλή υδροφιλικότητα. Αντίστοιχα για μεγαλύτερης διάρκειας αποδέσμευση (από ένα έως έξι μήνες), κρίνονται καταλληλότερα ημικρυσταλλικά ή και υψηλής κρυσταλλικότητας πολυμερή. Το φαινόμενο της ταχείας αποδέσμευσης ενδέχεται να μην είναι κατά περίπτωση επιθυμητό, ή σε περιπτώσεις άμεσης δράσης (όπως ανοιχτά τραύματα) να πρέπει να εξετασθεί χωριστά. Επιγραμματικά οι κύριοι παράγοντες που φαίνεται να συνηγορούν στην ταχύτερη αποικοδόμηση και αύξηση του ρυθμού αποδέσμευσης είναι οι ακόλουθοι:

- Υδροφιλικότητα: προσθήκη γλυκολικού οξέος στο πολυμερές $M_w < 100\text{kDa}$, άμορφη φάση πολυμερούς,
- Πρόσθετα: είδος εγκλεισμένης δραστικής ουσίας, πλαστικοποιητές,
- Πάχος: $> 0,2\text{mm}$
- Μέσο αποδέσμευσης: $5 < \text{pH} < 8$

- Συνθήκες: θερμοκρασία $> T_g$, παρουσία αέρα, επιβολή τάσης. [30]

ΜΟΝΤΕΛΑ-ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ:

Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί, που περιγράφουν τη λειτουργία των συστημάτων σταδιακής αποδέσμευσης όπως:

- Συστήματα βασισμένα στη διάχυση,
- Συστήματα διόγκωσης,
- Χημικά ελεγχόμενα συστήματα,
- Μαγνητικά ελεγχόμενα

Εκ των οποίων τα πρώτα δύο είναι τα πλέον διεξοδικά μελετημένα συστήματα. Στη γενική μορφή της ανάλυσης αποδέσμευσης η αρχική ταχεία αποδέσμευση αναπαριστάται ως μία παράμετρος α , κατά την εξίσωση:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n + \alpha$$

Όπου $\frac{M_t}{M_\infty}$ το λεγόμενο κλάσμα αποδέσμευσης, n ο εκθέτης διάχυσης και k προεκθετικός παράγοντας. Στο γενικό αυτό μοντέλο, η παράμετρος α λαμβάνεται για αποδέσμευση σε χρόνο $t=0$, δηλαδή ανεξάρτητη του χρόνου για λόγους απλοποίησης, με αποτέλεσμα η καμπύλη αποδέσμευσης σύμφωνα με αυτό το μοντέλο να μετατοπίζεται κατά έναν όρο α .

Σε περιπτώσεις αποδέσμευσης ελεγχόμενης από φαινόμενα διάχυσης της εγκλεισμένης δραστικής ουσίας, διαμέσου του περιβλήματος, η διάχυση καθορίζει όλη τη διαδικασία. Έτσι, η ύπαρξη πόρων στην επιφάνεια του συστήματος, αλλά και τα ίδια τα υλικά και η δομή τους καθορίζουν τον ρυθμό αποδέσμευσης, ενώ η ταχεία αποδέσμευση φαίνεται να εξαρτάται από την διαλυτότητα της χρησιμοποιούμενης δραστικής ουσίας. Επιπλέον, γίνεται συχνά η παραδοχή ότι τα συστήματα δεν αλλάζουν μορφολογία κατά την αποδέσμευση. Στην πιο απλοποιημένη μορφή συστήματος διάχυσης, από λεπτή πλάκα πολυμερούς, με πάχος l , θεωρείται ότι το σύστημα διατηρείται σε σταθερή, ομοιόμορφη συγκέντρωση δραστικής ουσίας C , ενώ η επιφάνεια του συστήματος έχει σταθερή συγκέντρωση δραστικής ουσίας C_0 . Η κατάσταση αυτή αναφέρεται ως τέλειες συνθήκες βύθισης κατά την πειραματική μελέτη. Για σταθερό συντελεστή διάχυσης D , με μονοδιάστατη διάχυση προς την κατεύθυνση x , εφαρμόζεται ο δεύτερος νόμος Fick, με τις αντίστοιχες συνοριακές συνθήκες:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}, \text{ όπου}$$

$$t=0 \quad -l/2 < x < l/2 \quad C=C_1$$

$$t>0 \quad x=\pm l/2 \quad C=C_0$$

και σε μορφή τριγωνομετρικών σειρών:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} \exp\left[\frac{-D(2n+1)^2 \pi^2}{l^2} t\right]$$

Όπου M_t η μάζα της απελευθερωμένης δραστικής ουσίας σε χρόνο t και M_∞ αντίστοιχα, όταν ο χρόνος τείνει στο άπειρο. Η ανωτέρω προσέγγιση ισχύει ικανοποιητικά για τα αρχικά στάδια αποδέσμευσης, σχεδόν το μισό της διαδικασίας αποδέσμευσης, για αρκετά συστήματα. Σε περιπτώσεις κυλινδρικών συστημάτων, ακτίνας a , των ίδιων συνθηκών οι εξισώσεις μετατρέπονται στις μορφές:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left[\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right], \text{ όπου}$$

$$t=0 \quad 0 < r < a \quad C=C_1$$

$$t>0 \quad r=a \quad C=C_0$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \frac{4}{\alpha_n^2 \alpha_n^2} \exp[-D\alpha_n^2 t],$$

Όπου α_n συμβολίζονται οι θετικές ρίζες της συνάρτησης Bessel $J_0(\alpha_n a)=0$. Τα μοντέλα αυτά φαίνεται να εφαρμόζονται ικανοποιητικά σε ακόμη μικρότερο ποσοστό της τάξης του 15% της διαδικασίας αποδέσμευσης.

Σε σφαιρικά σωματίδια, όμοιων συνθηκών με ακτίνα a το μοντέλο διάχυσης λαμβάνει τη μορφή:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left[\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right], \text{ όπου}$$

$$t=0 \quad 0 < r < a \quad C=C_1$$

$$t>0 \quad r=a \quad C=C_0$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left[\frac{-Dn^2 \pi^2 t}{a^2}\right]$$

Λαμβάνοντας υπόψη την τρισδιάστατη δομή συστημάτων, σε ακτίνα r και αξονική διεύθυνση z (με συμμετρία ως προς τη θ διεύθυνση), μελετώνται συστήματα αποδέσμευσης διαφόρων σχημάτων, όπως δισκία, ταμπλέτες, ράβδοι. Στα συστήματα αυτά το πάχος ορίζεται l , η διάμετρος $2a$ και χαρακτηρίζονται από τον λόγο $2a/l$. Το μοντέλο λαμβάνει τη μορφή:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \left[\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial C}{\partial r} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right], \text{ όπου}$$

$$t=0 \quad -l/2 < z < l/2$$

$$0 < r < a \quad C=C_1$$

$$t > 0 \quad z = \pm l/2$$

$$r = a \quad C = C_0$$

και

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{4}{\alpha^2 \alpha_n^2} \exp[-D \alpha_n^2 t] \times \sum_{m=0}^{\infty} \frac{8}{l^2 \beta_m^2} \exp[-D \beta_m^2 t], \text{ όπου } \beta_m = \frac{(2m+1)\pi}{l}$$

Τα μαθηματικά μοντέλα, που περιγράφουν την αποδέσμευση με διάχυση, τροποποιούνται κατάλληλα για να συμπεριλάβουν όπου κρίνεται απαραίτητο και διαφοροποιήσεις λόγω ανομοιομορφίας στη διασπορά μεγέθους και τις συνοριακές συνθήκες των εξεταζόμενων συστημάτων. [31]

Σε συστήματα διόγκωσης, παρατηρείται απορρόφηση του μέσου διασποράς (διαλύτη, πλάσματος, ορού ή νερού) από το σύστημα, με αποτέλεσμα την έκταση των πολυμερικών νανοσωματιδίων και διαφοροποίηση της κινητικής αποδέσμευσης, ενώ ο συνδυασμός και μοντέλων διάχυσης, προσφέρει σφαιρική προσέγγιση της μελέτης αποδέσμευσης. Στο ρυθμό αποδέσμευσης υπεισέρχονται η διάχυση της εγκλεισμένης ουσίας, αλλά και φαινόμενα χαλάρωσης των πολυμερικών αλυσίδων του συστήματος. Το τελικό πρότυπο συνήθως δεν ακολουθεί το συνηθισμένο μοντέλο κατά Fick, ή λαμβάνοντας διάφορες παραδοχές θα το προσεγγίσει κατά περίπτωση, ενώ έχουν προταθεί αρκετές μαθηματικές εξισώσεις που περιγράφουν τη διαδικασία αποδέσμευσης αυτής της μορφής. Συχνά παραλείπεται η ταχεία αποδέσμευση, θέτοντας στο αρχικό μοντέλο $\alpha=0$ και μεταβάλλοντας την τιμή του n κατάλληλα, $n=0.5$ για σχετικά ομαλή διάχυση κατά Fick και $n=1$ για ανομοιομορφίες στη διάχυση. Στο σύνολο των συστημάτων τύπου μήτρας (reservoir), η δραστική ουσία περιβάλλεται από μία πολυμερική μεμβράνη κι απελευθερώνεται σταδιακά. Τα μοντέλα αυτής της μορφής επιτυγχάνουν συνήθως κινητική μηδενικής τάξης ή σταθερή αποδέσμευση. Το φαινόμενο ταχείας αποδέσμευσης σε αυτά τα συστήματα αποδίδεται σε παρατεταμένη αποθήκευση, κατά την οποία η δραστική ουσία έχει διαχυθεί στην επιφάνεια, με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται άμεσα με τη διάλυση του συστήματος σε ένα ρευστό μέσο. Το εκτιμώμενο ποσό ταχείας αρχικής αποδέσμευσης σε αυτές τις περιπτώσεις υπολογίζεται ως

$$M_t = \frac{DC_0}{l} \left(t + \frac{l^2}{6D} \right),$$

Όπου D είναι ο συντελεστής διάχυσης, C_0 η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας στο εσωτερικό της συσκευής και l το πάχος της μεμβράνης.

Μια αξιοσημείωτη εκτίμηση, που συμπεριλαμβάνει την ταχεία αποδέσμευση και την αποδίδει στην ενζυματική αποικοδόμηση των πολυμερικών συστημάτων στα βιοσυστήματα είναι η πρόταση του μαθηματικού μοντέλου του Tzafiriri:

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \frac{\partial S}{\partial t} = D \nabla^2 C$$

Όπου C και S οι συγκεντρώσεις της δραστικής ουσίας, σε περιοχές αυξημένης και μειωμένης κινητικότητας μορίων, ανάλογα με τον καθορισμό και τη μορφή των ορίων του συστήματος. [32]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ

Υλικά και αντιδραστήρια:

- Διαλύματα PVA 2%, 1.5% και 1% w/o
- χρησιμοποιήθηκε πολυμερές πολυγαλακτικού οξέως PLA μέσου μοριακού βάρους 56000 g/mol και 140000, σε μορφή pellets,
- ακετόνη
- διαλύτης διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO)
- φθαλοκυανίνη με υποκαταστάτες αργιλίου και χλωρίου (AIClPc),

Μεθοδολογία:

Δοκιμή 1:

Παρασκευή κενών νανοσωματιδίων (Blank)

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η γαλακτωματοποίηση – εξάτμιση διαλύτη. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η παρασκευή μιας δοκιμαστικής παρτίδας κενών νανοσωματιδίων με στόχο την διερεύνηση της εφικτότητας της διεργασίας. Για το σκοπό αυτό, έγινε ανάμιξη 15 mg PLA σε 1,5ml διαλύτη ακετόνη σε δοκιμαστικό σωλήνα, με επικάλυψη septum και ανάδευση για πέντε λεπτά σε συσκευή vortex, έως ότου επιτευχθεί η πλήρης διάλυση του πολυμερούς. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έγχυση 1,5ml διαλύματος PLA, με τη βοήθεια σύριγγας, σε 15 ml διαλύματος PVA 1% w/v, στο μέσο της ακτίνας, υπό ήπια μαγνητική ανάδευση, όπου και παρέμεινε για δέκα λεπτά.

Παρασκευή νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη τη δραστική ουσία

Όλοι οι εγκλεισμοί πραγματοποιήθηκαν με ποσοστό φόρτωσης (Drug Loading) ίσο με 20%.

$Drug\ Loading\ (DL) = \frac{\text{μάζα ουσίας προς εγκλεισμό (mg)}}{\text{μάζα πολυμερούς (mg)}}$

Παρασκευάστηκε διάλυμα φθαλοκυανίνης αργιλίου χλωρίου, με την προσθήκη 10mg AIClPc σε 1ml DMSO.

Η οργανική φάση παρασκευάστηκε με ανάμειξη 1,5ml διαλύματος PLA 1% w/v και 0,375ml του διαλύματος φθαλοκυανίνης AIClPc 1% w/v. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έγχυση της οργανικής φάσης στην υδατική, συγκεκριμένα σε 15ml αναδευόμενου PVA 1% w/v (με λόγο w/o 8), με τη βοήθεια σύριγγας στο μέσο

της ακτίνας, όπου αφέθηκε το σύστημα προς μαγνητική ανάδευση δέκα λεπτά σε ήπια ταχύτητα.

Για την εξάτμιση του διαλύτη τα δύο συστήματα, με παρουσία και χωρίς φθαλοκυανίνη, μεταγγίστηκαν σε ποτήρια ζέσεως και με επικάλυψη parafilm τοποθετήθηκαν εικοσιτέσσερις ώρες σε συσκευή shaker.

Δοκιμή 2:

Παρασκευή κενών νανοσωματιδίων (Blank)

Πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη δοκιμή για τον προσδιορισμό της διεργασίας έγινε επανάληψη της διεργασίας, με ανάμιξη 15 mg PLA σε 1,5ml διαλύτη ακετόνη σε δοκιμαστικό σωλήνα, με επικάλυψη septum και ανάδευση για πέντε λεπτά σε συσκευή vortex, έως ότου επιτευχθεί πλήρης διάλυση. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έγχυση 1,5ml διαλύματος PLA, με τη βοήθεια σύριγγας, σε 15 ml διαλύματος PVA 1% w/v, στο μέσο της ακτίνας, υπό μαγνητική ανάδευση, όπου και παρέμεινε για δέκα λεπτά σε ήπιες στροφές.

Παρασκευή νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη τη δραστική ουσία

Παρασκευάστηκε διάλυμα φθαλοκυανίνης αργιλίου χλωρίου, με την προσθήκη 10mg AlClPc σε 1ml DMSO.

Για παρασκευή νανοσωματιδίων με 20% drug loading παρασκευάστηκε η οργανική φάση με 1,5ml διαλύματος PLA 1% w/v και 0,375ml διαλύματος φθαλοκυανίνης AlClPc 1% w/v. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έγχυση της οργανικής φάσης στην υδατική, συγκεκριμένα σε 15ml αναδευόμενου PVA 1% w/v (με λόγο w/o 8), με τη βοήθεια σύριγγας στο μέσο της ακτίνας, όπου αφέθηκε το σύστημα προς μαγνητική ανάδευση δέκα λεπτά σε ήπια ταχύτητα.

Τα δύο συστήματα για δημιουργία κενών και εγκλεισμένης ουσίας νανοσωματιδίων, (δοκιμή 2) οδηγήθηκαν αυτή τη φορά σε συσκευή rotary με στόχο την ομαλή εξάτμιση του διαλύτη. Στη συσκευή κάθε σύστημα παρέμεινε μισή ώρα υπό κενό, σε ήπια περιστροφή στους 45°C.

Παραλαβή νανοσωματιδίων

Για την παραλαβή των κενών και των νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη ουσία, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ζυγό αριθμό erendorfs, στα οποία έγινε πλήρωση με απιονισμένο νερό, και οδηγήθηκαν προς φυγοκέντρωση σε 20°C, σε 17000 rpm (9G) για είκοσι λεπτά. Από την πρώτη φυγοκέντρωση τα νανοσωματίδια που σχηματίστηκαν απομακρύνθηκαν, καθώς με χρήση πιπέτας ακριβείας, έγινε λήψη των υπερκείμενων διαλυμάτων τα οποία οδηγήθηκαν σε δεύτερη φυγοκέντρωση σε ζυγό αριθμό erendorfs, στα οποία έγινε πλήρωση με απιονισμένο νερό, σε 20°C, σε 17000 rpm (9G) για είκοσι λεπτά. Από τη δεύτερη φυγοκέντρωση παρελήφθησαν τα

υπερκείμενα διαλύματα και φυλάχθηκαν σε ψυγείο (S_1), ενώ τα νανοσωματίδια που καθίζησαν, με διαδοχικές επαναδιασπορές με τη βοήθεια πιπέτας και απιονισμένου νερού, οδηγήθηκαν εκ νέου σε φυγοκέντρηση σε ζυγό αριθμό erendorfs, στα οποία έγινε πλήρωση με απιονισμένο νερό, και οδηγήθηκαν προς φυγοκέντρηση σε 10°C , σε 17000 rpm (9G) για είκοσι λεπτά. Από την τελευταία φυγοκέντρηση απομακρύνθηκαν και φυλάχθηκαν σε ψύξη τα υπερκείμενα διαλύματα (S_2), ενώ με χρήση πιπέτας και διαδοχικές επαναδιασπορές με 3ml απιονισμένο νερό, έγινε παραλαβή των τελικών νανοσωματιδίων, τα οποία φυλάχθηκαν σε ψυγείο.

Τα τελικά νανοσωματίδια στα διαλύματα των 3ml, τοποθετήθηκαν σε κρυσταλλωτήρια, με επικάλυψη αλουμινόχαρτου με τρύπες για διέλευση αέρα και οδηγήθηκαν τελικά προς ξήρναση με freeze drying, για δώδεκα ώρες. Τα ξηρά νανοσωματίδια φυλάχθηκαν σε vials σε ψυγείο.

3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Μεθοδολογία:

Πραγματοποιήθηκε κλασματικός παραγοντικός πειραματικός σχεδιασμός δύο επιπέδων, με δύο κεντρικά σημεία, με τρεις συνεχείς και μία ονομαστική μεταβλητή, με στόχο την ανεύρεση αλληλεπιδράσεων και βέλτιστης αναλογίας συστατικών κατά την παραγωγική διαδικασία, με οικονομία πειραμάτων. Τα όρια των μεταβλητών φαίνονται στην ακόλουθη εικόνα.

Για τον πειραματικό σχεδιασμό επιλέχθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα «Design-Expert 6», όπου έγινε ο σχεδιασμός με ορισμό των μεταβλητών και των αποκρίσεων. Στο ίδιο υπολογιστικό πρόγραμμα, καταχωρήθηκαν οι τιμές των αποκρίσεων με το πέρας της διεξαγωγής των πειραμάτων, όπου και πραγματοποιήθηκε ανάλυση των αποτελεσμάτων, κατά τις υποδείξεις του ίδιου του προγράμματος.

		Number of Factors													
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Experiments	4	Full	1/2 Fract.												
	8		Full	1/2 Fract.	1/4 Fract.	1/8 Fract.	1/16 Fract.								
	16			Full	1/2 Fract.	1/4 Fract.	1/8 Fract.	1/16 Fract.	1/32 Fract.	1/64 Fract.	1/128 Fract.	1/256 Fract.	1/512 Fract.	1/1024 Fract.	1/2048 Fract.
	32				Full	1/2 Fract.	1/4 Fract.	1/8 Fract.	1/16 Fract.	1/32 Fract.	1/64 Fract.	1/128 Fract.	1/256 Fract.	1/512 Fract.	1/1024 Fract.
	64					Full	1/2 Fract.	1/4 Fract.	1/8 Fract.	1/16 Fract.	1/32 Fract.	1/64 Fract.	1/128 Fract.	1/256 Fract.	1/512 Fract.
	128						Full	1/2 Fract.	1/4 Fract.	1/8 Fract.	1/16 Fract.	1/32 Fract.	1/64 Fract.	1/128 Fract.	1/256 Fract.
	256							Full	1/2 Fract.	1/4 Fract.	1/8 Fract.	1/16 Fract.	1/32 Fract.	1/64 Fract.	1/128 Fract.

Replicates: Blocks: Center points per block:

Εικόνα 20 επιλογή είδους πειραματικού σχεδιασμού.

Factors					
	Name	Units	Type	Low	High
A:	Cpva	% w/v	Numeric	1	2
B:	Cpla	% w/v	Numeric	1	2
C:	R w/o		Numeric	2	8
D:	Mr		Categorical	56000	140000

Εικόνα 21 ορισμός μεταβλητών DoE

Responses:

	Name	Units
	size	nm
	z-potential	mV
	pdi	
	EE	%

Εικόνα 22 ορισμός αποκρίσεων DoE

Design Summary							
Study Type	Factorial		Experiments	10			
Initial Design	2 Level Factorial		Blocks	No Blocks			
Center Points	2						
Design Model	Reduced 2FI						
Response	Name	Units	Obs	Minimum	Maximum	Trans	Model
Y1	size	nm	10	224.70	318.63	None	RMain effects
Y2	z-potential	mV	10	-24.57	-4.10	None	R2FI
Y3	pdi		10	0.089	0.27	Inverse sqrt	RMain effects
Y4	EE	%	10	93.15	99.23	None	Mean
Factor	Name	Units	Type	Low Actual	High Actual	Low Coded	High Coded
A	Cpva	%w/v	Numeric	1.00	2.00	-1.000	1.000
B	Cpla	%w/v	Numeric	1.00	2.00	-1.000	1.000
C	R w/o		Numeric	2.00	8.00	-1.000	1.000
D	Mr		Categorical	56000	14000		

Εικόνα 23 σύνοψη πειραματικού σχεδιασμού

Όπως φαίνεται ως συνεχείς μεταβλητές επιλέχθηκαν η συγκέντρωση της επιφανειοδραστικής ουσίας (PVA) και του διαλύματος πολυμερούς (PLA) σε ποσοστό επί τις εκατό w/v, ο λόγος υδατικής προς οργανική φάση, με ακραίες τιμές 1-2, 1-2 και 2-8 αντίστοιχα . Ενώ ως ονομαστική μεταβλητή ορίστηκε το μέσο μοριακό βάρος του πολυμερούς με τιμές 56000 και 140000.

3.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ PVA

Υλικά:

- Πολυβινυλική αλκοόλη (PVA), υδρολυμένη κατά 87-89%.,
- καθαρό και υπερκάθαρο νερό

Μεθοδολογία:

για το PVA 2% w/o έγινε προσθήκη 2gr PVA σε 100ml απιονισμένου νερού υπό ανάδευση (250rpm) στους 45°C για δώδεκα ώρες. Ομοίως, για το PVA 1,5% w/o έγινε προσθήκη 0,75gr PVA σε 50ml απιονισμένου νερού υπό ανάδευση (250rpm) στους 45°C για δώδεκα ώρες και για το PVA 1% w/o έγινε προσθήκη 3gr PVA σε 300ml απιονισμένου νερού υπό ανάδευση (250rpm) στους 45°C για δώδεκα ώρες.

3.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟ

Με βάση τα αποτελέσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων κατασκευάστηκε το ακόλουθο πρωτόκολλο.

- Διάλυμα φθαλοκυανίνης 1% w/v με προσθήκη 10mg AICIPc σε 1ml DMSO.
- Παρασκευή διαλύματος PLA με συγκέντρωση σύμφωνα με της υποδείξεις του σχεδιασμού και κατάλληλο μέσο μοριακό βάρος, σε διαλύτη ακετόνης.
- Ανάμειξη των δύο διαλυμάτων και ταχεία έγχυση με τη βοήθεια σύριγγας, στο μέσο της ακτίνας αναδευόμενου διαλύματος PVA, σε συγκέντρωση και ποσότητα σύμφωνη με τις υποδείξεις του πειραματικού σχεδιασμού.
- Ήπια ανάδευση του συστήματος δέκα λεπτά.
- Εξάτμιση του διαλύτη σε συσκευή rotary σε θερμοκρασία 45°C υπό κενό για μισή ώρα.
- Τοποθέτηση των διαλυμάτων σε ζυγό αριθμό erendorfs και πλήρωση με απιονισμένο νερό, φυγοκέντριση σε 20°C, σε 17000 rpm (9G) για είκοσι λεπτά.
- Απομάκρυνση των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων μεγαλύτερου μεγέθους και παραλαβή των υπερκείμενων διαλυμάτων σε νέα παρτίδα (ζυγού αριθμού erendorfs και πλήρωση με απιονισμένο νερό) και φυγοκέντρωση σε 20°C, σε 17000 rpm (9G) για είκοσι λεπτά.
- Παραλαβή και φύλαξη σε ψύξη, υπερκείμενων διαλυμάτων S₁, επαναδιασπορά και παραλαβή νανοσωματιδίων σε νέα erendorfs, πλήρωση με απιονισμένο νερό και φυγοκέντρωση σε 10°C, σε 17000 rpm (9G) για είκοσι λεπτά.
- Παραλαβή και φύλαξη σε ψύξη, υπερκείμενων διαλυμάτων S₂, επαναδιασπορά και παραλαβή νανοσωματιδίων, φύλαξη σε vials σε ψύξη.

Ο πειραματικός σχεδιασμός (DoE) υπέδειξε δέκα δοκιμές, η σειρά και οι ποσότητες έκαστης παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα, υπολογίζοντας σταθερό drug loading στο 20%.

Πίνακας 5 εφαρμογή πειραματικού σχεδιασμού

Std	Run	FACTOR 1: Cpva %w/v	FACTOR 2: Cpla %w/v	FACTOR 3: Rw/o	FACTOR 4: Mr	Μάζα PLA (mg)	Acetone (ml)	Διάλυμα AICIPc 1% w/v (ml)
5	1	1	1	8	140000	13,2	1,32	0,264
1	2	1	1	2	56000	9,3	0,93	0,186
10	3	1,5	1,5	5	140000	10,2	0,68	0,204
22	4	2	1	2	140000	14,1	0,705	0,282
7	5	1	2	8	56000	11	0,55	0,22
3	6	1	2	2	140000	22,4	1,12	0,448
9	7	1,5	1,5	5	56000	9,9	0,66	0,198
4	8	2	2	2	56000	15	0,75	0,3
6	9	2	1	8	56000	13,9	1,39	0,278
8	10	2	2	8	140000	14,1	1,41	0,282

3.5 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ

Υλικά και αντιδραστήρια:

- Διάλυμα PVA 1% w/o
- χρησιμοποιήθηκε πολυμερές πολυγαλακτικού οξέως PLA μέσου μοριακού βάρους 56000 g/mol, σε μορφή pellets,
- ακετόνη
- διαλύτης διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- φθαλοκυανίνη με υποκαταστάτες αργιλίου και χλωρίου (AICIPc),

Μεθοδολογία:

Δοκιμή 3:

Κατά τη δοκιμή αυτή αξιοποιήθηκε το αποτέλεσμα του πειραματικού σχεδιασμού που αφορά στη μείωση της ποσότητας του τασιενεργού διαλύματος PVA καθώς ο πειραματικός σχεδιασμός δεν επέδειξε σημαντική επίδραση της ποσότητας PVA. Επίσης, μελετήθηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι ξήρανσης των νανοσωματιδίων (λ και ξήρανση σε αντλία υψηλού κενού).

Δοκιμή 3^α:

Παρασκευή νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη τη δραστική ουσία

Με ανάμιξη 77,5 mg PLA σε 7,75ml διαλύτη ακετόνη σε δοκιμαστικό σωλήνα, με επικάλυψη septum και ανάδευση για πέντε λεπτά σε συσκευή vortex, έως ότου

επιτευχθεί πλήρης διάλυση. Παράλληλα παρασκευάστηκε διάλυμα φθαλοκυανίνης-αργιλίου-χλωρίου με προσθήκη 15.5 mg AICIPc σε 1,55ml διαλύτη DMSO. Για παρασκευή νανοσωματιδίων με 20% drug loading παρασκευάστηκε η οργανική φάση με 7.75ml διαλύματος PLA 1% w/v και 1.55ml διαλύματος φθαλοκυανίνης AICIPc 1% w/v. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έγχυση της οργανικής φάσης στην υδατική, συγκεκριμένα σε 46,5 ml αναδευόμενου PVA 1% w/v (με λόγο w/o 5:1), με τη βοήθεια σύριγγας στο μέσο της ακτίνας, όπου αφέθηκε το σύστημα προς μαγνητική ανάδευση δέκα λεπτά σε ήπια ταχύτητα.

Το σύστημα οδηγήθηκε σε συσκευή rotary με στόχο την ομαλή εξάτμιση του διαλύτη και τον σχηματισμό νανοσωματιδίων. Στη συσκευή κάθε σύστημα παρέμεινε μισή ώρα υπό κενό, σε ήπια ανάδευση στους 45°C.

Παραλαβή νανοσωματιδίων

Για την παραλαβή των κενών και των νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη ουσία, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ζυγό αριθμό δοκιμαστικών σωλήνων κατάλληλων για φυγοκέντρηση (tubes), στα οποία έγινε πλήρωση με απιονισμένο νερό, και οδηγήθηκαν προς φυγοκέντρηση σε -10°C, σε 12000 rpm (9G) για είκοσι λεπτά, αφού προζυγίστηκαν σε ίσες ποσότητες των 39,94 g. Από την πρώτη φυγοκέντρηση απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, έγινε εκ νέου πλήρωση των “tubes” με απιονισμένο νερό και ζύγιση στα 39,35g έκαστο, τα οποία οδηγήθηκαν σε δεύτερη φυγοκέντρηση σε -20°C, σε 12000 rpm (9G) για είκοσι λεπτά. Από τη δεύτερη φυγοκέντρηση παρελήφθησαν τα υπερκείμενα διαλύματα, ενώ τα νανοσωματίδια που καθίζησαν, οδηγήθηκαν κατά τον ίδιο τρόπο, με πλήρωση απιονισμένου νερού και ζύγιση στα 34,36g έκαστο, προς τρίτη φυγοκέντρηση σε -10°C, σε 12000 rpm (9G) για είκοσι λεπτά. Από την τελευταία φυγοκέντρηση απομακρύνθηκαν και φυλάχθηκαν σε ψύξη τα υπερκείμενα διαλύματα (S₂), ενώ με χρήση πιπέτας και διαδοχικές επαναδιασπορές με 3ml απιονισμένο νερό, έγινε παραλαβή των τελικών νανοσωματιδίων, τα οποία φυλάχθηκαν σε ψυγείο.

Τα τελικά νανοσωματίδια στα διαλύματα των 3ml, τοποθετήθηκαν σε κρυσταλλωτήρια, με επικάλυψη αλουμινόχαρτου με τρύπες για διέλευση αέρα και οδηγήθηκαν τελικά προς ξήρανση με λυοφιλοποίηση (freeze drying), για δώδεκα ώρες. Τα ξηρά νανοσωματίδια ζυγίστηκαν και φυλάχθηκαν σε vials σε ψυγείο.

Δοκιμή 3^β:

Παρασκευή νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη τη δραστική ουσία

Με ανάμιξη 78 mg PLA σε 7,8ml διαλύτη ακετόνη σε δοκιμαστικό σωλήνα, με επικάλυψη septum και ανάδευση για πέντε λεπτά σε συσκευή vortex, έως ότου επιτευχθεί πλήρης διάλυση. Παράλληλα παρασκευάστηκε διάλυμα φθαλοκυανίνης-αργιλίου-χλωρίου με προσθήκη 17 mg AICIPc σε 1,7 ml διαλύτη DMSO. Για παρασκευή νανοσωματιδίων με 20% drug loading παρασκευάστηκε η οργανική φάση με 7.8 ml διαλύματος PLA 1% w/v και 1.56 ml διαλύματος φθαλοκυανίνης AICIPc

1% w/v. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έγχυση της οργανικής φάσης στην υδατική, συγκεκριμένα σε 46,8 ml αναδευόμενου PVA 1% w/v (με λόγο w/o 5:1), με τη βοήθεια σύριγγας στο μέσο της ακτίνας, όπου αφέθηκε το σύστημα προς μαγνητική ανάδευση δέκα λεπτά σε ήπια ταχύτητα.

Το σύστημα οδηγήθηκε σε συσκευή rotary με στόχο την ομαλή εξάτμιση του διαλύτη και τον σχηματισμό νανοσωματιδίων. Στη συσκευή κάθε σύστημα παρέμεινε μισή ώρα υπό κενό, σε ήπια ανάδευση στους 45°C.

Παραλαβή νανοσωματιδίων

Για την παραλαβή των κενών και των νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη ουσία, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ζυγό αριθμό tubes, στα οποία έγινε πλήρωση με απιονισμένο νερό, και οδηγήθηκαν προς φυγοκέντρωση σε -10°C, σε 12000 rpm (9G) για είκοσι λεπτά, αφού προζυγίστηκαν σε ίσες ποσότητες των 39,4 g. Από την πρώτη φυγοκέντρωση απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, έγινε εκ νέου πλήρωση των “tubes” με απιονισμένο νερό και ζύγιση στα 24,26 g έκαστο, τα οποία οδηγήθηκαν σε δεύτερη φυγοκέντρωση σε -20°C, σε 12000 rpm (9G) για είκοσι λεπτά. Από τη δεύτερη φυγοκέντρωση παρελήφθησαν τα υπερκείμενα διαλύματα, ενώ τα νανοσωματίδια που καθίζησαν, οδηγήθηκαν κατά τον ίδιο τρόπο, με πλήρωση απιονισμένου νερού και ζύγιση στα 19,91 g έκαστο, προς τρίτη φυγοκέντρωση σε -10°C, σε 12000 rpm (9G) για είκοσι λεπτά. Από την τελευταία φυγοκέντρωση απομακρύνθηκαν και φυλάχθηκαν σε ψύξη τα υπερκείμενα διαλύματα (S₂), ενώ με χρήση πιπέτας και διαδοχικές επαναδιασπορές με 3ml απιονισμένο νερό, έγινε παραλαβή των τελικών νανοσωματιδίων, τα οποία φυλάχθηκαν σε ψυγείο.

Τα τελικά νανοσωματίδια στα διαλύματα των 3ml, τοποθετήθηκαν σε vial κι οδηγήθηκαν σε ξήρανση σε αντλία υψηλού κενού “Edwards” για δώδεκα ώρες. Τα ξηρά νανοσωματίδια ζυγίστηκαν και φυλάχθηκαν σε vials σε ψυγείο.

3.6 ΞΗΡΑΝΣΗ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

Για την ξήρανση των διασπορών νανοσωματιδίων, δηλαδή την τελική παραλαβή τους σε ξηρή μορφή, με σκοπό την παρατεταμένη διάρκεια αποθήκευσής τους, εξετάστηκαν δύο μεθοδολογίες. Η πρώτη αφορά την ξήρανση με λυοφιλοποίηση (freeze drying) και η δεύτερη ξήρανση σε αντλία υψηλού κενού (συσκευή Edwards). Για τη σύγκριση των δύο μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν τα νανοσωματίδια που προέκυψαν από την τρίτη δοκιμή. Συγκεκριμένα, για την ξήρανση με λυοφιλοποίηση τα νανοσωματίδια που παραλήφθηκαν από την δοκιμή 3^α τοποθετήθηκαν σε κρυσταλλωτήρια, με επικάλυψη αλουμινόχαρτου με τρύπες για διέλευση αέρα και οδηγήθηκαν τελικά προς ξήρανση με freeze drying, για δώδεκα ώρες, αφού προηγήθηκε ψύξη στους -20°C για μισή ώρα. Ομοίως τα νανοσωματίδια που προέκυψαν από τη δοκιμή 3^β τοποθετήθηκαν σε vial και συνδέθηκαν σε συσκευή

ξήρανσης υπό κενό για δώδεκα ώρες. Τα ξηρά νανοσωματίδια παραλήφθηκαν σε κάθε περίπτωση και φυλάχθηκαν σε vials σε θερμοκρασία 3-5°C.

Ξήρανση δοκιμής 3^α:

Υλικά και αντιδραστήρια:

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- νανοσωματίδια από φυγοκέντρηση χωρίς υπερκείμενο υγρό,

όργανα και σκεύη:

κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν:

- όργανα: ψυγείο, ζυγός ακριβείας, συσκευή λυοφιλοποίησης,
- σκεύη: κρυσταλωτήριο, αλουμινόχαρτο

Μεθοδολογία:

τα νανοσωματίδια τοποθετήθηκαν σε κρυσταλωτήριο για μεγαλύτερη επιφάνεια και ταχύτερη κι ομοιόμορφη απομάκρυνση υγρασίας. Το σκεύος καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο στο οποίο ανοίχτηκαν τρύπες και τοποθετήθηκε για είκοσι λεπτά στους -20°C στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε συσκευή freeze drying για ένα εικοσιτετράωρο, σε ψύξη στους -40°C υπό κενό. Κατόπιν έγινε παραλαβή και ζύγιση των σωματιδίων από την οποία προέκυψαν 17,4 mg ξηρών νανοσωματιδίων τα οποία συλλέχθηκαν και φυλάχθηκαν σε vial σε σκιά στους -5°C.

Ξήρανση δοκιμής 3^β:

Υλικά και αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- νανοσωματίδια από φυγοκέντρηση χωρίς υπερκείμενο υγρό,
- πεντοξειδίο του φωσφόρου (phosphorus pentoxide, P₂O₃)

όργανα και σκεύη:

κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν:

- όργανα: αντλία υψηλού κενού Edwards, ζυγός ακριβείας
- σκεύη: πιστόλι συσκευής Edwards, αλουμινόχαρτο, βαμβάκι, vial

Μεθοδολογία

Σε έναν απαγωγό τοποθετείται 1-2 κουταλιές P₂O₃ στο πιστόλι της συσκευής, χωρίς να έρθει σε επαφή με νερό. Πάνω από το P₂O₃ τοποθετείται βαμβάκι. Το vial με τα νανοσωματίδια σφραγίζεται και προσαρτάται στη συσκευή με αλουμινόχαρτο στο οποίο γίνονται μικρές τρύπες. Τοποθετείται στη συσκευή μέχρι σταθερού βάρους.

Τα νανοσωματίδια που συλλέχθηκαν ζύγιζαν 8,5mg και φυλάχτηκαν σε vial σε σκιά στους -5°C.

3.7 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

3.7.1 Μέτρηση μεγέθους, ζ-δυναμικού και δείκτη πολυδιασποράς διασποράς νανοσωματιδίων

Υλικά και όργανα:

- Υπερκάθαρο νερό
- Διάλυμα νανοσωματιδίων,
- Πιπέτα ακριβείας 10μl-100μl και 100μl-1000μl,
- Κυψελίδες DTS1070,
- Συσκευή DLS (Zetasizer, Malvern instruments, UK)

Μεθοδολογία

Οι διασπορές των νανοσωματιδίων χαρακτηρίζονται ως προς το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και z-δυναμικό μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός . Συγκεκριμένα η διαδικασία μέτρησης περιελάμβανε τα ακόλουθα στάδια:

- Από το κάθε δείγμα παρασκευάζεται διάλυμα νανοσωματιδίων σε δις-απιονισμένο νερό, σε erpendorf, με προσθήκη 40μL από τα διαλύματα νανοσωματιδίων (πριν υποστούν ξήρανση), σε 2,96 ml δις-απιονισμένο νερό
- έκαστο διάλυμα υποβάλλεται σε μηχανική ανάδευση, δύο λεπτά σε συσκευή vortex
- στη συνέχεια τοποθετείται σε κυψελίδα *disposable capillary cell* (DTS1070) και οδηγείται διεξαγωγή της μέτρησης,
- Τοποθετείται στο όργανο κυβέττα με διαλύτη υπερκάθαρο νερό, για μηδενισμό του οργάνου και εξάλειψη θορύβου.
- Γίνεται σάρωση των δειγμάτων των διασπορών και καταγραφή των μετρήσεων, για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται τρεις μετρήσεις και λαμβάνεται ο μέσος όρος.

Οι αραιώσεις προέκυψαν με στόχο στο όργανο να διεξάγονται μετρήσεις σε διαλύματα με κατά προσέγγιση περιεκτικότητα πολυμερούς 0,05mg/ml, ώστε να υπάρχει ικανοποιητική ευκρίνεια και διασπορά, εντός των προδιαγραφών του οργάνου.

3.7.2 Φάσμα απορρόφησης φωτοευαισθητοποιητή

Η απόδοση του εγκλεισμού (encapsulation efficiency, EE%) προσδιορίστηκε έμμεσα, μέσω φασματομετρίας UV-Vis (Ηέλιος α-UNICAM, India). Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των μη εγκλεισμένων ενώσεων στα διαλύματα S1 και S2, δηλαδή στα υπερκείμενα των φυγοκεντρήσεων και το ποσοστό εγκλεισμού υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση 1:

$$\%EE = \frac{m_{\text{αρχικά}} (mg) - m_{\text{υπερκείμενα}} (mg)}{m_{\text{αρχικά}} (mg)} * 100 \quad (1)$$

Προκειμένου να προσδιορισθεί η απόδοση της διαδικασίας εγκλεισμού, λήφθηκαν αρχικά φάσματα απορρόφησης της φθαλοκυανίνης αργιλίου-χλωρίου και καταστρώθηκε καμπύλη αναφοράς, βάση της οποίας προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των υπερκείμενων διαλυμάτων των φυγοκεντρήσεων. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς- βαθμονόμησης η διαδικασία περιελάμβανε τα ακόλουθα στάδια:

- Μηδενισμός σήματος πριν από τη μέτρηση με κυβέττα μόνο με διαλύτη (DMSO) για απαλειφή θορύβου,
- Σάρωση δείγματος διαλύματος γνωστής συγκέντρωσης, στην περιοχή 300-800nm με ταχύτητα 480nm/min, για να προκύψει το μήκος κύματος όπου εμφανίζεται η μέγιστη απορρόφηση

Προσδιορισμός απόδοσης εγκλεισμού:

- Παρασκευή διαλυμάτων φθαλοκυανίνης αργιλίου-χλωρίου σε διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) με διαδοχικές αραιώσεις από αρχικό διάλυμα στην περιοχή 10^{-7} - 10^{-9} M,
- Μηδενισμός σήματος πριν από τη μέτρηση με κυβέττα μόνο με διαλύτη (DMSO) για απαλειφή θορύβου
- καταγραφή απορρόφησης, στο πρωτίστως καθορισμένο μήκος κύματος της φθαλοκυανίνης αργιλίου-χλωρίου, διαδοχικά των αραιώσεων του διαλύματος φθαλοκυανίνης.
- Κατασκευή καμπύλης απορρόφησης-συγκέντρωσης των αραιωμένων διαλυμάτων, θεωρώντας γραμμική περιοχή εφαρμογής του νόμου Lambert-Beer.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν διαδοχικά αραιώσεις των υπερκείμενων διαλυμάτων άγνωστης συγκέντρωσης προς έμμεσο προσδιορισμό της συγκέντρωσης τους, συγκεκριμένα:

- Μηδενισμός σήματος πριν από τη μέτρηση με κυβέττα μόνο με διαλύτη απιονισμένο νερό, για απαλειφή θορύβου
- Παρασκευή αραιωμένου διαλύματος υπερκείμενου δείγματος προς μέτρηση, με 2,5ml υπερκείμενο διάλυμα και 2,475ml απιονισμένο νερό,
- Μηχανική ανάδευση ένα λεπτό σε συσκευή vortex για ομογενοποίηση,
- Μετάγγιση αραιωμένου δείγματος σε κυβέττα,
- Σάρωση στο αποθηκευμένο μήκος κύματος της φθαλοκυανίνης αργιλίου-χλωρίου και καταγραφή έκαστης απορρόφησης.
- Υπολογισμός της συγκέντρωσης του αραιωμένου δείγματος με τη βοήθεια της σχεδιασμένης καμπύλης αναφοράς και του υπολογιστικού προγράμματος excel,
- Αναγωγή της συγκέντρωσης του αραιωμένου δείγματος σε συγκέντρωση αρχικού υπερκείμενου δείγματος, με εφαρμογή του νόμου αραιώσης.

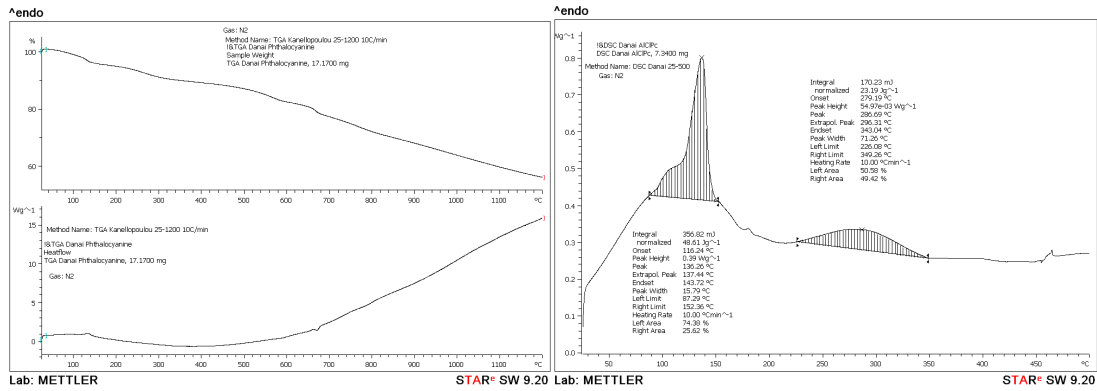
Η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλα τα υπερκείμενα διαλύματα S_1 και S_2 από κάθε δοκιμή.

3.7.3 Προσδιορισμός θερμικών χαρακτηριστικών

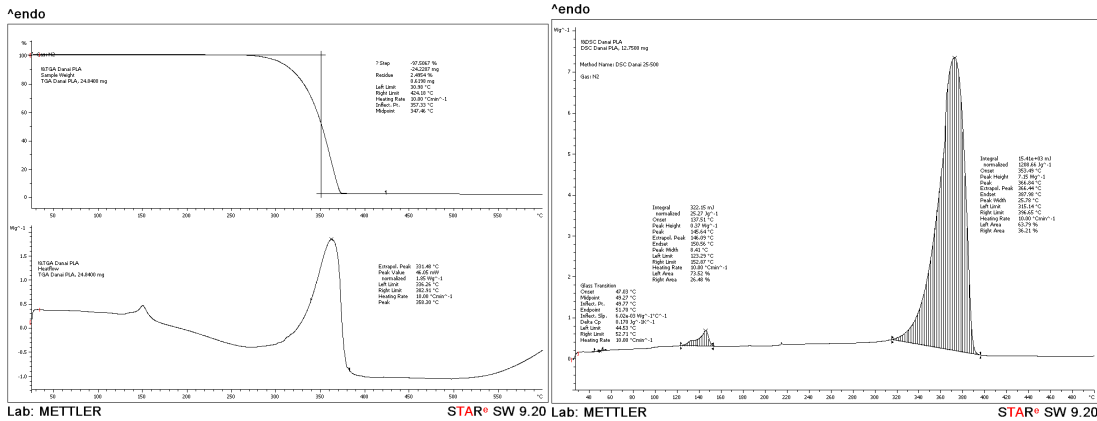
Τα θερμικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, προσδιορίστηκαν μέσω διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC : differential scanning calorimetry). Τα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν ως προς τις θερμικές ιδιότητές τους, οι οποίες αποτελούν κρίσιμες παραμέτρους στον μηχανισμό και στην κινητική αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας. Η μεθοδολογία συμπεριλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Άνοιγμα και βαθμονόμηση οργάνου,
- Ζύγιση ορισμένης ποσότητας μετρούμενου δείγματος, μικρότερης των 20mg,
- Καταχώρηση προδιαγραφών δείγματος και μεθόδου στη συσκευή,
- Επιλογή κατάλληλου μοντέλου σάρωσης με θερμοκρασιακό εύρος 20°C-800°C, βήμα 10°C /min και παροχή αερίου αζώτου (N_2),
- Διεξαγωγή μέτρησης,
- Προσαρμογή ολοκλήρωσης κι επεξεργασία αποτελεσμάτων,
- Καταγραφή θερμικών χαρακτηριστικών.

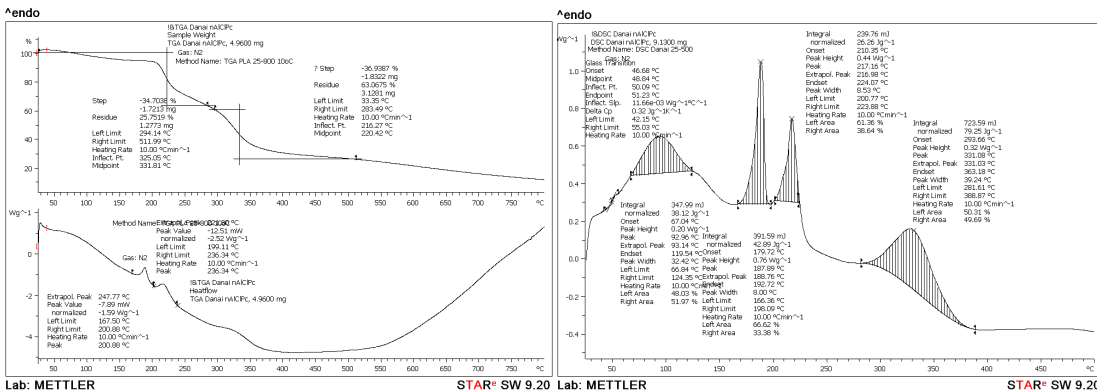
Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε για δείγματα ξηρών ουσιών φθαλοκυανίνης αργιλίου-χλωρίου, πολυ-γαλακτικού οξέος, αλλά και νανοσωματίδια πολυ-γαλακτικού οξέος με εγκλεισμένες ποσότητες (20% w/w drug loading) φθαλοκυανίνης αργιλίου-χλωρίου.



Εικόνα 24 διάγραμμα TGA και DSC για AICIPc



Εικόνα 25 διάγραμμα TGA και DSC για PLA



Εικόνα 26 διάγραμμα TGA και DSC για δείγμα ξηρών νανοσωματιδίων PLA-AICIPc.

3.8 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ Παρασκευή διαλύματος PBS (phosphate Saline Buffer):

Υλικά:

- απιοντισμένο νερό,
- διάλυμα υδροχλωρίου 1M

- NaCl
- KCl
- Na₂HPO₄
- KH₂PO₄

Μεθοδολογία: 40 ml δις απιονισμένου νερού τίθενται υπό μαγνητική ανάδευση, σε ήπια ταχύτητα για να μην εισάγεται οξυγόνο στο διάλυμα,

- Προστίθενται 0,4g NaCl, 0,01g KCl, 0,072g Na₂HPO₄ και 0,0125g KH₂PO₄. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση μέχρι πλήρους διαλυτοποίησης των αλάτων. Γίνεται μέτρηση του pH του διαλύματος και με προσθήκη στάγδην HCl 1M, επιτυγχάνεται σταθεροποίηση του pH στο 7,4.
- Το διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Έλεγχος αποδέσμευσης:

Υλικά: διάλυμα PBS, ξηρά νανοσωματίδια.

Όργανα και σκεύη:

Φασματοφωτόμετρο UV-Vis, ζυγός ακριβείας, πιπέτες ακριβείας των 100-1000μL, μαγνητικός αναδευτήρας, φυγόκεντρος, vials των 4mL, κυψελίδα χαλαζία 1mL και μαγνητάκι.

Μεθοδολογία:

- Σε ένα vial τοποθετείται 1,5mL PBS και 25mg νανοσωματιδίων και η προκύπτουσα διασπορά τίθεται υπό ανάδευση,
- Στις χρονικές στιγμές 0, 24, 48h, πραγματοποιείται δειγματοληψία 0,5mL και συμπληρώνεται το σύστημα με 0,5 mL PBS.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται και το υπερκείμενο φυλάσσεται.
- Τα υπερκείμενα συμπληρώνονται με 0,3mL PBS και γίνεται φωτομέτρηση στα 679nm, όπου σημειώνεται η απορρόφηση, αφού προηγηθεί μηδενισμός με PBS, αν κριθεί απαραίτητο πραγματοποιείται περαιτέρω αραίωση των δειγμάτων (ώστε η απορρόφηση να κυμαίνεται στα 0,1-0,9 Abs σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή).

3.9 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

Η διαλυτότητα της εγκλεισμένης φθαλοκυανίνης σε υδατικό μέσο παρατηρήθηκε ποιοτικά σε οπτικό μικροσκόπιο (Axio Lab.A1 ZEISS).

Η αξιολόγηση έγινε με βάση την ποσότητα της δραστικής ουσίας AICIPc. Συγκεκριμένα λήφθηκαν ποσότητες 0,3 mg AICIPc και 1,6 mg νανοσωματιδίων (20% drug loading AICIPc) ξηρού υλικού.

Υλικά και όργανα:

- Δείγματα ξηρής φθαλοκυανίνης (AICIPc) και νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη ποσότητα φθαλοκυανίνης (PLA- AICIPc nps),
- Απιονισμένο νερό,
- Ηλεκτρονική πιπέτα 10μl-100μl,
- Γυαλί μικροσκοπίου και
- μικροσκόπιο (Axio Lab.A1 ZEISS).

Μεθοδολογία:

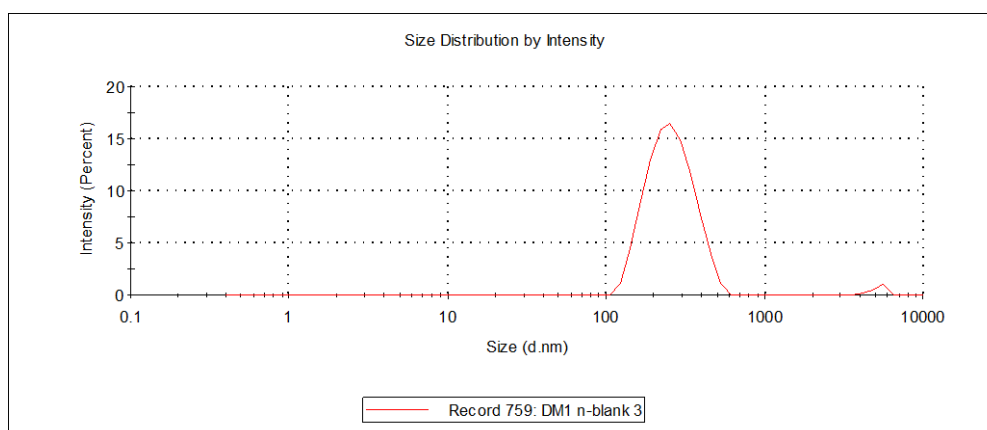
- Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κατάλληλο γυαλί προς παρακολούθηση στο μικροσκόπιο.
- Πραγματοποιήθηκε σε έκαστο δείγμα προσθήκη στάγδην απιονισμένου νερού σε ίδιες ποσότητες, ενώ ταυτόχρονα γινόταν παρακολούθηση μέσω μικροσκοπίου της εικόνας των διαλυμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

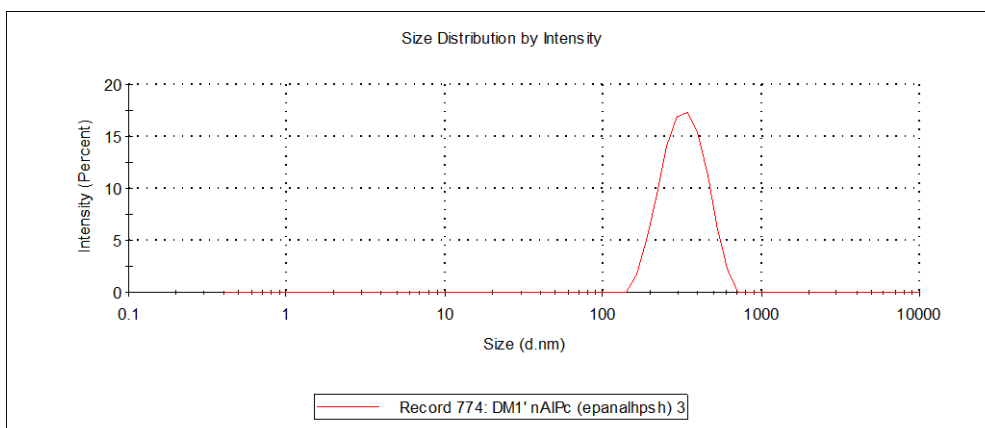
4.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

4.1.1 Μέτρηση μεγέθους, ζ-δυναμικού και δείκτη πολυδιασποράς

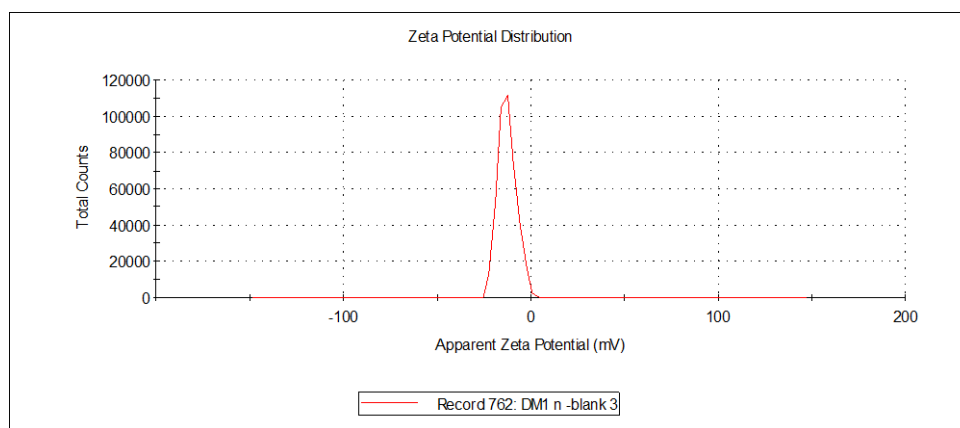
Οι διασπορές των νανοσωματιδίων χαρακτηρίζονται ως προς το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς και z-δυναμικό μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS Zetasizer, Malvern instruments, UK). Τα αποτελέσματα του DLS των σχηματιζόμενων νανοσωματιδίων αποτυπώνονται στον Πίνακα 1. Όσο αφορά στο μέγεθος των σωματιδίων, αυτό βρέθηκε χαμηλότερο από 300 nm στην πλειοψηφία των δοκιμών, με ικανοποιητικό δείκτη πολυδιασποράς ($PDI < 0.4$) και, σε ορισμένες περιπτώσεις, ικανοποιητικές τιμές ζ-δυναμικού που υποδηλώνουν σταθερότητα στις αντίστοιχες διασπορές. Τα μεγέθη αυτά κρίνονται κατάλληλα τόσο για γενικευμένες εφαρμογές των φθαλοκυανινών, καθώς και για πιο εξειδικευμένες, όπου απαιτείται πρόσληψη από κυτταρικούς ιστούς. Συγκεκριμένα το μέγεθος των νανοσωματιδίων μικρότερο των 300nm είναι ικανοποιητικό ακόμα και για εξειδικευμένες ιατρικές εφαρμογές, για διείσδυση σε κυτταρικούς ιστούς, όπως επιθηλιακά τοιχώματα οργάνων, ενώ η στόχευση σε συγκεκριμένα όργανα επιβάλλει περαιτέρω μείωση μεγέθους και διασποράς. Το δυναμικό παρουσιάζει ικανοποιητικά αρνητικές τιμές, ενδεικτικές της σταθερότητας των αιωρημάτων, ωστόσο εμφανίζονται σημαντικές αυξομειώσεις οι οποίες μπορεί να επιβαρύνουν τη σταθερότητα μίας παραγωγής στο χρόνο, οπότε περαιτέρω διερεύνηση θα ήταν ωφέλιμη.



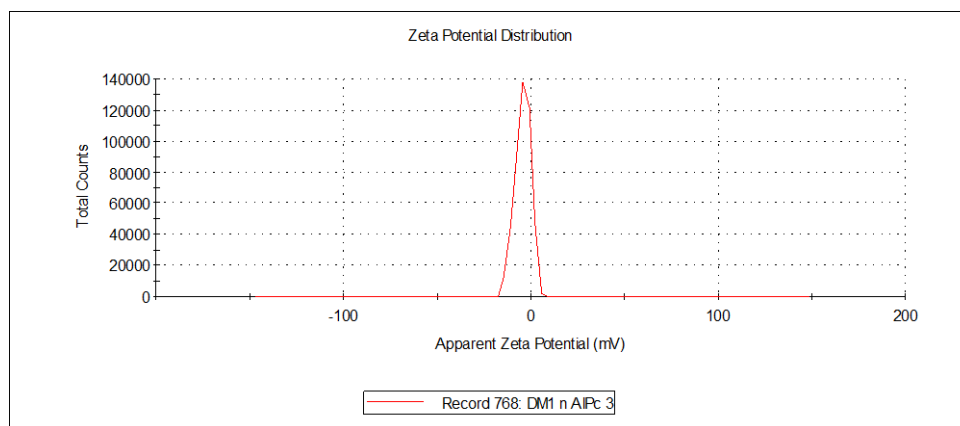
Εικόνα 27 διάγραμμα DLS μεγέθους κενών νανοσωματιδίων PLA.



Εικόνα 28 διάγραμμα DLS μεγέθους νανοσωματιδίων AICIPc-PLA.



Εικόνα 29 διάγραμμα DLS ζ-δυναμικού κενών νανοσωματιδίων PLA.



Εικόνα 30 διάγραμμα DLS ζ-δυναμικού νανοσωματιδίων AICIPc-PLA.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα μετρήσεων DLS.

	Μέγεθος (nm)	PDI	Zeta-Δυναμικό (mV)
Κενά	266.43±2.17	0.22	-12.73±0.95
AICIPc	233.17±4.35	0.35	-8.89±4.40

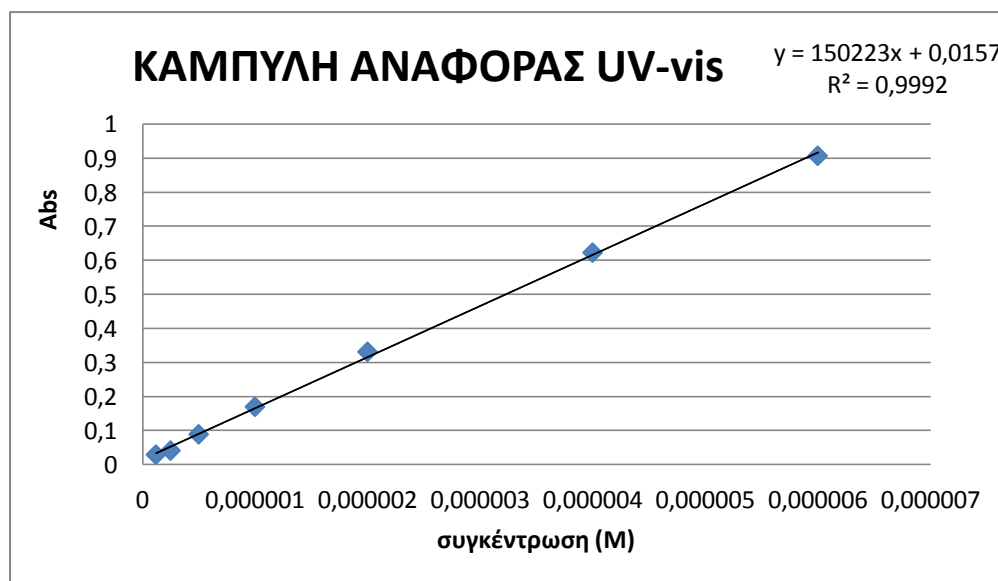
ΔΟΚΙΜΗ	Μέγεθος (nm)	PDI	Zeta-Δυναμικό (mV)
1	246.53±26.82	0.16	-24.57±8.87
2	277.77±6.79	0.12	-10.83±3.96
3	247.53±3,87	0.09	-23.9±3.81
4	224.7±11.69	0.27	-20.53±3.52
5	252.47±1.18	0.1	-12.04±3.3
6	298.83±8.29	0.15	-8.73±3.53
7	269.53±4.37	0.1	-9.71±0.78
8	318.63±21.44	0.17	-5.65±0.92
9	278.5±20.73	0.19	-4.1±0.77
10	316±9.74	0.16	-4.95±0,09

4.1.2 Αποτελέσματα φασματομετρίας UV-vis

Σύμφωνα με τις κατάλληλες τιμές συγκεντρώσεων που φαίνονται στον πίνακα 2 καταστρώθηκε η καμπύλη αναφοράς.

Πίνακας 7 δεδομένα καμπύλης αναφοράς.

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (10^{-6} mol/L)	Abs
6	0.901
4	0.623
2	0.332
1	0.170
0.5	0.089
0.25	0.042
0.12	0.029



Εικόνα 31 καμπύλη αναφοράς

Από την καμπύλη αναφοράς προσδιορίστηκε η εξίσωση

$$y = 150223 \cdot x + 0.0157$$

Όπου y και x η απορρόφηση κι η συγκέντρωση αντίστοιχα, σύμφωνα με το νόμο του Lambert Beer. Από την καμπύλη αναφοράς, με γνωστές τιμές των όγκων των υπερκείμενων διαλυμάτων και μέτρηση των αντίστοιχων απορροφήσεων στο καθορισμένο μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης προσδιορίστηκαν οι αποδόσεις εγκλεισμού κάθε δοκιμής καθώς και η μέση τιμή τους.

Πίνακας 8 αποτελέσματα UV-Vis.

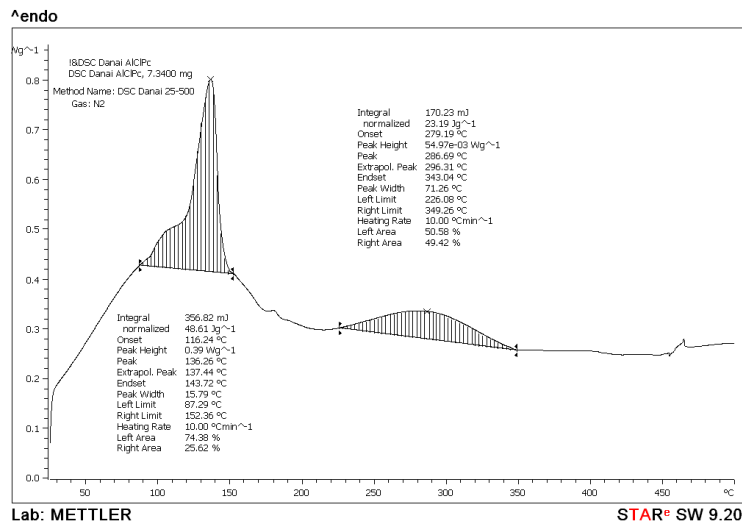
Δοκιμή	ΕΕ%	Μ.Ο.
1	93.15	95.99±1.83
2	95.31	
3	99.23	
4	96.97	
5	96.39	
6	95.69	
7	93.95	
8	95.95	
9	98.16	
10	95.06	

Όσο αφορά στην απόδοση του εγκλεισμού (ΕΕ), οι τιμές βρέθηκαν ιδιαίτερα υψηλές σε ποσοστά 80-90%, ενδεικτικά της κατάλληλης τεχνικής εγκλεισμού για το συγκεκριμένο σύστημα και των αντίστοιχων συνθηκών. Η συγκεκριμένη τεχνική χαρακτηρίζεται από εύκολη μεθοδολογία και σχετικά χαμηλό κόστος παραγωγής, κατά αυτό τον τρόπο το αποτέλεσμα αποτελεί σημαντική παράμετρο για τη μεταφορά της διεργασίας σε βιομηχανική παραγωγή. Η υψηλή απόδοση ενδείκνυται ακόμα και για αύξηση της δυναμικότητας παραγωγής, ενώ η μικρή διακύμανση είναι επίσης κατάλληλη για εφαρμογές, όπου απαιτείται υψηλή ακρίβεια στην ποσότητα της δραστικής ουσίας, όπως στην προκειμένη περίπτωση σε ιατρικές εφαρμογές φωτοδυναμικής θεραπείας.

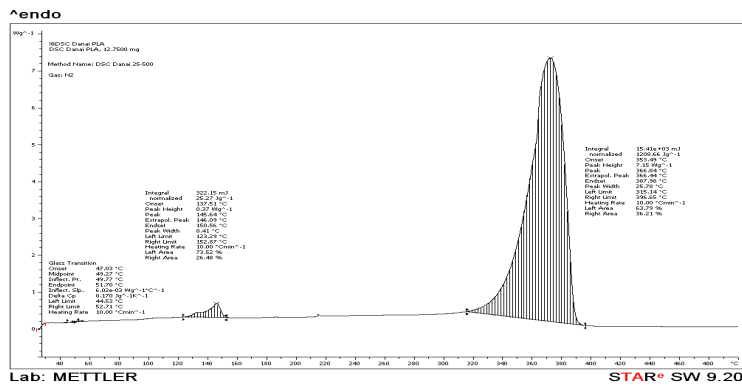
4.1.3 Θερμικά χαρακτηριστικά

Τα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν ως προς τις θερμικές ιδιότητές τους, οι οποίες αποτελούν κρίσιμες παραμέτρους στον μηχανισμό και στην κινητική της αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας. Παρατίθεται το συγκριτικό γράφημα DSC κατόπιν του εγκλεισμού της AICIPc. Κατ' αρχήν, η φθαλοκυανίνη παρουσιάζει δυο ενδόθερμα σε θερμοκρασίες 136.3 °C και 286.7 °C, με συνεχή απώλεια μάζας στο αντίστοιχο γράφημα TGA η οποία ωστόσο οδηγεί σε υψηλό υπόλειμμα (60 %, 1200 °C) ενδεικτικό της σταθερότητας του σχηματισμένου συμπλόκου. Από την άλλη πλευρά, το PLA εμφάνισε σημείο υαλώδους μετάπτωσης (T_g) σε θερμοκρασία 49°C, σημείο τήξης (T_m) 146°C και θερμοκρασία αποικοδόμησης (T_d) 367°C. Οι αντίστοιχες κορυφές της δραστικής ουσίας και του πολυμερούς εντοπίζονται και στο γράφημα των νανοσωματιδίων, ωστόσο με κάποιες μετατοπίσεις: η T_d του PLA εμφανίζεται μειωμένη (331.1 °C), γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην ναοκλίμακα του μεγέθους των σωματιδίων. Το ίδιο μπορεί να εικαστεί και για το T_m , το οποίο

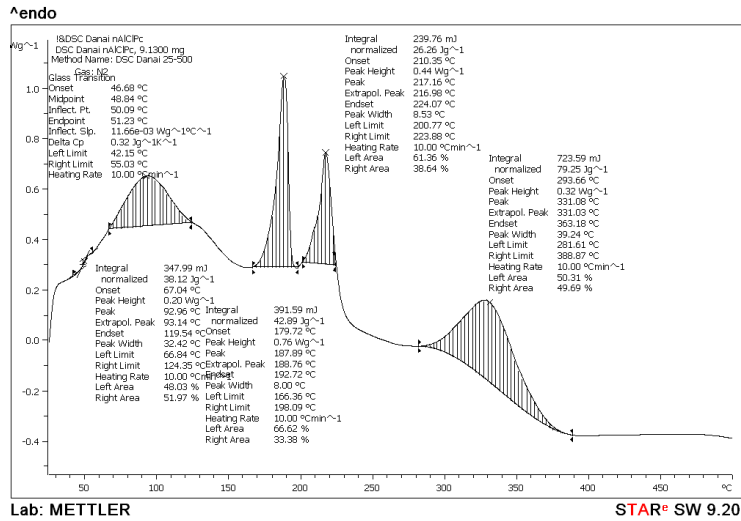
μπορεί να αντιστοιχεί στο πρώτο ενδόθερμο του 'Σχήματος 2c', δηλαδή στους 99 °C. Οι επόμενες δυο κορυφές, αποδίδονται, η μεν πρώτη στους 188 °C στη σουκρόζη που προστέθηκε κατά την ξήρανση και η δεύτερη στους 217 °C, στην εγκλεισμένη φθαλοκυανίνη AICIPc, η οποία λόγω της προστασίας της από το πολυμερές παρουσιάζει ενδόθερμα σε διαφορετικές θερμοκρασίες.



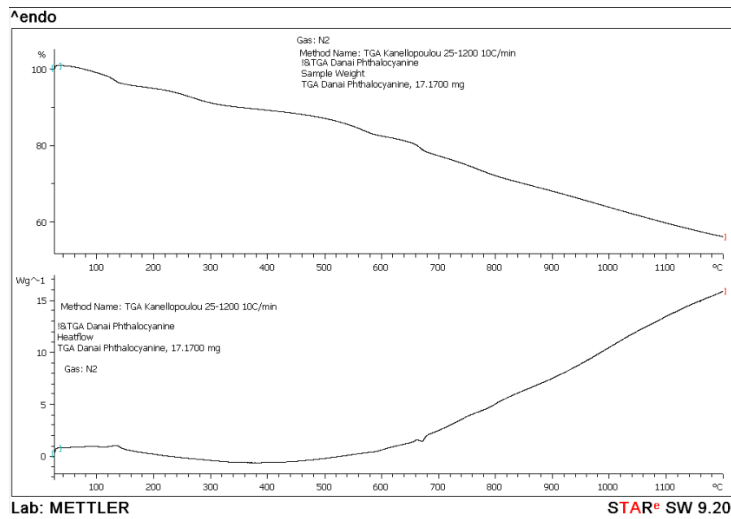
Εικόνα 32 DSC γράφημα AICIPc.



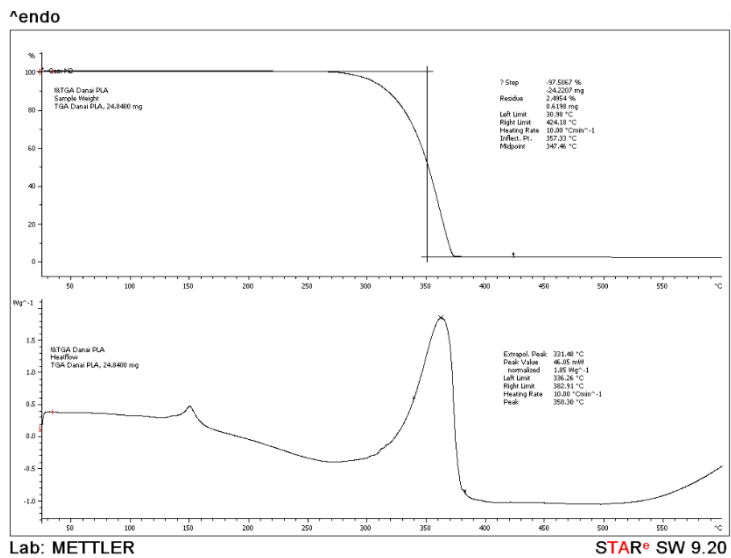
Εικόνα 33 DSC γράφημα PLA.



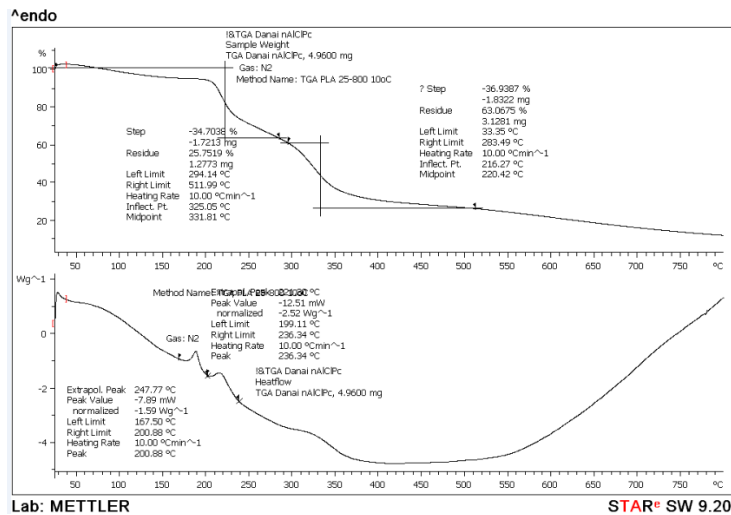
Εικόνα 34 DSC γράφημα νανοσωματιδίων AICIPc-PLA.



Εικόνα 35 TGA γράφημα AICIPc.



Εικόνα 36 TGA γράφημα PLA.



Εικόνα 37 TGA γράφημα νανοσωματιδίων AICIPc-PLA.

4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ

Ο σχεδιασμός και οι πειραματικές αποκρίσεις όπως προέκυψαν από τα αντίστοιχα πειράματα, με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος «design – expert 6.0.8» εικονίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Std	Run	Block	Factor 1 A:Cpva %w/v	Factor 2 B:Cpla %w/v	Factor 3 C:R w/o	Factor 4 D:Mr	Response 1 size nm	Response 2 z-potential mV	Response 3 pdi	Response 4 EE %
1	1	Block 1	1.00	1.00	2.00	56000	277.77	-10.83	0.115	95.15
9	2	Block 1	1.50	1.50	5.00	56000	269.53	-9.71	0.096	93.95
7	3	Block 1	1.00	2.00	8.00	56000	252.47	-12.04	0.103	96.39
6	4	Block 1	2.00	1.00	8.00	56000	278.5	-4.1	0.195	98.16
4	5	Block 1	2.00	2.00	2.00	56000	318.63	-5.65	0.166	95.95
2	6	Block 1	2.00	1.00	2.00	14000	224.7	-20.53	0.271	96.97
8	7	Block 1	2.00	2.00	8.00	14000	316	-4.95	0.156	95.06
3	8	Block 1	1.00	2.00	2.00	14000	298.83	-8.73	0.155	95.69
10	9	Block 1	1.50	1.50	5.00	14000	247.53	-23.9	0.089	99.23
5	10	Block 1	1.00	1.00	8.00	14000	246.53	-24.57	0.156	93.15

Εικόνα 38 καταγραφή τιμών μεταβλητών κι αποκρίσεων στο υπολογιστικό φύλλο.

Στο πρόγραμμα καταχωρήθηκαν οι αποκρίσεις και στη συνέχεια έγινε ανάλυση των αποτελεσμάτων κάθε απόκριση σύμφωνα με τις υποδείξεις του προγράμματος.

Για την απόκριση μεγέθους οι τιμές κυμαίνονταν από 224,7 nm και 318,63 nm, με λόγο μέγιστο προς ελάχιστο στα 1,42 το οποίο είναι $1,42 < 3$, με αποτέλεσμα να μην απαιτείται μετασχηματισμός των αποτελεσμάτων. Μικρή επίδραση παρουσίασε μόνο η παράμετρος της συγκέντρωσης του πολυμερούς, καθώς η παράμετρος της

πιθανότητας “prob>F” είχε τιμή 0,07 που προσεγγίζει το προκαθορισμένο όριο 0,05 για αποδεκτή επίδραση της παραμέτρου στο μοντέλο. Επιπλέον τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζουν καμπυλότητα, ενώ το σήμα χαρακτηρίζεται αρκετά ασθενές για την ξεκάθαρη αποτίμησή του. Ως ενδεικτική επιμέρους εξίσωση προέκυψε για τη μεταβλητή μεγέθους:

$$size = 39.61 \cdot Cpla + 217.27$$

Για την απόκριση z-δυναμικού, οι τιμές κυμαίνονταν από -24,57 mV και -4,1 mV, με λόγο μέγιστο προς ελάχιστο μικρότερο από 10, με αποτέλεσμα να μην επιλεγεί κάποιος μετασχηματισμός. Ως σημαντικές παράμετροι αναδείχθηκαν το μοριακό βάρος του πολυμερούς, οι συγκεντρώσεις πολυμερούς και επιφανειοδραστικού, καθώς και η αλληλεπίδραση της συγκέντρωσης πολυμερούς με τον λόγο υδατικής/οργανικής φάσης, με τιμές “prob>F” 0.09, 0.04, 0.02 και 0.03 αντίστοιχα. Το μοντέλο παρουσιάζει κάποια καμπυλότητα, ενώ ενδείκνυται μείωση των μεταβλητών σε επόμενο μοντέλο καθώς και ομαδοποίηση των πειραμάτων.

Οι εξισώσεις που προέκυψαν είναι διαφορετικές ανάλογα με τις ακραίες τιμές μοριακών βαρών. Συγκεκριμένα,

Για $M_r = 56000$

$$z - potential = -9.01 \cdot C_{pva} + 7.17 \cdot C_{pla} - 4.26917 \cdot R \frac{W}{O} + 2.85 \cdot C_{pva} \cdot R \frac{W}{O} - 4.65$$

και για $M_r = 140000$

$$z - potential = -9.01 \cdot C_{pva} + 7.17 \cdot C_{pla} - 4.26917 \cdot R \frac{W}{O} + 2.85 \cdot C_{pva} \cdot R \frac{W}{O} - 12.71$$

Όσον αφορά το δείκτη pd_i οι τιμές κυμαίνονταν από 0.089 σε 0.271 κι ενώ ο λόγος ήταν προσεγγιστικά 3, επιλέχθηκε μετασχηματισμός αντίστροφης τετραγωνικής ρίζας ($y' = \frac{1}{\sqrt{y}}$). Σημαντική επίδραση ανέδειξε μόνο η συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού (PVA), με τιμή “prob>F” 0.03. η δοκιμασία εμφάνισε καμπυλότητα, αλλά και ισχυρό σήμα, με χαρακτηριστική εξίσωση:

$$\frac{1}{\sqrt{pd_i}} = -0.49 \cdot C_{pva} + 3.28$$

Για την απόδοση εγκλεισμού οι τιμές κυμαίνονταν από 93.15 % σε 99.23 % κι ο λόγος ήταν προσεγγιστικά 1 με αποτέλεσμα να μην επιλεγεί κάποιος μετασχηματισμός, ενώ δεν αναδείχθηκε παράλληλα καμία σημαντική επίδραση κάποιας μεταβλητής.

Το πρόγραμμα κατέδειξε ένα πιθανό σχεδιασμό, που προσεγγίζει τα δεδομένα που επιλέχθηκαν ως βέλτιστες λύσεις, συγκεκριμένα τη μικρότερη τιμή μεγέθους

νανοσωματιδίων, ζ-δυναμικού και δείκτη πολυδιασποράς κοντά στο 0.5, τα αποτελέσματα φαίνονται στην ακόλουθη εικόνα.

Προέκυψαν επίσης και δεκαεννέα πιθανοί συνδυασμοί διεργασιών με τις πιθανές κατά περίπτωση αποκρίσεις, όπως παρουσιάζονται στη συνέχεια.

The screenshot displays a software interface with a table of factor levels and a 'Factors Tool' dialog box. The table lists factors A, B, C, and D with their respective levels and standard deviations. Below the table, a section titled 'Prediction' provides statistical data for 'size', 'z-potential', 'pdi', and 'EE'. The 'Factors Tool' dialog box is open, showing a list of factors (A: Cpva, B: Cpla, C: R w/o, D: Mr) and a value of 1.50 for factor D.

Factor	Name	Level	Low Level	High Level	Std. Dev.
A	Cpva	1.50	1.00	2.00	0.000
B	Cpla	1.50	1.00	2.00	0.000
C	R w/o	5.00	2.00	8.00	0.000
D	Mr	56000	56000	14000	N/A

	Prediction	SE Mean	95% CI low	95% CI high	SE Pred	95% PI low	95% PI high
size	276.679	8.54	256.49	296.87	28.32	209.72	343.64
z-potential	-7.39	1.16	-10.61	-4.17	2.84	-15.29	0.51
pdi	0.155179		0.13	0.18		0.098	0.28
EE	95.815	0.60	94.42	97.21	2.01	91.19	100.44

Factors Tool

Gauges: Sheet

A: Cpva +

B: Cpla +

C: R w/o +

D: Mr

1.50

Default

Εικόνα 39 προτεινόμενος βέλτιστος σχεδιασμός διεργασίας.

Number	Cpva	Cpla	R w/o	Mr	size	z-potential	pdi	EE	Desirability	Selected
1	1.08	1.00	7.90	14000	256.875	-24.6533	0.132947	95.815	0.835	
2	1.01	1.00	7.75	14000	256.875	-25.4348	0.129487	95.815	0.835	
3	1.07	1.00	7.92	14000	256.875	-24.9267	0.132075	95.815	0.835	
4	1.02	1.00	7.34	14000	256.875	-24.789	0.129774	95.815	0.835	
5	1.00	1.00	7.05	14000	256.916	-24.5728	0.129008	95.815	0.835	
6	1.06	1.00	7.55	14000	257.018	-24.5702	0.131597	95.815	0.835	
7	2.00	1.00	2.00	14000	256.875	-20.6968	0.190202	95.815	0.741	
8	2.00	1.01	2.00	14000	257.383	-20.6055	0.190201	95.815	0.736	
9	1.85	1.00	2.00	14000	256.875	-20.1981	0.178479	95.815	0.728	
10	1.54	1.00	2.00	14000	256.875	-19.1875	0.157844	95.815	0.702	
11	1.00	1.00	8.00	56000	256.875	-17.8624	0.129008	95.815	0.666	
12	1.00	1.02	8.00	56000	257.503	-17.7468	0.129008	95.815	0.660	
13	1.00	1.00	7.75	56000	256.875	-17.5109	0.129008	95.815	0.656	
14	1.00	1.00	7.45	56000	256.875	-17.0808	0.129008	95.815	0.644	
15	1.00	1.00	7.17	56000	256.875	-16.6829	0.129008	95.815	0.633	
16	1.18	1.00	8.00	56000	256.875	-15.3367	0.137775	95.815	0.593	
17	1.06	1.00	4.64	56000	256.875	-12.8339	0.13165	95.815	0.514	
18	2.00	1.00	2.00	56000	256.877	-12.6267	0.190192	95.815	0.507	
19	1.71	1.00	2.41	56000	256.875	-11.4309	0.168858	95.815	0.465	

19 Solutions found

Εικόνα 40 πιθανές διεργασίες κι αποκρίσεις.

4.3 ΞΗΡΑΝΣΗ

Από την ξήρανση των δοκιμών «3^α» και «3^β» προσδιορίστηκε η απόδοση με βάση τη σχέση:

$$\alpha = \frac{\text{πειραματικά μετρούμενη ποσότητα νανοσωματιδίων (mg)}}{\text{θεωρητικά προσδιοριζόμενη ποσότητα νανοσωματιδίων (mg)}} \cdot 100\%$$

Όπου στον αριθμητή υπολογίζεται η ποσότητα νανοσωματιδίων που προέκυψε από κάθε δοκιμή με την αντίστοιχη μέθοδο ξήρανσης, ενώ στον παρανομαστή υπολογίζεται η αρχική ποσότητα πολυμερούς και νανοσωματιδίων (20% drug loading) που θα έπρεπε να παραλειφθεί θεωρητικά. Για τον υπολογισμό της θεωρητικής ποσότητας εγκλεισμένης φθαλοκυανίνης αργιλίου –χλωρίου, θεωρήσαμε ως παραδοχή μία μέση τιμή απόδοσης εγκλεισμού το 95%.

Κατά τον τρόπο αυτόν προκύπτουν τα ακόλουθα δεδομένα:

Πίνακας 9 δεδομένα ξήρανσης

ΔΟΚΙΜΗ	Πειραματική ποσότητα νανοσωματιδίων (mg)	Θεωρητική ποσότητα νανοσωματιδίων (mg)	ΑΠΟΔΟΣΗ ΞΗΡΑΝΣΗΣ %
3 ^α	17,4	92,23	18,87 ±0,05
3 ^β	8,5	92,82	9,16±0,05

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ως προτιμότερη μέθοδος ξήρανσης η λυοφιλοποίηση. Η λυοφιλοποίηση παρουσιάζει εκτός από καλύτερη απόδοση ξήρανσης και καλύτερες λειτουργικές συνθήκες, καθώς είναι πιο προστατευμένο το προϊόν από επιμολύνσεις. Σε αυτό το σημείο κρίνεται σκόπιμο να αναφερθεί ότι κατά την λυοφιλοποίηση των νανοσωματιδίων, κρίθηκε αναγκαία η παράληψη προσθήκης σακχάρων, (όπως σουκρόζης) η οποία ενδείκνυται ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας, για ευκολία επαναδιασποράς των νανοσωματιδίων κατά τη χορήγησή τους. Ο λόγος αφορά την ιδιαίτερη συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων ως προς τα σάκχαρα, τα οποία αποτελούν πηγή ενέργειας για το αγγειακό καρκινικό σύστημα, με αποτέλεσμα να δημιουργήσουν πιθανή αναστολή της αντικαρκινικής δράσης των φθαλοκυανινών.

4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ

Τα αποτελέσματα απορρόφησης από τη φωτομέτρηση των υπερκείμενων διαλυμάτων στα 679 nm, καταγράφονται και με τη βοήθεια του υπολογιστικού προγράμματος «excel» μελετάται η αποδέσμευση της εγκλεισμένης φθαλοκυανίνης. Αναλυτικά το εξεταζόμενο σύστημα περιέχει 15,8 mg νανοσωματιδίων, στα οποία αντιστοιχούν 2,63mg AlCIPc. Κάθε δειγματοληψία θεωρούμε ότι παραλαμβάνει το 1/3 της εναπομένουσας ανά φορά ποσότητας AlCIPc.

Πίνακας 10 μάζες κατά την αποδέσμευση AlCIPc

ΧΡΟΝΟΣ (h)	ΑΠΟΜΕΙΝΟΥΣΑ ΠΟΣΟΤΗΤΑ AlCIPc ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑ(mg)	ΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥΜΕΝΗ AlCIPc (mg)	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ (Abs)
0	2.63	0.877	0.096
24	1.752	0.584	0.529
48	1.168	0.389	0.729
72	0.779	0.259	0.565

Από την καθορισμένη καμπύλη αναφοράς έχει προκύψει η σχέση

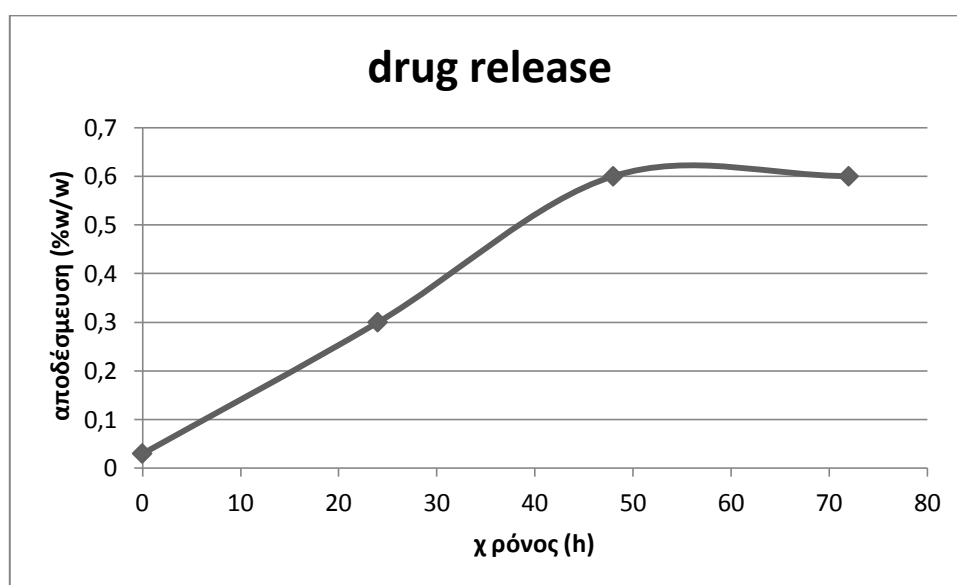
$$y = 150223 \cdot x + 0.0157$$

Όπου y η μετρούμενη απορρόφηση και x η συγκέντρωση της αποδεσμευμένης ποσότητας AICIPc σε M (mol/L). Από την προαναφερθείσα σχέση προσδιορίζεται η συγκέντρωση της αποδεσμευμένης ποσότητας στο εκάστοτε χρονικό διάστημα, ενώ κατόπιν πολλαπλασιασμού με τη γραμμομοριακή μάζα της εξεταζόμενης φθαλοκυανίνης ($M_r = 574.96 \text{ g/mol}$) αλλά και με 0,8 ml, που αντιστοιχούν στον όγκο της φωτομετρούμενης ποσότητας, προκύπτει η καθαρή ποσότητα αποδεσμευμένης φθαλοκυανίνης καθώς και το ποσοστό αποδέσμευσης ανά ημέρα, διαιρώντας την ποσότητα αποδεσμευμένης AICIPc προς την αντίστοιχη προ δειγματοληψίας ποσότητα στο σύστημα.

Πίνακας 11 δεδομένα αποδέσμευσης AICIPc

ΧΡΟΝΟΣ (h)	AICIPc (mg) σε σύστημα	AICIPc (mg) αποδεσμευμένη	% w/w ποσοστό αποδέσμευσης
0	0.877	0,0002	0,03
24	0.584	0,0015	0,3
48	0.389	0,0022	0,6
72	0.259	0,0017	0,6

Από τη μελέτη αποδέσμευσης γίνεται φανερό ότι ο εγκλεισμός των φθαλοκυανινών αργιλίου- χλωρίου σε πολυμερές πολυ-γαλακτικού οξέος επιφέρει σταδιακή αποδέσμευση της δραστικής ουσίας. Η αποδέσμευση λαμβάνει χώρα σε εξαιρετικά μικρό ποσοστό, με ενδεχόμενη σταθεροποίηση του ρυθμού μετά τη δεύτερη μέρα.



Εικόνα 41 σχηματική απεικόνιση αποδέσμευσης.

Τα εν λόγω ευρήματα χαρακτηρίζουν τον εγκλεισμό επιτυχή, ωστόσο η εφαρμογή τους στη συγκεκριμένη μορφή συστήματος αποδέσμευσης για τη φωτοδυναμική θεραπεία χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, καθώς πιθανώς να αλλάζει το πρωτόκολλο χορήγησης ακτινοβολίας από ώρες σε μέρες, και να παρατείνεται η διάρκεια της

θεραπείας, με πιθανότητα επανάληψης της ακτινοβολήσης. Ωστόσο η σταδιακή αποδέσμευση ενδέχεται να μειώσει την φωτοευαισθησία, ως παρενέργεια της φωτοδυναμικής θεραπείας. Παράλληλα κρίνεται απαραίτητο να εξετασθεί η αποδέσμευση και σε διάστημα ωρών, ιδίως εντός του πρώτου εικοσιτετραώρου, με παράλληλη εξέταση φθοριζομετρίας του συστήματος ώστε να εξακριβωθεί όχι μόνο η αποδέσμευση της εγκλεισμένης ποσότητας φθαλοκυανίνης, αλλά και ο χρόνος ενεργοποίησης και δράσης της (αν πρέπει να ακτινοβοληθεί ο ασθενής πριν ή μετά την μέγιστη αποδέσμευση), με στόχο να προσαρμοστούν εκ νέου τα πρωτόκολλα φωτοδυναμικών εφαρμογών. Περαιτέρω μελέτη κρίνεται σκόπιμη και για την εξακρίβωση του μηχανισμού αποδέσμευσης καθώς η ακτινοβολία ενδέχεται να επιδράσει στην αποδέσμευση, όπως ενδέχεται να επιδράσουν και ενζυμικές αντιδράσεις αποικοδόμησης του πολυμερούς. Για τον λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητη η:

- Επανάληψη drug release χωρίς ακτινοβολήση και με ακτινοβολήση,
- Εφαρμογή φθοριζομετρίας σε σύστημα νανοσωματιδίων,
- Μελέτη επίδρασης ενζύμων στη διάρρηξη της πολυμερικής μεμβράνης του εξεταζόμενου συστήματος.

4.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ

Από την προσπάθεια εκτίμησης της διαλυτότητας της εγκλεισμένης φθαλοκυανίνης (20% AICIPc loading) σε υδατικό μέσο, παρατηρήθηκε ποιοτικά σε οπτικό μικροσκόπιο η συμπεριφορά της εγκλεισμένης σε νανοσωματίδια φθαλοκυανίνης, συγκριτικά με ίδια ποσότητα μη εγκλεισμένης φθαλοκυανίνης. Στην εγκλεισμένη φθαλοκυανίνη AICI με σταδιακή προσθήκη υδατικού μέσου, παρατηρήθηκε άμεσος χρωματισμός του παρακείμενου υγρού. Αντίθετα στην περίπτωση της μη εγκλεισμένης ουσίας, δεν έγινε εμφανής χρωματισμός του υδατικού μέσου, ωστόσο σχηματίστηκαν εμφανή κι αδιάλυτα συσσωματώματα.

Η εν λόγω εικόνα επαληθεύει τη βελτίωση της φυσικοχημικής συμπεριφοράς των υδρόφοβων φθαλοκυανινών AICIPc, μέσω του εγκλεισμού τους σε νανοσωματίδια PLA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία έγινε εγκλεισμός υδρόφοβων φθαλοκυανινών σε νανοσωματίδια βιοδιασπώμενου πολυ-γαλακτικού οξέος, με τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη. Στόχος ήταν να αποφευχθεί η μειωμένη δράση της φθαλοκυανίνης AICIPc ως φωτοευαισθητοποιητή στη χρήση της φωτοδυναμικής θεραπείας κατά του καρκίνου, η οποία παρατηρείται λόγω παρουσίας συσσωματωμάτων της υδρόφοβης φθαλοκυανίνης, εμποδίζοντας έτσι την ομοιόμορφη κυτταροτοξική της δράση, αλλά και παρατείνουν φαινόμενα φωτοευαισθησίας των ασθενών.

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων έγινε χρήση πειραματικού σχεδιασμού (DoE), με στόχο τη μείωση του αριθμού των πειραμάτων και παράλληλα την διερεύνηση των κύριων παραμέτρων, που επιδρούν στη διαδικασία εγκλεισμού, του καθορισμένου συστήματος.

Πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των παραγόμενων νανοσωματιδίων, ενώ έγινε επίσης προσπάθεια εκτίμησης της αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας σε διάλυμα PBS. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ξήρανση των νανοσωματιδίων με διαφορετικές μεθόδους (υπό κενό με συσκευή Edwards και με λυοφιλοποίηση), για να προσδιορισθεί η αποδοτικότερη.

Τέλος, έγινε μία ποιοτική εκτίμηση της διαλυτότητας των νανοσωματιδίων εγκλεισμένης AICIPc συγκριτικά με την μη εγκλεισμένη μορφή.

Από τα ανωτέρω κατέστη εμφανές ότι η χρησιμοποιούμενη μέθοδος σχηματισμού νανοσωματιδίων, επιφέρει υψηλό ποσοστό απόδοσης εγκλεισμού, με αντίστοιχα ικανοποιητικό μέγεθος νανοσωματιδίων (~ 300nm), ζ-δυναμικό και δείκτη πολυδιασποράς.

Από την ανάλυση του πειραματικού σχεδιασμού αναδείχθηκαν μικρές μόνο επιδράσεις, πιθανώς λόγω μεγάλου εύρους των τιμών των παραμέτρων, αλλά και μεγάλου αριθμού μεταβλητών, σε συνδυασμό με τις μικρές ποσότητες διαλυμάτων προς μέτρηση. Συγκεκριμένα, αναδείχθηκε σημαντική η επίδραση της συγκέντρωσης του πολυμερούς για τη μεταβλητή μεγέθους των νανοσωματιδίων, με συνέπεια να απαιτείται μείωση της συγκέντρωσης για μείωση του μεγέθους. Στην παράμετρο του ζ-δυναμικού φαίνεται να επιδρούν το μοριακό βάρος και η συγκέντρωση του πολυμερούς, καθώς και η συγκέντρωση του PVA, ενώ παράλληλα αναδείχθηκε σημαντική κι η αλληλεπίδραση της συγκέντρωσης πολυμερούς και του λόγου υδατικής-οργανικής φάσης σε αμελητέο ωστόσο βαθμό. Στη διασπορά φάνηκε να επιδρά σε πολύ μικρό βαθμό μόνο η συγκέντρωση του PVA, ενώ η απόδοση του εγκλεισμού ήταν σε κάθε περίπτωση υψηλή ξεπερνώντας το 90%, με αποτέλεσμα να μη συσχετισθεί με κάποιον παράγοντα. Από το σύνολο του πειραματικού σχεδιασμού γίνεται εμφανής η ανάγκη για επανάληψη των μετρήσεων σε μικρότερες οριακές

τιμές του συστήματος και με λιγότερες μεταβλητές. Όσον αφορά τη διαδικασία εγκλεισμού και σχηματισμού των νανοσωματιδίων, υποδεικνύεται μη σκόπιμη η υψηλή ποσότητα επιφανειοδραστικού που χρησιμοποιείται για το συγκεκριμένο σύστημα.

Αναφορικά με την μέθοδο ξήρανσης των νανοσωματιδίων, η λυοφιλοποίηση παρουσίασε σχεδόν διπλάσιο ποσοστό αποδόσεως, με αποτέλεσμα να φαίνεται ενδεικτικότερη. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύει κι η σταθερότητα των συνθηκών στις οποίες διεξάγεται η μέθοδος, η οποία σε βιομηχανική κλίμακα μπορεί να μειώσει διακυμάνσεις μεταξύ παρτίδων.

Από την μελέτη αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας, το σύστημα παρουσίασε αργή και σταδιακή αποδέσμευση της εγκλεισμένης ποσότητας AICIPc. Το αποτέλεσμα αυτό, επαληθεύει την μειωμένη διαφυγή φθαλοκυανίνης σε υδατικό μέσο προς σχηματισμό συσσωματωμάτων. Ωστόσο, δεν παρατηρείται κάποια απότομη αύξηση (burst release) στην αποδέσμευση, η οποία θα ήταν επιθυμητή κατά την εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας. Για το λόγο αυτό θα ήταν σκόπιμο να μελετηθεί η χρήση άλλου πολυμερούς για εγκλεισμό, καθώς και περαιτέρω ανάλυση των πρωτόκολλων εφαρμογής της φωτοδυναμικής θεραπείας με χρήση νανοσωματιδίων, καθότι κρίνεται επιτακτική ανάγκη αλλαγής του προκαθορισμένου χρόνου ακτινοβόλησης προς ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή, αλλά πιθανολογείται και παράταση της φωτοευαισθησίας με το πέρας της εφαρμογής, λόγω παράτασης της αποδέσμευσης φωτοευαισθητοποιητή.

Τέλος, η ποιοτική εκτίμηση της διαλυτότητας των νανοσωματιδίων στο νερό επέδειξε ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Η επιλογή εγκλεισμού των φθαλοκυανινών σε νανοδομές φαίνεται να βελτιώνει την διαλυτότητα των φθαλοκυανινών σε υδατικό μέσο, ελαττώνοντας φαινόμενα συσσωμάτωσης, με πιθανό όφελος σε πληθώρα εφαρμογών τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο : ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ- ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ

Οι φθαλοκυανίνες έχουν κερδίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον σε πληθώρα εφαρμογών. Οι ξεχωριστές ηλεκτρικές και οπτικές ιδιότητές τους, σε συνδυασμό με την ευελιξία, που παρουσιάζουν τόσο στην παρασκευή όσο και στη δυνατότητα μορφοποίησής τους, δίνει την ευκαιρία να προσδιοριστεί και να ελεγχθεί με μεγάλη ακρίβεια η επιθυμητή κατά περίπτωση συμπεριφορά τους. Το περιθώριο για βελτίωση σαφώς και είναι μεγάλο, με διαφορετικό επίκεντρο ανά εφαρμογή.

Όσον αφορά τη διαδικασία παρασκευής των νανοσωματιδίων στην οποία επικεντρώθηκε η παρούσα εργασία υπάρχουν διαφορετικά σημεία που κρίνεται σκόπιμο να εστιάσει η μετέπειτα έρευνα. Αρχικά, η μέθοδος παρασκευής νανοσωματιδίων παρότι επέδειξε ικανοποιητικό ποσοστό εγκλεισμού, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης κατά πόσο θα αυξηθεί η κατανομή του μεγέθους και των τελικών ιδιοτήτων, σε αύξηση της κλίμακας παραγωγής (scale up). Ενδεχομένως μία διαφορετική μέθοδος παραγωγής θα μπορούσε να λύσει το πρόβλημα διακυμάνσεων, με προτεινόμενη την μέθοδο ψεκασμού (spray- drying) ή και με συνεκβολή της δραστικής ουσίας (φθαλοκυανίνης) με το πολυμερές.

Η μορφολογία των νανοσωματιδίων είναι ένα κομμάτι, το οποίο που δεν έχει πλήρως εκτιμηθεί. Για το λόγο αυτό, κρίνεται σκόπιμη η εξακρίβωση της μορφολογίας των παραγόμενων νανοσωματιδίων, τα οποία παρασκευάστηκαν με τη διαδικασία γαλακτωματοποίησης- εξάτμισης διαλύτη. Η μορφή των νανοσωματιδίων μπορεί να επηρεάσει την αποδέσμευση των εγκλεισμένων ουσιών, μέσω φαινομένων μεταφοράς, ενώ μπορεί να συμβάλλει και στην πρόσδεση των νανοσωματιδίων σε διαφορετικό ιστό κατά την εφαρμογή τους σε βιοχημικές έρευνες. Η εξακρίβωση της μορφολογίας μπορεί να επιτευχθεί μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (SEM), αν και η νανοκλίμακα είναι γνωστό ότι δυσχεραίνει την πειραματική διαδικασία.

Όσον αφορά το χρησιμοποιούμενο πολυμερές ως μήτρα των νανοσωματιδίων, θα ήταν σκόπιμο να ελεγχθεί κατά περίπτωση. Συγκεκριμένα, ανάλογα με την τελική εφαρμογή των φθαλοκυανινών, αλλά και με το κάθε είδος φθαλοκυανίνης, που χρησιμοποιείται κάθε φορά, θα πρέπει να εξετασθεί πρωτίστως το είδος του πολυμερικού περιβλήματος των νανοσωματιδίων, που κρίνεται καταλληλότερο. Το πολυμερικό υλικό επιφέρει σημαντικές διαφοροποιήσεις στο τελικό σύστημα, όπως η διαδικασία αποδέσμευσης και η πρόσδεση σε διαφορετικά υποστρώματα, με αποτέλεσμα η επιλογή του να είναι ένα σημαντικό τμήμα του πειραματικού σχεδιασμού κατά περίπτωση.

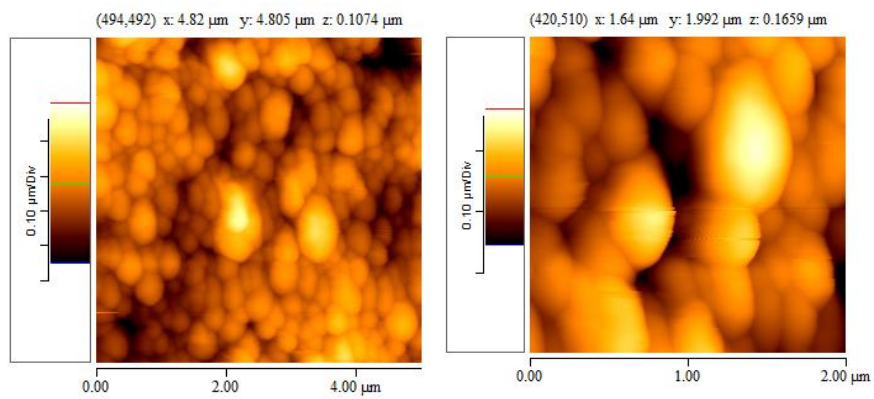
Κατά την εφαρμογή των φθαλοκυανινών στη φωτοδυναμική θεραπεία, έχει γίνει μεγάλη πρόοδος τα τελευταία χρόνια, καθώς ήδη χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη. Ωστόσο, υπάρχει μεγάλο περιθώριο βελτίωσης κι εξέλιξης. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχει ο διεξοδικός έλεγχος του εκάστοτε συστήματος και πρωτοκόλλου

φωτοδυναμικής θεραπείας, με ξεχωριστή βαρύτητα σε κάθε παράγοντα που το απαρτίζει (φωτοευαισθητοποιητή, λέιζερ, πρωτόκολλο εφαρμογής, μέθοδο παρασκευής κ.ο.κ.). έχουν ήδη ενσωματωθεί πρωτεϊνικοί παράγοντες στα νανοσωματίδια των φθαλοκυανινών, με αποτέλεσμα να γίνεται στοχευμένη δράση σε προκαθορισμένους ιστούς. Έτσι, παρουσιάζεται μεγάλη εκλεκτικότητα, ιδίως σε περιπτώσεις καρκινικών ιστών, χωρίς να διαταράσσεται η ισορροπία των περιφερικών υγρών κυττάρων.

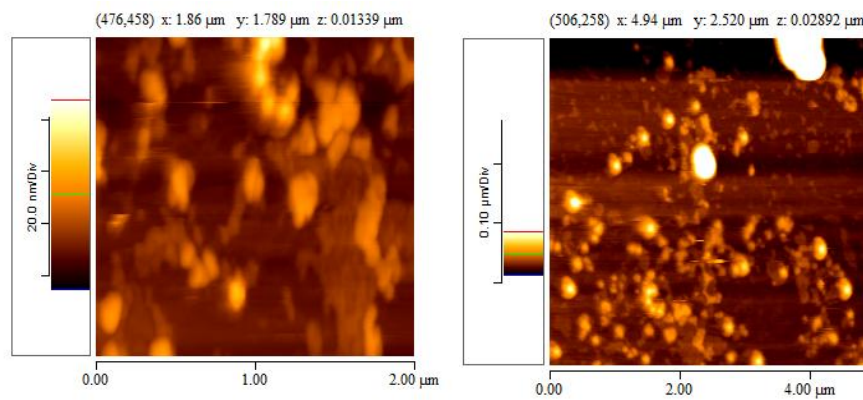
Ένας εξαιρετικά περίπλοκος τομέας προς διερεύνηση αφορά τον μηχανισμό καταστροφής των καρκινικών κυττάρων κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία, καθώς δεν είναι πλήρως εξακριβωμένος σε κάθε σύστημα και είναι ιδιαίτερης σημασίας. Η μέθοδος καταστροφής των καρκινικών κυττάρων είναι απαραίτητο να είναι γνωστή εκ των προτέρων, ώστε να μπορούν να προβλεφθούν αναμενόμενες επιπλοκές, όπως χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν περιπτώσεις ενδοκρανιακών νεοπλασμάτων, όπου η διαδικασία καταστροφής των καρκινικών κυττάρων μπορεί να προκαλέσει αύξηση της ενδοκρανιακής πίεσης, ή υπέρμετρη φλεγμονή, τα οποία με τη σειρά τους ενδέχεται να έχουν αντίστροφα αποτελέσματα.

Ένα παρεμφερές τμήμα της ογκολογίας, στο οποίο η φωτοδυναμική θεραπεία δεν έχει προς το παρόν εισχωρήσει αρκετά, είναι η αντιμετώπιση περιπτώσεων λευχαιμίας. Λόγω της μη ύπαρξης ευκρινών νεοπλασμάτων, η φωτοδυναμική θεραπεία δεν βρίσκει την ίδια αναγνώριση και χρήση με άλλες φαρμακευτικές εφαρμογές, στον τομέα αυτό. Μία πιθανή κατεύθυνση προς διερεύνηση για το κομμάτι αυτό, θα μπορούσε να είναι η στόχευση των νανοσωματιδίων στον μυελό των οστών, συνδυάζοντας κατάλληλη διάταξη λέιζερ, μέγεθος νανοσωματιδίων, αλλά και μόρια πρόσδεσης στη συγκεκριμένη θέση.

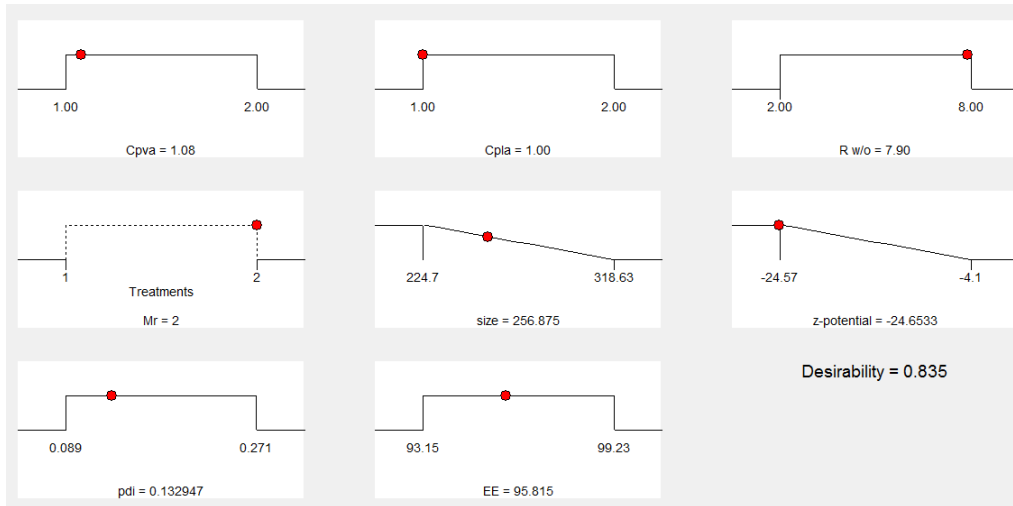
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο : ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



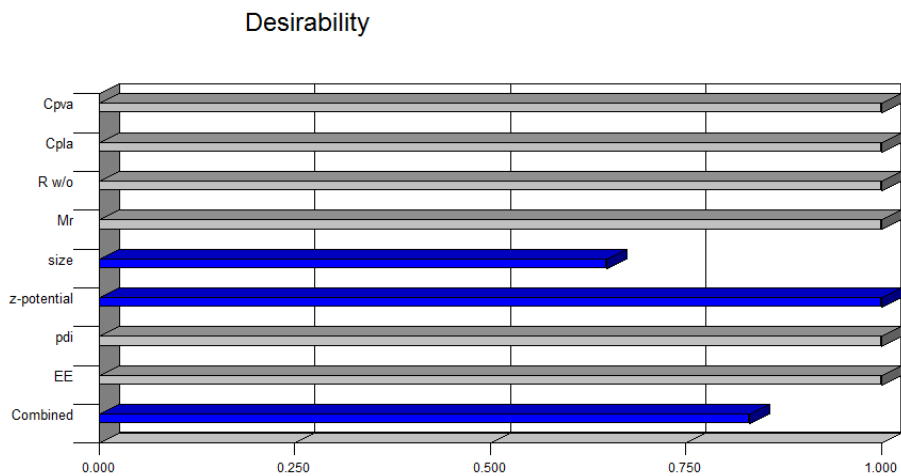
Εικόνα 42 απεικόνιση AFM πυκνού δείγματος διασποράς νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένη AICIPc.



Εικόνα 43 απεικόνιση AFM αραιού δείγματος διασποράς νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένη AICIPc.



Εικόνα 44 υπόδειγμα γραφικής απεικόνισης πιθανών τιμών σύμφωνα με τις προδιαγραφές του υπολογιστικού προγράμματος "design expert".



Εικόνα 45 υπόδειγμα επιθυμητών προδιαγραφών ανά πιθανή δοκιμή, σε μορφή ιστογράμματος, κατά τις υποδείξεις του υπολογιστικού προγράμματος "design expert".

Factor	Name	Level	Low Level	High Level	Std. Dev.			
A	Cpva	1.50	1.00	2.00	0.000			
B	Cpla	1.50	1.00	2.00	0.000			
C	R w/o	5.00	2.00	8.00	0.000			
D	Mr	56000	56000	14000	N/A			
		Prediction	SE Mean	95% CI low	95% CI high	SE Pred	95% PI low	95% PI high
size		276.679	8.54	256.49	296.87	28.32	209.72	343.64
z-potential		-7.39	1.16	-10.61	-4.17	2.84	-15.29	0.51
pdi		0.155179		0.13	0.18		0.098	0.28
EE		95.815	0.60	94.42	97.21	2.01	91.19	100.44

Εικόνα 46 βέλτιστες πειραματικές συνθήκες και πιθανές τιμές αποκρίσεων σύμφωνα με τις υποδείξεις του υπολογιστικού προγράμματος "design expert".



Εικόνα 47 διαλύματα πολυγαλακτικού οξέος χωρίς (αριστερά) και με προσθήκη (δεξιά) φθαλοκανίνης αλουμινίου-χλωρίου.



Εικόνα 48 παρασκευή νανοσωματιδίων σε ήπια περιστροφή σε συσκευή rotary.



Εικόνα 49 συσκευή φυγοκέντρωσης.



Εικόνα 50 ξηρό δείγμα PLA-NPs με εγκλεισμένη AICIPc.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] H. Tye, «Application of statistical ‘design of experiments’ methods in drug discovery,» τόμ. 9, 2004.
- [2] Δ. Χατζηαβραμίδης, Διαχείριση Πόρων και Ποιότητας, Αθήνα: ΕΜΠ, 2013.
- [3] Ι. Κουτρουβέλης, Σχεδιασμός και ανάλυση πειραμάτων, Πάτρα: ΕΑΠ, 2002.
- [4] G. Sharma, «a review on nanomedical and nanosensing potential of nanoparticles».
- [5] S. K. Kulkarni, nanotechnology: principles and practices, 3rd edition.
- [6] R. J. A. J. R. F. V. Catarina Pinto Reis, «Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles,» τόμ. 2, αρ. 1: Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2006.
- [7] F. W. M. Y. Iosif Daniel Rosca, «Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation,» τόμ. 99, αρ. Journal of Controlled Release, 2004.
- [8] P. Bihari, «Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies,» τόμ. 5 :14, αρ. Particle and Fibre Toxicology, 2008.
- [9] P. K. P. M. Louis Renaud, «Zeta potential determination by streaming current modelization and measurement in electrophoretic microfluidic systems,» τόμ. 25, αρ. Electrophoresis, 2004.
- [10] Σ. Λιοδάκης, Αναλυτική Χημεία, Αθήνα: Παπασωτηρίου, 2001.
- [11] C. R. D. a. B. C. Sophie-Dorothee Clas, «Differential scanning calorimetry: applications in drug development.,» τόμ. 2, αρ. research focus, 1999.
- [12] S. A. D. C. J. F. ε. ε. έ. Γ. K. Sunil R Lakhani, Βασική Παθολογική Ανατομική, Αθήνα: ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε., 2011.
- [13] Β. Μ. Γιώργος Φούντηλας, Βασικές Αρχές Θεραπείας του Καρκίνου, Θεσσαλονίκη: UNIVERSITY STUDIO PRESS, 1997.
- [14] J.-O. Y. a. K.-S. Ha, «New Insights into the Mechanisms for Photodynamic Therapy-Induced Cancer Cell Death,» σε *International Review of Cell and Molecular Biology*, Volume 295, South Korea, Elsevier Inc, 2012.
- [15] a. P. B. J. H. M. S. – F. A. S. Martijn Triesscheijn, «Photodynamic Therapy in Oncology,» τόμ. 11, 2006.

- [16] Patrizia Agostinis, «Photodynamic Therapy of Cancer: An Update,» τόμ. doi:10.3322, 2011.
- [17] C. H. S. P. Ron R. Allison MD, «Oncologic photodynamic therapy photosensitizers:A clinical review,» τόμ. 10.1016/j.pdpdt.2010.02.001, αρ. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2010.
- [18] K. M. Ron R. Allison, «Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action,» τόμ. 10, αρ. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2013.
- [19] L. Benov, «Photodynamic Therapy:Current Status and Future Directions,» τόμ. 1011–7571/14/0241, αρ. medical principles and practice, 2014.
- [20] L. J. a. R. Boyle, «Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer?,» Τόμ. %1 από %2154, 1–3, αρ. British Journal of Pharmacology, 2008.
- [21] I. ROSENTHAL, «PHTHALOCYANINES AS PHOTODYNAMIC,» τόμ. 53, αρ. Photochemistry and Photobiology, 1991.
- [22] U. H. T. T. CHRISTIAN G. CLAESSENS, «Phthalocyanines: From Outstanding Electronic Properties to Emerging Applications,» τόμ. 8, αρ. The Chemical Record,, 2008.
- [23] M. K. Engel, «Single-Crystal and Solid-State Molecular Structures of Phthalocyanine Complexes.,» σε *The Porphyrin Handbook, Volume 20/ Phthalocyanines: Structural Characterization*, USA, Elsevier Science, 2003.
- [24] U. H. T. T. CHRISTIAN G. CLAESSENS, «Phthalocyanines: From Outstanding Electronic Properties to Emerging Applications,,» Τόμ. %1 από %2Vol. 8, 75–97, αρ. The Chemical Record, 2008.
- [25] H. O. Z. Z. I. & Y. B. Rumiana Bakalova, «Quantum dots as photosensitizers?,» τόμ. VOLUME 22 NUMBER 11, αρ. NATURE BIOTECHNOLOGY, 2004.
- [26] M. I. B. C. C.-G. Edgar Marin, «Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs,» *International Journal of Nanomedicine*, τόμ. 20, αρ. 3:8, pp. 3071-3091, 2013.
- [27] N. R. J. H. Bhuvanesh Gupta, «Poly(lactic acid) fiber: An overview,» *progress in polymer science*, τόμ. 32, pp. 455-482, 2007.
- [28] S. K. Y. S. C. Y. Avnesh Kumari, «Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems,» τόμ. 75, αρ. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010.
- [29] T. M. A. A. R. K. W. E. R. Kumaresh S. Soppimath, «Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices,» τόμ. 70, αρ. Journal of Controlled Release,

2001.

- [30] F. Alexis, «Review Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly(lactic acid) and poly[(lactic acid)-co-(glycolic acid)],» τόμ. 54, αρ. Polymer Internation, 2005.
- [31] P. L. R. a. N. A. Peppas, «A SIMPLE EQUATION FOR DESCRIPTION OF SOLUTE RELEASE I. FICKIAN AND NON-FICKIAN RELEASE FROM NON-SWELIABLE DEVICES IN THE FORM OF SLABS, SPHERES, CYLINDERS OR DISCS,» τόμ. 5, αρ. Journal of Controlled Release,, 1987.
- [32] C. S. B. Xiao Huang, «Review On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems,» τόμ. 73, αρ. Journal of Controlled Release, 2001.
- [33] L. L.Schramm, Nano- and microtechnology from A-Z.