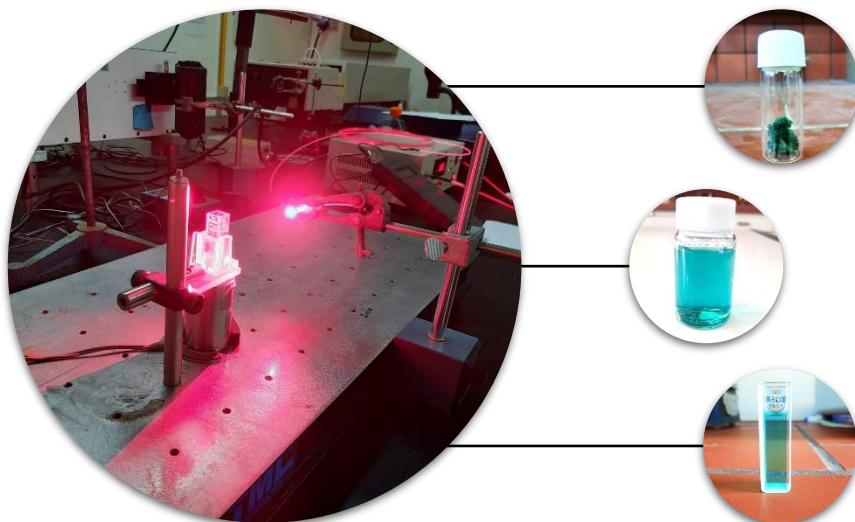




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

## Διπλωματική Εργασία

«Ανάπτυξη καινοτόμων νανοσυστημάτων για εφαρμογή στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου»



Ανάργυρος Δρόλαπας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Αναστασία Δέτση

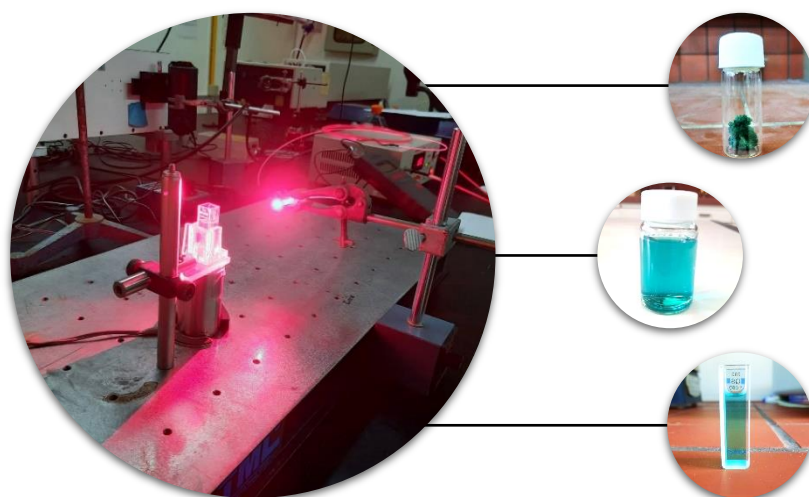
Αθήνα, Σεπτέμβριος 2022



NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF ATHENS  
SCHOOL OF CHEMICAL ENGINEERING  
DEPARTMENT I: CHEMICAL SCIENCES  
ORGANIC CHEMISTRY LABORATORY

## Diploma Thesis

«Preparation and Characterization of Supramolecular Inclusion Complexes of a Near-infrared Fluorescent Cyanine-type Photosensitizer with  $\beta$ -Cyclodextrin for Theranostic Cancer Applications»



By Anargyros Drolapas

Supervisor

Prof. Dr. Anastasia Detsi

Athens, September 2022

## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία αναπτύχθηκε κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2021-2022 στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, με επιβλέπουσα την Καθηγήτρια Αναστασία Δέτση. Στόχο της διπλωματικής εργασίας αποτελεί η πρόταση καινοτόμων συνθέσεων στη νανο-κλίμακα για την αντιμετώπιση των εμφανιζόμενων προκλήσεων κατά την κλινική εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας και διάγνωσης κατά του καρκίνου.

Η εργαστηριακή υλοποίηση της παρούσας εργασίας αποτέλεσε για εμένα μία αξιόλογη αφετηρία στον κόσμο της έρευνας. Οι γνώσεις που απέκτησα, τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο, αποτελούν μία σημαντική βάση για την εξέλιξή μου στους επιστημονικούς τομείς της Νανοτεχνολογίας και της Νανοϊατρικής, σε μεταπτυχιακό και διδακτορικό επίπεδο.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., και συγκεκριμένα την Καθηγήτρια Αναστασία Δέτση για την εποπτεία και το συντονισμό της διπλωματικής μου εργασίας, τη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Δρ. Ελένη Καβέτσου για την εύστοχη ερευνητική καθοδήγηση που μου προσέφερε, την Υποψήφια Διδάκτορα Ιωάννα Πιττερού για την καθημερινή υποστήριξή της στην εργαστηριακή υλοποίηση του θέματος, και την κ. Ζαμπία Κατσανεβάκη, μέλος ΕΔΙΠ, για την πολύτιμη βοήθειά της σε οποιαδήποτε τεχνική δυσκολία κι αν αντιμετώπιζα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Ελένη Αλεξανδράτου, μέλος ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής και Βιοϊατρικής Οπτικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών & Μηχανικών Υπολογιστών Ε.Μ.Π., για την άψογη συνεργασία μας κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων μελέτης οπτικών ιδιοτήτων και τον Δρ. Κυριάκο Προυσή, ερευνητή του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, για την παροχή της δραστικής ένωσης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους φίλους μου, και συγκεκριμένα την Ευαγγελία, το Φώτη, τη Μαρία και τη Νεφέλη, που πιστεύουν σε εμένα και στις ιδέες μου, με την ανθρώπινη και αυθεντική στάση τους να με γεμίζει έμπνευση και αισιοδοξία για το μέλλον.

## Περίληψη

Η Φωτοδυναμική Διάγνωση (PDD) και Θεραπεία (PDT) αποτελεί ιδιαίτερα καινοτόμο προσέγγιση για την αντιμετώπιση μεταστατικών καρκίνων, επιτρέποντας ταυτόχρονη απεικόνιση και εξάλειψη του καρκινικού όγκου (Theranostics). Οι κυανίνες αποτελούν υποψήφιους φωτοευαίσθητοποιητές (PS) με εξαιρετικές οπτικές ιδιότητες, καθώς απορροφούν και εκπέμπουν ακτινοβολία στην εγγύς υπέρυθρη περιοχή (750-1000 nm), εξυπηρετώντας βαθύτερη διείσδυση του φωτός στον καρκινικό ιστό, ενώ παράλληλα παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) κατόπιν ακτινοβόλησης. Ο εγκλωβισμός των φωτοευαίσθητοποιητών εγγύς υπέρυθρου σε βιοσυμβατά νανοσυστήματα μεταφοράς, αποτελεί μία υποσχόμενη στρατηγική για την αντιμετώπιση των προκλήσεων που εμφανίζονται κατά την κλινική εφαρμογή θεραπευτικών οργανικών μορίων, όπως η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και βιοδιαθεσιμότητα, η φωτοαποδόμηση και η συσσωμάτωση.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος kneading για την σύνθεση συμπλόκων εγκλωβισμού (ICs) στη νανο-κλίμακα, μεταξύ της κυανίνης IR-786 Iodide και διαφόρων φορέων κυκλοδεξτρίνης, συμπεριλαμβανομένων της β-κυκλοδεξτρίνης (β-CD), της γ-κυκλοδεξτρίνης (γ-CD), καθώς και του τροποποιημένου παραγώγου της β-CD, 2-υδροξυπροπυλ-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD). Το προφίλ αποδέσμευσης της κυανίνης IR-786 τροποποιήθηκε περαιτέρω φορτώνοντας το σύμπλοκο HP-β-CD:IR-786 Iodide IC σε νανοσωματίδια χιτοζάνης (CS NPs), τα οποία παρασκευάστηκαν μέσω της τεχνικής ιονική πηκτωμάτωση. Τα παραγόμενα ICs και CS NPs χαρακτηρίστηκαν μέσω διαφόρων αναλυτικών τεχνικών, όπως DLS, ATR-FTIR, UV-VIS, και φασματοφωτομετρία φθορισμού. Η απόδοση εγκλωβισμού των συντεθειμένων ICs προσδιορίστηκε μέσω της φασματοφωτομετρίας UV-Vis και προέκυψε υψηλότερη από 70% σε κάθε περίπτωση. Η μέση υδροδυναμική διάμετρος των ICs σε υδατική διασπορά κυμάνθηκε από 147.3 έως 203.4 nm, με τιμές δείκτη πολυδιασποράς της τάξης του 0.450, ενώ το ζ-δυναμικό κυμάνθηκε από +27.5 mV έως +32.1 mV, υποδεικνύοντας ικανοποιητική κολλοειδή σταθερότητα.

Αναφορικά με τις οπτικές ιδιότητες, η συμπλοκοποίηση του φωτοευαίσθητοποιητή με την HP-β-CD, περιόρισε την τάση δημιουργίας διμερών συσσωματωμάτων της κυανίνης στην υδατική φάση, όπως προσδιορίστηκε από τη φασματοφωτομετρία UV-Vis. Οι μελέτες της κινητικής φωτοαποδόμησης και παραγωγής ROS, πραγματοποιήθηκαν κατόπιν ακτινοβόλησης με κόκκινο laser σε pH=7.4, με σκοπό την αξιολόγηση της φωτοσταθερότητας, και της ικανότητας της ελεύθερης και της συμπλοκοποιημένης κυανίνης να παράγει ROS. Ανάμεσα στους εξεταζόμενους φορείς, η HP-β-CD προσέφερε την υψηλότερη φωτοσταθερότητα στην κυανίνη, καθώς και τον υψηλότερο ρυθμό παραγωγής ROS. Ενδιαφέρον παρουσίασε η μελέτη φωτοαποδόμησης των CS NPs, όπου παρατηρήθηκε αύξηση της απορρόφησης της κυανίνης εντός 4 λεπτών ακτινοβόλησης, σηματοδοτώντας αποκρινόμενη αποδέσμευση στην ακτινοβολία. Τέλος, τα CS NPs παρουσίασαν χαμηλότερο ρυθμό παραγωγής ROS από το σύμπλοκο HP-β-CD:IR-786 Iodide IC, αποδεικνύοντας την παρατεταμένη αποδέσμευση του νανοσυστήματος.

**Λέξεις κλειδιά:** Φωτοδυναμική Θεραπεία & Διάγνωση, Καρκίνος, Νανοςύστημα, Σύμπλοκα εγκλωβισμού, Φωτοευαίσθητοποιητής, Κυανίνη, Χρωστική Εγγύς Υπερύθρου, Κυκλοδεξτρίνη, Χιτοζάνη, Φωτοπροστασία, Οξειδωτικό Στρες

**Επιστημονικό πεδίο:** Νανοϊατρική, Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία, Νανοφωτονική

## Abstract

Photodynamic Diagnosis (PDD) and Therapy (PDT) is a novel approach for cancer theranostics and imaging-guided treatment of metastatic tumors. Heptamethine cyanine dyes are potential Photosensitizers (PS) with excellent optical properties, as they can absorb and emit light in the near-infrared range (750–1000 nm), improving light penetration through cancer tissue, while generating Reactive Oxygen Species (ROS) upon irradiation. The encapsulation of NIR-photosensitizing dyes in biocompatible drug delivery nanosystems, is a promising strategy to overcome challenges commonly presented during the administration of organic theranostic probes, such as poor aqueous solubility and bioavailability, photobleaching and aggregation.

In the present work, the kneading method was utilized to prepare nanosized inclusion complexes (ICs) of the cyanine IR-786 Iodide with different cyclodextrin carriers, including  $\beta$ -Cyclodextrin ( $\beta$ -CD),  $\gamma$ -Cyclodextrin ( $\gamma$ -CD), as well as the chemically modified  $\beta$ -CD derivative, 2-hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD). The release profile of IR-786 was further modified by loading the HP- $\beta$ -CD:IR-786 Iodide IC in chitosan nanoparticles (CS NPs), prepared with the ionic gelation method. The obtained ICs and CS NPs were characterized using various analytical techniques, including DLS, ATR-FTIR, UV-Vis and Fluorescence spectroscopy.

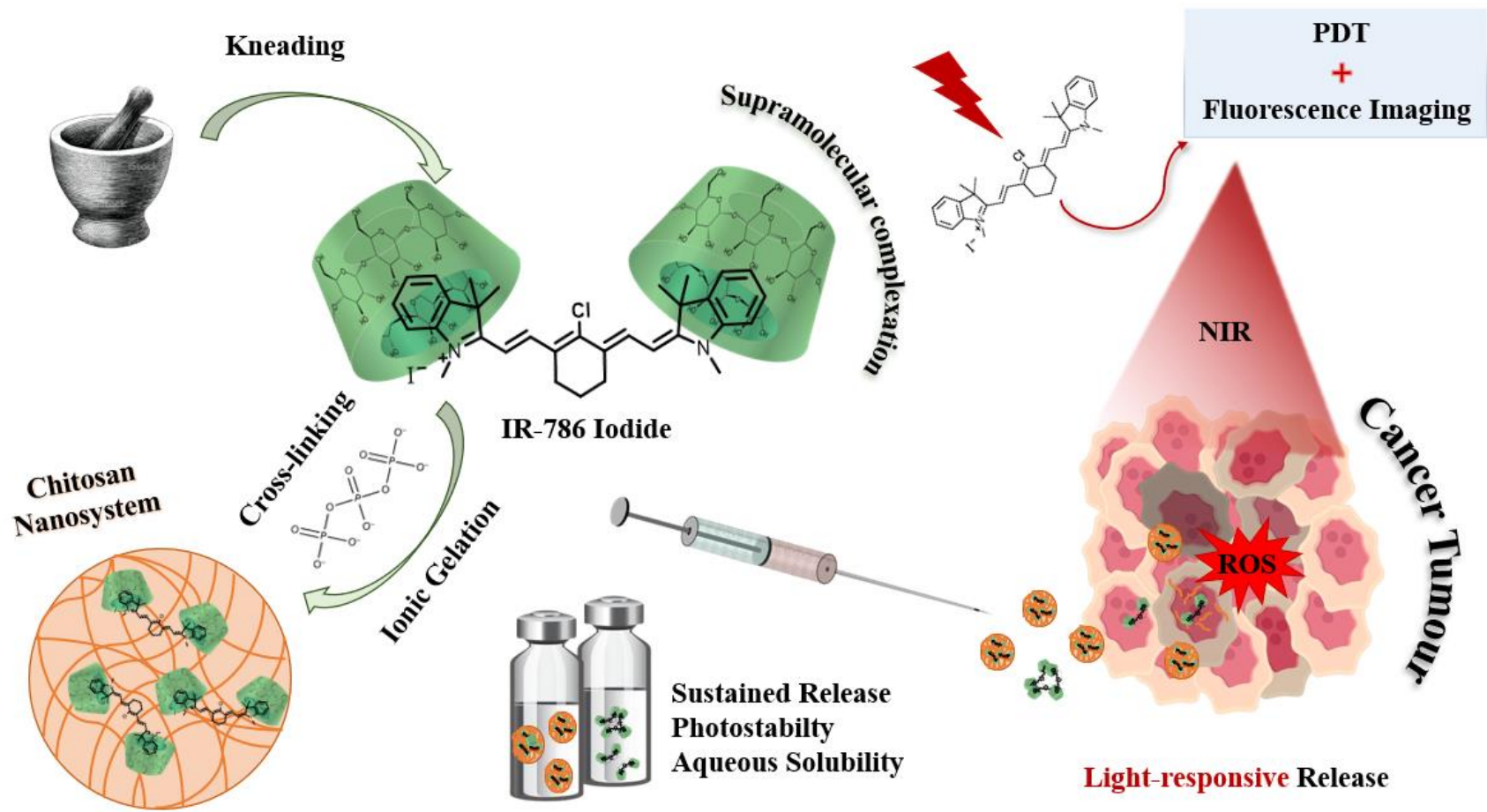
Inclusion efficiency of the obtained ICs was determined via UV-Vis and was found higher than 70% for each case. Regarding the synthesis of CS NPs, a high entrapment efficiency of cyanine was achieved using the final freeze-dried product. The average hydrodynamic size of ICs in aqueous dispersion ranged from 147.3 to 203.4 nm with polydispersity index values in the magnitude of 0.450, while zeta potential ranged from +27.5 mV to +32.1 mV, indicating sufficient stability in aqueous dispersion.

Regarding optical properties, the supramolecular complexation of the photosensitizer IR-786 Iodide with HP- $\beta$ -CD, restricted cyanine's tendency to form dimeric aggregates in aqueous media, as observed via UV-Vis spectrometry. Photobleaching kinetics and ROS generation studies were conducted upon red laser irradiation at pH=7.4, in order to evaluate the photostability and ROS production capacity of free and encapsulated IR-786 Iodide in cyclodextrin ICs, respectively. Among the studied carriers, HP- $\beta$ -CD offered the highest photostability to IR-786, as well as the highest ROS generation rate. Interestingly, regarding the photobleaching study of CS NPs, cyanine's absorbance increased during the first 4 min of irradiation, signifying light-responsive release of the encapsulated photosensitizer. Furthermore, CS NPs exhibited slower rate of ROS production in comparison to the HP- $\beta$ -CD IC, proving the sustained release feature of the final formulation.

**Key words:** Photodynamic Therapy & Diagnosis (PDT & PDD), Cancer, Nanosystem, Inclusion Complexes, Photosensitizer, Cyanine, Near-infrared Dye, Cyclodextrin, Chitosan, Photoprotection, Oxidative Stress

**Scientific field:** Nanomedicine, Pharmaceutical Nanotechnology, Nanophotonics.

# Graphical Abstract



## Παρουσιάσεις σε Διεθνή Συνέδρια

Η υπογράμμιση υποδηλώνει προφορική παρουσίαση της εργασίας από εμένα (**presenting author**) στα παρακάτω Διεθνή Συνέδρια:

**ΔΣ1. Anargyros Drolapas**, Ioanna Pitterou, Eleni Kavetsou, Eleni Alexandratou, Kyriakos Prousis, Anastasia Detsi, *Preparation and Characterization of Supramolecular Inclusion Complexes of a Near-infrared Fluorescent Cyanine-type Photosensitizer with  $\beta$ -Cyclodextrin for Theranostic Cancer Applications*, Athens Summer School on Organic Synthesis 2022 (ASSOS2022), 7-9 July **2022**, Athens, Greece, Book of Abstracts p.41.

**ΔΣ2. Anargyros Drolapas**, Ioanna Pitterou, Eleni Kavetsou, Eleni Alexandratou, Kyriakos Prousis, Anastasia Detsi, *Development of Novel Nanosystem for Bio-imaging and Photodynamic Cancer Therapy: The Case of  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes with a Near-infrared Cyanine-type Photosensitizer*, 10<sup>th</sup> International Conference on Oxidative Stress in Skin Medicine and Biology, 15-18 September **2022**, Andros, Greece. Book of Abstracts p.114.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>Πρόλογος</b> .....	3
<b>Περίληψη</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	5
<b>Graphical Abstract</b> .....	6
<b>Παρουσιάσεις σε Διεθνή Συνέδρια</b> .....	7
<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	8
<b>Συνοτομογραφίες</b> .....	11
<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ</b> .....	12
<b>Κεφάλαιο 1. Καρκίνος</b> .....	12
1.1 Καρκίνος: Ορισμός και Αποσαφήνιση Εννοιών .....	12
1.2 Επιδημιολογία του Καρκίνου .....	14
1.3 Παθοφυσιολογία και Ανατομία του Καρκινικού Όγκου.....	16
1.4 Συμβατικές Θεραπευτικές Προσεγγίσεις: Προκλήσεις .....	18
1.4.1 Χειρουργική Επέμβαση .....	18
1.4.2 Χημειοθεραπεία.....	18
1.4.3 Ακτινοθεραπεία .....	20
1.4.4 Ανοσοθεραπεία.....	21
1.4.5 Υπερθερμία.....	21
<b>Κεφάλαιο 2. Φωτοδυναμική Θεραπεία (PDT)</b> .....	22
2.1 Ιστορική Αναδρομή και Βασικές Αρχές.....	22
2.2 Μηχανισμός και Στοιχεία Φωτοχημείας .....	23
2.3 Οξειδωτικό Στρες & Απόπτωση.....	24
2.4 Φωτοευαισθητοποιητές (PSs).....	26
2.3 Ταυτόχρονη Θεραπεία & Διάγνωση (Theranostics) .....	29
2.4 Κλινική Εφαρμογή και Προκλήσεις.....	31
<b>Κεφάλαιο 3. Νανοϊατρική</b> .....	35
3.1 Τι ονομάζεται Νανοϋλικό; .....	35
3.2 Νανοϋλικά για τη Θεραπεία και Διάγνωση του Καρκίνου .....	37
3.3 Νανοδομημένα Τροποποιημένα Αποδέσμευση: Στόχευση στα Καρκινικά Κύτταρα .....	38
3.4 Νανοτοξικότητα .....	41
<b>Κεφάλαιο 4. Μελέτη Περίπτωσης: Υπερμοριακά Σύμπλοκα (Supramolecular Host-Guest Complexes) ως Φορείς Φωτοευαισθητοποιητών Εγγύς Υπερύθρου (NIR PSs)</b> .....	42
4.1 Εισαγωγή.....	42
4.2 Φωτοευαισθητοποιητές Εγγύς Υπερύθρου (NIR PSs).....	43



4.2.1 Κυανίνες.....	46
4.2.2 Η Κυανίνη IR-786 Iodide.....	49
4.3 Κυκλοδεξτρίνες.....	51
4.3.1 Κυκλοδεξτρίνες ως Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων .....	51
4.3.2 Τεχνικές Σύνθεσης Συμπλόκων Εγκλωβισμού (ICs) .....	54
4.4 Νανοσυστήματα με βάση τη Χιτοζάνη .....	56
4.4.1 Εισαγωγή.....	56
4.4.2 Σύνθεση Νανοσωματιδίων Χιτοζάνης μέσω Φαινομένων Αυτοσυναρμογής (Self-assembled CS NPs).....	57
4.5 Χαρακτηρισμός Νανοϋλικών .....	59
4.5.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering) .....	59
4.5.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier & Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (Attenuated Total Reflectance Fourier Transmittance Infrared Spectroscopy) .....	65
4.5.3 Μελέτη Προφίλ Αποδέσμευσης (Release Studies) .....	67
4.5.4 Μελέτη Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species Generation).....	69
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>71</b>
5.1 Σκοπός.....	71
5.2 Όργανα & Αντιδραστήρια .....	72
5.3 Ανάπτυξη νανοσυστημάτων μεταφοράς της κυανίνης IR-786 Iodide .....	73
5.3.1 Σύνθεση συμπλόκων εγκλωβισμού (ICs).....	73
5.3.2 Σύνθεση νανοσωματιδίων χιτοζάνης (CS NPs).....	74
5.4 Χαρακτηρισμός Νανοϋλικών .....	78
5.4.1 Απόδοση Διεργασίας.....	78
5.4.2 Απόδοση Εγκλωβισμού.....	78
5.4.3 Προφίλ Αποδέσμευσης της IR-786 Iodide από τα Νανοσυστήματα Μεταφοράς ( <i>in vitro</i> Release Study) .....	82
5.4.4 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering) .....	86
5.4.5 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier: Τεχνική Ολικής Αποσβένουσας Ανάκλασης (ATR-FTIR) .....	91
5.4.6 Οπτικές Ιδιότητες .....	92
5.4.6.1 Μελέτη Κινητικής Φωτοαποδόμησης (Photobleaching Kinetics Study) .....	92
5.4.6.2 Μελέτη Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species Generation).....	94
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>95</b>
6.1 Απόδοση Διεργασίας.....	95
6.2 Απόδοση Εγκλωβισμού.....	96

6.3 Προφίλ Αποδέσμευσης.....	98
6.4 Δυναμική Σκέδαση Φωτός .....	102
6.5 Δομικός χαρακτηρισμός μέσω φασματοσκοπίας ATR-FTIR .....	108
6.6 Οπτικές ιδιότητες.....	118
6.6.1 Κινητική Φωτοαποδόμησης (Photobleaching).....	118
6.6.2 Μελέτη Παραγωγής ROS .....	135
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>139</b>
<b>ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ.....</b>	<b>141</b>
<b>ΣΥΝΕΙΣΦΟΡΑ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΚΤΑΣΕΙΣ .....</b>	<b>142</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>143</b>
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I: Διαγράμματα Αυτοσυσχέτισης .....	153
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II: Φάσματα ATR-FTIR .....	155
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III: Φάσματα Φθορισμού κατά τη Μελέτη Παραγωγής ROS .....	158

## Συντομογραφίες

Ορολογία	Συντομογραφία
Μικροπεριβάλλον καρκινικού όγκου (Tumor microenvironment)	TME
Food and Drug Administration	FDA
Φωτοδυναμική θεραπεία (Photodynamic therapy)	PDT
Φωτοευαισθητοποιητής (Photosensitizer)	PS
Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species)	ROS
Φωτοδυναμική Διάγνωση (Photodynamic Diagnosis)	PDD
5-αμινολεβουλινικό οξύ	5-ALA
Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering)	DLS
Enhanced Permeability and Retention effect	EPR
Near Infra-Red Fluorescence Imaging	NIRF
Heptamethine Cyanine Dyes	HMCDs
β-κυκλοδεξτρίνη	β-CD
2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη	HP-β-CD
γ-κυκλοδεξτρίνη	γ-CD
Σύμπλοκα Εγκλωβισμού (Inclusion complexes)	ICs
Χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους	CS LMW
Τριπολυφωσφορικό Νάτριο	TPP
Νανοδοματίδια Χιτοζάνης	CS NPs
Δείκτης Πολυδιασποράς (Polydispersity Index)	PDI
Διχλωροφλουορεσκεΐνη (Dichlorofluorescein)	DCF

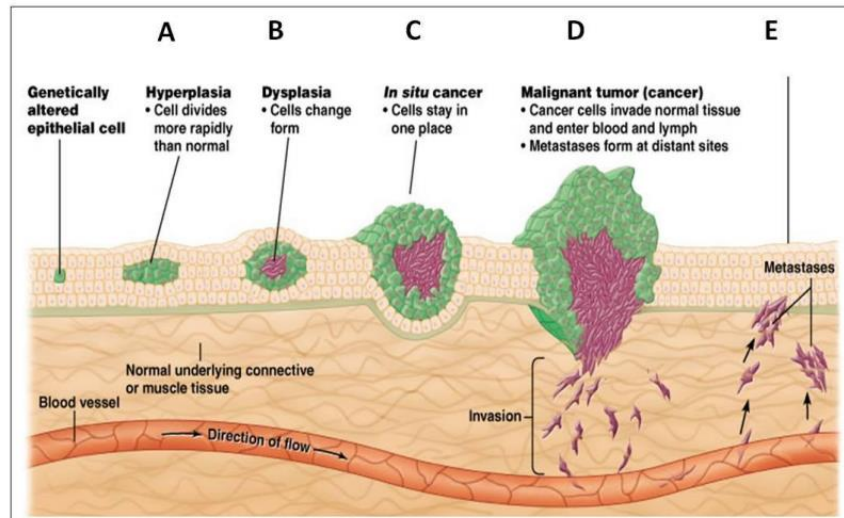
## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ

### Κεφάλαιο 1. Καρκίνος

#### 1.1 Καρκίνος: Ορισμός και Αποσαφήνιση Εννοιών

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization), ο όρος «καρκίνος» αναφέρεται σε μία ευρεία ομάδα ασθενειών, οι οποίες δύναται να εκδηλωθούν σε οποιοδήποτε όργανο ή ιστό του οργανισμού, όταν παρουσιάζονται ανώμαλα κύτταρα που αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και διαφεύγουν από τα φυσιολογικά τους όρια, με αποτέλεσμα να εισβάλουν σε γειτνιάζουσες περιοχές του σώματος ή/και να εξαπλώνονται σε άλλα όργανα. Η τελευταία διαδικασία ονομάζεται «μετάσταση» και αποτελεί κύρια αιτία θανάτου προκαλούμενη από καρκίνο. Το νεόπλασμα και ο κακοήθης όγκος αποτελούν εναλλακτικούς όρους για την περιγραφή του καρκίνου. [1]

Η ανάπτυξη ενός καρκινικού όγκου πραγματοποιείται μέσω μίας αλυσίδας σταδίων που παρουσιάζονται αναλυτικά στο **Σχήμα 1.1**. Αρχικά, το αρχέγονο καρκινικό κύτταρο, το οποίο έχει δεχτεί κάποιο μεταλλαξιογόνο ερέθισμα, αναπαράγεται ανεξέλεγκτα και με ταχύτερο ρυθμό συγκριτικά με τα υγιή κύτταρα, συνιστώντας το στάδιο της Υπερπλασίας (A). Στο επόμενο στάδιο ανάπτυξης του καρκινικού όγκου, που ονομάζεται Δυσπλασία (B), τα καρκινικά κύτταρα μεταβάλουν την αρχική τους μορφή, με αποτέλεσμα ο όγκος πλέον να συνίσταται κυρίως από ανώριμα κύτταρα. Ακολουθεί η δημιουργία Καρκινώματος *in situ* (C), όπου τα κύτταρα που πλέον δεν υπόκεινται στη διαδικασία της ωρίμανσης, χάνουν τη συνάφεια με τον ιστό και αναπαράγονται χωρίς έλεγχο. Όταν τα καρκινικά κύτταρα ξεκινήσουν να εισβάλουν σε γειτνιάζουσες περιοχές διαρρηγνύοντας τη μεμβράνη του ιστού, τότε γίνεται λόγος για τη δημιουργία του Κακοήθη Όγκου (D). Τέλος, η Μετάσταση (E) πραγματοποιείται όταν τα καρκινικά κύτταρα φθάσουν σε απομακρυσμένες περιοχές του οργανισμού μέσω του λεμφικού συστήματος και της κυκλοφορίας του αίματος. [2]



**Σχήμα 1.1.** Στάδια ανάπτυξης κακοήθους όγκου και μηχανισμός δημιουργίας καρκινικών μεταστάσεων. (Α: Υπερπλασία, Β: Δυσπλασία, Γ: Καρκίνωμα *in situ*, Δ: Κακοήθους καρκινικός όγκος, Ε: Δημιουργία μετάστασης). [2]

Υπάρχουν πάνω από 100 διαφορετικοί τύποι καρκίνου, οι οποίοι συνήθως ονομάζονται με βάση το όργανο ή τον ιστό, από όπου προέρχονται. Οι τύποι του καρκίνου δύναται να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω σε δύο κύριες κατηγορίες, τους στερεούς όγκους (solid tumors) και τους αιματολογικούς καρκίνους (blood cancers). Ακόμα, ο καρκίνος μπορεί να κατηγοριοποιηθεί με βάση το είδος του κυττάρου από το οποίο σχηματίστηκε (λ.χ. επιθηλιακό ή ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα). Στον **Πίνακα 1.1** παρουσιάζονται αναλυτικά οι κυριότεροι τύποι καρκίνων. [3]

**Πίνακας 1.1** Κυριότερες κατηγορίες καρκίνων που εκδηλώνονται σε συγκεκριμένο τύπο κυττάρων. [3]

Όνομασία	Συνοπτική Περιγραφή
Καρκίνωμα	Ο πιο συχνός τύπος καρκίνου. Σχηματίζεται από επιθηλιακά κύτταρα και ανάλογα με το είδος διακρίνεται σε: Αδενοκαρκίνωμα, Βασιλοκυτταρικό, Ακανθοκυτταρικό & Ουροθηλιακό Καρκίνωμα
Σάρκωμα	Σχηματίζεται στα οστά (Οστεοσάρκωμα) και στους μαλακούς ιστούς, περιλαμβάνοντας μύες, λιπώδη ιστό, λεμφαγγεία, τένοντες & αιμοφόρα αγγεία.
Λευχαιμία	Ξεκινά στο μυελό των οστών. Δε σχηματίζονται στερεοί όγκοι (αιματολογικός καρκίνος), αλλά παρουσιάζεται υπέρμετρη αύξηση ανώριμων λευκών αιμοσφαιρίων στο αίμα και στον μυελό των οστών.
Λέμφωμα	Σχηματίζεται σε λεμφοκύτταρα (T ή B), με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ανώριμων λεμφοκυττάρων στους λεμφαδένες και στα λεμφαγγεία.
Πολλαπλό Μυέλωμα	Εμφανίζεται στα πλασματοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στο μυελό των οστών και να δημιουργούν όγκους στα οστά ολόκληρου του οργανισμού.
Μελάνωμα	Συνήθως εμφανίζεται στα μελανοκύτταρα του δέρματος, αλλά και σε άλλα όργανα, όπως οι οφθαλμοί.
Γλοίωμα	Εγκεφαλικός όγκος που αναπτύσσεται από νευρογλοιακά κύτταρα.

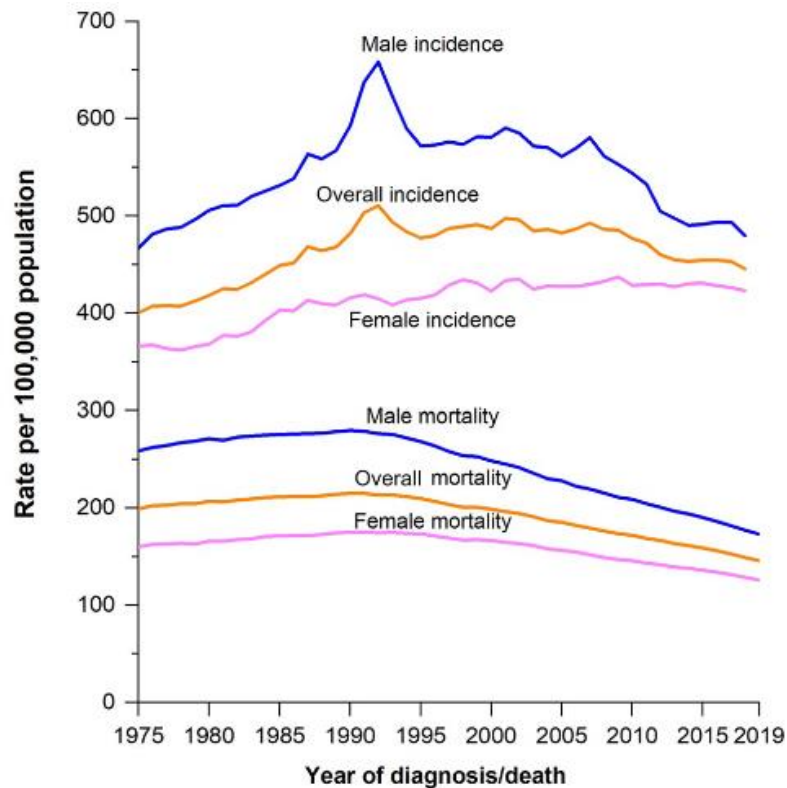
## 1.2 Επιδημιολογία του Καρκίνου

Ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη κατά σειρά αιτία θανάτου παγκοσμίως μετά τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Σύμφωνα με την παγκόσμια μελέτη του οργανισμού Global Burden of Disease (GBD) το 2015, τα ποσοστά θνησιμότητας και αναπηρίας εξαιτίας της νόσησης από καρκίνο, ελαττώθηκαν μεταξύ των ετών 2005 και 2015, παρόλο που η παγκόσμια συχνότητα εμφάνισης καρκίνου παρουσίασε αύξηση στην παραπάνω περίοδο. Ωστόσο, η βελτίωση στα ποσοστά επιβίωσης των καρκινοπαθών αφορά μόνο στην περίπτωση των ανεπτυγμένων χωρών, όπου υπάρχουν διαθέσιμες εξελιγμένες ιατρικές παροχές, σε πλήρη αντιδιαστολή με τις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου η πρόσβαση σε διαγνωστικά τεστ και αντικαρκινικές θεραπείες είναι αρκετά περιορισμένη. Σε συνδυασμό με το παραπάνω, η προοπτική των τεχνικών πρόληψης του καρκίνου, όπως ο εμβολιασμός και τα προγράμματα απεξάρτησης από το κάπνισμα, δεν βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή σε κοινωνικοοικονομικά υποβαθμισμένες πληθυσμιακές ομάδες. Αυτό έχει οδηγήσει σε υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου σε χώρες χαμηλού εισοδήματος. Για την περαιτέρω ανάπτυξη του ελέγχου της νόσου, απαιτείται κατάλληλη διάθεση οικονομικών πόρων για την πρόληψη, έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου. Από την ίδια μελέτη προέκυψε ότι οι συχνότεροι τύποι καρκίνου είναι αυτοί του προστάτη, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου στους άντρες, και αναφορικά με τις γυναίκες κυριαρχούν ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα και του παχέος εντέρου, σε φθίνουσα σειρά αντίστοιχα. Στους εφήβους και στους νεαρούς ενήλικες, ηλικίας 15 έως 39 ετών, για τους οποίους η πρόληψη και η έγκαιρη διάγνωση διακατέχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο, οι πιο συχνές περιπτώσεις νόσησης σε παγκόσμιο επίπεδο αφορούν στον καρκίνο του μαστού και της μήτρας, ενώ τη μεγαλύτερη θνησιμότητα εμφανίζουν η λευχαιμία και ο καρκίνος του ήπατος. [4]

Τα αποτελέσματα της στατιστικής μελέτης από τη μη κερδοσκοπική οργάνωση American Cancer Society (Ιανουάριος 2022), φανερώνουν ότι την τελευταία δεκαετία η πρόοδος για τον καρκίνο του μαστού και του προστάτη έχει παραμείνει στάσιμη, αλλά έχει ενισχυθεί για τον καρκίνο του πνεύμονα, στο πλαίσιο αλλαγών στην κλινική πρακτική, και συγκεκριμένα στους προσυμπτωματικούς ελέγχους ή/και στη θεραπεία του καρκίνου. [5]

Στο **Σχήμα 1.2** παρουσιάζονται οι μακροπρόθεσμες τάσεις εμφάνισης καρκίνου στον πληθυσμό των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής. Τα στατιστικά δεδομένα αντανακλούν μεταβολές σε μοτίβα συμπεριφορών σχετιζόμενων με τον κίνδυνο έκθεσης σε καρκινογόνους παράγοντες, καθώς και με αλλαγές στην κλινική πρακτική, όπως τα διαγνωστικά τεστ. Για παράδειγμα, η κορυφή που εμφανίζεται στην τάση εμφάνισης καρκίνου στους άντρες κατά τις αρχές της δεκαετίας του 1990, σχετίζεται με την αύξηση στην ανίχνευση ασυμπτωματικών περιπτώσεων με καρκίνο του προστάτη, ως αποτέλεσμα της εκτεταμένης διενέργειας του διαγνωστικού τεστ Ειδικού Προστατικού Αντιγόνου (PSA) από άντρες που δεν είχαν προηγουμένως ελεγχθεί. Συνολικά η τάση εμφάνισης καρκίνου στους άντρες παρουσίασε μείωση από τις αρχές της δεκαετίας 1990 έως το 2013 και στη συνέχεια σταθεροποιήθηκε έως το 2018. Για την περίπτωση των γυναικών, η τάση εμφάνισης καρκίνου ήταν σχετικά σταθερή μέχρι τα μέσα της δεκαετίας 2010, αλλά παρουσιάζει ελαφριά αύξηση (0.2% ανά έτος) τα τελευταία έτη.

Συνεπώς, το χάσμα στην τάση εμφάνισης καρκίνου μεταξύ των δύο φύλων μειώνεται σταδιακά, με την αναλογία του ρυθμού εμφάνισης στους άντρες ως προς τον αντίστοιχο ρυθμό των γυναικών, να μειώνεται από την τιμή 1.39 που σημείωνε το 1995, στην τιμή 1.14 του 2018. [5]

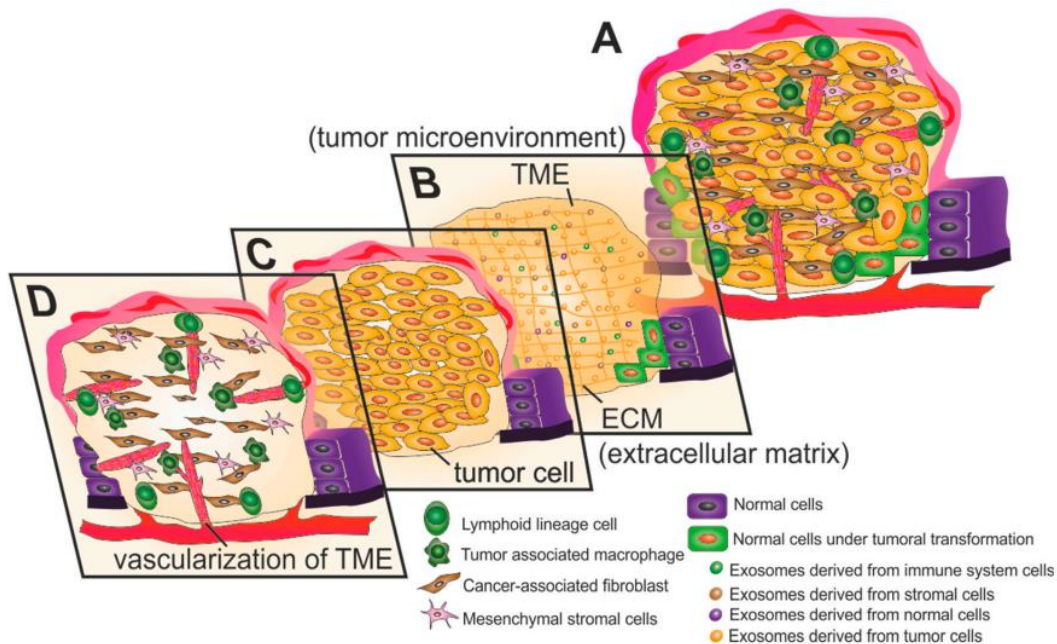


**Σχήμα 1.2** Δεδομένα τάσεων εμφάνισης καρκίνου (Cancer Incidence) και θνησιμότητας λόγω καρκίνου (Cancer Mortality) στον πληθυσμό των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής κατά το διάστημα 1975-2019. [5]

Να σημειωθεί ότι στην παραπάνω μελέτη, τα στατιστικά δεδομένα διακόπτονται στη χρονολογία 2019, καθώς το 2020 η διάγνωση και η θεραπεία του καρκίνου επηρεάστηκαν αρνητικά από την έξαρση της νόσου COVID-19. Συγκεκριμένα, η περιορισμένη πρόσβαση σε ιατρική περίθαλψη λόγω των περιοριστικών μέτρων και ο φόβος έκθεσης στον ιό SARS-CoV-2, οδήγησαν σε καθυστερήσεις στις διαγνώσεις και στις θεραπείες, με αποτέλεσμα η τάση εμφάνισης καρκίνου να παρουσιάζει βραχυπρόθεσμα μείωση και η τάση θνησιμότητας αύξηση, αντίστοιχα. Ωστόσο, για την ποσοτικοποίηση των παραπάνω, καθώς και άλλων δευτερογενών συνεπειών της πανδημίας σε επίπεδο πληθυσμού, απαιτούνται αρκετά χρόνια λόγω της καθυστέρησης στη διάδοση των δεδομένων παρακολούθησης βάσει πληθυσμού. Για τους προηγούμενους λόγους οι χρονολογίες μετά το ξέσπασμα της πανδημίας, δεν παρέχουν στατιστικά αξιόπιστα δεδομένα για την εξαγωγή συμπερασμάτων αναφορικά με τον καρκίνο και δεν λαμβάνονται υπόψιν στις στατιστικές μελέτες του 2022. [5]

### 1.3 Παθοφυσιολογία και Ανατομία του Καρκινικού Όγκου

Η δομική ανομοιογένεια του καρκινικού όγκου εντείνεται κατά την πρόοδο της νόσου, παράλληλα με την ωρίμανσή των κυτταρικών και μη-κυτταρικών στοιχείων της μικροανατομικής δομής του καρκίνου, η οποία ονομάζεται μικροπεριβάλλον του όγκου (Tumor microenvironment, ή σύντομα TME). Το TME συνίσταται από την εξωκυττάρια μήτρα, τα στρωματικά κύτταρα (λ.χ. ινοβλάστες, μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα, περικύτταρα, αδιποκύτταρα, αιμοφόρα και λεμφικά αγγειακά δίκτυα) και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (T και B λεμφοκύτταρα και μακροφάγα). Στο **Σχήμα 1.3** παρουσιάζονται αναλυτικά οι ανατομικές λεπτομέρειες ενός στερεού κακοήθου όγκου. [6]

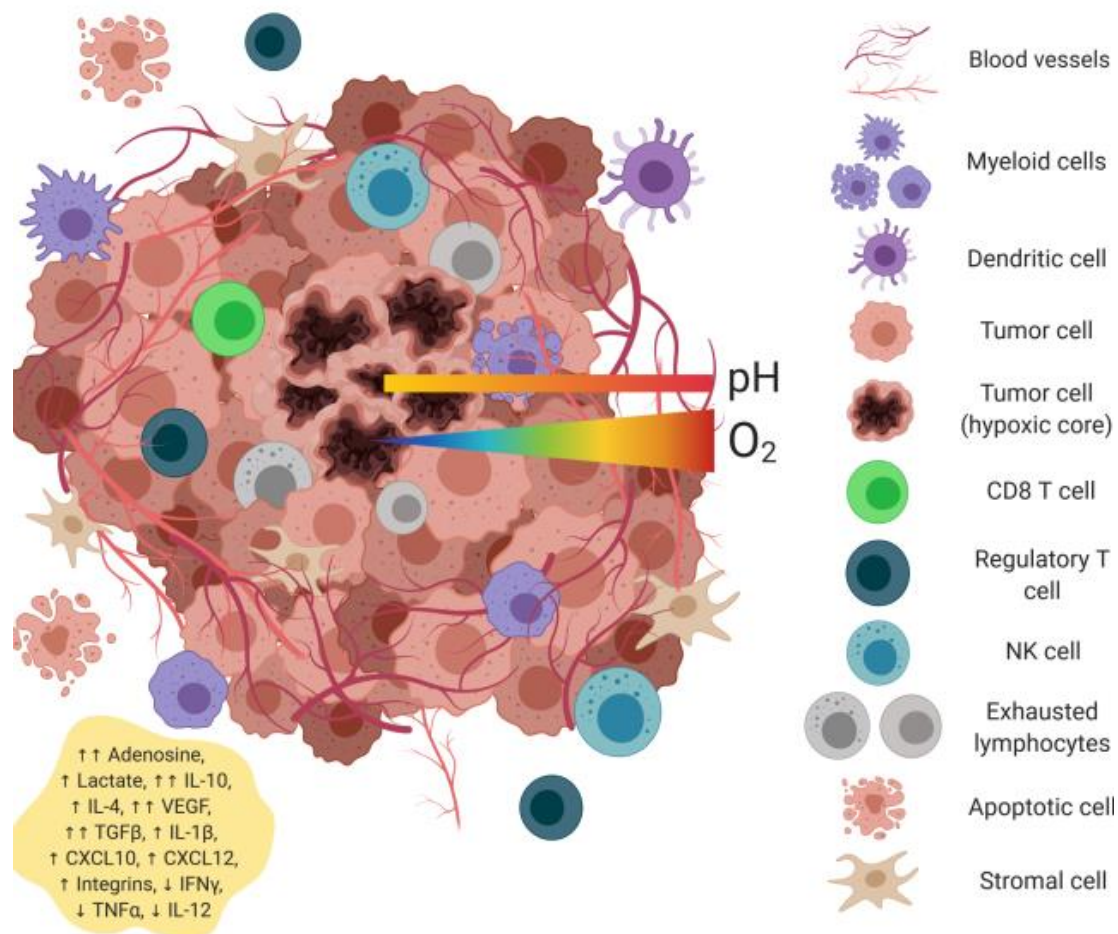


**Σχήμα 1.3** Ανατομία του μικροπεριβάλλοντος του καρκινικού όγκου (TME). (A: Αναπαράσταση της πολυπλοκότητας του TME σε προοδευμένους στερεούς όγκους. B: Εξωκυττάρια μήτρα του TME. C: Η ταχεία ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων οδηγεί στη δημιουργία περιοχών υποξίας και έλλειψης θρεπτικών συστατικών στο TME (φαινόμενο Warsburg), με αποτέλεσμα την υποκίνηση της αναερόβιας γλυκολυτικής οδού D: Η ταχεία ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων επάγει την αγγειογένεση, και κατ'επέκταση τη δημιουργία ενός πολύπλοκου αγγειακού δικτύου στο TME. [6])

Οι γενετικές τροποποιήσεις που έχουν υποστεί τα καρκινικά κύτταρα οδηγούν στη δημιουργία υπερπλασίας, ανεξέλεγκτης ανάπτυξης, αντίστασης στην απόπτωση και υποκίνηση του μεταβολισμού προς την οδό της αναερόβιας γλυκόλυσης (φαινόμενο Warsburg). Τα παραπάνω δημιουργούν συνθήκες υποξίας, οξειδωτικού στρες και οξέωσης εντός του TME, πυροδοτώντας αποκρίσεις από την εξωκυττάρια μήτρα, τα γειτνιάζονται στρωματικά κύτταρα, τα λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα, με αποτέλεσμα την επαγωγή αγγειογένεσης, η οποία οδηγεί τελικά σε μετάσταση. [6]



Αναλυτικότερα, οι ιδιάζουσες μεταβολικές δραστηριότητες εντός του TME διαφοροποιούν τον καρκινικό ιστό από τον υγιή, καθώς ο καρκινικός όγκος χαρακτηρίζεται από αυξημένη οξύτητα, υποξία, υψηλή συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, μειωμένα επίπεδα γλυκόζης, πρωτεωμικές μεταβολές και πρόσληψη στρωματικών και ανοσοποιητικών κυττάρων. [7] Μάλιστα, φυσικοχημικές ιδιότητες όπως η συγκέντρωση του οξυγόνου και το pH δεν είναι ομοιόμορφα κατανομημένες στο TME, αλλά παρουσιάζουν διαμερισματοποίηση ως προς το χώρο, δεδομένης της δομικής πολυπλοκότητας των καρκινικών όγκων. Όπως παρατηρείται και στο **Σχήμα 1.4**, όσο αυξάνεται η απόσταση από το αγγειακό δίκτυο του όγκου, οι συγκεντρώσεις του οξυγόνου και της γλυκόζης μειώνονται, ενώ οι συγκεντρώσεις του γαλακτικού οξέος και των πρωτονίων αυξάνονται (ή ισοδύναμα το pH μειώνεται) λόγω του υποξικού περιβάλλοντος. [8]



**Σχήμα 1.4** Σχηματική αναπαράσταση του TME και απεικόνιση της διαμερισματοποίησης της μεταβολικής του λειτουργίας. [8]

## 1.4 Συμβατικές Θεραπευτικές Προσεγγίσεις: Προκλήσεις

Οι συμβατικές προσεγγίσεις για τη θεραπεία του καρκίνου περιλαμβάνουν χειρουργική αφαίρεση του όγκου, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ανοσοθεραπεία και υπερθερμία. Οι παραπάνω τεχνικές χρησιμοποιούνται συχνά συνδυαστικά για την κλινική αντιμετώπιση της νόσου, ωστόσο εμφανίζουν σημαντικές προκλήσεις και δυσκολίες, σηματοδοτώντας την ανάγκη για ανάπτυξη αποτελεσματικότερων θεραπευτικών προσεγγίσεων. [9] Παρακάτω αναλύονται οι επιμέρους μεθοδολογίες και οι αντίστοιχες προκλήσεις που παρουσιάζουν.

### 1.4.1 Χειρουργική Επέμβαση

Η χειρουργική επέμβαση αποτελεί μία από τις κυριότερες ιατρικές τεχνικές για την αντιμετώπιση των περισσότερων στερέων όγκων. Ωστόσο, παρόλο που η χειρουργική αφαίρεση κυρίων και μεταστατικών καρκινικών όγκων, μπορεί να επεκτείνει το προσδόκιμο ζωής του ασθενούς, είναι πολλές οι περιπτώσεις που παρατηρείται τοπική υποτροπή του καρκίνου κατά την μετεγχειρουργική περίοδο, με αποτέλεσμα να μην επιτυγχάνεται η θεραπεία. [10] Συγκεκριμένα, η χειρουργική επέμβαση επάγει τη μεταφορά καρκινικών κυττάρων στη συστηματική κυκλοφορία του οργανισμού, ενώ καταστέλλει τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος κατά του όγκου επιτρέποντας την επιβίωση των μεταναστευόντων κυττάρων, και κατ' επέκταση ευνοώντας τη δημιουργία μεταστάσεων. [11] Ακόμα, το χειρουργικό τραύμα επάγει τοπική και συστημακή φλεγμονώδη απόκριση, η οποία συνεισφέρει στην επιτάχυνση της υποτροπής του όγκου και της δημιουργίας νέων μεταστάσεων. [10]

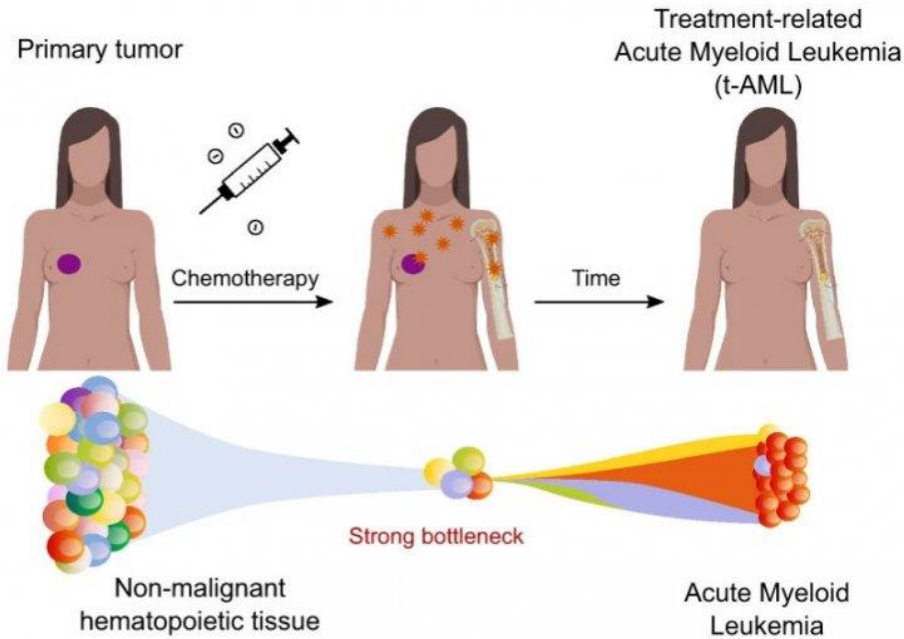
### 1.4.2 Χημειοθεραπεία

Η δράση της χημειοθεραπείας έγκειται στην αναστολή της αναπαραγωγής των καρκινικών κυττάρων και του πολλαπλασιασμού του κακοήθι όγκου, στοχεύοντας στην αποφυγή της εισβολής του καρκίνου σε υγιείς ιστούς και της δημιουργίας μεταστάσεων. Οι παραδοσιακοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες (λ.χ. δοξορουβικίνη), λειτουργούν είτε αλληλεπιδρώντας με τα νουκλεϊκά οξέα των νεοπλασματικών κυττάρων για την αναστολή της βιοσύνθεσης σημαντικών μακρομορίων, είτε επηρεάζουν τη δραστηριότητα προσχηματισμένων βιομορίων. Στην πρώτη περίπτωση ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να οφείλεται άμεσα στη δράση του χημειοθεραπευτικού παράγοντα ή έμμεσα στην επαγόμενη κυτταρική απόπτωση. Για την περίπτωση των συμβατικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων, ο θάνατος των καρκινικών κυττάρων επιβραδύνεται, καθώς μόνο ένα κλάσμα αυτών εξαλείφεται σε κάθε κύκλο θεραπείας. Συνεπώς, για να επιτευχθεί το επιθυμητό βιολογικό αποτέλεσμα, συχνά απαιτούνται αρκετές επαναλήψεις της χημειοθεραπείας, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την προξένιση βλάβης στον υγιή ιστό και την εμφάνιση σημαντικών παρενεργειών στον ασθενή. [12]

Οι συχνότερες παρενέργειες που εμφανίζονται σε καρκινοπαθείς που έχουν υποβληθεί σε χημειοθεραπεία, περιλαμβάνουν διαταραχές του γαστρεντερικού συστήματος (ναυτία, έμετος, διάρροια), καρδιοτοξικότητα, κεντρική και περιφερική νευροπάθεια. Οι παραπάνω παρενέργειες απαιτούν τη χορήγηση επιπλέον φαρμάκων για την αντιμετώπισή τους μετά το πέρας της χημειοθεραπείας, καθώς μπορεί να οδηγήσουν σε κρίσιμες καταστάσεις για τη ζωή του ασθενούς. [13]

Μία από τις συχνότερες επιπλοκές που παρουσιάζονται σε καρκινοπαθείς αποτελεί η θρομβοπενία. Από παθολογικής άποψης, η θρομβοπενία περιγράφεται από μη φυσιολογική μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων στο αίμα, με σημαντικές επιπτώσεις στη διαδικασία της πήξης του αίματος. Παρόλο που η θρομβοπενία μπορεί να προκύψει από την ίδια την ασθένεια, συνήθως εμφανίζεται ως παρενέργεια της μυελοκατασταλτικής χημειοθεραπείας. Η χημειοθεραπευτικά επαγόμενη θρομβοπενία αποτελεί συχνή επιπλοκή και μπορεί πιθανώς να συνεισφέρει στη θνητότητα της νόσου μέσω της πρόκλησης αιμορραγικών επιπλοκών. Παρόλο που έχουν αναπτυχθεί αποτελεσματικά φάρμακα για την πρόληψη και τη θεραπεία άλλων αιματολογικών επιπλοκών του καρκίνου, όπως η αναιμία, η θρόμβωση και η ουδετεροπενία, δεν υπάρχει ακόμα εγκεκριμένο φάρμακο από τον οργανισμό FDA για την αντιμετώπιση της θρομβοπενίας. [14]

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον επιδεικνύει η έρευνα του εργαστηρίου IRB Barcelona's Biomedical Genomics Laboratory το 2021, σύμφωνα με την οποία ανιχνεύθηκαν ίχνη γενετικών μεταλλάξεων προκαλούμενα από χημειοθεραπευτικούς παράγοντες με βάση το λευκόχρυσο, σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία, που είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε χημειοθεραπεία για την αντιμετώπιση κάποιου στερεού όγκου. Τα δευτερογενή νεοπλάσματα, όπως η οξεία μυελογενής λευχαιμία, είναι δυνατόν να δημιουργηθούν από αιματοποιητικά κύτταρα, τα οποία δεν ήταν κακοήθη τη χρονική στιγμή της έκθεσης του οργανισμού στη χημειοθεραπεία (**Σχήμα 1.5**). [15]



**Σχήμα 1.5** Οι ασθενείς που έχουν εκτεθεί σε χημειοθεραπεία για την αντιμετώπιση κάποιου στερεού όγκου (καρκίνος του μαστού στο συγκεκριμένο σχήμα), είναι πιθανόν να αναπτύξουν οξεία μυελογενή λευχαιμία ως αποτέλεσμα της επαγόμενης βλάβης στο κυτταρικό DNA (πορτοκαλί αστερίσκοι). Τα μη-κακοήγη αιματοποιητικά κύτταρα οδηγούν στη δημιουργία οξείας μυελογενούς λευχαιμίας, κατόπιν της έκθεσης σε μεταλλαξιογόνους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. [15]

### 1.4.3 Ακτινοθεραπεία

Η ακτινοθεραπεία απαιτείται στο 60 – 70% των κλινικών περιπτώσεων κατά τη διάρκεια της θεραπείας του καρκίνου. Αποτελεί μία από τις συχνότερες μεθόδους αντιμετώπισης των καρκινικών όγκων, ωστόσο δύναται να προκαλέσει οξεία ή/και μακροχρόνια βλάβη στον υγιή ιστό. Η ακτινοθεραπεία αξιοποιεί τη χρήση ιονιζουσών ακτινοβολιών υψηλής ενέργειας (ακτίνες X, ακτινοβολία γ και σωματιδιακές ακτινοβολίες) για την πρόκληση βλάβης στο γενετικό υλικό των καρκινικών κυττάρων, με σκοπό την εξαφάνιση του κακοήγη όγκου. Ωστόσο, η χορηγούμενη δόση στον καρκινικό όγκο περιορίζεται από την επαγόμενη τοξικότητα στον παρακείμενο υγιή ιστό, με αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να μην εξαλείφονται ολοκληρωτικά και το θεραπευτικό αποτέλεσμα να μειώνεται. [16]

Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει καταγραφεί σαφής συσχέτιση μεταξύ της ακτινοθεραπείας και της εμφάνισης σοβαρών παρενεργειών μετά το πέρας της θεραπείας. Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, παρατηρείται αυξημένο ρίσκο εμφάνισης μεταγενέστερου καρκίνου σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε ακτινοθεραπεία. [17] Χαρακτηριστικό συμπέρασμα των στατιστικών μελετών αποτελεί η υψηλή πιθανότητα εμφάνισης μεταγενέστερου καρκίνου του μαστού, η οποία ανέρχεται σε ποσοστό του 30% μέχρι την ηλικία των 55, σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε ακτινοθεραπεία για την αντιμετώπιση του λεμφώματος Hodgkin. [18], [17]

#### 1.4.4 Ανοσοθεραπεία

Η προσέγγιση της ανοσοθεραπείας έχει αποκτήσει κυρίαρχο ρόλο στην κλινική ογκολογία επιτρέποντας την ολοκληρωτική εξάλειψη του καρκίνου. Μέσω της ανοσοθεραπείας ενεργοποιείται το ανοσοποιητικό σύστημα του ίδιου του ασθενούς για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Μία από τις πολλά υποσχόμενες προσεγγίσεις για τη θεραπεία του καρκίνου, περιλαμβάνει την ανοσοθεραπεία που βασίζεται στους αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (immune checkpoint inhibitors), οι οποίοι ενισχύουν την ικανότητα των T-λεμφοκυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος να προσβάλλουν τον καρκινικό όγκο. Παρ' όλ' αυτά μόνο ένα μικρό υποσύνολο των ασθενών αποκρίνεται στην ανοσοθεραπεία (< 20%), ενώ σε άλλες περιπτώσεις παρατηρείται υποτροπή της νόσου μετά από αρχική απόκριση. [19] Οι διαφορετικοί τύποι όγκου αντιδρούν με διαφορετικό τρόπο στην ανοσοθεραπεία, με αποτέλεσμα να υπάρχουν περιπτώσεις καρκίνων που γενικώς ανταποκρίνονται σε αυτή την τεχνική, αλλά ορισμένοι όγκοι που έχουν αναπτυχθεί στον ασθενή, να παρουσιάζουν αντίσταση στη θεραπεία. [20]

#### 1.4.5 Υπερθερμία

Ως υπερθερμία στην ιατρική, ορίζεται η αύξηση της μέσης θερμοκρασίας του σώματος σε υψηλότερα επίπεδα από τη φυσιολογική. Ερευνητικά έχει αποδειχτεί ότι η αυξημένη θερμοκρασία του σώματος δύναται να προκαλέσει βλάβη εκλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα χωρίς σημαντικές επιπτώσεις στον υγιή ιστό. Ο κύριος μηχανισμός της υπερθερμίας περιλαμβάνει την καταστροφή των πρωτεϊνών και της εσωτερικής δομής των καρκινικών κυττάρων, με συνέπεια τη σμίκρυνση του καρκινικού όγκου. Ακόμα, η υπερθερμία συχνά συνδυάζεται με άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις (ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία), καθώς καθιστά τα καρκινικά κύτταρα πιο ευπαθή στην ακτινοβολία και μπορεί να ενισχύσει τη δράση ορισμένων χορηγούμενων αντικαρκινικών παραγόντων. Ωστόσο, η υπερθερμία, είτε εφαρμόζεται τοπικά είτε σε ολόκληρο τον οργανισμό, έχει συσχετιστεί με πλήθος παρενεργειών, όπως η ναυτία, ο έμετος και η διάρροια. Σε ορισμένες περιπτώσεις έχει οδηγήσει σε προβλήματα υγείας που αφορούν στο μυοκάρδιο, στα αιμοφόρα αγγεία και σε άλλα ζωτικά όργανα. [21]

## Κεφάλαιο 2. Φωτοδυναμική Θεραπεία (PDT)

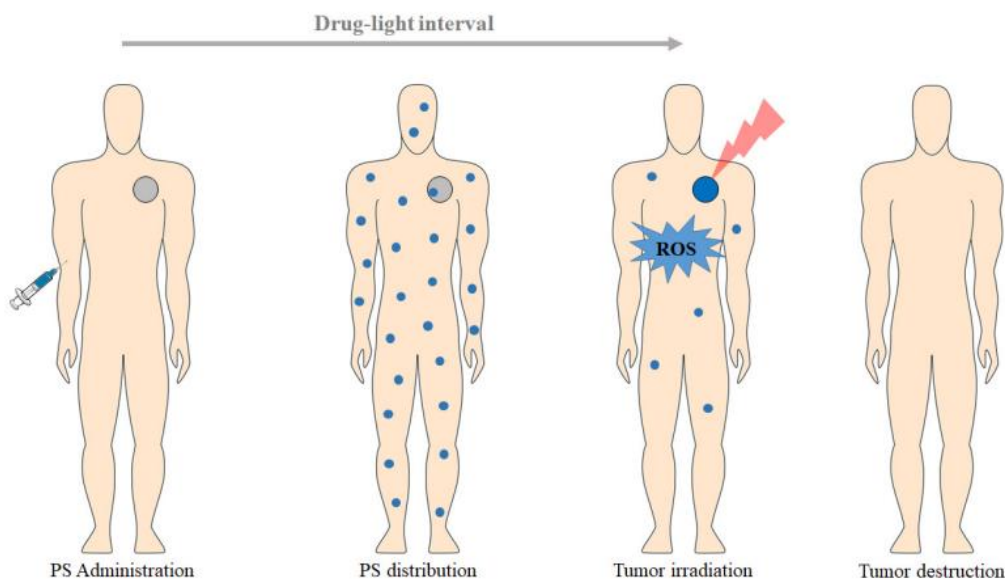
### 2.1 Ιστορική Αναδρομή και Βασικές Αρχές

Για την αντιμετώπιση των προκλήσεων και των παρενεργειών των συμβατικών αντικαρκινικών θεραπευτικών προσεγγίσεων που αναλύονται στο Κεφάλαιο 1, έχουν προταθεί καινοτόμες τεχνικές για την αντιμετώπιση των στερεών καρκινικών όγκων. Σε αυτές ανήκει η Φωτοδυναμική Θεραπεία (Photodynamic Therapy, ή εν συντομία PDT). Το πρώτο επιστημονικό επίτευγμα-ορόσημο που ανέδειξε την αξία της PDT στην κλινική ογκολογία, πραγματοποιήθηκε το 1975 στο Roswell Park Cancer Institute του Buffalo της Νέα Υόρκης. Η ερευνητική ομάδα του ινστιτούτου κατέγραψε για πρώτη φορά την επιτυχή εφαρμογή της PDT σε ζωικά μοντέλα για την ολοκληρωτική θεραπεία του καρκινικού όγκου. Ως αποτέλεσμα, η πρώτη κλινική δοκιμή της PDT πραγματοποιήθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1970. Στη συγκεκριμένη μελέτη, εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα των παραγώγων αιματοπορφυρίνης (HPDs) σε πέντε ασθενείς με καρκίνο στη ουροδόχο κύστη. Αργότερα, το 1978 καταγράφηκε η πρώτη σειρά ασθενών που θεραπεύτηκε επιτυχώς μέσω της PDT. Έκτοτε, έχουν πραγματοποιηθεί πάνω από 283 κλινικές δοκιμές για τη φωτοδυναμική θεραπεία, όπου οι 44 εξ' αυτών ήταν ενεργές το έτος 2021. [22]

Η φωτοδυναμική θεραπεία βασίζεται στο συνδυασμό της δράσης ενός φωτοευαισθητοποιητή (PS), ακτινοβολίας συγκεκριμένου μήκους κύματος, συνήθως στην κόκκινη περιοχή του ορατού φάσματος ( $\lambda \geq 600 \text{ nm}$ ), και του φυσικά ευρισκόμενου μοριακού οξυγόνου (οξυγόνο τριπλής κατάστασης) στο μικροπεριβάλλον του όγκου. [23]

Η φωτοδυναμική θεραπεία ως θεραπευτική προσέγγιση για τον καρκίνο περιλαμβάνει τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή στον ασθενή, η οποία ακολουθείται από ακτινοβολία με ορατό φως συγκεκριμένου μήκους κύματος. Ο διεγερμένος φωτοευαισθητοποιητής αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο προς παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), με αποτέλεσμα την πρόκληση οξειδωτικού στρες στα καρκινικά κύτταρα. [24]

Ο φωτοευαισθητοποιητής χορηγείται τοπικά στον καρκινικό ιστό ή μέσω της συστημικής κυκλοφορίας και συσσωρεύεται στο μικροπεριβάλλον του καρκινικού όγκου. Στη συνέχεια, ενεργοποιείται από ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος επάγοντας μία σειρά φωτοχημικών αντιδράσεων, οι οποίες παράγουν δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), με αποτέλεσμα την ελεγχόμενη καταστροφή του όγκου, όπως παρουσιάζεται στο **Σχήμα 2.1**. Στη PDT οι φωτοευαισθητοποιητές που χρησιμοποιούνται είναι μοριακές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους, κλινικά αποδεκτές και έχουν εφαρμοστεί μέχρι τώρα στη θεραπεία ασθενειών μεταξύ αυτών των καρκίνων του δέρματος και του καρκίνου του οισοφάγου. [25]

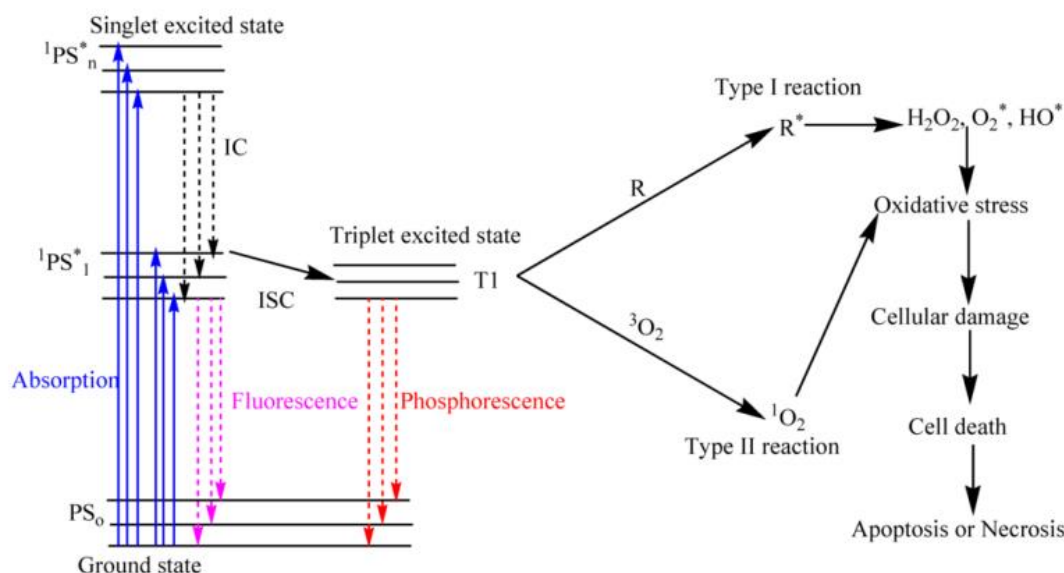


**Σχήμα 2.1.** Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων της φωτοδυναμικής θεραπείας στην κλινική εφαρμογή, για την αντιμετώπιση στερεών καρκινικών όγκων. [23]

## 2.2 Μηχανισμός και Στοιχεία Φωτοχημείας

Η θεραπευτική λειτουργία της PDT βασίζεται στο συνδυασμό τριών παραγόντων, και συγκεκριμένα το είδος του Φωτοευαισθητοποιητή (PS), το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και την παρουσία μοριακού οξυγόνου στο μικροπεριβάλλον του καρκινικού όγκου. Η εκκίνηση της φωτοδυναμικής αντίδρασης πραγματοποιείται με την απορρόφηση της ακτινοβολίας από τον φωτοευαισθητοποιητή στον καρκινικό ιστό, γεγονός που επάγει ένα σύνολο από φωτοχημικές αντιδράσεις που οδηγούν στην παραγωγή ROS. Μετά την απορρόφηση των φωτονίων της προσπίπτουσας δέσμης, ο φωτοευαισθητοποιητής διεγείρεται από την απλή θεμελιώδη ηλεκτρονιακή κατάσταση ( $^1\text{PS}$ ) σε μία ασταθή διεγερμένη ηλεκτρονιακή κατάσταση που ονομάζεται απλή διεγερμένη ( $^1\text{PS}^*$ ) και έχει χρόνο ζωής μόλις μερικά nanoseconds. Δεδομένης της αστάθειας της απλής διεγερμένης κατάστασης, το σύστημα αποδιεγείρεται επιστρέφοντας στη θεμελιώδη κατάσταση, με την ενεργειακή διαφορά να μετατρέπεται σε εκπομπή φωτονίων (φθορισμός) ή σε θερμική ενέργεια χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας (εσωτερική μετατροπή, IC). Εναλλακτικά, η απλή διεγερμένη κατάσταση δύναται να μεταβεί στην ηλεκτρονικά διεγερμένη τριπλή κατάσταση ( $^3\text{PS}^*$ ), η οποία είναι αρκετά πιο σταθερή. Η μετάβαση αυτή πραγματοποιείται μέσω ενδοσυστηματικής διασταύρωσης (ISC), η οποία πρόκειται για μη ακτινοβόλουσα μετάβαση μεταξύ δύο καταστάσεων με διαφορετικούς κβαντικούς αριθμούς spin (αναστροφή του spin κατά την μετάπτωση  $^1\text{PS}^* \rightarrow ^3\text{PS}^*$ , Σχήμα 2.2).

Στη συνέχεια η τριπλή διεγερμένη κατάσταση, η οποία έχει σημαντικά μεγαλύτερο χρόνο ζωής (της τάξης των microseconds), μπορεί να επιστρέψει στην θεμελιώδη εκπέμποντας φωσφορισμό ή να υποβληθεί σε δύο ειδών φωτοχημικές αντιδράσεις (Τύπου I & II).



**Σχήμα 2.2** Ενεργειακό διάγραμμα Jablonski των φωτοχημικών μεταπτώσεων που παρουσιάζονται στη PDT. [26]

Οι αντιδράσεις τύπου I περιλαμβάνουν την αντίδραση του διεγερμένου φωτοευαισθητοποιητή απευθείας με το βιολογικό υπόστρωμα, όπως η κυτταρική μεμβράνη ή μόρια στο γειτνιάζον περιβάλλον, όπου πραγματοποιούνται αντιδράσεις απομάκρυνσης υδρογόνου και μεταφοράς ηλεκτρονίων προς σχηματισμό ελευθέρων ριζών και ανιοντικών ριζών ( $R^*$ ). Οι παραγόμενες ρίζες αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο, σχηματίζοντας Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ROS), όπως  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^*$  και  $H_2O_2$ , οι οποίες επάγουν οξειδωτική βλάβη στο βιολογικό περιβάλλον.

Αντίθετα, στις αντιδράσεις τύπου II, η ενεργειακή περίσσεια του διεγερμένου φωτοευαισθητοποιητή μεταφέρεται απευθείας στο μοριακό οξυγόνο, το οποίο διεγείρεται κατά συνέπεια από τη θεμελιώδη στην απλή διεγερμένη κατάσταση ( $^1O_2$ ). Το αποτέλεσμα της παραπάνω αντίδρασης μεταφοράς ενέργειας είναι ο σχηματισμός οξυγόνου απλής κατάστασης (singlet oxygen), το οποίο χαρακτηρίζεται από έντονη δραστηριότητα.

### 2.3 Οξειδωτικό Στρες & Απόπτωση

Ως «οξειδωτικό στρες» ορίζεται ως η σχετική περίσσεια δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), συγκριτικά με τη συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών παραγόντων στο κυτταρικό περιβάλλον. Τα κύτταρα διαθέτουν πολύπλοκους βιοχημικούς και γενετικούς μηχανισμούς για τη διατήρηση της ισορροπίας των ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών ουσιών στο περιβάλλον τους, η οποία όταν διαταράσσεται



προκύπτουν σημαντικές συνέπειες στην παθοφυσιολογία του προσβεβλημένου ιστού. Αναφορικά με τον καρκίνο, οι δραστικές μορφές οξυγόνου σε χαμηλά επίπεδα ευνοούν την καρκινογένεση σε έναν υγιή ιστό, ωστόσο σε υψηλές συγκεντρώσεις παρουσιάζουν κυτταροτοξικότητα στα ίδια τα καρκινικά κύτταρα. [27]

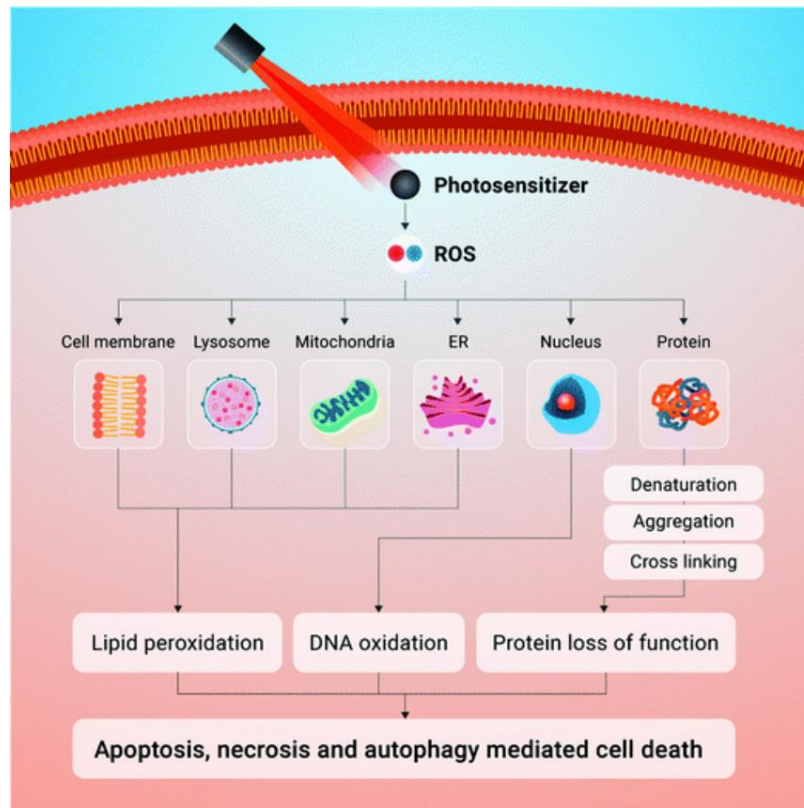
Σχετικά με τη φωτοδυναμική θεραπεία, κατά την ακτινοβόληση του καρκινικού ιστού οι παραγόμενες δραστικές μορφές οξυγόνου προκαλούν φωτοεπαγόμενο οξειδωτικό στρες στα οργανίδια των καρκινικών κυττάρων, οδηγώντας τελικώς σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο που ονομάζεται Απόπτωση. Σε αντίθεση με τον τυχαίο κυτταρικό θάνατο που οφείλεται στην κυτταρική λύση κατά την έκθεση σε εξωτερικούς παράγοντες (νέκρωση), η απόπτωση αποτελεί μία ελεγχόμενη διαδικασία για την εξάλειψη κυττάρων που έχουν υποστεί γήρανση ή κάποιου είδους βλάβη (οξειδωτικό στρες στην προκειμένη περίπτωση). [28] Έχουν παρατηρηθεί και εναλλακτικά μονοπάτια προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, όπως η αυτοφαγία, η νεκρόπτωση (αλληλεπικαλυπτόμενες διαδικασίες νέκρωσης και απόπτωσης) και η φερρόπτωση. [27]

Στον **Πίνακα 2.1** παρουσιάζονται οι κύριες μορφολογικές διαφορές μεταξύ της νέκρωσης και της απόπτωσης στον κυτταρικό θάνατο.

**Πίνακας 2.1** Μορφολογικές διαφορές νεκρωτικού και αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου. [29]

<b>Νέκρωση</b>	<b>Απόπτωση</b>
Διόγκωση του κυττάρου	Συρρίκνωση κυττάρου
Διαρρηγμένη κυτταροπλασματική μεμβράνη	Ακέραιη κυτταροπλασματική μεμβράνη
Ακέραιος πυρήνας	Συρρίκνωση της χρωματίνης και βλάβη στο mDNA
Μη εκλεκτική πρωτεόλυση	Εξειδικευμένη προγραμματισμένη πρωτεόλυση
Διόγκωση κυτταρικών οργανιδίων	Φυσιολογικό μέγεθος κυτταρικών οργανιδίων
Συμβαίνει λόγω μη διαθέσιμης ενέργειας	Απαιτείται ενέργεια

Στη φωτοδυναμική θεραπεία, η έκταση του αποπτωτικού θανάτου στα καρκινικά κύτταρα εξαρτάται από τις βασικές παραμέτρους της φωτοδυναμικής θεραπείας, όπως το είδος και η συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή στο μικροπεριβάλλον του όγκου, καθώς και η χορηγούμενη δόση ακτινοβολίας (**Σχήμα 2.3**).



**Σχήμα 2.3** Μηχανισμός δράσης της Φωτοδυναμικής Θεραπείας (PDT) στα καρκινικά κύτταρα μέσω του φωτοεπαγόμενου οξειδωτικού στρες. [30]

## 2.4 Φωτοευαισθητοποιητές (PSs)

Οι Φωτοευαισθητοποιητές (PSs) είναι χημικές ενώσεις, οι οποίες χορηγούνται στον ασθενή ενδοφλέβια ή τοπικά, και συσσωρεύονται στον παθολογικό ιστό, δηλαδή στον καρκινικό όγκο στη συγκεκριμένη περίπτωση. Στη συνέχεια, ο ιστός ακτινοβολείται με δέσμη συγκεκριμένου μήκους κύματος και ο φωτοευαισθητοποιητής διεγείρεται μέσω της απορρόφησης των προσπιπτόντων φωτονίων. Υπάρχουν χιλιάδες φυσικές και συνθετικές φωτοδραστικές ενώσεις, οι οποίες αποτελούν πιθανούς υποψήφιους φωτοδυναμικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, οι φωτοευαισθητοποιητές περιλαμβάνουν προϊόντα αποδόμησης της χλωροφύλλης, πολυακετυλένια, θειοφαίνια, κινίνες και ανθρακινόνες. Η πλειονότητα των φωτοευαισθητοποιητών που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη, αποτελούν χρωστικές, όπως πορφυρίνες, χλωρίνες και φουροκουμαρίνες. Γενικά οι φωτοευαισθητοποιητές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: [26]

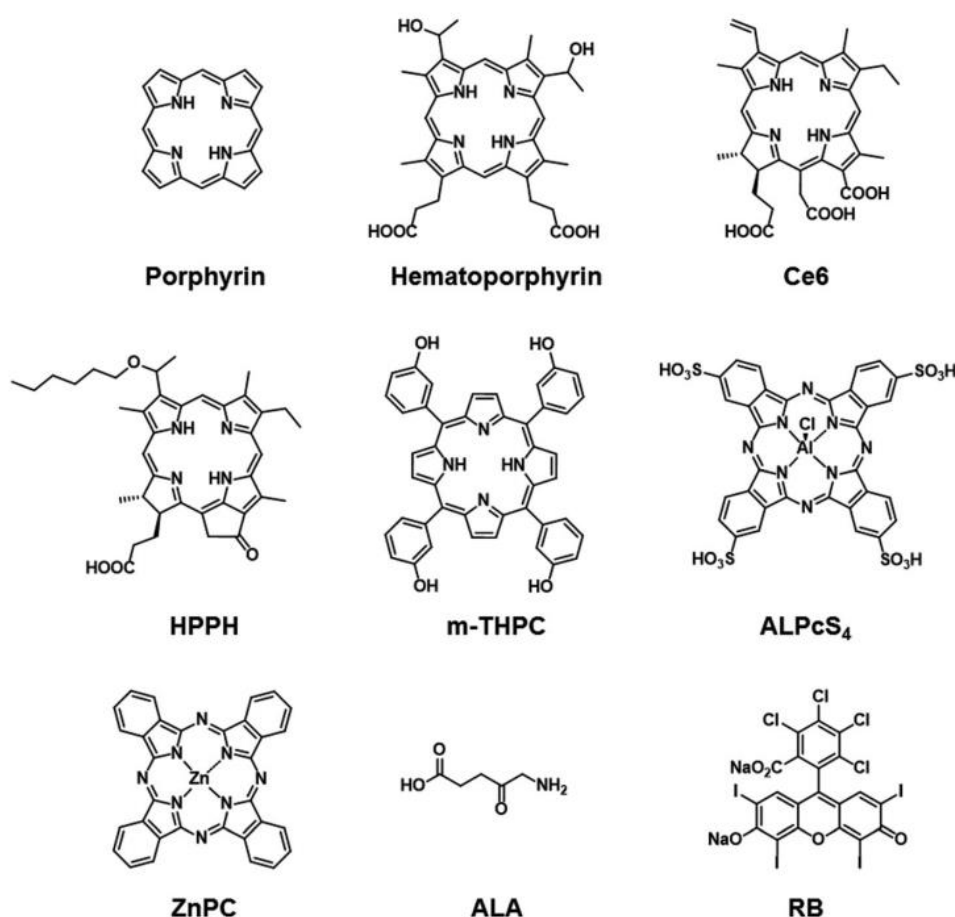
1. Παράγωγα πορφυρινών (λ.χ. Photofrin, 5-αμινο-λεβουλινικό οξύ)
2. Φωτοευαισθητοποιητές με βάση τη χλωροφύλλη (λ.χ. chlorine e6)
3. Χρωστικές (φθαλοκυανίνες, κυανίνες)

Οι φωτοευαισθητοποιητές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν και με βάση τη χρονολογική τους εξέλιξη στο χώρο της ιατρικής, σε φωτοευαισθητοποιητές 1<sup>ης</sup>, 2<sup>ης</sup>

και 3<sup>ης</sup> γενιάς, όπως παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.2**. Στους φωτοευαισθητοποιητές 1<sup>ης</sup> γενιάς ανήκουν οι πορφυρίνες και οι αιματοπορφυρίνες, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το εμπορικό σκεύασμα Photofrin. [31] Τα παράγωγα των πορφυρινών που παρασκευάζονται συνθετικά από τα τέλη της δεκαετίας του 1980, ονομάζονται φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς και περιλαμβάνουν οργανικές ενώσεις, όπως το 5-αμινο-λεβουλινικό οξύ και οι φθαλοκυανίνες (**Σχήμα 2.4**). Στην τρίτη γενιά των φωτοευαισθητοποιητών ανήκουν βιολογικά σύμπλοκα των φωτοευαισθητοποιητών με μονοκλωνικά αντισώματα, νανοσωματίδια ή λυσοσώματα (**Σχήμα 2.5**). [26], [22]

**Πίνακας 2.2.** Γενιές φωτοευαισθητοποιητών που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου. [31]

Κατηγορία	Φωτοευαισθητοποιητές
1 <sup>ης</sup> Γενιάς	Photofrin, παράγωγα αιματοπορφυρίνης (HPDs)
2 <sup>ης</sup> Γενιάς	5-αμινολεβουλινικό οξύ (ALA), παράγωγα βενζοπορφυρίνης (BPD), lutetium texaphyrin, τεμοπορφίνη (mTHPC), tinethyletiopurpurin (SnET2), talaporfin sodium (LS11), Foscan
3 <sup>ης</sup> Γενιάς	Βιολογικά σύμπλοκα (λ.χ. σύμπλοκα αντισωμάτων, λιποσωμακά σύμπλοκα)



**Σχήμα 2.4.** Χαρακτηριστικά παραδείγματα φωτοευαισθητοποιητών 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς. [30]

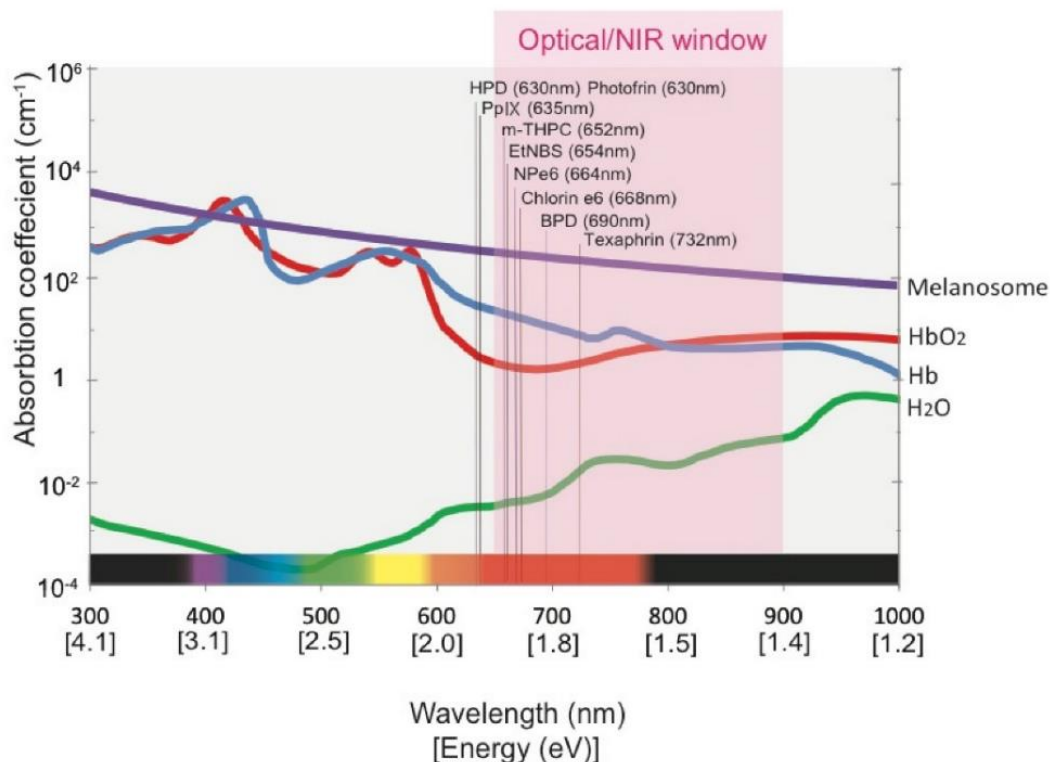


**Σχήμα 2.5.** Φωτοευαισθητοποιητές (PSs) 3<sup>ης</sup> γενιάς. a: Σύζευξη των PSs 2<sup>ης</sup> γενιάς με οργανικά μόρια ειδικής στόχευσης (λ.χ. αντισώματα), b: Εγκλωβισμός των PSs 2<sup>ης</sup> γενιάς σε φορείς μεταφοράς (λιπосώματα, μικύλλια, νανοσωματίδια). [22]

Αναφορικά με τα φυσικοχημικά και φαρμακολογικά χαρακτηριστικά των φωτοευαισθητοποιητών, οφείλουν να πληρούν ορισμένες προδιαγραφές. Αρχικά, οι φωτοευαισθητοποιητές πρέπει να συντίθενται σχετικά εύκολα ως καθαρές ενώσεις, να έχουν αμελητέα κυτταροτοξικότητα στο σκοτάδι, αλλά και να μην παρουσιάζουν σημαντικές παρενέργειες στον οργανισμό, όπως υπόταση ή υπερευαισθησία. [32]

Επιπλέον, οι φωτοευαισθητοποιητές που διεγείρονται από ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος, και ειδικά στις περιοχές του κόκκινου ορατού και του εγγύς υπερύθρου φάσματος, είναι κατάλληλοι για τη θεραπεία όγκων σε περιοχές του σώματος με περιορισμένη προσβασιμότητα (λ.χ. ενδοκρανιακοί όγκοι). Το κόκκινο φως παρουσιάζει υψηλότερη διαπερατότητα στους βιολογικούς ιστούς και προκαλεί σπανιότερα φωτοευαισθησία στο δέρμα. Σε χαμηλότερα μήκη κύματος ( $< 600 \text{ nm}$ ) παρουσιάζεται εντονότερη σκέδαση της ακτινοβολίας από τους βιολογικούς ιστούς, λόγω της απορρόφησης ακτινοβολίας από χρωμοφόρα συστατικά των ιστών (μελανίνη, αιμογλοβίνη), οδηγώντας εν τέλει σε χαμηλότερη απορρόφηση της δέσμης από τον φωτοευαισθητοποιητή. Από την άλλη πλευρά, η ακτινοβολία υψηλότερου μήκους κύματος ( $> 850 \text{ nm}$ ) δεν διαθέτει επαρκή ενέργεια για την επίτευξη ικανοποιητικής παραγωγής  $^1\text{O}_2$  και ROS (απαιτούνται  $\sim 0.96 \text{ eV}$  για τη διέγερση ενός μορίου οξυγόνου από τη θεμελιώδη στην απλή διεγερμένη κατάσταση), με αποτέλεσμα το θεραπευτικό αποτέλεσμα να μειώνεται. [33] Συνεπώς, η φασματική περιοχή που περιγράφεται από το εύρος  $600 - 850 \text{ nm}$ , αποτελεί το οπτικό «παράθυρο» που επιτρέπει τη μέγιστη διαπερατότητα του φωτός στους βιολογικούς ιστούς και την επίτευξη του βέλτιστου φωτοθεραπευτικού αποτελέσματος (Σχήμα 2.6). [23]

Σχετικά με τις οπτικές ιδιότητες, οι φωτοευαισθητοποιητές πρέπει να παρουσιάζουν υψηλή γραμμομοριακή απορροφητικότητα ( $\epsilon > 30,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), ούτως ώστε να απαιτείται χαμηλότερη ένταση ακτινοβολίας ή χαμηλότερη δόση του φωτοευαισθητοποιητή, δεδομένου ότι η απομάκρυνση του φωτοευαισθητοποιητή από τον οργανισμό πρέπει να πραγματοποιείται το συντομότερο δυνατό για την αποφυγή χρήσης προστασίας κατά του φωτός, μετά το πέρας της θεραπείας. Τέλος, η φωτοδυναμική δράση του φωτοευαισθητοποιητή πρέπει να είναι αρκετά υψηλή για να εξασφαλίζεται το θεραπευτικό αποτέλεσμα, αλλά όχι πάνω από το όριο που εμφανίζονται παρενέργειες και βλάβες στον υγιή ιστό. [32]



**Σχήμα 2.6.** Φάσμα απορρόφησης των πλέον χρησιμοποιούμενων φωτοευαισθητοποιητών στην φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου. Το φωτοθεραπευτικό «παράθυρο» (600 – 850 nm) όπου η απορρόφηση του φωτός από τα χρωμοφόρα συστατικά των βιολογικών ιστών είναι περιορισμένη, παρουσιάζεται με κόκκινο χρώμα. Σημειώνονται οι κορυφές απορρόφησης των φωτοευαισθητοποιητών, που αντιστοιχούν στη φωτοδιέγερση, εντός του εύρους υψηλής διαπερατότητας φωτός. [33]

Στον **Πίνακα 2.3** παρουσιάζεται η σύνοψη των κυριότερων χαρακτηριστικών που πρέπει να διαθέτει ένας ιδανικός φωτοευαισθητοποιητής.

**Πίνακας 2.3.** Γενικές προδιαγραφές φωτοευαισθητοποιητών που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου. [23], [26]

Κριτήριο	Ιδανικός Φωτοευαισθητοποιητής
Κυτταροτοξικότητα στο σκοτάδι & στο ηλιακό φως	Χαμηλή
Εκλεκτική συσσώρευση στον καρκινικό ιστό έναντι του υγιούς	Υψηλή
Απέκκριση από τον οργανισμό	Ταχεία
Κβαντική απόδοση φθορισμού και διαλυτότητα σε υδατικά μέσα	Υψηλή
Περιοχή απορρόφησης/διέγερσης	Έντονη στο εύρος 600–850 nm
Χημική σταθερότητα, καθαρότητα και ομοιογένεια στη σύσταση	Υψηλή
Διεργασία σύνθεσης	Απλή και επαναλήψιμη

### 2.3 Ταυτόχρονη Θεραπεία & Διάγνωση (Theranostics)

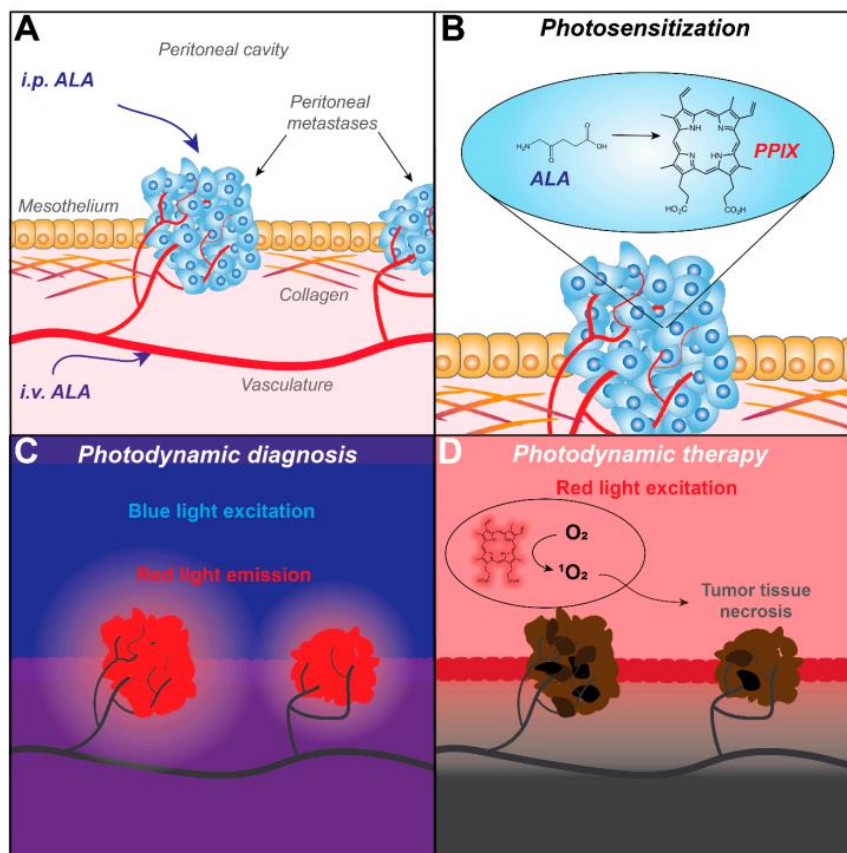
Ο όρος «Theranostics» προέρχεται από την σύμπτυξη των εννοιών «Therapeutics» και «Diagnostics» και αναφέρεται σε οποιοδήποτε ιατρικό σχήμα συνδυάζει εξειδικευμένη διάγνωση μίας νόσου με ταυτόχρονο θεραπευτικό αποτέλεσμα. Η ιδέα των Theranostics εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1946 στον τομέα της πυρηνικής

ιατρικής, όπου χρησιμοποιήθηκαν ραδιοϊσότοπα ιωδίου για ταυτόχρονη απεικόνιση και θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του θυρεοειδούς. Το Ιώδιο-131 αποτέλεσε τον πρώτο παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε στον τομέα των theranostics για την αντιμετώπιση της θυρεοτοξίκωσης. Το συγκεκριμένο ραδιοϊσότοπο όταν χορηγείται ενδοφλέβια, καταστρέφει εκλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα του θυρεοειδούς μέσω της εκπομπής ακτινών β, ενώ ταυτόχρονα συσσωρεύεται στα κύτταρα του καρκινικού όγκου, επιτρέποντας την απεικόνισή του με ειδικό ανιχνευτή ακτινών γ. Με αυτό τον τρόπο ανιχνεύονται ευκολότερα τυχόν τοπικές υποτροπές του καρκίνου, σε πιο έγκαιρο στάδιο. [34]

Η έννοια των Theranostics έχει επεκταθεί και σε άλλες ιατρικές προσεγγίσεις για την καταπολέμηση του καρκίνου, όπως η φωτοδυναμική θεραπεία. Τα μόρια των φωτοευαισθητοποιητών παρουσιάζουν εγγενή φθορισμό κατόπιν εξωτερικής διέγερσης (συγκεκριμένα κατά την αποδιέγερση στη θεμελιώδη κατάσταση,  $^1PS^* \rightarrow PS_0$ ), με αποτέλεσμα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό και την απεικόνιση (imaging) του καρκινικού όγκου. Συνεπώς, συνδυάζουν τη θεραπευτική λειτουργία μέσω του παραγόμενου οξειδωτικού στρες στα καρκινικά κύτταρα, με την απεικόνιση μέσω της ανίχνευσης του εκπεμπόμενου σήματος φθορισμού. Δεδομένου ότι οι φωτοευαισθητοποιητές συσσωρεύονται εκλεκτικά στο μικροπεριβάλλον του καρκινικού όγκου, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη διάγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης και την υποβοήθηση της χειρουργικής αφαίρεσης καρκινικών όγκων. Η προσέγγιση αυτή ονομάζεται και Φωτοδυναμική Διάγνωση (PDD). [35]

Οι αρχές της φωτοδυναμικής διάγνωσης (PDD) αλληλεπικαλύπτονται σε ένα βαθμό με τις συμβατικές μεθοδολογίες χειρουργικών επεμβάσεων υποβοηθούμενων με φθορισμό (fluorescence-guided surgery). Ωστόσο, η ειδοποιός διαφορά της PDD είναι η χρήση φωτοευαισθητοποιητών, δηλαδή ενώσεων που χρησιμοποιούνται και στη PDT, έναντι απλών σκιαγραφικών ουσιών που δεν παράγουν οξειδωτικό στρες κατόπιν ακτινοβολήσης (λ.χ. φλουορεσκεΐνη). [36] [37] Ο φωτοευαισθητοποιητής 5-αμινολεβουλινικό οξύ (5-ALA) και τα παράγωγά του, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη φωτοδυναμική θεραπεία και διάγνωση του καρκίνου. Ο παράγοντας 5-ALA αποτελεί πρόδρομη ένωση στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της αίμης και μεταβολίζεται προς το φωτοευαισθητοποιητή πρωτοπορφυρίνη IX (PpIX) και στη συνέχεια σχηματίζει χηλικά σύμπλοκα με τον σίδηρο παράγοντας την μη φθορίζουσα αίμη. Παρόλο που η βιοσύνθεση της αίμης πραγματοποιείται στα περισσότερα είδη κυττάρων, η εξωγενής χορήγηση του παράγοντα 5-ALA οδηγεί στη συσσώρευση της PpIX εντός των καρκινικών κυττάρων με αξιοσημείωτη εκλεκτικότητα. Η PpIX διεγείρεται κυρίως στα 409 nm και εκπέμπει φθορισμό στα 635 nm, δηλαδή στην περιοχή του κόκκινου φωτός που παρουσιάζει σημαντική διαπερατότητα στους βιολογικούς ιστούς, επιτρέποντας την απεικόνιση του καρκινικού όγκου με υψηλή αντίθεση και ευκρίνεια. Ακόμα, διεγείρεται στα 630 nm, αλλά με χαμηλότερη γραμμομοριακή απορροφητικότητα, και κατά την αποδιέγερση στη θεμελιώδη κατάσταση επάγει την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Επόμενος σύμφωνα με τα παραπάνω, ο ίδιος ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απεικόνιση του όγκου μέσω ακτινοβολήσης με μπλε φως (PDD), και στη συνέχεια να επιτύχει θεραπευτικό αποτέλεσμα ακτινοβολώντας με

κόκκινο φως (PTT), συνιστώντας μία παραδειγματική περίπτωση παράγοντα theranostics (Σχήμα 2.7). [36]

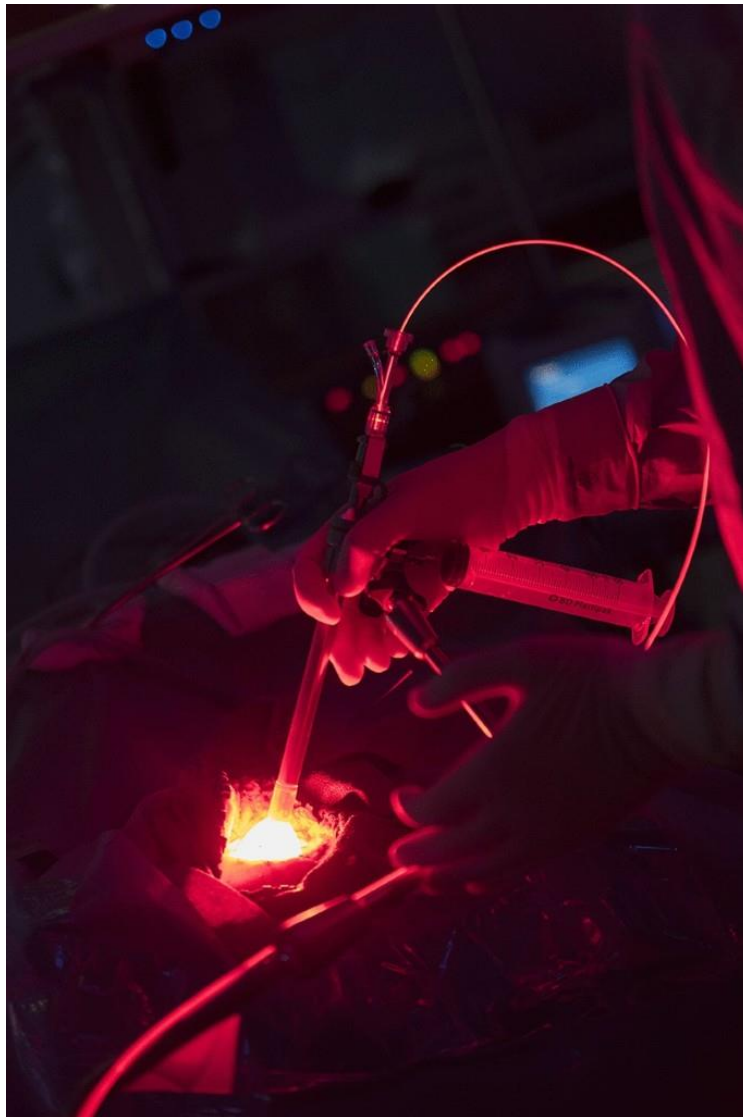


**Σχήμα 2.7.** Ανίχνευση περιτοναϊκού καρκινώματος μέσω της φωτοδυναμικής διάγνωσης (PDD) και επακόλουθη αντιμετώπιση μέσω της φωτοδυναμικής θεραπείας (PDT), χρησιμοποιώντας τον φωτοευαισθητοποιητή 5-ALA. A) Χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή (ενδοφλέβια ή τοπικά) και συσσώρευση στον καρκινικό ιστό. B) Μεταβολισμός του 5-ALA στα καρκινικά κύτταρα προς σχηματισμό του φθορίζοντα φωτοευαισθητοποιητή PpIX. C) Διέγερση της PpIX κατόπιν ακτινοβόλησης με μπλε φως, και εκπομπή φθορισμού στην κόκκινη περιοχή του ορατού φάσματος, ικανό για την ανίχνευση του όγκου και την υποβοήθηση της χειρουργικής επέμβασης. D) Διέγερση της PpIX κατόπιν ακτινοβόλησης με κόκκινο φως, και παραγωγή οξειδωτικού στρες στα συστατικά των καρκινικών κυττάρων (λιπίδια, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα) οδηγώντας σε απόπτωση. [36]

## 2.4 Κλινική Εφαρμογή και Προκλήσεις

Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) έχει διερευνηθεί εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες για την καταπολέμηση καρκινικών όγκων, καθώς χαρακτηρίζεται από ελάχιστα επεμβατικό χαρακτήρα, χρονική και χωρική εκλεκτικότητα, περιορισμένες παρενέργειες και την ικανότητα να κινητοποιηθεί το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς ενισχύοντας το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Αποτελεί μία ελπιδοφόρο προσέγγιση για μεγάλο εύρος ιατρικών πεδίων, συμπεριλαμβανομένων της ογκολογίας, της ανοσολογίας, της ουρολογίας, της δερματολογίας, της οφθαλμολογίας, της πνευμονολογίας και της οδοντιατρικής. [30]

Μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές της φωτοδυναμικής θεραπείας στην κλινική πράξη, αποτελεί η έγκριση του φωτοευαισθητοποιητή 5-αμινο-λεβουλινικού οξέος (5-ALA) από τον FDA στις Η.Π.Α., για την απεικόνιση του καρκινικού ιστού του γλοιοβλαστώματος μέσω φθορισμού, κατά τη διάρκεια της χειρουργικής αφαίρεσης του ενδοκρανιακού όγκου. Περαιτέρω μελέτες πραγματοποιούνται για την ενσωμάτωση της φωτοδυναμικής θεραπείας και του φωτοεπαγόμενου οξειδωτικού στρες στο παραπάνω ιατρικό σχήμα, μέσω ακτινοβόλησης του γλοιώματος με κόκκινο φως κατά τη διάρκεια της επέμβασης (**Εικόνα 2.1**). [38]

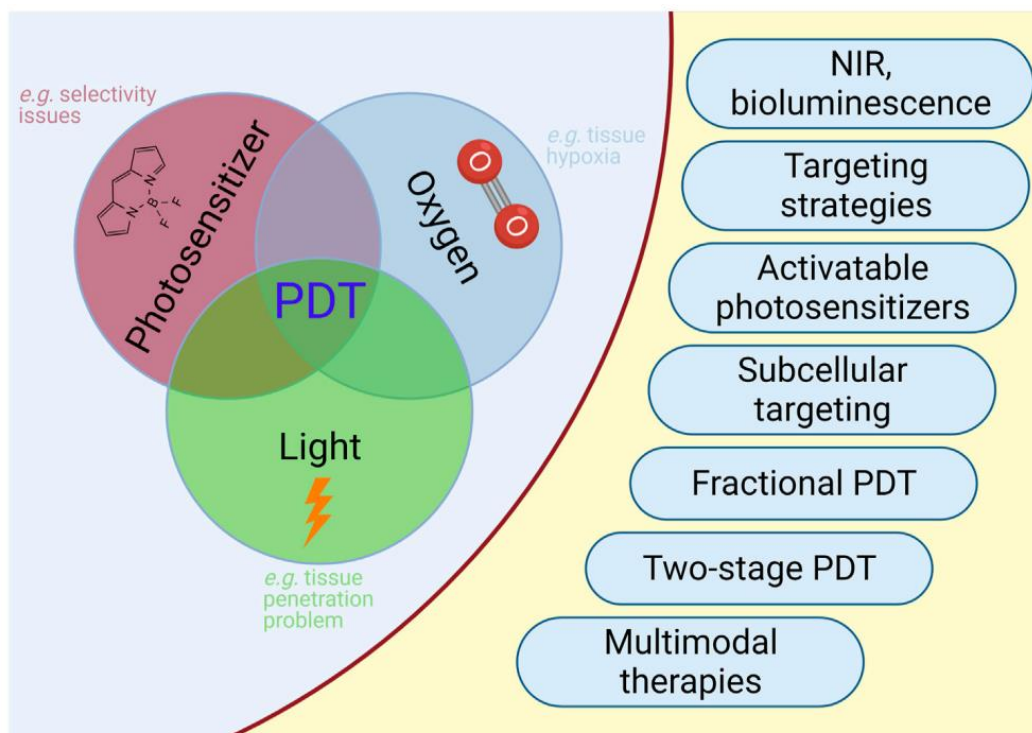


**Εικόνα 2.1.** Εφαρμογή της φωτοδυναμικής θεραπείας για την αντιμετώπιση του γλοιοβλαστώματος. Ο εγκεφαλικός όγκος ακτινοβολείται μέσω ειδικής διάταξης οπτικών ινών για τη διέγερση του χορηγημένου φωτοευαισθητοποιητή 5-ALA. [38]

Ωστόσο, η κλινική εφαρμογή της PDT εξακολουθεί να περιορίζεται σημαντικά από τα μειονεκτήματα των παραδοσιακών φωτοευαισθητοποιητών, την περιορισμένη διαπερατότητα του φωτός στον καρκινικό ιστό, την ανεπαρκή επαγωγή αποπτωτικού θανάτου στα καρκινικά κύτταρα και την αντίσταση του καρκινικού όγκου στη θεραπεία. [30]



Σύμφωνα με το **Σχήμα 2.8**, οι περιορισμοί που παρουσιάζονται στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου δύναται να εξεταστούν με περισσότερη λεπτομέρεια έχοντας ως βάση αναφοράς τις τρεις βασικές παραμέτρους της PDT, το είδος του φωτοευαισθητοποιητή, το μοριακό οξυγόνο και το φως. Αρχικά αναφορικά με το είδος του φωτοευαισθητοποιητή, τα περισσότερα χρωμοφόρα οργανικά μόρια της συγκεκριμένης κατηγορίας παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και έντονη τάση συσσωμάτωσης στο νερό (διμερισμός μέσω π-π αλληλεπιδράσεων), με αποτέλεσμα να χάνουν τη φωτοδυναμική τους δραστηριότητα στο υδατικό περιβάλλον, και κατ' επέκταση τη δράση τους *in vivo*. Το υποξικό περιβάλλον των στερεών καρκινικών όγκων, όπως περιγράφεται στο **Κεφάλαιο 1**, περιορίζει σημαντικά το μοριακό οξυγόνο που διατίθενται για την έναρξη των φωτοχημικών αντιδράσεων της PDT. Το παραπάνω σε συνδυασμό με την ταχεία κατανάλωση του μοριακού οξυγόνου που παρουσιάζει συνήθως η φωτοδυναμική θεραπεία, την καθιστά αυτοπεριοριζόμενη διεργασία, και κατά συνέπεια η ακτινοβολία προτείνεται να πραγματοποιείται σε διακριτές δόσεις, ώστε να μην εξαντληθεί το υπάρχον οξυγόνο στον καρκινικό όγκο. Τέλος, το φως δεν μπορεί να διεισδύσει παρά μόνο μερικά mm στους βιολογικούς ιστούς, περιορίζοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας σε επιφανειακούς καρκίνους. Συνεπώς, για την καταπολέμηση καρκινικών όγκων που βρίσκονται βαθύτερα στους ιστούς του οργανισμού και σε δυσπρόσιτα σημεία, όπως οι εγκεφαλικοί όγκοι, είναι αναγκαία η ενίσχυση της φωτοδυναμικής θεραπείας με διαδικασίες επεμβατικού χαρακτήρα (χειρουργείο, εμφύτευση οπτικών ινών στον ιστό) και με ιονίζουσες ακτινοβολίες (ακτίνες X) για την επίτευξη μεγαλύτερου βάθους διείσδυσης. Ωστόσο, οι παραπάνω τεχνικές επιβαρύνουν περαιτέρω τον οργανισμό του ασθενή και αυξάνουν τον κίνδυνο πρόκλησης τραυματισμού στον υγιή ιστό. [39]



**Σχήμα 2.8.** Κυριότεροι περιορισμοί και οι προτεινόμενες στρατηγικές επίλυσής τους στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου. [39]

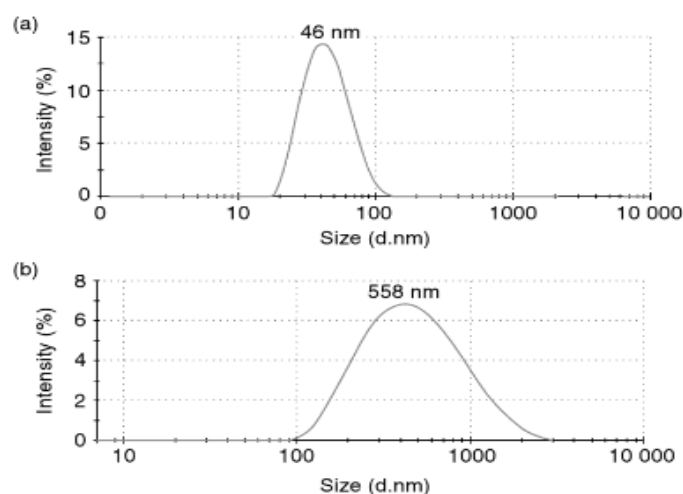
Ένα ακόμα από τα μειονεκτήματα της φωτοδυναμικής θεραπείας για την αντιμετώπιση των επιφανειακών καρκίνων, αποτελεί η πρόκληση οξύ πόνου στον ασθενή κατά την ακτινοβολήση. Ο πόνος που προκαλείται από τα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής θεραπείας, με χρήση μπλε ή κόκκινου φωτός, δεν δύναται να καταπραυνθεί με κάποιον αναισθητικό παράγοντα (με εξαίρεση τον πάγο), με αποτέλεσμα οι ασθενείς να διακόπτουν τη θεραπεία. Έχει βρεθεί άμεση συσχέτιση ανάμεσα στον προκαλούμενο πόνο και στον απαιτούμενο χρόνο επώασης του εκάστοτε φωτοευαισθητοποιητή, δεδομένου ότι απαιτείται συγκεκριμένο χρονικό διάστημα ώστε η ουσία με τη φωτοδυναμική δράση να συσσωρευτεί στο βιολογικό στόχο. Για τον περιορισμό του πόνου, έχει προταθεί η μείωση του απαιτούμενου χρόνου επώασης μέσω της διαδερμικής χορήγησης του φωτοευαισθητοποιητή στον καρκινικό ιστό, και εν συνεχεία η απευθείας έκθεση σε ηλιακό φως έναντι τεχνητής δέσμης (daylight PDT). Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την εξαγωγή ενός ασφαλούς πρωτοκόλλου με στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα. [40]

## Κεφάλαιο 3. Νανοϊατρική

### 3.1 Τι ονομάζεται Νανοϋλικό;

Σύμφωνα με την προτυποποίηση ISO 2015 (International Organization for Standardization) ως νανοϋλικό ορίζεται ένα υλικό που διαθέτει τουλάχιστον μία εξωτερική του διάσταση στη νανοκλίμακα ('nano-object') ή εσωτερική ή επιφανειακή δομή στη νανοκλίμακα ('nanostructured material'). Συγκεκριμένα, ως 'nano-object' ορίζεται ένα διακριτό τμήμα του υλικού με μία, δύο ή τρεις εξωτερικές διαστάσεις στη νανοκλίμακα. Τα νανοσωματίδια ('nanoparticles') αποτελούν 'nano-objects' με όλες τις εξωτερικές διαστάσεις στη νανοκλίμακα, όπου τα μήκη των μεγαλύτερων και των μικρότερων δε διαφέρουν σημαντικά. Αν οι διαστάσεις διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, τυπικά πάνω από το τριπλάσιο, προτιμώνται ορισμοί, όπως νανοϊνα ('nanofibre') ή νανοφύλλο ('nanoplate'). Επιπλέον, ως νανοδομημένο υλικό ('nanostructured material') ορίζεται ένα υλικό, το οποίο διαθέτει εσωτερική ή επιφανειακή νανοδομή, όπως για παράδειγμα μία σύνθεση διασυνδεδεμένων τμημάτων, όπου ένα ή περισσότερα εκ των τμημάτων ανήκει στην περιοχή της νανοκλίμακας. Ως νανοκλίμακα ('nanoscale') ορίζεται το εύρος διαστάσεων 1 έως 100 nm.

Στο **Σχήμα 3.1** παρουσιάζονται δύο παραδείγματα υλικών για την αποσαφήνιση των παραπάνω εννοιών. [41]

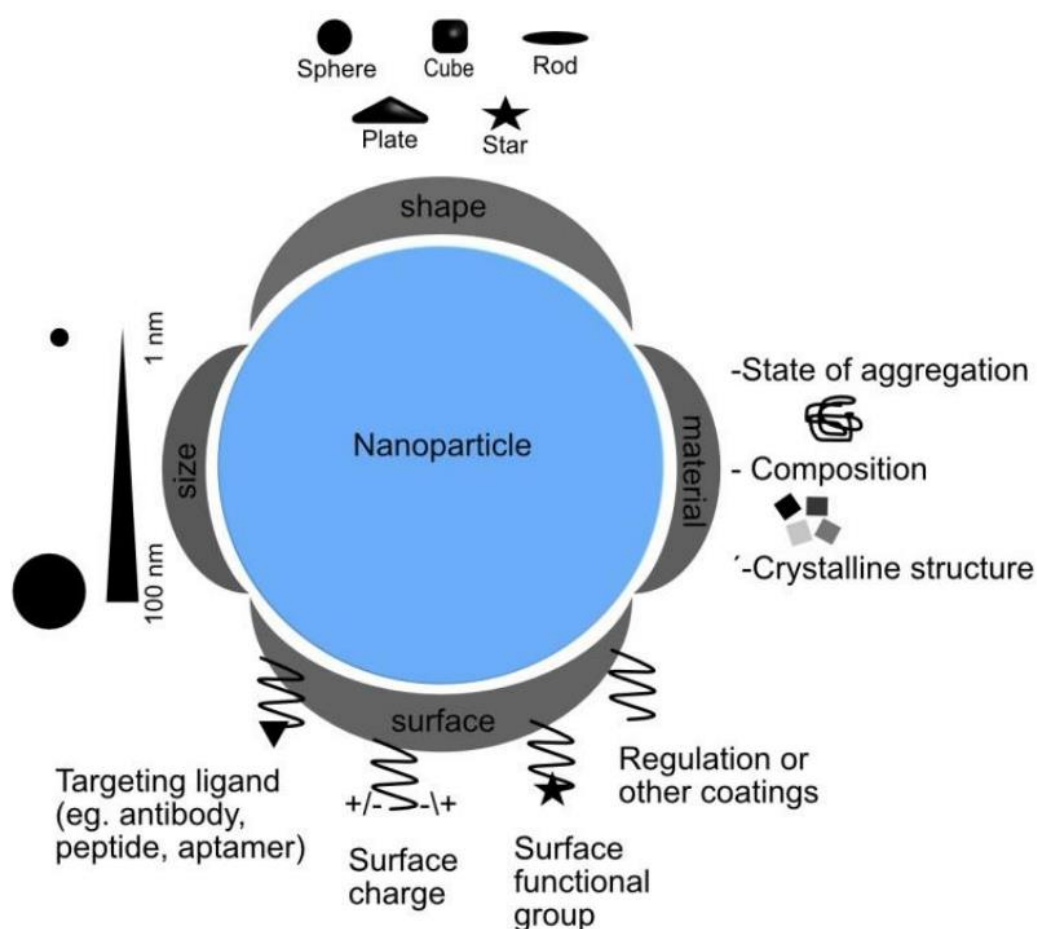


**Σχήμα 3.1.** Κατανομές μεγέθους νανοϋλικών προσδιοριζόμενες με την τεχνική δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). a) Νανοσωματίδια, των οποίων ολόκληρη η κατανομή μεγέθους βρίσκεται στο εύρος 1 – 100 nm σύμφωνα με τον τυπικό ορισμό. b) Πολυδιάσπαρτο δείγμα σωματιδίων, όπου μόνο ένα μικρό κλάσμα των σωματιδίων βρίσκεται στο εύρος 1 – 100 nm με τα υπόλοιπα να κατανέμονται στη νανο- και μικρο- κλίμακα. Το υλικό αυτό δεν κατατάσσεται στα νανοϋλικά με την τυπική έννοια παρόλο που διαθέτει σωματίδια με μία διάσταση στην κλίμακα των nm. [42]

Τα νανοϋλικά λόγω του πολύ μικρού τους μεγέθους θεωρείται ότι βρίσκονται στην επιφανειακή κατάσταση, γι' αυτό και επιδεικνύουν πολύ διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες από τα υλικά όγκου (bulk materials). Οι ιδιότητες αυτές αφορούν στην αυξημένη ειδική επιφάνεια, στη βελτίωση των μαγνητικών ιδιοτήτων, στην οπτική

διαφάνεια, στις ιδιάζουσες ηλεκτρικές και θερμικές ιδιότητες, στην υψηλή χημική δραστηριότητα, καθώς και στις ενισχυμένες μηχανικές ιδιότητες. Οι ιδιότητες της νανοκλίμακας στο περιβάλλον ενός βιολογικού συστήματος δύναται να οδηγήσουν σε διαφορετικές δράσεις συγκριτικά με τα σωματίδια μεγαλύτερων διαστάσεων. [43]

Στο **Σχήμα 3.2** συνοψίζονται τα κυριότερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων που επηρεάζουν την αλληλεπίδρασή τους με τα βιολογικά περιβάλλοντα. Στα παραπάνω περιλαμβάνονται το μέγεθος, το σχήμα, η κατανομή του φορτίου στην επιφάνεια του σωματιδίου, η ύπαρξη και το είδος επιφανειακών τροποποιήσεων (ομοιοπολική σύνδεση οργανικών μορίων βιολογικής στόχευσης, επικαλύψεις με πολυμερή), η χημική σύσταση, η κολλοειδής σταθερότητα και ο σχηματισμός πρωτεϊνικής κορώνας (αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με πρωτεΐνες του πλάσματος). [44]

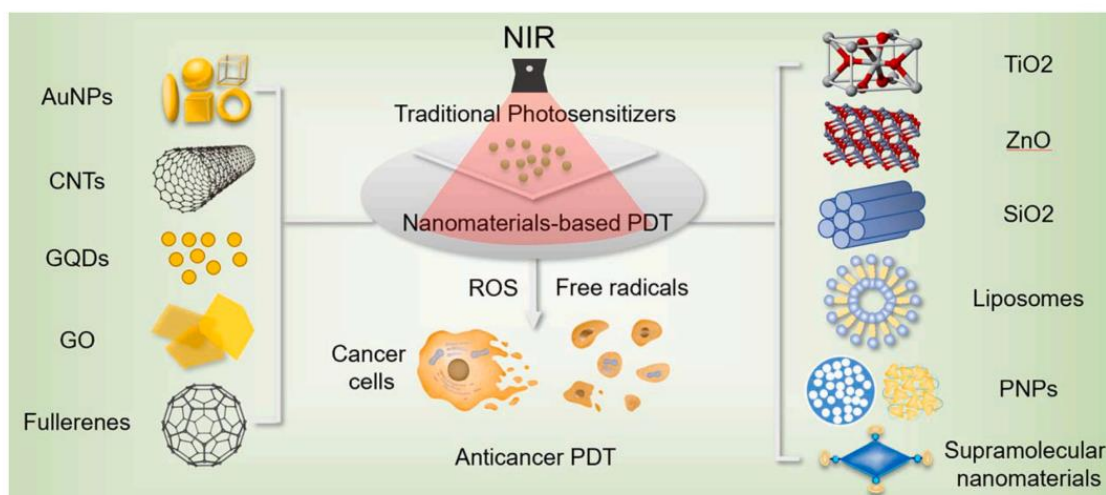


**Σχήμα 3.2.** Κυριότερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων που καθορίζουν το μηχανισμό της αλληλεπίδρασής τους με βιολογικά συστήματα. [44]

### 3.2 Νανοϋλικά για τη Θεραπεία και Διάγνωση του Καρκίνου

Η ανάπτυξη του κλάδου της Νανοϊατρικής (Nanomedicine) επιτρέπει τη δημιουργία καινοτόμων βιοσυμβατών και βιοαποικοδομήσιμων συστημάτων, με τη δυνατότητα να μεταφέρουν συμβατικούς χημειοθεραπευτικούς παράγοντες στοχευμένα στον καρκινικό όγκο *in vivo*, αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα και τη συγκέντρωση του φαρμάκου στον καρκινικό ιστό, και κατ' επέκταση ελέγχοντας το προφίλ της αποδέσμευσής τους στον οργανισμό. Τα νανοσωματίδια δύνανται να αξιοποιηθούν για μεγάλο εύρος εφαρμογών, ενσωματώνοντας διαγνωστικές και θεραπευτικές λειτουργικότητες. [45]

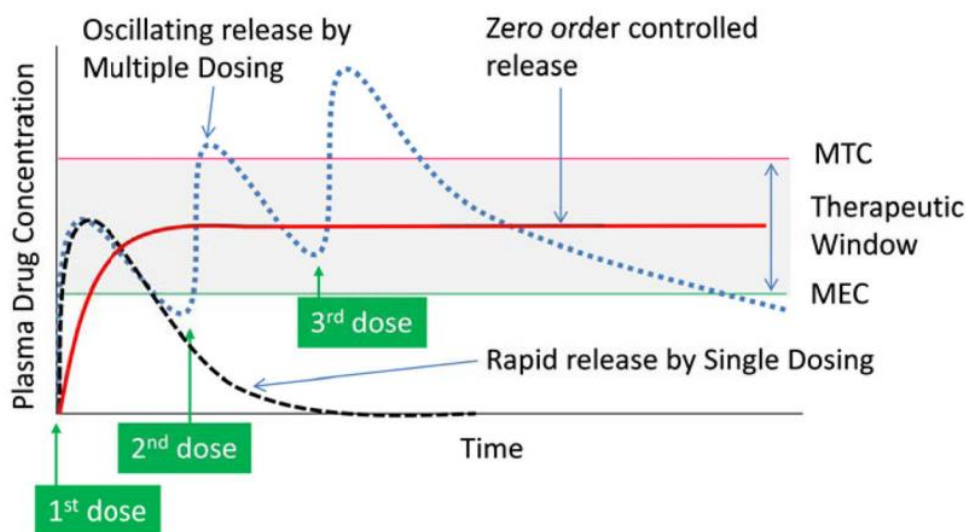
Σχετικά με τη φωτοδυναμική θεραπεία, η αξιοποίηση των νανοϋλικών ως φορέων μεταφοράς των φωτοευαισθητοποιητών αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση. Παρόλο που ορισμένοι φωτοευαισθητοποιητές έχουν εγκριθεί για κλινική χρήση στη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου, η PDT περιορίζεται σημαντικά από την αστάθεια και την απουσία στόχευσης των περισσότερων συμβατικών χρωμοφόρων μορίων. Πολλά είδη νανοϋλικών έχουν μελετηθεί ως υποψήφιοι φορείς φωτοδυναμικών παραγόντων, αλλά και ως υλικά με εγγενή φωτοδυναμική λειτουργικότητα. Στις παραπάνω κατηγορίες περιλαμβάνονται μεταλλικά νανοσωματίδια (λ.χ. Au NPs), νανοσωματίδια μεταλλικών οξειδίων ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{SiO}_2$ ), νανοϋλικά με βάση το γραφένιο (Graphene Oxide), νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs), φουλερένια, κβαντικές τελείες (QDs), λιποσώματα, πολυμερικά νανοσωματίδια (PNPs), νανοφορείς εκλεκτικοί ως προς το οξειδωτικό στρες και υπερμοριακά νανοϋλικά (Σχήμα 3.3). [46]



Σχήμα 3.3. Οπτική αναπαράσταση χρησιμοποιούμενων νανοϋλικών στη PDT. [46]

### 3.3 Νανosuστήματα Τροποποιημένης Αποδέσμευσης: Στόχευση στα Καρκινικά Κύτταρα

Από τους κυριότερους στόχους της χρήσης νανοφορέων ως συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων (Drug Delivery Systems, DDSs) είναι η επίτευξη τροποποιημένης αποδέσμευσης της χορηγούμενης ουσίας, τόσο ως προς το χρόνο όσο και ως προς το βιολογικό στόχο στον οργανισμό. Η χρονικά ελεγχόμενη αποδέσμευση αποσκοπεί στην διατήρηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στη συστηματική κυκλοφορία εντός του θεραπευτικού παραθύρου για τον περιορισμό της εμφάνισης παρενεργειών (Σχήμα 3.4). Όταν ένα ελεύθερο φάρμακο χορηγείται σε μία μοναδική υψηλή δόση, η συγκέντρωση της ουσίας στο πλάσμα του αίματος υπερβαίνει το τοξικό όριο και στη συνέχεια μειώνεται απότομα κάτω από τη θεραπευτική συγκέντρωση. Η λήψη πολλαπλών δόσεων σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, αν και μπορεί να περιορίσει τη διακύμανση στη συγκέντρωση του φαρμάκου στη συστηματική κυκλοφορία, αυτό δεν επιτυγχάνεται πάντα λόγω της μη συμμόρφωσης του ασθενή στη λήψη της θεραπείας. Το παραπάνω πρόβλημα επιλύεται μέσω του κατάλληλου σχεδιασμού νανοφορέων για την αποδέσμευση του φαρμάκου με αργό και σταθερό ρυθμό στον οργανισμό. [47]

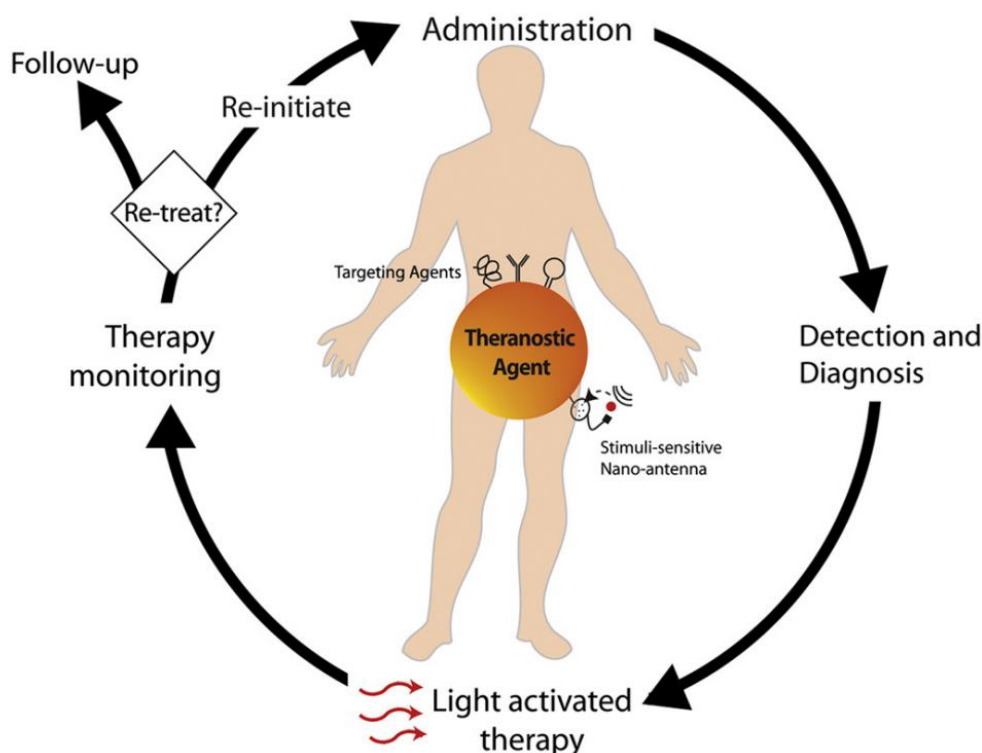


**Σχήμα 3.4.** Συγκέντρωση του φαρμάκου στη συστηματική κυκλοφορία συναρτήσει του χρόνου. [47]

Τα χαρακτηριστικά της τροποποιημένης αποδέσμευσης ως προς το χρόνο είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τη χορήγηση φωτοευαισθητοποιητών μέσω κατάλληλων νανosuστημάτων μεταφοράς. Κατά αυτόν τον τρόπο, ο φωτοευαισθητοποιητής αποδεσμεύεται σταδιακά στον καρκινικό όγκο και αντιδρά αμέσως με το προσπίπτον φως, με αποτέλεσμα να μην συσσωρεύεται η περίσσεια του ελεύθερου φαρμάκου στους βιολογικούς ιστούς προκαλώντας υπερευαισθησία και οξύ πόνο στον ασθενή. [40]

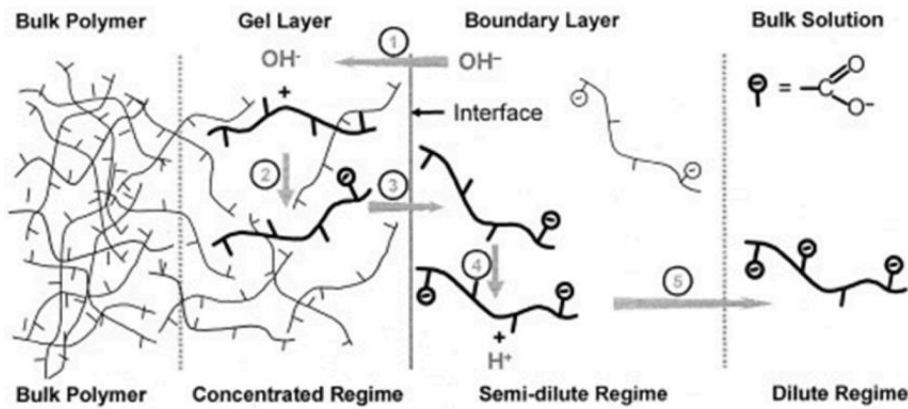
Η θεραπευτική δράση του φαρμάκου δύναται παρουσιάσει συνέργεια με το φορέα μεταφοράς, ιδίως στις περιπτώσεις που η αποδέσμευση ελέγχεται από εξωτερικά

ερεθίσματα. Το γεγονός ότι η ενεργοποίηση του θεραπευτικού και διαγνωστικού παράγοντα, στην προκειμένη περίπτωση, ελέγχεται από μία εξωτερική παράμετρο, όπως η ακτινοβολία, ενισχύει την εξειδίκευση της θεραπείας επάγοντας κυτταροτοξικότητα μόνο στα καρκινικά κύτταρα. Η ικανότητα ρύθμισης της αποδέσμευσης του φάρμακου, τόσο ως προς το χρόνο (κινητική) όσο και ως προς τον χώρο (στόχευση), αποτελεί το σημαντικότερο στόχο της ανάπτυξης συστημάτων μεταφοράς για τη μεγιστοποίηση του θεραπευτικού αποτελέσματος και την εξάλειψη των παρενεργειών. [35]



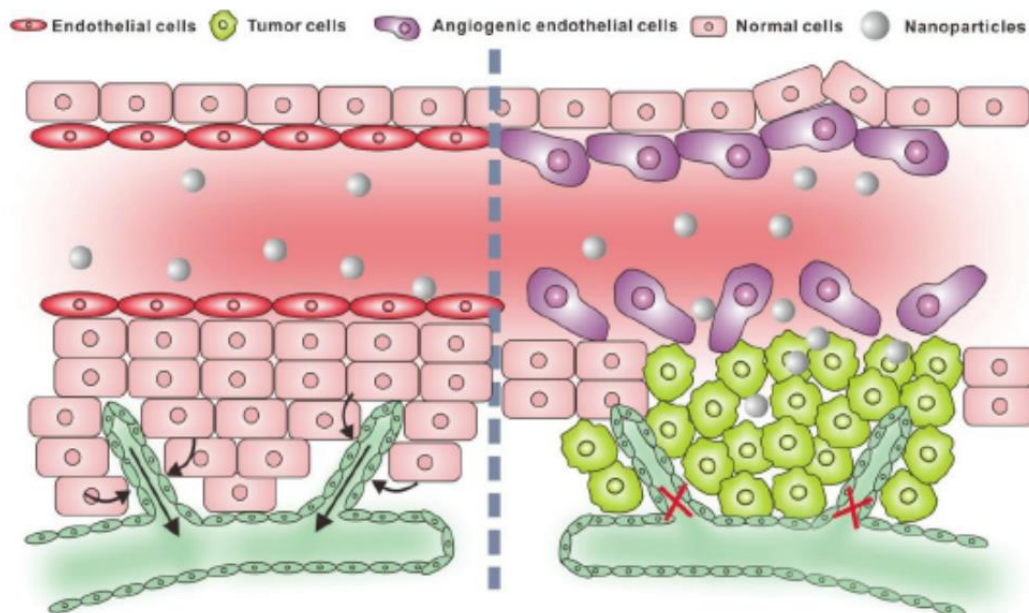
**Σχήμα 3.5.** Γενικό σχήμα εφαρμογής παραγόντων στόχευσης στη PDT με ενεργοποίηση ελεγχόμενη από εξωτερικά ερεθίσματα. [35]

Πέρα από το μηχανισμό της φωτοαποκρινόμενης αποδέσμευσης, η ανατομία και οι μεταβολικές λειτουργίες του καρκινικού όγκου που αναλύθηκαν στο **Κεφάλαιο 1** (όξινο μικροπεριβάλλον, υποξία) αποτελούν τη βάση για το σχεδιασμό νανοσυστημάτων, τα οποία αποδεσμεύουν το φωτοευαίσθητοποιητή εκλεκτικά μόλις φθάσουν στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Για παράδειγμα, έχουν αναπτυχθεί πολυμερικά νανοσυστήματα μεταφοράς, τα οποία αποδεσμεύουν τον εγκλωβισμένο φωτοευαίσθητοποιητή στοχευμένα στα καρκινικά κύτταρα, μέσω της διάβρωσης της πολυμερικής μήτρας των νανοσωματιδίων από το όξινο μικροπεριβάλλον του καρκινικού ιστού (pH-responsive release). [48] Ο μηχανισμός της διάβρωσης παρουσιάζεται στο **Σχήμα 3.6**.



**Σχήμα 3.6.** Μηχανισμός διαλυτοποίησης πολυμερούς αποκρινόμενου στο pH του υδατικού μέσου. Αναλυτικά στάδια: 1) Διάχυση μορίων νερού και ανιόντων OH<sup>-</sup> διαμέσου της μήτρας του πολυμερούς προς σχηματισμό στιβάδας γέλης (gel layer). 2) Ιονισμός των πολυμερικών αλυσίδων στη στιβάδα γέλης. 3) Αποσύμπλεξη των πολυμερικών αλυσίδων από τη στιβάδα γέλης στη διεπιφάνεια υλικού-διαλύματος. 4) Περαιτέρω ιονισμός των αλυσίδων του πολυμερούς στη διεπιφάνεια. 5) Διάχυση των αποσυμπλεγμένων αλυσίδων του πολυμερούς από τη διεπιφάνεια στον κύριο όγκο του υδατικού διαλύματος. [49]

Τέλος, οι νανοφορείς παρουσιάζουν το πλεονέκτημα της εκλεκτικής συσσώρευσης εντός του καρκινικού ιστού μέσω του φαινομένου της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης (EPR). Ειδικότερα, η ελαττωματική δομή του αγγειακού δικτύου των καρκινικών όγκων επιτρέπει την ελεύθερη εισχώρηση νανοσωματιδίων από τη συστηματική κυκλοφορία, τα οποία συσσωρεύονται στον όγκο, επιτυγχάνοντας εν τέλει εξειδικευμένη αποδέσμευση του αντικαρκινικού παράγοντα. Αντίθετα, τα επιθηλιακά κύτταρα του υγιούς ιστού αποτελούν φραγμό για την είσοδο των νανοσωματιδίων. Αυτό το είδος χωρικά εξειδικευμένης αποδέσμευσης ονομάζεται και παθητική στόχευση (**Σχήμα 3.7**). [50]

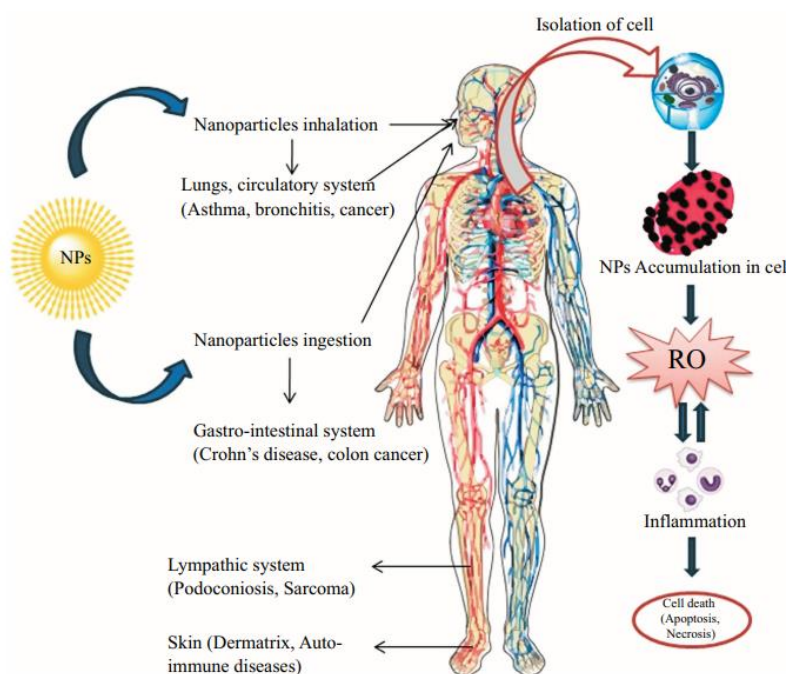


**Σχήμα 3.7.** Παθητική στόχευση στον καρκινικό όγκο μέσω του φαινομένου EPR. [50]



### 3.4 Νανοτοξικότητα

Οι ιδιάζουσες φυσικοχημικές ιδιότητες που πηγάζουν από τη νανο-κλίμακα είναι πιθανόν να προκαλούν νέου τύπου τοξικές αποκρίσεις στην ανθρώπινη υγεία και στο περιβάλλον. Όσο μειώνεται το μέγεθος των σωματιδίων αυξάνεται η συνολική επιφάνεια του υλικού, με αποτέλεσμα υψηλότερο ποσοστό των ατόμων να βρίσκεται στην επιφάνεια από ότι στον κύριο όγκο. Αυτό οδηγεί σε σημαντική αύξηση της χημικής δραστηριότητας της επιφάνειας των νανოსωματιδίων που μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις με βιομόρια του οργανισμού (πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα). Σε αυτή την περίπτωση πρέπει να μελετηθούν οι μηχανισμοί που υπαγορεύουν τη συμπεριφορά και τη βιοδιανομή των νανοςωματιδίων αφού εισαχθούν στο σώμα, όχι μόνο για την ανάπτυξη νανοϋλικών για στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, αλλά και για την πρόβλεψη των πιθανών τοξικολογικών αποκρίσεων που οφείλονται στη νανοκλίμακα. Είναι σημαντικό να εκτιμηθεί αν οι πιθανές ανεπιθύμητες επιδράσεις των νανοϋλικών παρατηρούνται εξαιτίας των νανοδιαστάσεών τους, δηλαδή αν τα νανοϋλικά προκαλούν νέους τύπους επιδράσεων που δεν παρατηρούνται στα υλικά μεγαλύτερου μεγέθους με την ίδια σύσταση. Τα νανοςωματίδια διεισδύουν εύκολα στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της όσφρησης, του πεπτικού συστήματος και του δέρματος, με αποτέλεσμα να προκαλούν μακροχρόνια βλάβες σε ζωτικά όργανα του αναπνευστικού, γαστρεντερικού, κυκλοφορικού και κεντρικού νευρικού συστήματος (Σχήμα 3.8). Ο ακριβής μηχανισμός της νανοτοξικότητας δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί με βεβαιότητα από την επιστημονική κοινότητα, εγείροντας ερωτηματικά αναφορικά με την ταχεία ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας. [51]



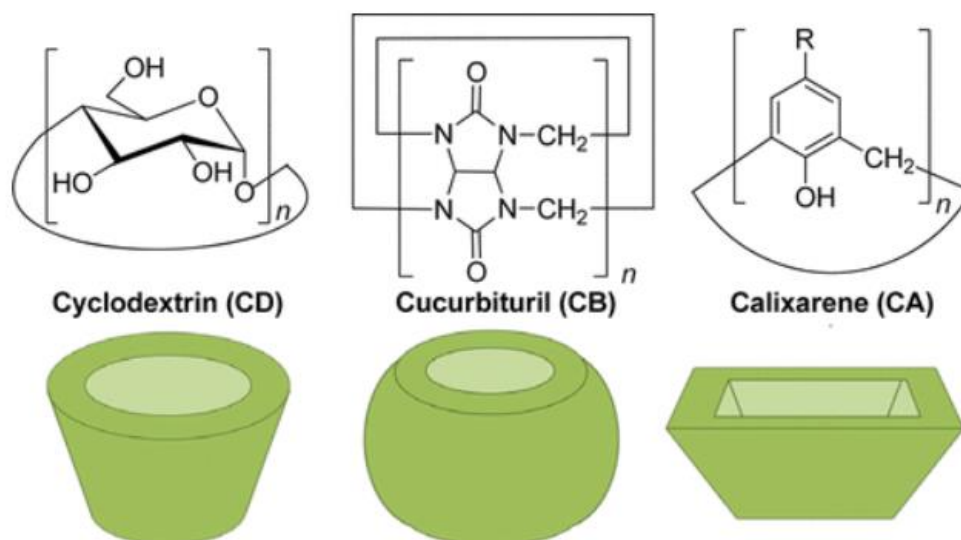
**Σχήμα 3.8.** Οπτική αναπαράσταση της έννοιας της νανοτοξικότητας και πιθανός μηχανισμός ερμηνείας. [51]

## Κεφάλαιο 4. Μελέτη Περίπτωσης: Υπερμοριακά Σύμπλοκα (Supramolecular Host-Guest Complexes) ως Φορείς Φωτοευαισθητοποιητών Εγγύς Υπερύθρου (NIR PSS)

### 4.1 Εισαγωγή

Η παρούσα διπλωματική εργασία εστιάζει στην ανάπτυξη νανοσυστημάτων που βασίζονται σε υπερμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός φορέα-ξενιστή και του φιλοξενούμενου φαρμακομορίου (Host-Guest Interactions). Τα παραπάνω συστήματα διακρίνονται σε τέσσερις επιμέρους κατηγορίες ανάλογα το είδος του χρησιμοποιούμενου μακροκυκλικού ξενιστή:

1. Κυκλοδεξτρίνες
2. Καλιξαρένια
3. Μακρομόρια Cucurbituril
4. Ξενιστές-μέταλλα



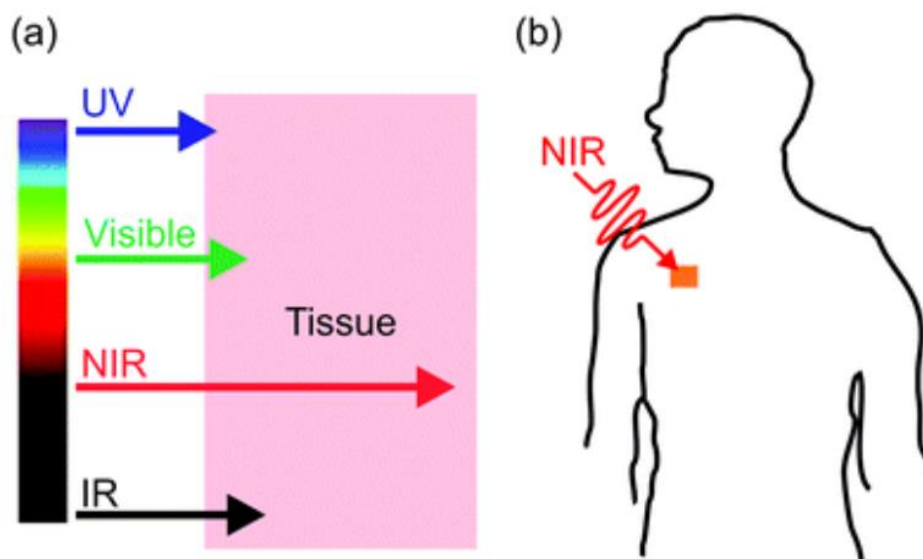
**Σχήμα 4.1.** Υπερμοριακοί ξενιστές: Κυκλοδεξτρίνες (CDs), Cucurbiturils (CBs) και Καλιξαρένια (CAs). [52]

Τα υπερμοριακά σύμπλοκα ως νανοσυστήματα μεταφοράς δύναται να χρησιμοποιηθούν ως σκιαγραφικές ουσίες για την διάγνωση του καρκίνου ή/και ως φορείς για τον εγκλωβισμό αντικαρκινικών παραγόντων. Τέτοιου είδους συστήματα υπερτερούν ως προς την ευελιξία που παρουσιάζουν στη σύνθεση και ανοικοδόμηση πολύπλοκων υπερμοριακών νανοδομών με εξαιρετικά εκλεκτική γεωμετρία και ιδιότητες. Οι υπερμοριακοί νανοφορείς απαντώνται συνήθως υπό τη μορφή μικκυλίων, κυστιδίων και νανοσωματιδίων για τη μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών. Μέσω της σύζευξής τους με άλλα νανοϋλικά, υπάρχει η δυνατότητα ανάπτυξης καινοτόμων υβριδικών νανοφορέων ικανών να επιτελούν ταυτόχρονα πολλαπλές λειτουργίες, με στόχο τη σύνθεση νέων συστημάτων θεραπείας και διάγνωσης του καρκίνου (Theranostics). [52]

Λόγω της εκτενούς εμπορικής αξιοποίησης των κυκλοδεξτρινών συγκριτικά με τους υπόλοιπους υπερμοριακούς ξενιστές, η ανάλυση θα πραγματοποιηθεί εστιασμένα στα σύμπλοκα εγκλωβισμού των κυκλοδεξτρινών με φωτοδυναμικούς και σκιαγραφικούς παράγοντες. [52]

#### 4.2 Φωτοευαισθητοποιητές Εγγύς Υπερύθρου (NIR PSSs)

Μία από τις κυριότερες προκλήσεις της φωτοδυναμικής θεραπείας και των *in vivo* απεικονίσεων των καρκινικών όγκων, αποτελεί η περιορισμένη διαπερατότητα της ακτινοβολίας στους βιολογικούς ιστούς, καθώς απορροφάται σημαντικά από τα υπάρχοντα χρωμοφόρα βιομόρια, όπως αναλύθηκε στο **Κεφάλαιο 2**. Γι' αυτό το σκοπό έχουν αναπτυχθεί νέοι φωτοευαισθητοποιητές που απορροφούν και εκπέμπουν φως στην περιοχή του εγγύς υπέρυθρου (Near Infra-Red, NIR), η οποία αφορά στο φασματικό εύρος 700 έως 1000 nm. Εκεί παρατηρείται το μέγιστο βάθος διείσδυσης της ακτινοβολίας στον οργανισμό, με αποτέλεσμα να ελαχιστοποιείται ο θόρυβος από τους βιολογικούς ιστούς και να αυξάνεται το σήμα της απεικόνισης (**Σχήμα 4.2**). [53]



**Σχήμα 4.2** a) Βάθος διείσδυσης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στους βιολογικούς ιστούς ως συνάρτηση του μήκος κύματος. Η εγγύς υπέρυθη ακτινοβολία (NIR) παρουσιάζει μεγαλύτερο βάθος διείσδυσης από την υπεριώδη και την ορατή λόγω της περιορισμένης απορρόφησης από τα χρωμοφόρα βιομόρια του οργανισμού. Ωστόσο, σε μεγαλύτερη μήκη κύματος, στην υπέρυθη περιοχή (IR), περιορίζεται η διείσδυση του φωτός από την απορρόφηση των μορίων νερού στους μαλακούς ιστούς. b) Η εγγύς υπέρυθη ακτινοβολία διαπερνά τους ιστούς και διεγείρει τον χορηγημένο φωτοευαισθητοποιητή του θεραπευτικού ή/και απεικονιστικού σχήματος. [54]

Στον **Πίνακα 4.1** παρουσιάζονται οι κυριότερες κατηγορίες χρωστικών εγγύς υπέρυθρου και οι φωτοφυσικές ιδιότητες που σχετίζονται με την ικανότητα τους να αποτελέσουν εναλλακτικές προτάσεις στη φωτοδυναμική θεραπεία και στις ιατρικές απεικονίσεις φθορισμού (NIR Fluorescence Imaging).

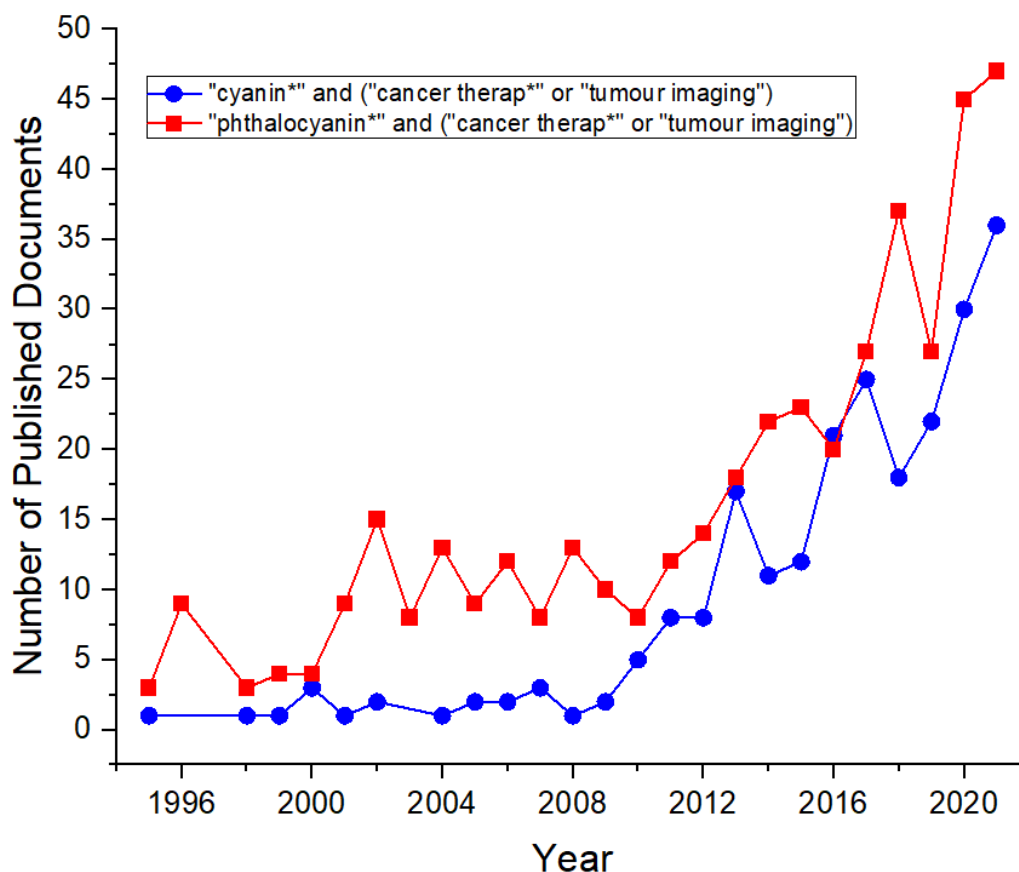
**Πίνακας 4.1.** Κυριότερες κατηγορίες χρωστικών εγγύς υπερύθρου και οι φωτοφυσικές τους ιδιότητες. ( $\lambda_{max}$  (Abs): μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης,  $\lambda_{max}$  (Emis): μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής φθορισμού,  $\epsilon$ : γραμμομοριακή απορροφητικότητα). [53]

Χρωστικές Εγγύς Υπερύθρου	$\lambda_{max}$ (Abs) (nm)	$\lambda_{max}$ (Emis) (nm)	$\epsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )
Κυανίνες	>700	>800	>200,000
Παράγωγα σκουαρίνης	650-800	>800	100,000-300,000
Φθαλοκυανίνες και παράγωγα πορφυρίνης	650-800	700-1000	>100,000
Ανάλογα διπυρομεθανίου του βορονίου (BODIPY)	650-800	>700	>200,000

Ωστόσο, για να χρησιμοποιηθούν οι παραπάνω χρωστικές σε *in vivo* απεικονίσεις φθορισμού NIRF απαιτείται η χημική σύζευξη με λειτουργικούς υποκαταστάτες που προσφέρουν την απαιτούμενη στόχευση στα καρκινικά κύτταρα (μεταβολικά υποστρώματα, πεπτίδια, αντισώματα) για την εξασφάλιση της ακρίβειας στην απεικόνιση. Συνεπώς, μόνο συγκεκριμένοι τύποι καρκίνων μπορούν να ανιχνευθούν επιτυχώς μέσω των φθορίζουσών ενώσεων εξαιτίας της ετερογένειας που παρουσιάζουν τα κύτταρα των καρκινικών όγκων (**Κεφάλαιο 1**). Συνεπώς, είναι αναγκαία η εύρεση νέων χρωστικών εγγύς υπερύθρου για την αντιμετώπιση των παραπάνω προκλήσεων. [55]

Τα τελευταία έτη έχουν αναπτυχθεί καινοτόμα οργανικά ετεροκυκλικά μόρια με τη εγγενή ιδιότητα να επιτελούν ταυτόχρονα απεικόνιση μέσω εκπομπής φθορισμού και στόχευση στα καρκινικά κύτταρα, χωρίς την ανάγκη για χημική σύζευξη με άλλους υποκαταστάτες. Οι ενώσεις αυτές ανήκουν στην κατηγορία των κυανινών επταμεθνίου (heptamethine cyanine dyes) και παρουσιάζουν εκλεκτική συσσώρευση και κατακράτηση σε διαφορετικούς τύπους καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, εισέρχονται επιλεκτικά στα μιτοχόνδρια και στα λυσοσώματα των καρκινικών κυττάρων, χωρίς να συσσωρεύονται σε υγιείς ιστούς. [55]

Για την επιβεβαίωση των παραπάνω, πραγματοποιείται βιβλιομετρική ανάλυση με σκοπό τη σύγκριση της χρήσης των κυανινών και των φθαλοκυανινών από την επιστημονική κοινότητα, καθώς οι τελευταίες αποτελούν μία επίσης εκτεταμένη κατηγορία φωτοευαισθητοποιητών. Η αναζήτηση πραγματοποιείται εξειδικευμένα για την περίπτωση εφαρμογής των χρωστικών στη θεραπεία του καρκίνου και στην απεικόνιση όγκων. Επομένως, πραγματοποιείται αναζήτηση των όρων ‘cyanin\*’ and (‘cancer therap\*’ or ‘tumour imaging’) και phthalocyanin\* and (‘cancer therap\*’ or ‘tumour imaging’) στη βάση δεδομένων Scopus. Καταγράφεται ο αριθμός των δημοσιευμένων εργασιών σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά για κάθε έτος και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Σχήμα 4.3**.

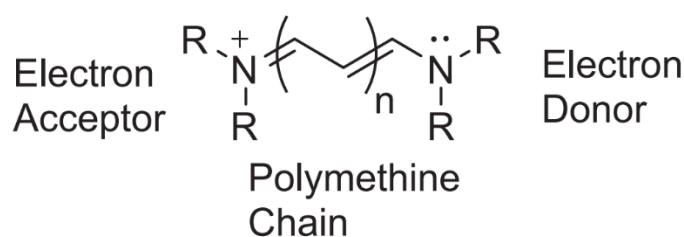


**Σχήμα 4.3.** Βιβλιομετρική ανάλυση αναφορικά με τη χρήση των κυανινών και των φθαλοκυανινών στη θεραπεία του καρκίνου και στην απεικόνιση κακοηθών όγκων στο διάστημα 1995-2022. Χρησιμοποιήθηκαν οι όροι αναζήτησης ‘cyanin\*’ and (‘cancer therap\*’ or ‘tumour imaging’) και phthalocyanin\* and (‘cancer therap\*’ or ‘tumour imaging’) στη βάση δεδομένων Scopus (31 Ιουλίου 2022).

Από τη βιβλιομετρική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, προκύπτει ότι τόσο οι φθαλοκυανίνες όσο και οι κυανίνες, παρουσιάζουν τα τελευταία έτη εκθετικά αυξανόμενο ενδιαφέρον από την επιστημονική κοινότητα για τη θεραπεία του καρκίνου. Οι φθαλοκυανίνες έχουν χρησιμοποιηθεί ελαφρώς εκτενέστερα από τις κυανίνες, καθώς η εφαρμογή τους στους βιοϊατρικούς τομείς έχει ξεκινήσει από τις αρχές της δεκαετίας του 2000. Ωστόσο, οι κυανίνες παρουσιάζουν ταχύτερο ρυθμό αύξησης στον αριθμό των δημοσιεύσεων στο διάστημα 2018-2021 από ότι οι φθαλοκυανίνες, υποδεικνύοντας ότι πιθανώς στα επόμενα έτη θα αποτελέσουν την κατηγορία φωτοευαισθητοποιητών με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Σε αυτό το πλαίσιο, επιλέγεται η εμβάθυνση της εργασίας στην κατηγορία των κυανινικών χρωστικών.

### 4.2.1 Κυανίνες

Κατά κανόνα, τα μόρια των κυανινών απαρτίζονται από δύο ετεροκυκλικούς πυρήνες που συνδέονται μεταξύ τους μέσω μίας αλυσίδας αποτελούμενης από περιττό αριθμό μονάδων μεθυνίου ( $-\text{CH}=\text{}$ ) (polymethine chain). Κατά αυτό τον τρόπο εξυπηρετείται ο απεντοπισμός του φορτίου από τη μία άκρη του μορίου στην άλλη, μέσω του σχηματιζόμενου υπερσυζυγιακού συστήματος. Όσο εκτενέστερος είναι ο απεντοπισμός του φορτίου στο χρωμοφόρο μόριο, τόσο υψηλότερο είναι και το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης που παρουσιάζει η κυανίνη. Σε αυτό το φαινόμενο οφείλεται η απορρόφηση και εκπομπή εγγύς υπερύθρου ακτινοβολίας από τους κυανικούς φωτοευαισθητοποιητές στην περιοχή των 750-1100 nm. [56], [57]



**Σχήμα 4.4.** Γενικός συντακτικός τύπος της ομάδας των κυανινών. (n: περιττός αριθμός μονάδων  $-\text{CH}=\text{}$ ) στην πολυμεθυνική αλυσίδα του μορίου) [57]

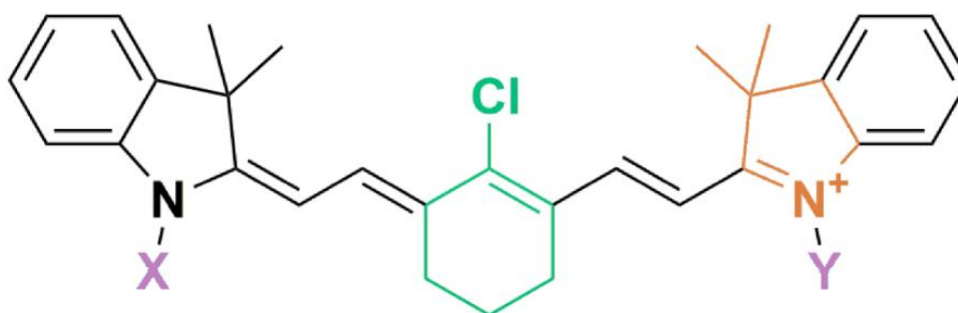
Από το γενικό συντακτικό τύπο του **Σχήματος 4.4**, δύναται να προκύψει πλήθος κυανινικών αναλόγων με σχετικά απλές χημικές τροποποιήσεις στο σκελετό του μορίου. Αυτές περιλαμβάνουν τη διαφοροποίηση του ετεροατόμου των δακτυλίων, την N-αλκυλίωση και τη μεταβολή του μήκους της πολυμεθυνικής αλυσίδας. [56]

Ανάλογα με τον αριθμό των ομάδων  $-\text{CH}=\text{}$  της αλυσίδας πολυμεθυνίου, οι κυανίνες διακρίνονται σε ανάλογα μονο-, τρι-, πεντα- και επτα-μεθυνίου, με το συντελεστή  $n=0, 1, 2$  και  $3$  αντίστοιχα. Οι φωτοφυσικές ιδιότητες των κυανινών, όπως το μήκος κύματος απορρόφησης και εκπομπής ακτινοβολίας, καθορίζονται από το μήκος της πολυμεθυνικής αλυσίδας και το είδος των τερματικών ομάδων του μορίου. Οι κυανίνες μονο- και τρι-μεθυνίου συνήθως απορροφούν στην ορατή περιοχή (500-600 nm) του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, με κάθε ομάδα  $-\text{CH}=\text{}$  που προστίθεται στο μόριο να προκαλεί βαθοχρωμική μετατόπιση κατά 100 nm. Έτσι, οι πεντα- και επτα-μεθυνικές κυανίνες παρουσιάζουν απορρόφηση σε μεγαλύτερο μήκος κύματος, άνω των 700 nm. [57]

Από τα διαφορετικά είδη κυανικών αναλόγων, οι κυανίνες επταμεθυνίου (Heptamethine Cyanine Dyes, HMCDS) κατέχουν ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον ως φωτοευαισθητοποιητές και παράγοντες απεικόνισης, καθώς απορροφούν και εκπέμπουν ακτινοβολία εγγύς υπερύθρου, η οποία διεισδύει βαθύτερα στους ιστούς, ενώ παράλληλα παρουσιάζουν στόχευση ως προς τα καρκινικά κύτταρα. Η εκλεκτικότητα των HMCDS ως προς τον καρκινικό όγκο έχει συσχετιστεί με ορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, αυτά περιλαμβάνουν: [58]

- Συμπυκνωμένος δακτύλιος χλωρο-κυκλοεξενίου.
- Συνδεδεμένη αλκυλική αλυσίδα με το άζωτο του ινδολικού δακτυλίου.
- Παρουσία ιοντίζουσας χαρακτηριστικής ομάδας (καρβοξυλική ή σουλφονική ομάδα).

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά διακρίνονται στο **Σχήμα 4.5**, όπου παρουσιάζεται ο γενικός συντακτικός τύπος των HMCDs που έχουν χρησιμοποιηθεί ως παράγοντες στόχευσης ως προς τα καρκινικά κύτταρα. Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει ορισμένα ανάλογα (IR-780, IR-783, IR-786 και MHI-148) που παρουσιάζουν εκλεκτική συσσώρευση στα καρκινικά κύτταρα. Ειδικότερα, η κυανίνη MHI-148 έχει χρησιμοποιηθεί σε προκλινικές δοκιμές ως σκιαγραφικός παράγοντας για τη χειρουργική αφαίρεση νεφρού από ασθενή που έπασχε από καρκίνο του ουροποιητικού συστήματος. Από τα πειράματα απεικόνισης φθορισμού NIRF προέκυψε ότι το σήμα φθορισμού της κυανίνης στην περιοχή του καρκινικού όγκου είναι έξι φορές υψηλότερο από το σήμα στον περιβάλλοντα υγιή ιστό, σηματοδοτώντας την ικανότητα της συγκεκριμένης κυανίνης να παράγει ακριβείς απεικονίσεις υψηλής αντίθεσης. [58]

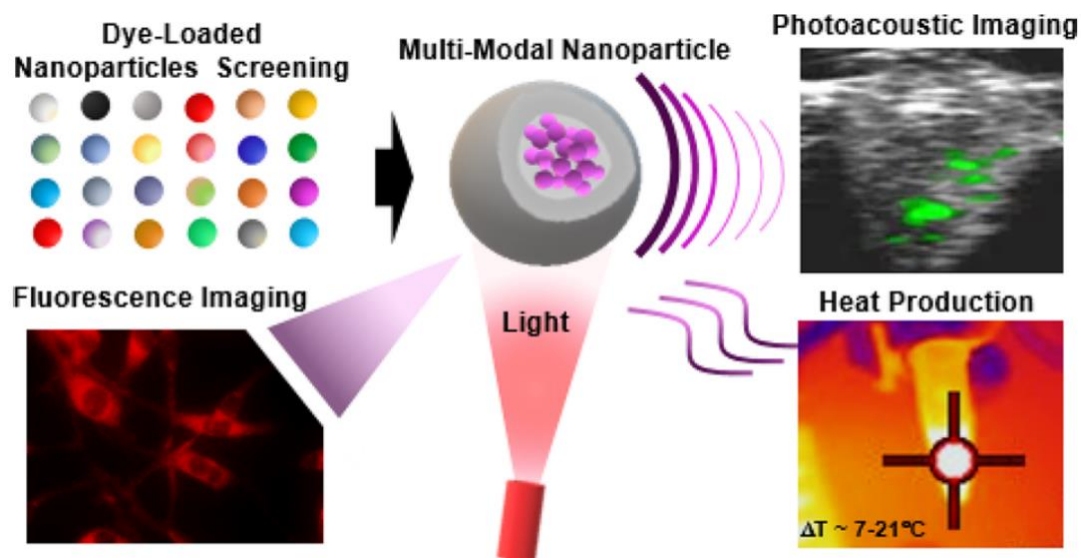


MHI-148, X=Y= (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COOH  
 IR-780, X=Y= (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
 IR-786 X=Y= CH<sub>3</sub>  
 IR-783, X=Y= (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>H  
 DZ-1, X= (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>H, Y= (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COOH

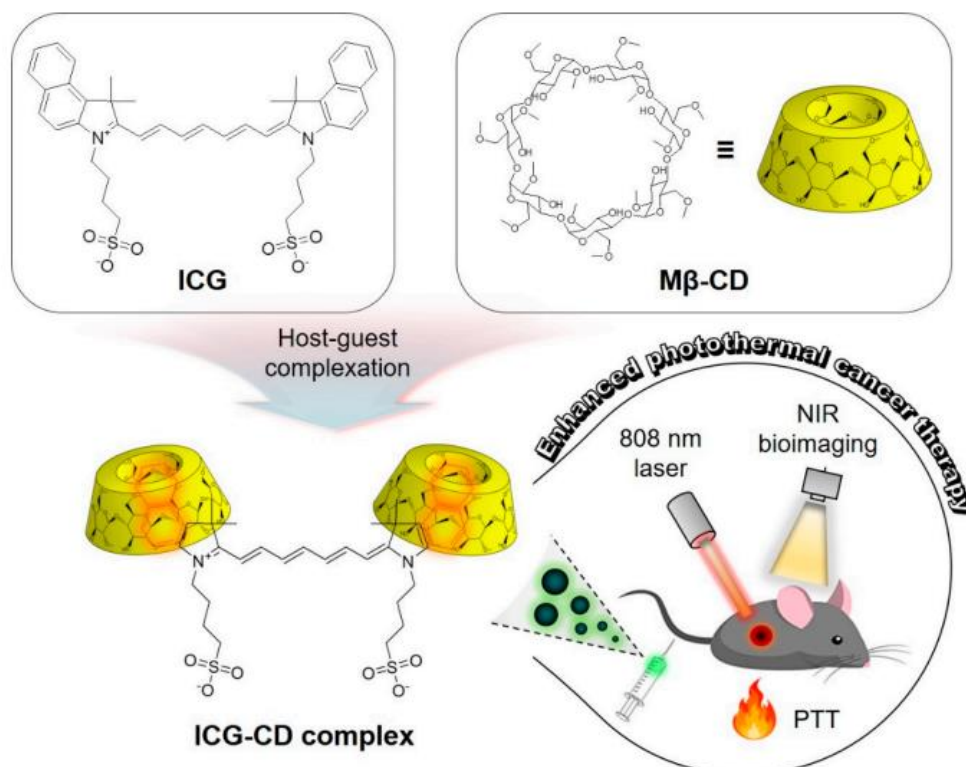
**Σχήμα 4.5.** Χημική δομή και μοριακά χαρακτηριστικά των HMCDs εγγύς υπερύθρου με εκλεκτικότητα ως προς τα καρκινικά κύτταρα. [58]

Ωστόσο, οι παραπάνω χρωστικές HMCDs παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα κατά την εφαρμογή τους *in vivo*. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, κατ' επέκταση βιοδιαθεσιμότητα, η ταχεία απέκκριση από τον οργανισμό μέσω του μεταβολισμού και η φωτοχημική αστάθεια. Παρόλο που τα παραπάνω μπορούν να βελτιωθούν με ορισμένες χημικές τροποποιήσεις στη δομή των κυανινών, υπάρχει η εναλλακτική προσέγγιση της νανοτεχνολογίας, η οποία επιτρέπει τον εγκλωβισμό των υδρόφοβων χρωστικών σε βιοσυμβατά νανοσυστήματα μεταφοράς. Με αυτό τον τρόπο αυξάνεται η υδατοδιαλυτότητα της κυανίνης στο βιολογικό μέσο, ενισχύεται η μεταβολική και φωτοχημική σταθερότητα της χρωστικής, ενώ παράλληλα αυξάνεται το μέγεθος του συστήματος μεταφοράς, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται ευκολότερα στο αγγειακό δίκτυο των στερεών καρκινικών όγκων μέσω του φαινομένου EPR. Τα παραγόμενα νανοσυστήματα μεταφοράς που περιέχουν την χρωστική (**Σχήματα 4.6** και **4.7**) μπορούν να επιτελέσουν ταυτόχρονα πλήθος

διαφορετικών λειτουργιών, όπως θεραπευτική δράση κατόπιν ακτινοβολήσης (φωτοδυναμική ή/και φωτοθερμική θεραπεία), και διαγνωστική μέσω διαφορετικών τεχνικών (NIRF, φωτοακουστική απεικόνιση). [59]



Σχήμα 4.6. Πολυλειτουργικά νανοσύστημα μεταφοράς χρωστικών HMCDs για θεραπεία και διάγνωση του καρκίνου. [59]



Σχήμα 4.7. Υπερμοριακό σύστημα τροποποιημένης μεθυλο-β-κυκλοδεξτρίνης ως φορέας μεταφοράς της υδρόφοβης κυανίνης ICG (Indocyanine Green), για ταυτόχρονη θεραπεία (Photothermal Therapy) και διάγνωση (NIR Bioimaging) του καρκίνου. [60]

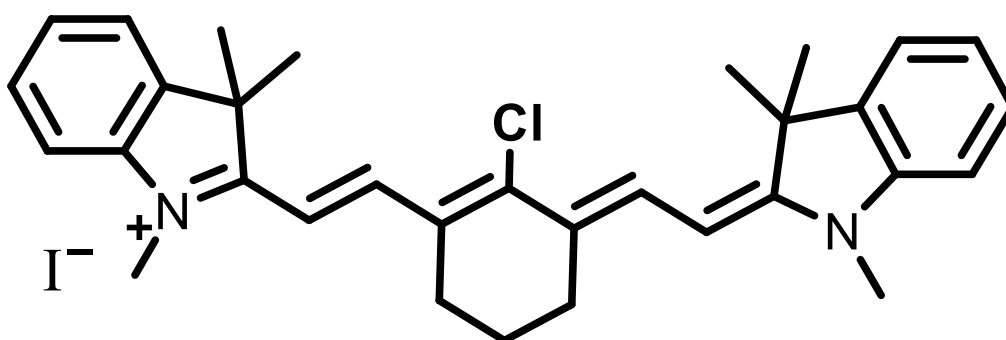


### 4.2.2 Η Κυανίνη IR-786 Iodide

Η ένωση IR-786 υπάγεται στην κατηγορία των κυανινών επταμεθυνίου (HMCDs) και αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα φωτοευαισθητοποιητή εγγύς υπερύθρου με εξαιρετικές οπτικές ιδιότητες και ικανότητα επιλεκτικής στόχευσης στα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η IR-786 έχει μελετηθεί *in vitro* ως φωτοδυναμικός παράγοντας μέσω του εγκλωβισμού της σε βιοαποκοδομήσιμους νανοφορείς για την αύξηση της υδατοδιαλυτότητάς της. [61] Ακόμα, η ίδια η ένωση δύναται να λειτουργήσει ως φορέας άλλων χημειοθεραπευτικών παραγόντων μέσω ομοιοπολικής σύζευξης. Έχει εξεταστεί *in vitro* σε κυτταρικές καλλιέργειες για τη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος, λόγω της ικανότητάς της να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να μεταφέρεται ενεργητικά στον καρκινικό όγκο. Ωστόσο, ο έντονα υδρόφοβος χαρακτήρας της IR-786 εμποδίζει τη διαλυτοποίησή της κυανίνης στο βιολογικά υγρά, με αποτέλεσμα να μην αναγνωρίζει τις κατάλληλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μηχανισμό ενεργητικής στόχευσης, και εν τέλει να μην μεταφέρεται στον καρκινικό όγκο *in vivo*. [62]

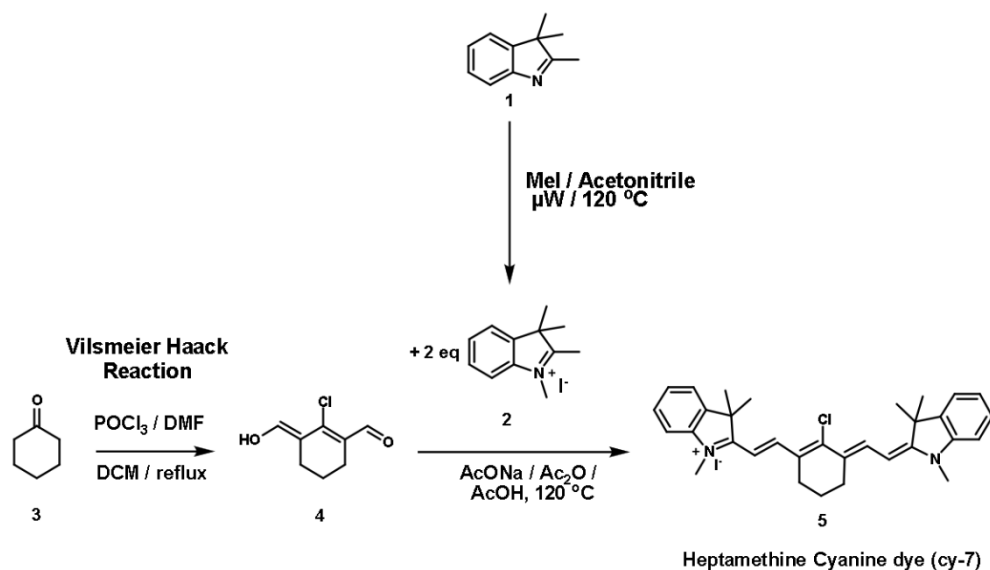
Συνεπώς, η επιλογή της συγκεκριμένης ένωσης προς διερεύνηση στην παρούσα εργασία αποσκοπεί στην πρόταση καινοτόμων συστημάτων για την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας της IR-786, ούτως ώστε να καταπολεμηθούν οι εγγενείς περιορισμοί που συναντά η ένωση σε βιολογικά περιβάλλοντα, και εν τέλει οι εξαιρετικές ιδιότητες που διαθέτει να μπορέσουν να μελετηθούν και *in vivo*.

Από χημικής άποψης, η ένωση IR-786 είναι ένα λιπόφιλο κατιόν και συνήθως υφίστανται υπό τη μορφή κάποιου άλατος για τη βελτίωση της διαλυτότητάς της στο νερό. [61] Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιείται το ιωδιούχο άλας της χρωστικής, IR-786 Iodide (2-[2-[2-Chloro-3-[(1,3-dihydro-1,3,3-trimethyl-2H-indol-2-ylidene)ethylidene]-1-cyclohexen-1-yl]ethenyl]-1,3,3-trimethylindolium iodide κατά IUPAC). Στο Σχήμα 4.8 παρουσιάζεται ο συντακτικός τύπος της κυανίνης.



Σχήμα 4.8. Συντακτικός τύπος της χρωστικής IR-786 Iodide.

Η συνθετική πορεία για την παραγωγή της κυανίνης IR-786 Iodide είναι απλή και επαναλήψιμη, καθώς αποτελείται από μικρό αριθμό επιμέρους σταδίων, όπως παρουσιάζονται στο **Σχήμα 4.9**.



**Σχήμα 4.9.** Συνθετική πορεία για την παραγωγή της χρωστικής IR-786 Iodide. (Παρέχεται από τον Δρ. Κυριάκο Προυσή, ερευνητή του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών).

Στον **Πίνακα 4.2** συνοψίζονται ορισμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ένωσης IR-786 Iodide.

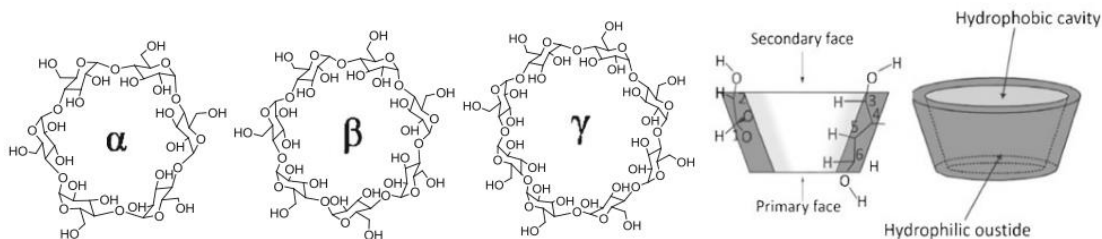
**Πίνακας 4.2.** Διαθέσιμα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ένωσης IR-786 Iodide. [63], [64]

Μοριακός Τύπος	$C_{32}H_{36}ClIN_2$
Μοριακό Βάρος (g/mol)	661.10
$\lambda_{max}$ (Απορρόφησης) (nm)	760-780 (εξαρτάται από το διαλύτη)
$\lambda_{max}$ (Εκπομπής) (nm)	795-815 (εξαρτάται από το διαλύτη)
Κβαντική Απόδοση Φθορισμού (%)	21 (δ/της EtOH)
Γραμμομοριακή Απορροφητικότητα $\epsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	230,500 (δ/της EtOH)
Μετατόπιση Stokes (nm)	18 (δ/της EtOH)
Συντελεστής Κατανομής logD (-)	4.79 (σε pH=7.4)

### 4.3 Κυκλοδεξτρίνες

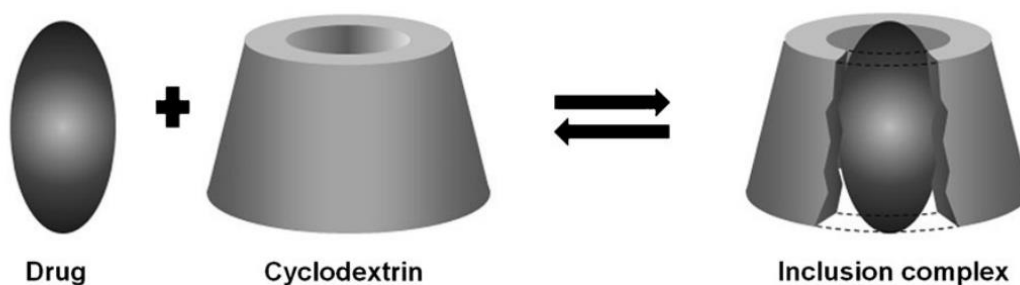
#### 4.3.1 Κυκλοδεξτρίνες ως Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων

Οι κυκλοδεξτρίνες (CDs) είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες αποτελούμενοι από επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες D-γλυκόζης, οι οποίες συνδέονται ομοιοπολικά μεταξύ τους μέσω α-1,4-γλυκοζιτικών δεσμών. Οι CDs είναι κρυσταλλικά φυσικά προϊόντα και προέρχονται από την ενζυμική αποδόμηση πολυσακχαριτών που απομονώνονται από ανανεώσιμες αμυλούχες πηγές. Οι ευρύτερα διαδομένες κυκλοδεξτρίνες είναι η α-, η β- και η γ-CD, οι οποίες συνίστανται από 6, 7 και 8 μονάδες D-γλυκόζης, αντίστοιχα. Οι κυκλοδεξτρίνες παρουσιάζουν τρισδιάστατη δομή κόλουρου κώνου, ο οποίος αποτελείται από την υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια και την υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα. [65] Οι ομάδες υδροξυλίου του μορίου της κυκλοδεξτρίνης είναι προσανατολισμένες προς την εξωτερική πλευρά του κόλουρου κώνου, με τα πρωτοταγή υδροξύλια να βρίσκονται στην στενή άκρη της διαμόρφωσης (primary face) και τα δευτεροταγή στην πλατιά πλευρά (secondary face), όπως παρουσιάζεται στο **Σχήμα 4.10**. [66]



**Σχήμα 4.10.** Στερεοχημική δομή των φυσικών κυκλοδεξτρινών α-CD, β-CD και γ-CD. Απεικόνιση της υδρόφοβης κοιλότητας και της υδρόφιλης εξωτερικής επιφάνειας των κυκλοδεξτρινών. [66]

Οι κυκλοδεξτρίνες έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με άλλα οργανικά μόρια, δημιουργώντας υπερμοριακές δομές που ονομάζονται σύμπλοκα εγκλωβισμού (Inclusion Complexes, ICs). Η ιδιότητα αυτή καθιστά τις κυκλοδεξτρίνες έναν από τους πιο διαδεδομένους βιοσυμβατούς φορείς για την ανάπτυξη συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων. Φαρμακευτικές ουσίες με ιδιαίτερα λιπόφιλο χαρακτήρα σχηματίζουν θερμοδυναμικά ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις με την υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης (**Σχήμα 4.11**). Η ενσωμάτωση ενός φαρμακομορίου στα σύμπλοκα εγκλωβισμού εξυπηρετεί στην ενίσχυση της βιοδιαθεσιμότητάς του κατά τη χορήγηση στον οργανισμό, καθώς και στη μείωση της ενδεχόμενης τοξικότητας που μπορεί να εμφανίσει. Το τελευταίο επιτυγχάνεται μέσω της τροποποιημένης αποδέσμευσης που προσφέρεται από την κυκλοδεξτρίνη. [67] Σχετικά με την περίπτωση των υδρόφοβων ενώσεων, η συμπλοκοποίηση με την κυκλοδεξτρίνη οδηγεί σε αύξηση της υδατοδιαλυτότητάς τους, χωρίς όμως να επηρεάζεται αρνητικά η εγγενής ικανότητά τους να διαπερνούν τις λιπόφιλες μεμβράνες του οργανισμού, καθώς η κυκλοδεξτρίνη μεταφέρει το φάρμακο στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης του εκάστοτε βιολογικού στόχου, όπου και το αποδεσμεύει. [9]



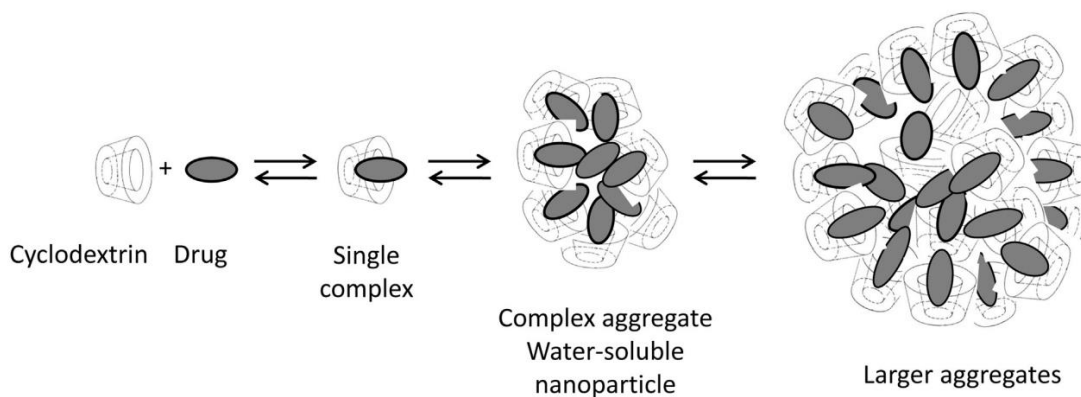
**Σχήμα 4.11.** Σχηματισμός συμπλόκων εγκλωβισμού (ICs) μεταξύ της κυκλοδεξτρίνης και του φαρμάκου. [67]

Τα τελευταία έτη, έχουν αποκτήσει εκτεταμένη εφαρμογή και τα συνθετικά παράγωγα της  $\beta$ -CD, όπως η 2-υδροξυ-προπυλο- $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη (HP- $\beta$ -CD) και η μεθυλο- $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη (Me- $\beta$ -CD), για τη βελτίωση της ικανότητας σχηματισμού συμπλόκων εγκλωβισμού με υδρόφοβα μόρια φαρμακευτικού ενδιαφέροντος. [68] Συγκεκριμένα, η HP- $\beta$ -CD παρουσιάζει την υψηλότερη υδατοδιαλυτότητα σε σχέση με τις φυσικές κυκλοδεξτρίνες και τα υπόλοιπα παράγωγά τους, όπως διακρίνεται και στον **Πίνακα 4.3**. [69]

**Πίνακας 4.3.** Κυριότερα δομικά, γεωμετρικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των φυσικών κυκλοδεξτρινών  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD και  $\gamma$ -CD, καθώς και του συνθετικού παραγώγου HP- $\beta$ -CD. [67], [70]

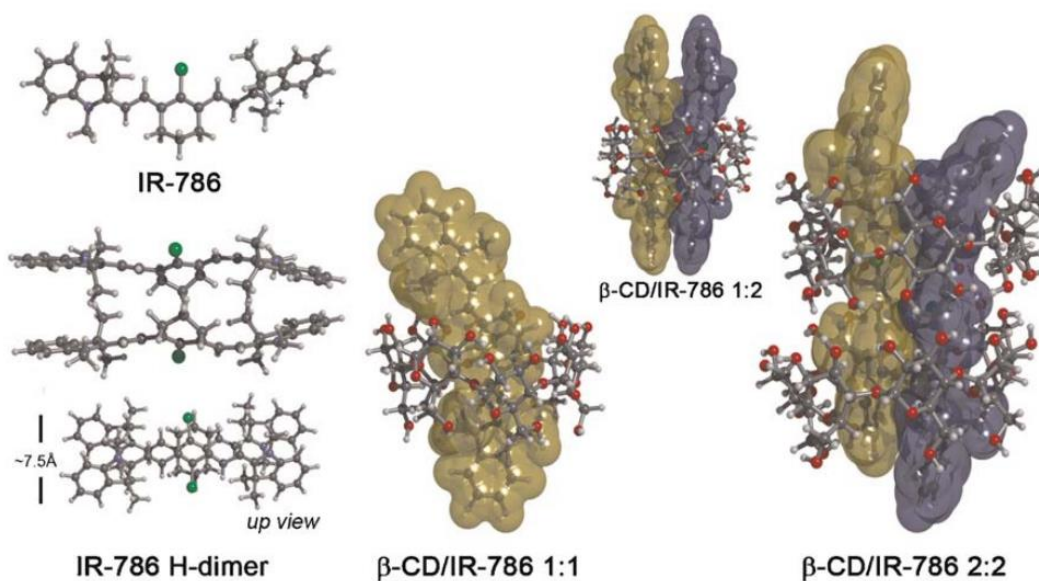
	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD	HP- $\beta$ -CD
Μονάδες D-γλυκόζης	6	7	8	7
Μοριακό βάρος (g/mol)	972	1,135	1,297	1,400
Βαθμός υποκατάστασης	-	-	-	0.65
Διαλυτότητα στο H <sub>2</sub> O (mg/mL), σε θερμοκρασία 25°C	130	18.4	250	>600
Συντελεστής μερισμού logP (-), σε θερμοκρασία 25°C	-13	-14	-17	-11
Διάμετρος εσωτερικής κοιλότητας (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3	6.0-6.5
Διάμετρος εξωτερικής περιφέρειας (Å)	14.6	15.4	17.5	15.4

Σε υδατικό περιβάλλον, η ελαφρώς υδρόφοβη εσωτερική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης είναι κατειλημμένη από μόρια νερού μέσω ανάπτυξης διαμοριακών αλληλεπιδράσεων διπόλου-απόλου, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλό ενεργειακό περιεχόμενο. Τα μόρια του νερού που βρίσκονται στην εσωτερική κοιλότητα δύνανται να υποκατασταθούν από λιγότερο πολικές ενώσεις (guest molecules) μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων προς σχηματισμό θερμοδυναμικά σταθερότερων υπερμοριακών συμπλόκων εγκλωβισμού. [67] Τα διεσπαρμένα σύμπλοκα εγκλωβισμού έχουν την τάση να συσσωματώνονται σε υδατικό περιβάλλον και να δημιουργούν μεγαλύτερες δομές που μπορούν να θεωρηθούν νανοσωματίδια λόγω των διαστάσεών τους στη νανο-κλίμακα (**Σχήμα 4.12**). [70]



**Σχήμα 4.12.** Σχηματισμός υπερμοριακών συμπλόκων εγκλωβισμού στην υδατική φάση μέσω φαινομένων αυτοσυναρμογής. [70]

Αντίστοιχες υπερμοριακές αλληλεπιδράσεις σχηματίζονται και με την υδρόφοβη κυανίνη IR-786 που αποτελεί και το επίκεντρο της παρούσας μελέτης. Ειδικότερα, η χρωστική IR-786 σχηματίζει σύμπλοκα εγκλωβισμού με την  $\beta$ -CD σε υδατικό περιβάλλον με αυθόρμητο τρόπο, καθώς ο λιπόφιλος χαρακτήρας της κυανίνης παρουσιάζει ευνοϊκότερες αλληλεπιδράσεις με την υδρόφοβη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης σε σχέση με το πολικό περιβάλλον του νερού (**Σχήμα 4.13**). Τα σύμπλοκα εγκλωβισμού που σχηματίζονται προσφέρουν προστασία στην κυανίνη ως προς την οξείδωση και την φωτοαποδόμηση, υποδεικνύοντας την αξία της  $\beta$ -CD ως πιθανού φορέα μεταφοράς υδρόφοβων φωτοευαισθητοποιητών. [71], [24]

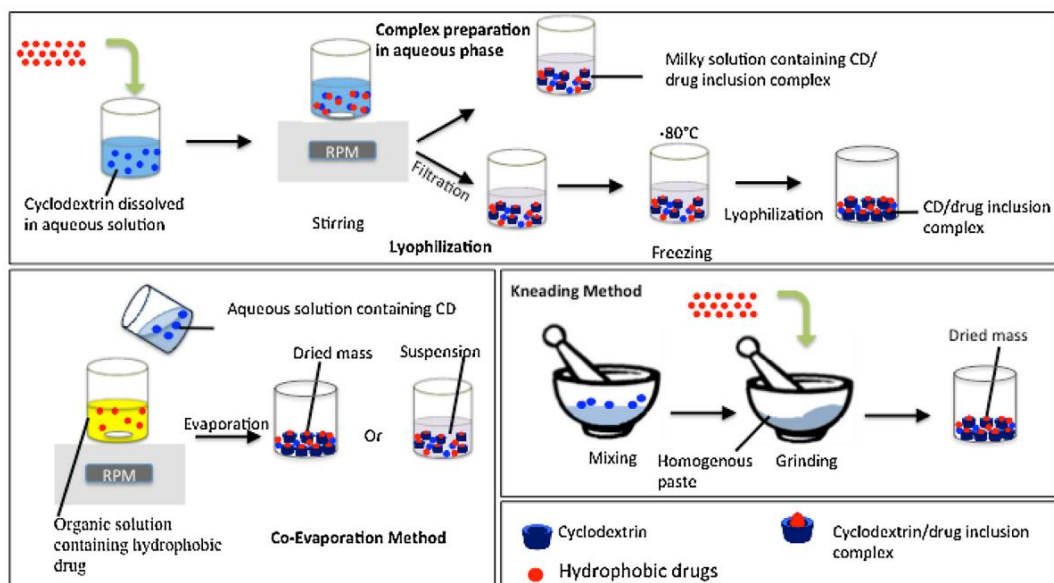


**Σχήμα 4.13.** Τρισδιάστατη αναπαράσταση των σχηματιζόμενων διμερών της υδρόφοβης κυανίνης IR-786 και των συμπλόκων εγκλωβισμού με την  $\beta$ -CD σε υδατικό περιβάλλον. [71]

## 4.3.2 Τεχνικές Σύνθεσης Συμπλόκων Εγκλωβισμού (ICs)

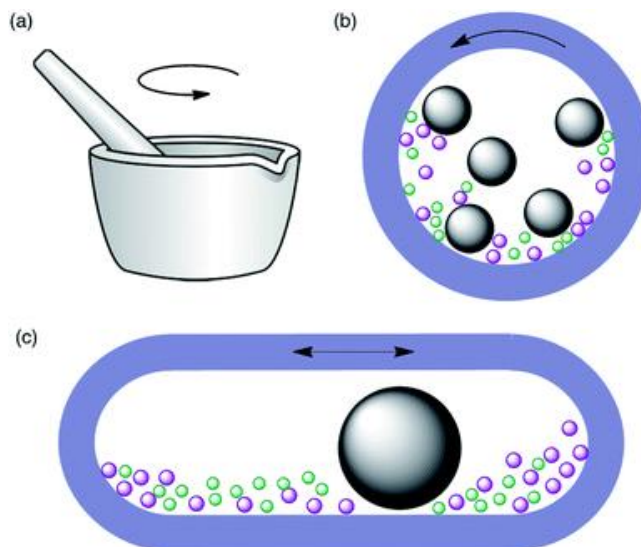
Για τη σύνθεση των συμπλόκων εγκλωβισμού της κυκλοδεξτρίνης με την εκάστοτε φαρμακευτική ουσία μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι ακόλουθες μέθοδοι: [72]

- Εξάτμιση διαλύτη (Co-evaporation)
- Σύνθεση στην υδατική φάση (Preparation in aqueous phase)
- Λυοφιλοποίηση (Lyophilization)
- Ξήρανση με ψεκασμό (Spray Drying)
- Υγρή λειοτριβήση προς σχηματισμό πάστας (Kneading)
- Συγκαταβύθιση (Co-precipitation)



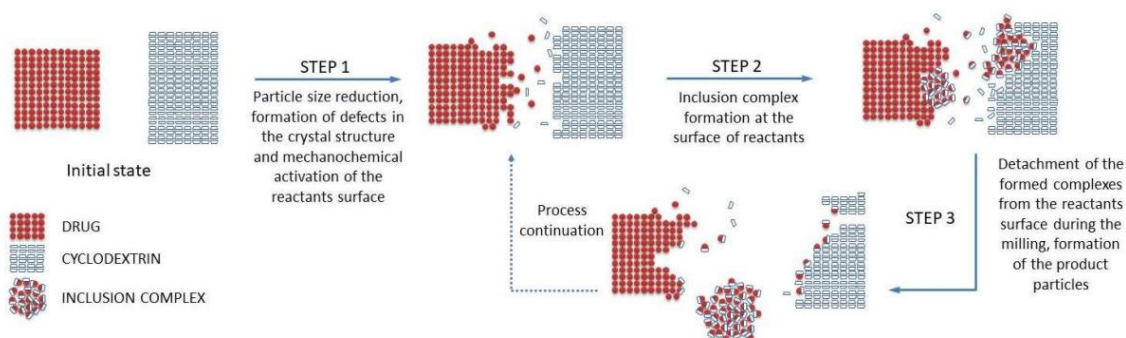
**Σχήμα 4.14.** Κύριες τεχνικές σύνθεσης συμπλόκων εγκλωβισμού CD/φαρμάκου. [72]

Ανάμεσα στις διάφορες τεχνικές που έχουν προταθεί για τη σύνθεση των συμπλόκων εγκλωβισμού (**Σχήμα 4.14**), οι μέθοδοι που βασίζονται στη μηχανοχημική σύνθεση στερεάς κατάστασης θεωρούνται από τις πιο απλές, ταχείες και φιλικές προς το περιβάλλον, καθώς δεν απαιτείται η χρήση μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών. [73] Ακόμα, οι μηχανοχημικές τεχνικές παρουσιάζουν δυνατότητα εύκολης ανακλιμάκωσης μέσω χρήσης ειδικών διατάξεων, όπως η ένσφαιρη λειοτριβήση (ball milling) για την παραγωγή του προϊόντος σε μεγαλύτερη κλίμακα (**Σχήμα 4.15**). [74]



**Σχήμα 4.15.** Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων τεχνικών μηχανοχημείας. a: λειοτρίβηση με ιγδίο και ύπερο (grinding), b: ένσφαιρη λειοτρίβηση (ball milling), c: άλεση υψηλής ταχύτητας (high-energy milling). [74]

Όταν το φυσικό μείγμα φαρμάκου/κυκλοδεξτρίνης υποβάλλεται σε μηχανική κατεργασία, η προσφερόμενη ενέργεια οδηγεί στη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων των δύο ουσιών και στη δημιουργία ατελειών στην κρυσταλλική τους δομή, με αποτέλεσμα να αυξάνεται σημαντικά η ενεργός επιφάνεια του συστήματος. Με περαιτέρω προσφορά μηχανικής ενέργειας, τα δύο υλικά χάνουν την κρυσταλλικότητά τους και μεταβαίνουν στην άμορφη κατάσταση, όπου εξυπηρετείται ο σχηματισμός των υπερμοριακών συμπλόκων εγκλωβισμού μεταξύ του φαρμάκου και της κυκλοδεξτρίνης. Τέλος, τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα απομακρύνονται από την επιφάνεια των σωματιδίων των καθαρών ουσιών ελευθερώνοντας την επιφάνειά τους, για την περαιτέρω δημιουργία αλληλεπιδράσεων στερεάς κατάστασης. [73] Τα παραπάνω στάδια συνοψίζονται στο **Σχήμα 4.16**.



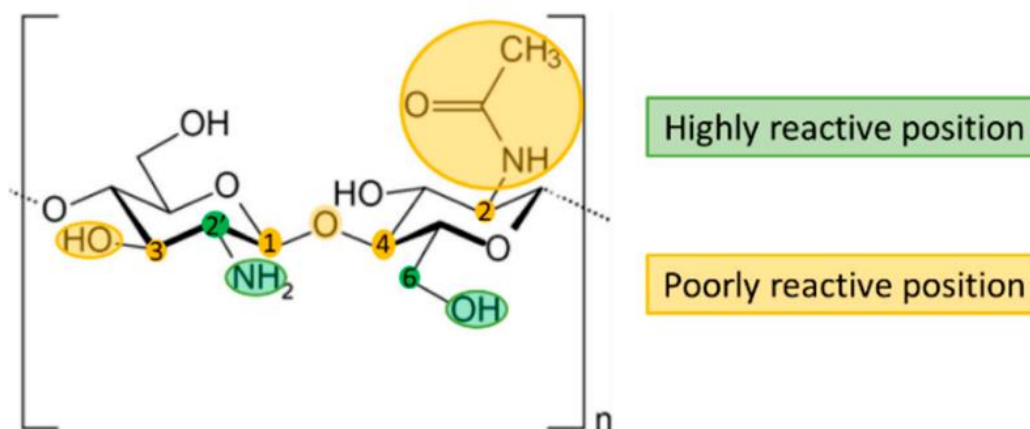
**Σχήμα 4.16.** Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης συμπλόκων εγκλωβισμού στη στερεά κατάσταση. [73]

## 4.4 Νανοσυστήματα με βάση τη Χιτοζάνη

### 4.4.1 Εισαγωγή

Η χιτοζάνη είναι φυσικός πολυσακχαρίτης αποτελούμενος από επαναλαμβανόμενες μονάδες D-γλυκοζαμίνης και N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνης, οι οποίες είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η χιτοζάνη παράγεται κατόπιν αποακετυλίωσης του πρόδρομου πολυμερούς χιτίνη, η οποία απομονώνεται από το κέλυφος των καρκινοειδών. Η χιτοζάνη είναι πλήρως διαλυτή σε όξινα υδατικά διαλύματα, καθώς η πρωτονίωση των ελεύθερων πρωτοταγών αμινομάδων ευνοείται σε τιμές pH χαμηλότερες από 6. Η διαλυτότητα της χιτοζάνης αποτελεί συνάρτηση του βαθμού ακετυλίωσής της (Degree of Acetylation), καθώς επηρεάζει την πυκνότητα ηλεκτρικού φορτίου στις αλυσίδες του πολυμερούς, και κατ' επέκταση την ηλεκτροκινητική συμπεριφορά του κατιοντικού πολυηλεκτρολύτη στα υδατικά διαλύματα. [75], [76]

Η χημική δομή της χιτοζάνης παρουσιάζεται στο **Σχήμα 4.17**. Αξίζει να σημειωθεί η ύπαρξη χαρακτηριστικών ομάδων υψηλής δραστηριότητας στο πολυμερικό σκελετό της χιτοζάνης, οι οποίες αποτελούν σημεία χημικής πρόσδεσης λειτουργικών μορίων, με σκοπό βελτίωση των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του πολυμερούς και τη διεύρυνση των προβλεπόμενων εφαρμογών στις βιοϊατρικές επιστήμες. [77]



**Σχήμα 4.17.** Χημική δομή της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας της χιτοζάνης. Οπτική αναπαράσταση των περιοχών υψηλής και χαμηλής δραστηριότητας στον πολυμερικό σκελετό. [77]

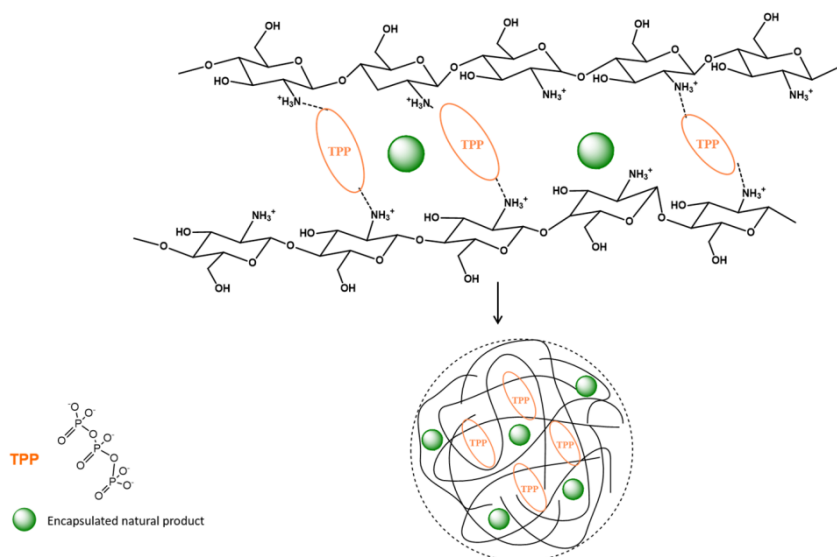
Η χιτοζάνη παρουσιάζει βλεννοπροσκολλητικές ιδιότητες, καθώς η ύπαρξη ομάδων υδροξυλίου και αμινομάδων στη δομή της εξυπηρετεί την αλληλεπίδραση του πολυμερούς με το βλεννογόνο μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων και δεσμών υδρογόνου. Δεδομένου ότι η χιτοζάνη είναι μη τοξική, βιοσυμβατή και βιοαποικοδομήσιμη, χρησιμοποιείται εκτενώς στην ανάπτυξη συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων και στη μηχανική ιστών, εφόσον έχει λάβει έγκριση ασφαλείας από τον FDA. [77]



#### 4.4.2 Σύνθεση Νανοσωματιδίων Χιτοζάνης μέσω Φαινομένων Αυτοσυναρμογής (Self-assembled CS NPs)

Ανάμεσα στις διαθέσιμες επιλογές για τη σύνθεση πολυμερικών νανοσυστημάτων, οι τεχνικές που βασίζονται σε φαινόμενα αυτοσυναρμογής (self-assembly) πλεονεκτούν, καθώς στηρίζονται σε απλές, επαναλήψιμες και οικονομικές διεργασίες. Ο όρος «αυτοσυναρμογή» αναφέρεται στην αυτόνομη οργάνωση των επιμέρους συστατικών σε συγκεκριμένες δομές μέσω της ανάπτυξης διαμοριακών αλληλεπιδράσεων. Οι δομές που δημιουργούνται μέσω τέτοιων φαινομένων είναι αρκετά σταθερές, καθώς ελαχιστοποιείται η συνολική ελεύθερη ενέργεια του συστήματος. Η μοριακή αυτοσυναρμογή χαρακτηρίζεται από τη διάχυση διαφορετικών μορίων, έως ότου αναπτύξουν μεταξύ τους ηλεκτροστατικές ή/και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές αν εξεταστούν μεμονωμένα είναι αρκετά ασθενείς. Ωστόσο, στις παραγόμενες δομές αυτοσυναρμογής ο αριθμός των δημιουργούμενων αλληλεπιδράσεων είναι αρκετά μεγάλος, ώστε να καθορίζεται πλήρως η διαμόρφωση του υλικού. [78]

Η χιτοζάνη αποτελεί ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα πολυμερή στη σύνθεση νανοδομών που βασίζονται στην αυτοσυναρμογή. Ο πολυκατιοντικός χαρακτήρας της χιτοζάνης επιτρέπει την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με άλλα ανιονικά είδη προς σχηματισμό θερμαδυναμικά σταθερών νανοδομών. Το τριπολυφωσφορικό νάτριο (TPP) αποτελεί τον συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο παράγοντα διασύνδεσης (cross-linker) για τη σύνθεση νανοσωματιδίων χιτοζάνης. Συγκεκριμένα, τα ανιόντα του τριπολυφωσφορικού νατρίου αναπτύσσουν ελκτικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις με τις πρωτονιωμένες αμινομάδες της διαλυμένης χιτοζάνης, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται νανοσωματίδια (Σχήμα 4.18). Η διεργασία αυτή εμπίπτει στη γενική κατηγορία σύνθεσης νανοϋλικών μέσω της ιονικής πηκτωμάτωσης (ionic gelation). [79], [80]

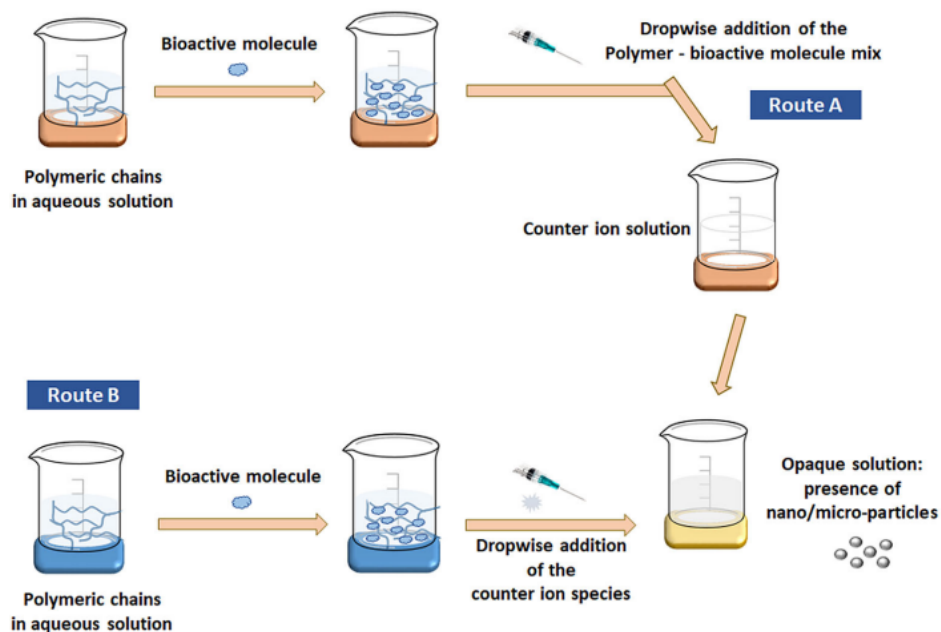


**Σχήμα 4.18.** Εγκλωβισμός βιοδραστικών ουσιών σε νανοσωματίδια χιτοζάνης μέσω της διεργασίας ιονικής πηκτωμάτωσης. [80]

Οι κυριότερες παράμετροι ελέγχου της ιονικής πηκτωμάτωσης είναι οι εξής: [79]

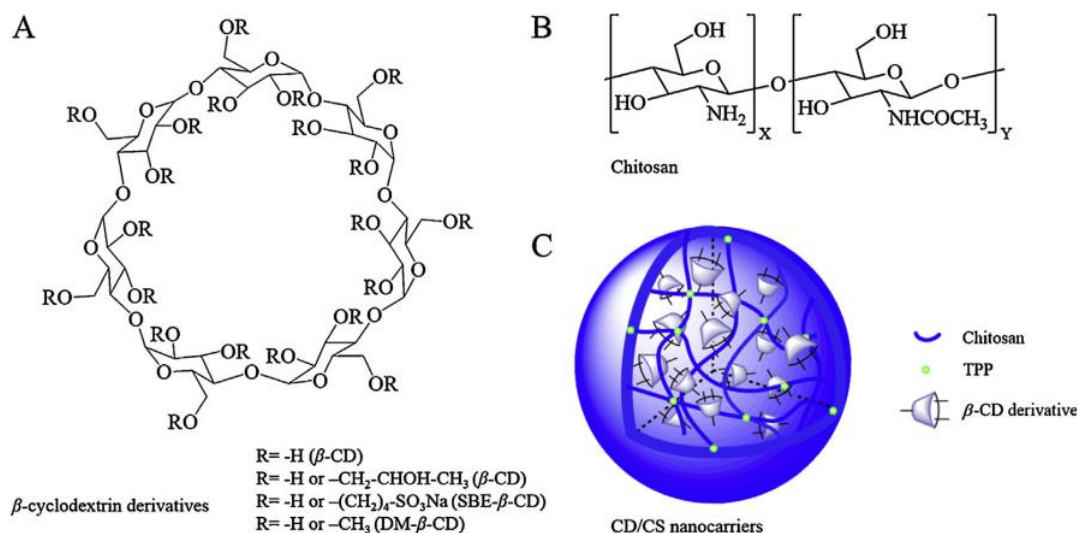
- Θερμοκρασία
- pH
- Συγκέντρωση cross-linker (TPP συνήθως)
- Συγκέντρωση ένωσης προς εγκλωβισμό
- Μοριακό βάρος της χιτοζάνης

Στο **Σχήμα 4.19** παρουσιάζονται διαφορετικές συνθετικές πορείες που δύναται να ακολουθηθούν για τον εγκλωβισμό βιοδραστικών ενώσεων σε νανοσωματίδια χιτοζάνης μέσω της τεχνικής ιονικής πηκτωμάτωσης.



**Σχήμα 4.19.** Υπάρχουσες συνθετικές πορείες για τον εγκλωβισμό βιοδραστικών ενώσεων σε πολυμερικά νανοσωματίδια μέσω της διεργασίας ιονικής πηκτωμάτωσης. [81]

Η διεργασία της ιονικής πηκτωμάτωσης μπορεί να συνδυαστεί με τα υπερμοριακά σύμπλοκα εγκλωβισμού κυκλοδεξτρινών που περιεγράφηκαν στην προηγούμενο παράγραφο. Ο συνδυασμός αυτός στοχεύει στην ενίσχυση των νανοσυστημάτων χιτοζάνης με το λιπόφιλο περιβάλλον της εσωτερικής κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης, το οποίο αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για τη συμπλοκοποίηση υδρόφοβων ενώσεων, και κατά συνέπεια για την ευκολότερη ενσωμάτωσή αυτών στο σχεδιαζόμενο νανοσύστημα μεταφοράς. Δεδομένου ότι τα μόρια της κυκλοδεξτρίνης παρουσιάζουν αρνητική φόρτιση στην εξωτερική υδρόφιλη επιφάνειά τους, λόγω του ιονισμού των ομάδων υδροξυλίου, εμφανίζονται ελκτικές αλληλεπιδράσεις με την κατιοντική χιτοζάνη ενισχύοντας τη σταθερότητα του τελικού σύνθετου νανοσυστήματος (**Σχήμα 4.20**). [82]



**Σχήμα 4.20.** Φόρτωση της  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνης και των παραγώγων της σε νανοσωματίδια χιτοζάνης μέσω της τεχνικής ιονικής πηκτωμάτωσης. (A: Δομή της  $\beta$ -CD και των παραγώγων της, B: Επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα της χιτοζάνης, Γ: Σχηματική αναπαράσταση των σύνθετων νανοφορέων κυκλοδεξτρίνης-χιτοζάνης. [82]

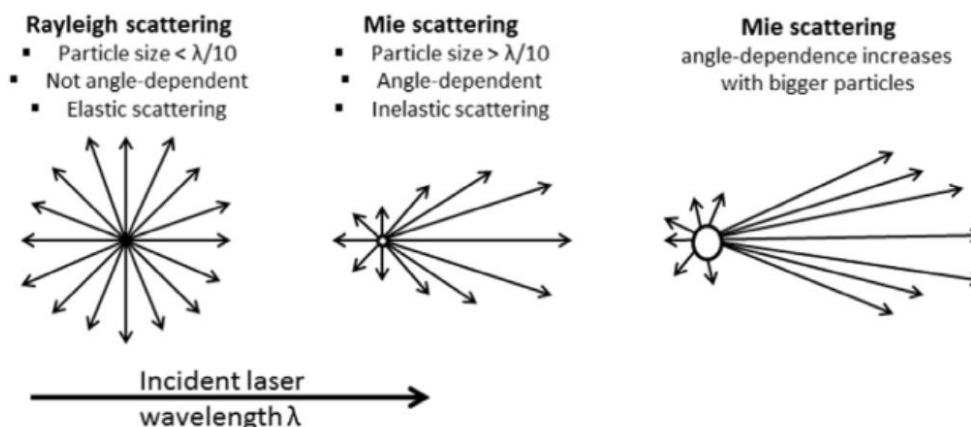
## 4.5 Χαρακτηρισμός Νανοϋλικών

### 4.5.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering)

Η Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS, γνωστή και ως φασματοσκοπία συσχετισμού φωτονίων (Photon Correlation Spectroscopy, PCS), αποτελεί αναλυτική τεχνική για τον προσδιορισμό του υδροδυναμικού μεγέθους νανοσωματιδίων σε κolloειδή διασπορά. Η τεχνική DLS παρέχει εντός μικρού χρονικού διαστήματος πληροφορίες σχετικές με τα μεγέθη σωματιδίων στο εύρος  $0.3 \text{ nm} - 10 \mu\text{m}$ , καθώς και για το ζ-δυναμικό. [83]

Στην τεχνική DLS πραγματοποιείται μέτρηση της διεύρυνσης Doppler του φωτός που προέρχεται από σκέδαση Rayleigh, ως αποτέλεσμα της κίνησης Brown των σωματιδίων. [83] Συγκεκριμένα, με την τεχνική DLS μετράται η υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων μέσω του μηχανισμού της σκέδασης μονοχρωματικής ακτινοβολίας laser, η οποία διέρχεται από την κolloειδή διασπορά και αναλύεται η διακύμανση της έντασης της περίθλασης ως συνάρτηση του χρόνου. Ως σκέδαση ορίζεται το οπτικό φαινόμενο, κατά το οποίο η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αποκλίνει από την αρχική της διεύθυνση λόγω των σωματιδίων ή των επιφανειών που συναντά στην οπτική της διαδρομή. Η εκτροπή από την αρχική διεύθυνση διάδοσης αποδίδεται στη διαφορετική τιμή του δείκτη διάθλασης μεταξύ του μέσου διασποράς και των διεσπαρμένων σωματιδίων. [84] Η θερμική κίνηση Brown, την οποία εκτελούν διαρκώς τα σωματίδια εξαιτίας των συγκρούσεων μεταξύ τους και με τα μόρια του μέσου διασποράς, συσχετίζεται με την υδροδυναμική τους διάμετρο. Τα σωματίδια

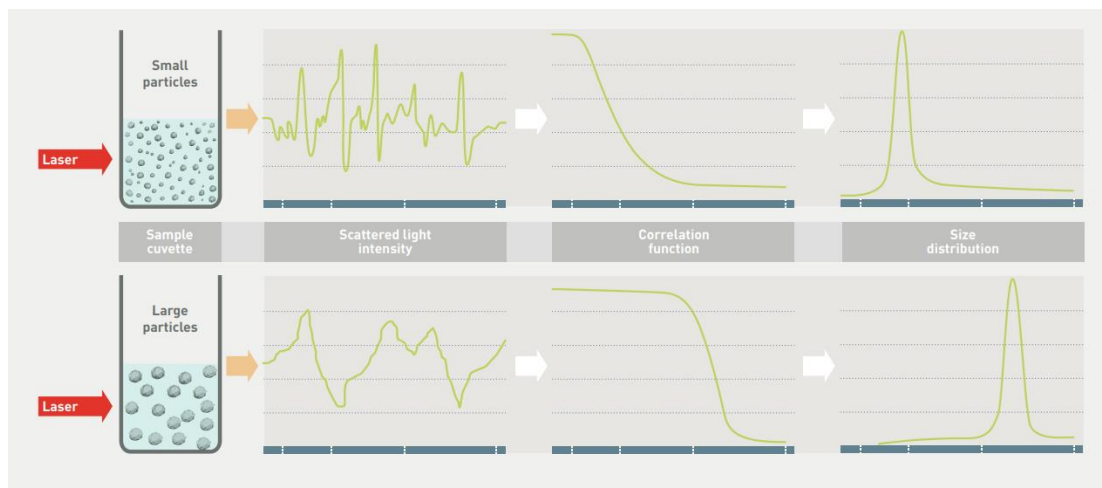
μικρότερου μεγέθους είναι πιο ευκίνητα και μεταβάλλεται η κινητική τους κατάσταση ταχύτερα από ότι τα μεγαλύτερα. Η δέσμη ακτινοβολίας κατά την πρόσπτωσή της στα αιωρούμενα σωματίδια σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις, εφόσον οι διαστάσεις των σωματιδίων είναι συγκριτικά μικρότερες ( $< 250 \text{ nm}$ ) από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. [85] Όταν το μέγεθος των σωματιδίων είναι μικρότερο από το  $1/10$  του μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, η σκέδαση είναι ελαστική (σκέδαση Rayleigh) και η σκεδαζόμενη δέσμη έχει την ίδια ενέργεια προς όλες τις κατευθύνσεις, όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 4.21**. [86]



**Σχήμα 4.21.** Σκέδαση ακτινοβολίας μήκους κύματος  $\lambda$  κατά την πρόσπτωσή της στα αιωρούμενα σωματίδια. Όταν το μέγεθος των σωματιδίων είναι μικρότερο από το  $1/10$  του μήκους κύματος πρόκειται για ελαστική σκέδαση Rayleigh προς όλες τις κατευθύνσεις (αριστερά), ενώ σε αντίθετη περίπτωση, ιδίως στα μεγαλύτερα σωματίδια, η σκέδαση είναι ανελαστική και σημαντικά ανισότροπη (μέση και δεξιά). [86]

Το σήμα της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι κυματοειδές, καθώς αποτελεί συνάρτηση του χρόνου και συνδέεται με το μέγεθος των σωματιδίων μέσω της συνάρτησης συσχέτισης, η οποία είναι επίσης χρονομεταβαλλόμενη. [83] Κάθε όργανο DLS διαθέτει ψηφιακό συσχετιστή, ο οποίος συγκρίνει το σήμα που λαμβάνεται τη χρονική στιγμή  $t_0$  με το σήμα έπειτα από μικρό χρονικό διάστημα καθυστέρησης  $dt$ . Τα σωματίδια καθώς κινούνται η συσχέτιση μεταξύ των σημάτων των στιγμών  $t_0$  και  $dt$  μειώνεται με το χρόνο, ξεκινώντας από την πλήρη συσχέτιση τη στιγμή  $t_0$  και καταλήγοντας σε απουσία συσχέτισης σε άπειρο χρόνο, ο οποίος πρακτικά διαρκεί μερικά ms. [84]

Όσον αφορά τις μετρήσεις υδροδυναμικού μεγέθους, όπως διακρίνεται και στο **Σχήμα 4.22**, τα σωματίδια μικρότερου μεγέθους παρουσιάζουν οριζόντιο τμήμα μικρότερου εύρους σε αρχικούς χρόνους στο διάγραμμα αυτοσυσχέτισης, καθώς και υψηλότερη κλίση στο φθίνον τμήμα της καμπύλης, καθώς μεταβάλλεται η κινητική τους κατάσταση ταχύτερα σε σχέση με τα μεγαλύτερα σωματίδια. [87]



**Σχήμα 4.22.** Διαγράμματα διακύμανσης της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ως προς το χρόνο, διαγράμματα αυτοσυσχέτισης και οι προκύπτουσες κατανομές υδροδυναμικής διαμέτρου για σωματίδια μικρού και μεγάλου μεγέθους. [87]

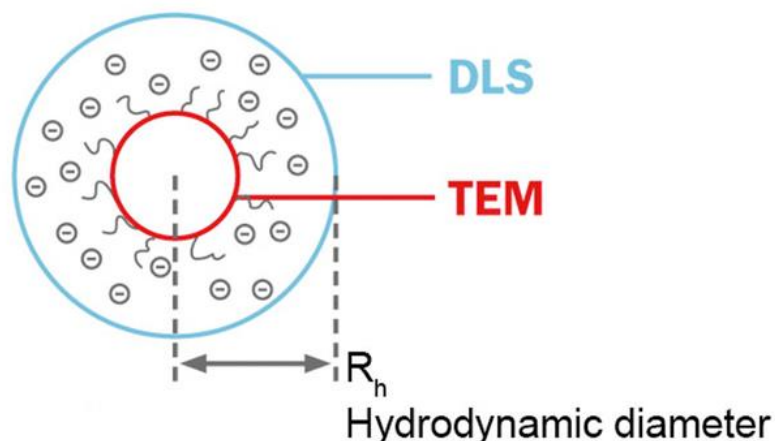
Η μορφή του διαγράμματος αυτοσυσχέτισης που προκύπτει αποτελεί ποιοτική ένδειξη για την αξιοπιστία της μέτρησης. Να τονιστεί ότι, ως αποδεκτά χαρακτηρίζονται διαγράμματα συσχέτισης, τα οποία ξεκινούν από τιμή στο εύρος  $0.65 - 1$ , δεν τέμνουν τον οριζόντιο άξονα σε κάποιο σημείο και δεν παρουσιάζουν κορυφές στο τμήμα της καμπύλης που τείνει ασυμπτωτικά στον άξονα του χρόνου, καθώς αυτό αποτελεί ένδειξη πολυδιάσπαρτου δείγματος (μη τυχαία κίνηση Brown) ή ύπαρξης επιμολυντών και σκεδαστών της ακτινοβολίας στο δείγμα. [87]

Από το διαγράμμα αυτοσυσχέτισης υπολογίζεται ο συντελεστής διάχυσης προσαρμόζοντας την καμπύλη συσχέτισης σε εκθετική συνάρτηση, όπου ο συντελεστής  $D$  είναι ανάλογος προς τη διάρκεια ζωής της εκθετικής απόσβεσης. Για την εύρεση της υδροδυναμικής διαμέτρου  $R_H$  των νανοσωματιδίων από το συντελεστή διάχυσης χρησιμοποιείται η εξίσωση Stokes-Einstein με την παραδοχή της σκληρής σφαίρας (**Εξίσωση 1**). [84]

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_H} \quad (1)$$

όπου  $k$  η σταθερά Boltzmann ( $1.38 \cdot 10^{23} \frac{J}{K}$ ),  $\eta$  το δυναμικό ιξώδες του μέσου και  $T$  η απόλυτη θερμοκρασία. Ο όρος υδροδυναμική ακτίνα που μετράται από το όργανο δεν αφορά στην πραγματική ακτίνα του σωματιδίου, αλλά στην υποθετική ακτίνα μιας σκληρής σφαίρας που διαχέεται με την ίδια ταχύτητα στο μέσο με αυτή του νανοσωματιδίου. [84]

Η υδροδυναμική ακτίνα αποτελεί μια υποθετική μέτρηση, καθώς στην πραγματικότητα δεν υφίστανται σκληρές σφαίρες στις κolloειδείς διασπορές, αλλά τα κolloειδή σωματίδια βρίσκονται σε ενυδατωμένη μη σφαιρική μορφή, η οποία περιβάλλεται από μια δυναμικά μεταβαλλόμενη στιβάδα διαλύτωσης (στιβάδα Stern) αποτελούμενη από μόρια διαλύτη και ιόντα (**Σχήμα 4.23**). [86], [88]



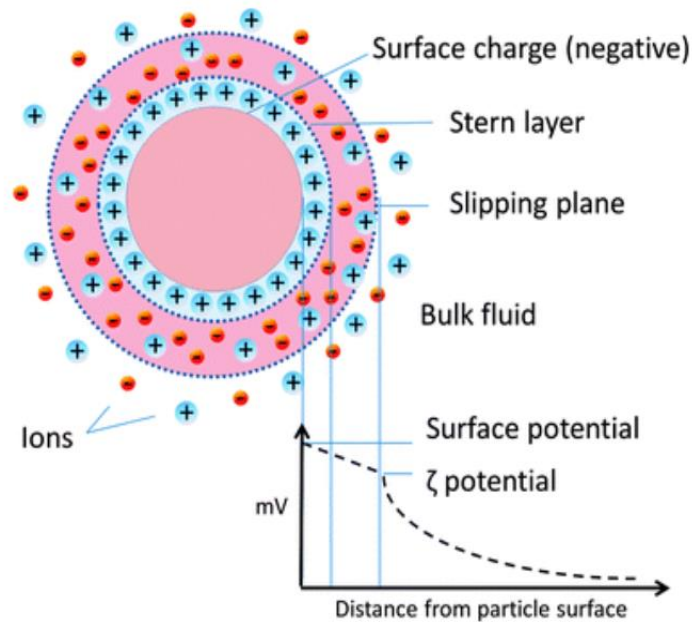
**Σχήμα 4.23.** Απλοποιημένη αναπαράσταση της έννοιας της υδροδυναμικής ακτίνας σωματιδίου σε υδατική διασπορά, που μετράται μέσω της τεχνικής DLS, και σύγκριση με το πραγματικό μέγεθος του σωματιδίου, όπως προκύπτει από την ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης. [88]

Επιπλέον, μέσω της τεχνικής DLS εξάγονται πληροφορίες αναφορικά με την κατανομή των μεγεθών των σωματιδίων στο υλικό. Η διακύμανση του μεγέθους των σωματιδίων ποσοτικοποιείται από το δείκτη PDI, ο οποίος αντιπροσωπεύει το μέτρο της ομοιογένειας ή ετερογένειας του μεγέθους των σωματιδίων και λαμβάνει τιμές από 0, όπου αντιστοιχεί σε πλήρη ομοιογένεια, έως την 1 που αφορά σε πολυδιάσπαρτα σωματίδια (**Εξίσωση 2**).

$$PDI = \frac{(\sigma)^2}{d} \quad (2)$$

όπου  $\sigma$  η τυπική απόκλιση και  $d$  το υδροδυναμικό μέγεθος των σωματιδίων. Δείγματα με τιμές PDI μεγαλύτερες από 1 είναι ακατάλληλα για μέτρηση από το όργανο. [83], [86]

Τέλος, μέσω της τεχνικής DLS δύναται να προσδιοριστεί και το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων, το οποίο περιγράφει την αλληλεπίδραση τους στο μέσο διασποράς. Το δυναμικό ζ αντικατοπτρίζει τη διαφορά δυναμικού μεταξύ της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας γύρω από το φορτισμένο σωματίδιο και της περιοχής ολίσθησης του μέσου διασποράς (**Σχήμα 4.24**). Κατά την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού στο μέσο, τα φορτισμένα σωματίδια αποκτούν ηλεκτροφορητική κινητικότητα  $U_E$ , καθώς υποβάλλονται σε εξαναγκασμένη κίνηση από το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται ανάλογα του φορτίου που φέρουν. [86]



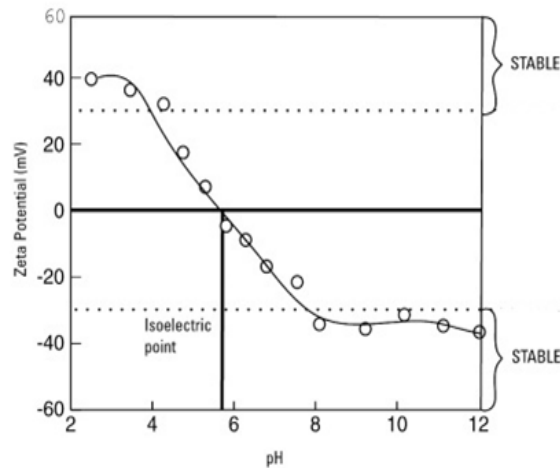
**Σχήμα 4.24.** Χωρική αναπαράσταση της ηλεκτροχημικής διπλοστιβάδας γύρω από αρνητικά φορτισμένο σωματίδιο σε υγρό μέσο διασποράς. [89]

Η τιμή του δυναμικού  $z$  υπολογίζεται από την ηλεκτροφορητική κινητικότητα των σωματιδίων  $U_E$  μέσω της εξίσωσης Henry (**Εξίσωση 3**).

$$U_E = \frac{2 \cdot \varepsilon \cdot z \cdot f(K_a)}{3 \cdot \eta} \quad (3)$$

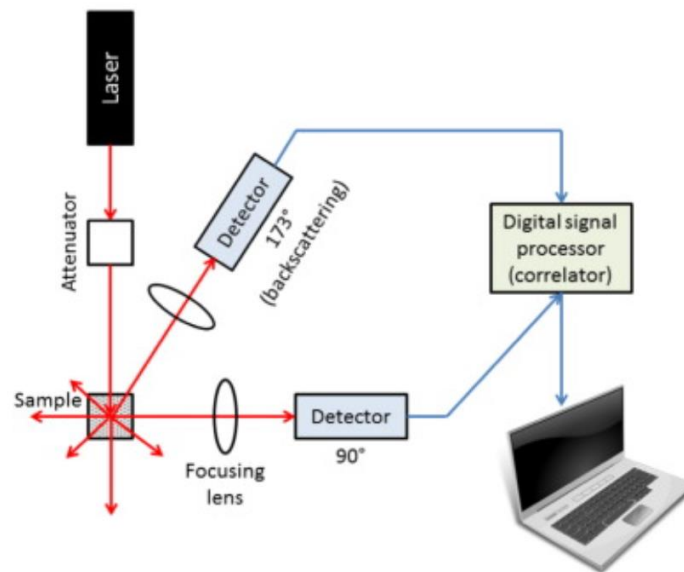
όπου  $\varepsilon$  η διηλεκτρική σταθερά του μέσου,  $\eta$  το δυναμικό ιξώδες και  $f(K_a)$  η σταθερά Henry, η οποία λαμβάνει τιμές 1.5 ή 1.0 για τις προσεγγίσεις Smoluchowski και Huckel αντίστοιχα. Η προσέγγιση Smoluchowski χρησιμοποιείται για υδατικά μέσα με μέση συγκέντρωση ηλεκτρολυτών, ενώ η προσέγγιση Huckel για μικρά σωματίδια σε μέσα χαμηλής διηλεκτρικής σταθεράς, συνήθως μη υδατικά. Μια διασπορά χαρακτηρίζεται ως σταθερή για τιμές δυναμικού  $\zeta$  χαμηλότερες από  $-30$  mV ή υψηλότερες από  $+30$  mV, καθώς και στις δύο περιπτώσεις κυριαρχούν οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις μεταξύ των σωματιδίων και αποφεύγεται η συσσωμάτωση και η καθίζηση. [86]

Το δυναμικό  $\zeta$  εξαρτάται από παράγοντες, όπως το pH, εφόσον πρόκειται για υδατική διασπορά, την ηλεκτρική αγωγιμότητα του μέσου (ή ισοδύναμα την ιοντική ισχύ) και τη συγκέντρωση των σωματιδίων στο μέσο. Όσον αφορά το pH κατασκευάζοντας το διάγραμμα δυναμικού  $\zeta$  συναρτήσει του pH (**Σχήμα 4.25**), η τιμή όπου μηδενίζεται το δυναμικό  $\zeta$  αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό σημείο. Εκεί λόγω της εκφόρτισης των σωματιδίων η κολλοειδής διασπορά αποσταθεροποιείται και υφίσταται κροκίδωση, φαινόμενο το οποίο είναι συνήθως ανεπιθύμητο σε εφαρμογές, όπως η παρασκευή νανοφαρμάκων. [86]



**Σχήμα 4.25.** Τυπικό διάγραμμα ζ-δυναμικού συναρτήσει του pH της υδατικής διασποράς των νανοσωματιδίων. [90]

Ένα όργανο DLS αποτελείται από μία πηγή Laser, μία κυψελίδα δείγματος, έναν φωτοανιχνευτή, τον αυτοσυσχετιστή (autocorrelator) και τον ηλεκτρονικό υπολογιστή (Σχήμα 4.26). Ως πηγή ακτινοβολίας χρησιμοποιείται λέιζερ He – Ne (632.8 nm) ή λέιζερ Ar<sup>+</sup> (488.0 nm και 514.5 nm). Η παραγόμενη μονοχρωματική δέσμη λέιζερ διέρχεται από τον εξασθενιστή, ο ρόλος του οποίου είναι η ελάττωση της έντασης, ή ισοδύναμα την ισχύος της προσπίπτουσας δέσμης ακτινοβολίας. Σε περίπτωση που το δείγμα είναι αρκετά πυκνό ή εμφανίζει υψηλή θολερότητα ή φθορισμό, τότε η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ενδέχεται να υπερβεί το όριο του ανιχνευτή και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να καταστραφεί. Έτσι, δύναται να μετρηθεί η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από τα μικρότερα σωματίδια του δείγματος, καθώς αποφεύγοντας την επικάλυψη του σήματος από τα μεγαλύτερα. Στη συνέχεια, η δέσμη λέιζερ εστιάζεται μέσω ενός φακού στο μέσο της κυψελίδας του δείγματος που περιέχει τα υπό μέτρηση σωματίδια σε αιώρηση εντός υγρού μέσου. [86]



**Σχήμα 4.26.** Τυπική οργανολογική διάταξη DLS. [86]



Ο ανιχνευτής της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας δύναται να τοποθετηθεί στην πλευρά από όπου εξέρχεται η διερχόμενη ακτινοβολία από την κυψελίδα ή πίσω από το δείγμα υπό γωνία  $173^\circ$  (Non-Invasive Backscatter). Με την τελευταία διάταξη αποφεύγονται φαινόμενα πολλαπλής σκέδασης που συμβαίνουν κατά μήκος της κυψελίδας, καθώς η οπισθοσκεδαζόμενη ακτινοβολία διανύει μικρότερη οπτική διαδρομή εντός της κυψελίδας και εξασθενίζει λιγότερο κατά τις διαδοχικές σκεδάσεις στα σωματίδια. Η παραπάνω λειτουργία είναι εξέχως σημαντική, ιδίως σε περιπτώσεις που εντείνονται τα φαινόμενα πολλαπλής σκέδασης λόγω της ποιότητας του δείγματος, όπως συμβαίνει σε πυκνές διασπορές σωματιδίων μεγάλου μεγέθους και σε επιμολυσμένα δείγματα με σωματίδια σκόνης ή φυσαλίδες. [86]

#### 4.5.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου με Μετασχηματισμό Fourier & Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (Attenuated Total Reflectance Fourier Transmittance Infrared Spectroscopy)

Μία από τις σημαντικότερες αναλυτικές τεχνικές για το δομικό χαρακτηρισμό και την ποιοτική ανάλυση των νανοϋλικών, αποτελεί η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR). Η φασματοσκοπία υπέρυθρου βασίζεται στη διέγερση των μορίων ενός υλικού σε ανώτερες περιστροφικές και δονητικές ενεργειακές στάθμες μέσω της απορρόφησης υπέρυθρης ακτινοβολίας. Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη περιοχή του υπέρυθρου φάσματος για τη δομική ανάλυση υλικών, είναι η μέση υπέρυθρη (Mid-InfraRed, MIR), η οποία εκτείνεται περίπου από τα  $670$  έως  $4000\text{ cm}^{-1}$ . Η συχνότητα εμφάνισης της κορυφής απορρόφησης είναι χαρακτηριστική για κάθε δραστική ομάδα και εξαρτάται από το είδος και την ισχύ των σχηματιζόμενων δεσμών μεταξύ των ατόμων από τα οποία απαρτίζεται. Σύμφωνα με την κβαντική θεώρηση των δονητικών καταστάσεων, ο κυματαριθμός  $\bar{\nu}$  μίας κορυφής απορρόφησης εξαρτάται άμεσα από τη σταθερά ισχύος του εξεταζόμενου δεσμού  $k$ , και την ανηγμένη μάζα  $\mu$  της χαρακτηριστικής ομάδας, σύμφωνα με την **Εξίσωση 4**.

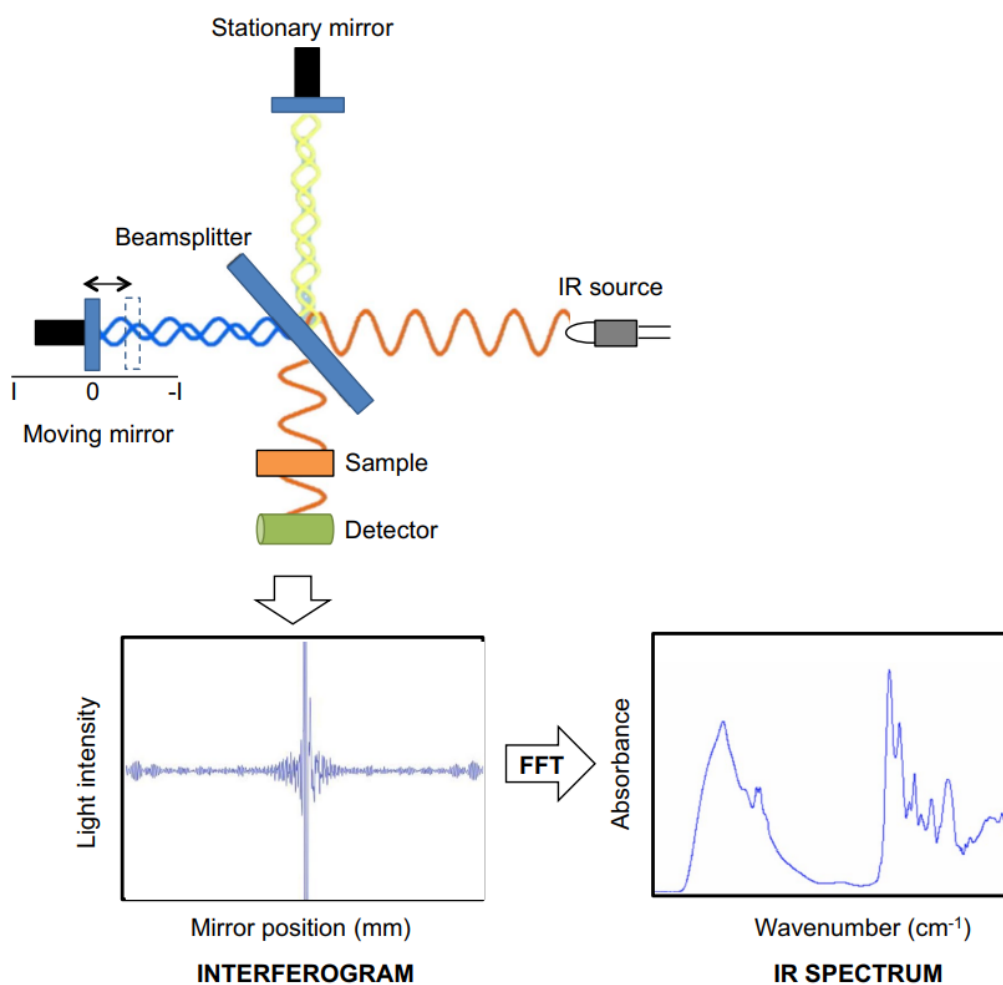
$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (4)$$

όπου  $c$  η ταχύτητα του φωτός.

Επομένως, η ταυτοποίηση μίας οργανικής ένωσης από το φάσμα υπέρυθρου είναι μία διαδικασία δύο σταδίων. Αρχικά, προσδιορίζονται οι χαρακτηριστικές ομάδες του μορίου, η παρουσία των οποίων είναι πιθανότερη στην περιοχή συχνοτήτων των χαρακτηριστικών ομάδων (group frequency region), η οποία εκτείνεται από τα  $3600\text{ cm}^{-1}$  έως τα  $4000\text{ cm}^{-1}$ . Να σημειωθεί ότι οι συχνότητες των χαρακτηριστικών ομάδων σπάνια είναι επακριβώς οι ίδιες, λόγω των αλληλεπιδράσεων με άλλες δονήσεις. Επομένως, τυχόν μετατοπίσεις στις κορυφές απορρόφησης σηματοδοτούν την ανάπτυξη διαφορετικού είδους αλληλεπιδράσεις, με τα υπόλοιπα δομικά στοιχεία του υλικού. Το δεύτερο στάδιο αφορά στη σύγκριση του φάσματος του υπό μελέτη δείγματος με τα φάσματα των καθαρών ουσιών από τις οποίες συνίσταται. Η περιοχή των δακτυλικών αποτυπωμάτων (fingerprint region) από τα  $1200\text{ cm}^{-1}$  έως τα

$600\text{ cm}^{-1}$ , είναι ιδιαίτερα χρήσιμη, καθώς μικρές διαφορές στη δομή και στη σύσταση ενός μορίου έχουν ως αποτέλεσμα σημαντικές αλλαγές στην εμφάνιση και στην κατανομή των κορυφών απορρόφησης στην περιοχή αυτή. [83]

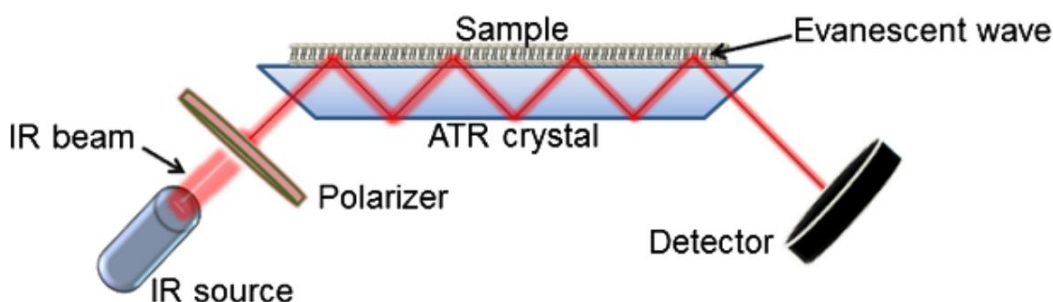
Η ανάλυση Fourier αποτελεί μία μαθηματική διαδικασία κατά την οποία μία καμπύλη αναλύεται σε άθροισμα ημιτονοειδών και συν ημιτονοειδών όρων, που ονομάζονται σειρές Fourier. Ο μετασχηματισμός Fourier επιτρέπει την παρακολούθηση ταυτόχρονα ολόκληρου του φάσματος απορρόφησης στην υπέρυθη περιοχή. Γι' αυτό το λόγο τα περισσότερα σύγχρονα όργανα φασματοσκοπίας υπέρυθρου διαθέτουν ενσωματωμένη μία ειδική οπτική διάταξη, η οποία ονομάζεται συμβολόμετρο και έχει τη δυνατότητα να επεξεργάζεται συγχρόνως ολόκληρη της φασματική περιοχή, σε αντίθεση με τα κλασικά φασματοφωτόμετρα, όπου η επεξεργασία γίνεται βηματικά. [91] Η τυπική διάταξη ενός φασματοφωτόμετρου Fourier παρουσιάζεται στο **Σχήμα 4.27**.



**Σχήμα 4.27.** Αναπαράσταση της τυπικής οργανολογικής διάταξης ενός φασματοφωτόμετρου FTIR και της μετατροπής του συμβολογράμματος (Interferogram) στο τελικό φάσμα υπέρυθρου (IR spectrum) μέσω του μετασχηματισμού Fourier. [92]

Σχετικά με τον τρόπο δειγματοληψίας, έχουν αναπτυχθεί μη καταστρεπτικές τεχνικές που επιτρέπουν την απευθείας λήψης του υπέρυθρου φάσματος χωρίς ειδική προετοιμασία του δείγματος, με κυριότερη την τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance). Η τεχνική ATR-FTIR στηρίζεται στο

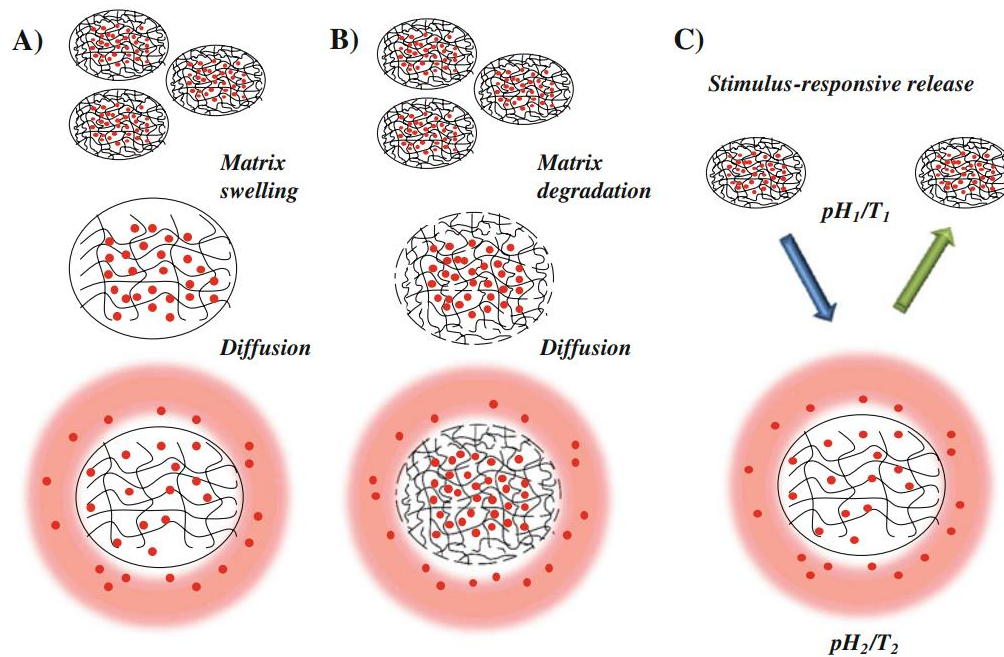
φαινόμενο της ολικής εσωτερικής ανάκλασης, το οποίο πραγματοποιείται όταν μία δέσμη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας διέρχεται από ένα μέσο υψηλής πυκνότητας, και κατ' επέκταση υψηλού δείκτη διάθλασης, σε ένα μέσο χαμηλότερης πυκνότητας. Στα φασματοφωτοφωτόμετρα ATR-FTIR ως στοιχείο ολικής εσωτερικής ανάκλασης χρησιμοποιείται ένας διαφανής κρύσταλλος στην υπέρυθη ακτινοβολία, πάνω στον οποίο τοποθετείται το δείγμα (Σχήμα 4.28). Το υλικό του κρυστάλλου συνήθως είναι Ge, Si, ZnS ή KRS-5, ανάλογα τον τύπο του οργάνου. Η προσπίπτουσα δέσμη υπέρυθρης ακτινοβολίας (συνήθως υπό γωνία 45°), υφίσταται πολλαπλές ανακλάσεις εντός του κρυστάλλου, με αποτέλεσμα να διέρχεται από το δείγμα πολλές φορές, από το οποίο και απορροφάται σε βάθος 0.5 – 2 μm. [93]



Σχήμα 4.28. Οπτική αναπαράσταση της λειτουργίας ενός φασματοφωτόμετρου υπέρυθρου με την τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (ATR-FTIR). [93]

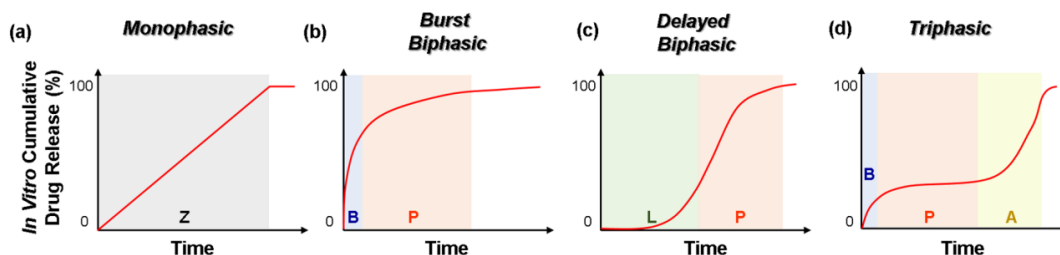
#### 4.5.3 Μελέτη Προφίλ Αποδέσμευσης (Release Studies)

Ο φορέας ενός συστήματος μεταφοράς φαρμάκου (Drug Delivery System) λειτουργεί ως ρυθμοκαθοριστικός παράγοντας για τη μεταφορά του δραστικής ουσίας σε έναν προκαθορισμένο βιολογικό στόχο και τον έλεγχο της αποδέσμευσής της ως προς το χρόνο, ενώ παράλληλα προστατεύει το φάρμακο από τους μηχανισμούς απέκκρισης του οργανισμού. Αρκετά φυσικά πολυμερή έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς τροποποιημένης αποδέσμευσης δεδομένης της βιοσυμβατότητας και βιοαποικοδομησιμότητας που συνήθως παρουσιάζουν, καθώς δεν εμφανίζουν τοξικότητα και απεκκρίνονται γρήγορα από τον οργανισμό χωρίς να υποβαθμίζουν τη δράση του μεταφερόμενου φαρμάκου. Ανάλογα το είδος του φορέα ενός συστήματος μεταφοράς, έχουν παρατηρηθεί διαφορετικοί μηχανισμοί αποδέσμευσης του εγκλωβισμένου φαρμακομορίου. Συγκεκριμένα, ιδιότητες του πολυμερούς, όπως η υδροφιλία και η βιοαποικοδομησιμότητα αποτελούν τους δύο κυριότερους παράγοντες για τον έλεγχο του μηχανισμού αποδέσμευσης. Για παράδειγμα, οι υδρόφιλες πολυμερικές μήτρες απελευθερώνουν την εγκλωβισμένη ουσία μέσω φαινομένων διάχυσης εξαιτίας της διόγκωσής τους κατά την επαφή του πολυμερούς με κάποιο υγρό μέσο (Σχήμα 4.29.A). [94]



**Σχήμα 4.29.** Οπτική αναπαράσταση διαφορετικών μηχανισμών αποδέσμευσης φαρμάκου από πολυμερικά νανοσυστήματα μεταφοράς. A: διάχυση φαρμάκου λόγω διόγκωσης της μήτρας, B: Αποδόμηση της πολυμερικής μήτρας και επακόλουθη διάχυση του φαρμάκου, C: Αποδέσμευση αποκρινόμενη σε εξωτερικά ερεθίσματα (pH ή/και θερμοκρασία) που προκαλούν μεταβολές στην πολυμερική μήτρα. [94]

Η κινητική αποδέσμευσης φαρμάκων από πολυμερικά συστήματα μεταφοράς *in vitro*, μπορεί να ταξινομηθεί σε τέσσερις επιμέρους κατηγορίες: μονοφασικό προφίλ, διφασικό προφίλ με ταχεία απελευθέρωση (burst release), διφασικό προφίλ με διάστημα επαγωγής και τριφασικό προφίλ, σύμφωνα με το **Σχήμα 4.30**. Το φαινόμενο «burst release» παρουσιάζεται στα περισσότερα πολυμερικά συστήματα μεταφοράς στο αρχικό χρονικό διάστημα που έρχεται το υλικό σε επαφή με το μέσο αποδέσμευσης. Κατά τη φάση της ταχείας απελευθέρωσης σημαντικό ποσοστό της εγκλωβισμένες δραστικής ουσίας αποδεσμεύεται στον οργανισμό σε σύντομο χρονικό διάστημα, κατόπιν της χορήγησης του φορέα. Είναι αντιληπτό ότι το φαινόμενο burst release είναι ανεπιθύμητο, καθώς ενδέχεται να προκαλέσει τοξικότητα στον οργανισμό, και κατ' επέκταση παρενέργειες, ενώ μειώνει σημαντικά τη συνολική διάρκεια δράσης του φαρμάκου, με αποτέλεσμα να απαιτείται επανάληψη της δόσης σε συντομότερο χρονικό διάστημα. Συνεπώς, ο έλεγχος των δομικών και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του φορέα και η μελέτη της κινητικής αποδέσμευσης του φαρμάκου *in vitro*, αποτελούν τα θεμέλια για τον ορθό σχεδιασμό ενός συστήματος μεταφοράς. [95]



**Σχήμα 4.30.** Συνηθέστερες κινητικές αποδέσμευσης φαρμάκου από πολυμερικά συστήματα μεταφοράς *in vitro*. A: Μονοφασικό προφίλ, B: Διφασικό προφίλ με ταχεία απελευθέρωση (Burst release), C: Διφασικό προφίλ με διάστημα επαγωγής, D: Τριφασικό προφίλ. [95]

#### 4.5.4 Μελέτη Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species Generation)

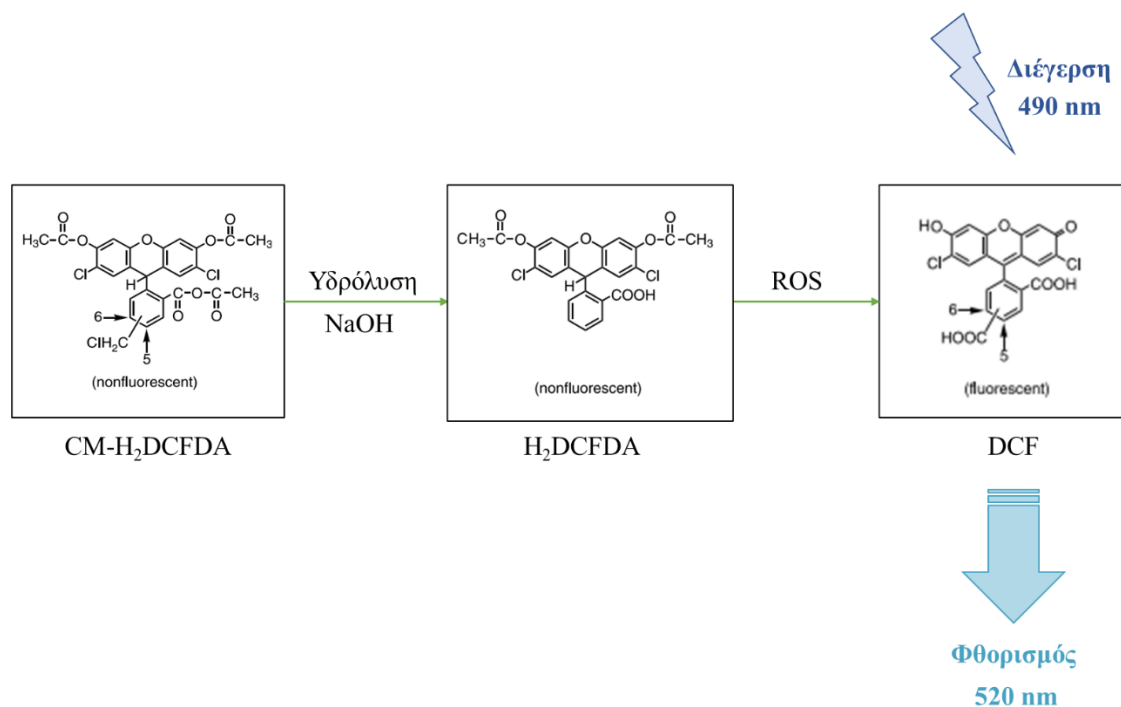
Η ανίχνευση της παραγωγής των Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ROS) κατά την ακτινοβόληση ενός νανοϋλικού με φωτοδυναμική λειτουργικότητα *in vitro*, απαιτεί συνήθως τη χρήση ιχνηθετών φθορισμού (fluorescent probes). Η προσέγγιση των ιχνηθετών φθορισμού αποτελεί μία από τις πιο εύκολες, γρήγορες και προσβάσιμες τεχνικές για την ποσοτικοποίηση των ROS σε ένα μέσο αποδέσμευσης ή ακόμα και σε κυτταρική καλλιέργεια. Ως ιχνηθέτες χρησιμοποιούνται οργανικές ενώσεις, οι οποίες εκπέμπουν φθορισμό εκλεκτικά, όταν βρίσκονται στο ίδιο περιβάλλον με ορισμένα είδη ελευθέρων ριζών. Συγκεκριμένα, η παραγωγή ROS επάγει την οξείδωση του αρχικά μη-φθορίζοντα ιχνηθέτη, μετατρέποντάς τον σε κάποιο φθορίζον παράγωγο. [96] Στον **Πίνακα 4.4** παρουσιάζονται οι κυριότεροι ιχνηθέτες φθορισμού και οι ελεύθερες ρίζες που ανιχνεύουν σε κάθε περίπτωση.

**Πίνακας 4.4.** Κυριότεροι ιχνηθέτες φθορισμού για την ανίχνευση ROS *in vitro*. [96]

Ιχνηθέτης Φθορισμού	Ανίχνευση ROS	Μήκος κύματος εκπομπής/διέγερσης (nm)	Φθορίζον παράγωγο
Dihydroethidium (DHE)	Κυτταρολυτικά υπεροξειδία, ONOO <sup>-</sup> , <sup>•</sup> OH	535/635	2-υδροξυ-αιθίδιο & αιθίδιο
MitoSOX Red	Μιτοχονδριακά υπεροξειδία & άλλους οξειδωτικούς παράγοντες	510/595 ή 400/595	2-υδροξυ-μιτο-αιθίδιο & μιτο-αιθίδιο
5-(and 6)- chloromethyl-2',7'-dichlorohydrofluorescein diacetate (CM-H <sub>2</sub> DCFDA)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , <sup>•</sup> OH, CO <sub>3</sub> <sup>•-</sup> , NO <sub>2</sub>	495/520	Διχλωροφλουορεσκεΐνη (DCF)

Ο ιχνηθέτης φθορισμού 5-(and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorohydrofluorescein diacetate (CM-H<sub>2</sub>DCFDA), αποτελεί μία εμπορικά διαθέσιμη επιλογή για την ανίχνευση των ROS *in vitro*, σε δοκιμαστικό σωλήνα ή/και σε κυτταρική καλλιέργεια. Ο ιχνηθέτης CM-H<sub>2</sub>DCFDA διαπερνά με ευκολία την κυτταροπλαστική μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων και υδρολύεται ενζυμικά από τις εστεράσες του κυτταροπλάσματος. Η υδρόλυση δύναται να επιτευχθεί και στο δοκιμαστικό σωλήνα προσθέτοντας διάλυμα καυστικού νατρίου στον ιχνηθέτη. Το προϊόν της υδρόλυσης

του εστέρα είναι το καρβοξυλικό ανιόν  $H_2DCFDA$ , όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 4.31**. Η παρουσία ελευθέρων ριζών ( $\cdot OH$ ,  $CO_3^{\cdot -}$ ,  $NO_2$ ) επάγει την οξειδωση του ενδιάμεσου προς σχηματισμό φθορίζοντος προϊόντος, το οποίο ονομάζεται διχλωροφλουορεσκεΐνη (DCF).



**Σχήμα 4.31.** Διαγραμματική αναπαράσταση της χρήσης του ιχνηθέτη φθορισμού CM-H<sub>2</sub>DCFDA για την ανίχνευση ROS.

Η διχλωροφλουορεσκεΐνη διεγείρεται στα 490 nm και εκπέμπει φθορισμό στα 520 nm. Επομένως, ακτινοβολώντας το μελετώμενο δείγμα στα 490 nm σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού, η εκπομπή σήματος στα 520 nm σηματοδοτεί την παρουσία δραστικών μορφών οξυγόνου, οι οποίες έχουν προέλθει από τη δράση φωτοευαισθητοποιητή. Με άλλα λόγια, η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού συσχετίζεται με την ικανότητα του φωτοδυναμικού παράγοντα να παράγει ROS, και κατ' επέκταση να επάγει οξειδωτικές στρες στα καρκινικά κύτταρα.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 5.1 Σκοπός

Σκοπός του πειραματικού σκέλους της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη καινοτόμων νανοφορέων για τον εγκλωβισμό του φωτοευαισθητοποιητή IR-786 Iodide. Το παραπάνω αποσκοπεί στην αύξηση της υδατοδιαλυτότητας, της βιοδιαθεσιμότητας και της σταθερότητας της IR-786 Iodide, ούτως ώστε να καταπολεμηθούν οι εγγενείς περιορισμοί που συναντά η ένωση σε βιολογικά περιβάλλοντα, και εν τέλει οι εξαιρετικές οπτικές ιδιότητες που διαθέτει να μπορέσουν να μελετηθούν και *in vivo* για τη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου (PDT). Ως βάση για την σύνθεση του νανοσυστήματος επιλέγονται οι κυκλοδεξτρίνες (CDs), καθώς ο λιπόφιλος χαρακτήρας της κυανίνης παρουσιάζει ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις με την εσωτερική υδρόφοβη κοιλότητα των CDs. Τα σχηματιζόμενο σύμπλοκο εγκλωβισμού (IC) της IR-786 Iodide με την HP-β-CD, ενσωματώνεται σε νανοσωματίδια χιτοζάνης, με σκοπό την περαιτέρω αύξηση της υδατοδιαλυτότητας της κυανίνης και την τροποποίηση του προφίλ αποδέσμευσης από το φορέα μεταφοράς.

Για τη σύνθεση των ICs επιλέγεται η μηχανοχημική τεχνική υγρής λειοτριβήσης προς σχηματισμό πάστας (kneading), καθώς αποτελεί μία περιβαλλοντικά φιλική εναλλακτική προσέγγιση με εύκολη ανακλιμάκωση. Συγκεκριμένα, εξετάζεται η ικανότητα των φυσικών κυκλοδεξτρινών β-CD και γ-CD, και του συνθετικού παραγώγου της β-CD, HP-β-CD, να σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα εγκλωβισμού με την IR-786 Iodide. Τα παραγόμενα σύμπλοκα φορτώνονται σε νανοσωματίδια χιτοζάνης (CS NPs) μέσω της τεχνικής ιονικής πηκτωμάτωσης (ionic gelation) χρησιμοποιώντας τα τριπολυφωσφορικά ιόντα (TPP) ως παράγοντα διασύνδεσης (cross-linker).

Στη συνέχεια, τα παραπάνω νανοσυστήματα χαρακτηρίζονται μέσω διαφόρων αναλυτικών τεχνικών. Αρχικά, προσδιορίζεται η απόδοση εγκλωβισμού της κυανίνης στον εκάστοτε φορέα μέσω φασματοφωτομετρίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis). Ακολουθεί ο χαρακτηρισμός μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) για τον προσδιορισμό του υδροδυναμικού μεγέθους, του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και του ζ-δυναμικού των συντεθειμένων νανοσωματιδίων σε υδατική διασπορά. Ο δομικός χαρακτηρισμός των νανοϋλικών πραγματοποιείται μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier με την τεχνική αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (ATR-FTIR). Για τη μελέτη του προφίλ αποδέσμευσης της IR-786 Iodide από τον εκάστοτε φορέα, εξετάζονται διαφορετικές τεχνικές με έμφαση στη μέθοδο της μεμβράνης διάλυσης-διάχυσης (dialysis bag method). Τέλος, προσδιορίζονται *in vitro* οι φωτοφυσικές ιδιότητες του ελεύθερου φωτοευαισθητοποιητή και του εγκλωβισμένου στους νανοφορείς που περιεγράφηκαν, μέσω ακτινοβόλησης με κόκκινο laser δίοδου. Πραγματοποιείται μελέτη της κινητικής φωτοαποδόμησης μέσω φασματοφωτομετρίας UV-Vis, για την διερεύνηση της προσφερόμενης φωτοπροστασίας από τους φορείς μεταφοράς, καθώς και μελέτη της παραγωγής ROS μέσω φασματοφωτομετρίας φθορισμού (Fluorescence spectroscopy), για την αξιολόγηση της φωτοδυναμικής δράσης του κάθε συστήματος

## 5.2 Όργανα & Αντιδραστήρια

Το σύνολο των χρησιμοποιούμενων οργάνων και αντιδραστηρίων κατά την εκπόνηση του πειραματικού σκέλους της παρούσας εργασίας, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5.1** και **5.2**, αντίστοιχα.

**Πίνακας 5.1.** Κατάλογος χρησιμοποιούμενων οργάνων και συσκευών.

Όργανο	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Αντλία κενού	Edwards	RV-5
Διαθλασίμετρο	Hinotek	WYA-3S/2S ABBE Digital Refractometer
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 210 g)	Kern	ADJ 200-4
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 2 g)	Sartorius	M2P
Λουτρό υπερήχων	Branson	2210 Ultrasonic Bath
Λυοφιλοποιητής	Frozen in Time	Lablyo Mini
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενο μάτι	Witeg	MSH-20A
Όργανο Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS)	Malvern Analytical	Zetasizer Nano ZS
Πεγάμετρο	Metrohm	744
Συσκευή Vortex	Velp	ZX4
Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)	Jasco	V-770 UV-Vis/NIR
Φασματοφωτόμετρο υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση (ATR-FTIR)	Bruker	ALPHA II
Φασματοφωτόμετρο φθορισμού	PerkinElmer	LS-45
Ψυχόμενη υπερφυγόκεντρος	ThermoScientific	Sorvall LYNX 6000 Superspeed Centrifuge

**Πίνακας 5.2.** Κατάλογος χρησιμοποιούμενων χημικών αντιδραστηρίων

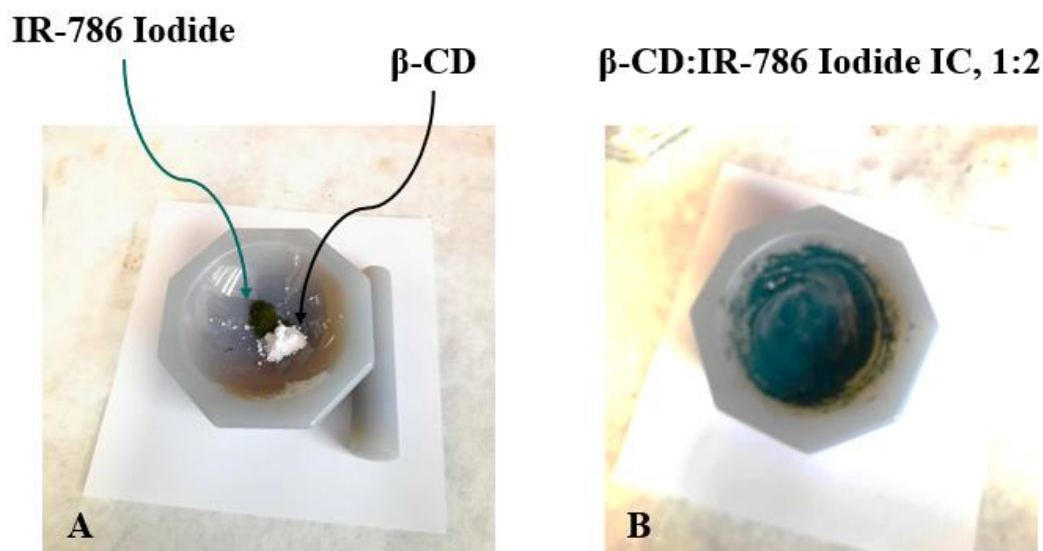
Αντιδραστήριο	Μοριακός Τύπος	Προμηθευτής
Αιθανόλη	$C_2H_6O$	Sigma-Aldrich
L-ασκορβικό οξύ	$C_6H_8O_6$	Duchefa
Γαλακτικό οξύ (80% v/v)	$C_3H_6O_3$	Labbox
Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)	$C_2H_6OS$	Sigma-Aldrich
Καυστικό νάτριο (pellets)	NaOH	Sigma-Aldrich
β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD)	$(C_6H_{10}O_5)_7$	Glentham Life Sciences
2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνη (HP-β-CD)	$C_{63}H_{112}O_{42}$	Acros Organics
γ-κυκλοδεξτρίνη (γ-CD)	$(C_6H_{10}O_5)_8$	Glentham Life Sciences
Μεθανόλη	$CH_4O$	Carlo Ebra
Τριπολυφωσφορικό νάτριο (TPP)	$Na_5P_3O_{10}$	Acros Organics
Υπερκάθαρο νερό	$H_2O$	-
Φλουορεσκεΐνη (CM-H <sub>2</sub> DCFDA)	$C_{20}H_{12}O_5$	ThermoFischer
Χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους	$(C_{56}H_{103}N_9O_{39})_n$	Glentham Life Sciences
IR-786 Iodide	$C_{32}H_{36}ClIN_2$	Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας (E.I.E.)
Polysorbate 80	$C_{64}H_{124}O_{26}$	Alfa Aesar



### 5.3 Ανάπτυξη νανοσυστημάτων μεταφοράς της κυανίνης IR-786 Iodide

#### 5.3.1 Σύνθεση συμπλόκων εγκλωβισμού (ICs)

Για τη σύνθεση των συμπλόκων εγκλωβισμού της κυανίνης IR-786 Iodide με την κυκλοδεξτρίνη επιλέγεται η μέθοδος της υγρής λειοτρίβησης προς σχηματισμό πάστας (kneading), όπως περιγράφεται από τον Abedalghani Halahlah et al. (2021). [97] Ως φορείς εγκλωβισμού της κυανίνης εξετάζονται οι φυσικές κυκλοδεξτρίνες β-CD και γ-CD, καθώς και το τροποποιημένο παράγωγο της β-CD, HP-β-CD. Ειδικότερα, ζυγίζονται οι ποσότητες της κυανίνης IR-786 Iodide και της εκάστοτε κυκλοδεξτρίνης που αντιστοιχούν σε γραμμομοριακή αναλογία ξενιστή:ένωσης 1: 2, και μεταφέρονται στο ιγδίο, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5.1.A** για την περίπτωση της β-CD. Για την εκκίνηση της διαδικασίας σύνθεσης προστίθενται στάγδην στο ιγδίο κατάλληλη ποσότητα μείγματος οργανικού διαλύτη  $MeOH:H_2O$  (2: 3 v/v), και η σχηματιζόμενη «πάστα» υπόκειται σε μηχανική κατεργασία με τη χρήση υπέρου για 30 min αδιαλείπτως. Για την αποφυγή αποδόμησης της φωτοευαίσθητης κυανίνης από το φως, η διαδικασία πραγματοποιείται πάντοτε σε ειδικό απαγωγό. Μετά το πέρας του απαραίτητου χρονικού διαστήματος, το προκύπτον στερεό (**Εικόνα 5.1.B**) συλλέγεται σε αδιάφανο φιαλίδιο και μεταφέρεται σε αντλία υψηλού κενού για 48 h, ούτως ώστε να εξατμιστεί η εναπομένουσα ποσότητα οργανικού διαλύτη. Το τελικό ξηρό προϊόν σφραγίζεται στο φιαλίδιο με parafilm και φυλάσσεται σε κλειστό περιέκτη στο ψυγείο για περαιτέρω μελέτη.



**Εικόνα 5.1.** Σύνθεση συμπλόκου εγκλωβισμού β-CD:IR-786 Iodide IC με την τεχνική kneading. (A: IR-786 Iodide και β-CD πριν την έναρξη της διεργασίας. B: Τελικό προϊόν συμπλόκου μετά το πέρας των 30 min μηχανικής κατεργασίας.)

### 5.3.2 Σύνθεση νανοσωματιδίων χιτοζάνης (CS NPs)

Τα νανοσωματίδια χιτοζάνης (CS NPs) συντίθενται μέσω της τεχνικής της ιονικής πηκτωμάτωσης (ionic gelation), χρησιμοποιώντας τα τριπολυφωσφορικά ιόντα (TPP) ως παράγοντα ιοντικής διασύνδεσης (cross-linker). Συγκεκριμένα, Το σύμπλοκο εγκλωβισμού HP-β-CD:IR-786 Iodide επιλέγεται να φορτωθεί στα νανοσωματίδια χιτοζάνης, αποσκοπώντας στην περαιτέρω αύξηση της υδατοδιαλυτότητας της κυανίνης, δεδομένου ότι η HP-β-CD παρουσιάζει την υψηλότερη εγγενή υδατοδιαλυτότητα μεταξύ των μελετώμενων φορέων.

Αναλυτικά, κατάλληλη ποσότητα χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους (Low molecular weight Chitosan) που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση πολυηλεκτρολύτη 0.2% w/v, διαλυτοποιείται σε υδατικό διάλυμα γαλακτικού οξέος 1% w/v, κατόπιν μαγνητικής ανάδευσης για 1 h, ούτως ώστε να εξασφαλιστεί η πλήρης ενυδάτωση των πολυμερικών αλυσίδων της χιτοζάνης (**Εικόνα 5.2**). Το pH του παραγόμενου διαλύματος χιτοζάνης ρυθμίζεται στην τιμή 5.8 μέσω προσθήκης σταγόνων υδατικού διαλύματος NaOH<sub>(aq)</sub> συγκέντρωσης 10% w/v και το διάλυμα διηθείται υπό κενό μέσω διάταξης Buchner για την απομάκρυνση τυχόν αδιάλυτων ακαθαρσιών που προέρχονται από τα αντιδραστήρια.



**Εικόνα 5.2.** Υδατικό διάλυμα χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους συγκέντρωσης 0.2% w/v σε διαλύτη γαλακτικό οξύ 1% w/v.

Στη συνέχεια, το σύμπλοκο εγκλωβισμού διασπείρεται ομοιογενώς σε υδατικό διάλυμα επιφανειοδραστικού παράγοντα 0.1% w/v Polysorbate 80 με χρήση vortex (**Εικόνα 5.3**), και η προκύπτουσα διασπορά προστίθεται με αργό ρυθμό στο φιλτραρισμένο διάλυμα χιτοζάνης υπό ανάδευση. Η μαζική αναλογία χιτοζάνης και συμπλόκου

κυκλοδεξτρίνης που φορτώνεται στο σύστημα, ρυθμίζεται στην τιμή CS/IC=2: 1 w/w, με σκοπό την επίτευξη των βέλτιστων αλληλεπιδράσεων μεταξύ πολυηλεκτρολύτη και συμπλόκου.



**Εικόνα 5.3.** Διασπορά του συμπλόκου HP-β-CD:IR-786 Iodide συγκέντρωσης 0.1% w/v, σε υδατικό διάλυμα 0.1% w/v Polysorbate 80.

Για το σχηματισμό των νανοσωματιδίων, προστίθενται στη διασπορά με αργό και σταθερό ρυθμό το διάλυμα του cross-linker (0.1 % w/v τριπολυφωσφορικού νατρίου (TPP), αυξάνοντας παράλληλα τον ρυθμό ανάδευσης στα 1000 rpm για να εξασφαλιστεί η βέλτιστη ομοιογένεια στο σύστημα κατά το σχηματισμό των νανοδομών.



**Εικόνα 5.4.** Πειραματική διάταξη προσθήκης του cross-linker (υδατικό διάλυμα TPP 0.1 % w/v) υπό έντονη ανάδευση για το σχηματισμό των νανοσωματιδίων μέσω της της τεχνικής ιονικής πηκτωμάτωσης.



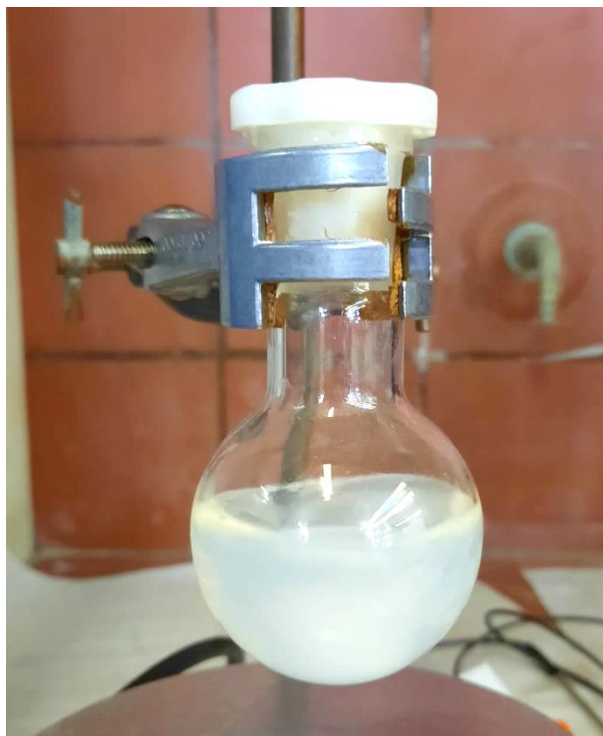
**Εικόνα 2.5.** Υδατική διασπορά νανοσωματιδίων χιτοζάνης (CS NPs) φορτωμένων με το σύμπλοκο εγκλωβισμού HP-β-CD:IR-786 Iodide, πριν τη λυοφιλοποίηση.

Η διασπορά αφήνεται 1 h σε μαγνητική ανάδευση και στη συνέχεια λυοφιλοποιείται στους  $-52^{\circ}\text{C}$  για 48 h. Το ξηρό προϊόν της λυοφιλοποίησης επαναδιασπείρεται σε υπερκάθαρο νερό και πραγματοποιείται έκπλυση της περίσσειας γαλακτικού οξέος μέσω υπερφυγοκέντρισης (28,000 rpm, 40 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Παραλαμβάνεται το ίζημα από την υπερφυγοκέντριση, επαναδιασπείρεται σε υπερκάθαρο νερό και το τελικό προϊόν του ξηρού νανοσυστήματος λαμβάνεται κατόπιν επανάληψης του σταδίου της λυοφιλοποίησης (**Εικόνα 5.6**).



**Εικόνα 5.6.** Τελικό προϊόν λυοφιλοποιημένων νανοσωματιδίων χιτοζάνης (CS NPs) φορτωμένων με το σύμπλοκο εγκλωβισμού HP-β-CD:IR-786 Iodide.

Για την παρασκευή των κενών νανοσωματιδίων χιτοζάνης (Blank CS NPs) ακολουθείται η παραπάνω διαδικασία παραλείποντας το στάδιο προσθήκης του συμπλόκου εγκλωβισμού HP-β-CD:IR-786 Iodide στο σύστημα. Με την προσθήκη του τριπολυφωσφορικού νατρίου (TPP) παρατηρείται οπτικά η μετατροπή του διαυγούς διαλύματος χιτοζάνης σε θολερή κολλοειδή διασπορά, λόγω της σκέδασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από τα σχηματιζόμενα νανοσωματίδια (Εικόνα -).



**Εικόνα 5.7.** Υδατική διασπορά κενών νανοσωματιδίων χιτοζάνης (Blank CS NPs) πριν τη λυοφιλοποίηση.

## 5.4 Χαρακτηρισμός Νανοϋλικών

### 5.4.1 Απόδοση Διεργασίας

Η απόδοση της διεργασίας σύνθεσης (Process Yield) των συμπλόκων εγκλωβισμού (CD:IR-786 Iodide ICs) μέσω της τεχνικής kneading, προσδιορίζεται διαιρώντας την ξηρή μάζα του εκάστοτε συμπλόκου ( $m_{Dried\_IC}$ ) με το άθροισμα των μαζών της καθαρής ένωσης IR-786 Iodide ( $m_{CYFeed}$ ) και της αντίστοιχης κυκλοδεξτρίνης ( $m_{CDFeed}$ ) που χρησιμοποιήθηκαν ως τροφοδοσία στη διεργασία (**Εξίσωση 5**).

$$Process\ Yield\ (\%) = \frac{m_{Dried\_IC} (mg)}{m_{CDFeed} (mg) + m_{CYFeed} (mg)} \cdot 100\% \quad (5)$$

### 5.4.2 Απόδοση Εγκλωβισμού

#### Καμπύλη Αναφοράς

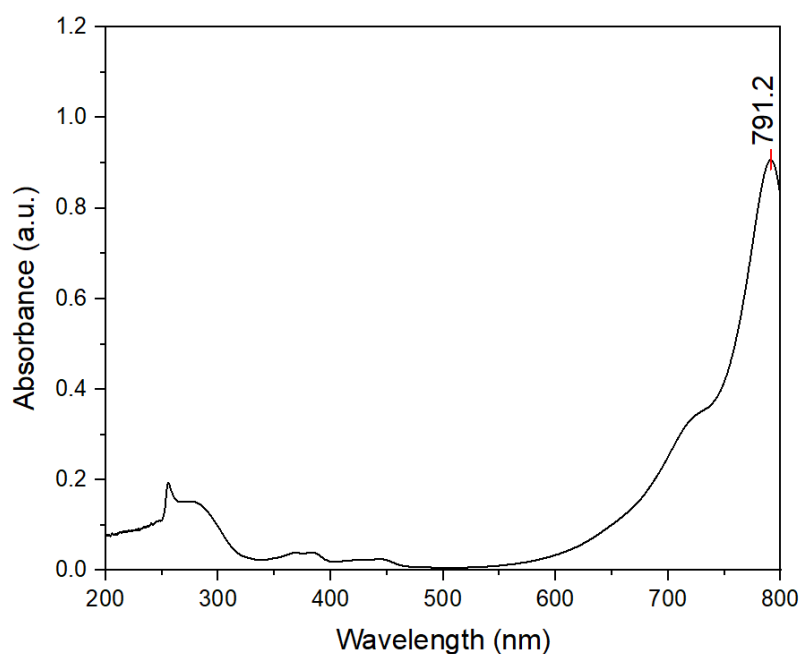
Για την πραγματοποίηση ποσοτικών προσδιορισμών μέσω φασματοφωτομετρίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) είναι αναγκαία η δημιουργία καμπύλης αναφοράς για την υπό μελέτη ένωση. Η κυανίνη IR-786 Iodide είναι πλήρως διαλυτή στον οργανικό διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Αρχικά, παρασκευάζεται μητρικό διάλυμα

της κυανίνης σε DMSO συγκέντρωσης 1 mg/mL, το οποίο παρουσιάζεται στην **Εικόνα 5.8**.



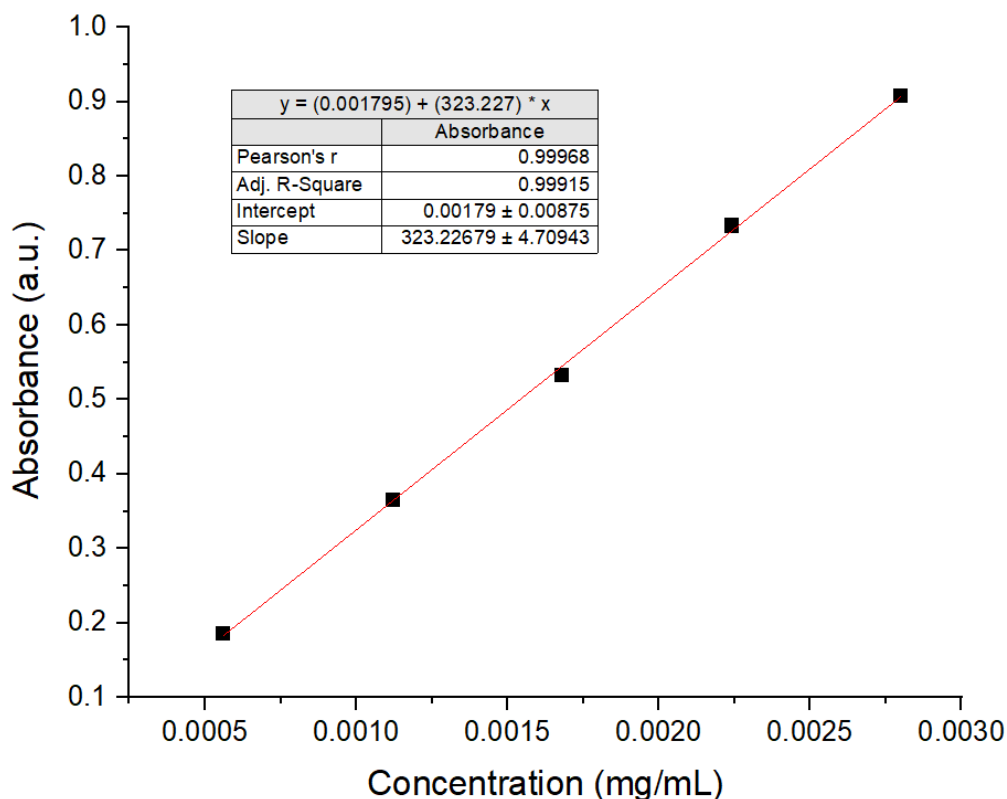
**Εικόνα 5.8.** Μητρικό διάλυμα IR-786 Iodide σε DMSO συγκέντρωσης 1 mg/mL.

Ακολουθεί κατάλληλη αραιώση του μητρικού διαλύματος με γνωστή ποσότητα DMSO, ούτως ώστε το μέγιστο της απορρόφησης της κυανίνης να βρίσκεται κοντά στο άνω όριο της γραμμικής περιοχής του οργάνου, δηλαδή κοντά στην τιμή 1.0. Από το τελευταίο παρασκευάζονται άλλα τέσσερα πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης (μέσω αραιώσης με κατάλληλη ποσότητα DMSO), καθώς απαιτούνται πέντε σημεία για την εξαγωγή καμπύλης βαθμονόμησης μέσω εξωτερικών προτύπων. Η μέγιστη απορρόφηση όλων των διαλυμάτων πρέπει να βρίσκεται στο εύρος 0.1 έως 1.0, ώστε να ισχύει η γραμμική σχέση του Lambert-Beer. Η κυανίνη IR-786 Iodide παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 791 nm σε περιβάλλον DMSO (**Σχήμα 5.1**), επομένως για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς λαμβάνεται υπόψιν η τιμή της απορρόφησης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.



**Σχήμα 5.1.** Φάσμα απορρόφησης του διαλύματος IR-786 Iodide συγκέντρωσης 4.6  $\mu\text{M}$  σε οργανικό διαλύτη DMSO.

Στο Σχήμα 5.2 παρουσιάζεται η προκύπτουσα καμπύλη αναφοράς και η γραμμική συνάρτηση με τη βέλτιστη προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα περιγράφεται από την Εξίσωση 6.



**Σχήμα 5.2.** Καμπύλη βαθμονόμησης IR-786 Iodide σε DMSO με τη μέθοδο των εξωτερικών προτύπων.

$$A = 323.23 \cdot C + 0.0018, \quad R^2 = 0.99915 \quad (6)$$

όπου  $A$  η απορρόφηση του διαλύματος στα 791 nm και  $C$  η συγκέντρωση της κυανίνης IR-786 Iodide σε μονάδες mg/mL. Ο υπολογιζόμενος συντελεστής  $R^2$  βρίσκεται κοντά στην τιμή 1 υποδεικνύοντας ικανοποιητική προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στη γραμμική εξίσωση.

### Άμεση Απόδοση

Η απόδοση εγκλωβισμού της κυανίνης IR-786 Iodide στα σύμπλοκα με τις κυκλοδεξτρίνες (Inclusion Efficiency, IE%) προσδιορίζεται με άμεσο τρόπο μέσω φασματοφωτομετρίας ορατού υπεριώδους (UV-Vis). Συγκεκριμένα, γνωστή ποσότητα ξηρού συμπλόκου προστίθεται σε συγκεκριμένο όγκο οργανικού διαλύτη DMSO και το σύστημα αφήνεται 24 h υπό ανάδευση. Η παρουσία του οργανικού διαλύτη DMSO εξυπηρετεί στη λύση των υπερμοριακών συμπλόκων, καθώς η υδρόφοβη κυανίνη παρουσιάζει μεγαλύτερη χημική συγγένεια με τον ισχυρό διαλύτη DMSO από ότι με την εσωτερική κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης, η οποία προσομοιάζει αιθανολικό



μικροπεριβάλλον. Επομένως, για τον προσδιορισμό της απόδοσης μετράται φασματοσκοπικά η ποσότητα της κυανίνης που έχει αποδεσμευτεί στον οργανικό διαλύτη. Πριν τη φωτομέτρηση, πραγματοποιείται η δημιουργία γραμμής βάσης (baseline) στο όργανο για τον διαλύτη DMSO. Το άγνωστο διάλυμα φιλτράρεται με φίλτρο σύριγγας 0.22 μm για την απομάκρυνση τυχόν αδιάλυτου συμπλόκου και κατόπιν κατάλληλης αραιώσης με DMSO μετράται η απορρόφηση στα 791 nm, ώστε το σήμα του ανιχνευτή να βρίσκεται στα όρια που έχει κατασκευαστεί η καμπύλη αναφοράς. Το σήμα της απορρόφησης μετατρέπεται σε συγκέντρωση από την εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης σε DMSO (Εξίσωση 6) και υπολογίζεται η μάζα της κυανίνης που βρίσκεται διαλελυμένη στο DMSO. Η τιμή της απόδοσης εγκλωβισμού (% IE) υπολογίζεται από το λόγο της μάζας της αποδεσμευμένης κυανίνης στον οργανικό διαλύτη ( $m_{CYInclusion}$ ) προς τη μάζα της ένωσης που χρησιμοποιήθηκε αρχικά στη διεργασία σύνθεσης ( $m_{CYFeed}$ ), όπως περιγράφεται από την **Εξίσωση 7**.

$$IE\% = \frac{m_{CYInclusion} (mg)}{m_{CYFeed} (mg)} \cdot 100\% \quad (7)$$

#### Έμμεση Απόδοση

Για την περίπτωση των νανοσωματιδίων χιτοζάνης (CS NPs), η απόδοση εγκλωβισμού (Entrapment Efficiency, %EE) προσδιορίζεται με έμμεσο τρόπο, καθώς δεν δύναται να επιτευχθεί λύση των νανοσωματιδίων άμεσα σε οργανικό διαλύτη (η χιτοζάνη απαιτεί όξινο υδατικό περιβάλλον). Γι' αυτό το σκοπό, λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό της φυγοκέντρωσης του σταδίου έκπλυσης των νανοσωματιδίων με υπερκείμενο νερό, το οποίο περιέχει το σύμπλοκο που δεν έχει ενσωματωθεί στο τελικό νανοςύστημα. Στη συνέχεια, λαμβάνεται γνωστή ποσότητα από το υπερκείμενο υγρό και προστίθεται διαλύτης DMSO για τη λύση των ελεύθερων συμπλόκων και την αποδέσμευση της κυανίνης. Το προκύπτον διάλυμα 50% v/v DMSO/H<sub>2</sub>O ανακινείται και φιλτράρεται πριν τη φωτομέτρηση, από την οποία λαμβάνεται η απορρόφηση στα 791 nm που αντιστοιχεί στην κυανίνη που δεν έχει εγκλωβιστεί στο νανοςύστημα. Η απόδοση εγκλωβισμού (% EE) προσδιορίζεται από το λόγο της διαφοράς της αρχικής ( $m_{CYFeed}$ ) από την ελεύθερη κυανίνη ( $m_{CYFree}$ ) προς την αρχική μάζα της κυανίνης στο σύμπλοκο που χρησιμοποιήθηκε ως τροφοδοσία στην διεργασία της ιονικής ηλεκτροκωμύωσης (**Εξίσωση 8**).

$$EE\% = \frac{m_{CYFeed} (mg) - m_{CYFree} (mg)}{m_{CYFeed} (mg)} \cdot 100\% \quad (8)$$

### 5.4.3 Προφίλ Αποδέσμευσης της IR-786 Iodide από τα Νανοσυστήματα Μεταφοράς (*in vitro* Release Study)

Η μελέτη του προφίλ αποδέσμευσης της ένωσης IR-786 Iodide από τους νανοφορείς αποσκοπεί στη διερεύνηση της ικανότητας του παρόντος συστήματος μεταφοράς φαρμάκου να επιτυγχάνει τροποποιημένη αποδέσμευση της δραστικής ουσίας υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Γενικότερα, στις μελέτες αποδέσμευσης γίνεται εσφαλμένα η παραδοχή ότι διεξάγονται σε επαρκώς αραιό μέσο, ούτως ώστε η διαλυτότητα της δραστικής ουσίας να μην έχει περιοριστική επίδραση στην απελευθέρωσή της, και κατ'επέκταση στη διάλυσή της στο μέσο αποδέσμευσης. Ακόμα, συνήθως θεωρείται ότι η κινητική της αποδέσμευσης που εξάγεται από τη μαθηματική επεξεργασία του προφίλ, αντικατοπτρίζει τη συμπεριφορά του συστήματος μεταφοράς φαρμάκου σε συνθήκες *in vivo*. Όλα τα προηγούμενα δεν ισχύουν για ενώσεις με πολύ χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, όπως ο φωτοευαισθητοποιητής IR-786 Iodide, καθώς σε τέτοιες περιπτώσεις απαιτείται αρκετά μεγάλος όγκος μέσου αποδέσμευσης συγκριτικά με τη μάζα του νανοσυστήματος για τη διεξαγωγή του προφίλ, κάτι που υπονομεύει την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης της αποδεσμευμένης ένωσης. [98]

Για τη μελέτη της αποδέσμευσης της κυανίνης IR-786 Iodide από τα συνθετιμένα σύμπλοκα εγκλωβισμού των κυκλοδεξτρινών ( $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD και  $\gamma$ -CD) και τα νανοσωματίδια χιτοζάνης, εξετάζονται τρεις διαφορετικές μεθοδολογίες ποσοτικοποίησης της απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας από τον εκάστοτε φορέα.

#### A) Μέθοδος των γυάλινων φιαλιδίων (vials)

Η μέθοδος των γυάλινων φιαλιδίων αφορά στην πεπερασμένη μελέτη αποδέσμευσης της δραστικής ουσίας σε διακριτά γυάλινα φιαλίδια (vials). Με αυτό τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα μελέτης της αποδέσμευσης της ένωσης από τους νανοφορείς σε ανεξάρτητους χρόνους. Το κυριότερο μειονέκτημα της συγκεκριμένης τεχνικής αποτελεί η αδυναμία μελέτης συστημάτων με ανεπαρκή ομοιογένεια και ανισότροπη κατανομή της δραστικής ουσίας στο φορέα. Άλλο ένα σημαντικό μειονέκτημα αποτελεί η χρήση οργανικού διαλύτη για την περίπτωση των υδρόφοβων ενώσεων. Με αυτό τον τρόπο υπονομεύεται η αντικειμενικότητα της ποσοτικοποίησης δεδομένου ότι ο οργανικός διαλύτης δύναται να προκαλέσει λύση των συμπλόκων και να παρέχει τελικά ψευδώς θετικό αποτέλεσμα για την αποδέσμευση της ένωσης, κάτι που φυσικά δεν θα είναι αντιπροσωπευτικό της συμπεριφοράς του συστήματος *in vivo*.

Ζυγίζονται 5 mg του εκάστοτε συμπλόκου εγκλωβισμού και προστίθενται σε 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH = 7.4) εντός γυάλινου φιαλιδίου. Τα δείγματα τοποθετούνται για επώαση σε θερμοκρασία 37 °C υπό ανακίνηση. Κάθε δείγμα αντιστοιχεί σε προκαθορισμένο χρόνο (20 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5h, 1d) και εξάγεται από τον επωαστήρα τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Για την παραλαβή της υδρόφοβης κυανίνης προστίθενται στο δείγμα 95  $\mu$ L οργανικού διαλύτη για την διαλυτοποίηση της αποδεσμευμένης κυανίνης και λαμβάνονται 100  $\mu$ L, τα οποία αραιώνονται με κατάλληλη ποσότητα PBS, ώστε η απορρόφηση της ένωσης να

βρίσκεται εντός της γραμμικής περιοχής του οργάνου UV-Vis ( $Abs = 0.1 - 1$ ). Η ποσοτικοποίηση της κυανίνης στο δείγμα πραγματοποιείται μέσω της καμπύλης αναφοράς της ένωσης σε DMSO σε μήκος κύματος 791 nm.

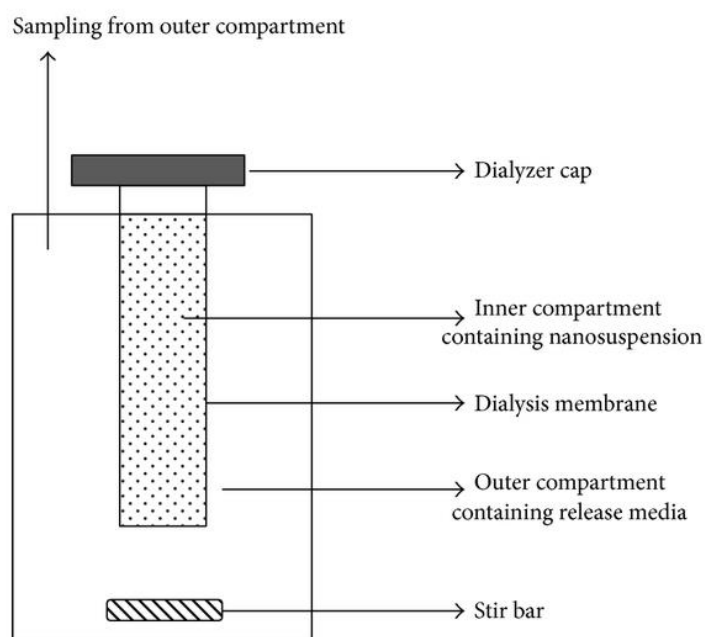
### B) Μέθοδος φυγοκέντρησης (Centrifugation Method)

Σε μία προσπάθεια για την αντιμετώπιση της ανομοιογένειας των συμπλόκων εγκλωβισμού δοκιμάστηκε η διεξαγωγή της μελέτης αποδέσμευσης εντός σφαιρικής φιάλης και τη χρήση της φυγοκέντρου για την παραλαβή της αποδεσμευμένης ένωσης από το μέσο. Κατά αυτό τον τρόπο χρησιμοποιείται μεγαλύτερη ποσότητα του εκάστοτε συστήματος, η οποία θα συμμετέχει αυτούσια σε όλους του χρόνους δειγματοληψίας του προφίλ, περιορίζοντας το φαινόμενο της τυχαιότητας του συμπλόκου εγκλωβισμού, όπως εμφανίστηκε στη μέθοδο των γυάλινων φιαλιδίων με ανεξάρτητες ποσότητες συμπλόκων. Ταυτόχρονα, εφόσον μέσω της φυγοκέντρησης θεωρητικά πραγματοποιείται πλήρης διαχωρισμός της αποδεσμευμένης ένωσης στο υπερκείμενο υγρό από τα σωματίδια που καθιζάνουν ως ίζημα, η χρήση οργανικού διαλύτη στο υπερκείμενο υγρό για τη διαλυτοποίηση της ένωσης δε θα επηρεάζει την αντικειμενικότητα της ποσοτικοποίησης. Ωστόσο, εξετάζονται και οι δύο περιπτώσεις, δηλαδή απευθείας φωτομέτρησης του υπερκείμενου υγρού και προσθήκης οργανικού διαλύτη DMSO πριν τη φωτομέτρηση στο UV-Vis.

Ζυγίζονται 40 mg συμπλόκου εγκλωβισμού  $\beta$ -CD:IR-786 Iodide και προστίθενται σε 25 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH = 7.4) εντός σφαιρικής φιάλης. Η σφαιρική φιάλη είναι τοποθετημένη σε θερμομαντικό μανδύα στους 37 °C και ο ρυθμός ανάδευσης ορίζεται στα 150 rpm. Λαμβάνονται δείγματα όγκου 1 mL από την υδατική διασπορά του συμπλόκου σε χρόνους 20 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h και 1 d. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε περιέκτες Eppendorf σε συνθήκες 18,000 rpm, 15 min, 10°C, με σκοπό την καθίζηση των αιωρούμενων σωματιδίων και την παραλαβή της αποδεσμευμένης ένωσης στο υπερκείμενο υγρό. Να σημειωθεί ότι στο δείγμα για το χρόνο 1 d αυξήθηκαν οι στροφές της φυγοκέντρου στις 20,000 rpm, καθώς εμφανίστηκε δυσκολία στην καθίζηση των αιωρούμενων σωματιδίων λόγω της ενδεχόμενης αποδόμησης του συμπλόκου (συνδυασμός οξειδωσης και φωτοαποδόμησης) κατά την έκθεσή του για μεγάλο χρονικό διάστημα σε ατμοσφαιρικό οξυγόνο εντός της φιάλης. Το ίζημα των σωματιδίων σε κάθε περίπτωση επαναδιασπείρεται σε 1 mL φρέσκου PBS και εισάγεται πίσω στη σφαιρική φιάλη αποσκοπώντας στον περιορισμό του σφάλματος στη συγκέντρωση του συμπλόκου εντός της διασποράς. Για την πραγματοποίηση των μετρήσεων απορρόφησης στο UV-Vis λαμβάνονται 500  $\mu$ L του υπερκείμενου υγρού μετά τη φυγοκέντρωση για κάθε δείγμα και αραιώνονται με κατάλληλη ποσότητα PBS στην κυψελίδα, ούτως ώστε η απορρόφηση της κυανίνης να βρίσκεται εντός της γραμμικής περιοχής του οργάνου.

### Γ) Μέθοδος με μεμβράνη διάλυσης-διάχυσης (dialysis bag method)

Για την αντιμετώπιση της καθίζησης της ελεύθερης κυανίνης κατά τη φυγοκέντρωση εξετάζεται η διενέργεια του προφίλ αποδέσμευσης με χρήση μεμβράνης διάλυσης-διάχυσης, η οποία θα επιτρέπει τη διέλευση μόνο της αποδεσμευμένης ένωσης διαχωρίζοντάς την από τα στερεά σωματίδια της διασποράς. Η διαγραμματική διάταξη ενός τέτοιου συστήματος παρουσιάζεται στο **Σχήμα 5.3**, όπου η διασπορά των σωματιδίων του φορέα τοποθετείται εντός της μεμβράνης και στη συνέχεια η μεμβράνη εμβαπτίζεται στο επιθυμητό μέσο αποδέσμευσης υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και ρυθμού ανάδευσης. Η ένωση που αποδεσμεύεται από το φορέα διαλυτοποιείται στο μέσο που έχει γίνει η διασπορά των σωματιδίων και στη συνέχεια διαχέεται μέσω των πόρων της πολυμερικής μεμβράνης προς το εξωτερικό διάλυμα, το οποίο λειτουργεί ως δεξαμενή. Τα σωματίδια του φορέα αδυνατούν να διαπεράσουν τους πόρους της μεμβράνης λόγω μεγαλύτερου μεγέθους. Η ποσοτικοποίηση της αποδέσμευσης γίνεται με λήψη δείγματος από το εξωτερικό διάλυμα και επιστροφή ίσου όγκου μέσου αποδέσμευσης για τη διατήρηση σταθερού όγκου, όπως και στη μέθοδο της φυγοκέντρωσης.



**Σχήμα 5.3.** Διαγραμματική διάταξη μελέτης προφίλ αποδέσμευσης με μεμβράνη διάλυσης-διάχυσης. [99]

Στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέγεται το διάλυμα της διασποράς των σωματιδίων που τοποθετείται στη μεμβράνη να είναι πανομοιότυπο με το μέσο αποδέσμευσης που τοποθετείται εξωτερικά στο ποτήρι ζέσεως, ώστε οι συνθήκες να είναι οι ίδιες.

Σχετικά με το μέσο αποδέσμευσης δοκιμάζεται αρχικά η μελέτη του προφίλ αποδέσμευσης σε περιβάλλον ρυθμιστικού διαλύματος PBS ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH = 7.4), όπως στις προηγούμενες δύο μεθόδους. Για την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας της κυανίνης προστίθεται στο μέσο αποδέσμευσης το επιφανειοδραστικό Polysorbate

80 σε σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα 0.1% w/v, το οποίο αποτελεί μια συνηθισμένη τακτική για την ποσοτικοποίηση υδρόφοβων ενώσεων κατά τη διενέργεια του προφίλ αποδέσμευσης σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. [98]. Ακόμα για περαιτέρω αύξηση της διαλυτότητας της κυανίνης, εξετάζεται η προσθήκη οργανικού διαλύτη DMSO στο ίδιο μέσο, αλλά σε σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα (0.1% v/v), έτσι ώστε να μην επηρεάζεται σημαντικά η αντικειμενικότητα της ποσοτικοποίησης και να μην είναι απαγορευτική η συγκέντρωση του DMSO για τη χορήγηση της επαναδιασποράς της φόρμουλας *in vivo*. Τέλος, στο μέσο αποδέσμευσης προστίθεται και το αντιοξειδωτικό L-ασκορβικό οξύ σε συγκέντρωση 1 mM αποσκοπώντας στην επιβράδυνση της οξείδωσης της κυανίνης στις συνθήκες που διενεργείται το προφίλ αποδέσμευσης. Όλα τα παραπάνω πρόσθετα δύναται να αποτελέσουν και το μέσο επαναδιασποράς του συστήματος μεταφοράς του φωτοευαισθητοποιητή IR-786 Iodide κατά τη χορήγησή του *in vivo* στο πλαίσιο της φωτοθεραπείας του καρκίνου. Συνεπώς, η μελέτη του προφίλ αποδέσμευσης στο συγκεκριμένο μέσο έχει νόημα και αντικατοπτρίζει με ρεαλιστικό τρόπο το περιβάλλον με το οποίο θα έρθει σε άμεση επαφή ο φορέας εγκλωβισμού της κυανίνης κατά την ενέσιμη χορήγηση του θεραπευτικού σχήματος στον οργανισμό.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, ζυγίζονται 15 mg του εκάστοτε φορέα εγκλωβισμού και διασπείρονται σε 5 mL μέσου αποδέσμευσης PBS με τιμή pH = 7.4 (0.1 %w/v Polysorbate 80, 0.1 % v/v DMSO, 1 mM ασκορβικού οξέος). Για την επίτευξη ομοιογενούς σταθερής διασποράς και την αποφυγή καθίζησης των σωματιδίων κατά τη μελέτη αποδέσμευσης, το δείγμα ανακινείται έντονα στη συσκευή vortex και αφήνεται υπό έντονη μαγνητική ανάδευση μέχρι τη στιγμή που είναι έτοιμο να τοποθετηθεί εντός της μεμβράνης (SERVAPOR® dialysis tubing, MWCO 12,000-14,000). Εν συνεχεία, τοποθετείται η διασπορά εντός της μεμβράνης και εμβαπτίζεται σε 30 mL του ίδιου μέσου αποδέσμευσης (PBS, 0.1%w/v Polysorbate 80, 0.1% v/v DMSO, 1 mM ασκορβικού οξέος) εντός ποτηριού ζέσεως, όπου έχει σταθεροποιηθεί η θερμοκρασία στους 37°C και με σταθερό ρυθμό ανάδευσης 300 rpm (**Εικόνα 5.9**). Από το εξωτερικό διάλυμα λαμβάνονται δείγματα όγκου 800  $\mu$ L σε χρονικές στιγμές 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h και επιστρέφεται ίσος όγκος φρέσκου μέσου στο εξωτερικό διάλυμα για τη διατήρηση σταθερού όγκου. Ακολουθεί φωτομέτρηση του κάθε δείγματος στο όργανο UV-Vis χωρίς την προσθήκη επιπλέον διαλύτη και λαμβάνεται η μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 791 nm. Για τη δημιουργία της γραμμής βάσης στο όργανο χρησιμοποιείται το διάλυμα του μέσου αποδέσμευσης. Σε όλες τις μετρήσεις μετά τα 5 min προστίθεται η μάζα της κυανίνης που αφαιρέθηκε από το σύστημα κατά τη δειγματοληψία οδηγώντας στο αθροιστικό προφίλ αποδέσμευσης.



**Εικόνα 5.9.** Πειραματική διάταξη μεμβράνης διάλυσης διάχυσης για τη μελέτη του προφίλ αποδέσμευσης της κυανίνης IR-786 Iodide.

#### 5.4.4 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering)

Για τον προσδιορισμό της υδροδυναμικής διαμέτρου, του δείκτη πολυδιασποράς PDI και του ζ-δυναμικού των συνθετημένων νανοϋλικών (CD:IR-786 ICs και CS NPs) σε υδατική διασπορά, χρησιμοποιείται η τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS). Στη συγκεκριμένη πειραματική διάταξη χρησιμοποιείται το όργανο Zetasizer Nano ZS της εταιρείας Malvern (**Εικόνα 5.10**), το οποίο είναι συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή που περιλαμβάνει και το αντίστοιχο λογισμικό. Ως πηγή φωτός χρησιμοποιείται μονοχρωματική δέσμη laser He/Ne μήκους κύματος  $\lambda = 633 \text{ nm}$  και επιλέγεται η λειτουργία οπισθοσκέδασης  $173^\circ$  (Non-Invasive Backscatter) για την ελαχιστοποίηση των φαινομένων πολλαπλής σκέδασης. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε κυψελίδα πολυστυρενίου DTS1070 με ηλεκτρόδια τύπου U, έχοντας ως μέσο διασποράς το υπερκάθαρο νερό ( $\text{pH} = 7.0$ ). Κάθε δείγμα μετράται τρεις φορές για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας της τεχνικής.



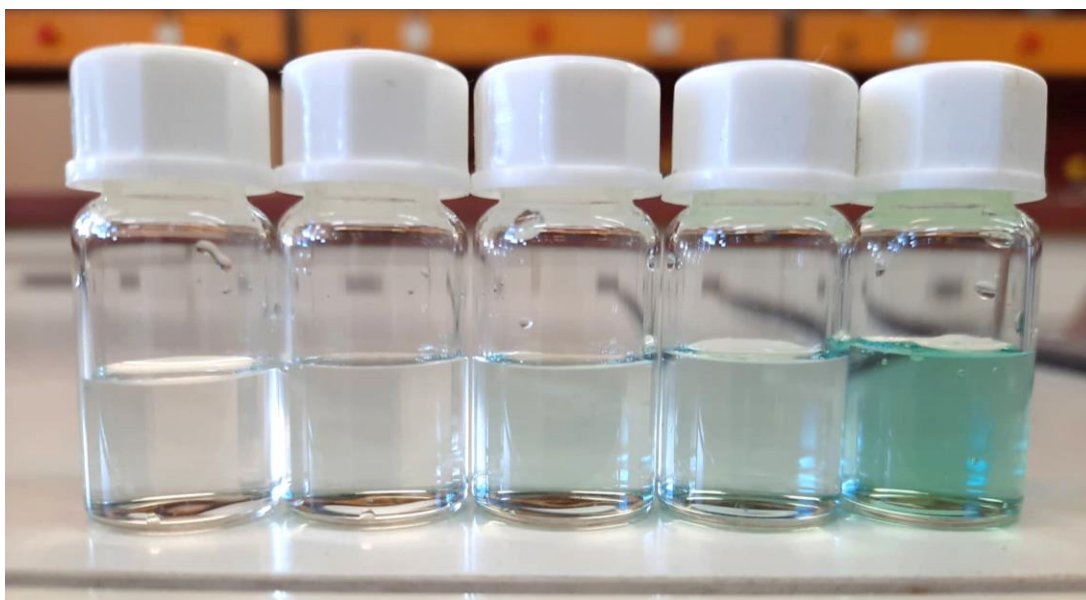
**Εικόνα 5.10.** Όργανο DLS (μοντέλο Zetasizer Nano ZS της εταιρείας Malvern Analytical).

Πριν την έναρξη των μετρήσεων, δημιουργείται στο περιβάλλον του λογισμικού ρουτίνα μέτρησης (SOP) για τα εξεταζόμενα υλικά. Αρχικά, για την έναρξη της διαδικασίας δημιουργίας SOP πρέπει να βρεθεί πρώτα η κατάλληλη συγκέντρωση της διασποράς των σωματιδίων για τη λήψη αξιόπιστων μετρήσεων, κάτι το οποίο δεν μπορεί να στηριχτεί σε βιβλιογραφικές πηγές και πρέπει να πραγματοποιείται κάθε φορά από το χειριστή όταν μελετά ένα υλικό για πρώτη φορά. Συνεπώς, παρασκευάζεται μητρική διασπορά (stock) του συμπλόκου HP- $\beta$ -CD:IR-786 Iodide σε συγκέντρωση 0.1% w/v (1 mg/mL), διασπείροντας 10 mg ξηρού συμπλόκου σε 10 mL υπερκάθαρου νερού μέσω ανάδευσης σε vortex. Ωστόσο, επειδή η συγκέντρωση 1 mg/mL είναι αρκετά υψηλή για τη μέτρηση σωματιδίων στο εύρος 100 nm – 1  $\mu$ m σύμφωνα με τον κατασκευαστή, πραγματοποιείται αραιώση του αρχικού δείγματος. Η μητρική διασπορά αραιώνεται με κατάλληλο όγκο νερού για την παρασκευή τεσσάρων διασπορών συγκεντρώσεων 0.05 mg/mL, 0.025 mg/mL, 0.0125 mg/mL και 0.00625 mg/mL. Σκοπός της διαδικασίας είναι η εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης νανοσωματιδίων, κατά την οποία το δείγμα δεν είναι ιδιαίτερα πυκνό, ώστε να εντείνονται τα φαινόμενα πολλαπλής σκέδασης, αλλά ούτε πολύ αραιό, ώστε να προκύπτει θορυβώδες σήμα. Πριν τη λήψη μετρήσεων στο όργανο DLS, προσδιορίζεται η απορρόφηση (ABS) στα 633nm (το δείγμα δεν πρέπει να απορροφά έντονα στο μήκος κύματος της προσπίπτουσας δέσμης του οργάνου DLS) μέσω φασματοφωτομετρίας UV-Vis και ο δείκτης διάθλασης (RI) στο διαθλασίμετρο (Εικόνα 5.11), για κάθε δείγμα. Ο μέσος όρος των παραπάνω μετρήσεων (ABS = 0.028, RI = 1.3327) εισάγεται στο λογισμικό του οργάνου DLS, στο πεδίο της δημιουργίας SOP, και αποθηκεύονται οι τιμές για το συγκεκριμένο τύπο υλικού.



**Εικόνα 5.11.** Διαθλασίμετρο WYA-3S/2S ABBE Digital Refractometer της εταιρείας Hinotek.

Ακολουθεί η μέτρηση της υδροδυναμικής διαμέτρου (Size) των τεσσάρων αραιωμένων δειγμάτων, στο όργανο DLS. Οι διασπορές αναδεύονται ξανά στο vortex για 2 λεπτά και με μία σύριγγα λαμβάνεται μικρή ποσότητα του δείγματος, η οποία εισάγεται στην κυψελίδα με αργό ρυθμό. Είναι σημαντικό κατά την εισαγωγή του δείγματος να μην δημιουργηθεί φυσαλίδα αέρα, καθώς αποτελεί πιθανό σκεδαστή της ακτινοβολίας και υπάρχει ο κίνδυνος να δημιουργήσει θόρυβο στη μέτρηση. Ο όγκος στο εσωτερικό της κυψελίδας δεν πρέπει να ξεπερνά την μέγιστη δυνατή ποσότητα. Χρειάζεται και τα δύο ηλεκτρόδια του κελιού να είναι καλυμμένα από το δείγμα και τυχόν φυσαλίδες αέρα απομακρύνονται με ελαφριά πίεση.



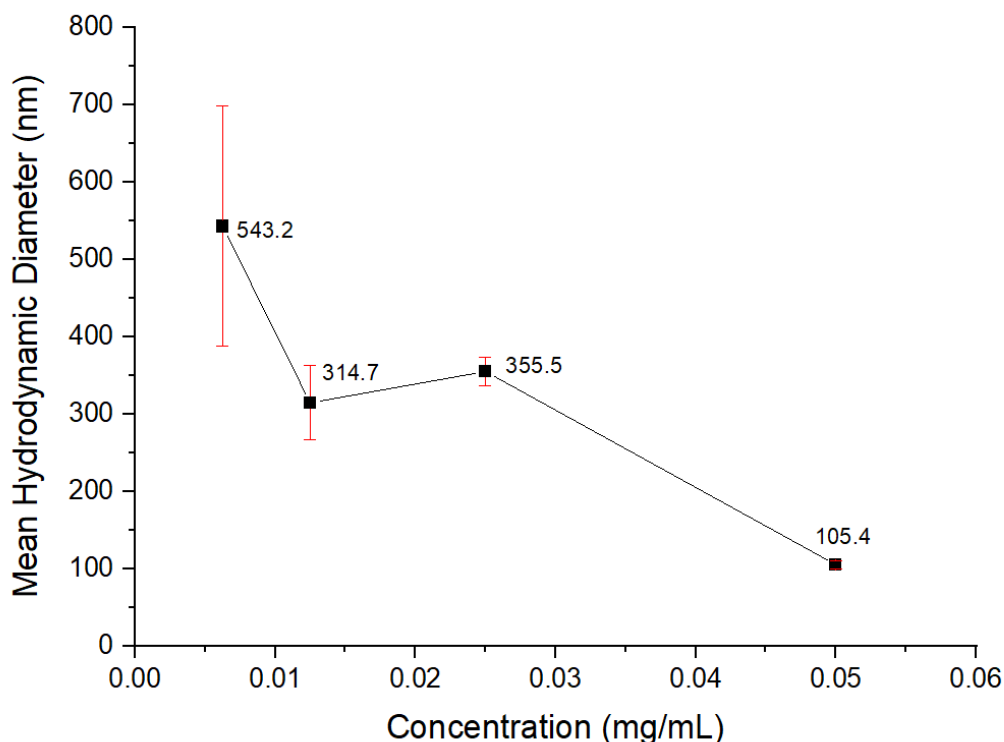
**Εικόνα 5.12.** Υδατικές διασπορές του συμπλόκου HP-β-CD:IR-786 Iodide IC σε συγκέντρωση 0.1 mg/mL (μητρική διασπορά), 0.05 mg/mL, 0.025 mg/mL, 0.0125 mg/mL και 0.00625 mg/mL (από δεξιά προς τα αριστερά).



Κατά τη μέτρηση της υδροδυναμικής διαμέτρου του συμπλόκου σε κάθε δείγμα σημειώνεται η τιμή για κάθε μέτρηση, και εξάγεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση για κάθε δείγμα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5.3**.

**Πίνακας 5.3.** Τιμές μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου και τυπικής απόκλισης για κάθε συγκέντρωση υδατικής διασποράς HP-β-CD:IR-786 Iodide IC.

Concentration (mg/mL)	Hydrodynamic Size (nm)	Mean Hydrodynamic Size (nm)	Standard Deviation (nm)
0.05	111.4	105.4	5.7
	97.7		
	107.2		
0.025	370.9	355.5	18.2
	365.7		
	330.0		
0.0125	250.8	314.7	48.0
	327.1		
	366.3		
0.00625	690.0	543.2	155.3
	611.3		
	328.4		



**Σχήμα 5.4.** Εύρεση βέλτιστης συγκέντρωσης διασποράς για τη μέτρηση στο όργανο DLS. Στο γράφημα παρουσιάζονται οι τιμές μέσης υδροδυναμικής διαμέτρου συναρτήσει της συγκέντρωσης της υδατικής διασποράς του συμπλόκου HP-β-CD:IR-786 Iodide IC. (Με κόκκινο χρώμα συμβολίζεται η διακύμανση κάθε μέτρησης γύρω από τη μέση τιμή.)

Τα παραπάνω δεδομένα αναπαρίστανται και γραφικά για την εξαγωγή συμπεράσματος (Σχήμα 5.4). Παρατηρείται ότι με τη μείωση της συγκέντρωσης της διασποράς των νανοσωματιδίων, αυξάνεται η τυπική απόκλιση κατά την μέτρηση της υδροδυναμικής διαμέτρου, καθώς το σήμα γίνεται σταδιακά πιο θορυβώδες, κάτι που επιβεβαιώθηκε και από τη μορφή των διαγραμμάτων αυτοσυσχέτισης. Αυτό είναι αναμενόμενο, διότι στα πολύ αραιά δείγματα μειώνεται σημαντικά ο αριθμός των σωματιδίων ανά μονάδα όγκου της περιοχής παρατήρησης, με αποτέλεσμα το σήμα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας να μεταβάλλεται με απρόβλεπτο τρόπο ως προς το χρόνο και να χάνεται η συσχέτιση. Επομένως, η συγκέντρωση σωματιδίων που αντιστοιχεί στην τιμή 0.05 mg/mL θεωρείται ως η βέλτιστη για τη μέτρηση της υδροδυναμικής διαμέτρου, του δείκτη PDI και του ζ-δυναμικού των συμπλόκων εγκλωβισμού της κυανίνης με τις κυκλοδεξτρίνες (CD:IR-786 Iodide ICs).

Με την ίδια διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω πραγματοποιούνται οι μετρήσεις για τα υπόλοιπα σύμπλοκα και για τα νανοσωματίδια χιτοζάνης, θεωρώντας ότι η απορρόφηση στα 633 nm και ο δείκτης διάθλασης της υδατικής διασποράς, δεν μεταβάλλονται σημαντικά λόγω της χημικής συνάφειας μεταξύ των μελετώμενων νανοϋλικών.

#### 5.4.5 Φασματοσκοπία Υπέρυθρου με Μετασχηματισμό Fourier: Τεχνική Ολικής Αποσβένουσας Ανάκλασης (ATR-FTIR)

Για τη δομική ανάλυση των παραγόμενων νανοϋλικών χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο ATR-FTIR της εταιρείας Bruker. Λαμβάνονται τα φάσματα υπέρυθρου για την καθαρή ένωση IR-786 Iodide, τα καθαρά συστατικά των φορέων τροποποιημένης αποδέσμευσης ( $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, CS LMW, TPP και Polysorbate 80), τα σύμπλοκα εγκλωβισμού της κυανίνης με τις κυκλοδεξτρίνες (CD:IR-786 Iodide ICs) και τα νανοσωματίδια χιτοζάνης (CS NPs). Το εκάστοτε δείγμα τοποθετείται πάνω στην επιφάνεια του κρυστάλλου, με τρόπο ώστε να καλύπτει όλη την επιφάνεια χωρίς ασυνέχειες. Στην περίπτωση των στερεών δειγμάτων, για την επίτευξη καλής επαφής, το δείγμα πιέζεται πάνω στον κρύσταλλο μέσω ειδικού εξοπλισμού (**Εικόνα 5.13**) και λαμβάνεται το φάσμα, αφού πρώτα έχει μηδενιστεί το υπόβαθρο. Στα υγρά δείγματα δεν απαιτείται συμπίεση πριν τη μέτρηση, καθώς εφαπλώνονται ευχερέστερα στην επιφάνεια του κρυστάλλου χωρίς ασυνέχειες.

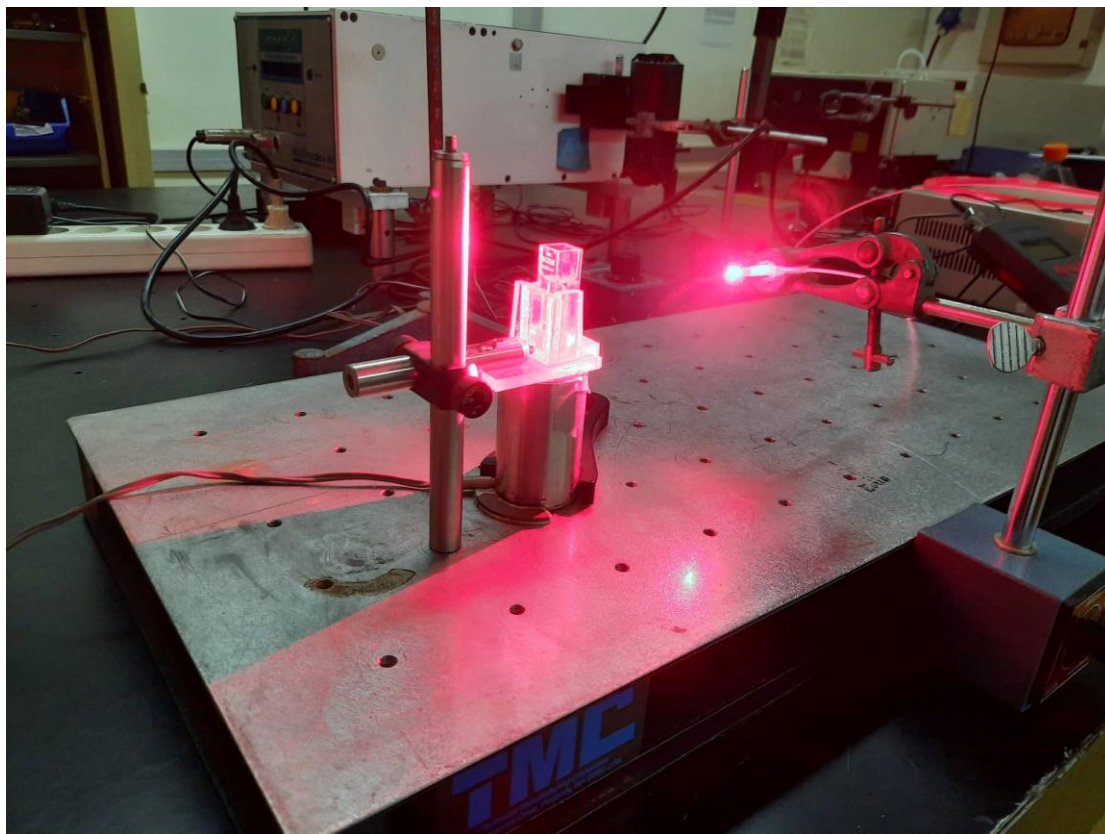


**Εικόνα 5.13.** Φασματοφωτόμετρο ATR-FTIR της εταιρείας Bruker (μοντέλο Alpha II). Συμπίεση του στερεού δείγματος (CS LMW) με ειδική πρέσα πριν τη μέτρηση για την εξασφάλιση καλής επαφής με τον κρύσταλλο του οργάνου.

## 5.4.6 Οπτικές Ιδιότητες

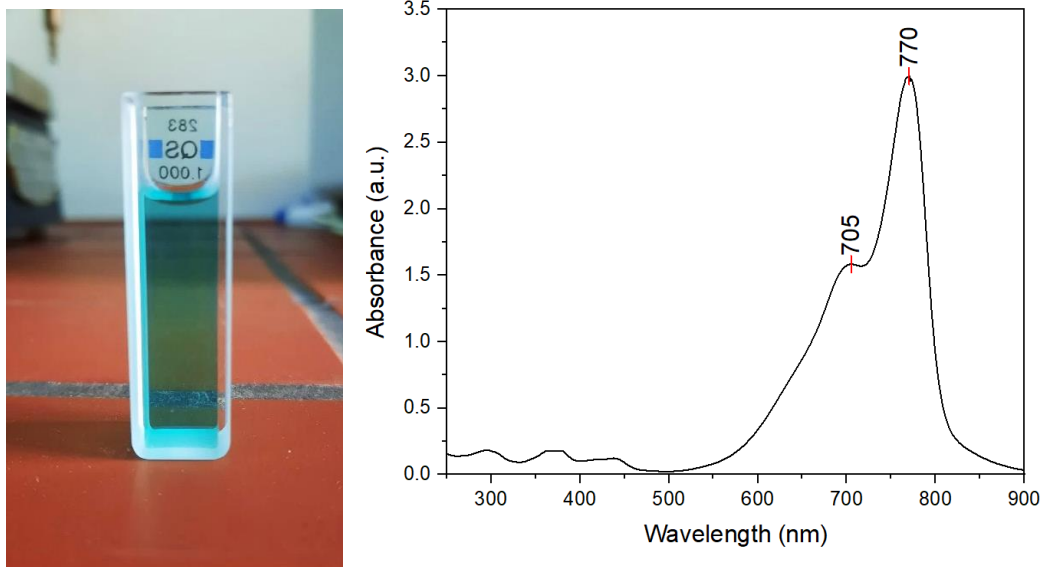
### 5.4.6.1 Μελέτη Κινητικής Φωτοαποδόμησης (Photobleaching Kinetics Study)

Οι φωτοφυσικές ιδιότητες της καθαρής κυανίνης IR-786 Iodide και των συντεθειμένων νανοφορέων εξετάζονται *in vitro* χρησιμοποιώντας διάταξη κόκκινου διοδικού λέιζερ ( $\lambda = 661 \text{ nm}$ ) ισχύος  $13.11 \text{ mW/cm}^2$  (Εικόνα 5.14).



**Εικόνα 5.14.** Πειραματική διάταξη διοδικού λέιζερ κόκκινου φωτός ( $\lambda = 661 \text{ nm}$ ) για τον προσδιορισμό των οπτικών ιδιοτήτων *in vitro*.

Για τη μελέτη των οπτικών ιδιοτήτων, αρχικά εξετάζεται η περίπτωση του ελεύθερου φωτοευαισθητοποιητή σε συγκέντρωση  $30 \mu\text{M}$ . Συγκεκριμένα, παρασκευάζεται μητρικό διάλυμα της κυανίνης σε οργανικό διαλύτη DMSO και στη συνέχεια αραιώνεται με κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος PBS ( $\text{pH} = 7.4$ ), έως ότου επιτευχθεί διάλυμα συγκέντρωσης  $30 \mu\text{M}$  της IR-786 Iodide στο μείγμα  $6\% \text{ v/v DMSO/PBS}$ . Το προκύπτον διάλυμα τοποθετείται στην κυψελίδα και λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis (Σχήμα 5.5).



**Σχήμα 5.5.** Φάσμα απορρόφησης του διαλύματος IR-786 Iodide  $30 \mu\text{M}$  σε μείγμα 6% v/v DMSO/PBS, πριν την ακτινοβολήση.

Σύμφωνα με το φάσμα της καθαρής ένωσης, η μέγιστη απορρόφηση παρατηρείται στα 770 nm, όπου αναμένεται και η βέλτιστη φωτοδυναμική δράση κατόπιν ακτινοβολήσης. Επομένως, το εργαστηριακό διαθέσιμο λέιζερ δεν εκτέμπει ακτινοβολία στο ίδιο μήκος κύματος με τη μέγιστη απορρόφηση του φωτοευαίσθητοποιητή. Ωστόσο, η απορρόφηση που παρουσιάζει η κυανίνη στα 661 nm θεωρείται ικανοποιητική για την παρούσα μελέτη των οπτικών ιδιοτήτων, καθώς προβλέπεται αμελητέα απόκλιση από το μέγιστο φωτοδυναμικό αποτέλεσμα που θα παρουσιαζόταν με ακτινοβολήση σε μήκος κύματος 770 nm.

Αρχικά, εξετάζεται η κινητική της φωτοαποδόμησης της κυανίνης παρουσία κόκκινου φωτός. Το διάλυμα ακτινοβολείται υπό μαγνητική ανάδευση εντός της κυψελίδας χαλαζία για συνολικά 30 min. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα συνεχούς ακτινοβολήσης, λαμβάνεται το φάσμα απορρόφησης του διαλύματος στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis. Από τις μετρήσεις που πραγματοποιούνται προκύπτει το διάγραμμα της απορρόφησης στα 770 nm συναρτήσεως του χρόνου ακτινοβολήσης, και προσαρμόζεται κατάλληλο μαθηματικό μοντέλο για την περιγραφή των πειραματικών δεδομένων.

Για την διερεύνηση της προσφερόμενης φωτοπροστασίας από τα ανεπτυγμένα συστήματα μεταφοράς, επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιώντας κατάλληλη ποσότητα του εκάστοτε νανοϋλικού, που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση κυανίνης ίση με  $30 \mu\text{M}$ .

#### 5.4.6.2 Μελέτη Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species Generation)

Για τη μελέτη της παραγωγής ROS χρησιμοποιείται ο ιχνηθέτης φθορισμού CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Ο παραπάνω εστέρας διαλύεται σε αιθανόλη (87 μM) και υδρολύεται παρουσία NaOH για 30 min, με σκοπό την παραγωγή του ενδιάμεσου H<sub>2</sub>DCFDA, το οποίο στη συνέχεια θα οξειδωθεί προς την φθορίζουσα μορφή της διχλωροφλουορεσκεΐνης (DCF). Η οξείδωση προκαλείται από την παραγωγή ελευθέρων ριζών κατόπιν ενεργοποίησης του φωτοευαισθητοποιητή μέσω της ακτινοβόλησης στα 661 nm. Συνεπώς, στην διάταξη που περιεγράφηκε παραπάνω προστίθεται ο υδρολυμένος ιχνηθέτης στο διάλυμα ακτινοβόλησης, διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση της κυανίνης, και ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνεται το φάσμα φθορισμού. Πριν την έναρξη της διαδικασίας έχει πραγματοποιηθεί μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου φθορισμού (**Εικόνα 5.15**) με το τυφλό δείγμα που περιέχει μόνο το μείγμα DMSO/PBS. Η διέγερση στο όργανο πραγματοποιείται στα 490 nm, όπου απορροφά η διχλωροφλουορεσκεΐνη και συλλέγεται ο φθορισμός της στα 520 nm. Καταγράφονται οι αποκρίσεις φθορισμού ως προς το χρόνο ακτινοβόλησης και εξάγονται συμπεράσματα αναφορικά με την επίδραση του εκάστοτε φορέα στην ικανότητα της IR-786 Iodide να παράγει ROS.



**Εικόνα 5.15.** Φασματοφωτόμετρο φθορισμού (Μοντέλο LS-45 της εταιρείας PerkinElmer).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

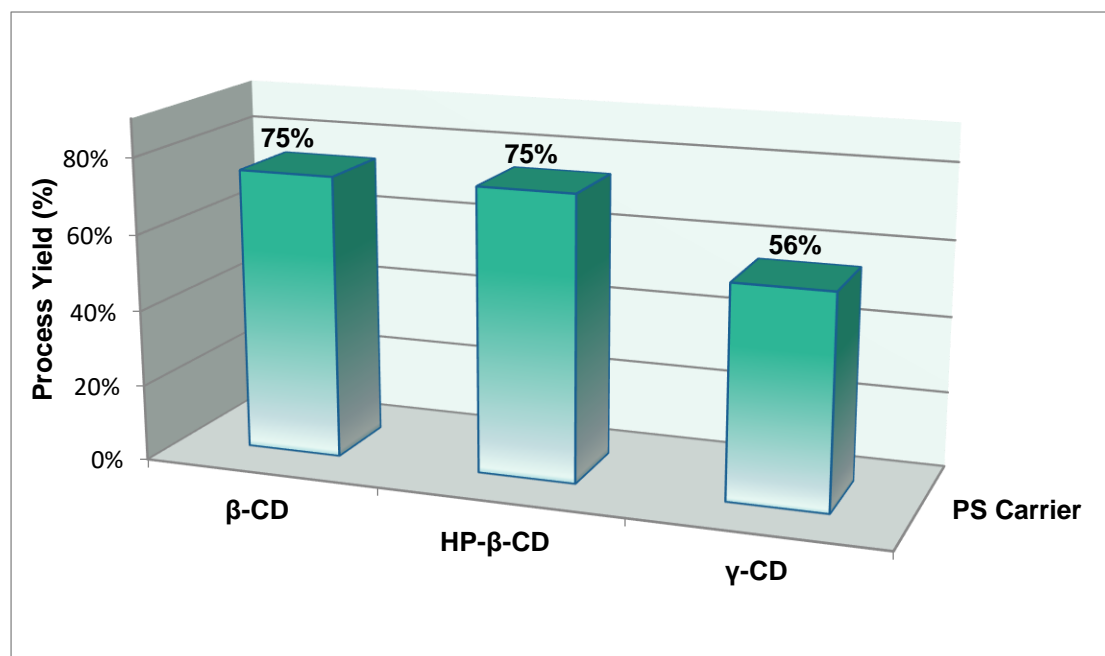
### 6.1 Απόδοση Διεργασίας

Για τον προσδιορισμό της απόδοσης της διεργασίας σύνθεσης των συμπλόκων εγκλωβισμού (kneading), εφαρμόζεται η **Εξίσωση 5** που αναλύθηκε στο **Κεφάλαιο 5**. Στον **Πίνακα 6.1** παρουσιάζονται οι ζυγιζόμενες ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στη διεργασία, η τελική μάζα του παραγόμενου συμπλόκου μετά την ξήρανση και η υπολογιζόμενη τιμή απόδοσης διεργασίας (Process Yield) για κάθε περίπτωση.

$$\text{Process Yield (\%)} = \frac{m_{\text{Dried\_IC}} \text{ (mg)}}{m_{\text{CD\_Feed}} \text{ (mg)} + m_{\text{Cy\_Feed}} \text{ (mg)}} \cdot 100\% \quad (5)$$

**Πίνακας 6.1.** Ποσότητες αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στη διεργασία kneading και υπολογιζόμενη απόδοση διεργασίας για κάθε φορέα εγκλωβισμού του φωτοευαισθητοποιητή IR-786 Iodide (PS carrier).

PS carrier	$m_{\text{CD\_Feed}}$ (mg)	$m_{\text{Cy\_Feed}}$ (mg)	$m_{\text{Dried\_IC}}$ (mg)	Process Yield (%)
β-CD	55.7	15.0	52.7	75
HP-β-CD	58.3	15.2	55.0	75
γ-CD	63.7	15.2	44.1	56



**Σχήμα 6.1.** Υπολογιζόμενες τιμές απόδοσης διεργασίας της μεθόδου kneading για τους φορείς β-CD, HP-β-CD και γ-CD.

Όπως παρατηρείται και στο **Σχήμα 6.1**, την υψηλότερη απόδοση διεργασίας εμφάνισαν τα σύμπλοκα που χρησιμοποιήθηκαν η β-CD και η HP-β-CD ως φορείς εγκλωβισμού. Η προκύπτουσα τιμή 75% και για τους δύο φορείς, θεωρείται ικανοποιητική για τη συγκεκριμένη διεργασία, καθώς παρατηρούνται μικρές απώλειες κατά τη μεταφορά του συμπλόκου από το ιγδίο στο φιαλίδιο όπου ξηραίνεται και αποθηκεύεται. Τη χαμηλότερη απόδοση διεργασίας εμφάνισε το σύμπλοκο γ-CD:IR-786 Iodide (56%), η οποία αποδίδεται σε απώλειες κατά τη μεταφορά του υλικού, δεδομένου ότι η κλίμακα των παραπάνω πειραμάτων είναι αρκετά χαμηλή, της τάξης των δεκάδων mg.

## 6.2 Απόδοση Εγκλωβισμού

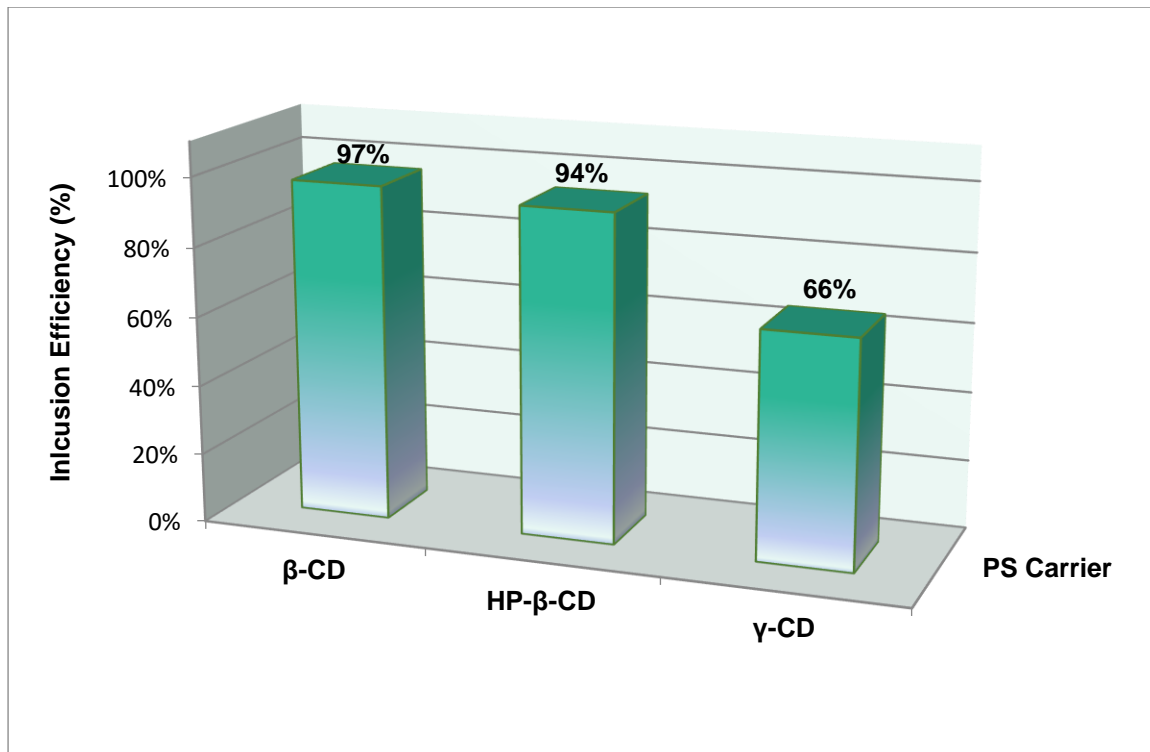
Η απόδοση εγκλωβισμού (Inclusion Efficiency) της κυανίνης στα σχηματιζόμενα σύμπλοκα με τις κυκλοδεξτρίνες (CD:IR-786 Iodide ICs) προσδιορίστηκε πειραματικά με άμεσο τρόπο μέσω της λύσης των συμπλόκων σε οργανικό διαλύτη DMSO. Οι μετρούμενες τιμές απορρόφησης στο μήκος κύματος που αντιστοιχεί στην ένωση IR-786 Iodide (791 nm) μετατρέπονται σε συγκεντρώσεις μέσω της καμπύλης αναφοράς της κυανίνης σε DMSO (**Εξίσωση 6**), οι οποίες αντιστοιχούν στη μάζα της ένωσης που εγκλωβίστηκε στην εκάστοτε κυκλοδεξτρίνη ( $m_{CYInclusion}$ ). Στη συνέχεια εφαρμόζεται η **Εξίσωση 7** για κάθε περίπτωση και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.2**.

$$IE\% = \frac{m_{CYInclusion} (mg)}{m_{CYFeed} (mg)} \cdot 100\% \quad (7)$$

**Πίνακας 6.2.** Υπολογιζόμενες τιμές απόδοσης εγκλωβισμού (IE%) της κυανίνης IR-786 Iodide στην εκάστοτε κυκλοδεξτρίνη.

PS carrier	$m_{CYFeed}$ (mg)	$m_{CYInclusion}$ (mg)	Inclusion Efficiency (%)
β-CD	15.0	14.5	97
HP-β-CD	15.2	14.3	94
γ-CD	15.2	10.0	66





**Σχήμα 6.2.** Υπολογιζόμενες τιμές απόδοσης εγκλωβισμού (%IE) του φωτοευαισθητοποιητή IR-786 Iodide στις κυκλοδεξτρίνες  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD και  $\gamma$ -CD.

Σύμφωνα με το **Σχήμα 6.2**, η υψηλότερη απόδοση εγκλωβισμού επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας τη  $\beta$ -CD ως φορέα (97%), με αμέσως επόμενη την HP- $\beta$ -CD (94%). Και στις δύο περιπτώσεις η τιμή της απόδοσης εγκλωβισμού είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντική και πιθανώς υποδεικνύει τον επιτυχή εγκλωβισμό του μελετώμενου φωτοευαισθητοποιητή στη  $\beta$ -CD και στην HP- $\beta$ -CD. Σχετικά με τα σύμπλοκα που συντέθηκαν με τη  $\gamma$ -CD, η απόδοση εγκλωβισμού είναι σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τις προηγούμενες δύο περιπτώσεις (66%). Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται ενδεχομένως στην επίσης χαμηλή απόδοση διεργασίας που παρατηρήθηκε στα σύμπλοκα  $\gamma$ -CD:IR-786 Iodide, όπου η απώλεια της κυανίνης κατά τη μεταφορά μεταξύ των σκευών, ενδεχομένως αντικατοπτρίζεται και στην τιμή της απόδοσης εγκλωβισμού. Το παραπάνω πιθανότατα σχετίζεται με την ποσοτική μεταφορά των αντιδραστηρίων δεδομένου ότι πρόκειται για μηχανοχημική μέθοδο σύνθεσης, και όχι απαραίτητα με την ικανότητα της  $\gamma$ -CD να λειτουργήσει ως φορέας εγκλωβισμού για τη συγκεκριμένη ένωση. Αυτό θα διαλευκανθεί παρακάτω με επιπλέον στοιχεία που προκύπτουν από τις υπόλοιπες τεχνικές χαρακτηρισμού.

Σχετικά με την απόδοση εγκλωβισμού (Entrapment Efficiency) της IR-786 Iodide στα νανοσωματίδια χιτοζάνης (CS NPs) που συντέθηκαν με την τεχνική της ιονικής πηκτωμάτωσης, υπολογίζεται με έμμεσο τρόπο μέσω της κυανίνης που δεν εγκλωβίστηκε στο τελικό νανοςύστημα. Συγκεκριμένα, προσδιορίζεται η συγκέντρωση της κυανίνης στο υπερκείμενο υγρό της φυγοκέντρισης κατά την έκπλυση των νανοσωματιδίων, όπου βρίσκεται υπό τη μορφή του συμπλόκου HP- $\beta$ -CD:IR-786 Iodide IC που δεν ενσωματώθηκε στο σύνθετο νανοςύστημα. Τα σύμπλοκα που βρίσκονται στην υδατική φάση διασπώνται με προσθήκη DMSO και η μετρούμενη τιμή απορρόφησης στα 791 nm μετατρέπεται μέσω της καμπύλης αναφοράς στη

συγκέντρωσης της ελεύθερης ένωσης. Η μάζα της κυανίνης ( $m_{CyFeed}$ ) που βρίσκεται στην ποσότητα του συμπλόκου ( $m_{ICFeed}$ ) που χρησιμοποιήθηκε στη διεργασία της ιονικής πηκτωμάτωσης υπολογίζεται από την απόδοση εγκλωβισμού του συμπλόκου με την HP-β-CD από τον **Πίνακα 6.2**. Επομένως, εφαρμόζοντας την **Εξίσωση 8** προσδιορίζεται η απόδοση εγκλωβισμού και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.3**.

$$EE\% = \frac{m_{CyFeed} (mg) - m_{CyFree} (mg)}{m_{CyFeed} (mg)} \cdot 100\% \quad (8)$$

**Πίνακας 6.3.** Υπολογιζόμενη απόδοση εγκλωβισμού (EE%) της κυανίνης IR-786 Iodide στο νανοσύστημα χιτοζάνης (HP-β-CD:IR-786 Iodide IC-loaded CS NPs).

PS carrier	$m_{ICFeed}$ (mg)	$m_{CyFeed}$ (mg)	$m_{CyFree}$ (mg)	Entrapment Efficiency (%)
HP-β-CD:IR-786 Iodide IC-loaded CS NPs	20.0	5.2	0.2	96

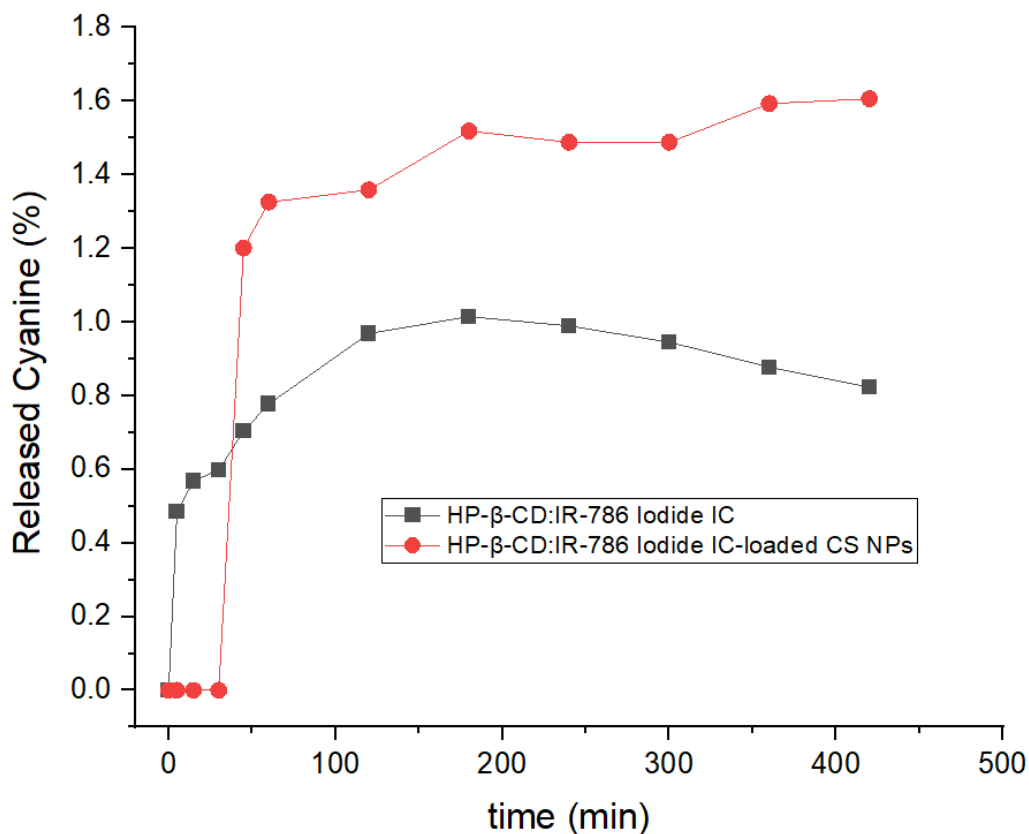
Η προκύπτουσα τιμή απόδοσης εγκλωβισμού του φωτοευαισθητοποιητή IR-786 Iodide στο σύνθετο νανοσύστημα κυκλοδεξτρίνης/χιτοζάνης (96%) κρίνεται ως ιδιαίτερα ενθαρρυντική, και υποδεικνύει την επιτυχή φόρτωση του συμπλόκου HP-β-CD:IR-786 Iodide στα νανοσωματίδια μέσω φαινομένων αυτοσυναρμογής κατά τη διεργασία της ιονικής πηκτωμάτωσης.

### 6.3 Προφίλ Αποδέσμευσης

Για την μελέτη του προφίλ αποδέσμευσης από τα νανοσυστήματα χρησιμοποιήθηκαν και οι τρεις μέθοδοι που περιεγράφηκαν στο **Κεφάλαιο 5**. Αρχικά σχετικά με την τεχνική των vials, κατά τη μελέτη αποδέσμευσης του συμπλόκου HP-β-CD:IR-786 Iodide IC παρουσιάστηκε υψηλή διακύμανση του ποσοστού αποδέσμευσης ως προς το χρόνο, η οποία αποδίδεται στην τυχαιότητα του στερεού συμπλόκου εγκλωβισμού και στη συσσώρευση της υδρόφοβης ένωσης IR-786 Iodide σε διαφορετικές περιοχές της ξηρής μάζας του στερεού. Στη συνέχεια, δοκιμάστηκε η τεχνική της φυγοκέντρωσης, όπου εξομαλύνθηκαν τα σφάλματα που πηγάζουν από την ανομοιογένεια του συμπλόκου, τα οποία προκαλούσαν τυχαίες διακυμάνσεις στο ποσοστό αποδέσμευσης ως προς το χρόνο. Ωστόσο, τα ποσοστά αποδέσμευσης εξακολούθησαν να είναι πολύ χαμηλά (< 2%), το οποίο οφείλεται στην καθίζηση της αποδεσμευμένης ένωσης μαζί με τα σύμπλοκα κατά το στάδιο της φυγοκέντρωσης λόγω της εξαιρετικά χαμηλής υδατοδιαλυτότητας της κυανίνης. Έτσι, το ποσοστό της ένωσης που παραμένει στο υπερκείμενο υγρό της φυγοκέντρωσης περιορίζεται από τη διαλυτότητα της κυανίνης εμποδίζοντας την ποσοτικοποίηση της αποδέσμευσης. Ακόμα, έγινε προσπάθεια προσθήκης οργανικού διαλύτη DMSO στο υπερκείμενο υγρό για την υποβοήθηση της μέτρησης της ένωσης (500 μL DMSO σε 500 μL δείγματος), αλλά τα ποσοστά αποδέσμευσης εξακολουθούν να είναι χαμηλά (< 4%) αποδεικνύοντας ότι έχει προηγηθεί η καθίζηση της ένωσης κατά τη φυγοκέντρωση και η προσθήκη οργανικού

διαλύτη στο υπερκείμενο δεν επιλύει σε ικανοποιητικό βαθμό το πρόβλημα της ποσοτικοποίησης.

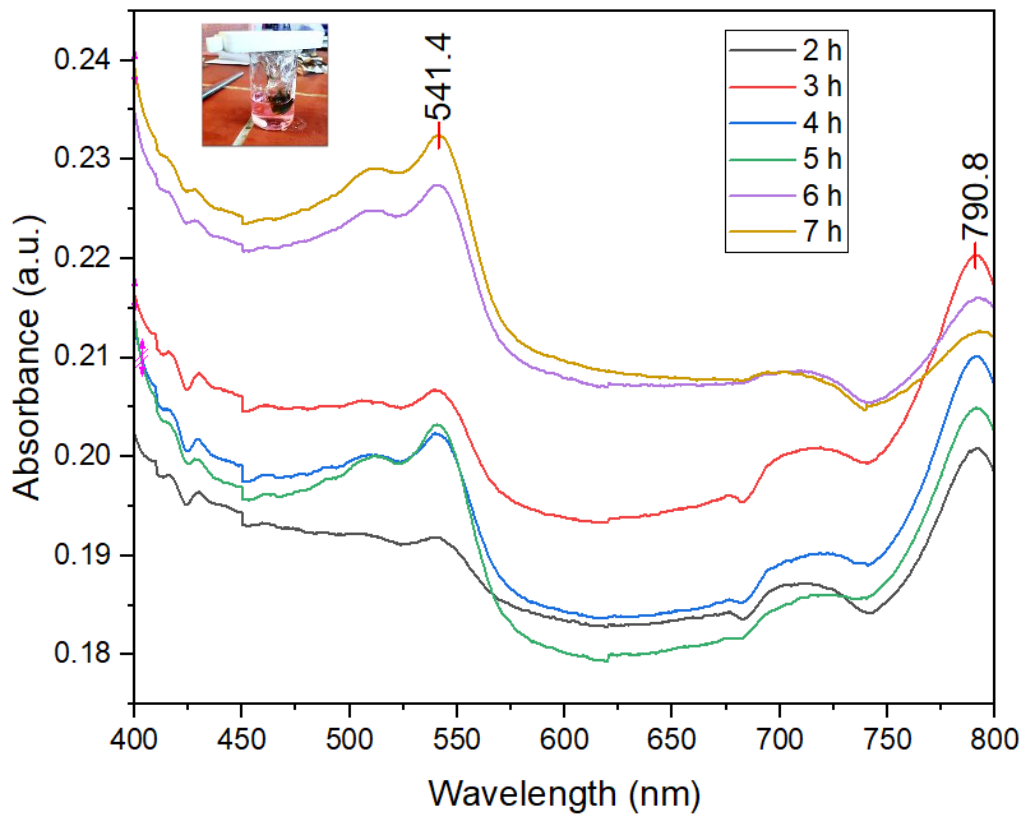
Για την αποφυγή της καθίζησης που παρουσίασε η αποδεσμευμένη κυανίνη κατά τη διενέργεια της μελέτης με την τεχνική της φυγοκέντρωσης, εξετάστηκε και η τεχνική διάλυσης-διάχυσης (dialysis bag method), όπου η αποδεσμευμένη ουσία διέρχεται από την πολυμερική μεμβράνη σε εξωτερικό διάλυμα μεγάλου όγκο (sink conditions), όπου και ποσοτικοποιείται. Με την προσθήκη της επιφανειοδραστικής ουσίας Polysorbate 80 υποβοηθήθηκε ταυτόχρονα και η σταθερότητα της διασποράς των σωματιδίων εντός της μεμβράνης, τα οποία είχαν την τάση να συσσωματώνονται και να καθιζάνουν έντονα κατά την επαναδιασπορά σε PBS. Ανάμεσα στα διαφορετικά μέσα αποδέσμευσης, το διάλυμα PBS (pH = 7.4), 0.1 %w/v Polysorbate 80, 0.1 % v/v DMSO και 1 mM ασκορβικού οξέος, καθώς παρουσιάστηκαν υψηλότερα ποσοστά αποδέσμευσης σε σχέση με το σκέτο PBS και το διάλυμα PBS με 0.1 %w/v Polysorbate 80. Ωστόσο, τα ποσοστά αποδέσμευσης εξακολουθούν να είναι σχετικά χαμηλά παρά την προσθήκη του επιφανειοδραστικού και του οργανικού διαλύτη στο μέσο αποδέσμευσης (Σχήμα 6.3).



**Σχήμα 6.3.** Σύγκριση προφίλ αποδέσμευσης της κυανίνης από το σύμπλοκο εγκλωβισμού HP-β-CD:IR-786 Iodide (μπλε) και από τα νανοσωματίδια χιτοζάνης HP-β-CD:IR-786 IC-loaded CS NPs (κόκκινο) με τη μέθοδο της μεμβράνης διάλυσης-διάχυσης.

Η ύπαρξη της χιτοζάνης στο φορέα και η συνεπαγόμενη επικάλυψη των συμπλόκων εγκλωβισμού με το πολυμερές οδηγεί στην παράταση της αποδέσμευσης της κυανίνης, η οποία ανιχνεύεται για πρώτη φορά στα 45 min, σε αντίθεση με το ελεύθερο σύμπλοκο εγκλωβισμού HP-β-CD:IR-786 Iodide που ανιχνεύθηκε μόλις σε χρόνο 5 min. Αυτό υποδεικνύει την ικανότητα του παρόντος συστήματος μεταφοράς φαρμάκου να επιτυγχάνει τροποποιημένη, και συγκεκριμένα παρατεταμένη, αποδέσμευση της εγκλωβισμένης ουσίας. Ακόμα, παρατηρείται μικρή αύξηση στο ποσοστό αποδέσμευσης της κυανίνης από τα νανοσωματίδια χιτοζάνης (έως 1.5%) συγκριτικά με το ελεύθερο σύμπλοκο HP-β-CD (έως ~1.0%). Αυτό οφείλεται στην αύξηση της υδατοδιαλυτότητας της κυανίνης λόγω χρήσης του υδρόφιλου πολυμερούς χιτοζάνη ως έκδοχο και συστατικό του φορέα τροποποιημένης αποδέσμευσης. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των νανοσωματιδίων χιτοζάνης αυξάνεται ελαφρώς η σταθερότητα της κυανίνης έναντι στην οξείδωση, καθώς η αποδέσμευση της ένωσης δεν παρουσιάζει πτωτική τάση μετά τις 4 h, όπως στη μελέτη του ελεύθερου συμπλόκου. Παρ' όλ' αυτά, τα ποσοστά αποδέσμευσης είναι αρκετά χαμηλά για να θεωρεί η ποσοτικοποίηση αξιόπιστη και να εξαχθεί κινητική και μηχανισμός *in vitro*. Συνεπώς, προτείνεται να αξιολογηθεί η αποδέσμευση και η φωτοδυναμική δράση της IR-786 Iodide απευθείας σε κυτταρικές καλλιέργειες μέσω μικροσκοπίας φθορισμού (cellular uptake), όπου η κυκλοδεξτρίνη υποβοηθά τη μεταφοράς της ένωσης στα καρκινικά κύτταρα.

Στο πλαίσιο της παραπάνω μελέτης, εξετάστηκε πιο διεξοδικά η παρουσιαζόμενη οξείδωση της κυανίνης. Η οξειδωτική υποβάθμιση της ένωσης είναι μακροσκοπικά εμφανής σε χρόνο 7 h, όπου παρατηρείται μεταβολή χρώματος στο μέσο αποδέσμευσης από διαυγές σε κόκκινο. Το κόκκινο χρώμα είναι χαρακτηριστικό των προϊόντων οξείδωσης της κυανίνης IR-786 σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. [71] Τα παραπάνω αποτυπώθηκαν στο φάσμα απορρόφησης του μέσου αποδέσμευσης που λήφθηκε μέσω φασματοφωτομετρίας UV-Vis (**Σχήμα 6.4**).



**Σχήμα 6.4.** Φασματική μελέτη της οξείδωσης της κυανίνης IR-786 Iodide ως προς το χρόνο κατά την διεξαγωγή του προφίλ αποδέσμευσης από τα νανοσωματίδια χιτοζάνης σε περιβάλλον PBS ( $pH = 7.4$ ), 0.1 %w/v Polysorbate 80, 0.1 % v/v DMSO, 1 mM ασκορβικού οξέος και θερμοκρασία 37°C.

Στο **Σχήμα 6.4** αποτυπώνεται φασματικά η οξείδωση της κυανίνης IR-786 λόγω της έκθεσης του μέσου αποδέσμευσης στον ατμοσφαιρικό αέρα υπό θερμοκρασία 37°C, κατά τη διενέργεια της παραπάνω μελέτης. Συγκεκριμένα, μετά τις 2 h παρατηρείται εμφάνιση κορυφής σε μήκος κύματος 541 nm, η οποία αντιστοιχεί στα προϊόντα οξείδωσης της κυανίνης. [71] Η απορρόφηση της συγκεκριμένης κορυφής αυξάνεται ραγδαία με την πάροδο του χρόνου, καθώς η αποδεσμευμένη ένωση υπόκειται σε οξείδωση. Παράλληλα, η κορυφή απορρόφησης σε μήκος κύματος 791 nm που αντιστοιχεί στην ελεύθερη κυανίνη παρουσιάζει αρχικά αύξηση καθώς αποδεσμεύεται η ένωση από το νανοςύστημα, και στη συνέχεια μείωση λόγω των αντιδράσεων οξείδωσης που συμβαίνουν παράλληλα στο υδατικό διάλυμα.

## 6.4 Δυναμική Σκέδαση Φωτός

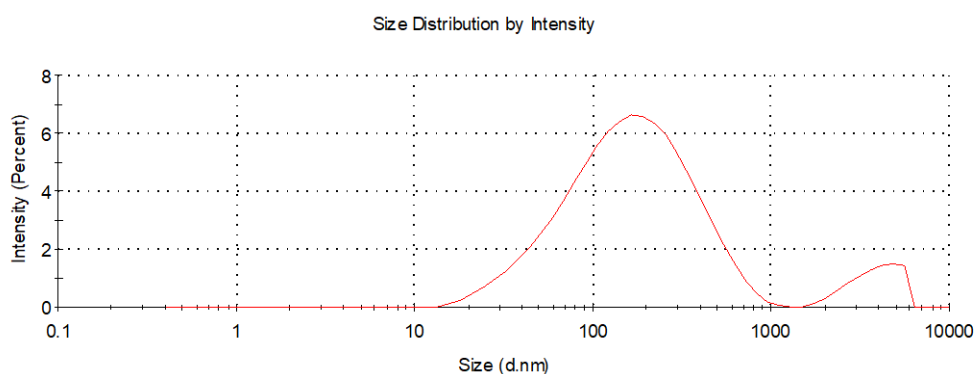
Τα αποτελέσματα μέτρησης της υδροδυναμικής διαμέτρου ( $D_H$ ), του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και του ζ-δυναμικού ( $\zeta$ ) των συνθεθειμένων νανοσωματιδίων σε υδατική διασπορά, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον **Πίνακα 6.4**. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνται στη βέλτιστη συγκέντρωση διασποράς σωματιδίων (0.05 mg/mL) που προσδιορίστηκε πειραματικά (**Κεφάλαιο 5**). Το μέσο διασποράς σε όλες της μετρήσεις είναι το υπερκάθαρο νερό (pH=7.0).

**Πίνακας 6.4.** Τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου ( $D_H$ ), δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και ζ-δυναμικού ( $\zeta$ ) των συμπλόκων εγκλωβισμού (CD:IR-786 Iodide ICs) και των νανοσωματιδίων χιτοζάνης (HP-β-CD:IR-786 Iodide IC-loaded CS NPs) υπό τη μορφή διασποράς σωματιδίων 0.05 mg/mL σε υπερκάθαρο νερό, όπως προσδιορίζονται μέσω της τεχνικής DLS.

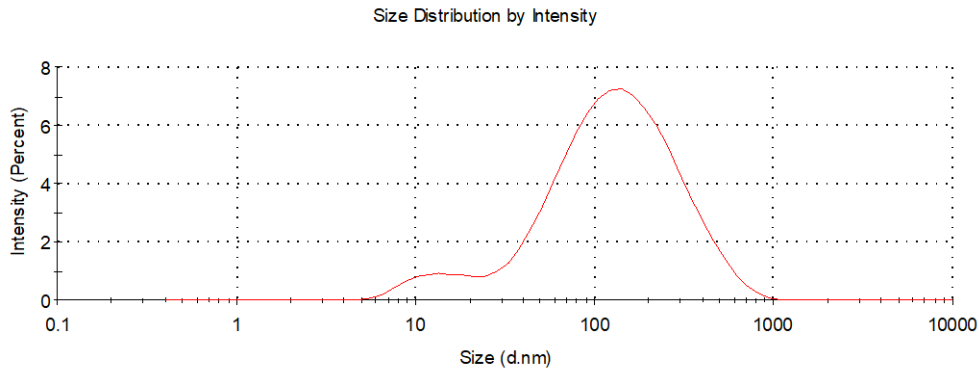
PS Carrier	$D_H$ (nm)	PDI (-)	$\zeta$ (mV)
β-CD	203.4 ± 13.3	0.468 ± 0.107	+31.7 ± 1.1
HP-β-CD	156.6 ± 14.0	0.465 ± 0.006	+27.5 ± 0.6
γ-CD	147.3 ± 5.9	0.450 ± 0.080	+32.1 ± 1.4
HP-β-CD:IR-786 Iodide IC-loaded CS NPs*	294.4 ± 10.7	0.333 ± 0.047	+29.0 ± 3.8

\*Χρήση φίλτρου για την απομάκρυνση συσσωματωμάτων

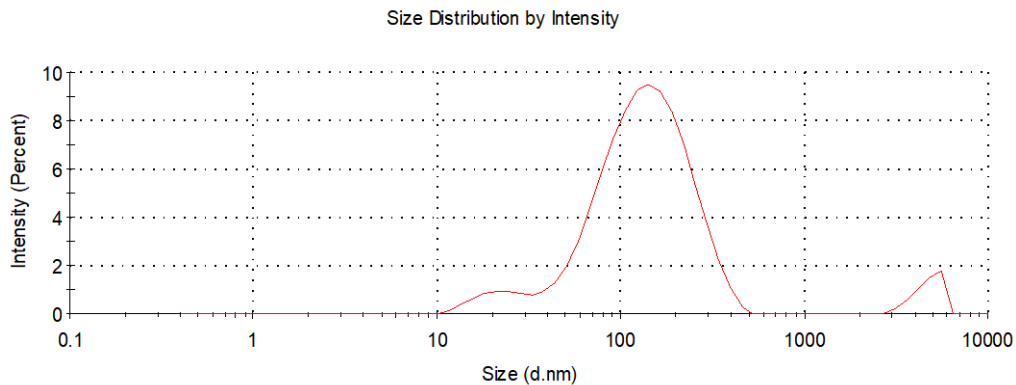
Αναφορικά με την υδροδυναμική διάμετρο, το όργανο DLS παρέχει την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων στο μετρούμενο δείγμα με βάση την ένταση του σκεδαζόμενου σήματος στον ανιχνευτή (Size Distribution by Intensity). Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα κατανομής της υδροδυναμικής διαμέτρου των συμπλόκων εγκλωβισμού της κυανίνης με τη β-CD, την HP-β-CD και την γ-CD (**Σχήματα 6.5, 6.6 και 6.7**, αντίστοιχα) και των νανοσωματιδίων χιτοζάνης με το σύμπλοκο HP-β-CD:IR-786 Iodide (**Σχήμα 6.8**).



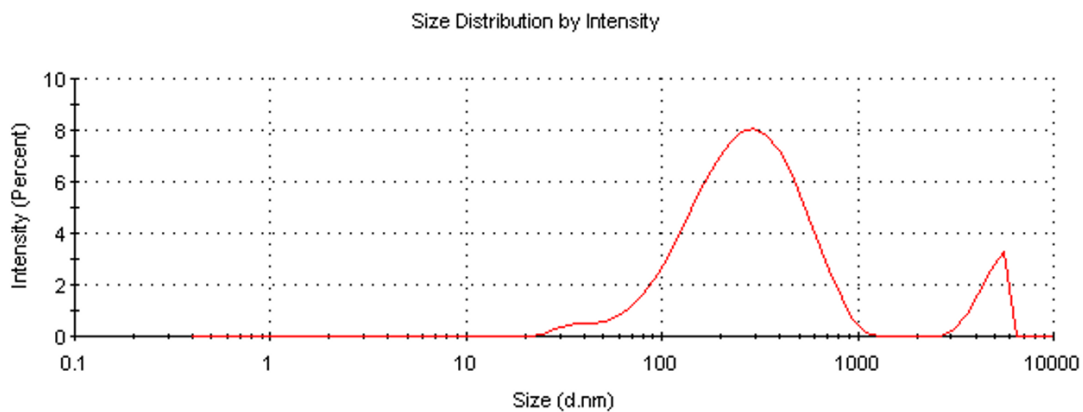
**Σχήμα 6.5.** Κατανομή υδροδυναμικής διαμέτρου του συμπλόκου β-CD:IR-786 Iodide IC σε υδατική διασπορά, όπως προσδιορίστηκε μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός.



**Σχήμα 6.6.** Κατανομή υδροδυναμικής διαμέτρου του συμπλόκου HP-β-CD:IR-786 Iodide IC σε υδατική διασπορά, όπως προσδιορίστηκε μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός.



**Σχήμα 6.7.** Κατανομή υδροδυναμικής διαμέτρου του συμπλόκου γ-CD:IR-786 Iodide IC σε υδατική διασπορά, όπως προσδιορίστηκε μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός.



**Σχήμα 6.8.** Κατανομή υδροδυναμικής διαμέτρου των νανοσωματιδίων χιτοζάνης (HP-β-CD:IR-786 Iodide IC-loaded CS NPs) σε υδατική διασπορά, όπως προσδιορίστηκε μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός.

Να σημειωθεί ότι σε κάθε μέτρηση για την εξακρίβωση της ποιότητας του δείγματος και της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων, ελέγχεται το αντίστοιχο διάγραμμα

αυτοσυσχέτισης ως προς τη μορφή του. Τα διαγράμματα αυτοσυσχέτισης παρατίθενται στο **Παράρτημα I**.

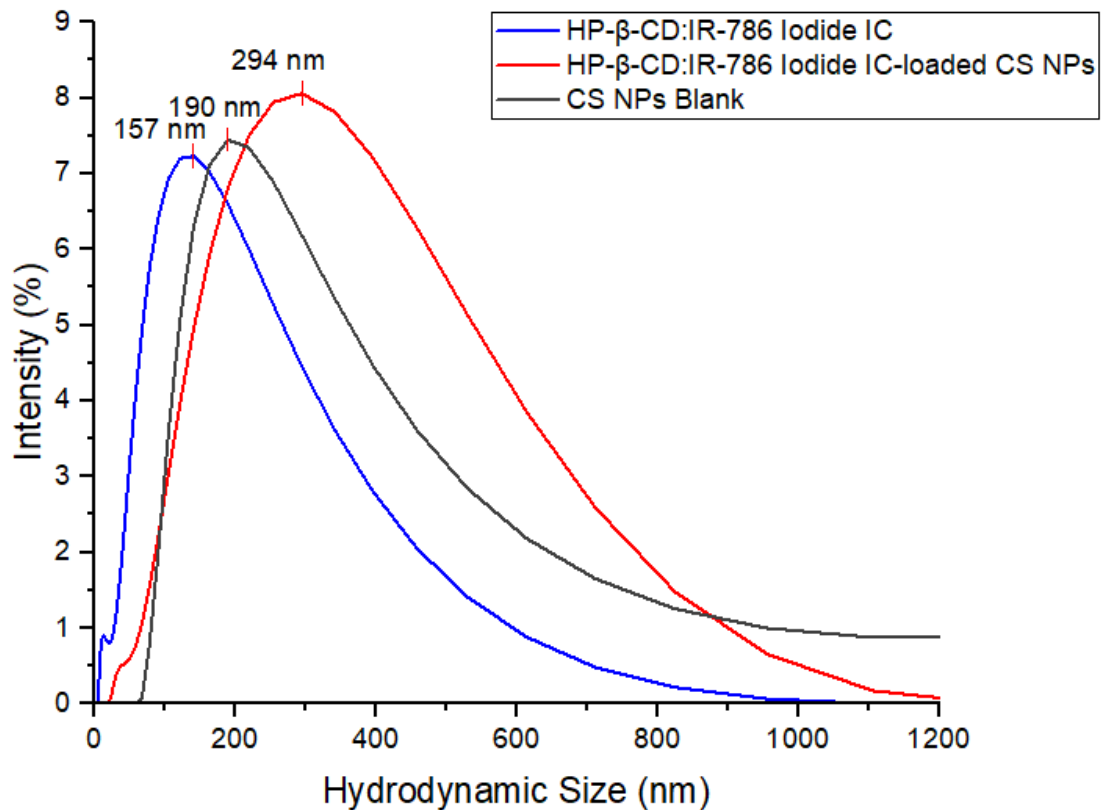
Στα **Σχήματα 6.5, 6.6 και 6.8** η μικρή κορυφή που παρουσιάζεται πάνω από την περιοχή των 1000 nm, αποτελεί ψευδές σήμα, δηλαδή δεν αντιστοιχεί σε σωματίδια του μεγέθους που αναφέρεται, αλλά οφείλεται στην ύπαρξη συσσωματωμάτων στο μετρούμενο δείγμα που σκεδάζουν έντονα την προσπίπτουσα δέσμη. Η ύπαρξη συσσωματωμάτων σε μικρό ποσοστό είναι αναμενομένη, καθώς τα σύμπλοκα εγκλωβισμού με βάση την κυκλοδεξτρίνη έχουν την τάση να συσσωματώνονται σε υδατικές διασπορές. [70] Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα αντίστοιχα διαγράμματα αυτοσυσχέτισης, όπου παρατηρείται έντονη διακύμανση στη συνάρτηση συσχέτισης, υποδεικνύοντας την ύπαρξη μη θερμικής κίνησης Brown στο δείγμα, δηλαδή σωματίδια με σημαντικά μεγαλύτερο μέγεθος που εκτοπίζουν τα νανοσωματίδια του μελετώμενου υλικού από την περιοχή παρατήρησης. Ακόμα, στα **Σχήματα 6.6, 6.7 και 6.8**, η κορυφή χαμηλής έντασης κοντά στα 50 nm δεν αντιστοιχεί σε πραγματικό σήμα, αλλά σε σήμα που οφείλεται σε φαινόμενα πολλαπλής σκέδασης. Συγκεκριμένα, η ύπαρξη των συσσωματωμάτων στη διασπορά οδηγεί σε διαδοχική εξασθένηση της προσπίπτουσας δέσμης μέσω φαινομένων σκέδασης, με αποτέλεσμα το εξασθενημένο σήμα που φθάνει στον ανιχνευτή να αντιστοιχίζεται λανθασμένα από το όργανο σε σωματίδια πολύ μικρού μεγέθους που η ύπαρξη τους θα προκαλούσε το συγκεκριμένο σήμα.

Συνολικά, τα σύμπλοκα εγκλωβισμού της IR-786 Iodide με τις κυκλοδεξτρίνες β-CD, HP-β-CD και γ-CD, παρουσίασαν μέση υδροδυναμική διάμετρο 203.4 nm, 156.6 nm και 147.3 nm αντίστοιχα. Αντίστοιχες μετρήσεις στη νανοκλίμακα (εννοώντας την περιοχή έως τα 1000 nm καταχρηστικά, **Κεφάλαιο 3**) έχουν καταγραφεί στη βιβλιογραφία για σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών με υδρόφοβα μόρια. [100]

Σχετικά με το δείκτη πολυδιασποράς PDI τα σύμπλοκα των κυκλοδεξτρινών β-CD, HP-β-CD και γ-CD παρουσίασαν παρόμοιες μέσες τιμές PDI 0.468, 0.465 και 0.450, αντίστοιχα. Οι παραπάνω τιμές βρίσκονται στο εύρος 0.1-0.7 που αφορά σε πολυδιάσπαρτα δείγματα με μεσαίο εύρος κατανομής υδροδυναμικού μεγέθους, σύμφωνα με τον κατασκευαστή. [101] Το παραπάνω είναι αναμενόμενο δεδομένου ότι σχηματίζονται συσσωματώματα σε μικρό ποσοστό στο δείγμα λόγω της εγγενούς τάσης που παρουσιάζει η κυκλοδεξτρίνη. Ωστόσο, η συσσωμάτωση δεν παρατηρήθηκε σε τέτοιο βαθμό που να θεωρείται το δείγμα μη αποδεκτό προς μέτρηση και τα αποτελέσματα κρίνονται ως αποδεκτά.

Αναφορικά με τα νανοσωματίδια χιτοζάνης η μέση υδροδυναμική διάμετρος μετρήθηκε ίση με 294.4 nm και ο μέσος δείκτης PDI ίσος με 0.333, όπου και οι δύο τιμές θεωρούνται αποδεκτές και αναμενόμενες. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέση υδροδυναμικής διάμετρος του ελεύθερου συμπλόκου HP-β-CD:IR-786 Iodide (156.6 nm) προέκυψε χαμηλότερη από την τιμή των νανοσωματιδίων χιτοζάνης με το εγκλωβισμένο σύμπλοκο. Αυτό είναι αναμενόμενο, καθώς το σύμπλοκο ενσωματώνεται στην πολυμερική μήτρα της χιτοζάνης μέσω της ιονικής πηκτωμάτωσης, με αποτέλεσμα το μέγεθος της σύνθετης νανοδομής να αυξάνεται (**Σχήμα 6.9**).





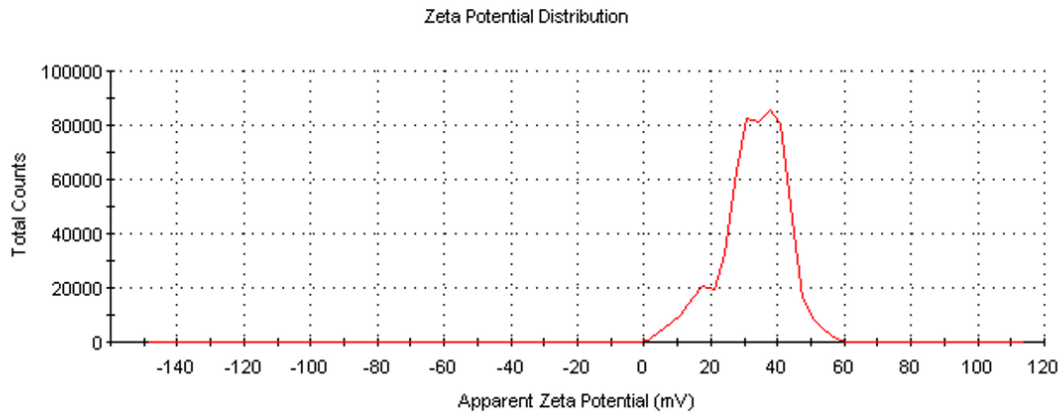
**Σχήμα 6.9** Κατανομές υδροδυναμικής διαμέτρου για το ελεύθερο σύμπλοκο HP-β-CD:IR-786 Iodide, το ενσωματωμένο στα νανοσωματίδια χιτοζάνης (HP-β-CD:IR-786 Iodide IC-loaded CS NPs) και για τα κενά νανοσωματίδια χιτοζάνης (blank CS NPs).

Αναφορικά με το ζ-δυναμικό στην περίπτωση των συμπλόκων εγκλωβισμού, κυμαίνεται στο εύρος +27.5 mV έως +32.1 mV, σύμφωνα με τον **Πίνακα 6.4**. Κατά απόλυτη τιμή οι προηγούμενες τιμές υποδεικνύουν εξαιρετική κολλοειδή σταθερότητα, μέσω της ανάπτυξης απωστικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σωματιδίων στην υδατική διασπορά, καθώς βρίσκονται κοντά στην τιμή +30 mV (**Σχήμα 4.22, Κεφάλαιο 4**). Ωστόσο, στη βιβλιογραφία συνήθως παρατηρείται αρνητική τιμή ζ-δυναμικού στα σύμπλοκα κυκλοδεξτρινών με υδρόφοβες ενώσεις, λόγω του ιονισμού των ομάδων υδροξυλίου στην εξωτερική επιφάνεια της κυκλοδεξτρίνης. Το θετικό ζ-δυναμικό στη συγκεκριμένη περίπτωση αποδίδεται στην κατιοντική φύση της κυανίνης IR-786 Iodide κατά τον σχηματισμό συμπλόκων μη-εγκλεισμού. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν προκύψει στη μελέτη των *Bazylińska et al. (2014)*, όπου μελετήθηκε ο εγκλωβισμός της επίσης κατιοντικής ένωσης IR-780 Iodide σε νανοσωματίδια πολυγαλακτικού οξέος (PLA), τα οποία παρουσίασαν θετικό ζ-δυναμικό (τα νανοσωματίδια PLA συνήθως παρουσιάζουν αρνητικό φορτίο) εξαιτίας της προσρόφησης της κυανίνης στην εξωτερική επιφάνεια των νανοδομών. [102] Συνολικά, η υδατική διασπορά των συντεθειμένων συμπλόκων εγκλωβισμού κρίνεται ως ικανοποιητική σταθερή.

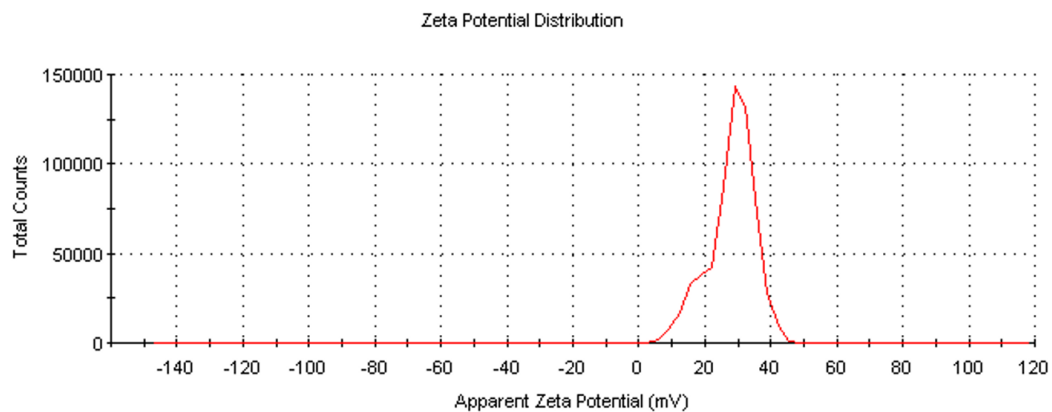
Σχετικά με τα νανοσωματίδια χιτοζάνης, η προκύπτουσα μέση τιμή ζ-δυναμικού +29.0 mV είναι ικανοποιητική και ενδεικτική της κολλοειδούς σταθερότητας.

Παρόμοια αποτελέσματα για νανοσωματίδια χιτοζάνης που έχουν παρασκευαστεί με την τεχνική της ιονικής πηκτωμάτωσης, έχουν καταγραφεί στη βιβλιογραφία. [103]

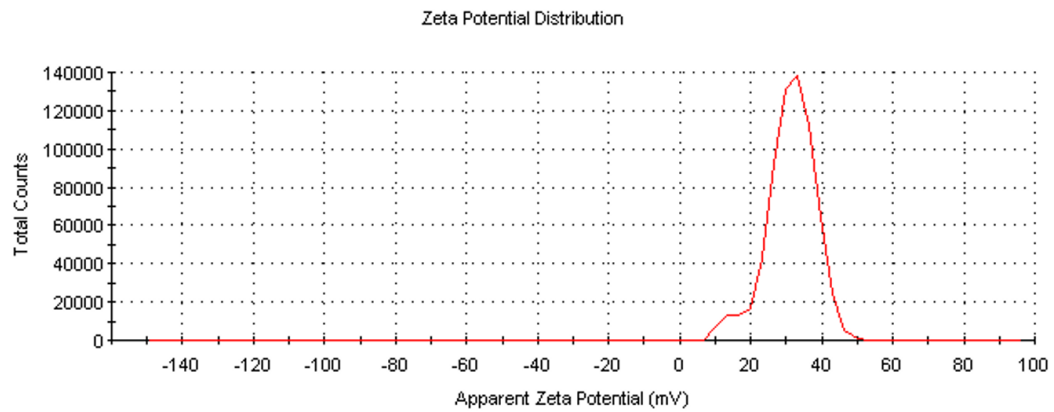
Η κατανομή του ζ-δυναμικού στα δείγματα των συμπλόκων με φορείς τη  $\beta$ -CD, την HP- $\beta$ -CD και την  $\gamma$ -CD, παρουσιάζεται στα **Σχήματα 6.10, 6.11** και **6.12**, ενώ στο **Σχήμα 6.13** παρουσιάζεται η κατανομή ζ-δυναμικού για τα loaded CS NPs.



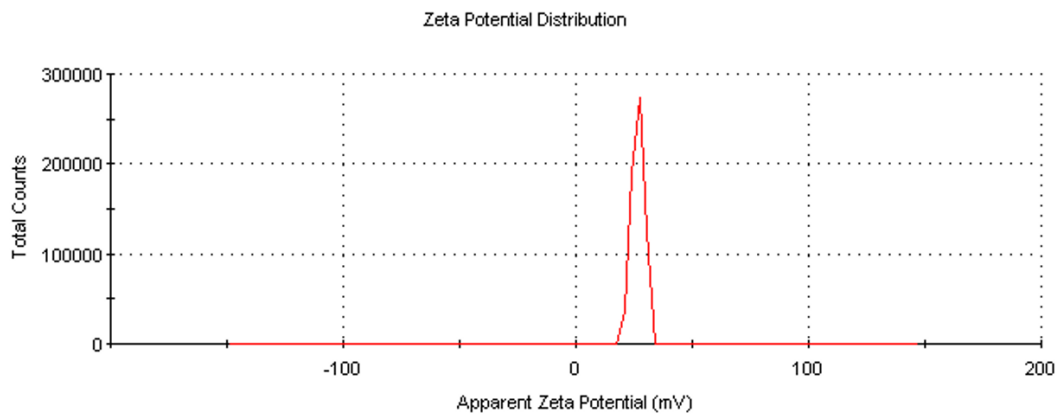
**Σχήμα 6.10.** Κατανομή ζ-δυναμικού υδροδυναμικής διαμέτρου του συμπλόκου  $\beta$ -CD:IR-786 Iodide IC σε υδατική διασπορά, όπως προσδιορίστηκε μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός.



**Σχήμα 6.11.** Κατανομή ζ-δυναμικού υδροδυναμικής διαμέτρου του συμπλόκου HP- $\beta$ -CD:IR-786 Iodide IC σε υδατική διασπορά, όπως προσδιορίστηκε μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός.



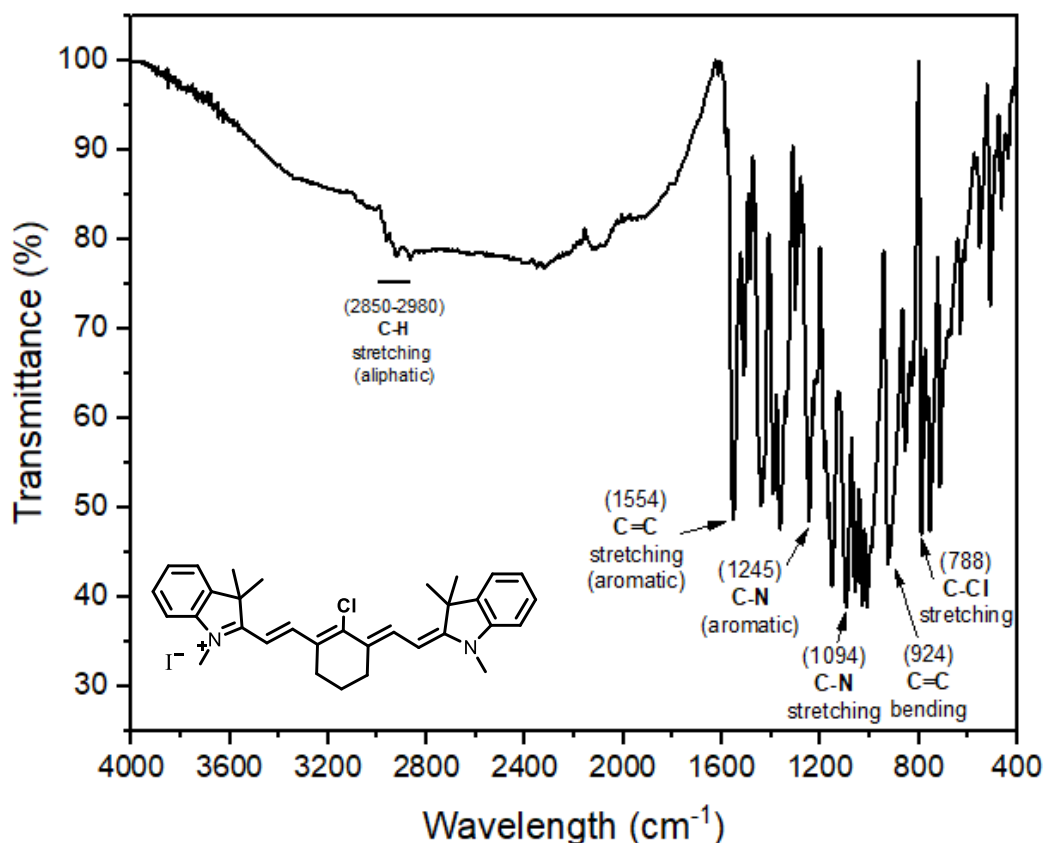
**Σχήμα 6.12.** Κατανομή ζ-δυναμικού υδροδυναμικής διαμέτρου του συμπλόκου  $\gamma$ -CD:IR-786 Iodide IC σε υδατική διασπορά, όπως προσδιορίστηκε μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός.



**Σχήμα 6.13.** Κατανομή ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων χιτοζάνης (HP- $\beta$ -CD:IR-786 Iodide IC-loaded CS NPs) σε υδατική διασπορά, όπως προσδιορίστηκε μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός.

## 6.5 Δομικός χαρακτηρισμός μέσω φασματοσκοπίας ATR-FTIR

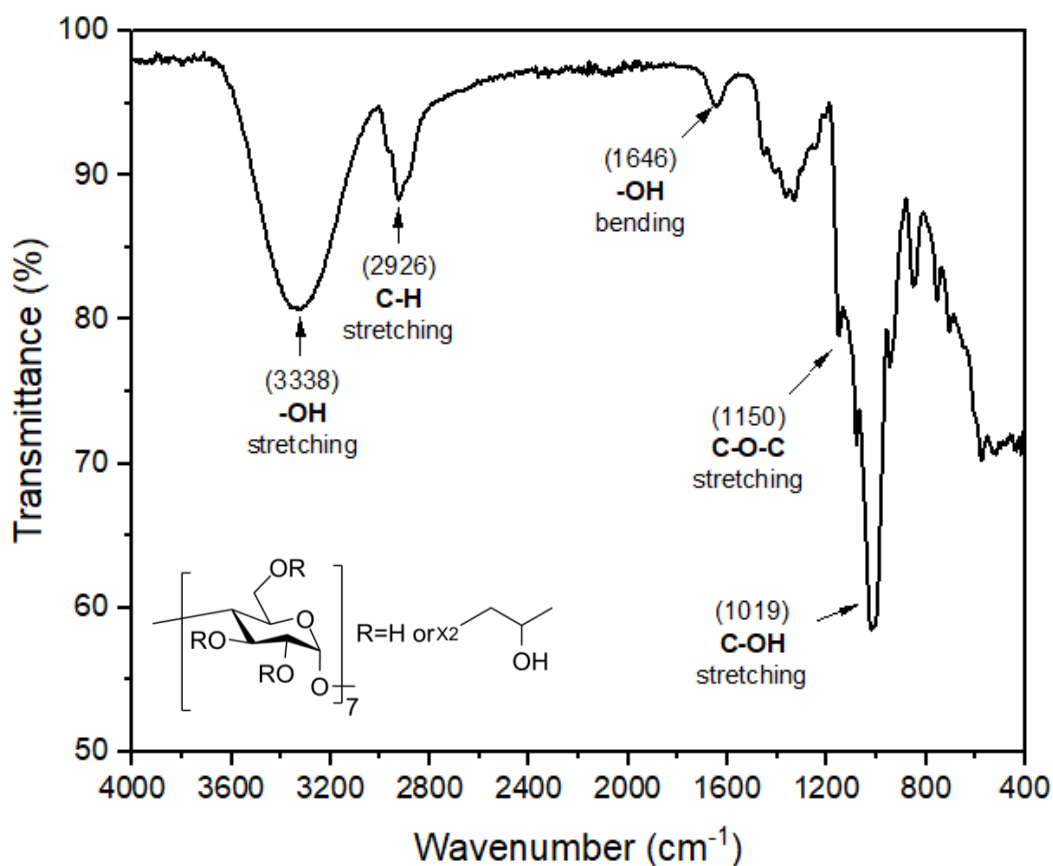
Αρχικά, αναλύεται ποιοτικά το φάσμα ATR-FTIR της καθαρής ένωσης IR-786 Iodide (Σχήμα 6.14), όπου ταυτοποιούνται οι κορυφές των χαρακτηριστικών ομάδων του οργανικού μορίου.



Σχήμα 6.14. Φάσμα ATR-FTIR της κυανίνης IR-786 Iodide.

Οι διαδοχικές κορυφές χαμηλής έντασης στο εύρος  $2850 - 2980 \text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχούν στη δόνηση τάσης των αλειφατικών δεσμών C – H του μορίου της κυανίνης. [104], [105] Η οξεία κορυφή υψηλής έντασης σε κυματάρημο  $1554 \text{ cm}^{-1}$  αφορά στη δόνηση τάσης του διπλού δεσμού C = C του αρωματικού συστήματος. Η χαρακτηριστική έντονη κορυφή στα  $1245 \text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C – N του αρωματικού συστήματος στον ινδολικό δακτύλιο της κυανίνης IR-786 Iodide. Στα  $1094 \text{ cm}^{-1}$  παρουσιάζεται η κορυφή που αφορά στη δόνηση τάσης του δεσμού C – N των αμινομάδων του μορίου, η οποία αποτελεί χαρακτηριστική δόνηση των επταμεθνικών κυανινών. [106], [107] Τέλος, η κορυφή στα  $924 \text{ cm}^{-1}$  αφορά στη δόνηση κάμψης του διπλού δεσμού C = C, και η κορυφή στα  $788 \text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχίζεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C – Cl που εμφανίζεται στον κυκλοεξενικό δακτύλιο στο κέντρο του μορίου.

Στη συνέχεια, αναλύονται τα φάσματα ATR-FTIR των καθαρών κυκλοδεξτρινών β-CD, HP-β-CD και γ-CD.

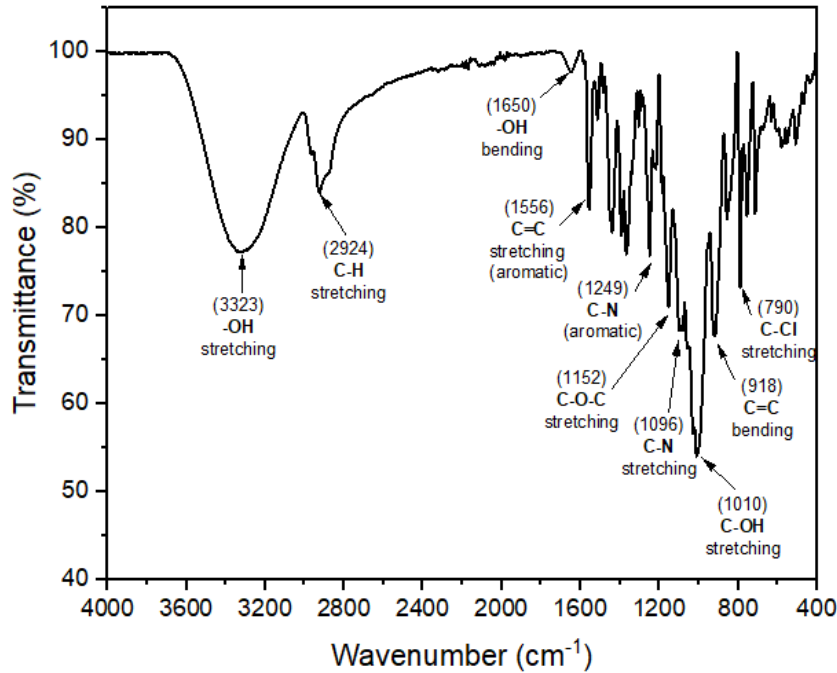


**Σχήμα 6.15.** Φάσμα ATR-FTIR της 2-υδροξυπροπυλο-β-κυκλοδεξτρίνης (HP-β-CD).

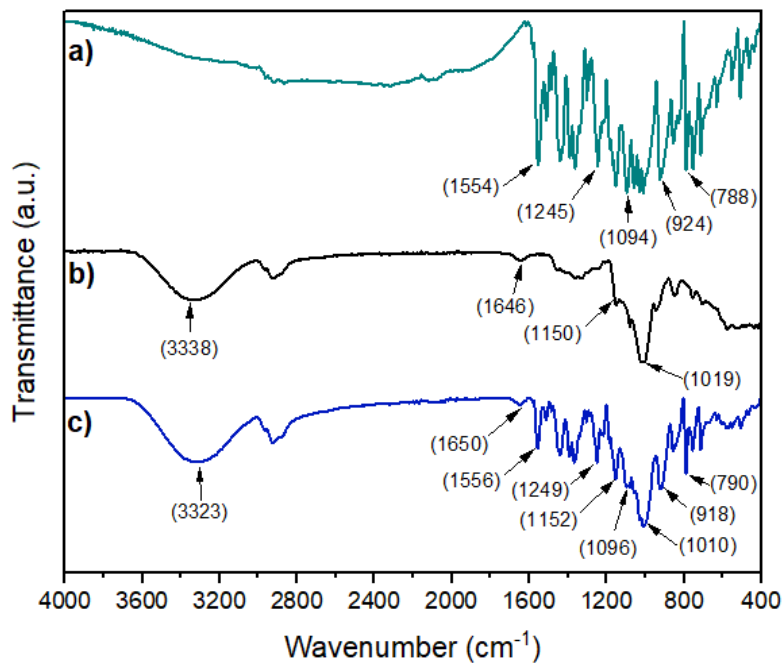
Στο **Σχήμα 6.15** παρουσιάζεται το φάσμα ATR-FTIR της καθαρής HP-β-CD. Η ευρεία κορυφή στα  $3338\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού O – H των πρωτοταγών και δευτεροταγών ομάδων υδροξυλίου και αποτελεί χαρακτηριστική δόνηση των κυκλοδεξτρινών. [108] Η μικρότερης έντασης κορυφή στα  $2926\text{ cm}^{-1}$  αφορά στη δόνηση τάσης του δεσμού C – H των αλειφατικών ομάδων –CH – και –CH<sub>2</sub> –, και η κορυφή στα  $1646\text{ cm}^{-1}$  αφορά στη δόνηση κάμψης του χημικού δεσμού O – H των μονάδων D-γλυκόζης της HP-β-CD. [108], [109] Στα  $1150\text{ cm}^{-1}$  παρατηρείται η δόνηση τάσης της αιθερικής ομάδας των γλυκοζιτικών δεσμών C – O – C, η οποία αποτελεί χαρακτηριστική κορυφή των υδατανθράκων και κατ' επέκταση των κυκλοδεξτρινών. Τέλος, η κορυφή στα  $1019\text{ cm}^{-1}$  αφορά στη δόνηση τάσης των δευτεροταγών αλκοολών C – OH του μορίου της HP-β-CD.

Με αντίστοιχο τρόπο αναλύονται τα φάσματα ATR-FTIR των καθαρών κυκλοδεξτρινών β-CD και γ-CD, τα οποία παρατίθενται στο **Παράρτημα II**.

Για την εξαγωγή συμπερασμάτων αναφορικά με τη δομή του συμπλόκου και την ύπαρξη αλληλεπιδράσεων, λαμβάνεται το φάσμα ATR-FTIR του συμπλόκου εγκλωβισμού HP-β-CD:IR-786 Iodide IC (Σχήμα 6.16), και εξετάζεται η ύπαρξη ενδεχόμενων μετατοπίσεων στις χαρακτηριστικές κορυφές των επιμέρους καθαρών συστατικών, IR-786 Iodide και HP-β-CD (Σχήμα 6.17).



Σχήμα 6.16. Φάσμα ATR-FTIR του συμπλόκου εγκλωβισμού HP-β-CD:IR-786 Iodide IC.



Σχήμα 6.17. Φάσματα ATR-FTIR των: a) IR-786 Iodide b) HP-β-CD c) HP-β-CD:IR-786 Iodide IC.

Στον **Πίνακα 6.5** παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι κυματάρθρωμοι των χαρακτηριστικών κορυφών της IR-786 Iodide, της HP-β-CD και του συμπλόκου HP-β-CD:IR-786 Iodide IC.

**Πίνακας 6.5.** Χαρακτηριστικές δονήσεις μέσου υπερύθρου της καθαρής IR-786 Iodide, της καθαρής HP-β-CD και του συμπλόκου εγκλωβισμού HP-β-CD:IR-786 Iodide IC, όπως προκύπτουν μέσω της φασματοσκοπίας ATR-FTIR.

Absorption Bands ( $\text{cm}^{-1}$ )			Vibrational Mode
IR-786 Iodide	HP-β-CD	HP-β-CD:IR-786 Iodide IC	
-	3338	3323	-OH stretching
2965 (asymmetric)	2967	2967	-CH <sub>3</sub> stretching
2869 (symmetric)	(asymmetric)	(asymmetric)	
2924	2926	2926	-CH <sub>2</sub> asymmetric stretching
-	1646	1650	-OH deformation bending
1554	-	1556	C=C stretching (aromatic)
1245	-	1249	C-N stretching (aromatic amine)
-	1150	1152	C-O-C stretching (oligosaccharide)
1094	-	1096	C-N stretching (amine)
-	1080	1082	C-OH stretching (primary alcohol)
-	1019	1010	C-OH stretching (secondary alcohol)
924	-	918	C=C bending
788	-	790	C-Cl stretching

Αρχικά, στο φάσμα του συμπλόκου παρατηρείται μετατόπιση της κορυφής που αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του δεσμού O-H της HP-β-CD κατά  $15 \text{ cm}^{-1}$ , το οποίο υποδεικνύει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ της κυανίνης και της κυκλοδεξτρίνης μέσω διαμοριακών δεσμών υδρογόνου ή/και ηλεκτροστατικών έλξεων. Αυτό ερμηνεύεται από τον κατιοντικό χαρακτήρα της κυανίνης, και συγκεκριμένα του ινδολικού αζώτου, το οποίο πιθανότητα σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τα αρνητικά φορτισμένα υδροξύλια της κυκλοδεξτρίνης. Να σημειωθεί ότι η παραπάνω κορυφή δεν υπάρχει στο φάσμα της καθαρής κυανίνης, καθώς το μόριο της δεν περιέχει ομάδες υδροξυλίου, και επομένως η εμφάνιση αυτής της κορυφής στο φάσμα του συμπλόκου λόγω της HP-β-CD, είναι ξεκάθαρη.

Ακόμα, παρουσιάζεται αξιοσημείωτη μετατόπιση κατά  $9 \text{ cm}^{-1}$  στην κορυφή του δεσμού C – OH των δευτεροταγών υδροξυλίων της HP-β-CD, το οποίο σηματοδοτεί την επιτυχή αλληλεπίδραση της κυανίνης με την κυκλοδεξτρίνη κατά τη συμπλοκοποίηση, για τους λόγους που αναφέρονται παραπάνω. Επιπλέον, το γεγονός ότι παρουσιάζεται μικρότερη μετατόπιση ( $2 \text{ cm}^{-1}$ ) στην αντίστοιχη κορυφή των πρωτοταγών υδροξυλίων της HP-β-CD, ενδεχομένως υποδεικνύει ότι η διαμόρφωση του συμπλόκου ευνοεί την ανάπτυξη ισχυρότερων αλληλεπιδράσεων της κυανίνης με τη δευτεροταγή πλευρά της κυκλοδεξτρίνης, δηλαδή την πλατιά άκρη του κόλουρου κώνου. Αυτό είναι λογικό από γεωμετρικής άποψης, καθώς το ογκώδες μόριο της

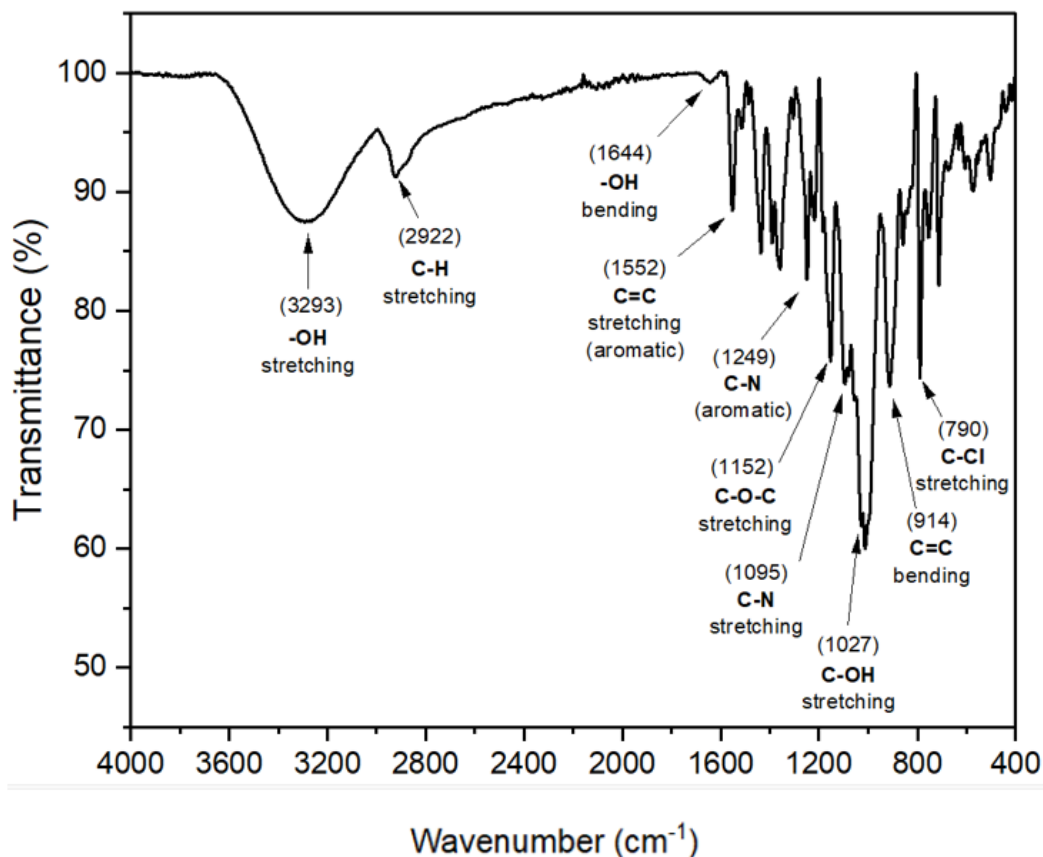
κυανίνης είναι πιθανότερο να εισέρχεται, εντός της εσωτερικής κοιλότητας μέσω της πλατιάς άκρη της κυκλοδεξτρίνης (secondary face).

Αξίζουν να σημειωθούν οι μετατοπίσεις που παρουσιάζονται στην κορυφή της δόνησης κάμψης των υδροξυλίων κατά  $4\text{ cm}^{-1}$  και στην κορυφή του γλυκοζιτικού δεσμού C – O – C της HP-β-CD κατά  $2\text{ cm}^{-1}$ , οι οποίες συμφωνούν με τα συμπεράσματα που αναφέρονται παραπάνω.

Σχετικά με την κυανίνη, παρουσιάζεται μετατόπιση στην κορυφή του δεσμού C – N του αρωματικού συστήματος κατά  $4\text{ cm}^{-1}$ , γεγονός που επιβεβαιώνει την ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου μεταξύ του κατιοντικού ινδολικού αζώτου και των υδροξυλίων της κυκλοδεξτρίνης κατά τη συμπλοκοποίηση. Ακόμα, εμφανίζεται μετατόπιση τάσης του δεσμού C – N κατά  $2\text{ cm}^{-1}$  και της δόνησης κάμψης του δεσμού C = C της κυανίνης κατά  $6\text{ cm}^{-1}$ , υποδεικνύοντας την αλληλεπίδραση των παραπάνω ομάδων με το μόριο της κυκλοδεξτρίνης.

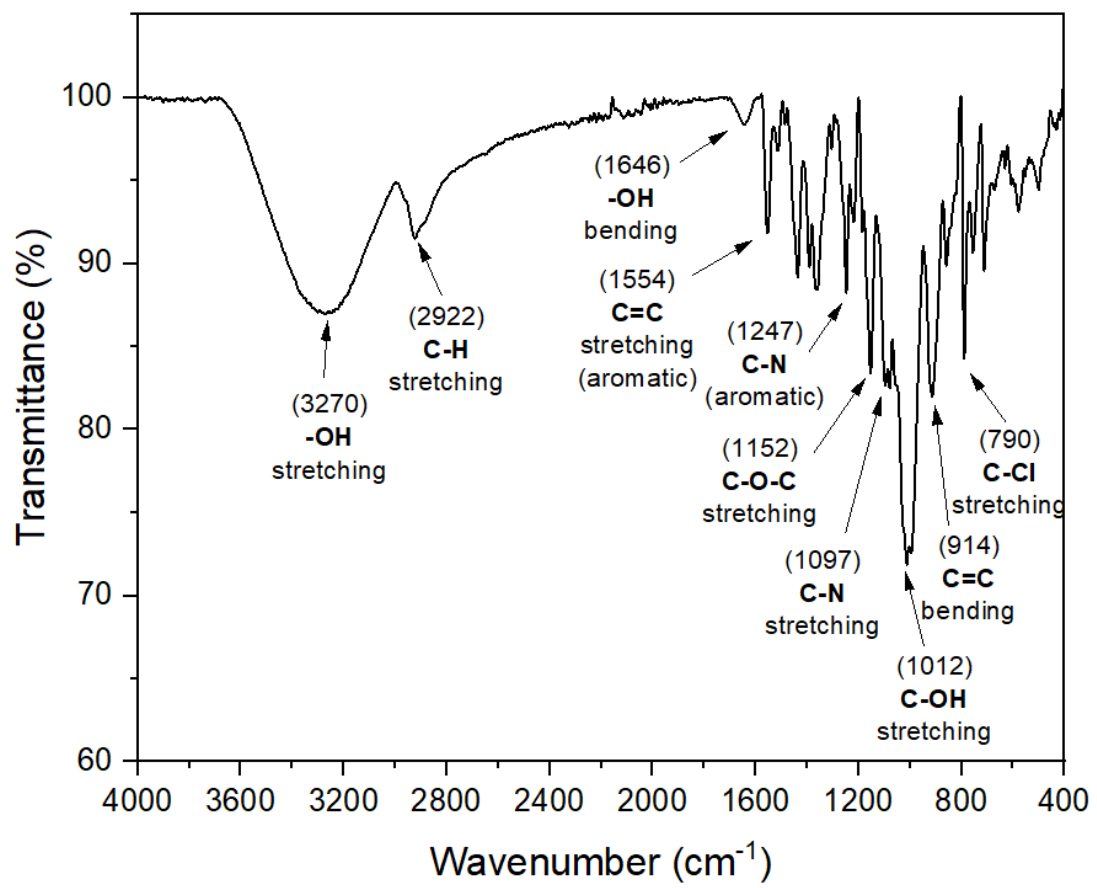
Συνολικά από τα παραπάνω προκύπτει η επιτυχής ανάπτυξη υπερμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της IR-786 Iodide και της HP-β-CD στο συνθετισμένο σύμπλοκο εγκλωβισμού.

Η ίδια ανάλυση ακολουθείται και για τα σύμπλοκα της κυανίνης με την β-CD και την γ-CD. Τα φάσματα ATR-FTIR των συμπλόκων εγκλωβισμού β-CD:IR-786 Iodide και γ-CD:IR-786 Iodide παρουσιάζονται στα **Σχήματα 6.18** και **6.19**, αντίστοιχα.



**Σχήμα 6.18.** Φάσμα ATR-FTIR του συμπλόκου εγκλωβισμού β-CD:IR-786 Iodide IC.





Σχήμα 6.19. Φάσμα ATR-FTIR του συμπλόκου εγκλωβισμού  $\gamma$ -CD:IR-786 Iodide IC.

**Πίνακας 6.6.** Χαρακτηριστικές δονήσεις μέσου υπερόθρου της καθαρής IR-786 Iodide, της καθαρής  $\beta$ -CD και του συμπλόκου εγκλωβισμού  $\beta$ -CD:IR-786 Iodide IC, όπως προκύπτουν μέσω της φασματοσκοπίας ATR-FTIR.

Absorption Bands ( $\text{cm}^{-1}$ )			Vibrational Mode
IR-786 Iodide	$\beta$ -CD	$\beta$ -CD:IR-786 Iodide IC	
-	3286	3293	-OH stretching
2965 (asymmetric) 2869 (symmetric)	-	-	-CH <sub>3</sub> stretching
2924	2924	2922	-CH <sub>2</sub> asymmetric stretching
-	1636	1644	-OH deformation bending
1554	-	1552	C=C stretching (aromatic)
1245	-	1249	C-N stretching (aromatic amine)
-	1152	1152	C-O-C stretching (oligosaccharide)
1094	-	1095	C-N stretching (amine)
-	1078	1078	C-OH stretching (primary alcohol)
-	1023	1027	C-OH stretching (secondary alcohol)
924	-	914	C=C bending
788	-	790	C-Cl stretching

**Πίνακας 6.7.** Χαρακτηριστικές δονήσεις μέσου υπερόθρου της καθαρής IR-786 Iodide, της καθαρής  $\gamma$ -CD και του συμπλόκου εγκλωβισμού  $\gamma$ -CD:IR-786 Iodide IC, όπως προκύπτουν μέσω της φασματοσκοπίας ATR-FTIR.

Absorption Bands ( $\text{cm}^{-1}$ )			Vibrational Mode
IR-786 Iodide	$\gamma$ -CD	$\gamma$ -CD:IR-786 Iodide IC	
-	3262	3270	-OH stretching
2965 (asymmetric) 2869 (symmetric)	-	-	-CH <sub>3</sub> stretching
2924	2926	2922	-CH <sub>2</sub> asymmetric stretching
-	1638	1646	-OH deformation bending
1554	-	1554	C=C stretching (aromatic)
1245	-	1247	C-N stretching (aromatic amine)
-	1150	1152	C-O-C stretching (oligosaccharide)
1094	-	1097	C-N stretching (amine)
-	1076	1078	C-OH stretching (primary alcohol)
-	1019	1012	C-OH stretching (secondary alcohol)
924	-	914	C=C bending
788	-	790	C-Cl stretching

Για να εξαχθεί συμπέρασμα αναφορικά με τη σύγκριση των τριών φορέων, υπολογίζονται οι μετατοπίσεις στις κυριότερες κορυφές και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.8**.

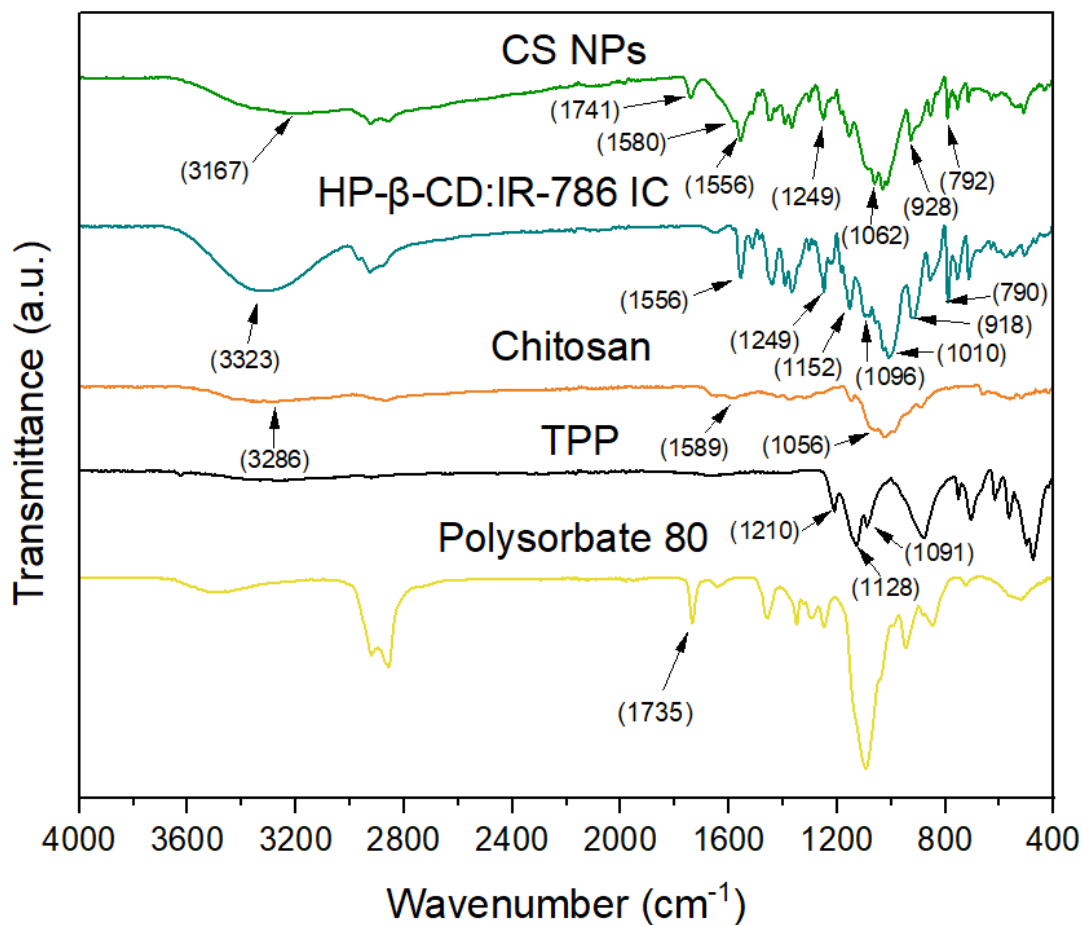
**Πίνακας 6.8.** Σύγκριση των μετατοπίσεων που παρουσιάστηκαν στις χαρακτηριστικές κορυφές των φασμάτων ATR-FTIR για τα 3 σύμπλοκα.

Band shift (cm <sup>-1</sup> )			Vibrational Mode
HP-β-CD:IR-786 IC	β-CD:IR-786 IC	γ-CD:IR-786 Iodide IC	
15	7	8	-OH stretching
4	8	8	-OH deformation bending
2	2	0	C=C stretching (aromatic)
4	4	2	C-N stretching (aromatic amine)
2	0	2	C-O-C stretching (oligosaccharide)
2	1	3	C-N stretching (amine)
2	0	2	C-OH stretching (primary alcohol)
9	4	7	C-OH stretching (secondary alcohol)
6	10	10	C=C bending
2	2	2	C-Cl stretching

Επομένως, συγκρίνοντας τις υπολογιζόμενες μετατοπίσεις που παρουσιάζονται στα φάσματα των συμπλόκων HP-β-CD:IR-786, β-CD:IR-786 και γ-CD:IR-786 IC, παρατηρείται ότι τα σύμπλοκα που έχουν προκύψει με φορέα την HP-β-CD, οι μετατοπίσεις σε γενικές γραμμές είναι υψηλότερες. Αυτό υποδεικνύει ότι η κυανίνη παρουσιάζει ευνοϊκότερη αλληλεπίδραση με την HP-β-CD κατά τη συμπλοκοποίηση σε σύγκριση με την β-CD και την γ-CD. Μια πιθανή ερμηνεία σχετικά με αυτό το συμπέρασμα, είναι το γεγονός ότι η HP-β-CD έχει την υψηλότερη υδατοδιαλυτότητα, ενώ παράλληλα βρίσκεται σε άμορφη κατάσταση ως συνθετικό παράγωγο, σε αντίθεση με τις κρυσταλλικές κυκλοδεξτρίνες β-CD και γ-CD. Για τους δύο παραπάνω λόγους, ενδεχομένως η δημιουργία υπερμοριακών αλληλεπιδράσεων στερεάς κατάστασης στη διεργασία kneading, γίνεται με μεγαλύτερη ευκολία.

Ακόμα, αξίζει να σημειωθεί ότι και στις τρεις περιπτώσεις μεγαλύτερη διακύμανση παρουσιάζεται στη μετατόπιση των δονήσεων που αντιστοιχούν στις ομάδες υδροξυλίου της εκάστοτε κυκλοδεξτρίνης, ενώ μετατοπίσεις που αφορούν στην κυανίνη δεν μεταβάλλονται σημαντικά μεταξύ των εξεταζόμενων φορέων. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στην μεγαλύτερη ευκολία των δεσμών της κυκλοδεξτρίνης να περιστρέφονται και να μεταβάλλουν το μήκος τους κατά την ανάπτυξη διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, σε αντίθεση με το πιο σταθερό και άκαμπτο μόριο της κυανίνης, το οποίο διαθέτει ένα εκτεταμένο συζυγιακό σύστημα που μειώνει τους βαθμούς ελευθερίας περιστροφής στο χώρο.

Στη συνέχεια, μελετάται το φάσμα ATR-FTIR των νανοσωματιδίων χιτοζάνης (HP-β-CD:IR-786 Iodide IC-loaded CS NPs) σε σύγκριση με τα επιμέρους συστατικά, δηλαδή τη χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους (CS LMW), τον cross-linker TPP, το σύμπλοκο HP-β-CD:IR-786 Iodide IC και το επιφανειοδραστικό Polysorbate 80 (**Σχήμα 6.20**).



**Σχήμα 6.20.** Φάσμα ATR-FTIR των νανοσωματιδίων χιτοζάνης (CS NPs), σε σύγκριση με τα φάσματα των επιμέρους συστατικών, δηλαδή των: HP-β-CD:IR-786 Iodide IC, CS LMW, TPP και Polysorbate 80.

**Πίνακας 6.9.** Χαρακτηριστικές δονήσεις μέσω υπερύθρου της IR-786 Iodide, του συμπλόκου εγκλωβισμού HP-β-CD:IR-786 Iodide, της χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους (CS LMW) και του τελικού νανοσυστήματος (CS NPs), όπως προκύπτουν μέσω της φασματοσκοπίας ATR-FTIR.

IR-786 Iodide	Absorption Bands (cm <sup>-1</sup> )			Vibrational Mode
	HP-β-CD:IR-786 IC	CS LMW	CS NPs	
-	-	1589	1580	N-H bending of the primary amine
1554	1556	-	1556	C=C stretching (aromatic)
1245	1249	-	1249	C-N stretching (aromatic amine)
-	-	1056	1062	C-O stretching
924	918	-	928	C=C bending
788	790	-	792	C-Cl stretching

Σχετικά με την κυανίνη IR-786 Iodide, οι χαρακτηριστικές κορυφές των δονήσεων τάσης του αρωματικού C=C και του ινδολικού δεσμού C-N, εμφανίζονται στο φάσμα των νανοσωματιδίων χιτοζάνης στους ίδιους κυματάρθμους με το φάσμα του συμπλόκου. Αυτό υποδεικνύει ότι η κυανίνη βρίσκεται συμπλοκοποιημένη με την HP-β-CD κατά την φόρτωση του συμπλόκου στο τελικό νανοσύστημα, που είναι και το αναμενόμενο. Επίσης, παρουσιάζεται μετατόπιση στη δόνηση τάσης του δεσμού C-Cl κατά και  $2\text{ cm}^{-1}$  και στη δόνηση κάμψης C=C κατά  $10\text{ cm}^{-1}$  σε σχέση με το σύμπλοκο, το οποίο ενδεχομένως σχετίζεται με το τμήμα του μορίου της κυανίνης που δεν εγκλωβίζεται στην κυκλοδεξτρίνη και παραμένει εκτεθειμένο να αλληλεπιδράσει με τη χιτοζάνη.

Σχετικά με τη χιτοζάνη, η μοναδική κορυφή που διακρίνεται χωρίς να υπάρχει σημαντική αλληλεπικάλυψη με τις κορυφές της κυκλοδεξτρίνης (υδατάνθρακες με αρκετές κοινές ομάδες), είναι της δόνησης του δεσμού N – H της πρωτοταγούς αμίνης στα  $1589\text{ cm}^{-1}$ . Η κορυφή αυτή εμφανίζεται στο τελικό νανοσύστημα μετατοπισμένη στα  $1580\text{ cm}^{-1}$ , το οποίο είναι αναμενόμενο λόγω της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης των πρωτοταγών αμινομάδων της χιτοζάνης με τον cross-linker TPP κατά τη διεργασία της ιονικής πηκτωμάτωσης.

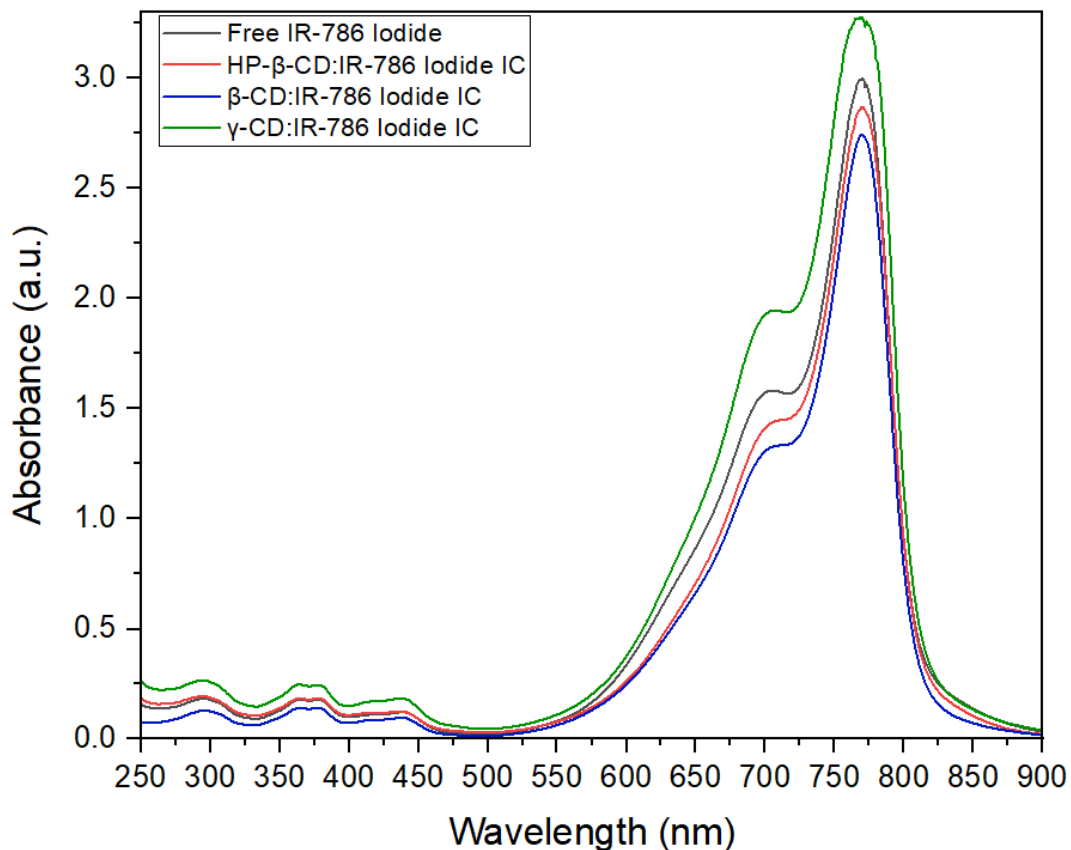
Σχετικά με τον cross-linker TPP, στην καθαρή ουσία ανιχνεύονται οι χαρακτηριστικές κορυφές  $1210\text{ cm}^{-1}$  της δόνησης τάσης P – O ,  $1128\text{ cm}^{-1}$  της δόνησης τάσης της ομάδας O – P = O, και  $1091\text{ cm}^{-1}$  της δόνησης τάσης του δεσμού P – O. [110] Ωστόσο, καμία από τις προηγούμενες κορυφές δεν εμφανίζεται στο φάσμα των νανοσωματιδίων χιτοζάνης, το οποίο υποδεικνύει ότι ο παράγοντας διασύνδεσης βρίσκεται στο εσωτερικό του νανοσυστήματος.

Σχετικά, με το Polysorbate 80 η κορυφή στα  $1735\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C = O των εστερικών ομάδων του επιφανειοδραστικού. [111] Στο τελικό νανοσύστημα παρουσιάζεται η συγκεκριμένη κορυφή μετατοπισμένη στα  $1741\text{ cm}^{-1}$  και σε σχετικά υψηλή ένταση, το οποίο σημαίνει ότι ποσότητα της επιφανειοδραστικής ουσίας έχει παραμείνει προσροφημένη μέσω διαμοριακών δυνάμεων στην εξωτερική επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Αυτό είναι επιθυμητό, καθώς κατά την επαναδιασπορά των νανοσωματιδίων μετά τη λυοφιλοποίηση, η εναπομείνουσα ποσότητα Polysorbate 80 θα διευκολύνει την παρασκευή ομοιογενούς και σταθερής διασποράς.

## 6.6 Οπτικές ιδιότητες

### 6.6.1 Κινητική Φωτοαποδόμησης (Photobleaching)

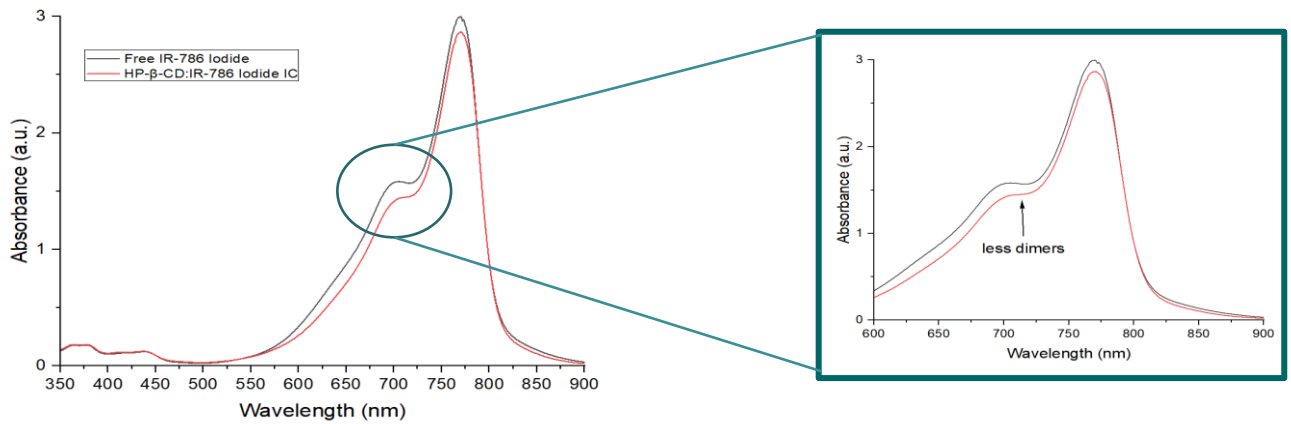
Πριν την έναρξη της μελέτης φωτοαποδόμησης, λαμβάνονται τα φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης κυανίνης και της εγκλωβισμένης ένωσης στα σύμπλοκα εγκλωβισμού, στην ίδια συγκέντρωση (30  $\mu\text{M}$ ) εντός του διαλύματος ακτινοβόλησης (6% v/v DMSO/PBS).



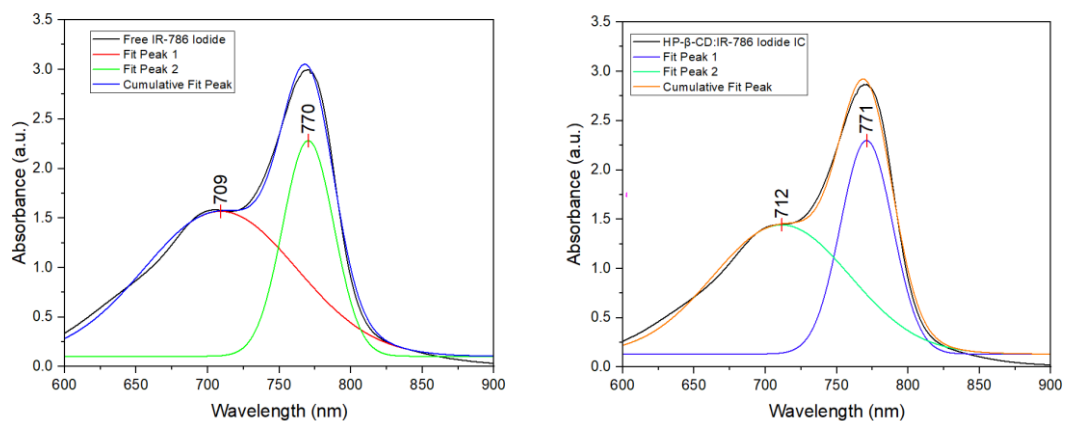
**Σχήμα 6.21.** Φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης και συμπλοκοποιημένης IR-786 Iodide στις κυκλοδεξτρίνες β-CD, HP-β-CD και γ-CD.

Αρχικά, στο φάσμα απορρόφησης της ελεύθερης κυανίνης (**Σχήματος 6.21**), παρατηρείται η κορυφή μέγιστης απορρόφησης της ένωσης στα 770 nm και μία δεύτερη κορυφή μικρότερης έντασης στα 709 nm. Η τελευταία κορυφή αποδίδεται στην απορρόφηση των σχηματιζόμενων διμερών συσσωματωμάτων της κυανίνης IR-786 σε υδατικό περιβάλλον, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Η τάση διμερισμού αποτελεί γνωστό χαρακτηριστικό των κυανινών, και των υδρόφοβων φωτοευαίσθητοποιητών γενικότερα, όταν βρίσκονται σε υδατικό περιβάλλον (λ.χ. πλάσμα του αίματος), με αποτέλεσμα να συσσωματώνεται η ένωση και να χάνει τη βιολογική της δράση. [60], [71], [112]

Ωστόσο, στην περίπτωση του συμπλόκου HP-β-CD:IR-786 Iodide παρατηρείται μείωση στην κορυφή απορρόφησης που αντιστοιχεί στο διμερισμό, συγκριτικά με την ελεύθερη κυανίνη (Σχήμα 6.22).



Σχήμα 6.22. Περιορισμός τάσης του σχηματισμού διμερών συσσωματωμάτων της υδρόφοβης κυανίνης μέσω της συμπλοκοποίησης με την ευδιάλυτη HP-β-CD.



Σχήμα 6.23. Διαχωρισμός των επιμέρους κορυφών (peak deconvolution), μέσω προσαρμογής γκαουσιανής συνάρτησης, για την α) ελεύθερη και την β) συμπλοκοποιημένη IR-786 Iodide.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνεισφοράς της συμπλοκοποίησης στην τάση διμερισμού της υδρόφοβης κυανίνης, πραγματοποιείται διαχωρισμός των δύο αλληλεπικαλυπτόμενων κορυφών μέσω προσαρμογής γκαουσιανής συνάρτησης στο περιβάλλον του λογισμικού OriginLab (Σχήμα 6.23). Συγκεκριμένα, για κάθε περίπτωση υπολογίζεται ο λόγος απορρόφησης των δύο κορυφών, όπου η πρώτη κορυφή αντιστοιχεί στα διμερή της κυανίνης στην υδατική φάση ( $A_{\text{dimer}}$ ), και η δεύτερη στη μονομοριακή IR-786 Iodide ( $A_{\text{cyanine}}$ ). Σύμφωνα με τον Πίνακα 6.10, παρατηρείται ότι στην περίπτωση της συμπλοκοποίησης με την HP-β-CD, η ένταση της κορυφής που αντιστοιχεί στο διμερισμό μειώνεται, ενώ η κορυφή της μονομοριακής κυανίνης αυξάνεται, συγκριτικά με την ελεύθερη κυανίνη.

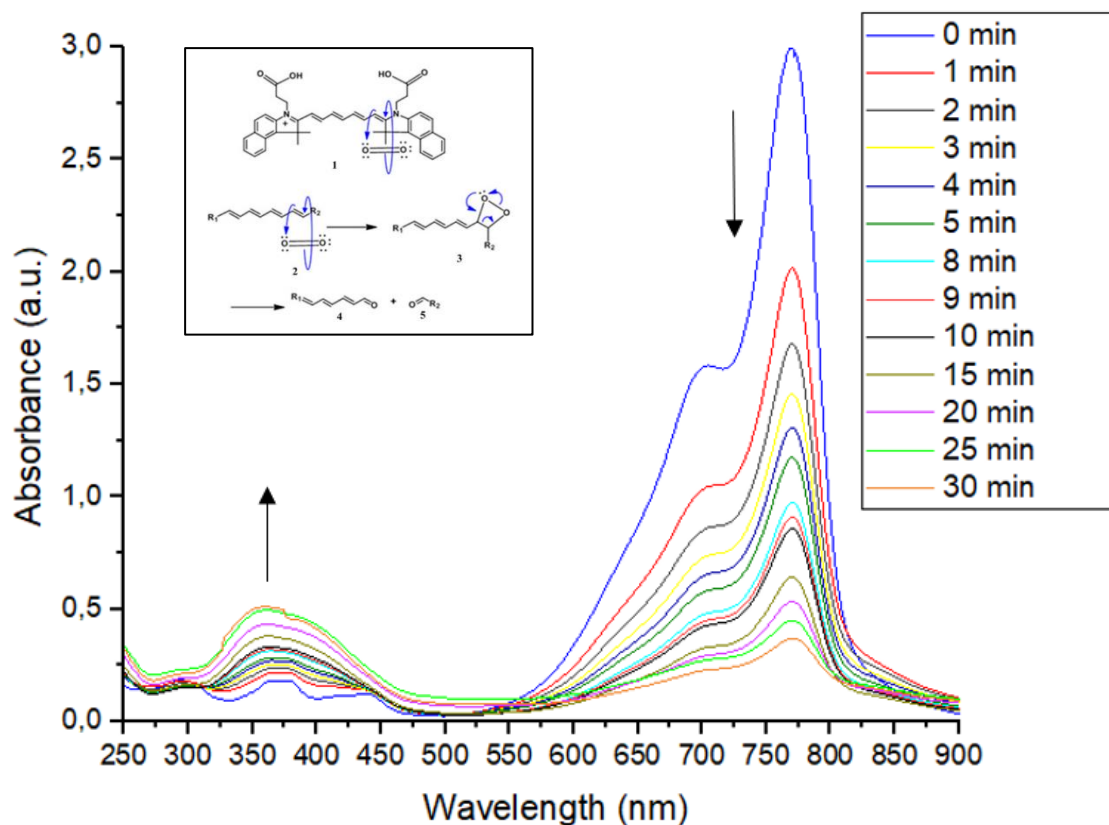
**Πίνακας 6.10.** Υπολογισμός του λόγου απορρόφησης της μονομοριακής κυανίνης ( $A_{\text{cyanine}}$ ) και των σχηματιζόμενων διμερών στην υδατική φάση ( $A_{\text{dimer}}$ ), για την περίπτωση της ελεύθερης IR-786 Iodide και της συμπλοκοποιημένης κυανίνης με την HP- $\beta$ -CD.

<b>Free IR-786 Iodide</b>				
$A_{\text{dimer}}$	$\lambda_{\text{dimer}}$ (nm)	$A_{\text{cyanine}}$	$\lambda_{\text{cyanine}}$ (nm)	$A_{\text{cyanine}}/A_{\text{dimer}}$
1.57	709	2.28	770	1.45
<b>HP-<math>\beta</math>-CD:IR-786 Iodide IC</b>				
$A_{\text{dimer}}$	$\lambda_{\text{dimer}}$ (nm)	$A_{\text{cyanine}}$	$\lambda_{\text{cyanine}}$ (nm)	$A_{\text{cyanine}}/A_{\text{dimer}}$
1.44	712	2.30	771	1.59

Επομένως, αποδεικνύεται ότι η συμπλοκοποίηση με την HP- $\beta$ -CD εμποδίζει το διμερισμό της IR-786 Iodide μεταξύ των υδρόφοβων μορίων της, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η συσσωμάτωση στα υδατικά διαλύματα, και κατ' επέκταση να αίρονται σε ένα βαθμό οι περιορισμοί που αφορούν στη χαμηλή υδατοδιαλυτότητα της κυανίνης. Στους υπόλοιπους φορείς ( $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD) παρατηρείται επίσης μικρή μείωση της καμπυλότητας κοντά στα 709 nm, αλλά όχι όσο στην περίπτωση της HP- $\beta$ -CD, ώστε να θεωρηθεί ότι περιορίζεται ο σχηματισμός των διμερών.

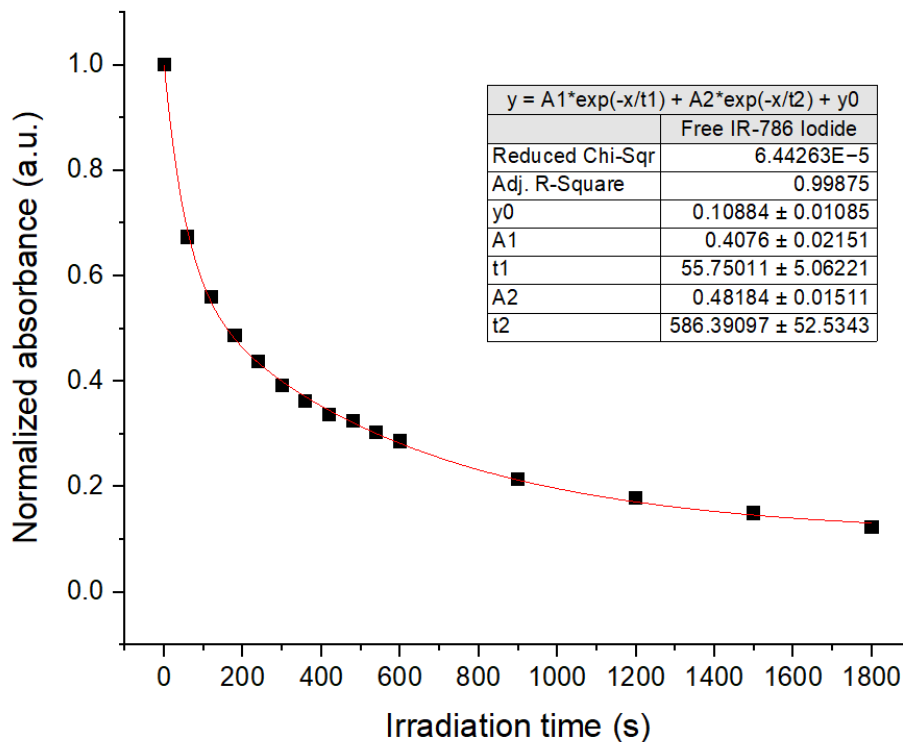
Η μελέτη φωτοαποδόμησης (photobleaching) ξεκινά με την ακτινοβολία (κόκκινο laser 661 nm, ισχύος  $13 \frac{mW}{cm^2}$ ) του διαλύματος της καθαρής κυανίνης και την λήψη των φασμάτων απορρόφησης σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (**Σχήμα 6.24**).





**Σχήμα 6.24.** Φάσμα απορρόφησης του διαλύματος ακτινοβολήσης της ελεύθερης κυανίνης IR-786 Iodide συναρτήσει του χρόνου στο πλαίσιο της μελέτης photobleaching.

Στο **Σχήμα 6.24**, παρατηρείται ραγδαία πτώση της κορυφής απορρόφησης της ελεύθερης κυανίνης στα 770 nm συναρτήσει του χρόνου, λόγω του φαινομένου photobleaching που παρουσιάζεται εξαιτίας του φωτοευαίσθητου χαρακτήρα της ένωσης. Ακόμα, εμφανίστηκε νέα κορυφή στο φάσμα απορρόφησης στα 358 nm κατόπιν ακτινοβολήσης, η οποία παρουσίασε αύξηση ως προς το χρόνο ακτινοβολήσης και αντιστοιχεί στα προϊόντα των αντιδράσεων φωτοαποδόμησης (photoproducts).



**Σχήμα 6.25.** Διάγραμμα κανονικοποιημένης απορρόφησης της IR-786 Iodide στα 770 nm συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης και προσαρμογή εκθετικής συνάρτησης bi-exponential στα πειραματικά δεδομένα.

Στο **Σχήμα 6.25** παρουσιάζονται τα κανονικοποιημένα δεδομένα απορρόφησης (Normalized absorbance) του διαλύματος στα 770 nm συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης. Το μαθηματικό μοντέλο με τη βέλτιστη προσαρμογή είναι η εκθετική συνάρτηση bi-exponential (**Εξίσωση 9**), υποδεικνύοντας ότι το φαινόμενο photobleaching διέπεται από δύο φάσεις εκθετικής μείωσης. Αντίστοιχα μαθηματικά μοντέλα έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία για την περιγραφή του φαινομένου της φωτοαπόδομησης οργανικών χρωστικών. [113], [114]

$$A = A_1 \cdot e^{-k_1 t} + A_2 \cdot e^{-k_2 t} + c \quad (9)$$

όπου  $A$  η κανονικοποιημένη απορρόφηση της IR-786 Iodide στα 770 nm και  $t$  ο χρόνος ακτινοβολήσης εκφρασμένος σε δευτερόλεπτα (s).

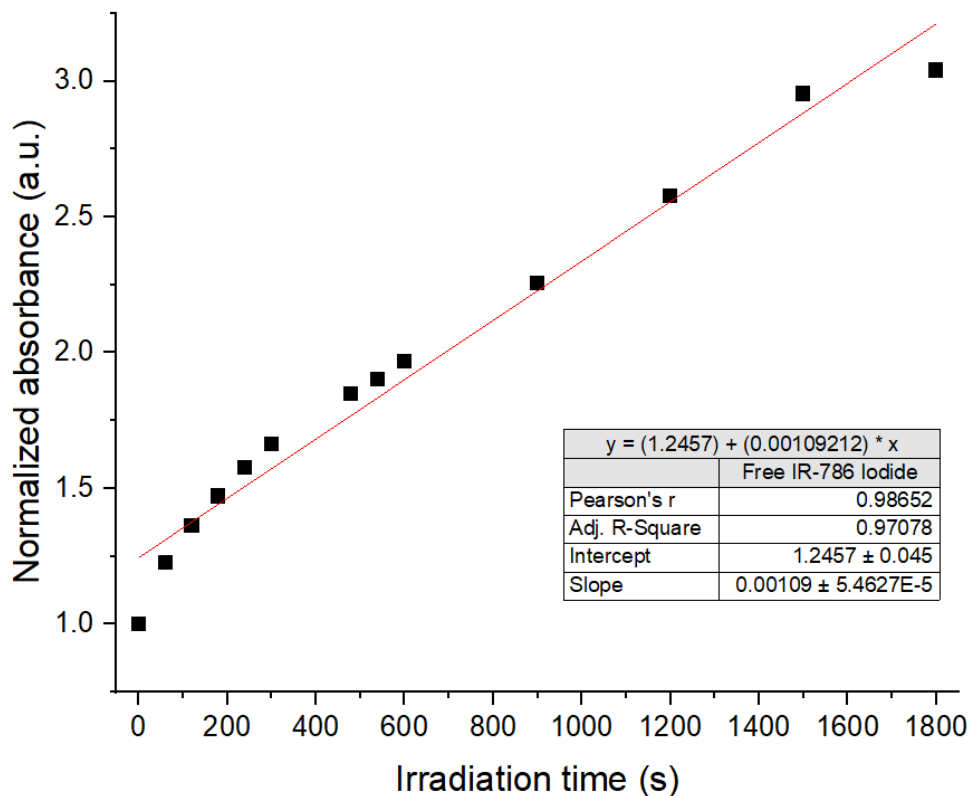
Οι προκύπτουσες κινητικές σταθερές  $k_1$ ,  $k_2$  που περιγράφουν τα επιμέρους στάδια εκθετικής μείωσης έχουν μέση τιμή:

$$k_1 = \frac{1}{t_1} = 0.0179 \text{ s}^{-1}, k_2 = \frac{1}{t_2} = 0.0017 \text{ s}^{-1}$$

Επομένως, ο χρόνος ημιζώης  $t_{1/2}$  της κάθε εκθετικής φάσης, ο οποίος αντιστοιχεί στο χρόνο που απαιτείται για την μείωση της απορρόφησης στο 50% της αρχικής τιμής, υπολογίζεται ως εξής:

$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_1} = 39 \text{ s}$  και  $t'_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_2} = 406 \text{ s}$  για την 1<sup>η</sup> και την 2<sup>η</sup> εκθετική φάση, αντίστοιχα.

Σχετικά με την παραγωγή των φωτοπροϊόντων, παρουσιάζεται γραμμική αύξηση της κανονικοποιημένης απορρόφησης στα 358 nm συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης (Σχήμα 6.26).



**Σχήμα 6.26.** Διάγραμμα κανονικοποιημένης απορρόφησης των προϊόντων φωτοαποδόμησης της IR-786 Iodide στα 358 nm συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης και προσαρμογή γραμμικής συνάρτησης στα πειραματικά δεδομένα.

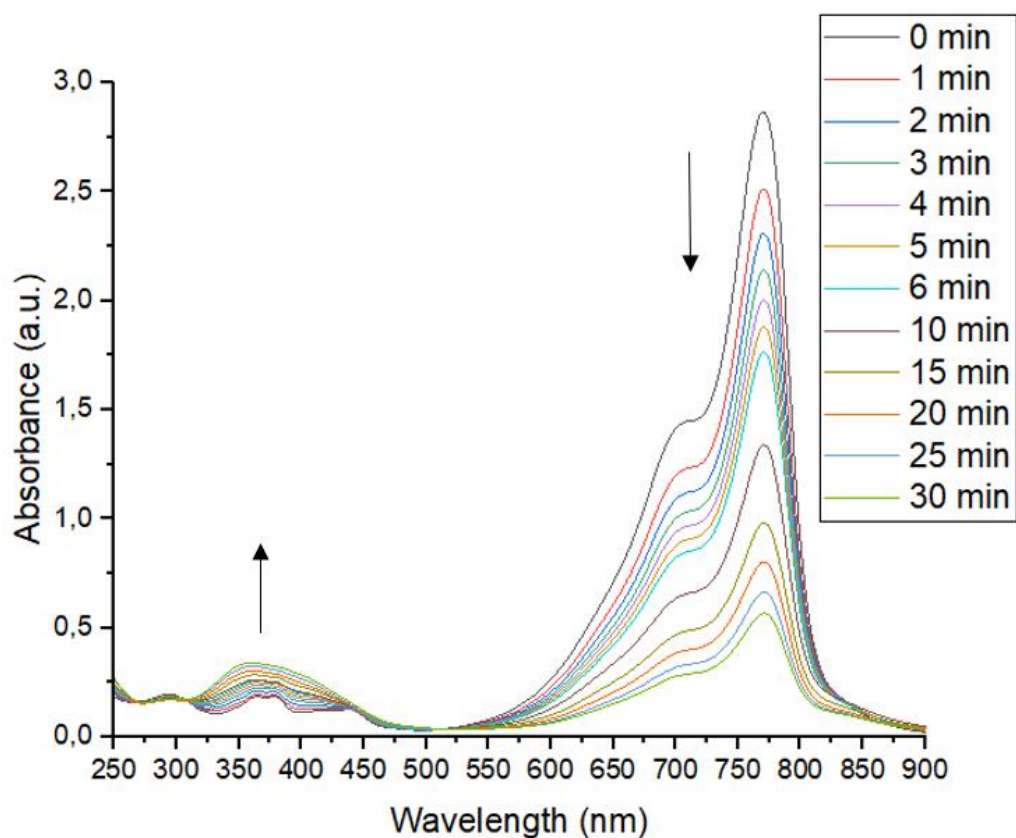
Η προσαρμόμενη γραμμική συνάρτηση περιγράφεται από την **Εξίσωση 10**.

$$A = A_0 + k_p \cdot t \quad (10)$$

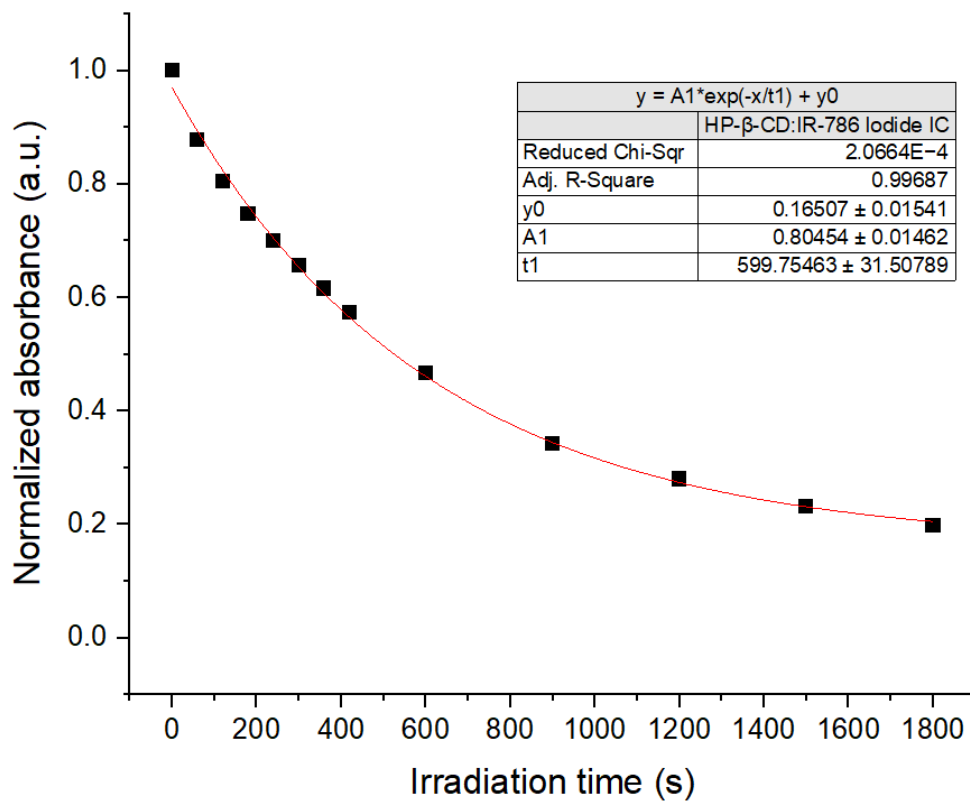
όπου A η κανονικοποιημένη απορρόφηση σε μήκος κύματος  $\lambda = 358 \text{ nm}$  και t ο χρόνος ακτινοβολήσης σε seconds (s).

Επομένως, η παραγωγή των προϊόντων φωτοαποδόμησης της ελεύθερης κυανίνης ακολουθεί κινητική μηδενικής τάξης και η κινητική σταθερά λαμβάνει μέση τιμή ίση με  $k_{p,\text{free}} = 1.09 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , με ο συντελεστή  $R^2 = 0.97$  να επιβεβαιώνει την ικανοποιητική προσαρμογή της γραμμικής εξίσωσης στα πειραματικά δεδομένα

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για τα δείγματα των συμπλόκων εγκλωβισμού της IR-786 Iodide με τις κυκλοδεξτρίνες HP- $\beta$ -CD,  $\beta$ -CD και  $\gamma$ -CD, προσαρμόζοντας κατάλληλο μαθηματικό μοντέλο για την κάθε περίπτωση.



**Σχήμα 6.27.** Φάσμα απορρόφησης του διαλύματος ακτινοβολήσης της εγκλωβισμένης κυανίνης στο σύμπλοκο HP- $\beta$ -CD:IR-786 Iodide IC, συναρτήσει του χρόνου στο πλαίσιο της μελέτης photobleaching.



**Σχήμα 6.28.** Διάγραμμα κανονικοποιημένης απορρόφησης της εγκλωβισμένης κυανίνης του συμπλόκου HP-β-CD:IR-786 Iodide IC, στα 770 nm συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης και προσαρμογή εκθετικής συνάρτησης mono-exponential στα πειραματικά δεδομένα.

Σύμφωνα με το **Σχήμα 6.28**, η κινητική φωτοαποδόμησης της εγκλωβισμένης κυανίνης στην HP-β-CD παρουσιάζει εκθετική μείωση μίας φάσης (mono-exponential decay) σε αντίθεση με την ελεύθερη κυανίνη. Η προσαρμογή μαθηματικού μοντέλου bi-exponential οδηγεί σε προεκθετικό παράγοντα  $A_2$  αμελητέας τιμής σε σχέση με τη σταθερά  $A_1$ , και γι' αυτό τον λόγο απορρίπτεται. Συνεπώς, το παραπάνω περιγράφεται μαθηματικά από την **Εξίσωση 11**.

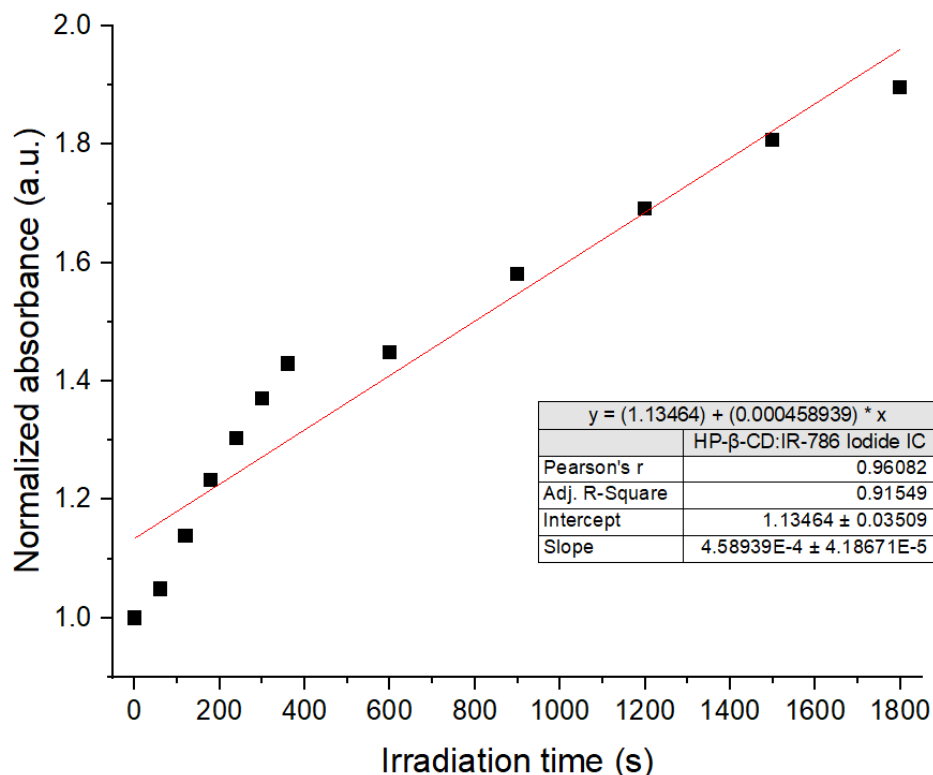
$$A = A_1 \cdot e^{-k_1 t} + c \quad (11)$$

Η μέση τιμή της κινητικής σταθεράς προκύπτει ίση με  $k_1 = \frac{1}{t_1} = 0.0017 \text{ s}^{-1}$  και ο χρόνος ημιζωής  $t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_1} = 416 \text{ s}$ , με τον ίδιο τρόπο που παρουσιάστηκε παραπάνω.

Επομένως, η συμπεριφορά bi-exponential που παρουσιάστηκε κατά την φωτοκαταστροφή της ελεύθερης κυανίνης και ο χαμηλός χρόνος ημιζωής (39 s) για την πρώτη φάση εκθετικής μείωσης, υποδεικνύουν την ταχύτητα αποδόμησης της φωτοευαίσθητης ένωσης κατόπιν ακτινοβολήσης με δέσμη κόκκινου laser. Ωστόσο, στην περίπτωση της συμπλοκοποιημένης κυανίνης με την HP-β-CD, στα πειραματικά δεδομένα παρουσιάζει καλύτερη προσαρμογή η συνάρτηση εκθετικής μείωσης μίας

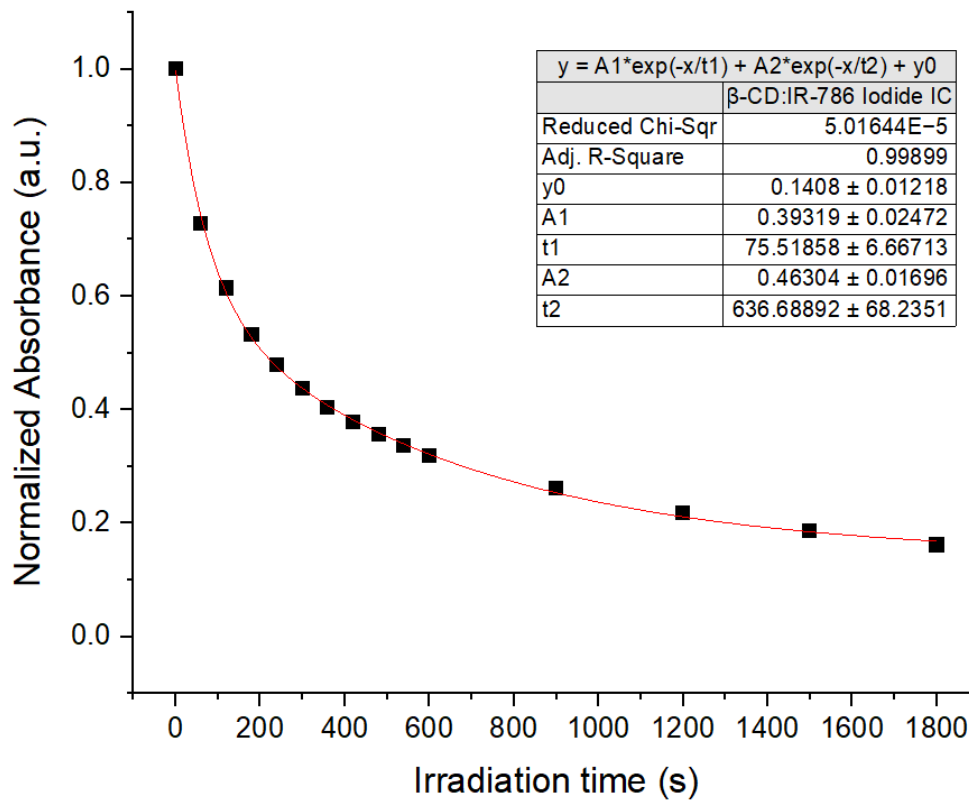
φάσης (mono-exponential decay), και ο αντίστοιχος χρόνος ημιζωής προκύπτει ίσος με 416 s, σηματοδοτώντας σημαντική μείωση στο ρυθμό της φωτοαποδόμησης.

Συνεπώς, η συμπλοκοποίηση της κυανίνης IR-786 Iodide με την HP-β-CD προσφέρει σημαντική φωτοπροστασία στην φωτοευαίσθητη ένωση.



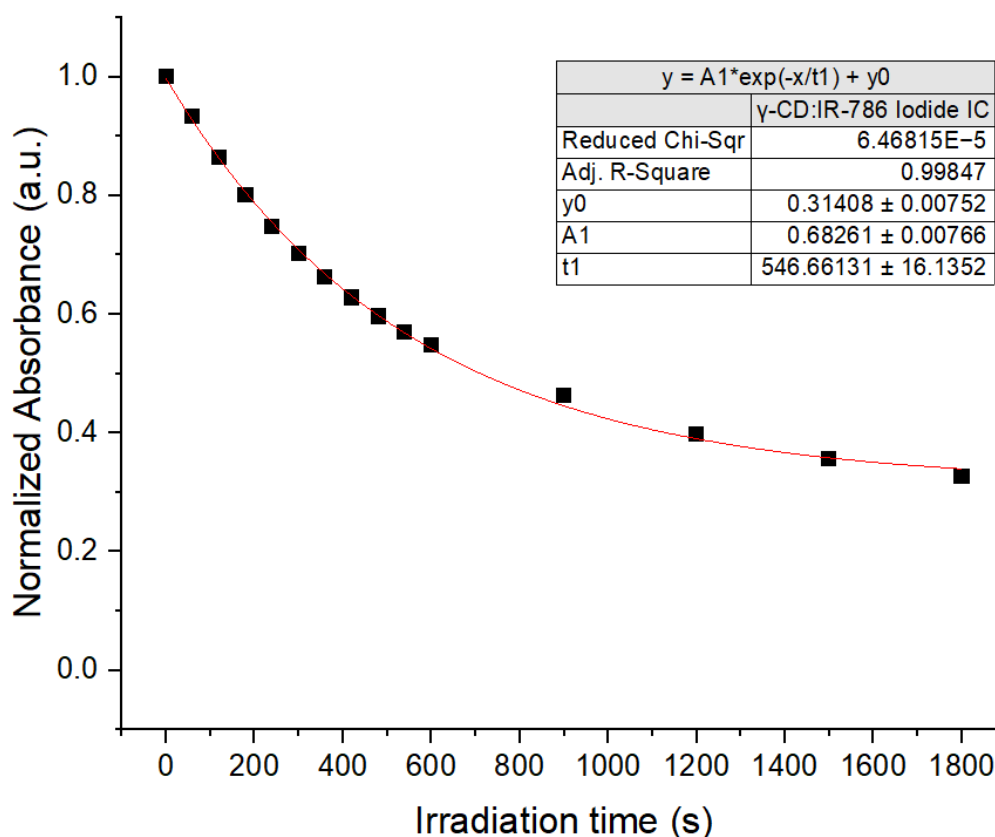
**Σχήμα 6.29.** Διάγραμμα κανονικοποιημένης απορρόφησης των προϊόντων φωτοαποδόμησης της συμπλοκοποιημένης IR-786 Iodide με την HP-β-CD, σε μήκος κύματος 358 nm συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης και προσαρμογή γραμμικής συνάρτησης στα πειραματικά δεδομένα.

Σχετικά με τα προϊόντα φωτοαποδόμησης, παρουσιάζεται κινητική μηδενικής τάξης, όπως και στην περίπτωση της ελεύθερης κυανίνης, με μέση τιμή της σταθεράς  $k_{p,HP-IC} = 4.59 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  και συντελεστή  $R^2 = 0.92$  της προσαρμοσμένης γραμμικής συνάρτησης (Σχήμα 6.29). Συγκριτικά με την ελεύθερη κυανίνη, στην περίπτωση του συμπλόκου με την HP-β-CD η σταθερά του ρυθμού παραγωγής φωτοπροϊόντων μειώνεται, το οποίο συνάδει με την επιβράδυνση στο ρυθμό φωτοκαταστροφής που προσφέρει ο φορέας HP-β-CD στη φωτοευαίσθητη ένωση.



**Σχήμα 6.30.** Διάγραμμα κανονικοποιημένης απορρόφησης της εγκλωβισμένης κυανίνης του συμπλόκου β-CD:IR-786 Iodide IC, στα 770 nm συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης και προσαρμογή εκθετικής συνάρτησης bi-exponential στα πειραματικά δεδομένα.

Αντίστοιχα, το σύμπλοκο β-CD:IR-786 Iodide IC παρουσιάζεται εκθετική φωτοποδόμηση δύο σταδίων (bi-exponential decay), όπως στην περίπτωση της ελεύθερης κυανίνης. Οι σταθερές της φωτοαποδόμησης υπολογίζονται ως εξής:  $k_1 = \frac{1}{t_1} = 0.0132 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = \frac{1}{t_2} = 0.0016 \text{ s}^{-1}$ , και οι χρόνοι ημιζωής των επιμέρους φάσεων προκύπτει  $t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_1} = 52 \text{ s}$  και  $t'_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_2} = 441 \text{ s}$  για την 1<sup>η</sup> και τη 2<sup>η</sup> εκθετική φάση, αντίστοιχα.

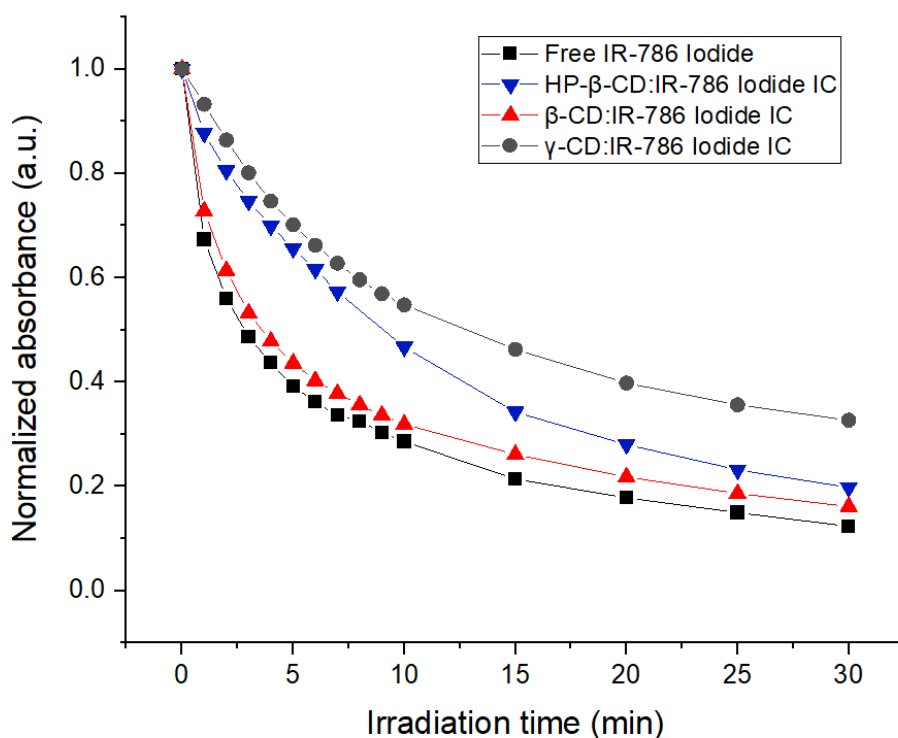


**Σχήμα 6.31.** Διάγραμμα κανονικοποιημένης απορρόφησης της εγκλωβισμένης κυανίνης του συμπλόκου γ-CD:IR-786 Iodide IC, στα 770 nm συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης και προσαρμογή εκθετικής συνάρτησης mono-exponential στα πειραματικά δεδομένα.

Σχετικά με το σύμπλοκο γ-CD:IR-786 Iodide IC παρουσιάζεται εκθετική φωτοαποδόμηση ενός σταδίου (mono-exponential decay), όπως και στην περίπτωση του συμπλόκου HP-β-CD:IR-786 Iodide IC. Η μέση τιμή της σταθεράς φωτοαποδόμησης υπολογίζεται ίση με  $k_1 = \frac{1}{t_1} = 0.0018 \text{ s}^{-1}$  και ο χρόνος ημιζωής  $t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_1} = 379 \text{ s}$ .

Για τη σύγκριση των φορέων HP-β-CD, β-CD και γ-CD ως προς την ικανότητά τους να προσφέρουν φωτοπροστασία στην κυανίνη IR-786 Iodide, συγκρίνονται οι καμπύλες της φωτοαποδόμησης των επιμέρους συμπλόκων (Σχήμα 6.32).





**Σχήμα 6.32.** Κανονικοποιημένη απορρόφηση σε μήκος κύματος  $\lambda_{max} = 770 \text{ nm}$  της ελεύθερης και της συμπλοκοποιημένης IR-786 Iodide στους φορείς HP-β-CD, β-CD και γ-CD, κατά την ακτινοβολία με δέσμη κόκκινου φωτός ( $P = 13 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$ ) για συνολικό χρόνο 30 min, σε διάλυμα 6% DMSO/PBS.

**Πίνακας 6.11.** Υπολογιζόμενες τιμές χρόνου ημιζωής των επιμέρους εκθετικών φάσεων για την ελεύθερη και τη συμπλοκοποιημένη IR-786 Iodide στις κυκλοδεξτρίνες HP-β-CD, β-CD και γ-CD.

Delivery Nanosystem	Fitted Model	R <sup>2</sup>	t <sub>1/2</sub> (s)	t' <sub>1/2</sub> (s)
Free IR-786 Iodide	Bi-exponential	0.999	39	406
HP-β-CD:IR-786 Iodide IC	Mono-exponential	0.997	416	-
β-CD:IR-786 Iodide IC	Bi-exponential	0.999	52	441
γ-CD:IR-786 Iodide IC	Mono-exponential	0.998	379	-

Σύμφωνα με το **Σχήμα 6.32** και τον **Πίνακα 6.11**, συμπεραίνεται ότι η συμπλοκοποίηση της κυανίνης με την κυκλοδεξτρίνη οδηγεί σε αύξηση του χρόνου ημιζωής της φωτοαποδόμησης. Για την περίπτωση του μοντέλου bi-exponential, συγκρίνονται οι χρόνοι ημιζωής της εκθετικής φάσης ταχείας φωτοαποδόμησης (t<sub>1/2</sub>). Πιο συγκεκριμένα, οι φορείς προσφέρουν καλύτερη φωτοπροστασία στη φωτοευαίσθητη κυανίνη με την εξής σειρά:

$$\text{HP-}\beta\text{-CD} > \gamma\text{-CD} \gg \beta\text{-CD}$$

Η παραπάνω σειρά συμπίπτει με αυτή της υδατοδιαλυτότητας των κυκλοδεξτρινών, γεγονός που αποδίδει μία φυσική ερμηνεία στο αποτέλεσμα. Η πλέον υδατοδιαλυτή κυκλοδεξτρίνη HP-β-CD σχηματίζει με μεγαλύτερη ευχέρεια σταθερά υπερμοριακά σύμπλοκα με την κυανίνη εντός της υδατικής φάσης, με αποτέλεσμα να προστατεύει την ένωση από την φωτοϋποβάθμιση. Αυτό συνάδει με το συμπέρασμα που προέκυψε από τη φασματοσκοπία ATR-FTIR, όπου παρατηρήθηκαν στο σύμπλοκο με την HP-β-CD οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις κορυφών, και κατ' επέκταση οι ισχυρότερες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, συγκριτικά με τα άλλα δύο σύμπλοκα της κυανίνης με την β-CD και την γ-CD.

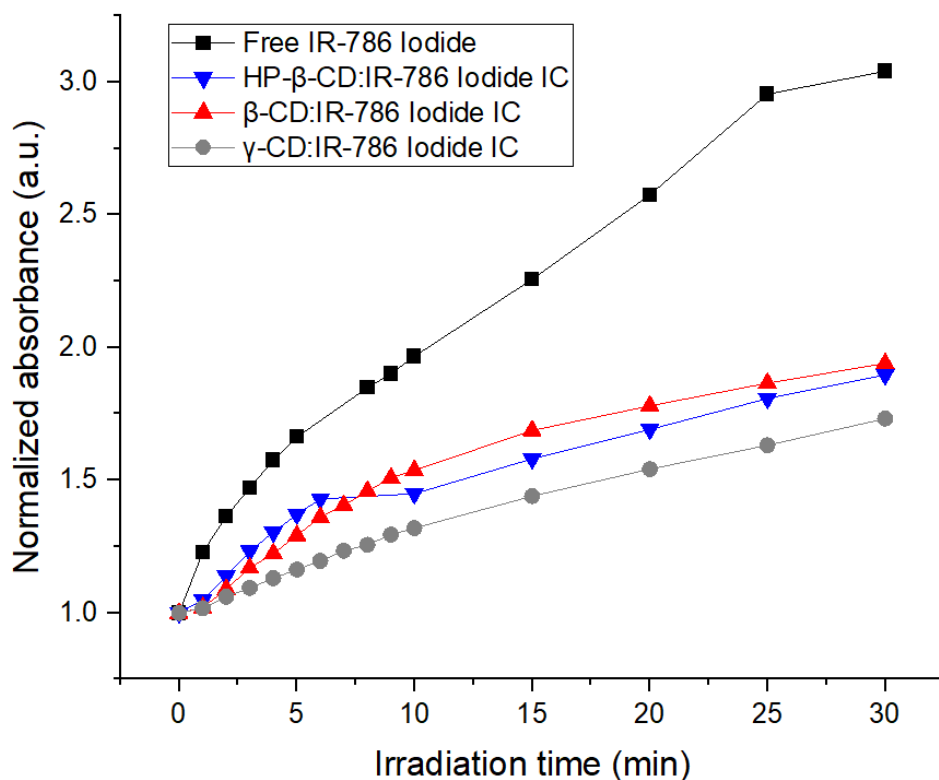
Επομένως, η επιλογή φόρτωσης του συμπλόκου HP-β-CD:IR-786 Iodide στο νανοσύστημα χιτοζάνης για περαιτέρω διερεύνηση, επιβεβαιώνεται ως ορθή με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα.

Αντίστοιχα συμπεράσματα προκύπτουν από τη σύγκριση των κινητικών σταθερών παραγωγής των προϊόντων φωτοαποδόμησης κατά τη μελέτη photobleaching (Πίνακας 6.12). Να σημειωθεί ότι σε αυτή την περίπτωση ο ρυθμός παραγωγής του φωτοπροϊόντος από το σύμπλοκο της HP-β-CD είναι ελαφρώς υψηλότερος από της γ-CD, το οποίο έρχεται σε αντιπαράθεση με την σειρά φωτοπροστασίας που εξήχθη από τη μελέτη photobleaching. Η διαφορά αυτή αποδίδεται στη μικρότερη ακρίβεια και ευαισθησία στη μελέτη κινητικής της παραγωγής του φωτοπροϊόντος, σε σχέση με τη μελέτη κινητικής του photobleaching, καθώς η απορρόφηση του προϊόντος αποδόμησης είναι σημαντικά χαμηλότερη από της κυανίνης, οδηγώντας έτσι σε σφάλματα.

**Πίνακας 6.12.** Σύγκριση της μέσης τιμής της κινητικής σταθεράς παραγωγής προϊόντων φωτοαποδόμησης της ελεύθερης και της συμπλοκοποιημένης IR-786 Iodide, στους φορείς HP-β-CD, β-CD και γ-CD.

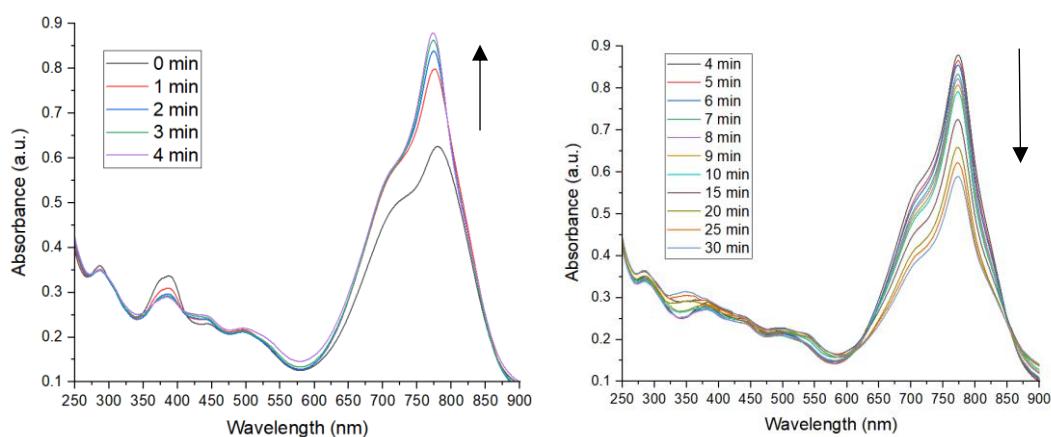
Delivery Nanosystem	Fitted Model	R <sup>2</sup>	k <sub>p</sub> (s <sup>-1</sup> )
Free IR-786 Iodide	Linear	0.97	1.09 · 10 <sup>-3</sup>
HP-β-CD:IR-786 Iodide IC	Linear	0.92	4.59 · 10 <sup>-4</sup>
β-CD:IR-786 Iodide IC	Linear	0.91	5.32 · 10 <sup>-4</sup>
γ-CD:IR-786 Iodide IC	Linear	0.98	4.10 · 10 <sup>-4</sup>

Στο **Σχήμα 6.33** συγκρίνονται τα σύμπλοκα της IR-786 Iodide με τους φορείς HP-β-CD, β-CD και γ-CD, ως προς το ρυθμό σχηματισμού του φωτοπροϊόντος.



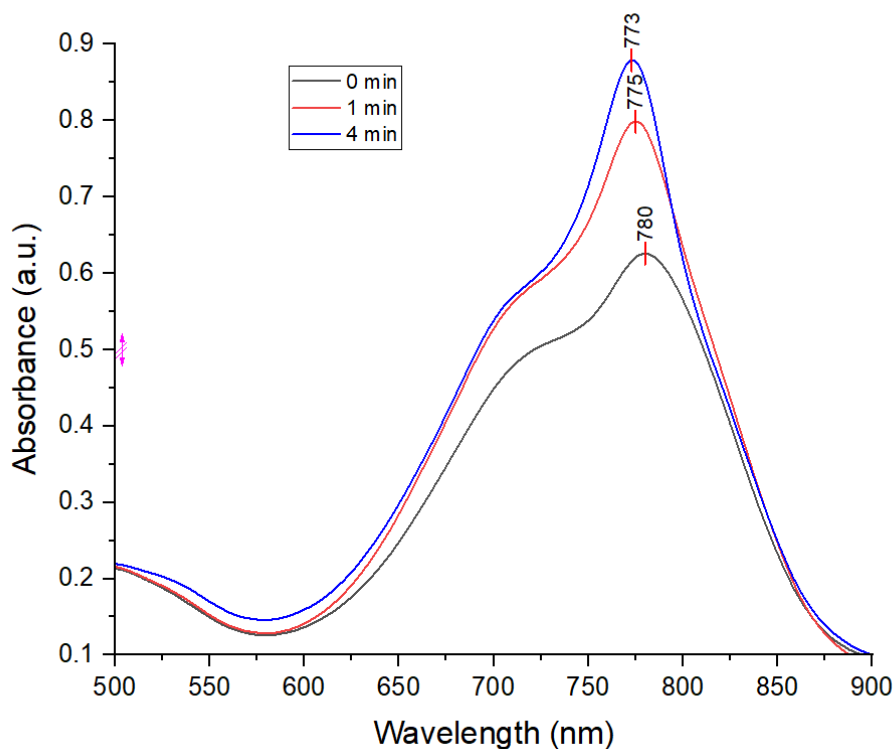
**Σχήμα 6.33.** Κανονικοποιημένη απορρόφηση σε μήκος κύματος  $\lambda_{max} = 358 \text{ nm}$  των προϊόντων φωτοαποδόμησης της ελεύθερης και συμπλοκοποιημένης IR-786 Iodide στους φορείς HP-β-CD, β-CD και γ-CD, κατά την ακτινοβολήση με δέσμη κόκκινου φωτός ( $P = 13 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$ ) για συνολικό χρόνο 30 min, σε διάλυμα 6% DMSO/PBS.

Σχετικά με την κινητική φωτοαποδόμησης των νανοσωματιδίων χιτοζάνης HP-β-CD:IR-786 Iodide-loaded CS NPs, παρουσιάζεται αρχικά αύξηση της απορρόφησης της κυανίνης κατά τα πρώτα 4 min ακτινοβολήσης και στη συνέχεια μείωση (Σχήμα 6.34), κάτι που δεν παρατηρείται σε κανένα από τα σύμπλοκα που μελετήθηκαν.



**Σχήμα 6.34.** Φάσμα απορρόφησης του διαλύματος ακτινοβολήσης των νανοσωματιδίων χιτοζάνης (HP-β-CD:IR-786 Iodide-loaded CS NPs) συναρτήσει του χρόνου στο πλαίσιο της μελέτης photobleaching.

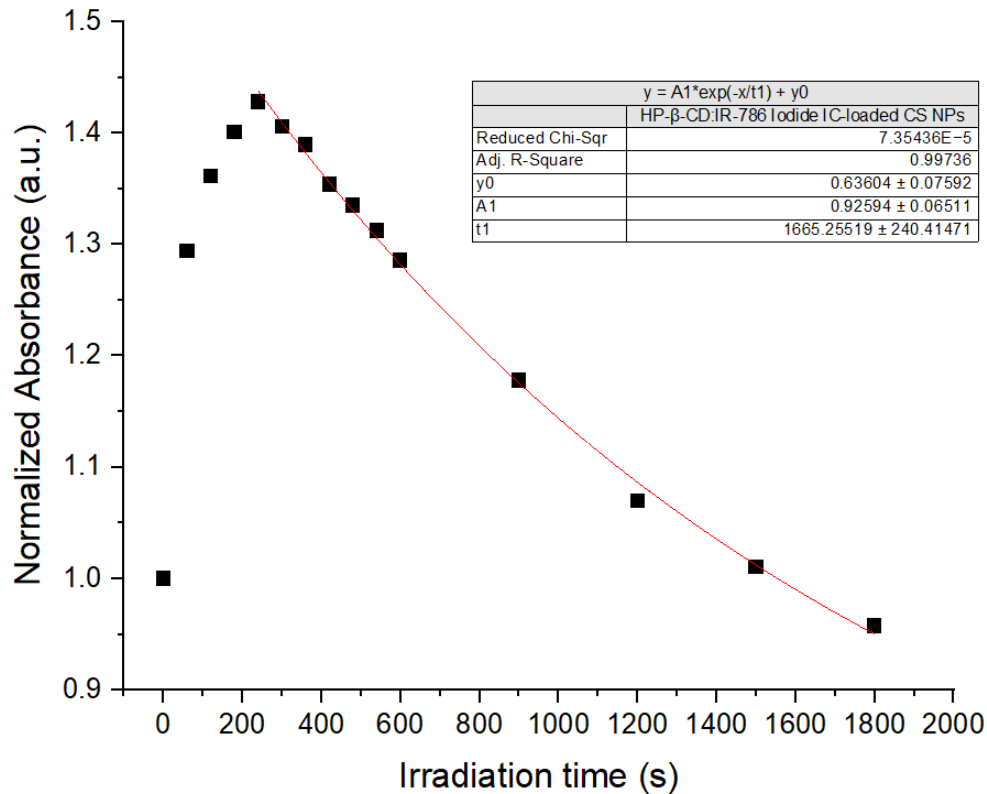
Η αύξηση της συγκέντρωσης της ελεύθερης κυανίνης στο μέσο ακτινοβόλησης στα πρώτα 4 min σηματοδοτεί την αποδέσμευσή της από τα νανοσωματίδια λόγω του προσπίπτοντος φωτός, δηλαδή γίνεται λόγος για τροποποιημένη αποδέσμευση ελεγχόμενη από την ακτινοβολία (light-responsive release). Το γεγονός ότι μετά τα 4 min η κορυφή της κυανίνης μειώνεται ως προς το χρόνο, σημαίνει ότι ο ρυθμός φωτοκαταστροφής της κυανίνης γίνεται υψηλότερος από το ρυθμό αποδέσμευσής της από τα νανοσωματίδια. Σχετικά με την επίδραση του φωτός στο μηχανισμό αποδέσμευσης, υπάρχουν δύο πιθανά σενάρια. Το πρώτο αφορά στην απόκριση του φορέα στο οξειδωτικό στρες που παράγει η κυανίνη που ελευθερώνεται τα πρώτα λεπτά ακτινοβόλησης, όπου οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες ενδεχομένως επάγουν μεταβολές στη δομή ή/και τη διαμόρφωση των αλυσίδων της χιτοζάνης στα νανοσωματίδια (ROS-responsive release). Η δεύτερη περίπτωση περιλαμβάνει την απευθείας επίδραση της προσπίπτουσας δέσμης στο υλικό του φορέα, η οποία συνεισφέρει στη διάβρωσή του και εν συνεχεία στην αποδέσμευση της κυανίνης. Για την αποσαφήνιση του μηχανισμού πρέπει να πραγματοποιηθεί το ίδιο πείραμα και με τα κενά νανοσωματίδια χιτοζάνης, καθώς και να ληφθούν φάσματα ATR-FTIR για την ανίχνευση τυχόν μεταβολών στη δομή της χιτοζάνης.



**Σχήμα 6.35.** Παρατηρούμενη μετατόπιση του μήκους κύματος μέγιστης απορρόφησης ( $\lambda_{max}$ ) της κυανίνης κατά τον εγκλωβισμό στα νανοσωματίδια χιτοζάνης (CS NPs)

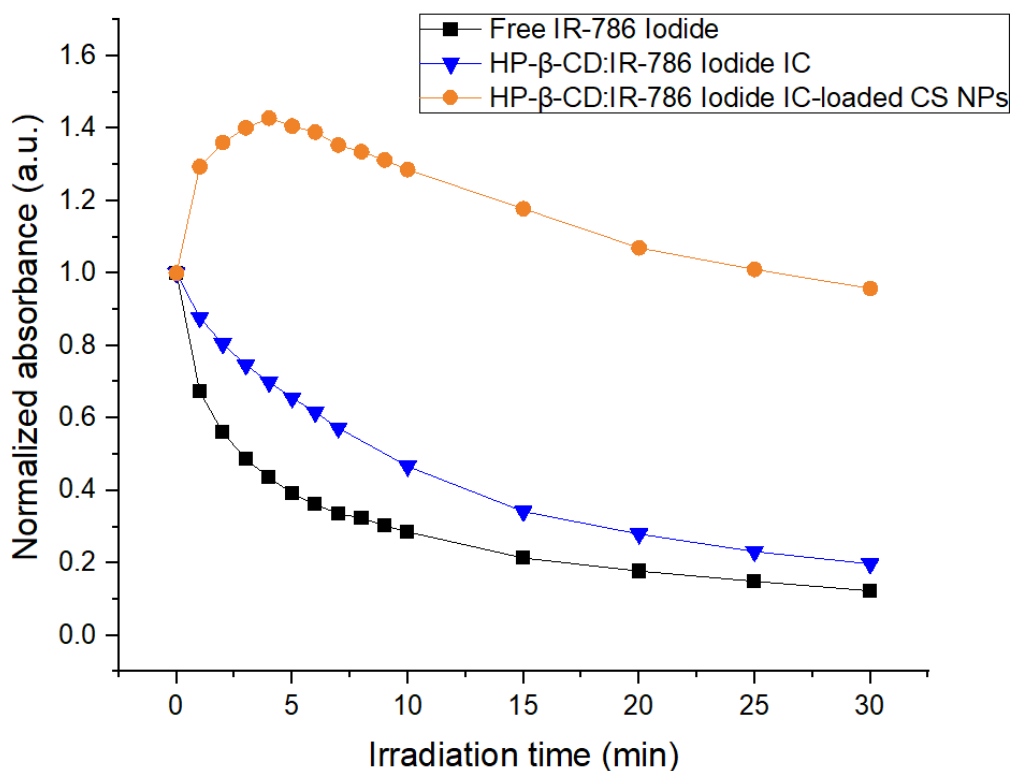
Ακόμα, αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των CS NPs, παρουσιάζεται μετατόπιση στο  $\lambda_{max}$  της μέγιστης απορρόφησης της κυανίνης, το οποίο στη χρονική στιγμή  $t = 0$  min ισούται με 780 nm, δηλαδή παρουσιάζει μετατόπιση κατά 10 nm σε σχέση με το  $\lambda_{max}$  της ελεύθερης κυανίνης (770 nm). Αυτό παρατηρείται συχνά κατά τον εγκλωβισμό ενώσεων σε νανοσυστήματα. [61], [102] Στη συνέχεια, σε χρονική

στιγμή  $t = 4 \text{ min}$  ακτινοβολήσης των νανοσωματιδίων χιτοζάνης, παρατηρείται μετατόπιση στα  $773 \text{ nm}$ , το οποίο αντιστοιχεί στην ελεύθερη κυανίνη υποδεικνύοντας η αποδέσμευσή της είναι ελεγχόμενη από την ακτινοβολία. (Σχήμα 6.35).



**Σχήμα 6.36.** Διάγραμμα κανονικοποιημένης απορρόφησης της εγκλωβισμένης κυανίνης στα νανοσωματίδια χιτοζάνης, στα  $773 \text{ nm}$  συναρτήσει του χρόνου ακτινοβολήσης και προσαρμογή εκθετικής συνάρτησης mono-exponential στα πειραματικά δεδομένα.

Προσαρμόζοντας μαθηματική συνάρτηση στα δεδομένα απορρόφησης μετά τα  $4 \text{ min}$ , που αντιστοιχούν στο photobleaching (Σχήμα 6.36) παρουσιάζεται εκθετική φωτοαποδόμηση ενός σταδίου (mono-exponential decay), όπως και στην περίπτωση του συμπλόκου HP-β-CD:IR-786 Iodide IC. Η μέση τιμή της σταθεράς φωτοαποδόμησης υπολογίζεται ίση με  $k_1 = \frac{1}{t_1} = 0.0006 \text{ s}^{-1}$  και ο χρόνος ημιζωής  $t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_1} = 1,155 \text{ s}$ .



**Σχήμα 6.37.** Κανονικοποιημένη απορρόφηση της ελεύθερης και της εγκλωβισμένης IR-786 Iodide στο σύμπλοκο με την HP-β-CD και τα νανοσωματίδια χιτοζάνης, κατά την ακτινοβολία για συνολικό χρόνο 30 min με δέσμη κόκκινου φωτός ( $P = 13 \frac{mW}{cm^2}$ ) σε διάλυμα 6% DMSO/PBS.

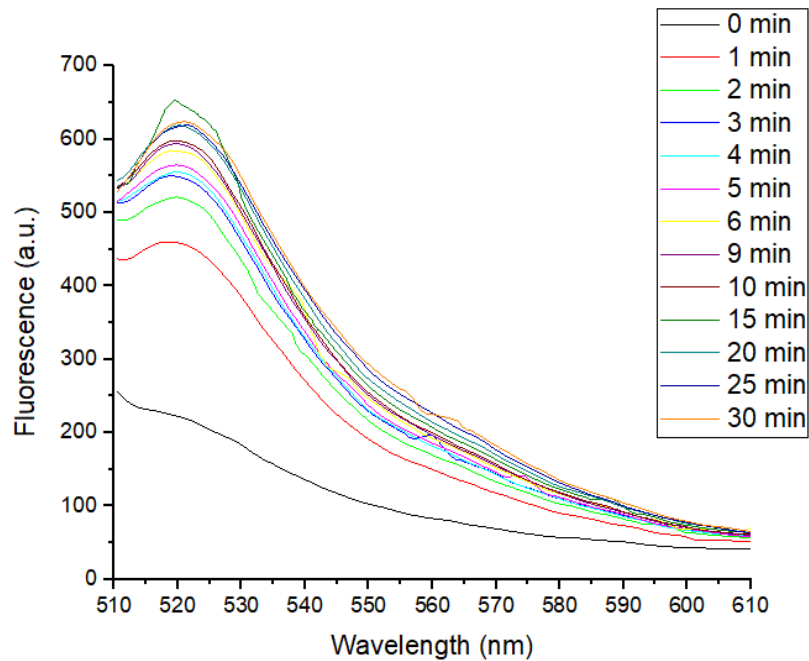
**Πίνακας 6.13.** Υπολογιζόμενες τιμές χρόνου ημιζωής για την ελεύθερη και την εγκλωβισμένη IR-786 Iodide στο σύμπλοκο και στα νανοσωματίδια χιτοζάνης.

Delivery Nanosystem	Fitted Model	R <sup>2</sup>	t <sub>1/2</sub> (s)
Free IR-786 Iodide	Mono-exponential	0.999	39
HP-β-CD:IR-786 Iodide IC	Mono-exponential	0.997	416
HP-β-CD:IR-786 Iodide IC-loaded CS NPS	Mono-exponential	0.997	1,155

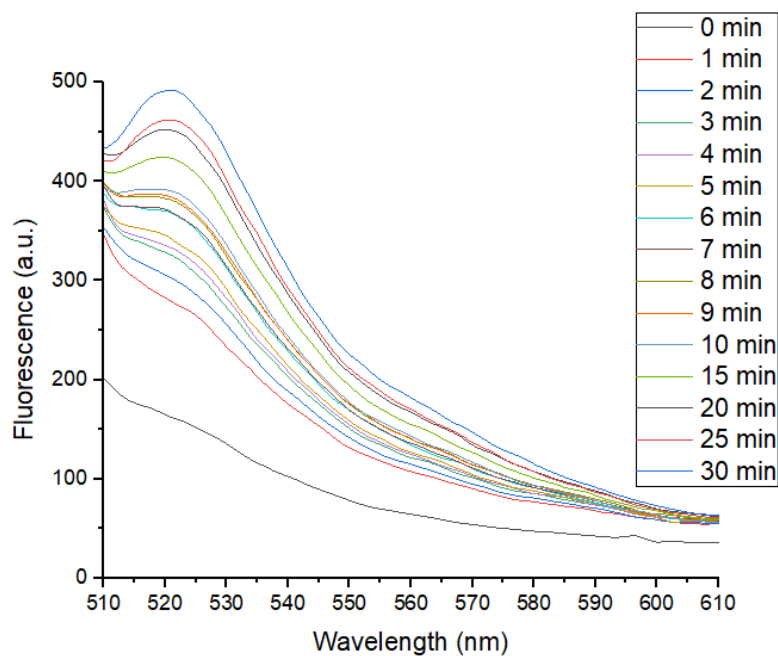
Από το **Σχήμα 6.37** και τον **Πίνακα 6.13**, παρατηρείται ότι μέσω της φόρτωσης του συμπλόκου στα νανοσωματίδια χιτοζάνης, επεκτείνεται περαιτέρω ο χρόνος ημιζωής της κυανίνης και ενισχύεται ακόμα περισσότερο η φωτοσταθερότητα.

### 6.6.2 Μελέτη Παραγωγής ROS

Στη μελέτη παραγωγής ROS εξετάζονται τα φάσματα φθορισμού του ιχνηθέτη DCF ως προς το χρόνο ακτινοβολήσης.

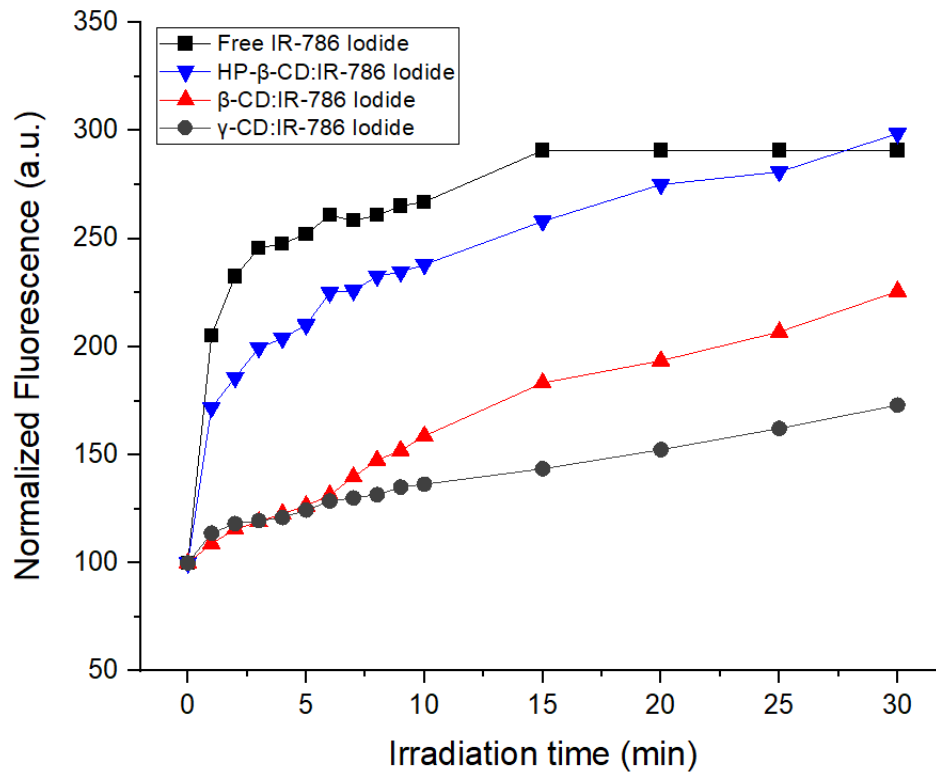


**Σχήμα 6.38.** Φάσμα φθορισμού του ιχνηθέτη DCF στην περίπτωση της ελεύθερης κυανίνης IR-786 Iodide συναρτήσει του χρόνου κατά τη μελέτη παραγωγής ROS.



**Σχήμα 6.39.** Φάσμα φθορισμού του ιχνηθέτη DCF στην περίπτωση της συμπλοκοποιημένης κυανίνης IR-786 Iodide με την HP-β-CD, συναρτήσει του χρόνου κατά τη μελέτη παραγωγής ROS.

Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται αύξηση της κορυφής φθορισμού της διχλωροφλουρορεσκεΐνης στα 520 nm, λόγω της παραγωγής ROS από τον φωτοευαισθητοποιητή κατά την ακτινοβόληση του διαλύματος. Στα **Σχήματα 6.38** και **6.39** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης παραγωγής ROS για τον ελεύθερο φωτοευαισθητοποιητή και τον συμπλοκοποιημένο στην HP-β-CD, αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα φάσματα παρατίθενται στο **Παράρτημα III**.



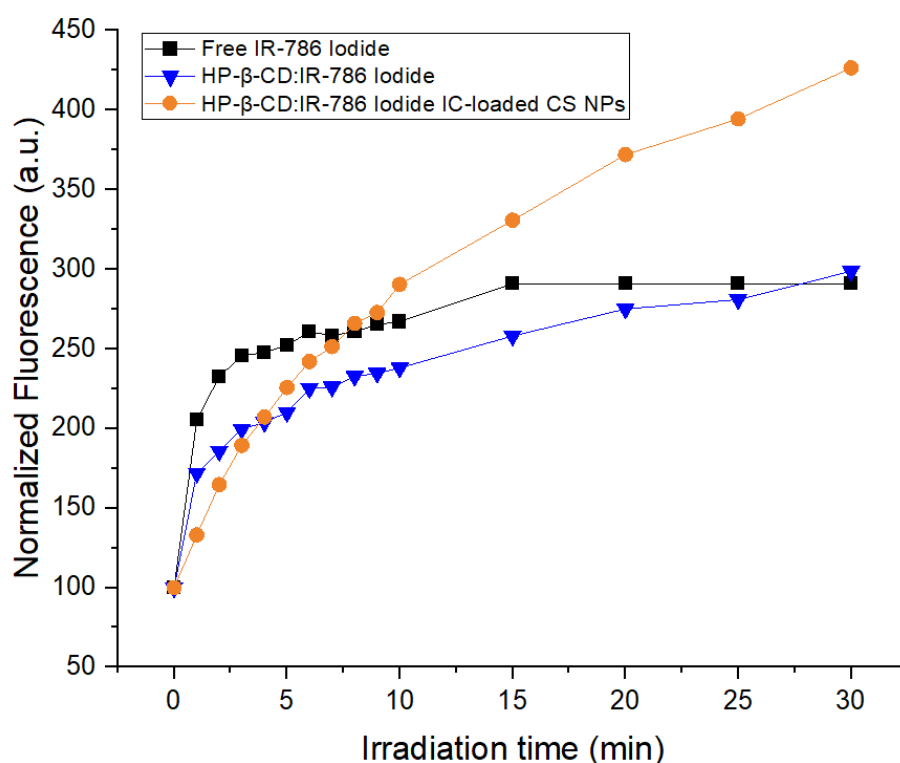
**Σχήμα 6.40.** Κανονικοποιημένο σήμα φθορισμού του ιχνηθέτη DCF σε μήκος κύματος  $\lambda_{max} = 520 \text{ nm}$ , για τις περιπτώσεις της ελεύθερης και της συμπλοκοποιημένης IR-786 Iodide στους φορείς HP-β-CD, β-CD και γ-CD, κατά την ακτινοβόληση για συνολικό χρόνο 30 min με δέσμη κόκκινου φωτός ( $P = 13 \frac{mW}{cm^2}$ ) σε διάλυμα 6% DMSO/PBS.

Στο **Σχήμα 6.40** παρουσιάζεται η μεταβολή της κανονικοποιημένης έντασης φθορισμού για την περίπτωση της ελεύθερης κυανίνης και της συμπλοκοποιημένης. Η ελεύθερη κυανίνη παράγει ROS με τον υψηλότερο ρυθμό, το οποίο είναι απόλυτα λογικό διότι βρίσκεται διαλελυμένη στο μέσο ακτινοβόλησης και υπόκειται κατευθείαν στις φωτοχημικές αντιδράσεις που σχετίζονται με την παραγωγή ελευθέρων ριζών, τις οποίες ανιχνεύει ο ιχνηθέτης DCF. Αντίθετα, στα σύμπλοκα παρατηρείται χαμηλότερος ρυθμός παραγωγής ROS, το οποίο αποδίδεται στην παρατεταμένη αποδέσμευση του εκάστοτε συστήματος μεταφοράς. Πιο συγκεκριμένα, ο ρυθμός παραγωγής ROS ακολουθεί τη σειρά **HP-β-CD > γ-CD > β-CD**, από τον υψηλότερο ρυθμό στον χαμηλότερο. Η σειρά αυτή συμπίπτει με της υδατοδιαλυτότητας των κυκλοδεξτρινών, όπως και στην περίπτωση της μελέτης photobleaching. Αυτό ερμηνεύεται από το γεγονός ότι η πλέον υδατοδιαλυτή HP-β-CD συνεισφέρει στην ελεγχόμενη διαλυτοποίηση της κυανίνης στο μέσο ακτινοβόλησης, και κατ' επέκταση στην παραγωγή ROS, ενώ παράλληλα αυξάνεται η φωτοσταθερότητά της όπως προέκυψε από τη μελέτη φωτοαποδόμησης.



**Πίνακας 6.14.** Υπολογιζόμενες τιμές του απαιτούμενου χρόνου ( $t_{50\%}$ ) για την επίτευξη του 50% της μέγιστης τιμής φθορισμού, για την ελεύθερη και τη συμπλοκοποιημένη IR-786 Iodide στις κυκλοδεξτρίνες HP-β-CD, β-CD και γ-CD.

Delivery Nanosystem	Fitted Model	$R^2$	$t_{50\%}$ (s)
Free IR-786 Iodide	Logarithmic $F = a - b \cdot \ln(t + c)$	0.96	49
HP-β-CD:IR-786 Iodide IC	Logarithmic $F = a - b \cdot \ln(t + c)$	0.98	189
β-CD:IR-786 Iodide IC	Linear $F = a + b \cdot t$	0.97	783
γ-CD:IR-786 Iodide IC	Linear $F = a + b \cdot t$	0.95	692



**Σχήμα 6.41.** Κανονικοποιημένο σήμα φθορισμού του ιχνηθέτη DCF σε μήκος κύματος  $\lambda_{max} = 520 \text{ nm}$ , για την ελεύθερη και την εγκλωβισμένη IR-786 Iodide, στο σύμπλοκο της HP-β-CD και στα νανοσωματίδια χιτοζάνης.

Από το **Σχήμα 6.41** παρατηρείται ότι η φόρτωση του συμπλόκου HP-β-CD:IR-786 Iodide στα νανοσωματίδια χιτοζάνης, παρατείνει και ενισχύει την παραγωγή ROS. Αυτό είναι αναμενόμενο δεδομένου ότι η πολυμερική μήτρα της χιτοζάνης που περιβάλλει το σύμπλοκο στα νανοσωματίδια, εμποδίζει την άμεση αποδέσμευση της κυανίνης. Η παρατεταμένη αποδέσμευση του συντεθειμένου νανοσυστήματος σε συνδυασμό με την αυξημένη φωτοσταθερότητα, είναι αρκετά ενθαρρυντική αναφορικά με την ενίσχυση της φωτοδυναμικής δράσης της κυανίνης και την αποφυγή εμφάνισης παρενεργειών που σχετίζονται με την συσσώρευση μεγάλης ποσότητας φωτοευαισθητοποιητή στον καρκινικό ιστό (οξύς πόνος κατά την ακτινοβολήση, φλεγμονώδης αντίδραση). Συνεπώς, αναμένεται η ποσότητα του

φωτοευαισθητοποιητή να αποδεσμεύεται σταδιακά και εκλεκτικά στον καρκινικό όγκο κατόπιν ακτινοβολήσης, και να καταναλώνεται για την παραγωγή των ελευθέρων ριζών επάγοντας αποπτωτικό θάνατο στα καρκινικά κύτταρα.

**Πίνακας 6.15.** Υπολογιζόμενες τιμές του απαιτούμενου χρόνου για την επίτευξη του 50% της μέγιστης τιμής φθορισμού ( $t_{50\%}$ ), για την για την ελεύθερη και την εγκλωβισμένη IR-786 Iodide στο σύμπλοκο και στα νανοσωματίδια χιτοζάνης.

Delivery Nanosystem	Fitted Model		R <sup>2</sup>	t <sub>50%</sub> (s)
Free IR-786 Iodide	Logarithmic	$F = a - b \cdot \ln(t + c)$	0.96	49
HP-β-CD:IR-786 Iodide IC	Logarithmic	$F = a - b \cdot \ln(t + c)$	0.98	189
HP-β-CD:IR-786 Iodide IC-loaded CS NPs	Logarithmic	$F = \ln(a + b \cdot t)$	0.97	538

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας αναπτύχθηκαν με επιτυχία δύο διαφορετικά νανοσυστήματα για τον εγκλωβισμό του φωτοευαισθητοποιητή IR-786 Iodide, έχοντας ως στόχο τη φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου με ταυτόχρονη απεικόνιση των καρκινικών όγκων.

Τα υπερμοριακά σύμπλοκα της κυανίνης με τις κυκλοδεξτρίνες HP-β-CD, β-CD και γ-CD συντέθηκαν επιτυχώς μέσω της μηχανοχημικής διεργασίας kneading, επιτυγχάνοντας ικανοποιητικές αποδόσεις διεργασίας 75%, 75% και 56% αντίστοιχα. Η απόδοση εγκλωβισμού της κυανίνης προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά ίση με 94%, 97% και 66% για τα σύμπλοκα HP-β-CD:IR-786 Iodide, β-CD:IR-786 Iodide και γ-CD:IR-786 Iodide, αντίστοιχα. Υψηλή απόδοση της τάξης του 96% σημειώθηκε και στα νανοσωματίδια χιτοζάνης (HP-β-CD:IR-786 Iodide IC-loaded CS NPs), τα οποία παρασκευάστηκαν μέσω της ιονικής πηκτωμάτωσης.

Σύμφωνα με τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός, η μέση υδροδυναμική διάμετρος των συμπλόκων σε υδατική διασπορά κυμάνθηκε από 147.3 έως 203.4 nm, με τιμές δείκτη πολυδιασποράς της τάξης του 0.450, ενώ το ζ-δυναμικό κυμάνθηκε από +27.5 mV έως τα +32.1 mV, υποδεικνύοντας ικανοποιητική κολλοειδή σταθερότητα. Το σύνθετο νανοςύστημα χιτοζάνης παρουσίασε υψηλότερη υδροδυναμική διάμετρο 294.4 nm και μέσο δείκτη PDI 0.333, όπου και οι δύο τιμές θεωρούνται αποδεκτές και αναμενόμενες. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέση υδροδυναμικής διάμετρος του ελεύθερου συμπλόκου προέκυψε χαμηλότερη από την τιμή των νανοσωματιδίων χιτοζάνης, το οποίο είναι αναμενόμενο, καθώς το σύμπλοκο ενσωματώνεται στην πολυμερική μήτρα μέσω της ιονικής πηκτωμάτωσης, με αποτέλεσμα να αυξάνεται το συνολικό μέγεθος του σωματιδίου.

Από τις υπολογιζόμενες μετατοπίσεις που παρουσιάζονται στα φάσματα ATR-FTIR των συμπλόκων HP-β-CD:IR-786, β-CD:IR-786 και γ-CD:IR-786 IC, παρατηρήθηκε ότι στα σύμπλοκα που έχουν προκύψει με φορέα την HP-β-CD, οι μετατοπίσεις σε γενικές γραμμές είναι υψηλότερες. Αυτό υποδεικνύει ότι η κυανίνη παρουσιάζει ευνοϊκότερη αλληλεπίδραση με την HP-β-CD κατά τη συμπλοκοποίηση σε σύγκριση με την β-CD και την γ-CD. Σχετικά με τα CS NPs, οι χαρακτηριστικές κορυφές της κυανίνης IR-786 Iodide, εμφανίστηκαν στο φάσμα των νανοσωματιδίων χιτοζάνης στους ίδιους κυματάριθμους με το φάσμα του συμπλόκου. Από αυτό συμπεραίνεται ότι η κυανίνη βρίσκεται συμπλοκοποιημένη με την HP-β-CD κατά την φόρτωση του συμπλόκου στο τελικό νανοςύστημα. Ακόμα, παρατηρήθηκε σημαντική μετατόπιση στην κορυφή των πρωτοταγών αμινομάδων της χιτοζάνης, γεγονός που αποδεικνύει την αλληλεπίδραση του πολυμερούς με τον cross-linker TPP, κατά το σχηματισμό του σύνθετου νανοςυστήματος μέσω της ιονικής πηκτωμάτωσης.

Αναφορικά με τις οπτικές ιδιότητες, αποδείχθηκε ότι η συμπλοκοποίηση με την HP-β-CD εμποδίζει το διμερισμό της υδρόφοβης κυανίνης, με αποτέλεσμα να περιορίζεται σημαντικά η συσσωμάτωση στα υδατικά διαλύματα, και κατ' επέκταση να αίρονται σε ένα βαθμό οι περιορισμοί που αφορούν στη χαμηλή υδατοδιαλυτότητα της IR-786 Iodide.

Από τη μελέτη φωτοαποδόμησης (photobleaching) προέκυψε ότι η συμπλοκοποίηση της κυανίνης με την κυκλοδεξτρίνη οδηγεί σε αύξηση του χρόνου ημιζωής. Πιο συγκεκριμένα, η συμπλοκοποίηση με την HP-β-CD προσέφερε τη μέγιστη φωτοπροστασία στην κυανίνη. Η πλέον υδατοδιαλυτή κυκλοδεξτρίνη HP-β-CD σχηματίζει με μεγαλύτερη ευχέρεια σταθερά υπερμοριακά σύμπλοκα με την κυανίνη εντός της υδατικής φάσης, με αποτέλεσμα να προστατεύει την ένωση από την φωτοϋποβάθμιση. Αυτό συνάδει με το συμπέρασμα που προέκυψε από τη φασματοσκοπία ATR-FTIR, όπου παρατηρήθηκαν στο σύμπλοκο με την HP-β-CD οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις κορυφών, και κατ' επέκταση οι ισχυρότερες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, συγκριτικά με τα άλλα δύο σύμπλοκα της κυανίνης, με την β-CD και την γ-CD. Επομένως, η επιλογή της φόρτωσης του συμπλόκου HP-β-CD:IR-786 Iodide στο νανοσύστημα χιτοζάνης για περαιτέρω διερεύνηση, επιβεβαιώνεται ως ορθή με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα.

Στην περίπτωση της φωτοαποδόμησης των CS NPs, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της ελεύθερης κυανίνης στο μέσο ακτινοβολήσης στα πρώτα 4 min σηματοδοτώντας την αποδέσμευσή της από τα νανοσωματίδια λόγω του προσπίπτοντος φωτός. Επομένως, πρόκειται για τροποποιημένη αποδέσμευση ελεγχόμενη από την ακτινοβολία (light-responsive release), το οποίο αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα για την εκλεκτική αποδέσμευση του φωτοευαίσθητοποιητή εντός του καρκινικού όγκου.

Από τη μελέτη παραγωγής ROS, παρατηρήθηκε ότι στα σύμπλοκα εμφανίζεται χαμηλότερος ρυθμός παραγωγής των ελευθέρων ριζών σε σχέση με την ελεύθερη κυανίνη, το οποίο αποδίδεται στην παρατεταμένη αποδέσμευση του εκάστοτε συστήματος μεταφοράς. Πιο συγκεκριμένα, ο ρυθμός παραγωγής ROS ακολούθησε τη σειρά: HP-β-CD > γ-CD > β-CD, από τον υψηλότερο ρυθμό στον χαμηλότερο. Η σειρά αυτή συμπίπτει με τη σειρά υδατοδιαλυτότητας των κυκλοδεξτρινών, όπως και στην περίπτωση της μελέτης photobleaching. Αυτό ερμηνεύεται από το γεγονός ότι η πλέον υδατοδιαλυτή HP-β-CD συνεισφέρει στην ελεγχόμενη διαλυτοποίηση της κυανίνης στο μέσο ακτινοβολήσης, και κατ' επέκταση στην παραγωγή ROS, ενώ παράλληλα αυξάνεται η φωτοσταθερότητά της, όπως προέκυψε από τη μελέτη φωτοαποδόμησης.

Τέλος, παρατηρήθηκε ότι η φόρτωση του συμπλόκου HP-β-CD:IR-786 Iodide στα νανοσωματίδια χιτοζάνης, παρατείνει και ενισχύει την παραγωγή ROS. Η παρατεταμένη αποδέσμευση του συντεθειμένου νανοσυστήματος σε συνδυασμό με την αυξημένη φωτοσταθερότητα, είναι αρκετά ενθαρρυντική αναφορικά με την ενίσχυση της φωτοδυναμικής δράσης της κυανίνης και την αποφυγή εμφάνισης παρενεργειών που σχετίζονται με την συσσώρευση μεγάλης ποσότητας φωτοευαίσθητοποιητή στον καρκινικό ιστό. Συνεπώς, αναμένεται η ποσότητα του φωτοευαίσθητοποιητή να αποδεσμεύεται σταδιακά και εκλεκτικά στον καρκινικό όγκο κατόπιν ακτινοβολήσης, και να καταναλώνεται για την παραγωγή των ελευθέρων ριζών, επάγοντας αποπτωτικό θάνατο στα καρκινικά κύτταρα.

## ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

- Λήψη φασμάτων ATR-FTIR για τα κενά (blank) νανοσωματίδια χιτοζάνης.
- Λήψη φασμάτων ATR-FTIR για το φυσικό μείγμα HP-β-CD/IR-786 Iodide και CS/HP-β-CD/IR-786 Iodide.
- Μελέτη φωτοαποδόμησης των κενών νανοσωματιδίων χιτοζάνης για την αποσαφήνιση της επίδρασης της ακτινοβολίας στο μηχανισμό αποδέσμευσης της κυανίνης.
- Μελέτη φωτοαποδόμησης και παραγωγής ROS σε όξινο pH για την εξέταση ενδεχομένου εμφάνισης αποδέσμευσης ελεγχόμενης από το όξινο μικροπεριβάλλον του καρκινικού όγκου.
- Αξιολόγηση φωτοδυναμικής δράσης των ανεπτυγμένων νανοσυστημάτων σε σειρά καρκινικών κυττάρων και μελέτη πρόσληψης του φωτοευαισθητοποιητή από τα κύτταρα (cellular uptake). Αξιολόγηση κυτταροτοξικότητας στο σκοτάδι.
- Διερεύνηση συνθηκών ακτινοβολήσης για την εύρεση ενδεχόμενης φωτοθερμικής δράσης (photothermal effect) της κυανίνης παράλληλα με το φωτοεπαγώμενο οξειδωτικό στρες (συνδυασμός PDT/PTT).
- Μικροσκοπία φθορισμού σε καλλιέργεια καρκινικών κυττάρων για την μελέτη του προφίλ αποδέσμευσης της κυανίνης εντός των κυττάρων μέσω του εκπεμπόμενου φθορισμού.
- Υπολογισμός κβαντικής απόδοσης του κυανικού αναλόγου IR-786 Iodide και της συμπλοκοποιημένης του μορφής.
- Λήψη φασμάτων 2D NMR για την ταυτοποίηση των υπερμοριακών αλληλεπιδράσεων στα σύμπλοκα.
- Δομικός χαρακτηρισμός των συμπλόκων και των νανοσωματιδίων χιτοζάνης μέσω θερμικών τεχνικών ανάλυσης (TGA, DSC).
- Δομικός χαρακτηρισμός μέσω περίθλασης ακτίνων X (XRD) για τη μελέτη της κρυσταλλικότητας στην ελεύθερη κυανίνη και στα σύμπλοκα εγκλωβισμού.
- Μελέτη Job's plot για την εύρεση της στοιχειομετρίας των συμπλόκων.
- Μελέτη διαλυτότητας φάσεων για την εύρεση των σταθερών συμπλοκοποίησης.
- Περαιτέρω μελέτη λειτουργικών παραμέτρων (λ.χ. αναλογία συμπλόκου/χιτοζάνης, συγκέντρωση TPP) της ιονικής πηκτωμάτωσης και αξιολόγηση της επίδρασής τους στις φωτοφυσικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων.
- Μορφολογικός χαρακτηρισμός των συμπλόκων και των νανοσωματιδίων μέσω μικροσκοπίας ατομικών δυνάμεων AFM.

## ΣΥΝΕΙΣΦΟΡΑ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΚΤΑΣΕΙΣ

Τα νανοσύστηματα μεταφοράς που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία για τη συμπλοκοποίηση της κυανίνης IR-786 Iodide, δύναται να αποτελέσουν μία καινοτόμο αφετηρία για την ανοικοδόμηση πολυπλοκότερων λειτουργικών νανοδομών, έχοντας ως βάση τις υπερμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της κυανίνης και της κυκλοδεξτρίνης. Συγκεκριμένα, το σύμπλοκο εγκλωβισμού της IR-786 Iodide με την τροποποιημένη κυκλοδεξτρίνη HP-β-CD, το οποίο κρίνεται ως η βέλτιστη σύνθεση στην παρούσα μελέτη, μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε αυτοτελώς ως μία βιοσυμβατή φαρμακευτική φόρμουλα που συνδυάζει τη φωτοδυναμική θεραπεία με την απεικόνιση του καρκινικού όγκου μέσω φθορισμού σε πραγματικό χρόνο, αλλά και ως δομικό στοιχείο για την ενσωμάτωση της IR-786 Iodide σε νέα νανοϋλικά, τα οποία θα συνδυάζουν επιπλέον θεραπευτικές (ανοσοθεραπεία, χημειοθεραπεία, ραδιοθεραπεία) ή/και διαγνωστικές λειτουργικότητες (MRI, CT, PET). Η προέκταση αυτή είναι κρίσιμη για περιπτώσεις ιδιαίτερα δυσπρόσιτων και επιθετικών καρκίνων, όπως το γλοιοβλάστωμα, μία επιθετική μορφή μεταστατικού καρκίνου στον εγκέφαλο με ελάχιστες εξαιρέσεις ασθενών που κατάφεραν να επιβιώσουν. Δυστυχώς, οι προσπάθειες της επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία 30 έτη δεν έχουν αποδώσει ακόμα νέους αποτελεσματικούς τρόπους αντιμετώπισης και εν τέλει θεραπείας. [115], [116], [117]

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] World Health Organization, «Health Topics: Cancer,» [Ηλεκτρονικό]. Available: [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1). [Πρόσβαση 3 September 2022].
- [2] S. Kanwal, Effect of O-GlcNAcylation on tamoxifen sensitivity in breast cancer derived MCF-7 cells, Universit´e Ren´e Descartes - Paris V, 2013.
- [3] National Cancer Institute, «What is Cancer?,» 5 May 2021. [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. [Πρόσβαση 3 September 2022].
- [4] H. Nagai και Y. H. Kim, «Cancer prevention from the perspective of global cancer burden,» *J Thorac Dis* 2017;9(3):448-451, 9 March 2017.
- [5] R. L. Siegel, K. D. Miller, H. E. Fuchs και A. Jemal, «Cancer statistics, 2022,» *CA Cancer J Clin* 2022;72:7-33., 12 January 2022.
- [6] C. Roma-Rodrigues, R. Mendes , P. V. Baptista και A. R. Fernandes, «Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy». *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 840.
- [7] E. Boedtkjer και S. F. Pedersen, «The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer». *Annu. Rev. Physiol.* 2020. 82:21.1–21.24.
- [8] J. P. Fernández, K. A. Luddy, C. Harmon και C. O’Farrelly, «Hepatic Tumor Microenvironments and Effects on NK Cell Phenotype and Function». *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20.
- [9] H. F. Tibbals, Medical nanotechnology and nanomedicine, CRC Press, 2011.
- [10] S. Tohme, R. L. Simmons και A. Tsung, «Surgery for Cancer: A Trigger for Metastases». *Cancer Res.* 2017 Apr 1;77(7):1548-1552.
- [11] B. Orneala, C. Lawson, S. Rouleau και L.-H. Tai, «Combining surgery and immunotherapy: turning an immunosuppressive effect into a therapeutic opportunity». *j. immunotherapy cancer* 6, 86 (2018).
- [12] M. T. Amjad, A. Chidharla και A. Kasi, «Cancer Chemotherapy». *StatPearls Publishing;* 2022.
- [13] K. Nurgali, R. T. Jagoe και R. Abalo, «Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae?». *Front Pharmacol.* 2018 Mar 22;9:245.
- [14] H. Al-Samkari και G. A. Soff, «Clinical challenges and promising therapies for chemotherapy-induced thrombocytopenia». *Expert Review of Hematology*, 2021.

- [15] O. Pich, A. Cortes-Bullich, F. Muiños, M. Pratcorona, A. Gonzalez-Perez και N. Lopez-Bigas, «The evolution of hematopoietic cells under cancer therapy». *Nat Commun* 12, 4803 (2021).
- [16] B. Lin, F. Gao, Y. Yang, D. Wu, Y. Zhang, G. Feng, T. Dai και X. Du, «FLASH Radiotherapy: History and Future». *Front. Oncol.*, 25 May 2021.
- [17] W. D. Newhauser, A. Berrington de Gonzalez, R. Schulte και C. Lee, «A Review of Radiotherapy-Induced Late Effects Research after Advanced Technology Treatments». *Front Oncol.* 2016 Feb 10;6:13.
- [18] L. B. Travis, D. Hill, G. M. Dores, M. Gospodarowicz, F. E. van Leeuwen, E. Holowaty, b. Glimelius, M. Andersson, E. Pukkala, C. F. Lynch, D. Pee, S. A. Smith, M. B. Van't Veer, T. Joensuu, H. Storm, M. Stovall, J. D. Boice Jr, E. Gilbert και M. H. Gail, «Cumulative absolute breast cancer risk for young women treated for Hodgkin lymphoma». *J Natl Cancer Inst.* 2005 Oct 5;97(19):1428-37.
- [19] A. Ruiz-de-Angulo, M. Bilbao-Asensio, J. Cronin, S. J. Evans, J. D. M. Clift, J. Llop, I. V. J. Feiner, R. Beadman, K. Z. Bascaran και J. C. Mareque-Rivas, «Chemically Programmed Vaccines: Iron Catalysis in Nanoparticles Enhances Combination Immunotherapy and Immunotherapy-Promoted Tumor Ferroptosis». *iScience*, vol 23, no. 9, p. 101499, 2020.
- [20] S. Taefehshokr, A. Parhizkar, S. Hayati, M. Mousapour, A. Mahmoudpour, L. Eleid, D. Rahmanpour, S. Fattahi, H. Shabani και N. Taefehshokr, «Cancer immunotherapy: Challenges and limitations». *Pathology - Research and Practice*, vol. 229, p. 153723, 2022..
- [21] S. Jha, P. K. Sharma και R. Malviya, «Hyperthermia: Role and Risk Factor for Cancer Treatment». *Achievements in the Life Sciences*, Volume 10, Issue 2, December 2016, Pages 161-167.
- [22] J. F. Algorri, M. Ochoa, P. Roldán-Varona, L. Rodríguez-Cobo και J. M. López-Higuera, «Photodynamic Therapy: A Compendium of Latest Reviews». *Cancers (Basel)*. 2021 Sep 3;13(17):4447.
- [23] J. H. Correia, J. A. Rodrigues, S. Pimenta, T. Dong και Z. Yang, «Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions». *Pharmaceutics* 2021, 13, 1332.
- [24] A. B. Mihoub, L. Larue, A. Moussaron, Z. Youssef, L. Colombeau, F. Baros, C. Frochot, R. Vanderesse και S. Acherar, «Use of Cyclodextrins in Anticancer Photodynamic Therapy Treatment». *Molecules*. 2018 Aug 2;23(8):1936.
- [25] C. C. Horgan, M. S. Bergholt, A. Nagelkerke, M. Z. Thin, I. J. Pence, U. Kauscher, T. L. Kalber, D. J. Stuckey και M. M. Stevens, «Integrated photodynamic Raman theranostic system for cancer diagnosis, treatment, and post-treatment molecular monitoring». *Theranostics*. 2021 Jan 1;11(4):2006-2019.



- [26] D. Tzerkovsky και Y. Protopovich, «PHOTODYNAMIC THERAPY IN CLINICAL ONCOLOGY: WHAT WE NEED TO KNOW ABOUT THE METHOD?». *International Journal of Medical Science and Health Research*, Vol. 2, No. 01; 2018.
- [27] J. d. Hayes, A. T. Dinkova-Kostova και K. d. Tew, «Oxidative Stress in Cancer,» *Cancer Cell* 38, Issue 2, p167-197, August 10, 2020.
- [28] E. Panzarini, E. Inguscio και L. Dini, «Overview of Cell Death Mechanisms Induced by Rose Bengal Acetate-Photodynamic Therapy,» *International Journal of Photoenergy*, Volume 2011, Article ID 713726, 11 pages.
- [29] R. K. Iles, «Chapter 1: Normal Cell,» σε *Urological oncology, second edition*, Springer London, 2015, pp. 1-38.
- [30] J. Xie, Y. Wang, W. Choi, P. Jangili, Y. Ge, Y. Xu, J. Kang, L. Liu, B. Zhang, Z. Xie, J. He, N. Xie, G. Nie, H. Zhang και J. S. Kim, «Overcoming barriers in photodynamic therapy harnessing nano-formulation strategies,» *Chem. Soc. Rev.*, 2021, 50, 9152–9201.
- [31] D. Dave, U. Desai και N. Despande, «Photodynamic Therapy: A View through Light» *Journal of Orofacial Research*, April-June 2012;2(2):82-86.
- [32] L. F. de Freitas και M. R. Hamblin, «Chapter 1 - Antimicrobial photoinactivation with functionalized fullerenes,» σε *Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy, Applications of Nanobiomaterials Volume 6*, 2016, pp. 1-27.
- [33] S. Mallidi, S. Anbil, A.-L. Bulin, G. Obaid, M. Ichikawa και T. Hasan, «Beyond the Barriers of Light Penetration: Strategies, Perspectives and Possibilities for Photodynamic Therapy,» *Theranostics* 2016; 6(13):2458-2487.
- [34] S. Saumya, J. Saloni, K. Deepak, S. S. Lal και S. Mukesh, «A Review on - Theranostics: An Approach to Targeted Diagnosis and Therapy,» *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*. 2019; 7(2):63-69.
- [35] P. Rai, S. Mallidi, X. Zheng, R. Rahmazzadeh, Y. Mir, S. Elrington, A. Khurshid και T. Hasan, «Development and applications of photo-triggered theranostic agents,» *Advanced Drug Delivery Reviews* 62 (2010) 1094–1124.
- [36] S. Xu, A.-L. Bulin, A. Hurbin, H. Elleaume, J.-L. Coll και M. Broekgaarden, «Photodynamic Diagnosis and Therapy for Peritoneal Carcinomatosis: Emerging Perspectives,» *Cancers* 2020, 12, 2491.
- [37] C. W. Barth και S. L. Gibbs, «Fluorescence Image-Guided Surgery – a Perspective on Contrast Agent Development,» *Proc SPIE Int Soc Opt Eng*. 2020 Feb;11222:112220J.
- [38] M. Vermandel, C. Dupont, F. Lecomte, H.-A. Leroy, C. Tuleasca, S. Mordon, C. G. Hadjipanayis και N. Reyns, «Standardized intraoperative 5-ALA photodynamic therapy for newly diagnosed glioblastoma patients: a preliminary analysis of the INDYGO clinical trial» *J Neurooncol* 152, 501–514 (2021)..

- [39] G. Gunaydin, M. E. Gedik και S. Ayan, «Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches,» *Front. Chem.* 9:691697.
- [40] U. Kaw, M. Ilyas, T. Bullock, L. Rittwage, M. Riha, A. Vidimos, B. Hu, C. B. Warren και E. Maytin, «A regimen to minimize pain during blue light photodynamic therapy of actinic keratoses: Bilaterally controlled, randomized trial of simultaneous versus conventional illumination,» *J Am Acad Dermatol.* 2020 April ; 82(4): 862–868.
- [41] European Food Safety Authority (EFSA), «Outcome of the public consultation on the draft guidance on risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain: Part 1, human and animal health,» *EFSA Journal*, 2018.
- [42] Q. Huang, *Nanotechnology in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries*, Oxford: Woodhead Publishing, 2016.
- [43] A. Roy, a. Elzaki, V. Tirth, S. Kajoak, h. Osman, A. Algahtani, S. Islam, N. L. Faizo, M. U. Khandaker, M. N. Islam, T. B. Emran και M. Bilal, «Biological Synthesis of Nanocatalysts and Their Applications,» *Catalysts* 2021,11, 1494.
- [44] C. Auría-Soro, T. Nesma, P. Juanes-Velasco, A. Landeira-Viñuela , H. Fidalgo-Gomez, V. Acebes-Fernandez, R. Gongora, M. J. A. Parra, R. Manzano-Roman και M. Fuentes, «Interactions of Nanoparticles and Biosystems: Microenvironment of Nanoparticles and Biomolecules in Nanomedicine,» *Nanomaterials* 2019, 9, 1365.
- [45] C. Pucci, C. Martinelli και G. Ciofani, «Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges,» *Ecancermedicalscience*, 13, 961. , 2019.
- [46] S. Y. Sui, Y. X. He, Y. X. He, C. H. Yu και Q. Peng, «Nanomaterials-based photosensitizers and delivery systems for photodynamic cancer therapy,» *Biomaterials Advances* 135 (2022) 212725.
- [47] J. H. Lee και Y. Yeo, «Controlled Drug Release from Pharmaceutical Nanocarriers,» *Chem Eng Sci.* 2015 March 24; 125: 75–84.
- [48] M. Kong, X. Peng, H. Cui, P. Liu, B. Pang και K. Zhang, «pH-responsive polymeric nanoparticles with tunable sizes for targeted drug delivery,» *RSC Adv.*, 2020,10, 4860-4868.
- [49] J. A. C. Barbosa, M. S. E. Abdelsadig, B. R. Conway και H. A. Merchant, «Using zeta potential to study the ionisation behaviour of polymers employed in modified-release dosage forms and estimating their pKa,» *International Journal of Pharmaceutics: X*, Volume 1, December 2019, 100024.
- [50] X. Xie, Y. Zhang, F. Li, T. Lv, Z. Li, H. Chen, L. Jia και Y. Gao, «Challenges and Opportunities from Basic Cancer Biology for Nanomedicine for Targeted Drug Delivery,» *Current Cancer Drug Targets*, 2018, 18, 1-20.
- [51] S. Asati, A. Sahu και A. Jain, «Nanotoxicity: The Dark Side of Nanoformulations,» *Current Nanotoxicity and Prevention*, 2021, Vol. 1, No. 1.

- [52] X. Ma και Y. Zhao, «Biomedical Applications of Supramolecular Systems Based on Host–Guest Interactions,» *Chem. Rev.* 2015, 115, 15, 7794–7839.
- [53] S. Luo, E. Zhang, Y. Su, t. Cheng και C. Shi, «A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging,» *Biomaterials Volume 32, Issue 29, October 2011, Pages 7127-7138.*
- [54] S. Wu και H. J. Butt, «Near-infrared photochemistry at interfaces based on upconverting nanoparticles upconverting nanoparticles,» *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017,19, 23585-23596.
- [55] C. Shi, J. B. Wu και D. Pan, «Review on near-infrared heptamethine cyanine dyes as theranostic agents for tumor imaging, targeting, and photodynamic therapy,» *J. of Biomedical Optics*, 21(5), 050901 (2016).
- [56] M. Clark, Handbook of textile and industrial dyeing, Volume 2: Applications of dyes, Woodhead Publishing Limited, 2011.
- [57] M. Henary, S. Paranjpe και E. A. Owen, «Synthesis and applications of benzothiazole containing cyanine dyes,» *Heterocycl. Commun.* 2013; 19(1): 1–11.
- [58] E. Cooper, P. J. Choi, W. A. Denny, J. Jose, M. Dragunow και T. H. Park, «The Use of Heptamethine Cyanine Dyes as Drug-Conjugate Systems in the Treatment of Primary and Metastatic Brain Tumors,» *Front. Oncol.* 11:654921.
- [59] A. S. Lorenz, E. R. Buabeng, O. Taratula, O. Taratula και M. Henary, «Near-Infrared Heptamethine Cyanine Dyes for Nanoparticle-Based Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy,» *J. Med. Chem.* 2021, 64, 12, 8798–8805.
- [60] G. Jo, B. Y. Lee, E. J. Kim, M. H. Park και H. Hyun, «Indocyanine Green and Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin Complex for Enhanced Photothermal Cancer Therapy,» *Biomedicines* 2020, 8, 476;.
- [61] U. Bazylińska, J. Pietkiewicz, J. Saczko, M. Nattich-Rak, J. Rossowska, A. Garbiec και K. A. Wilk, «Nanoemulsion-templated multilayer nanocapsules for cyanine-type photosensitizer delivery to human breast carcinoma cells,» *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 47 (2012) 406–420.
- [62] W. Lim, J. W. Byun, G. Jo, E. J. Kim, M. H. Park και H. Hyun, «Molecular Tuning of IR-786 for Improved Tumor Imaging and Photothermal Therapy,» *Pharmaceutics* 2022, 14, 676.
- [63] K. Leung, «IR-786 perchlorate,» σε *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*, National Center for Biotechnology Information (US), 2011.
- [64] A. Levitz, F. Marmarchi και M. Henary, «Introduction of various substitutions to the methine bridge of heptamethine cyanine dyes Via substituted dianil linkers,» *Photochem. Photobiol. Sci.* 2018.
- [65] L. Wang, L. L. Li, Y. S. Fan και H. Wang, «Host–Guest Supramolecular Nanosystems for Cancer Diagnostics and Therapeutics,» *Adv. Mater.* 2013.

- [66] J. J. Yin, Z. W. Zhou και S. F. Zhou, «Cyclodextrin-based targeting strategies for tumor treatment,» *Drug Deliv. and Transl. Res.*
- [67] P. J. Salústio, P. Pontes, C. Conduto, I. Sanches, C. Carvalho, J. Arrais και H. M. Cabral Marques, «Advanced Technologies for Oral Controlled Release: Cyclodextrins for Oral Controlled Release,» *AAPS PharmSciTech*, Vol. 12, No. 4, December 2011.
- [68] F. Semcheddine, N. E. Islem Guissi, X. Liu, Z. Wu και B. Wang, *AAPS PharmSciTech*, Vol. 16, No. 3, June 2015.
- [69] K. M. Raghava Srivalli και B. Mishra, «Improved Aqueous Solubility and Antihypercholesterolemic Activity of Ezetimibe on Formulating with Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin and Hydrophilic Auxiliary Substances,» *AAPS PharmSciTech*. 2016 Apr; 17(2): 272–283..
- [70] A. Ryzhakov, T. D. Thi, J. Stappaerts, L. Bertoletti, K. Kimpe, A. R. Sa Couto, P. Saokham, G. Van den Mooter, P. Augustijns, G. W. Somsen, S. Kurkov, S. Inghelbrecht, A. Arien, M. I. Jimidar, K. Schrijnemakers και T. Loftsson, «Self-Assembly of Cyclodextrins and Their Complexes in Aqueous Solutions,» *Journal of Pharmaceutical Sciences* 105 (2016) 2556e2569.
- [71] T. C. Barros, S. H. Toma, H. E. Toma, E. L. Bastos και M. Baptista, «Polymethine cyanine dyes in β-cyclodextrin solution: multiple equilibria and chemical oxidation,» *J. Phys. Org. Chem.* 2010, 23 893–903.
- [72] R. Gharib, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin, C. Charcosset και L. Auezova, «Liposomes incorporating cyclodextrin–drug inclusion complexes:: Current state of knowledge,» *Carbohydrate Polymers* 129 (2015) 175–186.
- [73] M. Jug και P. A. Mura, «Grinding as Solvent-Free Green Chemistry Approach for Cyclodextrin Inclusion Complex Preparation in the Solid State,» *Pharmaceutics* 2018, 10, 189.
- [74] M. Leonardi, M. Villacampa και J. C. Menéndez, «Multicomponent mechanochemical synthesis,» *Chem. Sci.*, 2018, 9, 2042, 2018.
- [75] M. L. Tummino, G. Magnacca, D. Cimino, E. Laurenti και R. Nisticò, «The Innovation Comes from the Sea: Chitosan and Alginate Hybrid Gels and Films as Sustainable Materials for Wastewater Remediation,» *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 55.
- [76] V. Milkova και F. M. Goycoolea, «Encapsulation of caffeine in polysaccharide oil-core nanocapsules,» *Colloid and Polymer Science*, 298 (8). pp. 1035-1041.
- [77] R. Cazorla-Luna, A. Martín-Ilana, F. Notario-Perez, R. Ruiz-Caro και M. D. Veiga, «Naturally Occurring Polyelectrolytes and Their Use for the Development of Complex-Based Mucoadhesive Drug Delivery Systems: An Overview,» *Polymers* 2021, 13(14), 2241.
- [78] C. Gonçalves, P. Pereira και M. Gama, «Self-Assembled Hydrogel Nanoparticles for Drug Delivery Applications,» *Materials* 2010, 3.

- [79] H. Wang, H. Deng, M. Gao και w. Zhang, «Self-Assembled Nanogels Based on Ionic Gelation of Natural Polysaccharides for Drug Delivery,» *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:703559. Published 2021 Jul 16. .
- [80] A. Detsi, E. Kavetsou, I. Kostopoulou, I. Pitterou, A. R. N. Pontillo, A. Tzani, P. Christodoulou, A. Siliachli και P. Zoumpoulakis, «Nanosystems for the Encapsulation of Natural Products: The Case of Chitosan Biopolymer as a Matrix,» *Pharmaceutics* 2020, 12, 669.
- [81] S. Pedroso-Santana και N. Fleitas-Salazar, «Ionotropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes,» *Polym Int* 2020.
- [82] Y.-Z. Chen , Y.-K. Huang, Y. Chen, Y.-J. Ye, K.-Y. Lou και F. Gao, «Novel nanoparticles composed of chitosan and b-cyclodextrin derivatives as potential insoluble drug carrier,» *Chin. Chem. Lett.*, 2015,26(07): 909-913, 2015.
- [83] D. A. Skoog, F. J. Holler και S. R. Crouch, Principles of Instrumental Analysis, Thomson Brooks/Cole, 2007.
- [84] N. Raval, R. Maheshwari, D. Kalyane, S. R. Youngren-Ortiz, M. B. Chougule και R. K. Tekade, «Chapter 10 - Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development,» σε *Basic Fundamentals of Drug Delivery: Advances in Pharmaceutical Product Development and Research*, Academic Press, 2019, pp. 369-400.
- [85] N. Lagopati, E. P. Tsilibary, P. Falaras, P. Papazafiri, E. A. Pavlatou, E. Kostopoulou και P. Kitsiou, «Effect of nanostructured TiO<sub>2</sub> crystal phase on photoinduced apoptosis of breast cancer epithelial cells,» *Int J Nanomedicine.* 2014 Jul 3;9:3219-30.
- [86] S. Bhattacharjee, «DLS and zeta potential – What they are and what they are not,» *Journal of Controlled Release, Volume 235, 2016, Pages 337-351.*
- [87] «ZETASIZER NANO SERIES Research Performance, Operational Simplicity, Application Versatility.,» [Ηλεκτρονικό]. Available: [https://www.malvernpanalytical.com/en/assets/MRK1839\\_tcm50-17228.pdf?fbclid=IwAR1b6wN0mbBtYXIT9XEpw4W6NdT4an\\_vhVR-WnU3HgEH04Byj3yFxoXv6YI](https://www.malvernpanalytical.com/en/assets/MRK1839_tcm50-17228.pdf?fbclid=IwAR1b6wN0mbBtYXIT9XEpw4W6NdT4an_vhVR-WnU3HgEH04Byj3yFxoXv6YI). [Πρόσβαση 13 September 2022].
- [88] Fritsch, «Particle Sizing: Hydrodynamic Diameter,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.fritsch-international.com/particle-sizing/fritsch-knowledge/hydrodynamic-diameter/>. [Πρόσβαση 13 September 2022].
- [89] R. A. Herrada Garcia, M. P. Corona, R. A. Shrestha, S. Pamukcu και E. Bustos, «Electrokinetic Remediation of Polluted Soil Using Nano-materials: Nano-iron Case,» σε *Evaluation of Electrochemical Reactors as a New Way to Environmental Protection*, Research Signpost, 2014, pp. 37-661.

- [90] Silver Colloids, «Why Does Zeta Potential Change: Zeta Potential And pH,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <https://www.silver-colloids.com/tutorials/intro/pcs18a/>. [Πρόσβαση 13 September 2022].
- [91] D. C. Harris, Quantitative Chemical Analysis, 7th Edition, W. H. Freeman and Company, 2007.
- [92] B. Campanella, V. Palleschi και S. Legnaioli, «Introduction to vibrational spectroscopies,» *Introduction to vibrational spectroscopies*.
- [93] A. Ausili, M. Sánchez και J. C. Gómez-Fernández, «Attenuated total reflectance infrared spectroscopy: A powerful method for the simultaneous study of structure and spatial orientation of lipids and membrane proteins,» *Biomedical Spectroscopy and Imaging 4 (2015) 159–170*.
- [94] E. R. Balmayor, H. S. Azevedo και R. L. Reis, «Controlled Delivery Systems: From Pharmaceuticals to Cells and Genes,» *Pharm Res (2011) 28:1241–1258*.
- [95] J. Yoo και Y. Y. Won, «Phenomenology of the Initial Burst Release of Drugs from PLGA Microparticles,» *ACS Biomater. Sci. Eng. 2020, 6, 6053–6062*.
- [96] A. Wojtala, M. Bonora, D. Malinska, P. Pinton, J. Duszynski και M. R. Wieckowski, «Chapter Thirteen: Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry,» σε *Methods in Enzymology, Volume 542*, Elsevier Inc., 2014, pp. 243-260.
- [97] A. Halahlah, E. Kavetsou, I. Pitterou, S. Grigorakis, S. Loupassaki, L.-A. Tziveleka, S. Kikionis, E. Ioannou και A. Detsi, «Synthesis and characterization of inclusion complexes of rosemary essential oil with various  $\beta$ -cyclodextrins and evaluation of their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*,» *Journal of Drug Delivery Science and Technology 65 (2021) 102660*, October 2021.
- [98] S. A. Abouelmagd, B. Sun, A. C. Chang, Y. J. Ku και Y. Yeo, «Release Kinetics Study of Poorly Water-Soluble Drugs from Nanoparticles: Are We Doing It Right?,» *Molecular Pharmaceutics 2015, 12 (3), 997–1003*.
- [99] S. A. D'Souza, «A Review of in Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms,» *Advances in Pharmaceutics 2014*.
- [100] Z. Ren, Y. Xu, Z. Lu, Z. Wang, C. Chen, Y. Guo, X. Shi, F. Li, J. Yang και Y. Zheng, «Construction of a water-soluble and photostable rubropunctatin/ $\beta$ -cyclodextrin drug carrier,» *RSC Adv., 2019, 9, 11396–11405*.
- [101] Malvern Instruments Ltd., «ZetaSize Nano User Manual,» 2013.
- [102] U. Bazylińska, A. Lewinska, L. Lamch και K. A. Wilk, «Polymeric nanocapsules and nanospheres for encapsulation and long sustained release of hydrophobic cyanine-type photosensitizer,» *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, Volume 442, 1 February 2014, Pages 42-49*.

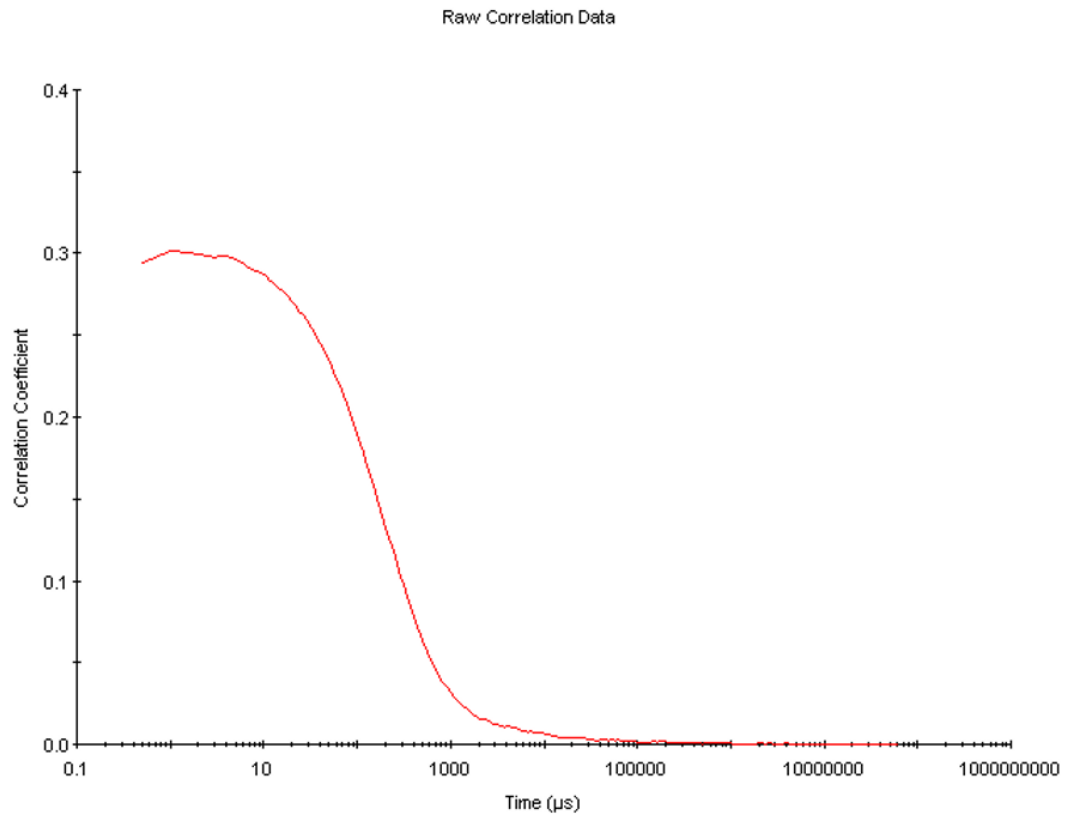
- [103] S. A. Algharib, A. Dawood, K. Zhou, D. Chen, C. Li, K. Meng, A. Zhang, W. Luo, S. Ahmed, L. Huang και S. Xie, «Preparation of chitosan nanoparticles by ionotropic gelation technique: Effects of formulation parameters and in vitro characterization.,» *Journal of Molecular Structure, Volume 1252, 15 March 2022, 132129.*
- [104] I. Barahan, B. Barare, M. H. Hijji, E. Bonyi, S. Tadesse και K. Aslan, «A Highly Selective Sensor for Cyanide in Organic Media and on Solid Surfaces,» *Sensors 2016, 16, 271.*
- [105] K. C. Prousis, R. Canton-Victoria, G. Pagona, M. Goulielmaki, V. Zoumpourlis, N. Tagmatarchis και T. Calogeropoulou, «New cationic heptamethinecyanine-graphene hybrid materials,» *Dyes and Pigments, Volume 175, April 2020, 108047.*
- [106] B. Jung και B. Anvari, «Synthesis and Characterization of Bovine Serum Albumin-Coated Nanocapsules Loaded with Indocyanine Green as Potential Multifunctional Nanoconstructs,» *Biotechnol. Prog., 2012, Vol. 28, No. 2.*
- [107] L. Rodríguez-Perez, C. Villegas, M. A. Herranz, J. L. Delgado και N. Martin, «Heptamethine Cyanine Dyes in the Design of Photoactive Carbon Nanomaterials,» *ACS Omega 2017, 2, 9164–9170.*
- [108] I. Savic-Gajic, I. M. Savic, V. D. Nikolic, L. B. Nolic, M. M. Popsavin και A. J. Kapor, «Study of the solubility, photostability and structure of inclusion complexes of carvedilol with  $\beta$ -cyclodextrin and (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin,» *J Incl Phenom Macrocycl Chem.*
- [109] S. Y. Lin, C. H. Hsu και M. T. Sheu, «Curve-fitting FTIR studies of loratadine/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex induced by co-grinding process,» *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 53 (2010) 799–803.*
- [110] H. M. Kenneth Ho, D. Q. M. Craig και R. M. Day, «Design of Experiment Approach to Modeling the Effects of Formulation and Drug Loading on the Structure and Properties of Therapeutic Nanogels,» *Mol. Pharmaceutics 2022, 19, 602–615.*
- [111] S. R. Choudhury, A. Mandal, D. Chakravorty, M. Gopal και A. Goswami, «Evaluation of physicochemical properties, and antimicrobial efficacy of monoclinic sulfur-nanocolloid,» *J Nanopart Res (2013) 15:1-11.*
- [112] F. Liu, R. Wei, J. Yin, M. Shen, Y. Wu, W. Guo και D. Sun, «Host-guest interactions of indocyanine green with  $\beta$ -cyclodextrin permit real-time characterization of the rat lymphatic system,» *JVSeVascular Science, 2022.*
- [113] D. P. Lyvers, M. Moazzezi, V. C. de Silva, D. P. Brown, A. M. Urbas, Y. V. Rostovtsev και V. P. Drachev, «Cooperative bi-exponential decay of dye emission coupled via plasmons,» *Scientific Reports (2018) 8:9508.*
- [114] I. D. Solovyev, A. V. Gavshina και A. P. Savitsky, «Reversible photobleaching of photoconvertible SAASoti-FP,» *J of Biomedical Photonics & Eng 3(4), 2017.*

- [115] R. Caruso, A. Pesce και V. Wierzbicki, «A very rare case report of long-term survival: A patient operated on in 1994 of glioblastoma multiforme and currently in perfect health,» *International Journal of Surgery Case Reports, Volume 33*, pp. 41-43, 2017.
- [116] I. Jovčevska, «Genetic secrets of long-term glioblastoma survivors,» *Bosn J Basic Med Sci. 2019 May 20;19(2):116-124.*, May 2019.
- [117] F. Hanif, K. Muzaffar, K. Perveen, S. M. Malhi και S. U. Simjee, «Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment,» *Asian Pac J Cancer Prev. 2017 Jan 1;18(1):3-9*, January 2017.

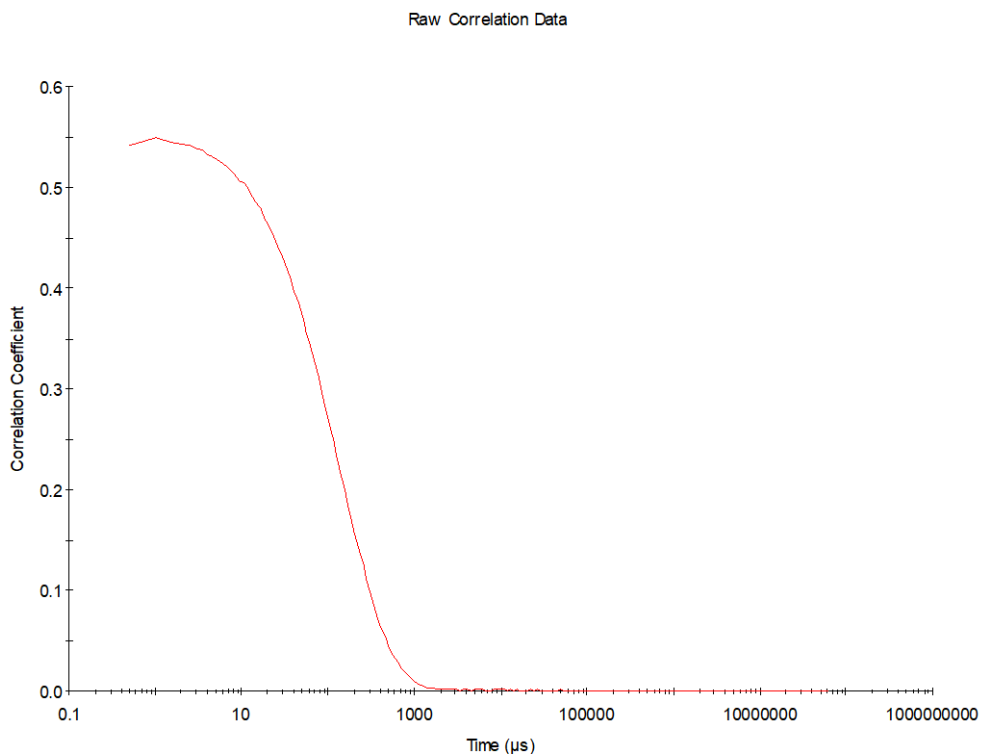


## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: Διαγράμματα Αυτοσυσχέτισης

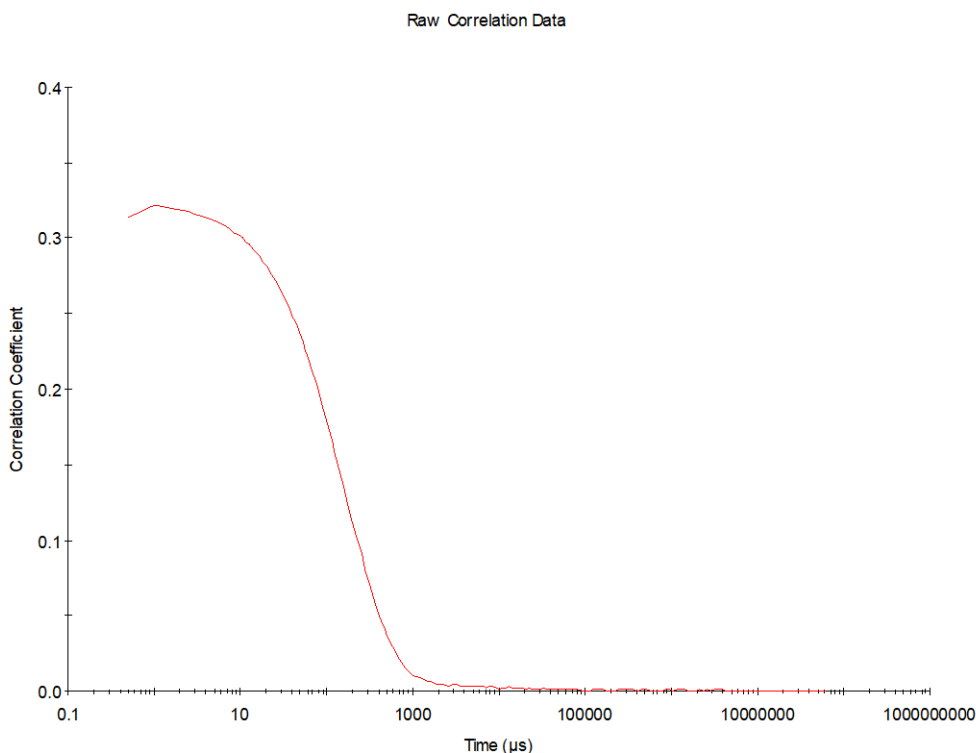
Διαγράμματα αυτοσυσχέτισης από τη διεξαγωγή των μετρήσεων υδροδυναμικής διαμέτρου μέσω της τεχνικής Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS).



**Σχήμα Π.1.1.** Διάγραμμα αυτοσυσχέτισης κατά τη μέτρηση υδροδυναμικής διαμέτρου του συμπλόκου β-CD:IR-786 Iodide IC σε υδατική διασπορά, όπως προσδιορίστηκε μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός.

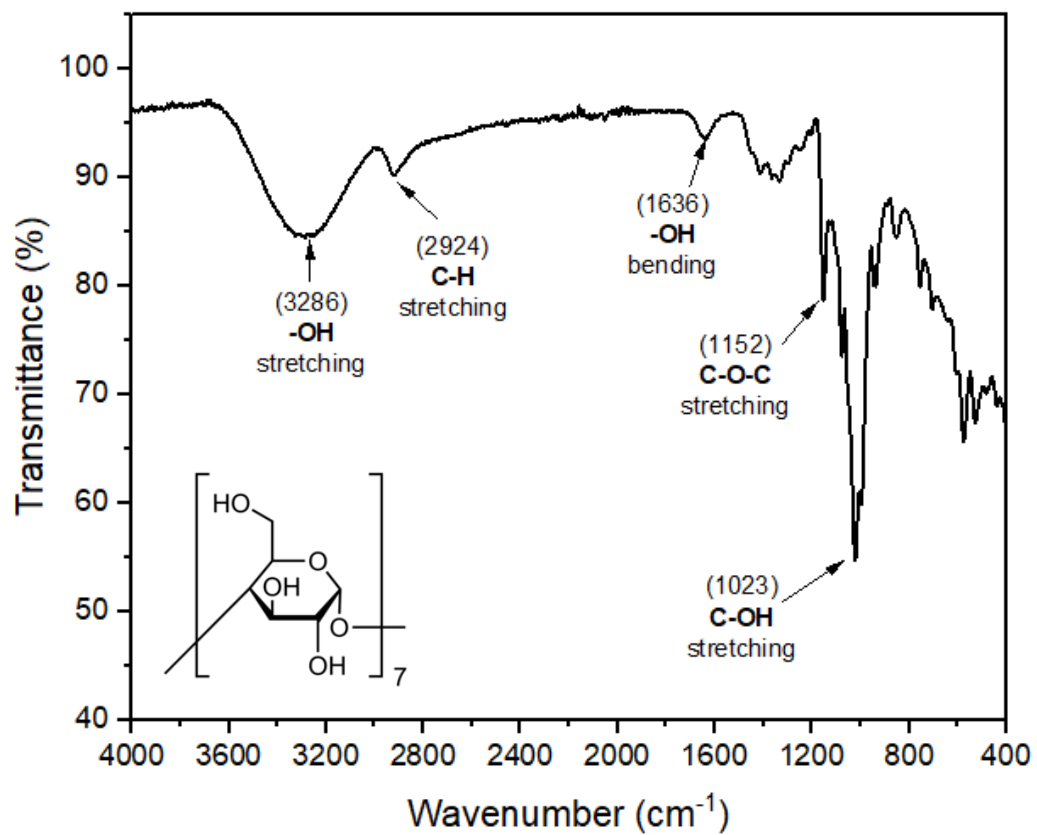


**Σχήμα Π.1.2.** Διάγραμμα αυτοσυσχέτισης κατά τη μέτρηση υδροδυναμικής διαμέτρου του συμπλόκου HP-β-CD:IR-786 Iodide IC σε υδατική διασπορά, όπως προσδιορίστηκε μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός.

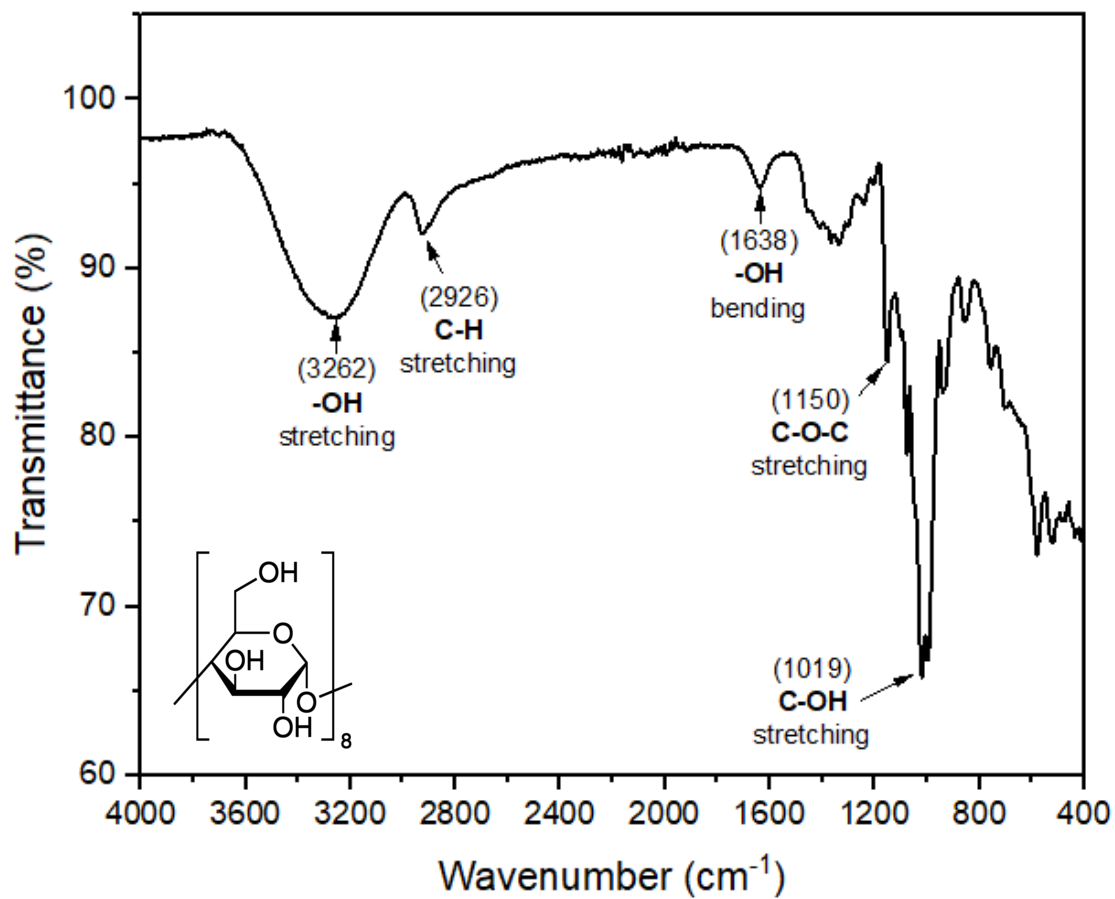


**Σχήμα Π.1.3.** Διάγραμμα αυτοσυσχέτισης κατά τη μέτρηση υδροδυναμικής διαμέτρου του συμπλόκου γ-CD:IR-786 Iodide IC σε υδατική διασπορά, όπως προσδιορίστηκε μέσω της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός.

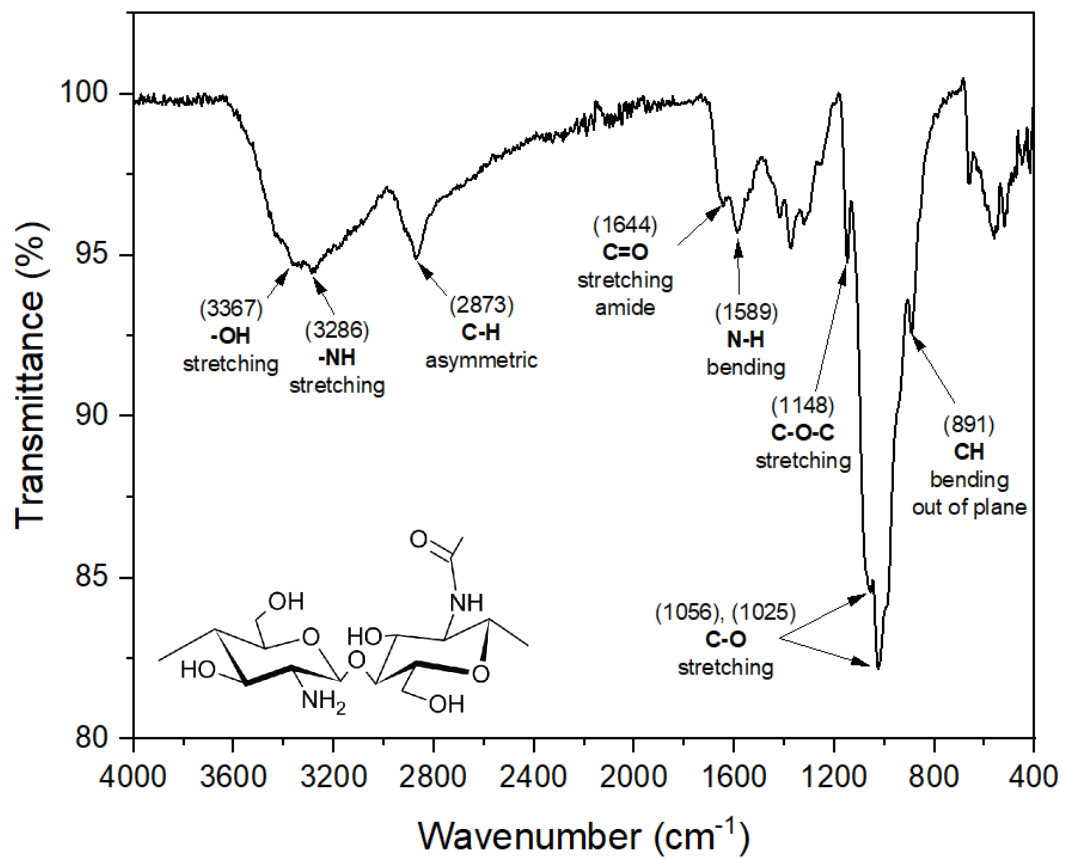
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ: Φάσματα ATR-FTIR



Σχήμα Π.2.1. Φάσμα ATR-FTIR της β-κυκλοδεξτρίνης (β-CD).

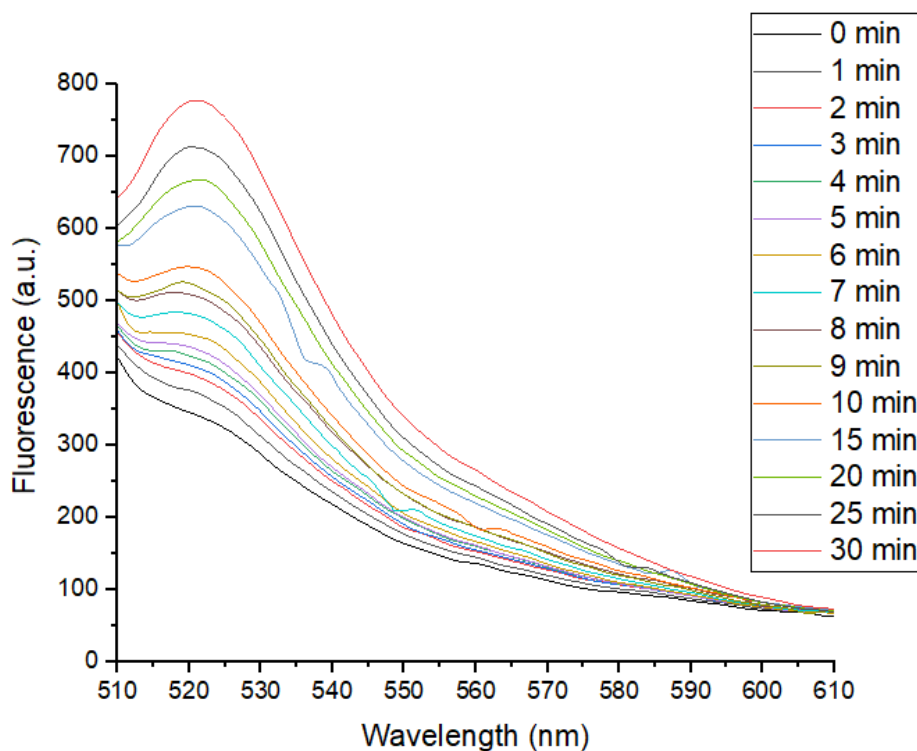


Σχήμα Π.2.2. Φάσμα ATR-FTIR της  $\gamma$ -κυκλοδεξτρίνης ( $\gamma$ -CD).

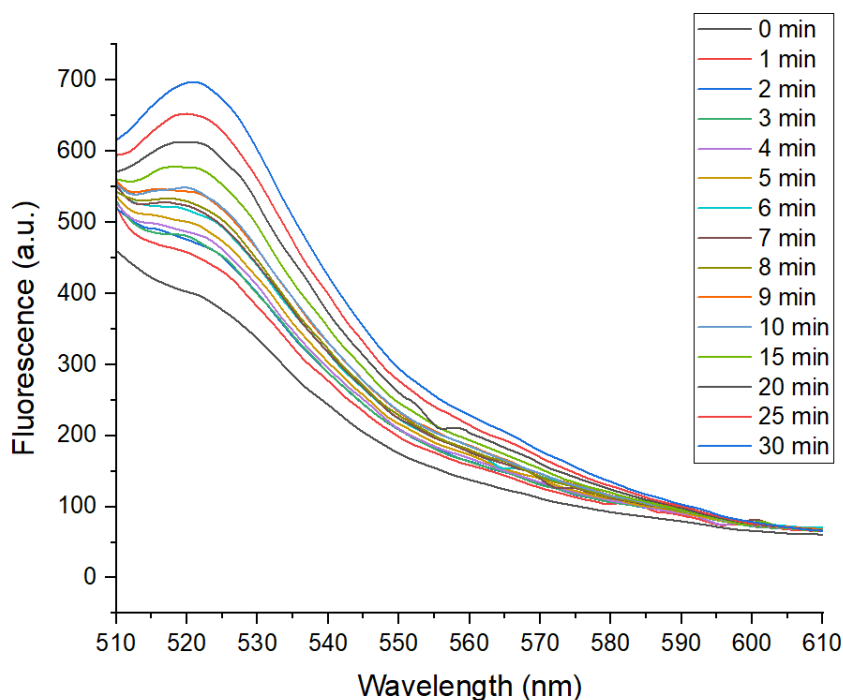


Σχήμα Π.2.3. Φάσμα ATR-FTIR της χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους (CS LMW).

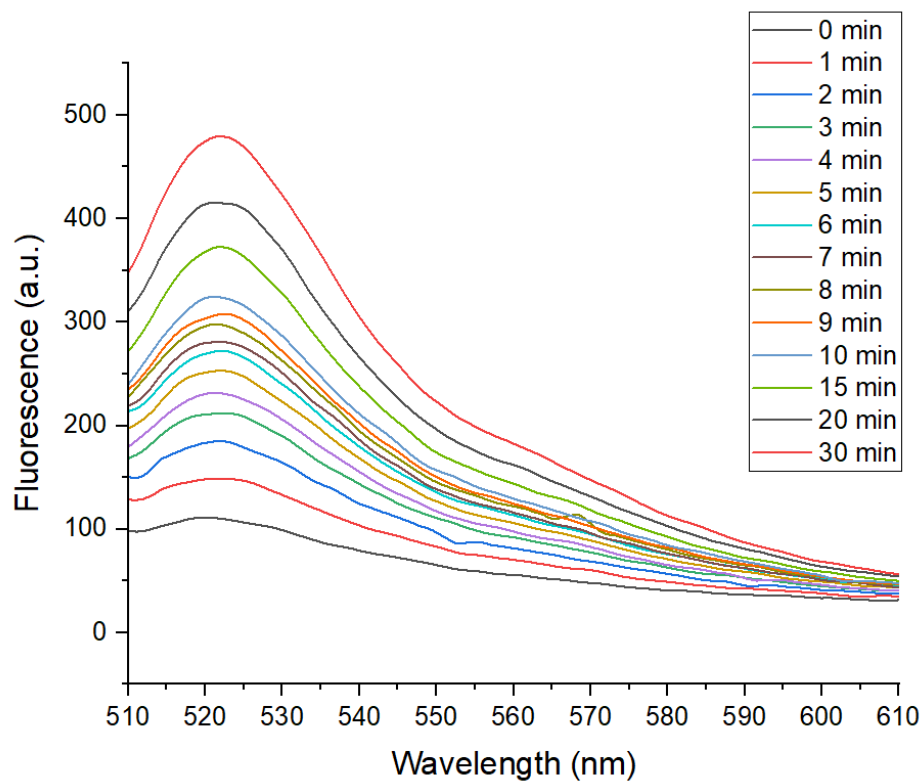
### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ: Φάσματα Φθορισμού κατά τη Μελέτη Παραγωγής ROS



**Σχήμα Π.3.1.** Φάσμα φθορισμού του ιχνηθέτη DCF στην περίπτωση της συμπλοκοποιημένης κυανίνης IR-786 Iodide με την  $\beta$ -CD, συναρτήσει του χρόνου κατά τη μελέτη παραγωγής ROS.



**Σχήμα Π.3.2.** Φάσμα φθορισμού του ιχνηθέτη DCF στην περίπτωση της συμπλοκοποιημένης κυανίνης IR-786 Iodide με την  $\gamma$ -CD, συναρτήσει του χρόνου κατά τη μελέτη παραγωγής ROS.



**Σχήμα Π.3.3.** Φάσμα φθορισμού του ιχνηθέτη DCF στην περίπτωση της εγκλωβισμένης κυανίνης IR-786 Iodide στα νανοσωματίδια CS NPs, συναρτήσει του χρόνου κατά τη μελέτη παραγωγής ROS.