



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΑΛΑΓΙΑΝΝΗΣ

Σχεδιασμός, σύνθεση και χαρακτηρισμός πολυμερικών νανοσωματιδίων χιτοζάνης, με εγκλεισμό φθαλοκυανίνης χλωρο-αλουμινίου AlCl₃, καθώς και αξιολόγηση της δράσης τους στη φωτοδυναμική θεραπεία καρκίνου.

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

ΕΛΕΝΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΤΟΥ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ (ΕΔΙΠ),
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ,
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΛΕΝΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΤΟΥ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ (ΕΔΙΠ),
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ Ε.Μ.Π.

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΔΕΤΣΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ Ε.Μ.Π.

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΟΛΙΤΟΠΟΥΛΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ,
ΣΧΟΛΗ ΗΛΕΚΤΡΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2024

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος σπουδών του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών 'Μικροσυστήματα και Νανοδιατάξεις', της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, όπου η υλοποίηση της πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών Ε.Μ.Π., καθώς και στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π..

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Ελένη Αλεξανδράτου, μέλος Ε.ΔΙ.Π του εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών Ε.Μ.Π., για την εμπιστοσύνη, την υποστήριξη και την καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναστασία Δέτση, Καθηγήτρια της Σχολής Χημικών Μηχανικών, που μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τα απαραίτητα πειράματα στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.. Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Ιωάννα Πιττερού για τη συνεργασία και την καθοδήγηση της στο σχεδιασμό και τη διεξαγωγή των πειραμάτων, καθώς και στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν. Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για την αρμονική συνεργασία και τη βοήθεια που μου παρείχαν.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Αλεξάνδρα Καραγιάννη για τη συνεργασία μας και την πολύτιμη της βοήθεια στην διεξαγωγή πειραμάτων σε κυτταρικό επίπεδο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για τη στήριξη που μου παρείχαν σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

.....
Ιωάννης Αλαγιάννης

© (2024) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights Reserved. Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	i
Περίληψη.....	vii
Abstract.....	viii
Συνομογραφίες.....	ix
Ευρετήριο Εικόνων.....	ix
Ευρετήριο Πινάκων.....	xii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 – Νανοτεχνολογία/Νανοεπιστήμη.....	1
1.2 – Νανოსωματίδια.....	1
1.3 – Ιδιότητες Νανοςωματιδίων.....	2
1.4 – Μέθοδοι Σύνθεσης Νανοςωματιδίων.....	5
1.4.1 – Top-down Μέθοδοι Σύνθεσης Νανοςωματιδίων.....	6
1.4.2 – Bottom-up Μέθοδοι Σύνθεσης Νανοςωματιδίων.....	6
1.5 – Εφαρμογές Νανοτεχνολογίας.....	7
1.6 – Νανοςωματίδια σε ιατρικές/βιολογικές εφαρμογές.....	8
1.6.1 – Νανοςωματίδια στη βιοαπεικόνιση.....	9
1.6.2 – Νανοςωματίδια στη βιοανάλυση.....	12
1.6.3 – Νανοςωματίδια στην ιατρική.....	13
1.7 – Λόγοι περιορισμένης χρήσης και αποτελεσματικότητας νανοςωματιδίων.....	15
1.8 – Πολυμερικά νανοςωματίδια.....	18
1.9 – Χιτοζάνη – Νανοςωματίδια Χιτοζάνης.....	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	22
2.1 – Φωτοδυναμική Θεραπεία.....	22
2.2 – Αλληλεπίδραση φωτός – ύλης.....	23
2.3 – Μηχανισμός Φωτοδυναμικής Δράσης.....	26
2.4 – Κυτταρικός θάνατος.....	28
2.4.1 – Απόπτωση.....	28
2.4.2 – Νέκρωση.....	28
2.4.3 – Αυτοφαγοκυττάρωση.....	29
2.4.4 – Κατάρρευση Κυκλοφορικού Συστήματος.....	30
2.4.5 – Ενεργοποίηση Ανοσοποιητικού Συστήματος.....	30
2.5 – Φωτοευαισθητοποιητές: χαρακτηριστικά και είδη.....	31
2.5.1 – Επιθυμητές ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητών.....	31

2.5.2 – Είδη φωτοευαισθητοποιητών.....	35
2.5.2.1 – Γενιές φωτοευαισθητοποιητών.....	35
2.5.2.2 – Οικογένειες φωτοευαισθητοποιητών	37
2.6 – Φθαλοκυανίνες ως 3 ^{ης} γενιάς φωτοευαισθητοποιητές.....	42
2.7 – Τεχνικές ενίσχυσης της φωτοδυναμικής δράσης φωτοευαισθητοποιητών.....	43
2.8 – Φως στη φωτοδυναμική θεραπεία.....	45
2.8.1 – Πηγή φωτός.....	45
2.8.1.1 – Λυχνίες	45
2.8.1.2 – Light Emitting Diodes, LEDs.....	46
2.8.1.3 – Lasers	46
2.8.2 – Μέσα μεταφοράς φωτός	46
2.8.2.1 – Επιφανειακή ακτινοβολήση.....	46
2.8.2.2 – Εσωτερική ακτινοβολήση.....	47
2.9 – Μελλοντικές προοπτικές και προκλήσεις για τη φωτοδυναμική θεραπεία.....	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	51
3.1 – Σκοπός της Μεταπτυχιακής Εργασίας.....	51
3.2 – Αντιδραστήρια.....	51
3.3 – Πειραματικός Σχεδιασμός	53
3.4 – Σύνθεση Νανοσωματιδίων Χιτοζάνης CS, CS@AIClPc.....	55
3.5 – Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού AIClPc (Encapsulation Efficiency, EE)	57
3.6 – Προσδιορισμός ποσοστού φόρτωσης AIClPc (Drug Load, DL)	58
3.7 – Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων Χιτοζάνης και AIClPc.....	59
3.7.1 – Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS).....	59
3.7.2 – Φασματομετρία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared spectroscopy, FTIR)	60
3.7.3 – Φασματομετρία απορρόφησης υπεριώδους/ορατού (UV/vis spectroscopy)	61
3.7.4 – Φασματομετρία φωτοφωταύγειας (Photoluminescence spectroscopy, PL).....	62
3.8 – Μελέτη φωτοδυναμικής δράσης AIClPc και CS@AIClPc NPs.....	62
3.8.1 – Μελέτη φωτοσταθερότητας	63
3.8.2 – Μελέτη παραγωγής δραστικών οξυγονούχων ειδών (ROS)	63
3.8.3 – Μελέτη βιωσιμότητας κυττάρων.....	65
3.8.4 – Μελέτη φωτοδυναμικής θεραπείας σε κυτταρικό πληθυσμό	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	67
4.1 – Αποτελέσματα Πειραματικού σχεδιασμού	67

4.1.1 – Αποτελέσματα DLS, Υδροδυναμική Διάμετρος και ζ-Δυναμικό.....	67
4.1.1.1 – Προσδιορισμός Υδροδυναμικής Διαμέτρου και Πολυδιασποράς	67
4.1.1.2 – Προσδιορισμός ζ- Δυναμικού	70
4.1.2 – Αποτελέσματα Απόδοσης Εγκλωβισμού (Encapsulation Efficiency, EE).....	72
4.1.2.1 – Καμπύλη Βαθμονόμησης AICIPc	72
4.1.2.2 – Υπολογισμός Απόδοσης Εγκλωβισμού	73
4.1.3 – Αποτελέσματα Ποσοστού Φόρτωσης (Drug Load, DL)	75
4.1.3.1 – Υπολογισμός Ποσοστού Φόρτωσης	75
4.1.3.2 – Μάζα Νανοσωματιδίων CS@AICIPc που συλλέχθηκε	79
4.1.4 – Βελτιστοποίηση Μοντέλου Πειραματικού Σχεδιασμού	82
4.2 – Χαρακτηρισμός AICIPc, CS@AICIPc NPs και CS_Blank NPs.....	85
4.2.1 – Αποτελέσματα Φασματομετρίας FTIR	85
4.2.1.1 - Αποτελέσματα Φασματομετρίας FTIR για νανοσωματίδια CS.....	86
4.2.1.2 - Αποτελέσματα Φασματομετρίας FTIR για νανοσωματίδια CS@AICIPc	88
4.2.2 – Αποτελέσματα Φασματομετρίας UV/vis	90
4.2.2.1 - Αποτελέσματα Φασματομετρίας UV/vis για ελεύθερη AICIPc.....	90
4.2.2.2 - Αποτελέσματα Φασματομετρίας UV/vis για CS@AICIPc NPs.....	91
4.2.3 – Αποτελέσματα Φασματομετρίας PL	92
4.2.3.1 - Αποτελέσματα Φασματομετρίας PL για ελεύθερη AICIPc	92
4.2.3.2 - Αποτελέσματα Φασματομετρίας PL για CS@AICIPc NPs.....	92
4.3 – Αποτελέσματα μελέτης φωτοδυναμικής δράσης AICIPc και CS@AICIPc NPs.....	93
4.3.1 – Αποτελέσματα φωτοσταθερότητας.....	93
4.3.2 – Αποτελέσματα παραγωγής δραστικών οξυγονούχων ειδών (ROS).....	94
4.3.3 – Μελέτη βιωσιμότητας κυττάρων	95
4.3.4 – Μελέτη φωτοδυναμικής θεραπείας σε κυτταρικό πληθυσμό	98
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΝΟΨΗ	100
5.1 – Συμπεράσματα	100
5.2 – Προτάσεις για μελλοντική μελέτη.....	101
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	104

Περίληψη

Η φωτοδυναμική θεραπεία (Photodynamic Therapy, PDT) αποτελεί μία καινοτόμα και πολλά υποσχόμενη θεραπεία κατά του καρκίνου, καθώς μπορεί να χαρακτηριστεί ως μία υψηλής επιλεκτικότητας, μη επεμβατική μέθοδο θεραπείας. Η PDT βασίζεται στη συνδυαστική δράση του φωτός, του οξυγόνου και μίας φωτοευαισθητοποιητικής ουσίας, όπου συγκεκριμένα κατά τη δράση της ο φωτοευαισθητοποιητής εκτίθεται σε κατάλληλη ακτινοβολία (στο μέγιστο απορρόφησής του στα 600-850nm), παράγοντας έτσι δραστικά οξυγονούχα είδη (Reactive Oxygen Species, ROS), τα οποία είναι υπεύθυνα για την καταστροφή του καρκινικού ιστού. Ωστόσο, ένα από τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα της PDT αποτελεί το γεγονός ότι οι φωτοευαισθητοποιητές ανήκουν στις οικογένειες των πορφυρίνων, χλωρίνων και χρωστικών, ουσίες που κατά κύριο λόγο παρουσιάζουν έντονα υδρόφοβο χαρακτήρα, έχοντας ως αποτέλεσμα την απόσβεση των ιδιοτήτων τους σε βιολογικά συστήματα. Για αυτό το λόγο, τα τελευταία χρόνια ερευνάται η χρήση αυτών των φωτοευαισθητοποιητών σε συνδυασμό με κατάλληλα νανοσυστήματα, τα οποία αποσκοπούν στην πιο αποτελεσματική μεταφορά των φωτοευαισθητοποιητών και στη βελτίωση της συμπεριφοράς τους στα βιολογικά συστήματα. Μερικά από τα πιο ελκυστικά και αποτελεσματικά νανοσυστήματα που μπορούν να αξιοποιηθούν για τη βελτίωση των ιδιοτήτων των φωτοευαισθητοποιητών, αποτελούν τα πολυμερικά νανοσωματίδια, καθώς ανάλογα με το είδος τους μπορούν να παρουσιάζουν υψηλή βιοσυμβατότητα, χαμηλή τοξικότητα και ευκολία στη σύνθεση τους.

Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε ο φωτοευαισθητοποιητής της χρωστικής 'φθαλοκυανίνης χλωρο-αλουμινίου' (AICIPc), όπου συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη ανάμεσα στην ελεύθερη μορφή της και κατά τον εγκλωβισμό της σε πολυμερικά νανοσωματίδια χιτοζάνης. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση της διεργασίας του εγκλωβισμού της AICIPc στα νανοσωματίδια χιτοζάνης, με βάση το πειραματικό σχεδιασμό της διεργασίας. Η σύνθεση των νανοσωματιδίων χιτοζάνης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ιονικής πηγμάτωσης, όπου και διερευνήθηκε το υδροδυναμικό τους μέγεθος και το ζ-Δυναμικό τους με τη μέθοδο της δυναμικής σκέδασης του φωτός (DLS), καθώς και η δομή τους με βάση τη φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR). Επιπλέον, προσδιορίστηκε η απόδοση εγκλωβισμού (EE) και το ποσοστό φόρτωσης (DL) της AICIPc στα νανοσωματίδια χιτοζάνης, όπου και ερευνήθηκαν οι φωτοφυσικές τους ιδιότητες, με βάσης τις φασματοσκοπίες απορρόφησης φωτός υπεριώδους/ορατού (UV/vis) και φωτοφωταύγειας (PL).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε και η μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης της ελεύθερης AICIPc και της εγκλωβισμένης AICIPc στα νανοσωματίδια χιτοζάνης, τόσο σε επίπεδο εργαστηρίου όσο και σε επίπεδο κυττάρων. Συγκεκριμένα, σε επίπεδο εργαστηρίου διερευνήθηκε η φωτοσταθερότητα του φωτοευαισθητοποιητή και η δυνατότητά του να παράγει ROS. Η μελέτη σε επίπεδο κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε καρκινικά κύτταρα A431, όπου και μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα του φωτοευαισθητοποιητή απουσία φωτός, καθώς και η φωτοδυναμική του δράση κατά την έκθεσή τους σε ακτινοβολία στην περιοχή του ερυθρού ορατού φωτός.

Λέξεις Κλειδιά: φωτοδυναμική θεραπεία, φθαλοκυανίνη χλωρο-αλουμινίου, νανοσωματίδια, χιτοζάνη, ιονική πηγμάτωση, καρκινικά κύτταρα

Abstract

Photodynamic Therapy (PDT) is a novel and very promising treatment against cancer, as it can be characterized as a highly selective and non-invasive treatment method. PDT is based on the combined action of light, oxygen and a photosensitizing substance, in which, specifically the photosensitizer is exposed into the appropriate radiation (at the photosensitizer's maximum absorption 600-850nm), thus producing reactive oxygen species (ROS), which are responsible for the destruction of the cancer tissue. However, one of the biggest drawbacks of PDT is the fact that most photosensitizers belong to the families of porphyrins, chlorines and pigments, substances that mainly exhibit strongly hydrophobic characteristics, resulting in the attenuation of the properties in biological systems. On account to this, in recent years, there's been increasing research in the combination of these photosensitizers with nanosystems, which aim to improve the photosensitizer's effective delivery and improve their overall characteristics in biological systems. Some of the most attractive and effective nanosystems, that can be utilized for the improvement of the photosensitizer's properties, are polymeric nanoparticles, which depending on their type they can exhibit high biocompatibility, low toxicity and ease of synthesis.

In the present work, the photosensitizer of the pigment 'chloro-aluminum phthalocyanine' (AlClPc) was examined, where more specifically a comparatively study was carried out between its free form and its encapsulation in polymeric chitosan nanoparticles. First of all, the encapsulation process of AlClPc in chitosan nanoparticles was optimized, based on the experimental designing of the process. The chitosan nanoparticles were synthesized based on the ionic gelation process, where their hydrodynamic size and ζ -potential were determined utilizing the dynamic light scattering method (DLS), while they were also characterized structurally based on the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Furthermore, the encapsulation efficiency (EE) and the drug load (DL) of AlClPc in the chitosan nanoparticles was investigated, as well as their photophysical properties based on the ultraviolet/visible light absorption (UV/vis) and photoluminescence (PL) spectroscopies.

Finally, in this study there was an evaluation of the photodynamic effect of both the free AlClPc, and the encapsulated AlClPc in chitosan nanoparticles, in a laboratory setting, as well as in a cell culture. In particular, at a laboratory setting, the photostability and the ability of the photosensitizer to produce ROS were investigated. The cell studies were carried out in A431 cancer cells, in which the dark toxicity of the photosensitizer was studied, along with its photodynamic effect when exposed to radiation in the red visible light spectra.

Keywords: photodynamic therapy, chloro-aluminum phthalocyanine, nanoparticles, chitosan, ionic gelation, cancer cells

Συνομογραφίες

PDT	Photodynamic Therapy	Φωτοδυναμική Θεραπεία
ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικές Οξυγονούχες Ρίζες
AICIPc	Chloro-aluminum phthalocyanine	Φθαλοκυανίνη χλωρο-αλουμινίου
DD	Degree of Deacetylation	Βαθμός Αποακετυλίωσης
EE	Encapsulation Efficiency	Απόδοση Εγκλωβισμού
DL	Drug Load	Ποσοστό Φόρτωσης Φαρμάκου
UV/vis	Ultraviolet/visible spectroscopy	Φασματομετρία Υπεριώδους/ορατού
PL	Photoluminescence spectroscopy	Φασματομετρία Φωτοφωταύγειας
FTIR	Fourier Transform Infrared spectroscopy	Φασματομετρία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier
DLS	Dynamic Light Scattering	Δυναμική Σκέδαση Φωτός
PDI	Polydispersity Index	Δείκτης Πολυδιασποράς
NPs	Nanoparticles	Νανοσωματίδια
SEM	Scanning Electron Microscopy	Μικροσκοπία Σάρωσης Ηλεκτρονίων
TEM	Transmission Electron Microscopy	Μικροσκοπία Διέλευσης Ηλεκτρονίων
EPR	Enhanced Permeation and Retention effect	Φαινόμενο Ενισχυμένης Διαπερατότητας και Κατακράτησης
CS	Chitosan	Χιτοζάνη
TPP	Sodium Tripolyphosphate	Τριπολυφωσφορικό Νάτριο
CS@AICIPc NPs	AICIPc encapsulated in chitosan nanoparticles	AICIPc εγκλωβισμένη σε νανοσωματίδια χιτοζάνης
CS_Blank NPs	Blank Chitosan nanoparticles	Κενά νανοσωματίδια χιτοζάνης

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1.1: Εικόνες SEM και TEM νανοσωματιδίων διαφορετικών σχημάτων και μεγεθών, (a,b) nanorods, (c,d) nanoneedles, (e,f) nanocandles, (g,h) nanodisks, (i,j) nanonuts, (k,l) microstars, (m,n) microUFOs και (o,p) microsphere.⁶ 2

Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας των top-down και bottom-up τεχνικών σύνθεσης NPs.^[1] 5

Εικόνα 1.3: Σχηματική απεικόνιση διαφόρων εφαρμογών που αξιοποιείται η νανοτεχνολογία^{1,3,6} 8

Εικόνα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου EPR, όπου παριστάνεται η αυξημένη διαπερατότητα και κατακράτηση του καρκινικού ιστού σε νανοσωματίδια, καθώς και το ελαττωματικό λεμφικό του σύστημα¹⁸ 10

Εικόνα 1.5: Σχηματική αναπαράσταση των τρόπων πρόσληψης νανοσωματιδίων από τον οργανισμό..... 17

Εικόνα 1.6: Δομή χιτίνης, αποτελείται από ομάδες N-ακετυλογλυκοζαμίνης συνδεδεμένες με β1-4 γλυκοσιδικούς δεσμούς (αριστερά) και δομή χιτοζάνης, αποτελείται από β1-4 συνδεδεμένες ομάδες D-γλυκοζαμίνης (αποακετυλιωμένη ομάδα) και ομάδες N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης (ακετυλιωμένη ομάδα)

(δεξιά). Η κατανομή των ομάδων είναι τυχαία και εξαρτάται από το βαθμό αποκετυλίωσης της χιτίνης κατά τη μετατροπή της σε χιτοζάνη.....	19
Εικόνα 1.7: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης νανοσωματιδίων χιτοζάνης με τη μέθοδο ionic gelation ⁴²	21
Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση της δράσης της φωτοδυναμικής θεραπείας, αρχικά χορηγείται ο φωτοευαισθητοποιητής, στη συνέχεια διανέμεται και συγκεντρώνεται στο στόχο και τέλος πραγματοποιείται η θεραπεία με ακτινοβολήση από φως κατάλληλου μήκους κύματος ⁴⁶	22
Εικόνα 2.2: Αλληλεπίδραση φωτός με το βιολογικό ιστό: ανάκλαση, σκέδαση, απορρόφηση και βάθος διείσδυσης με βάση το μήκος κύματος ⁴³	23
Εικόνα 2.3: Οπτικό/Θεραπευτικό παράθυρο βιολογικών ιστών ⁴⁷	24
Εικόνα 2.4: Διάγραμμα Jablonski, όπου παρατηρούνται διαφορετικά ενεργειακά και δονητικά επίπεδα, καθώς και οι διαφορετικές μεταβάσεις που μπορούν να πραγματοποιηθούν κατά την απορρόφηση φωτός	25
Εικόνα 2.5: Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών παραγωγής δραστικών οξυγονούχων ριζών κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία ⁵²	27
Εικόνα 2.6: Απεικόνιση των τριών τρόπων άμεσου κυτταρικού θανάτου, απόπτωσης (αριστερά), νέκρωσης (μέση) και αυτοφαγοκυττάρωσης (δεξιά) ⁴³	30
Εικόνα 2.7: Δομή Photofrin ⁷⁸	38
Εικόνα 2.8: Δομή 5-αμινολεβουλικού οξέος ⁷⁹	38
Εικόνα 2.9: Δομή Verteporfin [31].....	39
Εικόνα 2.10: Δομή Temoporfin [31].....	39
Εικόνα 2.11: Δομή Npe6 [31].....	40
Εικόνα 2.12: Δομή Purlytin [31]	40
Εικόνα 2.13: Δομή Lutrin [38]	41
Εικόνα 2.14: Δομή Φθαλοκυανίνης (αριστερά) και Ναφθαλοκυανίνης (δεξιά) με ψευδάργυρο στο κέντρο των δακτυλίων τους ⁸⁰	42
Εικόνα 2.15: Απεικόνιση φωτοδυναμικής θεραπείας σε επιφανειακούς καρκινικούς όγκους ⁹⁴	47
Εικόνα 2.16: Απεικόνιση φωτοδυναμικής θεραπείας σε εσωτερικούς καρκινικούς όγκους (αριστερά) και διαχυτές που χρησιμοποιούνται στα άκρα οπτικών ινών (δεξιά) ^{91,94}	47
Εικόνα 3.1: Φθαλοκυανίνη χλωρο-αλουμινίου AlClPc σε μορφή σκόνης (αριστερά), χημική δομή AlClPc (δεξιά)	51
Εικόνα 3.2: Χιτοζάνη πολύ χαμηλού μοριακού βάρους (30kDa, 10cps) σε στερεή μορφή από το Glentham Life Science.....	52
Εικόνα 3.3: Δοχείο αποθήκευσης γαλακτικού οξέος (αριστερά), χημική δομή γαλακτικού οξέος (δεξιά).....	52
Εικόνα 3.4: TPP σε στερεή μορφή (αριστερά), χημική δομή TPP (δεξιά)	52
Εικόνα 3.5: Χημική δομή NaOH	53
Εικόνα 3.6: Σχηματική απεικόνιση της σύνδεσης του TPP με τη χιτοζάνη κατά το σχηματισμό νανοσωματιδίων με τη μέθοδο ionic gelation ¹⁰¹	56
Εικόνα 3.7: Αριστερή εικόνα: σύνθεση νανοσωματιδίων χιτοζάνης χωρίς εγκλωβισμό AlClPc (αριστερά) με εγκλωβισμό AlClPc (δεξιά) πριν την προσθήκη TPP, Δεξιά εικόνα: σύνθεση νανοσωματιδίων χιτοζάνης χωρίς εγκλωβισμό AlClPc (αριστερά) με εγκλωβισμό AlClPc (δεξιά) μετά την προσθήκη TPP	56
Εικόνα 3.8: Διάταξη υπερήχων Vibra-cell από την Sonics & Materials (αριστερά), μηχανήμα υπερφυγόκεντρος Sorvall Lynx 6000 centrifuge από την Themro Scientific.....	57
Εικόνα 3.9: Διασπορές νανοσωματιδίων, αριστερά παρατηρούνται νανοσωματίδια CS χωρίς εγκλωβισμένη AlClPc, ενώ οι άλλες τρεις διασπορές περιέχουν εγκλωβισμένη AlClPc	57
Εικόνα 3.10: Διάταξη Rotavapor, Rotavapor R-114, υδατόλουτρο B-480, αντλία κενού V-710 και χειριστής κενού V-850 από τη Buchi.....	58

Εικόνα 3.11: Αριστερά: Διάταξη λυοφιλίωσης Lablgo Mini από την Frozen in Time Ltd, Δεξιά: Λυοφιλιωμένα νανοσωματίδια CS (λευκά) και νανοσωματίδια CS@AlCIPc (πράσινα).....	59
Εικόνα 3.12: Σχηματική απεικόνιση της υδροδυναμικής διαμέτρου μικκυλίου (αριστερά), συσσωματώματος σφαιρικών σωματιδίων (κέντρο) και ελλειπτικού σωματιδίου (δεξιά), όπου και παρατηρείται η διαφορά ανάμεσα στο πραγματικό μέγεθος (πράσινο χρώμα) και στο υδροδυναμικό μέγεθος που εξάγεται από το DLS (μπλε διακεκομμένη γραμμή)	60
Εικόνα 3.13: Μηχάνημα Zetasizer Nano ZS της Malvern Analytical (αριστερά) και ειδική κυψελίδα DTS1070 (δεξιά).....	60
Εικόνα 3.14: Φασματόμετρο απορρόφησης UV/vis Lambda 35 UV/VIS Spectrometer από την Perkin-Elmer instruments	61
Εικόνα 3.15: Φασματοφωτόμετρο φωτοφωταύγειας LS 45 Luminescence Spectrometer της Perkin-Elmer instruments	62
Εικόνα 3.16: Διάταξη διοδικού laser GCSLS-10-1500m μήκους κύματος 660 nm	63
Εικόνα 3.17: Μόριο φλουορεσκεΐνης (6-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester) CM-H ₂ DCFDA (αριστερά) και φάσματα Uv/vis και PL φλουορεσκεΐνης CM-H ₂ DCFDA (δεξιά) ^{[100], [101]}	64
Εικόνα 3.18: Χημική δομή MTT (αριστερά) και φορμαζάνης (δεξιά).....	65
Εικόνα 3.19: Ημισυμπληρωμένο plate 96 θέσεων, όπου κατά την ανάλυση MTT στις θέσεις που παρατηρείται πιο έντονο χρώμα παρατηρείται και μεγαλύτερος αριθμός ζωντανών κυττάρων	66
Εικόνα 4.1: Συσχέτιση της υδροδυναμικής διαμέτρου (Nps size (nm)) των νανοσωματιδίων CS@AlCIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% (αριστερά), TPP w/v% (κέντρο) και ST min (δεξιά)	68
Εικόνα 4.2: Συσχέτιση πειραματικών και προβλεπόμενων τιμών από το μοντέλο για το μέγεθος των νανοσωματιδίων CS@AlCIPc.....	69
Εικόνα 4.3: Απεικόνιση της συσχέτισης του μεγέθους των νανοσωματιδίων CS@AlCIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% και TPP w/v% σε δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) κατανομή, για ST = 5 min.....	70
Εικόνα 4.4: Απεικόνιση της συσχέτισης του μεγέθους των νανοσωματιδίων CS@AlCIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% και TPP w/v% σε δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) κατανομή, για ST = 15 min.....	70
Εικόνα 4.5: Συσχέτιση του ζ-Δυναμικού (Zeta potential (mV)) των νανοσωματιδίων CS@AlCIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% (αριστερά), TPP w/v% (κέντρο) και ST min (δεξιά)	71
Εικόνα 4.6: Φάσματα απορρόφησης UV/vis της AlCIPc σε διάφορες συγκεντρώσεις σε εύρος 300-750 nm	72
Εικόνα 4.7: Καμπύλη βαθμονόμησης της AlCIPc με βάση τη μέγιστη απορρόφησης της στα 679 nm	73
Εικόνα 4.8: Συσχέτιση της απόδοσης εγκλωβισμού (EE (%)) της AlCIPc στα νανοσωματίδια CS με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% (αριστερά), TPP w/v% (κέντρο) και ST min (δεξιά)	75
Εικόνα 4.9: Συσχέτιση του ποσοστού φόρτωσης (DL (%)) των νανοσωματιδίων CS@AlCIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% (αριστερά), TPP w/v% (κέντρο) και ST min (δεξιά).....	76
Εικόνα 4.10: Συσχέτιση πειραματικών και προβλεπόμενων τιμών από το μοντέλο για το DL των νανοσωματιδίων CS@AlCIPc.....	78
Εικόνα 4.11: Απεικόνιση της συσχέτισης του DL των νανοσωματιδίων CS@AlCIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% και TPP w/v% σε δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) κατανομή, για ST = 5 min.....	78
Εικόνα 4.12: Απεικόνιση της συσχέτισης του DL των νανοσωματιδίων CS@AlCIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% και TPP w/v% σε δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) κατανομή, για ST = 15 min.....	78
Εικόνα 4.13: Συσχέτιση της μάζας των νανοσωματιδίων CS@AlCIPc που συλλέχθηκε (NPs Weight (mg)) με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% (αριστερά), TPP w/v% (κέντρο) και ST min (δεξιά)	79
Εικόνα 4.14: Συσχέτιση πειραματικών και προβλεπόμενων τιμών από το μοντέλο για τη μάζα των νανοσωματιδίων CS@AlCIPc.....	81

Εικόνα 4.15: Απεικόνιση της συσχέτισης της μάζας των νανοσωματιδίων CS@AICIPc που συλλέχθηκε με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% και TPP w/v% σε δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) κατανομή, για ST = 5 min	81
Εικόνα 4.16: Απεικόνιση της συσχέτισης της μάζας των νανοσωματιδίων CS@AICIPc που συλλέχθηκε με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% και TPP w/v% σε δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) κατανομή, για ST = 15 min	81
Εικόνα 4.17: Νανοσωματίδια CS_Blank (λευκά) και CS@AICIPc (πράσινα) σε υδατική διασπορά (αριστερά) και λυοφιλιωμένα (δεξιά)	85
Εικόνα 4.18: Φάσματα FTIR χιτοζάνης, TPP και νανοσωματιδίων χιτοζάνης	86
Εικόνα 4.19: Φάσματα FTIR νανοσωματιδίων χιτοζάνης, νανοσωματιδίων χιτοζάνης με εγκλωβισμένη AICIPc και ελεύθερης AICIPc.....	88
Εικόνα 4.20: Φάσμα απορρόφησης UV/vis ελεύθερης AICIPc σε διάφορους διαλύτες.....	90
Εικόνα 4.21: Φάσμα απορρόφησης UV/vis νανοσωματιδίων CS@AICIPc_1 σε διάφορους διαλύτες.....	91
Εικόνα 4.22: Φάσματα φωτοφωταύγειας ελεύθερης AICIPc σε DMSO και PBS.....	92
Εικόνα 4.23: Φάσματα φωτοφωταύγειας νανοσωματιδίων CS@AICIPc σε DMSO και PBS.....	92
Εικόνα 4.24: Αριστερά: Φάσμα εκπομπής φωτοφωταύγειας ελεύθερης AICIPc σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, Δεξιά: Ποσοστιαία μεταβολή έντασης φωτοφωταύγειας.....	93
Εικόνα 4.25: Διαγράμματα εκπομπής φωτοφωταύγειας CM-H ₂ DCFDA για διαλύμα ελεύθερης AICIPc (αριστερά) και ποσοστιαία μεταβολή παραγωγής ROS για ελεύθερη AICIPc (δεξιά).....	94
Εικόνα 4.26: Βιωσιμότητα κυττάρων A431 μετά την επώασή τους με ελεύθερη AICIPc και νανοσωματίδια CS@AICIPc_1	96
Εικόνα 4.27: Βιωσιμότητα κυττάρων A431 μετά την επώασή τους με νανοσωματίδια CS@AICIPc_1 και CS_Blank_3	97
Εικόνα 4.28: Βιωσιμότητα κυττάρων A431 μετά την επώασή τους με ελεύθερη AICIPc και νανοσωματίδια CS@AICIPc_1 και την ακτινοβόλησή τους με laser 660 nm, 9 mW/cm ² για διαφορετικούς χρόνους	98

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 3.1: Πίνακας με πληροφορίες για τους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν	53
Πίνακας 3.2: Παρουσίαση ανεξάρτητων μεταβλητών και αποκρίσεων που χρησιμοποιήθηκαν για τον πειραματικό σχεδιασμό με το μοντέλο Box-Behnken	54
Πίνακας 3.3: Τα 15 πειράματα που προκύπτουν από το λογισμικό πειραματικού σχεδιασμού για τη σύνθεση CS@AICIPc NPS	54
Πίνακας 4.1: Αναλυτική παρουσίαση όλων των αποκρίσεων που προέκυψαν πειραματικά για τα 15 πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό	67
Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα σχετικά με την υδροδυναμική ακτίνα και το δείκτη πολυδιασποράς PDI που προέκυψαν από το DLS	67
Πίνακας 4.3: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA σχετικά με το μέγεθος των νανοσωματιδίων CS@AICIPc	69
Πίνακας 4.4: Αποτελέσματα σχετικά με ζ-Δυναμικό που προέκυψαν από το DLS.....	70
Πίνακας 4.5: Τιμές EE που υπολογίστηκαν για τα νανοσωματίδια CS@AICIPc	74
Πίνακας 4.6: Αποτελέσματα σχετικά με το DL των CS@AICIPc	76
Πίνακας 4.7: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA σχετικά με το DL των νανοσωματιδίων CS@AICIPc	77
Πίνακας 4.8: Τιμές μάζας που συλλέχθηκε από τα CS@AICIPc.....	79

Πίνακας 4.9: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA σχετικά με το μέγεθος των νανοσωματιδίων CS@AICIPc	80
Πίνακας 4.10: Άνω και κάτω όριο των ανεξάρτητων και εξαρτημένων μεταβλητών και κριτήρια βελτιστοποίησης για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας σύνθεσης νανοσωματιδίων CS@AICIPc.....	82
Πίνακας 4.11: Βέλτιστες τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών και προβλεπόμενες τιμές εξαρτημένων μεταβλητών	82
Πίνακας 4.12: Πειραματικές τιμές που προέκυψαν για τα τρία δείγματα επιβεβαίωσης μοντέλου που παράχθηκαν	83
Πίνακας 4.13: Επιβεβαίωση μοντέλου πρόβλεψης για νανοσωματίδια CS@AICIPc για διάστημα εμπιστοσύνης 95%	83
Πίνακας 4.14: Χαρακτηριστικά κενών νανοσωματιδίων CS_Blank.....	84
Πίνακας 4.15: Χαρακτηριστικά δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.....	85
Πίνακας 4.16: Συσχέτιση τιμής p-value με τη στατιστική σημασία της	95

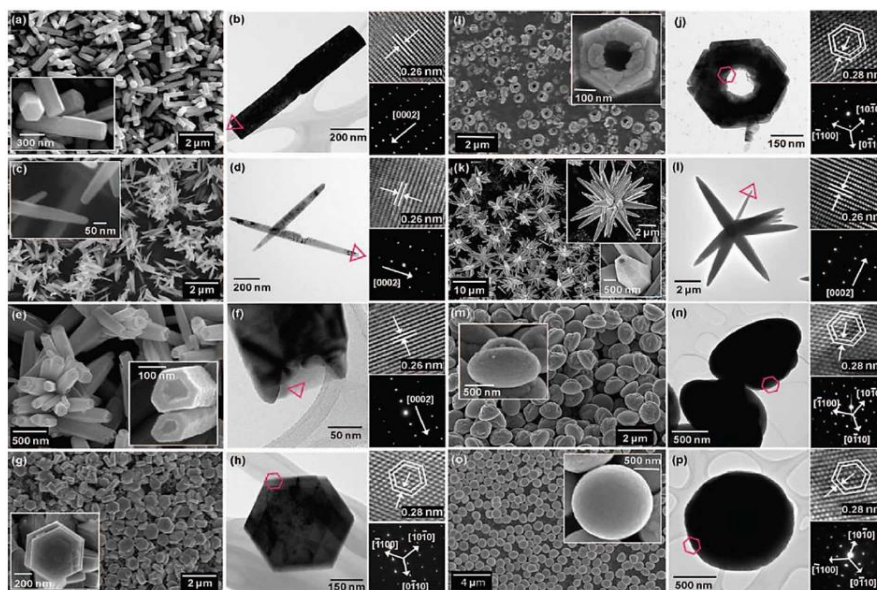
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 – Νανοτεχνολογία/Νανοεπιστήμη

Η νανοτεχνολογία είναι η επιστήμη που αφορά τη μελέτη και την κατανόηση των ιδιοτήτων της ύλης στη νανοκλίμακα, καθώς επίσης σχετίζεται και με το σχεδιασμό και την παραγωγή υλικών ή συστημάτων με ελεγχόμενη μοριακή/ατομική δομή. Τα τελευταία χρόνια ο κλάδος της επιστήμης της νανοτεχνολογία έχει αναπτυχθεί σημαντικά, καθώς τα νανοϋλικά παρουσιάζουν μοναδικές και καινοτόμες ιδιότητες, οι οποίες είναι πολύ χρήσιμες σε διάφορες εφαρμογές. Ως νανοϋλικά γίνεται αναφορά σε υλικά που παρουσιάζουν τουλάχιστον μία κύρια διάσταση τους από 1 έως 100 νανόμετρα, όπου και το μέγεθος των νανοϋλικών είναι ο κύριος παράγοντας για τον οποίο παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες σε σχέση με τα υλικά στη συμβατική κλίμακα, καθώς στη νανοκλίμακα είναι παρόντα κβαντικά φαινόμενα και παρατηρείται αυξημένη αναλογία ανάμεσα στην επιφάνεια του υλικού και τη μάζα του (μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια). Με βάση τη σύσταση, το μέγεθος και τη μορφολογία τους τα νανοϋλικά παρουσιάζουν νέες ή και βελτιωμένες φυσικές, χημικές ή βιολογικές ιδιότητες. Τα νανοϋλικά ανάλογα με το πόσες από τις τρεις διαστάσεις τους δεν βρίσκονται στη νανοκλίμακα μπορούν να χαρακτηριστούν ως 3D υλικά, αυτά είναι τα υλικά της συμβατικής κλίμακας όπου καμία διάστασή τους δεν βρίσκεται στη νανοκλίμακα, ως 2D υλικά, στα οποία μία διάστασή τους βρίσκεται στη νανοκλίμακα (για παράδειγμα υμένα ή επιστρώσεις με πάχος μερικά νανόμετρα), ως 1D υλικά στα οποία δύο διαστάσεις βρίσκονται στη νανοκλίμακα (για παράδειγμα νανονήματα-*nanofiber* ή νανοσωλήνες-*nanotubes*) και ως 0D υλικά, στα οποία όλες τους οι διαστάσεις βρίσκονται στη νανοκλίμακα (για παράδειγμα κβαντικές τελείες και νανοσωματίδια).¹

1.2 – Νανοςωματίδια

Όπως προαναφέρθηκε, ως νανοςωματίδιο (*nanoparticle*, NP) χαρακτηρίζεται ένα 0D υλικό, στο οποίο όλες του οι διαστάσεις βρίσκονται στη νανοκλίμακα, δηλαδή η τιμή τους είναι ανάμεσα στα 0-100 nm. Βέβαια, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι αναφορά σε νανοςωματίδια μπορεί να γίνει και σε υλικά που παρουσιάζουν μέγεθος πάνω από 100 nm, λόγω της δυσκολίας ελέγχου της δομής τους σε αυτές τις διαστάσεις, οπότε συμβατικά ως νανοςωματίδια αναφέρονται και υλικά με διαστάσεις έως και 500 nm. Αυτά τα υλικά μπορούν να παρουσιάσουν διαφορετικά σχήματα, όπως σφαιρικά, ελλειπτικά, κυβικά, ραβδοειδή ή και συνδυασμό αυτών, τα οποία πλέον μπορούν να μελετηθούν με τη βοήθεια της μικροσκοπίας σάρωσης ηλεκτρονίων (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) και της μικροσκοπίας διέλευσης ηλεκτρονίων (*Transmission Electron Microscopy*, TEM). Το σχήμα και το μέγεθος των νανοςωματιδίων επηρεάζουν σημαντικά τις ιδιότητες τους, και συνεπώς την εφαρμογή στην οποία μπορούν να αξιοποιηθούν, όπου και έχει παρατηρηθεί ότι αυτοί οι δύο παράγοντες μπορούν να ελέγχονται και να ρυθμίζονται με τη χρήση της κατάλληλης μεθόδου σύνθεσης και των κατάλληλων παραμέτρων υλοποίησης της. Γενικά, τα νανοςωματίδια μπορούν να παραχθούν από πολυμερικά, ανθρακικά, ανόργανα, ημιαγώγιμα ή και μεταλλικά υλικά. Είναι σημαντικό επίσης να σημειωθεί ότι τα νανοςωματίδια, εκτός από την εργαστηριακή τους σύνθεση μπορούν να εντοπιστούν και στη φύση σε διάφορες μορφές.¹⁻³



Εικόνα 1.1: Εικόνες SEM και TEM νανοσωματιδίων διαφορετικών σχημάτων και μεγεθών, (a,b) nanorods, (c,d) nanoneedles, (e,f) nanocandles, (g,h) nanodisks, (i,j) nanonuts, (k,l) microstars, (m,n) microUFOs και (o,p) microsphere.⁴

1.3 – Ιδιότητες Νανοσωματιδίων

Το μέγεθος των νανοσωματιδίων (και γενικότερα όλων των νανοϋλικών) είναι ο κυριότερος παράγοντας για τον οποίο παρουσιάζουν διαφορετικές ή και βελτιωμένες ιδιότητες σε σχέση με τα υλικά στη μακροκλίμακα. Συγκεκριμένα, στις νανοδιαστάσεις τα κβαντικά και ηλεκτροστατικά φαινόμενα παίζουν πολύ πιο σημαντικό ρόλο στη συμπεριφορά της ύλης, σε σχέση με τη συμβατική κλίμακα. Για αυτό το λόγο είναι πολύ δύσκολο έως και αδύνατον να περιγράψει η συμπεριφορά των νανοϋλικών με τη χρήση της κλασικής φυσικής και των βαρυτικών δυνάμεων. Ωστόσο, με την ανάπτυξη της κβαντομηχανικής και της κβαντικής φυσικής, είναι πλέον εφικτή η κατανόηση των χαρακτηριστικών και των ιδιοτήτων των νανοϋλικών, έχοντας ως τελικό σκοπό την χρήση τους σε περισσότερες, πιο απαιτητικές και καινοτόμες εφάρμογες. Στη νανοκλίμακα, μικρές διακυμάνσεις στο μέγεθος ενός υλικού είναι πιθανόν να επιφέρουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στις τελικές ιδιότητές του, λόγω της ισχυρότερης δράσης διαμοριακών δυνάμεων, όπως οι Van Der Waals.^{1,2,4-8}

Ειδική επιφάνεια

Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό των νανοσωματιδίων είναι η πολύ μεγάλη ειδική επιφάνεια που παρουσιάζουν σε σχέση με τα υλικά στη συμβατική κλίμακα, γεγονός που οφείλεται αποκλειστικά στο πολύ μικρό τους μέγεθος. Η αυξημένη ειδική τους επιφάνεια έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη δραστικότητά τους και συνεπώς τη βελτιωμένη αποτελεσματικότητά τους σε πληθώρα εφαρμογών. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η αυξημένη ειδική τους επιφάνεια είναι πιθανόν να οδηγήσει και στην αύξηση της τάσης τους να συσσωματώνονται, κυρίως λόγω των δυνάμεων Van der Waals που αναπτύσσονται ανάμεσα στα NPs, όπου και είναι πιο ισχυρές σε αυτές τις διαστάσεις. Επίσης παρατηρείται ότι στα NPs είναι πιο έντονη και η τυχαία κίνηση Brown, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα να μην καθιζάνουν εύκολα σε διαλύματα.^{1,2,4-8}

Καταλυτικές ιδιότητες

Γενικά, τα NPs λόγω της υψηλής τους ειδικής επιφάνειας παρουσιάζουν εξαιρετικές καταλυτικές ιδιότητες, καθώς παρουσιάζουν αυξημένη δραστικότητα και μεγαλύτερη ποσότητά τους έρχεται σε επαφή με τα υλικά υπό κατάλυση, σε σχέση με άλλα υλικά στη συμβατική κλίμακα.^{1,2,4-8}

Μαγνητικές ιδιότητες

Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι οι μαγνητικές ιδιότητες των υλικών στη νανοκλίμακα αλλάζουν, και συγκεκριμένα αλλάζουν με βάση το μέγεθος του υλικού. Μη μαγνητικά υλικά έχουν τη δυνατότητα να παρουσιάσουν μαγνητικές ιδιότητες όταν βρεθούν στη νανοκλίμακα, ενώ παραμαγνητικά υλικά μπορούν να παρουσιάσουν υπερπαραμαγνητικότητα. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν διατήρηση της κατεύθυνσης της μαγνήτισής τους, καθώς και μεγαλύτερη σταθερότητα. Η μείωση του μεγέθους των νανοσωματιδίων μπορεί να οδηγήσει και σε υλικά που παρουσιάζουν πολύ ισχυρές υπερμαγνητικές ιδιότητες.^{1,2,4-8}

Ηλεκτρικές ιδιότητες

Όπως και οι μαγνητικές, έτσι και οι ηλεκτρικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων επηρεάζονται και αλλοιώνονται με βάση το μέγεθός τους. Στα νανοσωματίδια με τη μείωση του μεγέθους τους παρατηρείται συνήθως μείωση της ηλεκτρικής αγωγιμότητάς τους, καθώς η διασπορά των ηλεκτρονίων εντοπίζεται στα όρια των κόκκων. Βέβαια, η φύση και το μέγεθος του κάθε νανοϋλικού καθορίζει το ιοντικό δυναμικό του και την έλξη των ηλεκτρονίων, όπου και για αυτό το λόγο υπάρχουν μερικά νανοϋλικά που παρουσιάζουν εξαιρετική ηλεκτρική αγωγιμότητα (κυρίως 2D νανοϋλικά). Να σημειωθεί ωστόσο, ότι τα νανοσωματίδια τείνουν να παρουσιάζουν βελτιωμένες ικανότητες να αποθηκεύουν ηλεκτρική ενέργεια.^{1,2,4-8}

Οπτικές ιδιότητες

Έχει παρατηρηθεί ότι τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν σημαντικά διαφορετικές οπτικές ιδιότητες σε σχέση με τα υλικά στη συμβατική κλίμακα, κυρίως όσον αφορά τις φθορίζουσες ιδιότητές τους, όπου με τον έλεγχο του μεγέθους μπορεί να ελεγχθεί το μήκος κύματος εκπομπής ή απορρόφησης τους. Ένας παράγοντας, λόγω του οποίου παρατηρείται αυτό, είναι επειδή το μέγεθός τους μπορεί να είναι μικρότερο από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας τους φωτός. Τα διαλύματα των νανοσωματιδίων συνήθως είναι διαφανή (ανάλογα με το διαλύτη), ενώ όταν βρίσκονται σε κolloειδή διασπορά παρατηρείται ότι μπορούν να σκεδάζουν το φως.^{1,2,4-8}

Μηχανικές ιδιότητες

Γενικά, τα νανοϋλικά διαφόρων υλικών έχουν την τάση να εμφανίζουν βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες, γεγονός που οφείλεται στο ότι στη νανοκλίμακα οι κρύσταλλοι των υλικών παρουσιάζουν λιγότερες κρυσταλλογραφικές ατέλειες. Ανάλογα με τη χημική τους σύσταση τα νανοσωματίδια μπορούν να παρουσιάσουν βελτιωμένη ελαστικότητα, σκληρότητα και αντοχή σε κόπωση, φθορά ή διάβρωση, ενώ ταυτόχρονα παρουσιάζουν χαμηλό βάρος. Βέβαια, λόγω του μεγέθους του η χρήση τους αφορά τη σύνθεση σύνθετων υλικών, όπου τα νανοϋλικά δρουν κυρίως ως ενισχυτικό μέσο.^{1,2,4-8}

Θερμικές ιδιότητες

Τα νανοσωματίδια έχει παρατηρηθεί ότι παρουσιάζουν χαμηλότερα σημεία τήξης και συμπύκνωσης σε σχέση με τα υλικά της συμβατικής κλίμακας, γεγονός που αποδίδεται στο μικρό μέγεθός τους, όπου και αποδίδεται στο γεγονός ότι οποιαδήποτε αλλαγή πραγματοποιείται σε ένα άτομο των νανοσωματιδίων επηρεάζει έντονα όλο το υλικό. Επιπλέον, ανάλογα με το υλικό υπάρχει η δυνατότητα τα νανοσωματίδια να παρουσιάσουν και καλύτερη θερμική αγωγιμότητα.^{1,2,4-8}

Κβαντικά φαινόμενα

Τα κβαντικά φαινόμενα είναι έντονα στα υλικά που βρίσκονται στη νανοκλίμακα, όπου η επίδρασή τους εξαρτάται από το μέγεθος και τη φύση του υλικού. Για παράδειγμα ένα τέτοιο φαινόμενο είναι αυτό του κβαντικού περιορισμού (Quantum confinement effect), όπου σύμφωνα με αυτό στα νανοσωματίδια (κυρίως ημιαγώγιμων υλικών), οι φθορίζουσες και οι ηλεκτρικές ιδιότητες τους εξαρτώνται από το μέγεθός τους. Συγκεκριμένα όσο μεγαλώνει το μέγεθός τους, τόσο μειώνεται το ενεργειακό χάσμα ανάμεσα στη ζώνη σθένους και στη ζώνη αγωγιμότητάς τους. Αυτό το φαινόμενο λαμβάνει χώρα σε υλικά που το μέγεθός τους είναι μικρότερο από την εξιτονική ακτίνα Bohr, η οποία είναι χαρακτηριστική για κάθε υλικό. Γενικά, η συμπεριφορά των νανοϋλικών μπορεί να περιγράψει πιο αποτελεσματικά μέσω της κβαντομηχανικής, σε σχέση με τη κλασική φυσική.^{1,2,4-8}

Ιατρικές/Βιολογικές ιδιότητες

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο ακαδημαϊκό ενδιαφέρον έχει αναπτυχθεί στην αξιοποίηση των νανοσωματιδίων σε ιατρικές/βιολογικές εφαρμογές, λόγω των μοναδικών χαρακτηριστικών που παρουσιάζουν. Τα νανοσωματίδια είναι δυνατόν να συνδεθούν κατάλληλα με φάρμακα και να σχεδιαστούν με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να μπορούν να συγκεντρώνονται επιλεκτικά σε συγκεκριμένα μέρη ή σε συγκεκριμένες λειτουργίες ενός οργανισμού. Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτού είναι η χρήση των νανοσωματιδίων σε αντικαρκινικές θεραπείες, όπου τα νανοσωματίδια λόγω του μεγέθους τους παρουσιάζουν την ιδιότητα να συσσωρεύονται περισσότερο σε καρκινικούς ιστούς σε σχέση με τους φυσιολογικούς, φαινόμενο γνωστό ως Ενισχυμένη Διαπερατότητα και Κατακράτηση (Enhanced Permeability and Retention effect, EPR), το οποίο βασίζεται στο ελλαττωματικό και πιο διαπερατό καρκινικό λεμφικό σύστημα που έχει αναπτυχθεί. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι μερικά νανοσωματίδια, υπό κατάλληλες συνθήκες, παρουσιάζουν και αντιμικροβιακή δράση.^{1,2,4-8}

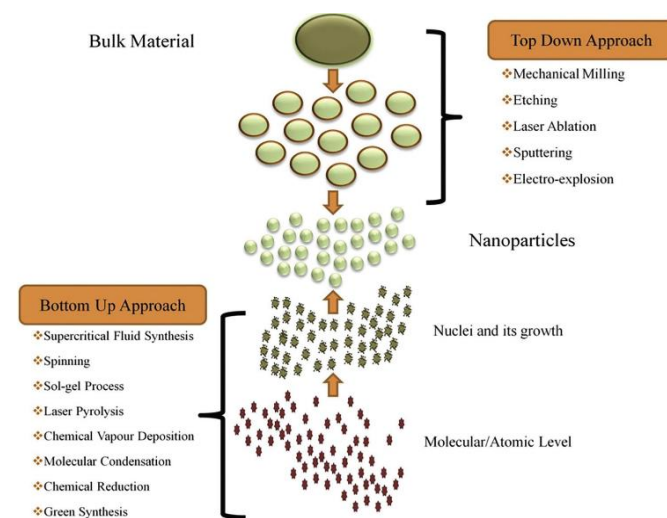
Το μέγεθος των νανοσωματιδίων επηρεάζει σημαντικά τη συμπεριφορά τους σε ένα βιολογικό σύστημα. Συγκεκριμένα, νανοσωματίδια μικρού μεγέθους είναι πιθανόν να παρουσιάζουν αυξημένη κυτταροτοξικότητα, λόγω του ότι μεταβολίζονται ευκολότερα και γρηγορότερα από τα κύτταρα, καθώς επίσης διαπερνούν με μεγαλύτερη ευκολία την κυτταρική μεμβράνη, γεγονός που μπορεί να αξιοποιηθεί για την πιο αποτελεσματική μεταφορά και αποδέσμευση φαρμάκων. Από την άλλη, νανοσωματίδια μεγάλου μεγέθους ή συσσωματώματά τους μπορεί να οδηγήσουν και αυτά στην αυξημένη κυτταροτοξικότητα, καθώς μπορεί να επηρεάσουν εντονότερα το άμεσο κυτταρικό περιβάλλον. Βέβαια, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα παραπάνω εξαρτώνται από το είδος των νανοσωματιδίων, δηλαδή από τις ουσίες και τα στοιχεία από τα οποία αποτελούνται. Επίσης, η επίδραση των νανοσωματιδίων εξαρτάται σημαντικά και από τα κύτταρα στα οποία επιδρούν. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι μερικά είδη νανοσωματιδίων, με τη μείωση του

μεγέθους τους παρουσιάζουν αυξημένη κυτταροτοξικότητα σε καρκινικά κύτταρα, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στο γρηγορότερο μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων σε σχέση με τα υγιή.^{1,2,4-8}

Ένα άλλο χαρακτηριστικό των νανοσωματιδίων που επηρεάζει τη συμπεριφορά τους σε ιατρικά/βιολογικά συστήματα είναι το ζ-δυναμικό. Αρχικά, για νανοσωματίδια που βρίσκονται σε διασπορά, είναι επιθυμητό να παρουσιάζουν υψηλή απόλυτη τιμή ζ-δυναμικού, το οποίο σημαίνει καλύτερη σταθερότητα και χαμηλότερη τάση συσσωμάτωσης. Εκτός αυτού, η συμπεριφορά των νανοσωματιδίων στα βιολογικά συστήματα εξαρτάται και από το πρόσημο του ζ-δυναμικού. Γενικά, οι μεμβράνες των κυττάρων παρουσιάζουν αρνητικό δυναμικό, οπότε έχει παρατηρηθεί ότι τα νανοσωματίδια που παρουσιάζουν θετικό ζ-δυναμικό προσδένονται και διαπερνούν ευκολότερα τις κυτταρικές μεμβράνες, λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσά τους. Εκτός αυτού, πολλά καρκινικά κύτταρα έχουν την τάση να παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές pH και ζ-δυναμικού σε σχέση με τα υγιή κύτταρα, έχοντας ως αποτέλεσμα να κατακρατούν περισσότερο τα νανοσωματίδια θετικού ζ-δυναμικού. Βέβαια, αυτό δεν σημαίνει ότι είναι απαγορευτική η χρήση νανοσωματιδίων αρνητικού ζ-δυναμικού, καθώς αυτά μπορεί να σχεδιαστούν ευκολότερα στο να παρουσιάζουν καλύτερη επιλεκτικότητα σε συγκεκριμένα είδη κυττάρων/λειτουργίες του οργανισμού. Επιπλέον, έχουν και αυτά, σε μερικές περιπτώσεις, τη δυνατότητα να διαπερνούν αποτελεσματικά τις κυτταρικές μεμβράνες, λόγω τοπικά θετικά φορτισμένων περιοχών που βρίσκονται στη δομή των μεμβρανών, στις οποίες τα ανιονικά νανοσωματίδια συσσωρεύονται, καθώς απωθούνται από την υπόλοιπη αρνητικά φορτισμένη μεμβράνη.⁹⁻¹¹

1.4 – Μέθοδοι Σύνθεσης Νανοσωματιδίων

Τα νανοσωματίδια μπορούν να παραχθούν με διάφορες μεθόδους, οι οποίες μπορούν να διαχωρίζονται σε πολλαπλές κατηγορίες, ανάλογα με τον τρόπο που πραγματοποιούνται. Συγκεκριμένα, ανάλογα με το είδος της διεργασίας που λαμβάνει χώρα κατά τη σύνθεση των νανοσωματιδίων χωρίζονται σε χημικές ή φυσικές, ενώ ανάλογα με την κατάσταση της ύλης μπορούν να χωριστούν σε στερεής, υγρής ή αέριας κατάστασης. Ωστόσο, η πιο σημαντική διαφοροποίηση των τεχνικών παρασκευής των νανοσωματιδίων παρατηρείται ανάλογα με τις διαστάσεις της πρώτης ύλης που



Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας των top-down και bottom-up τεχνικών σύνθεσης NPs.^[1]

χρησιμοποιείται, όπου τελικώς παρατηρούνται οι τεχνικές top-down και bottom-up. Κατά τις top-down τα νανοσωματίδια παράγονται από τη διάσπαση υλικών ή νανοϋλικών μεγαλύτερα από τα νανοσωματίδια, με χημικές ή φυσικές μεθόδους, ενώ κατά τις bottom-up τα νανοσωματίδια παράγονται από τα μόρια ή άτομα των πρώτων υλών, από τα οποία τα μεγαλύτερα σε μέγεθος νανοσωματίδια αυτό-συγκροτούνται υπό κατάλληλες συνθήκες. Γενικά, ανάλογα με το τι είδος τεχνική έχουν παραχθεί τα νανοσωματίδια παρατηρούνται διαφορές στο κόστος παραγωγής τους, καθώς και στη δομή τους, γεγονός που σημαίνει διαφορές και στις ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά

τους. Επομένως, είναι σημαντικό, να επιλέγεται η κατάλληλη μέθοδος σύνθεσης ανάλογα και με την εφαρμογή για την οποία προορίζεται το κάθε νανοϋλικό.^{1,4,5,7}

1.4.1 – Top-down Μέθοδοι Σύνθεσης Νανοσωματιδίων

Οι μέθοδοι top-down βασίζονται στη διάσπαση δεσμών ανάμεσα σε άτομα υλικών όγκου, προς το σχηματισμό νανοϋλικών. Τα νανοσωματίδια που παράγονται από αυτές τις μεθόδους συνήθως έχουν καθορισμένη δομή, την οποία αποκτούν από τα πρόδρομα υλικά που χρησιμοποιούνται, και έτσι δεν υπάρχουν ατέλειες στη δομή τους. Γενικά οι top-down μέθοδοι παρασκευής είναι κατάλληλες για 1D ή 2D νανοϋλικών, καθώς επίσης και για παρασκευή νανοδομημένων υλικών, ωστόσο οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους δεν είναι κατάλληλες για παραγωγή 0D νανοσωματίδια, καθώς είναι δύσκολο και πολύ απαιτητικό να διασπαστεί η ύλη σε τέτοιες διαστάσεις. Επιπλέον, οι top-down μέθοδοι, κατά κύριο λόγο, δεν είναι ικανές για μεγάλη παραγωγή νανοϋλικών πολύ μικρών διαστάσεων, επειδή είναι χρονοβόρες και το κόστος παραγωγής μεγάλης ποσότητας είναι υψηλό, λόγω του ακριβούς εξοπλισμού που απαιτείται για να πραγματοποιηθούν. Επίσης, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι πολλές ουσίες που χρησιμοποιούνται κατά τη σύνθεση ή την επεξεργασία των νανοϋλικών, με αυτές τις μεθόδους, είναι δραστικές/τοξικές, γεγονός που μπορεί είτε να περιορίσει την χρήση αυτών των υλικών σε ορισμένες εφαρμογές, είτε να οδηγήσει στην απαίτηση περαιτέρω μετεπεξεργασίας των υλικών, αυξάνοντας έτσι ακόμα περισσότερο το κόστος και την απαιτητικότητα αυτών των τεχνικών.^{1,4,5,7}

1.4.2 – Bottom-up Μέθοδοι Σύνθεσης Νανοσωματιδίων

Οι bottom-up μέθοδοι βασίζονται στο σχηματισμό νανοδομών από άτομα ή μόρια. Οι τεχνικές bottom-up αναπτύχθηκαν έτσι ώστε να αντιμετωπιστούν τα κύρια μειονεκτήματα των top-down, δηλαδή το μεγάλο κόστος, την αδυναμία μαζικής παραγωγής, τη χρήση δραστικών/τοξικών ουσιών και την απαίτηση της περεταίρω επεξεργασίας των περισσότερων προϊόντων από αυτές τις μεθόδους. Στις top-down μεθόδους τα νανοσωματίδια που παράγονται κατά κύριο λόγο παρουσιάζουν απλή συγκεκριμένη δομή, που είναι παρόμοια με αυτή των πρόδρομων υλικών που χρησιμοποιήθηκαν. Αντιθέτως στις bottom-up μεθόδους είναι πιο δύσκολο να ελέγχει το μέγεθος και η δομή τους και κατά τη διαδικασία παραγωγής τους είναι πιθανόν να παραχθούν και παραπροϊόντα, τα οποία απαιτούν περαιτέρω διαδικασίες για απομάκρυνση (όπως φυγοκέντριση ή διάλυση). Όμως, το σημαντικό πλεονέκτημα των bottom-up μεθόδων είναι η εύκολη και οικονομική παραγωγή των νανοσωματιδίων, η οποία συνήθως πραγματοποιείται από χημικές μεθόδους αέριας ή υγρής κατάστασης. Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιείται η σύνθεση επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων που παράγονται, γεγονός που οδηγεί σε μεγάλη ποικιλία νανοϋλικών, όσον αφορά τη δομή, τη σύσταση και το μέγεθός τους. Στις bottom-up συνθέσεις, ανεξάρτητα από το υλικό που χρησιμοποιείται, συνήθως ο μηχανισμός σύνθεσης των νανοσωματιδίων είναι παρόμοιος. Αρχικά, πραγματοποιείται η διάσπαση της πρόδρομης ουσίας, συνήθως υγρής ή αέριας, σε μοριακό ή ατομικό επίπεδο. Μετά τη διάσπασή της, ακολουθεί το στάδιο της πυρηνοποίησης, κατά το οποίο τα μόρια ή άτομα της δημιουργούν ξεχωριστούς διακριτούς πυρήνες, στους οποίους αναπτύσσονται τα νανοσωματίδια μέσω διάχυσης, με βάση τα μόρια ή άτομα που έχουν διασπαστεί. Η πυρηνοποίηση μπορεί να είναι ομογενής, όπου έτσι λαμβάνει χώρα σε απόλυτα καθαρά διαλύματα, απουσία ξένων σωματιδίων ή επιφανειών. Μπορεί επίσης να είναι και ετερογενής, όπου έτσι η πυρηνοποίηση πραγματοποιείται από ξένα

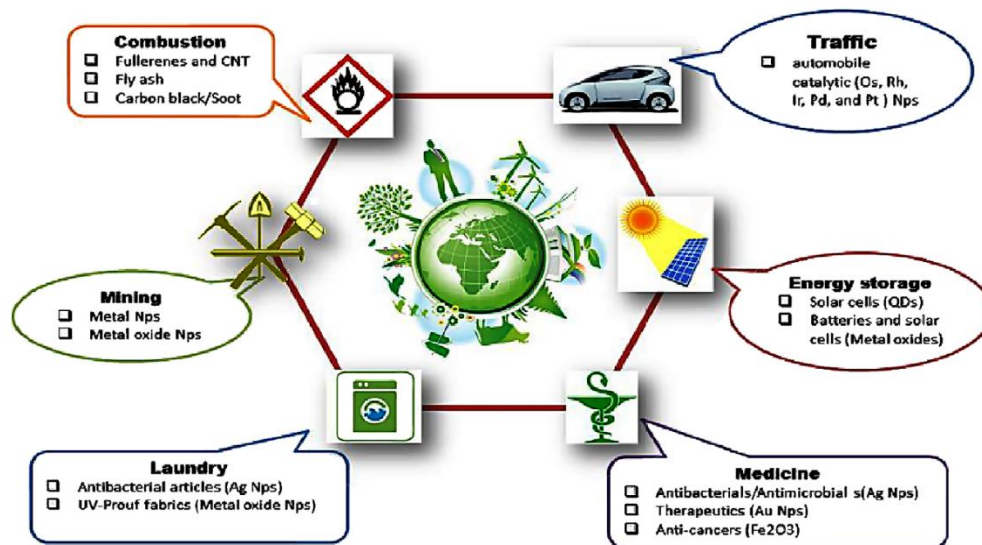
σωματίδια. Τα τελικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, όπως ήδη αναφέρθηκε, εξαρτώνται από τη μέθοδο και τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανάπτυξή τους.^{1,4,5,7}

Κατά κύριο λόγο, οι τεχνικές bottom-up ανήκουν στις χημικές υγρές μεθόδους, επιτρέποντας έτσι την επεξεργασία υλικών σε μοριακό επίπεδο, όπου βασίζονται στη χρήση πρόδρομων υγρών αντιδραστηρίων που περιέχουν τα στοιχεία από τα οποία τελικός αποτελούνται τα παραγόμενα νανοϋλικά. Αυτό, όπως προαναφέρθηκε, έχει ως αποτέλεσμα τα προϊόντα αυτών των μεθόδων να παρουσιάζουν μεγάλο εύρος υλικών που μπορούν να αξιοποιηθούν και τα τελικά νανοσωματίδια να παρουσιάζουν ομοιογένεια στο μέγεθός τους. Επιπλέον, αυτές οι μέθοδοι χαρακτηρίζονται από το χαμηλό τους κόστος και τη δυνατότητά τους να παρασκευάζουν μεγάλες ποσότητες προϊόντος. Ωστόσο, η καθαρότητά τους είναι πιθανόν να μην είναι ιδανική, καθώς επίσης και η παρασκευή παραπροϊόντων οδηγούν στην αναγκαιότητα επεξεργασία των προϊόντων μετά την σύνθεσή τους. Βέβαια, συνήθως η μετεπεξεργασία που απαιτείται είναι λιγότερο απαιτητική σε σχέση με τις top-down μεθόδους. Εκτός αυτού, αυτές οι τεχνικές πιθανόν να απαιτούν τη χρήση ισχυρών χημικών αντιδραστηρίων, καθιστώντας τις πιο επικίνδυνες από τις τεχνικές top-down, όπου και απαιτούν πολλές φορές την εφαρμογή συγκεκριμένων συνθηκών κατά τη σύνθεση των νανοσωματιδίων, αυξάνοντας έτσι τη δυσκολία στη χρήση τους. Από την άλλη όμως, οι bottom-up μέθοδοι μπορούν να πραγματοποιηθούν και με τη χρήση υδατικών ή πράσινων διαλυτών, δίνοντας έτσι την ευκαιρία καταλληλότερης παραγωγής νανοσωματιδίων για περιβαλλοντικές ή και βιολογικές εφαρμογές. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τις χημικές υγρές μεθόδους, τα νανοσωματίδια που παράγονται είναι πιο πιθανόν να δημιουργήσουν συσσωματώματα μεταξύ τους, λόγω της μεγάλης ειδικής τους επιφάνειας, της επιφανειακής τους δραστηριότητας και των δυνάμεων Van der Waals. Βέβαια, αυτό το πρόβλημα είναι πλέον αντιμετωπίσιμο σε αυτές τις μεθόδους σύνθεσης, με τη χρήση είτε ηλεκτροστατικής άπωση ανάμεσα στα νανοσωματίδια είτε με την επικάλυψή τους με επιφανειοδραστικές ενώσεις, οι οποίες αλληλοεπιδρούν με το διαλύτη και σταθεροποιούν έτσι τη διασπορά των νανοσωματιδίων εντός αυτού. Σε κάθε περίπτωση, τα πλεονεκτήματα των τεχνικών bottom-up είναι πολύ σημαντικότερα από τα μειονεκτητά τους (τα οποία με τη χρήση κατάλληλων τεχνικών αντιμετωπίζονται), και για αυτό το λόγο θεωρούνται καταλληλότερες για την παρασκευή νανοσωματιδίων σε σχέση με τις τεχνικές top-down.^{1,4,5,7}

1.5 – Εφαρμογές Νανοτεχνολογίας

Με βάση τις πολλαπλές και καινοτόμες ιδιότητες των νανοσωματιδίων έχει μελετηθεί εκτενώς η χρήση τους σε μεγάλη ποικιλία εφαρμογών. Πλέον, η αξιοποίηση της νανοτεχνολογίας στην κατασκευή νανοηλεκτρονικών διατάξεων και μικροσυστημάτων είναι πολύ σημαντική, όπου η χρήση των κατάλληλων νανοϋλικών μπορεί να βελτιώσει τα τελικά χαρακτηριστικά αυτών των συστημάτων. Επιπλέον, λόγω των οπτικών ιδιοτήτων τους τα νανοσωματίδια αξιοποιούνται ήδη σε διάφορες εφαρμογές, όπως για παράδειγμα σε αντιηλιακές κρέμες ή ως επιστρώσεις σε παράθυρα. Λόγω της αυξημένης ειδικής τους επιφάνειας, διάφορα νανοϋλικά χρησιμοποιούνται αρκετά σε καταλυτικές εφαρμογές, όπου και παρουσιάζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με τα υλικά στη μακροκλίμακα. Εκτός αυτού, έχει μελετηθεί και η ενίσχυση διαφόρων υλικών, όπως πολυμερών, με νανοϋλικά με σκοπό τη βελτίωση των μηχανικών, ηλεκτρικών ή θερμικών ιδιοτήτων τους. Η χρήση της νανοτεχνολογίας είναι πολύ σημαντική και στις ενεργειακές εφαρμογές, κυρίως για την ανάπτυξη συσκευών αποθήκευσης ενέργειας ή τη βελτίωση φωτοβολταϊκών κελιών. Επίσης, έχει εξεταστεί και η καταλληλότητα της χρήσης των νανοϋλικών σε περιβαλλοντικές εφαρμογές,

καθώς και στην ανάπτυξη αισθητήρων διαφόρων ειδών, όπως πιεζοηλεκτρικών, θερμικών, ηλεκτρικών, βιολογικών ή και χημικών. Τέλος, πολλά υποσχόμενη είναι και η αξιοποίηση της νανοτεχνολογίας σε ιατρικές και βιολογικές εφαρμογές είναι, καθώς τα μοναδικά χαρακτηριστικά των ναοϋλικών μπορούν να αξιοποιηθούν τόσο για θεραπευτικούς όσο και για διαγνωστικούς σκοπούς.^{1,4,6}



Εικόνα 1.3: Σχηματική απεικόνιση διαφόρων εφαρμογών που αξιοποιείται η νανοτεχνολογία^{1,4,6}

1.6 – Νανοσωματίδια σε ιατρικές/βιολογικές εφαρμογές

Μερικές από τις πιο ενδιαφέρουσες και αναπτυσσόμενες εφαρμογές των ναοϋλικών αφορούν τη χρήση τους στον ιατρικό/βιολογικό κλάδο, όπου αναφέρεται και ως η επιστήμη της νανοϊατρικής. Τα μοναδικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν αυτά τα υλικά τα καθιστούν κατάλληλα για χρήση στη βιοαπεικόνιση, στη φαρμακευτική, σε αντικαρκινικές θεραπείες, σε αντιμικροβιακές εφαρμογές, στην πραγματοποίηση διάγνωσης/βιοανάλυσης ή και στο συνδυασμό των παραπάνω. Κατά κύριο λόγο, τα νανοσωματίδια που χρησιμοποιούνται στις παραπάνω εφαρμογές προέρχονται από bottom-up συνθέσεις υγρής φάσης, λόγω του ότι αυτές οι τεχνικές παρουσιάζουν λιγότερα τοξικά παραπροϊόντα ή πρόδρομες ενώσεις, μικρότερο μέγεθος και καλύτερο έλεγχο των τελικών χαρακτηριστικών του προϊόντος. Για να χρηστεί κατάλληλο ένα υλικό για χρήση σε ιατρικές/βιολογικές εφαρμογές είναι σημαντικό να παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα, κατάλληλα φαρμοκοκινητικά χαρακτηριστικά και να αποδεσμεύεται ή να αποικοδομείται γρήγορα και αποτελεσματικά από τον οργανισμό. Τα νανοσωματίδια, ανάλογα με το είδος τους, έχει παρατηρηθεί ότι έχουν την ικανότητα να παρουσιάσουν αυτά τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, ωστόσο η χρήση, η καταλληλότητα και η αποτελεσματικότητά τους βρίσκεται ακόμα, κατά μεγάλο βαθμό υπό μελέτη. Γενικά έχουν μελετηθεί πολλά, διαφορετικών ειδών νανοσωματίδια και γενικότερα ναοϋλικά για χρήση σε τέτοιου είδους εφαρμογές, όπως ανόργανα νανοσωματίδια (νανοσωματίδια μετάλλων ή μεταλλικών οξειδίων, κβαντικές τέλειες μετάλλων ή άνθρακα), ναοϋλικά άνθρακα (νανοσωλήνες/ναοΐνες άνθρακα), λιποσώματα και πολυμερικά νανοσωματίδια, όπου και μερικά από αυτά έχουν ήδη εγκριθεί κατάλληλα για χρήση σε εφαρμογές στον ιατρικό κλάδο.¹²⁻¹⁴

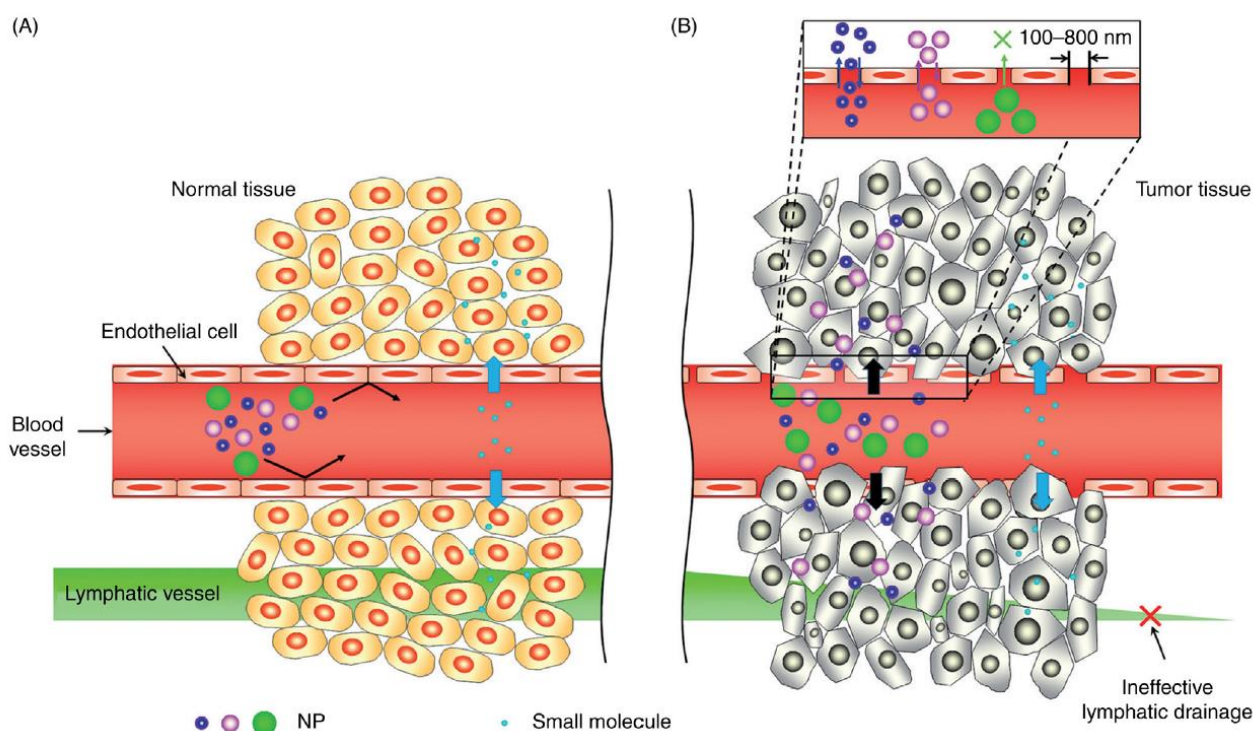
1.6.1 – Νανοσωματίδια στη βιοαπεικόνιση

Μία από τις πιο γνωστές και σημαντικές βιολογικές/ιατρικές εφαρμογές των νανοσωματιδίων είναι η βιοαπεικόνιση. Η βιοαπεικόνιση είναι μία μη επεμβατική μέθοδος, η οποία παρέχει οπτικές πληροφορίες σχετικά με βιολογικές λειτουργίες ή μορφολογίες σε πραγματικό χρόνο, όπου και ανήκει στις τεχνικές βιοφωτονικής. Η βιοφωτονική είναι ο συνδυασμός της βιολογίας με την επιστήμη της φωτονικής. Με άλλα λόγια, αναφέρεται σε τεχνικές οι οποίες δίνουν τη δυνατότητα να μελετηθούν βιολογικά μόρια, κύτταρα, κυτταρικά σωματίδια/δομές ή ιστοί, μέσω της αλληλεπίδρασης της βιολογικής ύλης με το φως (φωτόνια). Με τη χρήση των κατάλληλων οπτικών μέσων μπορούν να μελετηθούν διεργασίες, όπως η εκπομπή φθορισμού, η απορρόφηση φωτός, η σκέδαση του φωτός κτλ., εντός βιολογικών συστημάτων, παρέχοντας έτσι σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία και μορφολογία τους. Εκτός από τη μελέτη των βιολογικών συστημάτων, η βιοφωτονική αξιοποιείται και για διαγνωστικές ή θεραπευτικές εφαρμογές.¹⁵⁻¹⁷

Η βιοαπεικόνιση συνήθως πραγματοποιείται με τη χρήση μίας εξωγενούς ουσίας (ιχνηθέτης), η οποία παρουσιάζει οπτικές ιδιότητες και είναι σχεδιασμένη έτσι ώστε να συγκεντρώνεται στους υπό μελέτη στόχους. Είναι προφανές, ότι αυτή η ουσία θα πρέπει να παρουσιάζει καλή βιοσυμβατότητα και να μην διαταράσσει τις κυτταρικές ή βιολογικές λειτουργίες. Η επίτευξη της απεικόνισης μπορεί να πραγματοποιηθεί με πολλούς τρόπους, ανάλογα με τις ιδιότητες που παρουσιάζει ο εκατοστή ιχνηθέτης. Μία από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές βιοαπεικόνισης είναι αυτή που βασίζεται στην εκπομπή φθορισμού εξωγενούς ουσιών. Για αυτό το λόγο, τα νανοσωματίδια είναι πολύ ελκυστικά για χρήση σε τέτοιου είδους εφαρμογές, καθώς μπορούν παρουσιάζουν καλή βιοσυμβατότητα, να έχουν τη δυνατότητα εκπομπής ακτινοβολίας στην περιοχή του ορατού φωτός με καλό λόγο σήματος/θορύβου και να παρουσιάζουν εξαιρετική φωτοσταθερότητα. Επιπλέον, τα νανοσωματίδια μπορούν να συζευχτούν με κατάλληλα βιομόρια, καθιστώντας τα έτσι κατάλληλα για επιλεκτική και στοχευμένη συγκέντρωση σε συγκεκριμένα κύτταρα, κυτταρικά σωματίδια ή βιολογικές λειτουργίες του οργανισμού. Ωστόσο, το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό των νανοσωματιδίων είναι το μικρό τους μέγεθος. Το μέγεθος των περισσότερων κυττάρων είναι της τάξης των μικρών (0.1 - 5 μm), έχοντας ως αποτέλεσμα αρκετά νανοσωματίδια να έχουν τη δυνατότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και να συγκεντρώνονται στα κυτταρικά οργανίδια, όπως τα μιτοχόνδρια και τα λυσοσώματα. Με αυτόν τον τρόπο, είναι πλέον δυνατή η πιο αναλυτική μελέτη των κυτταρικών δομών με βάση των φθορισμό των νανοσωματιδίων που δρουν ως ιχνηθέτες.

Εκτός από τη χρήση τους ως ιχνηθέτες, τα νανοσωματίδια αξιοποιούνται στη βιοαπεικόνιση και ως μέσα μεταφοράς άλλων ουσιών, οι οποίες παρουσιάζουν πιο αποτελεσματικές ιδιότητες (για παράδειγμα φθορίζουσες ιδιότητες). Η βιοαπεικόνιση συνηθίζεται να πραγματοποιείται με τη χρήση χρωστικών, καθώς παρουσιάζουν εξαιρετικές φθορίζουσες ιδιότητες, με υψηλές κβαντικές αποδόσεις. Ωστόσο, αυτές οι ουσίες, κατά κύριο λόγο, παρουσιάζουν υδρόφοβο χαρακτήρα, λόγω του οποίου παρατηρείται η υποβάθμιση της δυνατότητας πρόσληψής τους από τα κύτταρα, η αυξημένη τοξικότητά τους, καθώς και η απόσβεση των φθορίζουσών ιδιοτήτων τους, λόγω της τάσης τους να δημιουργούν συσσωματώματα. Για τη βελτίωση της εικόνας που παράγεται από τις χρωστικές, έχει μελετηθεί η σύζευξή τους με διαφόρων ειδών νανοσωματίδια (πολυμερικά, μεταλλικά, άνθρακα), τα οποία έχουν τροποποιηθεί κατάλληλα, έτσι ώστε να παρουσιάζουν

υδρόφιλο χαρακτήρα, καθώς επίσης να μπορούν να εισέρχονται και να απομακρύνονται από τα κύτταρα, μέσω ενδοκυττάρωσης και μακροφάγων, αντίστοιχα. Έκτος αυτού, έχει μελετηθεί και η δυνατότητα της ελεγχόμενης τοπικής απελευθέρωσης της χρωστικής, μέσω ακτινοβολίας φως, όπου επιτυγχάνεται από τα μόρια υποκινητές που συνδέουν τη χρωστική με τα νανοσωματίδια. Η ποσότητα χρωστικής που απελευθερώνεται εξαρτάται από το χρόνο ακτινοβολήσης, όπου και τελικώς είναι δυνατόν να ληφθούν εικόνες βιοαπεικόνισης πολύ καλής ποιότητας. Εκτός από τη βελτίωση του υδρόφιλου χαρακτήρα των χρωστικών, τα νανοσωματίδια μπορούν να βελτιώσουν και την επιλεκτική συγκέντρωση της σε συγκεκριμένα κύτταρα ή κυτταρικά οργανίδια. Η επιλεκτική βιοαπεικόνιση με χρήση νανοσωματιδίων μπορεί να επιτευχθεί με βάση το μέγεθός τους ή με βάση τα βιομόρια με τα οποία έχουν συνδεθεί, διαδικασία γνωστή ως βιοσύζευξη. Με βάση το μέγεθός τους τα νανοσωματίδια μπορούν να συγκεντρωθούν επιλεκτικά σε καρκινικούς ιστούς, λόγω του EPR φαινομένου. Αυτό δίνει τη δυνατότητα πραγματοποίησης βιοαπεικόνισης σε πραγματικό χρόνο, σε καρκινικούς ιστούς, το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί και σε διαγνωστικές εφαρμογές. Κατά τη βιοσύζευξη των νανοσωματιδίων με βιομόρια, μπορεί να επιτευχθεί και η περαιτέρω βελτίωση της επιλεκτικότητας τους σε καρκινικούς ιστούς, για παράδειγμα με τη σύνδεση τους με καρκινικά αντιγόνα ή μονοσακχαρίτες, όπου έχει παρατηρηθεί ότι μερικά καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερη χημική συγγένεια με τη γλυκόζη σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, επιτυγχάνοντας έτσι την επιλεκτική συγκέντρωση. Επιπλέον, η βιοσύζευξη μπορεί να πραγματοποιηθεί με σκοπό την επισήμανση συγκεκριμένων κυτταρικών σωματιδίων ή λειτουργιών. Με τη χρήση κατάλληλων βιομορίων για τη βιοσύζευξη των νανοσωματιδίων, είναι δυνατόν να επιτευχθεί η βιοαπεικόνιση με μεγάλη ευκρίνεια σε πολλά βιολογικά συστήματα.^{12-15,18}



Εικόνα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου EPR, όπου παριστάνεται η αυξημένη διαπερατότητα και κατακράτηση του καρκινικού ιστού σε νανοσωματίδια, καθώς και το ελαττωματικό λεμφικό του σύστημα¹⁸

Μια άλλη τεχνική απεικόνισης στην οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά τα νανοσωματίδια είναι η μαγνητική τομογραφία (Magnetic Resonance Imaging). Η MRI είναι μία μη επεμβατική διαγνωστική μέθοδος, η οποία απεικονίζει μαλακούς βιολογικούς ιστούς με πολύ καλή

χωρική ανάλυση. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χαρτογράφηση της συγκέντρωσης και των μαγνητικών ιδιοτήτων του νερού που βρίσκεται στους ιστούς, λαμβάνοντας μετρήσεις σημάτων σχετικά με την ένταση και τους χρόνους της μαγνητικής χαλάρωσης των πρωτονίων σε έναν τρισδιάστατο χώρο. Κατά την MRI γίνεται χρήση ενός μαγνητικού πεδίου, το οποίο επάγει τον προσανατολισμό (στην ίδια ή στην αντίθετη φορά) των πρωτονίων των μορίων του νερού, λόγω της μαγνητικής τους ροπής. Έπειτα, εφαρμόζεται ένα παλμός ραδιοσυχνότητας (rf-pulse), αντιστρέφοντας έτσι τη φορά του μαγνητικού πεδίου, προκαλώντας τον αναπροσανατολισμό των μορίων του νερού, το οποίο προκύπτει σε χαρακτηριστική χρονική σταθερά. Η διαδικασία της επαναευθυγράμμισης διαχωρίζεται σε δύο τρόπους, τον T1 (χαλάρωση σπιν-κρυστάλλου, spin-lattice relaxation) και στον T2 (χαλάρωση σπιν-σπιν, spin-spin relaxation). Κατά τη διάρκεια της MRI, οποιαδήποτε αλλαγή πραγματοποιείται σε ολόκληρο το μαγνητικό πεδίο ανιχνεύεται από ειδικό ανιχνευτή, όπου το σήμα που συλλέγεται μετατρέπεται σε εικόνα, με τη βοήθεια υπολογιστή, όπου βασικά απεικονίζεται η πυκνότητα υδρογόνου σε έναν τρισδιάστατο χώρο, δίνοντας τη δυνατότητα να παρατηρηθούν τόσο διαφορετικοί ιστοί, όσο και διαφορετικές περιοχές ενός ιστού, το οποίο καθιστά την τελική εικόνα να παρουσιάζει μεγάλη ευκρίνεια και αντίθεση.

Κατά την MRI αξιοποιούνται ουσίες γνωστές ως σκιαγραφικά (Contrast Agent, CA), όπου η χρήση τους αποσκοπεί στην ενίσχυση της αντίθεσης που λαμβάνεται από το σήμα εσωτερικών δομών ή υγρών του οργανισμού, κατά τη διάρκεια της MRI. Οι CAs δρουν σαν καταλύτες, όπου ενισχύουν τους ρυθμούς μαγνητικής χαλάρωσης, τόσο του T1 όσο και του T2 μηχανισμού. Οι CAs χαρακτηρίζονται από την αφηρέμηση (relaxivity), η οποία είναι η αλλαγή του χρόνου χαλάρωσης που επάγεται μετά την προσθήκη του CA, συναρτήσει της συγκέντρωσης του CA, η οποία αφορά κυρίως τη συγκέντρωση κάποιου μεταλλικού ιόντος το οποίο βρίσκεται στη δομή του CA (κατά κύριο λόγο είναι το ιόν Γαδολίνιου Gd^{3+}). Σύμφωνα με την θεωρία αφηρέμησης Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM), η ενίσχυση του ρυθμού χαλάρωσης των μορίων νερού επιτυγχάνεται είτε λόγω της δέσμευσης και χαλάρωσης του οξυγόνου των μορίων του νερού με το μεταλλικό ιόν, είτε μέσω της χαλάρωσης των μορίων του νερού που έχουν συνδεθεί με τα συνδετικά μόρια του μεταλλικού ιόντος. Έχει παρατηρηθεί ότι τα νανοσωματίδια, λόγω του μεγέθους τους και της μεγάλης ειδικής τους επιφάνειας, παρουσιάζουν πολύ καλή αφηρέμηση, καλύτερη από τους CAs που χρησιμοποιούνται κλινικά. Εκτός αυτού, τα νανοσωματίδια κυκλοφορούν ευκολότερα και γρηγορότερα στο αίμα, ανάλογα φυσικά με τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους, καθώς επίσης απομακρύνονται γρηγορότερα από τον οργανισμό, μειώνοντας έτσι και τις πιθανές παρενέργειες που μπορεί να προκληθούν. Είναι αναμενόμενο ότι τα νανοσωματίδια που χρησιμοποιούνται κατά τη MRI να παρουσιάζουν μαγνητικές ιδιότητες, το οποίο σημαίνει ότι κατά κύριο λόγο γίνεται αναφορά σε μεταλλικά νανοσωματίδια. Τα πιο διαδεδομένα από αυτά είναι τα νανοσωματίδια αποτελούνται από οξειδία του σιδήρου, όπου και έχει εγκριθεί η χρήση τους από το FDA.^{12,19-21}

Τέλος, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι κάθε τεχνική απεικόνισης παρουσιάζει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, ανάλογα με το βάθος διεξόδου, τη χωρική ανάλυση και τις περιοχές εφαρμογής της. Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει η μελέτη της βιοαπεικόνισης πολλαπλών ειδών, κατά την οποία δύο ή και παραπάνω τεχνικές απεικόνισης μπορούν να συνδυαστούν έτσι ώστε να ληφθεί μία πιο πλήρης εικόνα βιολογικών ιστών ή δομών. Ειδικότερα, οι μέθοδοι που έχουν μελετηθεί για συνδυαστική χρήση είναι η MRI, η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (Positron Emission Tomography, PET), η αξονική τομογραφία (Computed Tomography, CT) και η οπτική βιοαπεικόνιση με βάση το φθορισμό. Η MRI παρέχει πολύ καλές χωρικές πληροφορίες με μεγάλο βάθος διεξόδου, αλλά παρουσιάζει περιορισμένη ευαισθησία και επίπεδη ανάλυση. Η CT

παρουσιάζει πολύ καλές εικόνες σχετικά με την ανατομία του οργανισμού, ωστόσο οι εικόνες που λαμβάνονται σχετικά με μαλακούς ιστούς και επίπεδων δομών είναι χαμηλής ανάλυσης. Η PET είναι μία πολύ ευαίσθητη τεχνική, ωστόσο η χωρική της ανάλυση είναι περιορισμένη. Η οπτική απεικόνιση παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και είναι η μόνη μέθοδος που δίνει πληροφορίες σε κυτταρικό/μοριακό επίπεδο, ωστόσο το βάθος διεϊσδυσής της είναι μικρό. Με το συνδυασμό αυτών των μεθόδων, μπορούν να ληφθούν πιο ακριβής πληροφορίες σχετικά με τη φυσιολογία και την ανατομία, λειτουργιών ή βιολογικών δομών, για τη βελτίωση της διάγνωσης και πρόγνωσης ασθενειών. Για να είναι εφικτή η βιοαπεικόνιση πολλαπλών ειδών απαιτούνται σύνθετες ουσίες, οι οποίες πρέπει να παρουσιάζουν συγκεκριμένα βιοχημικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Για αυτό το λόγο, τα νανοσωματίδια είναι μερικά πολλά υποσχόμενα υλικά για τη χρήση τους σε αυτού του είδους εφαρμογές. Τα νανοσωματίδια έχουν τη δυνατότητα να παρουσιάζουν πολλαπλές επιθυμητές ιδιότητες (όπως φθορισμού και μαγνητικές), κατάλληλες για χρήση σε διαφορετικές τεχνικές απεικόνισης, χωρίς να απαιτείται πολύπλοκη σύνθεση (συνήθως bottom-up μέθοδοι) ή η χρήση πολλαπλών διαφορετικών ουσιών. Επιπλέον, λόγω της δυνατότητας επιφανειακής τροποποίησης τους και βιοσύζευξης τους, μπορούν να βελτιωθούν τα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους και να αποκτήσουν τη δυνατότητα πιο στοχευμένης και αναλυτικής απεικόνισης. Βέβαια, η χρήση πολλαπλών μεθόδων απεικόνισης, σε μικρό χρονικό διάστημα, είναι πολύ πιθανόν να είναι επιβαρυντική για τον οργανισμό ή τους ιστούς υπό μελέτη, οπότε είναι επιθυμητό οι ουσίες που χρησιμοποιούνται να παρουσιάζουν μεγαλύτερους χρόνους παραμονής στον οργανισμό, έτσι ώστε να πραγματοποιηθούν οι απεικονίσεις σταδιακά.

1.6.2 – Νανοσωματίδια στη βιοανάλυση

Ένας ακόμα κλάδος των βιολογικών εφαρμογών στον οποίο έχει εξεταστεί η χρήση των νανοσωματιδίων είναι αυτός των βιοαισθητήρων (biosensors) και των βιοαναλύσεων (bioassays). Γενικά ένας βιοαισθητήρας πρέπει να παρουσιάζει τα χαρακτηριστικά της ευαισθησίας, του ορίου ανίχνευσης, της ακρίβειας, της επιλεκτικότητας, της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας. Η ευαισθησία αφορά το πόσο πολύ επηρεάζει κάποια αλλαγή στον αναλύτη (π.χ. συγκέντρωση) το τελικό σήμα, όπου υψηλή ευαισθησία είναι επιθυμητή. Το όριο ανίχνευση (Limit Of Detection, LOD) καθορίζει την ελάχιστη συγκέντρωση αναλύτη που μπορεί να επάγει σήμα από τον αισθητήρα, δηλαδή που μπορεί να ανιχνευτεί. Η ακρίβεια αφορά το πόσο ακριβές είναι το σήμα που προκύπτει από τον αισθητήρα, και η επιλεκτικότητα είναι η ικανότητα του αισθητήρα να ξεχωρίζει τον αναλύτη από άλλες ουσίες. Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα αφορούν τη συμφωνία των επιτυχών μετρήσεων όταν πραγματοποιούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Λόγω των μοναδικών και καινοτόμων χαρακτηριστικών που παρουσιάζουν τα νανοσωματίδια, η χρήση τους σε τέτοιους είδους εφαρμογές μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την ευαισθησία, το όριο ανίχνευσης, την ακρίβεια και την επιλεκτικότητα, σε σχέση με τα πιο παραδοσιακά χρησιμοποιούμενα μακροσκοπικά μέσα ανίχνευσης και ανάλυσης. Η χρήση των νανοσωματιδίων μπορεί να επιτευχθεί είτε για αναλύσεις σε πραγματικό χρόνο σε βιολογικά συστήματα, είτε σε ειδικά σχεδιασμένες εξωτερικές διατάξεις (όπως μικροσυστοιχίες και μικρορευστομηχανικά συστήματα). Γενικά, η πραγματοποίηση των αναλύσεων εντός του οργανισμού είναι πιο περίπλοκη και δύσκολη, και για αυτό το λόγο δεν έχει αναπτυχθεί ιδιαίτερα συγκριτικά με τις εξωγενείς αναλύσεις. Αυτές οι εφαρμογές μπορούν να αποσκοπούν, στην ανίχνευση μεταλλικών τοξικών ιόντων, προσδιορίζοντας τη συγκέντρωσή τους σε ζωντανά κύτταρα. Επιπλέον, μπορεί να γίνει η

ανίχνευση αέριων μορίων, όπως το οξυγόνο ή το διοξείδιο του άνθρακα, εντός υγρών βιολογικών δειγμάτων. Εκτός αυτών, είναι εφικτή και η ανίχνευση ιόν ή βακτηρίων, καθώς και βιομορίων (πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα κτλ.). Βιοαισθητήρες/Βιοαναλύσεις που αναπτύσσονται με βάση τα νανοσωματίδια βασίζονται στην παρακολούθηση σημάτων, όπως το pH, η εκπομπή φθορισμού και η λήψη ηλεκτρικού σήματος, τα οποία μεταβάλλονται ανάλογα με το αν στην περιοχή που βρίσκονται τα νανοσωματίδια είναι παρούσα υπό ανίχνευση ουσία. Πολλών διαφορετικών ειδών νανοσωματίδια/νανοϋλικών έχουν μελετηθεί για τέτοιου είδους εφαρμογές, όπως μεταλλικά, οργανικά, ανθρακικά ή και συνδυασμός αυτών, όπου και συνηθίζεται να συνδέονται με κάποια άλλη ουσία, η οποία είναι υπεύθυνη για την ανίχνευση του στόχου (για παράδειγμα συνδέονται με αντιγόνα), όπου στη συνέχεια η απόκριση του αισθητήρα προέρχεται από τα νανοσωματίδια. Κυρίως οι αισθητήρες που έχουν αναπτυχθεί και αξιοποιούν τα νανοσωματίδια βασίζονται είτε στη συλλογή του σήματος του φθορισμού των νανοσωματιδίων (ένταση ή/και μήκος κύματος) είτε στη συλλογή ηλεκτρικού σήματος (από ηλεκτροχημική αντίδραση) έχοντας τη δυνατότητα να εξάγουν τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά αποτελέσματα, δίνοντας τη δυνατότητα έγκαιρης και ακριβούς διάγνωσης ασθενειών, ενώ αυτές βρίσκονται στα αρχικά τους στάδια. Επίσης, ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης των νανοσωματιδίων για διαγνωστικούς σκοπούς, είναι ότι μπορούν να συνδυάσουν εφαρμογές απεικόνισης και ανάλυσης, παρέχοντας έτσι πολύ σημαντικές πληροφορίες για ασθένειες ή λειτουργίες του οργανισμού, ακόμα και σε κυτταρικό ή μοριακό επίπεδο.^{12,16,22}

1.6.3 – Νανοσωματίδια στην ιατρική

Η νανοϊατρική είναι ο συνδυασμός της ιατρικής επιστήμης με τη νανοτεχνολογία, κατά τον οποίο γίνεται η αξιοποίηση νανοϋλικών για θεραπευτικούς, φαρμακευτικούς ή διαγνωστικούς σκοπούς. Αυτό πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικών νανοδομημένων υλικών, τα οποία είναι κατάλληλα για την επίτευξη μη επεμβατικών διαγνώσεων, παρακολούθηση θεραπειών σε πραγματικό χρόνο και στοχευμένη θεραπεία ή μεταφορά φαρμάκων. Τα νανοϋλικά, και ειδικότερα τα νανοσωματίδια, μπορούν να αξιοποιηθούν τόσο σε θεραπευτικές όσο και σε διαγνωστικές εφαρμογές, γεγονός που οφείλεται στις μοναδικές και καινοτόμες ιδιότητες που παρουσιάζουν. Ο συνδυασμός θεραπεία-διάγνωσης ονομάζεται Theranostics, όπου μέσω αυτού είναι δυνατή πραγματοποίηση πιο ακριβούς, αποτελεσματικών και με λιγότερες παρενέργειες θεραπειών, καθώς υπάρχει η δυνατότητα να παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο η πορεία της θεραπείας. Γενικά, υλικά που έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούνται σε πολλαπλές διαφορετικές είδους εφαρμογές ονομάζονται πολυλειτουργικά, όπου ο τρόπος με τον οποίο τα νανοσωματίδια μπορούν να αξιοποιηθούν σε εφαρμογές βιοαπεικόνισης ή βιοανάλυσης αναφέρθηκε παραπάνω. Ως θεραπευτικά μέσα, έχει μελετηθεί η χρήση αυτούσιων νανοσωματιδίων, ως κύρια μέσα θεραπείας, ωστόσο καλύτερα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί όταν αξιοποιούνται ως μέσα μεταφοράς ή ενίσχυσης παραδοσιακά χρησιμοποιούμενων φαρμάκων.^{13,15,23}

Αρχικά, η χρήση των νανοσωματιδίων σε θεραπευτικές εφαρμογές, πολλές φορές απαιτεί την κατάλληλη τροποποίηση ή/και βιοσύζευξή τους, έτσι ώστε να είναι βιοσυμβατά και επιλεκτικά στο στόχο. Η χρήση τους, όπως προαναφέρθηκε, κατά κύριο λόγο είναι αυτή του μέσου μεταφοράς κάποιου φαρμάκου ή θεραπευτικής ουσίας, και όχι η δράση τους ως θεραπευτικό μέσο. Εκτός από μεταφορικό μέσο, ανάλογα με τη δομή τους, μπορούν να αξιοποιηθούν και ως μέσα διάγνωσης ή παρακολούθησης της θεραπείας. Ένα μεγάλο πλεονέκτημα που παρουσιάζουν τα νανοσωματίδια

είναι το γεγονός ότι χαρακτηρίζονται από την ευελιξία στη δομή τους, και συνεπώς στις ιδιότητές τους, χωρίς να επηρεάζεται το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό τους που είναι η μεγάλη ειδική τους επιφάνεια. Η χρήση των νανοσωματιδίων έχει μελετηθεί σε διάφορων ειδών θεραπείες, όπως αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, μεταφοράς γονιδίων ή ανοσοθεραπείας. Σε αυτές τις θεραπείες έχει μελετηθεί, τόσο η χρήση των νανοσωματιδίων ως θεραπευτικά μέσα (για παράδειγμα έχει παρατηρηθεί ότι νανοσωματίδια τιτανίας παρουσιάζουν αντικικροβιακή δράση), όσο και η χρήση τους ως μέσα μεταφοράς κλινικών φαρμάκων. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι κατά τη μεταφορά φαρμάκων, κατά κύριο λόγο, γίνεται αναφορά στον εγκλωβισμό του φαρμάκου στη δομή των νανοσωματιδίων, και όχι στη χημική σύνδεση τους, καθώς αυτό είναι πολύ πιθανόν να αλλοιώσει και να αποσβέσει τη δραστηριότητά του. Γενικά, ο εγκλωβισμός των φαρμάκων στη δομή των νανοσωματιδίων πραγματοποιείται κατά τη διαδικασία της bottom-up σύνθεσής τους, όπου το φάρμακο μπορεί να εγκλωβιστεί είτε στο εσωτερικό είτε στην εξωτερική επιφάνεια των νανοσωματιδίων.²⁴⁻²⁷

Πολλά από τα κλινικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται παρουσιάζουν σημαντικές παρενέργειες, οι οποίες κατά κύριο λόγο οφείλονται σε δύο παράγοντες, την κακή κυκλοφορία τους στον οργανισμό και τη χαμηλή επιλεκτικότητά τους στο στόχο. Ο εγκλωβισμός φαρμάκων στη δομή των νανοσωματιδίων αποσκοπεί στην πιο αποτελεσματική, επιλεκτική και με λιγότερες παρενέργειες μεταφορά τους στο στόχο, βελτιώνοντας την υδατοδιαλυτότητα, διασπορά, σταθερότητα και βιοσυμβατότητα του φαρμάκου, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται και η απαιτούμενη ποσότητα για την αποτελεσματική δράση του φαρμάκου. Αυτό είναι εφικτό επειδή τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν μεγέθη της τάξης των νανομέτρων, παρουσιάζουν ελεγχόμενες ιδιότητές, όπως υδροφιλικότητα, καθώς και μπορούν να συνδεθούν με άλλα βιομόρια τα οποία βελτιώνουν τη βιοσυμβατότητά τους ή/και παρουσιάζουν επιλεκτικότητα στο στόχο. Για παράδειγμα, στην περίπτωση των αντικαρκινικών θεραπειών (χημειοθεραπεία, φωτοδυναμική/φωτοθερμική θεραπεία), λόγω του μεγέθους τους, όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν αυξημένη συγκέντρωση σε καρκινικά κύτταρα, EPR φαινόμενο, το οποίο μπορεί να ενισχυθεί με την κατάλληλη επιφανειακή τροποποίηση τους, κατά την οποία θα μπορούν να παρουσιάσουν επιλεκτικότητα και σε άλλες βιολογικές λειτουργίες ή συστήματα (π.χ. υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες στην επιφάνεια καρκινικών κυττάρων). Επιπλέον, οι καρκινικοί ιστοί παρουσιάζουν ελλαττωματικό λεμφικό σύστημα, όπου λόγω αυτού κατακρατούνται περισσότερο τα νανοσωματίδια εντός αυτών. Εκτός αυτού, ανάλογα με το σχεδιασμό τους, τα νανοσωματίδια είναι εφικτό να διαπερνούν και την κυτταρική μεμβράνη, γεγονός που οφείλεται ότι το μέγεθος των περισσότερων κυττάρων είναι της τάξης των μικρομέτρων έχοντας ως αποτέλεσμα την πιο αποτελεσματική θεραπεία. Μια ακόμα πολύ σημαντική λειτουργία της χρήσης των νανοσωματιδίων ως μέσα μεταφοράς φαρμάκων είναι και η δυνατότητα της επιλεκτικής απελευθέρωσης φαρμάκων από εξωγενή ή ενδογενή ερεθίσματα. Συγκεκριμένα η απελευθέρωση του φαρμάκου οφείλεται σε φαινόμενα μεταφοράς ενέργειας ή φωτοεπαγόμενα φαινόμενα, όπου παρατηρείται η διάσπαση των δεσμών (ή μορίων) που συγκρατούν το φάρμακο. Επίσης η απελευθέρωση μπορεί να οφείλεται και σε συνθήκες που επικρατούν στην περιοχή στόχο, όπως το pH, όπου για παράδειγμα σε καρκινικού ιστούς η τιμή του είναι χαμηλότερη συγκριτικά με τους φυσιολογικούς. Επιπλέον, είναι δυνατή και η αξιοποίηση των μαγνητικών ιδιοτήτων που πιθανόν να παρουσιάζουν τα νανοσωματίδια, τόσο για την μεταφορά και επιλογή στόχου, όσο και για την απελευθέρωση των φαρμάκων. Η ελεγχόμενη αποδέσμευση των φαρμάκων από τα νανοσωματίδια είναι μια πολύ σημαντική ιδιότητα, καθώς με αυτό τον τρόπο μπορεί να ελέγχεται ο χρόνος και το μέρος που πραγματοποιείται μέσα στον οργανισμό,

ελαττώνοντας έτσι τις ανεπιθύμητες παρενέργειες και βελτιώνοντας την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Τέλος, είναι σημαντικό να σημειωθεί και το γεγονός ότι είναι δυνατή η συνδυαστική χρήση παραπάνω από ενός είδους νανοσωματίδια κατά τη μεταφορά φαρμάκων ή κατά τη θεραπεία, καθώς επίσης και η χρήση τους σε συνδυαστικές θεραπείες, για παράδειγμα χημειοθεραπεία και φωτοδυναμική θεραπεία κατά του καρκίνου.^{18,24-27}

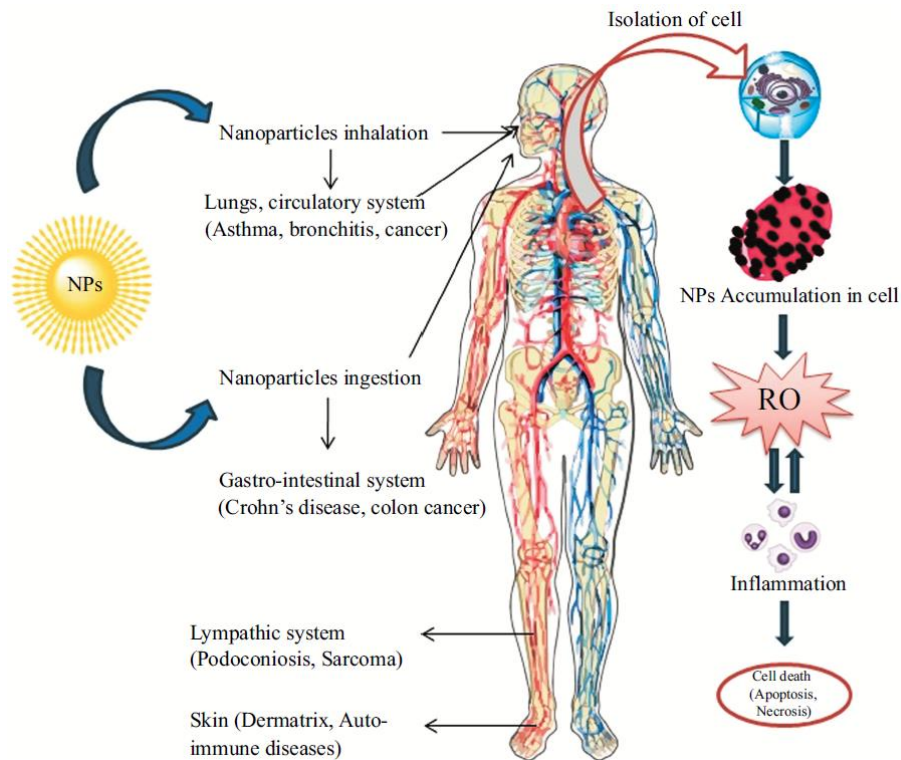
1.7 – Λόγοι περιορισμένης χρήσης και αποτελεσματικότητας νανοσωματιδίων

Παρόλο που τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν αρκετές χρήσιμες ιδιότητες, η κλινική χρήση τους στην ιατρική παραμένει περιορισμένη, γεγονός που οφείλεται κατά μεγάλο βαθμό στο ότι η επίδραση των νανοσωματιδίων στον ανθρώπινο οργανισμό δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή. Γενικά, όταν γίνεται αναφορά σε κάποια βιολογική εφαρμογή, είναι απαραίτητο να εξεταστεί η πιθανή τοξικότητα των υλικών που είναι υπό χρήση. Ακαδημαϊκά, τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, έχουν μελετηθεί κυρίως ή σε καλλιέργειες κυττάρων ή σε πειραματόζωα (κυρίως ποντίκια). Και στις δύο περιπτώσεις έχουν εξαχθεί ενθαρρυντικά αποτελέσματα σχετικά με την αποτελεσματικότητα των νανοσωματιδίων σε ιατρικές εφαρμογές, παρουσιάζοντας χαμηλή τοξικότητα και καλή βιοσυμβατότητα, καθώς επίσης και ικανοποιητική θεραπευτική δράση, ανάλογα με την εφαρμογή που χρησιμοποιούνται. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο οργανισμός και το μεταβολικό σύστημά τους διαφέρει αρκετά από τον πιο πολύπλοκο ανθρώπινο οργανισμό, το οποίο σημαίνει ότι είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί περαιτέρω έρευνα πριν κριθούν κατάλληλα για κλινική χρήση.²⁸⁻³⁰

Ο πιο σημαντικός λόγος που η χρήση των νανοσωματιδίων είναι ακόμα περιορισμένη σε ιατρικές εφαρμογές είναι η πιθανή τοξικότητα και οι πιθανές παρενέργειες που παρουσιάζουν. Αρχικά η τοξικότητα τους μπορεί να οφείλεται στα συστατικά από τα οποία αποτελούνται, γεγονός που παρατηρείται περισσότερο στα μεταλλικά νανοσωματίδια. Για αυτό το λόγο επίσης, για αυτού του είδους τις εφαρμογές ερευνώνται και προτιμώνται περισσότερο νανοσωματίδια από πιο φιλικά προς τον οργανισμό υλικά, όπως βιο-αποικοδομήσιμα πολυμερή και λιπίδια. Η τοξικότητα των νανοσωματιδίων μπορεί να αντιμετωπιστεί αποτελεσματικά και μέσω της κατάλληλης τροποποίησης τους, είτε με κατάλληλα βιομόρια είτε με σύνδεσή τους με άλλα βιοσυμβατά νανοσωματίδια. Ωστόσο, ο μεγαλύτερος πιθανός κίνδυνος των νανοσωματιδίων στον ανθρώπινο οργανισμό προέρχεται από το χαρακτηριστικό που τα καθιστά ενδιαφέροντα και καινοτόμα για χρήση στον ιατρικό κλάδο, δηλαδή το μικρό τους μέγεθος που βρίσκεται στην τάξη των νανόμετρων. Το πρόβλημα με την τοξικότητα των νανοσωματιδίων (νανοτοξικότητα), όσον αφορά το μέγεθός τους, οφείλεται κυρίως στη διασπορά τους, στους τρόπους με τους οποίους εισέρχονται και στη συσσώρευση τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Το μικρό τους μέγεθος έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή τους ειδική επιφάνεια, το οποίο συνεπώς σημαίνει και την πιθανή αυξημένη χημική δραστηριότητά τους, ακόμα και σε ανεπιθύμητα μέρη του σώματος. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν έντονη τάση να συσσωματώνονται, φαινόμενο που ενισχύεται με τη μείωση του μεγέθους, γεγονός που αποσβένει αρκετές τις ιδιότητές τους, αλλά πιο σημαντικά, μπορεί να προκαλέσει έντονες παρενέργειες στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως η δυσλειτουργία του αγγειακού συστήματος, από την παρεμπόδιση της κυκλοφορίας των ερυθρών αιμοπεταλίων, από του μεγάλου σχετικά μεγέθους συσσωματωμάτων των νανοσωματιδίων ή και την πιθανή ενσωμάτωσή τους στα αγγειακά τοιχώματα, γεγονός που εξαρτάται ακόμα και από το σχήμα των νανοσωματιδίων. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, είναι σημαντικό να γίνεται χρήση

νανοσωματιδίων ή νανοσυστημάτων που παρουσιάζουν υδρόφιλο χαρακτήρα, εφόσον αυτά προορίζονται για βιο-ιατρικές εφαρμογές, έτσι ώστε να βελτιωθεί όσο το δυνατόν περισσότερο η διασπορά τους εντός του οργανισμού. Επιπλέον, έχει μελετηθεί και η χρήση κατάλληλων επιφανειοδραστικών ουσιών, οι οποίες προσδένονται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων και βελτιώνουν με αυτό τον τρόπο τη διασπορά τους. Βέβαια, αυτό το πρόβλημα δεν εμφανίζεται σε νανοσωματίδια που δεν προορίζονται να κυκλοφορήσουν εντός του οργανισμού, όπου για παράδειγμα σε περιπτώσεις καρκίνου του δέρματος μπορεί να πραγματοποιηθεί τοπική επάλειψη.²⁹⁻³⁴

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ένας ακόμα κίνδυνος που σχετίζεται με τα νανοσωματίδια αφορά την πρόσληψη και τη συσσώρευση τους στον οργανισμό. Εκτός από την ελεγχόμενη χορήγηση των νανοσωματιδίων στα πλαίσια μίας θεραπείας, υπάρχει και περίπτωση της αθέμητης πρόσληψής τους, μέσω του αναπνευστικού ή πεπτικού συστήματος ή ακόμα και μέσω των πόρων του δέρματος. Στην πρώτη περίπτωση υπάρχει ο κίνδυνος τα νανοσωματίδια να συσσωρευτούν στα οργανίδια των πνευμόνων, δυσχεραίνοντας έτσι την ομαλή λειτουργία τους, όπου και είναι πιθανόν να είναι υπαίτια για την πρόκληση ασθενειών, όπως ο καρκίνος. Από την άλλη, κατά την πρόσληψη τους από τους πόρους του δέρματος, είναι πιθανόν αυτά να εισέλθουν στο κυκλοφορικό σύστημα, και κατά συνέπεια στο μεταβολικό. Έχει παρατηρηθεί ότι τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν σχετικά μικρούς χρόνους παραμονής στο κυκλοφορικό σύστημα, όπου όμως τελικά συσσωρεύονται στα μεταβολικά όργανα όπως το συκώτι, ο σπλήνας και τα νεφρά. Ο μικρός χρόνος παραμονής στο κυκλοφορικό σύστημα από τη μία είναι ένα θετικό χαρακτηριστικό, καθώς σημαίνει ότι υπάρχει μικρότερη πιθανότητα να προκληθούν παρενέργειες σε αυτό, από την άλλη όμως αυτό σημαίνει ότι το χρονικό παράθυρο για απεικόνιση ή θεραπεία είναι μικρό. Ωστόσο, η συσσώρευση των νανοσωματιδίων στα μεταβολικά όργανα παραμένει ένας κίνδυνος που πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω, έτσι ώστε τα νανοσωματίδια κριθούν κατάλληλα για κλινική χρήση. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί αυξημένη πρόσληψη νανοσωματιδίων από τα κύτταρα, φαινόμενο που είναι εντονότερο με τη μείωση του μεγέθους. Αυτό μπορεί να οδηγήσει τόσο στην πιο αποτελεσματική και γρήγορα θεραπεία, όσο και στην αυξημένη κυτταροτοξικότητα, ακόμη και σε υγιή κύτταρα. Σε κάθε περίπτωση, τα παραπάνω οφείλονται κατά κύριο λόγο στο μικρό μέγεθος των νανοσωματιδίων. Είναι σημαντικό επίσης να σημειωθεί ότι η νανοτεχνολογία παραμένει μία σχετικά νέα επιστήμη, ειδικότερα όταν αφορά εφαρμογές στην νανοϊατρική, και για αυτό το λόγο η επίδραση των νανοσωματιδίων στον ανθρώπινο οργανισμό δεν είναι πλήρως κατανοητή, καθώς επίσης δεν είναι γνωστά τα πιθανά μακροχρόνια προβλήματα που μπορεί να προκληθούν από τη χρήση των νανοσωματιδίων, τόσο στην επίδρασή τους στον ανθρώπινο οργανισμό, όσο και γενικότερα στο περιβαλλοντικό τους αντίκτυπο.^{29,33,34}



Εικόνα 1.5: Σχηματική αναπαράσταση των τρόπων πρόσληψης νανοσωματιδίων από τον οργανισμό

Τέλος, ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει αρνητικά την αποτελεσματική χρήση τους στις βιοιατρικές εφαρμογές αφορά την παραγωγή τους. Συγκεκριμένα, είναι σημαντικό να αναπτυχθούν μέθοδοι παραγωγής νανοσωματιδίων, κατάλληλες για οικονομική παραγωγή μεγάλης κλίμακας, διότι σε αντίθετη περίπτωση δεν μπορούν να κριθούν κατάλληλα για κλινική χρήση. Εκτός αυτού, ένα εξίσου σημαντικό πρόβλημα είναι το γεγονός ότι πολλές φορές τα νανοσωματίδια δεν αποτελούν μία απλή καθαρή ένωση, όπου και συνεπώς παρατηρείται το πρόβλημα της κατάλληλης και αποτελεσματικής ποσοτικοποίησης τους κατά τη χορήγησή τους. Το μοναδικό μέγεθος και οι μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητές τους, απαιτούν ακριβή προδιαγραφές, όσον αφορά τη δοσολογία και τη χορήγησή τους. Αυτό είναι εξίσου σημαντικό και κατά τον εγκλωβισμό φαρμάκων σε νανοσωματίδια, όπου είναι σημαντικό να εξασφαλίζεται ο αποτελεσματικός και ομοιόμορφος εγκλωβισμός του φαρμάκου στη δομή τους, έτσι ώστε να είναι δυνατός και ο ακριβής προσδιορισμός της συγκέντρωσής του. Επιπλέον, κατά τη μεταφορά φαρμάκων είναι απαραίτητος και ο προσδιορισμός της απελευθέρωσης του φαρμάκου από τα νανοσωματίδια, και γενικότερα οποιαδήποτε διαφοροποίηση που μπορεί να παρατηρείται στο σύστημα νανοσωματίδια-φάρμακο σε σχέση με το ελεύθερο φάρμακο, όπως για παράδειγμα και η δραστηριότητά του. Η ποσοτικοποίηση της δοσολογίας τους είναι αρκετά περίπλοκη και εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες, όπως το είδος των νανοσωματιδίων, οι ιδιότητές τους, τα φαρμοκινητικά χαρακτηριστικά τους, καθώς επίσης και ο τρόπος χορήγησης τους. Οι μέθοδοι σύνθεσης και παραγωγής των νανοσωματιδίων αποτελούν ένα αντικείμενο που παρουσιάζει μεγάλο ακαδημαϊκό ενδιαφέρον, έχοντας ως αποτέλεσμα τη συνεχή ανάπτυξη νέων μεθόδων ή τη βελτίωση υπαρχόντων, με σκοπό τον καλύτερο προσδιορισμό της χρήσης τους σε ιατρικές εφαρμογές και τη μείωση των αρνητικών επιπτώσεών τους. Αυτό, αντικατοπτρίζεται και στο γεγονός ότι, πλέον, η χρήση μερικών συγκεκριμένων νανοσωματιδίων έχει ήδη εγκριθεί για κλινική χρήση, από αρμόδιες αρχές όπως το FDA, κυρίως σε εφαρμογές που δρουν ως μέσα μεταφοράς (φαρμάκων ή γονιδίων),

όπου κατά κύριο λόγο αφορούν νανοσωματίδια που αποτελούνται από πολυμερή, λιποσώματα ή λιπίδια.^{16,30}

1.8 – Πολυμερικά νανοσωματίδια

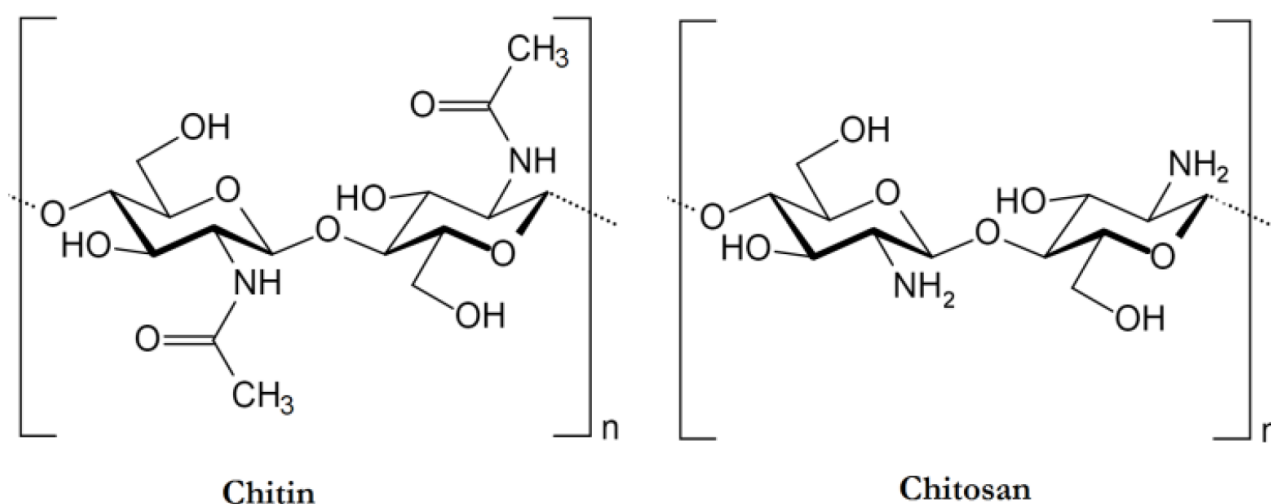
Για να κριθεί κατάλληλο για χρήση σε ιατρικές εφαρμογές, ένα υλικό ή μια ουσία είναι απαραίτητο να παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα, καλή βιοσυμβατότητα και τα κατάλληλα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά. Για αυτό το λόγο, η χρήση των πολυμερή υλικών είναι πλέον ευρέως διαδομένη σε ιατρικές εφαρμογές. Η χρήση τους αποσκοπεί κυρίως στη μεταφορά φαρμάκων, με σκοπό την πιο στοχευμένη μεταφορά τους στο στόχο, στη βελτίωση της κυκλοφορίας τους στον οργανισμό, στην κάλυψη της πιθανής δυσάρεστης γεύσης τους, την ελεγχόμενη απελευθέρωσή τους και στην παροχή της δυνατότητας συνδυασμού φαρμάκων. Τα πολυμερή που αξιοποιούνται σε αυτές τις εφαρμογές παρουσιάζουν καλή βιοσυμβατότητα και κατά κύριο λόγο είναι βιο-αποικοδομήσιμα ή βιοδιασπώμενα (η διάσπαση πραγματοποιείται μέσω ενζύμων ή των οξέων που υπάρχουν στο στομάχι), ή είναι υλικά που μεταβολίζονται και αποβάλλονται σχετικά γρήγορα από τον οργανισμό. Αυτά τα πολυμερή μπορεί να είναι είτε συνθετικά (π.χ. το PEG), είτε βιοπολυμερή, όπου συναντάται στη φύση (π.χ. παράγωγα της χιτίνης), ή ακόμα και συνδυασμός αυτών. Μακροσκοπικά, όταν γίνεται χρήση πολυμερών, αυτά συνήθως βρίσκονται σε μορφή αμπούλας, όπου στο εσωτερικό τους περιέχεται η φαρμακευτική ουσία.^{29,35,36}

Στην νανοϊατρική, τα πιο αποτελεσματικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την μεταφορά φαρμάκων είναι τα πολυμερή, καθώς επίσης και τα λιποσώματα και τα λιπίδια. Τα πολυμερή νανοσωματίδια συνήθως βρίσκονται σε σφαιρική ή ελλειπτική μορφή, και έχουν τη δυνατότητα να παρουσιάζουν όλα τα θετικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων που προορίζονται για ιατρικές εφαρμογές, καθώς και τα χαρακτηριστικά που καθιστούν τα πολυμερή κατάλληλα για χρήση στη μακροκλίμακα. Ωστόσο, λόγω του μεγέθους τους, η μεταφορά των φαρμάκων πραγματοποιείται κυρίως με τη σύνδεση της φαρμακευτικής ουσίας με το μέσω μεταφορά (π.χ. με ομοιοπολικούς δεσμούς), παρά με το φυσικό εγκλωβισμό εντός της δομής τους. Αυτό, δίνει τη δυνατότητα της ελεγχόμενης απελευθέρωσης της ουσίας από το μέσο μεταφοράς, με παράγοντες όπως το pH ή ακτινοβολία με φως κατάλληλου μήκους κύματος.^{29,35,36}

1.9 – Χιτοζάνη – Νανοσωματίδια Χιτοζάνης

Η χιτοζάνη είναι ένα βιοδιασπώμενο πολυμερές, όπου παράγεται από το βιοπολυμερές χιτίνη. Η χιτίνη αποτελεί ένα γραμμικό πολυσακχαρίτη που περιέχει δεσμούς Β Ν-ακετυλογλυκοζαμίνης, και είναι το δεύτερο πιο άφθονο βιοπολυμερές στη φύση, μετά την κυτταρίνη. Συναντάται στον εξωσκελετό των αρθροπόδων και σε μερικούς μύκητες, που είναι και ο λόγος για τον οποίο θεωρείται ως μία άφθονη πρώτη ύλη. Η χιτίνη στη μορφή που συλλέγεται είναι αδιάλυτη στους περισσότερους διαλύτες (υδατικούς ή οργανικούς), όπου και για αυτό το λόγο δεν είναι εύχρηστη σε αυτήν τη μορφή. Από την άλλη, το παράγωγο πολυμερές της χιτίνης, η χιτοζάνη, είναι ένα κατιονικό ημι-συνθετικό πολυμερές, αποτελώντας ένα αμινό-πολυσακχαρίτη και παρουσιάζει αυξημένη διαλυτότητα, συνήθως σε τιμές pH χαμηλότερες του 6 (λόγω των αμινομάδων που περιέχει), γεγονός που την καθιστά καταλληλότερη για χρήση σε αρκετές βιολογικές εφαρμογές, ως ένα βιοδιασπώμενο και βιοσυμβατό υλικό. Η χιτοζάνη παράγεται μέσω της διαδικασίας της αποακετυλίωσης (deacetylation) της χιτίνης, όπου στην **Εικόνα 1.6** παρουσιάζονται και οι δομές της

χιτίνης και της χιτοζάνης. Γενικά, υπάρχει η δυνατότητα παραγωγής διαφορετικών ειδών χιτοζάνης ανάλογα από το που προέρχεται η χιτίνη και τη μέθοδο τροποποίησης της σε χιτοζάνη. Τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά της χιτοζάνης, όπου και τελικά επηρεάζουν εντονότερα τις ιδιότητές της, είναι ο βαθμός αποακετυλίωσης της χιτίνης (Degree of Deacetylation, DD), το μοριακό βάρος της χιτοζάνης (μπορεί να κυμαίνεται από 20kDA έως και 400kDA) και σε μικρότερο βαθμό το ιξώδες. Σημαντικό επίσης είναι και το γεγονός ότι έχει ερευνηθεί και η χημική τροποποίησή της, με σκοπό τη βελτίωση των ιδιοτήτων της ή την ανάπτυξη καινούργιων.³⁷⁻⁴⁰



Εικόνα 1.6: Δομή χιτίνης, αποτελείται από ομάδες N-ακετυλογλυκοζαμίνης συνδεδεμένες με β1-4 γλυκοσιδικούς δεσμούς (αριστερά) και δομή χιτοζάνης, αποτελείται από β1-4 συνδεδεμένες ομάδες D-γλυκοζαμίνης (αποακετυλιωμένη ομάδα) και ομάδες N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης (ακετυλιωμένη ομάδα) (δεξιά). Η κατανομή των ομάδων είναι τυχαία και εξαρτάται από το βαθμό αποακετυλίωσης της χιτίνης κατά τη μετατροπή της σε χιτοζάνη³⁸

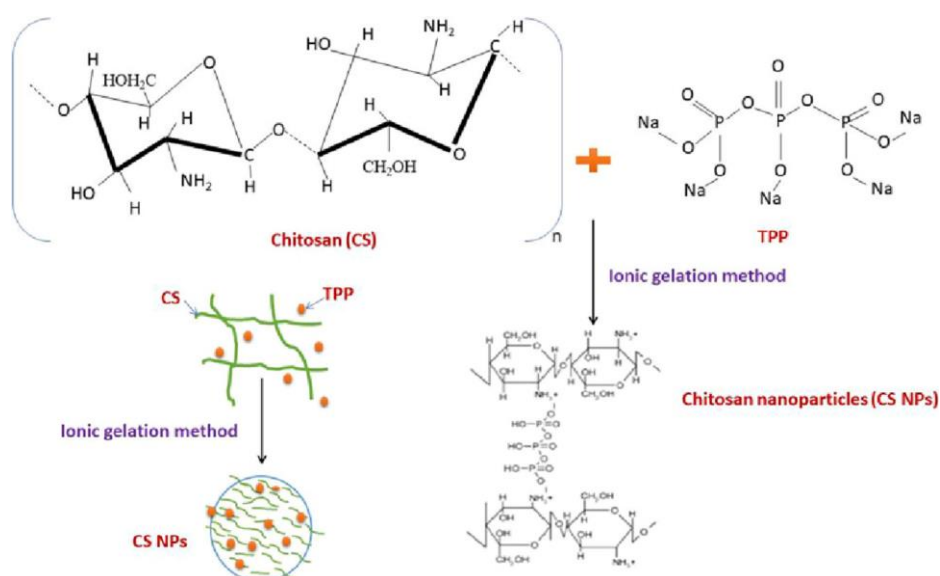
Η χιτοζάνη κυρίως χρησιμοποιείται σε μορφή υδρογέλης ή νανοσωματιδίων, όπου και βρίσκει εφαρμογή σε αρκετούς κλάδους της βιοτεχνολογίας, φαρμακευτικής και στη βιομηχανία τροφίμων. Η χρήση της χιτοζάνης σε αυτούς τους κλάδους οφείλεται στη χαμηλή τοξικότητα που παρουσιάζει, στη καλή βιοσυμβατότητά της, στο γεγονός ότι είναι βιοδιασπώμενη, καθώς και στο ότι προέρχεται και από μία φυσικά άφθονη πρώτη ύλη τη χιτίνη. Βέβαια, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι παραπάνω ιδιότητες διαφέρουν ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της χιτοζάνης, κυρίως με το βαθμό αποακετυλίωσης και το μοριακό βάρος. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι χιτοζάνη με χαμηλότερο μοριακό (20kDA-175kDA) διασπάται ευκολότερα ενζυμικά, σε σχέση με υψηλά μοριακά βάρη (175kDA-400kDA), όπου πολλές φορές παρατηρείται ο υποβιβασμός της χιτοζάνης και όχι η πλήρης διάσπασή της από τα κύτταρα, ή και η διάσπασή της από τα οξέα του στομαχιού. Από την άλλη, έχει επίσης παρατηρηθεί ότι η μεγάλη αύξηση του βαθμού αποακετυλίωσης της μπορεί να οδηγήσει και στην αύξηση της τοξικότητάς της. Στην περίπτωση των νανοσωματιδίων χιτοζάνης, παρατηρούνται οι περιορισμοί στην αποτελεσματικότητά της, με βάση τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων Κεφάλαιο 1.7 (15). Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι νανοσωματίδια χιτοζάνης μπορεί να παρουσιάζουν αυξημένη κυτταροτοξικότητα όσο μειώνεται το μέγεθός τους. Γενικά, η χιτοζάνη θεωρείται ως ένα μη τοξικό βιοσυμβατό πολυμερές, ωστόσο οι τροποποιήσεις που μπορεί να υποστεί πιθανόν να έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση ή μείωση της τοξικότητάς της. Επιπλέον, είναι σημαντικό όταν προορίζεται για ιατρικές εφαρμογές να έχουν αφαιρεθεί οποιαδήποτε υπολειπόμενα αντιδραστήρα, που πιθανόν να έχουν αξιοποιηθεί κατά την παραγωγή

της. Όταν η χιτοζάνη προορίζεται για σύνδεση με κάποιο φάρμακο, πρέπει να ληφθεί υπόψιν και το γεγονός ότι κατά τη σύνδεσή τους είναι πολύ πιθανόν να αλλάξουν τα φαρμακοκινητικά της χαρακτηριστικά, καθώς και η γενικότερη συμπεριφορά της εντός ενός βιολογικού συστήματος, λόγω των πιθανόν αλλαγών που μπορεί να παρατηρηθούν στο μέγεθος ή και στο δυναμικό της.^{31,37,39}

Η αξιοποίηση της χιτοζάνης μπορεί να πραγματοποιηθεί σε διάφορους τομείς της βιοτεχνολογίας και φαρμακευτικής. Συγκεκριμένα, μελετάται η χρήση της στη μεταφορά υδρόφοβων/αδιάλυτων φαρμάκων ή και γονιδίων. Έχει επίσης εξεταστεί και η χρήση της στη θεραπεία πληγών, λόγω του ότι έχει παρατηρηθεί ότι η χιτοζάνη μπορεί να παρουσιάζει αντιφλεγμονώδη δράση, καθώς και να προσδένεται με ινοβλάστες, οδηγώντας έτσι στην ταχύτερη και αποτελεσματικότερη θεραπεία τραυμάτων. Η κατιονική της φύση της δίνει και τη δυνατότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, όταν βρίσκεται σε μορφή νανοσωματιδίων, καθώς επίσης και να παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση κατά μερικών ειδών βακτηρίων και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών. Τέλος, έχει μελετηθεί και η αξιοποίηση της στη τεχνολογία τροφίμων, κυρίως για τη διατήρηση τροφίμων για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Η χρήση και η καταλληλότητα της χιτοζάνης και βιολογικές/φαρμακευτικές εφαρμογές βρίσκεται κατά μεγάλο βαθμό υπό μελέτη, ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί μεγάλο ακαδημαϊκό ενδιαφέρον για τις πιθανές της χρήσεις, καθώς και έχει ήδη εγκριθεί η χρήση της σε μερικές χώρες. Συγκεκριμένα σε χώρες όπως η Ιαπωνία, η Ιταλία και η Φιλανδία έχει εγκριθεί για χρήση στο τομέα των τροφίμων, ενώ έχει επίσης εγκριθεί από το FDA για εφαρμογές επικάλυψης/επίδεσης πληγών.^{38,39}

Η χρήση της χιτοζάνης, όπως προαναφέρθηκε, πραγματοποιείται κυρίως σε μορφή υδρογέλης ή νανοσωματιδίων. Οι υδρογέλες χιτοζάνης αποτελούν ένα τρισδιάστατο πολυμερές δίκτυο, με τη δυνατότητα να απορροφούν μεγάλες ποσότητες νερού. Η υψηλή περιεκτικότητά τους σε νερό τις καθιστά ως ένα μαλακό, εύκαμπτο και υγρό υλικό, όπου λόγω αυτών των χαρακτηριστικών θεωρείται κατάλληλη για εφαρμογές μίμησης λειτουργιών και μορφολογία των ιστών, όπως για παράδειγμα η επούλωση πληγών. Από την άλλη, τα νανοσωματίδια χιτοζάνης κυρίως παράγονται σε σφαιρική μορφή, όπου τα τελικά χαρακτηριστικά τους, όπως το μέγεθος, η τοξικότητα και η σταθερότητά τους εξαρτάται σημαντικά από τα χαρακτηριστικά της χιτοζάνης (δηλαδή βαθμός αποακετυλίωσης και μοριακό βάρος), από τη μέθοδο σύνθεσης και τις συνθήκες που επικρατούν κατά τη σύνθεσή τους, όπου και είναι πολύ ελκυστικά για χρήση στη μεταφορά φαρμάκων ή σε αντιμικροβιακές εφαρμογές. Οι μέθοδοι σύνθεσης υδρογέλης ή νανοσωματιδίων χιτοζάνης κατά κύριο λόγο βασίζονται στη χρήση ενός ανιονικού μέσου διασταύρωσης (cross-linker) σε ένα διάλυμα χιτοζάνης, όπου μερικές μέθοδοι σύνθεσης είναι κατάλληλες στο να παράγουν τόσο υδρογέλη, όσο και νανοσωματίδια χιτοζάνης, ανάλογα με τις συνθήκες στις οποίες πραγματοποιούνται. Συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια χιτοζάνης μπορούν να κυρίως με μεθόδους σύνθεσης bottom-up, υγρής φάσης, για παράδειγμα τύπου γαλακτωματοποίησης και καταβύθισης, όπου σε κάθε περίπτωση είναι απαραίτητη η χρήση ενός μέσου διασταύρωσης. Από αυτές τις μεθόδους η πλέον δημοφιλέστερη είναι αυτή της ιονικής πηγμάτωσης (ionic gelation). Αυτή η μέθοδος πλεονεκτεί σε σχέση με άλλες, καθώς είναι πολύ απλή, γρήγορη, πραγματοποιείται σε υδατικούς διαλύτες (ή και πράσινους διαλύτες), χωρίς την απαίτηση δραστικών ή τοξικών αντιδραστηρίων και πολύ σημαντικά βασίζεται στην ηλεκτροστατική σύνδεση της χιτοζάνης με έναν ανιοντικό cross-linker και όχι στη χημική τροποποίησή/σύνδεση της, η οποία μπορεί να οδηγήσει και στην αύξηση της τοξικότητάς της ή την αλλοίωση των ιδιοτήτων της. Περιληπτικά, κατά αυτή τη μέθοδο διάλυμα του cross-linker (συνήθίζεται να χρησιμοποιείται ως cross-linker το sodium triphosphate, TPP), προστίθεται στάγδην σε υδατικό όξινο διάλυμα χιτοζάνης, κατάλληλου pH, υπό συνεχή ανάδευση. Αυτό μπορεί να

επιτευχθεί και με τη προσθήκη του διαλύματος της χιτοζάνης σε διάλυμα του cross-linker. Σε κάθε περίπτωση, όταν η κατιονική χιτοζάνη έρχεται σε επαφή με τον ανιονικό cross-linker πραγματοποιείται η συμπλοκοποίηση δύο αντίθετα φορτισμένων ειδών, έχοντας ως αποτέλεσμα την ιονική πηγμάτωση της χιτοζάνης, και τελικώς καταβύθισής της ως σφαιρικά σωματίδια. Κατά αυτή τη μέθοδο, είναι σημαντικός ο έλεγχος πολλαπλών παραμέτρων οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν τα τελικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων χιτοζάνης. Τέτοιες παράμετροι είναι η συγκέντρωση και η αναλογία χιτοζάνης-cross-linker, το pH, η θερμοκρασία, η ταχύτητα και ο χρόνος ανάδευσης. Γενικά η επιλογή της μεθόδου σύνθεσης χιτοζάνης βασίζεται σε πολλούς παράγοντες όπως τα τελικά επιθυμητά χαρακτηριστικά της, η μορφή της, η εφαρμογή της, το κόστος παραγωγής και η δυνατότητα μεγάλης επαναλήψιμης παραγωγής.³⁹⁻⁴²



Εικόνα 1.7: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης νανοσωματιδίων χιτοζάνης με τη μέθοδο ionic gelation ⁴²

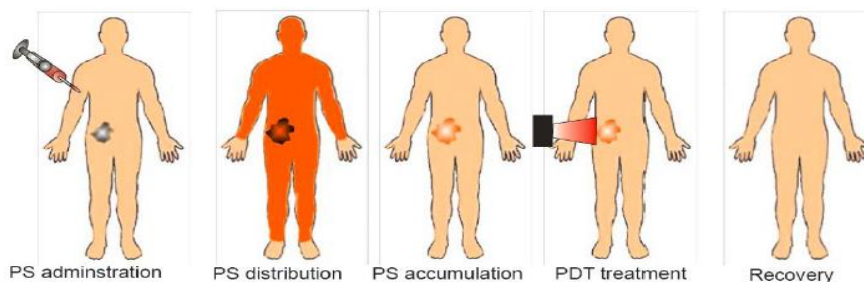
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

2.1 – Φωτοδυναμική Θεραπεία

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι ένας μη επεμβατικός τρόπος θεραπείας παθολογικών καταστάσεων, ειδικότερα καρκινικών όγκων, που βασίζεται στη χορήγηση μιας φωτοευαισθητοποιητικής ουσίας και ενεργοποίησης της μέσω ακτινοβολίας συγκεκριμένου μήκους κύματος πάνω σε κύτταρα στόχους, παρουσίας οξυγόνου, κάνοντας έτσι επιλεκτική την καταστροφή των κυττάρων. Σε σχέση με άλλες θεραπείες κατά του καρκίνου (όπως η χημειοθεραπεία) η φωτοδυναμική θεραπεία έχει το πλεονέκτημα ότι δεν προκαλεί μακροχρόνια προβλήματα στον ασθενή, λόγω του ότι για να πραγματοποιηθεί απαιτεί κατάλληλη ποσότητα φωτοευαισθητοποιητή και φως συγκεκριμένου μήκους κύματος στην ίδια περιοχή.⁴³

Για την αποτελεσματική δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας απαιτούνται τρεις παράγοντες: φως, φωτοευαισθητοποιητής και οξυγόνο. Κάθε ένας από αυτούς τους παράγοντες δεν είναι τοξικός από μόνος του στις δόσεις που χρησιμοποιείται, αλλά η καταστροφή των κυττάρων οφείλεται στη συνεργασία τους. Για αυτό το λόγο η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να χαρακτηριστεί και ως μια μέθοδος υψηλής επιλεκτικότητας. Αυτό επιτυγχάνεται επειδή η καταστροφή των κυττάρων πραγματοποιείται μόνο όταν έχει συγκεντρωθεί κατάλληλη ποσότητα φωτοευαισθητοποιητή, υπάρχει κατάλληλη ποσότητα οξυγόνου και ταυτόχρονη έκθεση με φως συγκεκριμένου μήκους κύματος, έτσι ώστε να απορροφάται από το φωτοευαισθητοποιητή. Συγκεκριμένα, όταν ικανοποιούνται οι παραπάνω συνθήκες, μέσω του φωτοευαισθητοποιητή παράγονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ή μονήρες οξυγόνο, στα οποία οφείλεται η κυτταρική καταστροφή.^{44,45}

Η διαδικασία εφαρμογής της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι αρκετά απλή, συγκριτικά με άλλες αντικαρκινικές θεραπείες. Αρχικά ο φωτοευαισθητοποιητής χορηγείται στον ασθενή (ενδοφλέβια ή με τοπική επάλειψη) και μετά από την πάροδο χρονικού διαστήματος ικανού έτσι ώστε ο φωτοευαισθητοποιητής να συγκεντρωθεί στα καρκινικά κύτταρα, παρέχεται φως κατάλληλου μήκους κύματος πάνω στα κύτταρα στόχους, τα οποία καταστρέφονται, λόγω της ενεργοποίησης του φωτοευαισθητοποιητή. Ο φωτοευαισθητοποιητής συγκεντρώνεται και στα φυσιολογικά κύτταρα, αλλά σε μικρότερο βαθμό, όπου και αποβάλλεται γρηγορότερα από ότι στα καρκινικά. Αυτό οφείλεται λόγω της διαφορετικής μορφολογίας, μεταβολισμού και λειτουργιών των καρκινικών ιστών. Είναι πιθανόν μετά τη χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή ο ασθενής να παρουσιάσει φωτοευαισθησία, το οποίο αποτελεί τη σημαντικότερη παρενέργεια αυτής της θεραπείας, και έτσι να πρέπει να αποφεύγει την άμεση έκθεση στο φως για κάποιο χρονικό διάστημα.⁴⁶

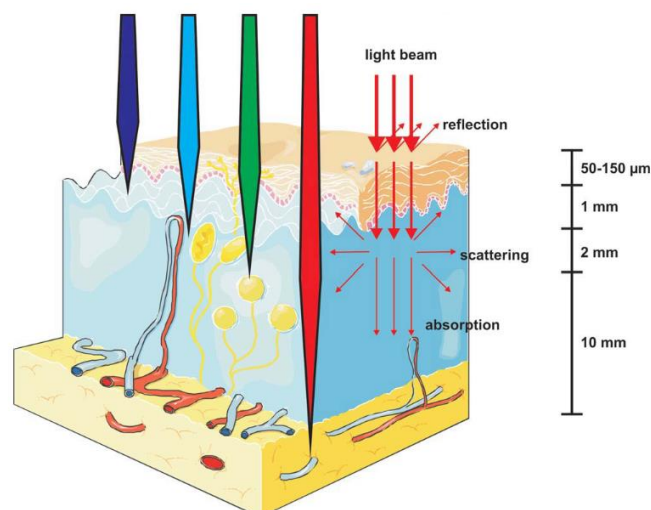


Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση της δράσης της φωτοδυναμικής θεραπείας, αρχικά χορηγείται ο φωτοευαισθητοποιητής, στη συνέχεια διανέμεται και συγκεντρώνεται στο στόχο και τέλος πραγματοποιείται η θεραπεία με ακτινοβολία από φως κατάλληλου μήκους κύματος⁴⁶

2.2 – Αλληλεπίδραση φωτός – ύλης

Το επιθυμητό μήκος κύματος του φωτός που χρησιμοποιείται κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία είναι στα 600-850 nm, γεγονός που οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Η περιοχή του φάσματος με μήκη κύματος 600-1300 nm ονομάζεται 'οπτικό παράθυρο', όπου εκεί παρατηρείται η μέγιστη διείσδυση του φωτός στους βιολογικούς ιστούς, και είναι η καταλληλότερη περιοχή για την πραγματοποίηση της φωτοδυναμικής θεραπείας. Όμως, μήκη κύματος υψηλότερα των 850 nm, δεν έχουν αρκετή ενέργεια για να ενεργοποιήσουν τον φωτοευαισθητοποιητή, έτσι ώστε να παραχθεί μονήρες οξυγόνο. Επίσης, σε μήκη κύματος χαμηλότερα των 600 nm η ακτινοβολία είναι ιονίζουσα και παρατηρείται έντονη απορρόφηση από τους ιστούς, δηλαδή ένα σημαντικό ποσοστό της εισερχόμενης ενέργειας δεν καταλήγει στον φωτοευαισθητοποιητή, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Για αυτό το λόγο, το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι το μέγιστο απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή στην περιοχή των 600-850 nm, όπου παράγοντες όπως η ένταση, η διάρκεια έκθεσης και η πηγή τους φωτός εξαρτώνται από το μέγεθος και το είδος του καρκινικού όγκου.⁴⁴

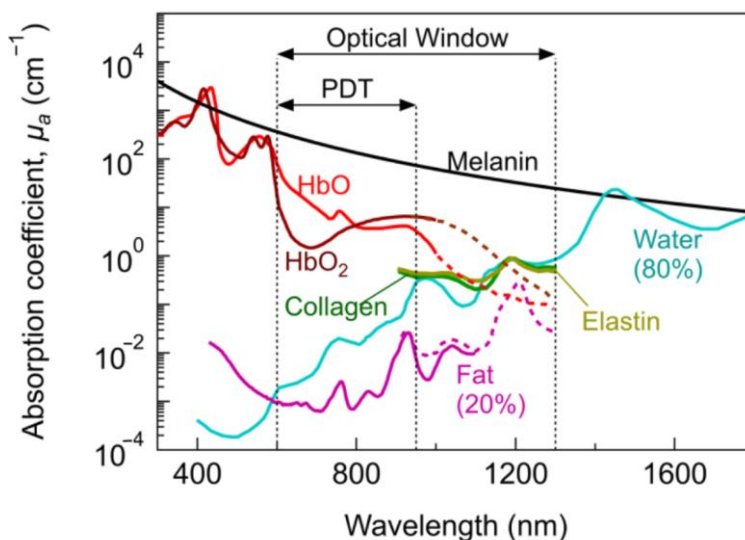
Πιο αναλυτικά, κατά την αλληλεπίδραση του φωτός με ένα βιολογικό ιστό είναι πιθανόν να παρατηρηθούν τα φαινόμενα της διάθλασης, ανάκλασης, σκέδασης ή απορρόφησης του φωτός. Το πιο από αυτά τα φαινόμενα θα επικρατήσει εξαρτάται τόσο από το μήκος κύματος του φωτός, όσο και από τη δομή του βιολογικού ιστού. Γενικά, ο βιολογικός ιστός μπορεί να αποτελείται από διαφορετικά κύτταρα, μακρομόρια και ενδοκυτταρικές δομές, γεγονός που καθιστά τη δομή του πολύπλοκη και ανομοιογενή, έχοντας ως αποτέλεσμα να μην μπορεί να προβλεφθεί με ευκολία η αλληλεπίδραση του φωτός με αυτόν. Κατά τη διάθλαση ή την ανάκλαση του φωτός, στον ιστό δεν προκαλείται καμία επίδραση από την επαφή του με το φως. Αντιθέτως, στις βιολογικές και ιατρικές εφαρμογές που βασίζονται στην αλληλεπίδραση του φωτός με το βιολογικό ιστό (όπως η φωτοδυναμική θεραπεία), παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο τα φαινόμενα της σκέδασης και της απορρόφησης του φωτός. Αυτά τα δύο φαινόμενα έχουν ως αποτέλεσμα την αλλοίωση της αρχικής κατεύθυνσης και την απώλεια έντασης της δέσμης φωτός που εισέρχεται στον ιστό, το οποίο μπορεί να οφείλεται σε μόρια εντός και εκτός των κυττάρων του.⁴³



Εικόνα 2.2: Αλληλεπίδραση φωτός με το βιολογικό ιστό: ανάκλαση, σκέδαση, απορρόφηση και βάθος διείσδυσης με βάση το μήκος κύματος⁴³

Η πολύπλοκη δομή του βιολογικού ιστού, έχει ως αποτέλεσμα τη λειτουργία του κυρίως ως ένα έντονα σκεδαστικό μέσο. Γενικά, κατά την απορρόφηση του φωτός, στον ιστό μπορεί να παρατηρηθεί τοπική θέρμανσή του, η πραγματοποίηση φωτοχημικών αντιδράσεων καθώς και η εκπομπή φθορισμού. Όπως προαναφέρθηκε, το φαινόμενο που θα επικρατήσει εξαρτάται τόσο από το μήκος κύματος του φωτός όσο και από τη δομή του βιολογικού ιστού.

Η απορρόφηση του φωτός από τον βιολογικό ιστό οφείλεται κατά κύριο λόγο σε μακρομόρια πρωτεϊνών ή χρωστικών, με τα πιο σημαντικά να είναι η αιμογλοβίνη και η μελανίνη. Εκτός αυτών, σημαντική απορρόφηση παρατηρείται και από το νερό, λόγω του ότι υπάρχει σε μεγάλο ποσοστό εντός των βιολογικών ιστών.

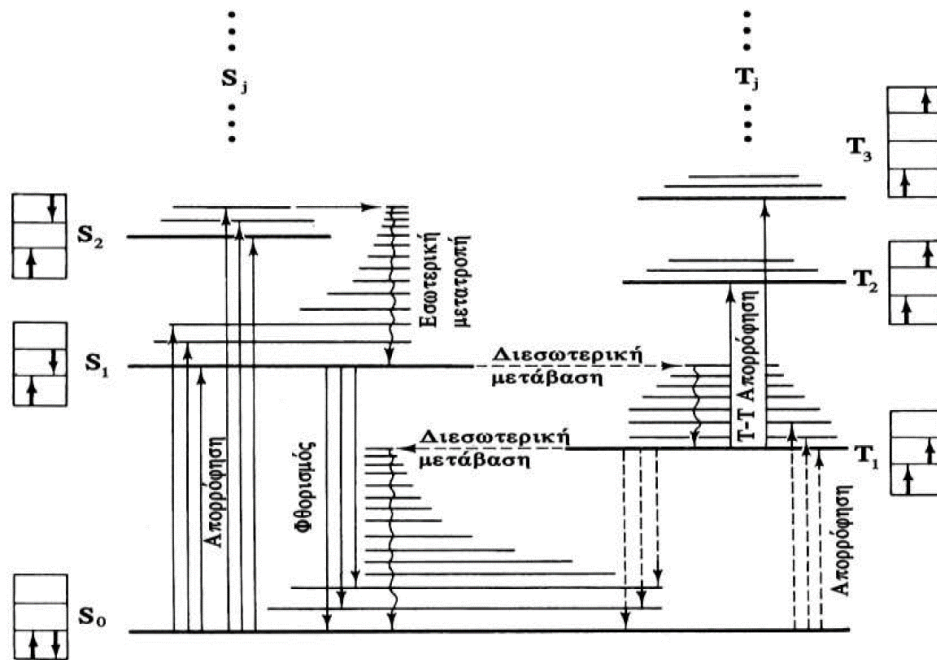


Εικόνα 2.3: Οπτικό/Θεραπευτικό παράθυρο βιολογικών ιστών⁴⁷

Όπως παρατηρείται στην **Εικόνα 2.3**, στο βιολογικό ιστό η ακτινοβολία φωτός μήκους κύματος μικρότερου από τα 600 nm απορροφάται έντονα από τα μακρομόρια της αιμογλοβίνης και της μελανίνης, ενώ στα μήκη κύματος μεγαλύτερα από τα 1300 nm παρατηρείται η έντονη απορρόφηση από το νερό. Συνεπώς, λόγω της χαμηλότερης απορρόφησης του φωτός στην περιοχή 600-1300 nm, παρατηρείται εντονότερα το φαινόμενο της σκέδασης σε αυτά τα μήκη κύματος. Λόγω της εντονότερης διεισδυτικότητας του φωτός η περιοχή του φάσματος στα 600-1300 nm ονομάζεται οπτικό (ή θεραπευτικό) παράθυρο των βιολογικών ιστών. Για αυτό το λόγο, οι βιολογικές και ιατρικές εφαρμογές που βασίζονται στην αλληλεπίδραση του φωτός με το βιολογικό ιστό αξιοποιούν μήκη κύματος εντός του οπτικού παραθύρου, όπου συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί ότι το φως παρουσιάζει το μέγιστο βάθος διείσδυσης στο βιολογικό ιστό στην κόκκινη περιοχή του φάσματος. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, τα μήκη κύματος που έχουν ικανή ενέργεια για την ενεργοποίηση του φωτοευαίσθητοποιητή, έχουν τιμή χαμηλότερη από 850 nm.^{47,48}

Το φαινόμενο της φωταύγειας αναφέρεται στην εκπομπή φωτός από ένα μόριο, η οποία δεν οφείλεται στην υψηλή θερμοκρασία. Μία υποκατηγορία της φωταύγειας είναι η φωτοφωταύγεια, η οποία οφείλεται στην απορρόφηση υπεριώδους, ορατού ή υπέρυθρου φωτός και επανεκπομπή σε μεγαλύτερο μήκος κύματος. Συγκεκριμένα, τα μόρια αποτελούνται από ενεργειακές στάθμες, οι οποίες με τη σειρά τους αποτελούνται από διαφορετικά δονητικά επίπεδα. Όταν ένα μόριο απορροφήσει ακτινοβολία φωτός, κατάλληλης ενέργειας ίσης με τη διαφορά ενέργειας μεταξύ δύο ενεργειακών επιπέδων, μπορεί να μεταβεί από το χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο στο υψηλότερο. Επιπλέον, κάθε ενεργειακό επίπεδο χαρακτηρίζεται από την πολλαπλότητα (M), η οποία εκφράζει

την τροχιακή στροφορμή και αφορά το συνολικό spin των ηλεκτρονίων του επιπέδου (S), με βάση τη σχέση $M=2\cdot S+1$. Το ενεργειακό επίπεδο στο οποίο βρίσκεται το μόριο πριν την απορρόφηση φωτός ονομάζεται βασική στάθμη/κατάσταση, ενώ τα υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα αναφέρονται ως διεγερμένη στάθμη/κατάσταση. Η μετάβαση του μορίου σε διεγερμένη κατάσταση πραγματοποιείται με τη μετάβαση/διέγερση ενός ηλεκτρονίου από τη βασική κατάσταση σε κατάσταση υψηλότερης ενέργειας, δηλαδή σε τροχιακό υψηλότερου ενεργειακού επιπέδου. Ο χρόνος ζωής των διεγερμένων καταστάσεων είναι μικρός, και η υψηλότερη τους ενέργεια μπορεί να μεταφερθεί σε γειτονικά μόρια, όπου και τελικός το μόριο επανέρχεται στη βασική του κατάσταση με την έκλυση θερμότητα ή εκπομπή ακτινοβολίας.^{48,49}



Εικόνα 2.4: Διάγραμμα Jablonski, όπου παρατηρούνται διαφορετικά ενεργειακά και δονητικά επίπεδα, καθώς και οι διαφορετικές μεταβάσεις που μπορούν να πραγματοποιηθούν κατά την απορρόφηση φωτός

Κατά το φαινόμενο του φθορισμού μία ουσία απορροφά ενέργεια σε μορφή ακτινοβολίας, όπου στη συνέχεια η ίδια η ουσία εκπέμπει φως. Η εκπομπή φωτός πραγματοποιείται κατά την αποδιέγερση από το χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης στάθμης της ουσίας στη βασική της κατάσταση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η εκπεμπόμενη ακτινοβολία να είναι συγκεκριμένου μήκους κύματος, ανεξάρτητα από την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Επιπλέον, η εκπεμπόμενη ακτινοβολία παρουσιάζει χαμηλότερη ενέργεια σε σχέση με την ακτινοβολία διέγερσης. Με άλλα λόγια, το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι μεγαλύτερο από το μήκος κύματος της διεγείρουσας ακτινοβολίας, όπου η διαφορά τους ονομάζεται μετατόπιση Stokes. Η μετατόπιση Stokes εκφράζει το μέτρο της απώλειας ενέργειας κατά την παραμονή του μορίου στην διεγερμένη κατάσταση, μέχρι να επιστρέψει στη βασική του κατάσταση. Η απώλεια της ενέργειας κατά την εκπομπή οφείλεται στις εσωτερικές μετατροπές που πραγματοποιούνται στα διάφορα δονητικά επίπεδα της διεγερμένης στάθμης, μέχρι την τελική μετατροπή από την πρώτη διεγερμένη στη βασική κατάσταση, στην οποία παρατηρείται και ο φθορισμός.

2.3 – Μηχανισμός Φωτοδυναμικής Δράσης

Όπως προαναφέρθηκε το κλειδί για την αποτελεσματική εκτέλεση της φωτοδυναμική θεραπείας είναι η έκθεση του φωτοευαισθητοποιητή, όταν αυτός έχει συγκεντρωθεί στα κύτταρα στόχους, με ακτινοβολία επαρκείς ενέργειας έτσι ώστε να διεγείρει τα μόρια του. Για αυτό το λόγο, το μήκος κύματος που επιλέγεται βρίσκεται στη περιοχή του φάσματος 600-850 nm και είναι αυτό στο οποίο παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση από το φωτοευαισθητοποιητή.

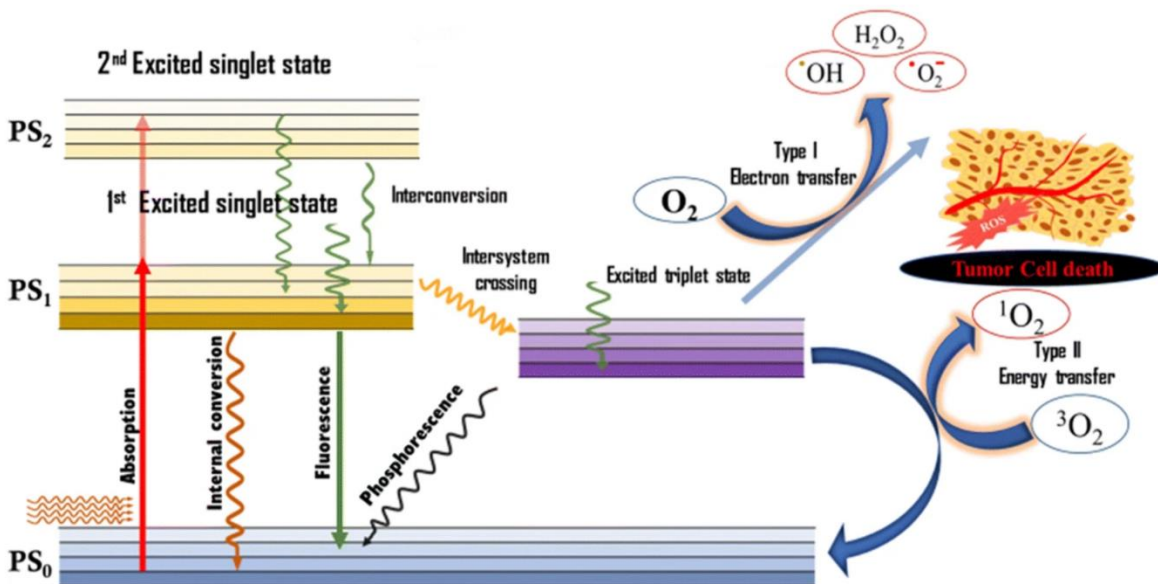
Όταν ο φωτοευαισθητοποιητής εκτεθεί και απορροφήσει φως κατάλληλου μήκους κύματος, τότε το μόριο του διεγείρεται από την αρχική του κατάσταση στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση (στη συνέχεια μπορεί να διεγερθεί και σε διεγερμένες καταστάσεις υψηλότερης ενέργειας). Αυτή η κατάσταση του μορίου έχει μικρό χρόνο ζωής (μερικά nanosecond), και μπορεί να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση με μη ακτινοβολική χαλάρωση (εκλύοντας θερμότητα) ή εκπέμποντας ακτινοβολία (φθορισμός), το οποίο μπορεί να είναι χρήσιμο για διαγνωστικούς σκοπούς ή για εφαρμογές βιοαπεικόνισης. Ωστόσο, από την πρώτη διεγερμένη κατάσταση το μόριο του φωτοευαισθητοποιητή μπορεί μέσω μηχανισμών εσωτερικής μετατροπής και εσωτερικής μετάβασης να καταλήξει, στην πολύ σημαντική για τη φωτοδυναμική θεραπεία, τριπλή διεγερμένη κατάσταση. Ενεργειακά, η τριπλή διεγερμένη κατάσταση βρίσκεται ανάμεσα στην πρώτη διεγερμένη και τη βασική. Αυτή η κατάσταση του μορίου είναι πιο σταθερή από την πρώτη διεγερμένη, όπου παρουσιάζει μεγαλύτερο χρόνο ζωής (μέχρι και μερικά millisecond) και πραγματοποιείται λόγω της αναστροφής του spin ενός ηλεκτρονίου στην εξωτερική στοιβάδα, δημιουργώντας έτσι ένα ζεύγος ασύζευκτων ηλεκτρονίων (παράλληλο spin). Από την τριπλή κατάσταση το μόριο μπορεί να επαναφερθεί στην αρχική του κατάσταση μέσω εκπομπής ακτινοβολίας (φωσφορισμός) ή μη ακτινοβολικά μέσω έκλυσης θερμότητας. Ο υψηλότερος χρόνος ζωής της τριπλής κατάστασης οφείλεται στο γεγονός ότι η μετάβαση από την τριπλή κατάσταση στην πρώτη διεγερμένη (μονήρη κατάσταση) είναι πολύ απίθανη (κβαντομηχανικά απαγορευμένη), λόγω του ότι το χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης παρουσιάζει μεγαλύτερη ενέργεια από την τριπλή κατάσταση. Να σημειωθεί επίσης, ότι ο μεγαλύτερος χρόνος ζωής της τριπλής κατάστασης, έχει ως αποτέλεσμα και το γεγονός να είναι πιο συχνό το φαινόμενο αποδιέγερσης χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας. Βέβαια, εάν το μόριο λάβει ενέργεια είναι πιθανόν να μεταβεί στην πρώτη διεγερμένη από την τριπλή κατάσταση, όπου και στη συνέχεια μπορεί αποδιεγερθεί εκπέμποντας ακτινοβολία (καθυστερημένος φθορισμός) ή χωρίς. Η δράση του φωτοευαισθητοποιητή κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία βασίζεται σε δύο μηχανισμούς που προέρχονται από την τριπλή κατάσταση, κατά τους οποίους παράγονται δραστικά είδη οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS).^{43,50,51}

- **Κατά τον πρώτο μηχανισμό (τύπου I)** ο διεγερμένος στην τριπλή κατάσταση φωτοευαισθητοποιητής αντιδρά άμεσα με το υπόστρωμα (δηλαδή τα κύτταρα και τα οργανίδια τους), όπου και παρατηρείται μεταφορά υδρογόνου και ηλεκτρονίων μεταξύ τους, παράγοντας έτσι ελεύθερες ρίζες. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο που βρίσκεται στα κύτταρα, παράγοντας έτσι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Συγκεκριμένα παράγεται υπεροξειδικό ανιόν O_2^- , όπου μέσω αυτού είναι δυνατή η παραγωγή του πιο ενεργού υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 , το οποίο με τη σειρά του μπορεί να μεσολαβήσει στην παραγωγή της πολύ δραστικής ρίζας υδροξυλίου $OH\cdot$. Αυτά τα οξειδωτικά είδη αντιδρούν και καταστρέφουν διάφορα οργανίδια που είναι

απαραίτητα για την ομαλή λειτουργία του κυττάρου, έχοντας ως αποτέλεσμα το κυτταρικό θάνατο.

➤ **Κατά το δεύτερο μηχανισμό (τύπου II)** ο διεγερμένος στην τριπλή κατάσταση φωτοευαισθητοποιητής μεταφέρει ενέργεια απευθείας στο μοριακό οξυγόνο που βρίσκεται ελεύθερο στους ιστούς των κυττάρων, οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό της πολύ δραστικής μονήρης κατάστασης $^1\text{O}_2$. Το μοριακό οξυγόνο είναι από τα λίγο μόρια όπου στην ελεύθερη μορφή τους βρίσκονται στην τριπλή κατάσταση $^3\text{O}_2$, δηλαδή έχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια (παράλληλο spin) σε δύο αντιδεσμικά π^* τροχιακά. Όταν αλληλοεπιδρά με το διεγερμένο φωτοευαισθητοποιητή το spin του ενός από αυτά τα δύο ηλεκτρόνια αντιστρέφεται, και έτσι αποσταθεροποιείται το μόριο και παράγεται το μονήρες οξυγόνο. Το μονήρες οξυγόνο είναι εξαιρετικά δραστικό, με μικρό χρόνο ζωής και μικρή ακτίνα δράσης. Κατά τη δράση του όμως, είναι ικανό να καταστρέψει τελείως τα ζωτικά για τη λειτουργία οργανίδια του κυττάρου με τα οποία έρχεται σε επαφή.

Κατά τη δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας, οι δύο παραπάνω μηχανισμοί πραγματοποιούνται παράλληλα. Ο μηχανισμός τύπου II θεωρείται ως ο πιο σημαντικός για την αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας, και το μονήρες οξυγόνο θεωρείται ως ο κύριος παράγοντας που οδηγεί στο θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, οι συνθήκες που επικρατούν γύρω από τα κύτταρα επηρεάζουν το ποσοστό δράσης κάθε μηχανισμού. Η ποσότητα του φωτοευαισθητοποιητή και η ποσότητα του ελεύθερου οξυγόνου είναι οι πιο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν αυτούς τους δύο μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, θεωρείται ότι σε αρκετά μεγάλες συγκεντρώσεις φωτοευαισθητοποιητή ή σε συνθήκες υποξίας ευνοείται ο μηχανισμός τύπου I.^{43,50,51}



Εικόνα 2.5: Σχηματική απεικόνιση των μηχανισμών παραγωγής δραστικών οξυγονούχων ριζών κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία⁵²

2.4 – Κυτταρικός θάνατος

Κατά τη δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας, τα καρκινικά κύτταρα στόχοι καταστρέφονται με διάφορους μηχανισμούς, οι οποίοι εξαρτώνται από αρκετούς παράγοντες, όπως το μέγεθος και το είδος του καρκίνου, η φωτοευαισθητοποιητική ουσία που χρησιμοποιείται, η διάρκεια ακτινοβολήσης και η ποσότητα του οξυγόνου που υπάρχει κοντά στα κύτταρα. Ο φωτοευαισθητοποιητής έχει τη δυνατότητα να συγκεντρώνεται τόσο στην κυτταρική μεμβράνη όσο και σε εσωτερικά οργανίδια του κυττάρου (όπως τα μιτοχόνδρια και τα λυσοσώματα) ανάλογα με το είδος του. Συνήθως, δεν μπορεί να διαπεράσει την πυρηνική μεμβράνη, οπότε δεν υπάρχει κίνδυνος να προκληθούν βλάβες στο DNA. Κατά την ενεργοποίηση του φωτοευαισθητοποιητή, τα κύτταρα στα οποία έχει συγκεντρωθεί καταστρέφονται λόγω άμεσου κυτταρικού θανάτου, με διαδικασίες απόπτωσης, νέκρωσης ή αυτοφαγωκυττάρωσης ή καταστρέφονται έμμεσα λόγω της κατάρρευσης του αγγειακού δικτύου που υποστηρίζει τον καρκινικό ιστό ή λόγω ενεργοποίησης ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού. Είναι επίσης δυνατό οι παραπάνω διαδικασίες να πραγματοποιούνται και ταυτόχρονα ή συνεργατικά.^{43,49}

2.4.1 – Απόπτωση

Η απόπτωση είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός προγραμματισμένου θανάτου των κυττάρων ενός πολυκύτταρου οργανισμού, απαραίτητος για την ελεγχόμενη ανάπτυξή του. Η δυσλειτουργία ή απουσία αυτού του μηχανισμού από τα κύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε ασθένειες όπως ο καρκίνος. Είναι μία έντονα ελεγχόμενη διαδικασία η οποία ενεργοποιείται ως απόκριση του κυττάρου σε διάφορα ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά ερεθίσματα, όπως η απελευθέρωση κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια ή λυσοσωμικών πρωτεασών από τα λυσοσώματα. Η απόπτωση καταναλώνει ενέργεια από το κύτταρο (ATP) και αλλάζει τη μορφολογία του κυττάρου. Συγκεκριμένα παρατηρείται συμπύκνωση της χρωματίνης, συρρίκνωση του κυττάρου, θρυμματισμός του DNA και σχηματισμός αποπτωτικών σωματιδίων. Για να πραγματοποιηθεί αυτός ο μηχανισμός, ενεργοποιούνται οι κασπάσες, οι οποίες είναι εξειδικευμένες πρωτεάσες που εξαρτούνται από την κυστεΐνη. Συγκεκριμένα οι κασπάσες -3,-6 και -7 είναι υπεύθυνες για τον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης και ονομάζονται 'εκτελεστικές κασπάσες' (executioner caspases). Τα αποπτωτικά σωματίδια που παράγονται δεν διαρρέουν έξω από το κύτταρο και απομακρύνονται από φαγοκύτταρα, χωρίς έτσι να δημιουργηθεί φλεγμονή. Ο μηχανισμός της απόπτωσης είναι από τους κυριότερους μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία, και παρατηρείται κυρίως όταν χρησιμοποιούνται φωτοευαισθητοποιητές που συγκεντρώνονται σε ενδοκυτταρικά οργανίδια, κυρίως μιτοχόνδρια και λυσοσώματα.^{49,53-58}

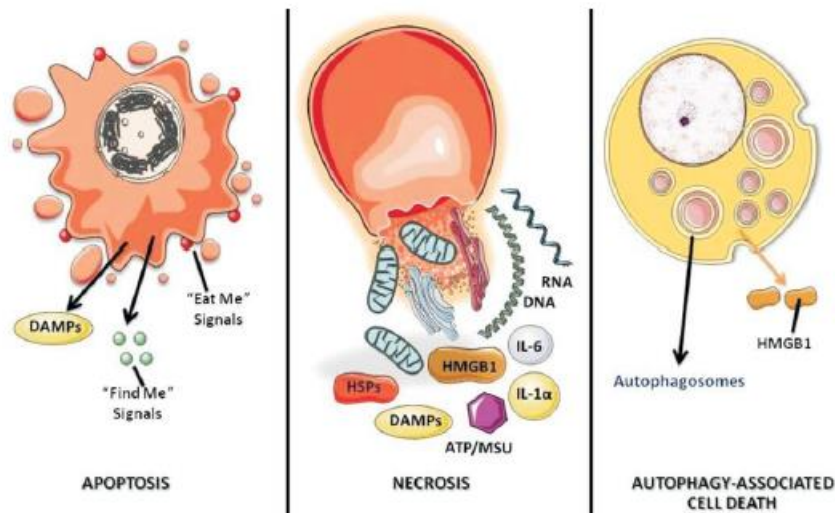
2.4.2 – Νέκρωση

Η νέκρωση είναι ένας τρόπος κυτταρικού θανάτου που χαρακτηρίζεται από τη βίαιη και ταχεία καταστροφή του κυττάρου ή ενός κυτταρικού πληθυσμού. Κατά τη νέκρωση παρατηρείται διόγκωση του κυτταροπλάσματος, καταστροφή οργανιδίων του κυττάρου και κατάρρευση της πλασματικής μεμβράνης, έχοντας ως αποτέλεσμα τη διαρροή των περιεχομένων του κυττάρου στην εξωκυτταρική περιοχή, οδηγώντας έτσι στην ανάπτυξη φλεγμονής. Μπορεί να προκληθεί στο κύτταρο από εξωτερική φυσική ή χημική ζημία ή από μόλυνση, όπου έτσι χάνεται η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Συνήθως, η νέκρωση σε αντίθεση με την απόπτωση είναι μη

προγραμματισμένη και δεν έχει θετικές επιπτώσεις στον οργανισμό. Επιπλέον, είναι αποτέλεσμα της εξάντλησης της ενέργειας ATP σε επίπεδα που δεν μπορεί να επιβιώσει το κύτταρο, έχοντας ως αποτέλεσμα την καταστροφή του. Αυτός ο μηχανισμός είναι δυσκολότερο να προσδιοριστεί κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία, αλλά θεωρείται ότι λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω φωτοευαισθητοποιητών που συγκεντρώνονται στην κυτταρική μεμβράνη, όπου κατά την ενεργοποίησή τους συμβάλλουν στην καταστροφή της. Επιπλέον, σε συνθήκες παραγωγής μεγάλης ποσότητας δραστικών οξυγονούχων ειδών, δηλαδή υψηλής συγκέντρωσης φωτοευαισθητοποιητή ή υψηλής ενέργειας από την πηγή φωτός, θεωρείται ότι ο μηχανισμός της νέκρωσης ευνοείται σε σχέση με το μηχανισμό της απόπτωσης.^{43,46,53,55,56}

2.4.3 – Αυτοφαγοκυττάρωση

Η αυτοφαγοκυττάρωση (αυτοφαγία) είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός του οργανισμού έτσι ώστε να διατηρείται η ισορροπία ανάμεσα στη σύνθεση, διάσπαση και ανακύκλωση κυτταρικών προϊόντων. Η δράση της βασίζεται στα λυσοσώματα, όπου πραγματοποιείται η διάσπαση οργανιδίων ή πρωτεϊνών του κυττάρου. Κατά την αυτοφαγία μία δομή που αποτελείται από διπλή μεμβράνη περικυκλώνει την περιοχή στόχο, αυτή η δομή ονομάζεται αυτοφαγόσωμα, δημιουργώντας έτσι μια φυσαλίδα που διαχωρίζει το παγιδευμένο υλικό από το υπόλοιπο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, το αυτοφαγόσωμα μεταφέρεται και συγχωνεύεται με τα λυσοσώματα, όπου το περιεχόμενο του διασπάται μέσω λυσοσωμικών υδρολασών. Αυτή η διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε περιόδους αστίας στο κύτταρο, μεταφέροντας θρεπτικά συστατικά από τις λιγότερο σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου σε αυτές που είναι απαραίτητες για την επιβίωση του. Επιπλέον, η αυτοφαγία μπορεί να δρα προστατευτικά στο κύτταρο απομακρύνοντας φθαρμένα οργανίδια, τοξικές ουσίες ή ενδοκυτταρικά παθογόνα. Ωστόσο, η υπερβολική της δράση οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στη δράση της σε απαραίτητα οργανίδια του κυττάρου λόγω της υψηλής έλλειψης θρεπτικών συστατικών, ή ενισχύοντας το μηχανισμό της απόπτωσης λόγω υψηλής βλάβης στο κύτταρο από εξωγενής παράγοντες. Κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία, η αυτοφαγία μπορεί τόσο να ενισχύει όσο και να αναστέλλει τη δράση της, ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν. Τα δραστικά οξυγονούχα είδη που παράγονται είναι στόχοι προς απομάκρυνση μέσω του μηχανισμού αυτοφαγίας, προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα από τη θεραπεία. Επίσης, έχει τη δυνατότητα σε μερικές περιπτώσεις να αναστέλλει και το μηχανισμό απόπτωσης του κυττάρου. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι η χρήση φωτοευαισθητοποιητών που συγκεντρώνονται στα λυσοσώματα ενισχύουν την καταστρεπτική για το κύτταρο λειτουργία της αυτοφαγοκυττάρωσης, καθώς δεν μπορεί να διασπάσει τις βλαβερές ουσίες που περιορίζει. Επιπλέον, σε συνθήκες υψηλής φωτοδυναμικής δόσης ενισχύει το μηχανισμό της απόπτωσης, ενώ σε κύτταρα που ο μηχανισμός της απόπτωσης είναι ελλαττωματικός ευνοεί τη δράση της νέκρωσης του κυττάρου.^{43,46,53,55}



Εικόνα 2.6: Απεικόνιση των τριών τρόπων άμεσου κυτταρικού θανάτου, απόπτωσης (αριστερά), νέκρωσης (μέση) και αυτοφαγοκυττάρωσης (δεξιά)⁴³

2.4.4 – Κατάρρευση Κυκλοφορικού Συστήματος

Έχει παρατηρηθεί ότι κατά τη δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι πιθανόν να καταστραφούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού συστήματος που υποστηρίζει τον καρκινικό όγκο, έχοντας ως αποτέλεσμα το θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Ανάλογα με το φωτοευαισθητοποιητή που χρησιμοποιείται μπορούν να προκληθούν διάφορα προβλήματα στο αγγειακό σύστημα όπως αιμορραγία, σχηματισμός θρόμβων, συσσωμάτωση αιμοπεταλίων, στένωση των αγγείων, διαταραχή της κυκλοφορίας του αίματος και αναστολή της παραγωγής και έκλυσης οξειδίου του αζώτου. Οι παραπάνω βλάβες του αγγειακού συστήματος έχουν ως αποτέλεσμα τη στέρση του καρκινικού όγκου από οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, οδηγώντας έτσι στο κυτταρικό θάνατο λόγω ισχαιμίας. Στα περιβάλλοντα με ελλιπή οξυγόνωση παράγονται μεγάλες ποσότητες ελεύθερων ριζών οξυγόνου, κυρίως υπεροξειδικό ανιόν O_2^- , όπου λόγω του οξειδωτικού στρες ενεργοποιούνται ουδετερόφιλα και φλεγμονώδη κύτταρα, και με αυτόν τον τρόπο καταστρέφεται ο καρκινικός όγκος.^{43,46,49,59-61}

2.4.5 – Ενεργοποίηση Ανοσοποιητικού Συστήματος

Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι αρκετά πιθανόν να προκαλέσει έντονη φλεγμονώδη αντίδραση στην περιοχή που λαμβάνει χώρα, όπου παρατηρείται σχηματισμός οιδήματος, λόγω του οξειδωτικού στρες που αναπτύσσεται από τη δράση της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εκκίνηση προστατευτικών δράσεων από τον οργανισμό, έτσι ώστε να απομακρύνει τα κατεστραμμένα κύτταρα, να αποκαταστήσει φθαρμένους ιστούς και να περιορίσει τη διαταραχή της ομοιόστασης. Όταν προκληθεί φλεγμονή από τη δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας, ενεργοποιείται μία ποικιλία σημάτων που σχετίζονται με κυτταρικές βλάβες (damage-associated molecular patterns DAMPs) ή με κυτταρικό θάνατο (cell death-associated molecular patterns CDAMPs), όπου ανιχνεύονται από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού, με κύριο στόχο την εξουδετέρωση αυτών των σημάτων. Η φλεγμονή που δημιουργείται χαρακτηρίζεται από ραγδαίες αλλαγές στο αγγειακό σύστημα του όγκου, ο οποίος γίνεται διαπερατός σε πρωτεΐνες του αίματος και σε φλεγμονώδη κύτταρα. Κατά κύριο λόγο παράγονται ουδετερόφιλα και σε μικρότερο βαθμό

μαστοκύτταρα και φαγοκύτταρα, τα οποία εισβάλουν άμεσα στον καρκινικό όγκο υπό την επίδραση της φωτοδυναμικής θεραπείας, εξουδετερώνοντας και απομακρύνοντας νεκρά ή φθαρμένα κύτταρα. Η εξάντληση αυτών των κυττάρων ή η αναστολή της λειτουργίας τους μετά τη δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας, έχει φανεί ότι υποβαθμίζει τις θεραπευτικές της ικανότητες. Η φωτοδυναμική θεραπεία δρα τοπικά σε συγκεκριμένες περιοχές, όπου και καταστρέφει τα κύτταρα στόχους κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης του φωτοευαισθητοποιητή. Ωστόσο, σε σπάνιες περιπτώσεις, έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να επιτύχει και μακροπρόθεσμη αντικαρκινική δράση, λόγω της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος. Κατά τη δράση της, τα φαγοκύτταρα σε μικρό χρονικό διάστημα απομακρύνουν μεγάλη ποσότητα καρκινικών κυττάρων, τα οποία περιέχουν αντιγόνα που σχετίζονται με τον καρκινικό όγκο, όπου με αυτό τον τρόπο είναι πιθανόν να συντηρηθεί τοπικά ανοσία.^{43,49,59,61}

2.5 – Φωτοευαισθητοποιητές: χαρακτηριστικά και είδη

2.5.1 – Επιθυμητές ιδιότητες φωτοευαισθητοποιητών

Από τους τρεις παράγοντες που είναι απαραίτητοι για τη φωτοδυναμική θεραπεία, ο φωτοευαισθητοποιητής είναι ο πιο σημαντικός και περίπλοκος. Το οξυγόνο υπάρχει είδη στα κύτταρα στόχους και το φως παρέχεται από εξωτερική πηγή, οπότε έχει καθοριστεί η ένταση το μήκος κύματος εκπομπής. Όμως, για να είναι κατάλληλος για χρήση ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να παρουσιάζει συγκεκριμένα φωτοφυσικά, φωτοχημικά, βιολογικά και φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά, έτσι ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί αποτελεσματικά η φωτοδυναμική θεραπεία. Επιπλέον, λόγω του ότι ο φωτοευαισθητοποιητής είναι μία ξένη ουσία για τον οργανισμό, θα πρέπει να εξασφαλιστεί η μείωση των πιθανών αρνητικών επιπτώσεων που μπορεί να προκληθούν στον ασθενή, κατά τη χορήγηση του. Τα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού φωτοευαισθητοποιητή είναι τα εξής:

➤ Μέγιστο απορρόφηση στη περιοχή του φάσματος 600-850 nm

Η ένταση του προσπίπτοντος φωτός όταν έρχεται σε επαφή με ένα βιολογικά ιστό, μειώνεται λόγω απορρόφησης από τα χρωμοφόρα του ιστού ή λόγω σκέδασης, μειώνοντας έτσι το βάθος διείσδυσής του. Όμως, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η περιοχή του φάσματος του φωτός με μήκη κύματος 600-1300 nm ονομάζεται 'οπτικό παράθυρο', όπου εκεί παρατηρείται η μέγιστη διείσδυση του φωτός στους βιολογικούς ιστούς, λόγω της μειωμένης απορροφητικότητας από τα χρωμοφόρα. Επιπλέον, μήκη κύματος μεγαλύτερα από 850 nm δεν έχουν αρκετή ενέργεια έτσι ώστε να διεγείρουν τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση, γεγονός που σημαίνει ότι δεν παράγεται ικανοποιητική ποσότητα μονήρες οξυγόνο που είναι απαραίτητο για τη φωτοδυναμική θεραπεία. Εκτός αυτού, η απορρόφηση του φωτός από μόρια νερού αυξάνεται σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από 800 nm. Για αυτούς τους λόγους, το κατάλληλο μέγιστο μήκος απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή βρίσκεται ανάμεσα στα 600-850 nm, δηλαδή στην κόκκινη περιοχή του φάσματος.⁶²⁻⁶⁴

➤ **Ελάχιστη απορρόφηση στα 400-600 nm**

Εκτός του ότι στα μήκη κύματος 400-600 nm του φάσματος το φως δεν έχει πολύ μεγάλο βάθος διείσδυσης στους ιστούς, παρατηρείται επίσης και η μέγιστη ένταση του ηλιακού φωτός. Σε αυτήν την περιοχή του φάσματος η ακτινοβολία έχει ικανή ενέργεια για να διεγείρει το φωτοευαισθητοποιητή που βρίσκεται στο δέρμα του ασθενή, προκαλώντας έτσι φωτοευαισθησία, η οποία είναι μία από τις κυριότερες παρενέργειες της φωτοδυναμικής θεραπείας.^{61,64}

➤ **Φθορισμός/Φωτοφωταύγεια**

Η ιδιότητα του φθορισμού είναι πολύ χρήσιμη για τους φωτοευαισθητοποιητές που χρησιμοποιούνται κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία. Μέσω του φθορισμού, μπορεί να εντοπιστεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η περιοχή του καρκινικού όγκου, έχοντας ως αποτέλεσμα την πιο αποτελεσματική φωτοδυναμική δράση και διατήρηση του φυσιολογικού ιστού. Παρακολουθώντας την ένταση του φθορισμού πριν, κατά τη διάρκεια και μετά τη δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας, είναι δυνατόν να εκτιμηθεί το πόσο επιτυχής είναι, καθώς και να προσαρμόζεται η δοσिमетρία του φωτός που παρέχεται. Επιπλέον, υπάρχει η δυνατότητα οι φωτοευαισθητοποιητές να λειτουργήσουν ως μέσα οπτικής διάγνωσης για καρκινικά ή προ καρκινικά στάδια, λόγω των φθοριζουσών ιδιοτήτων τους, μέσω των οποίων υπάρχει η δυνατότητα να υλοποιηθεί βιοαπεικόνιση. Με άλλα λόγια, φωτοευαισθητοποιητές που παρουσιάζουν την ιδιότητα του φθορισμού μπορούν να χαρακτηριστούν ως πολυλειτουργικά υλικά, όπου έχουν τη δυνατότητα να δράσουν ως μέσα βιοαπεικόνισης, θεραπείας και διάγνωσης (Theranostics).⁶³⁻⁶⁶

➤ **Αμφιφιλικότητα**

Η αμφιφιλικότητα χαρακτηρίζει μόρια τα οποία έχουν μερικώς υδρόφιλο (λιπόφοβο) χαρακτήρα και μερικώς λιπόφιλο (υδρόφοβο) χαρακτήρα σε διαφορετικές περιοχές του μορίου τους, και έτσι κάθε περιοχή συμπεριφέρεται διαφορετικά σε ένα διάλυμα. Η ισορροπία ανάμεσα στον υδρόφιλο και λιπόφιλο χαρακτήρα του φωτοευαισθητοποιητή είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του στη φωτοδυναμική θεραπεία. Κατά την ενδοφλέβια χορήγηση ο φωτοευαισθητοποιητής μεταφέρεται μέσω του αίματος, και για αυτό το λόγο είναι πολύ σημαντικός ο υδρόφιλος χαρακτήρας του, καθώς έτσι μειώνεται ο σχηματισμός συσσωματωμάτων και η καθίζηση του. Ο σχηματισμός συσσωματωμάτων των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη κυκλοφορία του στο αίμα και τη μείωση της φωτοδυναμικής του δράσης, δηλαδή τη μείωση της ικανότητας του να απορροφά φως, το χρόνο ζωής του και την κβαντική απόδοση στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση. Αντιθέτως, ο λιπόφιλος χαρακτήρας εξασφαλίζει την ικανότητα των μορίων του φωτοευαισθητοποιητή να διαπερνούν το λιπιδικό στρώμα της κυτταρικής μεμβράνης και να εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου, όπου και συγκεντρώνονται στα ενδοκυτταρικά οργανίδια. Σε εξαιρετικά υδρόφοβους φωτοευαισθητοποιητές, οι οποίοι είναι αδιάλυτοι, υπάρχει η δυνατότητα να προσδένονται υδρόφιλα μέσα μεταφοράς, έτσι ώστε να βελτιώνεται ο υδρόφιλος χαρακτήρας τους.^{61,63,65,67}

➤ **Κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρους οξυγόνου $^1\text{O}_2$ στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση**

Στους περισσότερους φωτοευαισθητοποιητές η τιμή της κβαντικής απόδοσης (Φ_D) κυμαίνεται στις τιμές 0.3-0.8. Η κβαντική απόδοση επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η περιοχή που έχει συγκεντρωθεί ο φωτοευαισθητοποιητής, ο βαθμός συσσωμάτωσης του, η ποσότητα του οξυγόνου και οι παράπλευρες αντιδράσεις που πραγματοποιούνται. Η υψηλή κβαντική απόδοση οδηγεί σε μεγάλη παραγωγή μονήρους οξυγόνου $^1\text{O}_2$, έχοντας ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη καταστροφή στα καρκινικά κύτταρα. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, απαιτείται πρώτα ικανή κβαντική απόδοση τριπλής διεγερμένης κατάστασης (Φ_T), με επαρκή ενέργεια για να σχηματιστεί το μονήρες οξυγόνο, καθώς και σχετικά υψηλό χρόνο ζωής στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση.^{64,65}

➤ **Σταθερή χημική σύσταση**

Ο φωτοευαισθητοποιητής είναι επιθυμητό να έχει καθορισμένη σύσταση και δομή, και κατά προτίμηση να είναι μία μοναδική ουσία και όχι μείγμα, έτσι ώστε να είναι πιο αξιόπιστη και ακριβής η εκτίμηση της δράσης του. Επιπλέον, με αυτόν τον τρόπο είναι πιο εύκολη η παραγωγή και η μελέτη του φωτοευαισθητοποιητή.^{62,64}

➤ **Μηδαμινή τοξικότητα**

Είναι σημαντικό ο φωτοευαισθητοποιητής στις δοσολογίες που χρησιμοποιείται να μην είναι τοξικός στον οργανισμό πριν από τη διέγερση του, καθώς και να μην παράγονται τοξικά είδη κατά τη φωτοκαταστροφή του ή το μεταβολισμό του από τα κύτταρα. Επιπλέον, θα πρέπει να μην αλλοιώνει το DNA ανεξάρτητα από το εάν είναι διεγερμένος ή όχι.^{62,64,66,68}

➤ **Επιλεκτικότητα**

Μία απαραίτητη ιδιότητα ενός φωτοευαισθητοποιητή είναι η επιλεκτική του συκέντρωση σε καρκινικά κύτταρα, έτσι ώστε να μην καταστρέφεται ο φυσιολογικός ιστός κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία. Ο φωτοευαισθητοποιητής συγκεντρώνεται και παραμένει για μεγαλύτερο χρονικά διάστημα στον καρκινικό όγκο σε σχέση με τα υγιή κύτταρα, λόγω της διαφορετικής του μορφολογίας και των διαφορετικών συνθηκών που επικρατούν κοντά του. Αυτό οφείλεται διότι στον καρκινικό ιστό παρατηρείται αύξηση της διαπερατότητας του αγγειακού συστήματος, χαμηλότερες τιμές pH στις περιοχές κοντά στα καρκινικά κύτταρα, αύξηση στην έκφραση των υποδοχέων χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (Low Density Lipoproteins LDLs) από τα καρκινικά κύτταρα που πολλαπλασιάζονται με υψηλό ρυθμό, στη μειωμένη λειτουργία του λεμφικού συστήματος, στον υψηλό αριθμό μακροφάγων που σχετίζονται με τον καρκινικό όγκο και κολλαγόνων, τα οποία έλκουν τα μόρια του φωτοευαισθητοποιητή και μονομερίζουν τους συσσωματωμένους φωτοευαισθητοποιητές. Επιπλέον, οι περιοχές στον καρκινικό όγκο (εντός ή εκτός των κυττάρων) που συγκεντρώνεται ο φωτοευαισθητοποιητής επηρεάζουν τον τρόπο με τον οποίο θα καταστραφεί.^{63,64}

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η αμφιφιλικότητα είναι μια πολύ σημαντική ιδιότητα του φωτοευαισθητοποιητή. Αυτή η ιδιότητα παίζει σημαντικό ρόλο και στην επιλεκτικότητα

του φωτοευαισθητοποιητή από τα καρκινικά κύτταρα. Όταν ο φωτοευαισθητοποιητής εισέρχεται στο αίμα, άμα παρουσιάζει υδρόφοβο χαρακτήρα, προσδένεται με λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας έτσι ώστε να μεταφερθεί. Λόγω των αυξημένων υποδοχέων LDLs που διαθέτουν τα καρκινικά κύτταρα, ο φωτοευαισθητοποιητής διασπάται και εισέρχεται στα καρκινικά κύτταρα, όπου και προσδένεται στα οργανίδια τους. Η πρόσληψη των υδρόφωβων φωτοευαισθητοποιητών από τα καρκινικά κύτταρα ενισχύεται και από τις χαμηλές τιμές του pH. Αντιθέτως, οι υδρόφιλοι φωτοευαισθητοποιητές όταν εισέρχονται στο αίμα προσδένονται με διάφορες πρωτεΐνες του αίματος (όπως αλβουμίνη) και συγκεντρώνονται κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων ή στο αγγειακό σύστημα του καρκινικού όγκου και εισέρχονται δυσκολότερα στα κύτταρα, καθώς δεν έχουν τη δυνατότητα να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη. Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 2.4 (28) η περιοχή που συγκεντρώνεται ο φωτοευαισθητοποιητής στον καρκινικό ιστό, και συνεπώς που διεγείρεται, επηρεάζει το μηχανισμό με τον οποίο θα καταστραφεί ο καρκινικός όγκος. Στους υδρόφωβους φωτοευαισθητοποιητές, λόγω του ότι συγκεντρώνονται στα ενδοκυτταρικά σωματίδια, παρατηρείται κατά κύριο λόγο απευθείας κυτταρικός θάνατος μέσω μηχανισμών απόπτωσης, νέκρωσης ή φαγοκυττάρωσης, ενώ στους υδρόφιλους συνήθως παρατηρείται καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, και συνεπώς νέκρωση των κυττάρων ή έμμεσος θάνατος του καρκινικού όγκου, λόγω καταστροφής του αγγειακού συστήματος που τον υποστηρίζει.^{60,65,67-71}

➤ **Αποβάλλεται από τον οργανισμό**

Η πιο σημαντική παρενέργεια της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι η φωτοευαισθησία που μπορεί να προκληθεί στον ασθενή. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι ποσότητες του φωτοευαισθητοποιητή που έχουν συγκεντρωθεί στο δέρμα ή άλλους ιστούς είναι πιθανόν να διεγερθούν από την ηλιακή ακτινοβολία. Για αυτό το λόγο είναι σημαντικό ο μεταβολισμός ή η αποδέσμευση του φωτοευαισθητοποιητή από τα κύτταρα να είναι όσο το δυνατόν γρηγορότερη. Το χρονικό διάστημα που παρατηρείται φωτοευαισθησία εξαρτάται από το είδος του φωτοευαισθητοποιητή.^{63,65,66}

➤ **Φωτοσταθερότητα**

Κατά την έκθεση του με ακτινοβολία, ο φωτοευαισθητοποιητής είναι πολύ πιθανόν να υποβληθεί σε φαινόμενα φωτολεύκανσης (photobleaching). Αυτά τα φαινόμενα μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, την ολική φωτοκαταστροφή και τη φωτοτροποποίηση, όπου έχουν ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση ή εξάλειψη των ιδιοτήτων απορρόφησης και φθορισμού του φωτοευαισθητοποιητή, και συνεπώς τη μείωση της φωτοδυναμικής του δράσης. Η φωτολεύκανση οφείλεται κατά κύριο λόγο στο μονήρες οξυγόνο και τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου που παράγονται κατά τη διάρκεια της φωτοδυναμικής θεραπείας, όπου εκτός από τους βιολογικούς ιστούς αντιδρούν και με το φωτοευαισθητοποιητή. Στην ολική φωτοκαταστροφή, ο φωτοευαισθητοποιητής διασπάται σε μικρότερα κομμάτια, τα οποία χάνουν τελείως τις ιδιότητες απορρόφησης και φθορισμού του αρχικού μορίου, έχοντας ως αποτέλεσμα να χάσει τη φωτοδυναμική του ικανότητα. Αντιθέτως, στη φωτοτροποποίηση, η οξείδωση που δέχεται ο φωτοευαισθητοποιητής οδηγεί στην τροποποίηση των πλευρικών του ομάδων και/ή του

μοριακού του σκελετού, όπου με αυτόν τον τρόπο το χρωμοφόρο αλλοιώνεται και παρατηρούνται διαφορετικές οπτικές ιδιότητες. Είναι πιθανόν η φωτοτροποποίηση του φωτοευαισθητοποιητή να οδηγήσει στη παραγωγή άλλων φωτοευαισθητοποιητικών ουσιών. Γενικά, το φαινόμενο της φωτολεύκανσης μπορεί να παρατηρηθεί μέσω της μείωσης της έντασης του φθορισμού, καθώς είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του φωτοευαισθητοποιητή. Όμως, σε βιολογικά συστήματα η παρατήρησή αυτού του φαινομένου είναι δυσκολότερη, καθώς η μείωση στην ένταση του φθορισμού μπορεί να οφείλεται και σε άλλους παράγοντες όπως ο σχηματισμός συσσωματωμάτων, οι μηχανισμοί απομάκρυνσης ξένων ουσιών από τα κύτταρα και οι αλλαγές στις οπτικές ιδιότητες των ιστών. Η αντίσταση του φωτοευαισθητοποιητή στα φαινόμενα φωτολεύκανσης ονομάζεται φωτοσταθερότητα, και είναι μία επιθυμητή ιδιότητα, καθώς με αυτόν τον τρόπο ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί να ακτινοβολείται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας. Παρ' όλα αυτά, πολύ υψηλός βαθμός φωτοσταθερότητας μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη φωτοευαισθησία για τον ασθενή, ενώ η φωτολεύκανση μπορεί να περιορίσει τη φωτοκαταστροφή στους φυσιολογικούς ιστούς. Για αυτόν το λόγο, ο βαθμός φωτολεύκανσης του φωτοευαισθητοποιητή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καθοριστεί η κατάλληλη δοσिमетρία κατά τη θεραπεία.^{61,63,64,69,71,72}

➤ Διαθεσιμότητα

Κατά προτίμηση ο φωτοευαισθητοποιητής θα πρέπει να έχει χαμηλό κόστος και να είναι εμπορικά διαθέσιμος. Η διαδικασία χορήγησης του θα πρέπει να είναι απλή, ασφαλής και ιδανικά να έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί παράλληλα με άλλες θεραπείες (π.χ. χημειοθεραπεία), χωρίς να εμποδίζει τη δράση τους.^{65,66}

2.5.2 – Είδη φωτοευαισθητοποιητών

2.5.2.1 – Γενιές φωτοευαισθητοποιητών

Με σκοπό την εύρεση του ιδανικού φωτοευαισθητοποιητή έχει εξεταστεί πλήθος ουσιών που εμφανίζουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, και μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικές γενιές φωτοευαισθητοποιητών. Συγκεκριμένα:

1^η γενιάς φωτοευαισθητοποιητές

Πρώτης γενιάς φωτοευαισθητοποιητές είναι παράγωγες ουσίες από την αιματοπορφυρίνη και κυριότερα το photofrin. Αυτές οι ουσίες παρουσιάζουν αρκετούς περιορισμούς στη φωτοδυναμική τους δράση, λόγω της περίπλοκης δομής τους (που καθιστά τη σύνθεσή τους δύσκολη και πιθανή τη μόλυνση από ακαθαρσίες), της χαμηλής τους απορρόφησης (σε συνδυασμό με το γεγονός ότι απορροφούν σε χαμηλά μήκη κύματος κοντά στην περιοχή του ορατού φωτός), της χαμηλής τους υδατικής διαλυτότητας και της αργή τους αποδέσμευση από τα κύτταρα του δέρματος, προκαλώντας φωτοευαισθησία για μεγάλα χρονικά διαστήματα.^{69,73}

2^{ης} γενιάς φωτοευαισθητοποιητές

Οι δεύτερης γενιάς φωτοευαισθητοποιητές αναπτύχθηκαν έτσι ώστε να αντιμετωπιστούν τα μειονεκτήματα των φωτοευαισθητοποιητών πρώτης γενιάς. Η δεύτερη γενιά φωτοευαισθητοποιητών αποτελείται από αρκετές ουσίες, που ανήκουν στις οικογένειες των πορφυρίνων, χλωρινών και χρωστικών. Αυτές οι ουσίες κατά κύριο λόγο είναι καθαρές ενώσεις, με υψηλή απορρόφηση φωτός στα 600-850 nm, υψηλή παραγωγή μονήρες οξυγόνου, χαμηλή τοξικότητα και σχετικά γρήγορη αποδέσμευση από τον οργανισμό. Ο πιο σημαντικός περιορισμός αυτών των φωτοευαισθητοποιητών είναι η χαμηλή τους επιλεκτικότητα στους ιστούς στόχους και ο έντονος υδρόφοβος χαρακτήρας τους.^{69,73}

3^{ης} γενιάς φωτοευαισθητοποιητές

Στην τρίτη γενιά φωτοευαισθητοποιητών ανήκουν οι ουσίες της πρώτης και της δεύτερης γενιάς, με τη διαφορά ότι προσδένονται με νανοϋλικά ή αντισώματα, έτσι ώστε να βελτιωθούν τα χαρακτηριστικά τους, όπως η επιλεκτικότητά τους στους ιστούς στόχους, η διαλυτότητά τους, η βιοσυμβατότητά τους και να μειωθεί η αποικοδόμηση τους. Ως μέσα μεταφοράς μπορούν να χρησιμοποιηθούν μικκύλια, λιποσώματα, νανοσωματίδια χρυσού, κβαντικές τελείες άνθρακα ή μετάλλων, νανοσωματίδια πυριτίου και βιοδιασπώμενα πολυμερή ή λιπιδικά νανοσωματίδια. Βέβαια, τα νανοϋλικά που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να απομακρύνονται γρήγορα από τα φυσιολογικά κύτταρα, να μην είναι τοξικά ή να είναι βιοδιασπώμενα, καθώς επίσης και να μην επηρεάζουν τις οπτικές ιδιότητες του φωτοευαισθητοποιητή. Οι φωτοευαισθητοποιητές τρίτης γενιάς έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν τόσο για θεραπευτικούς σκοπούς όσο και για διαγνωστικούς.

Υπάρχουν αρκετοί λόγοι για τους οποίους τα νανοσωματίδια μπορούν να βελτιώσουν τις ιδιότητες των φωτοευαισθητοποιητών κατά τη χρήση τους ως φορείς. Αρχικά, είναι αρκετά σταθερά υπό συνθήκες ακτινοβολίας, και ανάλογα με το είδος τους παρουσιάζουν εξαιρετικές οπτικές ιδιότητες, ενισχύοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας. Επιπλέον, βελτιώνουν την επιλεκτική συγκέντρωση των φωτοευαισθητοποιητών στα κύτταρα στόχους, λόγω της μεγάλης τους ειδικής επιφάνειας και της ευελιξίας στην επιφανειακή τους τροποποίησης. Όπως αναφέρθηκε, το ελλαττωματικό αγγειακό σύστημα των καρκινικών όγκων έχει μεγαλύτερη διαπερατότητα, επιτρέποντας σε σωματίδια μικρού μήκους να διαπερνούν και να συγκεντρώνονται σε αυτό, φαινόμενο γνωστό ως ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης (enhanced permeability and retention effect, EPR). Με αυτόν τον τρόπο, βελτιώνεται η θεραπευτική ικανότητα της θεραπείας και μειώνονται οι παρενέργειές της. Μερικά νανοϋλικά (όπως νανοσωματίδια ημιαγωγών) συμβάλλουν και στην παραγωγή δραστικών οξυγονούχων ειδών, μέσω φαινομένων φωτοεπαγόμενης μεταφοράς ηλεκτρονίων (Photoinduced electron transfer, PET) και μεταφοράς ενέργειας συντονισμού Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET). Τέλος, η χρήση νανοϋλικών που παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες σε σχέση με το φωτοευαισθητοποιητή (για παράδειγμα μαγνητικές ή φθορίζουσες), μπορούν να συμβάλλουν στη χρήση των φωτοευαισθητοποιητών 3^{ης} γενιάς σε ως μέσα ταυτόχρονης, πιο αποτελεσματικής, θεραπείας και διάγνωσης. Για παράδειγμα, ένα ενδιαφέρον και καινοτόμο είδος φωτοευαισθητοποιητή 3^{ης} γενιάς που έχει μελετηθεί αποτελείται από σύστημα μεταφοράς νανοσωματιδίων που εμφανίζουν την ιδιότητα του up-conversion φθορισμού. Αυτά τα νανοσωματίδια έχουν τη δυνατότητα να απορροφούν χαμηλής ενέργειας ακτινοβολία στην υπέρυθη περιοχή του φάσματος (με μήκη κύματος μεγαλύτερα από 850nm), και στη συνέχεια να εκπέμπουν ακτινοβολία υψηλότερης

ενέργειας (με μήκη κύματος στην περιοχή του υπεριώδους-ορατού φωτός), εμφανίζοντας έτσι μετατόπιση anti-Stokes. Αυτό πραγματοποιείται με την ταυτόχρονη απορρόφηση πολλαπλών φωτονίων χαμηλής ενέργειας, προς την επανεκπομπή ενός φωτονίου υψηλότερης ενέργειας. Αυτό το φαινόμενο παρουσιάζει αρκετά χαμηλές κβαντικές αποδόσεις, και απαιτεί χρήση πηγών φωτός υψηλής ισχύος, ωστόσο έχει μελετηθεί η χρήση αυτών των σωματιδίων ως μέσα μεταφοράς φωτοευαισθητοποιητών 3^{ης} γενιάς, καθώς κατά των Up-conversion φθορισμό τους έχουν τη δυνατότητα να διεγείρουν των φωτοευαισθητοποιητή, κάνοντας έτσι δυνατή τη χρήση πηγών ακτινοβολίας με μήκη κύματος μεγαλύτερα από 850nm, βελτιώνοντας με αυτό το τρόπο το βάθος των ιστών στο οποίο μπορεί να είναι αποτελεσματική η φωτοδυναμική θεραπεία.^{43,50,74-76}

2.5.2.2 – Οικογένειες φωτοευαισθητοποιητών

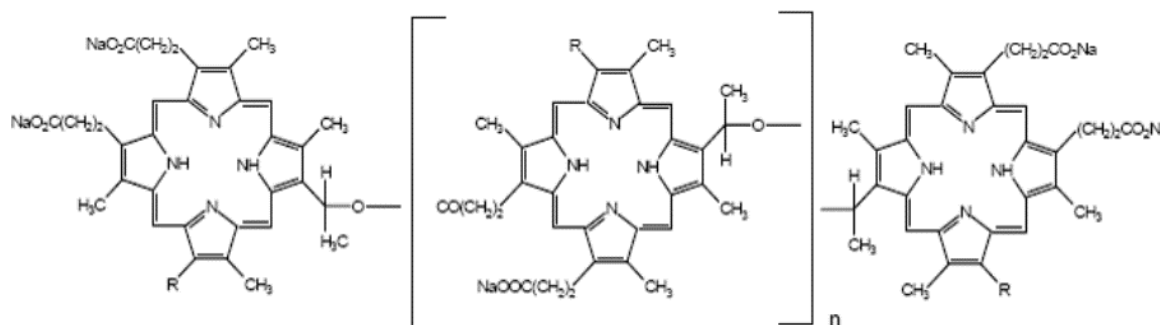
Ανάλογα με τη δομή και τη σύσταση τους οι φωτοευαισθητοποιητές μπορούν να χωριστούν σε τρεις οικογένειες, τις πορφυρίνες (πορφύρες), τις χλωρίνες και τις χρωστικές. Οι πορφυρίνες βασίζονται στα παράγωγα της αιματοπορφυρίνης, ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία της. Αυτά τα προϊόντα είναι εμπορικά διαθέσιμα και αποτελούνται από διαφορετικές ποσότητες μονομερών, διμερών και ολιγομερών πορφυρίνης. Ανάλογα με τη σύσταση τους παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες, αλλά όσον αφορά τη φωτοδυναμική θεραπεία είναι παρόμοια τα αποτελέσματά τους. Αντιθέτως, οι χλωρίνες είναι ουσίες παρόμοιες με τη χλωροφύλλη ή παράγωγά της (πουρίνες). Οι χρωστικές αφορούν κυρίως τη χρήση των φθαλοκυανίνων και ναφθαλοκυανίνων. Μερικοί από τους πιο γνωστούς φωτοευαισθητοποιητές είναι οι εξής:

Πορφυρίνες

Photofrin (Porfimer Sodium)

Ο πιο διαδεδομένος φωτοευαισθητοποιητής και ο πρώτος που εγκρίθηκε για χρήση στη φωτοδυναμική θεραπεία είναι το Photofrin (Porfimer Sodium). Είναι μίγμα διαφόρων παραγώγων, μονομερών, διμερών και ολιγομερών της αιματοπορφυρίνης, γεγονός που σημαίνει ότι έχει περίπλοκη και μη καθορισμένη δομή και σύσταση. Εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης περίπου στα 630 nm (παρουσιάζει απορρόφηση και στην περιοχή 400-600 nm), και λόγω αυτού δεν είναι δυνατή η φωτοδυναμική θεραπεία σε ιστούς που απαιτούν υψηλή διείσδυση φωτός. Επίσης, η παραγωγή μονήρες οξυγόνου είναι χαμηλή, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μεγάλη διάρκεια θεραπείας. Στις δόσεις που χρησιμοποιείται παρουσιάζει πολύ χαμηλή τοξικότητα και δεν είναι καρκινογόνος, αλλά παρουσιάζει κακή υδατοδιαλυτότητα και αποδεσμεύεται αρκετά αργά από τα κύτταρα του δέρματος, όπου σε συνδυασμό με την χαμηλή του επιλεκτικότητα έχει ως αποτέλεσμα τη παρατεταμένη φωτοευαισθησία για τον ασθενή (περίπου 4-8 βδομάδες).

Κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία, αρχικά το Photofrin μπορεί να χορηγηθεί ενδοφλέβια (2-5 mg/kg), όπου στη συνέχεια ακτινοβολείται με φως μήκους κύματος 630 nm (δόση φωτός 100-300 J·cm⁻²) ύστερα από 24-48 ώρες από τη χορήγηση. Βέβαια, μετά από τη θεραπεία ο ασθενής θα πρέπει να αποφεύγει την άμεση επαφή με το ηλιακό φως, γεγονός που είναι και ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα του Photofrin. Το Photofrin είναι ένας από τους πρώτους φωτοευαισθητοποιητές που κρίθηκε κατάλληλος για κλινική χρήση, όπου πλέον έχει εγκριθεί παγκοσμίως για θεραπεία διαφόρων ειδών καρκίνου, όπως του πνεύμονα, του οισοφάγου, της κύστης και του δέρματος.^{61,65,66,71,73,77}

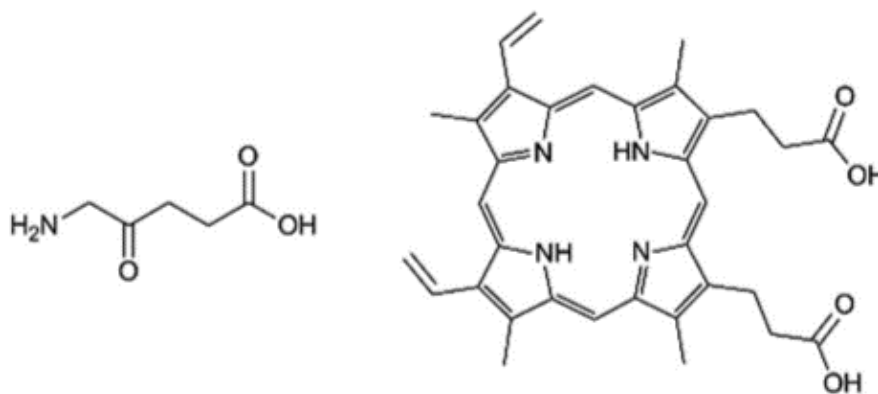


Εικόνα 2.7: Δομή Photofrin ⁷⁸

5-αμινολεβουλινικό οξύ (5-Aminolevulinic acid, Ala)

Το Ala είναι φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς και είναι ένα αμινοξύ που εντοπίζεται φυσιολογικά στον οργανισμό, το οποίο μετατρέπεται ενζυμικά στην πρωτοπορφυρίνη IX. Η πρωτοπορφυρίνη IX μετατρέπεται σε αίμη, και είναι υπεύθυνη για τη φωτοδυναμική δράση του Ala, ωστόσο στις ποσότητες που παράγεται φυσιολογικά στον οργανισμό δεν είναι ικανή να πραγματοποιήσει φωτοδυναμική αντίδραση. Το Ala παρουσιάζει απορρόφηση στο μήκος κύματος 630 nm (αλλά και στην περιοχή 400-600 nm), χαμηλή παραγωγή μονήρες οξυγόνου και η επιλεκτικότητα του σε καρκινικούς όγκους είναι χαμηλή. Για κλινική χρήση είναι πιθανόν να χρησιμοποιηθούν και τροποποιημένες μορφές Ala, έτσι ώστε να εμφανίζουν υψηλότερη απορρόφηση και παραγωγή μονήρους οξυγόνου.

Συνήθως η χορήγηση του Ala στον ασθενή γίνεται τοπικά, και λόγω του ότι μπορεί να είναι επώδυνη, πραγματοποιείται και τοπική αναισθησία. Γενικά, χρησιμοποιείται 20% Ala που ακτινοβολείται περίπου τέσσερις ώρες μετά την τοπική επάλειψη με ακτινοβολία 630 nm (δόσης φωτός 150 J·cm⁻²). Λόγω του ότι βρίσκεται και φυσιολογικά στον οργανισμό, απομακρύνεται σχετικά γρήγορα από τα κύτταρα. Το Ala χρησιμοποιείται κυρίως για καρκίνους του δέρματος μικρού βάθους (μέχρι 2 mm), όπου και θεωρείται ότι είναι ένας από τους πιο αποτελεσματικούς φωτοευαισθητοποιητές, έχοντας εγκριθεί για κλινική χρήση από το FDA για την ακτινική κεράτωση.^{66,71,77}

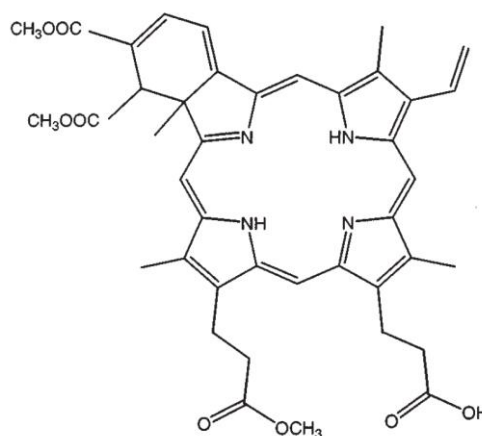


Εικόνα 2.8: Δομή 5-αμινολεβουλινικού οξέος ⁷⁹

Παράγωγα Βενζοπορφυρίνης (Benzoporphyrin derivatives, BPD)

Το Verteporfin είναι το πιο διαδεδομένο BPD που χρησιμοποιείται κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία. Είναι εξαιρετικά υδρόφοβο και για αυτό το λόγο χρειάζεται ένα μέσο μεταφοράς για την κλινική χρήση του (κυρίως χρησιμοποιούνται λιποσώματα). Παρουσιάζει απορρόφηση στα 690 nm, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα για χρήση σε μεγαλύτερου βάθους ιστούς. Επιπλέον απομακρύνεται σχετικά γρήγορα από τον οργανισμό (περίπου 5 μέρες).

Verteporfin χορηγείται ενδοφλέβια (0.15-1 mg/kg, ενώ όταν δεν χορηγείται ενδοφλέβια μπορεί να γίνει και με δόση έως 6 mg/kg), όπου ακτινοβολείται ύστερα από 30 λεπτά (δόση φως 50-100 J·cm⁻²). Κλινικά, χρησιμοποιείται κυρίως για την αντιμετώπιση της ωχράς κηλίδας και μερικών ειδών καρκίνου του δέρματος.^{65,66,71,73}



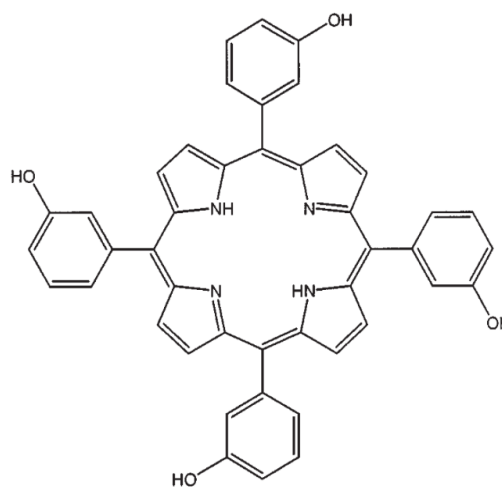
Εικόνα 2.9: Δομή Verteporfin [31]

Χλωρίνες

Temoporfin (5,10,15,20-Tetrakis(3-hydroxyphenyl)chlorin, m-Thpc)

Το m-Thpc, με εμπορικό όνομα Foscan, είναι φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς και είναι ένας από τους πιο αποτελεσματικούς για χρήση στη φωτοδυναμική θεραπεία. Παρουσιάζει υψηλή παραγωγή μονήρες οξυγόνου στα 652 nm, γεγονός που δίνει τη δυνατότητα θεραπείας και ιστών σχετικά μεγάλου βάθους. Είναι καθαρή ουσία, γεγονός που σημαίνει ότι η παραγωγή του είναι σχετικά εύκολη. Επιπλέον, παρουσιάζει υδρόφοβο χαρακτήρα και συγκεντρώνεται σε μεγάλο βαθμό στα καρκινικά κύτταρα. Θεωρείται ότι στη φωτοδυναμική θεραπεία είναι έως και 100 φορές πιο αποτελεσματικό από το Photofrin.

Χορηγείται ενδοφλέβια (0.1-0.2 mg/kg), χρειάζεται περίπου τέσσερις μέρες μέχρι να συγκεντρωθεί στα καρκινικά κύτταρα, έτσι ώστε τελικά να ακτινοβοληθεί (χρειάζεται δόση φως μόλις 5-20 J·cm⁻²). Η θεραπεία διαρκεί μερικά λεπτά, αλλά είναι αρκετά επώδυνη και χρειάζεται αναισθησία. Τις πρώτες μέρες μετά τη χορήγηση προκαλεί έντονη φωτοευαισθησία, και κατά τη θεραπεία είναι απαραίτητο να επικεντρώνεται η ακτινοβολία μόνο στα κύτταρα στόχους και να μην έρθει σε επαφή με τα φυσιολογικά, καθώς μπορεί να τα βλάψει από τη φωτοδυναμική δράση. Η φωτοευαισθησία του ασθενή διαρκεί για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα (2-6 εβδομάδες). Κλινικά, η χρήση του έχει εγκριθεί στην Ευρώπη, όπου και είναι αρκετά αποτελεσματικό για ανακουφιστικές θεραπείες σε καρκίνους της κεφαλής και του οισοφάγου, όπου επίσης εξετάζεται η δράση του και για καρκίνους πνεύμονα, στομάχους και προστάτη. Η πολύ έντονη φωτοδυναμική του δράση απαιτεί



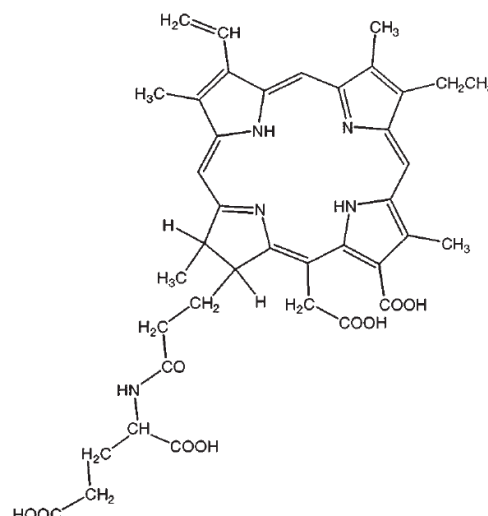
Εικόνα 2.10: Δομή Temoporfin [31]

ότι η δοσολογία τόσο του ίδιου του m-Thrc όσο και του φωτός είναι υψηλής ακρίβειας, καθώς σε σχέση με άλλους φωτοευαισθητοποιητές οι παρενέργειες του μπορεί να είναι εντονότερες.^{65,66,71,77}

Mono-apsartyl chlorin e6 (Npe6, Laserphyrin)

Το Npe6 είναι φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς, παρουσιάζει υδατική διαλυτότητα, απομακρύνεται σχετικά γρήγορα από τα κύτταρα, αλλά η επιλεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα είναι χαμηλή. Παράγει μονήρες οξυγόνο αποτελεσματικά και απορροφά ακτινοβολία στο μήκος κύματος 656 nm, δίνοντας της δυνατότητα για χρήση και σε βαθύτερους ιστούς.

Χορηγείται ενδοφλέβια (0.5-3.5 mg/kg) και η ακτινοβολία (δόση φωτός 50-200 J·cm⁻²) μπορεί να πραγματοποιηθεί τέσσερις ώρες μετά τη χορήγηση. Η φωτοευαισθησία που προκαλεί μετά τη θεραπεία διαρκεί για μικρό χρονικό διάστημα (3-7 ημέρες) και η συγκέντρωση του στα κύτταρα του δέρματος είναι χαμηλή. Κλινικά, η δράση του είναι κυρίως υπό μελέτη, ωστόσο στην Ιαπωνία έχει εγκριθεί για χρήση στα αρχικά στάδια του καρκίνου του πνεύμονα, καθώς επίσης εξετάζεται και η καταλληλότητά του για οφθαλμικές παθήσεις.^{66,71,77}

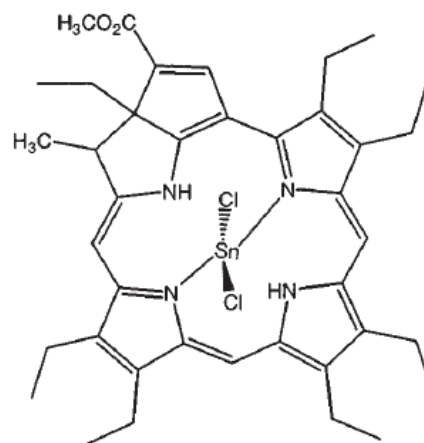


Εικόνα 2.11: Δομή Npe6 [31]

Tin-ethyl-etiopurpurin (Purlytin, SnET2)

Το SnET2 είναι παράγωγο από την αποδόμηση της χλωροφύλλης, είναι καθαρή ένωση, αλλά λόγω της πολύ κακής του υδατικής διαλυτότητας η παραγωγή του είναι απαιτητική. Παρουσιάζει απορρόφηση στα 660 nm με μεγάλη παραγωγή μονήρες οξυγόνου, επιτρέποντας έτσι τη χρήση του σε βαθύτερους ιστούς. Για τη χορήγηση του είναι απαραίτητη η χρήση μέσου μεταφοράς, όπως λιποσώματα.

Χορηγείται ενδοφλέβια (1.2 mg/kg) και η ακτινοβολία μπορεί να πραγματοποιηθεί μετά από ένα εικοσιτετράωρο (δόση φωτός 200 J·cm⁻²). Η θεραπεία με το SnET2 είναι σχετικά ανώδυνη και οι παρενέργειές του στα δερματικά κύτταρα είναι ελάχιστες, όμως έχει παρατηρηθεί ότι είναι πιθανόν να προκαλέσει αλλεργική αντίδραση, καθώς επίσης πρέπει να εξεταστεί περισσότερο η πιθανή τοξικότητα. Η φωτοδυναμική του δράση εξετάζεται με κλινικές δοκιμές για καρκίνους του δέρματος, του στήθους και του προστάτη.^{66,71,73,77}

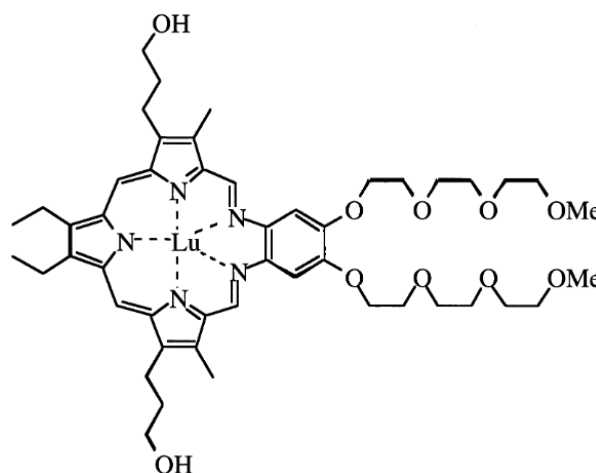


Εικόνα 2.12: Δομή Purlytin [31]

Lutetium texaphyrin (Lutrin)

Το Lutrin είναι φωτοευαισθητοποιητής δεύτερης γενιάς και παρουσιάζει καλή υδατοδιαλυτότητα και επιλεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα. Το μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης του είναι στα 732 nm, ωστόσο η παραγωγή μονήρους οξυγόνου είναι σχετικά χαμηλή.

Χορηγείται ενδοφλέβια (0.6-7.2 mg/kg), η ακτινοβολήση του μπορεί να πραγματοποιηθεί τρεις ώρες μετά τη χορήγηση (δόση φωτός 150 J·cm⁻²) και απομακρύνεται γρήγορα από τα φυσιολογικά κύτταρα. Έχει εγκριθεί για κλινική χρήση για καρκίνο του προστάτη και μελετάται η δράση του για καρκίνους του πνεύμονα, δέρματος και κεφαλής.^{71,73,77}



Εικόνα 2.13: Δομή Lutrin [38]

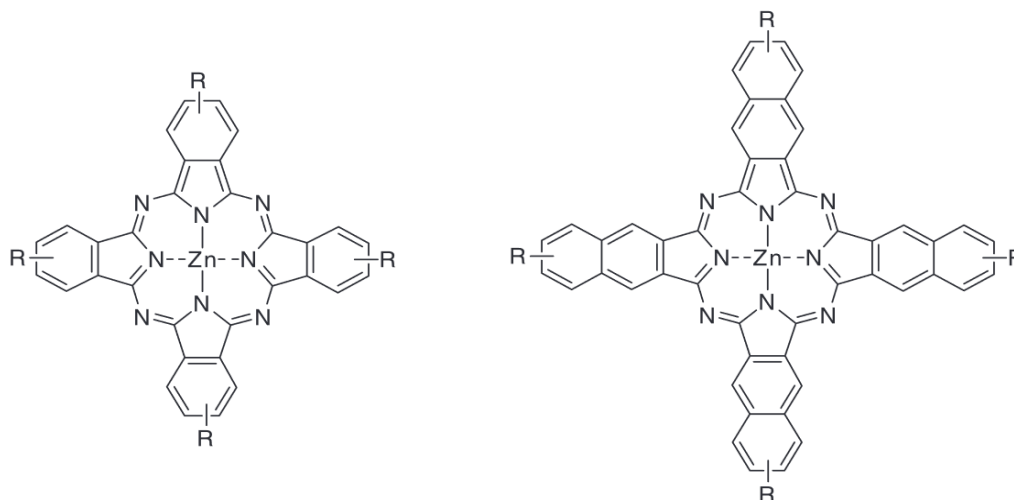
Χρωστικές

Φθαλοκυανίνες και ναφθαλοκυανίνες

Οι φθαλοκυανίνες και τα παράγωγά τους οι ναφθαλοκυανίνες είναι μακροκυκλικές ενώσεις με δομή δακτυλίων με εναλλασσόμενα άτομα άνθρακα-αζώτου. Είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιημένοι φωτοευαισθητοποιητές από την οικογένεια των χρωστικών. Είναι εξαιρετικά υδρόφοβες ενώσεις, και για αυτόν το λόγο συνήθως προστίθεται ένα άτομο μετάλλου στο κέντρο του δακτυλίου τους (π.χ. Zn, Al, Ni), έτσι ώστε να βελτιωθεί η υδατική τους διαλυτότητα και να μειωθεί ο σχηματισμός συσσωματωμάτων. Η πρόσθεση του μετάλλου στη δομή τους βοηθάει επίσης και στη φωτοδυναμική τους δράση, αυξάνοντας το χρόνο ζωής της τριπλής διεγερμένης κατάστασής τους. Επιπλέον, ο υδρόφοβος χαρακτήρας τους απαιτεί τη χρήση μέσου μεταφοράς για την αποτελεσματική τους δράση κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία. Οι φθαλοκυανίνες, ειδικά όταν συνδυάζονται με κάποιο μέσο μεταφοράς, παρουσιάζουν αρκετά καλή βιοσυμβατότητα, επιλεκτικότητα στους καρκινικούς όγκους και απομακρύνονται σχετικά γρήγορα από τον οργανισμό. Παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση στην περιοχή του φάσματος 650-800 nm και η παραγωγή μονήρους οξυγόνου είναι ικανοποιητική, γεγονός που τις καθιστά κατάλληλες για φωτοδυναμική θεραπεία και σε όγκους με μεγάλο βάθος. Παρόλο που είναι καθαρές ενώσεις, μπορούν να παραχθούν από ποικιλία πρόδρομων ενώσεων, όπου με αυτόν τον τρόπο οι ιδιότητες τους διαφέρουν. Τα κύρια χαρακτηριστικά κάθε φθαλοκυανίνης παραμένουν τα ίδια ανεξάρτητα από τη σύστασή της, αλλά η δοσολογία, η ένταση του φωτός που χρειάζεται και άλλοι παράγοντες σχετική με τη διαδικασία της θεραπείας πιθανόν να διαφέρουν. Οι φθαλοκυανίνες έχει παρατηρηθεί ότι συγκεντρώνονται κυρίως στα μιτοχόνδρια των καρκινικών κυττάρων, οδηγώντας στον καρκινικό θάνατο μέσω του μηχανισμού της απόπτωσης. Διάφορα είδη φθαλοκυανινών έχουν εγκριθεί για κλινική δοκιμή σε θεραπεία καρκίνων του δέρματος, του πνεύμονα, του οισοφάγου, του στήθους και του συκωτιού.

Για παράδειγμα το Photosens (Sulfonated aluminum phthalocyanine) είναι ένα μείγμα φθαλοκυανίνης με αλουμίνιο στο κέντρο του δακτυλίου της και με υποκατάστατες σουλφονικού οξέος. Παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 675 nm και χορηγείται ενδοφλέβια (0.5-0.8 mg/kg)

όπου η ακτινοβόληση πραγματοποιείται μετά από 24-72 ώρες (δόση φωτός 150 J·cm⁻²). Έχει εξετασθεί σε κλινικές δοκιμές η φωτοδυναμική του δράση για καρκίνο του δέρματος, του στήθους, του οισοφάγου και του πνεύμονα.^{51,62,65,66,72,73}



Εικόνα 2.14: Δομή Φθαλοκυανίνης (αριστερά) και Ναφθαλοκυανίνης (δεξιά) με ψευδάργυρο στο κέντρο των δακτυλίων τους ⁸⁰

2.6 – Φθαλοκυανίνες ως 3^{ης} γενιάς φωτοευαισθητοποιητές

Οι φθαλοκυανίνες αποτελούν φωτοευαισθητοποιητές 2^{ης} γενιάς, όπου σε ερευνητικό επίπεδο έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό η αποτελεσματικότητά τους στη φωτοδυναμική θεραπεία. Ο λόγος που παρουσιάζουν μεγάλο ακαδημαϊκό ενδιαφέρον είναι τα πολύ καλά χαρακτηριστικά τους, όπως η υψηλή χημική σταθερότητα και φωτοσταθερότητα, υψηλή απορρόφηση στην περιοχή του φάσματος κοντά στα 600-800 nm, υψηλούς χρόνους ζωής στην τριπλή κατάσταση, υψηλή κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρες οξυγόνου, δυνατότητα διαπέρασης της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς επίσης είναι και εμπορικά διαθέσιμες με σχετικά μεγάλη ποικιλία στη δομή που μπορούν να παρουσιάζουν. Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν στη δομή τους είναι το μεταλλικό ιόν που πιθανόν να έχει ενταχθεί στο κέντρο του δακτυλίου τους. Το μεταλλικό ιόν έχει τη δυνατότητα να ενισχύσει τις φωτοφυσικές και φωτοχημικές ιδιότητές της φθαλοκυανίνης, να ενισχύσει τη σταθερότητα του μορίου και να βελτιώσει τη διαλυτότητά της σε υδατικά ή οργανικά μέσα. Το πιο κοινό και μελετημένο μεταλλικό ιόν είναι αυτό του ψευδάργυρου (Zn), όπου φθαλοκυανίνες στις οποίες έχει ενταχθεί στη δομή τους παρουσιάζουν αρκετά υψηλή κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρες οξυγόνου, με το ιόν του αλουμινίου (Al) να είναι το επόμενο πιο κοινό μεταλλικό ιόν, το οποίο παρουσιάζει ελαφρώς χαμηλότερη κβαντική απόδοση παραγωγής μονήρες οξυγόνου. Εκτός αυτών, σε μικρότερο βαθμό έχουν μελετηθεί και άλλα μεταλλικά ή μεταλλοειδή ιόντα, όπου μερικά από αυτά είναι το γάλλιο (Ga), το πυρίτιο (Si) και το μαγγάνιο (Mn). Επιπλέον, η δομή των φθαλοκυανίνων μπορεί να διαφέρει και με βάση τους υποκατάστατες που υπάρχουν στη δομή της, τροποποιώντας έτσι τις ιδιότητές τους. Ωστόσο η εισαγωγή ή τροποποίηση των υποκαταστατών πολλές φορές συνδέεται με τη χημική τροποποίηση τους, το οποίο δυσκολεύει την ολική χρήση τους.^{81,82}

Παρόλα τα πολύ καλά για τη φωτοδυναμική θεραπεία που παρουσιάζουν οι φθαλοκυανίνες, το μεγαλύτερο μειονέκτημά τους είναι η πολύ κακή υδατική τους διαλυτότητα, γεγονός που περιορίζει και τη χρήση τους. Η κακή υδατική τους διαλυτότητα οφείλεται στον αρωματικό τους πυρήνα και στην επίπεδη δομή τους, έχοντας ως αποτέλεσμα να παρουσιάζουν έντονο υδρόφοβο χαρακτήρα

και μεγάλη τάση συσσωμάτωσης, το οποίο περιορίζει σημαντικά τη χρήση και αποτελεσματικότητά τους σε βιοφαρμακευτικές εφαρμογές. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα συσσωματώματα φθαλοκυανίνης που σχηματίζονται εκτός του ότι δυσκολεύουν την κυκλοφορία τους και χρήση τους σε βιολογικά συστήματα, έχουν ως αποτέλεσμα την αλλοίωση και πιθανή απόσβεση των φωτοφυσικών ιδιοτήτων τους, μειώνοντας έτσι και την αποτελεσματικότητά τους κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία.^{81,83}

Για αυτό το λόγο, η χρήση της φθαλοκυανίνης στη φωτοδυναμική θεραπεία μελετάται πλέον ως φωτοευαισθητοποιητής 3^{ης} γενιάς, όπου συνδυάζεται με διάφορες νανοδομές, οι οποίες δρουν ως μέσα μεταφοράς της. Να σημειωθεί επίσης ότι, σε σημαντικά μικρότερο βαθμό, έχει μελετηθεί και η χημική τροποποίηση διαφόρων φθαλοκυανινών έτσι ώστε να παρουσιάσει πιο υδρόφιλο χαρακτήρα, το οποίο επιτυγχάνεται κυρίως με την τροποποίηση των υποκαταστατών στη δομή της. Η χρήση μέσων μεταφοράς για τη φθαλοκυανίνη έχει παρουσιάσει σημαντικά βελτιωμένα αποτελέσματα όσον αφορά την επιλεκτικότητά της σε καρκινικούς ιστούς, τη φωτοδυναμική της δράση και την ευκολία χρήσης της σε διαφορετικά μέσα. Έχουν μελετηθεί πολλές και διαφορετικές νανοδομές ως μέσα μεταφοράς των φθαλοκυανινών, όπου βασίζονται είτε στη σύζευξή τους μέσω π-π αλληλεπιδράσεων και δυνάμεων Van der Waals (π.χ. κβαντικές τελείες μετάλλων, άνθρακα ή γραφενίου) ή με τον εγκλωβισμό τους στη δομή νανοσωματιδίων (όπως νανοσωματίδια μετάλλων, λιπιδικά και πολυμερών ή μικκύλια και λιποσώματα), κυρίως μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ή προσρόφησης της φθαλοκυανίνης στη δομή τους. Σε κάθε περίπτωση έχει παρατηρηθεί η βελτίωση των φθαλοκυανινών όσον αφορά τη χρήση τους στη φωτοδυναμική θεραπεία, λόγω των φυσικοχημικών και βιολογικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν αυτά τα νανοσυστήματα. Τέλος, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα μέσα μεταφοράς που αξιοποιούνται εκτός του ότι βελτιώνουν σημαντικά τη υδατική διαλυτότητα και τη τάση συσσωμάτωσής των φθαλοκυανινών, δεν πρέπει να επηρεάζουν έντονα (ιδανικά καθόλου) τις φωτοφυσικές τους ιδιότητες, καθώς και ιδανικά να βελτιώνουν την επιλεκτικότητά τους σε καρκινικά κύτταρα. Αυτό πραγματοποιείται είτε παθητικά (με βάση το φαινόμενο EPR) είτε με την εισαγωγή λειτουργικών ομάδων και την παθητικοποίηση των επιφανειών των νανοδομών που δρουν ως μέσα μεταφοράς (όπως για παράδειγμα με αντισώματα). Σε μερικές περιπτώσεις βέβαια, νανοσυστήματα που παρουσιάζουν φθορίζουσες ιδιότητες έχουν τη δυνατότητα να ενισχύουν τη φωτοδυναμική δράση της φθαλοκυανίνης, μέσω φαινομένων μεταφοράς ενέργειας όπως τα φαινόμενα FRET ή PET.⁸¹⁻⁸³

2.7 – Τεχνικές ενίσχυσης της φωτοδυναμικής δράσης φωτοευαισθητοποιητών

Όπως έχει προαναφερθεί, η φωτοδυναμική θεραπεία επιτυγχάνεται από τη συνεργατική δράση του φωτοευαισθητοποιητή με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος και με το οξυγόνο, έτσι ώστε να επιφέρει τον κυτταρικό θάνατο στα καρκινικά κύτταρα, μέσω οξειδωτικού στρες, από τις δραστικές ρίζες οξυγόνου που παράγονται. Ωστόσο, αυτοί οι τρεις παράγοντες παρουσιάζουν μερικούς περιορισμούς, οι οποίοι έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της αποτελεσματικότητας της φωτοδυναμικής θεραπείας. Σχετικά με το φωτοευαισθητοποιητή, στο Κεφάλαιο 2.5 (31) έγινε αναφορά σχετικά με τα χαρακτηριστικά που πρέπει να παρουσιάζει ένας φωτοευαισθητοποιητής έτσι ώστε να είναι αποτελεσματικός. Η ανάπτυξη των φωτοευαισθητοποιητών 3^{ης} έχει βοηθήσει σημαντικά στη βελτίωση πολλών επιθυμητών χαρακτηριστικών, όπως η επιλεκτικότητα, η βιοσυμβατότητα, διαλυτότητα και χημική σταθερότητα, μέσω της χρήσης κατάλληλων νανοσυστημάτων για τη μεταφορά του φωτοευαισθητοποιητή. Σχετικά με το φως που

χρησιμοποιείται στη φωτοδυναμική θεραπεία, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η θεραπεία περιορίζεται σε βιολογικούς ιστούς μικρού πάχους, καθώς το φως αδυνατεί να διεισδύσει σε μεγάλα πάχη. Για την αντιμετώπιση αυτού του φαινομένου, γίνεται προσπάθεια αξιοποίησης φωτοευαισθητοποιητών που παρουσιάζουν μέγιστα απορρόφησης κοντά στην κόκκινη περιοχή του φάσματος (οπτικό παράθυρο βιολογικών ιστών), καθώς επίσης αναπτύσσονται και νέα μέσα ακτινοβολήσεως τα οποία μπορούν να βελτιώσουν τη διάδοση του φωτός και σε ιστούς μεγαλύτερου πάχους.

Ο τρίτος και εξίσου σημαντικός παράγοντας για την αποτελεσματική δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι το οξυγόνο, όπου στην περιοχή που λαμβάνει χώρα η φωτοδυναμική θεραπεία είναι απαραίτητο να υπάρχει επαρκής ποσότητα οξυγόνου έτσι ώστε να παραχθεί, μέσω του φωτοευαισθητοποιητή, υψηλή συγκέντρωση δραστικών οξυγονούχα είδη, με κυριότερο το μονήρες οξυγόνο. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι οι καρκινικοί ιστοί παρουσιάζουν υποξία, το οποίο οφείλεται στην ταχεία παραγωγή νέων καρκινικών κυττάρων και στον ταχύτερο μεταβολισμό τους, οδηγώντας έτσι στην υψηλότερη κατανάλωση του ελεύθερου οξυγόνου στην περιοχή του καρκινικού όγκου, έχοντας ως αποτέλεσμα την απόσβεση της φωτοδυναμικής δράσης. Εκτός αυτού, έχει επίσης παρατηρηθεί ότι οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού, με κυριότερο τη γλουταθειόνη (GSH), αναστέλλουν τη δράση των δραστικών οξυγονούχων ειδών που παράγονται, όπου με αυτόν το τρόπο αναστέλλουν τη φωτοδυναμική δράση του φωτοευαισθητοποιητή. Για την αντιμετώπιση των παραπάνω, έχουν αναπτυχθεί και μελετηθεί διάφορες τεχνικές. Η πιο απλή είναι η εξωτερική παροχή της περιοχής του καρκινικού όγκου με οξυγόνο έτσι ώστε να αναπληρωθεί το οξυγόνο, το οποίο καταναλώνεται συνεχώς από το φωτοευαισθητοποιητή. Αυτή η τεχνική ωστόσο, περιορίζεται από τη δυσκολία πρόσβασης στον καρκινικό ιστό και από το γεγονός ότι είναι πιθανόν να διαταράξει την ομαλή λειτουργία της θεραπείας. Για αυτό το λόγο, πλέον μελετάται η χρήση ουσιών, οι οποίες εντάσσονται στη δομή των νανοσυστημάτων που μεταφέρουν τους φωτοευαισθητοποιητές, με σκοπό την αναστολή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των κυττάρων ή την ενίσχυση της συγκέντρωσης του οξυγόνου, κοντά στην εμβέλεια του φωτοευαισθητοποιητή. Η αναστολή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των κυττάρων αποσκοπεί κατά κύριο λόγο στην αναστολή της δράσης της γλουταθειόνης (η οποία έχει παρατηρηθεί ότι υπερεκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα), το οποίο πραγματοποιείται με τη χρήση ουσιών όπως το buthionine sulfoximine (BSO) ή το διοξείδιο του μαγγανίου (MnO_2). Αντιθέτως, η παραγωγή οξυγόνου πραγματοποιείται με τη χρήση διαφόρων ουσιών, όπως ένζυμα, ερυθρά αιμοσφαίρια και αιμογλοβίνης. Από αυτά, το πιο αποτελεσματικό έχει παρατηρηθεί ότι είναι το ένζυμο της καταλάσης. Η καταλάση είναι παρούσα στα φυσιολογικά κύτταρα, όπου και ο σκοπός της είναι η ρύθμιση των επιπέδων του υπεροξειδίου του υδρογόνου H_2O_2 , μετατρέποντάς το σε νερό και ελεύθερο οξυγόνο. Παρόλο που είναι ένας αντιοξειδωτικός μηχανισμός των κυττάρων, είναι σημαντικό ότι δεν αναστέλλει τη δράση του μονήρες οξυγόνου, παρά μόνο του υπεροξειδίου του υδρογόνου, ενώ ταυτόχρονα παράγει ελεύθερο οξυγόνο, το οποίο μπορεί να καταναλωθεί από τον φωτοευαισθητοποιητή, αντιμετωπίζοντας έτσι την υποξία. Η χρήση της καταλάσης ενισχύεται επίσης και από το γεγονός ότι έχει παρατηρηθεί ότι αρκετοί καρκινικοί όγκοι παρουσιάζουν υψηλότερα από τα φυσιολογικά επίπεδα συγκέντρωσης H_2O_2 . Βέβαια, για να είναι αποτελεσματική η συνδυαστική χρήση της καταλάσης με έναν φωτοευαισθητοποιητή, είναι απαραίτητο αυτός να είναι ικανός να παράγει υψηλές ποσότητες μονήρες οξυγόνου. Επιπλέον, λόγω της φύσης της, η καταλάση παρουσιάζει εξαιρετική βιοσυμβατότητα, το οποίο όμως σημαίνει και ότι μεταβολίζεται σχετικά γρήγορα από τον οργανισμό. Για αυτό το λόγο, η καταλάση για να αξιοποιηθεί στη φωτοδυναμική θεραπεία είναι

απαραίτητο να εγκλωβίζεται εντός της δομής κατάλληλων νανοσυστημάτων, έτσι ώστε να προστατεύεται και να απελευθερώνεται όταν είναι απαραίτητη η παρουσία της, δηλαδή στην περιοχή του καρκινικού ιστού. Τέτοια νανοσυστήματα είναι και αυτά που αξιοποιούνται στη ανάπτυξη φωτοευαίσθητοποιητών 3^{ης} γενιάς.⁸⁴⁻⁸⁹

2.8 – Φως στη φωτοδυναμική θεραπεία

Για την αποτελεσματική δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι απαραίτητη η χρήση της κατάλληλης πηγής φωτός και του κατάλληλου μέσου μεταφοράς της. Η πηγή του φωτός θα πρέπει να εκπέμπει ακτινοβολία μήκους κύματος ανάμεσα στα 600-850 nm, και συγκεκριμένα στο μήκος κύματος όπου ο φωτοευαίσθητοποιητής εμφανίζει τη μέγιστη απορρόφηση. Θεωρητικά οποιαδήποτε πηγή φωτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη φωτοδυναμική θεραπεία, αρκεί να βρίσκεται στο κατάλληλο μήκος κύματος. Πρακτικά, όμως οι πηγές φωτός που χρησιμοποιούνται είναι τα lasers, τα LEDs και οι λυχνίες. Η επιλογή της κατάλληλης πηγής φωτός βασίζεται στον φωτοευαίσθητοποιητή που χρησιμοποιείται, στο είδος και το μέγεθος του καρκινικού όγκου, στην απλότητα χρήσης της και στο κόστος της. Επιπλέον, η δοσιμετρία του φωτός στη φωτοδυναμική θεραπεία είναι καθοριστική για την αποτελεσματικότητά της, όπου αφορά την ένταση του φωτός, το χρόνο ακτινοβολίας και το μέσο ακτινοβολίας και εξαρτάται από την ποσότητα και το είδος του φωτοευαίσθητοποιητή, την ποσότητα του οξυγόνου και τα χαρακτηριστικά του καρκινικού όγκου. Σκοπός της δοσιμετρίας είναι ο υπολογισμός της απαραίτητης δόσης ενέργειας έτσι ώστε να διεγερθεί ο φωτοευαίσθητοποιητής. Είναι σημαντικό η ενέργεια του φωτός να είναι η ελάχιστη δυνατή, ώστε να αποφευχθεί η καταστροφή των φυσιολογικών κυττάρων κοντά στον καρκινικό ιστό.^{43,61,90,91}

2.8.1 – Πηγή φωτός

2.8.1.1 – Λυχνίες

Οι πρώτες πηγές φωτός που χρησιμοποιήθηκαν για τη φωτοδυναμική θεραπεία ήταν οι λυχνίες (για παράδειγμα χρησιμοποιούνται λυχνίες φθορισμού, πυρακτώσεως, ξένου ή μεταλλικών αλογονιδίων). Οι λυχνίες εκπέμπουν σε ένα ευρύ φάσμα, και για αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η χρήση ειδικών φίλτρων έτσι ώστε να εστιάζεται το φως στο στόχο. Συγκεκριμένα αυτά μπορεί να είναι τα φίλτρα στενής ζώνης (narrowband) που επιτρέπουν τη διέλευση φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος της ακτινοβολίας (εντός 10 nm), τα φίλτρα υψηλής διέλευσης (longpass) που βοηθούν στο να αποκοπεί η υψηλής ενέργειας UV ακτινοβολία που εκπέμπεται από τη λυχνία και τα φίλτρα χαμηλής διέλευσης (shortpass) που βοηθούν στο να αποκοπεί η IR ακτινοβολία που εκπέμπεται από τη λυχνία, όπου λόγω αυτής μπορεί να θερμανθεί η υπό θεραπεία περιοχή. Επιπλέον, λόγω του ότι εκπέμπουν σε ευρύ φάσμα η ισχύ του φωτός που παράγεται είναι χαμηλή και είναι δύσκολο να καθοριστεί κατάλληλη δοσιμετρία για τη θεραπεία. Για αυτό το λόγο οι λυχνίες είναι κατάλληλες για φωτοδυναμική θεραπεία μόνο σε επιφανειακές περιοχές (όπως καρκίνος του δέρματος). Το πλεονέκτημα των λυχνιών είναι το χαμηλό τους κόστος, καθώς και η απλότητα και ευκολία στη χρήση και συντήρησή τους.^{91,92}

2.8.1.2 – *Light Emitting Diodes, LEDs*

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αρχίσει και χρησιμοποιούνται ως πηγές φωτός στη φωτοδυναμική θεραπεία τα LEDs. Στα LEDs η παραγωγή φωτός οφείλεται στην επανασύνδεση ενός ηλεκτρονίου με μία κενή θέση. Το φως που εκπέμπεται μπορεί να βρίσκεται από τη UVA περιοχή του φάσματος (350 nm) έως την εγγύς υπέρυθρη (1100 nm), όπου το εύρος της δέσμης είναι 5-10 nm και παρέχει έως και 150 mW/cm² σε επιφάνεια 20 cm². Τα LEDs είναι κατάλληλη πηγή φωτός για αντιμετώπιση επιφανειακών καρκίνων, λόγω της χαμηλής ισχύος τους, όμως με την εξέλιξη στην τεχνολογία τους μπορεί να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητά τους και σε καρκινικούς όγκους μεγάλου βάθους. Το χαμηλό κόστος τους σε συνδυασμό με το γεγονός ότι είναι φορητά, δίνει τη δυνατότητα χρήσης του με διαφορετικούς τρόπους κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία. Για παράδειγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί διάταξη πολλαπλών LEDs, με διάφορες γεωμετρίες, έτσι ώστε να καλυφθεί μεγαλύτερη επιφάνεια.⁹¹⁻⁹³

2.8.1.3 – *Lasers*

Τα Lasers είναι οι καταλληλότερες πηγές φωτός για τη φωτοδυναμική θεραπεία, λόγω του ότι η ακτινοβολία που εκπέμπουν είναι μονοχρωματική, έχει μικρό εύρος η δέσμη της, είναι συνεχές με υψηλή ένταση και το μήκος κύματος μπορεί να ελέγχεται ώστε να συμπίπτει με το μέγιστο απορρόφησης του φωτοευαίσθητοποιητή. Η δέσμη φωτός των Lasers μπορεί να εστιάζεται κατευθείαν στο στόχο με τη βοήθεια οπτικών ινών, δίνοντας τη δυνατότητα για την πραγματοποίηση φωτοδυναμικής θεραπείας και στα εσωτερικά όργανα. Επιπλέον, τα Lasers μπορούν να λειτουργούν με συνεχή ή παλμική ακτινοβολία, γεγονός που δίνει ευελιξία στην κλινική τους χρήση.

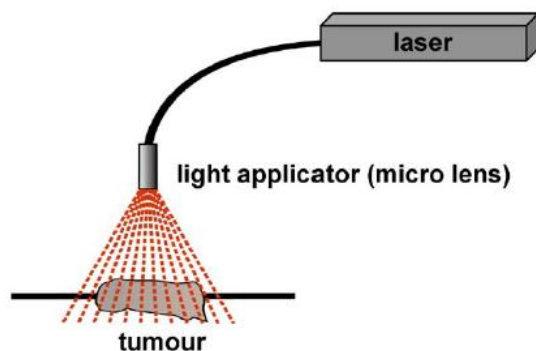
Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα είδη Laser για τη φωτοδυναμική θεραπεία, όπως laser χρωστικών και laser ατμών μετάλλου, ωστόσο τα διοδικά Lasers έχουν κυριαρχήσει και είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιημένα. Τα διοδικά Lasers είναι συσκευές που βασίζονται στη χρήση ημιαγωγών, και όπως και στα LEDs η παραγωγή φωτός οφείλεται στην επανασύνδεση ενός ηλεκτρονίου με την κενή θέση. Έχουν τη δυνατότητα να παράγουν ισχύ στην έξοδο τους έως και 2-8 Watts. Σε σχέση με του άλλου είδους Lasers είναι καταλληλότερα για κλινική χρήση λόγω του ότι μπορούν να αξιοποιούν τροφοδοσία 120 V, έχουν ως μέσο ψύξης τον αέρα, είναι φορητά με απλότητα στη χρήση, έχουν χαμηλό κόστος και μπορούν να παρέχουν σταθερή δέσμη φωτός για μεγάλο χρονικό διάστημα.^{69,91-93}

2.8.2 – *Μέσα μεταφοράς φωτός*

Το σύστημα μεταφοράς φωτός κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία καθορίζεται από τη περιοχή που βρίσκεται ο καρκινικός όγκος, δηλαδή εάν είναι επιφανειακός ή σε εσωτερικά όργανα, το μέγεθός του και τη φύση του.

2.8.2.1 – *Επιφανειακή ακτινοβολήση*

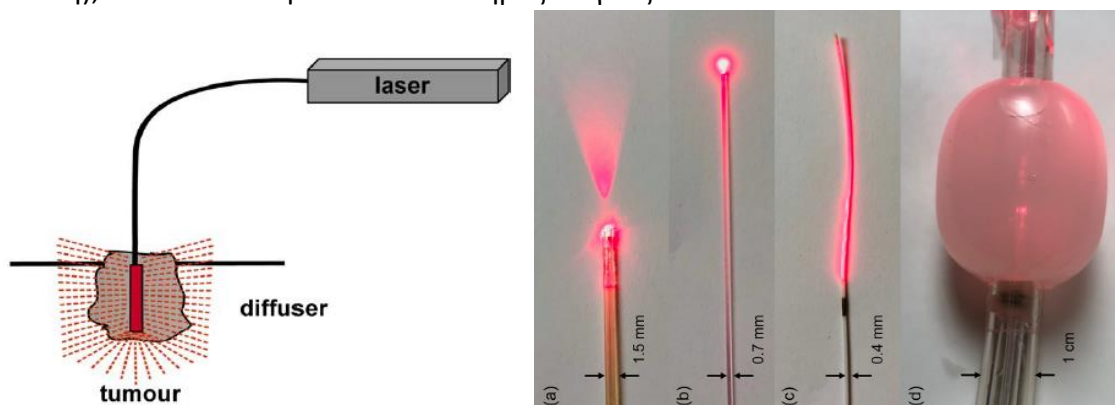
Η επιφανειακή ακτινοβολήση πραγματοποιείται σε καρκινικούς όγκους που είναι εύκολα προσβάσιμοι και με μικρό πάχος (συγκεκριμένα κυρίως σε καρκίνους στο δέρμα ή στη στοματική κοιλότητα), που να μην ξεπερνά το βάθος διείσδυσης του φωτός. Το φως διανέμεται μέσω μίας οπτικής ίνας, όπου φωτίζει την περιοχή του καρκινικού όγκου με κατάλληλη ισχύ.⁹⁴



Εικόνα 2.15: Απεικόνιση φωτοδυναμικής θεραπείας σε επιφανειακούς καρκινικούς όγκους⁹⁴

2.8.2.2 – Εσωτερική ακτινοβολήση

Η εσωτερική ακτινοβολήση πραγματοποιείται για καρκινικούς όγκους με πάχος μεγαλύτερο από 1 cm (το οποίο είναι το όριο του βάθους διείσδυσης του φωτός στους ιστούς του οργανισμού). Το φως διανέμεται μέσω οπτικών ινών που έχουν στα άκρα τους ειδικούς διαχυτές και εισάγονται στον καρκινικό όγκο. Αυτό πραγματοποιείται μέσω ειδικών βελόνων που τοποθετούνται στον καρκινικό όγκο με τη βοήθεια αξονικής ή μαγνητικής τομογραφίας. Οι οπτικές ίνες εισέρχονται εντός των βελόνων όπου και μπορούν να διανέμουν το φως στον καρκινικό όγκο. Σε μεγάλους όγκους μπορούν να χρησιμοποιηθούν παραπάνω από μία οπτική ίνα, και τοποθετούνται κοντά η μία στην άλλη (1-2 cm απόσταση), έτσι ώστε να φωτιστεί ολόκληρος ο όγκος.^{93,94}



Εικόνα 2.16: Απεικόνιση φωτοδυναμικής θεραπείας σε εσωτερικούς καρκινικούς όγκους (αριστερά) και διαχυτές που χρησιμοποιούνται στα άκρα οπτικών ινών (δεξιά)^{91,94}

2.9 – Μελλοντικές προοπτικές και προκλήσεις για τη φωτοδυναμική θεραπεία

Τα τελευταία χρόνια, έχει μελετηθεί εκτενώς η δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας σε διάφορα είδη καρκίνου και με χρήση διαφόρων φωτοευαίσθητοποιητών, τόσο σε ερευνητικό επίπεδο, όσο και σε επίπεδο κλινικών δοκιμών, όπου και παρουσιάζει αρκετά ενθαρρυντικά αποτελέσματα, σε σχέση με την καταλληλότητα και αποτελεσματικότητα της χρήσης της. Γενικά, έχει ήδη εγκριθεί για κλινική χρήση επιφανειακών καρκίνων (όπως του δέρματος), όπου είναι και αρκετά αποτελεσματική. Σε σχέση με άλλες καρκινικές θεραπείες όπως η χημειοθεραπεία και η ακτινοθεραπεία, παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, τα οποία οφείλονται στην απλότητα και στην επιλεκτικότητα της. Συγκεκριμένα:

- Η δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας βασίζεται στην ταυτόχρονη παρουσία οξυγόνου, κατάλληλης ποσότητας φωτοευαισθητοποιητή και φωτός κατάλληλου μήκους κύματος, όπου σε συνδυασμό με τα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά των φωτοευαισθητοποιητών 3^{ης} γενιάς, δηλαδή την επιλεκτική συγκέντρωση τους στα καρκινικά κύτταρα, οδηγεί στην επιλεκτική καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, μειώνοντας την καταστροφή φυσιολογικών κυττάρων και την πρόκληση πιθανών παρενεργειών. Επιπλέον, οι φωτοευαισθητοποιητές στις ποσότητες που χρησιμοποιούνται δεν είναι τοξικοί και η δράση τους σπάνια πραγματοποιείται στην πυρηνική μεμβράνη, οπότε δεν υπάρχει κίνδυνος αλλοίωσης του DNA.⁶⁹
- Σε σχέση με άλλες θεραπείες κατά του καρκίνου, η φωτοδυναμική θεραπεία παρουσιάζει χαμηλό κόστος και μπορεί να πραγματοποιηθεί γρηγορότερα και με λιγότερες παρενέργειες, καθώς και μπορεί να πραγματοποιηθεί πολλαπλές φορές άμα είναι αναγκαίο, χωρίς να αυξάνεται αθροιστικά ο κίνδυνος πιθανόν παρενεργειών (όπως για παράδειγμα στην ακτινοθεραπεία).
- Η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να πραγματοποιηθεί συνεργατικά με άλλου είδους θεραπείες (χημειοθεραπείες, ακτινοθεραπείες ή εγχειρητική αφαίρεση του όγκου) ως συμπληρωματική ή ανακουφιστική θεραπεία. Επίσης, λόγω του φθορισμού που παρουσιάζουν πολλοί φωτοευαισθητοποιητές ή λόγω των ιδιοτήτων που παρουσιάζουν τα μέσα μεταφοράς τους, ένας φωτοευαισθητοποιητής κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ταυτόχρονα και ως διαγνωστικό μέσο ή ως μέσο πιο ακριβέστερου εντοπισμού/απεικόνισης του καρκινικού όγκου.^{45, 65}

Βέβαια, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η χρήση της φωτοδυναμικής θεραπείας κατά του καρκίνου παραμένει κατά μεγάλο βαθμό υπό μελέτη. Αυτό οφείλεται σε μερικούς περιορισμούς που πρέπει πρώτα να αντιμετωπιστούν που πρέπει να αντιμετωπιστούν έτσι ώστε να γίνει πιο αποτελεσματική, ασφαλής και προβλεπόμενη η κλινική χρήση της φωτοδυναμικής θεραπείας κατά του καρκίνου. Συγκεκριμένα:

- Η πιο σημαντική παρενέργεια της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι η φωτοευαισθησία του ασθενή μετά τη θεραπεία. Το χρονικό διάστημα και η σοβαρότητα των συμπτωμάτων της που παρατηρείται εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του φωτοευαισθητοποιητή που χρησιμοποιείται και το χρόνο που χρειάζεται ο οργανισμός να τον αποβάλλει. Η φωτοευαισθησία μπορεί να διαρκεί από μερικές μέρες μέχρι και λίγους μήνες, όπου η ενδοφλέβια χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή συνήθως οδηγεί στην εντονότερη και πιο παρατεταμένη φωτοευαισθησία.
- Ενώ η φωτοδυναμική θεραπεία είναι αρκετά αποτελεσματική στην αντιμετώπιση επιφανειακών καρκίνων, αδυνατεί να αντιμετωπίσει καρκίνους σε εσωτερικά όργανα του οργανισμού και καρκίνους μεγάλου μεγέθους. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι η διείσδυση του φωτός στους βιολογικούς ιστούς είναι περιορισμένη. Ιδανικά, αυτό θα μπορούσε εν μέρη να αντιμετωπιστεί με χρήση ακτινοβολία άνω των 850 nm, ωστόσο η ακτινοβολία αυτού του μήκους κύματος δεν παρουσιάζει αρκετή ενέργεια έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί σημαντική ποσότητα μονήρες οξυγόνου, το οποίο είναι απαραίτητο για την αποτελεσματική δράση της φωτοδυναμικής θεραπείας. Επιπλέον, η φωτοδυναμική θεραπεία δεν είναι κατάλληλη να αντιμετωπίσει μεταστατικές καταστάσεις καρκίνου,

καθώς πραγματοποιείται τοπικά, στην περιοχή που έχει οριοθετηθεί ο καρκινικός όγκος.^{50,71}

- Κάθε είδους θεραπεία αξιοποιεί κάποιου είδους δοσιμετρία, έτσι ώστε να είναι αποτελεσματική η δράση της και να περιοριστεί η ζημιά στα φυσιολογικά κύτταρα. Στη φωτοδυναμική θεραπεία, η δοσιμετρία αναφέρεται στην ποσότητα του φωτοευαισθητοποιητή, στην ένταση της ακτινοβολίας και στον χρόνο ακτινοβολήσης του καρκινικού όγκου. Ωστόσο, αυτή τη στιγμή κατά μεγάλο βαθμό δεν υπάρχουν τα κατάλληλα πρωτόκολλα για τη φωτοδυναμική θεραπεία, καθιστώντας τη χρήση της περιορισμένη. Σε περιπτώσεις όπου ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί να επαλειφθεί τοπικά, ο προσδιορισμός της κατάλληλης δοσιμετρίας είναι ικανοποιητικός, καθώς η δράση του φωτοευαισθητοποιητή περιορίζεται κατά μεγάλο βαθμό στην περιοχή που βρίσκεται. Αυτό το γεγονός είναι σημαντικά εντονότερο κατά τη χρήση της φωτοδυναμικής θεραπείας σε όγκους εσωτερικών οργάνων ή μεγάλου μεγέθους, καθώς απαιτείται η ενδοφλέβια χορήγηση του φωτοευαισθητοποιητή. Όπως έχει προαναφερθεί, η φωτοδυναμική θεραπεία για την αντιμετώπιση δύσκολα προσβάσιμων καρκινικών όγκων, βασίζεται πλέον στη χρήση φωτοευαισθητοποιητών 3^{ης} γενιάς. Από τη μία η χρήση ειδικά σχεδιασμένων νανοσυστημάτων για τη μεταφορά των φωτοευαισθητοποιητών προσφέρει σημαντικά οφέλη στην αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας. Από την άλλη όμως, η χρήση αυτών των νανοσυστημάτων αυξάνει την πολυπλοκότητα του θεραπευτικού παράγοντα που χρησιμοποιείται. Στο Κεφάλαιο 1.7 (15) έγινε αναφορά σχετικά με τους κινδύνους και περιορισμούς της χρήσης των νανοσωματιδίων σε βιολογικές/ιατρικές εφαρμογές, το οποίο αφορά και τα μέσα μεταφοράς που αξιοποιούνται στους φωτοευαισθητοποιητές 3^{ης} γενιάς. Είναι σημαντικό λοιπόν, για την καταλληλότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας να είναι εφικτός ο ακριβής προσδιορισμός της συγκέντρωσης φωτοευαισθητοποιητικής ουσίας στα μέσα μεταφοράς της, ο προσδιορισμός των φαρμακοκινητικών χαρακτηριστικών ολόκληρου του συστήματος ενός φωτοευαισθητοποιητή 3^{ης} γενιάς, καθώς και προσδιορισμού του τρόπου με τον οποίο επάγεται ο θάνατος των καρκινικών κυττάρων.⁶³
- Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα δραστικά οξυγονούχα είδη που παράγονται κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία, είναι πιθανόν να αποσβέσουν τη δράση του φωτοευαισθητοποιητή, να οδηγήσουν στην τροποποίησή του ή να δημιουργήσουν συνθήκες υποξίας στον καρκινικό όγκο. Σε κάθε περίπτωση, η αποτελεσματικότητα της φωτοδυναμικής θεραπείας μειώνεται. Το πρόβλημα της απόσβεσης της φωτοδυναμικής δράσης του φωτοευαισθητοποιητή μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρήση πιο φωτοανθεκτικών ουσιών, ή εναλλακτικά να αξιοποιηθεί έτσι ώστε να μειωθούν οι παρενέργειες που πιθανόν να προκαλεί. Ωστόσο, το πρόβλημα της ελλείψεως οξυγόνωσης της περιοχής που δρα η φωτοδυναμική θεραπεία αποτελεί ένα σημαντικότερο περιορισμό. Έχει παρατηρηθεί ότι φωτοευαισθητοποιητές που παρουσιάζουν υψηλές αποδόσεις παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου, μπορεί να καταναλώσουν το οξυγόνο που υπάρχει στους ιστούς πολύ γρήγορα, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Εκτός αυτού, σε μερικούς καρκινικούς όγκους παρατηρούνται εξ αρχής συνθήκες υποξίας, καθιστώντας δύσκολη και αναποτελεσματική τη φωτοδυναμική δράση. Είναι σημαντικό λοιπόν, να αναπτυχθούν μέθοδοι που θα συμβάλλουν στην

επαρκή και αποτελεσματική οξυγόνωση της περιοχής στην οποία πραγματοποιείται η φωτοδυναμική θεραπεία.^{51,63}

Για την αντιμετώπιση των παραπάνω προκλήσεων πραγματοποιείται συνεχής έρευνα για εύρεση καταλληλότερων φωτοευαισθητοποιητών, συστημάτων ακτινοβολήσης και μεθοδολογιών υλοποίησης της φωτοδυναμικής θεραπείας. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας laser (και κυρίως των διοδικών laser) έχει δώσει τη δυνατότητα της πραγματοποίησης της φωτοδυναμικής θεραπείας και σε βαθύτερους ιστούς του σώματος, μέσω της χρήσης κατάλληλων οπτικών ινών. Οι φωτοευαισθητοποιητές 3^{ης} γενιάς έχουν δώσει τη δυνατότητα ανάπτυξης καινούργιων φωτοευαισθητοποιητών ή τη βελτίωση ήδη υπάρχοντων, ώστε να προσεγγίζουν περισσότερο τις ιδιότητες του ιδανικού φωτοευαισθητοποιητή καλύτερα. Αυτό πραγματοποιείται κυρίως λόγω της χρήσης νανοσωματιδίων ως μέσα μεταφοράς τα οποία βελτιώνουν τις ιδιότητες των φωτοευαισθητοποιητών. Επιπλέον, μελετάται και η αντιμετώπιση της ελλειψής οξυγόνωσης των καρκινικών ιστών, είτε με τη χρήση φωτοευαισθητοποιητών που δρουν αποτελεσματικά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις οξυγόνου, είτε με τη χρήση εξωγενή ή ενδογενή μεθόδων ενίσχυσης της συγκέντρωσης οξυγόνου στις περιοχές που λαμβάνει χώρα η φωτοδυναμική θεραπεία. Η φωτοδυναμική θεραπεία είναι ήδη αποτελεσματική κατά συγκεκριμένων ειδών καρκίνου (π.χ. καρκίνος του δέρματος) και η ανάπτυξη στη τεχνολογία των συστημάτων ακτινοβολήσης, στα είδη των φωτοευαισθητοποιητών και στα θεραπευτικά πρωτόκολλα, την καθιστούν ως έναν πολλά υποσχόμενο τρόπο αντιμετώπισης του καρκίνου ως μία κύρια μέθοδο θεραπείας ή ως μία συνεργατική μέθοδο.⁷⁰

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

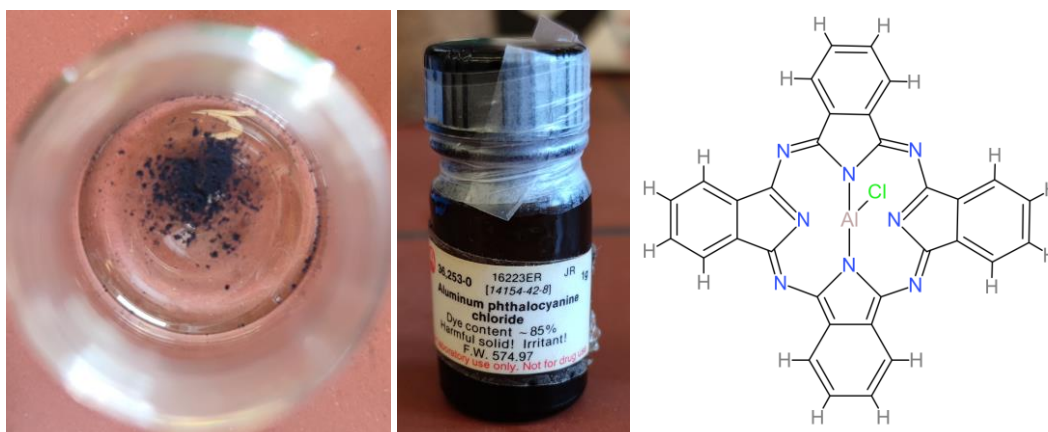
3.1 – Σκοπός της Μεταπτυχιακής Εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας Μεταπτυχιακής εργασίας αφορά το σχεδιασμό, τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό ενός φωτοευαισθητοποιητή τρίτης γένια, όπου και προορίζεται για φωτοδυναμική θεραπεία κατά του καρκίνου. Ο φωτοευαισθητοποιητής αποτελείται από τη χρωστική φθαλοκυανίνη χλωρό-αλουμινίου (AlClPc), η οποία εγκλωβίζεται στη δομή νανοσωματιδίων του βιο-πολυμερούς χιτοζάνης (CS). Ο εγκλωβισμός της AlClPc σε νανοσωματίδια χιτοζάνης αποσκοπεί στη βελτίωση του υδρόφοβου χαρακτήρα της, και κατ' επέκταση της καταλληλότητας και αποτελεσματικότητάς της στη φωτοδυναμική θεραπεία. Ο χαρακτηρισμός που πραγματοποιείται αποσκοπεί στον προσδιορισμό των φωτοφυσικών και φωτοχημικών ιδιοτήτων, της δομής και του μεγέθους, τόσο της ελεύθερης AlClPc, όσο και του συστήματος νανοσωματιδίων CS@AlClPc. Τέλος, θα αξιολογηθεί και η φωτοδυναμική δράση των παραπάνω υλικών, τόσο σε συνθήκες εργαστηρίου όσο και σε επίπεδο κυττάρων.

3.2 – Αντιδραστήρια

Φθαλοκυανίνη Χλωρό-Αλουμινίου, *Chloro-Aluminum Phthalocyanine, AlClPc*

Η AlClPc είναι μια ένωση που ανήκει στην ομάδα των χρωστικών, όπου και θα εξεταστεί η φωτοδυναμική της δράση τόσο σε ελεύθερη μορφή, όσο και κατά τον εγκλωβισμό της σε νανοσωματίδια χιτοζάνης. Η δομή και τα χαρακτηριστικά της είναι παρόμοια με τις περισσότερες φθαλοκυανίνες, όπου η συγκεκριμένη φθαλοκυανίνη, στο κέντρο του δακτυλίου της έχει ενσωματωθεί ένα μόριο αλουμινίου συνδεδεμένο με χλώριο. Παρουσιάζει σκούρο μπλε χρώμα, θερμική σταθερότητα (melting point > 300 °C), υδρόφοβο χαρακτήρα και απορροφά κυρίως στην υπέρυθη περιοχή του φάσματος (680 nm). Έγινε χρήση της εμπορικά διαθέσιμης AlClPc από το Sigma-Aldrich.⁹⁵



Εικόνα 3.1: Φθαλοκυανίνη χλωρο-αλουμινίου AlClPc σε μορφή σκόνης (αριστερά), χημική δομή AlClPc (δεξιά)

Χιτοζάνη, *Chitosan, CS*

Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε χρήση χιτοζάνης πολύ χαμηλού μοριακού βάρους (30kDA, 10cps), από το Glentham Life Science. Η χιτοζάνη βρίσκεται αρχικά σε στερεή μορφή σκόνης, και η

Καυστικό Νάτριο, Sodium Hydroxide, NaOH

Υδατικό διάλυμα καυστικού νατρίου αξιοποιήθηκε έτσι ώστε να γίνει η ρύθμιση του pH στα διαλύματα της χιτοζάνης. Έγινε χρήση καυστικού νατρίου σε μορφή pellets.

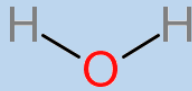
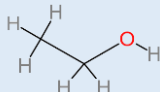
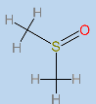
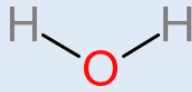


Εικόνα 3.5: Χημική δομή NaOH

Διαλύτες

Οι περισσότερες διεργασίες πραγματοποιούνται σε υπερκάθαρο νερό, όπου στη συνέχεια η αναφορά σε υδατικά διαλύματα γίνεται για διαλύματα υπερκάθαρου νερού.

Πίνακας 3.1: Πίνακας με πληροφορίες για τους διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν

Διαλύτης	Μοριακός Τύπος	Χημική Δομή	Προμηθευτής
Ακετόνη, Acetone, AC	C_3H_6O		Lach:ner
Αιθανόλη, Ethanol, EtOH	C_2H_6O		Sigma-Aldrich
Διμεθυλοσουλφοξείδιο, Dimethyl sulfoxide, DMSO	C_2H_6OS		Fisher scientific
Υπερκάθαρο νερό	H_2O		ELGA - PURELAB Quest Water purification system

3.3 – Πειραματικός Σχεδιασμός

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε πειραματικός σχεδιασμός, με σκοπό να βελτιστοποιηθεί η διεργασία της σύνθεσης των νανοσωματιδίων χιτοζάνης με εγκλωβισμό της AICIPc (CS@AICIPc NPs). Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Design-Expert 12.0 (trial version), όπου ο πειραματικός σχεδιασμός πραγματοποιήθηκε με χρήση του μοντέλου Box-Behnken.⁹⁶

Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η βελτιστοποίηση της διεργασίας με χρήση τριών ανεξάρτητων μεταβλητών και πέντε συνολικά αποκρίσεων προς βελτιστοποίηση, οι οποίες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.2**.

Πίνακας 3.2: Παρουσίαση ανεξάρτητων μεταβλητών και αποκρίσεων που χρησιμοποιήθηκαν για τον πειραματικό σχεδιασμό με το μοντέλο Box-Behnken

Παράμετροι		Νανοσωματίδια Χιτοζάνης με Εγκλωβισμό AICIPc CS@AICIPc NPS		
Ανεξάρτητες Μεταβλητές		Κάτω Όριο	Μέση Τιμή	Άνω Όριο
		-1	0	1
A	Περιεκτικότητα Χιτοζάνης (w/v%)	0.2	0.35	0.5
B	Περιεκτικότητα TPP (w/v%)	0.1	0.3	0.5
C	Χρόνος Υπερήχων (min)	5	10	15
Αποκρίσεις				
1	Μέγεθος Νανοσωματιδίων (nm)			
2	ζ-Δυναμικό (mV)			
3	Απόδοση Εγκλωβισμού AICIPc (%)			
4	Ποσοστό Φόρτωσης AICIPc (%)			
5	Μάζα Νανοσωματιδίων που συλλέχθηκε (mg)			

Μετά τον ορισμό των άνω και κάτω ορίων των ανεξάρτητων μεταβλητών, από το λογισμικό προκύπτει ότι για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας πρέπει να πραγματοποιηθούν 15 συνολικά πειράματα, όπως φαίνεται και από την Εξίσωση (i).

$$N = 2 \cdot k \cdot (k - 1) - C_o \quad (i)$$

Συγκεκριμένα το N είναι ο αριθμός των πειραμάτων, k είναι το πλήθος των ανεξάρτητων μεταβλητών (3) και C_o είναι το πλήθος των επαναλήψεων του κεντρικού σημείου, όπου και ορίστηκε από το χρήστη ότι το πλήθος των επαναλήψεων είναι 3. Στον **Πίνακα 3.3** παρουσιάζονται αναλυτικά τα 15 πειράματα που προτείνει το λογισμικό, όπου και παρατηρούνται οι συνθήκες υλοποίησής τους. Η αναλυτική διαδικασία της διεργασίας σύνθεσης των νανοσωματιδίων αναφέρεται στο Κεφάλαιο 3.4 (55).

Πίνακας 3.3: Τα 15 πειράματα που προκύπτουν από το λογισμικό πειραματικού σχεδιασμού για τη σύνθεση CS@AICIPc NPS

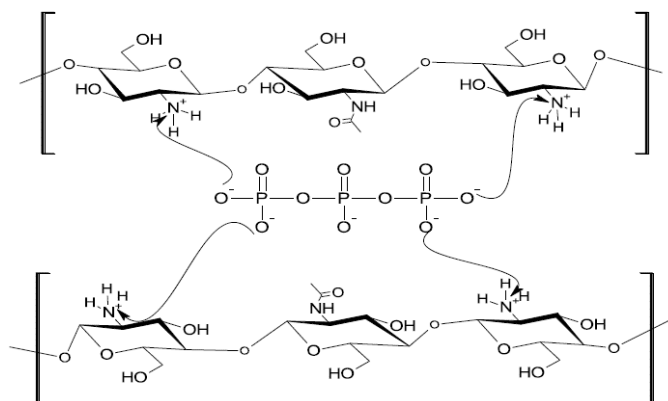
Πείραμα	Περιεκτικότητα Χιτοζάνης (w/v%)	Περιεκτικότητα TPP (w/v%)	Χρόνος Υπερήχων (min)
1	0.2	0.5	10
2	0.5	0.3	15
3	0.2	0.3	15
4	0.35	0.5	5

5	0.35	0.5	15
6	0.35	0.1	15
7	0.5	0.5	10
8	0.35	0.3	10
9	0.2	0.1	10
10	0.5	0.3	5
11	0.5	0.1	10
12	0.35	0.3	10
13	0.35	0.1	5
14	0.35	0.3	10
15	0.2	0.3	5

3.4 – Σύνθεση Νανοσωματιδίων Χιτοζάνης CS, CS@AIClPc

Η σύνθεση των νανοσωματιδίων χιτοζάνης και ο εγκλωβισμός της AIClPc πραγματοποιήθηκαν με την τεχνική ionic-gelation, όπου ως cross-linker χρησιμοποιήθηκε το TPP. Οι περιεκτικότητες της CS, του TPP και ο χρόνος υπερήχων ήταν ανάλογα με τις τιμές που προέκυψαν από το DOE (Πίνακας 3.3).

Συγκεκριμένα, αρχικά, πραγματοποιείται η προσθήκη στερεής CS (περιεκτικότητα 0.2-0.5 w/v%) σε 8 mL υδατικού διαλύματος LA 1v/v%, όπου και πραγματοποιείται μαγνητική ανάδευση μέχρι την πλήρη διάλυση της. Μετά την πλήρη διάλυση της CS, ρυθμίζεται το pH με υδατικό διάλυμα NaOH 20 w/v%, σε πεχάμετρο 744 pH Meter, της Metrohm. Το υδατικό διάλυμα NaOH προστίθεται στάγδην μέχρι η τιμή του διαλύματος να φτάσει την τιμή 4.5-4.8. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό σε διάταξη Buchner, με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν αντιδραστηρίων που δεν έχουν διαλυθεί πλήρως, όπου έπειτα το διάλυμα επανατοποθετείται στη διάταξη μαγνητικής ανάδευσης. Στην περίπτωση εγκλωβισμού AIClPc, πρώτα 5 mg AIClPc διαλύονται σε 5 mL ακετόνης, με τη βοήθεια vortex και υπερήχων. Έπειτα, το διάλυμα AIClPc προστίθεται στάγδην στο διάλυμα CS, υπό συνεχή ανάδευση (~300 rpm), όπου μετά την προσθήκη όλης της ποσότητας το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση (~360 rpm) για περίπου 15 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιείται η προσθήκη TPP από υδατικό διάλυμα. Συγκεκριμένα προστίθεται 2 mL TPP (περιεκτικότητα 0.1-0.5 w/v%), στάγδην, υπό συνεχή ανάδευση (~300 rpm), όπου μετά την προσθήκη όλης της ποσότητας το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση (~360 rpm) για μία μέρα. Στην περίπτωση σύνθεσης νανοσωματιδίων με εγκλωβισμό AIClPc, η σφαιρική φιάλη καλύπτεται με αλουμινόχαρτο, έτσι ώστε να προστατεύεται η φωτοευαίσθητη AIClPc, όπου επίσης στο άνοιγμα της φιάλης ανοίγονται τρύπες στο αλουμινόχαρτο, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η ακετόνη στην οποία είχε διαλυθεί η AIClPc. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, στην πραγματικότητα, τα νανοσωματίδια που παράγονται αποτελούν ένα σύμπλοκο χιτοζάνης-TPP, ωστόσο για διευκόλυνση του αναγνώστη αναφέρονται απλά ως νανοσωματίδια χιτοζάνης.⁹⁷⁻¹⁰⁰



Εικόνα 3.6: Σχηματική απεικόνιση της σύνδεσης του TPP με τη χιτοζάνη κατά το σχηματισμό νανοσωματιδίων με τη μέθοδο *ionic gelation*¹⁰¹



Εικόνα 3.7: Αριστερή εικόνα: σύνθεση νανοσωματιδίων χιτοζάνης χωρίς εγκλωβισμό AICIPc (αριστερά) με εγκλωβισμό AICIPc (δεξιά) πριν την προσθήκη TPP, Δεξιά εικόνα: σύνθεση νανοσωματιδίων χιτοζάνης χωρίς εγκλωβισμό AICIPc (αριστερά) με εγκλωβισμό AICIPc (δεξιά) μετά την προσθήκη TPP

Την επόμενη μέρα, τα νανοσωματίδια συλλέγονται σε vial και τοποθετούνται στους υπέρηχους (χρόνος 5-15 min), έτσι ώστε να διασπαστούν όσο το δυνατόν περισσότερα συσσωματώματά τους. Στη συνέχεια, το διάλυμα με τη διασπορά των νανοσωματιδίων τοποθετείται σε υπερ-φυγόκεντρο (Sorvall Lynx 6000, Themro Scientific), σε συνθήκες 28000 rpm, 4 °C, 20 min. Μετά το τέλος της φυγόκεντρου, το υπερκείμενο υγρό συλλέγεται στη σφαιρική φιάλη όπου πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των νανοσωματιδίων, έτσι ώστε να προσδιοριστεί η απόδοση εγκλωβισμού της AICIPc. Το ίζημα των νανοσωματιδίων ξεπλένεται με υπερκάθαρο νερό, όπου και πραγματοποιείται φυγόκεντρωση ξανά, στις ίδιες συνθήκες. Μετά το τέλος της δεύτερης φυγόκεντρου, το ίζημα που περιέχει τα νανοσωματίδια επαναδιασπείρεται σε υπερκάθαρο νερό, με τη βοήθεια vortex και υπερήχων (ο χρόνος υπερήχων δεν ξεπερνά το 1 λεπτό). Τέλος, η διασπορά των νανοσωματιδίων αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος, έτσι ώστε να μην έρχονται σε επαφή με το φως.



Εικόνα 3.8: Διάταξη υπερήχων Vibra-cell από την Sonics & Materials (αριστερά), μηχανήμα υπερ-φυγόκεντρο Sorvall Lynx 6000 centrifuge από την Thermo Scientific

Οπτικά, τα κενά νανοσωματίδια (blank), δηλαδή χωρίς εγκλωβισμένη AICIPc όταν διασπείρονται σε υδατικό διάλυμα παρουσιάζουν λευκό/διαφανές θολό χρώμα. Αντιθέτως, όταν τα νανοσωματίδια με εγκλωβισμένη AICIPc διασπείρονται σε υδατικό διάλυμα παρουσιάζουν ένα έντονο μπλε χρώμα, το οποίο προέρχεται από την αδιάλυτη στο νερό AICIPc, παρέχοντας έτσι μία πρώτη οπτική επιβεβαίωση του επιτυχούς εγκλωβισμού της στα νανοσωματίδια CS, καθώς δεν παρατηρείται ίζημα στα τοιχώματα του vial.



Εικόνα 3.9: Διασπορές νανοσωματιδίων, αριστερά παρατηρούνται νανοσωματίδια CS χωρίς εγκλωβισμένη AICIPc, ενώ οι άλλες τρεις διασπορές περιέχουν εγκλωβισμένη AICIPc

3.5 – Προσδιορισμός απόδοσης εγκλωβισμού AICIPc (Encapsulation Efficiency, EE)

Ο προσδιορισμός της απόδοσης εγκλωβισμού της AICIPc στα νανοσωματίδια CS πραγματοποιήθηκε έμμεσα, δηλαδή με τον υπολογισμό της AICIPc που δεν εγκλωβίστηκε επιτυχώς. Όπως προαναφέρθηκε, το υπερκείμενο υγρό που προκύπτει μετά την πρώτη φυγόκεντρο, κατά τη σύνθεση των CS@AICIPc NPs επανατοποθετείται στη σφαιρική φιάλη που πραγματοποιήθηκε η σύνθεσή τους. Η ποσοτικοποίηση της ποσότητας της AICIPc προκύπτει από την τιμή απορρόφησής της στα 680 nm, όπου και παρουσιάζει την κύρια κορυφή απορρόφησης. Για αυτό το λόγο έχει πραγματοποιήθηκε και η σχεδίαση καμπύλης βαθμονόμησης της AICIPc, με βάση την απορρόφησή της στα 680 nm. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι επειδή η AICIPc είναι αδιάλυτη σε υδατικά διαλύματα, η καμπύλη βαθμονόμησης πραγματοποιήθηκε με διαλύτη DMSO. Για αυτό το λόγο, για να είναι έγκυρα τα αποτελέσματα που προκύπτουν για την απόδοση εγκλωβισμού αφαιρέθηκε το

νερό από τη σφαιρική φιάλη, και πραγματοποιήθηκε επαναδιαλυτοποίηση με DMSO. Συγκεκριμένα, το νερό αφαιρέθηκε με χρήση διάταξη Rotanapor, και η επαναδιαλυτοποίηση έγινε με 10 mL DMSO.



Εικόνα 3.10: Διάταξη Rotanapor, Rotanapor R-114, υδατόλουτρο B-480, αντλία κενού V-710 και χειριστής κενού V-850 από τη Buchi

3.6 – Προσδιορισμός ποσοστού φόρτωσης AICIPc (Drug Load, DL)

Για το προσδιορισμό του ποσοστού φόρτωσης της AICIPc στα CS@AICIPc NPs, αρχικά πραγματοποιήθηκε η ξήρανσής τους, με τη διαδικασία της λυοφιλίωσης (freeze drying). Η λυοφιλίωση των νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκε σε κρυσταλλωτήριο, όπου μετά τη ξήρανση μεταφέρθηκαν σε vial και ζυγίστηκε η ποσότητα που συλλέχθηκε. Λόγω του ότι δεν είναι δυνατή η συλλογή όλης της ποσότητας των νανοσωματιδίων από το κρυσταλλωτήριο, η συνολική μάζα από την οποία προκύπτει το ποσοστό φόρτωσης της AICIPc υπολογίζεται από τη διαφορά του βάρους του κρυσταλλωτηρίου με τα ξηραμένα νανοσωματίδια και του βάρους του κρυσταλλωτηρίου αφού συλλεχθούν τα νανοσωματίδια και καθαριστεί πλήρως. Το ποσοστό φόρτωσης προκύπτει από την Εξίσωση (ii).

$$DL = \frac{m_{AICIPc}}{m_{CS@AICIPc NPs}} \% \quad (ii)$$

DL είναι το ποσοστό φόρτωσης, m_{AICIPc} είναι η μάζα της AICIPc που εγκλωβίστηκε επιτυχώς στα νανοσωματίδια και υπολογίστηκε με βάση την απόδοση εγκλωβισμού EE και $m_{CS@AICIPc NPs}$ είναι η συνολική μάζα των νανοσωματιδίων που υπολογίστηκε. Τα νανοσωματίδια που συλλέχθηκαν σε vial καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο, έτσι ώστε να μην έρχονται σε επαφή με το φως, και αποθηκεύτηκαν εντός ξηραντήρα.



Εικόνα 3.11: Αριστερά: Διάταξη λυοφιλίωσης Lablyo Mini από την Frozen in Time Ltd, Δεξιά: Λυοφιλωμένα νανοσωματίδια CS (λευκά) και νανοσωματίδια CS@AICIPc (πράσινα)

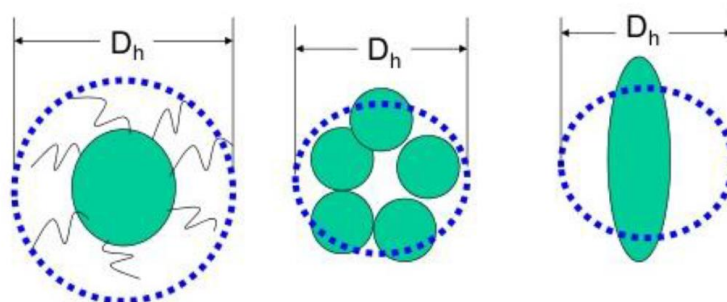
3.7 – Χαρακτηρισμός Νανοσωματιδίων Χιτοζάνης και AICIPc

Οι παρακάτω χαρακτηρισμοί πραγματοποιήθηκαν με σκοπό τον προσδιορισμό των φωτοφυσικών και φωτοχημικών ιδιοτήτων, της δομής και του μεγέθους, ελεύθερης AICIPc και του συστήματος νανοσωματιδίων CS@AICIPc, έτσι ώστε να παρατηρηθεί η επιρροή του εγκλωβισμού της AICIPc στις ιδιότητές της.

3.7.1 – Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

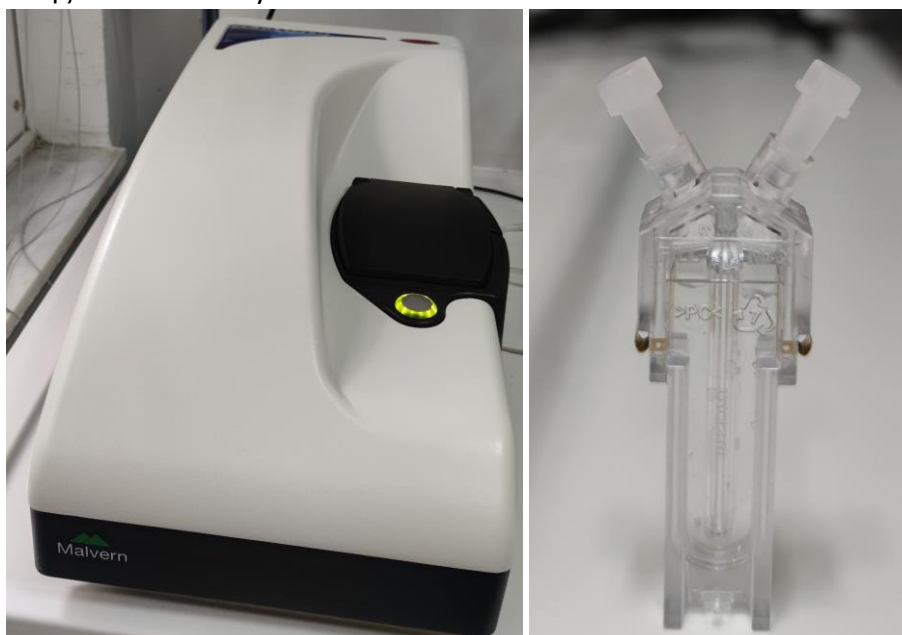
Η δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering - DLS), γνωστή και ως φασματοσκοπία συσχετισμού φωτονίων (Photon Correlation Spectroscopy - PCS), αποτελεί μία γρήγορη, μη καταστρεπτική και αποτελεσματική τεχνική, μέσω της οποίας μπορούν να προσδιοριστούν το μέγεθος, η κατανομή μεγέθους και το ζ-Δυναμικό διαφόρων σωματιδίων ή μακρομορίων σε ένα διάλυμα, υπό διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και pH. Βασίζεται στην κίνηση Brown των σωματιδίων σε ένα διάλυμα, σύμφωνα με την οποία τα σωματίδια συγκρούονται με μόρια του διαλύτη μεταφέροντας έτσι ενέργεια, οδηγώντας στη συνεχή κίνησή τους, όπου αυτή η κίνηση είναι εντονότερη σε μικρού μεγέθους σωματίδια. Οι μετρήσεις που λαμβάνονται από ένα όργανο DLS βασίζονται στην αλληλεπίδραση των σωματιδίων που βρίσκονται σε ένα διάλυμα, όταν αυτά εκτεθούν σε ακτινοβολία. Συγκεκριμένα, σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται το φαινόμενο της σκέδασης του φωτός, όπου από τη συλλογή και κατάλληλη επεξεργασία (με χρήση κατάλληλου λογισμικού) του σήματος της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας εξάγονται οι σχετικές πληροφορίες για το δείγμα που μελετάται. Τα αποτελέσματα που εξάγονται από αυτή τη τεχνική χαρακτηρισμού εξαρτώνται τόσο από τα χαρακτηριστικά της ακτινοβολίας φωτός που χρησιμοποιείται (μήκος κύματος, ένταση ακτινοβολίας, γωνία πρόσπτωσης, γωνία ανιχνευτή σκεδαζόμενης ακτινοβολίας) όσο και από τα χαρακτηριστικά της διασποράς σωματιδίων που εξετάζεται (μέγεθος, συγκέντρωση, οπτικές ιδιότητες, διαλύτης, θερμοκρασία, pH). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι με αυτή τη τεχνική δεν υπολογίζεται το ακριβές μέγεθος των σωματιδίων, αλλά το υδροδυναμικό τους μέγεθος. Το υδροδυναμικό μέγεθος αναφέρεται ως το υποθετικό μέγεθος ενός σφαιρικού σχήματος σωματιδίου, το οποίο παρουσιάζει τα ίδια υδροδυναμικά χαρακτηριστικά με το σωματίδιο που μελετάται. Για αυτό το λόγο, από την τεχνική DLS συνήθως το μέγεθος των σωματιδίων που προκύπτει είναι μεγαλύτερο συγκριτικά με το πραγματικό τους μέγεθος, όπου επίσης δεν

λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με το σχήμα των σωματιδίων, καθώς και για το βαθμό συσσωμάτωσής τους.^{102,103}



Εικόνα 3.12: Σχηματική απεικόνιση της υδροδυναμικής διαμέτρου μικκυλίου (αριστερά), συσσωματώματος σφαιρικών σωματιδίων (κέντρο) και ελλειπτικού σωματιδίου (δεξιά), όπου και παρατηρείται η διαφορά ανάμεσα στο πραγματικό μέγεθος (πράσινο χρώμα) και στο υδροδυναμικό μέγεθος που εξάγεται από το DLS (μπλε διακεκομμένη γραμμή)

Στην παρούσα εργασία, με τη χρήση της τεχνικής DLS προσδιορίστηκε η υδροδυναμική διάμετρος, η πολυδιασπορά και το ζ-Δυναμικό νανοσωματιδίων CS και CS@AlClPc. Για τη λήψη των μετρήσεων, αρχικά από την υδατική διασπορά των νανοσωματιδίων 10 mL επαναδιασπείρθηκαν σε 20 mL υπερκάθαρου νερού. Από την καινούργια διασπορά, κατάλληλη ποσότητα (~1 mL) μεταφέρθηκε σε ειδική κυψελίδα DTS1070, όπου και οι μετρήσεις λήφθηκαν στο μηχάνημα Zetasizer Nano ZS της Malvern Analytical.



Εικόνα 3.13: Μηχάνημα Zetasizer Nano ZS της Malvern Analytical (αριστερά) και ειδική κυψελίδα DTS1070 (δεξιά)

3.7.2 – Φασματομετρία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared spectroscopy, FTIR)

Η φασματομετρία υπέρυθρου αποτελεί μία ευρέως διαδεδομένη μέθοδο ανάλυση τόσο για ποιοτικούς, όσο και για ποσοτικούς σκοπούς. Το φάσμα που λαμβάνεται από αυτήν την τεχνική αντιστοιχεί στις δονήσεις των δεσμών ανάμεσα στα άτομα από τα οποία αποτελείται η υπό μελέτη ουσία. Για αυτό το λόγο, το φάσμα υπέρυθρου μίας ουσίας χαρακτηρίζεται και ως το ‘δακτυλικός της αποτύπωμα’, καθώς κάθε ουσία αποτελείται από διαφορετικό συνδυασμό ατόμων, γεγονός που

σημαίνει ότι δεν είναι δυνατόν δύο διαφορετικές ουσίες να παρουσιάζουν το ίδιο φάσμα. Η κλασική φασματομετρία υπέρυθρου αποτελεί μία αργή και δύσχρηστη τεχνική, λόγω του ότι κάθε συχνότητα πρέπει να μελετάται ξεχωριστά. Για αυτό το λόγο, αναπτύχθηκε η φασματομετρία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared spectroscopy, FTIR), η οποία έχει τη δυνατότητα να μετράει ολόκληρο το φάσμα υπέρυθρου με μία σάρωση, γεγονός που μειώνει σημαντικά το χρόνο που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί η φασματοσκοπία σε σχέση με την κλασική φασματομετρία υπέρυθρου. Πλέον, η τεχνική FTIR αποτελεί μία καταστρεπτική, γρήγορη και ακριβής μέθοδο φασματομετρίας.^{104,105}

Στην παρούσα εργασία, η φασματομετρία FTIR πραγματοποιήθηκε για ποιοτικό σκοπό. Αρχικά εκτιμήθηκε η επιτυχής παραγωγή των νανοσωματιδίων χιτοζάνης με το TPP, μέσω της μεθόδου ionic gelation. Αυτό επιτυγχάνεται με βάση τη σύγκριση των φασμάτων της ελεύθερης χιτοζάνης και του ελεύθερου TPP με τα νανοσωματίδια χιτοζάνης που παρήχθησαν. Επίσης, με βάση τη μέθοδο FTIR μελετήθηκε και ο επιτυχής εγκλωβισμός της AICIPc στη δομή των νανοσωματιδίων χιτοζάνης, συγκρίνοντας τα φάσματα της ελεύθερης AICIPc με τα νανοσωματίδια CS@AICIPc.

3.7.3 – Φασματομετρία απορρόφησης υπεριώδους/ορατού (UV/vis spectroscopy)

Η φασματομετρία απορρόφησης υπεριώδους/ορατού (UV/vis spectroscopy) βασίζεται στην ιδιότητα των μορίων να απορροφούν ενέργεια όταν εκτίθενται σε ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, όπου με αυτόν τον τρόπο διεγείρονται. Κατά την πραγματοποίηση αυτής της τεχνικής, το δείγμα εκτίθεται σε ένα εύρος μηκών κύματος στην περιοχή του υπεριώδους-ορατού (150-850 nm), όπου η ακτινοβολία προέρχεται από μία λάμπα, η δέσμη της οποίας περνάει από μονοχρωμάτορα, όπου και τελικά ανιχνεύεται η ένταση της αφού διαπεράσει το δείγμα. Η μειωμένη ένταση που πιθανόν να παρατηρηθεί αντιστοιχεί στην απορρόφηση από το δείγμα. Αυτή η μέθοδος φασματομετρίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για ποσοτικές όσο και για ποιοτικές αναλύσεις.¹⁰⁶

Στην παρούσα εργασία η φασματομετρία UV/vis χρησιμοποιείται αρχικά, έτσι ώστε να προσδιοριστούν οι οπτικές ιδιότητες των της ελεύθερης AICIPc σε διάφορους διαλύτες (DMSO, EtOH, PBS και υπερκάθαρο νερό), όπου επίσης με βάση το φάσμα απορρόφησης της σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σε διαλύτη DMSO κατασκευάζεται η καμπύλη βαθμονόμησής της. Με βάση την καμπύλη βαθμονόμησης είναι εφικτός και ο προσδιορισμός της έμμεσης απόδοσης εγκλωβισμού της στα CS@AICIPC NPs. Επιπλέον λήφθηκαν και τα φάσματα απορρόφησης των νανοσωματιδίων CS@AICIPc, στους ίδιους διαλύτες, έτσι ώστε να μελετηθεί η τυχόν επιρροή του εγκλωβισμού της AICIPc στα νανοσωματίδια CS. Οι μετρήσεις λήφθηκαν με χρήση του οργάνου Lambda 35 UV/VIS Spectrometer από την Perkin-Elmer instruments.

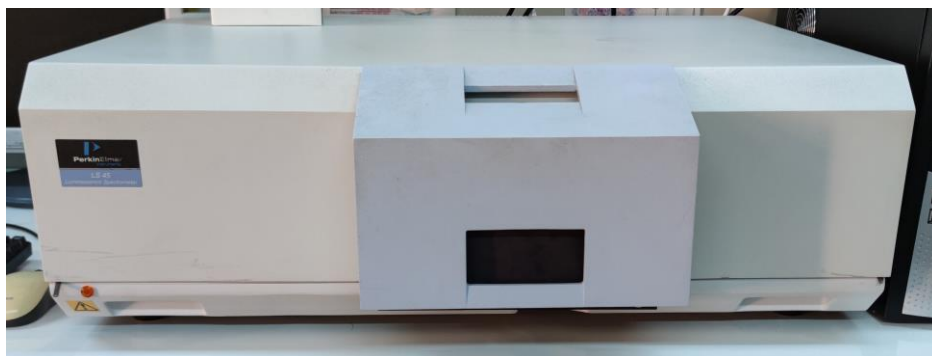


Εικόνα 3.14: Φασματόμετρο απορρόφησης UV/vis Lambda 35 UV/VIS Spectrometer από την Perkin-Elmer instruments

3.7.4 – Φασματομετρία φωτοφωταύγειας (*Photoluminescence spectroscopy, PL*)

Η φωτοφωταύγεια στα μόρια είναι η εκπομπή φωτός μετά την απορρόφηση φωτονίου, που μπορεί να προέρχεται από εξωτερική πηγή. Κατά την απορρόφηση το μόριο διεγείρεται σε κατάσταση υψηλότερης ενέργειας, όπου κατά την αποδιέγερσή του μπορεί να παρατηρηθεί εκπομπή ακτινοβολίας (φθορισμός ή φωσφορισμός). Στη φασματομετρία φωτοφωταύγειας (*Photoluminescence spectroscopy, PL*) το δείγμα ακτινοβολείται, όπου μέσω του ανιχνευτή μπορεί να προσδιοριστεί το μήκος κύματος και η ένταση της ακτινοβολίας που εκπέμπεται από το δείγμα. Η φασματομετρία PL και η φασματομετρία UV/vis συνήθως χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά η μία με την άλλη, καθώς μέσω του φάσματος απορρόφησης μπορεί να προσδιοριστεί το κατάλληλο μήκος κύματος διέγερσης που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί κατά τη φασματομετρία PL. Η κύρια πληροφορία που λαμβάνεται από αυτή την τεχνική είναι το φάσμα εκπομπής ακτινοβολίας (φθορισμού) της ουσίας που μελετάται, όπου βέβαια ανάλογα με το τι εξετάζεται από τα αποτελέσματα του φάσματος εκπομπής, μπορούν να εξαχθούν πληροφορίες σχετικά με τις χημικές, φυσικές ή ηλεκτρικές ιδιότητες του δείγματος, καθώς και πληροφορίες σχετικά με τη δομή και σύσταση του.^{107–109}

Στην παρούσα εργασία, η τεχνική της φασματομετρίας PL χρησιμοποιείται αρχικά για τον προσδιορισμό του φάσματος εκπομπής φθορισμού της ελεύθερης AIClPc και της εγκλωβισμένης σε νανοσωματίδια CS@AIClPc, με βάση τις κύριες κορυφές απορρόφησης που προκύπτουν από τα φάσμα απορρόφησης UV/vis τους. Επιπλέον, με βάση τη φασματομετρία PL εξετάζεται και η φωτοσταθερότητα και η δυνατότητα των παραπάνω υλικών να παράγουν δραστικές οξυγονούχες ρίζες (*Reactive Oxygen Species, ROS*). Οι παραπάνω χαρακτηρισμοί πραγματοποιήθηκαν με φασματόμετρο LS 45 Luminescence Spectrometer της Perkin-Elmer instruments.



Εικόνα 3.15: Φασματοφωτόμετρο φωτοφωταύγειας LS 45 Luminescence Spectrometer της Perkin-Elmer instruments

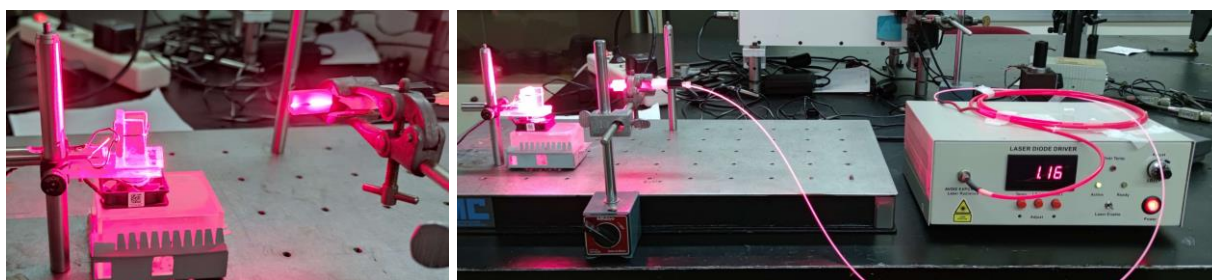
3.8 – Μελέτη φωτοδυναμικής δράσης AIClPc και CS@AIClPc NPs

Η φωτοδυναμική δράση της ελεύθερης AIClPc και των νανοσωματιδίων CS@AIClPc εξετάστηκε τόσο σε επίπεδο εργαστηρίου όσο και σε επίπεδο κυττάρων, με σκοπό τη λήψη συγκριτικών αποτελεσμάτων έτσι ώστε να διαπιστωθεί εάν και σε τι βαθμό ο εγκλωβισμός της AIClPc σε νανοσωματίδια CS επηρεάζει θετικά ή αρνητικά της επιθυμητές ιδιότητες της.

3.8.1 – Μελέτη φωτοσταθερότητας

Η μελέτη φωτοσταθερότητας αποσκοπεί στον προσδιορισμό των φωτοφυσικών ιδιοτήτων του φωτοευαισθητοποιητή AICIPc, κατά ένα διάστημα παρατεταμένης έκθεσης σε ακτινοβολία. Κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία, ο φωτοευαισθητοποιητής εκτίθεται σε ακτινοβολία έτσι ώστε να παραχθούν ROS, τα οποία και είναι υπεύθυνα για το κυτταρικό θάνατο. Για αυτό το λόγο, είναι σημαντικό ο φωτοευαισθητοποιητής να έχει την ιδιότητα να διατηρεί τις φωτοφυσικές του ιδιότητες για, για όσο το δυνατό μεγαλύτερο διάστημα, κατά την ακτινοβόλησή του, έτσι ώστε να είναι αποτελεσματική η θεραπεία. Γενικά οι φωτοευαισθητοποιητές είναι πιθανόν να παρουσιάσουν το φαινόμενο της φωτολεύκανσης, κατά το οποίο κατά την έκθεση τους σε ακτινοβολία παρατηρείται η απόσβεση των φωτοφυσικών ιδιοτήτων, δηλαδή απορρόφηση και φωτοφωταύγεια, έχοντας ως αποτέλεσμα και τη μείωση της ικανότητάς τους να παράγουν ROS. Από τη φωτολεύκανσης, μπορεί να παρατηρηθεί και το φαινόμενο της ολικής φωτοκαταστροφής του μορίου ή της φωτοτροποποίησης του, κατά την οποία το μόριο διασπάται, παράγοντας έτσι άλλες ουσίες που μπορεί να παρουσιάζουν μειωμένη ή και μηδενική ικανότητα παραγωγής ROS. Επίσης, κατά τη φωτοτροποποίηση είναι πιθανόν να παραχθούν και ουσίες αυξημένης τοξικότητας. Η ιδιότητα της φωτοσταθερότητας ενός φωτοευαισθητοποιητή εξαρτάται καταρχάς από τα χαρακτηριστικά της ίδιας της ουσίας, από το περιβάλλον του (π.χ. διαλύτης) και από τα χαρακτηριστικά της ακτινοβολίας (μήκος κύματος και ένταση).

Η μελέτη φωτοσταθερότητας πραγματοποιείται με την παρακολούθηση του φάσματος φθορισμού της AICIPc σε χρονικό διάστημα 30 λεπτών, ενώ το δείγμα εκτίθεται σε ακτινοβολία. Συγκεκριμένα, η διάταξη που χρησιμοποιείται για τη μελέτη της φωτοσταθερότητας αποτελείται από ένα διοδικό laser GCSLS-10-1500m μήκους κύματος 660 nm, μία υποδοχή για την κυψελίδα, και από μία οπτική ίνα. Η οπτική ίνα περιέχεται στο άκρο της από ένα διάχυτή κυκλικής συμμετρίας και αποσκοπεί στην καθοδήγηση της δέσμης του laser, όπου η ένταση είναι 13 mW/cm². Επιπλέον, καθ' όλη τη διάρκεια της ακτινοβόλησης το διάλυμα εντός της κυψελίδας βρίσκεται υπό συνεχή μαγνητική ανάδευση. Για την ελεύθερη AICIPc, η φωτοσταθερότητα εξετάστηκε σε διαλύτη DMSO, σε συγκέντρωση 10⁻⁷ M, όπου για τα λεπτά 0-10 οι μετρήσεις λήφθηκαν ανά λεπτό, ενώ για τα λεπτά 10-30 οι μετρήσεις λήφθηκαν ανά 5 λεπτά. Η πρώτη μέτρηση λαμβάνεται πριν αρχίσει η ακτινοβόληση του δείγματος.

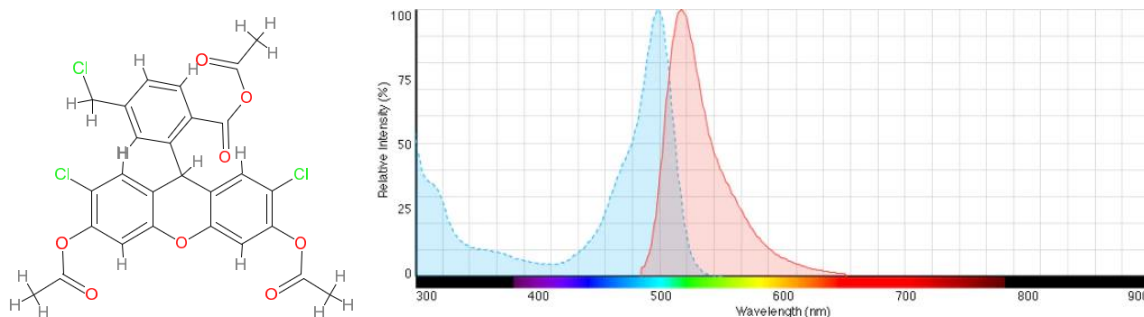


Εικόνα 3.16: Διάταξη διοδικού laser GCSLS-10-1500m μήκους κύματος 660 nm

3.8.2 – Μελέτη παραγωγής δραστικών οξυγονούχων ειδών (ROS)

Η μελέτη παραγωγής δραστικών οξυγονούχων ειδών (Reactive Oxygen Species, ROS), πραγματοποιήθηκε τόσο για την ελεύθερη AICIPc όσο και για τα νανοσωματίδια CS@AICIPc. Για την περαιτέρω χρήση των νανοσωματιδίων που παράχθηκαν ως φωτοευαισθητοποιητή 3^{ης} γενιάς, είναι

απαραίτητο να παρατηρηθεί η δυνατότητα παραγωγής ROS σε εργαστηριακό επίπεδο, καθώς τα ROS που παράγονται οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Στην παρούσα εργασία η ανίχνευση των ROS επιτεύχθηκε με τη χρήση του ανιχνευτή ROS φλουορεσκεΐνης CM-H₂DCFDA, και συγκεκριμένα με βάση του φάσματος εκπομπής φωτοφωταύγειας του. Η φλουορεσκεΐνη είναι παράγωγο του χλωρομεθυλίου της H₂DCFDA, όπου διαθέτει εστερικές ομάδες και παρουσιάζει απορρόφηση στα 490 nm και εκπομπή στα 520 nm. Να σημειωθεί ότι η φλουορεσκεΐνη δεν είναι ένα φθορίζον μόριο, ωστόσο έχει τη δυνατότητα να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες και να υδρολύεται παρουσία ενδοκυτταρικών εστερασών, παράγοντας έτσι φθορίζοντα μόρια, τα οποία είναι υπεύθυνα για το σήμα που συλλέγεται. Στην συγκεκριμένη εργασία, αντί για εστεράσες του κυττάρου αξιοποιείται διάλυμα NaOH, ώστε να υδρολυθεί η φλουορεσκεΐνη. ^{110,111}



Εικόνα 3.17: Μόριο φλουορεσκεΐνης (6-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester) CM-H₂DCFDA (αριστερά) και φάσματα UV/vis και PL φλουορεσκεΐνης CM-H₂DCFDA (δεξιά) ^{[100], [101]}

Πιο αναλυτικά, για τον προσδιορισμό της παραγωγής ROS των δειγμάτων, αρχικά παρασκευάζεται ένα stock διάλυμα φλουορεσκεΐνης. Συγκεκριμένα 50 μg φλουορεσκεΐνης (M_r = 577.8 g/mol) διαλύονται σε 1 mL DMSO, και έτσι προκύπτει stock διάλυμα συγκέντρωσης φλουορεσκεΐνης C = 87·10⁻⁶ M. Από το stock διάλυμα λαμβάνονται 15 μL και αραιώνονται σε 40 μL αιθανόλης, όπου στη συνέχεια προστίθενται 5 μL NaOH 4N. Αυτό το διάλυμα αποτελεί το διάλυμα υδρόλυσης, όπου και αφήνεται σε σκοτεινό μέρος για 30 λεπτά, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η υδρόλυση της φλουορεσκεΐνης από τη βάση NaOH.

Τόσο για την ελεύθερη όσο και για την εγκλωβισμένη AIClPc επιλέχθηκε να εξεταστεί η ικανότητά παραγωγής ROS σε συγκέντρωση 10⁻⁶ M AIClPc. Ο τελικός όγκος για τα διαλύματα ακτινοβολήσης είναι 3 mL, οπότε γνωρίζοντας την αρχική και τελική συγκέντρωση κάθε δείγματος, υπολογίστηκε ο απαιτούμενος όγκος κάθε δείγματος. Τελικά, κάθε διάλυμα ακτινοβολήσης αποτελείται από τον απαιτούμενο όγκο του δείγματος, 35 μL του διαλύματος υδρόλυσης και συμπληρωματική ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος PBS (Phosphate Buffered Saline) έτσι ώστε να έχουν τελικό όγκο ίσο με 3 mL. Το ρυθμιστικό διάλυμα που προστίθεται έχει ως σκοπό την αδρανοποίηση των ριζών OH⁻ που περιέχονται στο διάλυμα υδρόλυσης, έτσι ώστε ο εστέρας να αντιδράσει μόνο με τις παραγόμενες ελεύθερες ρίζες.

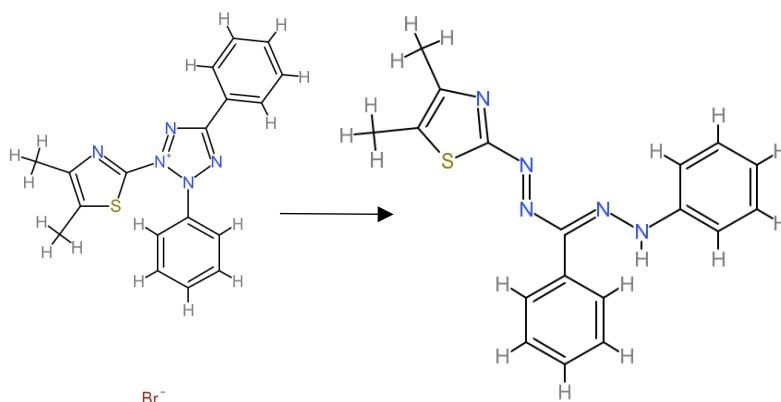
Η διάταξη που χρησιμοποιείται για την παραγωγή των ελευθέρων ριζών είναι η ίδια με αυτήν που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη φωτοσταθερότητας, στο Κεφάλαιο 3.8.1 (63). Και σε αυτήν την περίπτωση, σε κάθε δείγμα πραγματοποιούνται συνολικά 15 μετρήσεις της έντασης φθορισμού σε διάστημα 30 λεπτών. Τα φάσματα φθορισμού λαμβάνονται με μήκος κύματος διέγερσης 490 nm και εύρος τιμών μήκους κύματος εκπομπής 510-650 nm, όπου και έχει παρατηρηθεί ότι τα εξεταζόμενα μόρια δεν απορροφούν/εκπέμπουν στη συγκεκριμένη περιοχή του φάσματος. Αρχικά, η πρώτη μέτρηση ελήφθη πριν αρχίσει η ακτινοβολήση των δειγμάτων, όπου στη συνέχεια για τα

πρώτα 10 λεπτά στα δείγματα οι μετρήσεις πραγματοποιούνται κάθε 1 λεπτό, ενώ για τα υπόλοιπα 20 λεπτά πραγματοποιούνται κάθε 5 λεπτά.

3.8.3 – Μελέτη βιωσιμότητας κυττάρων

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο κυττάρων έγινε σε κυτταρικό πληθυσμό A431 ανθρώπινων κυττάρων, καρκίνου του δέρματος, στα οποία η καλλιέργεια διατηρείται εντός κλιβάνου στους 37 °C σε συνθήκες 5% CO₂, με χρήση πλήρες θρεπτικού μέσου (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, από τη BioSera), το οποίο περιέχει FBS (Fetal Bovine Serum). Η μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων κατά την προσθήκη ελεύθερης AICIPc και νανοσωματιδίων CS@AICIPc πραγματοποιήθηκε σε 96-well plate, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ουσίας, ενώ αυτά βρίσκονται εντός του κλιβάνου (dark toxicity), όπου και η τελική ποσοτικοποίηση του κυτταρικού θανάτου έγινε με χρήση ανάλυσης MTT. Η επώαση της κάθε ουσία πραγματοποιήθηκε για μία μέρα.

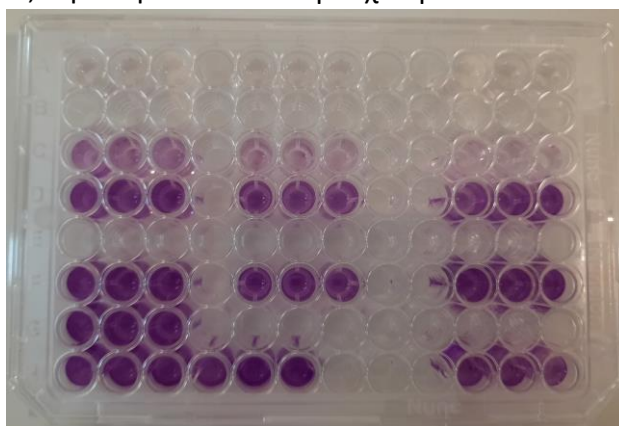
Το MTT είναι μία χρωστική, όπου αποτελεί ένα tetrazolium άλας, με χημική σύσταση 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide. Παρουσιάζει κίτρινο χρώμα και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση κυτταρικών πληθυσμών/κυτταροτοξικότητα. Συγκεκριμένα, μπορεί να μεταβολίζεται ενζυμικά από τα ζωντανά κύτταρα (ένζυμα NAD(P)H-εξαρτώμενα oxidoreductase), όπου με αυτόν τον τρόπο παράγεται η ένωση της φορμαζάνης, μέσω αναγωγής. Η φορμαζάνη είναι αδιάλυτη στα υδατικά διαλύματα, όπου κατά το μεταβολισμό του MTT από τα κύτταρα παράγεται σε μορφή μωβ κρυστάλλων. Η ποσότητα των κρυστάλλων φορμαζάνης που παράγεται είναι ανάλογη με τον κυτταρικό πληθυσμό, όπου μεγαλύτεροι αριθμοί κυττάρων οδηγούν στην παραγωγή περισσότερων κρυστάλλων. Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιείται με βάση την απορρόφηση της φορμαζάνης στα 500-600 nm, όπου υψηλότεροι αριθμοί απορρόφησης αντιστοιχούν σε υψηλότερο αριθμό κυττάρων. Για τη λήψη των τιμών απορρόφησης η φορμαζάνη διαλύεται με διαλύτες όπως το DMSO.



Εικόνα 3.18: Χημική δομή MTT (αριστερά) και φορμαζάνης (δεξιά)

Όπως αναφέρθηκε, η μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με ανάλυση MTT σε 96-well plate. Αρχικά, σε κάθε well του plate τοποθετήθηκαν $0.6 \cdot 10^4$ κύτταρα και 100 μL πλήρες θρεπτικού μέσου DMEM, όπου στη συνέχεια το plate τοποθετήθηκε στον κλίβανο για μια μέρα. Την επόμενη μέρα αφαιρέθηκε το DMEM από κάθε well και προστέθηκε 100 μL DMEM, όπου και περιέχει κατάλληλη συγκέντρωση των δειγμάτων υπό μελέτη. Κάθε δείγμα μελετήθηκε για 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις, όπου κάθε συγκεντρώνση μελετήθηκε σε τρία διαφορετικά well. Εκτός από τα well που περιέχουν DMEM με τα δείγματα, μερικά well περιέχουν μόνο DMEM (control), έτσι ώστε να υπάρχει μέτρο σύγκρισης ανάμεσα στη βιωσιμότητα των κυττάρων με και χωρίς το υπό

μελέτη δείγμα. Το plate τοποθετείται για μία μέρα στον κλίβανο, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η επώαση των υπό μελέτη ουσιών. Την επόμενη μέρα, αφαιρείται από τα well του plate το DMEM (που περιέχει και τα δείγματα) και προστίθεται 115 μL DMEM που περιέχει PBS και MTT. Συγκεκριμένα προστίθεται 100 μL DMEM, 15 μL PBS και η ποσότητα του MTT, που αρχικά βρίσκεται σε στερεή μορφή είναι $C_{\text{MTT}} = 0.05\text{g}/10\text{mL}$. Το plate με το MTT αφήνεται για τρεις ώρες για επώαση στον κλίβανο. Στη συνέχεια, αφαιρείται το DMEM με το MTT από τα well, όπου και παρατηρούνται οι μωβ κρύσταλλοι φορμαζάνης που έχουν σχηματιστεί. Το πιο έντονο μωβ χρώμα στο plate αντιστοιχεί και σε υψηλότερο πληθυσμό κυττάρων. Για να πραγματοποιηθεί η διάλυση της φορμαζάνης, έτσι ώστε να μετρηθεί η απορρόφησή της, σε κάθε well προστίθεται 200 μL DMSO. Η μέτρηση απορρόφησης λαμβάνεται στα 570 nm σε microplate spectrometer Epoch2, από τη BioTek. Η βιωσιμότητα των κυττάρων (ή η κυτταροτοξικότητα των ουσιών) υπολογίζεται με βάση το λόγο της απορρόφησης της φορμαζάνης στα well που περιείχαν τις ουσίες, προς την απορρόφηση φορμαζάνης στα control well, δηλαδή αυτά που περιείχαν μόνο DMEM.



Εικόνα 3.19: Ημισυμπληρωμένο plate 96 θέσεων, όπου κατά την ανάλυση MTT στις θέσεις που παρατηρείται πιο έντονο χρώμα παρατηρείται και μεγαλύτερος αριθμός ζωντανών κυττάρων

3.8.4 – Μελέτη φωτοδυναμικής θεραπείας σε κυτταρικό πληθυσμό

Η μελέτη της αποτελεσματικότητας ελεύθερης AICIPc και των νανοσωματιδίων CS@AICIPc στη φωτοδυναμική θεραπεία πραγματοποιήθηκε στις μέγιστες δυνατές συγκεντρώσεις των ουσιών, στις οποίες παρατηρήθηκε ικανοποιητική κυτταρική βιωσιμότητα. Η φωτοδυναμική τους δράση εξετάστηκε σε 96-well plate, ύστερα από τρίωρη επώαση των ουσιών υπό μελέτη, για διαφορετικού χρόνους ακτινοβολήσης, με χρήση διοδικού laser ισχύος $9 \text{ mW}/\text{cm}^2$, και μήκος κύματος εκπομπής στα 660 nm. Ο τελικός προσδιορισμός της φωτοδυναμικής δράσης έγινε με την ποσοτικοποίηση του κυτταρικού θανάτου με χρήση της ανάλυσης MTT, Κεφάλαιο 3.8.3 (65).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 – Αποτελέσματα Πειραματικού σχεδιασμού

Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζονται οι πειραματικές τιμές των αποκρίσεων που προέκυψαν, σύμφωνα με τα πειράματα που προβλέφθηκαν από τον πειραματικό σχεδιασμό.

Πίνακας 4.1: Αναλυτική παρουσίαση όλων των αποκρίσεων που προέκυψαν πειραματικά για τα 15 πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό

Πείραμα	Περιεκτικότητα Χιτοζάνης (w/v%)	Περιεκτικότητα TPP (w/v%)	Χρόνος Υπερήχων (min)	Υδροδυναμική Διάμετρος (nm)	Απόδοση Εγκλωβισμού AICIPc (%)	ζ-Δυναμικό (mV)	Ποσοστό Φόρτωσης AICIPc (%)	Μάζα Νανοσωματιδίων που συλλέχθηκε (mg)
1	0.2	0.5	10	347.3	94.2	-37	15.2	22.6
2	0.5	0.3	15	285.6	98.7	9	24.3	19.5
3	0.2	0.3	15	198	97.5	15.7	39.7	10.8
4	0.35	0.5	5	350	87.4	7.2	13.1	21.7
5	0.35	0.5	15	271.1	94.3	10.5	14.0	18.4
6	0.35	0.1	15	196	96.0	-32.2		0.3
7	0.5	0.5	10	373.5	95.8	9.6	16.5	20
8	0.35	0.3	10	330.7	92.5	18.2	28.3	18
9	0.2	0.1	10	206.4	95.2	6.7		6.5
10	0.5	0.3	5	292.1	95.5	7.6	17.2	11
11	0.5	0.1	10	318.5	97.0	-30		1.4
12	0.35	0.3	10	258.8	97.3	9.7	17.6	26.5
13	0.35	0.1	5	339.5	97.1	-45.2		5.3
14	0.35	0.3	10	241	97.2	18.8	29.2	16
15	0.2	0.3	5	361.8	94.8	-17	12.8	25

Σε αυτό το κεφάλαιο, θα γίνει ανάλυση των παραπάνω πειραματικών τιμών, σχετικά με το πως προέκυψαν, καθώς και το μοντέλο που χρησιμοποιείται για τη βελτιστοποίηση τους.

4.1.1 – Αποτελέσματα DLS, Υδροδυναμική Διάμετρος και ζ-Δυναμικό

4.1.1.1 – Προσδιορισμός Υδροδυναμικής Διαμέτρου και Πολυδιασποράς

Με τη μέθοδο DLS αρχικά για τα 15 πειράματα που προέκυψαν από τον πειραματικό σχεδιασμό προσδιορίστηκαν η υδροδυναμική διάμετρος και η πολυδιασπορά PDI του κάθε δείγματος. Οι μετρήσεις λήφθηκαν σε υδατική διασπορά των νανοσωματιδίων CS@AICIPc, πριν πραγματοποιηθεί ξήρανση με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 4.2.

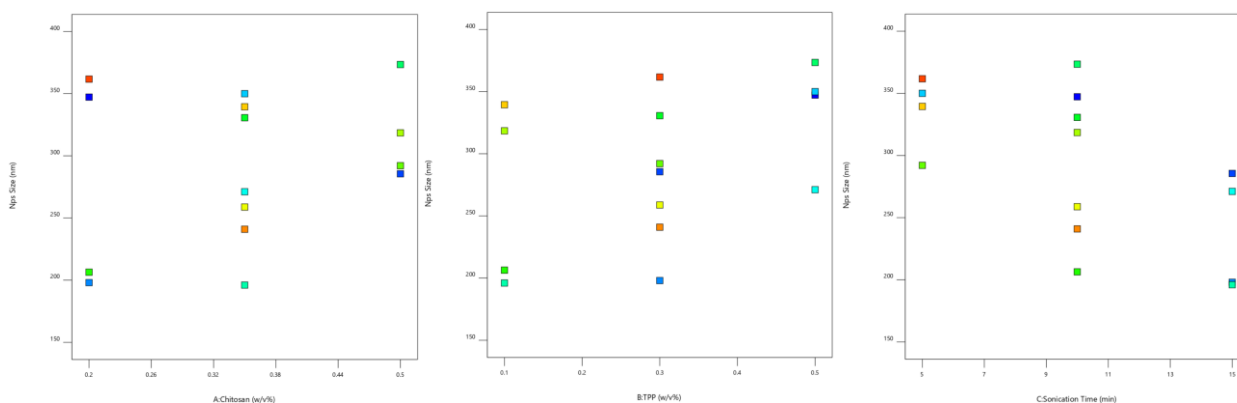
Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα σχετικά με την υδροδυναμική ακτίνα και το δείκτη πολυδιασποράς PDI που προέκυψαν από το DLS

Πείραμα	Περιεκτικότητα Χιτοζάνης (w/v%)	Περιεκτικότητα TPP (w/v%)	Χρόνος Υπερήχων (min)	Υδροδυναμική Διάμετρος (nm)	Πολυδιασπορά (0-1)
1	0.2	0.5	10	347.3 ± 22.5	0.403 ± 0.036
2	0.5	0.3	15	285.6 ± 9.3	0.470 ± 0.028
3	0.2	0.3	15	198 ± 4.4	0.270 ± 0.034
4	0.35	0.5	5	350 ± 7.9	0.454 ± 0.027
5	0.35	0.5	15	271.1 ± 10.4	0.491 ± 0.024
6	0.35	0.1	15	196 ± 15	0.495 ± 0.039

7	0.5	0.5	10	373.5 ± 15.5	0.383 ± 0.049
8	0.35	0.3	10	330.6 ± 12.3	0.281 ± 0.022
9	0.2	0.1	10	206.4 ± 22.9	0.441 ± 0.053
10	0.5	0.3	5	292.1 ± 16.6	0.360 ± 0.026
11	0.5	0.1	10	318.5 ± 2.8	0.491 ± 0.043
12	0.35	0.3	10	258.8 ± 0.5	0.387 ± 0.029
13	0.35	0.1	5	339.5 ± 23.2	0.472 ± 0.025
14	0.35	0.3	10	241 ± 10.4	0.424 ± 0.060
15	0.2	0.3	5	361.8 ± 22.2	0.339 ± 0.008

Από τα παραπάνω αποτελέσματα που προκύπτουν, παρατηρείται αρχικά σημαντική διαφοροποίηση των τιμών της υδροδυναμικής διαμέτρου των νανοσωματιδίων που παράχθηκαν, με την υψηλότερη τιμή να παρατηρείται στο πείραμα 7 με 373 nm και τη χαμηλότερη τιμή να παρατηρείται στο πείραμα 6 με τιμή 196 nm. Με άλλα λόγια παρατηρείται ότι οι τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών που επιλέχθηκαν επηρεάζουν το τελικό υδροδυναμικό μέγεθος των νανοσωματιδίων. Επιπλέον, παρατηρείται και διακύμανση στις τιμές PDI των νανοσωματιδίων, χωρίς ωστόσο σε κανένα πείραμα να ξεπερνάτε η τιμή 0.5, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί σε σχετικά καλή διασπορά των νανοσωματιδίων.

Από τις τιμές της υδροδυναμικής διαμέτρου που προκύπτουν, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της επίδρασης των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών που έχουν οριστεί, δηλαδή της περιεκτικότητας χιτοζάνης (CS w/v%), της περιεκτικότητας TPP (TPP w/v%) και του χρόνου υπερήχων (ST min).



Εικόνα 4.1: Συσχέτιση της υδροδυναμικής διαμέτρου (Nps size (nm)) των νανοσωματιδίων CS@AICIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% (αριστερά), TPP w/v% (κέντρο) και ST min (δεξιά)

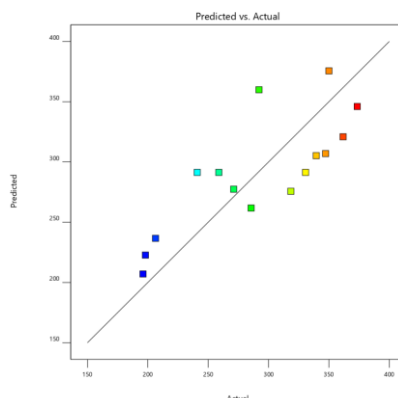
Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται αρχικά οι υψηλές περιεκτικότητες, τόσο CS όσο και TPP οδηγούν σε αύξηση της υδροδυναμικής διαμέτρου των νανοσωματιδίων, ενώ σε σχετικά με τις μεσαίες και χαμηλές τιμές τους παρατηρείται μία πιο ευρεία κατανομή, το οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι το τελικό μέγεθος των νανοσωματιδίων εξαρτάται από το συνδυασμό αυτών των δύο παραμέτρων. Αντιθέτως, σε σχέση με το χρόνο υπερήχων παρατηρείται η πιο έντονη μείωση της υδροδυναμικής διαμέτρου με την αύξηση του χρόνου, γεγονός που είναι αναμενόμενο, καθώς με αυτό τον τρόπο σπάνε περισσότερο τα συσσωματώματα ανάμεσα στα νανοσωματίδια.

Για να γίνει η βελτιστοποίηση της διεργασίας, η πρόβλεψη του μεγέθους των νανοσωματιδίων πραγματοποιείται με το γραμμικό μοντέλο (Linear), χωρίς κάποιο μετασχηματισμό. Η εξίσωση που προκύπτει αποτελείται από τους όρους A, B, C όπου και αντιστοιχούν στις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v%, TPP w/v% και ST min. Η στατιστική ανάλυση του μοντέλου πραγματοποιείται μέσω ANOVA, όπου τα αποτελέσματα που προκύπτουν παρουσιάζονται στον **Πίνακας 4.3**.

Πίνακας 4.3: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA σχετικά με το μέγεθος των νανοσωματιδίων CS@AICIPc

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	32212.29	3	10737.43	6	0.0113	significant
A-Chitosan	3047.2	1	3047.2	1.7	0.2187	
B-TPP	9898.25	1	9898.25	5.53	0.0384	
C-Sonication Time	19266.85	1	19266.85	10.76	0.0073	
Residual	19699.85	11	1790.9			
Lack of Fit	15191.4	9	1687.93	0.7488	0.6895	not significant
Pure Error	4508.45	2	2254.22			
Cor Total	51912.14	14				

Από το μοντέλο της στατιστικής ανάλυσης προκύπτει p-value ίσο με 0.0113, το οποίο και σημαίνει ότι το παρόν μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό (<0.05). Επιπλέον το F-value που προκύπτει ισούται με 6, το οποίο επίσης υποδεικνύει ότι το μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό, όπου και σημαίνει ότι υπάρχει μόνο 1.13% πιθανότητα αυτή η τιμή να προέκυψε λόγω θορύβου. Επίσης, η έλλειψη προσαρμογής του F-value (Lack of fit) που προκύπτει είναι 0.7488, το οποίο και σημαίνει ότι δεν είναι στατιστικά σημαντικό, καθώς η πιθανότητα της μη προσαρμογής του μοντέλου να οφείλεται σε θόρυβο είναι 68.95%. Η τελική τιμή του συντελεστή προσδιορισμού που προκύπτει είναι $R^2 = 0.6205$, γεγονός που σημαίνει ότι η προσαρμογή των πειραματικών τιμών στο μοντέλο είναι μέτρια, όπου και είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι υπάρχει μια σχετικά υψηλή διαφορά ανάμεσα στην προβλεπόμενη και προσαρμοσμένη τιμή.

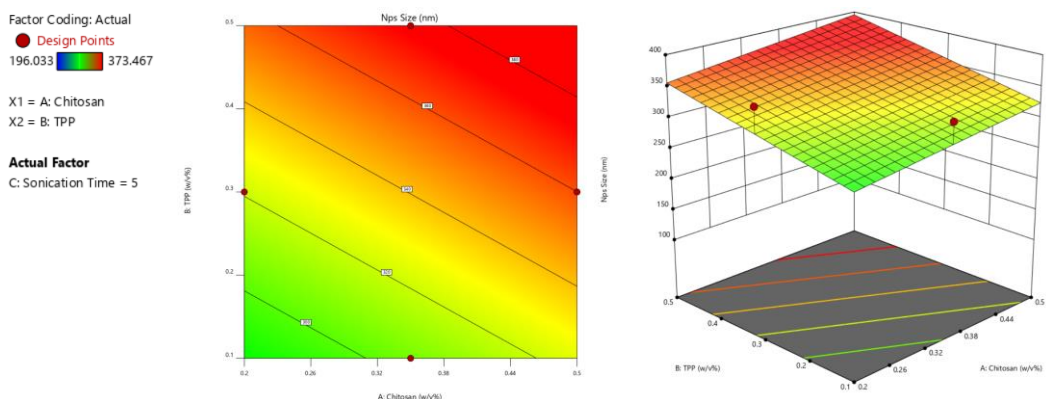


Εικόνα 4.2: Συσχέτιση πειραματικών και προβλεπόμενων τιμών από το μοντέλο για το μέγεθος των νανοσωματιδίων CS@AICIPc

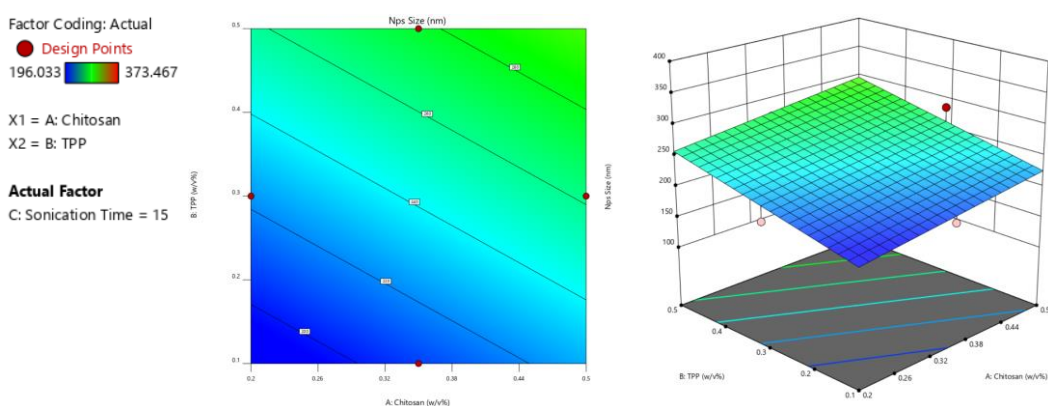
Η εξίσωση εξάρτησης του μεγέθους των νανοσωματιδίων CS@AICIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές παρουσιάζεται παρακάτω:

$$NPs\ Size = 291.199 + 130.111 \cdot CS + 175.875 \cdot TPP - 9.815 \cdot ST \quad (iii)$$

Στη συνέχεια παρουσιάζονται δισδιάστατα και τρισδιάστατα διαγράμματα συσχέτισης του μεγέθους των νανοσωματιδίων CS@AICIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές.



Εικόνα 4.3: Απεικόνιση της συσχέτισης του μεγέθους των νανοσωματιδίων CS@AICIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% και TPP w/v% σε δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) κατανομή, για ST = 5 min



Εικόνα 4.4: Απεικόνιση της συσχέτισης του μεγέθους των νανοσωματιδίων CS@AICIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% και TPP w/v% σε δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) κατανομή, για ST = 15 min

4.1.1.2 – Προσδιορισμός ζ- Δυναμικού

Ο προσδιορισμός του ζ-Δυναμικού πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο για τα 15 πειράματα που προέκυψαν από τον πειραματικό σχεδιασμό. Όπως και για τον προσδιορισμό του μεγέθους των νανοσωματιδίων CS@AICIPc, οι μετρήσεις λήφθηκαν σε υδατική διασπορά, πριν πραγματοποιηθεί ξήρανση με τη μέθοδο της λυοφιλίωσης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 4.4.

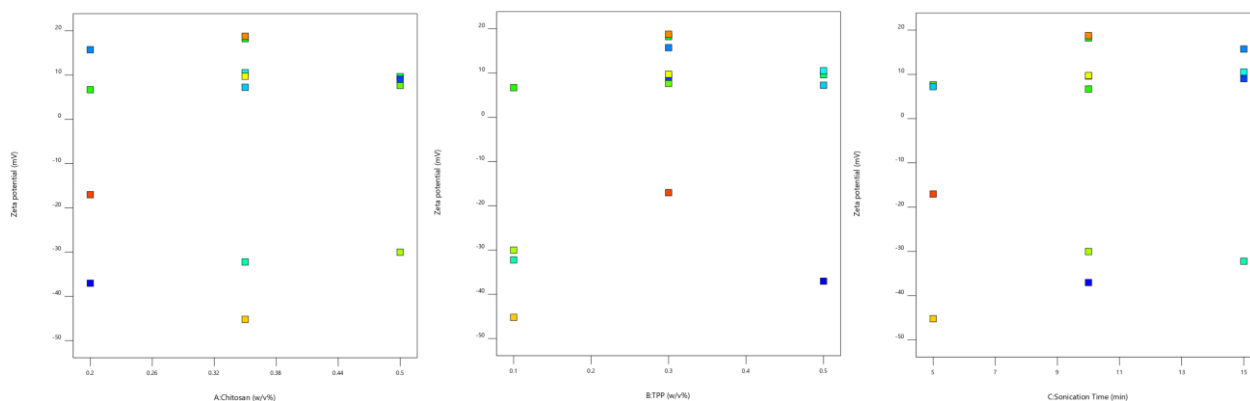
Πίνακας 4.4: Αποτελέσματα σχετικά με ζ-Δυναμικό που προέκυψαν από το DLS

Πείραμα	Περιεκτικότητα Χιτοζάνης (w/v%)	Περιεκτικότητα TPP (w/v%)	Χρόνος Υπερήχων (min)	Z-Δυναμικό (mV)
1	0.2	0.5	10	-37 ± 9.6
2	0.5	0.3	15	9 ± 0.6
3	0.2	0.3	15	15.7 ± 1.8
4	0.35	0.5	5	7.2 ± 1.4
5	0.35	0.5	15	10.5 ± 0.5
6	0.35	0.1	15	-32.2 ± 7.5
7	0.5	0.5	10	9.6 ± 2.3
8	0.35	0.3	10	18.2 ± 0.1
9	0.2	0.1	10	6.7 ± 4.4
10	0.5	0.3	5	7.7 ± 1

11	0.5	0.1	10	-30 ± 9.6
12	0.35	0.3	10	9.7 ± 0.5
13	0.35	0.1	5	-45.2 ± 2
14	0.35	0.3	10	18.8 ± 1.6
15	0.2	0.3	5	-17 ± 5.9

Λόγω της κατιονικής φύσης της χιτοζάνης, ήταν αναμενόμενο το ζ-Δυναμικό να φέρει θετική τιμή. Ωστόσο σε μερικά από τα δείγματα το ζ-Δυναμικό παρατηρήθηκε να έχει αρνητική τιμή, το οποίο πιθανόν να μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η AICIPc δεν εγκλωβίστηκε στο εσωτερικό των αυτών των νανοσωματιδίων CS, αλλά προσροφήθηκε στην επιφάνειά τους. Βέβαια, αυτό απαιτεί περαιτέρω χαρακτηρισμό έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί, για παράδειγμα μικροσκοπία διέλευσης ηλεκτρονίων TEM, όπου και θα μπορούσε να απεικονιστεί η χωρική συσχέτιση της AICIPc στα νανοσωματίδια CS. Επιπλέον, οι τιμές του ζ-Δυναμικού κατά πλειοψηφία παρουσιάζουν απόλυτη τιμή χαμηλότερη του 30 mV, το οποίο υποδεικνύει περιορισμένη σταθερότητα και πιθανός αυξημένη τάση συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων. Μία άλλη εξήγηση για την αρνητική τιμή του ζ-δυναμικού, ή και τη σχετικά χαμηλή θετική τιμή μερικών πειραμάτων, θα μπορούσε να είναι το γεγονός ότι το αρνητικό φορτίο του TPP υπερσχύει σε σχέση με το φορτίο της χιτοζάνης. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, όπως τα χαρακτηριστικά της χιτοζάνης (μοριακό βάρος και DD), του TPP καθώς και οι συνθήκες σύνθεσης των νανοσωματιδίων (π.χ. pH). Ωστόσο, αυτό πρέπει να επιβεβαιωθεί πειραματικά.

Από τις τιμές του ζ-δυναμικού που προκύπτουν, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της επίδρασης των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών που έχουν οριστεί, δηλαδή της περιεκτικότητας χιτοζάνης (CS w/v%), της περιεκτικότητας TPP (TPP w/v%) και του χρόνου υπερήχων (ST min).



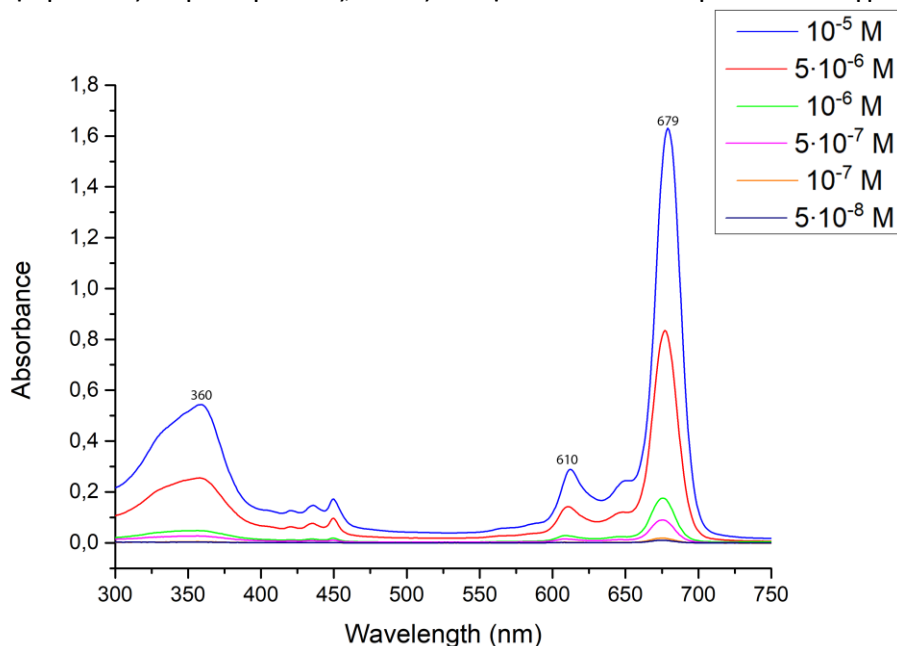
Εικόνα 4.5: Συσχέτιση του ζ-Δυναμικού (Zeta potential (mV)) των νανοσωματιδίων CS@AICIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% (αριστερά), TPP w/v% (κέντρο) και ST min (δεξιά)

Λόγω των υψηλών διακυμάνσεων των τιμών του ζ-Δυναμικού δεν προκύπτει κάποιο στατιστικά σημαντικό και αξιόπιστο μοντέλο για την πρόβλεψη της τιμής του σε σχέση με τις τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές που έχουν οριστεί. Για αυτό το λόγο, η βελτιστοποίηση της διεργασίας πραγματοποιήθηκε χωρίς να ληφθεί υπόψιν το ζ-Δυναμικό, και ο προσδιορισμός της τιμής του πραγματοποιείται πλέον για την ποιοτική ανάλυση της σταθερότητας της διασποράς των νανοσωματιδίων CS@AICIPc.

4.1.2 – Αποτελέσματα Απόδοσης Εγκλωβισμού (Encapsulation Efficiency, EE)

4.1.2.1 – Καμπύλη Βαθμονόμησης AICIPc

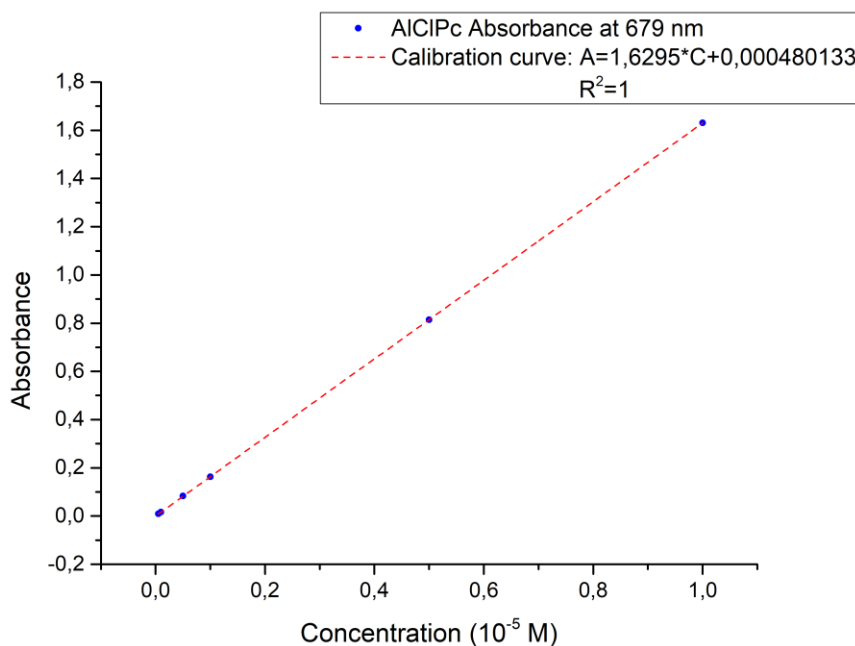
Όπως προαναφέρθηκε, ο υπολογισμός της απόδοσης εγκλωβισμού πραγματοποιήθηκε έμμεσα, με τον υπολογισμό της AICIPc που δεν εγκλωβίστηκε επιτυχώς στα νανοσωματίδια CS. Για αυτό το λόγο, σχεδιάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης της AICIPc σε διαλύτη DMSO, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση της σε διαλύματα άγνωστης συγκέντρωσης. Η καμπύλη βαθμονόμησης πραγματοποιήθηκε με λήψη των φασμάτων απορρόφησης UV/vis της AICIPc διαλυμένη σε DMSO σε έξι συνολικά διαφορετικές συγκεντρώσεις, όπως και φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.



Εικόνα 4.6: Φάσματα απορρόφησης UV/vis της AICIPc σε διάφορες συγκεντρώσεις σε εύρος 300-750 nm

Στην **Εικόνα 4.6** παρουσιάζεται το φάσμα απορρόφησης UV/vis της AICIPc σε διάφορες συγκεντρώσεις, σε διαλύτη DMSO. Γενικά, οι φθαλοκυανίνες με μέταλλο στον κυκλικό τους δακτύλιο παρουσιάζουν δύο σημαντικές ζώνες απορρόφησης, τη ζώνη Q (Q band) που εμφανίζεται στην περιοχή του φάσματος του ορατού φωτός και τη ζώνη B (B band ή Soret) που εμφανίζεται στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος. Η θέση και η ένταση αυτών των δύο ζωνών εξαρτάται τόσο από το είδος και τους υποκατάστατες της φθαλοκυανίνης όσο και από το μεταλλικό ιόν που έχει ενταχθεί στο δακτύλιο της. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η ζώνη B παρατηρείται στα 360 nm και οφείλεται σε π-π* ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις του δακτυλίου από τη θεμελιώδη S₀ κατάσταση στη δεύτερη διεγερμένη κατάσταση S₂. Η ζώνη Q παρατηρείται στα 679 nm και οφείλεται σε π-π* ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις του δακτυλίου από τη θεμελιώδη S₀ κατάσταση στην πρώτη διεγερμένη κατάσταση S₁. Επίσης, παρατηρείται και μία κορυφή απορρόφησης χαμηλότερης έντασης στα 610 nm.^{112,113}

Η καμπύλη βαθμονόμησης της AICIPc εξάγεται με βάση τη μέγιστη απορρόφησης της στην κύρια κορυφή της, δηλαδή στα 680 nm, όπου και προκύπτει η εξής καμπύλη:



Εικόνα 4.7: Καμπύλη βαθμονόμησης της AICIPc με βάση τη μέγιστη απορρόφηση της στα 679 nm

Στην **Εικόνα 4.7** παρουσιάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης της AICIPc με βάση τη μέγιστη απορρόφηση της στα 679 nm. Στον κάθετο άξονα βρίσκεται η απορρόφηση της AICIPc και στον οριζόντιο άξονα βρίσκεται η συγκέντρωσή της, όπου εφαρμόζοντας τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων για τις πειραματικές τιμές που λήφθηκαν προκύπτει η καμπύλη με την εξής εξίσωση:

$$A = 1.6295 \cdot C + 0.000480133 \quad (iv)$$

Στην (iv) το A αναφέρεται στη μέγιστη απορρόφηση της AICIPc στα 679 nm και το C στη συγκέντρωσή της. Η καμπύλη που προκύπτει παρουσιάζει συντελεστή προσδιορισμού $R^2 = 1$, το οποίο σημαίνει ότι η προσαρμογή των πειραματικών τιμών είναι πολύ καλή. Αναμενόμενα, παρατηρείται η αύξηση της απορρόφησης με την αύξηση της συγκέντρωσης, όπου και πλέον είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης της AICIPc σε διαλύματα DMSO.

4.1.2.2 – Υπολογισμός Απόδοσης Εγκλωβισμού

Στη συνέχεια θα παρουσιαστούν οι αναλυτικοί υπολογισμοί που πραγματοποιήθηκαν για τον έμμεσο προσδιορισμό της απόδοσης εγκλωβισμού της AICIPc. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, από το υπερκείμενο υγρό που συλλέγεται, ύστερα από την πραγματοποίηση της πρώτης φυγοκέντρου, αφαιρείται το νερό σε Rotanapor και πραγματοποιείται επαναδιαλυτοποίηση της AICIPc σε 10 mL DMSO (V_1). Στη συνέχεια 10 μ L (V_2) από το διάλυμα όγκου V_1 μεταφέρονται στην κυψελίδα στην οποία πραγματοποιείται η φασματομετρία απορρόφησης UV/vis, όπου και περιέχει τελικά 3 mL (V_3). Για καθ' ένα από τα 15 δείγματα που προέκυψαν από το πειραματικό σχεδιασμό, λήφθηκε το φάσμα απορρόφησης UV/vis τους σε εύρος 300 750 nm, όπου με βάση την απορρόφηση τους στα 679 nm μπορεί να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή τους C_3 , εντός της κυψελίδας. Παρακάτω αναγράφονται οι αναλυτικοί υπολογισμοί που πραγματοποιήθηκαν, όπου χρησιμοποιούνται οι τιμές που προέκυψαν για τη μη εγκλωβισμένη AICIPc στο πείραμα 1.

$$A = 1.6295 \cdot C_3 + 0,0004801 \rightarrow C_3 = \frac{A - 1.6295}{0,0004801} \xrightarrow{A=0.02874} C_3 = 1.734 \cdot 10^{-7} M$$

Από τον νόμο της αραιώσης μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση C_2 στο διάλυμα όγκου V_2 :

$$V_3 \cdot C_3 = V_2 \cdot C_2 \rightarrow C_2 = \frac{V_3 \cdot C_3}{V_2} \xrightarrow{\substack{V_2=0.01 \text{ mL} \\ V_3=3 \text{ mL}}} C_2 = 5.202 \cdot 10^{-5} M$$

Από τη C_2 υπολογίζεται και η μάζα AICIPc στο V_2 :

$$C_2 = \frac{n_2}{V_2} = \frac{m_2}{Mr \cdot V_2} \rightarrow m_2 = C_2 \cdot V_2 \cdot Mr \xrightarrow{Mr=574.97 \frac{g}{mol}} m_2 = 0,000299 \text{ mg}$$

Όμως, το διάλυμα V_2 προέρχεται από το διάλυμα V_1 , οπότε ισχύει $C_1 = C_2$, και συνεπώς μπορεί να υπολογιστεί η μάζα της AICIPc στο V_1 , η οποία αντιστοιχεί στη μη εγκλωβισμένη AICIPc:

$$C_1 = C_2 \rightarrow \frac{n_1}{V_1} = \frac{n_2}{V_2} \rightarrow \frac{m_1}{Mr \cdot V_1} = \frac{m_2}{Mr \cdot V_2} \rightarrow \frac{V_2}{V_1} = \frac{m_2}{m_1} \xrightarrow{\substack{V_2=0.01 \text{ mL} \\ V_1=10 \text{ mL}}} \frac{m_2}{m_1} = \frac{0.01}{10} = \frac{1}{1000} \rightarrow$$

$$m_1 = 1000 \cdot m_2 \rightarrow m_1 = 0.299 \text{ mg}$$

Η αρχική μάζα AICIPc που προστέθηκε στα νανοσωματίδια του πειράματος 1 είναι $m_o = 5.2 \text{ mg}$, οπότε μπορεί να υπολογιστεί και η μάζα AICIPc που τελικά εγκλωβίστηκε m_τ :

$$m_\tau = m_o - m_1 \rightarrow m_\tau = 4.9 \text{ mg}$$

Και συνεπώς η συγκέντρωση της AICIPc που συνδέθηκε θα είναι:

$$C_\tau = \frac{m_\tau}{Mr \cdot V} \xrightarrow{V=10 \text{ ml}} C_\tau = 8.52 \cdot 10^{-4} M$$

Γνωρίζοντας την τελική μάζα AICIPc που συνδέθηκε με τις CQDs είναι δυνατός ο υπολογισμός της απόδοσης εγκλωβισμού ΕΕ:

$$EE = \frac{m_\tau}{m_o} \cdot 100 \rightarrow a = 0.942 \cdot 100 = 94.2\%$$

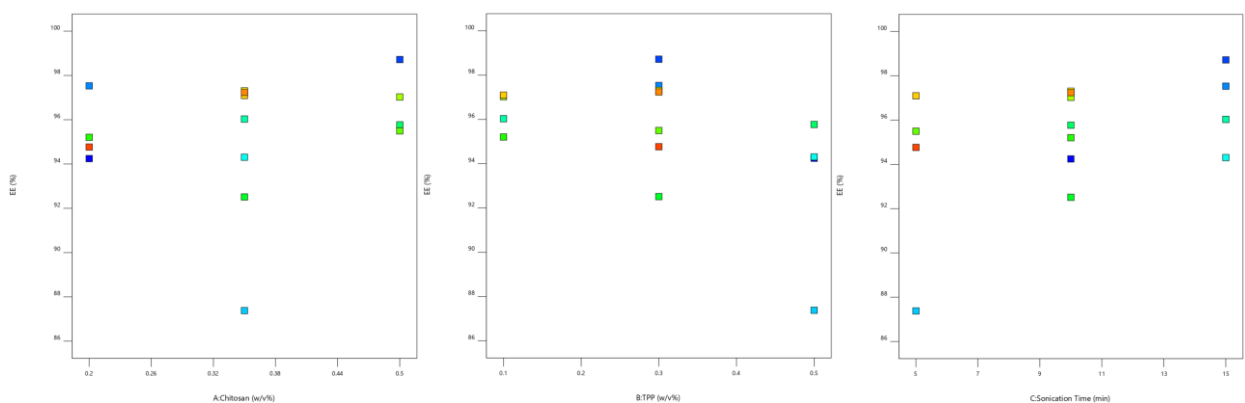
Για κάθε πείραμα ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία έτσι ώστε να υπολογιστεί η απόδοση εγκλωβισμού της AICIPc στα νανοσωματίδια CS, όπου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4.5: Τιμές ΕΕ που υπολογίστηκαν για τα νανοσωματίδια CS@AICIPc

Πείραμα	Περιεκτικότητα Χιτοζάνης (w/v%)	Περιεκτικότητα TPP (w/v%)	Χρόνος Υπερήχων (min)	Απόδοση Εγκλωβισμού AICIPc (%)
1	0.2	0.5	10	94.2
2	0.5	0.3	15	98.7
3	0.2	0.3	15	97.5
4	0.35	0.5	5	87.4

5	0.35	0.5	15	94.3
6	0.35	0.1	15	96.0
7	0.5	0.5	10	95.8
8	0.35	0.3	10	92.5
9	0.2	0.1	10	95.2
10	0.5	0.3	5	95.5
11	0.5	0.1	10	97.0
12	0.35	0.3	10	97.3
13	0.35	0.1	5	97.1
14	0.35	0.3	10	97.2
15	0.2	0.3	5	94.8

Από τις τιμές της απόδοσης εγκλωβισμού που προκύπτουν, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της επίδρασης των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών που έχουν οριστεί, δηλαδή της περιεκτικότητας χιτοζάνης (CS w/v%), της περιεκτικότητας TPP (TPP w/v%) και του χρόνου υπερήχων (ST min).



Εικόνα 4.8: Συσχέτιση της απόδοσης εγκλωβισμού (EE (%)) της AICIPc στα νανοσωματίδια CS με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% (αριστερά), TPP w/v% (κέντρο) και ST min (δεξιά)

Παρατηρήθηκε ότι όλα τα πειράματα παρουσίασαν πολύ υψηλές αποδόσεις εγκλωβισμού (>85), το οποίο και σημαίνει ότι η διαδικασία εγκλωβισμού AICIPc στα νανοσωματίδια NPs αποτελεί μία πολύ αποδοτική διεργασία. Ωστόσο, λόγω του ότι όλες οι τιμές EE που προέκυψαν στα 15 πειράματα που πραγματοποιήθηκαν είναι πολύ κοντά μεταξύ, δεν είναι δυνατόν να εξαχθεί στατιστικά σημαντικό μοντέλο πρόβλεψης της τιμής της EE, οπότε για αυτό το λόγο η EE δεν χρησιμοποιείται για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας σύνθεσης νανοσωματιδίων CS@AICIPc. Βέβαια, η EE παραμένει μία πολύ σημαντική μέτρηση που είναι απαραίτητη για την περαιτέρω χρήση των νανοσωματιδίων CS@AICIPc που παράγονται.

4.1.3 – Αποτελέσματα Ποσοστού Φόρτωσης (Drug Load, DL)

4.1.3.1 – Υπολογισμός Ποσοστού Φόρτωσης

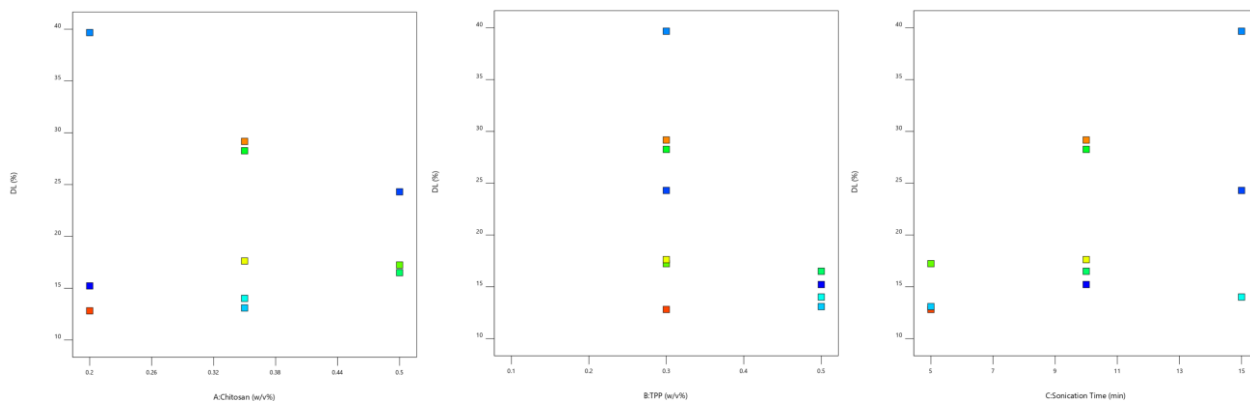
Ο υπολογισμός του ποσοστού φόρτωσης (Drug Load, DL) των 15 πειραμάτων που προέκυψαν από τον πειραματικό σχεδιασμό πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία που αναλύθηκε στο πειραματικό κομμάτι. Οι τιμές που υπολογίστηκαν για το DL των νανοσωματιδίων CS@AICIPc παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.6: Αποτελέσματα σχετικά με το DL των CS@AICIPc

Πείραμα	Περιεκτικότητα Χιτοζάνης (w/v%)	Περιεκτικότητα TPP (w/v%)	Χρόνος Υπερήχων (min)	Ποσοστό Φόρτωσης AICIPc (%)
1	0.2	0.5	10	15.2
2	0.5	0.3	15	24.3
3	0.2	0.3	15	39.7
4	0.35	0.5	5	13.1
5	0.35	0.5	15	14.0
6	0.35	0.1	15	
7	0.5	0.5	10	16.5
8	0.35	0.3	10	28.3
9	0.2	0.1	10	
10	0.5	0.3	5	17.2
11	0.5	0.1	10	
12	0.35	0.3	10	17.6
13	0.35	0.1	5	
14	0.35	0.3	10	29.2
15	0.2	0.3	5	12.8

Αρχικά, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι τιμές DL των πειραμάτων 6,9,11 και 13 απορρίφθηκαν, καθώς η τελική μάζα των νανοσωματιδίων ήταν πολύ χαμηλή, γεγονός που οδηγεί στη μεγάλη αύξηση της τιμής DL, όπου και δεν θεωρήθηκε αξιόπιστη. Συγκεκριμένα, αυτά τα τέσσερα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με χρήση περιεκτικότητας TPP w/v% ίση με 0.1 %, από το οποίο μπορεί διαπιστωθεί ότι η χαμηλή περιεκτικότητα TPP δεν ευνοεί την παραγωγή υψηλής σταθερότητας και ποσότητας νανοσωματιδίων CS@AICIPc.

Από τις υπόλοιπες τιμές του DL που προκύπτουν, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της επίδρασης των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών που έχουν οριστεί, δηλαδή της περιεκτικότητας χιτοζάνης (CS w/v%), της περιεκτικότητας TPP (TPP w/v%) και του χρόνου υπερήχων (ST min).



Εικόνα 4.9: Συσχέτιση του ποσοστού φόρτωσης (DL (%)) των νανοσωματιδίων CS@AICIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% (αριστερά), TPP w/v% (κέντρο) και ST min (δεξιά)

Από τα παραπάνω διαγράμματα αρχικά παρατηρείται ότι η περιεκτικότητα, της CS όσο δεν παρουσιάζει τόσο σημαντικό ρόλο στο τελικών DL των νανοσωματιδίων, ωστόσο παρατηρείται μία σχετική αύξηση με την αύξηση της τιμής της. Αντιθέτως, η αύξηση της τιμής του TPP παρουσιάζει και μείωση του DL στα νανοσωματίδια, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στο ότι με την αύξηση του

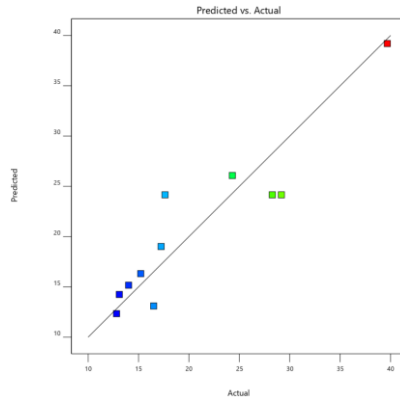
TPP αυξάνεται και η τελική μάζα των νανοσωματιδίων. Επίσης, παρατηρείται ότι η αύξηση του ST μπορεί να οδηγήσει και στην αύξηση του τελικού DL.

Για να γίνει η βελτιστοποίηση της διεργασίας, η πρόβλεψη του DL των νανοσωματιδίων πραγματοποιείται με το μοντέλο αλληλεπίδρασης δύο παραγόντων (two factor interaction, 2FI), χωρίς κάποιο μετασχηματισμό. Η εξίσωση που αποτελείται από τους όρους A, B, C, AB, AC, BC όπου και αντιστοιχούν στις ανεξάρτητες μεταβλητές A = CS w/v%, B = TPP w/v% και C = ST min. Η στατιστική ανάλυση του μοντέλου πραγματοποιείται μέσω ANOVA, όπου για να προκύψει στατιστικά σημαντικό μοντέλο πρόβλεψης χρειάστηκε να αφαιρεθεί ο όρος AB. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν παρουσιάζονται στον **Πίνακας 4.7**.

Πίνακας 4.7: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA σχετικά με το DL των νανοσωματιδίων CS@AICIPc

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	628.9	5	125.78	5.88	0.0371	significant
A-Chitosan	15.58	1	15.58	0.7285	0.4324	
B-TPP	227.23	1	227.23	10.62	0.0225	
C-Sonication Time	287.68	1	287.68	13.45	0.0145	
AC	97.98	1	97.98	4.58	0.0853	
BC	85.76	1	85.76	4.01	0.1016	
Residual	106.94	5	21.39			
Lack of Fit	24.47	3	8.16	0.1978	0.8905	not significant
Pure Error	82.47	2	41.23			
Cor Total	735.83	10				

Από το μοντέλο της στατιστικής ανάλυσης προκύπτει p-value ίσο με 0.0371, το οποίο και σημαίνει ότι το παρόν μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό (<0.05). Συγκεκριμένα παρατηρείται και ότι ο όρος A (CS) δεν είναι στατιστικά σημαντικός. Επιπλέον το F-value που προκύπτει ισούται με 5.88, το οποίο επίσης υποδεικνύει ότι το μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό, όπου και σημαίνει ότι υπάρχει μόνο 3.71% πιθανότητα αυτή η τιμή να προέκυψε λόγω θορύβου. Επίσης, η έλλειψη προσαρμογής του F-value (Lack of fit) που προκύπτει είναι 0.1978, το οποίο και σημαίνει ότι δεν είναι στατιστικά σημαντικό, καθώς η πιθανότητα της μη προσαρμογής του μοντέλου να οφείλεται σε θόρυβο είναι 89.05%. Η τελική τιμή του συντελεστή προσδιορισμού που προκύπτει είναι $R^2 = 0.8547$, γεγονός που σημαίνει ότι η προσαρμογή των πειραματικών τιμών στο μοντέλο είναι καλή, όπου και είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι υπάρχει μια σχετικά υψηλή διαφορά ανάμεσα στην προβλεπόμενη και προσαρμοσμένη τιμή.



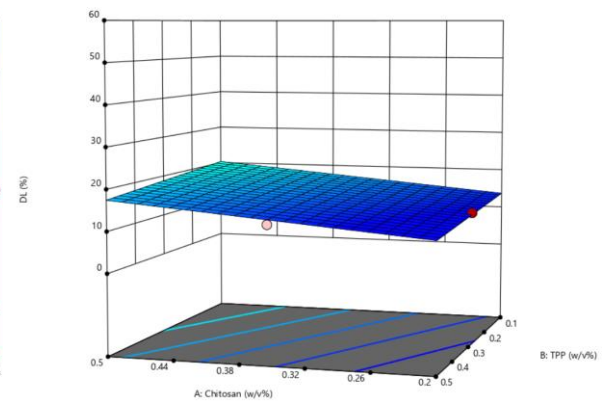
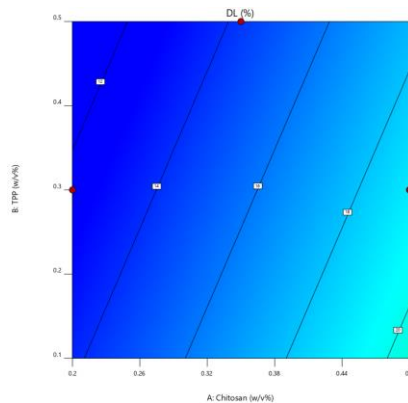
Εικόνα 4.10: Συσχέτιση πειραματικών και προβλεπόμενων τιμών από το μοντέλο για το DL των νανοσωματιδίων CS@AICIPc

Η εξίσωση εξάρτησης του μεγέθους των νανοσωματιδίων CS@AICIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές παρουσιάζεται παρακάτω:

$$DL = -22.030 + 55.247 \cdot CS + 32.960 \cdot TPP + 6.412 \cdot ST - 6.599 \cdot CS \cdot ST - 8.020 \cdot TPP \cdot ST \quad (v)$$

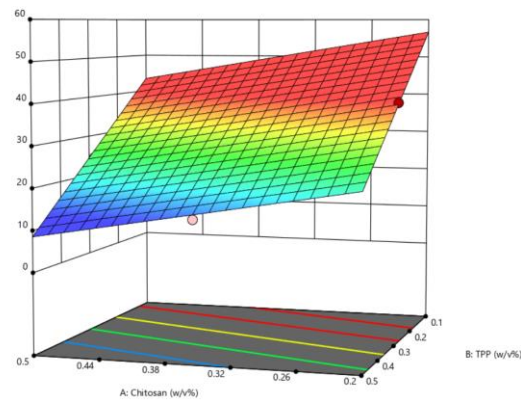
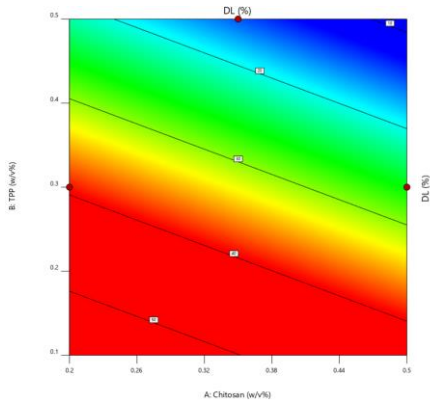
Στη συνέχεια παρουσιάζονται δισδιάστατα και τρισδιάστατα διαγράμματα συσχέτισης του μεγέθους των νανοσωματιδίων CS@AICIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές.

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 12.8135 39.6732
 X1 = A: Chitosan
 X2 = B: TPP
 Actual Factor
 C: Sonication Time = 5



Εικόνα 4.11: Απεικόνιση της συσχέτισης του DL των νανοσωματιδίων CS@AICIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% και TPP w/v% σε δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) κατανομή, για ST = 5 min

Factor Coding: Actual
 ● Design Points
 12.8135 39.6732
 X1 = A: Chitosan
 X2 = B: TPP
 Actual Factor
 C: Sonication Time = 15



Εικόνα 4.12: Απεικόνιση της συσχέτισης του DL των νανοσωματιδίων CS@AICIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% και TPP w/v% σε δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) κατανομή, για ST = 15 min

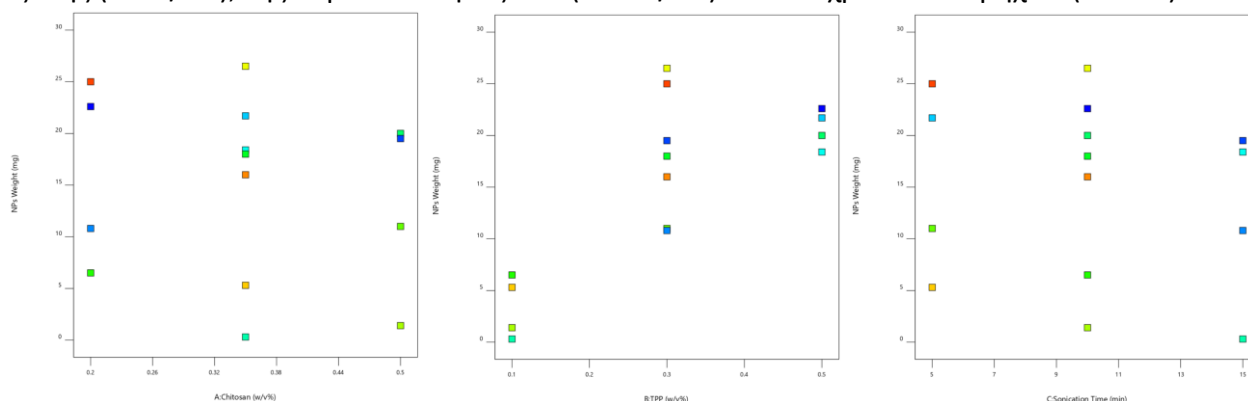
4.1.3.2 – Μάζα Νανοσωματιδίων CS@AICIPc που συλλέχθηκε

Το τελευταίο μοντέλο πρόβλεψης που πραγματοποιήθηκε αφορά την τελική μάζα των νανοσωματιδίων CS@AICIPc που συλλέχθηκε (NPs Weight (mg)). Οι τιμές της μάζας των νανοσωματιδίων CS@AICIPc παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.8: Τιμές μάζας που συλλέχθηκε από τα CS@AICIPc

Πείραμα	Περιεκτικότητα Χιτοζάνης (w/v%)	Περιεκτικότητα TPP (w/v%)	Χρόνος Υπερήχων (min)	Μάζα Νανοσωματιδίων που συλλέχθηκε (mg)
1	0.2	0.5	10	22.6
2	0.5	0.3	15	19.5
3	0.2	0.3	15	10.8
4	0.35	0.5	5	21.7
5	0.35	0.5	15	18.4
6	0.35	0.1	15	0.3
7	0.5	0.5	10	20
8	0.35	0.3	10	18
9	0.2	0.1	10	6.5
10	0.5	0.3	5	11
11	0.5	0.1	10	1.4
12	0.35	0.3	10	26.5
13	0.35	0.1	5	5.3
14	0.35	0.3	10	16
15	0.2	0.3	5	25

Από τη μάζα των νανοσωματιδίων CS@AICIPc που συλλέχθηκε, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της επίδρασης των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών που έχουν οριστεί, δηλαδή της περιεκτικότητας χιτοζάνης (CS w/v%), της περιεκτικότητας TPP (TPP w/v%) και του χρόνου υπερήχων (ST min).



Εικόνα 4.13: Συσχέτιση της μάζας των νανοσωματιδίων CS@AICIPc που συλλέχθηκε (NPs Weight (mg)) με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% (αριστερά), TPP w/v% (κέντρο) και ST min (δεξιά)

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι η πιο σημαντική ανεξάρτητη μεταβλητή, σχετικά με τη μάζα των νανοσωματιδίων που συλλέχθηκε, είναι η περιεκτικότητα TPP, όπου και παρατηρείται η αύξηση της τελικής μάζας με την αύξηση της περιεκτικότητας. Όπως αναφέρθηκε και κατά τους υπολογισμούς του DL, οι ποσότητες των νανοσωματιδίων CS@AICIPc που παράχθηκαν με TPP 0.1 w/v% είναι πολύ χαμηλές, το οποίο απεικονίζεται και στο παραπάνω διάγραμμα όπου και φαίνεται η χαμηλή ποσότητα που τελικά ήταν δυνατόν να συλλεχθεί. Αντιθέτως, οι άλλες δύο ανεξάρτητες μεταβλητές δεν φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά την τελική ποσότητα των

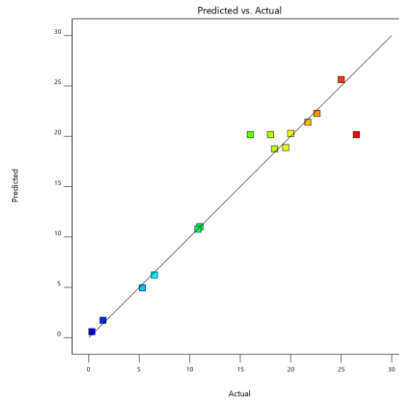
νανοσωματιδίων που παράγεται και συλλέγεται. Αυτό είναι λογικό, καθώς ο σχηματισμός των νανοσωματιδίων χιτοζάνης, κατά τη μέθοδο ιονικής πηγμάτωσης, πραγματοποιείται με την αλληλεπίδρασή της με το cross-linker, δηλαδή το TPP. Οπότε είναι λογικό ότι η αύξηση της ποσότητας του TPP θα επιφέρει και αύξηση στο σχηματισμό των νανοσωματιδίων.

Για να γίνει η βελτιστοποίηση της διεργασίας, η πρόβλεψη της μάζας των νανοσωματιδίων που συλλέγεται πραγματοποιείται με το τετραγωνικό μοντέλο (Quadratic), χωρίς κάποιο μετασχηματισμό. Η εξίσωση του μοντέλου αποτελείται από τους όρους A, B, C, AB, AC, BC, A², B², C² όπου και αντιστοιχούν στις ανεξάρτητες μεταβλητές A = CS w/v%, B = TPP w/v% και C = ST min. Η στατιστική ανάλυση του μοντέλου πραγματοποιείται μέσω ANOVA, όπου και τελικός προκύπτει στατιστικά σημαντικό μοντέλο πρόβλεψης. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.9.

Πίνακας 4.9: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης ANOVA σχετικά με το μέγεθος των νανοσωματιδίων CS@AICIPc

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	938.74	9	104.3	8.18	0.0161	significant
A-Chitosan	21.13	1	21.13	1.66	0.2543	
B-TPP	598.58	1	598.58	46.96	0.001	
C-Sonication Time	24.5	1	24.5	1.92	0.2243	
AB	1.56	1	1.56	0.1226	0.7405	
AC	128.82	1	128.82	10.11	0.0246	
BC	0.7225	1	0.7225	0.0567	0.8213	
A ²	5.28	1	5.28	0.4142	0.5482	
B ²	148.69	1	148.69	11.66	0.0189	
C ²	21.19	1	21.19	1.66	0.2537	
Residual	63.74	5	12.75			
Lack of Fit	1.57	3	0.5233	0.0168	0.9961	not significant
Pure Error	62.17	2	31.08			
Cor Total	1002.47	14				

Από το μοντέλο της στατιστικής ανάλυσης προκύπτει p-value ίσο με 0.0161, το οποίο και σημαίνει ότι το παρόν μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό (<0.05). Συγκεκριμένα παρατηρείται ότι στατιστικά σημαντικοί είναι κυρίως οι όροι που σχετίζονται με το TPP. Επιπλέον το F-value που προκύπτει ισούται με 8.18, το οποίο επίσης υποδεικνύει ότι το μοντέλο είναι στατιστικά σημαντικό, όπου και σημαίνει ότι υπάρχει μόνο 1.61% πιθανότητα αυτή η τιμή να προέκυψε λόγω θορύβου. Επίσης, η έλλειψη προσαρμογής του F-value (Lack of fit) που προκύπτει είναι 0.0168, το οποίο και σημαίνει ότι δεν είναι στατιστικά σημαντικό, καθώς η πιθανότητα της μη προσαρμογής του μοντέλου να οφείλεται σε θόρυβο είναι 99.61%. Η τελική τιμή του συντελεστή προσδιορισμού που προκύπτει είναι R² = 0.9364, γεγονός που σημαίνει ότι η προσαρμογή των πειραματικών τιμών στο μοντέλο είναι πάρα πολύ καλή, όπου επίσης παρατηρείται ότι δεν υπάρχει υψηλή διαφορά ανάμεσα στην προβλεπόμενη και προσαρμοσμένη τιμή.

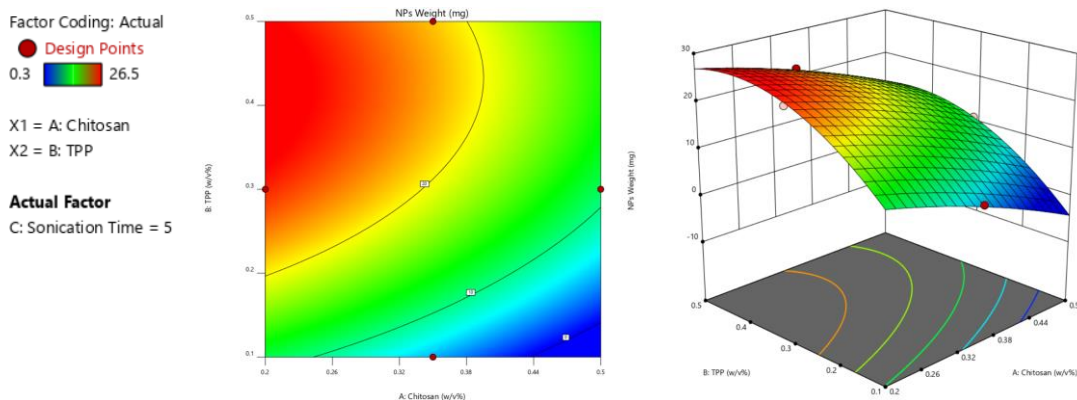


Εικόνα 4.14: Συσχέτιση πειραματικών και προβλεπόμενων τιμών από το μοντέλο για τη μάζα των νανοσωματιδίων CS@AICIPc

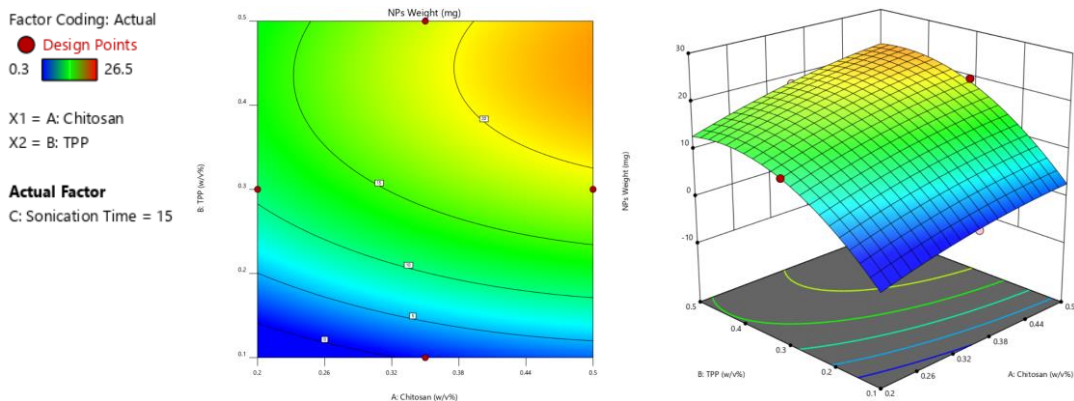
Η εξίσωση εξάρτησης του μεγέθους των νανοσωματιδίων CS@AICIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές παρουσιάζεται παρακάτω:

$$\begin{aligned}
 NPs\ Weight = & 14.057 - 55.546 \cdot CS + 126.896 \cdot TPP - 1.209 \cdot ST + 20.833 \cdot CS \cdot TPP \quad (vi) \\
 & + 7.567 \cdot CS \cdot ST + 0.425 \cdot TPP \cdot ST - 53.148 \cdot CS^2 - 158.646 \cdot TPP^2 \\
 & - 0.096 \cdot ST^2
 \end{aligned}$$

Στη συνέχεια παρουσιάζονται δισδιάστατα και τρισδιάστατα διαγράμματα συσχέτισης του μεγέθους των νανοσωματιδίων CS@AICIPc με τις ανεξάρτητες μεταβλητές.



Εικόνα 4.15: Απεικόνιση της συσχέτισης της μάζας των νανοσωματιδίων CS@AICIPc που συλλέχθηκε με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% και TPP w/v% σε δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) κατανομή, για ST = 5 min



Εικόνα 4.16: Απεικόνιση της συσχέτισης της μάζας των νανοσωματιδίων CS@AICIPc που συλλέχθηκε με τις ανεξάρτητες μεταβλητές CS w/v% και TPP w/v% σε δισδιάστατη (αριστερά) και τρισδιάστατη (δεξιά) κατανομή, για ST = 15 min

4.1.4 – Βελτιστοποίηση Μοντέλου Πειραματικού Σχεδιασμού

Με βάση το μοντέλο πρόβλεψης που εξάχθηκε πραγματοποιήθηκε η βελτιστοποίηση της διεργασίας σύνθεσης νανοσωματιδίων CS@AICIPc, προσδιορίζοντας τις βέλτιστες τιμές των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών, δηλαδή της περιεκτικότητας CS (w/v%), της περιεκτικότητας TPP (w/v%) και του χρόνου υπερήχων ST (min). Η βελτιστοποίηση πραγματοποιήθηκε ως προς τριών εξαρτημένων μεταβλητών, το υδροδυναμικό μέγεθος των νανοσωματιδίων, το ποσοστό φόρτωσης της AICIPc και της μάζας που συλλέχθηκε. Όπως προαναφέρθηκε, δεν ήταν δυνατή η εξαγωγή στατιστικά σημαντικών μοντέλων πρόβλεψης για το ζ-Δυναμικό και το EE, οπότε για αυτό το λόγο δεν χρησιμοποιήθηκαν και στη βελτιστοποίηση της διεργασίας. Για την πραγματοποίηση της βελτιστοποίηση ορίστηκαν τα άνω και κάτω όρια των ανεξάρτητων μεταβλητών, τα άνω και κάτω όριο που προέκυψαν πειραματικά των εξαρτημένων μεταβλητών, καθώς και τα επιθυμητά κριτήρια βελτιστοποίησης των εξαρτημένων μεταβλητών, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4.10: Άνω και κάτω όριο των ανεξάρτητων και εξαρτημένων μεταβλητών και κριτήρια βελτιστοποίησης για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας σύνθεσης νανοσωματιδίων CS@AICIPc

Μεταβλητές	Κάτω Όριο	Άνω Όριο	Κριτήριο Βελτιστοποίησης
Ανεξάρτητες Μεταβλητές			
CS (w/v%)	0.2	0.5	
TPP (w/v%)	0.1	0.5	
ST (min)	5	15	
Εξαρτημένες Μεταβλητές			
Size (nm)	196	373.5	Ελαχιστοποίηση
DL (%)	12.8	39.7	Μεγιστοποίηση
NPs weight (mg)	0.3	26.5	Μεγιστοποίηση

Στον **Πίνακα 4.11** παρουσιάζονται οι βέλτιστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών και οι προβλεπόμενες τιμές των εξαρτημένων τιμών, με βάση τη στατιστική ανάλυση και τα μοντέλα πρόβλεψης που πραγματοποιήθηκαν.

Πίνακας 4.11: Βέλτιστες τιμές ανεξάρτητων μεταβλητών και προβλεπόμενες τιμές εξαρτημένων μεταβλητών

Ανεξάρτητες Μεταβλητές	Βέλτιστες τιμές	Εξαρτημένες Μεταβλητές	Προβλεπόμενες Τιμές
CS (w/v%)	0.41	Size (nm)	231.5
TPP (w/v%)	0.19	DL (%)	39.3
ST (min)	15	NPs weight (mg)	10.6

Για την επιβεβαίωση του μοντέλου που εξάχθηκε πραγματοποιήθηκε η σύνθεση τριών όμοιων δειγμάτων με βάση τις τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών που προέκυψαν. Η διαδικασία σύνθεσης που πραγματοποιήθηκε ήταν ακριβώς η ίδια με αυτή που πραγματοποιήθηκε για τα 15 πειράματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον πειραματικό σχεδιασμό. Από αυτά τα τρία δείγματα νανοσωματιδία CS@AICIPc προσδιορίστηκαν οι τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών προς βελτιστοποίηση, καθώς και οι τιμές του ζ-Δυναμικού και EE, οι οποίες παρόλο που δεν χρησιμοποιήθηκαν στο μοντέλο πρόβλεψης παρέχουν απαραίτητες πληροφορίες σχετικά με τα δείγματα. Στον **Πίνακα 4.12** παρουσιάζονται οι τιμές που προέκυψαν για τα τρία δείγματα επιβεβαίωσης.

Πίνακας 4.12: Πειραματικές τιμές που προέκυψαν για τα τρία δείγματα επιβεβαίωσης μοντέλου που παράχθηκαν

Δείγμα	Size (nm)	PDI (0-1)	Zeta potential (mV)	EE (%)	DL (%)	NPs Weight (mg)
CS@AICIPc_1	238.6	0.382	5.8	94.4	30.2	10.2
CS@AICIPc_2	221	0.332	3.8	95.9	31.6	12.3
CS@AICIPc_3	238.1	0.381	8.6	96.3	37.9	8.7

Οπότε με βάση τον μέσο όρο των πειραματικών τιμών που προέκυψαν, διαπιστώθηκε η ορθότητα του μοντέλου, καθώς οι παραπάνω τιμές είναι εντός των ορίων του μοντέλου πρόβλεψης, σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%, όπως παρατηρείται και στον Πίνακα 4.13.

Πίνακας 4.13: Επιβεβαίωση μοντέλου πρόβλεψης για νανοσωματίδια CS@AICIPc για διάστημα εμπιστοσύνης 95%

Response	Predicted Mean	Predicted Median	Std Dev	n	SE Pred	95% PI low	Data Mean	95% PI high
Size	231.5	231.5	42.3	3	32.4	160.3	232.6	302.8
DL	39.3	39.3	4.6	3	5.8	24.4	33.3	54.2
NPs Weight	10.6	10.6	3.6	3	3.2	2.3	10.4	18.9

- **Predicted Mean/Median:** Μέσος όρος/Διάμεσος που προβλέπεται από το μοντέλο
- **Std Dev:** Τυπική απόκλιση προβλεπόμενων τιμών
- **n:** Αριθμός πειραμάτων επιβεβαίωσης μοντέλου που πραγματοποιήθηκαν
- **SE Pred:** Τυπικό σφάλμα προβλεπόμενων τιμών
- **PI low/high:** Ελάχιστη/Μέγιστη πιθανή τιμή που προκύπτει από το μοντέλο για διάστημα εμπιστοσύνης 95%
- **Data Mean:** Μέσος όρος πειραματικών τιμών

Μια ακόμα θετική παρατήρηση είναι ότι οι πειραματικές τιμές που προέκυψαν είναι αρκετά κοντά στο μέσο όρο των προβλεπόμενων τιμών, καθώς επίσης τα τρία δείγματα δεν διαφέρουν πολύ μεταξύ τους. Και τα τρία δείγματα νανοσωματιδίων που παράχθηκαν παρουσιάζουν σχετικά καλές τιμές πολυδιασποράς PDI, το οποίο και σημαίνει ότι παρουσιάζουν καλή κατανομή μεγέθους. Επιπλέον, και τα τρία δείγματα παρουσίασαν θετική τιμή ζ-Δυναμικού, το οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί στον επιτυχή εγκλωβισμό της AICIPc από τη χιτοζάνη. Ωστόσο, οι χαμηλές σχετικά τιμές του ζ-Δυναμικού σημαίνουν ότι η διασπορά δεν είναι ιδανική και ότι πιθανόν να παρατηρείται αυξημένη τάση συσσωμάτωσης. Τέλος, παρατηρήθηκαν και στα τρία δείγματα υψηλές αποδόσεις εγκλωβισμού της AICIPc, όπως και ήταν αναμενόμενο από τα προηγούμενα πειράματα που είχαν διεξαχθεί.

Εκτός των τριών δειγμάτων που παράχθηκαν για την επιβεβαίωση του μοντέλου, πραγματοποιήθηκε και η σύνθεση νανοσωματιδίων χιτοζάνης (CS_Blank) χωρίς εγκλωβισμό AICIPc.

Πίνακας 4.14: Χαρακτηριστικά κενών νανοσωματιδίων CS_Blank

Δείγμα	Size (nm)	PDI (0-1)	Zeta potential (mV)	NPs Weight (mg)
CS_Blank_1	269.4	0.443	-17	2.2
CS_Blank_2	346.5	0.340	-10.2	1.6
CS_Blank_3	415	0.430	13.8	3.5

Στον Πίνακα 4.14 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων CS_Blank σχετικά με το μέγεθος, τη διασπορά, το ζ-Δυναμικό και τη μάζα που συλλέχθηκε. Τα δύο πρώτα δείγματα συντέθηκαν με ακριβώς την ίδια διαδικασία (χωρίς βέβαια το στάδιο προσθήκης AICIPc) και τις ίδιες ακριβώς αναλογίες αντιδρώντων με τα δείγματα νανοσωματιδίων CS@AICIPc που παράχθηκαν για την επιβεβαίωση του μοντέλου. Ωστόσο, τα νανοσωματίδια CS_Blank δεν παρουσίασαν ιδανικά και επιθυμητά χαρακτηριστικά. Αρχικά, παρατηρείται αύξηση του μεγέθους τους σε σχέση με τα νανοσωματίδια CS@AICIPc, όπου αναμενόταν το αντίθετο. Επιπλέον, παρατηρείται ότι το ζ-Δυναμικό παρουσιάζει αρνητική τιμή, το οποίο είναι επίσης αντίθετο με την αναμενόμενη εκτίμηση καθώς η χιτοζάνη είναι κατιονικής φύσης. Τέλος, η ποσότητα των νανοσωματιδίων που συλλέχθηκε (και τελικώς παράχθηκε) ήταν πάρα πολύ χαμηλή. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η σταθερότητα των νανοσωματιδίων CS_Blank, δεν είναι καλή. Το αρνητικό ζ-Δυναμικό κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στο cross-linker, το TPP, όπου σε συνδυασμό με τη χαμηλή μάζα των νανοσωματιδίων που παράχθηκε συμπεραίνεται ότι αντί να πραγματοποιηθεί η ιζηματοποίηση και διασπορά των νανοσωματιδίων εντός του νερού, κυριαρχεί η επαναδιαλυτοποίησή τους.

Το γεγονός ότι τα νανοσωματίδια CS_Blank διαφέρουν έντονα από τα βελτιστοποιημένα CS@AICIPc, αποδίδεται στο ότι το μοντέλο πρόβλεψης που εξάχθηκε απευθύνεται σε νανοσωματίδια χιτοζάνης με εγκλωβισμό AICIPc. Από την κακή σταθερότητα των CS_Blank, μπορεί να συμπεραθεί ότι η AICIPc, και πιθανόν και η ακετόνη στην οποία διαλύεται και προστίθεται η AICIPc κατά τη σύνθεση, συμβάλλουν θετικά στο σχηματισμό και στη σταθερότητα των νανοσωματιδίων CS@AICIPc, υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες και αναλογίες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η σύνθεσή τους. Επιπλέον, η παρατήρηση αρνητικού ζ-δυναμικού που παρατηρείται στα κενά νανοσωματίδια χιτοζάνης σημαίνει και ότι η αρνητική τιμή του ζ-δυναμικού που παρατηρείται σε μερικά πειράματα στον Πίνακα 4.1, κατά πάσα πιθανότητα δεν οφείλεται στην AICIPc, αλλά στο TPP και στη σταθερότητα των νανοσωματιδίων.

Με σκοπό την εύρεση του παράγοντα που οφείλεται για την κακή σταθερότητα των νανοσωματιδίων CS_Blank, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του δείγματος CS_Blank_3. Στο συγκεκριμένο δείγμα, το βήμα των υπερήχων πραγματοποιήθηκε για 10 λεπτά, αντί για 15 λεπτά. Από ότι φαίνεται από τον Πίνακα 4.14, το δείγμα CS_Blank_3 παρουσιάζει αναμενόμενα ελαφρώς αυξημένο μέγεθος, αλλά και θετικό ζ-Δυναμικό, όπου και τελικά παράχθηκε και συλλέχθηκε λίγο παραπάνω ποσότητα. Για τη σύνθεση των CS_Blank παρατηρείται ότι η αύξηση του χρόνου υπερήχων είναι πολύ πιθανόν να επιφέρει αρνητικές επιπτώσεις στα χαρακτηριστικά τους, συγκεκριμένα στη σταθερότητα της διασποράς τους.



Εικόνα 4.17: Νανοσωματίδια CS_Blank (λευκά) και CS@AIClPc (πράσινα) σε υδατική διασπορά (αριστερά) και λυοφιλιωμένα (δεξιά)

4.2 – Χαρακτηρισμός AIClPc, CS@AIClPc NPs και CS_Blank NPs

Οι χαρακτηρισμοί που πραγματοποιήθηκαν για την ελεύθερη AIClPc, τα νανοσωματίδια CS@AIClPc και CS_Blank, έχουν ως σκοπό τον προσδιορισμό των φωτοφυσικών ιδιοτήτων τους (φασματομετρίες UV/vis και PL) και της δομής τους (φασματομετρία FTIR). Η μελέτη της ελεύθερης AIClPc πραγματοποιήθηκε από ένα stock διάλυμα της με συγκέντρωση $C = 10^{-2}$ M σε διαλύτη DMSO. Για τη μελέτη των νανοσωματιδίων με εγκλωβισμένη AIClPc επιλέχθηκε το δείγμα CS@AIClPc_1, όπου και πραγματοποιήθηκε επαναδιασπορά του λυοφιλιωμένου δείγματος σε υπερκάθαρο νερό. Η τελική διασπορά του δείγματος παρουσίαζε συγκέντρωση AIClPc $C = 10^{-3}$ M. Τέλος, ο χαρακτηρισμός των κενών νανοσωματιδίων χιτοζάνης έγινε με την επαναδιασπορά του δείγματος CS_Blank_3, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή του να είναι $C = 280$ $\mu\text{g/ml}$.

Πίνακας 4.15: Χαρακτηριστικά δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν

Δείγμα	Διαλύτης	Συγκέντρωση AIClPc (M)	Υδροδυναμική διάμετρος (nm)	PDI (0-1)	ζ-Δυναμικό (mV)
Stock AIClPc	DMSO	10^{-2}			
CS@AIClPc_1	Υπερκάθαρο Νερό	10^{-3}	333.9 ± 14.5	0.447 ± 0.033	19.1 ± 1.4
CS_Blank_3	Υπερκάθαρο Νερό		391.2 ± 28.9	0.299 ± 0.091	-10.4 ± 7.3

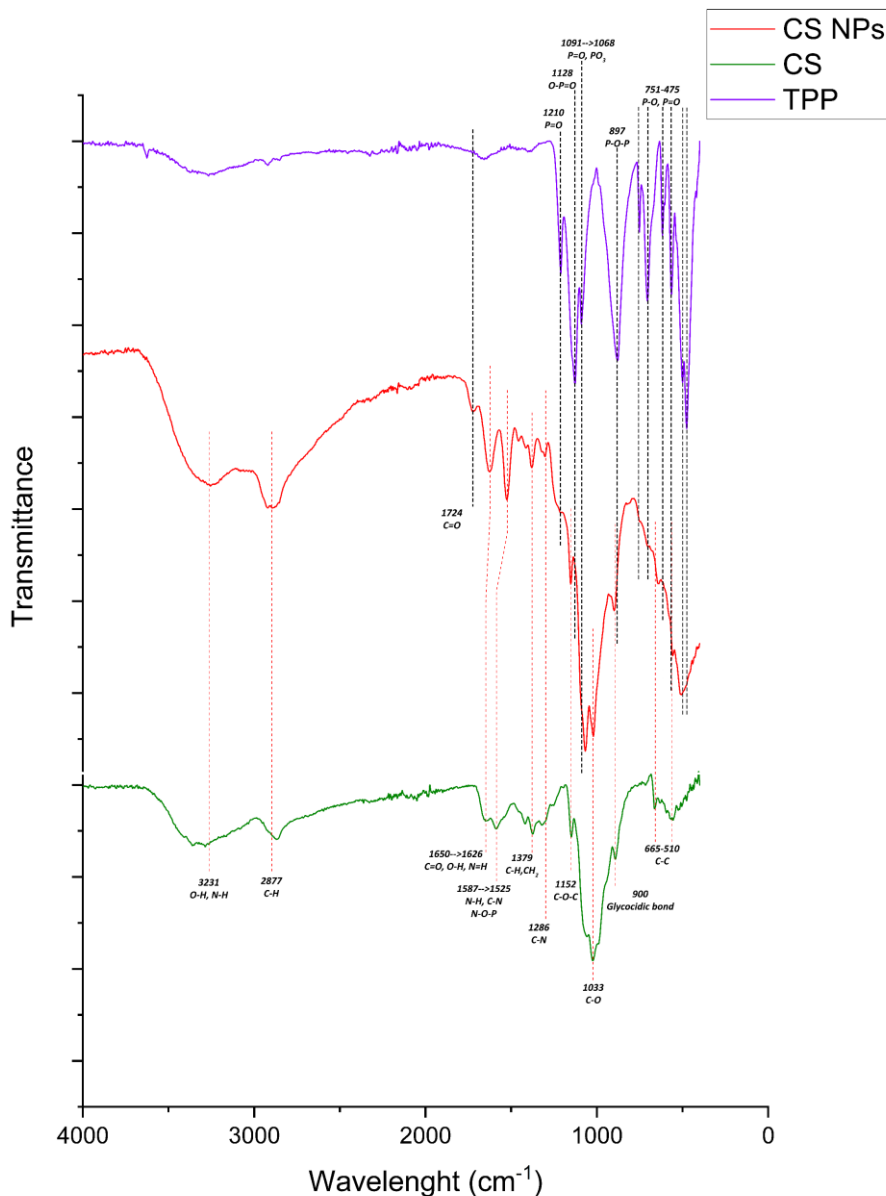
Σχετικά με τα δείγματα των νανοσωματιδίων παρατηρείται αύξηση του μεγέθους τους και στο δείκτη πολυδιασποράς PDI, το οποίο είναι αναμενόμενα μετά την λυοφιλίωση και επαναδιασπορά τους. Επίσης παρατηρείται και αύξηση της τιμής του ζ-Δυναμικού για το δείγμα CS@AIClPc_1, το οποίο σημαίνει ότι είναι βελτιωμένη η σταθερότητα της διασποράς, ενώ το δείγμα CS_Blank_3 παρουσίασε αρνητική τιμή ζ-δυναμικού, το οποίο πιθανόν να οφείλεται στη χαμηλή σταθερότητά τους, και πιθανή διαλυτοποίηση ποσότητάς τους.

4.2.1 – Αποτελέσματα Φασματομετρίας FTIR

Η φασματομετρία FTIR αρχικά πραγματοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της επιτυχής σύνθεσης των νανοσωματιδίων χιτοζάνης, συγκρίνοντας τα φάσματα της χιτοζάνης, του TPP και των νανοσωματιδίων χιτοζάνης, τα οποία αποτελούνται τόσο από χιτοζάνη όσο και από TPP. Στη

συνέχεια, επιβεβαιώθηκε και ο εγκλωβισμός της AICIPc στα νανοσωματίδια χιτοζάνης, με βάση τη σύγκριση των φασμάτων των νανοσωματιδίων χιτοζάνης, των νανοσωματιδίων CS@AICIPc και της ελεύθερης AICIPc.

4.2.1.1 - Αποτελέσματα Φασματομετρίας FTIR για νανοσωματίδια CS



Εικόνα 4.18: Φάσματα FTIR χιτοζάνης, TPP και νανοσωματιδίων χιτοζάνης

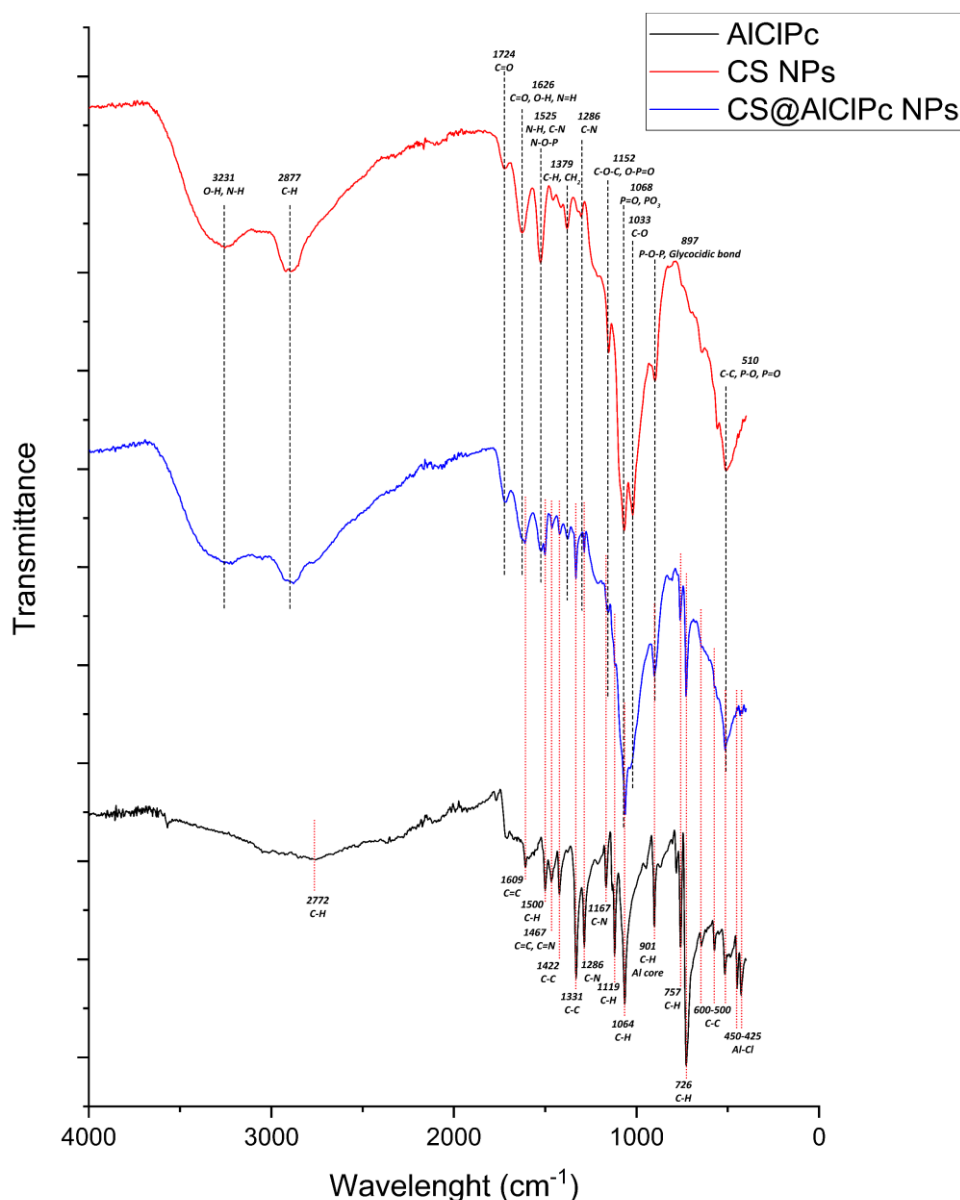
Αρχικά, από το φάσμα της σκέτης χιτοζάνης παρατηρείται μία ευρεία κορυφή στα περίπου 3231 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στις δονήσεις εκτάσεως (stretching) δεσμών O-H, από καρβοξυλομάδες και υδροξυλομάδες στη δομή της χιτοζάνης. Επιπλέον σε αυτών τον κυματαριθμό παρατηρούνται και κορυφές που αποδίδονται στις δονήσεις εκτάσεων των δεσμών N-H, οι οποίες στη συγκεκριμένη περίπτωση επικαλύπτονται από τις κορυφές των δεσμών O-H. Η κορυφή στα 2877 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις εκτάσεων των δεσμών C-H, των ατόμων άνθρακα της χιτοζάνης που παρουσιάζουν υβριδισμό sp^3 . Στα 1650 cm^{-1} η κορυφή που παρατηρείται οφείλεται κυρίως σε δονήσεις εκτάσεων των δεσμών C=O και N-H αμιδίων I (C=ONH), και σε μικρότερο βαθμό σε δονήσεις κάμψεων δεσμών

O-H. Η κορυφή στα 1587 cm^{-1} αποδίδεται δονήσεις εκτάσεως και κάμψης των δεσμών C-N και N-H από ομάδες αμιδίων II. Η κορυφή στα 1379 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις κάμψεων δεσμών C-H, ενώ η κορυφή στα 1286 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις εκτάσεως των δεσμών C-N από αμίδια III. Στα 1152 cm^{-1} η κορυφή που παρατηρείται οφείλεται στις αντισυμμετρικές δονήσεις εκτάσεων των δεσμών C-O-C στη δομή της χιτοζάνης. Η έντονη κορυφή που παρατηρείται στα 1033 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις εκτάσεων των δεσμών C-O και η χαμηλής έντασης κορυφή στα 900 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί στον γλυκοσιδικό δεσμό της χιτοζάνης. Τέλος, οι κορυφές που παρατηρούνται σε κυματαριθμούς χαμηλότερους από τα 600 cm^{-1} οφείλονται σε δονήσεις εκτάσεων δεσμών C-C.^{100,101,114-118}

Σχετικά με το TPP, η πρώτη σημαντική κορυφή εντοπίζεται στα 1210 cm^{-1} , όπου και αποδίδεται σε δονήσεις εκτάσεως του δεσμού P=O. Η κορυφή στα 1128 cm^{-1} αφορά τις συμμετρικές και αντισυμμετρικές δονήσεις εκτάσεων των δεσμών O-P=O, ενώ η κορυφή στα 1091 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις εκτάσεως που προέρχονται από του δεσμού P=O και PO₃. Στη συνέχεια η κορυφή που παρατηρείται στα 897 cm^{-1} αποδίδεται στις αντισυμμετρικές δονήσεις εκτάσεων των δεσμών P-O-P, όπου τελικά, οι κορυφές που παρουσιάζουν κυματαριθμούς χαμηλότερους από τα 750 cm^{-1} μπορούν να αποδοθούν σε δονήσεις εκτάσεων τόσο των δεσμών P-O όσο και των δεσμών P=O.^{100,101,114-118}

Τελικώς, λήφθηκε το φάσμα των νανοσωματιδίων χιτοζάνης, όπου και επιβεβαιώνεται η σύνδεση της χιτοζάνης με το cross-linker TPP. Αυτό παρατηρείται αρχικά από την ενίσχυση του σήματος της κορυφής με κυματαριθμό 3231 cm^{-1} , όπου η αύξηση της έντασης οφείλεται στους δεσμούς υδρογόνου που έχουν αναπτυχθεί ανάμεσα στη χιτοζάνη και το TPP. Στη συνέχεια παρατηρείται μία νέα κορυφή στα 1724 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στους δεσμούς εκτάσεως C=O των αμιδίων της χιτοζάνης, τα οποία επηρεάζονται από την παρουσία του TPP. Αυτό παρατηρείται επίσης και από τις μετατοπίσεις των κορυφών της χιτοζάνης στα 1650 και 1587 cm^{-1} , στις νέες τιμές στα 1628 και 1525 cm^{-1} , αντίστοιχα, γεγονός που οφείλεται στην αλληλεπίδραση του TPP με τις αμινομάδες της χιτοζάνης, όπου και αναπτύσσονται δεσμοί N-O-P. Εκτός αυτού, παρατηρείται ελαφριά ενίσχυση της κορυφής στα 1379 cm^{-1} , το οποίο αποδίδεται στην ενίσχυση της γωνιακής κάμψης των δεσμών C-H των ομάδων CH₂, λόγω της ενίσχυσης της πόλωσης των καρβονυλομάδων μετά την αλληλεπίδραση με της χιτοζάνης με το TPP. Σχετικά με το TPP, παρατηρείται μετατόπιση της κορυφής των δεσμών P=O και PO₃, από τα 1091 cm^{-1} στα 1068 cm^{-1} , κατά την αλληλεπίδραση της χιτοζάνης και του TPP. Είναι σημαντικό να σημειωθεί και το ότι παρατηρείται και αλληλοεπικάλυψη μερικών κορυφών, για παράδειγμα στα 1150 και 900 cm^{-1} , από τους διαφορετικούς δεσμούς που αποτελούν τη χιτοζάνη και το TPP. Τέλος, παρατηρείται απόσβεση του σήματος των κορυφών του TPP σε κυματαριθμούς χαμηλότερους από τα 750 cm^{-1} , το οποίο οφείλεται στο γεγονός ότι κατά τη συμπλοκοποίηση και διαμόρφωση των νανοσωματιδίων περιορίζονται οι δονήσεις των δεσμών στη κύρια δομή του TPP.^{100,101,114-118}

4.2.1.2 - Αποτελέσματα Φασματομετρίας FTIR για νανοσωματίδια CS@AICIPc



Εικόνα 4.19: Φάσματα FTIR νανοσωματιδίων χιτοζάνης, νανοσωματιδίων χιτοζάνης με εγκλωβισμένη AICIPc και ελεύθερης AICIPc

Αρχικά για να επιβεβαιωθεί ο εγκλωβισμός της AICIPc στη δομή των νανοσωματιδίων χιτοζάνης, λήφθηκε το φάσμα FTIR της ελεύθερης AICIPc. Η πρώτη κορυφή που παρατηρείται στο φάσμα της AICIPc βρίσκεται στα 2772 cm^{-1} όπου και αφορά δεσμού C-H, και συγκεκριμένα τις δονήσεις εκτάσεώς του. Η κορυφή στα 1609 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις εκτάσεως των δεσμών C=C στη δομή πυρόλης της φθαλοκυανίνης. Η κορυφή στα 1500 cm^{-1} οφείλεται σε δονήσεις κάμψης των δεσμών C-H, ενώ οι κορυφή στα 1467 cm^{-1} αποδίδεται στους δεσμούς C=C και C=N κατά τη δόνησή τους στο επίπεδο της πυρόλης. Οι κορυφές με κυματαριθμού στα 1422 και 1331 cm^{-1} αφορούν δονήσεις εκτάσεως των δεσμών C-C στη δομή της ισοϊνδόλης, ενώ οι κορυφές στα 1286 και 1167 cm^{-1} αφορούν δονήσεις εκτάσεως των δεσμών C-N στη δομή της ισοϊνδόλης. Οι κορυφές με κυματαριθμούς στα 1119 , 1064 , 901 , 757 και 726 cm^{-1} αποδίδονται σε δονήσεις κάμψης των δεσμών C-H στη δομή της ισοϊνδόλης, όπου οι δύο πρώτες κορυφές πραγματοποιούνται στο ίδιο επίπεδο με την πυρόλη (in plane) και οι άλλες τρεις εκτός επιπέδου (out of plane). Επιπλέον, η κορυφή που

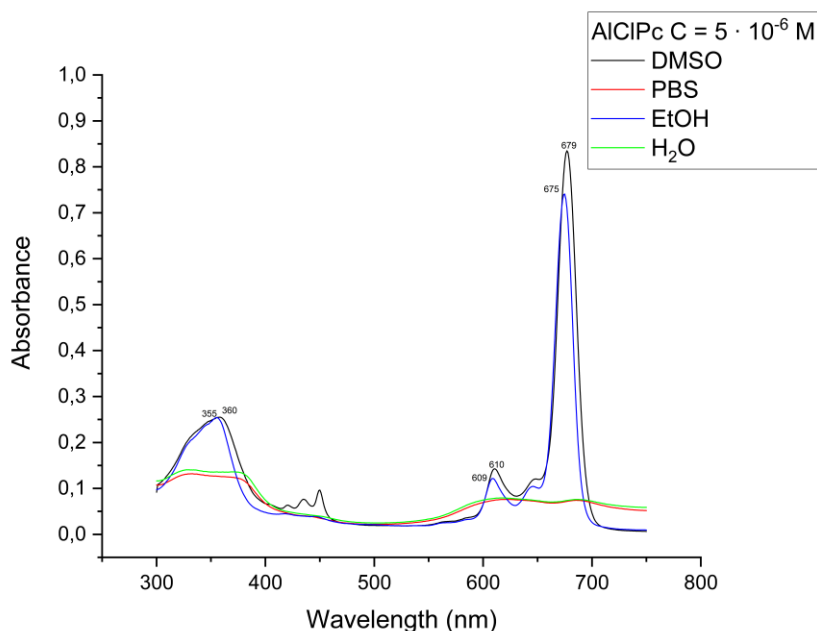
παρατηρείται στα 901 cm^{-1} , πιθανόν να οφείλεται και σε δονήσεις (rocking vibration) στους δεσμούς του μετάλλου του αλουμινίου στο κέντρο της δομής της φθαλοκυανίνης. Οι κορυφές που παρατηρούνται στην περιοχή των $600\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ αποδίδονται σε δονήσεις κάμψης δεσμών C-C σε όλο το δακτύλιο της φθαλοκυανίνης, καθώς επίσης οι κορυφές στα $450\text{-}425\text{ cm}^{-1}$ αφορούν δονήσεις εκτάσεως του δεσμού Al-Cl, στο κέντρο του δακτυλίου της φθαλοκυανίνης. Τέλος, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η απουσία κορυφών στα 3280 και 1006 cm^{-1} , κορυφές που σχετίζονται με το δεσμό N-H, οφείλεται στο γεγονός ότι στο κέντρο του δακτυλίου της η φθαλοκυανίνη έχει συνδεθεί με το χλωρίδιο αλουμίνιου.¹¹⁹⁻¹²¹

Σχετικά με τα νανοσωματίδια χιτοζάνης με εγκλωβισμένη AIClPc, η πρώτη σημαντική παρατήρηση που γίνεται είναι το ότι δεν παρατηρείται καμία μετατόπιση τόσο στις κορυφές που σχετίζονται με τα νανοσωματίδια χιτοζάνης, όσο και στις κορυφές που σχετίζονται με την AIClPc. Αυτό υποδεικνύει ότι κατά τον εγκλωβισμό δεν πραγματοποιήθηκε χημική σύνδεση ανάμεσα στη χιτοζάνη και την AIClPc, το οποίο είναι και το επιθυμητό αποτέλεσμα. Ο επιτυχής εγκλωβισμός επιβεβαιώνεται με την παρατήρηση του φάσματος των νανοσωματιδίων CS@AIClPc, και τη σύγκρισή του με το φάσμα των νανοσωματιδίων χιτοζάνης. Πρώτα απ' όλα, στην περιοχή των $1500\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$, παρατηρείται αύξηση του σήματος που λαμβάνεται από τις κορυφές στα CS@AIClPc, το οποίο αποδίδεται στην παρουσία της φθαλοκυανίνης. Επιπλέον, στα 1331 cm^{-1} παρατηρείται η κορυφή που σχετίζεται με τις δονήσεις εκτάσεων των δεσμών C-C στη δομή της AIClPc, όπου η συγκεκριμένη κορυφή δεν εμφανίζεται στα νανοσωματίδια χιτοζάνης. Ομοίως, παρατηρούνται και δύο άλλες κορυφές που σχετίζονται με τη AIClPc, στα 757 και 726 cm^{-1} , οι οποίες δεν παρατηρούνται στο φάσμα των κενών νανοσωματιδίων χιτοζάνης. Εκτός αυτού, στα 901 cm^{-1} , η κορυφή που λαμβάνεται στα νανοσωματίδια CS@AIClPc παρουσιάζει ελαφρώς πιο απότομη μορφή, σε σχέση με τα κενά νανοσωματίδια χιτοζάνης, το οποίο οφείλεται στο γεγονός ότι σε αυτόν το κυματαριθμό παρουσιάζει κορυφή και η AIClPc. Τέλος, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι κορυφές της AIClPc που δεν παρατηρούνται (π.χ. $600\text{-}500\text{ cm}^{-1}$) ή παρουσιάζουν απόσβεση στο σήμα τους (π.χ. $450\text{-}425\text{ cm}^{-1}$) στο φάσμα των CS@AIClPc, πιθανότατα να επικαλύπτονται από τις κορυφές των νανοσωματιδίων. Εναλλακτικά, αυτό πιθανόν να οφείλεται και στο περιορισμό της κινητικότητας και της δόνησης των δεσμών της AIClPc κατά τον εγκλωβισμό της.¹¹⁹⁻¹²¹

4.2.2 – Αποτελέσματα Φασματομετρίας UV/vis

Τα φάσματα απορρόφησης UV/vis όλων των δειγμάτων λήφθηκαν για την ίδια συγκέντρωση του κάθε δείγματος, σε τέσσερις διαφορετικούς διαλύτες, DMSO, EtOH, PBS και υπερκάθαρο νερό, σε εύρος μήκους κύματος 300-750 nm.

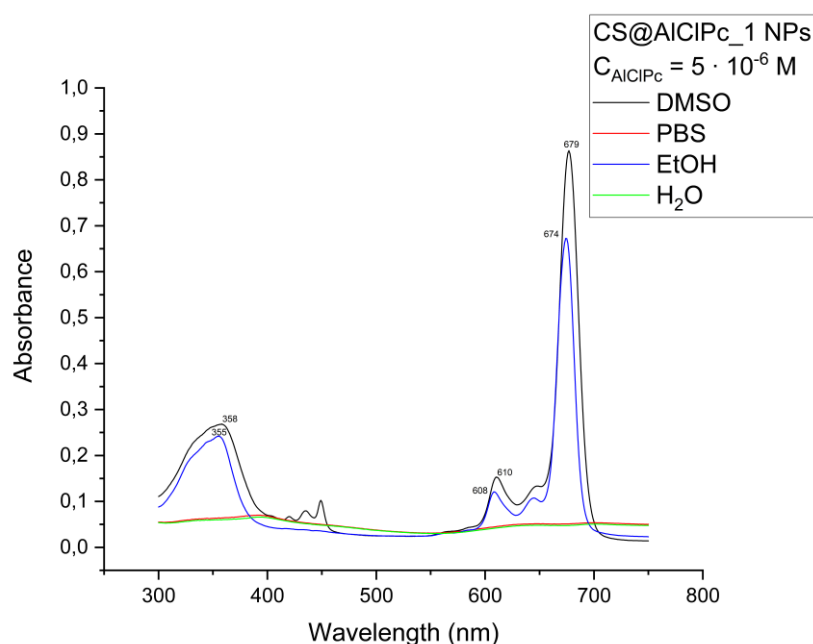
4.2.2.1 - Αποτελέσματα Φασματομετρίας UV/vis για ελεύθερη AICIPc



Εικόνα 4.20: Φάσμα απορρόφησης UV/vis ελεύθερης AICIPc σε διάφορους διαλύτες

Αρχικά, από το διάγραμμα στην **Εικόνα 4.20** παρατηρείται η επιρροή του διαλύτη στο φάσμα απορρόφησης της ελεύθερης AICIPc. Συγκεκριμένα, στους διαλύτες που είναι διαλυτή (DMSO και EtOH) παρουσιάζει τρεις έντονες κορυφές απορρόφησης, με την κύρια κορυφή να βρίσκεται στα 679 nm. Όπως αναφέρθηκε και στη βαθμονόμηση της AICIPc, οι κορυφές κοντά στα 679 nm αποδίδονται στην ζώνη απορρόφησης Q, ενώ οι κορυφές στα 360 nm στη ζώνη απορρόφησης B. Ανάμεσα σε αυτούς τους δύο διαλύτες δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στα φάσμα απορρόφησης, παρά μόνο μία μικρή μετατόπιση του φάσματος προς τ' αριστερά, και μικρή μείωση της απορρόφησης με τη χρήση του διαλύτη EtOH. Αντιθέτως, κατά τη χρήση υδατικών διαλυτών, PBS και υπερκάθαρο νερό, παρατηρείται η αναμενόμενη έντονη απόσβεση του σήματος απορρόφησης, καθώς η AICIPc είναι δεν είναι υδατοδιαλυτή.

4.2.2.2 - Αποτελέσματα Φασματομετρίας UV/vis για CS@AlClPc NPs



Εικόνα 4.21: Φάσμα απορρόφησης UV/vis νανοσωματιδίων CS@AlClPc_1 σε διάφορους διαλύτες

Αρχικά, η πρώτη σημαντική παρατήρηση που φαίνεται από το διάγραμμα της **Εικόνα 4.21** είναι ότι σε διαλύτη DMSO, η απορρόφηση του δείγματος CS@AlClPc αντιστοιχεί σε τιμή 0.84. Με βάση την καμπύλη βαθμονόμησης της ελεύθερης AlClPc (Εξίσωση (iv)), προκύπτει ότι αυτή η τιμή απορρόφησης αντιστοιχεί σε συγκέντρωση AlClPc ίση με 5.15 μM . Αυτή η τιμή είναι πρακτικά όμοια με αυτήν που θεωρήθηκε και υπολογιστική για τα νανοσωματίδια CS@AlClPc_1, με βάση τους υπολογισμούς της απόδοσης εγκλωβισμού και του ποσοστού φόρτωσής τους. Οπότε, και με αυτόν τον τρόπο επιβεβαιώνεται η ορθότητα των υπολογισμών που έχουν πραγματοποιηθεί. Ο λόγος που είναι εφικτός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης AlClPc από τα νανοσωματίδια είναι επειδή η χιτοζάνη σε διαλύτη DMSO διαλύεται, οπότε απελευθερώνεται και η εγκλωβισμένη AlClPc. Αντιθέτως, σε υδατικούς διαλύτες παρατηρείται η διασπορά των νανοσωματιδίων και όχι η διάλυσή τους.

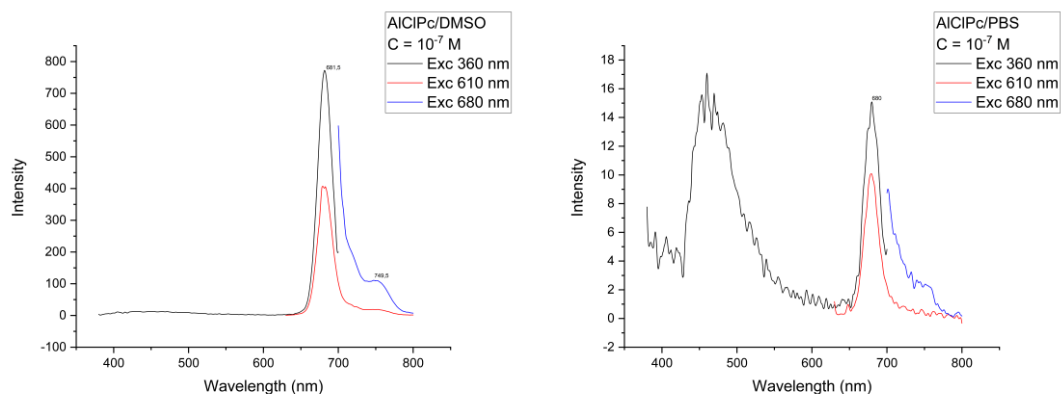
Εκτός από το διαλύτη DMSO, σημαντική απορρόφηση μπορεί να παρατηρηθεί και με τη χρήση του διαλύτη EtOH, με παρατήρηση μίας μετατόπισης του φάσματος στα αριστερά, καθώς και μία μικρή απόσβεση του σήματος απορρόφησης, η οποία πιθανόν να οφείλεται και στη μη πλήρη διάλυση και απελευθέρωση της AlClPc από τα νανοσωματίδια χιτοζάνης.

Από την άλλη, στα υδατικά διαλύματα, PBS και υπερκάρθαρο νερό, δεν παρατηρείται σημαντική απορρόφηση από το δείγμα των νανοσωματιδίων CS@AlClPc_1. Αυτό αρχικά σημαίνει ότι τα νανοσωματίδια χιτοζάνης δεν παρουσιάζουν σημαντική απορρόφηση UV/vis σε αυτό το εύρος μήκους κύματος, το οποίο επιβεβαιώθηκε και με τη λήψη του φάσματος απορρόφησης του δείγματος CS_Blank_3, όπου και παρουσίασε μηδαμινή απορρόφηση σε όλους τους διαλύτες. Γενικά, τα νανοσωματίδια από τη φύση τους είναι σκεδαστικά μέσα, δηλαδή συμβάλλουν περισσότερο στο φαινόμενο σκέδασης του φωτός, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται η έλλειψη υψηλών τιμών απορρόφησης στους υδατικούς διαλύτες.

4.2.3 – Αποτελέσματα Φασματομετρίας PL

Τα φάσματα φωτοφωταύγειας των δειγμάτων λήφθηκαν με διέγερση σε τρία διαφορετικά μήκη κύματος, 360, 610 και 680 nm, τα οποία αντιστοιχούν στις κορυφές απορρόφησης της AICIPc. Τα φάσματα λήφθηκαν επίσης σε δύο διαλύτες, DMSO και PBS.

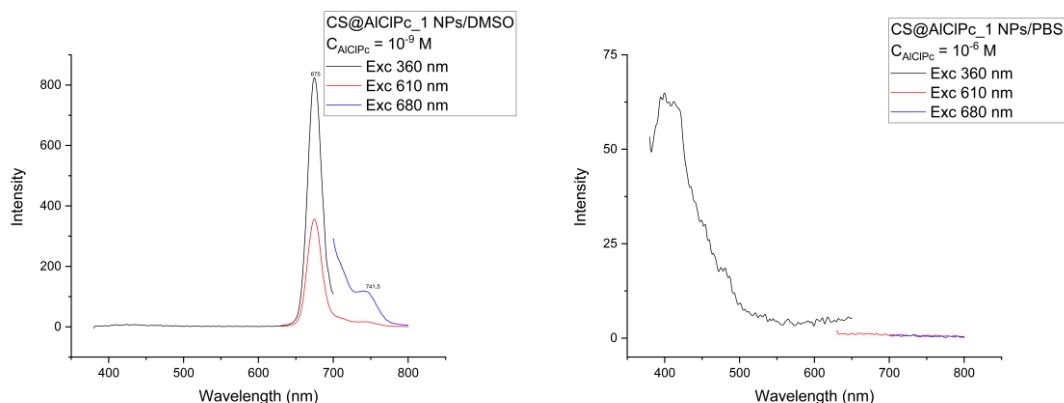
4.2.3.1 - Αποτελέσματα Φασματομετρίας PL για ελεύθερη AICIPc



Εικόνα 4.22: Φάσματα φωτοφωταύγειας ελεύθερης AICIPc σε DMSO και PBS

Η πρώτη παρατήρηση που γίνεται από τα φάσματα φωτοφωταύγειας της ελεύθερης AICIPc είναι η σημαντική διαφορά στις εντάσεις του σήματος, το οποίο οφείλεται στο ότι η AICIPc είναι διαλυτή στο DMSO και όχι στο PBS. Ωστόσο, και στα δύο φάσματα παρατηρείται μία κύρια κορυφή φωτοφωταύγειας στα περίπου 681 nm, παρουσιάζονται έτσι πολύ μικρή μετατόπιση Stokes, καθώς η κύρια κορυφή απορρόφησης βρίσκεται στα 679 nm, το οποίο και σημαίνει ότι στο μόριο της AICIPc παρατηρούνται πολύ μικρές απώλειες ενέργειας κατά την παραμονή της σε διεγερμένη κατάσταση. Οι διαφορές ανάμεσα στις εντάσεις των σημάτων ανάλογα με το μήκος κύματος διέγερσης, οφείλονται στην απορρόφηση της AICIPc, όπου αναμενόμενα η μεγαλύτερη απορρόφηση οδηγεί και σε εντονότερο σήμα φωτοφωταύγειας. Τέλος, κατά τη διέγερση της AICIPc με το μήκος κύματος της μέγιστης κορυφής απορρόφησης (680 nm) παρατηρείται και μία μικρή δευτερεύουσα κορυφή φωτοφωταύγειας στα 749.5 nm.

4.2.3.2 - Αποτελέσματα Φασματομετρίας PL για CS@AICIPc NPs



Εικόνα 4.23: Φάσματα φωτοφωταύγειας νανοσωματιδίων CS@AICIPc σε DMSO και PBS

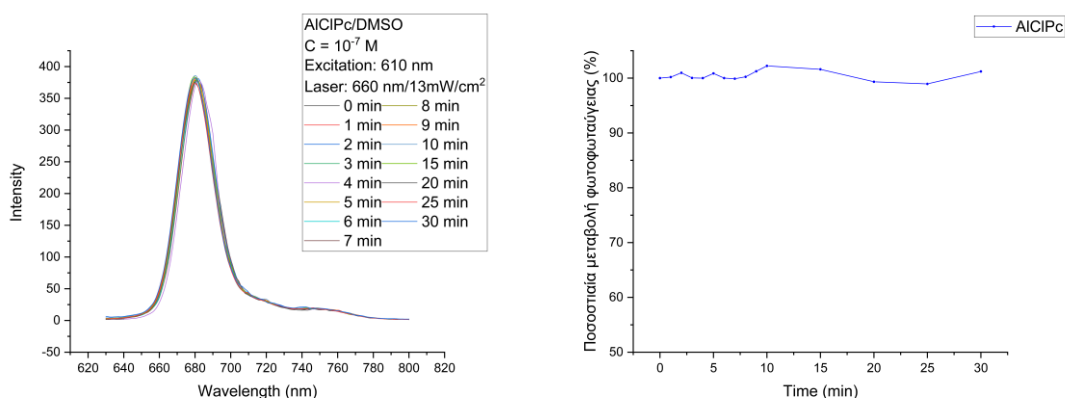
Από την **Εικόνα 4.23** παρατηρείται ότι το φάσμα φωτοφωταύγειας των νανοσωματιδίων CS@AlClPc παρουσιάζει τις ίδιες κορυφές εκπομπής, καθώς επίσης και την ίδια συμπεριφορά στους διαλύτες DMSO και PBS. Συγκεκριμένα παρατηρείται έντονη ένταση εκπεμπόμενης ακτινοβολίας στον διαλύτη DMSO, όπου και είναι διαλυτή η AlClPc, και σημαντικά αποσβεσμένη ένταση στο PBS. Ωστόσο, συγκριτικά με την ελεύθερη AlClPc παρατηρείται επίσης η ενίσχυση του σήματος εκπομπής στο δείγμα των νανοσωματιδίων AlClPc, καθώς σε χαμηλότερη συγκέντρωση AlClPc παρατηρείται περίπου η ίδια ένταση. Αυτό σημαίνει ότι το περιβάλλον που δημιουργείται από τη διάλυση των νανοσωματιδίων και της AlClPc ενισχύει την ένταση της φωτοφωταύγειας. Το γεγονός ότι σε υδατικούς διαλύτες δεν παρατηρούνται σημαντικές τιμές απορρόφησης και φωτοφωταύγειας στα νανοσωματίδια CS@AlClPc_1, μπορεί να υποδεικνύει ότι ο εγκλωβισμός της AlClPc έχει πραγματοποιηθεί στο εσωτερικό των νανοσωματιδίων, το οποίο όμως μπορεί να επιβεβαιωθεί μόνο με μικροσκοπία σάρωσης (SEM) ή διέλευσης (TEM) ηλεκτρονίων. Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι διασπορές νανοσωματιδίων που έχουν σχηματιστεί, κατά πάσα πιθανότητα δρουν ως μέσα σκέδασης του φωτός.

4.3 – Αποτελέσματα μελέτης φωτοδυναμικής δράσης AlClPc και CS@AlClPc NPs

Η μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης, τόσο σε επίπεδο εργαστηρίου όσο και σε επίπεδο κυττάρων, πραγματοποιήθηκε με τα ίδια δείγματα στα οποία πραγματοποιήθηκε και ο χαρακτηρισμός τους. Πιο αναλυτικά, η ελεύθερη φθαλοκυανίνη μελετήθηκε από το stock διάλυμα που παράχθηκε, διαλυμένη σε DMSO, ενώ τα νανοσωματίδια CS@AlClPc_1 μελετήθηκαν σε υδατική διασπορά.

4.3.1 – Αποτελέσματα φωτοσταθερότητας

Η μελέτη της φωτοσταθερότητας της ελεύθερης AlClPc πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη DMSO σε συγκέντρωση $C = 10^{-7}$ M, όπου η αναλυτική διαδικασία αναφέρεται στο Κεφάλαιο 3.8.1 (63). Το φάσμα εκπομπής φωτοφωταύγειας λήφθηκε με διέγερση στα 610 nm και εύρος τιμών μήκος κύματος εκπομπής στα 620-820 nm. Η πρώτη μέτρηση λήφθηκε πριν ξεκινήσει η ακτινοβολία με το laser, και στη συνέχεια για τα πρώτα 10 λεπτά οι μετρήσεις λήφθηκαν ανά λεπτό, ενώ για τα υπόλοιπα 20 λεπτά λήφθηκαν ανά 5 λεπτά.

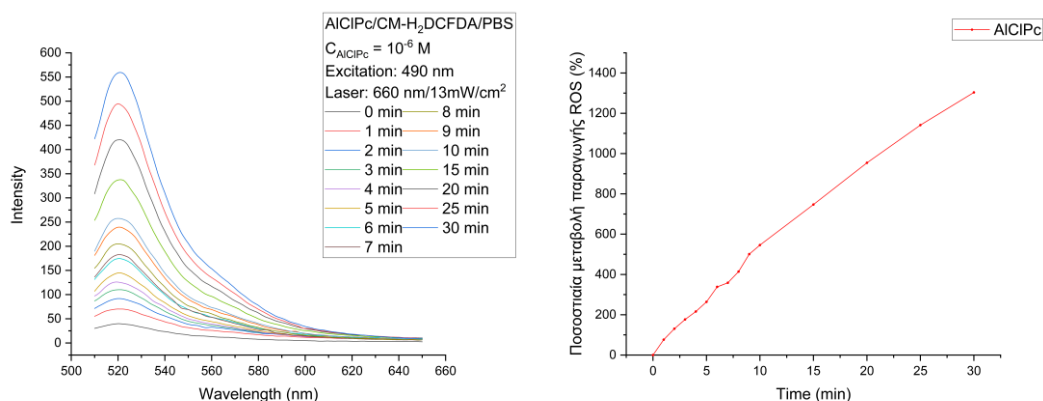


Εικόνα 4.24: Αριστερά: Φάσμα εκπομπής φωτοφωταύγειας ελεύθερης AlClPc σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, Δεξιά: Ποσοστιαία μεταβολή έντασης φωτοφωταύγειας

Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα της **Εικόνα 4.24**, η AICIPc παρουσιάζει εξαιρετική φωτοσταθερότητα, καθώς δεν παρατηρείται καθόλου μεταβολή στο φάσμα εκπομπής φωτοφωταύγειάς της, σε όλη τη διάρκεια των 30 λεπτών, στην οποία πραγματοποιήθηκε η ακτινοβόλησή της. Λόγω αυτού κρίθηκε ότι δεν είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθεί μελέτη φωτοσταθερότητας και στα νανოსωματίδια CS@AICIPc.

4.3.2 – Αποτελέσματα παραγωγής δραστικών οξυγονούχων ειδών (ROS)

Η μελέτη παραγωγής ROS πραγματοποιήθηκε στην ελεύθερη AICIPc και στα νανოსωματίδια CS@AICIPc_1, όπου και στις δύο περιπτώσεις τα διαλύματα που εξετάστηκαν παρουσίαζαν συγκέντρωση σε AICIPc ίση με 10^{-6} M. Όπως προαναφέρθηκε, η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε διαλύματα PBS, όπου λήφθηκαν 15 μετρήσεις για την εκπομπή φωτοφωταύγειας της CM-H₂DCFDA σε διάστημα 30 λεπτών, με ακτινοβολία διέγερσης στα 490 nm και εύρος τιμών μήκος κύματος εκπομπής στα 510-650 nm. Η πρώτη μέτρηση λήφθηκε πριν ξεκινήσει η ακτινοβόληση με το λέζερ, και στη συνέχεια για τα πρώτα 10 λεπτά οι μετρήσεις λήφθηκαν ανά λεπτό, ενώ για τα υπόλοιπα 20 λεπτά λήφθηκαν ανά 5 λεπτά.



Εικόνα 4.25: Διαγράμματα εκπομπής φωτοφωταύγειας CM-H₂DCFDA για διάλυμα ελεύθερης AICIPc (αριστερά) και ποσοστιαία μεταβολή παραγωγής ROS για ελεύθερη AICIPc (δεξιά)

Στο αριστερό διάγραμμα της **Εικόνα 4.25** παρατηρούνται τα φάσματα εκπομπής φωτοφωταύγειας της CM-H₂DCFDA για την ελεύθερη AICIPc. Αρχικά παρατηρείται η κορυφή εκπομπής στα 520 nm, όπου είναι και η χαρακτηριστική κορυφή της CM-H₂DCFDA. Επίσης, παρατηρείται η αύξηση της έντασης του σήματος εκπομπής με την πάροδο του χρόνου, γεγονός που οφείλεται στη συνεχή και αυξανόμενη παραγωγή δραστικών οξυγονούχων ειδών, τα οποία ανιχνεύονται από τη CM-H₂DCFDA. Συνεπώς, από τα παραπάνω αποτελέσματα μπορεί να συμπεραθεί ότι η ελεύθερη AICIPc, είναι ικανή να παράγει ROS, παρόλο που παρουσιάζει πολύ χαμηλές τιμές απορρόφησης και εκπομπής φωτοφωταύγειας σε διαλύτη PBS. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το δεύτερο διάγραμμα της **Εικόνα 4.25**, όπου παρουσιάζει την ποσοστιαία μεταβολή παραγωγής ROS, σε σχέση με το χρόνο ακτινοβόλησης για την ελεύθερη AICIPc, όπου και είναι σημαντικό ότι παρατηρείται μία συνεχή και αυξανόμενη παραγωγή.

Αντιθέτως, στα νανოსωματίδια CS@AICIPc_1 δεν παρατηρήθηκε παραγωγή ROS με τη χρήση της συγκεκριμένης πειραματικής διάταξης. Αυτό, αρχικά ενισχύει την υπόθεση ότι ο εγκλωβισμός της AICIPc έχει πραγματοποιηθεί στο εσωτερικό των νανოსωματιδίων, καθώς υπό τις ίδιες συνθήκες και συγκεντρώσεις η ελεύθερη AICIPc παρουσίασε ικανότητα παραγωγής ROS. Επίσης, η μη παραγωγή ROS μπορεί να ερμηνευτεί και από το γεγονός ότι η διασπορά των νανοςωματιδίων στα υδατικά

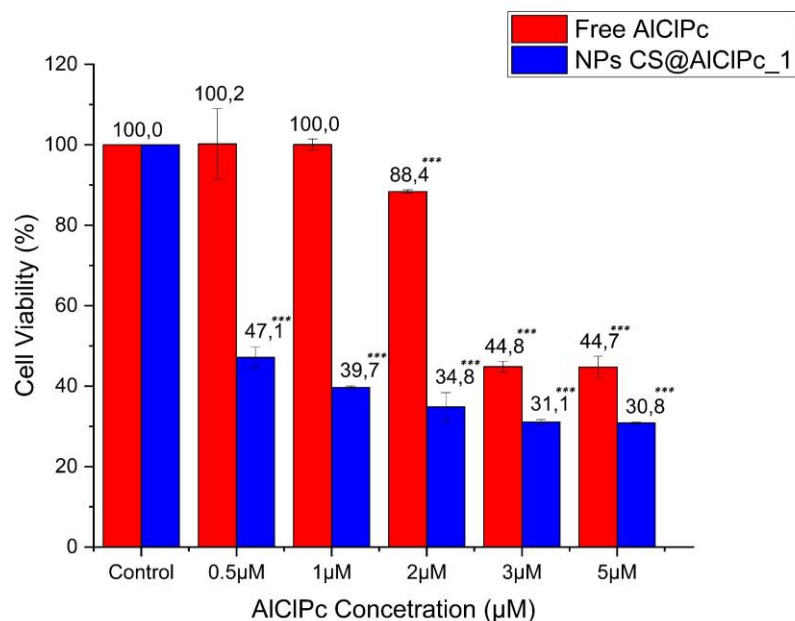
διαλύματα δρα κυρίως ως ένα σκεδαστικό μέσο. Η μειωμένη παραγωγή ROS δεν σημαίνει βέβαια ότι τα νανοσωματίδια CS@AICIPc δεν είναι κατάλληλα για φωτοδυναμική θεραπεία, καθώς ο κύριος σκοπός του εγκλωβισμού της AICIPc είναι βελτίωση της υδατοδιαλυτότητάς της και κατ' επέκταση η συμπεριφορά της σε βιολογικά συστήματα, καθώς η ελεύθερη AICIPc δεν είναι κατάλληλος φωτοευαισθητοποιητής, διότι παρουσιάζει κακή υδατοδιαλυτότητα, χαμηλή επιλεκτικότητα και μεταφέρεται δύσκολα από το κυκλοφορικό σύστημα ενός οργανισμού. Σε επίπεδο κυττάρων, αναμένεται ότι η AICIPc θα απελευθερωθεί από τα νανοσωματίδια, ιδανικά εντός των κυττάρων, βελτιώνοντας έτσι τη δράση της. Για αυτό το λόγο, παρόλο που δεν παρατηρήθηκε παραγωγή ROS με τη χρήση του ανιχνευτή CM-H₂DCFDA, η φωτοδυναμική δράση των CS@AICIPc_1 εξετάστηκε και σε επίπεδο κυττάρων. Τέλος, να σημειωθεί ότι, αναμενόμενα, τα νανοσωματίδια χιτοζάνης δεν παρουσίασαν ικανότητα παραγωγής ROS.

4.3.3 – Μελέτη βιωσιμότητας κυττάρων

Η μελέτη βιωσιμότητας κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα καρκίνου του δέρματος A431, με βάση την ανάλυση MTT. Κάθε συγκέντρωση μελετήθηκε τρεις φορές, όπου η τελική τιμή βιωσιμότητας υπολογίστηκε από το μέσο όρο των τιμών που προέκυψαν. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη ανάμεσα στην ελεύθερη AICIPc και στα νανοσωματίδια CS@AICIPc_1, με βάση τη συγκέντρωσή τους σε AICIPc. Η επίδραση και στατιστική σημασία της κάθε συγκέντρωσης προσδιορίζεται με την τιμή p-value, συγκρίνοντας τις τιμές απορρόφησης του MTT στις θέσεις του plate που περιείχαν τα δείγματα υπό μελέτη με την απορρόφησης στις θέσεις του plate που περιείχαν τα control δείγματα.

Πίνακας 4.16: Συσχέτιση τιμής p-value με τη στατιστική σημασία της

p-value	Significance	
>0.05		not significant
<0.05	*	significant
<0.005	**	very significant
<0.0001	***	highly significant

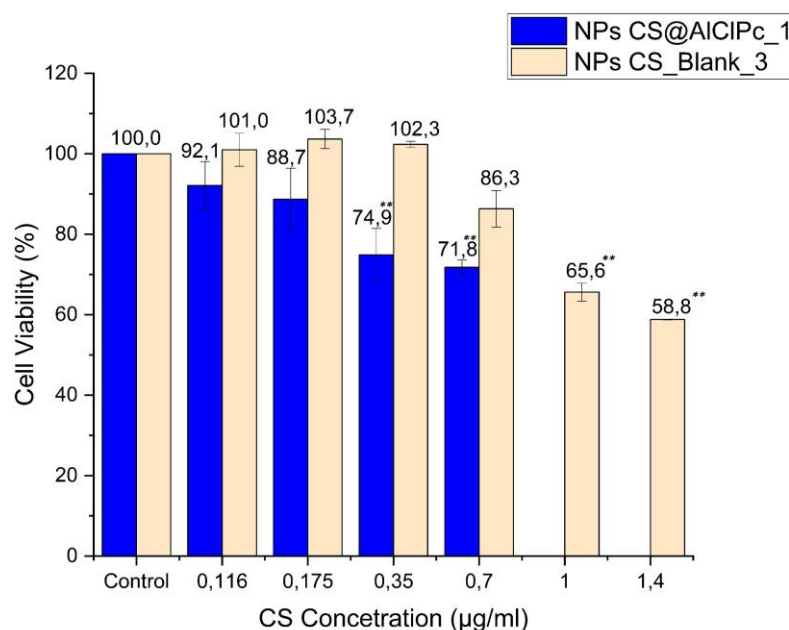


Εικόνα 4.26: Βιωσιμότητα κυττάρων A431 μετά την επώασή τους με ελεύθερη AICIPc και νανοσωματίδια CS@AICIPc_1

Όπως παρατηρείται από την **Εικόνα 4.26**, η ελεύθερη AICIPc παρουσιάζει μηδαμινή κυτταροτοξικότητα για συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 1μM, ενώ αντιθέτως τα νανοσωματίδια CS@AICIPc_1 παρουσιάζουν σημαντική κυτταροτοξικότητα για όλα τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε δύο παράγοντες, είτε στο γεγονός ότι τα νανοσωματίδια χιτοζάνης, στις παραπάνω συγκεντρώσεις, παρουσιάζουν τοξικότητα ανεξάρτητα από τον εγκλωβισμό της AICIPc, είτε στο γεγονός ότι ο εγκλωβισμός της AICIPc οδηγεί στην πιο αποτελεσματική πρόσληψή της από τα κύτταρα, δηλαδή στην πιο αποτελεσματική μεταφορά της AICIPc στα κύτταρα, οδηγώντας έτσι και στον αυξημένο κυτταρικό θάνατο. Η τοξικότητα των CS@AICIPc_1 είναι πιθανόν να οφείλεται επίσης να οφείλεται στην αντικαρκινική δράση της χιτοζάνης. Έχει παρατηρηθεί ότι η υλικά που βασίζονται στη χιτοζάνη μπορούν να παρουσιάσουν αντικαρκινική δράση, γεγονός που οφείλεται στην κατιονική της φύση και στην παρουσία αμινομάδων στη δομή της. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πιο έντονη πρόσδεση της με τις αρνητικά φορτισμένες κυτταρικές μεμβράνες των καρκινικών κυττάρων, όπου και με αυτόν τον τρόπο είναι πιο πιθανό τα νανοϋλικά χιτοζάνης να τη διαπεράσουν. Συγκεκριμένα, η πρόσληψη χιτοζάνης από καρκινικά κύτταρα έχει παρατηρηθεί ότι δυσχεραίνει την ικανότητά τους να πολλαπλασιαστούν αποτελεσματικά, οδηγώντας και στον κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης. Βέβαια, η αντικαρκινική δράση της χιτοζάνης εξαρτάται σημαντικά από τα χαρακτηριστικά της, την πιθανή τροποποίησή της και τις ενώσεις με τις οποίες έχει προσδεθεί. Όσον αφορά τη χιτοζάνη, παρατηρείται ότι η αντικαρκινική της δράση βελτιώνεται με την αύξηση του βαθμού αποακετυλίωσής της και τη μείωση του μοριακού της βάρους, όπου αυτά τα χαρακτηριστικά διευκολύνουν τη διαπέραση της καρκινικής κυτταρικής μεμβράνης από τα νανοσωματίδια χιτοζάνης. Στην παρούσα εργασία μελετάται χιτοζάνη που παρουσιάζει αυτά τα χαρακτηριστικά, δηλαδή υψηλό DD (>90%) και χαμηλό μοριακό βάρος (30kDA).¹²²⁻¹²⁶

Σε κάθε περίπτωση οι παραπάνω τιμές βιωσιμότητας για τα νανοσωματίδια CS@AICIPc_1 είναι πολύ χαμηλές, και συνεπώς ακατάλληλες για μελέτη της φωτοδυναμικής τους δράσης. Για αυτό το λόγο, μελετήθηκε και η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την επώαση νανοσωματιδίων CS_Blank_3.

Σε αυτήν τη περίπτωση οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν με βάση τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων σε χιτοζάνη (μg/ml). Δηλαδή, στη περίπτωση των CS_Blank_3, η συγκέντρωση χιτοζάνης αντιστοιχεί στη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων, ενώ στη περίπτωση των CS@AICIPc_1 η συγκέντρωση χιτοζάνης είναι μικρότερη από τη συνολική συγκέντρωση των νανοσωματιδίων, τα οποία αποτελούνται και από AICIPc (DL = 30.2%). Για παράδειγμα συγκέντρωση 0.7 μg/ml χιτοζάνης στα CS_Blank_3, αντιστοιχεί σε συγκέντρωση νανοσωματιδίων CS@AICIPc_1 ίση περίπου με 1 μg/ml. Και σε αυτήν τη περίπτωση η επίδραση και στατιστική σημασία της κάθε συγκέντρωσης προσδιορίζεται με την τιμή p-value.



Εικόνα 4.27: Βιωσιμότητα κυττάρων A431 μετά την επώασή τους με νανοσωματίδια CS@AICIPc_1 και CS_Blank_3

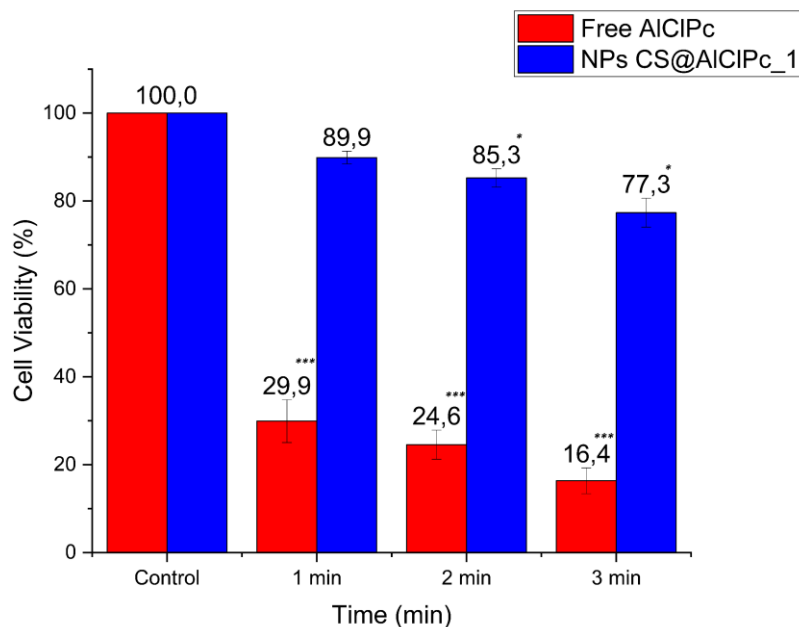
Αρχικά, από την **Εικόνα 4.27** παρατηρείται το γεγονός ότι τα νανοσωματίδια CS_Blank_3 παρουσιάζουν σημαντική κυτταροτοξικότητα στις πιο υψηλές τιμές που μελετήθηκαν. Θεωρητικά, η χιτοζάνη θεωρείται ως ένα βιοσυμβατό και χαμηλής τοξικότητας υλικό. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι τα νανοσωματίδια της είναι πιθανόν να παρουσιάσουν τοξικότητα, το οποίο μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Πρώτα απ' όλα, τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, όπως το μέγεθος, το ζ-Δυναμικό και τα χαρακτηριστικά της χιτοζάνης που χρησιμοποιήθηκε, μπορεί να είναι ο λόγος που παρατηρείται κυτταροτοξικότητα. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η τοξικότητα των νανοσωματιδίων χιτοζάνης που παρατηρείται είναι πολύ πιθανόν να οφείλεται στην αντικαρκινική τους δράση, δηλαδή είναι πιθανόν σε υγιή κύτταρα να μην παρουσιάζουν σημαντική τοξικότητα. Γενικά, κάθε είδος κυττάρων ανταποκρίνεται διαφορετικά σε εξωτερικά ερεθίσματα και παράγοντες (π.χ. παρουσία νανοσωματιδίων). Αυτή η διαφορά είναι σημαντικά πιο έντονη κατά τη μελέτη καρκινικών και υγιή κυττάρων, όπου κατά κύριο λόγο, παρατηρείται ότι στα καρκινικά κύτταρα είναι αυξημένη η τοξικότητα των νανοσωματιδίων, γεγονός που παρατηρείται και σε μερικά νανοσωματίδια χιτοζάνης. Αυτό οφείλεται στη διαφορετική φυσιολογία των κυττάρων, όπου τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν πιο αρνητικά φορτισμένες κυτταρικές μεμβράνες, πιο έντονο μεταβολικό ρυθμό και ενισχυμένη κατακράτηση ουσιών (EPR φαινόμενο).³¹

Συγκριτικά με τα νανοσωματίδια CS_Blank_3, τα νανοσωματίδια CS@AICIPc_3 παρουσίασαν αυξημένη κυτταροτοξικότητα, γεγονός που οφείλεται στον εγκλωβισμό της AICIPc. Αυτό ενισχύει

την αρχική υπόθεση ότι τα νανοσωματίδια χιτοζάνης που παράχθηκαν έχουν τη δυνατότητα να εισέρχονται στα κύτταρα, απελευθερώνοντας έτσι και την AICIPc. Ωστόσο, αυτό πρέπει να επιβεβαιωθεί πειραματικά και με τη χρήση μικροσκοπίας φθορισμού. Η αυξημένη κυτταροτοξικότητα σημαίνει ότι το νανოსύστημα εγκλωβισμού AICIPc που παράχθηκε αποτελεί ένα αποτελεσματικό σύστημα μεταφοράς φαρμάκου, καθώς όπως παρατηρήθηκε και στην **Εικόνα 4.26**, τα νανοσωματίδια παρουσίασαν σημαντικά αυξημένη κυτταροτοξικότητα με χρήση χαμηλότερων συγκεντρώσεων AICIPc.

4.3.4 – Μελέτη φωτοδυναμικής θεραπείας σε κυτταρικό πληθυσμό

Η μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης της ελεύθερης AICIPc και των νανοσωματιδίων CS@AICIPc_1 πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα καρκίνου του δέρματος A431, με βάση την ανάλυση MTT. Και για τις δύο ουσίες επιλέχθηκε η μελέτη να πραγματοποιηθεί σε συγκέντρωση φθαλοκυανίνης ίση με 0.13 μM , η οποία αντιστοιχεί στα νανοσωματίδια σε συγκέντρωση 0.25 $\mu\text{g/ml}$ (ή 0.175 $\mu\text{g/ml}$ συγκέντρωση CS). Σε αυτήν τη συγκέντρωση παρατηρήθηκε ότι οι ουσίες δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική κυτταροτοξικότητα. Κάθε ουσία μελετήθηκε για τρεις χρόνους ακτινοβολίας (1, 2 και 3 λεπτά), με χρήση διοδικού laser (660 nm, 9 mW/cm²), όπου κάθε χρόνος μελετήθηκε με τρία δείγματα και η τελική τιμή βιωσιμότητας υπολογίστηκε από το μέσο όρο των τιμών που προέκυψαν. Η επίδραση και στατιστική σημασία του κάθε χρόνου ακτινοβολίας προσδιορίζεται με την τιμή p-value, συγκρίνοντας τις τιμές απορρόφησης του MTT στις θέσεις του plate που περιείχαν τα δείγματα υπό μελέτη με την απορρόφησης στις θέσεις του plate που περιείχαν τα control δείγματα, τα οποία δεν εκτέθηκαν σε ακτινοβολία (**Πίνακας 4.16**).



Εικόνα 4.28: Βιωσιμότητα κυττάρων A431 μετά την επώασή τους με ελεύθερη AICIPc και νανοσωματίδια CS@AICIPc_1 και την ακτινοβολή τους με laser 660 nm, 9 mW/cm² για διαφορετικούς χρόνους

Από την **Εικόνα 4.28** παρατηρείται ότι και στις δύο ουσίες παρουσιάζεται αύξηση του κυτταρικού θανάτου με την αύξηση του χρόνου ακτινοβολίας, το οποίο αποδίδεται στη συνεχή παραγωγή ROS από την AICIPc. Ωστόσο, παρατηρείται σημαντική απόσβεση της φωτοδυναμικής δράσης στα

νανοσωματίδια σε σχέση με την ελεύθερη AICIPc. Αυτό παρατηρήθηκε και στο Κεφάλαιο 4.3 (94), όπου τα νανοσωματίδια CS@AICIPc δεν παρουσίασαν παραγωγή ROS σε συνθήκες εργαστηρίου. Η μειωμένη φωτοδυναμική δράση πιθανόν να οφείλεται στην όχι πλήρη απελευθέρωση της AICIPc από τα νανοσωματίδια CS ή και στην πιθανή αλληλεπίδραση ανάμεσα στα ROS που παράγονται και τη χιτοζάνη, περιορίζοντας έτσι τη δραστικότητά τους. Συγκεκριμένα, από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει παρατηρηθεί ότι τα υλικά χιτοζάνης είναι πιθανόν να παρουσιάσουν έντονη αντιοξειδωτική δράση, η οποία οφείλεται κατά κύριο λόγο στις αμινομάδες (και σε μικρότερο βαθμό σε υδροξυλομάδες) που βρίσκονται στη δομή της, οι οποίες αντιδρούν με τα ROS. Όπως και η αντικαρκινική τους δράση, έτσι και η αντιοξειδωτική τους δράση, έχει παρατηρηθεί ότι ενισχύεται με την αύξηση του DD και τη μείωση του μοριακού βάρους της χιτοζάνης. Ο λόγος που η αύξηση του DD οδηγεί στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής δράσης της χιτοζάνης είναι η εισαγωγή περισσότερων ελεύθερων αμινομάδων στη δομή της. Στην περίπτωση του μοριακού βάρους, η μείωση του σημαίνει και μείωση του μήκους των πολυμερικών αλυσίδων χιτοζάνης, έχοντας ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη λιγότερων διαμοριακών δεσμών υδρογόνου, οδηγώντας έτσι στην αύξηση των ελεύθερων και ενεργών υδροξυλομάδων και αμινομάδων, οι οποίες ανιχνεύουν και αντιδρούν με τα ROS. Είναι πιθανό επίσης, η αντιοξειδωτική δράση της χιτοζάνης να ενισχύει και την αντικαρκινική της δράση, καθώς βασίζονται σε παρόμοιους μηχανισμούς και δομές στην μοριακή τους δομή.^{39,126–128}

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΝΟΨΗ

5.1 – Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση νανοσωματιδίων χιτοζάνης με εγκλωβισμό της χρωστικής AICIPc, στα οποία εκτιμήθηκε η καταλληλότητά τους για χρήση στη φωτοδυναμική θεραπεία κατά του καρκίνου.

Το πρώτο κομμάτι της εργασίας αφορά τη βελτιστοποίηση της παραγωγής νανοσωματιδίων χιτοζάνης, με εγκλωβισμό της AICIPc, με βάση τη διεργασία ionic gelation. Ο πειραματικός σχεδιασμός πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος Design-Expert 12.0 (trial version), με χρήση του μοντέλου Box-Behnken και στατιστική ανάλυση ANOVA. Οι βέλτιστες τιμές που προέκυψαν αφορούν την περιεκτικότητα χιτοζάνης (0.41 w/v%), την περιεκτικότητα TPP (0.19 w/v%) και το χρόνο υπερήχων (15 min). Από τις πέντε αποκρίσεις προς βελτιστοποίηση που εξετάστηκαν, μοντέλα πρόβλεψης εξάχθηκαν για τις τρεις, όπου και στις τρεις περιπτώσεις, οι μέσες τιμές που προέκυψαν από τα πειράματα επιβεβαίωσης ήταν εντός των ορίων των προβλεπόμενων τιμών για ένα διάστημα εμπιστοσύνης 95%. Συγκεκριμένα, για τα νανοσωματίδια CS@AICIPc μοντέλα πρόβλεψης εξάχθηκαν για την υδροδυναμική διάμετρο, το ποσοστό φόρτωσης (DL) και τη μάζα που συλλέχθηκε, με τις μέσες τιμές από τα πειράματα επιβεβαίωσης να είναι 232.6 nm, 33.3% και 10.4 mg αντίστοιχα. Αντιθέτως, μοντέλα πρόβλεψης δεν ήταν δυνατόν να εξαχθούν για την απόδοση εγκλωβισμού (EE%) της AICIPc και το ζ-Δυναμικό των νανοσωματιδίων. Στην πρώτη περίπτωση, αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι τιμές EE που προέκυψαν για όλες τις επαναλήψεις παρουσίασαν μικρές διακυμάνσεις μεταξύ τους, όπου και τελικά στα πειράματα επιβεβαίωσης προέκυψε μέση τιμή EE ίση με 95.5%. Για το ζ-Δυναμικό, από τα πειράματα επιβεβαίωσης προέκυψε μέση τιμή ίση με 6 mV, το οποίο και σημαίνει ότι η σταθερότητα της διασποράς των νανοσωματιδίων δεν είναι ιδανική. Συνεπώς, από το σχεδιασμό και τη σύνθεση των νανοσωματιδίων CS@AICIPc, προέκυψε ο επιτυχής εγκλωβισμός της AICIPc σε νανοσωματίδια χιτοζάνης, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα της χρήσης της υδρόφοβης AICIPc και σε υδατικές διασπορές.

Με βάση τη φασματοσκοπία FTIR, αρχικά επιβεβαιώθηκε η επιτυχής σύνθεση των νανοσωματιδίων χιτοζάνης με τη μέθοδο ionic gelation. Αυτό παρατηρείται κυρίως με τη μετατόπιση των κορυφών της χιτοζάνης (στα ~ 1650 - 1500 cm^{-1}), η οποία οφείλεται στην αλληλεπίδραση του TPP με τις αμινομάδες της χιτοζάνης. Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε και ο εγκλωβισμός της AICIPc στα νανοσωματίδια χιτοζάνης, καθώς στο φάσμα των νανοσωματιδίων CS@AICIPc παρατηρούνται κορυφές που οφείλονται αποκλειστικά στην AICIPc. Σημαντική παρατήρηση είναι και το γεγονός ότι στο φάσμα FTIR των νανοσωματιδίων CS@AICIPc δεν παρατηρήθηκαν μετατοπίσεις, τόσο στις κορυφές που αποδίδονται στα νανοσωματίδια χιτοζάνης, όσο και στις κορυφές που αποδίδονται στην AICIPc, το οποίο υποδεικνύει ότι πραγματοποιήθηκε ο φυσικός εγκλωβισμός της AICIPc στη δομή των νανοσωματιδίων, και δεν πραγματοποιήθηκε χημική σύνδεση ανάμεσά τους.

Από τη μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων CS@AICIPc, επιβεβαιώθηκε η ορθότητα των υπολογισμών της EE% και του DL% της AICIPc στα νανοσωματίδια χιτοζάνης. Αυτό επιτεύχθηκε με τη λήψη φάσματος απορρόφησης των νανοσωματιδίων CS@AICIPc σε διαλύτη DMSO, όπου και παρατηρείται η διάλυση της χιτοζάνης και απελευθέρωση της AICIPc. Σε αυτή τη περίπτωση παρατηρήθηκε η ταύτιση της υπολογισμένης τιμής της συγκέντρωσης AICIPc στα νανοσωματίδια χιτοζάνης, με την τιμή που προέκυψε φασματοσκοπικά με βάση την καμπύλη

απορρόφησης της AICIPc σε διαλύτη DMSO. Επίσης, είναι σημαντικό να σημειωθεί, ότι στα νανοσωματίδια CS@AICIPc δεν παρατηρήθηκε ούτε απορρόφηση ούτε φωτοφωταύγεια με τη χρήση υδατικών διαλυτών, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στη σκεδαστική φύση των νανοσωματιδίων.

Κατά τη μελέτη της φωτοδυναμικής δράσης των νανοσωματιδίων, αρχικά παρατηρήθηκε η εξαιρετική φωτοσταθερότητα της AICIPc σε εύρος χρόνου 30 λεπτών. Έπειτα μελετήθηκε η δυνατότητα της ελεύθερης AICIPc και των νανοσωματιδίων CS@AICIPc να παράγουν ROS, σε συνθήκες εργαστηρίου με βάση τον ανιχνευτή της φλουρεσκεΐνης. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε η σημαντική απόσβεση της AICIPc να παράγει ROS κατά τον εγκλωβισμό της. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο ότι αυτή η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες εργαστηρίου, η μειωμένη παραγωγή θα μπορούσε να αποδοθεί στο ότι η AICIPc έχει εγκλωβιστεί στο εσωτερικό των νανοσωματιδίων, περιορίζοντας έτσι τη δυνατότητα της να απορροφά την ακτινοβολία του φωτός, το οποίο παρατηρείται και στη μελέτη των φωτοφυσικών ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων. Από την άλλη, η μη παρατήρηση ROS είναι πιθανόν να οφείλεται στην αντιοξειδωτική φύση της χιτοζάνης, η οποία αντιδρά με ROS, καθιστώντας αδύνατη της παρατήρησή με τον ανιχνευτή της φλουρεσκεΐνης.

Τέλος, κατά τη μελέτη των νανοσωματιδίων σε καρκινικά κύτταρα A431, παρατηρήθηκε η αυξημένη κυτταροτοξικότητα των CS@AICIPc, σε σχέση με την ελεύθερη AICIPc, με βάση την συγκέντρωση της AICIPc. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην πιο αποτελεσματική πρόσληψη των νανοσωματιδίων από τα κύτταρα, όπου ο κυτταρικός θάνατος πιθανότατα να προέρχεται και από τη φύση των νανοσωματιδίων. Επιπλέον, καθώς παρατηρήθηκε κυτταροτοξικότητα και στα κενά νανοσωματίδια χιτοζάνης, η κυτταροτοξικότητα θα μπορούσε να αποδοθεί στην αντικαρκινική δράση της χιτοζάνης. Το γεγονός ότι τα νανοσωματίδια CS@AICIPc, συγκριτικά με την ελεύθερη AICIPc και τα νανοσωματίδια CS_Blank παρουσίασαν σημαντικά αυξημένη κυτταροτοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα A431, υποδηλώνει ότι αποτελούν ένα αποτελεσματικό μέσο μεταφοράς υδρόφοβων φαρμάκων. Ωστόσο, κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία στα καρκινικά κύτταρα A431, παρατηρήθηκε έντονη απόσβεση της φωτοδυναμικής δράσης της AICIPc κατά τον εγκλωβισμό της στα νανοσωματίδια χιτοζάνης, το οποίο είναι πολύ πιθανόν να οφείλεται στην αντιοξειδωτική δράση της χιτοζάνης.

5.2 – Προτάσεις για μελλοντική μελέτη

Από τα αποτελέσματα της παραπάνω διπλωματικής μελέτης προέκυψαν ποικίλα και σημαντικά ευρήματα, όσον αφορά τη αξιοποίηση των νανοσωματιδίων χιτοζάνης ως μέσα μεταφοράς φωτοευαίσθητοποιητών στη φωτοδυναμική θεραπεία. Αυτά τα ευρήματα παρουσιάζουν την προοπτική της χρήση αυτών των υλικών, καθώς και τους περιορισμούς τους, αποτελώντας έτσι μία βάση για περαιτέρω έρευνα στο κλάδο της νανοϊατρικής.

Αρχικά, σχετικά με την παραγωγή των νανοσωματιδίων χιτοζάνης, είναι σημαντικό να διερευνηθεί περαιτέρω η σταθερότητα των διασπορών τους, οι οποίες παρουσίασαν σχετικά χαμηλές τιμές ζ-Δυναμικού (5-15 mV). Επιπλέον, σε μερικά πειράματα παρατηρήθηκε και αρνητική τιμή του ζ-Δυναμικού, η οποία είναι αντίθετη με την κατιονική φύση της χιτοζάνης. Η παρατήρηση αρνητικών τιμών ζ-Δυναμικού και σε κενά νανοσωματίδια χιτοζάνης υποδεικνύει ότι αυτό δεν οφείλεται στον εγκλωβισμό της AICIPc, παρά στα νανοσωματίδια και στη μέθοδο σύνθεσής τους. Συγκεκριμένα, η αρνητική τιμή του ζ-Δυναμικού πιθανόν να οφείλεται στη φύση της χιτοζάνης που χρησιμοποιήθηκε, η οποία είναι πολύ χαμηλού μοριακού βάρους (30 kDA) ή και στις τιμές του pH

που επιλέχθηκαν κατά τη σύνθεση των νανοσωματιδίων (~ 4.5-4.8). Και στις δύο περιπτώσεις είναι πιθανόν το φορτίο της χιτοζάνης να μην είναι αρκετά ισχυρό, έχοντας ως αποτέλεσμα να υπερισχύει το αρνητικό φορτίο του TPP ή την αποσταθεροποίηση και διάλυση των νανοσωματιδίων. Θα ήταν ενδιαφέρον λοιπόν, να διερευνηθούν περαιτέρω τα αίτια της αρνητικής τιμής του ζ-Δυναμικού που παρατηρήθηκε, είτε με τη χρήση χιτοζάνης υψηλότερου μοριακού βάρους, είτε με τη σύνθεση των νανοσωματιδίων διερευνώντας την επίδραση του pH στο τελικό προϊόν.

Αναφορικά με τις χαμηλές τιμές του ζ-Δυναμικού, αντικείμενο μελλοντικής έρευνας θα μπορούσε να αποτελέσει εύρεση μεθόδων βελτίωσης του ζ-Δυναμικού, και συνεπώς της σταθερότητας της διασποράς των νανοσωματιδίων. Αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί με περαιτέρω διερεύνηση παραγόντων κατά τη σύνθεση των νανοσωματιδίων, όπως το pH, η θερμοκρασία, ο ρυθμός ανάδευσης κτλ. Εναλλακτικά θα μπορούσε να εξεταστεί και η χρήση κατάλληλων επιφανειοδραστικών ενώσεων, με σκοπό τη βελτίωση της σταθερότητας της διασποράς των νανοσωματιδίων. Μία άλλη ενδιαφέρουσα προσέγγιση, αφορά την εξέταση της ενσωμάτωσης των παραγόμενων νανοσωματιδίων σε υδρογέλη, και εξέταση των ιδιοτήτων του συστήματος υδρογέλης-νανοσωματιδίων.

Σχετικά με τα νανοσωματίδια που παράχθηκαν, θα ήταν σημαντικό να μελετηθεί περαιτέρω η μορφολογία τους, το μέγεθός τους και η χωρική συσχέτιση της εγκλωβισμένης AICIPc στη δομή των νανοσωματιδίων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την αξιοποίηση των κατάλληλων μεθόδων μικροσκοπίας, όπως TEM, SEM ή AFM.

Ακόμα, καθώς τα νανοσωματίδια που παράγονται προορίζονται για χρήση σε εφαρμογές βιολογικού τύπου, είναι σημαντικό διερευνηθούν περαιτέρω τα φαρμακοκινητικά τους χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, για την πιο ακριβή εκτίμηση της δράσης τους είναι σημαντικό να ερευνηθεί το προφίλ αποδέσμευσης της AICIPc από τα νανοσωματίδια χιτοζάνης, υπό συνθήκες παρόμοιες με τον ανθρώπινο οργανισμό. Επιπλέον, καθώς παρατηρήθηκε ότι τα νανοσωματίδια που παράχθηκαν παρουσίασαν σημαντική κυτταροτοξικότητα, είναι σημαντικό να διερευνηθούν περαιτέρω τα αίτια της. Η τοξικότητα που παρατηρήθηκε είναι πιθανόν να οφείλεται στην πρόσληψη των νανοσωματιδίων από τα κύτταρα, το οποίο μπορεί να διερευνηθεί με βάση τη μικροσκοπία φθορισμού (καθώς φθορίζει η AICIPc), έτσι ώστε να παρατηρηθεί η πιθανή πρόσληψη και συσσώρευση των νανοσωματιδίων στα κύτταρα. Εκτός αυτού, θα μπορούσε να διερευνηθεί και η κυτταροτοξικότητα των νανοσωματιδίων σε διαφορετικού είδους κύτταρα, όπου για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί ότι τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν αυξημένη κυτταροτοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα, σε σχέση με τα φυσιολογικά υγιή κύτταρα. Με αυτό τον τρόπο θα μπορούσε να επιβεβαιωθεί και η θεώρηση ότι η κυτταροτοξικότητα που παρατηρήθηκε στα καρκινικά κύτταρα A431 οφείλεται και στην αντικαρκινική δράση των νανοσωματιδίων που παράχθηκαν.

Τέλος, είναι σημαντικό να διερευνηθεί περαιτέρω και η αποδοτικότητα των νανοσωματιδίων που παράχθηκαν στη φωτοδυναμική θεραπεία. Παρότι παρατηρήθηκε ο επιτυχής εγκλωβισμός και μεταφορά του φωτοευαισθητοποιητή AICIPc, τελικώς, το σύστημα που αναπτύχθηκε δεν ήταν αποτελεσματικό κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία. Όπως ήδη αναφέρθηκε, αυτό είναι πολύ πιθανόν να οφείλεται στον αντιοξειδωτικό χαρακτήρα των νανοσωματιδίων χιτοζάνης, το οποίο θα μπορούσε να επιβεβαιωθεί με ανάλυση της αντιοξειδωτικής τους δράσης (π.χ. DPPH ανάλυση). Ωστόσο, αντικείμενο μελλοντικής μελέτης θα μπορούσε να είναι η εξέταση του εγκλωβισμού άλλων αντικαρκινικών φαρμάκων, που δεν προορίζονται για φωτοδυναμική θεραπεία, καθώς το συγκεκριμένο σύστημα που παρήχθη ήταν επιτυχές στο επίπεδο μεταφοράς φαρμάκου. Επίσης, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, τα καρκινικά κύτταρα A431 που μελετήθηκαν στην παρούσα

μελέτη είναι τύπου καρκίνου του δέρματος, οπότε από τη στιγμή που παρατηρήθηκε η επιτυχής καταστροφή τους (ανεξάρτητα από τη φωτοδυναμική θεραπεία), θα μπορούσε να μελετηθεί περαιτέρω η δυνατότητα των νανοσωματιδίων που παράχθηκαν να δρουν αποτελεσματικά και κατά την τοπική τους επάλειψη, σε μορφή αλοιφής ή γέλης. Σε αυτήν την περίπτωση, λόγω της φύσης της πιθανής θεραπείας, θα είναι και πιο στοχευμένη και επιλεκτική η δράση τους. Επιπλέον, θα μπορούσε να ερευνηθεί και η αντιμικροβιακή ικανότητα των νανοσωματιδίων χιτοζάνης που παράχθηκαν, καθώς τα χαρακτηριστικά της χιτοζάνης που συμβάλλουν στην αντικαρκινική και αντιοξειδωτική της φύση, όπως οι αμινομάδες και το χαμηλό μοριακό βάρος, συμβάλλουν και στην αντιμικροβιακή της ικανότητα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Nadeem Baig; Irshad Kammakam; Wail Falath. Nanomaterials: A Review of Synthesis Methods, Properties, Recent Progress, and Challenges. *Mater. Adv.* **2021**, 2 (6), 1821–1871. <https://doi.org/10.1039/D0MA00807A>.
- (2) Mukesh Meena; Andleeb Zehra; Prashant Swapnil; Harish; Avinash Marwal; Garima Yadav; Priyankaraj Sonigra. Endophytic Nanotechnology: An Approach to Study Scope and Potential Applications. *Front. Chem.* **2021**, 9, 613343. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.613343>.
- (3) Almas Bashir; Tahir Iqbal Awan; Aqsa Tehseen; Muhammad Bilal Tahir; Mohsin Ijaz. Interfaces and Surfaces. In *Chemistry of Nanomaterials*; Elsevier, 2020; pp 51–87. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818908-5.00003-2>.
- (4) *Emerging Research on Bioinspired Materials Engineering*; Mohamed Bououdina, Ed.; J. Davim, Series Ed.; Advances in Chemical and Materials Engineering; IGI Global, 2016. <https://doi.org/10.4018/978-1-4666-9811-6>.
- (5) *Nanomaterials*. https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/nanomaterials/en/index.htm (accessed 2023-06-30).
- (6) *Nanoparticles - what they are, how they are made*. https://www.nanowerk.com/how_nanoparticles_are_made.php (accessed 2023-06-30).
- (7) Adawiya J. Haider; Mohammad J. Haider; Mohammad S. Mehde. A Review on Preparation of Silver Nano-Particles; Beirut, Lebanon, 2018; p 030086. <https://doi.org/10.1063/1.5039273>.
- (8) Takalani Cele. Preparation of Nanoparticles. In *Engineered Nanomaterials - Health and Safety*; Sorin Marius Avramescu, Kalsoom Akhtar, Irina Fierascu, Sher Bahadar Khan, Fayaz Ali, Abdullah M. Asiri, Eds.; IntechOpen, 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90771>.
- (9) S Honary; F Zahir. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Trop. J. Pharm Res* **2013**, 12 (2), 255–264. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.19>.
- (10) Ayush Verma; Francesco Stellacci. Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. *Small* **2010**, 6 (1), 12–21. <https://doi.org/10.1002/sml.200901158>.
- (11) Eleonore Fröhlich. The Role of Surface Charge in Cellular Uptake and Cytotoxicity of Medical Nanoparticles. *IJN* **2012**, 5577. <https://doi.org/10.2147/IJN.S36111>.
- (12) Guodong Liu; Jun Wang; Yuehe Lin; Joseph Wang. Nanoparticle-Based Biosensors and Bioassays. In *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*; Elsevier, 2008; pp 441–457. <https://doi.org/10.1016/B978-012373738-0.50016-7>.
- (13) Jayanta Kumar Patra; Gitishree Das; Leonardo Fernandes Fraceto; Estefania Vangelie Ramos Campos; Maria Del Pilar Rodriguez-Torres; Laura Susana Acosta-Torres; Luis Armando Diaz-Torres; Renato Grillo; Mallappa Kumara Swamy; Shivesh Sharma; Solomon Habtemariam; Han-Seung Shin. Nano Based Drug Delivery Systems: Recent Developments and Future Prospects. *J Nanobiotechnol* **2018**, 16 (1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>.
- (14) Yoshinobu Fukumori; Hideki Ichikawa. Nanoparticles for Cancer Therapy and Diagnosis. *Advanced Powder Technology* **2006**, 17 (1), 1–28. <https://doi.org/10.1163/156855206775123494>.
- (15) Suphiya Parveen; Ranjita Misra; Sanjeeb K. Sahoo. Nanoparticles: A Boon to Drug Delivery, Therapeutics, Diagnostics and Imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2012**, 8 (2), 147–166. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.016>.
- (16) Shiza Malik; Khalid Muhammad; Yasir Waheed. Emerging Applications of Nanotechnology in Healthcare and Medicine. *Molecules* **2023**, 28 (18), 6624. <https://doi.org/10.3390/molecules28186624>.
- (17) Andreas Wicki; Dominik Witzigmann; Vimalkumar Balasubramanian; Jörg Huwyler. Nanomedicine in Cancer Therapy: Challenges, Opportunities, and Clinical Applications. *Journal of Controlled Release* **2015**, 200, 138–157. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.030>.
- (18) Neda Alasvand. Chapter 13 - Therapeutic Nanoparticles for Targeted Delivery of Anticancer Drugs.
- (19) Sofia Caspani; Ricardo Magalhães; João Pedro Araújo; Célia Tavares Sousa. Magnetic Nanomaterials as Contrast Agents for MRI. *Materials* **2020**, 13 (11), 2586. <https://doi.org/10.3390/ma13112586>.

- (20) Ashish Avasthi; Carlos Caro; Esther Pozo-Torres; Manuel Pernia Leal; María Luisa García-Martín. Magnetic Nanoparticles as MRI Contrast Agents. *Top Curr Chem (Z)* **2020**, 378 (3), 40. <https://doi.org/10.1007/s41061-020-00302-w>.
- (21) M. Antonia Busquets; Joan Estelrich; Maria Jesús Sánchez-Martín. Nanoparticles in Magnetic Resonance Imaging: From Simple to Dual Contrast Agents. *IJN* **2015**, 1727. <https://doi.org/10.2147/IJN.S76501>.
- (22) Robby A. Petros; Joseph M. DeSimone. Strategies in the Design of Nanoparticles for Therapeutic Applications. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, 9 (8), 615–627. <https://doi.org/10.1038/nrd2591>.
- (23) L Zhang; Fx Gu; Jm Chan; Az Wang; Rs Langer; Oc Farokhzad. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clin Pharmacol Ther* **2008**, 83 (5), 761–769. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100400>.
- (24) Jayanth Panyam; Vinod Labhasetwar. Biodegradable Nanoparticles for Drug and Gene Delivery to Cells and Tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, 55 (3), 329–347. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00228-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00228-4).
- (25) De Jong. Drug Delivery and Nanoparticles: Applications and Hazards. *IJN* **2008**, 133. <https://doi.org/10.2147/IJN.S596>.
- (26) Rajesh Singh; James W. Lillard. Nanoparticle-Based Targeted Drug Delivery. *Experimental and Molecular Pathology* **2009**, 86 (3), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>.
- (27) Brian P. Timko; Tal Dvir; Daniel S. Kohane. Remotely Triggerable Drug Delivery Systems. *Advanced Materials* **2010**, 22 (44), 4925–4943. <https://doi.org/10.1002/adma.201002072>.
- (28) Nastassja Lewinski; Vicki Colvin; Rebekah Drezek. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small* **2008**, 4 (1), 26–49. <https://doi.org/10.1002/sml.200700595>.
- (29) Ibrahim Khan; Khalid Saeed; Idrees Khan. Nanoparticles: Properties, Applications and Toxicities. *Arabian Journal of Chemistry* **2019**, 12 (7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>.
- (30) Andre Nel; Tian Xia. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. **2006**, 311.
- (31) Liaw Hui Zoe; Sheba R. David; Rajan Rajabalaya. Chitosan Nanoparticle Toxicity: A Comprehensive Literature Review of in Vivo and in Vitro Assessments for Medical Applications. *Toxicology Reports* **2023**, 11, 83–106. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2023.06.012>.
- (32) Shiza Malik; Khalid Muhammad; Yasir Waheed. Emerging Applications of Nanotechnology in Healthcare and Medicine. *Molecules* **2023**, 28 (18), 6624. <https://doi.org/10.3390/molecules28186624>.
- (33) Peter Hm Hoet; Irene Brüske-Hohlfeld; Oleg V Salata. [No Title Found]. *J Nanobiotechnol* **2004**, 2 (1), 12. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-12>.
- (34) Saket Asati; Adarsh Sahu; Ashish Jain. Nanotoxicity: The Dark Side of Nanoformulations. *CNTP* **2021**, 1 (1), 6–25. <https://doi.org/10.2174/2665980801999201230095324>.
- (35) D'souza, A. A.; Shegokar, R. Polyethylene Glycol (PEG): A Versatile Polymer for Pharmaceutical Applications. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2016**, 13 (9), 1257–1275. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182485>.
- (36) Greco, F.; Vicent, M. J. Combination Therapy: Opportunities and Challenges for Polymer–Drug Conjugates as Anticancer Nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**, 61 (13), 1203–1213. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.05.006>.
- (37) T. Kean; M. Thanou. Biodegradation, Biodistribution and Toxicity of Chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62 (1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004>.
- (38) Islem Younes; Marguerite Rinaudo. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs* **2015**, 13 (3), 1133–1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>.
- (39) M. Dash; F. Chiellini; R.M. Ottenbrite; E. Chiellini. Chitosan—A Versatile Semi-Synthetic Polymer in Biomedical Applications. *Progress in Polymer Science* **2011**, 36 (8), 981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>.

- (40) Sunil A. Agnihotri; Nadagouda N. Mallikarjuna; Tejrjaj M. Aminabhavi. Recent Advances on Chitosan-Based Micro- and Nanoparticles in Drug Delivery. *Journal of Controlled Release* **2004**, *100* (1), 5–28. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.010>.
- (41) Stephany Celeste Gutiérrez-Ruiz; Hernán Cortes; Maykel González-Torres; Zainab M. Almarhoon; Eda Sönmez Güler; Javad Sharifi-Rad; Gerardo Leyva-Gómez. Optimize the Parameters for the Synthesis by the Ionic Gelation Technique, Purification, and Freeze-Drying of Chitosan-Sodium Tripolyphosphate Nanoparticles for Biomedical Purposes. *J Biol Eng* **2024**, *18* (1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13036-024-00403-w>.
- (42) Samah Attia Algharib; Ali Dawood; Kaixiang Zhou; Dongmei Chen; Chao Li; Kuiyu Meng; Aoxue Zhang; Wanhe Luo; Saeed Ahmed; Lingli Huang; Shuyu Xie. Preparation of Chitosan Nanoparticles by Ionotropic Gelation Technique: Effects of Formulation Parameters and in Vitro Characterization. *Journal of Molecular Structure* **2022**, *1252*, 132129. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.132129>.
- (43) Patrizia Agostinis; Kristian Berg; Keith A. Cengel; Thomas H. Foster; Albert W. Girotti; Sandra O. Gollnick; Stephen M. Hahn; Michael R. Hamblin; Asta Juzeniene; David Kessel; Mladen Korbelik; Johan Moan; Pawel Mroz; Dominika Nowis; Jacques Piette; Brian C. Wilson; Jakub Golab. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2011**, *61* (4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>.
- (44) Mircea Tampa; Maria-Isabela Sarbu; Clara Matei; Cristina-Iulia Mitran; Madalina-Irina Mitran; Constantin Caruntu; Carolina Constantin; Monica Neagu; Simona-Roxana Georgescu. Photodynamic Therapy: A Hot Topic in Dermato-Oncology (Review). *Oncol Lett* **2019**. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.9939>.
- (45) Ancely Ferreira Dos Santos; Daria Raquel Queiroz De Almeida; Leticia Ferreira Terra; Mauricio S. Baptista; Leticia Labriola. Photodynamic Therapy in Cancer Treatment - an Update Review. *JCMT* **2019**, *2019*. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2018.83>.
- (46) Pawel Mroz; Anastasia Yaroslavsky; Gitika B Kharkwal; Michael R. Hamblin. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers* **2011**, *3* (2), 2516–2539. <https://doi.org/10.3390/cancers3022516>.
- (47) Brondwyn S. McGhie; Janice R. Aldrich-Wright. Photoactive and Luminescent Transition Metal Complexes as Anticancer Agents: A Guiding Light in the Search for New and Improved Cancer Treatments. *Biomedicines* **2022**, *10* (3), 578. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030578>.
- (48) Brian C Wilson; Michael S Patterson. The Physics, Biophysics and Technology of Photodynamic Therapy. *Phys. Med. Biol.* **2008**, *53* (9), R61–R109. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/9/R01>.
- (49) Ασπασία Γ Πετρή and Aspasia G. Petri, “Διερεύνηση Μηχανισμών Συνδυαστικής Δράσης Φωτός, Φωτοευαίσθητων Ουσιών & Φυσικών Αντιοξειδωτικών Σε Μοντέλα Νεοπλασιών Με Ανάπτυξη Οπτικών Μεθόδων,” Study of Light, Photosensitizing Agents and Natural Compounds Interactions Mechanisms in Cancer Models by the Development of Optical Methods, Jun. 2013, Doi: 10.26240/Heal.Ntua.951.
- (50) Jianming Chen; Taojian Fan; Zhongjian Xie; Qiqiao Zeng; Ping Xue; Tingting Zheng; Yun Chen; Xiaoling Luo; Han Zhang. Advances in Nanomaterials for Photodynamic Therapy Applications: Status and Challenges. *Biomaterials* **2020**, *237*, 119827. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119827>.
- (51) Minhuan Lan; Shaojing Zhao; Weimin Liu; Chun-Sing Lee; Wenjun Zhang; Pengfei Wang. Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Adv. Healthcare Mater.* **2019**, *8* (13), 1900132. <https://doi.org/10.1002/adhm.201900132>.
- (52) Rengarajan Baskaran; Junghan Lee; Su-Geun Yang. Clinical Development of Photodynamic Agents and Therapeutic Applications. *Biomater Res* **2018**, *22* (1), 25. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0140-z>.
- (53) David Kessel; Nancy L. Oleinick. Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update. *Photochem Photobiol* **2018**, *94* (2), 213–218. <https://doi.org/10.1111/php.12857>.
- (54) Pawel Mroz; Anastasia Yaroslavsky; Gitika B Kharkwal; Michael R. Hamblin. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers* **2011**, *3* (2), 2516–2539. <https://doi.org/10.3390/cancers3022516>.

- (55) Esther Buytaert; Michael Dewaele; Patrizia Agostinis. Molecular Effectors of Multiple Cell Death Pathways Initiated by Photodynamic Therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2007**, *1776* (1), 86–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.07.001>.
- (56) C.A. Robertson; D. Hawkins Evans; H. Abrahamse. Photodynamic Therapy (PDT): A Short Review on Cellular Mechanisms and Cancer Research Applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2009**, *96* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001>.
- (57) Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2011**, *61* (4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>.
- (58) The Role of Apoptosis in Response to Photodynamic Therapy: What, Where, Why, and How. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1* (1), 1–21. <https://doi.org/10.1039/b108586g>.
- (59) Dominika Nowis; Tomasz Stokłosa; Magdalena Legat; Tadeusz Issat; Marek Jakóbiśiak; Jakub Gołąb. The Influence of Photodynamic Therapy on the Immune Response. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2005**, *2* (4), 283–298. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00098-0](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00098-0).
- (60) Ana P. Castano; Tatiana N. Demidova; Michael R. Hamblin. Mechanisms in Photodynamic Therapy: Part Three—Photosensitizer Pharmacokinetics, Biodistribution, Tumor Localization and Modes of Tumor Destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2005**, *2* (2), 91–106. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00060-8](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00060-8).
- (61) Ian J. Macdonald; Thomas J. Dougherty. Basic Principles of Photodynamic Therapy. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2001**, *05* (02), 105–129. <https://doi.org/10.1002/jpp.328>.
- (62) Raymond Bonnett. Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24* (1), 19. <https://doi.org/10.1039/cs9952400019>.
- (63) K. Plaetzer; B. Krammer; J. Berlanda; F. Berr; T. Kiesslich. Photophysics and Photochemistry of Photodynamic Therapy: Fundamental Aspects. *Lasers Med Sci* **2009**, *24* (2), 259–268. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0539-1>.
- (64) K. Lang; J. Mosinger; D.M. Wagnerová. Photophysical Properties of Porphyrinoid Sensitizers Non-Covalently Bound to Host Molecules; Models for Photodynamic Therapy. *Coordination Chemistry Reviews* **2004**, *248* (3–4), 321–350. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.02.004>.
- (65) Ron R. Allison; Claudio H. Sibata. Oncologic Photodynamic Therapy Photosensitizers: A Clinical Review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2010**, *7* (2), 61–75. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.02.001>.
- (66) Ron R Allison; Gordon H Downie; Rosa Cuenca; Xin-Hua Hu; Carter JH Childs; Claudio H Sibata. Photosensitizers in Clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2004**, *1* (1), 27–42. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00007-9).
- (67) Halina Mojzisořova; Stéphanie Bonneau; Daniel Brault. Structural and Physico-Chemical Determinants of the Interactions of Macrocyclic Photosensitizers with Cells. *Eur Biophys J* **2007**, *36* (8), 943–953. <https://doi.org/10.1007/s00249-007-0204-9>.
- (68) Ana P. Castano; Tatiana N. Demidova; Michael R. Hamblin. Mechanisms in Photodynamic Therapy: Part One—Photosensitizers, Photochemistry and Cellular Localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2004**, *1* (4), 279–293. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4).
- (69) Asta Juzeniene; Qian Peng; Johan Moan. Milestones in the Development of Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6* (12), 1234. <https://doi.org/10.1039/b705461k>.
- (70) Tayyaba Hasan; Anne C E Moor; Bernard Ortel. Photodynamic Therapy Of Cancer. 14.
- (71) Fiona Stewart; Paul Baas; Willem Star. What Does Photodynamic Therapy Have to Offer Radiation Oncologists (or Their Cancer Patients)? *Radiotherapy and Oncology* **1998**, *48* (3), 233–248. [https://doi.org/10.1016/S0167-8140\(98\)00063-2](https://doi.org/10.1016/S0167-8140(98)00063-2).
- (72) Raymond Bonnett; Gabriel Martínez. Photobleaching of Sensitizers Used in Photodynamic Therapy. *Tetrahedron* **2001**, *57* (47), 9513–9547. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00952-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00952-8).

- (73) N. V. Kudinova; T. T. Berezov. Photodynamic Therapy of Cancer: Search for Ideal Photosensitizer. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B* **2010**, *4* (1), 95–103. <https://doi.org/10.1134/S1990750810010129>.
- (74) Dev Kumar Chatterjee; Li Shan Fong; Yong Zhang. Nanoparticles in Photodynamic Therapy: An Emerging Paradigm. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60* (15), 1627–1637. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.003>.
- (75) Guanying Chen; Hailong Qiu; Paras N. Prasad; Xiaoyuan Chen. Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (10), 5161–5214. <https://doi.org/10.1021/cr400425h>.
- (76) Jacky Fong-Chuen Loo; Yi-Hsin Chien; Feng Yin; Siu-Kai Kong; Ho-Pui Ho; Ken-Tye Yong. Upconversion and Downconversion Nanoparticles for Biophotonics and Nanomedicine. *Coordination Chemistry Reviews* **2019**, *400*, 213042. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.213042>.
- (77) Shigenobu Yano; Shiho Hirohara; Makoto Obata; Yuichiro Hagiya; Shun-ichiro Ogura; Atsushi Ikeda; Hiromi Kataoka; Mamoru Tanaka; Takashi Joh. Current States and Future Views in Photodynamic Therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2011**, *12* (1), 46–67. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2011.06.001>.
- (78) *Photofrin (Porfimer Sodium): Uses, Dosage, Side Effects, Interactions, Warning*. RxList. <https://www.rxlist.com/photofrin-drug.htm> (accessed 2021-09-22).
- (79) Adam J. Plaunt; Kara M. Harmatys; Kyle A. Hendrie; Anthony J. Musso; Bradley D. Smith. Chemically Triggered Release of 5-Aminolevulinic Acid from Liposomes. *RSC Adv.* **2014**, *4* (101), 57983–57990. <https://doi.org/10.1039/C4RA10340H>.
- (80) Thalita de Souza; Felipe Antonio; Mateus Zanotto; Paula Homem-de-Mello; Anderson Ribeiro. Photophysical and Photochemical Properties and Aggregation Behavior of Phthalocyanine and Naphthalocyanine Derivatives. *J. Braz. Chem. Soc.* **2017**. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170215>.
- (81) Vladimir I. Makarov; Daria V. Pominova; Anastasiya V. Ryabova; Igor D. Romanishkin; Arina V. Voitova; Rudolf W. Steiner; Victor B. Loschenov. Theranostic Properties of Crystalline Aluminum Phthalocyanine Nanoparticles as a Photosensitizer. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (10), 2122. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102122>.
- (82) Antonio Carlos Figueiredo Vendette; Henrique Luis Piva; Luis Alexandre Muehlmann; Delfrank Ananias De Souza; Antonio Claudio Tedesco; Ricardo Bentes Azevedo. Clinical Treatment of Intra-Epithelia Cervical Neoplasia with Photodynamic Therapy. *International Journal of Hyperthermia* **2020**, *37* (3), 50–58. <https://doi.org/10.1080/02656736.2020.1804077>.
- (83) Leonardo Lobo Ribeiro Cavalcante; Antonio Claudio Tedesco; Luandra Aparecida Unten Takahashi; Fabiana Almeida Curylofo-Zotti; Aline Evangelista Souza-Gabriel; Silmara Aparecida Milori Corona. Conjugate of Chitosan Nanoparticles with Chloroaluminium Phthalocyanine: Synthesis, Characterization and Photoinactivation of Streptococcus Mutans Biofilm. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2020**, *30*, 101709. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101709>.
- (84) Hong Cheng; Jing-Yi Zhu; Shi-Ying Li; Jin-Yue Zeng; Qi Lei; Ke-Wei Chen; Chi Zhang; Xian-Zheng Zhang. An O₂ Self-Sufficient Biomimetic Nanoplatform for Highly Specific and Efficient Photodynamic Therapy. *Adv Funct Materials* **2016**, *26* (43), 7847–7860. <https://doi.org/10.1002/adfm.201603212>.
- (85) Ting Zhu; Leilei Shi; Chuan Ma; Li Xu; Jiawei Yang; Guoyu Zhou; Xinyuan Zhu; Lingyue Shen. Fluorinated Chitosan-Mediated Intracellular Catalase Delivery for Enhanced Photodynamic Therapy of Oral Cancer. *Biomater. Sci.* **2021**, *9* (3), 658–662. <https://doi.org/10.1039/D0BM01898H>.
- (86) Reda M. El-Shishtawy; Nahed S. E. Ahmed; Yaaser Q. Almulaiky. Immobilization of Catalase on Chitosan/ZnO and Chitosan/ZnO/Fe₂O₃ Nanocomposites: A Comparative Study. *Catalysts* **2021**, *11* (7), 820. <https://doi.org/10.3390/catal11070820>.
- (87) Lingyue Shen; Yu Huang; Dong Chen; Feng Qiu; Chuan Ma; Xin Jin; Xinyuan Zhu; Guoyu Zhou; Zhiyuan Zhang. pH-Responsive Aerobic Nanoparticles for Effective Photodynamic Therapy. *Theranostics* **2017**, *7* (18), 4537–4550. <https://doi.org/10.7150/thno.19546>.

- (88) F. Jiang; A. M. Robin; M. Katakowski; L. Tong; M. Espiritu; G. Singh; M. Chopp. Photodynamic Therapy with Photofrin in Combination with Buthionine Sulfoximine (BSO) of Human Glioma in the Nude Rat. *Lasers in Medical Science* **2003**, *18* (3), 128–133. <https://doi.org/10.1007/s10103-003-0269-3>.
- (89) Jianzhi Zhu; Tingting Xiao; Jiulong Zhang; Hailong Che; Yuxin Shi; Xiangyang Shi; Jan C. M. Van Hest. Surface-Charge-Switchable Nanoclusters for Magnetic Resonance Imaging-Guided and Glutathione Depletion-Enhanced Photodynamic Therapy. *ACS Nano* **2020**, *14* (9), 11225–11237. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c03080>.
- (90) Willem M. Star. Light Delivery and Light Dosimetry for Photodynamic Therapy. *Laser Med Sci* **1990**, *5* (2), 107–113. <https://doi.org/10.1007/BF02031371>.
- (91) Michele M. Kim; Arash Darafsheh. Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol* **2020**, *96* (2), 280–294. <https://doi.org/10.1111/php.13219>.
- (92) L. Brancalion; H. Moseley. Laser and Non-Laser Light Sources for Photodynamic Therapy. *Lasers Med Sci* **2002**, *17* (3), 173–186. <https://doi.org/10.1007/s101030200027>.
- (93) Il Yoon; Jia Zhu Li; Young Key Shim. Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy. *Clin Endosc* **2013**, *46* (1), 7. <https://doi.org/10.5946/ce.2013.46.1.7>.
- (94) Alexander C. Kübler. Photodynamic Therapy. *Medical Laser Application* **2005**, *20* (1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.mla.2005.02.001>.
- (95) Carina Silva De Paula; Antonio Cláudio Tedesco; Fernando Lucas Primo; José Mário Carneiro Vilela; Margareth Spangler Andrade; Vanessa Carla Furtado Mosqueira. Chloroaluminium Phthalocyanine Polymeric Nanoparticles as Photosensitisers: Photophysical and Physicochemical Characterisation, Release and Phototoxicity in Vitro. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2013**, *49* (3), 371–381. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.03.011>.
- (96) Débora Cerdá-Bernad; Ioanna Pitterou; Andromachi Tzani; Anastasia Detsi; María José Frutos. “Novel Chitosan/Alginate Hydrogels as Carriers of Phenolic-Enriched Extracts from Saffron Floral by-Products Using Natural Deep Eutectic Solvents as Green Extraction Media.” *Current Research in Food Science* **2023**, *6*, 100469. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100469>.
- (97) Antonio Carlos Figueiredo Vendette; Henrique Luis Piva; Luis Alexandre Muehlmann; Delfrank Ananias De Souza; Antonio Claudio Tedesco; Ricardo Bentes Azevedo. Clinical Treatment of Intra-Epithelia Cervical Neoplasia with Photodynamic Therapy. *International Journal of Hyperthermia* **2020**, *37* (3), 50–58. <https://doi.org/10.1080/02656736.2020.1804077>.
- (98) Leonardo Lobo Ribeiro Cavalcante; Antonio Claudio Tedesco; Luandra Aparecida Unten Takahashi; Fabiana Almeida Curylofo-Zotti; Aline Evangelista Souza-Gabriel; Silmara Aparecida Milori Corona. Conjugate of Chitosan Nanoparticles with Chloroaluminium Phthalocyanine: Synthesis, Characterization and Photoinactivation of Streptococcus Mutans Biofilm. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2020**, *30*, 101709. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101709>.
- (99) Anastasia Detsi; Eleni Kavetsou; Ioanna Kostopoulou; Ioanna Pitterou; Antonella Rozaria Nefeli Pontillo; Andromachi Tzani; Paris Christodoulou; Aristeia Siliachli; Panagiotis Zoumpoulakis. Nanosystems for the Encapsulation of Natural Products: The Case of Chitosan Biopolymer as a Matrix. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (7), 669. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070669>.
- (100) Yi-Hsuan Hsieh; Wen-Ching Chuang; Kun-Hua Yu; Cheng-Ping Jheng; Cheng-I Lee. Sequential Photodynamic Therapy with Phthalocyanine Encapsulated Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles and Flucytosine Treatment against *Candida Tropicalis*. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (1), 16. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11010016>.
- (101) Samah A Loutfy; Hanaa M Alam El-Din; Mostafa H Elberry; Nanis G Allam; M T M Hasanin; Ahmed M Abdellah. Synthesis, Characterization and Cytotoxic Evaluation of Chitosan Nanoparticles: *In Vitro* Liver Cancer Model. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, *7* (3), 035008. <https://doi.org/10.1088/2043-6262/7/3/035008>.
- (102) Sourav Bhattacharjee. DLS and Zeta Potential – What They Are and What They Are Not? *Journal of Controlled Release* **2016**, *235*, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.

- (103) Dynamic Light Scattering in 30 Minutes.Pdf.
<https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/Dynamic%20light%20scattering%20in%2030%20minutes.pdf> (accessed 2022-11-15).
- (104) Greg Swain. Principles of FTIR Spectroscopy. 6.
- (105) Doyle, W. M. *Principles and Applications of Fourier Transform Infra-red (FTIR) Process Analysis*.
[https://www.semanticscholar.org/paper/Principles-and-Applications-of-Fourier-Transform-\(-Doyle/8b9108726fe76043badeecd1c75ed6e72352b8a1](https://www.semanticscholar.org/paper/Principles-and-Applications-of-Fourier-Transform-(-Doyle/8b9108726fe76043badeecd1c75ed6e72352b8a1) (accessed 2021-12-22).
- (106) Caro, C. D.; Claudia, H. *UV/VIS Spectrophotometry - Fundamentals and Applications*; 2015.
- (107) 10.6: Photoluminescence Spectroscopy. Chemistry LibreTexts.
https://chem.libretexts.org/Courses/Northeastern_University/10%3A_Spectroscopic_Methods/10.6%3A_Photoluminescence_Spectroscopy (accessed 2021-12-22).
- (108) Eaton-Magana, S.; Breeding, C. M. An Introduction to Photoluminescence Spectroscopy for Diamond and Its Applications in Gemology. *G&G* **2016**, 52 (1), 2–17. <https://doi.org/10.5741/GEMS.52.1.2>.
- (109) *What is Photoluminescence spectroscopy?* https://www.horiba.com/en_en/products/by-technique/molecular-spectroscopy/photoluminescence-pl-electroluminescence-el/ (accessed 2021-12-22).
- (110) PubChem. 5-CM-H2Dcfda. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23847175> (accessed 2022-02-03).
- (111) CM-H2DCFDA (General Oxidative Stress Indicator).
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C6827> (accessed 2022-02-03).
- (112) Inés Scalise; Edgardo N. Durantini. Synthesis, Properties, and Photodynamic Inactivation of Escherichia Coli Using a Cationic and a Noncharged Zn(II) Pyridyloxypthalocyanine Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, 13 (8), 3037–3045.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.01.063>.
- (113) K. Bayo; J.C. Mossoyan; G.V. Ouedraogo. Preparation and Analysis by UV-Vis of Zinc Phthalocyanine Complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2004**, 60 (3), 653–657. [https://doi.org/10.1016/S1386-1425\(03\)00275-0](https://doi.org/10.1016/S1386-1425(03)00275-0).
- (114) Jinglei Li; Haishan Wu; Kexin Jiang; Yuting Liu; Liu Yang; Hyun Jin Park. Alginate Calcium Microbeads Containing Chitosan Nanoparticles for Controlled Insulin Release. *Appl Biochem Biotechnol* **2021**, 193 (2), 463–478. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03420-9>.
- (115) N Mohammadpour Dounighi; R Eskandari; Mr Avadi; H Zolfagharian; A Mir Mohammad Sadeghi; M Rezayat. Preparation and in Vitro Characterization of Chitosan Nanoparticles Containing Mesobuthus Eupeus Scorpion Venom as an Antigen Delivery System. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis* **2012**, 18 (1), 44–52. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992012000100006>.
- (116) Samah Attia Algharib; Ali Dawood; Kaixiang Zhou; Dongmei Chen; Chao Li; Kuiyu Meng; Aoxue Zhang; Wanhe Luo; Saeed Ahmed; Lingli Huang; Shuyu Xie. Preparation of Chitosan Nanoparticles by Ionotropic Gelation Technique: Effects of Formulation Parameters and in Vitro Characterization. *Journal of Molecular Structure* **2022**, 1252, 132129. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.132129>.
- (117) S Y Azhary; D Purnama; F F Florena; M Vanitha; Muchtaridi; C Panatarani; I M Joni. Synthesis and Characterization of Chitosan:SiO2 Nanocomposite by Ultrasonic Spray Drying. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* **2019**, 550 (1), 012037. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/550/1/012037>.
- (118) Fabiola Galbiatti De Carvalho; Taís Chaves Magalhães; Natália Moreira Teixeira; Brenna Louise Cavalcanti Gondim; Hugo Lemes Carlo; Rogério Lacerda Dos Santos; Alan Reis De Oliveira; Ângelo Marcio Leite Denadai. Synthesis and Characterization of TPP/Chitosan Nanoparticles: Colloidal Mechanism of Reaction and Antifungal Effect on C. Albicans Biofilm Formation. *Materials Science and Engineering: C* **2019**, 104, 109885. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109885>.
- (119) R. Seoudi; G.S. El-Bahy; Z.A. El Sayed. FTIR, TGA and DC Electrical Conductivity Studies of Phthalocyanine and Its Complexes. *Journal of Molecular Structure* **2005**, 753 (1–3), 119–126.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2005.06.003>.

- (120) Tamara Basova; Vladimir Plyashkevich; Fotini Petraki; Heiko Peisert; Thomas Chassé. Magnetic Field-Induced Reactions on the Surface of Chloroaluminum Phthalocyanine Thin Films. *The Journal of Chemical Physics* **2011**, *134* (12), 124703. <https://doi.org/10.1063/1.3569860>.
- (121) Afsaneh Hosseini Aghdam; Mohammad Esmaeil Azim Araghi; Vahid Vatanpour. Tuning the Band Gap of the Graphene Oxide-Chloro Aluminum Phthalocyanine Nanocomposite by Reducing the Rate of Graphene Oxide. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **2020**, *115*, 113636. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2019.113636>.
- (122) Zeinab Abedian; Ali Akbar Moghadamnia; Ebrahim Zabihi; Roghayeh Pourbagher; Hamid Reza Nouri; Hamed Tashakorian; Masoumeh Ghasemi; Niloofer Jenabian. Anticancer Properties of Chitosan on Osteocarcinoma , Breast Cancer and Cervical Cancer Cell Lines. *Caspian J Intern Med* **2019**, *10* (4). <https://doi.org/10.22088/cjim.10.4.439>.
- (123) Jae Kweon Park; Mi Ja Chung; Ha Na Choi; Yong Il Park. Effects of the Molecular Weight and the Degree of Deacetylation of Chitosan Oligosaccharides on Antitumor Activity. *IJMS* **2011**, *12* (1), 266–277. <https://doi.org/10.3390/ijms12010266>.
- (124) Caiqin Qin; Yumin Du; Ling Xiao; Zhan Li; Xiaohai Gao. Enzymic Preparation of Water-Soluble Chitosan and Their Antitumor Activity. *International Journal of Biological Macromolecules* **2002**, *31* (1–3), 111–117. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(02\)00064-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00064-8).
- (125) Md Salman Shakil; Kazi Mustafa Mahmud; Mohammad Sayem; Mahruba Sultana Niloy; Sajal Kumar Halder; Md. Sakib Hossen; Md. Forhad Uddin; Md. Ashraful Hasan. Using Chitosan or Chitosan Derivatives in Cancer Therapy. *Polysaccharides* **2021**, *2* (4), 795–816. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2040048>.
- (126) Patricia Garcia Ferreira; Vitor Francisco Ferreira; Fernando De Carvalho Da Silva; Cyntia Silva Freitas; Patricia Ribeiro Pereira; Vania Margaret Flosi Paschoalin. Chitosans and Nanochitosans: Recent Advances in Skin Protection, Regeneration, and Repair. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (6), 1307. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061307>.
- (127) Dai-Hung Ngo; Se-Kwon Kim. Antioxidant Effects of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives. In *Advances in Food and Nutrition Research*; Elsevier, 2014; Vol. 73, pp 15–31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00002-0>.
- (128) Lijie Wei; Wenqiang Tan; Gang Wang; Qing Li; Fang Dong; Zhanyong Guo. The Antioxidant and Antifungal Activity of Chitosan Derivatives Bearing Schiff Bases and Quaternary Ammonium Salts. *Carbohydrate Polymers* **2019**, *226*, 115256. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115256>.