



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Ανόργανη Χημεία και Εφαρμογές της στην Βιομηχανία»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Θεραπωστικές» εφαρμογές νανοσωματιδίων
του χρυσού, τροποποιημένων με αναστολείς
της αγγειογένεσης, στον καρκίνο του
γλοιοβλαστώματος**

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ Π. ΣΤΑΥΡΟΠΟΥΛΟΥ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2020

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**“ Θερανωστικές εφαρμογές νανোসωματιδίων του χρυσού,
τροποποιημένων με αναστολείς της αγγειογένεσης, στον
καρκίνο του γλοιοβλαστώματος ”**

Σταυροπούλου Αναστασία

A.M.: 181803

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

*Ευθυμιάδου Ελένη, Επίκουρος Καθηγήτρια Ανόργανης Χημείας Εθνικού και
Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

*Ευθυμιάδου Ελένη, Επίκουρος Καθηγήτρια Ανόργανης Χημείας Εθνικού και
Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών*

*Μητσοπούλου Χριστίνα-Άννα, Καθηγήτρια Ανόργανης Χημείας Εθνικού και
Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών*

*Μεθενίτης Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ανόργανης Χημείας
Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι ο σχεδιασμός, η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η βιολογική αξιολόγηση φαρμάκων και νανο-συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, με σκοπό την στόχευση της καρκινικής αγγειογένεσης.

Τα νανο-συστήματα μεταφοράς φαρμάκου που παρουσιάζονται, είναι νανοσωματίδια χρυσού σφαιρικού σχήματος, τα οποία έχουν επικαλυφθεί με κιτρικό οξύ, ώστε να δημιουργηθούν καλά κολλοειδή υδατικά διαλύματα. Μέσω της εκμετάλλευσης του κιτρικού οξέος, γίνεται επικάλυψη των νανοσωματιδίων νανοσωματίδια χρυσού με νανοσωματίδια λευκόχρυσου, προκειμένου να προκληθεί οξειδωτικό στρες στα κύτταρα που βρίσκονται κοντά στο σημείο στόχευσης, ώστε να ενισχυθεί η αντικαρκινική δράση. Παράλληλα, γίνεται σύνθεση μικρού οργανικού μορίου, με το οποίο γίνεται ενεργητική στόχευση, σε έναν από τους παράγοντες ανάπτυξης της αγγειογένεσης, του Αγγειακού Αυξητικού Ενδοθηλιακού Παράγοντα, αποτρέποντας την έκφρασή του, συνεπώς και την ανάπτυξη της αγγειογένεσης. Το μικρό οργανικό μόριο που συντίθενται είναι παράγωγο της κινολίνης, που είναι ευρέως διαδεδομένη για τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της. Το μικρό οργανικό μόριο που συντίθεται συνδέεται στα νανοσωματίδια χρυσού.

Τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκου εξετάζονται σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος, U87MG, D54 και U251 οι οποίες είναι αγγείο-εξαρτώμενες καρκινικές σειρές, καθώς και στην υγιή σειρά εμβρυονικών κυττάρων ήπατος HEK293. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστήματα απεικόνισης, εκμεταλλευόμενο, τις οπτικές ιδιότητες του χρυσού, οι οποίες μάλιστα ενισχύονται όταν τα νανοσωματίδια χρυσού συνδέονται με τα νανοσωματίδια λευκόχρυσου.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Νανοτεχνολογία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Νανοσωματίδια, Χρυσός, Πλατίνα, Αγγειογένεση, Γλοιοβλάστωμα

ABSTRACT

The purpose of this thesis is the design, synthesis, characterisation and biological evaluation of drugs and Nano-drug delivery systems, to target the cancerous angiogenesis.

The presented Nano-systems consist of spherical gold nanoparticles coated with citric acid in order to have good colloidal solutions. Taking advantage of the citric acid, the gold nanoparticles are coated with platinum nanoparticles to cause oxidative stress to the cells which are near the targeted region, in order to enhance the anticancer activity. Furthermore, a small organic molecule is synthesized, through which, energetic targeting of an angiogenesis factor, the Vascular Endothelial Growth Factor will probably be succeeded, inhibiting its expression and thus the angiogenesis. The small organic molecule synthesized is a quinazoline derivative, since quinazoline is widely known for its anti-inflammatory activity. The small organic molecule will also be conjugated to the gold nanoparticles.

These Drug Delivery Systems (DDS) are tested in glioblastoma cell lines, U87MG, D54 that are angiogenetic-dependent cancer cell lines and the U251 which is not VEGFR-dependent, as well as the HEK293 cell line, which is healthy embryonic cells of liver. The DDS can be used as imaging agents due to the optical properties of the gold, which are enhanced when the gold nanoparticles are coated with the platinum nanoparticles.

SUBJECT AREA: Nanotechnology

KEY WORDS: Nanoparticles, Gold, Platinum, Angiogenesis, Glioblastoma

Στον άνθρωπο που μου δίνει δύναμη για ζωή,

στην γιαγιά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια μου κ. Ελένη Ευθυμιάδου, για την πολύτιμη βοήθειά της καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, για τον χρόνο που μου αφιέρωσε, για την στήριξή της και την αγάπη της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια Ανόργανης Χημείας του ΕΚΠΑ κ. Χριστίνα Άννα Μητσοπούλου, και τον αναπληρωτή Καθηγητή Ανόργανης Χημείας κ. Κωνσταντίνο Μεθενίτη που δέχτηκαν να είναι μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Γεώργιο Μήτρικα, για την φιλοξενία στο εργαστήριο Sol Gel, στο Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», για την πραγματοποίηση μεγάλου μέρους των πειραμάτων, καθώς επίσης και τον Δρ. Νίκο Μπούκο, μαζί με τον Δρ. Ηλία Σακέλλη για τις εικόνες TEM και τα φάσματα φωτοφωταύγειας που λήφθηκαν. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Dr Oliviero Gobbo, στο Trinity College Dublin School of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences and Institute of Neuroscience, και εκείνο για τις εικόνες TEM. Για τις εικόνες AFM, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Γουρνή με τον διδακτορικό του φοιτητή Νίκο Χαλμπέ, από το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου, ιδιαιτέρως την Υποψήφια διδάκτωρ Μαρία Θεοδοσίου, για την βοήθεια της τόσο εργαστηριακά, όσο και βιβλιογραφικά.

Ευχαριστώ τις φίλες μου Παναγιώτα, Νικόλ, Κατερίνα, Σοφία και Κρίστου, που δίνουν χρώμα στην ζωή μου.

Τέλος, το μεγαλύτερο «ευχαριστώ» το οφείλω στους γονείς μου, τον Πολύδωρο και την Εύη, που με εμπιστεύονται και με στηρίζουν σε όλες μου τις αποφάσεις

και σε κάθε βήμα μου, που με εκείνους κοντά μου κάθε χαρά είναι διπλάσια και
κάθε στεναχώρια μισή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.0 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	25
1.1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	25
1.3 ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ.....	27
1.3.1 Ιστορική Αναδρομή.....	27
1.3.2 Νανοσωματίδια ως συστήματα μεταφοράς και απελευθέρωσης φαρμάκου.....	30
1.3.3 Χρυσός.....	32
1.3.4 Λευκόχρυσος	44
1.4 ΝΕΟΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ	47
1.5 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ	49
1.5.1 Αγγειογένεση Εκβλάστησης	49
1.5.2 Αγγειογένεση Διαχωρισμού	51
1.5.3 Αγγειοποιητίνες και υποδοχείς πρόσδεσης (angiopoietins and tie receptors).....	58
1.6 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	61
1.7 ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ	62
1.7.1 Παθητική Στόχευση	62
1.7.2 Ενεργητική Στόχευση	63
1.8 ΜΟΡΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	65

1.8.1	Κιναζολίνη.....	65
1.8.2	Αμινοξέα ως θεραπευτικοί παράγοντες	67
1.9	ΣΤΟΧΟΣ.....	69
2	ΚΕΦΑΛΑΙΟ	71
2.0	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	71
2.1	Δομικός-Μορφολογικός Χαρακτηρισμός.....	72
2.1.1	Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού	72
2.1.2	Φωτοφωταύγεια	82
2.1.3	Δυναμική Σκέδαση Φωτός.....	85
2.1.4	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης	88
2.1.5	Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης	89
2.2	Βιολογική Αξιολόγηση	90
2.2.1	Έλεγχος βιοσυμβατότητας μέσω αιμόλυσης.....	90
2.2.2	Προσδιορισμός ζωτικότητας κυττάρων μέσω της διαδικασίας MTT 92	
2.2.3	Μικροσκοπία Φθορισμού	94
2.3	Υλικά και Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν	95
3	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	99
3.0	ΣΥΝΘΕΣΕΙΣ – ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	99
3.1	Νανοσωματίδια Χρυσού Με Τρι-Νάτριο Άλας Κιτρικού Οξέος ως Αναγωγικό Μέσο (AuNPs).....	100

3.1.1	Σύνθεση Νανოსωματιδίων χρυσού	100
3.1.2	Διαδικασία Καθαρισμού Νανოსωματιδίων Χρυσού.....	101
3.2	Νανοςωματίδια Χρυσού επικαλυμμένα με νανοςωματίδια Λευκόχρυσου	102
3.2.1	Σύνθεση Νανοςωματιδίων Χρυσού επικαλυμμένων με κιτρικό οξύ και τροποποιημένων με νανοςωματίδια Λευκόχρυσου (Au@Pt NPs) ..	102
3.3	Σύνθεση Οργανικού Μορίου	104
3.4	Τροποποίηση Au@PtNPs με APTMS (Au@Pt@APTMS NPs)	106
3.5	Σύνδεση του οργανικού μορίου (παράγωγο της Κιναζολίνης ή Qd) στα Au@Pt@APTMS NPs (Au@Pt@Qd NPs).....	106
4	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΙ.....	109
4.0	Χαρακτηρισμός συντιθέμενων Νανοςωματιδίων	110
4.0.1	Χαρακτηρισμός Νανοςωματιδίων Χρυσού	110
4.0.2	Χαρακτηρισμός Νανοςωματιδίων Χρυσού επικαλυμμένων με νανοςωματίδια λευκόχρυσου	116
4.1	Βιολογική Αξιολόγηση	123
4.1.1	Αιμόλυση.....	123
4.1.2	MTT αξιολόγηση	126
4.1.3	Μικροσκοπία Φθορισμού	130
4.2	Χαρακτηρισμός Οργανικού Μορίου	133
4.3	ΠΙΝΑΚΑΣ: Ορολογίας, Συντομογραφιών.....	135
5.0	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	145

6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	147
---	-------------------	-----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Νανοσωματίδιο Χρυσού	34
Εικόνα 2: Τρόποι σύνθεσης νανοσωματιδίων χρυσού	35
Εικόνα 3: Νανοσωματίδιο λευκόχρυσου	45
Εικόνα 4 Νανοσωματίδια Χρυσού επικαλυμμένα με τρικιτρικό οξύ και επικαλυμμένα με νανοσωματίδια λευκόχρυσου	46
Εικόνα 5: a) αγγειογένεση Εκβλάστησης (Sprouting Angiogenesis) b) Αγγειογένεση Διαχωρισμού (Splitting Angiogenesis)/ (Εικόνα από Molecular Cell Biology)	53
Εικόνα 6: VEGF και VEGF-Receptors (Εικόνα από Mikael Häggström. WikiJournal of Medicine).....	55
Εικόνα 7: Φαινόμενο αυξημένης διαπερατότητας και συγκράτησης (Εικόνα από Pharmaceutical Nanotechnology: Innovation and Production)	62
Εικόνα 8: Μοριακή δομή Κιναζολίνης.....	65
Εικόνα 9: Ηλεκτρονιακές μεταβάσεις που μπορούν να πραγματοποιηθούν ..	72
Εικόνα 10: Συνοριακές συνθήκες στην διεπιφάνεια μετάλλου-διηλεκτρικού. Τα πεδία φθίνουν εκθετικά μακριά απο την διεπιφάνεια, όπως φαίνεται στα αριστερά του σχήματος.....	75
Εικόνα 11: Πλασμονικός συντονισμός νανοσωματιδίων χρυσού.....	80
Εικόνα 12: Διάγραμμα Jablonski με τις αρχές της φασματοσκοπίας φωσφορισμού , Εικόνα από Handbook of Deposition Technologies for Films and Coatings	84
Εικόνα 13: Εικόνα συσχέτισης υδροδυναμικής και πραγματικής διαμέτρου του νανοσωματιδίου.....	87

Εικόνα 14: Εικόνες SEM από υγιή και αλλοιωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια.....	91
Εικόνα 15: Μετατροπή του τετραζολίου σε φορμαζάνη.....	92
Εικόνα 16: Πλακίδιο 96 πηγαδιών για την πραγματοποίηση του MTT assay (96well plate Εικόνα από Wikipedia).....	93
Εικόνα 17: Εικόνα από σφαιρική με κολλοειδές διάλυμα νανοσωματιδίων χρυσού	100
Εικόνα 18: Χημική αντίδραση σύνθεσης του 2-(quinazolin-4-ylamino) propanoic acid από την 4-chloroquinazoline και το 2-aminopropanoic acid	104
Εικόνα 19: Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης σύνθεσης του οργανικού μορίου	105
Εικόνα 20: Προτεινόμενος μηχανισμός σύνδεσης του οργανικού μορίου στο νανοσωματίδιο Au@Pt@APTMS.....	107
Εικόνα 21: Φάσμα απορρόφησης UV-Vis νανοσωματιδίων χρυσού επικαλυμμένων με τρικιτρικό οξύ πριν και μετά την διάλυση.....	110
Εικόνα 22:Φάσμα φωτοφωταύγειας νανοσωματιδίων χρυσού	111
Εικόνα 23: Προσδιορισμός της Hd των νανοσωματιδίων χρυσού πριν και μετά τον καθαρισμό με διαδικασία μεμβράνης μέσω Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS).....	112
Εικόνα 24: Εικόνες ζ-δυναμικού για τα νανοσωματίδια χρυσού πριν και μετά την διαδικασία της διάλυσής τους	113
Εικόνα 25(α): Εικόνα TEM νανοσωματιδίων χρυσού στην κλίμακα των 20 nm (β):Εικόνα TEM νανοσωματιδίων χρυσού στην κλίμακα των 100 nm.....	114
Εικόνα 26: Εικόνα AFM των νανοσωματιδίων AuNPs.....	115
Εικόνα 27: Εικόνα 2D Μικροσκοπίας Ατομικής Δύναμης των νανοσωματιδίων AuNPs	115

Εικόνα 28: Φάσμα απορρόφησης Υπεριώδους-Ορατού, νανοσωματιδίων χρυσού επικαλυμμένων με νανοσωματίδια λευκόχρυσου από τις δύο συνθετικές πορείες	116
Εικόνα 29: Φάσμα φωτοφωταύγειας των νανοσωματιδίων Au@Pt NPs	117
Εικόνα 30: Υδροδυναμική διάμετρος νανοσωματιδίων χρυσού επικαλυμμένων με νανοσωματίδια λευκόχρυσου από την πρώτη και την δεύτερη σύνθεση αντίστοιχα	118
Εικόνα 31: Μέτρηση DLS ζ-δυναμικού για τις δύο πορείες σύνθεσης	118
Εικόνα 32: Εικόνες TEM νανοσωματιδίων χρυσού επικαλυμμένων με νανοσωματίδια λευκόχρυσου	119
Εικόνα 33: Εικόνα Μικροσκοπίας Ατομικής Δύναμης Au@PtNPs	120
Εικόνα 34: Εικόνα 2D Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης των νανοσωματιδίων Au@PtNPs	120
Εικόνα 35: Φωτογραφία από πείραμα αιμόλυσης στην πρώτη θέση (αριστερά) βρίσκεται το NC ενδιάμεσα βρίσκονται συγκεντρώσεις 1 mM και 5 mM αντίστοιχα Au@Pt NPs και στην τελευταία θέση (δεξιά) το PC.....	123
Εικόνα 36: Φωτογραφίες από το πείραμα της αιμόλυσης. Σε όλες τις περιπτώσεις το πρώτο erppendorf είναι το NC, το δεύτερο το PC, και ακολουθούν τα δείγματα σε συγκεντρώσεις 10, 30, 50, 100 μ M (συγκέντρωση χρυσού για τα νανοσωματίδια). Στην αριστερή φωτογραφία απεικονίζεται το πείραμα για τα AuNPs, στην μεσαία για τα Au@PtNPs και στην δεξιά για τα Au@Pt@QNPs.....	124
Εικόνα 37: Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού κυττάρων MCF-7 κύτταρα έπειτα απο επώαση Α) με AuNPs Β) με Au@PtNPs Γ) με Au@Pt@Q NPs στα MCF-7 κύτταρα.....	131

Εικόνα 38: Εικόνα από μικροσκόπιο Φθορισμού της κυτταρικής σειράς U87MG, έπειτα από επώαση A) Au@NPs B) Au@Pt NPs C) με Au@Pt@Q NPs 132

Εικόνα 39: Δομή 2-(quinazolin-4-ylamino) propanoic acid 133

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας Ορολογίας, Συντομογραφιών.....	135
--	-----

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στον τομέα της Ανόργανης Χημείας, στο ερευνητικό εργαστήριο της καθ. Ελένης Ευθυμιάδου.

Παράλληλα, μέρος των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Ερευνών και Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος», στο εργαστήριο «Sol-Gel», του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας.

Επιστημονική υπεύθυνος της παρούσας εργασίας είναι η Επ. Καθ. Ελένη Ευθυμιάδου.

Η περίοδος εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας είναι Σεπτέμβριος 2018 - Φεβρουάριος 2020.

1.0 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.3 NANOTEΧΝΟΛΟΓΙΑ

1.3.1 Ιστορική Αναδρομή

Οι όροι νανοτεχνολογία και νανοϋλικά εμπεριέχουν τον ελληνικό όρο νάνο ($<1\mu\text{m}$). Στη σύγχρονη επιστημονική ορολογία, ένα νανόμετρο είναι το ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου ($1\text{nm}=10^{-9}\text{m}$). Ευρύτερα, ο προσδιορισμός «νάνο» χρησιμοποιείται για να περιγράψει αντικείμενα, συστήματα ή φαινόμενα με χαρακτηριστικά που πηγάζουν από δομές στην κλίμακα του νανομέτρου. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, υπάρχει πληθώρα παραδειγμάτων νανοϋλικών που χρονολογούνται ήδη από τον 4ο αιώνα μ.Χ. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η «Κούπα του Λυκούργου»[1], η οποία αποτελείται από διχρωϊκό ύαλο, εμφανίζεται δηλαδή με διαφορετικό χρώμα ανάλογα με το σημείο πρόσπτωσης του φωτός. Η ιδιαιτερότητα αυτή οφείλεται στην ύπαρξη μικρο-ποσοτήτων κολλοειδούς χρυσού και αργύρου που επιτρέπουν την εμφάνιση του αδιαφανούς πράσινου χρώματος όταν φωτίζεται εξωτερικά και ημιδιάφανου κόκκινου χρώματος, όταν φωτίζεται εσωτερικά. Ομοίως, κατά τον Μεσαίωνα, τεχνίτες βιτρό έκαναν χρήση αλάτων διαφόρων μετάλλων μαζί με τετηγμένο γυαλί ώστε να του δώσουν διαφορετικά χρώματα. Το άλας χρυσού έδινε το κόκκινο χρώμα, ο νιτρικός άργυρος κίτρινο χρώμα, ενώ άλατα χαλκού μπλε ή πράσινο, ανάλογα με την οξειδωτική του κατάσταση.

Ορόσημο στην εξέλιξη της νανοτεχνολογίας αποτέλεσε η ανακάλυψη του Michael Faraday του κολλοειδούς «ρουμπινί» χρυσού. Στην παρουσίαση της εργασίας του, στις 5 Φεβρουαρίου 1857, με τίτλο «The Bakerian Lecture» - Πειραματική Σχέση του Χρυσού (και άλλων μετάλλων) με το Φως (Experimental relations of Gold and other metals to Light), συζήτησε την επίδραση του φωτός στα μεταλλικά σωματίδια, τα οποία ήταν πολύ μικρότερα από το μήκος κύματος του φωτός και ιδιαίτερα τα σωματίδια χρυσού, διότι «ήδη γνωστά φαινόμενα φάνηκαν να υποδεικνύουν ότι έστω και ελάχιστη μεταβολή του μεγέθους τους, οδηγούσε σε ποικιλία διαφορετικών χρωμάτων» [2]. Παρότι η έννοια των κολλοειδών ορίστηκε λίγο αργότερα, από τον Thomas Graham, το 1861, η έρευνα του Faraday έθεσε τα θεμέλια της επιστήμης των κολλοειδών και κυρίως

όσον αφορά τη συμπεριφορά των μεταλλικών σωματιδίων, των εναιωρημάτων τους και τον επακόλουθο σχηματισμό μεταλλικών υμενίων. Το 1936 ο Erwin Müller, εργαζόμενος στο Ερευνητικό Εργαστήριο της Siemens, εφηύρε το FEM - Field Emission Microscope, επιτρέποντας την απεικόνιση υλικών στην ατομική κλίμακα. Αργότερα, το 1950, οι Victor La Mer και Robert Dinagar ανέπτυξαν τη θεωρία και μια μέθοδο παρασκευής μόνο-διεσπαρμένων κολλοειδών διαλυμάτων. Η ελεγχόμενη ικανότητα παρασκευής κολλοειδών ανοίγει πλέον το δρόμο σε χιλιάδες βιομηχανικές εφαρμογές, όπως ειδικά χαρτιά γραφής, μπογιές, λεπτά υμένια (φίλμ), αλλά και σε ιατρικές εφαρμογές.

Ωστόσο, το σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη της τεχνολογίας και της μηχανικής σε ατομική κλίμακα, που οδήγησε στη σημερινή εξέλιξή της νανοτεχνολογίας, ήταν το 1959 στην ετήσια συνέλευση της “American Physical Society”, όπου ο νομπελίστας Laureate Richard Feynman έδωσε μία ομιλία με τίτλο «Υπάρχει πολύς χώρος στον πάτο» (“There’ s plenty of room at the bottom”) και ήταν ο πρώτος που ανέφερε την νανοτεχνολογία [3]. Ο Feynman περιέγραψε μια διαδικασία με την οποία η δυνατότητα χειρισμού ξεχωριστών ατόμων και μορίων θα μπορούσε να αναπτυχθεί, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα εργαλεία για την κατασκευή αναλογικά μικρότερων επιθυμητών συνόλων. Επίσης, έκανε λόγο και για τα προβλήματα που μπορεί να ανακύψουν προχωρώντας προς τα κάτω στην κλίμακα του μέτρου, όπως η επιφανειακή τάση, η ύπαρξη των διαμοριακών δυνάμεων (Van der Waals) - όπου οφείλεται η έλξη μεταξύ των μορίων- ενώ η βαρύτητα παύει να παίζει σημαντικό ρόλο.

Ο όρος νανοτεχνολογία ορίστηκε για πρώτη φορά από τον Norio Taniguchi, καθηγητή του Tokyo Science University, το 1974: «Η “Νανοτεχνολογία” αποτελείται κυρίως από διαδικασίες διαχωρισμού, συνένωσης και παραμόρφωσης υλικών κατά άτομο ή κατά μόριο» («Nano-technology» mainly consists of the processing of, separation, consolidation, and deformation of materials by one atom or by one molecule”) [4].

Ο Dr. K. Eric Drexler αργότερα, τη δεκαετία του 1980, εξέδωσε το πρώτο βιβλίο, που ασχολήθηκε με την τεχνολογική σημασία φαινομένων και υλικών σε νανοκλίμακα, με τίτλο «Μηχανές της Δημιουργίας: Η επερχόμενη Εποχή της Νανοτεχνολογίας» (“Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology”) και έτσι ο όρος νανοτεχνολογία πήρε τη σημερινή του μορφή. Την ίδια περίοδο, οι Gerd Binnig και Heinrich Rohrer, από το εργαστήριο της IBM, στη Ζυρίχη, εφηύραν το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Tunneling Microscope, STM), που για πρώτη φορά έδωσε τη δυνατότητα στους επιστήμονες να «δουν» ξεχωριστά άτομα. Η ανακάλυψη αυτή τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ, το 1986 [5]. Ακολούθησαν πολλές επαναστατικές έρευνες στην φυσική, στην χημεία και στην βιολογία που βασίζονται στην ιδέα του Feynman στον χειρισμό των υλικών σε πολύ μικρή κλίμακα, στο επίπεδο δηλαδή των μορίων και των ατόμων, την νανοκλίμακα.

Η νανοτεχνολογία εμπεριέχει δύο τρόπους για την παραγωγή των νανοδομών: την δημιουργία των νέων δομών “top-down”, κατά την οποία μεγαλύτερες δομές μειώνουν το μέγεθος τους ως το επίπεδο της νανοκλίμακας ενώ παράλληλα διατηρούν τις ιδιότητές τους, ή αποικοδομούνται μεγαλύτερες δομές σε μικρότερα τμήματα, και την “bottom-up” που ονομάζεται επίσης και «μοριακή νανοτεχνολογία» η οποία αναφέρθηκε πρώτη φορά από τον Drexler, κατά την οποία τα υλικά σχηματίζονται από άτομα ή μοριακά συστατικά, μέσω μιας διαδικασίας συναρμολόγησης ή αυτο-συναρμολόγησης [6].

1.3.2 Νανοσωματίδια ως συστήματα μεταφοράς και απελευθέρωσης φαρμάκου

Η νανοτεχνολογία αφορά στην κατανόηση και στην επεξεργασία της ύλης, στις διαστάσεις 1-100nm. [7] Με τον τομέα αυτό να αποτελεί ένα ραγδαία αναπτυσσόμενο κλάδο της επιστήμης, τα νανοσωματίδια λαμβάνουν όλο και μεγαλύτερη θέση σε πολλούς κλάδους, με έναν από τους σημαντικότερους να είναι η νανο-φαρμακευτική, μέσω της χρήσης τους ως μεταφορείς αντιμικροβιακών, αντιφλεγμονωδών, αντικαρκινικών και πολλών άλλων ειδών φαρμάκων [8-10]. Σήμερα, τα νανοσωματίδια έχουν μοναδικές ιδιότητες, όπως μικρό μέγεθος, μεγάλη αναλογία επιφάνειας προς όγκο και ευνοϊκά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά [7]. Έχουν τη δυνατότητα να διαμορφώνουν τόσο τη φαρμακοκινητική, όσο και το φαρμακοδυναμικό προφίλ των φαρμάκων, ενισχύοντας έτσι τη θεραπευτική τους αποτελεσματικότητα. Η παθοφυσιολογική κατάσταση και οι ανατομικές μεταβολές των νοσούντων ιστών, λόγω καρκίνου ή φλεγμονής, προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα για τη χορήγηση των νανοσωματιδίων. Η στόχευση των φαρμάκων μπορεί να εκμεταλλευτεί τα διακριτά αυτά χαρακτηριστικά των νοσούντων ιστών. Καινοτομία στον σχεδιασμό νέων υλικών ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων αποτελεί η σύνθεση συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, τα οποία θα μπορούν να απελευθερώνουν θεραπευτικούς παράγοντες, όποτε «τους ζητηθεί». Ο εγκλωβισμός φαρμάκων σε νανοσωματίδια ή η πρόσδεση των φαρμάκων στην επιφάνειά τους, σε συνδυασμό με την ελεγχόμενη απελευθέρωσή τους λόγω χημικών επιδράσεων (pH, ιοντική ισχύς, αναγωγικό περιβάλλον), φυσικών (θερμοκρασία, φως, ηλεκτρομαγνητικό πεδίο) και βιολογικών (ενζυματική διάσπαση) μπορεί να αυξήσει την *in vivo* σταθερότητα τους και να παρατείνει το χρόνο κυκλοφορίας τους στο αίμα [11-15]. Είναι, παράλληλα, δυνατό να αλλάξει η βιοκατανομή των φαρμάκων, επιτρέποντάς τους να συσσωρεύονται κατά προτίμηση στην παθούσα περιοχή (π.χ. όγκος). Για την παθητική στόχευση, τα νανοσωματίδια είναι αναγκαίο να έχουν μεγάλο χρόνο ζωής μέσα στη κυκλοφορία του αίματος, ώστε η συσσώρευση τους να είναι μέγιστη στον

όγκο και όχι στο συκώτι, στο σπλήνα και στους νεφρούς, προκειμένου να ελαχιστοποιούν την τοξικότητά τους.

Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας, κάθε φορέας φαρμάκου πρέπει ιδανικά να έχει μια υδρόφιλη επιφάνεια, ώστε να επιβραδύνει την σύλληψη του από τα μακροφάγα. Το παραπάνω μπορεί να επιτευχθεί με επικάλυψη της επιφάνειάς τους με ένα υδρόφιλο πολυμερές, όπως πολυ-αιθυλενογλυκόλη (Polyethylene Glycol, PEG), που τα προστατεύει από τον οψωνισμό απωθώντας τις πρωτεΐνες του πλάσματος [16].

Οι ευρέως γνωστές κατηγορίες νανοσωματιδίων είναι τα πολυμερικά μικκύλια, τα λιποσώματα, τα δένδριμερή, τα πολυμερικά νανοσωματίδια, οι νανοσωλήνες άνθρακα και τα ανόργανα νανοσωματίδια. Όλα τα παραπάνω αποτελούν έξυπνα συστήματα μεταφοράς, τα οποία αναμένεται να μελετώνται όλο και περισσότερο με το πέρασμα του χρόνου.

Στην τελευταία κατηγορία νανοσωματιδίων, τα ανόργανα νανοσωματίδια, ανήκουν και τα νανοσωματίδια *χρυσού* καθώς και τα νανοσωματίδια *λευκόχρυσου*.

1.3.3 Χρυσός

Ο χρυσός αποτελεί στοιχείο μετάπτωσης, της 11ης (IB) ομάδας του περιοδικού πίνακα, με ατομικό αριθμό 79 και ατομική μάζα 196,966569. Εμφανίζει υψηλά σημεία τήξεως και ζέσεως, της τάξεως των 1337 K και 3129 K, αντιστοίχως. Η κρυσταλλική δομή του μεταλλικού χρυσού είναι το ολοεδρικά κεντρωμένο κυβικό πλέγμα, όπου η διατομική απόσταση είναι 289pm, το οποίο ενισχύει την ελατότητά του. Υπό συνήθεις συνθήκες, ο χρυσός είναι ένα αστραφτερό κιτρινωπό, μαλακό, ελατό και όλκιμο μέταλλο υψηλής πυκνότητας ($19,30 \text{ g.cm}^{-3}$). Έχει την ικανότητα να σχηματίζει αμαλγάματα με άλλα, λιγότερο μαλακά μέταλλα, όπως ο άργυρος και ο λευκόχρυσος, μια ιδιότητα που εκμεταλλεύεται η αργυροχρυσοχοϊά [17].

Στην αέρια κατάσταση ο χρυσός υφίσταται ως μίγμα ατόμων και διατομικών μορίων. Το μήκος δεσμού Au-Au στο Au_2 είναι 250 pm και η ενέργεια διαστάσεως αυτού είναι $221 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}$. Η ενέργεια πρώτου ιοντισμού του χρυσού είναι 890 kJ mol^{-1} , η ηλεκτραρνητικότητα στην κλίμακα Pauling είναι 2,54 και είναι συγκρίσιμη με αυτή του ιωδίου, που είναι 2,78.

Πολλά σύμπλοκα του χρυσού στην στερεά κατάσταση χαρακτηρίζονται από *χρυσοφιλικές αλληλεπιδράσεις (aurophilic interactions)*, που οδηγούν σε διατομικές αποστάσεις της τάξεως των 250-330 pm. Οι αποστάσεις αυτές θεωρούνται συγκρίσιμες με τις βραχύτερες αποστάσεις μεταξύ ατόμων χρυσού στην στοιχειακή κατάσταση, καθώς και των αποστάσεων του διατομικού μορίου Au_2 στην αέρια κατάσταση, είναι όμως βραχύτερες από την συνολική έκταση, η οποία είναι 360 pm. Αυτό οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις Van der Waals που χαρακτηρίζουν τον χρυσό. Η ενέργεια σταθεροποίησης των χρυσοφιλικών αυτών αλληλεπιδράσεων είναι $7\text{-}11 \text{ kcal mol}^{-1}$, που είναι ίδιας τάξεως με αυτή του δεσμού υδρογόνου. Οι χρυσοφιλικές αλληλεπιδράσεις ανήκουν στην κατηγορία σχετικιστικών φαινομένων και συντελούν στην συστολή της ατομικής ακτίνας των ατόμων χρυσού στην αέρια κατάσταση με τρόπο ώστε η ηλεκτρονιακή κατανομή να είναι $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^{10} 6s^1$ έναντι της αναμενόμενης $[\text{Xe}]4f^{14} 5d^9 6s^2$ [17].

Η συστολή αυτή της ατομικής ακτίνας μπορεί να αποδοθεί στις υψηλές ταχύτητες όλων των ηλεκτρονίων, όταν κινούνται γύρω από ένα βαρύ πυρήνα ($Z > 50$). Η επερχόμενη αύξηση της μάζας οδηγεί σε ενεργειακή σταθεροποίηση και συστολή της ατομικής ακτίνας. Πιο συγκεκριμένα, τα s και p τροχιακά έλκονται ισχυρά από τον πυρήνα με αποτέλεσμα να συστέλλονται, σε αντίθεση με τα d και f τροχιακά τα οποία επηρεάζονται ελάχιστα από την πυρηνική έλξη και το ενεργό δυναμικό τους προστατεύεται λόγω συστολής των s και p τροχιακών, οδηγώντας τα d και f τροχιακά σε άμεση σχετικιστική ακτινική διαστολή. Στον χρυσό λοιπόν το 6s τροχιακό συστέλλεται, ενώ το 5d διαστέλλεται. Αποτέλεσμα του προαναφερθέντος φαινομένου είναι η ευκολία με την οποία τα d ηλεκτρόνια μπορούν να ενεργοποιηθούν και να συμπληρωθεί η εξωτερική στιβάδα με ακόμη ένα ηλεκτρόνιο, ώστε να πλησιάσει την δομή ευγενούς αερίου [18].

Ενώσεις του χρυσού έχουν καταγραφεί σε όλες τις δυνατές οξειδωτικές καταστάσεις από -1 έως +5. Οι στοιχειακές καταστάσεις του χρυσού, μεταλλική και κολλοειδής, είναι εξαιρετικά σταθερές υπό ποικίλες συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων των υδατικών συστημάτων. Ωστόσο, παρουσία κατάλληλων σταθεροποιητικών υποκαταστατών μπορεί ο χρυσός να αυτοοξειδωθεί προς Au^{+1} ή Au^{+3} . Οι οξειδωτικές καταστάσεις +1 και +3 είναι οι πιο κοινές για τον χρυσό, ιδιαίτερα στα υδατικά διαλύματα, γεγονός το οποίο τις καθιστά δημοφιλείς για χρήση σε βιολογικά συστήματα. Αντιθέτως οι -1, +2, +4 και +5 οξειδωτικές καταστάσεις απαντώνται σπανιότερα [19].

1.3.3.1 Νανοσωματίδια Χρυσού

Τα νανοσωματίδια χρυσού παρουσιάζουν πολλές ενδιαφέρουσες ιδιότητες, όπως υψηλό δείκτη απορρόφησης ακτινών Χ, εύκολες διαδικασίες σύνθεσης, οι οποίες μπορούν να τροποποιηθούν και με αυτό τον τρόπο μπορούν να καθοριστούν οι φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων χρυσού, υφίστανται ως κολλοειδές διάλυμα σε διαφορετικά μέσα διασποράς. Παράλληλα, παρουσιάζουν εξαιρετικές οπτικές και ηλεκτρονικές ιδιότητες, ενώ, είναι βιοσυμβατά και έχουν την ικανότητα να συνδέονται με βιοσυμβατά πολυμερή, προσδίδοντάς τους το κατάλληλο φορτίο για την επιφάνεια και την επιθυμητή σταθερότητα.



Εικόνα 1:
Νανοσωματίδιο
Χρυσού

Τα νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) χωρίζονται σε 3 κατηγορίες, ανάλογα με τις διαστάσεις τους οι οποίες είναι: Τα μονοδιάστατα νανοσωματίδια χρυσού (1D): νανοράβδοι, νανοσύρματα, νανοσωλήνες, νανοζώνες, τα δισδιάστατα νανοσωματίδια χρυσού (2D): χρυσές νανόπλακες ως αστέρια, πεντάγωνα, τετράγωνα/ ορθογώνια, κυψελιδοειδείς νανόπλακες, εξάγωνα, τρίγωνα, και τα τρισδιάστατα νανοσωματίδια χρυσού (3D): δίπολα χρυσού, νανοαστέρια και νανοδενδρίτες.

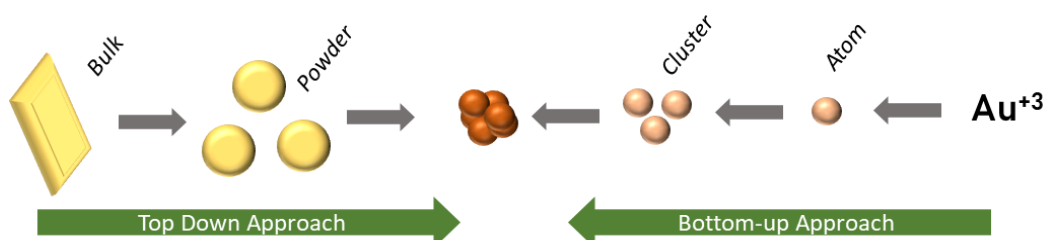
Τα AuNPs είναι ορατά στο εγγύς υπέρυθρο (Near Infrared Region, NIR), η απορρόφηση των οποίων, ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του νανοσωματιδίου. Η απορρόφηση στο εγγύς υπέρυθρο τα καθιστά κατάλληλα για *in vivo* εφαρμογές [20]. Λόγω της παραπάνω ιδιότητας, χρησιμοποιούνται ευρέως ως διαγνωστικά, ως αισθητήρες αλλά και ως θεραπευτικά. Επιπρόσθετα, έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν την ενέργεια φθορισμού σε θερμότητα, μέσω του εντοπισμού του συντονισμού των επιφανειακών πλασμονίων, ιδιότητα που τα καθιστά ικανά για φωτοθερμική θεραπεία [21]. Επίσης, εμφανίζουν σημαντικές οπτικές, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανοσοθεραπεία, μέσω της ενεργοποίησης τους μέσω φωτός προκειμένου να γίνει ελεγχόμενη απελευθέρωση του φαρμάκου [22].

Πρόσφατα, τα νανοσωματίδια χρυσού έχουν προταθεί ως πολλά υποσχόμενοι μεταφορείς δραστικής ουσίας που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία και την διάγνωση του καρκίνου [23]. Τα νανοσωματίδια χρυσού μπορούν να λειτουργήσουν προστατευτικά και να μειώσουν την απαιτούμενη δόση φαρμάκου, που απαιτείται από τους ασθενείς, ενώ ταυτόχρονα, να αυξήσουν την δόση του φαρμάκου, που φτάνει στα καρκινικά κύτταρα. Μια σειρά μελετών, που έχει γίνει στα νανοσωματίδια χρυσού, έχει δείξει πως δεν εμφανίζουν σημαντική κυττοτοξικότητα [24].

1.3.3.2 Σύνθεση νανοσωματιδίων χρυσού

Λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων χρυσού, που περιγράφηκαν παραπάνω, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι συνθετικού και συστηματικού ελέγχου της μορφολογίας και της επιφανειακής σύστασής τους. Οι μέθοδοι περιλαμβάνουν χημικές, φωτοχημικές, ηλεκτροχημικές, μικροκυματικά και υπερηχητικά υποβοηθούμενες μεθόδους. Υπάρχουν δυο τεχνικές για την σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων: «από κάτω προς τα πάνω» (bottom-up) και «από τα πάνω προς τα κάτω» (top-down), που προαναφέρθηκαν [25].

Στην πρώτη περίπτωση, η σύνθεση ξεκινά από την αλληλεπίδραση μεταλλικών ιόντων προς την δόμηση περίπλοκων δομών, ενώ στην δεύτερη περίπτωση, το δομικό υλικό διαβρώνεται σταδιακά, μέσω φυσικοχημικών μεθόδων έως ότου φτάσει στο επιθυμητό σχήμα και μέγεθος.



Εικόνα 2: Τρόποι σύνθεσης νανοσωματιδίων χρυσού

Αναλυτικότερα, αναφέρονται, αρχικά, οι φυσικές μέθοδοι σύνθεσης χρυσών νανοσωματιδίων: η γ-ακτινοβόληση, η μέθοδος μικροκυμάτων, η ακτινοβολία

υπεριώδους, η ακτινοβολία υπερήχων, η θερμολυτική μέθοδος, και οι φωτοχημικές μεθόδους. Με την μέθοδο γ-ακτινοβόλησης λαμβάνονται νανοσωματίδια των οποίων το μέγεθος μπορεί να ρυθμιστεί από 5-40 nm και πρόκειται για νανοσωματίδια υψηλής καθαρότητας. Χρησιμοποιείται θέρμανση ή φωτοχημική αναγωγή για να παρασκευαστούν AuNPs. Η μέθοδος ακτινοβόλησης υπερήχων μπορεί να δώσει Au/Pd διμεταλλικά νανοσωματίδια, καθώς και νανοσωματίδια χρυσού, στους πόρους πυριτίας. Όσον αφορά την παραγωγή νανοσωματιδίων για βιολογικές εφαρμογές, προτιμάται η πρώτη τεχνική, καθώς οι συνθετικές μέθοδοι που υιοθετούνται όπως η σύνθεση υγρής φάσης, η πυρόλυση και η εναπόθεση, επιτρέπουν τον έλεγχο της επιφανειακής σύστασης (επικαλύψεις ή/και τροποποιητές), άρα και της κolloειδούς σταθερότητας και της τοξικότητας, ενώ διευκολύνεται η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων νανοσωματιδίων. Η υψηλή θερμοκρασία και η UV ακτινοβολία αποτελούν τους κύριους αναγωγικούς παράγοντες στην θερμολυτική μέθοδο καθώς και στην παραγωγή AuNPs μέσω UV ακτινοβολίας, σημειώνοντας πως, με αλλαγές στις συνθήκες σύνθεσης, μπορεί να καθοριστεί το μέγεθος των σφαιρών. Τα μονοδιάστατα AuNRs παράγονται με φωτοχημικές μεθόδους, απαιτώντας πολύπλοκες φυσικές συνθήκες.

Επιπλέον, για την παραγωγή νανοσωματιδίων χρυσού χρησιμοποιούνται χημικές μέθοδοι. Στις χημικές μεθόδους γίνεται αναγωγή του χρυσού με έναν αναγωγικό παράγοντα σε υδατικό διάλυμα. Το κιτρικό οξύ και το βοροϋδρίδιο του νατρίου αποτελούν από τους πιο κοινούς αναγωγικούς παράγοντες. Η μέθοδος Turkevich είναι η συνηθέστερα εφαρμοζόμενη και παράγει σφαιρικά νανοσωματίδια χρυσού, των οποίων το μέγεθος μπορεί να καθοριστεί.

Τέλος, μπορεί να γίνει βιολογική σύνθεση όπου πρόκειται για «πράσινη χημεία» στην οποία οι διαλύτες, τα αναγωγικά, και οι σταθεροποιητές παράγοντες είναι φιλικόι προς το περιβάλλον. Βασίζεται σε φυτικά σύμπλοκα και παράγωγά τους, σε βακτήρια, μύκητες και ιούς. Μπορούν να παραχθούν νανοσωματίδια ποικίλων μορφών και μεγεθών.

1.3.3.3 Ιδιότητες νανოსωματιδίων χρυσού

Τα νανოსωματίδια του χρυσού λόγω των εξαιρετικών τους ιδιοτήτων βρίσκουν εφαρμογή τόσο στην θεραπεία, όσο και στην διάγνωση, γεγονός που τα καθιστά «θεραπαστικούς» παράγοντες. Πιο αναλυτικά μερικές από τις εφαρμογές των νανοςωματιδίων αυτών περιγράφονται παρακάτω.

1.3.3.3.1 Φωτοδυναμική θεραπεία

Η φωτοδυναμική θεραπεία χρησιμοποιείται για όγκους, καθώς και για ορισμένες παθήσεις του δέρματος και χρησιμοποιεί φωτοαισθητήρες, ως αισθητήρες φωτός και ένα λέιζερ. Απόπτωση ή νέκρωση προκαλείται στα καρκινικά κύτταρα από δραστικές ρίζες οξυγόνου, που προκαλείται από την ενέργεια των φωτοευαισθητοποιητών.

Η απορρόφηση από επιφανειακό συντονισμό πλάσμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR) είναι χαρακτηριστικό εξαιρετικά ωφέλιμο στην φωτοδυναμική θεραπεία [26].

1.3.3.3.2 Φωτοθερμική θεραπεία

Η φωτοθερμική θεραπεία (ΦΘΘ), η οποία είναι γνωστή και ως οπτική υπερθερμία, αποτελεί μέθοδο θεραπείας του καρκίνου, η οποία απαιτεί επέμβαση σε μικρό βαθμό [27]. Τα κύτταρα είναι ευαίσθητα στις μικρές αλλαγές της θερμοκρασίας και αυξάνοντας την θερμοκρασία, είναι δυνατός ο θάνατος του κυττάρου. Στην προκειμένη περίπτωση, είναι επιθυμητό να γίνει τροποποίηση με συνδέτες, οι οποίοι είναι επιλεκτικοί σε υποδοχείς που υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα, επιτρέποντας τους να εισέλθουν στον καρκινικό ιστό. Μέσω της θέρμανσης των νανοςωματιδίων, με ένα συγκεκριμένο διεγερτικό, θα θερμανθούν αυτόματα και τα κύτταρα, στα οποία τα σωματίδια έχουν συσσωρευθεί, με αποτέλεσμα να επέλθει ο θάνατός τους [28-30].

Τα νανοςωματίδια χρυσού, που έχουν μέγιστο απορρόφησης στο ορατό ή στο εγγύς υπέρυθρο, μέσω της ακτινοβολίας απορροφούν ενέργεια και παράγουν

θερμότητα. Γι' αυτό, όσο μεγαλύτερη είναι η συσσώρευση των νανοσωματιδίων στην καρκινική περιοχή, τόσο μειώνεται ο χρόνος έκθεσης του υποκειμένου σε μη επιθυμητό περιβάλλον (υψηλή θερμοκρασία) [26, 31]. Η φωτοθερμική θεραπεία είναι ευρέως διαδεδομένη διότι επιτρέπει την επιλεκτική υπερθερμία των ιστών των όγκων, ελαττώνοντας σε σημαντικό ποσοστό τις μη επιθυμητές παρενέργειες στους γειτονικούς υγιείς ιστούς. Η θερμότητα καταστρέφει τους καρκινικούς ιστούς. Στην προκειμένη θεραπεία χρησιμοποιούνται πιο συχνά νανοσωματίδια χρυσού σε περίπου 50 nm που έχουν ισχυρή απορρόφηση στο εγγύς υπέρυθρο. Ιδιαίτερα στην ΦΘΘ χρησιμοποιούνται νανοκέλυφη και νανοράβδοι, που καλύπτουν την ερυθρή περιοχή του φάσματος λόγω της ηλεκτρονιακής τους διέγερσης και χαλάρωσης. Χρήση τέτοιων νανοσωματιδίων έχουν εφαρμοστεί σε καρκίνο του μαστού. Όταν μία πηγή ενέργειας παράγει μη ιονισμένη ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η μετατροπή σε θερμική ενέργεια γίνεται λόγω της διέγερσης και χαλάρωσης των ηλεκτρονίων στο νανοσωματίδιο χρυσού. Μάλιστα το λέιζερ μπορεί να ρυθμιστεί στην κατάλληλη συχνότητα, του LSPR. Η φωτοδιέγερση των νανοσωματιδίων χρυσού στο μέγιστο μήκος κύματος, το οποίο είναι περίπου στα 520 nm για μία νανόσφαιρα χρυσού γύρω στα 15 nm, λειτουργεί αποτελεσματικά στην μετατροπή του φωτός σε θερμική ενέργεια [32]. Η μελέτη του Pedrosa et al. έδειξε ότι η σύνδεση των νανοσωματιδίων χρυσού με ένα αντι-αγγειογενετικό πεπτιδίδια μπορεί να συνδυαστεί με ακτινοβολία λέιζερ και να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της παρεμπόδισης της αγγειογένεσης *in vivo*. Δείχνουν, μάλιστα, ότι ο συνδυασμός ενός πράσινου λέιζερ σε συνδυασμό με τα νανοσωματίδια χρυσού μπορεί να επιτύχει υψηλές θερμοκρασίες στα επιθυμητά σημεία, προσβάλλοντας συγκεκριμένα αιμοφόρα αγγεία. Αυτή η συνδυαστική θεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός τρόπος για την αναστολή του Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor-VEGFR), με αποτέλεσμα την ελάττωση έκφρασης του VEGF Υποδοχέα 1 [33].

Αξίζει, επίσης, να αναφερθεί η σπουδαιότητα της φωτοθερμικής θεραπείας, η οποία ανήκει στην κατηγορία των θερανωστικών ("theranostics"), που είναι συνδυασμός θεραπείας και διαγνωστικής, κατά την οποία αυξάνεται η ακρίβεια

και η αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Αυτά τα καινοτόμα συστήματα βοηθούν να προσπεραστούν οι παρατηρούμενες διαφορές στην βιοδιαθεσιμότητα και ειδίκευση των απεικονιζόντων μορίων και θεραπευτικών παραγόντων. Η κατηγορία αυτή αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην γρήγορη διάγνωση, την θεραπεία και την πρόληψη της ασθένειας. Ο σχεδιασμός τέτοιων νανοσωματιδίων περιλαμβάνει την ανίχνευση/ απεικόνιση και την απελευθέρωση θεραπευτικών παραγόντων σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον. Τα νανοσωματίδια χρυσού έχουν χρησιμοποιηθεί σε πειράματα ραδιοθεραπείας με εφαρμογές στους ραδιο-αισθητήρες. Οι συνδετικές ικανότητες του χρυσού έχουν μεγάλη σημασία για την παραπάνω εφαρμογή, καθώς επίσης είναι εξαιρετικά σημαντική η απώλεια τοξικότητας, που τον καθιστά κατάλληλο για κλινικές εφαρμογές.

1.3.3.3 Απεικόνιση

Η μοριακή απεικόνιση επιτρέπει την μελέτη των βιολογικών διεργασιών των κυττάρων στους οργανισμούς. Τα νανοσωματίδια χρυσού έχουν μελετηθεί σε μία σειρά από απεικονίσεις όπως η Υπολογιστική Τομογραφία Ακτινών-Χ (X-Ray Computed Tomography, CT), η Μαγνητική Τομογραφία (Magnetic Resonance Imaging, MRI), η Τομογραφία Εκτομής Ποζιτρονίων (Positron Emission Tomography, PET), Τομογραφία Μονοφωτονικής Εκπομπής (Single Photon Emission Computed Tomography, SPECT), η Φωτοακουστική Τομογραφία (Photoacoustic Tomography, PT) και η Απεικόνιση Φθορισμού (Fluorescent imaging). Στις προαναφερθείσες τεχνικές τα νανοσωματίδια λειτουργούν αυτόνομα ως δείκτες ή συνδέονται με κάποιο μόριο δείκτη, προκειμένου να εκμεταλλευθούν την εξειδίκευσή του.

Ο χρυσός έχει μεγάλο συντελεστή απορρόφησης στην περιοχή των ακτινών Χ, συνεπώς αποτελεί έναν καλό παράγοντα αντίθεσης (contrast agent) για απεικόνιση στις ακτίνες Χ. Η μέθοδος CT είναι ικανή να παρέχει πληροφορίες για την παθολογία των ιστών και των οργάνων, και μέσω της εκτεταμένης παρουσίας που εμφανίζουν στο αίμα, είναι αποτελεσματική στην αγγειακή απεικόνιση. Παράλληλα, η ευκολία στην τροποποίηση της επιφάνειας για

κολλοειδή συμπεριφορά και η ενεργητική στόχευση συμβάλλουν θετικά στην χρήση τους ως παράγοντες αντίθεσης. Συνήθως, ως τέτοιοι παράγοντες χρησιμοποιούνται μόρια χαμηλού μοριακού βάρους με ιώδιο. Οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν υδατοδιαλυτότητα και χαμηλή τοξικότητα.

Η απεικόνιση PET αποτελεί μια από τις πιο ευαίσθητες τεχνικές, αλλά δεν παρέχει πληροφορίες για την ανατομία. Σε συνδυασμό με την CT είναι ικανή να προσφέρει πληροφορίες για την ανατομία. Ο συνδυασμός του MRI, CT και φθορισμού μπορεί να προσπερνά τα εμπόδια που εμφανίζονται στην κάθε τεχνική ξεχωριστά.

1.3.3.3.4 Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκου (Drug Delivery Systems)

Τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκου (ΣΜΦ) κατέχουν μια σειρά από πλεονεκτήματα, όπως ότι αυξάνουν την διαλυτότητα, την *in vivo* σταθερότητα και την βιοκατανομή ενός φαρμάκου. Για να είναι αποτελεσματικά τα ΣΜΦ, είναι απαραίτητο να γίνει κατανοητός ο τρόπος αλληλεπίδρασης των κυττάρων με το σύστημα και το μεταφερόμενο φάρμακο [34]. Υπάρχουν ορισμένα χαρακτηριστικά, τα οποία καθορίζουν την ποσότητα πρόσληψης νανοσωματιδίων, την ενδοκυτταρική μεταφορά τους, καθώς και το ποσοστό απελευθέρωσης φαρμάκου, που εξαρτάται από το φορτίο τους, το μέγεθός τους και την λειτουργικότητα της επιφάνειάς τους [35, 36]. Τα νανοσωματίδια είναι 100-1000 φορές μικρότερα από τα ανθρώπινα κύτταρα, γι' αυτό τέτοιου είδους συστήματα καθίστανται ικανά να εισχωρήσουν στα κύτταρα και να αλληλεπιδράσουν εύκολα με το ενδοκυτταρικό και το εξωκυτταρικό DNA, τις πρωτεΐνες, τα ένζυμα και τους υποδοχείς [37]. Λόγω των εξαιρετικών ιδιοτήτων, που προαναφέρθηκαν, που εμφανίζουν τα νανοσωματίδια χρυσού, τα ίδια αποτελούν πολλά υποσχόμενα συστήματα μεταφοράς φαρμάκου [38-40].

Τα νανοσωματίδια χρυσού, με μέγεθος περίπου στα 20 nm, μπορούν να διέρχονται μέσω των αιμοφόρων αγγείων και έτσι να βοηθούν στην μεταφορά του φαρμάκου στον ιστό-στόχο. Η ενεργητική στόχευση, όπως

προαναφέρθηκε, σχετίζεται με την σχέση που έχει το φάρμακο και το νανοσωματίδιο χρυσού. Ο δεσμός μεταξύ τους μπορεί να είναι ομοιοπολικός ή μη-ομοιοπολικός. Τα υδρόφιλα φάρμακα μπορούν να συνδέονται με τα νανοσωματίδια χρυσού μέσω μη-ομοιοπολικών δεσμών και δεν απαιτούν δομική τροποποίηση του φαρμάκου προκειμένου να γίνει η απελευθέρωσή του, σε αντίθεση με την περίπτωση σχηματισμού ομοιοπολικού δεσμού, όπου καθίσταται απαραίτητη η παρουσία κάποιου ενεργοποιητή. Το 2011 ο Wang et al. περιέγραψαν ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκου με δοξορουβικίνη και νανοσωματίδια χρυσού, όπου αναφέρθηκε ένα pH-ευαίσθητο σύστημα, ένα σύστημα δηλαδή στο οποίο το φάρμακο ήταν συνδεδεμένο με pH ευαίσθητο τρόπο στο νανοσωματίδιο χρυσού [41]. Τα ΣΜΦ υποδεικνύουν ότι η αντίσταση των καρκινικών κυττάρων στα φάρμακα μπορεί να ξεπερασθεί μέσω της εισαγωγής τους στο κύτταρο με υψηλή απόδοση και την απελευθέρωση του φαρμάκου, εκμεταλλευόμενοι το όξινο pH των συγκριμένων οργανιδίων. Ο Brown et al. δημιούργησαν νανοσωματίδια χρυσού, τα οποία λειτουργούσαν ως συστήματα μεταφοράς του oxaliplatin. Το σύστημα μελετήθηκε σε κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα και του παχέος εντέρου και παρατηρήθηκε μεγαλύτερη κυττοτοξικότητα κατά την χρήση του συστήματος, συγκριτικά με το oxaliplatin μόνο του, καθώς και εισαγωγή του φαρμάκου στον πυρήνα [42].

Παράλληλα, είναι αξιοσημείωτη η ενεργοποίηση ενός φαρμάκου μέσω της γλουταθειόνης, που αποτελεί έναν ακόμα τρόπο μη ενζυματικού συστήματος. Αυτός ο τρόπος εκμεταλλεύεται την μεγάλη διαφορά συγκέντρωσης γλουταθειόνης μέσα στο κύτταρο (1-10 mM) και της εξωκυτταρικής συγκέντρωσης της θειόλης (κυστεΐνη 8 μ M, γλουταθειόνη 2 μ M). Αυτή η μεθοδολογία βασίζεται στους διπλούς δεσμούς μεταξύ του φαρμάκου και του μεταφορέα. Είναι δύσκολο, όμως, να προβλεφθεί η δραστηριότητα των δισουλφιδικών δεσμών, και επιπρόσθετα, η ανταλλαγή των θειολο-δισουλφιδικών δεσμών μπορεί να πραγματοποιηθεί με μόρια κυστεΐνης που βρίσκονται στην επιφάνεια πρωτεϊνών σχηματίζοντας μεταφορείς συνδεδεμένους με πρωτεΐνες οι οποίοι έχουν διαφορετική βιοσυμβατότητα [43].

Αναμφισβήτητα, η ενεργητική μεταφορά του φαρμάκου αποτελεί έναν εξαιρετικά σημαντικό τρόπο για την μεταφορά φαρμάκων στα καρκινικά κύτταρα, διότι ο σχεδιασμός των νανο-συνδετών των χρυσών νανოსωματιδίων δεν επηρεάζουν τον περιβάλλοντα υγιή ιστό, όταν απελευθερώνουν την θεραπευτική ουσία. Ορισμένοι όγκο-ειδικοί μοριακοί δείκτες υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα δίνοντας, έτσι, την δυνατότητα να ξεχωρίσουν από τα υγιή [44]. Η απόδοση των ΣΜΦ εξαρτάται από την αύξηση της συσσώρευσης των χρυσών νανοςωματιδίων στα κύτταρα μέσω της ενεργητικής στόχευσης, που επιτρέπει την μεγαλύτερη διάρκεια κυκλοφορίας τους μέχρι να φτάσουν στον στόχο τους, την καρκινική περιοχή. Υπάρχουν ποικίλα βιομόρια με τα οποία μπορεί να γίνει η στόχευση, όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και ολιγονουκλεοτίδια, όπως απταμερή και μονοκλωνικά αντισώματα. Επί παραδείγματι, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την στόχευση του Υποδοχέα του Επιδερμικού Παράγοντα Ανάπτυξης (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), που βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου και ενεργοποιείται από την σύνδεση του Επιδερμικού Παράγοντα Ανάπτυξης EGF με τον Αυξητικό Παράγοντα Μετασχηματισμού (Transforming Growth Factor- α , TGF α). Επιπροσθέτως, υποδοχείς του φολικού οξέος υπερεκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα στην μεμβράνη του εγκεφάλου, στο συκώτι, στο στήθος και στον πνεύμονα. Επομένως, είναι εφικτό να στοχευθούν αυτοί οι υποδοχείς μέσω της σύνδεσης των νανοςωματιδίων χρυσού με φολικό οξύ, τα οποία θα είναι παράλληλα συνδεδεμένα με το επιθυμητό φάρμακο επιτυγχάνοντας έτσι μεγαλύτερη κυττοτοξικότητα [45]. Πρόσφατα, ο Fernandes et al. πρότειναν ένα σύστημα χρυσού νανοςωματιδίου ενωμένου με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα και ένα σύμπλοκο συναρμογής Co(II), που έχει δυνατότητα παρεμπόδισης του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Αυτό το νανοςύστημα μετέφερε ελεγχόμενα το αντικαρκινικό στο επιθυμητό σημείο [46]. Ένα ακόμα παράδειγμα χρήσης νανοςωματιδίων χρυσού 5 nm ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκου, είναι στον παγκρεατικό καρκίνο, όπου είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη η κετουξιμάμπη (cetuximab) ως συνδέτης για την στόχευση και η γεμισιταβίνη (gemcitabine) ως θεραπευτικός παράγοντας [47].

Τα νανοσωματίδια μπορούν επιλεκτικά να στοχεύσουν και να μεταφέρουν την δραστική ουσία αποτελεσματικά, μειώνοντας τις παρενέργειες. Υπάρχουν ορισμένα μονοπάτια, τα οποία χρησιμοποιούν τα νανοσωματίδια χρυσού, ορισμένα εκ των οποίων είναι μέσω δερματικών οδών, μέσω της ρινικής οδού, εκμεταλλευόμενα την εισπνοή, ή μέσω των οφθαλμών. Μέσω αυτών των οδών μεταφέρουν αποτελεσματικά τα μόρια, ολιγονουκλεοτίδια, πρωτεΐνες, πεπτίδια, γονίδια ή μόρια που έχουν συνδεθεί, τα οποία υπό κανονικές συνθήκες αποικοδομούνται από μηχανισμούς του οργανισμού. Μάλιστα, τα προαναφερθέντα μόρια είναι όλα μεγάλου μοριακού βάρους, με αποτέλεσμα να υπάρχει δυσκολία διακίνησης τους μέσω των μεμβρανών.

1.3.4 Λευκόχρυσος

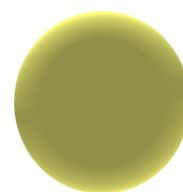
Το χημικό στοιχείο Pt ανήκει στην 10^η ομάδα και 6^η περίοδο του περιοδικού πίνακα, και στην ομάδα της 3^{ης} κύριας σειράς των στοιχείων μετάπτωσης και ονομάζεται λευκόχρυσος αλλά είναι γνωστό και ως πλατίνα. Είναι βαρύ, πολύ δύστηκτο, το χρώμα του είναι αργυρόλευκο και έχει μεταλλική λάμψη. Είναι ελατό και όλκιμο μέταλλο, με ατομικό αριθμό 78 και σχετική μάζα 195,084. Έχει μεγάλη πυκνότητα (3η μεγαλύτερη από όλα τα χημικά στοιχεία μετά τα συγγενικά Os και Ir), ενώ σχηματίζει κράματα με πολλά μέταλλα ιδίως της οικογένειάς του. Είναι μέταλλο παραμαγνητικό, διότι έχει μονήρη ηλεκτρόνια, τα οποία συμπεριφέρονται ως στοιχειώδεις μαγνήτες και έλκονται από μαγνητικά πεδία. Είναι, επίσης, καλός αγωγός του ηλεκτρισμού και της θερμότητας. Έχει θερμοκρασία τήξης 1768,3 °C και θερμοκρασία βρασμού 3825 °C. Κρυσταλλώνεται στο κυβικό σύστημα, ενώ η τάση των ατμών του είναι αμελητέα (στους 2057 °C είναι μόνο 10⁻⁵ atm και φθάνει στην 1 atm στους 3821 °C).

Από άποψη χημικής συμπεριφοράς, ανήκει στην ομάδα που φέρει το όνομά του: «Ομάδα του λευκόχρυσου», Platinum Group Metals, PGM ή Platinum Group Elements, PGE. Ο λευκόχρυσος θεωρείται ευγενές μέταλλο μαζί με το ρουθίνιο, το ιρίδιο, το παλλάδιο, τον άργυρο, το όσμιο, το ρόδιο και το χρυσό.

1.3.4.1 Νανοσωματίδια Λευκόχρυσου

Νανοσωματίδια με καταλυτικές ιδιότητες, όπως το δημήτριο και ο λευκόχρυσος, έχουν μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες σχετιζόμενες με την επιφάνειά τους, οι οποίες δίνουν την δυνατότητα να χρησιμοποιούνται σε μία πληθώρα εφαρμογών. Πιο συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια λευκόχρυσου λαμβάνουν όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον αφού αποτελούν νάνο-εργαλεία για την χημική βιομηχανία, και την παραγωγή βιο-ιατρικών συσκευών. Στόχος πολλών ερευνών είναι η ανάπτυξη υλικών, που βασίζονται στα νανοσωματίδια λευκόχρυσου, για καταλυτικούς μετατροπείς. Για παράδειγμα, οι αντιδράσεις

υδρογόνωσης, που καταλύονται από τον λευκόχρυσο, χρησιμοποιούνται για την σύνθεση λιπαρών οξέων και βιταμινών. Ο λευκόχρυσος κατέχει, επίσης, πολύ σημαντικό ρόλο σε άλλες κρίσιμες χημικές αντιδράσεις, όπως η οξείδωση στην διαδικασία παραγωγής οργανικών οξέων [48], του ισομερισμού και της αφυδρογόνωσης [49, 50] καθώς επίσης και την οξείδωση του μονοξειδίου του άνθρακα [51]. Επιπρόσθετα, η αναζήτηση «πράσινων τεχνολογιών» και η αυξημένη απαίτηση εύρεσης φιλικών προς το περιβάλλον πηγών ενέργειας, όπως η φωτοχημική συγκομιδή ηλιακής ενέργειας, η αποικοδόμηση των εξαιρετικά μολυσματικών αρωματικών συμπλόκων και ο καθαρισμός του νερού, μπορούν να υποβοηθηθούν από την παρουσία των καταλυτικών ιδιοτήτων τη πλατίνας. Όσον αφορά τον βιολογικό τομέα, τα νανοσωματίδια λευκόχρυσου (Platinum Nanoparticles, PtNPs) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βελτιώσουν την διάγνωση και την θεραπεία. Τα PtNPs λειτουργούν ως ικανές και επιλεκτικές χημικές παγίδες των ριζών για θεραπείες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες [52, 53]. Ωστόσο, δεν χρησιμοποιούνται εκτεταμένα κλινικά, διότι υπάρχουν ορισμένες τοξικολογικές ανησυχίες. Ομογενή δεδομένα για την βιοδιαθεσιμότητα των νανοσωματιδίων δεν είναι διαθέσιμα λόγω των διαφορετικών μεγεθών, σχημάτων και τροποποιητών επιφάνειας, και της καθαρότητας που έχουν. Τα μεταλλικά αυτά σωματίδια έχουν περιορισμένες βιο-εφαρμογές, είναι, όμως, ικανά να χρησιμοποιηθούν με ποικίλους τρόπους στην νανοφαρμακευτική. Έχουν χρησιμοποιηθεί ως συστήματα μεταφοράς αντικαρκινικού φαρμάκου για τον καρκίνο του κόλονος. [54] Η χρήση των νανοσωματιδίων λευκόχρυσου έχει εγκριθεί για προσθήκη σε προϊόντα καταναλωτών και καλλυντικών από το Υπουργείο Υγείας, Εργασίας και Πρόνοιας της Ιαπωνίας («Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan»). Αυτό δείχνει πως τα νανοσωματίδια λευκόχρυσου αποτελούν τομέα με περιθώρια ανάπτυξης.

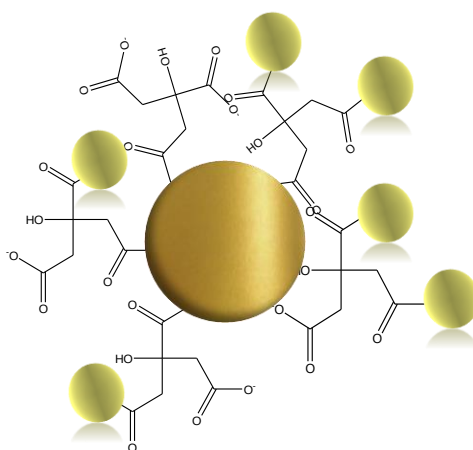


Εικόνα 3:
Νανοσωματίδιο
λευκόχρυσου

Οι οπτικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων λευκόχρυσου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο πεδίο της νανο-οπτικής, λόγω του επιφανειακού συντονισμού πλάσμονίων στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος, με κορυφή

στα 215 nm, εκτός από την περίπτωση που τα νανοσωματίδια λευκόχρυσου έχουν τροποποιηθεί με κιτρικό οξύ. Τα συγκεκριμένα νανοσωματίδια στερούνται της κορυφής αυτής υπέρυθρο. [55]

Στην παρούσα ερευνητική εργασία σε επικαλυμμένα με τρι-κιτρικό οξύ νανοσωματίδια χρυσού, που συντέθηκαν μέσω της αναγωγής του τρι-κιτρικού τρι-νατρίου, συνδέονται τα, μικρότερου μεγέθους, νανοσωματίδια λευκόχρυσου.



Εικόνα 4 Νανοσωματίδια Χρυσού επικαλυμμένα με τρικιτρικό οξύ και επικαλυμμένα με νανοσωματίδια λευκόχρυσου

1.4 ΝΕΟΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Το αγγειακό δίκτυο είναι ένα από τα πρώτα λειτουργικά δίκτυα που δημιουργούνται στα σπονδυλωτά ζώα και αποτελεί ένα περίπλοκο και πολυσύνθετο δίκτυο που περιέχει αρτηρίες, φλέβες, τριχοειδή αγγεία και λεμφικά κύτταρα. Το σύστημα αυτό μεταφέρει θρεπτικά συστατικά και μεταβολίτες σε όλο το σώμα και αποτελεί σημαντικό παράγοντα στον έλεγχο της ομοιόστασης, τόσο στο έμβρυο, όσο και στους ενήλικες. Κατά την ανάπτυξη του εμβρύου σχηματίζονται πρόδρομα βλαστικά στρώματα (germ layer). Από τα τρία βλαστικά στρώματα, το μεσόδερμα και το ενδόδερμα προέρχονται από τον εμβρυϊκό επιβλάστη, από την γαστρική διαδικασία (gastrulation process). Αμέσως μόλις δημιουργηθεί το μεσόδερμα, ένα μέρος των πρόδρομων μεσοδερμικών κυττάρων διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία οδηγούν στην δημιουργία των πρώτων αγγείων του εμβρύου, των πρόδρομων επιθηλιακών κυττάρων (αγγειοβλάστες). Η διαφοροποίηση των αγγειοβλαστών από το μεσόδερμα και ο σχηματισμός τους ονομάζονται «Νεοαγγειογένεση» [56-60].

Οι αγγειοβλάστες βρίσκονται στην περιφέρεια των αιμοφόρων αγγείων, ενώ αυτά που βρίσκονται στο κέντρο των αιμοφόρων αγγείων ονομάζονται “αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα”. Τα δύο αυτά είδη κυττάρων έχουν κοινούς ορισμένους αντιγονικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του Υποδοχέα Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αυξητικού Παράγοντα-2 (VEGFR-2), ονομαζόμενος και Flk-1 στα ποντίκια και KDR στους ανθρώπους, την αγγειοποιητίνη-1 (Ang-1), τον Υποδοχέα Tie-2, το αντιγόνο βλαστοκυττάρων-1 (Stem cell antigen, Sca-1), και το CD34. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι προέρχονται από τον ίδιο πρόδρομο ιστό, ο οποίος ονομάζεται “αιμαγγειοβλάστης”. Υπάρχουν δύο είδη αιμαγγειοβλαστών, ο ένας προέρχεται από το σπλαγχοπλευρικό μεσόδερμα, ενώ ο άλλος προέρχεται από το σωματοπλευρικό μεσόδερμα. Αιμοποιητικά κύτταρα μπορούν να προέλθουν μόνο από το σπλαγχοπλευρικό μεσόδερμα. Η ανάπτυξη και μίξη των πολλαπλών αιμοφόρων αγγείων έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία του πρωτεύοντος τριχοειδούς δικτύου. Μετά την έναρξη της κυκλοφορίας του αίματος, ανάλογα με τις εξωκυτταρικές δράσεις, τα

ενδοθηλιακά κύτταρα αποκτούν αρτηριακή ή φλεβική ταυτότητα, με αποτέλεσμα το πρωτεύον τριχοειδές δίκτυο να τροποποιείται σε αρτηριο-φλεβικό αγγειακό σύστημα.

1.5 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Αφού σχηματιστεί το πρώτο αγγειακό σύστημα, σχηματίζονται περισσότερα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία μπορούν να σχηματίσουν τριχοειδή μέσω σχηματισμού νέων βλαστωμάτων ή μέσω του διαχωρισμού τους από πρόδρομο αγγείο. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται «Αγγειογένεση» και έχει δυο μορφές, την «Αγγειογένεση Εκβλάστησης» και την «Αγγειογένεση Διαχωρισμού». Η αγγειογένεση παρατηρείται, κυρίως, σε όργανα που προέρχονται από το εκτόδερμα ή το μεσόδερμα, όπως του εγκεφάλου και του νευρο-εκτοδέρματος.

1.5.1 Αγγειογένεση Εκβλάστησης

Η αγγειογένεση εκβλάστησης λαμβάνει χώρα στον λεκιθινικό σάκο και στο έμβρυο συνήθως κατά την διάρκεια της οργανογένεσης.

1. Η διαδικασία δημιουργίας νέων βλαστών-αγγείων ξεκινάει με την δημιουργία νέων τριχοειδών από μικρά φλεβίδια ή από άλλα τριχοειδή, τα οποία υφίστανται παρατεταμένη διαστολή.
2. Στην συνέχεια γίνεται πρωτεολυτική αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής-βασικής μήτρας. Στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων δεσμεύεται ένας αγγειογενετικός παράγοντας, όπως οι κυτοκίνες, με αποτέλεσμα να διεγείρονται τα ενδοθηλιακά κύτταρα και να αυξάνουν την παραγωγή τους σε πλασμινογόνο και κολλαγενάσες. Η πλασμίνη ενεργοποιεί την κολλαγενάση, η οποία αποικοδομεί την βασική μεμβράνη του αγγειακού τοιχώματος. Ο ενεργοποιητής του κολλαγόνου πιθανόν αναστέλλει την θρόμβωση στο νεοσχηματιζόμενο άκρο του τριχοειδούς, πριν ολοκληρωθεί ο σχηματισμός και πριν αρχίσει η ροή του αίματος. Αξιοσημείωτη είναι η δημιουργία ινώδους πλέγματος εξωκυττάρια, λόγω της αυξημένης διαπερατότητας.
3. Ακολουθεί η χημειοτακτική μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων προς ένα αγγειογονικό ερέθισμα, επομένως η δημιουργία

«ψευδοποδίων», δηλαδή προεξοχών στην επιφάνεια. Σε αυτή την διαδικασία συμβάλλει το κολλαγόνο τύπου I και II. Το ινώδες πλέγμα παίζει ρόλο στον σχηματισμό νέων τριχοειδών διακλαδώσεων, ιδιαίτερα στην περίπτωση που η αγγειογένεση οφείλεται σε φλεγμονή ή σε ανάπτυξη καρκίνου. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα διατάσσονται διπολικά και δημιουργούν τον αυλό ενδοκυτταρικά (intra-cellular), από τα κενοτόπια (vacuoles) ή ενδοκυττάρια (inter-cellular).

4. Άμεσα, ξεκινάει η μίτωση των ενδοθηλιακών κυττάρων κοντά στο απομακρυσμένο άκρο του βλαστού.
5. Στην συνέχεια, γίνεται σχηματισμός των βρόγχων, μέσω της σύνδεσης μεμονωμένων βλαστών και η ροή αίματος ξεκινάει μέσω των νεοσχηματισμένων βρόγχων. Τα περικύτταρα ή τα κύτταρα λείου μυός ενώνονται τελικά με το τριχοειδές στην εξωτερική πλευρά του τριχοειδούς και στηρίζουν το ενδοθήλιο. Τα συγκεκριμένα οργανίδια έλκονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα από αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνει το ενδοθήλιο.
6. Τέλος, αφού σχηματιστούν κυκλικά τριχοειδή-θηλιές, ξεκινάει η ροή του αίματος. Το βήμα αυτό αποτελεί την λειτουργική ωρίμανση του ενδοθηλίου, με τελικό στάδιο να παράγεται μία νέα βασική μεμβράνη [56-59].

1.5.2 Αγγειογένεση Διαχωρισμού

Σύμφωνα με τον R.H.D. Short, στον πνεύμονα, τα τριχοειδή μπορεί να διαχωρίζονται με την τοποθέτηση λεπτών στηλών δια μέσου των ιστών, που ονομάζονται πυλώνες ή στύλοι ιστών.

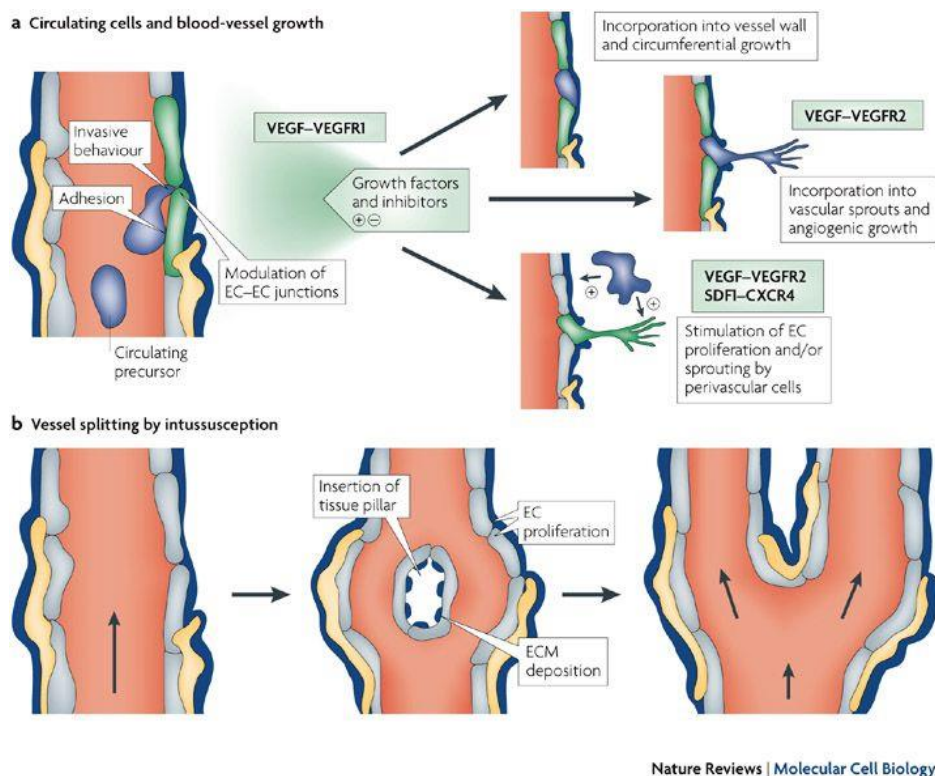
1. Η ανάπτυξη παρατηρείται κυρίως στην πλευρά της φλέβας των αγγείων όλων των μεγεθών και στην τριχοειδή περιοχή της κυκλοφορίας.
2. Το ενδοθηλιακό στρώμα υποχωρεί σταδιακά γύρω από μια οργανωμένη μονάδα διάμεσου ιστού, που βρίσκεται στο τοίχωμα του αγγείου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποκοπή του αυλού του αγγείου γύρω από αυτή την μονάδα. Ο μικρότερος πυρήνας πυλώνων σχηματίζεται από την επέκταση των ενδοθηλίων, που καλύπτουν μια δέσμη ινιδίων κολλαγόνου. Συχνά, οι επεκτάσεις των περι-ενδοθηλιακών κυττάρων βρίσκονται μεταξύ αυτών των ενδοθηλιακών επεκτάσεων και των ινιδίων κολλαγόνου. Με βάση αυτή την διαδικασία σχηματίζονται πτυχές ιστών που εμφανίζονται στον αυλό του αγγείου, όπως πυρήνες ενδοαγγειακών δομών ιστού (ΕΔΙ) που έχουν διάμετρο $\geq 2.0\text{-}2.5\ \mu\text{m}$, καθώς και πυλώνες ιστού (pillar cores), που έχουν διάμετρο $\leq 2.0\text{-}2.5\ \mu\text{m}$, μέσα στον αυλό του αγγείου. Η ανάπτυξη πτυχών μπορεί επίσης να κατευθύνεται προς τον αυλό του αγγείου. Και στις δύο περιπτώσεις σχηματίζονται πτυχές μέσα στον αυλό. Αυτή η διαδικασία απαιτεί αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης-μήτρας, για να επιτρέψει την οργανωμένη κίνηση του ενδοθηλιακού στρώματος.
3. Ο διαχωρισμός των στηλών από την πτυχή των ιστών και η διαίρεση μιας ενδοαγγειακής δομής ή ο διαχωρισμός της από τα πλευρικά τοιχώματα του αγγείου, είναι αλληλεξαρτώμενα και αποτελούν ένα πολύ σημαντικό βήμα, την συστολή (thinning) των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η διαδικασία αυτή συμβαίνει έως ότου οι δύο αντίθετες κυτταρικές μεμβράνες διασταλούν μέχρι να σχηματίσουν μια διακυτταρική οπή. Η διαδικασία αυτή τροποποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε μια μορφή δακτυλίου και επιτρέπει την επέκταση του αγγειακού αυλού μέσω αυτής

της οπής, ενώ οδηγεί σε σχηματισμό ΕΔΙ και πυλώνων ιστών μέσα στον αυλό, καθώς και σε *in situ* σχηματισμό αγγειακών βρόγχων. Στο πάνω και στο κάτω μέρος οι ΕΔΙ παραμένουν προσδεμένες στο πλευρικό αγγειακό τοίχωμα. Οι ΕΔΙ και οι πυλώνες ιστού μπορούν τελικά να διαιρούνται και να δημιουργούν μικρότερες δομές, η μικρότερη από τις οποίες έχει διάμετρο $<1.0 \mu\text{m}$. Επιπρόσθετα, διαίρεση των αγγείων μπορεί να συμβεί με την εισαγωγή ιστού στο αντίθετο τοίχωμα του αγγείου. Σε αυτήν την περίπτωση η ένωση της κυτταρικής μεμβράνης στα δύο «αντίθετα» ενδοθηλιακά κύτταρα δημιουργεί δύο διακυτταρικές οπές οι οποίες θα καταληφθούν από εξωκυτταρικά στοιχεία της μήτρας για να σχηματίσουν μια σταθερή σύνδεση μεταξύ της πτυχής και του αντίθετου αγγειακού τοιχώματος.

4. Η σύνθεση ινών κολλαγόνου αποτελεί απαραίτητο βήμα για να σχηματιστεί ο πυρήνας ΕΔΙ και οι πυλώνες ιστού και να σταθεροποιηθούν. Δεν είναι ακόμα γνωστό ποιος τύπος κολλαγόνου χρησιμοποιείται. Το κολλαγόνο τύπου 1 έχει βρεθεί σε πολλά αγγειογόνα αγγεία σε όγκους. Επιπρόσθετα, πρέπει να ταυτοποιηθεί το είδος του κυττάρου που είναι υπεύθυνο για τον σχηματισμό κολλαγόνου. Πιθανόν να είναι υπεύθυνα τα περι-ενδοθηλιακά κύτταρα. Πάραυτα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορούν να συνθέσουν και να εναποθέσουν ίνες κολλαγόνου κατά την διάρκεια της αγγειογένεσης *in vitro*.
5. Ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων πρέπει να συμβεί, αλλά δεν αποτελεί αναπόσπαστο μέρος αυτής της διαδικασίας.
6. Η ροή είναι μόνιμα παρούσα σε αυτά τα βήματα.
7. Γενικά, τα περι-ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν πολλές ομοιότητες με τα ενδοθηλιακά κύτταρα που αναπτύσσουν αγγεία στο έμβρυο. Λαμβάνουν μέρος στον σχηματισμό των ΕΔΙ και στους πυρήνες πυλώνων. Στην περίπτωση των ενηλίκων τα περι-ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος λαμβάνουν μέρος στην αγγειογένεση διαχωρισμού.

8. Δημιουργείται η βασική μεμβράνη [56, 58, 59, 61].

Η αγγειογένεση εκβλάστησης αλλά και η αγγειογένεση διαχωρισμού, παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες αλλά και διαφορές, με την μεγαλύτερη από αυτές να είναι η εξαρχής επέκταση του αυλού, σε αντίθεση με την οργάνωση της εξωκυτταρικής μήτρας που ακολουθείται από επέκταση του αυλού. Στην αγγειογένεση εκβλάστησης η επέκταση του αυλού οδηγεί στον σχηματισμό ενός νέου σωλήνα, ενώ στην αγγειογένεση διαχωρισμού οργανωμένα διαφορετικά κομμάτια της εξωκυτταρικής μήτρας καθορίζουν την ανάπτυξη του αυλού που τα περιβάλλει. Γι' αυτό στην ενδοθηλιακή εκβλάστηση σχηματίζονται νέα αγγεία από ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω της μετανάστευσης και της μίτωσης. Ο διαχωρισμός μπορεί να προέλθει από ήδη υπάρχοντα αγγεία μέσω του διαχωρισμού των αυλών τους. Πάραυτα, έχει παρατηρηθεί στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, στην επούλωση πληγών (wound healing) και στην ανάπτυξη όγκων να γίνεται *in situ* δημιουργία βρόγχων.



Εικόνα 5: α) αγγειογένεση Εκβλάστησης (Sprouting Angiogenesis) β) Αγγειογένεση Διαχωρισμού (Splitting Angiogenesis)/ (Εικόνα από Molecular Cell Biology)

1.5.2.1 Αγγειογενετικοί Παράγοντες

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η αγγειογένεση είναι ελεγχόμενη διαδικασία με υψηλή ρύθμιση, επειδή απαιτεί αδρανή ενδοθηλιακά κύτταρα σε μια μονοστιβάδα να διαιρεθούν και να εξαπλωθεί το αγγειακό δίκτυο, όσο απαιτείται, σύμφωνα με τις απαιτήσεις των ιστών που αναπτύσσονται. Υπάρχουν παράγοντες που λειτουργούν θετικά και αρνητικά στην αγγειογένεση μεταξύ των οποίων υπάρχουν διαλυτά πολυπεπτίδια, αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-μήτρας, και αιμοδυναμικά φαινόμενα αλλά και πρωτεΐνες που είναι συνδεδεμένες στην μεμβράνη.

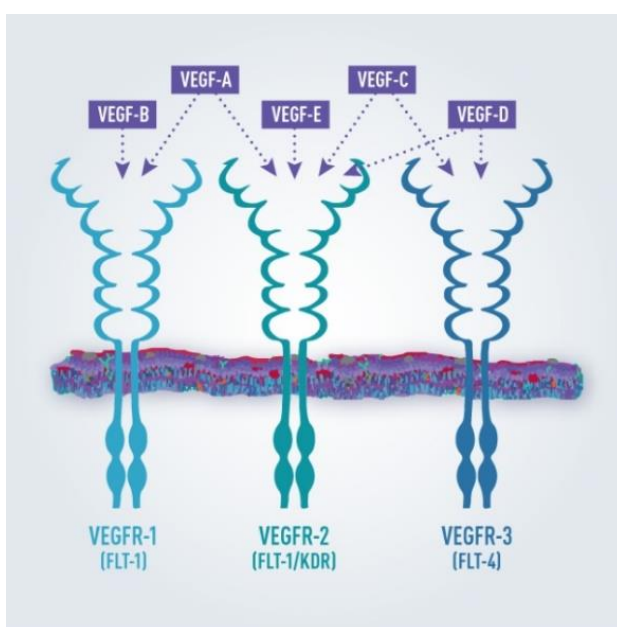
1.5.2.2 Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)

Αποτελεί, ίσως, τον πιο καλά χαρακτηρισμένο αγγειογενετικό παράγοντα, και προέρχεται από διαφορετικό διαχωρισμό έξι ισομερών του VEGF που συντίθενται από 121, 145, 165, 183, 189, και 206 αμινοξέα, με την πιο συνήθη μορφή έκφρασης να είναι ο VEGF₁₆₅. Παρόλο που όλα τα ισομερή παρουσιάζουν ταυτόσημες βιολογικές ιδιότητες, ο VEGF₁₂₁ και ο VEGF₁₆₅ είναι οι πιο συνήθεις μορφές έκφρασης και είναι οι μόνες που εκκρίνονται σε εξωκυτταρικό περιβάλλον, ενώ ο VEGF₁₈₉ και ο VEGF₂₀₆, και εν μέρει ο VEGF₁₆₅, παραμένουν συνδεδεμένα στο κύτταρο ή στην μήτρα μέσω της συγγένειάς τους με θειικές ομάδες της ηπαρίνης. Ο VEGF είναι ένα διμερές γλυκοπρωτεΐνης καλά συγκρατημένο με δισουλφιδικούς δεσμούς, με μοριακό βάρος 34-45 kDa, που χάνει την βιολογική του δραστηριότητα παρουσία αναγωγικών φορέων [61, 62].

Ένα πλήθος ιστών ανθρώπου και ζώων εκφράζουν χαμηλά επίπεδα VEGF, ενώ υψηλά επίπεδα VEGF εκφράζονται όπου απαιτείται η αγγειογένεση, όπως ο εμβρυϊκός ιστός, ο πλακούντας καθώς και η πλειονότητα των ανθρωπίνων όγκων. Πολλά μεσεγχυματικά και στρωματικά κύτταρα παράγουν VEGF. Ο VEGF συνδέεται με τουλάχιστον τρεις υποδοχείς τυροσινικής κινάσης, οι οποίοι

είναι ο Flt-1 (VEGFR-1), KDR/Flk-1 (VEGFR-2), και ο Flt-4 (VEGFR-3). Οι λειτουργικοί VEGF υποδοχείς χαρακτηρίστηκαν ως εξειδικευμένοι ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά έχουν βρεθεί και σε άλλους τύπους φυσιολογικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου και των αγγειακών κυττάρων λείου μυός και των μονοκυττάρων/ μακροφάγων. Γι' αυτό, ο VEGF ενεργοποιεί διάφορες δράσεις που προέρχονται από ποικίλες πηγές και ίσως να χρησιμοποιούν ενδοθηλιακούς και άλλους τύπους κυττάρων ως τελεστές.

Οι VEGF υποδοχείς ανήκουν στην «7-Ig» ή flt οικογένεια γονιδίων, που είναι χαρακτηρισμένοι από επτά εξωκυτταρικούς τομείς ανοσοσφαιρίνης, ένα τμήμα που καλύπτει την μεμβράνη κι έναν τομέα της ενδοκυτταρικής τυροσινικής κινάσης. Ο VEGFR-1 έχει την μεγαλύτερη συγγένεια για τον VEGF και εκφράζεται στο ενδοθήλιο του ενήλικα, στα ποντίκια-έμβρυα, στις ανθρώπινες πληγές του δέρματος κατά την επούλωση, καθώς επίσης στα αγγειακά κύτταρα λείου μυός. Αποτελεί ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο VEGFR-1 δεν έχει βρεθεί να λαμβάνει μέρος σε μετάσταση, πολλαπλασιασμό ή σε κυτταροσκελετικά φαινόμενα.



Εικόνα 6: VEGF και VEGF-Receptors (Εικόνα από Mikael Häggström. WikiJournal of Medicine)

Αντίθετα, ο VEGFR-2, που είναι ένας υποδοχέας με μικρότερη συγγένεια με το VEGF, ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα, την μιτογένεση, την χημειοταξία και την αλλαγή της μορφής τους. Ο VEGFR-2 εκφράζεται στο ενδοθήλιο, σε αιμοποιητικά πρόδρομα, και σε πολλαπλασιαζόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα στο έμβρυο, αλλά στο αδρανές ενδοθήλιο του αγγειακού συστήματος του ενήλικα, το VEGFR-2 mRNA μειώνεται δραματικά.

Ένας τρίτος υποδοχέας τυροσινικής κινάσης VEGFR-3 εκφράζεται κυρίως στο λεμφικό ενδοθήλιο και μπορεί να λαμβάνει μέρος στην λεμφοαγγειογένεση. Ο VEGFR-3 δεν δεσμεύεται από το VEGF, αλλά με πρωτεΐνες VEGF-C και VEGF-D [61, 62].

Ένας υποδοχέας VEGF που προέρχεται από την οικογένεια γονιδίων *flt* είναι η νευροπιλίνη. Η Νευροπιλίνη-1 είναι ένας νευρικός υποδοχέας για μέλη της οικογένειας “κατάρρευσης/σήμανσης” (“collapsing/semaphoring”). Πάραυτα, η νευροπιλίνη-1 εκφράζεται και σε υγιή ενδοθηλιακά κύτταρα. Συνδέεται με τον VEGF₁₆₅ τον VEGF₁₂₁, ενισχύει την δέσμευσή της στον VEGFR-2 και εμφανίζει τα δικά της χημειοτακτικά φαινόμενα. Η Νευροπιλίνη-1 είναι πιθανό να συμβάλλει στην αγγειογένεση, διότι με την μελέτη του Papetti et al. τα ποντίκια που την υπερεκφράζουν εμφανίζουν μεγάλη πυκνότητα διεσταλμένων αιμοφόρων αγγείων και πεθαίνουν την εμβρυϊκή μέρα 17,5. Επιπλέον, τα ποντίκια που δεν εμφανίζουν νευροπιλίνη-1 παρουσιάζουν διαταραγμένα αιμοφόρα αγγεία και ανεπαρκή ανάπτυξη του αγγειακού τους συστήματος [61].

Ο VEGF είναι μέλος της οικογένειας των παραγόντων ανάπτυξης που έχουν ομολογία αμινοξέων μεταξύ τους. Ο Αιμοπεταλιακός Αυξητικός Παράγοντας (Platelet-derived growth factor, PDGF) είναι ομόλογος με τον VEGF κατά 18-24% και διατηρεί οχτώ τμήματα κυστεΐνης, μέσω των οποίων προτείνεται ένας όμοιος σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών -ενδο- και δια-μοριακών- των πεπτιδικών αλυσίδων (intra-, interchain), όπου ο PDGF και ο VEGF δεσμεύουν συγκεκριμένους υποδοχείς [61, 63].

Ένας ακόμα παράγοντας που εμφανίζει 53% ομολογία αμινοξέων με τον VEGF, στην περιοχή που είναι όμοια με τον PDGF, είναι ο αυξητικός παράγοντας του πλακούντα (Placenta growth factor, PIGF). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ο PIGF εκφράζεται στον πλακούντα, ενώ ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι η εμβρυϊκή αγγειογένεση στα ποντίκια δεν επηρεάζεται από την έλλειψη του PIGF. Ο συγκεκριμένος παράγοντας μπορεί να συνδέεται με τον VEGF σχηματίζοντας ετεροδιμερή VEGF/PIGF, ή να ενισχύσει τα σήματα του VEGF. Ο VEGF-B είναι ένας αυξητικός παράγοντας που έχει 43%

ταυτόσημα αμινοξέα με τον VEGF₁₆₄ και 30% με τον PlGF. Εκφράζεται κυρίως στους ιστούς των μυών στο έμβρυο και τον ενήλικα και λιγότερο στον εγκέφαλο, τους πνεύμονες και το συκώτι. Ο VEGF-B συνδέεται και ενεργοποιεί τον VEGFR-1 και την Νευροπιλίνη-1. Σύμφωνα με μια σειρά από έρευνες, ο VEGF-B δεν φαίνεται να λαμβάνει μέρος στην αγγειογένεση. Αποτελεί, όμως έναν μιτογενικό παράγοντα για τα ενδοθηλιακά κύτταρα, και όμοια με τον PlGF, μπορεί να συνδεθεί με τον VEGF και να σχηματίσει ετεροδιμερή [61, 63, 64].

Άλλα μόρια που συνδέονται με τον VEGF με μικρότερη ομολογία με εκείνο, είναι τα VEGF-C και VEGF-D, τα οποία δημιουργούν μία υπο-ομάδα με την δική της δομική ομοιότητα. Είναι, αντίστοιχα, 32% και 31% όμοια με τον VEGF₁₂₁ και τον VEGF₁₆₅, και ενώνονται-ενεργοποιούν τον VEGFR-2 και VEGFR-3 και είναι μιτογενετικά για τα ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*. Ενεργοποιούν την αγγειογένεση *in vitro* και *in vivo*, με τον VEGF-C (λόγω της θέσης του), και τον υποδοχέα που προτιμάει (VEGFR-3), να επιδεικνύουν παρακρινικό ρόλο στην αγγειογένεση των λεμφικών αγγείων, κατά την ανάπτυξη και διατήρηση του διαφοροποιημένου λεμφικού ενδοθηλίου στον ενήλικα. Ο VEGF-D ενεργοποιείται από το *c-fos* και η υψηλή έκφρασή του στον εμβρυϊκό πνεύμονα δείχνει ότι λαμβάνει μέρος στην ανάπτυξη των πνευμόνων. Τέλος, ο VEGF-E αναφέρεται σε μια ομάδα πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τον γό *orf*, έναν γό που προσβάλλει τα πρόβατα, τις κατσίκες και περιστασιακά τους ανθρώπους, και έχει 16-27% ομολογία με τον VEGF των θηλαστικών. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν διατηρήσει την λειτουργία του VEGF, επειδή λαμβάνουν σήματα από τον VEGFR-2 και ενεργοποιούν την αγγειογένεση *in vitro* και *in vivo*. Επιπρόσθετα, οι αλλοιώσεις του γού *orf* ωθούν στον πολλαπλασιασμό και την διαστολή των δερματικών ενδοθηλιακών αγγείων [61].

1.5.3 Αγγειοποιητίνες και υποδοχείς πρόσδεσης (angiopoietins and tie receptors)

Οι αγγειοποιητίνες ανήκουν σε μία οικογένεια εκκρινόμενων πρωτεϊνών οι οποίες προσδένονται σε συγκεκριμένους υποδοχείς. Οι προαναφερθείσες και οι υποδοχείς τους έχουν προταθεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση.

1.5.3.1 Οι υποδοχείς

Τα μοντέλα έκφρασης δύο εκ των υποδοχέων που έχουν αναγνωρισθεί, του Tie1 και Tie2 μιμούνται αυτά των υποδοχέων του VEGF και είναι ειδικά για το αγγειακό ενδοθήλιο. Η έκφραση και των δύο μοντέλων των προαναφερθέντων υποδοχέων υποδηλώνουν ότι λαμβάνουν μέρος στην ανάπτυξη της αγγειογένεσης. Ο Tie1 λαμβάνει μέρος όχι τόσο στην διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά περισσότερο στην ακεραιότητα και στην επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων κατά την αγγειογένεση, ενώ ο Tie2 στην εκβλάστηση και διακλάδωση των σχηματιζόμενων αγγείων, που αποτελεί χαρακτηριστικό της αγγειογένεσης.

1.5.3.2 Αγγειοποιητίνες

Οι αγγειοποιητίνες είναι εκκρινόμενοι συνδέτες (ligands) που συνδέονται με τον Tie2. Η Ang1 δεν εντείνει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων ή των σχηματισμό σωλήνων *in vitro*, αλλά ενεργοποιεί τον σχηματισμό βλαστών από ενδοθηλιακά κύτταρα. Η διακλάδωση και η αλλαγή της δομής των αγγείων εντείνεται από τα σήματα της Ang1 και φαίνεται να συνδέεται μηχανιστικά με την ικανότητά της να σταθεροποιεί το ενδοθήλιο στα νεοσχηματιζόμενα αγγεία, που βρίσκονται κατά την εκβλάστηση.

Ένα άλλο μέλος της οικογένειας των αγγειοποιητινών είναι η αγγειοποιητίνη 2 (Ang2), που αρχικά χαρακτηρίστηκε ως δομικό ανάλογο που συνδέεται με τον Tie2. Σε έρευνες έχει βρεθεί ότι η Ang2 συν-εκφράζεται με τον VEGF, σε μία

περιοχή ανάπτυξης των αγγείων, υποβοηθώντας την αγγειογένεση εκβλάστησης [61, 65].

1.5.3.3 Ινοβλαστικός Αυξητικός Παράγοντας (Fibroblast Growth factor ή FGF)

Οι βασικοί (basic) και όξινοι (acidic) FGFs με ισοηλεκτρικά σημεία $pI=9.6$ και $pI=5$ αντίστοιχα, (συγκεκριμένα οι aFGF και bFGF) είναι πολυπεπτίδια των 18-25 kDa που εκφράζονται από την ουβικιλίνη, και ανήκουν σε μία οικογένεια αυξητικών παραγόντων που σχετίζονται δομικά μεταξύ τους και θεωρούνται ότι εμπλέκονται στην ανάπτυξη της αγγειογένεσης. Και οι δύο αυτοί παράγοντες ενεργοποιούν διαδικασίες στα ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*, όπως τον πολλαπλασιασμό τους και την μετανάστευσή τους, καθώς και την παραγωγή νέων ενδοθηλιακών κυττάρων από το πλασμινογόνο και την κολλαγενάση. [66].

1.5.3.4 Παράγοντας ανάπτυξης αιμοπεταλίων (Platelet-derived Growth Factor-PDGF)

Ο PDGF εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα επιθηλιακά κύτταρα και είναι παρών στα αιμοπετάλια. Ενεργοποιούνται μέσω της σύνδεσης πέντε λειτουργικών αυξητικών παραγόντων. Οι επιδράσεις του PDGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro* δείχνουν ότι λειτουργεί ως αυξητικός παράγοντας στην αγγειογένεση. Οι PDGF ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και των περικυττάρων, που έχουν βρεθεί να εκφράζουν PDGF-β υποδοχείς.

1.5.3.5 Αυξητικός Παράγοντας Μετατροπής-β (Transforming growth factor-β ή TGF-β)

Ο TGF-β έχει σημαντικό ρόλο στην μορφοποίηση των αγγείων κατά την ανάπτυξη της αγγειογένεσης. Είναι γνωστό πως η συστηματική αύξηση αυτού του παράγοντα ανάπτυξης έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία οξειδωτικού στρες και την δυσλειτουργία του αγγειακού ενδοθηλίου. Μάλιστα, έχει αναφερθεί να εντείνει την αγγειογένεση αλλά και να παρεμποδίζει την ανάπτυξη

των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ δρα συνεργικά με τον VEGF προς όφελος της αγγειογένεσης, μέσω της αύξησης της απόπτωσης των μεγάλων αγγειακών βλαστών. Επίσης, έχει βρεθεί να μειώνει την έκφραση του VEGFR-2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα και να παρεμποδίζει τις αγγειογενικές αντιδράσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων που προκαλούνται από τον VEGF. Παράλληλα, βοηθά στην παρεμπόδιση της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων [67].

Οι παράγοντες που βρίσκονται προσδεμένοι στην μεμβράνη για να δράσουν απαιτούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων που βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους ή αλληλεπιδράσεις κυττάρου μήτρας, όπου σ' αυτές συμπεριλαμβάνονται οι ιντεγκρίνες, οι καντερίνες και οι ευφρίνες, οι οποίες είναι πρωτεΐνες της ενδοθηλιακής μεμβράνης, που ενεργοποιούν πολλές λειτουργίες των αιμοφόρων αγγείων *α_vβ₃ ιντεγκρίνη*: Οι ιντεγκρίνες είναι διμερή που δημιουργούνται από α- και β- υπομονάδες, που είναι υποδοχείς πρωτεϊνών της εξωκυτταρικής μήτρας, και πολυπεπτίδια που συνδέονται στην μεμβράνη άλλων κυττάρων. Ο Brooks et al. σε ερευνητική του εργασία το 1994 αναφέρει ότι η ιντεγκρίνη *α_vβ₃* κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αγγειογένεσης, ενεργοποιώντας μια σειρά ερεθισμάτων και εκφράζεται μόνο σε νεοσχηματιζόμενα αγγεία [68].

1.6 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Ο Folkman et al. υποστήριξε ότι η ανάπτυξη όγκων καθώς και η μετάσταση τους εξαρτάται από την αγγειογένεση, συνεπώς μέσω της παρεμπόδισης της αγγειογένεσης θα μπορούσε να κατασταλεί και η ανάπτυξη των καρκινικών όγκων [69]. Τα κύτταρα σε προ-καρκινικό ιστό επάγουν την αγγειογένεση καθώς μεταπίπτουν σε καρκινικά και αυτό συμβαίνει όταν οι αγγειογενετικοί παράγοντες «υπερ-λειτουργούν» σε σχέση με τους αγγειοσταλτικούς. Σήματα που οδηγούν στην αγγειογένεση είναι το μεταβολικό στρες (χαμηλό pH, ή υπογλυκαιμία), απόκριση σε φλεγμονή ή ανοσοφλεγμονή, μηχανική πίεση και μεταλλάξεις.

Τα αγγεία που δημιουργούνται στους όγκους προέρχονται από αγγειογένεση εκβλάστησης ή αγγειογένεση διαχωρισμού, δημιουργούνται δηλαδή, όπως προαναφέρθηκε, από προέκταση ή διαχωρισμό ήδη υπάρχοντων αγγείων. Πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα που κυκλοφορούν μέσω του κυκλοφορικού συστήματος μπορεί επίσης να συμβάλλουν στην αγγείωση του όγκου [70]. Αξιοσημείωτο είναι ότι τα αγγεία των όγκων στερούνται προστατευτικών μηχανισμών τους οποίους τα φυσιολογικά κύτταρα αποκτούν κατά την ανάπτυξη, όπως τα περικύτταρα που ωφελούν στην ισορροπία ορμονών και επιπέδων οξυγόνου. Επίσης, το τοίχωμα των αγγείων αυτών δεν αποτελείται από ομοιογενές στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά μόνο από καρκινικά ή μείγμα καρκινικών και ενδοθηλιακών κυττάρων, η παρουσία των οποίων ωθεί στην μετάσταση του καρκίνου. Οι όγκοι απαιτούν την ανάπτυξη αιμοφόρων αγγείων για να αναπτυχθούν, συνεπώς θεραπείες που θα παρεμποδίζουν την αγγειογένεση είναι πιθανό να σταματούν την ανάπτυξη όγκων σε μια ποικιλία τύπων καρκίνου. Μπορεί, αρχικά, να ανασταλεί η δράση μορίων που λειτουργούν ως αγγειογενετικοί παράγοντες παρεμποδίζοντας τα τοπικά σήματα της αγγειογένεσης.

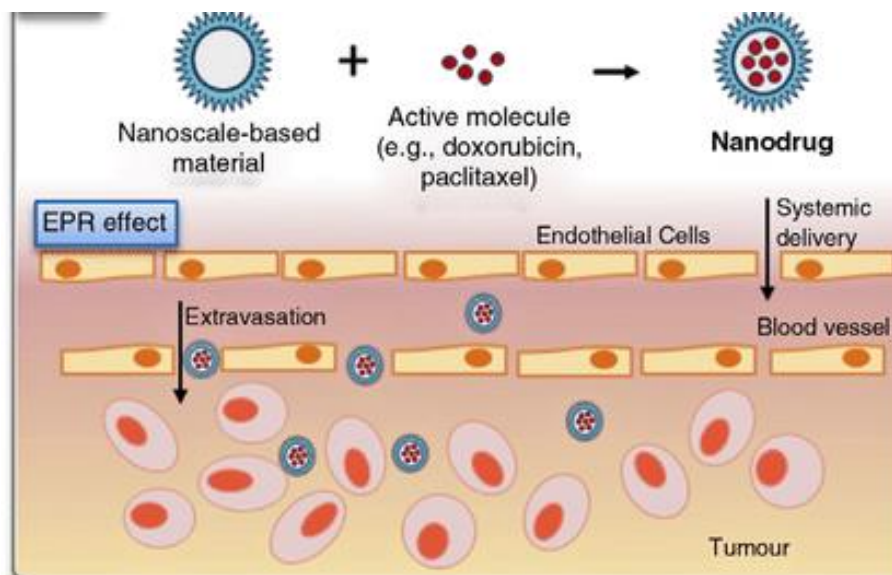
1.7 ΣΤΟΧΕΥΣΗ ΤΗΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

1.7.1 Παθητική Στόχευση

Στην παθητική στόχευση γίνεται εκμετάλλευση του φαινομένου αυξημένης διαπερατότητας και συγκράτησης.

Φαινόμενο αυξημένης διαπερατότητας και συγκράτησης – (Enhanced Permeability and Retention effect-EPR effect)

Το φαινόμενο αυξημένης διαπερατότητας και συγκράτησης είναι ουσιαστικά ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά της αγγειογένεσης του όγκου.



Εικόνα 7: Φαινόμενο αυξημένης διαπερατότητας και συγκράτησης (Εικόνα από Pharmaceutical Nanotechnology: Innovation and Production)

Οι όγκοι προκειμένου να διατηρήσουν επαρκή αποθέματα θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου, τείνουν να πραγματοποιούν ταχεία αγγειογένεση. Ο γρήγορος πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων, κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης, οδηγεί σε μειωμένη πυκνότητα ενδοθηλιακών κύτταρων και σε απώλεια των στενών συνδέσεων μεταξύ τους, με σχηματισμό μεγάλων κενών

μεταξύ των κυττάρων. Εξαιτίας του φαινομένου EPR, τόσο τα μακρομοριακά φάρμακα, όσο και τα νανοσωματίδια, μπορούν να στοχεύσουν τους όγκους πιο αποτελεσματικά από ότι τα μικρά μόρια μόρια. Τα νανοσωματίδια, λόγω του μικρού τους μεγέθους, μπορούν να διαπερνούν το τοίχωμα των ατελών αιμοφόρων αγγείων και να αυξάνουν έτσι την παραμονή τους στην περιοχή του όγκου [71].

1.7.2 Ενεργητική Στόχευση

Εκτός από την παθητική στόχευση, όπου γίνεται εκμετάλλευση των χαρακτηριστικών των καρκινικών όγκων, εξίσου σημαντική είναι και η *ενεργητική στόχευση*. Βασίζεται στην δημιουργία/ τροποποίηση μορίων με μία ποικιλία παραγόντων στόχευσης, οι οποίοι αναγνωρίζονται και συνδέονται με την επιφάνεια των κυττάρων-στόχων ή σε πρωτεΐνες, που λαμβάνουν μέρος στην ανάπτυξη της αγγειογένεσης. Αυτοί οι παράγοντες στόχευσης είναι, συνήθως, πρωτεΐνες (κυρίως αντισώματα και τα κλάσματα τους), νουκλεϊκά οξέα ή άλλοι συνδέτες υποδοχέων (πεπτίδια, βιταμίνες, υδατάνθρακες, κ.α.), καθώς και μικρού μοριακού βάρους οργανικά μόρια. Γενικά, όταν χρησιμοποιείται ένας παράγοντας στόχευσης σε καρκινικά κύτταρα, είναι αναγκαίο ο συνδέτης να προσδένεται με υψηλή εκλεκτικότητα στα μόρια που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Επίσης, για τη βελτιστοποίηση της εκλεκτικότητας, κρίνεται σκόπιμο το μόριο, στο οποίο θα προσδεθεί ο συνδέτης, να είναι υπερ-εκφρασμένο στην επιφάνεια του κυττάρου στόχου, συγκριτικά με τα φυσιολογικά κύτταρα.

Ένας μελετημένος στόχος για την στόχευση της αγγειογένεσης είναι ο VEGF υποδοχέας. Με χρήση μικρών μορίων, ή αντισωμάτων που λειτουργούν ως παρεμποδιστές της τυροσινικής κινάσης, αναστέλλεται η φωσφορυλίωση της τελευταίας, με αποτέλεσμα να σταματάει ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και κατ' επέκταση η δημιουργία νέων βλαστών αγγείων ή/και ο διαχωρισμός τους [72-74]. Πρόκειται, δηλαδή, για την σύνθεση Αναστολέων της τυροσινικής κινάσης (Tyrosine Kinase Inhibitors ή TKI).

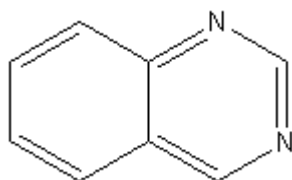
Στην παρούσα εργασία έχει πραγματοποιηθεί σύνθεση ενός οργανικού μορίου, το οποίο λαμβάνει την θέση της ATP στην τυροσινική κινάση, με αποτέλεσμα να αποτρέπει την φωσφορυλίωση της και να την απενεργοποιεί.

1.8 ΜΟΡΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Γενικά, ως μόρια τροποποίησης χρησιμοποιούνται ενώσεις που θα προσδώσουν στο νανοϋλικό κάποια επιθυμητή ιδιότητα, αλλά και μόρια στόχευσης τα οποία είναι επιθυμητό να μεταφερθούν στο κατάλληλο σημείο. Ενώσεις με μικρό μοριακό βάρος έχουν πολλά πλεονεκτήματα ως μόρια στόχευσης, όπως μικρό μέγεθος, μικρό κόστος παραγωγής και βελτιωμένη σταθερότητα.

1.8.1 Κιναζολίνη

Είναι γεγονός πως οι ετεροκυκλικές ενώσεις διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην φαρμακευτική χημεία. Μία από τις πιο σημαντικές ετεροκυκλικές ενώσεις στην φαρμακευτική χημεία είναι η κιναζολίνη, ένα οργανικό μόριο που αποτελείται από δύο δακτυλίους, έναν βενζολικό και έναν πυριμιδινικό. Είναι μόριο κίτρινου χρώματος, το οποίο βρίσκεται κυρίως σε κρυσταλλική μορφή. Φαρμακευτικά χρησιμοποιούταν κυρίως ενάντια της ελονοσίας. Παρασκευάστηκε πρώτη φορά από τον Gabriel το 1903 και πρώτο-απομονώθηκε από το κινεζικό φυτό της οικογένειας των κρανοειδών (*aseru*) [75]. Η διερεύνησή του ως φαρμακευτικό προϊόν έγινε όταν συντέθηκε το παράγωγο του 2-μεθυλ-1,3-αρυλ-4-κιναζολίνη το οποίο λειτουργεί ως καταπραϋντικό και υπνωτικό.



Εικόνα 8: Μοριακή δομή Κιναζολίνης

1.8.1.1 Φάρμακα με βάση την κιναζολίνη

Στα τελευταία 10-15 χρόνια στα οποία ερευνάται η προαναφερθείσα ένωση, φαίνεται να παρουσιάζει μια σειρά από θεραπευτικές ιδιότητες. Το 1968 χρησιμοποιούταν μόνο δύο από τα παράγωγά του, τα οποία ήταν το υπνωτικό μεθακαλόνη και η διουρητική κινθαζόνη. Μέχρι το 1980 δημιουργήθηκαν περίπου 50 παράγωγα της, τα οποία είχαν διαφορετικές ιδιότητες όπως υπνωτική, καταπραϋντική, ηρεμιστική, αντισπασμωδικό, αντιβηχικό, μυοχαλαρωτικό, αντιρρευματικό, υποτασικό, αντιαλλεργικό, βρογχοδιασταλτικό, αντιδιαβητικό, διουρητικό, κυτταροστατικό, ανθελονοσιακό, σπερματοκτόνο. Η έρευνα για υποκατάστατα καρδιαγγειακών παραγόντων ξεκίνησε με παράγωγα κιναζολίνης, αφού ερευνήθηκε η υποτασική δράση αυτών που έχουν ένα αμίδιο γλυκίνης ή ένα αμίδιο β-αλανίνης.

Λόγω της πληθώρας των ευεργετικών της ιδιοτήτων έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή μια σειράς από φαρμακευτικές ουσίες, μερικές από τις οποίες παρουσιάζονται παρακάτω.

Prazosin: Είναι φάρμακο που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση της υψηλής πίεσης και είναι μέρος της τάξης των αλφα-ανδρενεργικών αναστολέων, οι οποίοι μειώνουν την αρτηριακή πίεση χαλαρώνοντας τα αιμοφόρα αγγεία.

Gefitinib: Χρησιμοποιείται για την θεραπεία συγκεκριμένων ειδών καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, το Gefitinib είναι ένας αναστολέας του EGFR που εμποδίζει την μετάδοση των σημάτων, μέσω του EGFR στα κύτταρα στόχους. Το Gefitinib έχει βρεθεί να είναι αποτελεσματικό και σε άλλα είδη καρκίνων στους οποίους υπάρχει υπερέκφραση του EGFR.

Erlotinib: Αποτελεί φάρμακο για την θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα μη-μικρών κυττάρων (Non-Small Cell Lung Cancer) , τον παγκρεατικό καρκίνο και ορισμένα άλλα είδη καρκίνου. Είναι ένας αναστολέας τυροσινικής κινάσης, ο

οποίος δρα στον EGFR. Δεσμεύεται μη αναστρέψιμα στην θέση της τριφωσφορικής αδενοσίνης.

Vandetanib: Είναι γνωστό και ως ZD6474 και αποτελεί ανταγωνιστή του VEGFR και του EGFR. Είναι αναστολέας της τυροσινικής κινάσης.

1.8.2 Αμινοξέα ως θεραπευτικοί παράγοντες

Τα αμινοξέα αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη κατηγορία φυσικών οργανικών μορίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να προσδώσουν βιοσυμβατές ιδιότητες στα νανοσωματίδια χρυσού. Περιέχουν λειτουργικές ομάδες όπως $-SH$ και $-NH_2$ οι οποίες μπορούν να αλληλοεπιδρούν με τα νανοσωματίδια χρυσού και να τα σταθεροποιούν. Μάλιστα, τα αμινοξέα που περιέχουν θείο, όπως η κυστεΐνη, φαίνεται να παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση ενώ παρουσιάζουν μεγάλη τάση να συνδεθούν με τον χρυσό αφού πρόκειται για σύνδεση μαλακού οξέος με μαλακή βάση.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία σκοπός είναι να γίνει σύνδεση του αμινοξέος αλανίνη με την κιναζολίνη, ώστε να παρασκευαστεί ένα μικρό οργανικό μόριο, παράγωγο της κιναζολίνης, που πιθανόν να δράσει ως αναστολέας του VEGFR, δηλαδή ως αντι-αγγειογενετικός παράγοντας, άρα και ως αντικαρκινικό.

1.9 ΣΤΟΧΟΣ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, στόχος είναι η «θεραπευτική» στόχευση της αγγειογένεσης, στον καρκίνο του γλοιοβλαστώματος.

Πιο συγκεκριμένα, θα γίνει προσπάθεια σύνθεσης νανοσωματιδίων χρυσού, τα οποία λόγω των εξαιρετικών οπτικών και ηλεκτρονιακών ιδιοτήτων τους, θα χρησιμεύσουν ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκου και ταυτόχρονα παράγοντες απεικόνισης, προκειμένου να πραγματοποιείται ταυτόχρονα θεραπεία και διάγνωση.

Παράλληλα, στόχος είναι η επικάλυψη των νανοσωματιδίων χρυσού με νανοσωματίδια λευκόχρυσου, τα οποία θα προκαλέσουν οξειδωτικό στρες στα κύτταρα, οδηγώντας τα σε απόπτωση, ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο την αντικαρκινική δράση του συστήματος μεταφοράς φαρμάκου.

Τέλος, πρόκειται να γίνει σύνθεση οργανικού μορίου, το οποίο δρα ως αναστολέας της αγγειογένεσης, μέσω της πρόσδεσής του στην τυροσινική κινάση-2, δηλαδή τον υποδοχέα-2 του Αγγειακού Αυξητικού Ενδοθηλιακού Παράγοντα.

Συνδυάζοντας, λοιπόν, όλα τα προηγούμενα πρόκειται να γίνει ενεργητική προσέγγιση-αναστολή της αγγειογένεσης, η οποία συνδυάζει την διάγνωση, μέσω της χρήσης νανοσυστημάτων ως παράγοντες απεικόνισης και την θεραπεία, μέσω της χρήσης τόσο των νανοσωματιδίων, όσο και τροποποιημένων φαρμάκων.

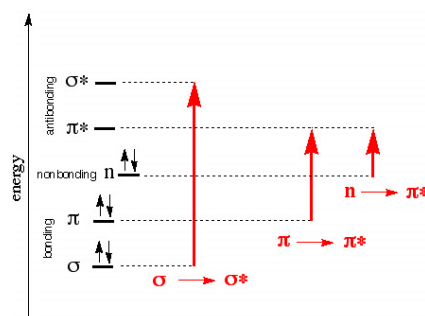
2 ΚΕΦΑΛΑΙΟΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

2.1 Δομικός-Μορφολογικός Χαρακτηρισμός

2.1.1 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού

Η απορρόφηση της ορατής και υπεριώδους ακτινοβολίας σχετίζεται με την διέγερση των ηλεκτρονίων των ατόμων και μορίων, από χαμηλότερα σε υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα. Λόγω του ότι τα ενεργειακά επίπεδα της ύλης είναι κβαντισμένα, μόνο φως με συγκεκριμένη ποσότητα ενέργειας μπορεί να προκαλέσει μεταβάσεις από ένα ενεργειακό επίπεδο σε ένα άλλο.

Οι μεταβάσεις που μπορούν να πραγματοποιηθούν είναι



Εικόνα 9: Ηλεκτρονικές μεταβάσεις που μπορούν να πραγματοποιηθούν

Σε κάθε περίπτωση ένα ηλεκτρόνιο αποχωρεί από ένα γεμάτο (χαμηλής ενέργειας, θεμελιώδους κατάστασης) τροχιακό, σε ένα άδειο (υψηλής ενέργειας, διεγερμένης κατάστασης) αντι-δεσμικό τροχιακό. Κάθε μήκος κύματος φωτός έχει συγκεκριμένη ενέργεια, η οποία σχετίζεται με αυτό. Εάν η ενέργεια που παρέχεται είναι ίδια μ' εκείνη που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί μία από τις παραπάνω μεταβάσεις, το μήκος κύματος αυτό θα απορροφηθεί. Είναι προφανές, πως όσο μεγαλύτερο είναι το ενεργειακό χάσμα μεταξύ των δύο επιπέδων, τόσο περισσότερη ενέργεια χρειάζεται το ηλεκτρόνιο για να κάνει την μετάβαση, άρα μεγαλύτερη συχνότητα, δηλαδή μικρότερο μήκος κύματος απορροφάται. Όλα τα μόρια θα υποβληθούν σε ηλεκτρονική διέγερση, ακολουθώντας την απορρόφηση του φωτός, αλλά για τα περισσότερα μόρια χρειάζεται η παρεχόμενη ενέργεια να είναι πολύ υψηλή.

Συνεπώς, η απορρόφηση του φωτός στην περιοχή του υπεριώδους-ορατού θα είναι αποτέλεσμα μόνο των παρακάτω μεταβάσεων μόνο η $\pi \rightarrow \pi^*$ και η $n \rightarrow \pi^*$.

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιούνται κυψελίδες χαλαζία. Για κάθε μήκος κύματος ισχύει ότι μετρίεται ταυτόχρονα το δείγμα και ο διαλύτης ως «τυφλό δείγμα», η απορρόφηση του οποίου αφαιρείται. Για κάθε μήκος κύματος η ένταση του φωτός που περνάει από το «τυφλό δείγμα» χαρακτηρίζεται ως I_0 , και η ένταση που περνάει μέσα από το δείγμα I . Όταν το $I < I_0$ έχει απορροφηθεί φως. Η απορρόφηση βρίσκεται από την σχέση:

$$A = \log(I_0/I)$$

Ο ανιχνευτής μετατρέπει το εισερχόμενο φως σε ρεύμα, για το οποίο ισχύει ότι όσο μεγαλύτερο είναι το ρεύμα τόσο υψηλότερη η ένταση. Το μήκος κύματος απορρόφησης είναι άμεσα σχετιζόμενο με το χρώμα του δείγματος, για τα οποία ισχύει:

Κόκκινο: 620-750 nm

Πορτοκαλί: 590-620 nm

Κίτρινο: 570-590 nm

Πράσινο: 496-570 nm

Μπλε: 450-495 nm

Κυανό: 380-450 nm

[76]

Στην περίπτωση των νανοσωματιδίων χρυσού, πάνω από ένα συγκεκριμένο μέγεθος εμφανίζονται κορυφές πλασμονικού συντονισμού, οι οποίες είναι άμεσα εξαρτώμενες από το μέγεθος, τη μορφολογία και το μέσο διασποράς, επομένως μελετώντας τα φάσματα απορρόφησης κολλοειδών διαλυμάτων χρυσού, μπορούν να ληφθούν πληροφορίες σχετικές με αυτές τις

παραμέτρους. Όμοια, λαμβάνονται πληροφορίες και για τα νανοσωματίδια λευκόχρυσου.

2.1.1.1 Συντονισμός Επιφανειακών Πλασμονίων

Το φαινόμενο του συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR), αφορά στην πρόσπτωση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας επί επίπεδης μεταλλικής επιφάνειας προς διέγερση και συντονισμό των αγωγίμων ηλεκτρονίων επιφάνειας. Το βάθος διείσδυσης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας μπορεί να προσδιοριστεί από την σχέση:

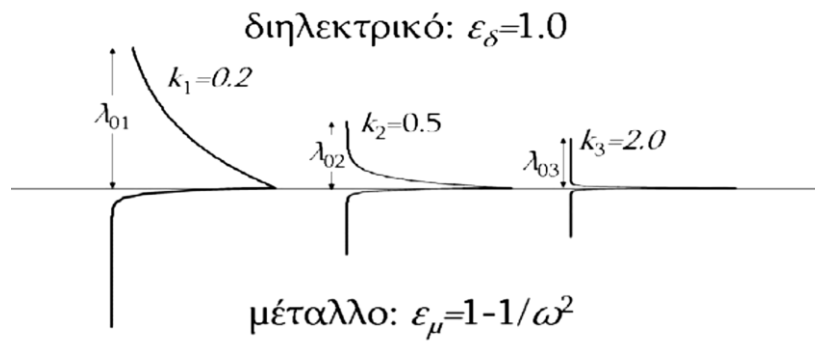
$$\delta = \sqrt{\frac{2\rho}{\mu_0\mu_r\omega}}$$

Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση ενός συστήματος επίπεδης μεταλλικής επιφάνειας-διηλεκτρικού, η αλληλεπίδραση φωτός-ύλης αφορά σε μια δέσμια κατάσταση φωτονίου-πλασμονίου που καλείται *πλασμόνιο επιφάνειας*. Η κατάσταση αυτή μπορεί να περιγραφεί εφαρμόζοντας τις συνοριακές συνθήκες της διεπιφάνειας στις εξισώσεις Maxwell, για να καταλήξουμε τελικά στην σχέση του κυματοδιανύσματος k_x , που περιγράφει την διασπορά πλασμονίων στην διεύθυνση x επί της επιφάνειας

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_\mu(\omega) * \varepsilon_\delta(\omega)}{\varepsilon_\mu(\omega) + \varepsilon_\delta(\omega)}}$$

όπου $\varepsilon_\mu(\omega), \varepsilon_\delta(\omega)$ οι διηλεκτρικές συναρτήσεις του μετάλλου και του διηλεκτρικού μέσου αντίστοιχα. Στην περίπτωση όπου $\varepsilon_\delta \neq 1$, δηλαδή το διηλεκτρικό δεν είναι κενό πρέπει να ικανοποιείται η συνθήκη $\varepsilon_\mu(\omega) \leq -\varepsilon_\delta$, ώστε το $k_x > 0$ και η διάδοση να γίνεται πράγματι στην διεύθυνση x , ενώ η οριακή συνθήκη εμφάνισης επιφανειακού συντονισμού πλασμονίων είναι

$$\varepsilon_\mu(\omega) = -\varepsilon_\delta$$



Εικόνα 10: Συνοριακές συνθήκες στην διεπιφάνεια μετάλλου-διηλεκτρικού. Τα πεδία φθίνουν εκθετικά μακριά από την διεπιφάνεια, όπως φαίνεται στα αριστερά του σχήματος.

2.1.1.2 Εντοπισμός Επιφανειακών Πλασμονίων

Φασματοσκοπικά όσον αφορά στα μεταλλικά νανοσωματίδια, και ιδιαίτερα στην περίπτωση του χρυσού, ο εντοπισμένος συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (Local Surface Plasmon Resonance, LSPR) εμφανίζεται περιοχή του ορατού έως το εγγύς υπέρυθρο. Η απλούστερη περίπτωση είναι η σφαιρική δομή στην οποία αναφέρεται και η θεωρία του Mie, για την οποία υπάρχουν 3 κατηγορίες:

- i *Μικρές Νανόσφαιρες* $d < 2\text{nm}$: Υπερισχύουν φαινόμενα κβαντικού περιορισμού
- ii *Ενδιάμεσου μεγέθους Νανόσφαιρες* $2\text{nm} < d < 25\text{nm}$: Οι διαφοροποιήσεις λόγω κβαντικού περιορισμού είναι μικρές, και το νανοσωματίδιο ανταποκρίνεται στην ακτινοβολία με δημιουργία εντοπισμένων πλασμονίων επιφάνειας, κυρίως διπολικής μορφής λόγω του μικρού μεγέθους. Σε αυτή την περίπτωση, εσωτερικά, δημιουργείται ομογενές πεδίο.
- iii *Μεγάλες Νανόσφαιρες* $d > 25\text{ nm}$: Εντοπίζονται και μεγαλύτερης τάξεως διεγέρσεις (τετραπολικές ροπές κτλ.). Σε αυτή την περίπτωση το πεδίο που δημιουργείται δεν είναι ομοιογενές.

Μια δέσμη φωτός καθώς προσπίπτει σε ομογενές σύστημα νανοσωματιδίων απορροφάται μερικώς στην συχνότητα συντονισμού πλάσματος ω_p , ενώ ταυτόχρονα τα νανοσωματίδια εμφανίζουν και σκέδαση. Όταν προκληθεί διέγερση στην συχνότητα ω_p το δίπολο εκπέμπει ηλεκτρομαγνητικό κύμα κοντινής περιοχής, που μπορεί να ενισχυθεί έως και 10 φορές. Συνολικά η διεργασία αυτή μπορεί να περιγραφεί από την σχέση που συνδέει τις ενεργές διατομές σκέδασης, απορρόφησης και απόσβεσης

$$\sigma_{ext} - \sigma_{scat} = \sigma_{abs}$$

Μάλιστα, εξαρτάται άμεσα από την συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας άρα είναι και χρονικά εξαρτώμενες διεργασίες.

Η πιο ενδιαφέρουσα και ευρέως χρησιμοποιούμενη κατηγορία μεγέθους σφαιρικών μεταλλικών νανοσωματιδίων είναι η δεύτερη ($2\text{nm} < d < 25\text{nm}$), όπου με επίπεδη κυματική διέγερσή τους, το ταλαντώμενο ηλεκτρικό πεδίο προκαλεί συνεκτική ταλάντωση των αγώγιμων ηλεκτρονίων (ελεύθερων ηλεκτρονίων σθένους). Αυτό οδηγεί σε συσσώρευση φορτίου πόλωσης στην επιφάνεια ενός νανοσωματιδίου. Για να συνεισφέρουν μόνο οι διπολικές ταλαντώσεις στην ενεργό διατομή απόσβεσης σ_{ext} , χρησιμοποιείται η λύση της θεωρίας Mie στις εξισώσεις Maxwell, ώστε να ληφθεί το φάσμα καλώς διεσπαρμένων νανοσωματιδίων [77]:

$$\sigma_{ext} = \left[\frac{24\pi^2 R^3 \varepsilon_\delta^{\frac{3}{2}} N}{\lambda \ln(10)} \right] \left[\frac{\varepsilon_i}{(\varepsilon_r + \chi \varepsilon_\delta)^2 + \varepsilon_i^2} \right]$$

Όπου

ε_δ : διηλεκτρική σταθερά του μέσου διασποράς

$\varepsilon_\mu = \varepsilon_r + i\varepsilon_i$ η συνολική διηλεκτρική σταθερά του ογκώδους μετάλλου

R: ακτίνα του νανοσωματιδίου

N: ηλεκτρονιακή πυκνότητα.

χ : το σχήμα του νανοσωματιδίου, λαμβάνοντας τιμές από 2 ,για σφαιρικά σωματίδια έως και 20 για σωματίδια με υψηλές αναλογίες διαστάσεων (όπως οι νανοράβδοι).

Επιπλέον, το ηλεκτρικό πεδίο της προσπίπτουσας ακτινοβολίας επάγει πόλωση σε ένα ενδιάμεσου μεγέθους μεταλλικό νανοσωματίδιο, αλλά πάντα μικρότερο του μήκους κύματος της αυτής προσπίπτουσας ακτινοβολίας, οδηγώντας στη δημιουργία παρωδικού δίπολου. Η ευκολία μετατόπισης φορτίων στην επιφάνεια ενός σφαιρικού μεταλλικού νανοσωματιδίου για την δημιουργία δίπολου, περιγράφεται από την εξίσωση πολωσιμότητας α [77]:

$$\alpha = 4\pi \varepsilon_\delta R^3 \frac{\varepsilon_\mu - \varepsilon_\delta}{\varepsilon_\mu + 2\varepsilon_\delta}$$

Επιπροσθέτως, το φαινόμενο LSPR εξαρτάται από το μέγεθος, τη διασπορά και το περιβάλλον των νανοσωματιδίων χρυσού κοντά στην επιφάνειά τους, δηλαδή από τους οργανικούς υποκαταστάτες, καθώς και από το μέσο διασποράς τους. Στις περιπτώσεις που το νανοσωματίδιο είναι επικαλυμμένο με λεπτό στρώμα διηλεκτρικού υλικού πυκνότητας d και διηλεκτρικής σταθεράς ε_d , η πολωσιμότητα ορίζεται ως [77]:

$$\alpha = 4\pi\varepsilon_d(R + d)^3 \frac{\varepsilon_\mu\varepsilon_A - \varepsilon_d\varepsilon_B}{\varepsilon_d\varepsilon_A + 2\varepsilon_d\varepsilon_B}$$

Όπου

$$\varepsilon_A = \varepsilon_\mu(3 - 2P) + 2\varepsilon_dP$$

$$\varepsilon_B = \varepsilon_\mu P + 2\varepsilon_d(3 - P)$$

$$P = 1 - \left(\frac{R}{R + d}\right)^3$$

Η πολωσιμότητα και η εσωτερική πόλωση των νανοσωματιδίων ενισχύονται στην κατάσταση συντονισμού. Φασματική μετατόπιση προς το ερυθρό παρατηρείται αυξανόμενης της διηλεκτρικής σταθεράς του περιβάλλοντος μέσου και προέρχεται από τη συσσώρευση φορτίων πόλωσης στο διηλεκτρικό που αποδυναμώνουν την δύναμη αποκατάστασης μέσα στο νανοσωματίδιο.

Πιο συγκεκριμένα, για την εμφάνιση Εντοπισμένου Συντονισμού Επιφανειακών Πλασμονίων πρέπει να ικανοποιείται η οριακή συνθήκη

$$\varepsilon_\mu = -2\varepsilon_d ,$$

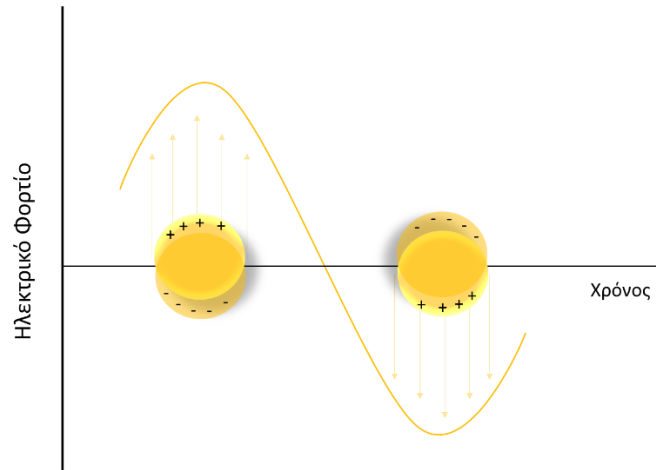
ώστε κάθε σωματίδιο να υφίσταται συντονισμό πλασμονίων (Frohlich frequency), με αποτέλεσμα την ενίσχυση της απορρόφησης, ή/και της σκέδασης συγκεκριμένου μήκους κύματος ακτινοβολίας. Η κατάσταση αυτή αντιπροσωπεύει την ενίσχυση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, ενώ η πόλωση α τείνει στη μονάδα καθώς ο παρονομαστής τείνει στο μηδέν [77]. Για τα νανοσωματίδια χρυσού η κατάσταση αυτή παρατηρείται στην ορατή περιοχή,

καθιστώντας τα υλικά αυτά κατάλληλα για πληθώρα εφαρμογών. Η συνολική ταλάντωση μπορεί να ερμηνευθεί ως μετατόπιση του κέντρου μάζας όλων των ηλεκτρονίων του νανοσωματιδίου αντίθετα από τους θετικά φορτισμένους ατομικούς πυρήνες.

Η ταλάντωση των αγώγιμων ηλεκτρονίων μετατοπίζει το ηλεκτρονικό νέφος σε σχέση με τον πυρήνα, προκαλώντας τη δημιουργία δύναμης αποκατάστασης, λόγω έλξης Coulomb, με αποτέλεσμα την ταλάντωση του ηλεκτρονικού νέφους ως προς τον πυρήνα. Η δύναμη αυτή επιτρέπει την κατάσταση συντονισμού να συμβεί σε συγκεκριμένη συχνότητα με τα ηλεκτρόνια να παρουσιάζουν διαφορά φάσης $\pi/2$ ως προς το πεδίο της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Το ενισχυμένο πεδίο συντονισμού εντός του νανοσωματιδίου οδηγεί στο διπολικό πεδίο εξωτερικά του νανοσωματιδίου, το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενισχυμένη απορρόφηση και την ενεργό διατομή σκέδασης, αλλά και των ισχυρά ενισχυμένων ηλεκτρομαγνητικών πεδίων που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια του νανοσωματιδίου.

Ένα λεπτό φύλλο χρυσού (30-50 nm) απορροφά στην ορατή έως και εγγύς IR περιοχή, ενώ ο διπολικός επιφανειακός συντονισμός πλασμονίων νανοσωματιδίου χρυσού 30 nm βρίσκεται συγκεντρωμένος στα 2.25 eV (552 nm). Αυτές οι συνεκτικές ταλαντώσεις του διπολικού συντονισμού πλασμονίων επηρεάζονται από την ηλεκτρονιακή κατανομή, την ηλεκτρονιακή πυκνότητα και την ενεργό μάζα του ηλεκτρονίου. Για μεγαλύτερου μεγέθους σωματίδια, μπορούν να προκύψουν καταστάσεις υψηλότερης πολικότητας (π.χ. τετράπολα), όπου το ήμισυ του ηλεκτρονικού νέφους κινείται παράλληλα και το υπόλοιπο μισό αντιπαράλληλα προς το ηλεκτρικό πεδίο.

Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι για μεγαλύτερα σωματίδια που δεν ανταποκρίνονται στην προσέγγιση Rayleigh, ο συντονισμός για τη μετατόπιση προς το ερυθρό είναι αποτέλεσμα φαινομένων υστέρησης, όπου τα αγώγιμα ηλεκτρόνια δε κινούνται όλα στη ίδια φάση. Το μέγεθος της φασματικής μετατόπισης της εξασθένησης LSPR, ή το μέγιστο μήκος κύματος σκέδασης για ένα μικρό νανοσωματίδιο δίνεται από την ακόλουθη σχέση [77]



Εικόνα 11: Πλασμονικός συντονισμός νανοσωματιδίων χρυσού

$$\Delta\lambda_{max} = m\Delta n \left[1 - \exp\left(\frac{-2d}{l_d}\right) \right]$$

όπου, m είναι η απόκριση του νανοσωματιδίου ως προς το δείκτη διάθλαση του αντίστοιχου ογκώδους υλικού, γνωστή και ως συντελεστής ευαισθησίας, εκφρασμένο σε nm ανά μονάδα δείκτη διάθλασης (nm /refractive index unit, RIU), Δn είναι η αλλαγή του δείκτη διάθλασης (σε RIU), d το ενεργό πάχος του απορροφώμενου στρώματος (nm) και l_d το χαρακτηριστικό μήκος εξασθένισης του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου (nm). Η εξίσωση αυτή είναι που θέτει τα θεμέλια για την επεξήγηση της μετατόπισης μήκους κύματος LSPR προερχόμενη από χημικές και βιολογικές δοκιμές που εξερευνούν τη συγγένεια μεταξύ μορίων στην επιφάνεια των νανοδομών [77].

Ανάλογα με το μέγεθος των νανοσωματιδίων χρυσού (την διάμετρο d) επικρατεί η εμφάνιση σκέδασης ή/και απορρόφησης. Επί παραδείγματι, νανοσωματίδια χρυσού έως και 20 nm απορροφούν εξ' ολοκλήρου την προσπίπτουσα δέσμη φωτός, μεγαλύτερα νανοσωματίδια κοντά στα 40 nm εμφανίζουν και σκέδαση, ενώ νανοσωματίδια 80 nm εμφανίζουν σε ίδια ποσοστά σκέδαση και απορρόφηση. Αναλογικά, η σχέση σκέδασης προς την απορρόφηση αυξάνει αυξανόμενου του μεγέθους του νανοσωματιδίου. Η εξάρτηση αυτή από το μέγεθος των νανοσωματιδίων μπορεί να βοηθήσει στην επιλογή του είδους των νανοσωματιδίων χρυσού που θα χρησιμοποιηθούν σε βιοϊατρικές εφαρμογές.

Τα μεγαλύτερα νανοσωματίδια επιλέγονται για απεικόνιση, λόγω εντονότερης σκέδασης, ενώ τα μικρότερου μεγέθους νανοσωματίδια, προτιμώνται στη φωτοθερμική θεραπεία, καθώς το φως που απορροφάται -σχεδόν εξ ολοκλήρου- από τα σωματίδια μπορεί να μετατραπεί ευκολότερα σε θερμότητα, με σκοπό την καταστροφή νοσούντων κυττάρων και ιστών [78].

2.1.2 Φωτοφωταύγεια

2.1.2.1 Φθορισμός

Ο φθορισμός αποτελεί ένα είδος φωταύγειας, που γενικά ορίζεται ως η εκπομπή φωτός από ένα μόριο. Ο φθορισμός είναι ένα οπτικό φαινόμενο κατά το οποίο η μοριακή απορρόφηση της ενέργειας σε μορφή φωτονίων οδηγεί στην εκπομπή φθορισμού φωτονίων σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Μέσω του φωτός ένα ηλεκτρόνιο μεταπηδά σε μία διεγερμένη κατάσταση. Η διεγερμένη κατάσταση υποβάλλεται σε γρήγορη θερμική απώλεια ενέργειας στο περιβάλλον μέσω δονήσεων, και στην συνέχεια ένα φωτόνιο εκπέμπεται από την χαμηλότερη απλή διεγερμένη κατάσταση που υπάρχει. Αυτή η διαδικασία εκπομπής φωτονίου συναγωνίζεται με άλλες μη-ραδιενεργές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένου της μεταφοράς ενέργειας και της απώλειας θερμότητας.

Φάσμα φθορισμού σταθερής φάσης υπάρχει όταν διεγείρονται μόρια μέσω μιας πηγής που παρέχει συνεχές φως, εκπέμπεται φθορισμός και τα φωτόνια μετρούνται ως μια μεταβολή του μήκους κύματος.

Φάσμα φθορισμού εκπομπής υπάρχει όταν το μήκος κύματος διέγερσης είναι σταθερό και το μήκος κύματος εκπομπής σαρώνεται με αποτέλεσμα ένα διάγραμμα έντασης-μήκος κύματος εκπομπής.

Φάσμα φθορισμού διέγερσης υπάρχει όταν το μήκος κύματος εκπομπής είναι σταθερό και σαρώνεται το μήκος κύματος διέγερσης του μονοχρωμάτορα. Με αυτό τον τρόπο λαμβάνονται πληροφορίες για τα μήκη κύματος για τα οποία το δείγμα θα απορροφήσει έτσι ώστε να εκπέμψει σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος εκπομπής που έχει επιλεχθεί να παρατηρηθεί. Είναι ανάλογο με το φάσμα απορρόφησης αλλά αποτελεί μια πιο ευαίσθητη τεχνική όσον αφορά τα όρια ανίχνευσης. Τα φάσματα διέγερσης είναι συγκεκριμένα σε ένα ορισμένο μήκος κύματος εκπομπής σε αντίθεση με τα φάσματα απορρόφησης, τα οποία μετράνε όλα τα είδη που απορροφούν μέσα στο δείγμα.

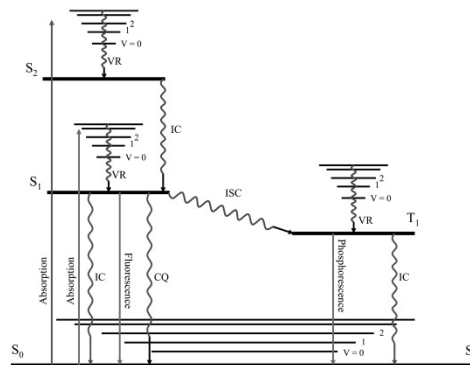
Το φάσμα εκπομπής και απορρόφησης είναι ουσιαστικά καθρέπτης το ένα του άλλου. Τυπικά, το φάσμα εκπομπής είναι σε μεγαλύτερα μήκη κύματος από το

φάσμα διέγερσης ή το φάσμα απορρόφησης. Τα δύο αυτά είδη φάσματος χρησιμοποιούνται προκειμένου να γίνει έλεγχος της αλλαγής ενός δείγματος με την πάροδο του χρόνου. Η ένταση του φάσματος ή τα μήκη κύματος των κορυφών μπορεί να μεταβληθούν λόγω ποικίλλων παραγόντων, όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση ή οι αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν μεταξύ των μορίων. Αυτό περιλαμβάνει μόρια που αποσβένουν και μόρια ή υλικά τα οποία λαμβάνουν μέρος σε μεταφορές ενέργειας. Ορισμένες φθοροφόρες ουσίες είναι επίσης ευαίσθητες σε παράγοντες που επηρεάζονται από τον διαλύτη όπως το pH, η πολικότητα και συγκεκριμένες συγκεντρώσεις ιόντων [79].

2.1.2.2 Φωσφορισμός

Η φασματομετρία φωσφορισμού χρησιμοποιεί μια δέσμη φωτός για να αιχμαλωτίσει το φως που παράγεται από μία ουσία, καθώς μεταβαίνει από την διεγερμένη κατάσταση στην βασική, όταν αυτή έχει ακτινοβοληθεί με ακτίνα λέιζερ. Η φυσική αρχή, της φασματομετρίας φωσφορισμού περιγράφεται από το διάγραμμα Jablonski. Η απορρόφηση φωτονίου οδηγεί στην διέγερση ενός φωτονίου από την θεμελιώδη κατάσταση S_0 σε συγκεκριμένα δονητικά επίπεδα ($v=1,2,3\dots$), της πρώτης S_1 ή μεγαλύτερης διεγερμένης κατάστασης ($S_{2,3,\dots}$). Το διεγερμένο ηλεκτρόνιο σε μικρό χρονικό διάστημα (συνήθως περίπου 10^{-12} δευτερόλεπτα) επανέρχεται στο πρώτο δονητικό επίπεδο, $v=0$, στο συγκεκριμένο επίπεδο διέγερσης (πχ S_1) μέσω εσωτερικής μετατροπής, που συμβαίνει όταν ένα δονητικό επίπεδο ενός ηλεκτρονικά διεγερμένου επιπέδου μπορεί να συζευχθεί με ένα δονητικό επίπεδο χαμηλότερης ηλεκτρονικά διεγερμένης κατάστασης. Το ηλεκτρόνιο μπορεί να «χαλαρώσει» περεταίρω, είτε μέσω ακτινοβολίας, εκπέμποντας ένα φωτόνιο, είτε χωρίς ακτινοβολία, μέσω ενός από τις 3 παρακάτω διαδικασίες: (1) εσωτερικής μετατροπής στο βασικό επίπεδο, (2) ενεργειακής απόσβεσης μέχρι το βασικό επίπεδο, (3) διασυστηματικής διασταύρωσης σε ένα τριπλά εκφυλισμένο επίπεδο (T_1) το οποίο είναι συνήθως χαμηλότερης ενέργειας από το αντίστοιχο απλώς εκφυλισμένο (S_1). Από εκεί το ηλεκτρόνιο μπορεί να εκπέμψει ένα φωτόνιο

μέσω φωσφορισμού, ή να χάσει την ενέργεια του μέσω εσωτερικής μετατροπής προς το S_0 .



Εικόνα 12: Διάγραμμα Jablonski με τις αρχές της φασματοσκοπίας φωσφορισμού , Εικόνα από Handbook of Deposition Technologies for Films and Coatings

2.1.3 Δυναμική Σκέδαση Φωτός

Η μέθοδος DLS είναι η πιο διαδεδομένη για μετρήσεις σωματιδίων και την ανάλυση των μεγεθών τους στην κλίμακα των νανομέτρων. Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίζεται η κατανομή μεγέθους σωματιδίων σε διασπορά.

Η δυναμική σκέδαση φωτός σχετίζεται με την κίνηση Brown που παρουσιάζουν τα διεσπαρμένα νανοσωματίδια. Όταν τα σωματίδια διασπείρονται σε ένα υγρό μέσο, κινούνται τυχαία προς όλες τις κατευθύνσεις. Η αρχή της κίνησης Brown βασίζεται στην παραδοχή πως τα σωματίδια συνδέονται με μόρια διαλύτη. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις των σωματιδίων με τα μόρια του διαλύτη έχουν ως αποτέλεσμα να μεταφέρεται ενέργεια και η μεταφορά της ενέργειας να οδηγεί σε κίνηση των σωματιδίων. Η ενεργειακή μεταφορά είναι περίπου ίδια σε όλες τις περιπτώσεις, που σημαίνει πως τα μικρότερα σωματίδια επηρεάζονται περισσότερο από αυτή. Ως αποτέλεσμα, τα μικρότερα σωματίδια κινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα. Δεδομένου ότι οι υπόλοιπες παράμετροι είναι γνωστές, μπορεί έτσι να υπολογισθεί η υδροδυναμική διάμετρος του σωματιδίου, μετρώντας την ταχύτητα κίνησης των σωματιδίων.

Η σχέση μεταξύ της ταχύτητας και της υδροδυναμικής διαμέτρου δίνεται από την εξίσωση Stokes-Einstein. Η ταχύτητα των σωματιδίων δίνεται από τον συντελεστή διάχυσης D . Επιπλέον, η εξίσωση περιλαμβάνει το ιξώδες της διεσπαρμένης ουσίας και την θερμοκρασία, διότι και οι δύο αυτές παράμετροι επηρεάζουν την κίνηση των σωματιδίων. Βασική προϋπόθεση για την χρήση της εξίσωσης Stokes-Einstein είναι η κίνηση των σωματιδίων να βασίζεται στην κίνηση Brown. Αν υπάρχει καθίζηση, η κίνηση δεν είναι τυχαία, το οποίο οδηγεί σε ανακριβή αποτελέσματα. Αυτό σημαίνει πως τα μεγαλύτερα σωματίδια παρουσιάζουν ορισμένους περιορισμούς στις μετρήσεις DLS. Παράλληλα, σε πολύ μικρά σωματίδια μπορεί να υπάρχουν περιορισμοί που σχετίζονται με τον λόγο σήματος προς θόρυβο. Τα πολύ μικρά σωματίδια δεν σκεδάζουν πολύ φως, οδηγώντας σε ανακριβές αποτέλεσμα [80].

$$D = \frac{KbT}{6\pi\eta Rh}$$

Όπου

D: Translational diffusion coefficient [m²/s] – “speed of the particles”

k_B: Boltzmann constant [m²kg/Ks²]

T: Temperature [K]

η: Viscosity [Pa.s]

R_H: Hydrodynamic radius [m]

Εκτός του μεγέθους, με το DLS μπορεί να γίνει και μέτρηση του ζ-δυναμικού. Το ζ-δυναμικό, το οποίο είναι γνωστό και ως ηλεκτροκινητικό δυναμικό, εμφανίζεται στην επιφάνεια κάθε σωματιδίου όταν αυτό έρχεται σε επαφή με κάποιο υγρό μέσο. Γι’ αυτό αποτελεί μια ιδιότητα της επιφάνειας. Συνήθως δίνεται σε μονάδες millivolt (mV).

Αν ένα υλικό έρχεται σε επαφή με ένα υγρό, τα μόρια με τα οποία είναι τροποποιημένη η επιφάνεια θα αλληλοεπιδράσουν με το μέσο. Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός επιφανειακού φορτίου, το οποίο ελκύει τα αντίθετου φορτίου ιόντα. Αυτά τα ιόντα κατανέμονται σε μία *ηλεκτροχημική διπλοστιβάδα*. Το ζ-δυναμικό ορίζεται ως το αρχικό φορτίο της επιφάνειας μαζί με την στιβάδα που έχει δημιουργηθεί.

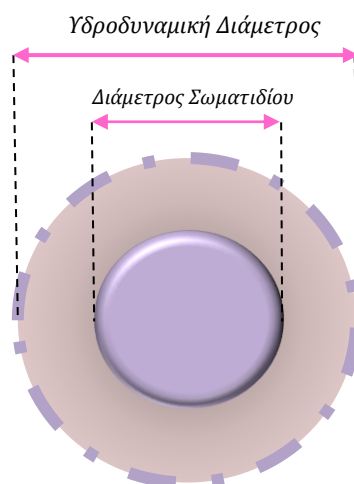
- Το ζ-δυναμικό υπάρχει μόνο όταν ένα υλικό βρίσκεται σε επαφή με ένα υγρό.
- Το ζ-δυναμικό μπορεί να μετρηθεί και σε μακροσκοπικές επιφάνειες (μεμβράνες, μαλλιά, πολυμερή) καθώς και σε σωματίδια που έχουν διασπαρθεί σε ένα υγρό (νανοσωματίδια, κολλοειδή, λιποσώματα). Και οι δύο τύποι θεωρούνται «υλικά». Πάραυτα, υπάρχουν σημαντικές

διαφορές για να γίνει επιλογή της κατάλληλης γεωμετρίας για να μετρηθεί το ζ-δυναμικό.

- Οι ιδιότητες του υγρού μέσου έχουν σημαντικές επιδράσεις στο σχηματισμό του ζ-δυναμικού, και είναι άμεσα εξαρτώμενες από το pH και την συγκέντρωση του διαλύματος.
- Ένα επιφανειακό φορτίο μπορεί να παρατηρηθεί σε στερεά υλικά (διεπαφή στερεού-υγρού) αλλά και σε υγρά (διεπαφή υγρού-υγρού)

Το ζ-δυναμικό παρέχει πληροφορίες για την επιφάνεια που έχει τροποποιηθεί, την σταθερότητα των διεσπαρμένων σωματιδίων, καθώς και την αλληλεπίδραση διαλυμένων ουσιών με την επιφάνεια του στερεού.

Το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων είναι ένας δείκτης της κολλοειδούς συμπεριφοράς τους, αφού δείχνει την δυνατότητα να απωθούν το ένα το άλλο. Εμπειρικά θεωρείται πως καλή κολλοειδή συμπεριφορά υπάρχει όταν το ζ-δυναμικό έχει απόλυτη τιμή μεγαλύτερη των 30mV. Το πρόσημο του ζ-δυναμικού είναι ενδεικτικό των φορτίων που κυριαρχούν στην επιφάνεια. Σε τιμές μικρότερες των 30 mV πιθανόν να υπάρξουν συσσωματώματα ή/ και καθίζηση.



Εικόνα 13: Εικόνα συσχέτισης υδροδυναμικής και πραγματικής διαμέτρου του νανοσωματιδίου

2.1.4 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM) βασίζεται στην αλληλεπίδραση της ύλης με δέσμη ηλεκτρονίων επιτρέποντας την λήψη εικόνων μεγαλύτερης ευκρίνειας από ένα οπτικό μικροσκόπιο. Η κβαντική θεωρία του Max Planck και η θεωρία της σχετικότητας του Albert Einstein μετά από επεξεργασία τους από τον deBroglie οδήγησαν στην απόδειξη ότι κάθε σωματίδιο κινούμενο πλησίον της ταχύτητας του φωτός (300.000 km/ sec) συνδέεται με τη μορφή ακτινοβολίας μέσω της σχέσης

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

όπου m η μάζα, v η ταχύτητα του σωματιδίου και h η σταθερά του Planck. Εάν αυτό το σωματίδιο είναι το ηλεκτρόνιο, το μήκος κύματος λ είναι περίπου 0,05Å, περίπου 100.000 φορές μικρότερο από την αντίστοιχη ορατή ακτινοβολία, αν και πρακτικά λόγω τεχνικών περιορισμών επιτυγχάνεται ενίσχυση της μεγέθυνσης μόνο 1.000 φορές παραπάνω [81].

Σε ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM) ένα πολύ λεπτό δείγμα προετοιμάζεται σε ειδικά μεταλλικά πλέγματα, τοποθετείται υπό κενό και ακτινοβολείται με δέσμη ηλεκτρονίων ομοιόμορφης πυκνότητας ρεύματος, με σύνηθες δυναμικό επιτάχυνσης 50-200 kV και κατά την αλληλεπίδραση εμφανίζονται ελαστικές και μη ελαστικές σκεδάσεις. Στη συνέχεια, η δέσμη εστιάζεται σε περιοχή μερικών μm με τη βοήθεια συγκεντρωτικών μαγνητικών φακών, ενώ ο αντικειμενικός φακός που βρίσκεται μετά το δείγμα σχηματίζει στο εστιακό του επίπεδο την περίθλαση μακρινού πεδίου του δείγματος η οποία αποτελεί τον μετασχηματισμό Fourier (σε αντίστροφο χώρο) των κρυσταλλικών χαρακτηριστικών του δείγματος. Ακολούθως, μέσω ενός ενδιάμεσου φακού σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο είδωλο, που αποτελεί μεγέθυνση της απεικόνισης του αντικειμένου, το οποίο εν συνεχεία μέσω ενός προβολικού φακού μεταφέρεται σε φθορίζουσα οθόνη, όπου παρατηρείται και φωτογραφίζεται [82].

2.1.5 Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης

Το μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων χρησιμοποιείται για την μελέτη επιφάνειας υλικών σε ατομική κλίμακα και επιτρέπει την λήψη τρισδιάστατων εικόνων επιφανειών με υψηλή ανάλυση. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής της μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM) βασίζεται στην σάρωση επιφανειών μέσω μίας λεπτής κεραμικής ή ημιαγώγιμης ακίδας στηριζόμενης σε μοχλό που μπορεί να ταλαντώνεται. Πραγματοποιείται μέτρηση των δυνάμεων μεταξύ της ακίδας που βρίσκεται στον μοχλό και της επιφάνειας του δείγματος που μελετάται. Οι δυνάμεις αυτές υπολογίζονται με μέσω του καθορισμού της κίνησης ενός εύκαμπτου βραχίονα, μέσω διαφόρων τεχνικών, όπως η οπτική εκτροπή [83].

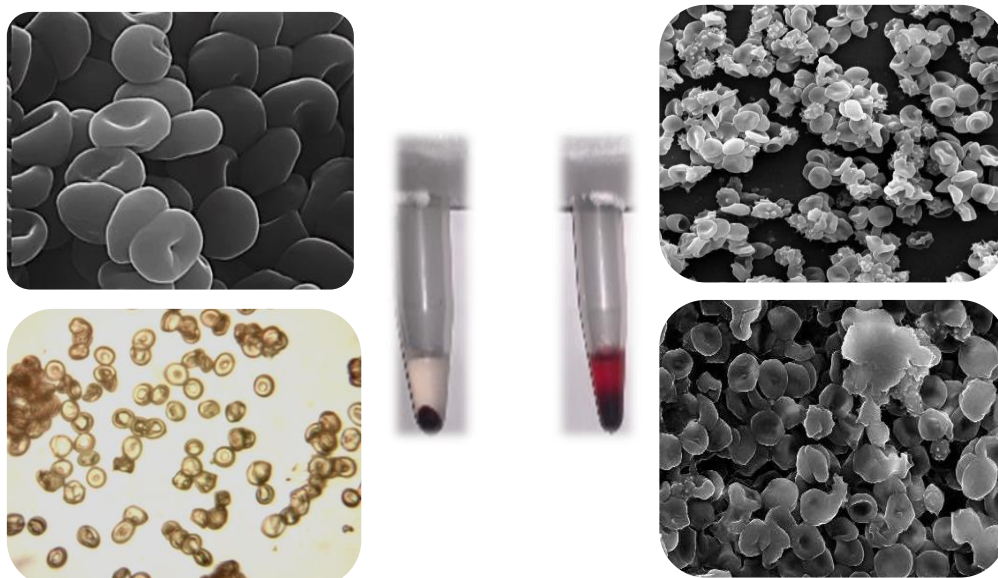
2.2 Βιολογική Αξιολόγηση

Στους προ-κλινικούς ελέγχους φαρμάκων είναι απαραίτητο να υπάρχουν πειραματικές διαδικασίες κατά τις οποίες να γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός των νεκρών κυττάρων σε ένα κυτταρικό πληθυσμό. Τα πιθανά φάρμακα ελέγχονται σε κυτταρικές σειρές θηλαστικών για να εξεταστούν τα κυττοτοξικά φαινόμενα που μπορεί να προκαλέσει η ουσία, όταν εκτεθεί στα κύτταρα του ίδιου του σώματος.

2.2.1 Έλεγχος βιοσυμβατότητας μέσω αιμόλυσης

Πραγματοποιείται έλεγχος της βιοσυμβατότητας των νανοσωματιδίων μέσω της διαδικασίας αιμόλυσης. Πιο συγκεκριμένα, λαμβάνεται αίμα από υγιή δότη το οποίο φυγοκεντρείται και απομονώνεται το ίζημα, το οποίο είναι τα ερυθρά αιμοσφαίρια, από το υπερκείμενο, που είναι το πλάσμα του αίματος.

Γίνεται επώαση των υλικών που πρόκειται να μελετηθούν, δηλαδή των νανοσωματιδίων στις επιθυμητές συγκεντρώσεις, στα ερυθρά αιμοσφαίρια, στους 37°C για επιλεγμένα χρονικά διαστήματα. Τα υλικά τα οποία προκαλούν αλλοίωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, έχουν ως αποτέλεσμα την απέκκριση αιμογλοβίνης, η οποία έχει έντονο κόκκινο χρώμα. Τα υλικά αυτά κρίνονται μη βιοσυμβατά. Σε αντίθεση, τα υλικά τα οποία δεν προκαλούν αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων κρίνονται βιοσυμβατά και η χρήση τους σε ζωντανούς οργανισμούς είναι δόκιμη. Για να γίνει σύγκριση και να βρεθεί το ποσοστό αιμόλυσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, χρησιμοποιείται θετικό control, το οποίο προκαλεί πλήρη αιμόλυση, όπως το νερό ή το Triton-X, και αρνητικό control, το οποίο δεν προκαλεί καμία αιμόλυση, όπως το PBS (Phosphate Buffered Saline). Για την εύρεση του ποσοστού αιμόλυσης χρησιμοποιείται φασματοφωτόμετρο ELISA, μέσω του οποίου μετρίεται η ένταση της απορρόφησης, στα 540 nm.

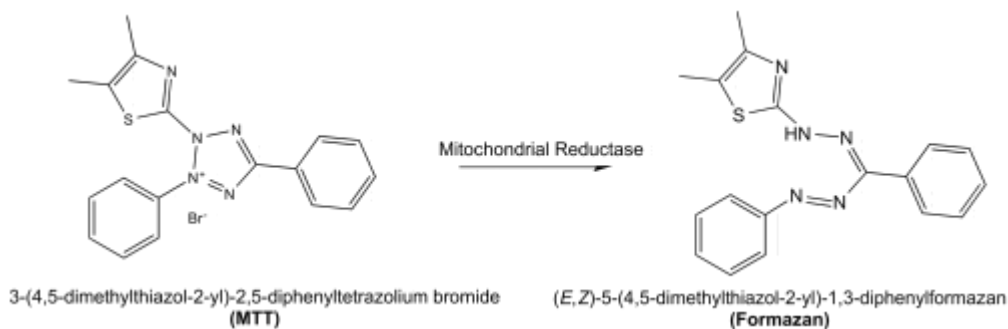


Εικόνα 14: Εικόνες SEM από υγιή και αλλοιωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια

Στις εικόνες SEM στην αριστερή πλευρά, εμφανίζονται ερυθρά αιμοσφαίρια τα οποία έχουν επωαστεί με Phosphine Buffered Saline, το οποίο είναι απαλλαγμένο από ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου. Σε αυτή την περίπτωση δεν υπάρχει διαφορά τονικότητας ανάμεσα στο εσωτερικό και εξωτερικό των ερυθρών αιμοσφαιρίων, συνεπώς δεν παρουσιάζεται και αλλοίωση της δομής. Στις εικόνες που παρουσιάζονται δεξιά, τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν επωαστεί με αιμολυτικό παράγοντα, όπως το νερό, και έχουν υποστεί αλλοίωση της δομής τους, λόγω ωσμωτικής πίεσης που υφίστανται από την διαφορετική τονικότητα στο εσωτερικό και στο εξωτερικό τους περιβάλλον.

2.2.2 Προσδιορισμός ζωτικότητας κυττάρων μέσω της διαδικασίας MTT

Ο έλεγχος ζωτικότητας γίνεται μέσω της αξιολόγησης MTT, που περιεγράφη για πρώτη φορά από τον Tim Mosmann το 1983 [84]. Αποτελεί μια χρωματομετρική μέθοδο κατά την οποία γίνεται εκμετάλλευση της αναγωγής του άλατος τετραζολίου (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, ή MTT), για να μετρηθεί η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων ως ένδειξη της ζωτικότητάς τους. Τα ζωντανά κύτταρα περιέχουν NAD(P)H-εξαρτώμενα οξειδοαναγωγικά ένζυμα τα οποία ανάγουν τον παράγοντα MTT σε φορμαζίνη, ένα αδιάλυτο κρυσταλλικό προϊόν με έντονο μωβ χρώμα. Στην συνέχεια, οι κρύσταλλοι φορμαζίνης, διαλύονται με την χρήση ενός διαλύτη (στην δική μας περίπτωση χρησιμοποιείται αποστειρωμένο DMSO) και μετρίεται η απορρόφηση στα 500-600 nm με την χρήση ενός ELISA plate-reader. Όσο πιο έντονο είναι το μωβ χρώμα στο διάλυμα, τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μεταβολικά ενεργών, δηλαδή ζωτικών κυττάρων.



Εικόνα 15: Μετατροπή του τετραζολίου σε φορμαζίνη

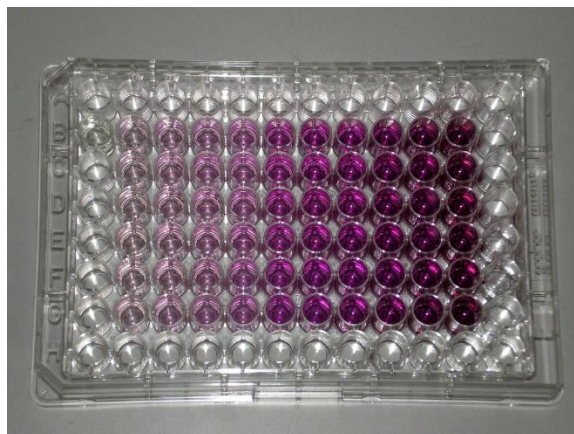
Συνοπτικά:

- Υπάρχουν 1.000-100.000 κύτταρα ανά τρυβλίο σε ένα 96-well plate όπου επωάζονται με την ουσία που θα μελετηθούν στον επιθυμητό χρόνο (6-48 ώρες)
- Στην συνέχεια αφαιρείται το μέσο που μελετάται και γίνεται πλύση των κυττάρων με PBS.

- Προστίθεται το MTT στα κύτταρα σε συγκέντρωση 1 mg/ ml
- Αφήνεται να επωαστεί από 30 λεπτά έως 4 ώρες στους 37 °C , μέχρι οι μωβ κρύσταλλοι που σχηματίζονται να είναι ορατοί με μικροσκόπιο.
- Αφαιρείται το MTT και προστίθεται η ουσία που διαλύει τους κρυστάλλους και γίνεται ήπια ανακίνηση.
- Αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 37 °C, από 30 λεπτά έως 2 ώρες, μέχρι να γίνει λύση των κυττάρων και να διαλυθούν οι μωβ κρύσταλλοι.
- Μετράται η απορρόφηση στα 540 nm/ 620 nm.

Η απορρόφηση του blank πρέπει να αφαιρείται από όλα τα δείγματα. Στην συνέχεια, οι μετρήσεις των απορροφήσεων πρέπει να χωριστούν σε αυτές των control και των δειγμάτων και να πολλαπλασιαστούν επί 100 για να δώσουν ποσοστά της ζωτικότητας των κυττάρων ή του πολλαπλασιασμού τους. Τιμές απορρόφησης μεγαλύτερες από τις τιμές του control υποδεικνύουν πολλαπλασιασμό, ενώ μικρότερες υποδεικνύουν θάνατο ή τερματισμό του πολλαπλασιασμού.

$$\% \text{ζωτικά κύτταρα} = (\text{Abs}_{\text{δείγμα}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) / (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) * 100\%$$



Εικόνα 16: Πλακίδιο 96 πηγαδιών για την πραγματοποίηση του MTT assay (96well plate Εικόνα από Wikipedia)

2.2.3 Μικροσκοπία Φθορισμού

Η μικροσκοπία φθορισμού (Fluorescent Microscopy) αποτελεί τεχνική οπτικής απεικόνισης υψηλής ανάλυσης. Αφού τοποθετηθεί το δείγμα των κυττάρων σε αντικειμενοφόρο πλάκα με καλυπτρίδα, ακτίνα λέιζερ το διαπερνά και η εστίαση πραγματοποιείται σε πολύ μικρή έκταση με τη χρήση κατάλληλου διαφράγματος, αποκλείοντας κατ' αυτόν τον τρόπο το φωτισμό περιοχών εκτός εστίασης. Μπορεί να γίνει μάλιστα χρήση long-pass φίλτρου, το οποίο είναι ειδικά σχεδιασμένο να επιτρέπει την διέλευση των ακτινοβολιών συγκεκριμένων μηκών κύματος και να ανακλά τις υπόλοιπες. Το χρησιμοποιούμενο λέιζερ μπορεί να είναι αργού ή/και ηλίου-νέου, ανάλογα με την περιοχή μέγιστης διέγερσης της φθορίζουσας ουσίας.

Γενικές εφαρμογές της μικροσκοπίας φθορισμού είναι ο εντοπισμός μακρομορίων (πρωτεΐνες, DNA) στο κύτταρο, η παρατήρηση κυτταρικών δομών (μεμβράνες, κυτταροσκελετός, χρωματίνη, λυσοσώματα) αλλά και η μελέτη κυτταρικών λειτουργιών όπως απόπτωση, κυτταρική διαίρεση, ενδοκύττωση και η κυτταρική διήθηση.

2.3 Υλικά και Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν

Για την σύνθεση, την επικάλυψη, τον καθαρισμό και τον χαρακτηρισμό των νανοσωματιδίων

- Σφαιρική φιάλη των 50 ml
- Μαγνήτης ανάδευσης
- Ποτήρι ζέσεως του 1L
- Μembrάνη διάλυσης, της εταιρίας *Medicell International Ltd*
- Σιφώνιο πλήρωσης των 10 ml
- Πιπέτα Gilson των 100-1000 μ l
- Tips
- Eppendorfs του 1,5 και των 2 ml
- Διπλά απεσταγμένο νερό (d.d. H_2O)
- $H_2AuCl_4 \cdot xH_2O$, της εταιρίας *Alfa Aesar*
- $Na_3C_6H_5O_7$, της εταιρίας *Sigma Aldrich*
- $PtCl_2$
- 3-aminopropyl-trimethoxysilane, της εταιρίας *Acros Organics*
- Methanol- d_4 , της εταιρίας *Eurisotop*
- Φασματοφωτόμετρο Jasco V-640

Για την σύνθεση, τον καθαρισμό και τον χαρακτηρισμό του μικρού οργανικού μορίου

- Crocs και στήλες στήριξής τους
- Σφαιρική φιάλη των 50 ml και των 100 ml
- Μαγνήτης ανάδευσης
- Σιφώνιο πλήρωσης των 10 ml
- Πιπέτα Gilson των 100-1000 μ l
- Tips
- Eppendorfs του 1,5 και των 2 ml
- $C_6H_{14}N_2O_4$, 2-propanol, της εταιρίας Merck
- $C_8H_5ClN_2$, 4-chloro-quinazoline, της εταιρίας Chembiotin
- $N_2C_4H_7O_2$, Alanine (2-Aminopropanoic Acid)
- CH_2Cl_2 , Dichloromethane, της εταιρίας Merck
- C_6H_{14} , Hexane, της εταιρίας Merck
- Methanol-d4, της εταιρίας Chembiotin
- Θερμαντική πλάκα
- Ζυγός OHAUS, Pioneer Model: PA224C
- Δοχείο με σιλικονέλαιο
- Crocs και στήλες στήριξής τους
- Μεταλλικές σπάτουλες
- Ψυκτήρας
- Διαχωριστική χωάνη
- Αντλία συμπύκνωσης
- NMR Φασματομέτρο, Bruker 400 MHz

Για την διαδικασία MTT

- Τρυβλία 96-πηγαδιών
- MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), της εταιρίας *Sigma-Aldrich*
- Κυτταρικές Σειρές:
 - HEK-293: εμβρυονικά κύτταρα ήπατος
 - U87MG: κύτταρα γλοιοβλαστώματος, άγριου τύπου
 - D54: κύτταρα γλοιοβλαστώματος, άγριου τύπου
 - U251: κύτταρα γλοιοβλαστώματος, μετάλλαξης
- Phosphate Buffered Saline, της εταιρίας *Sigma-Aldrich*
- Πιπέτα Gilson των 0,5-10 μl
- Πιπέτα Gilson των 10-100 μl
- Πιπέτα Gilson των 100-1000 μl
- Tips
- Πλαστικά κωνικά σωληνάρια φυγοκέντρου Falcon, των 15 ml
- Πλαστικά κωνικά σωληνάρια φυγοκέντρου Falcon, των 50 ml
- Φασματοφωτόμετρο ELISA

Για την διαδικασία της αιμόλυσης

- Αίμα από υγιή δότη
- Φυγόκεντρος
- Τρυβλίο 96-πηγαδιών
- Eppendorfs
- Διπλά Απεσταγμένο H₂O
- Phosphate Buffered Saline, της εταιρίας *Sigma Aldrich*
- Πιπέτα Gilson των 0,5-10 μl
- Πιπέτα Gilson των 10-100 μl
- Tips
- Πλαστικά κωνικά σωληνάρια φυγοκέντρου Falcon, των 15 ml
- Πλαστικά κωνικά σωληνάρια φυγοκέντρου Falcon, των 50 ml

- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis (Perkin Elmer, Lambda 35, φασματοφωτόμετρο UV / VIS) σε μέγιστο μήκος κύματος ($\lambda_{\max}$) 540 nm

Για την μικροσκοπία φθορισμού

- Τρυβλίο 6-πηγαδιών
- Κυτταρικές σειρές
MCF-7: κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού
U87MG: κυτταρική σειρά καρκίνου του γλοιοβλαστώματος
- Phosphate Buffered Saline, της εταιρίας *Sigma-Aldrich*
- Φορμαλδεΰδη, της εταιρίας *Sigma-Aldrich*
- Πιπέτα Gilson των 0,5-10 μ l
- Πιπέτα Gilson των 10-100 μ l
- Πιπέτα Gilson των 100-1000 μ l
- Tips
- Πλαστικά κωνικά σωληνάρια φυγοκέντρου Falcon, των 15 ml
- Πλαστικά κωνικά σωληνάρια φυγοκέντρου Falcon, των 50 ml
- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Καλυπτρίδες Μικροσκοπίου
- Μικροσκόπιο φθορισμού, OMAX Trinocular Compound EPI, μοντέλο M834FLR σε μεγέθυνση x4

3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.0 ΣΥΝΘΕΣΕΙΣ – ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Νανοσωματίδια Χρυσού Με Τρι-Νάτριο Άλας Κιτρικού Οξέος ως Αναγωγικό Μέσο (AuNPs)

3.1.1 Σύνθεση Νανοσωματιδίων χρυσού

Πειραματική Πορεία:

Παρασκευάζονται τα πρόδρομα διαλύματα της αντίδρασης στις επιθυμητές συγκεντρώσεις: υδατικό διάλυμα $\text{HAuCl}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ συγκεντρώσεων 25,4 mM και υδατικό διάλυμα $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ συγκεντρώσεων 136 mM. Το νερό που χρησιμοποιείται και για την παρασκευή των διαλυμάτων αλλά και κατά την αντίδραση είναι διπλά απεσταγμένο (H_2O double distilled, d.d.), με αγωγιμότητα 18,2 mΩ.

Σφαιρική φιάλη των 50 mL που περιέχει 23,75 mL H_2O d.d. αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση, επί μαγνητοθερμικό αναδευτήρα, έως ότου η θερμοκρασία σταθεροποιηθεί στους 100 °C (~1 ώρα). Στη συνέχεια προστίθεται 1 mL του υδατικού διαλύματος $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, το οποίο αφήνεται προς ανάδευση και θέρμανση ~10min και ακολουθεί η προσθήκη 0,25 mL του υδατικού διαλύματος $\text{HAuCl}_4 \times \text{H}_2\text{O}$. Άμεσα, σε διάστημα λιγότερο από 20 δευτερολέπτων, αρχίζει η χρωματική μεταβολή του διαλύματος, η οποία υποδεικνύει την έναρξη της αναγωγής άρα και του σχηματισμού νανοσωματιδίων χρυσού. Κατ' αυτόν τον τρόπο, από διαυγές και άχρωμο το διάλυμα γίνεται αρχικά γκρι, στη συνέχεια μωβ, ροζ και σταθεροποιείται στο κόκκινο χρώμα, περίπου στο τρίτο λεπτό της αντίδρασης. Το διάλυμα παραμένει στις ίδιες συνθήκες, μετά την σταθεροποίηση του χρώματος για ακόμη 10 λεπτά. Τέλος, το διάλυμα ψύχεται σταδιακά με εμβάπτιση της σφαιρικής σε υδατόλουτρο και τελικά σε



Εικόνα 17: Εικόνα από σφαιρική με κολλοειδές διάλυμα νανοσωματιδίων χρυσού

παγόλουτρο. Το κολλοειδές προϊόν των νανοσωματιδίων χρυσού φυλάσσεται στους 1-4 °C.

3.1.2 Διαδικασία Καθαρισμού Νανοσωματιδίων Χρυσού

10 ml νανοσωματιδίων χρυσού που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με την προηγούμενη διαδικασία λαμβάνονται προκειμένου να καθαριστούν σύμφωνα με την μέθοδο της διάλυσης με μεμβράνη [85]. Στόχος της διαδικασίας αυτής είναι ο καθαρισμός των νανοσωματιδίων χρυσού από την περίσσεια του τρικιτρικού ιόντος, αλλά και από τα παραπροϊόντα της αντίδρασης σχηματισμού των νανοσωματιδίων χρυσού, όπως η δικάρβοξυ-ακετόνη που προέρχεται από τον διμερισμό του κιτρικού οξέος, καθώς και ιόντων χρυσού.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: λαμβάνεται η μεμβράνη διάλυσης η οποία εμβαπτίζεται σε 20 ml d.d. H₂O και στην συνέχεια τοποθετείται το κολλοειδές των νανοσωματιδίων στη μεμβράνη με χρήση μηχανικής πιπέτας και αφού σφραγιστεί τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως με 800 mL d.d. H₂O σε θερμοκρασία δωματίου. Το νερό του δοχείου ζέσεως αλλάζεται διαδοχικά κάθε 4-6 ώρες για δύο εικοσιτετράωρα. Το διάλυμα αποθηκεύεται στο 1-4 °C.

3.2 Νανοσωματίδια Χρυσού επικαλυμμένα με νανοσωματίδια Λευκόχρυσου

3.2.1 Σύνθεση Νανοσωματιδίων Χρυσού επικαλυμμένων με κιτρικό οξύ και τροποποιημένων με νανοσωματίδια Λευκόχρυσου (Au@Pt NPs)

Για την σύνθεση νανοσωματιδίων χρυσού τροποποιημένων με νανοσωματίδια λευκόχρυσου (Au@PtNPs) χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές τεχνικές. Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε μέρος από το κολλοειδές των νανοσωματιδίων χρυσού, ενώ στην δεύτερη περίπτωση έγινε σύνθεση των νανοσωματιδίων χρυσού και ταυτόχρονη τροποποίησή τους.

Σε όλες τις περιπτώσεις η παρασκευή των διαλυμάτων γίνεται με d.d. H₂O αγωγιμότητας 18.2 mΩ

1^η Διαδικασία

Πειραματική Πορεία

Αρχικά παρασκευάζονται τα διαλύματα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν τα οποία είναι Na₃C₆H₅O₇ 1 ml, συγκέντρωσης 68 mM και H₂PtCl₆ 1ml, συγκέντρωσης 4.2 mM, το τελευταίο διασπείρεται με υπερήχους.

Λαμβάνονται 5 ml AuNPs και τοποθετούνται σε σφαιρική των 50 ml και στην συνέχεια τοποθετούνται στην σφαιρική 18 ml d.d. H₂O. Το κολλοειδές διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση μέχρι τους 100 °C, όπου αφήνεται να σταθεροποιηθεί. Στην συνέχεια προστίθεται 1 ml διαλύματος Na₃C₆H₅O₇ και αφήνεται για 10 λεπτά μέχρι τους 100 °C. Τέλος, προστίθεται το 1ml διαλύματος H₂PtCl₆. Κατά την προσθήκη παρατηρείται σταδιακή χρωματική αλλαγή από κόκκινο-ροζ σε μπλε-μωβ όπου μετά το πέρας των 2,5 ωρών πραγματοποιείται σταθεροποίηση του τελικού χρώματος του κολλοειδούς και αφήνεται για μία ώρα ακόμα. Η αντίδραση διακόπτεται μετά το πέρας 3 ωρών.

2^η Διαδικασία

Πειραματική Πορεία:

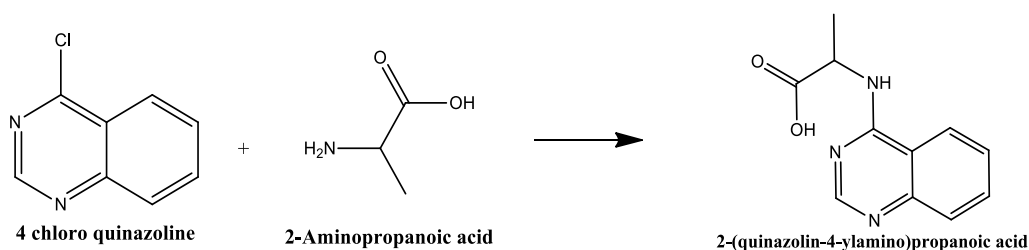
Σε σφαιρική φιάλη των 50 ml προστίθενται 22.75 ml H₂O και θερμαίνεται μέχρις σταθεροποίησης της θερμοκρασία στους 100 °C. Παράλληλα, παρασκευάζεται διάλυμα 25.4 mM H₂AuCl₄ xH₂O και 250μl αυτού προστίθενται στη σφαιρική στην οποία προστίθεται διαδοχικά 1 ml Na₃C₆H₅O₇ συγκέντρωσης 68 mM και διάλυμα 1 ml H₂PtCl₆ συγκέντρωσης 4.2 mM. Μετά την σταθεροποίηση της θερμοκρασίας προστίθεται σε αυτή το Na₃C₆H₅O₇ και αφήνεται για 10 λεπτά προκειμένου να αποκτήσει την ίδια θερμοκρασία.

Τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν φυγοκεντρήθηκαν σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στα 15.000 rpm για 10 λεπτά και απομονώθηκε το ίζημα . Το υπερκείμενο περιείχε τα επιθυμητά νανοσωματίδια.

3.3 Σύνθεση Οργανικού Μορίου

Στην παρούσα ερευνητική εργασία έγινε σύνθεση ενός μικρού οργανικού μορίου, με βάση την κιναζολίνη, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας στόχευσης συνδεόμενος στα νανοσωματίδια χρυσού.

- **2-(quinazolin-4-ylamino) propanoic acid**



Εικόνα 18: Χημική αντίδραση σύνθεσης του 2-(quinazolin-4-ylamino) propanoic acid από την 4-chloroquinazoline και το 2-aminopropanoic acid

Πειραματική Πορεία:

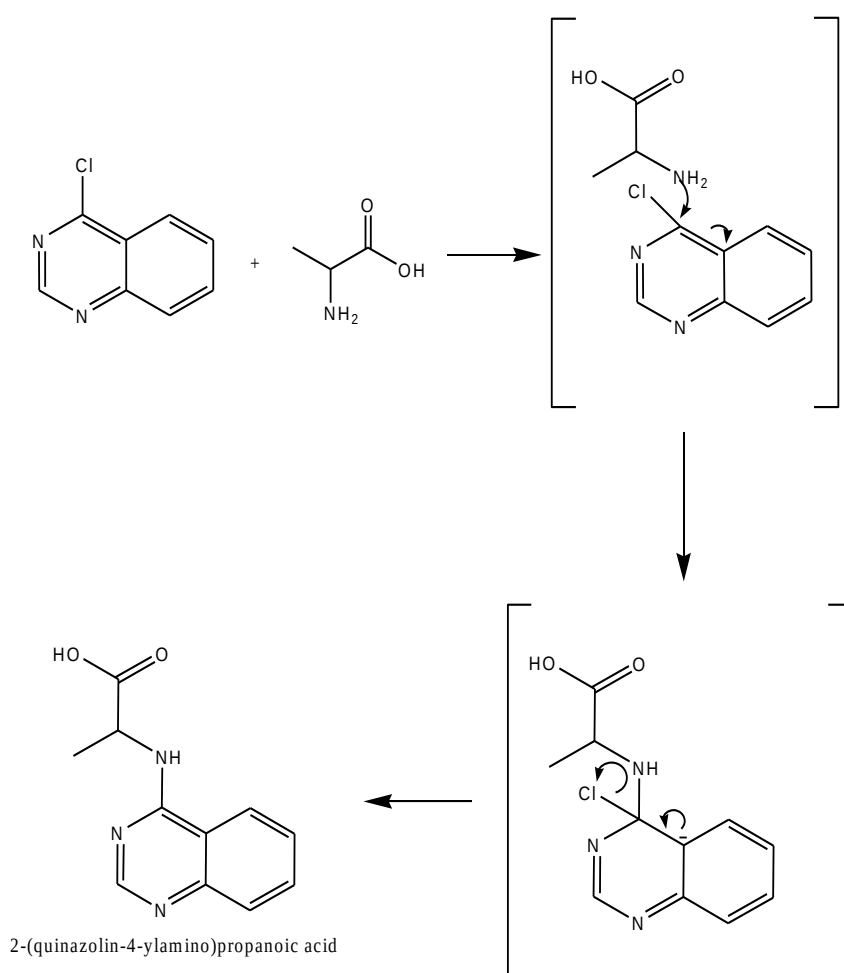
Σε σφαιρική φιάλη των 50 ml τοποθετήθηκαν 20 ml ισοπροπανόλης με 0.37 gr 4-χλωρο-κιναζολίνης (2.25 mmol) και 0.223 gr. 2-αμινοπροπανοϊκού οξέος (L-αλανίνης, 2.5 mmol), και αφήνονται να αντιδράσουν καθ' όλη την διάρκεια της νύχτας (overnight) στους 90 °C (reflux). Στην συνέχεια πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με διχλωρομεθάνιο και εξάνιο, κατά την οποία παρατηρείται ο σχηματισμός λευκού ιζήματος. Το ίζημα διαχωρίζεται από το διήθημα με ηθμό. [86] Το διήθημα στεγνώνεται και ακολουθεί ξανά ανακρυστάλλωση με διχλωρομεθάνιο και μεθανόλη.

Από την παραπάνω αντίδραση λήφθηκαν 0.13 gr προϊόντος. Το μοριακό βάρος του προϊόντος που λαμβάνεται είναι 217,09. Από την σχέση $n=m/Mr$ υπολογίζονται τα mmols του παραγώγου της κιναζολίνης που έχει συντεθεί, τα οποία είναι 0.60 mmols.

Από την σχέση $\alpha = n_{\text{τελ}}/n_{\text{αρχ}} \cdot 100\%$ συμπεραίνουμε ότι η απόδοση της αντίδρασης είναι 26,7%.

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου επιτυγχάνεται η παραπάνω αντίδραση είναι $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$. Ο μηχανισμός αυτός λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια, στο πρώτο από τα οποία συμβαίνει μια προσθήκη και στο δεύτερο μια απόσπαση. [86] Αρχικά συμβαίνει η προσθήκη της αλανίνης από την πλευρά της αμίνης, και σε δεύτερο χρόνο γίνεται η απόσπαση του χλωρίου από τον άνθρακα.

Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης:



Εικόνα 19: Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης σύνθεσης του οργανικού μορίου

3.4 Τροποποίηση Au@PtNPs με APTMS (Au@Pt@APTMS NPs)

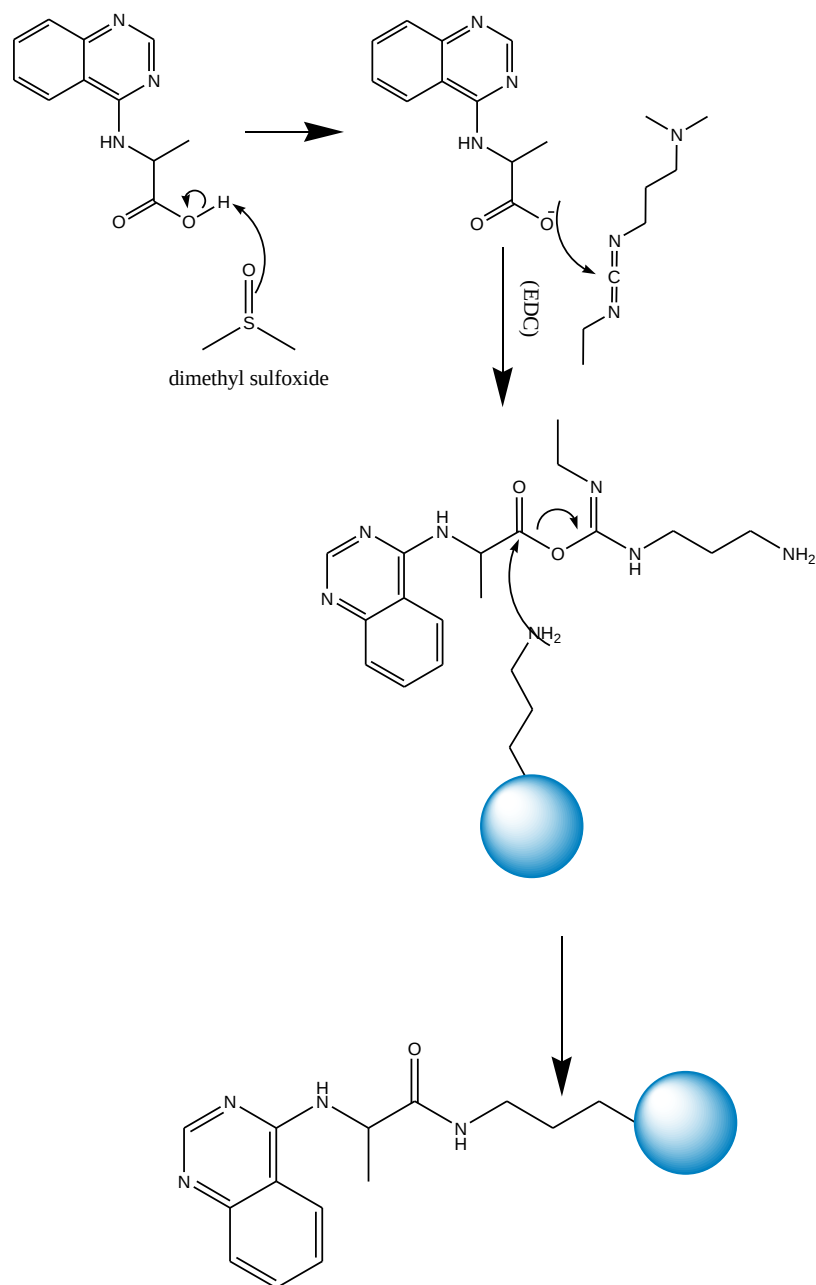
Πειραματική Πορεία

Σε σφαιρική φιάλη των 25 ml τοποθετήθηκαν 2 ml d.d. H₂O και 8 ml μεθανόλης και προστέθηκαν 1 ml από τα Au@Pt NPs και 0.6 ml APTMS. Το μίγμα αφέθηκε να αντιδράσει για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με μαγνητική ανάδευση. Το τελικό κολλοειδές συλλέγεται και αποθηκεύεται στο ψυγείο στους 1-4 °C.

3.5 Σύνδεση του οργανικού μορίου (παράγωγο της Κιναζολίνης ή Qd) στα Au@Pt@APTMS NPs (Au@Pt@Qd NPs)

Πειραματική Πορεία

Αρχικά σε 5 ml Διμέθυλσουλφοξείδιο (DMSO) προστέθηκαν 20 μl 1-αιθυλ-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλ-καρβοδιιμίδιο (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC (0,020 μmol) και 5.56 mg του 2-(quinazolin-4-ylamino) propanoic acid (Qd) (0,026 mmol) και υπόκεινται σε sonication μέχρι την πλήρη διάλυσή τους. Παράλληλα, σε σφαιρική των 50 ml προστίθενται 7.5 ml των νανοσωματιδίων Au@Pt@APTMS διασπείρονται σε 7,5 ml νερό υπό μαγνητική ανάδευση για 5 λεπτά. Μετά το πέρας των 5 λεπτών, προστίθεται στάγδην το διάλυμα του DMSO με το EDC και το Qd. Στο διάλυμα προστίθενται 2-3 σταγόνες NH₃, μέχρι το pH=11.. Η αντίδραση αφήνεται υπό μαγνητική ανάδευση, χωρίς θέρμανση, καθ' όλη την διάρκεια της νύχτας. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί απομάκρυνση των παραπροϊόντων, τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια υφίστανται διάλυση.



Εικόνα 20: Προτεινόμενος μηχανισμός σύνδεσης του οργανικού μορίου στο νανοςωματίδιο Au@Pt@APTMS

Πειραματική Πορεία

Η πορεία της διάλυσης, προκειμένου να καθαριστούν από τα ανεπιθύμητα παραπροϊόντα, είναι όμοια με την πορεία διάλυσης στα προηγούμενα στάδια. Αρχικά λαμβάνεται η μεμβράνη και εμβαπτίζεται σε d.d.H₂O, το οποίο είναι στους 100 °C, για 5 λεπτά. Έπειτα, εισάγονται στην μεμβράνη 6 ml του

παραπάνω κολλοειδούς η οποία κλείνεται αεροστεγώς με την βοήθεια δύο κλιπ στις δύο άκρες της. Τοποθετείται, αμέσως μετά, σε ποτήρι ζέσεως με 800 ml d.d. H₂O, υπό μαγνητική ανάδευση και αφήνεται για 24 ώρες χωρίς θέρμανση. Γίνεται αλλαγή του νερού κάθε 4-6 ώρες.

4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΙ

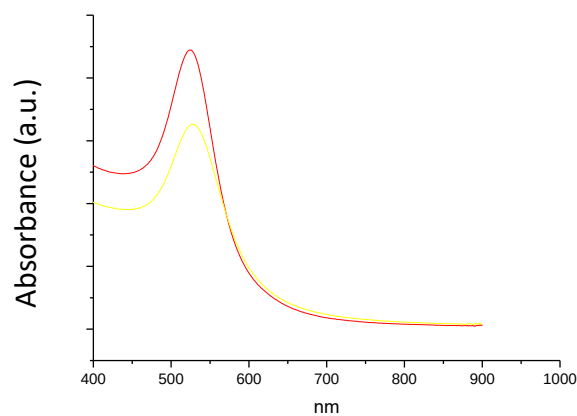
4.0 Χαρακτηρισμός συντιθέμενων Νανოსωματιδίων

4.0.1 Χαρακτηρισμός Νανοςωματιδίων Χρυσού

4.0.1.1 Δομικός Χαρακτηρισμός

4.0.1.1.1 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού

Μέσω φασματοσκοπίας Ορατού-Υπεριώδους χαρακτηρίζονται τα επικαλυμμένα με τρικιτρικό οξύ νανοςωματίδια AuNPs, τα οποία όπως προαναφέρθηκε εμφανίζουν κορυφή πλασμονικού συντονισμού. Το μέγιστο απορρόφησης ($\lambda_{\max}$) εμφανίζεται στα 521 nm.



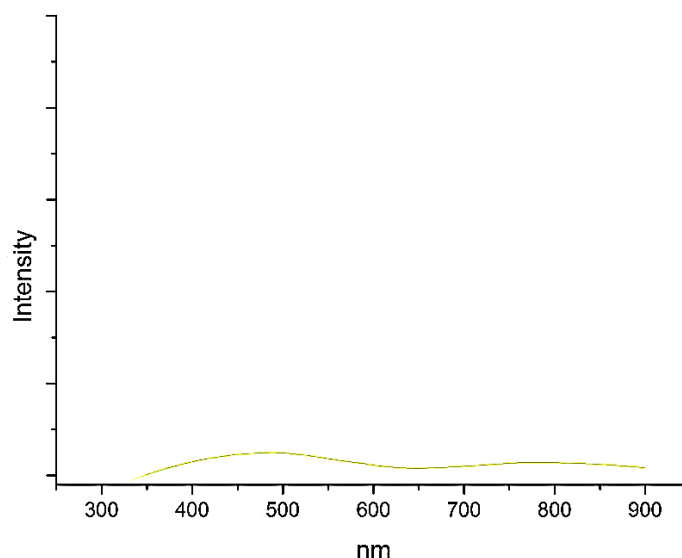
Εικόνα 21: Φάσμα απορρόφησης UV-Vis νανοςωματιδίων χρυσού επικαλυμμένων με τρικιτρικό οξύ πριν και μετά την διάλυση

4.0.1.1.2 Φασματοσκοπία Φωτοφωταύγειας

Παρακάτω παρατίθεται το φάσμα φωτοφωταύγειας των νανοσωματιδίων χρυσού.

Τα νανοσωματίδια χρυσού παρουσιάζουν φθορισμό στην περιοχή του ορατού-εγγύς υπέρυθρου. Ο μηχανισμός φθορισμού για τα νανοσωματίδια χρυσού συμβαίνει όταν ένα ηλεκτρόνιο της d- στιβάδας μεταβαίνει σε επίπεδο που βρίσκεται πάνω από την ενέργεια Fermi, αφήνοντας «πίσω» του μία d-τρύπα, η οποία χαλαρώνει, είτε μέσω σκέδασης Auger, είτε μέσω εκπομπής φωτονίου. Τελικά, η d-τρύπα μπορεί να επανασυνδυαστεί απευθείας με ένα sp ηλεκτρόνιο, που να βρίσκεται κάτω από το Fermi ενεργειακό επίπεδο, και να ακτινοβολήσει το αντίστοιχο φωτόνιο, ή να εκπέμψει ένα πλασμόνιο, το οποίο μπορεί να χάσει την ενέργειά του με ή χωρίς ακτινοβολία [87, 88]

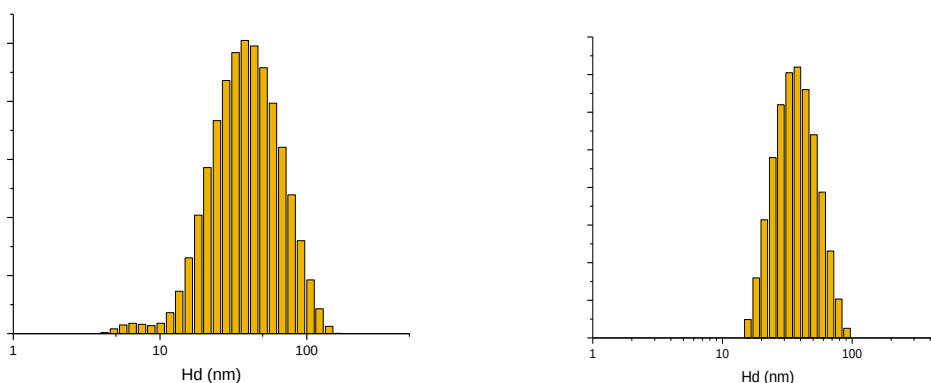
Η κορυφή που παρατηρείται στο φάσμα φωτοφωταύγειας στα 480 nm, παρατηρείται λόγω του φθορισμού των νανοσωματιδίων χρυσού και αποδίδεται στην απορρόφηση των νανοσωματιδίων στην ορατή/υπεριώδη περιοχή, η οποία φαίνεται στην προηγούμενη εικόνα [87]



Εικόνα 22: Φάσμα φωτοφωταύγειας νανοσωματιδίων χρυσού

4.0.1.1.3 Δυναμική Σκέδαση Φωτός

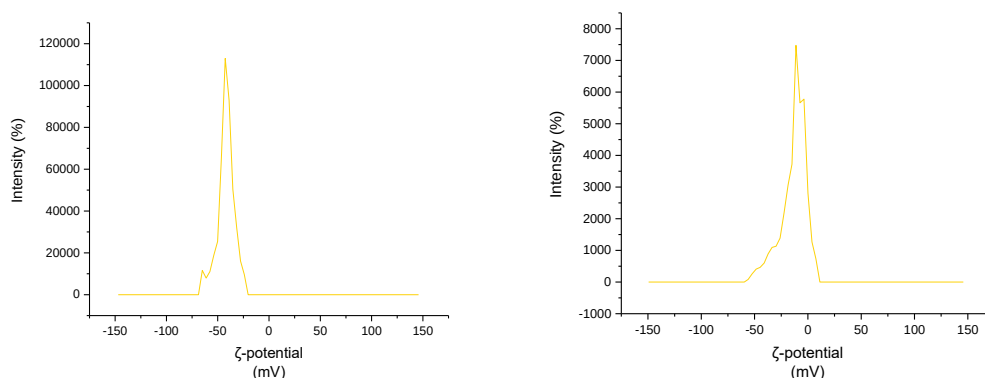
Μέτρηση υδροδυναμικής (Hd) των νανοσωματιδίων χρυσού μέσω δυναμικής σκέδασης φωτός, η οποία είναι 32,80 nm με συντελεστή πολυδιασποράς (polydispersity index, PDI), $PDI=0,339$ πριν από τον καθαρισμό μέσω της διαδικασίας της διάλυσης με μεμβράνη και 31,88 nm με $PDI=0,210$ μετά την εφαρμογή της. Παρατηρείται πως υπάρχει μείωση της πολυδιασποράς, αφού στο δεύτερο γράφημα δεν εμφανίζονται κορυφές κοντά 7-10 nm, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τις μετρήσεις του συντελεστή πολυδιασποράς. Παρατηρείται μάλιστα και μικρή μείωση της υδροδυναμικής διαμέτρου, πιθανόν λόγω της απομάκρυνσης του επιπλέον κιτρικού οξέος που υπήρχε πριν την διαδικασία της διάλυσης. Η απομάκρυνσή των παραπροϊόντων οδηγεί σε μικρότερη αλληλεπίδραση μεταξύ του νανοσωματιδίου με τα μόρια διαλύτη, αλλά και με τους τροποποιητές της επιφάνειας του νανοσωματιδίου μεταξύ τους (αλληλεπιδράσεις -απωστικές δυνάμεις- μεταξύ των μορίων του τρικιτρικού οξέος που έχουν επικαλύψει την επιφάνεια των νανοσωματιδίων του χρυσού)



Εικόνα 23: Προσδιορισμός της Hd των νανοσωματιδίων χρυσού πριν και μετά τον καθαρισμό με διαδικασία μεμβράνης μέσω Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS)

Παρακάτω, παρατίθενται τα διαγράμματα του ζ-δυναμικού, που προήλθαν από τις μετρήσεις DLS, μέσω των οποίων γίνεται έλεγχος της κολλοειδούς συμπεριφοράς των διαλυμάτων. Στην πρώτη περίπτωση, δηλαδή πριν την

διάλυση των νανοσωματιδίων το ζ-δυναμικό είναι $-40,4 \text{ mV} \pm 7,40 \text{ mV}$, ενώ μετά την διάλυση είναι $-18,6 \text{ mV} \pm 13,2 \text{ mV}$. Συνεπώς, έχουμε και στις δύο περιπτώσεις καλά κολλοειδή διαλύματα. Στο ζ-δυναμικό παρατηρείται αυτή η μείωση, πιθανόν διότι με την διαδικασία της διάλυσης έχουν απομακρυνθεί μόρια κιτρικού οξέος τα οποία συντελούν στην αύξηση του αρνητικού φορτίου αφού είναι μερικώς αποπρωτονιωμένα στο μέσο διασποράς που βρίσκονται, δηλαδή στο απιονισμένο νερό. Οι pKa του τρικιτρικού οξέος είναι 3.1, 4.7 και 6.4, που σημαίνει ότι στο απιονισμένο νερό με pH περίπου 5.5, το τρικιτρικό οξύ είναι μερικώς αποπρωτονιωμένο. Συνεπώς, η αφαίρεσή του από το κολλοειδές, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του ζ-δυναμικού.

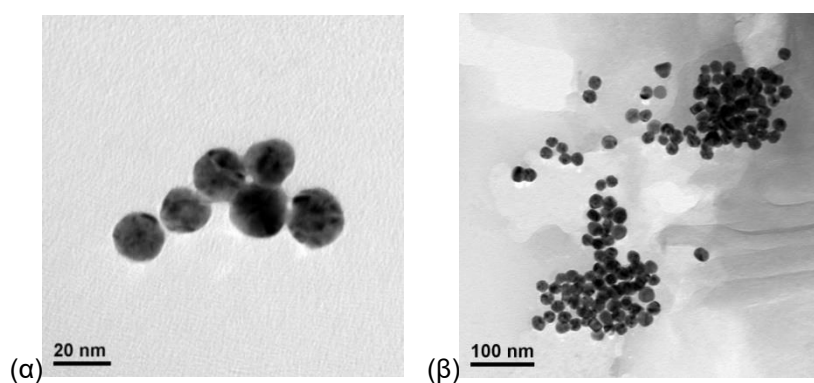


Εικόνα 24: Εικόνες ζ-δυναμικού για τα νανοσωματίδια χρυσού πριν και μετά την διαδικασία της διάλυσής τους

4.0.1.2 Μορφολογικός Χαρακτηρισμός

4.0.1.2.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διεύλευσης

Τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, τόσο ως προς το μέγεθος, όσο και ως προς την μορφολογία τους, προσδιορίζονται μέσω της μικροσκοπίας TEM. Στις εικόνες TEM που βρίσκονται παρακάτω, φαίνεται πως τα νανοσωματίδια χρυσού είναι σφαιρικά και η διάμετρος περίπου στα 20 nm γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με την H_d που προέκυψε από τα DLS. Είναι αναμενόμενο η υδροδυναμική διάμετρος να εμφανίζεται μεγαλύτερη από την διάμετρο των νανοσωματιδίων, όπως αυτή φαίνεται από τις εικόνες TEM. [89]

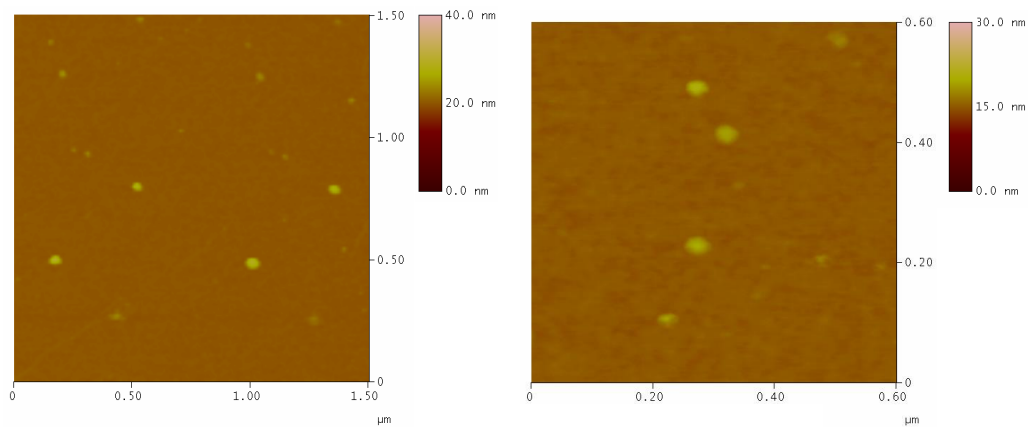


Εικόνα 25(α): Εικόνα TEM νανοσωματιδίων χρυσού στην κλίμακα των 20 nm (β):Εικόνα TEM νανοσωματιδίων χρυσού στην κλίμακα των 100 nm

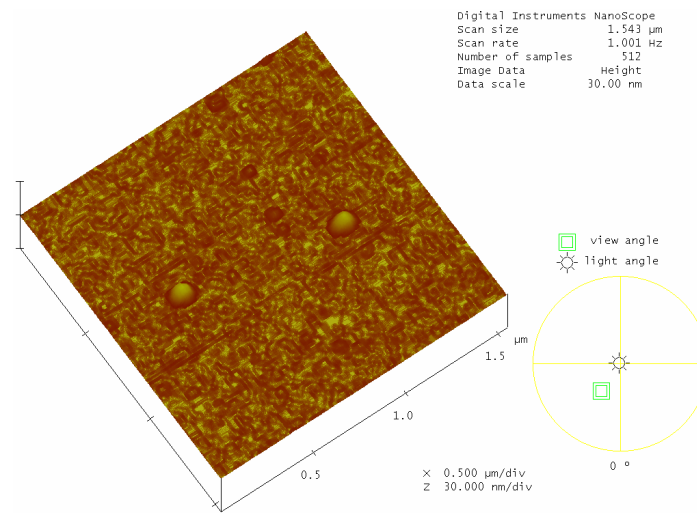
Εκτός από το σχήμα και την διάμετρο των νανοσωματιδίων, που προσδιορίζεται μέσω των εικόνων αυτών, είναι φανερό πως η κατανομή των νανοσωματιδίων είναι σε μονοδιασπορά.

4.0.1.2.2 Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης

Τα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν μορφολογικά και με μικροσκοπία Ατομικής δύναμης. Σύμφωνα με τις εικόνες που παρουσιάζονται (Εικ. 20 & Εικ. 21) λαμβάνουμε επιπλέον πληροφορίες για την μορφολογία και το μέγεθος των νανοσωματιδίων τα οποία επιβεβαιώνουν τις προηγούμενες μετρήσεις.



Εικόνα 26: Εικόνα AFM των νανοσωματιδίων AuNPs



Εικόνα 27: Εικόνα 2D Μικροσκοπίας Ατομικής Δύναμης των νανοσωματιδίων AuNPs

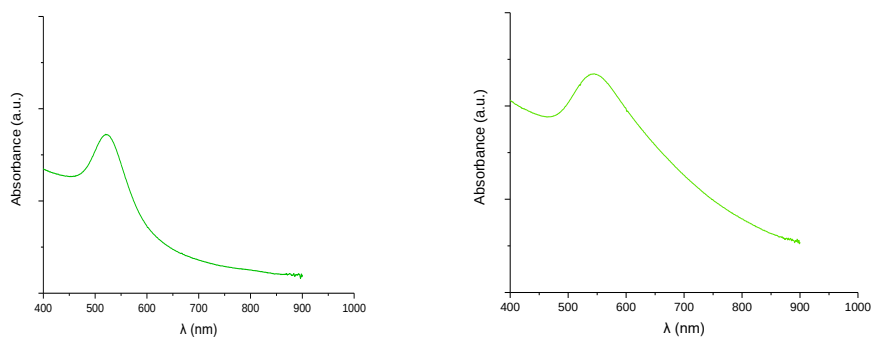
Στις παραπάνω εικόνες είναι φανερό πως τα νανοσωματίδια χρυσού είναι περίπου 20 nm.

4.0.2 Χαρακτηρισμός Νανოსωματιδίων Χρυσού επικαλυμμένων με νανოსωματίδια λευκόχρυσου

4.0.2.1 Δομικός Χαρακτηρισμός

4.0.2.1.1 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού

Όμοια με τα νανοςωματίδια χρυσού, χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού και τα νανοςωματίδια Au@Pt. Η κορυφή που παρατηρείται αποδίδεται, όπως και στην περίπτωση των νανοςωματιδίων χρυσού, στον εντοπισμό του επιφανειακού συντονισμού των πλασμονίων στα νανοςωματίδια του χρυσού. Το μέγιστο του φάσματος έχει αυξηθεί, και βρίσκεται πλέον στα 522,5 nm για τα νανοςωματίδια χρυσού επικαλυμμένα με νανοςωματίδια λευκόχρυσου που προήλθαν από την πρώτη σύνθεση και στα 539,5 nm για τα νανοςωματίδια χρυσού επικαλυμμένα με νανοςωματίδια λευκόχρυσου για εκείνα που προήλθαν από την δεύτερη σύνθεση. Το γεγονός αυτό η μετατόπιση, δηλαδή, προς την περιοχή του ερυθρού, οφείλεται στην αύξηση του μεγέθους των νανοςωματιδίων, γεγονός που είναι αναμενόμενο αφού τα νανοςωματίδια του χρυσού έχουν επικαλυφθεί με νανοςωματίδια λευκόχρυσου.

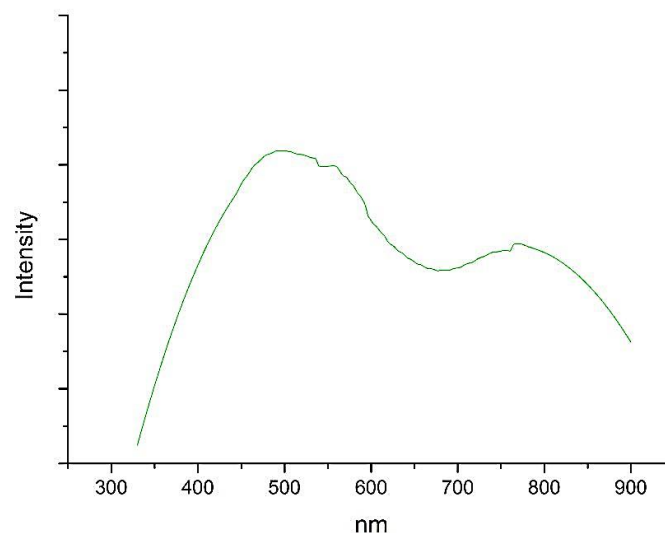


Εικόνα 28: Φάσμα απορρόφησης Υπεριώδους-Ορατού, νανοςωματιδίων χρυσού επικαλυμμένων με νανοςωματίδια λευκόχρυσου από τις δύο συνθετικές πορείες

4.0.2.1.2 Φασματοσκοπία φωτοφωταύγειας

Όμοια με τα νανοσωματίδια χρυσού, στα νανοσωματίδια χρυσού που έχουν επικαλυφθεί με νανοσωματίδια λευκόχρυσου γίνεται έλεγχος της ικανότητας φθορισμού τους.

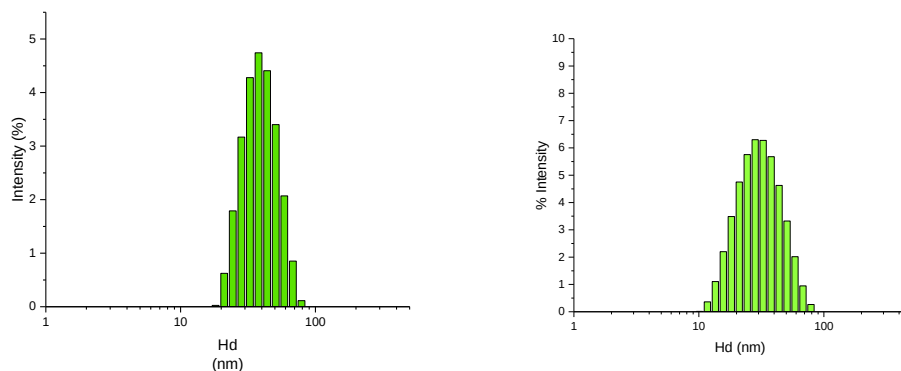
Η κορυφή που εμφανίζεται στο φάσμα φωτοφωταύγειας με μέγιστο στα 507 nm, των Au@Pt NPs της πρώτης διαδικασίας σύνθεσης, φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα. Παρατηρείται ότι στην περίπτωση των νανοσωματιδίων χρυσού επικαλυμμένων με νανοσωματίδια λευκόχρυσου η ένταση του φθορισμού είναι πολύ μεγαλύτερη. Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποίησε ο Tanaka et al. τα νανοσωματίδια λευκόχρυσου απέδωσαν τουλάχιστον 3 φορές εντονότερο φθορισμό συγκριτικά με νανοσωματίδια χρυσού, γεγονός που αποδόθηκε στο μικρό μέγεθος των νανοσωματιδίων λευκόχρυσου. Το μικρό τους μέγεθος είναι κοντά σε αυτό των κβαντικών τελειών, που αποτελούν ευρέως διαδεδομένους ημιαγωγούς, με εξαιρετικές φθορίζουσες ιδιότητες [90, 91].



Εικόνα 29: Φάσμα φωτοφωταύγειας των νανοσωματιδίων Au@Pt NPs

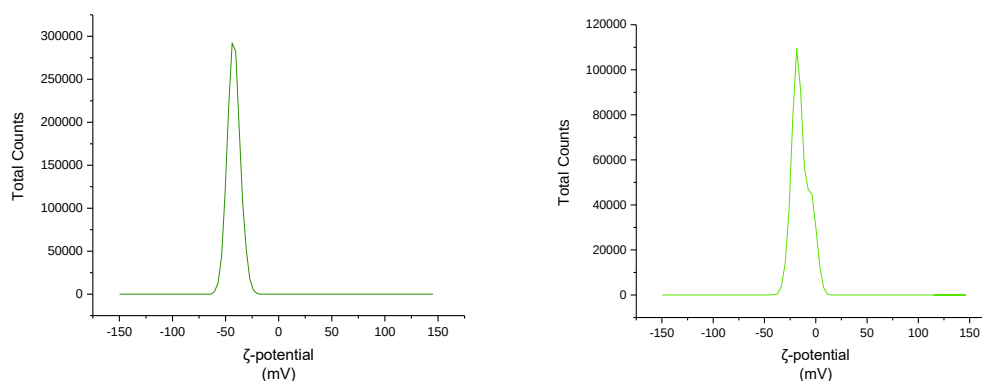
4.0.2.1.3 Δυναμική Σκέδαση Φωτός

Μετρήθηκε η υδροδυναμική διάμετρος των νανοσωματιδίων χρυσού που τροποποιήθηκαν με νανοσωματίδια λευκόχρυσου και βρέθηκε να είναι 37,84 nm με PDI=0,337 από την πρώτη σύνθεση και 31,2 nm με PDI=0,587 από την δεύτερη.



Εικόνα 30: Υδροδυναμική διάμετρος νανοσωματιδίων χρυσού επικαλυμμένων με νανοσωματίδια λευκόχρυσου από την πρώτη και την δεύτερη σύνθεση αντίστοιχα

Παρακάτω είναι παρατεθειμένες οι μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός του ζ-δυναμικού, προκειμένου να γίνει έλεγχος της κολλοειδούς συμπεριφοράς για τις δύο πορείες σύνθεσης. Για την πρώτη πορεία σύνθεσης το ζ-δυναμικό είναι $-38,5 \text{ mV} \pm 7,24 \text{ mV}$ και για την δεύτερη $-28,1 \pm 7,46 \text{ mV}$. Συνεπώς, πρόκειται για καλά κολλοειδή διαλύματα και στις δύο περιπτώσεις.

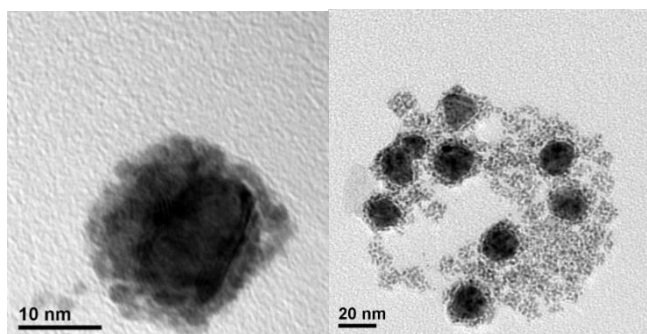


Εικόνα 31: Μέτρηση DLS ζ-δυναμικού για τις δύο πορείες σύνθεσης

4.0.2.2 Μορφολογικός Χαρακτηρισμός

4.0.2.2.1 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης

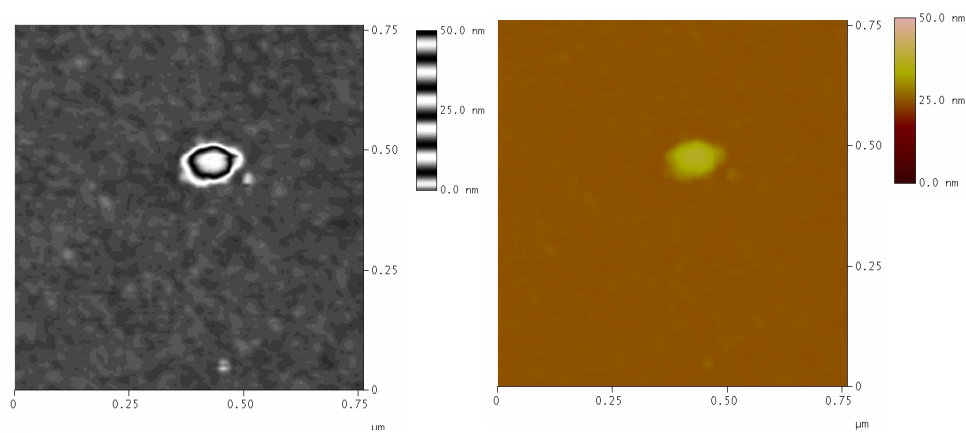
Μέσω της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διέλευσης αντλούμε επιπλέον πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος και το σχήμα των νανοσωματιδίων, όπως επίσης και για την επιτυχημένη επικάλυψη των νανοσωματιδίων χρυσού για την σύνθεση των Au@Pt NPs. Όπως είναι φανερό, στις εικόνες TEM που ακολουθούν, τα νανοσωματίδια χρυσού είναι συνδεδεμένα με νανοσωματίδια λευκόχρυσου, δημιουργώντας ουσιαστικά ένα κέλυφος νανοσωματιδίων λευκόχρυσου στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρούνται και νανοσωματίδια λευκόχρυσου τυχαία διεσπαρμένα. Τα νανοσωματίδια χρυσού που είναι επικαλυμμένα με νανοσωματίδια λευκόχρυσου φαίνεται να είναι περίπου 25 nm.



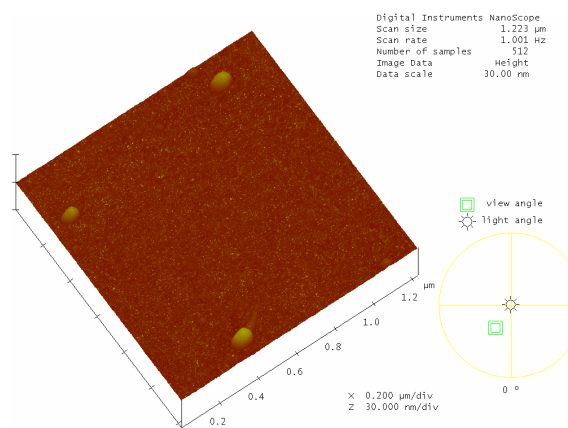
Εικόνα 32:Εικόνες TEM νανοσωματιδίων χρυσού επικαλυμμένων με νανοσωματίδια λευκόχρυσου

4.0.2.2.2 Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης

Τα νανოსωματίδια Au@Pt NPs χαρακτηρίστηκαν μορφολογικά και με Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης. Μέσω των εικόνων επιβεβαιώνεται η επικάλυψη τους με τα νανოსωματίδια λευκόχρυσου αλλά και το μέγεθός τους που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από τις εικόνες TEM, δηλαδή πρόκειται για νανოსωματίδια μεγέθους 25 nm.



Εικόνα 33: Εικόνα Μικροσκοπίας Ατομικής Δύναμης Au@PtNPS



Εικόνα 34: Εικόνα 2D Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης των νανოსωματιδίων Au@PtNPs

4.0.2.3 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

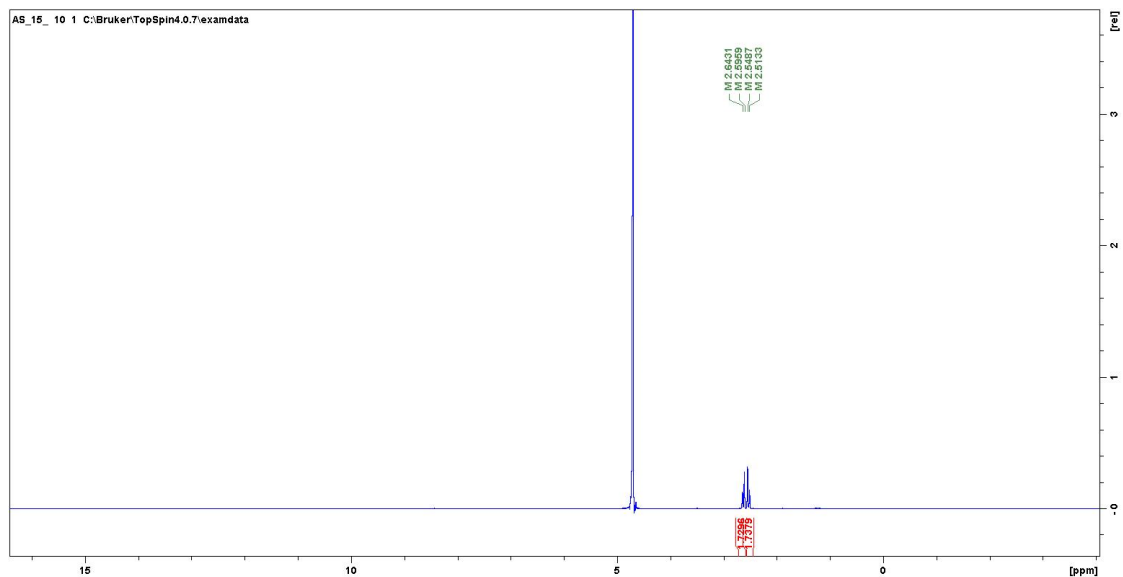
Όπως αναφέρθηκε, προκειμένου να συνδεθεί το οργανικό μόριο στα νανοσωματίδια, αυτά επικαλύφθηκαν με APTMS. Για να επιβεβαιωθεί αυτή η επικάλυψη λήφθηκαν φάσματα πρωτονίου NMR πριν και μετά την διαδικασία της επικάλυψης.

Τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν όπως περιεγράφη παραπάνω. Στην συνέχεια καθαρίστηκαν μέσω της διαδικασίας διάλυσης με μεμβράνη και λυοφιλιώθηκαν. Τα νανοσωματίδια επαναδιασπάρθηκαν σε δευτεριωμένο νερό (D_2O), και πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος 1H NMR με το οποίο επιβεβαιώθηκε η επικάλυψη των νανοσωματιδίων με APTMS. Πιο συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια πριν επικαλυφθούν με το APTMS, έχουν στην εξωτερική επιφάνεια τρι-κιτρικό οξύ, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν κορυφές των τεσσάρων πρωτονίων από το τρικιτρικό οξύ.

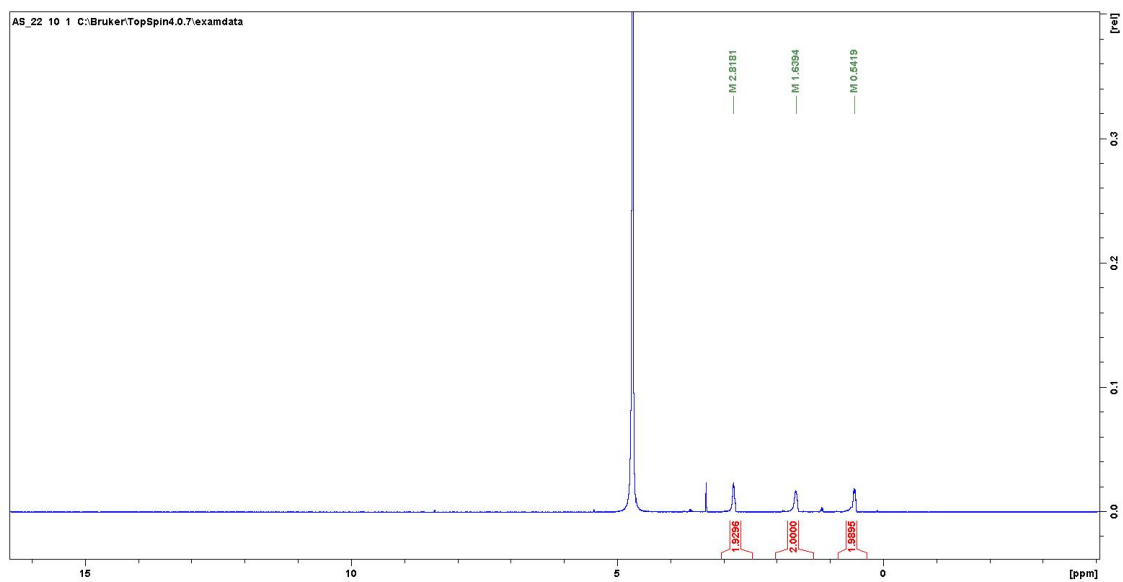
Όταν αυτά επικαλυφθούν με το APTMS στην εξωτερική τους επιφάνεια, στο φάσμα πρωτονίου NMR εμφανίζονται τα έξι πρωτόνια από το αμινπροπυλ-τριμεθοξυ-σιλάνιο.

Συνεπώς επιβεβαιώνεται η επιτυχημένη επικάλυψη.

Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα 1H NMR για τα δύο είδη νανοσωματιδίων.



Γράφημα 1: Φάσμα ^1H NMR Au@Pt NPs



Γράφημα 2: Φάσμα ^1H NMR Au@Pt@APTMS NPs

4.1 Βιολογική Αξιολόγηση

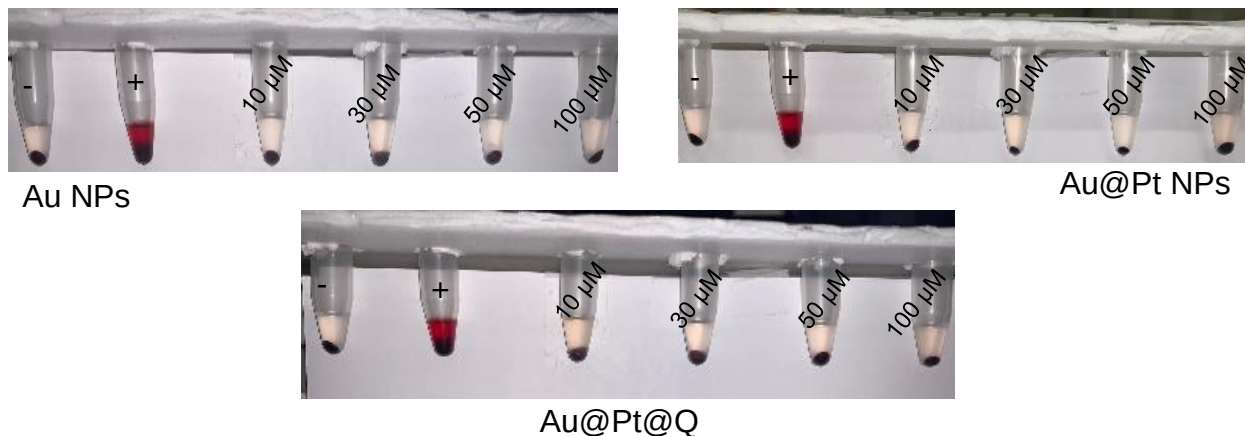
4.1.1 Αιμόλυση

Για την βιολογική αξιολόγηση των νανοσωματιδίων έγιναν πειράματα προσδιορισμού της πρόκλησης αιμόλυσης προκειμένου να αξιολογηθεί η βιοσυμβατότητά τους. Για το πείραμα της αιμόλυσης λήφθηκε αίμα από υγιή δότη, το οποίο μετά από εκπλύσεις με ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), φυγοκεντρήθηκε προκειμένου να απομονωθούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια από το πλάσμα.

Τα δείγματα για την διαδικασία της αιμόλυσης ήταν:

- Το αρνητικό δείγμα ελέγχου (Negative Control, NC): Αυτό που δεν προκαλεί αιμόλυση, στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών απαλλαγμένο από Mg^{2+} και Ca^{2+} (Phosphate Buffered Saline free, PBS free).
- Το θετικό δείγμα ελέγχου (Positive Control, PC): Αυτό που προκαλεί 100% αιμόλυση στα ερυθροκύτταρα, το οποίο στην προκειμένη περίπτωση είναι το νερό.
- Τα νανοσωματίδια που πρόκειται να μελετηθούν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, ώστε να αξιολογηθεί η πρόκληση αιμόλυσης. Τα AuNPs, τα Au@Pt NPs και τα Au@Pt@Q NPs χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις 10 μM , 30 μM , 50 μM και 100 μM (συγκέντρωση χρυσού στα νανοσωματίδια).

Σε Eppendorfs του 1.5 ml τοποθετήθηκαν 285 μl από κάθε δείγμα και προστέθηκαν 15 μl από το φυγοκεντρημένο αίμα, και τοποθετήθηκαν για 24 ώρες στον φούρνο, στους 37 °C.



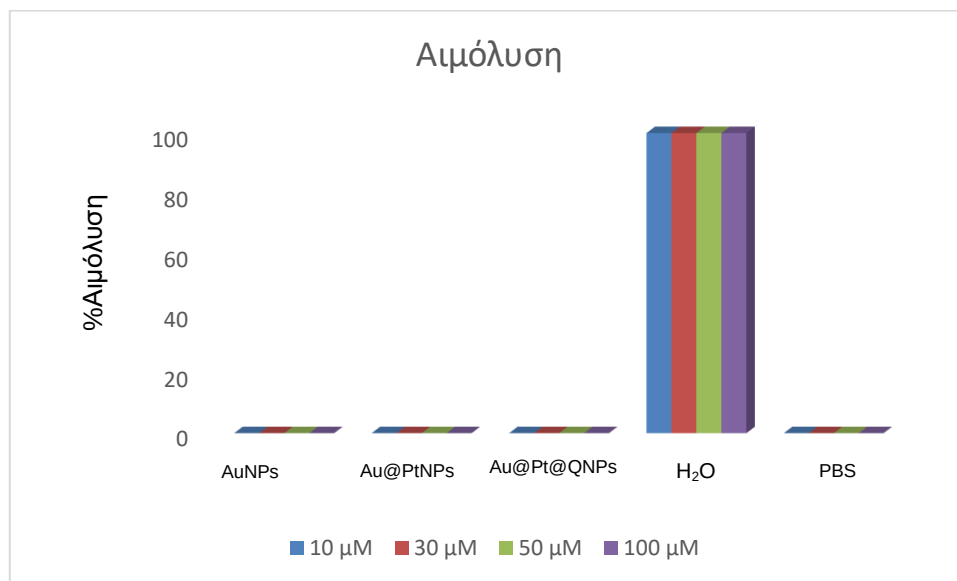
Εικόνα 36: Φωτογραφίες από το πείραμα της αιμόλυσης. Σε όλες τις περιπτώσεις το πρώτο erppendorf είναι το NC, το δεύτερο το PC, και ακολουθούν τα δείγματα σε συγκεντρώσεις 10, 30, 50, 100 μM (συγκέντρωση χρυσού για τα νανοσωματίδια). Στην αριστερή φωτογραφία απεικονίζεται το πείραμα για τα AuNPs, στην μεσσαία για τα Au@PtNPs και στην δεξιά για τα Au@Pt@QNPs

Μετά το πέρας των 24^{ωv} ωρών, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των erppendorfs στα οποία έχουν τοποθετηθεί τα δείγματα. Έπειτα, λαμβάνεται το υπερκείμενο των δειγμάτων με προσοχή και τοποθετείται σε πλάκα 96 πηγαδιών (96-well plate) ώστε να μετρηθεί η απορρόφηση του σε ELISA (plate reader). Ανάλογα με την απορρόφηση λαμβάνεται το ποσοστό της αιμόλυσης. Όπως είναι προφανές, σε μεγαλύτερα ποσοστά αιμόλυσης, η απορρόφηση στο κόκκινο χρώμα θα είναι μεγαλύτερη, λόγω της απελευθέρωσης της αιμογλοβίνης, μετά από την αλλοίωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η αιμόλυση είναι παράγοντας που υποδεικνύει την μείωση της βιοσυμβατότητας για τα μελετώμενα νανοσωματίδια

Για την λήψη του ποσοστού αιμόλυσης από τα αποτελέσματα της απορρόφησης που λήφθηκαν μέσω του ELISA plate reader, στα 540 nm χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$\% \text{Viability} = \frac{OD_{\text{sample}} - OD_{\text{negative}}}{OD_{\text{positive}} - OD_{\text{negative}}} * 100\%$$

Από αυτή την εξίσωση λαμβάνεται η ποσοστιαία αιμόλυση των νανοσωματιδίων που μελετώνται, η οποία παρουσιάζεται παρακάτω σε μορφή διαγράμματος.



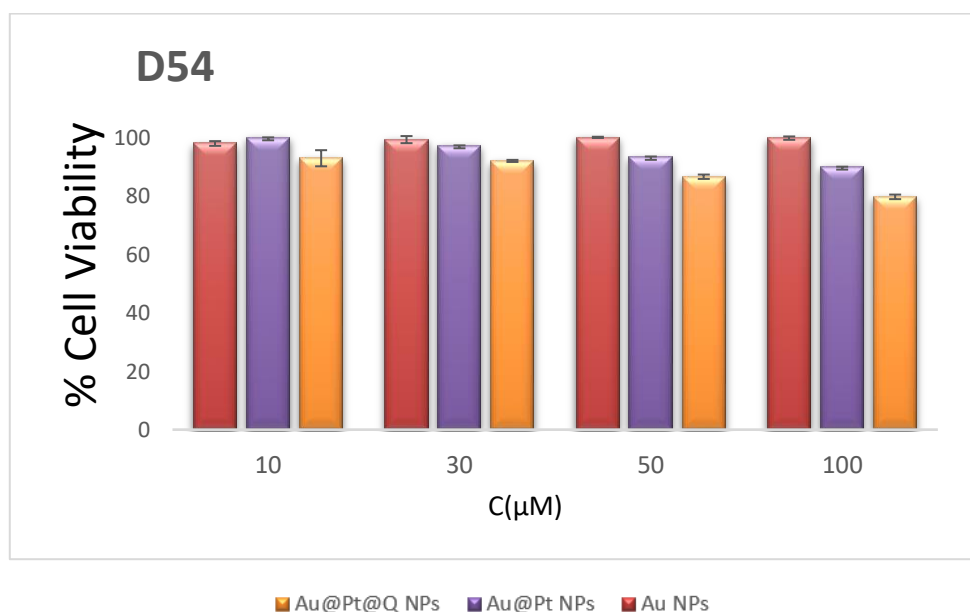
Γράφημα 3: Γράφημα ποσοστιαίας αιμόλυσης των AuNPs και Au@PtNPs συγκρητικά με PC και NC

Όπως φαίνεται στο παραπάνω γράφημα, όλα τα νανοσωματίδια τα οποία μελετώνται δεν εμφανίζουν καμία αιμόλυση.

Σύμφωνα με τα πειραματικά μας αποτελέσματα, επιβεβαιώνεται πως και τα τρία είδη νανοσωματιδίων, τα AuNPs, τα Au@Pt NPs καθώς και εκείνα τα οποία είναι συνδεδεμένα με το παράγωγο της κινολίνης (Au@Pt@Q NPs) είναι βιοσυμβατά ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις. Προτείνονται, λοιπόν, ως υλικά, η χρήση των οποίων δεν προκαλεί κλινικές βλάβες, επιτρέποντάς τους να θεωρηθούν κατάλληλα ως συστήματα διάγνωσης και μεταφοράς φαρμάκου.

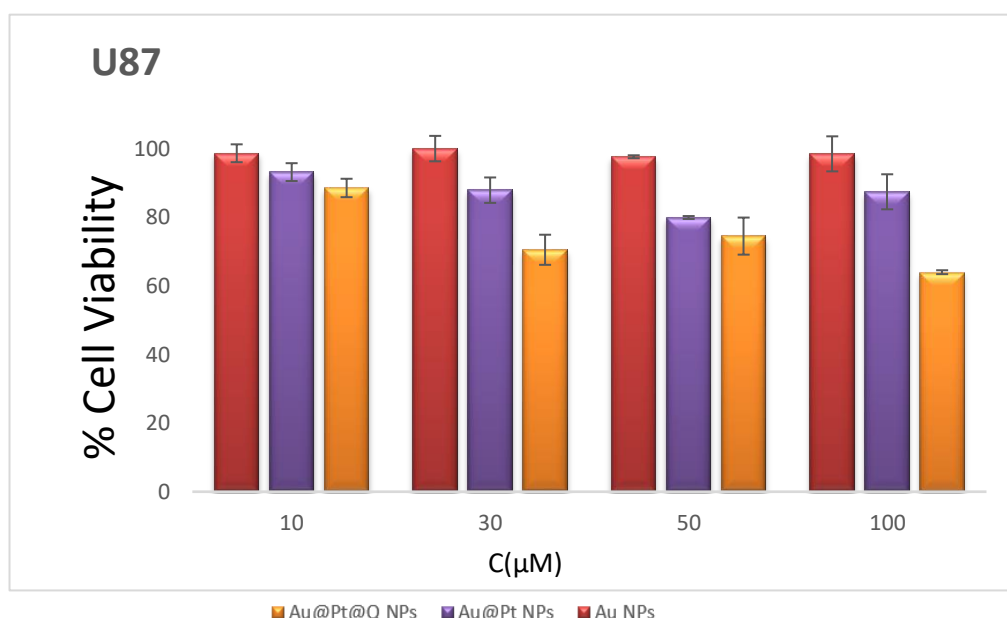
4.1.2 MTT αξιολόγηση

Για την βιολογική αξιολόγηση των νανοσωματιδίων αλλά και του συντιθέμενου οργανικού μορίου χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικές σειρές κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκε η υγιής σειρά HEK293 (υγιής σειρά εμβρυονικών κυττάρων ήπατος) και οι καρκινικές σειρές U87MG (wild type glioblastoma), D54 (wild type glioblastoma), και η U251 (mutant glioblastoma), και οι τρεις αυτές σειρές είναι γλοιοβλαστώματος επιθετικού καρκίνου του εγκεφάλου. Οι δύο πρώτες σειρές αποτελούν καρκινικές σειρές γλοιοβλαστώματος άγριου τύπου, που έχουν βρεθεί να είναι VEGFR-εξαρτώμενες, ενώ η τρίτη σειρά, η U251 έχει βρεθεί να είναι VEGFR-ανθεκτική. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) με επιπλέον πενικιλίνη/ στρεπτομυκίνη (100 U/ml πενικιλίνης και 100 $\mu\text{g/ml}$ στρεπτομυκίνης (PAA)) και 10% w/w ορό από έμβρυο μόσχου στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα CO₂ 5% ως εκθετικά αυξανόμενες μονοστιβάδες. Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής βιωσιμότητας όπως προαναφέρθηκε, χρησιμοποιείται το MTT ως χρωματομετρική μέθοδος.



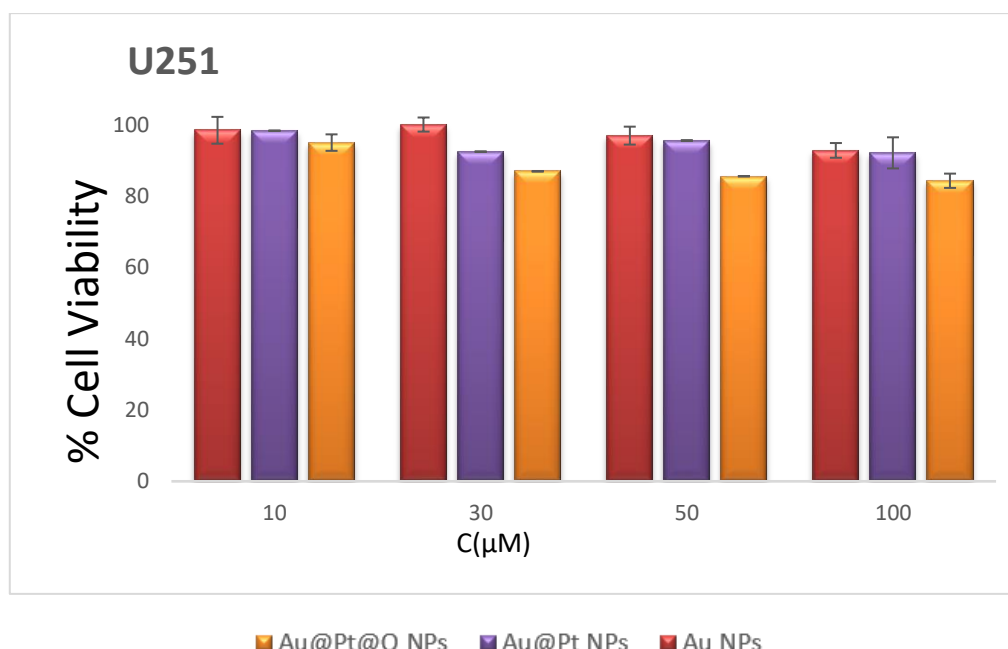
Γράφημα 4: Ποσοτική απεικόνιση % βιωσιμότητας των κυττάρων της κυτταρικής σειράς D54 (γλοιοβλάστωμα) έπειτα από επώαση τους με AuNPs, Au@PtNPs και των Au@Pt@Q NPs σε συνάρτηση της συγκέντρωσής τους (μM).

Στην πιο επιθετική μορφή του γλοιοβλαστώματος, από τις καρκινικές σειρές που μελετώνται, είναι προφανές, πως τα νανοσωματίδια χρυσού δεν παρουσιάζουν τοξικότητα σε αντίθεση με εκείνα που περιέχουν πλατίνα, και ιδιαίτερα τα νανοσωματίδια τα οποία είναι συνδεδεμένα με τον αναστολέα της τυροσινικής κινάσης.



Γράφημα 5: Ποσοτική απεικόνιση % βιωσιμότητας των κυττάρων της κυτταρικής σειράς U87MG(γλοιβλάστωμα) έπειτα από επώαση τους με AuNPs, Au@PtNPs και των Au@Pt@Q NPs σε συνάρτηση της συγκέντρωσής τους (μM).

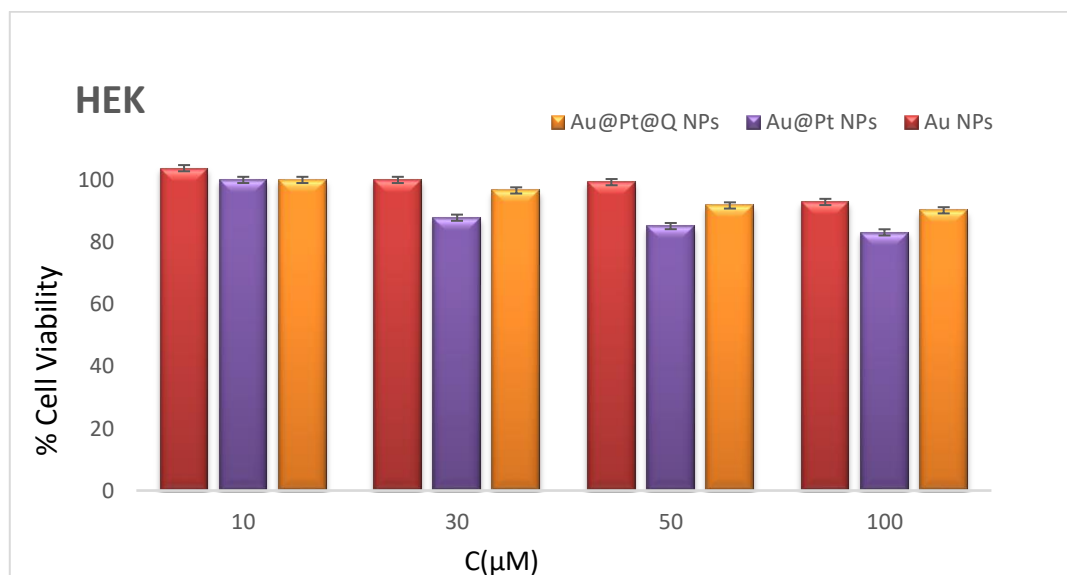
Στο παραπάνω γράφημα φαίνεται η βιωσιμότητα κυττάρων του γλοιοβλαστώματος U87MG σε ποσοστό %, μετά από επώαση τους με τα διαφορετικά νανοσωματίδια, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Είναι φανερό πως τα νανοσωματίδια χρυσού δεν παρουσιάζουν κάποια τοξικότητα, ενώ τα νανοσωματίδια που περιέχουν πλατίνα πιθανόν να έχουν προκαλέσει οξειδωτικό στρες στα κύτταρα. Επιπλέον, το παράγωγο της κιναζολίνης έχει δράσει ως αναστολέας της τυροσινικής κινάσης, μη επιτρέποντας στα κύτταρα να πολλαπλασιαστούν, μειώνοντας την βιωσιμότητά τους έως και 40% στην περίπτωση των 100 μM.



Γράφημα 6: Ποσοτική απεικόνιση βιωσιμότητας κυτταρικής σειράς U251 (γλοιοβλάστωμα) έπειτα από επώαση τους με AuNPs, Au@PtNPs και των Au@Pt@Q NPs σε συνάρτηση της συγκέντρωσής τους (μM)

Όπως προαναφέρθηκε, τα U251 αποτελούν σειρά κυτάρων γλοιοβλαστώματος, η οποία προέρχεται από PTEN-μετάλλαξη. [92] Το PTEN δρα ως γονίδιο καταστολής όγκου, δρώντας μέσω του προϊόντος της πρωτεϊνικής φωσφατάσης του. Αυτή η φωσφατάση εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, εμποδίζοντας τα κύτταρα να αναπτυχθούν και να υποδιαιρεθούν πολύ γρήγορα, και αποτελεί στόχο πολλών αντικαρκινικών φαρμάκων. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι φωσφατιδυλνινοσιτόλ-3,4,5-τριφωσφορική-3-φωσφατάση. Περιλαμβάνει περιοχή που μοιάζει με τενσίνη, καθώς και καταλυτική περιοχή, παρόμοια με εκείνη των τυροσινικών πρωτεϊνών φωσφατάσης. Σε αντίθεση με τις περισσότερες πρωτεϊνικές φωσφατάσεις τυροσίνης, αυτή η πρωτεΐνη αποφωσφορυλιώνει, κατά προτίμηση, τα υποστρώματα φωσφοϊνοσιτίδης. Επηρεάζει αρνητικά τα ενδοκυτταρικά επίπεδα 3,4,5-τριφωσφορικής φωσφατιδυλνινοσιτόλης στα κύτταρα, και λειτουργεί ως καταστολέας όγκου ρυθμίζοντας αρνητικά το μονοπάτι σηματοδότησης Akt / PKB.[93]

Η μετάλλαξη έχει καταστήσει τα U251 ανεξάρτητα του VEGFR. Από το διάγραμμα φαίνεται πως η βιωσιμότητά τους είναι μικρότερη όταν υπάρχει η κιναζολίνη, με το ποσοστό της τοξικότητας να φτάνει το 20% στα 100 μM .



Τέλος, παρουσιάζεται το γράφημα της κυτταρικής σειράς HEK293, η οποία είναι υγιής κυτταρική σειρά εμβρυονικών κυττάρων ήπατος, στην οποία δεν παρουσιάζεται τοξικότητα από το παράγωγο της κιναζολίνης. Ωστόσο, παρουσιάζεται κάποια τοξικότητα, λόγω της παρουσίας της πλατίνας πιθανόν λόγω της πρόκλησης οξειδωτικού στρες στα κύτταρα.

4.1.3 Μικροσκοπία Φθορισμού

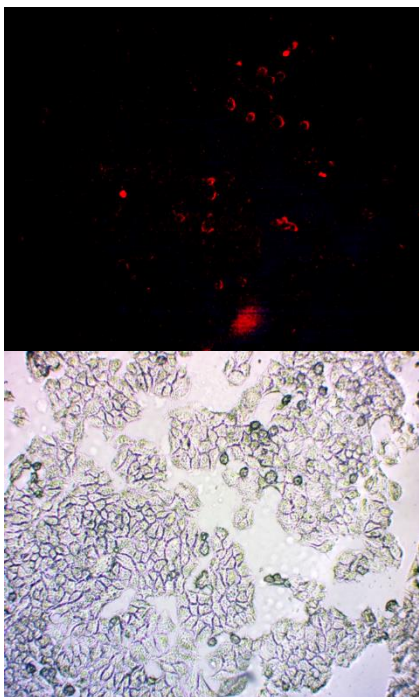
Για την μελέτη και την αξιολόγηση της ικανότητας εσωτερίκευσης των νανοσωματιδίων πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε πλακίδιο 6 πηγαδιών στο οποίο τοποθετήθηκαν κύτταρα τα οποία αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες για 24 ώρες και επωάστηκαν για 1 ώρα με συγκεντρώσεις 150 μM ως προς τον περιεχόμενο χρυσό για όλα τα είδη των νανοσωματιδίων. Για το παρακάτω πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω σειρές κυττάρων:

- MCF-7, καρκίνος του μαστού
- U-87MG, γλοιοβλάστωμα

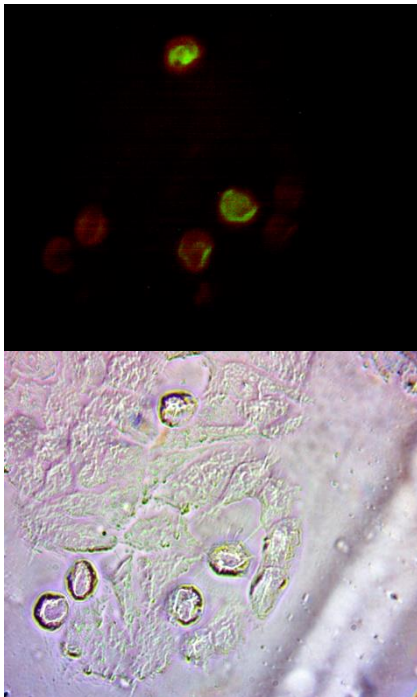
Έπειτα, πραγματοποιούνται εκπλύσεις με PBS (x3), ώστε να απομακρυνθούν σωματίδια που δεν έχουν εσωτερικευθεί στα κύτταρα. Στη συνέχεια, προστίθεται στο πλακίδιο των πηγαδιών που πραγματοποιείται η επώαση 4% φορμαλδεΰδη σε PBS για να πραγματοποιηθεί μονιμοποίηση των κυττάρων στην καλυπτρίδα. Η φορμαλδεΰδη αφήνεται για 20' και στην συνέχεια γίνονται ξανά εκπλύσεις με PBS (x3), ώστε να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα, τα οποία δεν έχουν μονιμοποιηθεί. Τέλος, η καλυπτρίδα τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα, ώστε να διευκολυνθεί η παρατήρηση του δείγματος κάτω από το μικροσκόπιο.

Παρατηρείται ότι τα νανοσωματίδια σε όλες τις περιπτώσεις εσωτερικεύονται στο κυτταρόπλασμα δίνοντας πληροφορίες σχετικά με την κατανομή τους στα διάφορα τμήματα του κυττάρου. Παρατηρείται ότι τα νανοσωματίδια χρυσού εσωτερικεύονται στο κυτταρόπλασμα δίνοντας πληροφορίες σχετικά με την κατανομή τους στα διάφορα τμήματα του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια αυτά εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται και από τον φθορισμό τους τόσο στο πράσινο, όσο και στο κόκκινο χρώμα. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία [94].

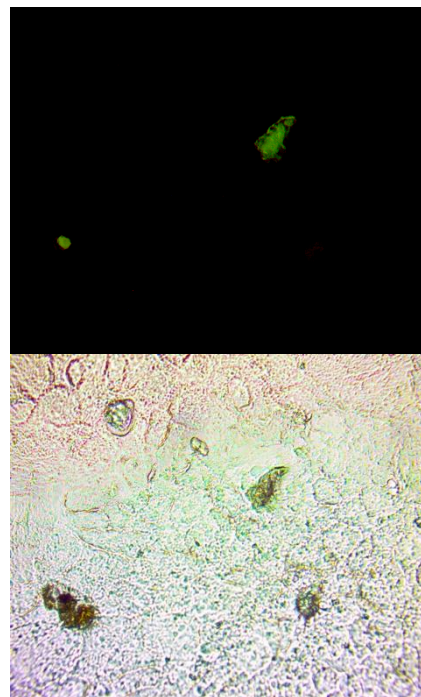
A)



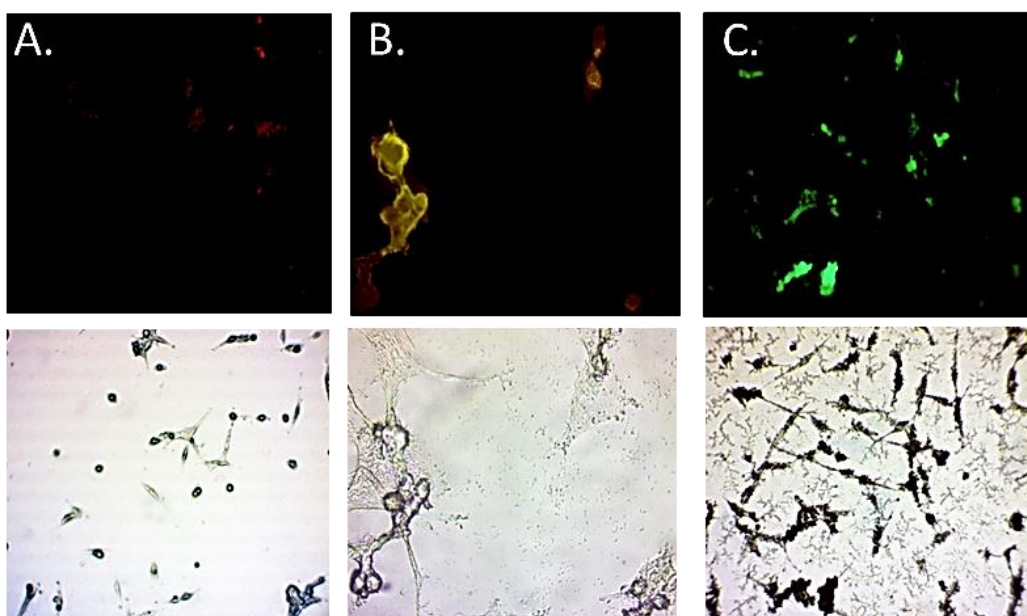
B)



Γ)



Εικόνα 37: Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού κυττάρων MCF-7 κύτταρα έπειτα απο επώαση A) με AuNPs B) με Au@PtNPs Γ) με Au@Pt@Q NPs στα MCF-7 κύτταρα



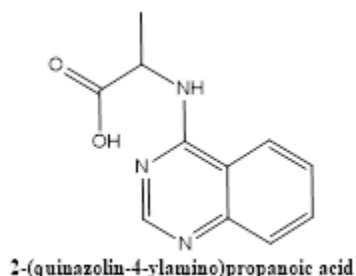
Εικόνα 38: Εικόνα από μικροσκόπιο Φθορισμού της κυτταρικής σειράς U87MG, έπειτα από επώαση A) Au@NPs B) Au@Pt NPs C) με Au@Pt@Q NPs

Όσον αφορά την βιολογική αξιολόγηση των νανοσωματιδίων στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος, παρατηρείται πως εσωτερικεύονται στο κύτταρο και παραμένουν στο κυτταρόπλασμα του. Η εικόνα αυτή είναι ίδια για όλα τα είδη των νανοσωματιδίων που έχουν συντεθεί για όλες τις κυτταρικές σειρές. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι ο εντοπισμός και η εσωτερίκευση των νανοσωματιδίων εμφανίζεται μεγαλύτερη και ο φθορισμός εντονότερος στα τροποποιημένα νανοσωματίδια με το παράγωγο της κιναζολίνης. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι τα συγκεκριμένα νανοσωματίδια είναι συνδεδεμένα με το οργανικό μόριο που «εντοπίζει» την τυροσινική κινάση. Συνεπώς, το ποσοστό εσωτερίκευσής τους στα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον VEGFR-2, είναι πολύ μεγαλύτερο σε σχέση με τα άλλα δυο είδη νανοσωματιδίων, αλλά και στην περίπτωση που αυτά επωάζονται σε μη-αγγειογενετικά καρκινικά κύτταρα (MCF-7).

4.2 Χαρακτηρισμός Οργανικού Μορίου

- 2-(quinazolin-4-ylamino) propanoic acid

Ο χαρακτηρισμός του οργανικού μορίου γίνεται με Φασματομετρία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

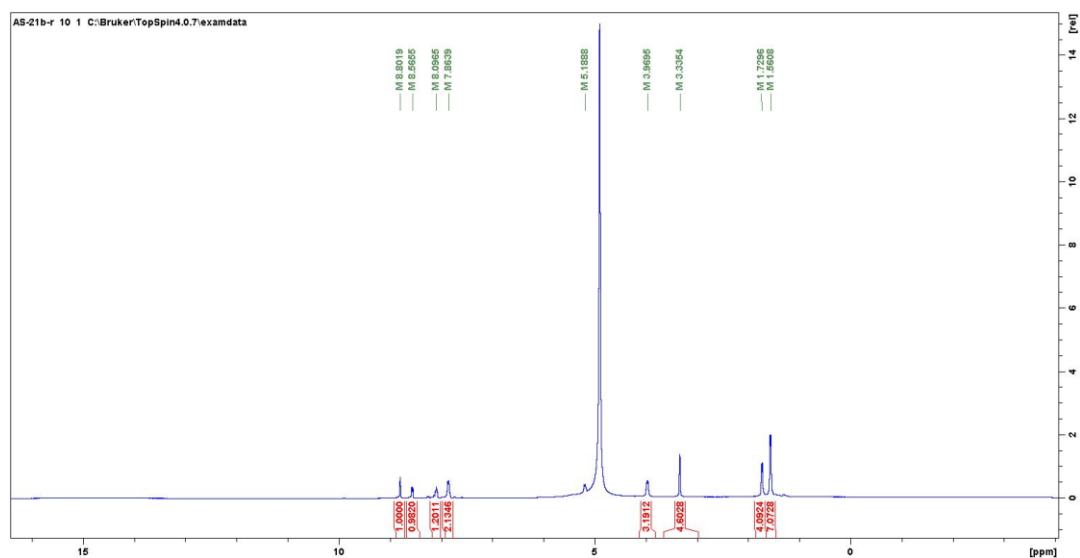


Εικόνα 39: Δομή 2-(quinazolin-4-ylamino) propanoic acid

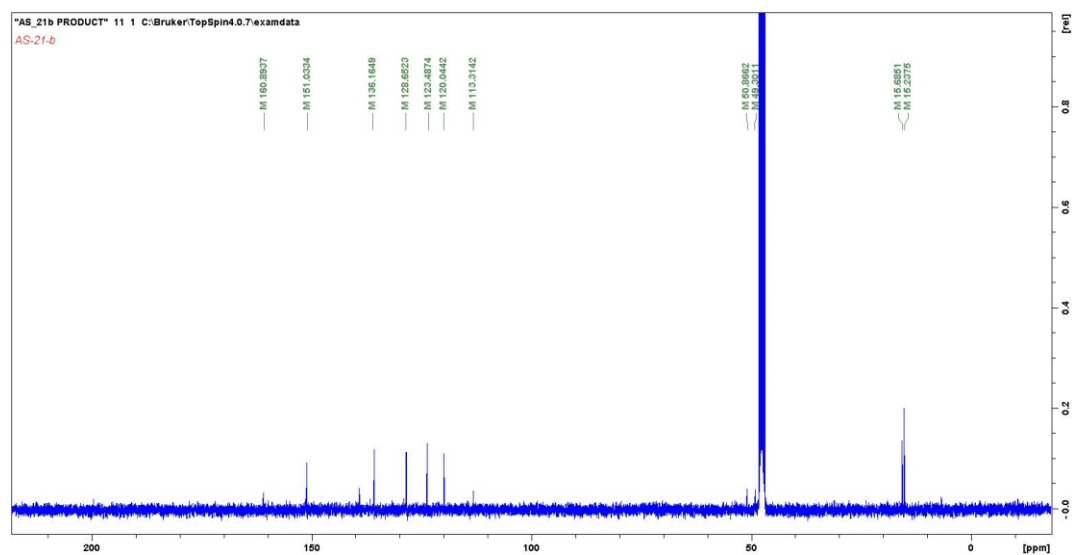
^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 3.9 (2H), δ 5.16 (1H), δ 7.83 (3H), δ 8.07 (1H), δ 8.53 (1H), δ 8.76 (1H)

^{13}C NMR (400 MHz, MeOD) δ 15.24, δ 15.69, δ 49.30, δ 50.87, δ 113.31, δ 120.04, δ 123.49, δ 136.16, δ 151.03, δ 160.89

Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα NMR, έπειτα από επεξεργασία με το πρόγραμμα TopSpin 4.0.7, όπου εμφανίζονται οι κορυφές για τα πρωτόνια και τους άνθρακες, μέσω των οποίων επιβεβαιώνεται πως έχει ληφθεί το επιθυμητό προϊόν.



Γράφημα 7: ^1H NMR Φάσμα του 2-(quinazolin-4-ylamino) propanoic acid



Γράφημα 8: ^{13}C NMR φάσμα του 2-(quinazolin-4-ylamino) propanoic acid

4.3 ΠΙΝΑΚΑΣ: Ορολογίας, Συντομογραφιών

Αγγλικός Όρος	Ελληνική Απόδοση
Germ layer	Βλαστικά στρώματα
Gastrulation process	Γαστρική διαδικασία
Vasculogenesis	Νεοαγγειογένεση
Intracellular	Ενδοκυτταρικά
Intercellular	Ενδοκυττάρια
Vacuoles	Κενοτόπια
Pillar cores	Πυλώνες ιστού
Thinning	Συστολή
Wound healing	Επούλωση πληγής
Collapsing/semaphoring	Κατάρρευση/σήμανση
Ligands	Συνδέτες
Meter	Μέτρο

Nanometre	Νανόμετρο
Micrometre	Μικρόμετρο
Picometer	Πικόμετρο
Field Emission Microscope	Μικροσκόπιο Εκπομπής Πεδίου
Scanning Tunnelling Microscope	Σαρωτικό Μικροσκόπιο Σήραγγας
Near Infrared Region	Περιοχή εγγύς υπέρυθρου
Ultraviolet	Υπεριώδες
X-Ray Computed Tomography	Υπολογιστική Τομογραφία Ακτινών-Χ
Magnetic Resonance Imaging	Μαγνητική Τομογραφία
Positron Emission Tomography	Τομογραφία Εκτομής Ποζιτρονίων
Single Photon Emission Computed Tomography	Τομογραφία Μονοφωτονικής Εκπομπής
Photoacoustic Tomography	Φωτοακουστική Τομογραφία

Gold Nanoparticles	Νανοσωματίδια Χρυσού
Gold Nanorods	Νανοράβδοι Χρυσού
Platinum Nanoparticles	Νανοσωματίδια Λευκόχρυσου
Gold coated Platinum Nanoparticles	Νανοσωματίδια Χρυσού επικαλυμμένα με Νανοσωματίδια Λευκόχρυσου
Platinum Group Metals	Ομάδα μετάλλων λευκόχρυσου
Platinum Group Elements	Ομάδα στοιχείων λευκόχρυσου
Surface Plasmon Resonance	Επιφανειακός Συντονισμός Πλασμονίων
Drug Delivery System	Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκου
In vitro	Σε δοκιμαστικό σωλήνα
In vivo	Σε ζωντανό οργανισμό
In situ	Επί τόπου/Απευθείας
Enhanced Retention and Permeability	Ενισχυμένη Συγκράτηση και Διαπερατότητα

Vascular Endothelial Growth Factor	Αγγειακός Ενδοθηλιακός Παράγοντας Ανάπτυξης
Vascular Endothelial Growth Factor Receptor	Υποδοχέας Αγγειακού Ενδοθηλιακού Παράγοντα Ανάπτυξης
Epidermal Growth Factor	Επιδερμικός Παράγοντας Ανάπτυξης
Epidermal Growth Factor Receptor	Υποδοχέας Επιδερμικού Παράγοντα Ανάπτυξης
Transforming Growth Factor	Παράγοντας Ανάπτυξης Μετασχηματισμού
Platelet-Derived Growth Factor	Αιμοπεταλιακός Αυξητικός Παράγοντας
Placenta Growth Factor	Αυξητικός Παράγοντας Πλακούντα
Fibroblast Growth Factor	Ινοβλαστικός Αυξητικός Παράγοντας
Tyrosine Kinase	Τυροσινική Κινάση
Tyrosine Kinase Inhibitors	Αναστολέας Τυροσινικής Κινάσης
Angiopoietin-1	Αγγειοποιητίνη-1

Stem cell antigen-1	Αντιγόνο βλαστικού κυττάρου-1
Cyclooxygenase	Κυκλοοξυγενάση
Interleukin-6	Ιντερλευκίνη-6
Auophilic Interactions	Χρυσοφιλικές Αλληλεπιδράσεις
Contrast Agent	Παράγοντας Αντίθεσης

Σύντμηση	Απόδοση
M	meter
Nm	nanometre
Mm	micrometre
kDa	kilodalton
FEM	Field Emission Microscope
STM	Scanning Tunnelling Microscope
NIR	Near Infrared Region
UV	Ultraviolet
X-Ray CT	X-Ray Computed Tomography
MRI	Magnetic Resonance Imaging
PET	Positron Emission Tomography
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
PT	Photoacoustic Tomography

NMR	Nuclear Magnetic Resonance
AuNPs	Gold Nanoparticles
AuNRs	Gold Nanorods
PtNPs	Platinum Nanoparticles
Au@PtNPs	Gold coated Platinum Nanoparticles
Au@Pt@Qd NPs	Gold coated Platinum Nanoparticles conjugated with the Quinazoline derivative
PGM	Platinum Group Metals
PGE	Platinum Group Elements
SPR	Surface Plasmon Resonance
DDG	Drug Delivery System
DNA	Deoxyribonucleic Acid
RNA	Ribonucleic Acid

EPR	Enhanced Retention and Permeability
PEG	Polyethylene Glycol
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
TGF	Transforming Growth Factor
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PlGF	Placenta Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
TK	Tyrosine Kinase
TKI	Tyrosine Kinase Inhibitors
Ang-1	Angiopoietin-1

Sca-1	Stem cell antigen-1
CD54	Cluster of Differentiation 54
COX	Cyclooxygenase
IL-6	Interleukin-6
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ΣΜΦ	Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκου
ΦΘΘ	Φωτοθερμική Θεραπεία
ΕΔΙ	Ενδοαγγειακές Δομές Ιστού

5.0 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η σύνθεση νανοδομών έγινε επιτυχώς, όπως αποδείχθηκε από τον δομικό και μορφολογικό τους χαρακτηρισμό. Σύμφωνα με την μελέτη που προηγήθηκε, τα νανοσωματίδια χρυσού είναι μη τοξικά και μπορούν να συνδυαστούν με τοξικούς για τον καρκίνο φορείς, για την διάγνωση αλλά και την θεραπεία του καρκίνου. Παράλληλα, από τα πειραματικά αποτελέσματα, εξήχθη το συμπέρασμα πως η συγκέντρωση καθώς και ο τρόπος σύνθεσης των νανοσωματιδίων μπορούν να αποδώσουν διαφορετικά αποτελέσματα (π.χ. νανοσωματίδια διαφορετικού μεγέθους, όπως στην προκειμένη περίπτωση). Στην προκειμένη περίπτωση από τις συνθέσεις που πραγματοποιήθηκαν, λήφθηκαν σφαιρικά, μονοδιεσπαρμένα νανοσωματίδια χρυσού. Τα νανοσωματίδια λευκόχρυσου επικάλυψαν τα νανοσωματίδια χρυσού σε μορφή κέλυφους στην εξωτερική επιφάνεια, δίνοντας, επίσης, μονοδιεσπαρμένα κολλοειδή διαλύματα. Επίσης, πραγματοποιήθηκε σύνθεση οργανικού μορίου, με βάση την κιναζολίνη, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως αναστολέας του επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGFR inhibitor), και κατ' επέκταση ως αντι-καρκινικός φορέας. Η δομή του χαρακτηρίστηκε με NMR, για να επιβεβαιωθεί ότι έχει γίνει λήψη του επιθυμητού προϊόντος. Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε μελέτη αιμόλυσης για όλα τα είδη των νανοσωματιδίων, για να ελεγχθεί αν τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκου είναι βιοσυμβατά. Επιπλέον, προσδιορίστηκε η κυττοτοξικότητα των ΣΜΦ σε υγιή κυτταρική σειρά και σε καρκινικές σειρές γλοιοβλαστώματος, σε δύο VEGFR-εξαρτώμενες και μια μη-VEGFR-εξαρτώμενη κυτταρική σειρά, τις U87MG, D54 και U251, αντίστοιχα. Μέσω της MTT διαδικασίας, έγινε φανερό πως τα κύτταρα εμφανίζουν υψηλή ζωτικότητα όταν επωαστούν με νανοσωματίδια χρυσού, ενώ παρουσιάζουν μικρή τοξικότητα στην περίπτωση που τα νανοσωματίδια χρυσού έχουν επικαλυφθεί με νανοσωματίδια λευκόχρυσου, πιθανόν λόγω της πρόκλησης οξειδωτικού στρες. Στην περίπτωση που αυτά έχουν συνδεθεί με το παράγωγο της κιναζολίνης, τα αποτελέσματα της αξιολόγησης MTT έδωσαν εμφανή αποτελέσματα δραστικού αναστολέα της τυροσινικής κινάσης. Όσον αφορά την βιολογική αξιολόγηση που πραγματοποιήθηκε, στην μικροσκοπία

φθορισμού, τα κύτταρα τα οποία έχουν επωαστεί με Au@Pt@Q NPs, αύξησαν σημαντικά τον φθορισμό τους στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν στην καρκινική σειρά γλοιοβλαστώματος, λόγω του μεγαλύτερου ποσοστού εσωτερίκευσης. Κλείνοντας, αξίζει να σημειωθεί πως δομές που σχηματίστηκαν εμφανίζουν επίσης ιδιαιτερότητες, και ο επανασχεδιασμός και βελτιστοποίηση των χαρακτηριστικών τους θα μπορούσε να έχει μεγαλύτερο ακόμα βιολογικό ενδιαφέρον, και σε κάθε περίπτωση, οι δομές αυτές χρήζουν περεταίρω βιολογικής αξιολόγησης *in vitro* και *in vivo*.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Freestone I., Meeks N., Sax M. and Higgitt C., *The Lycurgus cup—a roman nanotechnology*. Gold bulletin, 2007. **40**(4): p. 270-277.
2. Faraday M., LIX. *Experimental relations of gold (and other metals) to light.—The bakerian lecture*. The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, 1857. **14**(96): p. 512-539.
3. Junk A. and Riess F., *From an idea to a vision: There's plenty of room at the bottom*. American Journal of Physics, 2006. **74**(9): p. 825-830.
4. Taniguchi N., ARAKAWA C. and KOBAYASHI T. *On the basic concept of 'nano-technology'*. in *Proceedings of the International Conference on Production Engineering, 1974-8*. 1974. 一般社団法人日本機械学会.
5. Drexler K.E., *Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1981. **78**(9): p. 5275-5278.
6. Sobolev K. and Gutiérrez M.F., *How nanotechnology can change the concrete world*. American Ceramic Society Bulletin, 2005. **84**(10): p. 14.
7. Zhang L., Gu F., Chan J., Wang A., Langer R. and Farokhzad O., *Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments*. Clinical pharmacology & therapeutics, 2008. **83**(5): p. 761-769.
8. Katsarou M.E., Efthimiadou E.K., Psomas G., Karaliota A. and Vourloumis D., *Novel copper (II) complex of N-propyl-norfloxacin and 1, 10-phenanthroline with enhanced antileukemic and DNA nuclease activities*. Journal of medicinal chemistry, 2008. **51**(3): p. 470-478.
9. Efthimiadou E.K., Karaliota A. and Psomas G., *Metal complexes of the third-generation quinolone antimicrobial drug sparfloxacin: Structure and biological evaluation*. Journal of inorganic biochemistry, 2010. **104**(4): p. 455-466.

10. Arayne S., Sultana N., Haroon U. and Mesaik M.A., *Synthesis, characterization, antibacterial and anti-inflammatory activities of enoxacin metal complexes*. Bioinorganic chemistry and applications, 2009. **2009**.
11. Chatzipavlidis A., Bilalis P., Efthimiadou E., Boukos N. and Kordas G., *Sacrificial template-directed fabrication of superparamagnetic polymer microcontainers for pH-activated controlled release of daunorubicin*. Langmuir, 2011. **27**(13): p. 8478-8485.
12. Efthimiadou E., Tapeinos C., Bilalis P. and Kordas G., *New approach in synthesis, characterization and release study of pH-sensitive polymeric micelles, based on PLA-Lys-b-PEGm, conjugated with doxorubicin*. Journal of Nanoparticle Research, 2011. **13**(12): p. 6725-6736.
13. Tsiapa I., Efthimiadou E.K., Fragogeorgi E., Loudos G., Varvarigou A.D., Bouziotis P., Kordas G.C., Mihailidis D., Nikiforidis G.C. and Xanthopoulos S., *^{99m}Tc-labeled aminosilane-coated iron oxide nanoparticles for molecular imaging of $\alpha\beta 3$ -mediated tumor expression and feasibility for hyperthermia treatment*. Journal of colloid and interface science, 2014. **433**: p. 163-175.
14. Bilalis P., Chatzipavlidis A., Tziveleka L.-A., Boukos N. and Kordas G., *Nanodesigned magnetic polymer containers for dual stimuli actuated drug controlled release and magnetic hyperthermia mediation*. Journal of materials chemistry, 2012. **22**(27): p. 13451-13454.
15. Bernardos A., Aznar E., Marcos M.D., Martínez-Máñez R., Sancenón F., Soto J., Barat J.M. and Amorós P., *Enzyme-responsive controlled release using mesoporous silica supports capped with lactose*. Angewandte Chemie, 2009. **121**(32): p. 5998-6001.
16. Bazile D., Prud'homme C., Bassoullet M.T., Marlard M., Spenlehauer G. and Veillard M., *Stealth Me. PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system*. Journal of pharmaceutical sciences, 1995. **84**(4): p. 493-498.

17. Gielen M. and Tiekink E.R., *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine*. 2005: John Wiley & Sons.
18. Bond G.C., *Introduction to the physical and chemical properties of gold*. Gold Nanoparticles for Physics, Chemistry and Biology, Imperial College Press, London, 2012: p. 29-42.
19. Shaw C.F., *Gold-based therapeutic agents*. Chemical reviews, 1999. **99**(9): p. 2589-2600.
20. Yu Y.-Y., Chang S.-S., Lee C.-L. and Wang C.C., *Gold nanorods: electrochemical synthesis and optical properties*. The Journal of Physical Chemistry B, 1997. **101**(34): p. 6661-6664.
21. Yuan F., Chen H., Xu J., Zhang Y., Wu Y. and Wang L., *Aptamer-based luminescence energy transfer from near-infrared-to-near-infrared upconverting nanoparticles to gold nanorods and its application for the detection of thrombin*. Chemistry—A European Journal, 2014. **20**(10): p. 2888-2894.
22. Almeida J.P.M., Figueroa E.R. and Drezek R.A., *Gold nanoparticle mediated cancer immunotherapy*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2014. **10**(3): p. 503-514.
23. Coelho S.C., Almeida G.M., Pereira M.C., Santos-Silva F. and Coelho M.A., *Functionalized gold nanoparticles improve afatinib delivery into cancer cells*. Expert opinion on drug delivery, 2016. **13**(1): p. 133-141.
24. Connor E.E., Mwamuka J., Gole A., Murphy C.J. and Wyatt M.D., *Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity*. Small, 2005. **1**(3): p. 325-327.
25. Voliani V., *Update on gold nanoparticles*. 2013: Smithers Rapra.
26. Narang J., Malhotra N., Singh G. and Pundir C., *Electrochemical impedimetric detection of anti-HIV drug taking gold nanorods as a sensing interface*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **66**: p. 332-337.

27. Mishra P., Ray S., Sinha S., Das B., Khan M.I., Behera S.K., Yun S.-I., Tripathy S.K. and Mishra A., *Facile bio-synthesis of gold nanoparticles by using extract of Hibiscus sabdariffa and evaluation of its cytotoxicity against U87 glioblastoma cells under hyperglycemic condition*. Biochemical engineering journal, 2016. **105**: p. 264-272.
28. Choi M.-R., Stanton-Maxey K.J., Stanley J.K., Levin C.S., Bardhan R., Akin D., Badve S., Sturgis J., Robinson J.P. and Bashir R., *A cellular Trojan Horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors*. Nano letters, 2007. **7**(12): p. 3759-3765.
29. Huang X., Jain P.K., El-Sayed I.H. and El-Sayed M.A., *Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles*. Lasers in medical science, 2008. **23**(3): p. 217.
30. Huff T.B., Tong L., Zhao Y., Hansen M.N., Cheng J.-X. and Wei A., *Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells*. 2007.
31. Manjunath H.M., Joshi C.G. and Raju N.G., *Biofabrication of gold nanoparticles using marine endophytic fungus–Penicillium citrinum*. IET nanobiotechnology, 2016. **11**(1): p. 40-44.
32. Mendes R., Pedrosa P., Lima J.C., Fernandes A.R. and Baptista P.V., *Photothermal enhancement of chemotherapy in breast cancer by visible irradiation of Gold Nanoparticles*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 10872.
33. Pedrosa P., Heuer-Jungemann A., Kanaras A.G., Fernandes A.R. and Baptista P.V., *Potentiating angiogenesis arrest in vivo via laser irradiation of peptide functionalised gold nanoparticles*. Journal of nanobiotechnology, 2017. **15**(1): p. 85.
34. Martins P., Rosa D., R Fernandes A. and Baptista P.V., *Nanoparticle drug delivery systems: recent patents and applications in nanomedicine*. Recent Patents on Nanomedicine, 2013. **3**(2): p. 105-118.

35. Cho E.C., Xie J., Wurm P.A. and Xia Y., *Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I2/KI etchant*. Nano letters, 2009. **9**(3): p. 1080-1084.
36. Jiang W., Kim B.Y., Rutka J.T. and Chan W.C., *Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent*. Nature nanotechnology, 2008. **3**(3): p. 145.
37. Conde J., Tian F., de la Fuente J.M. and Baptista P.V., *Cancer Nanotheranostics: What Have We Learned So Far?* Frontiers in chemistry, 2016. **3**: p. 71.
38. Wang Y., Black K.C., Luehmann H., Li W., Zhang Y., Cai X., Wan D., Liu S.-Y., Li M. and Kim P., *Comparison study of gold nanohexapods, nanorods, and nanocages for photothermal cancer treatment*. ACS nano, 2013. **7**(3): p. 2068-2077.
39. Luo P., Liu Y., Xia Y., Xu H. and Xie G., *Aptamer biosensor for sensitive detection of toxin A of Clostridium difficile using gold nanoparticles synthesized by Bacillus stearothermophilus*. Biosensors and Bioelectronics, 2014. **54**: p. 217-221.
40. Love A.J., Makarov V.V., Sinitsyna O.V., Shaw J., Yaminsky I.V., Kalinina N.O. and Taliany M., *A genetically modified tobacco mosaic virus that can produce gold nanoparticles from a metal salt precursor*. Frontiers in plant science, 2015. **6**: p. 984.
41. Wang F., Wang Y.-C., Dou S., Xiong M.-H., Sun T.-M. and Wang J., *Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells*. ACS nano, 2011. **5**(5): p. 3679-3692.
42. Brown S.D., Nativo P., Smith J.-A., Stirling D., Edwards P.R., Venugopal B., Flint D.J., Plumb J.A., Graham D. and Wheate N.J., *Gold nanoparticles for*

the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(13): p. 4678-4684.

43. Duncan B., Kim C. and Rotello V.M., *Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems.* Journal of Controlled Release, 2010. **148**(1): p. 122-127.

44. Ruoslahti E., Bhatia S.N. and Sailor M.J., *Targeting of drugs and nanoparticles to tumors.* The Journal of cell biology, 2010. **188**(6): p. 759-768.

45. Asadishad B., Vossoughi M. and Alemzadeh I., *Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin using polyethylene glycol-functionalized gold nanoparticles.* Industrial & engineering chemistry research, 2010. **49**(4): p. 1958-1963.

46. Fernandes A.R., Jesus J., Martins P., Figueiredo S., Rosa D., Martins L.M., Corvo M.L., Carvalheiro M.C., Costa P.M. and Baptista P.V., *Multifunctional gold-nanoparticles: A nanovectorization tool for the targeted delivery of novel chemotherapeutic agents.* Journal of controlled release, 2017. **245**: p. 52-61.

47. Patra C.R., Bhattacharya R., Mukhopadhyay D. and Mukherjee P., *Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer.* Advanced drug delivery reviews, 2010. **62**(3): p. 346-361.

48. Huang X., Zhao Z., Fan J., Tan Y. and Zheng N., *Amine-assisted synthesis of concave polyhedral platinum nanocrystals having {411} high-index facets.* Journal of the American chemical Society, 2011. **133**(13): p. 4718-4721.

49. Miyake M. and Miyabayashi K., *Shape and size controlled Pt nanocrystals as novel model catalysts.* Catalysis Surveys from Asia, 2012. **16**(1): p. 1-13.

50. Li Y. and Somorjai G.A., *Nanoscale advances in catalysis and energy applications.* Nano letters, 2010. **10**(7): p. 2289-2295.

51. Kuhn J.N., Tsung C.-K., Huang W. and Somorjai G.A., *Effect of organic capping layers over monodisperse platinum nanoparticles upon activity for ethylene hydrogenation and carbon monoxide oxidation*. Journal of Catalysis, 2009. **265**(2): p. 209-215.
52. Moglianetti M., De Luca E., Pedone D., Marotta R., Catelani T., Sartori B., Amenitsch H., Retta S.F. and Pompa P.P., *Platinum nanozymes recover cellular ROS homeostasis in an oxidative stress-mediated disease model*. Nanoscale, 2016. **8**(6): p. 3739-3752.
53. Hosaka H., Haruki R., Yamada K., Böttcher C. and Komatsu T., *Hemoglobin–albumin cluster incorporating a Pt nanoparticle: artificial O₂ carrier with antioxidant activities*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110541.
54. Pelka J., Gehrke H., Esselen M., Türk M., Crone M., Bräse S., Muller T., Blank H., Send W. and Zibat V., *Cellular uptake of platinum nanoparticles in human colon carcinoma cells and their impact on cellular redox systems and DNA integrity*. Chemical research in toxicology, 2009. **22**(4): p. 649-659.
55. Stepanov A., Golubev A., Nikitin S. and Osin Y., *A review on the fabrication and properties of platinum nanoparticles*. Rev. Adv. Mater. Sci, 2014. **38**(2): p. 160-175.
56. Patan S., *Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling*. Journal of neuro-oncology, 2000. **50**(1-2): p. 1-15.
57. Chetty S., Choi K. and Sumanas S., *Vasculogenesis in Development*. 2014.
58. Kolte D., McClung J.A. and Aronow W.S., *Vasculogenesis and angiogenesis*, in *Translational Research in Coronary Artery Disease*. 2016, Elsevier. p. 49-65.

59. Risau W., *Mechanisms of angiogenesis*. nature, 1997. **386**(6626): p. 671.
60. Risau W. and Flamme I., *Vasculogenesis*. Annual review of cell and developmental biology, 1995. **11**(1): p. 73-91.
61. Papetti M. and Herman I.M., *Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2002. **282**(5): p. C947-C970.
62. Demir R., Seval Y. and Huppertz B., *Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta*. Acta histochemica, 2007. **109**(4): p. 257-265.
63. Papadopoulos N. and Lennartsson J., *The PDGF/PDGFR pathway as a drug target*. Molecular aspects of medicine, 2018. **62**: p. 75-88.
64. Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Ferraro M.G., Aprelikova O., Alitalo K., Del S.V., Lei K., Chou J.Y. and Persico M., *Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14*. Oncogene, 1993. **8**(4): p. 925-931.
65. van Meurs M., Kümpers P., Ligtenberg J.J., Meertens J.H., Molema G. and Zijlstra J.G., *Bench-to-bedside review: angiopoietin signalling in critical illness—a future target?* Critical care, 2009. **13**(2): p. 207.
66. Presta M., Dell'Era P., Mitola S., Moroni E., Ronca R. and Rusnati M., *Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis*. Cytokine & growth factor reviews, 2005. **16**(2): p. 159-178.
67. Jeong J.H., Jang H.J., Kwak S., Sung G.J., Park S.H., Song J.H., Kim H., Na Y. and Choi K.C., *Novel TGF- β 1 inhibitor antagonizes TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in human A549 lung cancer cells*. Journal of cellular biochemistry, 2019. **120**(1): p. 977-987.
68. Brooks P.C., Clark R.A. and Cheresh D.A., *Requirement of vascular integrin α v β 3 for angiogenesis*. Science, 1994. **264**(5158): p. 569-571.

69. Folkman J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. New england journal of medicine, 1971. **285**(21): p. 1182-1186.
70. Asahara T., Kalka C. and Isner J., *Stem cell therapy and gene transfer for regeneration*. Gene therapy, 2000. **7**(6): p. 451.
71. Stylianopoulos T., *EPR-effect: utilizing size-dependent nanoparticle delivery to solid tumors*. Therapeutic delivery, 2013. **4**(4): p. 421-423.
72. Maeda H., Nakamura H. and Fang J., *The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo*. Advanced drug delivery reviews, 2013. **65**(1): p. 71-79.
73. Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y. and Hori K., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*. Journal of controlled release, 2000. **65**(1-2): p. 271-284.
74. Torchilin V., *Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect*. Advanced drug delivery reviews, 2011. **63**(3): p. 131-135.
75. Selvam T.P. and Kumar P.V., *Quinazoline marketed drugs*. Research in Pharmacy, 2011. **1**(1).
76. Jentoft F.C., *Ultraviolet–visible–near infrared spectroscopy in catalysis: theory, experiment, analysis, and application under reaction conditions*. Advances in catalysis, 2009. **52**: p. 129-211.
77. Petryayeva E. and Krull U.J., *Localized surface plasmon resonance: nanostructures, bioassays and biosensing--a review*. Anal Chim Acta, 2011. **706**(1): p. 8-24.
78. Huang X. and El-Sayed M.A., *Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy*. Journal of Advanced Research, 2010. **1**(1): p. 13-28.

79. Lakowicz J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2013: Springer Science & Business Media.
80. Brown W., *Dynamic light scattering: the method and some applications*. Vol. 313. 1993: Clarendon Press Oxford.
81. Herrera J.E. and Sakulchaicharoen N., *14 Microscopic and Spectroscopic Characterization of Nanoparticles*. Drug delivery nanoparticles formulation and characterization, 2016. **191**: p. 239.
82. Reimer L., *Transmission electron microscopy: physics of image formation and microanalysis*. Vol. 36. 2013: Springer.
83. Rugar D. and Hansma P., *Atomic force microscopy*. Physics today, 1990. **43**(10): p. 23-30.
84. Mosmann T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. Journal of immunological methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
85. Low A. and Bansal V., *A visual tutorial on the synthesis of gold nanoparticles*. Biomedical imaging and intervention journal, 2010. **6**(1): p. e9.
86. de Castro Barbosa M.L., Lima L.M., Tesch R., Sant'Anna C.M.R., Totzke F., Kubbutat M.H., Schächtele C., Laufer S.A. and Barreiro E.J., *Novel 2-chloro-4-anilino-quinazoline derivatives as EGFR and VEGFR-2 dual inhibitors*. European journal of medicinal chemistry, 2014. **71**: p. 1-14.
87. Theodosiou M., Boukos N., Sakellis E., Zachariadis M. and Efthimiadou E.K., *Gold nanoparticle decorated pH-sensitive polymeric nanocontainers as a potential theranostic agent*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2019. **183**: p. 110420.
88. He H., Xie C. and Ren J., *Nonbleaching fluorescence of gold nanoparticles and its applications in cancer cell imaging*. Analytical chemistry, 2008. **80**(15): p. 5951-5957.

89. Maguire C.M., Rösslein M., Wick P. and Prina-Mello A., *Characterisation of particles in solution—a perspective on light scattering and comparative technologies*. Science and technology of advanced materials, 2018. **19**(1): p. 732-745.
90. Tanaka S.I., Miyazaki J., Tiwari D.K., Jin T. and Inouye Y., *Fluorescent platinum nanoclusters: synthesis, purification, characterization, and application to bioimaging*. Angewandte Chemie International Edition, 2011. **50**(2): p. 431-435.
91. Zheng J., Nicovich P.R. and Dickson R.M., *Highly fluorescent noble-metal quantum dots*. Annu. Rev. Phys. Chem., 2007. **58**: p. 409-431.
92. Ren Y., Zhou X., Mei M., Yuan X.-B., Han L., Wang G.-X., Jia Z.-F., Xu P., Pu P.-Y. and Kang C.-S., *MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells U251 (PTEN-mutant) and LN229 (PTEN-wild type) to taxol*. BMC cancer, 2010. **10**(1): p. 27.
93. Maehama T. and Dixon J.E., *PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase*. Trends in cell biology, 1999. **9**(4): p. 125-128.
94. Nam J., Won N., Bang J., Jin H., Park J., Jung S., Jung S., Park Y. and Kim S., *Surface engineering of inorganic nanoparticles for imaging and therapy*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(5): p. 622-48.

