



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Σύνθεση πολυμερικών νανοσφαιριδίων για μεταφορά
του αντικαρκινικού φαρμάκου δαουνορουβικίνη**

**ΚΟΥΤΣΙΚΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2016

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση πολυμερικών νανοσφαιριδίων για μεταφορά του αντικαρκινικού
φαρμάκου δαουνορουβικίνη

ΚΟΥΤΣΙΚΟΥ ΘΕΟΔΩΡΑ

A.M.:141012

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Σακελλαρίου Γεώργιος, Επ. Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Γεώργιος Σακελλαρίου, Επ. Καθηγητής ΕΚΠΑ**
- 2. Γεώργιος Κόρδας, Ερευνητής Α' Δημόκριτος**
- 3. Ερμόλαος Ιατρού, Καθηγητής ΕΚΠΑ**

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 14/10/2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων με βάση τα πολυμερή, έχουν αποτελέσει το επίκεντρο σημαντικών ερευνών για τη θεραπεία του καρκίνου. Η εφαρμογή των «έξυπνων» πολυμερών, τα οποία ανταποκρίνονται σε αλλαγές του περιβάλλοντος τους, είναι αρκετά διαδεδομένη και υπάρχουν πολλές μελέτες που έχουν αναφερθεί για τη χρήση τους ως βιοσυμβατά νανοσωματίδια-μεταφορείς εκλεκτικής στόχευσης καρκινικών κυττάρων.

Μέχρι τώρα τα συμβατικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα λόγω της μη επιλεκτικής στόχευσης, κατέστρεφαν τα καρκινικά κύτταρα, αλλά κατέστρεφαν επίσης και μεγάλο ποσοστό υγιών κυττάρων. Το πρόβλημα αυτό, της κυτταροτοξικότητας, μπορεί να λυθεί αποτελεσματικά με την εφαρμογή των «έξυπνων» πολυμερικών συστημάτων, η οποία είναι μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος για την στοχευόμενη θεραπεία πολλών ειδών καρκίνου, καθώς οι παρενέργειες ελαχιστοποιούνται έως και μηδενίζονται.

Στην εργασία αυτή, παρουσιάζεται η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός κοίλων νανοδοχείων (NCs), με διαφορετικές ευαισθησίες, ως εν δυνάμει συστήματα μεταφοράς φαρμάκων για τη θεραπεία του καρκίνου. Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της εργασίας όσον αφορά την συνθετική διαδικασία, είναι το εσωτερικό των σφαιρών που διαμορφώθηκε κατά την διάρκεια του σχηματισμού του κελύφους, επιτρέποντας στα μικρά μόρια, βιολογικού ενδιαφέροντος, να φιλοξενηθούν και να αποδεσμεύσουν το φάρμακο στην περιοχή του όγκου. Τα συντιθέμενα νανοδοχεία έχουν μέση διάμετρο περίπου 300 nm και αποκρίνονται σε αλλαγές pH, θερμοκρασίας και οξειδοαναγωγικού δυναμικού. Η συμπεριφορά αποδέσμευσης του ενθυλακωμένου φαρμάκου στα νανοδοχεία, υπό φυσιολογικές και όξινες συνθήκες σε δύο θερμοκρασίες, επιβεβαιώνει την ευαισθησία του νανοδοχείου (NC).

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Βιοσυμβατά, Εκλεκτική στόχευση, Καρκινικά κύτταρα, Κυτταροτοξικότητα, Συνεργιστικό φαινόμενο, pH, Θερμοκρασία, Οξειδοαναγωγικό δυναμικό

ABSTRACT

The drug delivery systems based on polymers have attracted the main interest of considerable research for cancer therapy. The application of "smart" polymers, which respond into changes in their environment, it is widespread and there are many studies that have been reported for use as biocompatible nano-carriers selectively targeting cancer cells.

Until now the conventional chemotherapeutic drugs due to non-specific targeting, destroy the cancerous cells, but also destroy a large proportion of healthy cells. This problem, cytotoxicity, solved effectively the implementation of "smart" polymers which is a promising method for the targeted treatment of many types of cancer, and the side effects minimized up to zero.

In this report, we have synthesized and characterized hollow NCs with different sensitivities, as potential drug delivery systems for cancer treatment. The main advantage of this work as it concerns the synthetic procedure is the inner cavity that is formed during the shell formation, allowing small molecules of biological interest to be hosted and the synergistic behavior of the drug release in the tumor area. The fabricated NCs have an average diameter of about 300 nm and are responsive to pH, temperature and redox alterations. The release behavior of the loaded NCs under physiological and acidic conditions, in two temperatures, confirms the NC's sensitivity.

SUBJECT AREA: Drug Delivery Systems

KEYWORDS: Biocompatible, Selective targeting, Tumor cells, Cytotoxicity, Synergistic effect, pH, temperature, redox potential

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της εργασίας, οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Καθηγητή Μ.Πιτσικάλη καθώς και τον επιβλέποντα μου Επ. Καθηγητή Γ. Σακελλαρίου, για την ευκαιρία την οποία μου πρόσφεραν να συμμετάσχω στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Επιστήμη Πολυμερών και Εφαρμογές στη Βιομηχανία». Επίσης ευχαριστώ τον Καθηγητή Ε.Ιατρού και τους υπόλοιπους καθηγητές του Ε.Κ.Π.Α. για τη συμβολή τους στην αποκόμιση των γνώσεων μου στα πλαίσια των μαθημάτων.

Επιπλέον είμαι ευγνώμων στον Ερευνητή Α Κόρδα Γεώργιο, για τη συνεχή του στήριξη καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριο του στον Δημόκριτο. Ευχαριστώ επίσης την ομάδα του και πιο συγκεκριμένα τη Διδάκτορα Κ.Μεταξά για την πολύτιμη βοήθεια της όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος θα ήθελα να πω το πιο μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Ε.Ευθυμιάδου που με καθοδηγούσε αυτά τα χρόνια και με συμβούλευε πάντα. Η βοήθεια της ήταν παραπάνω από σημαντική, τόσο για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, όσο και για την εξέλιξη μου σε έναν καλύτερο επιστήμονα. Όλα αυτά δε θα ήταν εφικτά χωρίς την συνεργασία στον σχεδιασμό και την εκτέλεση των πειραμάτων, την συμπαράσταση και τη πολύτιμη βοήθεια της σε όλα τα στάδια εκτέλεσης και συγγραφής της εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	12
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	13
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
1.1 Πολυμερή	13
1.2 Σύνθετα υλικά με μήτρα κάποιο πολυμερές.....	17
1.3 Νανοσύνθετα.....	17
1.3.1 Ιδιότητες.....	18
1.3.2 Εγκλείσματα των Νανοσυνθέτων	18
1.3.3 Παρασκευή Τεχνική Λύματος-Πηκτής (Sol – Gel).....	19
1.4 «Έξυπνα Πολυμερή»	20
1.5 Ριζικός πολυμερισμός.....	21
1.5.1 Μηχανισμός Ριζικού Αλυσιδωτού Πολυμερισμού	22
1.5.2 Αλλυλικός Ριζικός Πολυμερισμός.....	24
1.5.3 Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά-Κινητική του Ριζικού Πολυμερισμού.....	26
1.5.4 Κινητική Ριζικού Πολυμερισμού	27
1.5.5 Ριζικός Πολυμερισμός για τη Σύνθεση Συμπολυμερών	29
1.6 Πολυμερή ευαίσθητα στη θερμοκρασία	30
1.7 Πολυμερή ευαίσθητα στο pH	31
1.8 Πολυμερή ευαίσθητα στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό.....	33
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	34
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ-ΙΑΤΡΙΚΗ	34
2.1 Διαγνωστική Ιατρική	35
2.1.1 <i>In vitro</i> διάγνωση	35
2.1.2 <i>In vivo</i> διάγνωση.....	37
2.1.3 Ιατρικές συσκευές.....	37
2.2 Ελεγχόμενη Αποδέσμευση Φαρμάκων.....	38
2.2.1 Φορείς Φαρμάκων.....	39
2.2.2 Συσκευές αποδέσμευσης φαρμάκων	43
2.2.3 Αντικαρκινικά φάρμακα υψηλής τοξικότητας- Ανθρακυκλίνες.....	44

2.2.4	Μελλοντικές προκλήσεις	45
2.3	Αναγεννητική ιατρική.....	46
2.3.1	Έξυπνα βιοϋλικά	47
2.3.2	Μόρια με βιοενεργή δράση	48
2.3.3	Κυτταροθεραπείες.....	48
3.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	49
	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	49
	ΤΕΧΝΙΚΕΣ-ΜΕΘΟΔΟΙ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	49
3.1	Ηλεκτρονική φασματοσκοπία σάρωσης, SEM.....	49
3.1.1	Αλληλεπιδράσεις Δέσμης – Δείγματος.....	50
3.1.2	Ελαστική σκέδαση.....	52
3.1.3	Μη ελαστική σκέδαση	53
3.1.4	Ακτίνες Χ.....	54
3.1.5	Οργανολογία	56
3.1.6	Πηγή ηλεκτρονίων	57
3.1.7	Σύστημα κενού.....	59
3.1.8	Σύστημα πληροφοριών	59
3.1.9	Εφαρμογές	59
3.2	Υπέρυθρη φασματοσκοπία, FT-IR	61
3.3	Δυναμική σκέδαση φωτός, DLS	63
3.4	Φασματομετρία UV-VIS.....	66
3.5	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης, TEM.....	68
3.6	Χρωματομετρική μέθοδος MTT	70
3.7	Αντιδραστήρια	72
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	74
	ΣΥΝΘΕΣΗ.....	74
4.1	Σύνθεση σφαιρών μεθακρυλικού οξέος (PMAA).....	75
4.2	Σύνθεση του θερμο-ευαίσθητου κελύφους.....	76
4.3	Σύνθεση του θερμο-pH-ευαίσθητου κελύφους.....	77
4.4	Σύνθεση του θερμο-pH-οξειδοαναγωγικά-ευαίσθητου κελύφους	78
4.5	Σύνθεση του δισουλφιδίου DSBMA.....	79
4.6	Εκδίωξη του πυρήνα: Απομόνωση κενών νανοσφαιρών	80

5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	81
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	81
5.1 Χαρακτηρισμός των νανοσφαιρών πολύ-μεθακρυλικού οξέος, PMAA.....	81
5.2 Χαρακτηρισμός του θέρμο-ευαίσθητου πολυμερούς PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA).....	83
5.3 Χαρακτηρισμός του pH- Θερμο-ευαίσθητου συμπολυμερούς PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)	85
5.4 Χαρακτηρισμός του pH-οξειδοαναγωγικού-θερμο ευαίσθητου πολυμερούς PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA).....	87
5.5 Κενές P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA) (Εκδίωξη του πυρήνα)	89
6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	95
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ.....	95
6.1 Μελέτη της ικανότητας εγκλωβισμού και απελευθέρωσης φαρμάκου (Loading and Release).....	95
6.1.1 Εγκλωβισμός του φαρμάκου DNR	95
6.1.2 Απελευθέρωση του φαρμάκου DNR	96
6.2 Τοξικότητα (toxicity).....	99
7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....	100
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	100
8. Συντημήσεις- Ακρωνύμια- Αρκτικόλεξα	101
9. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	102
10. ΑΝΑΦΟΡΕΣ	103

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Οι βασικοί τύποι συμπολυμερών. (α) Συσταδικό συμπολυμερές, (β) Ενοφθαλμισμένο συμπολυμερές, (γ) Μίγμα πολυμερών, (δ) Πολυμερικό δίκτυο, (ε) Ενδιαπλεκόμενο πολυμερικό δίκτυο (IPN), (στ) AB-Σταυροδεσμοποιημένο συμπολυμερές [2]	14
Εικόνα 1.2: Οι βασικοί τύποι κρυσταλλινών. (α) Μονοκρύσταλλοι, (β) Σφαιρουλίτες. [2]	15
Εικόνα 1.3: Κρυστάλλωση συσταδικού συμπολυμερούς πολυεθυλενοξειδίου/πολυστυρενίου. Μονοκρύσταλλοι: (α) οπτική μικροσκοπία και (β) ηλεκτρονική μικροσκοπία. Σφαιρουλίτες: (c) ηλεκτρονική μικροσκοπία. [2]	16
Εικόνα 1.4: Φασματοσκοπία ΗΠΣ για τη σύνθεση των συμπολυμερών με ζωντανό ριζικό πολυμερισμό P(NMeMA-b-St-b-Is)[51]	30
Εικόνα 1.5: Αντιπροσωπευτικά pH-αποκρίσιμα μονομερή: (α) ακρυλικό οξύ και (β) μεθακρυλικό οξύ.[52]	32
Εικόνα 1.6: pH-αποκρίσιμο μονομερές που περιέχει ομάδα σουλφαμιδίου[52]	33
Εικόνα 2.1: Βιοαισθητήρας υψηλής ευαισθησίας για την ανίχνευση της γλυκόζης στο αίμα σε σχεδόν πραγματικό χρόνο. Αποτελείται από νανοσωλήνες άνθρακα με επικάλυψη από σωματίδια λευκόχρυσου διαμέτρου 1-5 nm (University of Arkansas, USA)[49]	36
Εικόνα 3.1: Επίδραση ατομικού αριθμού και δυναμικού επιτάχυνσης στον όγκο αλληλεπίδρασης[53]	52
Εικόνα 3.2: Φαινόμενα αλληλεπίδρασης δέσμης – δείγματος[53]	53
Εικόνα 3.3: Οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια[53]	54
Εικόνα 3.4: Δευτερογενή ηλεκτρόνια[53]	55
Εικόνα 3.5: Συνεχές φάσμα ακτίνων Χ[53]	56
Εικόνα 3.6: Κ και L γραμμές χαρακτηριστικών ακτίνων Χ[53]	57
Εικόνα 3.7: Ηλεκτρόνια Auger[53]	57
Εικόνα 3.8: Διάγραμμα λειτουργίας μικροσκοπίου[53]	58
Εικόνα 3.9: Διάγραμμα εκπομπής δέσμης[53]	59
Εικόνα 3.10: Διάγραμμα εστίασης σε διαφορετικές αποστάσεις εργασίας[53]	59
Εικόνα 3.11: Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης ZEISS EVO MA 10, Εργαστήριο Τμήματος Επιστήμης των Υλικών.	60
Εικόνα 3.12: Σχεδιάγραμμα της εικόνας ενός φασματοφωτομέτρου IR.[41]	61
Εικόνα 3.13: Σύγκριση της γωνιακής εξάρτησης της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ενός σφαιρικού σωματιδίου στην περιοχή Rayleigh (κόκκινη γραμμή) και ενός μεγάλου σφαιρικού σωματιδίου (μπλε γραμμή).[52]	64
Εικόνα 3.14: Συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την στατική σκέδαση του φωτός. 1) Laser 2) κυψελίδα, 3) γωνιόμετρο, 4) ανιχνευτής, 5)	

φωτοπολλαπλασιαστής, 6) μετρητής φωτονίων, 7) υπολογιστής και 8) εκτυπωτής.[52].....	65
Εικόνα 3.15: Συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την δυναμική σκέδαση του φωτός.[52].....	66
Εικόνα 3.16: Σχηματική παράσταση Φ.Φ. UV-VIS[46].....	67
Εικόνα 3.17: Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης FEI CM20, Ερευνητικό Ινστιτούτο «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ».....	69
Εικόνα 3.18: Μέθοδος MTT.....	71
Εικόνα 4.1: Συνθήκες κάθε βήματος σύνθεσης.....	74
Εικόνα 4.2: Σύνθεση νανοσφαιρών πολύ-μεθακρυλικού οξέος, PMAA.....	76
Εικόνα 4.3: Σύνθεση του PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA).....	77
Εικόνα 4.4: Σύνθεση του PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA).....	78
Εικόνα 4.5: Σύνθεση του PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@ P(DS-co-EGMA).....	79
Εικόνα 4.6: Πορεία σύνθεσης του διμεθακρυλαμιδικού δισουλφιδίου DSBMA.....	80
Εικόνα 4.7: Εκδίωξη του πυρήνα.....	81
Εικόνα 5.1: FT-IR των νανοσφαιρών πολύ-μεθακρυλικού οξέος, PMAA	82
Εικόνα 5.2: Απεικόνιση των νανοσφαιρών του πολυ-μεθακρυλικού οξέος, PMAA.....	82
Εικόνα 5.3: FT-IR του PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA).....	83
Εικόνα 5.4: Μορφολογικός χαρακτηρισμός του θερμο-ευαίσθητου συμπολυμερούς PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA).....	84
Εικόνα 5.5: FT-IR φάσμα του PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA).....	85
Εικόνα 5.6: pH θερμο-ευαίσθητου συμπολυμερούς PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA).....	86
Εικόνα 5.7: FT-IR του PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@ P(DS-co-EGMA).....	87
Εικόνα 5.8: Μορφολογικός χαρακτηρισμός του οξειδοαναγωγικά-pH-θερμο-ευαίσθητο συμπολυμερές PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA) A. SEM, B. TEM.....	88
Εικόνα 5.9: FT-IR φάσμα του P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA).....	90
Εικόνα 5.10: Εικόνα SEM κενών νανοδοχείων P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA).....	91
Εικόνα 5.11: Θερμοκρασιακή εξάρτηση των κενών νανοσφαιρών, P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA), με δυναμική σκέδαση φωτός σε pH 7.4.....	91
Εικόνα 5.12: Θερμοκρασιακή εξάρτηση των κενών νανοσφαιρών, P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA), με δυναμική σκέδαση φωτός σε pH 4,6.....	92
Εικόνα 5.13: Θερμοκρασιακή εξάρτηση των κενών νανοσφαιρών, P(MAA-co-	

NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA), με δυναμική σκέδαση φωτός σε pH 6,0.....	92
Εικόνα 5.14: Θερμοκρασιακή εξάρτηση των κενών νανοσφαιρών, P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA), με δυναμική σκέδαση φωτός σε pH 12	93
Εικόνα 5.15: Θερμοκρασιακή εξάρτηση των κενών νανοσφαιρών, P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA), με δυναμική σκέδαση φωτός σε pH 8	93
Εικόνα 5.16: Συγκριτικό διάγραμμα της θερμοκρασιακής εξάρτησης της υδροδυναμικής διαμέτρου σε διαφορετικό περιβάλλον οξύτητας (pH).....	93
Εικόνα 6.1: Εγκλωβισμός του αντικαρκινικού φαρμάκου δαουνορουβικίνη ...	95
Εικόνα 6.2: Διάγραμμα % απελευθέρωσης του φαρμάκου σε συνάρτηση με το χρόνο (ώρες) σε διαφορετικό περιβάλλον pH.....	96
Εικόνα 6.3: Διάγραμμα % απελευθέρωσης του φαρμάκου σε συνάρτηση με το χρόνο (ώρες) σε διαφορετικό περιβάλλον pH και θερμοκρασίας.....	97
Εικόνα 6.4: Διάγραμμα % απελευθέρωσης του φαρμάκου σε συνάρτηση με το χρόνο (ώρες) σε διαφορετικό οξειδοαναγωγικό περιβάλλον.....	98
Εικόνα 6.5: Συγκεντρωτικό διάγραμμα του % δείκτη βιωσιμότητας σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις MCF7 κυτταρικών σειρών.	99
Εικόνα 9.1: Φάσμα ¹ H NMR σε CDCl ₃ του διμεθακρυλαμιδικού δισουλφιδίου.....	101
Εικόνα 9.2: Φάσμα ¹³ C NMR σε CDCl ₃ του διμεθακρυλαμιδικού δισουλφιδίου.....	101

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της σύνθεσης, του χαρακτηρισμού και της βιολογικής αξιολόγησης νανοδοχείων, εξειδικεύοντας την στόχευση των καρκινικών κυττάρων και την καθοδηγούμενη απόπτωση. Συνάμα αποτελεί μία απόπειρα συνδρομής στην προσπάθεια για θεωρητική θεμελίωση της σύγχρονης επιστήμης των υλικών.

Πιο συγκεκριμένα, στην εργασία μελετούνται πολυμερή, ευαίσθητα σε τρεις φυσικοχημικές ιδιότητες: θερμοκρασία, pH και οξειδοαναγωγικό δυναμικό, με σκοπό τη σύνθεση βιοσυμβατών πολυευαίσθητων-ανταποκρινόμενων με τρία στρώματα ευαισθησίας νανοσωματιδίων, τα οποία θα στοχεύσουν εκλεκτικά και θα αποδεσμεύσουν το ενθυλακωμένο φάρμακο, μόνο σε καρκινικά κύτταρα. Για το σκοπό αυτό, εφαρμόστηκαν μέθοδοι δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS), φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR), φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (VIS-UV), ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) και διέλευσης (TEM), καθώς επίσης και ελέγχου της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων (MTT assay) στο εργαστήριο Χημείας sol-gel του Ινστιτούτου Νανοτεχνολογίας και νανοεπιστημών του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πολυμερή

Ως πολυμερή ονομάζονται οι οργανικές ενώσεις, των οποίων τα μόρια αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα μικρότερα τμήματα, τα μονομερή, που ενώνονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας τις λεγόμενες πολυμερικές αλυσίδες. Όταν η πολυμερική αλυσίδα αποτελείται πάνω από δέκα μονομερή χρησιμοποιείται ο όρος μακρομόριο (macromolecule). [1,2,3]

Στην περίπτωση που οι δεσμοί είναι ομοιοπολικοί, συγκρατούν τα μονομερή μεταξύ τους και καθορίζουν τη θερμική και χημική σταθερότητα του υλικού. Οι πολυμερικές αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με ασθενείς διαμοριακές δυνάμεις τύπου Van der Waals ή δεσμούς υδρογόνου. Οι ασθενείς αυτές αλληλεπιδράσεις ευθύνονται για τις φυσικές ιδιότητες του πολυμερούς (π.χ. διαλυτότητα, ιξώδες, ελαστικότητα κ.ά.).

Οι κύριες μέθοδοι πολυμερισμού είναι δύο:

- Ο σταδιακός πολυμερισμός (γραμμικός και μη γραμμικός ή συσταδικός)
- Ο αλυσωτός πολυμερισμός (ή πολυμερισμός ελευθέρων ριζών)

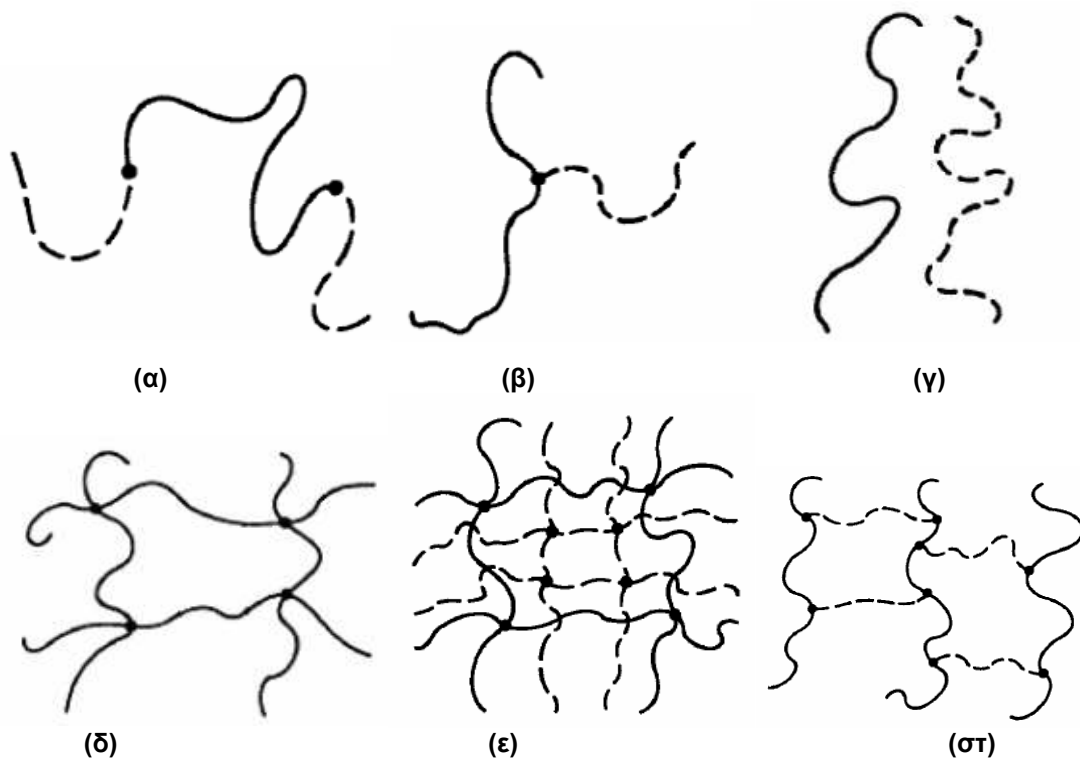
Υπάρχουν διάφοροι τρόποι ταξινόμησης των πολυμερών. Με την ικανότητά τους να διαχέονται εύκολα ή δύσκολα σε διάλυμα ή διαλύτη, διακρίνονται σε κρυσταλλοειδή ή κολλοειδή αντίστοιχα. Ανάλογα με το αν απαρτίζονται από ένα, δύο ή τρία είδη δομικών μονάδων, χωρίζονται αντίστοιχα σε ομοπολυμερή, συμπολυμερή, τριπολυμερή, ακόμα και σε πολυμερικά μίγματα. Τα συμπολυμερή (copolymers) κατανέμονται σε τέσσερις κατηγορίες:

- Τυχαία ή στατιστικά (random or statistical copolymers), των οποίων οι δομικές μονάδες κατανέμονται τυχαία κατά μήκος του μακρομορίου.
- Εναλλασσόμενα συμπολυμερή (alternating copolymers), που οι δύο δομικές μονάδες εναλλάσσονται με απόλυτη κανονικότητα, στο μακρομόριο.
- Συσταδικά ή αδρομερή (block copolymers), που όταν είναι γραμμικά μακρομόρια αποτελούνται από εναλλασσόμενες συστάδες ή blocks συμπολυμερών.
- Ενοφθαλμισμένα ή εμβολιασμένα συμπολυμερή (graft copolymers), είναι τα πολυμερή που κατά μήκος ενός ομοπολυμερούς 'ενοφθαλμίζονται', ως διακλαδώσεις συστάδες ενός άλλου ομοπολυμερούς.

- Πολυμερικά μίγματα (polymer blends), τα οποία αποτελούνται από διαφορετικές πολυμερικές αλυσίδες, χωρίς αυτές να συνδέονται μεταξύ τους με χημικό τρόπο.

Μία ακόμη ιδιότητα των μακρομορίων είναι να σχηματίζουν πέρα από γραμμικές αλυσίδες και αλυσίδες με διακλαδωμένα μόρια, που μπορούν να είναι τόσο πολύπλοκα ώστε να αλλάζουν σε μεγάλο βαθμό τις φυσικές τους ιδιότητες. Έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν πολυμερικά δίκτυα, απλά ή πιο σύνθετα (π.χ. IPNs). Το σημείο-δεσμός διακλάδωσης των πολυμερικών αλυσίδων καλείται σταυροδεσμός (crosslink).

Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζονται διάφοροι τύποι συμπολυμερών.



Εικόνα 1.1: Οι βασικοί τύποι συμπολυμερών. (α) Συσταδικό συμπολυμερές, (β) Ενοφθαλισμένο συμπολυμερές, (γ) Μίγμα πολυμερών, (δ) Πολυμερικό δίκτυο, (ε) Ενδιαπλεκόμενο πολυμερικό δίκτυο (IPN), (στ) AB-Σταυροδεσμοποιημένο συμπολυμερές [2]

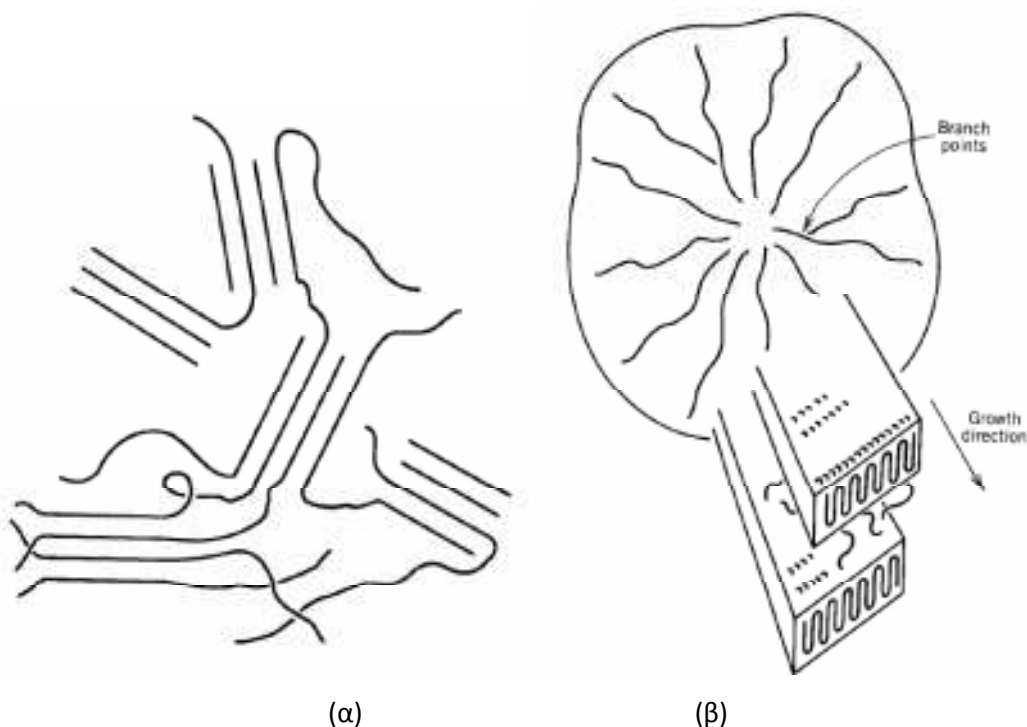
Από άποψη θερμομηχανικής συμπεριφοράς τα πολυμερή κατατάσσονται σε:

- Θερμοπλαστικά: Διακρίνονται σε γραμμικά ή διακλαδωμένα πολυμερικά υλικά, των οποίων τα μόρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με ασθενείς δεσμούς και έτσι με την αύξηση της θερμοκρασίας είναι εφικτό να

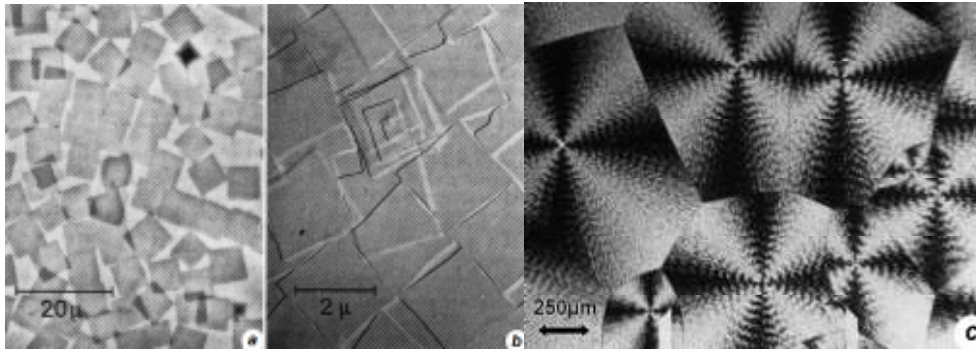
μορφοποιηθούν, παραδείγματος χάριν το πολυστυρένιο, το PVC, το πολυαιθυλένιο κ.ά.

- **Θερμοσκληρυνόμενα:** Είναι τα πολυμερή τα οποία έχουν παρασκευασθεί με αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ σε θερμοκρασία δωματίου βρίσκονται στην υαλώδη φάση. Με τις πολυμερικές τους αλυσίδες να σχηματίζουν τρισδιάστατο πλέγμα (network) σε αύξηση της θερμοκρασίας δε ρέουν. Επίσης έχουν μεγάλη αντοχή στους διαλύτες. Τέτοια υλικά είναι ο βακελίτης, το βουλκανισμένο καουτσούκ, οι εποξικές ρητίνες κ.ά.
- **Ελαστικά:** Όπως και στην περίπτωση των θερμοσκληρυνόμενων έτσι και στα ελαστικά εμφανίζονται πολυμερικά δίκτυα. Βρίσκονται στην ελαστική φάση καθώς έχουν χαμηλή θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης.

Τα πολυμερικά υλικά μπορούν να διαχωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες ανάλογα με το εάν έχουν την δυνατότητα να κρυσταλλωθούν ή όχι. Αυτά που έχουν αυτήν τη δυνατότητα ονομάζονται κρυσταλλικά, ενώ αυτά που δεν εμφανίζουν κρυσταλλικότητα ονομάζονται άμορφα. Στην περίπτωση που σε ένα πολυμερές συνυπάρχουν και οι άμορφες και οι κρυσταλλικές περιοχές, τότε το υλικό ονομάζεται ημικρυσταλλικό (semicrystalline).



Εικόνα 1.2: Οι βασικοί τύποι κρυσταλλινών. (α) Μονοκρύσταλλοι, (β) Σφαιρουλίτες. [2]



Εικόνα 1.3: Κρυστάλλωση συσταδικού συμπολυμερούς πολυεθυλενοξειδίου/πολυστυρενίου. Μονοκρύσταλλοι: (a) οπτική μικροσκοπία και (b) ηλεκτρονική μικροσκοπία. Σφαιρουλίτες: (c) ηλεκτρονική μικροσκοπία. [2]

Με την διαδικασία της κρυστάλλωσης (crystallization) αναπτύσσεται ή αυξάνει η κρυσταλλικότητα του πολυμερούς. Όταν αυτή γίνεται από ένα τήγμα πολυμερούς, τα επιμέρους φυλλίδια των αναδιπλωμένων αλυσίδων γίνονται πυκνότερα και δημιουργούνται σφαιρόμορφες περιοχές, οι λεγόμενοι σφαιρουλίτες (spherulites). Η ανάπτυξη αυτών γίνεται σε τρεις διαστάσεις μέχρι να έλθουν σε επαφή με γειτονικούς σφαιρουλίτες. Η κύρια μορφή, με την οποία κρυσταλλώνονται τα συνθετικά πολυμερή, από ψύξη τήγματος ή από ψύξη σχετικώς πυκνού διαλύματος πολυμερούς (δηλ. περιεκτικότητας 1% ή μεγαλύτερης σε πολυμερές), είναι ο σφαιρουλίτης. Οι σφαιρουλίτες δεν είναι μονοκρύσταλλοι, αλλά πολυκρυσταλλικές σφαιρόμορφες περιοχές, με διάμετρο 0.1μm-1cm ή και περισσότερο. Εφόσον υπάρχει υψηλή συγκέντρωση πυρήνων κρυστάλλωσης, αναπτύσσεται δομή λεπτών κρυστάλλων και το υλικό θα είναι σχετικώς διαφανές. Αντιθέτως, εάν δεν υπάρχει μεγάλος αριθμός πυρήνων κρυστάλλωσης, τότε αναπτύσσονται περισσότερο ακανόνιστες δομές και το υλικό θα είναι αδιαφανές. Κατά κύριο λόγο, τα κρυσταλλικά πολυμερή εμφανίζονται ως αδιαφανή υλικά, εφόσον το υλικό είναι ανομοιογενές με συνέπεια την παρεμπόδιση της διόδου του φωτός, σε αντίθεση με τα περισσότερα άμορφα πολυμερή που είναι διαφανή. Στην περίπτωση που η κρυστάλλωση των πολυμερών πραγματοποιείται από αραιό διάλυμα (δηλ. συγκέντρωσης κάτω από 1% σε πολυμερές), τότε δε σχηματίζονται σφαιρουλίτες, αλλά μονοκρύσταλλοι, με την μορφή πλακιδίων (platelets). Εκτός από τις δύο αυτές κατηγορίες, η κρυσταλλική φάση μπορεί να έχει τη μορφή ινώδων κρυστάλλων (fibrillar crystals), οι οποίοι σε γενικές γραμμές εμφανίζουν σημαντική ανάπτυξη κατά τον έναν άξονα και διακρίνονται σε ταινίες, διακρυσταλλικά ινίδια και μικροινίδια. Οι ιδιότητες των πολυμερών εξαρτώνται από τη μικροδομή τους και κυρίως από τα χαρακτηριστικά των αλυσίδων, που απαρτίζουν τα μακρομόρια τους. Βασικά χαρακτηριστικά είναι η κατανομή των μοριακών βαρών, η τακτικότητα και οι διαμορφώσεις των αλυσίδων.

Τα μοριακά βάρη είναι κατανεμημένα με ποικίλους τρόπους και χαρακτηρίζονται απ' τις μέσες τιμές τους. Τακτικότητα των πολυμερών ονομάζεται η ιδιότητα των αλυσίδων να διατάσσονται με διαφορετικούς

τρόπους, όταν υφίσταται διαφορετικός προσανατολισμός των διαδοχικών δομικών τους μονάδων. Έτσι, οι διαμορφώσεις των αλυσίδων στο χώρο, που σχετίζονται με την κατάσταση των πολυμερών καθώς και με την ικανότητα των ατόμων ή ομάδων ατόμων να περιστρέφονται σε διάφορες θέσεις γύρω από κύριους ατομικούς δεσμούς, διακρίνονται στις εξής δύο κατηγορίες:

- Διαμορφώσεις μεγάλης κλίμακας, που αφορούν την κατάσταση του πολυμερούς (στερεό, τήγμα ή διάλυμα). Με αυτόν τον τρόπο καθίσταται δυνατόν να προκύπτει μακρομόριο που να έχει το σχήμα έλικας, διπλωμένων αλυσίδων ή ακόμα και τεθλασμένης γραμμής (στο επίπεδο).
- Διαμορφώσεις μικρής κλίμακας, που είναι απόρροια των περιστροφικών κινήσεων των πλευρικών ομάδων, γύρω από απλούς δεσμούς των ατόμων άνθρακα της κύριας αλυσίδας, κάτι το οποίο δε σχετίζεται με την κατάσταση του πολυμερούς.

1.2 Σύνθετα υλικά με μήτρα κάποιο πολυμερές

Με την εξέλιξη των υλικών και των αυξημένων απαιτήσεων σε ολοένα και πιο εξειδικευμένες εφαρμογές, γεννήθηκε η ανάγκη για βελτίωση ή συνδυασμό ορισμένων (επιθυμητών) ιδιοτήτων τους. Ειδικότερα, οι βιοϊατρικές εφαρμογές των πολυμερικών υλικών οδήγησαν στην ανάπτυξη τεχνικών, έχοντας ως σκοπό την βελτίωση των μηχανικών τους ιδιοτήτων. Σε αυτό οδηγεί και η ανάπτυξη των σύνθετων υλικών, η μήτρα των οποίων είναι κάποιο πολυμερές ή απλώς σύνθετων υλικών (composite materials).

Σε κάθε σύνθετο υλικό υπάρχουν ταυτόχρονα δύο ή και περισσότερα είδη υλικών (δύο ή περισσότερες φάσεις), όπως π.χ. πολυμερική μήτρα (συνεχής φάση) με κεραμικό έγκλεισμα (ασυνεχής ή διεσπαρμένη φάση). Με έναν τέτοιο συνδυασμό είναι δυνατό να προσφέρονται νέες επιθυμητές ιδιότητες, ενώ την ίδια στιγμή να διατηρούνται κάποιες από τις ήδη υπάρχουσες φυσικές ιδιότητες των πρωτογενών υλικών. Είναι ακόμη δυνατή η επιλογή ή η απόρριψη ιδιοτήτων μέσω της κατευθυνόμενης μεταβολής των αναλογιών ή του τρόπου σύνδεσης των διαφορετικών υλικών.

1.3 Νανοσύνθετα

Μία ειδική κατηγορία των σύνθετων υλικών είναι τα νανοσύνθετα. Αυτά τα υλικά έχουν ως επιπλέον χαρακτηριστικό ότι οι διαστάσεις των εγκλεισμένων σωματιδίων είναι της τάξεως των 10^{-9} m, δηλαδή του νανομέτρου. Αυτό το ειδικό γνώρισμα είναι που βελτιστοποιεί ακόμη περισσότερο τις επιθυμητές ιδιότητες (κυρίως μηχανική αντοχή και θερμική σταθερότητα). Στα νανοσωματίδια παρουσιάζεται επίσης οπτική διαφάνεια, ενώ συγκριτικά με τα παραδοσιακά σύνθετα υλικά, απαιτούν μικρότερες ποσότητες εγκλεισμάτων. Μία από τις μεθόδους με την οποία διασπείρονται τα νανοεγκλείσματα είναι αυτή της τεχνικής λύματος-πηκτής (Sol-Gel). Η χρήση αυτής

πραγματοποιείται σε συνδυασμό με μεθόδους πολυμερισμού, για την παραγωγή νανοσύνθετων υλικών. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο επιτυγχάνεται πολύ καλή διασπορά των νανοσωματιδίων, σε σχέση με τεχνικές απλής ανάμιξης. [2,4,5]

1.3.1 Ιδιότητες

Οι ιδιότητες των νανοσύνθετων υλικών, όπως προαναφέρθηκε, είναι τροποποιημένες σε σχέση με τις αντίστοιχες των σύνθετων. Η τροποποίηση οφείλεται σε δύο βασικές αιτίες:

1. Το μέγεθος των εγκλεισμάτων. Στην περίπτωση κατά την οποία οι διαστάσεις των εγκλεισμάτων είναι μικρότερες των 102 nm, αναμένεται η παρουσία φαινομένων που αφορούν την τροποποίηση των φυσικών ιδιοτήτων των νανοεγκλεισμάτων, σε σχέση με τις αντίστοιχες μακροσκοπικές ιδιότητες τους. Τα φαινόμενα αυτά ονομάζονται μεγέθους ή κλίμακος (size effects)
2. Την τροποποίηση των εσωτερικών διεπιφανειών μήτρας-εγκλείσματος. Σε αυτές τις διεπιφάνειες προκαλούνται μεταβολές στις πολυμερικές αλυσίδες, όπως για παράδειγμα αλλαγή στην πυκνότητα της αλυσίδας, στην κινητικότητά της καθώς και θερμοδυναμικές μεταβολές (αλλαγές φάσεις).

Όσον αφορά τα νανοσύνθετα υλικά δεν υπάρχει κάποια ειδική θεωρία ή μοντέλο που να μπορεί να περιγράψει ή να προβλέπει τις ιδιότητες τους, ενώ οι θεωρίες που υπάρχουν για τα κλασσικά σύνθετα υλικά δεν συμπεριλαμβάνονται στην περίπτωση των νανοσυνθέτων.

1.3.2 Εγκλείσματα των Νανοσυνθέτων

Με βασικό στόχο τη βελτίωση, κατά κύριο λόγο, των μηχανικών ιδιοτήτων ενός πολυμερούς, διασπείρονται μέσα στο πολυμερές υλικά διαφορετικής φύσεως, γνωστά ως εγκλείσματα. Τα εγκλείσματα αυτά μπορεί να εμφανίζονται με τη μορφή κόκκων, ινών, φύλλων ή και τρισδιάστατων πλεγμάτων. Οι πιο σημαντικές κατηγορίες νανοεγκλεισμάτων είναι:

- Αιθάλη και πυριτία: Η δράση τους πραγματοποιείται με τη μορφή ενισχυτικών μέσων σε ελαστομερή. Αποτελούνται από σφαιρικά σωματίδια (διαστάσεων 10-90 nm) και συσσωματώνονται μόνιμα σε μεγαλύτερες δομές (20-200 σωματιδίων).

- Κεραμικά νανοσωματίδια: Δημιουργούνται μέσω της τεχνικής Sol-Gel (πυριτία, αλουμίνα, τιτανία, ζirkονία). Με αυτή τη μέθοδο παρασκευάζονται στην πολυμερική μήτρα τα κεραμικά σωματίδια.
- Φυλλόμορφοι πηλοί: Αποτελούν φυσικά ή τεχνητά υλικά και διαμορφώνονται από φύλλα πάχους 1nm, που διατάσσονται σε στοιβάδες με κατιόντα Na^+ ανάμεσα στα κενά τους. Μετά την τροποποίηση τους, χρησιμοποιούνται στα νανοσύνθετα υλικά, με σκοπό τον διαχωρισμό των στοιβάδων σε μεμονωμένα στρώματα. Οι φυλλόμορφοι πηλοί συμβάλλουν στη βελτίωση των ιδιοτήτων φραγμού, εξαιτίας του μικρού πάχους και της μεγάλης τους επιφάνειας.
- Νανοςωλήνες άνθρακα: Είναι σωλήνες με διάμετρο nm και μήκος 3-50 μm . Η εφαρμογή του πραγματοποιείται υπό μορφή εγκλεισμάτων σε πολυμερικές μήτρες, μιας και παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες μηχανικές και ηλεκτρικές ιδιότητες.
- Φουλερένια και POSS: Το φουλερένιο απαρτίζεται από 60 άτομα άνθρακα που σχηματίζουν μία σφαιρική δομή (διαμέτρου μερικών nm), ενώ το POSS διαμορφώνεται ως κύβος με άτομα πυριτίου στις κορυφές και άτομα οξυγόνου στα μέσα των ακμών. Η χρήση τους γίνεται αντίστοιχα σε εφαρμογές οπτοηλεκτρονικής και βελτίωσης της μηχανικής αντοχής.

1.3.3 Παρασκευή Τεχνική Λύματος-Πηκτής (Sol – Gel)

Μία από τις κύριες μεθόδους παρασκευής νανοσύνθετων υλικών, με κεραμικά εγκλείσματα, βασίζεται στην τεχνική λύματος-πηκτής ή ζελατινοποίησης διαλύματος. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται ακόμα για την παρασκευή κεραμικών υλικών και γυαλιών. Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους παρασκευής, από χημικής άποψης, είναι πιο ήπια, φιλικότερη προς το περιβάλλον και διεξάγεται σε σχετικά χαμηλότερες θερμοκρασίες.

Στην πρώτη φάση της διαδικασίας δημιουργείται ένα κολλοειδές διάλυμα (Sol), εξαιτίας των μικρών σωματιδίων που περιέχονται στις πρώτες ύλες, τα οποία αιωρούνται σε ένα υγρό. Για την καλύτερη αποφυγή συσσωμάτωσης των σωματιδίων, αυτά φορτίζονται ηλεκτρικά, με σκοπό να απωθούνται μεταξύ τους. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη ενός κατάλληλου μέσου (π.χ. κάποιο οξύ) το οποίο προστίθεται στο διάλυμα. Υπό ορισμένες συνθήκες αρκετά σωματίδια αλληλεπιδρούν χημικά ή ηλεκτροστατικά και δημιουργούν ένα συνεχές τρισδιάστατο πλέγμα, που ονομάζεται ζελατίνη (Gel). Τα υπόλοιπα σωματίδια ενώνονται, σε μεγάλα διακριτά συσσωματώματα, καθιζάνουν και αφαιρούνται με σχετική ευκολία από τον πυθμένα του δοχείου. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται μία 'υγρή' ζελατίνη, ενδιαμέσως του πλέγματος των συνδεδεμένων σωματιδίων, που περιέχει πόρους, με διάλυμα. Με το πέρασμα του χρόνου αυτό συμπυκνώνεται και η ζελατίνη σταδιακά απόκτα μια πιο σκληρή μορφή. Με αυτό τον τρόπο, παρασκευάζεται είτε ένα συμπαγές κεραμικό υλικό είτε μικρά σωματίδια, υπό μορφή σκόνης. Η

διαδικασία μπορεί να εκτελεστεί σε συνδυασμό με μεθόδους πολυμερισμού, για την παρεμβολή των κεραμικών σωματιδίων και την τελική παρασκευή σύνθετου υλικού.

Η μέθοδος Sol-Gel παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως η πολύ καλή διασπορά καθώς επίσης και η δυνατότητα ρύθμισης του μεγέθους και της μορφολογίας των εγκλεισμάτων.

1.4 «Έξυπνα Πολυμερή»

Γίνεται ολοένα και πιο σαφές ότι τα πολυμερή έχουν κατακτήσει μια ισχυρή θέση ανάμεσα σε θεραπευτικούς παράγοντες. Αυτό συμβαίνει διότι επιδεικνύουν εξαιρετικές φυσικοχημικές ιδιότητες κάθε φορά που γίνονται μικρές αλλαγές στο περιβάλλον τους, όπως στη θερμοκρασία, στο pH, στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, στο φως, στο μαγνητικό πεδίο κτλ. Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα για τα πολυευαίσθητα πολυμερή έχει καταφέρει να επιδείξει τρομερά αποτελέσματα κατά τη μεταφορά των φαρμάκων μέσα στον οργανισμό, με σκοπό τη στοχευόμενη θεραπεία ασθενειών, όπως ο καρκίνος. Αντιδρούν θετικά σε ερεθίσματα με αυξημένη θεραπευτική αποτελεσματικότητα και μηδαμινές παρενέργειες, κάτι που σημαίνει πως τα καθιστά μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο καταπολέμησης πολλών ειδών καρκίνου. Αυτοί οι θεραπευτικοί παράγοντες, δημιουργούνται συνθετικά και η μοναδικότητα τους έγκειται στην τάση τους να μιμούνται κατά μεγάλο ποσοστό τη φύση. Αρκετά βιολογικά συστήματα με τρόπο ελεγχόμενο και προβλέψιμο, έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη πολυευαίσθητων πολυμερικών συστημάτων. Τα δύο σημαντικότερα χαρακτηριστικά τους είναι η βιοαποικοδομησιμότητα και η βιοσυμβατότητα τους, τα οποία στην *in vivo* εφαρμογή τους, τα κάνει να συμπεριφέρονται ως «έξυπνα» πολυμερή. Έχοντας συντεθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να μεταφέρουν κάποιο φάρμακο, το απελευθερώνουν με διάφορους μηχανισμούς σε συγκεκριμένο περιβάλλον, το οποίο διαμορφώνεται από τη χημική σύσταση του πολυμερούς. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η πιθανότητα του να οδηγηθεί σε περιβάλλον με υγιή κύτταρα, πράγμα το οποίο ενισχύει την απελευθέρωση. Με τη γνώση των ιδιοτήτων τους κάθε φορά, είναι εφικτός ο πλήρης έλεγχος της στόχευσης των μη υγιών κυττάρων, με αποτέλεσμα η βιοσυμβατότητα να αγγίζει εξαιρετικά υψηλά ποσοστά. Μερικές από αυτές τις ιδιότητες είναι η ισορροπία μεταξύ υδροφοβικότητας και υδροφιλικότητας, το μήκος της μακρομοριακής αλυσίδας, το μοριακό βάρος, η δομή καθώς και η αρχιτεκτονική μεταξύ άλλων. Τα θεραπευτικά πολυμερή θα μπορούσαν να αποτελούν μια υποκατηγορία νανοφαρμάκων αφού το μέγεθος τους χρήζει ιδιαίτερης προσοχής, τόσο για τη βιοσυμβατότητα τους, όσο και για τη βιοαποικοδομησιμότητα τους. Κατά τη διαδικασία της χημειοθεραπείας ο φαρμακοδυναμικός έλεγχος ενός αντικαρκινικού φαρμάκου είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες,

επειδή τα αντικαρκινικά φάρμακα ως τώρα παρουσίαζαν τοξικές παρενέργειες όταν μεταφέρονταν σε ιστούς μη στοχευμένους. Με σκοπό τον έλεγχο αυτής της διαδικασίας, συντέθηκαν βιοσυμβατά πολυμερή-μεταφορείς με διάμετρο από 10 nm έως 200 nm. Φορείς τέτοιου είδους φαρμάκου κυκλοφορούν στο αίμα αποτρέποντας την πρόσληψη από το ενδοθηλιακό σύστημα, καθώς επίσης επιτυγχάνοντας γρήγορη αποβολή μέσω νεφρικής διήθησης. Με αυτόν τον τρόπο τα γνωστά ως «έξυπνα» πολυμερή μπορούν εύκολα να μεταφέρουν το φάρμακο και να το απελευθερώνουν αποκλειστικά σε καρκινικά κύτταρα, μειώνοντας ταυτόχρονα την τοξικότητα κατά των φυσιολογικών κυττάρων-ιστών. Με τη στόχευση αυξάνεται η αναλογία της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο στόχο (καρκινικό κύτταρο) σε σχέση με τους ιστούς που δεν αποτελούν στόχο, μέσω ελέγχου των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των πολυμερών (πχ. μέγεθος, επιφανειακές ιδιότητες κτλ.). Τέλος με το συνδυασμό διαφόρων συστημάτων στόχευσης, οι ιδιότητες των «έξυπνων» πολυμερών ενισχύονται δραματικά.

1.5 Ριζικός πολυμερισμός

Σημαντικές εφαρμογές έχουν βρει οι ελεύθερες ρίζες στις αλυσιδωτές (ή αλυσωτές) αντιδράσεις ακόρεστων οργανικών ενώσεων με σκοπό τη σύνθεση πολυμερών μεγάλου μοριακού βάρους. Στο ριζικό πολυμερισμό οι αντιδράσεις έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν σε καταλυτικές δράσεις, φωτοπολυμερισμό και τερματισμό υπό ορισμένες συνθήκες ώστε να επιτευχθούν οι στόχοι του πολυμερισμού με αναμενόμενα προϊόντα. Ο πολυμερισμός με ελεύθερες ρίζες, από βιομηχανικής απόψεως, είναι βαρύνουσας σημασίας μιας και τα πιο σημαντικά βιομηχανικά πολυμερή παρασκευάζονται με τη χρήση και τις τεχνικές του σταδιακού ριζικού πολυμερισμού ελευθέρων ριζών. Όπως συμβαίνει σε όλες τις αντιδράσεις στην οργανική σύνθεση με ελεύθερες ρίζες ο πολυμερισμός ελευθέρων ριζών πραγματοποιείται σε τρία στάδια: έναρξη (initiation), διάδοση (propagation) και τερματισμό (termination). Ο πρώτος πολυμερισμός που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή μεγάλου μοριακού βάρους ουσιών είναι αυτός των βινυλοπαραγώγων. Το ενεργό κέντρο (συνήθως ρίζα με το μονήρες ηλεκτρόνιο σε άτομο άνθρακα) κατά τη διάρκεια της διάδοσης της αντίδρασης παραμένει αμετάβλητο από ένα πολυμερές μόριο σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής του, κάτι που αποτελεί το κοινό χαρακτηριστικό του ριζικού πολυμερισμού. Έτσι, κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού το μίγμα περιλαμβάνει υψηλού μοριακού βάρους πολυμερές και μονομερές που δεν έχει μεταβληθεί σε ενδιάμεσα στάδια της ανάπτυξης.

Με αυτόν τον τρόπο ο ριζικός πολυμερισμός δίνει εξαιρετικά μεγάλου βάρους πολυμερή οδηγώντας ένα μόριο που δημιουργείται με διαδοχικά βήματα μιας

μονής αλυσιδωτής (αλυσωτής) διεργασίας που επηρεάζεται από το ενεργό κέντρο (active center), το οποίο φέρει ασύζευκτο ηλεκτρόνιο σε άνθρακα και το οποίο διατηρείται κατά κάποιον τρόπο από την αυξανόμενη πολυμερή αλυσίδα με κάθε τμηματική προσθήκη μονομερούς. Η έναρξη του πολυμερισμού οφείλεται σε ορισμένες χημικές ενώσεις, που με θερμοκρασία ή ακτινοβολία δίνουν με ευκολία ελεύθερη ρίζα η οποία προσβάλλει τον διπλό δεσμό του μονομερούς. Οι ουσίες αυτές ονομάζονται εκκινητές, εναρκτές ή απαρχητές (initiators) και είναι διάφορα υπεροξειδία ή υδροϋπεροξειδία, αζωενώσεις, υπερθειικά άλατα, συστήματα οξειδοαναγωγής. Οι φωτοευαίσθητες ουσίες που δίνουν ελεύθερες ρίζες με την επίδραση φωτός καλούνται φωτοαπαρχητές (photoinitiators). Στο στάδιο της διάδοσης (propagation) υπάρχει μεγάλη ταχύτητα και τα μόρια του εκκινητή προστίθενται στο μονομερές δημιουργώντας νέο ριζικό κέντρο (μακρορίζες) που αυτό με την σειρά του συνεχίζει την αντίδραση διάδοσης. Ο τερματισμός είναι δυνατό να επιτευχθεί από τις μακρορίζες είτε με συνένωση (combination) είτε με δυσανάλογη ανακατανομή (disproportionation) μέσω της μεταφοράς υδρογόνου από μακρορίζα σε άλλη μακρορίζα. Επιπλέον ο τερματισμός μπορεί να επιτευχθεί και με την προσθήκη άλλων οργανικών ενώσεων (όπως βενζοκινόνη) που εξαιτίας του ηλεκτρονικού χαρακτήρα της τερματίζει ή μειώνει αρκετά την ταχύτητα πολυμερισμού των μακροριζών (terminators, inhibitors). Αναλόγως των απαιτήσεων για τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των πολυμερών και τη χρήση για την παρασκευή ορισμένων βιομηχανικών προϊόντων, στις αντιδράσεις ριζικού πολυμερισμού μπορούν να προστεθούν τροποποιητές του μοριακού βάρους (modifiers). Ενώσεις τέτοιας μορφής είναι οι μερκαπτάνες, οι φαινόλες, οι αλκυλο-αρωματικοί υδρογονάνθρακες κ.λπ. και λειτουργούν ως παράγοντες μεταφοράς αλυσίδας (chain transfer agents). Για τη βιομηχανική παρασκευή του συμπολυμερούς πολυ(στυρολίου-βουταδιενίου) με συγκεκριμένο μοριακό βάρος προστίθεται ως τροποποιητής η ένωση n- δωδεκυλομερκαπτάνη.

1.5.1 Μηχανισμός Ριζικού Αλυσιδωτού Πολυμερισμού

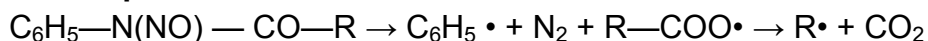
Οι Taylor και Bates ήταν οι πρώτοι που πρότειναν τον μηχανισμό ριζικού αλυσιδωτού (ή αλυσωτού) πολυμερισμού το 1927 [6] με σκοπό να εξηγήσουν τον πολυμερισμό του αιθυλενίου ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$) που προκλήθηκε από ελεύθερες ρίζες στην αέρια φάση. Το 1932 ο ίδιος μηχανισμός ριζικού πολυμερισμού προτάθηκε ανεξάρτητα και από τον Staudinger (Βραβείο Νόμπελ Χημείας 1954) για πολυμερισμούς σε υγρή φάση [7].

Για τον ριζικό πολυμερισμό χρειάζεται μια μικρή ποσότητα εκκινητή (ή ουσίας που προκαλεί την έναρξη, ή εναρκτής) που είναι συνήθως υπεροξείδιο διασπώμενο εύκολα σε ελεύθερη ρίζα και ακολουθούν στη συνέχεια στάδια

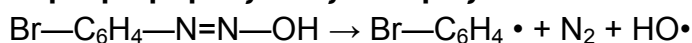
διάδοσης της αλυσίδας. Αυτός ο πολυμερισμός ονομάζεται πολυμερισμός αλυσιδωτής (ή αλυσσωτής) αντίδρασης. Ως στάδια αλυσιδωτής διάδοσης (chain propagation steps) χαρακτηρίζονται κυρίως από την προσβολή της ελεύθερης ρίζας σε κάποιον από τους άνθρακες των διπλών δεσμών του μονομερούς. Ένα ηλεκτρόνιο του ζεύγους του διπλού δεσμού σχηματίζει δεσμό μεταξύ της ρίζας και αυτού του ατόμου άνθρακα, με το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της ελεύθερης ρίζας. Το ηλεκτρόνιο που δεν παίρνει μέρος στο διπλό δεσμό μετατοπίζεται στον άλλο άνθρακα, ο οποίος στη συνέχεια μετατρέπεται σε ελεύθερη ρίζα. Με αυτό τον τρόπο το ενεργό κέντρο (άνθρακας με μονήρες ηλεκτρόνιο) μετατοπίζεται αποκλειστικά στο νέο μονομερές που προστίθεται και έτσι μπορεί να δεχθεί και νέο μονομερές και η διεργασία αυτή συνεχίζεται. Σε όλες οι αλυσιδωτές αντιδράσεις υπάρχουν τρία στάδια : εκκίνηση ή έναρξη με την προσβολή της ρίζας (chain initiation), διάδοση (chain propagation) και τερματισμός (chain termination), όπου η ρίζα στο άκρο της αυξανόμενης αλυσίδας καταστρέφεται ή εξουδετερώνεται ή αδρανοποιείται. Μία διαδικασία που εξαρτάται από την φύση των διεργασιών.

Υπάρχουν διάφορες ουσίες οι οποίες έχουν την δυνατότητα να προκαλέσουν την έναρξη ή εκκίνηση αντιδράσεων πολυμερισμού τυπικών βινυλομονομερών, όπως στυρόλιο, μεθακρυλικός μεθυλ-εστέρας, βουταδιένιο κλπ. Οι πιο κοινές ουσίες για την έναρξη αλυσιδωτού πολυμερισμού είναι αυτές που σε μέσες θερμοκρασίες υπόκεινται σε θερμική διάσπαση μέσω μηχανισμών που απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες.

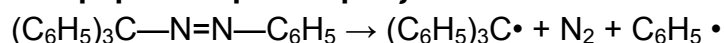
- **N-νιτροδοακυλο—ανιλίδια :**



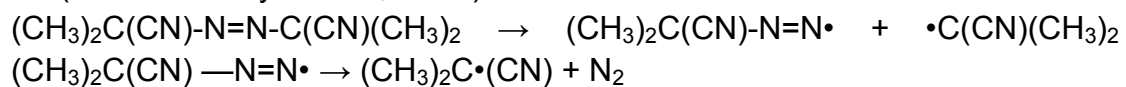
- **p-Βρωμοβενζοδιαζω- υδροξείδια :**



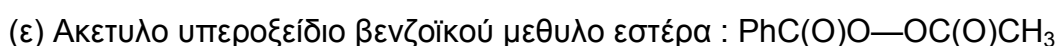
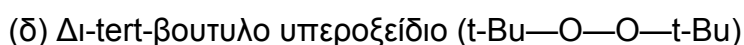
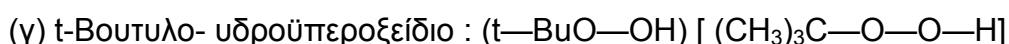
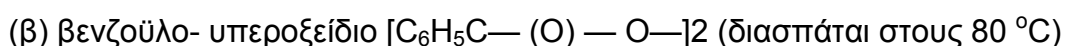
- **Τριφαινυλομεθυλοβενζόλια :**



- **Αλειφατικά αζω-δισ-νιτρίλια**, όπως το αζω-δισ-ισοβουτυρονιτρίλιο (azobis-isobutyronitrile, AIBN) :



- **Οργανικά υπεροξειδία και υδροϋπεροξειδία :**

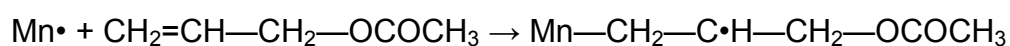


Με σκοπό τον τερματισμό του ριζικού πολυμερισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν ποικίλες ουσίες που σε αντίδραση με την ελεύθερη ρίζα της διάδοσης δίνουν μη ριζικά προϊόντα ή ρίζες με αρκετά μικρή δραστηριότητα. Με αυτό τον τρόπο, η διαδικασία του πολυμερισμού διακόπτεται και λαμβάνονται πολυμερή με ορισμένο μοριακό βάρος. Οι ουσίες αυτές καλούνται αναστολείς (inhibitors). Σε περίπτωση που χρησιμοποιηθούν ουσίες που μειώνουν το βαθμό πολυμερισμού τότε χαρακτηρίζονται επιβραδυντές (retarders). Αποτελέσματα μελετών έχουν δείξει πως με την παρουσία διάφορων ουσιών, ανακόπηκε σημαντικά ο βαθμός πολυμερισμού, παραδείγματος χάριν η παρουσία 0.1 % βενζοκινόνης σε πολυμερισμό στυρολίου [8]. Τέλος, σταθερές ελεύθερες ρίζες, όπως το DPPH (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο υδραζύλιο), είναι αποτελεσματικός αναστολέας πολυμερισμού σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 10^{-4} M του βινυλο οξικού εστέρα και του στυρολίου [9]. Πέρα από την προσθήκη αναστολέων ή επιβραδυντών για τον τερματισμό ή επιβράδυνση του πολυμερισμού, πραγματοποιούνται και αντιδράσεις τερματισμού μεταξύ των ριζών του εκκινήτη ($R\cdot + R\cdot \rightarrow R-R$). Ένας τρόπος είναι η σύζευξη ριζών, αλλά και η δυσανάλογη ανακατανομή εξουδετέρωσης ριζών που αποτελεί αρκετά σημαντική διεργασία. Οι αρωματικές νιτρο-ενώσεις, όπως το νιτροβενζόλιο και το δινιτροβενζόλιο μειώνουν αρκετά τη διεργασία ριζικού πολυμερισμού του στυρολίου [6]. Για τις δινιτρο-ενώσεις έχει βρεθεί πειραματικά ότι καθώς συνδυάζονται με το πολυμερές, ορισμένα m-νιτροβενζόλια δρουν ως επιβραδυντές του ριζικού πολυμερισμού. Ταυτόχρονα μεταφέρουν ένα άτομο υδρογόνου στο στυρόλιο και δημιουργούν μία νέα ρίζα του μονομερούς [10].

Άλλες ουσίες που έχουν ανασταλτικό ρόλο σε ριζικό πολυμερισμό είναι το οξυγόνο μιας και αντιδρά με την ρίζα του πολυμερούς και την μετατρέπει σε υπεροξειδίο που δεν έχει μεγάλη δραστηριότητα [11]. Το υπεροξειδίο που σχηματίζεται δεν είναι αδρανές και προστίθεται σε μονομερή (στυρόλιο, μεθακρυλικός μεθυλο εστέρας κλπ) με αποτέλεσμα την αναγέννηση του ριζικού πολυμερισμού. Με την πορεία αυτή το οξυγόνο ενσωματώνεται στο πολυμερές [12].

1.5.2 Αλληλικός Ριζικός Πολυμερισμός

Ο πολυμερισμός αλληλικών ενώσεων εμφανίζει μερικές ιδιαιτερότητες εξαιτίας του συναγωνισμού μεταξύ μεταφοράς αλυσίδας και αναστολής στην συνολική διεργασία του πολυμερισμού. Η διάδοση της αλυσίδας της μακρορίζας πιστεύεται ότι διαδίδεται με τον ακόλουθο τρόπο :



Η μακρορίζα που δημιουργείται δεν εμφανίζει σταθεροποιητικό φαινόμενο συντονισμού. Οι πολυμερισμένες αλυσίδες με το ενεργό ριζικό κέντρο είναι πολύ δραστικές για να συνεχίσουν τη διάδοση του πολυμερισμού, αλλά στη περίπτωση αυτή η απουσία δομών συντονισμού στη μεταβατική κατάσταση του αλλυλικού οξικού μεθυλο εστέρα καθιστά το μονομερές αδρανές. Οι παράγοντες αυτοί είναι απόρροια των αντιδράσεων συναγωγισμού :



Στην περίπτωση αυτή δημιουργείται αλλυλική ρίζα με την απομάκρυνση ενός H_α από το μονομερές. Οι ρίζες αυτές εμφανίζουν σταθεροποιητικό συντονισμό και δεν προστίθενται στο μονομερές, κάτι που έχει σαν αποτέλεσμα να παρουσιάζονται με διμοριακή συνένωση. Η αντίδραση αυτή ονομάζεται "υποβιβάζουσα μεταφορά αλυσίδας" (degradative chain transfer). Η διεργασία είναι όπως η κανονική μεταφορά αλυσίδας, αλλά σε αυτή την περίπτωση η μακρορίζα που δημιουργείται είναι αδρανής έτσι ώστε να αναγεννήσει την πολυμερική αλυσίδα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η τελευταία αντίδραση να είναι αντίδραση τερματισμού από έναν αναστολέα, που σε αυτή την περίπτωση είναι το ίδιο το μονομερές. Η ταχύτητα του πολυμερισμού είναι άμεσα ανάλογη της συγκέντρωσης του εκκινητή και όχι από τη συγκέντρωση στο τετράγωνο σε σχέση με τους άλλους πολυμερισμούς βινυλο-ενώσεων. Ο ισοπροπενυλο-οξικός εστέρας και το αλλυλοχλωρίδιο έχουν παρόμοια συμπεριφορά[6]. Στον πολυμερισμό του αλλυλοχλωριδίου η υποβιβάζουσα μεταφορά αλυσίδας γίνεται πιο εύκολα με την απομάκρυνση του ατόμου του χλωρίου και με τη δημιουργία μη υποκατεστημένης αλλυλικής ρίζας $\cdot CH_2 - CH = CH_2$, που προστίθεται περιστασιακά στο μονομερές. Κάτι τέτοιο φαίνεται από τη δημιουργία τριών πολυμερικών μορίων, τα οποία έχουν κατά μέσο όρο βαθμό πολυμερισμού έξι μονάδων, για κάθε μόριο βενζοϋλο υπεροξειδίου που διασπάται (εκκινητής).

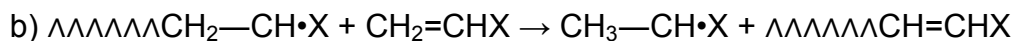
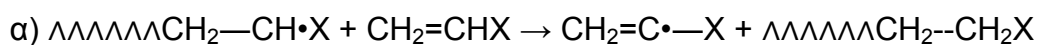
Οι ολεφίνες που έχουν α-μεθυλενικό υδρογόνο, όπως το 1-οκτένιο, το προπυλένιο και το ισοβουτυλένιο, πολυμερίζονται δύσκολα με παρουσία ριζών και δημιουργούν προϊόντα μικρού μοριακού βάρους [6], μιας και υποβάλλονται σε ανάλογες ανασταλτικές αντιδράσεις κατά τον πολυμερισμό τους. Αντιθέτως, μονομερή όπως ο μεθακρυλικός μεθυλ-εστέρας και το μεθακρυλονιτρίλιο, που περιέχουν α-υδρογόνα, πολυμερίζονται κανονικά και αυτό οφείλεται στο σταθεροποιητικό παράγοντα των υποκαταστατών τους. Οι υποκαταστάτες ελαττώνουν την δραστικότητα της ελεύθερης ρίζας κάτι που έχει ως αποτέλεσμα να μειώνουν την τάση για μεταφορά αλυσίδας, ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν τη δραστικότητα του μονομερούς σε ότι έχει να κάνει με την προσθήκη.

1.5.3 Φυσικοχημικά Χαρακτηριστικά-Κινητική του Ριζικού Πολυμερισμού

Ο ριζικός πολυμερισμός έχει βαρύνουσα σημασία για την βιομηχανία των πολυμερών. Παρόλα αυτά υπάρχουν κι άλλα είδη πολυμερισμού με παραπλήσιο τρόπο διάδοσης όπως παραδείγματος χάριν ο ανιοντικός πολυμερισμός και ο κατιοντικός πολυμερισμός. Στον ανιοντικό πολυμερισμό το αναπτυσσόμενο μακρομόριο είναι φορτισμένο αρνητικά ενώ αντιθέτως στον κατιοντικό πολυμερισμό το αναπτυσσόμενο μακρομόριο είναι φορτισμένο θετικά. Τα βασικότερα μονομερή με βιομηχανική σημασία που πολυμερίζονται κατά κύριο λόγο με πολυμερισμό ελευθέρων ριζών είναι: αιθυλένιο, βινυλοαλογονίδια (βινυλοχλωρίδιο, VCM), βινυλεστέρες, μεθακρυλικοί εστέρες, ακρυλο-νιτρίλιο, στυρόλιο (ή στυρένιο) και το 1,3-βουταδιένιο.

Ένα από τα χαρακτηριστικά του ριζικού πολυμερισμού κατά τη διάδοση του είναι οι αντιδράσεις μεταφοράς. Αυτές καταλήγουν σε πολυμερές με μικρότερο μοριακό βάρος, συγκριτικά με πολυμερισμούς όπου δεν εμφανίζονται τέτοια φαινόμενα. Μιας και το μοριακό βάρος προσδίδει τις ιδιότητες και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά στο προϊόν που δημιουργείται, οι αντιδράσεις μεταφοράς είναι αναγκαίο να ρυθμισθούν θετικά ή αρνητικά. Μία από τις περιπτώσεις είναι η μεταφορά ατόμων από το διαλύτη όπου πραγματοποιείται ο πολυμερισμός στη μακρορίζα. Ένα παράδειγμα είναι ο πολυμερισμός του στυρολίου σε τετραχλωράνθρακα όπου το πολυμερές έχει πολύ μικρότερο βάρος σε σχέση με τον πολυμερισμό σε βενζόλιο και κάτω από παρεμφερείς συνθήκες. Κάτω από αυτές τις συνθήκες η ρίζα που δημιουργείται δεν έχει την ίδια δραστηριότητα με την αρχική μακρορίζα του στυρολίου και ο πολυμερισμός περιορίζεται ελαττώνοντας το μοριακό βάρος.

Μια διαφορετική περίπτωση είναι η μεταφορά ατόμου υδρογόνου από το μονομερές στη μακρορίζα και αντίστροφα. Η μεταφορά ατόμου υδρογόνου μπορεί να γίνει με δύο τρόπους :



Η ελεύθερη ρίζα $\text{CH}_3\text{—CH}\cdot\text{X}$ σχηματίζει γραμμικά πολυμερή, ενώ στην περίπτωση του μακρομονομερούς $\text{ΛΛΛΛΛ}\text{CH}=\text{CHX}$ που δημιουργείται ενδιάμεσα από την μεταφορά δεν πολυμερίζεται, διότι τα 1,2-υποκατεστημένα αιθυλένια, δεν υποβάλλονται σε πολυμερισμό με ελεύθερες ρίζες. Η μεταφορά ατόμου υδρογόνου από το μονομερές στις μακρορίζες ευνοείται σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών.

Επιπροσθέτως, υπάρχει και η περίπτωση μεταφοράς ατόμου υδρογόνου από το πολυμερές στην μακρορίζα. Αυτή η μεταφορά πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις κάτι που οδηγεί στο σχηματισμό διακλαδισμένων και δικτυωμένων μακρομορίων. Τα δικτυωμένα πολυμερή διαφέρουν από τα

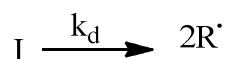
διακλαδισμένα και εξαιτίας της δομής τους είναι αδιάλυτα σε κοινούς οργανικούς διαλύτες που διαλύουν συνηθισμένα πολυμερή.

Τα δικτυωμένα μακρομόρια εμφανίζουν πλέγμα μακροριζών σε κάθετο και οριζόντιο επίπεδο με κεφαλές που έχουν ασύζευκτο ηλεκτρόνιο για τη συνέχιση του ριζικού πολυμερισμού. Αυτές οι πρακτικές πτυχές της χημείας των πολυμερών κατά το ριζικό πολυμερισμό καθιστούν εφικτή τη ρύθμιση του μοριακού βάρους του πολυμερούς. Αυτό πραγματοποιείται στον πολυμερισμό του αιθυλενίου σε υψηλές θερμοκρασίες (150-300°C) και υψηλές πιέσεις (1.00-3.000 ατμόσφαιρες). Το πολυμερές που δημιουργείται είναι διακλαδισμένο και χαρακτηρίζεται ως πολυαιθυλένιο υψηλής πίεσης (High Pressure Polyethylene, HPPE). Αυτό το πολυμερές έχει μεγάλο αριθμό διακλαδώσεων με ενδομοριακή μεταφορά ατόμου υδρογόνου. Οι διακλαδώσεις αυτές δεν αφήνουν τα μακρομόρια να συμπιεσθούν σε μικρό όγκο, με αποτέλεσμα να εμφανίζει μικρότερη πυκνότητα από το γραμμικό πολυαιθυλένιο που συνθέτονται με τη μέθοδο καταλυτών Ziegler-Natta.

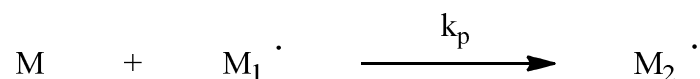
1.5.4 Κινητική Ριζικού Πολυμερισμού

Η κινητική του ριζικού πολυμερισμού μπορεί να εκφρασθεί με αντιδράσεις, εφαρμόζοντας απλές σχέσεις για τα τρία στάδια: έναρξη, διάδοση και τερματισμό ενός μονομερούς M (monomer), με τη βοήθεια ενός εκκινητή (ή απαρχητή) I (initiator) που διασπάται αρχικά σε ρίζες R• (radical).

Έναρξη (initiation) :



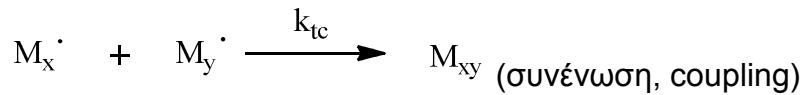
Διάδοση (propagation):



Διάδοση γενικά:



Τερματισμός (termination):



Οι εξισώσεις της ταχύτητας των αντιδράσεων είναι :

Έναρξη :

$$d[M\cdot]/dt = 2fk_d[I]$$

Τερματισμός :

$$-d[M\cdot]/dt = 2k_t[M\cdot]^2$$

Στην εξίσωση έναρξης ο παράγοντας f ισούται με το κλάσμα των ριζών που δημιουργούνται από τη διάσπαση του εκκινητή (απαρχητή) με τον οποίο πραγματοποιείται η εκκίνηση της αντίδρασης ριζικού πολυμερισμού. Οι k_i , k_d , k_p , k_t είναι οι σταθερές ταχύτητας των αντιδράσεων στα επιμέρους στάδια. Η συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών κατά τον πολυμερισμό $[M\cdot]$, σταθεροποιείται στα πρώτα στάδια των αντιδράσεων πολυμερισμού και οι ρίζες καταστρέφονται και πραγματοποιούνται με παραπλήσιες ταχύτητες. Με αυτόν τον τρόπο η σταθερή κατάσταση στατικής ισορροπίας πετυχαίνεται την στιγμή που η ταχύτητα της αντίδρασης έναρξης είναι ίση με αυτή της αντίδρασης τερματισμού :

$$d[M\cdot]/dt = -d[M\cdot]/dt$$

$$2fk_d[I] = 2k_t[M\cdot]^2 \quad M = fk_d I / k_t^{1/2}$$

Η ταχύτητα της αντίδρασης διάδοσης του πολυμερισμού είναι η ίδια με αυτή της εξαφάνισης του μονομερούς. Στην περίπτωση που ο αριθμός των μονομερών που χρησιμοποιούνται στο στάδιο έναρξης είναι μικρότερος από τον αριθμό χρήσης στο στάδιο της διάδοσης, οι εξισώσεις που εκφράζουν την κινητική, είναι οι εξής:

Διάδοση :

$$-d[M]/dt = k_p[M][M\cdot]$$

$$-d[M]/dt = k_p[M](fk_d[I]/k_t)^{1/2}$$

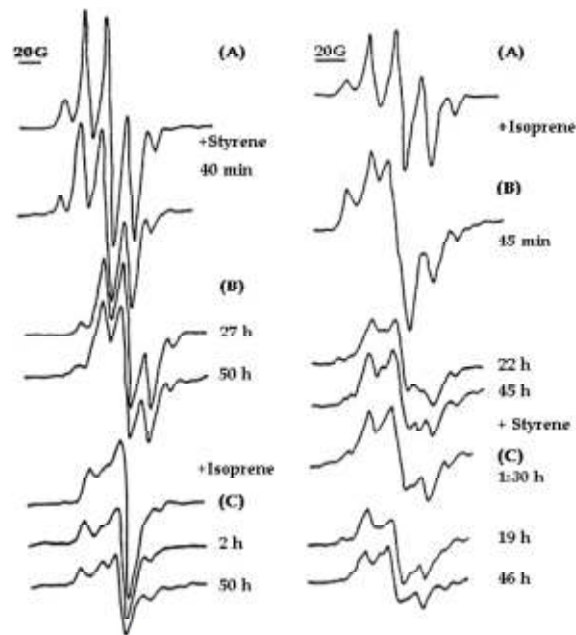
Από αυτές τις εξισώσεις φαίνεται ότι στα πρώτα στάδια του ριζικού πολυμερισμού, η ταχύτητα του πολυμερισμού είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του εκκινητή στο τετράγωνο $[I]^2$ και στην πρώτη δύναμη της συγκέντρωσης του μονομερούς $[M]$. Οι εξισώσεις αυτές έχουν επιβεβαιωθεί και μέσω πειραματικών αποτελεσμάτων. Παρόλα αυτά θα πρέπει να γίνουν ορισμένες απλοποιήσεις και παραδοχές στις αντιδράσεις αυτές. Η ταχύτητα με την οποία σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες από τον εκκινητή είναι ίση με αυτή της καταστροφής τους. Στο στάδιο της διάδοσης η δραστηριότητα των μακροριζών δεν επηρεάζεται από το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας. Η ταχύτητα παραγωγής μακροριζών είναι ίση με την ταχύτητα καταστροφής

τους (με συνένωση ή ανακατανομή). Ακόμα, η ταχύτητα ριζικού πολυμερισμού ισούται με την ταχύτητα διάδοσης του ριζικού πολυμερισμού.

1.5.5 Ριζικός Πολυμερισμός για τη Σύνθεση Συμπολυμερών

Ο ριζικός πολυμερισμός έχει χρησιμοποιηθεί με σκοπό τη σύνθεση και συμπολυμερών (copolymers). Τα συμπολυμερή αποτελούνται από δύο διαφορετικά μονομερή, π.χ. στυρόλιο και ισοπρένιο. Σε αντίθεση με τα ομοπολυμερή (homopolymers), τα συμπολυμερή κατατάσσονται σε τυχαία συμπολυμερή (random) ή στατιστικά (statistical) συμπολυμερή όταν η επανάληψη των δομικών μονάδων A και B είναι τυχαία, εναλλασσόμενα συμπολυμερή (alternating) όταν οι δομικές μονάδες A και B εναλλάσσονται διαδοχικά, στα κατά συστάδες συμπολυμερή (block) όταν αποτελούνται από 2,3 ή και πιο πολλές συστάδες δομικών μονάδων : ---AAAABBBBAAAA--- και στα εμβολιασμένα συμπολυμερή (graft) όταν η κύρια αλυσίδα αποτελείται από τη μία δομική μονάδα και οι κλάδοι από την άλλη δομική μονάδα.

Ο ριζικός πολυμερισμός για τη σύνθεση συμπολυμερών κατά συστάδες πραγματοποιήθηκε στο συμπολυμερισμό N-μεθυλο μεθακρυλαμιδίου με στυρόλιο και ισοπρένιο [P(NMeMA@St@Is)] εντός ετερογενούς διαλύματος των μονομερών σε βενζόλιο. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε υάλινα δοχεία που είχαν υποστεί συστηματική απαέρωση με υψηλό κενό για να αφαιρεθούν ο αέρας και άλλα ίχνη ουσιών που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν τον πολυμερισμό. Η ζωή των μακροριζών που σχηματίζεται μ' αυτό τον τρόπο διαρκούν μερικές ώρες καθώς εγκλωβίζονται μέσα στα αδιάλυτα τμήματα του πολυμερούς. Η μετατροπή των αρχικών μακροριζών του N-μεθυλο μεθακρυλαμιδίου σε αυτά του στυρολίου και του ισοπρενίου ελέγχεται με ευκολία μέσω του Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού [13].



Εικόνα 1.4: Φασματοσκοπία ΗΠΣ για τη σύνθεση των συμπολυμερών με ζωντανό ριζικό πολυμερισμό P(NMeMA-b-St-b-Is)[39]

1.6 Πολυμερή ευαίσθητα στη θερμοκρασία

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η θερμοκρασία του ανθρώπινου οργανισμού είναι $36,6^{\circ}\text{C}$, ενώ υπό ορισμένες παθολογικές συνθήκες ή παρουσία πυρετογόνων, η θερμοκρασία του σώματος διαφέρει από τα κανονικά επίπεδα. Μια αλλαγή τέτοιου είδους στη θερμοκρασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ερέθισμα για την απελευθέρωση φαρμάκων, αποκλειστικά και μόνο σε εκείνες τις περιοχές που θα βρίσκονται οι αποκλίσεις. Η θερμοκρασία είναι το πιο γνωστό χρησιμοποιούμενο ερέθισμα στα αποκρίσιμα πολυμερικά συστήματα [14,15,16,17]. Η μεταβολή της θερμοκρασίας ελέγχεται εύκολα, καθώς επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί το ίδιο εύκολα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα θερμο-ευαίσθητα πινάκια, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διεργασίες απομόνωσης κυττάρων *in vitro* και θερμοευαίσθητα υδατοπηκτώματα ή μικκύλια, που περιέχουν φάρμακα και μπορούν να εφαρμοστούν *in vivo*. Μια από τις σημαντικές ιδιότητες των θερμοευαίσθητων πολυμερών είναι πως υπάρχει μια κρίσιμη θερμοκρασία διάλυσης (Lower Critical Solution Temperature, LCST), στην οποία η φάση του πολυμερούς και του διαλύματος αλλάζουν ασυνεχώς σύμφωνα με τη σύστασή τους. Στην περίπτωση που το διάλυμα του πολυμερούς (κυρίως υδατικό) έχει μια φάση κάτω από μια συγκεκριμένη θερμοκρασία, ενώ παρουσιάζει διαχωρισμό φάσεων πάνω από τη θερμοκρασία αυτή, τότε αυτό το πολυμερές έχει LCST. Σε αντίθετη περίπτωση ονομάζεται ανώτατη κρίσιμη

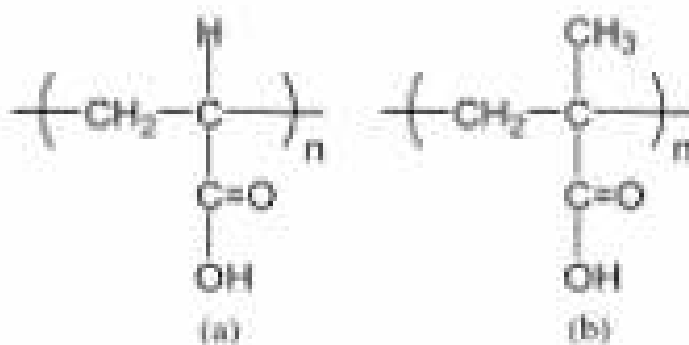
θερμοκρασία διάλυσης (Upper Critical Solution Temperature, UCST). Παρόλα αυτά ο μεγαλύτερος αριθμός εφαρμογών σχετίζεται με πολυμερικά συστήματα τα οποία εμφανίζουν LCST. Συρρίκνωση των αλυσίδων συμβαίνει πριν τη διαμοριακή συσσωμάτωση στην LCST και αυτή η συρρίκνωση των μεμονωμένων αλυσίδων μεγαλώνει τη σκεδαζόμενη ακτινοβολία από το διάλυμα (σημείο θολώσεως, cloud point). Ο διαχωρισμός των φάσεων μεταξύ πολυμερούς και διαλύτη εμφανίζεται στο σημείο θολώσεως. Πέρα από τη σχέση μεταξύ του πολυμερούς και των μορίων του νερού παρουσιάζεται ένα επίσης σημαντικό χαρακτηριστικό για τα θερμο-αποκρινόμενα πολυμερή. Η διαμοριακή αλληλεπίδραση σε υδατικό μέσο, προκαλεί πιθανή συρρίκνωση του υδατοπηκτώματος, συσσωμάτωση των μικκυλίων και σχηματισμό φυσικών σταυροδεσμών σε ένα δίκτυο. Θεωρείται ότι υπάρχουν δύο είδη διαμοριακών δυνάμεων, οι δεσμοί υδρογόνου καθώς επίσης και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Μία μεταβολή της θερμοκρασίας μπορεί να δημιουργήσει ή να καταστρέψει δεσμούς υδρογόνου με αποτέλεσμα υδατοπηκτώματα αποτελούμενα από πολυοξέα (πρωτονιοδότης σε χαμηλό pH) και πολυαμίδια (πρωτονιοδέκτης) να διογκώνονται και να συρρικνώνονται αντιστρεπτά γύρω από μια κρίσιμη θερμοκρασία. Από την άλλη, η διαμοριακή συσσωμάτωση είναι εφικτό να ελεγχθεί μέσω της ισορροπίας υδρόφιλου-υδρόφοβου και της θερμοκρασίας [18]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα πολυμερούς με LCST είναι το πολύ(N-ισοπροπυλ-ακρυλαμίδιο), PNIPAAm, που παρουσιάζει απότομη αλλαγή φάσης στο νερό στους 32°C. Τελευταία έχουν υπάρξει αναφορές για βιολογικά πολυμερή, αλλά και για συμπολυμερή πολυπεπτιδίων, που μεταβάλλουν τη διαμόρφωση τους με αλλαγή της θερμοκρασίας[38].

1.7 Πολυμερή ευαίσθητα στο pH

Τα πολυμερή τα οποία παρουσιάζουν ευαισθησία στο pH αποτελούνται από μονομερή που δύνανται να ιονιστούν, να δώσουν δηλαδή ή να πάρουν πρωτόνια ανταποκρινόμενα στη μεταβολή του pH. Ενώ το pH αλλάζει ο βαθμός ιονισμού του πολυμερούς μεταβάλλεται σημαντικά γύρω από μια συγκεκριμένη τιμή pH, η οποία ονομάζεται pKa. Η ταχύτερη αυτή αλλαγή στο συνολικό φορτίο της αλυσίδας επιφέρει μεταβολή του υδροδυναμικού όγκου των πολυμερικών αλυσίδων. Η εναλλαγή από συρρικνωμένη σε εκτεταμένη διαμόρφωση ορίζεται από την οσμωτική πίεση, που προκύπτουν από τα αντισταθμιστικά ιόντα των φορτίων των αλυσίδων [19]. Δύο είναι τα είδη των αποκρινόμενων στο pH πολυηλεκτρολυτών: ασθενή πολυοξέα και ασθενείς πολυβάσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ασθενούς πολυοξέως είναι το πολυακρυλικό οξύ, που εμφανίζεται ουδέτερο σε χαμηλό pH, ενώ αντίθετα ιονίζεται σε υψηλό pH [20]. Από την άλλη πλευρά πολυβάσεις, όπως για παράδειγμα η 4-βινυλοπυριδίνη είναι πρωτονιωμένη σε χαμηλό pH και

ουδέτερη σε υψηλό pH [21]. Έτσι, η πιο σωστή επιλογή ανάμεσα στα πολυοξέα και στις πολυβάσεις θα πρέπει να γίνει για κάθε μία από τις εφαρμογές. Τα υδρόφοβα τροποποιημένα pH-ευαίσθητα πολυμερή εμφανίζουν μια ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ ηλεκτροστατικών απώσεων και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Στην περίπτωση που οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις εξελείφονται, τότε υπερισχύουν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, κάτι που έχει σαν αποτέλεσμα να δημιουργείται συσσωμάτωση των πολυμερικών αλυσίδων σε υδατικό περιβάλλον[20].

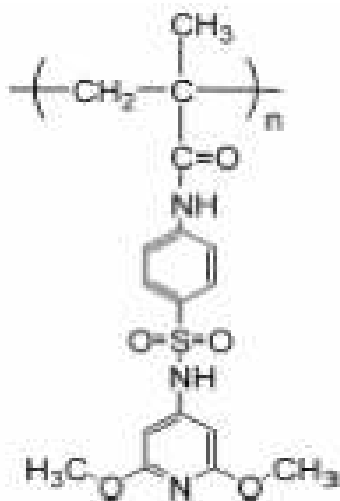
Τα ασθενή πολυοξέα τα οποία υφίστανται πρωτονίωση/αποπρωτονίωση σε περιοχή pH από 4 ως 8, κατατάσσονται στα pH-αποκρινόμενα πολυμερή. Τα πολυοξέα που έχουν την καρβοξυλική ομάδα με pKa περίπου 5-6 είναι τα πιο αντιπροσωπευτικά ασθενή πολυοξέα. Μεταξύ αυτών, το πολυακρυλικό οξύ PAA[20] και το πολυμεθακρυλικό οξύ PMAA[22] είναι αυτά τα οποία εμφανίζονται συχνότερα στις αναφορές των pH-αποκρίσιμων πολυοξέων.



Εικόνα 1.5: Αντιπροσωπευτικά pH-αποκρίσιμα μονομερή: (α) ακρυλικό οξύ και (β) μεθακρυλικό οξύ.[40]

Η καρβοξυλική ομάδα έχει πρωτόνια σε χαμηλό pH, ενώ ιονίζεται σε υψηλό, τη στιγμή που ένα πρωτόνιο απομακρύνεται. Έτσι, σε υψηλό pH μετατρέπεται σε πολυηλεκτρολύτη με ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις ανάμεσα στις αλυσίδες. Αυτό το γεγονός μαζί με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι εφικτό να συμβάλλουν στην καταβύθιση/διαλυτοποίηση πολυμερικών αλυσίδων, ή συρρίκνωση/διόγκωση των υδατοπηκτωμάτων και τις υδρόφιλες/υδρόφοβες ιδιότητες τροποποιημένων επιφανειών. Το PMAA εμφανίζει μια συμπαγή διαμόρφωση των αλυσίδων σε μικρότερες από μια κρίσιμη τιμή βαθμού ιονισμού, γιατί έτσι η μεθυλ-ομάδα που έχει, επιφέρει αρκετά υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Η συμπαγής αυτή διαμόρφωση του PMAA στην αφόρτιστη κατάσταση καλείται ως διαμόρφωση υπερέλικας (hypercoil)[19]. Ασθενή πολυοξέα ονομάζονται τα pH-ευαίσθητα πολυμερή όταν περιέχουν ομάδες σουλφοναμιδίου, τα οποία αποτελούνται από ποικίλες τιμές pKa στην περιοχή

pH από 3 ως 11[23]. Στην παρακάτω εικόνα εμφανίζεται ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα pH-αποκρίσιμου πολυμερούς που έχει ομάδα σουλφαμιδίου, όπου το άτομο του υδρογόνου στο αμιδικό άζωτο είναι εφικτό με ευκολία να ιονιστεί και να δημιουργηθεί ένα ασθενές πολυοξύ.



Εικόνα 1.6: pH-αποκρίσιμο μονομερές που περιέχει ομάδα σουλφαμιδίου.[40]

1.8 Πολυμερή ευαίσθητα στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό

Τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων τα οποία χρησιμοποιούν διάσπαση δισουλφιδικών δεσμών έχουν μεγάλη σημασία. Αυτό γίνεται γιατί η κιτοσόλη και οι πυρήνες των κυττάρων έχουν 100-1000 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH: τριπεπτίδιο) από τα υγρά του σώματος, περιλαμβανομένου και του αίματος καθώς επίσης και του εξωκυττάριου μέσου (0,5-10 mM έναντι 2-20 M GSH). Επιπλέον τα καρκινικά κύτταρα συχνά εμφανίζουν πιο υψηλά επίπεδα γλουταθειόνης. Οξειδοαναγωγικά ευαίσθητα νανοσωματίδια σαν και αυτά, παρασκευάζονται από αυτοσυνένωση αμφιφιλικού μπλοκ ή εμβολιασμένα συμπολυμερή, τα οποία φέρουν υδρόφοβα και υδρόφιλα τμήματα συνδεδεμένα ή εγκάρσια συνδεδεμένα διαμέσου μίας δισουλφιδικής γέφυρας[24]. Μια ευρεία ποικιλία βιοαποικοδομήσιμων οξειδοαναγωγικών ευαίσθητων αμφίφιλων συμπολυμερών, έχει μελετηθεί να ενσωματώνει και στη συνέχεια να απελευθερώνει φάρμακα. Υδρόφοβα πολυμερή σαν την πολύ-καπρολακτόνη (PCL), το πολύ(γαλακτικό@γλυκολικό οξύ), το πολύ(γαλακτικό οξύ), τους πολύ-φωσφοεστέρες και τα πολυπεπτίδια έχουν συζευχθεί, παραδείγματος χάριν, με υδρόφιλη πολύ-αιθυλενογλυκόλη[25] ή πολυσακχαρίτες[26]. Οι πολυσακχαρίτες είναι σημαντικού ενδιαφέροντος λόγω της ανανεωσιμότητας τους, της μη τοξικότητας, της βιοαποικοδομησιμότητας και για κάποιους από αυτούς, εξαιτίας των βιολογικών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους[27].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ-ΙΑΤΡΙΚΗ

Με την εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στη ιατρική έχει υπάρξει ανάπτυξη μίας νέας γενιάς διαγνωστικών εργαλείων τα οποία παρέχουν ακριβή βιολογικά δεδομένα σε σύντομο χρονικό διάστημα και με απλό τρόπο. Καθώς επίσης η έρευνα για την ανάπτυξη φορέων με διαφορετικές ιδιότητες και λειτουργίες (χρήσεις), αλλά και νέων συσκευών για την ελεγχόμενη αποδέσμευση των φαρμάκων αποτελούν έναν σημαντικό τομέα της νανοϊατρικής. Έτσι η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στην αναγεννητική ιατρική υπόσχεται μια εντελώς διαφορετική προσέγγιση στην αντιμετώπιση των ασθενειών.

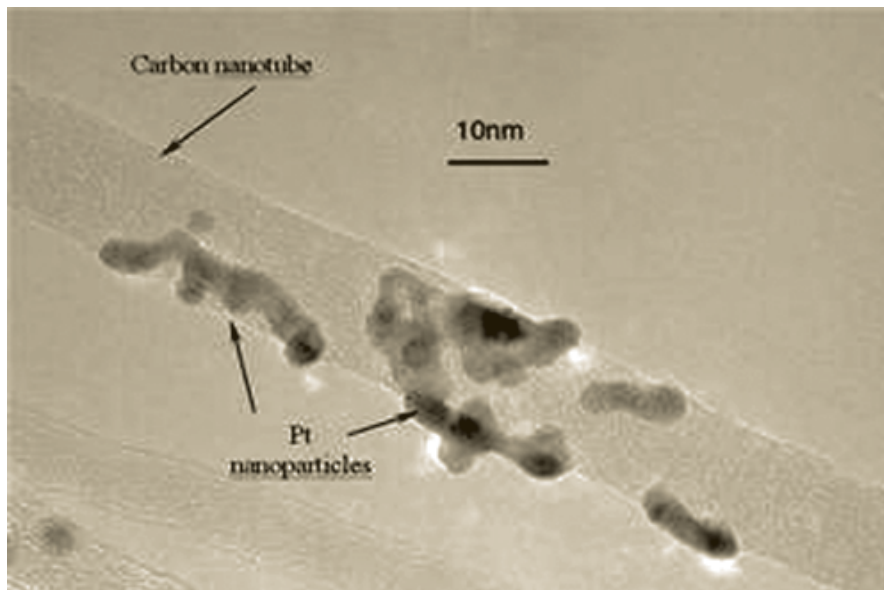
Η νανοϊατρική χαρακτηρίζεται ως η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στον τομέα της υγείας. Έχει βάσεις στις βελτιωμένες και συχνά νέες φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες των νανοδομημένων υλικών. Το συγκρίσιμο μέγεθος των συνθετικών αυτών δομών με φυσικές λειτουργικές μονάδες (βιομόρια και κύτταρα) επιτρέπει την άμεση αλληλεπίδραση τους με τους ζωντανούς οργανισμούς. Στόχος της νανοϊατρικής είναι να βελτιώσει τόσο τη διαγνωστική ιατρική (έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση) όσο και τη θεραπευτική ιατρική (π.χ. βελτιωμένες φαρμακευτικές ουσίες, συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων) καθώς επίσης και την ανάπτυξη μεθόδων για τη συστηματική ιατρική παρακολούθηση (π.χ. της εξέλιξης των ασθενειών, της αποτελεσματικότητας της φαρμακευτικής αγωγής).

2.1 Διαγνωστική Ιατρική

Η νανοτεχνολογία στη διαγνωστική ιατρική έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μίας νέας γενιάς διαγνωστικών τα οποία έχουν μικρό μέγεθος, απαιτούν μικρή ποσότητα δείγματος και παρέχουν σε σύντομο χρονικό διάστημα ακριβή βιολογικά δεδομένα μέσω μίας απλής μέτρησης. Συνάμα, η σύγκλιση της νανοτεχνολογίας και της ιατρικής απεικόνισης αναμένεται μελλοντικά να καταστήσει εφικτή την ανίχνευση ενός μόνο μορίου ή ενός κυττάρου μέσα σε ένα πολύπλοκο βιολογικό περιβάλλον.

2.1.1 *In vitro* διάγνωση

Ένα *in vitro* διαγνωστικό εργαλείο είναι δυνατό να είναι ένας απλός χημικός ή βιοχημικός αισθητήρας ή μία ολοκληρωμένη συσκευή πολλαπλών αισθητήρων. Ο αισθητήρας έχει ένα στοιχείο, το οποίο μπορεί να αναγνωρίζει την παρουσία, δραστηριότητα ή συγκέντρωση ενός ορισμένου βιομορίου σε ένα διάλυμα και να παράγεται ένα σήμα μέσω μίας βιοχημικής αλλαγής. Με τον μετατροπέα σήματος πραγματοποιείται η ποσοτικοποίηση του βιοχημικού αυτού σήματος. Με τον συνδυασμό της ελαχιστοποίησης του μεγέθους των συσκευών και της ενσωμάτωσης διαφόρων λειτουργιών σε μία μοναδική συσκευή, με βάση προηγμένες τεχνικές της βιομηχανίας ηλεκτρονικών, αναπτύσσεται μια νέα γενιά συσκευών που είναι μικροσκοπικές, γρήγορες, έχουν χαμηλό κόστος, δεν απαιτούν κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό για τη χρήση τους, χρειάζονται μικρά δείγματα, κάτι που οδηγεί σε λιγότερο επώδυνες και τραυματικές μεθόδους λήψης δειγμάτων αίματος, βιολογικών υγρών και ιστών, και παράγουν ολοκληρωμένα και ακριβή δεδομένα από μία και μόνο μέτρηση. Είναι επίσης σημαντικό ότι έχουν ήδη αναπτυχθεί νανοσυσκευές διάγνωσης σε μορφή πλακιδίου (chip), οι οποίες έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να ποσοτικοποιούν συγκεκριμένα τμήματα του ανθρώπινου γονιδιώματος, καθώς και των εκφρασμένων πρωτεϊνών τους έχοντας ως ανιχνευτές τα αντίστοιχα συμπληρωματικά DNA τμήματα ή κατάλληλα αντισώματα.



Εικόνα 2.1: Βιοαισθητήρας υψηλής ευαισθησίας για την ανίχνευση της γλυκόζης στο αίμα σε σχεδόν πραγματικό χρόνο. Αποτελείται από νανοσωλήνες άνθρακα με επικάλυψη από σωματίδια λευκόχρυσου διαμέτρου 1-5 nm (University of Arkansas, USA)[37]

Η *ex vivo* ανάλυση βιολογικών δειγμάτων γίνεται με μία σειρά από φασματοσκοπικές μεθόδους και μεθόδους μικροσκοπίας, με πιο συχνά χρησιμοποιούμενες την οπτική μικροσκοπία και τις μεθόδους ηλεκτρονικής και μικροσκοπίας κοντινού πεδίου. Επιπλέον αναλυτικές τεχνικές σαν τις μικροσκοπία σάρωσης με ακίδα, φασματοσκοπία απεικόνισης μάζας και προηγμένες τεχνολογίες υπέρηχων μας δίνουν την δυνατότητα για *in vitro* διάγνωση ή ανάγνωση ολοκληρωμένων υπερευαίσθητων βιοπλακιδίων (biochips).

Μελλοντικά, προτεραιότητα αναμένεται να δοθεί στη σχεδίαση γρήγορων, αξιόπιστων, ολοκληρωμένων πολυλειτουργικών συσκευών διάγνωσης για πολλές παθολογίες. Οι νέες συσκευές διάγνωσης επιδέχονται επιθυμητές βελτιώσεις οι οποίες συνοψίζονται στις εξής: i) λήψη δείγματος από σωματικά υγρά ή ιστούς για βιοψία χωρίς το αίσθημα του πόνου, ii) ενσωμάτωση της διεργασίας προετοιμασίας του δείγματος στις συσκευές, iii) ακόμα μεγαλύτερη μείωση του απαιτούμενου όγκου των βιολογικών δειγμάτων, iv) περαιτέρω σμίκρυνση που έχει ως στόχο την ανάπτυξη πιο γρήγορων συστημάτων αυξημένης απόδοσης στα πλαίσια της ανάλυσης, ευαισθησίας, εξειδίκευσης, ικανότητας αναπαραγωγής των αποτελεσμάτων (από εργαστήριο σε εργαστήριο) και ολοκλήρωσης (μεγάλος αριθμός λειτουργιών σε μία μοναδική συσκευή), v) εξ' ολοκλήρου ανάλυση ενός βιο-μοτίβου (χαρτογράφηση) που περιέχει γονίδια, πεπτίδια και μικρά μόρια, σε ένα πολύπλοκο δείγμα, vi) διαγνωστικά συστήματα με ενσωματωμένο λογισμικό, δείκτες για συγκεκριμένες ασθένειες και εξειδικευμένο εξοπλισμό για συλλογή δεδομένων από απόσταση.

2.1.2 *In vivo* διάγνωση

Με τον όρο *in vivo* διάγνωση γίνεται γενικά αναφορά σε τεχνικές απεικόνισης (π.χ. μοριακή απεικόνιση), ωστόσο περιέχει και τις εμφυτεύσιμες διαγνωστικές συσκευές. Ως πλεονεκτήματα η μοριακή απεικόνιση έχει την έγκαιρη διάγνωση διαφόρων ασθενειών και την παρακολούθηση της εξέλιξής τους (π.χ. καρκινικές μεταστάσεις). Με την στοχευμένη μοριακή απεικόνιση επιτρέπεται η αναγνώριση του τόπου ανάπτυξης μιας φλεγμονής, η οπτικοποίηση των αγγειακών δομών ή των σταδίων συγκεκριμένων ασθενειών, η παρακολούθηση της κατανομής ενός φαρμάκου και η ανίχνευση της απρόβλεπτης και τυχόν επικίνδυνης συσσώρευσης του σε κάποιες περιοχές.

Ως βασικός στόχος της *in vivo* απεικόνισης παρουσιάζεται η ανάπτυξη ιδιαίτερα ευαίσθητων και αξιόπιστων μεθόδων απεικόνισης, ειδικά κατάλληλων για διάγνωση ασθενειών, αποδέσμευση φαρμάκων και παρακολούθηση της κατανομής τους, καθώς επίσης και έλεγχο της αποτελεσματικότητας της θεραπείας (theranostics). Ως μελλοντικούς ερευνητικούς στόχους η *in vivo* απεικόνιση έχει τους εξής: i) να αναπτυχθούν βελτιωμένα συστήματα ανίχνευσης εστιασμένα σε μικρές, αποτελεσματικές, χαμηλού κόστους κάμερες για απεικόνιση όλου του σώματος με πολλαπλά ισότοπα και πολλαπλούς ανιχνευτές, ii) να βελτιωθούν οι υπάρχοντες ανιχνευτές μέσω εξέλιξης της αρχιτεκτονικής τους ή των υλικών δόμησής τους, iii) να αναπτυχθούν βελτιωμένες, μη τοξικές ανιχνευτικές μικρο-διατάξεις που δεν επιφέρουν διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος ενώ διεγείρονται από κάποιο εξωτερικό μαγνητικό ή ηλεκτρομαγνητικό πεδίο (ραδιοσυχνότητα, υπέρηχους, ακτίνες Χ) και εισέρχονται στα κύτταρα ξεπερνώντας τα διάφορα βιολογικά εμπόδια, και iv) να βελτιωθούν οι μέθοδοι συλλογής σημάτων, ανάλυσης εικόνας και επεξεργασίας σήματος και δεδομένων (π.χ. μετατροπή σήματος από απόσταση, ενδοκυτταρική τομογραφία σε πραγματικό χρόνο, ανίχνευση και διάγνωση με χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή για διευκόλυνση της εξαγωγής πληροφοριών).

2.1.3 Ιατρικές συσκευές

Με την παρακολούθηση των μορίων που κυκλοφορούν στο αίμα παρουσιάζεται μεγάλο ενδιαφέρον ειδικά για τις χρόνιες ασθένειες όπως είναι ο διαβήτης και το AIDS. Έτσι, η ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέτρηση της γλυκόζης ή/και των δεικτών κάποιας μολυσματικής ασθένειας στο αίμα, συντελεί στην ύπαρξη μίας σημαντικής εφαρμογής των ιατρικών συσκευών.

Οι τεχνολογικοί στόχοι στον τομέα των ιατρικών συσκευών είναι δυνατό να συνοψιστούν στους εξής: i) ελαχιστοποίηση του μεγέθους των στοιχείων που

εισχωρούν στο ανθρώπινο σώμα κατά τη διάρκεια της ανάλυσης με στόχο την πιο ανώδυνη χρήση τους, καθώς επίσης και επεξεργασία των επιφανειών τους ώστε να είναι σίγουρη η συμβατότητά τους με το ανθρώπινο σώμα (αύξηση βιοσυμβατότητας), ii) χρήση νανο-οντοτήτων που είναι εφικτό να αναγνωρίσουν παθολογίες-ατέλειες σε πρώιμο στάδιο, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη γρήγορη αντιμετώπισή τους, iii) βελτίωση της διάγνωσης-θεραπείας χρησιμοποιώντας προηγμένες τεχνολογίες πλοήγησης και απεικόνισης iv) αυτόνομη ισχύς, v) αυτο-διάγνωση, vi) τηλεχειρισμός και vii) εξωτερική μεταφορά δεδομένων.

2.2 Ελεγχόμενη Αποδέσμευση Φαρμάκων

Η εξέλιξη στην ελεγχόμενη αποδέσμευση των φαρμάκων έχει να κάνει με την ανάπτυξη συνθετικών νανο-συστημάτων για τη στοχευμένη απόδοση περίπλοκων θεραπευτικών φαρμάκων και βιομορίων. Τα στοχευμένα συστήματα απόδοσης φαρμάκων έχουν διάφορες ιδιότητες, με πιο χαρακτηριστική την ικανότητα που έχουν στο να αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μόρια τα οποία μπορεί να είναι τοποθετημένα είτε στην εξωτερική μεμβράνη των προς στόχευση κυττάρων ή στο εσωτερικό τους.

Οι βασικοί στόχοι της νανοιατρικής στα πλαίσια της ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων είναι η αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας και της αποτελεσματικότητας των θεραπευτικών ουσιών, ο έλεγχος της φαρμακοκινητικής και της φαρμακοδυναμικής που παρουσιάζουν, ο έλεγχος και η καταστολή της μη επιθυμητής τοξικότητας και της ανοσογένειας που δημιουργούν καθώς επίσης και η αποτελεσματική αντιμετώπιση περιορισμών χρήσης τους εξαιτίας της μικρής διαλυτότητας τους, της ταχύτατης αποικοδόμησης και αποβολής τους από τον οργανισμό του ανθρώπου, της σχετικά μικρής βιολογικής δραστηριότητάς τους και της αδυναμίας τους να διαπεράσουν βιολογικά εμπόδια.

Η ανάπτυξη συστημάτων στοχευμένης απόδοσης πρωτεϊνικών/πεπτιδικών (Π/Π) φαρμάκων για εισπνεόμενη, ρηνική ή στοματική χορήγηση αποτελεί μία ιδιαίτερη πρόκληση για την νανοϊατρική. Μέχρι τώρα, η πλειονότητα των φαρμάκων αυτών χορηγούνται σε ενέσιμη μορφή. Παρόλα αυτά έχοντας ως δεδομένο ότι τα Π/Π φάρμακα αποβάλλονται εξαιρετικά γρήγορα από τον ανθρώπινο οργανισμό πριν καν προλάβουν να επιτύχουν τον θεραπευτικό τους στόχο, είναι απαραίτητη η συχνή χορήγηση τους προκειμένου να ενισχυθεί η θεραπευτική τους αποτελεσματικότητα κάτι που αποτελεί μία πολύ επώδυνη διαδικασία για τους ασθενείς.

Οι στόχοι που προαναφέρθηκαν αναμένεται να επιτευχθούν μέσω της ανάπτυξης συστημάτων στοχευμένης απόδοσης τα οποία αποδεσμεύουν επιλεκτικά το φάρμακο σε συγκεκριμένα σημεία στον ανθρώπινο οργανισμό.

Έχοντας όμως ως δεδομένο ότι τα χαρακτηριστικά των φαρμάκων έχουν σημαντικές διαφορές σε ότι έχει να κάνει με τη σύσταση, το μοριακό μέγεθος, την υδροφιλικότητα, τη βιοδιαθεσιμότητα, τη μέγιστη δυνατή συγκέντρωση (σε υψηλότερες ή χαμηλότερες συγκεντρώσεις το φάρμακο μπορεί να είναι τοξικό ή να μην έχει θεραπευτική ικανότητα) κλπ., τα κύρια χαρακτηριστικά που καθορίζουν την αποτελεσματικότητα των συστημάτων στοχευμένης απόδοσης είναι αρκετά πολύπλοκα. Για αυτόν το λόγο, η ανάπτυξη τους θα πρέπει να είναι απόρροια συνεργασίας επιστημόνων διαφόρων ειδικοτήτων με πλήρη κατάρτιση στους παρακάτω τομείς: ανόργανη και οργανική χημεία, πολυμερή, φαρμακοχημεία, φαρμακολογία, μοριακή βιολογία, τοξικολογία, κλπ.

2.2.1 Φορείς Φαρμάκων

Ο σχηματισμός των μικυλλίων πραγματοποιείται με αυτοοργάνωση των μορίων αμφίφιλων συσταδικών συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα. Τα μικύλλια αποτελούν μία σημαντική πλατφόρμα για τη νανοϊατρική λόγω του μικρού μεγέθους τους (10-100 nm) και των εξαιρετικών τους ιδιοτήτων. Μέσω του τρόπου παρασκευής τους καθίσταται δυνατός ο ακριβής έλεγχος του μεγέθους και της μορφολογίας τους όπως επίσης και η δυνατότητα εγκλεισμού υδρόφιλων φαρμάκων στον πυρήνα τους. Έχει παρατηρηθεί ότι τα μικύλλια παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα *in vivo* και μεγάλο χρόνο παραμονής στο αίμα. Επιπροσθέτως, η δομή πυρήνα/κελύφους των μικυλλίων καθιστά εφικτή την αποτελεσματική προστασία του εμβλαπτισμένου φαρμάκου από υδρόλυση και ενζυματική αποικοδόμηση. Ακόμα είναι δυνατή και η σύνθεση πολυλειτουργικών μικυλλίων που αποσκοπούν στην στοχευμένη απόδοση φαρμάκων μέσω σύζευξης ομάδων στόχευσης (π.χ. φολικό οξύ, πεπτιδίο RGD, αντισώματα, υδρογονάνθρακες όπως γλυκόζη, λακτόζη κ.λπ.) στα άκρα των αμφίφιλων πολυμερικών αλυσίδων.

Τα λιποσώματα χαρακτηρίζονται ως μία μορφή κυστιδίων που αποτελούνται από λιπιδικές διπλοστοιβάδες. Οι φορείς αυτοί καθίστανται εφικτοί τόσο για τον εγκλεισμό πολικών/υδρόφιλων φαρμάκων στον πυρήνα των λιποσωμάτων όσο και αμφίφιλων ή λιπόφιλων φαρμάκων στο εσωτερικό της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Η έρευνα στην τεχνολογία των λιποσωμάτων έχει μεταβεί από τα συμβατικά κυστίδια (λιποσώματα πρώτης γενιάς) στα λιποσώματα δεύτερης γενιάς τα οποία έχουν λειτουργικές ομάδες στην επιφάνειά τους όπως γλυκολιπίδια, σιαλικό οξύ και πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG). Τα τελευταία μπορούν να φέρουν και ομάδες στόχευσης (π.χ. μονοκλωνικά αντισώματα) με σύζευξη αυτών με κατάλληλα τροποποιημένα μόρια PEG.

Τα δενδριμερή είναι πολυμερή μονοδιάσπαρτα διακλαδισμένα τα οποία έχουν συμμετρική αρχιτεκτονική. Φέρουν έναν κεντρικό πυρήνα, μονάδες

διακλάδωσης και τελικές λειτουργικές ομάδες. Με αυτή τη μορφή αρχιτεκτονικής ευνοείται ο σχηματισμός νανο-κοιλοτήτων, το περιβάλλον των οποίων καθορίζει τη διαλυτοποίηση μορίων μέσα σε αυτές, ενώ οι εξωτερικές ομάδες επηρεάζουν τη διαλυτότητα και τη χημική συμπεριφορά των φορέων. Τα υπερ-διακλαδισμένα πολυμερή σχηματίζονται επίσης από νανο-κοιλότητες αλλά σε σύγκριση με τα δενδριμερή είναι πολυδιάσπαρτα και μη-συμμετρικά. Πολυλειτουργικά δενδριτικά πολυμερή (δενδριμερή και υπερ-διακλαδισμένα πολυμερή) δύνανται να παραχθούν με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων μέσω κατάλληλης επεξεργασίας των επιφανειακών τους ομάδων (π.χ. σύζευξη με PEG και ομάδες στόχευσης). Οι υγροί κρύσταλλοι έχουν τις ιδιότητες τόσο των υγρών όσο και των στερεών, ενώ παράλληλα εμφανίζουν διαφορετικές γεωμετρίες με εναλλαγή πολικών και μη-πολικών στοιβάδων (στρωματική δομή) όπου είναι εφικτό να περιέχονται υδατικά διαλύματα φαρμάκων.

Τα νανοσωματίδια (συμπεριλαμβανομένων των νανοσφαιριδίων και νανοκαψουλών) χαρακτηρίζονται ως σταθερά, οργανικά ή ανόργανα σωματίδια με μεγέθη μεταξύ 10nm και 1000 nm. Οι φαρμακευτικές ενώσεις μπορούν και να προσροφηθούν στην επιφάνεια των σωματιδίων και να εγκλειστούν μέσα σε αυτά με σκοπό την προστασία τους από κάθε πιθανή χημική ή ενζυματική αποικοδόμηση. Τα νανοσωματίδια συνηθίζεται να συσσωρεύονται σε καρκινικούς όγκους, φλεγμονές και σημεία μόλυνσης λόγω του φαινομένου της ενισχυμένης διαπερατότητας και της κατακράτησης που παρουσιάζουν τα αγγεία της πάσχουσας περιοχής εξαιτίας μη φυσιολογικής λειτουργίας. Η χιτοζάνη αποτελεί ένα βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές με πολύ μεγάλη ικανότητα προσκόλλησης σε βλεννώδη ιστό και χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο με σκοπό τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας των στοματικά χορηγούμενων πρωτεϊνών. Σχηματίζει με ευκολία νανοσωματίδια στα οποία είναι εφικτό να εμβαπτιστούν υδρόφιλα φάρμακα. Το συμπολυμερές γλυκολικού-λακτικού οξέος (PLGA) αποτελεί ένα ακόμη βιοαποικοδομήσιμο-βιοσυμβατό πολυμερές που χρησιμοποιείται ευρέως ως φορέας ενός μεγάλου αριθμού βιοδραστικών παραγόντων. Προσφάτως έχουν συντεθεί νέα παράγωγα του PLGA (π.χ., PVA-g-PLGA, SB-PVA-g-PLGA και DEAPA-PVAg-PLGA) με σκοπό την βελτίωση των ιδιοτήτων του PLGA ως προς τη σταθερότητα του φαρμάκου, το ρυθμό αποδέσμευσης, το μηχανισμό αποικοδόμησης του πολυμερούς κ.λπ. Μία πολλά υποσχόμενη τεχνική αποτελεί η παρασκευή πολυμερικών φορέων φαρμάκων παρουσία CO₂ σε υπερκρίσιμες συνθήκες. Η μέθοδος αυτή έχει ήδη εφαρμοστεί με σκοπό τη σταθεροποίηση της άμορφης δομής φαρμάκων με μικρή διαλυτότητα στο νερό. Τα νανοσωματίδια χρυσού αντιπροσωπεύουν σημαντικά ελκυστικούς και πολλά υποσχόμενους φορείς φαρμάκων λόγω του μεγέθους τους, του ελέγχου των λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια τους και των κατατομών αποδέσμευσης του φαρμάκου που παρουσιάζουν. Η αποτελεσματικότητα των μαγνητικών νανοσωματιδίων ως φορείς φαρμάκων έχει ως τώρα αποδειχθεί

in vivo. Επίσης, οι τελευταίες εξελίξεις στην ανάπτυξη μαγνητικών νανοφορέων και εμφυτεύσιμων μαγνητών, προσδίδουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την προώθηση της τεχνολογίας σε κλινικές δοκιμές.

Ανόργανα ορυκτά υλικά έχουν επίσης την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν ως βιοσυμβατά κατιονικά υλικά για την ανάπτυξη φορέων. Αυτά τα υλικά έχουν τη δυνατότητα να σχηματίσουν σωματίδια σε υδατικά μέσα ενώ ταυτόχρονα μέσω ιοντοανταλλαγής να προσροφήσουν-εσωκλείσουν κύριες φαρμακευτικές ουσίες κατά τη διάρκεια του σχηματισμού τους. Με αυτού του είδους τη χορήγηση των φορέων, το εμβλαπτισμένο φάρμακο αντικαθίσταται από αντίθετα ιόντα που προέρχονται από το βιολογικό μέσο και έτσι αποδεσμεύονται από τον φορέα. Αρκετές μελέτες έχουν γίνει για τα ορυκτά μοντοριλονίτης και σαπωνόλιθος, εξαιτίας της μεγάλης ικανότητας ιοντοανταλλαγής που παρουσιάζουν σε σύγκριση με τα άλλα ανόργανα ορυκτά υλικά (π.χ. ορυκτό τάλκης, κεραμικά υλικά). Μία νέα γενιά υβριδικών συστημάτων είναι τα νανο-σύμπλοκα πολυμερών ορυκτών, στα οποία ανόργανα νανοσωματίδια είναι διεσπαρμένα σε πολυμερικές μήτρες και έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον ως πιθανά συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης. Μεγάλο ενδιαφέρον ακόμα παρουσιάζουν και τα μεσοπορώδη νανοϋλικά του ορυκτού διοξειδίου του πυριτίου. Με τη μεγάλη ειδική επιφάνεια και την ομοιόμορφη μεσοπορώδης δομή τους δίνουν ένα σημαντικό πλεονέκτημα για τον εγκλεισμό και την αποδέσμευση μεγάλων ποσοτήτων θεραπευτικών ουσιών. Πρόοδος έχει υπάρξει σε ότι αφορά τον έλεγχο του μεγέθους σωματιδίων και του σχήματος των υλικών αυτών, κάτι το οποίο έχει οδηγήσει σε βελτίωση της βιοσυμβατότητας τους και της αποτελεσματικότητας με την οποία εισχωρούν στα κύτταρα. Επιπροσθέτως, υπάρχει η δυνατότητα να τοποθετηθούν λειτουργικές ομάδες στην επιφάνειά τους και αυτό έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη συστημάτων ευαίσθητων σε εξωτερικά ερεθίσματα. Τα υβριδικά συστήματα λιποσωμάτων-νανοσωματιδίων αποτελούν πολλά υποσχόμενους φορείς δραστικών ουσιών για έναν εξαιρετικό συνδυασμό πρόγνωσης και θεραπείας. Υπάρχουν διάφοροι τύποι νανοσωματιδίων όπως παραδείγματος χάριν το οξειδίου του σιδήρου, το διοξειδίου του πυριτίου, οι κβαντικές τελείες (νανοδομές ημιαγωγικών υλικών) κ.λπ. που έχουν ήδη εγκλειστεί σε λιποσώματα με στόχο τη βέλτιστη βιοσυμβατότητά τους με τα βιολογικά υγρά και τη φαρμακευτική τους αποτελεσματικότητα.

Οι υδροπηκτές αποτελούν τρισδιάστατα, υδρόφιλα δίκτυα πολυμερών που παρουσιάζουν θερμοδυναμική συμβατότητα με το νερό, με την οποία καταφέρνουν να διογκώνονται σε υδατικά μέσα. Εξαιτίας της ευαισθησίας τους στο pH, τη θερμοκρασία, την ιοντική ισχύ, το ηλεκτρικό πεδίο, ή τις διαφορές στη συγκέντρωση ορισμένων ουσιών, προσδίδουν την ικανότητα ρύθμισης της αποδέσμευσης του φαρμάκου. Στα συστήματα αυτά η αποδέσμευση της δραστικής ουσίας μπορεί να γίνει σε συγκεκριμένες περιοχές στο ανθρώπινο σώμα (π.χ. σε συγκεκριμένο pH του γαστρεντερικού συστήματος). Οι υδροπηκτές ως συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης

φαρμάκων, υπόσχονται πολλά αν συνδυαστούν με την τεχνική της μοριακής αποτύπωσης. Η μοριακή αποτύπωση απαιτεί το σχηματισμό ενός συμπλόκου μεταξύ στο προς αποτύπωση μόριο και το μονομερές με βάση ομοιοπολικούς ή μη-ομοιοπολικούς δεσμούς. Εφόσον σχηματιστεί το σύμπλοκο γίνεται αντίδραση πολυμερισμού με την παρουσία ενός μέσου δικτύωσης και ενός κατάλληλου διαλύτη, με τον οποίο ρυθμίζεται η συνολική μορφολογία του πολυμερούς και η μακροπορώδης δομή του. Αφού απομακρυνθεί το αποτυπωμένο μόριο, το προϊόν είναι μία πολυμερική μήτρα που έχει συγκεκριμένα στοιχεία αναγνώρισης του αποτυπωμένου μορίου (μοριακά αποτυπωμένο πολυμερές). Κάποια παραδείγματα μοριακών αποτυπωμένων πολυμερών ως συστήματα ελεγχόμενης απόδοσης φαρμάκων είναι τα εξής: (i) αποδέσμευση φαρμάκου με προκαθορισμένο ρυθμό, όπου ο ρυθμός διάχυσης του φαρμάκου από το σύστημα πραγματοποιεί μία κατάλληλη κατατομή, (ii) αποδέσμευση φαρμάκου μέσω μιας διέγερσης από το εξωτερικό περιβάλλον, όπου ενεργοποιείται η αποδέσμευση από κάποια φυσική, χημική ή βιοχημική διεργασία και τέλος (iii) αποδέσμευση φαρμάκου μέσω ρυθμισμένης ανάδρασης, όπου ο ρυθμός αποδέσμευσης καθορίζεται από τη συγκέντρωση μιας βιοχημικής ουσίας, η συγκέντρωση της οποίας συνδέεται με μια σχέση εξάρτησης από τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο ανθρώπινο σώμα. Τα συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων βρίσκονται ακόμα σε αρχικό στάδιο, παρόλες τις ενδιαφέρουσες εφαρμογές των μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών. Οι μικρο- και νανο-πηκτές που έχουν λειτουργικές σουλφυδρυλομάδες αφορούν μια ακόμη κατηγορία φορέων φαρμάκων. Συντίθενται με διάφορες τεχνικές όπως για παράδειγμα με τον πολυμερισμό ελευθέρων ριζών, με γαλακτωματοποίηση-εξάτμιση διαλύτη κ.λπ. Αυτά τα πολυμερικά υλικά παρασκευάζονται με καθήλωση ενώσεων που έχουν ομάδες -SH στην πολυμερική αλυσίδα διαφόρων πολυμερών σαν τη χιτοζάνη και τους ακρυλικούς πολυεστέρες. Με την εισαγωγή των σουλφυδρυλομάδων στα πολυμερή βελτιώνεται αρκετά η ικανότητα προσκόλλησης τους στο βλεννογόνο μέσω της ανάπτυξης δισουλφιδικών δεσμών ανάμεσα στις -SH ομάδες των πολυμερών και των γλυκοπρωτεϊνών του βλεννογόνου.

Ως συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι όπως η σύξευξη πεπτιδίων-πρωτεϊνών με συνθετικά πολυμερή, κάτι το οποίο βελτιώνει κατά πολύ τον έλεγχο σχηματισμού νανο-δομών πολυμερικών υλικών. Με τη σύξευξη βιοσυμβατών πολυμερών με βιοενεργά πεπτιδία ή πρωτεΐνες είναι εφικτό να μειωθεί η τοξικότητα, να εμποδιστεί η ανοσοαντίδραση, να ενισχυθεί ο χρόνος κυκλοφορίας στο αίμα και να βελτιωθεί η διαλυτότητα. Αντιθέτως, η τροποποίηση συνθετικών πολυμερών με συγκεκριμένες ακολουθίες ολιγοπεπτιδίων, είναι δυνατόν να εμποδίσει την τυχαία κατανομή των φαρμάκων στο σώμα του ασθενούς και να επιτρέψει τη στόχευση.

Τα τελευταία χρόνια, το πεδίο των επί τόπου σχηματιζόμενων εμφυτευμάτων έχει παρουσιάσει σημαντική άνοδο. Υγρά τα οποία δημιουργούν ένα ημιστερεό στρώμα μετά από υποδερμική ένεση αφορούν αρκετά ελκυστικά συστήματα αποδέσμευσης φαρμάκων για ενέσιμες εφαρμογές, επειδή είναι λιγότερο επίπονα συγκριτικά με τα συνηθισμένα εμφυτεύματα. Τοπική ή συστηματική αποδέσμευση φαρμάκων είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί για μεγάλες χρονικές περιόδους (π.χ. ένας ή περισσότεροι μήνες). Τα ενέσιμα, επί τόπου σχηματιζόμενα εμφυτεύματα διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες ως προς το μηχανισμό σχηματισμού τους: i) θερμοπλαστικοί πολτοί, ii) πολυμερικά συστήματα που δικτυώνονται επί τόπου, iii) επί τόπου καθίζηση πολυμερών και (iv) συστήματα σχηματισμού πηκτών μέσω θερμικής διέγερσης.

2.2.2 Συσσκευές αποδέσμευσης φαρμάκων

Ο στόχος τον οποίο η ελεγχόμενη αποδέσμευση καλείται να εκπληρώσει, είναι η επαναληψιμότητα στη μαζική παραγωγή ενέσιμων, εμφυτεύσιμων και επιδερμικών συσκευών, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα αποθήκευσης και απελευθέρωσης πολλαπλών χημικών ουσιών κάθε φορά που αυτό απαιτείται. Οι μικροσκοπικές συσκευές στοχευμένης αποδέσμευσης φαρμάκων έχουν την ικανότητα να ελέγχουν την έκταση και το χρόνο αποδέσμευσης. Με τον έλεγχο της έκτασης έχουμε τη δυνατότητα για μικρότερες δόσεις και για μειωμένες παρενέργειες, ενώ παράλληλα με τον έλεγχο του χρόνου γίνεται εφικτή η παρατεταμένη δοσολογία και οι ελαχιστοποιημένες αποκλίσεις από τα θεραπευτικά όρια. Οι τελευταίες εξελίξεις στις τεχνικές κατασκευής μικρο- και νανο-δομών (π.χ. φωτολιθογραφία, εναπόθεση μεμβρανών, εγχάραξη, μοριακή αυτο-οργάνωση κ.λπ.) και στην τεχνολογία των μικρο-ηλεκτρομηχανικών συστημάτων (MEMS) δίνουν τη δυνατότητα κατασκευής μικροσκοπικών βιοϊατρικών συσκευών (από εμφυτεύματα μέχρι αναλυτικές συσκευές σε μορφή πλακιδίου) για μια ποικιλία εφαρμογών. Παραδείγματος χάριν, τα σύγχρονα αγγειακά εμφυτεύματα (stents), τα οποία είναι εξοπλισμένα με μικροδεξαμενές μηχανικής λειτουργίας, που απελευθερώνουν αντί-νεοπλαστικά φάρμακα απευθείας στους ιστούς αντί στο αίμα. Αυτή η νέα γενιά συσκευών αποδέσμευσης φαρμάκων με τη μορφή δοχείων, κατασκευάζονται με έναν συνδυασμό λιθογραφίας και αυτοοργάνωσης. Τα συστήματα αυτά έχουν την ικανότητα να φορτωθούν με πηκτές ή πολυμερή που έχουν εμβαπτισμένα φάρμακα (από πριν, κατά τη διάρκεια, ή μετά τη διεργασία της αυτο-οργάνωσης) και μπορούν να ενσωματώσουν ηλεκτρονικά στοιχεία και αισθητήρες. Τα μικρο-πλακίδια (micro-chips) ελεγχόμενης αποδέσμευσης εμφανίζουν τα εξής πλεονεκτήματα: i) αποθηκεύουν και απελευθερώνουν πολλαπλές χημικές ενώσεις σε πολλές μορφές (π.χ.

στερεές, υγρές ή πηκτές), ii) αποδεσμεύουν ταυτόχρονα διάφορα φάρμακα με ακρίβεια και ασφάλεια, iii) έχουν τη δυνατότητα για περίπλοκα μοτίβα αποδέσμευσης (π.χ. άμεση, σταθερή και παλμική αποδέσμευση) και τέλος iv) εμφανίζουν μικρό μέγεθος κάτι που καθιστά δυνατή την τοπική χημική αποδέσμευση επιτυγχάνοντας έτσι μεγάλες συγκεντρώσεις φαρμάκου στο σημείο που επιθυμούμε, παραμένοντας ταυτόχρονα η συγκέντρωση του φαρμάκου στην κυκλοφορία σε χαμηλά επίπεδα.

2.2.3 Αντικαρκινικά φάρμακα υψηλής τοξικότητας- Ανθρακυκλίνες

Με τη συμβατική θεραπεία του καρκίνου του μαστού και του προστάτη συνεπάγεται η εφαρμογή χειρουργικής επέμβασης, βιοψίας, χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας[42]. Στα πλαίσια της χημειοθεραπείας υπάρχει μια ποικιλία φαρμάκων που χρησιμοποιείται για την θεραπεία των ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων, αλλά στη παρών κεφάλαιο θα αναφερθούμε στις ανθρακυκλίνες.

Οι ενώσεις δοξορουβικίνη (doxorubicin ή adriamycin ή Adriablastin) και τα ανάλογα δαουνορουβικίνη (daunorubicin ή Daunoblastin) και τα ημισυνθετικά ιδαρουβικίνη (idarubicin ή Zavedos) και επιρουβικίνη (epirubicin ή Farmorubicin) κατατάσσονται στην κατηγορία των ανθρακυκλινών[43]. Οι ανθρακυκλίνες ονομάζονται οι ενώσεις με αντιβιοτική δράση, που περιέχουν μια ανθρακινόνη και έναν συμπυκνωμένο και υποκατεστημένο κυκλοεξανικό δακτύλιο [44]. Τη δεκαετία 1950-1960 απομονώθηκε για πρώτη φορά ένα ανάλογο από τον μικροοργανισμό *streptomyces peucetius* σε δείγμα αποβλήτων του κάστρου Castle de Monde του 13^{ου} αιώνα, από τη ιταλική εταιρεία Farmitalia[44]. Την ίδια εποχή και η γαλλική εταιρεία Rhone-Poulenc απομόνωσε την ίδια ένωση από τον μικροοργανισμό *streptomyces coeruleorubidus*. Η ένωση αυτή πήρε το όνομα daunorubicin από την πόλη Dauni, προ-ρωμαϊκή ονομασία της πόλης στην οποία απομονώθηκε και από την γαλλική λέξη rubis που περιγράφει το χρώμα της[44]. Έκθεση του βακτηρίου *streptomyces peucetius* σε N-νιτροζο-N-μεθυλουρεθάνη οδήγησε στην μετάλλαξη του σε ένα νέο είδος μικροοργανισμού το οποίο παράγει ένα κόκκινου χρώματος αντιβιοτικό το adriamycin (ονομασία που δόθηκε από την Αδριατική θάλασσα), αλλά αργότερα επικράτησε η ονομασία doxorubicin σε αναλογία με τη ονομασία daunorubicin[44]. Οι ανθρακυκλίνες ήταν τα πρώτα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, ενώ στη θεραπεία του μαστού η δοξορουβικίνη και η επιρουβικίνη προστέθηκαν στην συστηματική θεραπεία του στις αρχές του 1970[45]. Γενικά η χημειοθεραπεία στον καρκίνο του προστάτη προτιμάται σε ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας, που έχουν χρόνια νόσο, και προσδόκιμο ζωής μεταξύ 6

και 12 μηνών. Σε αυτές τις περιπτώσεις η θεραπεία πρέπει να είναι κυρίως καταπραϋντική και με ελάχιστη τοξικότητα.

Το κυριότερο μειονέκτημα της χρήσης ανθρακυκλινών και γενικά αντικαρκινικών φαρμάκων, είναι η έλλειψη εκλεκτικότητας. Τα αντικαρκινικά φάρμακα αδυνατούν να ξεχωρίσουν τα καρκινικά από τα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτό οδηγεί σε μεγάλη τοξικότητα και σε ανεπιθύμητες ενέργειες. Κατά συνέπεια, η συστηματική εφαρμογή των εν λόγω φαρμάκων προκαλεί συχνά σοβαρές παράπλευρες επιπτώσεις (side effects) σε άλλους ιστούς, το οποίο περιορίζει σε μεγάλο βαθμό τη μέγιστη επιτρεπόμενη δόση του φαρμάκου[42]. Η βασική παρενέργεια των ανθρακυκλινών είναι η καρδιοτοξικότητα τους. Μπορούν να προκαλέσουν παρατεταμένες επιπλοκές και να οδηγήσουν σε χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, κοιλιακή δυσλειτουργία και αρρυθμία αρκετούς μήνες έως και χρόνια μετά το τέλος της χημειοθεραπείας.

Άλλες παρενέργειες από τη χρήση των ανθρακυκλινών είναι[43]:

- Ναυτία, εμετός, κόπωση, αδυναμία συγκέντρωσης.
- Αναιμία, μείωση του πληθυσμού των αιμοπεταλίων-αιμορραγία, ουδετεροπενία (μείωση του πληθυσμού των λευκών αιμοσφαιρίων).
- Ανεπάρκεια του ανοσοποιητικού συστήματος-ανοσοκαταστολή.
- Αλωπεκία (Απώλεια των μαλλιών).
- Ηπατοτοξικότητα, νεφροτοξικότητα, καρδιοτοξικότητα.

2.2.4 Μελλοντικές προκλήσεις

Οι βασικές επιστημονικές και τεχνολογικές προκλήσεις στον τομέα των συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων αφορούν:

- Την ανάπτυξη συνθετικών νανοσυστημάτων για θεραπευτικούς παράγοντες μεγάλης πολυπλοκότητας, ειδικών για την αντιμετώπιση σοβαρών ασθενειών: i) συστήματα στοχευμένης αποδέσμευσης τα οποία επιτρέπουν τη συσσώρευση του φαρμάκου στους όγκους για τη θεραπεία του καρκίνου, ii) ομάδες στόχευσης που επιτρέπουν την αποδέσμευση ενός φαρμάκου που σταθεροποιεί την αθηρωματική πλάκα και δεν αφήνει τη διάρρηξή της, iii) νανοσωματίδια που προσδένονται σε εμβρυονικά κύτταρα και απελευθερώνουν τοπικά διεγερτικούς παράγοντες, ώστε να αντιμετωπίσουν μυοσκελετικές παθήσεις, iv) νανοφορείς με συγκεκριμένες επιφανειακές ιδιότητες οι οποίες είναι δυνατό να μεταφερθούν μέσω του αίματος στον εγκέφαλο και μικροσκοπικές βιοσυμβατές διατάξεις, που επιτρέπουν την αποδέσμευση φαρμάκων για μεγάλες χρονικές περιόδους ή την ηλεκτρική διέγερση περιοχών του εγκεφάλου για τη θεραπεία ασθενειών του κεντρικού νευρικού συστήματος και v) μη ενέσιμα

συστήματα αποδέσμευσης ινσουλίνης με βάση νανοφορείς που έχουν δημιουργηθεί για να διαπερνούν βιολογικά εμπόδια.

- Την εξέλιξη έξυπνων συστημάτων αποδέσμευσης φαρμάκων που να έχουν τη δυνατότητα προσαρμογής της θεραπείας στις ανάγκες του ασθενούς. Αυτά τα συστήματα, θα πρέπει να κατασκευάζονται με μικρό κόστος, η τεχνολογία παρασκευής τους να επιτρέπει τον εύκολο εγκλωβισμό φαρμακευτικών ουσιών, να χορηγούνται με το πιο ανώδυνο τρόπο, να ανιχνεύονται με ευκολία και τέλος να επιτρέπουν την αποδέσμευση του φαρμάκου στο επιθυμητό σημείο με όσον το δυνατό μεγαλύτερη ακρίβεια. Εξελιγμένα λειτουργικά στοιχεία όπως αισθητήρες, συσκευές μνήμης και λογικής, θα πρέπει να είναι ικανά να ενσωματωθούν απευθείας στο σύστημα αποδέσμευσης επιτρέποντας την απελευθέρωση του φαρμάκου την σωστή στιγμή.
- Την συστηματική μελέτη τοξικότητας των συστημάτων αποδέσμευσης φαρμάκων: i) ανάπτυξη ειδικών *in vitro* μοντέλων με σκοπό τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων των νανοφορέων με τα κύτταρα, ii) προσδιορισμός διαφόρων βιολογικών παραμέτρων, με τις οποίες υποδηλώνονται όλες οι επιβλαβείς επιδράσεις των νανοφορέων σε διάφορα είδη κυττάρων και ιστών, iii) επιλογή κατάλληλου *in vivo* μοντέλου και iv) σύγκριση των *in vivo* και *in vitro* μοντέλων.

2.3 Αναγεννητική ιατρική

Η αναγεννητική ιατρική μπορεί να επιφέρει στο μέλλον αλλαγές στον τρόπο με τον οποίο αντιμετωπίζονται ορισμένες ασθένειες. Βασισμένη στις νέες τεχνικές κυτταροκαλλιέργειας και στο σχεδιασμό βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών, η μηχανική ιστών αναμένεται να είναι η πιο εξελιγμένη μέθοδος θεραπείας στην αναγεννητική ιατρική. Ένας από τους στόχους της μηχανικής ιστών είναι η αναγέννηση παθολογικών ιστών και η πρόληψη-θεραπεία χρόνιων διαταραχών που δημιουργούν ανικανότητα, όπως παραδείγματος χάριν η οστεοαρθρίτιδα, και ασθένειες του καρδιαγγειακού και κεντρικού νευρικού συστήματος.

Η μηχανική ιστών αφορά τη χρήση κυττάρων για το σχηματισμό τεχνητών δομών που έχουν ως στόχο την αντικατάσταση προβληματικών ιστών και οργάνων του ανθρώπινου σώματος. Επιπλέον αφορά την απόθεση-ανάπτυξη κυττάρων σε πορώδη, βιοαποικοδομήσιμα ικριώματα, που στην πορεία διαφοροποιούνται και αποκτούν μορφή φυσικών ιστών, όντας ικανά να μιμηθούν τις λειτουργίες αυτών. Στη συνέχεια, με αυτές τις τεχνητές δομές πραγματοποιείται η εμφύτευση σε ασθενείς, με στόχο την αντικατάσταση ασθενικών ή κατεστραμμένων ιστών. Καθώς ο χρόνος περνάει, τα ικριώματα αφομοιώνονται από τον ανθρώπινο οργανισμό και αναπτύσσονται στη θέση τους ιστοί, που φέρουν αιμοφόρα αγγεία και νεύρα. Έως πρόσφατα, οι

κλινικές εφαρμογές αφορούσαν τη μηχανική δέρματος, χόνδρων και οστών, ενώ οι τελευταίες εξελίξεις στις θεραπευτικές στρατηγικές αφορούν τη χρήση εμβρυονικών κυττάρων ως πηγή αναγεννητικών κυττάρων και τη χρήση μορίων, τα οποία άγουν συγκεκριμένες βιολογικές αποκρίσεις και διεγείρουν την ανάπτυξη ιστών σε μοριακό επίπεδο.

Ο όρος βιομίμηση (biomimesis), στον τομέα της βιοτεχνολογίας-βιοϋλικών, έχει οριστεί για να περιγραφεί η προσομοίωση των λειτουργιών των φυσικών οργάνων. Η φιλοσοφία του όρου αυτού, έχει τη δυνατότητα να συνοψιστεί σε τρία κύρια στοιχεία: έξυπνα βιοϋλικά, μόρια που διεγείρουν βιο-αποκρίσεις και κύτταρα.

2.3.1 Έξυπνα βιοϋλικά

Η τρίτη γενιά βιοϋλικών, περιέχει πολυμερή που έχουν τη δυνατότητα απορρόφησης από τον οργανισμό και είναι σχεδιασμένα σε μοριακό επίπεδο για να άγουν συγκεκριμένες κυτταρικές αποκρίσεις. Αποτελούν επίσης ιδιαίτερα ελκυστικά υλικά που χρησιμοποιούνται ως ικριώματα ή μήτρες στην αναγέννηση ιστών. Τα έξυπνα αυτά βιοϋλικά έχουν σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να αντιδρούν στις αλλαγές του άμεσου περιβάλλοντός τους (π.χ. pH, θερμοκρασία, ηλεκτρικά ή φυσικά ερεθίσματα, ενεργειακή κατάσταση) καθώς επίσης και να διεγείρουν συγκεκριμένες κυτταρικές αποκρίσεις σε μοριακό επίπεδο. Με την νανοτεχνολογία έχει γίνει δυνατή η βελτίωση των μη-απορροφήσιμων από τον οργανισμό υλικών (π.χ. κεραμικών υλικών) και ο αποτελεσματικός έλεγχος των βιολογικών αντιδράσεων που έχουν ως στόχο τη σημαντική αύξηση της λειτουργικότητας και της μακροβιότητας των εμφυτευμάτων.

Οι στόχοι της νανοτεχνολογίας σε ότι αφορά τα έξυπνα βιοϋλικά για το άμεσο μέλλον, συνοψίζονται στους εξής: i) βιοαποικοδομήσιμα έξυπνα βιοϋλικά με βιοδραστικές επιφάνειες τα οποία έχουν ελεγχόμενους ρυθμούς αποικοδόμησης, ii) βιοϋλικά που μπορούν να ενεργοποιήσουν γονίδια και είναι ειδικά σχεδιασμένα για συγκεκριμένες ασθένειες, iii) έξυπνα ικριώματα τα οποία έχουν ελεγχόμενη δομή για μηχανική ιστών, iv) λειτουργικές βιομιμητικές μεμβράνες που μιμούνται τις κυτταρικές μεμβράνες, v) τεχνολογία αισθητήρων έτσι ώστε να γίνεται αποτίμηση της ενσωμάτωσης και της λειτουργικότητας των εμφυτευμάτων, vi) αισθητήρες για συγκεκριμένη ενεργοποίηση γονιδίων και έλεγχο της ανάπτυξης των κυττάρων και των ιστών, vii) έλεγχος της ασυμβατότητας μεταξύ του δότη και του παραλήπτη, των μολύνσεων λόγω των εμφυτευμάτων και της μη αποδοχής του εμφυτεύματος και ix) νανο-οργάνωση βιοϋλικών που ενεργοποιούν την εξωκυτταρική μεμβράνη των ιστών.

2.3.2 Μόρια με βιοενεργή δράση

Μόρια με βιοενεργή δράση είναι αυτά που βρίσκονται στα κύτταρα (π.χ. κυτοκίνες, παράγοντες ανάπτυξης, κυτταρικοί υποδοχείς) και δημιουργούν αναγέννηση σε κυτταρικό επίπεδο. Οι ερευνητικοί στόχοι για αυτήν τη περιοχή είναι οι εξής: i) μικρά μόρια που στρατολογούν και ενεργοποιούν τα εμβρυονικά κύτταρα, ii) βιοϋλικά για τη διαδοχική αποδέσμευση ενεργών ουσιών που έχουν ως στόχο να προκαλέσουν ενδογενείς μηχανισμούς αυτο-επιδιόρθωσης, iii) τεχνολογίες για την ελεγχόμενη αποδέσμευση παραγόντων σήμανσης εμβρυονικών κυττάρων, iv) ενσωμάτωση συστημάτων αποδέσμευσης φαρμάκων και γονιδίων σε ικρίωματα από βιοϋλικά, v) εναλλακτικά βιοδραστικά μόρια που αντικαθιστούν ακριβούς παράγοντες ανάπτυξης και φαρμάκων στη μηχανική ιστών και vi) συνδυασμός φαρμάκων και τεχνολογιών αποδέσμευσης με κυτταροθεραπείες.

2.3.3 Κυτταροθεραπείες

Η ανάπτυξη όσον αφορά την πλευρά των κυττάρων, είναι μία αδιάλειπτη διεργασία κυτταρικής αναδιοργάνωσης που εξαρτάται από την παρουσία αυτο-ανανεώσιμων εμβρυονικών κυττάρων και την ανάπτυξή τους σε ώριμα κύτταρα. Η κυτταρική αναδιοργάνωση είναι ταχύτερη σε κάποιους ιστούς όπως για παράδειγμα το επιθήλιο του εντέρου, το αίμα και η επιδερμίδα και αργή σε κάποιους άλλους όπως τα οστά και οι χόνδροι. Θεωρείται επίσης περιορισμένη ή και ανύπαρκτη σε ιστούς όπως ο εγκέφαλος και η καρδιά. Παρόλα αυτά, τα τελευταία επιστημονικά αποτελέσματα άλλαξαν τις αντιλήψεις όσον αφορά την ικανότητα των ιστών αυτών να αναγεννούνται ύστερα από ένα ισχαιμικό επεισόδιο. Αυτό οδήγησε στο να εστιαστεί η έρευνα στην κατανόηση των μηχανισμών στρατολόγησης, ενεργοποίησης και ελέγχου των εμβρυονικών κυττάρων. Υπάρχουν αρκετές μελλοντικές κατευθύνσεις στις κυτταροθεραπείες, οι οποίες παρουσιάζονται παρακάτω: i) κυτταροθεραπείες σε επιλεγμένα σημεία χωρίς την αίσθηση του πόνου, ii) αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα κύτταρα και στο άμεσο περιβάλλον τους, iii) παρακολούθηση του τρόπου με τον οποίο συντελείται η αναγέννηση των ιστών, iv) τρόποι απελευθέρωσης εμβρυονικών κυττάρων σε ικρίωματα από βιοϋλικά, χωρίς την ύπαρξη προβλημάτων για την επιβίωση των κυττάρων, v) ορθολογική βάση δεδομένων που δίνει πληροφορίες που αφορούν την προσκόλληση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων καθώς επίσης και τη βιοχημεία των κυττάρων αλλά και των ιστών και τέλος vi) περιβάλλον ικανό να αποθηκεύσει και να διατηρήσει λίγα ή ακόμα και ένα μόνο κύτταρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΤΕΧΝΙΚΕΣ-ΜΕΘΟΔΟΙ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

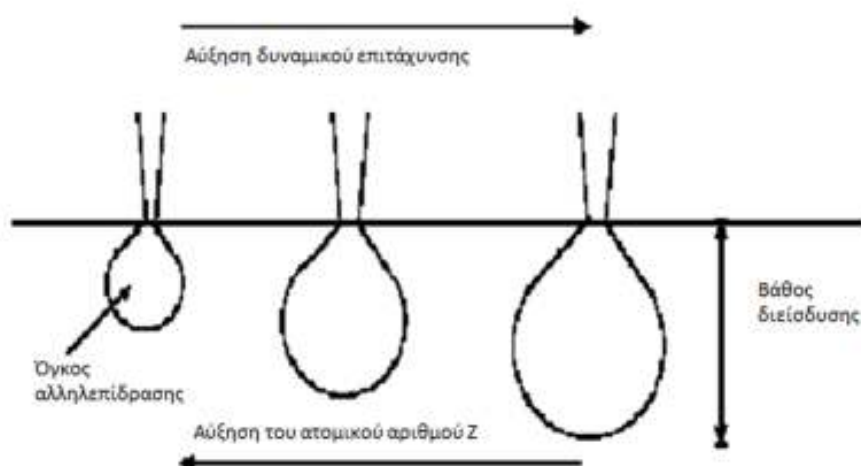
3.1 Ηλεκτρονική φασματοσκοπία σάρωσης, SEM

Η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)[28,29,30] αποτελεί μία από τις πιο σύγχρονες και ευέλικτες μεθόδους, ώστε να γίνεται εφικτή η ανάλυση της μικροδομής μεγάλου αριθμού υλικών. Εξαιτίας της φύσης του φωτός, η ικανότητα των οπτικών μικροσκοπίων περιορίζεται σε επίπεδα μεγεθύνσεων έως 1000x και σε διακριτική ικανότητα έως 0.2 μm . Έχει υπάρξει ήδη η ανάγκη για εξέταση του εσωτερικού του κυττάρου στο παρελθόν (πυρήνας, μιτοχόνδρια κλπ.), κάτι που απαιτούσε μεγεθύνσεις μεγαλύτερες του 10,000x. Με τη χρήση αυτών των μεγεθύνσεων οδηγηθήκαμε στην ανακάλυψη καθώς επίσης και στην εφαρμογή των ηλεκτρονικών μικροσκοπίων. Το πρώτο είδος ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ήταν το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης ή διαπερατότητας (TEM, Transmission Electron Microscope) και τα επόμενα χρόνια ακολούθησε το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM, Scanning Electron Microscope). Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης είναι ένα όργανο που λειτουργεί με δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας αντί για φως, με σκοπό να εξετάσει αντικείμενα σε λεπτομερή κλίμακα, όπως περίπου και ένα οπτικό μικροσκόπιο. Τα ηλεκτρόνια εξαιτίας της κυματικής τους φύσης έχουν τη δυνατότητα εστίασης όπως και τα φωτεινά κύματα μα σε αρκετά μικρότερη επιφάνεια (π.χ. κόκκος υλικού). Η δέσμη ηλεκτρονίων καταφέρνει να σαρώσει την επιφάνεια του δείγματος με το οποίο γίνεται η αλληλεπίδραση. Λόγω της αλληλεπίδρασης αυτής προκύπτουν πληροφορίες που αφορούν τα άτομα των στοιχείων τα οποία απαρτίζουν το εξεταζόμενο υλικό. Από τα άτομα των στοιχείων εκπέμπονται ως επί των πλείστων δευτερογενή (secondary) και οπισθοσκεδαζόμενα (backscattered) ηλεκτρόνια καθώς επίσης και ακτίνες X. Η ένταση των εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων είναι δυνατόν να επηρεαστεί από τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας. Με αυτόν το τρόπο το SEM παρέχει πληροφορίες που σχετίζονται κυρίως με τη μορφολογία και τη σύσταση της

επιφάνειας. Τέλος είναι επίσης εφικτό να γίνει ημιποσοτική στοιχειακή ανάλυση του υλικού, εφαρμόζοντας ένα σύστημα ανίχνευσης της διασποράς των ενεργειών των ακτίνων Χ, που δημιουργούνται στην επιφάνεια από την προσπίπτουσα δέσμη. Έτσι το SEM μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξέταση μικροδομής στερεών δειγμάτων καθώς επίσης και για να παρέχει εικόνες υψηλού βαθμού διείδυσης.

3.1.1 Αλληλεπιδράσεις Δέσμης – Δείγματος

Η βασική αρχή λειτουργίας περιέχει την ακτινοβολία του δείγματος με μια δέσμη ηλεκτρονίων, πολύ καλά εστιασμένη. Η περιοχή στην οποία ενεργητικά ηλεκτρόνια έχουν αλληλεπίδραση με το στερεό, όπου εναποτίθεται ενέργεια και παράγονται εκείνες οι μορφές δευτερεύουσας ακτινοβολίας που μετράμε, ονομάζεται *όγκος αλληλεπίδρασης*.



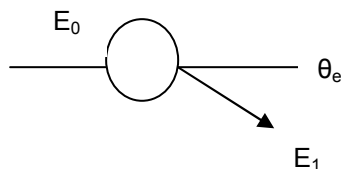
Εικόνα 3.1: Επίδραση ατομικού αριθμού και δυναμικού επιτάχυνσης στον όγκο αλληλεπίδρασης[29]

Η διείδυση της δέσμης στο δείγμα μπορεί να καθοριστεί από τις εξής 4 παραμέτρους, με πιο σημαντικές τις δύο τελευταίες:

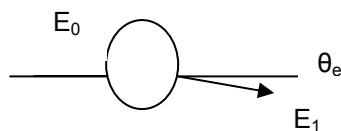
- 1) Πόσα ηλεκτρόνια έχουμε στην δέσμη (emission current)
- 2) Διάμετρο της δέσμης (spot size)
- 3) Ταχύτητα-Ενέργεια των ηλεκτρονίων (accelerating voltage)
- 4) Είδος του δείγματος (Μέσος ατομικός αριθμός του δείγματος)

Οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα ανάμεσα στο δείγμα και τα ηλεκτρόνια της δέσμης φαίνονται στο σχήμα και περιλαμβάνουν:

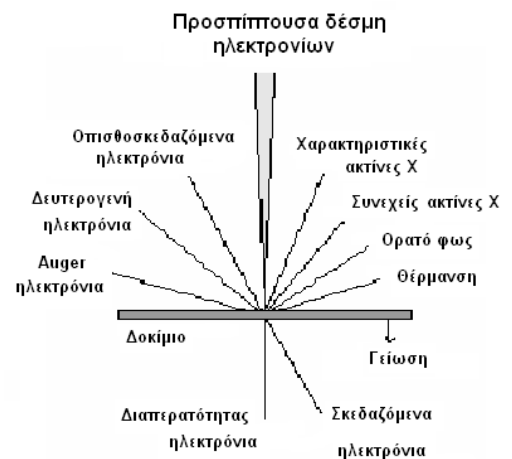
1. *Φόρτιση (Charging)*: συσσώρευση φορτίου ηλεκτρονίων στο δείγμα (Για να μην συμβαίνει αυτό, το δείγμα θα πρέπει να είναι αγώγιμο και συνδεδεμένο με γείωση ή να χρησιμοποιείται χαμηλό δυναμικό επιτάχυνσης)
2. *Ελαστική σκέδαση ηλεκτρονίων* (Μεγαλύτερη γωνία, μικρότερη απώλεια ενέργειας)



3. *Μη ελαστική σκέδαση ηλεκτρονίων* (Μικρότερη γωνία, μεγαλύτερη απώλεια ενέργειας)



4. *Θέρμανση του δείγματος*



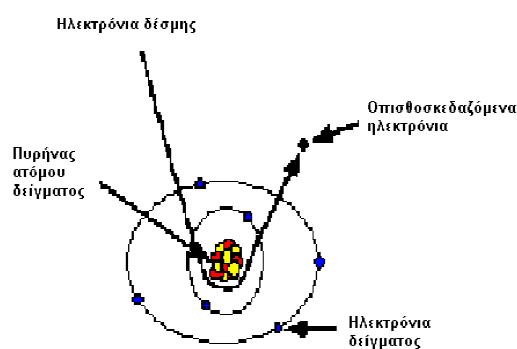
Εικόνα 3.2: Φαινόμενα αλληλεπίδρασης δέσμης – δείγματος[29]

3.1.2 Ελαστική σκέδαση

- ▶ Ελαστικά σκεδαζόμενα ηλεκτρόνια δέσμης (Elastically scattered primary electrons) που δεν μπορούν να ανιχνευτούν από το σύστημα.
- ▶ Οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια (Backscattered Electrons)

Όταν τα ηλεκτρόνια της δέσμης έχουν για παράδειγμα ενέργεια 30 KeV και φθάσουν στην επιφάνεια του δείγματος, έχουν τη δυνατότητα να διεισδύσουν σε βάθος, κάτι το οποίο εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό. Τα ηλεκτρόνια μπορούν να ταξιδεύουν προς τυχαίες κατευθύνσεις μέσα στο δείγμα και έτσι καταφέρνουν να συγκρούονται με τα άτομα του δείγματος. Τα ηλεκτρόνια εμφανίζουν ελαστικές συγκρούσεις με τον πυρήνα του ατόμου (ειδικά σε μεγάλα άτομα) και τελικά σκεδάζονται προς οποιαδήποτε κατεύθυνση χωρίς μεγάλη απώλεια της ενέργειάς τους (κρατούν το 50 με 80% της αρχικής ενέργειας). Τα ηλεκτρόνια που σκεδάζονται προς τα πίσω έχοντας γωνία 180° , ονομάζονται οπισθοσκεδαζόμενα (Backscattered electrons, BSE). Αυτά τα ηλεκτρόνια έχουν μεγαλύτερη ενέργεια και εκπέμπονται από μεγαλύτερο βάθος από το δείγμα.

Το ποσοστό των ηλεκτρονίων που εκπέμπονται ως οπισθοσκεδαζόμενα, είναι εξαρτημένο από τον ατομικό αριθμό του ατόμου του δείγματος. Για τα ελαφρά στοιχεία είναι ~6% ενώ σε αντίθεση με τα βαρύτερα που είναι ~50%. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η αλλαγή του ποσοστού των BSE να παρέχει διαφοροποίηση στην εικόνα ανάλογα με τον ατομικό αριθμό. Οι βαρύτερες φάσεις παρουσιάζονται λαμπρότερες από τις ελαφρύτερες και με αυτόν τον τρόπο έχουμε πληροφορίες για την σύσταση του δείγματος.



Εικόνα 3.3: Οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια[29]

Ανίχνευση οπισθοσκεδαζόμενων

Η ανίχνευση μπορεί να γίνει με τη χρήση ανιχνευτή, τον ημιαγωγό στερεάς ακτάστασης (solid state semiconductor) που έχει σχήμα donut και

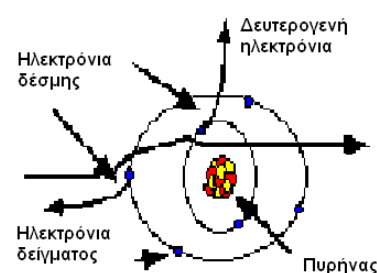
προσαρμόζεται στην έξοδο της κολώνας. Έτσι μετρώνται οι κτύποι των ηλεκτρονίων στον ανιχνευτή, που μετατρέπονται σε ένταση των ψηφίδων και εμφανίζονται στον σωλήνα δημιουργώντας την εικόνα.

3.1.3 Μη ελαστική σκέδαση

- ▶ Μη ελαστικά σκεδαζόμενα ηλεκτρόνια (Inelastically scattered electrons), που δεν μπορούν να ανιχνευτούν από το σύστημα
- ▶ Δευτερογενή ηλεκτρόνια (Secondary electrons, SE)

Δευτερογενή ηλεκτρόνια

Όταν τα ηλεκτρόνια της δέσμης έρχονται σε σύγκρουση με τα ηλεκτρόνια του ατόμου, μερικά από τα χαλαρά συγκρατούμενα ηλεκτρόνια είναι εφικτό να φύγουν από το άτομο και τότε αυτά καλούνται δευτερογενή ηλεκτρόνια. (Κάθε προσπίπτον ηλεκτρόνιο έχει τη δυνατότητα να παράγει αρκετά δευτερογενή). Κάθε ηλεκτρόνιο το οποίο φεύγει από το άτομο ύστερα από τη σύγκρουση με άλλο υψηλής ενέργειας, αποτελεί θεωρητικά ένα δευτερογενές ηλεκτρόνιο. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια έχουν χαμηλή ενέργεια (50eV) και εκπέμπονται σε κοντινή απόσταση από την επιφάνεια του δείγματος, μιας και αυτά που εκπέμπονται από μεγαλύτερο βάθος, μπορούν να απορροφηθούν με ευκολία από την μάζα του δείγματος. Γι'αυτό το λόγο τα δευτερογενή ηλεκτρόνια είναι αρκετά χρήσιμα στην απεικόνιση της επιφάνειας του δείγματος.



Εικόνα 3.4: Δευτερογενή ηλεκτρόνια[29]

Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια παράγονται με δύο βασικούς μηχανισμούς:

- Όταν η δέσμη εισέρχεται στην επιφάνεια
- Όταν η οπισθοσκεδαζόμενη δέσμη εξέρχεται από την επιφάνεια

Ο δεύτερος μηχανισμός έχει δέκα φορές μεγαλύτερη πιθανότητα ύπαρξης από τον πρώτο. Έτσι αναμένεται να υπάρχει αυξημένη εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων εκεί όπου είναι αυξημένη και η εκπομπή οπισθοσκεδαζόμενων. Γι'αυτό το λόγο οι εικόνες των δευτερογενών και των οπισθοσκεδαζόμενων μοιάζουν αρκετά.

Ανίχνευση δευτερογενών ηλεκτρονίων

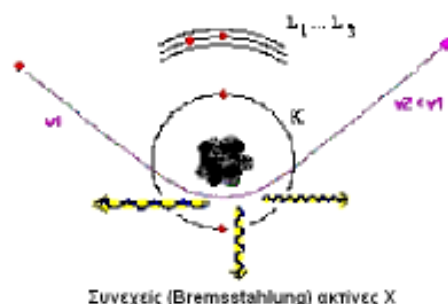
Η συλλογή των δευτερογενών ηλεκτρονίων πραγματοποιείται με τη χρήση ενός «συλλέκτη», δηλαδή ένα πλέγμα με θετικό δυναμικό (+100V) που η θέση του είναι μπροστά από τον ανιχνευτή με σκοπό να έλκει τα αρνητικά ηλεκτρόνια που μετρώνται από τους κτύπους οι οποίοι παράγονται στον ανιχνευτή. Η ένταση των εκπεμπομένων ηλεκτρονίων εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της μορφολογίας της επιφανείας. Η διακύμανση στην ένταση των ηλεκτρονίων μπορεί να αλλάξει την φωτεινότητα ενός καθοδικού σωλήνα (CRT), ο οποίος σαρώνεται συγχρονισμένα με την δέσμη ηλεκτρονίων. Έτσι παράγεται η εικόνα της επιφανείας στην οθόνη του καθοδικού σωλήνα.

3.1.4 Ακτίνες X

- ▶ Ακτίνες X (X-Rays): Συνεχείς (Bremsstrahlung) και Χαρακτηριστικές (Characteristic)
- ▶ Auger ηλεκτρόνια

Συνεχές φάσμα

Καθώς ένα ηλεκτρόνιο έχει την ικανότητα να σκεδάζεται μη ελαστικά σε αλληλεπίδραση με τον πυρήνα ενός ατόμου, επιβραδύνεται και μέρος (έως και το σύνολο) της ενέργειάς του αποδίδεται σαν ακτίνες X που καλούνται Bremsstrahlung. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ένα ευρύ φάσμα ακτίνων X με

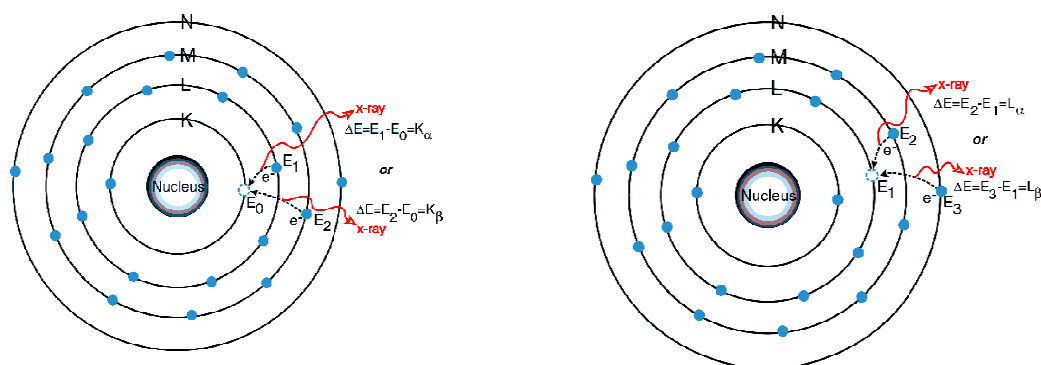


Εικόνα 3.5: Συνεχές φάσμα ακτίνων X[29]

μέγιστη ενέργεια εκείνη του προσπίπτοντος ηλεκτρονίου. Το φάσμα αυτό δεν καθίσταται χρήσιμο στην στοιχειακή ανάλυση διότι δεν αποτελεί χαρακτηριστικό του στοιχείου.

Χαρακτηριστικό φάσμα

Οι χαρακτηριστικές ακτίνες X εμφανίζονται με έναν εντελώς διαφορετικό μηχανισμό. Όταν ένα ηλεκτρόνιο φεύγει από εσωτερική στοιβάδα, τότε ένα ηλεκτρόνιο από υψηλότερη ενεργειακή στοιβάδα καλύπτει το κενό μεταπηδώντας στην χαμηλότερη στοιβάδα και εκπέμποντας την διαφορά ενεργείας σαν ακτίνες X. Η ενέργεια αυτών των ακτίνων χαρακτηρίζει τη μετάπτωση και κατά συνέπεια το άτομο.



Εικόνα 3.6: Κ και L γραμμές χαρακτηριστικών ακτίνων X[29]

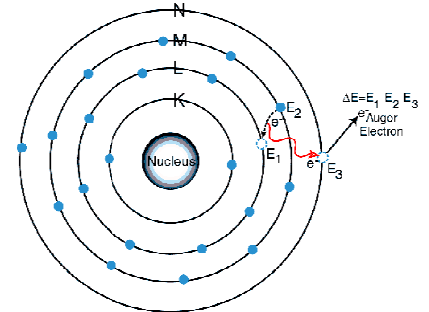
Ανίχνευση ακτίνων X

Ο ανιχνευτής ακτίνων X αποτελεί έναν κρύσταλλο πυριτίου (με λίθιο) ο οποίος αλλάζει την αντίστασή του σε σχέση με την απορρόφηση της ενέργειας των ακτίνων X. Αυτό καταγράφεται σαν μέτρηση της ακτίνας, κάτι το οποίο χαρακτηρίζει την προέλευση της και όσον αφορά το μέγεθος της, μετράται σε eV από έναν πολυκάναλο αναλυτή (Multi-Channel Analyzer). Ο ανιχνευτής έχει έναν πίνακα (Look Up Table) για να προσδιορίζει την προέλευση.

Ο ανιχνευτής δεν μετρά μόνον την χαρακτηριστική ενέργεια των ακτίνων αλλά όμοια με τον ανιχνευτή δευτερογενών ηλεκτρονίων, έχει τη δυνατότητα να προβλέψει την θέση των ατόμων προέλευσης και να φτιάξει ένα χάρτη ακτίνων X. Όλοι οι ανιχνευτές εμφανίζουν θερμική απώλεια ρεύματος και για αυτό τον λόγο πρέπει να ψύχονται με υγρό άζωτο.

Auger ηλεκτρόνια

Τα ηλεκτρόνια Auger δημιουργούνται όταν οι εκπεμπόμενες από το δείγμα ακτίνες X διώξουν ηλεκτρόνια από άλλη στιβάδα με την έξοδό τους από το δείγμα.



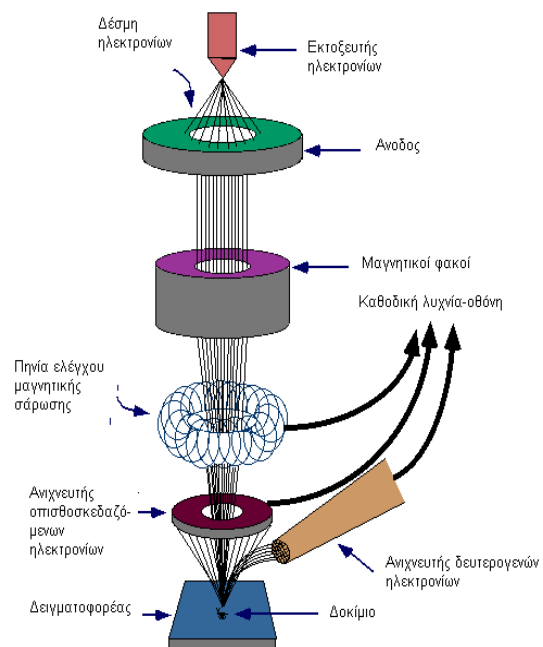
Εικόνα 3.7: Ηλεκτρόνια Auger[29]

3.1.5 Οργανολογία

Η αρχή λειτουργίας του SEM στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις που υπάρχουν μεταξύ του προς εξέταση δείγματος και της προσπίπτουσας σε αυτό δέσμης ηλεκτρονίων. Οι κύριες διατάξεις που εμφανίζονται στο μικροσκόπιο είναι το σύστημα παραγωγής δέσμης ηλεκτρονίων, το σύστημα κατεύθυνσης της δέσμης, το σύστημα πληροφοριών και τέλος το σύστημα κενού.

Τα κύρια στάδια λειτουργίας ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου είναι τα εξής:

1) Αρχικά σχηματίζεται μία δέσμη ηλεκτρονίων από την πηγή, η οποία επιταχύνεται προς το δείγμα διαμέσου ενός θετικού ηλεκτρικού δυναμικού.



Εικόνα 3.8: Διάγραμμα λειτουργίας μικροσκοπίου[29]

2) Στη συνέχεια με τη χρήση μεταλλικών ανοιγμάτων, ηλεκτρομαγνητικών φακών και πηνίων σάρωσης, επιταχύνεται μία λεπτή εστιασμένη μονοχρωματική δέσμη η οποία σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος.

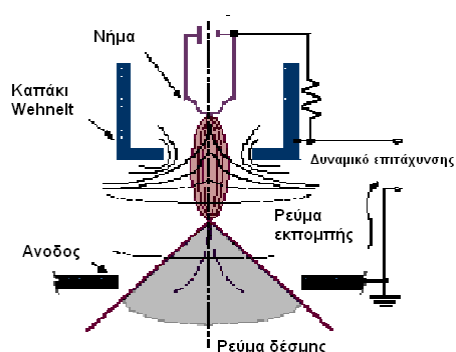
3) Τέλος οι αλληλεπιδράσεις δέσμης δείγματος καταγράφονται από τους ανιχνευτές και μετατρέπονται σε εικόνα.

Τα προαναφερθέντα στάδια ισχύουν για όλους τους τύπους ηλεκτρονικών μικροσκοπίων.

3.1.6 Πηγή ηλεκτρονίων

Τα ηλεκτρόνια δημιουργούνται από ένα νήμα βολφραμίου (υπάρχουν και άλλα υλικά), που λειτουργεί σαν κάθοδος. Μέσα από αυτό το νήμα περνάει ρεύμα (filament current) και καθώς το ρεύμα αυξάνεται, εκπέμπονται ηλεκτρόνια τα οποία έχουν κατεύθυνση προς την άνοδο στην οποία εφαρμόζεται ένα δυναμικό 1-30 KV (accelerating voltage). Η άνοδος η οποία είναι θετική, όπως και το κύκλωμα, παρουσιάζει ισχυρές ελκτικές δυνάμεις στα ηλεκτρόνια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η άνοδος να κατευθύνει και να επιταχύνει τα ηλεκτρόνια, να ελέγχει δηλαδή την ενέργειά τους.

Όταν αυξάνεται το ρεύμα του νήματος, φθάνει σε ένα σημείο που δεν γίνεται εκπομπή πλέον άλλων ηλεκτρονίων. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται κορεσμός

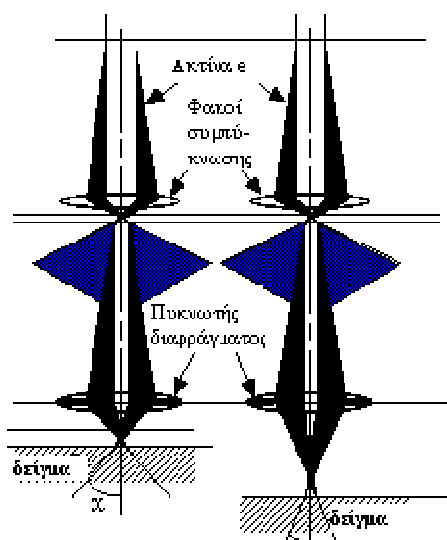


Εικόνα 3.9: Διάγραμμα εκπομπής δέσμης[29]

του νήματος (filament saturation). Όταν το ρεύμα του νήματος αυξηθεί παραπάνω, δημιουργούνται υπερθέρμανση καθώς και εξάχνωση του βολφραμίου, με άλλα λόγια το νήμα καίγεται. Μέρος του βολφραμίου εξαχνώνεται, ακόμα και στο σημείο κορεσμού, πράγμα το οποίο σημαίνει πως με την πάροδο του χρόνου το νήμα λεπταίνει. Ο αριθμός ηλεκτρονίων στην δέσμη ορίζεται σαν ρεύμα εκπομπής

(emission current-100 μ A). Καθορίζεται από την απόσταση μεταξύ της άκρης του νήματος (filament tip) και του ανοίγματος που υπάρχει στο καπάκι

(Wehnelt cap aperture). Όσο πιο κοντά βρίσκονται, τόσο περισσότερα ηλεκτρόνια έλκονται και τόσο μεγαλύτερο γίνεται το ρεύμα εκπομπής.



Εικόνα 3.10: Διάγραμμα εστίασης σε διαφορετικές αποστάσεις εργασίας[29]

Η επιτάχυνση των ηλεκτρονίων από την άνοδο και το πέρασμα αυτών μέσα από ένα ηλεκτρομαγνητικό φακό συμπύκνωσης (condenser lens), έχει ως αποτέλεσμα αυτά να μετατραπούν σε δέσμη (Στάδιο απομεγέθυνσης). Με την ισχύ αυτού του φακού καθορίζεται η διάμετρος της δέσμης (spot size). Υπάρχουν κι άλλοι ηλεκτρομαγνητικοί φακοί που ελέγχουν την εστίαση της δέσμης πάνω στην επιφάνεια του δείγματος. Τα παρακάτω σχήματα δείχνουν δύο διαφορετικές συνθήκες εστίασης της δέσμης των ηλεκτρονίων. Η μία

σε μικρή απόσταση εργασίας από το δείγμα (αριστερά) και η άλλη σε μεγαλύτερη (δεξιά). Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιούνται οι ίδιοι φακοί, με το ίδιο μέγεθος διαφράγματος. Αλλά, όταν μετακινείται το δείγμα μακριά από τους φακούς παρατηρούνται τα παρακάτω:

- Η απόσταση εργασίας S αυξάνει
- Η απομεγέθυνση ελαττώνεται
- Το μέγεθος του σημείου αυξάνει
- Η γωνία απόκλισης α ελαττώνεται

Το μήκος εστίασης f των φακών αυξάνεται λόγω της ελάττωσης της απομεγέθυνσης, που συμβαίνει όταν ελαττώνεται το ρεύμα των φακών. Επίσης η ανάλυση του δείγματος ελαττώνεται με την αύξηση της απόστασης εργασίας, διότι αυξάνεται το μέγεθος του σημείου. Αντιστρόφως, το βάθος του πεδίου αυξάνει όταν αυξάνεται η απόσταση εργασίας, γιατί η γωνία απόκλισης είναι μικρότερη.

3.1.7 Σύστημα κενού

Για την χρήση του SEM, η στήλη είναι απαραίτητο να βρίσκεται υπό κενό για να είναι εφικτό να παραχθεί και να διατηρηθεί σταθερή η ακτίνα των ηλεκτρονίων. Σε διαφορετική περίπτωση, τα ηλεκτρόνια συγκρούονται με τα μόρια του αέρα και απορροφώνται.

3.1.8 Σύστημα πληροφοριών

Αφορά τους ανιχνευτές που δέχονται τα σήματα, τα οποία παράγονται από την αλληλεπίδραση της δέσμης ηλεκτρονίων με το δείγμα καθώς και με το σύστημα παρουσίασης (μεγένθυση-παρουσίαση-καταγραφή). Αυτοί οι ανιχνευτές είναι συνήθως ανιχνευτές δευτερογενών ηλεκτρονίων όπως για παράδειγμα ο ανιχνευτής Everhart-Thornley (ETD), ο ανιχνευτής ευρέως πεδίου (Large Field Detector, LFD), ο ανιχνευτής σε ατμοσφαιρική πίεση (Gaseous Electron Detector GED), ο ανιχνευτής διόδου στερεάς φάσης (Solid State Electron Detector, SSED) για τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια (BSE), καθώς και ο ανιχνευτής διόδου λιθίου-πυριτίου (SiLi), με τον οποίο μπορούμε να ανιχνεύσουμε ενεργειακή διασπορά ακτίνων X (Energy Dispersive Spectrometer, EDS).

3.1.9 Εφαρμογές

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως σε όλα τα πεδία που μας ενδιαφέρει η γεωμετρία και η σύσταση της μικροδομής. Ακόμα έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί για μία μεγάλη ποικιλία δειγμάτων όπως για παράδειγμα, βιολογικά υλικά, φιλμ, μεμβράνες, φίλτρα, ίνες, ρητίνες, τέφρες, τσιμέντα, χρώματα, μεταλλικές επιφάνειες, κλπ. Το SEM μας δίνει μεγάλη δυνατότητα εστίασης και αλλαγής μεγέθυνσης σε ένα ευρύ πεδίο, μικρή προετοιμασία δείγματος καθώς επίσης και τρισδιάστατα διαγράμματα, κάτι που το καθιστούν ως ένα απαραίτητο όργανο έρευνας. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης μπορούμε να λαμβάνουμε ποσοτικές

αναλύσεις με γεωμετρικές λεπτομέρειες και να ξεχωρίζουμε τις φάσεις. Όσον αφορά τον συνδυασμό του SEM με το XRD, χρησιμοποιείται για την ποσοτική ανάλυση σε ελατές και εύθραυστες φάσεις, για το βάθος των ρηγματών, το μέγεθος της ζώνης στη σχισμή, και τον τρόπο δημιουργίας ρωγμών έτσι ώστε να καθοριστεί ένα ποσοτικό μοντέλο σκληρότητας της δομής. Μελετώνται επίσης η διάβρωση και η επικάλυψη επιφανειών με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, κάνοντας χρήση όλων των πλεονεκτημάτων του για τον χαρακτηρισμό των τύπων της διάβρωσης και της επικάλυψης καθώς επίσης και την κινητική μελέτη των διεργασιών. Οι δομές των προστατευτικών επικαλυπτικών και το πόσο αποτελεσματικές είναι αυτές, ελέγχονται με τις εικόνες του SEM.

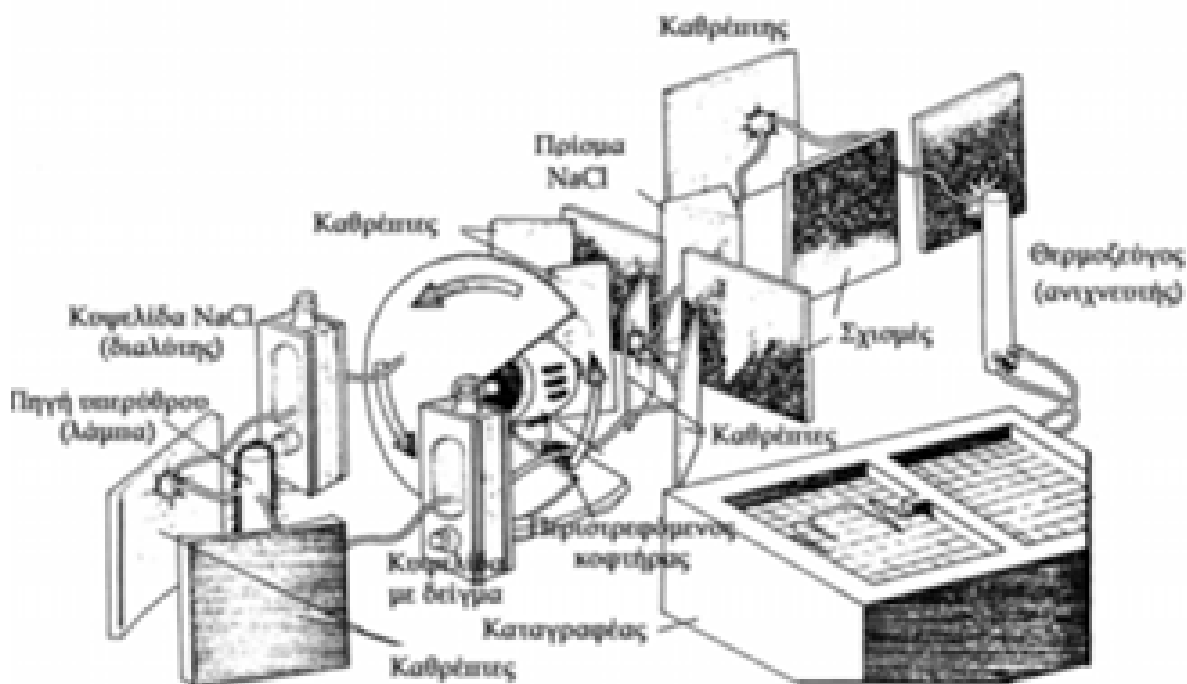


Εικόνα 3.11: Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης ZEISS EVO MA 10, Εργαστήριο Τμήματος Επιστήμης των Υλικών.

3.2 Υπέρυθρη φασματοσκοπία, FT-IR

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία (Infrared Spectroscopy, IR)[31] είναι μια από τις σημαντικές φασματοσκοπικές τεχνικές στην Οργανική Χημεία, εξαιτίας της εύκολης λήψης φασμάτων και της σύγκρισής τους με φάσματα γνωστών οργανικών ενώσεων. Η χρήση της γίνεται ευρέως κατά τη σύνθεση χημικών ενώσεων και για τη διαδικασία πιστοποίησης της καθαρότητάς τους. Στην περιοχή υπερέυθρου του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (IR) λαμβάνουν χώρα απορροφήσεις που οφείλονται σε δονήσεις ή κάμψεις των δεσμών των μορίων για ενώσεις με μόνιμη διπολική ροπή, η οποία μεταβάλλεται κατά την παραμόρφωση του μορίου, και έτσι απορροφούν ισχυρά στην περιοχή υπερέυθρου. Πέρα από τις δονήσεις και τις κάμψεις εμφανίζουν και άλλα είδη παραμόρφωσης της δομής των μορίων, όπως για παράδειγμα όταν αυτό σείεται (wagging), κλυδωνίζεται (rocking), στρεβλώνεται (twisting), ή έχει ψαλιδωτή κίνηση (scissoring), κ.λπ.

Η λειτουργία ενός φασματοφωτόμετρου IR παρατίθεται στο παρακάτω σχήμα, στο οποίο φαίνεται η πορεία που ακολουθεί το φως.



Εικόνα 3.12: Σχεδιάγραμμα της εικόνας ενός φασματοφωτόμετρου IR.[31]

Η πηγή φωτός έχει την ικανότητα να εκπέμπει σε όλη την υπέρυθρη περιοχή της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και είναι μια λάμπα με νήμα Ni-Cr (Nichrome). Υπάρχουν κι άλλες πηγές φωτός που χρησιμοποιούν νήμα Nernst (ZrO ή άλλα οξειδία σπάνιων γαιών) ή λάμπα υδραργύρου. Το βασικότερο μειονέκτημα των πηγών φωτός είναι πως υπάρχει άνιση κατανομή ενέργειας σε σχέση με το μήκος κύματος και η μικρή ένταση τους. Η λάμπα Globar έχει αρκετά υψηλότερη ένταση (κατασκευάζεται από καρβίδιο του πυριτίου) και χρησιμοποιείται σε καλής ποιότητας φασματοφωτόμετρα IR. Επίσης, γίνεται χρήση αυτής και στα φασματοφωτόμετρα IR με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform IR). Ο μονοχρωμάτορας αποτελεί ένα σύστημα λεπτών σχισμών (slits) καθρεπτών, γυάλινων πρισμάτων και του φράγματος περίθλασης που έχει την ικανότητα να αναλύει την ακτινοβολία σε ξεχωριστές λουρίδες φωτός με διαφορετικό μήκος κύματος. Πριν χρόνια, γινόταν η χρήση πρισμάτων NaCl, που δεν απορροφούν την ακτινοβολία IR, αλλά στα νεότερα φασματοφωτόμετρα ο μηχανισμός του φράγματος περίθλασης εμφανίζεται αρκετά πιο αποτελεσματικός. Υπάρχουν τουλάχιστον δύο σχισμές σε όλο το σύστημα του μονοχρωμάτορα και είναι οι σχισμές εισαγωγής και εξαγωγής, που το άνοιγμά τους αλλάζει σε σχέση με το μήκος κύματος του φωτός και αυτό γίνεται είτε μηχανικά (με μια έκκεντρη μηχανική χτένα), είτε ηλεκτρικά (ποτενσιόμετρο). Η μείωση της σχισμής είναι δυνατό να αυξάνει τη διακριτική ικανότητα ή βαθμό διαχωρισμού του φασματοφωτομέτρου, αλλά ταυτόχρονα μπορεί να μειώνει την ένταση του φωτός και χρειάζεται μεγάλη ενίσχυση σήματος μέσα στον ανιχνευτή. Το φράγμα περίθλασης (grating diffraction) κατάφερε να αντικαταστήσει τα πρίσματα NaCl τα οποία ήταν ευαίσθητα στην υγρασία και αναλύει ή σκεδάζει την ακτινοβολία στα συστατικά της μήκη κύματος με ένα σύστημα παράλληλων γραμμικών αυλακώσεων, που υπάρχουν σε ίσες αποστάσεις μεταξύ τους, πάνω σε μια γυαλιστερή μεταλλική επιφάνεια η οποία χρησιμοποιείται ως καθρέπτης. Καθώς μια δέσμη φωτός πέφτει πάνω στο φράγμα περίθλασης, κάθε αυλακωτή γραμμή μετατρέπεται σε μια νέα πηγή φωτός που μπορεί να εκπέμψει προς την κατεύθυνση του ανιχνευτή. Οι γραμμές έχουν μία διάταξη κατά αυτόν τον τρόπο ώστε το φως (ακτινοβολία) από ένα μόνο μήκος κύματος και τα πολλαπλάσια του, να υποστούν θετική συμβολή σε μια ορισμένη γωνία του φράγματος περίθλασης. Ακτινοβολίες διαφορετικών μηκών κύματος λαμβάνονται περιστρέφοντας το φράγμα ανάλογα με την κατεύθυνση της δέσμης του φωτός από την πηγή, σαρώνοντας (scanning) με αυτόν τον τρόπο τις διάφορες συχνότητες (ή μήκη κύματος) της ακτινοβολίας IR.

3.3 Δυναμική σκέδαση φωτός, DLS

Σκέδαση Φωτός (Light Scattering)

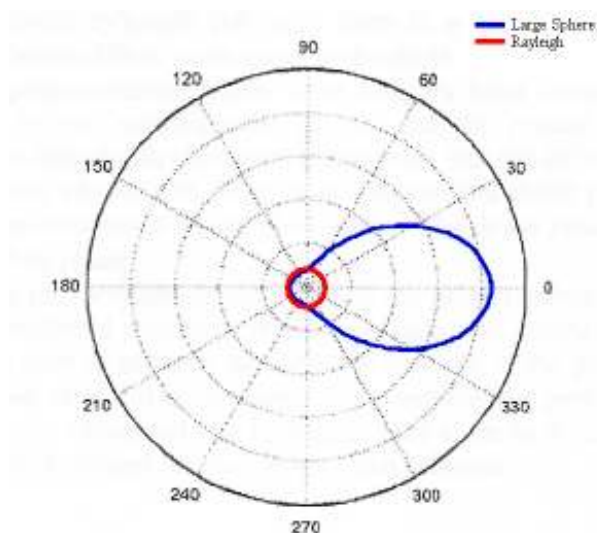
Η τεχνική της σκέδασης του φωτός είναι μια από τις πιο σημαντικές πειραματικές τεχνικές για το χαρακτηρισμό των πολυμερών σε αραιά διαλύματα, γιατί επιτρέπει τον προσδιορισμό του απολύτου M_w και της γυροσκοπικής ακτίνας, R_g^2 (στατική σκέδαση φωτός), καθώς επίσης και της υδροδυναμικής ακτίνας R_h (δυναμική σκέδαση του φωτός). Οι πρώτες μελέτες σκέδασης του φωτός από διαλύματα πραγματοποιήθηκαν από τον Faraday τον περασμένο αιώνα όταν γινόταν η μελέτη κolloειδών διασπορών του χρυσού. Τις μελέτες αυτές συνέχισε ο Tyndall και ολοκλήρωσε ο λόρδος Rayleigh, καθώς το 1871 θεμελίωσε τη θεωρία σκέδασης του φωτός από σωματίδια τα οποία έχουν μέγεθος πολύ μικρότερο σε σχέση με το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Κατά τη διάρκεια που μια δέσμη φωτός προσπίπτει σε ένα κolloειδές διάλυμα, ένα μέρος της ακτινοβολίας διέρχεται μέσα από το διάλυμα και το υπόλοιπο σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι αρκετά μεγαλύτερη από των διαλυμάτων των “μικρών” μορίων, όσον αφορά τα διαλύματα μακρομορίων. Η τεχνική της σκέδασης του φωτός βασίζεται στη μέτρηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από το διάλυμα σε πολλές κατευθύνσεις ανάλογα με την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Το φως αποτελεί μια ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που συνίσταται από ένα ηλεκτρικό και ένα μαγνητικό πεδίο, που είναι κάθετα μεταξύ τους. Μια δέσμη φωτός, καθώς προσπίπτει σε ένα υλικό, τα ηλεκτρόνια του υλικού έχουν την δυνατότητα να αλληλεπιδράσουν με το φως και τότε διεγείρονται και γίνονται δευτερογενείς πηγές ακτινοβολίας, επανεκπέμποντας την απορροφημένη ενέργεια προς όλες τις κατευθύνσεις με ακριβώς το ίδιο μήκος κύματος που είχε και η προσπίπτουσα ακτινοβολία. Η τεχνική της σκέδασης του φωτός βασίζεται στη μέτρηση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε διάφορες κατευθύνσεις ανάλογα με την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός επηρεάζεται από το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός, το μέγεθος και το σχήμα των κέντρων σκέδασης, τις οπτικές ιδιότητες των σκεδαστών και τη γωνία παρατήρησης[32]. Η τεχνική της σκέδασης του φωτός αποτελεί μια γρήγορη μέθοδος, που δεν καταστρέφει το δείγμα, απόλυτη γιατί δεν χρειάζεται βαθμονόμηση και τέλος έχει την ικανότητα να εφαρμοστεί σε συστήματα, που αποτελούνται από μεγάλο αριθμό σωματιδίων. Υπάρχουν παρόλα αυτά και δυο μειονεκτήματα: το δείγμα δεν θα πρέπει να είναι αρκετά πυκνό για να μην γίνεται πολλαπλή σκέδαση και δεν θα πρέπει να υπάρχει πουθενά στο σύστημα σκόνη, γιατί τα σωματίδια σκόνης είναι και αυτά κέντρα σκέδασης.

Στατική Σκέδαση Φωτός (Static Light Scattering, SLS)

Με την τεχνική SLS γίνεται ο προσδιορισμός του απόλυτου M_w των μακρομορίων, του 2^{ου} συντελεστή Virial A και της R^2_g . Η μέθοδος αυτή έχει τις βάσεις της στην πολωσιμότητα των σωματιδίων, στα οποία επάγεται διπολική ροπή στην περίπτωση που ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια τους. Σε αυτή την τεχνική είναι εφικτή η μέτρηση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας υπό συγκεκριμένες γωνίες για ένα εύρος συγκεντρώσεων του πολυμερούς στο διάλυμα. Υπάρχουν δυο κυρίως θεωρίες, που μπορούν να περιγράψουν τη στατική σκέδαση του φωτός και χρησιμοποιούνται ανάλογα με το μέγεθος των σωματιδίων:[33]

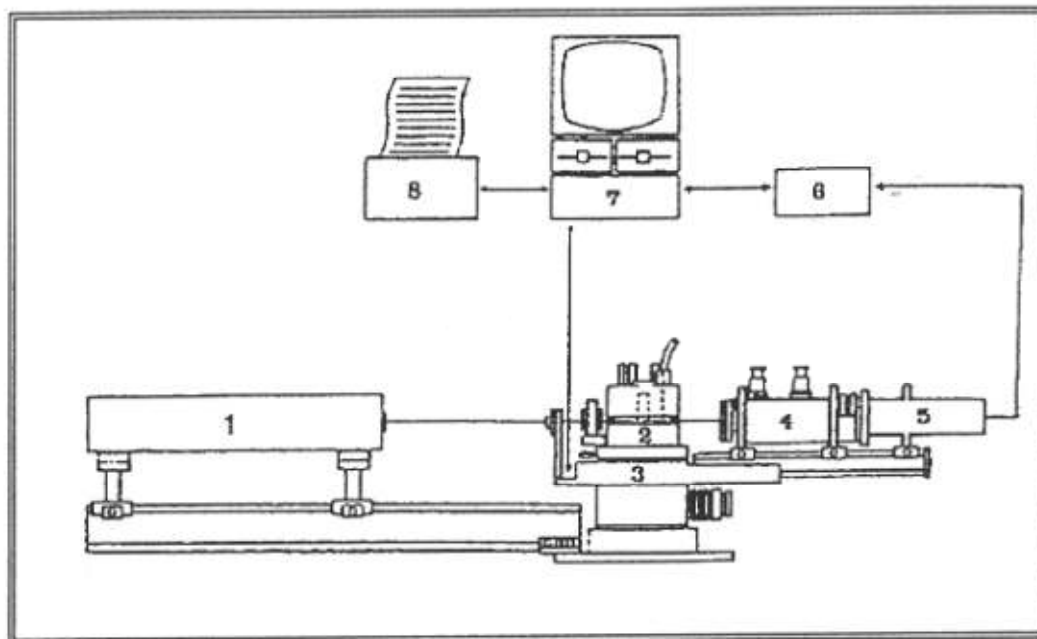
- Η θεωρία Rayleigh για τη σκέδαση του φωτός από ισότροπα αιωρούμενα σωματίδια με διαστάσεις μικρές σε σχέση με το μήκος κύματος λ της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ($<\lambda/20$) και
- Η θεωρία Debye, στην οποία περιγράφεται η σκέδαση φωτός από σωματίδια, των οποίων οι διαστάσεις είναι συγκρίσιμες με το μήκος κύματος λ της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ($>\lambda/20$).

Στο σχήμα φαίνεται η γωνιακή εξάρτηση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ενός σωματιδίου στην περιοχή Rayleigh και ενός μεγάλου σωματιδίου:



Εικόνα 3.13: Σύγκριση της γωνιακής εξάρτησης της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ενός σφαιρικού σωματιδίου στην περιοχή Rayleigh (κόκκινη γραμμή) και ενός μεγάλου σφαιρικού σωματιδίου (μπλε γραμμή).[40]

Η διάταξη με την οποία πραγματοποιήθηκε το πείραμα της στατικής σκέδασης του φωτός εμφανίζεται στο παρακάτω σχήμα:



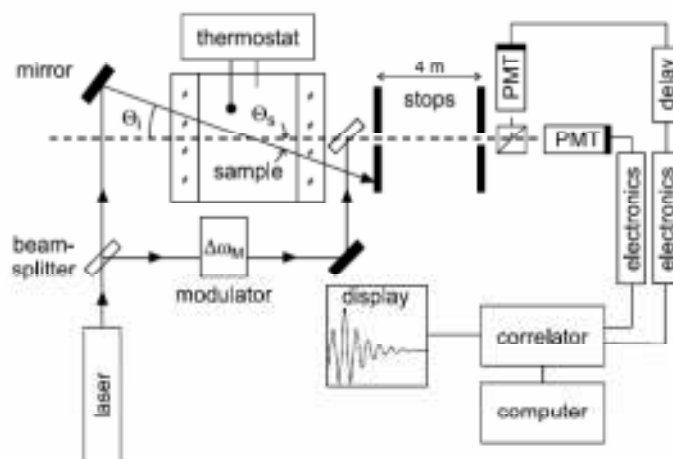
Εικόνα 3.14: Συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την στατική σκέδαση του φωτός.1) Laser 2) κυψελίδα, 3) γωνιόμετρο, 4) ανιχνευτής, 5) φωτοπολλαπλασιαστής, 6) μετρητής φωτονίων, 7) υπολογιστής και 8) εκτυπωτής.[40]

Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Η δυναμική σκέδαση έγινε επίσης γνωστή με εναλλακτικά ονόματα όπως: οιονεί ελαστική σκέδαση φωτός – QELS (quasi-elastic light scattering) και φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων – (photon correlation spectroscopy). Στις μέρες μας η τεχνική της δυναμικής σκέδασης του φωτός αποτελεί μια καθιερωμένη τεχνική μέτρησης του συντελεστή διάχυσης (μεταφοράς και περιστροφής) σε αραιά διαλύματά τους, μα και του μεγέθους, του σχήματος των σωματιδίων, των χρόνων χαλάρωσης και της πολυδιασποράς του συστήματος.

Η χρήση της μεθόδου του DLS γίνεται για τον υπολογισμό της υδροδυναμικής ακτίνας R_h των μακρομορίων στο διάλυμα. Στη δυναμική σκέδαση φωτός χρησιμοποιείται μονοχρωματική ακτινοβολία και μετράται (υπό συγκεκριμένη γωνία) η χρονική διακύμανση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας υπό γωνία θ [34]. Αυτή η χρονική διακύμανση αφορά το γεγονός ότι η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός στον ανιχνευτή προκαλείται από συμβολή της ακτινοβολίας, η οποία προέρχεται από τα διάφορα σωματίδια, που κινούνται άτακτα εξαιτίας της θερμικής κίνησης.[35] Επειδή τα σωματίδια κινούνται από ή προς τον ανιχνευτή, προκαλείται μια διεύρυνση των συχνοτήτων εξαιτίας του φαινομένου Doppler.

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την δυναμική σκέδαση του φωτός παρατίθεται στο παρακάτω σχήμα. Το βασικό κλάσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας από το laser περνάει μέσα από τη θερμοστατούμενη κυψελίδα του δείγματος. Η σκεδαζόμενη ακτινοβολία μπορεί να ενισχυθεί, να διαχωριστεί και να διοχετευτεί στο συσχετιστή (correlator), απ' όπου η συσχετισμένη ακτινοβολία καταγράφεται στην οθόνη του υπολογιστή.



Εικόνα 3.15: Συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την δυναμική σκέδαση του φωτός.[40]

3.4 Φασματομετρία UV-VIS

Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι χημικής ανάλυσης, στις οποίες ανήκει και η φασματοφωτομετρία UV-VIS[31], χρησιμοποιούνται ευρέως ώστε να γίνει εφικτή η επίλυση διαφόρων χημικών προβλημάτων, που αφορούν τη δομή, την κινητική, την ταυτοποίηση, την ποσοτική ανάλυση διαφόρων ενώσεων, κ.α.

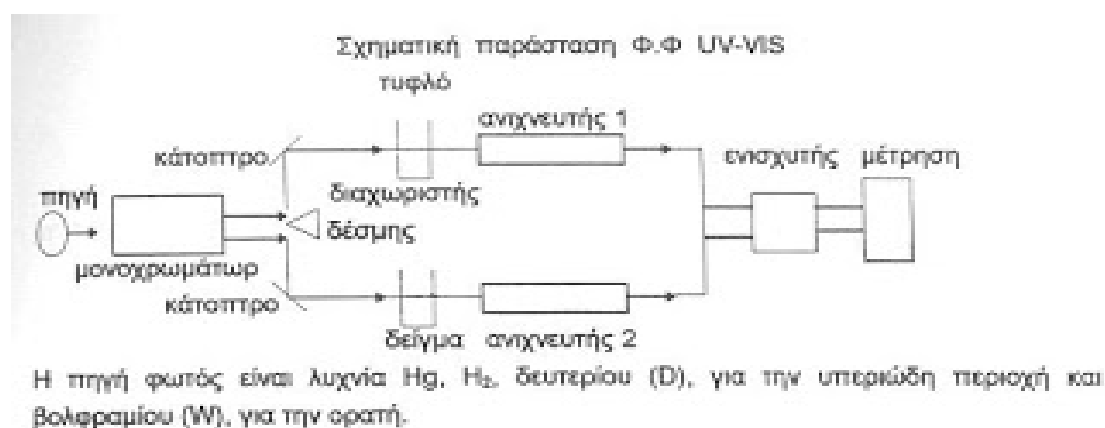
Τα πλεονεκτήματα των μεθόδων αυτών είναι τα εξής:

- χρήση μικρής ποσότητας δείγματος
- δεν καταστρέφεται στο τέλος της ανάλυσης
- μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία
- μικρός χρόνος μέτρησης.

Οι πιο πολλές από τις φασματοφωτομετρικές μεθόδους έχουν βάσεις στην επίδραση κατάλληλης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε μια ουσία, η οποία δεσμεύεται από τα άτομα, ή τα μόρια της ύλης και δημιουργεί ηλεκτρονικές διεγέρσεις, διεγέρσεις πυρήνων, αλλαγές στην περιστροφή και τη δόνηση των μορίων. Στη συνέχεια τα άτομα και τα μόρια γυρίζουν πίσω στην αρχική τους κατάσταση, αφού πρώτα αποβάλλουν το ποσό της ενέργειας το οποίο απορρόφησαν. Με την καταγραφή της έντασης της απορρόφησης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος, ή τη συχνότητα της ακτινοβολίας έχουμε το

φάσμα απορρόφησης, το οποίο είναι γραμμικό στα άτομα και ταινίες στα μόρια.

Η απορρόφηση υπεριώδους (UV: 190-400 nm), ή ορατής ακτινοβολίας (visual 400-800 nm), μπορεί να προκαλέσει μόνο ηλεκτρονικές διεγέρσεις, δηλαδή διεγέρσεις ηλεκτρονίων της στοιβάδας σθένους, που μεταβαίνουν από μια δεσμική σε μια αντιδεσμική κατάσταση, δίχως να υπάρξει αλλαγή στον κύριο κβαντικό αριθμό.



Εικόνα 3.16: Σχηματική παράσταση Φ.Φ. UV-VIS[31]

Ο μονοχρωμάτορας (πρίσμα, ή παραθλαστικό φράγμα) μπορεί να αναλύσει το λευκό φως στις διάφορες μονοχρωματικές περιοχές του καθώς επίσης μπορεί να επιλέγει το επιθυμητό μήκος κύματος με μεγάλη ακρίβεια. Ο διαχωριστής δέσμης έχει την ικανότητα να χωρίζει την εξερχόμενη δέσμη σε δύο ίσα μέρη. Οι κυψελίδες οι οποίες περιέχουν το τυφλό καθώς και το δείγμα μέτρησης, παρασκευάζονται από χαλαζία όσον αφορά την περιοχή UV, ή και από ύαλο όσον αφορά την περιοχή VIS. Οι ανιχνευτές 1 και 2 σε συνδυασμό καθορίζουν το σήμα που προέρχεται από την ουσία που θέλουμε να προσδιορίσουμε, ενώ ο ενισχυτής, ενισχύει το εξερχόμενο σήμα. Η μέτρηση, ή όπως και η καταγραφή του σήματος γίνονται από ευπαθές φωτοκύτταρο και εκφράζονται σαν απορρόφηση, ή σαν διαπερατότητα. Στις μέρες μας, τα όργανα που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως αυτογραφικά διπλής δέσμης, (ο μηδενισμός του οργάνου γίνεται αυτόματα) και εμφανίζουν τις μεταβολές της απορρόφησης, ή της διαπερατότητας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος.

ΟΡΙΣΜΟΙ:

α) Στο μήκος κύματος, στο οποίο παρατηρείται το μεγαλύτερο ποσοστό απορρόφησης, πραγματοποιούνται υποχρεωτικά όλες οι μετρήσεις και καλείται μ.κ. μέγιστης απορρόφησης (συμβολίζεται με λ).

β) Λευκό διάλυμα, ή τυφλό δείγμα (blank) καλείται το διάλυμα που έχει υποστεί τις ίδιες ακριβώς επεξεργασίες, όπως και το άγνωστο, αλλά δεν περιέχει την ουσία που επιλέγουμε να εξετάσουμε. Η κυψελίδα η οποία έχει το λευκό διάλυμα καλείται και κυψελίδα αναφοράς και είναι κατασκευασμένη από χαλαζία, ή γυαλί ανάλογα με την περιοχή μέτρησης που επιλέξαμε.

γ) Καμπύλη αναφοράς, ή βαθμονόμησης (calibration curve), προκύπτει από τη γραφική απεικόνιση των αριθμητικών τιμών μιας φυσικοχημικής ιδιότητας του δείγματος (A ή $\%T$), σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ουσίας σε πρότυπα διαλύματα. Από την καμπύλη αναφοράς έχουμε τη δυνατότητα να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση ενός άγνωστου διαλύματος. Σωστές μετρήσεις λαμβάνονται όταν η μικρότερη τιμή της $\%T$ είναι $\sim 10\%$ και η μέγιστη οριακή τιμή της απορρόφησης μονάδα ($A = 1$).

3.5 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης, TEM

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης, αποτελείται από ένα νήμα βολφραμίου (ή ακίδα LaB_6) που με την πυράκτωσή, όταν περάσει από αυτό ηλεκτρικό ρεύμα, εκπέμπει ηλεκτρόνια. Μέσα στο νήμα αυτό, που αποτελεί την κάθοδο και την άνοδο, εφαρμόζεται μια διαφορά δυναμικού (συνήθως της τάξης των 60-100 kV) η οποία μπορεί να επιταχύνει τα ηλεκτρόνια. Η πορεία των ηλεκτρονίων ρυθμίζεται από τους ηλεκτρομαγνητικούς φακούς, στους οποίους όταν αλλάξουμε την ένταση του ρεύματος που τους διαπερνάει, έχουμε τη δυνατότητα να μεταβάλλουμε την ένταση του μαγνητικού πεδίου τους (δηλαδή την εστιακή τους απόσταση) και έτσι εστιάζουμε στη δέσμη των ηλεκτρονίων πάνω στο παρασκεύασμα.

Οι βασικές ρυθμίσεις σε ένα μικροσκόπιο TEM επιτυγχάνονται με τα εξής:

1. Τον συγκεντρωτή φακό (condenser lens), που εστιάζει τη δέσμη στο παρασκεύασμα.
2. Τον αντικειμενικό φακό (objective lens), που εστιάζει την εικόνα στην οθόνη.
3. Ενδιάμεσος ή και φακός προβολής (intermediate, projector lens), που ρυθμίζει τη μεγέθυνση.

Η εικόνα η οποία σχηματίζεται σε μια οθόνη επικαλυμμένη με φωσφορίζουσα ουσία, διεγείρεται από τα ηλεκτρόνια που πέφτουν επάνω της, αφού πρώτα αυτά διαπεράσουν το παρασκεύασμα. Τα σημεία του παρασκευάσματος τα οποία δεν είναι διαπερατά από τα ηλεκτρόνια, μας παρέχουν σκοτεινές περιοχές (ηλεκτρονιόφιλες, ηλεκτρονιακά πυκνές, electron dense) ενώ σε αντίθεση με τα διαπερατά σημεία (ηλεκτρονιακά διαφανή, electron lucent) που μας παρέχουν φωτεινές περιοχές. Η διαφοροποίηση αυτή επιτυγχάνεται με την εκλεκτική «χρώση» του παρασκευάσματος.



Εικόνα 3.17: Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης FEI CM20, Ερευνητικό Ινστιτούτο «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ».

Ο τρόπος λειτουργίας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, έχει πολλούς περιορισμούς ως προς τη φύση των δειγμάτων που έχουμε τη δυνατότητα να παρατηρήσουμε. Έτσι, για αυτό το λόγο, ένα δείγμα για να μπορεί να παρατηρηθεί με το κλασσικό Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης και με τις κλασσικές μεθόδους θα πρέπει να έχει τις εξής ιδιότητες:

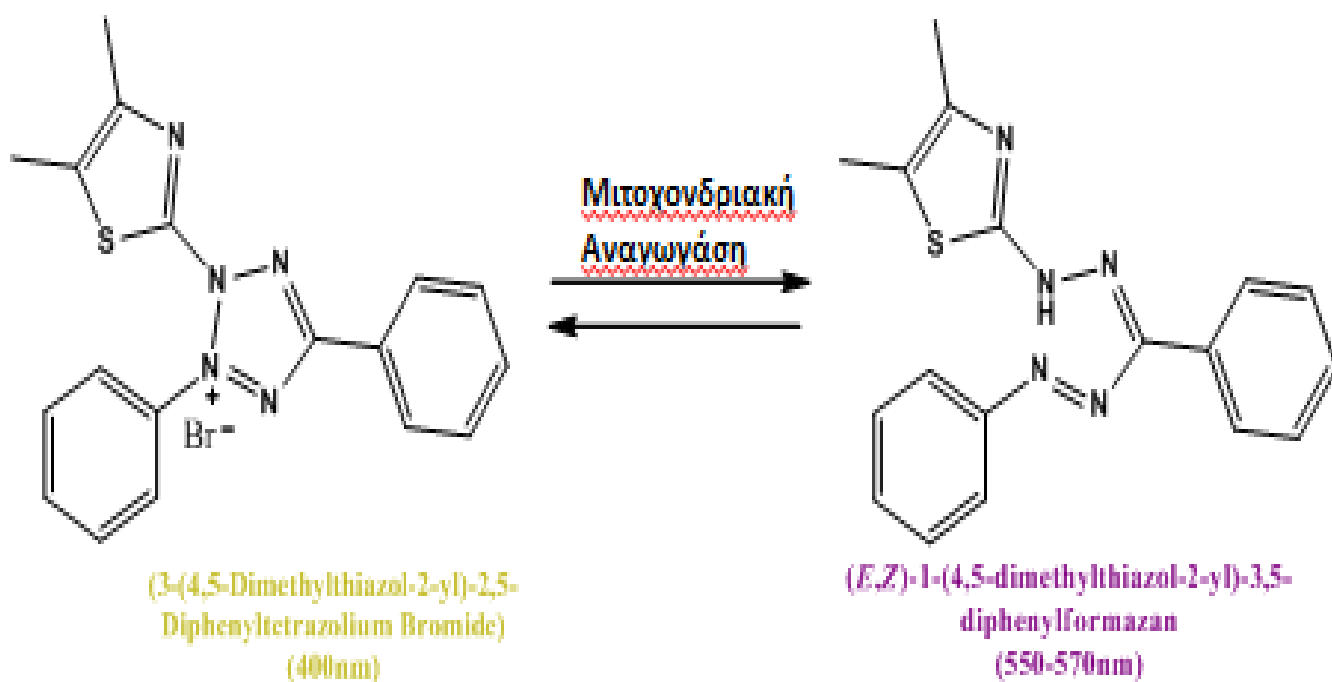
- Αντοχή σε υψηλό κενό,
- Σταθερότητα στο βομβαρδισμό ηλεκτρονίων,
- Λεπτό για να μπορούν να το διαπερνούν τα ηλεκτρόνια, και
- Να επιτρέπει τη διαφορική σκέδαση των ηλεκτρονίων.

Με αυτές τις ιδιότητες που είναι υποχρεωμένο να έχει ένα παρασκεύασμα, περιοριζόμαστε στην εξέταση μόνο μονιμοποιημένων δειγμάτων (νεκρά), αφυδατωμένων, κομμένων σε πολύ λεπτές τομές (πάχος 50-100 nm) και «χρωματισμένων» με «χρωστικές» που περιέχουν βαριά μέταλλα, όπως για παράδειγμα ο μόλυβδος και το ουράνιο[36].

3.6 Χρωματομετρική μέθοδος MTT

Αρχή μεθόδου

Η χρωματομετρική μέθοδος MTT[54] μετράει τη μεταβολική δραστηριότητα των μιτοχονδρίων, βασισμένη στην μετατροπή του τετραζολίου του MTT (3-(4,5-διμέθυλο-θειαζόλ-2-ίλ)2,5-διφαινύλο-τετραζόλιο) σε φορμαζάνη, από το ένζυμο ηλεκτρική αφυδρογονάση στα μιτοχόνδρια. Η φορμαζάνη απορροφά σε διαφορετικό μήκος κύματος (550-570 nm, χρώση ιώδες) από αυτό του MTT (400 nm, χρώση κίτρινο). Οι διαφορές στα επίπεδα φορμαζάνης που προσδιορίζονται αντανακλούν τη μεταβολική δραστηριότητα των μιτοχονδρίων παρουσία/απουσία φαρμάκου και επιτρέπουν να εκτιμήσουμε το ποσοστό (%) ζωντικών κυττάρων στην καλλιέργεια σε σχέση με το μάρτυρα. Θεωρείται ο ακριβέστερος δείκτης, με υψηλή ευαισθησία, ποιότητα και επαναληπτικότητα.



Εικόνα 3.18: Μέθοδος MTT

Διαλύματα

- Διάλυμα MTT (5 mg/mL σε PBS 1x, pH= 7,5): Διατήρηση στους 4 °C, για σύντομη χρήση, σε σκουρόχρωμη φιάλη. Κατάψυξη σε μικρές ποσότητες για μεγαλύτερης διάρκειας διατήρηση.
- Διάλυμα λύσης κυττάρων (DMF): 12.5% SDS, 45% διμεθυλοφορμαμίδιο, ρύθμιση pH=4.7 με HCl.

Πειραματική διαδικασία

- Επώαση κυττάρων στους 37 °C παρουσία/απουσία φαρμάκου για ποικίλα χρονικά διαστήματα
- Προσθήκη 50 μL διαλύματος MTT σε 500 μL αιωρήματος κυττάρων, το οποίο αποκτά κίτρινο χρωματισμό, και επώαση στους 37 °C για 4 h. Στο τέλος της 4ώρης επώασης τα δείγματα έχουν αποκτήσει ιώδη χρωματισμό (λόγω μετατροπής του τύπου MTT σε φορμαζάνη).
- Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 6 min και αφαίρεση υπερκειμένου.
- Προσθήκη διαλύματος λύσης (DMF) και επώαση στους 37 °C όλη τη νύχτα με ήπια ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση και φωτομέτρηση σε ELIZA reader στα 570 nm με μήκος κύματος αναφοράς τα 630 nm.
- Δείκτης ζωτικότητας MTT: OD δείγματος φαρμάκου/OD μάρτυρα αντίστοιχου χρόνου ×100

3.7 Αντιδραστήρια

Τα παρακάτω αντιδραστήρια αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich

- Πολυ- (αιθυλενογλυκόλη) του μεθακρυλικού μεθυλαιθέρα, PEGMA, poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (Mn=475, CAS=26915-72-0),
- Μεθακρυλικό οξύ, MAA, methacrylic acid 99% (MW=86.09g/mol, CAS=79-41-4) και
- Ακετονιτρίλιο, CH₃CN, acetonitrile>99.9% (MW=41.05, CAS=75-05-8)
- 2,2'-αζω-διισοβουτυρονιτρίλιο, AIBN, 2,2'-azobis-isobutyronitrile (MW=164.21, CAS=78-67-1)
- Κιτρικό οξύ, Citric acid, (MW=210.14, CAS=5949-29-1)

Όλοι οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που αγοράστηκαν χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό εκτός από το μεθακρυλικό οξύ που χρησιμοποιήθηκε μετά από απόσταξη.

Τα παρακάτω αντιδραστήρια από την εταιρεία Merck

- Εξάνιο, n-HEXANE, (M=86.18g/mol)
- Οξικός αιθυλεστέρας, EtOAc, ethylacetate (M=88.11g/mol)
- Διχλωρομεθάνιο, CH₂Cl₂, dichloromethane (M=84.93g/mol)
- Χλωριούχο νάτριο, NaCl, sodium chloride (M=58.44g/mol, CAS=7647-14-5)
- Υδροξείδιο του νατρίου, NaOH, sodium hydroxide pellets (M=40.00g/mol)

Τα παρακάτω αντιδραστήρια από την εταιρεία Alfa Aesar

- Θειικό μαγνήσιο, MgSO₄, magnesium sulfate anhydrous 99.5% (CAS=7487-88-9)
- Χλωρίδιο του μεθακρυλικού οξέος, Methacryloyl chloride 97% (MW=104.53, CAS=920-46-7)
- Δι-υδροχλωρική κυσταμίνη, Cystamine dihydrochloride 97+% (MW=225.20, CAS=56-17-7)

Το N,N'-μεθυλενοδιαακρυλαμίδιο, MBA, N,N'-methylenebisacrylamide 96% εξαιρετικά καθάρo (MW=154.17, CAS=110-26-9) από την εταιρεία Acros Organics. Το N-ισοπροπυλοακρυλαμίδιο, NIPAAm, N-isopropylacrylamide >98% από την εταιρεία TGI. Την αιθανόλη, EtOH, ethanol absolute (M.M=46.07, CAS=64-17-5) από την VWR Chemicals. Το όξινο φωσφορικό δι-νάτριο, Na₂HPO₄, sodium phosphate dibasic anhydrous >98.0% (Mr=141.96) από την εταιρεία Fluka. Το δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH₂PO₄, potassium phosphate monobasic 98% (M.M=136,09) από την εταιρεία Codex Carlo Erba. Το χλωριούχο κάλιο, KCl, potassium chloride (M=74.56) από την εταιρεία Panreac. Τέλος το διϋδρο-κιτρικό-τρινάτριο, tri-sodium citrate-2aq 99.5⁺% (MW=294.10g/mol, CAS=6132-04-3) από την εταιρεία Chem-Lab NV.

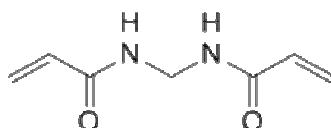
Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν κάτω από άνυδρη ατμόσφαιρα με τη χρήση αζώτου. Σε όλες τις αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε μαγνητική ανάδευση και εξωτερικός θερμοκρασιακός έλεγχος. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε γυάλινα σκεύη στα οποία είχε πραγματοποιηθεί ξήρανση. Ο μορφολογικός χαρακτηρισμός των νανοσφαιρών πραγματοποιήθηκε με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης, SEM.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

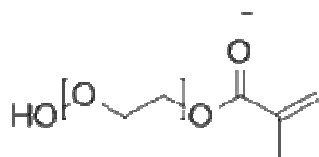
ΣΥΝΘΕΣΗ

Η σύνθεση των πολλαπλά αποκρινόμενων νανοδοχείων, πραγματοποιήθηκε με την διαδικασία του ριζικού πολυμερισμού καταβύθισης μέσω απόσταξης. Κάθε βήμα είχε τις ίδιες συνθήκες.

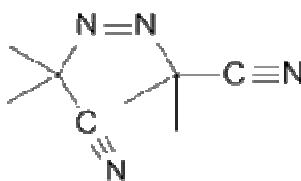
- Παράγοντας σταυροσύνδεσης: N,N'-μεθυλενοδισακρυλαμίδιο (MBA)



- Παράγοντας βιοσυμβατότητας: Πολυαιθυλενογλυκόλη (PEGMA)

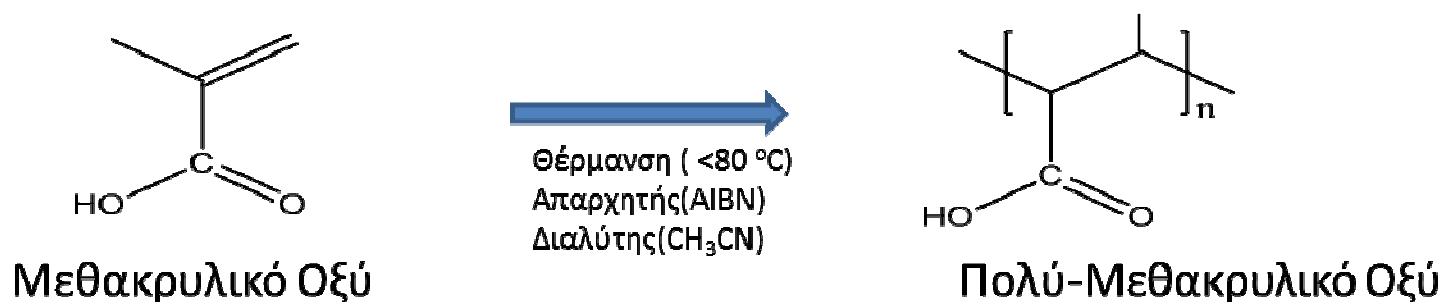


- Απαρχητής: Αζωδιισοβουτυλονιτρίλιο (AIBN)



Εικόνα 4.1: Συνθήκες κάθε βήματος σύνθεσης

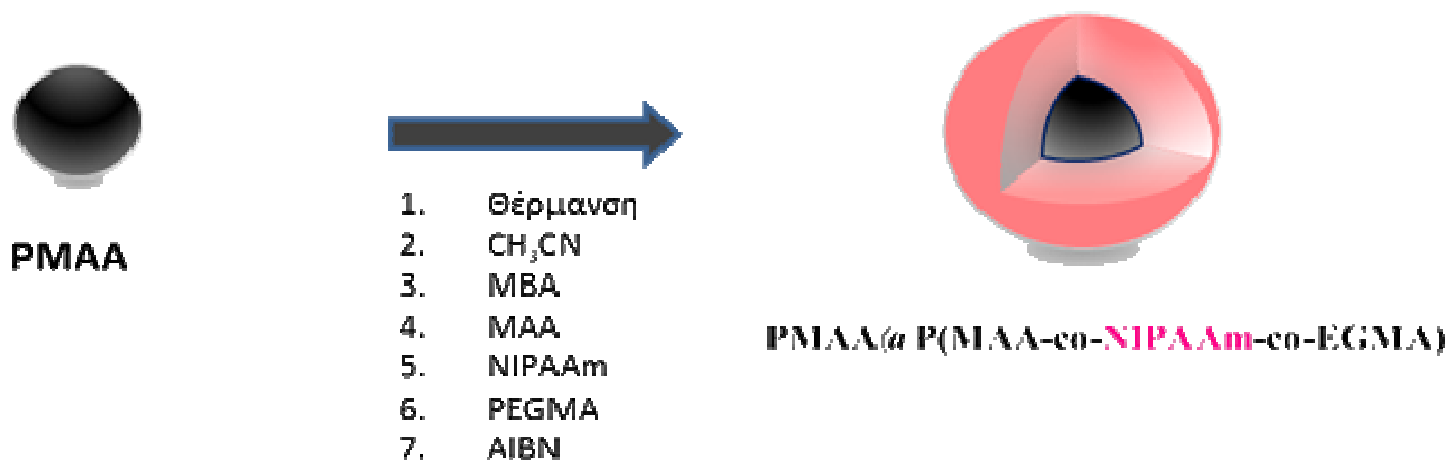
4.1 Σύνθεση σφαιρών πολυ(μεθακρυλικού οξέος) (PMAA)



Εικόνα 4.2: Σύνθεση νανοσφαιρών πολυ-μεθακρυλικού οξέος, PMAA

Η αντίδραση της σύνθεσης των σφαιρών του μεθακρυλικού οξέος πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του τυχαίου ριζικού πολυμερισμού καταβύθισης μέσω απόσταξης. Σε σφαιρική φιάλη των 1L προστίθεται ακετονιτρίλιο (CH₃CN, 800ml, d=0.786g/ml,) και μεθακρυλικό οξύ (MAA, 12ml, d=1.015g/ml, mmol=0.14). Το μίγμα στη συνέχεια θερμάνθηκε στους 70°C υπό ατμόσφαιρα αζώτου και συνεχή ανάδευση. Το μίγμα αφέθηκε για μικρό χρονικό διάστημα και προστέθηκε το 2,2'-αζω-διισοβουτυρονιτρίλιο (AIBN, 240mg), διατηρώντας τη θερμοκρασία στους 80°C. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αύξηση της θερμοκρασίας στους 90-100°C και γίνεται έναρξη της απόσταξης του διαλύτη. Η απομόνωση και ο καθαρισμός του δείγματος πραγματοποιήθηκε με φυγοκέντρηση (8000×5min×3). Ο μορφολογικός χαρακτηρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε μικροσκοπικά με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης και ο δομικός με φασματοσκοπία υπερύθρου (Βλ. Κεφάλαιο χαρακτηρισμού).

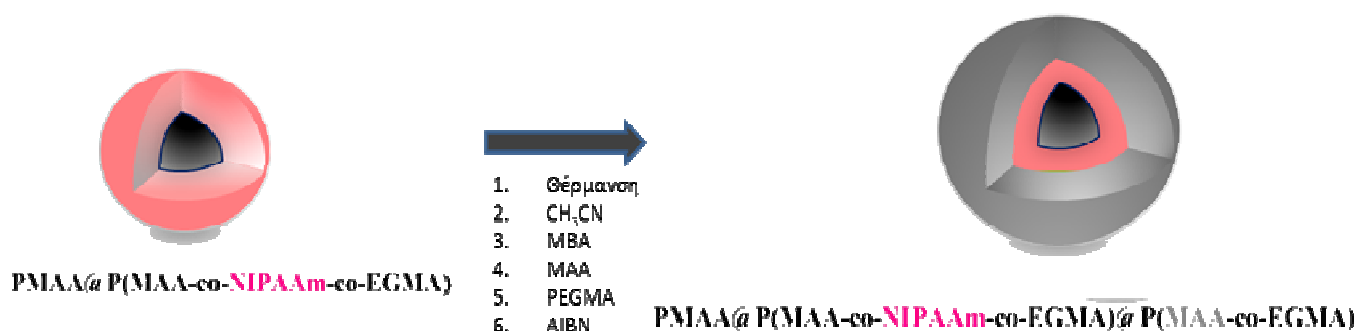
4.2 Σύνθεση του θερμο-ευαίσθητου κελύφους PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)



Εικόνα 4.3: Σύνθεση του PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)

Σε σφαιρική φιάλη του 1L προστίθεται ακετονιτρίλιο (CH₃CN, 400ml, d=0.786g/ml) και διασπείρονται 0.5g των σφαιρών του πολύ-μεθακρυλικού οξέος (PMAA) με χρήση υπερήχων έως ότου το διάλυμα γίνει ομοιογενές. Στη συνέχεια αυξάνεται η θερμοκρασία του διαλύματος στους 70°C υπό ατμόσφαιρα αζώτου και συνεχή ανάδευση. Η διασπορά αφήνεται για μικρό χρονικό διάστημα και στη συνέχεια προστίθενται διαδοχικά τα εξής: N,N'-μεθυλενοδισακρυλαμίδιο (MBA, 314mg), μεθακρυλικό οξύ (MAA, 200μl, d=1.015g/ml), N-ισοπροπυλοακρυλαμίδιο (NIPAAm, 260mg), πολύ-(αιθυλενογλυκόλη) του μεθακρυλικού μεθυλ-αιθέρα (PEGMA, 240μl, d=1.05g/ml) και τέλος 2,2'-αζω-διισοβουτυρονιτρίλιο (AIBN, 20mg), ενώ η θερμοκρασία διατηρείται στους 80°C. Στη συνέχεια αυξάνεται η θερμοκρασία στους 90-100°C όπου ξεκινάει η απόσταξη. Όταν αποστάξουν 40ml ακετονιτρίλιου, CH₃CN η αντίδραση ολοκληρώνεται και το εναιώρημα που προκύπτει φυγοκεντρείται. Το προϊόν απομονώνεται με διαδοχικούς κύκλους επαναδιασποράς και φυγοκέντρωσης(8000×5min×3). Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε μικροσκοπικά με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης και ο δομικός με φασματοσκοπία υπερύθρου (Βλ. Κεφάλαιο χαρακτηρισμού).

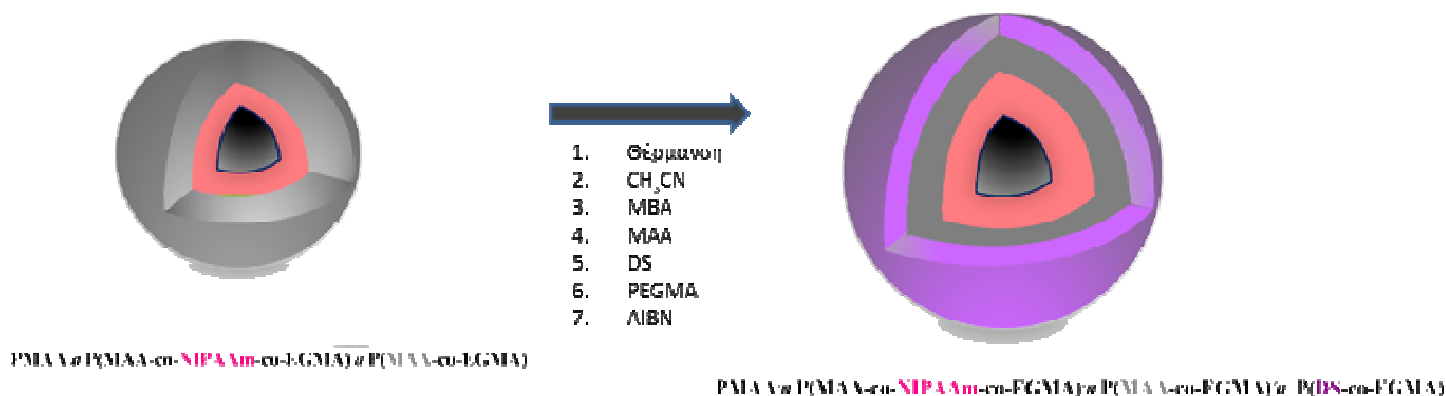
4.3 Σύνθεση του θερμο-pH-ευαίσθητου κελύφους PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)



Εικόνα 4.4: Σύνθεση του PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)

Σε σφαιρική φιάλη των 500 ml προστίθενται ακετονιτρίλιο (CH₃CN, 211 ml, d=0.786g/ml) και οι θερμο-ευαίσθητες σφαίρες (m=283mg) οι οποίες διασπείρονται με τη βοήθεια υπερήχων έως ότου η διασπορά γίνει ομοιογενής. Στη συνέχεια η διασπορά θερμαίνεται στους 70°C υπό ατμόσφαιρα αζώτου και συνεχή ανάδευση. Αφού αφεθούν για μικρό χρονικό διάστημα, προστίθεται διαδοχικά το N,N'-μεθυλενοδισακρυλαμίδιο (MBA, 181mg), το μεθακρυλικό οξύ (MAA, 271μl, d=1.015g/ml), η πολύ-(αιθυλενογλυκόλη) του μεθακρυλικού μεθυλ-αιθέρα (PEGMA, 135μl, d=1.05g/ml) και τέλος το 2,2'-αζω-διισοβουτυρονιτρίλιο (AIBN, 11.8mg) με διατήρηση της θερμοκρασίας στους 80°C. Μετά την αύξηση της θερμοκρασίας στους 90-100°C πραγματοποιείται απόσταξη. Μετά την απόσταξη των 67ml ακετονιτρίλιου, το προϊόν απομονώνεται με διαδοχικούς κύκλους φυγοκέντρησης και επαναδιασποράς (8000×5min×3). Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε μικροσκοπικά με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης και ο δομικός με φασματοσκοπία υπεριώθρου (Βλ. Κεφάλαιο χαρακτηρισμού).

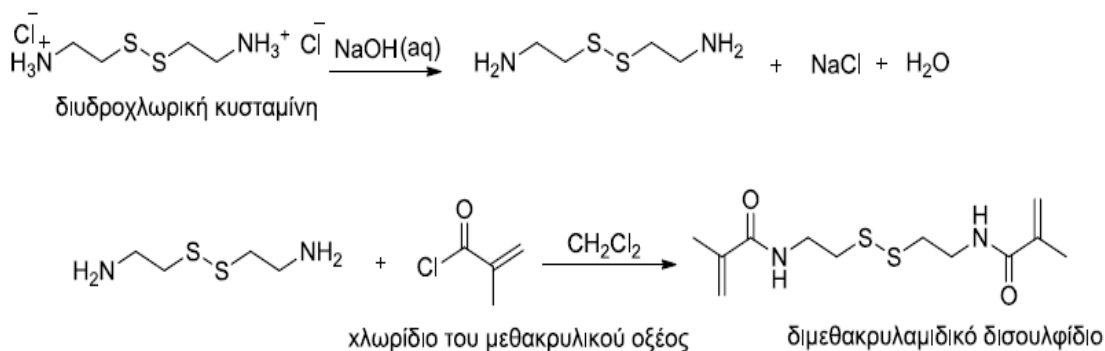
4.4 Σύνθεση του θερμο-pH-οξειδοαναγωγικά-ευαίσθητου κελύφους πολυμερούς PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA)



Εικόνα 4.5: Σύνθεση του PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA)

Σε σφαιρική φιάλη του 1L προστίθεται ακετονιτρίλιο (CH₃CN, 933ml, d=0.786g/ml) και οι θερμο-pH ευαίσθητες νανοσφαίρες (m=311mg) που συνετέθησαν στο προηγούμενο στάδιο, οι οποίες και επαναδιασπείρονται με την βοήθεια υπερήχων. Στη συνέχεια το μίγμα θερμαίνεται έως 70°C υπό ατμόσφαιρα αζώτου και συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια προστίθενται διαδοχικά N,N'-μεθυλενοδισακρυλαμίδιο (MBA, 491mg), μεθακρυλικό οξύ (MAA, 233.2μl, d=1.015g/ml), N,N'-(δι-σουλφονο-διϋλ-δισ(αιθάνιο-2,1-διϋλ)δισ(2-μεθυλ-ακρυλαμίδιο) (DSBMA, 31mg), πολύ-(αιθυλενογλυκόλη) του μεθακρυλικού μεθυλ-αιθέρα (PEGMA, 62.2μl, d=1.05g/ml) και τέλος 2,2'-αζω-διισοβουτυρονιτρίλιο (AIBN, 21.7mg), διατηρώντας τη θερμοκρασία στους 80°C. Μετά την αύξηση της θερμοκρασίας στους 90-100°C ξεκινάει η απόσταξη. Μετά την απόσταξη 120ml ακετονιτριλίου η αντίδραση ολοκληρώνεται και το προϊόν απομονώνεται με διαδοχικούς κύκλους επαναδιασποράς και φυγοκέντρωσης (8000×5min×3). Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε μικροσκοπικά με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης και ο δομικός με φασματοσκοπία υπεριώθρου (Βλ. Κεφάλαιο χαρακτηρισμού).

4.5 Σύνθεση του διμεθακρυλαμιδικού δισουλφιδίου DSBMA

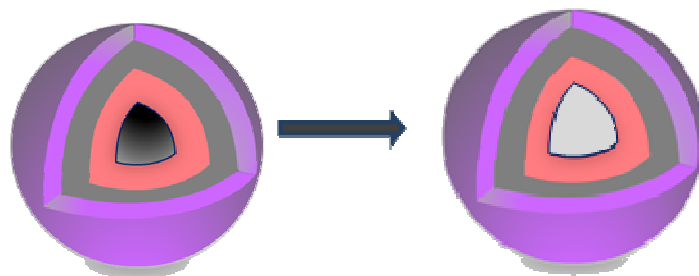


Εικόνα 4.6: Πορεία σύνθεσης του διμεθακρυλαμιδικού δισουλφιδίου DSBMA

Σε σφαιρική φιάλη των 100ml προστίθενται H₂O (25ml), δι-υδροχλωρική κυσταμίνη (Cystamine-2×HCl, 5g, mol=0.022, 1eq) και υδροξείδιο του νατρίου (NaOH, 3.52g, mol=0.088, 4eq) και αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται αργά (~1h) το διάλυμα του χλωριδίου του μεθακρυλικού οξέος (Methacryloyl Chloride, 4.34ml, d=1.08g/cm³, mol=0.044, 2eq), το οποίο αραιώθηκε σε 10ml διχλωρομεθανίου (CH₂Cl₂). Η φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο (0°C) και αφήνεται για 2h υπό ανάδευση διατηρώντας τη θερμοκρασία σταθερή. Στη συνέχεια αφαιρείται το παγόλουτρο και αφήνεται η φιάλη να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου αναδεύοντας για 2h. Εξαιτίας των δύο φάσεων που δημιουργούνται στο διάλυμα γίνεται διαχωρισμός με διαχωριστική χοάνη και πραγματοποιείται καθαρισμός της οργανικής φάσης με εκπλύσεις χρησιμοποιώντας διχλωρομεθάνιο και στη συνέχεια ξήρανση με θειικό μαγνήσιο (MgSO₄). Το περιεχόμενο διηθείται και συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα εξανίου/οξικού αιθυλεστέρα (3:1) και αφήνεται για ανακρουσάλωση στους 0°C για 24h. Επιπρόσθετα πραγματοποιείται διήθηση και γίνεται ποιοτικός έλεγχος του προϊόντος με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC σε σύστημα οξικού αιθυλεστέρα/εξανίου σε αναλογία 80:20. Ο τελικός καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με στήλη χρωματογραφίας με καταλληλότερο σύστημα οξικού αιθυλεστέρα/εξανίου 80:20. Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν από τη χρωματογραφία συμπυκνώθηκαν και ξηράθηκαν σε υψηλό κενό. Περαιτέρω χαρακτηρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπικά (Βλ. Κεφάλαιο χαρακτηρισμού).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.67 (s, 2H), 5.8 (d, 2H), 5.40 (d, 1H), 3.70 (q, 4H), 2.90 (t, 4H), 1.95 (s, 6H); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 168.90, 139.30, 119.10, 39.64, 37.00, 19.88. (Βλ. Παράρτημα I)

4.6 Εκδίωξη του πυρήνα: Απομόνωση κενών νανοσφαιρών P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA (Εκδίωξη του πυρήνα)



Εικόνα 4.7: Εκδίωξη του πυρήνα

Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται 0.128 g σφαιρών που παρασκευάστηκαν στο προηγούμενο βήμα, pH-θερμο-οξειδοαναγωγικά ευαίσθητες, σε αναλογία 1:1 με το διάλυμα H₂O:EtOH (500ml). Το διάλυμα αφέθηκε για 48h υπό ανάδευση και μετά φυγοκεντρήθηκε (8000×5min×3 φορές) για να απομονωθεί το τελικό προϊόν. Περαιτέρω χαρακτηρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε μικροσκοπικά και ο δομικός με φασματοσκοπία υπέρυθρου (Βλ. Κεφάλαιο χαρακτηρισμού).

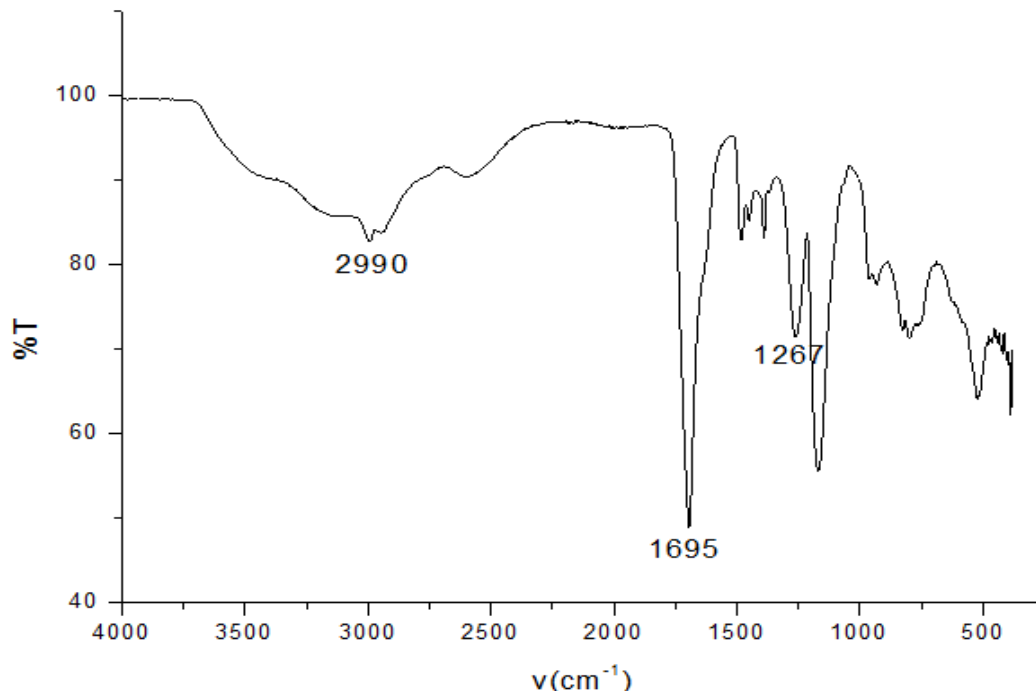
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

Ο δομικός καθώς και ο μορφολογικός χαρακτηρισμός κάθε βήματος της συνθετικής πορείας, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φασματοσκοπίας υπερέυθρου (FT-IR), ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM), διέλευσης (TEM), και δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS). Οι πειραματικές τεχνικές που αναλύθηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο.

5.1 Χαρακτηρισμός των νανοσφαιρών πολύ-μεθακρυλικού οξέος, PMAA

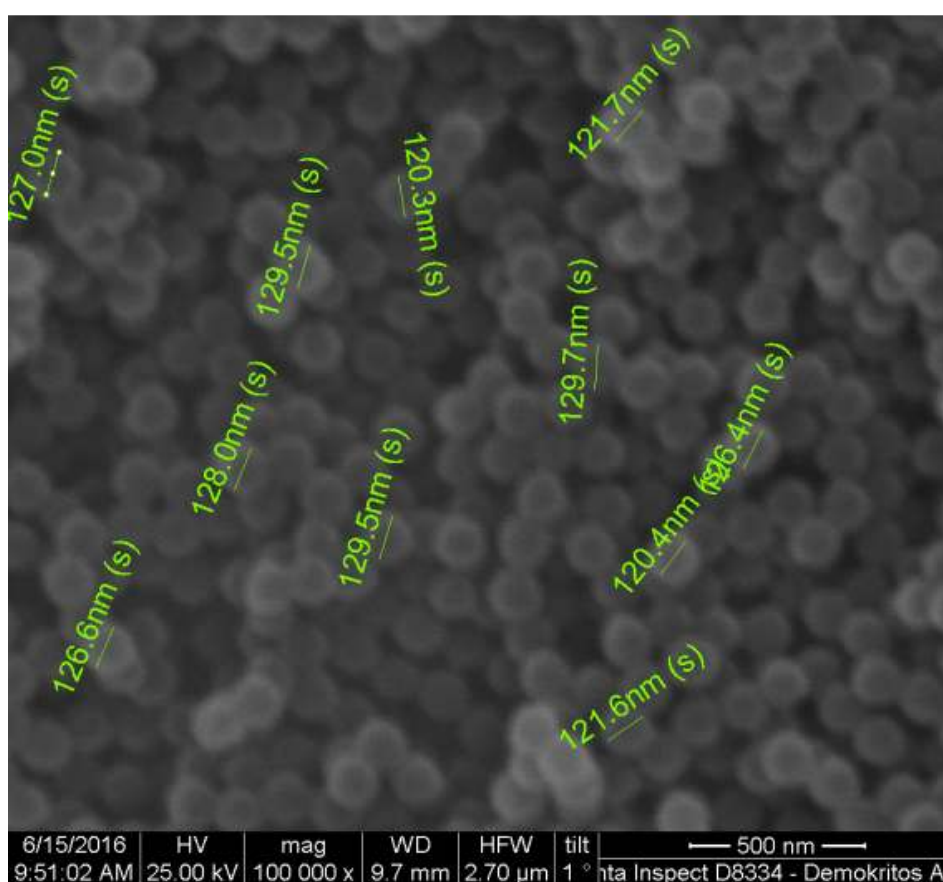
Από το φάσμα FT-IR των νανοσφαιρών παρατηρούμε χαρακτηριστικές κορυφές της δομής τους.



Εικόνα 5.1: FT-IR των νανοσφαιρών πολύ-μεθακρυλικού οξέος, PMAA

Λεπτομερώς, το φάσμα υπερύθρου του πολυ-μεθακρυλικού οξέος παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.1. Η κορυφή στα 1695 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις του διπλού δεσμού καρβοξυλίου του μεθακρυλικού οξέος. Επίσης η δόνηση του δεσμού του οξυγόνου με το υδρογόνο του μοριακού νερού εμφανίζεται στα 2990 cm^{-1} και στα 2980 cm^{-1} εμφανίζεται η κορυφή των μεθυλένο ομάδων ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$). Η κορυφή στα 1267 cm^{-1} οφείλεται στις μέθυλο ομάδες ($-\text{CH}_3$) του πολυμερούς.

Ο μορφολογικός χαρακτηρισμός των συντιθέμενων σφαιρών πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης. Η εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζει την μορφολογία των σφαιρών μετά την ανάπτυξη του θερμοευαίσθητου κελύφους.

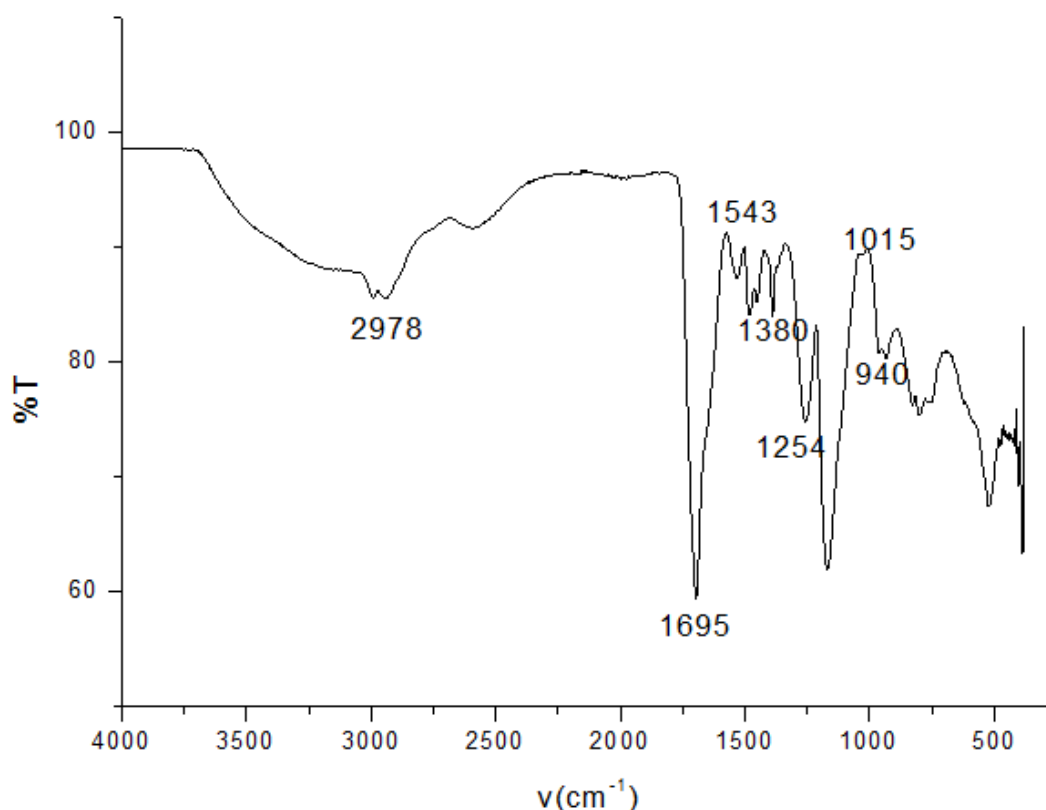


Εικόνα 5.2: Απεικόνιση των νανοσφαιρών του πολυ-μεθακρυλικού οξέος, PMAA

Ο μορφολογικός χαρακτηρισμός των σφαιρών πολυ-μεθακρυλικού οξέος πραγματοποιήθηκε με μικροσκοπία και από την Εικόνα 5.2, παρατηρούμε ότι η διάμετρος των σφαιρών είναι $120\pm 10\text{ nm}$.

5.2 Χαρακτηρισμός του θέρμο-ευαίσθητου πολυμερούς PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)

Κατά την ανάπτυξη του θέρμο ευαίσθητου κελύφους πραγματοποιήθηκε δομικός και μορφολογικός χαρακτηρισμός.

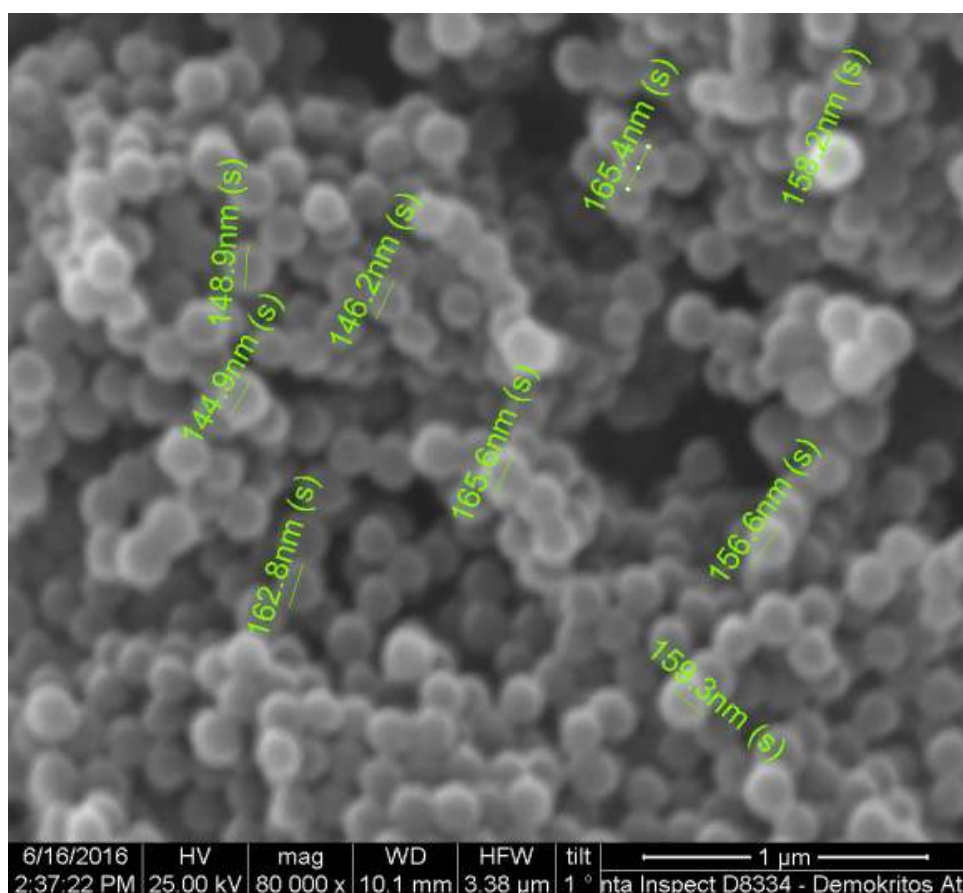


Εικόνα 5.3: FT-IR του PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)

Η Εικόνα 5.3 παρουσιάζει το φάσμα FT-IR του θέρμο ευαίσθητου συμπολυμερούς. Η κορυφή που παρατηρείται στα 1695 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση του δεσμού C=O του αμιδικού δεσμού, η οποία επικαλύπτεται από αυτή του καρβοξυλίου του μεθακρυλικού οξέος. Ενώ στα 1543 cm^{-1} εμφανίζεται κορυφή που οφείλεται στον αμιδικό δεσμό C-N του σταυροδέτη (MBA). Η κορυφή στα 1100 cm^{-1} αποδίδεται στην ύπαρξη δόνησης δεσμού άνθρακα-οξυγόνου του αιθερικού δεσμού του πολυ-(αιθυλενογλυκόλη) του μεθακρυλικού μεθυλαιθέρα (PEGMA). Οι κορυφές που περιγράφηκαν μπορούν να επιβεβαιώσουν την συμμετοχή του N-ισοπροπυλοακρυλαμίδιου στο πολυμερές.

Ο μορφολογικός χαρακτηρισμός των συντιθέμενων σφαιρών πραγματοποιήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης. Η εικόνα που

ακολουθεί παρουσιάζει την μορφολογία των σφαιρών μετά την ανάπτυξη του θερμοευαίσθητου κελύφους.

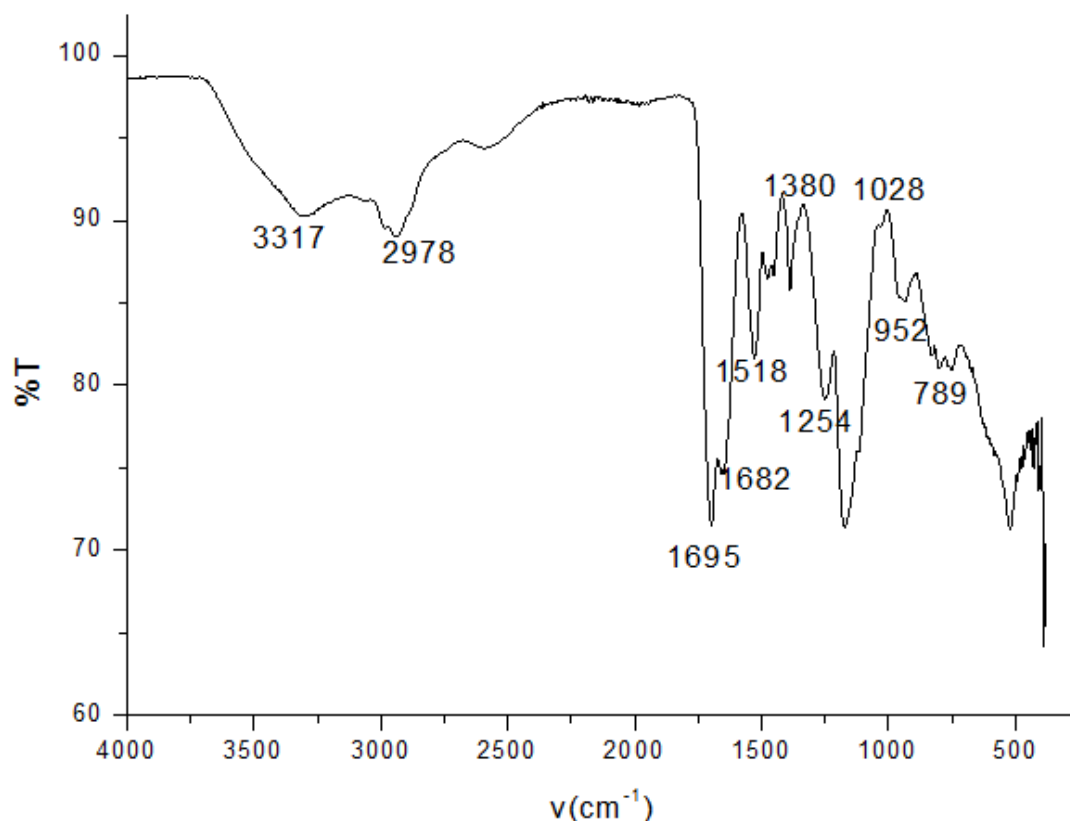


Εικόνα 5.4: Μορφολογικός χαρακτηρισμός του θερμο-ευαίσθητου συμπολυμερούς PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)

Παρατηρούμε ότι το σχήμα των σφαιρών είναι σφαιρικό και η διάμετρος τους 150 ± 15 nm. Η θερμο ευαισθησία του νανοσφαιριδίου αποδίδεται στην συμμετοχή του Ν-ισοπροπυλ-ακρυλαμίδιο (NIPAAm) μιας και πραγματοποιείται αλλαγή στη διαμόρφωση του μορίου στους 32°C . Σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από τη θερμοκρασία αυτή το πολυμερές έχει την ικανότητα να συρρικνώνεται. Τα αποτελέσματα της εξάρτησης της υδροδυναμικής διαμέτρου επιβεβαιώνονται μέσω της τεχνικής της σκέδασης του φωτός (DLS).

5.3 Χαρακτηρισμός του pH- Θερμο-ευαίσθητου συμπολυμερούς PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)

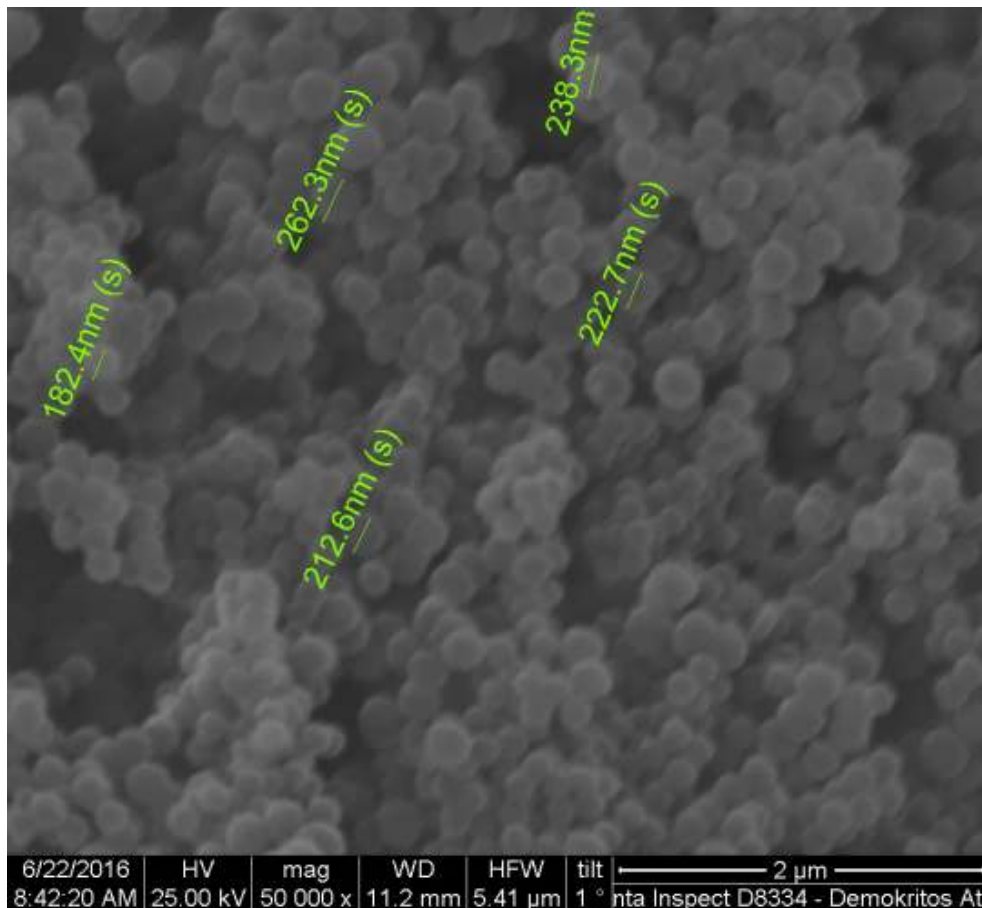
Κατά την ανάπτυξη του θέρμο-pH ευαίσθητου κελύφους πραγματοποιήθηκε δομικός και μορφολογικός χαρακτηρισμός.



Εικόνα 5.5: FT-IR φάσμα του PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)

Από τις κορυφές του φάσματος της Εικόνας 5.5 παρατηρείται σχετική ομοιότητα με τα προηγούμενα φάσματα με διαφορά στην αύξηση της έντασης της κορυφής του πολύ(μεθακρυλικού οξέος), διότι προστέθηκε κι άλλη ποσότητα αυτού. Διαχωρίζεται έτσι η κορυφή στα 1695cm^{-1} και στα 1682cm^{-1} .

Ο προσδιορισμός των μορφολογικών χαρακτηριστικών όπως της διαμέτρου καθώς και των επιφανειακών χαρακτηριστικών πραγματοποιήθηκε με μικροσκοπία σάρωσης.

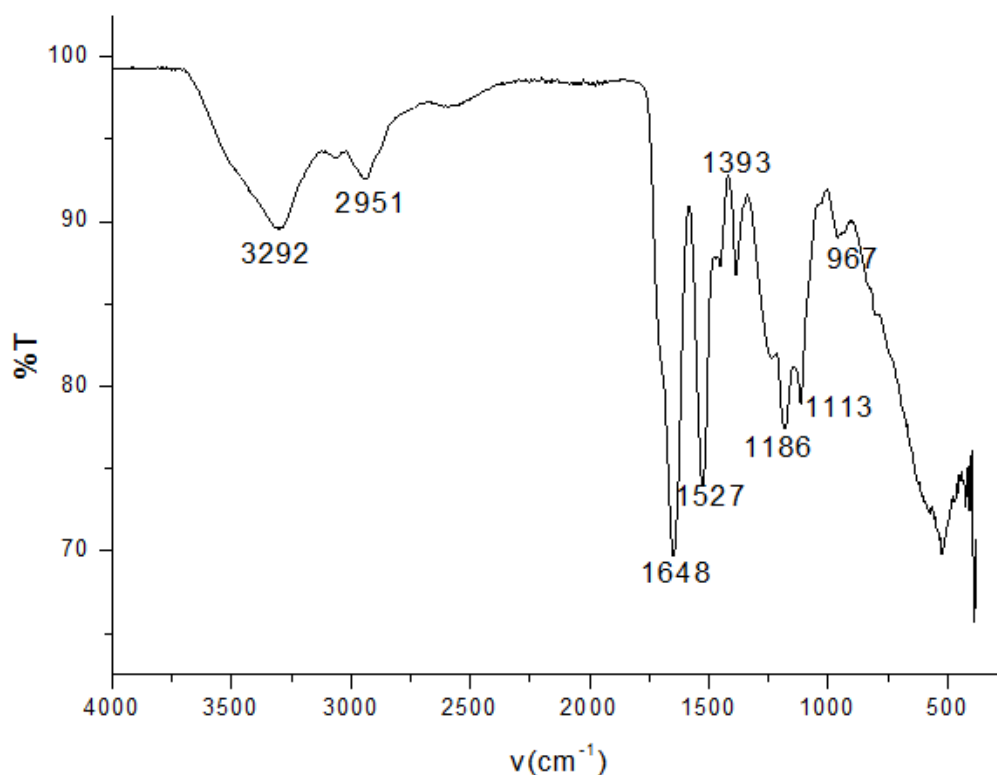


Εικόνα 5.6: pH θερμο-ευαίσθητου συμπολυμερούς PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)

Παρατηρούμε ότι το σχήμα των σφαιρών είναι σφαιρικό και η διάμετρος τους 180 ± 15 nm. Υπάρχει και μία περιοχή σφαιρών με τα ίδια χαρακτηριστικά αλλά με διάμετρο 240 ± 10 nm.

5.4 Χαρακτηρισμός του pH-οξειδοαναγωγικού-θερμο ευαίσθητου πολυμερούς PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA)

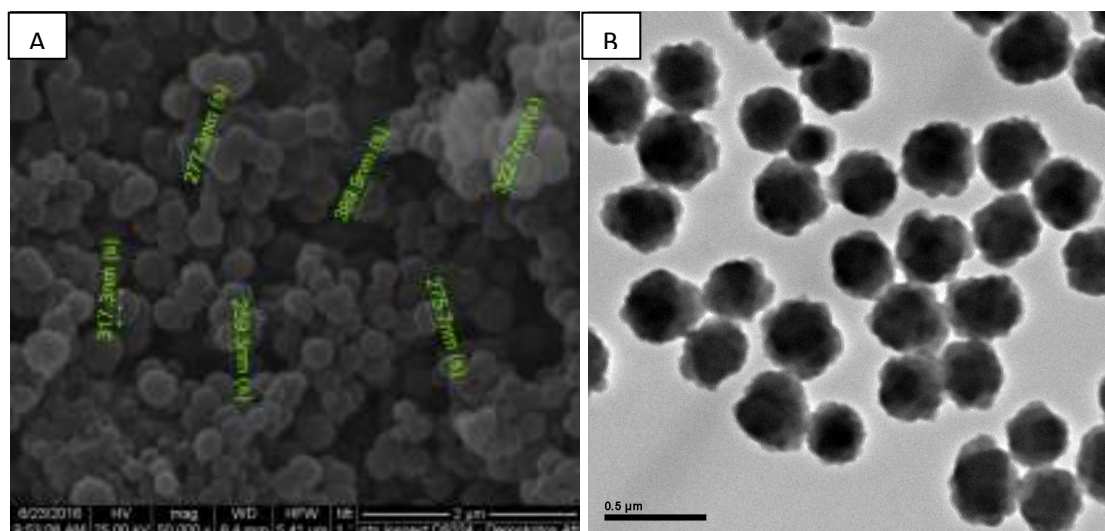
Από τη μελέτη του φάσματος FT-IR δίδονται δομικές πληροφορίες για τις θέρμο, pH και οξειδοαναγωγικά ευαίσθητες νανοσφαίρες.



Εικόνα 5.7: FT-IR του PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA)

Οι κορυφές που οφείλονται στην ύπαρξη του δισουλφιδίου (DSBMA) εμφανίζονται σε χαμηλούς κυματάριθμους και συμπίπτουν με ήδη υπάρχουσες.

Ο προσδιορισμός του σχήματος, της διαμέτρου καθώς και των επιφανειακών χαρακτηριστικών πραγματοποιήθηκε με μικροσκοπία σάρωσης και διέλευσης.



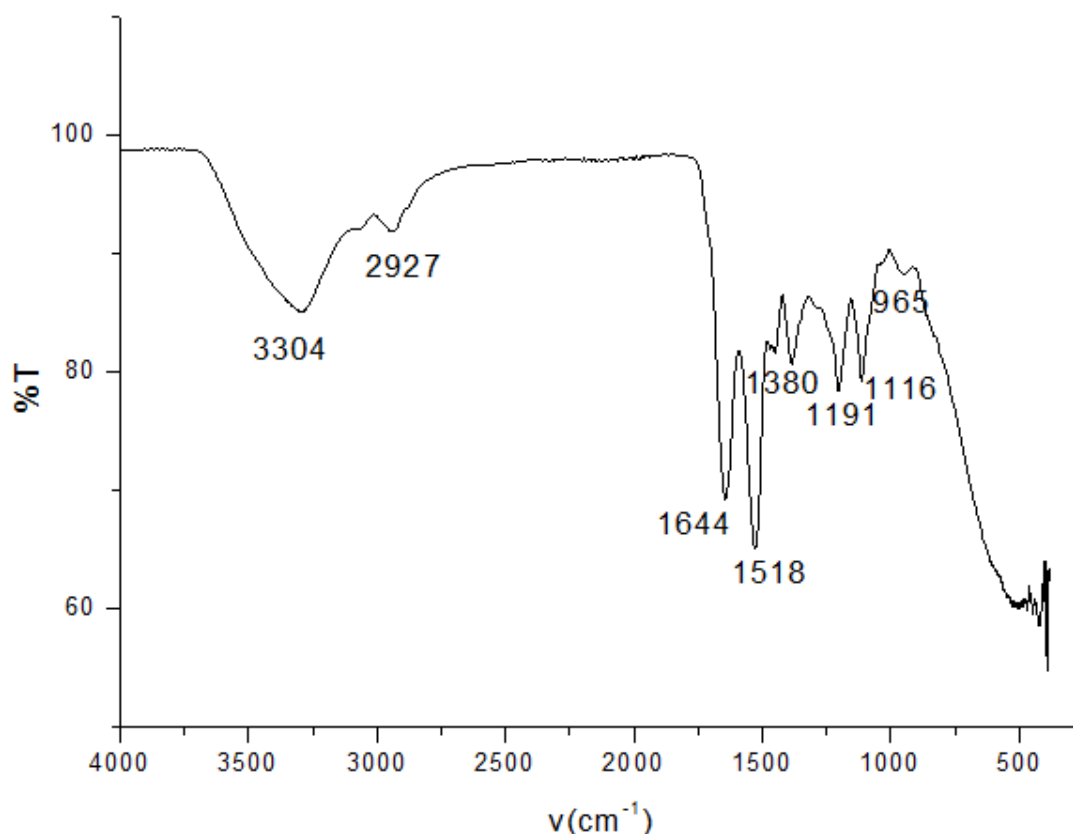
Εικόνα 5.8: Μορφολογικός χαρακτηρισμός του οξειδοαναγωγικά-pH-θερμο-ευαίσθητο συμπολυμερές PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA) A. SEM, B. TEM

Από την μικροσκοπία σάρωσης (Εικόνα 5.8 A) παρατηρούμε ότι το μέγεθος των σφαιρών είναι $320 \pm 50 \text{ nm}$. Το δείγμα παρουσιάζει πολυδιασπορά.

Από τη μικροσκοπία διέλευσης (Εικόνα 5.8 B) δίνεται η απεικόνιση των νανοσφαιριδίων με δομή πυρήνα-φλοιού PMAA@P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA) πριν την αφαίρεση του πυρήνα. Στο κέντρο με μαύρο χρώμα απεικονίζεται ο πυρήνας από μεθακρυλικό οξύ (MAA), ενώ με γκρι απεικονίζονται οι φλοιοί του συμπολυμερούς.

5.5 Κενές P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA) (Εκδίωξη του πυρήνα)

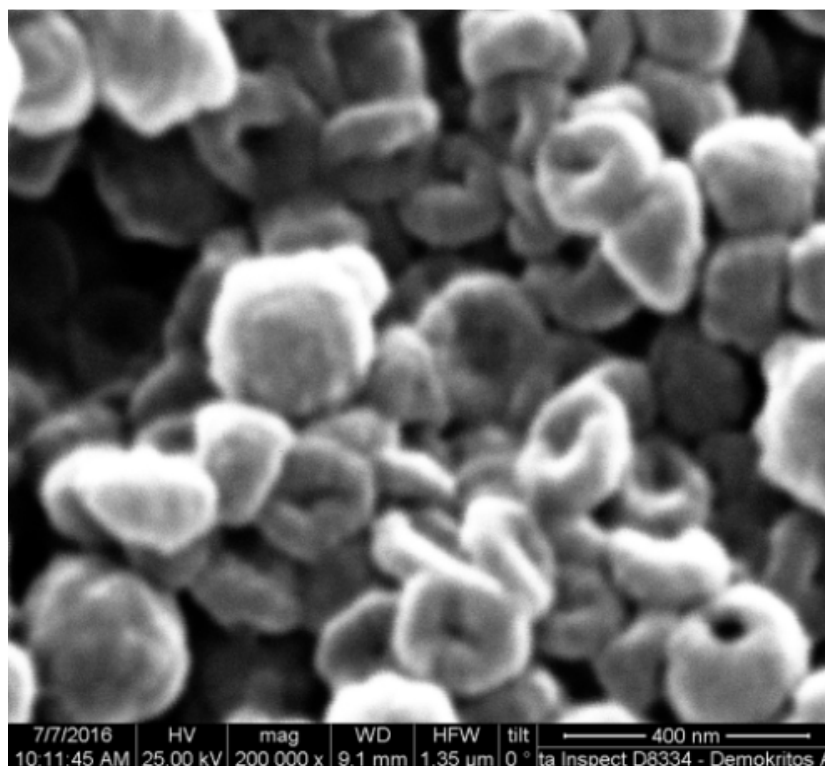
Η εκδίωξη του πυρήνα των νανοσφαιρών πιστοποιήθηκε αφενός με την φασματοσκοπία FT-IR, όπως επίσης και με την ηλεκτρονική φασματοσκοπία.



Εικόνα 5.9: FT-IR φάσμα του P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA)

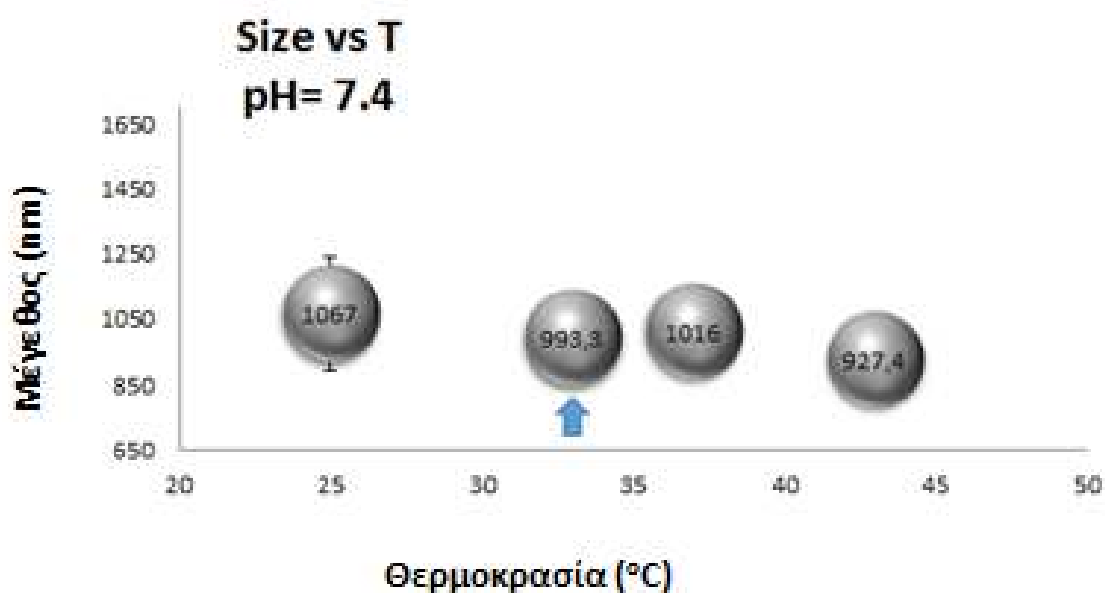
Εξαιτίας του γεγονότος ότι ο πυρήνας των σφαιρών αποτελείται από πολυμεθακρυλικό οξύ, η περιοχή του φάσματος που αναμένεται να παρουσιάσει αλλαγές μετά την εκδίωξη του πυρήνα είναι αυτή που αποδίδεται στην απουσία του οξέος, δηλαδή στην περιοχή 1700-1320 cm⁻¹. Όπως φαίνεται από το φάσμα FT-IR στην περιοχή αυτή οι κορυφές εμφανίζονται άλλα μικρότερης έντασης.

Η περαιτέρω επιβεβαίωση της απομάκρυνσης του πυρήνα πραγματοποιήθηκε με την μικροσκοπία SEM, όπου είναι φανερή η ύπαρξη της κοιλότητας.



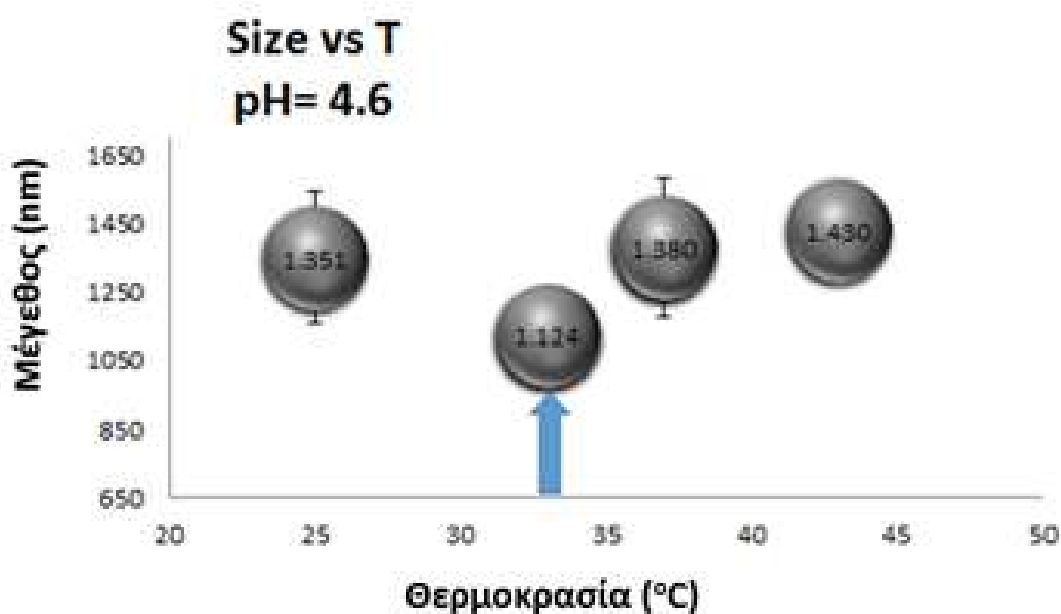
Εικόνα 5.10: Εικόνα SEM κενών νανοδοχείων P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA)

Στο τελικό προϊόν πραγματοποιήθηκαν επίσης μελέτες με την τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός με σκοπό να μελετηθεί η σχέση εξάρτησης θερμοκρασίας και η μεταβολή του μεγέθους σε διάφορα pH ώστε να επιβεβαιωθεί η συμπεριφορά τους. Η μελέτη της συμπεριφοράς πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και pH, καθώς και σε συνδυασμό αυτών. Από τη μελέτη της θερμοκρασιακής εξάρτησης σε pH=7.4 παρατηρείται μείωση μεγέθους στην κρίσιμη θερμοκρασία (32°C). Όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 5.11), η υδροδυναμική διάμετρος των σωματιδίων μειώνεται καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, γεγονός το οποίο μπορεί να αποδοθεί αφενός στο PNIPAAm αφετέρου στην μείωση των συσσωματωμάτων λόγω βελτίωσης της διασποράς με την αύξηση της θερμοκρασίας.



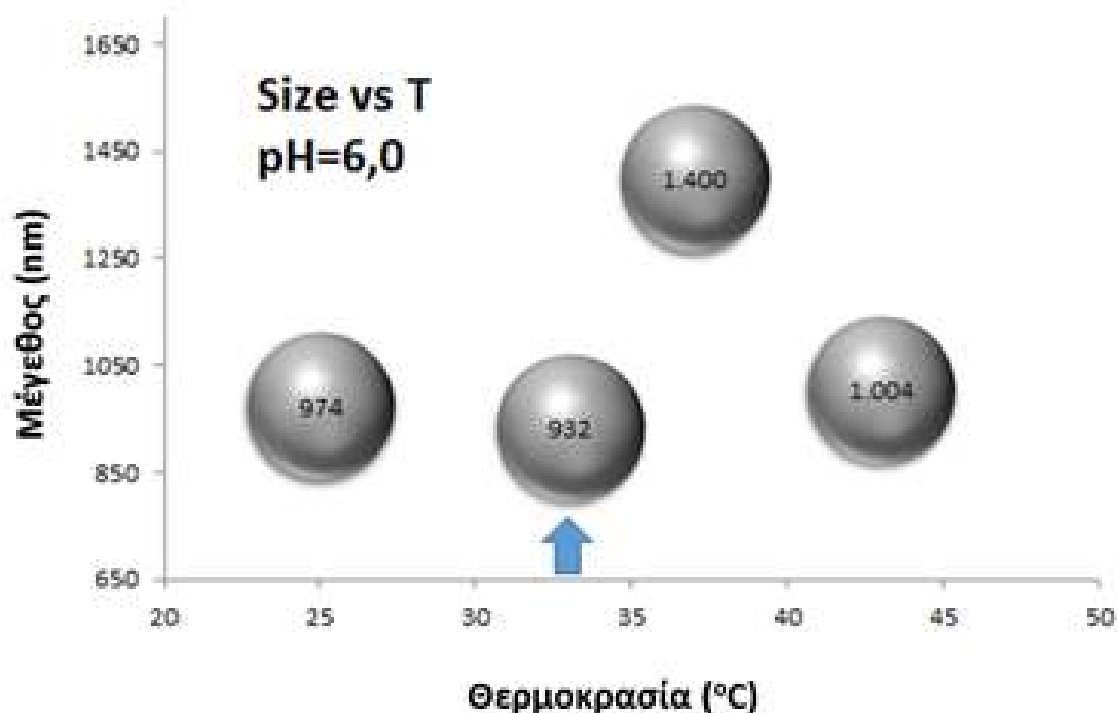
Εικόνα 5.11: Θερμοκρασιακή εξάρτηση των κενών νανοσφαιρών, P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA), με δυναμική σκέδαση φωτός σε pH=7.4

Η θερμοκρασιακή εξάρτηση μελετήθηκε σε pH=4.6, όξινο περιβάλλον, όπου παρατηρήθηκε μείωση του μεγέθους γύρω από την κρίσιμη θερμοκρασία (32°C) και περαιτέρω σταθεροποίηση όσο αυτή αυξάνεται (Εικόνα 5.12).



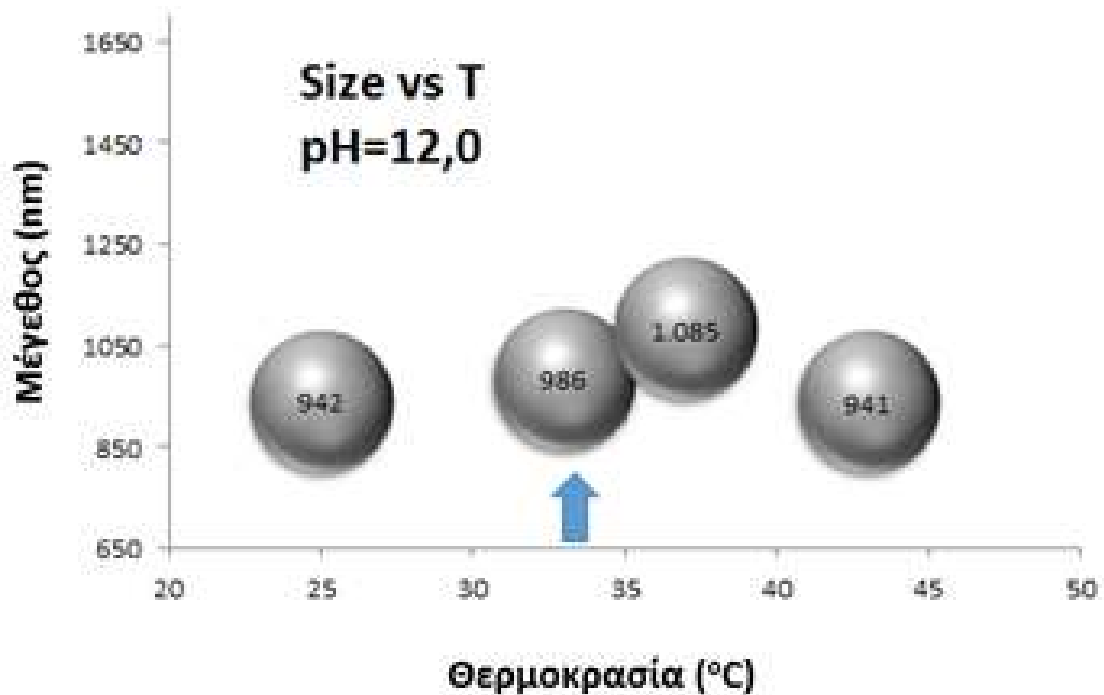
Εικόνα 5.12: Θερμοκρασιακή εξάρτηση των κενών νανοσφαιρών, P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA), με δυναμική σκέδαση φωτός σε pH=4.6

Στη συνέχεια έγινε μελέτη της συμπεριφοράς των νανοσφαιρών σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον, pH=6.0. Παρατηρήθηκε όμοια συμπεριφορά, μείωση μεγέθους στην κρίσιμη θερμοκρασία (32°C), και στη συνέχεια σταθεροποίηση του μεγέθους με την αύξηση της θερμοκρασίας.

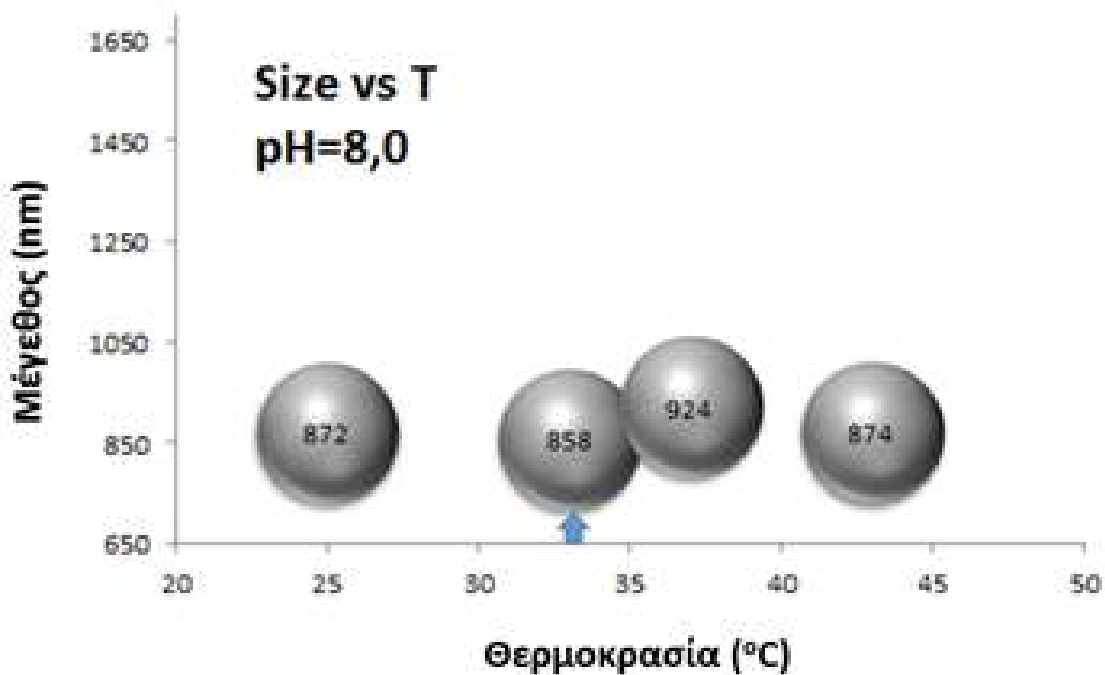


Εικόνα 5.13: Θερμοκρασιακή εξάρτηση των κενών νανοσφαιρών, P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA), με δυναμική σκέδαση φωτός σε pH=6,0

Η θερμοκρασιακή εξάρτηση μελετήθηκε επίσης σε pH=12 και pH=8. Από την μελέτη παρατηρούμε ότι παρουσιάζει ελαφρώς αύξηση του μεγέθους των νανοσφαιρών μετά τους 32°C, και στη συνέχεια διατηρήθηκε σταθερή η θερμοκρασία.

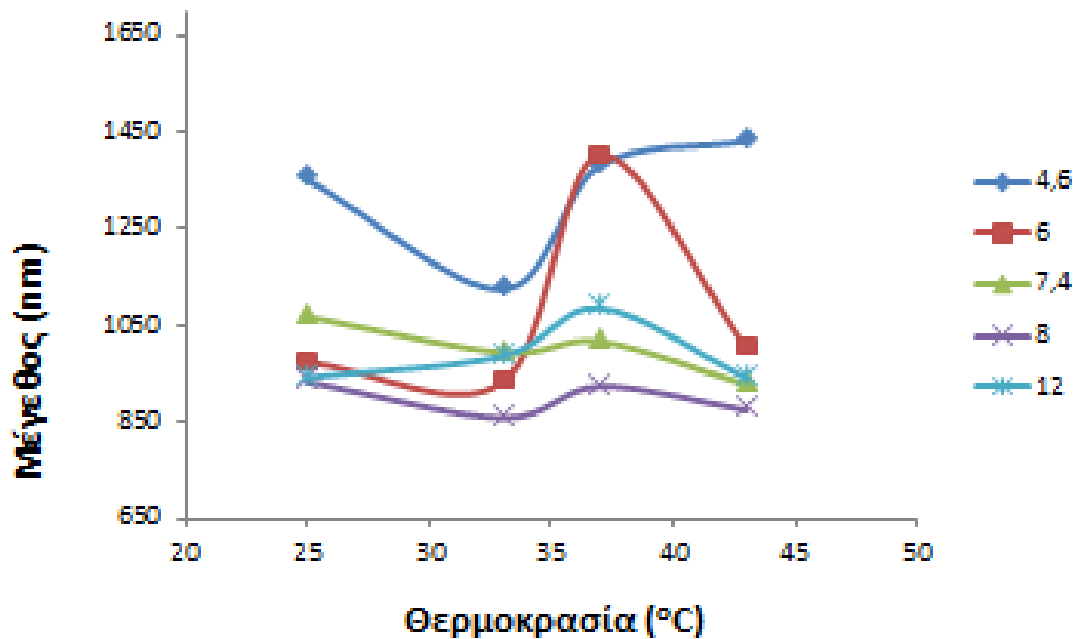


Εικόνα 5.14: Θερμοκρασιακή εξάρτηση των κενών νανοσφαιρών, P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA), με δυναμική σκέδαση φωτός σε pH= 12



Εικόνα 5.15: Θερμοκρασιακή εξάρτηση των κενών νανοσφαιρών, P(MAA-co-NIPAAm-co-EGMA)@P(MAA-co-EGMA)@P(DS-co-EGMA), με δυναμική σκέδαση φωτός σε pH= 8

Τέλος, στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζονται συγκριτικά όλα τα παραπάνω δεδομένα και όπως παρατηρείται η υδροδυναμική διάμετρος αυξάνει μετά τους 32 οC κυρίως σε όξινες συνθήκες [50].



Εικόνα 5.16: Συγκριτικό διάγραμμα της θερμοκρασιακής εξάρτησης της υδροδυναμικής διαμέτρου σε διαφορετικό περιβάλλον οξύτητας (pH).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

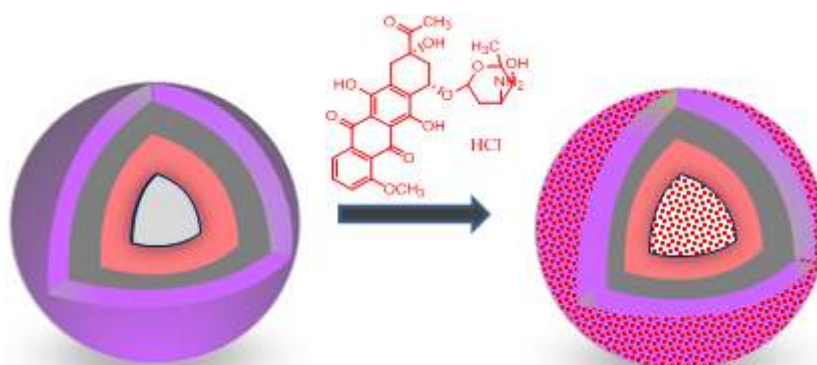
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

6.1 Μελέτη της ικανότητας εγκλωβισμού και απελευθέρωσης φαρμάκου (Loading and Release)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το περιβάλλον των καρκινικών κυττάρων εκφράζει διαφορετικά χαρακτηριστικά και επικρατούν διαφορετικές συνθήκες οξύτητας, θερμοκρασίας και οξειδοαναγωγικού περιβάλλοντος σε σύγκριση με τα υγιή κύτταρα. Βάση αυτού μελετήθηκε η ικανότητα των σφαιρών να απελευθερώνουν το φάρμακο σε διαφορετικές συνθήκες κατεργασίας, προσμοιάζοντας το περιβάλλον των κυττάρων.

Η ικανότητα των νανοσφαιρών να εγκλωβίζουν και να απελευθερώνουν φαρμακευτικές δραστικές ουσίες μετά από την ενεργοποίηση του συστήματος από τους παραπάνω παράγοντες μελετήθηκε χρησιμοποιώντας το φάρμακο δαουνορουβικίνη (DNR) ως πρότυπο φάρμακο. Στην εικόνα που ακολουθεί περιγράφεται διαγραμματικά ο εγκλωβισμός του φαρμάκου.

6.1.1 Εγκλωβισμός του φαρμάκου DNR



Εικόνα 6.1: Εγκλωβισμός του αντικαρκινικού φαρμάκου δαουνορουβικίνη

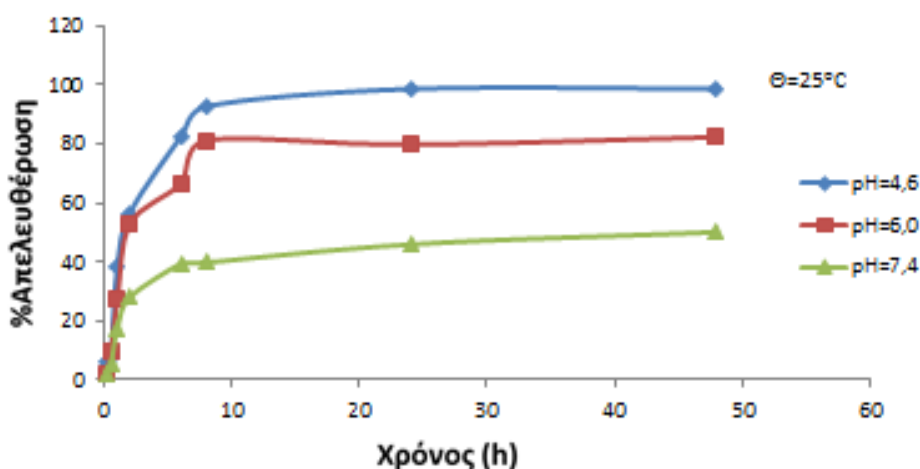
Σε ποτήρι ζέσεως των 10ml προστίθενται 5mg των κενών σφαιρών και διασπείρονται σε 5ml ρυθμιστικού διαλύματος PBS, pH=7.4 με τη βοήθεια υπερήχων. Στη συνέχεια προστίθενται 5mg DNR, πραγματοποιείται ομογενοποίηση και το μίγμα αφήνεται προς ανάδευση για 72 h, στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις

8000×5min και αφέθηκε προς ξήρανση. Ο προσδιορισμός του ποσοστού εγκλωβισμού πραγματοποιήθηκε με τη φασματοσκοπία UV-vis με βάση τη μέθοδο της καμπύλης αναφοράς. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίστηκε η ποσότητα του φαρμάκου που δεν έγινε ενθυλάκωση του στις νανοσφαίρες και αφαιρέθηκε από την αρχική ποσότητα, οπότε από τη διαφορά προσδιορίστηκε το ποσοστό εγκλωβισμού. Το LC% υπολογίστηκε στο 40.2% και το EE% υπολογίστηκε στο 80.4%.

- Ικανότητα εγκλωβισμού (%) (%LC) = $\frac{\text{μάζα εγκλωβισμένου φαρμάκου}}{\text{ολική μάζα νανοσφαιρών}} \times 100 \%$
- Αποδοτικότητα εγκλωβισμού (%) (%EE) = $\frac{\text{μάζα εγκλωβισμένου φαρμάκου}}{\text{ολική μάζα φαρμάκου}} \times 100 \%$

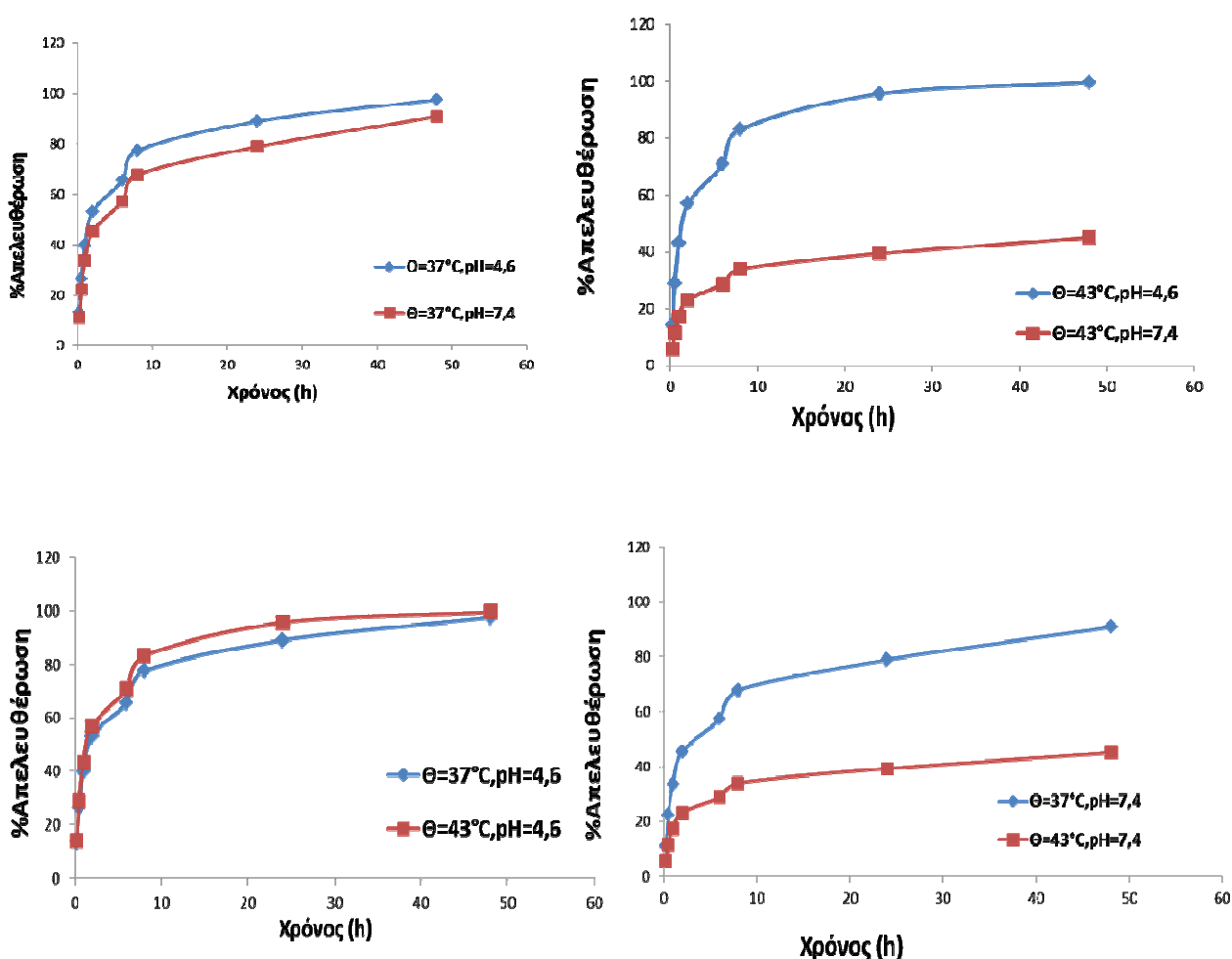
6.1.2 Απελευθέρωση του φαρμάκου DNR

Η αποδέσμευση του φαρμάκου μελετήθηκε σε διαφορετικά pH έτσι ώστε να βρεθεί η βέλτιστη περιοχή δράσης του νανοδοχείου. Μελετήθηκε η απελευθέρωση του φαρμάκου σε pH=7.4, pH=6.0 και τέλος σε pH=4.6. Ο υπολογισμός του ποσοστού απελευθέρωσης του φαρμάκου πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της καμπύλης αναφοράς. Από την εικόνα που ακολουθεί συμπεραίνουμε ότι η απελευθέρωση του φαρμάκου είναι εξαρτώμενη από το pH του διαλύματος. Το ποσοστό του φαρμάκου που απελευθερώνεται είναι μεγαλύτερο σε όξινο περιβάλλον, σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες κατεργασίας. Αυτό συνηγορεί και επιβεβαιώνει την σύνθεση των pH ευαίσθητων νανοσφαιρών μέσω της συμπεριφοράς τους.



Εικόνα 6.2: Διάγραμμα % απελευθέρωσης του φαρμάκου σε συνάρτηση με το χρόνο (ώρες) σε διαφορετικό περιβάλλον pH σε $\Theta=25^{\circ}\text{C}$

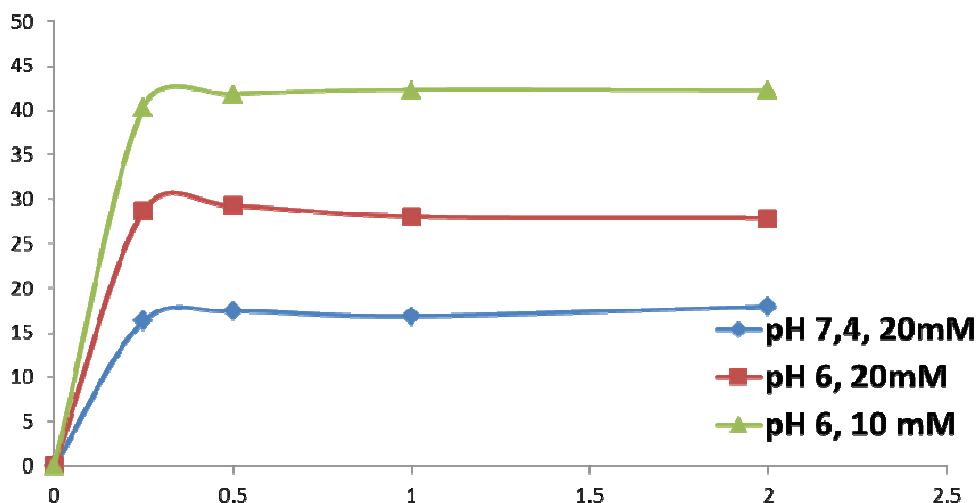
Η αποδέσμευση του φαρμάκου μελετήθηκε σε διαφορετικές θερμοκρασίες έτσι ώστε να προσδιοριστεί η εξάρτηση των νανοδοχείων από την μεταβολή της θερμοκρασίας. Αρχικά μελετήθηκε σε θερμοκρασία 37°C και pH=7.4 καθώς και pH=4.6 και στη συνέχεια σε θερμοκρασία 43°C. Τα ποσοστά απελευθέρωσης προσδιορίστηκαν βάση της μεθόδου της καμπύλης αναφοράς.



Εικόνα 6.3: Διάγραμμα % απελευθέρωσης του φαρμάκου σε συνάρτηση με το χρόνο (ώρες) σε διαφορετικό περιβάλλον pH και θερμοκρασίας

Από την μελέτη των διαγραμμάτων παρατηρείται ότι η απελευθέρωση του φαρμάκου επηρεάζεται από την θερμοκρασιακή αύξηση και το φαινόμενο ενισχύεται με τον συνδυασμό όξινου περιβάλλοντος. Συμπερασματικά ο συνδυασμός όξινου περιβάλλοντος και υψηλής θερμοκρασίας αυξάνει την απελευθέρωση του προϊόντος στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η αποδέσμευση του φαρμάκου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλουταθειόνης, μεταβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο το οξειδοαναγωγικό περιβάλλον έτσι ώστε να βρεθεί η βέλτιστη περιοχή δράσης του νανοδοχείου. Αρχικά σε pH=6.0 με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις γλουταθειόνης και στη συνέχεια σε pH=7.4. Ο υπολογισμός των ποσοστών του φαρμάκου έχει προσδιοριστεί με τη μέθοδο της καμπύλης αναφοράς.



Εικόνα 6.4: Διάγραμμα % απελευθέρωσης του φαρμάκου σε συνάρτηση με το χρόνο (ώρες) σε διαφορετικό οξειδοαναγωγικό περιβάλλον

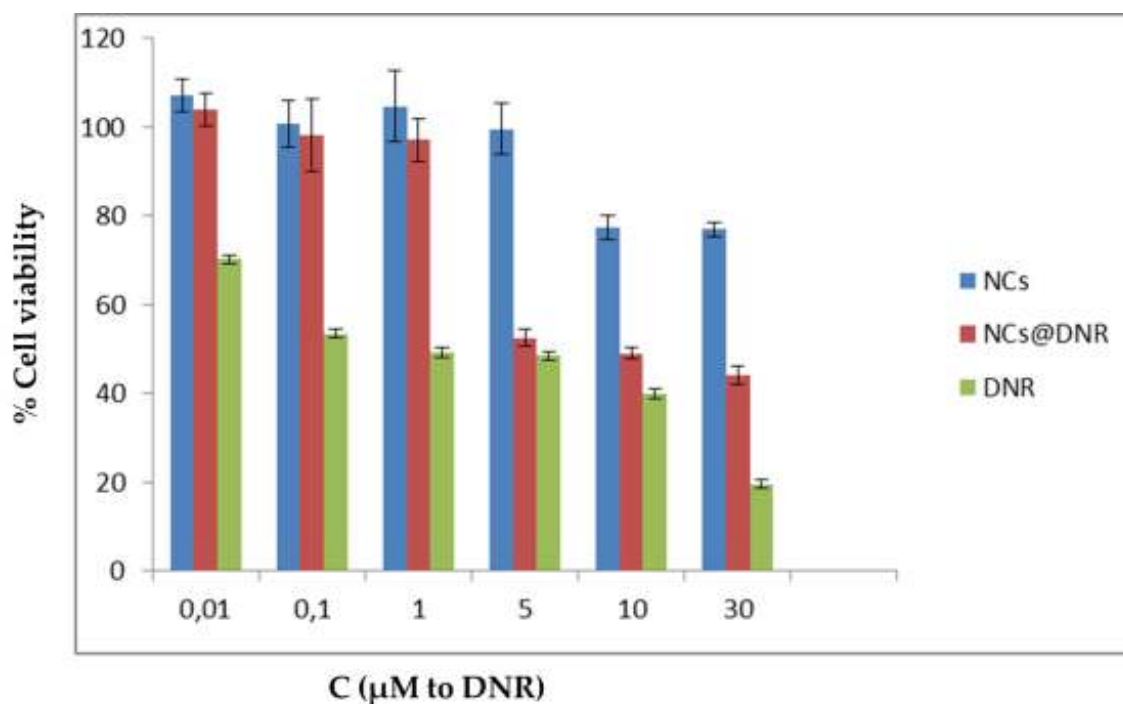
Βάση των αποτελεσμάτων μπορεί να γίνει αντιληπτό ότι η βέλτιστη απελευθέρωση του φαρμάκου πραγματοποιείται σε όξινο pH, στους 43°C παρουσία οξειδοαναγωγικού περιβάλλοντος.

Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων

- I. **pH=4.6:** Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμίχθηκαν οι εξής ουσίες: κιτρικό οξύ: citric acid monohydrate (0.9345g) και διϋδρο-κιτρικό-τρινάτριο: trisodium citrate dehydrate (1.6317g, d=1.76g/ml) σε 100ml H₂O και αφέθηκαν μέχρι πλήρους διαλύσεως(citrate buffer).
- II. **pH=6.0:** Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμίχθηκαν οι εξής ουσίες: κιτρικό οξύ: citric acid monohydrate (0.2415g) και διϋδρο-κιτρικό-τρινάτριο: trisodium citrate dehydrate (2.6019g, d=1.76g/ml) σε 100ml H₂O και αφέθηκαν μέχρι πλήρους διαλύσεως (citrate buffer).
- III. **pH=7.4:** Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμίχθηκαν οι εξής ουσίες: χλωριούχο νάτριο: NaCl (8g), χλωριούχο κάλιο: KCl (0.2g), όξινο φωσφορικό δινάτριο: Na₂HPO₄(1.44g) και δισόξινο φωσφορικό κάλιο: KH₂PO₄(0.24g) σε 1L H₂O και αφέθηκαν μέχρι πλήρους διαλύσεως (PBS buffer).

6.2 Τοξικότητα (toxicity)

Τα νανοσφαιρίδια που συνετέθησαν αξιολογήθηκαν βιολογικά για την τοξικότητά τους. Στη συνέχεια μελετήθηκε η τοξικότητα των νανοδοχείων με εγκλωβισμένο το αντικαρκινικό φάρμακο σε σχέση με το ελεύθερο φάρμακο. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε καρκινικά κύτταρα μαστού (MCF-7) και οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν έχουν εύρος από 0.01 έως 30 μM ως προς το φάρμακο. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο MTT (η διαδικασία περιγράφηκε στο Πειραματικό Μέρος). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα όπου παρατηρούμε εξάρτηση της τοξικότητας των νανοσφαιριδίων που περιέχουν το εγκλωβισμένο φάρμακο με την αύξηση της συγκέντρωσης συγκρίσιμη με αυτή του ελεύθερου φαρμάκου, συμπεραίνοντας ότι το φάρμακο μετά τον εγκλωβισμό του διατηρεί τη δράση του. Η βιωσιμότητα των κυττάρων είναι εξαρτώμενη με τη συγκέντρωση του εξεταζόμενου δείγματος.



Εικόνα 6.5: Συγκεντρωτικό διάγραμμα του % δείκτη βιωσιμότητας σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις MCF7 κυτταρικών σειρών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ολοκληρώνοντας την περιγραφή των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων συνοψίζονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν.

Στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η σύνθεση πολυμερικών νανοσωματιδίων με σφαιρική δομή, που να λειτουργούν σαν φορείς αντικαρκινικών φαρμάκων. Τα νανοσωματίδια αυτά θα πρέπει να μεταφέρουν με ασφάλεια την φαρμακευτική ένωση στην παθολόγο περιοχή και να την απελευθερώνουν αποκλειστικά στην περιοχή του όγκου.

Η εκλεκτικότητα διασφαλίστηκε με τα διαφορετικά κελύφη ευαισθησίας θερμοκρασίας, pH και οξειδοαναγωγικού δυναμικού. Τα μέχρι τώρα πολυευσταστά πολυμερικά νανοσφαιρίδια είχαν ένα κέλυφος που εμφάνιζε όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Όλα τα συστήματα που συντέθηκαν διαθέτουν μικρό μέγεθος (<300nm) ώστε να μπορούν να διαχέονται στους παθολόγους ιστούς του όγκου, λόγω του φαινομένου EPR. Επίσης, οι νανόσφαιρες που συντέθηκαν παρουσιάζουν σταθερότητα.

Στις παραπάνω σφαίρες πραγματοποιήθηκε εγκλωβισμός του αντικαρκινικού φαρμάκου δαουνουβικίνη και μελετήθηκε η απελευθέρωση του φαρμάκου σε διαφορετικές συνθήκες pH και θερμοκρασίας και οξειδοαναγωγικού δυναμικού. Είναι προφανές ότι τα παραπάνω πειράματα δεν μπορούν να προβλέψουν την συμπεριφορά των νανοσωματιδίων *in vivo*, αλλά μπορούμε να εξάγουμε σημαντικά συμπεράσματα για τον μηχανισμό του εγκλωβισμού και της απελευθέρωσης της φαρμακευτικής ένωσης. Η ικανότητα εγκλωβισμού του φαρμάκου (loading) με το επιθυμητό αντικαρκινικό φάρμακο καθώς και αποδέσμευσης τους (release), κρίθηκε εκ των αποτελεσμάτων αντιπροσωπευτική της ευαισθησίας των νανοσφαιριδίων ενώ παράλληλα διατηρήθηκε η υψηλή τοξικότητα του εγκλωβισμένου φαρμάκου σε καρκινικά κύτταρα.

Συντμήσεις- Ακρωνύμια- Αρκτικόλεξα

DLS - Dynamic Light Scattering

DNR - Daunorubicin Hydrochloride

DSBMA - N,N'-(DisulfanediyIbis(ethane-2,1-diyl))Bis(2-Methylacrylamide)

FT-IR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy

PNIPAAM - Poly (N-IsoPropyl AcrylAMide)

SEM - Scanning Electron Microscopy

TEM - Transmission Electron Microscopy

PEGMA - Poly(ethylene glycol) methacrylate

PMMA - Poly methacrylic Acid

MBA - N,N'-methylenebisacrylamide

UV-Vis - Ultraviolet-Visual Spectroscopy

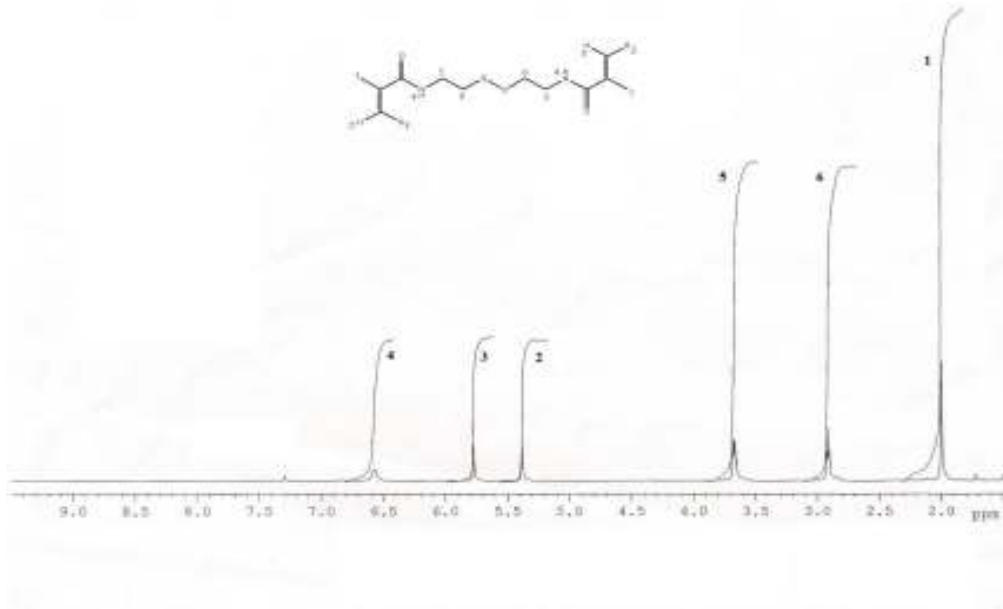
NCs - Nanocontainers

MMA - Methacrylic acid

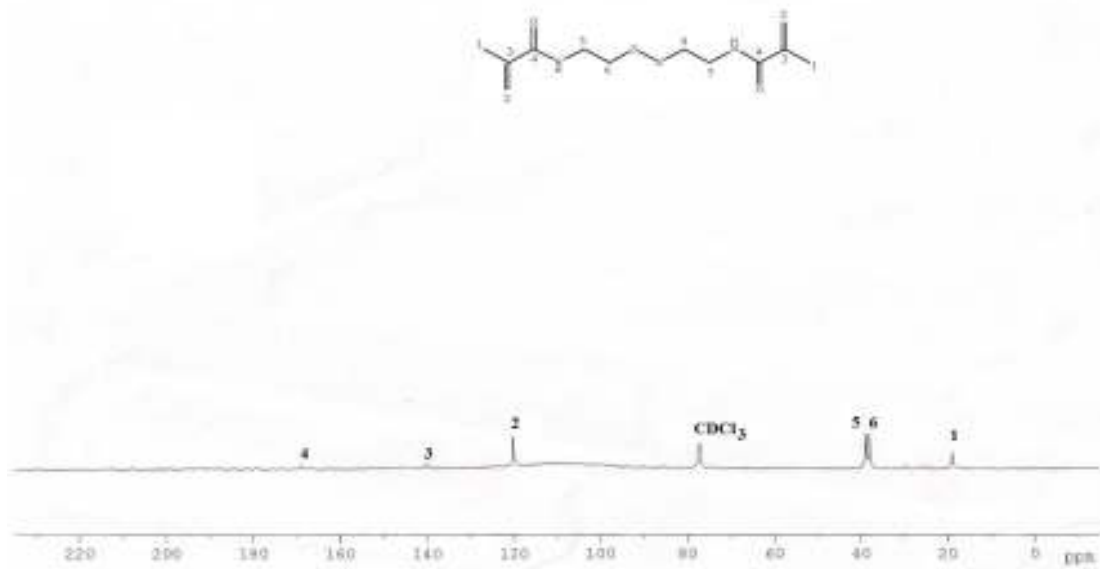
AIBN - 2,2'-azobis-isobutyronitrile

MW – molecular weight

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι



Εικόνα 9.1: Φάσμα ^1H NMR σε CDCl_3 του διμεθακρυλαμιδικού δισουλφιδίου.



Εικόνα 9.2: Φάσμα ^{13}C NMR σε CDCl_3 του διμεθακρυλαμιδικού δισουλφιδίου.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Παναγιώτου Κ., *Επιστήμη και Τεχνολογία Πολυμερών*, Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη 2000
2. Sperling L. H., *Introduction to physical polymer science*, New Jersey 2006
3. Σιμιτζής Χρ. Ιωάννης, *Πολυμερή*, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα 2004
4. Πίσσης Π., Ράπτης Κ., *Κεραμικά – Διηλεκτρικά*, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα 2003
5. Φραγκιαδάκης Δ., *Πειραματική μελέτη της σχέσης δομής – Ιδιοτήτων σε νανοσύνθετα πολυμερικά υλικά*, Διδακτορική Διατριβή, Αθήνα 2006
6. Paul J. Flory, *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University Press 1953
7. Hermann Staudinger, *Macromolecular chemistry*, Nobel Lecture, 1953
8. George Odian, *Principles of Polymerization*, New York 2004
9. Richard E. Powell, *Reaction Kinetics*, University of California 1951
10. R.L. Frank, J.R. Blegen, G.E. Inskeep, P.V. Smith, *Effects of Impurities on Copolymerization of butadiene and styrene*, University of Illinois 1947
11. F.A. Bovey, F.H. Winslow, *Macromolecules: An Introduction to polymer science*, New York 1979
12. F.A. Bovey, I.M. Kolthoff, *The Mechanism of Emulsion Polymerizations. III. Oxygen as a Comonomer in the Emulsion Polymerization of Styrene*, *J. Am. Chem. Soc.* 1947
13. Kefetzopoulos C, Valavanidis A, Yioti I, Hadjichristidis N., *Synthesis of block terpolymers of N-methyl methacrylamide with styrene and isoprene by living radical polymerization*, *Polymer International* 47, 226-230, 1998
14. Yoshida R, Uchida K, Kaneko Y, et al., *Combtype grafted hydrogels with rapid de-swelling response to temperature-changes*, *Nature*. 1995; 374: 240-2.
15. Hoffman AS, Afrassiabi AA, Dong LC., *Thermally reversible hydrogels: II. Delivery and selective release of substances from aqueous solution*, *J Control Release*. 1986;4: 213-22.
16. Bae YH, Okano T, Kim SW., *A new thermosensitive hydrogel: interpenetrating polymer networks from N-acryloylpyrrolidine and poly(oxyethylene)*, *Makromol. Chem Rapid Commun*. 1988;9: 185-9.
17. Kokardekar R, Shah V, Mody H, *PNIPAM Poly (N-isopropylacrylamide): A Thermoresponsive "Smart" Polymer in Novel Drug Delivery Systems*, *Internet Journal of Medical Update*.
18. Oak M, Mandke R, Singh J, *Smart Polymers for Peptide and Protein Parenteral Sustained Delivery*, *Drug Discovery Today: Technologies*, Volume 9, Issue 2, pg. 131-140.
19. Tonge SR, Tighe BJ., *Responsive hydrophobically associating polymers: a review of structure and properties*, *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 53:109–22.

20. Paul Ducheyne, *Metallic, Ceramic and Polymeric Biomaterials*, University of Pennsylvania, vol1, Elsevier 2011
21. Gabriele Sadowski, Walter Richtering, *Intelligent Hydrogels*, Switzerland 2013
22. Torres-Lugo M, Peppas NA., *Physicochemical Foundations and Structural Design of Hydrogels in Medicine and Biology*, Annu. Rev. Biomed. Eng. 2000. 02:9–29
23. Park SY, Bae YH., *Novel pH-sensitive polymers containing sulfonamide groups*,. Macromol Rapid Commun 1999; 20:269–73.
24. Harada & Kataoka, *Supramolecular assemblies of block copolymers in aqueous media as nanocontainers relevant to biological applications*, Progress in Polymer Science 2006, 31, 949–982.
25. Huanli sun, Fenghua Meng, *Reduction-Responsive Polymeric Micelles and Vesicles for Triggered Intracellular Drug Release*, Antioxid Redox Signal. 2014
26. Huanli et al., *Shell-Sheddable Micelles Based on Dextran-SS-Poly(ϵ -caprolactone) Diblock Copolymer for Efficient Intracellular Release of Doxorubicin*, American Chemical Society 2010
27. Gref, Rodrigues, & Couvreur, *Polysaccharides grafted with polyesters: Novel amphiphilic copolymers for biomedical applications*. Macromolecules 2002, 35, 9861–9867.
28. Skoog, Holler, Nilman, Principles of Instrumental Analysis, Harcourt College Publishers, 1998
29. R.Kellner, J.M.Mermet, M.Otto, H.M.Widmer, Analytical Chemistry Wiley-VCH, 1997
30. Scoog, Holler, Nieman, Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης, Εκδόσεις Κωσταράκη 2007
31. Αθ.Βαλαβανίδης, Βασικές αρχές Μοριακής Φασματοσκοπίας και Εφαρμογές στην Οργανική Χημεία, Εκδόσεις Σύγχρονα Θέματα μη Κερδοσκοπική Εκδοτική Εταιρεία, Αθήνα 2008
32. Cowie J. M. G., Polymers: Chemistry & Physics of Modern Materials, 2nd ed., Stanley Thornes Ltd: UK, 1998, Chap. 9, 196-202.
33. Heimenz, P.; Rajagopalan, R., Principles of Colloid and Surface Chemistry; 3rd ed. Rev. & exp., Markel Dekker: New York, 1997, Chap. 5, p. 193-247.
34. Cummins, H. Z.; Pike, E. R., Photon Correlation Spectroscopy and Velocimetry, Plenum Press: New York 1976
35. Pecora, R., Dynamic Light Scattering. Applications of Photon Correlation Spectroscopy; Plenum Press: New York, 1985, Chap. 1-5, p. 1-240.
36. Β. Πεογλός, Τεχνικές Πειραματικής Φυσικής, Κεφ.7ο, Τομέας Φυσικής Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Ε.Μ.Π, Αθήνα 2004

37. Κυπριασσίδης Κ., Εφαρμογές Νανοτεχνολογίας στην Ιατρική, Intesectum ,Τεύχος 04, Μαΐος 2008
38. Jian Qian and Feipeng Wu, Thermosensitive PNIPAM semi-hollow spheres for controlled drug release, J. Mater. Chem. B, 2013, 1, 3464
39. Χατζηρησιτίδης Ν. Σημειώσεις Χημείας Πολυμερών. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 1992
40. Γκοτζαμάνης Γ., Ανάπτυξη Νέων «Ευφυών» κατά συστάδες συμπολυμερών τύπου ομοπολυμερές – Στατιστικό συμπολυμερές, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2007
41. Efthimiadou, E.K., Karaliota A., Psomas, G., Mononuclear dioxomolybdenum(VI) complexes with the quinolones enrofloxacin and sparfloxacin: synthesis, structure, antibacterial activity and interaction with DNA, Polyhedron 2008, 27, 349–356.
42. G. J. Kim, S. Nie, Targeted cancer nanotherapy, Nano today, 2005, 8, 28-33.
43. Γ. Φρουτζήλας, Β. Μπαρμπούνης, Βασικές Αρχές Θεραπείας του Καρκίνου, Θεσσαλονίκη, University Studio press, 2006.
44. J.R. Brown, Adriamycin and Related Anthracycline Antibiotics, Prog. Med. Chem., 1978, 15, 125-164.
45. K. Friedrich, F. Holzel, F. Janicke, Combination of taxanes and anthracyclines in first-line chemotherapy of metastatic breast cancer: an interim report, Eur. J. Cancer, 2002, 38, 1730–1738.

