

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ



**ΡΑΔΙΟΕΠΙΣΗΜΑΝΣΕΙΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΧΡΥΣΟΥ
ΜΕ ^{99m}Tc ΓΙΑ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ SPECT**

Π.Μ.Σ. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΡΑΔΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΠΟΣΤΟΛΟΠΟΥΛΟΥ ΑΔΑΜΑΝΤΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2021

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ****Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή****Αριστείδης Χιωτέλλης**

Ερευνητής Γ΄

ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Ιωάννης Πιρμεττής

Ερευνητής Α΄

ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

Ανδρέας Τσοτίνης

Καθηγητής

Τμήμα Φαρμακευτικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Επιβλέπων**Αριστείδης Χιωτέλλης**

Ερευνητής Γ΄

ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»

*Στην Κοραλία και
τον Κωνσταντίνο...*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ραδιοεπισημασμένα νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs), έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου τις τελευταίες δεκαετίες. Στη παρούσα εργασία, εστιάζουμε στην παρασκευή και *in vitro* αξιολόγηση τεσσάρων συμπλόκων νανοσωματιδίων επισημασμένων με Τεχνητίο-99m με χρήση του προσυμπλόκου ^{99m}Tc-carboxyls, μέσω δύο χηλικών υποκαταστατών που περιέχουν μια ομάδα θειόλης για πρόσδεση στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Πιο συγκεκριμένα, δύο νανοσωματίδια χρυσού με διαφορετικό μέγεθος (2 nm και 20 nm που αναφέρονται ως Au⁽²⁾NPs και Au⁽²⁰⁾NPs αντίστοιχα), τροποποιήθηκαν με δύο χηλικούς υποκαταστάτες (L₁H και L₂H). Τα AuNPs επισημάνθηκαν επιτυχώς με ^{99m}Tc παρουσιάζοντας υψηλή ραδιοχημική καθαρότητα (>95%). Αξιολογήθηκε επιπλέον η *in vitro* τοξικότητα σε ανθρώπινο ορό και σε διαλύματα κυστεΐνης και ιστιδίνης. Επιπρόσθετα, αξιολογήθηκε η κυτταροτοξικότητα των σκέτων, τροποποιημένων AuNPs και των χηλικών υποκαταστατών L₁H και L₂H στην καρκινική κυτταρική σειρά 4T1, καθώς επίσης πραγματοποιήθηκε και δοκιμασία αιμόλυσης προκειμένου να διερευνηθεί η βιοσυμβατότητα των σκέτων και τροποποιημένων AuNPs. Τέλος, εξετάστηκε η λιποφιλικότητα των επισημασμένων συμπλόκων του ^{99m}Tc χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ανακινούμενης φιάλης.

ABSTRACT

Radiolabeled Gold Nanoparticles (AuNPs) have been widely used for cancer diagnosis and therapy over the last decades. In this study we focus on the development and *in vitro* evaluation of four new Au nanoconjugates radiolabeled with Technetium-99m (^{99m}Tc) *via* thiol-bearing ligands attached to the NP surface. More specifically, AuNPs of two different sizes (2 nm and 20 nm, referred to as Au⁽²⁾ and Au⁽²⁰⁾ respectively) were functionalized with two bifunctional thiol ligands (referred to as L₁H and L₂H). *In vitro* cytotoxicity was assessed in 4T1 murine mammary cancer cells. The AuNPs were successfully radiolabeled with ^{99m}Tc -carbonyls at high radiochemical purity (> 95%) and showed excellent *in vitro* stability in competition studies with cysteine and histidine. Moreover, lipophilicity studies were performed in order to determine the lipophilicity of the radiolabeled conjugates, while a hemolysis assay was performed to investigate the biocompatibility of the bare and functionalized AuNPs. We have shown that the functionalized AuNPs developed in this study lead to stable radiolabeled nanoconstructs with the potential to be applied in multimodality imaging or for *in vivo* tracking of drug-carrying AuNPs.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε κατά τη διάρκεια των ετών 2019–2021 στο Εργαστήριο Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιοφαρμάκων του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α.) του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (Ε.Κ.Ε.Φ.Ε.) “Δημόκριτος”, υπό την επίβλεψη της Δρος Πηνελόπης Μπουζιώτη, Ερευνήτρια Α΄ σε συνεργασία με το Τμήμα Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.).

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην επιβλέπουσα μου Δρ. Πηνελόπη Μπουζιώτη για την επιστημονική και πνευματική καθοδήγηση καθώς και για την υποστήριξη και εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή. Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά τους Δρ. Άρη Χιωτέλλη, Δρ. Ιωάννη Πιρμεττή καθώς και Δρ. Ανδρέα Τσοτίνη για τις συμβουλές και τις παρατηρήσεις τους στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού προγράμματος ως μέλη της εξεταστικής επιτροπής.

Επίσης δε θα μπορούσα να παραλείψω την αμέριστη βοήθεια των υπόλοιπων μελών του εργαστηρίου και πιο συγκεκριμένα τις υποψήφιες διδάκτορες Μαρία-Αργυρώ Καραγεώργου, Ευαγγελία-Αλεξάνδρα Σαλβάνου και Κωνσταντίνα Μακρυπίδη, για την υποστήριξη, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες υποδείξεις που μου προσέφεραν τα τελευταία δύο χρόνια.

Τέλος το πιο μεγάλο «ευχαριστώ», θα ήθελα να το εκφράσω στους γονείς μου, Σοφία και Παναγιώτη καθώς και στους πιο κοντινούς μου φίλους για την αγάπη, την υποστήριξη και την υπομονή που δείχνουν μαζί μου στις δυσκολίες όλων αυτών των χρόνων.

Αθήνα, Οκτώβριος 2021

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AuNPs	Gold Nanoparticles	Νανοςωματίδια Χρυσού
SPR	Surface Plasmon Resonance	Συντονισμός Επιφανειακών Πλασμονίων
EPR	Enhanced Permeability and Retention	Ενισχυμένη Διαπερατότητα και Διέλευση
TEM	Transmission Electron Microscope	Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography	Υπολογιστική Τομογραφία Εκπομπής Μονού Φωτονίου
PET	Positron Emission Tomography	Τομογραφία Εκπομπής Ποζιτρονίων
TFA	Trifluoroacetic acid	Τριφθοροξικό οξύ
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
EtOH	Ethanol	Αιθανόλη
PBS	Phosphate Buffer Solution	Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών Αλάτων
CT	Computed Tomography	Αξονική Τομογραφία
MRI	Magnetic Resonance Imaging	Μαγνητική Τομογραφία
RBCs	Red Blood Cells	Ερυθρά Αιμοσφαίρια
RP-HPLC	Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Ανάστροφης Φάσης
LET	Linear Energy Transfer	Γραμμική Μεταφορά Ενέργειας
PSMA	Prostate Specific Membrane Antigen	Ειδικό Μεμβρανικό Αντιγόνο κατά του Προστάτη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

• Εισαγωγή στη Ραδιοφαρμακευτική Χημεία	σελ.10
-Διαγνωστικά Ραδιοφάρμακα	σελ.10
-Θεραπευτικά Ραδιοφάρμακα	σελ.13
• Νανοτεχνολογία	σελ.15
-Κατηγορίες νανοφορέων	σελ.16
• Νανოსωματίδια Χρυσού	σελ.21
-Φυσικοχημικές ιδιότητες	σελ.22
-Εφαρμογή στη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου	σελ.23
-Επισήμανση των νανოსωματιδίων χρυσού	σελ.26
• Το στοιχείο τεχνητίο	σελ.29
-Τεχνητίο ⁹⁹ Tc	σελ.29
-Τεχνητίο ^{99m} Tc	σελ.30
-Χημεία ενώσεων τεχνητίου	σελ.31
-Ανιχνευτικές διατάξεις	σελ.33
• Σκοπός εργασίας	σελ.36

Πειραματικό μέρος

• Χημικά αντιδραστήρια και εργαστηριακός εξοπλισμός	σελ.37
• Σύνθεση των νανოსωματιδίων χρυσού	σελ.39
• Σύνθεση των χηλικών υποκαταστατών L ₁ H και L ₂ H	σελ.39
• Τροποποίηση της επιφάνειας των νανοςωματιδίων χρυσού με τους χηλικούς υποκαταστάτες L ₁ H και L ₂ H	σελ.41
• Μελέτες κυτταροτοξικότητας	σελ.42
• Δοκιμασία αιμόλυσης	σελ.43
• Σχηματισμός του προσυμπλόκου [^{99m} Tc][Tc(H ₂ O) ₃ (CO) ₃] ⁺	σελ.44
• Ραδιοχημικός έλεγχος του προσυμπλόκου [^{99m} Tc][Tc(H ₂ O) ₃ (CO) ₃] ⁺	σελ.44
• Επισήμανση με [^{99m} Tc][Tc(H ₂ O) ₃ (CO) ₃] ⁺	σελ.45
• Μελέτες <i>in vitro</i> σταθερότητας	σελ.45
• Μελέτες λιποφιλικότητας	σελ.46
• Αποτελέσματα- Συζήτηση	σελ.48
• Συμπεράσματα	σελ.62
• Επίλογος	σελ.63
• Βιβλιογραφία	σελ.64

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΡΑΔΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

Η Πυρηνική Ιατρική αποτελεί ένα σύγχρονο κλάδο της Ιατρικής η οποία χρησιμοποιεί ραδιενεργές ενώσεις για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς. Πιο συγκεκριμένα, εκμεταλλεύεται τις μοναδικές ιδιότητες των ραδιενεργών στοιχείων που διαφέρουν σημαντικά σε σύγκριση με τα σταθερά στοιχεία αλλά παρουσιάζουν παρόμοια χημική συμπεριφορά.

Η Ραδιοφαρμακευτική Χημεία αποτελεί ένα κλάδο της Φαρμακευτικής, ο οποίος ασχολείται με τη σύνθεση, χαρακτηρισμό και αξιολόγηση ραδιενεργών φαρμακευτικών ενώσεων, οι οποίες ονομάζονται ραδιοφάρμακα και αποτελούν θεμελιώδες και κρίσιμο κομμάτι της Πυρηνικής Ιατρικής [1–3].

Πιο συγκεκριμένα με τον όρο *ραδιοφάρμακα*, χαρακτηρίζονται ανόργανες ή οργανικές ενώσεις συζευγμένες με ραδιονουκλίδια με κατάλληλες φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες για χρήσιμη και ταυτόχρονα ασφαλή χορήγηση στον άνθρωπο. Ως *ραδιονουκλίδια* ορίζονται ασταθή νουκλίδια (πυρήνες με συγκεκριμένο αριθμό πρωτονίων και νετρονίων), τα οποία διασπώνται με εκπομπή ακτινοβολίας [1].

Τα ραδιοφάρμακα, δεν αναφέρονται όπως τα συμβατικά φάρμακα στην φαρμακολογικώς δραστική ουσία, αλλά στο ποσοστό χορηγούμενης ακτινοβολίας. Η έννοια της «θεραπευτικής δόσης» αν και υπάρχει και στα ραδιοφάρμακα, ωστόσο αφορά το ποσοστό ακτινοβολίας το οποίο δρα θεραπευτικά [4]. Πρόκειται λοιπόν για φάρμακα που αποτελούνται από δύο μέρη: ένα συστατικό φαρμάκου για τον εντοπισμό σε ένα συγκεκριμένο ιστό ή όργανο και ένα ραδιενεργό συστατικό για διάγνωση ή θεραπεία. Το φαρμακευτικό μέρος έχει κατάλληλη φαρμακοκινητική συμπεριφορά. Συσσωρεύεται στο όργανο-στόχο και είναι υπεύθυνο για τη βιολογική συμπεριφορά του ραδιοφαρμάκου στο σώμα. Το ραδιενεργό μέρος, επιτρέπει την ανίχνευση/παρακολούθηση του φαρμάκου στον οργανισμό, μετά τη χορήγηση του. Πρέπει να είναι ένα ραδιονουκλίδιο με κατάλληλες φυσικές ιδιότητες [5].

Διαγνωστικά Ραδιοφάρμακα

Τα διαγνωστικά ραδιοφάρμακα περιέχουν στο μόριο τους ραδιονουκλίδια που εκπέμπουν ακτινοβολία γ ή β^+ . Η δόση ακτινοβολίας που χορηγείται στη διάγνωση πρέπει να είναι όσο το δυνατόν λιγότερη για την ελαχιστοποίηση της ακτινοβόλησης του ασθενούς, αλλά αρκετή ώστε να καθίσταται δυνατή η εξέταση και η απεικόνιση των παθολογικών εστιών, εκπέμποντας σήμα ραδιενέργειας ανιχνεύσιμο από εξωτερικές απεικονιστικές διατάξεις.

Το ραδιονουκλίδιο το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των διαγνωστικών ραδιοφαρμάκων πρέπει να πληροί τα παρακάτω κριτήρια [4,5]:

- Να εκπέμπει μόνο γ ή β^+ ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, χωρίς ταυτόχρονη εκπομπή σωματιδιακής ακτινοβολίας όπως α ή β^- γιατί στα σωματίδια α και β^- έχουν υψηλή LET (γραμμική μεταφορά ενέργειας) με αποτέλεσμα να μπορεί να προκληθεί μεγαλύτερη βλάβη στους ιστούς.
- Να έχει κατάλληλο χρόνο ημιζωής, δηλαδή να μην είναι πολύ μικρός, ώστε να καθίσταται δυνατή η σύνθεση του ραδιοφαρμάκου και η ολοκλήρωση της εξέτασης, αλλά ούτε πολύ μεγάλος έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται η δόση ακτινοβολίας που λαμβάνει ο ασθενής. Ραδιονουκλίδια με χρόνο ημιζωής μεγαλύτερο του έτους είναι ανεπιθύμητα λόγω της μεγάλης δόσης ακτινοβολίας στην οποία εκτίθεται ο ασθενής, ακόμη και αν ο βιολογικός χρόνος ημιζωής τους είναι βραχύς.
- Η ακτινοβολία γ την οποία εκπέμπει θα πρέπει να είναι 100-250 keV. Αυτά τα επίπεδα ενέργειας μπορούν να ανιχνευθούν με σπινθηριστή γάμμα κάμερας. Όταν η ενέργεια είναι <30 keV μπορεί να απορροφηθεί από τον σπινθηριστή ενώ επίπεδα ενέργειας >300 keV μπορεί να μην ανιχνευθούν.
- Η μέθοδος παραγωγής του ραδιονουκλιδίου πρέπει να είναι σχετικά εύκολη και χαμηλού κόστους, ενώ η διάθεση του ραδιονουκλιδίου να είναι εύκολη. Τα ραδιοϊσότοπα στην Πυρηνική Ιατρική λαμβάνονται από γεννήτριες, κυκλοτρόνια και πυρηνικούς αντιδραστήρες. Οι γεννήτριες είναι συσκευές που έχουν σχεδιαστεί για να προστατεύουν τον χειριστή από την ακτινοβολία και για να ελαχιστοποιήσουν τις διεργασίες εξαγωγής του ραδιοϊσοτόπου.
- Ένα ιδανικό ραδιονουκλίδια που χρησιμοποιείται για διαγνωστικούς σκοπούς, θα πρέπει να μπορεί να συνδεθεί με μεγάλη ποικιλία ενώσεων υπό φυσιολογικές συνθήκες.

Για όλους τους ανωτέρω λόγους, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι περιορίζεται σημαντικά ο αριθμός των ραδιονουκλιδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διαγνωστικούς σκοπούς. Στον Πίνακα 1 αναφέρονται τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα διαγνωστικά ραδιονουκλίδια με το ^{99m}Tc να κατέχει τη σημαντικότερη θέση από άποψη διαγνωστικής αξίας, δεδομένου ότι παρουσιάζει σχεδόν ιδανικές πυρηνικές ιδιότητες όπως κατάλληλος χρόνος ημιζωής, εύκολη διαθεσιμότητα από γεννήτριες $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ και εκπομπή χαμηλής ενέργειας γάμμα όπως θα αναφερθούν πιο αναλυτικά παρακάτω [4].

Ακόμη χρησιμοποιείται ευρέως και το ^{68}Ga που εκπέμπει ποζιτρόνια, λόγω της εύκολης διαθεσιμότητας από γεννήτριες $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ καθώς και του μικρού χρόνου ημιζωής (68 min) ο οποίος ταιριάζει με τη φαρμακοκινητική πολλών πεπτιδίων και άλλων μικρών μορίων οδηγώντας σε ταχεία διάχυση, εντοπισμό στο όργανο-στόχο και γρήγορη εκκαθάριση από την κυκλοφορία του αίματος [6].

Ιδιαίτερη σημασία κατέχει επίσης και το ^{18}F το οποίο εκπέμπει ένα ποζιτρόνιο που συγκρούεται με ένα ηλεκτρόνιο μέσω του φαινομένου εξαΰλωσης όπως αναλύεται στην συνέχεια. Λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής (109.8 min) και της εκπομπής ποζιτρονίων, το ^{18}F χρησιμοποιείται ευρέως για απεικονιστικούς σκοπούς με PET (Positron Emission Tomography), με στόχο την έγκαιρη ανίχνευση πολλών ασθενειών καθώς και την εκτίμηση ανταπόκρισης στη θεραπεία [7]. Το ^{18}F εισέρχεται στο σώμα μέσω ενός βιολογικά ενεργού μορίου το οποίο δρα ως φορέας. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο μόριο που χρησιμοποιείται συνήθως για PET είναι το 2-deoxy-2- ^{18}F -fluoro- β -D glucose (^{18}F -FDG) το οποίο χρησιμεύει για έγκαιρη ανίχνευση όγκων και αξιολόγηση ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Πίνακας 1. Φυσικές ιδιότητες ραδιονουκλιδίων που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση

Ραδιονουκλίδιο	$t_{1/2}$	Τρόπος Διάσπασης
^{67}Ga	77.9 h	β^+ , EC
^{123}I	13.3 h	EC
^{125}I	60.2 d	EC
^{131}I	8.1 d	β^-
^{111}In	2.8 d	EC
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6 h	IT
^{201}Tl	74 h	EC
^{68}Ga	68.3 min	β^+ , EC
^{18}F	109.7 min	β^+ , EC
^{11}C	20.3 min	β^+
^{13}N	9.9 min	β^+
^{15}O	123 s	β^+

Θεραπευτικά Ραδιοφάρμακα

Οι ιδιότητες που πρέπει να έχουν τα ραδιονουκλίδια για να είναι χρήσιμα ως θεραπευτικά ραδιοφάρμακα είναι οι εξής:

- Διάσπαση με εκπομπή σωματιδιακής ακτινοβολίας (α , β^- ή Auger ηλεκτρόνια)
- Υψηλή LET ακτινοβολία (μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα)
- Επιθυμητή η εκπομπή, σε μικρή περιεκτικότητα, διεισδυτικής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας γ , παρέχοντας τη δυνατότητα παρακολούθησης του θεραπευτικού αποτελέσματος με απεικόνιση καθώς και πληροφορίες για δοσομετρικούς υπολογισμούς
- Κατάλληλος χρόνος ημιζωής των ραδιονουκλιδίων για την εκλεκτική συγκέντρωση και παραμονή του ισοτόπου στον ιστό, ώστε να αποδοθεί μια ελάχιστη κυτταροτοξική δόση ακτινοβολίας
- Υψηλή ειδική ραδιενέργεια και παραγωγή σταθερού νουκλιδίου
- Χαμηλό κόστος και εύκολη διαθεσιμότητα
- Εύκολη μέθοδος σύζευξης με βιομόρια

Τα ραδιονουκλίδια που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση θεραπευτικών ραδιοφαρμάκων πρέπει να υφίστανται διάσπαση με εκπομπή σωματιδίων α ή β , ή με εκπομπή ηλεκτρονίων Auger (Πίνακα 2). Τα σωματίδια αυτά εμφανίζουν διαφορετική ικανότητα διείσδυσης στους ιστούς και διάφορα επίπεδα γραμμικής μεταφοράς ενέργειας (Linear Energy Transfer, LET) και σχετικής βιολογικής αποτελεσματικότητας [4]. Πιο συγκεκριμένα:

- Τα σωματίδια α έχουν σχετικά μεγάλη μάζα, θετικό ηλεκτρικό φορτίο και μικρή διεισδυτική ικανότητα της τάξης των 40-90 μm , η οποία μπορεί να σταματήσει με ένα φύλλο χαρτιού. Τα σωματίδια α μπορούν να καταστρέφουν κύτταρα λόγω της υψηλής LET που διαθέτουν, γεγονός που επιτρέπει την ακτινοβολήση μόνο των καρκινικών κυττάρων.
- Τα σωματίδια β^- διαθέτουν μεγαλύτερη διεισδυτική ικανότητα από τα σωματίδια α και τα ηλεκτρόνια Auger. Το εύρος της διεισδυτικότητας τους στους ιστούς κυμαίνεται από μερικά mm έως μερικά cm , ανάλογα με την ένταση της ακτινοβολίας. Τα ραδιονουκλίδια που εκπέμπουν σωματίδια β^- είναι αποτελεσματικά στην ακτινοβολήση μικρού έως μεσαίου μεγέθους όγκων.
- Τα ηλεκτρόνια Auger έχουν διεισδυτική ικανότητα της τάξης των 10 nm . Επομένως για να επιτευχθεί θεραπευτικό αποτέλεσμα θα πρέπει η ραδιοφαρμακευτική ένωση να έχει τη δυνατότητα να εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου.

Πίνακας 2. Φυσικές ιδιότητες ραδιονουκλιδίων που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία

Ραδιονουκλίδιο	$t_{1/2}$	Τρόπος Διάσπασης
³² P	14.3 d	β^-
⁴⁷ Sc	3.4 d	β^-
⁶⁷ Cu	61.7 h	β^-
⁹⁰ Y	64.1 h	β^-
⁹⁷ Ru	2.9 d	EC
¹¹¹ In	2.81 d	EC
¹²⁴ I	4.15 d	EC, β^+
¹²⁵ I	60 d	EC
¹³¹ I	8 d	β^-
¹⁵³ Sm	46.7 h	β^-
¹⁸⁶ Re	90.6 h	β^- , EC
¹⁸⁸ Re	17 h	β^-
²¹¹ At	7.2 h	α
²²⁵ Ac	10 d	α

ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

Στην επιστήμη και την τεχνολογία, το πρόθεμα «νάνο» προέρχεται από την ελληνική λέξη «νάνος» και ένα νανόμετρο ισούται με ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου ($10^{-9}=0.000000001$). Η νανοτεχνολογία αναφέρεται στην επιστήμη και στην τεχνολογία όπου οι δομικές μονάδες της ύλης αναπτύσσονται σε νανοκλίμακα για τη δημιουργία σύνθετων μακρομοριακών συστημάτων. Υλικά με διαστάσεις κάτω από 100 nm, χρησιμοποιούνται τα τελευταία 20 χρόνια ως εργαλεία με μοναδικές ιδιότητες, βρίσκοντας εφαρμογή σε πολλές πτυχές της ανθρώπινης ζωής όπως [8]:

- Στην Ιατρική, όπου χρησιμοποιείται για απεικονιστικούς, διαγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς
- Στον τομέα της πληροφορικής, προσφέροντας τη δυνατότητα για αποθήκευση πληροφοριών μέσω της βιομοριακής νανοηλεκτρονικής και κβαντικής τεχνολογίας των ηλεκτρονικών υπολογιστών
- Στον τομέα αποθήκευσης ενέργειας, χρησιμοποιώντας στερεές νανοδομές για την αποθήκευση υδρογόνου ως καύσιμου υλικού
- Στον τομέα της επιστήμης των υλικών, παρέχοντας τη δυνατότητα τροποποίησης επιφανειών με επίστρωση διάφορων νανοϋλικών
- Στο τομέα της οικονομίας, για την αντικατάσταση συμβατικών τεχνολογιών με νέες που θα ελαχιστοποιούν το κόστος
- Στο τομέα της αυτοκίνησης, καθώς χάρη στη νανοτεχνολογία νέα καύσιμα θα αντικαταστήσουν τα συμβατικά
- Στο τομέα της ένδυσης, αφού ακόμα και σήμερα υπάρχουν ενδύματα με νανοκλωστές που λειτουργούν ως αντλίες ιδρώτα και απορροφούν την υγρασία του σώματος
- Στο τομέα της καθημερινής υγιεινής, για παράδειγμα μια οδοντόκρεμα μπορεί να περιέχει νανοσωματίδια που θα φροντίζουν την υγιεινή των δοντιών

Οι ιδιότητες των νανοσωματιδίων εξαρτώνται από το μέγεθος και το σχήμα τους, προσφέροντας πολλαπλές δυνατότητες σε διαφορετικά πεδία της Ιατρικής. Επιπλέον οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν οδηγώντας σε μια ποικιλία νανοδομών και επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο βελτιωμένα συστήματα χορήγησης φαρμάκων [9]. Διαφορετικοί απεικονιστικοί παράγοντες που βασίζονται σε νανοσωματίδια, χρησιμοποιούνται σε διάφορες τεχνικές απεικόνισης, παρέχοντας πληροφορίες με αυξημένη ευαισθησία [10]. Ως Μεταφορά Φαρμάκου (Drug Delivery) ορίζεται η διαδικασία απελευθέρωσης ενός φαρμάκου την κατάλληλη χρονική στιγμή και σε ένα συγκεκριμένο ιστό-όργανο [11]. Η Νανοϊατρική επικεντρώνεται στη βελτιστοποίηση των συστημάτων χορήγησης φαρμάκων με τη βοήθεια της νανοτεχνολογίας. Πιο συγκεκριμένα, στόχος της νανοτεχνολογίας

είναι να επιτρέψει ικανοποιητική συσσώρευση των νανοσωματιδίων στο όργανο-ιστό στόχο, ανεξάρτητα από τη μέθοδο και τον τρόπο χορήγησης, ενώ παράλληλα να περιορίζει τις τοξικές και ανεπιθύμητες παρενέργειες. Τα νανοσωματίδια μπορούν να χορηγηθούν μέσω διαφορετικών οδών όπως από του στόματος (oral administration), ρινικά (nasal administration), παρεντερικά (parenteral), ενδοφλέβια (intravenous injection), και χορήγηση απευθείας στον όγκο (intratumoral injection), ενώ η μεταφορά στο όργανο-στόχο επιτυγχάνεται μέσω παθητικών ή ενεργών μηχανισμών στόχευσης όπως θα αναφερθεί πιο αναλυτικά παρακάτω [12].

Κατηγορίες νανοφορέων

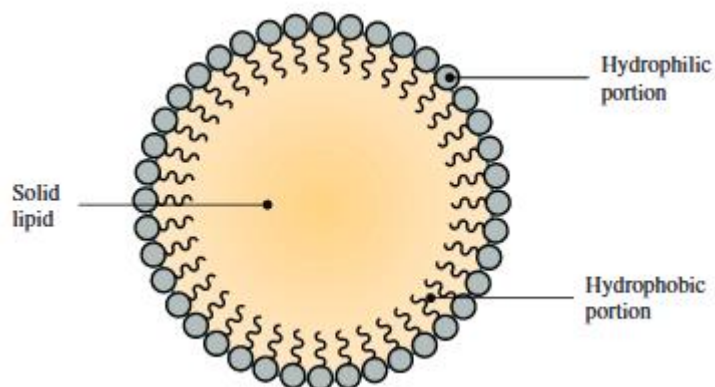
Οι νανοφορείς, ανάλογα με τη σύσταση τους διακρίνονται σε:

- Οργανικούς νανοφορείς (λιποσώματα, μικκύλια, δενδριμερή, εξωσώματα κτλ)
- Ανόργανους νανοφορείς (κβαντικές τελείες, νανοσωματίδια χρυσού και άλλων μετάλλων, άνθρακα, πυριτίου κτλ)

Οργανικοί νανοφορείς

Λιποσώματα

Τα λιποσώματα έχουν σφαιρικό σχήμα και μπορούν να σχηματισθούν από χοληστερόλη και φυσικά μη τοξικά φωσφολιπίδια. Το μέγεθος τους καθώς και ο υδρόφοβος και υδρόφιλος τους χαρακτήρας (υδρόφιλες κεφαλές και υδρόφοβες ουρές), τα καθιστά πολλά υποσχόμενα για συστήματα χορήγησης φαρμάκων. Οι ιδιότητές τους διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με τη λιπιδική σύνθεση, το επιφανειακό φορτίο, το μέγεθος και την παρασκευή [13].



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση ενός λιποσώματος [14]

Πολυμερικά Νανοσωματίδια

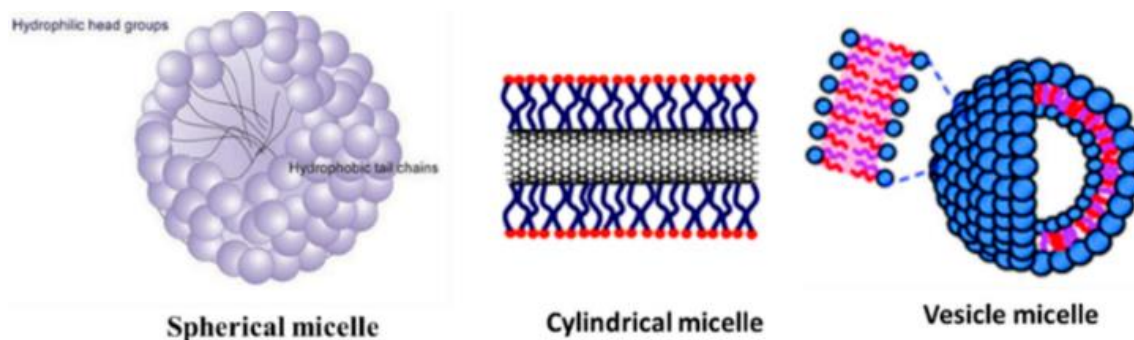
Τα πολυμερικά νανοσωματίδια φτιάχνονται από φυσικά ή συνθετικά πολυμερή με μέγεθος μικρότερο από 1 μm τα οποία μπορούν να σταθεροποιηθούν με σύζευξη ή απορρόφηση υδρόφιλων πολυμερών στην επιφάνεια τους. Τα πολυμερικά νανοσωματίδια έχουν το πλεονέκτημα ότι διασπώνται σε μονομερή που απομακρύνονται από τον οργανισμό μέσω μεταβολικών οδών. Επιπλέον, έχουν μεγάλες δυνατότητες για τροποποίηση της επιφάνειάς τους με διαφορετικά μόρια, επιτρέποντας την ελεγχόμενη απελευθέρωση θεραπευτικών παραγόντων [12].

Πρωτεϊνικά Νανοσωματίδια

Τα πρωτεϊνικά νανοσωματίδια προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα όπως χαμηλή τοξικότητα, βιοσυμβατότητα και βιοδιασπασιμότητα (biodegradability). Μπορούν να παρασκευαστούν υπό ήπιες συνθήκες χωρίς τη χρήση τοξικών χημικών ή οργανικών διαλυτών. Επιπλέον, προσφέρουν τη δυνατότητα τροποποίησης της επιφάνειάς τους καθώς και της ομοιοπολικής σύνδεσης φαρμάκων μέσω προσδετών (linkers). Τα πρωτεϊνικά νανοσωματίδια παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί είναι σχετικά ασφαλή και εύκολα στην προετοιμασία [15,16].

Νανομικκύλια

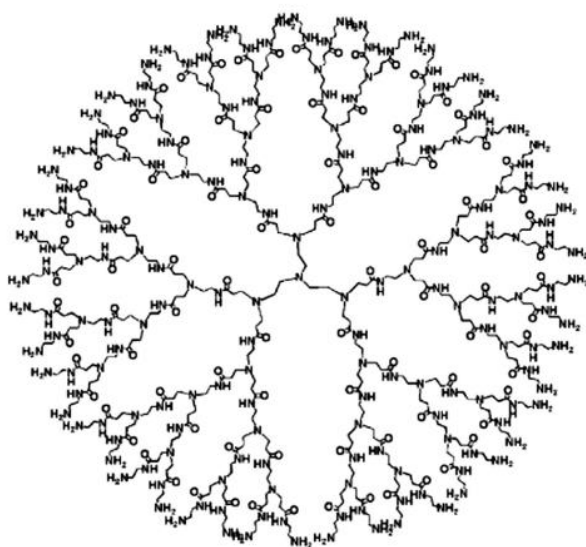
Τα νανομικκύλια έχουν μέγεθος νανομέτρων και διαθέτουν και υδρόφιλες (πολικές) και υδρόφοβες (μη πολικές) ομάδες. Οι ομάδες αυτές προσανατολίζονται ανάλογα με τη φύση του διαλύτη. Για παράδειγμα, αν ο διαλύτης είναι πολικός, το υδρόφιλο τμήμα προσανατολίζεται προς την εξωτερική επιφάνεια, ενώ το υδρόφοβο τμήμα συγκεντρώνεται στον πυρήνα για να ελαχιστοποιηθεί η επαφή με τον πολικό διαλύτη. Με αυτόν τον τρόπο, τα νανομικκύλια δρουν ως προστατευτικό κέλυφος μειώνοντας την άμεση επαφή των φαρμάκων με το *in vivo* περιβάλλον, βελτιώνοντας με αυτό τον τρόπο τη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου και τη μείωση των ανεπιθύμητων παρενεργειών. Τα νανομικκύλια έχουν λάβει τεράστιο ενδιαφέρον στην νανοϊατρική, λόγω του χαμηλού κόστους, της βιοσυμβατότητας, της εύκολης παρασκευής και της αποτελεσματικότητάς τους. Επιπλέον, είναι θερμοδυναμικά σταθερά σε φυσιολογικά διαλύματα [17].



Εικόνα 2. Απεικόνιση νανομικκυλίων διαφορετικών δομών [17]

Δενδριμερή

Τα δενδριμερή είναι συμμετρικά νανομόρια, με καλά καθορισμένη, ομοιογενή και μονοδιάσπαρτη δομή και αποτελούνται από μακριές αλυσίδες που συνδέονται με έναν κεντρικό πυρήνα. Τα δενδριμερή έχουν την ικανότητα να φέρουν στην επιφάνεια τους πολλές λειτουργικές ομάδες και μπορούν να υποστούν αλλαγές ως προς το μέγεθος και το σχήμα, τροποποιώντας έτσι τις φυσικοχημικές και βιολογικές τους ιδιότητες [18,19].



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση ενός δενδριμερούς [18]

Εξωσώματα / Εξωκυτταρικά κυστίδια

Πρόκειται για νανοσωματίδια με μέγεθος 30-150 nm που σχηματίζονται ενδοκυτταρικά και στη συνέχεια απελευθερώνονται από τα κύτταρα με εξωκυττάρωση. Ως εκ τούτου, η επιφάνεια τους περιέχει αρκετές πρωτεΐνες μεμβράνης. Επιπλέον, περιέχουν ενώσεις όπως νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες και λιπίδια τα οποία μεταφέρονται μεταξύ των κυττάρων [9].

Ανόργανοι Νανοφορείς

Κβαντικές νανοκουκκίδες

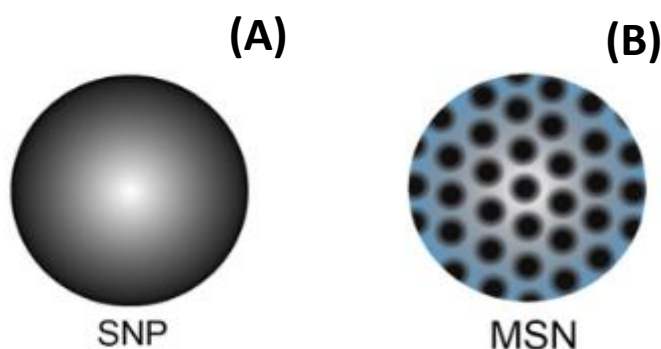
Οι κβαντικές νανοκουκκίδες είναι σφαιρικοί νανοκρύσταλλοι. Προσφέρουν εξαιρετικές οπτικές και ημιαγωγικές ιδιότητες με τεράστια ποικιλία εφαρμογών στην απεικόνιση. Έχουν μέγεθος 2-10 nm. Αποτελούνται από έναν πυρήνα ημιαγωγού, ο οποίος επικαλύπτεται από ένα κέλυφος για να βελτιώσει τις οπτικές του ιδιότητες αλλά και τη διαλυτότητα σε ρυθμιστικά μέσα. Απορροφούν φως σε ευρύ φάσμα μηκών κύματος (υπέρυθρο έως υπεριώδες) που εξαρτάται από το μέγεθος του κρυστάλλου [8,20].

Σιδηρομαγνητικά νανοσωματίδια

Τα σιδηρομαγνητικά νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται σε πλήθος βιοϊατρικών εφαρμογών λόγω των αξιοσημείωτων φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων. Το μικρό τους μέγεθος σε συνδυασμό με την υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο (surface to volume ratio), τα καθιστούν ιδανικούς υποψήφιους για πλήθος κλινικών εφαρμογών συμπεριλαμβανομένης της απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού (MRI). Επιπλέον, η επιφάνεια τους μπορεί να τροποποιηθεί με διάφορες μεθόδους και να επικαλυφθεί με ποικιλία μορίων (φαρμακοφόρων, φαρμάκων, πολυμερών) και χάρη σε αυτήν την ιδιότητα τους, τα σιδηρομαγνητικά νανοσωματίδια παρέχουν κολλοειδή σταθερότητα μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [21].

Νανοσωματίδια πυριτίας

Τα νανοσωματίδια πυριτίας χρησιμοποιούνται ευρέως στον τομέα της βιοϊατρικής λόγω της χαμηλής τους τοξικότητας και της σταθερότητας στο σώμα. Συχνά αναφέρονται ως μεσοπορώδη νανοσωματίδια πυριτίας (mesoporous silica nanoparticles), λόγω της ιδιότητάς τους να περιέχουν πόρους 2-50 nm. Η σύνθεσή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί με ποικίλους τρόπους οδηγώντας σε διαφορετικές ιδιότητες. Τα νανοσωματίδια αυτά διαφέρουν ως προς τη διάμετρο, το μέγεθος των πόρων, το σχήμα και την επιφάνεια. Η πορώδης τους επιφάνεια τα καθιστά αποτελεσματικούς φορείς για μικρά μόρια και πρωτεΐνες, ενώ ο χρόνος ημιζωής τους είναι αρκετός έτσι ώστε να παραμένουν σταθερά στον ορό αίματος [22].



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση (Α) νανοσωματιδίου πυριτίας και (Β) μεσοπορώδους νανοσωματιδίου πυριτίας [22]

Νανοσωματίδια άνθρακα

Τα νανοσωματίδια άνθρακα έχουν προσελκύσει τα τελευταία χρόνια σημαντικό ενδιαφέρον στην νανοϊατρική κυρίως λόγω της καλής φωταύγειας (luminescence) τους, της υψηλής χημικής τους σταθερότητας καθώς και λόγω των οπτικών και μηχανικών τους ιδιοτήτων. Για αρκετό χρονικό διάστημα, τα νανοσωματίδια άνθρακα θεωρούνταν ότι ήταν κρυσταλλικά ή άμορφα με μέγεθος περίπου στα 10 nm. Η χρήση νανοσωλήνων από άνθρακα (carbon nanotubes) παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον στον τομέα της απεικόνισης μέσω της ραδιοεπισήμανσης [9,23].



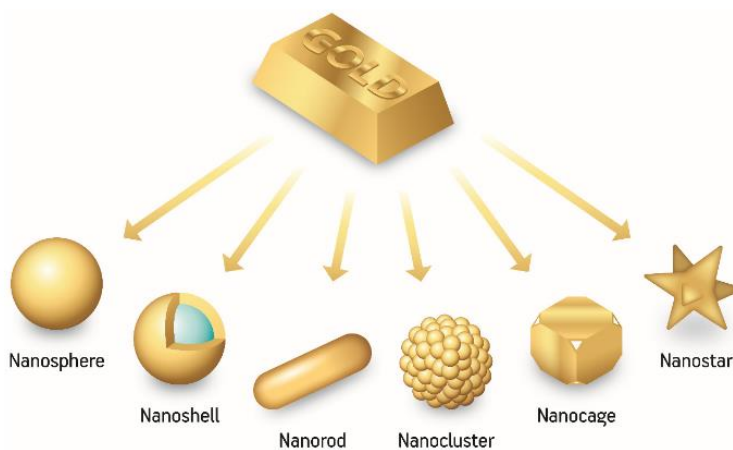
Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση νανοσωλήνα από άνθρακα [24]

Νανοσωματίδια χρυσού

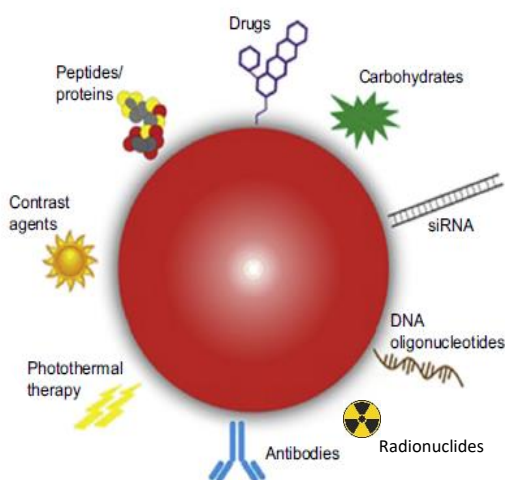
Τα νανοσωματίδια χρυσού χρησιμοποιούνται ευρέως τα τελευταία χρόνια στον τομέα της νανοτεχνολογίας καθώς παρουσιάζουν εξαιρετικές φυσικοχημικές και οπτικές ιδιότητες σε συνδυασμό με χαμηλή τοξικότητα που τα καθιστούν τα πιο κοινά που χρησιμοποιούνται για απεικόνιση, διάγνωση και στοχευμένη θεραπεία.

ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΧΡΥΣΟΥ

Τα νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) έχουν διερευνηθεί εκτενώς για τις εφαρμογές τους στην διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου λόγω κάποιων βασικών πλεονεκτημάτων που εμφανίζουν. Αρχικά παρουσιάζουν μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες όπως αντοχή στη διάβρωση και οπτικές ιδιότητες (έχουν την ικανότητα να απορροφούν και να διαχέουν το φως). Ακόμα, μπορούν να συντεθούν σε διάφορα μεγέθη και σχήματα όπως νανοσφαίρες, νανοκαλύφη, νανοράβδο, κτλ (Εικόνα 6) και η επιφάνεια τους μπορεί εύκολα να τροποποιηθεί με διάφορες λειτουργικές ομάδες (όπως νουκλεϊκά οξέα, φάρμακα, πρωτεΐνες κτλ) οδηγώντας σε μια ποικιλία διαφορετικών ενώσεων (Εικόνα 7). Επιπλέον, η χρήση τους τα τελευταία χρόνια αυξάνεται συνεχώς λόγω της χαμηλής τοξικότητας και της βιοσυμβατότητας τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Τέλος, παρουσιάζουν υψηλή ευαισθησία και μπορούν να ανιχνευθούν ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις [25–28].



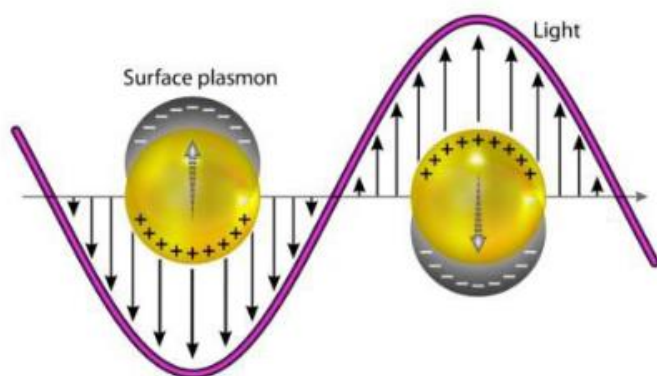
Εικόνα 6. Διαφορετικοί τύποι νανοσωματιδίων χρυσού ανάλογα με το μέγεθος και τη μορφολογία [29]



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση της πιθανής τροποποίησης της επιφάνειας νανοσωματιδίων χρυσού [12]

Φυσικοχημικές ιδιότητες

Όταν το νανοσωματίδιο χρυσού εκτίθεται στο φως, το ταλαντευόμενο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο του φωτός προκαλεί μια συλλογική ταλάντωση των ελεύθερων ηλεκτρονίων (ηλεκτρόνια που βρίσκονται στη ζώνη αγωγιμότητας) του χρυσού. Αυτή η ταλάντωση των ηλεκτρονίων γύρω από την επιφάνεια των νανοσωματιδίων οδηγεί σε διαχωρισμό του φορτίου, σχηματίζοντας μια ταλάντωση διπόλου κατά την κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου του φωτός (Εικόνα 8). Το πλάτος της ταλάντωσης αυτής, φτάνει σε μια μέγιστη συχνότητα που ονομάζεται Συντονισμός Επιφανειακών Πλασμονίων (SPR- Surface Plasmon Resonance) [30]. Το φαινόμενο SPR προκαλεί ισχυρή απορρόφηση του προσπίπτοντος φωτός και έτσι μπορεί να μετρηθεί χρησιμοποιώντας ένα UV-Vis φασματομέτρο απορρόφησης. Η ένταση και το μήκος κύματος, εξαρτώνται από παράγοντες όπως η ηλεκτρονιακή πυκνότητα, η επιφάνεια, το μέγεθος, το σχήμα, η σύνθεση των νανοσωματιδίων κτλ [31].



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου SPR σε πλασματικά νανοσωματίδια [32]

Το φαινόμενο SPR, προκαλεί απορρόφηση του φωτός στο πράσινο-μπλε τμήμα στο φάσμα του ορατού φωτός (~450nm), ενώ το κόκκινο φως αντανακλάται (~700nm), προσδίδοντας τελικά ένα κόκκινο χρώμα στα νανοσωματίδια χρυσού. Καθώς αυξάνεται το μέγεθος των νανοσωματιδίων, το μήκος κύματος της απορρόφησης, μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, επομένως το κόκκινο φως απορροφάται και το μπλε αντανακλάται, δίνοντας διαλύματα με ανοιχτό μπλε ή μωβ χρώμα [33].

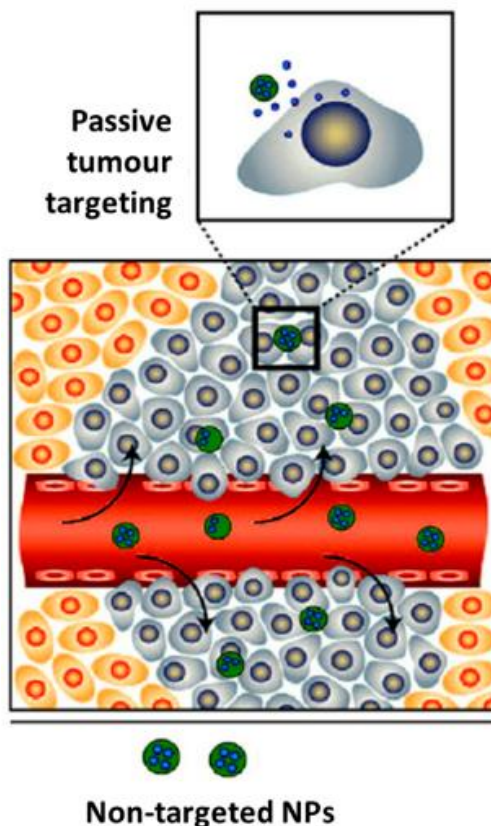
Εφαρμογή στη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου

Επί του παρόντος, τα περισσότερα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που διαχέονται σε υγιείς ιστούς και κατανέμονται ομοιόμορφα σε όλο το σώμα. Ωστόσο, η ποσότητα του φαρμάκου που φτάνει στο όργανο-στόχο είναι σχετικά μικρή και προκαλούνται ανεπιθύμητες παρενέργειες στους υγιείς ιστούς. Τα Συστήματα Χορήγησης Φαρμάκων (Drug Delivery Systems) προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα όπως αυξημένη διαλυτότητα, *in vivo* σταθερότητα και κατάλληλη βιοκατανομή [12]. Η επιστήμη της νανοτεχνολογίας στοχεύει στην επαρκή συγκέντρωση του βιοδραστικού μορίου στα βιολογικά υγρά που θα επιτρέψει την αποτελεσματική συσσώρευση στον καρκινικό ιστό και στο να εμφανίζει το βιοδραστικό μόριο υψηλή διαφορική τοξικότητα απέναντι στα καρκινικά κύτταρα [8]. Υπάρχουν αρκετά χαρακτηριστικά που μπορεί να επηρεάσουν την κυτταρική πρόσληψη των νανοσωματιδίων όπως το μέγεθος, το φορτίο και η επιφάνειά τους. Γενικότερα ως στόχευση βιοδραστικού μορίου, ορίζεται η ικανότητα του να συσσωρεύεται στο όργανο-στόχο ή στον ιστό-στόχο, ανεξάρτητα από την οδό και τη μέθοδο χορήγησης και η συγκέντρωση του στα υπόλοιπα όργανα και ιστούς να μην υπερβαίνει ένα ορισμένο επίπεδο ώστε να περιορισθούν οι ανεπιθύμητες παρενέργειες. Υπάρχουν δύο είδη στοχεύσεων: [8]

- Παθητική στόχευση (passive targeting)
- Ενεργητική στόχευση (active targeting)

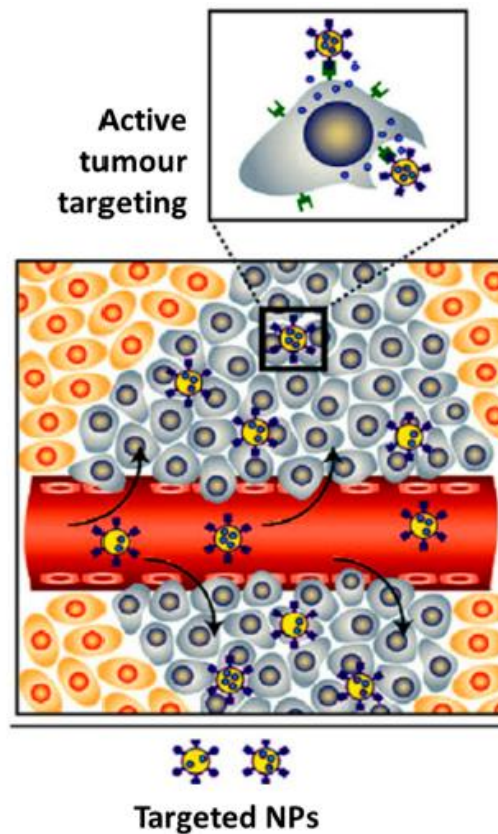
Στην **παθητική στόχευση**, εκμεταλλευόμαστε τη χαρακτηριστική ικανότητα των νανοσωματιδίων να συσσωρεύονται στους όγκους. Αυτό συμβαίνει διότι προκειμένου να αναπτυχθούν γρήγορα τα καρκινικά κύτταρα, απαιτείται γρήγορος σχηματισμός αιμοφόρων αγγείων. Τα αιμοφόρα αγγεία όμως στους φυσιολογικούς ιστούς διαφέρουν από εκείνα στους καρκινικούς ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, τα αγγεία στους καρκινικούς ιστούς παρουσιάζουν ανομοιογένεια και ακανόνιστες περιμέτρους. Τα τοιχώματα αυτών των αγγείων συχνά είναι διάτρητα με μικρούς πόρους με διάμετρο κάποιες εκατοντάδες νανόμετρα, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν διαρροές. Με αυτόν τον τρόπο λοιπόν, τα νανοσωματίδια καταφέρνουν να εισέλθουν στον καρκινικό ιστό σε σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά σε σχέση με τους υγιείς ιστούς. Αυτή η παθητική συσσώρευση των νανοσωματιδίων στους καρκινικούς ιστούς ονομάζεται φαινόμενο Ενισχυμένης Διαπερατότητας και Συγκράτησης (EPR effect) [34–36]. Η αποδέσμευση της βιοδραστικής ουσίας από το νανοσύστημα, έχει ως αποτέλεσμα τη σχετικά αυξημένη συγκέντρωση της στον όγκο και την αυξημένη τοξικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων. Το φαινόμενο EPR θα ενισχυθεί εάν τα νανοσωματίδια χρυσού παραμείνουν στην κυκλοφορία του αίματος για ικανό χρονικό διάστημα. Παρόλο που το φαινόμενο EPR έχει υποστηριχθεί ότι μεταφέρει τα νανοσωματίδια στον καρκινικό ιστό, όπου και εξαπλώνονται,

μόνο ένα μικρό ποσοστό (0,7%) της συνολικής χορηγούμενης δόσης νανοσωματιδίων είναι συνήθως ικανό να φτάσει σε έναν συμπαγή όγκο.



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού παθητικής στόχευσης σε καρκινικά κύτταρα [37]

Η **ενεργητική στόχευση**, είναι σε θέση να αυξήσει σημαντικά την ποσότητα του φαρμάκου που μεταφέρεται στον όγκο σε σχέση με την παθητική στόχευση. Αυτό επιτυγχάνεται με την τροποποίηση της επιφάνειας των νανοσωματιδίων με κατάλληλους υποκαταστάτες που αναγνωρίζουν ειδικά καρκινικά αντιγόνα στο μικροπεριβάλλον του όγκου (π.χ. πεπτίδια, αντισώματα, απταμερή κτλ). Μετά την πρόσδεση των νανοσωματιδίων στα κύτταρα-στόχους, ακολουθεί είτε ενδοκυττάρωσή τους, είτε προσκόλλησή τους στην επιφάνεια, ανάλογα με το είδος τους υποκαταστάτη. Η ενδοκυττάρωση πλεονεκτεί στην περίπτωση που το φάρμακο πρέπει να απελευθερωθεί εντός του κυττάρου, ενώ η προσκόλληση στην επιφάνεια είναι αναγκαία σε συμπαγείς όγκους, όπου πρέπει να σκοτωθούν και γειτονικά καρκινικά κύτταρα, τα οποία ενδεχομένως να μην εκφράζουν τον υποδοχέα στον οποίο θα προσδεθούν τα νανοσωματίδια. Η ενεργητική στόχευση μπορεί να ενισχύσει την θεραπευτική ικανότητα των φαρμάκων που δεν διαπερνούν εύκολα την κυτταρική μεμβράνη [8,35].



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού ενεργητικής στόχευσης σε καρκινικά κύτταρα [37]

Ωστόσο, οι υπάρχουσες θεραπείες δεν είναι πάντα τόσο αποτελεσματικές και συχνά αποτυγχάνουν. Αυτό συμβαίνει διότι:

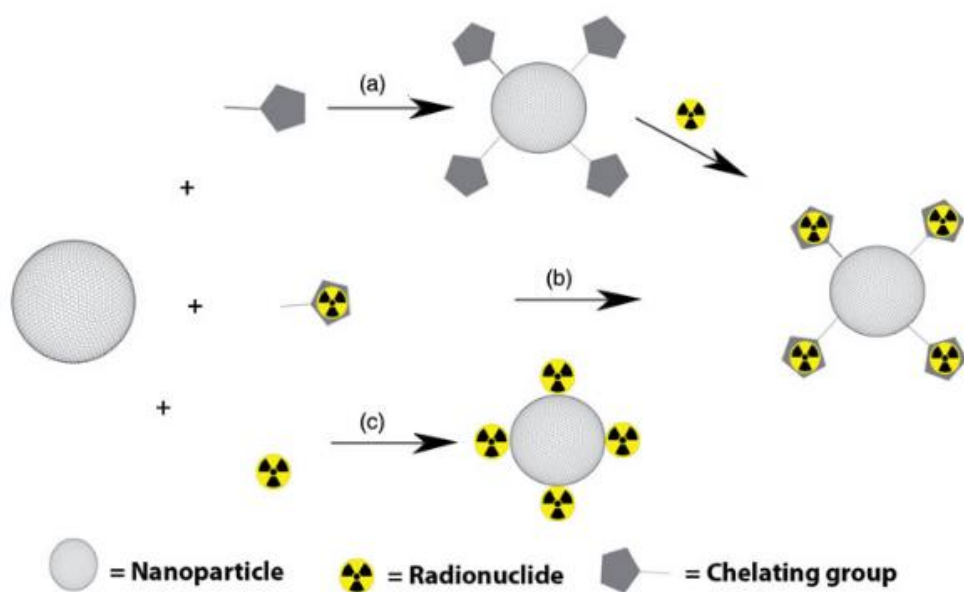
- Συνήθως όταν γίνει η διάγνωση, ο όγκος είναι ήδη αρκετά αναπτυγμένος, άρα για να επιτευχθεί πλήρης θεραπεία θα πρέπει να καταστραφούν όλα τα κύτταρα. Ακόμα όμως και με την αφαίρεση του 99.9% αυτών των κυττάρων, θα παραμείνει ένας ικανός αριθμός ζώντων κυττάρων.
- Στο 50% των ασθενών, η χειρουργική αφαίρεση του όγκου δεν οδηγεί σε ίαση, λόγω των μεταστάσεων, όπου τα λόγω μετάλλαξης γενετικά τροποποιημένα κύτταρα εξαπλώνονται μέσω της κυκλοφορίας και εγκαθίστανται σε νέες θέσεις. Συχνά οι μεταστάσεις δεν είναι ανιχνεύσιμες λόγω του μικρού μεγέθους τους και μπορούν να παραμείνουν ανενεργές για πολλά χρόνια μετά την αφαίρεση του πρωτογενούς όγκου.
- Η σύσταση των όγκων παρουσιάζει ανομοιογένεια, δηλαδή ο ίδιος όγκος περιέχει κύτταρα με διαφορετικά βιοχημικά, ανοσολογικά και βιολογικά χαρακτηριστικά. Αυτή η ανομοιογένεια μειώνει τις πιθανότητες να επιτευχθεί καταστροφή όλων των κυττάρων του όγκου. [8]

Επισημανση των Νανοσωματιδίων Χρυσού

Προκειμένου να διερευνηθεί η *in vivo* κινητική των νανοσωματιδίων χρυσού, μπορούν να επισημανθούν με μια μεγάλη ποικιλία ραδιονουκλιδίων. Συνήθως η ραδιοεπισημανση νανοσωματιδίων χρυσού προϋποθέτει την τροποποίηση της επιφάνειάς τους με κατάλληλες λειτουργικές ομάδες και ύστερα τη σύζευξη με το ισότοπο (Εικόνα 11a). Έτσι, προκύπτουν διάφορα μονοπάτια για την τροποποίηση της επιφάνειάς τους [38]:

- Χρήση δι-λειτουργικών (bifunctional) μορίων που λειτουργούν ως παράγοντες επικάλυψης ή σταθεροποίησης κατά τη σύνθεση των νανοσωματιδίων χρυσού και μπορούν να συζευχθούν με ραδιοϊσότοπα
- Άμεση σύζευξη μορίων που φέρουν αμινομάδες ή ομάδες θειόλης, με την επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού
- Ανταλλαγή υποκατάστατων (ligand exchange) κατά την οποία ολόκληρο ή μέρος του μορίου που σταθεροποιεί τα νανοσωματίδια χρυσού, ανταλλάσσεται με ένα άλλο μόριο το οποίο έχει ικανότητα πρόσδεσης στο χρυσό
- Χημική τροποποίηση των μορίων που ήδη υπάρχουν στην αρχική δομή των νανοσωματιδίων χρυσού

Ωστόσο μπορεί να γίνει και πρώτα τροποποίηση κατάλληλων χηλικών υποκαταστατών με το ισότοπο και στην συνέχεια σύζευξη με το νανοσωματίδιο (Εικόνα 11b). Ακόμη, είναι δυνατή η ενσωμάτωση ραδιοϊσοτόπων στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων χρυσού χωρίς τροποποίηση της επιφάνειάς τους μέσω εισαγωγής των ραδιοϊσοτόπων στον πυρήνα των νανοσωματιδίων (Εικόνα 11c).



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση εισαγωγής ραδιοϊσοτόπων στην επιφάνεια των AuNPs [39]

Ωστόσο, η ραδιοεπισήμανση νανοσωματιδίων ενδέχεται να παρουσιάσει ορισμένα προβλήματα. Για παράδειγμα, ορισμένες τροποποιήσεις έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να επηρεάσουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων. Επιπλέον, τα AuNPs παρουσιάζουν πολλά σχήματα, μεγέθη και μορφολογίες οδηγώντας σε μια μεγάλη ποικιλία ραδιοεπισημασμένων ενώσεων. Το πιο σημαντικό όμως είναι ότι η αποτελεσματικότητα της στόχευσης χάνεται εάν το ραδιονουκλίδιο δεν παραμένει συνδεδεμένο με το νανοσωματίδιο για επαρκές χρονικό διάστημα [40]. Σε αυτήν την περίπτωση ανιχνεύεται το απελευθερωμένο νουκλίδιο και όχι το ραδιοεπισημασμένο νανοσωματίδιο, με αποτέλεσμα να οδηγούμαστε σε λάθος συμπεράσματα.

Για διάγνωση, βραχύβια ραδιονουκλίδια που εκπέμπουν ακτίνες γ ή ποζιτρόνια όπως ^{99m}Tc , ^{68}Ga , ^{123}I , ^{111}I , ^{18}F και ^{64}Cu χρησιμοποιούνται εκτενώς για ραδιοεπισήμανση με νανοσωματίδια χρυσού [40–49].

Ακόμα, τα νανοσωματίδια χρυσού μπορούν να επισημανθούν με θεραπευτικά ισότοπα ραδιοϊσότοπα όπως ^{225}Ac , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re και ^{211}At [50–52]. Όπως και στη διάγνωση, τα νανοσωματίδια συσσωρεύονται στο όγκο μέσω του φαινομένου EPR ή με ενεργητική στόχευση. Το μικρό τους μέγεθος και η χημεία της επιφάνειάς τους επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την κυτταρική τους πρόσληψη. Η χρήση των AuNPs στην ακτινοθεραπεία, αύξησε το ποσοστό επιβίωσης έως και 86% σε σχέση με την ακτινοθεραπεία χωρίς AuNPs (ποσοστό επιβίωσης 20%) [53].

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί διάφορες μελέτες σχετικά με την επισήμανση νανοσωματιδίων χρυσού με ^{99m}Tc και έχουν δείξει ενδιαφέροντα αποτελέσματα ανάλογα με τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά και την λειτουργικότητα της επιφάνειάς τους, μετά την τροποποίησή αυτής. Ενδεικτικά, οι *Alberto et al* συνέθεσαν ένα νέο χηλικό υποκαταστάτη για άμεση επισήμανση των AuNPs με ^{99m}Tc -carbonyls, ο οποίος περιέχει:

- μια ομάδα θειόλης ως άγκυρα για την επιφάνεια των AuNPs;
- PEG (polyethylene glycol) ως συνδέτη και
- τον χηλικό υποκαταστάτη DAP (Diaminopropionic Acid) που δρα ως διλειτουργικός υποκαταστάτης για τον πυρήνα $^{99m}\text{Tc}[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$.

Επιπλέον, ο υποκαταστάτης συζεύχθηκε με έναν αναστολέα για το αντιγόνο ειδικής μεμβράνης του προστάτη (PSMA), για να εισάγει ένα παράγοντα στόχευσης για το καρκίνο του προστάτη [48].

Οι *Gómez-Oliván et al* τροποποίησαν την επιφάνεια των AuNPs με HYNIC-GGC (Hydrazinonicotinamide-GGC) για επισήμανση με ^{99m}Tc και πεπτίδια c[RGDFK(C)] για στόχευση

του όγκου μέσω αυθόρμητης αντίδρασης των ομάδων θειόλης της κυστεΐνης [41]. Ακόμη, οι *Torres-Garcia et al*, τροποποίησαν AuNPs μέσω ομάδων θειόλης της κυστεΐνης και στη συνέχεια έγινε *in vitro* αξιολόγηση των επισημασμένων AuNPs με ^{99m}Tc και με ^{177}Lu συζευγμένων με πεπτίδια μπομπεσίνης για εφαρμογή σε σύστημα στοχευμένης ραδιοθεραπείας σε καρκινικά κύτταρα προστάτη PC3 [49].

ΤΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ ΤΕΧΝΗΤΙΟ

Το τεχνητίο γενικά

Πρόκειται για το χημικό στοιχείο με $Z=43$ το οποίο βρίσκεται στην 7^η ομάδα του Περιοδικού Πίνακα. Ανήκει στην 5^η περίοδο και στη δεύτερη σειρά των στοιχείων μετάπτωσης. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για το τελευταίο από τα στοιχεία μετάπτωσης που έχει ανακαλυφθεί. Έχει 7 ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα και η ηλεκτρονιακή του δομή είναι $[\text{Kr}]4d^55s^2$.

Επίσημα ανακαλύφθηκε το 1937 από τους Carlo Perrie και Emilio Segre, οι οποίοι κατάφεραν να απομονώσουν βραχύβια νουκλίδια του στοιχείου με ατομικό αριθμό 43 με βομβαρδισμό του μολυβδαινίου με δευτερόνια στο κύκλοτρο. Έλαβε την ονομασία τεχνητίο το 1947, από την ελληνική λέξη «τεχνητός», επειδή ήταν το πρώτο στοιχείο που παρασκευάστηκε τεχνητά [54].

Τα σημαντικότερα ραδιονουκλίδια του τεχνητίου είναι:

- Το ψευδοσταθερό ^{99}Tc το οποίο κατέστησε δυνατή τη μελέτη της χημείας του τεχνητίου
- Το μετασταθερό ^{99m}Tc λόγω της εκτεταμένης χρήσης του στη διάγνωση

➤ Τεχνητίο ^{99}Tc

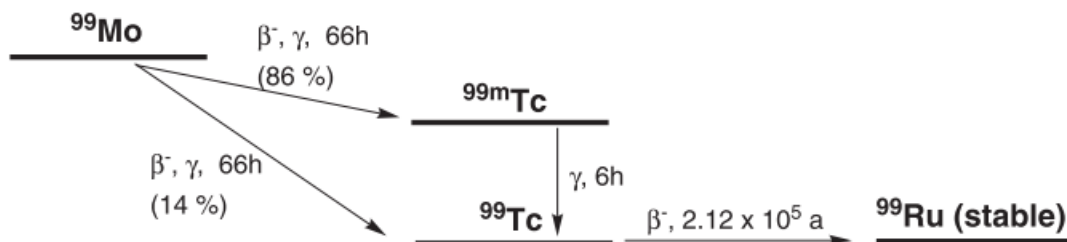
Το ^{99}Tc είναι το πιο σημαντικό ισότοπο του τεχνητίου και παράγεται σε μεγάλες ποσότητες με πυρηνική σχάση. Πρόκειται για ένα από τα πιο μακρόβια νουκλίδια του τεχνητίου με χρόνο ημιζωής 2.1×10^5 χρόνια και χάρη σε αυτό έγινε δυνατή η ανάπτυξη της έρευνας πάνω στη χημεία του. Βρίσκεται επίσης στο φλοιό της γης λόγω της αυθόρμητης σχάσης του ^{238}U καθώς και με σχάση του ^{235}U που προκαλείται από νετρόνια. Το ^{99}Tc εκπέμπει ασθενώς β⁻ ακτινοβολία ($E_{\text{max}}=0.292 \text{ MeV}$) και μεταπίπτει στο σταθερό στοιχείο ^{99}Ru . Η εκπομπή β⁻ ακτινοβολίας μπορεί να συνοδεύεται από δευτερεύουσες ακτίνες Χ, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για ποσότητες πολλών mg του ισότοπου.

Ο χειρισμός ποσοτήτων του ^{99}Tc σε μικρή κλίμακα (< 100 mg), δεν παρουσιάζει σημαντικό κίνδυνο για την υγεία (λόγω της χαμηλής β⁻ ακτινοβολίας), υπό την προϋπόθεση όμως ότι λαμβάνονται κάποια στοιχειώδη μέτρα προφύλαξης (ειδικές εγκαταστάσεις και ειδική αδειοδότηση). Εκτός αυτού όμως, προκύπτουν και προβλήματα κυρίως με τη διαχείριση των μακρόβιων ραδιενεργών καταλοίπων του, τα οποία τελικά περιορίζουν σημαντικά τη χρήση του [55,56].

➤ Τεχνητίο ^{99m}Tc

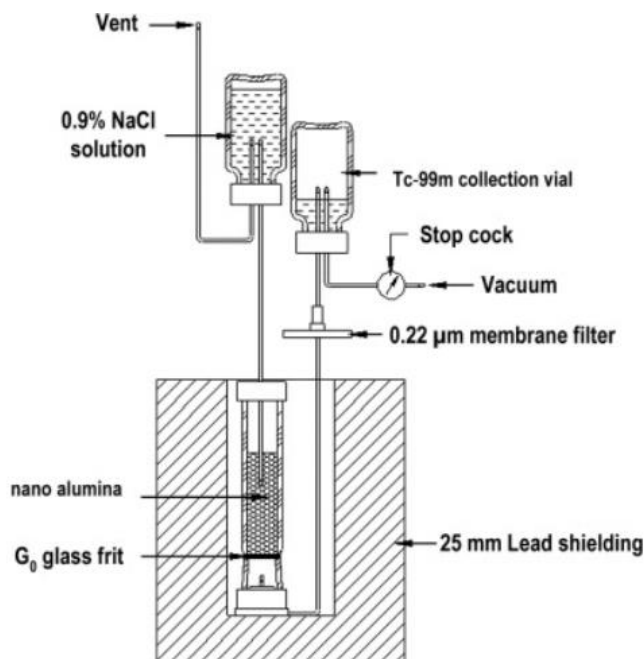
Το μετασταθερό ^{99m}Tc χρησιμοποιείται ευρέως στην Πυρηνική Ιατρική ως διαγνωστικός παράγοντας και αυτό χάρη στα ιδανικά πυρηνικά του χαρακτηριστικά όπως: εκπομπή ακτινών γ χαμηλής ενέργειας (140 keV), κατάλληλο χρόνο ημιζωής (6.02 h) καθώς και εύκολη διαθεσιμότητα από γεννήτριες $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. Ο χρόνος ημιζωής σε συνδυασμό με την έλλειψη ακτινοβολίας β^- , έχει ως αποτέλεσμα τη μικρή επιβάρυνση του ασθενούς με ακτινοβολία. Από την άλλη, η ακτινοβολία γ που εκπέμπεται διαπερνά τους ιστούς του σώματος και ανιχνεύεται από τις υπάρχουσες ανιχνευτικές διατάξεις [54–57].

Το ασταθές μητρικό ραδιονουκλίδιο του ^{99m}Tc είναι το ^{99}Mo , το οποίο είναι β^- εκπομπός με χρόνο ημιζωής 66.02 h και απομονώνεται από τα προϊόντα σχάσης με ειδική χημική κατεργασία. Το ^{99}Mo μεταπίπτει προς το μετασταθερό ραδιονουκλίδιο ^{99m}Tc , το οποίο στη συνέχεια διασπάται στο ^{99}Tc με εκπομπή γ ακτινοβολίας (Εικόνα 12). Η μετάβαση μεταξύ ^{99m}Tc και ^{99}Tc είναι σχετικά αργή. Η ενέργεια του γ -φωτονίου είναι περίπου 140 keV όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η οποία είναι αρκετά χαμηλή και δεν επιβαρύνει τον ασθενή, αλλά αρκετά ικανή για να διεισδύσει στον ιστό [55].



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση ραδιενεργούς διάσπασης του ^{99}Mo και παραγωγής του ^{99m}Tc [58]

Κατά τη διάρκεια του 1950, ανακαλύφθηκε τυχαία ότι το ^{99m}Tc μπορεί να διαχωριστεί από το μητρικό ραδιονουκλίδιο ^{99}Mo μέσω γεννήτριας. Μια γεννήτρια αποτελείται από μια στήλη η οποία περιέχει οξείδιο του αργιλίου, στην οποία είναι επιστοιβαδευμένο το ^{99}Mo υπό μορφή μολυβδαινικών ιόντων $[\text{}^{99}\text{MoO}_4]^{2-}$. Η συγγένεια της στήλης με το θυγατρικό ραδιονουκλίδιο είναι πολύ λιγότερη απ' ό,τι με το μητρικό, με αποτέλεσμα το θυγατρικό να εκλούεται, ενώ το μητρικό να παραμένει προσροφημένο στην στατική φάση. Το θυγατρικό ^{99m}Tc παράγεται υπό μορφή $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ και αποχωρίζεται τη στήλη με διάλυμα φυσιολογικού ορού. Μετά το τέλος της έκλουσης, το ^{99m}Tc αρχίζει πάλι και αναγεννάται από το μητρικό ^{99}Mo μέσα στη στήλη [55,58].



Εικόνα 13. Γεννήτρια $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ [59]

Χημεία των ενώσεων του τεχνητίου

Το τεχνητίο ανήκει στην 7η ομάδα του Περιοδικού Πίνακα μεταξύ του μαγγανίου και του ρηνίου. Η ατομική ακτίνα του τεχνητίου είναι παρόμοια με του ρηνίου. Έτσι υπάρχουν πολλές ομοιότητες στη χημεία μεταξύ των δύο αυτών στοιχείων. Το τεχνητίο με ατομικό αριθμό 43 έχει 7 ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα και η ηλεκτρονιακή του δομή είναι $[\text{Kr}]4d^55s^2$, υποδεικνύοντας ότι τα 4d και 5s τροχιακά συμβάλλουν σε διάφορες καταστάσεις οξείδωσης. Το τεχνητίο μπορεί να υπάρχει σε 8 οξειδωτικές καταστάσεις που ποικίλουν από (VII) έως (-I), με πιο σταθερές καταστάσεις να είναι (VII), (V), (IV), (III), (I) και 0. Οι πιο ασταθείς από την άλλη είναι (VI), (II) και (-I) [54].

Το τεχνητίο που εκλύεται από την γεννήτρια $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, βρίσκεται υπό μορφή ιόντων $[\text{TcO}_4]^-$ και το τεχνητίο στη συγκεκριμένη περίπτωση βρίσκεται στην οξειδωτική βαθμίδα (VII). Έτσι για την παραγωγή ραδιοφαρμάκων του ^{99m}Tc , γίνεται αναγωγή σε χαμηλότερες οξειδωτικές καταστάσεις παρουσία ενός κατάλληλου χηλικού υποκαταστάτη που είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την σύνθεση επισημασμένων μορίων με ^{99m}Tc . Κατά τη διάρκεια της αναγωγής, ο υποκαταστάτης σταθεροποιεί τη χαμηλότερη οξειδωτική κατάσταση, διαφορετικά σχηματίζεται κolloειδές TcO_2 [54,56].

Στην παρούσα εργασία, το τεχνητίο χρησιμοποιείται υπό την μορφή του ημι-υδατικού ιόντος $[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$. Το μεταλλικό κέντρο βρίσκεται στην οξειδωτική κατάσταση (I). Το τεχνητίο σε αυτήν την οξειδωτική βαθμίδα, σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με χηλικούς υποκαταστάτες οι οποίοι φέρουν ομάδες ικανές να σταθεροποιούν το μέταλλο με το φαινόμενο

της π-οπισθοσύνδεσης όπως ισοκυανίδια, φωσφίνες και καρβονύλια. Το ιόν $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ λοιπόν, είναι υδατοδιαλυτό, σταθερό στο νερό και έχει μόνο τρεις διαθέσιμες θέσεις συναρμογής. Η παρασκευή συμπλόκων του ^{99m}Tc στην οξειδωτική κατάσταση (I), βασίστηκε στην μέθοδο αντικατάστασης των υποκαταστατών καθώς τα μόρια του H_2O μπορούν εύκολα να αντικατασταθούν. Από την άλλη, τα τρία μόρια CO , συμπλέκονται με το μέταλλο ευρισκόμενα ανά δύο σε cis θέση μεταξύ τους και σταθεροποιούν τον πυρήνα του μετάλλου με π-οπισθοσύνδεση. Τα σύμπλοκα του Tc είναι κινητικά και θερμοδυναμικά σταθερά όταν ο αριθμός συναρμογής είναι 6. Έτσι, μια τεράστια ποικιλία μονο-, δι- και τρι- δραστικών υποκαταστατών περιλαμβάνοντας διαφορετικά άτομα και ομάδες δότες μπορούν να αντικαταστήσουν τα ευκίνητα μόρια του H_2O . Οι τριδραστικοί υποκαταστάτες αντικαθιστούν και τα τρία ευκίνητα μόρια του H_2O , ενώ οι διδραστικοί υποκαταστάτες που έχουν ως δότες ηλεκτρονίων δύο άτομα, έχουν ως αποτέλεσμα να παραμένει στο σύμπλοκο ένα ευκίνητο μόριο H_2O . Αντίστοιχα, οι μονοδραστικοί υποκαταστάτες έχουν ως δότη ηλεκτρονίων ένα άτομο [54].

Ανιχνευτικές διατάξεις

Η εξέλιξη της τεχνολογίας οδήγησε στην ανάπτυξη δύο ανιχνευτικών διατάξεων που χρησιμοποιούνται σήμερα για διαγνωστικά ραδιοφάρμακα: υπολογιστική τομογραφία μονοφωνικής εκπομπής (SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography) και τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET: Positron Emission Tomography) (Εικόνα 14).



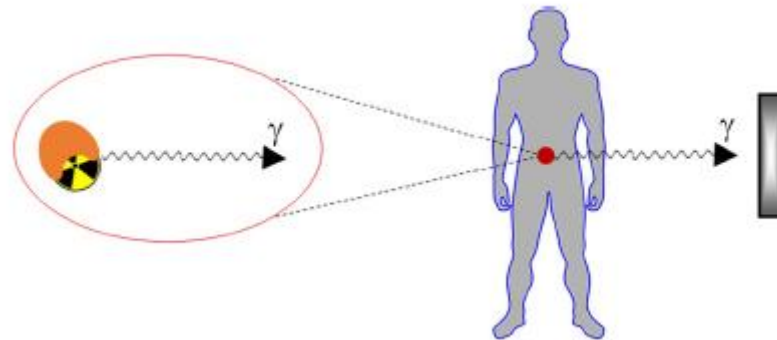
Εικόνα 14. Ανιχνευτικές διατάξεις (Α) SPECT και (Β) PET

Και οι δύο τεχνικές βασίζονται στην ανίχνευση ραδιονουκλιδίων. Η ανίχνευση νανοσωματιδίων χρησιμοποιώντας PET/SPECT απαιτεί επισήμανση με ραδιονουκλίδια, γεγονός που επιτρέπει μη επεμβατική *in vivo* απεικόνιση μέσω των εκπομπών ραδιενεργού διάσπασης του ραδιονουκλιδίου. Και οι δύο τεχνικές απεικόνισης έχουν βασικές ιδιότητες που τις καθιστούν ιδιαίτερα κατάλληλες για τη μελέτη της βιοκατανομής και φαρμακοκινητικής των νανοσωματιδίων *in vivo*. Και οι δύο τεχνικές παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία συγκριτικά με άλλες τεχνικές όπως MRI, CT κτλ. Ένα ακόμη, βασικό τους όφελος είναι το γεγονός ότι απαιτείται τόσο χαμηλή ποσότητα ραδιοϊχνηθέτη που δεν διαταράσσεται το βιολογικό σύστημα και είναι λιγότερο πιθανό να προκληθεί τοξικότητα. Επιπλέον, η χρήση ραδιονουκλιδίων επιτρέπει με ακρίβεια την ποσοτικοποίηση της πρόσληψης του νανοσωματιδίου στους ιστούς τόσο *in vivo* όσο και *ex vivo*. Ωστόσο, οι δύο τεχνικές διαφέρουν ως προς τη μέθοδο ανίχνευσης οδηγώντας σε σημαντικές διαφορές [9]. Πιο συγκεκριμένα:

➤ **SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)**

Αυτή η τεχνική απεικόνισης αποτελεί εξέλιξη του στατικού σπινθηρογράφου. Χρησιμοποιεί ραδιονουκλίδια που εκπέμπουν μονοενεργειακή ακτινοβολία γ. Οι εκπεμπόμενες ακτίνες γ έχουν καθορισμένα επίπεδα ενέργειας τα οποία ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας μια γάμμα κάμερα. Η απεικόνιση SPECT πραγματοποιείται περιστρέφοντας την κάμερα γύρω από το αντικείμενο ή τον ασθενή για να συλλάβει τις ακτίνες γ σε τρισδιάστατη μορφή, γεγονός που επιτρέπει τον ακριβή εντοπισμό των βλαβών και την εκτίμηση του όγκου των οργάνων. Ακόμα προσφέρει δυνατότητα αφαίρεσης της ακτινοβολίας υποστρώματος, κατά την επεξεργασία με υπολογιστή για τη διασφάλιση ακρίβειας στις μετρήσεις και τη λήψη ευκρινέστερων απεικονίσεων. Τέλος, μπορεί να προσδιοριστεί η ποσοστιαία πρόσληψη της

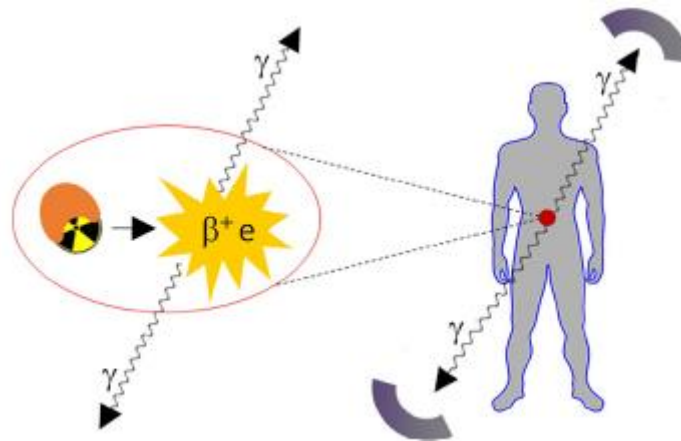
ραδιοφαρμακευτικής ένωσης από το όργανο-στόχο, καθώς η απεικόνιση του οργάνου γίνεται σε τομές [3,9,60,61].



Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής απεικόνισης SPECT [3]

➤ PET (Positron Emission Tomography)

Πρόκειται για μια απεικονιστική μέθοδο που χρησιμοποιεί ραδιοφάρμακα επισημασμένα με ραδιονουκλίδια που εκπέμπουν ποζιτρόνια κατά τη διάσπαση ενός ραδιενεργού πυρήνα. Η τομογραφία PET στηρίζεται στο φαινόμενο της εξαΰλωσης, σύμφωνα με το οποίο μόλις τα ποζιτρόνια αλληλεπιδράσουν με κοντινά ηλεκτρόνια, απελευθερώνουν ενέργεια με τη μορφή ζευγών φωτονίων ενέργειας 511 keV που εκπέμπονται σε αντίθετες κατευθύνσεις και υπό γωνία μεταξύ τους. Οι κάμερες PET αποτελούνται από ένα δακτύλιο ανιχνευτών για την ανίχνευση αυτών των ακτίνων γ [3,9,60].



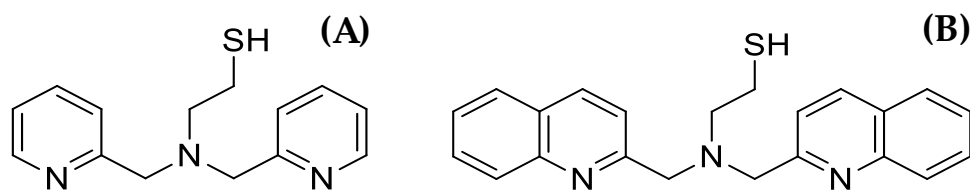
Εικόνα 16. Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής απεικόνισης PET [3]

Σύγκριση SPECT και PET

Η ευαισθησία της απεικόνισης με PET είναι ανώτερη από την ευαισθησία της απεικόνισης με SPECT και αυτό οφείλεται στην έλλειψη ευθυγράμμισης στην PET, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα βελτιωμένη ποσοτικοποίηση σήματος. Ωστόσο, η SPECT απεικόνιση είναι ευρέως διαθέσιμη και λιγότερο δαπανηρή λόγω της χρήσης ευκολότερα διαθέσιμων και μακροβιότερων ισωτόπων. Επιπλέον, η SPECT παρέχει τη δυνατότητα απεικόνισης πολλαπλών ραδιονουκλιδίων και αυτό διότι τα ραδιονουκλίδια που χρησιμοποιούνται στη SPECT εκπέμπουν ακτίνες γ και ακτίνες X διαφορετικών ενεργειών επομένως μπορούν να απεικονιστούν ταυτόχρονα πολλαπλά ραδιονουκλίδια και κατ' επέκταση πολλαπλά ραδιοφάρμακα. Αντίθετα, οι γ ακτίνες που εκπέμπονται από ραδιονουκλίδια που χρησιμοποιούνται στην PET, έχουν την ίδια ενέργεια (511 keV), καθιστώντας την πολλαπλή απεικόνιση μη εφικτή. Παρά τη χαμηλότερη διαθεσιμότητά του, αυξάνεται ο αριθμός των σαρωτών PET παγκοσμίως, λόγω της ανώτερης ευαισθησίας και χωρικής ανάλυσης. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί, η πρόσφατη ανακάλυψη σαρωτή συνολικού σώματος. Με τη χρήση ραδιοανιχνευτών PET για απεικόνιση του συνολικού σώματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν χαμηλότερες δόσεις ακτινοβολίας (έως και 40 φορές χαμηλότερα) [9,60].

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η τροποποίηση της επιφάνειας νανοσωματιδίων χρυσού δύο διαφορετικών μεγεθών (2 nm και 20 nm που αναφέρονται ως Au⁽²⁾NPs και Au⁽²⁰⁾NPs αντίστοιχα) με δύο χηλικούς υποκαταστάτες που περιέχουν μια ομάδα θειόλης (L₁H και L₂H), οι οποίοι επιτρέπουν την επισήμανση με [^{99m}Tc][Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺. Οι χηλικοί υποκαταστάτες φαίνονται στην Εικόνα 17. Η ομάδα θειόλης προσδένεται στην επιφάνεια των AuNPs καθώς δημιουργούνται ισχυροί δεσμοί Au-S που σταθεροποιούν τα νανοσωματίδια. Από την άλλη, τα τρία άτομα N είναι διαθέσιμα να συμπλεχθούν με το [^{99m}Tc][Tc(CO)₃]⁺. Η διαδικασία της επισήμανσης προϋποθέτει αρχικά την τροποποίηση των AuNPs με τους χηλικούς υποκαταστάτες L₁H και L₂H οδηγώντας στα σύμπλοκα Au⁽²⁾NPs-L₁, Au⁽²⁾NPs-L₂, Au⁽²⁰⁾NPs-L₁ και Au⁽²⁰⁾NPs-L₂ και στη συνέχεια επώαση με το ημι-υδατικό ιόν [^{99m}Tc][Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺. Τα μόρια του H₂O μπορούν εύκολα να υποκατασταθούν και τα τρία άτομα N λειτουργούν ως άτομα-δότες τα οποία συμπλέκονται με το μεταλλικό πυρήνα. Πρόκειται λοιπόν για τριδραστικούς υποκαταστάτες, εφόσον αντικαθίστανται και τα τρία μόρια H₂O.



Εικόνα 17. Χημική δομή των δύο τριδραστικών υποκαταστατών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία: (A) L₁H και (B) L₂H

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Χημικά αντιδραστήρια και εργαστηριακός εξοπλισμός

Λόγω χρήσης ραδιενεργού ^{99m}Tc , το πειραματικό μέρος της εργασίας αυτής γίνεται σε ειδικά αδειοδοτημένα εργαστήρια, με τις κατάλληλες προφυλάξεις έναντι της ακτινοβολίας, σύμφωνα με ειδικά πρωτόκολλα ακτινοπροστασίας και διαχείρισης αποβλήτων χαμηλής ραδιενέργειας.

Τα AuNPs συντέθηκαν στο Κέντρο Ραδιοχημείας και Πυρηνικής Χημείας, στο Ινστιτούτο Πυρηνικής Χημείας και Τεχνολογίας (Centre of Radiochemistry and Nuclear Chemistry, Institute of Nuclear Chemistry and Technology) στη Βαρσοβία, ενώ οι χηλικοί υποκαταστάτες L_1H και L_2H καθώς και το πρόδρομο σύμπλοκο $[\text{}^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, συντέθηκαν στο Εργαστήριο Ραδιοφαρμακευτικής Χημείας, στο Ινστιτούτο Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Έρευνας & Ασφάλειας (ΙΠΡΕΤΕΑ), ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος».

Οι εμπορικά διαθέσιμες πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία είναι οι ακόλουθες:

- Dimethylsulfoxide – DMSO (Aldrich Chemical, France)
- Acetonitrile – CH_3CN (Carlo Erba, France)
- Trifluoroacetic acid – TFA (Alfa Aesar, United Kingdom)
- Human Serum (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- RPMI (Biowest, Nuaille, France)
- [3-(4,5 – dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] – MTT (Applichem, Darmstadt, Germany)
- Cysteine/Histidine
- Isopropanol (Merck, Germany)
- 1-Octanol (Acros, Germany)
- Phosphate Buffered Saline Tablets – PBS (Fischer, Belgium)
- Ethanol Absolute – EtOH (Carlo Erba, Milano)
- TRITON X (Merck, Germany)

Η γεννήτρια $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (Mallinckrodt Medical B.V.), αποτελείται από ένα θωρακισμένο, φορητό δοχείο όπου βρίσκεται το ^{99}Mo ($t_{1/2} = 66\text{h}$) υπό μορφή μολυβδαινικών $^{99}\text{Mo}^{2+}$ σε στήλη αλουμίνας, και το $^{99m}\text{TcO}_4^-$ παράγεται μέσω β^- αποδιέγερσης. Το ιόν αυτό εκλύεται με saline 0.15 M, ενώ το $^{99}\text{Mo}^{2+}$ παραμένει προσροφημένο στη χρωματογραφική στήλη [3].

Το σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) που χρησιμοποιήθηκε, αποτελείται από:

- Αντλία τύπου 600 (Waters)
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος στη χρωματογραφική στήλη (injector UK6) με υποδοχέα δειγμάτων 500 μ L
- Ανιχνευτή UV 996 Photodiode Array detector (Waters)
- Ηλεκτρονικό υπολογιστή
- Ανιχνευτή ακτινοβολίας γ -RAM για την ανίχνευση ραδιενεργών συστατικών
- Στήλη Jupiter C4 (150 x 4.60 mm, 5 μ m, 300 Å, Phenomenex, USA)

Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιείται με γραμμικά μεταβαλλόμενο σύστημα διαλυτών, όπου ως κινητή φάση Α χρησιμοποιείται $H_2O/0.1\%$ TFA και ως κινητή φάση Β ACN/ 0.1% TFA. Το gradient μεταβάλλεται γραμμικά από 0% Β έως 100% Β για 25 min, με ρυθμό ροής 1 mL/min. Οι διαλύτες έκλουσης έχουν υποστεί διήθηση υπό κενό μέσω ειδικών φίλτρων (στείρα φίλτρα διαμέτρου 0.22 mm, Milipore) και απαέρωση με διαβίβαση He υψηλής καθαρότητας (Air Liquide Hellas). Η ποσότητα του δείγματος που ενίεται κάθε φορά εξαρτάται από την ραδιενέργεια του δείγματος.

Κατά τη δίοδο από τη χρωματογραφική στήλη, οι ενώσεις που διαχωρίζονται διέρχονται από δύο ανιχνευτικές διατάξεις, έναν ανιχνευτή υπεριώδους φωτός (UV) και έναν ανιχνευτή ραδιενέργειας (κρύσταλλος NaI). Οι διατάξεις αυτές είναι συνδεδεμένες με ηλεκτρονικό υπολογιστή, με σκοπό την επεξεργασία των μετρήσεων. Καταγράφονται έτσι οι εξής παράμετροι: ο ρυθμός μεταβολής των κρούσεων του ^{99m}Tc και η μεταβολή απορρόφησης στα 220 nm.

Η ραδιενέργεια των δειγμάτων μετρήθηκε με μετρητή ραδιονουκλιδίων (Capintec, Ramsey, NJ). Τα δείγματα για τις μελέτες λιποφιλικότητας μετρήθηκαν σε έναν Packard COBRA II Auto-Gamma Counter (Canberra, USA).

Για την ανάμιξη των διαλυμάτων, χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Vortex. Για την παρασκευή υδατικών διαλυμάτων, χρησιμοποιήθηκε Milli-Q H_2O ($\rho > 18 M\Omega \cdot cm$).

Η καρκινική κυτταρική σειρά 4T1, χρησιμοποιήθηκε από την κυτταρική τράπεζα του εργαστηρίου Ραδιοβιολογίας (ΙΠΡΕΤΕΑ, ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος»). Για τη μέτρηση της απορρόφησης των μωβ κρυστάλλων φορμαζάνης στη μέθοδο MTT, χρησιμοποιήθηκε ένα LabSystems Multiskan RC Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Σύνθεση των νανοσωματιδίων χρυσού

Τα νανοσωματίδια χρυσού με διάμετρο 20 nm ($\text{Au}^{(20)}$) συντέθηκαν τροποποιώντας τη μέθοδο Turkevich [62]. Για το σκοπό αυτό, 40 mg $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ διαλύθηκαν σε 100 mL απεσταγμένου νερού και θερμάνθηκαν σε σφαιρική φιάλη. Στη συνέχεια 112 mg διένυδρου κιτρικού τρινατρίου (trisodium citrate dihydrate) που είχαν διαλυθεί προηγουμένως σε 10 mL απεσταγμένου νερού προστέθηκαν στο προηγούμενο διάλυμα χλωριούχου χρυσού και το μείγμα θερμάνθηκε για επιπλέον 15 min. Ύστερα, αφού το διάλυμα νανοσωματιδίων χρυσού ήρθε σε θερμοκρασία δωματίου, τυλίχθηκε με αλουμινόχαρτο και φυλάχθηκε στους 4-8 °C. Το μέγεθος των νανοσωματιδίων ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τις τεχνικές DLS και TEM. Το διάλυμα των νανοσωματιδίων εμφάνισε ένα βαθύ κόκκινο χρώμα.

Τα νανοσωματίδια χρυσού με διάμετρο 2nm ($\text{Au}^{(2)}$) συντέθηκαν σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [63]. Διάλυμα HAuCl_4 (78.8 mg σε 10 mL αιθανόλης) προστέθηκε σε υδατικό διάλυμα MBA (4-mercaptobenzoic acid) (104.85 mg σε 8 mL). Το pH ρυθμίστηκε στο 13 χρησιμοποιώντας NaOH και το διάλυμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Στη συνέχεια, στο παραπάνω διάλυμα προστέθηκαν 86.67 mL μεθανόλης, 246.67 mL νερού και 3.33 mL βοροϋδρίδιου του νατρίου και το μείγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 18 h. Το χρώμα του διαλύματος άλλαξε από κίτρινο σε μαύρο. Στο τελευταίο στάδιο, στο παραπάνω διάλυμα προστέθηκαν 350 mL μεθανόλης και το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 8000 g για 10 min. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα διαλύθηκε σε 16 mL οξικού αμμωνίου (10 mM). Το μέγεθος ελέγχθηκε με TEM.

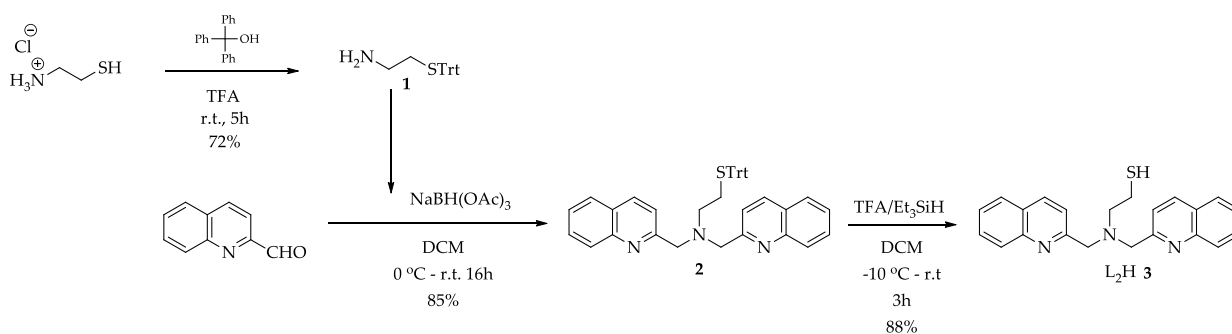
Σύνθεση των L_1H και L_2H

Η σύνθεση του L_1H περιγράφεται στη βιβλιογραφία [64,65].

Σύνθεση του ενδιάμεσου 2: Ένα διάλυμα κινόλινο-2-καρβαλδεΐδης (0.49 g, 3.13 mmol) σε DCM (1 mL) προστέθηκε στάγδην εντός 5 min σε ένα μείγμα 2-(τριτυλοθειό)-αιθαναμίνης (0.5 g, 1.57 mmol) και $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (1 g, 4.7 mmol) σε DCM (4 mL) στους 0°C. Η αντίδραση αφέθηκε να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου όπου το καστανόχρωμο εναιώρημα μετατράπηκε σε βαθύ καφέ και αφέθηκε για ολονύχτια ανάδευση. Την επόμενη μέρα η αντίδραση σταμάτησε (quenched) με NaHCO_3 (10 mL) στους 0°C και αναδεύθηκε για 3 h αφήνοντας το να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια η αντίδραση μεταφέρθηκε σε χοάνη, αραιώθηκε με 60 mL CHCl_3 και έγινε έκπλυση με NaHCO_3 (1 x 50 mL), νερό (1 x 50 mL) και κορεσμένο διάλυμα άλατος (brine) (1 x 50 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με Na_2SO_4 , διηθήθηκε και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό κενό.

Το ακατέργαστο κόκκινο-καφέ έλαιο (1.56 g) καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης βαρύτητας χρησιμοποιώντας $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}/\text{Et}_3\text{N}$ 80:20:1 για να δώσει προϊόν 3.725 mg (77%).

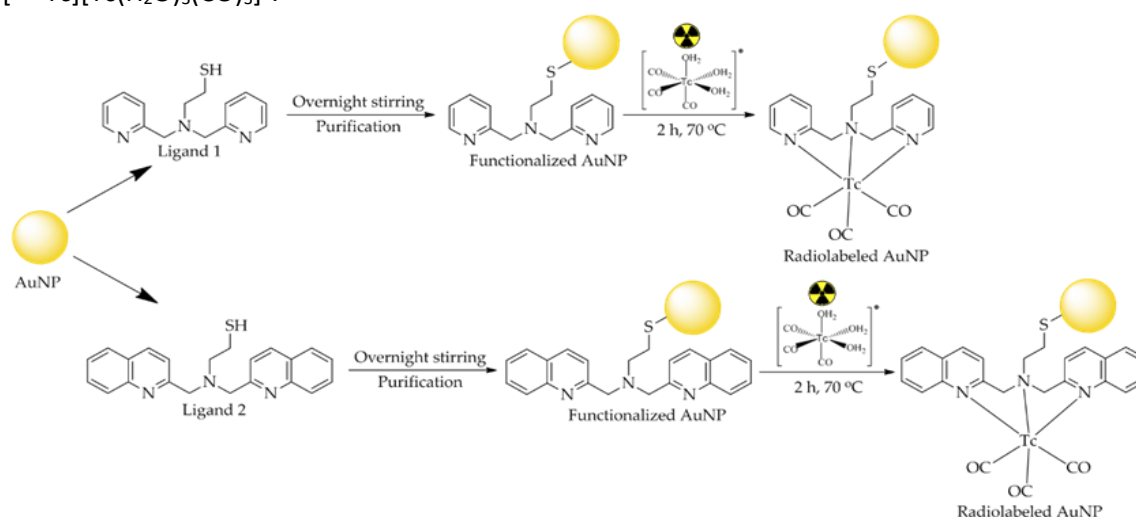
Σύνθεση του L_2H : TFA (3,4 mL, 44,8 mmol) προστέθηκε στάγδην εντός 10 min σε διάλυμα από το ενδιάμεσο **2** που συντέθηκε προηγουμένως (412 mg, 0,68 mmol) και τριαιθυλοσιλάνιο (0,34 mL, 2,12 mol) σε DCM (10 mL) στους -10°C . Το μείγμα εμφάνισε βαθυκόκκινο χρώμα και αναδεύτηκε στους -10°C για 5 min και στη συνέχεια αφέθηκε να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου όπου και αναδεύτηκε για 2 h. Τα πτητικά στη συνέχεια απομακρύνθηκαν υπό κενό στους 30°C και το κόκκινο/καφέ στερεό διαλύθηκε σε 30 mL CHCl_3 και έγινε έκπλυση με NaHCO_3 (1 x 25 mL), νερό (1 x 25 mL) και κορεσμένο διάλυμα άλατος (brine) (1 x 25 mL). Η οργανική στιβάδα ξηράνθηκε με Na_2SO_4 , διηθήθηκε και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού υπό κενό. Το ακατέργαστο προϊόν (0.5 g) καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}/\text{Et}_3\text{N}$ 8: 2: 0.1 για να δώσει L_2H (216 mg, 88%) ως κίτρινο στερεό.



Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του L_2H

Τροποποίηση της επιφάνειας των AuNPs με τους χηλικούς υποκαταστάτες L₁H και L₂H

Πριν τη διαδικασία της επισήμανσης, τα Au⁽²⁾NPs και Au⁽²⁰⁾NPs τροποποιήθηκαν με τους χηλικούς υποκαταστάτες L₁H και L₂H, οδηγώντας στο σχηματισμό τεσσάρων διαφορετικών συμπλόκων: Au⁽²⁾NPs-L₁, Au⁽²⁾NPs-L₂, Au⁽²⁰⁾NPs-L₁ και Au⁽²⁰⁾NPs-L₂. Όλα τα παραπάνω δείγματα συντέθηκαν ακολουθώντας την ίδια διαδικασία (Εικόνες 19,20). Έγιναν πολλές απόπειρες τροποποίησης των νανοσωματιδίων, αλλά τελικά καταλήξαμε σε μία πειραματική διαδικασία που μας έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα επισήμανσης, τελικά. Εν συντομία, 0,001 nmol Au⁽²⁾NPs και Au⁽²⁰⁾NPs αναμίχθηκαν με 0.8 μmol από κάθε υποκαταστάτη (0.21 mg L₁H και 0.29 mg L₂H σε DMSO) και αφέθηκαν για ολονύχτια ανάδευση. Την επόμενη μέρα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 4500 rpm για 20 min σε erpendorfs και το υπερκείμενο αφαιρέθηκε προσεκτικά. Στη συνέχεια, τα καθαρισμένα πλέον AuNPs χρησιμοποιήθηκαν για επισήμανση με [^{99m}Tc][Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺.



Εικόνα 19. Τροποποίηση των AuNPs με τους χηλικούς υποκαταστάτες L₁H και L₂H και επισήμανση με [^{99m}Tc][Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺



Εικόνα 20. Διαδικασία τροποποίησης των AuNPs με τους χηλικούς υποκαταστάτες L₁H και L₂H και επισήμανση με [^{99m}Tc][Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺

Μελέτες Κυτταροτοξικότητας

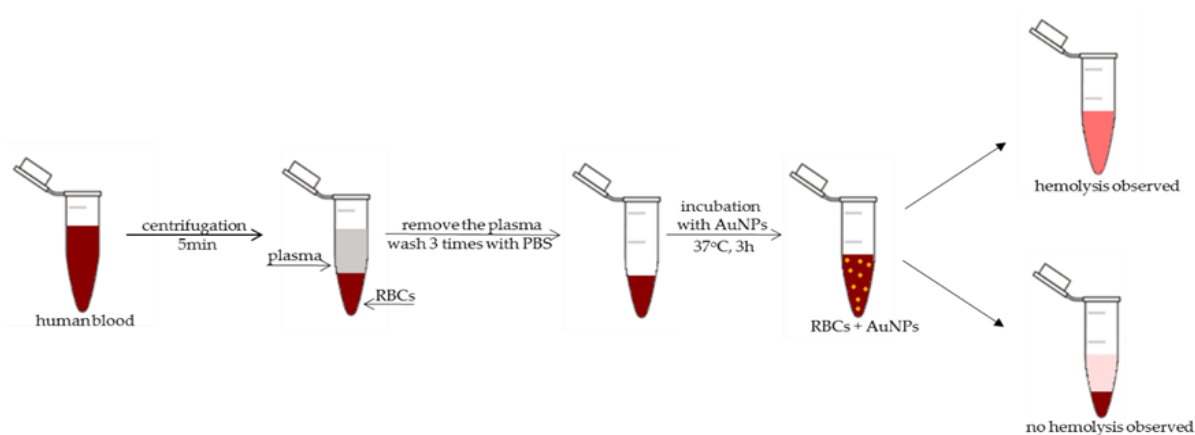
Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας των σκέτων νανοσωματιδίων ($Au^{(2)}$ και $Au^{(20)}$) καθώς και των νανοσωματιδίων που έχουν τροποποιηθεί με τους υποκαταστάτες ($Au^{(2)}L_1$, $Au^{(2)}L_2$, $Au^{(20)}L_1$ and $Au^{(20)}L_2$), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MTT ([3-(4,5 -dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]). Το MTT είναι ένα κίτρινο υδατοδιαλυτό άλας του τετραζολίου και η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αναγωγή του MTT σε μωβ κρυστάλλους φορμαζάνης από ενεργά κύτταρα στα μιτοχόνδρια μέσω της δράσης των ενζύμων αφυδρογονάσης. Οι σχηματιζόμενοι μωβ κρύσταλλοι μπορούν να διαλυτοποιηθούν με ισοπροπανόλη και η απορρόφηση αυτού του μωβ διαλύματος μπορεί να μετρηθεί με φασματοφωτομετρία σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος και να ποσοτικοποιηθεί. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται μόνο στα βιώσιμα κύτταρα και αυτό διότι τα νεκρά κύτταρα δε μπορούν να μεταβολίσουν το MTT με αποτέλεσμα να μη σχηματίζονται μωβ κρύσταλλοι και να μην μετρείται απορρόφηση (ή να υπάρχει μειωμένη απορρόφηση). Η μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων είναι ανάλογη της πυκνότητας του χρώματος των μωβ κρυστάλλων φορμαζάνης που σχηματίζονται. Για τους παραπάνω λόγους, η μέθοδος MTT μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την βιωσιμότητα και τοξικότητα των κυττάρων [21,66]. Για το σκοπό της διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε η καρκινική σειρά 4T1.

Περίπου 10^4 κύτταρα (4T1) ανά φρεάτιο σε 100 μ L θρεπτικό υλικό, καλλιεργούνται σε πλάκες 96 φρεατίων και επωάζονται για 24 h στους 37°C σε 5% CO_2 επωαστικό κλίβανο. Ύστερα από την επώαση, οι υπό μελέτη ενώσεις προστίθενται στα φρεάτια σε έξι διαδοχικές συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων χρυσού (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 και 2 nM). Στα κύτταρα αναφοράς (control group), προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται με τα παράγωγα για 24 h. Μετά τις 24 h, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και προστίθεται σε κάθε φρεάτιο 100 μ L MTT ($C_{MTT}=1$ mg/mL). Ακολουθεί επώαση για 4 h. Με την πάροδο των 4 h σχηματίζονται κρύσταλλοι φορμαζάνης οι οποίοι διαλυτοποιούνται σε 100 μ L ισοπροπανόλης. Η απορρόφηση μετρείται στα 560 nm στον ELISA reader. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως το ποσοστό (%) της κυτταρικής βιωσιμότητας, δηλαδή η οπτική πυκνότητα (Optical Density, OD) των κυττάρων που έχουν επωαστεί με τα παράγωγα / οπτική πυκνότητα των κυττάρων αναφοράς (control group) x 100. Το κάθε πείραμα επαναλήφθηκε 4 φορές.

Δοκιμασία Αιμόλυσης

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, ελήφθη αίμα από δύο υγιείς δότες και φυγοκεντρήθηκε στις 3000 rpm για 5 min προκειμένου να διαχωριστεί το πλάσμα από τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs). Στην συνέχεια, γίνεται τρεις φορές έκπλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με PBS (0.01 M, pH 7.4) ελεύθερο από μαγνήσιο και ασβέστιο. Προετοιμάζονται δείγματα των σκέτων νανοσωματιδίων χρυσού και των τροποποιημένων νανοσωματιδίων με τους υποκαταστάτες σε συγκεντρώσεις 2 nM – 1 nM – 0.5 nM. Λαμβάνονται 285 μL από κάθε δείγμα και προστίθενται 15 μL RBCs. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 285 μL PBS από την τελευταία φυγοκέντρηση μαζί με 15 μL RBCs, ενώ ως θετικό δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 10 μL TRITON X (10%) μαζί με 275 μL PBS και 15 μL RBCs. Τα δείγματα μαζί με τα δείγματα ελέγχου επώαστηκαν για 3 h στους 37°C και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για μια ακόμα φορά στις 3000 rpm για 5 min (Εικόνα 21). Τέλος, λαμβάνονται 100 μL από το υπερκείμενο από κάθε δείγμα και τοποθετούνται σε πλάκες 96 φρεατίων. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 450 nm σε LabSystems Multiskan RC Microplate Reader. Το ποσοστό της αιμόλυσης υπολογίστηκε από την παρακάτω σχέση:

$$\text{Ποσοστό αιμόλυσης \%} = \frac{(OD \text{ of AuNPs} - OD \text{ of negative control})}{(OD \text{ of positive control} - OD \text{ of negative control})}$$



Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση της δοκιμασίας αιμόλυσης

Σχηματισμός του προσυμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$

Το προσύμπλοκο $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ παρασκευάζεται με αναγωγή των ιόντων $^{99m}\text{TcO}_4^-$, τα οποία λαμβάνονται από τη γεννήτρια $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, με τη μορφή διαλύματος $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$, σε ατμόσφαιρα κορεσμένη με CO όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία [67]. Πιο συγκεκριμένα, φέρονται σε φιαλίδιο πενικιλίνης 4 mg Na_2CO_3 , 20 mg τρυγικό νάτριο και 7 mg NaBH_4 , τα οποία είναι απαραίτητα για την αναγωγή και την σταθεροποίηση του ^{99m}Tc στην οξειδωτική βαθμίδα (I). Κατόπιν, το φιαλίδιο σφραγίζεται με πώμα αλουμινίου και στη συνέχεια διαβιβάζεται μέσα του ρεύμα CO για 2-3 min περίπου, έτσι ώστε να απομακρυνθεί το οξυγόνο και να κορεστεί η ατμόσφαιρα σε CO. Στη συνέχεια προστίθενται 1 mL διαλύματος $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ 10-50 mCi, με κάθε δυνατή προφύλαξη, έτσι ώστε να μην εισέλθει ατμοσφαιρικός αέρας στο φιαλίδιο, και ακολουθεί ήπια ανάδευση.

Ο σχηματισμός του προσυμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ γίνεται με θέρμανση του φιαλιδίου στους 90°C για 30 min. Στη συνέχεια, το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται για 5 min με σκοπό να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Το pH του διαλύματος, το οποίο ελέγχεται με πεχαμετρικό χαρτί και ρυθμίζεται με την προσθήκη διαλύματος 1M HCl, σε εύρος τιμών 6.5-7. Η ρύθμιση του pH γίνεται με σκοπό την εξουδετέρωση τυχόν περισσειας του αναγωγικού μέσου.

Ραδιοχημικός έλεγχος του προσυμπλόκου

Ο σχηματισμός του προσυμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ ελέγχεται και πιστοποιείται με εφαρμογή της αναλυτικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ανάστροφης φάσης (Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC). Η συγκεκριμένη τεχνική (RP-HPLC), πραγματοποιείται με σύστημα διαλυτών έκλουσης, το οποίο αποτελείται από $\text{MeOH}/0.1\%$ τριφθοροξικό οξύ (TFA) και $\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ TFA. Οι διαλύτες έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν είχαν υποστεί ειδική επεξεργασία, που περιελάμβανε διήθηση υπό κενό μέσω ειδικών φίλτρων, καθώς και απαέρωση με διαβίβαση ηλίου (He) υψηλής καθαρότητας. Σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι ο καθαρισμός της κινητής φάσης από μικροσωματίδια, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν την ανάλυση, αλλά και να βλάψουν σοβαρά τη στήλη. Προβλήματα μπορεί να δημιουργήσουν και οι μικροφυσσαλίδες αέρα που παγιδεύονται στους διαλύτες, αφού αυτές που φτάνουν στις αντλίες του οργάνου προκαλούν μεταβολή της ροής της κινητής φάσης, ενώ αυτές που περνούν από τον ανιχνευτή δίνουν ανύπαρκτες κορυφές. Σε αυτό το γεγονός οφείλεται η χρήση του He που έχει ελάχιστη διαλυτότητα στα υγρά με αποτέλεσμα να εξωθεί τον αέρα έξω από την κινητή φάση.

Για την εισαγωγή του δείγματος στο σύστημα εισαγωγής δείγματος του χρωματογράφου, χρησιμοποιείται μικρομετρική σύριγγα των 100 μL . Η ποσότητα που ενίεται εξαρτάται από τη ραδιενέργεια του δείγματος και κυμαίνεται από 10 έως 100 μL . Η ροή των διαλυτών έκλουσης στη χρωματογραφική στήλη κατά τη διάρκεια της ανάλυσης ρυθμίζεται σε 1.0 mL/min. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε το μίγμα διαλυτών κλιμακωτά μεταβαλλόμενης σύστασης (gradient).

Εφόσον το προϊόν της έκλουσης διέλθει από τη χρωματογραφική στήλη, διέρχεται από δύο ανιχνευτικές διατάξεις. Καταρχήν, από έναν ανιχνευτή υπεριώδους φωτός (UV) και στη συνέχεια από έναν ανιχνευτή ραδιενέργειας (κρύσταλλος ιωδιούχου νατρίου - NaI). Οι διατάξεις αυτές είναι συνδεδεμένες με ηλεκτρονικό υπολογιστή, με σκοπό τη συλλογή και την περαιτέρω επεξεργασία των λαμβανομένων μετρήσεων. (t_R HPLC (γ detector): $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$: 4 - 6 min, $[^{99m}\text{Tc}][\text{TcO}_4]^-$: 3.0 min. Radiochemical yield (RCY) > 95%)

Επισημάνση με $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$

Μετά την τροποποίηση, τα AuNPs επισημάνθηκαν με 100 μL $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ (0.8 - 2 mCi), ύστερα από επώαση στους 70°C για 2 h. Το ποσοστό της επισημάνσης προσδιορίστηκε με HPLC. Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιείται με σύστημα διαλυτών όπου ως κινητή φάση Α είναι $\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ TFA και ως κινητή φάση Β $\text{ACN}/0.1\%$ TFA. Το gradient μεταβάλλεται γραμμικά από 0% Β έως 100% Β για 25 min, με ρυθμό ροής 1 mL/min. Στην συνέχεια τα δείγματα καθαρίζονται με φυγοκέντρηση σε erpendorf στις 4500 rpm για 20 min (Εικόνα 16).

Μελέτες *in vitro* σταθερότητας

Ύστερα από τον καθαρισμό, εξετάσαμε την *in vitro* σταθερότητα των ραδιοεπισημασμένων συμπλόκων σε ανθρώπινο ορό και σε διαλύματα κυστεΐνης/ιστιδίνης προκειμένου να αξιολογήσουμε την *in vivo* σταθερότητα τους.

-Σταθερότητα των συμπλόκων του ^{99m}Tc παρουσία περίσσειας ανθρώπινου ορού

Για την αξιολόγηση της σταθερότητας σε ανθρώπινο ορό, 50 μL καθενός των συμπλόκων του ^{99m}Tc , προστίθενται 450 μL ανθρώπινου ορού. Τα διαλύματα επωάζονται στους 37°C έως 24 h. Σε χρονικά διαστήματα 1 h και 24 h λαμβάνονται 100 μL από το κάθε δείγμα, και στο καθένα προστίθενται 200 μL EtOH. Ακολουθεί έντονη ανάδευση με Vortex, φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 10 min και το υπερκείμενο κάθε δείγματος αναλύεται με HPLC [41].

-Σταθερότητα των συμπλόκων του ^{99m}Tc παρουσία περισσειας κυστεΐνης και ιστιδίνης

Για την αξιολόγηση της σταθερότητας σε κυστεΐνη και ιστιδίνη, 100 μL καθενός των συμπλόκων του ^{99m}Tc , προστίθενται 50 μL υδατικού διαλύματος κυστεΐνης ή ιστιδίνης (2×10^{-2} M) αντίστοιχα και συμπληρώνεται 450 μL ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Τα διαλύματα αυτά επωάζονται στη συνέχεια στους 37°C έως 24 h και σε χρονικά διαστήματα 1 h και 24 h λαμβάνονται δείγματα τα οποία αναλύονται με HPLC [68].

Μελέτες Λιποφιλικότητας

Η λιποφιλικότητα των ραδιοεπισημασμένων συμπλόκων προσδιορίστηκε υπολογίζοντας τον Συντελεστή Μερισμού (Partition Coefficient-P) χρησιμοποιώντας την μέθοδο ανακινούμενης φιάλης. Πιο συγκεκριμένα, σ' ένα σωλήνα φυγόκεντρου, φέρονται 2.0 mL κανονικής οκτανόλης (n-οκτανόλη) και 2.0 mL PBS (0.1 M, pH=7.4). Στη συνέχεια, προστίθενται περίπου 10 μL του συμπλόκου του ^{99m}Tc (δηλαδή όσο αντιστοιχεί σε 1-2 μCi). Ο σωλήνας φυγόκεντρου τοποθετείται στο vortex για περίπου 2 min. Στη συνέχεια, σχηματίζεται ένα διφασικό σύστημα n-οκτανόλης / υδατικού διαλύματος PBS. Σε 3 δοκιμαστικούς σωλήνες φέρονται 200 μL από τη φάση της n-οκτανόλης και σε 3 διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες, φέρονται 200 μL από τη φάση του PBS. Ακολουθεί μέτρηση στο μετρητή γ ακτινοβολίας (γ -counter). Στη συνέχεια λαμβάνονται 500 μL από τη φάση της n-οκτανόλης (ή από την φάση του PBS αν πρόκειται για υδρόφιλο σύμπλοκο) από τον πρώτο σωλήνα φυγόκεντρου, και μεταφέρονται σ' ένα δεύτερο σωλήνα φυγόκεντρου ο οποίος περιέχει 2.0 mL PBS και 1.5 mL n-οκτανόλης (ή 1.5 mL PBS και 2.0 mL n-οκτανόλης αντίστοιχα αν πρόκειται για υδρόφιλο σύμπλοκο). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται συνολικά 3 φορές. Μέσα από τις μελέτες λιποφιλικότητας, υπολογίζεται το logP και δίνεται από τη σχέση:

$$P = \frac{\text{Κρούσεις ανά mL κανονικής οκτανόλης}}{\text{Κρούσεις ανά mL υδατικού διαλύματος PBS}}$$

Η επιλογή του συστήματος n-οκτανόλης-υδατικού διαλύματος PBS, βασίστηκε στα εξής κριτήρια: [11]

- Η n-οκτανόλη έχει την ικανότητα να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου ως δέκτης και ως δότης, ιδιότητα που προσομοιάζει σε πολλά βιολογικά συστήματα (μεμβράνες, πρωτεΐνες)
- Είναι σχετικά εύκολος ο προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού, συγκριτικά με άλλα συστήματα διαλυτών
- Η n-οκτανόλη δεν είναι τοξική, αν και έχει δυσάρεστη γλυκερή οσμή

- Η n-οκτανόλη είναι φθηνή

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

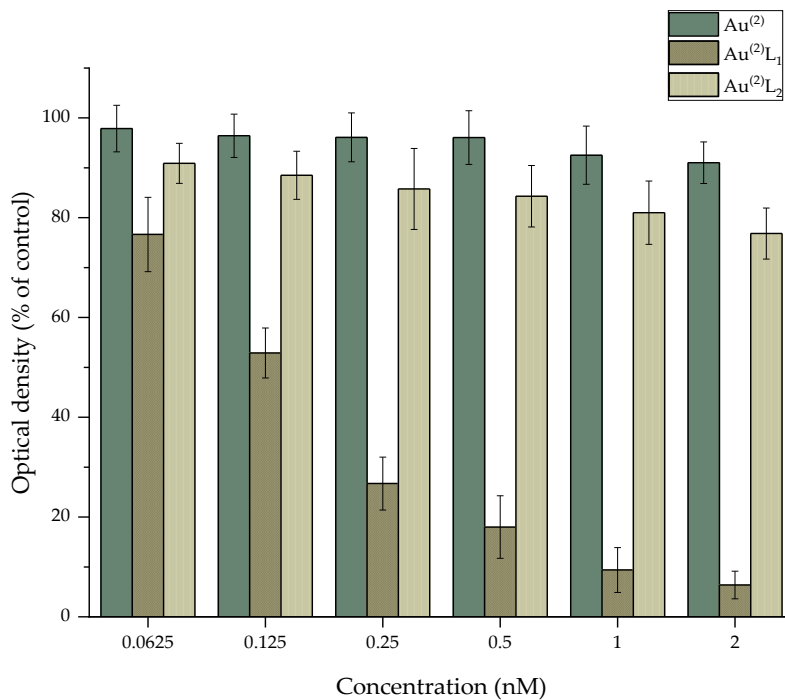
Μελέτες Κυτταροτοξικότητας

Η μέθοδος MTT πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε παραπάνω προκειμένου να αξιολογηθεί η κυτταροτοξικότητα τόσο των σκέτων όσο και των τροποποιημένων νανοσωματιδίων χρυσού με τους υποκαταστάτες L_1H και L_2H , έναντι της καρκινικής κυτταρικής σειράς 4T1. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά αντιπροσωπεύει ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο τριπλά-αρνητικού καρκίνου του μαστού (Triple-Negative Breast Cancer-TNBC) [69]. Η καρκινική σειρά 4T1 εμφανίζει πολλά χαρακτηριστικά του ανθρώπινου καρκίνου του μαστού (στάδιο IV), συμπεριλαμβανομένης της μεταστατικής συμπεριφοράς σε ποντίκια, με αυθόρμητη μετάσταση στους λεμφαδένες, πνεύμονες, συκώτι, οστά και εγκέφαλο ενώ ο αρχικός όγκος εξακολουθεί να αυξάνεται [70]. Πρόκειται λοιπόν για μια καλά μεταμοσχεύσιμη καρκινική σειρά με αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού που διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό το πειραματικό μέρος της εργασίας [71].

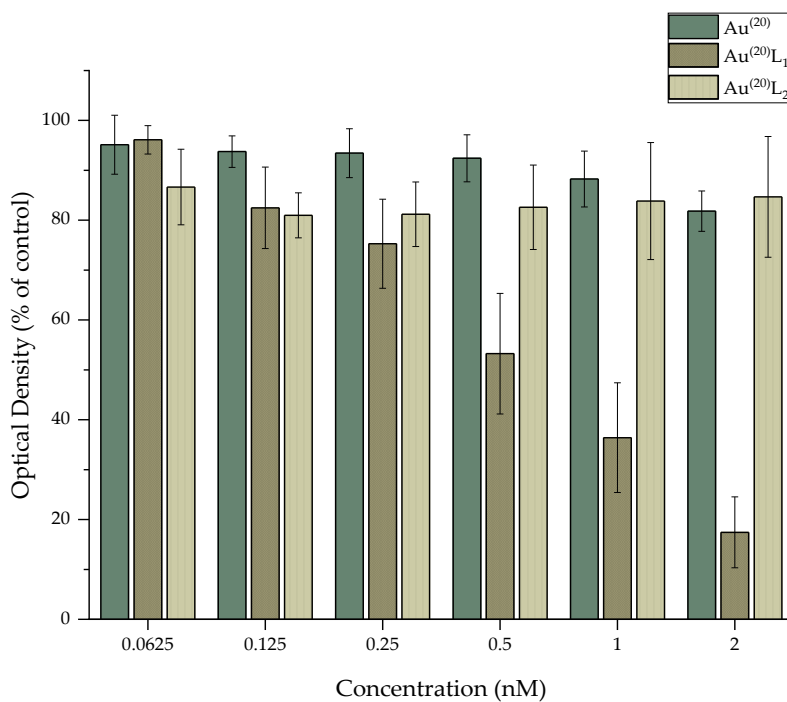
Τα δείγματα εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων χρυσού για 24 h. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στις Εικόνες 22 και 23 και έδειξαν ότι τα σκέτα νανοσωματίδια χρυσού με μέγεθος 2 nm καθώς και με 20 nm ($Au^{(2)}$ και $Au^{(20)}$ αντίστοιχα) δεν παρουσίασαν σχεδόν καθόλου τοξικότητα ακόμα και στην πιο υψηλή εξεταζόμενη συγκέντρωση (2 nM). Στην περίπτωση των AuNPs που τροποποιήθηκαν με τον L_1H , το σύμπλοκο $Au^{(2)}L_1$ παρουσίασε σημαντική τοξικότητα, με τη βιωσιμότητα των κυττάρων να μειώνεται σταδιακά από 77% στην χαμηλότερη συγκέντρωση (0.0625 nM) σε 6% στην υψηλότερη συγκέντρωση (2 nM), ενώ το σύμπλοκο $Au^{(20)}L_1$ έδειξε παρόμοια τοξικότητα, με τη βιωσιμότητα των κυττάρων να μειώνεται από 96% στην χαμηλότερη συγκέντρωση (0.0625 nM) σε 17% στην υψηλότερη συγκέντρωση (2 nM). Από την άλλη πλευρά, τα νανοσωματίδια χρυσού που είχαν τροποποιηθεί με τον L_2H , έδειξαν πολύ μικρότερη τοξικότητα συγκριτικά με τα τροποποιημένα με τον L_1H , με τη βιωσιμότητα των κυττάρων να κυμαίνεται από 91% στην χαμηλότερη συγκέντρωση (0.0625 nM) έως 77% στην υψηλότερη συγκέντρωση (2 nM) για το σύμπλοκο $Au^{(2)}L_2$, ενώ για το σύμπλοκο $Au^{(20)}L_2$ η κυτταρική βιωσιμότητα κυμαίνεται από 87% στην χαμηλότερη συγκέντρωση (0.0625 nM) έως 84% στην υψηλότερη συγκέντρωση (2 nM).

Επιπλέον αξιολογήθηκε η κυτταροτοξικότητα των σκέτων L_1H και L_2H και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στην Εικόνα 24. Στην περίπτωση του L_1H , οι τιμές βιωσιμότητας μειώθηκαν σταδιακά από 47% σε 7%, ενώ στην περίπτωση του L_2H τα επίπεδα βιωσιμότητας κυμάνθηκαν περίπου στο 70% σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, υποδεικνύοντας ότι η παρουσία των $Au^{(2)}NPs$ και $Au^{(20)}NPs$, δεν μεταβάλλει τη βιολογική επίδραση των

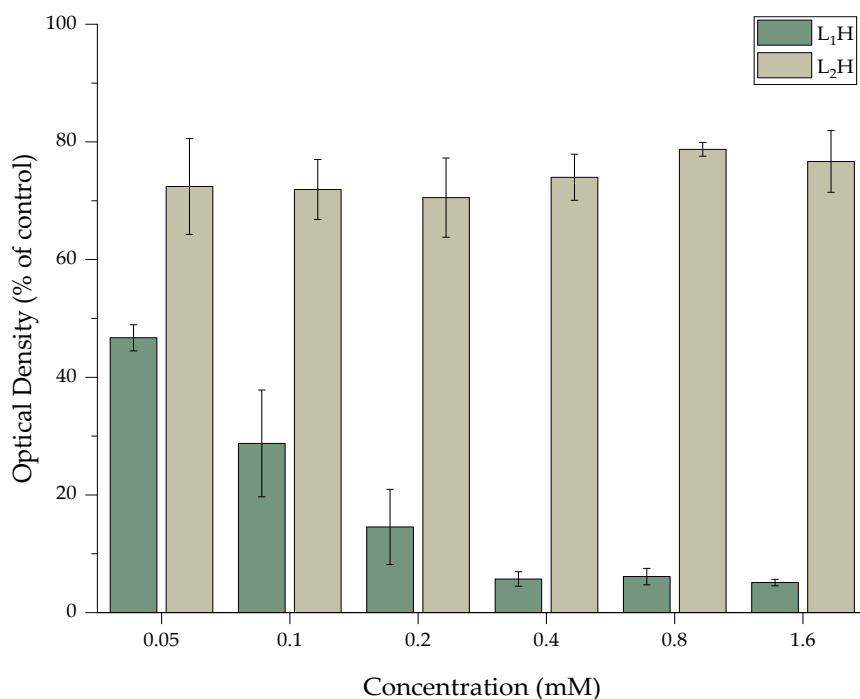
υποκαταστατών στα κύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις η παρουσία του υποκαταστάτη L₁H που φέρει πυριδίνη στην επιφάνεια του, τόσο όταν τροποποιείται με τα Au⁽²⁾NPs όσο και όταν τροποποιείται με τα Au⁽²⁰⁾NPs προκαλεί μια τοξικότητα σε σχέση με τον L₂H. Το γεγονός αυτό, μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στη δομή, το μέγεθος, τη στερεοχημεία κ.τ.λ. των υποκαταστατών και χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση.



Εικόνα 22. Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT στην καρκινική κυτταρική σειρά 4T1 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των Au⁽²⁾, Au⁽²⁾L₁, και Au⁽²⁾L₂



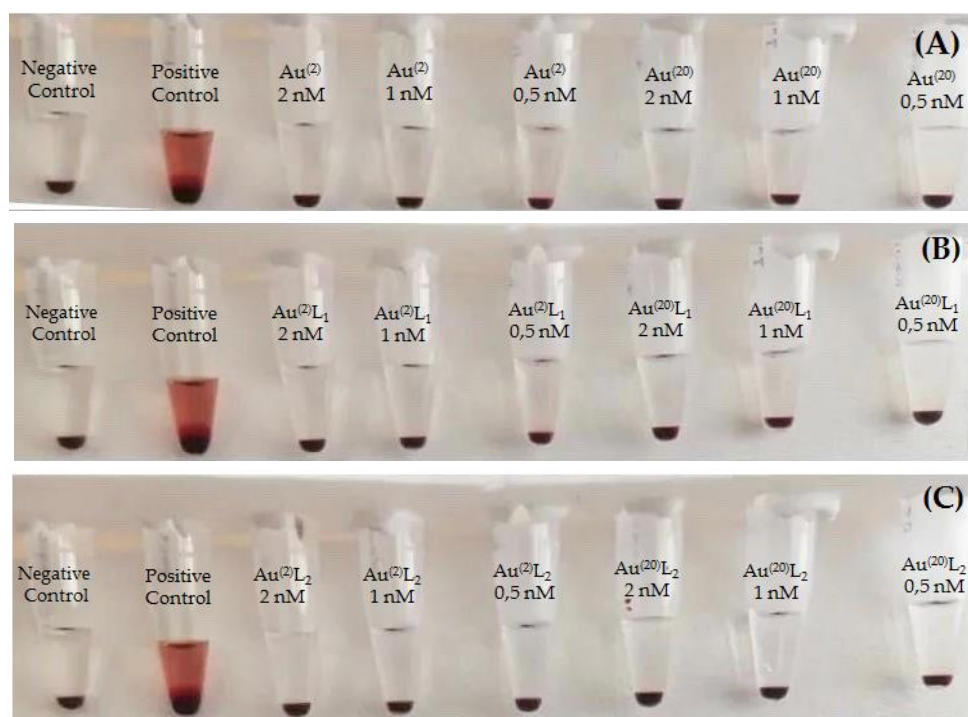
Εικόνα 23. Προσδιορισμό κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT στην καρκινική κυτταρική σειρά 4T1 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των Au⁽²⁰⁾, Au⁽²⁰⁾L₁, και Au⁽²⁰⁾L₂



Εικόνα 24. Προσδιορισμό κυτταροτοξικότητας με τη μέθοδο MTT στην καρκινική κυτταρική σειρά 4T1 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις των L₁H και L₂H. Οι εξεταζόμενες συγκεντρώσεις των υποκαταστατών αντιστοιχούν στις συγκεντρώσεις των AuNPs που χρησιμοποιήθηκαν στο MTT.

Δοκιμασία Αιμόλυσης

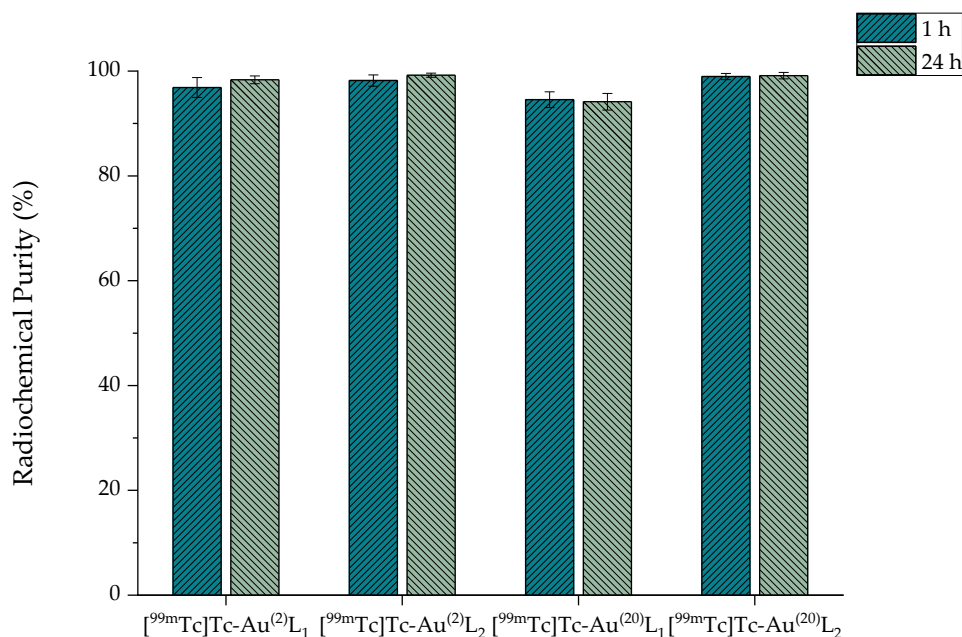
Η δοκιμασία αιμόλυσης μας δίνει τη δυνατότητα να αξιολογήσουμε τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) και των νανοσωματιδίων χρυσού. Όταν μια ένωση είναι τοξική για τα ερυθρά αιμοσφαίρια, η τονικότητα τους αλλάζει. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 285 μL PBS από την τελευταία φυγοκέντρηση με 15 μL ερυθρών αιμοσφαιρίων, ενώ σα θετικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 10 μL TRITON X 10% (το οποίο προκαλεί αιμόλυση), με 285 μL PBS και 15 μL ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στην Εικόνα 25 και έδειξαν ότι μετά την επώαση σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις, τα δείγματα δεν προκάλεσαν αιμόλυση, γεγονός που επιβεβαιώνει τη βιοσυμβατότητα τόσο των σκέτων όσο και των τροποποιημένων νανοσωματιδίων χρυσού.



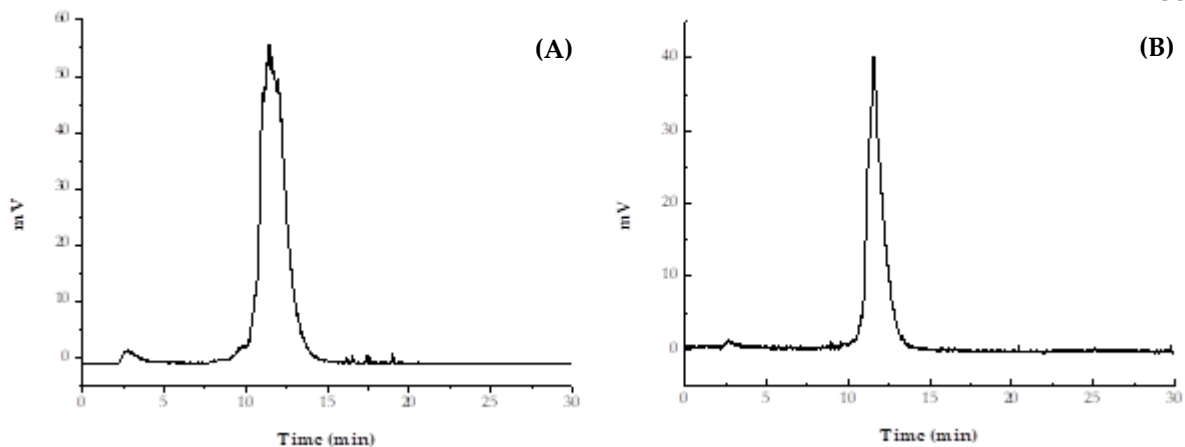
Εικόνα 25. Αποτελέσματα δοκιμασίας αιμόλυσης για τα σύμπλοκα (A) $\text{Au}^{(2)}$ και $\text{Au}^{(20)}$, (B) $\text{Au}^{(2)}\text{L}_1$ και $\text{Au}^{(20)}\text{L}_1$ και (C) $\text{Au}^{(2)}\text{L}_2$ και $\text{Au}^{(20)}\text{L}_2$ σε εξεταζόμενες συγκεντρώσεις 0.5 – 1 – 2 nM

Επισήμανση των συμπλόκων με $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$

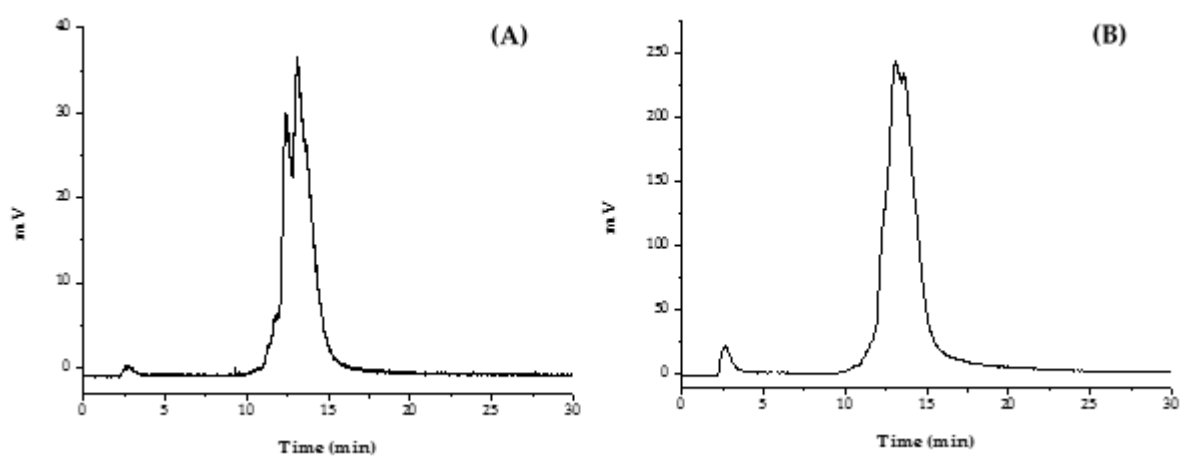
Η τροποποίηση των AuNPs με τους L_1H και L_2H και η επισήμανση με $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ περιγράφηκε παραπάνω. Στόχος της τροποποίησης των νανοσωματιδίων με τους υποκαταστάτες είναι να θα μπορεί άμεσα να ραδιοεπισημανθεί με $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$. Με την τροποποίηση σχηματίζονται ισχυροί δεσμοί Au-S μεταξύ των AuNPs και της ομάδας θειόλης που περιέχουν οι δύο υποκαταστάτες. Οι ομάδες θειόλης θεωρούνται ο πιο σημαντικός τρόπος σταθεροποίησης των AuNPs οποιουδήποτε μεγέθους [48,54]. Για το ημι-υδατικό ιόν $[^{99m}\text{Tc}][\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, ισχύει ότι το μεταλλικό κέντρο βρίσκεται σε οξειδωτική κατάσταση +1. Τα μόρια του H_2O είναι ευκίνητα και αντικαθίστανται με τα τρία άτομα N που λειτουργούν ως άτομα δότες και περιέχονται σε καθένα από τους δύο υποκαταστάτες που χρησιμοποιούνται. Η απόδοση των επισημασμένων συμπλόκων βρέθηκε να είναι ~85%. Στη συνέχεια όμως, γίνεται καθαρισμός με φυγοκέντρηση και η ραδιοχημική καθαρότητα για όλα τα δείγματα βρέθηκε να είναι >95%, η οποία παρέμεινε σταθερή για τουλάχιστον 24 h. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στην Εικόνα 26, ενώ τα διαγράμματα από την HPLC στις Εικόνες 27,28,29 και 30.



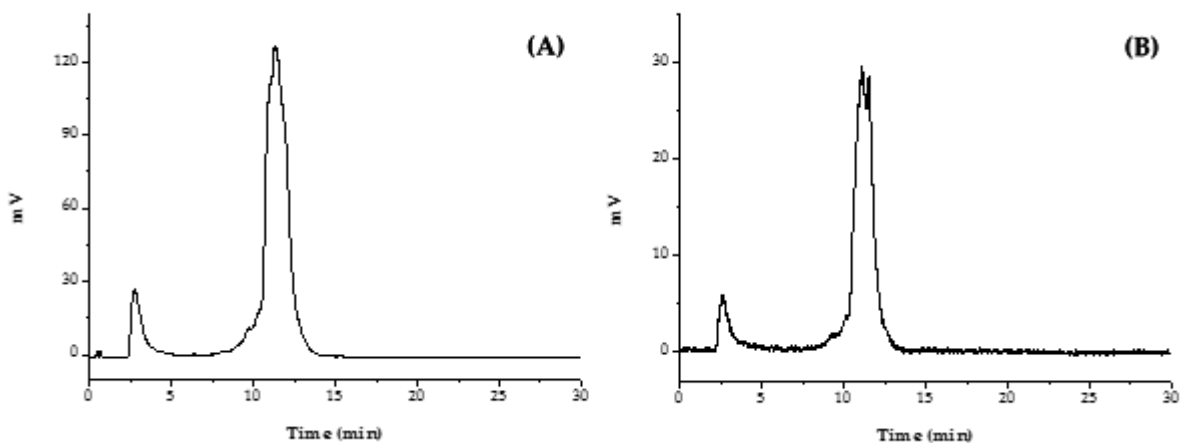
Εικόνα 26. Αποτελέσματα της HPLC που αναπαριστούν την ραδιοχημική καθαρότητα των συμπλόκων $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(2)}L_1$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(2)}L_2$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(20)}L_1$ και $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(20)}L_2$ στη 1 h και 24 h μετά την επισήμανση



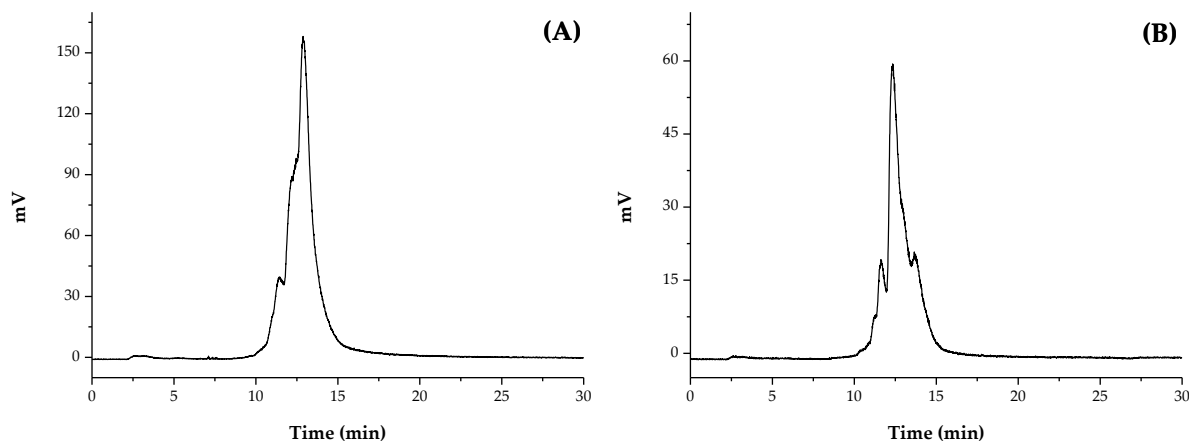
Εικόνα 27. Διαγράμματα της HPLC που αναπαριστούν την ραδιοχημική καθαρότητα του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(2)}\text{L}_1$ στη (A) 1 h και (B) 24 h μετά την επισήμανση



Εικόνα 28. Διαγράμματα της HPLC που αναπαριστούν την ραδιοχημική καθαρότητα του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(2)}\text{L}_2$ στη (A) 1 h και (B) 24 h μετά την επισήμανση



Εικόνα 29. Διαγράμματα της HPLC που αναπαριστούν την ραδιοχημική καθαρότητα του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(20)}\text{L}_1$ στη (A) 1 h και (B) 24 h μετά την επισήμανση



Εικόνα 30. Διαγράμματα της HPLC που αναπαριστούν την ραδιοχημική καθαρότητα του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(20)}\text{L}_2$ στη (A) 1 h και (B) 24 h μετά την επισήμανση

Ωστόσο, μέχρι να καταλήξουμε στις ποσότητες των AuNPs και των υποκαταστατών που χρησιμοποιήθηκαν εν τέλει, έγιναν διάφορες πειραματικές δοκιμές οι οποίες όμως δεν κατέληξαν σε ικανοποιητικές επισημάνσεις με ευδιάκριτες κορυφές και συνοψίζονται για το κάθε δείγμα στους Πίνακες 3,4,5 και 6.

Πίνακας 3. Πειραματικές δοκιμές για την επισήμανση του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(2)}\text{L}_1$

Ποσότητα AuNPs (nmol)	Ποσότητα L_1H (μmol)	Ποσοστό επισήμανσης (%)
45	2.7	74
2.3	0.8	77
2.3	8	72
0.001	0.8	85

Πίνακας 4. Πειραματικές δοκιμές για την επισήμανση του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(2)}\text{L}_2$

Ποσότητα AuNPs (nmol)	Ποσότητα L_2H (μmol)	Ποσοστό επισήμανσης (%)
9	0.8	45
90	0.8	60
2.4	0.2	53.5
4.6	0.4	60.2

2.3	0.8	62.3
0.001	0.8	85

Πίνακας 5. Πειραματικές δοκιμές για την επισήμανση του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(20)}\text{L}_1$

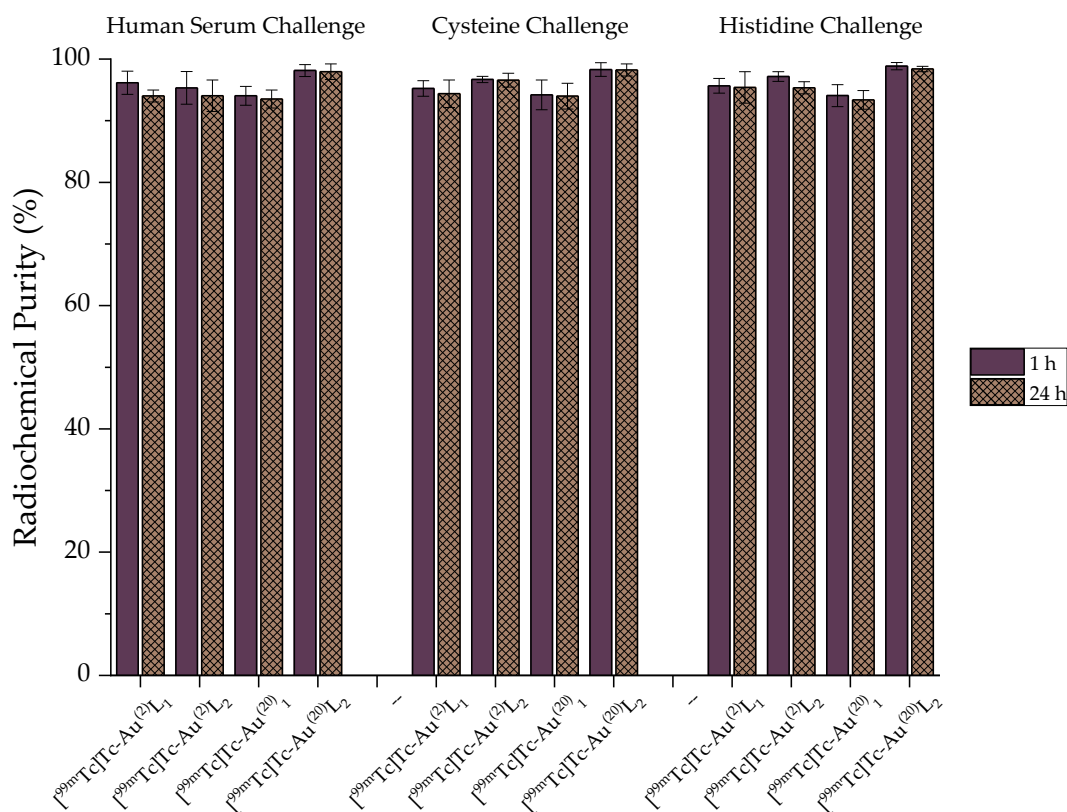
Ποσότητα AuNPs (nmol)	Ποσότητα L_1H (μmol)	Ποσοστό επισήμανσης (%)
0.004	6	75
0.004	6.2	64
0.0015	0.8	67.8
0.0001	8	60.2
0.001	0.8	85

Πίνακας 6. Πειραματικές δοκιμές για την επισήμανση του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(20)}\text{L}_2$

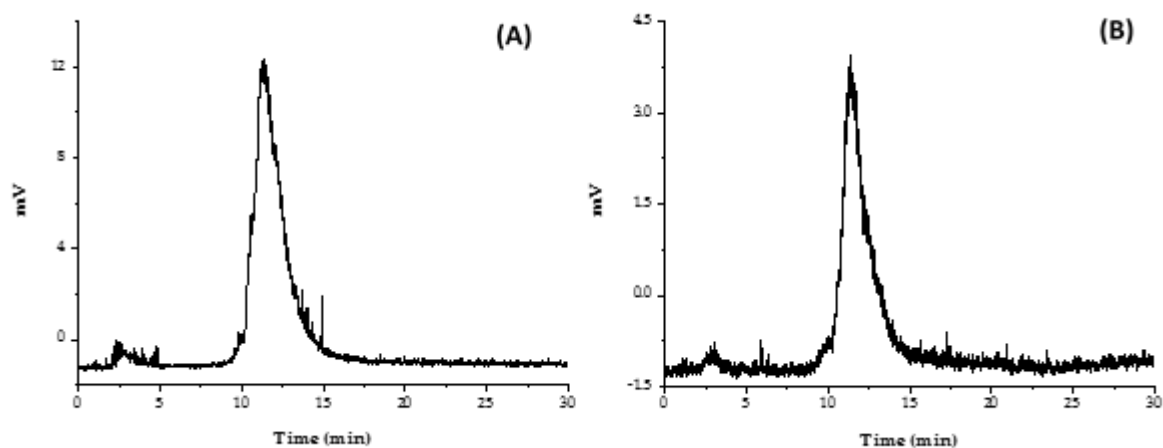
Ποσότητα AuNPs (nmol)	Ποσότητα L_2H (μmol)	Ποσοστό επισήμανσης (%)
0.0007	0.8	60
0.004	0.8	60
0.004	6.2	72
0.0006	0.9	73.3
0.0004	0.4	62
0.0002	0.2	52
0.0015	0.8	67
0.001	0.8	85

Μελέτες *in vitro* σταθερότητας

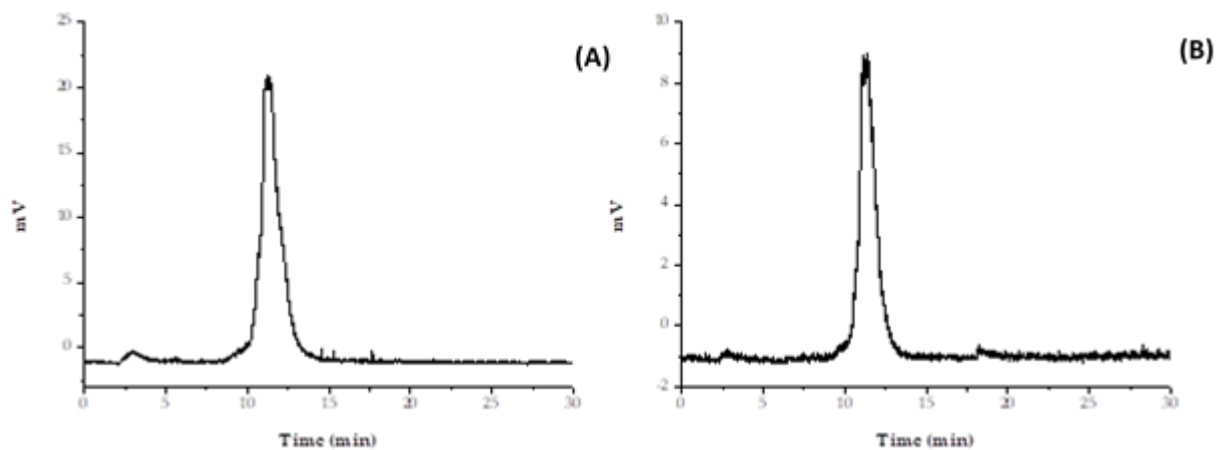
Τα ραδιοεπισημασμένα σύμπλοκα παρουσίασαν ικανοποιητική *in vitro* σταθερότητα τόσο στον ανθρώπινο ορό, όσο και σε διαλύματα κυστεΐνης και ιστιδίνης στους 37°C για 1 h και 24 h. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την ισχυρή δέσμευση του ^{99m}Tc στην επιφάνεια των AuNPs, ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο την πιθανή χρήση τους ως παράγοντες απεικόνισης SPECT. Τα αποτελέσματα ελέγχθηκαν με HPLC και έδειξαν ότι τα σύμπλοκα παρέμειναν σταθερά, δηλαδή πάνω 95% έως και μετά από 24 h (Εικόνα 31). Τα αντίστοιχα διαγράμματα από την HPLC, αναπαριστώνται στις παρακάτω Εικόνες.



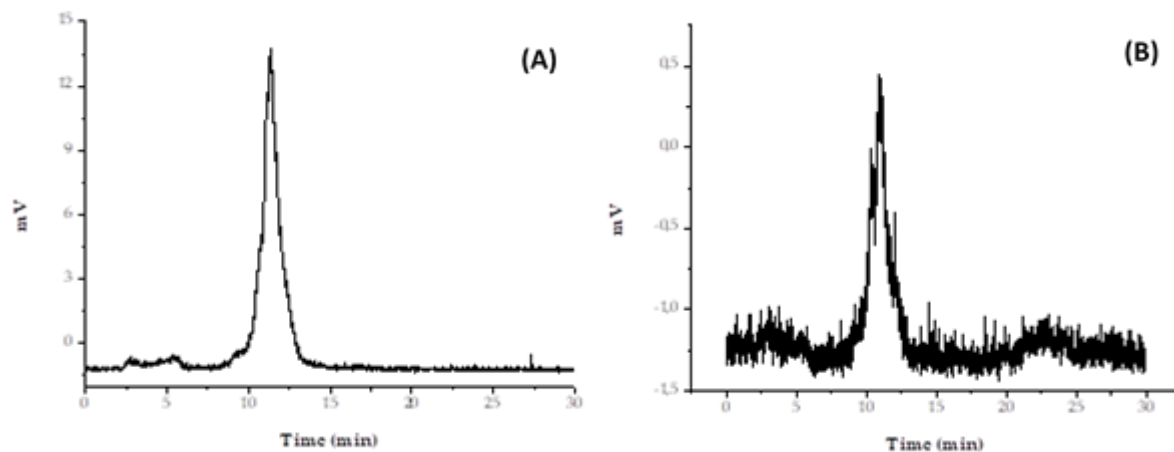
Εικόνα 31. *In vitro* σταθερότητα των [^{99m}Tc]Tc-Au⁽²⁾L₁, [^{99m}Tc]Tc-Au⁽²⁾L₂, [^{99m}Tc]Tc-Au⁽²⁰⁾L₁ and [^{99m}Tc]Tc-Au⁽²⁰⁾L₂ στη 1 h και 24 h μετά την επισήμανση



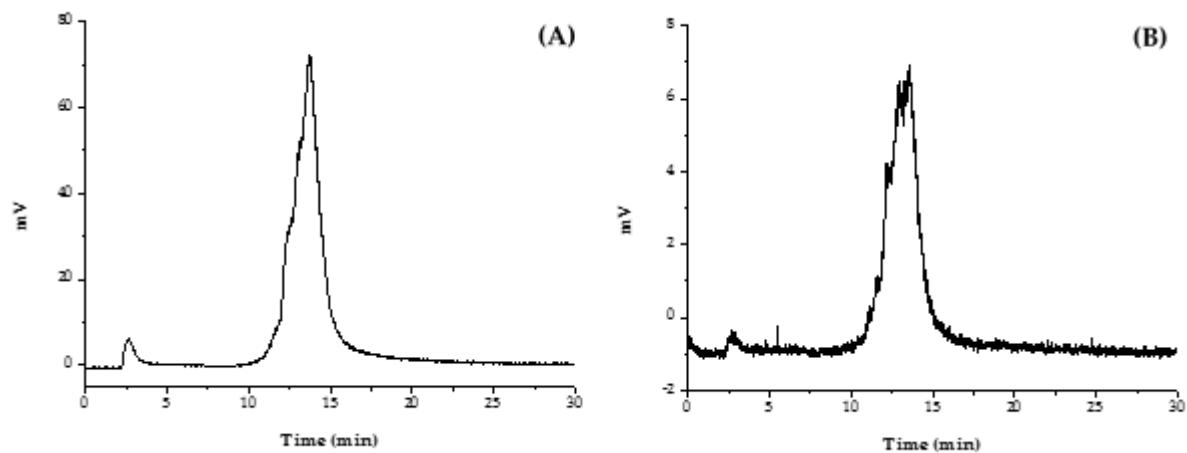
Εικόνα 32. Διαγράμματα της HPLC που αναπαριστούν την *in vitro* σταθερότητα του συμπλόκου [^{99m}Tc]Tc-Au⁽²⁾L₁ σε διάλυμα κυστεΐνης στη (A) 1 h και (B) 24 h



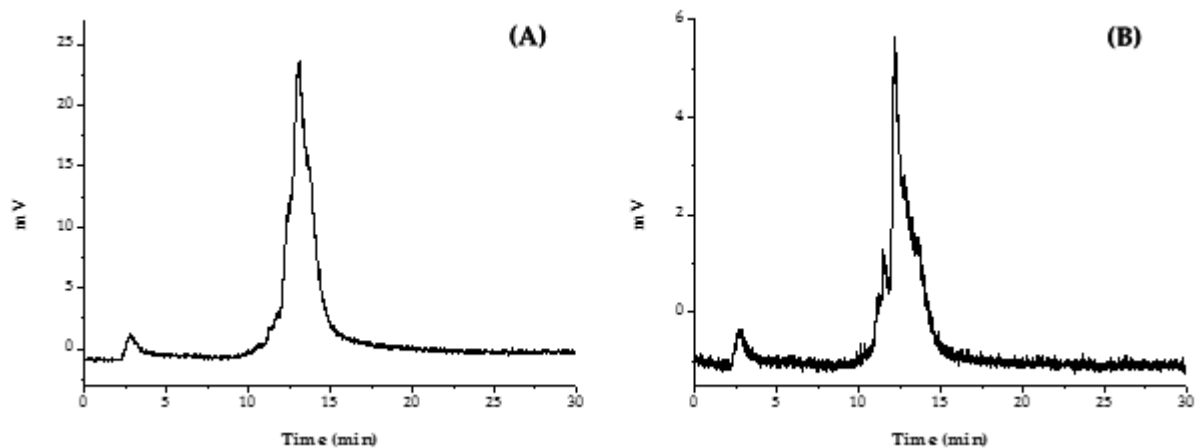
Εικόνα 33. Διαγράμματα της HPLC που αναπαριστούν την *in vitro* σταθερότητα του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(2)}\text{L}_1$ σε διάλυμα ιστιδίνης στη (A) 1 h και (B) 24 h



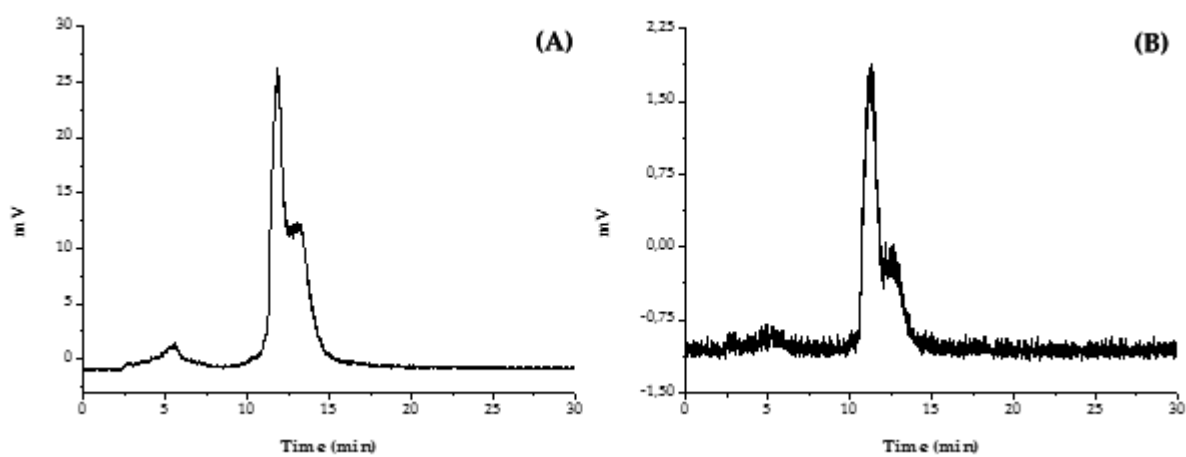
Εικόνα 34. Διαγράμματα της HPLC που αναπαριστούν την *in vitro* σταθερότητα του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(2)}\text{L}_1$ σε ανθρώπινο ορό στη (A) 1 h και (B) 24 h



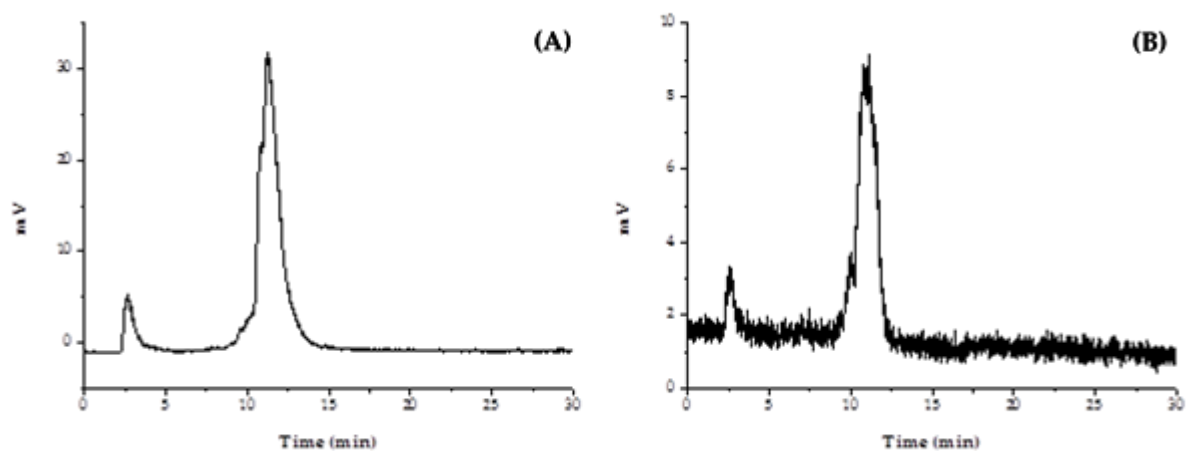
Εικόνα 35. Διαγράμματα της HPLC που αναπαριστούν την *in vitro* σταθερότητα του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(2)}\text{L}_2$ σε διάλυμα κυστεΐνης στη (A) 1 h και (B) 24 h



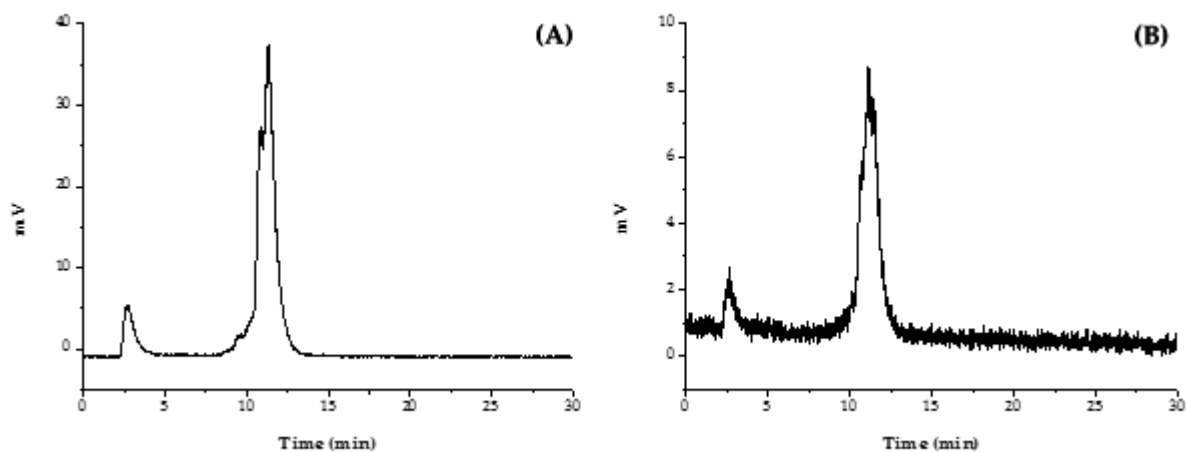
Εικόνα 36. Διαγράμματα της HPLC που αναπαριστούν την *in vitro* σταθερότητα του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(2)}\text{L}_2$ σε διάλυμα ισιδίνης στη (A) 1 h και (B) 24 h



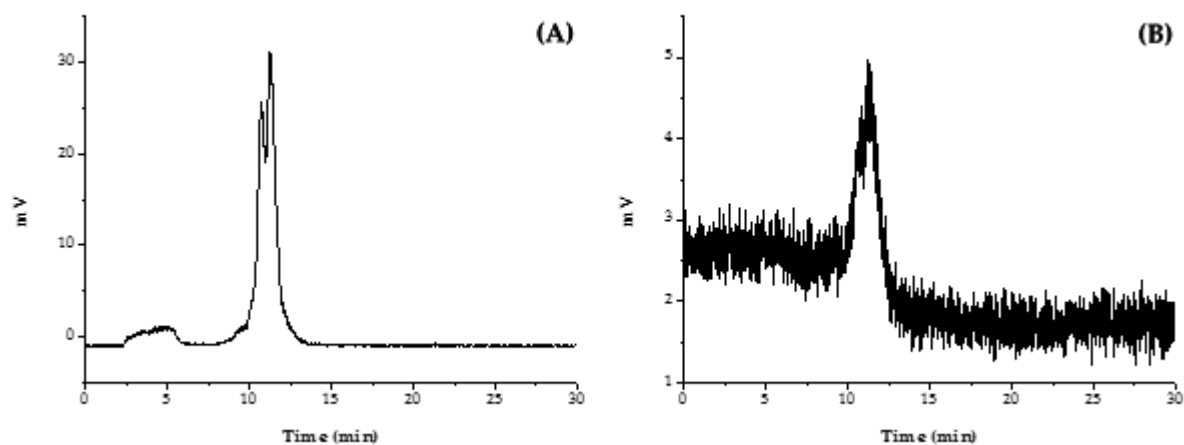
Εικόνα 37. Διαγράμματα της HPLC που αναπαριστούν την *in vitro* σταθερότητα του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(2)}\text{L}_2$ σε ανθρώπινο ορό στη (A) 1 h και (B) 24 h



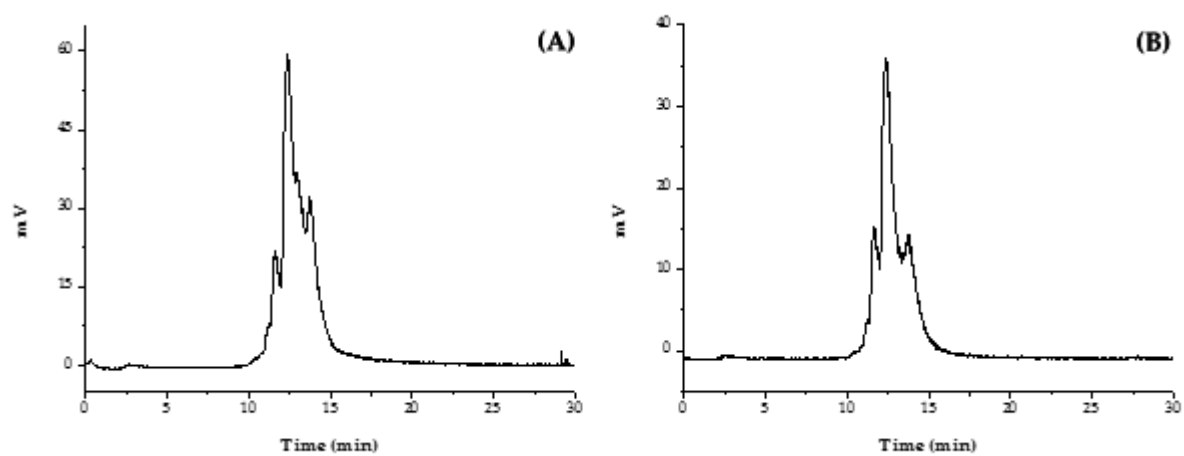
Εικόνα 38. Διαγράμματα της HPLC που αναπαριστούν την *in vitro* σταθερότητα του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(20)}\text{L}_1$ σε διάλυμα κυστεΐνης στη (A) 1 h και (B) 24 h



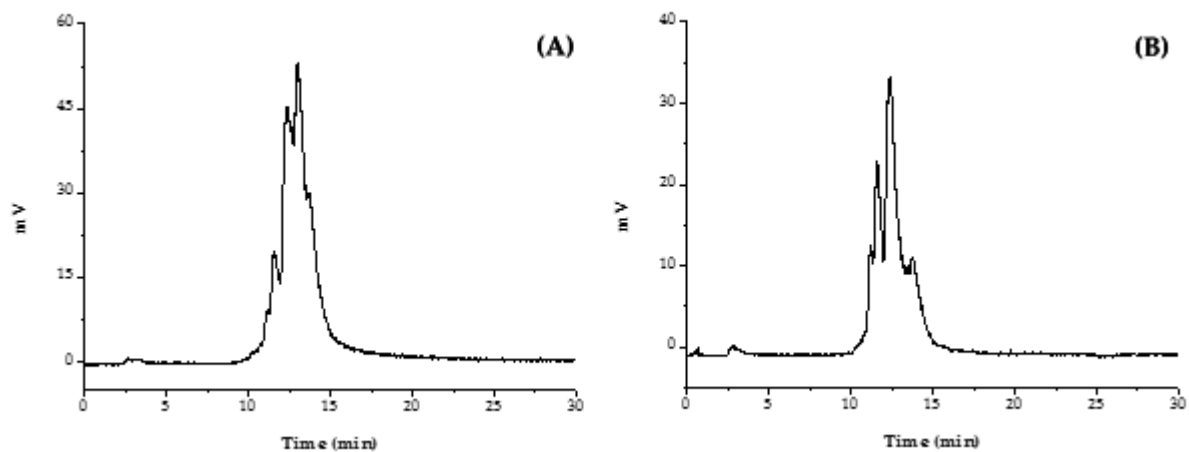
Εικόνα 39. Διαγράμματα της HPLC που αναπαριστούν την *in vitro* σταθερότητα του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(20)}\text{L}_1$ σε διάλυμα ισιδίνης στη (A) 1 h και (B) 24 h



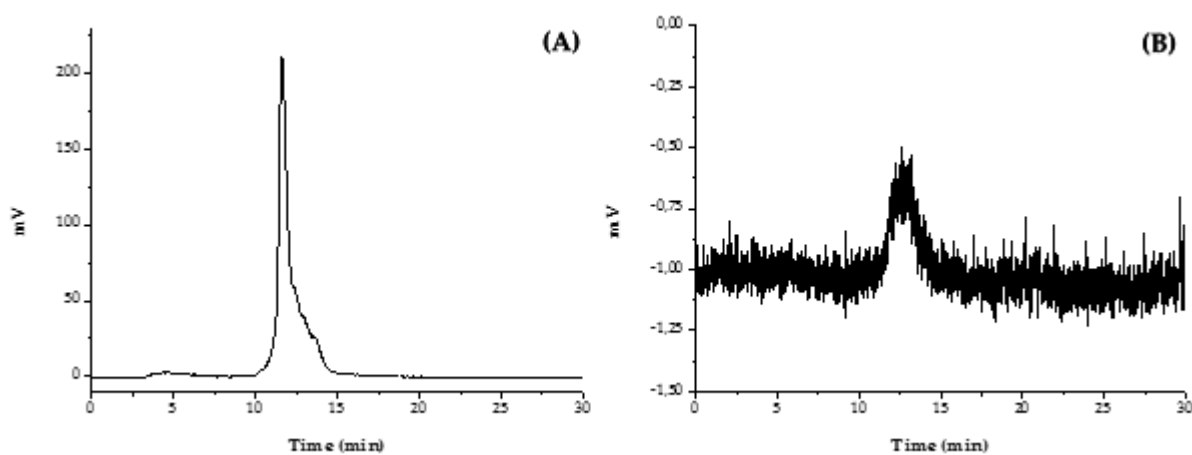
Εικόνα 40. Διαγράμματα της HPLC που αναπαριστούν την *in vitro* σταθερότητα του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(20)}\text{L}_1$ σε ανθρώπινο ορό στη (A) 1 h και (B) 24 h



Εικόνα 41. Διαγράμματα της HPLC που αναπαριστούν την *in vitro* σταθερότητα του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(20)}\text{L}_2$ σε διάλυμα κουρκεΐνης στη (A) 1 h και (B) 24 h



Εικόνα 42. Διαγράμματα της HPLC που αναπαριστούν την *in vitro* σταθερότητα του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(20)}\text{L}_2$ σε διάλυμα ιστιδίνης στη (A) 1 h και (B) 24 h



Εικόνα 43. Διαγράμματα της HPLC που αναπαριστούν την *in vitro* σταθερότητα του συμπλόκου $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(20)}\text{L}_2$ σε ανθρώπινο ορό στη (A) 1 h και (B) 24 h

Λιποφιλικότητα των συμπλόκων του ^{99m}Tc

Η λιποφιλία, εκφράζει τη συγγένεια του μορίου ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον. Αποτελεί φυσικοχημική ιδιότητα πρωταρχικής σημασίας για τη βιολογική δράση, διότι υπεισέρχεται τόσο στις παθητικές διαδικασίες όσο και στις διαδικασίες σύνδεσης, επηρεάζοντας τη φαρμακοκινητική αλλά και φαρμακοδυναμική συμπεριφορά. Ωστόσο, μπορεί να συσχετισθεί και με ανεπιθύμητα φαινόμενα. Πιο συγκεκριμένα, η αυξημένη λιποφιλία οδηγεί συνήθως: [72]

- Παρατεταμένη παραμονή μιας ουσίας στον οργανισμό με αποτέλεσμα την εμφάνιση αθροιστικών φαινομένων
- Αύξηση της τοξικότητας
- Επαγωγή των μικροσωμικών ενζύμων λόγω της τάσης του οργανισμού για άμυνα έναντι λιπόφιλων ουσιών
- Προβλήματα στη μορφοποίηση του τελικού προϊόντος

Η λιποφιλία εκφράζεται από το συντελεστή μερισμού P (Partition Coefficient), όπου αποτελεί θερμοδυναμική σταθερά, χαρακτηριστική για κάθε ένωση, εξαρτώμενη από το σύστημα διαλυτών και τη θερμοκρασία. Συνήθως χρησιμοποιείται υπό λογαριθμική μορφή ($\log P$). Για το προσδιορισμό της λιποφιλίας των συμπλόκων, χρησιμοποιήθηκαν η-οκτανόλη και ρυθμιστικό διάλυμα PBS (0.01 M, pH 7.4). Κατά τη διεξαγωγή του προσδιορισμού της λιποφιλικότητας πραγματοποιείται επανάληψη του πειράματος με τη διαφορά ότι χρησιμοποιείται μέρος της οκτανόλης από το προηγούμενο πείραμα (ή του PBS αν πρόκειται για υδρόφιλο σύμπλοκο). Τα αποτελέσματα για τα σύμπλοκα του ^{99m}Tc που παρασκευάστηκαν συνοψίζονται στο Πίνακα 7. Τα AuNPs που τροποποιήθηκαν με τον L_1H , παρουσίασαν μια υδρόφιλη συμπεριφορά, ενώ τα AuNPs που τροποποιήθηκαν με τον L_2H έδειξαν μια αυξημένη λιποφιλικότητα η οποία μπορεί να αποδοθεί στο λιπόφιλο χαρακτήρα του L_2H λόγω παρουσίας ομάδας κινολίνης στο μόριο αυτού του υποκαταστάτη.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα μελέτης λιποφιλικότητας των συμπλόκων του ^{99m}Tc

Ραδιοεπισημασμένο σύμπλοκο	$\log P$
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(2)}L_1$	-0.94 ± 0.24
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(20)}L_1$	-0.85 ± 0.16
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(2)}L_2$	2.39 ± 0.17
$[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(20)}L_2$	2.23 ± 0.20

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία, παρασκευάστηκαν τα σύμπλοκα $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(2)}\text{L}_1$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(2)}\text{L}_2$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(20)}\text{L}_1$ και $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-Au}^{(20)}\text{L}_2$. Χρησιμοποιήθηκαν AuNPs δύο διαφορετικών μεγεθών (2 nm και 20 nm) καθώς και δυο τριδραστικοί υποκαταστάτες που περιέχουν μια ομάδα θειόλης και τρία άτομα N.

Μελέτες σταθερότητας σε ανθρώπινο ορό και σε διαλύματα κυστεΐνης και ιστιδίνης έδειξαν ικανοποιητική *in vitro* σταθερότητα όλων των δειγμάτων για τουλάχιστον 24 h, ενισχύοντας τις δυνατότητες τους για χρήση ως παράγοντες SPECT.

Μελέτες λιποφιλικότητας των σχηματιζόμενων συμπλόκων έδειξαν ότι τα σύμπλοκα με τον L_2H παρουσιάζουν αυξημένη λιποφιλία, πιθανώς λόγω της λιπόφιλης φύσης του L_2H λόγω της παρουσίας κινολίνης.

Μελέτες κυτταροτοξικότητας στα σκέτα, τροποποιημένα νανοσωματίδια καθώς και στους σκέτους υποκαταστάτες έδειξαν ότι η παρουσία του L_1H στα νανοσωματίδια προκαλεί μια αυξημένη κυτταροτοξικότητα σε σχέση με τον L_2H , γεγονός που μπορεί να οφείλεται στις φυσικοχημικές ιδιότητες του L_1H . Τα δεδομένα αυτά, ενδεχομένως να περιορίσουν την μελλοντική εφαρμογή των συμπλόκων με τον L_1H σε βιολογικές κατανομές σε πειραματόζωα.

Η δοκιμασία αιμόλυσης, έδειξε ότι τόσο τα σκέτα όσο και τα τροποποιημένα νανοσωματίδια δε οδήγησαν σε αιμόλυση δείγματος ερυθρών αιμοσφαιρίων, γεγονός που επιβεβαιώνει τη βιοσυμβατότητα των δειγμάτων αυτών.

ΕΠΙΛΟΓΟΣ – ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Νανοσωματίδια χρυσού δύο διαφορετικών μεγεθών (2 nm και 20 nm) τροποποιήθηκαν επιφανειακά με δύο υποκαταστάτες με ομάδα θειόλης και τρία άτομα N (L₁H και L₂H). Η ομάδα θειόλης δρα ως «άγκυρα» για την επιφάνεια των AuNPs, σχηματίζοντας ισχυρούς δεσμούς Au-S, ενώ τα τρία άτομα N επιτρέπουν την πρόσδεση του πυρήνα [^{99m}Tc][^{99m}Tc(CO)₃]⁺ που προέρχεται από το πρόδρομο σύμπλοκο [^{99m}Tc][Tc(H₂O)₃(CO)₃]⁺. Τα ευκίνητα μόρια του H₂O μπορούν εύκολα και αντικαθίστανται από τα τρία άτομα N που περιέχουν και οι δυο τριδραστικοί χηλικοί υποκαταστάτες. Η ραδιοεπιψήμανση των συμπλόκων είναι γρήγορη (2 h) και αποτελεσματική, με τη ραδιοχημική καθαρότητα να ξεπερνάει το 95% σε όλα τα δείγματα για τουλάχιστον 24 h. Επίσης, ικανοποιητική εμφανίζεται και *in vitro* σταθερότητα τόσο σε ανθρώπινο ορό, όσο και σε διαλύματα κυστεΐνης και ιστιδίνης. Αφού ολοκληρώθηκε πλήρως η *in vitro* μελέτη των ραδιοεπισημασμένων συμπλόκων, έχει ήδη ξεκινήσει και η *in vivo* αξιολόγηση τους η οποία θα περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

- Βιοκατανομές σε φυσιολογικά και παθολογικά πειραματόζωα σε 4 διαφορετικούς χρόνους (1, 2, 4 και 24 h) έτσι ώστε να διερευνηθεί η *in vivo* κινητική των νανοσωματιδίων και να γίνει σύγκριση μεταξύ των δυο μεγεθών των νανοσωματιδίων
- Διερεύνηση παθητικής στόχευση (passive targeting) στον όγκο
- Διερεύνηση της επίδρασης της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων στην *in vivo* κινητική τους
- Απεικόνιση του παθολογικού πειραματικού μοντέλου σε γάμμα κάμερα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Χιωτέλλης, Ε. Ραδιοφαρμακευτική Χημεία. Τόμος Α, **1998**.
2. Ling, X.; Cutler, C.S.; Anderson, C.J. *The Radiopharmaceutical Chemistry of the Radioisotopes of Copper*, **2019**. ISBN 9783319989464.
3. Elisa Crestoni, M. *Radiopharmaceuticals for Diagnosis and Therapy*, Elsevier Inc., **2018**. ISBN 9780124095472.
4. Χιωτέλλης, Ε. Ραδιοφαρμακευτική Χημεία. Τόμος Β, **2000**.
5. Ilem-Ozdemir, D.; Atlihan Gundogdu, E.; Ekinci, M.; Ozgenc, E.; Asikoglu, M. *Nuclear medicine and radiopharmaceuticals for molecular diagnosis*; Elsevier Inc., **2019**. ISBN 9780128165065.
6. Breeman, W.A.P.; Verbruggen, A.M. The $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator has high potential, but when can we use ^{68}Ga -labelled tracers in clinical routine? *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2007**, *34*, 978–981, doi:10.1007/s00259-007-0387-4.
7. Alauddin, M.M. Positron emission tomography (PET) imaging with ^{18}F -based radiotracers. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2012**, *2*, 55–76.
8. Δεμέτζος Κ.Ν. Φαρμακευτική Νανοτεχνολογία: Βασικές αρχές και πρακτικές εφαρμογές, **2014**.
9. Pellico, J.; Gawne, P.J.; T. M. De Rosales, R. Radiolabelling of nanomaterials for medical imaging and therapy. *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, *50*, 3355–3423, doi:10.1039/d0cs00384k.
10. Kunjachan, S.; Ehling, J.; Storm, G.; Kiessling, F.; Lammers, T. Noninvasive Imaging of Nanomedicines and Nanotheranostics: Principles, Progress, and Prospects. *Chem. Rev.*, **2015**, *115*, 10907–10937, doi:10.1021/cr500314d.
11. Gu, M.; Wang, X.; Toh, T.B.; Chow, E.K.H. Applications of stimuli-responsive nanoscale drug delivery systems in translational research. *Drug Discov. Today*, **2018**, *23*, 1043–1052, doi:10.1016/j.drudis.2017.11.009.
12. Carvalho, A.; Fernandes, A.R.; Baptista, P. V. *Nanoparticles as Delivery Systems in Cancer Therapy*; Elsevier Inc., **2019**. ISBN 9780128140291.
13. Akbarzadeh, A.; Rezaei-sadabady, R.; Davaran, S.; Joo, S.W.; Zarghami, N. Liposome : classification , preparation , and applications., **2013**, 1–9.

14. Deb, P.K.; Al-Attraqchi, O.; Chandrasekaran, B.; Paradkar, A.; Tekade, R.K. *Protein/peptide drug delivery systems: Practical considerations in pharmaceutical product development*; Elsevier Inc., **2018**. ISBN 9780128179093.
15. Hawkins, M.J.; Soon-Shiong, P.; Desai, N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, *60*, 876–885, doi:10.1016/j.addr.2007.08.044.
16. Bhunchu, S.; Rojsitthisak, P. Biopolymeric alginate-chitosan nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. *Pharmazie*, **2014**, *69*, 563–570, doi:10.1691/ph.2014.3165.
17. Dasgupta, I.; Chatterjee, A. Recent advances in miRNA delivery systems. *Methods Protoc.*, **2021**, *4*, 1–18, doi:10.3390/mps4010010.
18. Thakore, S.I.; Solanki, A.; Das, M. *Exploring potential of polymers in cancer management*; Elsevier Inc., **2019**. ISBN 9780128184332.
19. Abbasi, E.; Aval, S.F.; Akbarzadeh, A.; Milani, M.; Nasrabadi, H.T. Dendrimers : synthesis , applications , and properties., **2014**, 1–10.
20. Matea, C.T.; Mocan, T.; Tabaran, F.; Pop, T.; Mosteanu, O.; Puia, C.; Iancu, C.; Mocan, L. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. *Int. J. Nanomedicine*, **2017**, *12*, 5421–5431, doi:10.2147/IJN.S138624.
21. Karageorgou, M.A.; Vranješ-Djurić, S.; Radović, M.; Lyberopoulou, A.; Antić, B.; Rouchota, M.; Gazouli, M.; Loudos, G.; Xanthopoulos, S.; Sideratou, Z.; et al. Gallium-68 labeled iron oxide nanoparticles coated with 2,3-dicarboxypropane-1,1-diphosphonic acid as a potential PET/MR imaging agent: A proof-of-concept study. *Contrast Media Mol. Imaging*, **2017**, doi:10.1155/2017/6951240.
22. Downing, M.A.; Jain, P.K. *Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, properties, and biomedical applications*; Elsevier Inc., **2019**. ISBN 9780128166628.
23. Kokorina, A.A.; Ermakov, A. V.; Abramova, A.M.; Goryacheva, I.Y.; Sukhorukov, G.B. Carbon nanoparticles and materials on their basis. *Colloids and Interfaces*, **2020**, *4*, 1–13, doi:10.3390/colloids4040042.
24. Aslam, M.M.A.; Kuo, H.W.; Den, W.; Usman, M.; Sultan, M.; Ashraf, H. Functionalized carbon nanotubes (Cnts) for water and wastewater treatment: Preparation to application. *Sustain.*, **2021**, *13*, 1–54, doi:10.3390/su13105717.
25. Dorsey, J.F.; Sun, L.; Joh, D.Y.; Witztum, A.; Zaki, A. Al; Kao, G.D.; Alonso-Basanta, M.; Avery, S.; Tsourkas, A.; Hahn, S.M. Gold nanoparticles in radiation research: Potential

- applications for imaging and radiosensitization. *Transl. Cancer Res.*, **2013**, *2*, 280–291, doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2013.08.09.
26. Ali, H.S.; El-Haj, B.M.; Saifullah, S.; Kawish, M. *Gold nanoparticles in cancer diagnosis and therapy*; Elsevier Inc., **2019**. ISBN 9780128169605.
27. Same, S.; Aghanejad, A.; Nakhjavani, S.A.; Barar, J.; Omidi, Y. Radiolabeled theranostics: Magnetic and gold nanoparticles. *BiolImpacts*, **2016**, *6*, 169–181, doi:10.15171/bi.2016.23.
28. Connor, D.M.; Broome, A.M. *Gold Nanoparticles for the Delivery of Cancer Therapeutics*; 1st ed.; Elsevier Inc., **2018**, *139*; ISBN 9780128141694.
29. De Freitas, L.F.; Varca, G.H.C.; Batista, J.G.D.S.; Lugão, A.B. An overview of the synthesis of gold nanoparticles using radiation technologies. *Nanomaterials*, **2018**, *8*, doi:10.3390/nano8110939.
30. Shah, M.; Badwaik, V.; Kherde, Y.; Waghwani, H.K.; Modi, T.; Aguilar, Z.P. Table of contents 1., **2014**, 1320–1344.
31. Huang, X.; El-Sayed, M.A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *J. Adv. Res.*, **2010**, *1*, 13–28, doi:10.1016/j.jare.2010.02.002.
32. Masson, J.F. Portable and field-deployed surface plasmon resonance and plasmonic sensors. *Analyst*, **2020**, *145*, 3776–3800, doi:10.1039/d0an00316f.
33. Hsu, C.W.; Zhen, B.; Qiu, W.; Shapira, O.; Delacy, B.G.; Joannopoulos, J.D.; Soljačić, M. Transparent displays enabled by resonant nanoparticle scattering. *Nat. Commun.*, **2014**, *5*, 1–6, doi:10.1038/ncomms4152.
34. Nakamura, Y.; Mochida, A.; Choyke, P.L.; Kobayashi, H. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? *Bioconjug. Chem.*, **2016**, *27*, 2225–2238, doi:10.1021/acs.bioconjchem.6b00437.
35. Gao, Q.; Zhang, J.; Gao, J.; Zhang, Z.; Zhu, H.; Wang, D. Gold Nanoparticles in Cancer Theranostics. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **2021**, *9*, 1–20, doi:10.3389/fbioe.2021.647905.
36. Danhier, F.; Feron, O.; Pr at, V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J. Control. Release*, **2010**, *148*, 135–146, doi:10.1016/j.jconrel.2010.08.027.

37. Mahmoudi, M.; Sant, S.; Wang, B.; Laurent, S.; Sen, T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2011**, *63*, 24–46, doi:10.1016/j.addr.2010.05.006.
38. Silva, F.; Campello, M.P.C.; Paulo, A. Radiolabeled gold nanoparticles for imaging and therapy of cancer. *Materials (Basel)*, **2021**, *14*, 1–32, doi:10.3390/ma14010004.
39. Enrique, M.A.; Mariana, O.R.; Mirshojaei, S.F.; Ahmadi, A. Multifunctional radiolabeled nanoparticles: Strategies and novel classification of radiopharmaceuticals for cancer treatment. *J. Drug Target.*, **2015**, *23*, 191–201, doi:10.3109/1061186X.2014.988216.
40. Trent, R.J. *Molecular Medicine*; Elsevier Inc., **2012**. ISBN 9780123814517.
41. Morales-Avila, E.; Ferro-Flores, G.; Ocampo-García, B.E.; De León-Rodríguez, L.M.; Santos-Cuevas, C.L.; García-Becerra, R.; Medina, L.A.; Gómez-Oliván, L. Multimeric system of ^{99m}Tc-labeled gold nanoparticles conjugated to c[RGDfK(C)] for molecular imaging of tumor $\alpha(v)\beta(3)$ expression. *Bioconjug. Chem.*, **2011**, *22*, 913–922, doi:10.1021/bc100551s.
42. Zhu, J.; Chin, J.; Wängler, C.; Wängler, B.; Lennox, R.B.; Schirmacher, R. Rapid ¹⁸F-labeling and loading of PEGylated gold nanoparticles for in vivo applications. *Bioconjug. Chem.*, **2014**, *25*, 1143–1150, doi:10.1021/bc5001593.
43. Ng, Q.K.T.; Olariu, C.I.; Yaffee, M.; Taelman, V.F.; Marincek, N.; Krause, T.; Meier, L.; Walter, M.A. Indium-111 labeled gold nanoparticles for in-vivo molecular targeting. *Biomaterials*, **2014**, *35*, 7050–7057, doi:10.1016/j.biomaterials.2014.04.098.
44. Yim, M.S.; Hwang, Y.S.; Bang, J.K.; Jung, D.W.; Kim, J.M.; Yi, G.R.; Lee, G.; Ryu, E.K. Morphologically homogeneous, pH-responsive gold nanoparticles for non-invasive imaging of HeLa cancer. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, **2021**, *34*, 102394, doi:10.1016/j.nano.2021.102394.
45. Pretze, M.; van der Meulen, N.P.; Wängler, C.; Schibli, R.; Wängler, B. Targeted ⁶⁴Cu-labeled gold nanoparticles for dual imaging with positron emission tomography and optical imaging. *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **2019**, *62*, 471–482, doi:10.1002/jlcr.3736.
46. Zhao, Y.; Sultan, D.; Detering, L.; Cho, S.; Sun, G.; Pierce, R.; Wooley, K.L.; Liu, Y. Copper-64-alloyed gold nanoparticles for cancer imaging: Improved radiolabel stability and diagnostic accuracy. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **2014**, *53*, 156–159, doi:10.1002/anie.201308494.

47. Chilug, L.E.; Leonte, R.A.; Patrascu, M.E.B.; Ion, A.C.; Tuta, C.S.; Raicu, A.; Manda, G.; Niculae, D. In vitro binding kinetics study of gold nanoparticles functionalized with ⁶⁸Ga-DOTA conjugated peptides. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **2017**, *311*, 1485–1493, doi:10.1007/s10967-016-5075-z.
48. Felber, M.; Bauwens, M.; Mateos, J.M.; Imstepf, S.; Mottaghy, F.M.; Alberto, R. ^{99m}Tc Radiolabeling and Biological Evaluation of Nanoparticles Functionalized with a Versatile Coating Ligand. *Chem. - A Eur. J.*, **2015**, *21*, 6090–6099, doi:10.1002/chem.201405704.
49. Jiménez-Mancilla, N.; Ferro-Flores, G.; Santos-Cuevas, C.; Ocampo-García, B.; Luna-Gutiérrez, M.; Azorín-Vega, E.; Isaac-Olivé, K.; Camacho-López, M.; Torres-García, E. Multifunctional targeted therapy system based on ^{99m}Tc/ ¹⁷⁷Lu-labeled gold nanoparticles-Tat(49-57)-Lys3-bombesin internalized in nuclei of prostate cancer cells. *J. Label. Compd. Radiopharm.*, **2013**, *56*, 663–671, doi:10.1002/jlcr.3087.
50. Dziawer, Ł.; Majkowska-Pilip, A.; Gawęł, D.; Godlewska, M.; Pruszyński, M.; Jastrzębski, J.; Wąs, B.; Bilewicz, A. Trastuzumab-modified gold nanoparticles labeled with ²¹¹At as a prospective tool for local treatment of HER2-positive breast cancer. *Nanomaterials*, **2019**, *9*, doi:10.3390/nano9040632.
51. Dziawer, L.; Koźmiński, P.; Męczyńska-Wielgosz, S.; Pruszyński, M.; Łyczko, M.; Wąs, B.; Celichowski, G.; Grobelny, J.; Jastrzębski, J.; Bilewicz, A. Gold nanoparticle bioconjugates labelled with ²¹¹At for targeted alpha therapy. *RSC Adv.*, **2017**, *7*, 41024–41032, doi:10.1039/c7ra06376h.
52. Salvanou, E.A.; Stellas, D.; Tsoukalas, C.; Mavroidi, B.; Paravatou-petsotas, M.; Kalogeropoulos, N.; Xanthopoulos, S.; Denat, F.; Laurent, G.; Bazzi, R.; et al. A proof-of-concept study on the therapeutic potential of au nanoparticles radiolabeled with the alpha-emitter actinium-225. *Pharmaceutics*, **2020**, *12*, 1–15, doi:10.3390/pharmaceutics12020188.
53. Cai, W.; Gao, T.; Hong, H.; Sun, J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnol. Sci. Appl.*, **2008**, *1*, 17–32, doi:10.2147/NSA.S3788.
54. Mazzi, U.; Schibli, R.; Pietzsch, H.J.; Künstler, J.U.; Spies, H. Technetium in Medicine. In *Technetium-99m, Pharmaceuticals*; Zolle, I., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, **2007**, 7–58.
55. Alberto, R. Technetium. *Comprehensive Coordination Chemistry II.*, **2003**, *5*, 127-270.

56. Sattelberger, A.P.; Bryan, J.C. Technetium. *Comprehensive Coordination Chemistry II.*, **1995**, *8*, 151-166.
57. Dilworth, J.R.; Parrott, S.J. The biomedical chemistry of technetium and rhenium. *Chem. Soc. Rev.*, **1998**, *27*, 43–55, doi:10.1039/a827043z.
58. Abram, U.; Alberto, R. Technetium and rhenium - Coordination chemistry and nuclear medical applications. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2006**, *17*, 1486–1500, doi:10.1590/S0103-50532006000800004.
59. Chakravarty, R.; Ram, R.; Dash, A.; Pillai, M.R.A. Preparation of clinical-scale ⁹⁹Mo/^{99m}Tc column generator using neutron activated low specific activity ⁹⁹Mo and nanocrystalline γ -Al₂O₃ as column matrix. *Nucl. Med. Biol.*, **2012**, *39*, 916–922, doi:10.1016/j.nucmedbio.2012.03.010.
60. Varga, J. An Introduction to Nuclear Medicine. *Nucl. Radiochem. Second Ed.*, **2018**, 369–397, doi:10.1016/B978-0-12-813643-0.00012-3.
61. Newberg, A.B.; Alavi, A. Single photon emission computed tomography. *Curated Ref. Collect. Neurosci. Biobehav. Psychol.*, **2016**, 861–870, doi:10.1016/B978-0-12-809324-5.02487-1.
62. Turkevich, J.; Stevenson, P.C.; Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.*, **1951**, *11*, 55–75, doi:10.1039/DF9511100055.
63. Ackerson, C.J.; Jadzinsky, P.D.; Sexton, J.Z.; Bushnell, D.A.; Kornberg, R.D. Synthesis and bioconjugation of 2 and 3 nm-diameter gold nanoparticles. *Bioconjug. Chem.*, **2010**, *21*, 214–218, doi:10.1021/bc900135d.
64. Lazarova, N.; Babich, J.; Valliant, J.; Schaffer, P.; James, S.; Zubieta, J. Thiol- and thioether-based bifunctional chelates for the {M(CO)₃}⁺ core (M = Tc, Re). *Inorg. Chem.*, **2005**, *44*, 6763–6770, doi:10.1021/ic050735a.
65. Vishwanatha, T.M.; Bergamaschi, E.; Dömling, A. Sulfur-Switch Ugi Reaction for Macrocyclic Disulfide-Bridged Peptidomimetics. *Org. Lett.*, **2017**, *19*, 3195–3198, doi:10.1021/acs.orglett.7b01324.
66. Papadopoulou, S.; Kolokithas-ntoukas, A.; Salvanou, E.; Gaitanis, A.; Xanthopoulos, S.; Avgoustakis, K.; Gazouli, M.; Paravatou-petsotas, M.; Tsoukalas, C.; Bakandritsos, A.; et al. Chelator-Free / Chelator-Mediated Radiolabeling of Colloidally Stabilized Iron Oxide

- Nanoparticles for Biomedical Imaging., **2021**, 1–19.
67. Schibli, R.; La Bella, R.; Alberto, R.; Garcia-Garayoa, E.; Ortner, K.; Abram, U.; Schubiger, P.A. Influence of the denticity of ligand systems on the in vitro and in vivo behavior of ^{99m}Tc(I)-tricarbonyl complexes: A hint for the future functionalization of biomolecules. *Bioconjug. Chem.*, **2000**, *11*, 345–351, doi:10.1021/bc990127h.
 68. Paparidis, G.; Akrivou, M.; Tsachouridou, V.; Shegani, A.; Vizirianakis, I.S.; Pirmettis, I.; Papadopoulos, M.S.; Papagiannopoulou, D. Synthesis and evaluation of ^{99m}Tc/Re-tricarbonyl complexes of the triphenylphosphonium cation for mitochondrial targeting. *Nucl. Med. Biol.*, **2018**, *57*, 34–41, doi:10.1016/j.nucmedbio.2017.11.003.
 69. Dexter, D.L.; Kowalski, H.M.; Blazar, B.A.; Fligiel, Z.; Vogel, R.; Gloria, H.; Heppner, H. Heterogeneity of Tumor Cells from a Single Mouse Mammary Tumor. *Cancer Res.*, **1978**, *38*, 3174–3181.
 70. Krystofiak, E.S.; Matson, V.Z.; Steeber, D.A.; Oliver, J.A. Elimination of tumor cells using folate receptor targeting by antibody-conjugated, gold-coated magnetite nanoparticles in a murine breast cancer model. *J. Nanomater.*, **2012**, doi:10.1155/2012/431012.
 71. Heppner, G.H.; Miller, F.R.; Shekhar, P.V.M. Nontransgenic models of breast cancer. *Breast Cancer Res.*, **2000**, *2*, 331–334, doi:10.1186/bcr77.
 72. Δημόπουλος, Β.; Τσαντίλη-Κακουλίδου, Α. Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Φαρμάκων. **2015**. ISBN 9789606031908.