



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Σύνθεση Αμφίφιλων Πολυπεπτιδικών Πολυμερών βασισμένα
στην πολυ(Ιστιδίνη), για την Μελέτη Εγκλωβισμού και
Αποδέσμευσης Αντικαρκινικών Φαρμάκων»**

**ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΒΑΡΒΑΡΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ MSc**

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2022

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Σύνθεση Πολυπετιδικών Πολυμερών βασισμένα στην πολυ(Ιστιδίνη), για την Μελέτη Εγκλωβισμού και Αποδέσμευσης Αντικαρκινικών Φαρμάκων

ΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΒΑΡΒΑΡΑ

A.M.: 001707

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ερμόλαος Ιατρού, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ
Πιτσικάλης Μαρίνος, Καθηγητής ΕΚΠΑ
Δήμας Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιατρού Ερμόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Πιτσικάλης Μαρίνος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Σακελλαρίου Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Χατζηχρηστίδη Μαργαρίτα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Γκιμήσης Αθανάσιος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Δήμας Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παν. Θεσσαλίας

Φραγκούλη Παναγιώτα, Επίκουρος Καθηγήτρια ΠΑΔΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 26/10/2022

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή παρουσιάζεται η σύνθεση μίας σειράς πολυπεπτιδικών συμπολυμερών βασισμένα στην πολυ(ιστιδίνη). Η σύνθεσή τους πραγματοποιήθηκε μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των προστατευμένων *N*-καρβοξυ ανυδριτών (μονομερή), με χρήση αμινο-τελικού πολυ(αιθυλενοξειδίου) (*m*PEO-NH₂) ως μακροαπαρχητή. Για τη σύνθεση των *N*-καρβόξυ ανυδριτών των α -αμινοξέων, τον καθαρισμό των διαλυτών, αλλά και για τη λήψη καλά καθορισμένων πολυμερών, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές υψηλού κενού, εξασφαλίζοντας υψηλή καθαρότητα στο σύστημα. Η επιτυχής σύνθεση όλων των πολυμερών επιβεβαιώθηκε με τις τεχνικές της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC), του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (¹H-NMR) και της φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR). Επιπλέον, μελετήθηκε η εξάρτηση της δευτεροταγούς δομής των πολυπεπτιδίων από το pH και τη θερμοκρασία με την τεχνική του κυκλικού διχρωϊσμού (CD). Η τεχνική της Δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) χρησιμοποιήθηκε, προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα αυτοοργάνωσης και το μέγεθος των συντιθέμενων νανοσωματιδίων, ενώ το επιφανειακό τους φορτίο προσδιορίστηκε με την τεχνική του ζ-δυναμικού. Επιπροσθέτως, αποδείχθηκε ότι τα πολυπεπτιδικά πολυμερή του τύπου PEO-*b*-PHis έχουν την ικανότητα να αυτοοργανώνονται σε υδατικά διαλύματα και να σχηματίζουν μικυλλιακές δομές, από υδρόφιλο κέλυφος πολυ(αιθυλενοξειδίου) και υδρόφοβο pH-αποκρινόμενο πυρήνα πολυ(ιστιδίνης). Το πολυπεπτιδικό συμπολυμερές PEO-*b*-PHis έχει την ικανότητα να εγκλωβίζει και να αποδεσμεύει το αντικαρκινικό φάρμακο της σισπλατίνης, με ένα στοχευμένο και ελεγχόμενο τρόπο, σε συνθήκες καρκινικού ιστού, αλλά και της δοξορουβικίνης, όπως αποκάλυψαν *in vitro* μελέτες αποδέσμευσης σε κύτταρα καρκίνου του μαστού.

Τέλος, παρουσιάζεται μια καινούρια, απλή και έξυπνη στρατηγική για τη σύνθεση υβριδικών νανοσωματιδίων που περιέχουν νανοκελύφη χρυσού (AuNSs) και έχουν την ικανότητα να απορροφούν στην εγγύς υπέρυθρη ακτινοβολία (near-infrared). Υβριδικά πολυπεπτιδικά του τύπου poly(ethylene oxide)-*b*-poly(L-histidine), poly(ethylene oxide)-*b*-poly(L-histidine)-*b*-poly(L-phenylalanine) και poly(ethylene oxide)-*b*-poly(L-histidine)-*b*-poly(γ -benzyl-L-glutamate) συντέθηκαν

για την ανάπτυξη των AuNSs. Αρχικά σχηματίστηκαν σφαιρικά νανοσωματίδια (NPs) από την αυτό-οργάνωση των αμφίφιλων συμπολυπετιδίων στο νερό. Η προσθήκη του HAuCl_4 και η θέρμανση που ακολούθησαν, είχαν ως αποτέλεσμα στην αναγωγή του Au(III) από την PHis οδηγώντας στον σχηματισμό νανοσωματιδίων χρυσού μόνο στο στρώμα της PHis με αποτέλεσμα το σχηματισμό νανοκελύφους χρυσού. Τα συντιθέμενα νανοσωματίδια αποτελούνται από μια εξωτερική στιβάδα PEO, από μια στιβάδα PHis, η οποία περιέχει τη νανοστιβάδα χρυσού και έναν πυρήνα PPhe ή PBLG αντίστοιχα. Ελέγχοντας το πάχος του AuNS και τη διάμετρο του πυρήνα από τα μοριακά χαρακτηριστικά των προδρόμων πολυμερών, καθώς και την αναλογία PHis/Au(III), οι οπτικές ιδιότητες των AuNSs μπορούν να ρυθμιστούν για να απορροφούν σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Έτσι, επιτύχαμε μια μετατόπιση του μεγίστου της απορρόφησης που αντιστοιχεί στον διαμήκη επιφανειακό συντονισμό πλασμονίου σε μήκη κύματος στο NIR. Το μέγεθος και η μορφολογία των AuNPs εξετάστηκαν με TEM και DLS. Μελέτες σχετικά με την αύξηση της θερμοκρασίας των διαλυμάτων NPs που ακτινοβολούνται με laser χαμηλής ακτινοβολίας στα 808 nm έδειξαν την ικανότητα των νανοσωματιδίων (NPs) να προκαλούν θερμική κατάλυση στα κύτταρα. Παρουσιάζουμε μια νέα προσέγγιση για το σχεδιασμό και την εύκολη σύνθεση βιοσυμβατών πολυμερικών νανοσωματιδίων με AuNSs με μέγιστη οπτική απορρόφηση στο NIR, καθιστώντας τα χρήσιμα βιοϋλικά όχι μόνο για μοριακή απεικόνιση αλλά και για φωτοθερμική θεραπεία.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Πολυμερή

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Πολυπεπίδια, δευτεροταγής δομή, μεταφορά φαρμάκων, βιοϋλικά, βιοσυμβατά νανοσωματίδια, νανοκελύφη χρυσού, πολυπεπίδια, επιφανειακός συντονισμός πλασμονίου. φωτοθερμική θεραπεία

ABSTRACT

In the present research project, the synthesis of a series of hybrid polypeptide copolymers based on poly(histidine) is presented. The synthesis of polymers was achieved through ring-opening polymerization (ROP) process of the corresponding protected *N*-carboxy anhydrides (monomers), using an amine end-functionalized poly(ethylene oxide) (*m*PEO-NH₂) macroinitiator. High-vacuum techniques were used for the synthesis of *N*-carboxy anhydrides of α -amino acids, for the purification of solvents and for the isolation of well-defined polymers as well, ensuring the high purity of the system. The successful synthesis of the polymers was confirmed by Size Exclusion Chromatography (SEC), proton Nuclear Magnetic Resonance (¹H-NMR) and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). In addition, the relation between the secondary structure of the polypeptides, and the pH and the temperature were studied, using the technique of circular dichroism (CD). Dynamic Light Scattering (DLS) was employed, in order to investigate the ability of the polypeptides to self-assemble into micelles, as well as their size. Z-potential measurements revealed the surface charge of the synthesized nanoparticles. These amphiphilic copolymers of the PEO-*b*-PHis type possess the ability to self-assemble in aqueous media and form micelle-like nanostructures, comprised of an outer hydrophilic corona of poly(ethylene oxide) chains, and a pH- responsive hydrophobic core based on poly(histidine). These nanoparticles have the ability to encapsulate and release the anticancer drug of cis-platin in a controlled manner at cancer tissue conditions, as well as doxorubicin, as *in vitro* trials in breast cancer cell lines revealed.

Finally, a new facile strategy for the synthesis of hybrid nanoparticles containing gold nanoshells (AuNSs) that absorb at near-infrared is presented. Poly(ethylene oxide)-*b*-poly(L-histidine), poly(ethylene oxide)-*b*-poly(L-histidine)-*b*-poly(L-phenylalanine) and poly(ethylene oxide)-*b*-poly(L-histidine)-*b*-poly(γ -benzyl-L-glutamate) hybrid copolypeptides were used for the development of AuNSs. Spherical nanoparticles (NPs) were initially formed by the self-assembly of the amphiphilic hybrid polypeptides in water. The addition of HAuCl₄ followed by heating, resulted on the reduction of the Au(III) by PHis leading to the formation of

gold nanoparticles only at the layer of PHis, thus forming a nanoshell within the preformed NPs. The NPs formed are composed of a PEO shell, a PHis layer containing the nanoshell and a PPhe or PBLG core. By controlling the AuNS thickness and the core diameter by the molecular characteristics of the polymeric precursors as well as the PHis/Au(III) ratio, the optical properties of the AuNSs can be fine-tuned to absorb at a specific wavelength. Thus, we achieved a shift of the absorption peak corresponding to longitudinal surface plasmon resonance to NIR wavelengths. The size and the morphology of AuNPs were examined by TEM and Dynamic Light Scattering. Studies on the temperature increase of NP solutions irradiated by a low radiation laser at 808 nm showed the ability of the NPs to induce thermal ablation to cells. We present a novel approach for the design and facile synthesis of biocompatible polymeric nanoparticles featuring AuNSs with a peak optical absorption in the NIR, rendering them useful biomaterials not only for molecular imaging but also for photothermal therapy.

SUBJECT AREA: Polymers

KEYWORDS: polypeptides, secondary structure, drug delivery, biomaterials, biocompatible nanoparticles, gold nanoshells, polypeptides, surface plasmon resonance, photothermal therapy

***Στους πιο σημαντικούς ανθρώπους της ζωής μου, στον σύζυγό μου, την
οικογένειά μου και στον μικρό μου πρίγκιπα...***

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Φτάνοντας εις πέρας τη διδακτορική μου διατριβή θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτού του ταξιδιού.

Αρχικά, για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Ερμόλαο Ιατρού για την ευκαιρία που μου έδωσε να γνωρίσω καλύτερα το κομμάτι της επιστήμης και να εξελιχθώ, τη συνεργασία, την καθοδήγησή του αλλά και την επιστημονική και ηθική υποστήριξή του. Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Μαρίνο Πιτσικάλη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γεώργιο Σακελλαρίου, για γνώσεις που μας μετέδωσαν στα πλαίσια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος ειδίκευσης καθώς και τη στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια του διδακτορικού.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Κωνσταντίνο Δήμα, για την τεράστια συνεισφορά του στην εργασία αυτή, με τη διεξαγωγή των *in vitro* και *in vivo* πειραμάτων καθώς και την άριστη συνεργασία και την εμπιστοσύνη του. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας κ. Νικόλαο Θωμαΐδη καθώς και τον μεταδιδακτορικό ερευνητή κ. Μάριο Κωστάκη για τη συνεργασία και την πολύτιμη βοήθειά τους με τη διεξαγωγή των μετρήσεων ICP-MS. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Γεώργιο Πατιά και τον καθηγητή του κ. D. M. Haddleton από το πανεπιστήμιο Warwick για τη συνεργασία τους και τη διεξαγωγή των μετρήσεων TEM.

Ιδιαίτερως, θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα την κα. Παναγιώτα Φραγκούλη, Επίκουρο Καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, η οποία με βοήθησε σε οτιδήποτε και αν χρειάστηκα. Ευχαριστώ ακόμη τον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή κ. Ιωάννη Χοινόπουλο για τις πολύτιμες συμβουλές αλλά και την πρακτική βοήθειά του σε πολλά θέματα, καθώς και την κα. Julie Stain που ήταν πάντα δίπλα μας σε ό,τι κι αν χρειαστήκαμε.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα εργαστηριακά μου αδέρφια, τα οποία με τη συνεργασία και τη στήριξή τους έκαναν αυτό το ταξίδι ακόμα πιο όμορφο. Ιδιαίτερως θα ήθελα να ευχαριστήσω την διδάκτορα κα. Δήμητρα Σταυρουλάκη, με

την οποία ήμασταν μαζί από την αρχή ως το τέλος, για την πολύτιμη βοήθειά της σε εργαστηριακό αλλά και σε προσωπικό επίπεδο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα κα. Φωτεινή Αρφαρά για την εξαιρετική συνεργασία και τη φιλία που αναπτύξαμε. Δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα κα. Νικολέττα Ρόκα για την τεράστια βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω καθένα ξεχωριστά, όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, για το χρόνο που αφιέρωσαν στη μελέτη, διόρθωση και αξιολόγηση της παρούσας εργασίας, καθώς επίσης και για όλη την επιστημονική συνεισφορά τους στη διεκπεραίωσή της.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω από καρδιάς τους δικούς μου ανθρώπους, την οικογένειά μου, οι οποίοι μου έδωσαν όλα αυτά τα εφόδια, για να φτάσω ως εδώ και με έμαθαν να αγωνίζομαι και να παλεύω για τα όνειρά μου ξεπερνώντας κάθε εμπόδιο και δυσκολία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	7
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	18
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	22
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	30
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	38
2.1 Γενικά για τον καρκίνο [4]	38
2.2 Καρκίνος του μαστού	40
2.3 Καρκίνος των ωθηκών	43
2.4 Νανοτεχνολογία στην αντικαρκινική θεραπεία	48
2.4.1 Επίδραση του φαινομένου EPR	48
2.4.2 Πολυμερικά μικύλλια	50
2.4.3 Άλλα θεραπευτικά νανοσυστήματα και μεταξύ τους σύγκριση [15].....	52
2.5 Αποκρινόμενα Νανοσυστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων [29, 30]	55
2.5.1 Φυσικώς αποκρινόμενα πολυμερή	57
2.5.2 Χημικώς αποκρινόμενα πολυμερή	59
2.5.3 Βιολογικώς αποκρινόμενα.....	60
2.5.4 Διπλά αποκρινόμενα	61
2.6 Δοξορουβικίνη.....	64
2.8 Θεωρητική προσέγγιση των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία	78
2.8.1 Πολυαιθυλενοξειδίο (PEO) [106 -117]	78
2.8.2 Πολυ(Ιστιδίνη) (PHis) [42, 118].....	78

2.8.3 Φαινυλαλανίνη (Phe)	81
2.8.4 Γλουταμικό οξύ.....	83
2.9 Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (Ring-Opening Polymerization, ROP)	87
2.9.1 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των <i>N</i> -καρβοξυ ανυδριτών (NCAs) των α -αμινοξέων.....	87
2.9.2 Μηχανιστικές μελέτες πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των NCAs	88
2.9.3 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με πρωτοταγείς αμίνες και χρήση τεχνικών υψηλού κενού 92	
2.10 Σύνθεση <i>N</i> -Καρβοξυ Ανυδριτών των α -Αμινοξέων (NCAs).....	95
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	98
3.1 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών	98
3.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου.....	102
3.3 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός	105
3.4 Δυναμική Σκέδαση Φωτός.....	109
3.5 Στατική Σκέδαση Φωτός.....	110
3.6 Ζ-Δυναμικό.....	112
3.7 Κυκλικός Διχρωϊσμός	116
3.8 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού	119
3.9 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διαπερατότητας.....	120
3.10 Φασματομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS).....	121
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	124
4.1 Τεχνικές Υψηλού Κενού (High Vacuum Techniques, HVT).....	124
4.2 Καθαρισμός διαλυτών και αντιδραστηρίων	127
4.3 Σύνθεση και Καθαρισμός των Μονομερών (<i>N</i> -Καρβόξυ Ανυδρίτες (NCA, <i>N</i> -Carboxy Anhydrides) των α -Αμινοξέων).....	131
4.3.1 Σύνθεση και καθαρισμός του <i>N</i> ^{im} -trityl-L-Histidine NCA (<i>N</i> ^{im} -Trt-L-HIS NCA)	
[42] 132	

4.3.2	Σύνθεση και καθαρισμός του γ -Benzyl-L-Glutamate NCA (BLG-NCA) [42, 174]	135
4.3.3	Σύνθεση του N-καρβοξυανυδρίτη της L-Phenylalanine (PHE-NCA) [175]...	137
4.4	Σύνθεση Πολυμερών	140
4.4.1	Σύνθεση του συμπολυμερούς Poly(Ethylene Oxide) ₂₂₈ - <i>block</i> -Poly(L-Histidine) _n (PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHIS _n)	141
4.4.2	Σύνθεση του Poly(Ethylene Oxide) ₁₂₈ - <i>block</i> -Poly(L-Histidine) ₂₂ - <i>block</i> -Poly(γ -Benzyl-L-Glutamate) _n (PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHIS ₂₂ - <i>b</i> -PBLG _n).....	145
4.4.3	Σύνθεση γραμμικών κατά συστάδες συμπολυμερών mPEO ₂₂₈ - <i>b</i> -Poly(L-Histidine) ₂₉ - <i>b</i> -Poly(L-Phenylalanine) _n (PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe _n)	148
4.5	Μελέτη Εγκλωβισμού του αντικαρκινικού φαρμάκου Σισπλατίνη	150
4.6	Μελέτη Αποδέσμευσης του αντικαρκινικού φαρμάκου Σισπλατίνη.....	152
4.7	Προετοιμασία Νανοσωματιδίων με Σισπλατίνη για <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> έλεγχο κυτταροτοξικότητας	153
4.8	Μελέτη Εγκλωβισμού του αντικαρκινικού φαρμάκου Δοξορουβικίνη	155
4.9	Μελέτη Αποδέσμευσης του αντικαρκινικού φαρμάκου Δοξορουβικίνη	158
4.10	Έλεγχος κυτταροτοξικότητας <i>in vitro</i> με τη μέθοδο SRB [177, 178]	158
4.11	Σύνθεση Νανοσωματιδίων Χρυσού βασισμένων στην πολυ (Ιστιδίνη)	161
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ		165
5.1	Χαρακτηρισμός N^{im} -Trityl-L-Histidine N-Carboxy Anhydride (N^{im} -Trityl-L-His NCA)	165
5.2	Χαρακτηρισμός του γ -Benzyl-L-Glutamate N-Carboxy Anhydride (BLG-NCA)..	167
5.3	Χαρακτηρισμός του N-καρβοξυανυδρίτη της L-Phenylalanine (Phe NCA).....	169
5.4	Χαρακτηρισμός των πολυμερών	171
5.4.1	Χαρακτηρισμός των πολυμερών του τύπου poly(ethyleneoxide) ₂₂₈ - <i>b</i> -poly(L-histidine) _n (PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis _n)	171
5.4.2	Χαρακτηρισμός των πολυμερών του τύπου poly(ethylene oxide) ₂₂₈ - <i>b</i> -poly(L-histidine) ₂₉ - <i>b</i> -poly(L-phenylalanine) _n (PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe _n)	175

5.4.3 Χαρακτηρισμός των κατά συστάδων συμπολυμερών του τύπου poly(ethyleneoxide) ₂₂₈ - <i>b</i> -poly(L-histidine) ₂₂ - <i>b</i> -poly(γ-benzyl-L-glutamate) _n (PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PBLG _n)	179
5.5 Μελέτη του κατά συστάδες συμπολυμερούς PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS).....	184
5.6 Μελέτη των πολυμερών του τύπου PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis _n με την τεχνική του Κυκλικού Διχρωϊσμού.....	190
5.7 Μελέτη του κατά συστάδες συμπολυμερούς PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ με την τεχνική του Z-Δυναμικού	193
5.8 Μελέτη των Νανοσωματιδίων με Σισπλατίνη	195
5.9 Αποτελέσματα Δέσμησης της Σισπλατίνης	200
5.10 Αποτελέσματα Αποδέσμησης της Σισπλατίνης	202
5.11 Αποτελέσματα <i>in vitro</i> και <i>in vivo</i> κυτταροτοξικότητας των Νανοσωματιδίων με Σισπλατίνη	203
5.12 Μελέτη των Νανοσωματιδίων με Δοξορουβικίνη.....	207
5.13 Αποτελέσματα Δέσμησης της Δοξορουβικίνης	211
5.14 Αποτελέσματα Αποδέσμησης της Δοξορουβικίνης σε ρυθμιστικά διαλύματα.....	212
5.15 Αποτελέσματα από τον έλεγχο κυτταροτοξικότητας <i>in vitro</i> με τη μέθοδο SRB	215
5.16 Μελέτη των Νανοσωματιδίων Χρυσού βασισμένων στην πολύ(Ιστιδίνη).....	218
5.16.1 Μελέτη των Νανοσωματιδίων Χρυσού με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης και του ζ-Δυναμικού.....	219
5.16.2 Μελέτη των Νανοσωματιδίων Χρυσού με την τεχνική του TEM.....	228
5.16.3 Μετρήσεις CD των συμπλόκων πολυπεπτιδίων/Au(III)	231
5.16.4 Φυσικο-Οπτικές Ιδιότητες των AuNPs.....	234
5.16.5 Αποδοτικότητα φωτοθερμικής μετατροπής των AuNPs.....	243
5.17 Συμπεράσματα - Μελλοντικοί Στόχοι.....	246
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	249

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ 252

ΑΝΑΦΟΡΕΣ 256

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Ταξινόμηση υποτύπων καρκίνου του μαστού [5].....	41
Εικόνα 2: Διάγραμμα για την ενισχυμένη επίδραση διεύδυσης και κατακράτησης που επιτρέπει την εισαγωγή μεγάλων μορίων στον καρκινικό ιστό.....	50
Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της δομής πυρήνα-κελύφους ενός πολυμερικού μικυλλίου [15]	52
Εικόνα 4: Διαφορετικοί τύποι αποκρινόμενων νανοσυστημάτων στην αντικαρκινική θεραπεία [30].....	57
Εικόνα 5: Διαγράμματα των επιφανειακών πλασμονίων. (Α) Πολλαπλασιαστική ενέργεια πλασμονίου (SPP) που παράγεται στη μεταλλική-διηλεκτρική διεπαφή. (Β) εντοπισμένος συντονισμός επιφανειακού πλασμονίου (LSPR) που παράγονται στα μεταλλικά νανοσωματίδια. (Γ) το πλασμό της επιφάνειας διασπάται με τρεις διαφορετικούς τρόπους (ηλεκτρόνιο σε φωτόνιο, ηλεκτρόνιο σε ηλεκτρόνιο και ηλεκτρόνιο σε φωνόνιο) και τελικά παράγει τοπική θέρμανση [81].	62
Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της δομής της δοξορουβικίνης	65
Εικόνα 7: Σχηματική Αναπαράσταση του συμπλόκου DOX-DNA	66
Εικόνα 8: Σχηματική Απεικόνιση της λιποσωμικής δοξορουβικίνης (Doxil)	68
Εικόνα 9: Χημικές δομές κλινικά εγκεκριμένων και αντικαρκινικών φαρμάκων πλατίνας που κυκλοφορούν στο εμπόριο	70
Εικόνα 10: Τέσσερα στάδια του μηχανισμού της σισπλατίνης και, κατ' επέκταση, των σχετικών αντικαρκινικών φαρμάκων από πλατίνα. (i) Κυτταρική πρόσληψη, (ii) εξίσωση/ενεργοποίηση, (iii) δέσμευση DNA και (iv) κυτταρική επεξεργασία αλλοιώσεων DNA που οδηγούν σε απόπτωση.....	72
Εικόνα 11: Ο σχηματισμός δίκλωνου μορίου DNA μέσω σύνδεσης με δεσμούςυδρογόνου των βάσεων θυμίνης-αδενίνης (ζεύγος TA) και κυτοσίνης-γουανίνης (ζεύγος CG). Με κόκκινο χρώμα και σε κόκκινο κύκλο δείχνονται τα άτομα αζώτου N7 της αδενίνης και της γουανίνης, τα οποία συνδέονται με τον λευκόχρυσο αντικαθιστώντας τα μόρια ύδατος στο σύμπλοκο $[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$	73

Εικόνα 12: Παραδείγματα ενώσεων προσθήκης (adducts) σισπλατίνης - τμημάτων DNA. Σε πράσινο κύκλο βρίσκονται οι βάσεις που αντικαθιστούν τα δύο άτομα χλωρίου (μόρια ύδατος μέσα στο κύτταρο) της σισπλατίνης και οι αντίστοιχοι συμβολισμοί.....	74
Εικόνα 13: Νανοφορείς που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά της σισπλατίνης.	77
Εικόνα 14: Τρόπος λειτουργίας της αντλίας πρωτονίων κατά την είσοδο πολυμερούς στα ενδοσώματα ("proton sponge effect").....	80
Εικόνα 15: Χημική δομή φαινυλαλανίνης.....	81
Εικόνα 16: Χημική δομή γλουταμικού οξέος.....	84
Εικόνα 17: Δομή του πολυ (γ-βένζυλο-L-γλουταμικού οξέος).....	86
Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας ενός αρνητικά φορτισμένου σωματιδίου.....	114
Εικόνα 19: Πρότυπο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού.....	118
Εικόνα 20: Τα βασικά μέρη ενός οργάνου TEM.....	121
Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση της δευτεροταγούς δομής του ομοπολυπεπτιδίου της PHis, του τύπου I της β-στροφής.....	191
Εικόνα 22: (α) Δοκιμασία δημιουργίας κλώνων (αποικιών) των καρκινικών κυττάρων OVCAR-3 παρουσία Cis-Platin, νανοφορέων με Cis-Platin (Δ1), κενών νανοφορέων (Δ2, blank) και (b) Ποσοτικοποίηση καρκινικών κυττάρων.....	206
Εικόνα 23: Αποτελέσματα TEM του δικτυωμένου νανοσωματιδίου του πολυμερούς PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ με DOX με αναλογία πολυμερούς/φαρμάκου ίση με 2:1.....	210
Εικόνα 24: Εικόνες TEM των νανοσφαιρών χρυσού του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au ίση με 5:1 (αριστερά) και 2:1 (δεξιά).....	229
Εικόνα 25: Εικόνες TEM των AuNSs του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₁₀ με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au ίση με 5:1.....	230
Εικόνα 26: Εικόνες TEM των AuNSs του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au ίση με: (a) 10:1 και (b) 9:1.....	231
Εικόνα 27: Ρυθμιζόμενες οπτικές ιδιότητες των AuNPs προσαρμόζοντας το πάχος του κελύφους χρυσού, με τη μεταβολή του H ₂ AuCl ₄ στη συνθετική πορεία.....	242

Εικόνα 28: Πειραματική διάταξη για τη μελέτη απόδοσης της φωτοθερμικής μετατροπής των AuNPs245

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Ο ιοντισμός του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πολυ(L-ιστιδίνης).....	79
Σχήμα 2: Στάδια έναρξης και διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM)	89
Σχήμα 3: Αντίδραση τερματισμού κατόπιν προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 2' από τον απαρχητή.....	90
Σχήμα 4: Υδρολυτικοί μηχανισμοί των NCAs παρουσία υγρασίας.....	90
Σχήμα 5: Μηχανισμός του Blout, στάδια έναρξης και διάδοσης.	91
Σχήμα 6: Στάδια ενεργοποίησης και έναρξης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των N-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM)	92
Σχήμα 7: Η αντίδραση με το νερό δίνει το αρχικό αμινοξύ και εν συνεχεία πολυμερισμό. Η αντίδραση με το υδροχλώριο και το φωσγένιο δίνουν ισοκυανατο χλωρίδιο και μετέπειτα N-χλωροφορμυλοκαρβόξυ ανυδρίτη	94
Σχήμα 8: Μέθοδοι “Leuchs” και “Fuchs-Farthing” για τη σύνθεση των N-καρβοξυ ανυδριτών.....	96
Σχήμα 9: Σχηματική αναπαράσταση ενός συστήματος ICP-MS. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν εισαγωγή αερίων δειγμάτων. Οι συνεχείς γραμμές υποδηλώνουν εισαγωγή υγρών δειγμάτων.....	123
Σχήμα 10: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού (HVL).....	125
Σχήμα 11: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου	126
Σχήμα 12: Αντίδραση υδρόλυσης του DMF προς DMA και φορμικό οξύ	127
Σχήμα 13: Αντιδράσεις σχηματισμού ιοντικών ζευγών THF/K.....	129
Σχήμα 14: Συσκευή αμπουλών για την παραλαβή απαρχητή	130
Σχήμα 15: Συσκευή αραίωσης απαρχητή	131
Σχήμα 16: Πειραματική πορεία για τη σύνθεση του N ^{im} -Trt-L-His NCA	132
Σχήμα 17: Σχηματική αναπαράσταση σύνθεσης του BLG-NCA	137
Σχήμα 18: Πειραματική διάταξη για τη σύνθεση των μονομερών N ^{im} -Trt-HIS-NCA και BLG-NCA	137

Σχήμα 19: Αντίδραση σύνθεσης του ανυδρίτη της φαινυλαλανίνης (PHE-NCA).	139
Σχήμα 20: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής ανακρυσταλλώσεων του N-καρβόξυ ανυδρίτη της φαινυλαλανίνης (PHE-NCA).....	140
Σχήμα 21: Ειδικά σχεδιασμένη συσκευή για τη σύνθεση του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHIS _n	143
Σχήμα 22: Μηχανισμός αποπροστασίας της P(Trt-L-His).....	144
Σχήμα 23: Στάδια σύνθεσης του αποπροστατευμένου συμπολυμερούς PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHIS _n	145
Σχήμα 24: Ειδικά σχεδιασμένη συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των συμπολυμερών PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHIS ₂₂ - <i>b</i> -PBLG _n (n=10, 20,40) και PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHIS ₂₉ - <i>b</i> -PPHE _n (n=5, 10).	147
Σχήμα 25: Συνθετική πορεία των συμπολυμερών PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHIS ₂₂ - <i>b</i> -PBLG _n	148
Σχήμα 26: Συνθετική πορεία των συμπολυμερών PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHIS ₂₂ - <i>b</i> -PPhe _n	150
Σχήμα 27: Πειραματική διάταξη για τη διαδικασία δέσμευσης της σισπλατίνης από το PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄	151
Σχήμα 28: Πορεία σύνθεσης των AuNSs.....	164
Σχήμα 29: Φάσματα FT-IR κατά την πορεία σύνθεσης του N ^{im} -Trityl-L-His NCA. A γράφημα: Πρόδρομο αμινοξύ Boc-His(trt)-OH, B γράφημα: Σχηματισμός N ^{im} -Trityl-L-His NCA*HCl έπειτα από 2.5 ώρες μετά την προσθήκη SOCl ₂ στην αντίδραση, C γράφημα: Τελικός N ^{im} -Trityl-L-His NCA	166
Σχήμα 30: Φάσμα ¹ H-NMR του N ^{im} -Trityl-L-His NCA σε διαλύτη CDCl ₃	167
Σχήμα 31: Φάσματα FT-IR: (A) του προδρόμου αμινοξέος, H-Glu(OBzl)-OH, (B) μετά από 5 ώρες αντίδρασης με το τριφωσγένιο (C) τελικό προϊόν, BLG-NCA, μετά τις ανακρυσταλλώσεις.....	168
Σχήμα 32: Φάσμα ¹ H-NMR του BLG-NCA σε CDCl ₃	169
Σχήμα 33: Φάσματα FT-IR: (A) του προδρόμου αμινοξέος, H-Phe-OH, (B) μετά από 4,5 ώρες αντίδρασης με τριφωσγένιο και (C) τελικό προϊόν, Phe-NCA, μετά τις ανακρυσταλλώσεις.....	170
Σχήμα 34: Φάσμα ¹ H-NMR του Phe-NCA σε CDCl ₃	171

Σχήμα 35: Φάσματα FT-IR: (A) N ^{im} -Trt-L-His NCA; (B) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -P(N ^{im} -Trt-L-His) ₂₂ ; (C) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂	172
Σχήμα 36: Φάσματα FT-IR: (A) N ^{im} -Trt-L-His NCA; (B) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -P(N ^{im} -Trt-L-His) ₄₄ ; (C) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄	173
Σχήμα 37: Φάσμα ¹ H-NMR του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ σε d-TFA.....	174
Σχήμα 38: Φάσμα ¹ H-NMR του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ σε d-TFA.....	174
Σχήμα 39: Χρωματογράφημα SEC των mPEO-NH ₂ , PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ και PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ σε διαλύτη H ₂ O/TFA.....	175
Σχήμα 40: Φάσματα FT-IR: (A) του προστατευμένου κατά συστάδες συμπολυμερούς PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -P(N ^{im} -Trt-L-His) ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₅ και (B) του αποπροστατευμένου κατά συστάδες συμπολυμερούς PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₅	176
Σχήμα 41: Φάσματα FT-IR: (A) του προστατευμένου κατά συστάδες συμπολυμερούς PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -P(N ^{im} -Trt-L-His) ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₁₀ και (B) του αποπροστατευμένου κατά συστάδες συμπολυμερούς PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₁₀	176
Σχήμα 42: Φάσμα ¹ H-NMR PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₅ σε D ₂ O/1% DCI.....	177
Σχήμα 43: Φάσμα ¹ H-NMR PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₁₀ σε D ₂ O/1% DCI.....	178
Σχήμα 44: Χρωματογραφήματα SEC του μακροαπαρχητή mPEO ₂₂₈ καθώς και των αποπροστατευμένων συμπολυμερών PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₅ και PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₁₀ σε σε διαλύτη H ₂ O/TFA.....	178
Σχήμα 45: Φάσματα FT-IR: (A) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -P(N ^{im} -Trt-L-His) ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₁₀ ; (B) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₁₀	179
Σχήμα 46: Φάσματα FT-IR: (A) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -P(N ^{im} -Trt-L-His) ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ ; (B) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₂₀	180
Σχήμα 47: Φάσματα FT-IR: (A) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -P(N ^{im} -Trt-L-His) ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₄₀ ; (B) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₄₀	180
Σχήμα 48: Φάσμα ¹ H-NMR του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₁₀ σε d-TFA.....	181
Σχήμα 49: Φάσμα ¹ H-NMR του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ σε d-TFA.....	182
Σχήμα 50: Φάσμα ¹ H-NMR του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₄₀ σε d-TFA.....	183

Σχήμα 51: Διαγράμματα SEC του μακροαπαρχητή mPEO ₂₂₈ καθώς και των συμπολυμερών PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₁₀ , PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ και PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₄₀ σε διαλύτη DMF/LiBr.....	184
Σχήμα 52: Σχηματική αναπαράσταση της εξάρτησης του μεγέθους των νανοσωματιδίων του συμπολυμερούς PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ από το pH, στους 25 °C, στις 90°.....	187
Σχήμα 53: Μελέτη αυτό-οργάνωσης του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ σε υπερκάθαρο νερό στους 25 °C, στις 90°.....	189
Σχήμα 54: Μελέτη αυτό-οργάνωσης του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ που προκύπτει από διάλυση του πολυμερούς σε DMSO και απευθείας διαπίδυση σε υπερκάθαρο νερό στους 25 °C, στις 90°.....	189
Σχήμα 55: Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού του πολυμερούς PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ συναρτήσει του pH στους 25 °C.....	192
Σχήμα 56: Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού του πολυμερούς PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ συναρτήσει pH στους 25 °C.	192
Σχήμα 57: Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού του πολυμερούς PEO ₂₂₈ - <i>b</i> - PHis ₄₄ σε pH=7.4 συναρτήσει της θερμοκρασίας.	193
Σχήμα 58: Αποτελέσματα ζ-Δυναμικού του υδατικού διαλύματος των νανοσωματιδίων PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ με τη δεσμευμένη σισπλατίνη.....	196
Σχήμα 59: Αποτελέσματα DLS από: (a) το δείγμα που περιέχει άδειους νανοφορείς (blank) σε 10 mM PBS buffer, NaCl 150 mM, pH= 7,4, (b) το δείγμα B ₁ που περιέχει το πολυμερές με το δεσμευμένο φάρμακο σε 10 mM PBS buffer, NaCl 150 mM, pH= 7,4 και (c) το δείγμα Δ ₁ που περιέχει το πολυμερές με το δεσμευμένο φάρμακο σε 10 mM PBS buffer, NaCl 150 mM, pH= 7,4 στους 25 °C, στις 90°.....	197
Σχήμα 60: Μετρήσεις CD του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ και του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ με Cis-Platin σε νερό, στους 25°C	198
Σχήμα 61: Μετρήσεις CD των κενών νανοσωματιδίων (Blank), των νανοσωματιδίων με Cis-Platin στους 25°C.....	199
Σχήμα 62: Μετρήσεις CD των νανοσωματιδίων με Cis-Platin σε pH= 7,4 και pH= 5, .200	

Σχήμα 63: Μελέτη δέσμευσης της Cis-Platin από το PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ συναρτήσει του χρόνου.....	201
Σχήμα 64: Μελέτη αποδέσμευσης της Cis-Platin σε pH = 7,4 και pH =5 συναρτήσει του χρόνου.....	202
Σχήμα 65: Καμπύλη δόσης-απόκρισης για τα κύτταρα NCI-ADRES	204
Σχήμα 66: Καμπύλη δόσης-απόκρισης για τα κύτταρα OVCAR-5.....	204
Σχήμα 67: Καμπύλη δόσης-απόκρισης για τα κύτταρα OVCAR-3.....	205
Σχήμα 68: Μεταθανάτια βάρη των καρκινικών όγκων xOVCAR-3 ύστερα από θεραπεία με Cis-Platin, με νανοσωματίδια PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ με Cis-Platin (B, formulation) και άδειους νανοφορείς PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ (blank). Οι ράβδοι παρουσιάζουν το μέσο όρο±SD (n=5).....	207
Σχήμα 69: Αποτελέσματα DLS για το PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ με δοξορουβικίνη με αναλογία πολυμερούς/φαρμάκου 2:1 σε pH 7.4, στους 25 °C, στις 90°.....	208
Σχήμα 70: Αποτελέσματα DLS για το PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ με δοξορουβικίνη με αναλογία πολυμερούς/φαρμάκου 1:1 σε pH 7.4, στους 25 °C, στις 90°.....	209
Σχήμα 71: Πρότυπη Καμπύλη βαθμονόμησης DOX, σε ρυθμιστικό διαλύμα PBS pH=7.4.	211
Σχήμα 72: Πρότυπη Καμπύλη βαθμονόμησης DOX, σε ρυθμιστικό διαλύμα PBS pH=7.4.	212
Σχήμα 73: Πρότυπη Καμπύλη βαθμονόμησης DOX, σε ρυθμιστικό διαλύμα PBS pH=6.5.	213
Σχήμα 74: Πρότυπη Καμπύλη βαθμονόμησης DOX, σε ρυθμιστικό διαλύμα Acetate pH=5.....	213
Σχήμα 75: Αθροιστική καμπύλη αποδέσμευσης της DOX από το νανοσωματίδιο με το πολυμερές PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄	214
Σχήμα 76: Καμπύλη δόσης-απόκρισης για τα κύτταρα MCF-7.....	216
Σχήμα 77: Καμπύλη δόσης-απόκρισης για τα κύτταρα T47D.	216
Σχήμα 78: Καμπύλη δόσης-απόκρισης για τα κύτταρα MB231	217

Σχήμα 79: Φάσματα FTIR του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ (μπλε) και του ίδιου πολυμερούς μετά τον σχηματισμό των νανοσφαιρών χρυσού (μαύρο).....	218
Σχήμα 80: DLS I=f(r) διαγράμματα του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₁₀ : (a) σε νερό, (b) σε νερό στους 80 °C, (c) σε νερό με HAuCl ₄ και PHis/Au(III) = 10:1, (d) σε νερό με HAuCl ₄ στους 80 °C και PHis/Au(III)= 10:1 (AuNSs), (e) σε νερό με HAuCl ₄ και PHis/Au(III) = 5:1, (f) σε νερό με HAuCl ₄ στους 80 °C και PHis/Au(III)= 5:1 (AuNSs), (g) σε νερό με HAuCl ₄ και PHis/Au(III) = 3:1, (h) σε νερό με HAuCl ₄ στους 80 °C και PHis/Au(III)= 3:1 (AuNSs), (i) σε νερό με HAuCl ₄ και PHis/Au(III) = 2:1, (j) σε νερό με HAuCl ₄ στους 80 °C και PHis/Au(III)= 2:1 (AuNSs).	228
Σχήμα 81: Μετρήσεις CD των νανοσωματιδίων PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ με HAuCl ₄ συναρτήσει της γραμμομοριακής αναλογίας PHis/Au(III).	232
Σχήμα 82: Μετρήσεις CD των νανοσωματιδίων PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₁₀ με HAuCl ₄ συναρτήσει της γραμμομοριακής αναλογίας PHis/Au(III).	233
Σχήμα 83: Φάσματα UV-Vis των συμπολυμερών σε νερό.....	235
Σχήμα 84: Μετρήσεις απορρόφησης UV-Vis των νανοσφαιρών PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ /Au με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au(III) ίση με 2:1	236
Σχήμα 85: Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των νανοσωματιδίων χρυσού του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₅ σε διάφορες γραμμομοριακές αναλογίες PHis/Au(III).	237
Σχήμα 86: Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των νανοσωματιδίων χρυσού του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₁₀ σε διάφορες γραμμομοριακές αναλογίες PHis/Au(III).	238
Σχήμα 87: Μετρήσεις UV-Vis στην περιοχή NIR των νανοκελύφων PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₁₀ /Au με διαφορετικές γραμμομοριακές αναλογίες PHis/Au(III).....	239
Σχήμα 88: Απορροφήσεις UV-Vis στην περιοχή NIR των νανοκελύφων χρυσού PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ ως συνάρτηση της αναλογίας πυρήνα/κελύφους.	240
Σχήμα 89: Αποτελέσματα (a) DLS, (b) UV-Vis των AuNSs του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au(III) ίση με 9:1.....	241
Σχήμα 90: Αποτελέσματα (a) DLS, (b) UV-Vis των AuNSs του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au(III) ίση με 10:1	241
Σχήμα 91: Μετρήσεις UV-Vis των AuNPs του PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₄₀	242

Σχήμα 92: Μεταβολή της θερμοκρασίας των PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLLG₂₀/AuNPs διασκορπισμένων σε νερό με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au(III) ίση με 5:1, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μετά από ακτινοβολία από μια πηγή μονάδας laser NIR που εκπέμπει στα 808 nm, με ισχύ εξόδου 1200 mW, για 20 λεπτά. 245

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Συνοπτικός πίνακας των νανοσυστημάτων που χρησιμοποιούνται στην αντικαρκινική θεραπεία.....	53
Πίνακας 2: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων σε cm^{-1}	104
Πίνακας 3: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ (ppm)	107
Πίνακας 4: Μοριακά χαρακτηριστικά των αμφίφιλων υβριδικών πολυμερών που χρησιμοποιήθηκαν	141
Πίνακας 5: Συγκεντρωτικός πίνακας των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα in vitro πειράματα.	155
Πίνακας 6: Συγκεντρωτικός πίνακας των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα in vivo πειράματα.	155
Πίνακας 7: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων DLS για το $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{44}$. Μελέτη της εξάρτησης του μεγέθους των νανοσωματιδίων από το pH, στους 25 °C.....	186
Πίνακας 8: Μελέτη της εξάρτησης του μεγέθους των νανοσωματιδίων του συπολυμερούς $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{44}$ από τη θερμοκρασία, στα διάφορα pH.....	188
Πίνακας 9: Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών ζ-δυναμικού του $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{44}$ συναρτήσει του pH.....	195
Πίνακας 10: Αποτελέσματα ζ-δυναμικού για τα νανοσωματίδια $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{44}$ με τη δεσμευμένη σισπλατίνη που χρησιμοποιήθηκαν σε in vitro και in vivo πειραματικές διαδικασίες.	196
Πίνακας 11: Εκτιμώμενο ποσοστό (%) δευτεροταγούς δομής για το $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{44}$ και το $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{44}$ με Cis-Platin σε νερό, στους 25°C	199
Πίνακας 12: Εκτιμώμενο ποσοστό (%) δευτεροταγούς δομής για τα κενά νανοσωματίδια (Blank) και για τα νανοσωματίδια με τη Cis-Platin (B_1 και Δ_1) σε 10 mM PBS buffer, NaCl 150 mM, pH= 7,4 στους 25 °C.....	200

Πίνακας 13: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων δέσμευσης της Cis-Platin από το πολυμερές PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ συναρτήσει του χρόνου.....	201
Πίνακας 14: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων αποδέσμευσης της Cis-Platin από το πολυμερές PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄ συναρτήσει του χρόνου.....	203
Πίνακας 15: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων αποδέσμευσης της DOX από το νανοσωματίδιο με το πολυμερές PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄	214
Πίνακας 16: Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών των μεγεθών GI50, TGI, LC50.....	217
Πίνακας 17: Μετρήσεις DLS: (a) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ σε νερό, (b) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ σε νερό στους 80 °C, (c) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ σε νερό με H ₂ AuCl ₄ ·3H ₂ O και (d) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ /Au σε νερό στους 80 °C (AuNPs).	222
Πίνακας 18: Μετρήσεις DLS: (a) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₅ σε νερό, (b) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₅ σε νερό στους 80 °C, (c) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₅ σε νερό με H ₂ AuCl ₄ ·3H ₂ O και (d) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₅ /Au σε νερό στους 80 °C (AuNSs).	223
Πίνακας 19: Μετρήσεις DLS: (a) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₁₀ σε νερό, (b) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₁₀ σε νερό στους 80 °C, (c) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₁₀ σε νερό με H ₂ AuCl ₄ ·3H ₂ O και (d) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₁₀ /Au σε νερό στους 80 °C (AuNSs).....	224
Πίνακας 20: Μετρήσεις DLS: (a) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₁₀ σε νερό, (b) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₁₀ σε νερό στους 80 °C, (c) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₁₀ σε νερό με H ₂ AuCl ₄ ·3H ₂ O και (d) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₁₀ /Au σε νερό στους 80 °C (AuNSs).	225
Πίνακας 21: Μετρήσεις DLS: (a) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ σε νερό, (b) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ σε νερό στους 80 °C, (c) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ σε νερό με H ₂ AuCl ₄ ·3H ₂ O και (d) PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₂₀ /Au σε νερό στους 80 °C (AuNSs).	226
Πίνακας 22: Εκτιμώμενο ποσοστό (%) δευτεροταγούς δομής για το PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ με H ₂ AuCl ₄	232
Πίνακας 23: Εκτιμώμενο ποσοστό (%) δευτεροταγούς δομής για το PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₁₀ με H ₂ AuCl ₄	233
Πίνακας 24: Μέγιστο μήκος κύματος που λήφθηκε από την κορυφή απορρόφησης των νανοκελύφων χρυσού ως συνάρτηση της αναλογίας ακτίνας πυρήνα/ πάχους κελύφους για τα AuNSs που σχηματίστηκαν μέσα σε διάφορα πολυμερικά νανοσωματίδια.	243

Πίνακας 25: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.	249
---	-----

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Αντικείμενο της συγκεκριμένης εργασίας είναι σύνθεση πολυπετιδικών πολυμερών βασισμένα στην πολυ(Ιστιδίνη), για την μελέτη εγκλωβισμού και αποδέσμευσης των αντικαρκινικών φαρμάκων της δοξορουβικίνης και της σισπλατίνης σε καρκινικές σειρές καρκίνου του μαστού και ωθηκών αντίστοιχα. Επίσης, πραγματοποιήθηκε ο σχηματισμός νανοσωματιδίων χρυσού βασισμένα στην πολυ (Ιστιδίνη) και αποδείχθηκε ο έλεγχος της απορρόφησής τους στο Far-IR μέσω των μοριακών χαρακτηριστικών των πολυμερών.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας (Τομέας Επιστήμης Πολυμερών) του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ερμόλαου Ιατρού, στα πλαίσια υποτροφίας από το Ίδρυμα Σταύρος Νιάρχος (ΙΣΝ), κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2017-2020.

Τα *in vitro* και *in vivo* πειράματα, για τη μελέτη αποδέσμευσης του αντικαρκινικών φαρμάκων της δοξορουβικίνης και της σισπλατίνης, διεξήχθησαν στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, από τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνου Δήμα.

Τέλος, η μελέτη της μορφολογίας των σχηματισθέντων νανοσωματιδίων χρυσού της παρούσας εργασίας, με τη χρήση της τεχνικής της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διαπερατότητας (TEM) πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο του Warwick, από τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Γιώργο Πατιά, υπό την καθοδήγηση του Καθηγητή κ. Dave Haddleton.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η νανοτεχνολογία εφαρμόζεται σε πολλές πτυχές της ανθρώπινης ζωής, συμπεριλαμβανομένης της γεωργίας, των μεταφορών, των ηλεκτρονικών, των επικοινωνιών, της βιομηχανίας τροφίμων και της ιατρικής. Το αρχικό θεμέλιο για την πρόσφατη δραματική πρόοδο στη χρήση νανοϋλικών για βιοϊατρικές εφαρμογές θεωρείται η διάσημη διάλεξη του R. Feynman το 1960, που ανέφερε ότι «Υπάρχει άφθονος χώρος στο κάτω μέρος». Ωστόσο, το έργο του Paul Ehrlich, ο οποίος επινόησε το όραμα «μαγικές σφαίρες» για να περιγράψει στοχευμένες κυτταρικές διαγνωστικές μεθόδους και θεραπείες, είναι επίσης σημαντικής σημασίας. Η νανοϊατρική, είναι ένας τομέας της επιστήμης και της τεχνολογίας που εφαρμόζει υλικά σε νανοκλίμακα για τη διάγνωση, την έξυπνη απεικόνιση και τη στοχευμένη θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών. Τα πλεονεκτήματα των νανοσωματιδίων οφείλονται στις μοναδικές ιδιότητες τους όπως το μέγεθος, το σχήμα, το επιφανειακό φορτίο, την τροποποιήσιμη επιφάνειά τους και την υδροφοβικότητά τους. Για παράδειγμα, το μικρό μέγεθος των νανοσωματιδίων μπορεί να τους επιτρέψει να περάσουν βιολογικά εμπόδια ενώ οι διαφορετικές δομές των νανοσωματιδίων μπορούν να αυξήσουν τη βιοδιαθεσιμότητα των μη διαλυτών ή ασταθών φαρμάκων. Η τροποποιήσιμη επιφάνεια των νανοσωματιδίων μπορεί να επιτρέψει την επιθυμητή ικανότητα στόχευσης στην πάσχουσα περιοχή είτε για απεικόνιση είτε για συγκεκριμένη χορήγηση φαρμάκου. Επιπροσθέτως, η βελτιωμένη βιοδραστικότητα, η βιοδιαθεσιμότητα και η ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκων πραγματοποιούνται καθώς τα φάρμακα μπορούν να ενθυλακωθούν στους νανοφορείς. Ως εκ τούτου, θεωρείται ως μια ανώτερη θεραπευτική προσέγγιση σε σύγκριση με τη συμβατική ιατρική. Με την ανάπτυξη της νανοϊατρικής, έχουν επίσης εγερθεί ανησυχίες σχετικά με την ασφάλεια των εμπλεκόμενων νανοϋλικών. Στην ιδέα της βελτίωσης του προφίλ ασφάλειας της νανοϊατρικής, τα βιοαποδομήσιμα νανοϋλικά κερδίζουν αυξανόμενη προσοχή σε αυτόν τον τομέα. Βιοδιασπώμενα νανοϋλικά είναι υλικά νανοκλίμακας που μπορούν να αποικοδομηθούν φυσικά υπό βιολογικές συνθήκες στο σώμα. Η ικανότητα αποικοδόμησης των νανοσωματιδίων μπορεί να είναι μια χρήσιμη ιδιότητα για τον έλεγχο της απελευθέρωσης φορτίου, καθώς τα ιδανικά βιοαποδομήσιμα νανοσωματίδια απαιτούν αποτελεσματική αποικοδόμηση στη θέση στόχο, ενώ παραμένουν σταθερά σε

θέση εκτός στόχου. Τα βιοδιασπώμενα νανοσωματίδια υπόσχονται πολλά στο σύστημα χορήγησης φαρμάκων για διάφορους λόγους: παρέχουν προφίλ ελεγχόμενης απελευθέρωσης, είναι σταθερά στο σύστημα κυκλοφορίας, είναι μη τοξικά και μη ανοσογόνα ενώ είναι επίσης ικανά να αποφύγουν το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα, μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος του σώματος που προσλαμβάνει και καθαρίζει ξένα αντικείμενα, παρατείνοντας έτσι χρόνο κυκλοφορίας τους. Με ορισμένα νανοϊατρικά φάρμακα να μπαίνουν ήδη στην κλινική, τα λιποσώματα, τα πολυμερικά νανοσωματίδια, τα δενδριμερή και τα νανοσωματίδια χρυσού έχουν επιδείξει αξιοσημείωτη δυναμική ως συστήματα φορέων. Ανεξάρτητα από τη δομή ή τον τρόπο ενσωμάτωσης του ωφέλιμου φορτίου, τα βιοαποδομήσιμα νανοσωματίδια παρέχουν αργή και ελεγχόμενη απελευθέρωση του φορτίου και στοχευμένη παράδοση, που οδηγούν σε ενισχυμένα θεραπευτικά αποτελέσματα και μειωμένες παρενέργειες, ειδικά για ορισμένα κυτταροτοξικά φάρμακα, με ένα ακόμη πλεονέκτημα ότι μειώνουν την κυτταροτοξικότητα στο σώμα. Μπορούν επίσης να γίνουν περαιτέρω τροποποιήσεις στην επιφάνεια για τη βελτίωση του προφίλ απελευθέρωσης φαρμάκου και της αποτελεσματικότητας της στόχευσης. Κατά την παραγωγή βιοαποδομήσιμων νανοσωματιδίων, τα πολυμερή έχουν δείξει υψηλή βιοσυμβατότητα και βιοασφάλεια. Τα νανοσωματίδια που βασίζονται σε πολυμερή είναι στερεά κολλοειδή σωματίδια μεγέθους 10-500 nm και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά θεραπευτικών παραγόντων είτε ενσωματώνοντας/ενθυλακώνοντας τους παράγοντες εντός της πολυμερικής τους μήτρας είτε προσροφώντας τους στην επιφάνεια. Επιπλέον, η επιφάνεια και το μέγεθος τους μπορούν να τροποποιηθούν για τον έλεγχο της απελευθέρωσης του φαρμάκου. Μία από τις πρώιμες εφαρμογές της νανοϊατρικής περιλαμβάνει τη χρήση νανοϋλικών ως σκιαγραφικών παραγόντων στη βιοϊατρική απεικόνιση για σκοπούς διάγνωσης, καθώς η εύκολη τροποποίηση και η ιδιότητα στόχευσης των νανοσωματιδίων τους επιτρέπει να εντοπίζουν τον ιστό και να οπτικοποιούν με υψηλή ανάλυση. Αυτά τα νανοσωματίδια εφαρμόζονται σε πολλούς τρόπους απεικόνισης όπως υπολογιστική τομογραφία (CT), απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού (MRI), τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων, απεικόνιση φθορισμού και φωτοακουστική απεικόνιση. Η στοχευμένη χορήγηση από νανοφορείς μπορεί να μειώσει σημαντικά τη συγκέντρωση των σκιαγραφικών παραγόντων, μειώνοντας τον κίνδυνο νεφρικής βλάβης που προκαλείται από την αντίθεση. Επίσης, τα νανοσωματίδια χρυσού είναι κεντρικά στην ανάπτυξη παραγόντων αντίθεσης απεικόνισης. Μια νέα ιδέα -theranostics- η ικανότητα του "βλέπω και

θεραπεία" έχει γίνει ένα περιζήτητο μοντέλο για την ανάπτυξη νέας πολυλειτουργικής νανοϊατρικής. Αυτά τα έξυπνα νανοσωματίδια συνδυάζουν παράγοντες απεικόνισης, φάρμακα ωφέλιμου φορτίου και τμήματα στόχευσης για να επιτύχουν τη διάγνωση μαζί με την παροχή θεραπείας. Μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να ενεργοποιούνται ως απόκριση σε περιβαλλοντικές αλλαγές όπως το pH, η θερμοκρασία, το φως και ο υπέρηχος. Η νανοϊατρική που χρησιμοποιεί βιοδιασπώμενα πολυμερικά νανοσωματίδια ως συστήματα χορήγησης φαρμάκων έχει σχεδιαστεί για τη θεραπεία του καρκίνου μέσω πολλαπλών προσεγγίσεων: να στοχεύει καρκινικά κύτταρα ή τα αιμοφόρα αγγεία που παρέχουν τα θρεπτικά συστατικά και το οξυγόνο που υποστηρίζουν την ανάπτυξη του όγκου. Ταυτόχρονα, η καλύτερη κατανόηση της φυσιολογικής φύσης των διαφόρων ασθενειών και η κατανόηση της αλληλεπίδρασης των νανοϋλικών με βιολογικά συστήματα σε διάφορα επίπεδα (δηλ. όργανο, ιστός και κύτταρο) είναι υψίστης σημασίας για περαιτέρω πρόοδο. Η χρήση υδρόφιλων υλικών, όπως η πολυαιθυλενογλυκόλη(PEG) και η πολυκαρβοξυβεταΐνη (PCB) και η ανακάλυψη του φαινομένου της ενισχυμένης διαπερατότητας και συγκράτησης (EPR) είναι δύο τέτοια παραδείγματα. Ησύνθεση της επιφάνειας των νανοσωματιδίων από υδρόφιλα πολυμερή προσδίδει έναν μυστικό/αόρατο (stealth) χαρακτήρα ενάντια στο ανοσοποιητικό σύστημα και ενισχύει τη συστηματική κυκλοφορία τους. Η πρωτοποριακή ανακάλυψη του φαινομένου EPR έθεσε τα θεμέλια για την πρώτη γενιά παθητικά στοχευμένων νανοϊατρικών φαρμάκων που συσσωρεύονται κατά προτίμηση στον καρκινικό ιστό. Ο συνδυασμός μακράς συστηματικής κυκλοφορίας που καθίσταται δυνατός από υδρόφιλα πολυμερή και το φαινόμενο EPR έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση των συστημάτων μεταφοράς στον ιστό του όγκου ακολουθούμενη από την απελευθέρωση του θεραπευτικού παράγοντα, είτε κοντά σε νοσούντες ιστούς είτε εντός των κυττάρων μετά την εσωτερίκευση. Πρόσφατα, η εκμετάλλευση της ειδικής συγγένειας των υποδοχέων με ορισμένα μόρια συνδέτη οδήγησε στη δεύτερη γενιά νανοϊατρικών φαρμάκων, οι οποίες στοχεύουν κατά προτίμηση σε συγκεκριμένα όργανα, ιστούς ή κύτταρα. Τα προσδέματα (υποκαταστάτες), με ειδική συγγένεια προς έναν συγκεκριμένο υποδοχέα ή μόριο που εκφράζονται στη θέση-στόχο, εμφανίζονται στην επιφάνεια των νανοφορέων, με αποτέλεσμα τη στοχευμένη συσσώρευση και πρόσληψη στη θέση δράσης. Παρόλο που έχουν προβληθεί ορισμένες ανησυχίες σχετικά με την κακή συστηματική κυκλοφορία, την αυξημένη κάθαρση από το σύστημα μονοκύτταρων φαγοκυττάρων και την περιορισμένη διείσδυση ιστών, το νέο παράδειγμα των νανομεταφορέων συζευγμένων με προσδέματα

αποδείχθηκε ότι βελτιώνει την κυτταρική πρόσληψη και την αποτελεσματικότητα του ωφέλιμου φορτίου τους σε σύγκριση με τους παθητικά στοχευμένους ομολόγους τους. Η ενισχυμένη κυτταρική πρόσληψη νανοσωματιδίων στο σημείο της νόσου είναι υψίστης σημασίας, επειδή οι στόχοι πολλών θεραπευτικών παραγόντων κατά διαφόρων διαταραχών (συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου) εντοπίζονται στα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Επιπροσθέτως, η γονιδιακή θεραπεία είναι ένας τύπος θεραπευτικής προσέγγισης που επιδιώκει να τροποποιήσει την έκφραση ορισμένων γονιδίων προκειμένου να αλλοιωθούν ορισμένες βιολογικές ιδιότητες, κάτι που έχει αποκτήσει σημαντικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Είτε αντικαθιστώντας το γονίδιο που προκαλεί την ασθένεια με ένα υγιές γονίδιο είτε αδρανοποιώντας το γονίδιο που προκαλεί νόσο ή εισαγωγή νέου ή τροποποιημένου γονιδίου για τη θεραπεία της υπάρχουσας νόσου, η γονιδιακή θεραπεία απαιτεί ακριβή στόχευση. Με τη βοήθεια νανοσωματιδίων για στοχευμένη παράδοση, περνούμε πιο κοντά στην υλοποίηση της γονιδιακής θεραπείας που χρησιμοποιείται στο κλινικό περιβάλλον. [1-3]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Γενικά για τον καρκίνο [4]

Με τον όρο καρκίνος εννοούμε μία γενετική ασθένεια που προκύπτει από αλλαγές σε συγκεκριμένα γονίδια. Τις περισσότερες φορές δεν αποτελεί μία κληρονομική ασθένεια, αλλά οι γενετικές αλλαγές προέρχονται από μεταλλάξεις του DNA στα σωματικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τα οποία αρχικά συνιστούν μία μάζα και μετά έναν συμπαγή όγκο, ή νεόπλασμα, που αυξάνεται απεριόριστα. Ορισμένα κύτταρα του όγκου έχουν την ικανότητα να αποσπώνται και να μεταφέρονται σε άλλους ιστούς και όργανα δια μέσου της κυκλοφορίας του αίματος και της λέμφου, μία διαδικασία που ονομάζεται μετάσταση, ενώ οι αντίστοιχοι όγκοι χαρακτηρίζονται ως κακοήθεις.

Οι κακοήθεις όγκοι είναι συνήθως θανατηφόροι εξαιτίας της αποστέρησης ορισμένων δραστηριοτήτων ή της απώλειας ζωτικών λειτουργιών που προκαλούν στα φυσιολογικά κύτταρα. Οι όγκοι καταστρέφουν τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς πιέζοντάς τους, τραυματίζοντάς τους, μειώνοντας την παροχή αίματος και αποστερώντας τους τα θρεπτικά τους υλικά.

Η επικρατούσα άποψη για το μηχανισμό με τον οποίο οι διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες, η γήρανση του κυττάρου, καθώς και άλλες κυτταρικές διαδικασίες επάγουν την καρκινογένεση είναι ότι αυξάνουν τις ελεύθερες ρίζες στο κύτταρο. Με τη σειρά τους οι ελεύθερες ρίζες δρουν στο DNA προκαλώντας διάφορες μόνιμες βλάβες. Επίσης, το ¼ περίπου των καρκίνων αναπτύσσεται σε άτομα γενετικώς υγιή, που ζουν σε περιβάλλον απαλλαγμένο από οποιοδήποτε καρκινογόνο, και αυτό συμβαίνει γιατί ο ίδιος ο οργανισμός παράγει καρκινογόνα κατά τη μεταβολική διεργασία.

Ένα κύτταρο μετατρέπεται σε καρκινικό όταν στα γονίδιά του συσσωρεύονται μεταλλάξεις, που σχετίζονται με την αύξηση, τη διαφοροποίηση και την επιβίωσή του. Τα γονίδια αυτά διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: στα πρωτο-ογκογονίδια και στα αντιογκογονίδια ή ογκοτασταλτικά γονίδια. Και οι δύο κατηγορίες γονιδίων απαντούν φυσιολογικά στα κύτταρα και συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Τα πρωτο-ογκογονίδια συμμετέχουν στις διαδικασίες που οδηγούν το κύτταρο στην αύξηση και τη διαίρεση, ενώ τα ογκοκατασταλτικά γονίδια συμβάλλουν στην καταστολή των

λειτουργιών αυτών. Η συνισταμένη των δύο αυτών διαδικασιών διατηρεί σε ισορροπία τη διαίρεση και την αύξηση ενός κυττάρου. Όταν από κάποια αιτία τα πρωτο-ογκογονίδια και τα αντιογκογονίδια μεταλλαχθούν, τότε ευθύνονται για τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Οι πιο κοινές προσπάθειες αντιμετώπισης του καρκίνου στηρίζονται στη χειρουργική, τη χημειοθεραπεία, την ανοσοθεραπεία και τις ακτινοβολίες. Η πιο επιτυχής αντιμετώπισή του όμως, έγκειται στην έγκαιρη διάγνωση, καθώς και στο σχεδιασμό φαρμάκων με επιλεκτική δράση στα καρκινικά κύτταρα.

Η ανάπτυξη μοριακών μεθόδων διάγνωσης (ανίχνευση μεταλλαγών σε ειδικά γονίδια) μπορεί να παρέχει πληροφορίες για την επιλογή της καταλληλότερης αγωγής. Η μοριακή διάγνωση έχει αρχίσει ήδη να έχει εφαρμογές. Ο σχεδιασμός όμως φαρμάκων αντιμετωπίζει δυσκολίες γιατί οι στόχοι (ογκογονίδια, αντιογκογονίδια και ογκοπρωτεΐνες) έχουν τα αντίστοιχά τους στα φυσιολογικά κύτταρα. Για να μην υπάρχουν, συνεπώς σοβαρές παρενέργειες, όπως συμβαίνει με την αγωγή που χορηγείται σήμερα, θα πρέπει τα φάρμακα να επηρεάζουν όσο το δυνατόν πιο εξειδικευμένες διεργασίες.

Από τις βασικότερες στρατηγικές που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι: η ανοσοθεραπεία, η γονιδιακή θεραπεία, η καταστολή της ενεργότητας πρωτεϊνώ/προϊόντων ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων και η καταστολή της αγγειογένεσης.

Στόχος της ανοσοθεραπείας είναι να σκοτώσει επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς αυτά εμφανίζουν συχνά στην επιφάνειά τους ειδικές πρωτεΐνες (αντιγόνα). Έτσι πραγματοποιείται είτε «εμβολιασμός» με ειδικά αντιγόνα, ώστε να προκληθεί ανοσοαπόκριση και καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, είτε παροχή αντισωμάτων για τον ίδιο σκοπό.

Η γονιδιακή θεραπεία συνίσταται στην εισαγωγή ενός γονιδίου, με σκοπό τα καρκινικά κύτταρα είτε να ανακτήσουν τις φυσιολογικές λειτουργίες τους, είτε να καταστραφούν.

Τέλος, με τη μέθοδο της καταστολής της αγγειογένεσης η θεραπεία δεν έγκειται στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων, αλλά στο σύστημα που διατηρεί τον όγκο και τον βοηθά να αναπτυχθεί. Τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες που δρουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων και τα παροτρύνουν να πολλαπλασιασθούν και να σχηματίσουν νέα αγγεία (αγγειογένεση). Η αναστολή της ικανότητας αγγειογένεσης θα μπορούσε να οδηγήσει στην καταπολέμηση του καρκίνου

και μάλιστα χωρίς τα καρκινικά κύτταρα να αποκτούν ανθεκτικότητα με επανάληψη της αγωγής, όπως συμβαίνει στην κοινή χημειοθεραπεία και αυτό γιατί η επίδραση δεν αφορά στα καρκινικά κύτταρα τα οποία είναι γενετικά ασταθή, αλλά στα υγιή.

2.2 Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συχνή κακοήθεια στις γυναίκες και είναι μια ετερογενής ασθένεια, σε μοριακό επίπεδο. Τα τελευταία 10-15 χρόνια, οι θεραπείες έχουν εξελιχθεί και λαμβάνουν υπόψη αυτήν την ετερογένεια, ενώ έμφαση δίνεται σε πιο βιολογικά κατευθυνόμενες θεραπείες, με σκοπό την ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων παρενεργειών τους.

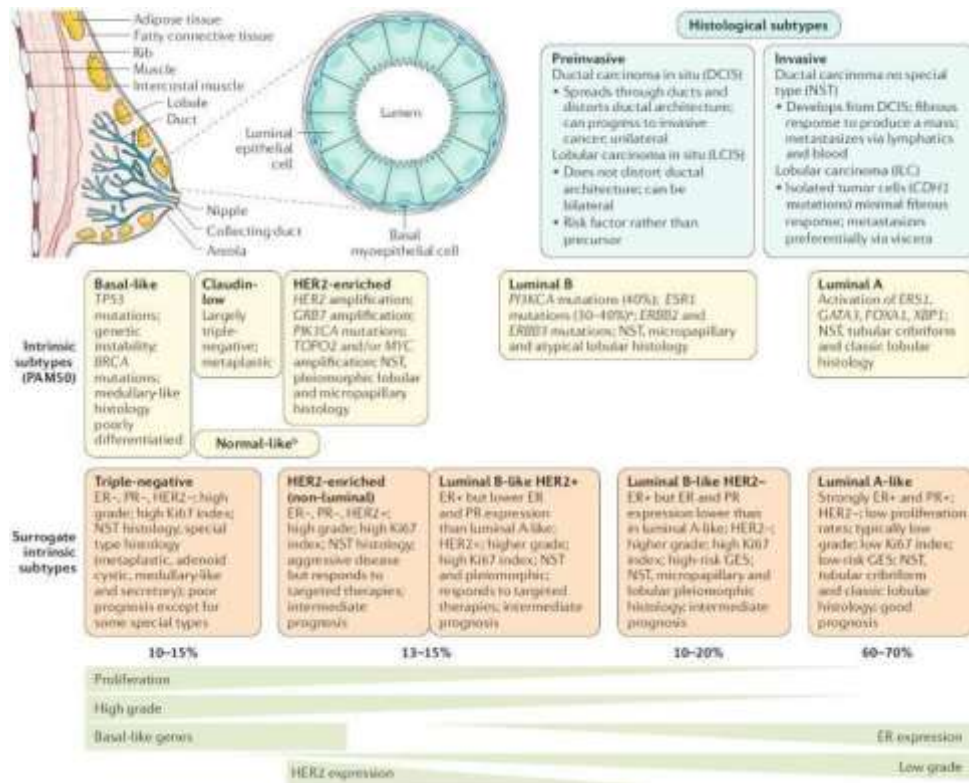
Ο πρώιμος καρκίνος του μαστού, δηλαδή ο καρκίνος που εντοπίζεται στο στήθος ή που έχει εξαπλωθεί μόνο στους μασχαλιαίους λεμφαδένες θεωρείται θεραπεύσιμος. Οι βελτιώσεις στις σύγχρονες πολυσχιδείς θεραπείες έχουν οδηγήσει σε αυξανόμενες πιθανότητες για ίαση σε ποσοστό ~ 70-80% των ασθενών. Αντίθετα, η προχωρημένη (μεταστατική) ασθένεια δεν θεωρείται θεραπεύσιμη, χρησιμοποιώντας τη διαθέσιμη θεραπευτική αγωγή. Ωστόσο, ο προχωρημένος καρκίνος του μαστού είναι αντιμετωπίσιμος ως έναν βαθμό, με την έννοια ότι οι κύριοι στόχοι της θεραπείας αφορούν την επιμήκυνση του χρόνου ζωής του ασθενούς, τον έλεγχο των συμπτωμάτων και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής του.

Οι βασικοί πυλώνες της διαχείρισης του καρκίνου του μαστού είναι η χειρουργική, η ακτινοβολία και η χημειοθεραπεία, ενώ το είδος της θεραπείας που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από τα ιστολογικά και τα μοριακά χαρακτηριστικά του.

Οι μοριακές αλλοιώσεις που οδηγούν στην καρκινογένεση του μαστού είναι πολλές, και έχουν αναπτυχθεί αρκετές ταξινομήσεις που ομαδοποιούν τους όγκους ανάλογα. Η εγγενής ταξινόμηση των Perou και Sorlie, που αναφέρθηκε το 2000, διακρίνει τέσσερις υποτύπους καρκίνου του μαστού:

- Luminal A (αυλός A) (εκφράζει τον υποδοχέα οιστρογόνων (oestrogen receptor, ER)),
- Luminal B (αυλός B) (εκφράζει τον υποδοχέα οιστρογόνων (oestrogen receptor, ER)),
- Basal-like (χωρίς έκφραση ER),
- Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)- enriched (ανθρώπινος υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2) - εμπλουτισμένος) (χωρίς έκφραση ER).

Επί του παρόντος, η κλινική πρακτική χρησιμοποιεί συνήθως μία ταξινόμηση με πέντε υποτύπους βάσει ιστολογικών και μοριακών χαρακτηριστικών (Εικόνα 1). Όγκοι που εκφράζουν τους υποδοχείς των οιστρογόνων ER ή/και τους υποδοχείς της προγεστερόνης (progesterone receptor, PR) θεωρούνται καρκίνοι με θετικούς υποδοχείς ορμονών. Οι όγκοι που δεν εκφράζουν τους υποδοχείς ER, PR ή HER2 είναι τριπλά αρνητικοί καρκινικοί τύποι μαστού, (triple negative breast cancer, TNBC). [5]



Εικόνα 1: Ταξινόμηση υποτύπων καρκίνου του μαστού [5]

Το 2018, περίπου 2,1 εκατομμύρια γυναίκες διαγνώστηκαν με καρκίνο του μαστού, 626.679 γυναίκες πέθαναν, ενώ υπολογίζεται ότι περίπου κάθε 18 δευτερόλεπτα γίνεται διάγνωση μιας νέας περίπτωσης. Τα ποσοστά θανάτου ποικίλλουν επίσης μεταξύ των υποτύπων του καρκίνου του μαστού, με τον υπότυπο HER2-θετικό να σχετίζεται με το υψηλότερο ποσοστό θανάτου, ακολουθούμενο από τον TNBC, τον Luminal A και τον Luminal B. Τα περιστατικά ποικίλλουν παγκοσμίως, με υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης σε περιοχές με υψηλό εισόδημα (92 ανά 100.000 στη Βόρεια Αμερική) από ό,τι σε περιοχές με χαμηλότερο εισόδημα (27 ανά 100.000 στη μέση Αφρική και ανατολική Ασία). Το μοτίβο αυτό αντικατοπτρίζει τόσο τους παράγοντες κινδύνου όσο και τη διαθεσιμότητα και την πρόσβαση σε προληπτικούς ελέγχους, όπως η μαστογραφία. Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού είναι ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο και σχετίζεται

άμεσα με τη γενετική προδιάθεση, τον τρόπο ζωής, καθώς και με άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες. [5]

Το στήθος είναι ένα σύνθετο σωληνοειδές κυψελιδικό όργανο μέσα σε έναν ασύμμετρο συνδετικό ιστό, που υφίσταται μια σειρά από αλλαγές, από την ηλικία τεκνοποίησης έως το γήρας. Οι αλλαγές παρατηρούνται σε κάθε 36 εμμηνορροϊκό κύκλο και η εγκυμοσύνη οδηγεί στην υπόθεση της εμφάνισης πρόδρομων κυττάρων στον ώριμο ιστό που είναι ικανός να συνθέτει νέες μονάδες αγωγού-λοβού. Η αρχιτεκτονική του τυπικού στήθους περιέχει ένα στρωματοποιημένο επιθήλιο που συνορεύει με μια βασική μεμβράνη και συγκρατείται χάρη στα αιμοφόρα αγγεία και στα λεμφικά και στρωματικά κύτταρα. Στο συνηθισμένο στήθος, το στρωματοποιημένο επιθήλιο αποτελείται από δύο ανόμοιους κυτταρικούς πληθυσμούς, τα μυοεπιθήλια και τα επιθήλια. Έχει υποστηριχθεί ότι η δημιουργία της κυτταρικής ετερογένειας στις διαταραχές του μαστού εξαρτάται από την κύρια αναπτυξιακή σειρά του συνηθισμένου μαστού. Αυτή η ετερογένεια του καρκινώματος του μαστού μπορεί να συμβεί από τη νεοπλαστική αλλαγή είτε του μυοεπιθηλιακού, είτε του επιθηλιακού κυττάρου, ή ακόμη από ένα βλαστικό κύτταρο που έχει την ικανότητα να αναπτυχθεί σε μυοεπιθηλιακά ή επιθηλιακά κύτταρα. Σύμφωνα με την ογκολογία του καρκίνου του μαστού, τα νεοπλασματικά κύτταρα διαφέρουν από τα κανονικά κύτταρα του σώματος. Οι κανονικοί ιστοί του οργανισμού έχουν περιορισμένη ανάπτυξη που βοηθά στη διατήρηση της δομής και των φυσιολογικών τους λειτουργιών. Ωστόσο, τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν παρατεταμένο και χρόνια πολλαπλασιασμό χωρίς εξωτερικά ερεθίσματα. Ο καρκίνος του μαστού είναι μια κακοήθης ασθένεια που ξεκινά στα κύτταρα του μαστού. Όπως και σε άλλους κακοήθεις όγκους, υπάρχουν πολλές αιτίες που μπορούν να αυξήσουν την πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Η έκθεση σε οιστρογόνα έχει συσχετιστεί με μετάλλαξη στο DNA και κληρονομική αλλοίωση. Μερικοί ασθενείς κληρονομούν μετάλλαξη στο DNA σε γονίδια όπως τα P53, BRCA1 και BRCA2. Οι ασθενείς με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού ή των ωοθηκών έχουν πιθανότητα ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Τα νεοπλαστικά κύτταρα παρουσιάζουν σημαντική δυνατότητα πολλαπλασιασμού και μετατροπής σε τεράστιους όγκους. Το ανοσοποιητικό σύστημα προσπαθεί συνήθως να εντοπίσει καρκινικά κύτταρα και κύτταρα με αλλοιωμένο DNA και να τα καταστρέψει. Ο καρκίνος του μαστού όμως μπορεί να είναι απόρροια μιας δυσλειτουργίας μιας τέτοιας ανοσοαπόκρισης. Επίσης, εμφανίζεται συνήθως εξαιτίας μιας αλληλεπίδρασης μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι διαταραχές στη

σηματοδότηση των αυξητικών παραγόντων μπορεί να συμβάλλουν στην ανάπτυξη κακοηθών κυττάρων. Η υπερβολική έκφραση του λιπώδους ιστού ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και του καρκίνου.

Οι κύριες οδοί που ακολουθούνται στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού είναι η χειρουργική επέμβαση, η ακτινοθεραπεία, η ορμονική θεραπεία η χημειοθεραπεία και, τέλος, οι στοχευμένες θεραπείες. Το ποια στρατηγική θα ακολουθηθεί στην καταπολέμηση του όγκου εξαρτάται από το μέγεθός του, το σημείο που εντοπίζεται, την πιθανότητα να έχει επεκταθεί σε άλλους ιστούς και όργανα του σώματος, καθώς και από την φυσική κατάσταση του ατόμου. [6]

2.3 Καρκίνος των ωοθηκών

Ο καρκίνος των ωοθηκών (OC) είναι ο έβδομος πιο συχνά διαγνωσμένος καρκίνος μεταξύ των γυναικών στον κόσμο και ο δέκατος πιο συχνός στην Κίνα. Παγκοσμίως, 225.500 νέες περιπτώσεις καρκίνου των ωοθηκών διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο, με 140.200 θανάτους λόγω καρκίνου. Τα ποσοστά επίπτωσης και επιβίωσης ποικίλλουν ανά χώρα. Η Ρωσία και το Ηνωμένο Βασίλειο έχουν τα υψηλότερα ποσοστά καρκίνου των ωοθηκών, ενώ η Κίνα έχει τα χαμηλότερα ποσοστά. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, συμβαίνουν περίπου 22.280 νέα κρούσματα ετησίως και ο αριθμός θανάτων για το 2016 ήταν 14.240. Την τελευταία δεκαετία, έχει παρατηρηθεί ελάχιστη βελτίωση στη θνησιμότητα. Η βάση δεδομένων επιτήρησης, επιδημιολογίας και τελικών αποτελεσμάτων των ΗΠΑ αναφέρει ότι η συνολική επιβίωση για όλους τους ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών είναι 45,6%, αλλά αυτό ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με το στάδιο στην αρχική διάγνωση. Η πενταετής συνολική επιβίωση σε ασθενείς με καρκίνο σταδίου I είναι 92,1% αλλά είναι 25% για ασθενείς με καρκίνο σταδίου III και IV. Ο κίνδυνος εμφάνισης OC στη ζωή μιας γυναίκας είναι 1 στις 75 και η πιθανότητα να πεθάνει από τη νόσο είναι 1 στις 100. Η ασθένεια συνήθως εμφανίζεται σε μεταγενέστερο στάδιο όταν το ποσοστό 5ετούς σχετικής επιβίωσης είναι μόνο 29%. Λίγες περιπτώσεις (15%) διαγιγνώσκονται με εντοπισμένο όγκο (στάδιο 1). Εντυπωσιακά, το συνολικό ποσοστό σχετικής επιβίωσης 5 ετών κυμαίνεται γενικά μεταξύ 30%-40% σε όλο τον κόσμο. Παρά τη σημασία για τη δημόσια υγεία, η αιτιολογία αυτής της θανατηφόρου νόσου δεν είναι πλήρως κατανοητή.

Σχεδόν όλοι οι καλοήθεις και κακοήθεις όγκοι των ωοθηκών προέρχονται από έναν από τους τρεις τύπους κυττάρων: επιθηλιακά κύτταρα, στρωματικά κύτταρα και γεννητικά κύτταρα. Ο επιθηλιακός OC είναι ο πιο επικρατέστερος παθολογικός υπότυπος, με πέντε

κύριους ισότυπους που διαφέρουν ως προς την προέλευση, την παθογένεση, τις μοριακές αλλοιώσεις, τους παράγοντες κινδύνου και την πρόγνωση. Τα κακοήθη OC, γνωστά και ως καρκινώματα, αποτελούνται από πέντε κύριους ιστοτύπους: ορώδη υψηλού βαθμού (HGSOC; 70%), ενδομητριοειδή (ENOC; 10%), διαυγή κύτταρα (CCOC; 10%), βλεννώδη (MOC; 3%) και χαμηλού βαθμού ορώδη (LGSOC; <5%). Η κυτταρική προέλευση και η παθογένεση του OC δεν είναι καλά κατανοητή και, είναι ενδιαφέρον ότι οι περισσότεροι όγκοι φαίνεται να προέρχονται από άλλους γυναικολογικούς ιστούς και να αφορούν δευτερογενώς την ωοθήκη.

Οι τυπικές θεραπείες για τον νεοδιαγνωσθέντα καρκίνο αποτελούνται από κυτταρομειωτική χειρουργική και χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα. Σε υποτροπιάζοντα καρκίνο, χρησιμοποιούνται χημειοθεραπεία, αντι-αγγειογονικοί παράγοντες και αναστολείς πολυ(ADP-ριβόζης) πολυμεράσης ενώ δοκιμάζονται και ανοσολογικές θεραπείες. Το υψηλού βαθμού ορώδες καρκίνωμα (HGSC) είναι η πιο συχνά διαγνωσθείσα μορφή καρκίνου των ωοθηκών και κατά τη διάγνωση συνήθως ανταποκρίνεται πολύ στη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα. Ωστόσο, εκτός από τις άλλες ιστολογίες, τα HGSCs συχνά παρέρχονται και γίνονται όλο και πιο ανθεκτικά στη χημειοθεραπεία. Κατά συνέπεια, η κατανόηση των μηχανισμών που κρύβουν την αντίσταση στην πλατίνα και η εύρεση τρόπων υπέρβασής τους είναι ενεργοί τομείς μελέτης στον καρκίνο των ωοθηκών. Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί στον εντοπισμό γονιδίων που σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο καρκίνου των ωοθηκών (όπως τα BRCA1 και BRCA2), καθώς και μια πρόδρομη βλάβη του HGSC που ονομάζεται ορογόνο ενδοεπιθηλιακό καρκίνωμα των σαλπίνγων, το οποίο υπόσχεται τον εντοπισμό ατόμων υψηλού κινδύνου ανάπτυξη της νόσου και για την ανάπτυξη στρατηγικών πρόληψης.

Αν και κάποτε θεωρούνταν μια ενιαία οντότητα, ο καρκίνος των ωοθηκών μπορεί να υποδιαιρεθεί σε διαφορετικούς ιστολογικούς υποτύπους που έχουν διαφορετικούς αναγνωρίσιμους παράγοντες κινδύνου, κύτταρα προέλευσης, μοριακές συνθέσεις, κλινικά χαρακτηριστικά και θεραπείες. Αυτοί οι ιστολογικοί υποτύποι περιλαμβάνουν επιθηλιακούς καρκίνους που αντιπροσωπεύουν το ~ 90% των καρκίνων των ωοθηκών και περιλαμβάνουν ορώδη, ενδομητριοειδή, διαυγή και βλεννώδη καρκινώματα. Από αυτούς τους τύπους, το υψηλού βαθμού ορώδες καρκίνωμα (HGSC) είναι το πιο συχνά διαγνωσμένο. Ιστολογικά και κλινικά, το χαμηλού βαθμού ενδομητριοειδές καρκίνωμα και το χαμηλού βαθμού ορογόνο καρκίνωμα (LGSC) διαφέρουν σε σύγκριση με τα αντίστοιχα

υψηλού βαθμού. Το HGSC είναι παρόμοιο με το υψηλού βαθμού ενδομητριοειδές καρκίνωμα. Άλλες πιο σπάνιες ιστολογίες περιλαμβάνουν το μικροκυτταρικό καρκίνωμα (επιθετικός καρκίνος που εμφανίζεται κυρίως σε νεότερες γυναίκες, με διάμεση ηλικία κατά τη διάγνωση τα 25 έτη), το οποίο έχει αβέβαιη ιστοική προέλευση και καρκινοσάρκωμα (επίσης επιθετικός καρκίνος). Ορισμένοι καρκίνοι των ωοθηκών προέρχονται από θέσεις εκτός των ωοθηκών. Για παράδειγμα, πολλά HGSC των ωοθηκών πιθανότατα προέρχονται από τη σάλπιγγα και ορισμένες υποομάδες καρκίνου των ωοθηκών έχει αποδειχθεί ότι προέρχονται από το περιτόναιο. Επιπλέον, τα διαυγή καρκινώματα και τα ενδομητριοειδή καρκινώματα μπορεί να προέρχονται από ενδομήτριο ιστό που βρίσκεται έξω από τη μήτρα (ενδομητρίωση). Πράγματι, οι πληροφορίες σχετικά με τις πρόδρομες θέσεις του καρκίνου των ωοθηκών επέτρεψαν τη διερεύνηση νέων πρωτογενών στρατηγικών πρόληψης, όπως η μείωση του κινδύνου και η ευκαιριακή σαλπινγεκτομή (χειρουργική αφαίρεση της σάλπιγγας). Οι κλινικές δοκιμές εστιάζουν τώρα όλο και περισσότερο τις απαιτήσεις καταλληλότητας με βάση την ιστολογία του καρκίνου των ωοθηκών. Αποτελεσματικές στρατηγικές προσυμπτωματικού ελέγχου για την έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου των ωοθηκών δεν υπάρχουν, αλλά άτομα με υψηλό κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο των ωοθηκών, όπως αυτά με μεταλλάξεις βλαστικής σειράς σε BRCA1 ή BRCA2 (που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αποκατάσταση της βλάβης του DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού) ή μπορούν να εντοπιστούν άλλα γονίδια που σχετίζονται με υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών. Για αυτά τα άτομα, έχουν εφαρμοστεί στρατηγικές για τη μείωση του κινδύνου καρκίνου των ωοθηκών μέσω χειρουργικής επέμβασης μείωσης του κινδύνου, όπως η αμφοτερόπλευρη σαλπινγοωοθηκεκτομή (αφαίρεση των ωοθηκών και των σαλπίγγων). Οι στρατηγικές προσυμπτωματικού ελέγχου σε γυναίκες με μέσο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών έχουν επικεντρωθεί κυρίως στον βιοδείκτη CA125 (γνωστός και ως βλεννίνη 16) και στη χρήση διακολπικού υπερηχογραφήματος. Οι συνδυασμοί αυτών των μεθόδων προσυμπτωματικού ελέγχου έχουν δείξει επιτυχία στην ανίχνευση καρκίνων πρώιμου σταδίου, αλλά δεν έχουν ακόμη επιδείξει οριστικές βελτιώσεις στη θνησιμότητα των ασθενών.

Οι πιο δραστικοί θεραπευτικοί παράγοντες κατά του νεοδιαγνωσθέντος καρκίνου των ωοθηκών είναι τα ανάλογα της πλατίνας (είτε σισπλατίνη είτε καρβοπλατίνη), με την προσθήκη ταξάνης (είτε πακλιταξέλη είτε ντοσεταξέλης). Τα παραδείγματα θεραπείας για τη διαχείριση πρώτης γραμμής του νεοδιαγνωσθέντος καρκίνου των ωοθηκών

περιλαμβάνουν είτε πρωτογενή χειρουργική κυτταρομείωση (σε εξομάλυνση όγκων) ακολουθούμενη από συνδυαστική χημειοθεραπεία με πλατίνα ή νεοεπικουρική χημειοθεραπεία (NACT, χορήγηση χημειοθεραπείας πριν από την επέμβαση) ακολουθούμενη από ενδιάμεση χειρουργική κυτταρομείωση και πρόσθετη χημειοθεραπεία. Η υποτροπή του καρκίνου μετά την αρχική χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα είναι πολύ συχνή για τις γυναίκες που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο προχωρημένου σταδίου. Το πιο δύσκολο ζήτημα στη θεραπεία του καρκίνου σε αυτές τις γυναίκες είναι η τελική ανάπτυξη αντίστασης στην πλατίνα. Οι πρόοδοι σε νέες θεραπευτικές μεθόδους για τη θεραπεία υποτροπιάζοντος καρκίνου των ωθηκών περιλαμβάνουν αναστολείς αγγειογένεσης, αναστολείς πολυ(ADP-ριβόζης) πολυμεράσης (PARP) (που εμποδίζουν την αποκατάσταση της βλάβης του DNA) και παράγοντες ανοσοθεραπείας. Οι στρατηγικές που χρησιμοποιούν αναστολείς PARP ως μέρος της θεραπείας πρώτης γραμμής, καθώς και συνδυασμοί αυτών των θεραπειών για τη θεραπεία τόσο του νεοδιαγνωσθέντος όσο και του υποτροπιάζοντος καρκίνου των ωθηκών βρίσκονται σε εξέλιξη. Συνολικά, η θεραπεία του καρκίνου των ωθηκών με βάση τη διακριτή γονιδιωματική σύνθεση των επιμέρους ιστολογικών υποτύπων του καρκίνου των ωθηκών εξελίσσεται.

Επίπτωση και θνησιμότητα:

Αρκετοί παράγοντες μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωθηκών, συμπεριλαμβανομένων των γενετικών παραγόντων, της ηλικίας, της χρήσης ορμονικής θεραπείας μετά την εμμηνόπαυση και της στειρότητας. Μια σειρά γενετικών παραγόντων σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωθηκών. Οι μεταλλάξεις της βλαστικής σειράς BRCA1 και BRCA2 είναι οι περισσότερο σημαντικοί γνωστοί γενετικοί παράγοντες κινδύνου για καρκίνο των ωθηκών και οποιαδήποτε μετάλλαξη βρίσκεται σε ποσοστό έως και 17% των ασθενών. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις στο BRCA αυξάνουν τον κίνδυνο άλλων καρκίνων — όπως ο καρκίνος του μαστού (BRCA1 και BRCA2), ο καρκίνος του παγκρέατος (BRCA2), ο καρκίνος του προστάτη (BRCA2), το μελάνωμα (BRCA2) και, πιθανώς, ο ορώδης καρκίνος του ενδομητρίου (BRCA1) και η κληρονομικότητα αυτών των γονιδίων έχει μελετηθεί εκτενώς. Οι περισσότεροι υποτύποι του επιθηλιακού καρκίνου των ωθηκών σχετίζονται με μεταλλάξεις BRCA της βλαστικής σειράς, αλλά τα HGSCs είναι τα πιο κοινά και οι βλεννώδεις υπότυποι σπάνια συνδέονται. Η επιβίωση είναι βελτιωμένη για γυναίκες με

καρκίνο των ωοθηκών που φέρουν μεταλλάξεις BRCA βλαστικής σειράς σε σύγκριση με γυναίκες που έχουν καρκίνο των ωοθηκών αλλά είναι άγριου τύπου για τα BRCA1 και BRCA2. Οι μεταλλάξεις της βλαστικής σειράς BRCA2 σχετίζονται με αυξημένη συνολική επιβίωση σε σύγκριση με τις μεταλλάξεις της βλαστικής σειράς BRCA1, πιθανώς επειδή το BRCA2 έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη ευαισθησία στην πλατίνα και συνεπώς μεγαλύτερη θανάτωση καρκινικών κυττάρων από το BRCA1. Τόσο η θέση της μετάλλαξης BRCA εντός του γονιδίου όσο και ο τύπος της μετάλλαξης μπορεί επίσης να επηρεάσουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού ή καρκίνου των ωοθηκών, καθώς και η διάμεση ηλικία κατά τη διάγνωση, μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο της μετάλλαξης, τη θέση των νουκλεοτιδίων και τη λειτουργική συνέπεια της μετάλλαξης σε ασθενείς με μεταλλάξεις βλαστικής σειράς BRCA1 ή BRCA2. Εκτός από τα BRCA1 και BRCA2, άλλες μεταλλάξεις βλαστικής σειράς σε γονίδια που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA μπορούν και αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών, συμπεριλαμβανομένων γονιδίων που αποτελούν μέρος της οδού αναιμίας Fanconi-BRCA, όπως τα RAD51C, RAD51D, BRIP1, BARD1 και PALB2. Οι κληρονομικές μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA, όπως τα CHEK2, MRE11A, RAD50, ATM και TP53, ενδέχεται επίσης να αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου των ωοθηκών. Άλλες κληρονομικές διαταραχές, όπως το σύνδρομο Lynch, μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο καρκίνου των ωοθηκών. Το σύνδρομο Lynch σχετίζεται με καρκίνους του παχέος εντέρου, του ενδομητρίου και των ωοθηκών, αλλά μπορεί επίσης να σχετίζεται με καρκίνους του ουροποιητικού συστήματος, του στομάχου, του λεπτού εντέρου και της χοληφόρου οδού. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από κληρονομικότητα μιας βλαστικής σειράς μετάλλαξης σε γονίδια του συστήματος επιδιόρθωσης ασυμφωνίας DNA — συγκεκριμένα, MLH1, PMS2, MSH2 ή MSH6, τα οποία μεταλλάσσονται σε διαφορετικές συχνότητες. Οι ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών που σχετίζεται με το σύνδρομο Lynch έχουν μέση ηλικία σε εμφάνιση 48 ετών (σε σύγκριση με διάμεση ηλικία ~68 ετών σε άτομα χωρίς σύνδρομο Lynch), με ~50% των ασθενών να έχουν καρκίνο σταδίου I. Επιπλέον, τα καρκινώματα του ενδομητριοειδούς και των διαυγών κυττάρων είναι πιο συχνά σε ασθενείς με σύνδρομο Lynch από ό,τι θα προβλεπόταν για σποραδικό καρκίνο των ωοθηκών. Παρόλο που τόσο το BRCA όσο και το μονοπάτι επιδιόρθωσης ασυμφωνίας DNA εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA, οι συγκεκριμένοι μηχανισμοί

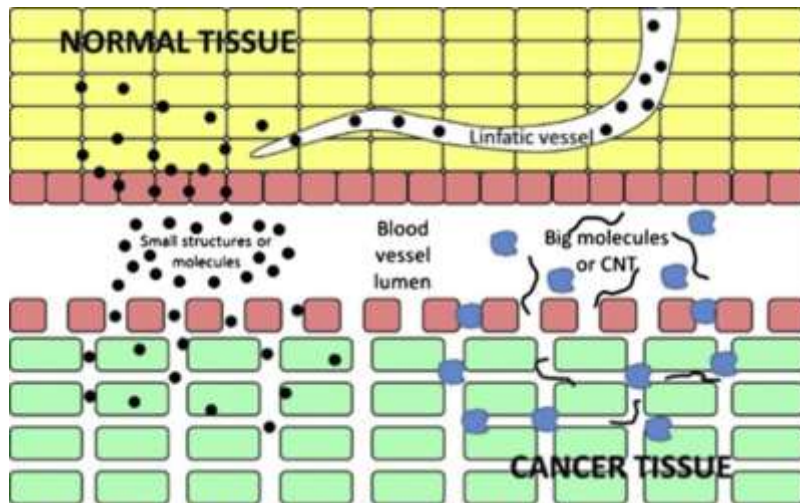
που βασίζονται στο γιατί εμφανίζονται οι καρκίνοι σε συγκεκριμένα όργανα που σχετίζονται με αυτά τα κληρονομικά μεταλλαγμένα γονίδια είναι άγνωστοι. [7-9]

2.4 Νανοτεχνολογία στην αντικαρκινική θεραπεία

2.4.1 Επίδραση του φαινομένου EPR

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι συμβατικές θεραπευτικές στρατηγικές για τον καρκίνο περιλαμβάνουν χειρουργική αφαίρεση των όγκων, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και ανοσολογική θεραπεία. Συγκεκριμένα, η χημειοθεραπεία είτε μόνη της, είτε σε συνδυασμό, είναι η πιο κοινή αντικαρκινική θεραπεία. Ωστόσο, τα αντικαρκινικά φάρμακα, όπως η δοξορουβικίνη και η πακλιταξέλη, συχνά παρουσιάζουν φτωχή *in vivo* φαρμακοκινητική και χρειάζονται υψηλές δόσεις για αποτελεσματική θεραπεία, με αποτέλεσμα τη μη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, η οποία οδηγεί σε μία απρόβλεπτη συστηματική τοξικότητα. Για την αντιμετώπιση αυτών των ζητημάτων, διάφορες διεπιστημονικές προσεγγίσεις έχουν διευκολυνθεί με τη νανοτεχνολογία. Μια ποικιλία νανοσωματιδίων αναπτύσσεται εντατικά για βιοϊατρικές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της μοριακής απεικόνισης και της μεταφοράς αντικαρκινικών φαρμάκων. Γενικά, τα σωματίδια νανο-μεγέθους τείνουν να συσσωρεύονται περισσότερο στους όγκους από ό,τι στους φυσιολογικούς ιστούς. Αυτή η ιδιότητα των νανοσωματιδίων έχει μελετηθεί ευρέως για βιοϊατρικές εφαρμογές, ενώ το φαινόμενο EPR (Enhanced Permeability and Retention) αποτελεί τον πιο διαδεδομένο μηχανισμό για την επίτευξη της στοχευμένης αυτής συσσώρευσης. Πρώτη φορά τη δεκαετία του 1980, η ομάδα του Maeda απέδειξε την ιδέα του μηχανισμού EPR σε συμπαγείς όγκους. Το φαινόμενο EPR είναι η ιδιότητα στην οποία τα νανοσωματίδια μικρού μεγέθους και τα μακρομοριακά φάρμακα μπορούν να συσσωρεύονται περισσότερο στους καρκινικούς όγκους από ό,τι στους φυσιολογικούς ιστούς. Το φαινόμενο EPR οφείλεται γενικά στο μεγαλύτερο μέγεθος των πόρων των νεο-αγγείων και στην κακή λεμφική κάθαρση των όγκων, και επηρεάζεται έντονα από το μέγεθος των μικρών μορίων συμπεριλαμβανομένων των νανοσωματιδίων. Η παθητική συσσώρευση των μικρών μορίων στον όγκο, ιδιαίτερα των νανοσωματιδίων, οφείλεται κυρίως στην ανώμαλη δομή των αγγειογενών αγγείων, η οποία αποτελείται από κακώς ευθυγραμμισμένα ελαττωματικά ενδοθηλιακά κύτταρα. Μια ποικιλία αγγειογενετικών παραγόντων και κακώς ευθυγραμμισμένων ενδοθηλίων βλάστησης νέων αιμοφόρων αγγείων παρέχει ένα πολύ διαπερατό περιβάλλον για τα νανοσωματίδια. Στο φαινόμενο EPR εμπλέκονται διάφοροι παράγοντες, όπως το

μέγεθος, η σύνθεση, το σχήμα, το επιφανειακό φορτίο και η παραμόρφωση των μικρών μορίων. Συγκεκριμένα, το φαινόμενο EPR επηρεάζεται έντονα από το μέγεθος των σωματιδίων. Έχει αναφερθεί ότι τα νανοσωματίδια πρέπει να έχουν μέγεθος λιγότερο από 200 nm για να επιτευχθεί το φαινόμενο EPR. Επιπλέον, σωματίδια μεγέθους κάτω των 100 nm βρέθηκε ότι εξαγγειώνονται αποτελεσματικά από αγγειογενή αγγεία χωρίς τον περιορισμό του μεγέθους. Ωστόσο, μεγαλύτερα νανοσωματίδια (~ 200 nm) με ορισμένη έκταση παραμορφωσιμότητας και ευκαμψίας μπορεί να συσσωρευτούν και σε όγκους, κυρίως λόγω του φαινομένου EPR. Η επίδραση EPR επηρεάζεται, επίσης, και από το μοριακό βάρος του φαρμάκου ή του φορέα του φαρμάκου. Στην πράξη, μόρια από 40 έως 800 kDa σε μέγεθος θεωρούνται ιδανικά για το φαινόμενο EPR. Μετά την εξαγγείωση, η βιοκατανομή μικρών μορίων συμπεριλαμβανομένων των νανοσωματιδίων εξαρτάται επίσης από το μέγεθος των σωματιδίων. Σχετικά μεγάλα νανοσωματίδια (> 100 nm) δεν κατανέμονται μακριά από τα αιμοφόρα αγγεία, ενώ τα μικρότερα (<100 nm) διεισδύουν βαθιά στους καρκινικούς ιστούς. Για να αναπτυχθούν νανοσωματίδια για μεταφορά φαρμάκων μέσω EPR, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη πολλοί παράγοντες. Για την αποτελεσματική μεταφορά, έχει προταθεί ότι τα νανοσωματίδια θα πρέπει να έχουν ιδιότητες ικανοποιητικού χρόνου ημιζωής στο αίμα, ελάχιστη μη ειδική παράδοση του φορτίου τους και αποτελεσματική αποβολή από το σώμα. Τέλος, πολλές προσπάθειες έχουν γίνει, με σκοπό να ενισχύσουν το φαινόμενο EPR. Οι προσπάθειες εστιάζονται κυρίως στον συνδυασμό του φαινομένου EPR με άλλα πλεονεκτικά λειτουργικά χαρακτηριστικά. Τα χαρακτηριστικά αυτά συνοψίζονται στα εξής: (1) λειτουργία στόχευσης με βάση τους υποκαταστάτες (ligands) που βρίσκονται στα καρκινικά κύτταρα, (2) σταθεροποίηση της επιφάνειας των νανοσωματιδίων για παράταση του χρόνου ημιζωής και αποφυγή ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, (3) διευκόλυνση της ενδοκυτταρικής πρόσληψης ή/και των ενδοκυτταρικών συμπεριφορών, όπως η ενδο-λυσοσωμική απόδραση και η απελευθέρωση φαρμάκων. [10-14]



Εικόνα 2: Διάγραμμα για την ενισχυμένη επίδραση διείσδυσης και κατακράτησης που επιτρέπει την εισαγωγή μεγάλων μορίων στον καρκινικό ιστό

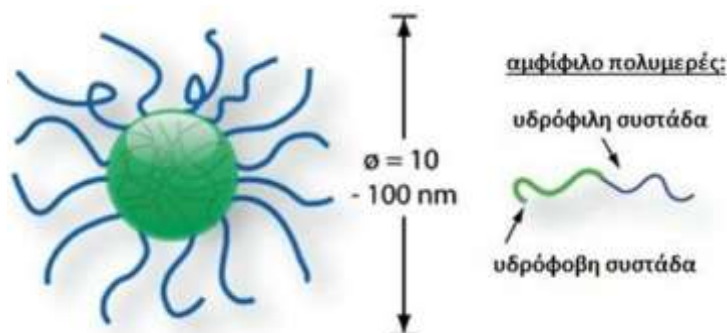
2.4.2 Πολυμερικά μικύλλια

Οι θεραπευτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου είναι γενικά υδρόφοβοι και κακώς υδατοδιαλυτοί, γεγονός που οδηγεί σε κακή απορρόφηση και χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα. Προκειμένου να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα, τα φάρμακα μπορούν να συζευχθούν με πολυμερή, για την αύξηση του χρόνου κυκλοφορίας τους στο αίμα και την αποτροπή νεφρικής κάθαρσης για πιο αποτελεσματική συσσώρευση στον συμπαγή όγκο μέσω της επίδρασης EPR. Μια άλλη μέθοδος θεραπείας καρκίνου είναι η χρήση μικυλλίων ή νανοσωματιδίων για μεταφορά αντικαρκινικών φαρμάκων. Τα μικύλλια έχουν υδρόφοβο πυρήνα και υδρόφιλο κέλυφος και μπορούν να εγκλωβίσουν υδρόφοβα φάρμακα στον πυρήνα τους. Η φαρμακευτική αποτελεσματικότητα του εγκλωβισμένου σε μικύλλιο φαρμάκου μπορεί να αυξηθεί με στόχευση των μικυλλίων με βάση το EPR σε παθολογικά όργανα ή ιστούς. [12]

Η χρήση των πολυμερικών μικυλλίων στη θεραπεία του καρκίνου αναφέρθηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1980 από τον Ringsdorf και τους συνεργάτες του. Αυτά τα σφαιρικά σωματίδια έχουν μέγεθος νανομέτρων (συνήθως στο εύρος 10-100 nm) και είναι υπερμοριακές κατασκευές που σχηματίζονται από την αυτοοργάνωση βιοσυμβατών αμφίφιλων κατά συστάδες συμπολυμερών σε υδατικά περιβάλλοντα. Στο νερό, το υδρόφοβο τμήμα του συμπολυμερούς σχηματίζει έναν ημιστερεό πυρήνα, ενώ το υδρόφιλο τμήμα συνιστά το εξωτερικό κέλυφος. Η προκύπτουσα αρχιτεκτονική πυρήνα-κελύφους είναι σημαντική για τη μεταφορά φαρμάκων, επειδή ο υδρόφοβος πυρήνας μπορεί να εγκλωβίσει τα αδιάλυτα στο νερό φάρμακα, ενώ το εξωτερικό κέλυφος

προστατεύει το μικύλλιο από την ταχεία εκκαθάρισή του. Παρόλο που έχουν μελετηθεί πολλές λειτουργικές πτυχές των συστάδων του συμπολυμερούς (π.χ. συστάδες ευαίσθητες σε θερμοκρασία ή pH), το πιο σημαντικό κριτήριο είναι η βιοσυμβατότητα και η βιοαποικοδομησιμότητα. Επί του παρόντος, το πολυμερές που χρησιμοποιείται πιο συχνά για να συνθέσει την εξωτερική κορώνα του μικυλλίου είναι η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 2 έως 15 kD. Ο πυρήνας του μικυλλίου ενδεικτικά μπορεί να αποτελείται από πολυ(προπυλενοξείδιο) (poly(propylene oxide), PPO), πολυ (D,L-γαλακτικό οξύ) (poly(D,L-lactic acid), PDLLA), πολυ(ε-καπρολακτόνη) (poly(ε-caprolactone), PCL), και το πολυ (L-ασπαρτικό οξύ) (poly(L-aspartic acid). Εξαιτίας της λιπόφιλης φύσης τους, τα περισσότερα αντικαρκινικά φάρμακα είναι εγγενώς αδιάλυτα στο νερό. Για παράδειγμα, η πακλιταξέλη, ένα πολύ αποτελεσματικό αντικαρκινικό φάρμακο, έχει διαλυτότητα στο νερό 0,0015 mg/mL. Παρόλο που αυτός ο βαθμός υδροφοβικότητας είναι ευνοϊκός για τη διαπερατότητα του φαρμάκου μέσω των πλασματικών μεμβρανών των κυττάρων, η ενδοφλέβια χορήγηση θα είχε ως αποτέλεσμα ταχεία συσσωμάτωση του φαρμάκου και σχηματισμό τριχοειδών εμβολισμών. Με τον εγκλωβισμό του φαρμάκου εντός του υδρόφοβου πυρήνα του μικυλλίου, η φαινομενική διαλυτότητα του φαρμάκου μπορεί να αυξηθεί σημαντικά. Για παράδειγμα, ο εγκλωβισμός της πακλιταξέλης σε πολυμερικά μικύλλια αυξάνει τη διαλυτότητα πάνω από τρεις τάξεις μεγέθους από 0,0015 σε 2 mg/mL. Ως εκ τούτου, τα μικύλλια επιτρέπουν την *in vivo* χορήγηση των είδη γνωστών υδρόφοβων φαρμάκων, χωρίς να χρειάζεται να διαφοροποιηθεί η χημική δομή τους. Επιπλέον, η ενθυλάκωση του φαρμάκου εντός του πυρήνα παρέχει σταθερότητα στο φάρμακο, παρεμποδίζοντας την ενζυματική αποικοδόμηση και απενεργοποίηση. Η υδρόφιλη μικυλλιακή κορώνα παίζει επίσης σημαντικό ρόλο σε *in vivo* εφαρμογές μειώνοντας την αναγνώριση των σωματιδίων από πρωτεΐνες οψονίνης. Χωρίς το υδρόφιλο κέλυφος, το μικύλλιο θα υποστεί ταχεία φαγοκυτταρική εκκαθάριση από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (reticuloendothelial system, RES). Επιπλέον, η κρίσιμη μικυλλιακή συγκέντρωση (critical micelle concentration, CMC, το όριο της συγκέντρωσης των πολυμερών στην οποία σχηματίζονται μικύλλια) είναι πολύ χαμηλή για πολυμερικά μικύλλια, συνήθως της τάξης των 10^{-6} – 10^{-7} M, με αποτέλεσμα το σχηματισμό σταθερών δομών, οι οποίες δεν αποικοδομούνται εύκολα *in vivo*. Αυτά τα χαρακτηριστικά συμβάλλουν όλα μαζί σε μεγαλύτερους χρόνους κυκλοφορίας του συστήματος στο αίμα, γεγονός το οποίο με τη σειρά του οδηγεί σε αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του φαρμάκου. Οι μεγάλοι χρόνοι

κυκλοφορίας και το μικρό μέγεθος των πολυμερικών μικυλλίων βοηθούν, επίσης, στην προτιμησιακή συσσώρευση των μικυλλίων στον καρκινικό όγκο μέσω του φαινομένου της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης (EPR), το οποίο επιτρέπει την παθητική στόχευση λόγω των διεγέρσεων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων στα αγγειογενετικά αγγεία του όγκου. [15]



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της δομής πυρήνα-κελύφους ενός πολυμερικού μικυλλίου [15]


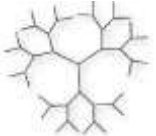


2.4.3 Άλλα θεραπευτικά νανοσυστήματα και μεταξύ τους σύγκριση [15]

Τα συζεύγματα πολυμερούς-φαρμάκου, τα δενδριμερή και τα λιποσώματα αντιπροσωπεύουν άλλα κύρια νανοθεραπευτικά συστήματα με βάση τα πολυμερή, το καθένα με διαφορετικές χημικές δομές και βιολογικές ιδιότητες. Μεταξύ αυτών των συστημάτων, τα συζεύγματα πολυμερούς-φαρμάκου και τα λιποσώματα έχουν μεγαλύτερη ιστορία στην ανάπτυξή τους και μέχρι σήμερα έχουν βρει τη μεγαλύτερη επιτυχία στις κλινικές χρήσεις. Για παράδειγμα, το SMANCS, ένα προϊόν σύζευξης της νεοκαρζινοστατίνης (neocarzinostatin, NCS) και του πολυ(στυρενίου-co-μηλεϊνικού οξέος) (poly(styrene-co-maleic acid), SMA), αναπτύχθηκε από την ομάδα του Maeda το 1980, και έχει εγκριθεί κλινικά για τη θεραπεία του καρκίνου του ήπατος [16]. Ο χρόνος ημιζωής του SMANCS στο αίμα είναι 10 φορές υψηλότερος από αυτόν του NCS, γεγονός που οδηγεί σε ενισχυμένη στόχευση στον όγκο μέσω του φαινομένου EPR. Όσον αφορά τα λιποσωματικά συστήματα μεταφοράς, το Doxil, που είναι ένα πεγκυλιωμένο σύστημα δοξορουβικίνης είναι κλινικά εγκεκριμένο για τη θεραπεία του σαρκώματος του Kaposi και αρκετών τύπων στερεών όγκων [17]. Ενώ τα δενδριμερή δεν έχουν βρει ακόμη το δρόμο τους στην κλινική χρήση, προκαταρκτική έρευνα με Δενδριμερή πολυαμιδοαμίνης που περιέχουν μεθοτρεξάτη έχουν δείξει μείωση της ανάπτυξης των υποδόριων όγκων σε ποντίκια [18]. Αρκετά μικυλλιακά συστήματα βρίσκονται επί του παρόντος στη Φάση I/II των κλινικών δοκιμών για τη χορήγηση δοξορουβικίνης (DOX) και πακλιταξέλης. Μεταξύ

αυτών, ο Kataoka και οι συνεργάτες του συνέθεσαν μικύλλια DOX από ένα κατά συστάδες συμπολυμερές πολυ(αιθυλενογλυκόλης)-*b*-πολυ(L-ασπαρτικού οξέος), τα οποία παρουσιάζουν σημαντικά βελτιωμένη προκλινική αντικαρκινική αποτελεσματικότητα [19].

Ο Πίνακας 1 δείχνει τις βασικές δομές και τις ιδιότητες των νανοσυστημάτων και χρησιμεύει για να επισημάνει τις διαφορές που υπάρχουν ανάμεσά τους.

Πίνακας 1: Συνοπτικός πίνακας των νανοσυστημάτων που χρησιμοποιούνται στην αντικαρκινική θεραπεία.

Νανο-Συστήματα	Σύζευξη πολυμερούς-φαρμάκου	Δενδριμερή	Μικύλλια πολυμερούς	Λιποσώματα
				
Μέγεθος	< 10 nm	2 - 10 nm	10 - 100 nm	100 - 200 nm
Δομικά χαρακτηριστικά	Μακρομοριακή δομή	Μακρομοριακή δομή δενδριμερούς	Σφαιρική, υπερομοιομοριακή δομή πυρήνα-κελύφους	Σφαιρική, διπλή στοιβάδα δομής μικκυλίου
Σύσταση φορέα	Υδατο-διαλυτό πολυμερές	Υπερδιακλαδισμένη αλυσίδα πολυμερούς	Αμφίφιλα δι- και τρι-συσταδικά συμπολυμερή	Φωσφολιπίδια, χοληστερόλη, μεμβράνη λιπιδίου
Στρατηγική ενσωμάτωσης φαρμάκου	Ομοιοπολική σύζευξη που απαιτεί δραστικές ομάδες σε φάρμακο και πολυμερές	Ομοιοπολική σύζευξη που απαιτεί δραστικές ομάδες σε φάρμακο και πολυμερές	Μη ομοιοπολική ενθυλάκωση/ συμβατή με υδρόφοβο φάρμακο	Μη ομοιοπολική ενθυλάκωση/ συμβατή με υδρόφοβο φάρμακο
Κλινική κατάσταση	Κλινική	Προ-κλινική	Φάση I/II κλινικές δοκιμές	Κλινική

Τόσο τα προϊόντα σύζευξης πολυμερούς-φαρμάκου, όσο και τα δενδριμερή απαιτούν την ομοιοπολική σύζευξη των φαρμάκων με τους φορείς. Αυτό με τη σειρά του απαιτεί την παρουσία χημικών ομάδων στα μόρια του φαρμάκου που μπορούν να τροποποιηθούν, περιορίζοντας τη γενικότητα αυτής της προσέγγισης. Υπό το φως της υψηλής χημικής σταθερότητας των ομοιοπολικών δεσμών, απαιτούνται συγκεκριμένες χημικές

στρατηγικές (π.χ. ενζυματική αποικοδόμηση, όξινη υδρόλυση) για την απελευθέρωση των φαρμάκων στις θέσεις του όγκου. Επιπλέον, λόγω του μικρού μεγέθους αυτών των συστημάτων (συνήθως <10 nm), μπορούν εύκολα να διαπεράσουν βασικές μεμβράνες στα σπειράματα των νεφρών και να εκκαθαριστούν γρήγορα, οδηγώντας σε πολύ μικρότερους χρόνους ημιζωής στο αίμα.

Τα λιποσώματα είναι φυσαλιδώδεις νανοδομές, οι οποίες αυτοοργανώνονται από τα μόρια φωσφολιπιδίων και χοληστερόλης που συνήθως σχηματίζουν τις κυτταρικές μεμβράνες [20]. Εξαιτίας του εσωτερικού υδρόφιλου διαμερίσματός τους, τα λιποσώματα είναι πιο κατάλληλα για τη μεταφορά υδατοδιαλυτών παραγόντων όπως θεραπευτικών πρωτεϊνών ή DNA. Τα ελάχιστα διαλυτά φάρμακα μπορούν να παγιδευτούν εντός της υδρόφοβης διπλοστιβάδας της μεμβράνης, αλλά η ικανότητα φόρτωσης (loading capacity) είναι περιορισμένη λόγω των προβλημάτων αποσταθεροποίησης της μεμβράνης. Σε πολλές μελέτες έχουν παρουσιαστεί λιποσώματα με Stealth ιδιότητες, όπου υδρόφιλα πολυμερή όπως η πολυ-αιθυλενογλυκόλη PEG έχουν συζευχθεί στην λιποσωμική επιφάνεια, αυξάνοντας το χρόνο κυκλοφορίας του συστήματος στο αίμα και ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα της παθητικής στόχευσης σε συμπαγείς όγκους μέσω του φαινομένου EPR. Ωστόσο, λόγω εγγενών δομικών περιορισμών, τα περισσότερα λιποσωμικά σωματίδια έχουν διάμετρο άνω των 90 nm, η οποία μπορεί να περιορίσει σημαντικά τη μεταφορά τους σε καρκινικούς ιστούς. Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το ινώδες κολλαγόνο είναι το κύριο δομικό εμπόδιο για τη μεταφορά. Επιπλέον, η απελευθέρωση φαρμάκου από συμβατικά λιποσωμικά σκευάσματα είναι αρκετά περιορισμένη όταν αυτά τα σωματίδια φτάσουν στον όγκο. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, τα θερμο- και pH- αποκρινόμενα λιποσώματα έχουν διερευνηθεί για να παρέχουν στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων με σκοπό να βελτιωθεί η βιοδιαθεσιμότητά τους [21].

Τα πολυμερικά μικύλλια δρουν συμπληρωματικά στα παραπάνω νανοσυστήματα. Οι υδρόφοβοι πυρήνες των μικυλλίων παρέχουν ένα φυσικό περιβάλλον φορέα που επιτρέπει τον εύκολο εγκλωβισμό σε κακώς διαλυτά αντικαρκινικά φάρμακα. Η μη ομοιοπολική σύνδεση καθιστά εφικτή την ενθυλάκωση των φαρμάκων χωρίς την απαίτηση δραστικών χημικών ομάδων. Παράλληλα όμως, η μοναδική χημεία των συστατικών του πολυμερούς επιτρέπει τη χημική σύζευξη των αντικαρκινικών φαρμάκων, όπως η δοξορουβικίνη [22, 23], σε αυτές τις αλυσίδες, βελτιώνοντας αποτελεσματικά τη

φόρτωση των φαρμάκων και παρεμποδίζοντας την πρόωρη απελευθέρωσή τους κατά τη χορήγηση. Επιπλέον, το μέγεθος των πολυμερικών μικυλλίων, 10-100 nm, μπορεί εύκολα να ελεγχθεί, μεταβάλλοντας το υδρόφοβο τμήμα του αμφίφιλου συμπολυμερούς[24]. Αυτό το εύρος μεγεθών επιτρέπει επίσης την αποφυγή εκκαθάρισης, ενώ επιτρέπει την αυξημένη διείσδυση του φαρμάκου στον όγκο σε σύγκριση με τα λιποσώματα.

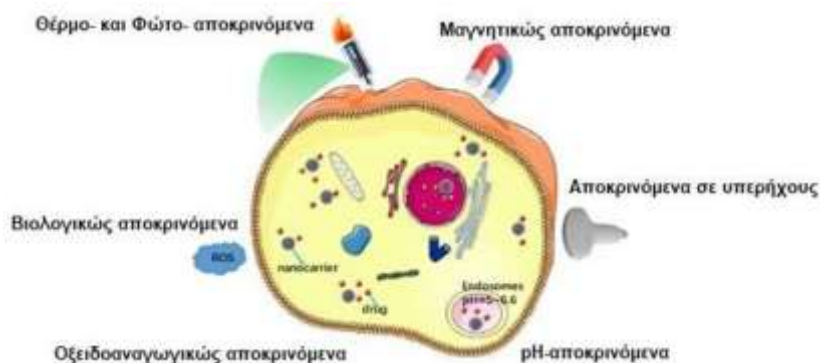
Παρά τα πολλά πλεονεκτήματα των πολυμερικών μικυλλίων για *in vivo* εφαρμογές, υπάρχουν αρκετές προκλήσεις και αντιπροσωπεύουν ένα ενεργό τομέα της έρευνας. Για παράδειγμα, το μικρό μέγεθος μικυλλίου των 10-100 nm περιορίζει την ποσότητα φαρμάκου που μπορεί να ενσωματωθεί στον πυρήνα, με την υψηλότερη φόρτωση φαρμάκων να έρχεται σε σύγκρουση με το αυξημένο μέγεθος του μικυλλίου και τη συσσωμάτωσή του [25,26]. Αυτό το μικρό μέγεθος και η περιορισμένη φόρτωση φαρμάκων με τη σειρά οδηγεί σε ταχύτερη απελευθέρωση από τα μικύλλια, γεγονός που προκαλεί πρόωρη απελευθέρωση πριν φτάσει το μικύλλιο στον προοριζόμενο τόπο δράσης. Ως εκ τούτου, χημικές στρατηγικές σύζευξης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, καθώς επίσης και αύξηση της συμβατότητας του πυρήνα του μικυλλίου με το προοριζόμενο φάρμακο, διερευνώνται για την αντιμετώπιση αυτών των ανησυχιών. Επιπλέον, έχουν τεθεί πολλά ερωτήματα σχετικά με τη μακροπρόθεσμη σταθερότητα των πολυμερικών μικυλλίων. Σε απάντηση αυτών των ζητημάτων, αρκετές ομάδες εξετάζουν τη σταθεροποίηση του πυρήνα των μικυλλίων με χρήση σταυροδεσμών, προκειμένου να βελτιωθεί η σταθερότητά τους *in vivo* [27, 28]. Τέλος, υπάρχουν πολλά ερωτηματικά σχετικά με την αντικαρκινική αποτελεσματικότητα των μικυλλίων στο κλινικό περιβάλλον. Όσον αφορά το ζήτημα αυτό, πολλά εργαστήρια έχουν διερευνήσει μεθόδους για να διασφαλιστεί η συσσώρευση των μικυλλίων στη θέση του όγκου και να απελευθερωθεί το περιεχόμενό του με ελεγχόμενο και προκαθορισμένο τρόπο.

2.5 Αποκρινόμενα Νανοσυστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων [29, 30]

Όπως έχει ήδη αναφερθεί εκτενώς, ο καρκίνος γίνεται όλο και πιο κοινός στη ζωή του ανθρώπου και παραμένει μια από τις κύριες αιτίες θανάτου. Εξαιτίας της πολύπλοκης φύσης του, των πολλαπλών μεταβολικών οδών και της ικανότητας αντοχής σε πολλαπλά φάρμακα, είναι δύσκολο να καταστραφούν τα καρκινικά κύτταρα, χωρίς να εμπλέκονται τα φυσιολογικά όργανα του σώματος. Επομένως, κρίνεται απαραίτητος ο σχεδιασμός και η σύνθεση έξυπνων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων που να μπορούν να μεταφέρουν τους θεραπευτικούς παράγοντες με έναν ελεγχόμενο χρονικά και χωρικά τρόπο. Την

ανάγκη αυτή έρχεται να καλύψει ο τομέας της νανοβιοτεχνολογίας με τη χρήση νανοβιοϋλικών, όπως μικύλλια, λιποσώματα, πολυμεροσώματα, μαγνητικά νανοσωματίδια, μεσοπορώδη νανοσωματίδια σίλικας κ.λπ. Με την πρόοδο που έχει γίνει στα νανοβιοϋλικά, έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια και η έρευνα για τα έξυπνα αποκρινόμενα νανοσωματίδια. Επειδή το περιβάλλον του όγκου είναι πολύπλοκο και ετερογενές, η μεταφορά του νανοφαρμάκου και η αλληλεπίδρασή του εντός της περιοχής του εμφανίζει μεγάλες προκλήσεις. Το μικροπεριβάλλον του όγκου είναι μια δυναμική και ιδιαίτερη θέση για οξύτητα, διατροφή, υποξία και ισχαιμία [31]. Συνήθως, η τιμή του pH ενός όγκου είναι 6,5-7,2, ενώ στα καρκινικά κύτταρα ανιχνεύονται και υψηλότερες συγκεντρώσεις σε διάφορες βιολογικές ουσίες (γλουταθειόνη [GSH], μεταλλοπρωτεϊνάση μήτρας 2 [MMP2], δραστικά οξειδωτικά είδη [ROS]). Ιδανικά, τα έξυπνα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων πρέπει να διαθέτουν τις ακόλουθες ιδιότητες: βιοσυμβατότητα χωρίς συστηματικές ανεπιθύμητες παρενέργειες, συσσώρευση στις περιοχές-στόχους, ακριβείς αποκρίσεις στα ερεθίσματα και μακροχρόνια σταθερότητα στην κυκλοφορία του αίματος. Ο συνδυασμός δύο ή τριών ερεθισμάτων μπορεί να βελτιώσει περαιτέρω την απόκριση κατά την απελευθέρωση του φαρμάκου στην περιοχή του όγκου. Η παρατεταμένη συγκέντρωση που βασίζεται στην ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου οδηγεί στη μειωμένη συνολική δόση ένεσης. Η βιοκατανομή των θεραπευτικών παραγόντων ελέγχεται από φυσικά ερεθίσματα (θερμότητα / φως, μαγνητικό πεδίο, υπέρηχοι), χημικά ερεθίσματα (pH, ένζυμα, οξειδοαναγωγικοί παράγοντες) και βιολογικά ερεθίσματα (ROS, MMP2). Τα συστήματα φυσικής απόκρισης βασίζονται σε εξωγενή (εξωτερικά) ερεθίσματα και χρειάζεται εξωτερική τροφοδοσία για παραγωγή απόκρισης όπως υπερθερμία, φως, μαγνητικό πεδίο κ.λπ. Η επίδραση του εξωτερικού συστήματος απόκρισης είναι συνήθως αναστρέψιμη και δεν έχει καμία σχέση με την ιοντική συγκέντρωση στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Ο περιορισμός της φυσικής απόκρισης έγκειται στην εφαρμογή των συστημάτων αυτών μόνο σε επιφανειακούς όγκους, επειδή το εξωτερικό ερέθισμα δεν είναι ικανό να φτάσει σε βαθείς ιστούς. Αντίθετα, τα χημικώς και βιολογικώς αποκρινόμενα συστήματα εξαρτώνται από ενδογενή (εσωτερικά) ερεθίσματα, όπως η ενδοκυτταρική ιοντική ισχύ, το pH, οι συγκεντρώσεις ενζύμων κ.λπ. Αυτού του είδους τα συστήματα βρίσκουν εφαρμογή σε όλους τους τύπους των όγκων του σώματος, ενώ η αποκρισιμότητα είναι μη αντιστρεπτή, εξαιτίας της κατανάλωσης των ενδογενών ουσιών. Τόσο τα εξωτερικώς, όσο και τα εσωτερικώς αποκρινόμενα

συστήματα έχουν διάφορα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, αλλά οι ερευνητές μπορούν να επιλέξουν την κατάλληλη αποκρισιμότητα για να θεραπεύσουν συγκεκριμένο όγκο.



Εικόνα 4: Διαφορετικοί τύποι αποκρινόμενων νανοσυστημάτων στην αντικαρκινική θεραπεία [30].

2.5.1 Φυσικώς αποκρινόμενα πολυμερή

• Θέρμο- και φώτο- αποκρινόμενα

Τα θερμικώς αποκρινόμενα νανοσωματίδια είναι τα πιο μελετημένα συστήματα για τη θεραπεία όγκων. Στα συστήματα αυτά, το εγκλωβισμένο φάρμακο συνήθως διατηρείται σε κανονική θερμοκρασία σώματος κατά την κυκλοφορία του αίματος, ενώ η εκρηκτική του απελευθέρωση προκαλείται από την τοπική υπερθερμία εντός του όγκου [32]. Η ανάπτυξη θερμοευαίσθητων νανοϋλικών βασίζεται στην επιλογή των βιοϋλικών, τα οποία διαθέτουν καλή βιοσυμβατότητα και ευαισθησία σε αύξηση ή μείωση θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα, το πολυ (*N*-ισοπροπυλο ακρυλαμίδιο) (poly(*N*-isopropyl acrylamide), PNIPAM) είναι το πολυμερές που χρησιμοποιείται περισσότερο και έχει τη χαμηλότερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος (Lower Critical Solution Temperature, LCST) [33]. Η νανοϊατρική που χρησιμοποιεί laser ή ακτινοβολία φωτός μπορεί να προκαλέσει ανταλλαγή ενέργειας για αύξηση της θερμοκρασίας στην περιοχή του στόχου. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορα συστήματα που αποκρίνονται στο φως εξαιτίας της μη επεμβατικής ικανότητάς τους και της δυνατότητας τηλεχειρισμού. Το συμβατικό φωτοευαίσθητο σύστημα παρουσιάζει χαμηλό βάθος διείσδυσης του μαλακού ιστού και ισχυρή σκέδαση, λόγω της υπεριώδους - ορατής πηγής φωτός. Τη νέα γενιά τέτοιων συστημάτων απαρτίζουν συστήματα υπέρυθρων (NIR) (Παράθυρο NIR I: 700-1.000 nm, NIR παράθυρο II: 1000- 1.350 nm, ακόμη και NIR παράθυρο III: 1500-1870 nm). Με αύξηση του μήκους κύματος, μειώνεται η σκέδαση και η διείσδυση των ιστών γίνεται βαθύτερη. Ένα τέτοιο φωτο-αποκρινόμενο σύστημα μεταφοράς φαρμάκων

επιτυγχάνει ελεγχόμενη και στοχευμένη μεταφορά, μεγιστοποιώντας την αντικαρκινική δράση και ελαχιστοποιώντας τις παρενέργειες [34]. Η νανοϊατρική που ανταποκρίνεται στο NIR είχε μελετηθεί ευρέως τα τελευταία χρόνια. Για παράδειγμα, το 2015, η ομάδα του Liao ανέπτυξε ένα NIRαποκρινόμενο σύστημα αποτελούμενο από πολυμεροσώματα πολυ(αιθυλενογλυκόλης)-πολυ(ε-καπρολακτόνης), τα οποία αντιδρούν με χρυσό, σχηματίζοντας nanoparticles χρυσού, και εγκλωβίζουν δοξορουβικίνη [35]. Όταν τα P-GNRs-DOX ακτινοβολήθηκαν με laser 808 nm στα 2,5 W / cm² για 5 λεπτά, οι nanoparticles χρυσού κατάφεραν να παράγουν θερμότητα που είχαν ως αποτέλεσμα την καταστροφή των πολυμερών. Με αυτόν τον τρόπο, ενεργοποιήθηκε η απελευθέρωση της DOX από το laser NIR.

• Μαγνητικώς αποκρινόμενα

Η αρχή λειτουργίας των μαγνητικώς-αποκρινόμενων συστημάτων βασίζεται στον τρόπο απόκρισης των μαγνητικών νανοσωματιδίων όταν εφαρμόζεται ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο [35]. Η κατάσταση μπορεί να χωριστεί σε δύο μέρη. Η μαγνητική στόχευση μπορεί να πραγματοποιηθεί, είτε με συσσώρευση των αντικαρκινικών φαρμάκων στον όγκο, υπό την επίδραση ενός μόνιμου μαγνητικού πεδίου, είτε με υπερθερμία που προκαλείται από τη φωτοθερμική θεραπεία με μαγνητικά νανοσωματίδια, όταν εφαρμόζεται εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο. Για παράδειγμα, η ομάδα του Liao συνέθεσε το πολυμερές πολυ(ε-καπρολακτόνη-co-λακτίδιο)-*b*-πολυ (αιθυλενογλυκόλη)-*b*-πολυ(ε-καπρολακτόνη-co-λακτίδιο) (PCLA-PEG-PCLA) το οποίο δημιουργεί μαγνητικές νανοκάψουλες με δυνατότητα εγκλωβισμού αντικαρκινικών φαρμάκων [36]. Το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο μπορεί να ελέγξει εξ αποστάσεως τις υβριδικές νανοκάψουλες Fe₃O₄, οι οποίες καθοδηγούν τα νανοσωματίδια να συσσωρεύονται στην περιοχή του όγκου, καταστέλλοντας την ανάπτυξη του όγκου του μαστού.

• Αποκρινόμενα σε υπερήχους

Σε σύγκριση με τα θερμο-, φωτο- και μαγνητικώς- αποκρινόμενα νανοσωματίδια, τα συστήματα που αποκρίνονται σε υπερήχους μπορούν να διεισδύουν βαθύτερα στους όγκους. Η τεχνολογία υπερήχων έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για μικροφουσαλίδες ή για μεταφορά φαρμάκων μέσω αερίων [37].

2.5.2 Χημικώς αποκρινόμενα πολυμερή

• pH-αποκρινόμενα πολυμερή

Είναι γνωστό ότι το pH του καρκινικού ιστού είναι 6,5-7,2. Το pH των ενδοκυτταρικών ενδοσωμάτων και των λυσοσωμάτων είναι 5,0-6,5 και 4,5- 5,0, αντίστοιχα. Επομένως, το περιβάλλον του όγκου είναι πιο όξινο από αυτό των φυσιολογικών ιστών (pH = 7,4) [38]. Το όξινο μικροπεριβάλλον συμβάλλει στη γρήγορη έκκριση και την αργή εξαγωγή διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και του γαλακτικού οξέος [39]. Τα νανοσωματίδια που αποκρίνονται στο pH μπορούν να απελευθερώσουν το φορτίο τους στο όξινο μικροπεριβάλλον, με αποτέλεσμα τον στοχευμένο θάνατο των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, με βάση τις μεταβολές του pH μεταξύ των ενδοκυτταρικών οργανιδίων του όγκου και της εξωκυτταρικής μήτρας, τα pH-αποκρινόμενα συστήματα μπορούν να προκαλέσουν ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκων και να διεισδύσουν βαθύτερα στα καρκινικά κύτταρα. Έτσι, τα ευαίσθητα στις μεταβολές του pH νανοσωματίδια έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για στοχευμένη διάγνωση και θεραπεία του όγκου. Για παράδειγμα, ένα νανοσύστημα, αποτελούμενο από «νανοσωματίδια εγκλωβισμένα σε νανοσωματίδια» (“nanoparticle-loaded nanoparticles”) αναπτύχθηκε από τους Kim et al., με σκοπό τη στοχευμένη και βαθιά διείσδυση στην περιοχή του καρκινικού όγκου [40]. Το σύστημα αυτό αποτελείται από νανοσωματίδια διοξειδίου του πυριτίου μεγάλου μεγέθους πόρων (πόροι μεγέθους = 29 nm), φορτωμένα με νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs). Ένα άλλο ενδιαφέρον νανοσύστημα αποτελούμενο από ένα δισυσταδικό συμπολυμερές δεξτράνης-*b*-πολυ(L-ιστιδίνης) (DexPHS) συντέθηκε από την ομάδα του Hwang με σκοπό τη στοχευμένη μεταφορά αντικαρκινικού φαρμάκου [41], επειδή ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της L-ιστιδίνης μπορεί να φορτιστεί θετικά στο όξινο περιβάλλον του όγκου. Το μέγεθος των σωματιδίων του DexPHS αυξήθηκε όταν η τιμή του pH ήταν χαμηλή, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του θεραπευτικού φαρμάκου στο όξινο pH. Τα πλεονεκτήματα της ιδιαίτερης δομής της L-ιστιδίνης έχει εκμεταλλευτεί και η δική μας ερευνητική ομάδα (Iatrou et al.) και έχει παρουσιάσει τη σύνθεση ποικίλων πολυπεπτιδικών πολυμερών βασισμένα στην πολυ(L-ιστιδίνη), τα οποία εμφανίζουν αποκρισιμότητα στο pH, αποδεσμεύοντας τα αντικαρκινικά φάρμακα στο όξινο pH του καρκινικού κυττάρου. [42 – 46]

• Οξειδοαναγωγικώς-αποκρινόμενα

Τα οξειδο-αναγωγικώς αποκρινόμενα νανοσωματίδια, που η δράση τους καθορίζεται από το μικροπεριβάλλον του καρκινικού ιστού, επίσης επάγουν την ελεγχόμενη αποδέσμευση των φαρμάκων [47, 48]. Η οξειδο-αναγωγική αντίδραση εξαρτάται από τη συγκέντρωση των δραστικών ουσιών στα οργανίδια του κυττάρου. Για παράδειγμα, η συγκέντρωση της γλουταθειόνης (GSH) είναι τέσσερις φορές υψηλότερη στους καρκινικούς όγκους, σε σύγκριση με τη συγκέντρωσή της στους υγιείς ιστούς. Επίσης, διαφορετικές συγκεντρώσεις GSH βρέθηκαν σε ενδοκυτταρικά (~2-10 mM) και εξωκυτταρικά (~2-10 μM) μέρη. Συγκεκριμένα, τα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα που περιλαμβάνουν το κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια και τον πυρήνα περιέχουν υψηλότερη συγκέντρωση GSH σε σύγκριση με εξωκυτταρικά υγρά [49 - 52]. Είναι πολύ γνωστό ότι οι δισουλφιδικοί δεσμοί είναι ευαίσθητοι στη GSH, καθώς η GSH μπορεί να προκαλέσει ταχεία διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών, οδηγώντας σε κυτοσολική παράδοση των αντικαρκινικών παραγόντων [55-61]. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι ένα νανοσωματίδιο που ανταποκρίνεται στα ερεθίσματα της GSH συντέθηκε από μια υδρόφοβη gramicidin A και ένα υδρόφιλο πολυπεπτίδιο πολυ-ιστιδίνης. Οι υδρόφοβες και υδρόφιλες αλληλουχίες συνδέθηκαν μέσω μιας δισουλφιδικής ομάδας, και η απόκριση στη γλουταθειόνη, οδήγησε στη συλλελευθέρωση ολιγονουκλεοτιδίων και φαρμάκου [53].

Λόγω του καρκινικού περιβάλλοντος που λειτουργεί, επίσης, και σαν φλεγμονώδης ιστός, η απόκριση στην οξείδωση μπορεί να βασιστεί και στο υποξικό περιβάλλον το οποίο προκαλείται από τη συσσώρευση των δραστικών οξειδωτικών ειδών ROS. Το 2017 οι Qian et al. ταυτοποίησαν το καρβονύλιο μαγγανίου ως ένα νέο μόριο απελευθέρωσης CO που αποκρίνεται στο H₂O₂ και συνέθεσαν MnCO@hMSN αντικαρκινικά νανοσωματίδια από κοίλα μεσοπορώδη νανοσωματίδια διοξειδίου του πυριτίου, στα οποία είχαν εγκλωβίσει νανοσωματίδια Mn και CO προφάρμακο [54]. Το νανოსύστημα MnCO@hMSN παρουσίασε στοχευμένη αποδέσμευση CO στο ενδοκυτταρικό μικροπεριβάλλον, εξαιτίας της αποκρισιμότητας στο H₂O₂ και παρουσίασε υψηλή αντικαρκινική αποτελεσματικότητα *in vitro* και *in vivo*.

2.5.3 Βιολογικώς αποκρινόμενα

Το μικροπεριβάλλον του όγκου έχει υψηλότερα βιολογικά σήματα από τον κανονικό ιστό, όπως ROS, MMP2, τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και ένζυμα [62]. Τα καρκινικά

κύτταρα έχουν συγκέντρωση ROS 10 φορές υψηλότερη από τα κανονικά κύτταρα, ενεργοποιώντας την απόκριση των νανοσωστημάτων στα ROS.

2.5.4 Διπλά αποκρινόμενα

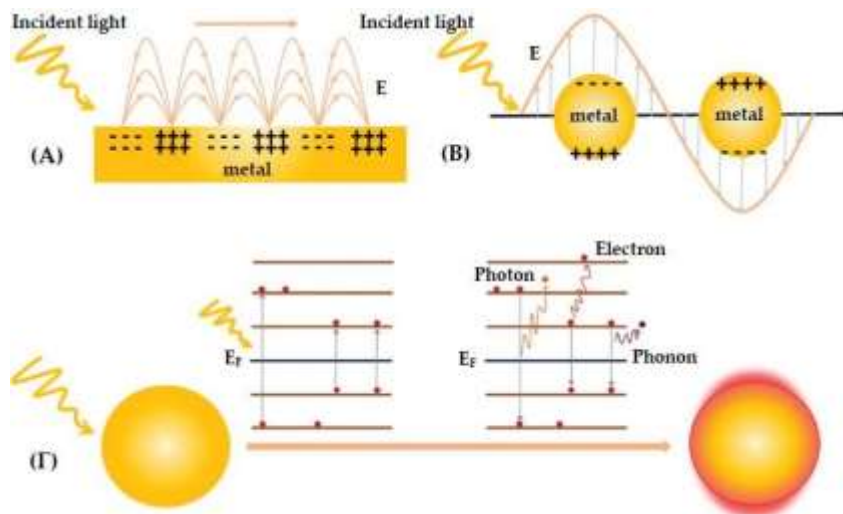
Τα διπλά- και πολλαπλά- αποκρινόμενα συστήματα μπορούν να συνδυαστούν με δύο ή τρεις παράγοντες διέγερσης, όπως pH/θερμο, pH/μαγνητικό πεδίο, μαγνητικό πεδίο/laser, laser/μαγνητικό πεδίο/ένζυμο, και pH/θερμοκρασία/μαγνητικό πεδίο, pH/οξειδοαναγωγή. Αυτά τα «έξυπνα» συστήματα έχουν πολλαπλές ιδιότητες στοχευμένης μεταφοράς και γι' αυτό το λόγο βελτιώνουν ακόμα περισσότερο την αντιακαρκινική θεραπεία [63 – 68].

2.6 Νανωσωματίδια Χρυσού

Η νανοϊατρική έχει εφαρμοστεί στην κυτταρική απεικόνιση, τη μοριακή διάγνωση και τη στοχευμένη θεραπεία εξαρτώμενη από τη δομή, τα βιοϋλικά και το σχήμα των νανωσωματιδίων (NPs) [69]. Πρόσφατα, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τη χρήση των πλασμονικών νανωσωματιδίων χρυσού (AuNPs) για τη διάγνωση του καρκίνου και τη φωτοθερμική θεραπεία, κυρίως μέσω των μοναδικών ιδιοτήτων που προκύπτουν από το εντοπισμένο επιφανειακό συντονισμό πλασμονίου (LSPR) [70]. Σύμφωνα με τη θεωρία Mie, μια ηλεκτρομαγνητική συχνότητα δημιουργεί μια συντονισμένη συνεχόμενη ταλάντωση των ελεύθερων ηλεκτρονίων, που ονομάζεται LSPR, στην επιφάνεια ενός σφαιρικού AuNP αν είναι πολύ μικρότερο από το μήκος κύματος φωτός [71, 72]. Σήμερα, η θεραπεία του καρκίνου βασίζεται σε χειρουργική επέμβαση που συμπληρώνεται με χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία και ανοσοθεραπεία. Δυστυχώς, οι συμβατικές μέθοδοι δεν είναι στοχευμένες, αλλά είναι αρκετά επεμβατικές σε υγιείς ιστούς κατά μήκος της ακτινοβολίας, σκοτώνοντας επίσης υγιή και όχι μόνο παθολογικά κύτταρα, καταστρέφοντας έτσι το ανοσοποιητικό σύστημα ή παρουσιάζοντας αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη δευτεροπαθών καρκίνων [73]. Η στοχευμένη φωτοθερμική θεραπεία με laser που χρησιμοποιεί οπτική θέρμανση για την κατάλυση των καρκινικών κυττάρων, αποτελεί μια ήπια λύση που μπορεί να ξεπεράσει τα παραπάνω μειονεκτήματα. Σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, το φως είναι ένα ιδανικό εξωτερικό ερέθισμα καθώς ρυθμίζεται εύκολα, εστιάζεται και ελέγχεται από απόσταση. Το πράσινο της ινδοκυανίνης ή άλλες οργανικές ομάδες που απορροφούν φως, νανωσωληνες άνθρακα (CNT) και ανόργανα νανωσωματίδια (NPs), όπως οξειδία σιδήρου, έχουν χρησιμοποιηθεί για φωτοθερμική θεραπεία όγκων, αλλά η υψηλή ενέργεια ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται σκοτώνει

εξίσου και τα υγιή κύτταρα ενώ η χρήση οξειδίων σιδήρου και CNT σε μεγάλες ποσότητες είναι συνήθως τοξικά [74].

Τα AuNPs παρουσιάζουν μοναδικές οπτικές ιδιότητες λόγω του LSPR, καθώς απορροφούν το φως εκατομμύρια φορές πιο έντονα από τα μόρια οργανικής βαφής [75,76]. Επιπλέον, σχεδόν όλο το απορροφημένο φως μετατρέπεται γρήγορα σε θερμότητα μέσω μιας σειράς ήπιων, μη ακτινοβολικών διεργασιών (Εικόνα 5) [77]. Τα AuNPs είναι επίσης, πολύ σταθερά στο φως και βιοσυμβατά [78]. Αυτά τα χαρακτηριστικά τα καθιστούν μια νέα γενιά φωτοθερμικών παραγόντων αντίθεσης για φωτοθερμική θεραπεία, στην οποία η ενέργεια των φωτονίων μετατρέπεται σε θερμότητα επαρκή για να προκαλέσει κυτταρική βλάβη μέσω θερμικών επιδράσεων όπως η υπερθερμία, η πήξη και η εξάτμιση [79]. Επιπροσθέτως, τα AuNPs μπορούν να εντοπιστούν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, καθιστώντας τα ιδανικά υλικά για απεικόνιση και πρόγνωση όταν συσσωρεύονται σε παθολογικά κύτταρα και χρησιμοποιούνται ήδη ως νέα θερμοστατικά. Ως εκ τούτου, υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για τη χρήση των οπτικών ιδιοτήτων τους σε βιολογικές εφαρμογές όπως φασματοσκοπική ανίχνευση, απεικόνιση καρκίνου και θεραπεία [80].



Εικόνα 5: Διαγράμματα των επιφανειακών πλάσμονίων. (Α) Πολλαπλασιαστική ενέργεια πλάσμονίου (SPP) που παράγεται στη μεταλλική-διηλεκτρική διεπαφή. (Β) εντοπισμένος συντονισμός επιφανειακού πλάσμονίου (LSPR) που παράγονται στα μεταλλικά νανοσωματίδια. (Γ) το πλάσμο της επιφάνειας διασπάται με τρεις διαφορετικούς τρόπους (ηλεκτρόνιο σε φωτόνιο, ηλεκτρόνιο σε ηλεκτρόνιο και ηλεκτρόνιο σε φωνόνιο) και τελικά παράγει τοπική θέρμανση [81].

Το μέγιστο φάσμα απορρόφησης για κανονικά, μικρά, σφαιρικού σχήματος κολλοειδή AuNPs είναι μεταξύ 500 και 560 nm. Σε αυτό το μήκος κύματος, η παραδοσιακή φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) των ιστών που μεσολαβεί από το laser ορατού φωτός περιορίζεται από το ανεπαρκές βάθος διείσδυσης, αφού σε αυτό το μήκος κύματος η δέσμη αλληλεπιδρά με τους ιστούς, περιορίζοντας τη χρησιμότητά της για βαθιά θεραπεία όγκων. Προκειμένου να αυξηθεί το βάθος διείσδυσης, η απορρόφηση των NPs θα πρέπει να μετατοπιστεί στο σχεδόν-υπέρυθρο φως (NIR), δηλαδή στο εύρος μήκους κύματος 800-1200 nm. Συνεπώς, συντέθηκαν μεγάλα συμπαγή AuNPs με μεγάλες διαστάσεις και ποικιλία σχήματων. Για να καταστούν αυτά τα NPs πιο βιοσυμβατά, θα πρέπει να στερεωθεί στην επιφάνειά τους ένα επιπλέον πολυμερικό κέλυφος. Αυτό θα αύξανε τις διαστάσεις τους, οδηγώντας σε εκκαθάριση μέσω του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος όταν παραδίδονται μέσω της συστημικής οδού.

Σε αντίθεση με τα AuNPs, η φασματική περιοχή απορρόφησης των νανοκελύφων χρυσού (AuNS) δεν εξαρτάται από τις συνολικές διαστάσεις του NP, αλλά από το σχετικό μέγεθος του πυρήνα των νανοσωματιδίων και το πάχος του κελύφους χρυσού [82]. Έχει αποδειχθεί ότι όσο μικρότερο είναι το πάχος του κελύφους και όσο μεγαλύτερες είναι οι διαστάσεις του πυρήνα, τόσο μεγαλύτερο είναι το μήκος κύματος απορρόφησης. Ως εκ τούτου, είναι δυνατό να φτάσουμε στο μήκος κύματος NIR ακόμη και με μικρά NPs. Η πρώτη γενιά AuNSs ήταν Si@AuNSs και αποτελούνταν από ένα διηλεκτρικό πυριτικό πυρήνα που περιβάλλεται από ένα λεπτό κέλυφος Au. Έκτοτε, έχουν παρουσιαστεί πολλές δομές AuNS, συμπεριλαμβανομένων κοίλων AuNSs, AuNSs με μαγνητική επίστρωση, AuNS με πυρήνα πολυμερούς καθώς και AuNS με πυρήνα φωσφολιπιδίων/λιποσωμάτων. Οι περισσότερες διαγνωστικές και θεραπευτικές μέθοδοι που βασίζονται σε νανοσωματίδια για τη θεραπεία του καρκίνου βασίζονται στη συσσώρευση νανοσωματιδίων στο σημείο του όγκου, η οποία μπορεί να λάβει χώρα κυρίως με την επίδραση του φαινομένου της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης (EPR) [83-85]. Ωστόσο, έχουν παρουσιαστεί περιορισμένες εργασίες για τον σχηματισμό AuNS εντός πολυμερικών NPs.

Μέχρι σήμερα, έχουν παρουσιαστεί μόνο μερικά άρθρα σχετικά με τη χρήση πολυ(L-ιστιδίνης) (PHis), στο σχηματισμό νανοσωματιδίων Au [80, 86-90], λόγω της αδυναμίας ελέγχου του πολυμερισμού της ιστιδίνης. Το αμινοξύ της His αρχικά χρησιμοποιήθηκε από τον Yang και τους συνεργάτες του για το σχηματισμό ατομικών συστάδων χρυσού

μέσω της αναγωγής Au (III) από το αμινοξύ σε θερμοκρασία δωματίου [91]. Η PHis χρησιμοποιήθηκε επίσης από την ομάδα του Gao ως μια ελεύθερη πολυμερική αλυσίδα που αλληλεπιδρά με ένα άλλο μέρος ενός νανοσωματιδίου, για το σχηματισμό AUNSSs. Σε αυτήν την προσέγγιση, η ελεύθερη PHis συμπυκνώθηκε σε ένα NP που φέρει αρνητικά φορτία στην επιφάνεια, ακολουθούμενο από προσθήκη και χηλίωση του Au (III) και της αναγωγής του με υδροξυλαμίνη [80,87,88]. Ο Karan και οι συνεργάτες του [89] έχουν επίσης αναφέρει ελεύθερες αλυσίδες PHis και αναγωγή με υδροξυλαμίνη για το σχηματισμό πλασμονικών γιγαντιαίων κβαντικών κουκίδων. Τέλος, ο Djalali και η ομάδα του [90] έχουν χρησιμοποιήσει πλούσια σε His πεπτίδια για το σχηματισμό νανοκρυστάλλων Au που καλλιεργούνται στην επιφάνεια των νανοσωληνών.

Σε αυτά τα έργα, η PHis χρησιμοποιήθηκε ως ελεύθερη αλυσίδα, η οποία δεν συζεύχθηκε χημικά με άλλη πολυμερική αλυσίδα, αλλά αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με προσχηματισμένα NPs. Επιπλέον, το μέγιστο φάσμα απορρόφησης που ελήφθη ήταν κοντά στα 750-800 nm και στις περισσότερες περιπτώσεις, η χρήση ενός αναγωγικού παράγοντα απαιτήθηκε για το σχηματισμό των νανοκελύφων ή των NPs. Η χρήση αναγωγικών αντιδραστηρίων μπορεί να οδηγήσει στην αδυναμία χρήσης προστατευμένων πεπτιδίων για τον έλεγχο της αυτοσυναρμολόγησης των NP που περιέχουν το AuNS, αφού η υδροξυλαμίνη οδηγεί σε αποπροστασία. Επιπλέον, αυτή η χημική τροποποίηση θα μπορούσε να οδηγήσει σε κυτταροτοξικά υλικά. Στα περισσότερα έργα που παρουσιάστηκαν μέχρι τώρα, προκειμένου να καταστούν τα μεταλλικά NPs πιο βιοσυμβατά και πιο σταθερά στο διαμέρισμα του αίματος, τα βιοπολυμερή έχουν εμβολιαστεί στην επιφάνεια του AuNS, χρησιμοποιώντας πολυμερή που φέρουν θειόλες ως τελικές δραστικές ομάδες, με αποτέλεσμα μια πολύ περίπλοκη διαδικασία με αμφισβητούμενο έλεγχο της δομής των συσσωματωμάτων.

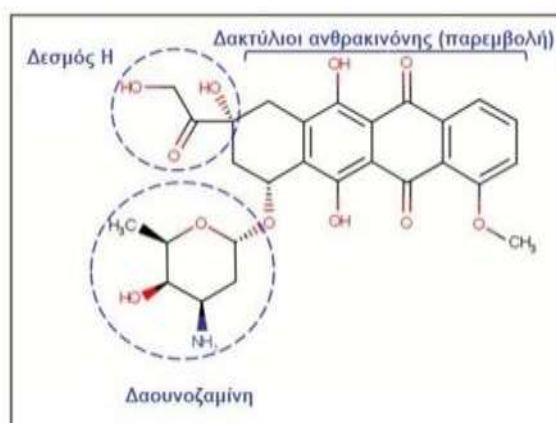
2.6 Δοξορουβικίνη

Η δοξορουβικίνη χρησιμοποιείται ως φάρμακο στην αντιμετώπιση διαφόρων τύπων καρκίνου και κυρίως στον καρκίνο του μαστού, των ωθηκών, το οστεοσάρκωμα, καθώς επίσης και στα λεμφώματα και τη λευχαιμία. Χορηγείται με ενδοφλέβια ένεση ή έγχυση και συνήθως εμφανίζει μια κάθαρση τριφασικού πλάσματος και τελικό χρόνο ημιζωής 24-36 ωρών. Αντινεοπλασματικά/Κυτταροτοξικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για χημειοθεραπεία είναι γνωστά για τις δυσάρεστες έως και θανατηφόρες παρενέργειες που προκαλούν και η δοξορουβικίνη δεν αποτελεί εξαίρεση. Ο μηχανισμός δράσης της

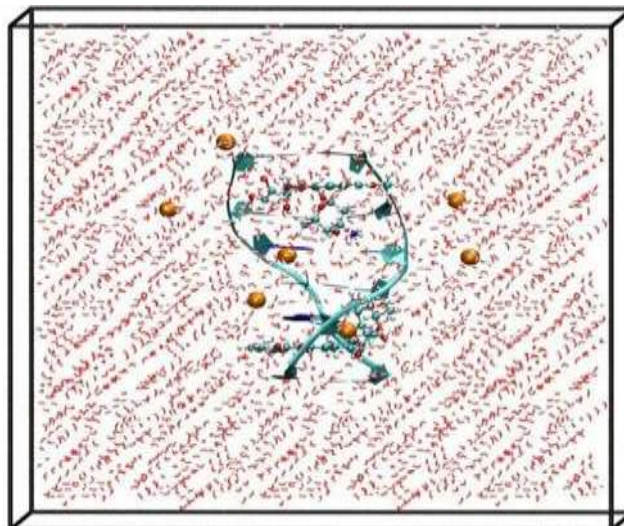
δοξορουβικίνη περιλαμβάνει την καταστροφή του DNA και την δημιουργία δραστικών οξειδωτικών ειδών (Reactive Oxygen Species, ROS), με σκοπό την πρόκληση οξειδωτικού στρες στο κυτταρικό περιβάλλον. Αυτά τα αποτελέσματα δεν περιορίζονται, όμως, μόνο στα καρκινικά κύτταρα, αλλά επηρεάζουν επίσης και τα υγιή κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των βλαστοκυττάρων. Καθώς τα βλαστοκύτταρα είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη και επιδιόρθωση ευρέος φάσματος ιστών στο σώμα, η καταστροφή τους δύναται να προκαλέσει προβλήματα υγείας δια βίου. [92]

Η δοξορουβικίνη (γνωστή, επίσης, με το εμπορικό όνομα Αδριαμικίνη (Adriamycin), ανήκει στην κατηγορία των ανθρακυκλίνων και συγκεκριμένα αποτελεί αντιβιοτικό, αντινεοπλασματικό φάρμακο, καθώς προέρχεται από τον μικροοργανισμό *Streptomyces peucetius var. caesius*. [93]

Η DOX αποτελείται από τρία λειτουργικά τμήματα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6. Το πρώτο είναι ο δακτύλιος ανθρακινόνης που παρεμβάλλεται στο DNA. Το δεύτερο είναι μια αμινο- ομάδα σακχάρου, η δασουνοζαμίνη, η οποία χρησιμεύει ως δευτερεύων παράγοντας δέσμησης. Το τρίτο είναι ένας δακτύλιος ανθρακινόνης που σταθεροποιεί το σύμπλοκο DOX-DNA (εικόνα 7) σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου (HBs) με τις βάσεις του DNA. Η παρεμβολή της DOX στο DNA μπορεί να προκαλέσει παραμόρφωση της πολυνουκλεοτιδικής δομής, με αποτέλεσμα την αναστολή της αντιγραφής και της μεταγραφής του DNA λόγω της αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με το ένζυμο τοποϊσομεράση II.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της δομής της δοξορουβικίνης



Εικόνα 7: Σχηματική Αναπαράσταση του συμπλόκου DOX-DNA

Παρεμβολή της δράσης της τοποϊσομεράσης II

Η τοποϊσομεράση II είναι ένα ένζυμο που ρυθμίζει την τοπολογία του DNA (το μοτίβο με το οποίο οι δύο συμπληρωματικοί κλώνοι είναι αλληλένδετοι), δημιουργώντας προσωρινές περικοπές και στα δύο σκέλη του DNA κατά την αντιγραφή. Αυτό χαλαρώνει το DNA και αποτρέπει τόσο αρνητικές όσο και θετικές υπερελικές στροφές. Η δοξορουβικίνη εκμεταλλεύεται την τοποϊσομεράση II, σταθεροποιώντας το ενδιάμεσο σύμπλοκο ενζύμου-DNA, που είναι υπεύθυνο για τη διάσπαση, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η συγκέντρωση αυτού του συμπλόκου μέσα στο κύτταρο. Ως συνέπεια είναι ο κυτταρικός θάνατος, καθώς το κατακερματισμένο DNA δεν μπορεί να μεταγραφεί, και το κύτταρο δεν μπορεί να υποβληθεί σε φυσιολογικές διαδικασίες μίτωσης.

Βλάβη ελεύθερων ριζών στα κύτταρα

Η δοξορουβικίνη μπορεί να δέχεται ένα ηλεκτρόνιο στις ομάδες της κινόνης, σχηματίζοντας μια ημικινόνη, παρουσία των ενζύμων NADH αφυδρογονάση, οξειδάση της ξανθίνης και αναγωγάση P450 του κυτοχρώματος. Αυτή η ημικινόνη μπορεί να βλάψει το ίδιο το DNA, καθώς επίσης και να επιστρέψει στη μητρική της κινόνη ανάγωντας το οξυγόνο, και σχηματίζοντας ROS όπως υπεροξειδίο του υδρογόνου και σουπεροξειδίο. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι ιστοί μπορούν να ανεχθούν την παρουσία των ROS. Ωστόσο, όταν τα επίπεδα υπερβαίνουν τη χωρητικότητα της ενδογενούς αντιοξειδωτικής άμυνας, λαμβάνει χώρα κυτταρική βλάβη. Αυτό περιλαμβάνει την αποκοπή ενός κλώνου

του DNA και την υπεροξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων, γεγονός που οδηγεί σε καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης.

Δοξορουβικίνη και βλαστικά κύτταρα

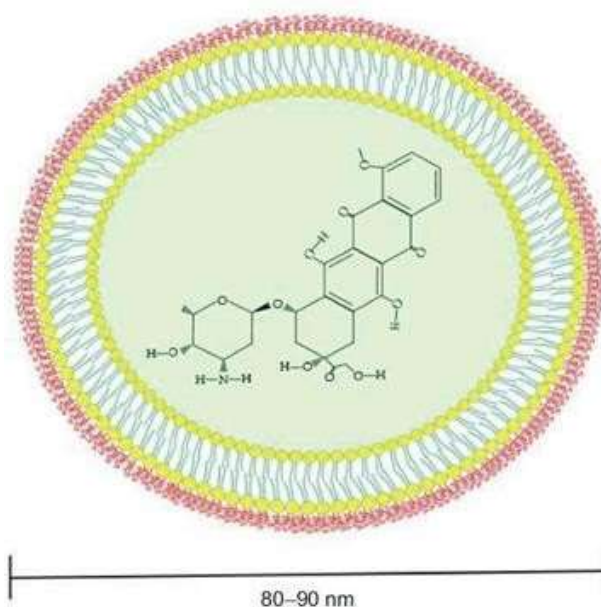
Η πλήρης επίδραση της δοξορουβικίνης στα μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη, εξαιτίας τόσο της πολυπλοκότητας του μηχανισμού δράσης των MSCs, όσο και του γεγονότος ότι η δοξορουβικίνη χρησιμοποιείται συχνά σε συνδυαστική θεραπεία με άλλα φάρμακα όπως κυκλοφωσφαμίδη, μεθοτρεξάτη και κορτικοστεροειδή, καθιστώντας δύσκολη τη μελέτη της επίδρασής της.

Ανεπιθύμητες Παρενέργειες [94, 95]

Η δοξορουβικίνη έχει ένα ευρύ φάσμα ανεπιθύμητων παρενεργειών, συμπεριλαμβανομένης της ανοσοκαταστολής, της δυσχρωμάτωσης, των γαστρεντερικών διαταραχών που οδηγούν σε σοβαρή ναυτία και έμετο, καθώς και της απειλητικής για τη ζωή καρδιοτοξικότητας. Το τελευταίο συνήθως εμφανίζεται ως οξεία ή ύπουλη καρδιομυοπάθεια και καρδιακή ανεπάρκεια και εξαρτάται από τη δόση. Προσπάθειες για να μειωθεί η καρδιοτοξικότητα και να αυξηθεί ο χρόνος κυκλοφορίας του φαρμάκου στο αίμα οδήγησαν τον FDA στην έγκριση της λιποσωμικής μορφής της δοξορουβικίνης (PEGylated liposomal formulation, L-DOX), Doxil® (γνωστή διεθνώς ως Caelyx®). Και τα δύο παρουσιάζουν μειωμένη καρδιοτοξικότητα, και γι' αυτό τον λόγο είναι εγκεκριμένα από τον EMA για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του μαστού. [96, 97]

Το σκεύασμα L-DOX εγκλείει την DOX μέσα σε μία φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα, η οποία επικαλύπτεται με μεθοξυπολυαιθυλενογλυκόλη (Εικόνα 8). Η πεγκυλίωση (PEGylation) προστατεύει τα λιποσώματα από αναγνώριση από το μονοπυρηνικό σύστημα φαγοκυττάρων (Mononuclear Phagocyte System, MPS) και επιτρέπει μεγαλύτερο χρόνο κυκλοφορίας τους στο αίμα, μειώνοντας παράλληλα την έκθεση στην ελεύθερη DOX που κυκλοφορεί στο πλάσμα αίματος. Μελέτες βιοδιανομής έδειξαν ότι η L-DOX έχει την ικανότητα εναπόθεσης και / ή διείσδυσης στους όγκους και απελευθέρωσης DOX. Αν και ο μηχανισμός απελευθέρωσης της DOX από τα λιποσώματα παραμένει άγνωστος, μια 10 φορές υψηλότερη έκθεση στην L- DOX από ότι στην DOX παρατηρείται σε μεταστατικό καρκίνο μαστού, σε σύγκριση με τον υγιή ιστό του μαστού, που εξηγείται από το

φαινόμενο της ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης. Αυτό δείχνει ότι μια θεραπευτική προσέγγιση με την L-DOX είναι πιο στοχευμένη σε σύγκριση με την DOX. Μια διαφορετική φαρμακοκινητική χαρακτηριστική μεταξύ των δύο σκευασμάτων περιλαμβάνει τη μειωμένη εκκαθάριση, το μικρότερο όγκο κατανομής, και το μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής για την L-DOX σε σύγκριση με την DOX. Η πιο κοινή ανεπιθύμητη παρενέργεια της L-DOX είναι η ερυθροδυσαισθησία της παλάμης και του πέλματος, μία τοξικότητα του δέρματος που μπορεί να αντιμετωπιστεί με υποστηρικτική φροντίδα, σε αντίθεση με την καρδιοτοξικότητα, η οποία είναι πολύ πιο διαδεδομένη για την DOX. Ενώ η L-DOX εμφανίζει περισσότερα πλεονεκτήματα σε σύγκριση με την DOX, ενδείκνυται μόνο για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του μαστού σε συνδυασμό με docetaxel, και ως επικουρική θεραπεία. Άλλες αναφορές: [98, 99]



Εικόνα 8: Σχηματική Απεικόνιση της λιποσωμικής δοξορουβικίνης (Doxil)

2.7 Σισπλατίνη [100-103]

Η σισπλατίνη ή cisplatin, που ονομάζεται επίσης *cis*-διαμμινοδιχλωρολευκόχρυσος(II), είναι μια μεταλλική ένωση συντονισμού με τετράγωνη επίπεδη γεωμετρία. Είναι μια λευκή ή βαθύ κίτρινη έως κιτρινοπορτοκαλί κρυσταλλική σκόνη σε θερμοκρασία δωματίου. Είναι ελαφρώς διαλυτή στο νερό και διαλυτή σε διμεθυλπριμανίδιο και *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιο. Η σισπλατίνη είναι σταθερή σε κανονικές θερμοκρασίες και πιέσεις, αλλά μπορεί να μετατραπεί αργά με την πάροδο του χρόνου στο *trans*-ισομερές. Η σισπλατίνη έχει μοριακό βάρος 301,1 g/mol, πυκνότητα 3,74 g/cm³, σημείο τήξης 270 °C, log K_{ow} -2,19 και υδατοδιαλυτότητα 2,53 g/L στους 25 °C.

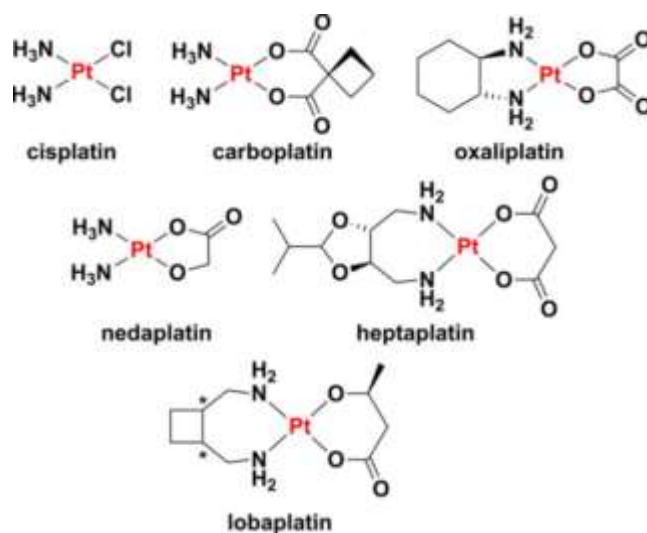
Η σισπλατίνη παρασκευάστηκε για πρώτη φορά από τον M. Peyrone (είναι γνωστό ως άλας του Peyrone, Peyrone's salt) το 1845, ενώ η δομή του μελετήθηκε και βρέθηκε ότι υπάρχει σε δύο δομές *cis*- και *trans*- από τον χημικό Alfred Werner το 1893. Από τότε και για 70 σχεδόν χρόνια η ένωση αυτή δεν ήταν τίποτα περισσότερο από ένα τυπικό σύμπλοκο άλας. Η αναγνώριση της κυτταροστατικής δράσης της σισπλατίνης αποτελεί μια τυπική περίπτωση τυχαίας ανακάλυψης μεγάλης σπουδαιότητας, που προέκυψε κατά τη διάρκεια μιας άλλης ερευνητικής εργασίας που είχε τελείως διαφορετικό σκοπό. Το 1961 στο Πανεπιστήμιο του Μίσιγκαν (ΗΠΑ) ο βιοχημικός Barnett Rosenberg και οι συνεργάτες του πειραματίζονταν πάνω στην επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου στην ανάπτυξη βακτηρίων. Παρατήρησαν ότι όταν τα ηλεκτρόδια που βύθιζαν στην κυτταροκαλλιέργεια των βακτηρίων ήταν από λευκόχρυσο, τότε η κυτταρική διαίρεση του *Escherichia coli* σταματούσε με ταυτόχρονη παραγωγή νηματίων μέχρι και 300 φορές μεγαλύτερων από τα κανονικά βακτήρια. Το γεγονός αυτό οφειλόταν στη διακοπή της κυτταρικής διαίρεσης και όχι σε διέγερση κάποιας αυξητικής διεργασίας.

Κατά τα επόμενα χρόνια μελετήθηκε η θεραπευτική δραστηριότητα της σισπλατίνης σε διάφορους τύπους κακοήθων νεοπλασιών. Η σισπλατίνη αποδείχθηκε ιδιαίτερα αποτελεσματική σε μεταστατικά νεοπλάσματα όρχεων, ωθηκών, τραχήλου της μήτρας, ουροδόχου κύστης και εγκεφάλου. Επίσης αποδείχθηκε αποτελεσματική στον μικροκυτταρικό καρκίνο των πνευμόνων και στον καρκίνο του προστάτη σε συνδυασμό με άλλα κυτταροστατικά φάρμακα.

Ο τρόπος δράσης του έχει συνδεθεί με την ικανότητά του να διασυνδέεται με τις πουρινικές βάσεις του DNA, παρεμποδίζοντας τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του

DNA, προκαλώντας βλάβη στο DNA και στη συνέχεια επάγοντας απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, λόγω αντοχής στα φάρμακα και πολλών ανεπιθύμητων ενεργειών όπως σοβαρά νεφρικά προβλήματα, αλλεργικές αντιδράσεις, μείωση της ανοσίας σε λοιμώξεις, γαστρεντερικές διαταραχές, αιμορραγία και βαρηκοΐα ειδικά σε νεότερους ασθενείς, άλλα αντικαρκινικά φάρμακα που περιέχουν πλατίνα όπως καρβοπλατίνη, οξαλιπλατίνη και άλλα, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί. Επιπλέον, οι συνδυαστικές θεραπείες σισπλατίνης με άλλα φάρμακα έχουν θεωρηθεί σε μεγάλο βαθμό ότι υπερνικούν την αντοχή στα φάρμακα και μειώνουν την τοξικότητα.

Πολλές χιλιάδες ανάλογα έχουν συντεθεί και δοκιμαστεί για ιδιότητες που θα ενίσχυαν το θεραπευτικό του δείκτη. Περίπου 13 από αυτά τα ανάλογα έχουν αξιολογηθεί σε κλινικές δοκιμές, αλλά μόνο ένα (καρβοπλατίνη) έχει προσφέρει σαφές πλεονέκτημα έναντι της σισπλατίνης και έχει επιτύχει παγκόσμια έγκριση. Εννέα ανάλογα πλατίνας βρίσκονται επί του παρόντος σε κλινικές δοκιμές σε όλο τον κόσμο ορμαπλατίνη (τετραπλατίνη), DWA2114R, οξαλιπλατίνη, ενλοπλατίνη, λοβαπλατίνη, CI-973(NK-121), 254-S, JM-216 και παγιδευμένη σε λιπόσωμα cis-bis-ato-odecan trans-R,R-1,2-διαμινοκυκλοεξανοπλάτινα (II) (LNDDP) (Weissand Christian, 1993). Στην εικόνα 9 παρουσιάζονται οι χημικές δομές της σισπλατίνης και ορισμένων αναλόγων της, συμπεριλαμβανομένης της καρβοπλατίνης, της οξαλιπλατίνης, της νενταπλατίνης, της επταπλατίνης και της λομπαπλατίνης.



Εικόνα 9: Χημικές δομές κλινικά εγκεκριμένων και αντικαρκινικών φαρμάκων πλατίνας που κυκλοφορούν στο εμπόριο

Μηχανισμός αντικαρκινικής δράσης της σισπλατίνης και άλλων συμπλόκων λευκοχρύσου

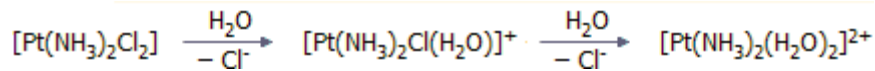
Η έρευνα για τα σύμπλοκα λευκοχρύσου και άλλων ευγενών μετάλλων επικεντρώθηκε κατά τα τελευταία χρόνια κυρίως στο μηχανισμό με τον οποίο εισάγονται στο ζωντανό οργανισμό, διαχέονται στα διάφορα όργανα και δρουν σε συγκεκριμένες θέσεις της δομής των νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA) προκαλώντας αναστολή της ανάπτυξης των κακοήθων κυττάρων. Συνήθως το ενέσιμο υλικό εισάγεται στην κοιλιακή χώρα και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος το φάρμακο κατευθύνεται στα διάφορα όργανα.

Πιστεύεται ότι η σισπλατίνη υδρολύεται σε δύο στάδια και μετά εισχωρεί σε προσιτές θέσεις του κυτταρικού DNA (υπάρχει και το μιτοχονδριακό DNA) και κυρίως σε θέσεις πλούσιες στις βάσεις γουανίνη (G) και αδενίνη (A), όπου πραγματοποιεί πυρηνόφιλες υποκαταστάσεις. Ο τρόπος αυτός δράσης κατατάσσει τη σισπλατίνη στους δραστικούς αλκυλιωτικούς παράγοντες. Πρέπει να σημειωθεί ότι ουσίες με αυτές τις ιδιότητες είναι και καρκινογόνες ενώσεις.

Οι διάφορες μελέτες έδειξαν ότι η κυτταροστατική δράση της σισπλατίνης οφείλεται στη δομή της, γιατί η *trans*-μορφή του συμπλόκου δεν παρουσιάζει αντικαρκινικές ιδιότητες. Οι προσπάθειες των επιστημόνων επικεντρώθηκαν στη διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο ειδικές κυτταρικές πρωτεΐνες αναγνωρίζουν τα σύμπλοκα σισπλατίνης-DNA. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών με τα σύμπλοκα οδηγεί σε προγραμματισμένο θάνατο (απόπτωση) των κακοήθων κυττάρων.

Με την ενέσιμη μορφή (η οποία περιέχει ισοτονικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου) η σισπλατίνη περνάει στο αίμα, όπου παραμένει αναλλοίωτη λόγω της σχετικά υψηλής συγκέντρωσης ιόντων χλωρίου (~100 mM). Ως ηλεκτρικώς ουδέτερη ουσία η σισπλατίνη εισέρχεται στο κύτταρο είτε με **παθητική διάχυση** (passive diffusion) μέσω της κυτταρικής μεμβράνης (δηλ. μεταφορά λόγω διαφοράς συγκέντρωσης), είτε με **ενεργητική πρόσληψη ή διαπέραση** (active uptake) (δηλ. μεταφορά μετά από σύνδεση με ένα μόριο-μεταφορέα, συνήθως μια πρωτεΐνη).

Μέσα στο κύτταρο, λόγω της χαμηλότερης συγκέντρωσης των ιόντων χλωρίου (~3-20 mM) και της υψηλότερης συγκέντρωσης του νερού στο κυτταρόπλασμα, το μόριο υπόκειται σε σταδιακή υδρόλυση, κατά την οποία τα χλώρια αντικαθίστανται με μόρια ύδατος κατά τις αντιδράσεις:

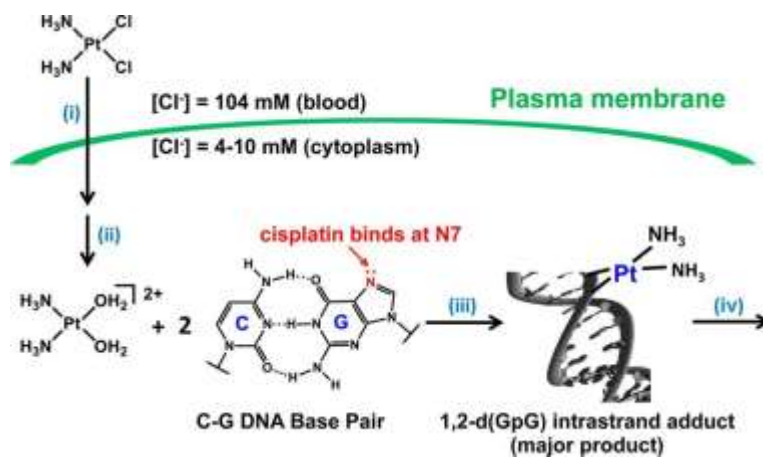


Η σισπλατίνη μετά την είσοδο στο κύτταρο

Μετά την είσοδο στο κύτταρο η σισπλατίνη φορτισμένη θετικά προσεγγίζει διάφορους στόχους, όπως τα βιομόρια DNA, RNA, ένζυμα που περιέχουν θείο, όπως μεταλλοθειονίνες ή τη γλουταθειόνη και τα μιτοχόνδρια.

Η επίδραση της σισπλατίνης στα μιτοχόνδρια δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητή, πάντως πιστεύεται ότι προκαλεί σ'αυτά βλάβες που μπορεί να οδηγούν στο θάνατο των κυττάρων. Πιο διευκρινισμένες είναι οι αλληλεπιδράσεις της σισπλατίνης με ένζυμα που περιέχουν θείο. Πιστεύεται ότι οι αλληλεπιδράσεις αυτές αποτελούν μέρος της άμυνας του κυτταρικού υποστρώματος στην κυτταροτοξικότητα της σισπλατίνης και σε κάποιο βαθμό συνεισφέρουν στην ανάπτυξη αντίστασης του οργανισμού κατά του φαρμάκου.

Οι έρευνες επικεντρώθηκαν στις αλληλοεπιδράσεις της σισπλατίνης με τα DNA και RNA, οι οποίες σε μεγάλο βαθμό έχουν διευκρινιστεί και παρέχουν στους επιστήμονες μία «εσωτερική» εικόνα και ερμηνεία της αντινεοπλασματικής δράσης του φαρμάκου.



Εικόνα 10: Τέσσερα στάδια του μηχανισμού της σισπλατίνης και, κατ' επέκταση, των σχετικών αντικαρκινικών φαρμάκων από πλατίνα. (i) Κυτταρική πρόσληψη, (ii) εξίσωση/ενεργοποίηση, (iii) δέσμευση DNA και (iv) κυτταρική επεξεργασία αλλοιώσεων DNA που οδηγούν σε απόπτωση.

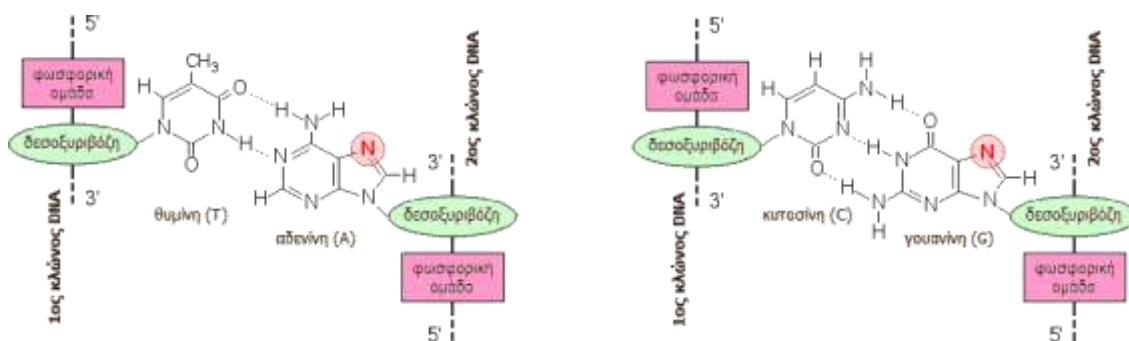
Αλληλεπίδραση της σισπλατίνης με το RNA

Αν και η σισπλατίνη μπορεί να συνδεθεί με το RNA, πιστεύεται ότι η σύνδεση αυτή δεν σχετίζεται άμεσα με την κυτταροστατική δράση της. Ένα συμπλεγμένο από τη σισπλατίνη

μόριο RNA μπορεί να αντικατασταθεί από ένα νέο άθικτο μόριο RNA, αφού οι έρευνες έδειξαν ότι η σισπλατίνη δεν επηρεάζει τη σύνθεση του RNA, ενώ αντίθετα επηρεάζει τη σύνθεση του DNA. Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη υψηλών (θανατηφόρων) δόσεων σισπλατίνης σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων καταστρέφει μόνο το 1-10% των μορίων RNA.

Αλληλεπίδραση της σισπλατίνης με το DNA

Η σισπλατίνη συμπλέκεται με το DNA μέσω των ατόμων αζώτου (N) των βάσεων με πουρινική δομή (αδενίνη και γουανίνη), τα οποία αντικαθιστούν τα δύο μόρια ύδατος του συμπλόκου $[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$. Ειδικά, το άτομο N7 της αδενίνης και της γουανίνης είναι ελεύθερο να ενωθεί με τη σισπλατίνη, αφού αυτό το άτομο αζώτου αυτό δεν συμμετέχει στους δεσμούς υδρογόνου που συνδέουν τις βάσεις ανά ζεύγη και επιπλέον χαρακτηρίζεται από μεγάλη ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Τα αδιατάρακτα ζεύγη θυμίνης-αδενίνης (TA) και κυτοσίνης-γουανίνης (CG) δείχνονται στο επόμενο σχήμα, όπου σημειώνεται (σε κόκκινο κύκλο) και το άτομο N7.

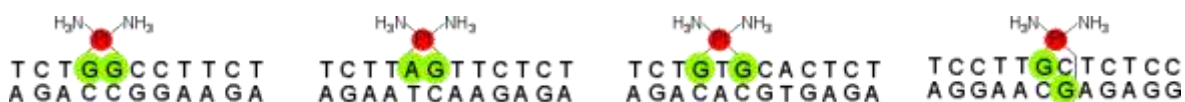


Εικόνα 11: Ο σχηματισμός δίκλωνου μορίου DNA μέσω σύνδεσης με δεσμούς υδρογόνου των βάσεων θυμίνης-αδενίνης (ζεύγος TA) και κυτοσίνης-γουανίνης (ζεύγος CG). Με κόκκινο χρώμα και σε κόκκινο κύκλο δείχνονται τα άτομα αζώτου N7 της αδενίνης και της γουανίνης, τα οποία συνδέονται με τον λευκόχρυσο αντικαθιστώντας τα μόρια ύδατος στο σύμπλοκο $[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$

Το DNA σχηματίζει διάφορες **ενώσεις προσθήκης** (adducts) με τη σισπλατίνη. Από αυτές τις ενώσεις προσθήκης σταθερότερες είναι εκείνες όπου τα δύο χλώρια υποκαθίστανται από τα άτομα αζώτου N7 που βρίσκονται σε γειτονικές γουανίνες (-G-G-) στον ίδιο κλώνο του DNA. Οι γειτονικές γουανίνες παρέχουν τα σταθερότερα σύμπλοκα, ωστόσο έχουν διαπιστωθεί και σύμπλοκα με γειτονικές αδενίνες και γουανίνες (-A-G-). Τα σύμπλοκα αυτά καλούνται **1,2-ενδοκλωνικές ενώσεις προσθήκης** (1,2-intrastrand adducts) και αποτελούν το 90% των δυνατών ενώσεων προσθήκης. Επιπλέον υφίστανται

και 1,3-ενδοκλωνικές, όπως και **διακλωνικές ενώσεις προσθήκης** (interstrand adducts). Από τις 1,2-ενδοκλωνικές ενώσεις προσθήκης το 65% αφορά γειτονικές γουανίνες (-G-G-) και το 25% γειτονικές αδενίνες-γουανίνες (-A-G-).

Άμεσο αποτέλεσμα της δημιουργίας αυτών των ενώσεων προσθήκης είναι η αποδιοργάνωση στην περιοχή τους της κανονικής στοίβαξης των βάσεων, γεγονός το οποίο θα προκαλεί μια τοπική **στρέβλωση** (kink) στη δομή του μορίου DNA. Η παραμόρφωση αυτή φαίνεται ότι καθιστά το μόριο του DNA μη λειτουργικό, γεγονός που οδηγεί στο θάνατο του κυττάρου.



Εικόνα 12: Παραδείγματα ενώσεων προσθήκης (adducts) σισπλατίνης - τμημάτων DNA. Σε πράσινο κύκλο βρίσκονται οι βάσεις που αντικαθιστούν τα δύο άτομα χλωρίου (μόρια ύδατος μέσα στο κύτταρο) της σισπλατίνης και οι αντίστοιχοι συμβολισμοί.

Οι πολύχρονες έρευνες έδειξαν ότι οι ενώσεις προσθήκης DNA-σισπλατίνης παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό και τη μεταγραφή του DNA, καθώς και την ενζυμική επιδιόρθωσή του. Οι επιστήμονες θέλουν να κατανοήσουν γιατί η διασύνδεση με το DNA επιδρά στον προγραμματισμένο θάνατο των κακοήθων κυττάρων και τη διαφορά μεταξύ *cis*- και *trans*-διαμμινοδιχλωρολευκόχρυσου(II). Οι έρευνες αυτές έγιναν *in vitro* (σε καλλιέργειες κυττάρων) και *in vivo* (σε πειραματόζωα). Οι έρευνες *in vitro* έγιναν σε προκαρυωτικά (βακτηρίων) και ευκαρυωτικά (θηλαστικών) κύτταρα και έδειξαν ότι και τα δύο ισομερή δημιουργούν ενώσεις προσθήκης (ιδιαίτερα 1,2-ενδοκλωνικές) με το DNA και αναστέλλουν τη επιδιορθωτική δράση της πολυμεράσης του DNA, που είναι απαραίτητη για αναδιπλασιασμό. Το ίδιο έδειξαν και τα πειράματα *in vivo*.

Αφού οι άλλες έρευνες έδειξαν ότι το *trans*-ισομερές δεν έχει αντικαρκινική δράση, το λογικό συμπέρασμα είναι ότι η αναστολή της επιδιορθωτικής δράσης της πολυμεράσης του DNA και επομένως της παραγωγής αντιγράφων μορίων DNA δεν αποτελεί τον μόνο μηχανισμό που προκαλεί την κυτταροστατική δράση της σισπλατίνης.

Οι επιδράσεις στη **μεταγραφή** του DNA (transcription) και για τα δύο ισομερή ήταν δύσκολο να ερμηνευθούν, αλλά οι έρευνες έδειξαν ότι η σισπλατίνη δεν εμπόδιζε τη μεταγραφή, αλλά πιθανώς οδηγεί στον προγραμματισμένο θάνατο των κυττάρων (για *in vitro* πειράματα). Η κυτταροτοξικότητα της σισπλατίνης σίγουρα πηγάζει από την

αδυναμία του κυττάρου να επιδιορθώσει τις βλάβες (ιδιαίτερα στην περίπτωση της 1,2-ενδοκλωνικής ένωσης προσθήκης) με **εκτομή** (excision repair system), δηλαδή μιας διαδικασίας επιδιόρθωσης του DNA κατά την οποία αποκόπεται το τμήμα του κλώνου με το σημείο βλάβης (εδώ από τη σισπλατίνη) και την αναδημιουργία του με βάση το "εκμαγείο" (template), που αποτελεί η αλληλουχία των βάσεων του απέναντι τμήματος του άθικτου κλώνου. Παρά τις παρατηρήσεις αυτές φαίνεται ότι είναι νωρίς ακόμη για οριστικά συμπεράσματα.

Οι επιστήμονες εξέτασαν και τις αλληλεπιδράσεις των κυτταρικών πρωτεϊνών με το DNA που έχει υποστεί βλάβες από τη σισπλατίνη. Υπέθεσαν ότι πρωτεΐνες που συνδέονταν με ενώσεις προσθήκης σισπλατίνης-DNA μπορούν να παρεμποδίσουν την επιδιόρθωση μέσω εκτομής. Με διάφορες δοκιμασίες διαχώρισαν διάφορες πρωτεΐνες και βρήκαν ότι όλες τους περιέχουν τμήματα με πανομοιότυπες αλληλουχίες αμινοξέων, οι οποίες ονομάζονται **ομάδες υψηλής κινητικότητας** (high mobility groups, HMG). Επίσης, διαπιστώθηκε ότι κύτταρα τα οποία δεν διαθέτουν το γονίδιο που κωδικοποιεί τις **πρωτεΐνες με περιοχές HMG** (HMG-domain proteins) είναι λιγότερο ευαίσθητα στη σισπλατίνη. Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αντινεοπλασματική δραστηριότητα του φαρμάκου θα είναι εντονότερη σε κύτταρα με πρωτεΐνες με περιοχές HMG. Πιστεύεται ότι οι πρωτεΐνες με περιοχές HMG είναι **παράγοντες μεταγραφής** (transcription factors), γεγονός που σημαίνει ότι είναι απαραίτητες για τη σύνθεση του RNA από κλώνους DNA-εκμαγεία.

Μια θεωρία επισημαίνει ότι εάν υπάρχει προτίμηση για τις πρωτεΐνες με περιοχές HMG να ενωθούν με ενώσεις προσθήκης σισπλατίνης-DNA, τότε δημιουργείται χάος στο μηχανισμό μεταγραφής γεγονός που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. Σύμφωνα με μια δεύτερη θεωρία η αλληλοεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών με τις ενώσεις προσθήκης σισπλατίνης-DNA δεν αναγνωρίζονται από τον επιδιορθωτικό μηχανισμό του DNA και αναπόφευκτα η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στην καταστροφή των κυττάρων.

Η χρήση συσκευών χορήγησης φαρμάκων σε νανοκλίμακα είναι ένας ιδιαίτερα αναπτυσσόμενος τομέας έρευνας. Τα λιποσώματα ήταν μια από τις πρώτες πλατφόρμες νανοκλίμακας που αναπτύχθηκαν για τη χορήγηση φαρμάκων. Οι νέοι φορείς νανοσωματιδίων, συμπεριλαμβανομένων των φυσικών πρωτεϊνών όπως η αλβουμίνη, καθώς και πιο πολύπλοκα βιομόρια, είναι επίσης πιθανό να συμβάλλουν σημαντικά. Αναμένεται ότι το ενδιαφέρον για την ανάπτυξη παραγόντων πλατίνης, ιδιαίτερα σε

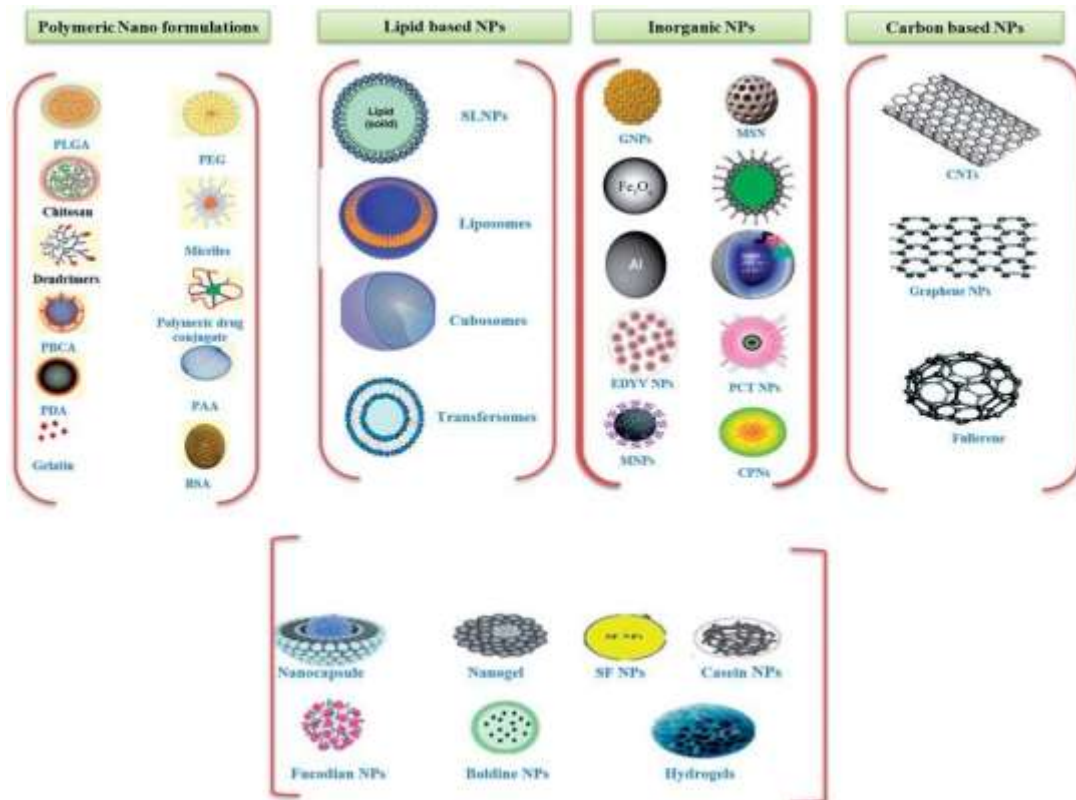
σκευάσματα νανοσωματιδίων, που καταδεικνύεται από ερευνητές σε όλο τον κόσμο, θα δημιουργήσει αυξημένη ροή αυτών των υποψηφίων φαρμάκων πλατίνας στον αγωγό ανάπτυξης, εγκαινιάζοντας την επόμενη γενιά φαρμάκων πλατίνας.

Το Aroplatin, το Liporlatin και το SPI-077 είναι νανοσκευάσματα που βασίζονται σε λιποσώματα τροποποιημένα με PEG που βρίσκονται ακόμη υπό κλινικές δοκιμές. Έχουν πολλούς περιορισμούς, για παράδειγμα, κακή υδατοδιαλυτότητα, αντοχή στα φάρμακα και τοξικότητες, οι οποίες μπορούν να ξεπεραστούν με την ενθυλάκωση της σισπλατίνης σε νανοφορείς.

Πολλά νανοσκευάσματα που βασίζονται σε λιποσώματα βρίσκονται στο στάδιο των κλινικών δοκιμών. Ένα από τα υπό κλινικές δοκιμές φάρμακα, το Liporlatin, είναι σκεύασμα πλατίνας που βασίζεται σε λιπόσωμα υπό κλινικές δοκιμές Φάσης III. Περιέχει έναν συνδυασμό σισπλατίνης (9%) και λιπιδίων (91% (w/w)), συμπεριλαμβανομένης της φωσφατιδυλοχολίνης σόγιας (SPC-3), της χοληστερόλης, της διπαλμιτοϋλοφωσφατιδυλογλυκερόλης (DPPG) και της μεθοξυ-PEG-διστεαροϋλφωσφατιδυλαιθανολαμίνης. Έχουν πραγματοποιηθεί προκλινικές μελέτες του σκευάσματος Liporlatin σε αρουραίους και ποντίκια, τα οποία έδειξαν μικρότερη τοξικότητα, ιδιαίτερα λόγω της νεφροτοξικότητας σε σύγκριση με τη συμβατική σισπλατίνη. Ένα άλλο νανοϊατρικό, το SPI-77 βρίσκεται στη φάση II. Αυτό το σκεύασμα περιέχει λιποσώματα φορτωμένα με σισπλατίνη και υδρογονωμένη φωσφατιδυλοχολίνη σόγιας, χοληστερόλη και φωσφατιδυλαιθανολαμίνη τροποποιημένη με PEG. Αυτό το σκεύασμα βρίσκεται στο τελικό κλινικό στάδιο, δηλαδή Φάση III, στην Ασία με το όνομα ανάπτυξης NC-6004. Κλινικές μελέτες Φάσης I έδειξαν ότι το NC-6004 έχει σημαντικά καλύτερη ανεκτικότητα, σε αντίθεση με το διάλυμα σισπλατίνης, χωρίς να προκαλεί σημαντική νεφροτοξικότητα. Ένα άλλο νανο-σκεύασμα, Aroplatin χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία κακοήθους μεσοθηλιώματος από την FDA των ΗΠΑ. Η Φάση II είχε ήδη ολοκληρωθεί το 2002 για τον μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου και τους προχωρημένους συμπαγείς όγκους.

Οι προσπάθειες στοχευμένης μεταφοράς της σισπλατίνης βασισμένες σε νανοφορείς είναι πολυάριθμες. Αρχικά, έχουν χρησιμοποιηθεί συστήματα χορήγησης νανοφαρμάκων με βάση πολυμερή. Χαρακτηριστικά είναι τα νανοσωματίδια Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), τα νανοσωματίδια πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG), καθώς και διάφορα μικκύλια και δενδριμερή. Ο Kataoka και οι συνεργάτες του ενσωμάτωσαν σισπλατίνη σε

πολυμερικά μικκύλια βασισμένα σε PEG-*b*-Poly(glutamic acid) και PEG-*b*-poly(aspartic acid) ενισχύοντας τη θεραπευτική ικανότητα του φαρμάκου κατά του παγκρεατικού καρκίνου [104], ενώ ο Song και οι συνεργάτες του παρουσίασαν τον εγκλωβισμό πακλιταξέλης και σισπλατίνης στο τρισυσταδικό συμπολυμερές mPEG-*b*-P(Glu)-*b*-P(Phe) και απέδειξαν ότι τα προκύπτοντα μικκύλια με τα δυο φάρμακα εμφάνισαν συνεργιστικά αποτελέσματα στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα A549 [105]. Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί νανοφορείς βασισμένοι σε λιπίδια όπως λιποσώματα. Επιπροσθέτως έχουν χρησιμοποιηθεί ανόργανα νανοσυστήματα μεταφοράς που βασίζονται σε νανοσωματίδια όπως τα νανοσωματίδια χρυσού. Νανοσκευάσματα με βάση τον άνθρακα καθώς και άλλα νανοσκευάσματα όπως νανογέλες και υδρογέλες για τη μεταφορά πλατίνης έχουν επίσης βρει εφαρμογή. Η σχηματική απεικόνιση διαφόρων νανοφορέων που έχουν χρησιμοποιηθεί στη μεταφορά της σισπλατίνης δίνεται στην Εικόνα 13.



Εικόνα 13: Νανοφορείς που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά της σισπλατίνης

2.8 Θεωρητική προσέγγιση των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

2.8.1 Πολυαιθυλενοξειδίο (PEO) [106 –117]

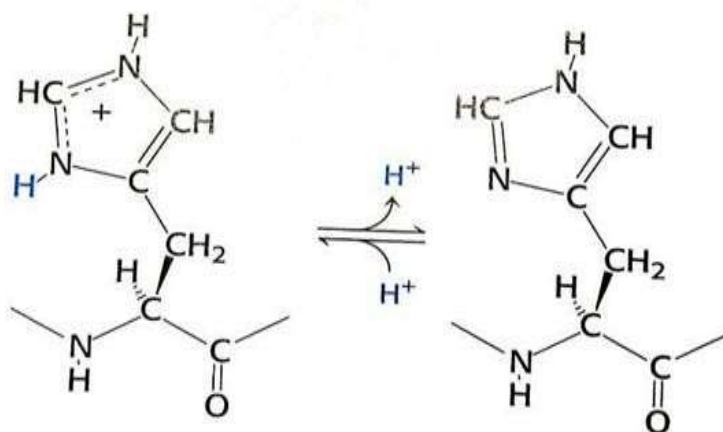
Η πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (polyethylene glycol, PEG) είναι ένας γραμμικός ή διακλαδισμένος πολυαιθέρας, με ποικιλία μοριακών βαρών. Η PEG είναι γνωστή και ως πολυ(αιθυλενοξειδίο) (polyethylene oxide, PEO), και ως πολυ(οξυαιθυλένιο) (polyoxyethylene, PEO) ανάλογα με το μοριακό της βάρος. Οι τρεις διαφορετικές ονομασίες είναι χημικά συνώνυμες, αλλά η ονομασία PEG προτιμάται στον βιοϊατρικό κλάδο, ενώ το όνομα PEO χρησιμοποιείται κυρίως στη χημεία των πολυμερών.

Η πολυ(αιθυλενογλυκόλη), μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πολλά επιστημονικά πεδία όπως τη βιο-φαρμακευτική, τη χημεία των επιφανειών, τη βιολογία και τη βιο-ιατρική. Είναι γνωστό ότι, το PEO κατέχει την πρώτη θέση σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, εξαιτίας της υψηλής του ευκαμψίας, της σταθερότητάς του, της υδροφιλικότητάς του, της μη τοξικότητάς του, της βιοαποικοδομησιμότητάς του, αφού αφομοιώνεται και αποβάλλεται εύκολα από τον οργανισμό και της βιοσυμβατότητάς του, καθώς δεν αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του αίματος, οι οποίες χρησιμοποιούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα για την ειδική αναγνώριση των αντιγόνων. Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό του PEO είναι ότι αυξάνει το χρόνο κυκλοφορίας του συστήματος στο αίμα. Τα τελευταία χρόνια το PEO είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη υδατοδιαλυτή συστάδα, στα αμφίφιλα κατά συστάδες συμπολυμερή. Αυτού του τύπου τα πολυμερή παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω του συνδυασμού των υδρόφιλων και των υδρόφοβων ιδιοτήτων τους και έχουν πιθανή εφαρμογή ως σταθεροποιητές διάχυσης, γαλακτωματοποιητές, συμβατοποιητές καθώς, επίσης, στη μεταφορά φαρμάκων και γονιδίων.

2.8.2 Πολυ(Ιστιδίνη) (PHis) [42, 118]

Η L-ιστιδίνη (L-His) ως αμινοξύ κατέχει μια μοναδική ιδιότητα που το καθιστά ξεχωριστό ανάμεσα στα 20 φυσικά αμινοξέα. Λόγω αυτής της ιδιότητας, το πολυμερές της ιστιδίνης (Poly(L-His), PHis)) αποτελεί ένα πολυδύναμο εργαλείο με αξιοσημείωτες δυνατότητες, καθώς επίσης και ιδανικό πολυπεπτίδιο ως συστατικό σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Η ξεχωριστή ιδιότητα που διαθέτει είναι η ομάδα ιμιδαζολίου, ένας αρωματικός δακτύλιος που μπορεί να φορτιστεί (Σχήμα 1). Στον ιμιδαζολικό δακτύλιο το μη υποκατεστημένο άζωτο φέρει ένα μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων, και μπορεί να

πρωτονιωθεί σε $pK_a \sim 6,5$. Έτσι, η ομάδα του ιμιδαζολίου μπορεί να είναι είτε φορτισμένη θετικά, είτε αφόρτιστη σε ουδέτερο pH, ανάλογα με το μικροπεριβάλλον στο οποίο θα βρεθεί, προσδίδοντας στο μόριο pH- αποκρισμότητα.



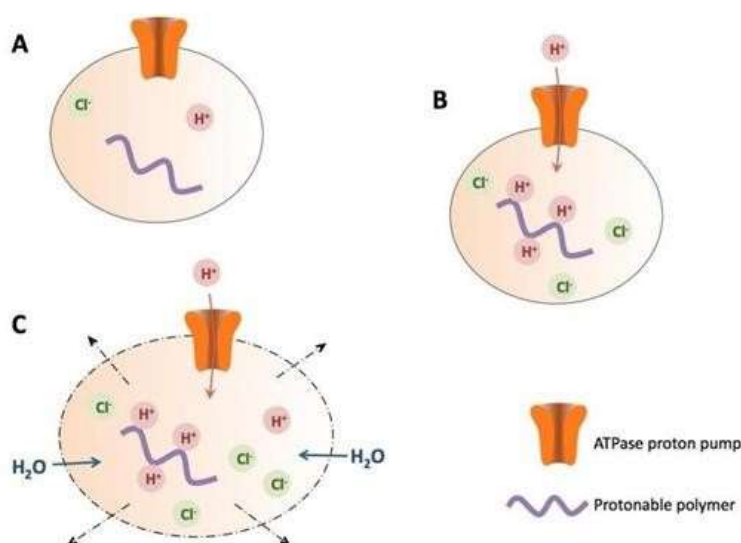
Σχήμα 1: Ο ιοντισμός του ιμιδαζολικού δακτυλίου της πολυ(L-ιστιδίνης).

Νανοφορείς οι οποίοι περιέχουν PHis έχουν την ικανότητα να ελέγχουν πού θα μεταφερθούν τα φάρμακα μέσω της “*sol-to-gel*” pH-αποκρισμότητας της ιστιδίνης. Πρακτικά, αυτό για ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων σημαίνει ότι σε $pH \sim 6,5$, δηλαδή το pH των καρκινικών κυττάρων, ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της ιστιδίνης πρωτονιώνεται και προκαλείται διόγκωση στο σύστημα λόγω της αλλαγής της δευτεροταγούς δομής του πολυπεπτιδίου και άρα απελευθέρωση του φαρμάκου. Αντίθετα, στους υγιείς ιστούς που έχουν τιμή $pH=7,4$ το μόριο είναι αποπρωτονιωμένο (υδρόφοβο) και απολύτως σταθερό. Η ιδιότητα αυτή της πολυ(ιστιδίνης) την κάνει να πλεονεκτεί έναντι των περισσότερων pH-αποκρινόμενων μεταφορέων φαρμάκων, οι οποίοι επικεντρώνονται στην ενδοσωματική απόκριση του pH με αποτέλεσμα να απελευθερώνουν το φάρμακο έξω από τα καρκινικά κύτταρα εξαιτίας του χαμηλού όξινου περιβάλλοντος, μειώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου.

Μια ακόμη πολύ ενδιαφέρουσα ιδιότητα που εμφανίζει τόσο η ιστιδίνη όσο και η πολυ(L-ιστιδίνη), είναι το λεγόμενο “*proton sponge effect*”, κατά το οποίο ένα πολυμερές εισέρχεται στο κύτταρο με τη διαδικασία της ενδοκύττωσης και στη συνέχεια παγιδεύεται στο ενδόσωμα. Με τη μεμβράνη των ενδοσωμάτων είναι συνδεδεμένη μία αντλία

πρωτονίων, η οποία τα εφοδιάζει συνεχώς με πρωτόνια, ειδικά όταν αντιληφθεί την ύπαρξη ξένου σώματος μέσα σε αυτά.

Ένα πολυμερές, όπως η πολυ(L-ιστιδίνη), που έχει τη δυνατότητα να πρωτονιωθεί, λαμβάνει αυτά τα πρωτόνια και έτσι η αντλία συνεχίζει να στέλνει πρωτόνια μέχρι να επιτευχθεί μείωση του pH. Η δράση αυτή της αντλίας, συνοδεύεται από παθητική είσοδο ιόντων χλωρίου, αυξάνοντας τη συγκέντρωση των ιόντων άρα και την εισροή νερού. Η υψηλή ωσμωτική πίεση, οδηγεί σε διόγκωση και τελικά σε ρήξη των ενδοσωμάτων, απελευθερώνοντας όλο το περιεχόμενο στο κυττосόλιο (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Τρόπος λειτουργίας της αντλίας πρωτονίων κατά την είσοδο πολυμερούς στα ενδοσώματα ("proton sponge effect")

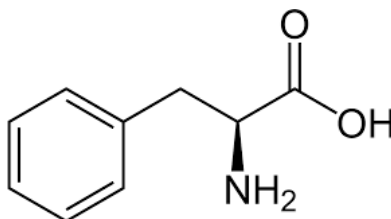
Άλλα πλεονεκτήματα της PHis είναι η ικανότητα σύνδεσης με μέταλλα όπως Au, Cu, Fe, Mn, Co, Ni καθώς και η δυνατότητα σχηματισμού σταθερών πολυϊοντικών συμπλεγμάτων, με αρνητικά φορτισμένα μόρια, όπως είναι το DNA ή διάφορα ένζυμα, μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

Είναι φανερό, ότι η PHis συνδυάζει εξαιρετικά ενδιαφέρουσες ιδιότητες, σχηματίζοντας μη τοξικά και βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, γεγονός το οποίο την καθιστά ένα ιδανικό μέσο για να χρησιμοποιηθεί σε βιολογικούς και φαρμακευτικούς σκοπούς και πολλά υποσχόμενο εργαλείο στην αντικαρκινική θεραπεία. Παρόλο όμως τις ποικίλες ιδιότητές της, η ιστιδίνη παρουσιάζει ένα πολύ σημαντικό μειονέκτημα αυτό της ρακεμείωσης.

Καθοριστικό παράγοντα στη μείωση της ρακεμείωσης αποτελεί η προστατευτική ομάδα. Οι προστατευτικές ομάδες που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση της PHis είναι είτε η benzyl προστατευτική ομάδα, είτε η 2,4-dinitrophenyl προστατευτική ομάδα (DNP), όμως καμία δεν προσδίδει έλεγχο στη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυμερών. Η benzyl προστατευτική ομάδα αποπροστατεύεται κάτω από πολύ δραστικές συνθήκες όπου μπορεί να προκαλέσει σπάσιμο του πεπτιδικού δεσμού ή ρακεμείωση ενώ η 2,4-dinitrophenyl προστατευτική ομάδα (DNP) δεν συνδυάζεται με διουλφιδικούς δεσμούς αφού ο δεσμός αυτός σπάει κατά τη διάρκεια της αποπροστασίας του DNP με θειόλυση. Το 2014 η ερευνητική ομάδα του κ. Ιατρού ανέφερε τη σύνθεση της PHis με τρίτυλο προστατευτική ομάδα. Τα πλεονεκτήματα της τρίτυλο προστατευτικής ομάδας είναι ότι εμφανίζει τη μικρότερη ρακεμείωση κατά την αποπροστασία και μπορεί να αποπροστατευτεί εύκολα με ασθενή οξέα. Επίσης, υπάρχει εκλεκτικότητα κατά την αποπροστασία της τρίτυλο προστατευτικής ομάδας αφού οι άλλες προστατευτικές ομάδες δεν θα επηρεαστούν, μόνο η τρίτυλο θα φύγει. Άλλο ένα χαρακτηριστικό της είναι ότι είναι πολύ σταθερή απέναντι σε ουδέτερα, αλκαλικά μέσα και ως προς τα πυρηνόφιλα.

2.8.3 Φαινυλαλανίνη (Phe)

Η φαινυλαλανίνη είναι ένα από τα α-αμινοξέα με σύντομο συντακτικό τύπο $\text{PhCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ και αποτελεί ένα από τα είκοσι αμινοξέα που υπάρχουν στον ανθρώπινο οργανισμό. Κανονικά, η ονομασία της κατά IUPAC θα ήταν: 2-αμινο-3-φαινυλοπροπανικό οξύ, αλλά το φαινυλαλανίνη αποτελεί επίσης αποδεκτή ονομασία από την IUPAC. Το L-στερεοϊσομερές της είναι ένα από τα 24 πρωτεϊνικά αμινοξέα (δομικές μονάδες των πρωτεϊνών) και παρουσιάζει S διαμόρφωση ως προς τον α-άνθρακα. Είναι ταξινομημένο ως ουδέτερο, μη πολικό (ή υδρόφοβο) αμινοξύ λόγω της πλευρικής του ομάδας η οποία είναι υδρόφοβη (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Χημική δομή φαινυλαλανίνης

Σπουδαίος είναι ο ρόλος της φαινυλαλανίνης ως βιολογικός ρυθμιστής εκ της μετατροπής της σε άλλα σπουδαία αμινοξέα του οργανισμού όπως είναι η ντοπαμίνη, η νοραντοπαμίνη, η επινεφρίνη, η μελανίνη κ.ά.

Η φαινυλαλανίνη βρίσκεται φυσιολογικά στο γάλα των θηλαστικών, ενώ χρησιμοποιείται για την παραγωγή τροφών και αναψυκτικών και παράλληλα πωλείται και ως ένα διατροφικό πρόσθετο για τα φημισμένα αναλγητικά και αντικαταθλιπτικά αποτελέσματά της. Ακόμη, είναι ένα άμεσος πρόδρομος για το νευροδιαβιβαστή φαινυλαιθυλαμίνη, που επίσης είναι συνηθισμένο συμπλήρωμα διατροφής [119, 120].

Πολυφαινυλαλανίνη (PPhe)

Η πολυφαινυλαλανίνη είναι ένα πολυμερές το οποίο, λόγω της εξαιρετικά άκαμπτης χημικής δομής του μορίου της, είναι ένα από τα πιο υδρόφοβα πολυμερή σε σύγκριση με τα υπόλοιπα αντίστοιχα τα οποία έχουν συντεθεί αποκλειστικά από αμινοξέα.

Η πολυφαινυλαλανίνη έχει εξαιρετική σταθερότητα τόσο σε όξινες όσο και σε βασικές συνθήκες. Η γεωμετρία και οι ελκτικές δυνάμεις των αρωματικών δακτυλίων παρέχουν προσανατολισμό στο μόριο, όπως επίσης και την ενέργεια που χρειάζεται για τον σχηματισμό πολύ καλά καθορισμένων δομών. Συγκεκριμένα, το διμερές της φαινυλαλανίνης αποτελεί ένα ευρέως μελετημένο αρωματικό διπεπτίδιο που σχηματίζει δομές νανοσωλήνα [121].

Η δομή του μορίου της έχει επιτρέψει την παρασκευή ζελατινών πολυφαινυλαλανίνης, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί ως μόρια για μεταφορά φαρμάκων, ως εξωκυτταρική μήτρα για προσομοίωση ανθρώπινων ιστών. Έχουν γίνει πολλές μελέτες που χρησιμοποιούν την πολυ(φαινυλαλανίνη) ως τμήμα αμφίφιλων δισυσταδικών και τρισυσταδικών συμπολυμερών που σχηματίζουν μικκυλιακές δομές ή τυχαίων συμπολυμερών και χρησιμοποιούνται στην ελεγχόμενη μεταφορά και απελευθέρωση αντικαρκινικών φαρμάκων. Ως παράδειγμα αναφέρεται η σύνθεση του τρισυσταδικού συμπολυμερούς Methoxy-poly(ethylene glycol)-poly(L-glutamic acid)-poly(L-phenylalanine) από τον Le και την ομάδα του, στο οποίο εγκλώβισαν το φάρμακο sorafenib. Η *in vitro* απελευθέρωση φαρμάκου έδειξε ότι τα μικκύλια που σχηματίστηκαν μπορούν να πραγματοποιήσουν ελεγχόμενη και παρατεταμένη απελευθέρωση φαρμάκου. Επιπλέον, η *in vitro* δοκιμασία κυτταροτοξικότητας έδειξε ότι τα πολυμερή ήταν βιοσυμβατά και τα φορτωμένα με

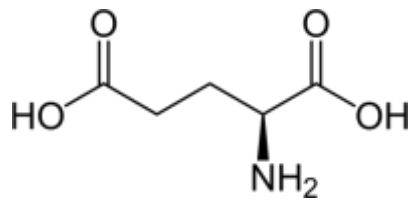
φάρμακο μικκύλια μπορούν να αυξήσουν την τοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα [122]. Το 2019, ο Yuan και οι συνεργάτες του παρουσίασαν τη σύνθεση του εμβολιασμένου με φαινυλαλανίνη και λυσίνη πολυμερούς (PAsp-g-Phe)-g-Lys το οποίο έδειξε τοπική χημική αποσταθεροποίηση των κυτταρικών μεμβρανών από την αλληλεπίδραση μεταξύ του πολυμερούς και των διπλών στοιβάδων της μεμβράνης σε pH 7,4 και διευκόλυε την είσοδο της καλσεΐνης στα κύτταρα NIH/3T3 και HeLa. Ως εκ τούτου, πρόκειται για pH αποκρινόμενα πολυμερή με ενισχυμένη δράση διαταραχής της μεμβράνης που θα μπορούσαν να είναι δυνητικά υποψήφιοι για ενδοκυτταρική παροχή βιοδραστικών μορίων σε βιοϊατρικές εφαρμογές [123]. Άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η σύνθεση του ενός νέου αμφίφιλου κατιονικού κατά συστάδες συμπολυμερούς πολυλυσίνη-πολυφαινυλαλανίνη (PLL-*b*-PPhe) το οποίο αυτοοργανώθηκε σε μικκύλια σε υδατικό διάλυμα και στη συνέχεια θωρακίστηκε με πολυ(γλουταμινικό οξύ) (PG/PLL-*b*-PPhe) για ταυτόχρονη μεταφορά γονιδίων και φαρμάκων για τη συνδυαστική θεραπεία του καρκίνου. Το PG/PLL-*b*-PPhe εμφάνισε εξαιρετική αποτελεσματικότητα γονιδιακής επιμόλυνσης, ενώ η ταυτόχρονη μεταφορά DOX και Bcl2 siRNA παρουσίασε αξιοσημείωτη κυτταροτοξικότητα έναντι των κυττάρων B16F10. Τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι η ταυτόχρονη μεταφορά γονιδίων και φαρμάκων είναι μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική στη μελλοντική θεραπεία του καρκίνου [124].

Γεγονός, όμως, είναι πως οι ιδιότητές του πολυμερούς της φαινυλαλανίνης δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς, λόγω της χαμηλής της διαλυτότητας τόσο σε υδατικούς όσο και σε οργανικούς διαλύτες [125].

2.8.4 Γλουταμικό οξύ

Το γλουταμινικό οξύ είναι ένα από τα 22 πρωτεϊνογόνα αμινοξέα. Είναι ένα μη απαραίτητο αμινοξύ. Τα καρβοξυλικά ανιόντα και άλατα του γλουταμινικού οξέος είναι γνωστά ως «γλουταμινικά». Στη νευρολογία, το γλουταμινικό οξύ είναι σημαντικός νευροδιαβιβαστής, που παίζει νευραλγικό ρόλο στην ανάπτυξη και είναι σημαντικό τόσο για τη μάθηση όσο και τη μνήμη.

Η πλευρική αλυσίδα του αμινοξέος περιέχει καρβοξυλομάδα με $pK_a = 4,07$ και γι' αυτό βρίσκεται, σχεδόν εντελώς, στην αρνητικά φορτισμένη αποπρωτονιωμένη μορφή της, για κάθε τιμή $pH > 4,07$. Γι' αυτό είναι αρνητικά φορτισμένο στις «φυσιολογικές τιμές pH», που κυμαίνονται από 7,35 ως 7,45.



Εικόνα 16: Χημική δομή γλουταμικού οξέος

Το γλουταμικό οξύ διαδραματίζει ποικίλους ρόλους, όπως ο ενδογενής αντικαρκινικός παράγοντας, έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με αντικαρκινικούς παράγοντες, ενώ τα παράγωγα του γλουταμικού οξέος είναι πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες. Η γλουταμίνη είναι ένα παράγωγο του γλουταμικού οξέος και σχηματίζεται στο σώμα από γλουταμινικό οξύ και αμμωνία σε μια ενέργεια που απαιτεί αντίδραση που καταλύεται από τη συνθάσητης γλουταμίνης. Έχει επίσης αντικαρκινική δράση. Τα γλουταμινικά είναι τα καρβοξυλικά ανιόντα και τα άλατα του γλουταμινικού οξέος.

Στον Καρκίνο υπάρχει κυρίως εξάντληση της γλουταμίνης, καθώς τα καρκινικά κύτταρα καταναλώνουν γλουταμίνη σε μεγάλη κλίμακα, γι' αυτό υπάρχει έλλειψη γλουταμίνης στους σκελετικούς μύες. Η γλουταμίνη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στα καρκινικά κύτταρα. Πρώτον δρα ως δότης αζώτου στη βιοσύνθεση νουκλεοτιδίων και αμινοξέων, δεύτερον η γλουταμίνη βοηθά στην πρόσληψη του απαραίτητου αμινοξέος και διατηρεί την ενεργοποίηση της κινάσης TOR. Σε πολλά καρκινικά κύτταρα, η γλουταμίνη είναι το κύριο μιτοχονδριακό υπόστρωμα και διατηρεί το δυναμικό και την ακεραιότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Παρέχει υποστήριξη για την παραγωγή NADPH που απαιτείται για τον έλεγχο της οξειδοαναγωγής και τη μακρομοριακή σύνθεση. Η γλουταμίνη είναι το αναπνευστικό καύσιμο των καρκινικών κυττάρων. Το γλουταμινικό οξύ και η γλουταμίνη είναι αμφότερα μετατρέψιμα μεταξύ τους. Το γλουταμινικό οξύ ανήκει στην κύρια ομάδα νευροδιαβιβαστών. Είναι ο κύριος νευροδιαβιβαστής του εγκεφάλου. Αυξάνει την εγκεφαλική λειτουργία και την πνευματική δραστηριότητα. Αποτοξινώνει τον εγκέφαλο από την αμμωνία προσκολλώντας τον εαυτό του σε άτομα αζώτου στον εγκέφαλο και επίσης βοηθά στη μεταφορά του καλίου μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Εικάζεται ότι το γλουταμικό εμπλέκεται σε γνωστικές λειτουργίες όπως η μάθηση και η μνήμη στον εγκέφαλο, αν και υπερβολικές ποσότητες

μπορεί να προκαλέσουν νευρωνική βλάβη που σχετίζεται με ασθένειες όπως η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση, ο λαθουρισμός και η νόσος Alzheimer [126].

Πολυ (γλουταμινικό οξύ) [poly(glutamate)]

Το γλουταμινικό οξύ χρησιμοποιείται ως συζυγές επειδή αυξάνει την αποτελεσματικότητα του αντικαρκινικού φαρμάκου και μειώνει την τοξικότητά του προς τα φυσιολογικά κύτταρα. Το πολυ(γλουταμινικό οξύ) (PGA) είναι ένα βιοπολυμερές αμινοξέων που έχει προσελκύσει πρόσφατα την προσοχή λόγω της βιοσυμβατότητας, της μη ανοσογονικότητας και της βιοδιασπασιμότητάς του. Πολλοί ερευνητές έχουν δείξει ότι τα σύνθετα PGA καθώς και το ίδιο το PGA είναι ιδανικοί υποψήφιοι για αντιμικροβιακά υλικά, ανοσοενισχυτικά εμβολίων, θεραπείες καρκίνου, ιατρικές συσκευές και αναγέννηση ιστών. Στο όχι και τόσο μακρινό μέλλον, το PGA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία πραγματικών ασθενών και όχι μόνο για δοκιμές σε ζώα [127].

Το πολυ(γλουταμινικό οξύ) έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο σχηματισμό νανοσωματιδίων για τη μεταφορά και εκλεκτική απελευθέρωση αντικαρκινικών φαρμάκων. Για παράδειγμα, η σύζευξη της πακλιταξέλης και του υδατοδιαλυτού πολυγλουταμικού είναι γνωστή ως πολυ (L-γλουταμινικό οξύ)-πακλιταξέλη (PG-TXL). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η PG-TXL έχει μεγαλύτερη αντικαρκινική δράση από την ελεύθερη πακλιταξέλη. Το PG-TXL ασκεί την αντικαρκινική του δράση με τη συνεχή απελευθέρωση ελεύθερης πακλιταξέλης στα κύτταρα [126].

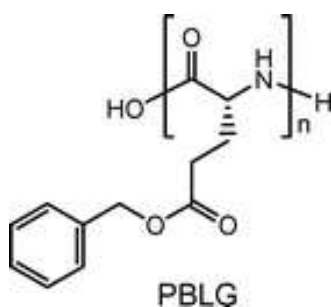
Επιπροσθέτως, η σισπλατίνη συνδυάζεται με γ-πολύ (α,L-γλουταμινικό οξύ) (γ-PGA) για να σχηματίσει γ-πολυ(γλουταμινικό οξύ)-cis-διχλωροδιαμμινοπλατίνη (γ-PGA-CDDP) που είναι υδατοδιαλυτό. Το συζυγές γ-PGA-cisplatin αναστέλλει αποτελεσματικά τα κύτταρα ανθρώπινου όγκου του μαστού σε ποντίκια. Μειώνει επίσης τις τοξικές παρενέργειες που σχετίζονται με τη χρήση του ελεύθερου CDDP και παράγει επιθυμητή φαρμακοκινητική και ενισχυμένη αντικαρκινική δράση [126]. Η σισπλατίνη έχει ακόμα ενσωματωθεί από τον Kataoka και την ομάδα του σε πολυμερικά μικκύλια PEG-*b*-poly(γ-benzyl-L-glutamate) (PEG-*b*-PBLG) ενισχύοντας τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα του φαρμάκου κατά του όγκου του παγκρέατος. Αυτοί οι επιτυχημένοι φορείς, αξιολογούνται σε κλινικές δοκιμές φάσης III σε ανθρώπους σε πολλές χώρες για να διευκρινιστεί η επίδραση αυτών των δομών στη βιολογική απόδοση των πολυμερών μικκυλίων [104]. Το 2016, ο Chen και οι συνεργάτες του παρουσίασαν μια σειρά καινοτόμων εμβολιασμένων

συμπολυμερών του τύπου poly(L-glutamic acid)-*graft*-methoxy poly(ethylene glycol) (PLG-*g*-mPEG) και οι ομάδες καρβοξυλίου των PLG-*g*-mPEG που δεν αντέδρασαν χρησιμοποιήθηκαν για τη συμπλοκοποίηση της σισπλατίνης για τον σχηματισμό νανοσωματιδίων συμπλόκου πολυμερούς-μετάλλου (CDDP/PLG-*g*-mPEG) για θεραπεία καρκίνου. Οι δοκιμές *in vitro* έδειξαν ότι τα νανοσωματίδια CDDP/PLG-*g*-mPEG θα μπορούσαν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων HeLa, MCF-7 και A549. Σε ίση δόση (4 mg kg⁻¹), τα νανοσωματίδια CDDP/PLG-*g*-mPEG έδειξαν συγκρίσιμη *in vivo* αντινεοπλασματική αποτελεσματικότητα και σημαντικά χαμηλότερη συστηματική τοξικότητα σε σύγκριση με την ελεύθερη *cis*-Diaminedichloroplatinum (*cisplatin*, CDDP) σε ποντίκια που φέρουν όγκο MCF-7 [128].

Ακόμη, ο Ni και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν poly [*N*-isopropylacrylamide-*co*-allyl poly(ethylene glycol)]-*b*-poly(γ-benzyl-Lglutamate) πολυμερικά μικκύλια ως συστήματα μεταφοράς DOX. Τα φορτωμένα με DOX μικκύλια εμφάνισαν συμπεριφορές επιταχυνόμενης απελευθέρωσης φαρμάκου σε όξινη κατάσταση και παρατηρήθηκε ενισχυμένη θεραπευτική αποτελεσματικότητα εμφάνισαν ισχυρή κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα HeLa και 3T3 [129].

Συμπερασματικά, τα πολυμερικά μικκύλια βασισμένα στο πολυ (γλουταμικό οξύ) μπορούν είναι πολλά υποσχόμενα συστήματα μεταφοράς αντικαρκινικών φαρμάκων.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το γ-βένζυλο προστατευμένο πολυ (L-γλουταμικό οξύ) (Εικόνα 17) ως συστάδα του τρισυσταδικού συμπολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-Poly(γ-benzyl-L-Glutamate) για το σχηματισμό νανοσωματιδίων χρυσού όπως θα αναλυθεί σε επόμενο κεφάλαιο.



Εικόνα 17: Δομή του πολυ (γ-βένζυλο-L-γλουταμικού οξέος)

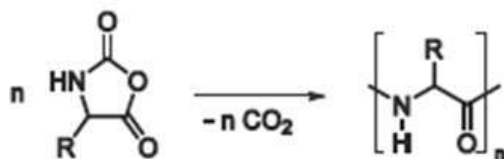
2.9 Πολυμερισμός Διάνοιξης Δακτυλίου (Ring-Opening Polymerization, ROP)

Ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου αποτελεί, μαζί με τον ανιοντικό και ριζικό πολυμερισμό, μία από τις τρεις βασικές πορείες για τη σύνθεση των πιο σημαντικών για τη ζωή πολυμερών του 21ου αιώνα.

Η κινητήριος δύναμη στον ROP αποτελεί η αυξημένη τάση διάνοιξης δακτυλίου (ring strain) του μονομερούς και οι στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις που μπορεί να την συνοδεύουν, σε αντίθεση με τα άλλα είδη πολυμερισμού στα οποία το έναυσμα δίνεται από τη μετατροπή των πολλαπλών δεσμών σε απλούς. Συνήθως, ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου δεν συνοδεύεται από την παραγωγή μικρών μορίων με εξαίρεση τον ROP των *N*-καρβοξυ ανυδριτών (ή ανυδρίτες Leuchs) και τον ROP του μονομερούς 2,2-diphenyl-4-methylene-1,3-dioxolane. Ανάλογα με τον μηχανισμό με τον οποίο πραγματοποιείται ο πολυμερισμός ROP σε κάθε τύπο μονομερών, διακρίνονται τέσσερα είδη: ο ριζικός ROP (RROP), ο ανιοντικός ROP (AROP), ο κατιοντικός ROP (CROP) και ο πολυμερισμός μετάθεσης με διάνοιξη δακτυλίου (ROMP), με τη χρήση καταλυτών μετάθεσης. [118, 130]

2.9.1 Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) των *N*-καρβοξυ ανυδριτών (NCAs) των α -αμινοξέων

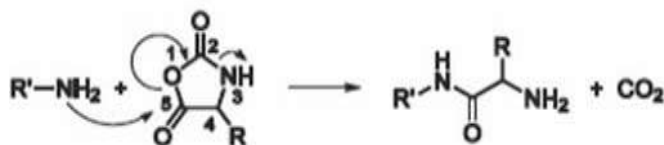
Ο πολυμερισμός των NCAs των α -αμινοξέων λαμβάνει χώρα μέσω του μηχανισμού διάνοιξης δακτυλίου (ROP). Στο μηχανισμό αυτό, σε κάθε στάδιο προσθήκης ενός μονομερούς, απελευθερώνεται ένα μόριο CO₂, όπως παρουσιάζεται και στην παρακάτω γενική αντίδραση:



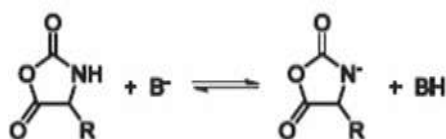
Έχει αποδειχθεί από μελέτες ιχνηθετημένων μονομερών με ¹⁴C, ότι το παραγόμενο CO₂ προέρχεται αποκλειστικά από τον άνθρακα C(2).

Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, ως απαραίτητες χρησιμοποιούνται πρωτοταγείς αμίνες. Το ελεύθερο ζεύγος ηλεκτρονίων του *N* της πρωτοταγούς αμίνης προσβάλλει τον C-5 του

μονομερούς, δηλαδή τον C με την λιγότερη ηλεκτρονική πυκνότητα, επομένως σπάνε οι δεσμοί C-5-O-1 και C-2-N-3 και παράγεται CO₂.



Σε έναν εναλλακτικό μηχανισμό, ως απαρχητής μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία βάση B⁻ (π.χ. ⁻OCH₃, H⁻, ⁻OOCCH₃). Σε αυτήν την περίπτωση, είναι δυνατόν να δημιουργηθεί ένα ανιόν από το μόριο oxazolidin-2,5-diones, το οποίο μέσω της πυρηνόφιλης προσβολής του επόμενου μονομερούς, μπορεί να συνεχίσει την ανάπτυξη της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. [130-134]



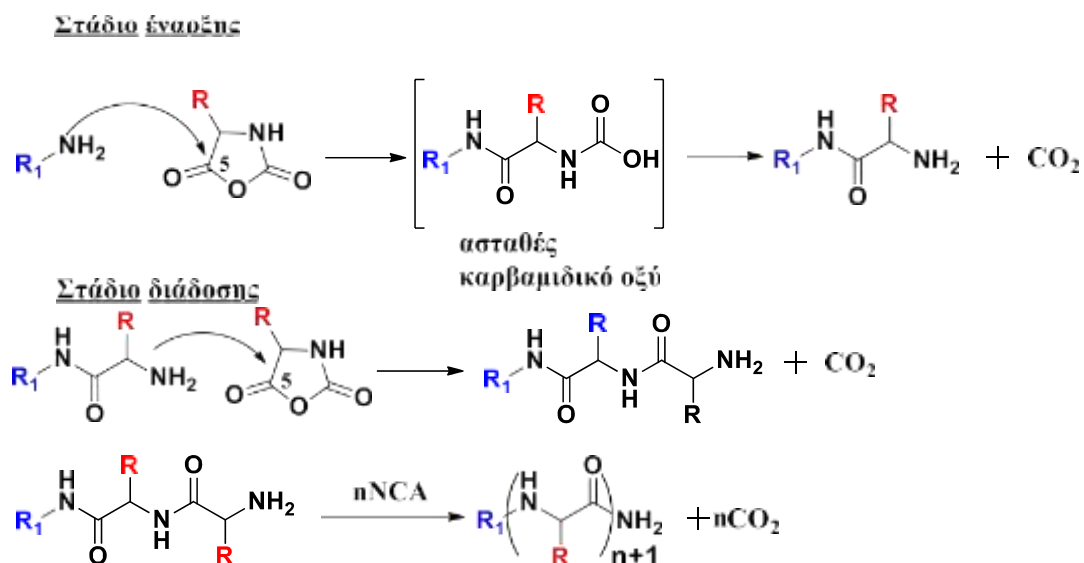
2.9.2 Μηχανιστικές μελέτες πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των NCAs

Μέχρι το 1997 οι ερευνητές συμφωνούσαν στην ύπαρξη δύο πιθανών μηχανισμών για τον ROP των NCAs. Οι μηχανισμοί αυτοί διακρίνονται με βάση το είδος του απαρχητή που θα χρησιμοποιηθεί, στον «κανονικό μηχανισμό αμινών» (“Normal Amine Mechanism”, NAM), και στον «μηχανισμό ενεργοποιημένου μονομερούς» (“Activated Monomer Mechanism”, AMM). Ο πρώτος μηχανισμός αναφέρεται στον πολυμερισμό με πρωτοταγείς αμίνες, που είναι ισχυρότερα πυρηνόφιλα από ότι βάσεις, και ο δεύτερος μηχανισμός χρησιμοποιεί ως απαρχητές αλκοξειδία μετάλλων ή τεταρτοταγείς αμίνες, δηλαδή ισχυρότερες βάσεις από ότι πυρηνόφιλα. Η συνύπαρξη των δύο μηχανισμών προτείνεται στην περίπτωση των δευτεροταγών αμινών, οι οποίες είναι ασθενή πυρηνόφιλα και βάσεις. [131-134]

- **Κανονικός Μηχανισμός Αμινών (Normal Amine Mechanism, NAM)**

Ο μηχανισμός αυτός εφαρμόζεται στον πολυμερισμό των NCAs με χρήση μη ιοντικών απαρχητών, οι οποίοι διαθέτουν τουλάχιστον ένα ευκίνητο άτομο υδρογόνου (του τύπου βάση-H), όπως είναι οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες (π.χ. *n*-εξυλαμίνη,

διμεθυλαμίνη), οι αλκοόλες και το νερό. Τα στάδια της έναρξης και της διάδοσης του πολυμερισμού μέσω αυτού του μηχανισμού παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.

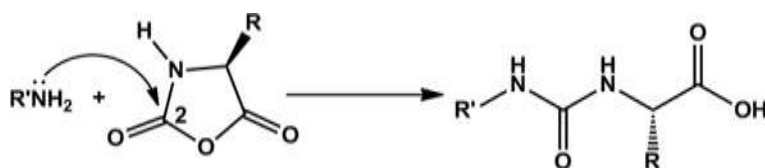


Σχήμα 2: Στάδια έναρξης και διάδοσης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των *N*- καρβοξυ ανυδριτών μέσω του κανονικού μηχανισμού αμινών (NAM)

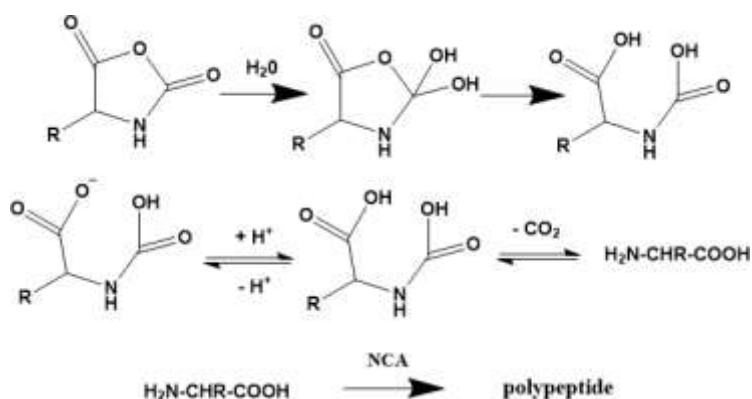
Η έναρξη βασίζεται στην πυρηνόφιλη προσβολή του απαρχητή στο καρβονύλιο στη θέση 5' του ανυδρίτη. Στη συνέχεια, το ασταθές ενδιάμεσο καρβαμίδικό οξύ που παράγεται αποκαρβοξυλιώνεται για να δώσει μια νέα ελεύθερη αμινομάδα, η οποία προωθεί τον πολυμερισμό. Στο στάδιο της διάδοσης η τελική αμινομάδα λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο, προσβάλλοντας το καρβονύλιο της θέσης 5' ενός δεύτερου μορίου NCA και η πορεία συνεχίζεται μέχρι πλήρους κατανάλωσης του μονομερούς. Οι πρωτοταγείς αμίνες, ως απαρχητές, οδηγούν σε πολυπεπίδια με στενές κατανομές μοριακών βαρών, ενώ επιτυγχάνουν καλή συμφωνία μεταξύ του θεωρητικά υπολογιζόμενου στοιχειομετρικού μοριακού βάρους και αυτού που λαμβάνεται πειραματικά.

Ωστόσο, παράπλευρες αντιδράσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν κατά το στάδιο της έναρξης, από την προσβολή του απαρχητή στη θέση 2-CO έναντι της επιθυμητής θέσης 5-CO, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ακραίου ουρείδο οξέος (Σχήμα 3). Με αυτόν τον τρόπο επέρχεται πρόωρος τερματισμός του πολυμερισμού καθώς η αμίνη δεν μπορεί να αναγεννηθεί. Όσο μεγαλύτερη είναι η πυρηνοφιλικότητα του αμινο-απαρχητή, τόσο μικρότερη είναι η πιθανότητα προσβολής της θέσης 2-CO. Άλλοι παράγοντες που μπορεί να προκαλέσουν αποκλίσεις από τον «ζωντανό» χαρακτήρα του ROP είναι η ισορροπία

μεταξύ καρβαμιδικού οξέος και CO₂, η επιλογή διαλύτη, η θερμοκρασία της αντίδρασης και η ύπαρξη υγρασίας ή άλλων προσμίξεων (υδρόλυση του μονομερούς).



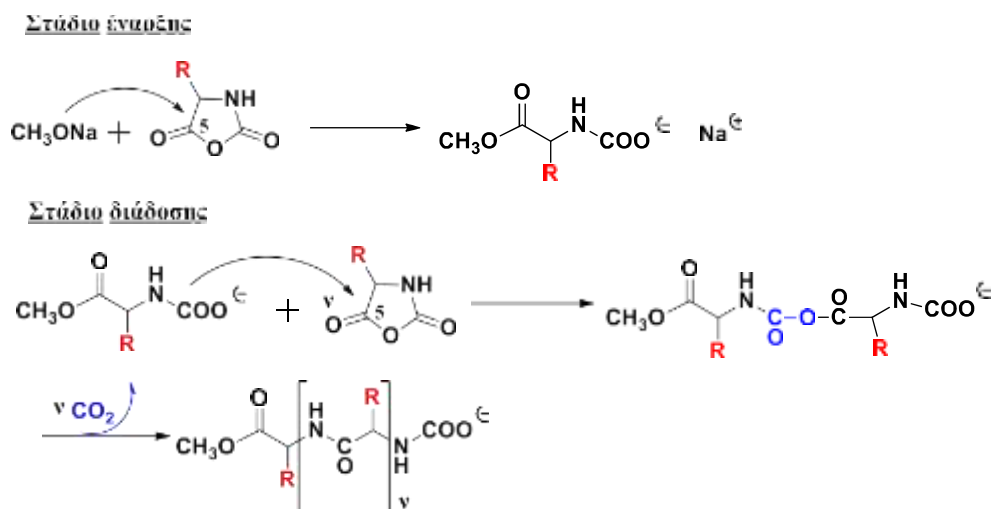
Σχήμα 3: Αντίδραση τερματισμού κατόπιν προσβολής του καρβονυλίου στη θέση 2' από τον απαρχητή.



Σχήμα 4: Υδρολυτικοί μηχανισμοί των NCAs παρουσία υγρασίας.

- **Μηχανισμός του Blout**

Ο μηχανισμός του Blout είναι μία ιοντική εκδοχή του μηχανισμού NAM, που προτάθηκε στην περίπτωση του πολυμερισμού του BLG-NCA σε διοξάνη, με χρήση μεθοξειδίου του νατρίου ως απαρχητή. Το στάδιο της έναρξης περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσβολή του ανιοντικού κέντρου του άλατος, η οποία ακολουθείται από διάνοιξη του δακτυλίου, ενώ δεν λαμβάνει χώρα αποκαρβοξυλίωση. Στο στάδιο της διάδοσης, το λαμβανόμενο καρβαμιδικό ανιόν συμπεριφέρεται όπως το ανιόν μεθοξειδίου και, επομένως, απελευθερώνεται CO₂. Ο συνολικός μηχανισμός παρατίθεται στο Σχήμα 5. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε *N*-μη υποκατεστημένους, όσο και σε *N*-υποκατεστημένους NCAs.



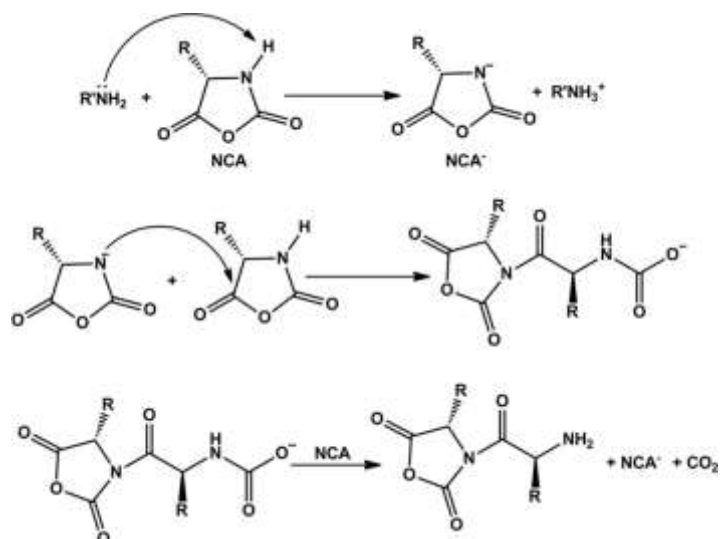
Σχήμα 5: Μηχανισμός του Blout, στάδια έναρξης και διάδοσης.

- **Μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς (Activated Monomer Mechanism, AMM)**

Ο μηχανισμός του ενεργοποιημένου μονομερούς βρίσκει εφαρμογή στους πολυμερισμούς όπου εκκινούνται από ισχυρές βάσεις ή τριτοταγείς αμίνες.

Στο μηχανισμό του ενεργοποιημένου μονομερούς ο βασικός απαρχητής δεν δρα ως απαρχητής αλυσίδας μέσω της πυρηνοφιλικότητάς του αλλά ως καταλύτης μέσω της βασικότητάς του για τον ιοντισμό του μονομερούς σε αντίδραση οξέος βάσεως προς σχηματισμό ανιόντος ανυδρίτη που δρα ως πυρηνόφιλο (Σχήμα 6). Στην περίπτωση αυτή η πολυμερική αλυσίδα είναι αυτοεκκινούμενη. Αυτός ο μηχανισμός εφαρμόζεται σε *N*-μη υποκατεστημένους NCAs.

Στην προέναρξη ο απαρχητής δρα ως βάση αποσπώντας το πρωτόνιο του *N* του NCA, οπότε προκύπτει το αντίστοιχο ανιόν. Στο στάδιο της έναρξης, ο ενεργός απαρχητής είναι το σχηματιζόμενο ανιόν του NCA, το οποίο δρα ως πυρηνόφιλο προσβάλλοντας τον 5-C ενός μονομερούς NCA, οπότε λαμβάνεται ένα διμερές και απελευθερώνεται CO₂. Φαίνεται ότι ο μηχανισμός περιλαμβάνει τρία μόρια μονομερούς και ότι αυτό που αναγεννάται είναι το ανιόν του NCA σε κάθε στάδιο της αντίδρασης.



Σχήμα 6: Στάδια ενεργοποίησης και έναρξης του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου των *N*-καρβοξυ ανυδριτών μέσω του μηχανισμού ενεργοποιημένου μονομερούς (AMM)

Ο μηχανισμός αυτός είναι πάρα πολύ γρήγορος, τουλάχιστον 100 φορές γρηγορότερος από τον κανονικό μηχανισμό. Επιπλέον, εφόσον ο μηχανισμός AMM λαμβάνει χώρα μέσω ανιόντων, ο ρυθμός διάδοσης είναι πολύ μεγάλος και επομένως τα λαμβανόμενα πολυπεπτίδια έχουν υψηλό μοριακό βάρος.

Επίσης, η ταχύτητα έναρξης στον AMM είναι μικρότερη από την ταχύτητα διάδοσης, οπότε τα σχηματιζόμενα πολυπεπτίδια εμφανίζουν μεγάλη κατανομή μοριακών βαρών. Ακόμη, το ανιόν NCA που αναγεννάται δεν έχει καμία εκλεκτικότητα καθώς μπορεί να αντιδράσει είτε με την αναπτυσσόμενη αλυσίδα είτε με ένα άλλο μονομερές με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη ανομοιογένεια στη σύσταση του τελικού προϊόντος. Τέλος, πληθώρα παράπλευρων αντιδράσεων, όπως αντιδράσεις διάσπασης, μεταφοράς αλυσίδας, ακόμα και ενδομοριακής κυκλοποίησης μπορούν να προκαλέσουν τερματισμό της πολυμερικής αλυσίδας. Υπό αυτές τις συνθήκες, αυτό το είδος πολυμερισμού δεν θεωρείται «ζωντανός».

2.9.3 Σύνθεση πολυπεπτιδίων με πρωτοταγείς αμίνες και χρήση τεχνικών υψηλού κενού

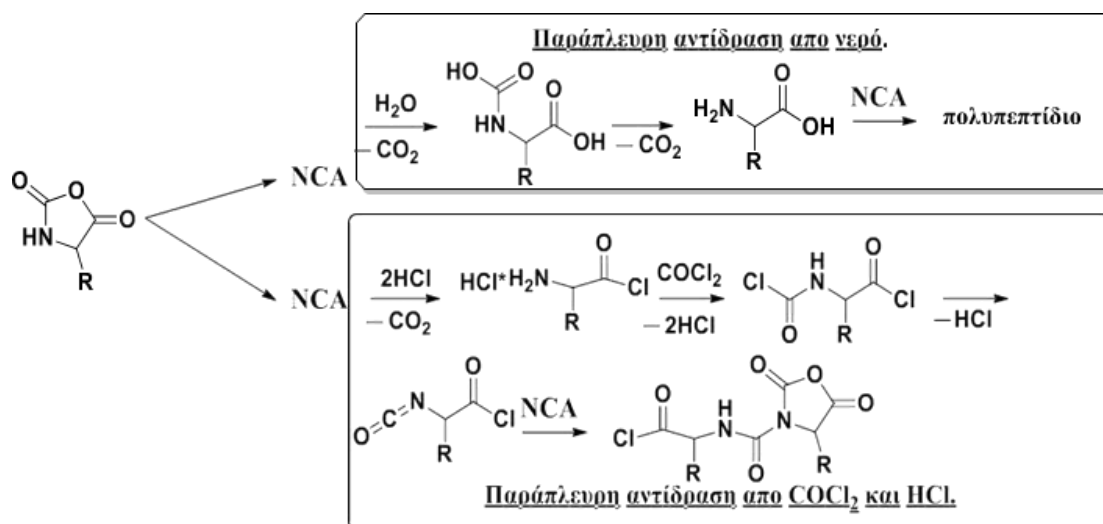
Μετά το 1997, οι ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώθηκαν στη σύνθεση πολυπεπτιδίων μεγάλου μοριακού βάρους, με καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά και μικρή κατανομή.

Γι' αυτό το λόγο, αναπτύχθηκαν νέες τεχνικές που περιελάμβαναν τη σύνθεση πολυπεπτιδίων με χρήση συμπλόκων των στοιχείων μετάπτωσης, τον πολυμερισμό με υδροχλωρικές αμίνες, την πολυπεπτιδική σύνθεση με τη χρήση τεχνικών υψηλού κενού, τον πολυμερισμό πεπτιδίων με πρωτοταγείς αμίνες και χαμηλή θερμοκρασία και, τέλος, τη σύνθεση πεπτιδίων με παράγωγα σιλανίων. [131-136] Παρακάτω, θα επικεντρωθούμε στην πολυπεπτιδική σύνθεση με τη χρήση τεχνικών υψηλού κενού.

Το 2004 η ομάδα των Iatrou, Aliferis, Hadjichristidis ανέφερε το πρώτο ζωντανό σύστημα πολυμερισμού με πρωτοταγείς αμίνες ως απαρχητές, με τη χρήση τεχνικών υψηλού κενού (high vacuum techniques, HVT). [131-135] Επίσης, κατάφερε για πρώτη φορά να επιτύχει ζωντανό πολυμερισμό διάνοιξης δακτυλίου των *N*-καρβοξυανυδριτών των α -αμινοξέων και να συνθέσει πολυπεπίδια με τις μικρότερες κατανομές μοριακών βαρών που έχουν αναφερθεί ως τώρα στη βιβλιογραφία. Επιπλέον, με αυτήν την τεχνική, επετεύχθη η σύνθεση καλά καθορισμένων όμο- και συμπολυπεπτιδίων με πολύπλοκη μακρομοριακή αρχιτεκτονική, όπως για παράδειγμα γραμμικά πολυσυσταδικά πολυμερή, αστεροειδή πολυμερή, αστεροειδή κατά συστάδες συμπολυμερή κ.ά., ανοίγοντας το δρόμο για τη δημιουργία πολύπλοκων δομών με πολλές βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές.

Οι τεχνικές υψηλού κενού είναι αναγκαίες εξαιτίας της ευαισθησίας των χρησιμοποιούμενων απαρχητών και των μονομερών, στα ίχνη του νερού, του διοξειδίου του άνθρακα, του οξυγόνου και άλλων δραστικών προσμίξεων.

Οι *N*-καρβοξυανυδρίτες είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι στο νερό και τις βάσεις. (Σχήμα 7), επομένως η συνθετική τους πορεία λαμβάνει χώρα υπό κενό, ως επί το πλείστον.



Σχήμα 7: Η αντίδραση με το νερό δίνει το αρχικό αμινοξύ και εν συνεχεία πολυμερισμό. Η αντίδραση με το υδροχλώριο και το φωσγένιο δίνουν ισοκυανατο χλωρίδιο και μετέπειτα *N*-χλωροφορμυλοκαρβόξυ ανυδρίτη

Επιπλέον, προκειμένου να επιτευχθεί ζωντανός πολυμερισμός των NCAs των α-αμινοξέων κρίνεται αναγκαία η απομάκρυνση του CO_2 που παράγεται κατά το στάδιο της διάδοσης. Η χρήση τεχνικών υψηλού κενού προσφέρει τη συνεχή απομάκρυνση του παραγόμενου CO_2 , οδηγώντας την αντίδραση του πολυμερισμού προς τα προϊόντα μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του καρβαμιδικού ενδιαμέσου. Λόγω της μικρής διαλυτότητας του διοξειδίου του άνθρακα σε διαλύτες, όπως το DMF, η αποκαρβοξυλίωση του καρβαμιδικού οξέος δεν συμβαίνει ακαριαία, με αποτέλεσμα ορισμένα ενεργά κέντρα να παραμένουν όπως είναι και άλλα να δημιουργούν άλατα με τις ενεργές αμινομάδες. Και στις δυο περιπτώσεις οι δομές που δημιουργούνται είναι απενεργοποιημένες, και οδηγούν σε αντιδράσεις τερματισμού και σε μη ολοκληρωμένο πολυμερισμό. Με τη χρήση ειδικών αντιδραστήρων πολυμερισμού, με όγκο τουλάχιστον τρεις φορές μεγαλύτερο από το εκλυόμενο διοξείδιο του άνθρακα, αποφεύγεται ο σχηματισμός καρβαμιδικών αλάτων με τα αμινοτελικά άκρα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, λόγω της γρηγορότερης αποκαρβοξυλίωσης που συμβαίνει στο σύστημα.

Το 2009 η ομάδα του Avgeropoulos [137], μια ομάδα εξοικειωμένη τόσο με τις τεχνικές υψηλού κενού όσο και με τις παραδοσιακές, κατάφερε να ενισχύσει ακόμη περισσότερο τα πλεονεκτήματα από τη χρήση τεχνικών υψηλού κενού, έναντι των συμβατικών μεθόδων, αναλύοντας για πρώτη φορά τις ακραίες ομάδες των λαμβανόμενων πολυμερών. Η ομάδα διεξήγαγε παράλληλους πολυμερισμούς υπό συνθήκες υψηλού κενού αλλά και υπό

αδρανή ατμόσφαιρα σε glove box και τα πολυμερή που ελήφθησαν χαρακτηρίστηκαν φασματοσκοπικά (^{13}C -NMR, MALDI-TOF-MS). Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι πολυμερισμοί σε υψηλό κενό ακολουθούσαν πλήρως τον κανονικό μηχανισμό, ενώ αντίδραση τερματισμού πραγματοποιήθηκε μόνο σε ένα πολύ μικρό ποσοστό. Αντίθετα, τα πολυπεπίδια που παρασκευάστηκαν στο glove box ακολουθούσαν τόσο τον κανονικό μηχανισμό αμινών, όσο και τον μηχανισμό ενεργοποιημένου μονομερούς, ενώ πολλαπλές αντιδράσεις τερματισμού έλαβαν χώρα. Έτσι, απέδειξαν ότι μόνο με την τεχνική υψηλού κενού μπορούν να συντεθούν πολυπεπίδια που να προσομοιάζουν στη δομή και τις ιδιότητες τα φυσικά ανάλογά τους, ενώ ταυτόχρονα το άμινο-τελικό τους άκρο να παραμένει ενεργό για περαιτέρω διάδοση του πολυμερισμού και δημιουργία πολύπλοκων αρχιτεκτονικών.

2.10 Σύνθεση *N*-Καρβοξυ Ανυδριτών των α -Αμινοξέων (NCAs)

Οι *N*-καρβοξυ ανυδρίτες των α -αμινοξέων (*N*-carboxy anhydrides, NCAs) περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Leuchs, το 1906. Επίσης, ο Leuchs παρατήρησε τον πολυμερισμό τους και κατάφερε να απομονώσει το πρώτο συνθετικό πολυπεπίδιο. Η συγκεκριμένη μέθοδος, περιλαμβάνει την αντίδραση κυκλοποίησης των προστατευμένων *N*-αλκοξυκαρβονυλοαμινο- αλογονιδίων, υπό παρατεταμένη θερμοκρασία 70-90 °C (Σχήμα 8). Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι στις υψηλές αυτές θερμοκρασίες μπορεί να πραγματοποιηθεί αποσύνθεση των NCAs και διάνοιξη του δακτυλίου.

Οι βελτιώσεις που επήλθαν αφορούσαν αντιδραστήρια, με τα οποία θα γινόταν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες η δημιουργία του αλογονιδίου οξέος. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε το θειόνυλο χλωρίδιο (SOCl_2) από τον ίδιο τον Leuchs. Εν συνεχεία, δοκιμάστηκε το πενταχλωρίδιο του φωσφόρου, που ήταν δραστικότερο αλλά έδινε ως παραπροϊόν το αντίστοιχο οξείδιο και είχε επίδραση στην κρυστάλλωση του ανυδρίτη, ενώ το ισχυρότερο μέσω αλογόνωσης της καρβοξυλομάδας του αμινοξέος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το τριβρωμίδιο του φωσφόρου (PBr_3). Επιπλέον, στην τελευταία περίπτωση το ανιόν του βρωμίου είναι καλύτερη αποχωρούσα ομάδα από το αντίστοιχο του χλωρίου στο στάδιο της κυκλοποίησης, αλλά και καλύτερο πυρηνόφιλο για το τελικό στάδιο. Συνεπώς η συνολική αντίδραση προχωράει γρηγορότερα και σε θερμοκρασίες μικρότερες από 25 °C. Όσον αφορά τον υποκαταστάτη R' , ο Leuchs είχε παρατηρήσει ότι τα μεθόξυ- αντιδρούσαν πιο εύκολα από τα αντίστοιχα αιθοξυκαρβονυλοάμινο χλωρίδια οξέων, αποδεικνύοντας ότι

το καθοριστικό (αργό) στάδιο της αντίδρασης είναι η αλκυλίωση του ιόντος αλογόνου. Η μέθοδος του Leuchs δεν είναι μόνο ιστορικής σημασίας, αλλά χρησιμοποιείται ακόμη με τις παραλλαγές της, για το σχηματισμό διαφόρων NCAs.

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την σύνθεση των NCAs σήμερα, είναι η αντίδραση των αμινοξέων με φωσγένιο. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε αρχικά από τον Fuchs το 1922 για την παρασκευή του NCA της *N*-φαινυλογλυκίνης και τροποποιήθηκε ακολούθως από τους Farthing, Coleman και Levy ώστε να εφαρμοστεί στη σύνθεση ενός μεγάλου εύρους NCAs. Η ονομασία που έχει επικρατήσει βιβλιογραφικά για την προσέγγιση αυτή είναι μέθοδος “Fuchs- Farthing”. Η συγκεκριμένη διαδικασία περιλαμβάνει ένα μόνο στάδιο, όπου στο πρώτο βήμα της αντίδρασης το ελεύθερο αμινοξύ αντιδρά με το φωσγένιο, σχηματίζοντας πολύ γρήγορα το ενδιάμεσο *N*-χλωροφόρμυλο αμινοξύ (συνήθως δεν απομονώνεται), το οποίο ακολούθως μετατρέπεται σε *N*-καρβοξυ ανυδρίτη, ενώ πραγματοποιείται και ταυτόχρονη παραγωγή HCl (Σχήμα 8). Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται διότι οι ανυδρίτες είναι διαλυτοί στους περισσότερους απρωτικούς πολικούς διαλύτες, ενώ τα ελεύθερα αμινοξέα είναι αδιάλυτα. Καθοριστικό ρόλο στην αντίδραση διαδραματίζουν ο διαλύτης, η θερμοκρασία αλλά και ο χρόνος της αντίδρασης. Το τετραυδροφουράνιο (THF) και το 1,4-διοξάνιο είναι οι περισσότερο χρησιμοποιούμενοι διαλύτες, ωστόσο δίνουν παράπλευρες αντιδράσεις όταν κατεργάζονται με υδροχλώριο για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Γενικά, όλοι οι διαλύτες που είναι αδρανείς ως προς το φωσγένιο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα αντίδρασης, αλλά οι λιγότερο πολικοί όπως το χλωροφόρμιο, ο τετραχλωράνθρακας και ο οξικός αιθυλεστέρας, αυξάνουν τους χρόνους της αντίδρασης. Από τους πιο πολικούς διαλύτες μόνο το ακετονιτρίλιο είναι αδρανές αρκετά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί, προτιμάται για τη σύνθεση του NCA της γλυκίνης.



Σχήμα 8: Μέθοδοι “Leuchs” και “Fuchs-Farthing” για τη σύνθεση των *N*-καρβοξυ ανυδριτών.

Το φωσγένιο, όμως, είναι ένα ιδιαίτερα δραστικό και τοξικό αντιδραστήριο, η μεταχείρισή του ακόμα και σε εργαστηριακή κλίμακα χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή. Επιπλέον είναι δύσκολο, λόγω της αέριας φύσης του, να τηρηθεί απόλυτα η στοιχειομετρία στις αντιδράσεις που συμμετέχει. Για το λόγο αυτό έχουν συχνά χρησιμοποιηθεί στην οργανική σύνθεση ως πηγές φωσγενίου, το τριχλωρομέθυλο- χλωροφορμικό (ή διφωσγένιο) και το δις(τριχλωρομέθυλο)- ανθρακικό (ή τριφωσγένιο). Το διφωσγένιο είναι υγρό ενώ αντίστοιχα το τριφωσγένιο είναι κρυσταλλικό στερεό, γεγονός που επιτρέπει την ευκολότερη και ασφαλέστερη χρησιμοποίησή τους, ως πρόδρομες ενώσεις δυο και τριών μορίων φωσγενίου. Στη σύνθεση των NCAs έχει επικρατήσει η χρήση του τριφωσγενίου, δίνοντας μονομερή υψηλής απόδοσης και καθαρότητας.

Οι παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη σύνθεση ενός NCA περιλαμβάνουν κυρίως την διάνοιξη του δακτυλίου του τελικού προϊόντος και λαμβάνουν χώρα λόγω αυξημένης θερμοκρασίας, αυξημένου χρόνου αντίδρασης ή υψηλής συγκέντρωσης παραγόμενου υδροχλωρίου. Στις περισσότερες περιπτώσεις χαμηλής απόδοσης ανυδρίτη, το παραγόμενο HCl πρωτονιώνει την αμινομάδα κάποιων αμινοξέων, σχηματίζοντας άλας και εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο το κλείσιμο του δακτυλίου. Ακόμα όμως και να σχηματιστεί ο δακτύλιος, είναι πιθανό να επέλθει διάνοιξή του σε αυξημένες συγκεντρώσεις HCl. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται βάσεις (όπως η Et₃N), ή ενώσεις της οικογένειας των πινενίων (όπως το D,L-λιμονένιο) ως αντιδραστήρια δέσμευσης του παραγόμενου HCl για τη διευκόλυνση σχηματισμού του δακτυλίου του NCA. Τα τελευταία 15 χρόνια, έχει συντεθεί ένας πολύ μεγάλος αριθμός NCAs όλων των βασικών αμινοξέων αλλά και αρκετών παραγώγων τους. Αναγκαία κρίνεται η χρησιμοποίηση διάφορων προστατευτικών ομάδων για τις δραστικές πλευρικές ομάδες των αμινοξέων, έτσι ώστε να αποφεύγονται παράπλευρες αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της σύνθεσης των μονομερών και του πολυμερισμού. [138-151]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

3.1 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών

Η SEC είναι ένα είδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC=High Performance Liquid Chromatography) προσαρμοσμένης στα μεγέθη των πολυμερών τα οποία χαρακτηρίζονται από μοριακά βάρη πολύ μεγαλύτερα από εκείνα των απλών χημικών ενώσεων. Οι προϋποθέσεις τις οποίες πρέπει να ικανοποιεί μια πολυμερική ουσία για να μπορέσει να προσδιοριστεί μέσω αυτής της μεθόδου είναι οι εξής:

- A. Να είναι πολύ καλά διαλυτή στο διαλύτη που χρησιμοποιείται στη διάταξη.
- B. Να μην αντιδρά με το διαλύτη.
- Γ. Να μην αντιδρά με το μέσο διαχωρισμού.

Ο μηχανισμός διαχωρισμού των πολυμερών μέσω της SEC είναι ο εξής:

Διάλυμα πολυμερούς διέρχεται μέσω στηλών οι οποίες περιέχουν ένα μέσο διαχωρισμού, συνήθως σφαιρικούς πόρους από δικτυωμένο πολυστυρένιο γνωστό με την εμπορική ονομασία styragel. Η πηκτή styragel διαθέτει πόρους το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται από $60-10^7$ Å (μέση διάμετρος). Το gel είναι πλήρως εμβαπτισμένο στο διαλύτη της διάταξης χωρίς την παρουσία αερίων. Όταν διάλυμα πολυμερούς εισέρχεται από τις στήλες, τα μόρια του πολυμερούς διέρχονται από τους πόρους οι οποίοι είναι αρκετά μεγάλοι ώστε αρκετά μεγάλα μόρια, όπως είναι τα πολυμερή, να χωρούν μέσα σε αυτούς. Επομένως, αφού οι στήλες είναι πακεταρισμένες με υλικό που παρουσιάζει κατανομή μεγέθους πόρων, είναι εφικτός ο διαχωρισμός των πολυμερικών μορίων με βάση τη διαφορά μεγέθους τους. Τα μεγάλα μόρια περνούν από ελάχιστους πόρους με αποτέλεσμα να εκλούνται νωρίτερα από τα μικρότερα που λόγω του μικρού μεγέθους τους παραμένουν σε περισσότερους πόρους. Ουσιαστικά, ο υδροδυναμικός όγκος είναι το μοριακό μέγεθος που καθορίζει τον χρόνο έκλουσης του πολυμερούς. Αν ο διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι καλός για κάποιο συγκεκριμένο πολυμερές τότε αυτό διογκώνεται και αποκτά όγκο (υδροδυναμικός όγκος). Γίνεται, συνεπώς, αντιληπτό ότι στην περίπτωση των γραμμικών

μονομοριακών πολυμερών ο υδροδυναμικός όγκος μπορεί να συνδεθεί άμεσα με το χρόνο έκλουσης. Δε συμβαίνει όμως το ίδιο με τα μίγματα ομοπολυμερών, συμπολυμερών και διακλαδισμένων ομοπολυμερών ή συμπολυμερών γιατί :

A. Για δεδομένο μοριακό βάρος ο υδροδυναμικός όγκος ενός διακλαδισμένου ομοπολυμερούς είναι μικρότερος από του αντίστοιχου γραμμικού.

B. Σε ένα συμπολυμερές, ο μερικός μοριακός όγκος M_i / V_h για κάθε μία από τις επαναλαμβανόμενες μονάδες είναι διαφορετικός.

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών δεν είναι μία απόλυτη μέθοδος και ως εκ τούτου είναι απαραίτητη η βαθμονόμηση του χρωματογράφου με πρότυπα δείγματα. Αυτά περιλαμβάνουν συνήθως ομοπολυμερή πολυστυρενίου διαφορετικού μοριακού βάρους παρασκευασμένα με ανιοντικό πολυμερισμό για να εμφανίζουν στενές κατανομές προσδίδοντας στον χρωματογράφο μεγαλύτερη ακρίβεια στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους και της κατανομής μοριακών βαρών ($I = M_w/M_n$). Αν κοιτάξει κανείς την καμπύλη βαθμονόμησης, θα παρατηρήσει ότι αυτή παρουσιάζει μια περιοχή που εμφανίζει γραμμικότητα. Αυτή είναι και η περιοχή καλής ακρίβειας στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους. Σε πολύ μικρά ή πολύ μεγάλα μοριακά βάρη διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου μικραίνει με αποτέλεσμα να μεγαλώνει η πιθανότητα σφάλματος που έτσι και αλλιώς αγγίζει στη GPC το 10%. Όπως προαναφέρθηκε, ένα διακλαδισμένο ομοπολυμερές (π.χ. αστέρι πολυστυρενίου) παρόλο που μπορεί να έχει το ίδιο μοριακό βάρος με ένα γραμμικό πολυστυρένιο, εκλούεται πρώτο αφού ο υδροδυναμικός του όγκος είναι μικρότερος. Αυτό καθιστά σαφές ότι ο χρόνος έκλουσης ενός πολυμερούς εξαρτάται άμεσα και από την αρχιτεκτονική κάτι που περιπλέκει τα πράγματα όσον αφορά στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους μέσω της SEC. Έπρεπε λοιπόν να βρεθεί ένας τρόπος για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα. Η λύση ήρθε από τον Άλμπερτ Αϊνστάιν ο οποίος πρώτος συσχέτισε το χρόνο έκλουσης με το μοριακό βάρος M και το εσωτερικό ιξώδες $[\eta]$, σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$[\eta]M = 0.025N_A V_h$$

Αν λοιπόν το εσωτερικό ιξώδες $[\eta]$ κάποιων προτύπων και του προς εξέταση πολυμερούς έχουν καθοριστεί ανεξάρτητα, το μοριακό βάρος του αγνώστου δείγματος

μπορεί να υπολογιστεί από την καμπύλη βαθμονόμησης του γινομένου $[\eta] M$ συναρτήσει του όγκου έκλουσης (V_e). Στην παραπάνω εξίσωση το N_A είναι ο αριθμός Avogadro και το V_h συμβολίζει τον υδροδυναμικό όγκο του πολυμερούς σε συγκεκριμένο διαλύτη.

Πολύ σημαντικό ρόλο στη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών παίζει και ο ανιχνευτής ή οι ανιχνευτές οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με το χρωματογράφο. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με το μέγεθος που προσδιορίζουν. Χρησιμοποιούνται ανιχνευτές συγκέντρωσης-μάζας, όπως είναι ο ανιχνευτής UV, ο IR και ο DRI. Επίσης, χρησιμοποιούνται ανιχνευτές μοριακής μάζας, όπως ο ανιχνευτής σκέδασης φωτός και ο ιξωδομετρικός ανιχνευτής.

Ο ανιχνευτής UV χρησιμοποιείται όταν τα προς ανάλυση πολυμερή διαθέτουν κάποια χρωμοφόρο ομάδα η οποία απορροφά σε αυτήν την περιοχή (συνήθως δουλεύουν μεταξύ 190 και 400 nm). Σε συνδυασμό με τον ανιχνευτή DRI, δίνουν από κοινού πληροφορίες για τη σύσταση ενός συμπολυμερούς που διαθέτει κάποια συστάδα που απορροφά στην περιοχή του υπεριώδους. Μπορεί να λειτουργήσει κάτω από μέσες θερμοκρασίες και οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται δεν θα πρέπει να απορροφούν στην περιοχή αυτή.

Ο ανιχνευτής DRI (Differential Refractometer Index), θεωρείται παγκόσμιος ανιχνευτής αφού είναι ευαίσθητος στις διαφορές του δείκτη διάθλασης του διαλύτη και της διαλυμένης προς προσδιορισμό πολυμερικής ουσίας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες, δίνει γραμμικές αποκρίσεις σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων αλλά είναι πολύ ευαίσθητος στις ατμοσφαιρικές συνθήκες.

Ο ανιχνευτής IR ουσιαστικά χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου στα πολυμερή που εξετάζουμε υπάρχουν ομάδες οι οποίες απορροφούν στην περιοχή του υπερύθρου, όπως η σουλφονική ομάδα (SO_3H). Χάρη σε αυτήν την ικανότητα του ανιχνευτή είναι εφικτός, μέσω της χρήσης του, ο προσδιορισμός της πολυμερικής σύστασης ως συνάρτηση της μοριακής μάζας.

Από την άλλη μεριά, οι ανιχνευτές σκέδασης που χρησιμοποιούνται στην χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών, εμφανίζουν μεγάλη ακρίβεια στον προσδιορισμό του πραγματικού μοριακού βάρους αλλά και στον προσδιορισμό της

κατανομής μοριακών βαρών σε όλους τους χρόνους έκλουσης αφού αποτελούνται από μικρούς ανιχνευτές που μπορούν να μετρούν την ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε διάφορες γωνίες και με ειδική επεξεργασία των αποτελεσμάτων να δίδουν το πραγματικό μοριακό βάρος M_w , αφού ο λόγος Rayleigh που προσδιορίζεται σχετίζεται με αυτό μέσω της παρακάτω σχέσης :

$$K_c/\Delta R_\theta = 1/M_w + 2A_2C + 3A_3C$$

(Με C συμβολίζεται η κατά βάρος προς όγκο συγκέντρωση του πολυμερούς στο διάλυμα, A_2 και A_3 τον δεύτερο και τον τρίτο συντελεστή Virial και με M_w το πραγματικό μοριακό βάρος).

Τέλος, όσον αφορά στον ιξωδομετρικό ανιχνευτή, αυτός χρησιμοποιείται συνήθως σε σειρά με κάποιο ανιχνευτή μάζας-συγκέντρωσης από αυτούς που προαναφέρθηκαν, και μπορεί να δώσει πολύ καλές πληροφορίες για την απόλυτη μέση μοριακή μάζα, το εσωτερικό ιξώδες και το βαθμό διακλάδωσης. Σε αυτούς τους ανιχνευτές προσδιορίζεται το εσωτερικό ιξώδες του διαλύματος του πολυμερούς από τη διαφορά πίεσης μέσω ενός τριχοειδούς που καταγράφεται από ένα διαφορικό μετατροπέα πίεσης. Το μεγάλο πλεονέκτημα του ιξωδομετρικού ανιχνευτή είναι η δυνατότητα λήψης μέσω μοριακών βαρών με βάση την παγκόσμια καμπύλη βαθμονόμησης για διαφορετικής σύστασης πολυμερή ανεξαρτητοποιώντας τον υδροδυναμικό όγκο από τον παράγοντα αρχιτεκτονική.

Συμπεραίνουμε ότι η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών αποτελεί μία εύχρηστη και γρήγορη μέθοδο με τη βοήθεια της οποίας μπορεί να σχηματιστεί μία πρώτη εικόνα για το πολυμερές που παρασκευάστηκε, ως προς το μέσο μοριακό του βάρος, αλλά κυρίως ως προς την κατανομή μοριακών βαρών του και να εξαχθούν συμπεράσματα για την επίτευξη ή όχι της σύνθεσης του επιθυμητού μακρομορίου. [152-159, 118]

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας όργανο αποτελούμενο από αντλία της Waters μοντέλο 510 και ανιχνευτές διαφορικού διαθλασίμετρου της Waters μοντέλο 401 και διοδική διάταξη UV-Vis. Η ταχύτητα ροής ρυθμίστηκε στο 1 mL/min και ως φέρον διαλύτης χρησιμοποιήθηκε νερό.

3.2 Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου (infrared, IR) είναι μία από τις καλύτερες τεχνικές για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό κάθε είδους ουσίας και βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία και στην ανάλυση φαρμάκων, πετρελαιοειδών, πολυμερών κ.λπ. Η περιοχή της υπέρυθρης ακτινοβολίας ή, όπως συνήθως αναφέρεται, το υπέρυθρο, εκτείνεται από το ορατό μέχρι τα μικροκύματα, 0,75-1000 μm . Για το χαρακτηρισμό του υπέρυθρου χρησιμοποιούνται μονάδες μήκους κύματος (L σε μm) και συνηθέστερα κυματαριθμού (ν σε cm^{-1}) που αλληλοσυνδέονται με τις σχέσεις: ($1/\lambda = \nu$) και [ν (cm^{-1}) = $10^4/L$ (μm)]. Η περιοχή της υπέρυθρης ακτινοβολίας υποδιαιρείται στο εγγύς υπέρυθρο (0,75-2,5 μm , 1330-4000 cm^{-1}), το μέσο υπέρυθρο (2,5-25 μm , 4000-400 cm^{-1}) και το άπω υπέρυθρο (25-1000 μm , 400-10 cm^{-1}). Η περισσότερο χρησιμοποιούμενη περιοχή είναι η μέση υπέρυθρη περιοχή. Η εγγύς υπέρυθρη περιοχή χρησιμοποιείται για ποσοτικούς προσδιορισμούς συγκεκριμένων ουσιών όπως το νερό, το διοξείδιο του άνθρακα, το θείο, υδρογονάνθρακες χαμηλού μοριακού βάρους, το αμινικό άζωτο και πολλές άλλες απλές ενώσεις που παρουσιάζουν ενδιαφέρον στη γεωργία και τη βιομηχανία. Η κύρια χρήση της άπω υπέρυθρης περιοχής αφορά στον προσδιορισμό των δομών ανόργανων και οργανομεταλλικών ουσιών. Τα φάσματα υπέρυθρου απεικονίζονται γραφικώς ως μεταβολή της διαπερατότητας (τεταγμένη) ή σπάνια της απορρόφησης, συναρτήσεως του μήκους κύματος σε μm ή συνηθέστερα του κυματαριθμού σε cm^{-1} (τετμημένη).

Τα φάσματα απορρόφησης, εκπομπής και ανάκλασης υπέρυθρου των διαφόρων ουσιών μπορούν να ερμηνευθούν θεωρώντας ότι οφείλονται σε μια ποικιλία ενεργειακών μεταβολών. Οι μεταβολές αυτές είναι αποτέλεσμα μεταπτώσεων των μορίων από μια δονητική ή μια περιστροφική ενεργειακή κατάσταση σε μια άλλη. Η απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας περιορίζεται στα μόρια στα οποία παρουσιάζονται μικρές ενεργειακές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών δονητικών και περιστροφικών καταστάσεων. Ένα μόριο θα απορροφήσει υπέρυθρη ακτινοβολία μόνο εφόσον η διπολική ροπή του μορίου μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δόνησής, διαφορετικά η δόνηση θεωρείται ανενεργή στο υπέρυθρο. Για παράδειγμα, όταν δονούνται ή περιστρέφονται ομοπυρηνικά διατομικά μόρια, όπως τα O_2 , N_2 ή

Cl_2 , δεν πραγματοποιείται καθαρή μεταβολή στη διπολική ροπή, οπότε τέτοιου είδους μόρια δεν απορροφούν στην υπέρυθη περιοχή του φάσματος. Με εξαίρεση λίγων μορίων αυτού του είδους, όλα τα άλλα μόρια απορροφούν την υπέρυθη ακτινοβολία και μάλιστα όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής τους ροπής, τόσο ισχυρότερη είναι η απορρόφηση.

Οι δονήσεις διακρίνονται σε δονήσεις τάσεως ή εκτατικές δονήσεις και δονήσεις κάμψεως. Στις δονήσεις τάσεως, η δόνηση γίνεται κατά μήκος του χημικού δεσμού, που συνδέει τα δονούμενα άτομα και αλλάζει η απόσταση μεταξύ τους, και η δόνηση μπορεί να είναι συμμετρική ή ασύμμετρη. Στις δονήσεις κάμψεως αλλάζει η γωνία μεταξύ δύο δεσμών, και η δόνηση μπορεί να είναι ψαλιδοειδής, ή λικνιζόμενη, ή παλλόμενη, ή συστρεφόμενη.

Το φάσμα υπέρυθρου μπορεί να χωριστεί στις πιο κάτω περιοχές με βάση τα άτομα ή τις ομάδες των οποίων οι δονήσεις προκαλούν την απορρόφηση στις περιοχές αυτές:

1. Περιοχή τάσεως υδρογόνου ($4000\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$). Η απορρόφηση στην περιοχή αυτή προκαλείται από δονήσεις τάσεως των δεσμών C-H, O-H, N-H και S-H. Οι δεσμοί N-H και O-H απορροφούν στην περιοχή $3300\text{--}3650\text{ cm}^{-1}$, ενώ ο δεσμός C-H απορροφά γύρω στα 3000 cm^{-1} .
2. Περιοχή τάσεως τριπλού δεσμού ($2500\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$). Στην περιοχή αυτή απορροφούν οι τριπλοί δεσμοί άνθρακα-άνθρακα και άνθρακα-αζώτου, καθώς επίσης και δύο διπλοί δεσμοί (C=C=C, N=C=O).
3. Περιοχή τάσεως διπλού δεσμού ($2000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$). Υπεύθυνες για την απορρόφηση στην περιοχή αυτή είναι οι δονήσεις των δεσμών C=C, C=O, C=N. Οι καρβονυλικές ομάδες απορροφούν γενικά στην περιοχή μεταξύ 1680 και 1750 cm^{-1} , ενώ η επιμήκυνση του δεσμού των αλκενίων εμφανίζεται συνήθως σε μια περιορισμένη περιοχή μεταξύ 1640 και 1680 cm^{-1} .
4. Περιοχή τάσεως και κάμψεως απλού δεσμού ($1500\text{--}700\text{ cm}^{-1}$). Στην περιοχή αυτή εμφανίζονται πολλές απορροφήσεις, όπως οι δονήσεις κάμψεως των δεσμών C-H και οι δονήσεις τάσεως και κάμψεως απλών δεσμών που συνδέουν ομάδες, όπως του μεθυλενίου, μεθυλίου και αμινομάδες, π.χ. C-C,

C-O, C-N, C-X, C-S. Η περιοχή αυτή ονομάζεται περιοχή των αποτυπωμάτων, επειδή το φάσμα στην περιοχή αυτή χαρακτηρίζει το μόριο ως σύνολο και αποτελεί κατά κάποιο τρόπο το δακτυλικό αποτύπωμα του μορίου.

Πίνακας 2: Περιοχές απορρόφησης χαρακτηριστικών λειτουργικών ομάδων σε cm^{-1}

Λειτουργική Ομάδα	Περιοχή Απορρόφησης ($1/\text{cm}$)			
O-H	3650-3590			
N-H	3500-3300	1650-1590	900-650	
=CH-H	3100-3070	1420-1410	900-880	
=C-H	3100-3000	2000-1600		
C-H	2900-2700	1440-1320		
=CH ₃	2880-2860	2970-2950	1380-1370	1470-1430
O-H	2700-2500	1320-1210	950-900	
C≡C	2140-2100			
C=O	1750-1700			
C=C	1600-1500			
C-N	1340-1250			
C-O-C	1200-1180			
-C-H	770-730			

Η τεχνική του IR εφαρμόζεται στα πολυπεπίδια προκειμένου να διερευνηθεί ποιοτικά η επιτυχής σύνθεση είτε του *N*-καρβόξυανυδριτη των αμινοξέων (συνήθεις δονήσεις έκτασης στα 1785 cm^{-1} και 1855 cm^{-1}), είτε για τη σύνθεση των πολυμερικών πεπτιδίων (δόνηση του αμιδικού δεσμού στα 1650 cm^{-1}). [159-160, 118]

Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε μηχάνημα PerkiN-Elmer Spectrum 100 FTIR. Για την παρασκευή του δείγματος χρησιμοποιείται περίπου 1 mg ουσίας και 0.2 g ξηρής σκόνης KBr. Τα δύο υλικά αναμιγνύονται και λειοτριβούνται καλά σε γουδί, σε σημείο που το μέγεθος των σωματιδίων να είναι μικρότερο από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, ώστε να αποφευχθεί η σκέδαση της ακτινοβολίας. Στη συνέχεια το μίγμα πιέζεται σε ειδική μήτρα σε πίεση μέχρι 10 τόνων για να δημιουργηθεί ένα διαφανές δισκίο. Τα αποτελέσματα είναι καλύτερα εάν το δισκίο παρασκευαστεί σε συνθήκες κενού για να ελαχιστοποιηθεί ο εγκλωβισμός αέρα. Τέλος, το δισκίο τοποθετείται στην οπτική δέσμη του φασματομέτρου και γίνεται η καταγραφή του φάσματος και η ταυτοποίηση της ένωσης με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή.

3.3 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) είναι η χρησιμότερη φασματοσκοπική τεχνική μέθοδος που έχουν στη διάθεσή τους οι χημικοί. Είναι η πρώτη μέθοδος προσδιορισμού της δομής των μορίων, προς την οποία στρέφονται για την άντληση πληροφοριών, γιατί παρέχει ένα «χάρτη» του όλου ανθρακικού σκελετού με τα άτομα υδρογόνου σε ένα μόριο. Στο χώρο των πολυμερών αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο, γιατί με τη βοήθειά της προσδιορίζουμε τη στερεοχημική απεικόνιση (τακτικότητα) του πολυμερούς καθώς και τη γεωμετρική ισομέρεια, τη δομή και τη σύσταση των συμπολυμερών, ενώ επίσης πραγματοποιείται η μελέτη της δυναμικής των μακρομορίων σε διάλυμα και σε στερεά κατάσταση.

Το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού εκδηλώνουν όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων και όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό νετρονίων. Μόνο οι πυρήνες με άρτιο αριθμό νετρονίων και πρωτονίων δεν προξενούν μαγνητικά φαινόμενα ($I = 0$). Έτσι, οι πυρήνες πολλών ατόμων (^1H , ^{13}C) συμπεριφέρονται σαν να περιστρέφονται γύρω από κάποιον άξονα (πυρηνικό spin, $I = 1/2$). Δεδομένου ότι είναι θετικά φορτισμένοι, οι περιστρεφόμενοι πυρήνες λειτουργούν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες και κατά συνέπεια αλληλεπιδρούν με ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο H_0 . Τα πυρηνικά spin των μαγνητικών πυρήνων προσανατολίζονται, απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, κατά τυχαίο τρόπο. Όταν, όμως, ένα δείγμα που περιέχει αυτούς τους πυρήνες τοποθετηθεί ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη, οι πυρήνες αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Ο πυρήνας μπορεί να διαταχθεί έτσι ώστε το δικό του εξαιρετικά μικρό μαγνητικό πεδίο να είναι είτε παράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με κβαντικό μαγνητικό αριθμό spin, $m_I = 1/2$) είτε αντιπαράλληλο (ενεργειακή κατάσταση με $m_I = -1/2$) ως προς το εξωτερικό πεδίο. Οι δύο προσανατολισμοί δεν έχουν την ίδια ενέργεια και συνεπώς δεν είναι εξίσου πιθανοί. Ο παράλληλος προσανατολισμός είναι χαμηλότερης ενέργειας, ευνοώντας σχετικά αυτή την κατάσταση του spin έναντι του αντιπαράλληλου προσανατολισμού.

Αν οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν τώρα με κατάλληλης συχνότητας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, λαμβάνει χώρα απορρόφηση ενέργειας και μεταβάλλονται οι πληθυσμοί πυρήνων στις δύο καταστάσεις (αναστροφή spin). Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, λέγεται ότι οι πυρήνες έχουν συντονιστεί με την εφαρμοζόμενη

ακτινοβολία. Η ακριβής συχνότητα που απαιτείται για το συντονισμό εξαρτάται από την ισχύ του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και από το είδος του πυρήνα.

Όλοι οι πυρήνες στα μόρια περιβάλλονται από ηλεκτρόνια. Όταν ασκηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε κάποιο μόριο, τα ηλεκτρόνια δημιουργούν τα δικά τους μικροσκοπικά τοπικά μαγνητικά πεδία. Αυτά τα τοπικά μαγνητικά πεδία δρουν αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο, έτσι ώστε το πραγματικό πεδίο στον πυρήνα να είναι λίγο μικρότερο από το εξωτερικό.

$$H_{\text{πραγματικό}} = H_{\text{εφαρμοζόμενο}} - H_{\text{τοπικό}}$$

Περιγράφοντας αυτό το φαινόμενο, μπορεί να ειπωθεί ότι οι πυρήνες προστατεύονται από την πλήρη επίδραση του εφαρμοζόμενου πεδίου, λόγω των ηλεκτρονίων που τους περιβάλλουν. Επειδή κάθε συγκεκριμένος πυρήνας ενός μορίου βρίσκεται σε κάπως διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον, προστατεύεται και σε κάπως διαφορετική έκταση, με αποτέλεσμα το πραγματικό εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο να μην είναι ίδιο για κάθε πυρήνα και έτσι να απορροφούν διαφορετικής συχνότητας (ενέργειας) ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία.

Συνέπεια των παραπάνω είναι ότι οι πυρήνες σε διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα δίνουν διαφορετική γραμμή συντονισμού. Για να εκφραστούν με ενιαίο τρόπο οι μεταβολές των γραμμών συντονισμού, στους διάφορους πυρήνες, χρησιμοποιούνται πρότυπες ουσίες αναφοράς και εισάγεται η έννοια της χημικής μετατόπισης. Ως ουσία αναφοράς χρησιμοποιείται συνήθως το τετραμεθυλοσιλάνιο [TMS, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$], που έχει δώδεκα ισοδύναμα (άρα δίνει μία κορυφή απορρόφησης) και ισχυρά προασπισμένα πρωτόνια. Η χημική μετατόπιση ορίζεται από τις σχέσεις:




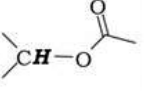

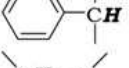
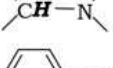
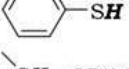
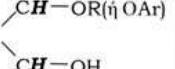
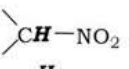
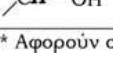

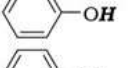
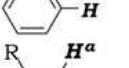
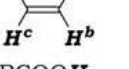

$$\delta = (H_{\alpha} - H_{\delta})/H_{\alpha} \times 10^6 \text{ ppm}$$

$$\delta = (v_{\alpha} - v_{\delta})/v_{\alpha} \times 10^6 \text{ ppm}$$

όπου H_{α} και H_{δ} τα πεδία συντονισμού των πυρήνων της ουσίας αναφοράς και του δείγματος αντίστοιχα, ενώ v_{α} και v_{δ} οι συχνότητες συντονισμού της ουσίας αναφοράς και του δείγματος αντίστοιχα. Όπως ορίζεται το δ στις σχέσεις είναι αδιάστατο και ανεξάρτητο του $H_{\text{εφαρμοζόμενο}}$. Από τις ίδιες εξισώσεις φαίνεται ότι όσο πιο θωρακισμένος είναι ένας πυρήνας τόσο ο συντονισμός θα επιτυγχάνεται σε υψηλά εφαρμοζόμενα μαγνητικά πεδία, όταν σαρώνεται το μαγνητικό πεδίο, αλλά σε χαμηλότερη συχνότητα, όταν μεταβάλλεται η

ραδιοσυχνότητα.

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ (ppm)

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΕΣ ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΕΙΣ $^1\text{H-NMR}$ (ppm)					
R-CH_3	0.8-1.2	Μεθύλιο			
$\text{R-CH}_2\text{-R}$	1.1-1.5	Μεθυλένιο			
R_3CH	1.4-1.9	Μεθίλιο			
$\text{C}\equiv\text{CH}$	1.5-3.0	Ακραία αλκίνα			
	1.6-1.8	Αλλυλικά μεθύλια			
	0.5-4.0*	Πρωτόνια αμινών			
R-OH	1.0-5.5*	Αλκοολικά υδροξύλια			
R-SH	1.1-1.9*	Αλκυλοθειόλες			
	2.0-3.6	α -Καρβονυλικά πρωτόνια		3.7-5.4	Εστερικά αλκύλια
	2.0-3.2	α -Πρωτόνια θειολών	$\text{A-CH}_2\text{-Cl}$	~ 3.5 (A=R), ~ 4.5 (A=Ar)	Χλωριδία
	2.2-3.0	Βενζυλικά πρωτόνια	$\text{A-CH}_2\text{-Br}$	~ 3.4 (A=R), ~ 4.4 (A=Ar)	Βρωμιδία
	2.2-3.6	α -Πρωτόνια Αμινών	$\text{A-CH}_2\text{-I}$	~ 3.2 (A=R), ~ 4.4 (A=Ar)	Ιωδιδία
	2.7-4.2	Αρωματικές θειόλες	$\text{A-CH}_2\text{-F}$	~ 4.3 (A=R), ~ 5.3 (A=Ar)	Φθοριδία
	3.3-4.3	Αιθερικά πρωτόνια		4.2-4.7	Νιτροαλκάνια
	3.5-4.0*	α -Πρωτόνια Αλκοολών		4.5-6.0	Βινυλικά πρωτόνια
			RCO-NHR RCONH_2 }	5.0-8.0	Αμιδικά πρωτόνια
				5.0-8.0*	Φαινολικά υδροξύλια
				6.8-7.8	Αρωματικά πρωτόνια
				H^a : 4.0-6.6 H^b : 3.8-6.2 H^c : 5.2-7.3	Βινυλικά πρωτόνια
			RCOOH	10-13*	Καρβοξυλικά οξέα
				9.0-10.1	Αλδεϋδικά πρωτόνια

* Αφορούν σε ανταλλάξιμα πρωτόνια

Από τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι κάθε διαφορετικός πυρήνας (π.χ. ^1H) θα σχηματίζει μία απλή κορυφή. Συχνό φαινόμενο αποτελεί, ωστόσο, η απορρόφηση ενός πυρήνα να διασπάται σε πολλαπλές κορυφές. Το φαινόμενο των πολλαπλών απορροφήσεων αποκαλείται σχάση spin – spin και προκαλείται από την αλληλεπίδραση ή σύζευξη των πυρηνικών spin γειτονικών πυρήνων. Εκτός από την ηλεκτρονιακή προστασία, το μαγνητικό πεδίο που υφίσταται ένας πυρήνας επηρεάζεται επίσης από τους γειτονικούς μαγνητικούς πυρήνες. Σύμφωνα με ένα γενικό κανόνα, που αποκαλείται κανόνας $n+1$, πυρήνες με n ισοδύναμους γειτονικούς πυρήνες εμφανίζουν $n+1$ κορυφές στο φάσμα του NMR. Οι σχετικές εντάσεις των κορυφών είναι οι συντελεστές των όρων του αναπτύγματος $(1+x)^n$. Για παράδειγμα, ένας πυρήνας που διαχωρίζεται από δύο άλλους γειτονικούς θα δίνει μια τριπλή κορυφή με εντάσεις κορυφών 1:2:1. Η απόσταση μεταξύ των επιμέρους

κορυφών σε μία πολλαπλή κορυφή ονομάζεται σταθερά σύζευξης και συμβολίζεται J . Η σταθερά σύζευξης είναι ίδια και για τους δύο πυρήνες, τα spin των οποίων συζεύγνυνται και δεν εξαρτάται από την ισχύ πεδίου του φασματοφωτόμετρου.

Τέλος, στη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ και όχι στη $^{13}\text{C-NMR}$ (λόγω του πυρηνικού φαινομένου Overhauser, Nuclear Overhauser Effect, NOE) το εμβαδόν που περικλείει κάθε κορυφή είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν την κορυφή. Ολοκληρώνοντας το εμβαδόν κάθε κορυφής είναι δυνατό να μετρήσουμε το σχετικό αριθμό των κάθε είδους πρωτονίων σε ένα μόριο. Με τον τρόπο αυτό εξάγονται ποσοτικά συμπεράσματα συγκρίνοντας το εμβαδόν χαρακτηριστικών κορυφών πρωτονίων ενός μορίου (π.χ. αν μία δραστική ομάδα έχει αντιδράσει με όλες τις μακρομοριακές αλυσίδες).

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχουν δύο είδη φασματοφωτόμετρων NMR, τα συνεχούς κύματος και τα παλμικά (ή μετασχηματισμού Fourier). Τα φασματοφωτόμετρα συνεχούς κύματος διέπονται από την ίδια αρχή που ισχύει και για τα οπτικά φασματοφωτόμετρα, στα οποία το σήμα απορρόφησης καταγράφεται ως συνάρτηση της συχνότητας της πηγής. Στα παλμικά, το δείγμα δέχεται περιοδικά ακτινοβολία με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα σήμα στην περιοχή του χρόνου το οποίο φθίνει. Στη συνέχεια, μέσω μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform, FT) το σήμα αυτό μετατρέπεται σε σήμα στην περιοχή των συχνοτήτων, με αποτέλεσμα να λαμβάνεται ένα φάσμα ανάλογο με αυτό που προκύπτει από τα φασματοφωτόμετρα συνεχούς κύματος. [161-162, 118]

Οι μετρήσεις της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ έγιναν στους δευτεριωμένους διαλύτες CDCl_3 , $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε συσκευή 400 MHz Bruker Avance Neo instrument.

3.4 Δυναμική Σκέδαση Φωτός

Σε ένα διάλυμα πολυμερούς τα μόρια του βρίσκονται σε διαρκή τυχαία κίνηση που προκαλείται από τη θερμική ενέργεια που μεταβιβάζεται σε αυτά μέσω συγκρούσεων με τα μόρια του διαλύτη (κίνηση Brown). Εξαιτίας των συγκρούσεων τα μόρια του πολυμερούς εκτελούν μεταφορική αλλά και περιστροφική κίνηση και οι συντελεστές διάχυσής τους συνδέονται άμεσα με την κίνησή τους. Αφού τα κινούμενα μόρια σκεδάσουν φως με τρόπο που συνδέεται ποσοτικά με την κίνησή τους, είναι δυνατόν χρησιμοποιώντας πειράματα σκέδασης φωτός να προσδιοριστούν οι συντελεστές διάχυσης των μορίων. Οι συντελεστές αυτοί συνδέονται άμεσα με χαρακτηριστικές ιδιότητες των μορίων, όπως το μοριακό βάρος, το σχήμα και το μέγεθός τους.

Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία στο ορατό φάσμα προσπίπτει σε ένα διάλυμα, το φως σκεδάζεται λόγω διακυμάνσεων συγκέντρωσης. Οι διακυμάνσεις αυτές συνδέονται με την κίνηση Brown. Τα σκεδαζόμενα μακρομόρια σε ένα διάλυμα κινούνται με παρόμοιες ταχύτητες αλλά σε τυχαίες κατευθύνσεις. Εξαιτίας της ομοιότητας της κίνησής τους το σκεδαζόμενο φως δηλαδή ο αριθμός των σκεδαζόμενων φωτονίων εμφανίζει συσχέτιση με το χρόνο. Μια συνάρτηση χρονικής συσχέτισης μεταξύ δύο σημάτων A και B δίνεται από την σχέση:

$$g(t) = \lim_{T \rightarrow \infty} (1/T) \int_{t_0}^{t_0+T} A(t)B(t-\tau)dt$$

όπου τ ο χρόνος καθυστέρησης (ή χρόνος δειγματοληψίας), t_0 ο αρχικός χρόνος, T ο χρόνος διεξαγωγής της μέτρησης. Εάν η B είναι μία αργοπορημένη μορφή της A τότε η παραπάνω εξίσωση αποτελεί συνάρτηση αυτοσυσχέτισης.

Στην απλή περίπτωση συνόλου από σφαιρικά μη αλληλεπιδρώντα μεταξύ τους ομοειδή σωματίδια που κινούνται μέσα σε ένα διάλυμα η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης έχει τη μορφή:

$$g(\tau) = A_0 + A \exp(-\Gamma \tau)$$

όπου $\Gamma = D_1 q^2$ είναι η σταθερά παρακμής της συνάρτησης όπου χάνεται, δηλαδή η συσχέτιση των σημάτων, D_1 ο συντελεστής διάχυσης και q το άνυσμα σκέδασης. [142-

Οι μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός, πραγματοποιήθηκαν στο όργανο: Brookhaven Instruments BI-200SM Research Goniometer system operating at $\lambda = 640$ nm and with 40 mW power. Οι συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης αναλύθηκαν με την τεχνική κανονικοποίησης (cumulant method), με χρήση του προγράμματος CONTIN.

3.5 Στατική Σκέδαση Φωτός

Στην στατική σκέδαση φωτός (Static Light Scattering, SLS), η μέση χρονική τιμή της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, μετράται συναρτήσει της γωνίας σκέδασης θ και της συγκέντρωσης του διαλύματος c και εκφράζεται μέσω του λόγου Rayleigh, R_θ , ο οποίος ορίζεται ως:

$$R_\theta = d^2 I_s / V f I_0 \quad (1)$$

όπου d είναι η απόσταση μεταξύ δείγματος και ανιχνευτή, V ο σκεδαζόμενος όγκος, f ο παράγοντας διόρθωσης ως προς το επίπεδο πόλωσης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και I_s , I_0 οι εντάσεις της σκεδαζόμενης και προσπίπτουσας ακτινοβολίας, αντίστοιχα.

Σε ένα αραιό σύστημα, όπως για παράδειγμα ένα αέριο, τα μόρια κατανέμονται τυχαία στο χώρο και σε μεγάλες αποστάσεις μεταξύ τους, οπότε η συνεισφορά κάθε μορίου στην ένταση σκέδασης μπορεί να θεωρηθεί ανάλογη του αριθμού τους. Στην περίπτωση όμως πυκνών συστημάτων, όπως τα καθαρά υγρά και τα διαλύματα, τα μόρια βρίσκονται σε κοντινές αποστάσεις, οπότε η ακτινοβολία που σκεδάζεται από κάθε μόριο αλληλεπιδρά με εκείνη που προέρχεται από άλλα μόρια. Η πιθανότητα για καταστρεπτική συμβολή αυξάνεται και το φαινόμενο αυτό μειώνει την ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Η περιγραφή του φαινομένου αυτού μπορεί να γίνει μέσω της θεωρίας των διακυμάνσεων Einstein-Smoluchowski, η οποία λαμβάνει υπόψη τις τοπικές διακυμάνσεις της διηλεκτρικής σταθεράς, σε κλίμακα της τάξης μεγέθους του μήκους κύματος, οι οποίες προέρχονται από διακυμάνσεις πυκνότητας σε ένα καθαρό υγρό και/ή από διακυμάνσεις συγκέντρωσης σε ένα διάλυμα. Σύμφωνα με τη θεωρία

αυτή, η συνεισφορά των διακυμάνσεων συγκέντρωσης στη σκέδαση εκφράζεται μέσω της σχέσης:

$$\Delta R_{\theta} = R_{\theta, \text{διαλύματος}} - R_{\theta, \text{διαλύτη}} \quad (2)$$

Όπως φαίνεται στη σχέση (1), ο λόγος R_{θ} εξαρτάται από τη γεωμετρία της πειραματικής διάταξης. Για το λόγο αυτό στην πράξη υπολογίζεται ο απόλυτος λόγος R_{θ} , ο οποίος κανονικοποιείται ως προς πρότυπους διαλύτες όπως το τολουόλιο, ως εξής:

$$R_{\theta} = R_T n^2_{0} I_S / n^2_T I_{S,T} \quad (3)$$

όπου R_T ο λόγος Rayleigh του τολουολίου, n_0 και n_T οι δείκτες διάθλασης του διαλύτη και του τολουολίου και I_S και $I_{S,T}$ οι εντάσεις της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας του διαλύματος και του τολουολίου, αντίστοιχα.

Στην περίπτωση των πολυμερικών διαλυμάτων, η διαφορά ΔR_{θ} συνδέεται με τα μοριακά χαρακτηριστικά του πολυμερούς και τις θερμοδυναμικές ιδιότητες του διαλύματος μέσω της εξίσωσης Zimm (4):

$$K c / \Delta R_{\theta} = 1/M_w (1 + 1/3 (R_g^2 q^2)) + 2 A_2 c \quad (4)$$

όπου M_w το μοριακό βάρος του πολυμερούς, R_g η γυροσκοπική ακτίνα του πολυμερούς, A_2 ο δεύτερος συντελεστής Virial, ο οποίος εκφράζει αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο μορίων και q το διάνυσμα σκέδασης, το οποίο ορίζεται ως: (5)

$$q = 4 \pi n_0 / \lambda * \sin (\theta/2) \quad (5)$$

όπου λ το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η σταθερά K δίνεται από τη σχέση (6):

$$K = 4 \pi^2 n^2_{0} / \lambda^4 N_A * (dn/dc)^2 \quad (6)$$

όπου N_A ο αριθμός του Avogadro και dn/dc ο διαφορικός δείκτης διάθλασης.

Μέσω της εξίσωσης (4) και για μετρήσεις σε πολλαπλές γωνίες θ και συγκεντρώσεις c , προκύπτει το διάγραμμα Zimm. Από το διάγραμμα αυτό με διπλή προέκταση των μετρούμενων τιμών του λόγου $Kc/\Delta R_\theta$ σε μηδενική γωνία σκέδασης και μηδενική συγκέντρωση, εξάγεται το μοριακό βάρος M_w ως το αντίστροφο της κοινής τεταγμένης επί της αρχής, ενώ ο συντελεστής A_2 και η γυροσκοπική ακτίνα R_g υπολογίζονται από τις κλίσεις των ευθειών για $\theta = 0$ και $c = 0$, αντίστοιχα.

Όπως φαίνεται από τη σχέση (6) ο διαφορικός δείκτης διάθλασης dn/dc του πολυμερικού διαλύματος, είναι μια απαραίτητη παράμετρος για την ανάλυση των μετρήσεων στατικής σκέδασης φωτός. Η παράμετρος αυτή αποτελεί το μέτρο της μεταβολής του δείκτη διάθλασης του διαλύματος συναρτήσει της αύξησης της συγκέντρωσης του πολυμερούς, είναι χαρακτηριστική του κάθε συστήματος πολυμερούς-διαλύτη και μετράται με τη χρήση διαφορικών διαθλασίμετρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι, στην περίπτωση συμπολυμερών κατά συστάδες και διαλυμάτων που περιέχουν δύο ή περισσότερα συστατικά, τα οποία δεν παρουσιάζουν ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ τους, ο διαφορικός δείκτης διάθλασης του διαλύματος (dn/dc) ολικό μπορεί να υπολογιστεί ως σταθμισμένος μέσος όρος των διαφορικών δεικτών διάθλασης (dn/dc)₁ και (dn/dc)₂ των επιμέρους συστατικών, ως εξής (7):

$$(dn/dc)_{ολικό} = w_1 (dn/dc)_1 + w_2 (dn/dc)_2 \quad (7)$$

όπου w_1 και w_2 τα κλάσματα βάρους των δύο συστατικών. [163,164]

3.6 Ζ-Δυναμικό

Το ζ-δυναμικό, που ονομάζεται επίσης ηλεκτροκινητικό δυναμικό, είναι το δυναμικό στο επίπεδο ολίσθησης / διάτμησης ενός κολλοειδούς σωματιδίου, το οποίο κινείται υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Το ηλεκτρικό δυναμικό μιας επιφάνειας είναι το μέγεθος της εργασίας που χρειάζεται να γίνει για να μεταφερθεί μία μονάδα θετικού φορτίου από το άπειρο στην επιφάνεια, χωρίς επιτάχυνση. Το ζ-δυναμικό αντικατοπτρίζει την διαφορά δυναμικού μεταξύ της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας (EDL, electric double layer) των ηλεκτροφορητικά κινούμενων σωματιδίων και της στοιβάδας των διασκορπισμένων σωματιδίων γύρω τους στο επίπεδο διάτμησης (slipping plane).

Όταν ένα φορτισμένο σωματίδιο διασκορπίζεται, ένα προσροφημένο διπλό στρώμα - συχνά αναφέρεται ως ηλεκτρική διπλοστοιβάδα (EDL) - αναπτύσσεται στην επιφάνειά του (Εικόνα 18). Το εσωτερικό της στοιβάδας αυτής αποτελείται κυρίως από ιόντα /μόρια με αντίθετο φορτίο από εκείνο του σωματιδίου (Stern layer). Πέρα από τη στοιβάδα Stern οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις οφείλονται στο επιφανειακό φορτίο των σωματιδίων

Αν και μαθηματικά αυτό το ηλεκτροστατικό φαινόμενο εκτείνεται μέχρι το άπειρο, πειραματικά παρουσιάζεται μόνο σε λίγα nm από την επιφάνεια των σωματιδίων. Λόγω του ηλεκτροστατικού πεδίου των φορτισμένων νανοσωματιδίων, μία διάχυτη στοιβάδα που αποτελείται από φορτισμένα ιόντα/μόρια τόσο του ίδιου, όσο και του αντίθετου φορτίου αναπτύσσεται πέρα από τη στοιβάδα Stern, και μαζί με τη στοιβάδα Stern σχηματίζει την ηλεκτρική διπλοστοιβάδα (EDL). Η σύνθεση αυτής της διάχυτης στοιβάδας είναι δυναμική και διαφέρει ανάλογα με μια ποικιλία παραγόντων π.χ. pH, ιοντική ισχύς, συγκέντρωση κλπ. Όταν ένα ηλεκτρικό Το πεδίο εφαρμόζεται σε τέτοια διασπορά, τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται προς το αντίθετο ηλεκτρόδιο (ηλεκτροφόρηση). Μέσα σε αυτή τη διάχυτη στοιβάδα, υπάρχει ένα υποθετικό επίπεδο που λειτουργεί ως διεπαφή μεταξύ των κινούμενων σωματιδίων και των διασκορπισμένων γύρω από αυτά ιόντων, κατά την ηλεκτροφόρηση. Αυτό το επίπεδο είναι το χαρακτηριστικό επίπεδο ολίσθησης

/ διάτμησης και το ζ-δυναμικό είναι το δυναμικό σε αυτή τη διεπαφή σωματιδίων/Ν-ρευστών. Το ελληνικό γράμμα ζ (zeta) χρησιμοποιήθηκε αρχικά σε μαθηματικές εξισώσεις για να το περιγράψει και ως εκ τούτου προέκυψε η ονομασία. Το δυναμικό στην ίδια την επιφάνεια των σωματιδίων είναι γνωστό ως το δυναμικό Nernst (ψ_0) και δεν μπορεί να μετρηθεί. Το ηλεκτροστατικό πεδίο μειώνεται σε διασπορά με την απόσταση από την επιφάνεια των σωματιδίων σύμφωνα με την εξίσωση:

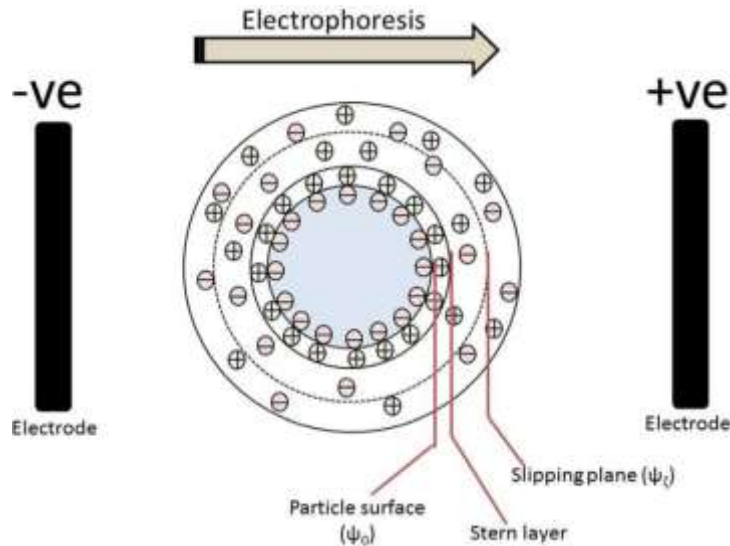
$$\psi = \psi_d e^{-\kappa x},$$

όπου ψ = το δυναμικό της επιφάνειας σε απόσταση x από την στοιβάδα Stern, ψ_d = το δυναμικό της επιφάνειας στην στοιβάδα Stern, κ = η παράμετρος Debye-Hückel, x = η απόσταση.

Όταν το επίπεδο ολίσθησης / διάτμησης βρίσκεται πολύ κοντά στη στοιβάδα Stern, τότε $\psi_d \sim \zeta$ και έτσι η εξίσωση μετατρέπεται:

$$\psi = \zeta e^{-\kappa x}$$

Η παράμετρος Debye-Hückel (κ) εξαρτάται από την ιοντική ισχύ. Έτσι, αυξανόμενης της ιοντικής ισχύος (π.χ. προσθήκη ηλεκτρολυτών), η διπλοστοιβάδα συμπιέζεται και το ζ-δυναμικό μειώνεται.



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας ενός αρνητικά φορτισμένου σωματιδίου

Το ζ-δυναμικό δεν μπορεί να μετρηθεί άμεσα και προκύπτει από την ηλεκτροφορητική κινητικότητα των φορτισμένων σωματιδίων υπό την επίδραση ενός εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα (μ_e) των σωματιδίων υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\mu_e = U/E,$$

όπου U = η ταχύτητα του σωματιδίου ($\mu\text{m/s}$), E = η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (Volt/cm) (γνωστές και οι δύο ποσότητες). Το ζ-δυναμικό τότε υπολογίζεται από την εξίσωση Henry:

$$\mu_e = 2 \epsilon_r \epsilon_0 \zeta f(Ka) / 3\eta$$

όπου ϵ_r = σχετική διαπερατότητα / διηλεκτρική σταθερά, ϵ_0 = διαπερατότητα στο κενό, ζ = ζ-δυναμικό, $f(Ka)$ = η συνάρτηση Henry, και η = το ιξώδες στη θερμοκρασία διεξαγωγής του πειράματος.

Όταν το πάχος της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας (EDL) είναι πολύ μικρότερο σε σύγκριση με την ακτίνα του σωματιδίου - που μπορεί να οφείλεται σε μεγαλύτερα σωματίδια (έως 1 μm) μέσα σε υδατικά διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης άλατος (10^{-2} M) - η τιμή του $f(Ka)$ λαμβάνεται ως 1,5 και η εξίσωση Henry τροποποιείται στην εξίσωση Helmholtz-Smoluchowski:

$$\mu_e = \epsilon_r \epsilon_0 \zeta / \eta$$

Η εξίσωση Helmholtz-Smoluchowski εφαρμόζεται στις περισσότερες φαρμακευτικές διαδικασίες και έτσι είναι πολύ σημαντική στην ανάπτυξη νανοσυστημάτων μεταφοράς φαρμάκων.

Αντίθετα, όταν το πάχος της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας (EDL) είναι πολύ μεγαλύτερο από το ίδιο το σωματίδιο, λόγω μικρότερων σωματιδίων (≤ 100 nm) που διασκορπίζονται σε χαμηλότερη συγκέντρωση άλατος (10^{-5} M), τότε η τιμή του $f(Ka)$ λαμβάνεται ως 1 και η εξίσωση Henry μετατρέπεται στην εξίσωση Hückel:

$$\mu_e = 2 \epsilon_r \epsilon_0 \zeta / 3\eta$$

Η εξίσωση Hückel συνήθως δεν σχετίζεται με φαρμακευτικά παρασκευάσματα, καθώς δεν ισχύει για υδατικές διασπορές αν και είναι δημοφιλής στη βιομηχανία κεραμικών.

Μία από τις πιο δημοφιλείς χρήσεις των αποτελεσμάτων του ζ-δυναμικού είναι η συσχέτισή του με τη σταθερότητα του κολλοειδούς. Στην βιβλιογραφία που αναφέρεται στη μεταφορά φαρμάκων υπάρχουν οδηγίες που αντιστοιχούν τις τιμές ζ-δυναμικού με τη σταθερότητα των νανοσωματιδίων. Έτσι τιμές $\pm 0 - 10$ mV, $\pm 10 - 20$ mV και $\pm 20 - 30$ mV και $> \pm 30$ mV, προσδιορίζουν εξαιρετικά ασταθή, σχετικά σταθερά, μέτρια σταθερά και πολύ σταθερά νανοσωματίδια, αντίστοιχα. Η πραγματικότητα όμως είναι πιο περίπλοκη, καθώς η θεωρία της σταθερότητας του κολλοειδούς εξαρτάται από το άθροισμα των ελκτικών δυνάμεων van der Waals και των ηλεκτροστατικών απώσεων λόγω της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας (EDL). Ενώ το ζ-δυναμικό παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις, δεν δίνει καμία εικόνα για τις ελκτικές δυνάμεις van der Waals. Επομένως, δεν είναι ασυνήθιστο να συναντούμε σταθερά κολλοειδή με χαμηλό ζ-δυναμικό και αντίστροφα. Η πεγκυλίωση (PEGylation) είναι γνωστό ότι διευκολύνει τη σταθερότητα των νανοσωματιδίων ενώ μειώνεται το ζ-δυναμικό.

Μια άλλη ευρέως δημοφιλής χρήση του ζ-δυναμικού είναι η χρήση του στον προσδιορισμό του επιφανειακού φορτίου των νανοσωματιδίων. Οι θετικές ή αρνητικές τιμές του ζ-δυναμικού προσδιορίζονται, διαπιστώνοντας σε ποιο ηλεκτρόδιο κινούνται τα σωματίδια κατά την ηλεκτροφόρηση. Το ζ-δυναμικό παρέχει μόνο ενδεικτικά στοιχεία για τη φύση του επιφανειακού φορτίου (θετικό/αρνητικό) υποθέτοντας ότι τα κυρίαρχα ιόντα στην ηλεκτρική διπλοστοιβάδα (EDL), μέχρι το επίπεδο ολίσθησης είναι παρόμοια (θετικά/αρνητικά) σε σύγκριση με την επιφάνεια του ίδιου του σωματιδίου. [165, 166]

Οι μετρήσεις ζ-δυναμικού πραγματοποιήθηκαν με το όργανο Brookhaven Instruments Nanobrook Series system operating σε μήκος κύματος $\lambda = 640 \text{ nm}$ και με ισχύ 40 mW , με τη τεχνική PALS και αναλύθηκαν με τη μέθοδο Smoluchowski.

3.7 Κυκλικός Διχρωϊσμός

Ο κυκλικός διχρωϊσμός (circular dichroism, CD) αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο ως πολύτιμη τεχνική για την εξέταση της δομής των πρωτεϊνών σε διάλυμα. Το επίπεδα πολωμένο φως μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από 2 κυκλικά πολωμένα στοιχεία ίσου μεγέθους, όπου το ένα περιστρέφεται αριστερόστροφα (αριστερά, L) και το άλλο δεξιόστροφα (δεξιά, R). Ο κυκλικός διχρωϊσμός αναφέρεται στη διαφορική απορρόφηση αυτών των 2 συστατικών. Αν μετά τη διέλευση από το εξεταζόμενο δείγμα, τα συστατικά L και R δεν απορροφώνται ή απορροφώνται σε ίση έκταση, ο ανασυνδυασμός των L και R θα αναγεννούσε ακτινοβολία πολωμένη στο αρχικό επίπεδο. Ωστόσο, εάν τα L και R απορροφώνται σε διαφορετική έκταση, η ακτινοβολία θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι κατέχει ελλειπτική πόλωση. Ένα σήμα κυκλικού διχρωϊσμού μπορεί να παρατηρηθεί όταν ένα χρωμοφόρο είναι χειρόμορφο (οπτικά ενεργό), για έναν από τους ακόλουθους λόγους: α) είναι εγγενώς χειραλικό λόγω της δομής του, για παράδειγμα, ένα άτομο C με 4 διαφορετικούς υποκαταστάτες, ή ένας δεσμός δισουλφιδίου που είναι χειρόμορφος λόγω των διεδρικών γωνιών του C-S-S-C των ατόμων της αλυσίδας, β) συνδέεται ομοιοπολικά με ένα χειρόμορφο κέντρο στο μόριο, ή γ) τοποθετείται σε ασύμμετρο περιβάλλον λόγω της τρισδιάστατης δομής που υιοθετείται από το μόριο. Στις πρωτεΐνες, τα χρωμοφόρα που μας ενδιαφέρουν περιλαμβάνουν τον πεπτιδικό δεσμό (απορρόφηση κάτω από 240 nm), αρωματικές πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων (απορρόφηση στο εύρος 260 έως 320 nm) και δισουλφιδικούς δεσμούς (αδύναμες ευρείες ζώνες απορρόφησης με κεντρικό άξονα

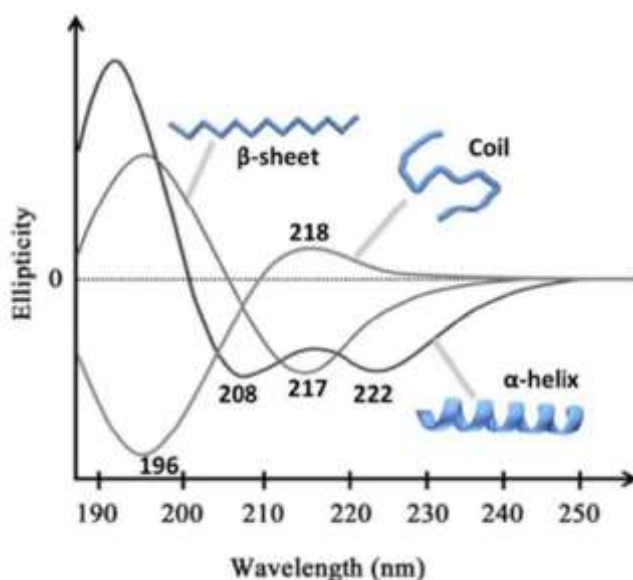
γύρω από τα 260 nm). Τέλος, μπορεί να προκύψουν σήματα από υποκαταστάτες, οι οποίοι δεν έχουν ενδογενή χειρομορφία αλλά αποκτούν χειραλικότητα όταν συνδέονται σε ένα ασύμμετρο περιβάλλον, όπως αυτό που παρέχεται από μια πρωτεΐνη.

Τα όργανα του κυκλικού διχρωϊσμού (γνωστά ως φασματοπολτάμετρα) μετρούν τη διαφορά στην απορρόφηση μεταξύ των L και R κυκλικά πολωμένων στοιχείων ($\Delta A = A_L - A_R$), αλλά αυτό γενικά αναφέρεται επίσης και σε όρους ελλειπτικότητας (ellipticity) (θ) σε μοίρες. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι $\theta = \tan^{-1} (b / a)$ όπου b και a είναι ο ελάχιστος και ο μέγιστος άξονας της προκύπτουσας ελλείψεως. Υπάρχει μια απλή αριθμητική σχέση μεταξύ ΔA και ελλειπτικότητας (σε μοίρες), δηλαδή $\theta = 32,98 \Delta A$. Το φάσμα του κυκλικού διχρωϊσμού λαμβάνεται όταν ο διχρωϊσμός μετρείται ως συνάρτηση του μήκους κύματος. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι με τις οποίες το φαινόμενο του κυκλικού διχρωϊσμού μπορεί να μετρηθεί: α) διαμόρφωση, στην οποία μεταδίδεται συνεχώς η προσπίπτουσα ακτινοβολία μεταξύ των συνιστωσών L και R, β) άμεση αφαίρεση, στην οποία οι απορροφήσεις των 2 συστατικών μετρώνται χωριστά και αφαιρούνται η μία από την άλλη και γ) ελλειψομετρική, στην οποία μετράται η ελλειπτικότητα της διαδιδόμενης ακτινοβολίας. Αν και οι μέθοδοι (β) και (γ) έχουν μερικά πλεονεκτήματα σε ό,τι αφορά το χρόνο μέτρησης του διχρωϊσμού, η μέθοδος της διαμόρφωσης είναι μακράν η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη. Σε ένα τέτοιο όργανο κυκλικού διχρωϊσμού το επίπεδα πολωμένο φως χωρίζεται στα L και R στοιχεία, μέσω διέλευσης από έναν διαμορφωτή, ο οποίος υποβάλλεται σε εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο (50 kHz είναι η συχνότητα που χρησιμοποιείται συχνότερα). Ο διαμορφωτής που συνήθως χρησιμοποιείται αποτελείται από ένα πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο χαλαζία και μια λεπτή πλάκα από ισότροπο υλικό (π.χ., πυρογενή διοξείδιο του πυριτίου) σφιχτά συνδεδεμένο με τον κρύσταλλο. Το εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο προκαλεί δομικές αλλαγές στον κρύσταλλο χαλαζία. Με αυτόν τον τρόπο, η πλάκα μεταδίδει κυκλικά πολωμένο φως στα άκρα του πεδίου. Καθώς μεταδίδεται η ακτινοβολία μεταξύ των L και R συστατικών, αυτά ανιχνεύονται με τη σειρά τους από τον φωτοπολλαπλασιαστή.

Θα πρέπει πάντα να θυμόμαστε ότι στις περισσότερες βιολογικές μελέτες τα παρατηρούμενα σήματα κυκλικού διχρωϊσμού είναι πολύ μικρά. Οι ελλειπτικές ιδιότητες είναι τυπικά στην περιοχή των 10 mdeg, που αντιστοιχούν σε διαφορά

απορρόφησης ΔΑ της τάξης των 3×10^{-4} . Επομένως, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στις πειραματικές συνθήκες προκειμένου να διασφαλιστεί η λήψη σωστών δεδομένων.

Οι πληροφορίες που μπορούν να ληφθούν από τη μελέτη των πρωτεϊνών με κυκλικό διχρωϊσμό είναι οι εξής: 1) Η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών (% έλικα, φύλλο, στροφές, κ.τ.λ.) (Εικόνα 19), η οποία ταυτοποιείται από την περιοχή του πεπτιδικού δεσμού. Η απορρόφηση στην περιοχή αυτή (240 nm και κάτω) οφείλεται κυρίως στον πεπτιδικό δεσμό. Υπάρχει μια αδύναμη αλλά ευρεία $n \rightarrow \pi^*$ μετατόπιση γύρω από τα 220 nm και μια πιο έντονη $\pi \rightarrow \pi^*$ μετάβαση γύρω στα 190 nm. 2) Η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών. Τα φάσματα στην περιοχή 260-320 nm προκύπτουν από τα αρωματικά αμινοξέα. Κάθε ένα από τα αμινοξέα τείνει να έχει ένα χαρακτηριστικό προφίλ μήκους κύματος. 3) Οι θέσεις δέσμευσης των συμπαραγόντων των πρωτεϊνών. 4) Συμπέρασμα σχετικά με τα χαρακτηριστικά της συνολικής δομής των πρωτεϊνών. 5) Μεταβολικές αλλαγές στις πρωτεΐνες. 6) Αναδίπλωση πρωτεϊνών. [167, 118]



Εικόνα 19: Πρότυπο φάσμα κυκλικού διχρωϊσμού

3.8 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού

Η φασματοσκοπία μοριακής απορρόφησης στηρίζεται στη μέτρηση της διαπερατότητας T , ή της απορρόφησης A διαλυμάτων, που τοποθετούνται σε διαφανείς κυψελίδες οπτικής διαδρομής b cm. Συνήθως, η συγκέντρωση c ενός αναλύτη που απορροφά συνδέεται γραμμικά με την απορρόφηση, σύμφωνα με την εξίσωση (1), η οποία αποτελεί μαθηματική έκφραση του νόμου του Beer.

$$A = -\log T = \log P_0/P = \epsilon bc \quad (1)$$

όπου, A (Απορρόφηση), T (Διαπερατότητα), P_0 και P (Ισχύς της ακτινοβολίας μετά τη διέλευσή της από την κυψελίδα που περιέχει το διαλύτη και τον αναλύτη, αντίστοιχα), ϵ (γραμμομοριακή απορροφητικότητα), b (μήκος διαδρομής της ακτινοβολίας), c (συγκέντρωση).

Η απορρόφηση της ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας οφείλεται στη διέγερση δεσμικών ηλεκτρονίων και κατά συνέπεια τα μήκη κύματος των απορροφήσεων μπορούν να συσχετιστούν με τους τύπους των δεσμών στα εξεταζόμενα σωματίδια. Έτσι, η φασματομετρία μοριακής απορρόφησης αποτελεί ένα χρήσιμο μέσο για την ταυτοποίηση χαρακτηριστικών ομάδων σε ένα μόριο, αλλά και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που περιέχουν τις ομάδες αυτές.

Στα πρώτα στάδια μιας φασματοφωτομετρικής ανάλυσης περιλαμβάνεται ο καθορισμός των βέλτιστων συνθηκών και η κατασκευή μιας καμπύλης αναφοράς με πρότυπα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων, που περιβάλλουν τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις των αγνώστων δειγμάτων.

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι τα εξής:

1. Ευρεία εφαρμοσιμότητα σε οργανικά και ανόργανα συστήματα
2. Όρια προσδιορισμών της τάξης των 10^{-4} έως 10^{-5} M, τα οποία μπορεί να φτάσουν και μέχρι 10^{-6} έως 10^{-7} M
3. Μέτρια μέχρι και μεγάλη εκλεκτικότητα
4. Καλή ακρίβεια
5. Εύκολη συλλογή των αποτελεσμάτων

Οι μετρήσεις φασματοσκοπίας UV/Vis πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα φασματόμετρο Perkin Elmer Lambda 650, από 250-800 nm, σε θερμοκρασία

δωματίου, με κυψελίδες χωρητικότητας 3 mL. Ένας ανιχνευτής Waters Diode-Array 690 χρησιμοποιήθηκε για τη βαθμονόμηση και τον προσδιορισμό της ποσότητας, της εγκλωβισμένης στα νανοσωματίδια, δοξορουβικίνης σε $\lambda = 485 \text{ nm}$. [159]

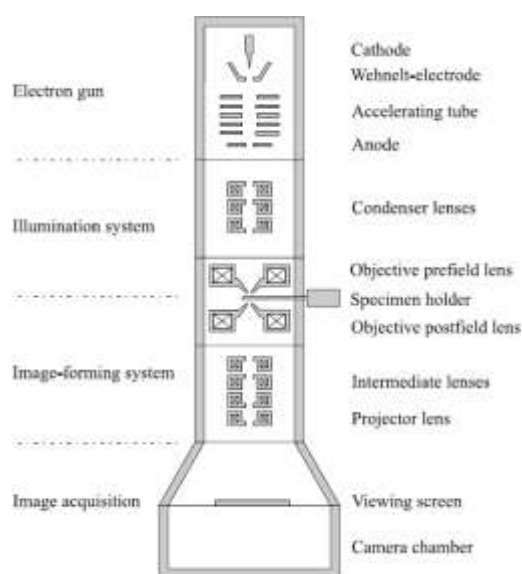
3.9 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διαπερατότητας

Η μικροσκοπία ηλεκτρονίων (Electron microscopy) και η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (atomic force microscopy) έχουν εξελιχθεί σε ισχυρά εργαλεία στον τομέα της επιστήμης των πολυμερών. Χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές και μεθόδους, μπορούν να ανιχνευθούν μορφολογικές λεπτομέρειες σε κλίμακες μήκους από 0,1 mm έως και 0,1 nm. Συστήματα με τουλάχιστον μία δομική διάσταση μικρότερη των 100 nm θεωρούνται ότι ανήκουν σε μια νέα κατηγορία υλικών, τα λεγόμενα νανοδομημένα (nanostructured) πολυμερή ή νανοσύνθετα (nanocomposites). Επιπλέον, η επίδραση πολλών παραμέτρων μπορεί να μελετηθεί αλλάζοντας τη μορφολογία του υλικού. Συγκεκριμένα, μπορεί να προσδιοριστεί η επίδραση των πραγματικών, τοπικών μορφολογικών επιδράσεων στη μηχανική φόρτωση. Οι μικρομηχανικές ιδιότητες ή οι μηχανισμοί που εμφανίζονται σε νανο- και μικροσκοπικό επίπεδο σχηματίζουν τη γέφυρα μεταξύ δομής, μορφολογίας και μηχανικών ιδιοτήτων. Επομένως, τόσο η ηλεκτρονική μικροσκοπία, όσο και η και μικροσκοπία ατομικής δύναμης συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση των συσχετίσεων δομής-ιδιοτήτων στα πολυμερή.

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διαπερατότητας (TEM) είναι μια τεχνική μικροσκοπίας, στην οποία αντί για φως χρησιμοποιείται δέσμη ηλεκτρονίων προκειμένου να δημιουργηθούν μεγεθυμένα είδωλα των αντικειμένων που εξετάζονται. Η τεχνική βασίζεται στο διαφορετικό ποσοστό σκέδασης της δέσμης των ηλεκτρονίων ανάλογα με την διαφορετική ηλεκτρονική πυκνότητα ή το διαφορετικό πάχος που έχουν τα υλικά, δημιουργώντας ένα είδωλο με φωτεινές και σκοτεινές περιοχές.

Τα βασικά στοιχεία ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου παρουσιάζονται στην Εικόνα 20. Ηλεκτρόνια που εκπέμπονται από μια θερμική ιονική πηγή ή μια πηγή εκπομπής πεδίου επιταχύνονται από μια υψηλή τάση που παράγεται μέσω γεννήτριας υψηλής τάσης. Η δέσμη ηλεκτρονίων σχηματίζεται με τη βοήθεια φακών συμπυκνωτή και στη συνέχεια κατευθύνεται στον αντικειμενικό φακό και «χτυπά» το δείγμα με κατάλληλους τρόπους. Τα ηλεκτρόνια, αφού διαπεράσουν το δείγμα, σχηματίζουν μια εικόνα μέσω της δράσης του αντικειμενικού φακού και ενός αντικειμενικού

διαφράγματος στο πίσω εστιακό επίπεδο του φακού. Η εικόνα διορθώνεται από έναν αντικειμενικό στιγματιστή και μεγεθύνεται από ένα σύστημα σχηματισμού εικόνας που αποτελείται από μια σειρά ενδιάμεσων φακών και μονάδων ευθυγράμμισης, οπότε τελικά προκύπτει η επιθυμητή εικόνα, η οποία γίνεται ορατή στην οθόνη προβολής ή καταγράφεται από μια κάμερα ή σε ένα φιλμ με ευαισθησία σε ηλεκτρόνια.



Εικόνα 20: Τα βασικά μέρη ενός οργάνου TEM

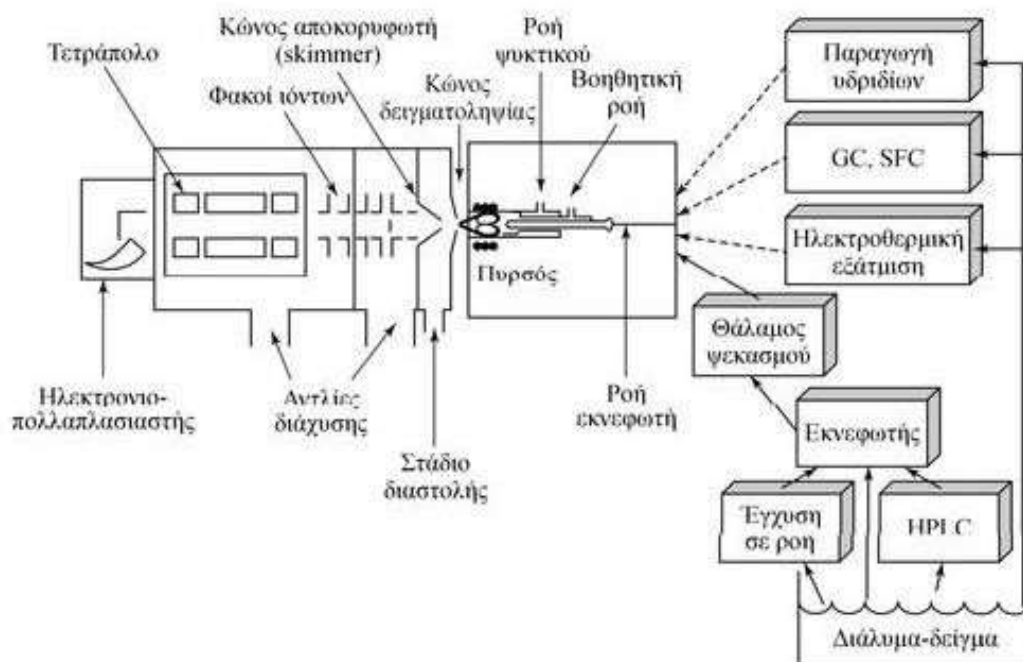
Η τεχνική TEM χρησιμοποιείται και στο πεδίο της νανοτεχνολογίας, δίνοντας τη δυνατότητα του μορφολογικού χαρακτηρισμού των υλικών που συντίθενται. Τα προς μελέτη υλικά εναποτίθενται πάνω σε κατάλληλες επιφάνειες, υπό μορφή αραιών διαλυμάτων, ώστε να είναι ομοιογενής η διασπορά των νανοσωματιδίων. [168,169]

3.10 Φασματομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS)

Φασματομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS). Από τις αρχές τις δεκαετίας του 1980 η ICP-MS αναπτύχθηκε ως μια από τις σπουδαιότερες τεχνικές στοιχειακής ανάλυσης, λόγω των χαμηλών ορίων ανίχνευσης για τα περισσότερα στοιχεία, του υψηλού βαθμού εκλεκτικότητας και της σχετικά καλής επαναληψιμότητας και ακρίβειας. Για την

ατομοποίηση και τον ιοντισμό χρησιμοποιείται πυρσός επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP). Για διαλύματα η εισαγωγή του δείγματος επιτυγχάνεται με έναν συμβατικό ή με έναν υπερηχητικό εκνεφωτή. Για στερεά δείγματα εφαρμόζεται αποσύνθεση του δείγματος με σπινθήρα ή laser ή εκκένωση λάμπης. Όργανα κατάλληλα για τις τεχνικές αυτές διατίθενται στην αγορά από το 1983. Στα όργανα αυτά θετικά μεταλλικά ιόντα, που παράγονται σε ένα πυρσό ICP συμβατικού τύπου, εισάγονται ως δείγματα με τη βοήθεια μιας διαφορικής αντλίας συνδεδεμένης με το τετραπολικό φασματόμετρο μαζών. Τα φάσματα που παράγονται με τον τρόπο αυτό είναι αξιολογώτα απλά συγκρινόμενα με τα συμβατικά οπτικά φάσματα ICP, επειδή αποτελούνται από απλές σειρές κορυφών των ισοτόπων κάθε στοιχείου που υπάρχει στο δείγμα. Τα φάσματα αυτά χρησιμοποιούνται τόσο για ποιοτική ταυτοποίηση, όσο και ποσοτικό προσδιορισμό των στοιχείων του δείγματος. Ο ποσοτικός προσδιορισμός συνήθως βασίζεται σε καμπύλες βαθμονόμησης, που αποδίδουν τον λόγο του σήματος των ιόντων του αναλύτη προς το σήμα των ιόντων ενός εσωτερικού προτύπου, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης.

Στο σχήμα 9 παρουσιάζονται τα τμήματα ενός συστήματος ICP-MS. Κρίσιμο τμήμα του οργάνου είναι το σημείο διασύνδεσης του πυρσού ICP, ο οποίος λειτουργεί σε ατμοσφαιρική πίεση, με το φασματόμετρο μαζών, όπου η πίεση πρέπει να είναι μικρότερη από 10^{-4} torr. Η σύζευξη αυτή επιτυγχάνεται με ένα διαφορικά αντλούμενο συζεύκτη, ο οποίος αποτελείται από έναν κώνο δειγματοληψίας, που είναι ένας υδρόψυκτος κώνος νικελίου με ένα μικρό στόμιο (<1.0 mm) στο κέντρο του. Το θερμό αέριο πλάσμα μεταφέρεται μέσω του στομίου σε μια περιοχή, η οποία διατηρείται σε πίεση περίπου 1 torr με μια μηχανική αντλία. Στην περιοχή αυτή πραγματοποιείται μια ταχεία διαστολή του αερίου με αποτέλεσμα την ψύξη του. Ένα κλάσμα του αερίου της περιοχής αυτής μεταφέρεται στη συνέχεια μέσω μιας μικρής οπής σε έναν δεύτερο κώνο, ο οποίος ονομάζεται αποκορυφωτής (skimmer, skimming: απομάκρυνση επιπλέοντος υλικού από ένα υγρό, αποκορύφωση, «ξάφρισμα») και στη συνέχεια σε ένα θάλαμο, ο οποίος διατηρείται στην πίεση του φασματόμετρου μαζών. Εδώ τα θετικά ιόντα διαχωρίζονται από τα ηλεκτρόνια και τα μοριακά σωματίδια με ένα αρνητικό δυναμικό επιταχύνονται και εστιάζονται με μαγνητικό φακό ιόντων στο στόμιο εισόδου ενός τετραπολικού αναλυτή μαζών.



Σχήμα 9: Σχηματική αναπαράσταση ενός συστήματος ICP-MS. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν εισαγωγή αερίων δειγμάτων. Οι συνεχείς γραμμές υποδηλώνουν εισαγωγή υγρών δειγμάτων.

Στις προδιαγραφές απόδοσης ενός τυπικού εμπορικού φασματομέτρου μαζών εξοπλισμένου με πυρσό ICP αναφέρονται: περιοχή μαζών 3 έως 300, δυνατότητα διάκρισης ιόντων που διαφέρουν κατά μια μονάδα m/z και δυναμική περιοχή σήματος 6 τάξεων μεγέθους. Με αυτόν τον τρόπο έχουν μετρηθεί πάνω από το 90% των στοιχείων του περιοδικού πίνακα. Οι χρόνοι μέτρησης είναι 10 s για κάθε στοιχείο και τα όρια ανίχνευσης για τα περισσότερα στοιχεία βρίσκονται στην περιοχή 0.1 έως 10 ppb. Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις στο μέσο της καμπύλης αναφοράς είναι 2% έως 4%. Ως μειονεκτήματα μπορούν να θεωρηθούν το υψηλό κόστος και οι ισοβαρικές παρεμποδίσεις. [170]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

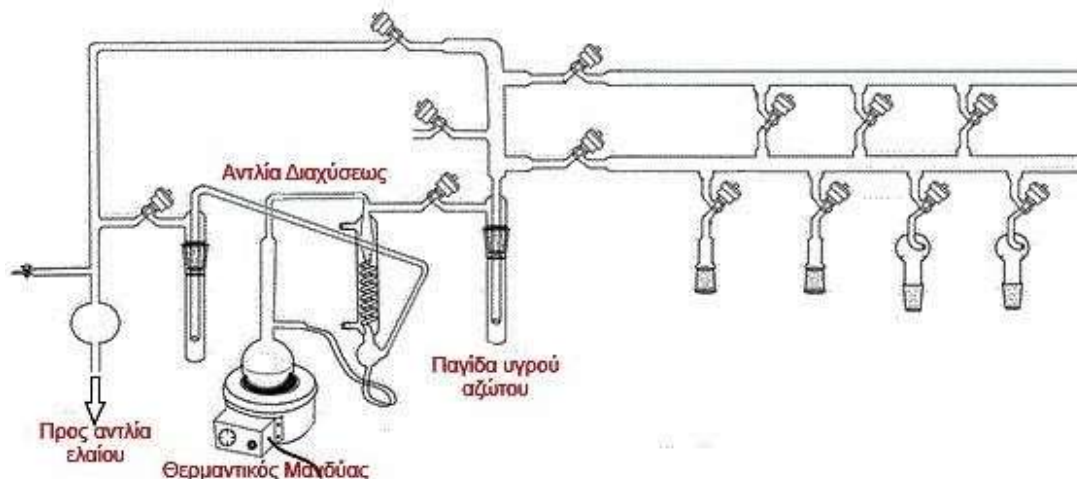
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Τεχνικές Υψηλού Κενού (High Vacuum Techniques, HVT)

Η σύνθεση των πολυμερών, που αποτελούν το αντικείμενο της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε μέσω τεχνικών υψηλού κενού κάτω από αυστηρά καθορισμένες συνθήκες και με χρήση ειδικά σχεδιασμένων συσκευών πολυμερισμού, οι οποίες κατασκευάζονται με τη βοήθεια υαλουργικών τεχνικών. Ο συνδυασμός αυτός αποτελεί ιδανική μέθοδο για τη σύνθεση μακρομορίων με καλά καθορισμένα μοριακά χαρακτηριστικά και με δυνατότητα άμεσης συσχέτισης μεταξύ της δομής και των ιδιοτήτων τους. Συνεπώς, για να επιτευχθούν τα επιθυμητά αποτελέσματα απαιτούνται κατάλληλες τεχνικές υψηλού κενού, ώστε να απομακρυνθούν από το περιβάλλον των αντιδράσεων όλες εκείνες οι προσμίξεις που μπορούν να οδηγήσουν σε παράπλευρες αντιδράσεις.

Πρώτα απ' όλα, με την επίτευξη υψηλού κενού στον αντιδραστήρα του πολυμερισμού απομακρύνεται ο ατμοσφαιρικός αέρας που περιέχει πλήθος ανεπιθύμητων προσμίξεων, όπως οξυγόνο, ίχνη υγρασίας, κτλ., οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν με τους απαρχητές, τα μονομερή αλλά και τις αναπτυσσόμενες πολυμερικές αλυσίδες. Στη συνέχεια, με εφαρμογή κατάλληλων τεχνικών καθαρισμού των χρησιμοποιούμενων διαλυτών και αντιδραστηρίων επιτυγχάνεται η απομάκρυνση διάφορων ανεπιθύμητων ουσιών από το σύστημα, όπως αλκοόλες, αμίνες, οξέα και άλλες δραστικές προσμίξεις (π.χ. σταθεροποιητές), που περιέχονται στα εμπορικά διαθέσιμα αντιδραστήρια.

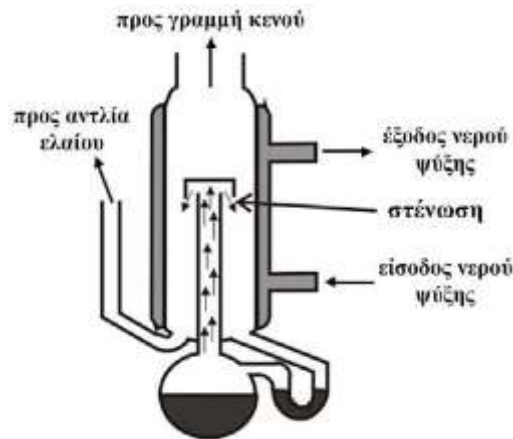
Όλες οι διαδικασίες καθαρισμού των αντιδραστηρίων, διαλυτών, απαρχητών, όπως και οι διαδικασίες πολυμερισμού, πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια της γραμμής υψηλού κενού (High Vacuum Line, HVL), σχηματική αναπαράσταση της οποίας παρατίθεται στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα 10).



Σχήμα 10: Σχηματική αναπαράσταση της γραμμής υψηλού κενού (HVL)

Η γραμμή υψηλού κενού αποτελείται από γυάλινους σωλήνες τύπου Pyrex, στρόφιγγες Teflon υψηλού κενού (Rotaflon HP 10 mm, 10^{-8} mm Hg), μία αντλία διαχύσεως υδραργύρου και μία αντλία ελαίου. Οι αντλίες ελαίου και διαχύσεως Hg προστατεύονται από διάφορα πτητικά συστατικά (π.χ. ατμοί διαλυτών, αέρια που εκλύονται κατά τη διεξαγωγή αντιδράσεων) τα οποία συμπυκνώνονται σε παγίδες υγρού αζώτου. Με τις στρόφιγγες, το κενό εφαρμόζεται μόνο στα επιθυμητά τμήματα της γραμμής, ενώ τα υπόλοιπα τμήματα παραμένουν απομονωμένα. Η γραμμή υψηλού κενού περιλαμβάνει εξόδους με εσφυρίσματα, μέσω των οποίων συνδέονται οι διάφορες συσκευές και γίνεται η εισαγωγή και η απόσταξη των αντιδραστηρίων (διαλύτες, μονομερή, απαρχητές).

Η αντλία ελαίου δημιουργεί ένα προκαταρκτικό κενό της τάξης των 10^{-2} - 10^{-3} mm Hg. Το κενό αυτό είναι απαραίτητο για να αποστάξει ο υδράργυρος που βρίσκεται στην αντλία διαχύσεως σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία (Σχήμα 11). Ο υδράργυρος θερμαίνεται με τη βοήθεια ενός θερμαντικού μανδύα και καθώς τα μόρια του κινούνται ανοδικά, διέρχονται από τη στένωση, η οποία προκαλεί αύξηση της ταχύτητάς τους με ταυτόχρονη ελάττωση της πίεσής τους, ακολουθώντας την αρχή του Bernoulli.



Σχήμα 11: Σχηματική αναπαράσταση της αντλίας διαχύσεως υδραργύρου.

Σύμφωνα με την αρχή του Bernoulli, όταν ένα ασυμπίεστο ρευστό ρέει κατά μήκος ενός σωλήνα που δεν έχει σταθερή διατομή, ο ρυθμός ροής του δεν πρέπει να αλλάζει. Όταν ένα στοιχείο του ασυμπίεστου ρευστού επιταχύνεται, θα πρέπει να κινείται από μία περιοχή υψηλής πίεσης προς μία άλλη χαμηλής πίεσης, ώστε να υπάρχει συνισταμένη δύναμη που να το επιταχύνει προς τα εμπρός. Έτσι, κατά τη δίοδο των μορίων του υδραργύρου μέσα από τη στένωση προκαλείται αύξηση της ταχύτητάς τους και λόγω της μείωσης της πίεσης που αυτό προκαλεί, δημιουργείται διαφορά πίεσης (υποπίεση) στα άκρα της στήλης. Κατά την επαφή του με τα τοιχώματα του ψυκτήρα, ο υδράργυρος συμπυκνώνεται και επιστρέφει στη φιάλη, όπου η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Έτσι επιτυγχάνεται το τελικό κενό που είναι της τάξης των 10^{-7} mm Hg, ίσο με την τάση ατμών του υδραργύρου.

Πριν χρησιμοποιηθεί η γραμμή υψηλού κενού πρέπει να τεθεί σε λειτουργία η αντλία ελαίου, να προσαρμοστεί σ' αυτήν η επιθυμητή κενή συσκευή και να ανιχνευθεί τυχόν ύπαρξη μικροοπών με τη βοήθεια του πηνίου Tesla. Μόνο όταν εξασφαλιστεί απόλυτη στεγανότητα, η γραμμή είναι έτοιμη για τη διεξαγωγή της διαδικασίας απομάκρυνσης του ατμοσφαιρικού αέρα από οποιοδήποτε σύστημα. Οι αποστάξεις υπό υψηλό κενό γίνονται με σχετική ευκολία, θερμαίνοντας ελαφρά το προς απόσταξη υγρό και ψύχοντας τον υποδοχέα με υγρό άζωτο (-196 °C).

Ο χειρισμός της γραμμής υψηλού κενού, ελοχεύει πολλούς κινδύνους, γι' αυτό κάθε φορά πρέπει να λαμβάνονται κατάλληλα μέτρα προστασίας, όπως χρήση προστατευτικών γυαλιών κ.ά. Λεπτομέρειες σχετικά με τον χειρισμό της γραμμής υψηλού κενού, τις

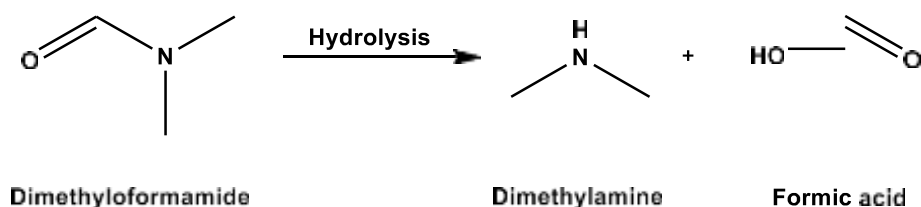
απαραίτητες προφυλάξεις και τα μέτρα ασφαλείας που πρέπει να λαμβάνονται κατά τη χρήση της αναφέρονται εκτενώς στη βιβλιογραφία. [171-173]

4.2 Καθαρισμός διαλυτών και αντιδραστηρίων

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η υψηλή καθαρότητα των αντιδραστηρίων είναι υψίστης σημασίας για την ομαλή διεξαγωγή των αντιδράσεων και τη λήψη επιθυμητών αποτελεσμάτων. Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις πολυμερισμού είναι απαραίτητο να μην περιέχουν ίχνη υγρασίας και οξυγόνου, αλλά και να έχουν απομακρυνθεί ανεπιθύμητες προσμίξεις που μπορεί να υπάρχουν. Οι ενώσεις αυτές επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την πορεία των αντιδράσεων, και ανάλογα τις συνθήκες, μπορούν να δράσουν ως απαρχητές, επιβραδυντές ή αναστολείς πολυμερισμού, οδηγώντας σε μη επιθυμητά αποτελέσματα, όπως είναι η ευρεία κατανομή μοριακών βαρών. Γι' αυτό το λόγο, οι εμπορικά διαθέσιμοι διαλύτες υπόκεινται σε περαιτέρω διαδικασίες καθαρισμού, που στις περισσότερες των περιπτώσεων περιλαμβάνουν την αντίδρασή τους με κάποιο ξηραντικό μέσο για απομάκρυνση της υγρασίας και εν συνεχεία την απαέρωση και απόσταξη τους υπό κενό. Ακολούθως παρατίθενται οι διαδικασίες καθαρισμού των οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. [146-147]

Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)

Το διμεθυλοφορμαμίδιο αποτελεί τον διαλύτη του πολυμερισμού των *N*-καρβοξυ ανυδριτών των α -αμινοξέων, αλλά χρησιμοποιείται και σε διάφορες οργανικές αντιδράσεις, όπως για παράδειγμα αντιδράσεις αποπροστασίας των πολυπεπτιδίων. Το DMF υπόκειται σε θερμική, αλλά και φωτοχημική αποικοδόμηση. Κατά την θερμική του αποικοδόμηση παράγεται διμεθυλαμίνη (DMA) και μονοξειδίο του άνθρακα. Επίσης υδρολύεται αργά παρουσία νερού, παράγοντας DMA και φορμικό οξύ, συστατικά που του αποδίδουν και την χαρακτηριστική οσμή του (Σχήμα 12).



Σχήμα 12: Αντίδραση υδρόλυσης του DMF προς DMA και φορμικό οξύ.

Η παραγωγή της διμεθυλαμίνης είναι μία διαδικασία που πρέπει να αποφεύγεται, καθώς κατά την διάρκεια του πολυμερισμού των NCAs μπορεί να δράσει ως απαρχητής, οδηγώντας σε μη επιθυμητά αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό, το εμπορικά διαθέσιμο DMF (99.9+% με <50 ppm προσμίξεις, Fischer Scientific) φυλάσσεται υπό αδρανή ατμόσφαιρα στο glove box. Κατά τον καθαρισμό του, περίπου 700 mL του διαλύτη μεταγγίζονται σε σφαιρική φιάλη 1 L που φέρει στρόφιγγα, η οποία προηγουμένως έχει υποστεί ξήρανση σε φούρνο 500 °C και στη γραμμή υψηλού κενού με φλόγα (flame-drying). Η φιάλη με τον διαλύτη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και απαερώνεται ενδεδειγμένα δύο φορές. Το πρώτο και το τελευταίο κλάσμα του διαλύτη απορρίπτονται πάντα κατά την απόσταξη και συλλέγονται μόνο τα μεσαία κλάσματα. Το απεσταγμένο DMF που λαμβάνεται, φυλάσσεται στους 3 °C, προστατευμένο από το φως. Επίσης, είναι καλό να καταναλωθεί το συντομότερο δυνατόν από την ημέρα καθαρισμού του. (διηλ.σταθερά $\epsilon_r=36,71$ στους 25 °C, $\Sigma.Z = 153$ °C)

Οξικός αιθυλεστέρας (EtOAc)

Ο οξικός αιθυλεστέρας χρησιμοποιείται ως διαλύτης τόσο για τη σύνθεση των μονομερών (*N*-καρβοξυ ανυδρίτες, NCAs) από τα αντίστοιχα α -αμινοξέα, όσο και για τις ανακρυσταλλώσεις τους. Ο εμπορικά διαθέσιμος διαλύτης (1400 mL, >99.5%, Merck Millipore) αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση σε σφαιρική φιάλη 2 L με πεντοξείδιο του φωσφόρου (P_2O_5) για μια ημέρα για απομάκρυνση της υγρασίας, οπότε ο διαλύτης αποκτά ένα χαρακτηριστικό μαύρο χρώμα. Στη συνέχεια, η φιάλη τοποθετείται στη γραμμή υψηλού κενού, απαερώνεται δύο φορές και εν συνεχεία τα μεσαία κλάσματα του διαλύτη αποστάζονται σε διπλανή σφαιρική φιάλη 2 L με στρόφιγγα. Μετά το πέρας της απόσταξης ακολουθεί νέα απαέρωση του διαλύτη. Η ποσότητα του οξικού αιθυλεστέρα που έχει απομείνει με το ξηραντικό στην αρχική φιάλη απενεργοποιείται με νερό. (διηλ.σταθερά $\epsilon_r = 6,02$ στους 25 °C, $\Sigma.Z = 77$ °C)

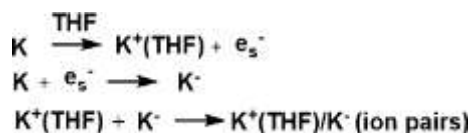
Εξάνιο

Το εξάνιο αποτελεί τον μη διαλύτη στο σύστημα ανακρυσταλλώσεων διαλύτη-μη διαλύτη για τον καθαρισμό των *N*-Καρβοξυανυδριτών ενώ χρησιμοποιείται επίσης για την αραίωση των απαρχητών. Το εμπορικά διαθέσιμο εξάνιο τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη με λεπτόκοκκα διαμερισμένο υδρίδιο του ασβεστίου (CaH_2) και αφήνεται υπό ανάδευση για μία νύχτα. Στη συνέχεια, ο διαλύτης, έπειτα από ενδεδειγμένη απαέρωση, αποστάζεται σε

καθαρή φιάλη που έχουν προηγουμένως εισαχθεί μέσω ένεσης ~10 mL *n*-BuLi και τέλος φυλάσσεται υπό κενό (διηλ.σταθερά $\epsilon_r = 1,89$ στους 20 °C , $\Sigma.Z = 69$ °C).

Τετραϋδροφουράνιο (THF)

Το εμπορικά διαθέσιμο τετραϋδροφουράνιο (1200 mL, max 0.005% H₂O, Merck Millipore) χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης για τη σύνθεση των μονομερών. Για τον καθαρισμό του, αρχικά αφήνεται να αντιδράσει υπό ανάδευση για μία μέρα σε σφαιρική φιάλη 1 L η οποία περιέχει μικρή ποσότητα καλά λειοτριβημένου CaH₂. Την επόμενη μέρα, η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και η ποσότητα του THF πρώτα απαερώνεται ενδεδειχώς δύο φορές και έπειτα αποστάζεται σε νέα σφαιρική φιάλη 1 L που περιέχει κομματάκια μεταλλικού νατρίου (Na), απαερώνεται άλλη μια φορά και αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα προς αντίδραση με το ξηραντικό. Ακολούθως, το THF αφού απαερωθεί ξανά, αποστάζεται σε γειτονική φιάλη 1 L που περιέχει κράμα μεταλλικού νατρίου και καλίου (Na/K alloy) σε αναλογία 1:3 κατά βάρος, όπου αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα. Η εμφάνιση χαρακτηριστικού έντονου κυανού χρώματος μετά από λίγες ώρες, αποτελεί ένδειξη υψηλής καθαρότητας του συγκεκριμένου διαλύτη. Έχει προταθεί ότι το χρώμα αυτό, προέρχεται από σύμπλοκα του διαλύτη με αρνητικά ιόντα των μετάλλων, κυρίως του καλίου (K⁻), λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίων μέσω του THF (επιδιαλυτωμένα ηλεκτρόνια).



Σχήμα 13: Αντιδράσεις σχηματισμού ιοντικών ζευγών THF/K.

Τέλος, πραγματοποιείται μια τελική απαέρωση. Πριν τη χρήση του διαλύτη συνίσταται να είναι υπό ανάδευση για μία ημέρα. (διηλ.σταθερά $\epsilon_r = 7,60$ στους 20 °C, $\Sigma.Z = 66$ °C)

Διχλωρομεθάνιο - DCM (CH₂Cl₂)

Το διχλωρομεθάνιο αποτέλεσε το διαλύτη του πολυμερισμού του *N*-καρβοξυ ανυδρίτη της φαινυλαλανίνης, παρότι ως διαλύτης των περισσότερων *N*-καρβοξυ ανυδριτών των α-αμινοξέων χρησιμοποιείται το διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Η επιθυμητή ποσότητα εμπορικά διαθέσιμου DCM τοποθετήθηκε σε φιάλη με λεπτόκοκκα διαμερισμένο CaH₂ και αφέθηκε υπό ανάδευση για μία ημέρα, ώστε να δεσμευτούν τυχόν ίχνη υγρασίας από το ξηραντικό μέσο. Στη συνέχεια, έπειτα από ενδεδειχτή απαέρωση, το DCM αποστάχθηκε

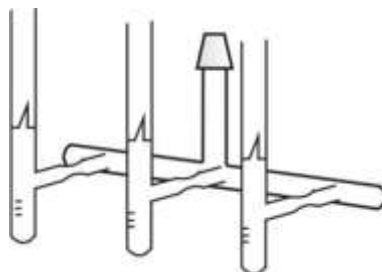
στην γραμμή κενού σε δεύτερη καθαρή φιάλη που περιείχε προξηραμένα μοριακά κόσκινα 3 Å και φυλάχθηκε υπό κενό μέχρι τη χρήση του.

Βενζόλιο (C₆H₆)

Το εμπορικά διαθέσιμο βενζόλιο (800 mL, 99% thiophen free grade, Sigma-Aldrich) χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση της υγρασίας από το μέσο πολυμερισμού, καθώς σχηματίζει αζεοτροπικό μείγμα με το νερό. Έτσι, μετά την απομάκρυνσή του από το μέσο, προσδίδει άνυδρες συνθήκες. Για τον καθαρισμό του τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη 1 L, ακολούθως προστίθεται μικρή ποσότητα λεπτότατα διαμερισμένου υδριδίου του ασβεστίου (CaH₂) και αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για μία ημέρα, για την δέσμευση ιχνών υγρασίας από το ξηραντικό μέσο. Στη συνέχεια, η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και αφού πρώτα το βενζόλιο έχει ψυχθεί σε όλη του τη μάζα με χρήση υγρού αζώτου, απαερώνεται ενδεδλεχώς και αποστάζεται σε γειτονική σφαιρική φιάλη 1 L στην οποία έχει γίνει προηγουμένως ένεση μικρής ποσότητας (~10 mL) κανονικού βουτυλολιθίου (*n*-BuLi), το οποίο αντιδρά με τις όποιες τυχόν προσμίξεις έχουν παραμείνει. Τέλος, η ποσότητα CaH₂ της αρχικής φιάλης απενεργοποιείται με χρήση τολουολίου και μεθανόλης. (διηλ.σταθερά $\epsilon_r = 2,27$ στους 25 °C, $\Sigma.Z=80$ °C)

Εξυλαμίνη

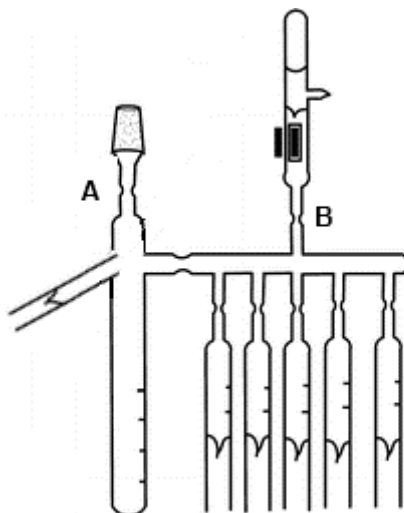
Η εξυλαμίνη χρησιμοποιείται ως απαραίτητη για τον πολυμερισμό των NCAs. Η εμπορικά διαθέσιμη εξυλαμίνη τοποθετείται σε φιάλη και αφήνεται υπό ανάδευση με λεπτόκοκκα διαμερισμένο CaH₂ για μία νύχτα. Την επόμενη ημέρα, έπειτα από ενδεδλεχή απαέρωση, αποστάζεται σε συσκευή (Σχήμα 14) που περιέχει βαθμονομημένες αμπούλες η επιθυμητή ποσότητα κάθε φορά. Η κάθε αμπούλα παγώνεται με υγρό άζωτο, απαερώνεται, συντήκεται στην στένωση και φυλάσσεται στους -20 °C.



Σχήμα 14: Συσκευή αμποουλών για την παραλαβή απαραίτητη.

Μία από τις αμπούλες αυτές προσαρμόζεται σε συσκευή αραίωσης (Σχήμα 15), η οποία μέσω του εσφυρίσματος τοποθετείται στη γραμμή κενού. Ακολουθεί προσεκτική

απαέρωση και ξήρανση της συσκευής (flame drying) πριν την απόσταξη ποσότητας διαλύτη ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση του απαρχητή. Κατόπιν, η συσκευή απομακρύνεται από τη γραμμή κενού με σύντηξη στο σημείο A και προστίθεται ο απαρχητής με θραύση του γυάλινου υμένα της αμπούλας (σημείο B).



Σχήμα 15: Συσκευή αραίωσης απαρχητή.

Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση της εξυλαμίνης ήταν το εξάνιο.

Τριαιθυλαμίνη (Et₃N)

Η τριαιθυλαμίνη χρησιμοποιείται στη σύνθεση του *N*^{lim}-Trt-His NCA ως μέσο δέσμευσης του παραγόμενου υδροχλωρίου. Για τον καθαρισμό της, η απαραίτητη ποσότητα Et₃N (150 mL, >99%, Acros Organics) τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη 250 mL που περιέχει μικρή ποσότητα καλά λειοτριβημένου CaH₂ και αφήνεται υπό ανάδευση για μία ημέρα. Έπειτα η σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και αφού πρώτα απαερωθεί η ποσότητα της Et₃N, ακολουθεί απόσταξη σε σφαιρική φιάλη με στρόφιγγα που περιέχει λεπτά κομματάκια μεταλλικού νατρίου και φυλάσσεται υπό κενό. (διηλ.σταθερά ε_r=2,42 στους 25 °C, Σ.Ζ = 89 °C.

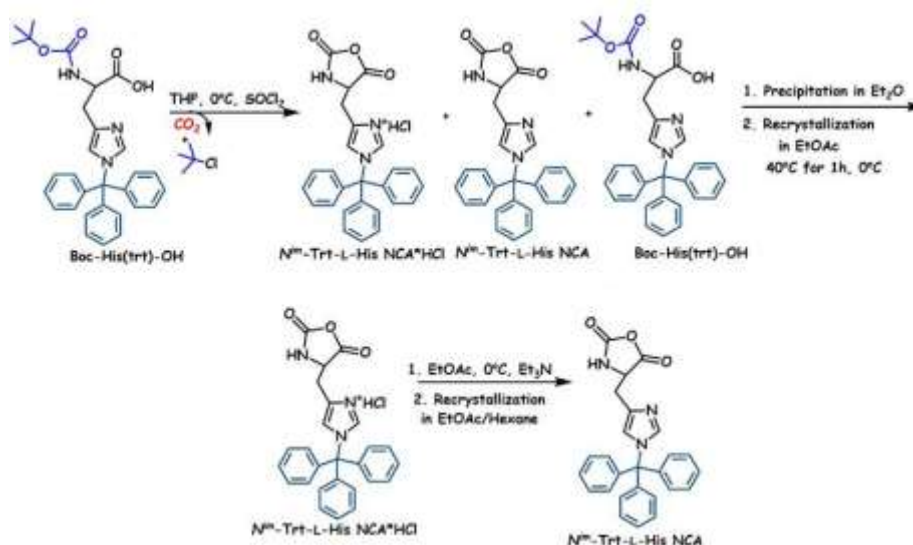
4.3 Σύνθεση και Καθαρισμός των Μονομερών (*N*-Καρβόξυ Ανυδρίτες (NCA, *N*-Carboxy Anhydrides) των α-Αμινοξέων)

Τα μονομερή που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση καλά καθορισμένων πολυπεπτιδίων (*N*-Καρβόξυ Ανυδρίτες των α-Αμινοξέων), λόγω της μεγάλης ευαισθησίας τους δεν είναι εμπορικά διαθέσιμα, ως επί το πλείστο, και συνεπώς κρίνεται απαραίτητη η εργαστηριακή

τους σύνθεση. Απαιτούν υψηλή καθαρότητα και απουσία υγρασίας ή άλλων ενεργών πρωτονίων προκειμένου να οδηγήσουν σε ελεγχόμενες αντιδράσεις πολυμερισμού και εν συνεχεία σε τελικά προϊόντα που φέρουν επιθυμητά μακρομοριακά χαρακτηριστικά. Οι συνθετικές πορείες που έλαβαν χώρα για τη λήψη των μονομερών *N^{im}*-trityl-L-Histidine *N*-Carboxy Anhydride (*N^{im}*-Trt-L-HIS NCA), γ -Benzyl-L-Glutamate *N*-Carboxy Anhydride (BLG-NCA) και L-Phenylalanine *N*-Carboxy Anhydride (PHE-NCA) περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

4.3.1 Σύνθεση και καθαρισμός του *N^{im}*-trityl-L-Histidine NCA (*N^{im}*-Trt-L-HIS NCA) [42]

Σύμφωνα με προηγούμενη δημοσίευση της εργαστηριακής μας ομάδας, η σύνθεση του μονομερούς *N^{im}*-Trt-HIS NCA πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Το πρώτο συνθετικό στάδιο περιλαμβάνει τη σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος του *N^{im}*-Trt-HIS NCA (*N^{im}*-Trt-HIS-NCA·HCl) το οποίο ακολουθείται από την απομάκρυνση του HCl προκειμένου να ληφθεί το καθαρό μονομερές. Για τη σύνθεση χρησιμοποιείται θειόνυλο χλωρίδιο αντι του τριφωσγενίου σε μια τροποποιημένη πορεία (Σχήμα 16). [130, 149]



Σχήμα 16: Πειραματική πορεία για τη σύνθεση του *N^{im}*-Trt-L-His NCA.

Σύνθεση του υδροχλωρικού άλατος του *N^{im}*-Trt-HIS NCA (*N^{im}*-Trt-HIS-NCA·HCl)

Σε δύλαιμη σφαιρική φιάλη των 500 mL, η οποία περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα, προστίθενται 10 g (20,1 mmol, MB=497,58 g mol⁻¹) της πρόδρομης ένωσης Boc-HIS(Trt)-OH. Ακολούθως, η φιάλη προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού (HVL) και το στερεό αφήνεται για ξήρανση για μία ημέρα. Την επόμενη μέρα, αποστάζονται στη σφαιρική φιάλη περίπου 150 mL καθαρού THF δίνοντας ένα διαυγές και ελαφρώς

υποκίτρινο διάλυμα. Στη συνέχεια, η φιάλη απομακρύνεται από τη γραμμή υψηλού κενού και μεταφέρεται στον απαγωγό, όπου προετοιμάζεται η πειραματική διάταξη για την αντίδραση σύνθεσης του υδροχλωρικού άλατος του *N^{im}*-Ttt-L-His NCA. Η φιάλη τοποθετείται σε παγόνερο (0 °C), ώστε να επιβραδυνθούν πιθανές παράπλευρες αντιδράσεις, και στη μία είσοδο της προσαρμόζεται κατάλληλο επίθεμα για συνεχή παροχή αργού και bubbler για έλεγχο της ροής του, ενώ στη δεύτερη είσοδο της φιάλης προσαρμόζεται γυάλινο σταγονομετρικό χωνί που διαθέτει στρόφιγγα. Παράλληλα, σε βαθμονομημένη αμπούλα, η οποία έχει υποστεί ξήρανση με φλόγα, αποστάζονται 1,7 mL απαερωμένου SOCl₂ (23,44 mmol) το οποίο χρησιμοποιείται ως μέσο κυκλοποίησης κατά την αντίδραση σχηματισμού του δακτυλίου του NCA. Το περιεχόμενο της αμπούλας αποστάζεται στη σφαιρική των 50 mL στην οποία έχουν προηγουμένως αποσταχθεί περίπου 20 mL καθαρού THF και το προκύπτον διάλυμα μεταγγίζεται στο σταγονομετρικό χωνί της συσκευής. Η προσθήκη του αραιωμένου SOCl₂ στη φιάλη της BOC-His(Ttt)-OH γίνεται στάγδην και υπό συνεχή και έντονη ανάδευση για περίπου 20 λεπτά. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη του αντιδραστήριου, το σταγονομετρικό χωνί απομακρύνεται από τη διάταξη, η φιάλη πωματίζεται και η αντίδραση αφήνεται για 2,5 ώρες υπό ανάδευση. Παρατηρείται ότι μόλις η αντίδραση ολοκληρωθεί, το διάλυμα αρχίζει να αποκτά ιξώδες και το χρώμα του από υποκίτρινο γίνεται πορτοκαλί. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται λήψη φασμάτων FT-IR, έτσι ώστε να παρακολουθείται η πρόοδος της. Στο σημείο αυτό, στη φιάλη της αντίδρασης υπάρχουν ο *N^{im}*-Ttt-L-His NCA, το υδροχλωρικό άλας του NCA (*N^{im}*-Ttt-L-His NCA·HCl) και ποσότητα της αρχικής πρόδρομης ένωσης BOC-His(Ttt)-OH που δεν έχει αντιδράσει.

Για να διαχωρισθεί το επιθυμητό προϊόν από τα παραπροϊόντα, προστίθενται στη φιάλη περίπου 1 L διαιθυλαιθέρα και αμέσως παρατηρείται καταβύθιση του υδροχλωρικού άλατος του NCA το οποίο αποτελεί το κύριο προϊόν της αντίδρασης. Στον διαιθυλαιθέρα παραμένει διαλυτή η μικρή ποσότητα της πρόδρομης ένωσης της ιστιδίνης και η περίσσεια του SOCl₂, οι οποίες διαχωρίζονται από το *N^{im}*-Ttt-L-His NCA·HCl και την ποσότητα του *N^{im}*-Ttt-L-His NCA που έχει σχηματισθεί, μέσω διήθησης υπό κενό σε φίλτρο πεφρυγμένης υάλου (por4). Η διήθηση πραγματοποιείται υπό αδρανείς συνθήκες με συνεχή παροχή αργού, έτσι ώστε να μην έρθει σε επαφή με την υγρασία. Το διήθημα απορρίπτεται, ενώ το υποκίτρινο στερεό που παραμένει στο φίλτρο συλλέγεται σε άδεια μονόλαιμη σφαιρική φιάλη 500 mL και αφήνεται για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Το διάλυμα αποχύνεται σε 2 L κρύου διαιθυλαιθέρα οδηγώντας σε

καταβύθιση του N^{im} -Trt-L-HIS-NCA·HCl που είναι και το κύριο προϊόν της αντίδρασης. Τελικά, το στερεό απομονώνεται μέσω διήθησης υπό κενό σε φίλτρο πεφρυγμένης υάλου (por4) κάτω από συνεχή παροχή αργού. Το υποκίτρινο στερεό που παραμένει στο φίλτρο συλλέγεται σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη 500 mL και αφήνεται για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα. Για περαιτέρω καθαρισμό του προϊόντος, πραγματοποιούνται ανακρυσταλλώσεις σε EtOAc. Αρχικά, αποστάζονται 250 mL καθαρού EtOAc στη φιάλη που περιέχει το στερεό σχηματίζοντας ένα κιτρινωπό γαλάκτωμα. Η φιάλη απομακρύνεται από τη HVL και μεταφέρεται στον απαγωγό όπου τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 45 °C για περίπου μία ώρα. Στη συνέχεια, η φιάλη τοποθετείται σε παγόνερο (0 °C) για περίπου 1h ακόμα, οδηγώντας σε πλήρη καταβύθιση του N^{im} -Trt-L-His NCA·HCl με τη μορφή ιζήματος, ενώ ο N^{im} -Trt-L-His NCA παραμένει διαλυτός στον EtOAc. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό σε φίλτρο πεφρυγμένης υάλου (por4) με συνεχή ροή αργού και το στερεό (N^{im} -Trt-L-His NCA·HCl) που έχει παραμείνει στο φίλτρο συλλέγεται σε προζυγισμένη μονόλαιμη σφαιρική φιάλη 100 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού για μία νύχτα.

Σύνθεση του μονομερούς N^{im} -Trt-L-HIS NCA

Την επόμενη ημέρα, ζυγίζεται η φιάλη με το ξηρό πλέον στερεό (6,22 g, 13,52 mmol), μεταφέρεται σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη 500 mL και αποστάζονται 200 mL καθαρού EtOAc. Έπειτα, η φιάλη απομακρύνεται από την HVL, μεταφέρεται στον απαγωγό και τοποθετείται σε υδατόλουτρο (25 °C) όπου αφήνεται υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, προστίθεται ισομοριακή ποσότητα τριαιθυλαμίνης (Et_3N), έτσι ώστε να δεσμευτεί το HCl από το άλας του NCA, δίνοντας το τελικό προϊόν του καθαρού N^{im} -Trt-L-His NCA. Κατά τη διαδικασία αυτή, σε καθαρή σφαιρική φιάλη των 50 mL, στην οποία έχει γίνει ξήρανση με φλόγα, αποστάζονται περίπου 20 mL καθαρού EtOAc μέσω της γραμμής υψηλού κενού. Σε αυτό τον όγκο διαλύτη θα πραγματοποιηθεί αραίωση της ποσότητας Et_3N , ενώ παράλληλα, αποστάζεται η ποσότητα καθαρής Et_3N σε κατάλληλη αμπούλα (1,88 mL, 13,52 mmol, MB=101,19 g mol⁻¹, d=0,7255 g/mL). Η φιάλη που περιέχει το υδροχλωρικό άλας του NCA τοποθετείται σε παγόνερο (0 °C), ενώ προσαρμόζονται σε αυτή με χρήση κατάλληλων επιθεμάτων συνεχής παροχή αργού με bubbler και γυάλινο σταγονομετρικό χωνί με στρόφιγγα. Το διάλυμα της Et_3N μεταγγίζεται στο σταγονομετρικό χωνί και η προσθήκη του διαλύματος γίνεται στάγδην και υπό συνεχή και έντονη ανάδευση για περίπου 30 λεπτά.

Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης, παρατηρείται χαρακτηριστική αλλαγή του χρώματος του διαλύματος που είναι ενδεικτική του σχηματισμού του τελικού προϊόντος. Το υδροχλωρικό άλας της τριαιθυλαμίνης ($\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$) που προκύπτει ως παραπροϊόν είναι αδιάλυτο στον EtOAc (σχηματισμός ιζήματος), ενώ ο N^{im} -Ttt-His NCA παραμένει διαλυτός. Συνεπώς, ο διαχωρισμός των δύο ενώσεων πραγματοποιείται μέσω διήθησης υπό κενό σε χωνί Buchner με φίλτρο πεφρυγμένης υάλου por4. Το διήθημα που περιέχει τον καθαρό πλέον N^{im} -Ttt-His NCA, καταβυθίζεται σε 2 L εξανίου και διηθείται ξανά από γυάλινο φίλτροpor 4 υπό συνεχή παροχή αργού. Επίσης πραγματοποιείται μια δεύτερη ανακρυστάλλωση σε EtOAc -εξάνιο σε αναλογία 1:5 και το λευκό στερεό απομονώνεται μέσω διήθησης και συλλέγεται σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη και αφήνεται για ξήρανση στη HVL για μία ημέρα. Την επόμενη ημέρα, η φιάλη μεταφέρεται στο glove box, όπου ζυγίζεται και στη συνέχεια φυλάσσεται το μονομερές (4,9 g, 11,57 mmol, $\text{MB}=423,72 \text{ g mol}^{-1}$). Η απόδοση του προϊόντος ήταν 58% ενώ η επιτυχής του σύνθεση επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ και FT-IR. Η συνθετική πορεία για τον σχηματισμό του N^{im} -Ttt-L-His NCA συνοψίζεται στο Σχήμα 16.

4.3.2 Σύνθεση και καθαρισμός του γ -Benzyl-L-Glutamate NCA (BLG-NCA) [42, 174]

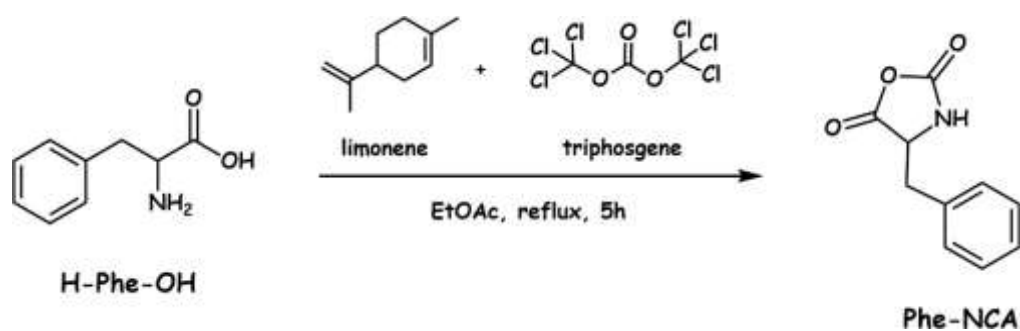
Αρχικά, 12,9305g της πρόδρομης ένωσης H-Glu(OBzl)-OH (54,5 mmol, $\text{MB}=237,25 \text{ g mol}^{-1}$) προστίθενται σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη 1 L, η οποία περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα. Η φιάλη με την πρόδρομη ένωση προσαρμόζεται στην HVL και το στερεό αφήνεται προς ξήρανση για μια ημέρα. Την επόμενη ημέρα, αποστάζονται περίπου 300 mL καθαρού EtOAc . Ο συγκεκριμένος διαλύτης επιλέχθηκε διότι το πρόδρομο αμινοξύ είναι αδιάλυτο σε αυτόν, ενώ ο N -καρβοξυ ανυδρίτης είναι διαλυτός. Έτσι, υπάρχει μια ένδειξη για την πρόοδο της αντίδρασης. Παρατηρείται ότι το πρόδρομο αμινοξύ βρίσκεται υπό μορφή λευκού αιωρήματος στον συγκεκριμένο διαλύτη. Στη συνέχεια, η φιάλη μεταφέρεται στον απαγωγό όπου προετοιμάζεται η πειραματική διάταξη για την αντίδραση σύνθεσης του BLG NCA. Στη μία είσοδο της φιάλης προσαρμόζεται κατάλληλο επίθεμα για συνεχή παροχή αργού και bubbler, ενώ στη δεύτερη είσοδο της φιάλης τοποθετείται κατακόρυφος ψυκτήρας και γυάλινο σταγονομετρικό χωνί που διαθέτει στρόφιγγα. Ακολούθως, υπό αδρανείς συνθήκες, προστίθενται 18 mL λιμονενίου (111,1 mmol, $\text{MB}=136,24 \text{ g mol}^{-1}$, $d=0,8411 \text{ g/ml}$, 2eq) το οποίο λειτουργεί ως μέσο δέσμευσης του παραγόμενου υδροχλωρίου. Παράλληλα, σε άλλη σφαιρική φιάλη των 100 mL, αποστάζονται περίπου 40 mL καθαρού EtOAc και σε αυτά διαλυτοποιούνται 10 g τριφωσγενίου (33,7 mmol, $\text{MB}=296,75 \text{ g/mol}$, 0,6 eq) το οποίο χρησιμοποιείται ως

μέσο κυκλοποίησης κατά την αντίδραση σχηματισμού του δακτυλίου του NCA. Το διάλυμα μεταγγίζεται στο σταγονομετρικό χωνί της συσκευής και ακολουθεί προσθήκη του στη φιάλη του H-Glu(OBzl)-OH. Η προσθήκη γίνεται στάγδην και υπό συνεχή έντονη ανάδευση για περίπου 15 λεπτά. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη του αντιδραστηρίου, το σταγονομετρικό χωνί αποσπάται από τη διάταξη, η φιάλη πωματίζεται και το διάλυμα διατηρείται υπό επαναροή για 5 ώρες στους 75 °C σε ελαιόλουτρο ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Το διάλυμα, όπως αναμενόταν, ήταν αρχικά ένα θολό λευκό αιώρημα, σταδιακά όμως παρατηρείται ομογενοποίηση και διαύγασή του, γεγονός που αποτελεί ένδειξη της επιτυχούς σύνθεσης του BLG-NCA. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται λήψη φασμάτων FT-IR, έτσι ώστε να παρακολουθείται η πρόοδος της. Μετά το πέρας των πέντε ωρών, το περιεχόμενο της φιάλης ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και διηθείται υπό κενό σε χωνί Buchner προς απομάκρυνση τυχόν στερεών προσμίξεων. Ακολουθεί το στάδιο καθαρισμού του μονομερούς μέσω εκχυλίσεων προς απομάκρυνση του παραγόμενου HCl, της πρόδρομης ένωσης που δεν έχει αντιδράσει, της περίσσειας του τριφωσγενίου και του λιμονενίου, αλλά και του υδροχλωρικού άλατος του αρχικού αμινοξέος που έχει σχηματισθεί. Το διάλυμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη των 2 L και πραγματοποιούνται τρεις εκχυλίσεις. Αρχικά, εκχυλίζεται με παγωμένο υδατικό διάλυμα NaCl 10% (250 mL), κατόπιν με παγωμένο διάλυμα NaCl 10%-K₂CO₃ 0.5% (250 mL, 2 φορές), έως ότου επιτευχθεί ουδέτερο pH. Στη συνέχεια, λαμβάνεται η οργανική φάση του EtOAc και ξηραίνεται με μικρή ποσότητα ενεργοποιημένου MgSO₄. Η οργανική φάση που λαμβάνεται διηθείται υπό κενό σε χωνί Buchner με γυάλινο φίλτρο por3 προς απομάκρυνση του ξηραντικού μέσου (MgSO₄) και το διήθημα συλλέγεται σε δίλιμη φιάλη. Η φιάλη μεταφέρεται στη HVL και ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύτη με απόσταξη του σε γειτονική σφαιρική φιάλη μέχρι ξηρού. Το προκύπτον στερεό αφήνεται για ξήρανση για μία νύχτα. Για τον περαιτέρω καθαρισμό του μονομερούς πραγματοποιούνται δύο ανακρυσταλλώσεις. Αρχικά, αποστάζονται 200 mL EtOAc στη φιάλη του BLG-NCA προς διαλυτοποίησή του. Έπειτα, η φιάλη μεταφέρεται στον απαγωγό και υπό ροή αργού καταβυθίζεται σε δίλιμη φιάλη που περιέχει 1 L εξάνιο. Το αιώρημα διηθείται υπό κενό με γυάλινο φίλτρο por 4 υπό ροή αργού και το στερεό που παραμένει στο φίλτρο συλλέγεται σε σφαιρική 250 mL και αφήνεται για ξήρανση στη HVL για μία ημέρα. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά και το τελικό στερεό ζυγίζεται και φυλάσσεται στο glove box (10,41g, 39,5mmol, MB=263,25 g mol⁻¹). Η απόδοση του προϊόντος υπολογίστηκε 80,5%.

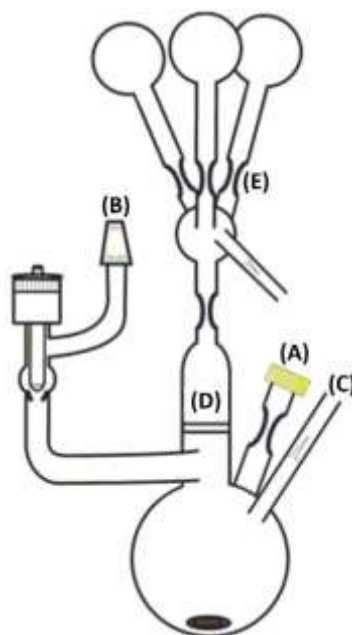
και σταγονομετρικό χωνί για τη διαδοχική προσθήκη των αντιδραστηρίων. Σε θερμοκρασία 25 °C και υπό ροή αργού προστέθηκαν στη φιάλη 19,6 mL (0,121 mol) λιμονενίου (αντιδραστήριο δέσμευσης του παραγόμενου υδροχλωρίου) σε μία δόση με την βοήθεια κατάλληλης πιπέτας. Στη συνέχεια, σε καθαρή σφαιρική φιάλη αποστάχθηκαν μέσω της γραμμής υψηλού κενού 40 mL καθαρού οξικού αιθυλεστέρα. Η φιάλη πληρώθηκε με αργό και μέσα προστέθηκαν 8,98 g (30,262 mmol) τριφωσγενίου. Η προσθήκη του διαλύματος του τριφωσγενίου στη φιάλη με το διάλυμα του πρόδρομου αμινοξέος γίνεται στάγδην και υπό συνεχή έντονη ανάδευση σε χρόνο περίπου 20 min, στους 40 °C. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη του αντιδραστηρίου, το σταγονομετρικό χωνί αποσπάται από τη διάταξη, η φιάλη πωματίζεται και το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι να επιτευχθεί επαναρροή του διαλύτη με χρήση υδατόλουτρου (70-75 °C). Το διάλυμα διατηρείται υπό επαναρροή για 4,5 ώρες, ώστε να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης γίνεται λήψη φασμάτων FT-IR, έτσι ώστε να παρακολουθείται η πρόοδος της. Πρώτη ένδειξη σχηματισμού του *N*-καρβοξυ ανυδρίτη αποτέλεσε η αλλαγή από λευκό γαλάκτωμα σε υποκίτρινο διαυγές διάλυμα κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της αντίδρασης. Μετά το πέρας των 4,5 ωρών η φιάλη ψύχεται με παγόνερο στους 0 °C και ακολουθεί το στάδιο καθαρισμού μέσω εκχυλίσεων προς απομάκρυνση του παραγόμενου HCl, της πρόδρομης ένωσης που δεν έχει αντιδράσει αλλά και του υδροχλωρικού άλατος του αρχικού αμινοξέος που έχει σχηματισθεί. Το διάλυμα μεταφέρεται σε διαχωριστική χοάνη των 2 L. Αρχικά εκχυλίζεται με παγωμένο (0 °C) υδατικό διάλυμα NaCl 6% και έπειτα με υδατικό διάλυμα NaCl 6% και K₂CO₃ 0.5% (500 mL) έως ότου επιτευχθεί ουδέτερο pH. Στη συνέχεια, λαμβάνεται η οργανική στιβάδα και ξηραίνεται με ενεργοποιημένο MgSO₄ το οποίο προηγουμένως είχε μπει στον φούρνο στους 150 °C. Η συσκευή ανακρυστάλλωσης (Σχήμα 20) ξηραίνεται στη γραμμή υψηλού κενού, μέσω του επιθέματος στη θέση (B). Στην συνέχεια, και ενώ η συσκευή έχει στατικό κενό, πραγματοποιείται διήθηση του διαλύματος μέσα στη συσκευή, μέσω ηθμού πεφρυγμένης υάλου στη θέση (A). Το διάλυμα ψύχεται με υγρό άζωτο, και με σύντηξη στη στένωση απομακρύνεται το τμήμα (A), από το οποίο έγινε η διήθηση. Ο διαλύτης αποστάζεται σε γειτονική φιάλη και το μονομερές αφήνεται για ξήρανση στη γραμμή υψηλού κενού όλη νύχτα.

Την επόμενη μέρα ακολουθεί η διαδικασία του καθαρισμού του *N*-καρβοξυανυδρίτη με σύστημα διαλύτη/μη διαλύτη. Συγκεκριμένα, στο στερεό προστίθεται ελάχιστη ποσότητα οξικού αιθυλεστέρα (διαλύτη) μέσω της γραμμής υψηλού κενού, περίπου 80 mL, ικανής

να διαλύσει το μονομερές. Εφόσον ο *N*-καρβόξυ ανυδρίτης της φαινυλαλανίνης διαλυθεί πραγματοποιείται απόσταξη εξανίου (μη διαλύτη), μέσω της γραμμής, ποσότητα πενταπλάσια (ή μεγαλύτερη) της ποσότητας του διαλύτη (~400 mL). Το μονομερές καταβυθίζεται κατά την ολοκλήρωση της απόσταξης και η συσκευή τοποθετείται σε θερμοκρασία -20 °C για μία νύχτα για ποσοτική καταβύθιση. Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται διήθηση, μέσω του ηθμού πεφρυγμένης υάλου στη θέση (D) της συσκευής, σε παρακείμενη φιάλη η οποία διατηρείται παγωμένη με την βοήθεια υγρού αζώτου και έπειτα απομακρύνεται με σύντηξη στη στένωση στο σημείο (E). Η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού και το μονομερές αφήνεται για ξήρανση για περίπου δύο ώρες. Η ανακρυστάλλωση επαναλαμβάνεται για ακόμη δύο φορές μέσα στις επόμενες δύο ημέρες και κάθε φορά απομακρύνεται μία φιάλη με σύντηξη. Μόλις η διαδικασία των ανακρυσταλλώσεων ολοκληρωθεί η συσκευή μεταφέρεται στο θάλαμο αδρανούς ατμόσφαιρας (glove box), όπου ζυγίζεται το στερεό και φυλάσσεται ο τελικός PHE-NCA. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία υπέρυθρου (FT-IR). Η συνολική ποσότητα που ζυγίστηκε ήταν 7,7 gr (40,27 mmol) και η απόδοση της αντίδρασης είναι 66%.



Σχήμα 19: Αντίδραση σύνθεσης του ανυδρίτη της φαινυλαλανίνης (PHE-NCA).



Σχήμα 20: Σχηματική αναπαράσταση της συσκευής ανακρυσταλλώσεων του *N*-καρβόξυ ανυδρίτη της φαινυλαλανίνης (PHE-NCA).

4.4 Σύνθεση Πολυμερών

Όλα τα πολυμερή συντέθηκαν με τη διαδικασία του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (Ring Opening Polymerization, ROP) των αντίστοιχων *N*-καρβόξυ ανυδριτών (NCAs) χρησιμοποιώντας απαρχητές που φέρουν αμινομάδες με ενεργά πρωτόνια ικανά να εκκινήσουν πολυμερισμό. Τεχνικές υψηλού κενού έλαβαν χώρα για τη λήψη καλά καθορισμένων πολυμερών, εξασφαλίζοντας την απομάκρυνση ακαθαρσιών και προσμίξεων που θα οδηγούσαν σε μη ελεγχόμενες αντιδράσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι όλες οι αντιδράσεις πολυμερισμού διεξήχθησαν σε ειδικά σχεδιασμένες συσκευές με τεχνικές υαλουργίας. Οι συσκευές αποτελούνται από μία σφαιρική φιάλη στην οποία πραγματοποιείται ο πολυμερισμός, στρόφιγγα υψηλού κενού, αμπούλες σχήματος «Π» που διαθέτουν γυάλινους υμένες (break seals) και μαγνήτες για τη θραύση τους (breakers), στις οποίες τοποθετούνται τα μονομερή. [132, 171]

Τα πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία παραδίδονται στον Πίνακα 4, ενώ οι συνθετικές πορείες όλων των ομοπολυμερών και συμπολυμερών που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη πειραματική προσπάθεια περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

Πίνακας 4: Μοριακά χαρακτηριστικά των αμφίφιλων υβριδικών πολυμερών που χρησιμοποιήθηκαν

Πολυμερές	$M_n \text{ total} \times 10^{-3}$ (g/mol)	$M_n \text{ PEO} \times 10^{-3}$ (g/mol)	$M_n \text{ PHIS} \times 10^{-3}$ (g/mol)	$M_n \text{ PBLG} \times 10^{-3}$ (g/mol)	$M_n \text{ PPHE} \times 10^{-3}$ (g/mol)	D
PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHIS ₂₂	13,0	10,0	3,0	-	-	1,12
PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHIS ₄₄	16,0	10,0	6,0	-	-	1,16
PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHIS ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₅	14,7	10,0	4,0	-	0,7	1,14
PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHIS ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₁₀	15,5	10,0	4,0	-	1,5	1,13
PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHIS ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₁₀	15,2	10,0	3,0	2,2	-	1,14
PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHIS ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₂₀	17,4	10,0	3,0	4,4	-	1,15
PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHIS ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₄₀	21,8	10,0	3,0	8,8	-	1,13

4.4.1 Σύνθεση του συμπολυμερούς Poly(Ethylene Oxide)₂₂₈-*block*-Poly(L-Histidine)_n (PEO₂₂₈-*b*-PHIS_n)

Ο πολυμερισμός πραγματοποιήθηκε σε ειδικά σχεδιασμένη συσκευή (Σχήμα 21) που διαθέτει στρόφιγγα υψηλού κενού (C) για την περιοδική απελευθέρωση του παραγόμενου διοξειδίου του άνθρακα (CO₂), μια σφαιρική φιάλη των 250 mL για την διεξαγωγή της αντίδρασης, (A) έναν γυάλινο υμένα (G) και μια αμπούλα (F) για την προσθήκη του μονομερούς.

Ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου του συντιθέμενου *N*^{im}-*Trt*-HIS NCA πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο μεθόξυ πολύ(αιθυλενοξειδίο) με αμινομάδα (*m*PEO-NH₂) ως μακροαπαρχητή και διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF) ως διαλύτη πολυμερισμού.

Συντέθηκαν δύο συμπολυμερή του τύπου PEO₂₂₈-*b*-PHIS_n, ένα με 22 δομικές μονάδες ιστιδίνης ($M_n \text{ PHIS} = 3 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$) και ένα με 44 δομικές μονάδες ιστιδίνης ($M_n \text{ PHIS} = 6 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$). Ενδεικτικά περιγράφεται η πορεία σύνθεσης PEO₂₂₈-*b*-PHIS₄₄.

Αρχικά, η συσκευή προσαρμόστηκε στη γραμμή υψηλού κενού μέσω ειδικού εσφυρίσματος (B) και ελέγχεται για μικροοπές με χρήση του πηνίου Tesla, απερώνεται και ξηραίνεται ενδελεχώς στη γραμμή υψηλού κενού (HVL) με τη χρήση φλόγας (flame-drying). Ακολούθως, 1 g (0.1 mmol) του μακροαπαρχητή *m*PEO-NH₂ ($M_n = 10 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$) προστέθηκε στη φιάλη (A) και αφέθηκε για ξήρανση όλη νύχτα στη γραμμή υψηλού κενού. Εν συνεχεία, αποστάζεται μικρή ποσότητα καθαρού βενζολίου στη συσκευή. Με αυτόν τον τρόπο, γίνεται απομάκρυνση κάθε ίχνους υγρασίας από το

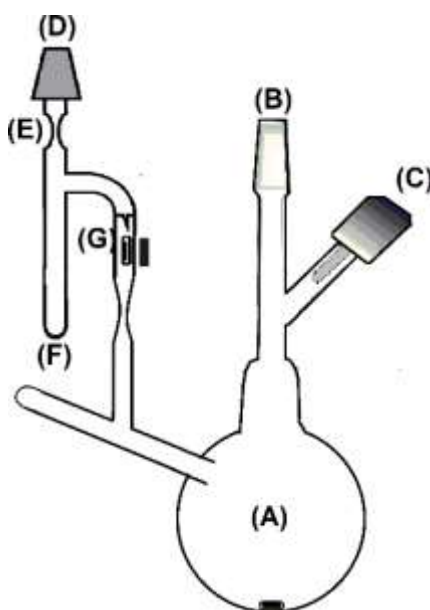
mPEO-NH₂, διότι το βενζόλιο έχει την ικανότητα να σχηματίζει αζεοτροπικό μείγμα με το H₂O και συνεπώς η υγρασία απομακρύνεται εύκολα από τη συσκευή, καθώς η ποσότητα του διαλύτη αποστάζεται σε γειτονική φιάλη. Η υψηλή καθαρότητα τόσο του μακροαπαρχητή όσο και των μονομερών κρίνεται απαραίτητη για τον ελεγχόμενο χαρακτήρα του πολυμερισμού και για την αποφυγή παράπλευρων αντιδράσεων. Μόλις ληφθεί η απαραίτητη ποσότητα, το διάλυμα μένει υπό συνεχή ανάδευση στους 35 °C για μισή ώρα (επαναρροή), έτσι ώστε να διαλυθεί πλήρως το mPEO-NH₂. Στη συνέχεια, η ποσότητα του βενζολίου αποστάζεται σε γειτονική κενή σφαιρική φιάλη. Στη φιάλη του πολυμερισμού έχει πλέον απομείνει το καθαρό από υγρασία mPEO-NH₂, το οποίο αφήνεται προς ξήρανση στη HVL για μία νύχτα.

Ακολούθως, αποστάζονται περίπου 15 mL καθαρού DMF στη συσκευή του πολυμερισμού, απορρίπτοντας τα πρώτα κλάσματά του γειτονική σφαιρική φιάλη. Για να διευκολυνθεί η διαλυτοποίηση του μακροαπαρχητή, η φιάλη παραμένει υπό ανάδευση στους 35 °C, έτσι ώστε να προκύψει ένα διαυγές και άχρωμο διάλυμα. Έπειτα, η συσκευή προσαρμόζεται στην HVL από την πλευρά της αμπούλας (F) μέσω του ειδικού εσμιρίσματος (D) και αφού απαερωθεί και ξηραθεί με φλόγα το συγκεκριμένο τμήμα της, μεταφέρεται στο glove box όπου φυλάσσονται τα μονομερή (NCAs) και προστίθενται 1.8527 g of *N^{im}-Trt*-HIS NCA (4.4 mmol, M_n = 423.46 g mol⁻¹) στην αμπούλα.

Η συσκευή προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού από πλευρά της αμπούλας. Ακολούθως, η αμπούλα απαερώνεται και αποστάζονται 15 mL καθαρού DMF προκειμένου να διαλυτοποιηθεί το μονομερές πριν γίνει η προσθήκη του στο διάλυμα του μακροαπαρχητή. Όσο ακόμα το διάλυμα είναι παγωμένο, η αμπούλα συντήκεται με φλόγα στη θέση (E), ώστε να παραμείνει υπό κενό, και η συσκευή απομακρύνεται από τη HVL. Μετά την πλήρη διάλυση του μονομερούς στο DMF, πραγματοποιείται θραύση του γυάλινου υμένα της αμπούλας (G) με τη βοήθεια κατάλληλου μαγνήτη και το περιεχόμενό της αποχύνεται ποσοτικά και υπό συνεχή ανάδευση στη φιάλη πολυμερισμού, ώστε να εκκινήσει ο πολυμερισμός και να αντιδράσουν ταυτόχρονα όλα τα μόρια του απαρχητή με το μονομερές.

Με την έναρξη του πολυμερισμού ξεκινά και η παραγωγή CO₂ από το διάλυμα υπό μορφή φυσαλίδων, το οποίο αποτελεί την κινητήρια δύναμη για τη διάδοση του πολυμερισμού. Έτσι, ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, η συσκευή απαερώνεται στη HVL ανοίγοντας τη στρόφιγγα με σκοπό να απομακρυνθεί

το διοξείδιο του άνθρακα που έχει παραχθεί και έτσι η ισορροπία της αντίδρασης να μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση παραγωγής του πολυπεπτιδίου. Το διάλυμα παραμένει υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι να καταναλωθεί πλήρως το μονομερές. Παρατηρείται ότι με την πάροδο των ημερών που διεξάγεται ο πολυμερισμός το διάλυμα μετατρέπεται σταδιακά από διαυγές κίτρινο σε λευκό-υποκίτρινο και μη διαυγές, γεγονός που αποτελεί ένδειξη για την επιτυχή σύνθεση της πρώτης πολυπεπτιδικής συστάδας. Η έλλειψη παραγωγής CO₂ αποτελεί ένδειξη τερματισμού της αντίδρασης. Παρόλα αυτά η πορεία του πολυμερισμού παρακολουθείται μέσω φασματοσκοπίας FT-IR. Μετά την πλήρη κατανάλωση του μονομερούς (5 ημέρες) το -trityl προστατευμένο συμπολυμερές καταβυθίζεται σε κρύο διαιθυλαιθέρα και το στερεό απομονώνεται μέσω διήθησης υπό κενό σε χωνί Buchner με χρήση υδρόφοβου φίλτρου PTFE 0,45μm. Το λευκό στερεό που συλλέγεται, μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη των 50 mL και αφήνεται προς ξήρανση στη HVL για μία νύχτα. Μετά την ξήρασή του, το τελικό προστατευμένο πολυμερές PEO₂₂₈-b-P(N^{im}-Trt-HIS)₄₄ ζυγίζεται (0,923 g).

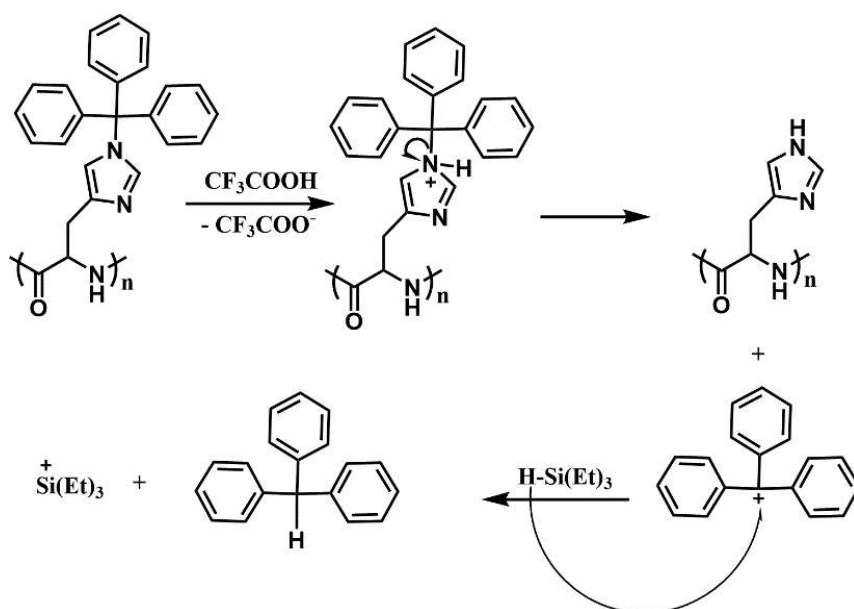


Σχήμα 21: Ειδικά σχεδιασμένη συσκευή για τη σύνθεση του PEO₂₂₈-b-PHIS_n.

Απομάκρυνση των -τρίτυλο (-Trt) προστατευτικών ομάδων της PHIS

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL που περιέχει ποσότητα πλήρως προστατευμένου πολυμερούς, προστίθενται 10 mL διχλωρομεθανίου (DCM) και σχηματίζεται ένα θολό διάλυμα ύστερα από έντονη ανάδευση 1h. Έπειτα, στη φιάλη προστίθενται 10 mL

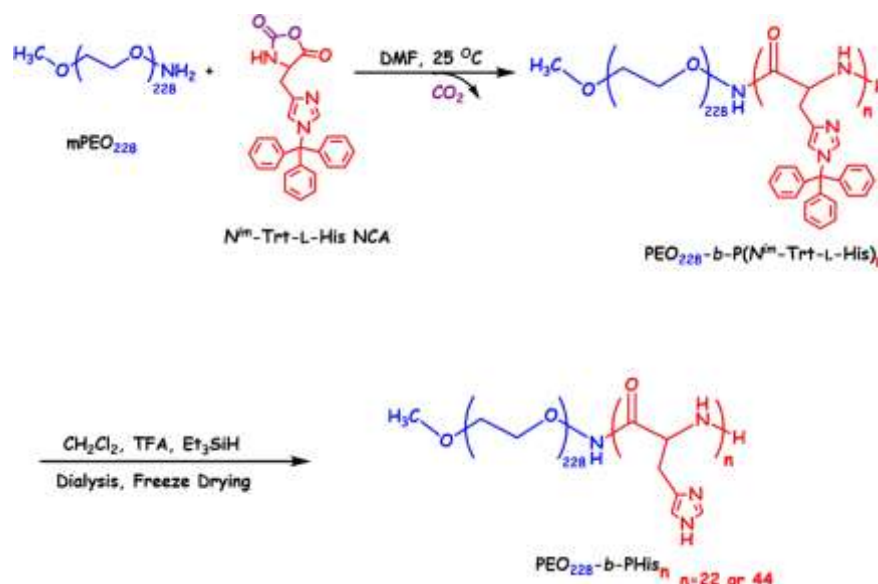
τριφθοροξικού οξέος (TFA) και το έντονο κίτρινο και διαυγές διάλυμα που προκύπτει αφήνεται υπό ανάδευση για 1h. Με την χρήση του TFA επιτυγχάνεται η απομάκρυνση των προστατευτικών τρίτυλο-ομάδων από τις δομικές μονάδες της πολυ(ιστιδίνης). Επιπλέον, για να εξασφαλιστεί ότι οι τρίτυλο ομάδες που έχουν αποκοπεί δεν θα επανασυνδεθούν στην πολυ(ιστιδίνη), καθώς παραμένουν στο διάλυμα ως καρβοκατιόντα, προστίθεται ισομοριακή ποσότητα τριαίθυλο σιλανίου ((Et)₃SiH), ως προς τις μονομερικές μονάδες της ιστιδίνης, για να τις δεσμεύσει, μέχρι ελαφρώς αποχρωματισμού του διαλύματος. Εν συνεχεία, η φιάλη της αντίδρασης προσαρμόζεται στη γραμμή υψηλού κενού σε ειδική διάταξη “short-path” προς απομάκρυνση των DCM και TFA σε κενή γειτονική φιάλη. Το στερεό που απομένει αφήνεται προς ξήρανση για μία νύχτα στη HVL.



Σχήμα 22: Μηχανισμός αποπροστασίας της P(Trt-L-His).

Στη συνέχεια, το πολυμερές διαλύεται σε 10 mL υπερκάθαρου νερού και αφήνεται υπό ανάδευση για 10-15 min. Το τριφαίνυλομεθάνιο παραμένει αδιάλυτο στο νερό και διαχωρίζεται από το πολυμερές με διήθηση υπό κενό σε χωνί Buchner με γυάλινο φίλτρο por3. Στο διήθημα ρυθμίζεται το pH στην τιμή ~5 με διάλυμα K_2CO_3 10% w/w, διότι αρχικά είναι πολύ όξινο (pH περίπου 1) και δεν είναι στα όρια ανοχής της μεμβράνης. Αμέσως μετά, το περιεχόμενο της φιάλης τοποθετείται με την βοήθεια πιπέτας σε κατάλληλη μεμβράνη διαπίδυσης (dialysis) (όριο αποκλεισμού μοριακών βαρών $\text{MWCO}=3,5\text{kDa}$), η οποία με τη σειρά της τοποθετείται υπό ανάδευση σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 2 L υπερκάθαρου νερού. Η διαδικασία της διαπίδυσης λαμβάνει χώρα για

την απομάκρυνση των υπολειμμάτων από το TFA και των τριτυλο-ομάδων από το πολυμερές διαμέσου των πόρων της μεμβράνης. Το pH του εξωτερικού διαλύματος ρυθμίζεται στην τιμή 2-3 με προσθήκη διαλύματος HCl 1 N. Με το πέρας 3h πραγματοποιείται αλλαγή του νερού με το ίδιο pH (2-3). Οι επόμενες αλλαγές γίνονται με υπερκάθαρο νερό με pH~10, το οποίο ρυθμίζεται με διάλυμα NaOH 1 N. Τις επόμενες ημέρες παρατηρείται μείωση του pH του νερού, οπότε πραγματοποιούνται διαδοχικές αλλαγές του ανά τακτές περιόδους με νέα ποσότητα και προσθήκη σταγόνων NaOH 1 N, μέχρι να παρατηρηθεί σταθεροποίηση του pH στην περιοχή 7-8. Όταν το pH σταθεροποιηθεί, γίνονται ακόμα δύο αλλαγές νερού με σκέτο νερό, ώστε να απομακρυνθεί τυχόν περίσσεια του NaOH. Η διαδικασία της διαπίδυσης διαρκεί 4 ημέρες και στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία της λυοφιλοποίησης (freeze-drying), για την εκδίωξη του νερού από το πολυμερές. Το αποπροστατευμένο πολυμερές PEO₂₂₈-*b*-PHIS₂₂, με τη μορφή λευκής σκόνης, ζυγίζεται (700 mg) και φυλάσσεται στο ψυγείο. Το Σχήμα 23 περιγράφει τη συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη λήψη του αποπροστατευμένου συμπολυμερούς PEO₂₂₈-*b*-PHIS_n.



Σχήμα 23: Στάδια σύνθεσης του αποπροστατευμένου συμπολυμερούς PEO₂₂₈-*b*-PHIS_n.

4.4.2 Σύνθεση του Poly(Ethylene Oxide)₁₂₈-*block*-Poly(L-Histidine)₂₂-*block*-Poly(γ -Benzyl-L-Glutamate)_n (PEO₂₂₈-*b*-PHIS₂₂-*b*-PBLG_n)

Για τις ανάγκες του πειράματος κρίθηκε απαραίτητη η σύνθεση τριών τριυσταδικών συμπολυμερών του τύπου PEO₂₂₈-*b*-PHIS₂₂-*b*-PBLG_n με διαφορετικά μοριακά βάρη PBLG. Πιο συγκεκριμένα συντέθηκαν τα PEO₁₂₈-*b*-PHIS₂₂-*b*-PBLG₁₀ (M_n PBLG = 2,192 x

10^3 g mol^{-1}), PEO₂₂₈-*b*-PHIS₂₂-*b*-PBLG₂₀ ($M_n \text{ PBLG} = 4,385 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$) και PEO₂₂₈-*b*-PHIS₂₂-*b*-PBLG₄₀ ($M_n \text{ PBLG} = 8,870 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$).

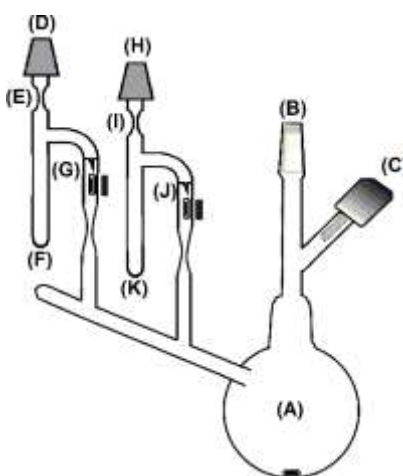
Το πρώτο συνθετικό μονοπάτι για το σχηματισμό του PEO₂₂₈-*b*-PHIS₂₉-*b*-PBLG_{*n*} περιλαμβάνει τη σύνθεση του δισυσταδικού συμπολυμερούς PEO₂₂₈-*b*-P(*N*^{*im*}-*Trt*-HIS)₂₉. Και σε αυτήν την περίπτωση ως μακροαπαρχητής χρησιμοποιείται το εμπορικά διαθέσιμο mPEO-NH₂ ($M_n \text{ PEO} = 10 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$) και το DMF ως διαλύτης πολυμερισμού. Ο πολυμερισμός επίσης έλαβε χώρα σε ειδικά σχεδιασμένη συσκευή με στρόφιγγα κενού (C) για την περιοδική απελευθέρωση του CO₂.

Η συσκευή αρχικά προσαρμόστηκε στη γραμμή υψηλού κενού μέσω του εσμιρίσματος (B) και πραγματοποιήθηκε απαέρωση και ξήρανση με τη χρήση φλόγας. Στη συνέχεια, ο μακροαπαρχητής mPEO-NH₂ προστέθηκε στη φιάλη (A) και αφέθηκε για ξήρανση όλη τη νύχτα στη γραμμή υψηλού κενού.

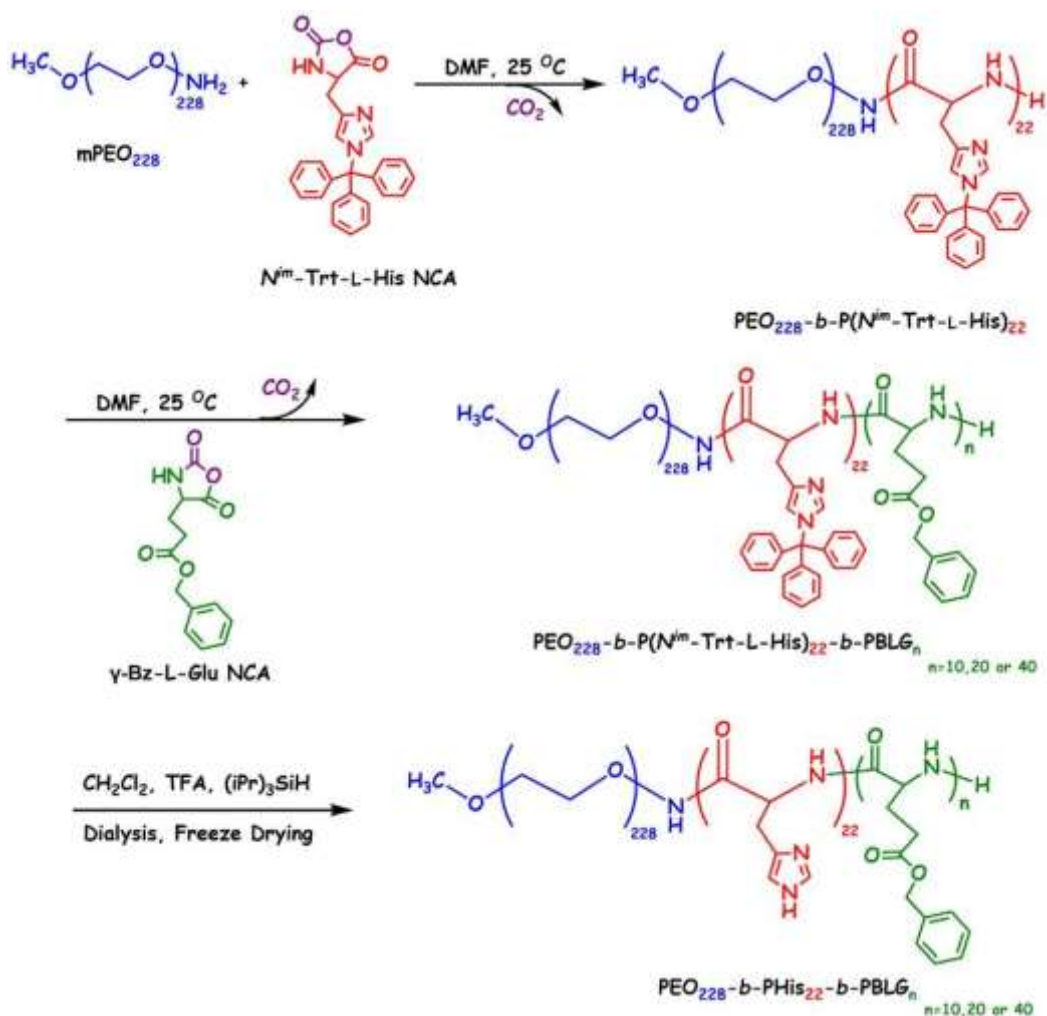
Στη συνέχεια, πολύ ξηρό βενζόλιο αποστάχθηκε στη συσκευή με αποτέλεσμα τη διάλυση του μακροαπαρχητή. Το διάλυμα αναδεύτηκε για 2 ώρες και στη συνέχεια το βενζόλιο εκδιώχθηκε μέσω απόσταξης σε γειτονική σφαιρική φιάλη μέχρι ξηρού. Μία ποσότητα εξαιρετικά καθαρού DMF αποστάχθηκε στη συσκευή ακολουθούμενη από διάλυση του μακροαπαρχητή.

Η συσκευή εισήχθη στο glove box όπου πραγματοποιήθηκε προσθήκη του μονομερούς *Trt*-HIS-NCA στην αμπούλα (F) η οποία φέρει ειδικό εσμίρισμα και σθένωση (D and E). Η συσκευή προσαρμόστηκε στη γραμμή υψηλού κενού μέσω του εσμιρίσματος της αμπούλας που περιέχει το μονομερές *Trt*-HIS-NCA. Αμέσως μετά, πραγματοποιήθηκε απαέρωση και απόσταξη DMF προς διάλυση του *N*-καρβόξυ ανυδρίτη. Στη συνέχεια, η συσκευή απομακρύνθηκε από τη γραμμή υψηλού κενού μέσω σύντηξης στη θέση (E). Μετά την πλήρη διαλυτοποίηση του *Trt*-HIS-NCA, το διάλυμα του μονομερούς προστέθηκε στο διάλυμα του απαρχητή, μέσω της θραύσης του γιάλινου υμένα της αμπούλας (G). Το διάλυμα αφέθηκε υπό έντονη ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, οδηγώντας στην εκκίνηση της αντίδρασης του πολυμερισμού. Η πλήρης κατανάλωση του μονομερούς επιβεβαιώθηκε μέσω φασματοσκοπίας FT-IR ύστερα από αφαίρεση ποσότητας του διαλύματος στο glove box. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, η συσκευή απεαerώνεται στη HVL ανοίγοντας τη στρόφιγγα (C) με σκοπό να απομακρυνθεί το διοξείδιο του άνθρακα που έχει παραχθεί κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου του NCA. Μετά την πλήρη κατανάλωση

του μονομερούς, ακολουθεί η προσθήκη του δεύτερου μονομερούς BLG-NCA στην δεύτερη αμπούλα (K) η οποία φέρει εσμίρισμα (H) και σθένωση (I), ακολουθούμενη από την απόσταξη DMF. Μετά την πλήρη διαλυτοποίηση του στερεού BLG-NCA, το διάλυμα προστέθηκε στον αντιδραστήρα (A) μέσω θραύσης του γυάλινου υμένα (J) εκκινώντας τον πολυμερισμό του γλουταμικού. Τελικά, το πολυμερές καταβυθίστηκε σε διεθυλαιθέρα και αφέθηκε για ξήρανση στην γραμμή υψηλού κενού. Στη συνέχεια ακολουθούν, η αποπροστασία των τρίτυλο προστατευτικών ομάδων της ιστιδίνης, η διαδικασία της διαπίδωσης καθώς και η διαδικασία της λυοφιλοποίησης όπως περιεγράφηκαν προηγουμένως.



Σχήμα 24: Ειδικά σχεδιασμένη συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των συμπολυμερών PEO_{228} -*b*-PHIS₂₂-*b*-PBLG_n (n=10, 20,40) και PEO_{228} -*b*-PHIS₂₉-*b*-PPHE_n (n=5, 10).



Σχήμα 25: Συνθετική πορεία των συμπολυμερών $\text{PEO}_{228}\text{-b-PHis}_{22}\text{-b-PBLG}_n$.

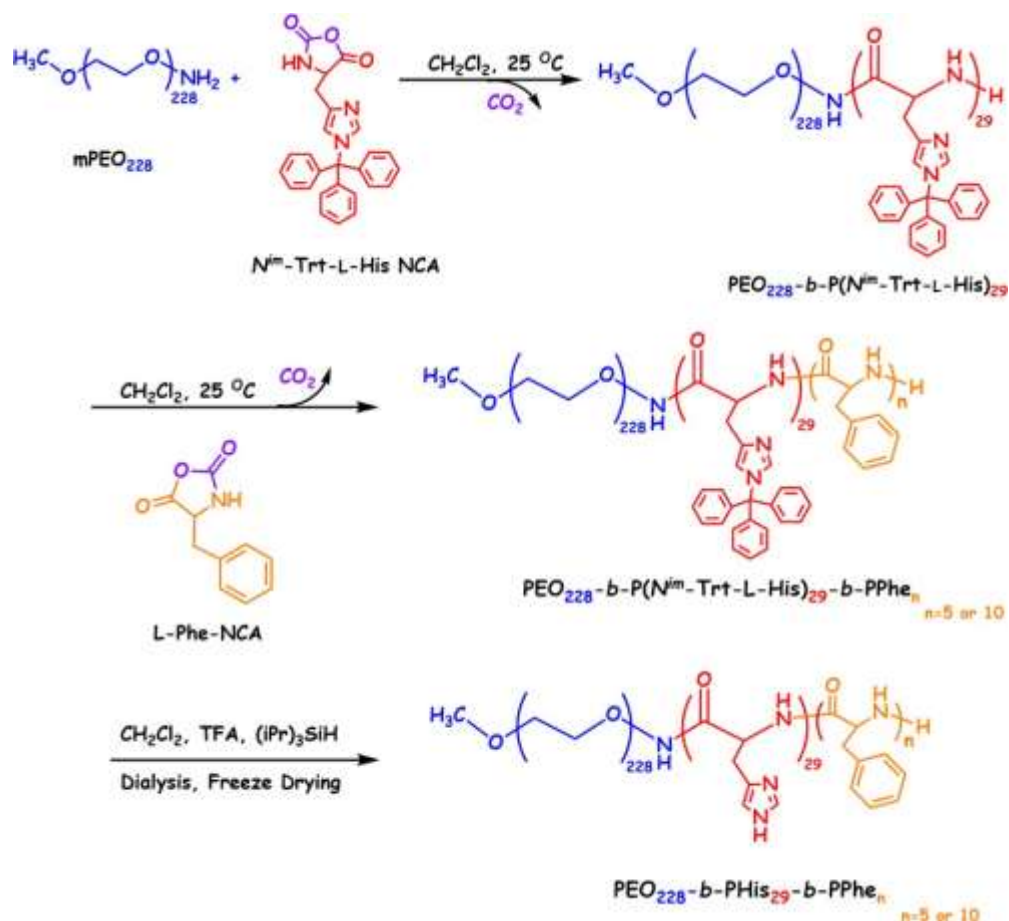
4.4.3 Σύνθεση γραμμικών κατά συστάδες συμπολυμερών $m\text{PEO}_{228}\text{-b-Poly}(\text{L-Histidine})_{29}\text{-b-Poly}(\text{L-Phenylalanine})_n$ ($\text{PEO}_{228}\text{-b-PHis}_{29}\text{-b-PPhe}_n$)

Η σύνθεση των δύο συμπολυμερών του τύπου PEO-b-PHis-b-PPhe με διαφορετικό μοριακό βάρος πολυφαινυλαλανίνης κάθε φορά και συγκεκριμένα με πέντε μονομερικές μονάδες στο πρώτο πολυμερές και δέκα στο δεύτερο συντέθηκαν στα πλαίσια εκπόνησης της μεταπτυχιακής εργασίας της Νίκης Ρουμελιώτη [175]. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε μέσω πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου (ring-opening polymerization, ROP). Το πρώτο βήμα της συνθετικής πορείας αποτέλεσε ο διαδοχικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου (ROP) του κατάλληλα προστατευμένου ανυδρίτη $N^m\text{-Trt-His NCA}$. Ως μακροαπαρχητής για την πρώτη πολυπεπτιδική συστάδα χρησιμοποιήθηκε το $m\text{PEO-NH}_2$ ($M_w=10000 \text{ g/mol}$) ενώ μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού του $m\text{PEO-b-P}(\text{N}^m\text{-Trt-His})$ προστέθηκε στη φιάλη το δεύτερο μονομερές για το οποίο ως απαρχητής δρα η τελική αμινομάδα της συστάδας $\text{P}(\text{N}^m\text{-Trt-His})$. Τα

προστατευμένα πολυμερή PEO-*b*-P(Trt-His)-*b*-PPhe που προκύπτουν, υπόκεινται σε διαδοχικές αντιδράσεις αποπροστασίας των δομικών μονάδων της PHis ώστε να ληφθούν τελικά τα πλήρως αποπροστατευμένα συμπολυμερή.

Σύνθεση γραμμικών κατά συστάδες συμπολυμερών poly(ethylene oxide)₂₂₈-*b*-poly(L-histidine)₂₉-*b*-poly(L-phenylalanine)_n (PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe_n (n=5, 10))

Η ίδια πειραματική πορεία που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των κατά συστάδες συμπολυμερών PEO₂₂₈-*b*-PHIS₂₂-*b*-PGlu_n χρησιμοποιήθηκε αντίστοιχα και για τη σύνθεση των κατά συστάδες συμπολυμερών PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe_n. Σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂) ως διαλύτης πολυμερισμού αντί για διμέθυλοφορμαμίδιο (DMF). Πιο αναλυτικά οι πειραματικές διαδικασίες που ακολουθούνται για τον πολυμερισμό και την αποπροστασία των πολυμερών περιγράφονται στο μεταπτυχιακό της της Νίκης Ρουμελιώτη [175].



Σχήμα 26: Συνθετική πορεία των συμπολυμερών PEO₂₂₈-b-PHis₂₂-b-PPhe_n.

4.5 Μελέτη Εγκλωβισμού του αντικαρκινικού φαρμάκου Σισπλατίνη

Στην παρούσα εργασία το κατά συστάδες συμπολυμερές PEO₂₂₈-b-PHis₄₄ χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα δέσμευσης του αντικαρκινικού φαρμάκου της σισπλατίνης σε αυτό, αλλά και η ικανότητα αποδέσμευσής του σε συνθήκες ζωντανού οργανισμού.

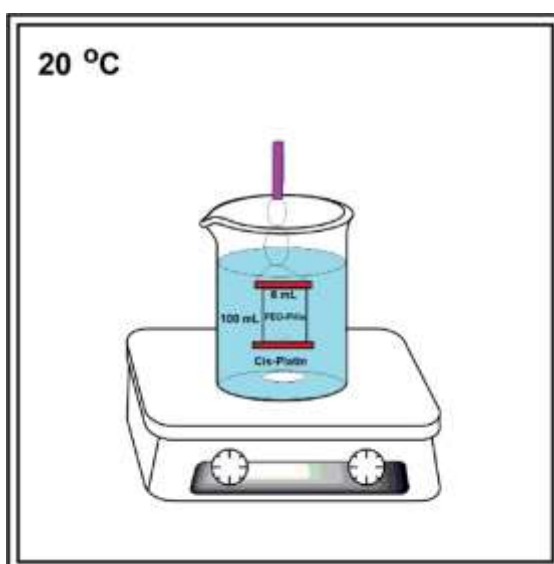
Από τη στιγμή που βρέθηκαν οι ιδανικές πειραματικές συνθήκες για την διαδικασία της δέσμευσης, πραγματοποιήθηκαν αρκετές πειραματικές προσπάθειες προκειμένου να εξακριβωθεί η επαναληψιμότητα και η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας. Η διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω αφορά τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα του πολυμερούς να δεσμεύει το φάρμακο σε συνάρτηση με το χρόνο.

Αρχικά, για τη διαδικασία δέσμευσης του φαρμάκου, 6 mg PEO₂₂₈-b-PHis₄₄ διαλυτοποιούνται σε 6 mL υπερκάθαρου νερού και το πολυμερές αφήνεται για ανάδευση όλο το βράδυ.

Την επόμενη μέρα 3,2 mg σισπλατίνης διαλύονται σε ποτήρι ζέσεως που περιέχει 100 mL υπερκάθαρου νερού. Στη συνέχεια το υδατικό διάλυμα του πολυμερούς μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης (Spectrapor, molecular weight cut-off (MWCO): 6000-8000 Da) και προστίθεται μέσα στη μεμβράνη μικρός μαγνητικός αναδευτήρας. Αμέσως μετά, η μεμβράνη με το πολυμερές εισάγεται στο ποτήρι ζέσεως των 100 mL που περιέχει το διαλυμένο φάρμακο.

Το υδατικό διάλυμα του φαρμάκου βρισκόταν υπό συνεχή ανάδευση ενώ ανά τακτά χρονικά πραγματοποιούταν συλλογή ορισμένου όγκου από το διάλυμα αυτό προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα δέσμευσης του φαρμάκου από το πολυμερές συναρτήσει του χρόνου. Θεωρητικά λοιπόν έπρεπε η συγκέντρωση του φαρμάκου να μειώνεται με τον χρόνο εφόσον αυτό έχει δεσμευτεί από το πολυμερές που βρίσκεται στο εσωτερικό της μεμβράνης.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η διαδικασία της δέσμευσης πραγματοποιήθηκε στους 20 °C με τη βοήθεια θερμοστατούμενου θαλάμου και υπό ήπια ανάδευση. Όπως παρατηρήθηκε σε προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες μεγάλες θερμοκρασίες και έντονη ανάδευση οδήγησαν στην εμφάνιση Pt πάνω στον μαγνητικό αναδευτήρα με τη μορφή γκρι σκιών και άρα σε λανθασμένα αποτελέσματα λόγω απωλειών του φαρμάκου. Η πειραματική διάταξη που ακολουθήθηκε για τη διαδικασία δέσμευσης συναρτήσει του χρόνου δίνεται στο Σχήμα 27.



Σχήμα 27: Πειραματική διάταξη για τη διαδικασία δέσμευσης της σισπλατίνης από το PEO₂₂₈-b-PHIs₄₄.

Τελικά, πραγματοποιήθηκε η λήψη συνολικά 8 δειγμάτων από το υδατικό διάλυμα του φαρμάκου. Έτσι, συλλέχθηκαν δείγματα μετά από 1, 3, 6, 8, 24, 48, 72 καθώς και 96 ώρες τα οποία στη συνέχεια αναλύθηκαν με την τεχνική του ICP-MS προς ανίχνευση Pt, μια μέθοδος η οποία, όπως προαναφέρθηκε, διακρίνεται για τη μεγάλη ευαισθησίας της και τα μικρά όρια ανίχνευσης.

4.6 Μελέτη Αποδέσμευσης του αντικαρκινικού φαρμάκου Σισπλατίνη

Μετά το πέρας της διαδικασίας εγκλωβισμού του αντικαρκινικού φαρμάκου της Cisplatin, η μεμβράνη με το πολυμερές PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ και το δεσμευμένο φάρμακο μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως που περιείχε 1000 mL υπερκάρθαρo νερό όπου και πραγματοποιήθηκε διαδικασία της διαπίδυσης για να απομακρυνθεί τυχόν φάρμακο που δε δεσμεύτηκε. Πραγματοποιήθηκαν 2 αλλαγές νερού 1 L, μία μετά από 3 ώρες και μία μετά από 6 ώρες ενώ η διαδικασία της διαπίδυσης διήρκεσε συνολικά 24 ώρες. Πριν από κάθε αλλαγή νερού πραγματοποιήθηκε συλλογή αντιπροσωπευτικού δείγματος, δηλαδή στις 3 και στις 6 ώρες καθώς επίσης και στο τέλος της διαπίδυσης (24 ώρες). Τα 3 αυτά δείγματα υποβλήθηκαν και αυτά σε μετρήσεις ICP-MS.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της διαπίδυσης σε υπερκάρθαρo νερό για την απομάκρυνση του ελεύθερου φαρμάκου, πραγματοποιήθηκαν μελέτες αποδέσμευσης του φαρμάκου σε συνθήκες καρκινικού ιστού.

Έτσι, το περιεχόμενο της μεμβράνης, δηλαδή το υδατικό διάλυμα του πολυμερούς με το δεσμευμένο φάρμακο χωρίζεται σε δύο ίσα μέρη, μεταφέρεται σε νέες μεμβράνες διαπίδυσης (Spectrapor, molecular weight cut-off (MWCO): 6000-8000 Da) και η κάθε μεμβράνη εμβαπτίστηκε σε 1000 mL του αντίστοιχου μέσου αποδέσμευσης. Η πρώτη μεμβράνη με το διάλυμα των νανοσωματιδίων τοποθετήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (pH 7,4), στους 37 °C, (0,010M PBS pH =7,4, 0,150 M NaCl ιοντική ισχύς), προκειμένου να μελετηθεί η απελευθέρωση της σισπλατίνης σε συνθήκες υγιούς οργανισμού. Επιπλέον, με σκοπό να ελεγχθεί η αποδέσμευση του φαρμάκου σε συνθήκες καρκινικού κυττάρου, και να εξεταστεί η pH-αποκρισιμότητα των νανοσωματιδίων η άλλη μεμβράνη τοποθετήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα acetate (0,050 M acetate, 0,150 M NaCl) pH=5 στους 40 °C. Σε όλη τη διάρκεια της μελέτης αποδέσμευσης η ανάδευση των διαλυμάτων ήταν ήπια και η θερμοκρασία παρέμεινε σταθερή με τη βοήθεια των θερμοστατούμενων θαλάμων, όπου και διεξήχθησαν τα πειράματα.

Και στις δύο συνθήκες μελετήθηκε ο ρυθμός αποδέσμευσης του φαρμάκου συναρτήσει του χρόνου. Έτσι, πραγματοποιήθηκε η συλλογή δείγματος ύστερα από 3, 6, 24, 48, 72, 96 και 120 ώρες για κάθε συνθήκη αντίστοιχα. Τα δείγματα αυτά μετρήθηκαν με ICP-MS προκειμένου να βρεθεί το ποσοστό του φαρμάκου που αποδεσμεύτηκε συναρτήσει του χρόνου, τόσο σε συνθήκες υγιούς οργανισμού όσο και σε συνθήκες καρκινικού κυττάρου.

4.7 Προετοιμασία Νανοσωματιδίων με Σισπλατίνη για *in vitro* και *in vivo* έλεγχο κυτταροτοξικότητας

Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τρεις εγκαθιδρυμένες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές από καρκίνο των ωθηκών NCI-ADRES, OVCAR-3 και OVCAR-5, για τις *in vitro* μελέτες κυτταροτοξικότητας, καθώς και ποντίκια στα οποία είχε αναπτυχθεί συγκεκριμένος τύπος καρκινικών κυττάρων OVCAR-3, για τα *in vivo* πειράματα.

Η διαδικασία σχηματισμού των νανοσωματιδίων που φέρουν το αντικαρκινικό φάρμακο της Cis-Platin και χρησιμοποιήθηκαν στα *in vitro* και *in vivo* πειράματα ήταν πιο απλή από τη διαδικασία που περιεγράφηκε προηγουμένως, καθώς έχει ήδη αποδειχθεί η ικανότητα δέσμευσης συναρτήσει του χρόνου.

Έτσι, το πολυμερές PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ διαλύθηκε σε υπερκάθαρο νερό και αφέθηκε υπό ανάδευση όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα σισπλατίνης του οποίου η συγκέντρωση εξακριβώθηκε με μέτρηση ICP-MS. Αμέσως μετά, η επιθυμητή ποσότητα από το υδατικό διάλυμα του φαρμάκου μεταφέρθηκε στο διάλυμα του πολυμερούς. Το διάλυμα με το φάρμακο και το πολυμερές αφέθηκε υπό ανάδευση για 4 ημέρες προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μέγιστη δυνατή δέσμευση. Η δέσμευση πραγματοποιήθηκε στους 20 °C σε θερμοστατούμενο θάλαμο.

Μετά το πέρας των 4 ημερών το διάλυμα το οποίο περιείχε πλέον νανοσωματίδια PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ με δεσμευμένο φάρμακο καθώς και ελεύθερο φάρμακο μεταφέρθηκε σε μεμβράνη διαπίδυσης (Spectrapor, molecular weight cut-off (MWCO): 6000-8000 Da). Η μεμβράνη μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως που περιείχε 1000 mL νερό όπου και πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της διαπίδυσης για να απομακρυνθεί το ελεύθερο φάρμακο. Πραγματοποιήθηκαν 2 αλλαγές νερού 1 L, μία μετά από 3 ώρες και μία μετά από 6 ώρες ενώ η διαδικασία της διαπίδυσης διήρκησε συνολικά 24 ώρες. Πριν από κάθε αλλαγή νερού αλλά και στις 24 ώρες πραγματοποιήθηκε συλλογή δείγματος

προκειμένου τα 3 αυτά δείγματα να υποβληθούν σε μετρήσεις ICP-MS για να ποσοτικοποιηθεί η ποσότητα του δεσμευμένου φαρμάκου.

Τελικά, η μεμβράνη που περιείχε τα νανοσωματίδια με τη δεσμευμένη Cis-Platin μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως με 1 L ρυθμιστικού διαλύματος PBS (pH 7,4), (0,010M PBS, pH =7,4, 0.150 M NaCl ιοντική ισχύς) και αφέθηκε όλο το βράδυ. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε συλλογή του δείγματος από τη μεμβράνη το οποίο είναι πλέον έτοιμο για τις *in vitro* και *in vivo* πειραματικές διαδικασίες.

Εκτός από τα δείγματα που περιέχουν πολυμερές με φάρμακο παρασκευάστηκαν και δείγματα με άδειους νανοφορείς για να χρησιμοποιηθούν ως δείγματα αναφοράς.

Για τα *in vitro* πειράματα παρασκευάστηκαν δύο σειρές δειγμάτων, η Β όπου αποτελείται από τα δείγματα Β₁ και Β₂ και η σειρά Δ όπου αποτελείται από τα δείγματα Δ₁ και Δ₂. Τα Β₂ και Δ₂ αφορούν τους άδειους νανοφορείς που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα αναφοράς. Συγκεκριμένα, το Β₂ (Blank) περιέχει 12 mg πολυμερούς PEO₂₂₈-b-PHis₄₄ σε 6,0963 ml 10 mM PBS buffer και NaCl 150 Mm, pH= 7,4, ενώ το Δ₂ (Blank) περιέχει 12 mg πολυμερούς σε 6,2548 ml 10 mM PBS buffer και NaCl 150 Mm, pH= 7,4. Τα δείγματα Β₁ και Δ₁ αντιπροσωπεύουν τα νανοσωματίδια με το φάρμακο. Συγκεκριμένα, το Β₁ περιέχει 12 mg πολυμερούς PEO₂₂₈-b-PHis₄₄ δεσμευμένο με 4,75 mg Cis-Platin σε 6,3297 ml 10 mM PBS buffer και NaCl 150 Mm, pH= 7,4, ενώ το Δ₁ περιέχει 12 mg πολυμερούς δεσμευμένο με 4,73 mg Cis-Platin σε 6,0252 ml 10 mM PBS buffer και NaCl 150 Mm, pH= 7,4. Παρακάτω παρατίθεται συνοπτικός πίνακας των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα *in vitro* πειράματα.

Πίνακας 5: Συγκεντρωτικός πίνακας των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα *in vitro* πειράματα.

Δείγμα	Ποσότητα Δείγματος (mL)	Ποσότητα Φαρμάκου (mg)	Συγκέντρωση Φαρμάκου (mg/ml)	Συγκέντρωση Φαρμάκου (mM)
Δ ₁	6,0	4,73 mg	0,785	2,62 mM
Δ ₂ (blank)	6,2	-	-	
B ₁	6,3	4,75 mg	0,75	2,49 mM
B ₂ (blank)	6,1	-	-	

Για τα *in vivo* πειράματα πραγματοποιήθηκε η παρασκευή νέων δειγμάτων ακολουθώντας ακριβώς την ίδια διαδικασία. Η ποσότητα του πολυμερούς ήταν ακριβώς η ίδια. Η μεγαλύτερη ποσότητα σε φάρμακο επετεύχθη από τη λίγο μεγαλύτερη αρχική ποσότητα φαρμάκου κατά τη διαδικασία της δέσμησης. Ο πίνακας των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα *in vivo* πειράματα παρουσιάζεται παρακάτω.

Πίνακας 6: Συγκεντρωτικός πίνακας των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα *in vivo* πειράματα.

Δείγμα	Ποσότητα Δείγματος (mL)	Ποσότητα Φαρμάκου (mg)	Συγκέντρωση Φαρμάκου (mg/ml)	Συγκέντρωση Φαρμάκου (mM)
Blank	6,9	-	-	-
B	6,3	6,41	1,019	3,38
Δ	6,9	6,17	0,8946	2,97

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλοι οι υπολογισμοί για την εύρεση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στα δείγματα πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια μετρήσεων ICP-MS και ότι το

4.8 Μελέτη Εγκλωβισμού του αντικαρκινικού φαρμάκου Δοξορουβικίνη

Στην παρούσα εργασία το κατά συστάδες συμπολυμερές PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα δέσμησης του αντικαρκινικού φαρμάκου της δοξορουβικίνης σε αυτό, αλλά και η ικανότητα αποδέσμησης του σε

συνθήκες ζωντανού οργανισμού. Η διαδικασία εγκλωβισμού του φαρμάκου, γίνεται ταυτόχρονα με την αυτοοργάνωση του πολυμερούς, προς σχηματισμό των αντίστοιχων νανοσωματιδίων με δοξορουβικίνη.

Για τη διαδικασία δέσμευσης του φαρμάκου, 5 mg PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ διαλυτοποιούνται αρχικά σε 2 mL DMSO και το πολυμερές αφήνεται για ανάδευση όλο το βράδυ.

Σε προηγούμενη πειραματική προσπάθεια χρησιμοποιήθηκε αναλογία πολυμερούς/φαρμάκου ίση με 2:1. Επειδή όμως, παρατηρήσαμε ότι το πολυμερές παρουσίασε μεγάλη ικανότητα δέσμευσης του φαρμάκου, η αναλογία πολυμερούς/δοξορουβικίνης που χρησιμοποιήθηκε τελικά ήταν σχεδόν ίση με 1:1. Έτσι τα αποτελέσματα δέσμευσης και αποδέσμωσης που θα αναλυθούν παρακάτω προκύπτουν από την αναλογία PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄/DOX ίση με 1:1.

Το εμπορικά διαθέσιμο φάρμακο βρίσκεται υπό μορφή υδροχλωρικού του άλατος (Doxorubicin hydrochloride) (DOX*HCl) και επομένως είναι υδρόφιλο, γεγονός που δυσκολεύει τη δέσμευσή του από τον υδρόφοβο πυρήνα του νανοσωματιδίου του πολυμερούς. Έτσι, κρίνεται απαραίτητη η διαδικασία μετατροπής της υδρόφιλης εμπορικά διαθέσιμης δοξορουβικίνης σε υδρόφοβη. Η διαδικασία που ακολουθείται βασίζεται σε αναφορές από την ομάδα του Kataoka [176]. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο αυτό, 4,29 mg υδροχλωρικής δοξορουβικίνης διαλύονται σε 100 mL υπερκάθαρου νερού, οπότε προκύπτει ένα διαυγές κόκκινο διάλυμα. Το διάλυμα αυτό προστίθεται εν συνεχεία σε μία διαχωριστική χοάνη των 250 mL που περιέχει 100 mL χλωροφόρμιο. Ακολούθως, 5 ισοδύναμα τριαιθυλαμίνης (mol Et₃N: mol Dox*HCl = 5:1) προστίθενται στην υδατική φάση και το χρώμα του διαλύματος της δοξορουβικίνης μετατρέπεται ακαριαία σε μωβ, ένδειξη ότι η τριαιθυλαμίνη έχει δεσμεύσει το υδροχλώριο της δοξορουβικίνης και την έχει μετατρέψει σε υδρόφοβη. Επίσης, μετράται το pH της υδατικής φάσης το οποίο πρέπει να είναι ουδέτερο (pH~7). Ως εκ τούτου, μετά από ανακίνηση του μίγματος της διαχωριστικής χοάνης, η δοξορουβικίνη βρίσκεται πλέον διαλυμένη στην υδρόφοβη οργανική φάση του χλωροφόρμιου, ενώ το χρώμα αυτού του διαλύματος γίνεται ξανά κόκκινο. Στη συνέχεια, οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και συλλέγονται. Η υδατική φάση συλλέγεται και φυλάσσεται, προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί φωτομετρικά στα 485 nm, η συγκέντρωση της εναπομείνουσας διαλυμένης δοξορουβικίνης. Η υδρόφοβη ελεύθερη βάση της δοξορουβικίνης, η οποία

είναι πλέον διαλυμένη στο χλωροφόρμιο συλλέγεται σε μία σφαιρική φιάλη, όπου με τη χρήση υψηλού κενού, ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται μέχρι ξηρού.

Σε επόμενο στάδιο, το διάλυμα του πολυμερούς σε DMSO προστίθεται στην αντίστοιχη φιάλη που περιέχει την ξηρή δοξορουβικίνη και αφήνεται υπό ανάδευση για 1:30 ώρα. Ακολούθως, 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS με pH = 7,4 προστίθεται στάγδην στο διάλυμα πολυμερούς-δοξορουβικίνης σε περίοδο 10 λεπτών. Τελικά, το νέο διάλυμα μεταφέρεται σε μεμβράνη διαπίδυσης (Spectrapor, molecular weight cut-off (MWCO): 3500 Da, 25 °C) και λαμβάνει χώρα διαπίδυση (dialysis) σε 2 L ισοτονικού ρυθμιστικού διαλύματος PBS με pH = 7.4 (150 mM NaCl, 10 mM PBS), προκειμένου να απομακρυνθεί το DMSO, καθώς επίσης και η περίσσεια φαρμάκου που δεν έχει εγκλωβιστεί από το νανοσωματίδιο. Δύο ώρες μετά το πρώτο dialysis, το εξωτερικό ρυθμιστικό διάλυμα ανανεώνεται με άλλα 2 L του ίδιου ισοτονικού ρυθμιστικού διαλύματος. Η διαπίδυση και σε αυτήν την περίπτωση διαρκεί επίσης δύο ώρες. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμη άλλες δύο φορές ανά δύο ώρες αλλά η διαπίδυση πραγματοποιείται σε 4 L ρυθμιστικού διαλύματος αντί για 2 L προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως το DMSO και το μη δεσμευμένο φάρμακο. Τελικά, δύο ώρες μετά το εξωτερικό ρυθμιστικό διάλυμα ανανεώνεται με άλλα 2 L ισοτονικού ρυθμιστικού διαλύματος και αφήνεται για όλη τη νύχτα. Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας της διαπίδυσης, η μεμβράνη βρίσκεται συνεχώς εμβαπτισμένη στο εξωτερικό ρυθμιστικό διάλυμα, ενώ αναδεύεται αδιαλείπτως, ταυτόχρονα με την ανάδευση του εξωτερικού διαλύματος, στα 800 rpm, προκειμένου να επιτευχθεί ομοιογένεια τους συστήματος. Την επόμενη μέρα, το διάλυμα των νανοσωματιδίων συλλέγεται από τη μεμβράνη διαπίδυσης και μετράται ο όγκος του (περίπου 10 mL). Ακολούθως, 4 mL του διαλύματος φυλάσσονται προκειμένου να αναλυθούν περαιτέρω και το υπόλοιπο διάλυμα μοιράζεται σε 3 ισοδύναμα μέρη των 2 mL, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μελέτη αποδέσμευσης του εγκλωβισμένου αντικαρκινικού φαρμάκου της δοξορουβικίνης που περιγράφεται παρακάτω.

Η απόδοση εγκλωβισμού του φαρμάκου (encapsulation efficiency (EE)) και η ικανότητα δέσμευσης (loading capacity (LC)) των διαφόρων νανοσωματιδίων προσδιορίζονται με φασματοφωτομετρία UV-Vis στα 485 nm, καθώς η ελεύθερη δοξορουβικίνη απορροφά σε αυτό το μήκος κύματος, ενώ τα πολυμερή όχι. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με χρήση πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης της δοξορουβικίνης στο αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH = 7,4, ενώ οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής:

EE (%) = (Μάζα της δεσμευμένης DOX/ Μάζα DOX του αρχικού διαλύματος) x 100

LC (%) = (Μάζα της δεσμευμένης DOX/ Μάζα DOX του πολυμερούς) x 100

4.9 Μελέτη Αποδέσμευσης του αντικαρκινικού φαρμάκου Δοξορουβικίνη

Μετά τη διαδικασία εγκλωβισμού του αντικαρκινικού φαρμάκου της δοξορουβικίνης (DOX) στο πολυμερές PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ πραγματοποιήθηκαν μελέτες αποδέσμευσης του φαρμάκου σε συνθήκες καρκινικού ιστού. Πιο συγκεκριμένα, μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της διαπίδυσης για την δέσμευση της DOX από το πολυμερές, το διάλυμα των σχηματισθέντων νανοσωματιδίων χωρίστηκε σε τρία ίσα μέρη των 2 mL περίπου, μεταφέρθηκε σε νέες μεμβράνες διαπίδυσης (Spectrapor, molecular weight cut-off (MWCO): 6000-8000 Da) και η κάθε μεμβράνη εμβαπτίστηκε σε 200 mL του αντίστοιχου μέσου αποδέσμευσης. Η πρώτη μεμβράνη με το διάλυμα των νανοσωματιδίων τοποθετήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (pH 7.4), στους 37 °C, (0,010M PBS pH =7,4, 0,150 M NaCl ιοντική ισχύς), προκειμένου να μελετηθεί η απελευθέρωση της DOX σε συνθήκες υγιούς οργανισμού. Επιπλέον, με σκοπό να ελεγχθεί η αποδέσμευση του φαρμάκου σε συνθήκες καρκινικού κυττάρου, και να εξεταστεί η pH-αποκρισιμότητα των νανοσωματιδίων οι άλλες δύο μεμβράνες τοποθετήθηκαν αντίστοιχα στα εξής μέσα απελευθέρωσης: ρυθμιστικό διάλυμα PBS (0,010M PBS, 0,150 M NaCl) pH=6,5 στους 40 °C και σε ρυθμιστικό διάλυμα acetate (0,010M acetate, 0,150 M NaCl) pH=5 στους 40 °C. Σε όλη τη διάρκεια της μελέτης αποδέσμευσης η ανάδευση των διαλυμάτων επιλέχθηκε να είναι 200 rpm και η θερμοκρασία παρέμεινε σταθερή με τη βοήθεια των θερμοστατούμενων θαλάμων, όπου και διεξήχθησαν τα πειράματα.

Τέλος, η αθροιστική απελευθέρωση του φαρμάκου μετρήθηκε στο εξωτερικό διάλυμα σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα. Η μεμβράνη διαπίδυσης μεταφερόταν σε ένα νέο ρυθμιστικό διάλυμα σε κάθε διάστημα, προκειμένου να αποφευχθεί ο κορεσμός του διαλύματος από το υδρόφοβο φάρμακο. Στη συνέχεια, η συγκέντρωση της DOX υπολογίστηκε με φασματοσκοπία UV σε λ = 485 nm, χρησιμοποιώντας τις καμπύλες βαθμονόμησης που λήφθηκαν με διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης DOX στα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα και μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας το ίδιο όργανο.

4.10 Έλεγχος κυτταροτοξικότητας *in vitro* με τη μέθοδο SRB [177, 178]

Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν οι εγκαθιδρυμένες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές από καρκίνο του μαστού MCF-7 (oestrogen and progesterone receptor positive invasive ductal carcinoma, θετικό

διδυτικό καρκίνωμα του υποδοχέα οιστρογόνων και προγεστερόνης), T-47D (progesterone receptor positive invasive ductal carcinoma, θετικό διδυτικό καρκίνωμα του υποδοχέα προγεστερόνης) και MDA-MB231 (triple negative breast cancer, τριπλά αρνητικός καρκίνος μαστού) τις οποίες προμηθεύθηκε το εργαστήριο φαρμακολογίας από το NCI (National Cancer Institute, NIH, Frederick, MD, USA).

Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 (Gibco®, Code: 31870025) συμπληρωμένο με 5% εμβρυικό ορό μοσχαριού [FBS: Fetal Bovine Serum, (Biosera, Code: 1001G)], 2 mM L-γλουταμίνη (Biosera, Code: XO-T1715), 100 U/mL πενικιλίνη και 100 μg/mL στρεπτομυκίνη (Biosera, Code: XO-A4122). Οι κυτταροκαλλιέργειες διατηρήθηκαν σε κλίβανο επώασης, στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ και 95% υγρασία.

Η αντιπολλαπλασιαστική δράση των ουσιών, που συντέθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία, ελέγχθηκε μέσω της χρωματομετρικής μεθόδου της σουλφοροδαμίνης Β (SRB, Sulforhodamine B). Η SRB είναι μια ανιονική μικρομοριακή ένωση που προσδένεται στοιχειομετρικά στα βασικά αμινοξικά κατάλοιπα των πρωτεϊνικών αλυσίδων, υπό ελαφρώς όξινες συνθήκες, και ακολούθως εκχυλίζεται, υπό βασικές συνθήκες.

Στην αρχή κάθε πειράματος ελέγχεται η βιωσιμότητα των κυττάρων με τη μέθοδο trypan blue ώστε να είναι πάντοτε μεγαλύτερη από 96%. Τα κύτταρα προστίθενται σε πλακίδια κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων με επίπεδο πυθμένα (με πυκνότητα 5.000-10.000 κύτταρα ανά θέση) και επωάζονται για 24 ώρες σε κλίβανο επώασης, στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ και 95% υγρασία, προκειμένου να επανέλθουν στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης (περίοδος προσαρμογής). Μετά το πέρας των 24 ωρών, γίνεται η προσθήκη των ουσιών. Στα κύτταρα ορισμένων θέσεων δεν προστίθεται παρά μόνο υλικό καλλιέργειας και αποτελούν τα κύτταρα ελέγχου (Control, C). Κάθε ελεγχόμενη ουσία ελέγχθηκε σε τέσσερις λογαριθμικές συγκεντρώσεις με μέγιστη συγκέντρωση τα 10 μM. Η τελική συγκέντρωση του DMSO σε κάθε κυτταροκαλλιέργεια δεν ήταν υψηλότερη από 0,1%. Ένας αριθμός θέσεων από κάθε κυτταρική σειρά σε κάθε πείραμα μονιμοποιείται με κρύο διάλυμα 50% v/v TCA (Trichloroacetic Acid) (Applichem, Code: A1431), για 1 ώρα, στους 4 °C, μετά το πέρας των 24 ωρών της περιόδου προσαρμογής, με στόχο την αντιπροσώπευση της κυτταρικής καλλιέργειας στη φάση της προσθήκης των ουσιών (Tz). Μετά από 48 ώρες επώασης των κυττάρων με τις ουσίες τα κύτταρα

μονιμοποιούνται, με ήπια προσθήκη 50% v/v TCA σε κάθε θέση του πλακιδίου κυτταροκαλλιέργειας, για 1 ώρα, στους 4 °C. Έπειτα, τα κύτταρα πλένονται με προσοχή, 3 φορές, με απιονισμένο νερό, απομακρύνεται η περίσσεια ύδατος και τα πλακίδια αφήνονται να στεγνώσουν στον αέρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα βάφονται με διάλυμα 0,04% w/v SRB (της εταιρείας SIGMA, Code: S9012) σε 1% acetic acid (της εταιρείας Fluka, Code: 45731), για 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση, η περίσσεια της χρωστικής απομακρύνεται με επανειλημμένες εκπλύσεις με 1% v/v acetic acid και οι κυτταρικές μονοστιβάδες αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα 10 mM Tris base και τα κύτταρα επώζονται για 10 λεπτά στους 37 °C. Σ' αυτές τις συνθήκες η συνδεδεμένη με πρωτεΐνη χρωστική απελευθερώνεται στο ελαφρώς βασικό διάλυμα Tris base. Για κάθε συγκέντρωση της ουσίας που μελετάται, μετράται η οπτική απορρόφηση στα 540 nm (Ti), σε συσκευή φωτομετρίας BioTek microelisa (Biotek, EI-311).

Χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις οπτικής απορρόφησης των κυττάρων την ώρα της προσθήκης των ουσιών (Tz), των κυττάρων ελέγχου (C), καθώς και των κυττάρων υπό την επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών, μπορεί να υπολογιστεί η ποσοστιαία ανάπτυξη των κυττάρων (% Growth Rate) με τη χρήση του παρακάτω τύπου:

$[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100$, για συγκεντρώσεις όπου $Ti \geq Tz$ και

$[(Ti-Tz)/Tz] \times 100$, για συγκεντρώσεις όπου $Ti < Tz$

Από τις προκύπτουσες καμπύλες δόσης-απόκρισης (όπου απόκριση, ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων, % growth rate) προσδιορίζονται οι παράμετροι GI50, TGI και LC50, όπου:

GI50, Growth Inhibition 50% = η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιτυγχάνεται αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων κατά 50%.

TGI, Total Growth Inhibition = η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιτυγχάνεται ολική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων.

LC50, Lethal Concentration 50% = η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιφέρεται θάνατος στο 50% του κυτταρικού πληθυσμού.

Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για την *in vitro* κυτταροτοξικότητα των νανοσωματιδίων με τη σισπλατίνη στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές από καρκίνο των ωοθηκών NCI-ADRES, OVCAR-3 και OVCAR-5.

4.11 Σύνθεση Νανοσωματιδίων Χρυσού βασισμένων στην πολυ (Ιστιδίνη)

Όπως προαναφέρθηκε, υπάρχει περιορισμένος αριθμός δημοσιεύσεων για τον σχηματισμό AuNSs εντός πολυμερικών NPs και συγκεκριμένα με τη χρήση της πολυ(L-ιστιδίνης) (PHis). Στις προσπάθειες αυτές, η PHis χρησιμοποιήθηκε ως ελεύθερη αλυσίδα, η οποία αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με προσχηματισμένα NPs. Επιπλέον, το μέγιστο φάσμα απορρόφησης που ελήφθη ήταν κοντά στα 750-800 nm και στις περισσότερες περιπτώσεις, η χρήση ενός αναγωγικού παράγοντα απαιτήθηκε για το σχηματισμό των νανοκελύφων ή των NPs. Η χρήση όμως αναγωγικών αντιδραστηρίων μπορεί να οδηγήσει στην αδυναμία χρήσης προστατευμένων πεπτιδίων για τον έλεγχο της αυτοσυναρμολόγησης των NPs που περιέχουν το AuNS, αφού η υδροξυλαμίνη οδηγεί σε αποπροστασία. Επιπλέον, αυτή η χημική τροποποίηση θα μπορούσε να οδηγήσει σε κυτταροτοξικά υλικά.

Εδώ, παρουσιάζουμε μια νέα, αποτελεσματική και εύκολη σύνθεση συντονιζόμενων AuNSs που περιέχονται στα NPs, αποτελούμενα από αποκρινόμενα, βιοσυμβατά υβριδικά πολυπεπίδια μέσω μιας απλής αναγωγικής αντίδρασης, με την PHis να δρα ταυτόχρονα ως αναγωγικό και ως σταθεροποιητικός παράγοντας των AuNPs [178, 179]. Η συνθετική διαδικασία που χρησιμοποιείται είναι μια «πράσινη» στρατηγική, όπου εμπλέκονται μόνο τα δύο μη τοξικά αντιδραστήρια H₂AuCl₄ και η πολυ (ιστιδίνη) χωρίς πρόσθετους καταλύτες, αναγωγικούς παράγοντες και ανόργανα ή μεταλλικά πρότυπα [180].

Μηχανισμός σχηματισμού AuNPs και AuNSs εντός των NPs

Η σύνδεση μεταξύ μετάλλων και ιστιδίνης έχει μελετηθεί εκτενώς λόγω της υψηλής συγγένειας αυτού του αμινοξέος με ιόντα μετάλλου [91]. Η PHis έχει επίσης την ικανότητα να ανάγει το H₂AuCl₄ και να σχηματίζει νανοσωματίδια χρυσού. Το χλωροαυρικό οξύ (III) είναι ένα μέταλλο μετάπτωσης d⁸ και είναι ισχυρό οξειδωτικό. Προκειμένου να επιτευχθούν οι βέλτιστες συνθήκες για την ανάπτυξη ενός νανοκελύφους με το υψηλότερο δυνατό μήκος κύματος απορρόφησης, πραγματοποιήσαμε την αναγωγή κάτω από διάφορες τιμές pH. Πριν από την ανάμιξη του οξέος με το πολυμερές, προσθέσαμε την ισοδύναμη ποσότητα NaOH στο διάλυμα H₂AuCl₄ προκειμένου να

δημιουργηθεί το μετά νατρίου άλας. Ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση, όταν το διάλυμα άλατος χρυσού προστέθηκε στο διάλυμα του πολυμερούς σε pH = 7,4 και θερμάνθηκε στους 80 °C, η αναγωγή Au (III) δεν επήλθε και ως εκ τούτου δεν σχηματίστηκαν τα NPs χρυσού. Προκειμένου να σχηματιστούν τα νανοσωματίδια χρυσού, ήταν απαραίτητο να προστεθεί όξινο διάλυμα Au στο διάλυμα του πολυμερούς, με αποτέλεσμα ένα όξινο τελικό διάλυμα. Στη συνέχεια, η θέρμανση στους 80 °C οδήγησε στην αναγωγή λόγω της μεταφοράς ηλεκτρονίων από την αμίνη της ομάδας ιμιδαζολίου στο μεταλλικό ιόν, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό Au (0) σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση: [91]

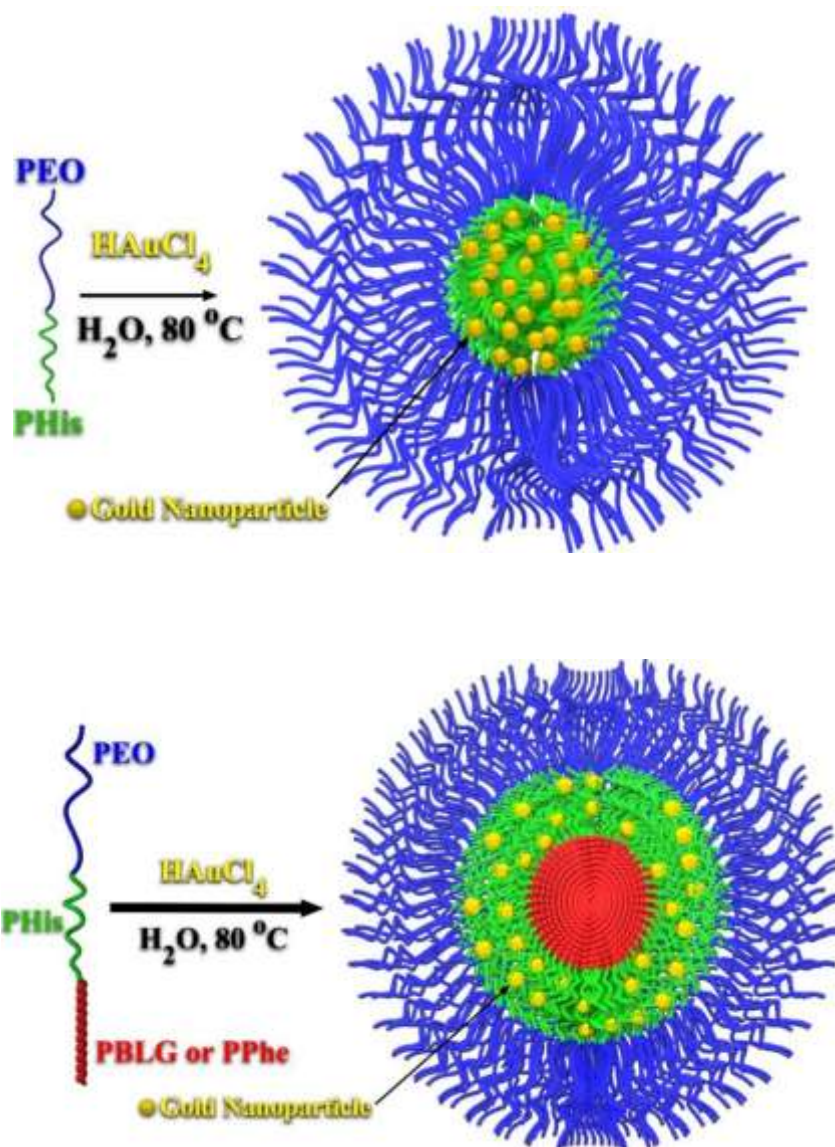


Η ιστιδίνη οξειδώνεται για να σχηματίσει ένα ριζικό κατιόν. Οι μονομερικές μονάδες της ιστιδίνης είναι θετικά φορτισμένες, δημιουργώντας επίσης HCl που θα πρωτονιώσει περαιτέρω την PHis που δεν αντέδρασε, καθιστώντας την πρωτονιωμένη PHis υδρόφιλη. Λόγω της ήπιας αναγωγικής ικανότητας του ιμιδαζολικού δακτυλίου, η αναγωγική αντίδραση μεταξύ Au³⁺ και ιστιδίνης είναι αργή και απαιτείται αυξημένη θερμοκρασία.

Τα αμφίφιλα και τα pH-αποκρινόμενα συμπολυμερή PEO-*b*-PHis παρουσιάζουν την ικανότητα να αυτό-οργανώνονται σε υδατικά μέσα σε pH = 7,4, όπου η PHis είναι ουδέτερη και υδρόφοβη και σχηματίζουν κυρίως μικκύλια πυρήνα-κελύφους [42], αποτελούμενα από έναν υδρόφοβο πυρήνα PHis και υδρόφιλη κορώνα PEO. Η PHis έχοντας pKa ~ 6,5 είναι pH-αποκρινόμενη εντός των φυσιολογικών τιμών του pH. Ως εκ τούτου, σε υγιή ιστό που παρουσιάζει pH = 7,4, η PHis είναι υδρόφοβη και σχηματίζει συσσωματώματα, ενώ το χαμηλότερο pH στον εξωκυττάριο καρκινικό ιστό οδηγεί στην πρωτονίωσή της καθιστώντας την υδρόφιλη, και σε πολύ χαμηλές τιμές pH τα συσσωματώματα διαταράσσονται τελείως [42]. Στην περίπτωση τρισυσταδικών τριπολυμερών PEO-*b*-PHis-*b*-PBLG και PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe, σχηματίζονται μικκύλια πυρήνα-κελύφους τριών στρώσεων στο νερό, όπου η εξωτερική κορώνα αποτελείται από PEO, το ενδιάμεσο στρώμα αποτελείται από την ελαφρώς ενυδατωμένη PHis, ενώ ο υδρόφοβος πυρήνας βασίζεται στο εξαιρετικά υδρόφοβο PBLG ή PPhe, αντίστοιχα. Σε διάλυμα υβριδικών τρισυσταδικών συμπολυπεπτιδίων, η προσθήκη υδατικού H₂AuCl₄ σε υδατικό διάλυμα πολυμερούς PEO-*b*-PHis-*b*-PBLG, αρχικά οδηγεί σε πρωτονίωση της PHis που την καθιστά υδρόφιλη και διογκωμένη και τα αντίθετα ανιόντα AuCl₄-

αλληλεπιδρούν με την πρωτονιωμένη και θετικά φορτισμένη PHis μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

Αυτή η αλληλεπίδραση συμβαίνει κυρίως στο σημείο σύνδεσης μεταξύ των αλυσίδων PEO και PHis. Σε αυτό το σημείο, τα NPs αναμένεται να αυξηθούν σε διάσταση λόγω της πρωτονίωσης που καθιστά την PHis υδρόφιλη και λόγω της διόγκωσης από το νερό. Το ελεύθερο άζωτο του ιμιδαζολίου στη συνέχεια συμπλέκεται με το Au(III), σχηματίζοντας χηλικά σύμπλοκα, οδηγώντας στο σχηματισμό πιο συμπαγών NPs και μικρότερων διαστάσεων. Η PHis έχει την ισχυρότερη ικανότητα να συμπλέκει ιόντα Au(III) μεταξύ των τριών πολυμερικών αλυσίδων. Κατά τη θέρμανση, ο Au(III) ανάγεται σύμφωνα με την εξίσωση (1) και παράγεται HCl που θα πρωτονώνει περαιτέρω το υπόλοιπο στρώμα της PHis του συσσωματώματος. Ο σχηματισμός ανηγμένων νανοσωματιδίων Au(0) θα συσσωματωθεί αφού είναι υδρόφοβα και θα προκαλέσουν περαιτέρω συρρίκνωση των NPs. Ωστόσο, μειώνοντας τον λόγο PHis/Au(III) (αυξάνοντας την ποσότητα του Au), αναμένεται μείωση των διαστάσεων των NPs, αφού όλες οι μονομερικές μονάδες της PHis γίνονται έντονα υδρόφοβες μέσω σύνδεσης με τα σχηματισμένα νανοσωματίδια Au(0).



Σχήμα 28: Πορεία σύνθεσης των AuNSs.

Μια πρόσθετη ποσότητα οξέος, θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με τις τελικές ομάδες αμίνης των αλυσίδων εντός του υδρόφοβου Phe ή PBLG, οδηγώντας στην αύξηση των διαστάσεων του πυρήνα. Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε σε αυτήν την εργασία περιγράφεται στο σχήμα 28. Χρησιμοποιήθηκαν πολλές γραμμομοριακές αναλογίες μεταξύ των μονομερών μονάδων PHis και Au προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση στη δομή των νανοσωματιδίων καθώς και το πάχος των νανοκελύφων, με στόχο το υψηλότερο δυνατό μήκος κύματος απορρόφησης. Υπάρχουν, σύμφωνα με τις γνώσεις μας, μόνο λίγα έργα που αναφέρουν τη χρήση του PHis για τον σχηματισμό μικρών NPs που απορροφούν στο NIR [80,87,88]. Ωστόσο, σε αυτές τις αναφορές, το μέγιστο μήκος κύματος που λαμβάνεται από μικρά AuNS ήταν κοντά στα 750 nm, ενώ υπήρχε κάποια απορρόφηση σε υψηλότερα μήκη κύματος.

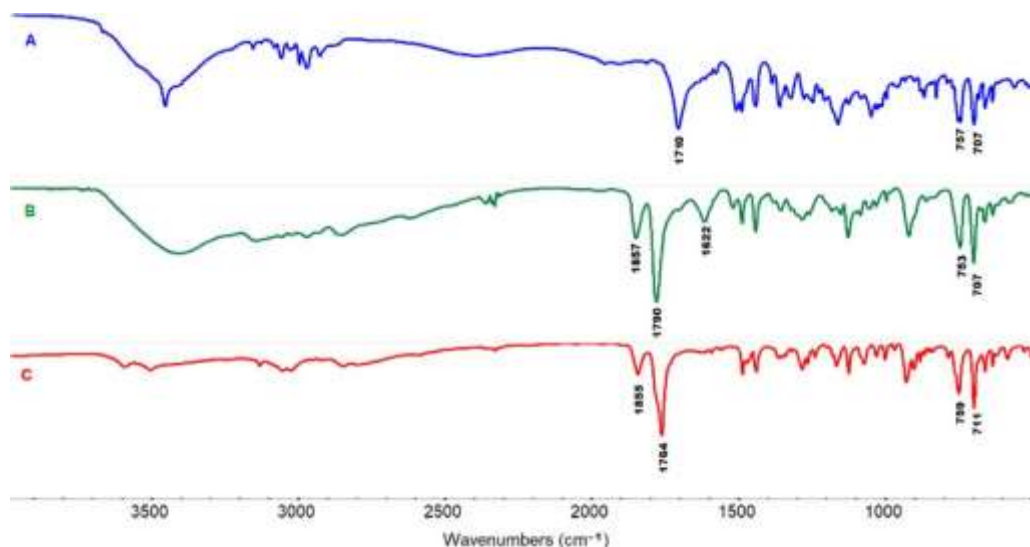
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Χαρακτηρισμός *N*^{im}-Trityl-L-Histidine N-Carboxy Anhydride (*N*^{im}-Trityl-L-His NCA)

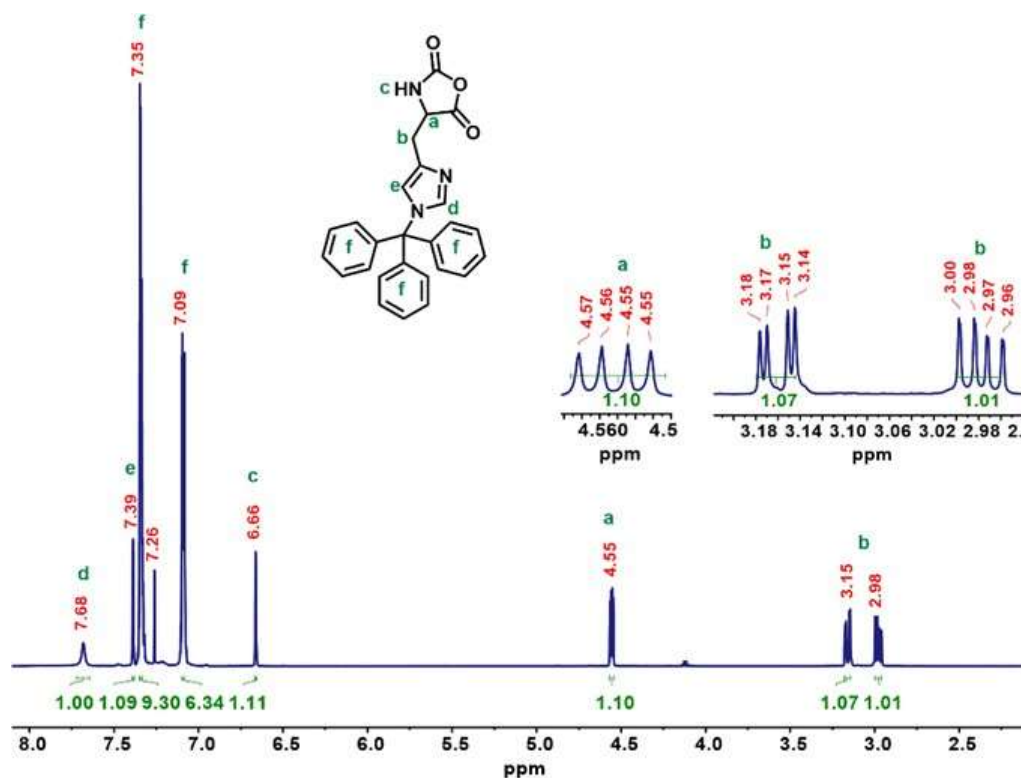
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η πορεία της σύνθεσης των *N*-καρβοξυ Ανυδριτών των αμινοξέων ελέγχεται σε όλα τα στάδιά της, με φασματοσκοπία FT-IR, καθώς η τεχνική αυτή δίνει πληροφορίες τόσο για το πρόδρομο αμινοξύ, όσο και για τα ενδιάμεσα προϊόντα της αντίδρασης κυκλοποίησης, προς σχηματισμό του τελικού ανυδρίτη.

Έτσι, κατά τη διαδικασία σύνθεσης του ανυδρίτη της ιστοιδίνης, αρχικά, λαμβάνεται φάσμα IR της πρόδρομης ένωσης BOC-His(Trt)-OH (Σχήμα 29A). Παρατηρείται η χαρακτηριστική κορυφή στα 1710 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στη δόνηση έκτασης του καρβονυλίου (C=O) του αμινοξέος της ιστοιδίνης. Ακολούθως, λαμβάνει χώρα η αντίδραση κυκλοποίησης του αμινοξέος προς σχηματισμό του ανυδρίτη, οπότε χρησιμοποιείται το SOCl_2 ως μέσο χλωρίωσης. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε 2.5 ώρες, και επιβεβαιώνεται με τη λήψη φάσματος IR (Σχήμα 29B). Σε αυτό το φάσμα η χαρακτηριστική κορυφή στα 1710 cm^{-1} του πρόδρομου αμινοξέος έχει εξαφανιστεί, ενώ είναι ορατές οι δύο κορυφές στα 1790 cm^{-1} και 1857 cm^{-1} , που αντιστοιχούν στη δόνηση του δεσμού του C=O δίπλα στο άζωτο του NCA και στη δόνηση του δεσμού του C=O δίπλα στην πλευρική ομάδα του NCA (συμμετρική και ασύμμετρη δόνηση τάσης των καρβονυλίων του ανυδρίτη). Επιπλέον, είναι εμφανής και μία κορυφή στα 1622 cm^{-1} , οποία οφείλεται στη δόνηση κάμψης του δεσμού N-H και αποδίδεται στο σχηματισθέν υδροχλωρικό άλας του NCA της ιστοιδίνης. Η πλήρης δέσμευση του HCl από τον ιμιδαζολικό δακτύλιο του NCA επιτυγχάνεται με χρήση ισομοριακής ποσότητας Et_3N προς σχηματισμό του άλατος $\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$ υπό μορφή ιζήματος, το οποίο απομακρύνεται από το επιθυμητό προϊόν μέσω διήθησης. Στο φάσμα IR του τελικού NCA (Σχήμα 29C) απουσιάζει η κορυφή στα 1622 cm^{-1} , που δείχνει ότι δεσμεύτηκε ποσοτικά το HCl μετά την προσθήκη της ποσότητας τριαιθυλαμίνης, ενώ δεν εμφανίζεται κορυφή στα 1650 cm^{-1} , που θα οφειλόταν στη δόνηση του καρβονυλίου του πεπτιδικού δεσμού λόγω πιθανής έναρξης του πολυμερισμού από τυχόν περίσσεια της Et_3N . Τέλος, παρατηρούμε ότι η τρίτυλο προστατευτική ομάδα παραμένει ανέπαφη σε όλα τα στάδια της συνθετικής πορείας, καθώς οι δονήσεις κάμψης των δεσμών -CH=CH- των βενζολικών δακτυλίων στα 711 cm^{-1} και 759 cm^{-1} παραμένουν αμετάβλητες σε όλα τα φάσματα.



Σχήμα 29: Φάσματα FT-IR κατά την πορεία σύνθεσης του N^{im} -Trityl-L-His NCA. **A** γράφημα: Πρόδρομο αμινοξύ Boc-His(trt)-OH, **B** γράφημα: Σχηματισμός N^{im} -Trityl-L-His NCA·HCl έπειτα από 2.5 ώρες μετά την προσθήκη SOCl_2 στην αντίδραση, **C** γράφημα: Τελικός N^{im} -Trityl-L-His NCA.

Τέλος, η επιτυχής σύνθεση του N^{im} -Trityl-L-His NCA επιβεβαιώνεται με λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ σε διαλύτη CDCl_3 (Σχήμα 30). Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του NCA, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν επακριβώς με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 2.96-3.18 (b: 2H, $-\text{CH}_2$), 4.55-4.57 (a: 1H, $-\text{CH}-$ του δακτυλίου του NCA), 6.66 (c: 1H, $-\text{NH}-$ του δακτυλίου του NCA), 7.08-7.35 (f: 16H, ArH των τριτυλο-ομάδων), 7.39 (e: 1H, $-\text{C}=\text{CH}-\text{N}$), 7.68 (d: 1H, $-\text{N}=\text{CH}-\text{N}$).

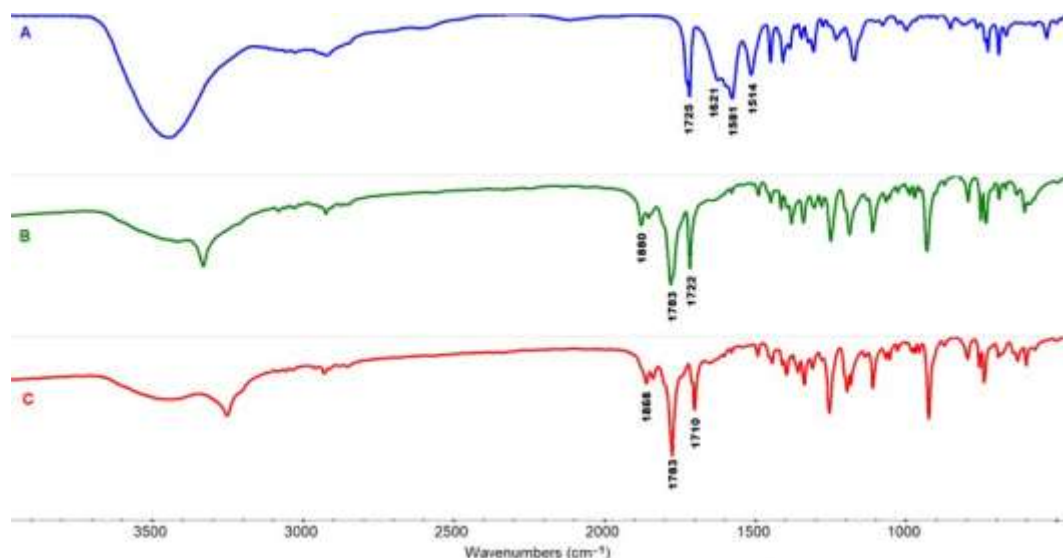


Σχήμα 30: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του N^{im} -Trityl-L-His NCA σε διαλύτη CDCl_3 .

5.2 Χαρακτηρισμός του γ -Benzyl-L-Glutamate N-Carboxy Anhydride (BLG-NCA)

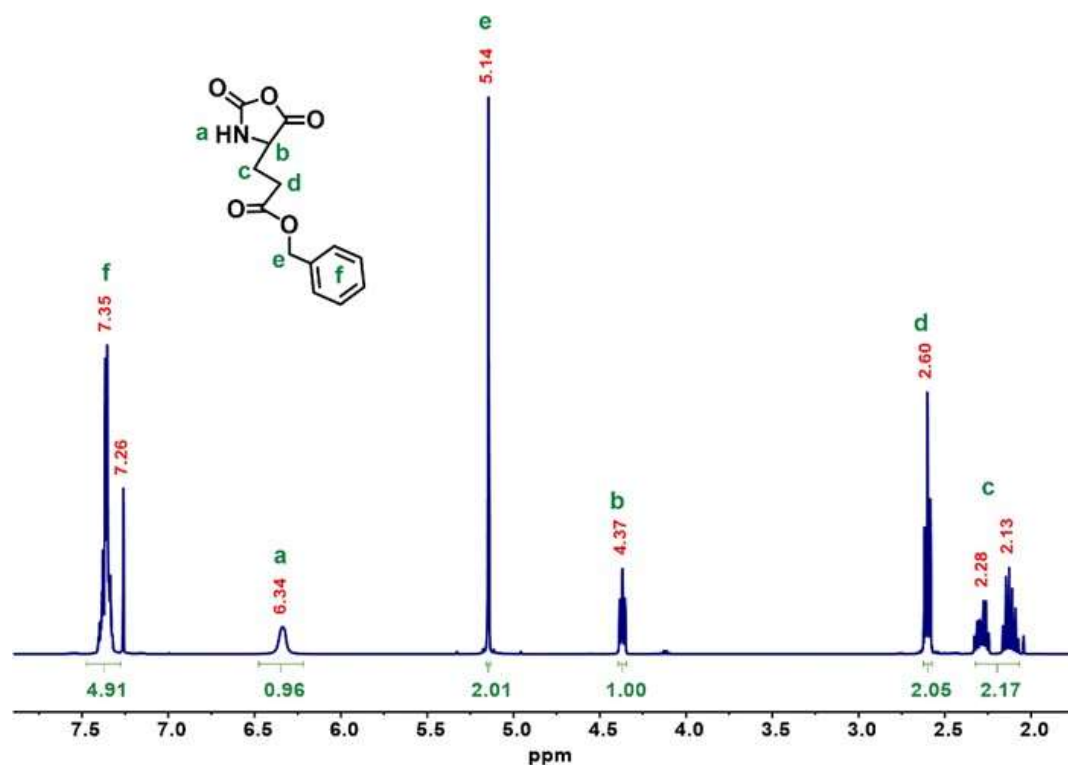
Σε πρώτο βήμα, πραγματοποιείται η λήψη φάσματος IR της πρόδρομης ένωσης H-Glu(OBzl)-OH (Σχήμα 31A). Η ευρεία κορυφή στην περιοχή $2500\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ αντιστοιχεί στη δόνηση έκτασης του δεσμού -N-H της πρωτοταγούς αμίνης και στις δονήσεις έκτασης των δεσμών -C-H του ανθρακικού σκελετού και του αρωματικού δακτυλίου. Στους 1725 cm^{-1} απορροφά το καρβονύλιο του εστερικού δεσμού (δόνηση έκτασης) στην πλευρική ομάδα του αμινοξέος, ενώ στην περιοχή $600\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται οι απορροφήσεις των δονήσεων του αρωματικού δακτυλίου της προστατευτικής ομάδας. Στους 1621 cm^{-1} και 1514 cm^{-1} αντιστοιχεί η ασύμμετρη και η συμμετρική δόνηση κάμψης του δεσμού N-H της αμινομάδας, ενώ στους 1581 cm^{-1} αντιστοιχεί η ασύμμετρη δόνηση έκτασης του καρβοξυλικού ανιόντος, που αποδεικνύει ότι το αμινοξύ βρίσκεται με τη μορφή διπολικού ιόντος. Η ολοκλήρωση της αντίδρασης με το τριφωσγένιο επιβεβαιώθηκε με την εμφάνιση των δύο νέων κορυφών στα 1783 cm^{-1} και 1880 cm^{-1} , που αφορούν τη συμμετρική και ασύμμετρη δόνηση έκτασης των καρβονυλίων του ανυδρίτη αντίστοιχα (Σχήμα 31B). Στο φάσμα του τελικού αμινοξέος (Σχήμα 31C), παρατηρείται η πλήρης κατανάλωση του αρχικού αμινοξέος καθώς απουσιάζουν οι

χαρακτηριστικές κορυφές της ελεύθερης αμινομάδας και του καρβοξυλίου στην περιοχή 1630-1510 cm^{-1} , ενώ ταυτόχρονα απουσιάζει η χαρακτηριστική δόνηση του αμιδικού δεσμού στους 1650 cm^{-1} , γεγονός που αποδεικνύει ότι δεν υπήρξε πρόωρος πολυμερισμός του μονομερούς κατά τη διάρκεια των σταδίων καθαρισμού του.



Σχήμα 31: Φάσματα FT-IR: (A) του προδρόμου αμινοξέος, H-Glu(OBzl)-OH, (B) μετά από 5 ώρες αντίδρασης με το τριφωσγένιο (C) τελικό προϊόν, BLG-NCA, μετά τις ανακρυσταλλώσεις.

Επιπροσθέτως, η επιτυχής σύνθεση του BLG-NCA επιβεβαιώνεται με λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ του ληφθέντος στερεού σε διαλύτη CDCl_3 . Παρατηρείται ότι όλες οι κορυφές αποδίδονται σε υδρογόνα του NCA, ενώ οι ολοκληρώσεις των εμβαδών συμπίπτουν με τις θεωρητικά προβλεπόμενες. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 2.10-2.30 (c: 2H, - $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$), 2.60 (d: 2H, - $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$), 4.37 (b: 1H, - CH- του δακτυλίου του NCA), 5.14 (e: 2H, - $\text{O-CH}_2\text{-βενζυλικά}$), 6.34 (a: 1H, - NH- του δακτυλίου του NCA), 7.26-7.40 (f: 5H, αρωματικά H της προστατευτικής ομάδας).



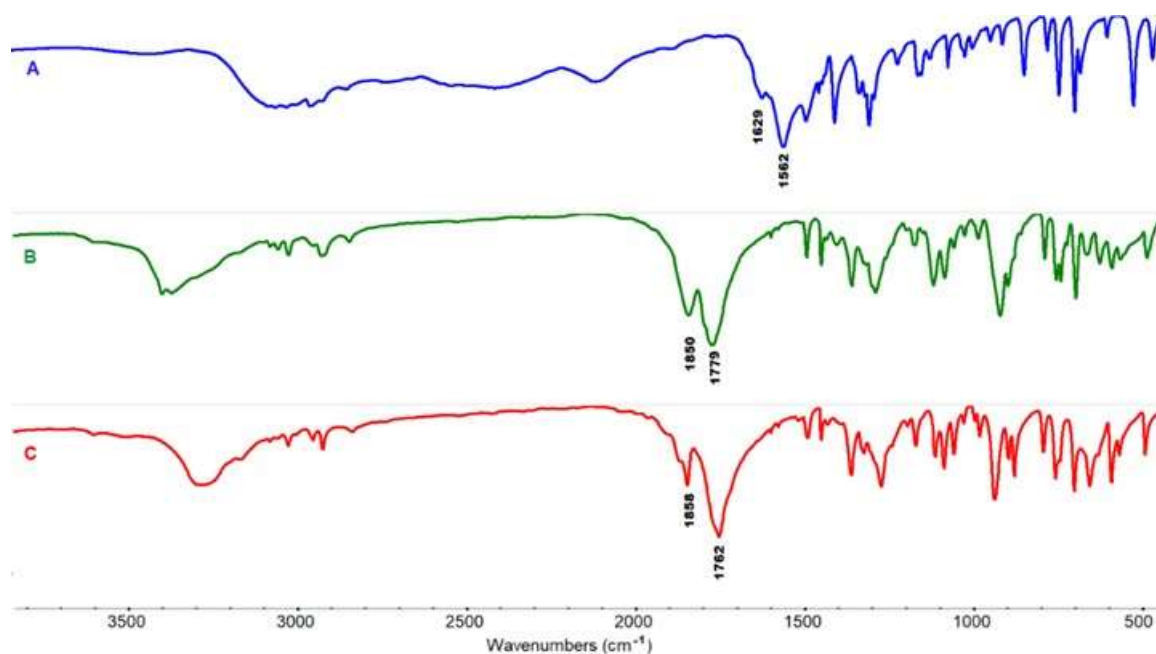
Σχήμα 32: Φάσμα ¹H-NMR του BLG-NCA σε CDCl₃.

5.3 Χαρακτηρισμός του N-καρβοξυανυδρίτη της L-Phenylalanine (Phe NCA)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός του N-καρβόξυ ανυδρίτη της φαινυλαλανίνης πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής εργασίας της Νίκης Ρουμελιώτη. [175]

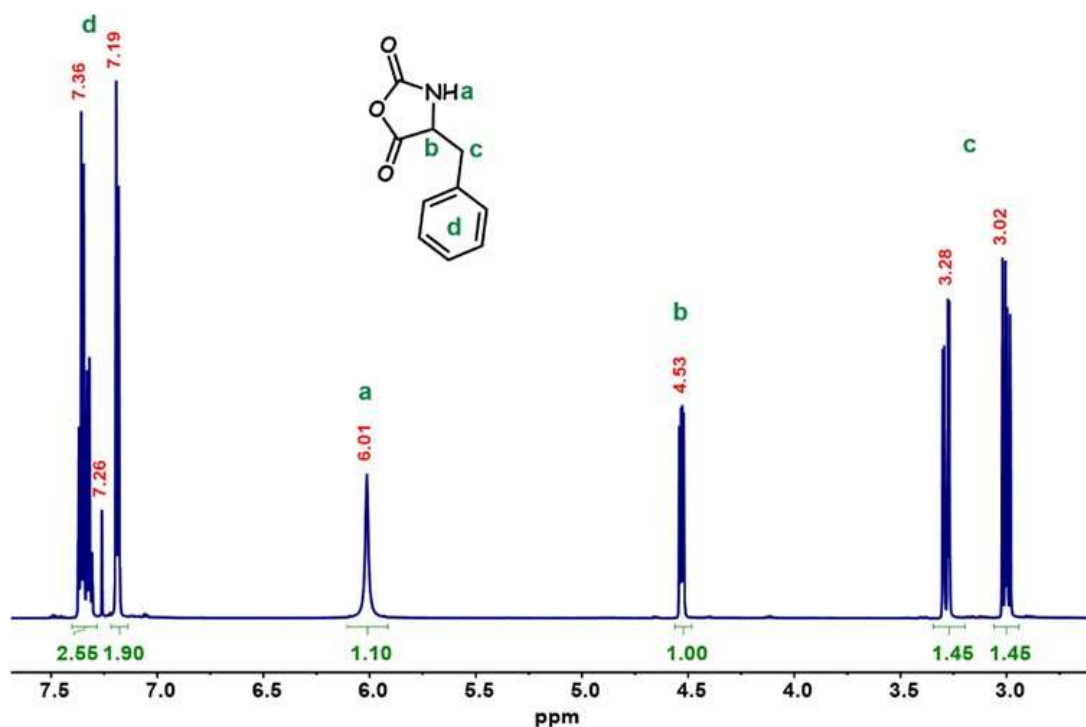
Αρχικά πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπία FT-IR του προδρόμου αμινοξέος H-Phe-OH (Σχήμα 33A). Η χαρακτηριστική κορυφή στα 1562 cm⁻¹ οφείλεται στη δόνηση του καρβονυλίου (C = O) του αμινοξέος της φαινυλαλανίνης. Η κορυφή στα 1629 cm⁻¹ οφείλεται επίσης στη δόνηση κάμψης της ελεύθερης αμινομάδας (-NH₂). Η αντίστοιχη δόνηση του δεσμού NH₂ συμβαίνει στο ευρύ φάσμα 2500-3300 cm⁻¹ σε συνδυασμό με την υδροξυλομάδα του καρβοξυλίου. Μετά την προσθήκη του τριφωσγενίου παρατηρείται ότι οι κορυφές που αντιστοιχούν στο αρχικό αμινοξύ της φαινυλαλανίνης απουσιάζουν εντελώς, ενώ η ύπαρξη δύο νέων κορυφών στα 1779 και 1850 cm⁻¹ υποδεικνύει την επιτυχημένη σύνθεση του NCA (Σχήμα 33B). Στο τελικό φάσμα (Σχήμα 33C) οι κορυφές στα 1762 και 1858 cm⁻¹ αντιστοιχούν στις δονήσεις των καρβονυλίων C2 και C5 του NCA αντίστοιχα, καθώς και στην απουσία της χαρακτηριστικής κορυφής

στα 1650 cm^{-1} λόγω του αμιδικού δεσμού φανερώνει αδρανείς συνθήκες σε όλη τη διάρκεια της σύνθεσης.



Σχήμα 33: Φάσματα FT-IR: (A) του προδρόμου αμινοξέος, H-Phe-OH, (B) μετά από 4,5 ώρες αντίδρασης με τριφωσγένιο και (C) τελικό προϊόν, Phe-NCA, μετά τις ανακρυσταλλώσεις.

Η λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$ του τελικού NCA (Σχήμα 33) απέδειξε την επιτυχή σύνθεση. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 3.02-3.28 (b: 2H, Ph- CH_2 -CH-), 4.53 (c: 1H, N- $\text{CH}(\text{C}=\text{O})$), 6.01 (a: -CH- NH -CO) of the NCA ring, 7.19-7.36 (d: 5H, =C-H, του φαινολικού δακτυλίου). Η κορυφή στα 7.26 ppm οφείλεται στο CDCl_3 .



Σχήμα 34: Φάσμα ¹H-NMR του Phe-NCA σε CDCl₃.

5.4 Χαρακτηρισμός των πολυμερών

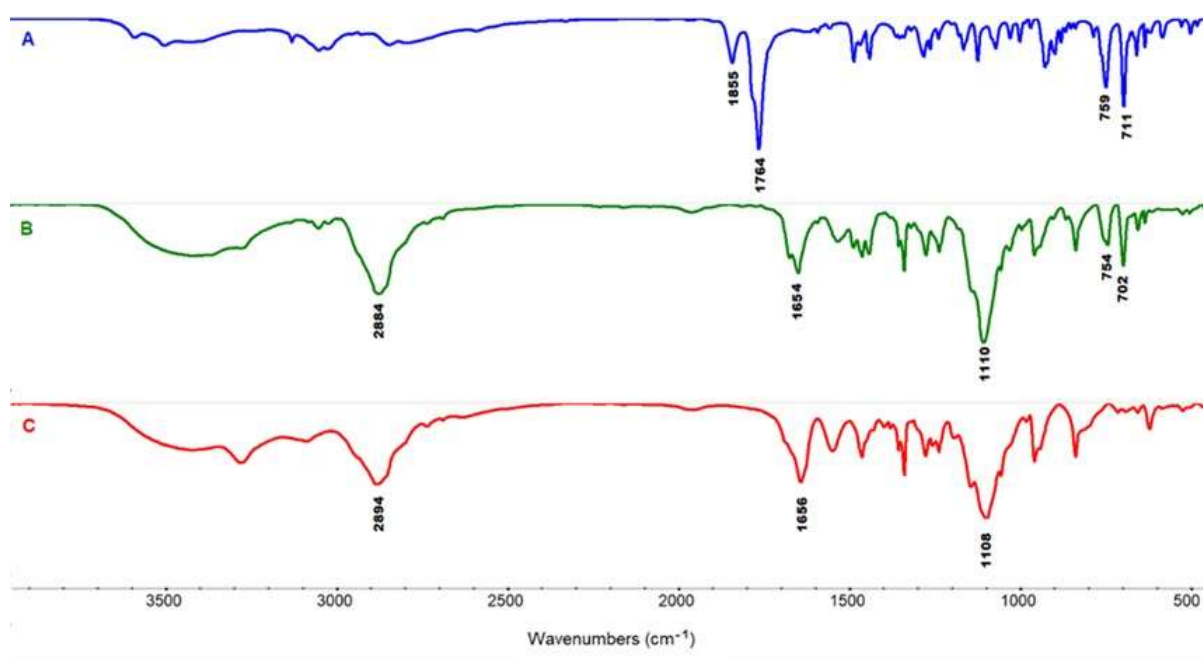
5.4.1 Χαρακτηρισμός των πολυμερών του τύπου poly(ethyleneoxide)₂₂₈-*b*-poly(L-histidine)_n (PEO₂₂₈-*b*-PHis_n)

Όπως προαναφέρθηκε στην αντίστοιχη παράγραφο του πειραματικού μέρους, η σύνθεση των πολυμερών του τύπου PEO₂₂₈-*b*-PHis_n επετεύχθη μέσω του πολυμερισμού διάνοιξης δακτυλίου του *N*^{im}-*Trt*-L-His NCA από τον μακροαπαρχητή mPEO-NH₂ προς σχηματισμό του PEO₂₂₈-*b*-P(*N*^{im}-*Trt*-L-His)_n. Τελικώς, πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση των *Trt*- προστατευτικών ομάδων προς σχηματισμό του τελικού προϊόντος PEO₂₂₈-*b*-PHis_n.

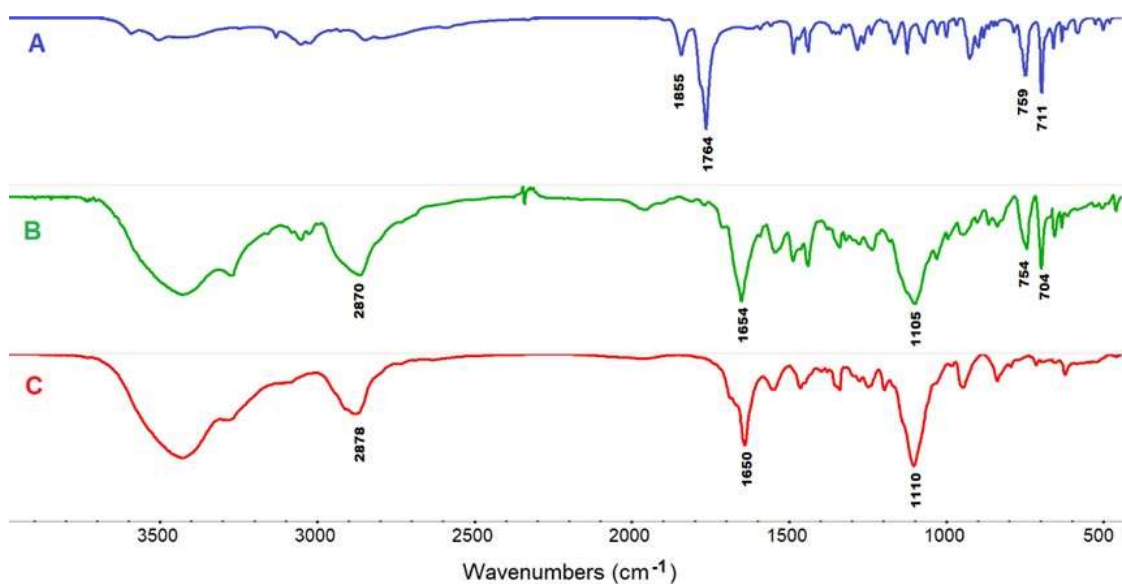
Στη συγκεκριμένη εργασία, έλαβε χώρα η σύνθεση δύο πολυμερών αυτού του τύπου, το ένα εκ των οποίων φέρει 22 δομικές μονάδες ιστιδίνης, PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂, ενώ το άλλο 44, PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα των δύο πολυμερών που προέκυψαν από μετρήσεις φασματοσκοπίας FT-IR, ¹H-NMR και SEC.

Η πρόοδος της σύνθεσης του PEO₂₂₈-*b*-PHis_n καθώς και η απομάκρυνση των *Trt*-ομάδων επιβεβαιώθηκαν αρχικά με φασματοσκοπία FT-IR όπως φαίνεται στα Σχήματα 35, 36. Πιο συγκεκριμένα οι κορυφές στα 1855 cm⁻¹ και 1764 cm⁻¹ (νCO, NCA, s) που οφείλονται στον *N*^{im}-*Trt*-His NCA (Σχήματα 35A, 36A), εξαφανίστηκαν μετά την

ολοκλήρωση του πολυμερισμού (Σχήματα 35B, 36B). Μια χαρακτηριστική κορυφή στα 1650 cm^{-1} εμφανίστηκε επίσης λόγω του σχηματισμού του πεπτιδικού δεσμού. Επιπλέον, η επιτυχής απομάκρυνση των *Trt*-προστατευτικών ομάδων επιβεβαιώθηκε με την απουσία των δύο χαρακτηριστικών κορυφών στα 702 και 754 cm^{-1} που οφείλονται στις προστατευτικές ομάδες (Σχήματα 35C, 36C). Άλλες ορατές κορυφές στο φάσμα είναι αυτές στα 1110 cm^{-1} που οφείλεται στην δόνηση έκτασης του δεσμού -C-O-C- του πολυ(αιθυλενοξειδίου) και στα $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ που αντιστοιχεί σε δονήσεις των δεσμών -C-H .

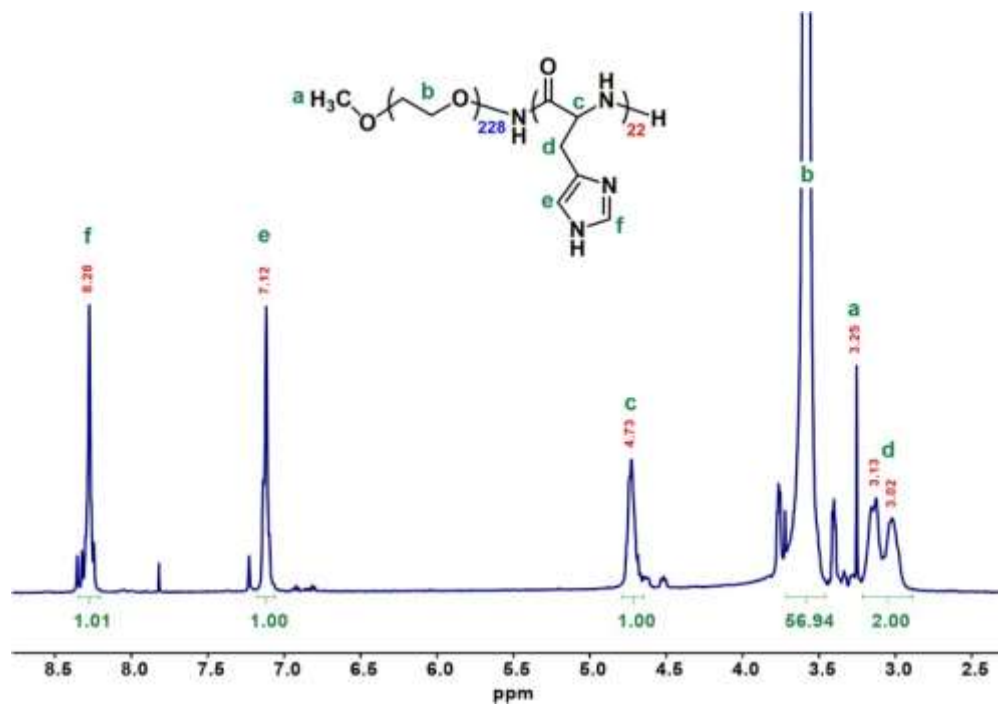


Σχήμα 35: Φάσματα FT-IR: (A) $\text{N}^{\text{im}}\text{-Trt-L-His NCA}$; (B) $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-P}(\text{N}^{\text{im}}\text{-Trt-L-His})_{22}$;
(C) $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}$.

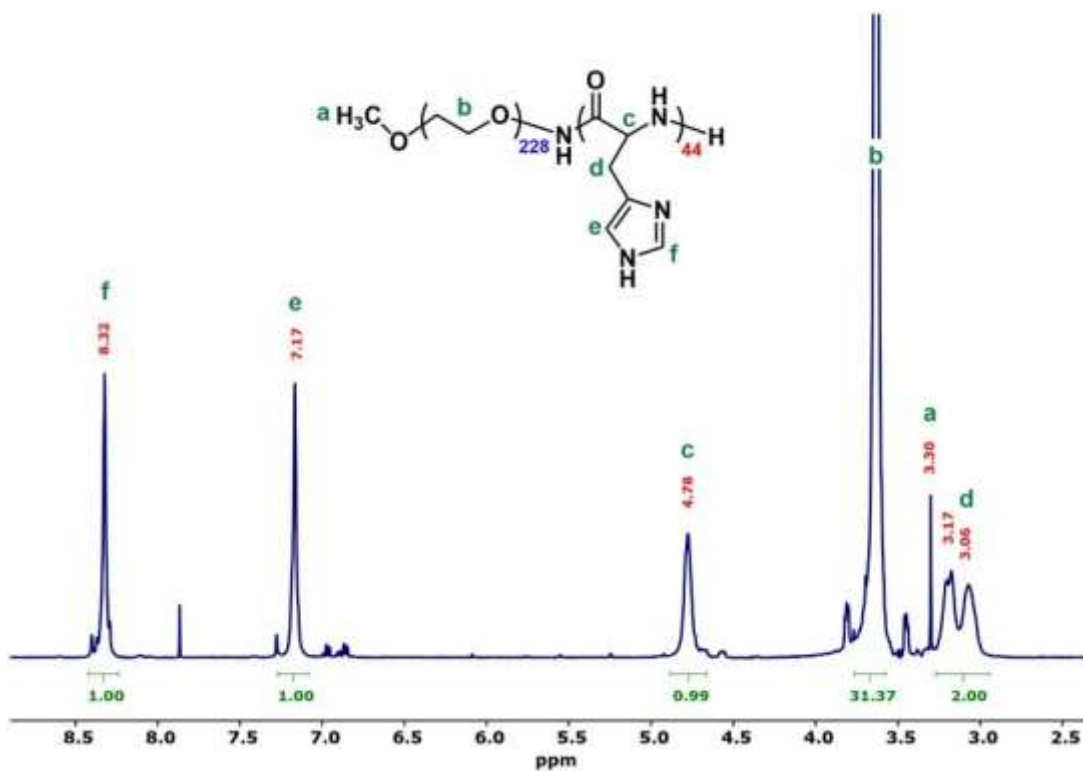


Σχήμα 36: Φάσματα FT-IR: (A) N^{im} -Trt-L-His NCA; (B) PEO_{228} -b-P(N^{im} -Trt-L-His) $_{44}$; (C) PEO_{228} -b-PHis $_{44}$.

Επιπλέον, η επιτυχής σύνθεση των συμπολυμερών αποκαλύφθηκαν επίσης με φασματοσκοπία 1H -NMR (Σχήματα 37, 38): 1H -NMR (400 MHz, d-TFA, δ, ppm): 3.00-3.20 (d: 2H, $-CH_2-IM$), 3.25-3.30 (a: 3H, CH_3-O-), 3.55-3.63 (b: 4H, $-CH_2-CH_2-O-$), 4.73-4.78 (c: 1H, $NH-CH-(CH_2-IM)-C=O$), 7.12-7.17 (e: 1 H, $C=CH-N-$), 8.28-8.32 (f: 1 H, $-N=CH-N-$). Η αποπροστασία της PHis είναι εμφανής αφού οι κορυφές των πρωτονίων που αντιστοιχούν στα αρωματικά υδρογόνα στα 7,09-7,35 ppm δεν είναι παρούσες. Όπως παρατηρήθηκε, η ολοκλήρωση των κορυφών συμπίπτει σχεδόν με τις θεωρητικά προβλεπόμενες τιμές, επιβεβαιώνοντας έτσι την επιτυχημένη σύνθεση.

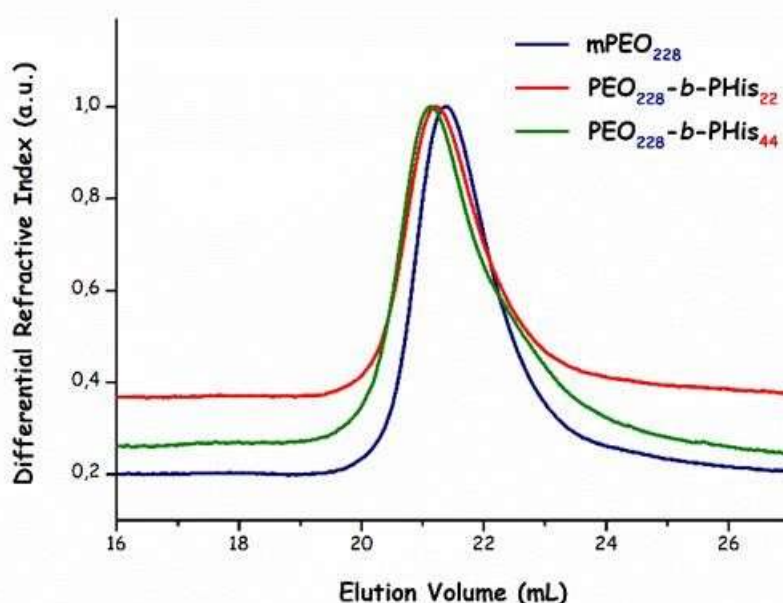


Σχήμα 37: Φάσμα ¹H-NMR του PEO₂₂₈-b-PHis₂₂ σε d-TFA.



Σχήμα 38: Φάσμα ¹H-NMR του PEO₂₂₈-b-PHis₄₄ σε d-TFA.

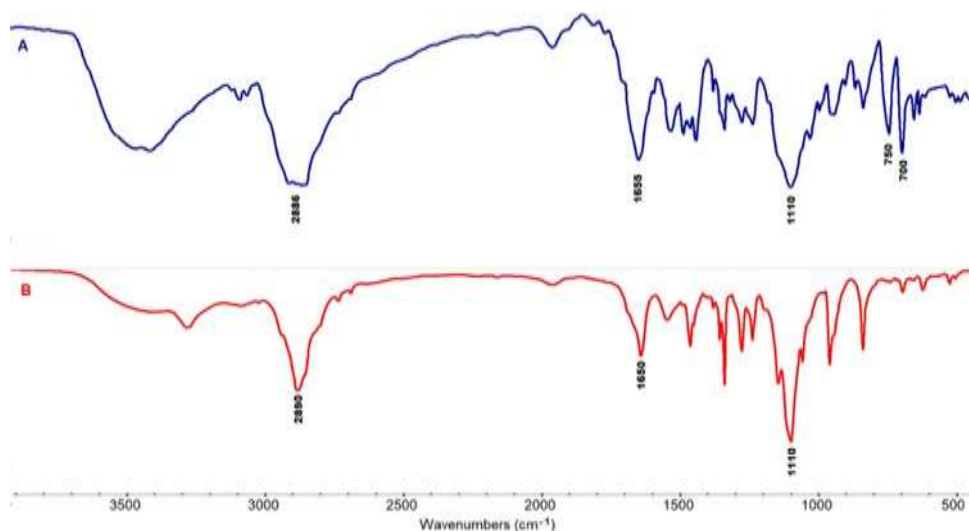
Περαιτέρω χαρακτηρισμός των τελικών συμπολυμερών πραγματοποιήθηκε σε υδατικό SEC (Σχήμα 39). Η κατανομή μοριακού βάρους του μακροαπαρχητή με άμινο τελική ομάδα ήταν ίση με 1,02 ενώ των συμπολυμερών PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂ και PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ ήταν ίση με 1,12 και 1,16 αντίστοιχα. Τα μοριακά βάρη που λήφθηκαν ήταν επίσης $M_n = 9,13 \times 10^{-3} \text{ g mol}^{-1}$, $M_n = 11,8 \times 10^{-3} \text{ g mol}^{-1}$ και $14,9 \times 10^{-3} \text{ g mol}^{-1}$ αντίστοιχα, κοντά στα θεωρητικά προβλεπόμενα. Ο χαμηλός δείκτης πολυδιασποράς καθώς και η ύπαρξη μονοτροπικής κορυφής υποδεικνύουν μια ελεγχόμενη διαδικασία πολυμερισμού.



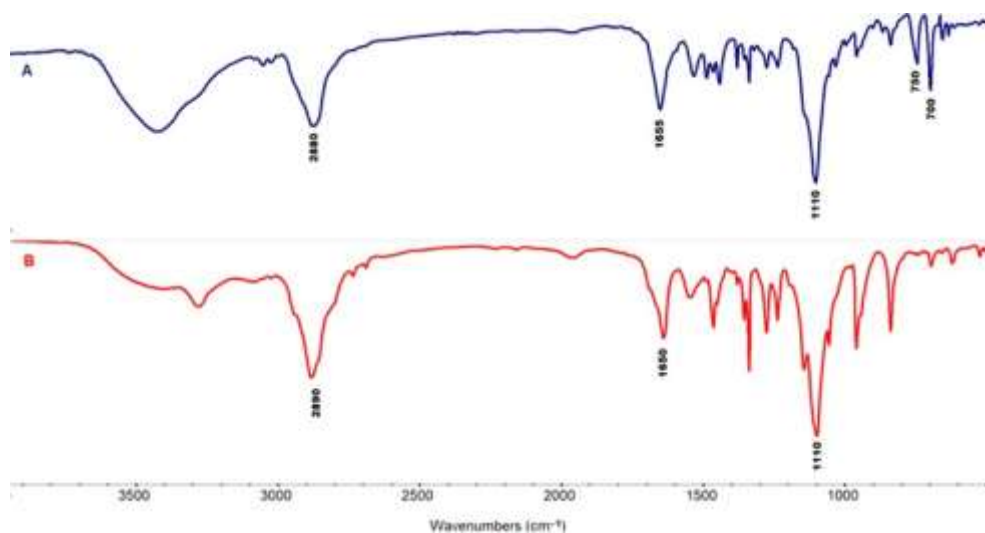
Σχήμα 39: Χρωματογράφημα SEC των mPEO-NH₂, PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂ και PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ σε διαλύτη H₂O/TFA.

5.4.2 Χαρακτηρισμός των πολυμερών του τύπου poly(ethylene oxide)₂₂₈-*b*-poly(L-histidine)₂₉-*b*-poly(L-phenylalanine)_n (PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe_n)

Η φασματοσκοπία υπερύθρων FT-IR χρησιμοποιήθηκε επίσης για να εξεταστεί η συνθετική πορεία των συμπολυμερών PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe₅ και PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe₁₀. Όπως φαίνεται στα Σχήματα 40A και 41A η απουσία των κορυφών NCA καθώς και η εμφάνιση της κορυφής στα 1655 cm⁻¹ του αμιδικού δεσμού, επιβεβαίωσε την ολοκλήρωση του πολυμερισμού των δύο συστάδων. Η εξαφάνιση των κορυφών στα 700 και 750 cm⁻¹ που αντιστοιχούν στις δονήσεις των Trt- προστατευτικών ομάδων είναι επίσης εμφανής όπως παρατηρείται στα Σχήματα 40B και 41B.



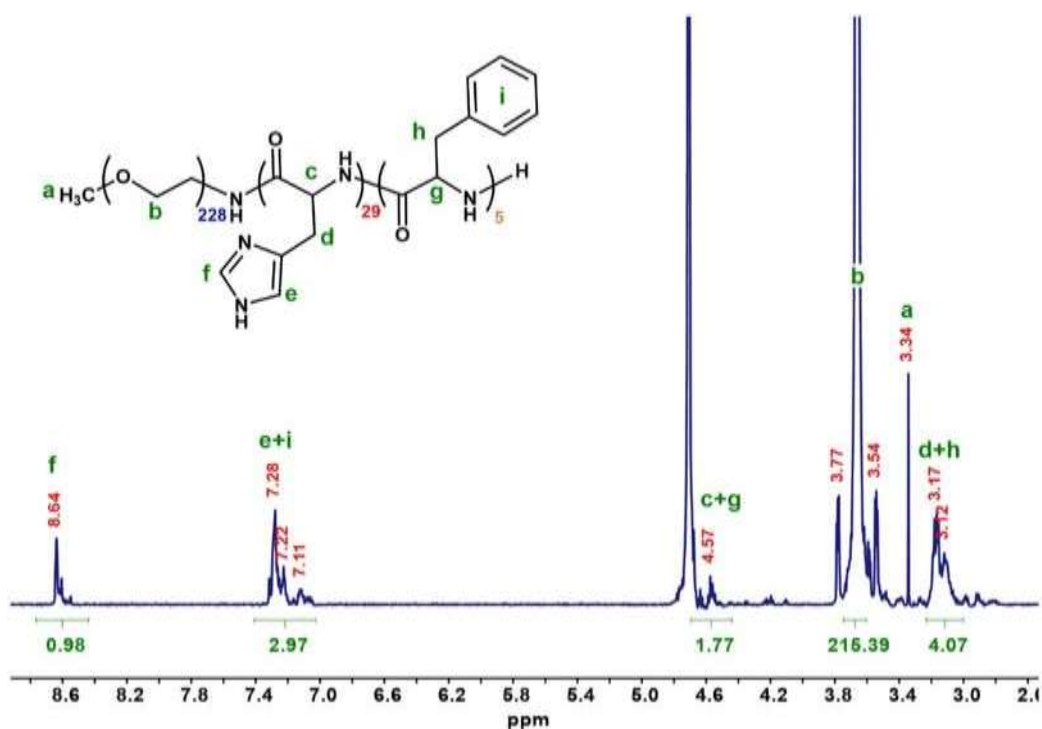
Σχήμα 40: Φάσματα FT-IR: (A) του προστατευμένου κατά συστάδες συμπολυμερούς PEO₂₂₈-b-P(N^{im}-Trt-L-His)₂₉-b-PPhe₅ και (B) του αποπροστατευμένου κατά συστάδες συμπολυμερούς PEO₂₂₈-b-PHis₂₉-b-PPhe₅.



Σχήμα 41: Φάσματα FT-IR: (A) του προστατευμένου κατά συστάδες συμπολυμερούς PEO₂₂₈-b-P(N^{im}-Trt-L-His)₂₉-b-PPhe₁₀ και (B) του αποπροστατευμένου κατά συστάδες συμπολυμερούς PEO₂₂₈-b-PHis₂₉-b-PPhe₁₀.

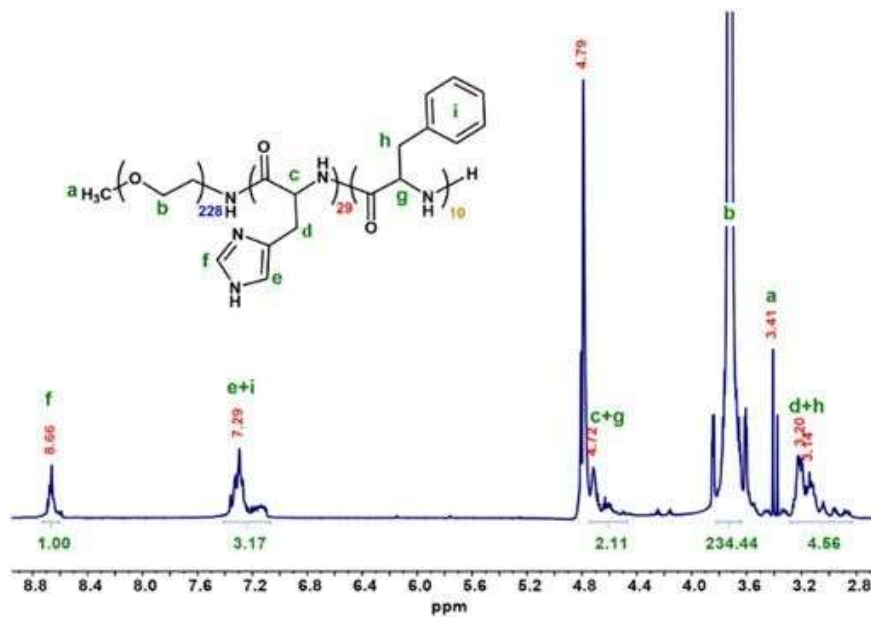
Ήταν δύσκολο να βρεθεί ένας κοινός καλός διαλύτης για τη διαλυτοποίηση και των τριών συστάδων του υβριδικού συμπολυμερούς. Επομένως, ερευνήθηκαν διάφοροι διαλύτες. Πιο συγκεκριμένα, λαμβάνονται φάσματα ¹H-NMR σε d-DMSO, d-DMSO και d-TFA 1%, D₂O και d-TFA 1%, 2% και 15% και τέλος D₂O και DCI 1% και 1,5%. Τα καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται σε D₂O/DCI 1%.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ 1%, δ , ppm) για $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{29}\text{-}b\text{-PPhe}_5$: 3.12-3.17 (d+h: 2H, $-\text{CH}_2\text{-IM}$ και 2H, $-\text{CH}_2\text{-Ph}$), 3.34 (a: 3H, $\text{CH}_3\text{-O-}$), 3.54-3.77 (b: 4H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 4.57 (c+g: 1 H, $\text{NH-CH}(\text{CH}_2\text{-IM})\text{-C=O}$ και 1 H, $\text{NH-CH}(\text{CH}_2\text{-Ph})\text{-C=O}$), 7.11-7.28 (1H, C=CH-N-) και (e+i: 5H, $=\text{CH}$ αρωματικό), 8.64 (f: 1H, $-\text{N=CH-N-}$). Όπως παρατηρήθηκε, όλες οι κορυφές αποδίδονται σε άτομα υδρογόνου του πολυμερούς. (Σχήμα 42).



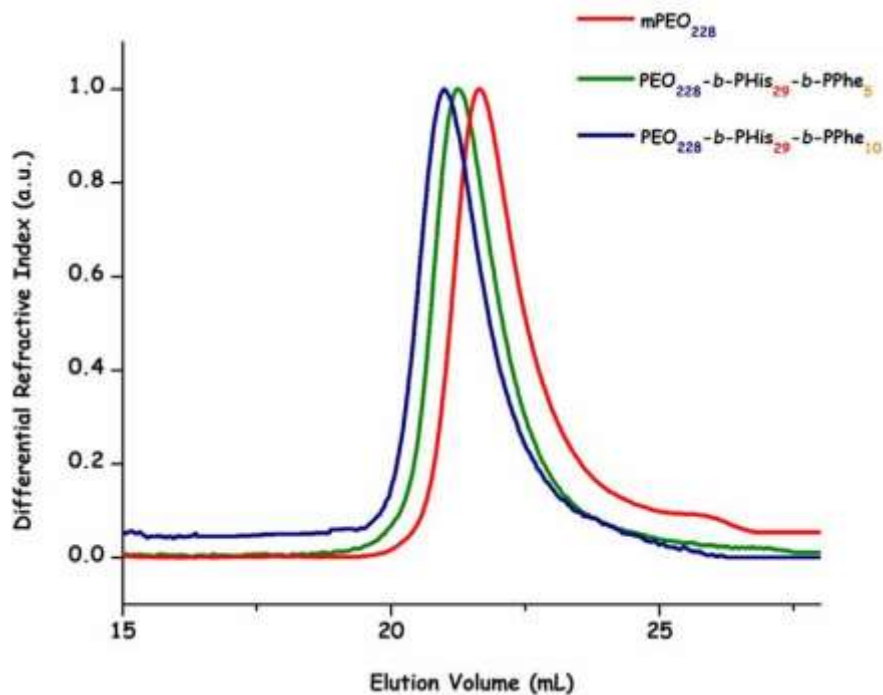
Σχήμα 42: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{29}\text{-}b\text{-PPhe}_5$ σε $\text{D}_2\text{O}/1\%$ DCI.

Το αντίστοιχο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του αποπροστατευμένου συμπολυμερούς παρουσιάζεται στο Σχήμα 43. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ 1%, δ , ppm): 3.14-3.20 (d+h: 2H, $-\text{CH}_2\text{ IM}$ και 2H, $-\text{CH}_2\text{-Ph}$), 3.41 (a: 3H, $\text{CH}_3\text{-O-}$), 3.54 -3,77 (b: 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 4,72 (c+g: 1 H, $\text{NH-CH}(\text{CH}_2\text{-IM})\text{-C=O}$ και 1 H, $\text{NH-CH}(\text{CH}_2\text{-Ph})\text{-C=O}$), 7.11-7.29 (e+j: 1H, C=CH-N- και 5H, $=\text{CH}$ αρωματικά), 8.66 (f: 1H, $-\text{N=CH-N-}$). Όπως παρατηρήθηκε, όλες οι κορυφές αποδίδονται σε άτομα υδρογόνου του πολυμερούς όπως παραπάνω.



Σχήμα 43: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{29}\text{-}b\text{-PPhe}_{10}$ σε $\text{D}_2\text{O}/1\%$ DCI.

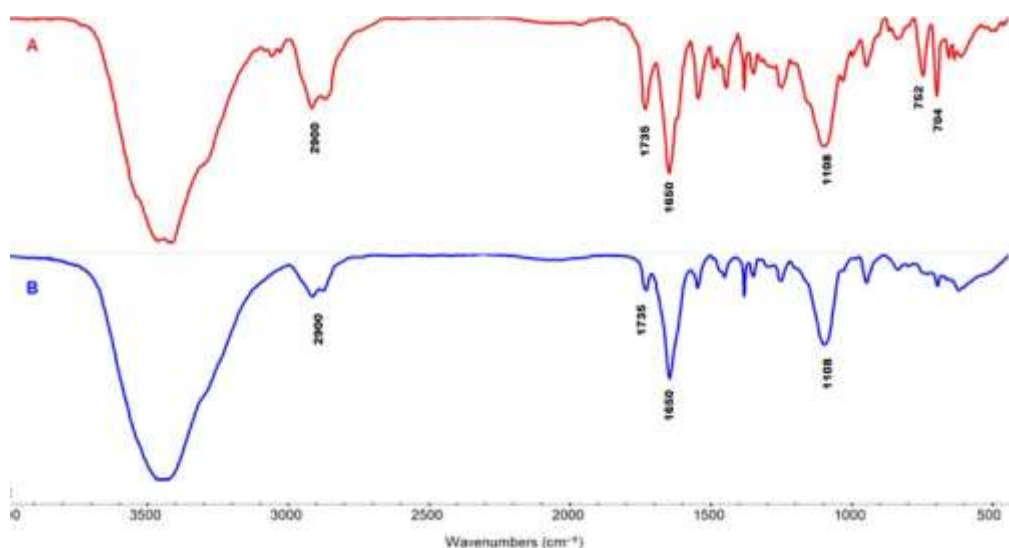
Τα αποπροστατευμένα συμπολυμερή εξετάστηκαν επίσης με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών σε υδατική SEC (Σχήμα 44). Η κατανομή μοριακού βάρους των συμπολυμερών $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{29}\text{-}b\text{-PPhe}_5$ και $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{29}\text{-}b\text{-PPhe}_{10}$ ήταν ίση με 1,14 και 1,13 αντίστοιχα.



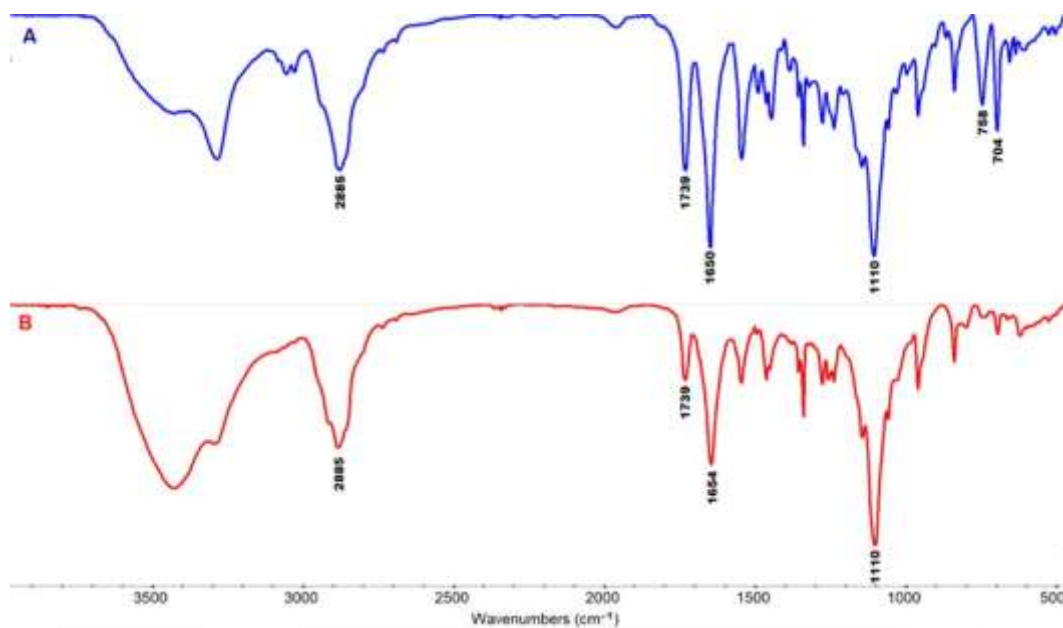
Σχήμα 44: Χρωματογραφήματα SEC του μακροαπαρηχτή mPEO_{228} καθώς και των αποπροστατευμένων συμπολυμερών $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{29}\text{-}b\text{-PPhe}_5$ και $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{29}\text{-}b\text{-PPhe}_{10}$ σε διαλύτη $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$.

5.4.3 Χαρακτηρισμός των κατά συστάδων συμπολυμερών του τύπου poly(ethyleneoxide)₂₂₈-b-poly(L-histidine)₂₂-b-poly(γ-benzyl-L-glutamate)_n (PEO₂₂₈-b-PHis₂₉-b-PBLG_n)

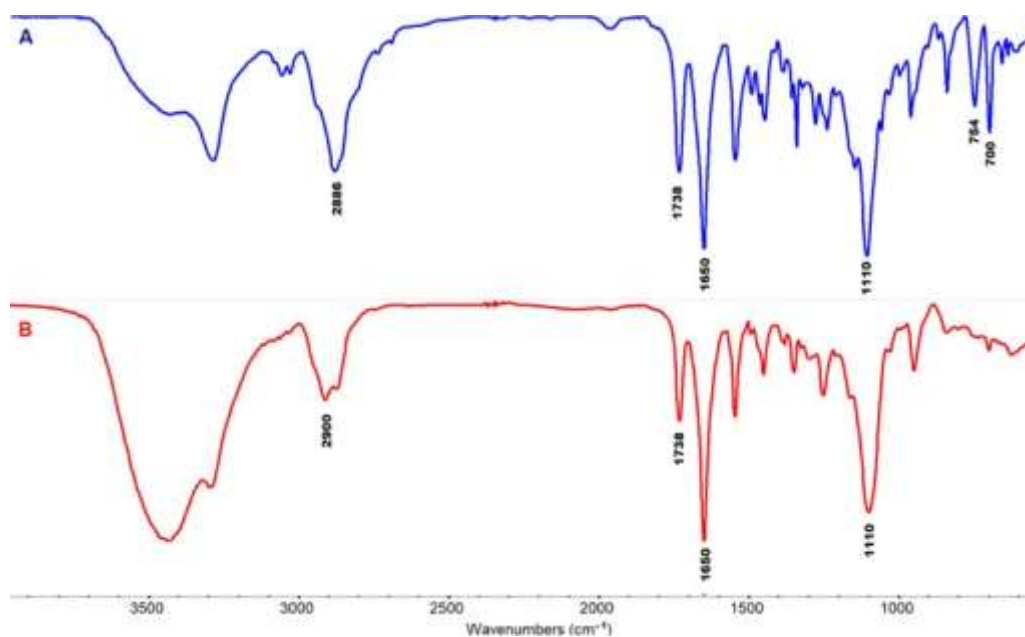
Οι ελεύθερες τελικές αμινομάδες του PEO₂₂₈-b-PHis₂₂ χρησιμοποιήθηκαν ως θέσεις έναρξης για τον ROP του BLG-NCA δίνοντας το προστατευμένο PEO₂₂₈-b-p(N^{im}-Trt-L-His)₂₂-b-PBLG_n. Φασματοσκοπία υπερώθρων FT-IR χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση της προόδου της σύνθεσης του συμπολυμερούς PEO₂₂₈-b-PHis₂₂-b-PBLG₁₀ (Σχήμα 45). Η ολοκλήρωση της αντίδρασης πολυμερισμού επιβεβαιώνεται από την απουσία των κορυφών των NCAs καθώς και την εμφάνιση των κορυφών στα 1650 cm⁻¹ και 1550 cm⁻¹, (Σχήμα 45A) που οφείλονται στην έκταση του δεσμού του καρβονυλίου και την κάμψη του δεσμού N-H, γεγονός που αποδεικνύει την επιτυχή σύνθεση της πολυπεπτιδικής συστάδας. Επιπλέον, η απουσία των χαρακτηριστικών κορυφών στα 704 και 752 cm⁻¹ που αποδίδονται στις ομάδες Trt- της ιστιδίνης υποδεικνύουν την πλήρη διάσπαση των προστατευτικών τμημάτων μετά την αποπροστασία, ενώ η κορυφή στα 1735 cm⁻¹, λόγω της βένζυλο προστατευτικής ομάδας, παρέμεινε άθικτη, όπως φαίνεται στο Σχήμα 45B. Τέλος, οι κορυφές στα 1110 cm⁻¹ και 2800 cm⁻¹ περίπου οφείλονται στην δόνηση έκτασης του δεσμού -C-O-C- του πολυ(αιθυλενοξειδίου) και στις δονήσεις των δεσμών -C-H αντίστοιχα. Τα φάσματα FT-IR των άλλων δύο προστατευμένων καθώς και των αποπροστατευμένων συμπολυμερών δείχνουν επίσης τις αναμενόμενες κορυφές όπως παρατηρείται στα Σχήματα 46 και 47.



Σχήμα 45: Φάσματα FT-IR: (A) PEO₂₂₈-b-p(N^{im}-Trt-L-His)₂₂-b-PBLG₁₀; (B) PEO₂₂₈-b-PHis₂₂-b-PBLG₁₀.



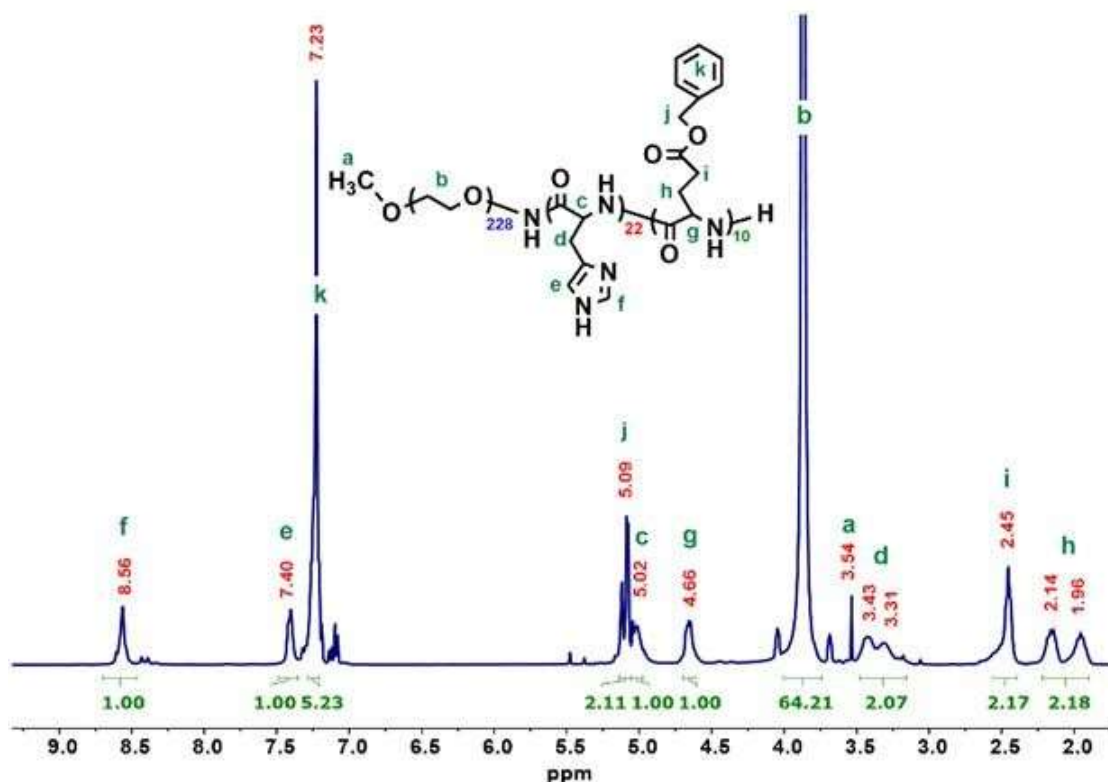
Σχήμα 46: Φάσματα FT-IR: (A) PEO₂₂₈-*b*-P(N^{im}-Trt-L-His)₂₂-*b*-PBLG₂₀; (B) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₂₀.



Σχήμα 47: Φάσματα FT-IR: (A) PEO₂₂₈-*b*-P(N^{im}-Trt-L-His)₂₂-*b*-PBLG₄₀; (B) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₄₀.

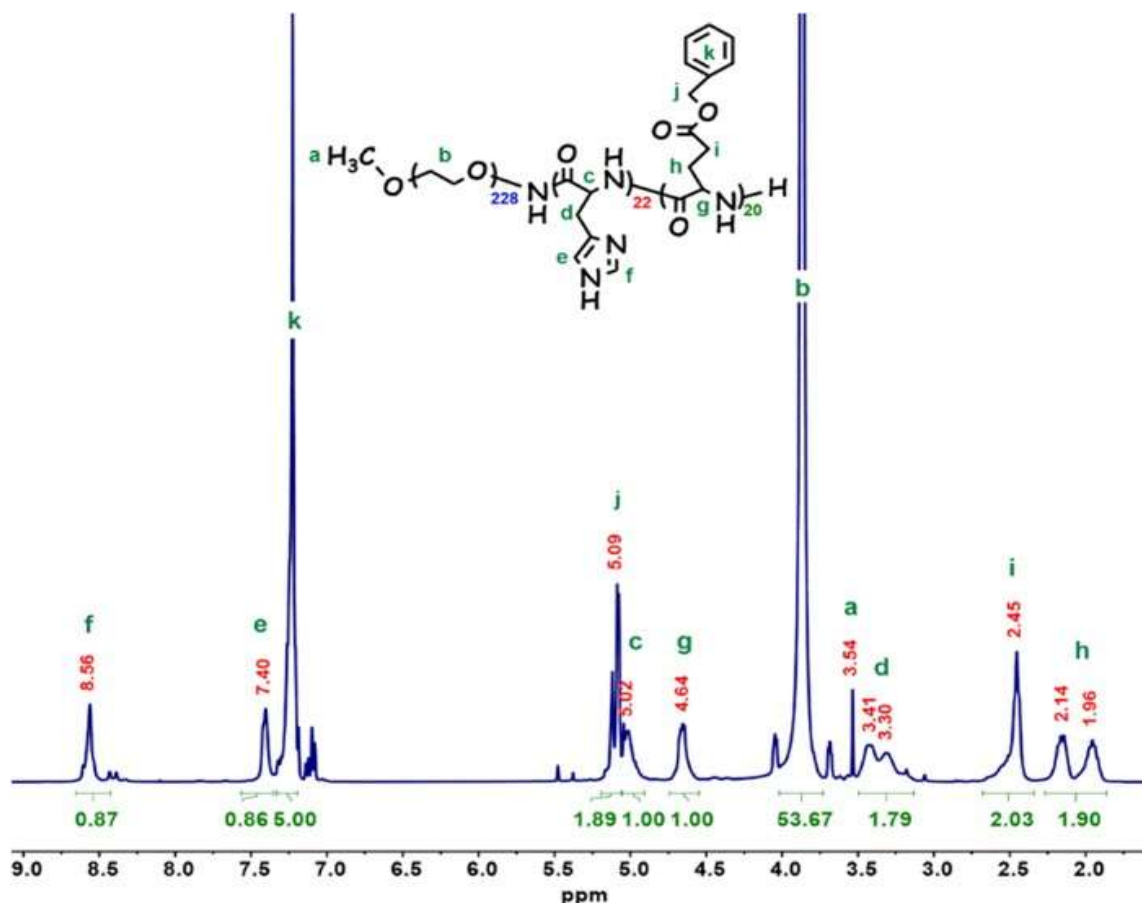
Επιπροσθέτως, πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπία ¹H-NMR των πλήρως αποπροστατευμένων συμπολυμερών PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG_n, η οποία επιβεβαίωσε όχι μόνο την επιτυχημένη διαδικασία του πολυμερισμού αλλά και την πλήρη απομάκρυνση των *Trt*-προστατευτικών ομάδων.

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}\text{-}b\text{-PBLG}_{10}$ δίνεται στο Σχήμα 48. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d-TFA, δ , ppm): 1.96-2.45 (h+i: 4H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O}$ βενζυλικός εστέρας), 3.31-3.43 (d: 2H, $-\text{CH}_2\text{-IM}$), 3.54 (a: 3H, $\text{CH}_3\text{-O-}$), 3.8 (b: 4H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 4.66-5.02 (c+g: 1H, $\text{NH-CH}(\text{CH}_2\text{-IM})\text{-C=O}$), 5.09 (j: 2H, $(\text{C=O})\text{-O-CH}_2\text{-benzyl}$), 7.23 (k: 5H, $=\text{C-H}$ αρωματικά), 7.40 (e: 1H, C=CH-N-), 8.56 (f: 1H, $-\text{N=CH-N-}$). Όπως παρατηρείται, όλες οι κορυφές αποδίδονται σε άτομα υδρογόνου του πολυμερούς.



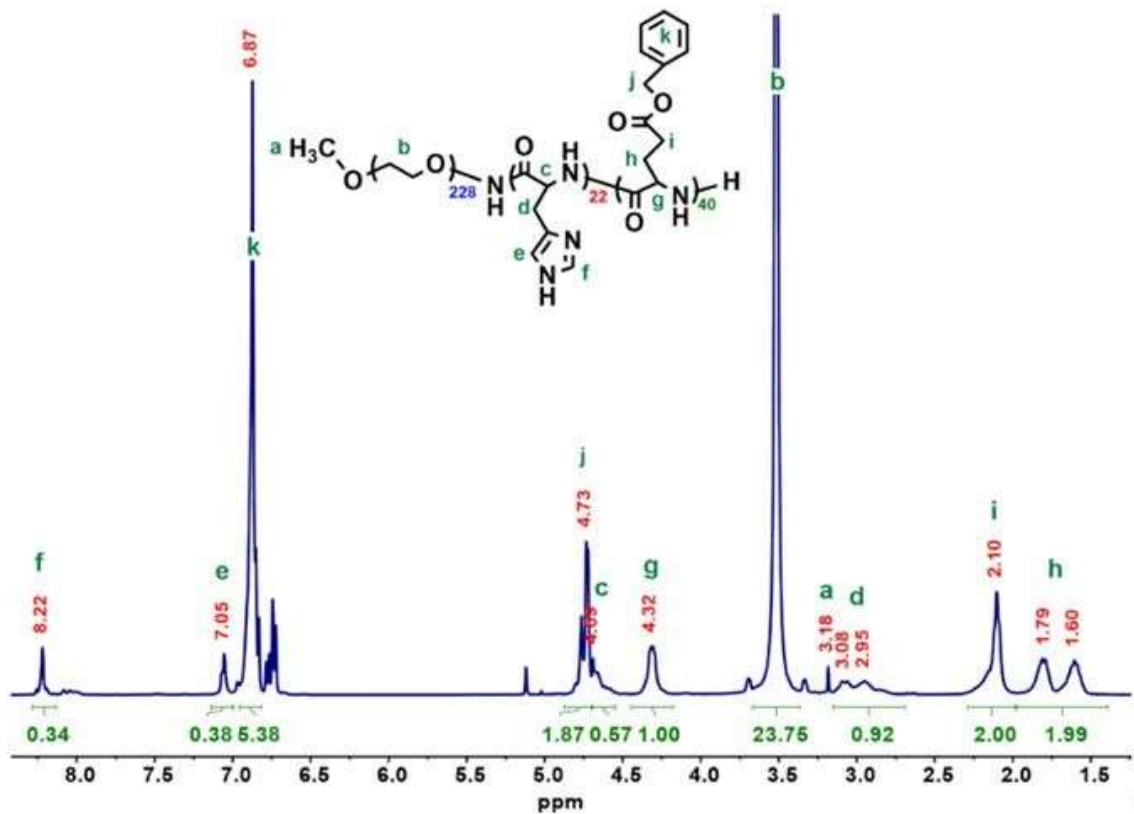
Σχήμα 48: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}\text{-}b\text{-PBLG}_{10}$ σε d-TFA.

Το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}\text{-}b\text{-PBLG}_{20}$ παρατίθεται στο Σχήμα 49. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d-TFA, δ , ppm): 1.96-2.45 (h+i: 4H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O}$ βενζυλικός εστέρας), 3.30-3.41 (d: 2H, $-\text{CH}_2\text{-IM}$), 3.54 (a: 3H, $\text{CH}_3\text{-O-}$), 3.8 (b: 4H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 4.64-5.02 (c+g: 1H, $\text{NH-CH}(\text{CH}_2\text{-IM})\text{-C=O}$), 5.09 (j: 2H, $(\text{C=O})\text{-O-CH}_2\text{-benzyl}$), 7.23 (k: 5H, $=\text{C-H}$ αρωματικά), 7.40 (e: 1H, C=CH-N-), 8.56 (f: 1H, $-\text{N=CH-N-}$). Και σε αυτήν την περίπτωση, όλες οι κορυφές αποδίδονται σε άτομα υδρογόνου των πολυμερούς.



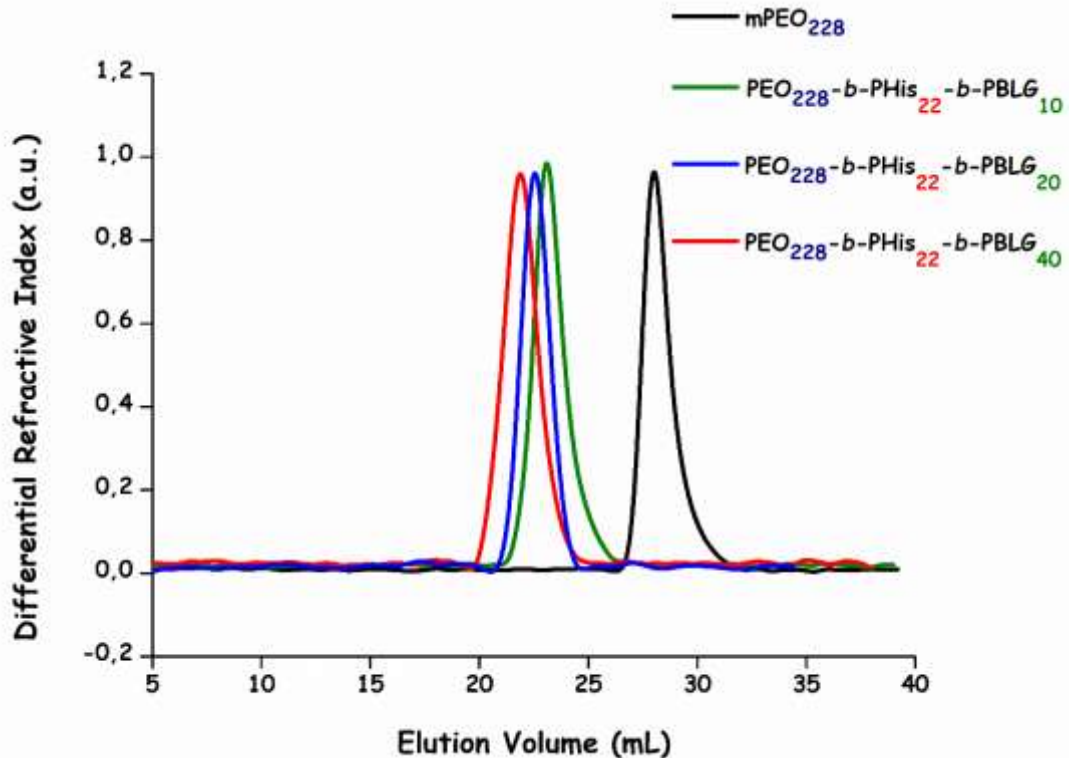
Σχήμα 49: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}\text{-}b\text{-PBLG}_{20}$ σε d-TFA.

Η επιτυχής σύνθεση του $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}\text{-}b\text{-PBLG}_{40}$ αξιολογήθηκε επίσης με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ του λαμβανόμενου στερεού σε d-TFA (Σχήμα 50). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d-TFA, δ , ppm) για το $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}\text{-}b\text{-PBLG}_{40}$: 1.60-2.10 (h+i: 4H, -CH₂-CH₂-C=O, βενζυλικός εστέρας), 2.95-3.08 (d: 2H, -CH₂-IM), 3.18 (a: 3H, CH₃-O-), 3.5 (b: 4H, -CH₂-CH₂-O-), 4.32-4.69 (c+g: 1H, NH-CH-(CH₂-IM)-C=O), 4.73 (j: 2H, (C=O)-O-CH₂-benzyl), 6.87 (k: 5H, =C-H αρωματικά), 7.05 (e: 1H, C=CH-N-), 8.22 (f: 1H, -N=CH-N-). Όπως παρατηρείται, και εδώ όλες οι κορυφές αποδίδονται σε άτομα υδρογόνου του πολυμερούς.



Σχήμα 50: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}\text{-}b\text{-PBLG}_{40}$ σε $d\text{-TFA}$.

Τα διαγράμματα SEC που παρέχονται στο Σχήμα 51 ελήφθησαν σε διαλύτη DMF/LiBr. Παρόλο που η αποπροστατευμένη συστάδα της PHis δεν είναι πλήρως διαλυτή σε αυτόν τον διαλύτη σε θερμοκρασία δωματίου, δεν συνέβη καμία συσσώρευση υπό τις συνθήκες SEC και παρουσιάστηκαν μονοτροπικές κορυφές. Αυτό ίσως οφείλεται στον ρυθμό διάτμησης που προκαλείται στο δείγμα μέσα στους πόρους των στηλών υπό αυτές τις συνθήκες καθώς και στην υψηλότερη θερμοκρασία. Ο δείκτης πολυδιασποράς του $m\text{PEO-NH}_2$ ήταν ίσος με 1,04 ενώ οι κατανομές μοριακού βάρους των $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}\text{-}b\text{-PBLG}_{10}$, $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}\text{-}b\text{-PBLG}_{20}$ και $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}\text{-}b\text{-PBLG}_{40}$ ήταν ίσες με 1,14, 1,15, 1,13 αντίστοιχα.



Σχήμα 51: Διαγράμματα SEC του μακροαπαρχητή $mPEO_{228}$ καθώς και των συμπολυμερών $PEO_{228}-b-PHis_{22}-b-PBLG_{10}$, $PEO_{228}-b-PHis_{22}-b-PBLG_{20}$ και $PEO_{228}-b-PHis_{22}-b-PBLG_{40}$ σε διαλύτη DMF/LiBr.

5.5 Μελέτη του κατά συστάδες συμπολυμερούς $PEO_{228}-b-PHis_{44}$ με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS)

Στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή, οι μελέτες ο εγκλωβισμού και απελευθέρωσης αντικαρκινικών φαρμάκων σε συνθήκες ζωντανού οργανισμού πραγματοποιήθηκαν στο κατά συστάδες συμπολυμερές $PEO_{228}-b-PHis_{44}$. Για το λόγο αυτό, στο συγκεκριμένο πολυμερές πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της αυτό-οργάνωσης καθώς και μελέτη των σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων με την τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός προκειμένου να αποφανθεί το μέγεθος των νανοσωματιδίων που θα εισέλθουν στο ζωντανό οργανισμό.

Η τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) χρησιμοποιείται, ώστε να μελετηθεί η ικανότητα αυτοοργάνωσης των πολυμερών, καθώς και το μέγεθος των συντιθέμενων νανοσωματιδίων. Για τη μελέτη αυτή έλαβαν χώρα μετρήσεις σε διαφορετικές τιμές pH και θερμοκρασίες, με σκοπό να ελεγχθεί η αποκρισιμότητα των νανοσωματιδίων τόσο σε συνθήκες υγιούς ιστού, όσο και σε καρκινικού κυττάρου. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις στα διαλύματα των πολυμερών που έχουν προκύψει

από την τεχνική της διαπίδυσης (dialysis) σε pH=7,4 (pH του ανθρώπινου αίματος), σε pH=6,5 (pH του εξωτερικού των καρκινικών κυττάρων), σε pH=5 (pH του εσωτερικού των καρκινικών κυττάρων), καθώς και σε pH=6,5 και pH=5. Σε κάθε pH λήφθηκαν αποτελέσματα σε τρεις θερμοκρασίες: 25 °C (θερμοκρασία περιβάλλοντος), 37 °C (θερμοκρασία υγιούς οργανισμού), 40 °C (θερμοκρασία φλεγμονής καρκινικών ιστών) και σε τρεις γωνίες 45°, 90°, 135° προκειμένου να διεξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με το πώς σκεδάζουν τα μικρά σωματίδια και πώς τα μεγάλα, καθώς και αν υπάρχει γωνιακή εξάρτηση.

Γενικά η διαδικασία της αυτό-οργάνωσης των πολυπεπτιδίων πραγματοποιήθηκε αρχικά με την προσθήκη του πολυμερούς σε έναν καλό διαλύτη, DMSO, προκειμένου να σπάσουν να συσσωματώματα και να δημιουργηθούν όσο το δυνατόν ελεύθερες αλυσίδες. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η προσθήκη υδατικού διαλύματος με αποτέλεσμα να δημιουργηθούν μικκυλιακές δομές αποτελούμενες από την υδρόφοβη πολύ(ιστιδίνη) στον πυρήνα και το υδρόφιλο πολυ(αιθυλενοξειδίο) στην εξωτερική στιβάδα.

Όπως είναι λογικό, στον τρόπο αυτό-οργάνωσης των πολυπεπτιδίων συμβάλλουν πολλοί παράγοντες, όπως η συγκέντρωση του πολυμερούς στον «καλό» διαλύτη, η επιλογή του «κακού» και του καλού «διαλύτη» καθώς και πολλοί άλλοι παράγοντες. Όσον αφορά τη συγκέντρωση του πολυμερούς, η διαδικασία συσσωμάτωσης που ακολουθήθηκε στη συγκεκριμένη πειραματική προσπάθεια είχε ως στόχο τελική συγκέντρωση 1 mg/mL, προκειμένου να προσεγγίσει τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες εγκλωβισμού και απελευθέρωσης των φαρμάκων.

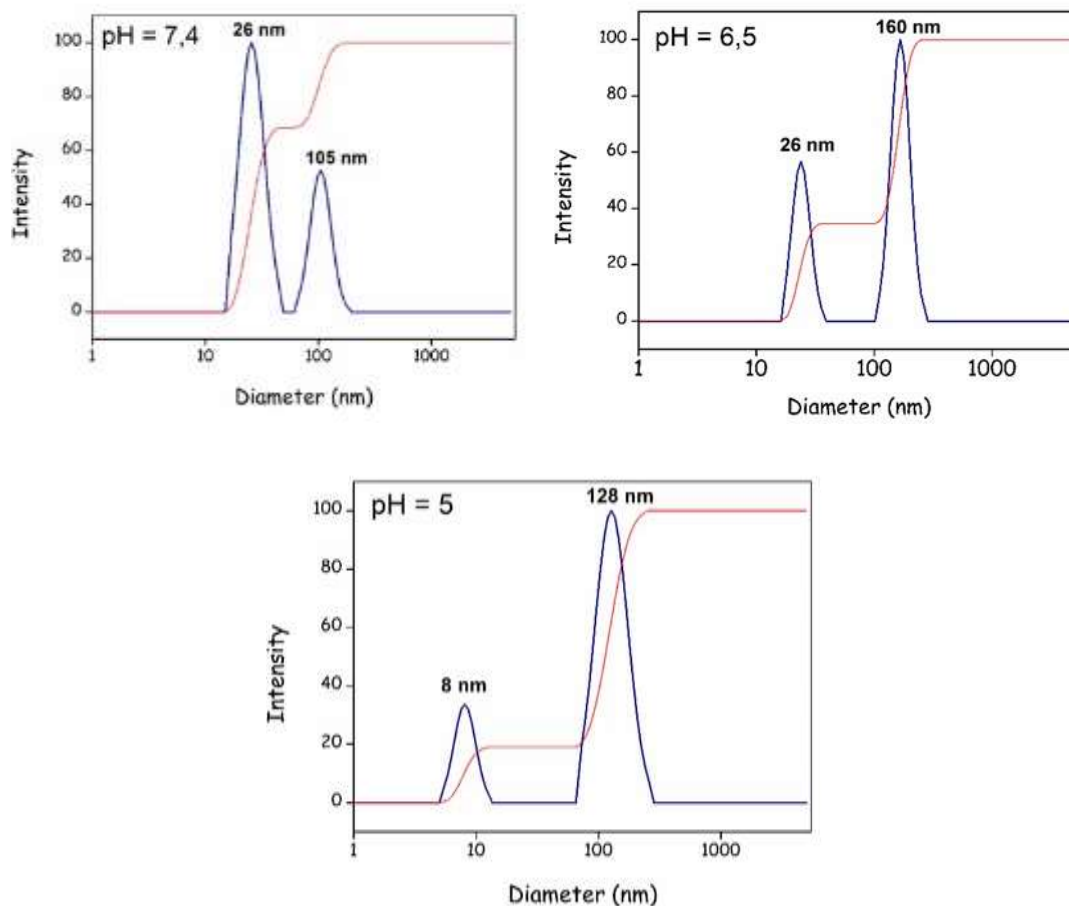
Συγκεκριμένα διαλύονται 15 mg πολυμερούς σε 3 ml DMSO και αφήνονται μία μέρα υπό ανάδευση με το DMSO, το οποίο χρησιμοποιείται προκειμένου να «σπάσει» τη συσσωμάτωση των πολυμερών. Την επόμενη μέρα, το διάλυμα του πολυμερούς χωρίζεται σε τρία μέρη και προστίθενται σε αυτά 2 ml από το ανάλογο ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο θα ρυθμίσει το επιθυμητό κάθε φορά pH. Για το pH 7,4 χρησιμοποιήθηκε PBS buffer 10 mM και NaCl 150 mM, για το pH 6,5 χρησιμοποιήθηκε PBS buffer 10 mM και NaCl 150 mM ενώ για το pH 5 χρησιμοποιήθηκε Acetate buffer 10 mM και NaCl 150 mM. Τα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη διαπίδυσης και πραγματοποιήθηκε διαδικασία “dialysis” με ρύθμιση του pH στην επιθυμητή τιμή. Μετά

από τρεις αλλαγές ρυθμιστικών διαλυμάτων ανά τρεις ώρες αφέθηκαν όλη τη νύχτα και η διαδικασία της μέτρησης με δυναμική σκέδαση φωτός έλαβε χώρα την επόμενη μέρα κατόπιν φιλτραρίσματος του δείγματος με υδρόφιλο φίλτρο πορώδους 0,45 μm ώστε να ελαχιστοποιηθεί το ποσοστό της σκόνης.

Στον πίνακα και το σχήμα που ακολουθεί απεικονίζονται συγκεντρωτικά οι μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός για το κατά συστάδες συμπολυμερές PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄.

Πίνακας 7: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων DLS για το PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄. Μελέτη της εξάρτησης του μεγέθους των νανοσωματιδίων από το pH, στους 25 °C.

pH	Degrees	Diameter (nm)	Intensity (%)	Polydispersity	Count Rate (Kcps)
7,4	45°	24	56	0,268	238
		102	44		
	90°	26	68	0,226	150
		105	32		
	135°	27	64	0,220	204
		104	36		
6,5	45°	22	26	0,377	216
		160	74		
	90°	26	34	0,330	491
		160	66		
	135°	24	50	0,291	116
		140	50		
5	45°	8	12	0,349	206
		136	88		
	90°	8	19	0,351	100
		128	81		
	135°	8	16	0,300	129
		116	84		



Σχήμα 52: Σχηματική αναπαράσταση της εξάρτησης του μεγέθους των νανοσωματιδίων του συμπολυμερούς PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ από το pH, στους 25 °C, στις 90°.

Από τον Πίνακα 7 και το Σχήμα 52 διεξάγονται συνοπτικά τα παρακάτω συμπεράσματα, σχετικά με την αυτο-οργάνωση των νανοσωματιδίων του PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ καθώς επίσης, την ικανότητα απόκρισής τους στα διαφορετικά pH.

Αρχικά σε pH = 7,4, παρατηρείται η ύπαρξη δύο πληθυσμών, ένας μικρός πληθυσμός μεγέθους 26 nm και ένας μεγαλύτερος πληθυσμός 105 nm. Η εμφάνιση δύο πληθυσμών είναι αποτέλεσμα της διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την αυτοοργάνωση του νανοσωματιδίου. Επίσης δεν παρατηρείται γωνιακή εξάρτηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανότατα τα σωματίδια είναι σφαιρικά. Με μείωση του pH από 7,4 σε 6,5 (25 °C, 90°) παρατηρείται μία μικρή αύξηση της διαμέτρου των πληθυσμών, επομένως τα σωματίδια διογκώνονται ελαφρώς. Η αύξηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε συνάρτηση με τη μείωση του pH, έρχεται σε συμφωνία με την θεωρία περί πρωτονίωσης των δομικών μονάδων της πολυ(ιστιδίνης) σε χαμηλό pH, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε διόγκωση των νανοσωματιδίων και

αύξηση της υδροφιλικότητάς τους. Με μείωση του pH από 6.5 σε 5 παρατηρείται διάσπαση των δύο πληθυσμών σε μονομοριακές αλυσίδες.

Από τον Πίνακα 8 διακρίνεται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας (σε ίδια γωνία, 90° και pH) παρατηρείται μικρή μείωση της διαμέτρου των σωματιδίων για τιμές pH 7,4 και 6,5, πιθανόν λόγω της μείωσης της διαλυτότητας του PEO (PEO 10.0 x 10³ g/mol LCST ~ 115 °C). [182]

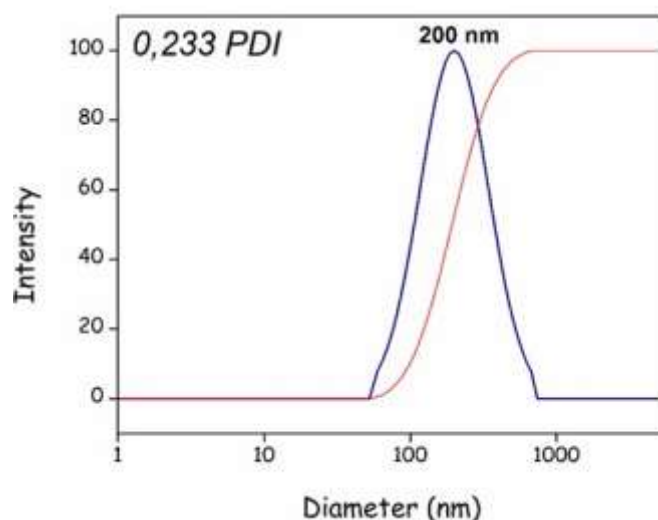
Πίνακας 8: Μελέτη της εξάρτησης του μεγέθους των νανοσωματιδίων του συμπολυμερούς PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ από τη θερμοκρασία, στα διάφορα pH.

PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄			
Temperature	pH		
	7,4	6,5	5
25 °C	26	24	8
	105	160	128
37 °C	23	20	9
	88	134	126
40 °C	24	20	9
	87	136	128

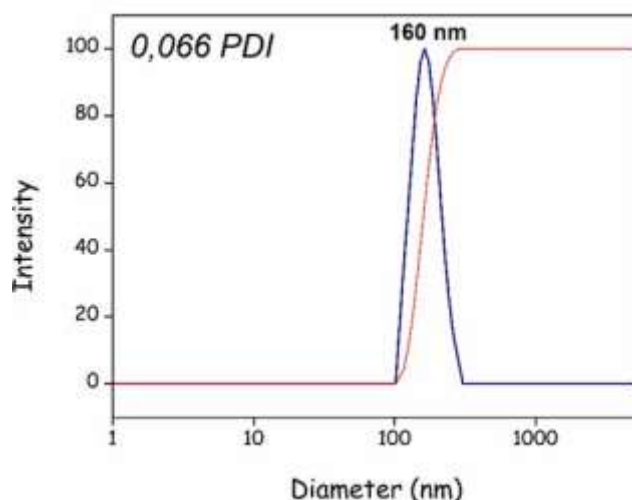
Τα παραπάνω αποτελέσματα φανερώνουν την ικανότητα του συμπολυμερούς PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ να αυτό-οργανώνεται σε υδατικά διαλύματα σχηματίζοντας μικκυλιακές δομές. Τα μικκύλια αυτά αποτελούνται από έναν υδρόφοβο πυρήνα πολύ(ιστιδίνης) και μια εξωτερική υδρόφιλη κορώνα αποτελούμενη από πολύ(αιθυλενοξειδίο). Τα νανοσωματίδια αυτά έχουν την ικανότητα να αποκρίνονται στις μεταβολές του pH μεταβάλλοντας το μέγεθός τους.

Στο Σχήμα 53 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της δυναμικής σκέδασης φωτός του υδατικού διαλύματος του PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ με συγκέντρωση 1 mg/mL, ενώ στο Σχήμα 54 το αποτέλεσμα προκύπτει ύστερα από διάλυση του πολυμερούς σε DMSO και διαπίδυση σε υπερκάθαρο νερό με συγκέντρωση 1 mg/mL. Όπως φαίνεται και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται η ύπαρξη ενός μόνο πληθυσμού σε αντίθεση με τις προηγούμενες περιπτώσεις όπου γίνεται χρήση ρυθμιστικού διαλύματος. Στη δεύτερη περίπτωση όπου το πολυμερές διαλύεται πρώτα σε DMSO και θεωρητικά σπάνε τα συσσωματώματα σε μονομερικές αλυσίδες, και στη συνέχεια γίνεται αυτό-οργάνωση του

πολυμερούς σε νερό παρατηρείται η ύπαρξη ενός μόνο πληθυσμού με εξαιρετικά στενή κατανομή.



Σχήμα 53: Μελέτη αυτό-οργάνωσης του PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ σε υπερκάρθαρο νερό στους 25 °C, στις 90°.



Σχήμα 54: Μελέτη αυτό-οργάνωσης του PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ που προκύπτει από διάλυση του πολυμερούς σε DMSO και απευθείας διαπίδυση σε υπερκάρθαρο νερό στους 25 °C, στις 90°.

Συμπερασματικά, φαίνεται πως το μέγεθος των σωματιδίων και ο τρόπος αυτό-οργάνωσης τους επηρεάζεται από ένα σύνολο παραγόντων. Πρακτικά όμως αυτό που μας ενδιαφέρει είναι το μέγεθος και το σχήμα των νανοσωματιδίων που θα εισέλθουν στον ζωντανό οργανισμό και θα μεταφέρουν το φάρμακο. Για το λόγο αυτό σε επόμενα κεφάλαια μελετάται το μέγεθος των νανοσωματιδίων που περιέχουν το εκάστοτε φάρμακο.

5.6 Μελέτη των πολυμερών του τύπου PEO₂₂₈-*b*-PHis_n με την τεχνική του Κυκλικού Διχρωϊσμού

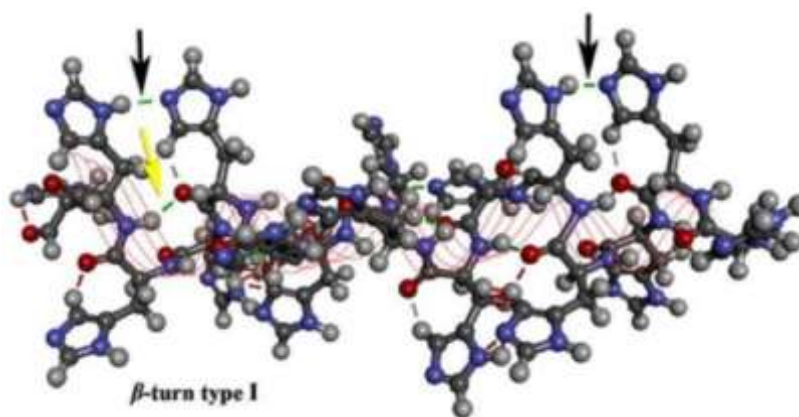
Η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στη μεταφορά και την εκλεκτική απελευθέρωση φαρμάκων στον ζωντανό οργανισμό, αφού οι πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να ανταποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα, όπως το pH. Σε αυτό το πολυπεπτίδιο, η πολυ (L-Histidine) ανταποκρίνεται στο φυσιολογικό εύρος pH (5,0 > pH > 7,4). Η μεταβολή της δευτεροταγής δομής οφείλεται στην PHis, η οποία έχει pKa = 6,5. Σε προηγούμενη εργασία, διαπιστώθηκε ότι η PHis υιοθετεί μια διαμόρφωση β στροφής σε pH υψηλότερο από 7,4, ενώ μετατρέπεται σε τυχαίο σπείραμα μειώνοντας το pH λόγω της πρωτονίωσης [43-45, 63, 65].

Στα συντιθέμενα πολυμερή της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις Κυκλικού Διχρωϊσμού (Circular Dichroism, CD), με σκοπό να μελετηθούν οι μεταβολές της δευτεροταγούς δομής και της διαμόρφωσης των πολυπεπτιδικών συστάδων σε συνάρτηση με το pH και τη θερμοκρασία. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα πολυμερή του γενικού τύπου PEO-*b*-PHis και έλαβαν χώρα μελέτες Κυκλικού Διχρωϊσμού σε διαφορετικά pH, συμπεριλαμβανομένων των τιμών pH = 7.4 (pH υγιούς ιστού), pH = 6.5 (pH εξωκυττάριου περιβάλλοντος του καρκινικού όγκου), pH = 5 (pH του κυττοσολίου του καρκινικού κυττάρου) και σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες: 25 °C (θερμοκρασία περιβάλλοντος), 37 °C (θερμοκρασία υγιούς ιστού), 40 °C (θερμοκρασία φλεγμονής).

Για τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο JASCO J-815. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα διαστάσεων 0,1 cm, η οποία πληρώθηκε με τα υδατικά διαλύματα των πολυμερών συγκέντρωσης 1 mg/mL. Η ρύθμιση του pH επετεύχθη ξεκινώντας από υπερκάθαρο νερό με επακόλουθη προσθήκη σταγόνων, αρχικά υδατικού διαλύματος NaCl 0.1 N, έτσι ώστε το pH να ρυθμιστεί στο 7.4 και έπειτα με προσθήκη σταγόνων υδατικού διαλύματος HCl 0.1 N, προκειμένου να μειώνεται σταδιακά το pH και να λαμβάνεται το αντίστοιχο φάσμα σε κάθε ενδιάμεση τιμή. Η ρύθμιση του pH πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ψηφιακού πεχάμετρου, ενώ η ρύθμιση της θερμοκρασίας έλαβε χώρα με τη χρήση ειδικής ψηφιακής συσκευής θερμοστάτησης. Επιπλέον, η παροχή του αζώτου ρυθμίστηκε στα 15 L/min. Τέλος, πραγματοποιήθηκε σάρωση του δείγματος στην περιοχή μηκών κύματος 260-180 nm και οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν από το όργανο 5 φορές ώστε να μειωθεί ο θόρυβος.

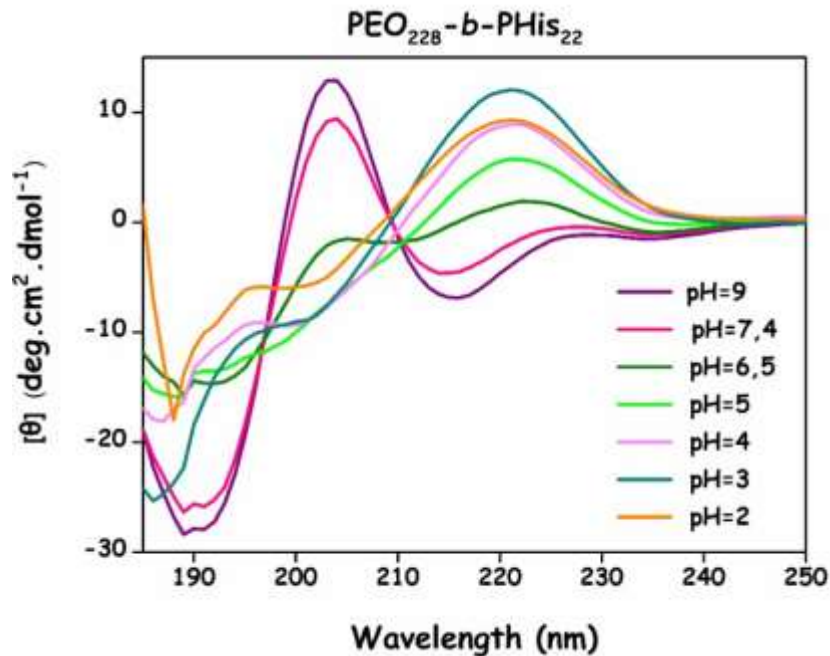
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αποκαλύπτουν μία ομοιόμορφη συμπεριφορά σε αυτού του τύπου τα πολυπεπτιδικά πολυμερή, η οποία διέπεται κυρίως από τη μετάβαση της δευτεροταγούς δομής από β-στροφή σε υψηλά pH (pH = 7.4 και pH = 6.5) σε διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος σε χαμηλότερα pH (pH = 5 και pH = 3), όπως φαίνεται και στα παρακάτω σχήματα. Οι αρνητικές κορυφές στα 190 και στα 225 nm, σε συνδυασμό με τη θετική κορυφή στα 205 nm είναι ενδεικτικές της διαμόρφωσης της β-στροφής [125]. Ενώ, η παρατηρούμενη αρνητική κορυφή στα 196 nm, σε συνδυασμό με τη θετική κορυφή στα 218 nm είναι χαρακτηριστικές της δομής τυχαίου σπειράματος.

Η διαμόρφωση της β-στροφής έχει πολλούς διαφορετικούς τύπους, δηλ. I, II και VI, ανάλογα με τις τιμές των διεδρικών γωνιών των αμινοξέων. Σε προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας, διαπιστώθηκε ότι ο τύπος I της β-στροφής, με $\phi+1 = -30^\circ$ και $\psi+1 = -60^\circ$ είναι η πιο πιθανή διαμόρφωση. Σε αυτές τις τιμές των διεδρικών γωνιών, οι ομάδες των ιμιδαζολικών δακτυλίων λαμβάνουν τέτοια διαμόρφωση ώστε να σχηματίσουν ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου, μεταξύ του πρωτονίου που είναι προσαρτημένο στο άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου μιας μονομερικής μονάδας N και του αζώτου του ιμιδαζολίου μιας άλλης μονομερικής μονάδας που απέχει 3 αμινοξέα N+3 (Εικόνα 21, μαύρα βέλη). Επιπλέον, δημιουργούνται τυπικοί δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του υδρογόνου του α άνθρακα του N μονομερούς και του καρβονυλίου του N+3 μονομερούς (Εικόνα 21, κίτρινο βέλος). Επομένως, η β-στροφή είναι η μόνη διαμόρφωση που ευνοεί ενθαλπικά τη δομή του πολυπεπτιδίου στο χώρο, και αυτό γιατί με αυτή τη διαμόρφωση οι ιμιδαζολικοί δακτύλιοι της πολυ-ιστιδίνης έρχονται τόσο κοντά μεταξύ τους αναπτύσσοντας δεσμούς υδρογόνου, όσο σε καμία άλλη διαμόρφωση. [65]

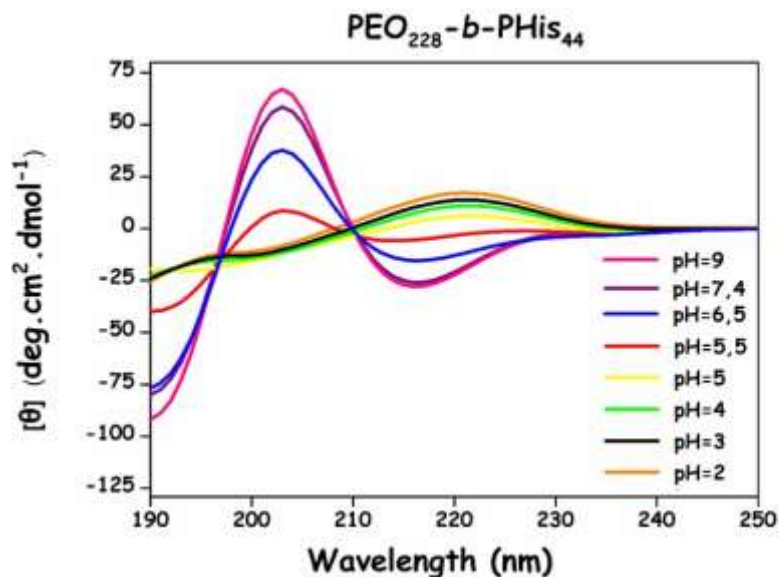


Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση της δευτεροταγούς δομής του ομοπολυπεπτιδίου της PHis, του τύπου I της β-στροφής

Σε pH μικρότερο ή ίσο του 5, παρατηρείται μία μετάβαση της δευτεροταγούς δομής από β-στροφή σε τυχαίο σπείραμα. Σε πιο όξινο pH οι δομικές μονάδες της πολυ-ιστιδίνης πρωτονιώνονται και οι απώσεις που αναπτύσσονται στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, δεν επιτρέπουν την οργάνωση του πολυμερούς σε μία τρισδιάστατη διαμόρφωση.

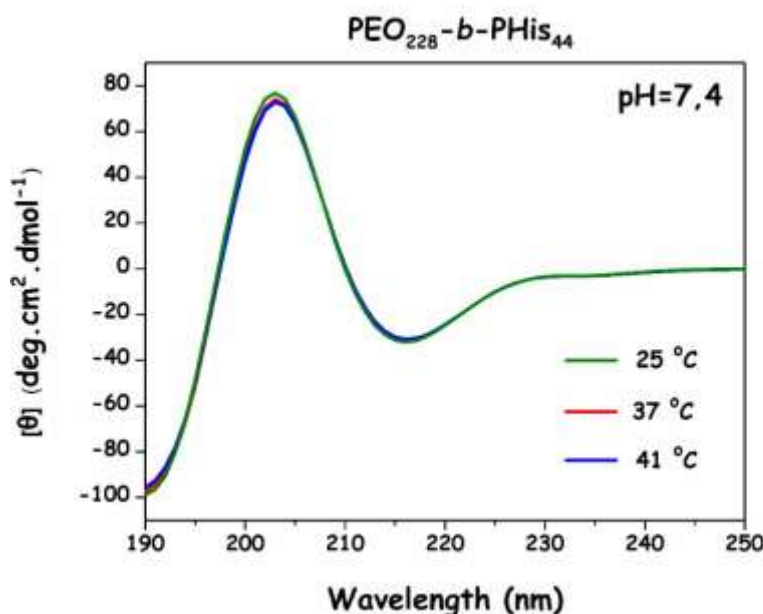


Σχήμα 55: Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού του πολυμερούς $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}$ συναρτήσεϊ του pH στους 25 °C.



Σχήμα 56: Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού του πολυμερούς $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{44}$ συναρτήσεϊ pH στους 25 °C.

Τέλος, από τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στη δευτεροταγή διαμόρφωση των συγκεκριμένων πολυμερών, διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της θερμοκρασίας σε σταθερό pH από τους 25, στους 37 και έπειτα στους 40 °C, δεν επηρεάζει καθόλου την δευτεροταγή δομή του πολυπεπτιδίου. Για το λόγο αυτό, παρατίθεται ενδεικτικά το φάσμα κυκλικού διχρωισμού (Σχήμα 57) για το κατά συστάδες συμπολυμερές PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄.



Σχήμα 57: Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού του πολυμερούς PEO₂₂₈-*b*- PHis₄₄σε pH=7.4 συναρτήσει της θερμοκρασίας.

5.7 Μελέτη του κατά συστάδες συμπολυμερούς PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ με την τεχνική του Z-Δυναμικού

Το επιφανειακό φορτίο και το μέγεθος των σωματιδίων είναι οι δύο πιο συχνά αναφερόμενοι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για μια σειρά βιολογικών επιδράσεων των νανοσωματιδίων συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής πρόσληψης, της τοξικότητας και της διάλυσης.

Η επιφάνεια των νανοσωματιδίων είναι πολύ σημαντική παράμετρος στον σχεδιασμό της στοχευμένης μεταφοράς φαρμάκων. Συμβατικά νανοσωματίδια (χωρίς τροποποίηση της επιφάνειας) και αρνητικά φορτισμένα σωματίδια μπορεί να οψωνιστούν γρήγορα και να εκκαθαριστούν από τα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού σύστημα (reticuloendothelial system, RES) στην κυκλοφορία του αίματος. Η τροποποίηση της επιφάνειας των συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων είναι η πιο κοινή στρατηγική για τον έλεγχο της διαδικασίας οψωνισμού, προκειμένου να διατηρηθούν τα συστήματα για μεγαλύτερο

χρονικό διάστημα στην κυκλοφορία του αίματος. Το κατάλληλο ζ-δυναμικό μπορεί να βελτιώσει τα προφίλ απελευθέρωσης των φαρμάκων σε συγκεκριμένες τοποθεσίες, καθώς και τη σταθερότητά τους σε συγκεκριμένες δοσολογίες.

Νανοσωματίδια με ζ-δυναμικό μεταξύ -10 και $+10$ mV θεωρούνται περίπου ουδέτερα, ενώ τα νανοσωματίδια με ζ-δυναμικό μεγαλύτερο από $+30$ mV ή μικρότερο από -30 mV θεωρούνται έντονα κατιονικά και ανιονικά, αντίστοιχα. [165, 166]

Τα νανοσωματίδια που έχουν συντεθεί στην παρούσα εργασία πρόκειται να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη εγκλωβισμού και αποδέσμευσης του αντικαρκινικού φαρμάκου της σισπλατίνης και της δοξορουβικίνης. Επομένως, το επιφανειακό τους φορτίο είναι καθοριστικής σημασίας για την αλληλεπίδρασή τους με τα συστατικά του αίματος, προκειμένου να μειωθεί η τοξικότητά τους και να αποφευχθεί η ενεργοποίηση των μακροφάγων και επομένως η ταχεία εκκαθάρισή τους από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα στην κυκλοφορία του αίματος.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, όπου τα συντιθέμενα πολυμερή αυτό-οργανώνονται σε μικυλλιακές δομές αποτελούμενες από ένα υδρόφοβο πυρήνα πολυ(ιστιδίνης) και από μία υδρόφιλη κορώνα πολυ(αιθυλενοξειδίου), η τιμή του ζ-δυναμικού εξαρτάται από το pH στο οποίο βρίσκονται κάθε φορά τα νανοσωματίδια.

Για τις μετρήσεις του ζ-δυναμικού χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια δείγματα των πολυμερών στα οποία έγιναν μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την τεχνική PALS εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσης άλατος, καθώς το pH των νανοσωματιδίων ρυθμίζεται από τα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα, και αναλύθηκαν με το μοντέλο του Smoluchowski. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ζ-δυναμικού για τα εν λόγω νανοσωματίδια, καθώς επίσης και η εξάρτηση του επιφανειακού τους φορτίου από το pH συνοψίζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών ζ-δυναμικού του PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ συναρτήσει του pH.

PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄	
pH	ζ-potential (mV)
7,4	-0,14
6,5	0,04
5	5,23

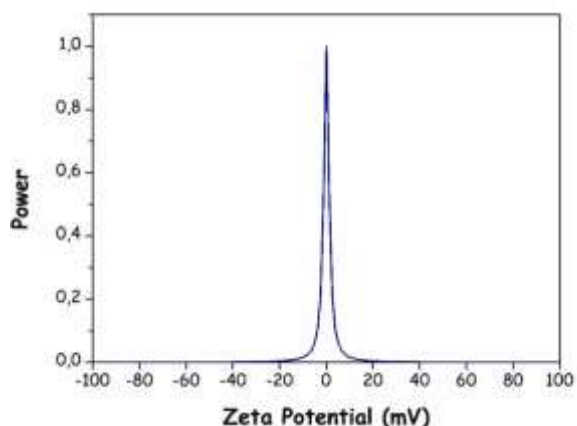
Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνεται πως για κάθε pH η μέση τιμή του ζ-δυναμικού (mean) είναι στην περιοχή [-10mV,+10mV], οπότε όλα τα συντιθέμενα νανοσωματίδια έχουν ουδέτερο επιφανειακό φορτίο.

Σε pH=5, οι τιμές του ζ-δυναμικού αυξάνονται λόγω της ύπαρξης ελεύθερων αλυσίδων, όπως επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα του DLS, με πρωτονιωμένη την συστάδα της PHis.

5.8 Μελέτη των Νανοσωματιδίων με Σισπλατίνη

Το πολυμερές με το δεσμευμένο φάρμακο υποβλήθηκε σε μετρήσεις ζ-δυναμικού προκειμένου να βρεθεί το εξωτερικό επιφανειακό φορτίο των νανοσωματιδίων, το οποίο όπως προαναφέρθηκε είναι υψίστης σημασίας για την κυκλοφορία και τη σταθερότητα των νανοσωματιδίων μέσα στον ζωντανό οργανισμό.

Για τις μετρήσεις του ζ-δυναμικού χρησιμοποιήθηκε αρχικά το υδατικό διάλυμα του πολυμερούς με το δεσμευμένο φάρμακο. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με την τεχνική ELS και αναλύθηκαν με το μοντέλο του Smoluchowski. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ζ-δυναμικού φανέρωσαν ένα μηδενικό εξωτερικό φορτίο αποδεικνύοντας ότι η υδρόφιλη συστάδα του PEO βρίσκεται στο εξωτερικό των νανοσωματιδίων, ενώ η σισπλατίνη βρίσκεται εγκλωβισμένη στον υδρόφοβο πυρήνα της PHis (Σχήμα 58).



Σχήμα 58: Αποτελέσματα ζ-Δυναμικού του υδατικού διαλύματος των νανοσωματιδίων PEO₂₂₈-b-PHis₄₄ με τη δεσμευμένη σισπλατίνη.

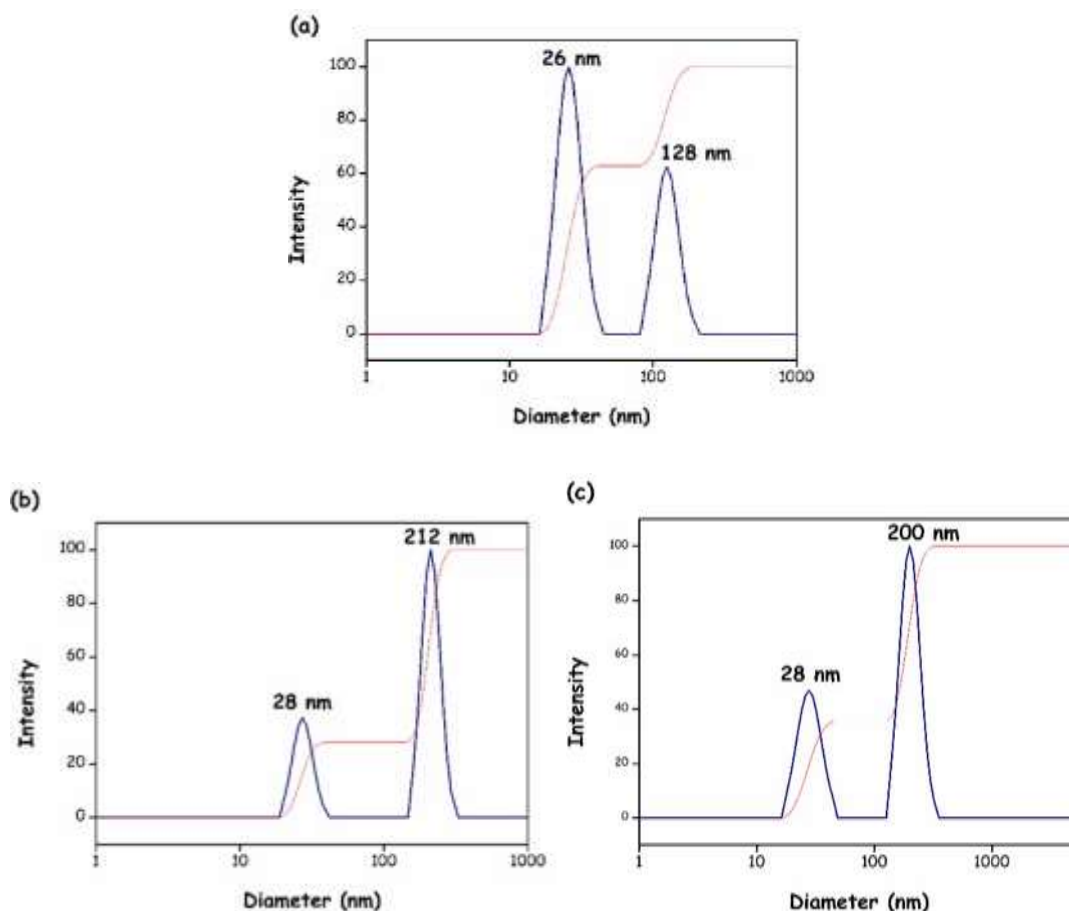
Επιπροσθέτως, όλα τα δείγματα με το δεσμευμένο φάρμακο τα οποία προορίζονταν για *in vitro* αλλά και *in vivo* πειράματα υποβλήθηκαν σε μετρήσεις ζ-δυναμικού με την τεχνική PALS και αναλύθηκαν με το μοντέλο του Smoluchowski. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ζ-δυναμικού για τα εν λόγω νανοσωματίδια, συνοψίζονται στον Πίνακα 10. Όπως παρατηρείται και σε αυτήν την περίπτωση τα νανοσωματίδια φέρουν ένα μηδενικό εξωτερικό φορτίο.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα ζ-δυναμικού για τα νανοσωματίδια PEO₂₂₈-b-PHis₄₄ με τη δεσμευμένη σισπλατίνη που χρησιμοποιήθηκαν σε *in vitro* και *in vivo* πειραματικές διαδικασίες.

Δείγμα	ζ-potential (mV)
B ₁	-0,20
Δ ₁	0,21
B	-0,13
Δ	-0,05

Επιπροσθέτως, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τα *in vitro* και τα *in vivo* πειράματα μελετήθηκαν με τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός προκειμένου να βρεθεί το μέγεθος των νανοσωματιδίων. Έτσι, τα δείγματα που περιείχαν τα νανοσωματίδια με το δεσμευμένο φάρμακο μετρήθηκαν με DLS και συγκρίθηκαν με εκείνα που περιείχαν τους άδειους νανοφορείς για να φανερωθεί ο τρόπος με τον οποίο επιδρά η σισπλατίνη στο μέγεθος και στην αυτοοργάνωση των νανοσωματιδίων. Ενδεικτικά, στην εικόνα δίνονται τα αποτελέσματα DLS για ένα δείγμα με άδειους νανοφορείς (Σχήμα 59α) καθώς και για τα δείγματα B₁ (Σχήμα 59b) και Δ₁ (Σχήμα 59c)

που περιέχουν το πολυμερές με το δεσμευμένο φάρμακο. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 25 °C, στις 90° ύστερα από φιλτράρισμα των διαλυμάτων με υδρόφιλο φίλτρο πορώδους 0,45 μm.



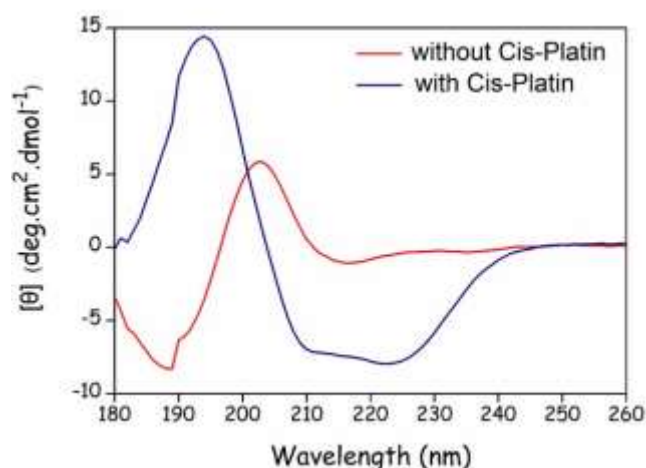
Σχήμα 59: Αποτελέσματα DLS από: (a) το δείγμα που περιέχει άδειους νανοφορείς (blank) σε 10 mM PBS buffer, NaCl 150 mM, pH= 7,4, (b) το δείγμα B₁ που περιέχει το πολυμερές με το δεσμευμένο φάρμακο σε 10 mM PBS buffer, NaCl 150 mM, pH= 7,4 και (c) το δείγμα Δ₁ που περιέχει το πολυμερές με το δεσμευμένο φάρμακο σε 10 mM PBS buffer, NaCl 150 mM, pH= 7,4 στους 25 °C, στις 90°.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται εύκολα αντιληπτή η επίδραση της σισπλατίνης στο μέγεθος και την αυτό-οργάνωση των νανοσωματιδίων. Όσον αφορά τα κενά νανοσωματίδια (Σχήμα 59a) παρατηρείται η ύπαρξη δύο πληθυσμών, ενός μικρότερου στα 26 nm που βρίσκεται σε πλειοψηφία σε ποσοστό 63% και ενός μεγαλύτερου πληθυσμού στα 128 nm, σε μικρότερο ποσοστό. Ο δείκτης πολυδιασποράς ήταν περίπου ίσος με 0,275. Στα δείγματα με το δεσμευμένο φάρμακο (Σχήματα 59b και c) παρατηρείται πάλι η ύπαρξη δύο πληθυσμών. Ο μικρότερος πληθυσμός είναι ίδιας τάξης μεγέθους, περίπου 28 nm, αλλά έχει μειωθεί σημαντικά το ποσοστό του στα 25-30% ενώ

ο δείκτης πολυδιασποράς ήταν περίπου 0,290. Επιπλέον, ο μεγαλύτερος πληθυσμός είναι της τάξης των 200 nm περίπου και βρίσκεται πλέον σε μεγαλύτερο ποσοστό. Αυτό είναι πολύ σημαντικό αποτέλεσμα καθώς οι νανοφορείς που επρόκειτο να εισέλθουν στον ζωντανό οργανισμό και να απελευθερώσουν εκλεκτικά το αντικαρκινικό φάρμακο, έχουν ιδανικό μέγεθος για την ενεργοποίηση του φαινομένου EPR. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσαν τα δείγματα Β και Δ, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι μετρήθηκαν και αφιλτράριστα και διαπιστώθηκε ότι δεν κατακρατούνται στο φίλτρο.

Επιπλέον, για να διερευνηθεί η επίδραση που έχει η σύμπλεξη του φαρμάκου στη δευτεροταγή δομή του συμπολυμερούς PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις CD των ελεύθερων πολυμερών καθώς και των αντίστοιχων νανοσωματιδίων τους με τη σισπλατίνη.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η μέτρηση κυκλικού διχρωισμού του PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ σε υπερκάθαρο νερό καθώς και του πολυμερούς με το δεσμευμένο φάρμακο σε υπερκάθαρο νερό που προέκυψε ύστερα από τη μελέτη δέσμησης του φαρμάκου συναρτήσει του χρόνου. Έτσι, αμέσως μετά την ολοκλήρωση της μελέτης δέσμησης το περιεχόμενο της μεμβράνης μετρήθηκε με CD και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 60, ενώ, το εκτιμώμενο περιεχόμενο δευτερογενούς δομής (%) δίνεται στον Πίνακα 11. Η φασματική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του BeStSel (Beta Structure Selection). [183]



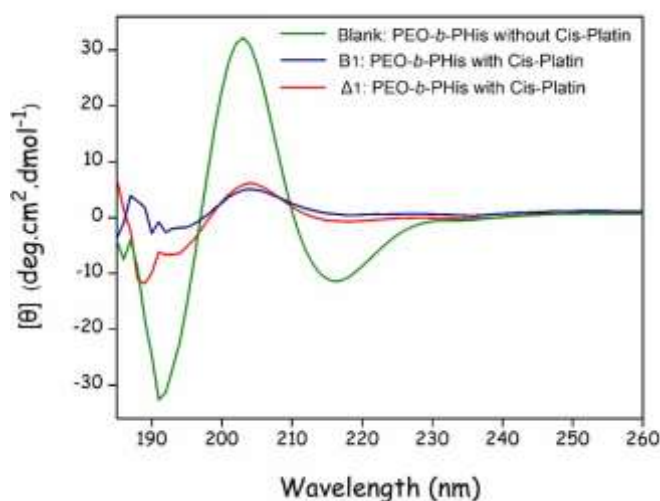
Σχήμα 60: Μετρήσεις CD του PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ και του PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ με Cis-Platin σε νερό, στους 25°C.

Πίνακας 11: Εκτιμώμενο ποσοστό (%) δευτεροταγούς δομής για το PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ και το PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ με Cis-Platin σε νερό, στους 25°C.

PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄	Helix (%)	Antiparallel (%)	Parallel (%)	Turn (%)	Others (%)
without Cis-Platin	0,0	28,7	9,4	22,0	39,9
with Cis-Platin	11,2	26,5	8,0	13,6	40,7

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η σύμπλεξη του φαρμάκου οδηγεί στη μετατροπή ποσοστού της δευτεροταγούς δομής της PHis από β-στροφή σε α-έλικα.

Τα δεδομένα CD για τα PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ σε 10 mM PBS buffer, NaCl 150 mM, pH= 7,4 στους 25 °C, παρέχονται στο Σχήμα 61.



Σχήμα 61: Μετρήσεις CD των κενών νανοσωματιδίων (Blank), των νανοσωματιδίων με Cis-Platin στους 25°C.

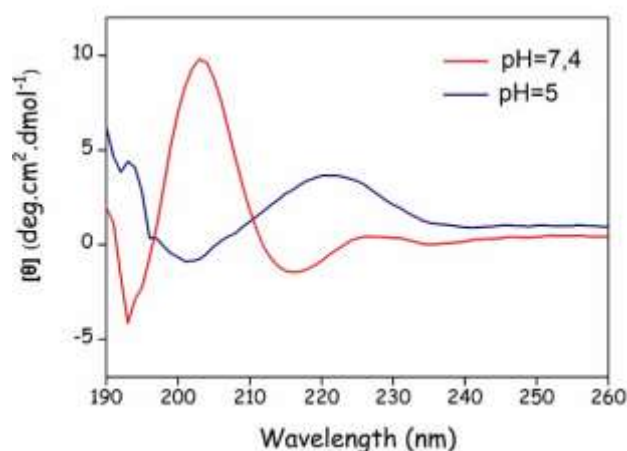
Επιπλέον, το εκτιμώμενο περιεχόμενο δευτερογενούς δομής (%) δίνεται στον Πίνακα 12. Η φασματική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του BeStSel (Beta Structure Selection) [183]. Η δευτεροταγής δομή των συμπολυμερών PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ οφείλεται μόνο στην PHis. Όπως παρατηρείται η PHis στο δείγμα με τα κενά νανοσωματίδια υιοθετεί κυρίως τη διαμόρφωση της β-φύλλου, ενώ στα δείγματα με το δεσμευμένο φάρμακο παρατηρείται μια μείωση της διαμόρφωσης του β-φύλλου και μια μικρή αύξηση της β-στροφής και του τυχαίου σπειράματος. Επίσης, η μείωση του σήματος οφείλεται στην αύξηση της υδροφοβικότητας του πολυπεπτιδίου, λόγω της σύμπλεξης της πλατίνας και

του αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης. Η χαμηλή τιμή σήματος που παραμένει οφείλεται κυρίως στην ελεύθερη PHis.

Πίνακας 12: Εκτιμώμενο ποσοστό (%) δευτεροταγούς δομής για τα κενά νανοσωματίδια (Blank) και για τα νανοσωματίδια με τη Cis-Platin (B₁ και Δ₁) σε 10 mM PBS buffer, NaCl 150 mM, pH= 7,4 στους 25 °C.

Sample	Helix(%)	Antiparallel (%)	Parallel (%)	Turn (%)	Others (%)
Blank	0,0	68,5	7,9	2,0	21,6
B ₁	0,0	49,5	3,1	11,9	35,4
Δ ₁	0,0	48,9	3,4	12,3	35,8

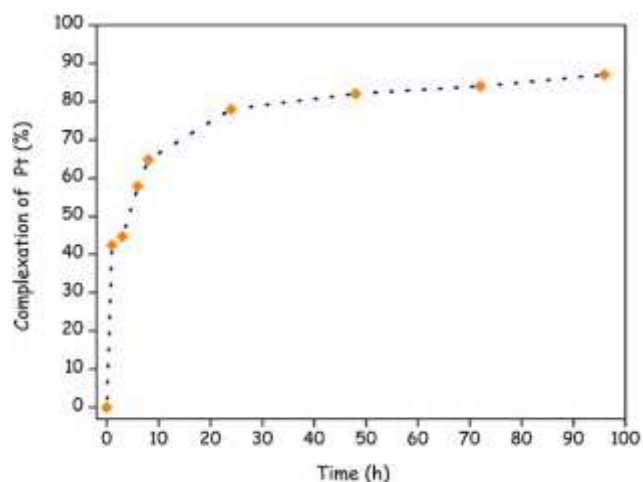
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις CD των νανοσωματιδίων με το δεσμευμένο φάρμακο σε pH= 7,4 (10 mM PBS buffer, NaCl 150 mM) και pH= 5 (50 mM Acetate buffer, NaCl 150 mM), στους 25 °C. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 62, σε pH=5 το πολυπεπτίδιο υιοθετεί τη διαμόρφωση του τυχαίου σπειράματος αποδεικνύοντας έτσι την αποκρισιμότητα του συστήματος στη μεταβολή του pH.



Σχήμα 62: Μετρήσεις CD των νανοσωματιδίων με Cis-Platin σε pH= 7,4 και pH= 5, στους 25 °C.

5.9 Αποτελέσματα Δέσμωσης της Σισπλατίνης

Όπως προαναφέρθηκε, για τη μελέτη της δέσμωσης συναρτήσε του χρόνου χρησιμοποιήθηκαν 6 mg PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ και 3,2 mg Cis-Platin. Με την τεχνική του ICP-MS βρέθηκε το ποσοστό του δεσμευμένου φαρμάκου ύστερα από 1, 3, 6, 8, 24, 48, 72 καθώς και 96 ώρες. Το διάγραμμα του ποσοστού δέσμωσης συναρτήσε του χρόνου δίνεται στο Σχήμα 63.



Σχήμα 63: Μελέτη δέσμευσης της Cis-Platin από το PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ συναρτήσει του χρόνου.

Πίνακας 13: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων δέσμευσης της Cis-Platin από το πολυμερές PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ συναρτήσει του χρόνου.

Time (h)	Cis-Platin Complexation (%)
1	42
3	45
6	58
8	65
24	78
48	82
72	85
96	87

Μετά το τέλος της διαδικασίας, υπολογίστηκε η απόδοση εγκλωβισμού του φαρμάκου (encapsulation efficiency (EE)) και η ικανότητα δέσμευσης (loading capacity (LC)) των νανοσωματιδίων με τη χρήση των εξισώσεων:

$$EE (\%) = (\text{Μάζα της δεσμευμένης Cis-Platin} / \text{Μάζα Cis-Platin του αρχικού διαλύματος}) \times 100$$

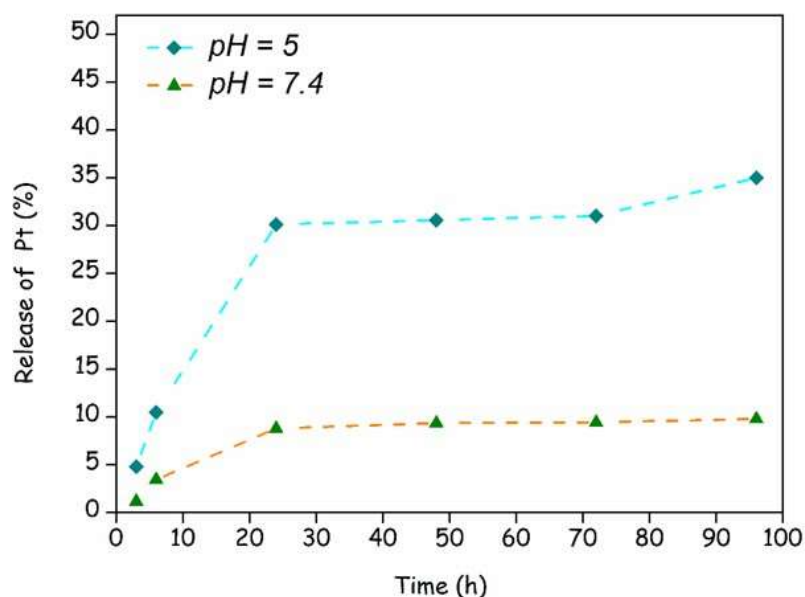
$$LC (\%) = (\text{Μάζα της δεσμευμένης Cis-Platin} / \text{Μάζα του πολυμερούς}) \times 100.$$

Έτσι για το PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄, τα αποτελέσματα έδωσαν EE (%) = 87% και LC (%) = 46%.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται η τεράστια ικανότητα της πολύ(ιστιδίνης) να δεσμεύει το φάρμακο. Από την πρώτη κιόλας ώρα το ποσοστό δέσμευσης είναι εξαιρετικά υψηλό (42 %), ενώ ήδη από τις 24 ώρες έχει πιάσει σχεδόν το μέγιστο του ποσοστού δέσμευσης (78%). Αυτή η γρήγορη και ποσοτική δέσμευση του φαρμάκου που φανερώνει την τεράστια χημική συγγένεια της ιστιδίνης με την σισπλατίνη δημιούργησε αμφιβολίες σχετικά με την αναστρεψιμότητα του δεσμού και την αποδέσμευση του φαρμάκου.

5.10 Αποτελέσματα Αποδέσμευσης της Σισπλατίνης

Η διαδικασία αποδέσμευσης πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες υγιούς οργανισμού, σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (pH 7,4), στους 37 °C, (0,010M PBS pH =7,4, 0,150 M NaCl ιοντική ισχύς), καθώς και σε συνθήκες καρκινικού κυττάρου σε ρυθμιστικό διάλυμα acetate (0,050 M acetate, 0,150 M NaCl) pH=5 στους 40 °C. Τα αποτελέσματα της αποδέσμευσης δίνονται στο Σχήμα 65 και στον Πίνακα 14.



Σχήμα 64: Μελέτη αποδέσμευσης της Cis-Platin σε pH = 7,4 και pH =5 συναρτήσει του χρόνου.

Πίνακας 14: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων αποδέσμευσης της Cis-Platin από το πολυμερές PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ συναρτήσει του χρόνου.

PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄		
Time (Hour)	Cis-Platin Release (%)	
	pH = 7,4	pH = 5,0
3	1,1	4,8
6	3,5	10,5
24	8,8	30,1
48	9,4	30,6
72	9,5	31,0
96	9,8	35,0

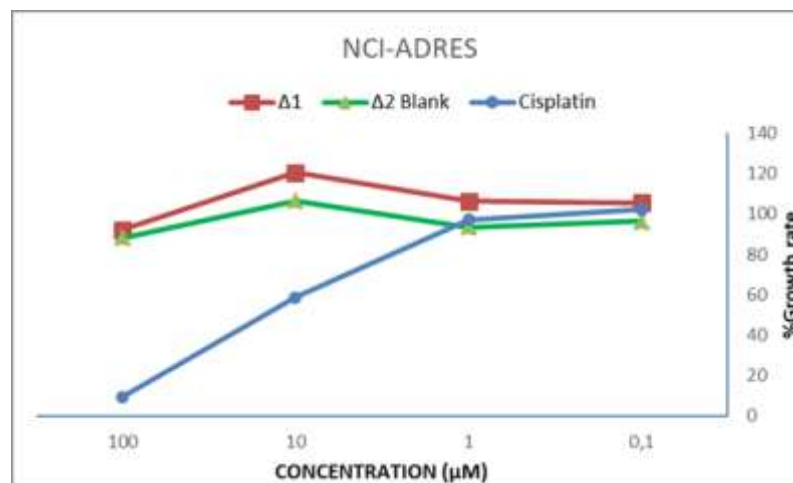
Από τα παραπάνω αποτελέσματα, επιβεβαιώνεται η αποκρισιμότητα του συστήματος στη μεταβολή του pH, καθώς το ποσοστό απελευθέρωσης του φαρμάκου είναι μεγαλύτερο σε pH = 5 σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό σε pH = 7,4. Λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα της δέσμευσης, αναμενόταν ελάχιστη η μηδενική αποδέσμευση του φαρμάκου. Παρ' όλα αυτά, παρατηρείται ένα ποσοστό αποδέσμευσης 35% σε pH = 5, το οποίο θεωρήθηκε ικανοποιητικό προκειμένου να χρησιμοποιηθούν τα νανοσωματίδια PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ με το φάρμακο τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* πειραματικές διαδικασίες.

5.11 Αποτελέσματα *in vitro* και *in vivo* κυτταροτοξικότητας των Νανοσωματιδίων με Σισπλατίνη

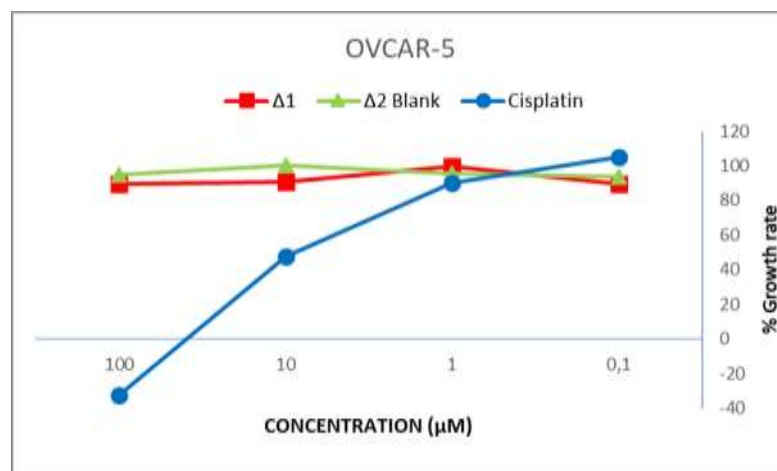
Όπως προαναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, το αντικαρκινικό φάρμακο της cisplatin ενσωματώθηκε στο κατά συστάδες συμπολυμερές PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ και πραγματοποιήθηκαν *in vitro* αλλά και *in vivo* πειραματικές διαδικασίες προκειμένου να μελετηθεί η αποτελεσματικότητα των νανοσωματιδίων ως συστήματα μεταφοράς αντικαρκινικών φαρμάκων.

Αρχικά, τα νανοσωματίδια με τη cisplatin χρησιμοποιήθηκαν για *in vitro* μελέτες κυτταροτοξικότητας σε τρεις εγκαθιδρυμένες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές από καρκίνο των ωοθηκών NCI-ADRES, OVCAR-3 και OVCAR-5. Στα Σχήματα 65-67 παρατίθενται οι καμπύλες δόσης-απόκρισης για τις τρεις καρκινικές σειρές αντίστοιχα. Όπως παρατηρείται, στα NCI-ADRES η όποια μικρή δράση φαίνεται να είναι ίδια για τα

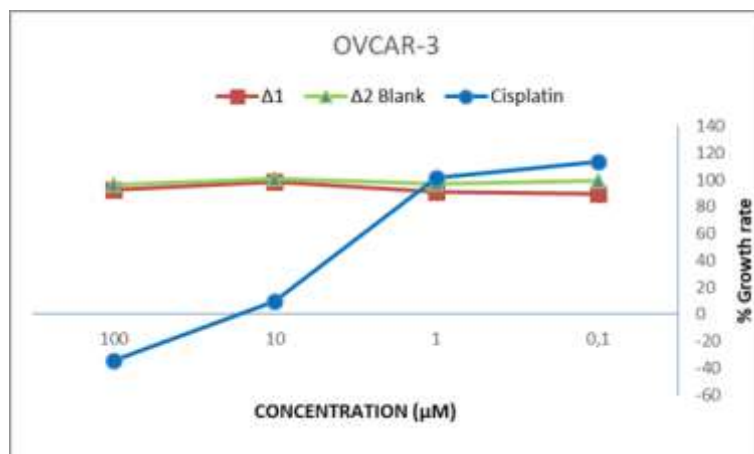
νανοσωματίδια με το φάρμακο (Δ1) και για τους άδειους νανοφορείς (Δ2) σε αντίθεση με το σκέτο φάρμακο (Cisplatin). Στις επόμενες καρκινικές σειρές OVCAR-3 και OVCAR-5 δεν παρατηρείται καμία δράση των νανοσωματιδίων με το φάρμακο καθώς ο ρυθμός ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων παραμένει σταθερός με την αύξηση της συγκέντρωσης των νανοφορέων. Και εδώ τα νανοσωματίδια με το φάρμακο έχουν ακριβώς ίδια συμπεριφορά με τους άδειους νανοφορείς σε αντίθεση με τη cisplatin που μείωσε σημαντικά την ανάπτυξη των κυττάρων.



Σχήμα 65: Καμπύλη δόσης-απόκρισης για τα κύτταρα NCI-ADRES.

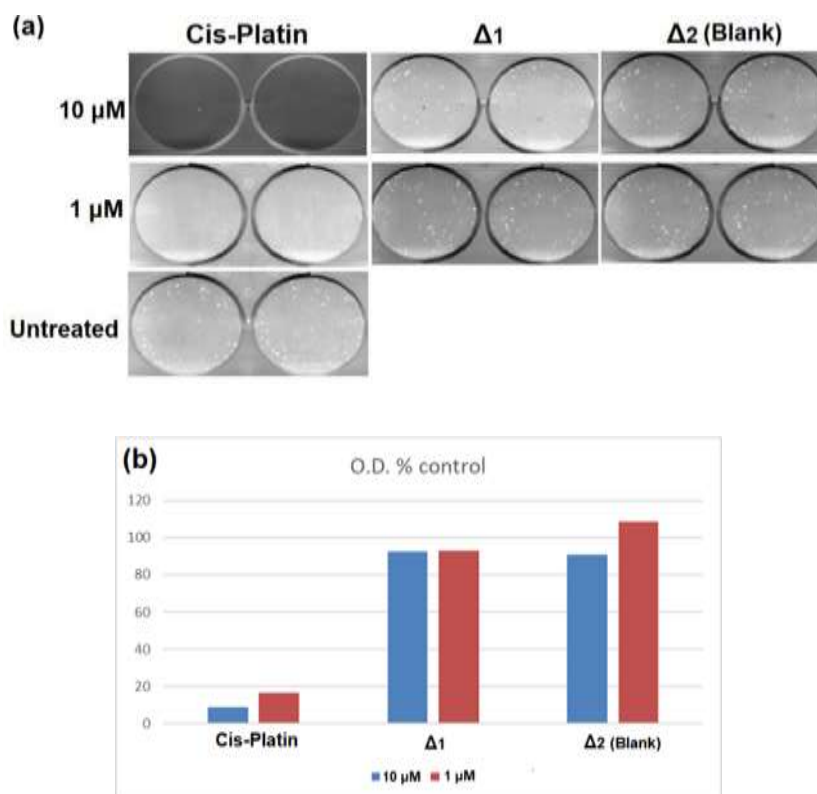


Σχήμα 66: Καμπύλη δόσης-απόκρισης για τα κύτταρα OVCAR-5.



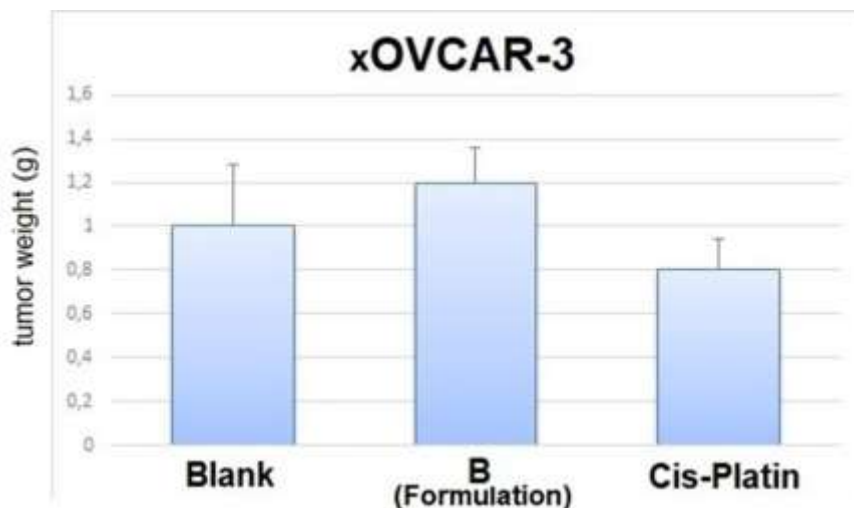
Σχήμα 67: Καμπύλη δόσης-απόκρισης για τα κύτταρα OVCAR-3.

Εν συνεχεία ακολούθησε η δοκιμασία των καρκινικών κυττάρων OVCAR-3 ως προς τη δυνατότητά τους να δημιουργούν κλώνους παρουσία Cis-Platin, ναοφορέων με Cis-Platin (Δ1) και κενών ναοφορέων (Δ2) τα αποτελέσματα των οποίων παρατίθενται στην Εικόνα 22. Οι άσπρες κουκίδες στην Εικόνα 22α είναι οι αποικίες των καρκινικών κυττάρων ενώ στην Εικόνα 22b δίνεται η ποσοτικοποίησή τους. Όπως αποδεικνύεται το δείγμα Δ1 που περιείχε τα ναοσωματίδια με το φάρμακο δεν είχε καμία δραστικότητα καθώς δεν παρατηρείται μείωση των αποικιών (κλώνων) των κυττάρων ούτε με την αύξηση της συγκέντρωσης από 1µM σε 10 µM σε αντίθεση με το ελεύθερο φάρμακο το οποίο και ανέστειλε πλήρως τη δημιουργία αποικιών.



Εικόνα 22: (a) Δοκιμασία δημιουργίας κλώνων (αποικιών) των καρκινικών κυττάρων OVCAR-3 παρουσία Cis-Platin, νανοφορέων με Cis-Platin (Δ1), κενών νανοφορέων (Δ2, blank) και (b) Ποσοτικοποίηση καρκινικών κυττάρων

Παρά τα αποτελέσματα από τις *in vitro* πειραματικές προσπάθειες συντέθηκαν καινούρια δείγματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε *in vivo* πειράματα καθώς η συμπεριφορά σε ζωντανό οργανισμό αναμενόταν πιο ελπιδοφόρα. Στο σχήμα 68 παρουσιάζονται τα μεταθανάτια βάρη των καρκινικών όγκων xOVCAR-3 ύστερα από θεραπεία με cisplatin, με νανοσωματίδια που φέρουν το φάρμακο αλλά και με άδειους νανοφορείς σε ποντίκια στα οποία είχε αναπτυχθεί ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου. Και σε αυτήν την περίπτωση τα νανοσωματίδια με το φάρμακο δεν έδειξαν δραστικότητα καθώς η συμπεριφορά τους ήταν ίδια με αυτήν των άδειων νανοφορέων. Η σισπλατίνη που χρησιμοποιήθηκε συγκριτικά ως θετικός μάρτυρας είχε ιδιαίτερα τοξική δράση στο σχήμα στο οποίο χορηγήθηκε (10mg/kg, δύο φορές την εβδομάδα). Κανένα από τα ζώα δεν κατάφερε να επιβιώσει ενώ και η αποτελεσματικότητα ήταν μηδενική.



Σχήμα 68: Μεταθανάτια βάρη των καρκινικών όγκων xOVCAR-3 ύστερα από θεραπεία με Cis-Platin, με νανοσωματίδια PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ με Cis-Platin (B, formulation) και άδειους νανοφορείς PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ (blank). Οι ράβδοι παρουσιάζουν το μέσο όρο±SD (n=5)

Συμπερασματικά, από όλες τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για το συγκεκριμένο σύστημα μεταφοράς του αντικαρκινικού φαρμάκου της cisplatin προκύπτει ότι η έλλειψη της δραστηριότητάς του οφείλεται το πιο πιθανό στην τεράστια ικανότητα της ιστιδίνης να συμπλέκει την πλατίνα γεγονός το οποίο καθιστά τη σύμπλεξη αυτή μια μη αναστρέψιμη διαδικασία και άρα δεν είναι δυνατή η σωστή αποδέσμευση του φαρμάκου, γεγονός που οδηγεί σε εξαφάνιση των αντικαρκινικών ιδιοτήτων σισπλατίνας. Αυτό, όσον αφορά τη δική μας προσπάθεια κατά τη διάρκεια μελέτης εγκλωβισμού του φαρμάκου, επιβεβαιώνεται από το τεράστιο ποσοστό της δέσμευσης που ανέρχεται περίπου στο 90% της αρχικής ποσότητας στις 96 ώρες, ενώ ήδη από την πρώτη κιόλας ώρα το ποσοστό δέσμευσης ήταν εξαιρετικά υψηλό και άγγιζε το 42%. Ταυτόχρονα η ποσοτική δέσμευση και η μη αναστρεψιμότητα του δεσμού της ιστιδίνης με τη σισπλατίνα επιβεβαιώνεται και από βιβλιογραφικές αναφορές. [190, 191]

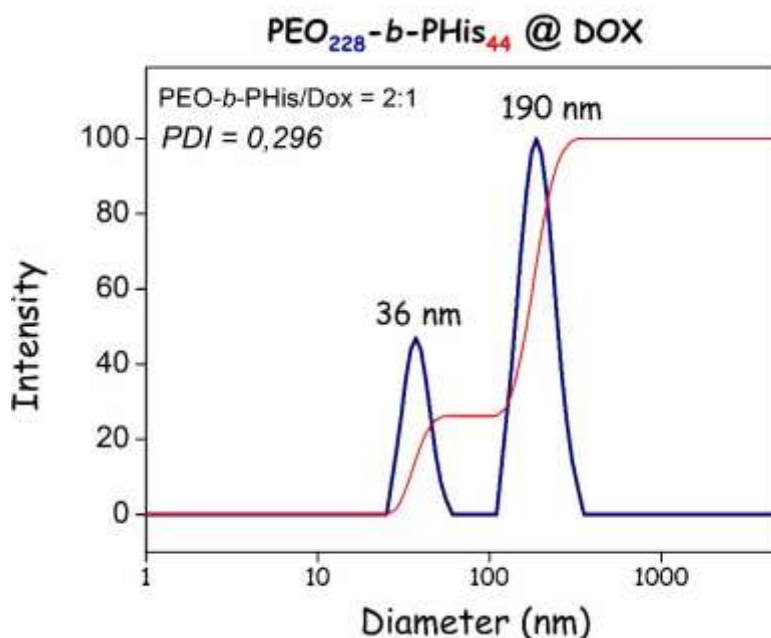
5.12 Μελέτη των Νανοσωματιδίων με Δοξορουβικίνη

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές εγκλωβισμού του αντικαρκινικού φαρμάκου της δοξορουβικίνης στο πολυμερές PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄. Μετά τη διαδικασία της δέσμευσης πραγματοποιήθηκαν μελέτες μοριακού χαρακτηρισμού, προκειμένου να αποσαφηνιστεί το μέγεθος αλλά και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων.

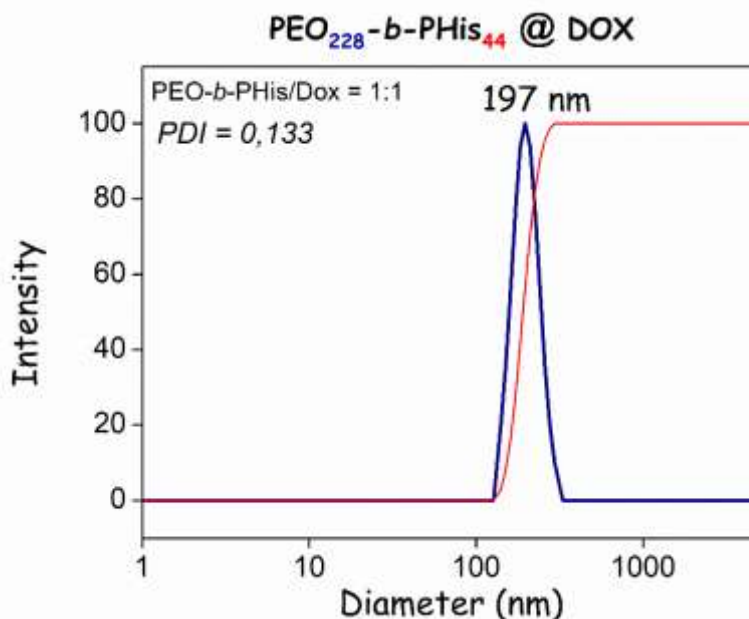
Πιο συγκεκριμένα, οι τεχνικές της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) και της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διαπερατότητας (TEM) χρησιμοποιήθηκαν, με σκοπό να μελετηθεί η δομή των νανοσωματιδίων, ενώ οι μετρήσεις ζ-δυναμικού που πραγματοποιήθηκαν, προσδιόρισαν το επιφανειακό τους φορτίο.

Οι μετρήσεις DLS για το πολυμερές PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ με δοξορουβικίνη πραγματοποιήθηκαν αμέσως μετά τη διαδικασία της δέσμευσης, σε pH 7,4 στους 25 °C. Όπως προαναφέρθηκε, αρχικά χρησιμοποιήθηκε η αναλογία πολυμερούς/φαρμάκου 2:1 στη διαδικασία της δέσμευσης αλλά επειδή αποδείχθηκε η τεράστια ικανότητα δέσμευσης του φαρμάκου από το πολυμερές, από μετέπειτα μελέτες, χρησιμοποιήθηκε τελικά η αναλογία πολυμερούς/φαρμάκου 1:1.

Στο Σχήμα 69, όπου η αναλογία πολυμερούς/DOX είναι ίση με 2:1, παρατηρείται η ύπαρξη δύο πληθυσμών, ο ένας εκ των οποίων είναι της τάξης μεγέθους των 190 nm, ενώ ο άλλος είναι κοντά στα 36 nm και δείκτης πολυδιασποράς είναι ίσος με 0,296. Η εικόνα, όπου η αναλογία πολυμερούς/DOX είναι ίση με 1:1, παρατηρείται η ύπαρξη ενός μόνο πληθυσμού της τάξης μεγέθους των 197 nm με πολύ πιο στενή κατανομή σε σχέση με την προηγούμενη, με δείκτη πολυδιασποράς ίσο με 0,133.



Σχήμα 69: Αποτελέσματα DLS για το PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ με δοξορουβικίνη με αναλογία πολυμερούς/φαρμάκου 2:1 σε pH 7.4, στους 25 °C, στις 90°.



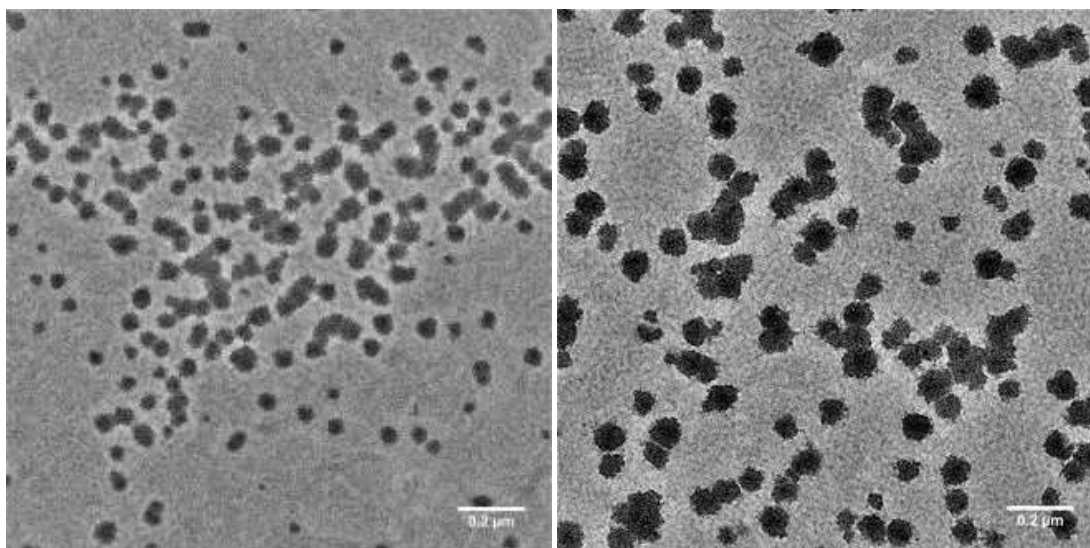
Σχήμα 70: Αποτελέσματα DLS για το PEO₂₂₈-b-PHis₄₄ με δοξορουβικίνη με αναλογία πολυμερούς/φαρμάκου 1:1 σε pH 7.4, στους 25 °C, στις 90°.

Εν συνεχεία, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων TEM για τα νανοσωματίδια του PEO₂₂₈-b-PHis₄₄ με DOX με αναλογία πολυμερούς/φαρμάκου ίση με 2:1. Η Εικόνα 23 φανερώνει την ύπαρξη δύο πληθυσμών που βρίσκεται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα αποτελέσματα του DLS, έναν κοντά στα 100 nm και ένα κοντά στα 40 nm.

Όπως παρατηρούμε, η διάμετρος των νανοσωματιδίων που λαμβάνεται από τη μέτρηση με TEM είναι μικρότερη από την υδροδυναμική διάμετρο που υπολογίζεται από τη δυναμική σκέδαση, γεγονός που οφείλεται στον διαφορετικό τρόπο με τον οποίο παρασκευάστηκαν τα δείγματα σε κάθε περίπτωση. Συγκεκριμένα, στο DLS τα νανοσωματίδια είναι διαλυμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7.4, ενώ για την μέτρησή τους με TEM ακολουθείται μία ειδική επεξεργασία, η οποία περιλαμβάνει την απομάκρυνση των αλάτων μέσω διαπίδυσης, την λιοφυλοποίηση του δείγματος προκειμένου να αφαιρεθεί το νερό και τέλος την επαναδιαλυτοποίηση του στερεού νανοσωματιδίου σε υπερκάθαρο νερό για να μετρηθεί στο όργανο. Σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία η μείωση του μεγέθους των νανοσωματιδίων, που παρουσιάζουν οι μετρήσεις TEM, αποδίδεται στη συρρίκνωση που προκαλείται από την εξάτμιση του νερού υπό κενό κατά τη διαδικασία της λιοφυλοποίησης. [58]

Επίσης, παρατηρείται ότι το PEO₂₂₈-b-PHis₄₄ παρουσιάζει σφαιρικές μικυλλιακές δομές πυρήνα-κελύφους. Στον υδρόφοβο πυρήνα του μικυλλίου, που αποτελείται από τη

συστάδα της πολυ(ιστιδίνης), βρίσκεται εγκλωβισμένη η δοξορουβικίνη, στην οποία οφείλεται και το έντονο μαύρο χρώμα του νανοσωματιδίου, καθώς δημιουργεί έντονη αντίθεση. Η υδρόφιλη κορώνα του μικυλλίου αποτελείται από τη συστάδα του πολυ(αιθυλενοξειδίου). Το υδρόφιλο κέλυφος, μπορεί να παρατηρηθεί σε αυτές τις εικόνες, ως μία αχνή, λευκή στεφάνη.



Εικόνα 23: Αποτελέσματα TEM του δικτυωμένου νανοσωματιδίου του πολυμερούς PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ με DOX με αναλογία πολυμερούς/φαρμάκου ίση με 2:1

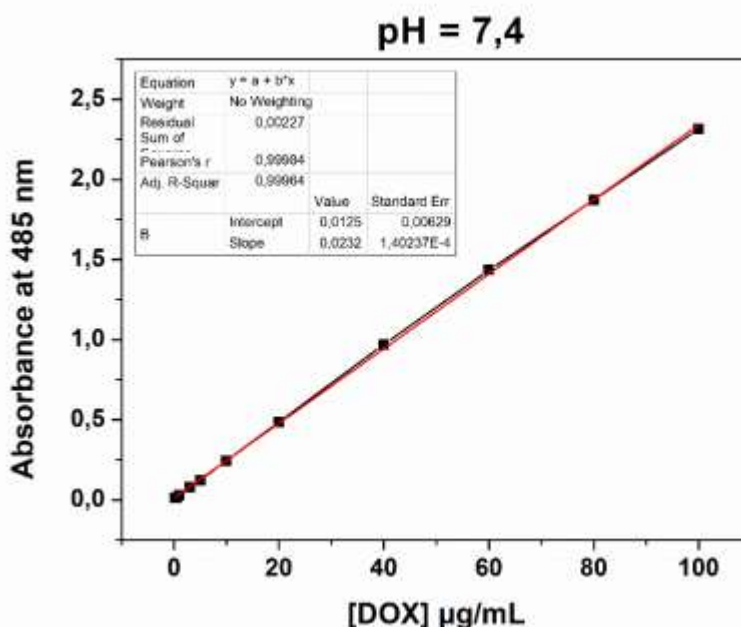
Συνοψίζοντας, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η δοξορουβικίνη «αναγκάζει» τα νανοσωματίδια να αυτοοργανωθούν καλύτερα σε δομές με μεγαλύτερη ομοιογένεια. Αυτό φανερώνεται επίσης και από το γεγονός ότι σε μεγαλύτερη ποσότητα φαρμάκου προέκυψαν νανοσωματίδια ενός μόνο πληθυσμού με μεγάλη ομοιογένεια και πολύ στενή κατανομή. Πολύ πιθανόν, αν υπήρχε η δυνατότητα να μετρηθούν τα νανοσωματίδια PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ με DOX με αναλογία πολυμερούς/φαρμάκου ίση με 1:1, να λαμβάνονταν σφαιρικές δομές ενός μόνο πληθυσμού και στενής κατανομής όπως προέκυψαν και στα αντίστοιχα αποτελέσματα από τις μετρήσεις DLS.

Τέλος, στα νανοσωματίδια του πολυμερούς με δοξορουβικίνη πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ζ-δυναμικού, με σκοπό την εύρεση του επιφανειακού τους φορτίου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε pH=7.4 η μέση τιμή του ζ-δυναμικού (mean) είναι 1.12, δηλαδή στην περιοχή [-10mV,+10mV], επομένως θεωρούμε ότι όλα τα συντιθέμενα νανοσωματίδια έχουν ουδέτερο επιφανειακό φορτίο, γεγονός που επιβεβαιώνεται και

από τις εικόνες TEM, στις οποίες φαίνεται το νανοσωματίδιο να περιβάλλεται από την αφόρτιστη και υδρόφιλη συστάδα του πολυ(αιθυλενοξειδίου).

5.13 Αποτελέσματα Δέσμευσης της Δοξορουβικίνης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η δέσμευση του φαρμάκου πραγματοποιήθηκε σε pH=7.4, με τη χρήση ισοτονικού ρυθμιστικού διαλύματος PBS (150 mM NaCl, 10 mM PBS). Μετά το τέλος της διαδικασίας, η απόδοση εγκλωβισμού του φαρμάκου (encapsulation efficiency (EE)) και η ικανότητα δέσμευσης (loading capacity (LC)) των νανοσωματιδίων προσδιορίστηκε με φασματοφωτομετρία UV-Vis στα 485 nm, καθώς η ελεύθερη δοξορουβικίνη απορροφά σε αυτό το μήκος κύματος, ενώ το πολυμερές όχι. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με χρήση πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης της δοξορουβικίνης στο αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH=7.4 (Σχήμα 71):



Σχήμα 71: Πρότυπη Καμπύλη βαθμονόμησης DOX, σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH=7.4.

Τα αποτελέσματα προέκυψαν ύστερα από την επεξεργασία των μετρήσεων της φασματοσκοπίας UV-Vis, με τη χρήση των εξισώσεων:

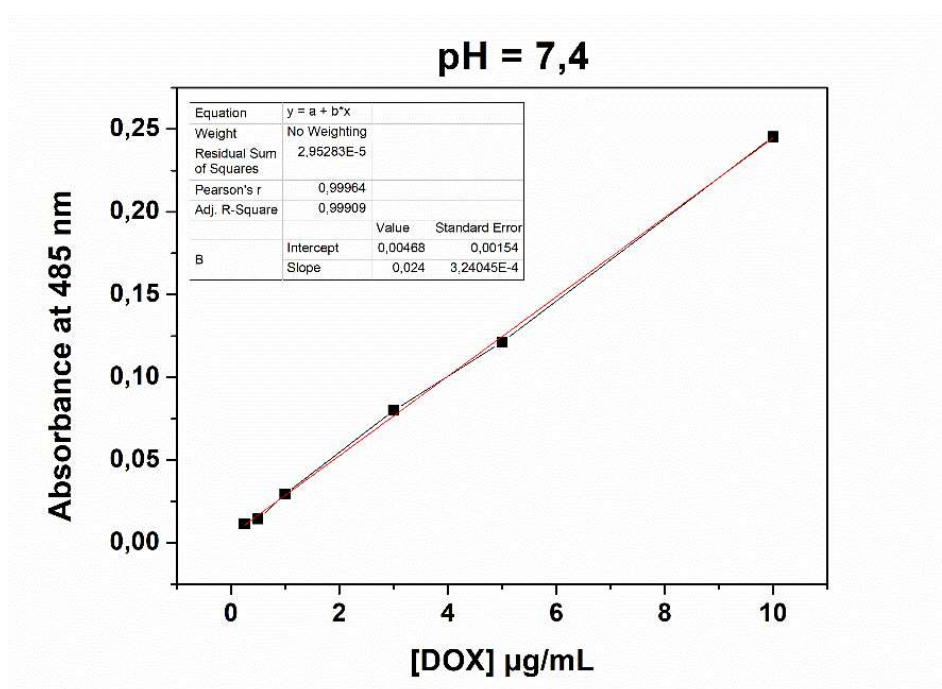
$$EE (\%) = (\text{Μάζα της δεσμευμένης DOX} / \text{Μάζα DOX του αρχικού διαλύματος}) \times 100$$

$$LC (\%) = (\text{Μάζα της δεσμευμένης DOX} / \text{Μάζα DOX του πολυμερούς}) \times 100.$$

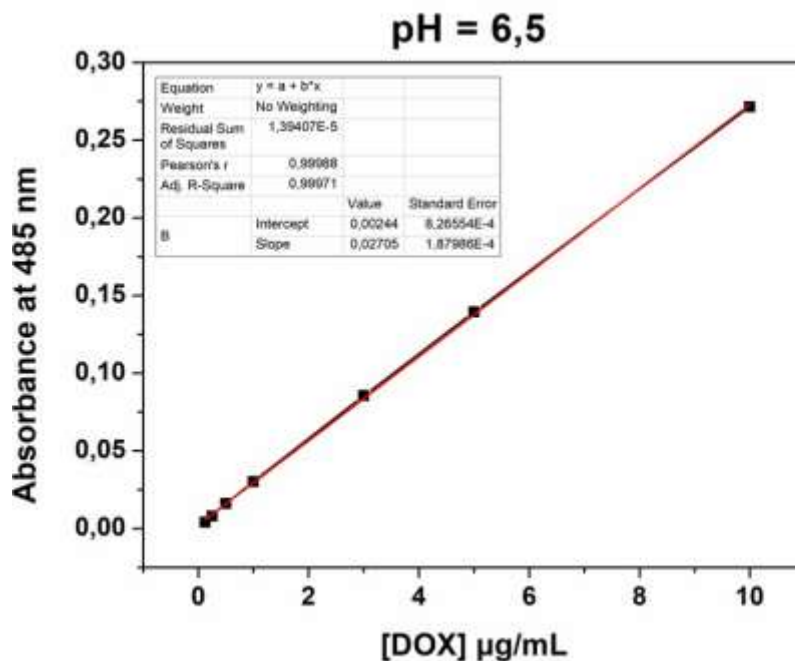
Έτσι για το PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄, τα αποτελέσματα έδωσαν ΕΕ (%) = 23% και LC (%) = 12%.

5.14 Αποτελέσματα Αποδέσμευσης της Δοξορουβικίνης σε ρυθμιστικά διαλύματα

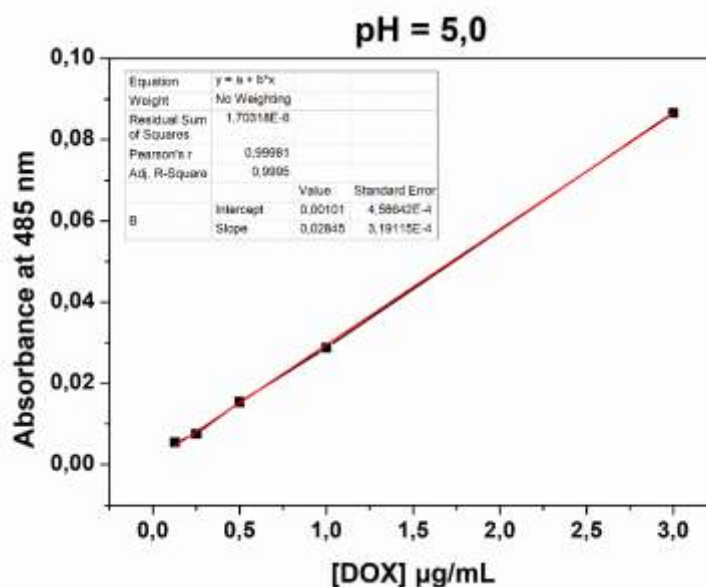
Σε προηγούμενο κεφάλαιο περιγράφηκε αναλυτικά η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την αποδέσμευση του αντικαρκινικού φαρμάκου της δοξορουβικίνης από το κατά συστάδες συμπολυμερές PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η απελευθέρωση του φαρμάκου πραγματοποιήθηκε σε διάφορα pH και θερμοκρασίες, προκειμένου να γίνει προσομοίωση της αποδέσμευσής του, τόσο σε συνθήκες υγιούς οργανισμού (pH=7.4, 37 °C), όσο και σε περιβάλλον καρκινικού κυττάρου (pH=6.5 ή 5.0, 40 °C). Μετά το τέλος της διαδικασίας, η ποσότητα της αποδεσμευμένης δοξορουβικίνης προσδιορίστηκε με φασματοφωτομετρία UV-Vis στα 485 nm και η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πρότυπων καμπυλών βαθμονόμησης του φαρμάκου στα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα (Σχήματα 72-74):



Σχήμα 72: Πρότυπη Καμπύλη βαθμονόμησης DOX, σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH=7.4.



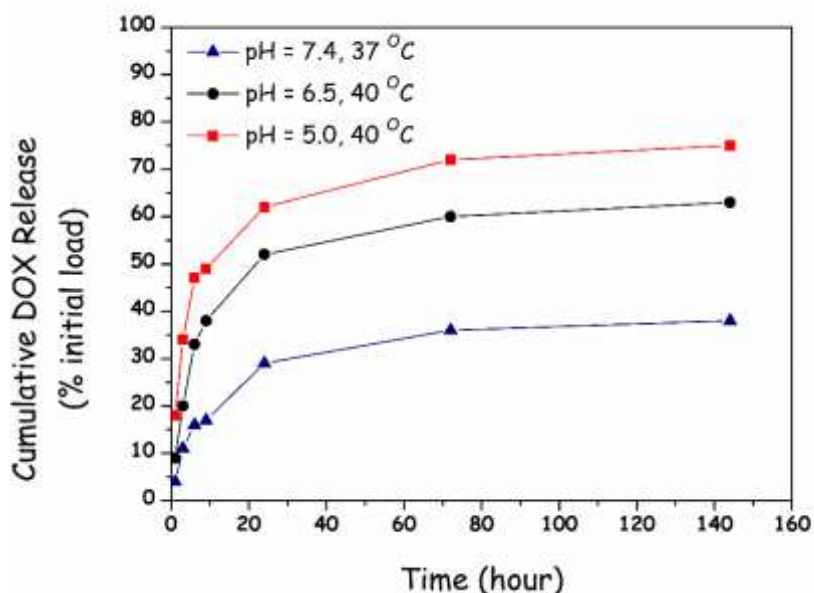
Σχήμα 73: Πρότυπη Καμπύλη βαθμονόμησης DOX, σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH=6.5.



Σχήμα 74: Πρότυπη Καμπύλη βαθμονόμησης DOX, σε ρυθμιστικό διάλυμα Acetate pH=5.

Η αθροιστική απελευθέρωση της δοξορουβικίνης μετρήθηκε στο εξωτερικό διάλυμα σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα. Ακολουθώς, παρατίθενται τα αποτελέσματα αποδέσμευσης για κάθε ένα από τα σχηματισθέντα νανοσωματίδια πολυμερούς-DOX. Στο Σχήμα 75 παρουσιάζονται οι αθροιστικές καμπύλες αποδέσμευσης του φαρμάκου και στον Πίνακα 15 παρατίθενται τα % αθροιστικά ποσοστά της αποδεσμευμένης δοξορουβικίνης με τον χρόνο.

Τα νανοσωματίδια του πολυμερούς PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ παρουσιάζουν μόνο αποκρισιμότητα στις μεταβολές του pH εξαιτίας της συστάδας της πολυ(ιστιδίνης). Έτσι, στις 144 ώρες έχει αποδεσμευτεί το 38% του φαρμάκου σε pH 7.4, το 63% σε pH 6.5 και το 75% σε pH 5.



Σχήμα 75: Αθροιστική καμπύλη αποδέσμευσης της DOX από το νανοσωματίδιο με το πολυμερές PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄.

Πίνακας 15: Συγκεντρωτικός πίνακας αποτελεσμάτων αποδέσμευσης της DOX από το νανοσωματίδιο με το πολυμερές PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄.

PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₄₄			
Time (Hour)	DOX Release (%)		
	pH = 7,4	pH = 6,5	pH = 5,0
1	4	9	18
3	11	20	34
6	16	33	47
9	17	38	49
24	29	52	62
72	36	60	72
144	38	63	75

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ένα «έξυπνο» σύστημα μεταφοράς αντικαρκινικών φαρμάκων το οποίο έχει την ικανότητα να αποκρίνεται στο pH και προτιμά να απελευθερώσει το φάρμακο σε συνθήκες καρκινικού ιστού έναντι του φυσιολογικού.

5.15 Αποτελέσματα από τον έλεγχο κυτταροτοξικότητας *in vitro* με τη μέθοδο SRB

Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 4.10, η αντιπολλαπλασιαστική δράση των διαφόρων ουσιών ελέγχθηκε μέσω της χρωματομετρικής μεθόδου της σουλφοροδαμίνης B (SRB, Sulforhodamine B).

Για κάθε συγκέντρωση της ουσίας που μελετήθηκε, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση στα 540 nm (Ti).

Χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις οπτικής απορρόφησης των κυττάρων την ώρα της προσθήκης των ουσιών (Tz), των κυττάρων ελέγχου (C), καθώς και των κυττάρων υπό την επίδραση των εξεταζόμενων ουσιών, υπολογίστηκε η ποσοστιαία ανάπτυξη των κυττάρων (% Growth Rate) με τη χρήση του παρακάτω τύπου:

$[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100$, για συγκεντρώσεις όπου $Ti \geq Tz$ και

$[(Ti-Tz)/Tz] \times 100$, για συγκεντρώσεις όπου $Ti < Tz$

Από τις προκύπτουσες καμπύλες δόσης-απόκρισης (όπου απόκριση ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων, % growth rate) (Σχήματα 76-78) προσδιορίστηκαν οι παράμετροι GI50, TGI και LC50 (Πίνακας 16), όπου:

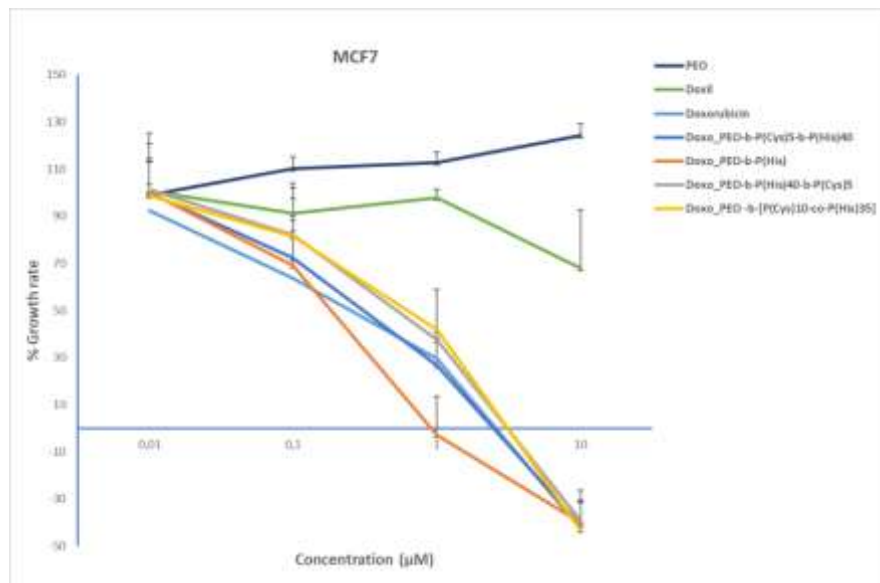
GI50, Growth Inhibition 50%= η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιτυγχάνεται αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων κατά 50%.

TGI, Total Growth Inhibition = η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιτυγχάνεται ολική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων.

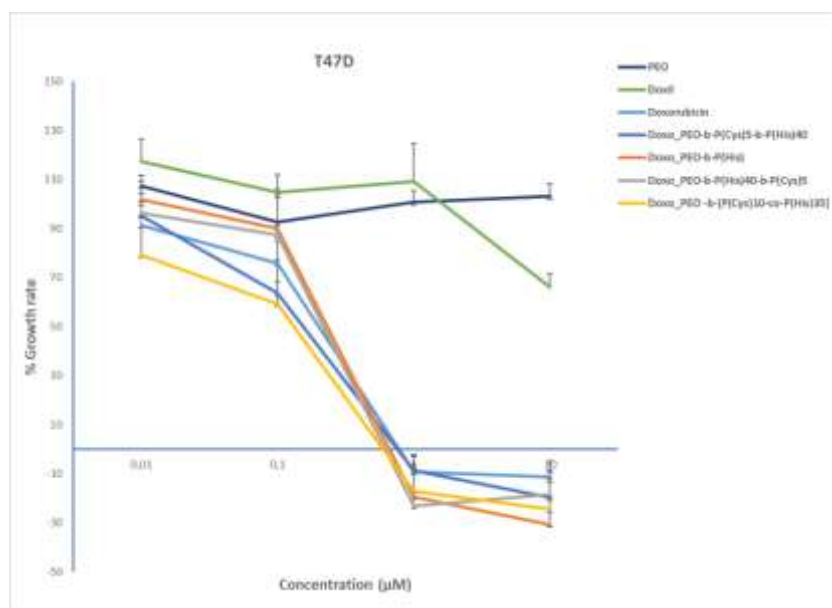
LC50, Lethal Concentration 50% = η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιφέρεται θάνατος στο 50% του κυτταρικού πληθυσμού.

Παρακάτω παρατίθενται οι καμπύλες δόσης-απόκρισης για τα κύτταρα MCF7, T47D και MB231. Στις καμπύλες παρουσιάζονται και αποτελέσματα από άλλα πολυμερή της εργαστηριακής μας ομάδας που πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα. Στην παρούσα όμως εργασία θα μας απασχολήσουν μόνο όσα αναγράφονται πάνω δεξιά σε κάθε γράφημα,

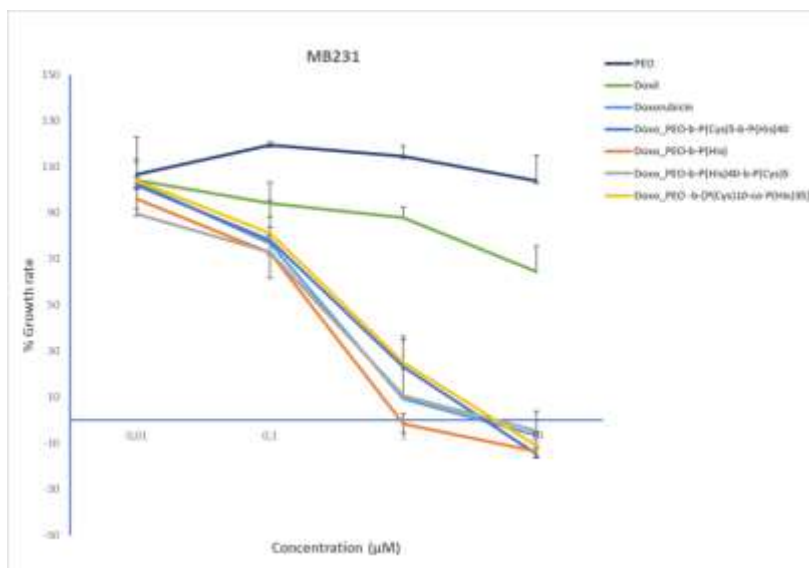
δηλαδή τα αποτελέσματα που προκύπτουν από το PEO, την Doxil, την Doxorubicin και τα νανοσωματίδια του PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ με την DOX.



Σχήμα 76: Καμπύλη δόσης-απόκρισης για τα κύτταρα MCF-7.



Σχήμα 77: Καμπύλη δόσης-απόκρισης για τα κύτταρα T47D.



Σχήμα 78: Καμπύλη δόσης-απόκρισης για τα κύτταρα MB231.

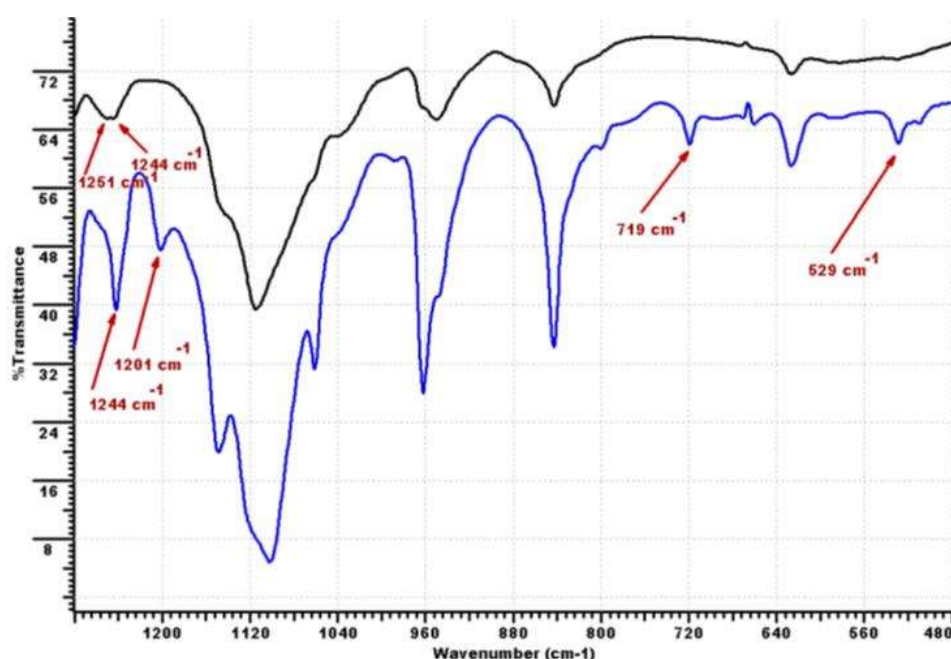
Πίνακας 16: Συγκεντρωτικός πίνακας των τιμών των μεγεθών GI₅₀, TGI, LC₅₀.

	Doxo_PEO-b-P(Cys) ₅ -b-P(His) ₄₀			Doxo_PEO-b-P(His)			Doxo_PEO-b-P(His) ₄₀ -b-P(Cys) ₅			Doxo_PEO-b-[P(Cys) ₁₀ -co-P(His) ₃₅]			Doxil			Doxorubicin		
	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀	GI ₅₀	TGI	LC ₅₀
T47D	0,3	0,9	>10	0,4	0,8	>10	0,4	0,8	>10	0,2	0,8	>10	>10	>10	>10	0,4	0,9	>10
MCF7	0,5	4,5	>10	0,3	1,0	>10	0,7	5,4	>10	0,8	5,4	>10	>10	>10	>10	0,5	4,7	>10
MB231	0,6	6,5	>10	0,4	1,0	>10	0,4	7,3	>10	0,6	7,2	>10	>10	>10	>10	0,5	6,3	>10

Από τις τρεις κυτταρικές σειρές που ελέγχθηκαν τα πιο ευαίσθητα στην δράση τόσο της δοξορουβικίνης όσο και των nanoformulations βρέθηκαν να είναι τα κύτταρα T-47D, ακολουθούμενα από τα MCF-7, ενώ τα MDA-MB231 εμφανίστηκαν να είναι τα λιγότερο ευαίσθητα κάτω από τις πειραματικές συνθήκες που ελέγχθηκαν (Σχήματα 76-78 και Πίνακας 16). Ενδιαφέρον εμφανίζει ότι το doxil (ή caelyx) δεν έχει καλή δράση στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες γεγονός που πιθανώς εξηγείται από τη σύνθεσή του. Αντίθετα με το doxil, οι νανοφορείς που δοκιμάστηκαν έδειξαν να έχουν αντίστοιχη δράση με τη δοξορουβικίνη, όπως προκύπτει τόσο από τις καμπύλες αύξησης των τριών κυτταρικών σειρών (Σχήματα 76-78) όσο και από τις παραμέτρους GI₅₀, TGI και LC₅₀ (Πίνακας 16). Ο φορέας PEO-*b*-P(His) έδειξε μια ελαφρά καλύτερη δράση στα κύτταρα MB231 και MCF-7 στην συγκέντρωση του 1 µM (Σχήματα 76 και 78) σε σχέση με το ελεύθερο φάρμακο γεγονός πολύ ελπιδοφόρο για το συγκεκριμένο σύστημα μεταφοράς, ωστόσο γενικά δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια εξειδίκευση στην κυτταροτοξική δράση, όπως άλλωστε συνέβη και με την ελεύθερη δοξορουβικίνη (Πίνακας 16). Τέλος, κανένας από τους άδειους νανοφορείς που εξετάστηκαν στις ίδιες κυτταρικές σειρές και πειραματικές συνθήκες δεν έδειξε τοξικότητα.

5.16 Μελέτη των Νανοσωματιδίων Χρυσού βασισμένων στην πολύ(ιστιδίνη)

Στην εργασία μας, χρησιμοποιήσαμε την πολυμερική μορφή της ιστιδίνης, δηλαδή PHis, για την αναγωγή του χρυσού. Λόγω της ήπιας αναγωγικής ικανότητας του ιμιδαζολικού δακτυλίου και της στερικής παρεμπόδισης της πολυμερικής φύσης της PHis, η αναγωγική αντίδραση μεταξύ Au^{3+} και PHis ήταν αργή και απαιτήθηκε αυξημένη θερμοκρασία. Η αλληλεπίδραση του Au με τα άζωτα της ομάδας ιμιδαζολίου αποδείχθηκε με φασματοσκοπία FTIR. Το φάσμα FTIR ελήφθη από το πρόδρομο PEO-*b*-PHis καθώς και από τα υλικά που προέκυψαν μετά τον σχηματισμό νανοσφαιρών χρυσού (Σχήμα 79). Διαπιστώθηκε ότι η δευτεροταγής δομή μεταβλήθηκε αφού η κορυφή στα 1640 cm^{-1} μετατοπίστηκε. Επιπλέον, μετά το σχηματισμό των νανοσφαιρών χρυσού, η δόνηση του δεσμού -C=N- μετατοπίστηκε προς τα πάνω, από 1201 σε 1251 cm^{-1} , ενώ οι κορυφές στα 719 και 529 cm^{-1} λόγω των δονήσεων του δεσμού -N-H εξαλείφθηκαν εντελώς [186]. Επομένως, αυτή είναι η πρώτη φορά που παρουσιάζεται η αναγωγή του Au(III) από ένα πολυμερές που περιέχει PHis, όπου η PHis συνδέεται χημικά με άλλες πολυμερικές συστάδες, χωρίς την απαίτηση αναγωγικού παράγοντα. Μέχρι στιγμής, η PHis χρησιμοποιήθηκε για τον συντονισμό και τον εντοπισμό των νανοσωματιδίων χρυσού, αλλά όχι ως αναγωγικός παράγοντας. Στην εργασία μας η PHis χρησιμοποιήθηκε τόσο ως αναγωγικός όσο και ως παράγοντας συντονισμού.



Σχήμα 79: Φάσματα FTIR του PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂ (μπλε) και του ίδιου πολυμερούς μετά τον σχηματισμό των νανοσφαιρών χρυσού (μαύρο).

Οι διαστάσεις και η δομή των AuNSs, όπως οι διαστάσεις του πυρήνα και το πάχος του κελύφους, ρυθμίσθηκαν επιτυχώς ελέγχοντας τα μοριακά χαρακτηριστικά των προδρόμων των αμφίφυλων υβριδικών τρισυσταδικών συμπολυπεπτιδίων, τη μακρομοριακή αρχιτεκτονική τους, την αυτό-οργάνωσή τους καθώς και τη συγκέντρωση του H₂AuCl₄. Τα υβριδικά τρισυσταδικά συμπολυπεπτίδια αποτελούνται από πολυ(αιθυλενοξειδίο)-*b*-PHis-*b*-πολυ(L-φαινυλαλανίνη) ή πολυ (γ-βενζυλο-L-γλουταμικό) (PEO-*b*-PHis-*b*-PPhe ή PEO-*b*-PHis-*b*-PBLG). Τα σχηματιζόμενα NPs αποτελούνται από έναν πολυπεπτιδικό πυρήνα αποτελούμενο από πολυ (L-φαινυλαλανίνη) ή πολυ (γ-βενζυλο-L-γλουταμικό), καλυμμένο από ένα στρώμα PHis, το οποίο περιβάλλεται με ένα επιπλέον εξωτερικό κέλυφος PEO. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με το αμφίφιλο υβριδικό πολυπεπτίδιο PEO-*b*-PHis που σχηματίζει τυπικές νανοσφαίρες χρυσού αντί για AuNSs. Ο Au (III) συμπλέχτηκε αρχικά στην PHis και στη συνέχεια υπέστη αναγωγή με θέρμανση σχηματίζοντας AuNSs πάνω στα υβριδικά τρισυσταδικά συμπολυπεπτίδια ή νανοσφαίρες χρυσού πάνω στα συσσωματώματα των νανοσωματιδίων του PEO-*b*-PHis. Τα νανοσωματίδια χαρακτηρίστηκαν από TEM, CD και DLS.

Διαπιστώθηκε ότι χρησιμοποιώντας αυτή τη νέα προσέγγιση και ελέγχοντας τα μοριακά χαρακτηριστικά και την αρχιτεκτονική των πολυμερικών προδρόμων, είναι δυνατό να ρυθμιστεί το σχετικό πάχος πυρήνα και κελύφους των NPs που σχηματίζουν τα AuNSs, μετατοπίζοντας έτσι την κορυφή απορρόφησης σε ένα επιθυμητό μήκος κύματος μεταξύ ορατού και NIR. Αυτός ο οπτικός συντονισμός επιτρέπει την εύκολη σύνθεση βιοσυμβατών NPs που περιέχουν AuNS με μέγιστη οπτική απορρόφηση στο NIR, όπου η οπτική διείσδυση στον ιστό είναι η βέλτιστη. Οι ρυθμιζόμενες οπτικές ιδιότητες των AuNSs εξετάστηκαν με φασματοσκοπία UV-Vis. Ένα υδατικό διάλυμα νανοσωματιδίων που περιείχε AuNSs που απορροφούν στο NIR, εκτέθηκε σε laser NIR με χαμηλή ισχύ και εστιασμένη και λεπτή δέσμη. Η θερμοκρασία του διαλύματος αυξήθηκε σημαντικά ως απόδειξη της αποτελεσματικότητάς τους ως φωτοθερμικών παραγόντων που επάγουν τη θερμική κατάλυση κυττάρων.

5.16.1 Μελέτη των Νανοσωματιδίων Χρυσού με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης και του ζ-Δυναμικού

Η δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) μετρά τις εξωτερικές διαστάσεις των NPs και είναι ακριβής όταν τα NPs είναι σφαιρικά. Ήταν απαραίτητο να επιτευχθεί έλεγχος των διαστάσεων του πυρήνα των NPs καθώς και του πάχους του νανοκελύφους χρυσού

μέσω των μοριακών χαρακτηριστικών των πολυμερικών υλικών προκειμένου να αυξηθεί η απορρόφηση του μήκους κύματος στις υψηλότερες δυνατές τιμές. Αρχικά, τα NPs χαρακτηρίστηκαν με DLS πριν από την προσθήκη HAuCl_4 , ύστερα μετά την προσθήκη του οξέος και τέλος μετά θέρμανση στους $80\text{ }^\circ\text{C}$. Αλλάξαμε τις μοριακές αναλογίες PHis/Au για να βρούμε τις βέλτιστες συνθήκες. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε υπερκάθαρο νερό και σε θερμοκρασίες είτε 25 είτε $80\text{ }^\circ\text{C}$. Αυτή η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε νανοσφαίρες $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}/\text{Au}$ καθώς και σε $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{29}\text{-}b\text{-PPhe}_5/\text{Au}$, $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{29}\text{-}b\text{-PPhe}_{10}/\text{Au}$, $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}\text{-}b\text{-PBLG}_{10}/\text{Au}$ και στα $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}\text{-}b\text{-PBLG}_{20}/\text{Au}$ nanoshells, αφού τα άλλα NPs $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}\text{-}b\text{-PBLG}_{40}/\text{Au}$ παρουσίασαν περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό λόγω του υψηλότερου μοριακού βάρους της υδρόφοβης συστάδας του PBLG.

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί στους Πίνακες 18c και 19c, η προσθήκη HAuCl_4 στο πολυμερικό διάλυμα είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άλατος Au της PHis, οδηγώντας σε NPs με μεγαλύτερες διαστάσεις, σε σύγκριση με τις διαστάσεις του ελεύθερου πολυμερούς στους $25\text{ }^\circ\text{C}$. Αυτό οφείλεται στην πρωτονίωση της PHis, η οποία γίνεται υδρόφιλη και διογκώνεται. Σε αυτή την περίπτωση, η μετάβαση της δευτεροταγούς δομής της συστάδας της PHis, κυρίως από τη βήτα στροφή σε τυχαίο σπείραμα είχε ως αποτέλεσμα μια πιο εκτεταμένη μορφή και αύξηση των διαστάσεων των νανοσωματιδίων. Στην περίπτωση των $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}$, $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}\text{-}b\text{-PBLG}_{10}$ και $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}\text{-}b\text{-PBLG}_{20}$, η προσθήκη Au(III) έδωσε νανοσωματίδια με μειωμένο διάμετρο και, ειδικότερα, η υδροδυναμική διάμετρος μειώθηκε με την αύξηση του λόγου του χλωροαυρικού οξέος, όπως φαίνεται στους Πίνακες 17c, 20c και 21c. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε ρήξη των συσσωματωμάτων σε μικρότερα NPs μετά την πρωτονίωση των αλυσίδων PHis. Η θέρμανση στους $80\text{ }^\circ\text{C}$ οδήγησε σε ακόμη μικρότερα NPs με χαμηλότερη πολυδιασπορά, όπως επιτεύχθηκε με μετρήσεις DLS και TEM (βλ. Παρακάτω). Η αύξηση της ποσότητας του Au, άρα η μείωση του λόγου PHis/Au, οδήγησε εν γένει σε μικρότερα συσσωματώματα. Φαίνεται ότι ο σχηματισμός νανοσωματιδίων χρυσού μέσα στα πολυμερικά NPs οδήγησε σε πιο συμπαγείς και υδρόφοβες δομές.

Στην περίπτωση των NPs που σχηματίζονται από το $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}$, η αύξηση της αναλογίας PHis/οξέος είχε ως αποτέλεσμα πιο διογκωμένα και σπασμένα NPs. Τα καλύτερα αποτελέσματα για τα $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}/\text{Au}$ δίνονται από τη μοριακή αναλογία PHis/Au = 5:1 όπως επαληθεύεται από την εμφάνιση ενός μόνο πληθυσμού στα 107 nm με χαμηλή πολυδιασπορά ίση με $0,171$ (Πίνακας 17d). Στην περίπτωση των NPs που

σχηματίστηκαν από το PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe₅, η προσθήκη HAuCl₄ οδήγησε σε σημαντική διόγκωση των NPs χωρίς θραύση όπως στην περίπτωση του PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂, λόγω της παρουσίας της υδρόφοβης PPhe που δεν επιτρέπει την πλήρη ρήξη των αρχικώς συσσωματωμένων αλυσίδων (Πίνακας 18c). Παρόμοια συμπεριφορά έδειξαν τα NPs που σχηματίστηκαν από το PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe₁₀ (Πίνακας 19). Η προσθήκη του οξέος αύξησε τις διαστάσεις των NPs ενώ η θέρμανση οδήγησε σε σημαντική μείωση των διαστάσεων των NPs και ελαφρά θραύση πιθανώς σε συσσωματώματα μονών αλυσίδων, όπως υποδεικνύεται από την παρουσία συσσωματωμάτων διαστάσεων 4-6 nm (Πίνακας 19d). Στην περίπτωση του PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₁₀, σχηματίστηκαν ελαφρώς μεγαλύτερα συσσωματώματα σε σύγκριση με αυτά του PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe₁₀ (Πίνακας 20), ίσως λόγω του σχηματισμού μεγαλύτερου πυρήνα από PBLG, λόγω του μεγαλύτερου μοριακού βάρους και υδροδυναμικού όγκου. Τέλος, τα NPs που σχηματίστηκαν από το PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₂₀, με τη μεγαλύτερη ποσότητα υδρόφοβου PBLG σχημάτισαν τα μεγαλύτερα συσσωματώματα (Πίνακας 21).

Πίνακας 17: Μετρήσεις DLS: (a) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂ σε νερό, (b) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂ σε νερό στους 80 °C, (c) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂ σε νερό με HAuCl₄·3H₂O και (d) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂/Au σε νερό στους 80 °C (AuNPs).

PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂		Μοριακή Αναλογία PHis/Au(III)	Υδροδυναμική Διάμετρος (nm)	Ένταση (%)	Πολυδιασπορά	Ποσοστό Καταμέτρησης (Kcps)			
(a)	σε νερό	-	9	10	-	0,287			
			198	90					
(b)	σε νερό στους 80 °C	-	7	8	-	0,376			
			43	19					
			152	73					
(c)	σε νερό με HAuCl ₄ ·3H ₂ O	10:1	11	10	-	0,283			
			192	90					
		5:1	24	13	-	0,311			
			190	87					
		3:1	14	17	-	0,330			
			151	83					
		2:1	12	18	-	0,324			
			42	34					
		(d)	σε νερό με HAuCl ₄ ·3H ₂ O στους 80 °C (AuNPs)	-	112	48	-	0,324	
					35	19			
10:1	164				81	0,341			94
5:1	107				100	0,171			462
3:1	10				11	-			0,257
	86				89				
2:1	20				15	-			0,245
119	85	428							

Πίνακας 18: Μετρήσεις DLS: (a) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe₅ σε νερό, (b) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe₅ σε νερό στους 80 °C, (c) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe₅ σε νερό με H₂AuCl₄·3H₂O και (d) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe₅/Au σε νερό στους 80 °C (AuNSs).

		Μοριακή Αναλογία PHis/Au(III)	Υδροδυναμική Διάμετρος (nm)	Ένταση (%)	Πολυδιασπορά	Ποσοστό Καταμέτρησης (Kcps)
(a)	σε νερό	-	129	100	0,267	335
(b)	σε νερό στους 80 °C	-	112	100	0,227	467
(c)	σε νερό με H ₂ AuCl ₄ ·3H ₂ O	10:1	146	100	0,250	502
		9:1	148	100	0,242	509
		8:1	149	100	0,237	522
		7:1	152	100	0,234	527
		5:1	154	100	0,229	542
(d)	σε νερό με H ₂ AuCl ₄ ·3H ₂ O στους 80 °C (AuNSs)	10:1	14	12	0,241	461
			103	88		
		9:1	88	100	0,203	430
		8:1	95	100	0,160	536
		7:1	108	100	0,176	471
	5:1	95	100	0,217	576	

Πίνακας 19: Μετρήσεις DLS: (a) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe₁₀ σε νερό, (b) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe₁₀ σε νερό στους 80 °C, (c) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe₁₀ σε νερό με HAuCl₄·3H₂O και (d) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe₁₀/Au σε νερό στους 80 °C (AuNSs).

PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₉ - <i>b</i> -PPhe ₁₀		Μοριακή Αναλογία PHis/Au(III)	Υδροδυναμική Διάμετρος (nm)	Ένταση (%)	Πολυδιασπορά	Ποσοστό Καταμέτρησης (Kcps)
(a)	σε νερό	-	96	100	0,269	467
	σε νερό στους 80 °C	-	75	100	0,242	498
(c)	σε νερό με HAuCl ₄ ·3H ₂ O	10:1	105	100	0,281	511
		9:1	123	100	0,282	485
		8:1	120	100	0,279	445
		7:1	119	100	0,280	437
		5:1	7 98	12 88	0,311	498
		10:1	6 69	15 85	0,311	492
(d)	σε νερό με HAuCl ₄ ·3H ₂ O στους 80 °C (AuNSs)	9:1	5 64	28 72	0,319	445
		8:1	6 82	23 77	0,353	485
		7:1	4 56	40 60	0,344	509
		5:1	10 100	6 84	0,258	548

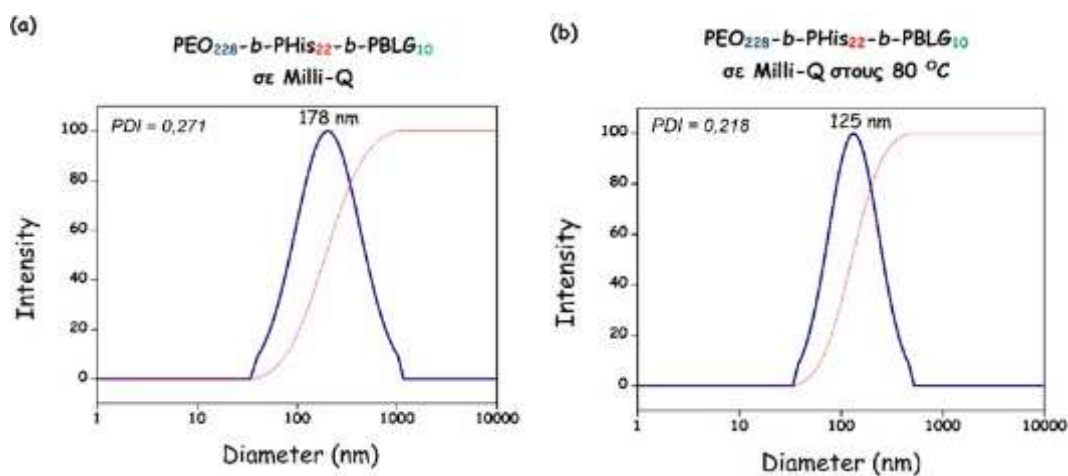
Πίνακας 20: Μετρήσεις DLS: (a) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₁₀ σε νερό, (b) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₁₀ σε νερό στους 80 °C, (c) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₁₀ σε νερό με H₂AuCl₄·3H₂O και (d) PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₁₀/Au σε νερό στους 80 °C (AuNSs).

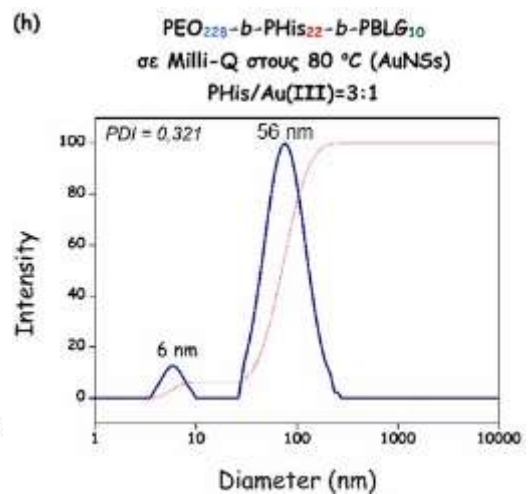
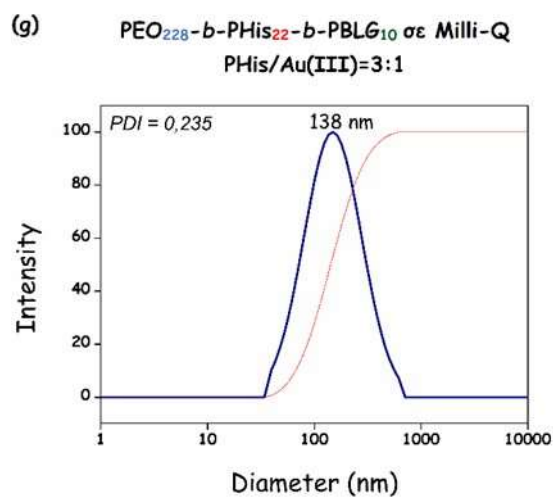
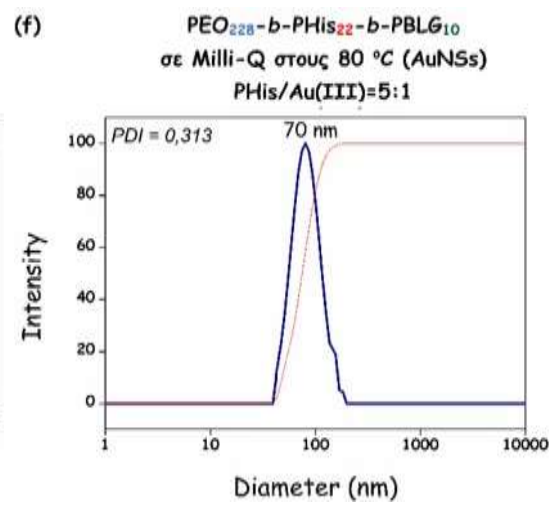
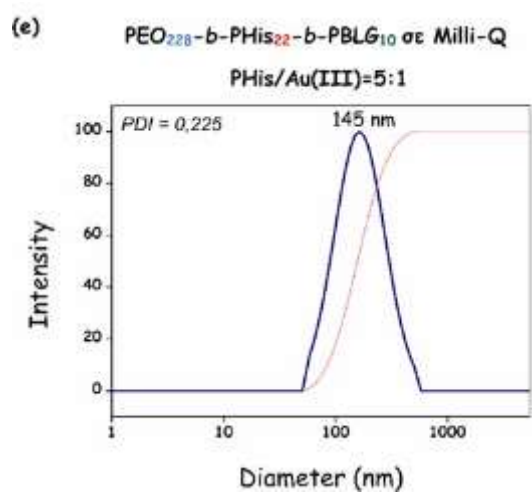
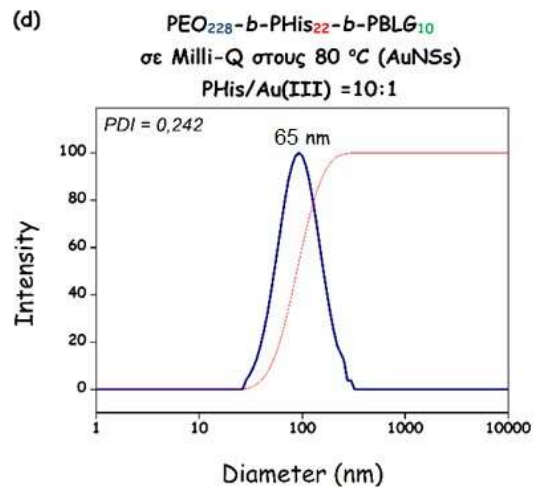
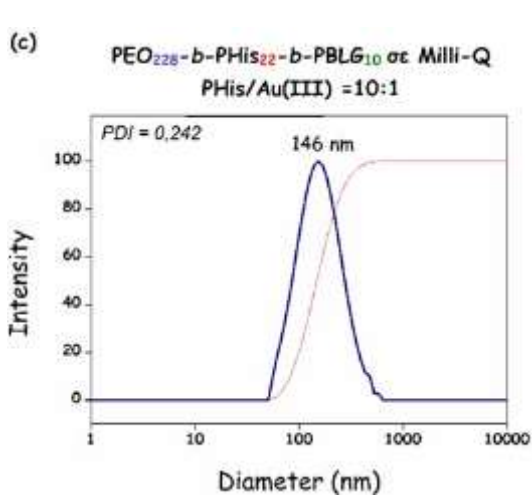
	PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₁₀	Μοριακή Αναλογία PHis/Au(III)	Υδροδυναμική Διάμετρος (nm)	Ένταση (%)	Πολυδιασπορά	Ποσοστό Καταμέτρησης (Kcps)
(a)	σε νερό	-	178	100	0,271	450
(b)	σε νερό στους 80 °C	-	125	100	0,218	525
(c)	σε νερό με H ₂ AuCl ₄ ·3H ₂ O	10:1	146	100	0,242	456
		5:1	145	100	0,225	440
		3:1	138	100	0,235	431
		2:1	37 131	15 85	0,231	439
(d)	σε νερό με H ₂ AuCl ₄ ·3H ₂ O στους 80 °C (AuNSs)	10:1	65	100	0,242	534
		5:1	70	100	0,313	553
		3:1	6.0	13	0,321	436
			56	87		
		2:1	26 66	18 82	0,224	542

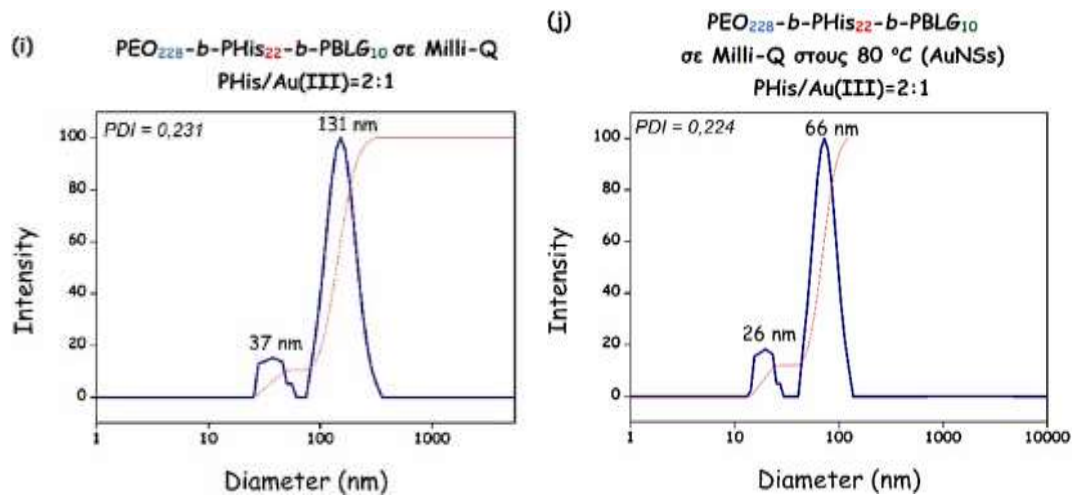
Πίνακας 21: Μετρήσεις DLS: (a) PEO₂₂₈-b-PHis₂₂-b-PBLG₂₀ σε νερό, (b) PEO₂₂₈-b-PHis₂₂-b-PBLG₂₀ σε νερό στους 80 °C, (c) PEO₂₂₈-b-PHis₂₂-b-PBLG₂₀ σε νερό με H₂AuCl₄·3H₂O και (d) PEO₂₂₈-b-PHis₂₂-b-PBLG₂₀/Au σε νερό στους 80 °C (AuNSs).

	PEO ₂₂₈ -b-PHis ₂₂ -b-PBLG ₂₀	Μοριακή Αναλογία PHis/Au(III)	Υδροδυναμική Διάμετρος (nm)	Ένταση (%)	Πολυδιασπορά	Ποσοστό Καταμέτρησης (Kcps)	
(a)	σε νερό	-	253	100	0,269	445	
(b)	σε νερό στους 80 °C	-	201	100	0,232	529	
		10:1	222	100	0,239	457	
(c)	σε νερό με H ₂ AuCl ₄ ·3H ₂ O	9:1	220				
		5:1	218	100	0,228	439	
		3:1	212	100	0,219	437	
			19	17			
		2:1	207	83	0,236	442	
(d)	σε νερό με H ₂ AuCl ₄ ·3H ₂ O στους 80 °C (AuNSs)	10:1	165	100	0,239	512	
		9:1	131	100	0,176	512	
		5:1	149	100	0,299	456	
		3:1	140	100	0,301	442	
			46	19			
		2:1	123	81	0,287	538	

Ενδεικτικά δίνονται τα διαγράμματα των μετρήσεων DLS του πολυμερούς PEO₂₂₈-b-PHis₂₂-b-PBLG₁₀ δίνονται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 80).







Σχήμα 80: DLS $I=f(r)$ διαγράμματα του $PEO_{228}-b-PHis_{22}-b-PBLG_{10}$: (a) σε νερό, (b) σε νερό στους 80 °C, (c) σε νερό με $H AuCl_4$ και $PHis/Au(III) = 10:1$, (d) σε νερό με $H AuCl_4$ στους 80 °C και $PHis/Au(III) = 10:1$ (AuNSs), (e) σε νερό με $H AuCl_4$ και $PHis/Au(III) = 5:1$, (f) σε νερό με $H AuCl_4$ στους 80 °C και $PHis/Au(III) = 5:1$ (AuNSs), (g) σε νερό με $H AuCl_4$ και $PHis/Au(III) = 3:1$, (h) σε νερό με $H AuCl_4$ στους 80 °C και $PHis/Au(III) = 3:1$ (AuNSs), (i) σε νερό με $H AuCl_4$ και $PHis/Au(III) = 2:1$, (j) σε νερό με $H AuCl_4$ στους 80 °C και $PHis/Au(III) = 2:1$ (AuNSs).

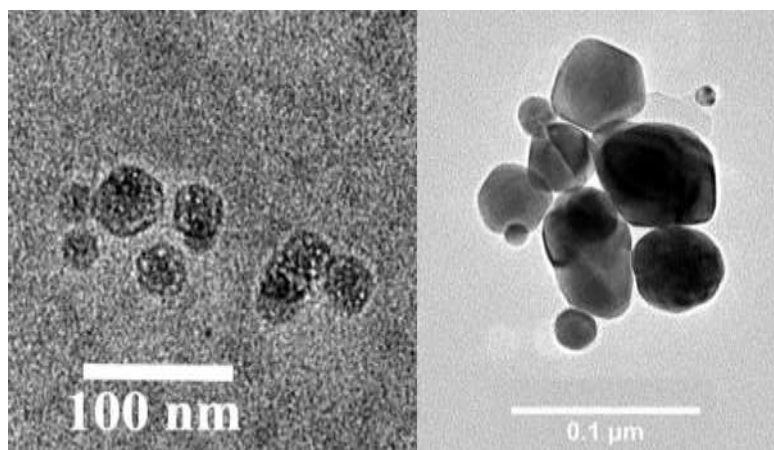
Προκειμένου να μελετηθεί το φορτίο των NPs στην εξωτερική περιφέρεια, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ηλεκτροφορητικής κινητικότητας που κατέληξαν πάντα σε σχεδόν μηδενικό ζ-δυναμικό, επομένως τα νανοσωματίδια εμφάνιζαν πάντα το ουδέτερο κέλυφος του PEO.

5.16.2 Μελέτη των Νανοσωματιδίων Χρυσού με την τεχνική του TEM

Οι μετρήσεις TEM των περισσότερων δειγμάτων, μετά τον σχηματισμό των AuNSs, λήφθηκαν προκειμένου να εξεταστεί περαιτέρω η δομή και το μέγεθος των NSs, να εξηγηθεί η ανάπτυξη των φασμάτων απορρόφησης που φαίνονται παρακάτω και να διευκρινιστούν οι ιδιότητες δομής-απορρόφησης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα συσσωματώματα που σχηματίστηκαν ήταν πολύ υδρόφοβα και τα συσσωματώματα σχημάτισαν συστάδες που δεν μπορούσαν να εξηγηθούν με την εικόνα TEM.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 24, τα νανοσωματίδια χρυσού του κατά συστάδες συμπολυμερούς $PEO_{228}-b-PHis_{22}$ με $PHis/Au(III)$ ίση με 5:1 (αριστερά) και 2:1 (δεξιά) σχηματίζουν νανοσφαίρες Au. Τα NPs με αναλογία $PHis/Au$ ίση με 2:1 σχημάτισαν νανοσφαίρες Au με τυχαίες διαστάσεις, ενώ αυτές με αναλογία $PHis/Au$ ίση με 5:1 είναι πιο ομοιογενείς. Τα συσσωματώματα που σχηματίζονται από το $PEO_{228}-b-PHis_{22}$ πριν από την προσθήκη του οξέος αναμένεται να είναι κυρίως NPs πυρήνα-κελύφους, που αποτελούνται από έναν πυρήνα $PHis$ και κέλυφος PEO. Η προσθήκη του $H AuCl_4$ είχε

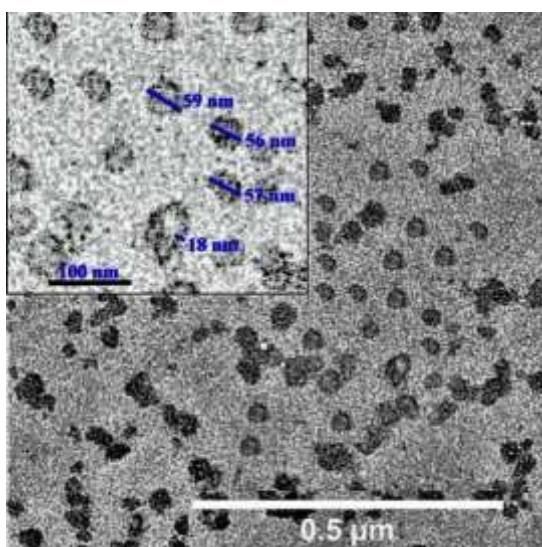
αρχικά ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό αλάτων με τα άζωτα του δακτυλίου της PHis στον πυρήνα των NPs και κατά τη θέρμανση σχηματίστηκαν νανόσφαιρες χρυσού με την εν συνεχεία αναγωγή του Au(III) μέσω της His. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι νανοσφαίρες Au μπορούν να παρατηρηθούν στον πυρήνα των NPs, ενώ υπάρχουν επίσης αλυσίδες PEO στην επιφάνεια των NPs και δεν εμφανίζονται λόγω της χαμηλής αντίθεσης των πολυμερών υλικών, σε σύγκριση με την αντίθεση από τα χρυσά μεταλλικά τμήματα.



Εικόνα 24: Εικόνες TEM των νανοσφαιρών χρυσού του $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}$ με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au ίση με 5:1 (αριστερά) και 2:1 (δεξιά)

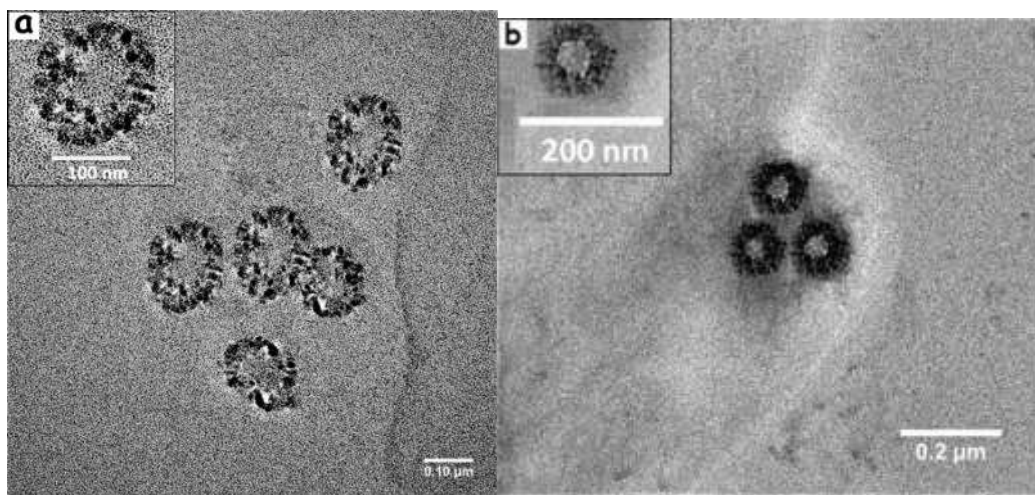
Οι εικόνες TEM των AuNPs που ελήφθησαν από το $\text{PEO}_{228}\text{-}b\text{-PHis}_{22}\text{-}b\text{-PBLG}_{10}$ με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au ίση με 5:1 φαίνονται στο Εικόνα 25. Είναι προφανές ότι τα NPs είναι μάλλον ομοιογενή σε διαστάσεις και δομή. Αποτελούνται από έναν λευκό πυρήνα και ένα σκούρο δακτυλίδι. Τα συσσωματώματα που σχηματίζονται πριν από την προσθήκη του οξέος αναμένεται να αποτελούνται από έναν πυρήνα του υδρόφοβου PBLG, ένα μεσαίο κέλυφος PHis μέτριας υδροφοβικότητας και ένα εξωτερικό υδρόφιλο κέλυφος PEO. Η προσθήκη οξέος Au θα προκαλέσει διόγκωση και σχηματισμό αλατιού μόνο εντός του στρώματος της PHis, ενώ η θέρμανση θα έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή του Au(III) μόνο σε αυτό το κέλυφος. Επομένως, ο λευκός πυρήνας αποτελείται πιθανότατα από το υδρόφοβο PBLG των αρχικών συσσωματωμάτων, μετά από ένα νανοκέλυφος Au που εμφανίζεται ως ένας σκοτεινός δακτύλιος με πάχος περίπου 18 nm που σχηματίζεται μέσα στο κέλυφος της PHis. Είναι σαφές ότι στην εξωτερική επιφάνεια των AuNSs, υπάρχουν εμβολιασμένες αλυσίδες PEO, οι οποίες δεν είναι ορατές λόγω της χαμηλής αντίθεσης των υδρογονανθρακικών υλικών, όπως για τον πυρήνα PBLG. Οι συνολικές εξωτερικές διαστάσεις του κελύφους της PHis των NPs του

PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₁₀ που λαμβάνονται με TEM είναι κατά μέσο όρο κοντά στα 56.6 nm, ενώ ο πυρήνας του είναι περίπου 18 nm. Εάν προστεθούν 5-10 nm για το κέλυφος PEO, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα αποτελέσματα TEM είναι σε συμφωνία με αυτά που λαμβάνονται από το DLS, υποδεικνύοντας συνολικές διαστάσεις NPs κοντά στα 70nm. Αξίζει να σημειωθεί ότι η παρουσία του PBLG στον πυρήνα παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στο σχηματισμό των νανοκελύφων, αντί για νανοσφαίρες χρυσού που λαμβάνονται από το PEO-*b*-PHis. Ο σχηματισμός ενός νανοκελύφους δίνει τα χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης των NPs στο NIR, όπως περιγράφεται παρακάτω.



Εικόνα 25: Εικόνες TEM των AuNSs του PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₁₀ με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au ίση με 5:1.

Τέλος, τα NPs που σχηματίζονται από το PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₂₀ με αναλογία PHis/Au ίση με (a) 10:1 και (b) 9:1 φαίνονται στην Εικόνα 26. Όπως και στην περίπτωση του PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₁₀, μπορούμε να δούμε τον σχηματισμό νανοκελύφων Au μέσω πολύ μικρών (~ 3-4 nm) νανοσφαιρών Au που συνδέονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν το AuNS που εμφανίζεται ως σκοτεινός δακτύλιος. Τα νανοκελύφη χρυσού στην Εικόνα 26a έχουν διάμετρο περίπου 150 nm με πάχος AuNS 40 nm, ενώ στην Εικόνα 26b το μέγεθος των NPs είναι σχεδόν 115 nm και πάχος AuNS 36 nm.



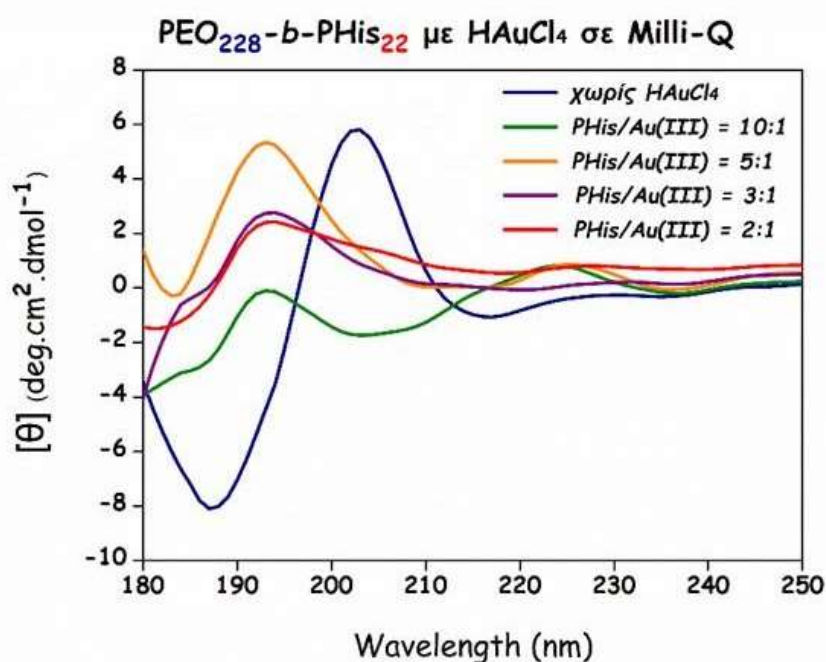
Εικόνα 26: Εικόνες TEM των AuNSs του PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₂₀ με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au ίση με: (a) 10:1 και (b) 9:1

Είναι σαφές ότι η αναλογία PHis/Au οδηγεί στο σχηματισμό AuNPs με διαφορετικό πάχος κελύφους και συνολικές διαμέτρους. Πιο συγκεκριμένα, η αλλαγή της γραμμομοριακής αναλογίας PHis/Au από 10:1 σε 9:1 οδηγεί στη σύνθεση νανοκελύφων αρκετά μειωμένης διαμέτρου, πολύ χαμηλής πολυδιασποράς και μικρότερου πάχους κελύφους. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην αυξημένη συγκέντρωση Au στο νανοκέλυφος της PHis, η οποία έχει ως αποτέλεσμα ένα πιο πυκνό AuNS. Επιπλέον, ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της PHis είναι ότι οι ομάδες ιμιδαζολίου της είναι ικανές να ακινητοποιήσουν τα ιόντα Au(III) σε πολύ υψηλή πυκνότητα συσκευασίας για την εναπόθεση λεπτών και λείων κελυφών χρυσού [91, 184, 185]. Αν και οι δύο γραμμομοριακές αναλογίες είναι πολύ κοντά μεταξύ τους, παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στις μετρήσεις TEM και DLS, παρόλο που οι οπτικές τους ιδιότητες ήταν παρόμοιες, όπως αποκαλύπτεται στα Σχήματα 89 και 90.

5.16.3 Μετρήσεις CD των συμπλόκων πολυπεπτιδίων/Au(III)

Για να αποδειχθεί περαιτέρω η ικανότητα της ιστιδίνης να συμπλέκει τα ιόντα χρυσού, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις CD των ελεύθερων πολυμερών καθώς και των αντίστοιχων νανοσωματιδίων τους με τα AuNSs. Τα δεδομένα CD για τα PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂ και PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₁₀ με διαφορετικές μοριακές αναλογίες PHis/Au παρέχονται στα Σχήματα 81 και 82, αντίστοιχα, ενώ το εκτιμώμενο περιεχόμενο δευτερογενούς δομής (%) δίνεται στους Πίνακες 22 και 23, αντίστοιχα. Η φασματική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του BeStSel (Beta Structure Selection) [183]. Η δευτεροταγής δομή των συμπολυμερών PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂ οφείλεται μόνο στην PHis. Η

δευτεροταγής δομή της PHis αυτού του υβριδικού πολυπεπτιδίου υιοθετεί αρχικά τη διαμόρφωση της β-στροφής σε ουδέτερο pH (χωρίς H₂AuCl₄) και στη συνέχεια γίνεται μίγμα κυρίως α-ελικά και β-φύλλου σε αναλογία 5:1, πολύ σπάνιο για την PHis, και τέλος σε ένα μίγμα διαμορφώσεων σε αναλογία 2:1. Είναι προφανές ότι η αύξηση του χλωραυρικού οξέος προκαλεί τη μείωση των σημάτων, το οποίο φανερώνει τη σύνδεση ιστιδίνης και Au(III). Κατά τη σύμπλεξη χρυσού και αζώτου του ιμιδαζολικού δακτυλίου της ιστιδίνης, το πολυπεπίδιο γίνεται υδρόφοβο, δίνοντας έτσι μειωμένο σήμα. Η χαμηλή τιμή σήματος που παραμένει οφείλεται κυρίως στην ελεύθερη PHis.

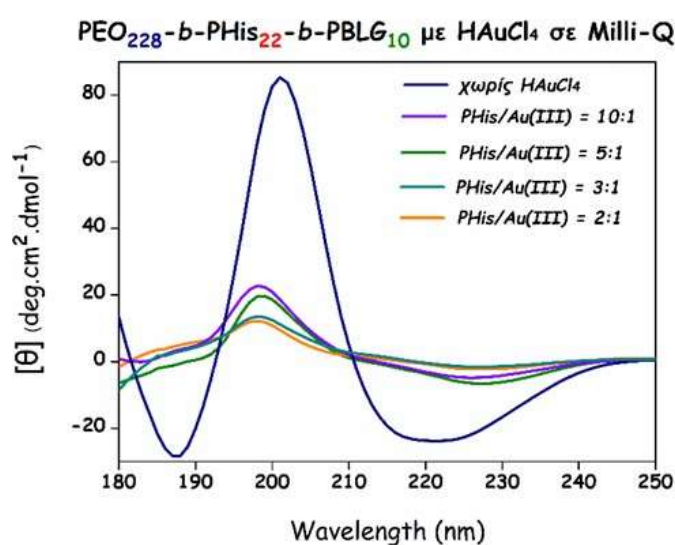


Σχήμα 81: Μετρήσεις CD των νανοσωματιδίων PEO₂₂₈-b-PHis₂₂ με H₂AuCl₄ συναρτήσει της γραμμομοριακής αναλογίας PHis/Au(III).

Πίνακας 22: Εκτιμώμενο ποσοστό (%) δευτεροταγούς δομής για το PEO₂₂₈-b-PHis₂₂ με H₂AuCl₄.

PEO ₂₂₈ -b-PHis ₂₂ με H ₂ AuCl ₄					
PHis/Au(III) molar ratio	Helix (%)	Antiparallel (%)	Parallel (%)	Turn (%)	Others (%)
-	0,1	26,9	10,9	21,9	40,2
10:1	3,8	32,5	0,0	14,7	49,0
5:1	50,9	35,3	0,0	12,3	1,5
3:1	0,0	40,9	0,0	8,4	50,7
2:1	16,3	51,9	0,0	7,3	24,5

Η δευτεροταγής δομή του PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₁₀ οφείλεται στην PHis καθώς και στο PBLG. Χωρίς H₂AuCl₄ το φάσμα αποκαλύπτει ένα μίγμα β-στροφής και β-φύλλου της PHis και α-ελίκας του PBLG. Όπως και στην περίπτωση του PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂, η συμπλοκοποίηση του Au(III) στο άζωτο του ιμιδαζολίου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της υδροφοβικότητας και τη μείωση του σήματος. Τα φάσματα σε διάφορες αναλογίες PHis/Au οφείλονται κυρίως στο PBLG και σε μια μικρή ποσότητα ελεύθερης PHis επομένως παραμένουν σχεδόν τα ίδια σε κάθε τιμή pH, αφού το PBLG δεν αλλάζει τη διαμόρφωσή του με μεταβολές του pH.



Σχήμα 82: Μετρήσεις CD των νανοσωματιδίων PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₁₀ με H₂AuCl₄ συναρτήσει της γραμμομοριακής αναλογίας PHis/Au(III).

Πίνακας 23: Εκτιμώμενο ποσοστό (%) δευτεροταγούς δομής για το PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₁₀ με H₂AuCl₄.

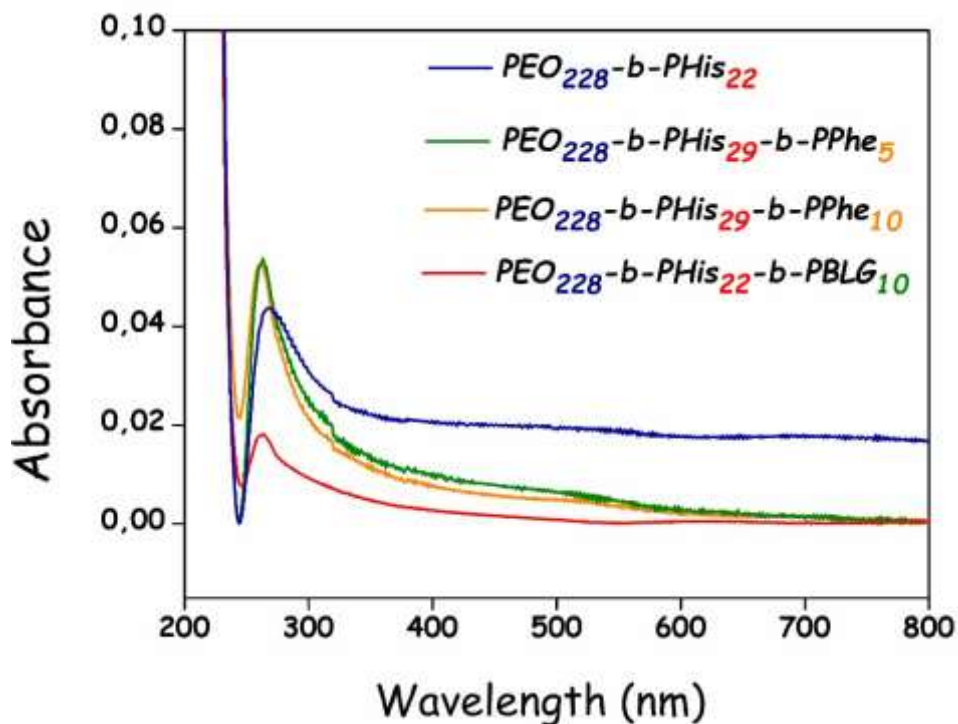
PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₁₀ με H ₂ AuCl ₄					
PHis/Au(III)					
molar ratio	Helix (%)	Antiparallel (%)	Parallel (%)	Turn (%)	Others (%)
-	3,8	36,2	21,6	16,6	21,8
10:1	8,0	44,0	0,0	10,9	37,1
5:1	13,3	55,4	0,0	6,6	24,3
3:1	0,0	56,6	0,0	7,4	36,0
2:1	0,0	68,9	0,0	11,0	20,1

5.16.4 Φυσικο-Οπτικές Ιδιότητες των AuNPs

Τα περισσότερα από τα NPs που φέρουν AuNSs και παρουσιάζονται μέχρι τώρα στη βιβλιογραφία με απορρόφηση στην περιοχή NIR αναπτύσσονται κυρίως στην επιφάνεια ανόργανων (πυριτίου) ή μεταλλικών (αργύρου) σφαιρικών NPs. Σε ορισμένες περιπτώσεις, προκειμένου να μειωθεί η κυτταροτοξικότητα καθώς και να αυξηθεί ο χρόνος κυκλοφορίας στο αίμα, πραγματοποιείται εμβολιασμός πολυμερικών αλυσίδων στην επιφάνεια του Au μέσω ομάδων σουλφιδίου που φέρουν στα άκρα τους οι πολυμερικές αλυσίδες. Από ότι γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη εργασία που παρουσιάζει τον σχηματισμό και τη μελέτη νανοκελύφων Au μέσω της τροποποίησης των μοριακών χαρακτηριστικών βιοσυμβατών προδρόμων υβριδικών *N*-πολυπεπτιδικών βιοπολυμερών που περιέχουν PHis χημικά συνδεδεμένη σε άλλη πολυμερική αλυσίδα. Στη δουλειά μας, τα AuNSs σχηματίζονται απλώς *in situ* εντός των NPs που έχουν προαναπτυχθεί μέσω της αυτοοργάνωσης των αμφίφιλων υβριδικών βιοπολυμερών.

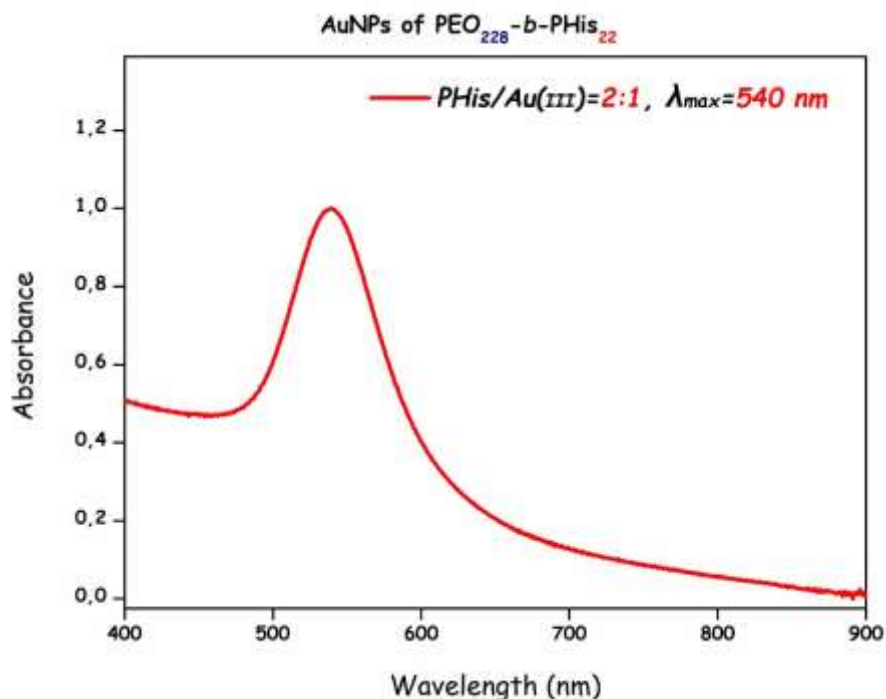
Ο συντονισμός των AuNPs για απορρόφηση φωτός σε συγκεκριμένα μήκη κύματος είναι ενδιαφέρον για τις βιοϊατρικές εφαρμογές, ιδιαίτερα για την απεικόνιση και τη θεραπεία του καρκίνου [72,74,76,187]. Έχει αποδειχθεί ότι ο συντονισμός των AuNPs μπορεί να επιτευχθεί ελέγχοντας τις φυσικές τους παραμέτρους, όπως το πάχος του νανοκελύφους, ή μεταβάλλοντας το συνολικό μέγεθος σωματιδίων ή και τα δύο. Με βάση τις διαφορετικές αναλογίες πυρήνα/κελύφους που μπορούν να επιτευχθούν με το νέο μας πρωτόκολλο, μπορούν να κατασκευαστούν AuNSs με απορροφήσεις SPR που εκτείνονται από την ορατή περιοχή έως το NIR (800-1300 nm). Οι οπτικές ιδιότητες των νανοκελύφων χρυσού στην περιοχή NIR, σε συνδυασμό με αποκρινόμενα και βιοσυμβατά υλικά όπως τα πολυπεπίδια με PEO θα καταστήσουν τα NSs κατάλληλα για στοχευμένη βιοαπεικόνιση για πρόγνωση καθώς και θεραπευτικές εφαρμογές, καθώς η ακτινοβολία με φως laser δεν επηρεάζει τα υγιή κύτταρα.

Τα φάσματα UV-Vis των υδατικών διαλυμάτων των κενών πολυμερών που χρησιμοποιούνται σε αυτήν την έρευνα παρουσιάζονται στο Σχήμα 83. Η κορυφή στα 271 nm οφείλεται στην απορρόφηση της ομάδας ιμιδαζολικού δακτυλίου της PHis, ενώ εκείνη στα 262 nm αντιστοιχεί στην αρωματική ομάδα της προστατευτικής ομάδα του PBLG. Καμία άλλη κορυφή δεν παρατηρείται στο εύρος άνω των 500 nm μήκους κύματος. Η απορρόφηση ήταν μάλλον χαμηλή λόγω της υδροφοβικότητας των πολυπεπτιδικών συστάδων, οι οποίες είναι οι μόνες που απορροφούν στην υπεριώδη ακτινοβολία.



Σχήμα 83: Φάσματα UV-Vis των συμπολυμερών σε νερό.

Ένα ευρύ φάσμα μοριακών αναλογιών PHis/Au(III) χρησιμοποιήθηκε για το σχηματισμό AuNPs με $PEO_{228}-b-PHis_{22}$. Αυτό το πολυμερές και η νέα μας διαδικασία έδωσαν νανοσφαίρες Au που εμφανίζουν τη χαρακτηριστική κορυφή στα 500-600 nm λόγω του επιφανειακού συντονισμού πλάσμονιου του χρυσού. Το μέγιστο της απορροφησης ποικίλλει λόγω της πολυδιασποράς των σχηματισμένων νανοσφαιρών AuNPs, που κυμαίνονται από 10-75 nm, όπως διαπιστώθηκε από το TEM (Εικόνα 24). Ενδεικτικά, το φάσμα UV-Vis των νανοσωματιδίων $PEO_{228}-b-PHis_{22}/Au$ με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au ίση με 2:1 δίνεται στο Σχήμα 84.

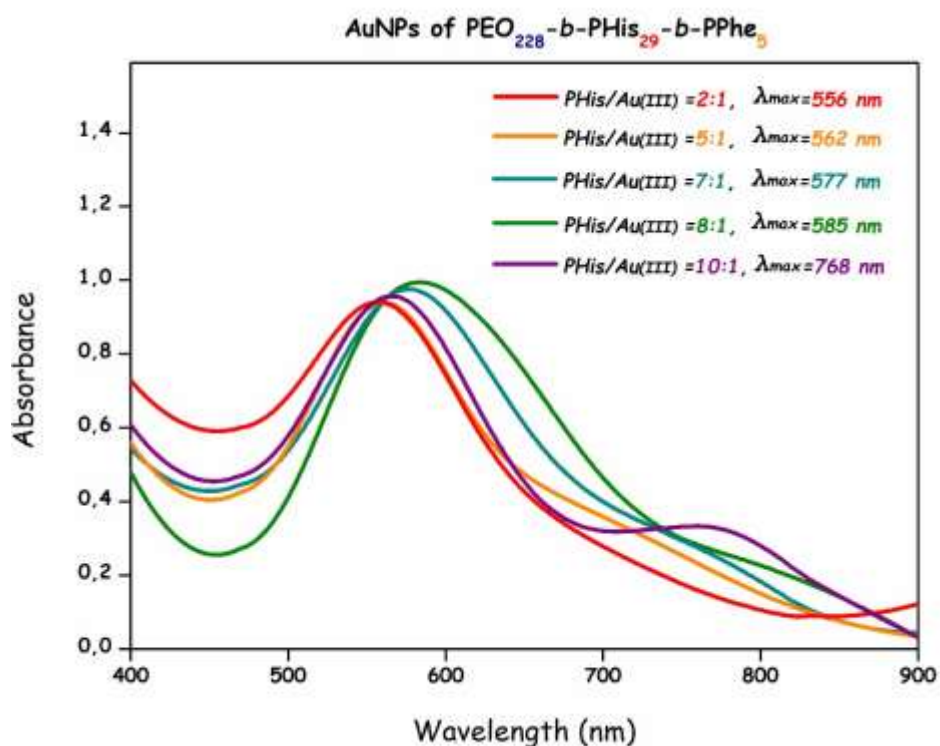


Σχήμα 84: Μετρήσεις απορρόφησης UV-Vis των νανοσφαιρών PEO₂₂₈-b-PHis₂₂/Au με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au(III) ίση με 2:1.

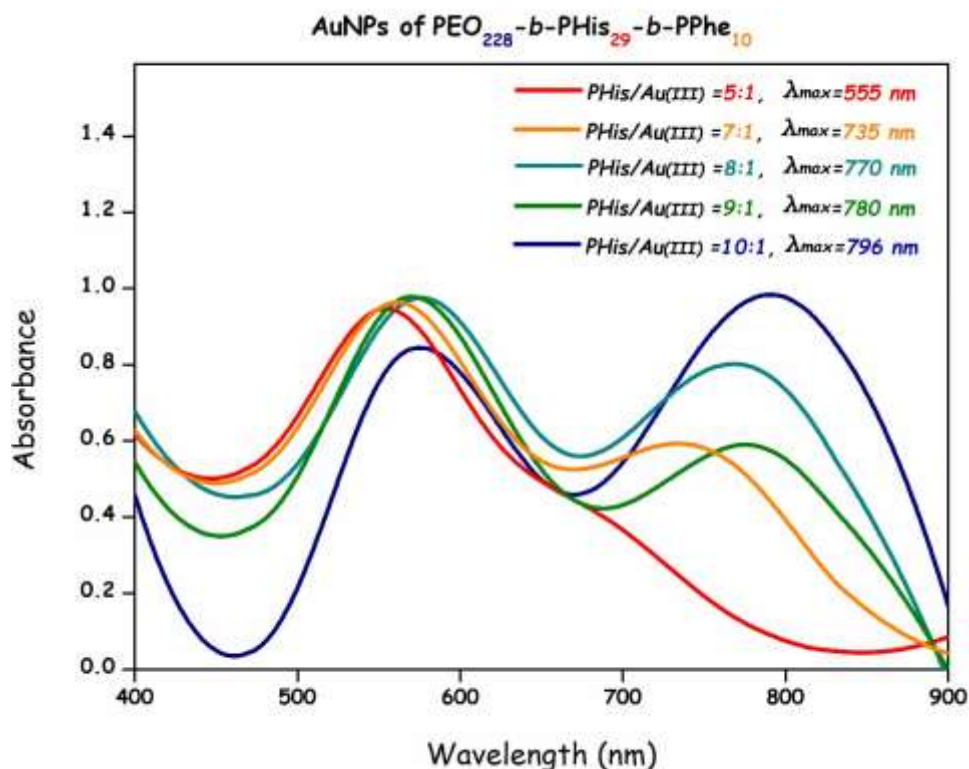
Ο Loo και η ομάδα του καθώς και ο Huang με τους συνεργάτες του έκαναν λόγο για την επίδραση της αναλογίας πυρήνα/κελύφους στους οπτικούς συντονισμούς των νανοσωματιδίων με κέλυφος χρυσού και πυρήνα πυριτίου [77,188]. Ειδικότερα, στην περίπτωση ενός νανοκελύφους χρυσού/πυριτίου με πυρήνα 60 nm, η κορυφή απορρόφησης μετατοπίστηκε από τα 740 nm στα 1020 nm μειώνοντας το πάχος του στρώματος χρυσού από 20 σε 5 nm.

Σε αυτήν την εργασία, χρησιμοποιήσαμε αρχικά τα συμπολυμερή PEO₂₂₈-b-PHis₂₉-b-PPhe₅ και PEO₂₂₈-b-PHis₂₉-b-PPhe₁₀ για να εξετάσουμε τα εξαρτώμενα από το μέγεθος οπτικά χαρακτηριστικά. Ο πυρήνας των νανοκελύφων αποτελείται από την PPhe, η οποία δεν συμπλέκει το Au(III). Τα φάσματα απορρόφησης του PEO₂₂₈-b-PHis₂₉-b-PPhe₅ παρέχονται στο Σχήμα 85. Σε αυτό το πολυμερές, η ποσότητα της υδρόφοβης PPhe στον πυρήνα του νανοκελύφους είναι πολύ μικρή, επομένως το μέγεθος του πυρήνα δεν ήταν αρκετά μεγάλο για να δώσει κορυφή απορρόφησης στο επιθυμητό μήκος κύματος και μόνο μια μικρή αύξηση στα φάσματα απορρόφησης επιτεύχθηκε, σε σύγκριση με εκείνη που ελήφθη για το PEO₂₂₈-b-PHis₂₂. Ως εκ τούτου, συνθέσαμε το PEO₂₂₈-b-PHis₂₉-b-PPhe₁₀ που εμφανίζει αυξημένη ποσότητα PPhe και η κορυφή απορρόφησης μετατοπίστηκε προς το υψηλότερο μήκος κύματος, μια ένδειξη του

σχηματισμού των επιθυμητών AuNSs. Ακόμα, δημιουργήθηκε μια σημαντική ποσότητα νανοσφαιρών Au που απορροφήθηκαν κοντά στα 560 nm (Σχήμα 86).



Σχήμα 85: Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των νανοσωματιδίων χρυσού του PEO₂₂₈-b-PHis₂₉-b-PPhe₅ σε διάφορες γραμμομοριακές αναλογίες PHis/Au(III).

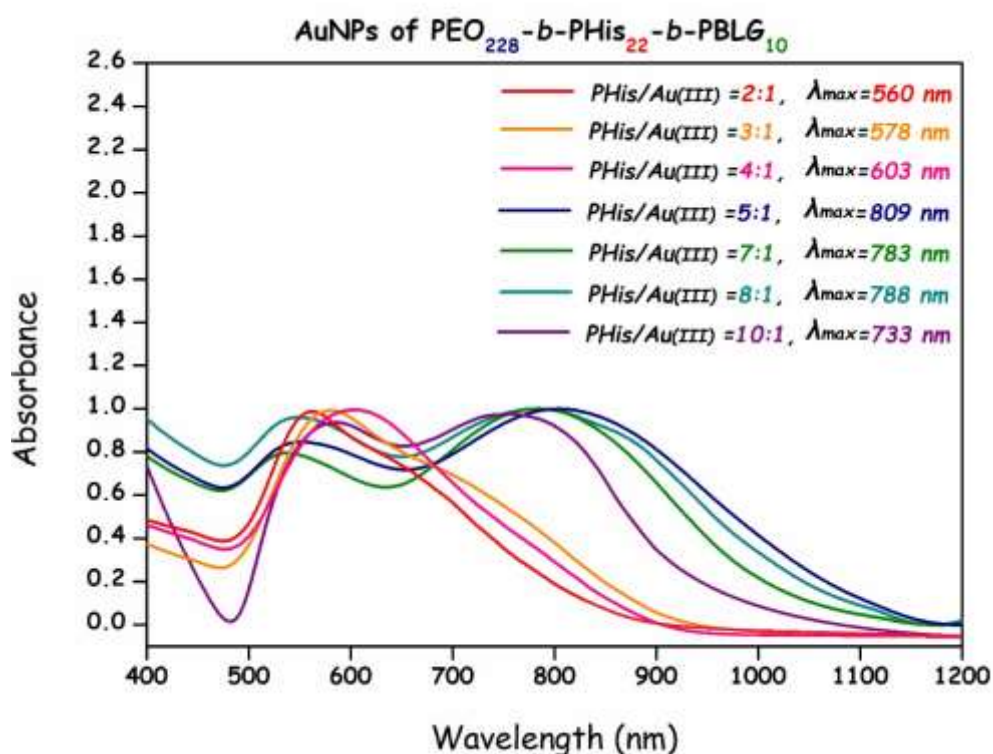


Σχήμα 86: Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των νανοσωματιδίων χρυσού του PEO₂₂₈-b-PHis₂₉-b-PPhe₁₀ σε διάφορες γραμμομοριακές αναλογίες PHis/Au(III).

Δεδομένου ότι τα πολυμερή με αυξημένες ποσότητες PPhe δεν ήταν διαλυτά στο νερό, συνθέσαμε παρόμοια πολυμερή αντικαθιστώντας την PPhe με PBLG, δηλαδή PEO₂₂₈-b-PHis₂₂-b-PBLG₁₀ και PEO₂₂₈-b-PHis₂₂-b-PBLG₂₀. Επιπλέον, δεδομένου ότι το AuNS σχηματίζεται μόνο μέσα στο στρώμα PHis, μειώσαμε την ποσότητα του PHis από 29 σε 22 μονομερικές μονάδες. Αυτό αναμενόταν ότι θα είχε ως αποτέλεσμα ένα λεπτότερο κέλυφος PHis, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός λεπτότερου AuNS και ως εκ τούτου, σε μια αύξηση του μεγίστου απορρόφησης.

Αυτά τα πολυμερή παρουσίασαν καλύτερη υδατική διαλυτότητα και ενώ τα αποτελέσματα UV-Vis που λήφθηκαν ήταν βελτιωμένα. Το φάσμα UV-VIS που λαμβάνεται για τα νανοκελύφη που σχηματίζονται από τα PEO₂₂₈-b-PHis₂₂-b-PBLG₁₀/AuNSs εντός των πολυμερικών NPs παρέχεται στο Σχήμα 87. Όσον αφορά το φάσμα που λαμβάνεται από τα PEO₂₂₈-b-PHis₂₂-b-PBLG₁₀/AuNSs (Σχήμα 87), το φάσμα περιέχει δύο κορυφές, μία κοντά στα 560 nm και μια άλλη κοντά στην περιοχή NIR. Επιπλέον, όπως φαίνεται στο Σχήμα 87, η αύξηση της ποσότητας Au(III), και συνεπώς η μείωση της γραμμομοριακής αναλογίας PHis/Au, οδηγεί σε αύξηση του μήκους

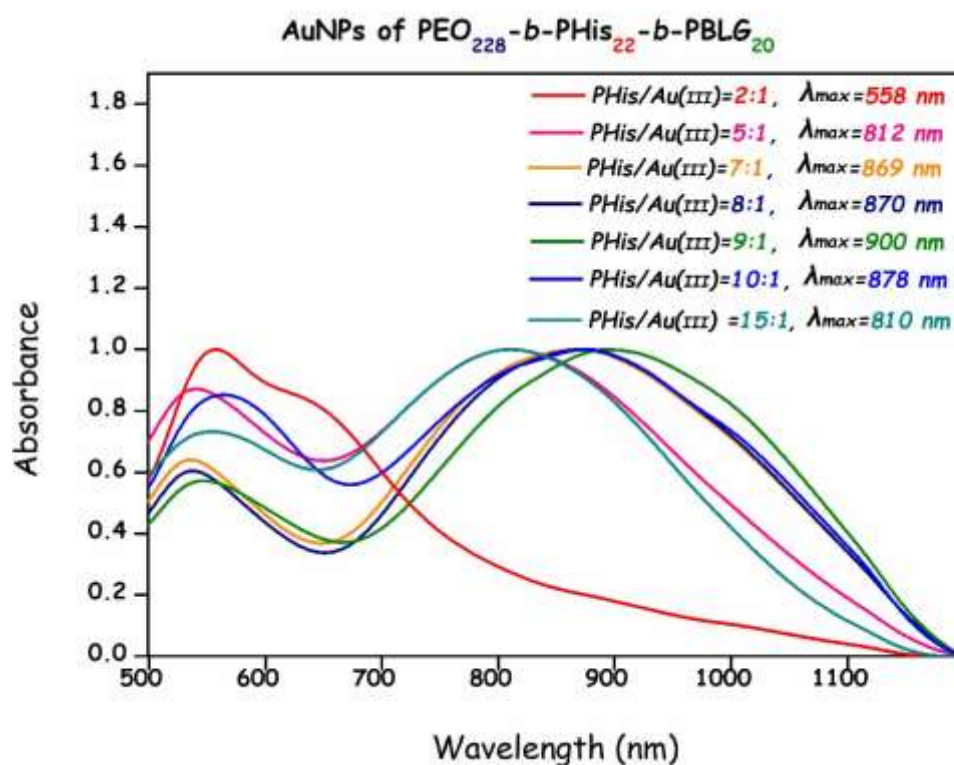
κύματος του μεγίστου της απορρόφησης έως τη γραμμομοριακή αναλογία 5:1, μετά την οποία μειώνεται. Αυξάνοντας την ποσότητα του οξέος, η PHis πρωτονιώνεται και συμπλέκεται με τα ιόντα Au(III), σχηματίζοντας νανοκέλυφος μετά την αναγωγή του Au(III). Αυξάνοντας ακόμη περισσότερο το Au(III), ο Au(III) αρχίζει να διαπερνά τον πυρήνα λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας, σε συνδυασμό με την συμπλοκοποίηση του Au με τις τελικές αμίνες των πολυμερικών αλυσίδων που υπάρχουν μέσα στον πυρήνα. Επομένως, αντί για νανοκελύφη, τα NPs αρχίζουν να συμπεριφέρονται ως νανοσφαίρες. Αυτό οδηγεί σε μείωση του μέγιστου μήκους κύματος και ταυτόχρονα σε αύξηση της ποσότητας της κορυφής σε χαμηλά μήκη κύματος. Η παρουσία της κορυφής σε χαμηλότερα μήκη κύματος μπορεί επίσης να οφείλεται στην παρουσία δύο συνδεδεμένων NPs στο διάλυμα [189].



Σχήμα 87: Μετρήσεις UV-Vis στην περιοχή NIR των νανοκελύφων PEO₂₂₈-b-PHis₂₂-b-PBLG₁₀/Au με διαφορετικές γραμμομοριακές αναλογίες PHis/Au(III).

Στην προσπάθειά μας να αυξήσουμε περαιτέρω το μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης, αυξήσαμε την ποσότητα του PBLG με τη σύνθεση του PEO₂₂₈-b-PHis₂₂-b-PBLG₂₀. Τα AuNSs που σχηματίστηκαν από αυτό το βιοπολυμερές εμφάνισαν την υψηλότερη απορρόφηση στην περιοχή NIR με τη χαμηλότερη ποσότητα NPs να απορροφούν κοντά στα 560 nm, σε σύγκριση με εκείνη που ελήφθη για το PEO₂₂₈-b-

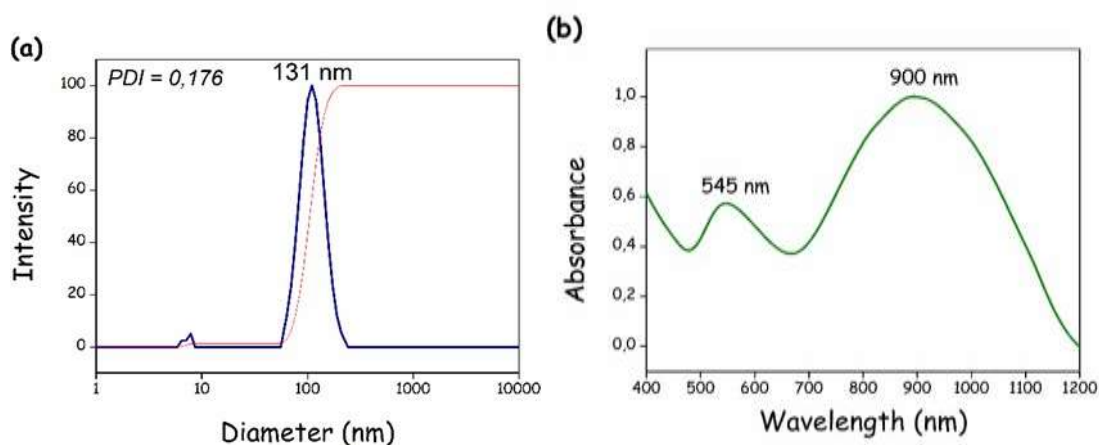
PHis₂₂-*b*-PBLG₁₀ (Σχήμα 89). Αυτό οφείλεται στο υψηλότερο μοριακό βάρος του PBLG που καταλαμβάνει μεγαλύτερο όγκο, οδηγώντας σε σημαντικά μεγαλύτερο πυρήνα.



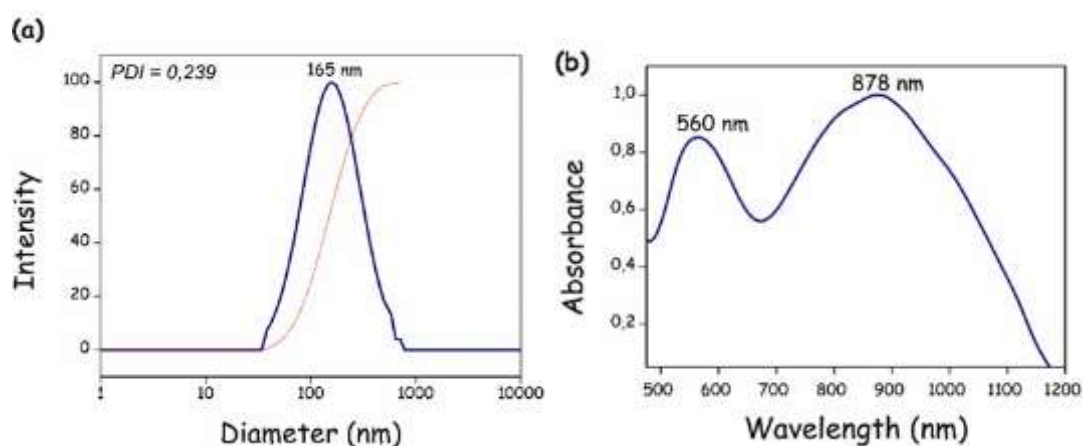
Σχήμα 88: Απορροφήσεις UV-Vis στην περιοχή NIR των νανοκελύφων χρυσού PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₂₀ ως συνάρτηση της αναλογίας πυρήνα/κέλυφους.

Τα φάσματα UV-VIS των νανοκελύφων χρυσού του PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₂₀ σε διάφορες μοριακές αναλογίες PHis/Au (III) παρέχονται στο Σχήμα 88. Σε αυτό το πολυμερές, το μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης συνέχισε να αυξάνεται με την αύξηση του οξέος, έως και τη γραμμομοριακή αναλογία 9:1, και στη συνέχεια μειώθηκε. Τα αποτελέσματα DLS και UV-VIS για PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₂₀ NPs με γραμμομοριακές αναλογίες 9:1 και 10:1, αντίστοιχα, μετά τη θέρμανση παρουσιάζονται στα Σχήματα 89 και 90. Τα μέγιστα απορρόφησης ήταν στα 900 και 878 nm, αντίστοιχα. Είναι προφανές ότι σε γραμμομοριακή αναλογία 9:1, υπάρχει ισχυρή απορρόφηση ακόμη και σε μήκη κύματος ύψους 1100 nm. Όπως παρατηρήθηκε από τις μετρήσεις DLS (Εικόνες 89α και 90α), υπάρχει μόνο ένας πληθυσμός AuNPs και στις δύο περιπτώσεις. Οι συνολικές διαστάσεις των NPs που λήφθηκαν με DLS σε 9:1 και 10:1 ήταν 131 nm και 165 nm, αντίστοιχα. Οι διαστάσεις των νανοκελύφων Au χωρίς το κέλυφος PEO που ελήφθη από το TEM για τα NP με αναλογία 9:1 και 10:1 ήταν 115 και

150 nm, αντίστοιχα. Το κέλυφος PEO αναμένεται να είναι της τάξης των 5-10 nm, επομένως, οι τιμές μεταξύ του DLS και του TEM είναι σε καλή συμφωνία.

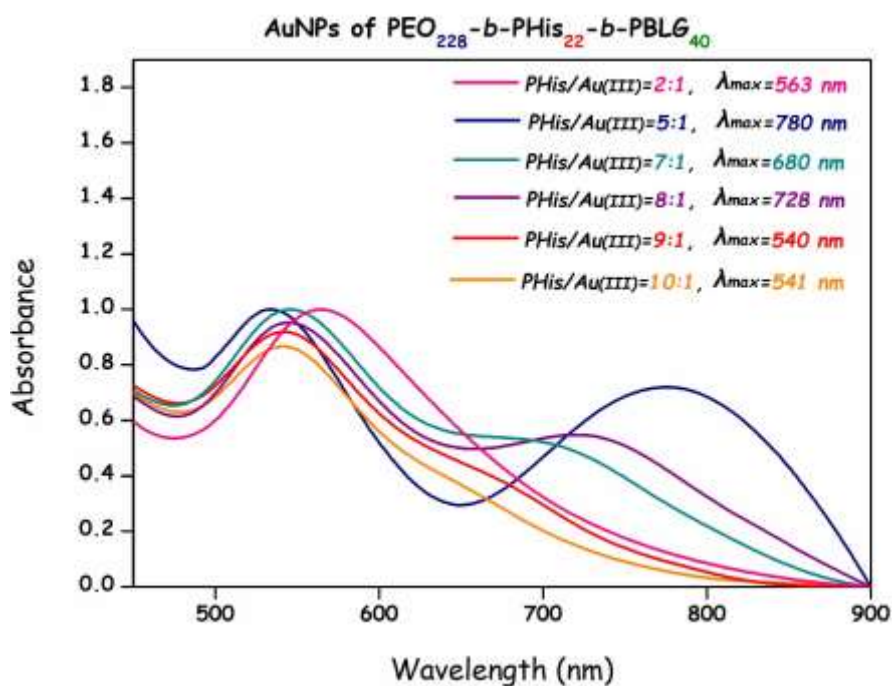


Σχήμα 89: Αποτελέσματα (a) DLS, (b) UV-Vis των AuNSs του PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₂₀ με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au(III) ίση με 9:1.



Σχήμα 90: Αποτελέσματα (a) DLS, (b) UV-Vis των AuNSs του PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₂₀ με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au(III) ίση με 10:1.

Τέλος, αυξήσαμε περαιτέρω την ποσότητα του PBLG, διατηρώντας σταθερά τα άλλα μοριακά χαρακτηριστικά, προκειμένου να επιτύχουμε απορρόφηση σε ακόμη μεγαλύτερο μήκος κύματος, δηλαδή τον σχηματισμό του PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₄₀. Αναμένονταν AuNPs με ακόμη μεγαλύτερο πυρήνα. Ωστόσο, σε όλες σχεδόν τις μοριακές αναλογίες PHis/Au(III) εμφανίζεται μόνο μια κορυφή στα 560 nm, που αντιστοιχεί στο σχηματισμό συμπαγών νανοσφαιρών χρυσού, εκτός από την αναλογία 5:1 με κορυφή στα 780 nm (Σχήμα 91). Η παρουσία μιας μεγαλύτερης υδρόφοβης συστάδας οδήγησε στο σχηματισμό συσσωματωμάτων που έδωσαν τα φάσματα UV-VIS της τυπικής απορρόφησης κοντά στα 560 nm.



Σχήμα 91: Μετρήσεις UV-Vis των AuNPs του PEO₂₂₈-b-PHis₂₂-b-PBLG₄₀.

Μερικά από τα συνθετικά διαλύματα νανοσωματιδίων που περιέχουν AuNSs αυτής της εργασίας παρουσιάζονται στην Εικόνα 27. Το πρώτο κόκκινο διάλυμα στα αριστερά αποδίδεται στις νανοσφαίρες PEO₂₂₈-b-PHis₂₂/Au με κορυφή απορρόφησης στα 540 nm, ενώ το τελικό το μπλε διάλυμα δεξιά αντιστοιχεί σε νανοκελύφη PEO₂₂₈-b-PHis₂₂-b-PBLG₂₀/Au με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au(III) ίση με 9:1 με κορυφή απορρόφησης NIR στα 900 nm.



Εικόνα 27: Ρυθμιζόμενες οπτικές ιδιότητες των AuNPs προσαρμόζοντας το πάχος του κελύφους χρυσού, με τη μεταβολή του HAuCl₄ στη συνθετική πορεία

Είναι προφανές ότι τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρούνται για τα PEO₂₂₈-b-PHis₂₂-b-PBLG₂₀/AuNPs. Η μικρή αύξηση στο μέγιστο μήκος κύματος που λαμβάνεται στα NPs

με μοριακές αναλογίες PHis/Au(III) 9:1 σε σύγκριση με το 10:1 οφείλεται πιθανώς στις πιο συμπαγείς δομές νανοκελύφων χρυσού που σχηματίζονται στην αναλογία 9:1, παρόλο που η αναλογία πυρήνα/κελύφους είναι ελαφρώς μικρότερη στην αναλογία αυτή. Είναι πιθανό ότι σε υψηλότερες μοριακές αναλογίες PHis/Au(III) από 9:1, ο Au διεισδύει στον πυρήνα PBLG και αυξάνει το πάχος τους, προκαλώντας μείωση του μήκους κύματος απορρόφησης. Λάβαμε μεγαλύτερο πάχος νανοκελύφους Au, σε σύγκριση με τα έργα του Gao και της ομάδας του [80,87], αλλά λόγω των μεγαλύτερων διαστάσεων των NPs μας, το μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης που επιτεύχθηκε ήταν 900 nm. Αυτό αποδεικνύει ότι για να επιτευχθεί το υψηλότερο δυνατό μήκος κύματος, κρίσιμες παράμετροι είναι το πάχος του νανοκελύφους σε συνδυασμό με τις διαστάσεις του πυρήνα. Στον Πίνακα 24 παρουσιάζεται η εξάρτηση του λ_{\max} από την αναλογία πυρήνα/κελύφους για τα AuNSs που σχηματίστηκαν μέσα σε διάφορα πολυμερικά νανοσωματίδια.

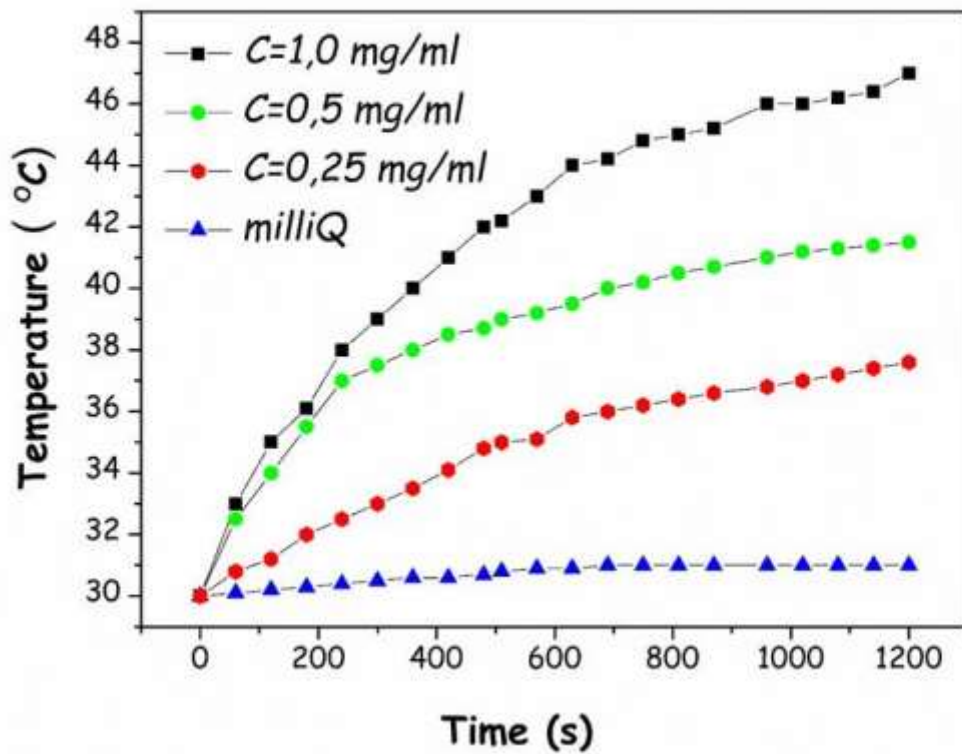
Πίνακας 24: Μέγιστο μήκος κύματος που λήφθηκε από την κορυφή απορρόφησης των νανοκελύφων χρυσού ως συνάρτηση της αναλογίας ακτίνας πυρήνα/ πάχους κελύφους για τα AuNSs που σχηματίστηκαν μέσα σε διάφορα πολυμερικά νανοσωματίδια.

Polymer	PHis/Au molar ratio	Core diameter (nm)	Nanoshell thickness (nm)	Core diameter/nanoshell thickness	λ_{\max} nanoshell
					extinction peak (nm)
PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₁₀	5/1	56.6	18	~3,14	809
PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₂₀	9/1	115	36	~3,19	900
PEO ₂₂₈ - <i>b</i> -PHis ₂₂ - <i>b</i> -PBLG ₂₀	10/1	150	39	~3,84	878

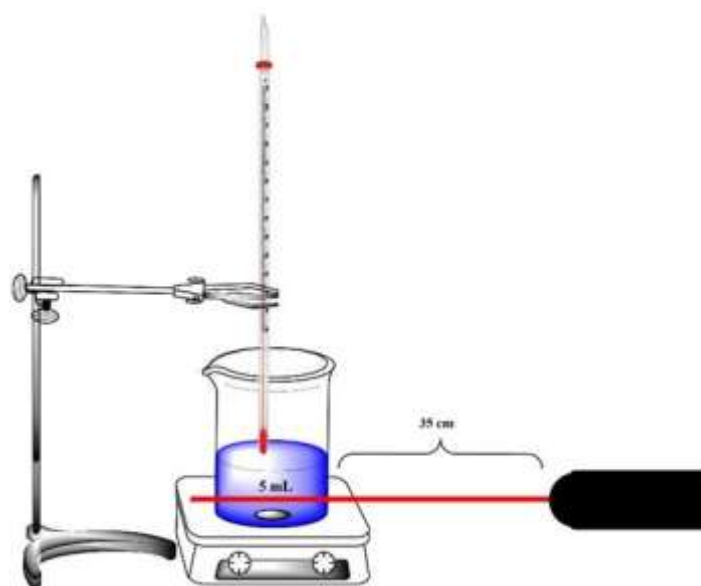
5.16.5 Αποδοτικότητα φωτοθερμικής μετατροπής των AuNPs

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι το φως που απορροφάται από ένα φωτοενεργό νανοϋλικό συνήθως απελευθερώνεται από διάφορες οδούς, συμπεριλαμβανομένων εκπομπών φωτονίων, παραγωγής θερμότητας και μεταφοράς σε άλλα μόρια. Δεδομένου ότι η αναλογία πυρήνα/κελύφους επηρεάζει τη θέση της απορρόφησης της ζώνης πλάσμονιου, η σύνθεση των AuNPs μπορεί να ρυθμιστεί ανάλογα για να φθάσει στο επιθυμητό μήκος κύματος, κατά προτίμηση στο NIR. Ο Song και οι συνεργάτες του εξέτασαν τη φωτοθερμική συμπεριφορά των διακλαδισμένων νανοπορώδων

νανοκελύφων χρυσού (AuNSPs) υπό συνεχή ακτινοβολία laser (808 nm), [71] όπου μετά από λίγα λεπτά ακτινοβολίας laser, η θερμοκρασία του διαλύματος αυξήθηκε σημαντικά. Μελέτησαν επίσης τη συγκέντρωση καθώς και τις φωτοθερμικές ιδιότητες που εξαρτώνται από την πυκνότητα ισχύος του laser. Εδώ, για να διερευνήσουμε την ικανότητα των AuNPs να χρησιμοποιηθούν για εφαρμογές φωτοθερμικής θεραπείας, εξετάσαμε την απόδοση της φωτοθερμικής μετατροπής ενός από τα συνθετικά NPs. Για αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν NPs που σχηματίστηκαν από PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₂₀ και H₂AuCl₄·H₂O με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au (III) ίση με 5:1, η οποία παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση ίση με 812 nm, κοντά στο μήκος κύματος του laser. Για να υποδείξουμε άμεσα τη φωτοθερμική συμπεριφορά των AuNPs, αξιολογήσαμε τις θερμικές ιδιότητες υπό συνεχή ακτινοβολία laser (808 nm) χρησιμοποιώντας απιονισμένο νερό ως δείγμα ελέγχου. Μετά από 20 λεπτά ακτινοβολίας με laser, η θερμοκρασία του διαλύματος των AuNPs (1 mg mL⁻¹) αυξήθηκε κατά 18 °C, ενώ η θερμοκρασία του νερού αυξήθηκε κατά <2 ° C (Σχήμα 92). Αυτή είναι μια σημαντική αύξηση, λαμβάνοντας υπόψη ότι η δέσμη θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με έναν μικρό όγκο του διαλύματος. Χρησιμοποιήθηκε μια επικεντρωμένη δέσμη με διάμετρο 5 mm. Επιπλέον, η θερμοκρασία του διαλύματος των AuNPs αυξήθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης, υποδεικνύοντας ότι η φωτοθερμική συμπεριφορά εξαρτάται και από τη συγκέντρωση. Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της φωτοθερμικής μετατροπής των AuNSs δίνεται στην Εικόνα 28.



Σχήμα 92: Μεταβολή της θερμοκρασίας των PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG₂₀/AuNPs διασκορπισμένων σε νερό με γραμμομοριακή αναλογία PHis/Au(III) ίση με 5:1, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μετά από ακτινοβολία από μια πηγή μονάδας laser NIR που εκπέμπει στα 808 nm, με ισχύ εξόδου 1200 mW, για 20 λεπτά.



Εικόνα 28: Πειραματική διάταξη για τη μελέτη απόδοσης της φωτοθερμικής μετατροπής των AuNPs

5.17 Συμπεράσματα - Μελλοντικοί Στόχοι

Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων και την ανάλυση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας ερευνητικής εργασίας, συνοψίζονται τα συμπεράσματα που προκύπτουν.

Πρώτα από όλα, διαπιστώθηκε η επιτυχής σύνθεση και καθαρισμός των προστατευμένων μονομερών *N^{im}*-Trityl-L-His NCA, BLG-NCA και PHE-NCA.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε με επιτυχία ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου των μονομερών και η αποπροστασία τους με σκοπό τη λήψη καλά καθορισμένων, -*τρίτυλο* αποπροστατευμένων υβριδικών πολυμερών PEO₂₂₈-*b*-PHis_n, PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe_n και PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PBLG_n. Η επιτυχής σύνθεση των πολυμερών αλλά και των μονομερών επιβεβαιώθηκε με τις τεχνικές της SEC, του NMR και του IR.

Σε επόμενο βήμα, μελετήθηκε η ικανότητα αυτο-οργάνωσης του κατά συστάδες συμπολυμερούς PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ καθώς και το μέγεθος των συντιθέμενων νανοσωματιδίων με την τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός σε διαφορετικές τιμές pH και θερμοκρασίες, με σκοπό να ελεγχθεί η αποκρισιμότητα των νανοσωματιδίων τόσο σε συνθήκες υγιούς ιστού, όσο και σε καρκινικού κυττάρου. Τα αποτελέσματα φανέρωσαν την ικανότητα του συμπολυμερούς PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ να αυτο-οργανώνεται σε υδατικά διαλύματα σχηματίζοντας μικκυλιακές δομές αποτελούμενες από έναν υδρόφοβο πυρήνα πολυ(ιστιδίνης) και μια εξωτερική υδρόφιλη κορώνα αποτελούμενη από πολυ(αιθυλενοξειδίο). Τα νανοσωματίδια αυτά έχουν την ικανότητα να αποκρίνονται στις μεταβολές του pH μεταβάλλοντας το μέγεθός τους.

Επιπροσθέτως, τα αποτελέσματα των μετρήσεων Κυκλικού Διχρωισμού που πραγματοποιήθηκαν στα πολυμερή του γενικού τύπου PEO-*b*-PHis σε διάφορα pH αποκάλυψαν τη μετάβαση της δευτεροταγούς δομής από β-στροφή σε υψηλά pH (pH = 7,4 και pH = 6,5) σε διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος σε χαμηλότερα pH (pH = 5 και pH = 3) αποδεικνύοντας την pH αποκρισιμότητα του συστήματος. Αντιθέτως, η αύξηση της θερμοκρασίας σε σταθερό pH από τους 25, στους 37 και έπειτα στους 40 °C, δεν επηρέασε καθόλου την δευτεροταγή δομή του πολυπεπτιδίου.

Επίσης, οι μετρήσεις ζ-δυναμικού που πραγματοποιήθηκαν στο PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ έδειξαν ουδέτερο επιφανειακό φορτίο για τα νανοσωματίδια, το οποίο παίζει καθοριστικό ρόλο στην παρατεταμένη κυκλοφορία τους στο αίμα και συνεπώς στη στοχευμένη και αποτελεσματική μεταφορά φαρμάκων.

Εν συνεχεία, οι αποκρινόμενες νανοδομές που προέκυψαν από το PEO₂₂₈-*b*-PHis₄₄ κατάφεραν να εγκλωβίσουν σε πολύ μεγάλο ποσοστό το φάρμακο της σισπλατίνης, αλλά οι *in vitro* και οι *in vivo* μελέτες αποδέσμευσης σε κύτταρα καρκίνου των ωθηκών και σε ποντίκια αντίστοιχα δεν ήταν ενθαρρυντικές. Αυτό οφείλεται στην εξαιρετική ικανότητα της ιστιδίνης να συμπλέκει ποσοτικά και γρήγορα την πλατίνα με αποτέλεσμα την μη αναστρεψιμότητα της σύμπλεξης. Αντιθέτως, τα ίδια νανοσωματίδια κατάφεραν να εγκλωβίσουν και να αποδεσμεύσουν, με ένα στοχευμένο και ελεγχόμενο τρόπο, το αντικαρκινικό φάρμακο της δοξορουβικίνης, σε συνθήκες καρκινικού ιστού, όπως αποκάλυψαν *in vitro* μελέτες αποδέσμευσης σε κύτταρα καρκίνου του μαστού.

Τέλος, παρουσιάστηκε μια εύκολη και πρωτότυπη στρατηγική για τη σύνθεση υβριδικών νανοσωματιδίων που περιέχουν AuNSs που απορροφούν στο εγγύς υπέρυθρο (NIR). Τα υβριδικά συμπολυπεπτιδία PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂, PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₉-*b*-PPhe_n και PEO₂₂₈-*b*-PHis₂₂-*b*-PBLG_n χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των AuNSs. Τα σφαιρικά NPs σχηματίστηκαν αρχικά από την αυτοοργάνωση των αμφίφιλων υβριδικών πολυπεπτιδίων στο νερό. Η προσθήκη H₂AuCl₄ που ακολουθήθηκε από θέρμανση, είχε ως αποτέλεσμα την αναγωγή του Au(III) από την PHis, οδηγώντας στο σχηματισμό AuNSs μόνο στο στρώμα PHis, σχηματίζοντας έτσι ένα νανοκέλυφος μέσα στα προσχηματισμένα NPs. Τα NPs που σχηματίστηκαν αποτελούνταν από ένα κέλυφος PEO, ένα στρώμα PHis που περιέχει το νανοκέλυφος χρυσού και έναν πυρήνα PPhe ή PBLG. Ελέγχοντας το πάχος του AuNS και τη διάμετρο του πυρήνα από τα μοριακά χαρακτηριστικά των πολυμερικών πρόδρομων ουσιών καθώς και την αναλογία PHis/Au(III), οι οπτικές ιδιότητες των AuNSs ρυθμίστηκαν με ακρίβεια ώστε να απορροφούν σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Έτσι, επιτύχαμε μια μετατόπιση της κορυφής απορρόφησης που αντιστοιχεί στον συντονισμό του διαμήκους επιφανειακού πλάσμονιου σε μήκη κύματος NIR. Το μέγεθος και η μορφολογία των πολυμερικών NPs που περιέχουν AuNSs εξετάστηκαν με TEM και DLS. Μελέτες σε ένα αραιό διάλυμα πολυμερικών νανοσωματιδίων που περιέχουν AuNSs έδειξαν ότι με ακτινοβολία με laser χαμηλής ισχύος στα 808 nm, οδηγεί σε σημαντική αύξηση της θερμοκρασίας του. Συνεπώς, παρουσιάστηκε μια νέα προσέγγιση για το σχεδιασμό και την εύκολη σύνθεση βιοσυμβατών πολυμερικών νανοσωματιδίων που διαθέτουν AuNSs με κορυφαία οπτική απορρόφηση στο NIR που μπορεί να ρυθμιστεί με ακρίβεια και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για ανίχνευση καρκινικών ιστών τόσο και για φωτοθερμική θεραπεία.

Στο μέλλον, θα μπορούσε να επαναληφθεί η σύνθεση των πολυμερών και να γίνει πρόσδεση ομάδων που θα ενισχύουν την αποκρισιμότητά τους έναντι κάποιου καρκινικού στόχου, πέρα από την απόκριση που έχει στο pH. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εισαγωγή φολικού οξέος στα άκρα των αλυσίδων του PEO, καθώς υποδοχείς του φολικού οξέος υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα. Έτσι, θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν εκ νέου *in vitro* και *in vivo* μελέτες με το φάρμακο της δοξορουβικίνης καθώς επίσης και με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα όπως το everolimus και η oxaliplatin. Τέλος, τα πολλά υποσχόμενα νανοσωματίδια χρυσού που συντέθηκαν θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες προκειμένου να αποφανθεί η αποτελεσματικότητά τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 25: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.

Ξενόγλωσσος Όρος	Ελληνικός Όρος
Activated monomer mechanism	Κανονικός μηχανισμός αμινών
Adriamycin	Αδριαμικίνη
Blout mechanism	Μηχανισμός του Blout
Break-seal	Υάλινος υμένας αμπούλας
Circular dichroism	Κυκλικός διχρωϊσμός
Critical micelle concentration	Κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση
Dialysis	Διαπίδωση
Doxil	Λιποσωμική δοξορουβικίνη
Doxorubicin	Δοξορουβικίνη
Drug delivery	Τεχνολογία μεταφοράς φαρμάκων
Dynamic light scattering	Δυναμική σκέδαση φωτός
Enhanced permeability and retention effect	Φαινόμενο ενισχυμένης διαπερατότητας και Κατακράτησης
Flame-drying	Ξήρανση συσκευής στη γραμμή υψηλού κενού προς απομάκρυνση υγρασίας με χρήση φλόγας
Fourier transform	Μετασχηματισμός Fourier

Freeze-drying	Λυοφιλοποίηση
Gel permeation chromatography	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
Glove box	Χώρος αποθήκευσης χημικών υλικών υπό αδρανή ατμόσφαιρα, όπου οι χειρισμοί γίνονται με την βοήθεια γαντιών προσαρμοσμένων σε υάλινο διάφραγμα
High-vacuum line	Γραμμή υψηλού κενού
High-vacuum techniques	Τεχνικές υψηλού κενού
Human epidermal growth factor receptor	Ανθρώπινος υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
Ligands	Υποκαταστάτες
Lower critical solution temperature	Χαμηλότερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος
Luminal	Αυλός
Mesenchymal Stem Cells	Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα
Mononuclear phagocyte system	Μονοπυρηνικό σύστημα φαγοκυττάρων
N-Carboxy anhydride	N-Καρβοξυ ανυδρίτης
Normal amine mechanism	Κανονικός μηχανισμός αμινών
Nuclear magnetic resonance	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
Nuclear Overhauser effect	Πυρηνικό φαινόμενο Overhauser

Oestrogen receptor	Υποδοχέας οιστρογόνων
PEGylation	Πεγκυλίωση
Poly(ethylene oxide)	Πολυ(αιθυλενοξειδίο)
Poly(L-histidine)	Πολυ(ιστιδίνη)
Poly(L-Phenylalanine)	Πολύ(Φαινυλαλανίνη)
Poly(γ -benzyl-L-Glutamate)	Πολύ(γ -βένζυλο-γλουταμικό οξύ)
Reactive oxygen species	Δραστικά οξειδωτικά είδη
Reticuloendothelial system	Δικτυοενδοθηλιακό σύστημα
Ring strain	Τάση διάνοιξης δακτυλίου
Ring-opening polymerization	Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
Size exclusion chromatography	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
Static light scattering	Στατική σκέδαση φωτός
Transmission electron microscopy	Ηλεκτρονική μικροσκοπία διαπερατότητας
Z-dynamic	Z-δυναμικό
Nanoparticle-loaded nanoparticles	Νανοσωματίδια εγκλωβισμένα σε νανοσωματίδια
Triple negative breast cancer	Τριπλά αρνητικοί καρκινικοί τύποι μαστού

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

ER	Oestrogen Receptor
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
PR	Progesterone Receptor
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
EPR	Enhanced Permeability and Retention effect
PEG	Poly(Ethylene Glycol)
PPO	Poly(Propylene Oxide)
PCL	Poly(ϵ -Caprolactone)
PDLLA	Poly(D,L-Lactic Acid)
RES	Reticuloendothelial System
CMC	Critical Micelle Concentration
NCS	Neocarzinostatin
SMA	Poly(Styrene-co-Maleic Acid)
GSH	Glutathione Γλουταθειόνη
MMP2	Matrix Metalloproteinase-2 Μεταλλοπρωτεϊνάση μήτρας
ROS	Reactive Oxygen Species
PNIPAM	Poly(<i>N</i> -Isopropyl Acrylamide)
PCLA-PEG-PCLA	πολυ(ϵ -καπρολακτόνη-co-λακτίδιο)- <i>b</i> - πολυ(αιθυλενογλυκόλη)- <i>b</i> - πολυ (ϵ -καπρολακτόνη- co- λακτίδιο)
AuNPs	Gold Nanoparticles Νανοσωματίδια χρυσού
LSPR	Local Surface Plasmon Resonance Εντοπισμένος Επιφανειακός Συντονισμός Πλασμονίου
NPs	Nanoparticles Νανοσωματίδια
AuNSs	Gold Nanoshells Νανοκελύφη Χρυσού
DexPHS	Δεξτράνη- <i>b</i> -πολυ(L-ιστιδίνη)
ATP	Adenosine Triphosphate Τριφωσφορική αδενοσίνη

MSCs	Mesenchymal Stem Cells
FDA	Food and Drug Administration
MPS	Mononuclear Phagocyte System
PCB	Polycarboxybetain Πολυκαρβοξυβεταΐνη
DOX	Doxorubicin
PEO	Poly(Ethylene Oxide)
PHis	Poly(L-Histidine)
PBLG	Poly(γ -benzyl-L-Glutamate)
PPhe	Poly(L-Phenylalanine)
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Νικοτιναμίδο-αδενινο-φωσφορικό δινουκλεοτίδιο
DNP	2,4-Dinitrophenyl
BOC	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl Βενζυλοξυκαρβονυλομάδα
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide <i>N,N'</i> -δικυκλοεξυλοκαρβοδιϊμίδιο
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide <i>N,N'</i> -δισοπροπυλοκαρβοδιϊμίδιο
ROP	Ring-Opening Polymerization Πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
NCA	N-Καρβοξυ ανυδρίτης
I	Κατανομή μοριακών βαρών
RROP	Ριζικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
AROP	Ανιοντικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
CROP	Κατιοντικός πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου
ROMP	Πολυμερισμός μετάθεσης με διάνοιξη δακτυλίου
HVT	Τεχνικές υψηλού κενού
NAM	Κανονικός μηχανισμός αμινών

AMM	Μηχανισμός ενεργοποιημένου μονομερούς
bipy	2,2'-Διπυριδίνη
COD	1,5-Κυκλοοκταδιένιο
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο
SOCl ₂	Θειονυλοχλωρίδιο
Et ₃ N	Τριαιθυλαμίνη
LCST	Lower critical solution temperature
Tyr	Τυροσίνη
m-PEG	μονομεθόξυ- PEG
IR	Υπέρυθρη ακτινοβολία
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
SEC (ή GPC)	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
CD	Κυκλικός διχρωϊσμός
DLS	Δυναμική σκέδαση φωτός
SLS	Στατική σκέδαση φωτός
NOE	Nuclear Overhauser effect
UV-Vis	Υπεριώδες-ορατό
TEM	Ηλεκτρονική μικροσκοπία διαπερατότητας
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Φασματομετρία μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος
HVL	Γραμμή υψηλού κενού
CaH ₂	Υδρίδιο του ασβεστίου
H ₂ SO ₄	Θειϊκό οξύ
P ₂ O ₅	Πεντοξειδίο του φωσφόρου
DMA	Διμεθυλαμίνη
EtOAc	Οξικός αιθυλεστέρας
THF	Τετραϋδροφουράνιο
TFA	Τριφθοροξικό οξύ

CDCl_3	Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
DMSO	Διμέθυλο σουλφοξειδίο

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. B. Yameen, W.I. Choi, C. Vilos, A. Swami, J. Shi, and O.C. Farokhzad, Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting, *J Control Release*, 2014. 190: p. 485-99.
2. L.P.Wu , D. Wang, Z. Lic, Grand challenges in nanomedicine, *Materials Science & Engineering*, 2020. C 106, 110302.
3. S. Su, P. M. Kang, Systemic Review of Biodegradable Nanomaterials in Nanomedicine, *Nanomaterials*, 2020, 10, 656.
4. Β. Μαρμαράς, Μ. Λαμπροπούλου, Βιολογία Κυττάρου, 2005, p. 381- 403.
5. N. Harbeck, F. Penault-Llorca, J. Cortes, M. Gnant, N. Houssami, P. Poortmans, K. Ruddy, J. Tsang, and F. Cardoso, Breast cancer, *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): p. 66.
6. M. Akram, M. Iqbal, M. Daniyal, and A.U. Khan, Awareness and current knowledge of breast cancer, *Biol Res*, 2017, 50(1): p. 33.
7. B. M. Reid, J. B. Permuth, T. A. Sellers, Epidemiology of ovarian cancer: a review, *Cancer Biol Med*, 2017, 14(1).
8. U. A. Matulonis, A. K. Sood, L. Fallowfield, B. E. Howitt, J. Sehouli and B. Y. Karlan, Ovarian cancer, *PRIMER*, 2016, 2.
9. L. A. Torre, B. Trabert, C.E. DeSantis, K. D. Miller, G. Samimi, C. D. Runowicz, M. M. Gaudet, A. Jemal, R. L. Siegel, Ovarian Cancer Statistics 2018, *CA CANCER J CLIN*, 2018, 68, 284-296.
- 10.H. Maeda, Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity, *Adv Drug Deliv Rev*, 2015. 91: p. 3-6.

11. Y. Shi, R. van der Meel, X. Chen, and T. Lammers, The EPR effect and beyond: Strategies to improve tumor targeting and cancer nanomedicine treatment efficacy, *Theranostics*, 2020. 10(17): p. 7921- 7924.
12. J.Y. Yhee, S. Son, S. Son, M.K. Joo, and I.C. Kwon, The EPR Effect in Cancer Therapy, *Cancer Targeted Drug Delivery*, 2013. p. 621-632.
13. J. Sandoval, J. Ventura-Sobrevilla, D. Boone-Villa, R. Ramos-Gonzalez, M. Velazquez, Y. Silva-Belmares, L. Cobos-Puc, C. Aguilar, Carbon nanomaterials as pharmaceutical forms for sustained and controlled delivery systems, *Nanomaterials for drug delivery and therapy*, 2019, p. 403-434.
14. B. Yameen, W. Il Choi, C. Vilos, A. Swami, J. Shi, O. C. Farokhzad, Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting, *Journal of Controlled Release*, 2014, 190, p. 485-499.
15. E. Blanco, C.W. Kessinger, B.D. Sumer, and J. Gao, Multifunctional micellar nanomedicine for cancer therapy, *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009. 234(2): p. 123-31.
16. H. Maeda, M. Ueda, T. Morinaga, and T. Matsumoto, Conjugation of poly(styrene-co-maleic acid) derivatives to the antitumor protein neocarzinostatin: pronounced improvements in pharmacological properties, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1985. 28(4): p. 455-461.
17. A.A. Gabizon, Pegylated Liposomal Doxorubicin: Metamorphosis of an Old Drug into a New Form of Chemotherapy, *Cancer Investigation*, 2001. 19(4): p. 424-436.
18. J.F. Kukowska-Latallo, K.A. Candido, Z. Cao, S.S. Nigavekar, I.J. Majoros, T.P. Thomas, L.P. Balogh, M.K. Khan, and J.R. Baker, Nanoparticle Targeting of Anticancer Drug Improves Therapeutic Response in Animal Model of Human Epithelial Cancer, *Cancer Research*, 2005. 65(12): p. 5317.

19. T. Nakanishi, S. Fukushima, K. Okamoto, M. Suzuki, Y. Matsumura, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, and K. Kataoka, Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin, *Journal of Controlled Release*, 2001. 74(1): p. 295-302.
20. V.P. Torchilin, Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005. 4(2): p. 145-160.
21. Q. Chen, S. Tong, M.W. Dewhirst, and F. Yuan, Targeting tumor microvessels using doxorubicin encapsulated in a novel thermosensitive liposome, *Molecular Cancer Therapeutics*, 2004. 3(10): p. 1311.
22. Y. Bae, N. Nishiyama, S. Fukushima, H. Koyama, M. Yasuhiro, and K. Kataoka, Preparation and Biological Characterization of Polymeric Micelle Drug Carriers with Intracellular pH-Triggered Drug Release Property: Tumor Permeability, Controlled Subcellular Drug Distribution, and Enhanced *in vivo* Antitumor Efficacy, *Bioconjugate Chemistry*, 2005. 16(1): p. 122-130.
23. H.S. Yoo and T.G. Park, Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles, *Journal of Controlled Release*, 2004, 96(2): p. 273-283.
24. X. Shuai, H. Ai, N. Nasongkla, S. Kim, and J. Gao, Micellar carries based on block copolymers of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) for doxorubicin delivery, *Journal of Controlled Release*, 2004, 98(3): p. 415-426.
25. C. Allen, D. Maysinger, and A. Eisenberg, Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1999. 16(1): p. 3- 27.
26. G. Gaucher, M.-H. Dufresne, V.P. Sant, N. Kang, D. Maysinger, and J.- C. Leroux, Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2005. 109(1): p. 169-188.

27. S. Bontha, A.V. Kabanov, and T.K. Bronich, Polymer micelles with cross-linked ionic cores for delivery of anticancer drugs, *Journal of Controlled Release*, 2006. 114(2): p. 163-174.
28. P. Xu, H. Tang, S. Li, J. Ren, E. Van Kirk, W.J. Murdoch, M. Radosz, and Y. Shen, Enhanced Stability of Core–Surface Cross-Linked Micelles Fabricated from Amphiphilic Brush Copolymers, *Biomacromolecules*, 2004. 5(5): p. 1736-1744.
29. M. Norouzi, M. Amerian, M. Amerian, and F. Atyabi, Clinical applications of nanomedicine in cancer therapy, *Drug Discov Today*, 2020. 25(1): p. 107-125.
30. J. Liao, Y. Jia, Y. Wu, K. Shi, D. Yang, P. Li, and Z. Qian, Physical-, chemical-, and biological-responsive nanomedicine for cancer therapy, *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2020. 12(1): p. e1581.
31. M. Najafi, N.H. Goradel, B. Farhood, E. Salehi, S. Solhjoo, H. Toolee, E. Kharazinejad, and K. Mortezaee, Tumor microenvironment: Interactions and therapy, *Journal of Cellular Physiology*, 2019. 234(5): p. 5700-5721.
32. N.S. Rejinold, R.G. Thomas, M. Muthiah, H.J. Lee, Y.Y. Jeong, I.-K. Park, and R. Jayakumar, Breast Tumor Targetable Fe₃O₄ Embedded Thermo-Responsive Nanoparticles for Radiofrequency Assisted Drug Delivery, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2016. 12(1): p. 43-55.
33. F. Mahmoodzadeh, M. Abbasian, M. Jaymand, R. Salehi, and E. Bagherzadeh-Khajehmarjan, A novel gold-based stimuli-responsive theranostic nanomedicine for chemo-photothermal therapy of solid tumors, *Materials Science and Engineering: C*, 2018. 93: p. 880-889.
34. Q. Feng, Y. Zhang, W. Zhang, Y. Hao, Y. Wang, H. Zhang, L. Hou, and Z. Zhang, Programmed near-infrared light-responsive drug delivery system for combined magnetic tumor-targeting magnetic resonance imaging and chemo-phototherapy, *Acta Biomaterialia*, 2017. 49: p. 402- 413.

35. J. Liao, W. Li, J. Peng, Q. Yang, H. Li, Y. Wei, X. Zhang, and Z. Qian, Combined cancer photothermal-chemotherapy based on doxorubicin/gold nanorod-loaded polymersomes, *Theranostics*, 2015. 5(4): p. 345-356.
36. J. Liao, X. Wei, B. Ran, J. Peng, Y. Qu, and Z. Qian, Polymer hybrid magnetic nanocapsules encapsulating IR820 and PTX for external magnetic field-guided tumor targeting and multifunctional theranostics, *Nanoscale*, 2017. 9(7): p. 2479-2491.
37. D. Gao, J. Gao, M. Xu, Z. Cao, L. Zhou, Y. Li, X. Xie, Q. Jiang, W. Wang, and J. Liu, Targeted Ultrasound-Triggered Phase Transition Nanodroplets for Her2-Overexpressing Breast Cancer Diagnosis and Gene Transfection, *Molecular Pharmaceutics*, 2017. 14(4): p. 984-998.
38. L. Jiang, Y. Liang, Q. Huo, Y. Pu, W. Lu, S. Han, J. Cao, B. He, and Y. Sun, Viral Capsids Mimicking Based on pH-Sensitive Biodegradable Polymeric Micelles for Efficient Anticancer Drug Delivery, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2018. 14(8): p. 1409-1419.
39. H. Kim, D. Sehgal, T.A. Kucaba, D.M. Ferguson, T.S. Griffith, and J. Panyam, Acidic pH-responsive polymer nanoparticles as a TLR7/8 agonist delivery platform for cancer immunotherapy, *Nanoscale*, 2018. 10(44): p. 20851-20862.
40. J. Kim, C. Jo, W.-G. Lim, S. Jung, Y.M. Lee, J. Lim, H. Lee, J. Lee, and W.J. Kim, Programmed Nanoparticle-Loaded Nanoparticles for DeepPenetrating 3D Cancer Therapy, *Advanced Materials*, 2018. 30(29): p. 1707557.
41. J.-H. Hwang, C.W. Choi, H.-W. Kim, D.H. Kim, T.W. Kwak, H.M. Lee, C.H. Kim, C.W. Chung, Y.-I. Jeong, and D.H. Kang, Dextran-*b*-poly(L-histidine) copolymer nanoparticles for pH-responsive drug delivery to tumor cells, *International journal of nanomedicine*, 2013. 8: p. 3197- 3207.
42. D. Mavrogiorgis, P. Bilalis, A. Karatzas, D. Skoulas, G. Fotinogiannopoulou, and H. Iatrou, Controlled polymerization of histidine and synthesis of well-defined stimuli

responsive polymers. Elucidation of the structure-aggregation relationship of this highly multifunctional material, *Polym. Chem.*, 2014. 5(21): p. 6256-6278.

43. P. Bilalis, L.-A. Tziveleka, S. Varlas, and H. Iatrou, pH-Sensitive nanogates based on poly(L-histidine) for controlled drug release from mesoporous silica nanoparticles, *Polymer Chemistry*, 2016. 7(7): p. 1475-1485.
44. D. Skoulas, D. Stavroulaki, K. Santorinaios, and H. Iatrou, Synthesis of Hybrid-Polypeptides m-PEO-*b*-poly(His-co-Gly) and m-PEO-*b*-poly(Hisco-Ala) and Study of Their Structure and Aggregation. Influence of Hydrophobic Copolypeptides on the Properties of Poly(L-histidine), *Polymers (Basel)*, 2017. 9(11).
45. A. Karatzas, J.S. Haataja, D. Skoulas, P. Bilalis, S. Varlas, P. Apostolidi, S. Sofianopoulou, E. Stratikos, N. Houbenov, O. Ikkala, and H. Iatrou, Macromolecular Architecture and Encapsulation of the Anticancer Drug Everolimus Control the Self-Assembly of Amphiphilic Polypeptide-Containing Hybrids, *Biomacromolecules*, 2019. 20(12): p. 4546-4562.
46. V. Athanasiou, P. Thimi, M. Liakopoulou, F. Arfara, D. Stavroulaki, I. Kyroglou, D. Skourtis, I. Stavropoulou, P. Christakopoulos, M. Kasimatis, P.G. Fragouli, and H. Iatrou, Synthesis and Characterization of the Novel N(epsilon)-9-Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Lysine N-Carboxy Anhydride. Synthesis of Well-Defined Linear and Branched Polypeptides, *Polymers (Basel)*, 2020. 12(12).
47. L. Feng, Z. Dong, D. Tao, Y. Zhang, and Z. Liu, The acidic tumor microenvironment: a target for smart cancer nano-theranostics, *National Science Review*, 2018. 5(2): p. 269-286.
48. B. Li, Q. Xu, X. Li, P. Zhang, X. Zhao, and Y. Wang, Redox-responsive hyaluronic acid nanogels for hyperthermia-assisted chemotherapy to overcome multidrug resistance, *Carbohydrate Polymers*, 2019. 203: p. 378-385.

49. M.R. Elzes, N. Akeroyd, J.F.J. Engbersen, and J.M.J. Paulusse, Disulfide-functional poly(amido amine)s with tunable degradability for gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 2016. 244: p. 357-365.
50. M.P. Gamcsik, M.S. Kasibhatla, S.D. Teeter, and O.M. Colvin, Glutathione levels in human tumors, *Biomarkers*, 2012. 17(8): p. 671- 91.
51. R. Perry, J. Mazetta, and M. Levin, Glutathione Levels and Variability in Breast Tumors and Normal Tissue, *CANCER*, 1993, 72(3): p. 783-787.
52. R. Cheng, F. Feng, F. Meng, C. Deng, J. Feijen, and Z. Zhong, Glutathione-responsive nano-vehicles as a promising platform for targeted intracellular drug and gene delivery, *J Control Release*, 2011. 152(1): p. 2-12.
53. S.J. Sigg, V. Postupalenko, J.T. Duskey, C.G. Palivan, and W. Meier, Stimuli-Responsive Codelivery of Oligonucleotides and Drugs by Self-Assembled Peptide Nanoparticles, *Biomacromolecules*, 2016. 17(3): p. 935-945.
54. Z. Jin, Y. Wen, L. Xiong, T. Yang, P. Zhao, L. Tan, T. Wang, Z. Qian, B.-L. Su, and Q. He, Intratumoral H₂O₂-triggered release of CO from a metal carbonyl-based nanomedicine for efficient CO therapy, *Chemical Communications*, 2017. 53(40): p. 5557-5560.
55. J. Wu, L. Zhao, X. Xu, N. Bertrand, W.I. Choi, B. Yameen, J. Shi, V. Shah, M. Mulvale, J.L. MacLean, and O.C. Farokhzad, Hydrophobic Cysteine Poly(disulfide)-based Redox-Hypersensitive Nanoparticle Platform for Cancer Theranostics, *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015. 54(32): p. 9218-23.
56. L. Wang, X. You, Q. Lou, S. He, J. Zhang, C. Dai, M. Zhao, M. Zhao, H. Hu, and J. Wu, Cysteine-based redox-responsive nanoparticles for small-molecule agent delivery, *Biomater Sci*, 2019. 7(10): p. 4218- 4229.
57. M. Huo, J. Yuan, L. Tao, and Y. Wei, Redox-responsive polymers for drug delivery: from molecular design to applications, *Polym. Chem.*, 2014. 5(5): p. 1519-1528.

58. K. Wang, G.-F. Luo, Y. Liu, C. Li, S.-X. Cheng, R.-X. Zhuo, and X.-Z. Zhang, Redox-sensitive shell cross-linked PEG-polypeptide hybrid micelles for controlled drug release, *Polymer Chemistry*, 2012. 3(4).
59. X. Wu, L. Zhou, Y. Su, and C.M. Dong, Plasmonic, Targeted, and Dual Drugs-Loaded Polypeptide Composite Nanoparticles for Synergistic Cocktail Chemotherapy with Photothermal Therapy, *Biomacromolecules*, 2016. 17(7): p. 2489-501.
60. X. Wu, L. Zhou, Y. Su, and C.M. Dong, An autoreduction method to prepare plasmonic gold-embedded polypeptide micelles for synergistic chemo-photothermal therapy, *J Mater Chem B*, 2016. 4(12): p. 2142- 2152.
61. B. Gyarmati, Á. Némethy, and A. Szilágyi, Reversible disulphide formation in polymer networks: A versatile functional group from synthesis to applications, *European Polymer Journal*, 2013. 49(6): p. 1268-1286.
62. N. Qiu, J. Gao, Q. Liu, J. Wang, and Y. Shen, Enzyme-Responsive Charge-Reversal Polymer-Mediated Effective Gene Therapy for Intraperitoneal Tumors, *Biomacromolecules*, 2018. 19(6): p. 2308- 2319.
63. P. Bilalis, S. Varlas, A. Kiafa, A. Velentzas, D. Stravopodis, and H. Iatrou, Preparation of hybrid triple-stimuli responsive nanogels based on poly(L-histidine), *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2016. 54(9): p. 1278-1288.
64. H. Iatrou, K. Dimas, M. Gkikas, C. Tsimblouli, and S. Sofianopoulou, Polymersomes from polypeptide containing triblock Co- and terpolymers for drug delivery against pancreatic cancer: asymmetry of the external hydrophilic blocks, *Macromol Biosci*, 2014. 14(9): p. 1222- 38.
65. P. Bilalis, D. Skoulas, A. Karatzas, J. Marakis, A. Stamogiannos, C. Tsimblouli, E. Sereti, E. Stratikos, K. Dimas, D. Vlassopoulos, and H. Iatrou, Self-Healing pH- and Enzyme Stimuli-Responsive Hydrogels for Targeted Delivery of Gemcitabine to Treat Pancreatic Cancer, *Biomacromolecules*, 2018. 19(9): p. 3840-3852.

66. J. Chen, X. Qiu, J. Ouyang, J. Kong, W. Zhong, and M.M. Xing, pH and reduction dual-sensitive copolymeric micelles for intracellular doxorubicin delivery, *Biomacromolecules*, 2011. 12(10): p. 3601-11.
67. Y. Xiao, C. Tang, Y. Chen, and M. Lang, Dual stimuli-responsive polypeptide prepared by thiol-ene click reaction of poly(L-cysteine) and N, N-dimethylaminoethyl acrylate, *Biopolymers*, 2019. 110(9): p. e23318.
68. J. Dai, S. Lin, D. Cheng, S. Zou, and X. Shuai, Interlayer-crosslinked micelle with partially hydrated core showing reduction and pH dual sensitivity for pinpointed intracellular drug release, *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011. 50(40): p. 9404-8.
69. J. B. Vines, J.-H. Yoon, N.-E. Ryu, D.-J. Park, H. Lim, Gold nanoparticles for photothermal cancer therapy. *Frontiers in chemistry*, 2019. 7, 167.
70. M. Sharifi, F. Attar, A. A. Saboury, K. Akhtari, N. Hooshmand, A. Hasan, M. A. El-Sayed, M. Falahati, Plasmonic gold nanoparticles: Optical manipulation, imaging, drug delivery and therapy, *Journal of Controlled Release*, 2019. 311, 170-189.
71. J. Song, X. Yang, Z. Yang, L. Lin, Y. Liu, Z. Zhou, Z. Shen, G. Yu, Y. Dai, O. Jacobson, Rational design of branched nanoporous gold nanoshells with enhanced physico-optical properties for optical imaging and cancer therapy, *ACS nano*, 2017. 11 (6), 6102-6113.
72. Y.-C. Wang, É. Rhéaume, F. Lesage, A. Kakkar, Synthetic methodologies to gold nanoshells: an overview, *Molecules*, 2018. 23 (11), 2851.
73. E. Boisselier, D. Astruc, Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity, *Chemical society reviews*, 2009. 38 (6), 1759-1782.

74. D. P. O'Neal, L. R. Hirsch, N. J. Halas, J. D. Payne, J. L. West, Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles, *Cancer letters*, 2004. 209 (2), 171-176.
75. J. M. Slocik, M. O. Stone, R. R. Naik, Synthesis of gold nanoparticles using multifunctional peptides. *small* 2005,1 (11), 1048-1052.
76. L. R. Hirsch, R. J. Stafford, J. A. Bankson, S. R. Sershen, B. Rivera, R. Price, J. D. Hazle, N. J. Halas, J. L. West, Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. 100 (23), 13549-13554.
77. X. Huang, M. A. El-Sayed, Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy, *Journal of advanced research*, 2010. 1 (1), 13-28.
78. M. S. Kang, S. Y. Lee, K. S. Kim, D.-W. Han, State of the art biocompatible gold nanoparticles for cancer theragnosis, *Pharmaceutics*, 2020. 12 (8), 701.
79. E. Oh, J. B. Delehanty, K. E. Sapsford, K. Susumu, R. Goswami, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, J. Granek, M. Shoff, Q. Zhang, Cellular uptake and fate of PEGylated gold nanoparticles is dependent on both cell-penetration peptides and particle size, *ACS nano*, 2011. 5 (8), 6434-6448.
80. Y. Jin, X. Gao, Spectrally tunable leakage-free gold nanocontainers, *Journal of the American Chemical Society*, 2009. 131 (49), 17774-17776.
81. J. Liang, H. Liu, J. Yu, L. Zhou and J. Zhu, PlasmoN-enhanced solar vapor generation, *Nanophotonics*, 2019. 8(5): 771-786.

82. M. R. Rasch, K. V. Sokolov, B. A. Korgel, Limitations on the optical tunability of small diameter gold nanoshells, *Langmuir*, 2009. 25 (19), 11777-11785.
83. B. Yameen, W. I. Choi, C. Vilos, A. Swami, J. Shi, O. C. Farokhzad, Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting, *Journal of controlled release*, 2014. 190, 485-499.
84. S. Lal, S. E. Clare, N. J. Halas, Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: impending clinical impact, *Accounts of chemical research*, 2008. 41 (12), 1842-1851.
85. Y. Shi, R. Van der Meel, X. Chen, T. Lammers, The EPR effect and beyond: Strategies to improve tumor targeting and cancer nanomedicine treatment efficacy, *Theranostics*, 2020. 10 (17), 7921.
86. Y. D. Jin, Multifunctional Compact Hybrid Au Nanoshells: A New Generation of Nanoplasmonic Probes for Biosensing, Imaging, and Controlled Release, *Accounts of Chemical Research*, 2014. 47 (1), 138-148.
87. Y. Jin, X. Gao, Plasmonic fluorescent quantum dots, *Nature nanotechnology*, 2009. 4 (9), 571-576.
88. Y. Jin, C. Jia, S.-W. Huang, M. O'Donnell, X. Gao, Multifunctional nanoparticles as coupled contrast agents, *Nature Communications*, 2010. 1 (1), 41.
89. N. S. Karan, A. M. Keller, S. Sampat, O. Roslyak, A. Arefin, C. J. Hanson, J. L. Casson, A. Desireddy, Y. Ghosh, A. Piryatinski, R. Iyer, H. Htoon, A. V. Malko, J. A. Hollingsworth, Plasmonic giant quantum dots: hybrid nanostructures for truly simultaneous optical imaging, photothermal effect and thermometry, *Chemical Science*, 2015. 6 (4), 2224-2236.

90. R. Djalali, Y.-f. Chen, H. Matsui, Au Nanocrystal Growth on Nanotubes Controlled by Conformations and Charges of Sequenced Peptide Templates, *Journal of the American Chemical Society*, 2003. 125 (19), 5873-5879.
91. X. Yang, M. Shi, R. Zhou, X. Chen, H. Chen, Blending of H₂AuCl₄ and histidine in aqueous solution: a simple approach to the Au₁₀ cluster, *Nanoscale*, 2011. 3 (6), 2596-2601.
92. M. Baxter-Holland and C.R. Dass, Doxorubicin, mesenchymal stem cell toxicity and antitumour activity: implications for clinical use, *J Pharm Pharmacol*, 2018. 70(3): p. 320-327.
93. B. Jawad, L. Poudel, R. Podgornik, N.F. Steinmetz, and W.Y. Ching, Molecular mechanism and binding free energy of doxorubicin intercalation in DNA, *Phys Chem Chem Phys*, 2019. 21(7): p. 3877- 3893.
94. Y.L. Franco, T.R. Vaidya, and S. Ait-Oudhia, Anticancer and cardio- protective effects of liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer, *Breast Cancer* (Dove Med Press), 2018. 10: p. 131-141.
95. H.M. Alkuraishy, A. I. Al-Gareeb, H. A. Al-hussaniy, Doxorubicin- Induced Cardiotoxicity: Molecular Mechanism and Protection by Conventional Drugs and Natural Products, *International Journal of Clinical Oncology and Cancer Research*, 2017. 2(2): p. 31-44.
96. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/caelyx-pegylated-liposomal-epar-product-information_el.pdf.
97. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/caelyx-pegylated-liposomal-epar-medicine-overview_el.pdf

98. M.T. McKenna, J.A. Weis, S.L. Barnes, D.R. Tyson, M.I. Miga, V. Quaranta, and T.E. Yankeelov, A Predictive Mathematical Modeling Approach for the Study of Doxorubicin Treatment in Triple Negative Breast Cancer, *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 5725.
99. C.J. Lovitt, T.B. Shelper, and V.M. Avery, Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins, *BMC Cancer*, 2018. 18(1): p. 41.
100. S. Dasari, P. B. Tchounwoun, Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action, *European Journal of Pharmacology*, 2014, 740, p. 364-378.
101. T. C. Johnstone, K. Suntharalingam, S. J. Lippard, The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs, *Chemical Reviews*, 2016, 116, 5, 3436-3486.
102. M. A. Farooq, M. Aquib, A. Farooq, D. H. Khan, M. B. J. Maviah, M. S. F., S. Kesse, K. O. Boakye-Yiadom, R. Mavlyanova, A. Parveen, B. Wang, Recent progress in nanotechnology-based novel drug delivery systems in designing of cisplatin for cancer therapy: an overview, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2019, 47, 1, p. 1674-1692.
103. Z. Jiang, X. Feng, H. Zou, W. Xu, X. Zhuang, Poly (L-glutamic acid)-cisplatin nanoformulations with detachable PEGylation for prolonged circulation half-life and enhanced cell internalization, *Bioactive Materials*, 2021 ,6, p. 2688-2697.
104. Y. Mochida, H. Cabral, Y. Miura, F. Albertini, S. Fukushima, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Bundled Assembly of Helical Nanostructures in Polymeric Micelles Loaded with Platinum Drugs Enhancing Therapeutic Efficiency against Pancreatic Tumor, *ACS NANO*, 2014, 8, 7, p.6724-6738.
105. W. Song, Z. Tang, M. Li, S. Lv, H. Sun, M. Deng, H. Liu, X. Chen, Polypeptide-based combination of paclitaxel and cisplatin for enhanced chemotherapy efficacy and reduced side-effects, *Acta Biomaterialia*, 2014, 10, p. 1392-1402.

106. S. Salmaso and P. Caliceti, Stealth properties to improve therapeutic efficacy of drug nanocarriers, *J Drug Deliv*, 2013. 2013: p. 374252.
107. M.A. Hillmyer, F.S. Bates, K. Almdal, K. Mortensen, A.J. Ryan, and J.P.A. Fairclough, Complex Phase Behavior in Solvent-Free Nonionic Surfactants, *Science*, 1996. 271(5251): p. 976.
108. J.M. Harris, Introduction to Biotechnical and Biomedical Applications of Poly(Ethylene Glycol), in *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J.M. Harris, Editor. 1992, Springer US: Boston, MA. p. 1-14.
109. M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, Chemistry for peptide and protein PEGylation, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, vol. 64, pp. 116-127.
110. F. E. Bailey, J. V. Koleske, *Alkylene Oxides and Their Polymers*, New York, 1976, vol. V, 3rd Edition.
111. R. Mahou and C. Wandrey, Versatile Route to Synthesize Heterobifunctional Poly(ethylene glycol) of Variable Functionality for Subsequent Pegylation, *Polymers*, 2012. 4(1).
112. Y. Kim, Y. Nagasaki, K. Kataoka, M. Kato, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, Nanotechnology in Drug Delivery, *Polym. Bull*, 1994, vol. 60, p. 33.
113. H. Iatrou, K. Dimas, M. Gkikas, C. Tsimblouli, and S. Sofianopoulou, Polymersomes from Polypeptide Containing Triblock Co- and Terpolymers for Drug Delivery against Pancreatic Cancer: Asymmetry of the External Hydrophilic Blocks, *Macromolecular Bioscience*, 2014. 14(9): p. 1222-1238.
114. G. Lapienis, Star-shaped polymers having PEO arms, *Polymer Science*, 2009. 34: p. 852-892.

115. J.-L. Wang, X.-J. Du, J.-X. Yang, S. Shen, H.-J. Li, Y.-L. Luo, S. Iqbal, C.-F. Xu, X.-D. Ye, J. Cao, J. Wang, The effect of surface poly(ethylene glycol) length on *in vivo* drug delivery behaviors of polymeric nanoparticles, *Biomaterials*, 2018.
116. T. T. Hoang Thi, E.H. Pilkington, D. H. Nguyen, J. S. Lee, K. D. Park, N. P. Truong, The Importance of Poly(ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug Delivery and Bioconjugation, *Polymers*, 2020, 12, 298.
117. Y. Fu, Y. Ding, L. Zhang, Y. Zhang, J. Liu, P. Yu, Poly ethylene glycol (PEG)-Related controllable and sustainable antidiabetic drug delivery systems, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 217, 113372.
118. Δ. Σταυρουλάκη, Σύνθεση δισυσταδικών τριπολυμερών πολυ(αιθυλενοξειδίου)-*b*- πολυ(L-ιστιδίνη-co-L-αλανίνη) και μελέτη της επίδρασης της L-αλανίνης στη συσσωμάτωση και την δευτεροταγή δομή, Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2017, p. 1-165.
119. W. D. Lehmann, N. Theobald, R. Fischer, H. C. Heinrich, Stereospecificity of phenylalanine plasma kinetics and hydroxylation in man following oral application of a stable isotope-labelled pseudo-racemic mixture of L- and D-phenylalanine, *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 1983.
120. D-phenylalanine: Biological activity. *The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY*, 2018.
121. H. Yoshida, K. Yanagisawa, *Creation of Superhydrophobic Poly(L-phenylalanine), Nonwovens by Electrospinning*, 2018.
122. X. Liu, R. Fan, B. Lu, Y. Le, Polypeptides Micelles Composed of Methoxy-Poly(Ethylene Glycol)-Poly(L-Glutamic Acid)-Poly(L-Phenylalanine) Triblock Polymer for Sustained Drug Delivery, *Pharmaceutics*, 2018, 10, 230.

- 123.B. Liu, Q. Zhang, F. Zhou, L. Ren, Y. Zhao, X. Yuan, Enhancing Membrane-Disruptive Activity via Hydrophobic Phenylalanine and Lysine Tethered to Poly(aspartic acid), *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2019, 11, p. 14538–14547.
- 124.J. Ma, J. Zhang, Lin Chia, C. Liu, Y. Li, H. Tian, Preparation of poly(glutamic acid) shielding micelles self-assembled from polylysine-*b*-polyphenylalanine for gene and drug codelivery, *Chinese Chemical Letters*, 2020, 31, p. 1427-1431.
- 125.Z. Zhao, Y. Wang, J. Han, K. Wang, D. Yang, Y. Yang, Q. Du, Y. Song, X. Yin, Self-assembled micelles of amphiphilic poly(l-phenylalanine)-*b*-poly(l-serine) polypeptides for tumor-targeted delivery, *International Journal of Nanomedicine*, 2014.
- 126.S. Dutta, S. Ray, K. Nagarajan, Glutamic acid as anticancer agent: An overview, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2013, 21, p. 337-343.
- 127.S. B. Park, M. H. Sung, H. Uyama, D. K. Han, Poly(glutamic acid): Production, composites, and medical applications of the next-generation biopolymer, *Progress in Polymer Science*, 2021, 113, 101341.
- 128.H. Yu, Z. Tang, M. Li, W. Song, D. Zhang, Y. Zhang, Y. Yang, H. Sun, M. Deng, X. Chen, Cisplatin Loaded Poly(L-glutamic acid)-*g*-Methoxy Poly(ethylene glycol) Complex Nanoparticles for Potential Cancer Therapy: Preparation, *In vitro* and *In vivo* Evaluation, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2016, 12, p. 69-78.
- 129.X. Sang, Q. Yang, Q. Wen, L. Zhang, C. Ni, Preparation and controlled drug release ability of the poly[N-isopropylacrylamide-co-allyl poly(ethylene glycol)]-*b*-poly(γ -benzyl-L-glutamate) polymeric micelles, *Materials Science and Engineering: C*, 2019, 98, p. 910-917.
- 130.O. Nuyken, S. D. Pask, Ring-Opening Polymerization — An Introductory Review, *Polymers*, 2013. 5: p. 361-403.

- 131.T. J. Deming, Synthesis and Self-Assembly of Well-Defined Block Copolypeptides via Controlled NCA Polymerization, *Adv. Polym. Sci.*, 2013, p. 1-38.
- 132.N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis, G. Sakellariou, Synthesis of Well-Defined Polypeptide-Based Materials via the Ring-Opening Polymerization of α -Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides, *Chem. Rev.*, 2009, 109: p. 5528-5578. 156.
- 133.T. J. Deming, Living Polymerization of α -Amino Acid-*N*-Carboxyanhydrides, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 2000, 38: p. 3011-3018.
- 134.H. R. Kricheldorf, Polypeptides and 100 Years of Chemistry of α -Amino Acid *N*-Carboxyanhydrides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45: p. 5752 - 5784.
- 135.T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadjichristidis, Living Polypeptides, *Biomacromolecules*, 2004, 5: p. 1653-1656.
- 136.H. Lu, J. Wang, Z. Song, L. Yin, Y. Zhang, H. Tang, C. Tu, Y. Lin, J. Cheng, Recent advances in amino acid *N*-carboxyanhydrides and synthetic polypeptides: chemistry, self-assembly and biological applications, *Chem. Commun.*, 2013, p. 1-17.
- 137.D. L. Pickel, N. Politakos, A. Avgeropoulos, J. M. Messman, A Mechanistic Study of α -(Amino acid)-*N*-carboxyanhydride Polymerization: Comparing Initiation and Termination Events in High- Vacuum and Traditional Polymerization Techniques, *Macromolecules*, 2009, 42: p. 7781-7788.
- 138.Σ. Βάρλας, Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Αυτο-Οργάνωση Αποκρινόμενων Συμπολυμερών Πολυ(αιθυλενοξειδίου), Πολυ(ιστιδίνης) και Πολυ(κυστεΐνης) για τον Εγκλωβισμό και την Ελεγχόμενη Αποδέσμευση Φαρμάκων, Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2016, p. 1-165.
- 139.Δ. Μαυρογιώργης, Μακρομοριακή αρχιτεκτονική πολυπεπτιδίων, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2015, p. 1-194.

- 140.H. Leuchs, Ueber die GlyciN-Carbonsäure, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1906, vol. 39: p. 857-861.
- 141.H. Leuchs, W. Geiger, Über die Anhydride von α -Amino-N- Carbonsäuren und die von α -Aminosäuren, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1908, 41: p. 1721-1726.
- 142.M. Bergmann, L. Zervas, W. Ross, On proteolytic enzymes VII. The synthesis of peptides of L-lysine and their behavior with papain, *J. Biol. Chem.*, 1935, vol. 111, pp. 245-260.
- 143.B. Ishai, D. Katchalski, Synthesis of N-Carboxy- α -amino Acid Anhydrides from N-Carbalkoxy- α -amino Acids by the Use of Phosphorus Tribromide, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 74: p. 3688-3689.
- 144.M. Green, M. A. Stahmann, Synthesis and enzymatic hydrolysis of glutamic acid polypeptides, *J. Biol. Chem.*, 1952, 197: p 771-782.
- 145.F. Fuchs, ÜberN-Carbonsäure-Anhydride, *Chem. Ber.*, 1922, 55: p. 2943.
- 146.D. Coleman, A. C. Farthing, Synthetic Polypeptides. Part II. Properties of Oxazolid-2:5-diones and an Initial Study of the Preparation of Polypeptides There-From, *J. Chem. Soc.*, 1950, p. 3218-3222.
- 147.C. J. Brown, D. Coleman, A. C. Farthing, Further Studies in Synthetic Polypeptides, *Nature*, 1949,163: p. 834-835.
- 148.A. L. Levy, Anhydro-N-Carboxy-dl-beta-Phenylalanine, *Nature*, 1950, 165: p. 152-153.
- 149.A. C. Farthing, Synthetic polypeptides. Part I. Synthesis of Oxazolid- 2:5-diones and a New Reaction of Glycine, *J. Chem. Soc.*, 1950, p. 3213-3217.
- 150.L. Cotarca, H. Eckert, Phosgenations - A Handbook, Wiley, 2003, p. 125-128.
- 151.L. Cotarca, Conversion of bis (trichloromethyl) carbonate to phosgene and reactivity of triphosgene, diphosgene, and phosgene with methanol, *Synthesis*, 1996, p. 553-560.

- 152.R. M. Wheaton, W. C. Bauman, Non-Ionic Separations with Ion Exchange Resins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1953, 57: p. 159-176.
- 153.G. H. Lathe, C. R. Ruthven, The Separation of Substances and Estimation of their Relative Molecular Sizes by the Use of Columns of Starch in Water, *Biochem. J.*, 1956, 62: p. 665-674.
- 154.J. Porath, P. Flodin, Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation, *Nature*, 1959, 183: p. 1657-1658.
- 155.D. J. Lea, A. H. Schon, Preparation of Synthetic Gels for Chromatography of Macromolecules, *Can. J. Chem.*, 1962, 40: p. 159- 160.
- 156.B. Jones-Cortis, Gel Filtration of Organic Compounds, *Nature*, 1961, 191: p. 272.
- 157.M. F. Vaughan, Fractionation of Polystyrene by Gel Filtration, *Nature*, 1960, 188: p. 55.
- 158.J. C. Moore, Gel Permeation Chromatography. I. A New Method for Molecular Weight Distribution of High Polymers, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 1964, 2: p. 835-843.
- 159.D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, M. I. Καραγιάννης, Κ. Η. Ευσταθίου, Ν. Χανιωτάκης, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 2005, p. 1- 984.
- 160.Ε. Γκίκας, Αμφίφιλα Πολυπεπίδια: Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Μελέτη Αυτοοργάνωσης σε Υδατικά Διαλύματα, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2012, p. 1-208.
- 161.J. McMurry, Οργανική Χημεία Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1998.
- 162.Μαυρομούστακος, Ι. Ματσούκας, Αρχές και Εφαρμογές Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, Εκδόσεις Παρισιάνος, 2006, κεφάλαιο 1.

- 163.B. Chu, Laser Light Scattering: Basic Principles and Practice, USA, 1991 vol. 1, 2nd Edition.
- 164.R. Pecora, Dynamic light scattering: Applications of photon correlation spectroscopy, USA, 1985, vol. 1, 2nd Edition.
- 165.S. Bhattacharjee, DLS and zeta potential - What they are and what they are not, *J Control Release*, 2016. 235: p. 337-351.
- 166.J.D. Clogston and A.K. Patri, Zeta potential measurement, *Methods Mol Biol*, 2011. 697: p. 63-70.
- 167.S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, How to study proteins by circular dichroism, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1751: p. 119- 139.
- 168.G.H. Michler, Electron Microscopy of polymers, *Springer*, 2008, p. 53.
- 169.M. Winey, J.B. Meehl, E.T. O'Toole, and T.H. Giddings, Jr., Conventional transmission electron microscopy, *Mol Biol Cell*, 2014, 25(3): p. 319-23.
- 170.D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, πέμπτη έκδοση, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΩΣΤΑΡΑΚΗΣ 2005, κεφάλαιο 11.
- 171.N. Hadjichristidis, H. Iatrou, S. Pispas, M. Pitsikalis, Anionic polymerization: High vacuum techniques, *J. Poly. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2000, 38: p. 3211-3234.
- 172.D. Uhrig, J. W. Mays, Experimental techniques in high-vacuum anionic polymerization, *J. Poly. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2005, 43: p. 6179- 6222.
- 173.N. Hadjichristidis, A. Hirao, Anionic Polymerization: Principles, Practice, Strength, Consequences and Applications, 1st ed. Springer: Japan, 2015.
- 174.G. J. M. Habraken, C. E. Koning, J. P. A. Heuts, A. Heise, Thiol chemistry on well-defined synthetic polypeptides, *Chem. Commun.* 2009, 3612-3614.

- 175.N. Ρουμελιώτη, Σύνθεση, χαρακτηρισμός και ιδιότητες ομοπολυμερών πολυφαινυλαλανίνης και υβριδικών συμπολυμερών πολυαιθυλενοξειδίου, πολυϊστιδίνης και πολυφαινυλαλανίνης, Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2019.
- 176.K. Kataoka, T. Matsumoto, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, S. Fukushima, K. Okamoto, G. S. Kwon, Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)-poly(L-benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance, *Journal of Controlled Release*, 2000, 64: p. 143-153.
177. P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M. R. Boyd. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(13): p. 1107-12.
- 178.E. Sereti, C. Tsimplouli, E. Kalaitidou, N. Sakellaridis, and K. Dimas, Study of the Relationship between Sigma Receptor Expression Levels and Some Common Sigma Ligand Activity in Cancer Using Human Cancer Cell Lines of the NCI-60 Cell Line Panel, *Biomedicines*. 2021, 9(1).
- 179.S. V. Khandekar, M. Kulkarni, P. V. Devarajan, Polyaspartic acid functionalized gold nanoparticles for tumor targeted doxorubicin delivery, *Journal of biomedical nanotechnology*, 2014, 10 (1), 143-153.
- 180.D. Toroz, S. Corni, Peptide synthesis of gold nanoparticles: the early steps of gold reduction investigated by density functional theory. *Nano letters*, 2011, 11 (3), 1313-1318.
- 181.M. Gkikas, J. Timonen, J. Ruokolainen, P. Alexandridis, H. Iatrou, Facile aqueous synthesis and stabilization of nearly monodispersed gold nanospheres by poly (L-proline). *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2013, 51 (6), 1448-1456.
- 182.S. Saeki, N. Kuwahara, M. Nakata, and M. Kaneko, Upper and lower critical solution temperatures in poly (ethylene glycol) solutions, *Polymer*, 1976. 18: p. 685-689.

- 183.A. Micsonai, F. Wien, L. Kernya, Y.-H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112 (24), E3095-E3103.
- 184.Y. Li, Z. Tang, P. N. Prasad, M. R. Knecht, M. T. Swihart, Peptide-mediated synthesis of gold nanoparticles: effects of peptide sequence and nature of binding on physicochemical properties, *Nanoscale*, 2014, 6 (6), 3165-3172.
- 185.X. Yan, J. Blacklock, J. Li, H. Mö hwald, One-pot synthesis of polypeptide-gold nanoconjugates for *in vitro* gene transfection, *Acs Nano*, 2012, 6 (1), 111-117.
- 186.J. G. Mesu, T. Visser, F. Soulimani, B. M. Weckhuysen, Infrared and Raman spectroscopic study of pH-induced structural changes of l-histidine in aqueous environment, *Vib. Spectrosc.*, 2005, 39 (1), 114-125.
- 187.V. De Matteis, M. Cascione, C. C. Toma, R. Rinaldi, Engineered gold nanoshells killing tumor cells: new perspectives, *Current pharmaceutical design*, 2019, 25 (13), 1477-1489.
- 188.C. Loo, A. Lin, L. Hirsch, M.-H. Lee, J. Barton, N. Halas, J. West, R. Drezek, Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer, *Technology in cancer research & treatment*, 2004, 3 (1), 33-40.
- 189.S. J. Oldenburg, J. B. Jackson, S. L. Westcott, N. J. Halas, Infrared extinction properties of gold nanoshells, *Applied Physics Letters*, 1999, 75 (19), 2897-2899.
- 190.N. Nishiyama, M.i Yokoyama, T. Aoyagi, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, Preparation and Characterization of Self-Assembled Polymer-Metal Complex Micelle from *cis*-Dichlorodiammineplatinum(II) and Poly(ethylene glycol)-Poly(α,β -aspartic acid) Block Copolymer in an Aqueous Medium, *Langmuir*, 1999, 15, 377-383.
- 191.G. Artiaga, A. Iglesias-Jiménez, E. Moreno-Gordaliza, M.L. Mena, M.M. Gómez-Gómez, Differences in binding kinetics, bond strength and adduct formation between Pt-based

drugs and S- or N-donor groups: A comparative study using mass spectrometry techniques, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 132, 96-105.