

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ ΜΕ  
ΧΡΗΣΗ ΝΑΝΟΒΙΟΪΒΡΙΔΙΩΝ**

**ΤΡΙΚΕΡΙΩΤΗΣ ΜΑΡΚΟΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007**

**UNIVERSITY OF CRETE  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
BIOCHEMISTRY LABORATORY**

**PhD DISSERTATION**

**STABILIZATION OF BIOMOLECULES  
USING NANOBIOHYBRIDS**

**TRIKERIOTIS MARKOS**

**HERAKLION 2007**

## **ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Γανωτάκης Δημήτριος Φ. (Επιβλέπων Καθηγητής)**

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

**Χανιωτάκης Νικόλαος**

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

**Ορφανόπουλος Μιχαήλ**

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

**Κουτσολέλος Αθανάσιος Γ.**

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

**Τσιώτης Γεώργιος**

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

**Τρικαλίτης Παντελής Ν.**

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

**Βαμβακάκη Μαρία**

Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών  
Πανεπιστημίου Κρήτης

*ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ*  
**ΤΡΙΚΕΡΙΩΤΗΣ ΜΑΡΚΟΣ**

**ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

Ημερομηνία γέννησης:	3 Νοεμβρίου 1977
Διεύθυνση:	Μονής Τοπλού 36, 71307, Ηράκλειο
Αριθμός τηλεφώνου:	+30 2810 281780
E-mail:	marktrik@chemistry.uoc.gr

**ΣΠΟΥΔΕΣ**

Οκτώβριος 2001 – Σήμερα

Μεταπτυχιακός Φοιτητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο.

Σεπτέμβριος 1997 – Ιούλιος 2001

Πτυχίο Χημείας (8.62/10), Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο.

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

Οκτώβριος 2001 – Σήμερα

Μεταπτυχιακή έρευνα την επίβλεψη του καθηγητή Δ. Γανωτάκη, με τίτλο: «Σταθεροποίηση βιομορίων με χρήση νανοβιοϋβριδίων».

Οκτώβριος 1999 – Ιούνιος 2001

Διπλωματική Εργασία υπό την επίβλεψη του καθηγητή Δ. Γανωτάκη, με τίτλο: «Απομόνωση και χαρακτηρισμός της Λυάσης του υδροϋπεροξειδίου των λιπαρών οξέων».

## ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Κυτταρικές καλλιέργειες:

Βακτήρια, μύκητες, ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα.

Απομόνωση και χαρακτηρισμός πρωτεϊνών:

Φυγοκέντρηση, υγρή χρωματογραφία, ηλεκτροφόρηση, φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού.

Σύνθεση και χαρακτηρισμός υλικών:

Περίθλαση ακτίνων Χ, Φασματοσκοπία υπεριώδους, Φασματοσκοπία φθορισμού, θερμοσταθμική ανάλυση.

Ακινητοποίηση πρωτεϊνών

## ΓΕΝΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Ξένες Γλώσσες:

Αγγλικά (Cambridge First Certificate).

Υπολογιστές:

Microsoft Word, Microsoft PowerPoint, Microcal Origin, Internet Explorer.

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Psylinakis, E.; Davoras, E., M.; Ioannidis, N.; **Trikeriotis, M.**; Petrouleas, V.; Ghanotakis, D., F.; Isolation and spectroscopic characterization of a recombinant bell pepper hydroperoxide lyase, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2001**, 1533, 119-127.
2. Kantonis, G.; **Trikeriotis, M.**; Ghanotakis, D., F.; Biocompatible protoporphyrin IX-containing nanohybrids with potential applications in photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2007**, 185, 62–66.
3. **Trikeriotis, M.**; Ghanotakis, D., F.; Intercalation of hydrophilic and hydrophobic antibiotics in layered double hydroxides, *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 332, 176-184.

4. Margellou, A.; Touloupakis, E.; **Trikeriotis, M.**; Ghanotakis, D., F.; Controlled release of adsorbed atrazine from layered double hydroxide nanohybrids, in preparation.
5. **Trikeriotis, M.**; Ghanotakis, D., F.; Surface functionalization of layered double hydroxides with folate and targeting to cancer cells, in preparation.

## ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ

1. Artificial Membranes Intercalated into Layered Double Hydroxides, **M. Trikeriotis**, D. F. Ghanotakis, *European summerschool "Nanocapsules with Functionalized Surfaces and Walls"*, Bremen, Germany, July 2003.
2. Ελεγχόμενη απελευθέρωση υδρόφιλων και υδρόφοβων αντιβιοτικών από στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια, **M. Trikeriotis**, D. F. Ghanotakis, *12<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας*, Σαντορίνη, Ελλάδα, Ιούλιος 2006.
3. Biocompatible protoporphyrin IX-containing nanohybrids with potential applications in photodynamic therapy, **M. Trikeriotis**, G. Kantonis, D. F. Ghanotakis, *6<sup>th</sup> International Symposium "Photodynamic Diagnosis and Therapy in Clinical Practice"*, Brixen/Bressanone, Italy, October 2006.
4. Εφαρμογή των νανοϋβριδίων LDH-ppIX στη φωτοδυναμική θεραπεία, **M. Trikeriotis**, D. F. Ghanotakis, *13<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας*, Σαντορίνη, Ελλάδα, Ιούλιος 2007.

*CURRICULUM VITAE*  
**TRIKERIOTIS MARKOS**

**PERSONAL DATA**

Date of birth:	3 November 1977
Home address:	Monis Toplou 36, 71307, Heraklion, Greece
Phone number:	+30 2810 281780
E-mail:	marktrik@chemistry.uoc.gr

**EDUCATION**

October 2001 – Today

Postgraduate student, Chemistry Department, University of Crete, Herakleion, Greece.

September 1997 - July 2001

Degree in Chemistry (8.62/10), Chemistry Department, University of Crete, Heraklion, Greece.

**RESEARCH EXPERIENCE**

October 2001 – Today

Postgraduate research under the supervision of Prof. D. Ghanotakis on “Stabilization of biomolecules using nanobiohybrids”.

October 1999 – June 2001

Undergraduate research under the supervision of Prof. D. Ghanotakis on “Isolation and characterization of fatty acid hydroperoxide lyase”.

## TECHNICAL EXPERIENCE

Cell cultures:

Bacteria, yeasts, epithelial cell lines.

Protein isolation and characterization:

Centrifugation, liquid chromatography, electrophoresis, UV-Vis spectroscopy.

Materials synthesis and characterization:

X-ray diffraction, FTIR spectroscopy, fluorescence spectroscopy, thermogravimetric analysis.

Protein immobilization.

## GENERAL KNOWLEDGE

Foreign languages:

English (Cambridge First Certificate).

Computers:

Microsoft Word, Microsoft PowerPoint, Microcal Origin, Internet Explorer.

## PUBLICATIONS

1. Psylinakis, E.; Davoras, E., M.; Ioannidis, N.; **Trikeriotis, M.**; Petrouleas, V.; Ghanotakis, D., F.; Isolation and spectroscopic characterization of a recombinant bell pepper hydroperoxide lyase, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2001**, 1533, 119-127.
2. Kantonis, G.; **Trikeriotis, M.**; Ghanotakis, D., F.; Biocompatible protoporphyrin IX-containing nanohybrids with potential applications in photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2007**, 185, 62–66.
3. **Trikeriotis, M.**; Ghanotakis, D., F.; Intercalation of hydrophilic and hydrophobic antibiotics in layered double hydroxides, *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 332, 176-184.



4. Margellou, A.; Touloupakis, E.; **Trikeriotis, M.**; Ghanotakis, D., F.; Controlled release of adsorbed atrazine from layered double hydroxide nanohybrids, in preparation.
5. **Trikeriotis, M.**; Ghanotakis, D., F.; Surface functionalization of layered double hydroxides with folate and targeting to cancer cells, in preparation.

## **PRESENTATIONS**

1. Artificial Membranes Intercalated into Layered Double Hydroxides, **M. Trikeriotis**, D. F. Ghanotakis, *European summerschool "Nanocapsules with Functionalized Surfaces and Walls"*, Bremen, Germany, July 2003.
2. Controlled release of hydrophilic and hydrophobic antibiotics from layered double hydroxides, **M. Trikeriotis**, D. F. Ghanotakis, *12<sup>th</sup> National Conference of Chemistry Graduate Students*, Santorini, Greece, July 2006.
3. Biocompatible protoporphyrin IX-containing nanohybrids with potential applications in photodynamic therapy, **M. Trikeriotis**, G. Kantonis, D. F. Ghanotakis, *6<sup>th</sup> International Symposium "Photodynamic Diagnosis and Therapy in Clinical Practice"*, Brixen/Bressanone, Italy, October 2006.
4. Application of LDH-ppIX nanohybrids to photodynamic therapy, **M. Trikeriotis**, D. F. Ghanotakis, *13<sup>th</sup> National Conference of Chemistry Graduate Students*, Santorini, Greece, July 2007.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	4
ABSTRACT .....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
Νανοϋβριδικά Υλικά .....	8
Σκοπός .....	10
Φυλλόμορφα Διπλά Υδροξείδια (LDH).....	11
Δομή .....	12
Ιδιότητες .....	13
Εφαρμογές.....	14
Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων .....	17
Ελεγχόμενη απελευθέρωση.....	19
Στόχευση .....	20
Αντιβιοτικά.....	22
Φωτοδυναμική Θεραπεία .....	26
Φωτοευαισθητοποιητές - πρωτοπορφυρίνη IX.....	27
Οξυγόνο - Υπερφθοράνθρακες .....	29
Νανοϋβρίδια LDH με πρωτοπορφυρίνη IX.....	29
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	31
Σύνθεση LDH.....	31
Χημική τροποποίηση του LDH.....	32
Τροποποίηση με αμινοπρόπυλο-σιλάνιο.....	32
Ομοιοπολική δέσμευση φυλλικού οξέος και βιοτίνης .....	32
Σύνθεση νανοϋβριδίων LDH με αντιβιοτικά .....	33
LDH-χολικό-γραμισιδίνη .....	33
LDH-χολικό-αμφοτερικίνη Β και LDH-αμφοτερικίνη Β .....	34
LDH-αμπικιλλίνη .....	34
LDH-ναλιδιξικό οξύ.....	34
Σύνθεση νανοϋβριδίων LDH με πρωτοπορφυρίνη IX.....	35
LDH-ppIX .....	35
LDH-ppIX-παλμιτικό και LDH-ppIX-PFC .....	35
[LDH(φυλλικό)]ppIX.....	36

[LDH(αλγινικό)]ppIX .....	36
Χαρακτηρισμός .....	37
Ποσοτική ανάλυση με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού .....	37
Κυτταρικές καλλιέργειες.....	38
Καλλιέργεια του μύκητα <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	38
Καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων HeLa.....	39
Εφαρμογές των νανοϋβριδίων.....	39
Προσδιορισμός ρυθμού απελευθέρωσης των αντιβιοτικών.....	39
Φωτοοξειδωση οργανικών υποστρωμάτων καταλύομενη από νανοϋβρίδια LDH-ppIX.....	40
Φωτοδυναμική απενεργοποίηση του <i>S.cerevisiae</i> με τη χρήση νανοϋβριδίων LDH-ppIX.....	41
Δέσμευση των τροποποιημένων νανοϋβριδίων LDH-ppIX σε καρκινικά κύτταρα HeLa .....	41
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	43
Σύνθεση και χαρακτηρισμός των LDH-NO <sub>3</sub> και LDH-CO <sub>3</sub> .....	43
Χημική τροποποίηση της επιφάνειας του LDH.....	46
Σύνθεση και χαρακτηρισμός νανοϋβριδίων LDH με αντιβιοτικά .....	50
Περίθλαση ακτίνων X .....	50
Φασματοσκοπία υπερύθρου .....	51
Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού.....	54
Απελευθέρωση των αντιβιοτικών από τα νανοϋβρίδια.....	56
Σύνθεση και χαρακτηρισμός νανοϋβριδίων LDH με πρωτοπορφυρίνη IX.....	58
Περίθλαση ακτίνων X .....	58
Φασματοσκοπία υπερύθρου.....	59
Θερμοσταθμική ανάλυση.....	61
Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού.....	63
Φασματοσκοπία φθορισμού.....	64
Εφαρμογές των νανοϋβριδίων LDH με πρωτοπορφυρίνη IX.....	66
Φωτοοξειδωση οργανικών υποστρωμάτων καταλύομενη από νανοϋβρίδια LDH-ppIX.....	66

Φωτοδυναμική απενεργοποίηση του <i>S.cerevisiae</i> με τη χρήση νανοϋβριδίων LDH-ppIX.....	67
Σύνθεση και χαρακτηρισμός νανοϋβριδίων LDH-ppIX με τροποποιημένη επιφάνεια	68
Φασματοσκοπία υπερύθρου.....	69
Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού.....	71
Καταβύθιση του [LDH(αλγινικό)]ppIX παρουσία ιόντων $Ca^{2+}$ .....	73
Δέσμευση των τροποποιημένων νανοϋβριδίων LDH-ppIX σε καρκινικά κύτταρα HeLa.....	74
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	76
Σύνθεση και χαρακτηρισμός LDH-NO <sub>3</sub> και LDH-CO <sub>3</sub> .....	76
Χημική τροποποίηση της επιφάνειας του LDH.....	78
Νανοϋβρίδια LDH με υδρόφιλα και υδρόφοβα αντιβιοτικά.....	79
LDH-χολικό-γραμισιδίνη.....	79
LDH-χολικό-αμφοτερικίνη Β και LDH-αμφοτερικίνη Β.....	81
LDH-αμπικιλλίνη και LDH-ναλιδιξικό οξύ.....	83
Σύνθεση και χαρακτηρισμός νανοϋβριδίων LDH με πρωτοπορφυρίνη IX.....	85
LDH-ppIX και LDH-ppIX-PFC.....	85
LDH-ppIX και LDH-ppIX-παλμιτικό.....	86
Εφαρμογές των νανοϋβριδίων LDH με πρωτοπορφυρίνη IX.....	90
Φωτοοξειδωση οργανικών υποστρωμάτων με τη χρήση νανοϋβριδίων LDH-ppIX	90
Φωτοδυναμική απενεργοποίηση του <i>S. cerevisiae</i> με τη χρήση νανοϋβριδίων LDH-ppIX.....	91
Νανοϋβρίδια LDH-ppIX με τροποποιημένη επιφάνεια.....	92
[LDH(αλγινικό)]ppIX.....	92
[LDH(φυλλικό)]ppIX.....	93
Δέσμευση των τροποποιημένων νανοϋβριδίων LDH-ppIX σε καρκινικά κύτταρα HeLa.....	95
Συμπεράσματα - προοπτικές.....	96
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	99

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο συνδυασμός διαφόρων βιομορίων με ένα ανόργανο υλικό, τα φυλλόμορφα διπλά υδροξείδια (LDH), έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση βιοσυμβατών νανοϋβριδίων. Τα νανοϋβρίδια αυτά σχεδιάστηκαν κατάλληλα με σκοπό τη χρήση τους σε βιολογικές εφαρμογές όπως η μεταφορά φαρμάκων και η φωτοδυναμική θεραπεία.

Με σκοπό την παρασκευή ενός συστήματος μεταφοράς φαρμάκων, τέσσερα διαφορετικά φάρμακα, που αντιπροσωπεύουν διαφορετικές κατηγορίες αντιβιοτικών, εισήχθησαν σε φυλλόμορφα διπλά υδροξείδια. Τα δύο από αυτά, η γραμισιδίνη και η αμφοτερικίνη Β, είναι υδρόφοβα αντιβιοτικά και ενσωματώθηκαν σε τεχνητές μεμβράνες που σχηματίστηκαν μέσα στο ανόργανο υπόστρωμα. Τα άλλα δύο, η αμπικιλίνη και το ναλιδιζικό οξύ, είναι υδατοδιαλυτά αντιβιοτικά και εισήχθησαν απευθείας με ιονανταλλαγή. Τα νανοϋβρίδια που προέκυψαν χαρακτηρίστηκαν με διάφορες τεχνικές όπως περίθλαση ακτίνων Χ, φασματοσκοπία υπερύθρου και φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού. Η αντιστρεπτή αλληλεπίδραση των φαρμάκων με το ανόργανο υπόστρωμα επιτρέπει την απελευθέρωσή τους υπό κατάλληλες συνθήκες. Οι μελέτες απελευθέρωσης έδειξαν ότι τα υβριδικά αυτά υλικά μπορούν να βρουν εφαρμογή σε συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης για διάφορα είδη αντιβιοτικών.

Η πρωτοπορφυρίνη IX (ppIX) ακινητοποιήθηκε σε LDH με σκοπό την παρασκευή βιοσυμβατών νανοϋβριδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη φωτοδυναμική θεραπεία. Επιπλέον παρασκευάστηκαν νανοϋβρίδια που περιείχαν εκτός από την ppIX και υπερφθοροεπτανοϊκό οξύ ή παλμιτικό οξύ. Τα νανοϋβρίδια χαρακτηρίστηκαν με περίθλαση ακτίνων Χ, φασματοσκοπία υπερύθρου, φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού, φασματοσκοπία φθορισμού και θερμοσταθμική ανάλυση. Η φωτοξείδωση οργανικών υποστρωμάτων όπως η ιστιδίνη, το 2,3-διμέθυλο-2-βουτένιο και το λινελαϊκό οξύ, απέδειξε την ικανότητα των νανοϋβριδίων να παράγουν οξυγόνο απλής κατάστασης όταν ακτινοβολούνται με ορατό φως. Επιπλέον, η δυνατότητα εφαρμογής των

νανοϋβριδίων στη φωτοδυναμική θεραπεία ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας ως μοντέλο το μύκητα *S. cerevisiae*.

Συντέθηκαν επίσης νανοϋβρίδια με βελτιωμένη υδατοδιαλυτότητα και την ικανότητα της στόχευσης καρκινικών κυττάρων. Αυτό επιτεύχθηκε με την ομοιοπολική πρόσδεση φυλλικού οξέος ή βιοτίνης στην επιφάνεια των LDH. Επιπλέον, προσδέθηκε αλγινικό νάτριο στην επιφάνεια του LDH-ppIX με ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση. Τα νανοϋβρίδια αυτά χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία υπερύθρου και φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού. Η ομοιοπολική πρόσδεση του φυλλικού οξέος δίνει στο LDH τη δυνατότητα να στοχεύει καρκινικά κύτταρα HeLa.

#### **Λέξεις-κλειδιά:**

Φυλλόμορφα διπλά υδροξείδια (LDH), νανοϋβρίδια, μεταφορά φαρμάκων, στόχευση, φωτοδυναμική θεραπεία, γραμισιδίνη, αμφοτερικίνη Β, αμπικικιλίνη, ναλιδιξικό οξύ, πρωτοπορφυρίνη IX, υπερφθοροεπτανοϊκό οξύ, παλμιτικό οξύ, φυλλικό οξύ, αλγινικό νάτριο.

## ABSTRACT

A variety of different biomolecules were combined with an inorganic material, layered double hydroxides (LDH), to produce biocompatible nanohybrids. These nanohybrids were appropriately designed for biological applications such as drug delivery and photodynamic therapy.

In order to produce a drug delivery system, four pharmaceutically active molecules, each representing a different class of antibiotic, were intercalated in layered double hydroxides. Two of them, gramicidin and amphotericin B, are hydrophobic and they were incorporated in artificial membranes formed in the interlayer of the inorganic host. The other two, ampicillin and nalidixic acid, are water soluble antibiotics that were directly intercalated by using simple ion exchange reactions. The synthetic nanohybrid materials were characterized by various methods, as X-ray diffraction, infrared spectroscopy and ultraviolet-visible spectroscopy that verified the successful intercalation of the antibiotics and provided information regarding the interlayer structure of the nanohybrids. The reversible interaction of the antibiotic molecules with the inorganic host leads to release of the active drugs under the appropriate conditions. The release studies showed that the synthetic nanohybrids can successfully serve as controlled release systems for different kinds of antibiotics.

Protoporphyrin IX (ppIX) was immobilized in the interlayer region of layered double hydroxides in order to produce biocompatible nanohybrids that could find application in photodynamic therapy. Additionally, nanohybrids with both ppIX and perfluoroheptanoic acid or palmitic acid were synthesized. The various nanohybrids were characterized by using X-ray diffraction, infrared spectroscopy, ultraviolet-visible spectroscopy, fluorescence spectroscopy and thermogravimetric analysis. Photooxidation experiments using substrates such as imidazole, 2,3-dimethyl-2-butene or linoleic acid, demonstrated the generation of singlet oxygen by these nanohybrids. Furthermore, the application of the nanohybrids to photodynamic therapy was evaluated by using *S. cerevisiae* as a model.

Surface modified nanohybrids with improved solubility and the ability to target cancer cells were also synthesized. This was achieved by covalent bonding of folic acid or biotin on the surface of LDH. Furthermore, sodium alginate was bound on the external surface of LDH-ppIX by electrostatic interaction. The nanohybrids were characterized by infrared spectroscopy and ultraviolet – visible spectroscopy. The covalent bonding of folate on the surface of LDH enables them to target HeLa cancer cells.

**Keywords:**

Layered double hydroxide, nanohybrids, drug delivery, targeting, photodynamic therapy, gramicidin, amphotericin B, ampicillin, nalidixic acid, protoporphyrin IX, perfluoroheptanoic acid, palmitic acid, folic acid, sodium alginate.



# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## Νανοϋβριδικά Υλικά

Μέσα από δεκαετίες ανεξάρτητης ανάπτυξης της χημείας και της βιολογίας αποκτήθηκε σημαντική γνώση και εμπειρία που οδηγεί σήμερα στη συνάντηση των δύο επιστημονικών πεδίων. Τα τελευταία χρόνια στους κόλπους της χημείας αναπτύσσεται ραγδαία η επιστήμη υλικών και η νανοτεχνολογία παρέχοντας αδιάκοπα νέα υλικά, οργανικής ή ανόργανης φύσης, με καινούριες ιδιότητες. Στο πεδίο της βιολογίας παρατηρήθηκε στα μέσα του προηγούμενου αιώνα μια στροφή προς την κατανόηση της μοριακής βάσης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βιομορίων οδηγώντας στην ανάπτυξη της βιοχημείας, της μοριακής βιολογίας και της βιοτεχνολογίας. Οι εξελίξεις αυτές δεν μπορούσαν παρά να οριοθετήσουν ένα νέο διεπιστημονικό χώρο όπου συναντάται η επιστήμη υλικών με τη βιοτεχνολογία.<sup>1</sup> Η έρευνα στο χώρο αυτό έχει ως σκοπό την ανάπτυξη και μελέτη υβριδικών υλικών που συνδυάζουν τις ιδιότητες των ανόργανων υλικών, όπως αυτές σχεδιάζονται στο χημικό εργαστήριο, με τις ιδιότητες των βιομορίων όπως έχουν εξελιχθεί μέσα στους αιώνες στο εργαστήριο της φύσης.

Η συνάντηση των νέων υλικών με τα βιομόρια λαμβάνει χώρα σε μεγέθη της τάξης των νανομέτρων. Τα νανοϋλικά, των οποίων τουλάχιστον μία από τις διαστάσεις μετριέται σε νανόμετρα, αλληλεπιδρούν με βιομόρια σχηματίζοντας υβριδικά υλικά. Τα υλικά αυτά είναι είτε οργανικά, όπως πολυμερή νανοσωματίδια και νανοκάψουλες, είτε ανόργανα, όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα, τα νανοσωματίδια μετάλλων (Au, Ag) ή μεταλλικών οξειδίων (ZnO, οξείδια του σιδήρου, TiO<sub>2</sub>) και οι κβαντικές τελείες (CdSe, InAs).

Παράλληλα με τη ραγδαία ανάπτυξη των νέων υβριδικών υλικών παρατηρείται και η εφαρμογή τους στη βιολογία, την ιατρική, τη φαρμακευτική και τη βιοχημεία.<sup>2</sup> Πληθώρα τεχνικών απεικόνισης που βασίζονται σε νανοϋβριδικά υλικά έχουν αναπτυχθεί. Ανάμεσα σε αυτές ξεχωρίζει η εφαρμογή των υπερπαραμαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (SPION) ως σκιαγραφικών στην μαγνητική τομογραφία (MRI).<sup>3</sup> Η πρόσδεση των σωματιδίων

σε αντισώματα ή κατάλληλα πεπτίδια έχει ως αποτέλεσμα τη λεπτομερή απεικόνιση συγκεκριμένων ιστών ή τη διάγνωση ασθενειών. Ιδιαίτερα σημαντική είναι επίσης η χρήση κβαντικών τελειών ως δεικτών φθορισμού για την απεικόνιση βιομορίων και κυττάρων.<sup>4</sup> Οι μοναδικές οπτικές ιδιότητες καθώς και η δυνατότητα πρόσδεσης βιομορίων στην επιφάνειά τους καθιστούν τις κβαντικές τελείες καταλληλότερους δείκτες σε εφαρμογές απεικόνισης από τα οργανικά φθορίζοντα μόρια. Τα νανοϋβριδικά υλικά βρίσκουν ακόμα σημαντική εφαρμογή στην ανάπτυξη και την κατασκευή αναλυτικών συσκευών όπως οι βιοαισθητήρες.<sup>2</sup> Στους ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες συνδυάζεται ένα ένζυμο με ένα αγωγίμο νανοϋλικό, όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα<sup>5</sup> ή τα νανοσωματίδια χρυσού, για την ανίχνευση του ηλεκτρικού ρεύματος που παράγεται κατά την ενζυμική αντίδραση. Επίσης υβρίδια ενζύμων με κβαντικές τελείες χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη οπτικών βιοαισθητήρων.

Η ιατρική και η φαρμακευτική επωφελούνται σε μεγάλο βαθμό από την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών και νέων υλικών. Τα νανοϋλικά που αναπτύσσονται τα τελευταία χρόνια είναι βιοσυμβατά και έτσι μπορούν να βρουν εφαρμογή σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Ένα ιδανικό σύστημα μεταφοράς φαρμάκων αποτελείται από ένα φορέα νανοσκοπικών διαστάσεων που μεταφέρει τη φαρμακευτική ουσία μέσα στο σώμα του ασθενούς και την απελευθερώνει μόνο στον στόχο για τον οποίο έχει σχεδιαστεί. Η υβριδοποίηση του νάνο-φορέα με βιολογικά μόρια δίνει την δυνατότητα της εξειδικευμένης αναγνώρισης στόχων μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Τόσο οργανικά πολυμερή<sup>6</sup> όσο και ανόργανα υλικά<sup>7</sup> μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς στα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.

## Σκοπός

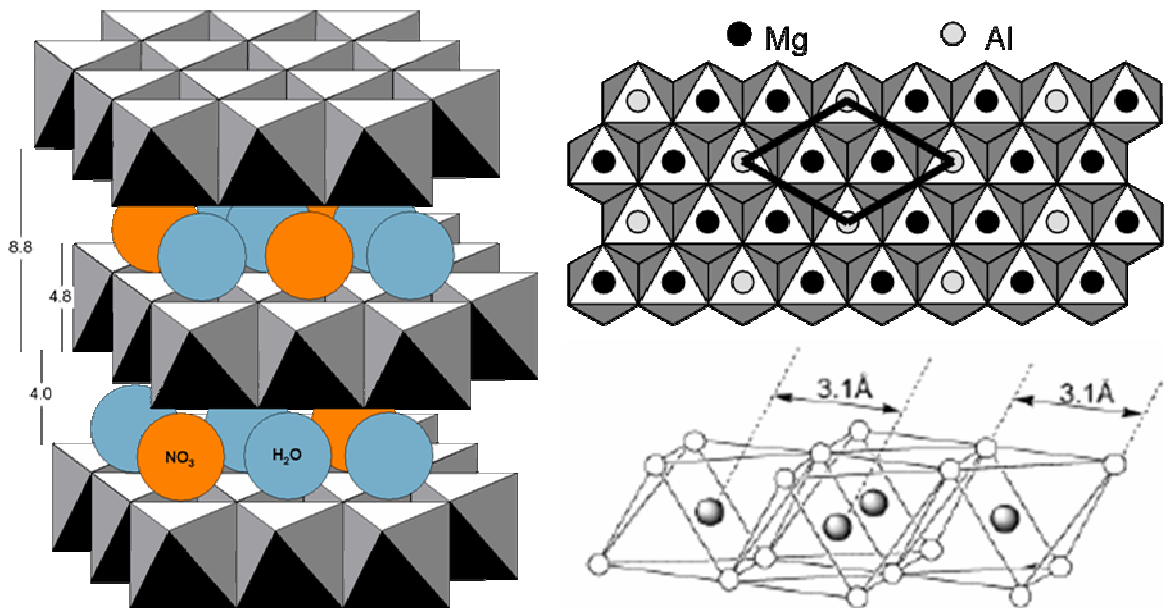
Ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός νέων νανοϋβριδικών υλικών καθώς και η εφαρμογή τους σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων και στη φωτοδυναμική θεραπεία. Τα νανοϋβριδικά υλικά που παρασκευάστηκαν αποτελούνται από ένα ανόργανο υλικό, τα φυλλόμορφα διπλά υδροξειδία (LDH), το οποίο συνδυάστηκε με πληθώρα βιομορίων όπως η αμπικιλίνη, το ναλιδιξικό οξύ, η αμφοτερικίνη Β, η γραμισιδίνη, η πρωτοπορφυρίνη ΙΧ, το φυλλικό οξύ, το παλμιτικό οξύ, το χολικό οξύ και το αλγινικό νάτριο. Η σύνθεση των υλικών αυτών έδωσε τη δυνατότητα διερεύνησης των αλληλεπιδράσεων των βιομορίων με τον ανόργανο φορέα. Έτσι μελετήθηκε η απελευθέρωση αντιβιοτικών από το LDH, η δυνατότητα φωτοξείδωσης οργανικών υποστρωμάτων από νανοϋβρίδια LDH με πρωτοπορφυρίνη ΙΧ καθώς και η δυνατότητα εφαρμογής των τελευταίων στη φωτοδυναμική θεραπεία. Επίσης μελετήθηκε η ομοιοπολική πρόσδεση βιομορίων με κατάλληλη χημική τροποποίηση των νανοϋβριδίων με σκοπό την εξειδικευμένη στόχευση καρκινικών κυττάρων.

Στη συνέχεια θα αναπτυχθούν τα χαρακτηριστικά και οι ιδιότητες του ανόργανου υλικού και των βιομορίων που χρησιμοποιήθηκαν στη σύνθεση των νέων νανοϋβριδίων. Επίσης θα αναφερθούν οι βασικές αρχές των συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων και της φωτοδυναμικής θεραπείας. Ακολούθως θα παρουσιαστεί η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και οι εφαρμογές των νανοϋβριδίων που παρασκευάστηκαν.

## Φυλλόμορφα Διπλά Υδροξειδία (LDH)

Τα φυλλόμορφα διπλά υδροξειδία (LDH), ή αλλιώς μικτά μεταλλικά υδροξειδία, είναι ανόργανα υλικά που αποτελούνται από υδροξειδία δύο διαφορετικών μετάλλων. Συχνά αποκαλούνται «ανιονικοί πηλοί» καθώς περιέχουν ανιόντα ( $\text{CO}_3^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$  κ.ά.) και έχουν κοινές ιδιότητες με τους περισσότερους πηλούς δηλαδή σχηματίζουν ιδιαίτερα μικρού μεγέθους κρυστάλλους (0.1 – 5  $\mu\text{m}$ ) και προσροφούν σημαντικές ποσότητες νερού ανάλογα με την υγρασία του περιβάλλοντα χώρου. Οι κατιονικοί πηλοί (ιλλίτης, μοντμοριλλονίτης κ.ά.) ανήκουν στην ομάδα των φυλλοπυριτικών ορυκτών και είναι αρκετά διαδεδομένοι στη φύση. Αντίθετα, οι ανιονικοί πηλοί είναι κυρίως συνθετικά υλικά με εξαίρεση τον υδροταλσίτη και ορισμένα πιο σπάνια ορυκτά που είναι φυσικά προϊόντα.

Η χημική σύσταση των LDH μπορεί να περιγραφεί από το γενικό τύπο  $[\text{M}^{\text{II}}_{(1-x)}\text{M}^{\text{III}}_x(\text{OH})_2][\text{A}^{n-}]_{x/n}\cdot z\text{H}_2\text{O}$ , όπου  $\text{M}^{\text{II}}$  και  $\text{M}^{\text{III}}$  είναι ένα δισθενές και ένα τρισθενές μέταλλο αντίστοιχα, και  $\text{A}^{n-}$  είναι ένα ανιόν. Το φυσικό ορυκτό υδροταλσίτης ανήκει στα φυλλόμορφα διπλά υδροξειδία και έχει τύπο  $[\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}][\text{CO}_3]_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Τόσο ο υδροταλσίτης όσο και τα υπόλοιπα φυλλόμορφα διπλά υδροξειδία μπορούν να παρασκευαστούν εύκολα και με χαμηλό κόστος σε εργαστηριακή κλίμακα.<sup>8,9</sup> Κατά τη σύνθεση μπορεί εύκολα να ελεγχθεί το είδος και η αναλογία των  $\text{M}^{\text{II}}$  και  $\text{M}^{\text{III}}$ , καθώς και το είδος του ανιόντος. Έτσι έχουν παρασκευαστεί LDH με Mg-Al, Mg-Fe, Ni-Al, Zn-Al, Li-Al, κ.ά. ενώ οι συνήθεις αναλογίες  $\text{M}^{\text{II}}/\text{M}^{\text{III}}$  είναι 4/1, 3/1 και 2/1. Κατά τη σύνθεση του LDH μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικά ανιόντα όπως  $\text{CO}_3^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{OH}^-$ . Καθίσταται λοιπόν φανερό πως η οικογένεια των LDH είναι πρακτικά ανεξάντλητη καθώς η χρήση διαφορετικών μετάλλων και ανιόντων σε διαφορετικές αναλογίες οδηγεί σε πληθώρα συνθετικών υλικών με διαφορετική χημική σύσταση. Επομένως τα φυλλόμορφα διπλά υδροξειδία αποτελούν μια ανεξάντλητη πηγή υλικών που μπορούν να σχεδιαστούν έτσι ώστε να διαθέτουν επιθυμητές ιδιότητες, καθώς αυτές σχετίζονται με τη χημική τους σύσταση.



**Σχήμα 1.** Χαρακτηριστικά της δομής του LDH-NO<sub>3</sub> (Προσαρμοσμένο από τις αναφορές 8 και 46).

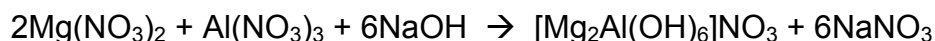
### Δομή

Η δομή των φυλλόμορφων διπλών υδροξειδίων, όπως και των κατιονικών πηλών, είναι φυλλοειδής.<sup>8, 10</sup> Τα ανόργανα φύλλα των LDH αποτελούνται από δύο διαφορετικά μέταλλα γεφυρωμένα με υδροξύλια σε οκταεδρική διαμόρφωση και συνολική αναλογία δύο υδροξυλίων προς ένα μέταλλο. Τα οκτάεδρα αυτά ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα δυσδιάστατο φύλλο το οποίο έχει παρόμοια δομή με το βρουσίτη, ένα ορυκτό με χημικό τύπο Mg(OH)<sub>2</sub>. Η δομική διαφορά ενός LDH μαγνησίου – αργιλίου με το βρουσίτη βρίσκεται στην αντικατάσταση ορισμένων οκταέδρων μαγνησίου με οκτάεδρα που έχουν στο κέντρο τους το τρισθενές αργίλιο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το φύλλο να αποκτά θετικό φορτίο. Για την εξουδετέρωση του φορτίου των ανόργανων φύλλων υπάρχουν τα αντισταθμιστικά ανιόντα, ανόργανα ή οργανικά, τα οποία, μαζί με μόρια νερού, σχηματίζουν ένα ενδιάμεσο στρώμα μεταξύ δύο ανόργανων φύλλων. Η συνολική δομή του LDH σχηματίζεται από την εναλλασσόμενη στοίβαξη ανόργανων φύλλων και ανιόντων όπως φαίνεται στο Σχήμα 1. Το ανόργανο φύλλο έχει πάχος 4.8 Å ενώ ο χώρος μεταξύ δύο φύλλων όπου

φιλοξενούνται τα ανιόντα εξαρτάται από το μέγεθος του ανιόντος και μπορεί να λάβει τιμές από 3.0 έως και 50 Å. Για το νιτρικό ανιόν η απόσταση αυτή είναι 4.0 Å οπότε η επαναλαμβανόμενη μονάδα μεταλλικών υδροξειδίων και ανιόντων έχει συνολικό πάχος 8.8 Å. Επιπλέον, στο Σχήμα 1 φαίνεται η κατανομή των κατιόντων στην περίπτωση του LDH με αναλογία Mg/Al = 2/1 η απόσταση μεταξύ των οποίων είναι 3.1 Å ενώ επισημαίνεται και η μοναδιαία κυψελίδα που αντιστοιχεί στο κατιόν  $[Mg_2Al(OH)_6]^+$ .

### *Ιδιότητες*

Η σύνθεση των φυλλόμορφων διπλών υδροξειδίων γίνεται με προσθήκη βάσης σε διάλυμα που περιέχει τα άλατα του δισθενούς και του τρισθενούς μετάλλου. Η αντίδραση που περιγράφει αυτή τη διαδικασία είναι:



Με την επίδραση όξινου διαλύματος πραγματοποιείται υδρόλυση του LDH και μάλιστα έχει παρατηρηθεί πως η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα σε pH χαμηλότερο του 5.<sup>11, 12</sup> Η αντίδραση όξινης υδρόλυσης του LDH είναι:

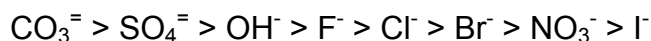


Η ιδιότητα των LDH να αποσυντίθεται σε όξινες συνθήκες είναι αρκετά σημαντική για τη χρήση τους σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Επιπλέον τα φυλλόμορφα διπλά υδροξειδία είναι βιοσυμβατά καθώς από την υδρόλυσή τους δεν απελευθερώνονται ουσίες που να είναι επιβλαβείς ή τοξικές για τον άνθρωπο. Για το λόγο αυτό έχουν λάβει έγκριση από των οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων (FDA) των ΗΠΑ.

Μια άλλη ιδιότητα των LDH είναι η παρασκευή μικτών μεταλλικών οξειδίων μετά από θερμική κατεργασία στους 500°C για 18 τουλάχιστον ώρες. Κατά την θερμική κατεργασία απομακρύνεται το νερό καθώς και τα ανιόντα με αποτέλεσμα να αλλάζει εντελώς η δομή και οι ιδιότητες του υλικού. Τα μικτά μεταλλικά οξειδία που προκύπτουν έχουν μικρό μέγεθος κρυστάλλων και μεγάλη ειδική επιφάνεια, αντέχουν στις υψηλές θερμοκρασίες και παρουσιάζουν αλκαλικές ιδιότητες. Έτσι έχουν χρησιμοποιηθεί ως καταλύτες σε πληθώρα οργανικών μετατροπών.<sup>8</sup> Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα μικτά μεταλλικά οξειδία

μπορούν να επανακτήσουν τη δομή του LDH αν βρεθούν σε υδατικό διάλυμα κάποιου ανιόντος. Επομένως με τη διαδικασία της ενυδάτωσης καθίσταται δυνατή η αλλαγή του ανιόντος στο ενδιάμεσο στρώμα του LDH.

Ωστόσο, η απλούστερη και συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την αλλαγή των ενδιάμεσων ανιόντων είναι η ιονανταλλαγή.<sup>13</sup> Η ιδιότητα αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι κάθε ανιόν έχει διαφορετική συγγένεια για το LDH. Σύμφωνα με παρατηρήσεις η σειρά σταθερότητας για ορισμένα μονοσθενή και δισθενή ανιόντα έχει ως εξής:<sup>14, 15</sup>



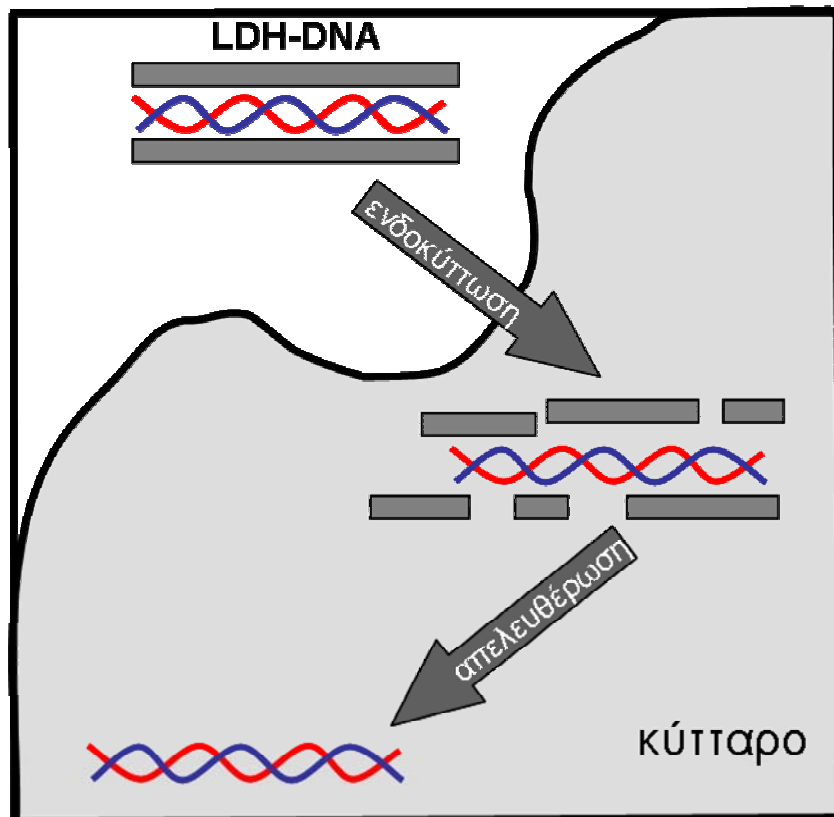
Στην σειρά αυτή κάθε ανιόν μπορεί να αντικαταστήσει αυτά που βρίσκονται δεξιά του. Παρατηρείται πως τα δισθενή ιόντα και ιδιαίτερα τα ανθρακικά έχουν μεγαλύτερη συγγένεια από τα μονοσθενή. Για το λόγο αυτό η σύνθεση υλικών όπως το LDH-NO<sub>3</sub> απαιτεί την προστασία των διαλυμάτων από τον ατμοσφαιρικό αέρα ώστε να αποφεύγεται η ανταλλαγή των ιόντων από CO<sub>3</sub><sup>=</sup>. Η ιονανταλλαγή είναι ίσως η σημαντικότερη ιδιότητα των LDH καθώς χάρη σε αυτήν μπορεί να συντεθεί εύκολα και σε ήπιες συνθήκες μια τεράστια ποικιλία διαφορετικών υλικών.

### *Εφαρμογές*

Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του 90 η κύρια εφαρμογή των LDH ήταν η παραγωγή καταλυτών είτε μέσω θερμικής κατεργασίας για την παρασκευή μεταλλικών οξειδίων<sup>8</sup> είτε με την ακινητοποίηση του καταλύτη στο LDH μέσω ιονανταλλαγής.<sup>16</sup> Τα LDH έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορων ειδών αντιδράσεις όπως αλδολικές συμπυκνώσεις, υδρογονώσεις, οξειδώσεις και αντιδράσεις πολυμερισμού. Επίσης το LDH-CO<sub>3</sub> καθώς και τα παράγωγά του με OH<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> και SO<sub>4</sub><sup>=</sup> μπορούν να δράσουν ως αλκαλικοί καταλύτες στη μετατροπή της 2-μέθυλο-3-βουτύλ-2-όλης σε ακετόνη και ακετυλένιο.<sup>16, 17</sup> Τα LDH χρησιμοποιούνται επίσης και ως υποστρώματα για την ακινητοποίηση καταλυτών με σκοπό τη μετατροπή τους από ομεγενείς σε ετερογενείς. Έτσι, με τη μέθοδο της ιονανταλλαγής έχουν ακινητοποιηθεί διάφορα πολυοξομεταλλικά ανιόντα

( $V_{10}O_{28}^{6-}$ ,  $H_2W_{12}O_{40}^{6-}$ ,  $MoO_4^{2-}$ ,  $Mo_7O_{24}^{6-}$ )<sup>16, 18-20</sup> καθώς επίσης πορφυρίνες και φθαλοκυανίνες.<sup>16, 21-23</sup>

Τα τελευταία χρόνια εκτός από την ανάπτυξη καταλυτών, τα φυλλόμορφα διπλά υδροξείδια άρχισαν να βρίσκουν εφαρμογή στη βιολογία και τη βιοϊατρική. Σημαντικός σταθμός προς αυτή την κατεύθυνση ήταν η εισαγωγή DNA σε LDH<sup>24</sup> και στη συνέχεια η εισαγωγή του DNA σε κύτταρα θηλαστικών.<sup>11</sup> Ολιγονουκλεοτίδια<sup>25</sup> ή ακόμα και ολόκληρα γονίδια<sup>26</sup> έχουν μεταφερθεί με επιτυχία σε διάφορες κυτταρικές σειρές χρησιμοποιώντας τα LDH ως φορείς. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2 το νανοϋβρίδιο LDH-DNA εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ενδοκύττωσης και στη συνέχεια το DNA απελευθερώνεται είτε λόγω υδρόλυσης του LDH είτε μέσω ιονανταλλαγής. Επιπλέον, ενδοφλέβια χορήγηση LDH σε αρουραίους με δόση έως και 200 mg/kg έδειξε την έλλειψη τοξικών



**Σχήμα 2.** Εισαγωγή DNA σε κύτταρα με τη χρήση νανοϋβριδίου LDH-DNA (Προσαρμοσμένο από την αναφορά 11).



παρενεργειών.<sup>27</sup> Εκτός από τη μεταφορά γονιδίων τα LDH μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στη μεταφορά φαρμάκων. Από το 2000 και μετά παρατηρείται μια αυξανόμενη παρασκευή νανοϋβριδίων LDH με διάφορα φάρμακα. Συγκεκριμένα έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως αντιφλεγμονώδη φάρμακα όπως το ibuprofen,<sup>28, 29</sup> το fenbufen<sup>30, 31</sup> και το naproxen<sup>29, 32</sup> και αντικαρκινικά φάρμακα όπως η camptothecin<sup>12</sup> και η methotrexate<sup>33, 34</sup> καθώς επίσης και άλλες φαρμακευτικές ουσίες.<sup>35-37</sup> Από την κατηγορία των αντιβιοτικών μόνο η φαινοξυμέθυλ-πενικιλίνη έχει εισαχθεί σε LDH.<sup>38</sup>

Τα φυλλόμορφα διπλά υδροξειδία έχουν χρησιμοποιηθεί και για την παρασκευή αναλυτικών ή διαγνωστικών συσκευών όπως οι βιοαισθητήρες. Συγκεκριμένα έχουν παρασκευαστεί ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες με ακινητοποίηση της οξειδάσης της πολυφαινόλης (PPO) σε LDH και με εναπόθεση στη συνέχεια σε υαλώδη άνθρακα.<sup>39</sup> Ο αισθητήρας αυτός χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια στην ανίχνευση κυανίου το οποίο αναστέλλει την οξειδάση της πολυφαινόλης.<sup>40</sup> Η ίδια ερευνητική ομάδα έχει παρασκευάσει επίσης βιοαισθητήρες που ανιχνεύουν ουρία και βασίζονται στην ακινητοποίηση ουρεάσης σε LDH.<sup>41, 42</sup> Μια διαφορετική προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή βιοαισθητήρα γλυκόζης βασισμένο σε LDH.<sup>43</sup> Ένα λεπτό φιλμ Ni-Al-LDH παρασκευάστηκε με ηλεκτροεναπόθεση των μετάλλων σε πλατίνα. Όταν η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα παρουσία οξειδάσης της γλυκόζης τότε το ένζυμο εγκλωβίζεται μέσα στο φιλμ του LDH. Πρέπει να σημειωθεί πάντως πως σε όλες τις παραπάνω εφαρμογές το ένζυμο δεν εισέρχεται στα ενδιάμεσα στρώματα του LDH αλλά εγκλωβίζεται ανάμεσα στα συσσωματωμένα σωματίδια του LDH που προκύπτουν από την εξάτμιση του διαλύματος.

Εκτός από τις πορφυρίνες, τα νουκλεϊκά οξέα, τα φάρμακα και τα ένζυμα που αναφέρθηκαν έχουν παρασκευαστεί νανοϋβρίδια LDH και με άλλα βιομόρια. Έτσι αναφέρεται στη βιβλιογραφία η σύνθεση LDH με λιπαρά οξέα<sup>44-46</sup> και αμινοξέα<sup>47-51</sup> ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει και η σύνθεση LDH με βιοπολυμερή<sup>52</sup> και πολυμερή.<sup>53</sup>

## Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων

Η χορήγηση φαρμάκων πραγματοποιείται συνήθως είτε μέσω της στοματικής οδού (χάπια, κάψουλες) είτε με ενδοφλέβια ένεση. Και στις δύο περιπτώσεις η δραστική ουσία εισέρχεται στο αίμα και κατανέμεται σε ολόκληρο το σώμα του ασθενούς. Παρόλο που το φάρμακο προορίζεται για δράση σε κάποιο συγκεκριμένο όργανο ή σημείο του σώματος, μόνο ένα μικρό ποσοστό θα φτάσει εκεί, ενώ το υπόλοιπο θα απεκκριθεί από τον οργανισμό. Πολλές ανεπιθύμητες παρενέργειες είναι αποτέλεσμα της κατανομής των φαρμάκων σε όλο το σώμα καθώς ορισμένα όργανα ή ιστοί μπορεί να παρουσιάζουν ευαισθησία ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις της δραστικής ουσίας. Επιπλέον πολλές φορές η απέκκριση του φαρμάκου είναι ταχεία και έτσι είναι απαραίτητη η επανάληψη της χορήγησης αρκετές φορές.

Τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων αποτελούν εναλλακτικό τρόπο χορήγησης των δραστικών ουσιών με σκοπό τον περιορισμό των παραπάνω προβλημάτων.<sup>54, 55</sup> Η βασική ιδέα στην οποία στηρίζονται τα συστήματα αυτά είναι η μεταφορά της δραστικής ουσίας από έναν κατάλληλο φορέα σε αντίθεση με την απευθείας χορήγηση του φαρμάκου. Ο σκοπός που καλείται να επιτύχει ο συνδυασμός φορέα-φαρμάκου είναι είτε η ελεγχόμενη απελευθέρωση είτε η στόχευση της δραστικής ουσίας. Κατά αυτό τον τρόπο είναι δυνατόν να επιτευχθεί η διατήρηση της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας στα επιθυμητά επίπεδα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα καθώς επίσης και η επιλεκτική κατανομή της σε συγκεκριμένα όργανα ή ιστούς.

Τα τελευταία χρόνια η ραγδαία ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας παρέχει έναν ολοένα αυξανόμενο αριθμό υλικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς σε συστήματα απελευθέρωσης φαρμάκων. Τα βασικά χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτει ένα υλικό ώστε να χρησιμοποιηθεί σε τέτοια συστήματα είναι: Πρώτον, η βιοσυμβατότητα του υλικού, δηλαδή η έλλειψη τοξικότητας του ίδιου του υλικού καθώς και των μορίων ή στοιχείων που το αποτελούν ή που μπορούν να προκύψουν από την αποικοδόμηση ή τον μεταβολισμό του. Δεύτερον, η δυνατότητα αντιστρεπτής αλληλεπίδρασης του υλικού με τη δραστική ουσία έτσι ώστε να είναι δυνατή η δέσμευση και η απελευθέρωσή της

κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Τέλος, το μέγεθος του υβριδίου φορέα-φαρμάκου του οποίου οι διαστάσεις πρέπει να είναι της τάξης των νανομέτρων ή μικρομέτρων. Οι συνηθέστεροι φορείς που χρησιμοποιούνται σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων ανήκουν σε τρεις κατηγορίες. Αυτές είναι τα οργανικά πολυμερή ή συμπολυμερή, οι αυτο-συγκροτούμενες λιπιδικές δομές και τα ανόργανα υλικά.

Τα πολυμερή ήταν τα πρώτα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων και βρίσκουν ευρύτατη εφαρμογή ακόμα και σήμερα. Αρχικά, την δεκαετία του 1970, κατασκευάστηκαν νανοσωματίδια από πολυακρυλαμίδιο τα οποία, λόγω της τοξικότητας που παρουσίαζαν, αντικαταστάθηκαν από πολυμεθακρυλικά και τελικά από πολυεστέρες.<sup>6</sup> Μεταξύ αυτών οι πολυεστέρες πολυγαλακτικό οξύ και πολυγλυκολικό οξύ καθώς και συμπολυμερή του γαλακτικού και του γλυκολικού οξέος έχουν μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί στο μεγαλύτερο βαθμό.<sup>56</sup> Άλλα πολυμερή που βρίσκουν ευρεία εφαρμογή είναι η πολύ-(ε-καπρολακτόνη), το πολύ-(μέθυλ)μεθακρυλικό οξύ και η πολυαιθυλενογλυκόλη.

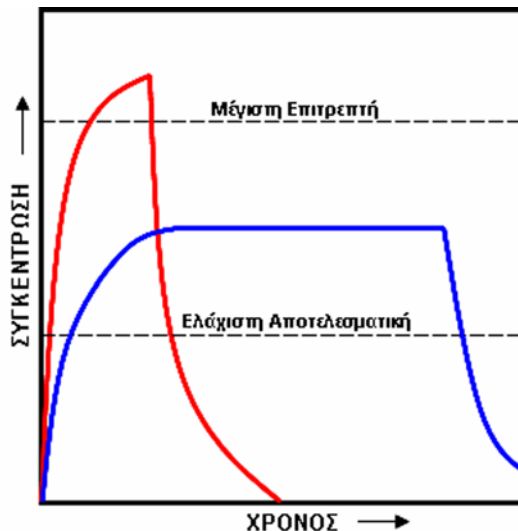
Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα μικύλλια,<sup>57</sup> τα λιποσώματα<sup>58</sup> καθώς και άλλες λιπιδικές δομές.<sup>59</sup> Το χαρακτηριστικό των λιπιδικών νανοσωματιδίων είναι ο σχηματισμός τους από αυθόρμητη αυτό-συγκρότηση λόγω της αμφίφιλης φύσης των μορίων που τα αποτελούν. Η συγκράτηση των μορίων μεταξύ τους από ασθενείς, μη ομοιοπολικές δυνάμεις έχει ως αποτέλεσμα τα συστήματα αυτά να μην είναι αρκετά σταθερά. Ωστόσο η τροποποίηση των αμφίφιλων μορίων με υδρόφιλα πολυμερή όπως η πολυαιθυλενογλυκόλη έχει πολλές φορές ως αποτέλεσμα την σταθεροποίηση των μικυλλίων και την εφαρμογή τους σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.<sup>57, 60-62</sup>

Τα τελευταία χρόνια η χρήση των ανόργανων υλικών σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων συνεχώς αυξάνεται.<sup>7</sup> Τέτοια υλικά είναι για παράδειγμα ο υδροξυαπατίτης,<sup>63</sup> οι νανοσωλήνες άνθρακα,<sup>64</sup> τα φυλλοπυριτικά όπως ο μοντμοριλονίτης<sup>65</sup> ή τα φυλλόμορφα διπλά υδροξείδια (LDH)<sup>12, 33</sup> που χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα διατριβή.<sup>66, 67</sup> Βασικά πλεονεκτήματα των ανόργανων υλικών είναι η χαμηλότερη τοξικότητα συγκριτικά με τα πολυμερή, η

αυξημένη σταθερότητα συγκριτικά με τα μικύλλια ή τα λιποσώματα καθώς και το χαμηλό τους κόστος και η απλή σύνθεσή τους.

### Ελεγχόμενη απελευθέρωση

Η δέσμευση ενός φαρμάκου σε έναν κατάλληλο φορέα δίνει πολλά πλεονεκτήματα συγκριτικά με την χορήγηση του ελεύθερου φαρμάκου. Ένα από αυτά είναι η ελεγχόμενη απελευθέρωση. Η σπουδαιότητά της έγκειται στο γεγονός ότι δίνει τη δυνατότητα να ελεγχθεί η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας συναρτήσει του χρόνου μετά τη χορήγηση. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3 η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας πρέπει να βρίσκεται



**Σχήμα 3.** Σύγκριση συμβατικής χορήγησης (κόκκινο) και ελεγχόμενης απελευθέρωσης (μπλε).

μεταξύ κάποιων ορίων, της ελάχιστης αποτελεσματικής συγκέντρωσης και της μέγιστης επιτρεπτής συγκέντρωσης. Κάτω από την ελάχιστη αποτελεσματική συγκέντρωση η ποσότητα του φαρμάκου δεν είναι αρκετή ώστε να έχει το επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα. Αντίθετα, πάνω από τη μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση η δραστική ουσία καθίσταται τοξική για τον οργανισμό.

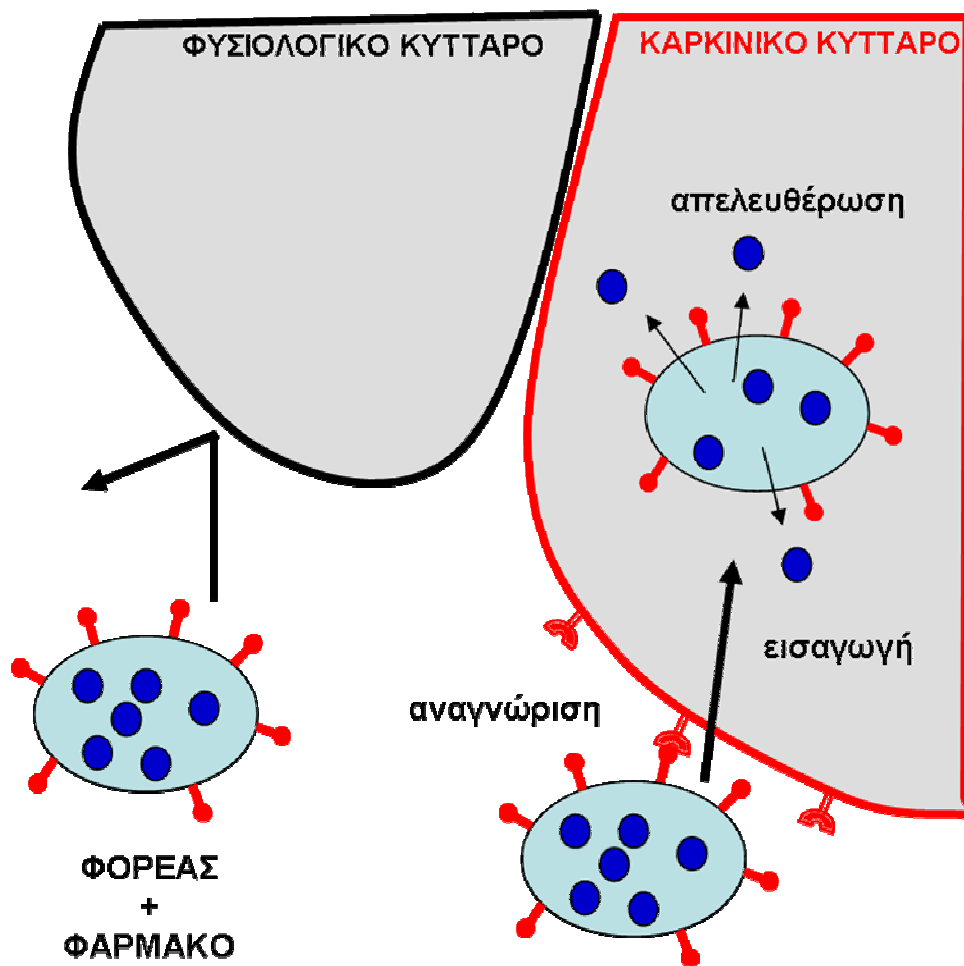
Κατά τη συμβατική χορήγηση η συγκέντρωση της δραστικής ουσίας ανεβαίνει γρήγορα αμέσως μετά τη χορήγηση και έτσι είναι πιθανό να ξεπεράσει τα επιτρεπτά όρια. Στη συνέχεια ο οργανισμός αποβάλλει το φάρμακο και η συγκέντρωση του μειώνεται με γρήγορο, πολλές φορές, ρυθμό. Αν το ίδιο φάρμακο χορηγηθεί μέσω ενός συστήματος ελεγχόμενης απελευθέρωσης, η αύξηση της συγκέντρωσης σε πρώτη φάση είναι πιο ομαλή και στη συνέχεια μένει σταθερή ώσπου να απομακρυνθεί από τον οργανισμό πολύ αργότερα. Αυτό παρατηρείται διότι η ταχύτητα απελευθέρωσης του φαρμάκου στον οργανισμό εξισορροπείται από την ταχύτητα απομάκρυνσής του και έτσι η

συγκέντρωση μένει σταθερή ώσπου να εξαντληθεί η ποσότητα του φαρμάκου που χορηγήθηκε. Το αποτέλεσμα τελικά είναι η διατήρηση της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας στα επιθυμητά επίπεδα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

### Στόχευση

Η σημαντικότερη δυνατότητα που παρέχουν τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων είναι η στόχευση, δηλαδή η επιλεκτική δέσμευση του υβριδίου φάρμακο-φορέας σε συγκεκριμένο κύτταρο-στόχο. Για να επιτευχθεί κάτι τέτοιο ο φορέας πρέπει να έχει τη δυνατότητα εξειδικευμένης βιολογικής αναγνώρισης του στόχου. Τα πλεονεκτήματα ενός στοχευμένου νανοσωματιδίου είναι πολλά. Οδηγώντας τη δραστική ουσία με ακρίβεια στο στόχο της επιτυγχάνεται το μέγιστο θεραπευτικό αποτέλεσμα. Επίσης απαιτείται μικρότερη δόση του φαρμάκου και αποφεύγονται τυχόν παρενέργειες. Ακόμα, φάρμακα που δεν έχουν εγκριθεί λόγω τοξικότητας μπορούν να χορηγηθούν χωρίς κίνδυνο αν η στόχευσή τους σε συγκεκριμένα κύτταρα ή όργανα εξουδετερώνει τις παρενέργειές τους και τα καθιστά μη τοξικά. Πολύ σημαντική είναι επίσης η περίπτωση της θεραπευτικής αγωγής κατά του καρκίνου όπου το ζητούμενο είναι επιλεκτική θανάτωση των καρκινικών κυττάρων (Σχήμα 4). Χρησιμοποιώντας μια ιδιαίτερα κυτταροτοξική ουσία και βάζοντας σαν στόχο ένα συγκεκριμένο τύπο καρκινικών κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί μερική ή και πλήρης εξουδετέρωση του καρκίνου χωρίς παρενέργειες.

Η βιολογική αναγνώριση του στόχου προϋποθέτει την ύπαρξη κατάλληλων μορίων ή πρωτεϊνών, εκτεθειμένων στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων, που να αλληλεπιδρούν με υποδοχείς που βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη στο κύτταρο-στόχο και μόνο σε αυτό. Ειδικά για την περίπτωση του καρκίνου έχουν αναπτυχθεί διάφορες στρατηγικές στόχευσης. Το φυλλικό οξύ χρησιμοποιείται στη στόχευση καρκινικών κυττάρων<sup>68</sup> καθώς έχει παρατηρηθεί πως σε πολλούς τύπους καρκίνου τα καρκινικά κύτταρα υπερεκφράζουν υποδοχείς του φυλλικού οξέος οι οποίοι βρίσκονται στη επιφάνειά τους. Επίσης έχουν παρασκευαστεί αρκετά αντισώματα που αναγνωρίζουν εξειδικευμένα καρκινικούς όγκους<sup>69, 70</sup> καθώς και ολιγοπεπτίδια



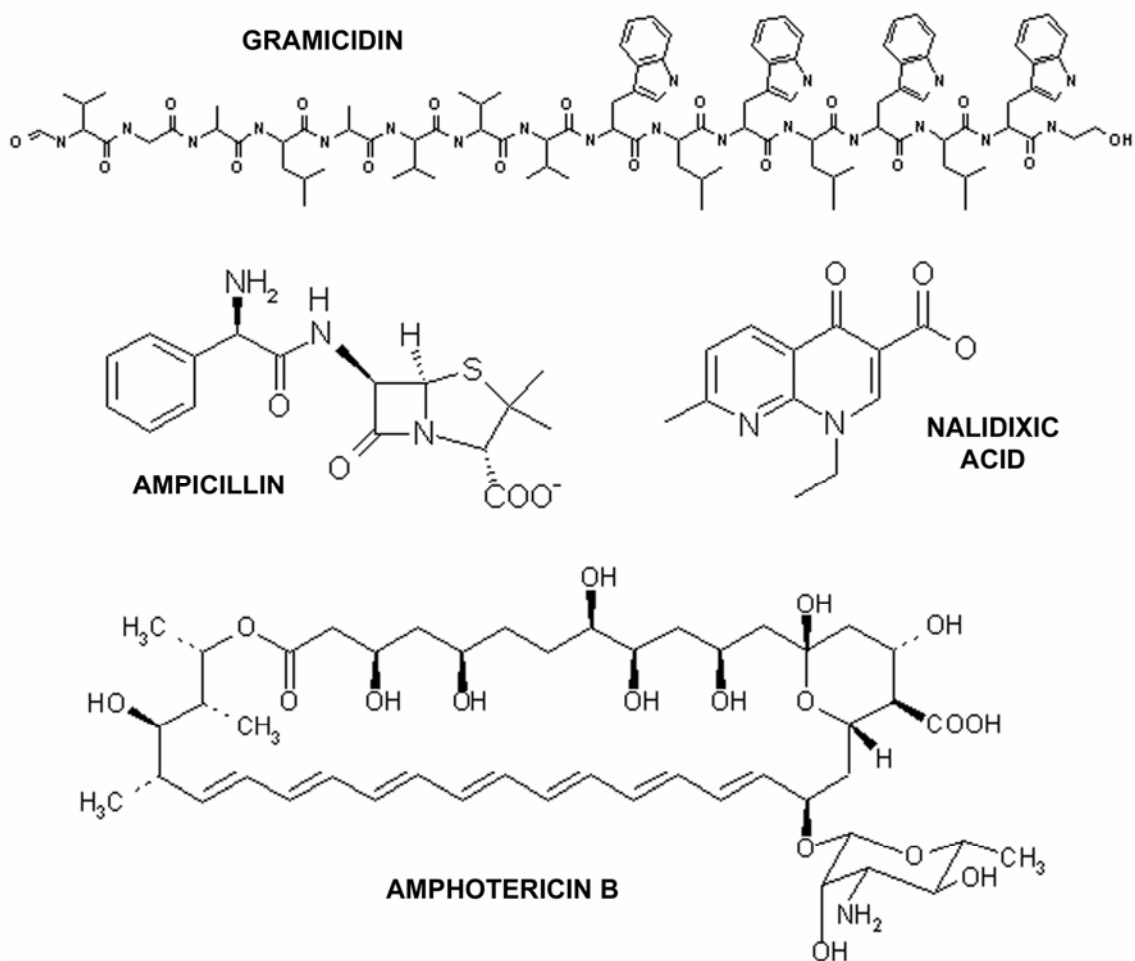
**Σχήμα 4.** Επιλεκτική στόχευση καρκινικών κυττάρων με χρήση κατάλληλα τροποποιημένου φορέα.

που αναγνωρίζονται από καρκινικά κύτταρα.<sup>71</sup> Επίσης, ένα άλλο παράδειγμα στόχευσης είναι η χρήση σακχάρων, όπως η γαλακτόζη, για τη στόχευση μυκήτων.<sup>72</sup>

Αν και η ιδέα της στόχευσης χρονολογείται από το 1954<sup>6</sup> δεν έχει μέχρι σήμερα αξιοποιηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό.<sup>73</sup> Παρόλο που έχουν αναπτυχθεί πολλά «έξυπνα» νανοσωματίδια που μπορούν να αναγνωρίζουν τους στόχους τους σε *in vitro* πειράματα, η εφαρμογή τους σε πειραματόζωα ή ανθρώπους σπάνια έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Ωστόσο πολλοί υποστηρίζουν πως είναι δυνατόν να ξεπεραστούν τα υπάρχοντα προβλήματα και τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων να αποτελέσουν τη νέα γενιά εργαλείων για την αντιμετώπιση των ασθενειών στο μέλλον.

## Αντιβιοτικά

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας τέθηκε ο στόχος της ανάπτυξης ενός συστήματος ελεγχόμενης απελευθέρωσης που να βασίζεται σε νανοϋβρίδια αποτελούμενα από φυλλόμορφα διπλά υδροξείδια και αντιβιοτικά. Έτσι επιλέχθηκαν τέσσερα αντιβιοτικά που αντιπροσωπεύουν τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες. Η αμπικιλίνη που ανήκει στις πενικιλίνες, το ναλιδιξικό που ανήκει στις κινολόνες, η γραμισιδίνη που είναι ένα πολυπεπτιδικό αντιβιοτικό και η αμφοτερικίνη Β που ανήκει στα πολυένια. Οι δομές των τεσσάρων αντιβιοτικών παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.



**Σχήμα 5.** Δομές των τεσσάρων αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν

Η αμπικιλίνη διαθέτει ένα δακτύλιο β – λακτάμης ο οποίος είναι χαρακτηριστικός σε όλες τις πενικιλίνες. Η δράση της οφείλεται στην αναστολή της σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης η οποία συγκρατεί τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων. Συγκεκριμένα η αμπικιλίνη δρα ως συναγωνιστικός αναστολέας του ενζύμου τρανσπεπτιδάση το οποίο καταλύει τη διασύνδεση της πεπτιδογλυκάνης.<sup>74</sup> Η σύνθεση νέου κυτταρικού τοιχώματος είναι απαραίτητη κατά τη διαίρεση των βακτηρίων και η αναστολή της σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης από την αμπικιλίνη έχει ως αποτέλεσμα την κατάρρευση του τοιχώματος και τη θανάτωση του βακτηρίου. Η αμπικιλίνη είναι περισσότερο δραστική κατά των Gram θετικών βακτηρίων καθώς αυτά έχουν πιο παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης σε σχέση με τα Gram αρνητικά βακτήρια. Συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης αμπικιλίνης έχουν αναπτυχθεί στο παρελθόν χρησιμοποιώντας ως φορέα υδρογέλη πολυμεθακρυλικού<sup>75</sup> και υδροξυαπατίτη.<sup>63</sup>

Οι κινολόνες, όπως το ναλιδιξικό οξύ, αναστέλλουν τη δράση της DNA γυράσης των βακτηρίων.<sup>76, 77</sup> Οι κινολόνες είναι περισσότερο δραστικές κατά των Gram αρνητικών βακτηρίων και μελέτες δομής-δραστικότητας έχουν δείξει ότι ο βασικός σκελετός του ναλιδιξικού οξέος με την κέτο-ομάδα στη θέση 4 και την καρβοξυλομάδα στη θέση 3 είναι απαραίτητος για τη δράση τους.<sup>78</sup> Επίσης βρέθηκε ότι ορισμένοι υποκαταστάτες, όπως το φθόριο στη θέση 6 και ένας δακτύλιος πιπεραζίνης στη θέση 7, αυξάνουν το εύρος του φάσματος δράσης του αντιβιοτικού. Η δραστικότητα του ναλιδιξικού οξέος οφείλεται στην ικανότητά του να παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA όταν αυτό βρίσκεται δεσμευμένο στην DNA-γυράση προκειμένου να ξεδιπλωθεί. Έτσι αναστέλλεται η διαδικασία της αντιγραφής του DNA που είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων. Στο παρελθόν έχουν αναπτυχθεί συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης για κινολόνες τα οποία βασίζονταν σε λιποσώματα.<sup>58, 79</sup>

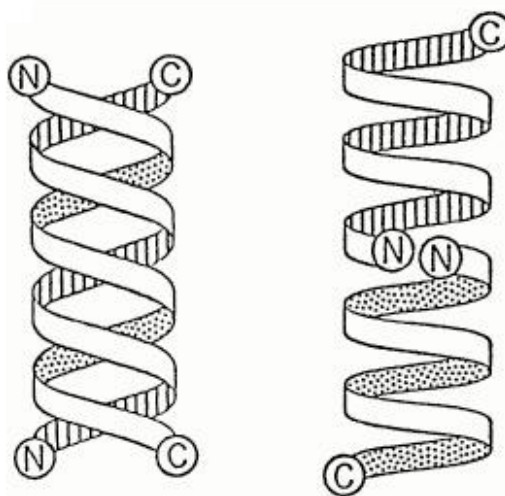
Η γραμισιδίνη είναι ένα πολυπεπτιδικό αντιβιοτικό που παράγεται από το βακτήριο *Bacillus brevis*.<sup>80</sup> Η αντιβιοτική του δράση οφείλεται στο γεγονός ότι σχηματίζει διαμεμβρανικά κανάλια ιόντων και έτσι διαταράσσει την ιοντική ισορροπία του κυττάρου-στόχου. Πρόκειται για ένα μικρό πολυπεπτίδιο 15



αμινοξέων που εμφανίζεται με τη μορφή διμερών. Η πρωτοταγής της δομή παρουσιάζει ορισμένα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά:

Val-Gly-Ala-DLeu-Ala-DVal-Val-DVal-Trp-DLeu-Trp-DLeu-Trp-DLeu-Trp

Πρώτον, πρόκειται για ένα ιδιαίτερα υδρόφοβο μόριο. Δεν περιέχει κανένα φορτισμένο ή πολικό αμινοξύ ενώ ακόμα και τα άκρα της αλυσίδας είναι τροποποιημένα ώστε να μη φέρουν φορτίο. Η τελική αμινομάδα είναι φορμυλιωμένη ενώ το καρβοξύλιο του τελευταίου καταλοίπου θρυπτοφάνης σχηματίζει πεπτιδικό δεσμό με την αμινομάδα ενός μορίου αιθανολαμίνης. Το δεύτερο χαρακτηριστικό της πρωτοταγούς δομής είναι η εναλλαγή D και L αμινοξέων. Η εναλλαγή αυτή έχει επιπτώσεις στη δευτεροταγή δομή της γραμισιδίνης καθώς οι πλευρικές αλυσίδες εξέχουν όλες από την ίδια πλευρά όταν αναδιπλώνεται σε δομή β-πτυχωτής επιφάνειας.



**Σχήμα 6.** Δευτεροταγής δομή της γραμισιδίνης (Προσαρμοσμένο από την αναφορά 80).

Παρά το μικρό της μέγεθος η γραμισιδίνη έχει μάλλον περίπλοκη δομή. Μπορεί να λάβει διαφορετικές διαμορφώσεις ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται. Τα δύο βασικά μοτίβα ανδίπλωσης είναι η διπλή έλικα και το ελικοειδές διμερές (Σχήμα 6). Η πρώτη προτιμάται σε οργανικούς διαλύτες αλλά μπορεί να σχηματιστεί και σε λιπιδικές διπλοστοιβάδες, ενώ η δεύτερη σχηματίζεται αποκλειστικά σε λιπιδικές διπλοστοιβάδες. Η διπλή έλικα σχηματίζεται από μια στρεβλωμένη β-πτυχωτή επιφάνεια στην οποία οι δύο αλυσίδες σχηματίζουν διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου σε όλο το μήκος τους. Στη δομή ελικοειδούς διμερούς, ή αλλιώς δομή καναλιού, οι αλυσίδες σχηματίζουν ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου, εκτός από την περιοχή επαφής στο αμινοτελικό άκρο όπου σχηματίζονται διαμοριακοί δεσμοί.

Στην ανοιχτή τους διαμόρφωση, τόσο ο πόρος της διπλής έλικας όσο και το κανάλι, είναι διαπερατά από μονοσθενή κατιόντα ενώ μπλοκάρονται από δισθενή. Μέσα από ένα ανοιχτό κανάλι διέρχονται περίπου  $10^7$  ιόντα ανά λεπτό αλλά το κανάλι μένει ανοιχτό για περίπου 1 sec. Αντίθετα ο πόρος της διπλής έλικας μένει ανοιχτός για περισσότερο από ένα λεπτό αλλά έχει μικρότερη ιοντική διαπερατότητα.

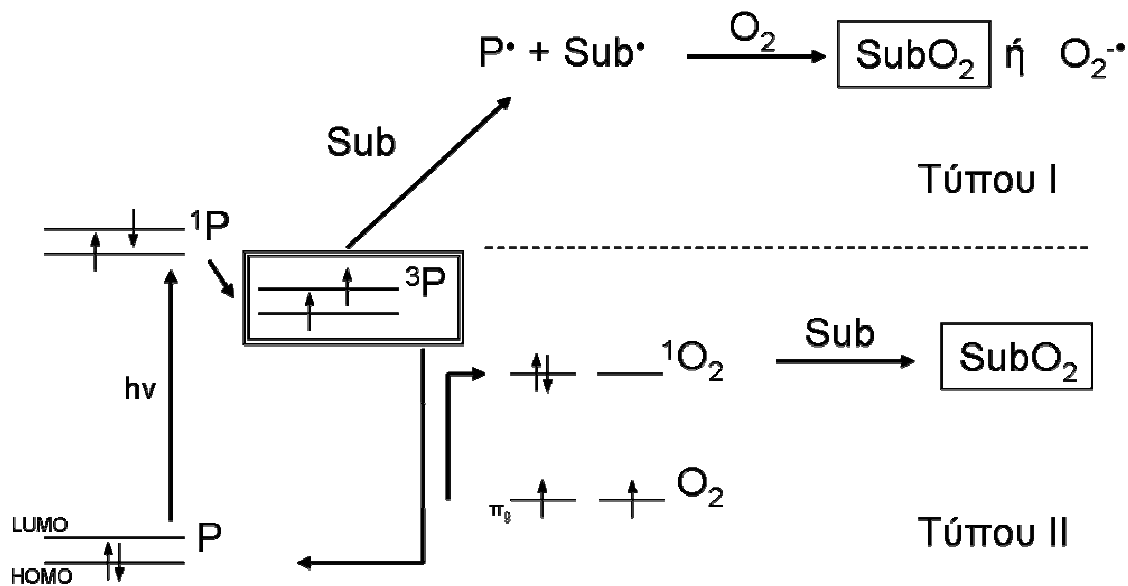
Η αμφοτεरिकίνη Β είναι ένα αντιβιοτικό που ανήκει στα πολυένια και συνήθως χρησιμοποιείται για τη θεραπεία μυκητιακών μολύνσεων σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.<sup>81</sup> Η δραστηριότητά της κατά των μυκήτων οφείλεται στην ικανότητά της να δεσμεύεται στις μεμβράνες αλληλεπιδρώντας με την εργοστερόλη που βρίσκεται εκεί. Η μεγάλη συγγένεια που εμφανίζει η αμφοτεरिकίνη Β για την εργοστερόλη σε σχέση με τη χοληστερόλη εξηγεί την προτίμησή της για τις μεμβράνες των μυκήτων έναντι των μεμβρανών των ανθρώπινων κυττάρων. Συνέπεια της δέσμευσης της αμφοτερικίνης Β στην μεμβράνη είναι ο σχηματισμός πόρων με ακόλουθο αποτέλεσμα τη λύση των κυττάρων του μύκητα. Ωστόσο η τοξικότητα της αμφοτερικίνης Β περιορίζει την ευρεία εφαρμογή της και έτσι για τον περιορισμό των παρενεργειών συνήθως χορηγείται με τη μορφή λιπιδικών σκευασμάτων<sup>82, 83</sup> ενώ το AmBisome®, με δραστική ουσία την αμφοτερικίνη Β, ήταν από τα πρώτα φάρμακα που κυκλοφόρησαν σε μορφή λιποσωμάτων.

Εκτός από τα πλεονεκτήματα της ελεγχόμενης απελευθέρωσης που προαναφέρθηκαν, τα νανοϋβρίδια LDH με αντιβιοτικά πιθανώς να προσφέρουν επιπρόσθετες ιδιότητες. Η συνεχώς αυξανόμενη εμφάνιση βακτηριακών στελεχών με ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά εγείρει ένα σημαντικό πρόβλημα στην τεχνολογία φαρμάκων. Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων οφείλεται είτε σε ένζυμα που αποικοδομούν το αντιβιοτικό είτε σε μεμβρανικές αντλίες που απεκκρίνουν το αντιβιοτικό. Η υβριδοποίηση του αντιβιοτικού με τα LDH μπορεί να το προστατεύσει από την ενζυμική αποικοδόμηση και να εμποδίσει την απέκκρισή του από το βακτήριο.

## Φωτοδυναμική Θεραπεία

Οι συνήθεις θεραπευτικές πρακτικές κατά του καρκίνου περιλαμβάνουν τις ακτινοθεραπείες, τις χημειοθεραπείες και τις χειρουργικές επεμβάσεις ή και συνδυασμό αυτών. Η ύπαρξη σοβαρών παρενεργειών όμως δείχνει την ανάγκη για εναλλακτικές θεραπευτικές προσεγγίσεις. Μία από αυτές είναι η φωτοδυναμική θεραπεία. Πρόκειται για μια μορφή ακτινοθεραπείας για την αντιμετώπιση του καρκίνου και βασίζεται στην θανάτωση των καρκινικών κυττάρων από ενεργές μορφές οξυγόνου.<sup>84, 85</sup> Η παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου, όπως το οξυγόνο απλής κατάστασης  $^1\text{O}_2$  και η ρίζα υπεροξειδίου  $\text{O}_2^-$ , βασίζεται στη φωτοδιέγερση ενός φωτοευαισθητοποιητή. Συνεπώς η επιτυχία της φωτοδυναμικής θεραπείας στηρίζεται στη σωστή συνεργασία τριών παραγόντων: του φωτοευαισθητοποιητή, του φωτός και του οξυγόνου. Εκτός από τη φωτοδυναμική θεραπεία η παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου με τη χρήση φωτοευαισθητοποιητών μπορεί να εφαρμοστεί και για τη θανάτωση βακτηρίων και μυκήτων όπως ο *Staphylococcus aureus*, το *Escherichia coli* και η *Candida albicans*.<sup>86-89</sup>

Υπάρχουν δύο βασικοί μηχανισμοί παραγωγής των ενεργών μορφών οξυγόνου, ο μηχανισμός τύπου I και ο μηχανισμός τύπου II<sup>90</sup> (Σχήμα 7). Και στους δύο μηχανισμούς η εκκίνηση δίνεται με τη φωτοδιέγερση του φωτοευαισθητοποιητή δίνοντας την απλή διεγερμένη κατάσταση η οποία μεταπίπτει αυθόρμητα στην τριπλή. Η τριπλή κατάσταση του φωτοευαισθητοποιητή έχει σημαντικά μεγαλύτερο χρόνο ζωής από την απλή γεγονός που επιτρέπει τη συμμετοχή της σε αντιδράσεις με μόρια που βρίσκονται στο περιβάλλον της. Στο μηχανισμό τύπου I η τριπλή διεγερμένη κατάσταση του φωτοευαισθητοποιητή αντιδρά με κάποιο μόριο μέσα στο κύτταρο με αποτέλεσμα την παραγωγή ριζών. Η ρίζα του βιομορίου μπορεί είτε να οξειδωθεί απευθείας από το οξυγόνο ή να αποσβεστεί παράγοντας τη ρίζα του υπεροξειδίου, εκκινώντας έτσι μια αλυσιδωτή αντίδραση ριζών με τελικό αποτέλεσμα το θάνατο του κυττάρου. Στον μηχανισμό τύπου II η τριπλή διεγερμένη κατάσταση του φωτοευαισθητοποιητή μεταφέρει την ενέργειά της στο οξυγόνο. Έτσι παράγεται το οξυγόνο απλής κατάστασης το οποίο δρα ως



**Σχήμα 7.** Τύπου I και τύπου II μηχανισμοί οξειδωσης κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία.

ισχυρό οξειδωτικό και οξειδώνει τα βιομόρια του κυττάρου με αποτέλεσμα και σε αυτή την περίπτωση τη θανάτωση του κυττάρου.

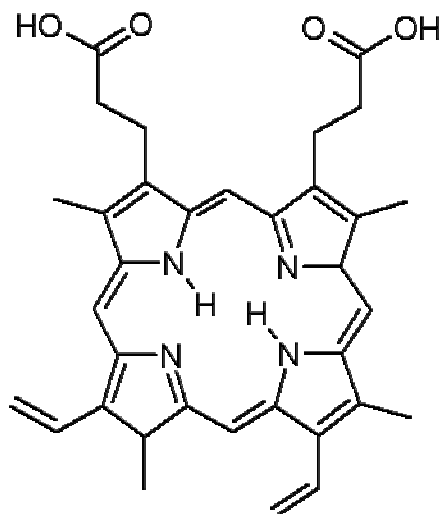
Αν και υπάρχουν ενδείξεις πως και οι δύο μηχανισμοί συμβάλλουν στη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία, πιστεύεται ότι η πλειονότητα των φωτοοξειδώσεων ακολουθούν μηχανισμό τύπου II με οξειδωτικό παράγοντα το οξυγόνο απλής κατάστασης.<sup>91</sup> Ο μηχανισμός τύπου I καθίσταται σημαντικός όταν η ποσότητα του οξυγόνου είναι περιορισμένη και επομένως είναι πιθανότερο ο φωτοευαισθητοποιητής να αντιδράσει με κάποιο υπόστρωμα παρά με το οξυγόνο.

### Φωτοευαισθητοποιητές - πρωτοπορφυρίνη IX

Η χρήση φωτοευαισθητοποιητών είναι μια απλή και ελεγχόμενη μέθοδος για την παραγωγή οξυγόνου απλής κατάστασης.<sup>92</sup> Κάθε μόριο του φωτοευαισθητοποιητή μπορεί να παράγει από  $10^3$  έως και  $10^5$  μόρια οξυγόνου απλής κατάστασης πριν καταστραφεί αντιδρώντας ο ίδιος με το ενεργοποιημένο οξυγόνο. Οι φωτοευαισθητοποιητές που χρησιμοποιούνται στη φωτοδυναμική θεραπεία είναι στην πλειοψηφία τους πορφυρίνες. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε το «παράγωγο της αιματοπορφυρίνης» (HPD) ένα μείγμα πορφυρινών, είτε

μονομερών είτε διμερών και ολιγομερών, που προκύπτει από κατεργασία της αιματοπορφυρίνης.<sup>84, 93</sup> Χρωματογραφικός διαχωρισμός του HPD ώστε να απομακρυνθούν τα μονομερή οδηγεί σε ένα παρασκεύασμα με την εμπορική ονομασία Photofrin®. Το Photofrin® έλαβε έγκριση για κλινική χρήση στον Καναδά το 1993 ενώ το 1998 εγκρίθηκε και στις ΗΠΑ από τον οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων. Ωστόσο το Photofrin® παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα όπως η σύστασή του που δεν είναι αυστηρά καθορισμένη καθώς και η μεγάλη διάρκεια παραμονής του στο ανθρώπινο σώμα που προκαλεί φωτοευαισθησία. Έτσι προέκυψε η ανάγκη της ανάπτυξης μιας νέας γενιάς φωτοευαισθητοποιητών με καλύτερα χαρακτηριστικά. Ένας ιδανικός φωτοευαισθητοποιητής πρέπει να πληρεί τις εξής προϋποθέσεις:<sup>94</sup> (1) Να έχει καθορισμένη σύσταση και χημική καθαρότητα, (2) να παρουσιάζει κυτοτοξικότητα μόνο παρουσία φωτός και όχι στο σκοτάδι, (3) να κατακρατείται από τον επιθυμητό ιστό-στόχο (4) να απεκκρίνεται από το σώμα γρήγορα και (5) να παράγει οξυγόνο απλής κατάστασης σε υψηλή κβαντική απόδοση όταν διεγείρεται με φως μήκους κύματος μεταξύ 600 και 800 nm. Οι πορφυρίνες, οι χλωρίνες και οι φθαλοκυανίνες είναι οι πιο συνηθισμένοι φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς που αναπτύχθηκαν για χρήση στη φωτοδυναμική θεραπεία.<sup>94</sup>

Η πρωτοπορφυρίνη IX (Σχήμα 8) ανήκει στους φωτοευαισθητοποιητές δεύτερης γενιάς και έχει λάβει έγκριση για χρήση στη φωτοδυναμική θεραπεία στην Ευρώπη. Ωστόσο η χρήση της πρωτοπορφυρίνης IX στη φωτοδυναμική θεραπεία δεν γίνεται απευθείας αλλά με χορήγηση της πρόδρομης ένωσης 5-αμινολεβουλινικό οξύ (ALA).<sup>95</sup> Οκτώ μόρια 5-αμινολεβουλινικού οξέος απαιτούνται για τη σύνθεση 4 μορίων πορφοχολινογόνου τα οποία συμπυκνώνονται δίνοντας ένα γραμμικό τετραπυρρόλιο. Η κυκλοποίηση του γραμμικού τετραπυρρόλιου και μια σειρά



**Σχήμα 8.** Δομή της πρωτοπορφυρίνης IX.

χημικών τροποποιήσεων οδηγεί τελικά στη σύνθεση της πρωτοπορφυρίνης IX. Περίπου 6 ώρες μετά τη χορήγηση του ALA η συσσώρευση της πρωτοπορφυρίνης IX στα κύτταρα φτάνει στο μέγιστο βαθμό ενώ μετά από 2 μέρες έχει απομακρυνθεί πλήρως από τον οργανισμό.

### *Οξυγόνο - Υπερφθοράνθρακες*

Η επάρκεια οξυγόνου είναι καθοριστική για την επιτυχία της φωτοδυναμικής θεραπείας.<sup>91, 96</sup> Οι συνήθεις συγκεντρώσεις οξυγόνου στους ιστούς είναι αρκετά υψηλές ώστε να μην περιορίζουν την ταχύτητα της φωτοξείδωσης μέσα στα κύτταρα. Ωστόσο, η γρήγορη κατανάλωσή του κατά τη φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να οδηγήσει σε πτώση της συγκέντρωσής του σε επίπεδα όπου πλέον σταματάει η οξειδωση των βιομορίων. Ένας τρόπος για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό είναι η χρήση υπερφθορανθράκων (PFCs). Οι υπερφθοράνθρακες είναι αλειφατικές ενώσεις στις οποίες όλα τα άτομα υδρογόνου έχουν αντικατασταθεί από φθόριο. Η διαλυτότητα του οξυγόνου σε PFC είναι 20 φορές μεγαλύτερη από ότι στο νερό και περίπου 2 - 3 φορές μεγαλύτερη από ότι στους αντίστοιχους υδρογονάνθρακες.<sup>97</sup> Η ικανότητά τους να διαλύουν μεγάλες ποσότητες αερίων μαζί με την χημική τους σταθερότητα καθιστούν τους υπερφθοράνθρακες ιδανικούς φορείς οξυγόνου.<sup>98, 99</sup> Μάλιστα έχει προταθεί η χρήση διαλυμάτων PFC ως υποκατάστατα του αίματος σε επείγοντα περιστατικά. Μεταξύ των υπερφθορο-καρβοξυλικών οξέων, το υπερφθοροεπτανοϊκό οξύ είναι αυτό που εμφανίζει τη μικρότερη τοξικότητα και την ταχύτερη απέκκριση από το σώμα.<sup>100, 101</sup>

### *Νανοϋβρίδια LDH με πρωτοπορφυρίνη IX*

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας τέθηκε ο στόχος της παρασκευής νανοϋβριδίων LDH με πρωτοπορφυρίνη IX και η εφαρμογή τους στη φωτοδυναμική θεραπεία. Η ικανότητα των LDH να λειτουργούν ως φορείς φαρμάκων και να εισέρχονται σε κύτταρα καθώς και η αποδεδειγμένη ιδιότητα της πρωτοπορφυρίνης IX να παράγει οξυγόνο απλής κατάστασης δίνουν το κίνητρο για την παρασκευή των νανοϋβριδίων. Στη βιβλιογραφία υπάρχει πληθώρα μελετών όπου χρησιμοποιούνται φωτοευαίσθητοποιητές δεσμευμένοι

σε κάποιο φορέα όπως νανοσωματίδια χρυσού<sup>102</sup> ή πυριτίου<sup>103, 104</sup> καθώς και λιποσώματα.<sup>89</sup> Επιπλέον έχουν μελετηθεί νανοϋβρίδια διαφόρων πορφυρινών με πηλούς<sup>21, 105, 106</sup> και φυλλόμορφα διπλά υδροξείδια.<sup>16, 21-23</sup>

Επιπρόσθετοι στόχοι είναι η σύνθεση νανοϋβριδίων που να συνδυάζουν τις ιδιότητες της πρωτοπορφυρίνης ΙΧ ως φωτοευαίσθητοποιητή και του υπερφθοροεπτανοϊκού οξέος ως φορέα οξυγόνου καθώς και τροποποιημένων νανοϋβριδίων που θα στοχεύουν καρκινικά κύτταρα. Τα νέα αυτά υλικά αναμένεται να καταλύουν τη φωτοξείδωση οργανικών υποστρωμάτων παράγοντας οξυγόνο απλής κατάστασης και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη φωτοδυναμική απενεργοποίηση βακτηρίων, μυκήτων και καρκινικών κυττάρων.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Σύνθεση LDH

Η σύνθεση των φυλλόμορφων διπλών υδροξειδίων βασίστηκε στο πρωτόκολλο του Miyata.<sup>9</sup> Σε 200 ml H<sub>2</sub>O προστίθενται ταυτόχρονα δύο διαλύματα: το ένα (200 ml) περιέχει Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> και Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> ενώ το άλλο (200 ml) περιέχει 1.5 M NaOH (300 mmole, 12.0 g). Καθ' όλη τη διάρκεια της προσθήκης διοχετεύεται αέριο άζωτο στο διάλυμα το οποίο αναδεύεται ισχυρά. Επίσης η ροή των δύο διαλυμάτων ρυθμίζεται έτσι ώστε το pH του διαλύματος να παραμένει σταθερό και ίσο με 10.0 ± 0.5 κατά τη διάρκεια της προσθήκης. Όλα τα διαλύματα παρασκευάζονται σε απιονισμένο H<sub>2</sub>O στο οποίο πρώτα διοχετεύεται αέριο άζωτο για 20 min ώστε να απομακρυνθεί ο ατμοσφαιρικός αέρας. Μετά το τέλος της προσθήκης το διάλυμα αναδεύεται για 24 επιπλέον ώρες ώστε να προκύψουν κρύσταλλοι με μικρό μέγεθος.<sup>27</sup> Στη συνέχεια το νιτρικό LDH καταβυθίζεται με φυγοκέντριση σε πεδίο 8000 x g για 15 min, ξεπλένεται δύο φορές με απιονισμένο H<sub>2</sub>O και φυλάσσεται ως αιώρημα σε H<sub>2</sub>O για να αποφευχθεί η συσσωμάτωση των κρυστάλλων.

Η μοριακή αναλογία των νιτρικών αλάτων του Mg και του Al κυμαίνεται από 2/1 έως 4/1. Για την παρασκευή LDH με αναλογία Mg/Al = 2/1 χρησιμοποιείται διάλυμα 0.4 M Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> και 0.2 M Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> ενώ για το LDH με

**Πίνακας 1.** Αναλογίες mole και γραμμαρίων για τη σύνθεση LDH-NO<sub>3</sub> με διαφορετική αναλογία Mg/Al.

LDH-NO <sub>3</sub>	Mg/Al	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O		Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	
		g	mmole	g	mmole
[Mg <sub>2</sub> Al(OH) <sub>6</sub> ]NO <sub>3</sub>	2/1	20.51	80	15.01	40
[Mg <sub>3</sub> Al(OH) <sub>8</sub> ]NO <sub>3</sub>	3/1	23.08	90	11.25	30
[Mg <sub>4</sub> Al(OH) <sub>10</sub> ]NO <sub>3</sub>	4/1	24.62	96	9.00	24



αναλογία Mg/Al = 3/1 0.45 M  $Mg(NO_3)_2$  και 0.15 M  $Al(NO_3)_3$  και για το LDH με αναλογία Mg/Al = 4/1 0.48 M  $Mg(NO_3)_2$  και 0.12 M  $Al(NO_3)_3$ . Οι αναλογίες παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 1.

Η περιεκτικότητα του αιωρήματος σε νιτρικό LDH υπολογίζεται λαμβάνοντας 4 δείγματα του 1 ml τα οποία φυγοκεντρώνται, ξεπλένονται με ακετόνη και αφήνονται να στεγνώσουν μέχρι να αποκτήσουν σταθερό βάρος. Από το μέσο όρο των 4 δειγμάτων υπολογίζεται η περιεκτικότητα του αιωρήματος η οποία κυμαίνεται συνήθως από 15-30 mg/ml ή 1.5-3.0 % w/v.

Το LDH- $CO_3$  μπορεί να προκύψει εύκολα από το νιτρικό LDH με ιονανταλλαγή. Αρχικά το LDH- $NO_3$  φυγοκεντρείται και στη συνέχεια επαναιωρείται σε διάλυμα 0.1 M  $Na_2CO_3$ . Μετά από 1 h ανάδευση επαναλαμβάνεται η φυγοκέντριση και επαναιωρήση του LDH σε 0.1 M  $Na_2CO_3$ . Τελικά, μετά από άλλες 18 h ανάδευση λαμβάνεται το LDH- $CO_3$ , το οποίο ξεπλένεται και φυλάσσεται όπως προαναφέρθηκε και για το LDH- $NO_3$ .

## **Χημική τροποποίηση του LDH**

### *Τροποποίηση με αμινοπρόπυλο-σιλάνιο*

Η αντίδραση τροποποίησης με APTS βασίστηκε σε γνωστές από τη βιβλιογραφία διαδικασίες τόσο σε LDH<sup>107, 108</sup> όσο και σε αργιλοπυριτικά υλικά.<sup>109</sup> Συγκεκριμένα, σε 50 ml τολουόλιο προστίθεται 1.0 g LDH- $CO_3$  και το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού. Στη συνέχεια προστίθενται 2.0 ml APTS και το διάλυμα αναδεύεται σε συνθήκες βρασμού για 2 h. Αφού κρυώσει, το διάλυμα φυγοκεντρείται στα 18000 x g για 15 min, το ίζημα ξεπλένεται δύο φορές με τολουόλιο και μία με αιθανόλη και τελικά ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου.

### *Ομοιοπολική δέσμευση φυλλικού οξέος και βιοτίνης*

Σε 70 ml DMSO διαλύονται 2.0 mmol (0.88 g) φυλλικού οξέος και προστίθενται 2.0 mmol DCC (0.41 g) και 2.0 mmol πυριδίνη (160 μl). Ακολουθεί ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα ώστε να ολοκληρωθεί η ενεργοποίηση των καρβοξυλομάδων του φυλλικού οξέος. Στη συνέχεια προστίθεται στάγδην διάλυμα DMSO (10 ml) που περιέχει 200 mg

τροποποιημένου LDH ( $[\text{LDH}(\text{Si-NH}_2)]\text{CO}_3$ ) και το μίγμα αναδεύεται για 18h. Το προϊόν  $[\text{LDH}(\text{φυλλικό})]\text{CO}_3$  απομονώνεται με φυγοκέντρηση στα 18000 x g για 15 min και ξεπλένεται δύο φορές με 80 ml DMSO.

Παρόμοια διαδικασία ακολουθείται και για την παρασκευή του  $[\text{LDH}(\text{βιοτίνη})]\text{CO}_3$ . Σε 35 ml DMSO διαλύεται 1.0 mmol βιοτίνη (0.24 g) και προστίθεται 1.0 mmol DCC (0.21 g) και 1.0 mmol πυριδίνη (80 μl). Ακολουθεί ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα ώστε να ολοκληρωθεί η ενεργοποίηση των καρβοξυλομάδων της βιοτίνης. Στη συνέχεια προστίθεται στάγδην διάλυμα DMSO (5 ml) που περιέχει 100 mg τροποποιημένου LDH και το μίγμα αναδεύεται για 18h. Το προϊόν  $[\text{LDH}(\text{βιοτίνη})]\text{CO}_3$  απομονώνεται με φυγοκέντρηση στα 18000 x g για 15 min και ξεπλένεται δύο φορές με 80 ml DMSO.

### **Σύνθεση νανοϋβριδίων LDH με αντιβιοτικά**

Η σύνθεση των νανοϋβριδίων με αντιβιοτικά ή πρωτοπορφυρίνη IX βασίστηκε στην ιονανταλλακτική ικανότητα του νιτρικού LDH.<sup>13</sup> Σε όλες τις αντιδράσεις που αναφέρονται παρακάτω χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό που έχει απαερωθεί υπό ροή αζώτου για 20 min. Επίσης μετά από την ολοκλήρωση της κάθε αντίδρασης το προϊόν συλλέγεται με φυγοκέντρηση και το ίζημα ξεπλένεται τουλάχιστον δύο φορές με  $\text{H}_2\text{O}$ . Στη συνέχεια είτε διηθείται υπό κενό και ξηραίνεται, ή φυλάσσεται σε μορφή αιωρήματος σε σφραγισμένο δοχείο.

#### *LDH-χολικό-γραμισιδίνη*

Η γραμισιδίνη αρχικά διαλύεται σε 2,2,2-τριφθοροαιθανόλη ώστε να προκύψει διάλυμα περιεκτικότητας 10 mg/ml. Από αυτό το διάλυμα προστίθενται 1.5 ml (15 mg γραμισιδίνης) σε υδατικό διάλυμα που περιέχει 0.65 g χολικό νάτριο (1.5 mmol) και 0.12 g Tris (1.0 mmol) και στη συνέχεια προστίθεται κατάλληλος όγκος του αιωρήματος του  $\text{LDH-NO}_3$  που αντιστοιχεί σε 0.50 g  $\text{LDH-NO}_3$ . Ο τελικός όγκος του μίγματος της αντίδρασης είναι 50 ml και το pH ρυθμίζεται στο 9.0 με την προσθήκη μικρής ποσότητας διαλύματος HCl. Η ιονανταλλαγή ολοκληρώνεται με ανάδευση για 18 h σε θερμοκρασία δωματίου.

### *LDH-χολικό-αμφοτερικίνη B και LDH-αμφοτερικίνη B*

Παρασκευάστηκαν δύο νανοϋβρίδια με αμφοτερικίνη B, ένα με χολικό νάτριο και ένα χωρίς. Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αμφοτερικίνης B σε DMSO με περιεκτικότητα 25 mg/ml. Για την παρασκευή του πρώτου, 4 ml από το διάλυμα (100 mg αμφοτερικίνης B) προστέθηκαν σε υδατικό διάλυμα χολικού νατρίου (0.22 g, 0.5 mmol) ρυθμισμένο σε pH = 9.0 με Tris (0.12 g, 1.0 mmol). Στη συνέχεια προστίθεται κατάλληλος όγκος του αιωρήματος του LDH-NO<sub>3</sub> που αντιστοιχεί σε 0.20 g LDH-NO<sub>3</sub> με αποτέλεσμα ο τελικός όγκος του μίγματος της αντίδρασης να είναι 50 ml. Η ιονανταλλαγή ολοκληρώνεται με ανάδευση για 18 h σε θερμοκρασία δωματίου απουσία φωτός.

Για την παρασκευή του νανοϋβριδίου που δεν περιέχει χολικό η διαδικασία είναι η εξής: 5 ml από το διάλυμα αμφοτερικίνης B σε DMSO προστέθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris (0.12 g, 1.0 mmol) το οποίο περιείχε μικύλλια του μη ιονικού απορρυπαντικού Hecameg (0.25 g, 0.75 mmol). Στη συνέχεια προστίθεται κατάλληλος όγκος του αιωρήματος του LDH-NO<sub>3</sub> που αντιστοιχεί σε 0.15 g LDH-NO<sub>3</sub> με αποτέλεσμα ο τελικός όγκος του μίγματος της αντίδρασης να είναι 50 ml. Η αντίδραση ιονανταλλαγής ολοκληρώνεται με ανάδευση για 18 h σε θερμοκρασία δωματίου απουσία φωτός.

### *LDH-αμπικικιλίνη*

Για την παρασκευή του νανοϋβριδίου LDH-αμπικικιλίνη διαλύονται 0.74 g (2.0 mmol) αμπικικιλίνης (στη μορφή του μετά νατρίου αλατός της) σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM ιμιδαζολίου. Το pH ρυθμίζεται στο 9.0 και κατόπιν προστίθεται κατάλληλος όγκος αιωρήματος νιτρικού LDH που περιέχει 0.20 g LDH-NO<sub>3</sub>. Μετά την προσθήκη ο τελικός όγκος του διαλύματος της αντίδρασης είναι 40 ml. Η αντίδραση ολοκληρώνεται μετά από 4 μέρες ανάδευσης σε θερμοκρασία δωματίου.

### *LDH-ναλιδιξικό οξύ*

Το ναλιδιξικό οξύ (0.50 g, 1.3 mmol) προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 10 mM και στη συνέχεια προστίθεται στάγδην πυκνό διάλυμα NaOH ώσπου

το pH του διαλύματος να φτάσει το 10.5 και το οξύ να διαλυθεί πλήρως. Στη συνέχεια προστίθεται κατάλληλος όγκος αιωρήματος LDH που περιέχει 0.30 g LDH-NO<sub>3</sub> και το διάλυμα, τελικού όγκου 80 ml, αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4 μέρες.

## **Σύνθεση νανοϋβριδίων LDH με πρωτοπορφυρίνη IX**

### *LDH-ppIX*

Το δινάτριο άλας της πρωτοπορφυρίνης IX (0.55 g, 0.90 mmol) προστίθεται σε διάλυμα Triton X-100 (72 ml H<sub>2</sub>O, 4 ml Triton). Το διάλυμα αυτό προστίθεται στάγδην σε 300 ml ρυθμιστικό διάλυμα Tris (0.97 g, 8.0 mmol) και στη συνέχεια το pH ρυθμίζεται στο 9.0. Τελικά προστίθενται 24 ml διαλύματος LDH που αντιστοιχούν σε 0.50 g LDH-NO<sub>3</sub> οπότε ο τελικός όγκος είναι 400 ml, η τελική συγκέντρωση του Tris είναι 20 mM και η τελική περιεκτικότητα σε Triton είναι 1.0 % v/v. Το μίγμα αυτό αναδεύεται προστατευμένο από το φως για 48 h σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το προϊόν φυγοκεντρείται σε πεδίο 25000 x g για 15 min. Το ίζημα αρχικά ξεπλένεται 3 – 4 φορές με 400 ml διάλυμα Triton 1.0 % v/v ώσπου το υπερκείμενο να είναι άχρωμο. Ακολουθούν άλλες δύο εκπλύσεις με απιονισμένο νερό και μία με αιθανόλη. Τελικά το ίζημα ξηραίνεται και φυλάσσεται σε ξηραντήρα στους 4 °C.

### *LDH-ppIX-παλμιτικό και LDH-ppIX-PFC*

Τα νανοϋβρίδια στα οποία συνυπάρχει η πρωτοπορφυρίνη IX με κάποιο καρβοξυλικό οξύ όπως το παλμιτικό οξύ ή το υπερφθοροεπτανοϊκό οξύ παρασκευάζονται ακολουθώντας παρόμοια διαδικασία με αυτή της παρασκευής του LDH-ppIX. Το καρβοξυλικό οξύ προστίθεται μαζί με την πρωτοπορφυρίνη στο διάλυμα του Triton και στη συνέχεια ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως και στην περίπτωση του νανοϋβριδίου LDH-ppIX. Η μοριακή αναλογία μεταξύ πορφυρίνης και καρβοξυλικού οξέος ήταν 1/8 στην περίπτωση του LDH-ppIX-παλμιτικό και 1/3 στην περίπτωση του LDH-ppIX-PFC.

Με σκοπό τη σύγκριση των ιδιοτήτων τους παρασκευάστηκαν και νανοϋβρίδια LDH με παλμιτικό οξύ ή υπερφθοροεπτανοϊκό οξύ χωρίς πρωτοπορφυρίνη IX. Η σύνθεση αυτών πραγματοποιείται όπως περιγράφεται παραπάνω, αλλά χωρίς την προσθήκη της πορφυρίνης. Έτσι παρασκευάστηκαν τα νανοϋβρίδια LDH-PFC και LDH-παλμιτικό.

#### *[LDH(φυλλικό)]ppIX*

Το δινάτριο άλας της πρωτοπορφυρίνης IX (60 mg, 0.10 mmol) προστίθεται σε διάλυμα Triton X-100 (12 ml H<sub>2</sub>O, 1.0 ml Triton). Το διάλυμα αυτό προστίθεται στάγδην σε 70 ml ρυθμιστικό διάλυμα Tris (0.24 g, 2.0 mmol) και στη συνέχεια το pH ρυθμίζεται στο 7.0. Τελικά προστίθενται 17 ml διαλύματος [LDH(φυλλικό)]CO<sub>3</sub> που αντιστοιχούν σε 0.10 g οπότε ο τελικός όγκος είναι 100 ml, η τελική συγκέντρωση του Tris είναι 20 mM και η τελική περιεκτικότητα σε Triton είναι 1.0 % v/v. Το μίγμα αυτό αναδεύεται προστατευμένο από το φως για 48 h σε θερμοκρασία δωματίου.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το προϊόν φυγοκεντρείται σε πεδίο 25000 x g για 15 min. Το ίζημα ξεπλένεται δύο φορές με 200 ml ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Tris με Triton 1.0 % v/v και άλλες δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα. Τελικά φυλάσσεται ως αιώρημα στους 4 °C.

#### *[LDH(αλγινικό)]ppIX*

Αρχικά συντίθεται LDH-ppIX όπως περιγράφεται παραπάνω και μετά τις εκπλύσεις με διάλυμα Triton και με απιονισμένο H<sub>2</sub>O το διάλυμα φυγοκεντρείται και κατόπιν επαναιωρείται σε διάλυμα 0.1 % w/v αλγινικού νατρίου, το pH ρυθμίζεται στο 9.0 και το διάλυμα αναδεύεται για 24 h. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντριση στα 25000 x g για 15 min και δύο εκπλύσεις με απιονισμένο H<sub>2</sub>O. Η τελευταία φυγοκέντριση πραγματοποιείται σε πεδίο 1000 x g για 10 min ώστε να απομακρυνθούν τα συσσωματωμένα σωματίδια. Το υπερκείμενο διηθείται μέσω χάρτινου ηθμού (Whatman # 40) και το διήθημα φυλάσσεται στους 4 °C.

## Χαρακτηρισμός

Τα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ ελήφθησαν σε περιθλασίμετρο Rigaku RINT 2000 με πηγή ακτίνων Χ Cu K $\alpha$  ( $\lambda=1.54 \text{ \AA}$ ) με τάση 40kV και ένταση 178mA. Για τα φάσματα υπεριώθρου χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer 1760X με την τεχνική των δίσκων KBr. Τα φάσματα υπεριώδους-ορατού ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο SLM-Aminco DW2000. Τα φάσματα φθορισμού ελήφθησαν σε φθορισμόμετρο Aminco-Bowman Series 2. Για το χαρακτηρισμό με θερμοσταθμική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Pyris Diamond TG/DTA της Perkin Elmer και επιλέχθηκε ταχύτητα αύξησης της θερμοκρασίας 10 °C / min.

### *Ποσοτική ανάλυση με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού*

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των οργανικών μορίων (αντιβιοτικά, πρωτοπορφυρίνη IX, φυλλικό οξύ) στα νανοϋβρίδια που παρασκευάστηκαν βασίστηκε στη μέτρηση των χαρακτηριστικών ζωνών απορρόφησης στα ηλεκτρονικά φάσματα υπεριώδους-ορατού. Για τον ακριβή προσδιορισμό της απορρόφησης του κάθε δείγματος απαιτείται η διάλυση των ανόργανων

**Πίνακας 2.** Μήκη κύματος και συντελεστές απορρόφησης (σε διάλυμα 80 % v/v αιθανόλη με 0.2 M HCl) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που δεσμεύτηκαν στο LDH.

Αναλύτης	Μήκος κύματος (nm)	$\epsilon$ (cm <sup>-1</sup> ·mM <sup>-1</sup> )
Αμπικιλίνη	270	0.113
Αμφοτερικίνη Β	417	59.0
Γραμισιδίνη	282	23.3
Ναλιδιξικό οξύ	320	9.80
Πρωτοπορφυρίνη IX	411	289
	558	17.3
Φυλλικό οξύ	294	19.6

στρωμάτων του LDH ώστε το διάλυμα που θα προκύψει να είναι διαυγές. Έτσι επιλέχθηκε ως διαλύτης ένα μίγμα υδροχλωρικού οξέος και αιθανόλης στο οποίο διαλύεται τόσο το LDH όσο και τα οργανικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα σε 80 % αιθανόλη – 20 % νερό, οξιμισμένο με 0.2 M HCl, διαλύθηκαν μερικά mg δείγματος έτσι ώστε η περιεκτικότητά του να είναι μεταξύ 50 – 500 μg / ml. Για την αμφοτερική Β προτιμήθηκε DMSO αντί για αιθανόλη. Μετά από 10 min ανάδευση το ανόργανο μέρος του δείγματος έχει διαλυθεί και μετράται η απορρόφηση στο χαρακτηριστικό μήκος κύματος για κάθε ένωση. Τα μήκη κύματος για κάθε ένωση καθώς και οι συντελεστές απορρόφησης που προσδιορίστηκαν με τη μέτρηση προτύπων διαλυμάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πρέπει να σημειωθεί πως στην περίπτωση του ναλιδιξικού οξέος η απορρόφηση στα 320 nm οφείλεται στο σύμπλοκο του αντιβιοτικού με ιόντα  $Mg^{2+}$  που απελευθερώνονται κατά την όξινη υδρόλυση του LDH.<sup>78, 110</sup> Για να εξασφαλιστούν όμοιες συνθήκες στην κατασκευή της πρότυπης καμπύλης οι μετρήσεις των προτύπων διαλυμάτων ναλιδιξικού οξέος έγιναν παρουσία 5 mM  $MgCl_2$ .

## Κυτταρικές καλλιέργειες

### *Καλλιέργεια του μύκητα Saccharomyces cerevisiae*

Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο YPD ( 1% w/v Yeast extract, 2% w/v Peptone και 2% w/v γλυκόζη). Συγκεκριμένα, σε 20 ml αποστειρωμένου YPD προστίθεται μία αποικία του μύκητα από στερεή καλλιέργεια. Μετά από ανάδευση σε θερμοκρασία 37 °C για 48 h το διάλυμα περιέχει περίπου  $10^7$ - $10^8$  κύτταρα ανά ml. Η καταβύθιση των κυττάρων επιτυγχάνεται με φυγοκέντριση σε πεδίο 500 x g για 3 min. Το ίζημα επαναιωρείται σε κατάλληλο όγκο αποστειρωμένου ρυθμιστικού διαλύματος PBS (100 mM  $Na_2HPO_4$ , 0.9 % NaCl, pH = 7.2) ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή πυκνότητα κυττάρων για περαιτέρω εφαρμογή.

Η βιωσιμότητα των μυκήτων μετρήθηκε μέσω της μεταβολικής τους δραστηριότητας με τη μέθοδο MTT.<sup>111, 112</sup> Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην

μετατροπή της ένωσης MTT σε αδιάλυτη φορμαζάνη από την ηλεκτρική αφυδρογονάση.<sup>113</sup> Η συγκέντρωση της φορμαζάνης προσδιορίζεται χρωματομετρικά και σχετίζεται ευθέως με την ποσότητα των μεταβολικά ενεργών κυττάρων στο διάλυμα. Συγκεκριμένα, σε 0.5 ml από διάλυμα του μύκητα σε PBS προστίθεται 0.5 ml διαλύματος MTT (0.5 mg / ml) και ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 2 h. Στη συνέχεια τα κύτταρα καταβυθίζονται με φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται 1.0 ml DMSO ώστε να διαλυθεί η φορμαζάνη. Ακολουθεί ανάδευση για 5 min και φυγοκέντρωση μετά από την οποία μετράται η απορρόφηση του υπερκείμενου στα 570 nm.

### *Καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων HeLa*

Η καρκινική κυτταρική σειρά HeLa αναπτύχθηκε σε θρεπτικό μέσο MEM με 10 % v/v FBS και 2.0 mM γλουταμίνη, 0.15 % w/v NaHCO<sub>3</sub>, 1.0 mM πυροσταφυλικό νάτριο και 0.1 mM από τα μη απαραίτητα αμινοξέα. Περίπου 10<sup>5</sup> κύτταρα προστίθενται σε φιάλη καλλιέργειας που περιέχει 7 ml θρεπτικού μέσου MEM και τοποθετούνται σε θάλαμο επώασης στους 37 °C σε ατμόσφαιρα 5 % CO<sub>2</sub>. Όταν η επιφάνεια της φιάλης έχει καλυφθεί το διάλυμα απορρίπτεται και τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με 5 ml PBS. Στη συνέχεια προστίθενται 2 ml διαλύματος θρυψίνης και ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 3-4 min ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια της φιάλης. Κατόπιν προστίθενται 5 ml MEM και το αιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται σε πεδίο 400 x g για 2 min, ξεπλένεται με MEM και μετράται η πυκνότητα των κυττάρων. Το αιώρημα των καρκινικών κυττάρων που προκύπτει μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανακαλλιέργεια οπότε αραιώνεται κατάλληλα και προστίθεται σε φιάλες καλλιέργειας ή χωρίζεται σε δείγματα για να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω εφαρμογές.

## **Εφαρμογές των νανοϋβριδίων**

### *Προσδιορισμός ρυθμού απελευθέρωσης των αντιβιοτικών*

Η μέτρηση της ποσότητας του αντιβιοτικού που απελευθερώνεται από το νανοϋβρίδιο σε διάφορα χρονικά διαστήματα προσδιορίζεται με φασματοσκοπία



υπεριώδους-ορατού. Το κάθε νανοϋβρίδιο προστίθεται σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris, pH = 7.0 και αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου με την ποσότητα που προστίθεται να κυμαίνεται από 40 µg/ml έως 1.0 mg/ml. Στην περίπτωση των υδρόφιλων αντιβιοτικών, αμπικιλίνη και ναλιδιξικό οξύ, οι μετρήσεις γίνονται παρουσία 0.2 M NaCl ή χωρίς καθόλου NaCl. Τα υδρόφοβα αντιβιοτικά, αμφοτερικίνη B και γραμισιδίνη, απελευθερώνονται σε διάλυμα 0.5 % w/v δωδέκυλο μαλτοζίτη, παρουσία 0.2 M NaCl στην περίπτωση της αμφοτερικίνης B και χωρίς NaCl στην περίπτωση της γραμισιδίνης. Σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα αφαιρείται δείγμα 1.5 ml, φυγοκεντρείται και διηθείται διαμέσου φίλτρου πολυμερικής μεμβράνης με διάμετρο πόρων 0.2 µm. Η απορρόφηση του διηθήματος στο χαρακτηριστικό για το κάθε αντιβιοτικό μήκος κύματος μετράται και απεικονίζεται συναρτήσεως του χρόνου. Τα χαρακτηριστικά μήκη κύματος απορρόφησης των αντιβιοτικών σε ουδέτερο pH είναι: 257 nm για την αμπικιλίνη, 283 nm για την γραμισιδίνη, 335 nm για το ναλιδιξικό οξύ και 415 nm για την αμφοτερικίνη B.

#### *Φωτοοξειδωση οργανικών υποστρωμάτων καταλυόμενη από νανοϋβρίδια LDH-ppIX*

Η φωτοκαταλυτική δραστηριότητα των νανοϋβριδίων LDH-ppIX και LDH-ppIX-PFC καθώς και της ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX υπολογίζεται μετρώντας την κατανάλωση O<sub>2</sub> κατά την οξειδωση του ιμιδαζολίου, του 2,3-διμέθυλο-2-βουτενίου ή του λινελαϊκού οξέος. Η συγκέντρωση του οξυγόνου μετριέται με ηλεκτρόδιο τύπου Clark (Yellow Spring Instruments, model 5300). Μια μικρή ποσότητα πρωτοπορφυρίνης IX, LDH-ppIX ή LDH-ppIX-PFC διαλύεται σε 15 ml ρυθμιστικού διαλύματος (Tris, pH = 8.0) με 1.0 % w/v Triton X – 100 και στη συνέχεια αναδεύεται για 15 min σε ατμόσφαιρα O<sub>2</sub>. Η ποσότητα της πορφυρίνης σε κάθε διάλυμα μετρήθηκε όπως αναφέρεται παραπάνω. Για κάθε αντίδραση φωτοοξειδωσης τοποθετούνται 3 ml από το οξυγονωμένο διάλυμα στην κυψελίδα του ηλεκτροδίου Clark και προστίθενται 0.3 µmole ιμιδαζόλιο ή 2,3-διμέθυλο-2-βουτενίου ή 0.03 µmole λινελαϊκό οξύ. Η αντίδραση ξεκινάει

ανάβοντας δύο λάμπες ορατής ακτινοβολίας ισχύος 350 W εκατέρωθεν της κυψελίδας.

### *Φωτοδυναμική απενεργοποίηση του *S.cerevisiae* με τη χρήση νανοϋβριδίων LDH-ppIX*

Σε 4 γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες με 3.9 ml PBS και περίπου  $10^8$  κύτταρα ανά ml προστίθενται 100 μl από: (Α) DMF, (Β) πρωτοπορφυρίνη IX σε DMF, (Γ) LDH-ppIX σε DMF και (Δ) LDH-ppIX-παλμιτικό σε DMF. Η τελική συγκέντρωση της πορφυρίνης στα Β, Γ και Δ είναι 3.5 μM. Ακολουθεί επώαση για 30 min στους 37 °C απουσία φωτός και στη συνέχεια φωτισμός των διαλυμάτων για 2 h υπό ανάδευση. Ο φωτισμός πραγματοποιείται με δύο λάμπες ορατής ακτινοβολίας ισχύος 350 W διαμέσου γυάλινων φίλτρων ώστε να απομακρύνεται η ακτινοβολία με μήκος κύματος μικρότερο από 320 nm. Από κάθε σωλήνα απομακρύνονται δείγματα όγκου 0.5 ml σε 4 χρονικά σημεία: (1) πριν την επώαση με πρωτοπορφυρίνη IX, (2) πριν την έναρξη του φωτισμού, (3) μετά από 1 h φωτισμού και (4) μετά από 2 h φωτισμού. Σε κάθε δείγμα προστίθεται 0.5 ml διαλύματος MTT ώστε να μετρηθεί το ποσοστό των μυκήτων που παραμένουν ζωντανοί σε κάθε χρονικό σημείο.

### *Δέσμευση των τροποποιημένων νανοϋβριδίων LDH-ppIX σε καρκινικά κύτταρα HeLa*

12 δείγματα αποτελούμενα από  $5 \times 10^4$  κύτταρα σε 0.5 ml MEM το καθένα επωάζονται για 24 h στους 37 °C σε 5 % CO<sub>2</sub>. Στη συνέχεια το διάλυμα απορρίπτεται και προστίθεται στο κάθε δείγμα 0.5 ml MEM που περιέχει είτε ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX ή [LDH(φυλλικό)]ppIX. Συγκεκριμένα, τα δείγματα χωρίστηκαν σε 4 ομάδες στις οποίες προστίθεται: (1) θρεπτικό μέσο MEM (τυφλό), (2) MEM με πρωτοπορφυρίνη IX, (3) MEM με [LDH(φυλλικό)]ppIX και (4) MEM με [LDH(φυλλικό)]ppIX και 0.1 mM φυλλικό οξύ. Επιπλέον παρασκευάζονται τυφλά δείγματα τοποθετώντας διάλυμα MEM με πρωτοπορφυρίνη IX και διάλυμα MEM με [LDH(φυλλικό)]ppIX και 0.1 mM φυλλικό οξύ σε θέσεις όπου δεν είχαν καλλιεργηθεί κύτταρα. Σε όλα τα δείγματα η τελική συγκέντρωση της πορφυρίνης ήταν 1.0 μM. Τα δείγματα επωάζονται για

30 min στους 37 °C σε 5 % CO<sub>2</sub> και στη συνέχεια ξεπλένονται 2 φορές με PBS. Ακολούθως προστίθεται διάλυμα 1.0 % v/v Triton X-100 και πραγματοποιείται επώαση για 24 h. Τέλος μετριέται η ένταση φθορισμού των δειγμάτων στα 630 nm, με διέγερση στα 410 nm, από την οποία αφαιρείται η ένταση φθορισμού των αντίστοιχων τυφλών δειγμάτων.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

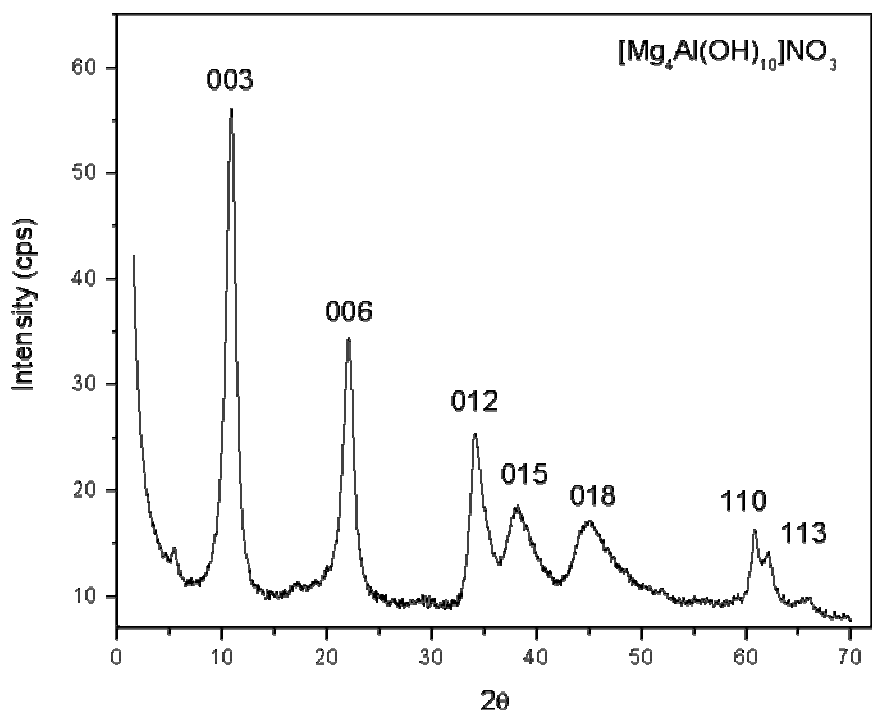
### Σύνθεση και χαρακτηρισμός των LDH-NO<sub>3</sub> και LDH-CO<sub>3</sub>

Ο χαρακτηρισμός των φυλλόμορφων διπλών υδροξειδίων που συντέθηκαν βασίστηκε κυρίως στην ανάλυση με περίθλαση ακτίνων Χ και με φασματοσκοπία υπερύθρου. Με την πρώτη τεχνική λαμβάνονται δομικά στοιχεία για το LDH με κυριότερο από αυτά την απόσταση μεταξύ των διαδοχικών ανόργανων στρωμάτων (d-spacing). Η απόσταση αυτή εξαρτάται τόσο από το είδος των ανιόντων στα ενδιάμεσα στρώματα όσο και από την πυκνότητα φορτίου των ανόργανων στρωμάτων. Ένα τυπικό διάγραμμα περίθλασης ακτίνων Χ για το LDH παρουσιάζεται στο Σχήμα 9 όπου σημειώνονται και οι δείκτες Miller για κάθε κορυφή. Η κορυφή 003 εμφανίζεται σε γωνία  $2\theta = 10.9^\circ$  και επομένως το d-spacing όπως υπολογίζεται από τον νόμο του Braggs είναι 8.1 Å. Στον Πίνακα 3 παρατίθενται οι τιμές του d-spacing για τα LDH που συντέθηκαν και είχαν διαφορετική σύσταση τόσο ως προς τα ανιόντα όσο και ως προς την αναλογία Mg/Al.

Η φασματοσκοπία υπερύθρου δίνει πληροφορίες κυρίως για τη φύση του ανιόντος στα ενδιάμεσα στρώματα. Στο Σχήμα 10 συγκρίνονται τα φάσματα IR για LDH με νιτρικά και ανθρακικά ιόντα. Στην περιοχή μεταξύ  $2500\text{ cm}^{-1}$  και  $4000\text{ cm}^{-1}$  εμφανίζονται οι δονήσεις των υδροξυλίων των ανόργανων στρωμάτων και των μορίων H<sub>2</sub>O από τα ενδιάμεσα στρώματα. Παρατηρείται μια ευρεία κορυφή στους  $3450\text{ cm}^{-1}$  ενώ στο LDH με ανθρακικά ιόντα υπάρχει και ένας ώμος στους

**Πίνακας 3** Σύγκριση της απόστασης των στρωμάτων (d-spacing) για LDH με διαφορετική αναλογία Mg/Al ή διαφορετικό ανιόν.

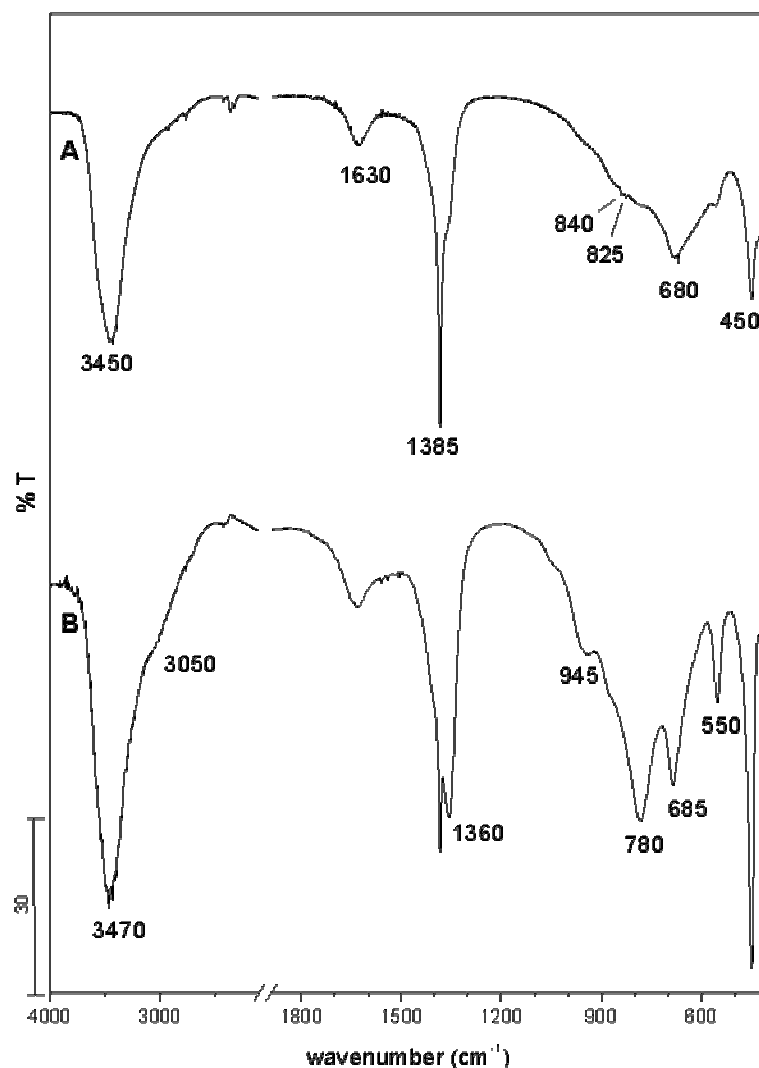
LDH	Mg/Al	Ανιόν	d-spacing (Å)
[Mg <sub>4</sub> Al <sub>2</sub> (OH) <sub>12</sub> ]CO <sub>3</sub>	2/1	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	7.7
[Mg <sub>2</sub> Al(OH) <sub>6</sub> ]NO <sub>3</sub>	2/1	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	8.8
[Mg <sub>4</sub> Al(OH) <sub>10</sub> ]NO <sub>3</sub>	4/1	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	8.1



**Σχήμα 9.** Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του  $[Mg_4Al(OH)_{10}]NO_3$ .

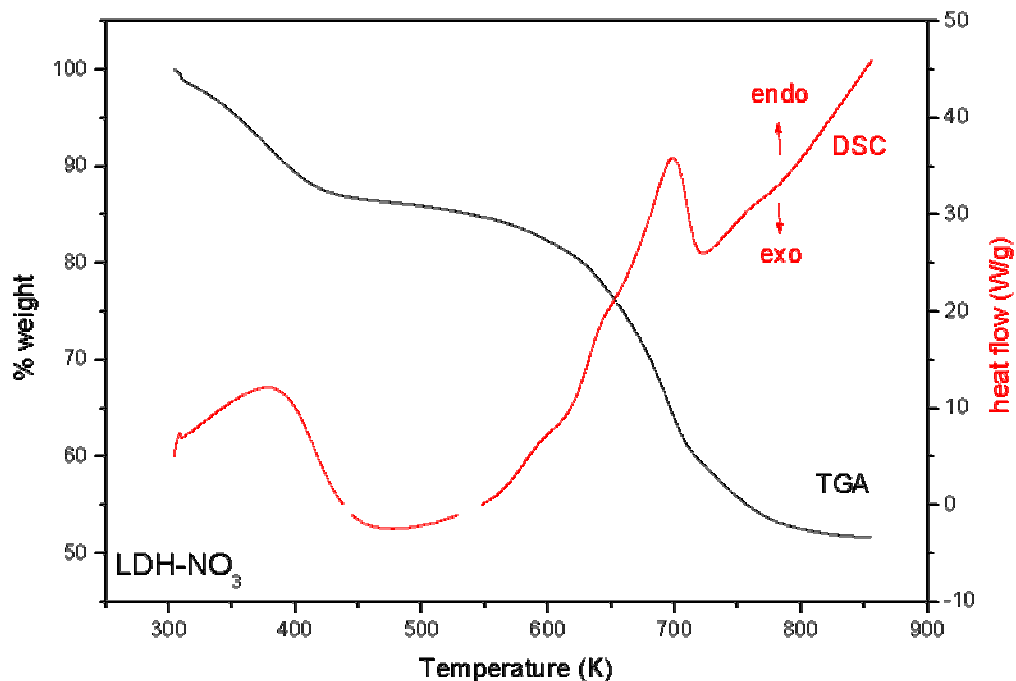
$3050\text{ cm}^{-1}$ . Στις χαμηλότερες συχνότητες εμφανίζονται οι κορυφές των ανιόντων και του ανόργανου κρυσταλλικού πλέγματος. Το LDH- $NO_3$  έχει μια χαρακτηριστική κορυφή στους  $1385\text{ cm}^{-1}$  που αποδίδεται στην  $\nu_3$  δόνηση των νιτρικών ιόντων<sup>114</sup> ενώ η  $\nu_2$  εμφανίζεται ως διπλή κορυφή στους  $825\text{ cm}^{-1}$  και  $840\text{ cm}^{-1}$ .<sup>9, 114</sup> Η παρουσία των ανθρακικών ιόντων στο LDH- $CO_3$  γίνεται εμφανής από τη χαρακτηριστική κορυφή της δόνησης  $\nu_3$  στους  $1360\text{ cm}^{-1}$  καθώς και τη δόνηση  $\nu_4$  στους  $685\text{ cm}^{-1}$ .<sup>114, 115</sup> Οι επιπλέον κορυφές που παρατηρούνται αποδίδονται στη δόνηση κάμψης του  $H_2O$  στους  $1630\text{ cm}^{-1}$  και στις δονήσεις των δεσμών των μετάλλων με τα υδροξύλια<sup>115</sup> στους  $450\text{ cm}^{-1}$ ,  $550\text{ cm}^{-1}$ ,  $780\text{ cm}^{-1}$ ,  $680\text{ cm}^{-1}$  και  $945\text{ cm}^{-1}$ .

Επιπλέον χαρακτηρισμός των υλικών που συντέθηκαν πραγματοποιήθηκε με θερμοσταθμική ανάλυση. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 11 κατά τη θέρμανση του LDH- $NO_3$  από 300 K έως 850 K παρατηρείται απώλεια βάρους της τάξης του 45 % η οποία λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια. Η πρώτη μείωση, μεταξύ 350 K και 400 K, οφείλεται στην απώλεια νερού η οποία είναι της τάξης του 10-15 %. Στο δεύτερο στάδιο από 550 K έως και 800 K παρατηρείται μείωση περίπου 35 %



**Σχήμα 10.** Φάσματα υπερύθρου: (A)  $[\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6]\text{NO}_3$  και (B)  $[\text{Mg}_4\text{Al}_2(\text{OH})_{12}]\text{CO}_3$

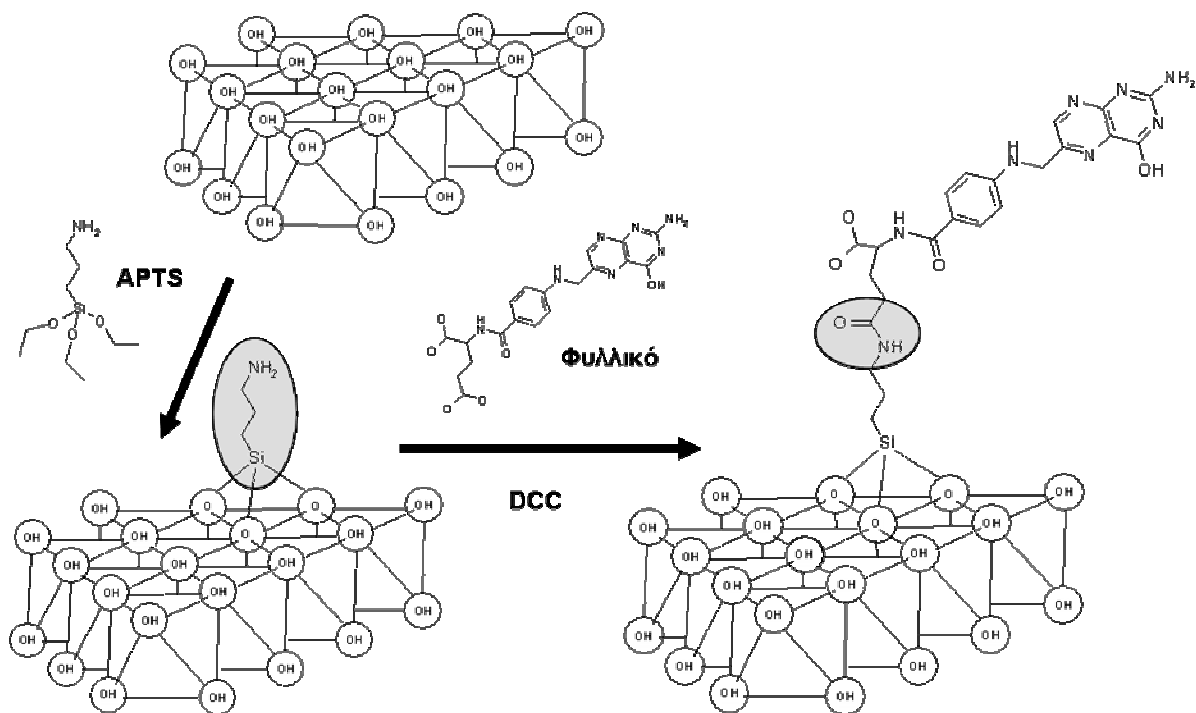
που οφείλεται στην απομάκρυνση των νιτρικών ιόντων καθώς και των υδροξυλίων των ανόργανων στρωμάτων. Κατά το δεύτερο στάδιο η δομή του LDH καταρρέει και παράγονται μικτά μεταλλικά οξείδια όπως  $\text{MgAl}_2\text{O}_4$ . Και τα δύο στάδια είναι ενδόθερμα όπως προκύπτει από το διάγραμμα DSC που φαίνεται στο Σχήμα 11. Η θερμική συμπεριφορά που παρατηρήθηκε, δηλαδή η απώλεια βάρους σε δύο ενδόθερμα στάδια, είναι τυπική για τα φυλλόμορφα διπλά υδροξείδια.<sup>8</sup>



Σχήμα 11. Διαγράμματα θερμικής ανάλυσης (TGA και DSC) του LDH-NO<sub>3</sub>

## Χημική τροποποίηση της επιφάνειας του LDH

Η χημική τροποποίηση πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Πρώτα έγινε ομοιοπολική πρόσδεση ομάδων αμινοπρότυλο-σιλανίου στην επιφάνεια του LDH, και κατά το δεύτερο στάδιο οι αμινομάδες συζεύχτηκαν με τις καρβοξυλομάδες του φυλλικού οξέος ή της βιοτίνης σχηματίζοντας πεπτιδικούς δεσμούς. Η διαδικασία αυτή παρουσιάζεται στο Σχήμα 12. Για τη σύνθεση του τροποποιημένου LDH χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη LDH-CO<sub>3</sub> για να ελαχιστοποιηθεί η εισαγωγή του φυλλικού οξέος ή της βιοτίνης με ιονανταλλαγή. Επίσης εκπλύσεις του προϊόντος [LDH(φυλλικό)]CO<sub>3</sub> διαδοχικά με DMSO, αιθανόλη και διάλυμα 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH = 7.0, 1% v/v Triton δεν οδηγούν σε απελευθέρωση του φυλλικού οξέος γεγονός που αποδεικνύει πως η ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά με ομοιοπολική δέσμευση και όχι με ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση ή προσρόφηση.

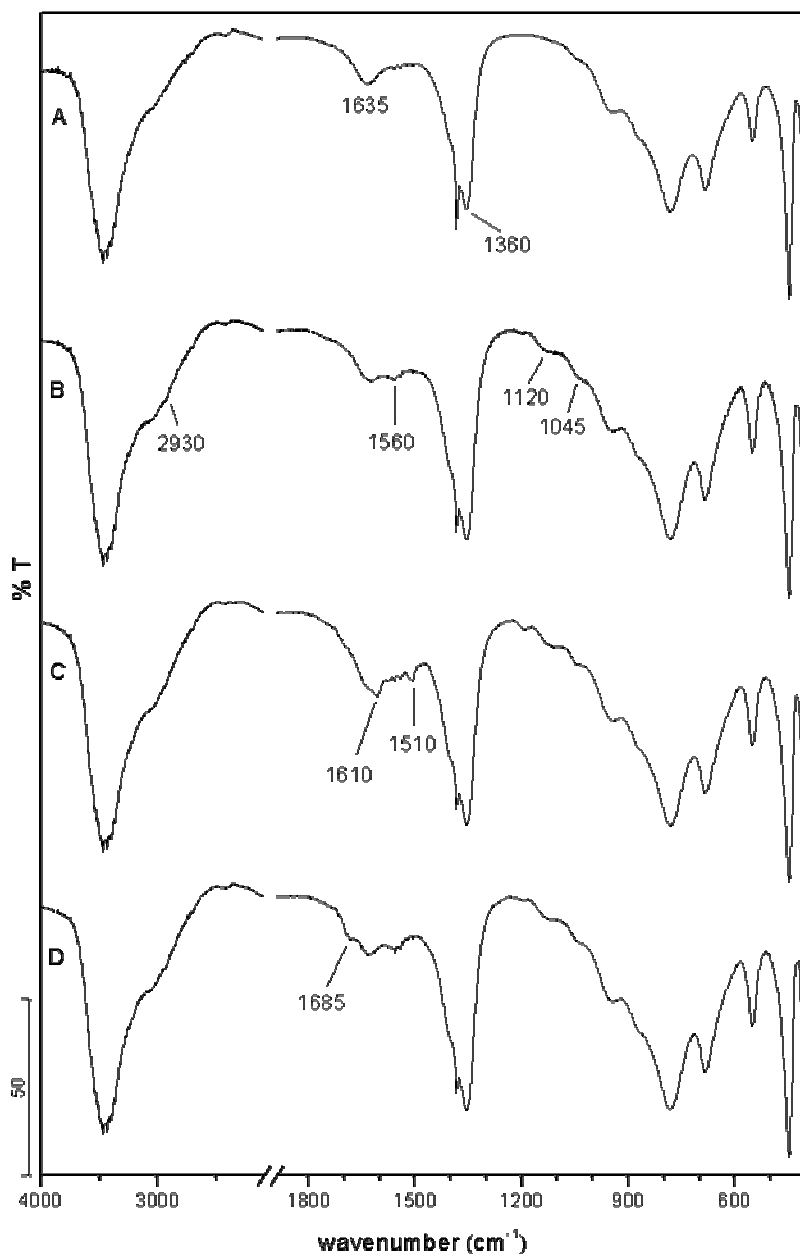


**Σχήμα 12.** Χημική τροποποίηση του LDH με APTS και ομοιοπολική πρόσδεση φυλλικού οξέος με δημιουργία πεπτιδικού δεσμού.

Το διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του προϊόντος που προκύπτει μετά την αντίδραση με APTS, δηλαδή του  $[\text{LDH}(\text{Si-NH}_2)]\text{CO}_3$ , είναι τυπικό για  $\text{LDH-CO}_3$  με d-spacing ίσο με 7.7 Å. Τόσο το  $[\text{LDH}(\text{φυλλικό})]\text{CO}_3$  όσο και το  $[\text{LDH}(\text{βιοτίνη})]\text{CO}_3$  έδωσαν το ίδιο διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X γεγονός που δείχνει ότι δεν έλαβε χώρα εισαγωγή του φυλλικού οξέος ή της βιοτίνης με ιονανταλλαγή.

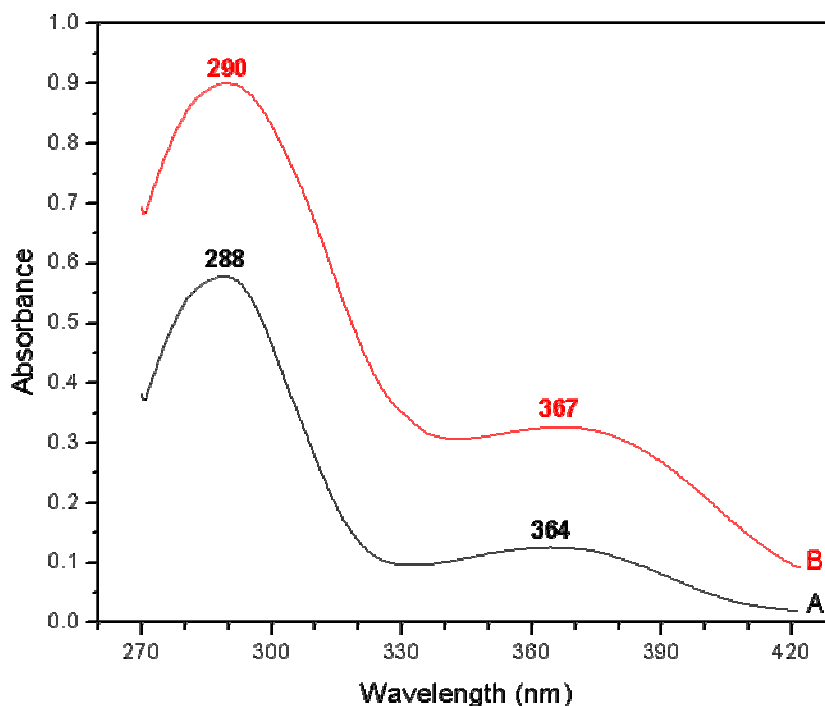
Ο χαρακτηρισμός των τροποποιημένων LDH με φασματοσκοπία υπερέυθρου έδωσε ικανοποιητικές αποδείξεις της χημικής τροποποίησης και της ομοιοπολικής δέσμευσης του φυλλικού οξέος και της βιοτίνης. Στο Σχήμα 13 παρουσιάζονται τα φάσματα υπερέυθρου των  $\text{LDH-CO}_3$ ,  $[\text{LDH}(\text{Si-NH}_2)]\text{CO}_3$ ,  $[\text{LDH}(\text{φυλλικό})]\text{CO}_3$  και  $[\text{LDH}(\text{βιοτίνη})]\text{CO}_3$ . Μετά την αντίδραση με το APTS εμφανίζονται νέες κορυφές στους  $1045\text{ cm}^{-1}$  και  $1120\text{ cm}^{-1}$  που αποδίδονται στον δεσμό  $\text{Si-O}$ ,<sup>108, 116</sup> στους  $1560\text{ cm}^{-1}$  εμφανίζεται η δόνηση κάμψης της αμινομάδας<sup>108, 109</sup> και ένας ώμος στους  $2930\text{ cm}^{-1}$  που οφείλεται στην δόνηση





**Σχήμα 13.** Φάσματα υπερέυθρου: (A)  $[\text{LDH}]\text{CO}_3$ , (B)  $[\text{LDH}(\text{Si-NH}_2)]\text{CO}_3$ , (C)  $[\text{LDH}(\text{φυλλικό})]\text{CO}_3$  και (D)  $[\text{LDH}(\text{βιοτίνη})]\text{CO}_3$ .

των δεσμών C – H των προπιονικών ομάδων. Κατά την ομοιοπολική πρόσδεση του φυλλικού οξέος ή της βιοτίνης παρατηρούνται αλλαγές στην περιοχή μεταξύ  $1450\text{ cm}^{-1}$  και  $1700\text{ cm}^{-1}$ . Στο  $[\text{LDH}(\text{φυλλικό})]\text{CO}_3$  εμφανίζονται δύο κορυφές σε αυτήν την περιοχή, μία στους  $1610\text{ cm}^{-1}$  και μία στους  $1510\text{ cm}^{-1}$ , που πιθανότατα οφείλονται στις δονήσεις του πεπτιδικού δεσμού (amide I και amide II



**Σχήμα 14.** Φάσματα υπεριώδους – ορατού σε διαλύτη DMSO: (A) φυλλικό οξύ, (B) LDH-φυλλικό.

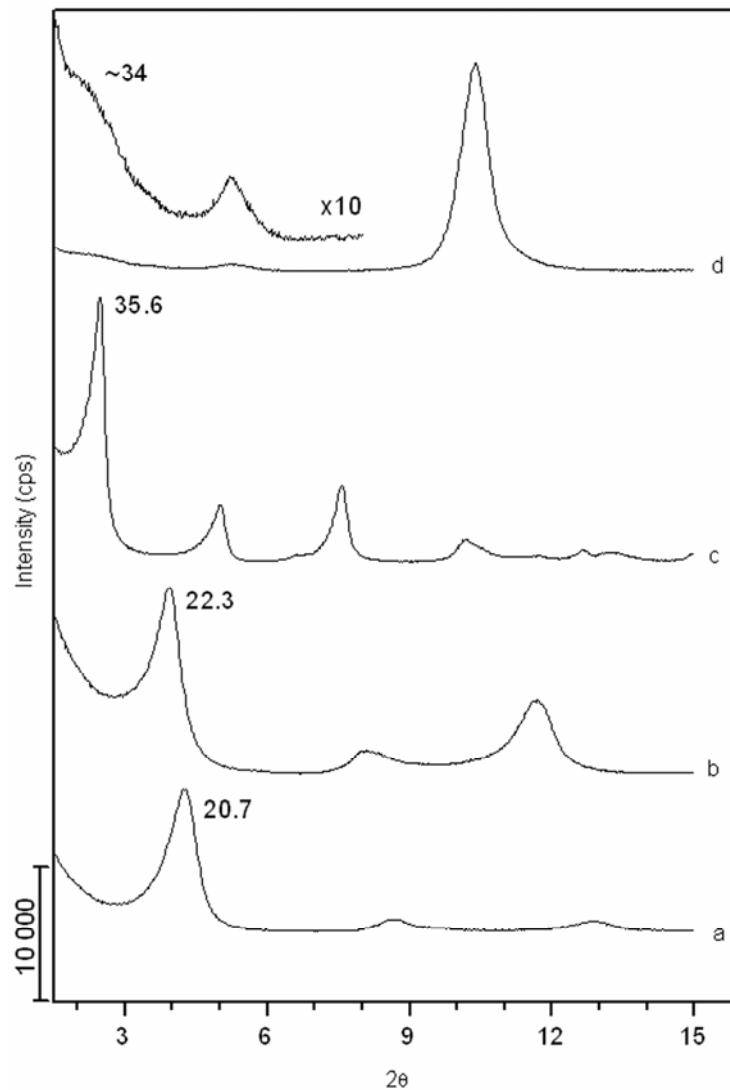
αντίστοιχα). Η βιοτίνη διαθέτει μια χαρακτηριστική ομάδα ουρίας η οποία δίνει την κορυφή στους  $1685\text{ cm}^{-1}$  η οποία εμφανίζεται στο φάσμα του  $[\text{LDH}(\text{βιοτίνη})]\text{CO}_3$ .

Επιπλέον χαρακτηρισμός του  $[\text{LDH}(\text{φυλλικό})]\text{CO}_3$  έγινε με φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού. Διάλυμα φυλλικού οξέος σε DMSO απορροφά στα 290 nm και 360 nm και έχει υποκίτρινο χρώμα. Το τροποποιημένο με φυλλικό οξύ LDH είναι επίσης κίτρινο και όπως φαίνεται στο Σχήμα 14 διαθέτει το ίδιο φάσμα απορρόφησης όταν διαλύεται σε DMSO. Επίσης ο προσδιορισμός της ποσότητας του φυλλικού οξέος που προσδέθηκε ομοιοπολικά στο LDH έγινε φωτομετρικά. Ο συντελεστής απορρόφησης του φυλλικού οξέος στα 294 nm βρέθηκε ίσος με  $19.6\text{ cm}^{-1}\text{ mM}^{-1}$  σε διάλυμα 80 % v/v αιθανόλη, 0.25 M HCl και έτσι υπολογίστηκε πώς το  $[\text{LDH}(\text{φυλλικό})]\text{CO}_3$  περιέχει 6.5 % w/w φυλλικό οξύ.

## Σύνθεση και χαρακτηρισμός νανοϋβριδίων LDH με αντιβιοτικά

### Περίθλαση ακτίνων Χ

Η επιτυχής εισαγωγή των αντιβιοτικών στο LDH διαπιστώνεται από τα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ. Κατά τη διάρκεια της ιονανταλλαγής το αντιβιοτικό αντικαθιστά τα νιτρικά ιόντα και η απόσταση μεταξύ των ανόργανων στρωμάτων του LDH διευρύνεται για να τα φιλοξενήσει. Από τα διαγράμματα



**Σχήμα 15.** Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των νανοϋβριδίων: (a) LDH-αμπικιλίνη, (b) LDH-ναλιδιζικό οξύ, (c) LDH-χολικό-γραμισιδίνη και (d) LDH-αμφοτερικίνη Β

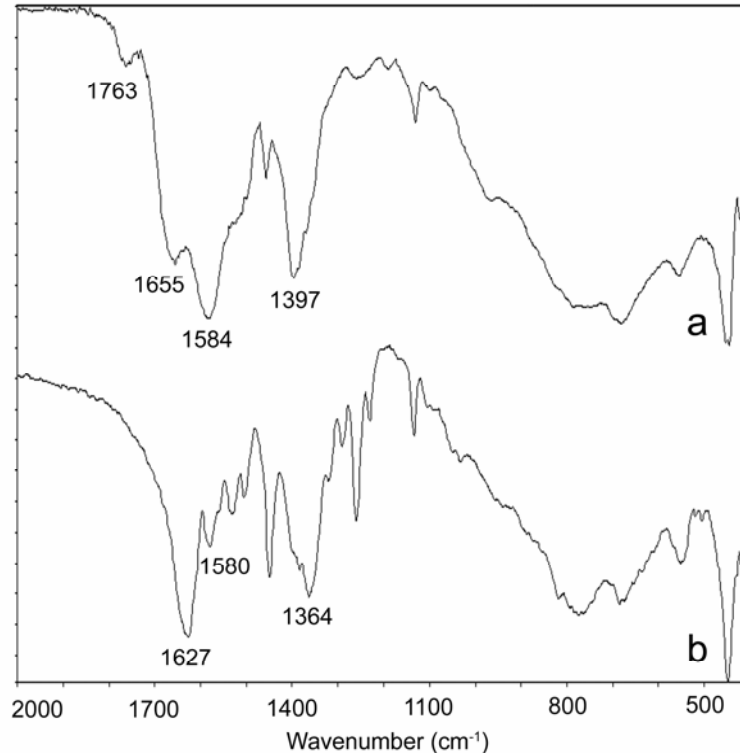
XRD υπολογίζεται η απόσταση μεταξύ των στρωμάτων και γίνεται εμφανής η διεύρυνσή της λόγω της εισαγωγής του κάθε αντιβιοτικού. Στο Σχήμα 15 παρουσιάζονται τα διαγράμματα αυτά για τα τέσσερα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν. Η απόσταση των στρωμάτων (d-spacing) όπως υπολογίστηκε από τη μέση τιμή των κορυφών πρώτης, δεύτερης και τρίτης τάξης είναι 20.6 Å για το LDH-αμπικιλίνη, 22.3 Å για το LDH-ναλιδιξικό και περίπου 34 Å για το LDH-αμφοτερικίνη Β. Στην περίπτωση των νανοϋβριδίων που περιείχαν γραμισιδίνη ή αμφοτερικίνη Β μαζί με χολικό τα διαγράμματα ήταν σχεδόν πανομοιότυπα δίνοντας d-spacing ίσο με 35.3 Å. Οι τιμές αυτές παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4.** Δεδομένα περίθλασης ακτίνων Χ και περιεκτικότητα σε αντιβιοτικά για τα νανοϋβρίδια που συντέθηκαν.

Νανοϋβρίδια	$d_{003}$	$d_{006}$	$d_{009}$	d-spacing	Αντιβιοτικό (% w/w)
LDH-χολικό-γραμισιδίνη	35.6	17.7	11.6	35.3	2.2
LDH- χολικό-αμφοτερικίνη Β	35.9	17.6	11.6	35.3	2.7
LDH- αμφοτερικίνη Β	~ 34	17.0	-	~ 34	9.7
LDH-αμπικιλίνη	20.7	10.2	6.9	20.6	51.7
LDH-ναλιδιξικό οξύ	22.3	10.9	7.6	22.3	40.0

#### *Φασματοσκοπία υπερύθρου*

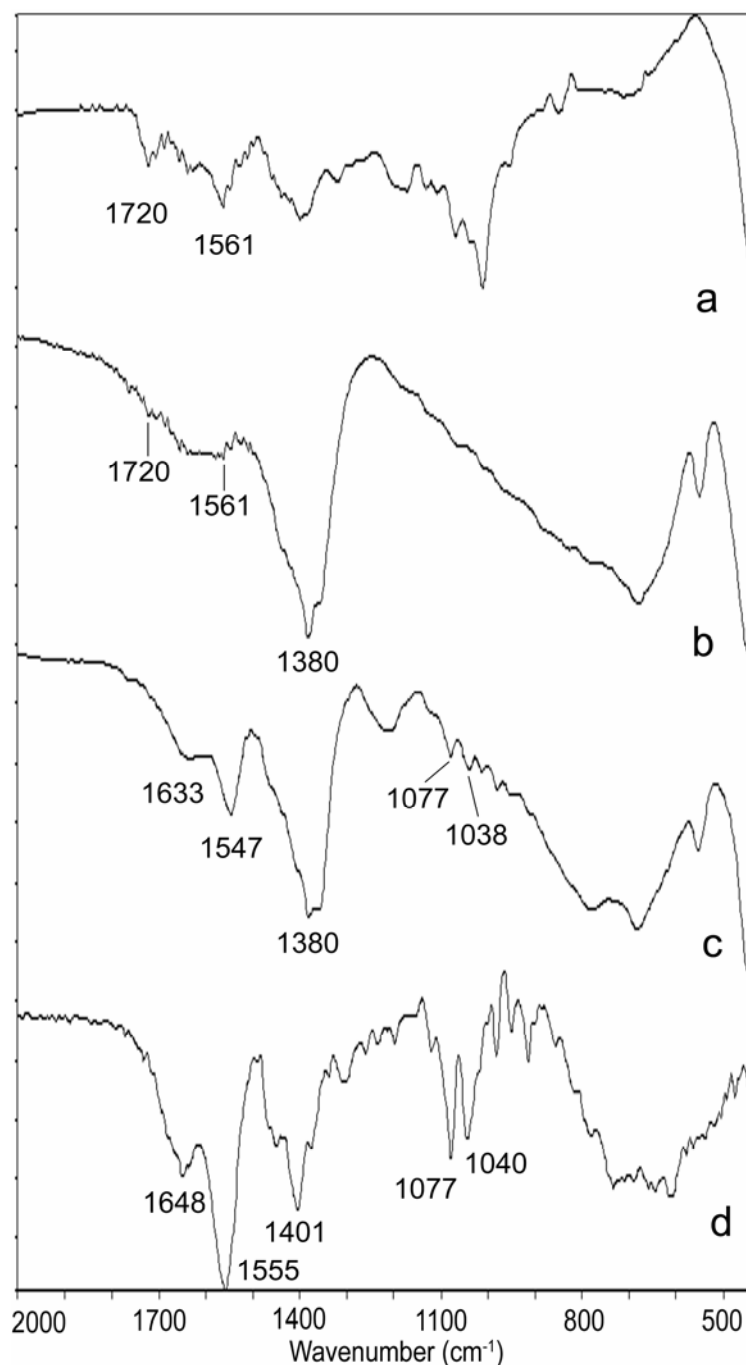
Η παρουσία των αντιβιοτικών στα υβριδικά υλικά που συντέθηκαν μπορεί εύκολα να επιβεβαιωθεί με φασματοσκοπία υπερύθρου. Στο Σχήμα 16 παρουσιάζονται τα φάσματα υπερύθρου των νανοϋβριδίων LDH-αμπικιλίνη και LDH-ναλιδιξικό. Η χαρακτηριστική δόνηση  $\nu_{C=O}$  του καρβονυλίου της β-λακτάμης της αμπικιλίνης εμφανίζεται στους  $1763\text{ cm}^{-1}$  ενώ στους  $1655\text{ cm}^{-1}$  εμφανίζεται η



**Σχήμα 16.** Φάσματα υπερύθρου των νανοϋβριδίων: (a) LDH-αμπικιλίνη και (b) LDH-βαλιδιξικό οξύ.

δόνηση  $\nu_{C=O}$  του αμιδικού καρβονυλίου.<sup>117</sup> Επίσης είναι εμφανής η συμμετρική και η αντισυμμετρική δόνηση του καρβοξυλίου στους  $1397\text{ cm}^{-1}$  και  $1584\text{ cm}^{-1}$  αντίστοιχα. Η ισχυρή απορρόφηση στους  $1627\text{ cm}^{-1}$  στο φάσμα του LDH-βαλιδιξικό οφείλεται στην δόνηση τάσης  $\nu_{C=C}$  των αρωματικών δακτυλίων.<sup>118</sup> Επίσης εμφανίζονται η δόνηση τάσης του καρβονυλίου στους  $1580\text{ cm}^{-1}$  και η συμμετρική δόνηση τάσης του καρβοξυλίου στους  $1364\text{ cm}^{-1}$ .

Τα φάσματα υπερύθρου της αμφοτερικίνης B, του χολικού νατρίου και των υβριδίων LDH-αμφοτερικίνη B και LDH-χολικό-αμφοτερικίνη B φαίνονται στο Σχήμα 17. Οι δονήσεις τάσης των δεσμών C=C και C=O της αμφοτερικίνης B στους  $1561\text{ cm}^{-1}$  και  $1720\text{ cm}^{-1}$  αντίστοιχα,<sup>119</sup> εμφανίζονται και στο νανοϋβρίδιο LDH-αμφοτερικίνη B. Επιπλέον παρατηρείται μια οξεία κορυφή στους  $1380\text{ cm}^{-1}$  που οφείλεται σε νιτρικά ιόντα που δεν έχουν αντικατασταθεί από την αμφοτερικίνη B. Με σύγκριση των φασμάτων του χολικού νατρίου και του



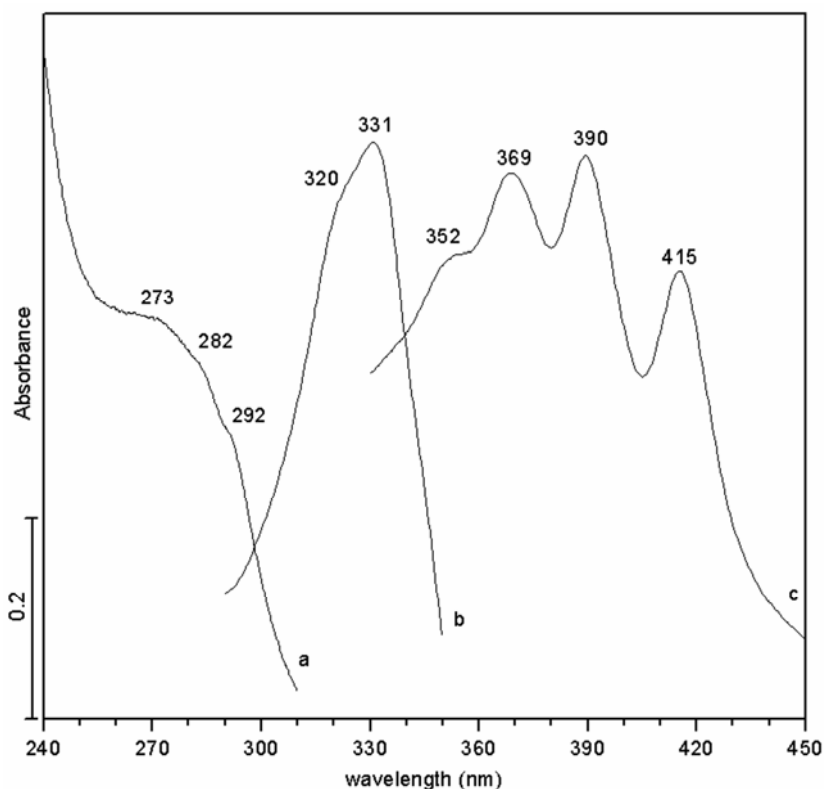
**Σχήμα 17.** Φάσματα υπερύθρου: (a) Αμφοτερικίνη Β, (b) LDH-αμφοτερικίνη Β, (c) LDH-χολικό-αμφοτερικίνη Β και (d) χολικό νάτριο.

υβριδίου LDH-χολικό-αμφοτερικίνη Β παρατηρούνται αρκετές ομοιότητες. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι στο φάσμα υπερύθρου του νανοϋβριδίου επικρατούν τα χαρακτηριστικά του χολικού οξέος σε σχέση με αυτά της αμφοτερικίνης Β.

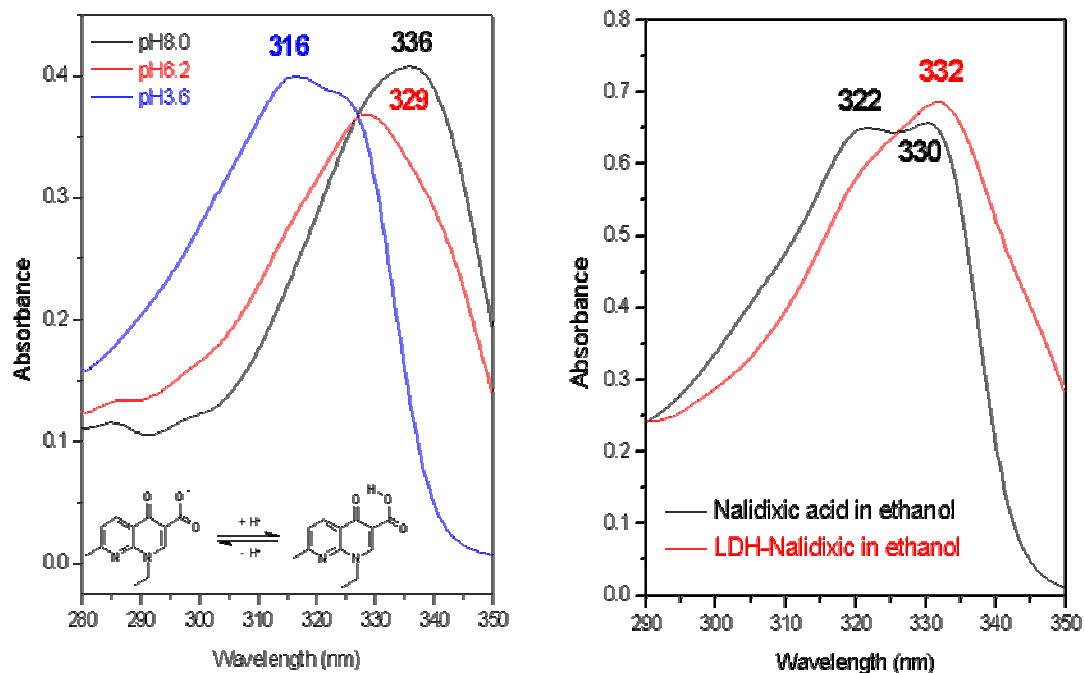
Συγκεκριμένα, οι κορυφές κοντά στους  $1550\text{ cm}^{-1}$  και  $1640\text{ cm}^{-1}$  που οφείλονται στην καρβοξυλική ομάδα καθώς και οι κορυφές στους  $1040\text{ cm}^{-1}$  και  $1077\text{ cm}^{-1}$ , είναι χαρακτηριστικές του χολικού νατρίου.

#### Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού

Το χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες-ορατό που παρουσιάζει το κάθε αντιβιοτικό εμφανίζεται και στα νανούβριδια που συντέθηκαν. Τα φάσματα αυτά για το LDH-γραμισιδίνη, το LDH-ναλιδιξικό και το LDH-αμφοτερικίνη Β παρουσιάζονται στο Σχήμα 18. Οι κορυφές στα 273 nm, 282 nm και 292 nm που φαίνονται στο φάσμα της γραμισιδίνης οφείλονται στα κατάλοιπα θρυπτοφάνης που έχει στο μόριό της. Το LDH-ναλιδιξικό παρουσιάζει μια κορυφή στα 331 nm με ώμο στα 320 nm ενώ οι χαρακτηριστικές



**Σχήμα 18.** Φάσματα υπεριώδους-ορατού των νανουβριδίων: (a) LDH-γραμισιδίνη, (b) LDH-ναλιδιξικό οξύ και (c) LDH-αμφοτερικίνη Β.



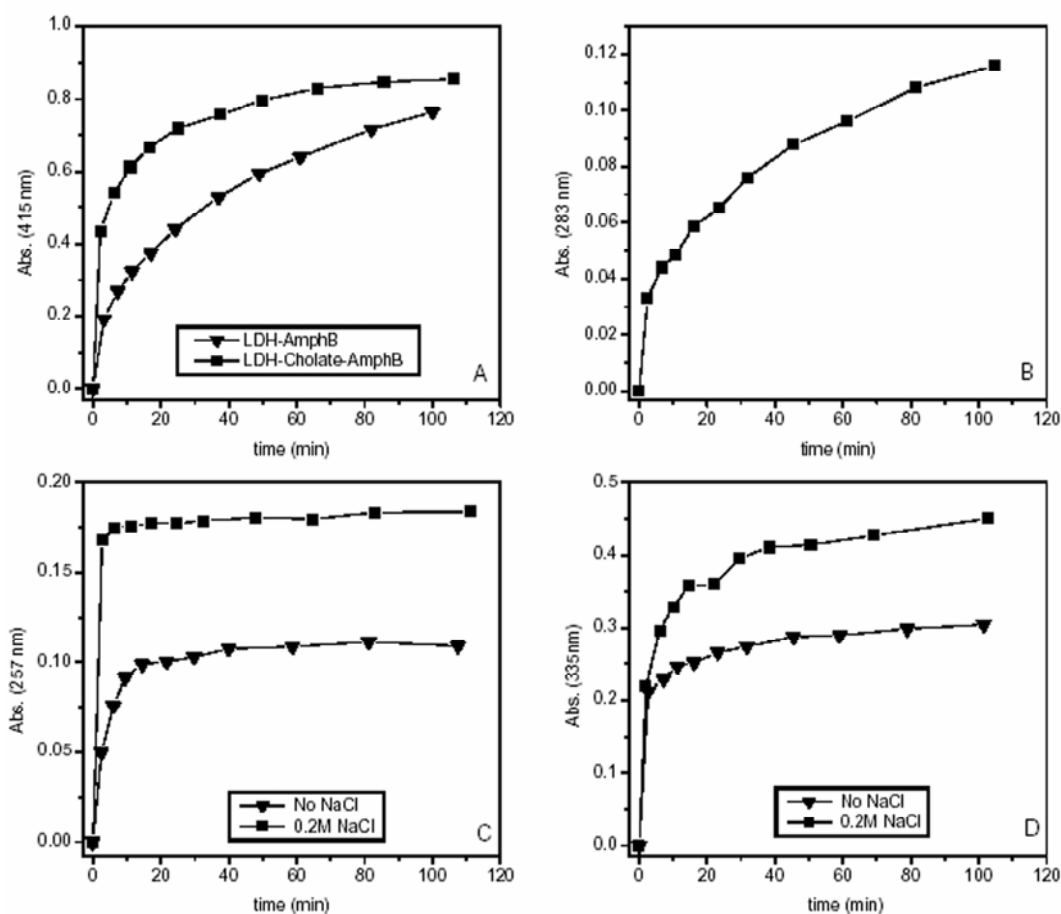
**Σχήμα 19.** Φάσματα υπεριώδους-ορατού του ναλιδιξικού οξέος σε διαφορετικές τιμές pH (αριστερά) και σύγκριση των φασμάτων υπεριώδους-ορατού του ναλιδιξικού οξέος και του LDH-ναλιδιξικό σε αιθανόλη (δεξιά).

απορροφήσεις της αμφοτερικίνης Β στην ορατή περιοχή (352 nm, 369 nm, 390 nm και 415 nm) εμφανίζονται και στα νανούβριδια που την περιέχουν προσδίδοντάς τους κίτρινο χρώμα.

Ο χαρακτηρισμός με φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού δίνει χρήσιμες πληροφορίες για την κατάσταση της καρβοξυλικής ομάδας του ναλιδιξικού οξέος.<sup>120</sup> Όπως φαίνεται στο Σχήμα 19 σε χαμηλά pH η καρβοξυλομάδα είναι πρωτονιωμένη και η ένωση απορροφά στα 316 nm. Αντίθετα, σε υψηλότερα pH η απορρόφηση μετατοπίζεται στα 336 nm ενώ σε ενδιάμεσες τιμές pH το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης βρίσκεται κάπου ενδιάμεσα. Όταν όμως χρησιμοποιείται η αιθανόλη ως διαλύτης το φάσμα του ναλιδιξικού οξέος είναι διαφορετικό, όπως φαίνεται στο δεξίο γράφημα του Σχήματος 19. Ωστόσο, το LDH-ναλιδιξικό σε αιθανόλη παρουσιάζει ένα φάσμα απορρόφησης παρόμοιο με αυτό του ναλιδιξικού οξέος σε υδατικό περιβάλλον και ουδέτερο pH.

Η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού χρησιμοποιήθηκε και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιβιοτικών στα νανούβριδια. Τα υδρόφοβα





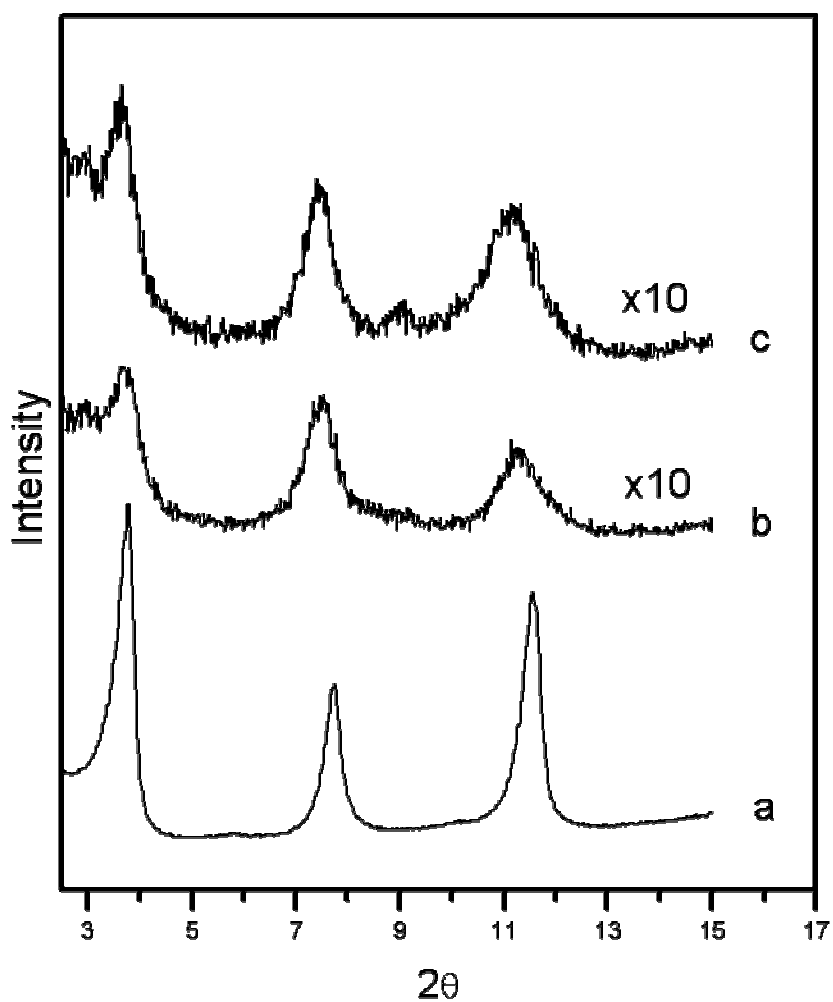
**Σχήμα 20.** Απελευθέρωση των αντιβιοτικών : (A) Αμφοτερικίνη Β, (B) Γραμισιδίνη, (C) Αμπικικιλίνη και (D) Ναλιδιξικό οξύ, από τα αντίστοιχα νανοϋβρίδια.

αντιβιοτικά, γραμισιδίνη και αμφοτερικίνη Β, αποτελούν μικρό ποσοστό του βάρους του νανοϋβριδίου: 2.2 % w/w για την γραμισιδίνη, 2.7 % w/w και 9.7 % w/w για την αμφοτερικίνη Β με και χωρίς χολικό νάτριο αντίστοιχα. Αντίθετα, στην περίπτωση της αμπικικιλίνης και του ναλιδιξικού οξέος τα κατά βάρος ποσοστά είναι πολύ υψηλότερα: 51.7 % w/w και 40.0 % w/w αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού συνοψίζονται στον Πίνακα 4.

#### *Απελευθέρωση των αντιβιοτικών από τα νανοϋβρίδια*

Η απελευθέρωση των αντιβιοτικών συναρτήσε του χρόνου παρουσιάζεται στο Σχήμα 20. Η απελευθέρωση της αμφοτερικίνης Β από τα δύο νανοϋβρίδια, LDH-αμφοτερικίνη Β και LDH-χολικό-αμφοτερικίνη Β, παρουσιάζεται συγκριτικά

στο ίδιο διάγραμμα (Σχήμα 20A) καθώς οι ποσότητες των νανοϋβριδίων στο διάλυμα υπολογίστηκαν έτσι ώστε η συγκέντρωση του αντιβιοτικού να είναι η ίδια και στις δύο περιπτώσεις. Επίσης, στην περίπτωση της αμπικιλίνης και του ναλιδιξικού οξέος παρουσιάζεται συγκριτικά η απελευθέρωση με και χωρίς NaCl (Σχήμα 20C και 20D).



**Σχήμα 21.** Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X των νανοϋβριδίων: (a) LDH-PFC, (b) LDH-rpIX και (c) LDH-rpIX-PFC.

## Σύνθεση και χαρακτηρισμός νανοϋβριδίων LDH με πρωτοπορφυρίνη IX

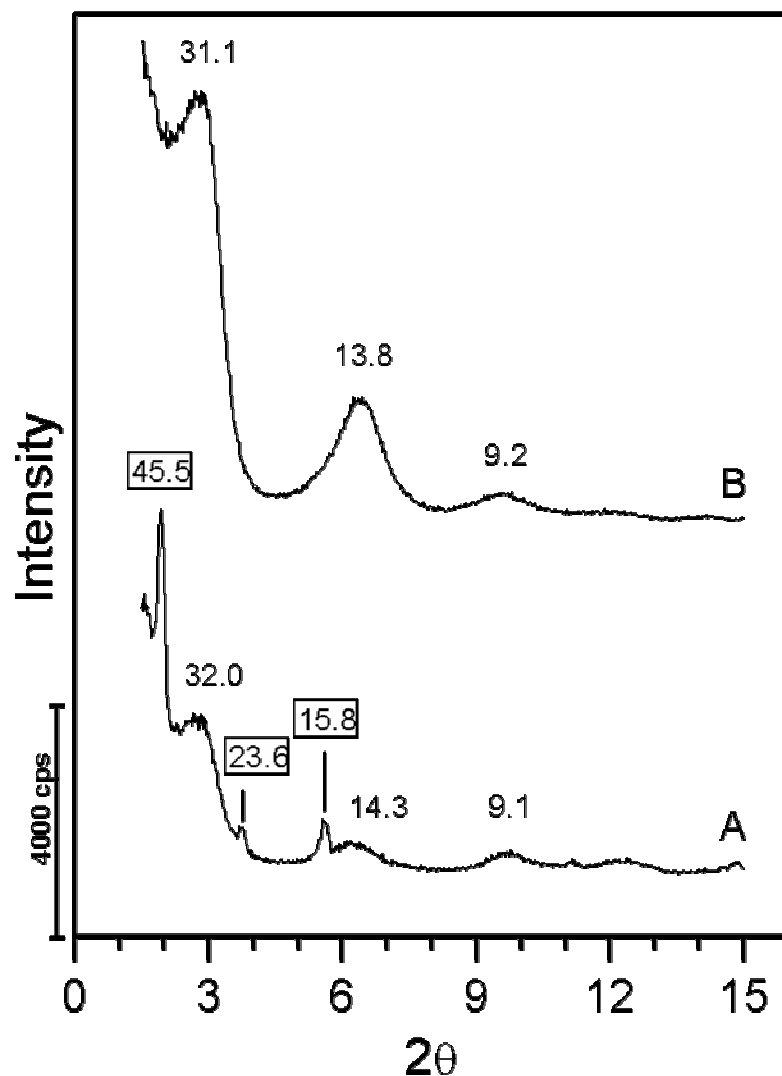
### Περίθλαση ακτίνων Χ

Η επιτυχής εισαγωγή της πρωτοπορφυρίνης IX στα ενδιάμεσα στρώματα του LDH διαπιστώνεται με την περίθλαση ακτίνων Χ. Τα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των νανοϋβριδίων LDH-PFC, LDH-ppIX και LDH-ppIX-PFC παρουσιάζονται στο Σχήμα 21. Η απόσταση των στρωμάτων, όπως υπολογίζεται λαμβάνοντας τη μέση τιμή των κορυφών πρώτης, δεύτερης και τρίτης τάξης, είναι 23.0 Å για το LDH-PFC, 23.6 Å για το LDH-ppIX και 23.9 Å για το LDH-ppIX-PFC. Τα δεδομένα που ελήφθησαν από τα διαγράμματα XRD παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Στο Σχήμα 22 συγκρίνονται τα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των νανοϋβριδίων LDH-παλμιτικό και LDH-ppIX-παλμιτικό. Στο πρώτο εμφανίζεται μία ομάδα από οξείες κορυφές που αντιστοιχούν σε αποστάσεις 45.5, 23.6 και 15.8 Å καθώς και μια δεύτερη ομάδα αποτελούμενη από κορυφές πιο ευρείες και χαμηλότερης έντασης στα 32.0, 14.3 και 9.1Å. Το διάγραμμα του LDH-ppIX-παλμιτικό αποτελείται από κορυφές που αντιστοιχούν σε αποστάσεις 31.1, 13.8 και 9.2 Å.

**Πίνακας 5.** Δεδομένα περίθλασης ακτίνων Χ και ποσοστιαίας σύστασης για τα νανοϋβρίδια που συντέθηκαν.

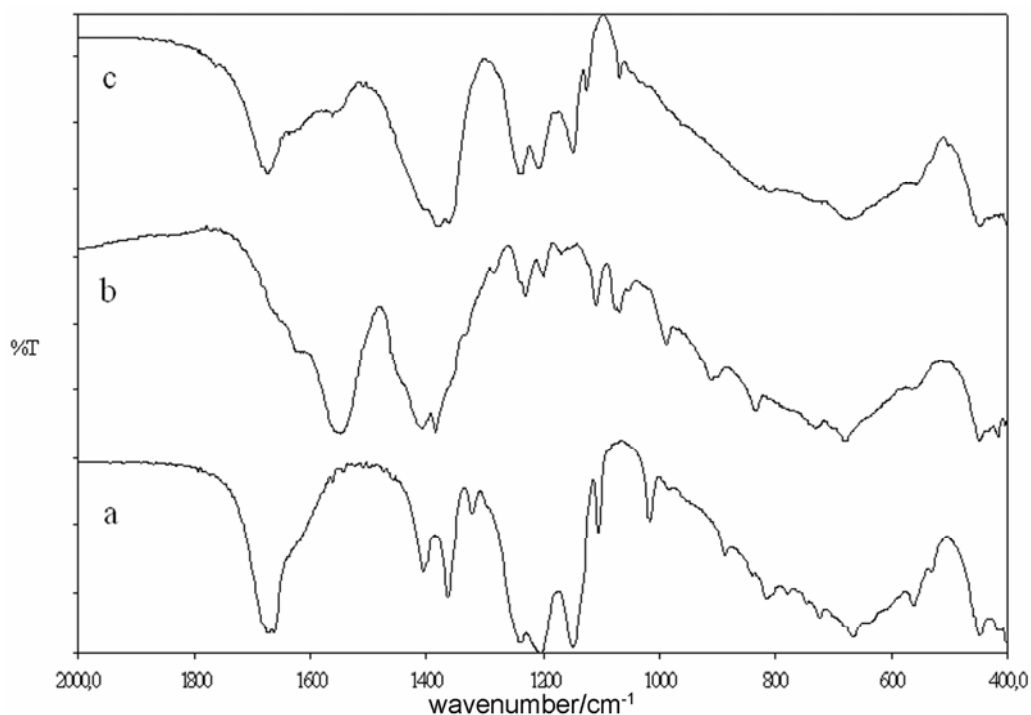
Νανοϋβρίδια	d values (Å)				% H <sub>2</sub> O (w/w)	% PFC (w/w)	% ppIX (w/w)	
	003	006	009	d-spacing			UV	TGA
LDH-PFC	23.3	11.4	7.6	23.0	4	54	-	-
LDH-ppIX	23.9	11.8	7.8	23.6	11	-	18	23
LDH-ppIX-PFC	24.1	11.8	7.9	23.9	4	15	10	11



**Σχήμα 22.** Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X των νανοϋβριδίων: (A) LDH-παλμιτικό και (B) LDH-ppIX-παλμιτικό.

### Φασματοσκοπία υπερύθρου

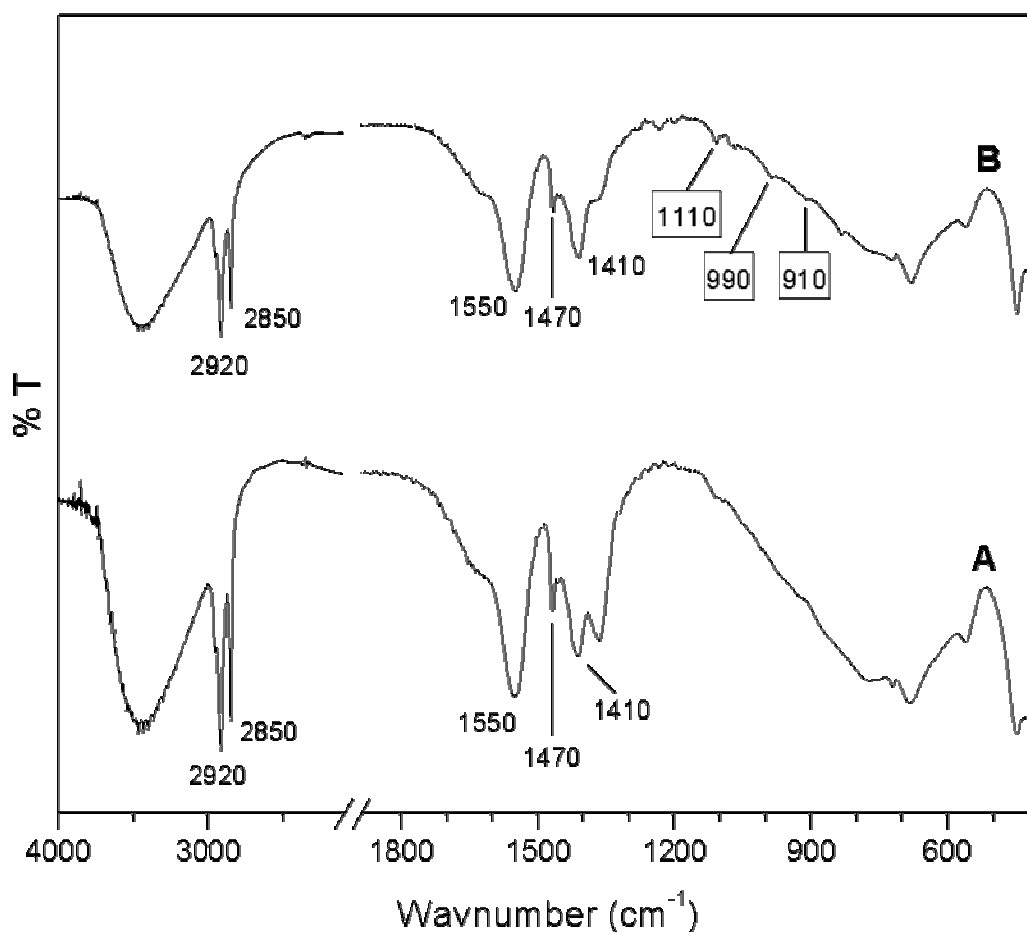
Στο Σχήμα 23 παρουσιάζονται τα φάσματα υπερύθρου των νανοϋβριδίων LDH-PFC, LDH-ppIX και LDH-ppIX-PFC στην περιοχή μεταξύ 400 και 2000  $\text{cm}^{-1}$ . Η αντισυμμετρική δόνηση τάσης των καρβοξυλομάδων του υπερφθοροεπτανοϊκού οξέος και της πρωτοπορφυρίνης IX εμφανίζεται στους 1670 και 1550  $\text{cm}^{-1}$  αντίστοιχα. Το νανοϋβρίδιο LDH-ppIX-PFC περιέχει και την πορφυρίνη και το υπερφθοροεπτανοϊκό οξύ και επομένως στο φάσμα του



**Σχήμα 23.** Φάσματα υπέρυθρου των νανοϋβριδίων: (a) LDH-PFC, (b) LDH-ppIX και (c) LDH-ppIX-PFC.

εμφανίζονται και οι δύο κορυφές. Η συμμετρική δόνηση τάσης της καρβοξυλικής ομάδας εμφανίζεται κοντά στους  $1400\text{ cm}^{-1}$  και στα τρία φάσματα. Επιπλέον, στην περιοχή μεταξύ  $850$  και  $1150\text{ cm}^{-1}$  παρατηρούνται αρκετές κορυφές που είναι χαρακτηριστικές της πρωτοπορφυρίνης IX ( $910$ ,  $990$  και  $1110\text{ cm}^{-1}$ ), ενώ μεταξύ  $1000\text{ cm}^{-1}$  και  $1300\text{ cm}^{-1}$  εμφανίζονται κορυφές που οφείλονται στο δεσμό C-F του φθοριωμένου επτανοϊκού οξέος.<sup>121</sup>

Τα φάσματα υπέρυθρου των νανοϋβριδίων LDH-παλμιτικό και LDH-ppIX-παλμιτικό παρουσιάζονται στο Σχήμα 24. Δύο οξείες κορυφές στους  $2850$  και  $2920\text{ cm}^{-1}$  εμφανίζονται και στα δύο φάσματα και οφείλονται στην δόνηση τάσης των δεσμών C – H ενώ η κάμψη των ομάδων  $\text{CH}_2$  δίνει μια χαμηλότερης έντασης κορυφή στους  $1470\text{ cm}^{-1}$ . Επίσης οι χαρακτηριστικές κορυφές της ιονισμένης καρβοξυλομάδας εμφανίζονται στους  $1550\text{ cm}^{-1}$  (αντισυμμετρική) και  $1410\text{ cm}^{-1}$  (συμμετρική). Η διαφορά ανάμεσα στα δύο φάσματα εντοπίζεται στην περιοχή

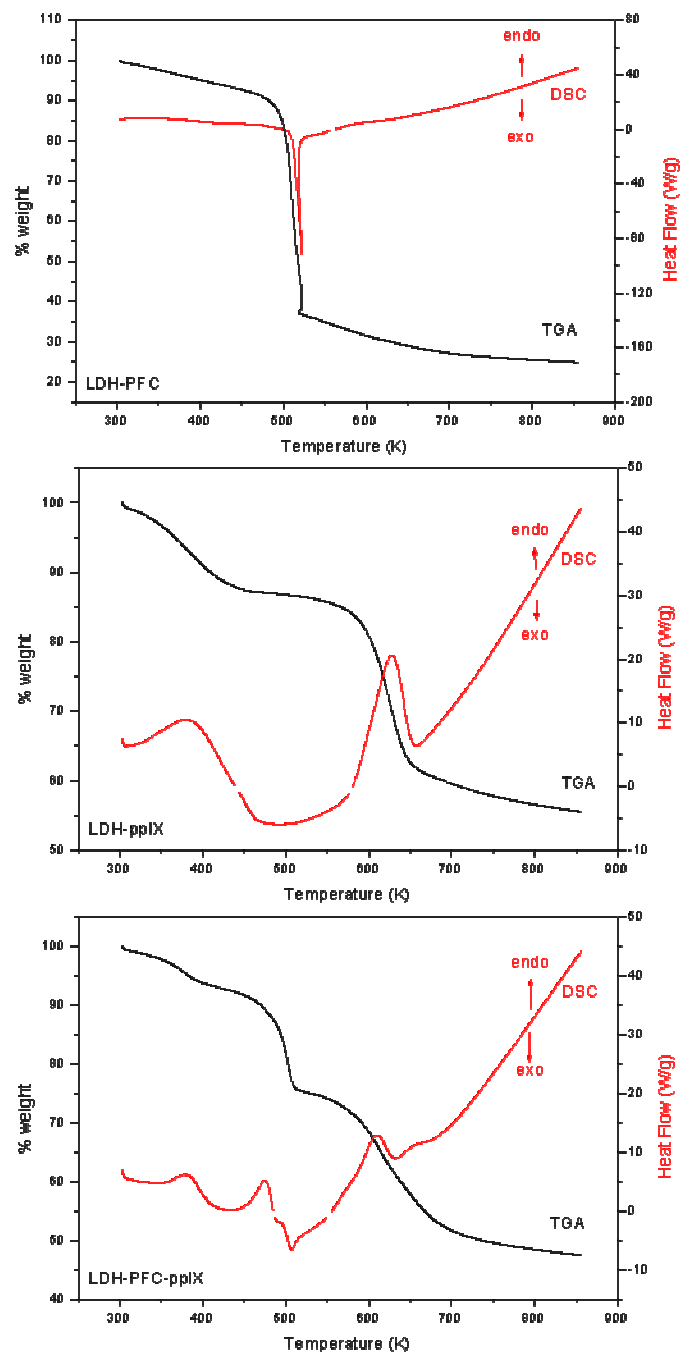


**Σχήμα 24.** Φάσματα υπέρυθρου των νανοϋβριδίων: (A) LDH-παλμιτικό και (B) LDH-ppIX-παλμιτικό.

μεταξύ 850 και 1150  $\text{cm}^{-1}$  όπου παρατηρούνται οι κορυφές στους 910, 990 και 1110  $\text{cm}^{-1}$  που οφείλονται στην πρωτοπορφυρίνη IX.

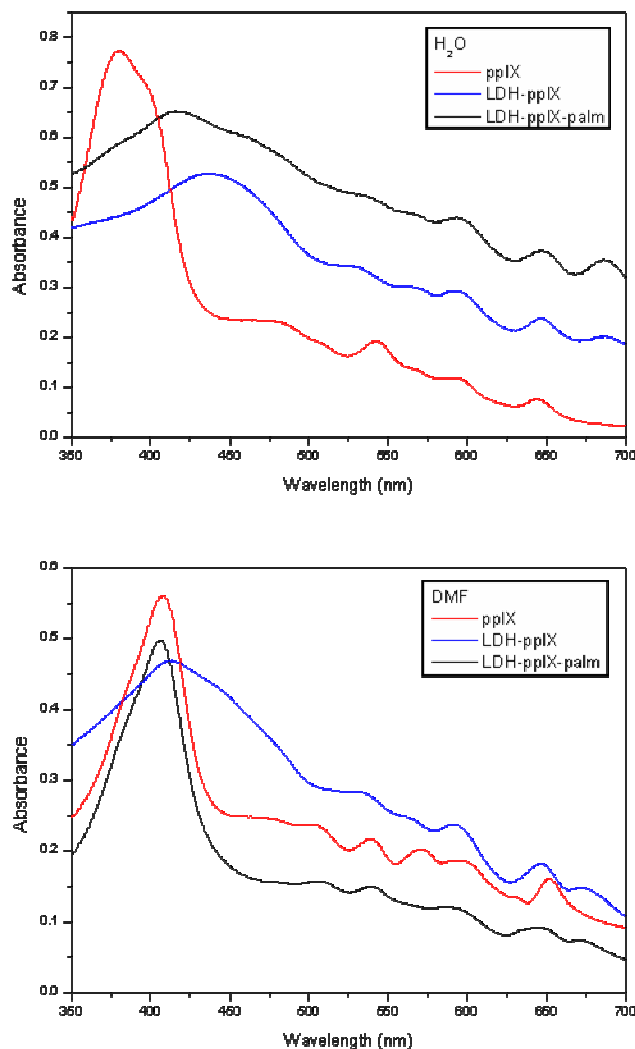
#### Θερμοσταθμική ανάλυση

Η θερμοσταθμική ανάλυση των νανοϋβριδίων παρέχει πληροφορίες για τη σύστασή τους (Πίνακας 5). Η πρώτη απώλεια βάρους εμφανίζεται κοντά στους 400 K (Σχήμα 25) και οφείλεται στην απώλεια  $\text{H}_2\text{O}$ , ενώ μεταξύ 450 - 700 K παρατηρείται η αποσύνθεση των ανιόντων που έχουν εισαχθεί στα νανοϋβρίδια. Συγκεκριμένα στο LDH-PFC παρατηρείται απώλεια 54 % μεταξύ 480 - 530 K σε μια εξώθερμη διαδικασία που οφείλεται στην αποσύνθεση του φθοριωμένου επτανοϊκού οξέος. Μια παρόμοια διαδικασία παρατηρείται στο διάγραμμα του



**Σχήμα 25.** Διαγράμματα θερμικής ανάλυσης (TGA και DSC) των νανοϋβριδίων: LDH-PFC, LDH-ppIX και LDH-ppIX-PFC.

LDH-ppIX-PFC με απώλεια βάρους 15 %. Και τα δύο νανοϋβρίδια που περιέχουν πρωτοπορφυρίνη IX δίνουν ενδόθερμες κορυφές κοντά στους 630 K



**Σχήμα 26.** Σύγκριση των φασμάτων υπεριώδους-ορατού των νανοβριδίων LDH-ppIX και LDH-ppIX-παλμιτικό με την ελεύθερη ppIX σε H<sub>2</sub>O (πάνω) και DMF (κάτω) .

που οφείλονται στην αποικοδόμηση της πορφυρίνης. Σε αυτό το στάδιο η απώλεια βάρους είναι 23 % για το LDH-ppIX και 11% για το LDH-ppIX-PFC.

#### *Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού*

Τα νανοβρίδια LDH-ppIX και LDH-ppIX-παλμιτικό μελετήθηκαν με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού. Τα φάσματα αυτά παρουσιάζονται στο Σχήμα 26 όπου γίνεται σύγκριση των νανοβριδίων με την ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX τόσο σε υδατικό διάλυμα (πάνω) όσο και σε διαλύτη DMF



(κάτω). Στην περιοχή της Soret (350 – 450 nm) εμφανίζονται σημαντικές διαφορές μεταξύ των νανοϋβριδίων και της ελεύθερης πορφυρίνης, ιδίως σε υδατικό διάλυμα. Στην περιοχή μεταξύ 500 και 700 nm (Q-bands) παρατηρούνται μικρές μετατοπίσεις καθώς και διαφορές στη σχετική ένταση των κορυφών στα διάφορα δείγματα. Επιπλέον, μια κορυφή κοντά στα 680 nm εμφανίζεται μόνο στα φάσματα των νανοϋβριδίων και όχι στην ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX. Τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά των τριών δειγμάτων παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 6.

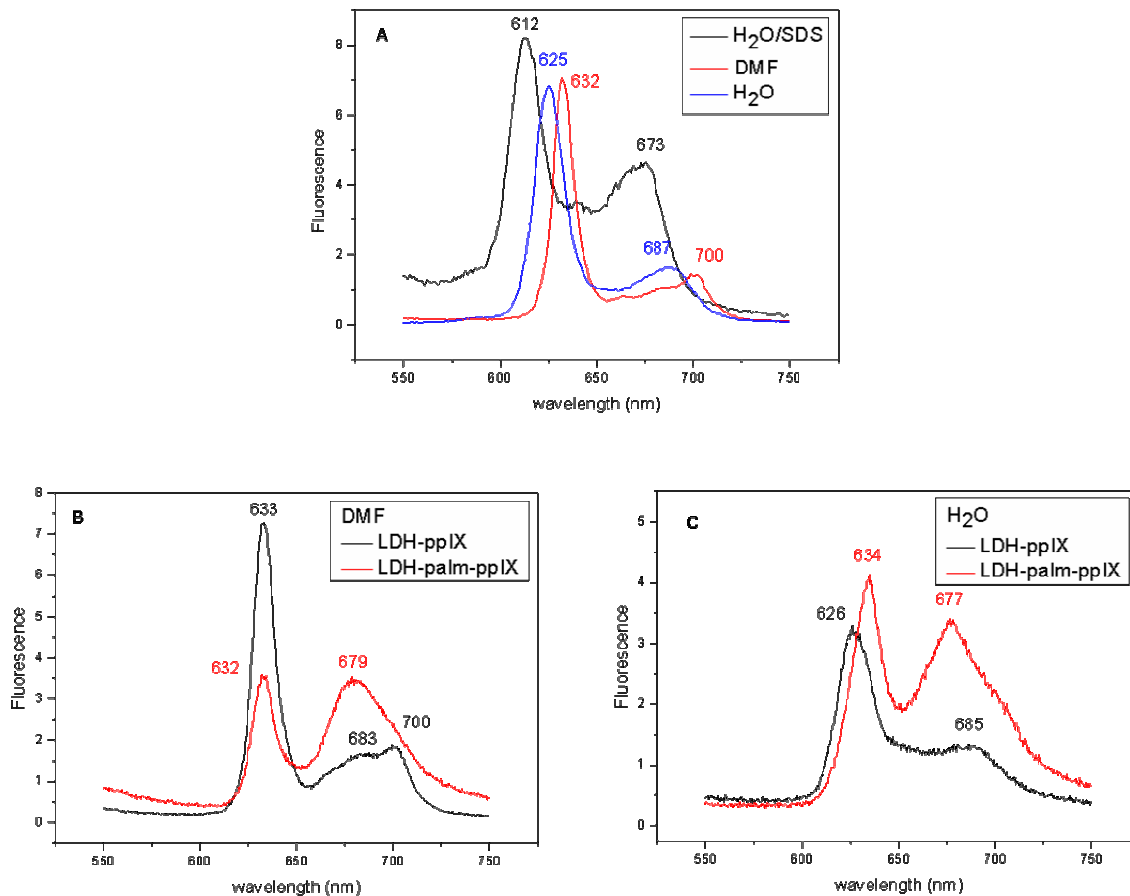
Η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού χρησιμοποιήθηκε και για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτοπορφυρίνης IX στα νανοϋβρίδια. Με βάση την απορρόφηση των νανοϋβριδίων στα 558 nm σε διάλυμα αιθανόλη/H<sub>2</sub>O με 0.2 M HCl υπολογίστηκε ότι το LDH-ppIX περιέχει 18 % w/w ppIX ενώ το LDH-ppIX-PFC 10 % w/w ppIX. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται και στον Πίνακα 5.

**Πίνακας 6.** Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά υπεριώδους - ορατού για την ελεύθερη και τη δεσμευμένη σε LDH πρωτοπορφυρίνη IX.

Χρωστική	Διαλύτης	Μήκος κύματος κορυφής (nm)								
		380	480	507	542	569	591	-	643	-
ppIX	H <sub>2</sub> O	380	480	507	542	569	591	-	643	-
	H <sub>2</sub> O/SDS	407	-	504	541	574	592	632	645	-
	DMF	408	474	502	539	570	593	630	651	-
LDH-ppIX	H <sub>2</sub> O	436		-	530	565	592	-	647	687
	DMF	413		-	535	564	590	-	646	671
LDH-ppIX-palm	H <sub>2</sub> O	416	470	-	536	565	593	-	646	686
	DMF	406	-	505	539	563	587	633	643	672

#### Φασματοσκοπία φθορισμού

Επιπλέον χαρακτηρισμός των νανοϋβριδίων LDH-ppIX και LDH-ppIX-παλμιτικό και σύγκρισή τους με την ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία φθορισμού. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 27A το φάσμα εκπομπής της πρωτοπορφυρίνης IX επηρεάζεται από το διαλύτη που χρησιμοποιείται. Έτσι σε υδατικό διάλυμα εμφανίζονται δύο κορυφές στα



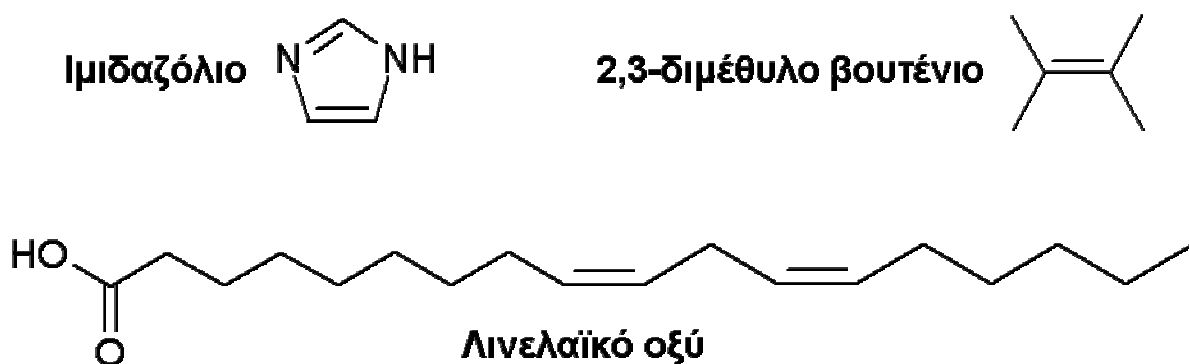
**Σχήμα 27.** Φάσματα εκπομπής φθορισμού (διέγερση στα 400 nm): (A) πρωτοπορφυρίνη IX, (B) LDH-ppIX και LDH-ppIX-παλμιτικό σε DMF και (C) LDH-ppIX και LDH-ppIX-παλμιτικό σε H<sub>2</sub>O.

625 και 687 nm ενώ σε DMF οι κορυφές αυτές μετατοπίζονται στα 632 και 700 nm. Όταν η πορφυρίνη είναι διαλυμένη σε μικύλλια SDS τα μέγιστα της εκπομπής είναι στα 612 και 673 nm. Το φάσμα εκπομπής του νανοϋβριδίου LDH-ppIX-παλμιτικό δεν μεταβάλλεται σημαντικά όταν χρησιμοποιείται νερό ή DMF ως διαλύτης (Σχήμα 27B και C). Οι δύο κορυφές εμφανίζονται στα 632 και 679 nm στο DMF και στα 634 και 677 nm στο H<sub>2</sub>O. Αντίθετα το φάσμα εκπομπής του νανοϋβριδίου LDH-ppIX εξαρτάται από το διαλύτη. Έτσι στο DMF τα μέγιστα εκπομπής είναι στα 633 και 700 nm ενώ στο νερό στα 626 και 685 nm.

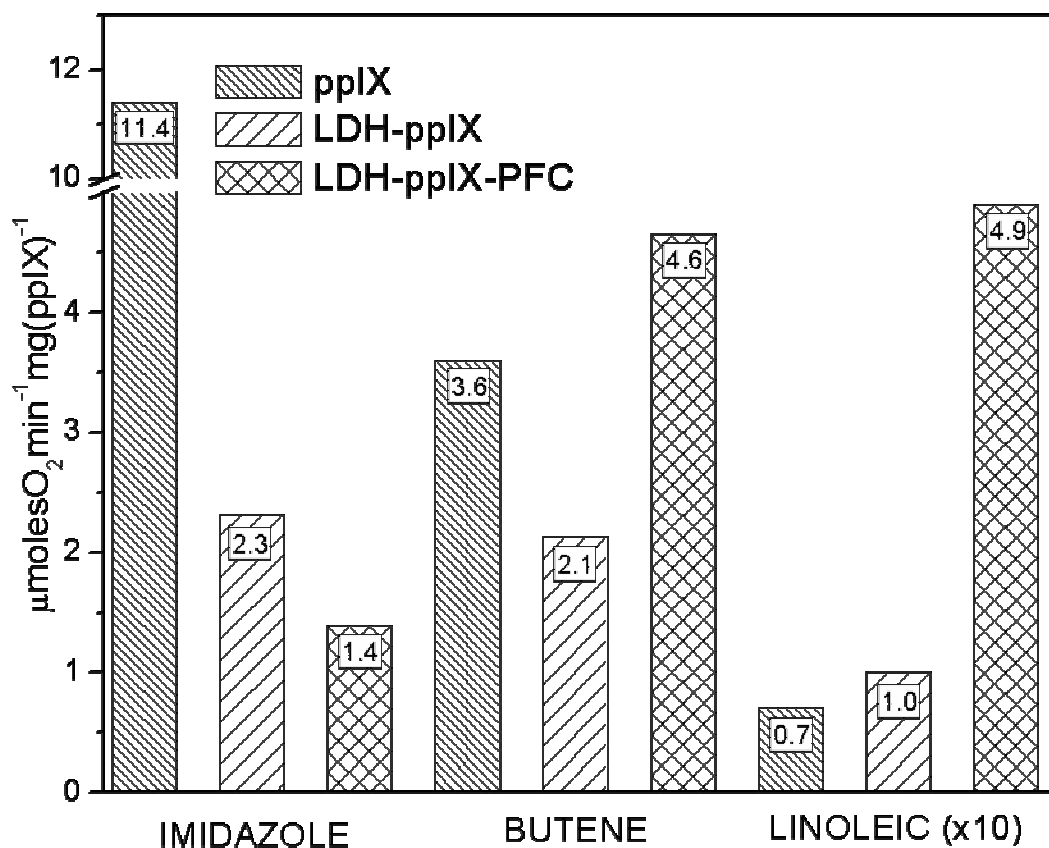
## Εφαρμογές των νανοϋβριδίων LDH με πρωτοπορφυρίνη IX

### Φωτοοξειδωση οργανικών υποστρωμάτων καταλυόμενη από νανοϋβρίδια LDH-ppIX

Τα νανοϋβρίδια LDH-ppIX και LDH-ppIX-PFC καθώς και η ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX χρησιμοποιήθηκαν ως καταλύτες για την φωτοοξειδωση διαφόρων οργανικών υποστρωμάτων. Τα υποστρώματα που επιλέχθηκαν είναι το ιμιδαζόλιο, το 2,3-διμέθυλο-2-βουτένιο και το λιγνελικό οξύ (Σχήμα 28). Τόσο η ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX όσο και τα δύο νανοϋβρίδια καταλύουν την οξειδωση των υποστρωμάτων παρουσία  $O_2$  και ορατής ακτινοβολίας. Αυτό διαπιστώθηκε μετρώντας την κατανάλωση του  $O_2$  κατά τη διάρκεια του φωτισμού του μίγματος της αντίδρασης. Αντίθετα, απουσία καταλύτη ή υποστρώματος δεν παρατηρήθηκε κατανάλωση  $O_2$ . Στο Σχήμα 29 συγκρίνεται ο ρυθμός κατανάλωσης  $O_2$  σε  $\mu\text{moleO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{ppIX}}^{-1}$  για τα τρία υποστρώματα και τους τρεις καταλύτες. Οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ 1.0 και  $5.0 \mu\text{moleO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{ppIX}}^{-1}$  με εξαίρεση την αντίδραση με υποστρώμα το ιμιδαζόλιο και καταλύτη την ελεύθερη ppIX όπου ο ρυθμός της αντίδρασης φτάνει τα  $11.4 \mu\text{moleO}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{ppIX}}^{-1}$ .



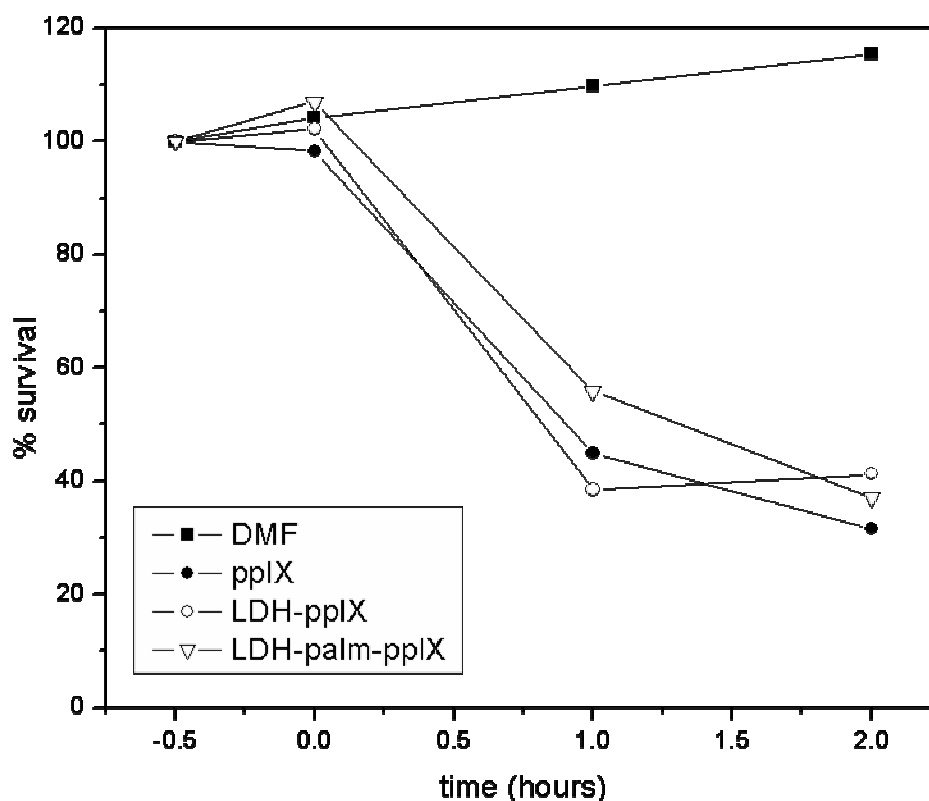
**Σχήμα 28.** Οι δομές των τριών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις φωτοοξειδωσης.



**Σχήμα 29.** Ρυθμός κατανάλωσης  $O_2$  στις αντιδράσεις φωτοοξειδωσης των τριών υποστρωμάτων με καταλύτη την ελεύθερη ppIX ή τα νανοϋβρίδια LDH-ppIX και LDH-ppIX-PFC.

### Φωτοδυναμική απενεργοποίηση του *S.cerevisiae* με τη χρήση νανοϋβριδίων LDH-ppIX

Τα νανοϋβρίδια LDH-ppIX και LDH-ppIX-παλμιτικό καθώς και η ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX χρησιμοποιήθηκαν στη φωτοδυναμική απενεργοποίηση μυκήτων. Ως μοντέλο χρησιμοποιήθηκε ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 30 τόσο η ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX όσο και τα νανοϋβρίδια απενεργοποιούν ένα σημαντικό μέρος του πληθυσμού του μύκητα. Το ποσοστό των μυκήτων που επιζούν μετά από 1 h πέφτει στο 40 – 60 % ενώ μετά από 2 h πλησιάζει το 30 %. Συγκεκριμένα, παρουσία ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX το ποσοστό επιβίωσης είναι 45 % μετά από 1 h

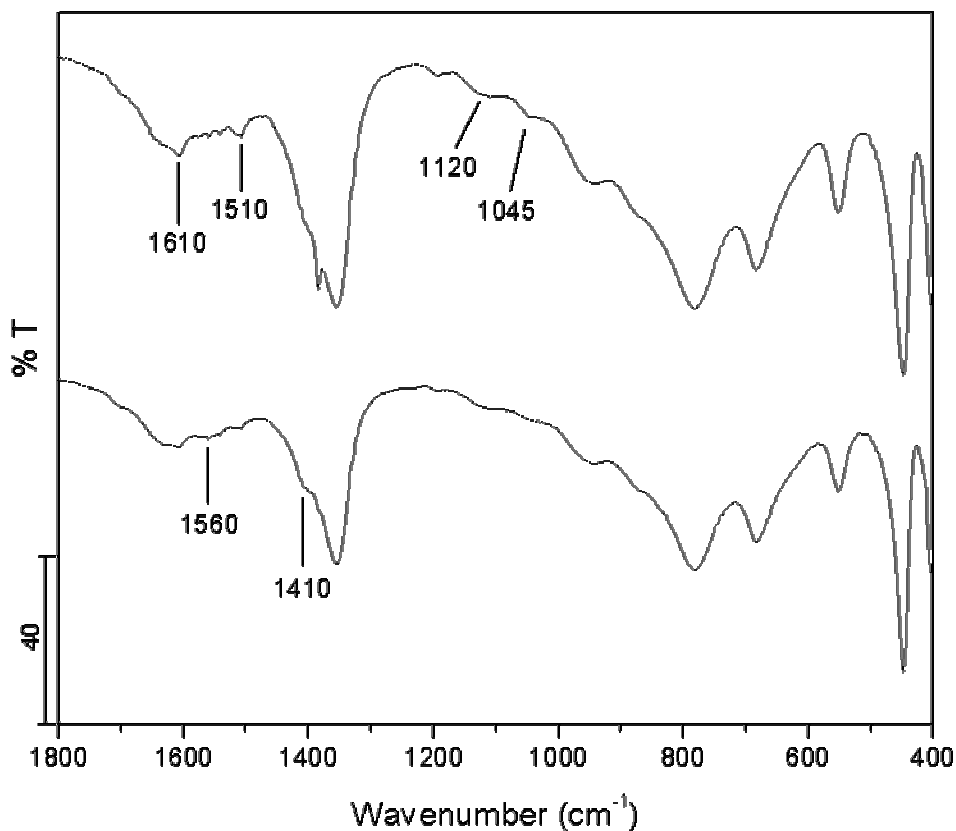


**Σχήμα 30.** Φωτοδυναμική απενεργοποίηση του *S.cerevisiae* με χρήση ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX και των νανοϋβριδίων LDH-ppIX και LDH-ppIX-παλμιτικό

και 32 % μετά από 2 h. Τα αντίστοιχα ποσοστά για το νανοϋβρίδιο LDH-ppIX είναι 38 % και 41 % ενώ για το νανοϋβρίδιο LDH-ppIX-παλμιτικό είναι 56 % και 37 %. Απουσία πρωτοπορφυρίνης IX δεν παρουσιάζεται μείωση του αριθμού των μυκήτων αλλά αντίθετα παρουσιάζεται μια μικρή αύξηση της τάξης του 15 %.

### **Σύνθεση και χαρακτηρισμός νανοϋβριδίων LDH-ppIX με τροποποιημένη επιφάνεια**

Με σκοπό την παρασκευή νανοϋβριδίων LDH-πρωτοπορφυρίνη IX τα οποία θα εμφανίζουν βελτιωμένες επιφανειακές ιδιότητες ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές στρατηγικές. Πρώτον, πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή της πορφυρίνης σε τροποποιημένο LDH που είχε προσδεμένο φυλλικό οξύ ([LDH(φυλλικό)]CO<sub>3</sub>) και δεύτερον, προσδέθηκε αλγινικό οξύ στην επιφάνεια των

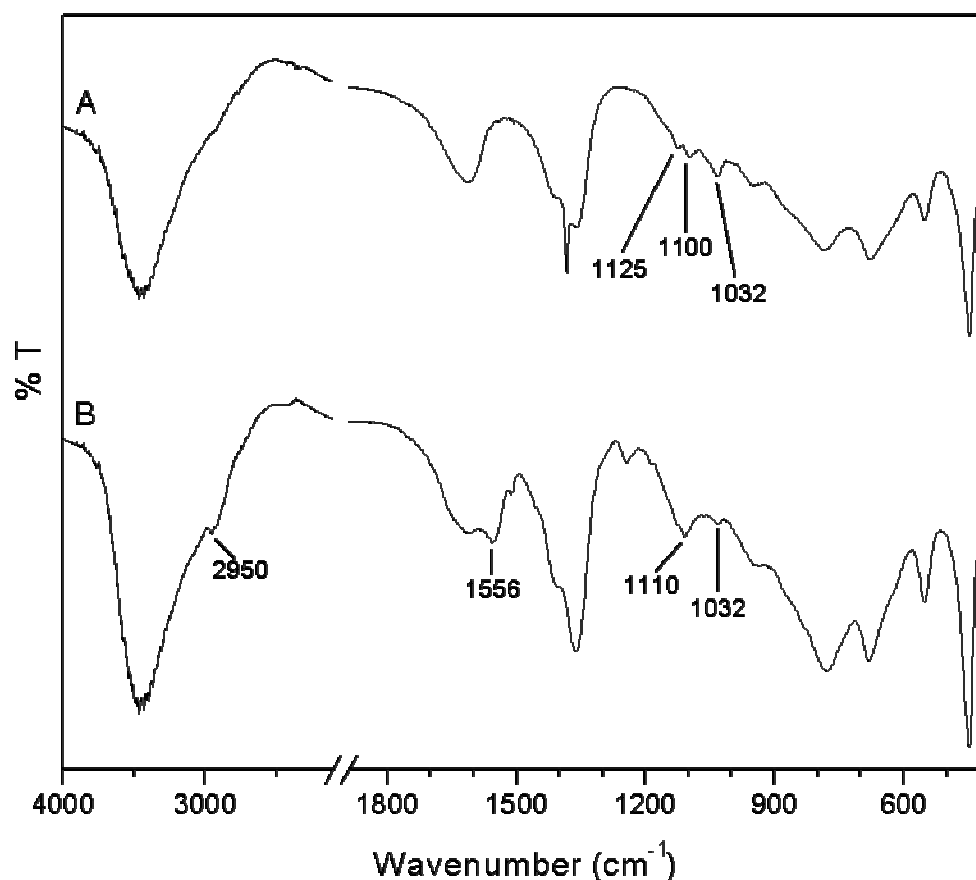


**Σχήμα 31.** Φάσματα υπερύθρου των νανοϋβριδίων: [LDH(φυλλικό)]CO<sub>3</sub> (πάνω) και [LDH(φυλλικό)]ppIX (κάτω).

σωματιδίων του LDH-ppIX. Ο χαρακτηρισμός αυτών των νανοϋβριδίων, [LDH(φυλλικό)]ppIX και [LDH(αλγινικό)]ppIX, βασίστηκε στην φασματοσκοπία υπερύθρου και την φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού.

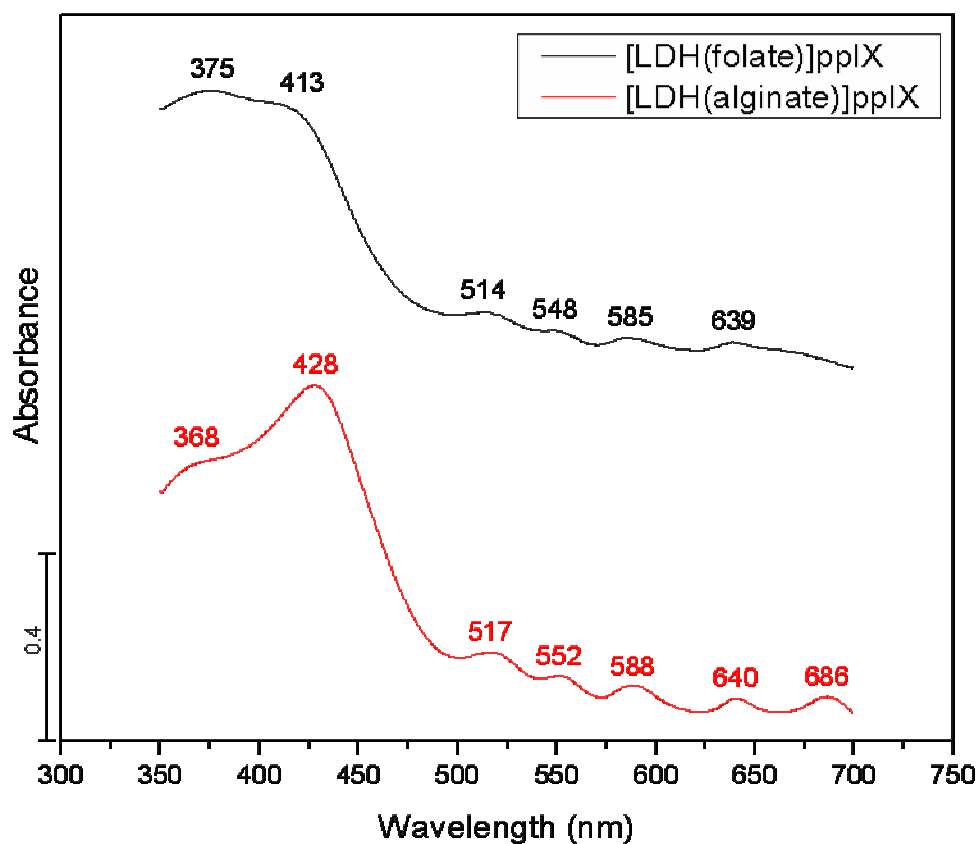
#### *Φασματοσκοπία υπερύθρου*

Το φάσμα υπερύθρου του νανοϋβριδίου [LDH(φυλλικό)]ppIX παρουσιάζεται στο Σχήμα 31. Συγκριτικά με το φάσμα του [LDH(φυλλικό)]CO<sub>3</sub> παρατηρείται αυξημένη απορρόφηση στους 1410 και 1560cm<sup>-1</sup>, δηλαδή στις συχνότητες δόνησης της καρβοξυλομάδας της πρωτοπορφυρίνης IX. Ωστόσο οι κορυφές αυτές έχουν ιδιαίτερα χαμηλή ένταση καθώς η ποσότητα της πορφυρίνης στο νανοϋβρίδιο είναι μικρή. Οι κορυφές στους 1045, 1120, 1510 και 1610 cm<sup>-1</sup> εμφανίζονται και στα δύο φάσματα γεγονός που υποδεικνύει ότι το νανοϋβρίδιο [LDH(φυλλικό)]ppIX διατηρεί τα χαρακτηριστικά του



**Σχήμα 32.** Φάσματα υπερέυθρου των νανοϋβριδίων: (A) LDH-αλγινικό και (B) [LDH(αλγινικό)]rprIX.

[LDH(φυλλικό)]CO<sub>3</sub>, δηλαδή τις πυριτικές ομάδες και το ομοιοπολικά προσδεμένο φυλλικό οξύ. Στο Σχήμα 32 συγκρίνεται το φάσμα του νανοϋβριδίου [LDH(αλγινικό)]rprIX με το LDH-αλγινικό. Στο φάσμα του LDH-αλγινικό παρατηρούνται κάποιες κορυφές στην περιοχή μεταξύ 1000 και 1150 cm<sup>-1</sup> οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για το αλγινικό νάτριο.<sup>122</sup> Οι κορυφές αυτές εμφανίζονται στους 1032, 1100 και 1125 cm<sup>-1</sup>. Από αυτές τις κορυφές αυτή στους 1032 cm<sup>-1</sup> εμφανίζεται και στο φάσμα του νανοϋβριδίου LDH(αλγινικό)]rprIX ενώ οι άλλες δύο υπερκαλύπτονται από την κορυφή στους 1110 cm<sup>-1</sup> που οφείλεται στην πρωτοπορφυρίνη IX. Επιπλέον, παρατηρείται η αντισυμμετρική δόνηση τάσης της καρβοξυλομάδας στους 1556 cm<sup>-1</sup> καθώς και η δόνηση τάσης των δεσμών C – H των προπιονικών ομάδων της πορφυρίνης στους 2950 cm<sup>-1</sup>.



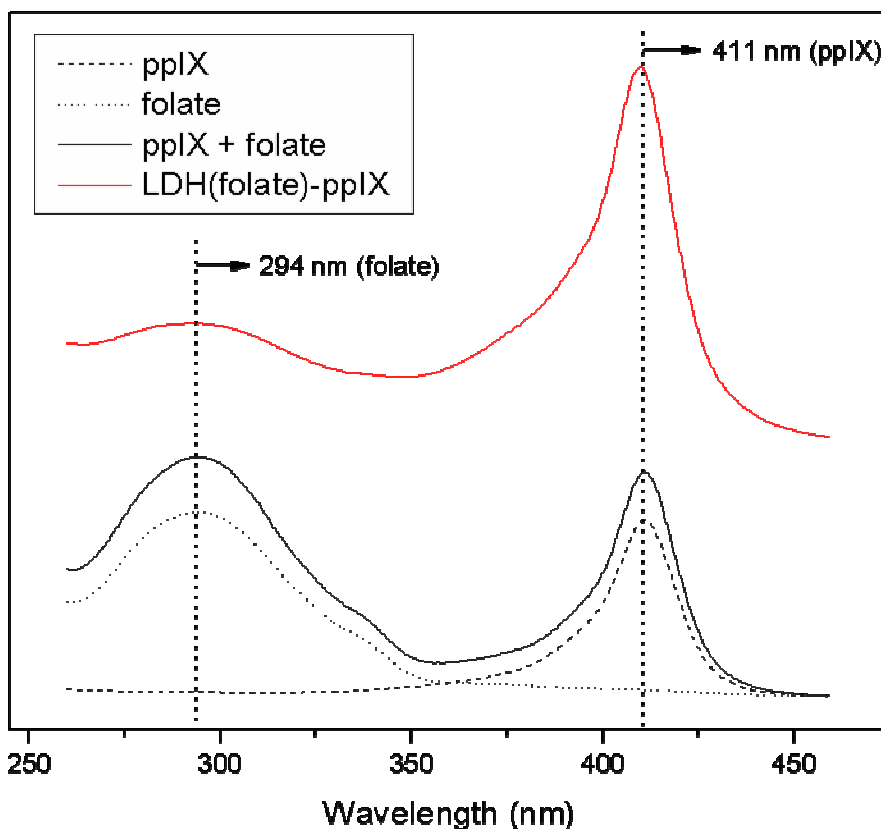
**Σχήμα 33.** Φάσματα υπεριώδους-ορατού των νανοβριδίων: [LDH(φυλλικό)]ppIX (πάνω) και LDH(αλγινικό)]ppIX (κάτω).

### Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού

Επιπλέον χαρακτηρισμός των νανοβριδίων [LDH(φυλλικό)]ppIX και LDH(αλγινικό)]ppIX πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού. Τα φάσματα των νανοβριδίων μεταξύ 350 και 700 nm παρουσιάζονται στο Σχήμα 33. Στην περιοχή μεταξύ 500 και 700 nm τα δύο φάσματα είναι παρόμοια με μόνη διαφορά την κορυφή στα 686 nm στο φάσμα του νανοβριδίου LDH(αλγινικό)]ppIX. Αντίθετα, στην περιοχή της Soret (350 – 450 nm) παρατηρούνται διαφορές. Το [LDH(φυλλικό)]ppIX παρουσιάζει μέγιστο στα 375 nm με έναν ώμο στα 413 nm ενώ το LDH(αλγινικό)]ppIX έχει μέγιστη απορρόφηση στα 428 nm ενώ μια μικρότερη κορυφή εμφανίζεται στα 368 nm.

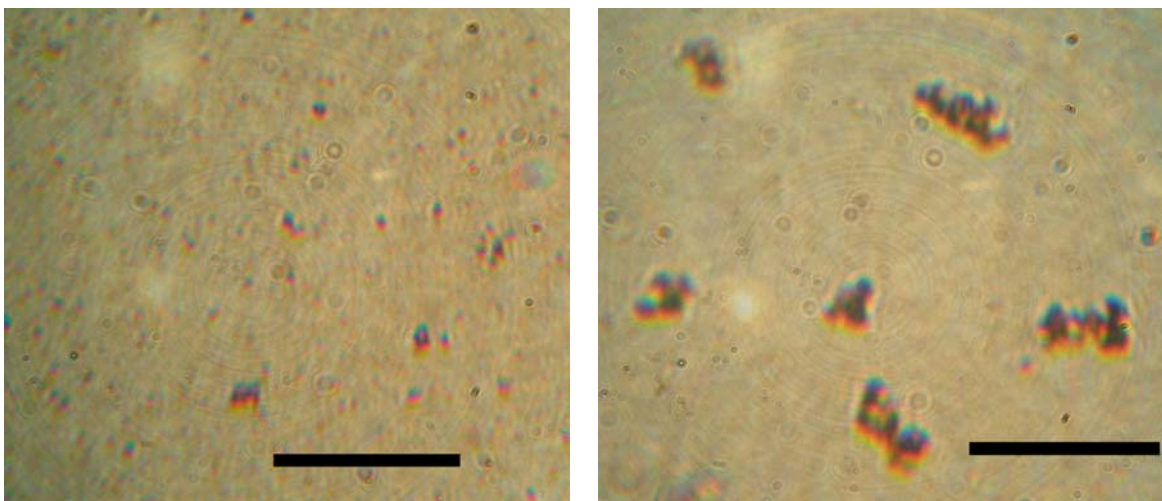
Στη φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού βασίστηκε και η ποσοτικοποίηση του φυλλικού οξέος και της πρωτοπορφυρίνης IX στο





**Σχήμα 34.** Φάσματα υπεριώδους-ορατού του φυλλικού οξέος, της πρωτοπορφυρίνης IX και του νανοϋβριδίου [LDH(φυλλικό)]ppIX σε οξινοποιημένο αθανολικό διάλυμα.

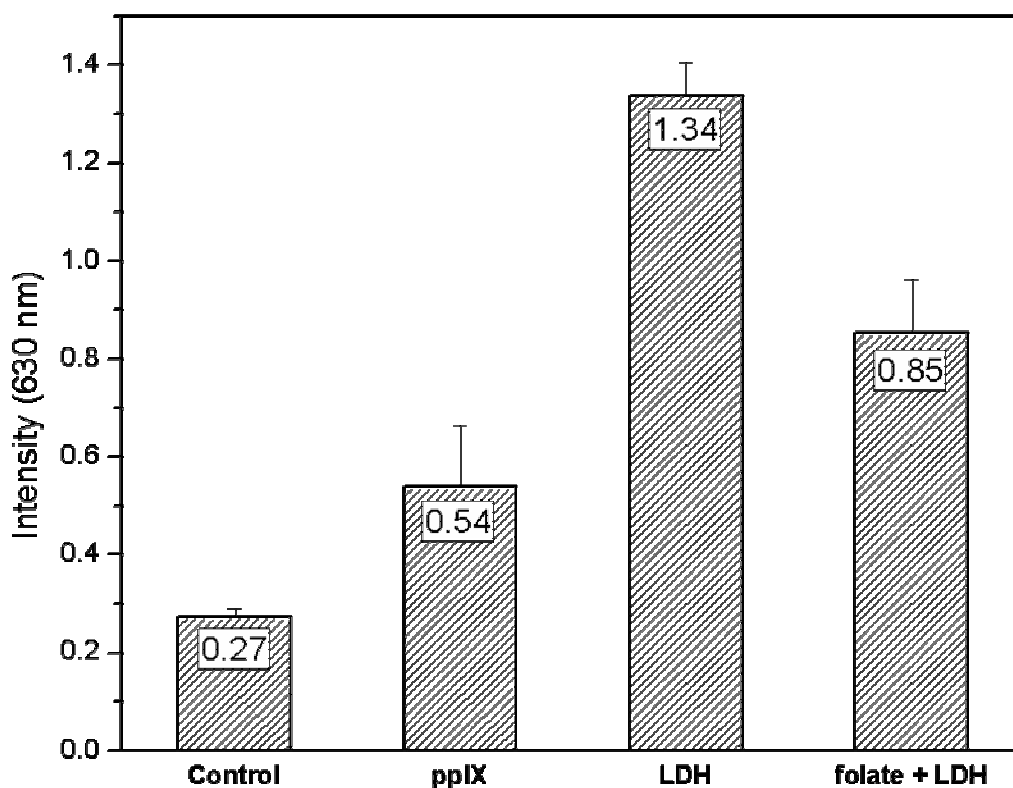
νανοϋβρίδιο [LDH(φυλλικό)]ppIX. Όταν το νανοϋβρίδιο διαλύεται σε οξινοποιημένο διάλυμα αιθανόλης (80 % v/v αιθανόλη, 0.25 M HCl) λαμβάνονται δύο κορυφές στην περιοχή μεταξύ 250 και 450 nm (Σχήμα 34). Η μία κορυφή στα 294 nm οφείλεται στο φυλλικό οξύ ενώ η άλλη στα 411 nm οφείλεται στην πρωτοπορφυρίνη IX. Όπως διαπιστώνεται από τα φάσματα πρότυπων διαλυμάτων φυλλικού οξέος και πρωτοπορφυρίνης IX δεν υπάρχει σημαντική αλληλεπικάλυψη των δύο κορυφών, δηλαδή το φυλλικό οξύ δεν απορροφά στα 411 nm και η πορφυρίνη δεν απορροφά στα 294 nm. Έτσι, με βάση το φάσμα του νανοϋβριδίου [LDH(φυλλικό)]ppIX υπολογίστηκε ότι περιέχει 6.3 % w/w φυλλικό οξύ και 2.7 % w/w πρωτοπορφυρίνη IX. Επίσης υπολογίστηκε πως το νανοϋβρίδιο LDH(αλγινικό)]ppIX περιέχει 10.1 % w/w πρωτοπορφυρίνη IX.



**Σχήμα 35.** Φωτογραφίες αιωρήματος σωματιδίων του νανοϋβριδίου [LDH(αλγινικό)]ppIX πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) την προσθήκη  $\text{CaCl}_2$ . Η μπάρα αντιστοιχεί σε 50  $\mu\text{m}$ .

#### *Καταβύθιση του [LDH(αλγινικό)]ppIX παρουσία ιόντων $\text{Ca}^{2+}$*

Περαιτέρω απόδειξη της ύπαρξης του αλγινικού οξέος στο [LDH(αλγινικό)]ppIX αποτελεί το γεγονός παρουσία ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  παρατηρείται καταβύθιση του νανοϋβριδίου. Η πρόσδεση του πολυσακχαρίτη στην επιφάνεια των σωματιδίων του [LDH(αλγινικό)]ppIX έχει ως αποτέλεσμα την δραματική αύξηση της υδατοδιαλυτότητάς του συγκριτικά με το LDH-ppIX το οποίο είναι αδιάλυτο στο νερό με αποτέλεσμα να συσσωματώνεται και να καταβυθίζεται γρήγορα. Αντίθετα το [LDH(αλγινικό)]ppIX σχηματίζει σταθερό αιώρημα σε  $\text{H}_2\text{O}$ . Η καταβύθιση του [LDH(αλγινικό)]ppIX όταν προστίθεται  $\text{CaCl}_2$  στο διάλυμα δείχνει πως το νανοϋβρίδιο διατηρεί την ιδιότητα του αλγινικού οξέος να δημιουργεί αδιάλυτα σύμπλοκα με το  $\text{Ca}^{2+}$ . Η συσσωμάτωση των σωματιδίων του νανοϋβριδίου παρατηρήθηκε με οπτικό μικροσκόπιο και στο Σχήμα 35 παρουσιάζεται μια φωτογραφία που δείχνει τα συσσωματωμένα σωματίδια 3-4  $\mu\text{m}$  μετά την προσθήκη διαλύματος  $\text{CaCl}_2$ .



**Σχήμα 36.** Δέσμευση πρωτοπορφυρίνης IX σε κύτταρα HeLa. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε 4 διαφορετικά διαλύματα: 1. “Control”: χωρίς πορφυρίνη, 2. “ppIX”: με ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX, 3. “LDH”: με [LDH(φυλλικό)]ppIX και 4. “folate + LDH”: με [LDH(φυλλικό)]ppIX και ελεύθερο φυλλικό οξύ.

#### *Δέσμευση των τροποποιημένων νανοϋβριδίων LDH-ppIX σε καρκινικά κύτταρα HeLa*

Το νανοϋβρίδιο [LDH(φυλλικό)]ppIX συντέθηκε με σκοπό να δεσμεύεται εξειδικευμένα σε καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν υποδοχείς του φυλλικού οξέος. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν και τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα HeLa. Για να διαπιστωθεί η ικανότητα εξειδικευμένης αναγνώρισης της επιφάνειας των καρκινικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων με το νανοϋβρίδιο παρουσία και απουσία ελεύθερου φυλλικού οξέος. Επίσης τα κύτταρα επώαστηκαν και με ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX για σύγκριση. Η ποσότητα της πρωτοπορφυρίνης IX υπολογίστηκε με βάση την εκπομπή φθορισμού των διαλυμάτων στα 630 nm. Στο Σχήμα 36 φαίνεται ο μέσος όρος

τριών μετρήσεων της έντασης φθορισμού για κάθε ένα από τα 4 δείγματα. Όπως παρατηρείται η ποσότητα της πρωτοπορφυρίνης IX που δεσμεύεται στα κύτταρα HeLa είναι πολύ μεγαλύτερη παρουσία του νανοϋβριδίου από ότι με την ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX (δείγματα "Control" και "LDH"). Αξιοσημείωτο είναι όμως το γεγονός πως η ποσότητα της πορφυρίνης παρουσιάζει σημαντική μείωση όταν στο διάλυμα επώασης υπάρχει και ελεύθερο φυλλικό οξύ εκτός από το νανοϋβρίδιο [LDH(φυλλικό)]pplX (δείγματα "LDH" και "folate + LDH").

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

### Σύνθεση και χαρακτηρισμός LDH-NO<sub>3</sub> και LDH-CO<sub>3</sub>

Για τη σύνθεση των νανοϋβριδίων των φυλλόμορφων διπλών υδροξειδίων είναι απαραίτητη η σύνθεση του αρχικού υλικού από το οποίο θα προκύψουν, με ιονανταλλαγή ή χημική τροποποίηση, τα τελικά υβριδικά προϊόντα. Το αρχικό υλικό που επιλέχθηκε για το σκοπό αυτό ήταν η νιτρική ή η ανθρακική μορφή του LDH ανάλογα με την χρήση για την οποία προοριζόταν. Επίσης χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά Mg<sup>2+</sup> και Al<sup>3+</sup> σε αναλογία 2/1 ή 3/1 καθώς τα LDH μαγνησίου-αργιλίου είναι καλά χαρακτηρισμένα και βιοσυμβατά υλικά. Η νιτρική μορφή του LDH παρασκευάστηκε με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης σε χαμηλό υπερκορεσμό και σταθερό pH.<sup>8, 9</sup> Το ανθρακικό LDH προέκυψε με ανταλλαγή των νιτρικών ιόντων του LDH-NO<sub>3</sub> με CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>.

Η χαρακτηριστική δομή των φυλλόμορφων διπλών υδροξειδίων με τα διαδοχικά φύλλα των υδροξειδίων του Mg και του Al να διαχωρίζονται από στρώματα που περιέχουν ανιόντα και H<sub>2</sub>O δίνει χαρακτηριστικά διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X. Επομένως η τεχνική της περίθλασης ακτίνων X χρησιμοποιείται ευρέως για να διαπιστωθεί η επιτυχής σύνθεση των υλικών αυτών. Η σημαντικότερη πληροφορία που λαμβάνεται από το διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X ενός LDH είναι η απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών φύλλων μεταλλικών υδροξειδίων. Η απόσταση αυτή εξαρτάται τόσο από το ανιόν που βρίσκεται στα ενδιάμεσα στρώματα όσο και από την πυκνότητα φορτίου των ανόργανων στρωμάτων κάτι το οποίο φαίνεται και στον Πίνακα 3 όπου συγκρίνονται οι αποστάσεις για τρία διαφορετικά LDH. Η πρώτη παρατήρηση που προκύπτει από αυτή τη σύγκριση είναι η διαφορά των αποστάσεων για τα ανθρακικά (7.7 Å) και τα νιτρικά (8.8 Å). Παρόλο που τα δύο ανιόντα έχουν παρόμοιο μέγεθος είναι το διαφορετικό τους φορτίο που έχει ως αποτέλεσμα να παρατηρείται αυτή η διαφορά.<sup>8</sup> Συγκριτικά με τα CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> απαιτείται διπλάσιος αριθμός NO<sub>3</sub><sup>-</sup> για την εξουδετέρωση του φορτίου των ανόργανων στρωμάτων και αυτό έχει ως αποτέλεσμα η διάταξή τους να μην είναι απολύτως

παράλληλη με τα ανόργανα στρώματα και επομένως η απόσταση των στρωμάτων να είναι μεγαλύτερη. Επίσης, από τα δεδομένα του Πίνακα 3 φαίνεται πως νιτρικά LDH με διαφορετική αναλογία Mg/Al δίνουν διαφορετικές αποστάσεις στο διάγραμμα περίθλασης ακτίνων Χ. Η διάταξη των νιτρικών ιόντων είναι και πάλι η αιτία αφού καθώς μειώνεται η πυκνότητα φορτίου των ανόργανων στρωμάτων μειώνεται και η πυκνότητα των νιτρικών ιόντων με αποτέλεσμα να διατάσσονται παράλληλα με τα ανόργανα στρώματα όπως δηλαδή και τα ανθρακικά ιόντα. Έτσι δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στην απόσταση των στρωμάτων του  $[Mg_4Al_2(OH)_{12}]CO_3$  (7.7 Å) και του  $[Mg_4Al(OH)_{10}]NO_3$  (8.1 Å).

Συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με τη χημική σύσταση των LDH λαμβάνονται από τη φασματοσκοπία υπερύθρου. Όπως φαίνεται από τα φάσματα υπερύθρου (Σχήμα 10) είναι εύκολη η διάκριση μεταξύ του LDH-NO<sub>3</sub> και του LDH-CO<sub>3</sub>. Η χαρακτηριστική οξεία κορυφή που οφείλεται στην ν<sub>3</sub> δόνηση του νιτρικού ιόντος εμφανίζεται στους 1385 cm<sup>-1</sup> ενώ η ν<sub>2</sub> εμφανίζεται ως διπλή κορυφή στους 825 και 840 cm<sup>-1</sup>. Αυτές οι συχνότητες δόνησης αποδεικνύουν τη δέσμευση των νιτρικών ιόντων πάνω στα ανόργανα στρώματα του LDH καθώς διαφέρουν από τις συχνότητες δόνησης του ελεύθερου νιτρικού ιόντος (ν<sub>2</sub>: 836 cm<sup>-1</sup>, ν<sub>3</sub>: 1358 cm<sup>-1</sup>).<sup>114</sup> Στο LDH-CO<sub>3</sub> η ν<sub>3</sub> δόνηση εμφανίζεται στους 1360 cm<sup>-1</sup> ενώ στο ελεύθερο CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> στους 1415 cm<sup>-1</sup>. Επίσης, από το φάσμα του LDH-CO<sub>3</sub> γίνεται εμφανές ότι η ανταλλαγή των νιτρικών ιόντων δεν είναι πλήρης και έτσι παρατηρούνται οι ν<sub>3</sub> δονήσεις τόσο του ανθρακικού όσο και του νιτρικού ιόντος.

Η θερμοσταθμική ανάλυση δίνει πληροφορίες για την κατά βάρος σύσταση των υλικών που συντέθηκαν. Κατά τη θέρμανση των LDH παρατηρούνται δύο ενδόθερμες διαδικασίες.<sup>8</sup> Η πρώτη παρατηρείται γύρω στους 350 με 400 K, όπου εξατμίζονται τα μόρια H<sub>2</sub>O που βρίσκονται στα ενδιάμεσα στρώματα. Στο Σχήμα 11 η απώλεια βάρους που παρατηρείται σε αυτό το στάδιο ήταν 12 % w/w γεγονός που συμφωνεί με τη θεωρητική σύσταση για το νιτρικό LDH με Mg/A = 3/1:  $[Mg_3Al(OH)_8]NO_3 \cdot 2H_2O$ . Στο δεύτερο στάδιο, μεταξύ 550 και 800 K η δομή του LDH καταρρέει καθώς απομακρύνονται τα νιτρικά ή ανθρακικά ιόντα μαζί με τα υδροξύλια των ανόργανων στρωμάτων και

παράγονται μεταλλικά οξείδια όπως  $MgAl_2O_4$  και  $MgO$ . Η συνολική απώλεια βάρους είναι της τάξης του 50 % w/w.

## Χημική τροποποίηση της επιφάνειας του LDH

Η επιφάνεια των σωματιδίων των φυλλόμορφων διπλών υδροξειδίων καλύπτεται από υδροξύλια που γεφυρώνουν μεταξύ τους τα μέταλλα των ανόργανων στρωμάτων. Αρνητικά φορτισμένα μόρια μπορούν να προσδεθούν στην εξωτερική επιφάνεια του LDH με ιονανταλλαγή μεταβάλλοντας τις ιδιότητες της επιφάνειάς του, ωστόσο ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση δεν είναι ιδιαίτερα ισχυρή και τα αρνητικά φορτισμένα μόρια μπορούν να αποδεσμευτούν εύκολα. Αντίθετα, η ομοιοπολική τροποποίηση της επιφάνειας μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμη πρόσδεση δραστικών ομάδων στην επιφάνεια του LDH. Έχουν μελετηθεί διάφοροι τρόποι με τους οποίους κατάλληλα μόρια μπορούν να αντιδράσουν με τις υδροξυλομάδες της επιφάνειας του LDH όπως η αντίδραση με χλωρίδια οξέων σε διαλύτη ακετονιτρίλιο<sup>123</sup> ή η αντίδραση με δισουκκινιμίδυλο εστέρες παρουσία πυριδίνης και τριαιθυλαμίνης σε ακετόνη.<sup>12</sup> Στην δεύτερη περίπτωση μάλιστα το τροποποιημένο LDH αντιδρά με πρωτεΐνες με αποτέλεσμα την ομοιοπολική τους πρόσδεση στην επιφάνεια του LDH. Μια τρίτη μέθοδος, η οποία χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία, είναι η αντίδραση του LDH με αμινοπρόπυλο τριαιθόξυ σιλάνιο (APTS) η οποία έχει χρησιμοποιηθεί τόσο για την τροποποίηση LDH<sup>107</sup> όσο και αργιλοπυριτικών υλικών.<sup>109</sup> Η τροποποίηση έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη πρωτοταγών αμινομάδων στην επιφάνεια οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω αντιδράσεις. Με τον τρόπο αυτό έχουν προσδεθεί ομοιοπολικά σιδηροπορφυρίνες σε LDH.<sup>108</sup>

Στην παρούσα εργασία η επιφάνεια του LDH τροποποιήθηκε με APTS και στη συνέχεια προσδέθηκε φυλλικό οξύ ή βιοτίνη. Και τα δύο μόρια διαθέτουν καρβοξυλικές ομάδες οι οποίες, αφού ενεργοποιηθούν με δικυκλοέξυλο καρβοδιιμίδιο, αντιδρούν με τις αμινομάδες στην επιφάνεια του τροποποιημένου LDH σχηματίζοντας αμιδικούς δεσμούς. Ωστόσο τα καρβοξυλικά οξέα μπορούν να προσδεθούν ηλεκτροστατικά στο LDH κάτι το οποίο δεν είναι επιθυμητό λόγω του ότι το τροποποιημένο LDH δε θα διατηρεί τις ιονανταλλακτικές του ιδιότητες.

Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε LDH-CO<sub>3</sub> δεδομένου ότι τα ανθρακικά ιόντα ανταλλάσσονται πιο δύσκολα. Επιπλέον, τα τελικά προϊόντα εκπλύθηκαν με οργανικούς διαλύτες καθώς και με υδατικά διαλύματα Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και απορρυπαντικού ώστε να απομακρυνθούν τυχόν προσροφημένα ή ηλεκτροστατικά προσδεμένα μόρια φυλλικού οξέος ή βιοτίνης. Ο χαρακτηρισμός τόσο του [LDH(Si-NH<sub>2</sub>)]CO<sub>3</sub>, όσο και των [LDH(φυλλικό)]CO<sub>3</sub> και [LDH(βιοτίνη)]CO<sub>3</sub> με περίθλαση ακτίνων Χ έδειξαν ότι ανάμεσα στα ανόργανα στρώματα υπάρχουν ανθρακικά ιόντα και επομένως το φυλλικό οξύ και η βιοτίνη που ανιχνεύθηκαν με φασματοσκοπία υπερύθρου και φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού είναι προσδεμένα ομοιοπολικά πάνω στο LDH.

Από τα φάσματα υπερύθρου γίνεται αρχικά εμφανής η πρόσδεση του αμινοπρόπυλο σιλανίου στην επιφάνεια του LDH καθώς εμφανίζονται κορυφές στους 1045 και 1120 cm<sup>-1</sup> που αποδίδονται στους δεσμούς Si – O.<sup>108, 116</sup> Ακόμα, στα φάσματα των [LDH(φυλλικό)]CO<sub>3</sub> και [LDH(βιοτίνη)]CO<sub>3</sub> εμφανίζονται επιπλέον κορυφές που μαρτυρούν την ύπαρξη του φυλλικού οξέος και της βιοτίνης αντίστοιχα. Ειδικά στην περίπτωση του νανοϋβριδίου LDH(φυλλικό)]CO<sub>3</sub> το κίτρινο χρώμα του αποδεικνύει την πρόσδεση του φυλλικού οξέος κάτι που φαίνεται και από το φάσμα υπεριώδους – ορατού στο Σχήμα 14. Η χαρακτηριστική απορρόφηση του φυλλικού οξέος στα 294 nm σε οξινομένο αιθανολικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίησή του και έτσι βρέθηκε πως το νανοϋβρίδιο LDH(φυλλικό)]CO<sub>3</sub> περιέχει 6.5 % w/w φυλλικό οξύ. Με βάση το ποσοστό του φυλλικού στο νανοϋβρίδιο μπορεί να υπολογιστεί ότι κατά την τροποποίηση με APTS αντιδρά περίπου το 2 % των υδροξυλίων του LDH.

## **Νανοϋβρίδια LDH με υδρόφιλα και υδρόφοβα αντιβιοτικά**

### *LDH-χολικό-γραμισιδίνη*

Η γραμισιδίνη είναι ένα υδρόφοβο μόριο αφού δε φέρει φορτισμένα αμινοξέα ενώ ακόμα και τα άκρα της πεπτιδικής αλυσίδας έχουν υποστεί τροποποίηση και δεν έχουν φορτίο. Επομένως η εισαγωγή της στο LDH δε θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί με απλή ιονανταλλαγή. Για το λόγο αυτό



ακολουθήθηκε στρατηγική δύο βημάτων για την παρασκευή του νανοϋβριδίου LDH με γραμισιδίνη. Αρχικά η γραμισιδίνη διαλυτοποιήθηκε σε αρνητικά φορτισμένα μικύλλια χολικού νατρίου και στη συνέχεια τα μικύλλια, με ενσωματωμένη τη γραμισιδίνη, εισήχθησαν στο LDH με ιονανταλλαγή. Η γραμισιδίνη διαλύθηκε αρχικά σε 2,2,2-τριφθοροαιθανόλη ώστε να σχηματιστεί η μορφή απλής αλυσίδας και εισερχόμενη στα μικύλλια να σχηματίσει ελικοειδή διμερή.<sup>80</sup> Εκτός από το χολικό νάτριο χρησιμοποιήθηκαν επίσης μικύλλια SDS καθώς και μικτά μικύλλια μη-ιονικών απορρυπαντικών με παλμιτικό οξύ δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα.

Ο χαρακτηρισμός του νανοϋβριδίου με περίθλαση ακτίνων Χ έδειξε ότι η απόσταση των ανόργανων στρωμάτων του LDH είναι 35.3 Å η οποία αντιστοιχεί σε διπλοστοιβάδα μορίων του χολικού ιόντος. Παρόμοια απόσταση παρατηρείται για το LDH-χολικό (33.9 Å) καθώς και για το LDH-δεοξυχολικό (32.9 Å).<sup>124</sup> Η γραμισιδίνη πιθανότατα βρίσκεται ενσωματωμένη στη διπλοστοιβάδα του χολικού, ωστόσο η περίθλαση ακτίνων Χ δεν δίνει στοιχεία που να επιβεβαιώνουν τον ισχυρισμό αυτό. Η ανίχνευση όμως της χαρακτηριστικής απορρόφησης της γραμισιδίνης στο φάσμα υπεριώδους-ορατού, που οφείλεται στα κατάλοιπα θρυπτοφάνης που περιέχει, αποδεικνύει το γεγονός ότι η γραμισιδίνη βρίσκεται ενσωματωμένη στο νανοϋβρίδιο.

Η απελευθέρωση της γραμισιδίνης από το νανοϋβρίδιο LDH-χολικό-γραμισιδίνη εξαρτάται από το διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί. Σε απιονισμένο νερό δεν παρατηρείται απελευθέρωση, ενώ αντίθετα σε αιθανόλη, η οποία αποτελεί καλό διαλύτη για τη γραμισιδίνη, η απελευθέρωση είναι άμεση. Η ελεγχόμενη απελευθέρωση, που είναι ο στόχος της σύνθεσης του νανοϋβριδίου, επιτυγχάνεται μόνο σε υδατικό διάλυμα μικυλλίων. Χρησιμοποιώντας το μη-ιονικό απορρυπαντικό δωδέκυλο μαλτοζίτη σε συγκέντρωση 15 mM, δηλαδή αρκετά υψηλότερη από την κρίσιμη συγκέντρωση μικυλλίων (CMC = 0.15 mM), παρατηρήθηκε σταδιακή απελευθέρωση της γραμισιδίνης. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η χρήση του νανοϋβριδίου σε σύστημα ελεγχόμενης απελευθέρωσης δίνει επιπλέον το πλεονέκτημα της απελευθέρωσης της γραμισιδίνης μόνο σε

βιολογικές μεμβράνες, όπου είναι ο στόχος της δράσης της, και όχι σε οποιοδήποτε περιβάλλον.

### *LDH-χολικό-αμφοτερικίνη B και LDH-αμφοτερικίνη B*

Όπως και στην περίπτωση της γραμισιδίνης έτσι και με την αμφοτερικίνη B ακολουθείται η ίδια στρατηγική δύο βημάτων για τη σύνθεση του νανοϋβριδίου LDH-χολικό-αμφοτερικίνη B. Η διαφορά όμως στην περίπτωση της αμφοτερικίνης B είναι η ύπαρξη της καρβοξυλομάδας που επιτρέπει την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με το LDH. Για αυτό το λόγο συντέθηκε και το νανοϋβρίδιο LDH-αμφοτερικίνη B όπου η πρόσδεση του αντιβιοτικού στο LDH βασίζεται αποκλειστικά στην ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση και όχι στην υδρόφοβη αλληλεπίδραση με το χολικό. Από πλευράς σύνθεσης η διαφορά βρίσκεται στη χρήση του μη-ιονικού απορρυπαντικού Hecameg το οποίο, σε αντίθεση με το χολικό νάτριο, δεν παραμένει στο τελικό προϊόν όπως αποδεικνύεται από το φάσμα υπερύθρου.

Όταν το χολικό και η αμφοτερικίνη B συνυπάρχουν στα ενδιάμεσα στρώματα του LDH, ο χαρακτηρισμός με περίθλαση ακτίνων X και φασματοσκοπία υπερύθρου δεν μπορεί να υποστηρίξει την ύπαρξη της αμφοτερικίνης B στο τελικό προϊόν καθώς επικρατούν τα χαρακτηριστικά του χολικού ιόντος που βρίσκεται σε περίσσεια. Έτσι η απόσταση των 35.3 Å που υπολογίζεται από το διάγραμμα XRD οφείλεται στη διπλοστοιβάδα χολικού ενώ στο φάσμα υπερύθρου οι κορυφές στους 1633  $\text{cm}^{-1}$ , 1547  $\text{cm}^{-1}$ , 1077  $\text{cm}^{-1}$  και 1038  $\text{cm}^{-1}$  είναι χαρακτηριστικές του χολικού ιόντος και παρατηρούνται τόσο στο φάσμα IR του χολικού νατρίου όσο και του νανοϋβριδίου LDH-χολικό. Παρόλα αυτά το κίτρινο χρώμα και το χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης μαρτυρά την παρουσία της αμφοτερικίνης B στα νανοϋβρίδια. Το φάσμα απορρόφησης στην περιοχή του υπεριώδους-ορατού δίνει επίσης πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση των μορίων της αμφοτερικίνης B μεταξύ τους. Όταν τα μόρια του αντιβιοτικού συσσωματώνονται παρατηρείται μεταβολή στη σχετική ένταση των κορυφών στο φάσμα υπεριώδους-ορατού και η μέγιστη απορρόφηση μετατοπίζεται στα 340 nm.<sup>82</sup> Κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται στο νανοϋβρίδιο LDH-

χολικό-αμφοτερικίνη Β του οποίου το φάσμα είναι παρόμοιο με την μονομερή μορφή της αμφοτερικίνης Β διαλυμένης σε οργανικό διαλύτη.

Η απουσία του χολικού νατρίου στο νανοϋβρίδιο LDH-αμφοτερικίνη Β διευκολύνει την ανίχνευση του αντιβιοτικού με την περίθλαση ακτίνων Χ και τη φασματοσκοπία υπερύθρου. Στο διάγραμμα XRD η κορυφή κοντά στις  $11^\circ$  οφείλεται στα νιτρικά ιόντα που δεν έχουν πλήρως αντικατασταθεί από την αμφοτερικίνη Β. Ωστόσο, όπως φαίνεται στη μεγεθυμένη περιοχή στο Σχήμα 15, εμφανίζεται καθαρά μία κορυφή που αντιστοιχεί σε απόσταση  $17.0 \text{ \AA}$  η οποία είναι προφανώς δεύτερης τάξης περίθλαση με την πρώτη να είναι ο ώμος κοντά στα  $34 \text{ \AA}$ . Αυτή η διεύρυνση των στρωμάτων του LDH δεν μπορεί παρά να οφείλεται στην εισαγωγή της αμφοτερικίνης Β ανάμεσα στα ανόργανα στρώματα. Επιπλέον αποδείξεις δίνει το φάσμα IR του νανοϋβριδίου όπου εμφανίζονται οι κορυφές στην περιοχή μεταξύ  $1550 \text{ cm}^{-1}$  και  $1750 \text{ cm}^{-1}$  οι οποίες παρατηρούνται και στο φάσμα της ελεύθερης αμφοτερικίνης Β. Το φάσμα υπεριώδους-ορατού του νανοϋβριδίου LDH-αμφοτερικίνη Β είναι όμοιο με αυτό του LDH-χολικό-αμφοτερικίνη Β, εμφανίζει δηλαδή τις χαρακτηριστικές κορυφές της αμφοτερικίνης Β στα  $352 \text{ nm}$ ,  $369 \text{ nm}$ ,  $390 \text{ nm}$  και  $415 \text{ nm}$  που δείχνουν ότι βρίσκεται στην μονομερή της μορφή.

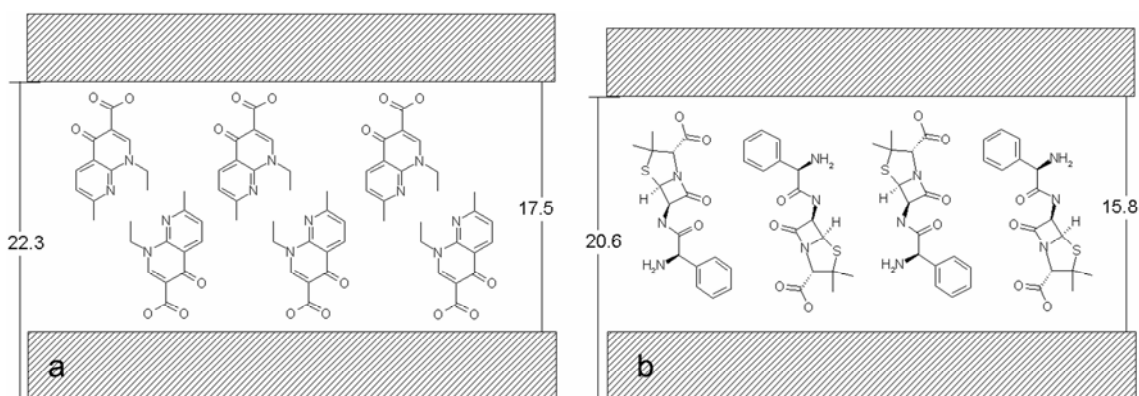
Για την απελευθέρωση της αμφοτερικίνης Β από τα δύο νανοϋβρίδια απαιτείται η παρουσία τόσο μικυλλίων απορρυπαντικού όσο και NaCl έτσι ώστε να υπερνικηθούν οι υδρόφοβες αλλά και οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις που την συγκρατούν. Επιπλέον, η χρήση απιονισμένου νερού ή οργανικών διαλυτών όπως η αιθανόλη και το DMSO δεν προκαλούν απελευθέρωση, γεγονός που δείχνει ότι, όπως και στην περίπτωση της γραμισιδίνης, η απελευθέρωση απαιτεί ένα υδρόφοβο περιβάλλον όπως τα μικύλλια ή οι βιολογικές μεμβράνες. Συγκρίνοντας το ρυθμό απελευθέρωσης της αμφοτερικίνης Β από τα δύο νανοϋβρίδια παρατηρείται ότι η απελευθέρωση είναι ταχύτερη από αυτό που περιέχει χολικό παρόλο που περιέχει μικρότερο ποσοστό αντιβιοτικού κατά βάρος ( $2.7 \%$  έναντι  $9.7 \%$ ). Μια πιθανή εξήγηση για το γεγονός αυτό είναι η αποδέσμευση ιόντων χολικού λόγω αντικατάστασης από ιόντα χλωρίου που περιέχει το ρυθμιστικό διάλυμα. Κάτι τέτοιο θα είχε ως αποτέλεσμα να

συμπαράσύρεται και μια ποσότητα αμφοτερικίνης Β μαζί με το χολικό αυξάνοντας έτσι το ρυθμό απελευθέρωσής της.

### LDH-αμπικιλλίνη και LDH-ναλιδιξικό οξύ

Τα νανοϋβρίδια με αμπικιλλίνη και το ναλιδιξικό οξύ παρασκευάστηκαν εύκολα με απλή ανάμειξη των διαλυμάτων του LDH-NO<sub>3</sub> και του αντιβιοτικού. Το ποσοστό του αντιβιοτικού στα τελικά προϊόντα ήταν υψηλό, 51.7 % w/w για την αμπικιλλίνη και 40.0 % w/w για το ναλιδιξικό οξύ, γεγονός που δείχνει σχεδόν πλήρη ανταλλαγή των νιτρικών ιόντων του αρχικού LDH. Αν και η αμπικιλλίνη είναι μεγαλύτερο μόριο από το ναλιδιξικό οξύ (Σχήμα 5), το νανοϋβρίδιο LDH-ναλιδιξικό οξύ φαίνεται να έχει μεγαλύτερη απόσταση στρωμάτων από το LDH-αμπικιλλίνη. Η απόσταση αυτή υπολογίζεται από τα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ και είναι 22.3 Å για το LDH-ναλιδιξικό οξύ και 20.7 Å για το LDH-αμπικιλλίνη. Αυτή η αντίφαση μπορεί να εξηγηθεί μόνο θεωρώντας ότι τα μόρια του ναλιδιξικού οξέος σχηματίζουν διπλοστοιβάδα στα ενδιάμεσα στρώματα του LDH ενώ η αμπικιλλίνη σχηματίζει μονοστοιβάδα, όπως αναπαρίστανται στο Σχήμα 37.

Στο φάσμα υπέρυθρου του νανοϋβριδίου LDH-αμπικιλλίνη εμφανίζονται αρκετές από τις κορυφές του αντιβιοτικού. Αυτές οφείλονται σε χαρακτηριστικές ομάδες της αμπικιλλίνης όπως το καρβονύλιο του δακτυλίου β-λακτάμης (1763 cm<sup>-1</sup>), το καρβονύλιο του αμιδικού δεσμού (1655 cm<sup>-1</sup>) καθώς και το ιονισμένο καρβοξύλιο (1397 cm<sup>-1</sup> και 1584 cm<sup>-1</sup>). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η



**Σχήμα 37.** Αναπαράσταση της διαμόρφωσης των αντιβιοτικών στα ενδιάμεσα στρώματα των νανοϋβριδίων: (a) LDH-ναλιδιξικό και (b) LDH-αμπικιλλίνη.

αμπικιλίνη βρίσκεται ακέραια και στην ανιονική της μορφή μέσα στο LDH. Η περίπτωση του ναλιδιξικού οξέος είναι πιο περίπλοκη καθώς εμφανίζονται αρκετές κορυφές στην περιοχή μεταξύ  $1300\text{ cm}^{-1}$  και  $1700\text{ cm}^{-1}$ . Ο μεγάλος αριθμός κορυφών σε αυτή την περιοχή δηλώνει την ύπαρξη διαφορετικών χημικά καρβοξυλομάδων γεγονός που έχει παρατηρηθεί και στην περίπτωση υβριδίων LDH με λιπαρά οξέα<sup>45</sup> και οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη τόσο πρωτονιωμένων όσο και αποπρωτονιωμένων καρβοξυλομάδων στο τελικό προϊόν.

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας IR είναι και τα φάσματα υπεριώδους-ορατού. Τα φάσμα του ναλιδιξικού οξέος σε υδατικό διάλυμα επηρεάζεται σημαντικά από το pH καθώς η πρωτονιωμένη και αποπρωτονιωμένη μορφή απορροφούν σε διαφορετικά μήκη κύματος.<sup>120</sup> Ενώ το φάσμα του ναλιδιξικού οξέος σε αιθανόλη εμφανίζει διπλή κορυφή στα 322 nm και 330 nm, το φάσμα του νανοϋβριδίου LDH-ναλιδιξικό οξύ σε αιθανόλη μοιάζει περισσότερο με αυτό του αντιβιοτικού σε υδατικό διάλυμα ουδέτερου pH. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να εξηγηθεί λαμβάνοντας υπόψη ότι το αντιβιοτικό βρίσκεται σε υδατικό περιβάλλον ανάμεσα στα ανόργανα στρώματα του LDH και συνυπάρχουν τόσο η δισταμένη όσο και η αδιάστατη μορφή της καρβοξυλομάδας.

Η απελευθέρωση των υδρόφιλων αντιβιοτικών σε διάλυμα NaCl είναι αρκετά γρήγορη. Όπως φαίνεται το Σχήμα 20 ο ρυθμός απελευθέρωσης της αμπικιλίνης στο διάλυμα είναι ταχύτερος από αυτόν του ναλιδιξικού οξέος, γεγονός που πιθανώς να οφείλεται στην μεγαλύτερη διαλυτότητα της αμπικιλίνης στο νερό συγκριτικά με το ναλιδιξικό οξύ καθώς και στο μεγαλύτερο κατά βάρος ποσοστό αντιβιοτικού στο νανοϋβρίδιο LDH-αμπικιλίνη. Ακόμα και σε ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς προσθήκη NaCl παρατηρείται απελευθέρωση σε σημαντικό βαθμό. Αυτό συμβαίνει καθώς το διάλυμα περιέχει ανιόντα, όπως Cl<sup>-</sup> από το ρυθμιστικό και HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> από το CO<sub>2</sub> της ατμόσφαιρας, τα οποία αντικαθιστούν τα αντιβιοτικά στο LDH. Η ύπαρξη ουδέτερων μορίων ναλιδιξικού οξέος στα ενδιάμεσα στρώματα του LDH έχει ως αποτέλεσμα η απελευθέρωση σε σκέτο ρυθμιστικό διάλυμα να είναι ταχύτερη καθώς αυτά αλληλεπιδρούν λιγότερο ισχυρά με το ανόργανο υλικό.

## Σύνθεση και χαρακτηρισμός νανοϋβριδίων LDH με πρωτοπορφυρίνη IX

Η παρασκευή των νανοϋβριδίων με πρωτοπορφυρίνη IX πραγματοποιήθηκε με ιονανταλλαγή χρησιμοποιώντας ως πρώτες ύλες το νιτρικό LDH και το δινάτριο άλας της πρωτοπορφυρίνης IX. Επίσης το διάλυμα περιείχε το μη ιονικό απορρυπαντικό Triton X – 100 σε ποσοστό 1.0 % v/v για την καλύτερη διαλυτοποίηση της πορφυρίνης η οποία σχηματίζει συσσωματώματα σε υδατικά διαλύματα. Παράλληλα παρασκευάστηκαν με τον ίδιο τρόπο τα νανοϋβρίδια LDH-PFC και LDH-παλμιτικό για να συγκριθούν με τα αντίστοιχα υλικά που περιέχουν πρωτοπορφυρίνη IX.

### *LDH-ppIX και LDH-ppIX-PFC*

Ο χαρακτηρισμός των νανοϋβριδίων LDH-ppIX, LDH-ppIX-PFC και LDH-PFC βασίστηκε στην περίθλαση ακτίνων X, τη φασματοσκοπία υπερύθρου και τη θερμοσταθμική ανάλυση. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X (Σχήμα 21) το LDH-PFC δίνει οξείες κορυφές σε αντίθεση με τα LDH-ppIX και LDH-ppIX-PFC. Συνεπώς το LDH-PFC παρουσιάζει καλά οργανωμένη δομή και όπως μαρτυρά και η απόσταση των στρωμάτων (23.0 Å) υπάρχει αρκετός χώρος για να φιλοξενήσει μια διπλοστοιβάδα των μορίων του φθοριωμένου επτανοϊκού οξέος. Οι περιθλάσεις των άλλων δύο νανοϋβριδίων είναι χαμηλότερης έντασης γεγονός που υποδεικνύει λιγότερο οργανωμένη δομή. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε διαφορετικό προσανατολισμό των πορφυρινικών δακτυλίων μέσα στα ενδιάμεσα στρώματα του LDH. Πάντως η αύξηση της απόστασης των στρωμάτων συγκριτικά με το LDH-NO<sub>3</sub> και στα τρία νανοϋβρίδια αποδεικνύει την εισαγωγή της πορφυρίνης ή του φθοριωμένου επτανοϊκού οξέος ανάμεσα στα ανόργανα στρώματα του LDH. Επιπλέον, η τιμή του d-spacing του LDH-ppIX είναι παρόμοια με αυτή που αναφέρεται σε προηγούμενες μελέτες υβριδίων πηλού-πορφυρίνης.<sup>21, 23</sup>

Η φασματοσκοπία υπερύθρου δίνει επιπλέον ενδείξεις για την ύπαρξη της πρωτοπορφυρίνης IX στα νανοϋβρίδια καθώς και για την κατάσταση των καρβοξυλικών ομάδων.<sup>45</sup> Στο φάσμα του LDH-ppIX η συμμετρική και η

αντισυμμετρική δόνηση της καρβοξυλομάδας εμφανίζονται στους 1410 και 1550  $\text{cm}^{-1}$  αντίστοιχα. Επιπλέον, στην περιοχή μεταξύ 1000 και 1300  $\text{cm}^{-1}$  παρατηρούνται αρκετές κορυφές που είναι χαρακτηριστικές της πρωτοπορφυρίνης IX. Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η πρωτοπορφυρίνη IX έχει εισαχθεί στο LDH και αλληλεπιιδρά ηλεκτροστατικά με τα ανόργανα στρώματα μέσω των αρνητικά φορτισμένων καρβοξυλομάδων της. Από τη σύγκριση των φασμάτων των νανοϋβριδίων LDH-PFC, LDH-ppIX και LDH-ppIX-PFC καθίσταται εμφανής η συνύπαρξη της πορφυρίνης και του υπερφθοροεπτανοϊκού οξέος στο LDH-ppIX-PFC καθώς στο φάσμα του παρατηρούνται τόσο οι κορυφές που οφείλονται στην πορφυρίνη όσο και αυτές του οξέος, δηλαδή η αντισυμμετρική δόνηση της καρβοξυλομάδας στους 1670  $\text{cm}^{-1}$  και οι δονήσεις που οφείλονται στους δεσμούς C – F.

Η σύσταση των νανοϋβριδίων μελετήθηκε με θερμοσταθμική ανάλυση και φασματοσκοπία υπεριώδους - ορατού. Με την πρώτη μέθοδο μετρήθηκε το κατά βάρος ποσοστό του  $\text{H}_2\text{O}$ , της πρωτοπορφυρίνης IX και του υπερφθοροεπτανοϊκού οξέος στα νανοϋβρίδια. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν την συνύπαρξη της πορφυρίνης και του φθοριομένου οξέος στο νανοϋβρίδιο LDH-ppIX-PFC σε ποσοστό 10 % και 15 % w/w αντίστοιχα. Το LDH-ppIX περιέχει σχεδόν διπλάσια ποσότητα πορφυρίνης (18 % w/w). Επιπλέον, παρατηρείται ότι το ποσοστό του  $\text{H}_2\text{O}$  στο LDH-ppIX είναι 10 % w/w, δηλαδή περίπου όσο και στο LDH- $\text{NO}_3$ , ενώ στα νανοϋβρίδια που περιέχουν το υπερφθοροεπτανοϊκό οξύ το ποσοστό του  $\text{H}_2\text{O}$  είναι 4 %, γεγονός που συμφωνεί με τον πιο υδρόφοβο χαρακτήρα των υλικών αυτών. Το ποσοστό της πρωτοπορφυρίνης IX υπολογίστηκε και φασματομετρικά και τα αποτελέσματα (23 % για το LDH-ppIX και 11 % για το LDH-ppIX-PFC) συμφωνούν με αυτά της θερμοσταθμικής ανάλυσης.

#### *LDH-ppIX και LDH-ppIX-παλμιτικό*

Η δομή και οι φασματοσκοπικές ιδιότητες του νανοϋβριδίου LDH-ppIX-παλμιτικό συγκρίθηκαν με αυτές του LDH-ppIX και του LDH-παλμιτικό. Συγκρίνοντας τα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X του LDH-παλμιτικό και του

LDH-ppIX-παλμιτικό παρατηρούνται κάποιες διαφορές. Στο διάγραμμα του LDH-παλμιτικό συνυπάρχουν δύο φάσεις, μία με περιθλάσεις που αντιστοιχούν σε αποστάσεις 45.5, 23.6 και 15.8 Å και μία δεύτερη με αποστάσεις 32.0, 14.3 και 9.1 Å. Το γεγονός αυτό δείχνει πως στο LDH-παλμιτικό υπάρχουν περιοχές όπου τα μόρια του παλμιτικού οξέος σχηματίζουν διπλοστοιβάδα με πάχος περίπου 41 Å και περιοχές όπου σχηματίζουν μονοστοιβάδα με πάχος περίπου 27 Å. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται συχνά σε νανοϋβρίδια LDH με λιπαρά οξέα.<sup>15, 46</sup> Στο διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του LDH-ppIX-παλμιτικό δεν παρατηρείται κάτι αντίστοιχο. Το d-spacing για το νανοϋβρίδιο αυτό είναι 31.1 Å οπότε προκύπτει το συμπέρασμα ότι σχηματίζεται μονοστοιβάδα μορίων παλμιτικού οξέος μέσα στην οποία φιλοξενείται η πρωτοπορφυρίνη IX.

Η περίθλαση ακτίνων X δεν μπορεί από μόνη της να αποδείξει την ύπαρξη της πορφυρίνης στο νανοϋβρίδιο LDH-ppIX-παλμιτικό καθώς η παρατηρούμενη απόσταση των ανόργανων στρωμάτων θα μπορούσε να οφείλεται στο παλμιτικό οξύ χωρίς να είναι απαραίτητη η ύπαρξη της πορφυρίνης. Ωστόσο ο χαρακτηρισμός του νανοϋβριδίου με φασματοσκοπία υπερύθρου και φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού δίνει τις απαραίτητες αποδείξεις. Στο φάσμα υπερύθρου του LDH-παλμιτικό (Σχήμα 24A) εμφανίζονται κορυφές που οφείλονται είτε στις ομάδες CH<sub>2</sub> είτε στην καρβοξυλομάδα του παλμιτικού οξέος. Η πρωτοπορφυρίνη IX διαθέτει επίσης δύο καρβοξυλομάδες και έτσι στο φάσμα του LDH-ppIX (Σχήμα 23b) επικρατούν οι κορυφές που οφείλονται σ' αυτές. Επιπλέον όμως, εμφανίζεται μια ομάδα κορυφών μεταξύ 850 και 1150 cm<sup>-1</sup> που οφείλονται σε δονήσεις του πορφυρινικού δακτυλίου. Στο φάσμα υπερύθρου του LDH-ppIX-παλμιτικό (Σχήμα 24B) εμφανίζονται οι κορυφές αυτές αποδεικνύοντας την ύπαρξη της πρωτοπορφυρίνης IX. Ακόμα παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές των ομάδων CH<sub>2</sub> και των καρβοξυλομάδων.

Περεταίρω απόδειξη της ύπαρξης της πρωτοπορφυρίνης IX είναι το χαρακτηριστικό καφεκόκκινο χρώμα των νανοϋβριδίων. Το χρώμα αυτό οφείλεται σε μια σειρά από ταινίες απορρόφησης του ορατού φωτός που είναι χαρακτηριστικές για όλες τις πορφυρίνες. Οι φασματοσκοπικές ιδιότητες της

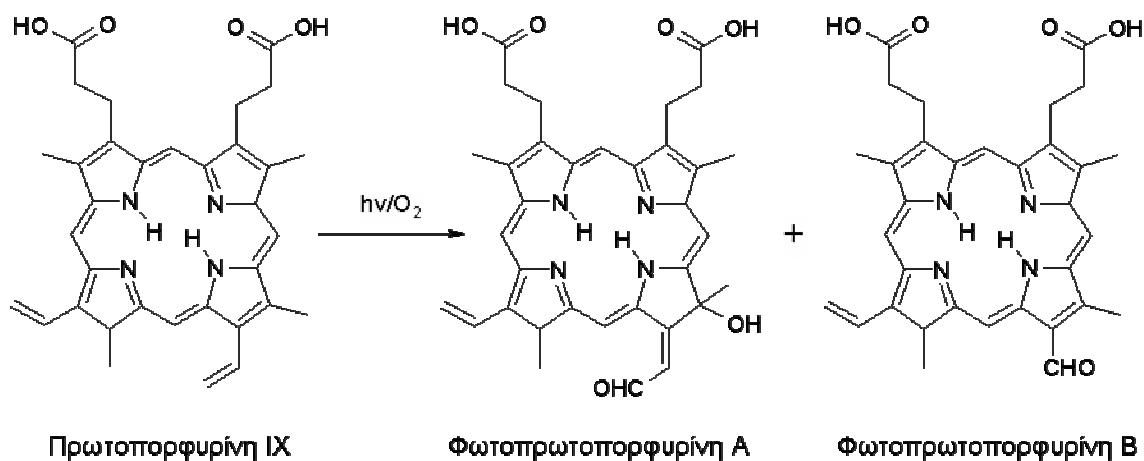


πρωτοπορφυρίνης IX επηρεάζονται από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται καθώς και από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων της χρωστικής. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 26 και στον Πίνακα 6 τα φάσματα της πρωτοπορφυρίνης IX σε DMF, H<sub>2</sub>O και υδατικό διάλυμα μικυλλίων SDS διαφέρουν μεταξύ τους. Οι κυριότερες διαφορές εντοπίζονται στις περιοχές μεταξύ 350 και 500 nm καθώς και μεταξύ 630 και 650 nm. Σε υδατικό διάλυμα η ταινία Soret εμφανίζεται στα 380 nm ενώ υπάρχει και μια κορυφή στα 480 nm. Επίσης χαρακτηριστική είναι και η κορυφή στα 643 nm. Όταν η χρωστική είναι διαλυμένη σε μικύλλια SDS η Soret βρίσκεται στα 407 nm ενώ δεν υπάρχει κορυφή κοντά στα 470 nm. Επίσης εμφανίζεται μια κορυφή στα 504 nm ενώ η τελευταία από τις Q-bands βρίσκεται στα 632 nm. Μια ενδιάμεση κατάσταση εμφανίζεται σε διαλύτη DMF. Η Soret βρίσκεται στα 408 nm αλλά εμφανίζεται και μια χαμηλότερης έντασης κορυφή στα 474 nm. Επίσης η τελευταία από τις Q-bands βρίσκεται στα 651 nm αλλά παρατηρείται και μια λιγότερο έντονη κορυφή στα 630 nm. Αυτές οι αλλαγές έχουν παρατηρηθεί σε φασματοσκοπικές μελέτες της πρωτοπορφυρίνης IX<sup>125</sup> και αποδίδονται στη συσσωμάτωση της πορφυρίνης σε υδατικό διάλυμα σε αντίθεση με την πλήρη διαλυτοποίησή της σε μικύλλια SDS. Τα χαρακτηριστικά της πλήρως διαλυτοποιημένης πρωτοπορφυρίνης IX είναι: (1) η οξεία ταινία Soret με μέγιστο μεταξύ 405 και 415 nm, (2) η απουσία κορυφών στα 470 και 650 nm και (3) η εμφάνιση κορυφών στα 505 και 630 nm.

Το φάσμα του νανοϋβριδίου LDH-ppIX χαρακτηρίζεται από την ευρεία ταινία Soret (400 – 500 nm) και την εμφάνιση της τελευταίας Q-band στα 646 nm τόσο σε υδατικό διάλυμα όσο και σε DMF. Τα χαρακτηριστικά αυτά δείχνουν ότι τα μόρια της πρωτοπορφυρίνης IX είναι συσσωματωμένα στα ενδιάμεσα στρώματα του LDH. Το φάσμα του νανοϋβριδίου LDH-ppIX-παλμιτικό σε H<sub>2</sub>O εμφανίζει μια ευρεία ταινία Soret που αποτελείται από δύο κορυφές στα 416 και 470 nm. Επίσης παρατηρείται και η κορυφή στα 646 nm γεγονός που δείχνει και πάλι συσσωμάτωση των μορίων της πορφυρίνης. Ωστόσο σε διαλύτη DMF το φάσμα είναι αρκετά διαφορετικό και μοιάζει αρκετά με αυτό της ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX σε DMF. Η Soret είναι οξεία με μέγιστο στα 406 nm ενώ εμφανίζεται και η κορυφή στα 505 nm. Στην περιοχή των 600 nm εμφανίζονται

δύο κορυφές, στα 633 και 643 nm. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν καλύτερη διαλυτοποίηση της πρωτοπορφυρίνης IX κάτι που εξηγείται θεωρώντας πως μέσα στη μονοστοιβάδα του παλμιτικού οξέος περιορίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων της πορφυρίνης.

Ένα ακόμα χαρακτηριστικό που εμφανίζεται μόνο στα φάσματα υπεριώδους – ορατού των νανοϋβριδίων αλλά όχι σε αυτά της ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX είναι η κορυφή στα 671-672 nm (DMF) ή 686-687 nm (H<sub>2</sub>O). Σύμφωνα με μελέτες σε διάφορες πορφυρίνες ο λόγος που παρατηρείται η ανάπτυξη κορυφής σε μεγαλύτερα μήκη κύματος είναι η φωτοεπαγόμενη αυτοοξειδωση της πορφυρίνης.<sup>93, 126</sup> Με τον τρόπο αυτό παράγονται οι «φωτοπρωτοπορφυρίνες» A και B σύμφωνα με την αντίδραση που φαίνεται στο Σχήμα 38. Πιθανόν λοιπόν είναι κατά τη σύνθεση ή την αποθήκευση των



**Σχήμα 38.** Προϊόντα φωτοοξειδωσης της πρωτοπορφυρίνης IX

νανοϋβριδίων LDH-ppIX και LDH-ppIX-παλμιτικό να οξειδώθηκε σε κάποιο βαθμό η πρωτοπορφυρίνη IX δίνοντας αντίστοιχα προϊόντα. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται στα διαλύματα της ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX καθώς τα φάσματα ελήφθησαν σε πρόσφατα παρασκευασμένα δείγματα.

Το περιβάλλον της πρωτοπορφυρίνης IX στα νανοϋβρίδια LDH-ppIX και LDH-ppIX-παλμιτικό μελετήθηκε και με φασματοσκοπία φθορισμού. Παρατηρώντας το Σχήμα 27 φαίνεται ότι το φάσμα εκπομπής του νανοϋβριδίου LDH-ppIX σε υδατικό διάλυμα διαφέρει από αυτό που λαμβάνεται σε διαλύτη

DMF. Και στις δύο περιπτώσεις μοιάζει με αυτό της ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX στον αντίστοιχο διαλύτη. Αντίθετα, το φάσμα του νανοϋβριδίου LDH-ppIX-παλμιτικό δεν αλλάζει όταν αλλάζει ο διαλύτης. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να ερμηνευτούν υποθέτοντας ότι στην περίπτωση του LDH-ppIX η πορφυρίνη είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη ενώ στην περίπτωση του LDH-ppIX-παλμιτικό βρίσκεται προστατευμένη μέσα στη μονοστοιβάδα των μορίων του παλμιτικού οξέος και δεν αλληλεπιδρά με το διαλύτη. Στο συμπέρασμα αυτό οδηγεί και το γεγονός ότι η κορυφή στα 677-679 nm που παρατηρείται στα φάσματα εκπομπής του LDH-ppIX-παλμιτικό εμφανίζεται και στο φάσμα της πρωτοπορφυρίνης IX όταν βρίσκεται στο υδρόφοβο περιβάλλον των μικυλλίων του SDS (Σχήμα 27A).

## **Εφαρμογές των νανοϋβριδίων LDH με πρωτοπορφυρίνη IX**

### *Φωτοοξειδωση οργανικών υποστρωμάτων με τη χρήση νανοϋβριδίων LDH-ppIX*

Τόσο η ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX όσο και τα νανοϋβρίδια LDH-ppIX και LDH-ppIX-PFC καταλύουν την φωτοοξειδωση του ιμιδαζολίου, του 2,3-διμέθυλο-2-βουτενίου και του λινελαϊκού οξέος. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι όταν τα νανοϋβρίδια φωτίζονται παρουσία  $O_2$  παράγουν οξυγόνο απλής κατάστασης το οποίο στη συνέχεια οξειδώνει τα υποστρώματα. Αντίθετα, απουσία καταλύτη ή υποστρώματος δεν παρατηρείται κατανάλωση  $O_2$ . Τα τρία υποστρώματα διαφέρουν όσον αφορά την πολικότητά τους, με το ιμιδαζόλιο να είναι το πιο υδρόφιλο και το λινελαϊκό οξύ το πιο υδρόφοβο. Η διαφορά αυτή φαίνεται να επηρεάζει το ρυθμό της αντίδρασης με τον κάθε καταλύτη. Στην περίπτωση του ιμιδαζολίου η αντίδραση με την ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX είναι 5 φορές ταχύτερη σε σχέση με το LDH-ppIX και 9 φορές ταχύτερη σε σχέση με το LDH-ppIX-PFC. Τα άλλα δύο υποστρώματα οξειδώνονται ταχύτερα παρουσία του LDH-ppIX-PFC ως καταλύτη. Ειδικά στην περίπτωση του πιο υδρόφοβου υποστρώματος, του λινελαϊκού οξέος, η αντίδραση με το LDH-ppIX-PFC είναι 5 φορές ταχύτερη σε σχέση με το LDH-ppIX και 7 φορές ταχύτερη σε σχέση με την ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX.

Τα νανοϋβρίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως καταλύτες δεν σχηματίζουν αιώρημα σε υδατικό διάλυμα παρά μόνο παρουσία των μικυλλίων του απορρυπαντικού. Η υδροφοβικότητα του LDH-ppIX-PFC πιθανότατα οφείλεται σε μόρια του υπερφθοροεπτανοϊκού οξέος που είναι προσδεμένα στην εξωτερική επιφάνεια των σωματιδίων. Επίσης, το LDH-ppIX είναι πιο υδρόφοβο από την ελεύθερη πορφυρίνη καθώς το φορτίο των καρβοξυλομάδων εξουδετερώνεται από το θετικό φορτίο των ανόργανων στρωμάτων του LDH. Παρατηρώντας το ρυθμό των αντιδράσεων φωτοοξειδωσης φαίνεται πως η πολικότητα του καταλύτη και του υποστρώματος καθορίζουν το ρυθμό της αντίδρασης. Όπως φαίνεται, επιτυγχάνεται υψηλότερος ρυθμός όταν αντιδρά ένα υδρόφοβο υπόστρωμα παρουσία υδρόφοβου καταλύτη ή όταν αντιδρά ένα υδρόφιλο υπόστρωμα παρουσία υδρόφιλου καταλύτη. Έτσι για το λινελαϊκό οξύ η σειρά των ταχυτήτων ακολουθεί την σειρά υδροφοβικότητας των καταλυτών (ppIX < LDH-ppIX < LDH-ppIX-PFC) ενώ για το ιμιδαζόλιο παρατηρείται η αντίστροφη σειρά. Κάτι ανάλογο έχει παρατηρηθεί κατά τη φωτοοξειδωση της 2,4,6 – τριχλωροφαινόλης με καταλύτη μια ανιονική φθαλοκυανίνη που περιείχε Pd.<sup>127</sup> Ο καταλύτης ακινητοποιήθηκε σε LDH και LDH-SDS με αποτέλεσμα η φωτοοξειδωση της 2,4,6 – τριχλωροφαινόλης να γίνεται πολύ ταχύτερα στο πιο υδρόφοβο LDH-SDS.

#### *Φωτοδυναμική απενεργοποίηση του *S. cerevisiae* με τη χρήση νανοϋβριδίων LDH-ppIX*

Τα νανοϋβρίδια LDH-ppIX και LDH-ppIX-παλμιτικό χρησιμοποιήθηκαν για τη φωτοδυναμική απενεργοποίηση του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Η φωτοδυναμική απενεργοποίηση είναι μια εναλλακτική θεραπεία βακτηριακών ή μυκητιακών μολύνσεων που δεν περιλαμβάνει τη χρήση αντιβιοτικών.<sup>87, 88</sup> Τα αποτελέσματα της φωτοδυναμικής απενεργοποίησης του μύκητα *S. cerevisiae* δείχνουν ότι τα νανοϋβρίδια μπορούν να λειτουργήσουν ως φωτοευαίσθητοποιητές και για αυτή την εφαρμογή. Ωστόσο, συγκρίνοντας τη δράση των νανοϋβριδίων με αυτή της ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά. Συγκεκριμένα με την ελεύθερη

πρωτοπορφυρίνη IX επιβιώνει μόνο το 32 % των μυκήτων μετά από 2 h ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τα νανοϋβρίδια είναι 37 % για το LDH-ppIX-παλμιτικό και 41 % για το LDH-ppIX. Ειδικά στη περίπτωση του LDH-ppIX ενώ μετά από 1 h φωτισμού έχει επιβιώσει μόνο το 38 % των μυκήτων στη συνέχεια το ποσοστό αυτό αυξάνεται ελαφρά. Το γεγονός αυτό ίσως να σημαίνει ότι μετά από 1 h το νανοϋβρίδιο παύει να είναι δραστικό με αποτέλεσμα ο πλυθισμός των μυκήτων να ανακάμπτει. Η απενεργοποίηση του νανοϋβριδίου μπορεί να συμβεί λόγω οξειδωσης της πρωτοπορφυρίνης IX σύμφωνα με το Σχήμα 38.

## **Νανοϋβρίδια LDH-ppIX με τροποποιημένη επιφάνεια**

### *[LDH(αλγινικό)]ppIX*

Προϋπόθεση για την εφαρμογή των νανοϋβριδίων LDH-ppIX στη φωτοδυναμική θεραπεία αποτελεί η υδατοδιαλυτότητά τους. Τα νανοϋβρίδια που αναφέρθηκαν παραπάνω (LDH-ppIX, LDH-ppIX-PFC, LDH-ppIX-παλμιτικό) έχουν ελάχιστη διαλυτότητα στο H<sub>2</sub>O. Για να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο παρασκευάστηκαν νανοϋβρίδια LDH-ppIX στα οποία προσδέθηκε εξωτερικά ένας αρνητικά φορτισμένος πολυσακχαρίτης, το αλγινικό νάτριο. Νανοσυνθετικά υλικά που βασίζονται στο LDH και στο αλγινικό νάτριο έχουν μελετηθεί στο παρελθόν<sup>52, 128</sup> και μάλιστα αναφέρεται πως η σύνθεσή τους με ιονανταλλαγή δεν είναι εφικτή καθώς το μεγάλο μέγεθος του πολυμερούς εμποδίζει την εισαγωγή του στα ενδιάμεσα στρώματα του LDH με αποτέλεσμα την πρόσδεσή του στην εξωτερική μόνο επιφάνεια. Το αλγινικό νάτριο δεν προσφέρει μόνο υδατοδιαλυτότητα στο νανοϋβρίδιο αλλά και την εγγενή ιδιότητά του να προσκολλάται σε ιστούς και κύτταρα.<sup>129</sup> Σημαντική ιδιότητα του αλγινικού νατρίου είναι και ο σχηματισμός γέλης μέσω διασύνδεσης των αλυσίδων παρουσία ιόντων Ca<sup>2+</sup>. Το νανοϋβρίδιο [LDH(αλγινικό)]ppIX εμφανίζει τις χαρακτηριστικές ιδιότητες του αλγινικού νατρίου. Σε αντίθεση με το LDH-ppIX που συσσωματώνεται και καταβυθίζεται γρήγορα σε υδατικό διάλυμα, το [LDH(αλγινικό)]ppIX σχηματίζει ομοιογενές αιώρημα σε H<sub>2</sub>O το οποίο παραμένει σταθερό για μέρες. Επιπλέον, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 35, παρατηρείται συσσωμάτωση των σωματιδίων του νανοϋβριδίου παρουσία CaCl<sub>2</sub>. Προκύπτει

λοιπόν το συμπέρασμα ότι το αλγινικό προσδένεται στην επιφάνεια των σωματιδίων του LDH-ppIX με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα κέλυφος από τον πολυσακχαρίτη που περιβάλλει τα σωματίδια και αλλάζει δραματικά τις ιδιότητές τους.

Ο χαρακτηρισμός του νανοϋβριδίου [LDH(αλγινικό)]ppIX βασίστηκε στην φασματοσκοπία υπεριώθρου και την φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού. Το φάσμα υπεριώθρου του νανοϋβριδίου συγκρίθηκε με αυτό του LDH-αλγινικό (Σχήμα 32). Η κορυφή στους  $1032\text{ cm}^{-1}$ , που έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες υβριδίων LDH με αλγινικό<sup>52, 128</sup> και αποδίδεται σε δόνηση της ομάδας C-O-C στο δακτύλιο του σακχάρου,<sup>122</sup> εμφανίζεται και στα δύο φάσματα αποδεικνύοντας την ύπαρξη του αλγινικού. Η παρουσία της πρωτοπορφυρίνης IX εκδηλώνεται στο φάσμα υπεριώθρου με τις κορυφές στους 1110, 1556 και  $2950\text{ cm}^{-1}$ .

Το φάσμα υπεριώδους – ορατού του νανοϋβριδίου [LDH(αλγινικό)]ppIX διαθέτει τα χαρακτηριστικά του φάσματος της πρωτοπορφυρίνης IX (Σχήμα 33). Η ταινία Soret είναι σχετικά ευρεία και παρουσιάζει μέγιστο στα 428 nm γεγονός που δείχνει συσσωμάτωση της πορφυρίνης όπως συζητήθηκε και παραπάνω. Ωστόσο, το φάσμα του νανοϋβριδίου [LDH(αλγινικό)]ppIX, συγκριτικά με αυτό του LDH-ppIX, εμφανίζει βελτίωση καθώς η Soret είναι πιο οξεία και οι υπόλοιπες κορυφές διαχωρίζονται καλύτερα γεγονός που δείχνει πως η συσσωμάτωση της πορφυρίνης στο [LDH(αλγινικό)]ppIX είναι κάπως περιορισμένη. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο σημαντικά μικρότερο ποσοστό πρωτοπορφυρίνης IX που ακινητοποιήθηκε (10.1 % w/w στο [LDH(αλγινικό)]ppIX έναντι 20 % w/w στο LDH-ppIX).

### *[LDH(φυλλικό)]ppIX*

Ιδιαίτερα σημαντική για την επιτυχία της φωτοδυναμικής θεραπείας, αλλά και κάθε θεραπείας κατά του καρκίνου, είναι η επιλεκτική στόχευση του θεραπευτικού παράγοντα στα καρκινικά κύτταρα. Με σκοπό λοιπόν την εξειδικευμένη στόχευση καρκινικών κυττάρων παρασκευάστηκαν νανοϋβρίδια LDH-ppIX στα οποία έχει προσδεθεί ομοιοπολικά φυλλικό οξύ. Το φυλλικό οξύ

μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα καρκινικά κύτταρα μέσω υποδοχέων του φυλλικού οξέος, οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό από ότι στα φυσιολογικά κύτταρα.<sup>68</sup>

Το νανοϋβρίδιο [LDH(φυλλικό)]rrIX χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία υπεριώθρου και την φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού. Στο φάσμα υπεριώθρου (Σχήμα 31) διακρίνονται τόσο τα χαρακτηριστικά του LDH-φυλλικό όσο και οι κορυφές στους 1410 και 1560 $\text{cm}^{-1}$  που αντιστοιχούν στις συχνότητες δόνησης της καρβοξυλομάδας της πρωτοπορφυρίνης IX. Ωστόσο οι κορυφές της πρωτοπορφυρίνης IX είναι χαμηλής έντασης ενώ αρκετά έντονη είναι η κορυφή του ανθρακικού ιόντος στους 1360  $\text{cm}^{-1}$  γεγονός που δείχνει ότι η αντικατάσταση των  $\text{CO}_3^{2-}$  από την πορφυρίνη δεν ήταν πλήρης. Στο φάσμα υπεριώδους – ορατού διακρίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές της πρωτοπορφυρίνης IX αλλά εμφανίζεται αυξημένη απορρόφηση στα 375 nm η οποία πιθανώς οφείλεται στο φυλλικό οξύ.

Τα παραπάνω δεδομένα δεν αποτελούν επαρκή απόδειξη της συνύπαρξης του φυλλικού οξέος και της πρωτοπορφυρίνης IX στο νανοϋβρίδιο [LDH(φυλλικό)]rrIX. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε επιπλέον φασματοσκοπική ανάλυση του νανοϋβριδίου σε οξινισμένο αιθανολικό διάλυμα στο οποίο το ανόργανο μέρος του νανοϋβριδίου καταστρέφεται επιτρέποντας έτσι τον ακριβή προσδιορισμό των οργανικών μορίων που περιέχει. Στο διάλυμα αυτό το φυλλικό οξύ απορροφά στα 294 nm ενώ η πρωτοπορφυρίνη IX στα 411 nm και όπως φαίνεται στο Σχήμα 34 οι δύο κορυφές δεν αλληλεπικαλύπτονται. Επομένως η εμφάνιση και των δύο κορυφών στο φάσμα του [LDH(φυλλικό)]rrIX σε οξινισμένο αιθανολικό διάλυμα αποδεικνύει την ύπαρξη και των δύο μορίων στο νανοϋβρίδιο. Επιπλέον, με βάση την απορρόφηση στα δύο μήκη κύματος κατέστη δυνατή η ποσοτικοποίηση του φυλλικού οξέος και της πορφυρίνης στο νανοϋβρίδιο. Το ποσοστό του φυλλικού οξέος βρέθηκε ίσο με 6.3 % w/w που είναι παρόμοιο με το αρχικό ποσοστό του [LDH(φυλλικό)] $\text{CO}_3$  που ήταν 6.5 % w/w. Το ποσοστό της πρωτοπορφυρίνης IX είναι σχετικά μικρό (2.7 % w/w) όπως άλλωστε αναμενόταν με βάση τα δεδομένα της φασματοσκοπίας υπεριώθρου.

### *Δέσμευση των τροποποιημένων νανοϋβριδίων LDH-ppIX σε καρκινικά κύτταρα HeLa*

Η επιφανειακή τροποποίηση των νανοϋβριδίων τους δίνει πολλά πλεονεκτήματα κυρίως για τη χρήση τους σε βιολογικές εφαρμογές. Ένα από αυτά είναι η αυξημένη υδατοδιαλυτότητα των τροποποιημένων νανοϋβριδίων. Όπως και το [LDH(αλγινικό)]ppIX έτσι και το [LDH(φυλλικό)]ppIX παρουσιάζουν μεγαλύτερη διαλυτότητα στο νερό συγκριτικά με το LDH-ppIX. Το γεγονός αυτό διευκολύνει σημαντικά τη χρήση τους σε βιολογικές εφαρμογές. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα όμως της τροποποίησης είναι η δυνατότητα εξειδικευμένης στόχευσης συγκεκριμένων κυττάρων. Όπως προαναφέρθηκε η ομοιοπολική δέσμευση του φυλλικού οξέος στο νανοϋβρίδιο LDH(φυλλικό)]ppIX του δίνει τη δυνατότητα να στοχεύει καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν υποδοχείς του φυλλικού οξέος όπως για παράδειγμα τα HeLa.<sup>68, 130</sup>

Για να διαπιστωθεί αν το νανοϋβρίδιο έχει τη δυνατότητα στόχευσης καρκινικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε μελέτη της δέσμευσης του νανοϋβριδίου σε κύτταρα HeLa. Όπως διαπιστώθηκε η ποσότητα της πρωτοπορφυρίνης που καταλήγει στα κύτταρα μετά την επώαση με το νανοϋβρίδιο είναι μεγαλύτερη από ότι μετά από επώαση με ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX (Σχήμα 36). Η σημαντικότερη παρατήρηση όμως είναι πως η ποσότητα της πορφυρίνης που δεσμεύεται στα κύτταρα μειώνεται σημαντικά όταν γίνεται επώαση με το νανοϋβρίδιο παρουσία 0.1 mM φυλλικού οξέος. Αυτό σημαίνει πως το ελεύθερο φυλλικό οξύ παρεμποδίζει τη δέσμευση του νανοϋβριδίου. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει πως η δέσμευση του νανοϋβριδίου στα κύτταρα γίνεται μέσω του φυλλικού οξέος με αποτέλεσμα να παρατηρείται συναγωνισμός μεταξύ του νανοϋβριδίου [LDH(φυλλικό)]ppIX και του ελεύθερου φυλλικού οξέος. Επομένως προκύπτει το συμπέρασμα πως το νανοϋβρίδιο στοχεύει επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα κάτι που επιτυγχάνεται μέσω της εξειδικευμένης αναγνώρισης των υποδοχέων φυλλικού οξέος στην επιφάνεια των κυττάρων από το φυλλικό οξύ στη επιφάνεια του νανοϋβριδίου.



## Συμπεράσματα - προοπτικές

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε σε βάθος η δυνατότητα χρήσης των φυλλόμορφων διπλών υδροξειδίων σε βιολογικές εφαρμογές. Πραγματοποιήθηκε μια ολοκληρωμένη προσπάθεια που περιλάμβανε το σχεδιασμό, τη σύνθεση, το χαρακτηρισμό και την εφαρμογή νέων υβριδικών υλικών. Τα υλικά αυτά προέκυψαν από το συνδυασμό των φυλλόμορφων διπλών υδροξειδίων με πληθώρα βιομορίων τα οποία σταθεροποιήθηκαν πάνω στο ανόργανο υλικό είτε με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είτε ομοιοπολικά. Συνολικά συντέθηκαν 12 διαφορετικά υλικά τα οποία μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες: (1) νανοϋβρίδια LDH με αντιβιοτικά, (2) νανοϋβρίδια LDH με πρωτοπορφυρίνη IX και (3) επιφανειακά τροποποιημένα νανοϋβρίδια LDH.

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν πέντε νανοϋβρίδια LDH με αντιβιοτικά και συγκεκριμένα τα: LDH-χολικό-γραμισιδίνη, LDH-χολικό-αμφοτερικίνη Β, LDH-αμφοτερικίνη Β, LDH-αμπικιλίνη και LDH-ναλιδιξικό οξύ. Τα νανοϋβρίδια αυτά συντέθηκαν με σκοπό την ανάπτυξη ενός συστήματος απελευθέρωσης φαρμάκων που να βασίζεται στα φυλλόμορφα διπλά υδροξείδια. Τα τέσσερα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες και ακινητοποιήθηκαν για πρώτη φορά σε LDH. Ιδιαίτερα η γραμισιδίνη είναι το πρώτο υδρόφοβο πολυπεπτίδιο που ακινητοποιείται σε LDH και η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε για τη γραμισιδίνη μπορεί να εφαρμοστεί για την ακινητοποίηση μεμβρανικών πρωτεϊνών σε LDH. Ο χαρακτηρισμός των νανοϋβριδίων με περίθλαση ακτίνων Χ, φασματοσκοπία υπεριώθρου και φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού έδειξε ότι τα αντιβιοτικά ακινητοποιήθηκαν στο LDH καθώς και ότι διατηρούν τη δομή και τις ιδιότητες τους. Επιπλέον μελετήθηκε ο ρυθμός απελευθέρωσης των αντιβιοτικών από το LDH και αποδείχτηκε ότι τόσο τα υδρόφιλα αντιβιοτικά, αμπικιλίνη και ναλιδιξικό οξύ, αλλά ιδιαίτερα τα υδρόφοβα αντιβιοτικά, γραμισιδίνη και αμφοτερικίνη Β, απελευθερώνονται με αργό ρυθμό. Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε για τη δέσμευση των αντιβιοτικών στο LDH μπορεί να εφαρμοστεί για οποιοδήποτε μόριο, ανεξάρτητα από το αν είναι υδρόφιλο ή υδρόφοβο και από το αν φέρει φορτίο ή όχι.

Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τα νανοϋβρίδια LDH-ppIX, LDH-ppIX-PFC και LDH-ppIX-παλμιτικό. Τα νανοϋβρίδια αυτά συντέθηκαν με σκοπό τη χρήση τους στη φωτοδυναμική θεραπεία. Αν και έχουν συντεθεί παρόμοια υλικά για χρήση ως ετερογενείς καταλύτες, δεν έχει διερευνηθεί η δυνατότητα της χρήσης τους στη φωτοδυναμική θεραπεία. Η δομή και η σύσταση των νανοϋβριδίων μελετήθηκε με πληθώρα τεχνικών όπως η περίθλαση ακτίνων Χ, η φασματοσκοπία ορατού και η θερμοσταθμική ανάλυση. Επίσης πραγματοποιήθηκε λεπτομερής μελέτη των οπτικών ιδιοτήτων των νανοϋβριδίων LDH-ppIX και LDH-ppIX-παλμιτικό με φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού και φασματοσκοπία φθορισμού. Έτσι προέκυψε το συμπέρασμα ότι η πρωτοπορφυρίνη IX διαλυτοποιείται καλύτερα μέσα στο υδρόφοβο περιβάλλον της μονοστοιβάδας παλμιτικού οξέος που σχηματίζεται στο LDH-ppIX-παλμιτικό. Η δυνατότητα της χρήσης των νανοϋβριδίων στη φωτοδυναμική θεραπεία αποδείχθηκε αρχικά με την επιτυχή φωτοξείδωση οργανικών υποστρωμάτων παρουσία των νανοϋβριδίων LDH-ppIX και LDH-ppIX-PFC. Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν μελέτες απενεργοποίησης μυκήτων με τη βοήθεια των νανοϋβριδίων LDH-ppIX και LDH-ppIX-παλμιτικό και όπως αποδείχθηκε εμφανίζουν παρόμοια δραστικότητα με την ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη IX.

Στην τρίτη κατηγορία ανήκουν τα νανοϋβρίδια με τροποποιημένη επιφάνεια και συγκεκριμένα τα: [LDH(φυλλικό)]CO<sub>3</sub>, [LDH(βιοτίνη)]CO<sub>3</sub>, [LDH(φυλλικό)]ppIX και [LDH(αλγινικό)]ppIX. Η επιφανειακή τροποποίηση έχει ως σκοπό την δυνατότητα εξειδικευμένης αναγνώρισης βιολογικών στόχων μέσω του φυλλικού οξέος και της βιοτίνης, καθώς και την αύξηση της υδατοδιαλυτότητάς τους με την πρόσδεση του αλγινικού νατρίου. Ο χαρακτηρισμός των νανοϋβριδίων έδειξε την επιτυχή ομοιοπολική δέσμευση του φυλλικού οξέος και της βιοτίνης. Επιπλέον η εισαγωγή της πρωτοπορφυρίνης IX στα νανοϋβρίδια [LDH(φυλλικό)]ppIX και [LDH(αλγινικό)]ppIX επιβεβαιώθηκε με τη χρήση φασματοσκοπίας υπερύθρου και φασματοσκοπίας υπεριώδους – ορατού. Οι μελέτη της δέσμευσης του νανοϋβριδίου [LDH(φυλλικό)]ppIX σε καλλιέργεια κυττάρων HeLa απέδειξε πως το νανοϋβρίδιο δεσμεύεται μέσω των

υποδοχέων του φυλλικού οξέος και επομένως στοχεύει επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στην παρούσα διατριβή δίνουν το έναυσμα για περαιτέρω μελέτες σχετικά με τη χρήση των νανοϋβριδίων του LDH σε βιολογικές εφαρμογές. Καταρχήν, η ικανότητα του [LDH(φυλλικό)]ppIX να στοχεύει καρκινικά κύτταρα οδηγεί στην προοπτική της χρήσης του στη φωτοδυναμική θεραπεία. Για να συμβεί αυτό πρέπει να μελετηθεί η ικανότητά του να προκαλεί το θάνατο των καρκινικών κυττάρων παρουσία φωτός. Επιπλέον τα τροποποιημένα LDH με φυλλικό οξύ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς για τη στοχευμένη μεταφορά αντικαρκινικών φαρμάκων. Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με τα LDH που φέρουν ομοιοπολικά προσδεμένη βιοτίνη. Η βιοτίνη αλληλεπιδρά πολύ ισχυρά με την πρωτεΐνη αβιδίνη η οποία διαθέτει τέσσερις θέσεις δέσμευσης της βιοτίνης. Έτσι χρησιμοποιείται σε πολλές εφαρμογές για να συνδέει μεταξύ τους βιοτυνυλιωμένα μόρια.<sup>131</sup> Με τον τρόπο αυτό μπορούν να προσδεθούν βιοτυνυλιωμένα αντισώματα πάνω στο [LDH(βιοτίνη)]CO<sub>3</sub> μέσω της αβιδίνης. Με την επιλογή του κατάλληλου αντισώματος μπορούν να δημιουργηθούν νανοϋβρίδια που να στοχεύουν σε οποιοδήποτε ιστό ή τύπο κυττάρων.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Niemeyer, C. M., Nanoparticles, Proteins, and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, 40, (22), 4128-4158.
2. Willner, I.; Basnar, B.; Willner, B., Nanoparticle-enzyme hybrid systems for nanobiotechnology. *FEBS Journal* **2007**, 274, (2), 302-309.
3. Bulte, J. W. M.; Kraitchman, D. L., Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR in Biomedicine* **2004**, 17, (7), 484-499.
4. Gao, X.; Yang, L.; Petros, J. A.; Marshall, F. F.; Simons, J. W.; Nie, S., In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. *Current Opinion in Biotechnology* **2005**, 16, (1), 63-72.
5. Sotiropoulou, S.; Chaniotakis, N., Carbon nanotube array-based biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, 375, (1), 103-105.
6. Kreuter, J., Nanoparticles--a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 331, (1), 1-10.
7. Xu, Z. P.; Zeng, Q. H.; Lu, G. Q.; Yu, A. B., Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chemical Engineering Science* **2006**, 61, (3), 1027-1040.
8. Cavani, F.; Trifiro, F.; Vaccari, A., Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications. *Catalysis Today* **1991**, 11, (2), 173-301.
9. Miyata, S., The syntheses of hydrotalcite-like compounds and their structures and physico-chemical properties - 1: The systems  $Mg^{2+}-Al^{3+}-NO_3^-$ ,  $Mg^{2+}-Al^{3+}-Cl^-$ ,  $Mg^{2+}-Al^{3+}-ClO_4^-$ ,  $Ni^{2+}-Al^{3+}-Cl^-$  and  $Zn^{2+}-Al^{3+}-Cl^-$ . *Clays and Clay Minerals* **1975**, 23, 369-375.
10. Bellotto, M.; Rebours, B.; Clause, O.; Lynch, J.; Bazin, D.; Elkaim, E., A Reexamination of Hydrotalcite Crystal Chemistry. *Journal of Physical Chemistry* **1996**, 100, (20), 8527-8534.
11. Choy, J.-H.; Kwak, S.-Y.; Jeong, Y.-J.; Park, J.-S., Inorganic Layered Double Hydroxides as Nonviral Vectors. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, 39, (22), 4041-4045.
12. Tyner, K. M.; Schiffman, S. R.; Giannelis, E. P., Nanobiohybrids as delivery vehicles for camptothecin. *Journal of Controlled Release* **2004**, 95, (3), 501-514.
13. Meyn, M.; Beneke, K.; Lagaly, G., Anion-exchange reactions of layered double hydroxides. *Inorganic Chemistry* **1990**, 29, (26), 5201-5207.
14. Reichle, W. T., Synthesis of anionic clay minerals (mixed metal hydroxides, hydrotalcite). *Solid State Ionics* **1986**, 22, (1), 135-141.
15. Carlino, S., The intercalation of carboxylic acids into layered double hydroxides: a critical evaluation and review of the different methods. *Solid State Ionics* **1997**, 98, (1-2), 73-84.

16. Pinnavaia, T. J.; Chibwe, M.; Constantino, V. R. L.; Yun, S. K., Organic chemical conversions catalyzed by intercalated layered double hydroxides (LDHs). *Applied Clay Science* **1995**, 10, (1-2), 117-129.
17. Constantino, V. R. L.; Pinnavaia, T. J., Basic Properties of  $Mg^{2+1-x}Al^{3+x}$  Layered Double Hydroxides Intercalated by Carbonate, Hydroxide, Chloride, and Sulfate Anions. *Inorganic Chemistry* **1995**, 34, (4), 883-892.
18. Drezdson, M. A., Synthesis of isopolymetalate-pillared hydrotalcite via organic-anion-pillared precursors. *Inorganic Chemistry* **1988**, 27, (25), 4628-4632.
19. Dimotakis, E. D.; Pinnavaia, T. J., New route to layered double hydroxides intercalated by organic anions: precursors to polyoxometalate-pillared derivatives. *Inorganic Chemistry* **1990**, 29, (13), 2393-2394.
20. van Laar, F. M. P. R.; De Vos, D. E.; Pierard, F.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Fiermans, L.; Jacobs, P. A., Generation of Singlet Molecular Oxygen from  $H_2O_2$  with Molybdate-Exchanged Layered Double Hydroxides: Effects of Catalyst Composition and Reaction Conditions. *Journal of Catalysis* **2001**, 197, (1), 139-150.
21. Chibwe, M.; Ukrainczyk, L.; Boyd, S. A.; Pinnavaia, T. J., Catalytic properties of biomimetic metallomacrocycles intercalated in layered double hydroxides and smectite clay: the importance of edge-site access. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **1996**, 113, (1-2), 249-256.
22. Robins, D. S.; Dutta, P. K., Examination of Fatty Acid Exchanged Layered Double Hydroxides as Supports for Photochemical Assemblies. *Langmuir* **1996**, 12, (2), 402-408.
23. Tong, Z.; Shichi, T.; Takagi, K., Oxidation catalysis of a manganese(III)porphyrin intercalated in layered double hydroxide clays. *Materials Letters* **2003**, 57, (15), 2258-2261.
24. Choy, J. H.; Kwak, S. Y.; Park, J. S.; Jeong, Y. J.; Portier, J., Intercalative Nanohybrids of Nucleoside Monophosphates and DNA in Layered Metal Hydroxide. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121, (6), 1399-1400.
25. Kwak, S.-Y.; Jeong, Y.-J.; Park, J.-S.; Choy, J.-H., Bio-LDH nanohybrid for gene therapy. *Solid State Ionics* **2002**, 151, (1-4), 229-234.
26. Tyner, K. M.; Roberson, M. S.; Berghorn, K. A.; Li, L.; Gilmour, J. R. F.; Batt, C. A.; Giannelis, E. P., Intercalation, delivery, and expression of the gene encoding green fluorescence protein utilizing nanobiohybrids. *Journal of Controlled Release* **2004**, 100, (3), 399-409.
27. Kwak, S.-Y.; Kriven, W. M.; Wallig, M. A.; Choy, J. H. J.-H., Inorganic delivery vector for intravenous injection. *Biomaterials* **2004**, 25, (28), 5995-6001.
28. Ambrogi, V.; Fardella, G.; Grandolini, G.; Perioli, L., Intercalation compounds of hydrotalcite-like anionic clays with antiinflammatory agents -- I. Intercalation and in vitro release of ibuprofen. *International Journal of Pharmaceutics* **2001**, 220, (1-2), 23-32.

29. Khan, A. I.; Lei, L.; Norquist, A. J.; O'Hare, D., Intercalation and controlled release of pharmaceutically active compounds from a layered double hydroxide. *Chemical Communications* **2001**, 2342-2343.
30. Li, B.; He, J.; G. Evans, D.; Duan, X., Inorganic layered double hydroxides as a drug delivery system--intercalation and in vitro release of fenbufen. *Applied Clay Science* **2004**, *27*, (3-4), 199-207.
31. Li, B.; He, J.; Evans, D. G.; Duan, X., Enteric-coated layered double hydroxides as a controlled release drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, *287*, (1-2), 89-95.
32. Wei, M.; Shi, S.; Wang, J.; Li, Y.; Duan, X., Studies on the intercalation of naproxen into layered double hydroxide and its thermal decomposition by in situ FT-IR and in situ HT-XRD. *Journal of Solid State Chemistry* **2004**, *177*, (7), 2534-2541.
33. Choy, J.-H.; Jung, J.-S.; Oh, J.-M.; Park, M.; Jeong, J.; Kang, Y.-K.; Han, O.-J., Layered double hydroxide as an efficient drug reservoir for folate derivatives. *Biomaterials* **2004**, *25*, (15), 3059-3064.
34. Oh, J.-M.; Park, M.; Kim, S.-T.; Jung, J.-Y.; Kang, Y.-G.; Choy, J.-H., Efficient delivery of anticancer drug MTX through MTX-LDH nanohybrid system. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **2006**, *67*, (5-6), 1024-1027.
35. Zhang, H.; Zou, K.; Guo, S.; Duan, X., Nanostructural drug-inorganic clay composites: Structure, thermal property and in vitro release of captopril-intercalated Mg-Al-layered double hydroxides. *Journal of Solid State Chemistry* **2006**, *179*, (6), 1792-1801.
36. Ambroggi, V.; Fardella, G.; Grandolini, G.; Nocchetti, M.; Perioli, L., Effect of hydrotalcite-like compounds on the aqueous solubility of some poorly water-soluble drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**, *92*, (7), 1407-1418.
37. Yang, Q. Z.; Yang, J.; Zhang, C. K., Synthesis and properties of cordycepin intercalates of Mg-Al-nitrate layered double hydroxides. *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, *326*, (1-2), 148-152.
38. Li, W.-Z.; Lu, J.; Chen, J.-S.; Li, G.-D.; Jiang, Y.-S.; Li, L.-S.; Huang, B.-Q., Phenoxymethylpenicillin-intercalated hydrotalcite as a bacteria inhibitor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2006**, *81*, 89-93.
39. Shan, D.; Cosnier, S.; Mousty, C., Layered Double Hydroxides: An Attractive Material for Electrochemical Biosensor Design. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, (15), 3872-3879.
40. Shan, D.; Mousty, C.; Cosnier, S., Subnanomolar Cyanide Detection at Polyphenol Oxidase/Clay Biosensors. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, (1), 178-183.
41. Vial, S.; Forano, C.; Shan, D.; Mousty, C.; Barhoumi, H.; Martelet, C.; Jaffrezic, N., Nanohybrid-layered double hydroxides/urease materials: Synthesis and application to urea biosensors. *Materials Science and Engineering: C* **2006**, *26*, (2-3), 387-393.
42. de Melo, J. V.; Cosnier, S.; Mousty, C.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N., Urea Biosensors Based on Immobilization of Urease into Two Oppositely

- Charged Clays (Laponite and Zn-Al Layered Double Hydroxides). *Analytical Chemistry* **2002**, 74, (16), 4037-4043.
43. Mignani, A.; Scavetta, E.; Tonelli, D., Electrodeposited glucose oxidase/anionic clay for glucose biosensors design. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 577, (1), 98-106.
  44. Itoh, T.; Shichi, T.; Yui, T.; Takagi, K., Layered double hydroxide hybrids with dicetylphosphate. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, 291, (1), 218-222.
  45. Borja, M.; Dutta, P. K., Fatty acids in layered metal hydroxides: membrane-like structure and dynamics. *Journal of Physical Chemistry* **1992**, 96, (13), 5434-5444.
  46. Itoh, T.; Ohta, N.; Shichi, T.; Yui, T.; Takagi, K., The Self-Assembling Properties of Stearate Ions in Hydrotalcite Clay Composites. *Langmuir* **2003**, 19, (22), 9120-9126.
  47. Nakayama, H.; Wada, N.; Tsuchioka, M., Intercalation of amino acids and peptides into Mg-Al layered double hydroxide by reconstruction method. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, 269, (2), 469-478.
  48. Whilton, N. T.; Vickers, P. J.; Mann, S., Bioinorganic clays: synthesis and characterization of amino- and polyamino acid intercalated layered double hydroxides. *Journal of Materials Chemistry* **1997**, 7, (8), 1623-1629.
  49. Wei, M.; Yuan, Q.; Evans, D. G.; Wang, Z.; Duan, X., Layered solids as a molecular container for pharmaceutical agents: L-tyrosine-intercalated layered double hydroxides. *Journal of Materials Chemistry* **2005**, 15, 1197-1203.
  50. Aisawa, S.; Sasaki, S.; Takahashi, S.; Hirahara, H.; Nakayama, H.; Narita, E., Intercalation of amino acids and oligopeptides into Zn-Al layered double hydroxide by coprecipitation reaction. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **2006**, 67, (5-6), 920-925.
  51. Ikeda, T.; Amoh, H.; Yasunaga, T., Stereoselective exchange kinetics of L- and D-histidines for chloride ion in the interlayer of a hydrotalcite-like compound by the chemical relaxation method. *Journal of the American Chemical Society* **1984**, 106, (20), 5772-5775.
  52. Darder, M.; Lopez-Blanco, M.; Aranda, P.; Leroux, F.; Ruiz-Hitzky, E., Bio-Nanocomposites Based on Layered Double Hydroxides. *Chemistry of Materials* **2005**, 17, (8), 1969-1977.
  53. Leroux, F.; Besse, J. P., Polymer Interleaved Layered Double Hydroxide: A New Emerging Class of Nanocomposites. *Chemistry of Materials* **2001**, 13, (10), 3507-3515.
  54. Kidane, A.; Bhatt, P. P., Recent advances in small molecule drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, 9, (4), 347-351.
  55. Allen, T. M.; Cullis, P. R., Drug delivery systems: Entering the mainstream. *Science* **2004**, 303, (5665), 1818-1822.
  56. Brannon-Peppas, L., Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **1995**, 116, (1), 1-9.

57. Gao, Z.; Lukyanov, A. N.; Singhal, A.; Torchilin, V. P., Diacyllipid-Polymer Micelles as Nanocarriers for Poorly Soluble Anticancer Drugs. *Nano Letters* **2002**, 2, (9), 979-982.
58. Fang, J.-Y.; Hong, C.-T.; Chiu, W.-T.; Wang, Y.-Y., Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. *International Journal of Pharmaceutics* **2001**, 219, (1-2), 61-72.
59. Muller, R. H.; Mader, K.; Gohla, S., Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, 50, (1), 161-177.
60. Sezgin, Z.; Yuksel, N.; Baykara, T., Investigation of pluronic and PEG-PE micelles as carriers of meso-tetraphenyl porphine for oral administration. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 332, (1-2), 161-167.
61. Yoo, H. S.; Park, T. G., Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. *Journal of Controlled Release* **2004**, 96, (2), 273-283.
62. Park, E. K.; Kim, S. Y.; Lee, S. B.; Lee, Y. M., Folate-conjugated methoxy poly(ethylene glycol)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) amphiphilic block copolymeric micelles for tumor-targeted drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2005**, 109, (1-3), 158-168.
63. Queiroz, A. C.; Santos, J. D.; Monteiro, F. J.; Gibson, I. R.; Knowles, J. C., Adsorption and release studies of sodium ampicillin from hydroxyapatite and glass-reinforced hydroxyapatite composites. *Biomaterials* **2001**, 22, (11), 1393-1400.
64. Bianco, A.; Kostarelos, K.; Prato, M., Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, 9, (6), 674-679.
65. Cypes, S. H.; Saltzman, W. M.; Giannelis, E. P., Organosilicate-polymer drug delivery systems: controlled release and enhanced mechanical properties. *Journal of Controlled Release* **2003**, 90, (2), 163-169.
66. Trikeriotis, M.; Ghanotakis, D. F., Intercalation of hydrophilic and hydrophobic antibiotics in layered double hydroxides. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 332, (1-2), 176-184.
67. Kantonis, G.; Trikeriotis, M.; Ghanotakis, D. F., Biocompatible protoporphyrin IX-containing nanohybrids with potential applications in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2007**, 185, (1), 62-66.
68. Lu, Y.; Low, P. S., Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, (5), 675-693.
69. Brannon-Peppas, L.; Blanchette, J. O., Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, 56, (11), 1649-1659.
70. Torchilin, V. P.; Lukyanov, A. N., Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions. *Drug Discovery Today* **2003**, 8, (6), 259-266.
71. Green, J. J.; Chiu, E.; Leshchiner, E. S.; Shi, J.; Langer, R.; Anderson, D. G., Electrostatic Ligand Coatings of Nanoparticles Enable Ligand-Specific



- Gene Delivery to Human Primary Cells. *Nano Letters* **2007**, 7, (4), 874-879.
72. Kassab, R.; Parrot-Lopez, H.; Fessi, H.; Menaucourt, J.; Bonaly, R.; Coulon, J., Molecular recognition by *Kluyveromyces* of amphotericin B-loaded, galactose-tagged, poly (lactic acid) microspheres. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002**, 10, (6), 1767-1775.
  73. Petrak, K., Essential properties of drug-targeting delivery systems. *Drug Discovery Today* **2005**, 10, (23-24), 1667-1673.
  74. Tipper, D. J.; Strominger, J. L., Mechanism of Action of Penicillins: A Proposal Based on their Structural Similarity to Acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* **1965**, 54, 1133-1141.
  75. Fernandez Degiorgi, C.; Mallo, R. A.; Smolko, E. E.; Lombardo, J. H., Ampicillin release from swellable controlled system. *Journal of Controlled Release* **1995**, 33, (3), 343-348.
  76. Shen, L. L.; Mitscher, L. A.; Sharma, P. N.; O'Donnell, T. J.; Chu, D. W. T.; Cooper, C. S.; Rosen, T.; Pernet, A. G., Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. *Biochemistry* **1989**, 28, (9), 3886-3894.
  77. Kampranis, S. C.; Maxwell, A., The DNA Gyrase-Quinolone Complex. ATP Hydrolysis and the mechanism of DNA cleavage. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273, (35), 22615-22626.
  78. Turel, I., The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. *Coordination Chemistry Reviews* **2002**, 232, (1-2), 27-47.
  79. Clerc, S.; Barenholz, Y., Loading of amphipathic weak acids into liposomes in response to transmembrane calcium acetate gradients. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1995**, 1240, (2), 257-265.
  80. Wallace, B. A., Recent Advances in the High Resolution Structures of Bacterial Channels: Gramicidin A. *Journal of Structural Biology* **1998**, 121, (2), 123-141.
  81. Schreier, S.; Malheiros, S. V. P.; de Paula, E., Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2000**, 1508, (1-2), 210-234.
  82. Hargreaves, P. L.; Nguyen, T.-S.; Ryan, R. O., Spectroscopic studies of amphotericin B solubilized in nanoscale bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, 1758, (1), 38-44.
  83. Espuelas, M. S.; Legrand, P.; Irache, J. M.; Gamazo, C.; Orecchioni, A. M.; Devissaguet, J. P.; Ygartua, P., Poly( $\epsilon$ -caprolacton) nanospheres as an alternative way to reduce amphotericin B toxicity. *International Journal of Pharmaceutics* **1997**, 158, (1), 19-27.
  84. Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q., Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute* **1998**, 90, (12), 889-905.

85. Henderson, B. W.; Dougherty, T. J., How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and Photobiology* **1992**, 55, (1), 145-157.
86. Tome, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Soncin, M.; Magaraggia, M.; Ferro, S.; Jori, G., Synthesis and Antibacterial Activity of New Poly-S-lysine-Porphyrin Conjugates. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, 47, (26), 6649-6652.
87. Calzavara-Pinton, P. G.; Venturini, M.; Sala, R., A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2005**, 78, (1), 1-6.
88. Lambrechts, S. A. G.; Aalders, M. C. G.; Van Marle, J., Mechanistic Study of the Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* by a Cationic Porphyrin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2005**, 49, (5), 2026-2034.
89. Ferro, S.; Ricchelli, F.; Mancini, G.; Tognon, G.; Jori, G., Inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by liposome-delivered photosensitising agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2006**, 83, (2), 98-104.
90. Foote, C. S.; Shook, F. C.; Abakerli, R. B., [3] Characterization of singlet oxygen. In *Methods in Enzymology*, Academic Press: 1984; Vol. 105, pp 36-47.
91. Sharman, W. M.; Allen, C. M.; van Lier, J. E., [35] Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. In *Methods in Enzymology*, Academic Press: 2000; Vol. 319, pp 376-400.
92. Kochevar, I. E.; Redmond, R. W., [2] Photosensitized production of singlet oxygen. In *Methods in Enzymology*, Academic Press: 2000; Vol. 319, pp 20-28.
93. Bonnett, R.; Martinez, G., Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* **2001**, 57, (47), 9513-9547.
94. Detty, M. R.; Gibson, S. L.; Wagner, S. J., Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, 47, (16), 3897-3915.
95. Kennedy, J. C.; Pottier, R. H.; Pross, D. C., Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin : IX: Basic principles and present clinical experience. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1990**, 6, (1-2), 143-148.
96. Fuchs, J.; Thiele, J., The Role of Oxygen in Cutaneous Photodynamic Therapy. *Free Radical Biology and Medicine* **1998**, 24, (5), 835-847.
97. Riess, J. G., Oxygen Carriers ("Blood Substitutes")-Raison d'Etre, Chemistry, and Some Physiology. *Chemical Reviews* **2001**, 101, (9), 2797-2920.
98. Habler, O. P.; Messmer, K. F., Tissue perfusion and oxygenation with blood substitutes. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, 40, (3), 171-184.
99. Winslow, R. M., Blood substitutes. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2000**, 40, (3), 131-142.

100. Kudo, N.; Suzuki, E.; Katakura, M.; Ohmori, K.; Noshiro, R.; Kawashima, Y., Comparison of the elimination between perfluorinated fatty acids with different carbon chain length in rats. *Chemico-Biological Interactions* **2001**, 134, (2), 203-216.
101. Ohmori, K.; Kudo, N.; Katayama, K.; Kawashima, Y., Comparison of the toxicokinetics between perfluorocarboxylic acids with different carbon chain length. *Toxicology* **2003**, 184, (2-3), 135-140.
102. Wieder, M. E.; Hone, D. C.; Cook, M. J.; Handsley, M. M.; Gavrilovic, J.; Russell, D. A., Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer-nanoparticle conjugates: cancer therapy using a Trojan horse. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2006**, 5, 727 - 734.
103. Roy, I.; Ohulchanskyy, T. Y.; Pudavar, H. E.; Bergey, E. J.; Oseroff, A. R.; Morgan, J.; Dougherty, T. J.; Prasad, P. N., Ceramic-Based Nanoparticles Entrapping Water-Insoluble Photosensitizing Anticancer Drugs: A Novel Drug-Carrier System for Photodynamic Therapy. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (26), 7860-7865.
104. Yan, F.; Kopelman, R., The Embedding of Meta-tetra(Hydroxyphenyl)-Chlorin into Silica Nanoparticle Platforms for Photodynamic Therapy and Their Singlet Oxygen Production and pH-dependent Optical Properties. *Photochemistry and Photobiology* **2003**, 78, (6), 587-591.
105. Giannelis, E. P., Highly organized molecular assemblies of porphyrin guest molecules in mica-type silicates: influence of guest-host interactions on molecular organization. *Chemistry of Materials* **1990**, 2, (6), 627-629.
106. Itoh, T.; Yamada, T.; Kodera, Y.; Matsushima, A.; Hiroto, M.; Sakurai, K.; Nishimura, H.; Inada, Y., Hemin (Fe<sup>3+</sup>)- and Heme (Fe<sup>2+</sup>)-Smectite Conjugates as a Model of Hemoprotein Based on Spectrophotometry. *Bioconjugate Chemistry* **2001**, 12, (1), 3-6.
107. Park, A.-Y.; Kwon, H.; Woo, A. J.; Kim, S. J., Layered Double Hydroxide Surface Modified with (3-aminopropyl)triethoxysilane by Covalent Bonding. *Advanced Materials* **2005**, 17, (1), 106-109.
108. Wypych, F.; Bail, A.; Halma, M.; Nakagaki, S., Immobilization of iron(III) porphyrins on exfoliated MgAl layered double hydroxide, grafted with (3-aminopropyl)triethoxysilane. *Journal of Catalysis* **2005**, 234, (2), 431-437.
109. Tonle, I. K.; Ngameni, E.; Njopwouo, D.; Carteret, C.; Walcarius, A., Functionalization of natural smectite-type clays by grafting with organosilanes: physico-chemical characterization and application to mercury(II) uptake. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2003**, 5, 4951 - 4961.
110. Park, H.-R.; Chung, K.-Y.; Lee, H.-C.; Lee, J.-K.; Bark, K.-M., Ionization and Divalent Cation Complexation of Quinolone Antibiotics in Aqueous Solution. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2000**, 21, (9), 849-854.
111. Tellier, R.; Krajden, M.; Grigoriew, G. A.; Campbell, I., Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1992**, 36, (8), 1619-1625.

112. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, 65, (1-2), 55-63.
113. Slater, T. F.; Sawyer, B.; Strauli, U., Studies on succinate-tetrazolium reductase systems : III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochimica et Biophysica Acta* **1963**, 77, 383-393.
114. Hernandez-Moreno, M. J.; Ulibarri, M. A.; Rendon, J. L.; Serna, C. J., IR characteristics of hydrotalcite-like compounds. *Physics and Chemistry of Minerals* **1985**, 12, (1), 34-38.
115. Kloprogge, J. T.; Frost, R. L., Fourier Transform Infrared and Raman Spectroscopic Study of the Local Structure of Mg-, Ni-, and Co-Hydrotalcites. *Journal of Solid State Chemistry* **1999**, 146, (2), 506-515.
116. Mikhaylova, M.; Kim, D. K.; Berry, C. C.; Zagorodni, A.; Toprak, M.; Curtis, A. S. G.; Muhammed, M., BSA Immobilization on Amine-Functionalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Chemistry of Materials* **2004**, 16, (12), 2344-2354.
117. Di Stefano, R.; Scopelliti, M.; Pellerito, C.; Fiore, T.; Vitturi, R.; Colomba, M. S.; Gianguzza, P.; Stocco, G. C.; Consiglio, M.; Pellerito, L., Organometallic complexes with biological molecules: XVII. Triorganotin(IV) complexes with amoxicillin and ampicillin. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2002**, 89, (3-4), 279-292.
118. Neugebauer, U.; Szeghalmi, A.; Schmitt, M.; Kiefer, W.; Popp, J.; Holzgrabe, U., Vibrational spectroscopic characterization of fluoroquinolones. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2005**, 61, (7), 1505-1517.
119. Gagos, M.; Gabrielska, J.; Dalla Serra, M.; Gruszecki, W. a., Binding of antibiotic amphotericin B to lipid membranes: monomolecular layer technique and linear dichroism-FTIR studies. *Molecular Membrane Biology* **2005**, 22, (5), 433-442.
120. Song, C.-H.; Ryu, H.-W.; Park, J.-K.; Ko, T.-S., Mechanism of DNA Gyrase Inhibition by Quinolones: I. Spectral Analysis for Nalidixic Acid Polymorphism. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **1999**, 20, (6), 727-730.
121. Dean, J. A., *Lange's Handbook of Chemistry*. McGraw-Hill: New York, 1999.
122. Sartori, C.; Finch, D. S.; Ralph, B.; Gilding, K., Determination of the cation content of alginate thin films by FTi.r. spectroscopy. *Polymer* **1997**, 38, (1), 43-51.
123. Morioka, H.; Tagaya, H.; Karasu, M.; Kadokawa, J.; Chiba, K., Preparation of New Useful Materials by Surface Modification of Inorganic Layered Compound. *Journal of Solid State Chemistry* **1995**, 117, (2), 337-342.
124. Ogawa, M.; Asai, S., Hydrothermal Synthesis of Layered Double Hydroxide-Deoxycholate Intercalation Compounds. *Chemistry of Materials* **2000**, 12, (11), 3253-3255.

125. Sivash, A. A.; Masinovsky, Z.; Lozovaya, G. I., Surfactant micelles containing protoporphyrin IX as models of primitive photocatalytic systems: a spectral study. *Biosystems* **1991**, 25, (3), 131-140.
126. Krieg, M.; Whitten, D. G., Self-sensitized photo-oxidation of protoporphyrin IX and related porphyrins in erythrocyte ghosts and microemulsions: A novel photo-oxidation pathway involving singlet oxygen. *Journal of Photochemistry* **1984**, 25, (2-4), 235-252.
127. Xiong, Z.; Xu, Y., Immobilization of Palladium Phthalocyaninesulfonate onto Anionic Clay for Sorption and Oxidation of 2,4,6-Trichlorophenol under Visible Light Irradiation. *Chemistry of Materials* **2007**, 19, (6), 1452-1458.
128. Leroux, F.; Gachon, J.; Besse, J.-P., Biopolymer immobilization during the crystalline growth of layered double hydroxide. *Journal of Solid State Chemistry* **2004**, 177, (1), 245-250.
129. Gombotz, W. R.; Wee, S., Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1998**, 31, (3), 267-285.
130. Lee, R. J.; Low, P. S., Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1995**, 1233, (2), 134-144.
131. Diamandis, E. P.; Christopoulos, T. K., The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clinical Chemistry* **1991**, 37, (5), 625-636.