ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΝΑΝΟΒΙΟΫ̈ΒΡΙΔΙΩΝ LDH (ΣΤΟΙΒΑΓΜΕΝΩΝ ΔΙΠΛΩΝ ΥΔΡΟΞΕΙΔΙΩΝ)

ΓΕΩΡΓΙΟΣ-ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΣΦΕΝΔΟΥΡΑΚΗΣ

Υπεύθυνος Καθηγητής: ΔΗΜ. Φ. ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2017

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

GENERAL PROGRAMME OF POSTGRADUATE STUDIES

BIOCHEMISTRY LABORATORY

Master Thesis

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF LDH (LAYERED DOUBLE HYDROXIDE) NANOBIOHYBRIDS

GEORGE-PANAGIOTIS SFENDOURAKIS

Master Thesis Supervisor: D. F. Ghanotakis

HERAKLION 2017

Εξεταστική Επιτροπή

Δημήτριος Φ. Γανωτάκης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Γεώργιος Τσιώτης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Νικόλαος Α. Χανιωτάκης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία ολοκληρώθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη του καθηγητή Γανωτάκη Δημητρίου, τον οποίο ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όταν με επέλεξε να εργαστώ στο εργαστήριό του, καθώς και για την καθοδήγησή του τα τρία χρόνια που βρισκόμουν εκεί. Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την υλικοτεχνική υποστήριξη που προσέφερε.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελής επιτροπής, που δέχθηκαν να αφιερώσουν το χρόνο τους για να κρίνουν την παρούσα εργασία, τους καθηγητές Γ. Τσιώτη και Ν. Χανιωτάκη.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους διδάκτορες και μεταπτυχιακούς του εργαστηρίου για τη βοήθειά τους στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο, για το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο, καθώς και για τις συμβουλές που μου έδωσαν και συνεχίζουν να μου δίνουν. Ιδιαίτερα, ένα μεγάλο ευχαριστώ αξίζει στο μεταδιδακτορικό Στεφανάκη Δημήτριο που βρισκόταν δίπλα μου και με καθοδηγούσε σε κάθε στάδιο, καθώς και για την υπομονή του να με βοηθήσει όποτε το χρειαζόμουνα. Θα ήταν παράβλεψη να μην ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους διδακτορικούς Θεωράχη Νάζο και Ελευθερία Βαλσαμή για την στήριξη και συμπαράστασή τους σε κάθε στάδιο διεκπεραίωσης αυτής της εργασίας, καθώς και για τις συμβουλές τους, σε ερευνητικά θέματα και μη. Τέλος, δεν θα ήθελα να παραλείψω να προσφέρω τις ευχαριστίες μου στην ερευνήτρια Lucille Chambon για τις εκτενέστατες ώρες που προσέφερε να με διδάξει την τεχνική DLS, αλλά και να τρέξει να βοηθήσει σε οτιδήποτε την χρειαζόμουν.

Κλείνοντας, ευχαριστώ τα εργαστήριο πολυμερών για την προσφορά κάθε βοήθειας με τις μετρήσεις περίθλασης ακτίνων Χ, καθώς και το εργαστήριο ηλεκτρονικής μικροσκοπίας του τμήματος Βιολογίας, για την διάθεση των υλικών υποδομών τους για μετρήσεις TEM, SEM και EDS.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΣΦΕΝΔΟΥΡΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ-ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ημερομηνία γέννησης:	3 Σεπτεμβρίου 1993
Διεύθυνση:	Χάνδακος 36Β, Ηράκλειο Κρήτης
Αριθμός τηλεφώνου:	6981695777
Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο:	geosfen1@gmail.com

ΣΠΟΥΔΕΣ

Οκτώβριος 2015-Σήμερα

Μεταπτυχιακό δίπλωμα Γενικής Χημείας με ειδίκευση στη Βιοχημεία, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάδα.

Σεπτέμβριος 2011-Ιούλιος 2015

Πτυχίο Χημείας (7,51), Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάδα

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Οκτώβριος 2014-Ιούλιος 2015

Διπλωματική εργασία υπό την επίβλεψη του καθηγητή Δ. Γανωτάκη, με τίτλο: «Σύνθεση νανοϋβριδίων πρωτοπορφυρίνης IX σε στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια και μήτρα αλγινικού ασβεστίου».

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Ιούλιος 2014-Οκτώβριος 2014

Πρακτική άσκηση στο Γενικό Χημείο του Κράτους, στο τμήμα Ανάλυσης Τροφίμων

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Κυτταρικές καλλιέργειες:

Ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα

Απομόνωση και χαρακτηρισμός πρωτεϊνών:

Φυγοκέντριση, υγρή χρωματογραφία, ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE, φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού

Σύνθεση και χαρακτηρισμός υλικών:

Περίθλαση ακτίνων Χ, φασματοσκοπία υπερύθρου, θερμοσταθμική ανάλυση, δυναμική σκέδαση φωτός, ηλεκτρονιακή μικροσκοπία διέλευσης, ηλεκτρονιακή μικροσκοπία σάρωσης, φασματοσκοπία ακτίνων Χ με ενεργειακή διασπορά

ΓΕΝΙΚΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Ξένες Γλώσσες:

Αγγλικά: άριστα (Cambridge First Certificate)
Γερμανικά: μέτρια (B2)

Υπολογιστές:

Microsoft Word, Excel, PowerPoint, Microcal Origin, βασικές γνώσεις Fortran και Python.

ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. 18^{ο} Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών
   Παρουσιαστής της εργασίας «Σύνθεση και χαρακτηρισμός νανοβιοϋβριδίων πρωτοπορφυρίνης IX παγιδευμένης σε μήτρα LDH»

2. 19^{ο} Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών

3. Hague International Model United Nations 2010
   Representing: Mongolia
   Committee: Disarmament

4. St. Andrews International Model United Nations 2009
   Representing: Japan
   Committee: Disarmament

5. Athens Model United Nations 2009
   Representing: Venezuela
   Committee: Disarmament

CURRIVULUM VITAE

SFENDOURAKIS GEORGE-PANAGIOTIS

PERSONAL INFO

Date of Birth:	3 September 1993
Address:	Chandakos 36B, Heraklion Crete
Phone Number:	6981695777
E-mail:	geosfen1@gmail.com

STUDIES

October 2015-Today

MSc degree in Chemistry (Biochemistry), Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion, Greece.

September 2011-July 2015

Degree in Chemistry (7.51), Department of Chemistry, University of Crete, Heraklion, Greece.

RESEARCH EXPERIANCE

October 2014-July 2015

Diploma thesis under the supervision of Professor D. Ghanotakis titled: "Synthesis of protoporphyrin nanohybrids IX in double hydroxide layers and calcium alginate matrix".

WORK EXPERIANCE

July 2014-October 2014

Internship at the State General Laboratory, Department of Food Analysis

TECHNICAL KNOWLEDGE

Cell cultures:

Human epithelial cells

Isolation and characterization of proteins:

Centrifugation, liquid chromatography, SDS-PAGE electrophoresis, ultraviolet-visible spectroscopy

Synthesis and characterization of materials:

X-ray diffraction, infrared spectroscopy, thermostatic analysis, Scanning Electron Microscopy, Transmission Electron Microscopy, Energy-dispersive X-ray spectroscopy, Dynamic Light Scattering

GENERAL KNOWLEDGE

Foreign Languages:

English: exceptional (Cambridge First Certificate)
German: average (B2)

Computers:

Microsoft Word, Excel, PowerPoint, Microcal Origin, basic knowledge of Fortran και Python.

CONFERENCES

1. 18th Postgraduate Conference
   Presentation titled « Synthesis and characterization of protoporphyrin IX nanohybrids IX trapped in LDH matrix »

2. 19th Postgraduate Conference

3. Hague International Model United Nations 2010
   Representing: Mongolia
   Committee: Disarmament

4. St. Andrews International Model United Nations 2009
   Representing: Japan
   Committee: Disarmament

5. Athens Model United Nations 2009
   Representing: Venezuela
   Committee: Disarmament

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία περιγράφεται η σύνθεση βιοανόργανων συμπλόκων, με παγίδευση οργανικών ουσιών στο εσωτερικό στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στη σύνθεση υβριδίου LDH με την πρωτοπορφυρίνη IX, ενώ στη συνέχεια μελετώνται οι ιδιότητες του υβριδίου αυτού. Η επιλογή της σύνθεσης των νανοϋβριδίων που περιγράφονται έγινε σύμφωνα με τις βιολογικές εφαρμογές που θα μπορούσαν να έχουν, όπως χρήση στη μεταφορά φαρμάκων και στη φωτοδυναμική θεραπεία.

Αρχικά, περιγράφεται η σύνθεση των υβριδίων με ιονταναλλαγή, επανενυδάτωση ή παγίδευση της ουσίας κατά το σχηματισμό των LDH. Τα νανοσωματίδια αυτά χαρακτηρίστηκαν με τις πιο συχνές τεχνικές ανάλυσης LDH, με έμφαση στην περίθλαση ακτινών X (XRD) και φασματοσκοπία υπεριώδους (IR). Εν ακολούθως, μελετάται η ικανότητα απελευθέρωσης και δράσης της περιεχόμενης ουσίας. Ιδιαίτερα εξετάζεται η δυνατότητα του υβριδίου LDH-ppIX να δράσει σαν φωτοευαισθητοποιητής για την εξουδετέρωση καρκινικών κυττάρων μέσω ριζών και στη συνέχεια συγκρίνεται η δραστικότητα αυτού με τη δραστικότητα της ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX. Ταυτόχρονα εξετάζεται και η κυτταροτοξικότητα του σκέτου LDH.

Στη συνέχεια μελετώνται τρεις μέθοδοι αποστοίβαξης LDH για την παρασκευή ενός καλύτερου φορέα φαρμάκων, καθώς και για το ποια τεχνική προσφέρει τα περισσότερα πλεονεκτήματα. Η αποστοίβαξη εξακριβώθηκε με τη χρήση δυναμικής σκέδασης φωτός και εν ακολούθως μελετήθηκαν οι ικανότητες εισαγωγής φαρμάκων σε αυτά τα LDH. Τέλος, εξετάστηκε η ικανότητα παρασκευής υβριδίου LDH-DNA.

Λέξεις κλειδιά: στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια (LDH), νανοϋβρίδια, πρωτοπορφυρίνη IX (ppIX), φωτοδυναμική θεραπεία, μεταφορά φαρμάκων, νιτροφουραντοΐνη, αμινοξέα, χολικό οξύ, αποστοίβαξη, δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA)

Abstract

The aim of this thesis has been the synthesis and characterization of layered double hydroxides (LDH) nanohybrids containing various organic substances within the layers of LDH. The nanohybrids described in this project were chosen based on their biological applications for drug delivery or photodynamic treatment. Emphasis was given on the synthesis and characterization of an LDH nanohybrid containing protoporphyrin IX.

LDH nanohybrids were prepared by using ion exchange, rehydration and coprecipitation techniques. The nanohybrids were subsequently characterized by employing the most commonly used analysis techniques, focusing on x-ray diffraction (XRD) and IR spectroscopy. Moreover, the rate of release and action of the trapped substance was studied. The ability of the LDH-ppIX hybrid to act as a photosensitizer to photooxidize cancerous cells was analyzed, and then compared to that of free protoporphyrin IX. The toxicity of pristine LDH was also investigated.

Three methods of LDH delamination were studied for the preparation of a better drug carrier, while trying to determine the technique that offers the most advantages. Degradation was assayed by using dynamic light scattering and the drug import capabilities in these LDHs were then examined. Finally, the preparation of an LDH-DNA hybrid was investigated.

Key words: layered double hydroxides (LDH), nanohybrids, protoporphyrin IX (ppIX), photodynamic therapy, drug delivery, cholic acid, nitrofurantoin, amino acids, delamination, deoxyribonucleic acid (DNA)

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ....1
1.1 Νανοϋβριδικά Υλικά....1
1.2 Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων....3
1.3 Στοιβαγμένα Διπλά Υδροξείδια....8
1.3.1 Εισαγωγή....8
1.3.2 Δομή....8
1.3.3 Ιδιότητες....9
1.3.4 Χαρακτηρισμός....10
1.3.5 Εφαρμογές....15
1.4 Αποστοιβαγμένα διπλά υδροξείδια....18
1.5 Φωτοδυναμική θεραπεία....19
1.6 Πρωτοπορφυρίνη IX....21
1.7 Γονιδιακή θεραπεία....22
1.8 Σκοπός....27
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ....28
2.1 Σύνθεση στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων....28
2.2 Σύνθεση υβριδίων LDH....29
2.2.1 Συνθέσεις με ανιονταναλλαγή....29
2.2.2 Συνθέσεις με συγκαταβύθιση....32
2.2.3 Συνθέσεις με επανενυδάτωση....32
2.2.4 Συνθέσεις με αποστοίβαξη....33
2.3 Χαρακτηρισμός....34
2.4 Έλεγχος ρυθμού απελευθέρωσης ουσίας από LDH....34
2.5 Έλεγχος δραστικότητας συναρμοσμένης ουσίας....35
2.6 Καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων HeLa....35
2.7 Έλεγχος τοξικότητας LDH-NO_3 σε καρκινικά κύτταρα....36

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 37
3.1 Χαρακτηρισμός των LDH 37
3.1.1 Περίθλαση ακτίνων Χ 37
3.1.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου 46
3.1.3 Φασματοσκοπία ακτίνων Χ με ενεργειακή διασπορά 53
3.1.4 Δυναμική σκέδαση φωτός 54
3.1.5 Θερμοσταθμική Ανάλυση 57
3.2 Έλεγχος ρυθμού απελευθέρωσης ουσίας από LDH 59
3.3 Έλεγχος δραστικότητας ακινητοποιημένης ουσίας 60
3.4 Έλεγχος τοξικότητας LDH σε καρκινικά 61
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 67

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

LDH : Στοιβαγμένα Διπλά Υδροξείδια

dLDH : Αποστοιβαγμένα διπλά υδροξείδια

ppIX : Πρωτοπορφυρίνη IX

IR : Φασματοσκοπία Υπερύθρου

XRD : Περίθλαση Ακτίνων X

UV-vis: Φασματοσκοπία Υπεριώδους Ορατού

DLS : Δυναμική Σκέδαση Φωτός

TEM : Ηλεκτρονιακή Μικροσκοπία Διέλευσης

TGA : Θερμοσταθμική Ανάλυση

tris : Τρις(υδροξυμέθυλο)αμινομεθάνιο

PDT : Φωτοδυναμική θεραπεία

EDS : Φασματοσκοπία ακτίνων X με ενεργειακή διασπορά

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Νανοβιοϋβριδικά 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 στα νανοβιοϋβριδικά υλικά, ένα νέο διεπιστημονικό χώρο όπου συναντάται η επιστήμη υλικών με τη βιοτεχνολογία[1]. Το πεδίο των νανοβιοϋβριδικών υλικών είναι ένα από τα πιο υποσχόμενα και γρήγορα αναπτυσσόμενα στη χημεία υλικών[2,3]. Τα υλικά αυτά ορίζονται ως συνθετικά υλικά με οργανικά και ανόργανα τμήματα τα οποία συνδέονται με μη ομοιοπολικούς δεσμούς (Τάξη 1) ή με ομοιοπολικούς δεσμούς (Τάξη 2), με μέγεθος στην κλίμακα των νανομέτρων. Οι ατελείωτοι δυνατοί συνδυασμοί των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων ανόργανων, οργανικών και βιοενεργών υλικών σε ένα μοναδικό νανοσωματίδιο, με κυτταρικές ή νάνο- διαστάσεις, έχουν τραβήξει μεγάλο ενδιαφέρον. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει στην δημιουργία ενός τεράστιου αριθμού καινοτόμων υλικών με καλά ελεγχόμενες ιδιότητες και πολλαπλές δομές. Τυπικά, ανόργανα συστατικά των νανοβιοϋβριδίων αποτελούν τα μεταβατικά μέταλλα και σωματίδια άνθρακα, οξείδια και υδροξείδια μετάλλων, πυρίτια, πυριτικά άλατα, ανθρακικά άλατα και φωσφορικά άλατα. Η συγγένεια μεταξύ των ανόργανων και των βιοοργανικών τμημάτων, η οποία καθορίζει τη σταθερότητα των βιοσύνθετων υλικών που προκύπτουν, εξαρτάται από τους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης που διέπουν τις διαδικασίες συναρμολόγησης.

Παράλληλα με τη ραγδαία ανάπτυξη των νέων υβριδικών υλικών, ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί στις τεχνικές σύνθεσης των νανοβιοϋβριδίων. Πολλές από αυτές έχουν να κάνουν με την προετοιμασία υλικών εμπνευσμένων από παραδείγματα της φύσης όπως τα οστά[4], δόντια, ή και διάφορα κελύφη. Τα υλικά αυτά διαθέτουν μοναδικές δομικές ιδιότητες χάρη στην ιδιαίτερη διευθέτηση των βιολογικών και ανόργανων τμημάτων τους. Τα κελύφη αποτελούν το καλύτερο παράδειγμα φυσικού βιοϋλικού, το οποίο σχηματίζεται στοιβάζοντας ανθρακικό ασβέστιο στερεωμένο με ινώδης πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια υπερδομή με πολύ καλύτερες δομικές ιδιότητες από το σκέτο ανθρακικό ασβέστιο[5]. Σήμερα, νανοβιοϋβρίδια μιμούμενα αυτά τα φυσικά υλικά παρασκευάζονται με στόχο την ανάπτυξη υλικών με βελτιωμένες μηχανικές ιδιότητες, που θα είναι βιοσυμβατά και θα διαθέτουν άλλα ενδιαφέροντα βιοανόργανα χαρακτηριστικά[6]. Στο πλαίσιο αυτό φαίνεται να είναι εξαιρετικής σημασίας, η ανάπτυξη βιοϋβριδικών συστημάτων τα οποία μιμούνται βιολογικές συνθέσεις, όπως η μέθοδος βιοορυκτοποίησης, όπως αυτή λαμβάνει χώρα στο κυτταρικό τοίχωμα των διατόμων, όπου νανοσφαιρίδια πυριτίου στοιβάζονται

από κατιονικά πολυπεπτίδια ονομαζόμενα σιλαφίνες. Βασισμένοι σε αυτά τα φυσικά συστήματα, οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης μεταξύ κολλοειδούς πυριτίου και πεπτιδίων έχουν μελετηθεί ιδιαιτέρως με στόχο την κατανόηση των διεργασιών βιοορυκτοποίησης και κατά συνέπεια την ανάπτυξη, με ελεγχόμενο τρόπο, νέων βελτιωμένων συνθετικών νανοβιοϋβριδίων.

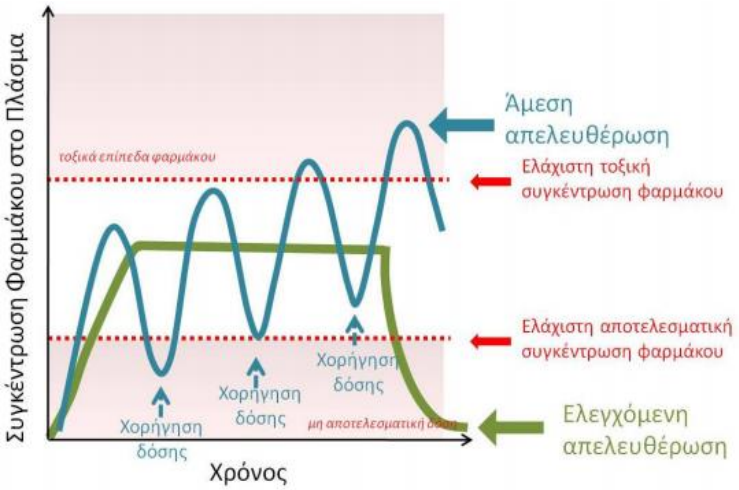
Όπως επισημάνθηκε παραπάνω, η ανάπτυξη νανοβιοϋβριδίων με τη μίμηση ανόργανων βιοκατασκευών, αντιπροσωπεύει μια εξαιρετικά χρήσιμη προσέγγιση. Αυτό ισχύει, για παράδειγμα, για τα νανοβιοϋβρίδια που βασίζονται σε προσεγγίσεις βιομιμητικής, τα οποία παρουσιάζουν εξαιρετικές δομικές ιδιότητες και βιοσυμβατότητα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα νανοϋβρίδια που παρασκευάζονται με συναρμολόγηση υδροξυαπατίτη, ο οποίος είναι το κύριο συστατικό κοκάλων και δοντιών, μαζί με βιοπολυμερή, όπως κολλαγόνο[7]. Ένα άλλο εξελισσόμενο τομέα, αποτελεί η επικάλυψη των μικρο-ή νανο-σωματιδιακών στερεών με βιοπολυμερή μέσω μηχανισμών σύνδεσης με το υδρογόνο ή με συμπλοκοποίηση μετάλλων. Με αυτόν τον τρόπο, η συναρμολόγηση μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου με βιοπολυμερή επιτρέπει την παρασκευή μαγνητικών νανοβιοϋβριδίων που εφαρμόζονται σε απεικόνιση NMR[8]. Εξίσου σημαντική είναι επίσης η χρήση κβαντικών τελειών ως δεικτών φθορισμού για την απεικόνιση βιομορίων και κυττάρων[9]. 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.

Η συναρμολόγηση βιοπολυμερών με ανόργανα στρώματα στερεών μπορεί να οδηγήσει σε νανοβιοϋβρίδια στα οποία το βιοπολυμερές παρεμβάλλεται μεταξύ των στρωμάτων των ανόργανων ξενιστών. Η παρεμβολή είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που μπορεί ταυτόχρονα να περιλαμβάνει διάφορους μηχανισμούς. Εκτός από τη σύνδεση υδρογόνου, έχει αναφερθεί ότι ορισμένα βιοπολυμερή αλληλεπιδρούν με τα ανόργανα στρώματα μέσω ιοντικών δεσμών. Αυτή είναι και η περίπτωση των πολυσακχαριτών, των πρωτεϊνών και των νουκλεϊνικών οξέων που μπορούν να ενεργούν ως παρεμβαλλόμενοι πολυηλεκτρολύτες, μέσω αντίδρασης ανταλλαγής ιόντων, σε στερεά που διαθέτουν θετικά ή αρνητικά φορτισμένα στρώματα, όπως τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια, ή οι πηλοί σμεκτίτη. Η ιατρική και η φαρμακευτική επωφελούνται σε μεγάλο βαθμό από την ανάπτυξη τέτοιων υλικών τα οποία όντας βιοσυμβατά και με ελεγχόμενη δομή, μπορούν να βρουν εφαρμογή σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.

1.2 Συστήματα Μεταφοράς Φαρμάκων

Συμβατικά η χορήγηση φαρμάκων περιλαμβάνει την άμεση παροχή του φαρμάκου από το στόμα ή ενδοφλεβίως. Πρόσφατες προσεγγίσεις στην έρευνα για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων έχουν οδηγήσει σε φάρμακα τα οποία είναι περισσότερο ισχυρά αλλά έχουν μικρότερη διαλυτότητα ή μεγαλύτερη τοξικότητα από ότι οι προηγούμενες γενιές φαρμάκων. Οι συμβατικές μεθοδολογίες επομένως, καθίστανται όλο και λιγότερο αποτελεσματικές στην επίτευξη του βέλτιστου φαρμακοκινητικού ρυθμού χορήγησης φαρμάκων νέας γενιάς. Έτσι, τις τελευταίες δεκαετίες η έρευνα έχει στραφεί στην ανάπτυξη καινοτόμων προσεγγίσεων ώστε η μεταφορά φαρμάκων να γίνεται πιο αποδοτικά και πιο αποτελεσματικά. Οι νέες τεχνικές περιλαμβάνουν συνήθως πολύπλοκα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων με στόχο την χορήγησή τους από το στόμα ή ενδοφλέβια καθώς και για την δημιουργία χειρουργικών εμφυτευμάτων.

Στόχος ενός συστήματος μεταφοράς φαρμάκου με ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου είναι να διατηρεί τη συγκέντρωση σταθερή μεταξύ των δύο χαρακτηριστικών συγκεντρώσεων. Με την χορήγηση ενός φαρμάκου από το στόμα (χάπια ή υγρό) ή ενδοφλέβια, τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα κυμαίνονται σύμφωνα με το διάγραμμα που δίνεται στην Εικόνα 1.1 (μπλε γραμμή). Το επίπεδο της συγκέντρωσης του φαρμάκου αυξάνεται μετά από κάθε χορήγηση του φαρμάκου και στη συνέχεια μειώνεται, καθώς μεταβολίζεται και απομακρύνεται από τον οργανισμό, μέχρι την χορήγηση της επόμενης δόσης. Η επιτυχία μιας φαρμακολογικής θεραπείας βασίζεται στην διατήρηση της διακύμανσης της συγκέντρωσης του ενεργού παράγοντα στο αίμα μεταξύ μιας μέγιστης τιμής (η οποία μπορεί να αναπαριστά ένα τοξικό επίπεδο), και μιας ελάχιστης τιμής (κάτω από την οποία το φάρμακο παύει να είναι αποτελεσματικό). Για να πετύχει ένα σύστημα μεταφοράς φαρμάκων πρέπει δηλαδή να απελευθερώνει ορισμένη ποσότητα φαρμάκου σε μία επιθυμητή χρονική περίοδο με σταθερή ταχύτητα. Με τον τρόπο αυτό στην ιδανική περίπτωση χορηγούνται μικρότερες δόσεις και προκαλούνται λιγότερες παράπλευρες δράσεις. Στα συστήματα ελεγχόμενης



Εικόνα 1.1. Σύγκριση συμβατικής χορήγησης (μπλε) και ελεγχόμενης απελευθέρωσης

απελευθέρωσης η ταχύτητα με την οποία το φάρμακο διατίθεται στο πλάσμα εξαρτάται από την ταχύτητα με την οποία απελευθερώνεται από τη μήτρα φαρμάκου και όχι από την ταχύτητα απορρόφησης από τον περιβάλλοντα ιστό, όπως συμβαίνει στα συμβατικά φάρμακα.

Με τις συμβατικές μορφές μόνο η δόση και η συχνότητα χορήγησης μπορούν να ελεγχθούν, ενώ το ποσό του φαρμάκου που διατίθεται στο στόχο και ο χρόνος διάθεσής του δεν μπορούν να καθοριστούν ανεξάρτητα. Αντίθετα, με την ελεγχόμενη χορήγηση είναι δυνατόν να καθοριστούν τόσο το ποσό του φαρμάκου που διατίθεται στο πάσχον ιστό, καθώς και ο χρόνος διάθεσης του στην επιθυμητή περιοχή. Πάνω σε αυτή την ιδέα αναπτύχθηκε το μοντέλο magic bullet[10]. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, θα μπορούσε να παρασκευαστεί ένας συνδυασμός μήτρας και φαρμάκου (σφαίρα) ο οποίος θα μπορεί να στοχεύσει ένα και μόνο συγκεκριμένο κύτταρο στόχο, εξαλείφοντας τον κίνδυνο να επηρεαστούν οι γειτονικοί ιστοί, άρα και χωρίς να υπάρξουν παρενέργειες. Η κατασκευή των συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων προϋποθέτει την ενσωμάτωση της φαρμακευτικής ουσίας σε ένα μη τοξικό, βιοσυμβατό ή βιοαποικοδομήσιμο νανοφορέα, ο οποίος θα χαρακτηρίζεται από παρατεταμένη παραμονή στη γενική κυκλοφορία και την ικανότητα να δεσμεύεται εκλεκτικά από το όργανο-στόχο με σκοπό την αποκλειστική αποδέσμευση του φαρμάκου στην πάσχουσα περιοχή. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό πως τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νανοφορέα καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό το φαρμακοκινητικό προφίλ.

Ένα άλλο πρόβλημα που μπορεί να αποφευχθεί με τη χρήση συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, είναι η χορήγηση αλλεπάλληλων δόσεων σε σύντομα χρονικά διαστήματα, φαινόμενο που εμφανίζεται σε φάρμακα με μικρό χρόνο ημιζωής. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μορφοποίηση σε συστήματα μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών με μεγάλο χρόνο ημιζωής είναι ανούσια καθώς οι ουσίες αυτές εμφανίζουν εκ φύσεως παρατεταμένη αποδέσμευση.

Συνοψίζοντας, τα κυριότερα πλεονεκτήματα των συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων, είναι τα ακόλουθα:

- Αύξηση της διάρκειας δράσης του φαρμάκου και καλύτερη συμμόρφωση του ασθενούς διότι αποφεύγονται οι συχνές λήψεις
- Χορήγηση μικρότερης ποσότητας φαρμάκου που έχει σαν αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων ενεργειών.
- Βελτίωση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας αφού αποφεύγεται η αυξομείωση των επιπέδων φαρμάκου στο αίμα.
- Αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας αρκετών φαρμακευτικών ουσιών.
- Αύξηση της σταθερότητας διαφόρων ουσιών.

Ωστόσο πρέπει να σημειωθούν και τα μειονεκτήματα των συστημάτων ελεγχόμενης μεταφοράς φαρμάκων:

- Η καθυστερημένη αποδέσμευση μπορεί να επιβραδύνει το θεραπευτικό αποτέλεσμα και να επιμηκύνει τη διάρκεια τυχόν ανεπιθύμητων ενεργειών.
- Ύπαρξη παραπροϊόντων από τη χημική αποικοδόμηση κάποιων συστημάτων.
- Πιθανή απόρριψη της φαρμακευτικής ουσίας από το νανοφορέα.
- Υψηλό κόστος σε σχέση με τα παραδοσιακά σκευάσματα.

Τρόποι στόχευσης

Η εκλεκτική στόχευση του φαρμάκου στο κύτταρο-στόχο συμβαίνει είτε παθητικά, είτε ενεργητικά.

Η παθητική στόχευση βασίζεται στη διαφορετική μορφολογία μεταξύ του υγιούς ιστού και του ιστού-στόχου. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα παθητικής στόχευσης είναι η περίπτωση καρκινικών όγκων. Πιο συγκεκριμένα, οι περισσότεροι συμπαγείς όγκοι, εμφανίζουν ιδιαίτερα παθολογικά χαρακτηριστικά που δεν παρατηρούνται στους φυσιολογικούς ιστούς, όπως εκτεταμένη αγγειογένεση προκειμένου να καλυφθούν οι συνεχώς αυξανόμενες ανάγκες του όγκου σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά. Αυτή όμως η υπεραγγείωση που δημιουργείται, έχει δομικές ατέλειες, με διεσταλμένα, ακανόνιστα ή διαπερατά αιμοφόρα αγγεία καθώς και κακή λεμφική παροχέτευση. Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κυτταρικών τοιχωμάτων συχνά παρουσιάζουν μεγάλα κενά. Έτσι, αυτή η ελαττωματική αρχιτεκτονική των αιμοφόρων αγγείων του όγκου, σε συνδυασμό με τον ευρύ αυλό τους, έχει σαν αποτέλεσμα την εκτεταμένη διαρροή συστατικών του πλάσματος του αίματος μέσα στον όγκο. Ταυτόχρονα, η κακή λεμφική παροχέτευση του όγκου, οδηγεί στην κατακράτηση αυτών των συστατικών (μακρομόρια, νανοσωματίδια, λιπιδικά νανοσωματίδια) εντός του όγκου. Αυτή η ιδιαιτερότητα των καρκινικών όγκων ονομάζεται φαινόμενο ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης [11,12]. Μέσω αυτού του μηχανισμού λοιπόν, οι νανοφορείς μπορούν, όπως τα συστατικά του πλάσματος, να συγκεντρωθούν στον καρκινικό ιστό. Σημαντική προϋπόθεση για την ικανοποιητική συγκέντρωση των νανοφορέων στο στόχο μέσω του φαινομένου ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης είναι η παρατεταμένη κυκλοφορία τους στο αίμα, ώστε σταδιακά να επιτευχθεί αυξημένη εντόπισή τους μέσω της διάχυσης από τα υψηλής διαπερατότητας αιμοφόρα αγγεία του όγκου.

Με βάση αυτό το φαινόμενο έχουν γίνει πολλές προσπάθειες στοχευμένης μεταφοράς και αποδέσμευσης φαρμάκων στην περιοχή του όγκου[13,14]. Έτσι είναι δυνατό

να επιτευχθούν τοπικές συγκεντρώσεις φαρμάκων έως και 10-50 φορές μεγαλύτερες στην περιοχή του όγκου συγκριτικά με τους φυσιολογικούς ιστούς, σε διάστημα 1-2 ημερών. Μελέτες έχουν δείξει ότι το φαινόμενο κατακράτησης, όμως, δεν είναι εφαρμόσιμο σε χαμηλού μοριακού βάρους φάρμακα εξαιτίας της γρήγορης διάχυσης τους στην κυκλοφορία του αίματος, ακολουθούμενη από νεφρική κάθαρση. Για να παρακαμφτεί ο περιορισμός έχουν σχεδιαστεί συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, τα οποία στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα βασιζόμενα σε άλλες ιδιαιτερότητες που εμφανίζουν τα καρκινικά κύτταρα, όπως χαμηλότερο pH[15,16]. Αυτή η διαφορά στην οξύτητα του κυττάρου οφείλεται στην αυξημένη γλυκολυτική δραστηριότητα που συμβαίνει στο κύτταρο, λόγω των αυξημένων αναγκών του σε ενέργεια. Ένα είδος νανοσωματιδίου που εκμεταλλεύεται εκτενώς αυτή τη διαφορά στο pH είναι τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια, τα οποία όπως θα αναλυθεί και στη συνέχεια, όταν βρίσκονται σε όξινο pH μπορούν να απελευθερώσουν το φάρμακο που είναι παγιδευμένο μέσα τους.

Η ενεργητική στόχευση βασίζεται στη μοριακή τροποποίηση της επιφάνειας των νανοφορέων, συνήθως μέσω χημικών μεθόδων. Έτσι επιτυγχάνεται η σύνδεσή τους με ποικίλους παράγοντες στόχευσης, οι οποίοι αναγνωρίζονται και συνδέονται εκλεκτικά με συγκεκριμένους υποδοχείς ή αντιγόνα της επιφάνειας των κυττάρων-στόχων. Αυτοί οι παράγοντες στόχευσης συνήθως είναι πρωτεΐνες (κυρίως αντισώματα και τα κλάσματα τους), κλάσματα νουκλεϊκών οξέων (aptamers), ή άλλοι συνδέτες υποδοχέων (πεπτίδια, βιταμίνες, υδατάνθρακες). Γενικά, όταν χρησιμοποιείται ένας παράγοντας στόχευσης για την πρόσδεση του νανοφορέα σε καρκινικά κύτταρα, είναι αναγκαίο ο συνδέτης να προσδένεται με υψηλή εκλεκτικότητα στα μόρια που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Επίσης, για τη βελτιστοποίηση της εκλεκτικότητας, κρίνεται σκόπιμο το μόριο στο οποίο θα προσδεθεί ο συνδέτης να είναι υπερ-εκφρασμένο στην επιφάνεια του κυττάρου στόχου, συγκριτικά με τα φυσιολογικά κύτταρα [17,18].

Μόλις οι νανοφορείς αναγνωριστούν και προσδεθούν στην επιφάνεια των κύτταρων στόχων, τότε ανάλογα με τον συνδέτη τον οποίο φέρουν, είτε θα πραγματοποιηθεί ενδοκυττάρωση του νανοφορέα, είτε θα παραμείνει προσκολλημένος στην επιφάνεια του κυττάρου. Στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιείται ιδιαίτερα το φολικό οξύ, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι σε πολλούς τύπους καρκίνου υπερεκφράζονται υποδοχείς φολικού οξέος στην επιφάνεια των κυττάρων[19]. Επίσης, έχουν παρασκευαστεί πολλά αντισώματα που αναγνωρίζουν εξειδικευμένα καρκινικά κύτταρα[20,21], καθώς και ολιγοπεπτίδια που αναγνωρίζονται από καρκινικά κύτταρα[22].

Κατηγορίες συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων

Ανάλογα με την πολυπλοκότητα που παρουσιάζουν στην τεχνολογία τους, τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

- Συστήματα προκαθορισμένου ρυθμού αποδέσμευσης
- Συστήματα ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης
- Συστήματα στα οποία η αποδέσμευση ελέγχεται από μηχανισμό ανάδρασης
- Συστήματα στόχευσης

Στα συστήματα προκαθορισμένου ρυθμού η απελευθέρωση της δραστικής ουσίας έχει προκαθοριστεί ώστε να γίνεται με συγκεκριμένο ρυθμό. Αυτό επιτυγχάνεται με τον κατάλληλο σχεδιασμό του συστήματος, κατά τον οποίο ο ρυθμός αποδέσμευσης της εγκλωβισμένης ουσίας ελέγχεται από τη διάχυση της ουσίας ή τη διείσδυση του διαλύτη. Τα ελεγχόμενα μέσω διάχυσης συστήματα διακρίνονται σε συστήματα δεξαμενής, στα οποία ο φραγμός είναι μια πολυμερική μεμβράνη που περιβάλλει το σύστημα και τα συστήματα τύπου μήτρας, όπου το φάρμακο βρίσκεται διαλυμένο ή διεσπαρμένο εντός μιας πολυμερικής μήτρας.

Στα συστήματα ενεργοποιούμενης αποδέσμευσης η αποδέσμευση του ενεργού συστατικού ξεκινά με την παρέμβαση φυσικών, χημικών και βιοχημικών διαδικασιών ή με την επίδραση εξωτερικώς παρεχόμενης ενέργειας.

Στα συστήματα στα οποία η αποδέσμευση ελέγχεται από μηχανισμό ανάδρασης η αποδέσμευση του φαρμάκου ρυθμίζεται από ένα βιοχημικά ανταποκρινόμενο αισθητήρα, ο οποίος ενσωματώνεται στο νανοφορέα. Ο αισθητήρας αυτός συνήθως ανιχνεύει μια βιολογική ουσία μέσα στο σώμα, η οποία δρα ως ενεργοποιητής του συστήματος. Ανάλογα με τη συγκέντρωση αυτής της ουσίας, ο μηχανισμός ανάδρασης του συστήματος ρυθμίζει κατάλληλα και το ρυθμό αποδέσμευσης του εγκλωβισμένου συστατικού. Τα συστήματα αυτής της κατηγορίας διακρίνονται στα:

- Ρυθμιζόμενα συστήματα μέσω βιοδιάσπασης.
- Βιο-αποκρινόμενα συστήματα.
- Αυτό-ρυθμιζόμενα συστήματα.

Το αυτορρυθμιζόμενο σύστημα χορήγησης ινσουλίνης αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της τελευταίας κατηγορίας

Τέλος, τα συστήματα στόχευσης αποσκοπούν στη μεταφορά και αποδέσμευση της δραστικής ουσίας στον επιθυμητό στόχο. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη τέτοιων συστημάτων έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της θεραπευτικής ικανότητας των δραστικών ουσιών. Παράλληλα συντελεί στη μείωση της εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών αφού ο στόχος

αυτών των συστημάτων είναι η καταστροφή των κυττάρων που βρίσκονται στον ιστό-στόχο χωρίς να προκαλούν βλάβες στα υγιή κύτταρα

1.3 Στοιβαγμένα Διπλά Υδροξείδια

1.3.1 Εισαγωγή

Ένα αρκετά υποσχόμενο υλικό για ελεγχόμενη μεταφορά φαρμάκων αποτελούν τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια. Με τον όρο στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια (LDH) αναφερόμαστε σε ανόργανα πολυμερή που συναποτελούνται από υδροξείδια δύο διαφορετικών μετάλλων. Στο εσωτερικό των φορτισμένων στρωμάτων των μετάλλων, συνυπάρχουν μόρια νερού και διάφορα ανιόντα, όπως CO_3^{2-}, NO_3^-, Cl^- κ.ά., τα οποία εξισορροπούν το θετικό φορτίο των στρωμάτων. Δύο από τις σημαντικότερες ιδιότητες των μορίων αυτών είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν κρυστάλλους μικρότερους του 1μm, καθώς και η ικανότητα προσρόφησης σημαντικών ποσοτήτων νερού από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται.

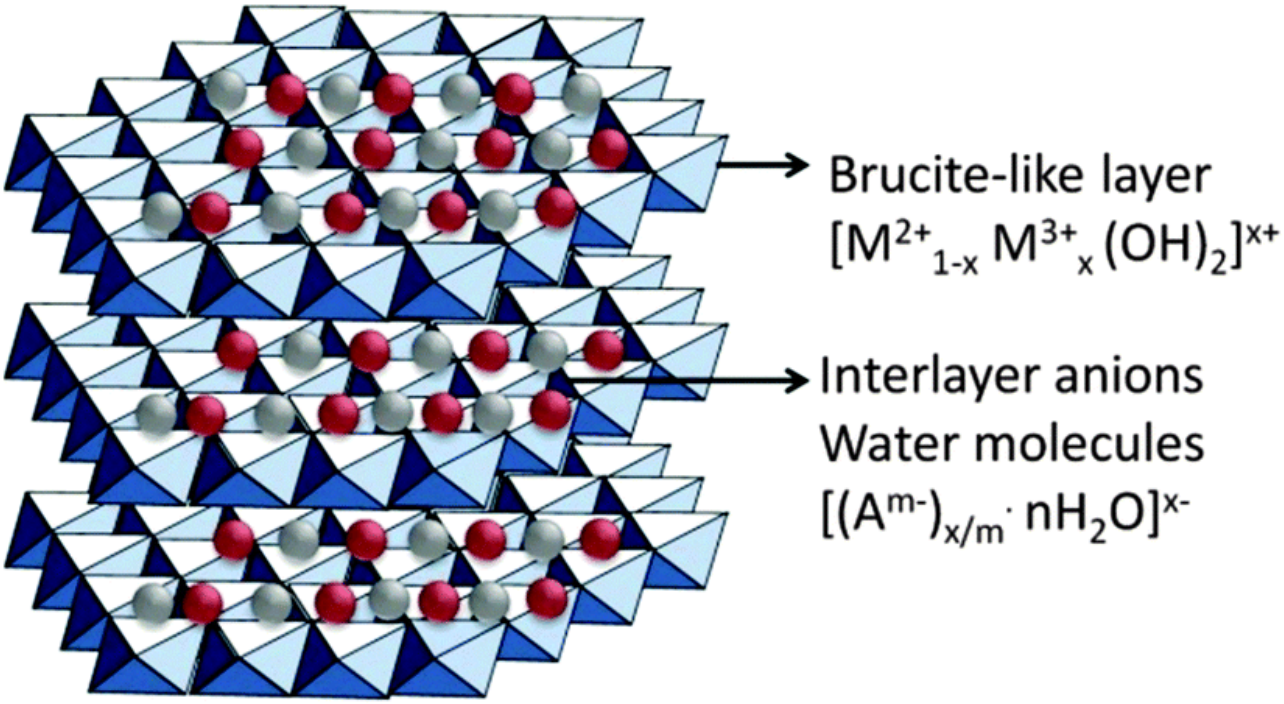
Η χημική σύσταση του LDH περιγράφεται από τον τύπο: $[M^{II}_xM^{III}_u(OH)_{2x+2y}][A^{n-}]_{y/n}.zH_2O$, όπου M^{II} και M^{III} είναι ένα δισθενές και ένα τρισθενές μέταλλο αντίστοιχα και A^{n-} είναι το ανιόν. Σαν αντισταθμιστικά ιόντα μπορεί να χρησιμοποιηθεί πληθώρα ανιόντων, όπως CO_3^{2-}, NO_3^-, Cl^-, ClO_4^-, OH^- κ.ά. Ταυτόχρονα η αναλογία των μετάλλων μπορεί εύκολα να καθοριστεί κατά την παρασκευή, με συνήθης αναλογίες M^{II}/M^{III} να είναι 4/1, 3/1 ή 2/1. Ο λόγος αυτός καθορίζει την ικανότητα και χωρητικότητα της ανιονανταλλαγής[23]. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η παρασκευή του LDH είναι εύκολη και έχει γενικά χαμηλό κόστος. Μετά το τέλος της παρασκευής, πληθώρα νέων ανιόντων μπορεί να εισαχθεί με τη μέθοδο της ανιονανταλλαγής η οποία θα αναλυθεί εκτενώς στη συνέχεια.

1.3.2 Δομή

Η δομή των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων είναι φυλλόμορφη[24]. Οι ανόργανες στοιβάδες LDH αποτελούνται από δύο διαφορετικά μέταλλα γεφυρωμένα με υδροξύλια σε οκταεδρική διαμόρφωση με αναλογία δύο υδροξυλίων προς ένα μέταλλο. Τα οκτάεδρα αυτά ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ένα δισδιάστατο φύλλο με δομή παρόμοια με αυτή του Βρουσίτη ($Mg(OH)_2$). Το πάχος του φύλλου αυτού είναι 4,78Å. Η μόνη διαφορά ενός φύλλου βρουσίτη με αυτού του LDH είναι, ότι με την εισαγωγή ενός τρισθενούς

μετάλλου το φύλλο αποκτά θετικό φορτίο. Το φορτίο αυτό εξουδετερώνεται από αντισταθμιστικά ιόντα, τα οποία μαζί με μόρια νερού, σχηματίζουν ένα στρώμα μεταξύ διαδοχικών ανόργανων φύλλων. Η συνολική δομή του LDH απεικονίζεται στην εικόνα 1.2.

Ανάλυση του LDH με ηλεκτρονική μικροσκοπία δείχνει ότι σχηματίζει κρυστάλλους σε σχήμα εξαγωνικής πλάκας[25,26]. Το μέγεθος των κρυστάλλων αυτών έχει εύρος από 100nm έως μερικά μικρόμετρα και εξαρτάται από τη μέθοδο σύνθεσης.



Εικόνα 1.2. Αναπαράσταση της δομής στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων.

1.3.3 Ιδιότητες

Οι βασικότερες ιδιότητες των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων είναι η αποσύνθεσή τους σε όξινες συνθήκες, η ιονταναλλαγή και η παραγωγή των αντίστοιχων μεταλλικών οξειδίων μετά από ισχυρή θέρμανση.

Η πρώτη ιδιότητα του LDH βασίζεται στο γεγονός ότι η παρασκευή του γίνεται με την προσθήκη βάσης στο μείγμα μετάλλων, ενώ παρουσία οξέος γίνεται η αντίστροφη διαδικασία. Οι αντιδράσεις, χρησιμοποιώντας ως παράδειγμα το LDH(MgAl) με αναλογία 2:1, είναι οι εξής:

- Σύνθεση: $2Mg(NO_3)_2 + Al(NO_3)_3 + 6NaOH \rightarrow [Mg_2Al(OH)_6]NO_3 + 6NaNO_3$
- Υδρόλυση: $[Mg_2Al(OH)_6]NO_3 + 7HCl \rightarrow 2MgCl_2 + AlCl_3 + HNO_3 + 6H_2O$

Η ιδιότητα του LDH να αποσυντίθεται σε pH μικρότερο του 5[27] είναι εξαιρετικά σημαντική, αφού επιτρέπει τη χρήστη του σαν μήτρα για τη μεταφορά και ελεγχόμενη απελευθέρωση

φαρμάκων. Ακόμα, η αποσύνθεση του LDH δεν παράγει τοξικές ουσίες, κάτι που καθιστά το μόριο βιοσυμβατό.

Η δεύτερη ιδιότητα είναι αυτή που επιτρέπει την εύκολη και γρήγορη αλλαγή του ενδιάμεσου ιόντος[28]. Η ιδιότητα αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι κάθε ανιόν έχει διαφορετική συγγένεια για το LDH. Η συγγένεια για ορισμένα από αυτά έχει μελετηθεί εκτενώς[29,30] και παρουσιάζεται στη συνέχεια:

$CO_3^{2-} > SO_4^{2-} > OH^- > F^- > Cl^- > Br^- > NO_3^- > I^-$

Όπου τα δισθενή ιόντα δεσμεύονται πολύ ισχυρότερα από τα μονοσθενή. Η σειρά ισχύος έχει μεγάλη σημασία για το σχεδιασμό του πειράματος. Για παράδειγμα σε ένα διάλυμα με LDH-NO_3 τα νιτρικά ιόντα μπορούν εύκολα να αντικατασταθούν από ιόντα χλωρίου με την προσθήκη NaCl. Στο ίδιο πείραμα εάν το διάλυμα δεν προστατευτεί και έρθει σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα θα γίνει ανταλλαγή ιόντων με ανθρακικά (CO_3^{2-}). Με την ιονταναλλαγή μπορεί να συντεθεί εύκολα και σε ήπιες συνθήκες πληθώρα διαφορετικών υλικών.

Σύμφωνα με την τρίτη ιδιότητα του LDH, μετά από θερμική κατεργασία στους 500°C για 5 ώρες παράγονται μικτά μεταλλικά οξείδια με μικρό μέγεθος κρυστάλλων, αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες και αλκαλικές ιδιότητες. Αυτή η αλλαγή δομής και ιδιοτήτων του LDH οφείλεται στην απομάκρυνση του νερού και των ανιόντων που βρίσκονται ανάμεσα στις στοιβάδες του. Η ιδιότητα αυτή παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, διότι το LDH μπορεί να επανακτήσει τη δομή του αν βρεθεί σε υδατικό διάλυμα κάποιου ανιόντος, δίνοντας έτσι μία ακόμα μέθοδο εισαγωγής ιόντων.

1.3.4 Χαρακτηρισμός

Ο χαρακτηρισμός των LDH γίνεται κυρίως και περίθλαση ακτίνων Χ και φασματοσκοπία υπερύθρου. Για μια πιο λεπτομερή εικόνα όμως χρησιμοποιούνται πολλές ακόμα μέθοδοι, όπως ηλεκτρονιακή μικροσκοπία και σκέδαση φωτός. Στη συνέχεια θα αναλυθούν οι πιο συχνές μέθοδοι ανάλυσης πηλού LDH.

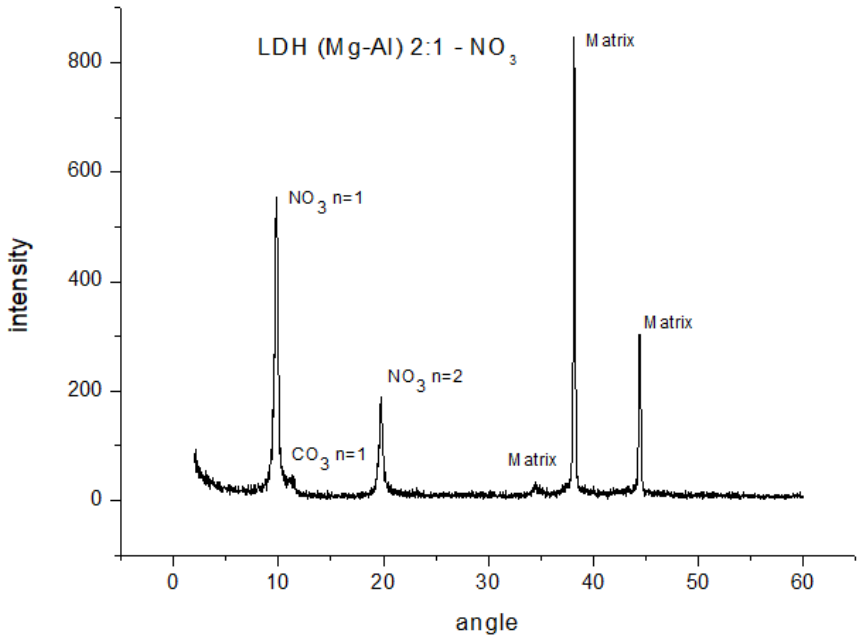
Περίθλαση ακτίνων Χ σε σκόνη (Powder X Ray Diffraction)

Εφόσον το LDH παρουσιάζει κρυσταλλική δομή, η κύρια μέθοδος ανάλυσης είναι η περίθλαση ακτίνων Χ σε σκόνη. Η μελέτη αυτή βασίζεται στο φαινόμενο περίθλασης μιας ακτίνας Χ όταν αυτή προσπίπτει πάνω σε κρύσταλλο. Η περίθλαση αυτή εξαρτάται από το μήκος κύματος των ακτίνων Χ, τον προσανατολισμό και τη δομή των κρυστάλλων. Η

δέσμη των ακτίνων Χ αλληλεπιδρά με την ηλεκτρονιακή πυκνότητα των ατόμων ή των ιόντων του κρυσταλλικού πλέγματος και έτσι δημιουργείται ένας ηλεκτρονιακός «χάρτης» του εξεταζόμενου κρυστάλλου. Ο χάρτης αυτός είναι χαρακτηριστικός για κάθε κρύσταλλο. Τα αποτελέσματα που συλλέγονται από μια τέτοια μέτρηση αναλύονται με βάση το νόμο του Bragg. Με τη μελέτη των κορυφών ενός διαγράμματος περίθλασης ακτίνων Χ (εικόνα 1.3) και τη χρήση του νόμου του Bragg μπορούμε να υπολογίζουμε την απόσταση d μεταξύ δύο διαδοχικών στρωμάτων. Ο νόμος του Bragg παρουσιάζεται στη συνέχεια:

$$n\lambda=2d\sin\theta$$

όπου n είναι η τάξη της κορυφής (n=1 για την (003), n=2 για τη (006) κοκ), λ είναι το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας σε Å, d είναι η απόσταση μεταξύ των διαδοχικών ανόργανων στρωμάτων και θ είναι η γωνία περίθλασης της κορυφής.



Εικόνα 1.3. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων Χ του LDH(Mg-Al)-NO_3.

Η απόσταση d εξαρτάται από το ανιόν που υπάρχει ανάμεσα στα στρώματα του LDH και οποιαδήποτε μεταβολή σε αυτό, μπορεί να επιβεβαιώσει την αλλαγή του ανιόντος αυτού. Το σχήμα των κορυφών δίνει επιπλέον πληροφορίες. Ένα καλά οργανωμένο προϊόν έχει οξείες γωνίες μεγάλης έντασης.

Φασματοσκοπία υπερύθρου

Όταν υπέρυθρη ακτινοβολία αλληλεπιδράσει με μία ουσία, υπάρχει πιθανότητα να απορροφηθεί από αυτήν. Γενικά, η υπέρυθρη ακτινοβολία είναι χαμηλότερης ενέργειας από αυτή της ορατής και της υπεριώδους περιοχής και αντιστοιχεί στην ενέργεια που χαρακτηρίζει τα δονητικά και περιστροφικά ενεργειακά επίπεδα ενός μορίου, τα οποία ως γνωστό είναι κβαντισμένα. Επομένως για να απορροφήσει ένα μόριο υπέρυθρη ακτινοβολία πρέπει η ενέργειά της να είναι ακριβώς τόση, ώστε να προκληθεί μια δονητική ή περιστροφική μετάπτωση.

Ένας άλλος παράγοντας που καθορίζει το αν θα απορροφηθεί η ακτινοβολία είναι η μεταβολή ή όχι τις διπολικής ροπής στους δεσμούς μιας ένωσης. Οι δεσμοί των οποίων η διπολική ροπή μεταβάλλεται, έχουν τη δυνατότητα να απορροφήσουν υπέρυθρη ακτινοβολία. Ο λόγος για τον οποίο παρατηρείται αυτό το φαινόμενο είναι το γεγονός ότι εξαιτίας της μεταβολής της διπολικής ροπής στο μόριο, δημιουργείται εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο με συχνότητα ίδια με αυτή της δόνησης του δεσμού. Αν η συχνότητα της υπέρυθρης ακτινοβολίας είναι ίδια με αυτή του προκύπτοντος ηλεκτρικού πεδίου, τότε πραγματοποιείται σύζευξη των δύο πεδίων με αποτέλεσμα την απορρόφηση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Όταν λοιπόν υπέρυθρη ακτινοβολία πέσει στην προς εξέταση ουσία, ένα ποσοστό αυτής απορροφάται. Η απορρόφηση της ακτινοβολίας συμβαίνει σε συχνότητες ν_δ οι οποίες είναι συχνότητες δόνησης των δεσμών και οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε ουσία. Στην υπέρυθρη φασματοσκοπία μετρούνται οι ενεργειακές διαφορές των επιπέδων δόνησης, βρίσκοντας έτσι τη διέγερση των δονήσεων του μορίου της ουσίας. Έτσι, κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μια κανονική μορφή δόνησης του συγκεκριμένου χημικού είδους. Η φασματοσκοπία υπερύθρου χρησιμοποιείται στη μελέτη LDH κυρίως για την ταυτοποίηση της εγκλωβισμένης ανάμεσα στις στοιβάδες ουσίας.

Φασματοσκοπία ακτίνων Χ με ενεργειακή διασπορά (Energy-dispersive X-ray spectroscopy)

Στην τεχνική φασματοσκοπίας ακτίνων Χ με ενεργειακή διασπορά (EDS) μετράται το φάσμα ακτίνων Χ που εκπέμπεται από ένα στερεό δείγμα, όταν αυτό βομβαρδίζεται με μία εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων, από τη μελέτη του οποίου μπορεί να γίνει χημική ανάλυση. Όλα τα στοιχεία με ατομικό αριθμός 4 (Be) έως 92 (U) μπορούν να ανιχνευθούν με αυτήν την τεχνική, αν και δεν είναι εξοπλισμένα όλα τα όργανα για την ανίχνευση

'ελαφρών' στοιχείων (Z <10). Η ποιοτική ανάλυση γίνεται με την αναγνώριση των γραμμών στο φάσμα και είναι αρκετά απλή λόγω της απλότητας ενός φάσματος ακτινών Χ. Η ποσοτική ανάλυση (προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των παρόντων στοιχείων) γίνεται με τη σύγκριση της έντασης της κορυφής για κάθε στοιχείο του δείγματος με αντίστοιχες κορυφές πρότυπων δειγμάτων, γνωστών συγκεντρώσεων[31].

Για να ξεκινήσει η εκπομπή ακτίνων Χ από ένα δείγμα, μια δέσμη ακτίνων Χ εστιάζεται πάνω στο δείγμα. Σε κατάσταση ηρεμίας, ένα άτομο μέσα στο δείγμα περιέχει ηλεκτρόνια σε διακεκριμένα επίπεδα ενέργειας (στοιβάδες). Η προσπίπτουσα δέσμη μπορεί να διεγείρει ένα ηλεκτρόνιο από μία εσωτερική στιβάδα, εκτοξεύοντάς το από το κέλυφος δημιουργώντας μια ενεργειακή «οπή» ηλεκτρονίων εκεί όπου ήταν το ηλεκτρόνιο. Στη συνέχεια, ένα ηλεκτρόνιο από μία εξωτερική στοιβάδα υψηλότερης ενέργειας γεμίζει την οπή και η διαφορά ενέργειας εκπέμπεται με τη μορφή ακτινογραφίας. Ο αριθμός και η ενέργεια των ακτινών Χ που εκπέμπονται από ένα δείγμα μπορούν να μετρηθούν με ένα φασματόμετρο ενεργειακής διασποράς. Καθώς οι ενέργειες των ακτίνων Χ είναι χαρακτηριστικές της διαφοράς ενέργειας μεταξύ των δύο στοιβάδων και της ατομικής δομής του στοιχείου εκπομπής, το EDS επιτρέπει τη μέτρηση της στοιχειακής σύστασης του δείγματος.

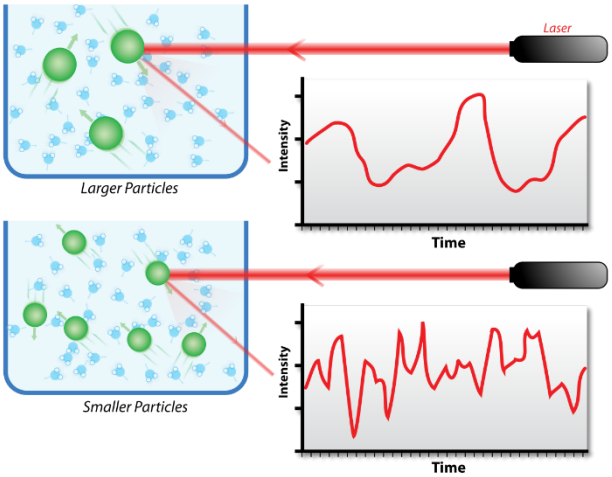
Θερμοσταθμική Ανάλυση

Η θερμοσταθμική ανάλυση είναι μία τεχνική χαρακτηρισμού υλικών αλλά και ποσοτικής ανάλυσης. Βασίζεται στην απώλεια μάζας μίας ουσίας, καθώς η ουσία υποβάλλεται σε σταθερή μεταβολή της θερμοκρασίας. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να προσδιοριστούν, η περιεκτικότητα σε διαλύτη καθώς και η παρουσία πτητικών ειδών. Η μέτρηση πραγματοποιείται συνήθως υπό ροή ατμοσφαιρικού αέρα, αζώτου ή ηλίου. Μέσω αυτής της μεθόδου είναι επιπλέον δυνατή η ταυτοποίηση πολυμερών και ο προσδιορισμός προσμίξεων σε αυτά, ενώ μπορεί να μελετηθεί και η θερμική αποικοδόμηση των πολυμερών καθώς και ο μηχανισμός γήρανσής τους.

Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering)

Η δυναμική σκέδαση φωτός είναι μια μέθοδος, που μπορεί μετρήσει το μέγεθος σωματιδίων σε διασπορά ταχύτατα, απαιτώντας ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος. Η τεχνική αυτή ανιχνεύει τη συχνότητα «τρεμοπαίγματος» ενός μοτίβου, που καταγράφεται στον ανιχνευτή, το οποίο δημιουργείται από τη σκέδαση του φωτός από τα σωματίδια. Η

ενισχυτική και καταστρεπτική συμβολή του φωτός από τη σκέδαση, είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση κορυφών σε αυτό το μοτίβο (Εικόνα 1.4). Η συχνότητα αυτή είναι ανάλογη της κίνησης Brown των σωματιδίων, η οποία με τη σειρά της εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων (όσο μικρότερα τα σωματίδια τόσο μεγαλύτερη είναι η κίνηση Brown) και από το ιξώδες του διαλύτη. Το ιξώδες ενός υγρού σχετίζεται άμεσα με τη θερμοκρασία του, άρα για να μετρηθεί η κινητικότητα των σωματιδίων μέσα σε ένα διάλυμα είναι απαραίτητο οι μετρήσεις να διεξάγονται κάτω από μια γνωστή και σταθερή θερμοκρασία.



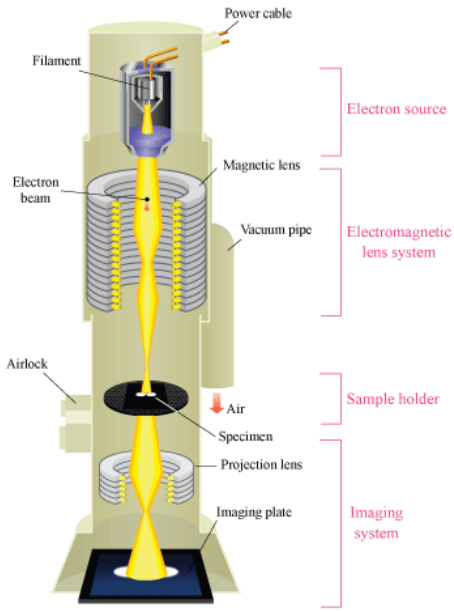
Εικόνα 1.4. Σχηματική αναπαράσταση του DLS

Η ανάλυση της χρονικής εξάρτησης της διακύμανσης του μοτίβου μπορεί να αποδώσει το συντελεστή διάχυσης των σωματιδίων (D), μέσω του οποίου χρησιμοποιώντας την εξίσωση Stokes-Einstein ($D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$)[32], και γνωρίζοντας το ιξώδες του μέσου (η), μπορεί να υπολογιστεί η υδροδυναμική διάμετρος (D_h) των σωματιδίων [όπου k: η σταθερά Boltzmann, T: η απόλυτη θερμοκρασία, και r: η υδροδυναμική ακτίνα του σωματιδίου (R_h = 0.5D_h)] . Η διάμετρος που υπολογίζεται μέσω της τεχνικής DLS ονομάζεται υδροδυναμική διάμετρος και είναι η διάμετρος μιας ιδεατής σφαίρας που έχει τον ίδιο συντελεστή διάχυσης με το σωματίδιο το οποίο δεν είναι απαραίτητα σφαιρικό. Η μέτρηση DLS αποτελεί μια γρήγορη και φτηνή εναλλακτική στη μελέτη με ηλεκτρονιακή μικροσκοπία διέλευσης για τη μελέτη του μεγέθους νανοσωματιδίων LDH. Επίσης, είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στη μελέτη των αποστοιβαγμένων LDH, τα οποία θα αναλυθούν εκτενώς στη συνέχεια.

Ηλεκτρονιακή μικροσκοπία διέλευσης (Transmition Electron Microscopy)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης είναι μια σημαντική τεχνική χαρακτηρισμού μιας και μπορεί να φτάσει σε διακριτική ικανότητα περίπου στα 0.15-0.35nm, εκμεταλλευόμενη την κυματική φύση των ηλεκτρονίων[33]. Κατά την τεχνική αυτή, μια δέσμη ηλεκτρονίων διέρχεται από το δείγμα και η προβολή της δέσμης αυτής αντιστοιχεί στο είδωλο του δείγματος. Η πηγή ηλεκτρονίων αποτελείται από νήμα βολφραμίου, το οποίο

καθώς διατρέχεται από ηλεκτρικό ρεύμα εκπέμπει ηλεκτρόνια. Μεταξύ του νήματος, που αποτελεί την κάθοδο, και της ανόδου, εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού, της τάξης των 60-200kV, η οποία επιταχύνει τα ηλεκτρόνια. Η πορεία και η κλίση των τροχιών των ηλεκτρονίων ρυθμίζεται από ηλεκτρομαγνητικούς φακούς. Όταν η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος που τους διαπερνά μεταβάλλεται, αλλάζει και η ένταση του μαγνητικού πεδίου, και επομένως η δέσμη των ηλεκτρονίων μπορεί να εστιαστεί στο δείγμα. Αφού η δέσμη ηλεκτρονίων διέλθει του δείγματος, στη συνέχεια διέρχεται από μία σειρά φακών με στόχο τη συγκέντρωση της δέσμης στην οθόνη παρατήρησης. Η εικόνα που λαμβάνεται σχηματίζεται πάνω σε οθόνη επικαλυμμένη με φθορίζουσα ουσία. Η οθόνη αυτή διεγείρεται από τα ηλεκτρόνια που πέφτουν επάνω της, αφού πρώτα έχουν διαπεράσει το δείγμα. Στα σημεία εκείνα όπου το δείγμα δεν είναι διαπερατό από τα ηλεκτρόνια δημιουργούνται σκοτεινές περιοχές, ενώ αντίθετα τα διαπερατά σημεία εμφανίζονται ως φωτεινές περιοχές. Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα λήψης εικόνας μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή σε ψηφιακή μορφή με τη χρήση μικροκάμερας. Όπως στην περίθλαση ακτίνων Χ, έτσι και στην ηλεκτρονική μικροσκοπία τα ηλεκτρόνια περιθλώνται από τα κρυσταλλογραφικά επίπεδα του κρυστάλλου έτσι ώστε να ισχύει ο νόμος του Bragg ($2d \sin\Theta = n\lambda$)[34]. Η ηλεκτρονιακή μικροσκοπία διέλευσης χρησιμοποιείται στα LDH κυρίως για την μελέτη της μορφολογίας τους.



Εικόνα 1.5. Σχηματική απεικόνιση ενός συστήματος TEM

1.3.5 Εφαρμογές

Κατάλυση

Τα LDH μετά τη διαδικασία της θέρμανσης στους 500°C εμφανίζουν μεγάλο εμβαδόν επιφάνειας με αλκαλικές ιδιότητες με αποτέλεσμα να βρίσκουν εφαρμογή σαν ετερογενείς καταλύτες. Γενικά έχουν χρησιμοποιηθεί σε διαφόρων ειδών αντιδράσεις, όπως αλδολικές συμπυκνώσεις, υδρογονώσεις, οξειδώσεις και αντιδράσεις πολυμερισμού.

LDH-MgAl, με ανιόντα CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, OH^- και Cl^- έχουν χρησιμοποιηθεί σαν αλκαλικοί καταλύτες στη μετατροπή της 2-μέθυλο-3-βουτύν-2-όλης σε ακετόνη και ακετυλένιο[35,36], ενώ έχουν φωτοκαταλυτική δράση για τη φωτοδιάσπαση χρωστικών[37]. Επίσης, LDH χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την ακινητοποίηση καταλυτών με σκοπό τη μετατροπή τους από ομογενείς σε ετερογενείς[38].

Επεξεργασία νερού

Λύματα περιέχουν συχνά οξυανιόντα όπως F^-, Cl^-, Br^-, PO_4^{3-}, NO_3^-,τα οποία είναι επιβλαβή για τον άνθρωπο. Η δυνατότητα να αφαιρεθούν τα οξυανιόντα αυτά είναι εξαιρετικής σημασίας για την προστασία του περιβάλλοντος[39]. Το LDH είναι ένα νέο πολλά υποσχόμενο υλικό, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην επεξεργασία του νερού, λόγω της ικανότητάς του να συλλάβει επιβλαβή οργανικά και ανόργανα ανιόντα, όπως ανιόντα μολύβδου[40]. Τα πυρωμένα LDH αποτελούν επίσης ένα σημαντικό νέο υλικό, που χρησιμοποιείται στην επεξεργασία του νερού, δεδομένου ότι μπορούν να αντέξουν μικτά μεταλλικά οξείδια και έχουν μία ιδιότητα που ονομάζεται φαινόμενο μνήμης. Τα κύρια πλεονεκτήματα των LDH πάνω από τις ανταλλακτικές ρητίνες, βρίσκονται στην υψηλότερη ικανότητα ανταλλαγής ανιόντων και την καλή θερμική σταθερότητά τους. Επιπλέον, τα LDH μπορούν να αναγεννηθούν πλήρως σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα για επαναχρησιμοποίηση.

Συμπληρώματα μπετού και επιβραδυντικά φλόγας

Οι σκόνες LDH αποτελούν ένα νέο τύπο προσθέτων στο σκυρόδεμα. Πιο συγκεκριμένα, το CaAl-LDH έχει ένα γενικό τύπο παρόμοιο με τη φάση AFm, που συμβαίνει σε ενυδατωμένο τσιμέντο. Αποτελείται από θετικά φορτισμένα στρώματα $[Ca_2Al(OH)]^+$, και αρνητικά φορτισμένα παρεμβαλλόμενα φύλλα $[X{\cdot}nH_2O]^-$. Η φάση AFm γενικά πιστεύεται ότι δρα ως κρυσταλλικός «σπόρος» επιταχύνοντας την στερεοποίηση του τσιμέντου. Τα CaAl-LDH έχουν, ως εκ τούτου, προταθεί ως επιταχυντές σκλήρυνσης στο σκυρόδεμα[41]. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι δείγματα που περιέχουν καθαρό CaAl-LDH, χωρίς μόλυνση από $CaCO^3$, παρουσίασαν μια πολύ βελτιωμένη απόδοση σε σχέση με την αρχική αντοχή σε θλίψη και κάμψη. Οι τιμές αυξήθηκαν κατά 61% και 71%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τα απλά δείγματα σκυροδέματος[42].

Τα LDH σε μορφή σκόνης είναι επίσης υποσχόμενα ως πρόσθετα σε επιβραδυντικά φλόγας[43]. Πολλά επιβραδυντικά θεωρούνται επιβλαβή και έχουν συνδεθεί με τοξικότητα

στο ήπαρ, το θυρεοειδή, προβλήματα στην αναπαραγωγή και νευρολογικές επιπτώσεις. Έτσι μελετούνται επιβραδυντικά φλόγας, χωρίς αλογόνο σαν εναλλακτικές λύσεις. Σε σύγκριση με άλλα επιβραδυντικά φλόγας, τα LDH είναι μία υποσχόμενη εναλλακτική λόγω της υψηλής καταστολής του καπνού και τη χαμηλή τοξικότητα. Τα LDH αυτή τη στιγμή διερευνώνται ως δεύτερης γενιάς επιβραδυντικά φλόγας με βελτιωμένες ιδιότητες, είτε με τροποποίηση των στρωμάτων ή με παρεμβολή διαφορετικών ανιόντων[44].

Βιοϊατρική

Τα τελευταία χρόνια εκτός από την ανάπτυξη καταλυτών τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια άρχισαν να βρίσκουν εφαρμογή στη βιολογία και τη βιοϊατρική. Σημαντικό βήμα προς αυτήν την κατεύθυνση ήταν η εισαγωγή DNA σε LDH[45]. Τα νουκλεϊκά οξέα και το DNA διαθέτουν αρνητικό φορτίο και έτσι μπορούν να εισαχθούν σε LDH με ιονταναλλαγή ή συνκαταβύθιση[46]. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός πως τα υβρίδια LDH-DNA μπορούν να εισχωρήσουν σε ευκαρυωτικά κύτταρα και να απελευθερώσουν το DNA, δρώντας έτσι ως γονιδιακοί φορείς.

Η απελευθέρωση γίνεται είτε στα λυσοσώματα όπου το όξινο περιβάλλον διασπά τη δομή του πηλού, είτε λόγω ιονταναλλαγής από ανιόντα του κυτταροπλάσματος. Συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι ένα υβρίδιο LDH με το κατάλληλο ολιγονουκλεοτίδιο μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, ενώ το σκέτο LDH δεν προκαλεί αναστολή[47]. Επίσης το ολιγονουκλεοτίδιο μόνο του δεν έχει επαρκή δράση, καθώς δεν εισέρχεται μέσα στα κύτταρα. Η αυξημένη δράση του υβριδίου οφείλεται στην εξουδετέρωση του θετικού φορτίου των στρωμάτων του LDH με το αρνητικό φορτίο των ολιγονουκλεοτιδίων, γεγονός που διευκολύνει την διείσδυσή του στο κύτταρο μέσω ενδοκύττωσης. Αυτό συμβαίνει καθώς μειώνονται οι ηλεκτροστατικές απωστικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις αρνητικά φορτισμένες μεμβράνες του κυττάρου και τα αρνητικά φορτισμένα ολιγονουκλεοτίδια. Το γεγονός ότι τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια μπορούν να απελευθερώσουν το ανιόν που φέρουν στο εσωτερικό τους μέσα σε κύτταρα τα καθιστά ελκυστικά υλικά για εφαρμογές μεταφοράς και ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμάκων. Μελέτες τέτοιων εφαρμογών έχουν γίνει και για πληθώρα φαρμάκων, όπως το αντιφλεγμονώδες φάρμακο ibuprofen[48] καθώς και αντικαρκινικά φάρμακα όπως η methotraxate[49]. Τελικά, υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για τις πορφυρίνες[50-53] αφού πολλές από αυτές συμμετέχουν σε αρκετές βιολογικές διεργασίες και έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν στην καταπολέμηση του καρκίνου μέσω της φωτοδυναμικής θεραπείας (πρωτοπορφυρίνη IX), ενώ παράλληλα πολλές

μεταλλοπορφυρίνες αποτελούν προσθετικές ομάδες πρωτεϊνών με εξέχουσα βιολογική σημασία (αιμίνη).

1.4 Αποστοιβαγμένα διπλά υδροξείδια

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για τα LDH στον τομέα της βιοχημείας έχει αυξηθεί πολύ περισσότερο, με την εξέλιξη των αποστοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων (dLDH). Αν και τα dLDH φτιάχτηκαν αρκετά χρόνια πριν[54,55], μόνο πρόσφατα τράβηξαν το ενδιαφέρων των ερευνητών, με τις πρώτες εφαρμογές τους σαν φορείς γενετικού υλικού[56-58]. Το μεγαλύτερο πρόβλημα στη χρήση των LDH σαν συστήματα μεταφοράς για ουσίες μεγαλύτερες από φάρμακα, είναι η σχετικά μικρή τους χωρητικότητα, σε σύγκριση με άλλους φορείς. Αυτή η αδυναμία μπορεί να ξεπεραστεί με την χρήση των dLDH, δηλαδή LDH των οποίων οι στοιβάδες έχουν μεμονωθεί. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί κανείς να εκμεταλλευτεί καλύτερα τις ενδιάμεσες στοιβάδες του LDH, ενώ το ίδιο δεν χάνει την ικανότητά του να προσροφά αρνητικά φορτισμένα σωματίδια. Έτσι έχουν εισαχθεί τμήματα DNA σε LDH [56] και στη συνέχεια μεταφέρει το γενετικό υλικό μέσα σε κύτταρα με επιτυχία. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις περιπτώσεις dLDH η εισαγωγή του έχει αναφερθεί ότι δεν γίνεται με ενδοκύττωση, αλλά μπορούν να διαπεράσουν ελεύθερα την πλασματική μεμβράνη[56,59] επιτρέποντας τον σχεδιασμό νέων συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων βασισμένων στα LDH.

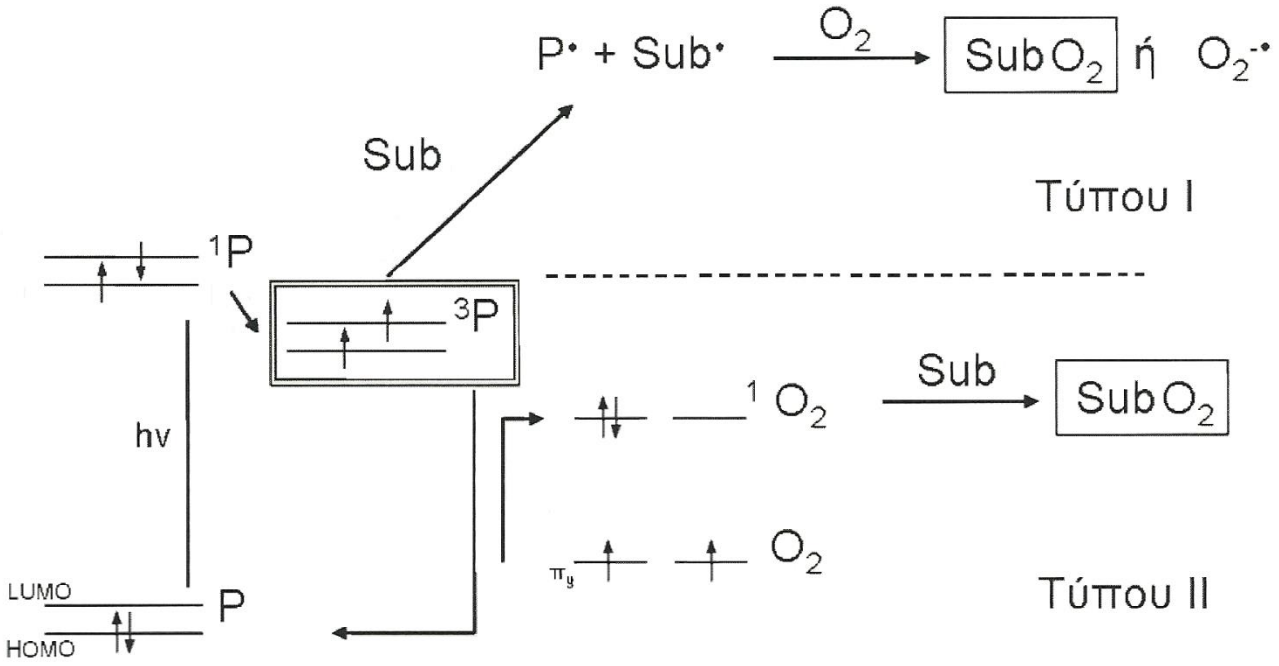
Η αποστοίβαξη των LDH είναι μια φτηνή και πολύ γρήγορη διαδικασία, αφού μπορεί να γίνει από απλό stock LDH μέσα σε 30 λεπτά. Μέχρι στιγμής η αποστοίβαξη LDH έχει γίνει με επιτυχία σε βουτανόλη, ακρυλικά, τετραχλωράνθρακα και τολουένιο, N,N-διμέθιλοφορμαμίδιο σε μίγμα με αιθανόλη, νερό, και φορμαμίδιο[60]. Από αυτές τις τεχνικές το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αποστοίβαξη σε νερό, αφού φτιάχνει ένα πιο βιοσυμβατό μίγμα dLDH. Από τις τεχνικές αποστοίβαξης LDH σε νερό, αυτές που έχουν τη μεγαλύτερη απόδοση αλλά και δίνουν ένα dLDH που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια σε ανιονταναλλαγή, είναι η αποστοίβαξη με λακτικό[55] και ακετικό[61]. Και στις δύο περιπτώσεις, η αποστοίβαξη συμβαίνει με την εισαγωγή ενός πολικού διαλύτη που θα κάνει το εσωτερικό περιβάλλον ανάμεσα στις στοιβάδες πιο «φιλικό» στην εισαγωγή περισσότερου διαλύτη, έως ότου οι στοιβάδες να χωρίσουν. Αυτές οι δύο μέθοδοι, καθώς και η αποστοίβαξη σε φορμαμίδιο, επιλέχθηκαν για χρήση στην παρούσα εργασία, λόγο της απλότητάς τους σαν διαδικασίες, αλλά και κυρίως λόγο του ότι αποδεδειγμένα οδηγούν σε dLDH αρκετά σταθερού για να χρησιμοποιηθεί σε περαιτέρω αντιδράσεις χωρίς να επαναστοιβαχτεί.

1.5 Φωτοδυναμική θεραπεία

Με τον όρο φωτοδυναμική θεραπεία, αναφερόμαστε σε ένα τύπο θεραπείας η οποία επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός φαρμάκου, που ονομάζεται φωτοευαισθητοποιητής ή παράγοντας φωτοευαισθητοποίησης, και ενός συγκεκριμένου τύπου φωτός. Όταν οι φωτοευαισθητοποιητές εκτίθενται σε συγκεκριμένο μήκος κύματος φωτός, παράγουν ρίζες οξυγόνου, οι οποίες είναι πολύ δραστικές και μπορούν να προκαλέσουν την οξειδωτική καταστροφή των πρωτεϊνών ενός κυττάρου[62 63]. Αυτό το μήκος κύματος καθορίζει πόσο μακριά το φως μπορεί να ταξιδέψει μέσα στο σώμα. Έτσι, οι γιατροί χρησιμοποιούν συγκεκριμένους φωτοευαισθητοποιητές και φως κατάλληλου μήκους κύματος για τη θεραπεία διαφόρων περιοχών του σώματος με PDT.

Στο πρώτο στάδιο της φωτοδυναμικής θεραπείας, για τη θεραπεία του καρκίνου, ένας παράγοντας φωτοευαισθητοποίησης εγχύεται στην κυκλοφορία του αίματος. Ο παράγοντας απορροφάται από τα κύτταρα σε όλο το σώμα, αλλά παραμένει σε καρκινικά κύτταρα περισσότερο από ό,τι στα φυσιολογικά κύτταρα. Περίπου 24 έως 72 ώρες μετά την ένεση[62], όταν το μεγαλύτερο μέρος του παράγοντα έχει αφήσει τα φυσιολογικά κύτταρα, αλλά παραμένει σε καρκινικά κύτταρα, ο όγκος εκτίθεται στο φως[64]. Ο φωτοευαισθητοποιητής στον όγκο απορροφά το φως και παράγει μια ενεργή μορφή του οξυγόνου που καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα σε κοντινή απόσταση[65].

Υπάρχουν δύο βασικοί μηχανισμοί παραγωγής των ενεργών μορφών οξυγόνου, οι μηχανισμοί τύπου I και II οι οποίοι παρουσιάζονται στην εικόνα 1.6. Και στους δύο μηχανισμούς η εκκίνηση γίνεται 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 σε 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 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 της απλής κατάστασης το οποίο δρα ως ισχυρό οξειδωτικό και οξειδώνει τα βιομόρια του κυττάρου με αποτέλεσμα τη θανάτωση του κυττάρου.



Εικόνα 1.6. Μηχανισμοί οξείδωσης τύπου I και II.

Εκτός από την απευθείας θανάτωση καρκινικών κυττάρων, η φωτοδυναμική θεραπεία εμφανίζεται να συρρικνώνει ή να καταστρέφει τους όγκους με δύο άλλους τρόπους. Ο φωτοευαισθητοποιητής μπορεί να βλάψει τα αιμοφόρα αγγεία στον όγκο, εμποδίζοντας έτσι τον καρκίνο από τη λήψη απαραίτητων θρεπτικών συστατικών. Η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει το ανοσοποιητικό σύστημα να επιτεθεί στα κύτταρα του όγκου.

Το φως που χρησιμοποιείται στη φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί να προέλθει από λέιζερ ή άλλες πηγές φωτός, ανάλογα με το πόσο χρειάζεται να διεισδύσει στον οργανισμό. Φως από λέιζερ μπορεί, ακόμα, να κατευθυνθεί μέσω καλωδίων οπτικών ινών μεταφέροντας φως στο εσωτερικό του οργανισμού. Για παράδειγμα, ένα καλώδιο οπτικών ινών μπορεί να εισαχθεί μέσω ενός ενδοσκοπίου μέσα στους πνεύμονες ή τον οισοφάγο για τη θεραπεία του καρκίνου σε αυτά τα όργανα. Άλλες πηγές φωτός περιλαμβάνουν διόδους εκπομπής φωτός, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για επιφανειακούς όγκους, όπως ο καρκίνος του δέρματος.

Ένα από τα μεγαλύτερα θετικά της φωτοδυναμικής θεραπείας είναι ότι εφαρμόζεται σαν εξωνοσοκομειακή διαδικασία[66], ενώ μπορεί να επαναληφθεί και να συνδυαστεί με άλλες θεραπείες, όπως χειρουργική επέμβαση, ακτινοβολία ή χημειοθεραπεία.

Μία νέα μέθοδος φωτοδυναμικής θεραπείας που μελετάται, είναι αυτή της εξωσωματικής φωτοφόρησης, στην οποία χρησιμοποιείται ένα μηχάνημα για τη συλλογή κυττάρων του αίματος του ασθενούς, τη θεραπεία τους έξω από το σώμα με ένα

παράγοντα φωτοευαισθητοποίησης και έκθεση στο φως, και στη συνέχεια επιστροφή στον ασθενή. Ο FDA έχει εγκρίνει την εξωσωματική φωτοφόρηση, για να βοηθήσει να ελαττωθεί η σοβαρότητα των συμπτωμάτων του δέρματος του δερματικού λεμφώματος Τ-κυττάρων, που δεν έχει ανταποκριθεί σε άλλες θεραπείες.

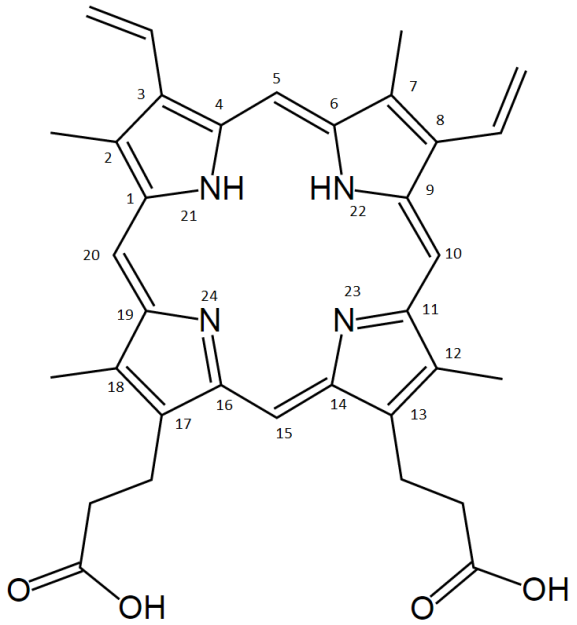
Μέχρι σήμερα, έχουν εγκριθεί παράγοντες φωτοευαισθητοποίησης, όπως το Photofrin για τη θεραπεία ή την ανακούφιση των συμπτωμάτων του καρκίνου του οισοφάγου και μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Παρ' όλα αυτά, οι φωτοευαισθητοποιητές που χρησιμοποιούνται μέχρι στιγμής εμφανίζουν σημαντικά μειονεκτήματα, όπως έλλειψη εκλεκτικότητας και αργής απομάκρυνσης από τον οργανισμό, με αποτέλεσμα να υπάρχει μακροχρόνια φωτοευαισθητοποίηση και σε υγιής ιστούς.

Μία κατηγορία ουσιών οι οποίες δεν έχουν τα παραπάνω μειονεκτήματα, αποτελούν οι πορφυρίνες. Έτσι, έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες και έχουν παρασκευαστεί πληθώρα πορφυρινικών συστημάτων, με διαφορετικούς υποκαταστάτες το καθένα και με διαφορετικά κεντρικά μεταλλικά ιόντα, τα οποία μπορούν να βρουν διάφορες φωτοχημικές εφαρμογές και κατ' επέκταση μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στη φωτοδυναμική θεραπεία[67,68]. Οι περισσότερες από αυτές είναι παράγωγα της πρωτοπορφυρίνης IX, καθώς η τοπική φωτοδυναμικά θεραπεία προωθεί την ενδογενή μετατροπή του 5-αμινολεβουλινικού οξέος σε πρωτοπορφυρίνη IX.

1.6 Πρωτοπορφυρίνη IX

Οι πρωτοπορφυρίνες είναι τετραπυρρολικά συστήματα που περιέχουν τις ακόλουθες πλευρικές αλυσίδες: τέσσερις μεθυλικές, δύο προπιονικού οξέος και δύο βινυλικές. Οι ομάδες αυτές μπορούν να τοποθετηθούν με δεκαπέντε διαφορετικούς τρόπους.

Η πρωτοπορφυρίνη IX είναι το μόνο ισομερές που υπάρχει σε βιολογικά συστήματα και χρησιμοποιείται ευρέως ως φορέας για δισθενή κατιόντα. Μαζί με σίδηρο (Fe^{2+}) σχηματίζει το σκελετό της ομάδας της αίμης, της αιμοσφαιρίνης, μυοσφαιρίνης και πολλών άλλων ενζύμων που περιέχουν αίμη, όπως το κυτόχρωμα c και η καταλάση. Με συναρμοσμένα ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}) σχηματίζεται το κύριο μέρος των χλωροφυλλών. Συμπλοκοποιημένη με ιόντα ψευδαργύρου (Zn^{2+}) σχηματίζει πρωτοπορφυρίνες ψευδαργύρου. Ο αριθμός (π.χ. IX) υποδεικνύει τη θέση των διαφόρων πλευρικών αλυσίδων στο κάθε ισομερές πορφυρίνης.



Εικόνα 1.7. Δομή της πρωτοπορφυρίνης IX.

Οι πορφυρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φωτοευαισθητοποιητές[69,70], καθώς λόγω της εκτεταμένης συζυγίας που διαθέτουν μπορούν να διεγερθούν πολύ εύκολα σε μία διεγερμένη κατάσταση χαμηλής ενέργειας και στην συνέχεια να προκαλέσουν την διέγερση του οξυγόνου. Κύριο εκφραστή αυτής της τάσης των πορφυρινών αποτελεί η πρωτοπορφυρίνη IX, η οποία μπορεί να εισαχθεί με δύο τρόπους εντός του κυττάρου. Αρχικά μπορεί να σχηματιστεί από το 5-αμινολεβουλινικό οξύ, μέσα στον οργανισμό, το οποίο μπορεί να χορηγηθεί στο οργανισμό, καθώς αποτελεί πρόδρομο της πρωτοπορφυρίνης IX, ή εναλλακτικά μπορεί να χορηγηθεί απευθείας στο κύτταρο. Κάθε ένας από τους δύο τρόπους έχει ως αποτέλεσμα να εισάγεται η πορφυρίνη στο κύτταρο και να προκαλείται η θανάτωση αυτού μέσα από την διαδικασία της φωτοδυναμικής θεραπείας. Με την ικανότητα του LDH να εισάγεται στο κύτταρο και να αποσυντίθεται μέσα σε αυτό εξαιτίας της χαμηλής τιμής του pH εντός αυτού, η εισαγωγή της πρωτοπορφυρίνης IX μπορεί να γίνει με μεγαλύτερη επιτυχία, ενώ θα είναι απευθείας δραστική. Έτσι μπορεί να γίνει η σύνθεση ενός υβριδίου το οποίο, αρχικά θα μπορούσε να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και αφού ελευθερώσει εντός του κυττάρου την πρωτοπορφυρίνη IX, να της επιτρέψει να δράσει φωτοδυναμικά.

1.7 Γονιδιακή θεραπεία

Γονιδιακή θεραπεία ονομάζεται ένας νέος τύπος θεραπείας ασθενειών, ο οποίος βασίζεται στην καταπολέμηση όχι των συμπτωμάτων, αλλά των υποκείμενων αιτιών

αυτών. Η θεραπεία βασίζεται σε τεχνολογίες, οι οποίες επιτρέπουν στον άνθρωπο να επέμβει στο γονιδίομα διαφόρων οργανισμών και να διορθώσει ασθένειες οι οποίες μπορεί να προέρχονται από μεταλλάξεις ή ελαττωματικά γονίδια. Η πιο συχνή τεχνική που χρησιμοποιείται στη γονιδιακή θεραπεία, περιλαμβάνει την εισαγωγή γονιδίου σε μία μη συγκεκριμένη θέση[71,72]. Με τη γονιδιακή θεραπεία μπορεί να γίνει και αντικατάσταση ελαττωματικών γονιδίων με υγιή βασιζόμενοι στον ομόλογο ανασυνδυασμό. Τέλος, υπάρχουν αρκετές τεχνικές, οι οποίες επιτρέπουν αντίστροφες μεταλλάξεις, κατά τις οποίες ένα αφύσικο γονίδιο μπορεί να μετατραπεί στην κανονική, λειτουργική μορφή του[73].

Η πρώτη εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας έγινε 27 χρόνια πριν, κάτω από την καθοδήγηση του William Anderson. Στην προσπάθεια αυτή κύτταρα του μυελού των οστών διορθώθηκαν γενετικά χρησιμοποιώντας ένα ρετροϊικό φορέα σε ένα παιδί που έπασχε από ανεπάρκεια δεαμινάσης αδενοσίνης, μία σπάνια μορφή ανοσοεπάρκειας[74]. Αυτή ήταν η πρώτη προσπάθεια να χρησιμοποιηθούν γενετικά τροποποιημένα βλαστοκύτταρα για την θεραπεία ανθρώπινης ασθένειας. Η δημοσίευση αυτής της μελέτης, καθώς και μίας παράλληλης, όπου χρησιμοποιήθηκαν Τ λεμφοκύτταρα του αίματος για να θεραπευθεί η ίδια ασθένεια[75], σηματοδότησε την έναρξη της γονιδιακής θεραπείας.

Μετά από 20 χρόνια έρευνας, τεχνολογικών βελτιώσεων και κλινικών δοκιμών για τη απόδειξη της αποτελεσματικότητα και της ασφάλεια αυτής της θεραπείας, η γονιδιακή θεραπεία αποκτά σιγά σιγά πρόσβαση στην αγορά[76-79]. Κατά την ίδια περίοδο, ex vivo καθώς και in vivo μορφές γονιδιακής θεραπείας για γενετικές ασθένειες έχουν αναπτυχθεί και δοκιμαστεί βρίσκοντας μεγάλο εύρος επιτυχιών και αποτυχιών, καθώς και ανεπιθύμητων ενεργειών, που αποκάλυψαν τους κινδύνους της ενσωμάτωσης ιικών στοιχείων στο ανθρώπινο γονιδίωμα[80]. Πιο πρόσφατα, μια σειρά κλινικών μελετών έδειξε ότι η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να αλλάξει την πορεία πολλών γενετικών ασθενειών, όπως ανοσοανεπάρκειες, προβλήματα αμφιβληστροειδούς, διαταραχές αποθήκευσης λυσσοσωμάτων, αιμοσφαιρινοπάθειες ή αιμοφιλία[81]. Με την ανακοίνωση άδειας κυκλοφορίας της πρώτης γονιδιακής θεραπείας (Strimvelis), πολλές από αυτές τις θεραπείες θα έχουν πρόσβαση αγορά στα επόμενα 2-5 χρόνια, συμβάλλοντας στην οριστικοποίηση της γονιδιακής θεραπείας στην κλινική ιατρική.

Η διαδικασία της γονιδιακής θεραπείας περιλαμβάνει τη χρήση ενός μορίου μήτρας που δρα ως μεταφορέας για το "κανονικό" γονίδιο που πρόκειται να αντικαταστήσει τα γονίδια στα κύτταρα-στόχους. Οι ιοί συνήθως χρησιμοποιούνται ως φορείς, καθώς από φύσης τους μεταφέρουν παθογόνα γονίδια στο εσωτερικό κυττάρων. Στη γονιδιακή θεραπεία, ιοί-φορείς τροποποιούνται γενετικά για να μεταφέρουν ανθρώπινο DNA[82].

Κοινοί ιοί που χρησιμοποιούνται ως φορείς γονιδιακής θεραπείας περιλαμβάνουν ρετροϊούς, αδενοϊούς, αδενο-συσχετιζόμενους ιούς και ιούς απλού έρπητα[83].

Σαν φορείς μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μη-ιικά συστήματα, αν και αυτές οι τεχνικές βρίσκονται σε νεότερο στάδιο εξέλιξης. Μία μέθοδος είναι η έγχυση του υγιούς γονιδίου απευθείας στα επιθυμητά κύτταρα[84]. Ένα μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σε ορισμένους ιστούς, ενώ η ποσότητα του απαιτούμενου DNA είναι πολύ μεγάλη. Μια άλλη προσέγγιση απαιτεί τη δημιουργία ενός λιποσώματος το οποίο μεταφέρει το θεραπευτικό DNA στον υδάτινο πυρήνα του[85]. Το πλεονέκτημά αυτής της μεθόδου είναι ότι μπορεί να περάσει τα υγιή γονίδια διαμέσω των μεμβρανών των κυττάρων στόχων. Μια ακόμα εναλλακτική λύση, αν και λιγότερο αποτελεσματική, είναι η χημική σύνδεση του DNA με ένα μόριο που δεσμεύεται στους υποδοχείς των κυττάρων και από εκεί το DNA μεταφέρεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου-στόχου[86]. Μια πολύ συναρπαστική τεχνική περιλαμβάνει την εισαγωγή ενός 47ου χρωμοσώματος στα κύτταρα[87]. Αυτό το αυτόνομο χρωμόσωμα μπορεί να λειτουργήσει ως φορέας μιας μεγάλης ποσότητας γενετικών δεδομένων, ωστόσο είναι δύσκολο να παραδοθεί το μεγάλο χρωμόσωμα στον πυρήνα των κυττάρων άθικτο.

Πέρα από το σύστημα φορέα-γονιδίου, για την επιτυχία της γονιδιακής θεραπείας έχει μεγάλη σημασία ο τρόπος μεταφοράς του συστήματος. Οι τεχνικές μεταφοράς χωρίζονται σε in vivo και ex vivo. Στις in vivo τεχνικές, χρησιμοποιείται κυρίως η ικανότητα του κυττάρου να απορροφά το DNA. Στις μεθόδους ex vivo, το υγιές γονίδιο προστίθεται στο κύτταρο έξω από το σώμα. Περιλαμβάνει την αφαίρεση των κυττάρων, την ανάπτυξη των διαγονιδιακών κυττάρων, την ανάλυση των κυττάρων και τέλος την προσθήκη τους στο σώμα. Η εξωσωματική θεραπεία χρειάζεται περισσότερη εργαστηριακή εργασία και έτσι παραμένει χρήσιμη μόνο σε εξατομικευμένες περιπτώσεις.

Παρ ’όλα τα θετικά που μπορεί να προσφέρει μια θεραπεία που επεμβαίνει στο γονιδίομα, υπάρχουν πολλοί παράγοντες που έχουν επιβραδύνει την πρόοδο της γονιδιακής θεραπείας[88]. Αρχικά, υπάρχει ανάγκη για συνεχείς θεραπείες εξαιτίας της μικρής διάρκειας ζωής των θεραπευτικών αποτελεσμάτων μίας μόνο θεραπευτικής χορήγησης. Επίσης, τα μακροπρόθεσμα οφέλη είναι δύσκολο να επιτευχθούν, καθώς δεν είναι εύκολο να ενσωματωθεί το υγιές DNA σε όλα τα κύτταρα, ενώ δεν μπορεί να εξασφαλιστεί η μακροζωία και η σταθερότητα των κυττάρων που θα εισαχθεί. Ακόμα, η θεραπεία διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα και η ανταπόκρισή του καθιστά τη θεραπεία λιγότερο αποτελεσματική. Ταυτόχρονα, η χρήση αντιβιοτικών για την καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να αφήσει τον ασθενή ευάλωτο σε ασθένειες. Τέλος, αν και οι ιοί χρησιμεύουν ως οι συνηθέστεροι φορείς, μπορούν να γίνουν τοξικοί κάποιες

φορές μέσα στο σώμα και η φλεγμονώδης αντίδραση του σώματος να επηρεάσει τη διαδικασία.

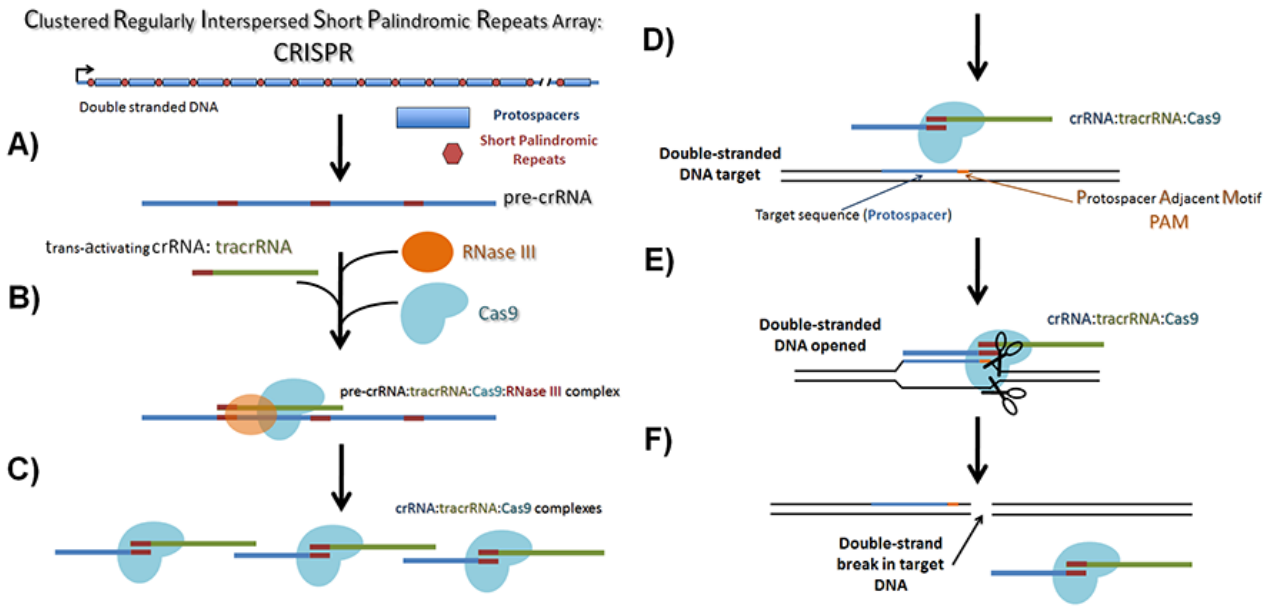
Βέβαια θα ήταν λάθος να λεχθεί ότι δεν έχουν γίνει πολύ μεγάλα επιτεύγματα στον τομέα της γονιδιακής θεραπείας. Οι πρόοδοι στη γονιδιακή θεραπεία, τα τελευταία χρόνια περιλαμβάνουν τη δυνατότητα να διορθώνονται ανωμαλίες στο αγγελιοφόρο RNA που λαμβάνεται από ελαττωματικά γονίδια[89]. Αυτό έχει εφαρμογή στην θεραπεία της κυστικής ίνωσης και της θαλασσαιμίας. Ταυτόχρονα, πλέον είναι δυνατόν να δημιουργηθούν πολύ μικρά λιποσώματα, διαμέτρου μόνο 25 νανόμετρα, που μπορούν να λειτουργήσουν ως φορείς θεραπευτικού DNA. Τα λιποσώματα επικαλυμμένα με πολυαιθυλενογλυκόλη έχουν χρησιμοποιηθεί για να μεταφέρουν γονίδια στον εγκέφαλο[90], κάτι που αποτελεί μεγάλο επίτευγμα, αφού ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός δεν επιτρέπει τη διέλευση των ιικών φορέων. Σε άλλες ερευνητικές προσπάθειες, η γονιδιακή θεραπεία έχει χρησιμοποιηθεί για την επιτυχή αντιμετώπιση της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας σε ποντίκια[91] και ανθρώπους[92]. Ακόμα, μια συναρπαστική νέα δυνατότητα έχει αναπτυχθεί με την επιτυχή εκτέλεση των τεχνικών γονιδιακής σίγασης που μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων τρόπων αντιμετώπισης του Huntington's[93]. Τέλος, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες, με αρκετές να βρίσκουν επιτυχία, αντιμετώπισης του μεταστατικού καρκίνου χρησιμοποιώντας γονιδιακή θεραπεία[94], όπου το microRNA χρησιμοποιήθηκε για να βοηθήσει στην απόκρυψη της ταυτότητας του υγιούς DNA για να αποτρέψει την ανίχνευση και καταστροφή του από το ανοσοποιητικό σύστημα.

Μέθοδος CRISPR

Στη γονιδιακή θεραπεία μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις είναι η στόχευση συγκεκριμένου τμήματος DNA, καθώς και η εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου χωρίς παρενέργειες. Στην προσπάθεια να επιτευχθεί ο στόχος αυτός, δημιουργήθηκαν πολλά συστήματα επεξεργασίας του γονιδιόματος, όπως είναι τα zinc finger proteins (ZNFs)[95] και οι Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)[96]. Τα τελευταία δέκα χρόνια εμφανίστηκε μια νέα μέθοδος γονιδιακής τροποποίησης, η οποία έχει τραβήξει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών λόγο των πολλών πλεονεκτημάτων που διαθέτει σε σύγκριση με τις προηγούμενες. Η νέα αυτή τεχνολογία ονομάζεται Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) και ξεκίνησε με την ανίχνευση μικρών παλινδρομικών τμημάτων DNA με άγνωστη λειτουργία στο γονιδίομα της Escherichia coli[97]. Σήμερα γνωρίζουμε ότι οι περιοχές CRISPR χαρακτηρίζονται από σειρά επαναλήψεων 20-50 βάσεων, ανάμεσα στις οποίες παρεμβάλλονται μοναδικές

αλληλουχίες DNA παρομοίου μήκους (spacer). Οι περιοχές αυτές προέρχονται από την ένθεση ξένων γενετικών στοιχείων συνήθως ιών και χρησιμοποιούνται για την άμυνα του οργανισμού[98].

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο σύστημα CRISPR του Escherichia coli έδειξαν ότι οι CRISPR αλληλουχίες μεταγράφονται σε μικρά crRNAS τα οποία περιλαμβάνουν τις παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες spacers που θα καθοδηγήσουν τη δράση της Cas νουκλεάσης[99]. Το επόμενο στοιχείο που έμενε να προσδιοριστεί ήταν ο ρόλος ενός μοτίβου που ακολουθούσε πάντα την ακολουθία στόχο στο γονιδίομα του ιού αλλά όχι του βακτηρίου. Η ύπαρξη αυτού του μοτίβου, που ονομάστηκε PAM (Protospacer Adjacent motif), φάνηκε πως εξασφάλιζε την δράση της Cas νουκλεάσης αποκλειστικά στο ξένο DNA και όχι στο βακτηριακό[100].



Εικόνα 1.8. Μηχανισμός λειτουργίας Crispr με τη χρήση της νουκλεάσης Cas9.

Έχοντας κατανοήσει πια σε μεγάλο βαθμό τις αρχές του μηχανισμού των CRISPR, οι επιστήμονες στράφηκαν στην προσπάθεια να τον αξιοποιήσουν. Έτσι με την κατασκευή ενός τεχνητού single guide RNA (sgRNA) που συνδυάζει και προσομοιάζει τις ιδιότητες των φυσικών crRNA και tracrRNA κατάφερε να γίνει η στοχευμένη θραυσματοποίηση του δίκλωνου DNA με πολύ μεγάλη δυνατότητα στόχευσης[101]. Τα συγκεκριμένα αυτά σπασίματα στη συνέχεια θα επιδιορθώνονταν από τους κυτταρικούς μηχανισμούς μέσω δύο πιθανών μονοπατιών, είτε της επιδιόρθωσης με μη ομόλογη σύνδεση άκρων, είτε επιδιόρθωση μέσω ομολογίας. Έτσι δημιουργήθηκε μία τεχνική γονιδιακής τροποποίησης με πολλά πλεονεκτήματα, όπως πολύ χαμηλό κόστος, άριστη επιλεκτικότητα και γρήγορα αποτελέσματα. Το κύριο πλεονέκτημα που μας ενδιαφέρει στους στόχους αυτής της

εργασίας είναι το σχετικά μικρό μέγεθός αλληλουχίας νουκλεοτιδίων που απαιτείται (κάτω από 100 ζεύγη βάσεων), αφού επιτρέπει την εισαγωγή των LDH στη γονιδιακή θεραπεία.

1.8 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παρασκευή και μελέτη νανοβιοϋβριδίων LDH με παγιδευμένες ουσίες που έχουν βιολογική σημασία. Στο πλαίσιο αυτό αρχικά έγιναν μερικές δοκιμές παγίδευσης αμινοξέων, καθώς και του αντιβιοτικού φαρμάκου νιτροφουραντοΐνη. Επιπλέον, σκοπός ήταν η μελέτη του LDH να δράσει σαν φορέας σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, καθώς και η απόδειξη ότι η παγίδευση ενός φωτοευαισθητοποιητή στο εσωτερικό του, οδηγεί στην παρασκευή ενός υβριδίου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη φωτοδυναμική θεραπεία.

Ταυτόχρονα, με τις επιτυχείς δοκιμές του LDH να μεταφέρει φάρμακα μέσα σε καρκινικά κύτταρα, δημιουργήθηκε και η σκέψη ότι πέρα από φάρμακα θα μπορούσαν να μεταφερθούν και ολόκληρα τμήματα DNA. Τελικός σκοπός της εργασίας λοιπόν ήταν η δημιουργία ενός υβριδίου LDH-DNA, καθώς και η μελέτη της πιθανότητας του LDH να δράσει σαν φορέας του συστήματος Crispr. Για την εκπλήρωση αυτού του σκοπού, μελετήθηκαν και τα αποστοιβαγμένα LDH, ως πολύ καλύτεροι μεταφορείς γενετικού υλικού, με μεγαλύτερη χωρητικότητα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιριών Aldrich, Sigma και Fluka, ποιότητας analytical grade. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε στις συνθέσεις ήταν nanopure και είχε απαερωθεί για 20min με διοχέτευση αερίου N_2.

2.1 Σύνθεση στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων

Για τη σύνθεση του LDH ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του Miyata[102]. Το πρωτόκολλο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή LDH Mg-Al 3:1 και LDH Mg-Al 2:1. Η διαδικασία, για την παρασκευή LDH Mg-Al 3:1, έχει ως εξής: σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 250ml προσαρμόζονται δύο προσθετικές φιάλες που επιτρέπουν τη στάγδην προσθήκη του περιεχομένου τους. Στη συνέχεια τοποθετείται πεχάμετρο, μαγνητικός αναδευτήρας και 50ml νερό. Από τις δύο προσθετικές φιάλες στη μία προστίθεται διάλυμα 50ml 0,675M $Mg(NO_3)$ και 0,225M $Al(NO_3)$, ενώ στη δεύτερη διάλυμα 50ml 2M NaOH. Στη συνέχεια ξεκινά η στάγδην ταυτόχρονη προσθήκη των δύο διαλυμάτων με τέτοιο ρυθμό, έτσι ώστε το διάλυμα στο εσωτερικό της τρίλαιμης να έχει pH σταθερό στο 10 ± 0.5. Καθώς τα δύο διαλύματα αναμειγνύονται σχηματίζεται λευκό ίζημα. Πρέπει να σημειωθεί, ότι κατά τη διάρκεια του πειράματος το σύστημα παραμένει σφραγισμένο, ενώ στην τρίλαιμη φιάλη γίνεται συνεχής διοχέτευση N_2. Μετά το τέλος της προσθήκης το διάλυμα θερμαίνεται για 24 ώρες σε θερμοκρασία 120°C, ώστε να προκύψει κρυσταλλική δομή με μικρό μέγεθος[103]. Αφού περάσουν οι 24 ώρες, το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει και στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε πεδίο 10000 x g για 10min, ακολουθούν δύο εκπλύσεις με απαερωμένο, nanopure H_2O και τελικά το νιτρικό LDH επαναιωρείται και φυλάσσεται, σφραγισμένο με parafilm, σε θερμοκρασία δωματίου. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την παρασκευή LDH Mg-Al 2:1, με μόνη διαφορά την αλλαγή των συγκεντρώσεων σε 0,600M $Mg(NO_3)$ και 0,300M $Al(NO_3)$

Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση του αιωρήματος LDH- νιτρικού, λαμβάνονται σε eppendorf 5 δείγματα του 1ml, φυγοκεντρούνται και αφήνονται να στεγνώσουν. Στη συνέχεια ζυγίζεται η ποσότητα νιτρικού LDH και υπολογίζεται η συγκέντρωση, η οποία για τις συνθέσεις που διεκπεραιώθηκαν κυμάνθηκε μεταξύ 48-56mg/ml.

2.2 Σύνθεση υβριδίων LDH

Για τη σύνθεση των υβριδίων LDH, όπου η επιθυμητή ουσία βρίσκεται παγιδευμένη ανάμεσα στις στιβάδες, χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι ανταλλαγής ιόντων, συνκαταβυθίσεως, επανενυδάτωσης του LDH και επαναστοίβαξης. Οι διαδικασίες παρουσιάζονται αναλυτικά στη συνέχεια:

2.2.1 Συνθέσεις με ανιονταναλλαγή

LDH (Mg-Al) 3:1 - nitrofurantoin / LDH (Mg-Al) 2:1 - nitrofurantoin

Για την παρασκευή αυτού του υβριδίου αρχικά 50mg (0,2mmol) nitrofurantoin διαλύονται σε 10ml DMSO δημιουργώντας ένα διάλυμα 0.02M. Στη συνέχεια το διάλυμα προστίθεται σε σφαιρική φιάλη που περιέχει νερό σε pH = 9 με Tris (0,30g, 2,4mmol). Στο διάλυμα προστίθεται κατάλληλος όγκος LDH-NO_3 που αντιστοιχεί σε 0,05g LDH-NO_3 και ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 50ml. Το διάλυμα αφήνεται να αναδεύεται για 24h σε σφραγισμένη σφαιρική φιάλη. Το ίζημα απομονώνεται στη συνέχεια με φυγοκέντριση 10000 x g για 10 λεπτά, ακολουθούν δύο εκπλύσεις με νερό και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

LDH (Mg-Al) 3:1 - cholic acid/ LDH (Mg-Al) 2:1 - cholic acid

Σε 50ml απαερωμένο νερό με 20mM Tris (0,12g, 1mmol) προστίθενται 0,2gr sodium cholate (0.46 mmol) και το pH ρυθμίζεται στο 9. Στη συνέχεια προστίθεται ποσότητα αιωρήματος LDH-NO_3 που αντιστοιχεί σε 0,075gr LDH-NO_3 και το διάλυμα αφήνεται σε ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24h. Η απομόνωση γίνεται με φυγοκέντριση σε 10000 x g για 10min και ακολουθούν δύο εκπλύσεις με νερό και η ουσία αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

LDH (Mg-Al) 2:1 -glutamine

Σε διάλυμα 50mM Tris (0,30g, 2,4mmol) προστίθενται 0,2g gln (1,4mmol) και το pH ρυθμίζεται στο 10.5 με NaOH. Ύστερα προστίθεται ποσότητα αιωρήματος LDH-NO_3 που αντιστοιχεί σε 0,1gr LDH-NO_3 και το διάλυμα, με τελικό όγκο 50ml, αφήνεται σε ανάδευση

για 24h. Το στερεό λαμβάνεται με φυγοκέντριση σε 10000 x g για 10 λεπτά, ξεπλένεται δύο φορές με νερό και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
Η σύνθεση του υβριδίου LDH-glutamine επαναλήφθηκε με μικρές αλλαγές στην πειραματική διαδικασία κάθε φορά. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν συνθέσεις με pH=9 και pH=7, αντίδραση σε διάλυμα 2M NaOH (4g, 0,1mol) και με θέρμανση στους 40°C για 24h.

LDH (Mg-Al) 2:1 - alanine-glutamine

Σε διάλυμα 30mM Tris (0,18g, 1,46mmol) προστίθεται 1ml σκευάσματος alanine-glutamine και το pH ρυθμίζεται στο 10. Στη συνέχεια προστίθενται 0,075g αιωρήματος LDH-NO_3 και το διάλυμα αφήνεται για ανάδευση 24h σε θερμοκρασία δωματίου. Η απομόνωση γίνεται με φυγοκέντριση 10000 x g για 10 λεπτά, ακολουθούν δύο εκπλύσεις με νερό για την απομάκρυνση της ουσίας που δεν συναρμόστηκε και η ουσία αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

LDH (Mg-Al) 2:1 - acetate

Ξεκινώντας την αντίδραση σε διάλυμα νερού nanopore προστίθενται 0,73g sodium acetate. Στη συνέχεια προστίθεται ποσότητα αιωρήματος LDH-NO_3 που αντιστοιχεί σε 0,1gr LDH-NO_3. Το διάλυμα με τελικό όγκο 50ml αφήνεται σε ανάδευση για 24h. Η απομόνωση γίνεται με φυγοκέντριση σε 10000 x g για 10 λεπτά, ακολουθούν δύο εκπλύσεις με νερό και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για μελέτη, ή φυλάσσεται σε απαερωμένο νερό για αποστοίβαξη.

LDH (Mg-Al) 3:1 - lactate

Για την παρασκευή αυτή, 2ml DL-Lactic acid 85% w/w προστίθενται σε σφαιρική φιάλη που περιέχει νερό 0,48M Tris (0,30g, 2,4mmol) και το pH ρυθμίζεται στο 10. Στη συνέχεια προστίθενται 0,3g LDH-NO_3. Το διάλυμα με τελικό όγκο 50ml αφήνεται σε ανάδευση για 24h. Η απομόνωση γίνεται με φυγοκέντριση σε 10000 x g για 10 λεπτά, ακολουθούν δύο εκπλύσεις με νερό και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για μελέτη, ή φυλάσσεται σε απαερωμένο νερό για αποστοίβαξη.

LDH (Mg-Al) 2:1 - glycine

Πρώτα διαλύουμε 0,4g γλυκίνης σε ρυθμιστικό με 50mM Tris (0.30g, 2.4mmol). Ύστερα προστίθενται 0,1g LDH-NO_3 και το pH ρυθμίζεται στο 10. Το διάλυμα με τελικό όγκο 50ml αφήνεται σε ανάδευση για 24h. Η απομόνωση γίνεται με φυγοκέντριση σε 10000 x g για 10 λεπτά, ακολουθούν δύο εκπλύσεις με νερό και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για μελέτη, ή φυλάσσεται σε απαερωμένο νερό για αποστοίβαξη.

LDH (Mg-Al) 2:1 - protoporphyrin IX/ LDH (Mg-Al) 3:1 - protoporphyrin IX

Αρχικά, σε 20ml απαερωμένου nanopure νερού προστίθενται 0,1213g πρωτοπορφυρίνης IX (0,215mmol) και δημιουργείται ένα διάλυμα περιεκτικότητας 10mM. Για καλύτερη διάλυση χρησιμοποιούνται υπέρηχοι. Στη συνέχεια προστίθεται αιώρημα LDH-NO_3 που αντιστοιχεί σε 0,02g στερεού και το pH ρυθμίζεται στο 8. Επαναλαμβάνεται απαέρωση για 20min και το διάλυμα αναδεύεται στο σκοτάδι για 48h. Ύστερα με φυγοκέντριση σε 10000 x g για 10 λεπτά λαμβάνεται το ίζημα LDH-πρωτοπορφυρίνης IX, ενώ ακολουθούν δύο εκπλύσεις για την απομάκρυνση της πορφυρίνης που δεν συναρμόστηκε και η ουσία αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
Το πείραμα επαναλήφθηκε μειώνοντας τις ποσότητες πρωτοπορφυρίνης IX σε 0.0606g (0,108mmol), 0.0303g (0,0538mmol), 0.0243g (0,0432mmol), 0.0152g (0,0270mmol), 0.0121g (0,0215mmol), 0.0110g (0,0195mmol), 0.0101g (0,0179mmol), 0.0093g (0,0165mmol), 0.0081g (0,0144mmol), 0.0076g (0,0135mmol), 0.0071g (0,0126mmol), 0.0067g (0,0119mmol), 0.0061g (0,0108mmol).

LDH (Mg-Al) 2:1 – Rose Bengal

Σε διάλυμα 48mM Tris (0,30g, 2,4mmol) προστίθενται 0,22g ροζ βενγκάλης (0,22mmol) και το pH ρυθμίζεται στο 10. Στη συνέχεια προστίθενται 0,150g αιωρήματος LDH-NO_3 και το διάλυμα αφήνεται για ανάδευση 24h σε θερμοκρασία δωματίου. Η απομόνωση γίνεται με φυγοκέντριση 10000 x g για 10 λεπτά, ακολουθούν δύο εκπλύσεις με νερό για την απομάκρυνση της ουσίας που δεν συναρμόστηκε και η ουσία αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.
Το πείραμα επαναλήφθηκε σε 50°C και ακόμα μια φορά χωρίς ρύθμιση pH.

2.2.2 Συνθέσεις με συγκαταβύθιση

LDH(Mg-Al) 3:1 - glycine

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με τη διαδικασία σύνθεσης του LDH-NO_3. Η μόνη διαφορά ήταν η τοποθέτηση 0,8g γλυκίνης (11mmol) στο νερό στη βάση της τρίλαιμης.

LDH (Mg-Al) 3:1 - lactate

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με τη διαδικασία σύνθεσης του LDH-NO_3 με δύο στάδια διαφορά. Στο πείραμα αυτό τα άλατα διαλύθηκαν σε διάλυμα 25ml νερού και 25ml 85% w/w γαλακτικού οξέος. Επιπλέον, η ποσότητα της βάσης διπλασιάστηκε για να αντισταθμίσει την αυξημένη ποσότητα οξέος.

LDH (Mg-Al) 2:1 – Rose Bengal

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με τη διαδικασία σύνθεσης του LDH-NO_3 με μόνη διαφορά την τοποθέτηση 0,22g ροζ βενγκάλης (0,22mmol) στο νερό στη βάση της τρίλαιμης..

2.2.3 Συνθέσεις με επανενυδάτωση

LDH (Mg-Al) 2:1 - Rose bengal

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε βασίζεται στα πειράματα του Nakayama[104]. Σκόνη από LDH-NO_3 ανθρακοποιήθηκε με θέρμανση σε φούρνο στους 500°C για 5h. Από αυτό 0,56g διαλύεται σε νερό δημιουργώντας έναν πολτό, ο οποίος στη συνέχεια προστίθεται σε ένα υδατικό διάλυμα 4,5mM ροζ βενγκάλης (0,22g, 0.22mmol). Το pH ρυθμίζεται στο 10 και η αντίδραση αφήνεται σε ανάδευση στους 40°C. Η απομόνωση γίνεται με φυγοκέντριση σε 10000 x g, ακολουθούν δύο εκπλύσεις με νερό και το δείγμα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2.4 Συνθέσεις με αποστοίβαξη

Μέθοδοι αποστοίβαξης

LDH (Mg-Al) 3:1 – lactate σε νερό

Για την αποστοίβαξη αυτή 1ml LDH (Mg-Al) 3:1 – lactate, το οποίο παρασκευάστηκε όπως αναγράφεται παραπάνω, αραιώνεται σε 49ml νερό και αφήνεται σε ισχυρή ανάδευση για 5 μέρες.
Το πείραμα επαναλήφθηκε με θέρμανση στους 60°C κατά την ανάδευση και η διάρκεια μειώθηκε στη 1 μέρα.

LDH (Mg-Al) 2:1 – acetate σε νερό

Για την αποστοίβαξη αυτή 0,05g LDH (Mg-Al) 3:1 – acetate, το οποίο παρασκευάστηκε όπως αναγράφεται παραπάνω, διαλύεται σε 50ml νερό και αφήνεται σε ισχυρή ανάδευση έως ότου να μην παρατηρείται ίζημα.

LDH (Mg-Al) 3:1 σε φορμαμίδιο

Για την αποστοίβαξη φτιάχτηκαν διαλύματα διαφόρων συγκεντρώσεων απλού LDH (Mg-Al) 3:1 διαλυμένου σε φορμαμίδιο. Τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν ήταν συγκεντρώσεων 1 , 2 , 3 , 4 , 5 και 20mg/ml. Το κάθε διάλυμα αναδεύτηκε έντονα έως ότου να μην παρατηρείται ίζημα.

Συνθέσεις με αποστοιβαγμένα διπλά υδροξείδια

dLDH (Mg-Al) 3:1 – Rose Bengal

Για την παρασκευή αυτή φτιάχτηκε διάλυμα 4,5mM ροζ βενγκάλης (0,22g, 0.22mmol) σε 45ml nanopure νερό. Στη συνέχεια προστέθηκαν 5ml αποστοιβαγμένου LDH-lactate και το διάλυμα αφέθηκε για ανάδευση για 1 μέρα. Η απομόνωση έγινε με φυγοκέντριση στα 10000rpm για 10 λεπτά και ακολουθήθηκε από δύο εκπλύσεις με νερό, πριν αφεθεί να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

dLDH (Mg-Al) 3:1 – DNA herring

Σε αυτή την παρασκευή χρησιμοποιήθηκε αποστοιβαγμένο LDH – acetate 500μg του οποίου αναδεύτηκαν με 100μg DNA από σπέρμα πέστροφας, φτιάχνοντας ένα διάλυμα 50ml σε νερό. Το διάλυμα αφέθηκε για 3 μέρες σε ανάδευση και απομονώθηκε με φυγοκέντριση στα 12000rpm για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο μαζεύτηκε και μετρήθηκε με

φασματοσκοπία UV-vis για να βρεθεί η ποσότητα που δεν συναρμόστηκε. Το πείραμα επαναλήφθηκε με ποσότητες LDH 400μg και 600μg.

2.3 Χαρακτηρισμός

Τα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ ελήφθησαν σε περιθλασίμετρο Rigaku RINT 2000 με πηγή ακτίνων Χ Cu Κα (λ=1,54Å), με τάση 40kV και ένταση 178mA. Τα φάσματα υπερύθρου λήφθηκαν σε φασματόμετρο Thermo-Electron Nicolet 6700 FT-IR με μέθοδο εξασθενημένης ολικής ανάκλασης. Τα φάσματα υπεριώδους-ορατού ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-2700. Για το χαρακτηρισμό με θερμοστατική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Pyris Diamond TG/DTA της Perkin Elmer και επιλέχθηκε ταχύτητα αύξησης της θερμοκρασίας 10°C / min και εύρος θερμοκρασίας 30-600°C. Για τις μελέτες σκέδασης φωτός χρησιμοποιήθηκε ένα μηχάνημα τυπικής διάταξης, κατασκευασμένο από την ALV GmbH στο Langen της Γερμανίας, με συσχετιστή ALV-5000. Το μήκος κύματος λέιζερ που χρησιμοποιήθηκε ήταν 532nm στα 100mW (χωρίς εξασθενητή), ενώ η θερμοκρασία ήταν 20°C.

2.4 Έλεγχος ρυθμού απελευθέρωσης ουσίας από LDH

Πέρα από το χαρακτηρισμό των υβριδίων LDH, μελετήθηκε και η ικανότητα απελευθέρωσης της συναρμοσμένης ουσίας. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τη μελέτη του υβριδίου LDH(Mg-Al)-nitrofurantoin παρουσιάζεται στη συνέχεια:

Αρχικά, κατασκευάζεται μία πρότυπη καμπύλη με γνωστές συγκεντρώσεις με μέγιστη απορρόφηση το 0,5. Στη συνέχεια, σε διάλυμα 50ml 0,9% NaCl προστίθενται 100μg LDH-nitrofurantoin και το διάλυμα αφήνεται σε ανάδευση. Πριν την προσθήκη του υβριδίου λαμβάνεται δείγμα το οποίο ορίζεται ως χρόνος μηδέν. Μετά την προσθήκη και την έναρξη της ανάδευσης, δείγματα του 1ml λαμβάνονται στις χρονικές στιγμές 1min, 5min, 15min, 30min, 45min, 1h και έπειτα ανά μία ώρα. Μετά την κάθε λήψη δείγματος, ακολουθεί φυγοκέντριση και το αιώρημα αποθηκεύεται σε ψυγείο μέχρι τη μέτρησή του. Μετά την πρώτη μέρα επιλέχθηκε να ληφθούν 3 με 4 δείγματα τη μέρα, αρκετά για την κατασκευή ομαλούς καμπύλης απελευθέρωσης. Το διάλυμα αφέθηκε για 170h συνολικά. Τα δείγματα μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού Shimadzu UV-2700 και κατάλληλες αραιώσεις έγιναν στο κάθε δείγμα, έτσι ώστε η απορρόφησή του να βρίσκεται μέσα στα πλαίσια της καμπύλης. Για το κάθε δείγμα λήφθηκαν απορροφήσεις στα 265nm και 367nm όπου η νιτροφουραντοΐνη παρουσιάζει κορυφές απορρόφησης.

2.5 Έλεγχος δραστικότητας συναρμοσμένης ουσίας

Για τον έλεγχο της δραστικότητας της συναρμοσμένης σε LDH ουσίας επιλέχθηκε μία αντίδραση η οποία έχει παρακολουθήσιμο αποτέλεσμα. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκε η οξείδωση του τερπινενίου από πρωτοπορφυρίνη IX παρουσία φωτός. Η οξείδωση του τερπινενίου έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της απορρόφησής του στο υπεριώδες και είναι εύκολα μετρήσιμη.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε έχει ως εξής: σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15ml προστίθενται ποσότητες τερπινενίου και πορφυρίνης, των οποίων η τελική συγκέντρωση έχει γνωστές απορροφήσεις κάτω του 0.5, και συμπληρώνεται με μεθανόλη ως τα 10ml. Στο διάλυμα διοχετεύεται αέρας, ενώ ο δοκιμαστικός σωλήνας σφραγίζεται με parafilm. Αφού ξεκινήσει η ανάδευση, λαμβάνεται δείγμα του 1ml, το οποίο σημειώνεται ως χρόνος μηδέν, και αρχίζει η διοχέτευση φωτός. Στη συνέχεια λαμβάνονται αντίστοιχα δείγματα στους χρόνους 5min, 10min, 15min, 20min, 30min, 40min και 50min. Τέλος, μετρούνται οι απορροφήσεις με φασματόμετρο.

Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Την πρώτη φορά στο διάλυμα υπήρχε μόνο τερπινένιο, για την μέτρηση οποιασδήποτε αλλοίωσης που μπορεί να επηρεάζει την απορρόφηση, πέρα από την οξείδωση. Τη δεύτερη φορά το πείραμα έγινε και με πρωτοπορφυρίνη IX για την μελέτη της οξείδωσης. Η τρίτη και τελευταία επανάληψη έγινε με πρωτοπορφυρίνη IX παγιδευμένη σε μήτρα LDH (Mg-Al) 2:1 για τη μελέτη της δραστικότητάς της μετά την προσθήκη.

2.6 Καλλιέργεια ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων HeLa

Τα καρκινικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, ανήκουν στην καρκινική σειρά HeLa. Τα κύτταρα HeLa αποτελούν την πιο παλιά και πιο συχνά χρησιμοποιούμενη σειρά ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Η σειρά προήλθε από κύτταρα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, που απομονώθηκαν στις 8 Φεβρουαρίου το 1951 από τη Henrietta Lacks[105]. Τα κύτταρα εμφάνισαν μία μοναδική ιδιότητα, μπορούσαν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα, αφού δεν πέθαιναν μετά από λίγες κυτταρικές διαιρέσεις. Αυτή η ικανότητα τα έκανε ιδανικά για in vitro μελέτες, δεδομένου ότι μπορούν να παραχθούν εύκολα και με μικρό κόστος. Σήμερα, κύτταρα HeLa χρησιμοποιούνται για μελέτες σε αντικαρκινικά φάρμακα, φάρμακα κατά του AIDS, έλεγχο τοξικότητας ουσιών, γονιδιακή χαρτογράφηση και αναρίθμητους άλλους σκοπούς.

Τα κύτταρα, που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, αναπτύχθηκαν σε 7ml θρεπτικού μέσου MEM με 10% v/v FBS και 1% στρεπτομυκίνη σε μικρή φλάσκα, με επώαση στους 37°C και ατμόσφαιρα 5% CO_2. Όταν τα κύτταρα έχουν δημιουργήσει τάπητα το θρεπτικό απορρίπτεται, γίνονται 3 εκπλύσεις με 5ml HBSS και προστίθεται 1ml θρυψίνης. Αφού τα κύτταρα αποκολληθούν από τη φλάσκα, η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 5ml θρεπτικού. Το αιώρημα των κυττάρων φυγοκεντρείται σε 400 x g για 3 λεπτά και ξεπλένεται με θρεπτικό. Από αυτό 20μl επεξεργάζονται με 30μl HBSS και 50μl trypan blue και μεταφέρονται σε μικροσκόπιο για να μετρηθεί η ποσότητα των κυττάρων. Στη συνέχεια το αιώρημα καρκινικών κυττάρων που λήφθηκε, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για εκ νέου καλλιέργεια, να αποθηκευτεί σε άζωτο για φύλαξη ή να χωριστεί σε δείγματα για άλλες εφαρμογές.

2.7 Έλεγχος τοξικότητας LDH-NO_3 σε καρκινικά κύτταρα

Ο έλεγχος της τοξικότητας του LDH-NO_3 σε καρκινικά κύτταρα έγινε με επώαση καρκινικών κυττάρων HeLa σε διάλυμα LDH-NO_3. Πιο συγκεκριμένα, καρκινικά κύτταρα επωάστηκαν για 24h σε διαλύματα θρεπτικού MEM, συνολικού όγκου 800μl, εκ των οποίων το πρώτο είχε 0μl LDH-NO_3 (24mg/ml), το δεύτερο 2,5μl (C=0,0769mg/ml), το τρίτο 10μl (C=0,2875mg/ml), το τέταρτο 25μl (C=0,7687mg/ml), το πέμπτο 50μl (C=1,5375mg/ml) και το έκτο και τελευταίο 100μl (C=3,075mg/ml). Τα νεκρά κύτταρα μετρήθηκαν μετά το πέρας του απαιτούμενου χρόνου με τη χρήση της μεθόδου MTT. Η διαδικασία στηρίζεται στο διαχωρισμό του κιτρικού άλατος του τετραζολίου (MTT), το οποίο σχηματίζει αδιάλυτους κρυστάλλους (μπλε σκούρο) φορμαζάνης. Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται μόνο από τα ζωντανά κύτταρα (ένζυμο: σουκινική δεϋδρογονάση). Οι αδιάλυτοι κρύσταλλοι φορμαζάνης διαλύονται με ισοπροπανόλη ή άλλο οργανικό διαλύτη (DMSO). Η οπτική πυκνότητα του διαλυμένου υλικού μετριέται φασματοφωτομετρικά, λόγω απορρόφησης της βαφής (μωβ), η οποία αντιστοιχεί στον αριθμό ζωντανών κυττάρων του διαλύματος (που μεταβολίζουν το MTT).

Αρχικά, αφαιρούνται τα 800μl θρεπτικού όπου “μεγαλώνουν” τα καρκινικά κύτταρα και προστίθενται 800μl διαλύματος MTT σε θρεπτικό υλικό. Αφήνεται 3 ώρες για να μεταβολίσουν τα ζωντανά κύτταρα το MTT. Μετά το πέρας του απαιτούμενου χρόνου, αφαιρούνται τα 800μl και προστίθενται 800μl DMSO (μωβ). Τέλος, μετριέται απορρόφηση στα 556nm με τυφλό DMSO.

Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές ακόμα, για τη μελέτη της πρωτοπορφυρίνης IX στο σκοτάδι και στο φως.

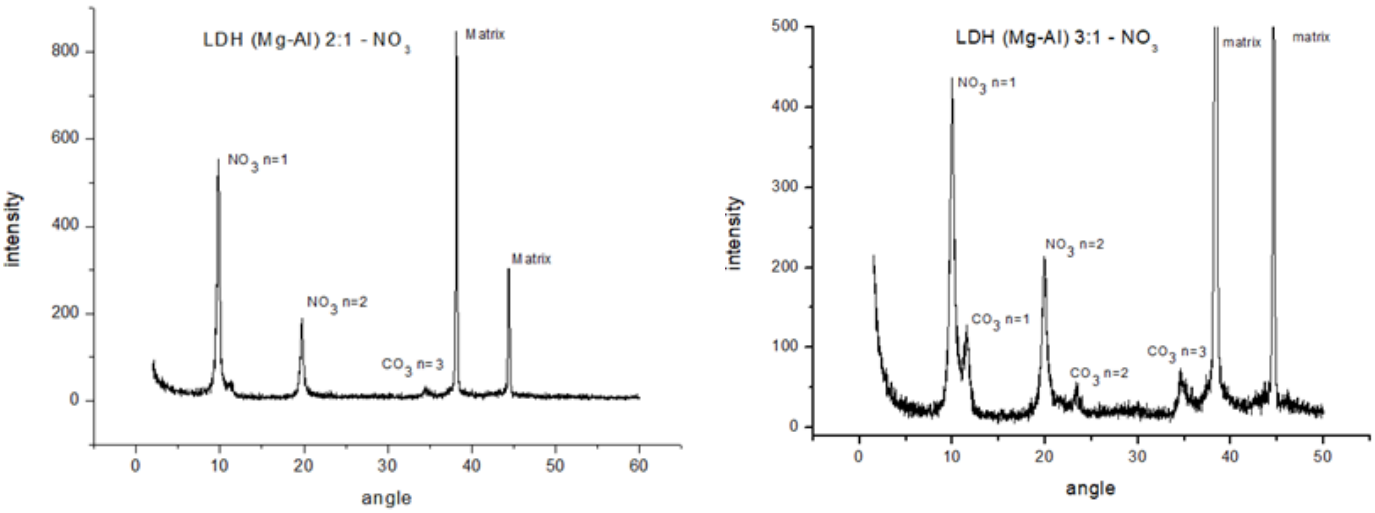
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Χαρακτηρισμός των LDH

3.1.1 Περίθλαση ακτίνων Χ

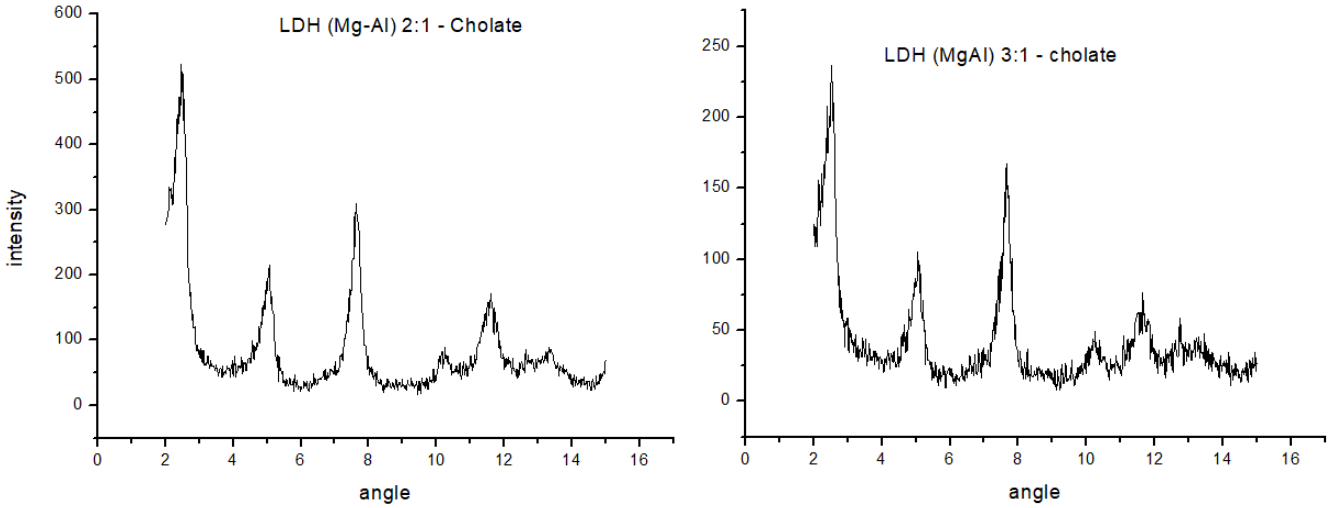
Ο χαρακτηρισμός των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων βασίστηκε κυρίως στην ανάλυση με περίθλαση ακτίνων Χ και στη φασματοσκοπία υπερύθρου. Με τη χρήση της περίθλασης ακτίνων Χ μελετάται η απόσταση μεταξύ των ανόργανων στρωμάτων των LDH (d-spacing). Η απόσταση αυτή εξαρτάται από το είδος των ανιόντων που βρίσκονται ανάμεσα στα στρώματα, το μέγεθος και το φορτίο τους. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να διαπιστωθεί οποιαδήποτε αντικατάσταση ανιόντων στο εσωτερικό των LDH.

Ξεκινώντας, παρουσιάζονται τα διαγράμματα περίθλασης των LDH(Mg-Al)2:1-NO_3 και LDH(Mg-Al)3:1-NO_3, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν μετέπειτα για τη σύνθεση των υπολοίπων υβριδίων LDH. Με την εφαρμογή του νόμου του Bragg προκύπτει ότι η απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών στρωμάτων είναι 8.92Å και 7.84Å αντίστοιχα. Το γεγονός ότι η απόσταση των στρωμάτων είναι 8.92Å δηλώνει τη σταθεροποίηση νιτρικών ιόντων μεταξύ των στρωμάτων, ενώ η μικρότερη σε ένταση κορυφή δίπλα της, που δίνει απόσταση 7.67Å, δηλώνει την ύπαρξη ανθρακικών. Η ύπαρξη ανθρακικών δεν είναι επιθυμητή, καθώς τα ιόντα αυτά δεσμεύονται πιο ισχυρά σε σχέση με τα νιτρικά και είναι δύσκολο να απομακρυνθούν, όπως θα φανεί και στα επόμενα διαγράμματα. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι κορυφές στις μεγαλύτερες γωνίες (38,19^o και 44,41^o αντίστοιχα) ανήκουν στη μήτρα αλουμινίου, πάνω στην οποία μετρήθηκαν τα δείγματα.



Εικόνα 3.1. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των LDH(Mg-Al) 3:1 -NO_3 και LDH(Mg-Al) 2:1 -NO_3 με αναγραφόμενους τους δείκτες Miller.

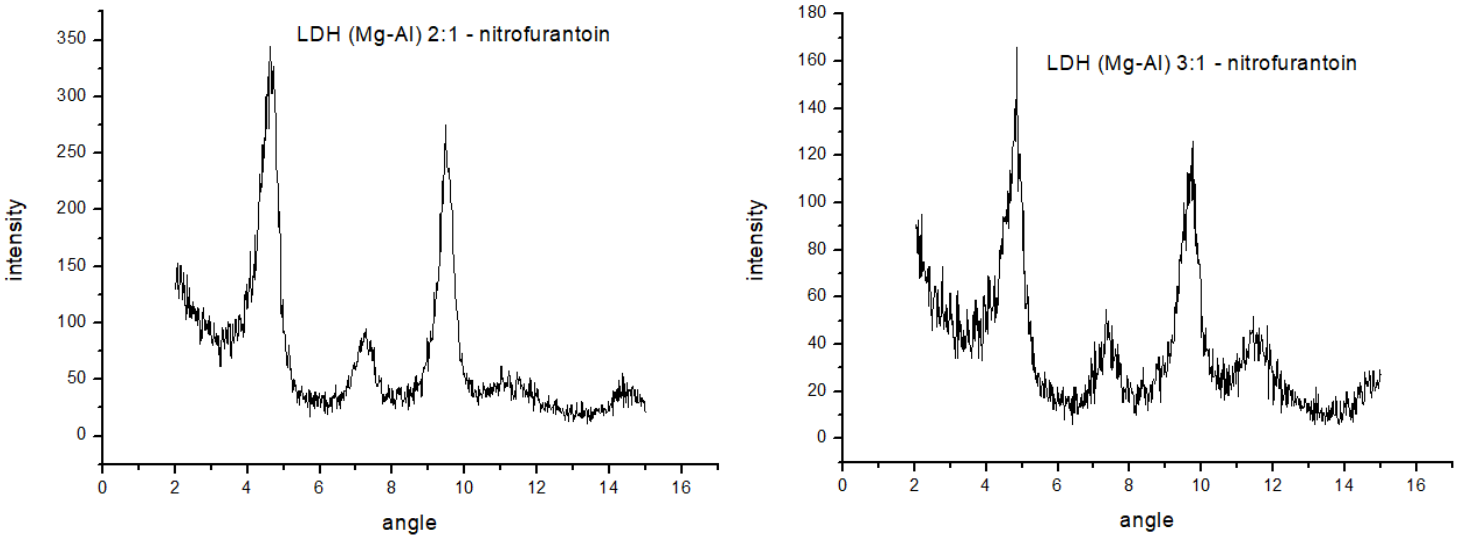
Ανάλυση LDH(Mg-Al)-cholate:



Εικόνα 3.2. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του LDH(Mg-Al)-cholic acid.

Χρησιμοποιώντας το νόμο του Bragg η απόσταση μεταξύ των στρωμάτων του LDH υπολογίζεται στα 34.82Å. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι το χολικό έχει συναρμοστεί στο εσωτερικό του LDH. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κορυφή στις 11,61° δεν ανήκει στο χολικό, αλλά σε ανθρακικά ιόντα τα οποία ήταν παρόντα στο αρχικό LDH και δεν μπορούσαν να αντικατασταθούν από το χολικό. Σημειώνεται ότι το διάγραμμα του LDH 2:1 είναι πιο ευδιάκριτο και έχει πιο οξείες κορυφές. Αυτό συμβαίνει διότι η αυξημένη ποσότητα θετικού φορτίου αυξάνει τις δυνάμεις μεταξύ στρώματος και αρνητικά φορτισμένης ουσίας, δημιουργώντας μια καλύτερα διαμορφωμένη δομή.

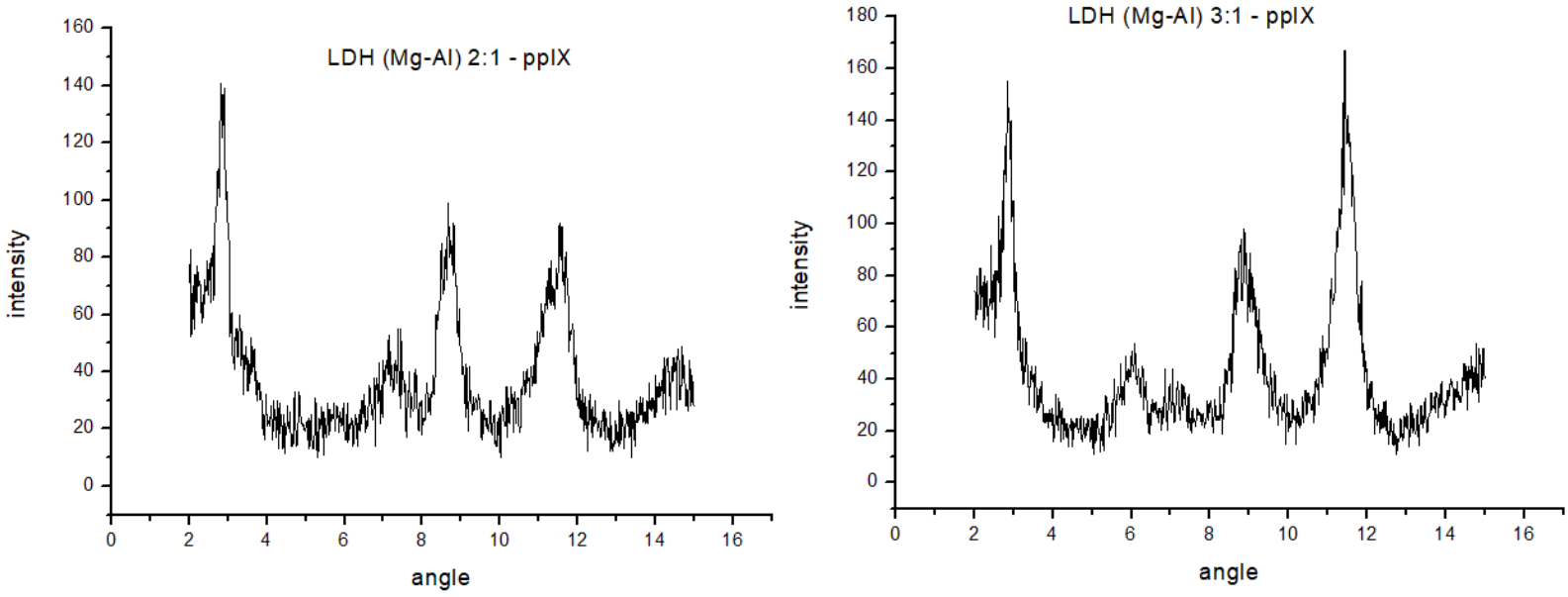
Ανάλυση LDH(Mg-Al)-nitrofurantoin:



Εικόνα 3.3. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του LDH (Mg-Al)-nitrofurantoin.

Με τη χρήση του νόμου του Bragg η απόσταση μεταξύ των στρωμάτων του LDH υπολογίζεται στα 18.65Å. Στην περίπτωση του LDH 2:1 κορυφή κοντά στις 11° δεν εμφανίζεται, δηλώνοντας ότι δεν υπάρχουν καθόλου περίσσεια νιτρικά ή ανθρακικά και η συναρμογή έχει γίνει πλήρως, σε αντίθεση με το LDH 3:1 όπου, όπως και στο αρχικό, στις 11,45° δηλώνεται η ύπαρξη ανθρακικών. Όπως και στο χολικό, το διάγραμμα LDH 2:1 είναι πιο ευδιάκριτο.

Ανάλυση LDH(Mg-Al)-protoporphyrin IX:

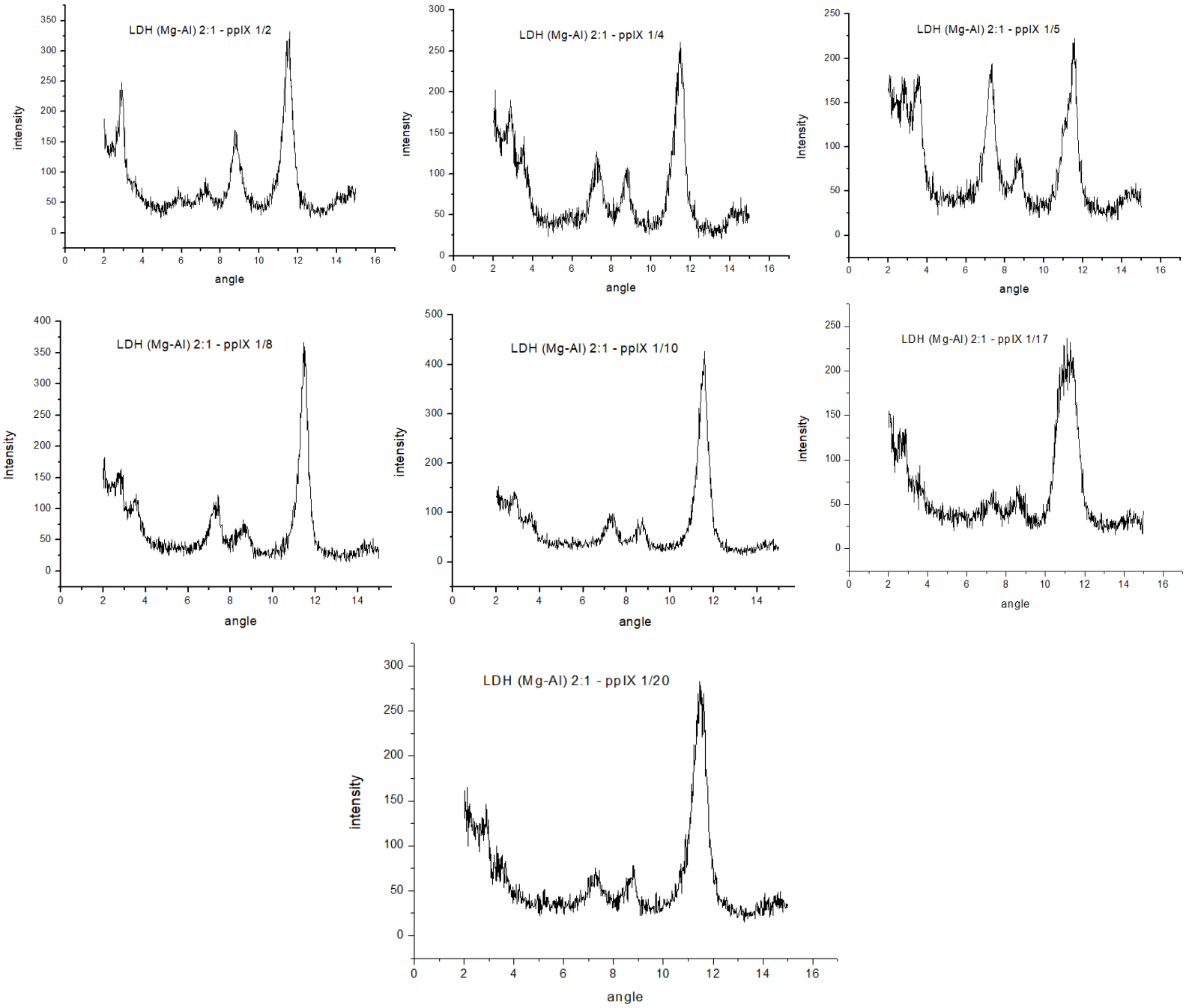


Εικόνα 3.4. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του LDH (Mg-Al)-protoporphyrin IX.

Η απόσταση μεταξύ στρωμάτων του LDH υπολογίστηκε ίση με 30.19 Å. Η κορυφή κοντά στις 11,43° δεν ανήκει στις κορυφές του επιθυμητού υβριδίου αλλά σε ανθρακικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι αν και τα στρώματα διευρύνθηκαν και υπάρχει συναρμοσμένη ουσία, η απόσταση δεν είναι ίση με αυτή της βιβλιογραφίας[106]. Κάτι τέτοιο μπορεί να οφείλεται σε τρία αίτια, είτε η ουσία έχει συναρμοστεί υπό γωνία ή σαν διπλή στοιβάδα, είτε η ουσία έχει υποστεί κάποια αλλοίωση αλλάζοντας το μέγεθος που καταλαμβάνει ανάμεσα στις στιβάδες. Το τρίτο αίτιο θεωρείται λιγότερο πιθανό, αφού σε μετέπειτα πειράματα, εξετάστηκε η δραστικότητα του υβριδίου σε σύγκριση με τη σκέτη πρωτοπορφυρίνη. Οι κορυφές του διαγράμματος δεν είναι αρκετά οξείες, λόγω της ανομοιόμορφης διάταξης των μορίων πρωτοπορφυρίνης IX στο εσωτερικό του LDH.

Στη συνέχεια παρατίθενται μερικά από τα διαγράμματα για τα πειράματα με πρωτοπορφυρίνη IX σε όλο και μικρότερη συγκέντρωση. Για τη μήτρα LDH χρησιμοποιήθηκε αναλογία Mg:Al 2:1 αφού δίνει πιο σταθερή δομή και θεωρήθηκε, ότι

λόγο του αυξημένου θετικού φορτίου θα τραβούσε πιο ισχυρά την πρωτοπορφυρίνη IX, επιτρέποντας έτσι την επιτυχία πειραμάτων σε μικρότερες συγκεντρώσεις:



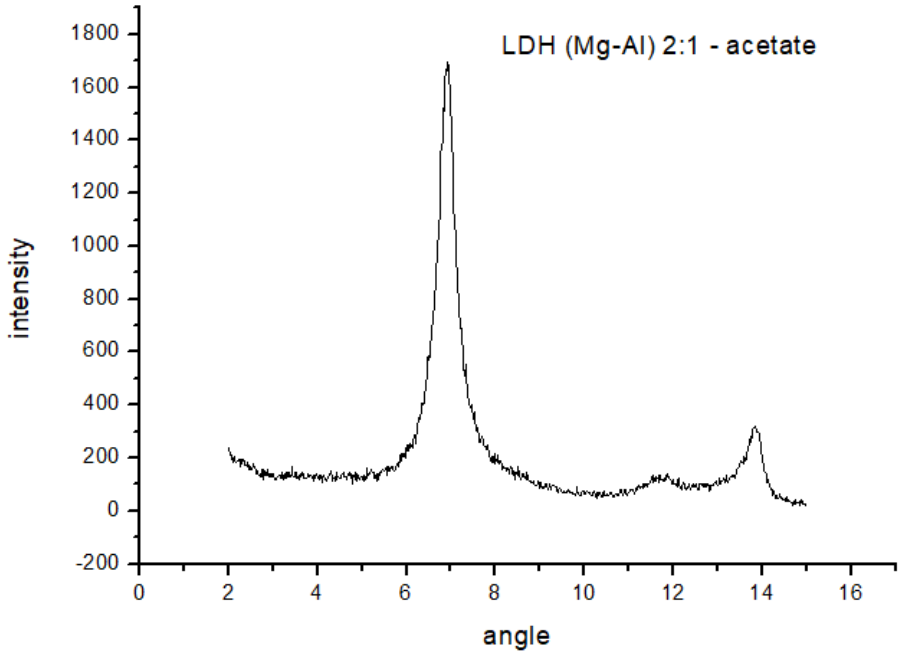
Εικόνα 3.5. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X LDH (Mg-Al)-protoporphyrin IX με συγκεντρώσεις όλο και μικρότερες σε σύγκριση με την αρχική.

Παρατηρείται ότι δίπλα από την κορυφή στις 2.81° που αντιστοιχεί σε απόσταση μεταξύ στρωμάτων 31,4Å, εμφανίζεται μία νέα κορυφή στις 3,61° που αντιστοιχεί σε

απόσταση 24,44Å. Η απόσταση αυτή σύμφωνα με τη βιβλιογραφία[106] αντιστοιχεί σε μονή στοιβάδα πρωτοπορφυρίνης IX, ενώ η κορυφή επαναλαμβάνεται για n=2 στις 7,33°. Το γεγονός ότι αυτές οι κορυφές εμφανίζονται όταν η ποσότητα της πρωτοπορφυρίνης IX μειώνεται, ενισχύει την υπόθεση ότι στα αρχικά στάδια η προσθήκη στο LDH είχε γίνει υπό την μορφή διπλοστοιβάδας. Συγκεντρώσεις μικρότερες του 1/20 της αρχικής δεν οδήγησαν σε ευδιάκριτα διαγράμματα XRD. Αν και πιθανότατα η ουσία και πάλι συναρμόζεται, το ποσοστό LDH με συναρμοσμένη την επιθυμητή ουσία είναι τόσο μικρό σε σύγκριση με το αρχικό LDH-NO_3 που οι κορυφές δεν εμφανίζονται.

Από τα πειράματα αυτά συμπεραίνουμε ότι η βέλτιστη ποσότητα για την παρασκευή LDH (Mg-Al) 2:1 – ppIX είναι το ¼ της αρχικής, καθώς μπορεί να χαρακτηριστεί επαναλήψιμα και περιέχει αρκετή ποσότητα πρωτοπορφυρίνης για περεταίρω μελέτες χωρίς σπατάλη περίσσειας. Το γεγονός αυτό επαληθεύτηκε και στις μελέτες στις καρκινικές σειρές, όπου η μειωμένη ποσότητα πρωτοπορφυρίνης επέτρεψε πιο ακριβή μελέτη του ισχυρού φωτοοξειδωτή.

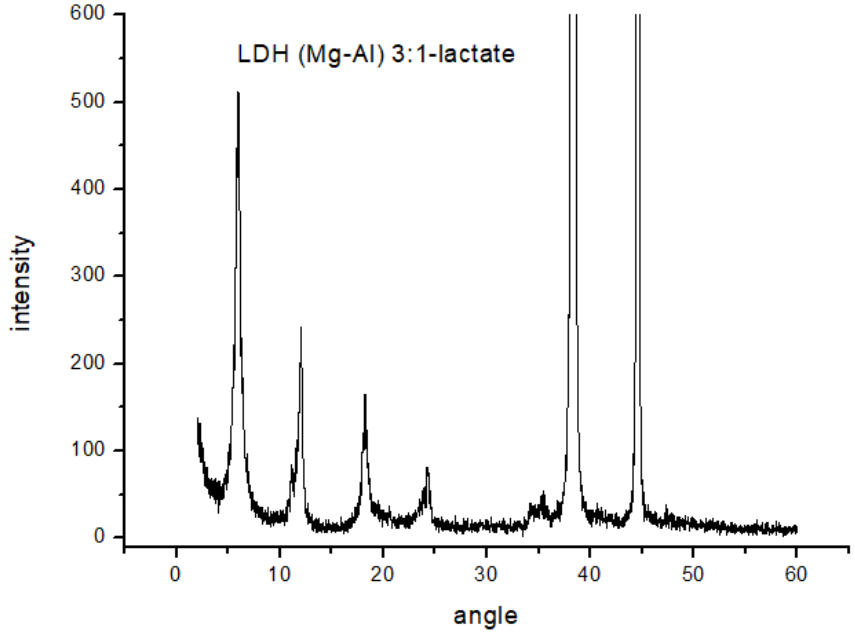
Ανάλυση LDH(Mg-Al)-acetate:



Εικόνα 3.6. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του LDH (Mg-Al)-acetate.

Η απόσταση μεταξύ των στρωμάτων υπολογίστηκε ίση με 12,74Å. Παρατηρείται η έλλειψη κορυφών που να ανήκουν σε νιτρικά ή ανθρακικά ανιόντα. Το γεγονός αυτό επέτρεψε τη συνέχεια σε πειράματα αποστοίβαξης του LDH.

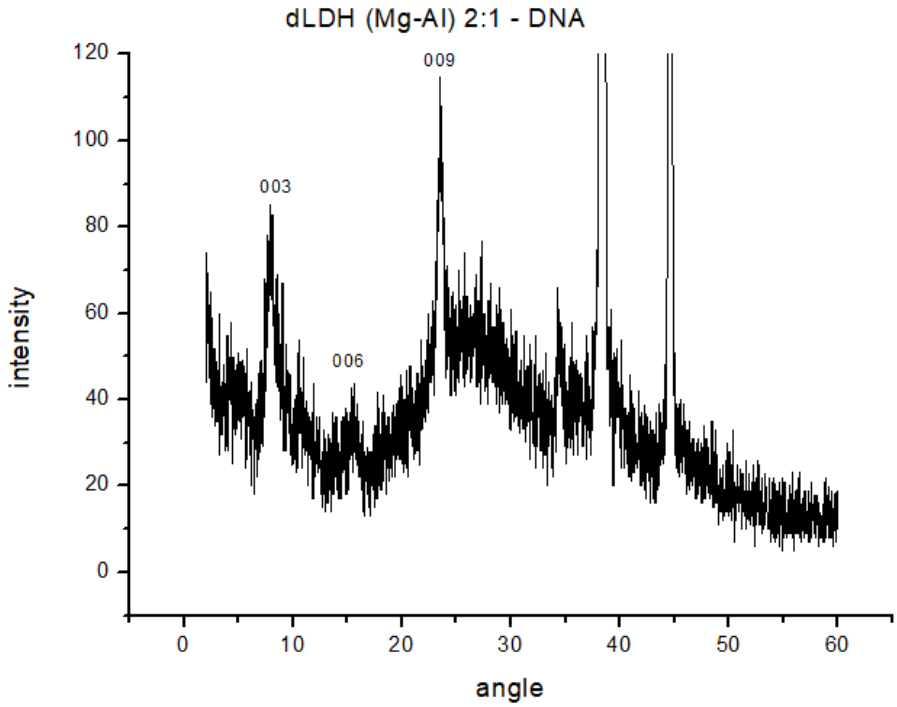
Ανάλυση LDH(Mg-Al)-lactate:



Εικόνα 3.7. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του LDH (Mg-Al)-lactate.

Η απόσταση μεταξύ των στρωμάτων υπολογίστηκε ίση με 14,72Å. Για την εισαγωγή lactate επιλέχθηκε LDH 3:1, έτσι ώστε η μικρότερη ποσότητα θετικών φορτίων να οδηγήσει σε εξασθενημένες δυνάμεις μεταξύ των στοιβάδων και να διευκολυνθεί η αποστοίβαξη του LDH-lactate.

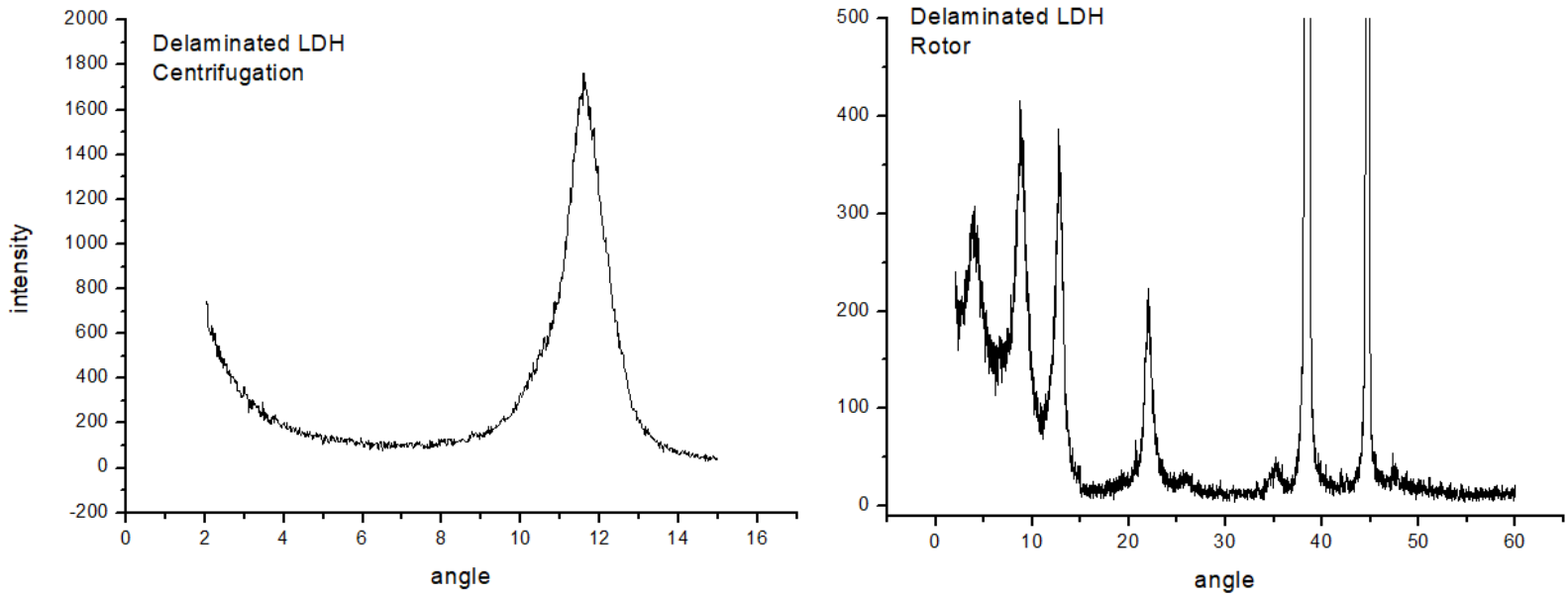
Ανάλυση LDH(Mg-Al)-DNA:



Εικόνα 3.8. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του LDH (Mg-Al)-DNA.

Η απόσταση μεταξύ των στρωμάτων υπολογίστηκε ίση με 11,94Å. Το γεγονός ότι στο XRD παρατηρούνται κορυφές, δηλώνει ότι είτε κατά την εισαγωγή του DNA, είτε στον καθαρισμό, το LDH στοιβάχτηκε ξανά. Η χαμηλή ένταση και οξύτητα των κορυφών ενδυναμώνει τη δεύτερη υπόθεση, αφού δείχνει την μη ομοιόμορφη στοίβαξη των στρωμάτων, κάτι που αναμένεται να γίνει κατά την φυγοκέντριση του δείγματος στον καθαρισμό. Η υπόθεση επαληθεύεται από το γεγονός ότι πριν τις φυγοκεντρίσεις το διάλυμα εμφανίζει φαινόμενο Tyndall.

Ανάλυση αποστοιβαγμένου LDH(Mg-Al):



Εικόνα 3.9. Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων X του LDH (Mg-Al)-acetate μετά την αποστοίβαξη.

Τα διαγράμματα της εικόνας 3.9 ανήκουν σε σκόνες LDH-acetate που αποστοιβάχτηκαν και επανασυλλέχθηκαν. Το αριστερό διάγραμμα αναφέρεται σε σκόνη που συλλέχθηκε με φυγοκέντριση, ενώ το δεξιά με υπό κενό εξάτμιση σε ρότορα.

Στο πρώτο διάγραμμα η κορυφή στις 11,51° δηλώνει την εμφάνιση ανθρακικών ανιόντων. Η μόλυνση από ανθρακικά από την ατμόσφαιρα είναι ένας γενικός κίνδυνος, αφού εισχωρούν πολύ ισχυρά στα LDH, και οι φυγοκεντρίσεις δεν γίνονται υπό κενό. Αν και σε κάθε παρασκευή LDH γίνονται πολλές φυγοκεντρίσεις κατά τον καθαρισμό του χωρίς τα ανθρακικά να εισβάλλουν ανάμεσα στα στρώματα, φαίνεται ότι σε αποστοιβαγμένα LDH μπορούν να εισχωρήσουν πολύ πιο εύκολα, καθώς αυτά επαναστοιβάζονται στη φυγοκέντριση.

Για να αποφευχθεί η μόλυνση και η επαναστοίβαξη του LDH, δοκιμάστηκε μια πιο ομαλή απομόνωση με εξάτμιση υπό κενό σε ρότορα. Όπως εμφανίζεται στο δεύτερο διάγραμμα XRD, κορυφή ανθρακικών δεν υπάρχει, άρα οποιαδήποτε μόλυνση αποφεύχθηκε. Παρ' όλο που η διαδικασία ήταν πιο ήπια, τα στρώματα LDH στοιβάχτηκαν και πάλι, αυτή τη φορά με απόσταση μεταξύ τους 20,80Å. Αν και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η απόσταση αυτή δεν ανήκει στο ακετικό, στο διάλυμα που εξατμίστηκε δεν υπήρχε κάποια άλλη ουσία, άρα η μόνη υπόθεση που μπορεί να γίνει, είναι ότι μεταξύ των στρωμάτων παγιδευτικέ πάλι ακετικό, αυτή τη φορά υπό γωνία, ή σαν διπλοστοιβάδα. Είναι προφανές, ότι τα πειράματα απομόνωσης αποστοιβαγμένου LDH πρέπει να συνεχιστούν για καλύτερη μελέτη, έως ότου να επιτευχθεί η απομόνωση LDH που δεν δίνει κορυφές.

Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκαν και μία σειρά από άλλες αντιδράσεις ακινητοποίησης μορίων με βιολογικό ενδιαφέρον, τα οποία δεν έδωσαν τα επιθυμητά αποτελέσματα. Τα διαγράμματα των πειραμάτων που απέτυχαν δεν θα αναλυθούν, καθώς έδωσαν πανομοιότυπα διαγράμματα με το αρχικό LDH. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τα πειράματα αυτά:

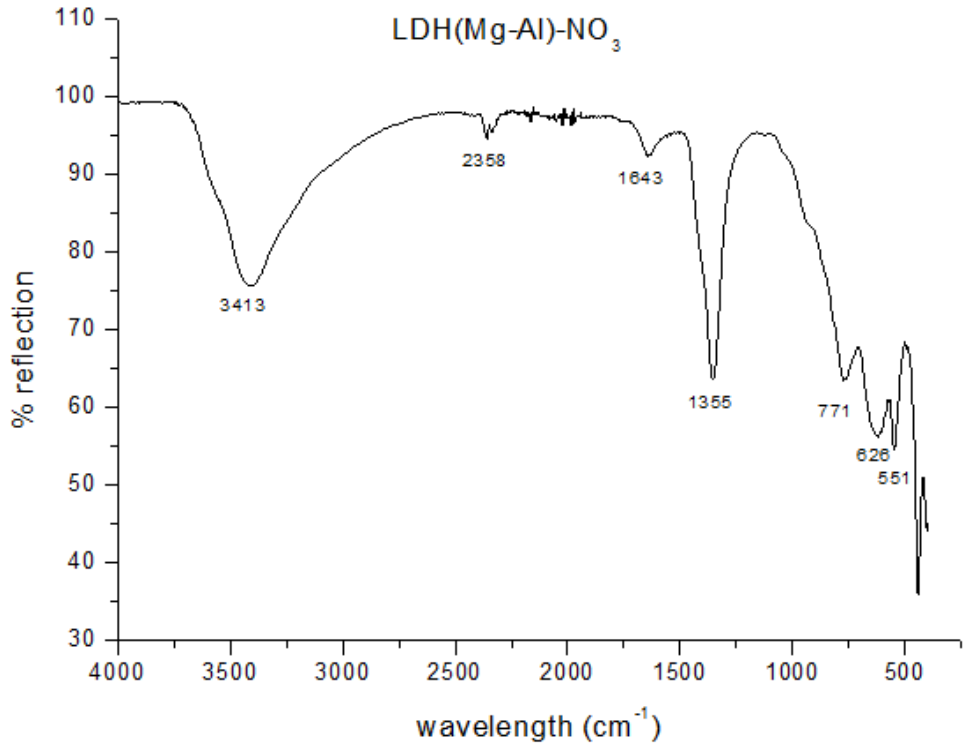
Πίνακας 3.1. Επισκόπηση των πειραμάτων παγίδευσης ουσιών σε LDH που απέτυχαν.

Όνομα ουσίας	Μέθοδος	Spacing
LDH(Mg-Al) 2:1 - ala-gln	Ανιονταντάλλαγή, pH 7	7.9
LDH(Mg-Al) 2:1 - ala-gln	Ανιονταντάλλαγή, pH 10	7.57
LDH(Mg-Al) 2:1 -gln	Ανιονταντάλλαγή, pH 7	7.65
LDH(Mg-Al) 2:1 -gln	Ανιονταντάλλαγή, σε NaOH 2M	7.88
LDH(Mg-Al) 2:1 -gln	Ανιονταντάλλαγή, pH 10,5, θέρμανση στους 40°C	7.85
LDH(Mg-Al) 2:1 -gln	Ανιονταντάλλαγή, pH 9	7.85
LDH(Mg-Al) 2:1 -gly	Ανιονταντάλλαγή, pH 10	7.61
LDH(Mg-Al) 2:1 -gly	Με συγκαταβύθιση	7.82
LDH(Mg-Al) 2:1 – Rose bengal	Ανιονταντάλλαγή, pH 10	7.81

LDH(Mg-Al) 2:1 – Rose bengal	Ανιονταναλλαγή, θέρμανση στους 50°C	7.85
LDH(Mg-Al) 2:1 – Rose bengal	Ανιονταναλλαγή, χωρίς ρύθμιση pH	8.31
LDH(Mg-Al) 2:1 – Rose bengal	Με συγκαταβύθιση	7.82
LDH(Mg-Al) 2:1 – Rose bengal	Με επανενυδάτωση	7.88
LDH(Mg-Al) 2:1 – Rose bengal	Σε αποστοιβαγμένο LDH	8.41

3.1.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου

Η παρουσία συναρμοσμένων ουσιών στα υβριδικά υλικά που συντέθηκαν, μπορεί εύκολα να επιβεβαιωθεί με φασματοσκοπία υπερύθρου. Η φασματοσκοπία υπερύθρου όμως δεν μπορεί να ανιχνεύσει αν η ουσία έχει μπει στο εσωτερικό των στρωμάτων του LDH ή απλά υπάρχει διάχυτη στο δείγμα που αναλύουμε, και για αυτό πρέπει τα αποτελέσματά της να διασταυρωθούν με αυτά της ανάλυσης με περίθλαση ακτίνων Χ. Ακολουθεί το φάσμα υπερύθρου του LDH.



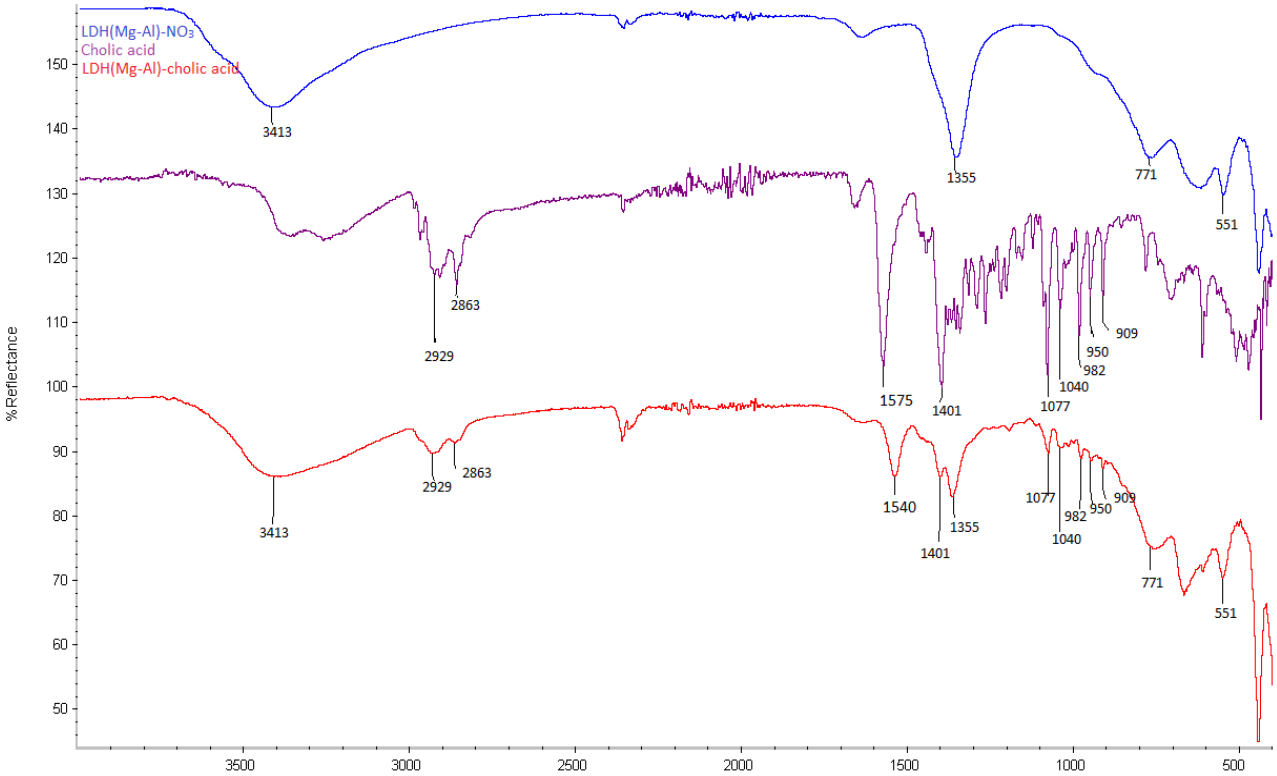
Εικόνα 3.10. Φάσμα υπερύθρου του LDH(Mg-Al)-NO_3.

Χαρακτηριστικό κάθε φάσματος LDH είναι η ευρεία ταινία που εμφανίζεται κοντά στα 3500cm^{-1}, η οποία οφείλεται στη δόνηση τάσης των υδροξυλίων των μεταλλικών στρωμάτων, καθώς και οι κορυφές στην περιοχή 400-1000 cm^{-1}, οι οποίες δηλώνουν τις δονήσεις των δεσμών μετάλλου-οξυγόνου (M-O) και μετάλλου-υδροξυλίου (M-OH). Η δόνηση που εμφανίζεται στα 1643 cm^{-1} ανήκει στη δόνηση κάμψης του νερού. Γενικά στην περιοχή 1000 cm^{-1} έως 2000 cm^{-1} εμφανίζονται οι κορυφές που οφείλονται αποκλειστικά στα ιόντα και έτσι είναι δυνατή η ταυτοποίησή τους στο δείγμα.

Στην περίπτωση του φάσματος LDH(Mg-Al)-NO_3 δεν εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του νιτρικού ιόντος στα 1380 cm^{-1}, 1760 cm^{-1} και 825 cm^{-1}. Αντίθετα, η κορυφή στα 1355 cm^{-1} δηλώνει την ύπαρξη ανθρακικών ιόντων. Αυτό μπορεί να σημαίνει δύο πράγματα: είτε ότι νιτρικά υπάρχουν, αλλά η εντάσεις των κορυφών τους είναι μικρές και υπερκαλύπτονται από τις διπλανές, είτε ότι δεν υπάρχουν καθόλου και το δείγμα είναι μόνο LDH-CO_3. Τα ανθρακικά ιόντα είναι δύσκολο να αντικατασταθούν από άλλα και η ύπαρξή τους θα δικαιολογούσε, γιατί πολλές από τις συνθέσεις υβριδίων LDH απέτυχαν.

Στη συνέχεια, γίνεται η ανάλυση των φασμάτων υπερύθρου των ουσιών που συντέθηκαν. Σημειώνεται, ότι δεν θα παρουσιαστούν τα φάσματα πειραμάτων που δεν έδωσαν αποτέλεσμα, αφού το φάσμα τους είναι πανομοιότυπο με αυτό του αρχικού LDH-NO_3. Για κάθε ουσία που θα αναλυθεί, παρουσιάζεται το φάσμα της αφού έχει αντιδράσει με LDH και το φάσμα της ελεύθερης ουσίας. Η ταυτοποίηση γίνεται με τη σύγκρισή τους.

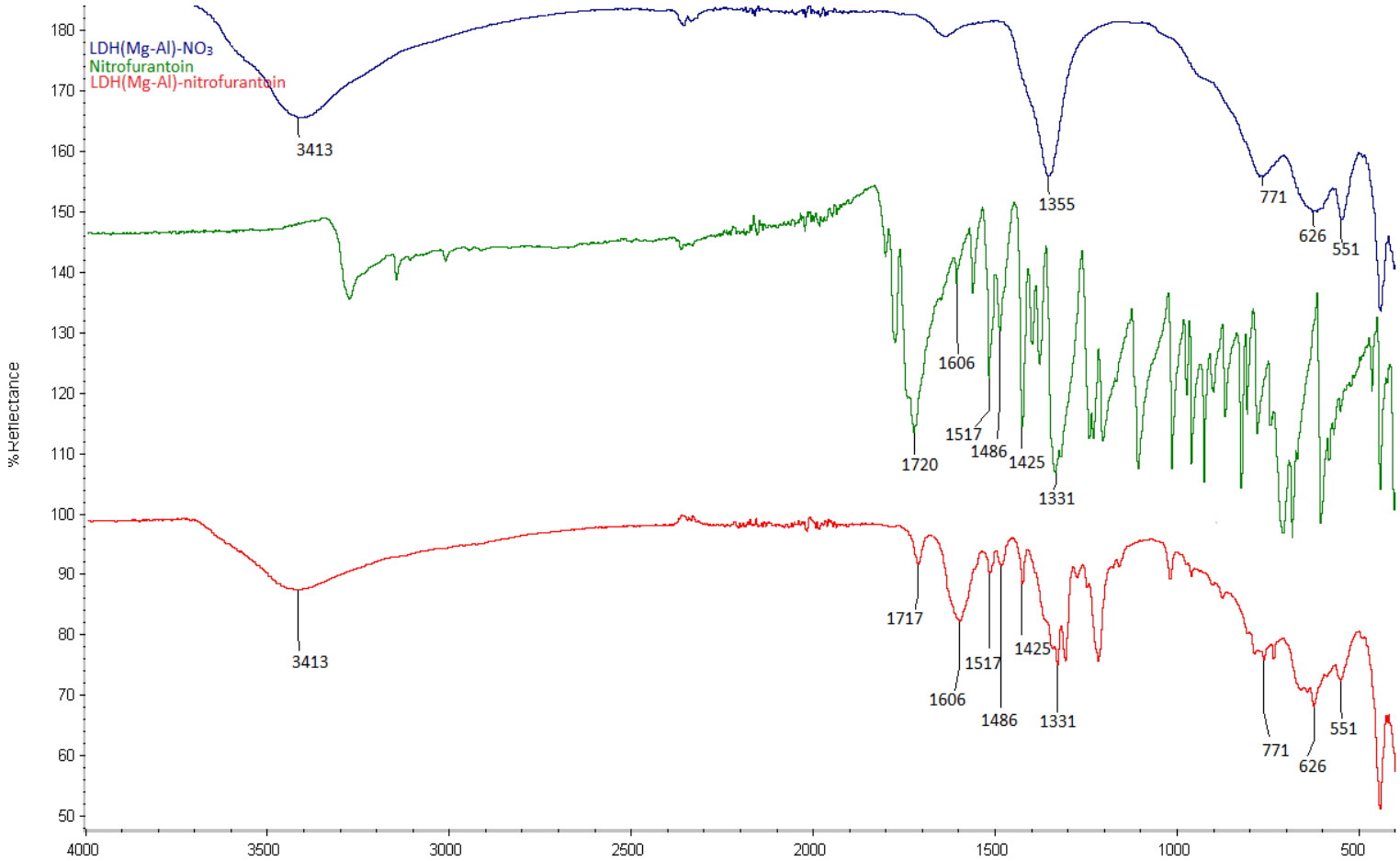
Ανάλυση LDH(Mg-Al)-cholic acid:



Εικόνα 3.11. Φάσμα υπερύθρου του LDH (Mg-Al)-cholic acid.

Αρχικά, αναλύεται το φάσμα του ελεύθερου χολικού. Οι κορυφές στα 2929 και 2863cm^{-1} οφείλονται στις δονήσεις C-H. Επίσης, είναι εμφανής η αντισυμμετρική δόνηση του καρβοξυλίου στους 1575 και 1401cm^{-1}. Οι κορυφές της περιοχής ταυτοποίησης 1000-2000cm^{-1} οφείλονται στις δονήσεις σκελετού του χολικού οξέος. Στο φάσμα του υβριδίου εμφανίζονται τόσο κορυφές του LDH όσο και του χολικού οξέος, αποκαλύπτοντας έτσι τη δέσμευση της ουσίας στο LDH. Η κορυφή στα 1355cm^{-1} μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα ανθρακικά δεν έχουν απομακρυνθεί πλήρως από το LDH. Συνδυάζοντας τα στοιχεία που πήραμε από τη φασματοσκοπία IR με αυτά της περίθλασης ακτίνων X, μπορούμε να συμπεράνουμε, ότι το χολικό οξύ, έχει συναρμοστεί εσωτερικά του LDH.

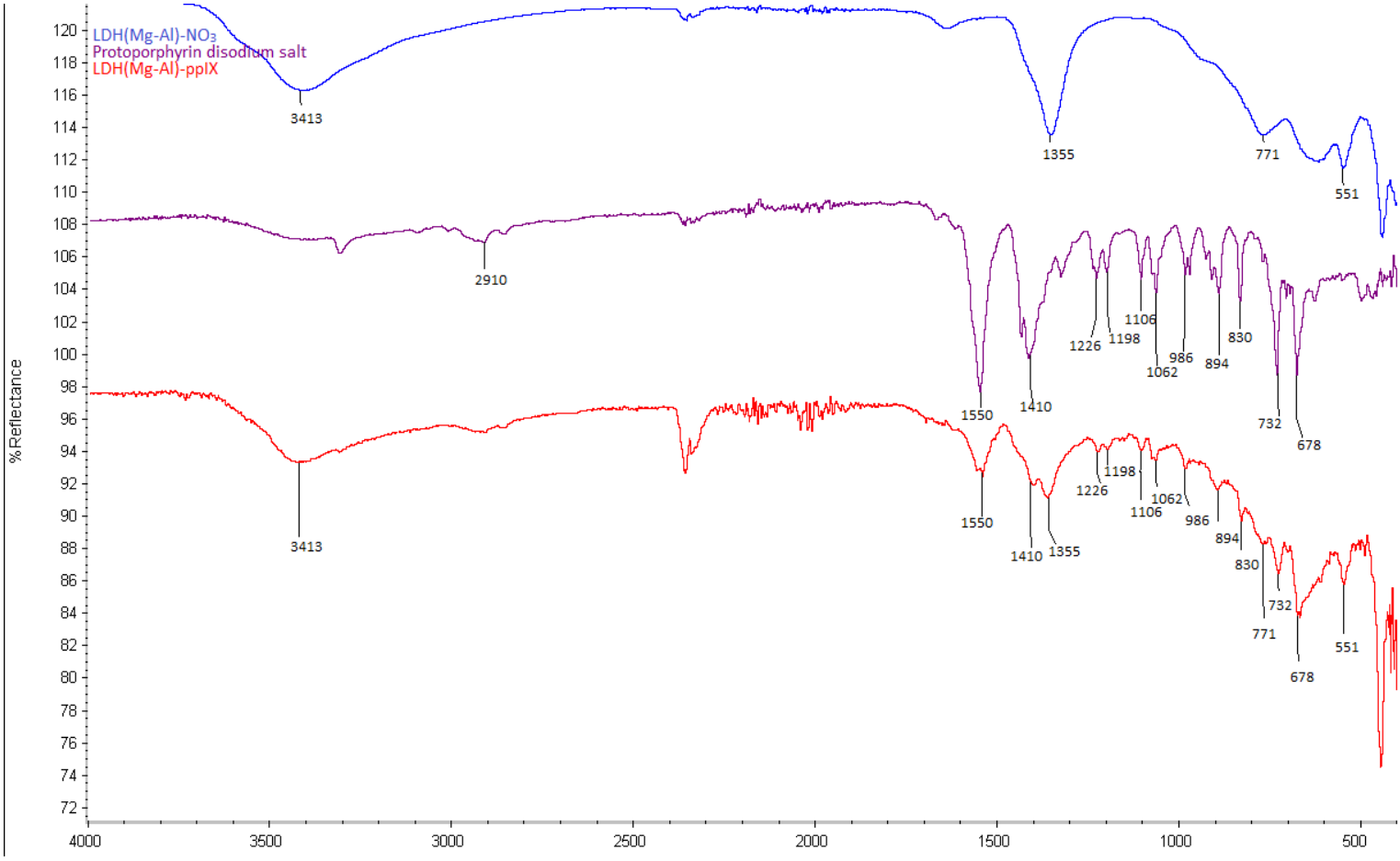
Ανάλυση LDH(Mg-Al)-nitrofurantoin:



Εικόνα 3.12. Φάσμα υπερύθρου του LDH (Mg-Al)-nitrofurantoin.

Παρατηρώντας το φάσμα της νιτροφουραντοΐνης η κορυφή στα 1720cm^{-1} αποδίδεται στην ομάδα C=O που υπάρχει στον κύκλο υδαντοΐνης, ενώ η κορυφές μεταξύ 1517-1331cm^{-1} δείχνουν τη ύπαρξη του α-νιτροφουραντο-δακτυλίου[107]. Η ύπαρξη των κορυφών αυτών, σε συνδυασμό με τις κορυφές του LDH αποδεικνύουν τη συναρμογή του φαρμάκου στο LDH. Η έλλειψη κορυφής στα 1355cm^{-1} και η αλλαγή της απόστασης στρωμάτων στην ανάλυση με περίθλαση ακτίνων Χ, δηλώνουν ότι η συναρμογή αυτή έγινε στο εσωτερικό των στοιβάδων και είναι πλήρης.

Ανάλυση LDH(Mg-Al)-protoporphyrin IX:

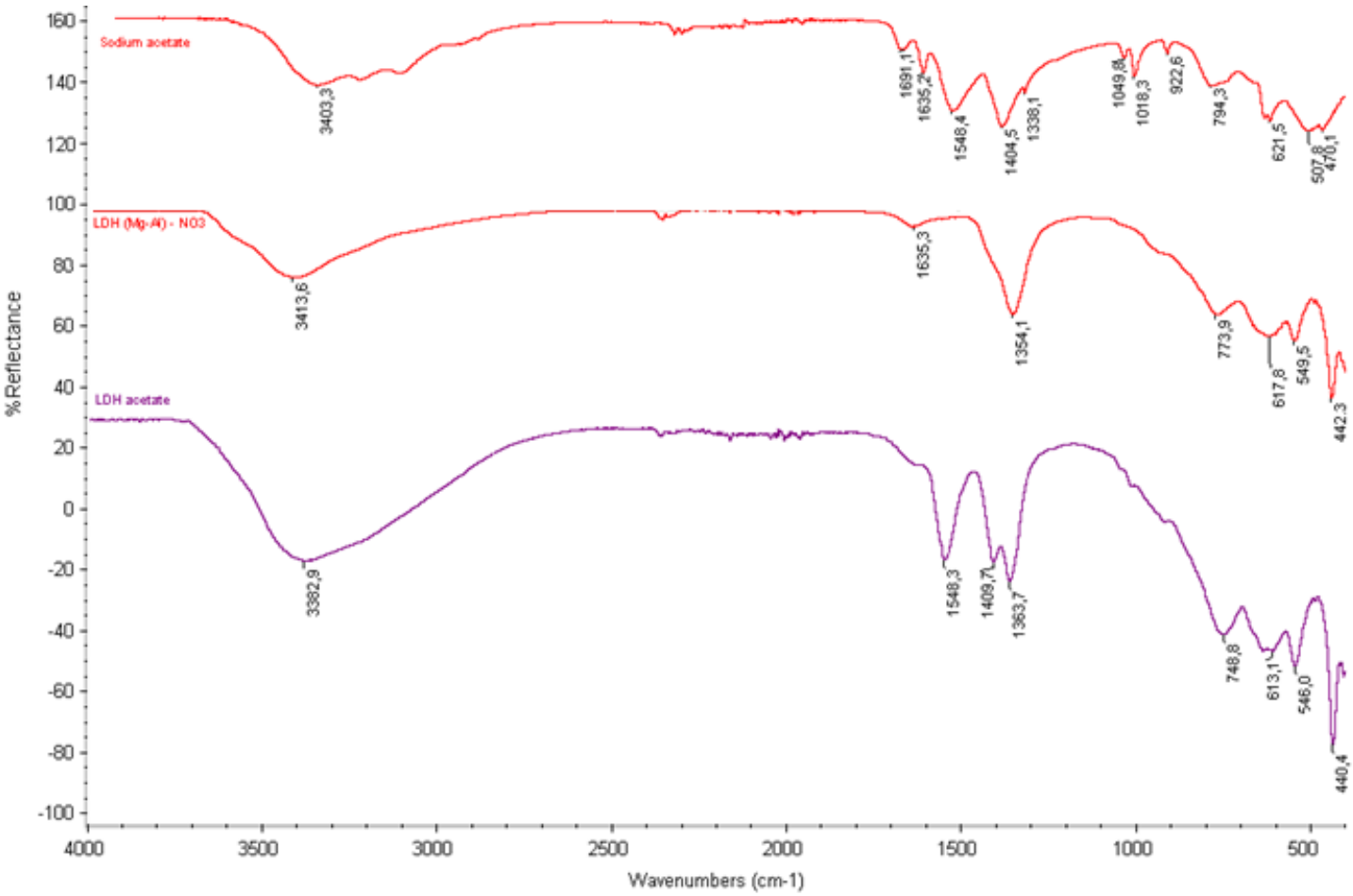


Εικόνα 3.13. Φάσμα υπερύθρου του LDH (Mg-Al)-protoporphyrin IX.

Στο φάσμα της ελεύθερης πρωτοπορφυρίνης IX παρατηρούνται κορυφές στα 986, 1410, 1566 και 2910cm^{-1} οι δηλώνουν την ύπαρξη

καρβοξυλικού ιόντος στην ένωση. Οι κορυφές στην περιοχή 678-1226cm^{-1} οφείλονται στις μεθυλικές και βινυλικές ομάδες που περιέχει η ένωση, καθώς και στους πυρρολικούς δακτυλίους της[14,35]. Η ύπαρξη αυτών των κορυφών στο φάσμα του LDH(Mg-Al)-protoporphyrin IX, δηλώνει την επιτυχή δέσμευση της ένωσης στο LDH, ενώ η κορυφή στα 1355cm^{-1}, δηλώνει την συνύπαρξή της με ανθρακικά ιόντα που δεν έχουν απομακρυνθεί. Η εσωτερική δέσμευση της πρωτοπορφυρίνης εξακριβώνεται από τη μελέτη με περίθλαση ακτίνων Χ.

Ανάλυση LDH(Mg-Al)-acetate:

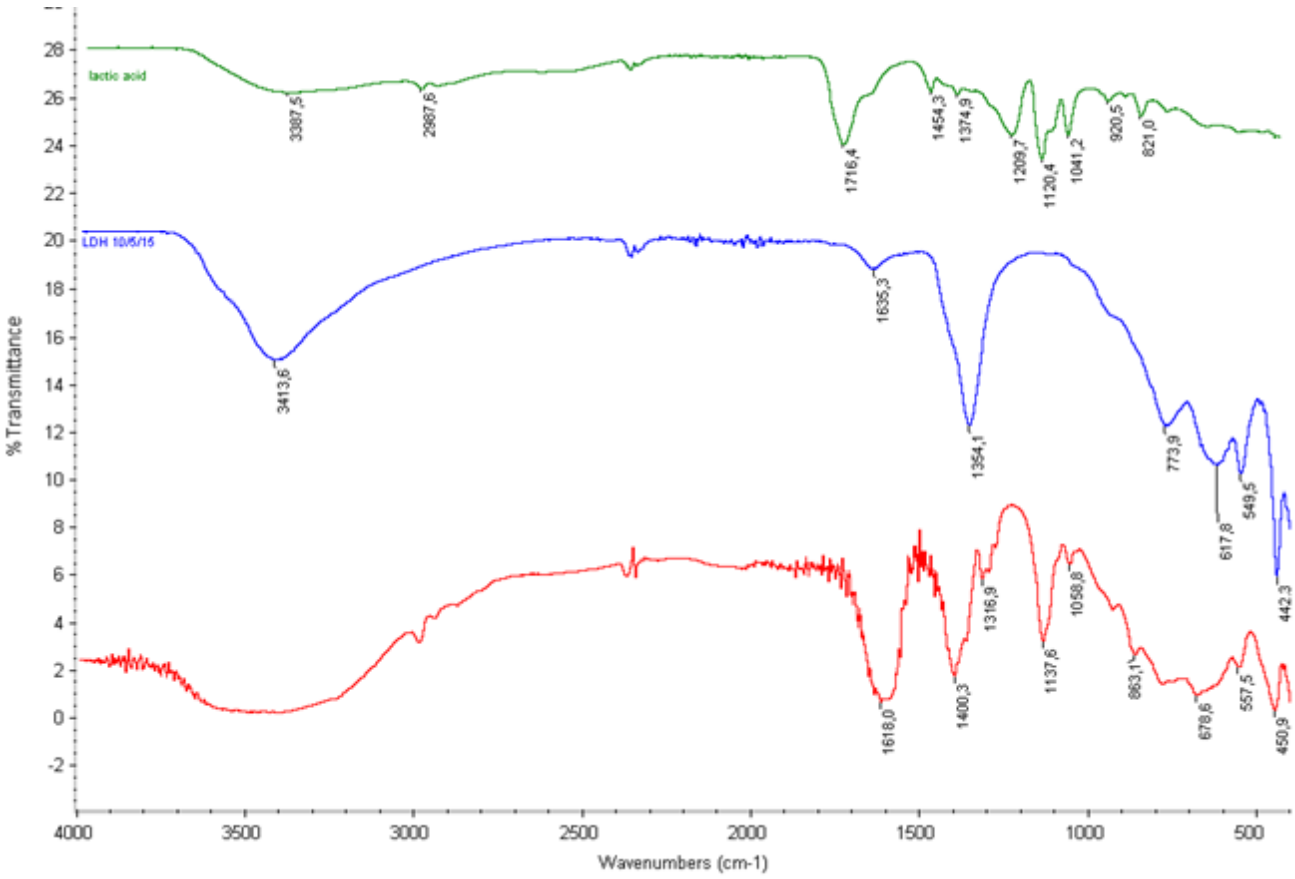


Εικόνα 3.14. Φάσμα υπερύθρου του LDH (Mg-Al)-acetate.

Το φάσμα εμφανίζει δονήσεις στα 1548,3 cm^{-1} και 1409,7 cm^{-1}, οι οποίες οφείλονται στη συμμετρική και ασύμμετρη δόνηση τάσης του COO^-.

Αντίστοιχα, η κορυφή στα 1363,7 cm^{-1} οφείλεται στην ομάδα –CH3 του ακετικού. Η ύπαρξη αυτών των κορυφών σε συνδυασμό με τη διαπλάτυνση των στρωμάτων στο αντίστοιχο διάγραμμα XRD, εξακριβώνουν την εσωτερική παγίδευση του ακετικού ανάμεσα στα στρώματα του LDH.

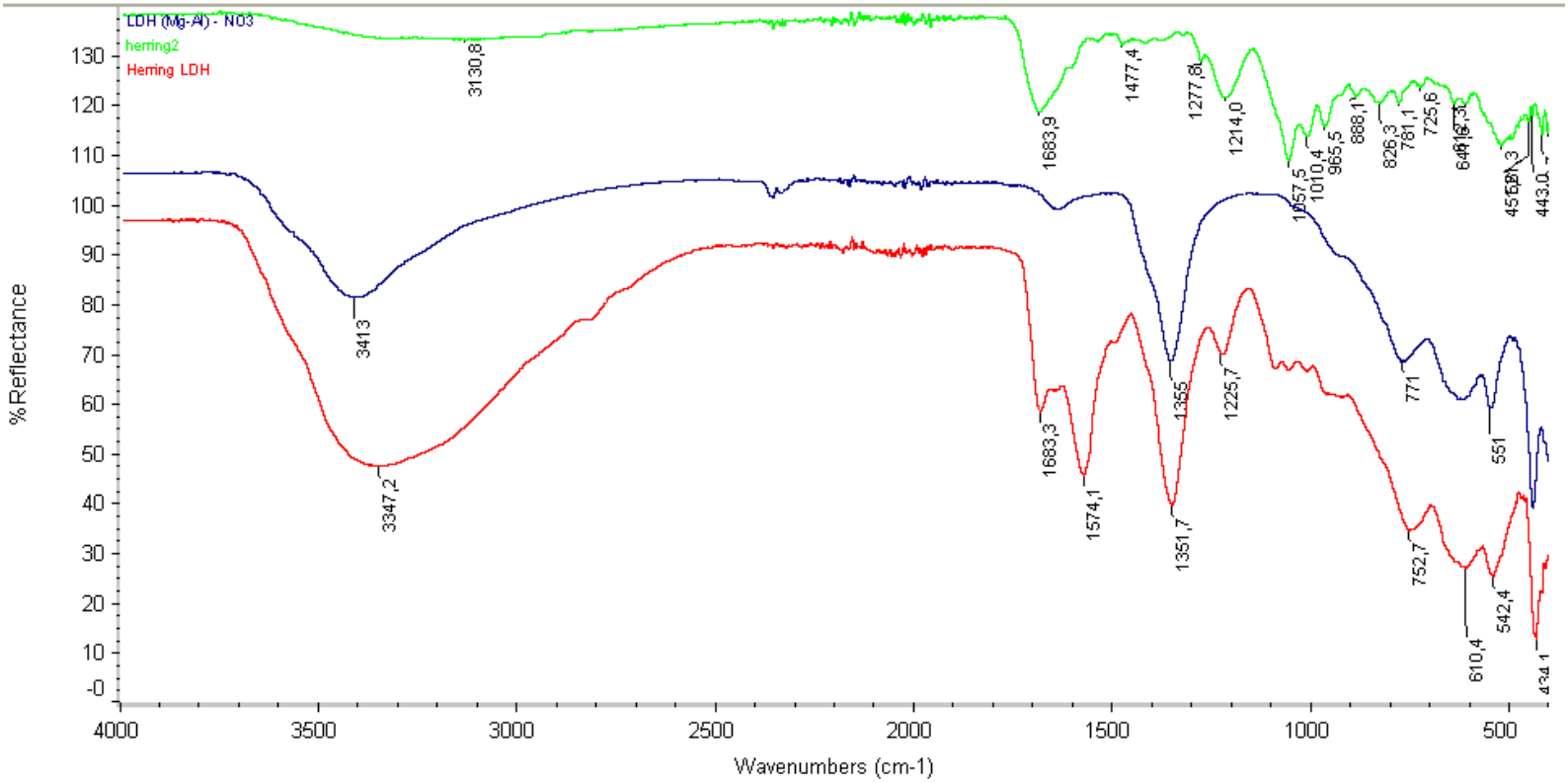
Ανάλυση LDH(Mg-Al)-lactate:



Εικόνα 3.15. Φάσμα υπερύθρου του LDH (Mg-Al)-lactate.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.15, υπάρχουν ευρείς ζώνες απορρόφησης στα 3413 cm^{-1} οι οποίες οφείλονται στις δονήσεις τάσης του υδροξυλίου, καθώς και στο νερό μεταξύ των στρωμάτων. Ιδιαίτερα έντονη απορρόφηση εμφανίζεται στα 1618 cm^{-1} και 1400 cm^{-1} η οποία οφείλεται στη συμμετρική και ασύμμετρη δόνηση τάσης του COO^-. Η κορυφή στα 1137,6 cm^{-1} μαζί με την χαμηλής έντασης κορυφή στα 1058,8 cm^{-1} ανήκουν στις δονήσεις τάσης του C OH. Η ύπαρξη αυτών των κορυφών μαζί με τις κορυφές

στα 400-700 cm^{-1} που είναι χαρακτηριστικές του LDH είναι αρκετές για να αποδείξουν την επιτυχή εισαγωγή του λακτικού ανάμεσα στη στοιβάδες.



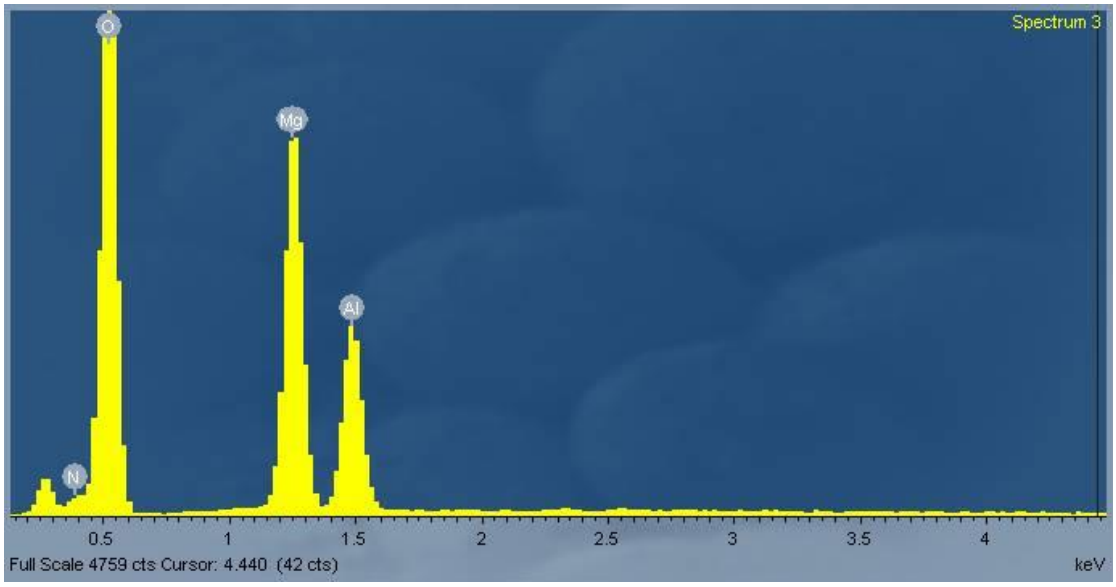
Ανάλυση LDH(Mg-Al)-DNA:

Εικόνα 3.16. Φάσμα υπερύθρου του LDH (Mg-Al)-DNA.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία[108,109] οι έντονες κορυφές που εμφανίζονται στο σχήμα αντιστοιχούν σε, συμμετρική δόνηση O-P-O στους 1057 cm^{-1}, ασύμμετρη δόνηση O-P-O στους 1214 cm^{-1} και δόνηση τάσης C=O των αμινομάδων στους 1683 cm^{-1}. Οι κορυφές μεταξύ 800-1010 cm^{-1} οφείλονται στις δονήσεις του σκελετού του DNA. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην κορυφή στους 1574 cm^{-1} η οποία οφείλεται στη δόνηση C=N του δαχτυλιδιού του ιμιδαζολίου, αλλά δεν υπάρχει στο αρχικό DNA. Εφόσον η ταυτοποίηση της ουσίας γίνεται πιστοποιώντας ότι το υβρίδιο LDH έχει τις ίδιες κορυφές με την προς παγίδευση ουσία, η εμφάνιση νέας κορυφής μας αποτρέπει από το να συμπεράνουμε με σιγουριά την επιτυχή προσθήκη.

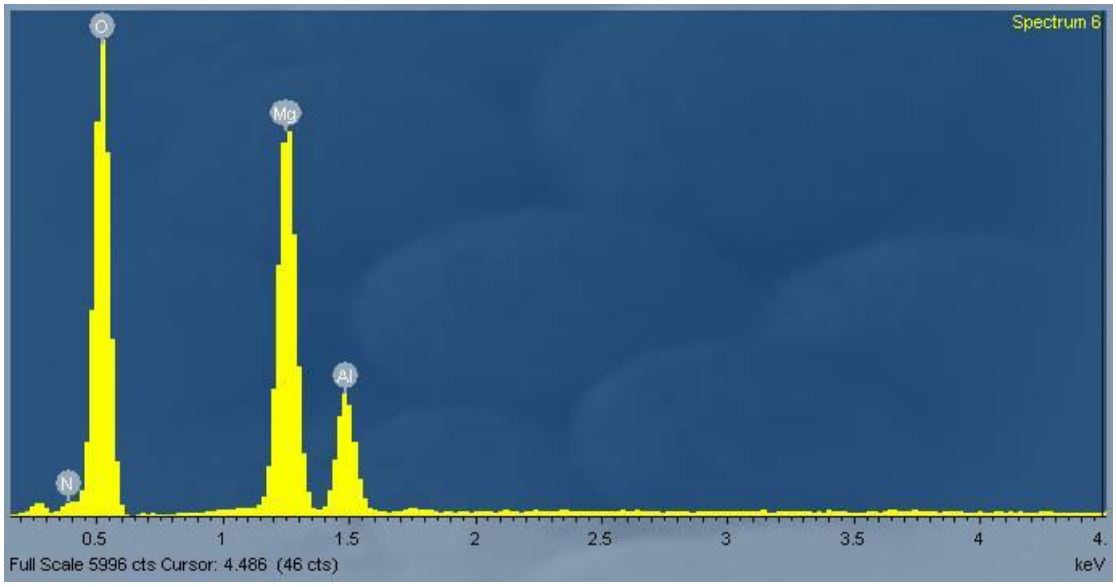
3.1.3 *Φασματοσκοπία ακτίνων Χ με ενεργειακή διασπορά*

Η τεχνική EDS χρησιμοποιήθηκε για την καλύτερη μελέτη των διαφορών στις αρχικές μήτρες LDH καθώς και για τον προσδιορισμό της απόλυτης αναλογίας μαγνησίου-αλουμινίου. Έτσι, στο LDH (Mg-Al) 2:1 τα ποσοστά κατά βάρος σε άζωτο, οξυγόνο, μαγνήσιο και αλουμίνιο ήταν 3,82 64,88 20,87 και 10,44 αντίστοιχα. Σημειώνεται ότι στην εικόνα 3.17 εμφανίζεται και μία κορυφή πριν του αζώτου, η οποία οφείλεται στον άνθρακα. Εφόσον κορυφές που να δείχνουν την ύπαρξή του στο προς μελέτη δείγμα, δεν υπάρχουν στα φάσματα XRD και IR, μπορούμε να πούμε με σιγουριά ότι η κορυφή αυτή οφείλεται στην ταινία άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε για την στερέωση του δείγματος. Η μεγάλη ποσότητα οξυγόνου είναι αναμενόμενη αφού τα μέταλλα ενώνονται μεταξύ τους με γέφυρες υδροξειδίων, ενώ τα ενδιάμεσα ανιόντα είναι νιτρικά. Η αναλογία κατά βάρος των δύο μετάλλων υπολογίζεται ακριβώς 2:1, ενώ αν πάρουμε υπ' όψη την ατομική αναλογία (15,40% Mg, 6.94% Al) υπολογίζεται ίση με 2,22:1.



Εικόνα 3.17. Φάσμα EDS LDH (Mg-Al) 2:1

Παρόμοια με τη μελέτη του παραπάνω LDH, στο LDH (Mg-Al) 3:1 τα ποσοστά κατά βάρος σε άζωτο, οξυγόνο, μαγνήσιο και αλουμίνιο ήταν 4,29 62,64 24,62 και 8,45. Η αναλογία κατά βάρος των δύο μετάλλων υπολογίζεται ακριβώς 3:1, ενώ αν πάρουμε υπ' όψη την ατομική αναλογία (18,26% Mg, 5,64% Al) υπολογίζεται ίση με 2,91:1.



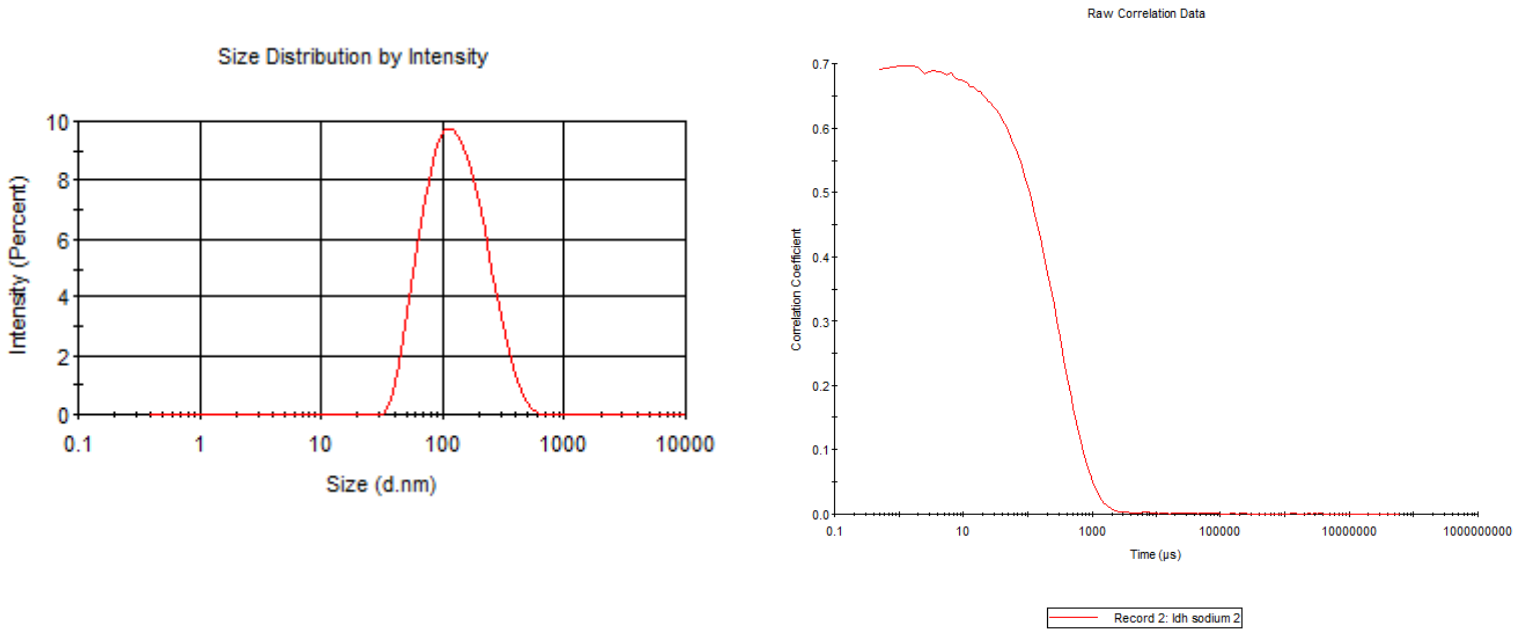
Εικόνα 3.18. Φάσμα EDS LDH (Mg-Al) 3:1

3.1.4 Δυναμική σκέδαση φωτός

Για απόδειξη ότι τα πειράματα αποστοίβαξης LDH όντως πέτυχαν, εξετάστηκε η ικανότητά τους να προξενούν φαινόμενο Tyndall:

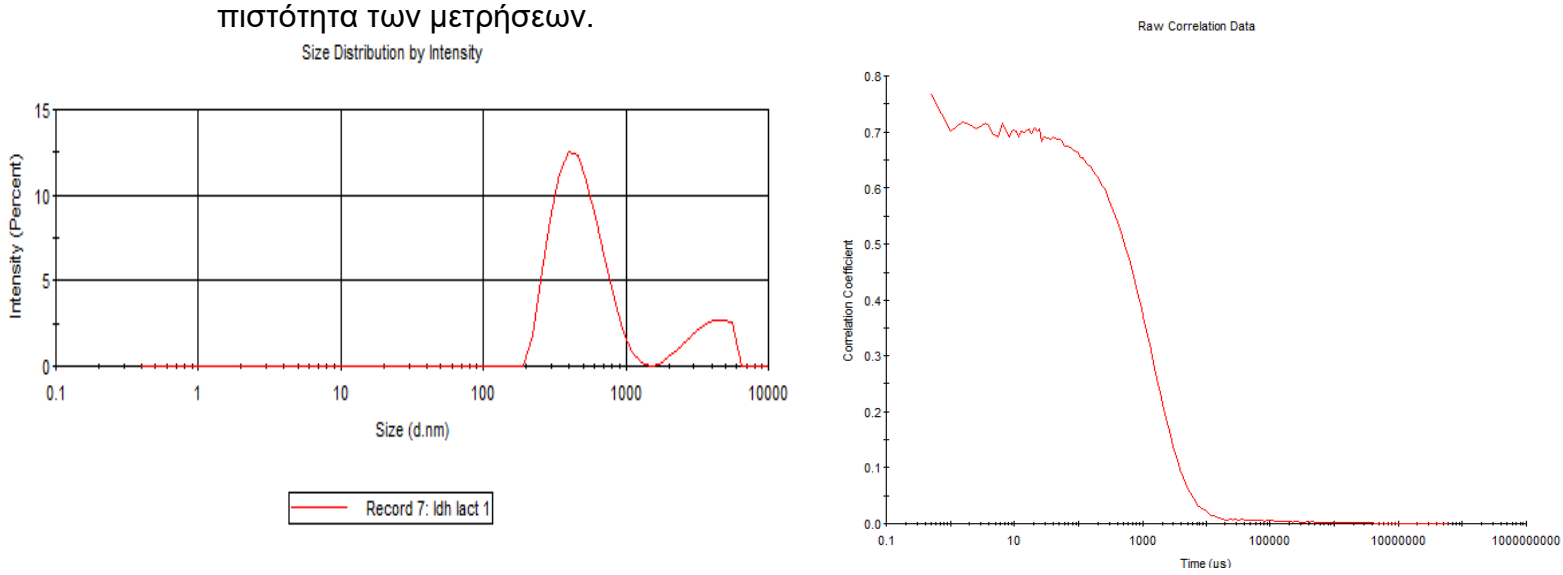
Εικόνα 3.19. Σκέδαση Tyndall σε διαλύματα αποστοιβαγμένων a) dLDH-acetate b) dLDH in formamide c) dLDH-lactate.

Εφόσον τα αποστοιβαγμένα LDH που παρήχθησαν μπορούσαν να εμφανίσουν φαινόμενο Tyndall μελετήθηκαν στη συνέχεια με σκέδαση φωτός σε διάταξη όπως αναφέρθηκε στο πειραματικό. Σημειώνεται ότι το LDH αποστοιβαγμένο σε φορμαμίδιο ήταν αδύνατο να μετρηθεί σε αυτή τη διάταξη.



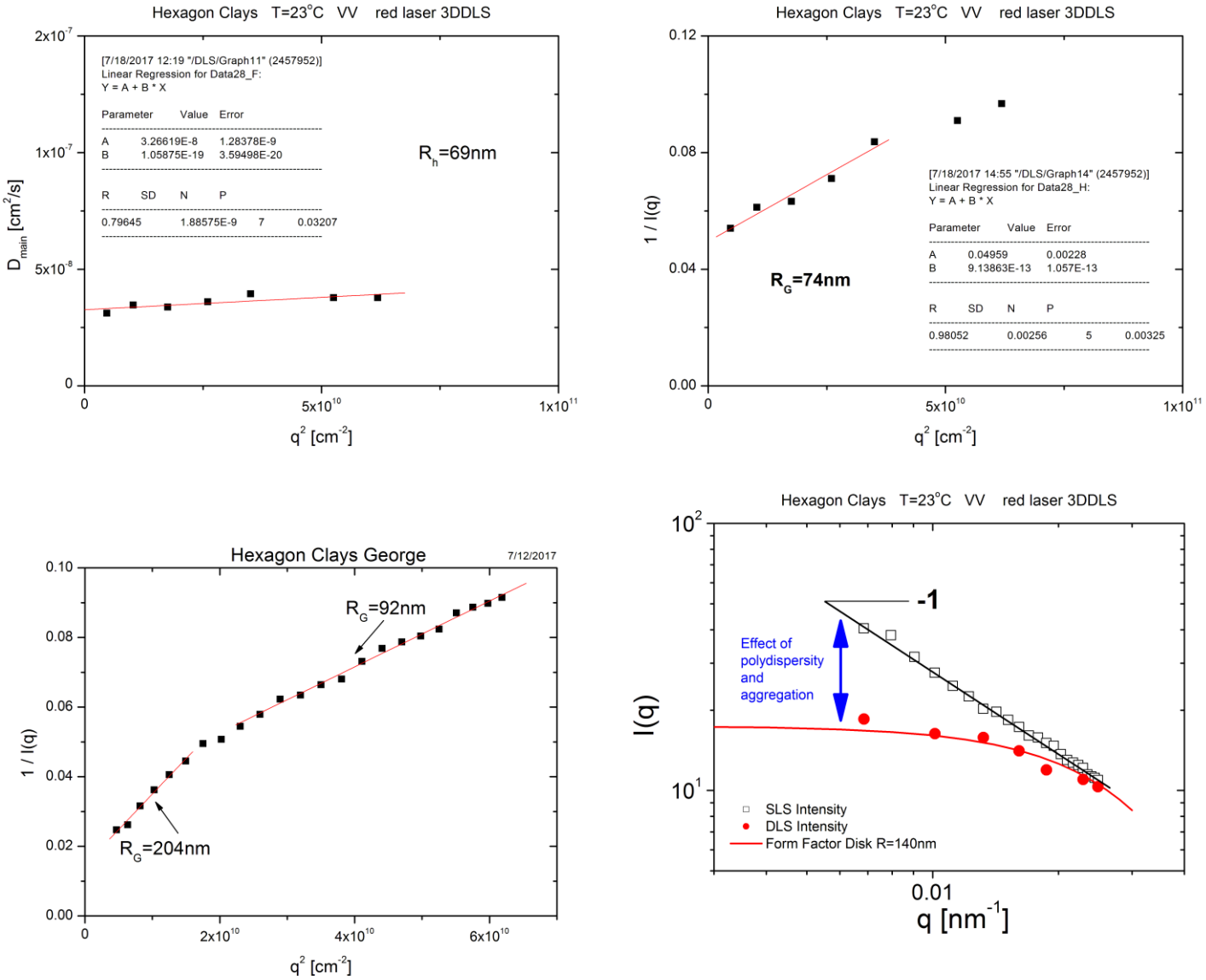
Εικόνα 3.20. Διαγράμματα σκέδασης φωτός dLDH-acetate.

Από τα παραπάνω διαγράμματα μπορούμε να δούμε ότι το μέσο μέγεθος των αποστοιβαγμένων LDH-acetate είναι τα 109nm. Ταυτόχρονα η σχεδόν τέλεια σιγμοειδής καμπύλη στο συντελεστή συσχέτισης ενισχύει την πιστότητα των μετρήσεων.



Εικόνα 3.21. Διαγράμματα σκέδασης φωτός dLDH-lactate.

Σε αντίθεση με το LDH-acetate σε αυτήν την περίπτωση το αποστοιβαγμένο LDH εμφανίζει πολύ μεγαλύτερα συσσωματώματα στα 509nm. Η κορυφή κοντά στα 5000nm οφείλεται σε σκόνη που υπήρχε στο διάλυμα. Η γενική αύξηση στο μέγεθος των σωματιδίων του αιωρήματος οφείλεται στο ότι αυτό το αιώρημα φτιάχτηκε με τη χρήση σκόνης LDH-lactate που είχε στεγνώσει, σε αντίθεση με το LDH-acetate που φτιάχτηκε από αραίωση υγρού διαλύματος.

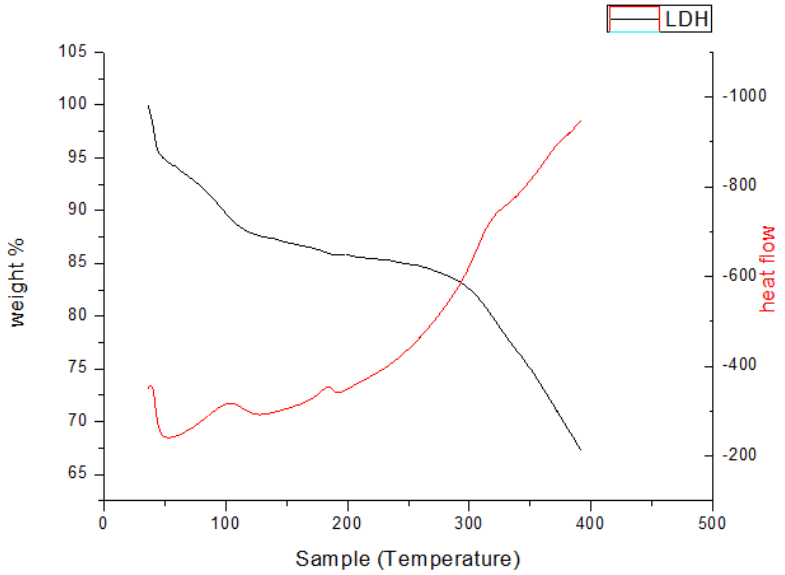


Εικόνα 3.22. Διαγράμματα στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός dLDH-acetate.

Το αποστοιβαγμένο LDH με ακετικό μελετήθηκε σε μεγαλύτερο βάθος με στατική και δυναμική σκέδαση φωτός. Λόγο της πολυδιασποράς και μερικής συσσωμάτωσης, όπως φαίνεται στο 4° διάγραμμα, τα αποτελέσματα της στατικής σκέδασης φωτός δεν είναι ακριβή ποσοτικά αλλά έχουν ενδιαφέρον ποιοτικά. Από τα παραπάνω διαγράμματα υπολογίστηκε ότι η υδροδυναμική ακτίνα είναι 69nm και ακτίνα περιστροφής 74nm. Το fit που εφαρμόστηκε στο διάγραμμα είχε παράγοντα μορφής για δίσκους με αμελητέο πάχος και βρήκε μέγεθος 140nm. Το μέγεθος εμφανίζεται μεγαλύτερο από αυτό που μετρήθηκε σε προηγούμενα στάδια. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κατά τη μέτρηση το δείγμα έμεινε για μεγάλο χρονικό διάστημα σε επαφή με τον αέρα και ανθρακικά προσκολλήθηκαν στα στρώματα LDH αναγκάζοντάς τα να επαναστοιβαχτούν λόγο των αυξημένων δυνάμεων που αναπτύχθηκαν. Τα παραπάνω στοιχεία οδηγούν στο ότι το dLDH-acetate έχει αποστοιβαχτεί πλήρως, αλλά τα πειράματα πρέπει να επαναληφθούν σε συνθήκες αζώτου ή κενού.

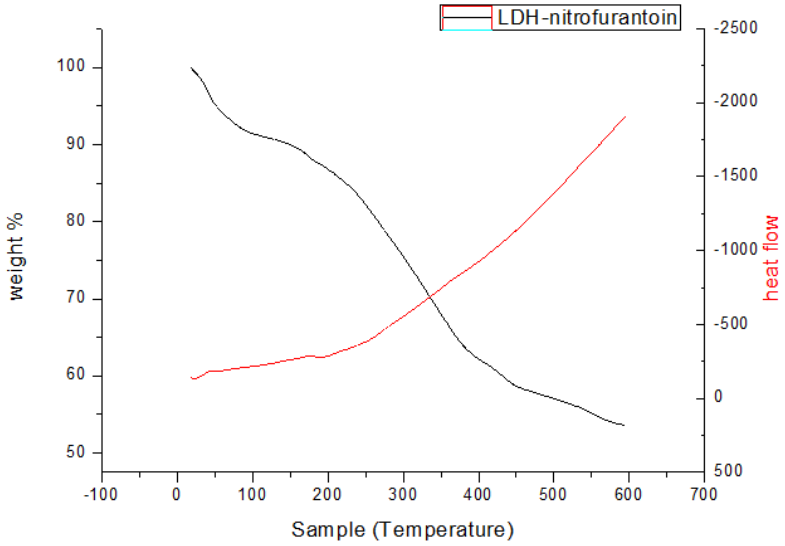
3.1.5 Θερμοσταθμική Ανάλυση

Η καμπύλη θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA) για το LDH(Mg-Al)NO_3 απεικονίζεται στην εικόνα 3.23. Αρχικά, εμφανίζεται μια αρχική μείωση του βάρους της τάξης του 8% κατά την αύξηση της θερμοκρασίας, από θερμοκρασία δωματίου στους 125°C. Η απώλεια αυτή οφείλεται στην απομάκρυνση νερού από τα εσωτερικό των στοιβάδων. Επόμενη απώλεια βάρους, της τάξης του 6%, παρατηρείται μεταξύ 150 και 200 ^{o}C, λόγω της αποϋδροξυλίωσης των ανόργανων στοιβάδων. Από το αντίστοιχο διάγραμμα ενεργειακής ροής παρατηρούνται οι ενδόθερμες μεταβολές, κατά τα στάδια απώλειας βάρους.



Εικόνα 3.23. Διάγραμμα θερμικής ανάλυσης του LDH(Mg-Al)-NO_3.

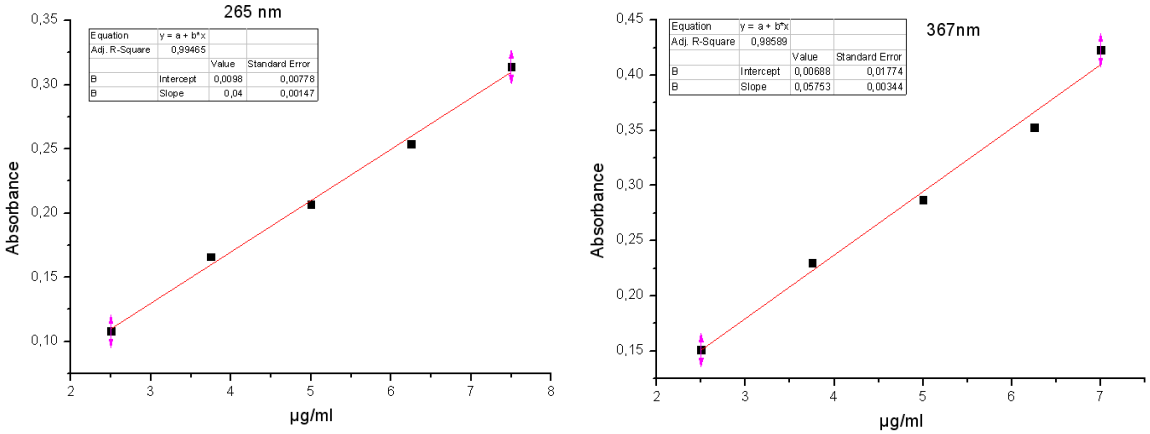
Στο σχήμα 18 απεικονίζεται η θερμική ανάλυση του LDH με συναρμοσμένη νιτροφουραντοΐνη. Το διάγραμμα αυτό εμφανίζει διαφορές με το διάγραμμα του σκέτου LDH. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίζεται μόνο μία απότομη μείωση βάρους, ξεκινώντας από τη θερμοκρασία δωματίου ως τους 200°C. Η απώλεια βάρους αυτή τη φορά είναι λιγότερο απότομη και μικρότερου μεγέθους (περίπου 3%). Αυτό δηλώνει την καύση διαφορετικής ουσίας, και μάλλον οφείλεται στην καύση του συνόλου της νιτροφουραντοΐνης. Άλλη απότομη μείωση βάρους δεν παρατηρείται.



Εικόνα 3.24. Διάγραμμα θερμικής ανάλυσης του LDH(Mg-Al)-nitrofurantoin.

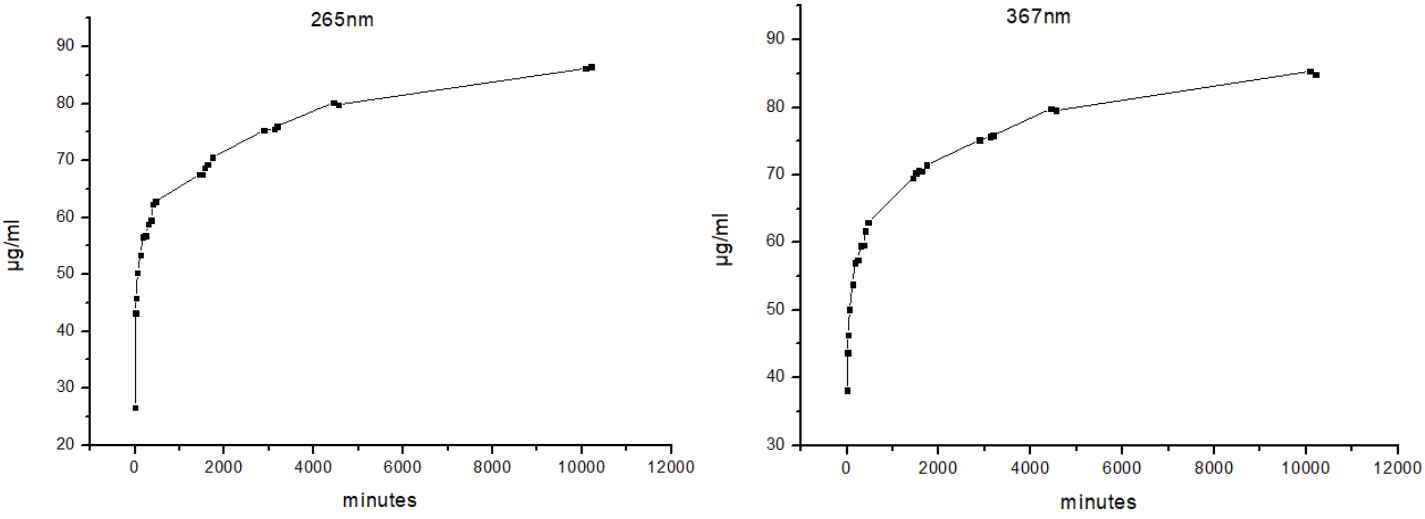
3.2 Έλεγχος ρυθμού απελευθέρωσης ουσίας από LDH

Αρχικά, μετρώντας τις απορροφήσεις των γνωστών διαλυμάτων, φτιάχτηκαν πρότυπες καμπύλες. Εφόσον παρατηρήθηκε μέγιστο σε δύο μήκη κύματος, για μεγαλύτερη ακρίβεια και για επαλήθευση των υπολογισμών στο άγνωστο, δημιουργήθηκαν δύο πρότυπες:



Εικόνα 3.25. Πρότυπες καμπύλες απορρόφησης της νιτροφουραντοΐνης.

Στη συνέχεια, μετρώντας τα δείγματα που λήφθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα και μετατρέποντας τις απορροφήσεις σε συγκέντρωση, με βάση τις πρότυπες καμπύλες, παίρνουμε δύο διαγράμματα απελευθέρωσης:

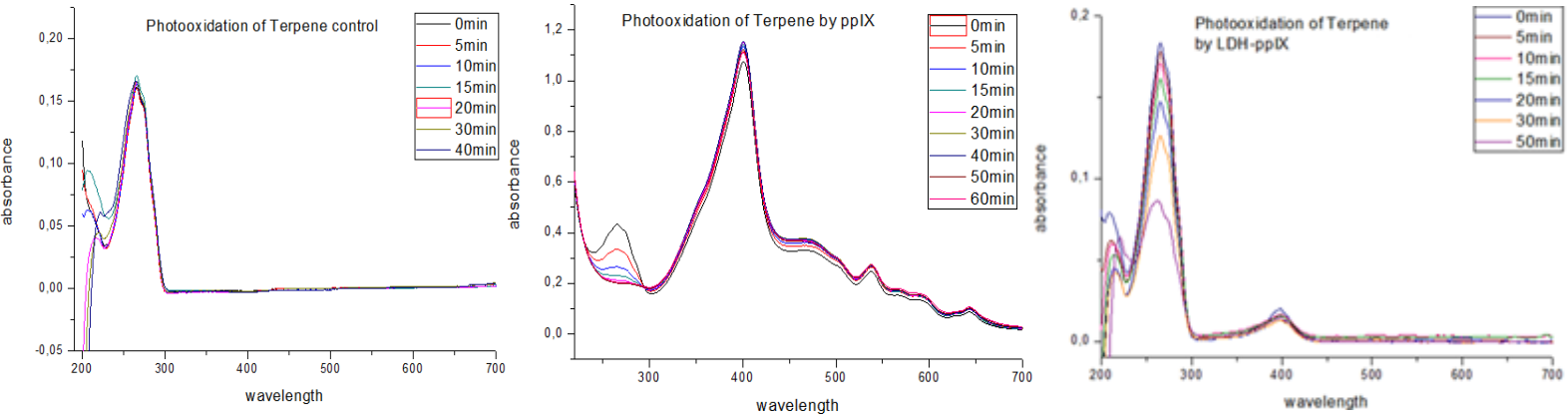


Εικόνα 3.26. Καμπύλες απελευθέρωσης της νιτροφουραντοΐνης ως προς το χρόνο.

Η απελευθέρωση της νιτροφουραντοΐνης στο υδατικό διάλυμα NaCl είναι αρκετά γρήγορη, με απελευθέρωση της μισής την πρώτη ώρα και απελευθέρωση περίπου των 2/3 της ουσίας στις πρώτες έξι ώρες. Η απελευθέρωση αυτή είναι δυνατή, καθώς το διάλυμα περιέχει ανιόντα Cl^-, από το προστιθέμενο NaCl τα οποία αντικαθιστούν τη νιτροφουραντοΐνη ανάμεσα στις στιβάδες. Ο γρήγορος ρυθμός απελευθέρωσης ενισχύεται επιπλέον από την υδατοδιαλυτότητα του φαρμάκου. Μικρές ανωμαλίες στο ρυθμό απελευθέρωσης του φαρμάκου μπορεί να εμφανίζονται, διότι με κάθε λήψη δείγματος για μέτρηση, το διάλυμα ερχόταν σε επαφή με την ατμόσφαιρα, από όπου προσλάμβανε ανθρακικά ανιόντα τα οποία βοηθούσαν στην περαιτέρω αντικατάσταση νιτροφουραντοΐνης από το LDH.

3.3 Έλεγχος δραστικότητας ακινητοποιημένης ουσίας

Στην εικόνα 3.27 φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis τερπινενίου κατά την κατεργασία του από πρωτοπορφυρίνη IX, και υβρίδιο LDH-ppIX.



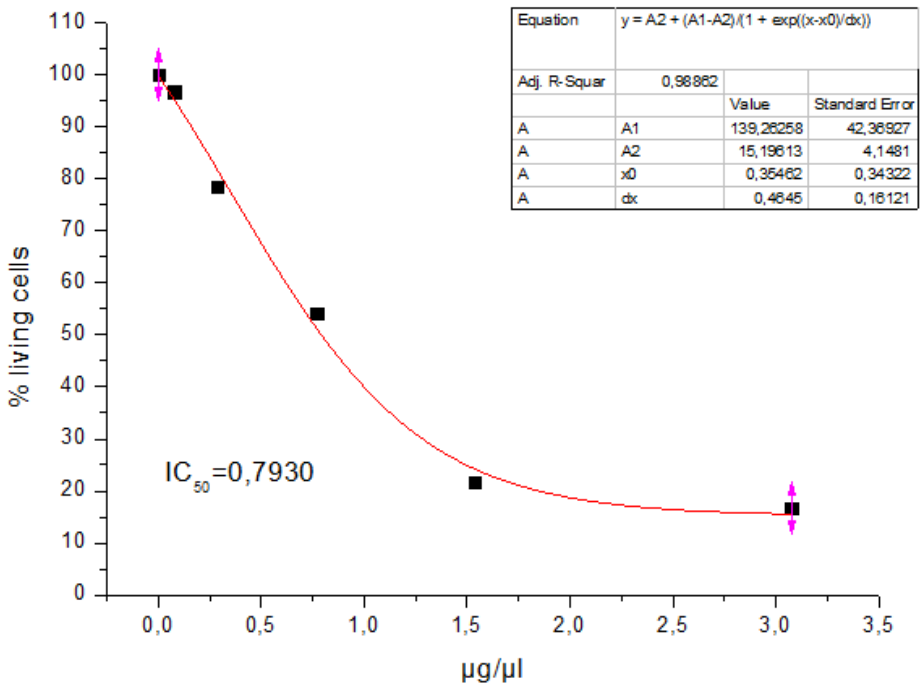
Εικόνα 3.27: Φάσματα απορρόφησης οξειδωμένου τερπινενίου από πρωτοπορφυρίνη IX και ακινητοποιημένης σε LDH πρωτοπορφυρίνης IX.

Από το πρώτο διάγραμμα, αποδεικνύεται ότι το τερπινένιο δεν οξειδώνεται από το φως, χωρίς την επίδραση της πρωτοπορφυρίνης. Στο δεύτερο διάγραμμα, όπου παρουσιάζεται η αντίδραση φωτοοξείδωσης από ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη, παρατηρείται η σταδιακή μείωση του τερπινενίου

κατά τη φωτοοξείδωση με την πάροδο του χρόνου. Το παραπάνω φαινόμενο παρουσιάζεται και στο τρίτο πείραμα, όπου η οξείδωση γίνεται από πρωτοπορφυρίνη συναρμοσμένη στο LDH. Από το πείραμα αυτό αποκαλύπτεται η ικανότητα της πρωτοπορφυρίνη να δράσει αφού ακινητοποιηθεί σε LDH. Αυτή η ικανότητα είναι μεγάλης σημασίας, εφόσον το LDH μελετάται σαν μήτρα για drug delivery.

3.4 Έλεγχος τοξικότητας LDH σε καρκινικά

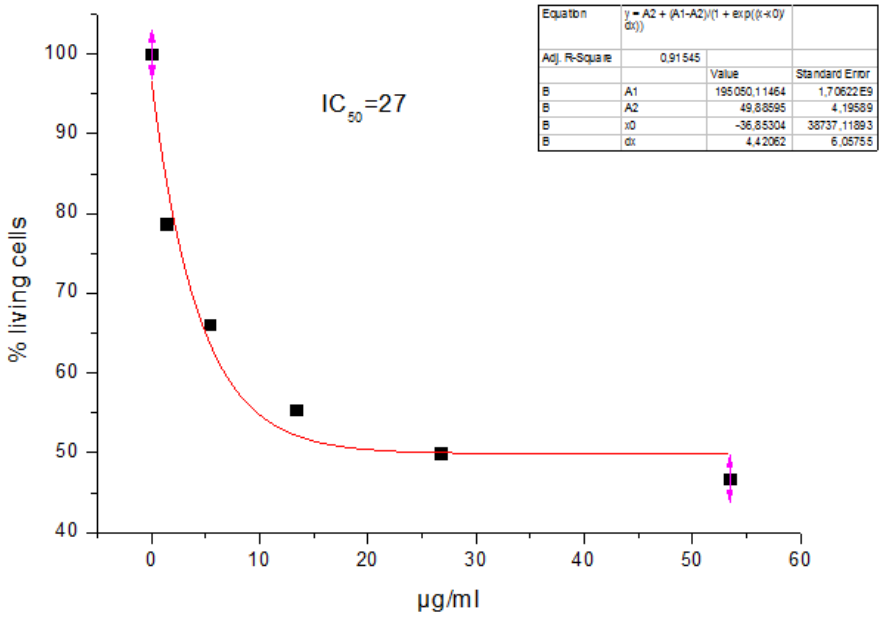
Οι ιδιότητες εισαγωγής, μεταφοράς και ελεγχόμενης απελευθέρωσης ουσιών συναρμοσμένων στο LDH έχουν μελετηθεί εκτενώς[110]. Για να μπορεί όμως ένα μόριο να χρησιμοποιηθεί για μεταφορά φαρμάκων, πρέπει το ίδιο να μην είναι τοξικό προς τον οργανισμό. Με αυτή τη σκέψη διεκπεραιώθηκε το πείραμα και βρέθηκε η τοξικότητα του LDH σε καρκινικά κύτταρα HeLa. Με τη χρήση της μεθόδου MTT μετρήθηκε το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων μετά την επώαση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις φαρμάκων.



Εικόνα 3.28. Διάγραμμα συσχέτισης συγκέντρωσης LDH με ποσοστό ζωντανών κυττάρων.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, το LDH εμφανίζει χαμηλή, έως ελάχιστη τοξικότητα. Το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων, ελαττώνεται σημαντικά σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις, όπου τα κύτταρα δεν μπορούν να επιβιώσουν αφού «πνίγονται» λόγο εξαιρετικής πυκνότητας του διαλύματος. Η συγκέντρωση του φαρμάκου που χρειάζεται για να μειώσει το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων στο 50% (IC_{50}), υπολογίστηκε ίση με 0,7930μg/μl. Τοξικότητα τέτοιου επιπέδου είναι αποδεκτή για τη χρήση μιας ουσίας για μεταφορά φαρμάκων.

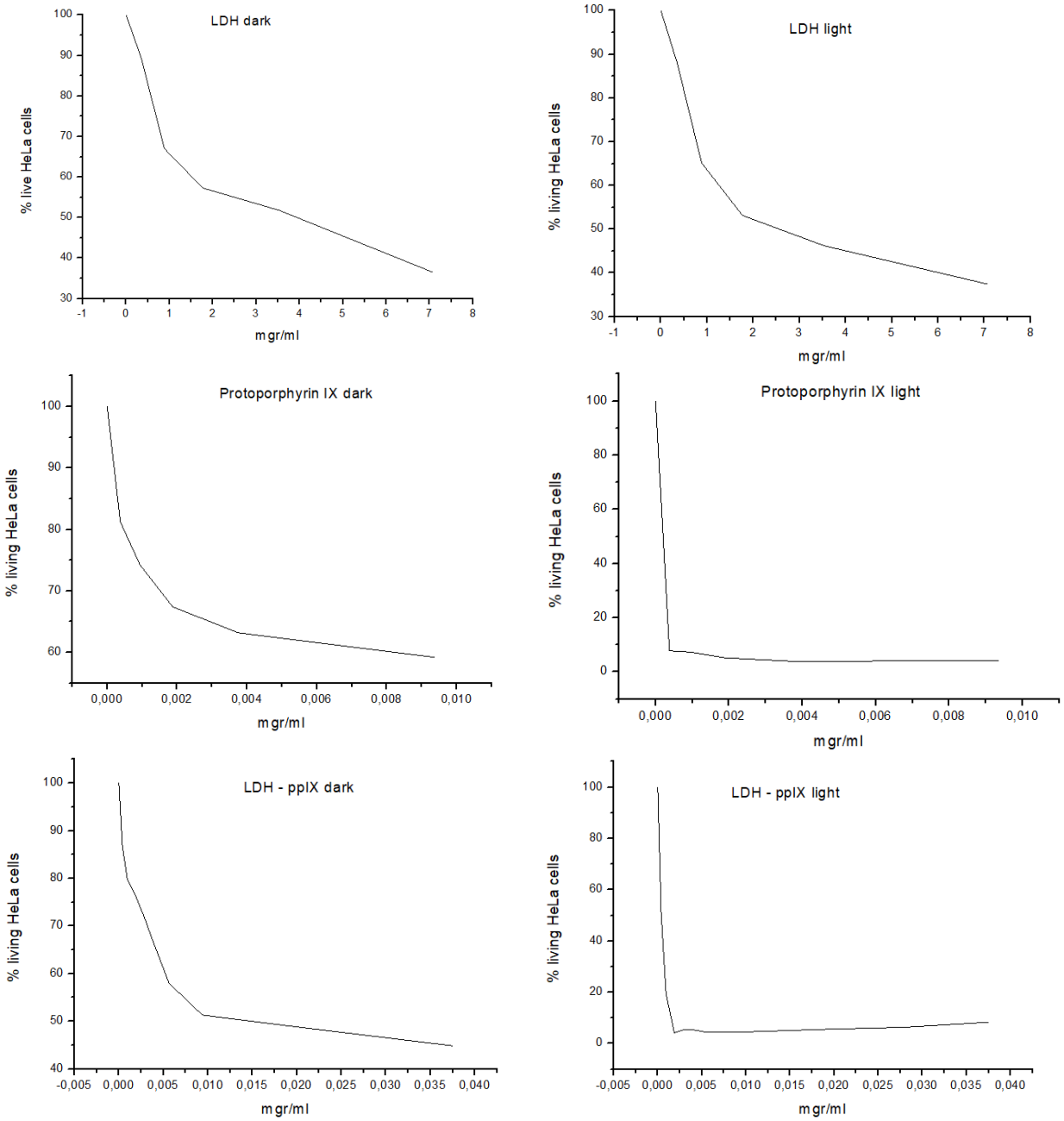
Στη συνέχεια, μελετήθηκε η τοξικότητα της πρωτοπορφυρίνης IX. Εφόσον η πρωτοπορφυρίνη IX μελετάται σαν πιθανό αντικαρκινικό φάρμακο, που θα μεταφερθεί με τη χρήση LDH, είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε την ακριβή τοξικότητά του.



Εικόνα 3.29. Διάγραμμα συσχέτισης συγκέντρωσης ppIX με ποσοστό ζωντανών κυττάρων.

Αν και το διάλυμα πρωτοπορφυρίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν αρκετά πιο αραιό από αυτό του LDH, παρατηρείται τοξικότητα. Σύμφωνα με το σχήμα, η τοξικότητα της πρωτοπορφυρίνης αρχικά αυξάνεται απότομα, ενώ στη συνέχεια παραμένει σχεδόν σταθερή. Από ένα σημείο και μετά αύξηση της συγκέντρωσης πρωτοπορφυρίνης IX στο διάλυμα δεν σημαίνει αύξηση νεκρών καρκινικών κυττάρων. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε σφάλμα

σχεδιασμού του πειράματος, αφού λόγω της αρχικής απότομης μείωσης των ζωντανών κυττάρων, δεν μπόρεσε να σχηματιστεί μια σιγμοειδής καμπύλη, όπως είναι απαραίτητο. Το IC_{50} υπολογίστηκε ίσο με 27μg/ml, κάτι που συμφωνεί με τη βιβλιογραφία[111]. Σε αυτό το πείραμα μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα της πρωτοπορφυρίνης IX στο σκοτάδι. Εφόσον η πρωτοπορφυρίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για φωτοδυναμική θεραπεία του καρκίνου, το πείραμα επαναλήφθηκε για να γίνει η σύγκριση δραστικότητας σε σκοτάδι και φως.



Εικόνα 3.30. Διάγραμμα συσχέτισης συγκέντρωσης LDH, ppIX και LDH-ppIX με ποσοστό ζωντανών κυττάρων σε σκοτάδι και φως.

Όπως και στα προηγούμενα πειράματα εμφανίζεται η ισχυρή τοξικότητα της πρωτοπορφυρίνης όταν αυτή εισαχθεί στα καρκινικά κύτταρα. Η τοξικότητα, όμως, ανεβαίνει εκθετικά όταν τα κύτταρα επωάζονται σε φως, όπου η πρωτοπορφυρίνη δρα σαν φωτοευαισθητοποιητής δημιουργώντας ρίζες οξυγόνου που σκοτώνουν το κύτταρο. Πιο συγκεκριμένα, στο πείραμα επώασης με ελεύθερη πρωτοπορφυρίνη, σε ποσότητες που στο σκοτάδι επιβιώνουν το 80% των κυττάρων, στο φως δεν επιβιώνει κανένα. Έτσι αν και η πρωτοπορφυρίνη IX είναι τοξική για τα κύτταρα, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε χαμηλές ποσότητες και να γίνει περεταίρω στόχευση χρησιμοποιώντας φως για την αύξηση της τοξικότητας σε θανάσιμα επίπεδα μόνο στα επιθυμητά κύτταρα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ίδια συμπεριφορά εμφανίζεται και όταν η πρωτοπορφυρίνη είναι παγιδευμένη ανάμεσα στις στοιβάδες του LDH.

Αν και τα πειράματα δίνουν πολύ θετικά αποτελέσματα για τη χρήση της πρωτοπορφυρίνης IX σαν φωτοευαισθητοποιητή, καθώς και για τη χρήση του LDH σαν μεταφορέας φαρμάκων, τα πειράματα πρέπει να επαναληφθούν σε μικρότερες συγκεντρώσεις, καθώς η πολύ απότομη αύξηση τοξικότητας δεν επέτρεψε τον υπολογισμό IC_{50}.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα χρήσης των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων σε βιολογικές εφαρμογές. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα που περιλάμβαναν τη σύνθεση, το χαρακτηρισμό και την εφαρμογή νανοϋβριδίων. Κατά τη σύνθεση μελετήθηκαν τρεις διαφορετικοί μέθοδοι παγίδευσης ανιόντων στο εσωτερικό των LDH και συγκρίθηκε η αποτελεσματικότητα της καθεμίας. Συνολικά, συντέθηκαν με επιτυχία 6 διαφορετικά υλικά: τα νανοϋβρίδια LDH-cholate, LDH-nitrofurantoin, LDH-protoporphyrin IX, LDH-lactate, LDH-acetate και LDH-DNA.

Το τρίτο από αυτά τα υλικά αναλύθηκε περαιτέρω. Για το νανοϋβρίδιο αυτό, βρέθηκε, ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη φωτοδυναμική θεραπεία, αφού ήταν ικανό να οδηγήσει στη θανάτωση κυττάρων παρουσία φωτός. Η τοξικότητα του LDH σε καρκινικά HeLa και το IC50 μετρήθηκε. Το μέγεθος του IC50 βρέθηκε ελάχιστο, επιβεβαιώνοντας ότι LDH μπορεί να δράσει σαν μήτρα για μεταφορά φαρμάκων, αφού το ίδιο δεν επηρεάζει τα κύτταρα. Αντίθετα το υβρίδιο LDH-ppIX βρέθηκε ότι σε μικρές συγκεντρώσεις, ενώ στο σκοτάδι δεν είναι ιδιαίτερα τοξικό, όταν βρίσκεται κάτω από φωτεινή ακτινοβολία, η τοξικότητά του εκτινάσσεται. Αυτή η ιδιότητα του υβριδίου, μαζί με το γεγονός ότι μπορεί να μεταβολιστεί και να απομακρυνθεί από τον οργανισμό, το καθιστά ιδανικό για χρήση στη φωτοδυναμική θεραπεία. Επόμενος σταθμός της έρευνας θα ήταν να τροποποιηθεί χημικά η επιφάνεια του υβριδίου, για να μπορεί να γίνει καλύτερη στόχευση των καρκινικών κυττάρων μέσα στον οργανισμό.

Από τα παραπάνω νανοβιοϋβρίδια δύο από αυτά, συγκεκριμένα το LDH-lactate και το LDH-acetate παρήχθησαν όχι για το βιολογικό τους ενδιαφέρον, αλλά για να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια στην αποστοίβαξη του LDH. Έτσι, χρησιμοποιώντας τα δύο υβρίδια μελετήθηκε η δυνατότητα αποστοίβαξής του στο νερό. Ταυτόχρονα, μελετήθηκε και η αποστοίβαξη σε οργανικούς διαλύτες με το φορμαμίδιο να έχει τη μόνη επιτυχία. Η επιτυχής δημιουργία αποστοιβαγμένου LDH διεύρυνε τα είδη ανιόντων που θα μπορούσαν να εισαχθούν στο LDH, είτε με απλή προσρόφηση είτε με

επαναστοίβαξη παρουσία του ανιόντος. Τελικά, τα αποστοιβαγμένα LDH χρησιμοποιήθηκαν για την παγίδευση DNA, σε μια προσπάθεια να φτιαχτεί ένα υβρίδιο που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη γονιδιακή θεραπεία. Αν και η παρασκευή του υβριδίου ήταν επιτυχής, αξίζει να γίνουν περεταίρω πειράματα μελέτης του. Πρώτα πρέπει να εξεταστεί το μέγεθος του τμήματος DNA που κατάφερε να παγιδευτεί, αφού πρέπει να εξεταστεί και η αρχική υπόθεση, ότι το LDH μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν φορέας στη μέθοδο Crispr. Τέλος, αξίζει να γίνουν μελέτες απελευθέρωσης DNA από τη μήτρα LDH, καθώς και μετρήσεις σε confocal για την μελέτη του μηχανισμού εισαγωγής του στο κύτταρο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Niemeyer, C. M. Nanoparticles, Proteins and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 4128-4158.

(2) Gómez-Romero, P.; Sanchez, C.: *Functional Hybrid Materials*; WILEYVCH,: Weinheim: Germany, 2004.

(3) Ruiz-Hitzky, E.; Van Meerbek, A. Polymer–clay nanocomposites. *Handbook of Clay Science* **2004**.

(4) P. Fratzl; H. S. Gupta; E. P. Paschalisb; Roschgerb, P. Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone. *Journal of Materials Chemistry* **2004**, 2115-2123.

(5) Bettye L. Smith; Tilman E. Schaffer; Mario Viani; James B. Thompson; Neil A. Frederick; Johannes Kindt; Angela Belcher; Galen D. Stucky; Daniel E. Morse; Hansma, P. K. Molecular mechanistic origin of the toughness of natural adhesives, fibres and composites. *Nature* **1999**, *399*, 761-763.

(6) Tang, Z.; Kotov, N. A.; Magonov, S.; Ozturk, B. Nanostructured artificial nacre. *Nat Mater* **2003**, *2*, 413-418.

(7) Kikuchi, M.; Itoh, S.; Ichinose, S.; Shinomiya, K.; Tanaka, J. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. *Biomaterials* **2001**, *22*, 1705-1711.

(8) Berry, C. C. Possible exploitation of magnetic nanoparticle-cell interaction for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry* **2005**, *15*, 543-547.

(9) Gao, X., Yang, L., Petrow, 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*, 63-72.

(10) Kreuter, J. Nanoparticles - a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *331*, 1-10.

(11) Kano, M. R. Nanotechnology and tumor microcirculation. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2014**, *74*, 2-11.

(12) Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release* **2000**, *65*, 271-284.

(13) Iyer, A. K.; Khaled, G.; Fang, J.; Maeda, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discovery Today* **2006**, *11*, 812-818.

(14) Muggia, F. M. Doxorubicin-Polymer Conjugates: Further Demonstration of the Concept of Enhanced Permeability and Retention. *Clinical Cancer Research* **1999**, *5*, 7.

(15) Lee, E. S.; Gao, Z.; Bae, Y. H. Recent progress in tumor pH targeting nanotechnology. *Journal of Controlled Release* **2008**, *132*, 164-170.

(16) Das, M.; Mardyani, S.; Chan, W. C. W.; Kumacheva, E. Biofunctionalized pH-Responsive Microgels for Cancer Cell Targeting: Rational Design. *Advanced Materials* **2006**, *18*, 80-83.

(17) Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nano* **2007**, *2*, 751-760.

(18) Duncan, R. Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nat Rev Cancer* **2006**, *6*, 688-701.

(19) Lu, Y.; Low, P. S. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 675-693.

(20) Brannon-Peppas, L.; Blanchette, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56*, 1649-1659.

(21) Torchilin, V. P.; Lukyanov, A. N. Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 259-266.

(22) 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*, 874-879.

(23) Meng, W.; Li, F.; Evans, D. G.; Duan, X. Preparation and intercalation chemistry of magnesium–iron(III) layered double hydroxides containing exchangeable interlayer chloride and nitrate ions. *Materials Research Bulletin* **2004**, *39*, 1185-1193.

(24) Cavvani F, T. F., Vaccari A. Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications. *Catalysis Today* **1991**, *11*, 173-301.

(25) Ogawa, M.; Kaiho, H. Homogeneous Precipitation of Uniform Hydrotalcite Particles. *Langmuir* **2002**, *18*, 4240-4242.

(26) Zhao, Y.; Li, F.; Zhang, R.; Evans, D. G.; Duan, X. Preparation of Layered Double-Hydroxide Nanomaterials with a Uniform Crystallite Size Using a New Method Involving Separate Nucleation and Aging Steps. *Chemistry of Materials* **2002**, *14*, 4286-4291.

(27) Choy, J. K., S.; Jeong, Y.; Park, J. Inorganic Layered Double Hydroxides as Nonviral Vectors. *Angewandte Chemie International Edition* **2000**, *39*, 4041-4045.

(28) Meyn, M.; Beneke, K.; Lagaly, G. Anion-exchange reactions of layered double hydroxides. *Inorganic Chemistry* **1990**, *29*, 5201-5207.

(29) Reichle, W. T. Synthesis of anionic clay minerals (mixed metal hydroxides, hydrotalcite). *Solid State Ionics* **1986**, *22*, 135-141.

(30) 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*, 73-84.

(31) Goldstein, J.; Newbury, D. E.; Joy, D. C.; Lyman, C. E.; Echlin, P.; Lifshin, E.; Sawyer, L.; Michael, J. R.: *SCANNING ELECTRON MICROSCOPY AND X-RAY MICROANALYSIS: THIRD EDITION*; Springer, 2013. pp. XIX, 689.

(32) Schärtl, W.: *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007. pp. 191.

(33) Roduner, E. Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews* **2006**, *35*, 583-592.

(34) Prasad, P. N.: *Nanophotonics*; John Wiley and Sons: New York, 2004.

(35) Pinnavaia, T. J., Chibwe, M., Constantino, V. R. L., Yun, S. K. Organic Chemical conversions catalyzed by intercalated layered double hydroxides. *Applied Clay Science* **1995**, *10*, 117-129.

(36) 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*, 883-892.

(37) Yang, Z.; Wang, F.; Zhang, C.; Zeng, G.; Tan, X.; Yu, Z.; Zhong, Y.; Wang, H.; Cui, F. Utilization of LDH-based materials as potential adsorbents and photocatalysts for the decontamination of dyes wastewater: a review. *RSC Advances* **2016**, *6*, 79415-79436.

(38) Fan, G.; Li, F.; G Evans, D.; Duan, X.: *ChemInform Abstract: Catalytic Applications of Layered Double Hydroxides: Recent Advances and Perspectives*, 2014; Vol. 43.

(39) Matosic, M.; Mijatović, I.; Hodzic, E.: *Nitrate removal from drinking water using ion exchange - Comparison of chloride and bicarbonate form of the resins*, 2000; Vol. 14.

(40) Mostafa, M. S.; Bakr, A.-S. A.; El Naggar, A. M. A.; Sultan, E.-S. A. Water decontamination via the removal of Pb (II) using a new generation of highly energetic surface nano-material: Co+2Mo+6 LDH. *Journal of Colloid and Interface Science* **2016**, *461*, 261-272.

(41) Raki, L., Beaudoin, J.J., Mitchell, L. Layered Double Hydroxide-like Materials: Nanocomposites for use in concrete. *Cement Concrete Resistance* **2004**, *34*, 1717-1724.

(42) Xu, S. L.; Chen, Z.; Zhang, B.; Yu, J.; Zhang, F. Z.; Evans, D. G. Facile preparation of pure CaAl-layered double hydroxides and their application as a hardening accelerator in concrete. *Chemical Engineering Journal* **2009**, *155*, 881-885.

(43) Matusinovic, Z.; Feng, J.; Wilkie, C. A. The role of dispersion of LDH in fire retardancy: The effect of different divalent metals in benzoic acid modified LDH on dispersion and fire retardant properties of polystyrene– and poly(methyl-methacrylate)–LDH–B nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability* **2013**, *98*, 1515-1525.

(44) Shi, L.; Li, D. Q.; Wang, J. R.; Li, S. F.; Evans, D. G.; Duan, X. Synthesis, flame-retardant and smoke-suppresant properties of a borate-

intercalated layered double hydroxide. *Clays and Clay Minerals* **2005**, *53*, 294-300.

(45) Leroux, F.; Belkacen, M. B.; Guyot, G.; Taviot-Guého, C.; Léone, P.; Cario, L.; Desigaux, L.; Pitard, B. LDH-DNA Nanohybrids: a complete biophysical characterization. *MRS Proceedings* **2011**, *847*.

(46) Desigaux, L.; Ben Belkacem, M.; Richard, P.; Cellier, J.; Léone, P.; Cario, L.; Leroux, F.; Taviot-Guého, C.; Pitard, B.: *Self-Assembly and Characterization of Layered Double Hydroxide/DNA Hybrids*, 2006; Vol. 6.

(47) Kwak, S.-Y.; Jeong, Y.-J.; Park, J.-S.; Choy, J.-H. Bio-LDH nanohybrid for gene therapy. *Solid State Ionics* **2002**, *151*, 229-234.

(48) Ambrogi, V.; Fardella, G.; Grandolini, G.; Perioli, L. Intercalation compounds of hydrotalcite-like anionic clays with antiinflammatory agents. *International Journal of Pharmaceutics* **2001**, *220*, 23-32.

(49) 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*, 1024-1027.

(50) Káfuňková, E.; Taviot-Guého, C.; Bezdička, P.; Klementová, M.; Kovář, P.; Kubát, P.; Mosinger, J.; Pospíšil, M.; Lang, K. Porphyrins Intercalated in Zn/Al and Mg/Al Layered Double Hydroxides: Properties and Structural Arrangement. *Chemistry of Materials* **2010**, *22*, 2481-2490.

(51) Lang, K.; Bezdička, P.; Bourdelande, J. L.; Hernando, J.; Jirka, I.; Káfuňková, E.; Kovanda, F.; Kubát, P.; Mosinger, J.; Wagnerová, D. M. Layered Double Hydroxides with Intercalated Porphyrins as Photofunctional Materials: Subtle Structural Changes Modify Singlet Oxygen Production. *Chemistry of Materials* **2007**, *19*, 3822-3829.

(52) Nakagaki, S.; Halma, M.; Bail, A.; Arízaga, G. G. C.; Wypych, F. First insight into catalytic activity of anionic iron porphyrins immobilized on exfoliated layered double hydroxides. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *281*, 417-423.

(53) Kafunkova, E.; Lang, K.; Kubat, P.; Klementova, M.; Mosinger, J.; Slouf, M.; Troutier-Thuilliez, A.-L.; Leroux, F.; Verney, V.; Taviot-Gueho, C. Porphyrin-layered double hydroxide/polymer composites as novel ecological photoactive surfaces. *Journal of Materials Chemistry* **2010**, *20*, 9423-9432.

(54) Hibino, T. Delamination of Layered Double Hydroxides Containing Amino Acids. *Chemistry of Materials* **2004**, *16*, 5482-5488.

(55) Hibino, T.; Kobayashi, M. Delamination of layered double hydroxides in water. *Journal of Materials Chemistry* **2005**, *15*, 653-656.

(56) Wang, J.; Bao, W.; Umar, A.; Wang, Q.; O'Hare, D.; Wan, Y. Delaminated Layered Double Hydroxide Nanosheets as an Efficient Vector for DNA Delivery. *Journal of biomedical nanotechnology* **2016**, *12*, 922-933.

(57) Bao, W.; Wang, J.; Wang, Q.; O'Hare, D.; Wan, Y. Layered Double Hydroxide Nanotransporter for Molecule Delivery to Intact Plant Cells. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 26738.

(58) Hou, W.; Kang, L.; Sun, R.; Liu, Z.-H. Exfoliation of layered double hydroxides by an electrostatic repulsion in aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, *312*, 92-98.

(59) Li, Y.; Bao, W.; Wu, H.; Wang, J.; Zhang, Y.; Wan, Y.; Cao, D.; O'Hare, D.; Wang, Q. Delaminated layered double hydroxide delivers DNA molecules as sandwich nanostructure into cells via a non-endocytic pathway. *Science Bulletin* **2017**, *62*, 686-692.

(60) Wang, Q.; O'Hare, D. Recent Advances in the Synthesis and Application of Layered Double Hydroxide (LDH) Nanosheets. *Chemical Reviews* **2012**, *112*, 4124-4155.

(61) Iyi, N.; Ebina, Y.; Sasaki, T. Water-Swellable MgAl−LDH (Layered Double Hydroxide) Hybrids: Synthesis, Characterization, and Film Preparation. *Langmuir* **2008**, *24*, 5591-5598.

(62) Dolmans DE, F. D., Jain RK,. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer* **2003**, *3*, 380-387.

(63) Wilson BC. Photodynamic therapy for cancer: principles. *Canadian Journal of Gastroenterology* **2002**, *16*, 393-396.

(64) Gudgin Dickson EF, G. R., Pottier RH,. New directions in photodynamic therapy. *Cellular and Molecular Biology* **2003**, *48*, 939-954.

(65) Vrouenraets MB, V. G., Snow GB, van Dongen GA,. Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. *Anticancer Research* **2003**, *23*, 505-522.

(66) Capella MA, C. L. A light in multidrug resistance: photodynamic treatment of multidrug - resistant tumors. *Journal of Biomedical Science* **2003**, *10*, 361-366.

(67) Schwab A.D., S. E. D., Watts B.B., Johnston D.E., Hone J., Johnson H., Johnson A.T., Paula J.C., Smith W.F. Photoconductivity of Self-Assembled Porphyrin Nanorods. *Nanoletters* **2004**, *4*, 1261-1265.

(68) Faust D., F. K., Horneck G., Millow B., Ortner J., Sattleger M., Schafer M., Schmitz C. Immobilized photosensitizers for solar photochemical applications. *Solar Energy* **1999**, *65*, 71.

(69) Pushpan, S. K.; Venkatraman, S.; Anand, V. G.; Sankar, J.; Parmeswaran, D.; Ganesan, S.; Chandrashekar, T. K. Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents* **2002**, *2*, 187-207.

(70) Ethirajan, M.; Chen, Y.; Joshi, P.; Pandey, R. K. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chem Soc Rev* **2011**, *40*, 340-362.

(71) Krege, J. H.; Hodgin, J. B.; Couse, J. F.; Enmark, E.; Warner, M.; Mahler, J. F.; Sar, M.; Korach, K. S.; Gustafsson, J. Å.; Smithies, O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 15677-15682.

(72) Hacein-Bey-Abina, S.; Von Kalle, C.; Schmidt, M.; McCormack, M. P.; Wulffraat, N.; Leboulch, P.; Lim, A.; Osborne, C. S.; Pawliuk, R.; Morillon, E.; Sorensen, R.; Forster, A.; Fraser, P.; Cohen, J. I.; de Saint Basile, G.; Alexander, I.; Wintergerst, U.; Frebourg, T.; Aurias, A.; Stoppa-Lyonnet, D.; Romana, S.; Radford-Weiss, I.; Gross, F.; Valensi, F.; Delabesse, E.; Macintyre, E.; Sigaux, F.; Soulier, J.; Leiva, L. E.; Wissler, M.; Prinz, C.; Rabbitts, T. H.; Le Deist, F.; Fischer, A.; Cavazzana-Calvo, M. LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science* **2003**, *302*, 415-419.

(73) Hu, H.; Gatti, R. A. New approaches to treatment of primary immunodeficiencies: fixing mutations with chemicals. *Current opinion in allergy and clinical immunology* **2008**, *8*, 540-546.

(74) Blaese, R. M.; Culver, K. W.; Miller, A. D.; Carter, C. S.; Fleisher, T.; Clerici, M.; Shearer, G.; Chang, L.; Chiang, Y.; Tolstoshev, P.; Greenblatt, J. J.; Rosenberg, S. A.; Klein, H.; Berger, M.; Mullen, C. A.; Ramsey, W. J.; Muul, L.; Morgan, R. A.; Anderson, W. F. T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA[−] SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science* **1995**, *270*, 475-480.

(75) Bordignon, C.; Notarangelo, L. D.; Nobili, N.; Ferrari, G.; Casorati, G.; Panina, P.; Mazzolari, E.; Maggioni, D.; Rossi, C.; Servida, P.; Ugazio, A. G.; Mavilio, F. Gene Therapy in Peripheral Blood Lymphocytes and Bone Marrow for ADA[−] Immunodeficient Patients. *Science* **1995**, *270*, 470-475.

(76) Aiuti, A.; Slavin, S.; Aker, M.; Ficara, F.; Deola, S.; Mortellaro, A.; Morecki, S.; Andolfi, G.; Tabucchi, A.; Carlucci, F.; Marinello, E.; Cattaneo, F.; Vai, S.; Servida, P.; Miniero, R.; Roncarolo, M. G.; Bordignon, C. Correction of ADA-SCID by Stem Cell Gene Therapy Combined with Nonmyeloablative Conditioning. *Science* **2002**, *296*, 2410-2413.

(77) Aiuti, A.; Vai, S.; Mortellaro, A.; Casorati, G.; Ficara, F.; Andolfi, G.; Ferrari, G.; Tabucchi, A.; Carlucci, F.; Ochs, H. D.; Notarangelo, L. D.; Roncarolo, M. G.; Bordignon, C. Immune reconstitution in ADA-SCID after PBL gene therapy and discontinuation of enzyme replacement. *Nat Med* **2002**, *8*, 423-425.

(78) Aiuti, A.; Cassani, B.; Andolfi, G.; Mirolo, M.; Biasco, L.; Recchia, A.; Urbinati, F.; Valacca, C.; Scaramuzza, S.; Aker, M.; Slavin, S.; Cazzola, M.; Sartori, D.; Ambrosi, A.; Di Serio, C.; Roncarolo, M. G.; Mavilio, F.; Bordignon, C. Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy. *Journal of Clinical Investigation* **2007**, *117*, 2233-2240.

(79) Aiuti, A.; Cattaneo, F.; Galimberti, S.; Benninghoff, U.; Cassani, B.; Callegaro, L.; Scaramuzza, S.; Andolfi, G.; Mirolo, M.; Brigida, I.; Tabucchi, A.; Carlucci, F.; Eibl, M.; Aker, M.; Slavin, S.; Al-Mousa, H.; Al Ghonaium, A.; Ferster, A.; Duppenthaler, A.; Notarangelo, L.; Wintergerst, U.; Buckley, R. H.; Bregni, M.; Marktel, S.; Valsecchi, M. G.; Rossi, P.; Ciceri, F.; Miniero, R.; Bordignon, C.; Roncarolo, M.-G. Gene Therapy for Immunodeficiency Due to

Adenosine Deaminase Deficiency. *New England Journal of Medicine* **2009**, *360*, 447-458.

(80) Cavazza, A.; Moiani, A.; Mavilio, F. Mechanisms of retroviral integration and mutagenesis. *Human gene therapy* **2013**, *24*, 119-131.

(81) Meekings, K. N.; Williams, C. S.; Arrowsmith, J. E. Orphan drug development: an economically viable strategy for biopharma R&D. *Drug Discov Today* **2012**, *17*, 660-664.

(82) Robbins, P. D.; Ghivizzani, S. C. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacology & therapeutics* **1998**, *80*, 35-47.

(83) Mancheno-Corvo, P.; Martin-Duque, P. Viral gene therapy. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* **2006**, *8*, 858-867.

(84) Herweijer, H.; Wolff, J. A. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Therapy* **2003**, *10*, 453-458.

(85) Balazs, D. A.; Godbey, W. Liposomes for Use in Gene Delivery. *Journal of Drug Delivery* **2011**, *2011*.

(86) Blankenstein, T.; Leisegang, M.; Uckert, W.; Schreiber, H. Targeting cancer-specific mutations by T cell receptor gene therapy. *Current opinion in immunology* **2015**, *33*, 112-119.

(87) Kouprina, N.; Earnshaw, W. C.; Masumoto, H.; Larionov, V. A new generation of human artificial chromosomes for functional genomics and gene therapy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2013**, *70*, 1135-1148.

(88) Pfeifer, A.; Verma, I. M. Gene therapy: promises and problems. *Annual review of genomics and human genetics* **2001**, *2*, 177-211.

(89) Guan, S.; Rosenecker, J. Nanotechnologies in delivery of mRNA therapeutics using nonviral vector-based delivery systems. *Gene Ther* **2017**, *24*, 133-143.

(90) Milla, P.; Dosio, F.; Cattel, L. PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. *Current drug metabolism* **2012**, *13*, 105-119.

(91) Pawliuk, R.; Westerman, K. A.; Fabry, M. E.; Payen, E.; Tighe, R.; Bouhassira, E. E.; Acharya, S. A.; Ellis, J.; London, I. M.; Eaves, C. J.;

Humphries, R. K.; Beuzard, Y.; Nagel, R. L.; Leboulch, P. Correction of Sickle Cell Disease in Transgenic Mouse Models by Gene Therapy. *Science* **2001**, *294*, 2368-2371.

(92) Ribeil, J.-A.; Hacein-Bey-Abina, S.; Payen, E.; Magnani, A.; Semeraro, M.; Magrin, E.; Caccavelli, L.; Neven, B.; Bourget, P.; El Nemer, W.; Bartolucci, P.; Weber, L.; Puy, H.; Meritet, J.-F.; Grevent, D.; Beuzard, Y.; Chrétien, S.; Lefebvre, T.; Ross, R. W.; Negre, O.; Veres, G.; Sandler, L.; Soni, S.; de Montalembert, M.; Blanche, S.; Leboulch, P.; Cavazzana, M. Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *New England Journal of Medicine* **2017**, *376*, 848-855.

(93) Southwell, A. L.; Patterson, P. H. Gene Therapy in Mouse Models of Huntington Disease. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **2011**, *17*, 153-162.

(94) Ji, W.; Sun, B.; Su, C. Targeting MicroRNAs in Cancer Gene Therapy. *Genes* **2017**, *8*, 21.

(95) Klug, A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annual review of biochemistry* **2010**, *79*, 213-231.

(96) Joung, J. K.; Sander, J. D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2013**, *14*, 49-55.

(97) Ishino, Y.; Shinagawa, H.; Makino, K.; Amemura, M.; Nakata, A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology* **1987**, *169*, 5429-5433.

(98) Barrangou, R.; Fremaux, C.; Deveau, H.; Richards, M.; Boyaval, P.; Moineau, S.; Romero, D. A.; Horvath, P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **2007**, *315*, 1709-1712.

(99) Brouns, S. J.; Jore, M. M.; Lundgren, M.; Westra, E. R.; Slijkhuis, R. J.; Snijders, A. P.; Dickman, M. J.; Makarova, K. S.; Koonin, E. V.; van der Oost, J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* **2008**, *321*, 960-964.

(100) Deveau, H.; Barrangou, R.; Garneau, J. E.; Labonte, J.; Fremaux, C.; Boyaval, P.; Romero, D. A.; Horvath, P.; Moineau, S. Phage

response to CRISPR-encoded resistance in Streptococcus thermophilus. *J Bacteriol* **2008**, *190*, 1390-1400.

(101) Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J. A.; Charpentier, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **2012**, *337*, 816-821.

(102) Shigeo, M. THE SYNTHESES OF HYDROTALCITE-LIKE COMPOUNDS AND THEIR STRUCTURES AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES *Clays and Clay Minerals* **1975**, *23*, 369-375.

(103) Kwak, S. Y.; Kriven, W. M.; Wallig, M. A.; Choy, J. H. Inorganic delivery vector for intravenous injection. *Biomaterials* **2004**, *25*, 5995-6001.

(104) Nakayama, H.; Wada, N.; Tsuhako, M. Intercalation of amino acids and peptides into Mg–Al layered double hydroxide by reconstruction method. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, *269*, 469-478.

(105) Scherer WF., S. J., Gey GO., Syverton.,. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *Journal of Experimental Medicine* **1953**, *97*, 695-710.

(106) Kantonis, G., Trikeriotis, M., Ghanotakis, D.F.,. Biocompadible protoporphyrin IX-containing nanohybrids with potential applications in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2007**, *185*, 62-66.

(107) Chakraborty, M.; Dasgupta, S.; Sengupta, S.; Chakraborty, J.; Ghosh, S.; Ghosh, J.; Mitra, M. K.; Mishra, A.; Mandal, T. K.; Basu, D. A facile synthetic strategy for Mg–Al layered double hydroxide material as nanocarrier for methotrexate. *Ceramics International* **2012**, *38*, 941-949.

(108) Huang, D.; Lowe, D.; Churchman, J.; Schipper, L.; Cursons, R.; Zhang, H.; Chen, T. Y.; Cooper, A.: *DNA adsorption by nanocrystalline allophane spherules and nanoaggregates, and implications for carbon sequestration in Andisols*, 2016; Vol. 120.

(109) Wood, B. R. The importance of hydration and DNA conformation in interpreting infrared spectra of cells and tissues. *Chemical Society Reviews* **2016**, 1980-1998.

(110) R. Rojas, C. E. G. Size-tunable LDH–protein hybrids toward the

optimization of drug nanocarriers. *Journal of Material Chemistry B* **2015**, 2778.

(111) Tachikawa, S.; El-Zaria, M. E.; Inomata, R.; Sato, S.; Nakamura, H. Synthesis of protoporphyrin-lipids and biological evaluation of micelles and liposomes. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2014**, *22*, 4745-4751.