



Διπλωματική Εργασία

*Επιφανειακά τροποποιημένες υδρογέλες πυριτίας
για ελεγχόμενη αποδέσμευση
αντιοστεοπορωτικών φαρμάκων*

*Surface-modified silica hydrogels for the
controlled release of antiosteoporotic drugs*



Φανουρία Ειρήνη Αλατζόγλου (Α.Μ. 1955)

Επιβλέπων Καθηγητής : Κωνσταντίνος Δημάδης

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΝ



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, στο εργαστήριο Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Κρυστάλλων, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Κ. Δημάδη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας για τις εγκαταστάσεις και τον εξοπλισμό που μου παρείχε, τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημάδη για τη πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε σε όποια δυσκολία κι αν αντιμετώπιζα κατά την διενέργεια της εργασίας αυτής, καθώς και για την δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω στο εργαστήριό του την διπλωματική μου εργασία. Επίσης, ευχαριστώ τον Δρ. Κώστα Παπαθανασίου για τις γνώσεις που μου μετέδωσε και τον χρόνο που μου αφιέρωσε για να με μυήσει στον ερευνητικό αυτό τομέα. Δεν μπορώ να παραλείψω να ευχαριστήσω όλη την εργαστηριακή ομάδα που καθένας ξεχωριστά ήταν πρόθυμος να με βοηθήσει.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

1. Περίληψη	4
2. Εισαγωγή	
2.1. Πολυμερικές μήτρες.....	5-6
2.2. Υδρογέλες πυριτίας.....	7-8
2.3. Οστεοπόρωση.....	8-9
2.4. Διφωσφονικά Φάρμακα.....	9-10
2.5. Μηχανισμός δράσης διφωσφονικών.....	10
2.6. Ελεγχόμενη αποδέσμευση των διφωσφονικών φαρμάκων.....	10
2.7. Χημεία των χρησιμοποιούμενων silane reagents	10-12
3. Πειραματικό μέρος	
3.1. Χημικά αντιδραστήρια.....	12
3.2. Όργανα.....	12
3.3. Πειραματική Διαδικασία.....	
3.3.1. Διαδικασία παρασκευής Υδρογελών.....	13
3.3.2. Υδρογέλες που παρασκευάστηκαν.....	14-17
3.3.3. Μετρήσεις του χρόνου αποδέσμευσης.....	16-23
4. Αποτελέσματα	25-27
5. Συμπεράσματα	27
6. Βιβλιογραφία	28



1. Περίληψη

Η παρούσα πτυχιακή εργασία υλοποιήθηκε με στόχο την ελεγχόμενη αποδέσμευση του ενεργού φαρμάκου και συγκεκριμένα την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη μείωση του ρυθμού και του τελικού ποσοστού αποδέσμευσής του. Για την επίτευξη του στόχου αυτού παρασκευάστηκαν υδρογέλες πυριτίας παρουσία αντιδραστηρίων πυριτίου (silane reagents), τα οποία πραγματοποιούν προσκόλληση μέσω συμπύκνωσης (grafting) στις σιλανόλες που βρίσκονται στην επιφάνεια των πόρων της πυριτίας. Επίσης, παρασκευάστηκαν υδρογέλες πυριτίας με αυξανόμενη ποσότητα πυριτικών ανιόντων. Από την διεξαγωγή των παραπάνω πειραματικών διεργασιών, αποδείχθηκε ότι το σύστημα αποδέσμευσης των διφωσφονικών φαρμάκων είναι ελεγχόμενο και ότι είναι εφικτή η μείωση του ρυθμού και της τελικής αποδέσμευσης του φαρμάκου.

2. Εισαγωγή

2.1. Πολυμερικές Μήτρες ^{1}

Για ορισμένα φάρμακα λόγω του ότι, είτε είναι αδιάλυτα σε βιολογικά υγρά, είτε μεταβολίζονται ταχέως, απαιτείται η ελεγχόμενη απελευθέρωσή τους στον οργανισμό. Αυτό επιτυγχάνεται με τον «εγκλωβισμό» τους σε μία πολυμερική μήτρα, μέσω της οποίας πραγματοποιείται ελεγχόμενη αποδέσμευση του ενεργού φαρμάκου, που σημαίνει πως το φάρμακο απελευθερώνεται στον οργανισμό σε καθορισμένη ποσότητα και για συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη πιο αποτελεσματική θεραπεία και παράλληλα τον αποκλεισμό της περίπτωσης της υπερδοσολογίας ή της μικρότερης δόσης από τη θεραπευτική.

Διάχυση του φαρμάκου από μη βιοδιασπώμενο πολυμερές

Η αποδέσμευση του συστατικού μπορεί να είναι σταθερή μέσα σε ένα μεγάλο χρονικό διάστημα, μπορεί να είναι κυκλική σε ένα μεγάλο χρονικό διάστημα ή μπορεί να προκληθεί από το περιβάλλον ή έναν άλλο εξωτερικό παράγοντα. Υπάρχουν δύο κοινές μέθοδοι ελεγχόμενης απελευθέρωσης, ο χρονικός έλεγχος και ο έλεγχος διανομής. Η πρώτη μέθοδος είναι εφαρμόσιμη σε φάρμακα που τείνουν να μεταβολίζονται γρήγορα και να εξαλείφονται από τον οργανισμό. Σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά του πολυμερούς, οι μηχανισμοί απελευθέρωσης είναι οι εξής:

Diffusion Controlled System

Στο συγκεκριμένο σύστημα αποδέσμευσης πραγματοποιείται διάχυση του φαρμάκου, καθώς η ενεργή ουσία διέρχεται μέσω του πολυμερούς (που αποτελεί το σύστημα ελεγχόμενης απελευθέρωσης) για να εισαχθεί στον οργανισμό. Υπάρχουν δύο κατηγορίες του συστήματος αυτού:

- **Σύστημα Μήτρας (Matrix Device)**

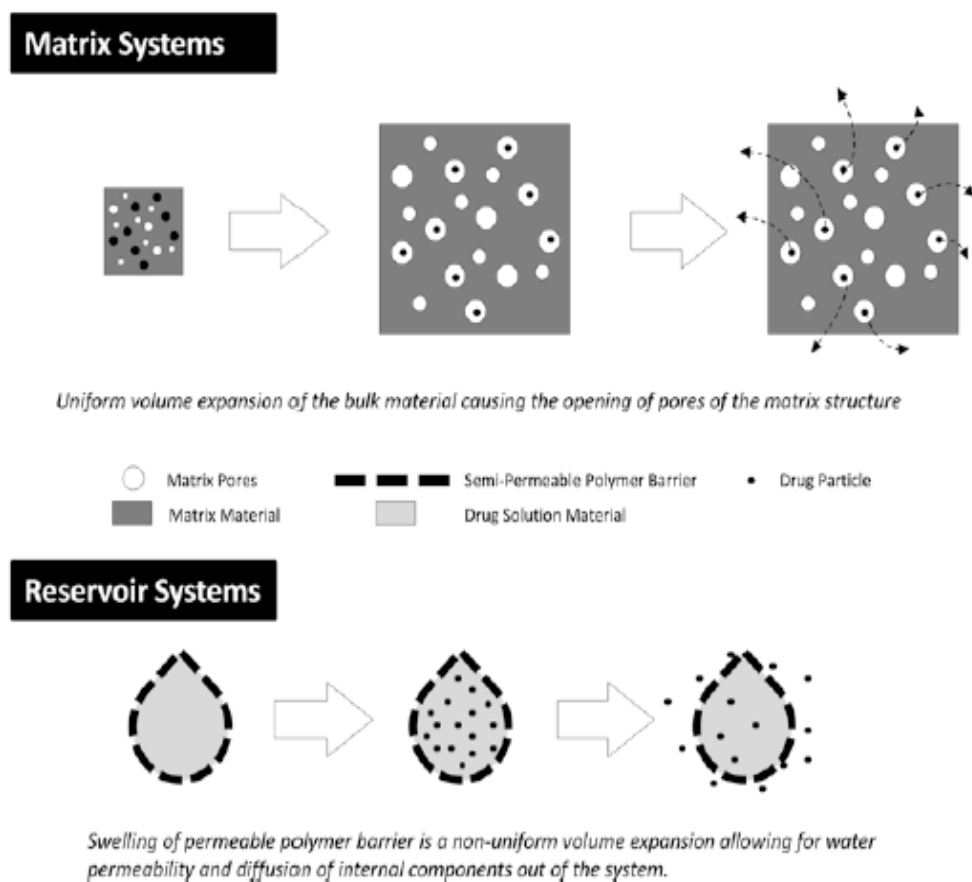
Αποτελεί το πιο διαδεδομένο σύστημα ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμάκου, καθώς η σύνθεσή του είναι πολύ απλή. Η διασπορά του ενεργού φαρμάκου στο πολυμερές σχηματίζει μια σύνθετη μήτρα και μέσω της διείσδυσης του νερού διαμέσου των πόρων του πολυμερούς, προκύπτει ένα ωσμωτικά ελεγχόμενο



σύστημα. Έτσι, προκαλείται μία ομοιόμορφη διόγκωση των πόρων σε όλη την δομή της μήτρας (εικόνα 2.1.1.).

- **Σύστημα Δεξαμενής (Reservoir System)**

Το φάρμακο είναι ενθυλακωμένο σε ένα σταγονίδιο πολυμερούς, δημιουργώντας έτσι, ένα διαπερατό φράγμα μεταξύ του διαλύματος του φαρμάκου και του γύρω περιβάλλοντος. Σε αυτή τη περίπτωση η διόγκωση λόγω διείσδυσης του νερού, δεν είναι ομοιόμορφη, καθώς η επίστρωση του φραγμού επιτρέπει την διαπερατότητα του νερού και διογκώνεται, ενώ ταυτόχρονα, πραγματοποιείται διάχυση του εσωτερικού διαλύματος προς το εξωτερικό περιβάλλον(εικόνα 2.1.1.).



2.1.1. Διάγραμμα των βασικών συστημάτων ελεγχόμενης αποδέσμευσης για μεταφορά φαρμάκων^[1]

➤ **Απελευθέρωση του φαρμάκου λόγω αποικοδόμησης και διάβρωσης του πολυμερούς (Erosion Controlled System)**

Όσον αφορά στα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, αξίζει να σημειωθεί ότι η αποικοδόμησή τους είναι μία χημική διεργασία, ενώ η διάβρωσή τους αποτελεί ένα φυσικό φαινόμενο. Ανάλογα με την χημική σύσταση του σκελετού του πολυμερούς η διάβρωση κατηγοριοποιείται σε:

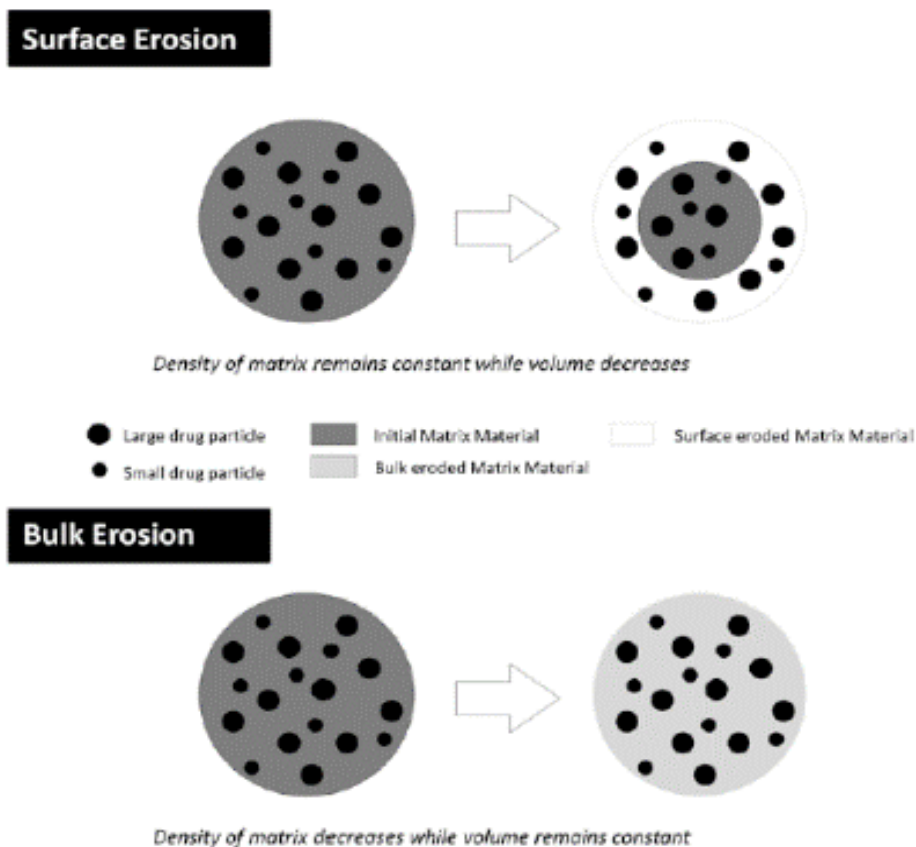


- **Επιφανειακή Διάβρωση (*Surface Erosion*)**

Η εξωτερική επιφάνεια του πολυμερούς διαβρώνεται, ενώ η εσωτερική όχι, μέχρι τη πλήρη αλλοίωση του γύρω περιβάλλοντος. Ο ρυθμός διάβρωσης υπερβαίνει τον ρυθμό διείσδυσης του νερού στον όγκο του πολυμερούς(εικόνα 2.1.2.).

- **Μαζική Διάβρωση (*Bulk Erosion*)**

Η διάβρωση πραγματοποιείται σε όλο το υλικό, τόσο στην επιφάνεια όσο και στο εσωτερικό του. Πραγματοποιείται όταν τα μόρια του νερού διεισδύουν στην μήτρα με ταχύτερο ρυθμό από εκείνον κατά την επιφανειακή διάβρωση(εικόνα 2.1.2.).



2.1.2. Διάγραμμα των μηχανισμών διάβρωσης που παρουσιάζονται στα συστήματα μήτρας ^{1}

2.2.Υδρογέλες Πυριτίας ^{2}

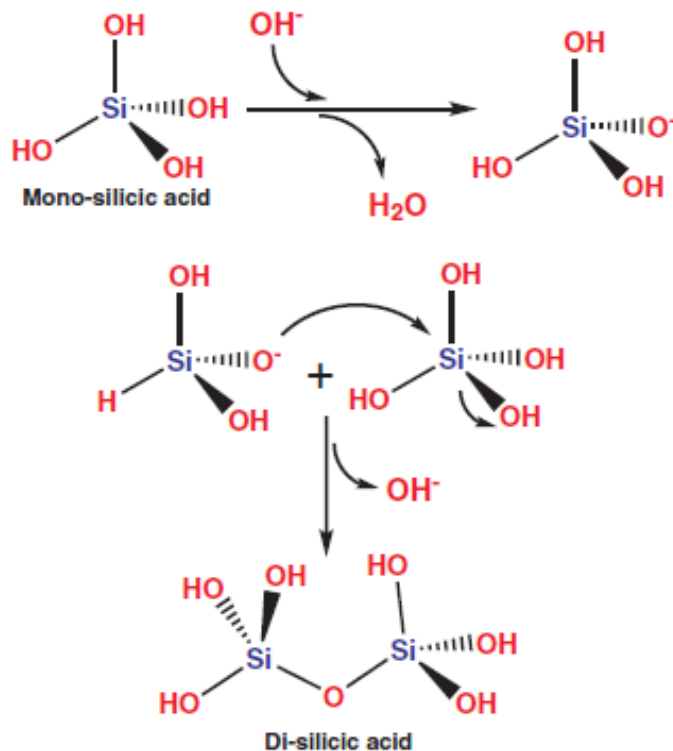
Στη παρούσα ερευνητική εργασία, υδρογέλες πυριτίας (*silica gel*) αποτέλεσαν την μήτρα για την ελεγχόμενη αποδέσμευση διφωσφονικών φαρμάκων. Ανήκει στη πρώτη κατηγορία των μηχανισμών αποδέσμευσης που αναφέρθηκαν παραπάνω (*Diffusion Controlled System- Matrix Device*). Τα συστήματα υδρογελών έχουν εφαρμοστεί εκτεταμένα στον φαρμακευτικό τομέα λόγω, της εύκολης παρασκευής τους, της δυνατότητάς τους για τροποποιήσεις, καθώς και της άμεσης ανταπόκρισής τους σε εξωτερικά, φυσικά ή



χημικά, ερεθίσματα. Οι υδρογέλες πυριτίας έχουν εντείνει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, λόγω της χαμηλής τους τοξικότητας (το πυρίτιο αποτελεί ιχνοστοιχείο του ανθρώπινου οργανισμού), της σταθερότητας, του χαμηλού κόστους παραγωγής τους, καθώς και εξαιτίας της δυνατότητας που διαθέτουν για επιφανειακή τροποποίηση.

Σχηματισμός υδρογελών πυριτίας ^[3]

Σε αραιωμένα υδατικά διαλύματα το διαλυτό SiO₂ βρίσκεται στην μορφή Si(OH)₄, ως μονο-πυριτικό οξύ. Είναι το μονομερές που σε ουδέτερο pH υπάρχει σε δύο μορφές την κύρια (πρωτονιωμένη) Si(OH)₄ και την δευτερεύουσα (αποπρωτονιωμένη) Si(OH)₃O⁻. Καθώς το pH αυξάνεται η συγκέντρωση της αποπρωτονιωμένης μορφής επίσης αυξάνεται, με αποτέλεσμα σε pH περίπου ίσο με 7, να πραγματοποιείται η συμπύκνωση δύο μονομερών με ταυτόχρονη απώλεια ενός μορίου νερού. Η διαδικασία ακολουθεί έναν μηχανισμό τύπου S_N2(εικόνα 2.2.1.), στον οποίο ένα αποπρωτονιωμένο μόριο πυριτικού οξέος προσβάλλει ένα πλήρως πρωτονιωμένο.

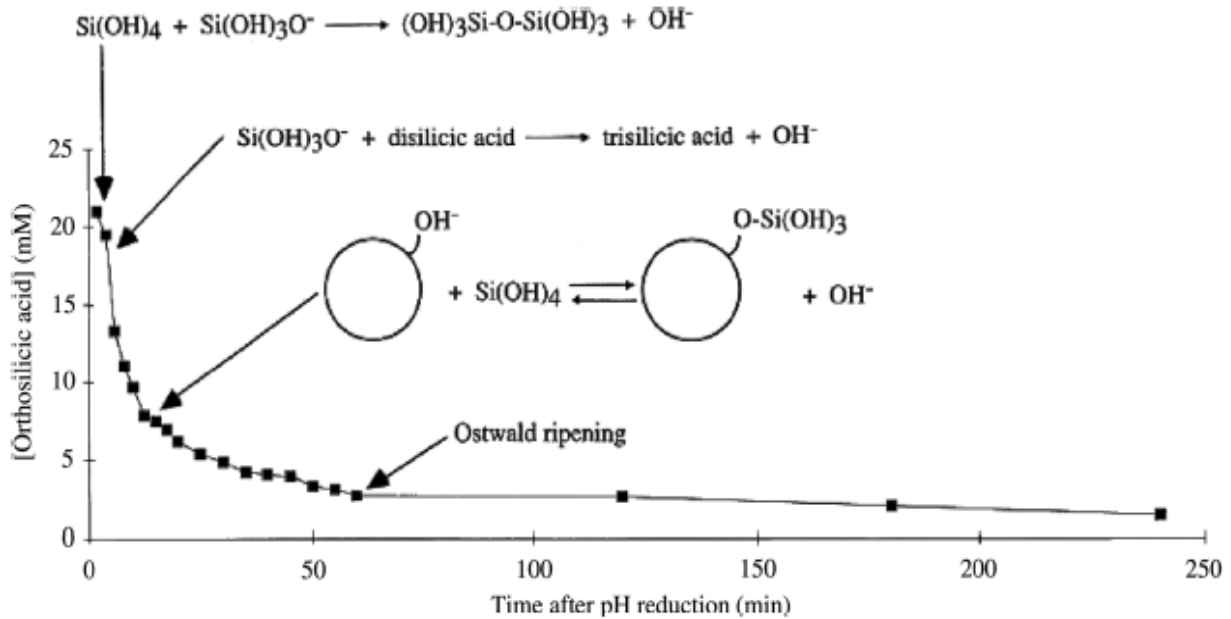


2.2.1. Μηχανισμός τύπου S_N2 για τη συμπύκνωση του μονο-πυριτικού οξέος σε δι-πυριτικό οξύ^[3]

Το συγκεκριμένο βήμα είναι και το καθοριστικό για την κινητική της πολυσυμπύκνωσης και του προσδιορισμού της ταχύτητας στη σύνθετη διαδικασία πολυσυμπύκνωσης του διοξειδίου του πυριτίου. Τα επόμενα βήματα περιλαμβάνουν το σχηματισμό τριμερών, τετραμερών και μετά υψηλότερων ολιγομερών ειδών έως το σχηματιστούν 1-2 nm νανοσωματίδια άμορφου πυριτίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι το pK_a των πολυπυριτικών οξέων σε αυτά τα στάδια πολυμερισμού είναι περίπου 6,5 και επομένως, πάνω από το pH 7-



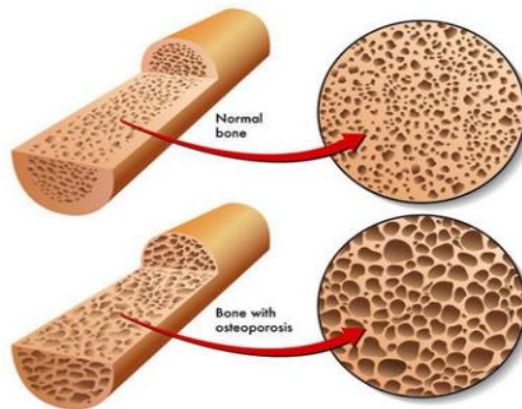
8, δεσπόζουν αρνητικά φορτισμένα πυριτικά άλατα. Σε τέτοιες συνθήκες, το πυριτικό οξύ στην επιφάνεια των κολλοειδών ειδών υπάρχει σε ισορροπία με τα διαλυμένα μόρια πυριτικού οξέος και, συνεπώς, λόγω της διαδικασίας ωρίμανσης Ostwald, (εικόνα 2.2.2.) εμφανίζεται περαιτέρω ανάπτυξη σωματιδίων, οδηγώντας σε σταθερούς διαλύτες. Αντίθετα, σε περιοχές pH κάτω από 7, τα σωματίδια μπορούν να φορτισθούν μόνο ελαφρά, οπότε δεν υπάρχει ηλεκτροστατική απόθεση που να τους αποτρέπει από τη συσσωμάτωση, οδηγώντας σε σχηματισμό πηκτώματος.



2.2.2. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας ωρίμανσης κατά Ostwald^[3]

2.3. Οστεοπόρωση^[4]

Με τον όρο οστεοπόρωση χαρακτηρίζεται η νόσος των οστών, που οδηγεί σε μειωμένη οστική πυκνότητα (εικόνα 2.3.1.), με άμεση συνέπεια την αυξημένη οστική ευθραυστότητα και την επιρρέπεια στην πρόκληση κατάγματος (ειδικά στη σπονδυλική στήλη).



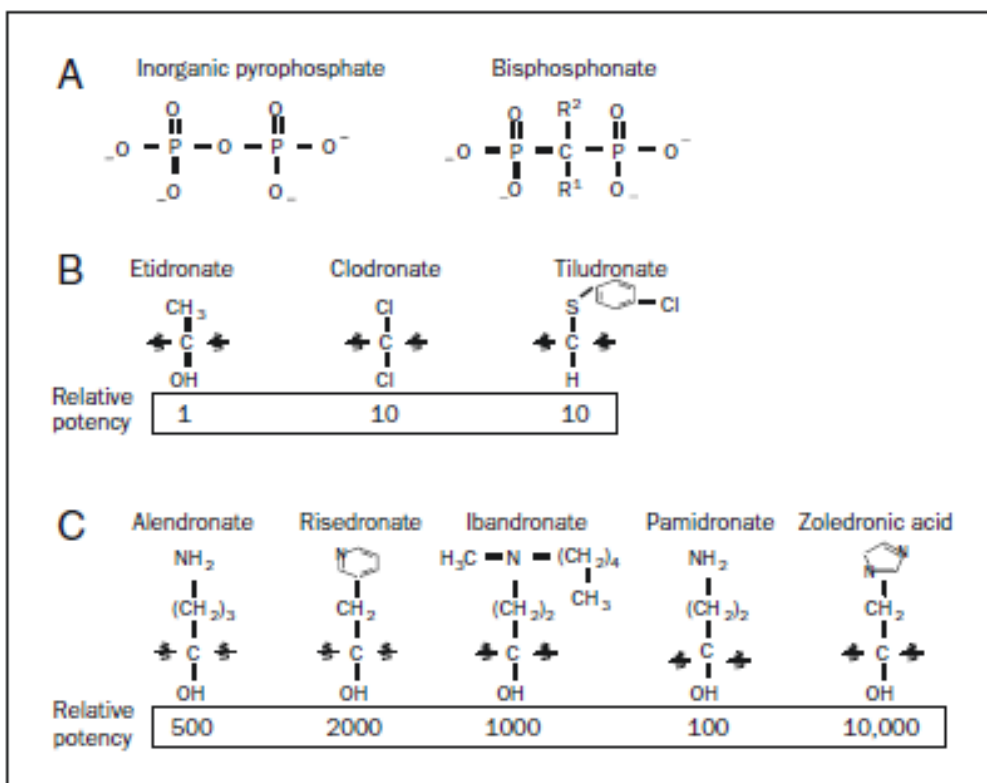
2.3.1. Απεικόνιση ενός φυσιολογικού οστού (πάνω) και ενός οστού με οστεοπόρωση



Υπάρχουν τρεις κατηγορίες οστεοπόρωσης η μετεμμηνοπαυσιακή, η γεροντική και η προκαλούμενη από στεροειδή οστεοπόρωση. Αναστέλλοντας την επαναρρόφηση οστού είτε με χρήση οιστρογόνων ή διφωσφονικών προλαμβάνεται η περαιτέρω απώλεια οστού, καθώς για ένα χρονικό διάστημα ο σχηματισμός του οστού είναι μεγαλύτερος από την επαναρρόφηση του και επιτυγχάνεται μια νέα ισορροπία.

2.4. Διφωσφονικά φάρμακα^{4}

Πρωτοποριακές μελέτες την δεκαετία 1960, απέδειξαν ότι το πυροφωσφορικό (PPI), που απαντάται στο αίμα και στα ούρα των ανθρώπων ως παραπροϊόν συνθετικών αντιδράσεων του οργανισμού, είναι ικανό να αναστείλει την ασβεστοποίηση, δεσμεύοντας τους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη. Τα διφωσφονικά ως προς την δομή, είναι χημικά σταθερά παράγωγα του πυροφωσφορικού οξέος. Κατά συνέπεια, τα διφωσφονικά παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια με το ασβέστιο των οστών, καθώς δεσμεύονται στους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη. Ύστερα από μελέτες έχει αποδειχθεί ότι είναι ικανά, να εμποδίζουν την ασβεστοποίηση, την διάλυση του υδροξυαπατίτη, καθώς και να καταστέλλουν την οστική επαναρόφηση.



2.4.1. Δομές των διφωσφονικών και η σχετική δυναμική τους για παρεμπόδιση των οστεοκλαστών^{4}

Η διαφορά μεταξύ του πυροφωσφορικού και των διφωσφονικών έγκειται στο ότι τα διφωσφονικά διαθέτουν ένα άτομο άνθρακα μεταξύ των δύο φωσφορικών ομάδων και όχι ένα άτομο οξυγόνου, όπως στη περίπτωση του πυροφωσφορικού (εικόνα 2.4.1.). Η διαφορά αυτή καθιστά τα διφωσφονικά χημικώς σταθερότερα και πιο ανθεκτικά σε οξέα και υδρολυτικά ένζυμα. Επιπλέον, διαθέτουν δύο πλευρικές αλυσίδες R₁ και R₂, από τις οποίες η μία καθορίζει τη πρόσδεση στο οστό και η άλλη τις φαρμακολογικές ιδιότητες της ένωσης. Όταν η μία πλευρική ομάδα είναι ένα υδροξείδιο, αυξάνεται η ικανότητα πρόσδεσής τους στο οστό,



εμποδίζοντας τόσο την διάλυση όσο και την ανάπτυξη του κρυστάλλου υδροξυαπατίτη. Αυτό επιτυγχάνεται, καθώς η ομάδα

υδροξειδίου συνδέεται χημικά με τα ιόντα ασβεστίου. Σύμφωνα με την χημική τροποποίηση, τον χρόνο σύνθεσης και δράσης όπως και την αντιστεοκλαστική ισχύ, τα διφωσφονικά κατανομούνται σε ομάδες πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς. Ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι αζώτου στο μόριο των διφωσφονικών διαφοροποιείται ο μηχανισμός δράσης τους και διακρίνονται σε αζωτούχα (αλεδρονάτη, ριζεδρονάτη) και μη αζωτούχα (ετιδρονάτη). Αποδείχθηκε ότι η παρουσία αζώτου στη πλευρική αλυσίδα αυξάνει την οστεολυτική δράση του μορίου, με αποτέλεσμα τα αζωτούχα διφωσφονικά να αποτελούν ισχυρότερα αντιστεολυτικά σε συσχέτιση με τα μη αζωτούχα.

2.5.Μηχανισμός δράσης των διφωσφονικών^{4}

Αρχικά προσδένονται στον κρύσταλλο του υδροξυαπατίτη και με την έναρξη της οστεόλυσης, αφού πραγματοποιηθεί η διάλυση του υδροξυαπατίτη, τα μόρια του φαρμάκου εισέρχονται με ενδοκύττωση στον οστεοκλάστη. Τα διφωσφονικά έχουν διαφορετική λειτουργία αναλόγως αν ανήκουν στην κατηγορία των αζωτούχων διφωσφονικών ή μη. Έτσι, τα αζωτούχα φάρμακα φαίνεται να παρεμβαίνουν στην μεταβολική οδό του μεβαλονικού οξέος, αναστέλλοντας έτσι τη πρενυλίωση των πρωτεϊνών (*εισαγωγή φαρνεσουλίου και του γερανυλγερανυλίου στις G πρωτεΐνες*). Αντίθετα, τα μη αζωτούχα ενσωματώνονται σε μόρια τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω των συνθετασών των αμινιάκυλ tRNA, αφού έχει προηγηθεί η απορρόφησή τους από την κρυσταλλική επιφάνεια του οστού. Η ενδοκυτταρική αυτή συσσώρευση των υδρολυμένων αναλόγων ATP πιστεύεται ότι είναι κυτταροτοξική για τους οστεοκλάστες, καθώς αναστέλλουν πολλές κυτταρικές διεργασίες που απαιτούν τη παρουσία ATP.

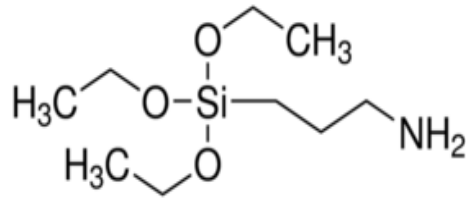
2.6.Ελεγχόμενη αποδέσμευση των διφωσφονικών φαρμάκων^{5}

Η βιοδιαθεσιμότητα των διφωσφονικών φαρμάκων είναι πολύ μικρή (η μέγιστη 10%), με αποτέλεσμα να χορηγείται στον οργανισμό πολύ μεγαλύτερη ποσότητα φαρμάκου από εκείνη που απαιτεί η θεραπευτική δόση. Όμως, αυτό έχει πολύ αρνητικά επακόλουθα στον οργανισμό, καθώς προκαλούνται ασθένειες όπως οστεονέκρωση της γνάθου, κολπική μαρμαρυγή, καρκίνος του οισοφάγου, οφθαλμική φλεγμονή κ.α. Έτσι, είναι επιτακτική η ανάγκη για την ανάπτυξη συστημάτων που θα οδηγούν σε ελεγχόμενη αποδέσμευση των φαρμάκων αυτών. Για τον σκοπό αυτό, στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία, τα διφωσφονικά φάρμακα «εγκλωβίστηκαν» σε υδρογέλες πυριτίας παρουσία συγκεκριμένων silane reagents, η προσθήκη των οποίων αποσκοπούσε στην ολόένα πιο αργή αποδέσμευση των ενεργών παραγόντων.

2.7.Χημεία των χρησιμοποιούμενων silane reagents:^{{6},{7},{8}}

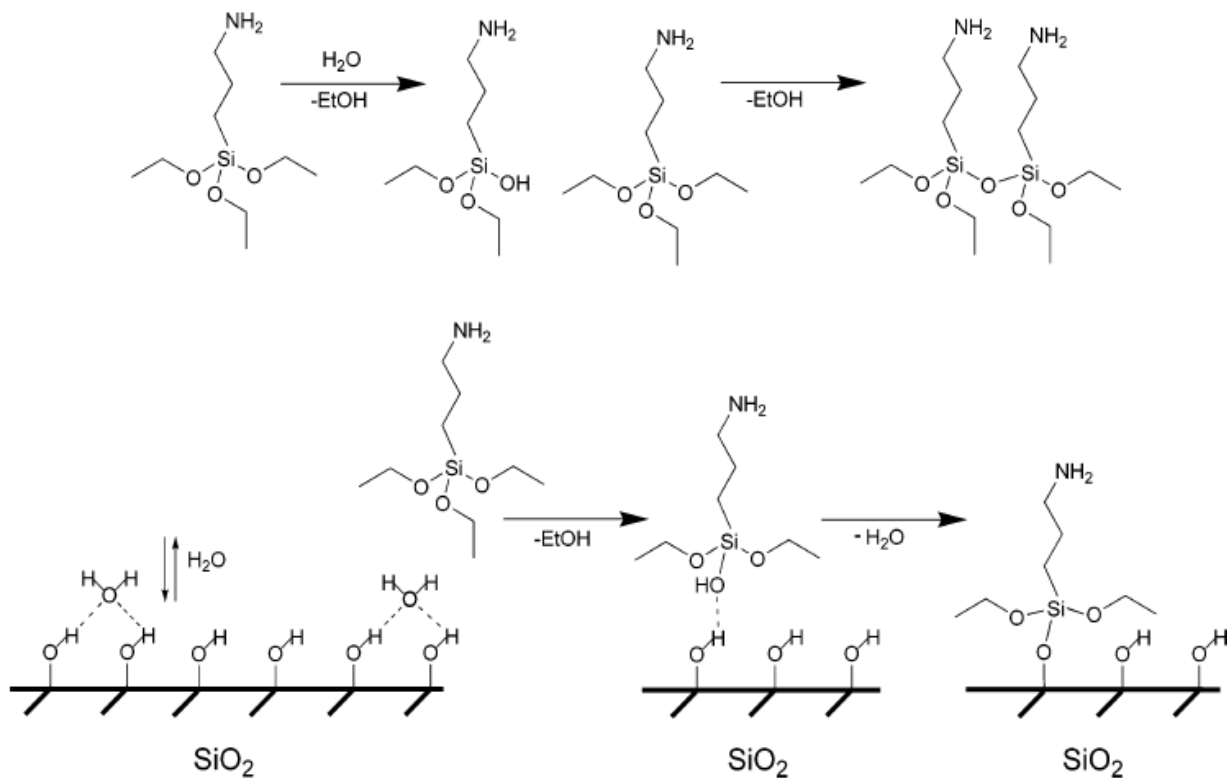
- **(3-Aminopropyl)TriEthoxy Silane (APTES)**

Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο αποτελεί έναν παράγοντα σύζευξης για τη τροποποίηση επιφανειών διοξειδίου του πυριτίου, με σκοπό την αύξηση της προσρόφησης σε σύνθετα υλικά. Χρησιμοποιείται επίσης για να προάγει τη προσκόλληση πολυμερών μεμβρανών στο γυαλί, καθώς και για τη σύζευξη φωτοαντιδραστικών φιλμ σε διοξείδιο του πυριτίου. Η υδρόλυση του σιλανίου οδηγεί στη πρόσδεση του APTES (*εικόνα 2.7.1.*) στην επιφάνεια του υποστρώματος, μέσω δεσμών σιλοξάνης.



2.7.1. Απεικόνιση της χημικής δομής του APTES

Το αντιδραστήριο APTES δηλαδή, πραγματοποιεί μέσω της ομάδας που έχει υδρολυθεί grafting (θα μπορούσε να χαρακτηριστεί και ως χημειορρόφηση), με τις σιλανόλες που βρίσκονται στην επιφάνεια των πόρων της πυριτίας και ταυτόχρονα απομακρύνεται ένα μόριο νερού(εικόνα 2.7.2.). Η διαδικασία του grafting που προαναφέρθηκε παρουσιάζεται παρακάτω :



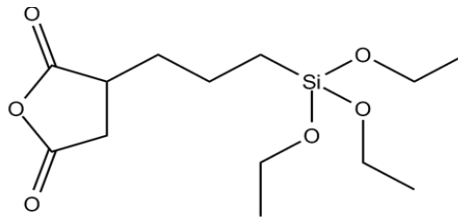
2.7.2. Πάνω: Υδρόλυση του APTES που ακολουθείται από αντίδραση συμπύκνωσης σε διάλυμα
.Κάτω: Υδρόλυση του APTES που ακολουθείται από αντίδραση συμπύκνωσης σε επιφάνεια υδρολυμένης πυριτίας ^{7}

- **(3-TriEthoxySilyl)Propyl Succinic Anhydride (TESPSA)**

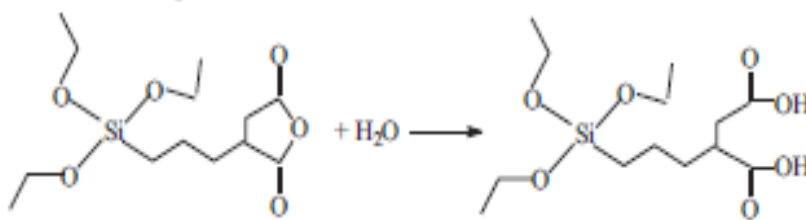
Το TESPSA(εικόνα 2.7.3.) όπως και το APTES είναι ένα αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για τροποποίηση επιφανειών διοξειδίου του πυριτίου. Πραγματοποιεί grafting με τις επιφανειακές σιλανόλες των πόρων της πυριτίας μέσω των αιθόξυ ομάδων που διαθέτει(εικόνα 2.7.5.), αφού προηγηθεί η υδρόλυσή



τους. Ταυτόχρονα με την υδρόλυση των αίθοξυ ομάδων του αντιδραστηρίου πραγματοποιείται και η μερική υδρόλυση του δακτυλίου του σουκινικού ανυδρίτη σύμφωνα με τη παρακάτω αντίδραση(εικόνα 2.7.4.):

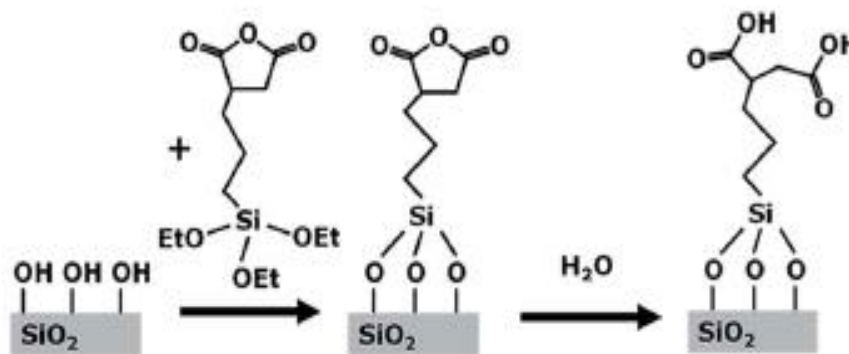


2.7.3. Απεικόνιση της χημικής δομής του TESPSPA



2.7.4. Υδρόλυση του σουκινικού ανυδρίτη του TESPSPA^[6]

Το grafting μεταξύ των δραστικών αίθοξυ ομάδων του TESPSPA και των ομάδων σιλανόλης στις επιφάνειες των πόρων της πυριτίας παρουσιάζεται παρακάτω:



2.7.5. Αντίδραση συμπύκνωσης του TESPSPA με τις επιφανειακές σιλανόλες της πυριτίας^[8]

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. Χημικά αντιδραστήρια

- Sodium silicate pentahydrate ($Na_2SiO_3 \cdot 5H_2O$, silicic acid) από την Sigma Aldrich



- Etidronic acid (*aqueous solution*) από την Solutia Inc.
- Pamidronic acid
- (3-Aminopropyl)Triethoxy Silane (98% w/w)
- (3-Triethoxysilyl)Propyl Succinic Anhydride (94% w/w)
- Hydrochloric acid 37% w/w
- Deuterium Oxide (99% atom D) that contained 0.05 wt. % 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d4 acid, sodium salt (TSP) από την εταιρία Sigma-Aldrich.
- Απιονισμένο νερό από αποστακτική στήλη χρησιμοποιήθηκε για όλα τα πειράματα

3.2. Όργανα:

- Ζυγός ακριβείας τριών δεκαδικών ψηφίων
- Πιπέτα Gilson (1000μL και 200μL) της εταιρίας Witeg Germany
- Φασματόμετρο NMR (Bruker DPX-300)

3.3. Πειραματική Διαδικασία

3.3.1. Διαδικασία παρασκευής Υδρογελών

Σε ένα ποτήρι ζέσεως των 250mL προστίθενται 10mL απιονισμένου νερού και 0,666g sodium silicate. Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση έως ότου διαλυθεί το στερεό. Ακολούθως, προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα του silane reagent που έχει υπολογιστεί για τη παρασκευή υδρογέλης με συγκεκριμένη αναλογία (silane reagent : sodium silicate) και το διάλυμα αφήνεται για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (από 10 λεπτά έως μία ώρα, αναλόγως την αναλογία των δύο αντιδραστηρίων) υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, προστίθεται το διφωσφονικό φάρμακο (350μL ETID ή 0,290g PAM) και αφήνεται το διάλυμα υπό ανάδευση για ένα λεπτό. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στη τιμή 7 με τη προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας διαλύματος HCl 37%w/w. Η συγκεκριμένη τιμή pH επιλέχθηκε καθώς ο ρυθμός πολυμερισμού του πυριτικού οξέος παρουσιάζει μέγιστο εκεί. Το gel σχηματίζεται στα επόμενα 10-15 λεπτά. Παρασκευάστηκαν και gel που δεν περιείχαν silane reagent, σε αυτά μετά την διάλυση του sodium silicate ακολούθησε αμέσως η προσθήκη του διαφωσφονικού φαρμάκου.

3.3.2. Υδρογέλες που παρασκευάστηκαν

- Χωρίς τη προσθήκη silane reagent

Πίνακας 1. Χημική σύσταση των υδρογελών με διαφορετική ποσότητα S.S.

Gel (pH=7)	Ποσότητα S.S.(g)	Ποσότητα H ₂ O (mL)	Ποσότητα φαρμάκου ETID	Ποσότητα δ/τος HCl (μL)
1	0,999	10	350 μL	500
2	1,332	10	-//-	530



3	1,5	10	-//-	547
4	2,664	10	-//-	1750

➤ *Με τη προσθήκη silane reagent:*

APTES

Παρασκευάστηκε stock διάλυμα το οποίο περιείχε 5 mL διαλύματος APTES 98% w/w και 10 mL απιονισμένο νερό.

$d_{\delta/\text{τος APTES}} = 0,948 \text{ g/mL}$, $M_r \text{ APTES} = 221,37 \text{ g/mol}$ επομένως:

Στα 100 g = 105,48 mL δ/τος περιέχονται 98 g APTES

Στα 5 ml $x = 4,65 \text{ g}$

Άρα τα 15 ml stock διαλύματος που παρασκευάστηκαν περιείχαν 4,65 g ουσίας = 21 mmol

Η υδρογέλη περιέχει 0,666 g Sodium Silicate (S.S., $M_r = 212,14 \text{ g/mol}$) δηλαδή 3,14 mmol Si. Άρα για τις εκάστοτε αναλογίες APTES:S.S. απαιτούνται οι παρακάτω τιμές των mmol APTES να περιέχονται στην γέλη:

Πίνακας 2. Ποσότητα των mmol APTES που απαιτούνται για παρασκευή υδρογέλης για την κάθε αναλογία (APTES: S.S.)

<i>Αναλογία (APTES: S.S.)</i>	<i>mmol APTES</i>
1/10	0,314
1/20	0,157
1/40	0,0785
1/80	0,03925

Αφού το stock διάλυμα που παρασκευάστηκε (15 mL) περιέχει 21 mmol APTES, τα μL που πρέπει να ληφθούν από το stock διάλυμα για την παρασκευή υδρογελών που θα έχουν τις παραπάνω αναλογίες APTES:S.S., αναγράφονται στο παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3. Ποσότητα των μL stock δ/τος APTES που απαιτούνται για παρασκευή υδρογέλης για την κάθε αναλογία (APTES: S.S.)

<i>Αναλογία (APTES:S.S.)</i>	<i>μL stock δ/τος APTES</i>
1/10	224
1/20	112



1/40	56
1/80	28

Πίνακας 4. Χημική σύσταση των υδρογελών που παρασκευάστηκαν με Etidronic acid

Gel (pH=7)	Αναλογία (APTES : S.S.)	Ποσότητα S.S(g)	Ποσότητα H₂O (mL)	Ποσότητα πρόσθετου (μL)	Ποσότητα ETID(μL)	Ποσότητα HCl(μL)
1	1/10	0,666	10	224	350	290
2	1/20	-/-	-/-	112	-/-	380
3	1/40	-/-	-/-	56	-/-	370
4	1/80	-/-	-/-	28	-/-	350

Πίνακας 5. Χημική σύσταση των υδρογελών που παρασκευάστηκαν με Pamidronic acid

Gel (pH=7)	Αναλογία (APTES : S.S.)	Ποσότητα S.S(g)	Ποσότητα H₂O (mL)	Ποσότητα πρόσθετου (μL)	Ποσότητα PAM(g)	Ποσότητα HCl(μL)
1	1/10	0,666	10	224	0,290	350
2	1/20	-/-	-/-	112	-/-	380
3	1/40	-/-	-/-	56	-/-	370
4	1/80	-/-	-/-	28	-/-	350

Το αντιδραστήριο APTES σε pH ίσο με 7, δηλαδή στις συνθήκες παρασκευής της υδρογέλης, έχει θετικό φορτίο, καθώς είναι πρωτονιωμένη η αμινομάδα του. Το ETID είναι αποπρωτονιωμένο και έχει αρνητικό φορτίο, ενώ το PAM έχει και θετικό (πρωτονιωμένη αμινομάδα) και αρνητικό (αποπρωτονιωμένη φωσφορική ομάδα) φορτίο. Με βάση τα δεδομένα αυτά, αναμένεται πως παρουσία του APTES λόγω ελκτικών αλληλεπιδράσεων, θα μειώσει αισθητά την αποδέσμευση του ETID, ενώ η «συμπεριφορά» του PAM δεν είναι εύκολο να προσδιοριστεί.

TESPSA

Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο χαρακτηρίζεται από σχετικά μεγάλο ιξώδες και για τη παρασκευή stock υδατικού διαλύματος απαιτούνταν μία διαδικασία. Για την διάλυση του TESPSA στο νερό απαιτούνταν πρώτα η διάνοιξη του δακτυλίου του σουκινικού ανυδρίτη. Έτσι, ζυγίστηκε μία ποσότητα του διαλύματος TESPSA και μαζί με μία αρκετά μεγαλύτερη ποσότητα νερού (που επίσης ζυγίστηκε) προστέθηκε σε ένα vial. Ακολούθησε προσθήκη πυκνού διαλύματος 2 M NaOH υπό ανάδευση, έως τη παραγωγή διαυγούς διαλύματος. Επειδή η ποσότητα του διαλύματος TESPSA που ζυγίζοταν δεν ήταν εφικτό (λόγω υψηλού ιξώδους) να είναι η ίδια σε κάθε παρασκευή stock διαλύματος, οι υπολογισμοί για τα μL που απαιτούνται



για την κάθε αναλογία TESPSA:S.S. πραγματοποιούνταν εκ νέου κάθε φορά. Ένα από τα stock διαλύματα παρασκευάστηκε ως εξής:

Αρχικά ζυγίστηκαν 2,073 g δ/τος TESPSA ($d=1,08 \text{ g/mol}$, $Mr=304.4 \text{ g/mol}$, $94\%w/w$) => 1,92 mL TESPSA και προστέθηκαν 15,08 mL H₂O και χρειάστηκαν 3 πελέτες NaOH για την πλήρη διάλυση. Επομένως, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα όγκου 15,45 mL, άρα:

Στα 100 g = 92,5 mL δ/τος περιέχονται 94 g TESPSA

$$(2,073/1,08) \text{ mL} = 1,92 \text{ ml} \quad x = 1,95 \text{ g}$$

Άρα τα 17 ml stock διαλύματος που παρασκευάστηκαν περιείχαν 1,95 g ουσίας = 6,4 mmol TESPSA και έτσι προκύπτει ότι τα μL που απαιτούνται για τη παρασκευή γελών με συγκεκριμένες αναλογίες TESPSA:S.S. είναι τα αναγραφόμενα στο παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6. Ποσότητα των μL stock δ/τος TESPSA που απαιτούνται για παρασκευή υδρογέλης για την κάθε αναλογία (TESPSA: S.S.)

Αναλογία (TESPSA:S.S.)	μL stock δ/τος TESPSA
1/20	417
1/40	208
1/80	104

Η παρασκευή gel με αναλογία TESPSA:S.S. = 1:10 δεν ήταν εφικτή.

Πίνακας 7. Χημική σύσταση των υδρογελών που παρασκευάστηκαν παρουσία Etidronic acid:

Gel (pH=7)	Αναλογία (TESPSA : S.S.)	Ποσότητα S.S.(g)	Ποσότητα H ₂ O (mL)	Ποσότητα ETID(μL)	Ποσότητα HCl(μL)
1	1/20	0,666	10	350	232
2	1/40	-/-	-/-	-/-	225
3	1/80	-/-	-/-	-/-	210

Πίνακας 7. Χημική σύσταση των υδρογελών που παρασκευάστηκαν παρουσία Pamidronic acid:

Gel (pH=7)	Αναλογία (TESPSA: S.S.)	Ποσότητα S.S.(g)	Ποσότητα H ₂ O (mL)	Ποσότητα PAM(g)	Ποσότητα HCl(μL)
1	1/20	0,666	10	0,290	600
2	1/40	-/-	-/-	-/-	600
3	1/80	-/-	-/-	-/-	320

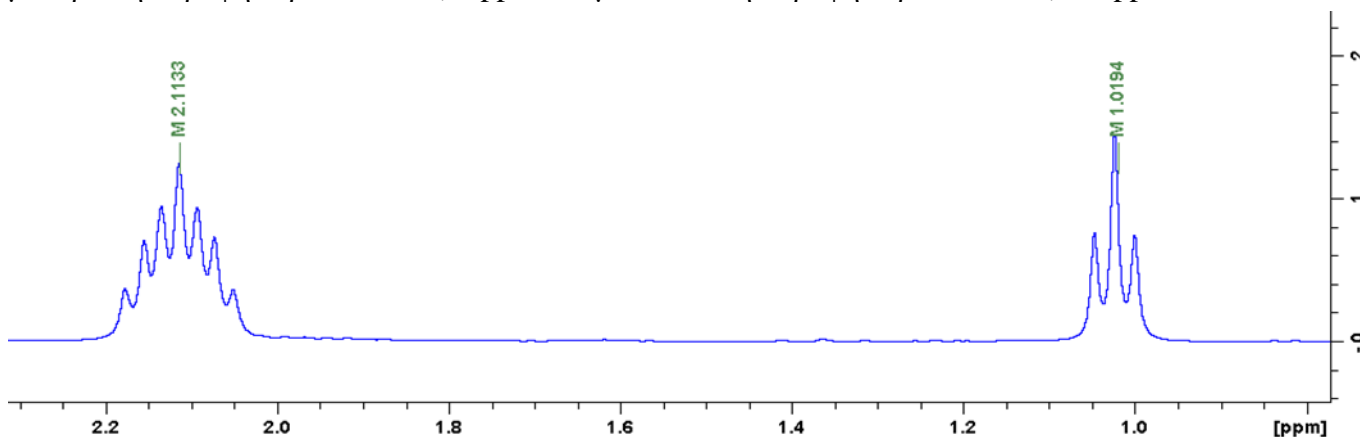


Το αντιδραστήριο TESPSA στο pH παρασκευής των gels, αφού έχει γίνει η διάνοιξη του δακτυλίου του σουκινικού ανυδρίτη, έχει αρνητικό φορτίο, λόγω των αποπρωτονιωμένων καρβοξυλικών ομάδων. Πιστεύεται λοιπόν πως με τη παρουσία του θα αυξηθεί ο ρυθμός και το τελικό ποσοστό αποδέσμευσης του ETID λόγω απωστικών αλληλεπιδράσεων. Όμως στη περίπτωση του PAM, που διαθέτει και τα δύο φορτία, οι απόψεις δίστανται.

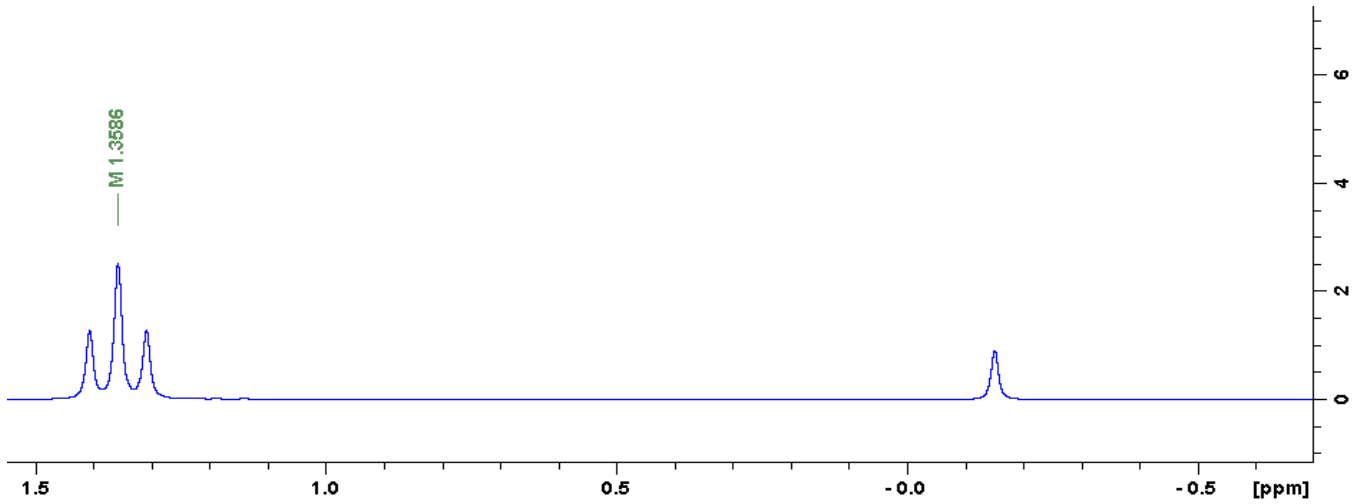
3.3.3. Μετρήσεις του χρόνου αποδέσμευσης

Τα gels αφού παρασκευαστούν αφήνονται να ωριμάσουν για 12 ώρες και με το τέλος του χρόνου αυτού γίνεται προσθήκη 50 ml απιονισμένου νερού στην επιφάνειά τους. Κάθε μία ώρα για 6 ώρες και μετά ανά

τακτά χρονικά διαστήματα, γίνεται λήψη 350 μL από το υπερκείμενο υγρό. Λαμβάνονται δείγματα μέχρι το σύστημα να φθάσει σε ισορροπία, δηλαδή να μην εξέρχεται άλλο φάρμακο από την υδρογέλη. Οι μετρήσεις των δειγμάτων πραγματοποιούνται με φασματοσκοπία ^1H NMR και πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση των κορυφών μέσω του προστιθέμενου προτύπου TSP. Στην κορυφή που δίνει ως σήμα το TSP στο ^1H NMR, δίνεται η τιμή του εμβαδού που αντιστοιχεί στα 9 πρωτόνια που διαθέτει η ένωση και με βάση αυτή τη τιμή προκύπτει το εμβαδόν και των υπόλοιπων κορυφών. Συγκεκριμένα το διφωσφονικό Pamidronic εμφανίζει μία τριπλή κορυφή περίπου στα 1,02ppm και μία επταπλή κορυφή περίπου στα 2,105 ppm:



Το Etidronic εμφανίζει μία τριπλή κορυφή περίπου στα 1,357 ppm.



Πίνακας 8. Τιμές των % μmol που λήφθησαν από τις μετρήσεις ^1H NMR για τα διάφορα gels:



<i>Δείγμα</i>	<i>% μmol</i>
1 g S.S. ETID	
3h	32.79044874
6h	62.46401976
9h	65.23160587
12h	71.71487361
54h	77.11466776
1,332 g S.S. ETID	
1h	13.4110059
2h	21.52303993
3h	27.9056808
4h	32.91895897
5h	38.01911239
6h	41.89771236
9h	48.73271195
12h	54.93822725
15h	59.74417566
18h	61.9242945
24h	63.75841087
32h	65.36745025
40h	64.34878002
48h	64.28190531
1,5 g S.S. ETID	
3h	23.72416632
6h	38.31505558
9h	55.04226266
12h	48.78958748
54h	61.60801976
2,664 g S.S. ETID	
1h	11.01989845
2h	16.80537011
3h	22.35826376
4h	27.91607685
5h	30.23004035
6h	39.00284479



9h	39.25236394
12h	46.06614245
15h	49.00975436
18h	52.83409579
24h	56.95398106
32h	57.02156443
40h	56.83448772
48h	57.63686208

1/10APTES ETID

1h	12.8707975
2h	21.0962425
3h	25.611235
4h	31.177865
5h	35.71043
6h	39.6963025
9h	41.329935
12h	47.379165
15h	50.043335
18h	50.238155
24h	52.14145
32h	51.5365725
40h	51.79127
48h	51.3923075

1/10APTES PAM

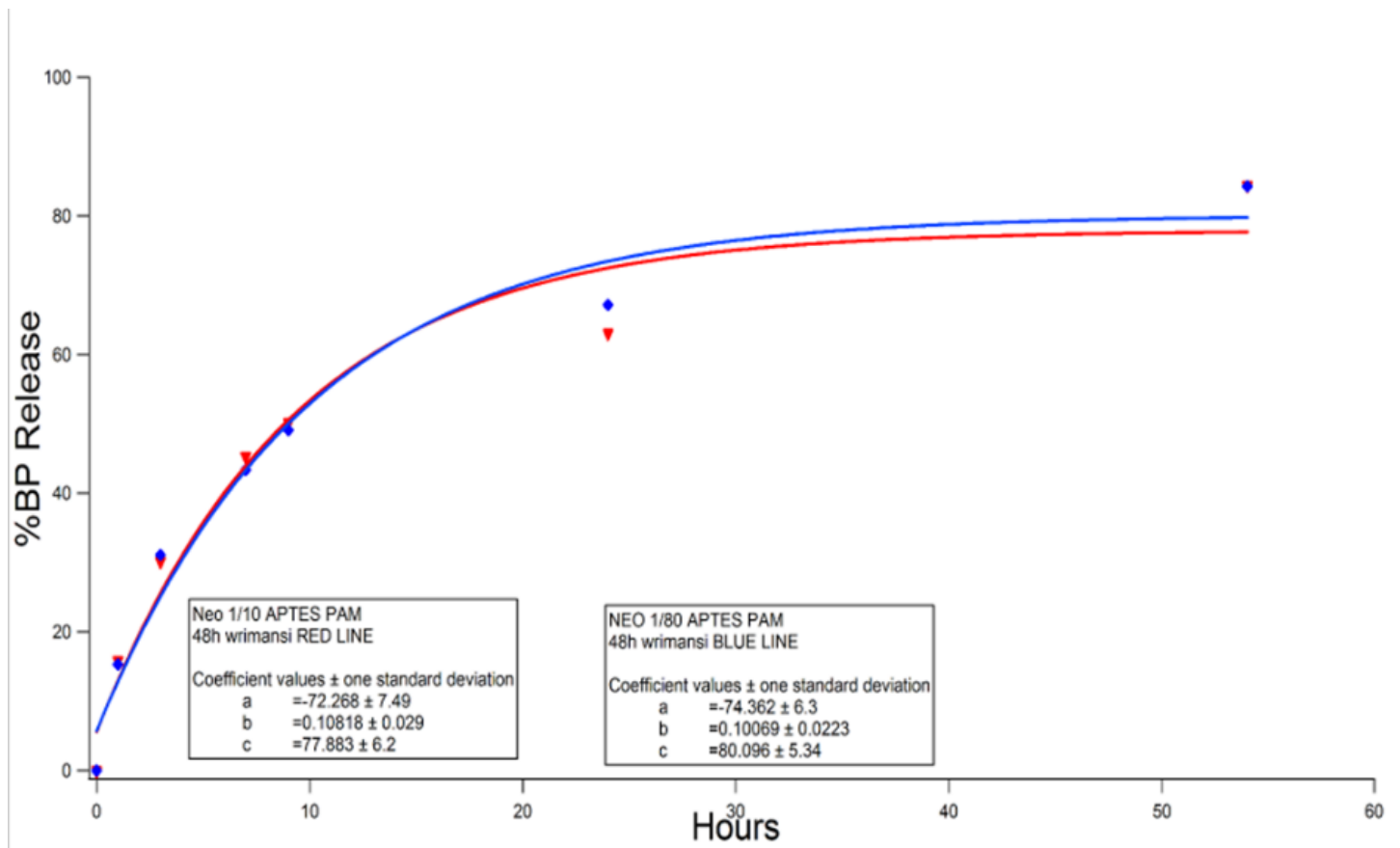
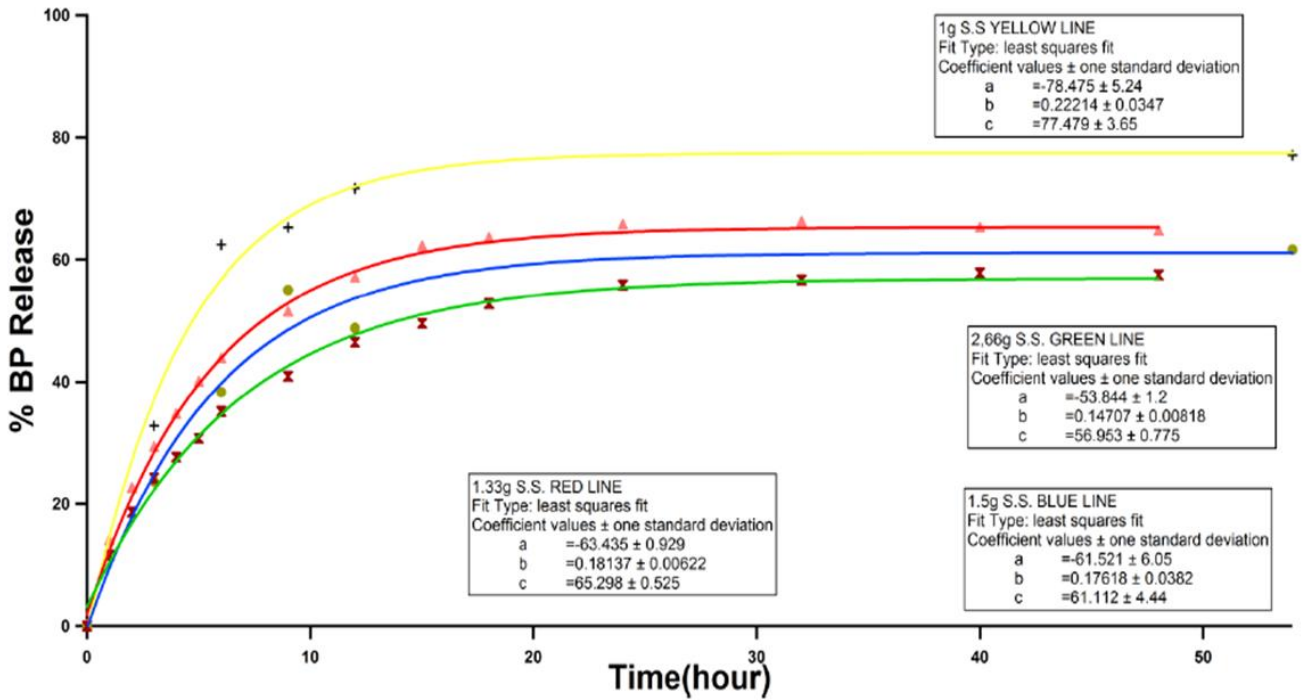
1h	15.780105
2h	24.8743875
3h	32.850125
4h	38.7696175
5h	43.5454825
6h	47.7311825
9h	56.591135
12h	63.73581
15h	66.894995
18h	69.4703375
24h	71.2314675
32h	70.8504675

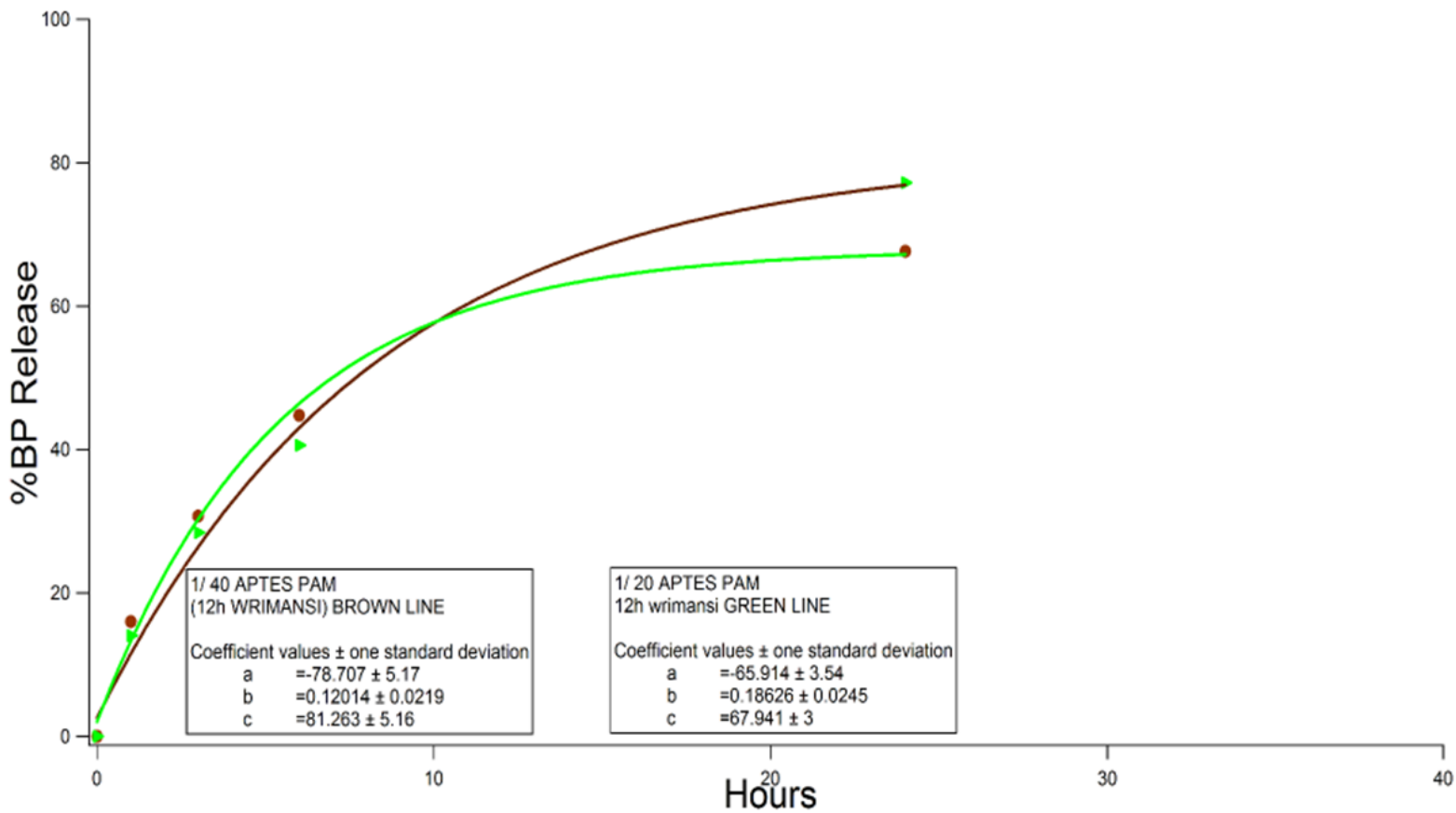
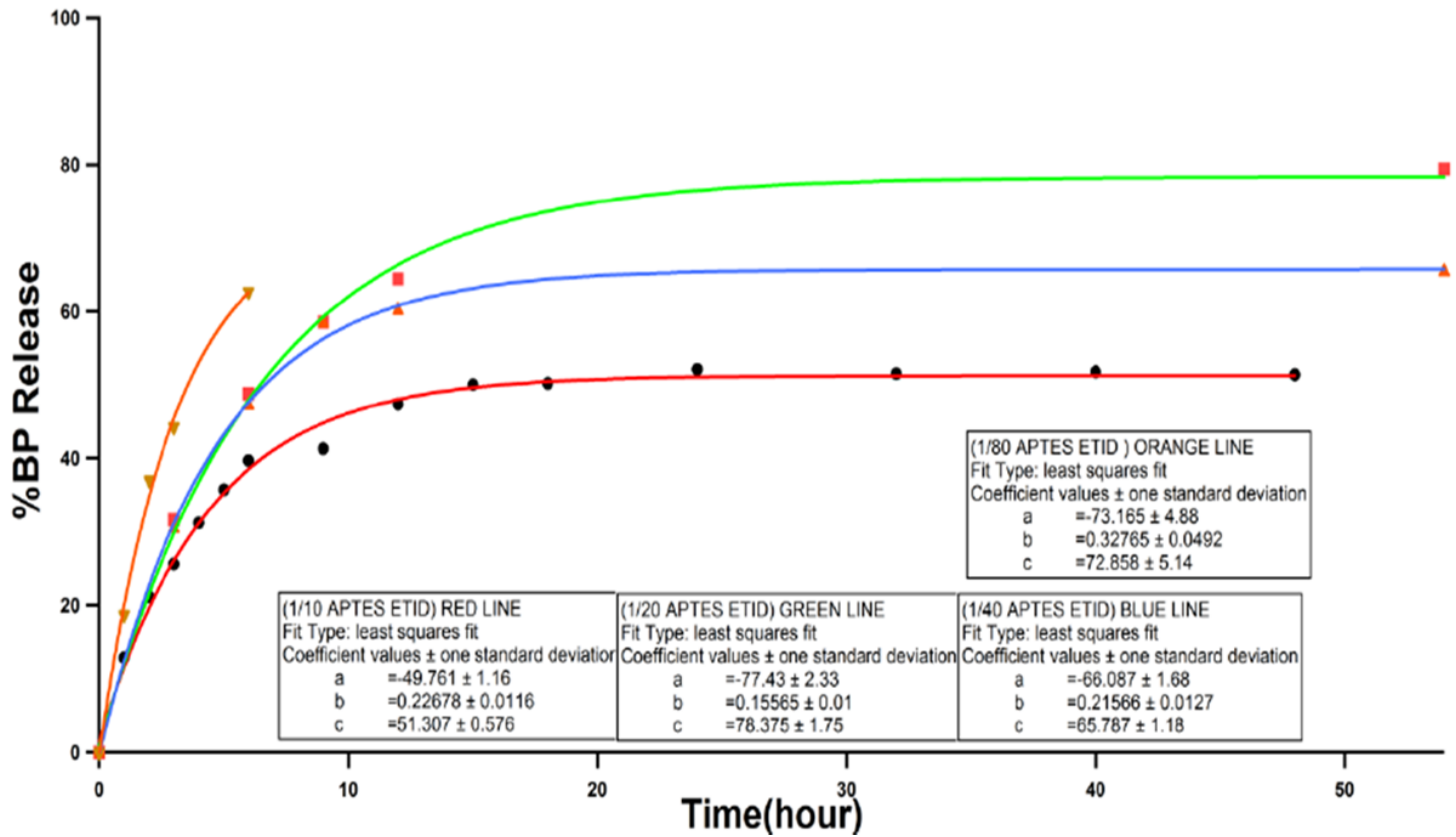


40h	71.20886
48h	70.06504
1/20 APTES PAM	
1h	15.99173554
3h	30.70327863
6h	44.74949941
24h	67.62381818
1/40 APTES PAM	
1h	14.0566706
3h	28.38842798
6h	40.59479575
24h	77.20576623
1/80 APTES PAM	
1h	15.29752066
3h	31.1095059
7h	43.38225384
9h	49.128
24h	67.1638229
54h	84.26717237
1/80APTES ETID	
1h	18.745986
2h	37.03575216
3h	44.27920736
6h	62.72371182
1/40APTES ETID	
3h	30.39385207
6h	47.20695019
9h	58.32243447
12h	60.13588445
54h	65.39624537
1/20APTES ETID	
3h	31.59736517
6h	48.76015644
9h	58.57302758
12h	64.44257088
54h	79.41668176



Λόγω χρονικού περιορισμού και κάποιου λάθους που φανερώθηκε κατά την διενέργεια της εργασίας αυτής, δεν ελέγχθηκαν όλα τα gel που παρασκευάστηκαν ως προς την αποδέσμευση των διφωσφονικών φαρμάκων, παρά μόνο αυτά που αναγράφονται στο παραπάνω πίνακα. Με βάση τα δεδομένα αυτά παρασκευάστηκαν οι ακόλουθες καμπύλες αποδέσμευσης:



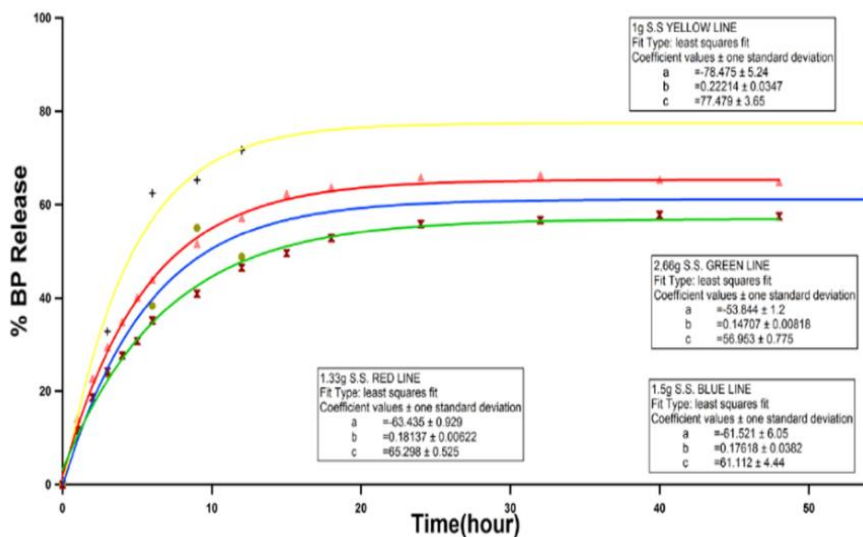




4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όσον αφορά στη πρώτη καμπύλη, όπου με:

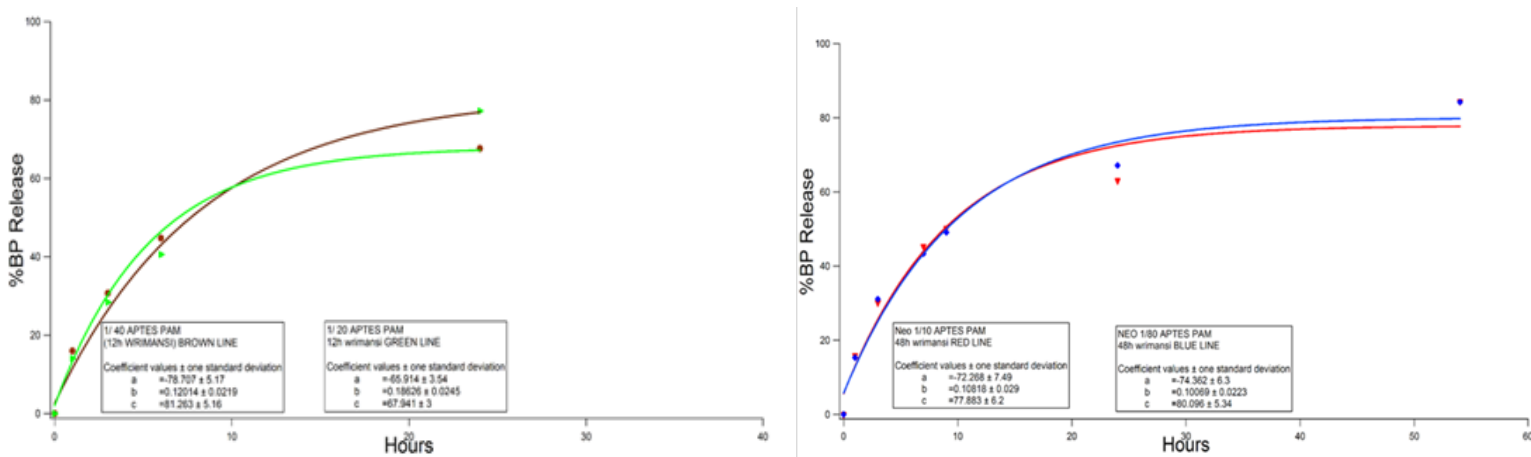
- **Κόκκινο** χρώμα αναπαρίσταται η αποδέσμευση του φαρμάκου ETID από την υδρογέλη που περιέχει **1,333 g S.S.**
- **Κίτρινο** χρώμα αναπαρίσταται η αποδέσμευση του φαρμάκου ETID από την υδρογέλη που περιέχει **1 g S.S**
- **Μπλε** χρώμα αναπαρίσταται η αποδέσμευση του φαρμάκου ETID από την υδρογέλη που περιέχει **1,5 g S.S**
- **Πράσινο** χρώμα αναπαρίσταται η αποδέσμευση του φαρμάκου ETID από την υδρογέλη που περιέχει **2,664 g S.S,**



παρατηρείται ότι αυξάνεται η προστιθέμενη στην γέλη ποσότητα S.S. τόσο πιο αργή είναι η αποδέσμευση του φαρμάκου και ταυτόχρονα τόσο μικρότερο είναι το ποσοστό της τελικής αποδέσμευσης. Το ότι είναι πιο αργή η αποδέσμευση φαίνεται από το ότι η κλίση της καμπύλης, όσο αυξάνεται η ποσότητα του S.S., ενώ ταυτόχρονα μειώνεται και το ύψος της (τελικό ποσοστό αποδέσμευσης μικρότερο). Αυτό εξηγείται καθώς, όσο αυξάνεται η ποσότητα του S.S. τόσο πιο μικρού μεγέθους πόροι δημιουργούνται και έτσι αυξάνεται η επιφάνεια αλληλεπίδρασης, δηλαδή είναι αυξημένος ο αριθμός των ελεύθερων σιλανολών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με τη πυριτία, καθώς είναι περισσότεροι σε αριθμό οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των επιφανειακών σιλανολών της πυριτίας και του φαρμάκου. Λόγω της αυξημένης αλληλεπίδρασης, το φάρμακο αργεί να εξέλθει από τους πόρους της υδρογέλης.



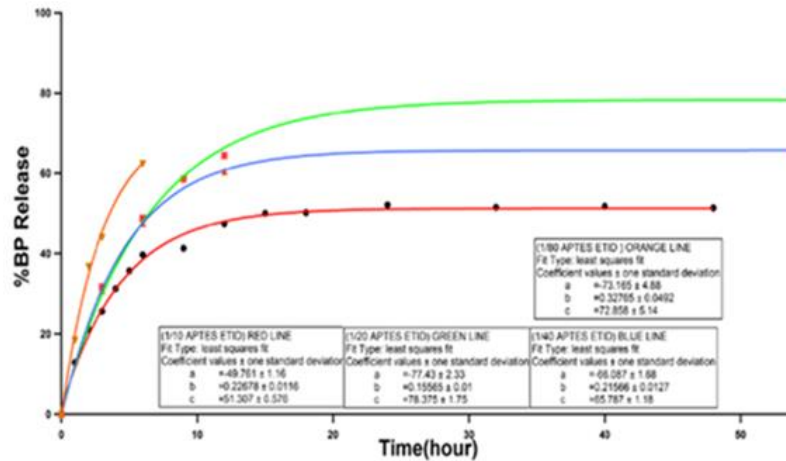
Το δεύτερο και το τέταρτο διάγραμμα μπορούν να σχολιαστούν ταυτοχρόνως.



Το διάγραμμα στα αριστερά αναπαριστά την αποδέσμευση του φαρμάκου PAM, στο οποίο η κόκκινη γραμμή αντιστοιχεί στο gel με αναλογία APTES:S.S. = 1/10, ενώ η μπλε στην αναλογία 1/80. Και τα δύο gel έχουν αφεθεί για ωρίμανση 48h. Στα δεξιά, παρουσιάζεται η αποδέσμευση του φαρμάκου PAM σε gel με αναλογία APTES:S.S.= 1/40 καφέ χρώμα, ενώ με πράσινο η αποδέσμευση του ίδιου φαρμάκου σε gel αναλογίας 1/20. Τα δύο αυτά gel έχουν αφεθεί 12h για ωρίμανση. Όπως μπορεί εύκολα να παρατηρηθεί, οι δύο καμπύλες του διαγράμματος στα δεξιά τέμνονται σε ένα σημείο, κάτι που σημαίνει ότι το gel με αναλογία 1/40 φαίνεται να έχει πιο αργή αποδέσμευση αλλά μεγαλύτερο ποσοστό τελικής αποδέσμευσης. Στο διάγραμμα στα αριστερά φαίνεται ότι τα δύο gel έχουν την ίδια συμπεριφορά παρά την μεγάλη διαφορά που παρουσιάζουν στην αναλογία APTES:S.S.. Όμως οι δύο αυτές καμπύλες δε τέμνονται μεταξύ τους, όπως εκείνες στο δεξί διάγραμμα. Το ότι δεν τέμνονται είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στο ότι αφέθηκαν να ωριμάσουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, αλλά από ότι φαίνεται όχι αρκετό για να έχει πραγματοποιηθεί πλήρως το grafting του APTES στις σιλανόλες της επιφάνειας των πόρων της πυριτίας.

Όσον αφορά στο τρίτο διάγραμμα με:

- **Κόκκινο** χρώμα αναπαρίσταται η αποδέσμευση του φαρμάκου ETID από την υδρογέλη που περιέχει αναλογία APTES:S.S.=**1/10**
- **Πορτοκαλί** χρώμα αναπαρίσταται η αποδέσμευση του φαρμάκου ETID από την υδρογέλη που περιέχει αναλογία APTES:S.S.=**1/80**
- **Μπλε** χρώμα αναπαρίσταται η αποδέσμευση του φαρμάκου ETID από την υδρογέλη που περιέχει αναλογία APTES:S.S.=**1/40**
- **Πράσινο** χρώμα αναπαρίσταται η αποδέσμευση του φαρμάκου ETID από την υδρογέλη που περιέχει αναλογία APTES:S.S.=**1/20**



Η καμπύλη για την αναλογία 1/80 δεν είναι ολοκληρωμένη, επομένως δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα μέσω αυτής. Όμως, δείχνει να έχει τον πιο γρήγορο ρυθμό αποδέσμευσης, κάτι που είναι αναμενόμενο λόγω του ότι είναι η πιο μικρή αναλογία (μικρότερη πιθανότητα για grafting). Επίσης η καμπύλη που αντιστοιχεί στην αναλογία 1/10 έχει και εκείνη την αναμενόμενη «συμπεριφορά», καθώς είναι η πιο πυκνή αναλογία με αποτέλεσμα να συγκρατείται πιο ισχυρά το φάρμακο λόγω αυξημένων ελκτικών αλληλεπιδράσεων. Η δεύτερη και η τρίτη καμπύλη δε παρουσιάζουν την αναμενόμενη «συμπεριφορά» καθώς στο διάγραμμα φαίνεται ότι η πιο πυκνή αναλογία (1/20) έχει μεγαλύτερο ποσοστό αποδέσμευσης από το gel με αναλογία 1/40. Η εξήγηση βασίζεται και πάλι στο ότι για να ολοκληρωθεί η αντίδραση του grafting απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Γι' αυτό στις επόμενες μελέτες ο χρόνος ωρίμανσης θα είναι αρκετά μεγαλύτερος των 12 και 48 ωρών και ανάλογα με τα αποτελέσματα θα εξαχθεί το ανάλογο συμπέρασμα.

Δεν θα μπορούσε να παραληφθεί η σύγκριση μεταξύ των δύο καμπυλών που αντιστοιχούν σε gel με αναλογία APTES:S.S.= 1/10, από τα οποία το ένα ελέγχει την αποδέσμευση του ETID (τρίτο διάγραμμα) και το άλλο του PAM (δεύτερο διάγραμμα). Όπως παρατηρείται, στο τρίτο διάγραμμα φαίνεται πως το τελικό ποσοστό αποδέσμευσης του ETID είναι αρκετά μικρότερο σε σχέση με εκείνο του PAM. Αυτό οφείλεται, όπως έχει προαναφερθεί, στις ελκτικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ του θετικά φορτισμένου APTES και του αρνητικά φορτισμένου ETID.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε η παρασκευή υδρογελών πυριτίας παρουσία silane reagents και συγκεκριμένα του APTES και TESPSA, τα οποία τροποποιούν την επιφάνεια της υδρογέλης, πραγματοποιώντας grafting στις τερματικές σιλανόλες. Σε αυτά τα συστήματα μελετήθηκε το ενδεχόμενο ελεγχόμενης αποδέσμευσης των αντιοστεοπορωτικών φαρμάκων ETID και PAM. Προς το παρόν μόνο η αναλογία 1/10 APTES:S.S. έχει οδηγήσει σε μία αισθητή μείωση του ρυθμού και του τελικού ποσοστού αποδέσμευσης των φαρμάκων. Πιστεύεται πως η αιτία που μόνο αυτή η αναλογία παρουσιάζει



αισθητή μείωση, είναι ότι δεν έχει αφεθεί ο απαιτούμενος χρόνος για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση grafting και γι' αυτό όλες οι αναλογίες παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά. Οι μετρήσεις των gels παρουσία TESPAS δε πραγματοποιήθηκαν σωστά και πρέπει να επαναληφθούν, γι' αυτό δε συμπεριελήφθησαν στα αποτελέσματα.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- {1} Holowka, E. P., & Bhatia, S. K. (2014). Drug delivery: Materials design and clinical perspective. *Drug Delivery: Materials Design and Clinical Perspective*.
- {2} Papathanasiou, K. E., & Growth, C. E. (2017). CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS FOR OSTEOPOROSIS PHARMACEUTICALS BASED ON SILICA, (March).
- {3} Spinthaki, A., Skordalou, G., Stathouloupoulou, A., & Demadis, K. D. (2016). Modified macromolecules in the prevention of silica scale. *Pure and Applied Chemistry*, 88(10–11), 1037–1047. <https://doi.org/10.1515/pac-2016-0807>
- {4} M.T. Drake, B.L. Clarke, S. Khosla (2008). Bisphosphonates : Mechanism of Action and Role in Clinical Practice, 55905(September), 1032–1045. <https://doi.org/10.4065/83.9.1032>
- {5} Papathanasiou, K. E., Turhanen, P., Brückner, S. I., Brunner, E., & Demadis, K. D. (2017). Smart, programmable and responsive injectable hydrogels for controlled release of cargo osteoporosis drugs. *Scientific Reports*, 7(1), 2–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04956-3>
- {6} Barabanova, A. I., Pryakhina, T. A., Afanas, E. S., Zavin, B. G., Vygodskii, Y. S., Askadskii, A. A., ... Khokhlov, A. R. (2012). Applied Surface Science Anhydride modified silica nanoparticles : Preparation and characterization. *Applied Surface Science*, 258(7), 3168–3172. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.11.057>
- {7} Howarter, J. A., & Youngblood, J. P. (2006). Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir*, 22(26), 11142–11147. <https://doi.org/10.1021/la061240g>
- {8} Gang, A., Gabernet, G., Renner, L. D., Baraban, L., & Cuniberti, G. (2015). A simple two-step silane-based (bio-) receptor molecule immobilization without additional binding site passivation. *RSC Adv.*, 5(45), 35631–35634. <https://doi.org/10.1039/C5RA04469C>
- {9} Simon, A., Port, M. C., & Aim, J. P. (2002). Study of Two Grafting Methods for Obtaining a 3-Aminopropyltriethoxysilane Monolayer on Silica Surface, 283, 278–283. <https://doi.org/10.1006/jcis.2002.8385>