

ΝΑΝΟΔΙΣΚΟΙ ΑΝΘΡΑΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΙ ΜΕ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΕΣ ΝΑΝΟΤΕΛΕΙΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΩΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΥΨΗΛΗΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Κ.Μ. Λύρα^{1*}, Ν. Καρούτα³, Κ. Σπύρου^{1,3}, Α. Ενοτιάδης¹, Ν. Χαλμπές³,

Α. Καμινάρη¹, Μ.Β. Πατίλα^{3,4}, Μ. Ζαχαριάδης², Χ. Σταμάτης⁴, Δ. Γουρνής³, Ω. Σιδεράτου¹

¹Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε “Δημόκριτος”, Αθήνα, Ελλάδα

²Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε “Δημόκριτος”, Αθήνα, Ελλάδα

³Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα

⁴Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα

(*k.lyra@inn.demokritos.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένα καινοτόμο σύστημα ανίχνευσης και μεταφοράς φαρμάκων αναπτύχθηκε με βάση νανοδίσκους άνθρακα τροποποιημένους με φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα (oxCNDs@FCDs). Η δοξορουβικίνη (DOX), ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό φάρμακο, δεσμεύτηκε επιτυχώς στους τροποποιημένους νανοδίσκους κυρίως μέσω π-π αλληλεπιδράσεων. Η χορήγηση του προκύπτοντος συστήματος σε δύο ανθρώπινες καρκινικές σειρές, τις DU145 και PC3, οι οποίες εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην DOX, οδήγησε σε αυξημένη δραστηριότητα της DOX ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (0.1 μM), γεγονός που αναμένεται να επιφέρει μείωση των παρενεργειών της. Επιπλέον βρέθηκε ότι το oxCNDs@FCDs εμφανίζει πολύ χαμηλή τοξικότητα. Η αποτελεσματική κυτταρική πρόσληψη της δεσμευμένης DOX βεβαιώνεται με κυτταρομετρία ροής και απεικονίζεται με συνεστιακή μικροσκοπία όπου φαίνεται ότι τα oxCNDs@FCDs εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, ενώ η δεσμευμένη DOX εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα των κυττάρων, γεγονός που δηλώνει τη σταδιακή αποδέσμευση του φαρμάκου από τον φορέα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ποικίλα νανοϋλικά έχουν προταθεί για βιοϊατρικές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένων των συστημάτων ανίχνευσης, διάγνωσης και θεραπείας^[1]. Με βάση τις εφαρμογές αυτές, οι φθορίζουσες τελείες άνθρακα (FCDs) καθώς και άλλα υλικά με βάση τον άνθρακα έχουν πρόσφατα τραβήξει μεγάλο ενδιαφέρον^[2]. Έχει αποδειχθεί ότι τα FCDs είναι φθορίζοντα (οπτική εκπομπή) νανοσωματίδια, ικανά να χρησιμοποιηθούν ως συστήματα ανίχνευσης και μεταφοράς φαρμάκων^[3]. Από την άλλη πλευρά, νανοδομημένα υλικά άνθρακα όπως νανοσωληνίτες άνθρακα, φουλερένια, γραφένιο κ.α. χρησιμοποιούνται εκτενώς ως φορείς φαρμάκων^[4]. Οι νανοδίσκοι άνθρακα αντιπροσωπεύουν μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση του κλασικού γραφίτη, οι οποίοι παράγονται μέσω της διαδικασίας πυρόλυσης Kvaerner Carbon Black & H₂ (CB&H)^[5]. Σε προηγούμενη μελέτη, αποδείχθηκε ότι υδρόφιλοι οξειδωμένοι νανοδίσκοι άνθρακα (oxCNDs) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένα πολλά υποσχόμενο σύστημα μεταφοράς φαρμάκων για τη θεραπεία του καρκίνου^[6].

ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν οξειδωμένοι νανοδίσκοι άνθρακα διακοσμημένοι με φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως σύστημα ανίχνευσης και μεταφοράς φαρμάκων. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα, οι οποίες αλληλεπιδράσαν με οξειδωμένους νανοδίσκους άνθρακα μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων δίνοντας ένα νέο φθορίζον υβριδικό νανοϋλικό, το oxCNDs@FCDs. Το νανοϋλικό αυτό χαρακτηρίστηκε χρησιμοποιώντας συνδυασμό πειραματικών τεχνικών όπως

περίθλαση ακτίνων Χ, φασματοσκοπίες XPS, FT-IR, UV-vis, φθορισμού, κ.α. Μετά τον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό, μελετήθηκε η ικανότητα του να δεσμεύει φαρμακευτικές ενώσεις. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη (DOX), ένα πολύ γνωστό αντικαρκινικό φάρμακο, η οποία δεσμεύτηκε επιτυχώς στο oxCNDs@FCDs, κυρίως μέσω π-π αλληλεπιδράσεων. Το σύστημα αυτό μελετήθηκε σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU145 και PC3, τα οποία εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην DOX, και βρέθηκε ότι εισέρχεται επιτυχώς σε αυτά και αυξάνει σημαντικά τη δραστικότητα της DOX σε σχέση με την ελεύθερη.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η οξείδωση των νανοδίσκων άνθρακα και η παρασκευή των νανοτελειών άνθρακα πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας γνωστές από τη βιβλιογραφία συνθετικές πορείες^[6,7].

Παρασκευή του υβριδικού νανοϋλικού oxCNDs@FCDs: Σε ένα τυπικό πείραμα, 150 mg oxCNDs διασπείρονται σε 50 mL H₂O, ανεβάζουμε την τιμή του pH της διασποράς μέχρι ~9 με προσθήκη διαλύματος NaOH (1M) και η διασπορά αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες. Ακολούθως, 150 mg FCDs διασπαρμένα σε 300 mL H₂O προστίθενται στην διασπορά των oxCNDs και αφήνονται υπό ανάδευση για 48 ώρες. Το τελικό προϊόν oxCNDs@FCDs παραλαμβάνεται μετά από φυγοκέντρηση, έκλυση με νερό μέχρι το υπερκείμενο διάλυμα να φτάσει την τιμή του pH≈6.5-7 και ξήρανση.

Δέσμευση της δοξορουβικίνης στο υβριδικό νανοϋλικό (oxCNDs@FCDs/DOX): Σε ένα τυπικό πείραμα, 10 mg oxCNDs@FCDs διασπείρονται σε 10 mL H₂O. Έπειτα, προστίθενται 10 mg DOX και το διάλυμα εκτίθεται σε υπερήχους για 30 λεπτά και αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες. Το oxCNDs@FCDs/DOX συλλέγεται μετά από φυγοκέντρηση, έκλυση με νερό και ξήρανση. Από το υπερκείμενο διάλυμα προσδιορίζεται η DOX που έχει δεσμευτεί με φασματοσκοπία UV-vis. Έτσι, το υπερκείμενο υγρό συλλέγεται και η συγκέντρωση της μη δεσμευμένης DOX προσδιορίζεται με βάση την απορρόφηση στα 480 nm και με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης αναφοράς στο ίδιο μήκος κύματος.

Μέθοδοι χαρακτηρισμού: Για τη λήψη των φασμάτων FTIR χρησιμοποιήθηκε το όργανο NICOLET 6700H της εταιρίας Thermo Scientific. Τα φάσματα φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων Χ (XPS) λαμβάνονται με το SPECS GmbH system εφοδιασμένο με διπλή πηγή ακτίνων Χ με άνοδο Al-Mg και ένα ημισφαιρικό πολυκαναλικό αναλυτή ηλεκτρονίων (HSA-Phoibos 100)^[8]. Τα δεδομένα της περίθλασης ακτίνων Χ συλλέγονται με ένα D8 Advance Bruker περιθλασίμετρο χρησιμοποιώντας την Κα ακτινοβολία του Cu (40 kV, 40 mA) και μία δευτερογενούς δέσμη ενός μονοχρωμάτορα γραφίτη. Τα διαγράμματα λαμβάνονται στην περιοχή 2θ από 2 μέχρι 30°, ανά 0.02° κάθε 2 s. Για τον προσδιορισμό της DOX χρησιμοποιήθηκε ένα φασματοφωτόμετρο Cary 100 Conc UV-vis (Varian Inc.)

Καλλιέργεια κυττάρων: Χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU145 και PC3. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες παρουσία τροφικού διαλύματος D-MEM που περιείχε 10% FBS, διάλυμα πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης (100 U/mL + 100 μg/mL) και 2 mM L-γλουταμίνης και επώαστηκαν στους 37 °C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Τα κύτταρα αφού αποκολλήθηκαν από τα τοιχώματα της φλάσκας χρησιμοποιώντας ένα διάλυμα που περιέχει τρυψίνη 0.05% (w/v) και EDTA 0.02 % (w/v), υποκαλλιεργήθηκαν δύο φορές την εβδομάδα και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν στα ακόλουθα πειράματα.

Κυτταροτοξική μελέτη: Η κυτταροτοξικότητα των oxCNDs@FCDs, DOX και oxCNDs@FCDs/DOX αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τη γνωστή μέθοδο MTT. Καρκινικά κύτταρα PC3 και DU145 αναπτύχθηκαν σε 96 θέσεων πλάκες (10⁴ κύτταρα/θέση) και επώαστηκαν σε DMEM, που περιείχε

10% FBS για 24 ώρες. Η κυτταρική βιωσιμότητα αξιολογήθηκε με την μέθοδο του MTT. Οι μετρήσεις απορρόφησης γίνονται στα 540 nm χρησιμοποιώντας το φασματοφωτομέτρο M200 plate reader (Tecan group Ltd., Männedorf, Switzerland).

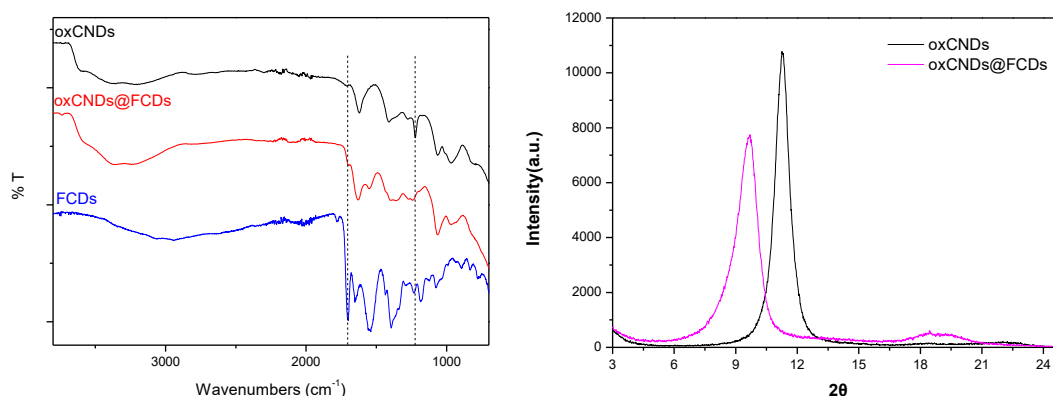
Ενδοκυτταρική πρόσληψη: Η κυτταρική πρόσληψη της ελεύθερης DOX και oxCNDs@FCDs/DOX επιβεβαιώθηκε με κυτταρομετρία ροής. Κύτταρα DU145 αναπτύχθηκαν σε πυκνότητα 25×10^5 κύτταρα ανά θέση σε πλάκα 6 φρεατίων. Στη συνέχεια, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ελεύθερη DOX και oxCNDs@FCDs/DOX (1μM DOX, 13.2 μg/mL υβριδικού υλικού) για 5 και 24 ώρες. Η DOX που έχει εισαχθεί στα κύτταρα προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας το κυτταρόμετρο FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) εκμεταλλευόμενοι το φθορισμό της DOX.

Συνεστιακή Μικροσκοπία: Κύτταρα DU145 (5×10^4 ανά θέση) αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες επιστρωμένες με πολυλυσίνη και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε DOX, oxCNDs@FCDs και oxCNDs@FCDs/DOX (1μM DOX, 13.2 μg/mL υβριδικού υλικού) για 5 ώρες. Έπειτα, τα κύτταρα ακινητοποιήθηκαν στις καλυπτρίδες χρησιμοποιώντας διάλυμα 4% PFA/PBS για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ ακολούθησε έκπλυση με PBS. Τα δείγματα μελετήθηκαν σε μικροσκόπιο Leica TCS SP8 MP (Wetzlar, Germany).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν νανοδίσκοι άνθρακα τροποποιημένοι με φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Συγκεκριμένα, οι νανοδίσκοι άνθρακα αντέδρασαν με νανοτελείες άνθρακα κυρίως μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων δίνοντας το υβριδικό υλικό oxCNDs@FCDs, το οποίο στη συνέχεια χαρακτηρίστηκε φυσικοχημικά με διάφορες τεχνικές. Αρχικά, πιστοποιήθηκε η επιτυχής σύνδεση των νανοτελειών άνθρακα στους νανοδίσκους με φασματοσκοπίες FTIR και φωτοηλεκτρονίων ακτίνων Χ (XPS) καθώς και περίθλαση ακτίνων Χ.

Από το φάσμα FTIR του oxCNDs@FCDs (Σχήμα 1) φαίνονται όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές τόσο των oxCNDs στα 1630, 1412 και 1063 cm^{-1} οι οποίες αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης και κάμψης του δεσμού C-O όσο και οι κορυφές των FCDs στα 1655 και 1540 cm^{-1} που αποδίδονται σε δονήσεις τάσης του δεσμού C-O και C-N. Επιπλέον, η κορυφή των oxCNDs στα 1224 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στις αντισυμμετρικές δονήσεις τάσεις των γεφυρών C-O-C της εποξειδικής ομάδας, έχει εξαφανιστεί στο φάσμα του oxCNDs@FCDs γεγονός που δηλώνει την επιτυχή αντίδραση των αμινομάδων των FCDs με τις εποξειδικές ομάδες των δίσκων.



Σχήμα 1. Φάσματα FTIR των oxCNDs, FCDs και του υβριδικού υλικού oxCNDs@FCDs (αριστερά) και διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ (δεξιά).

Είναι γνωστό ότι η φασματοσκοπία XPS είναι ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο, δεδομένου ότι παρέχει όχι μόνο ποιοτικά αλλά και ποσοτικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, αναλύοντας τις κορυφές των φασμάτων XPS μπορεί να ληφθούν ποσοτικά αποτελέσματα των ατομικών ποσοστών των

δειγμάτων. Με βάση αυτά, προσδιορίστηκαν τα ποσοστά των ατόμων άνθρακα, αζώτου και οξυγόνου στα oxCNDs, FCDs και oxCNDs@FCDs, τα οποία παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Από την ανάλυση των ποσοτικών αποτελεσμάτων είναι εμφανές ότι η εισαγωγή των FCDs στα oxCNDs οδήγησε σε μια σημαντική αύξηση του λόγου C/O. Συγκεκριμένα, ο λόγος C/O του υβριδικού υλικού υπολογίζεται στο 1,27, σημαντικά αυξημένος σε σύγκριση με εκείνο του αρχικού oxCNDs που είναι 0,76, γεγονός που υποδηλώνει την επιτυχή αντίδραση των αμινομάδων των FCDs με τις οξυγονούχες ομάδες των δίσκων. Παρόμοια μείωση της περιεκτικότητας σε οξυγόνο έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία σε ανάλογες περιπτώσεις επιτυχής αντίδρασης μεταξύ ενώσεων που περιέχουν αμινομάδες και οξειδίου του γραφενίου.^[9]

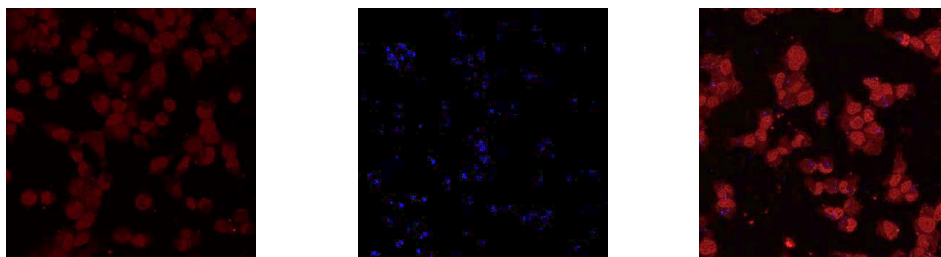
Πίνακας 1. Πίνακας αποτελεσμάτων της φασματοσκοπίας XPS για τα oxCNDs, FCDs και oxCNDs@FCDs .

Υλικό	Άνθρακας, C (%)	Άζωτο, N (%)	Οξυγόνο, O (%)
oxCNDs	43.1 ± 2.5	0 ± 0	56.9 ± 0.6
FCDs	63.5 ± 2.5	7.5 ± 0.7	29 ± 0.6
oxCNDs@FCDs	53 ± 2.5	5.4 ± 0.7	41.6 ± 0.6

Επιπλέον, η περίθλαση ακτίνων Χ, είναι γνωστό, ότι χρησιμοποιείται ευρέως στο χαρακτηρισμό φυλλόμορφων υλικών, εφόσον εφαρμόζοντας το νόμο του Bragg είναι δυνατόν να προσδιοριστεί με ακρίβεια η απόσταση d_{001} . Στο Σχήμα 1 δίνονται τα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων Χ των oxCNDs και oxCNDs@FCDs όπου φαίνεται σαφώς ότι έχει γίνει ένθεση των FCDs ανάμεσα στα γραφιτικά στρώματα. Συγκεκριμένα, στο διάγραμμα XRD του oxCNDs εμφανίζεται μια οξεία κορυφή 001 αντανάκλασης στα 11.4° που αντιστοιχεί σε απόσταση $d_{001} = 7,8 \text{ \AA}$, η οποία μετά από την αντίδραση των δίσκων με τα FCDs, αυξάνεται στα 9,1 \AA , γεγονός που υποδηλώνει τη επιτυχή εισαγωγή των FCDs εντός του ενδοστρωματικού χώρου των νανοδίσκων.

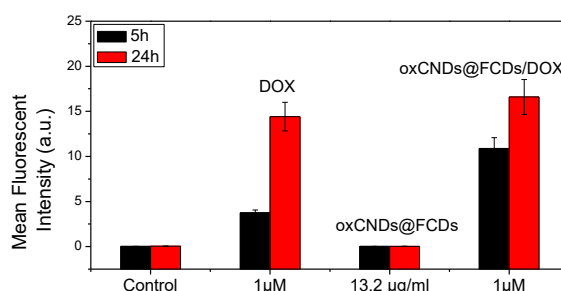
Λαμβάνοντας υπόψη διάφορες πιθανές εφαρμογές για αυτό το νέο υβριδικό υλικό δοκιμάσαμε αν τα oxCNDs@FCDs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποτελεσματικό σύστημα μεταφοράς φάρμακων. Έτσι η δοξορουβικίνη, ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό φάρμακο, χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο φαρμάκου προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα δέσμησης φαρμάκων από τα oxCNDs@FCDs. Η DOX δεσμεύτηκε επιτυχώς στο oxCNDs@FCDs, κυρίως μέσω π-π αλληλεπιδράσεων, και προσδιορίστηκε το ποσοστό δέσμησης της με φασματοσκοπία UV-vis. Χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη αναφοράς, βρέθηκε ότι το ποσοστό δέσμησης της DOX στα oxCNDs@FCDs είναι 32 %.

Ακολούθως, προχωρήσαμε με τη χορήγηση των oxCNDs@FCDs/DOX σε δύο κυτταρικές σειρές προστάτη, τις DU145 και PC3, οι οποίες είναι ανθεκτικές στην DOX. Αρχικά, μελετήθηκε η ικανότητα των oxCNDs@FCDs να μεταφέρουν την DOX στα κύτταρα. Έτσι η ενδοκυττάρια πρόσληψη της DOX μελετήθηκε ποσοτικά με κυτταρομετρία ροής (FACS) και παρατηρήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία (CLSC), εκμεταλλευόμενοι τον φθορισμό τόσο της DOX όσο και των oxCNDs@FCDs. Στο Σχήμα 2 παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες CLSC κυττάρων DU145 επωασμένα με DOX, oxCNDs@FCDs και oxCNDs@FCDs/DOX για 5 ώρες. Η συγκέντρωση της DOX που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1 μM και του oxCNDs@FCDs 13.2 $\mu\text{g/mL}$. Από τις εικόνες φαίνεται ότι τα oxCNDs@FCDs (μπλε χρώμα) εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, η DOX όταν είναι σε ελεύθερη μορφή εντοπίζεται, όπως αναμενόταν, στον πυρήνα των κυττάρων (κόκκινο χρώμα)^[10], ενώ όταν είναι δεσμευμένη εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα, γεγονός που δηλώνει τη σταδιακή αποδέσμευση του φαρμάκου από τον φορέα. Συνεπώς, τα oxCNDs@FCDs δεν παρεμποδίζουν την ενδοκυττάρια πρόσληψη της DOX, αλλά επιτυχώς την μεταφέρουν σταδιακά στον πυρήνα, διατηρώντας, έτσι, την δραστηριότητα της.



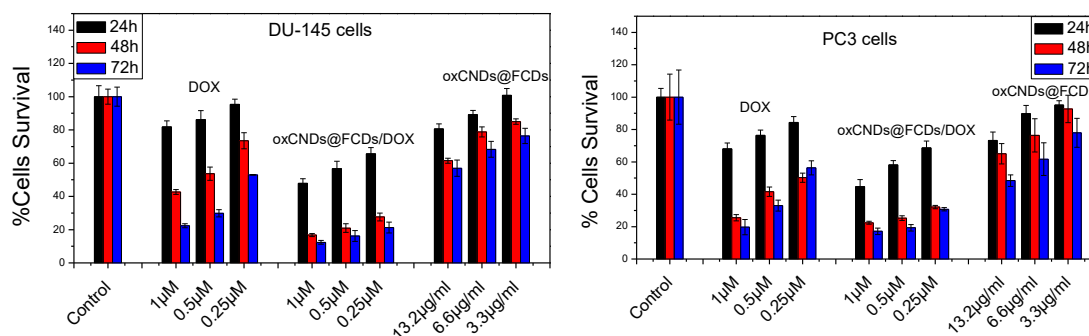
Σχήμα 2. Εικόνες Συνεστιακής μικροσκοπίας καρκινικών κυττάρων DU145 επωασμένων με DOX (αριστερά), oxCNDs@FCDs (μέση) και oxCNDs@FCDs/DOX (δεξιά) για 5 ώρες.

Στο Σχήμα 3 παρουσιάζονται τα διαγράμματα κυτταρομετρία ροής των κυττάρων DU145 τα οποία έχουν επωαστεί με DOX (1 μ M), oxCNDs@FCDs /DOX (1 μ M DOX, 13.2 μ g/mL υβριδικού υλικού) και oxCNDs@FCDs (13.2 μ g/mL) για 5 και 24 ώρες. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα είναι εμφανές ότι η ενδοκυττάρια πρόσληψη της DOX όταν είναι δεσμευμένη ενισχύεται σε σχέση με την ελεύθερη, ενώ η αύξηση του φθορισμού εξαρτάται από το χρόνο επώασης.



Σχήμα 3. Ποσοτική ανάλυση της μέσης έντασης φθορισμού μέσα στα κύτταρα DU145 που είχαν επωαστεί με DOX, oxCNDs@FCDs και oxCNDs@FCDs/DOX για 5 και 24 ώρες όπως προκύπτει από τα διαγράμματα κυτταρομετρίας ροής

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η δραστηριότητα της δεσμευμένης DOX σε σχέση με την ελεύθερη. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε ο κυτταροτοξικός έλεγχος των oxCNDs@FCDs, oxCNDs@FCDs/DOX και DOX σε κύτταρα DU145 και PC3, με την μέθοδο του MTT, τα αποτελέσματα του οποίου φαίνεται στην Σχήμα 4. Τα κύτταρα επώαση σε 24, 48 και 72 ώρες σε διάφορες συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, σε όλα τα πειράματα η συγκέντρωση της DOX ήταν 0.25, 0.5 και 1 μ M και οι αντίστοιχες του υβριδικού υλικού ήταν 3.3, 6.6 και 13.2 μ g/mL. Διαπιστώθηκε ότι τα oxCNDs@FCDs εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα ακόμα και μετά από 72h επώαση, ενώ η εγκλεισμένη DOX προκαλεί σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων και στις δυο κυτταρικές σειρές σε σύγκριση με την ελεύθερη DOX, ιδιαίτερα μετά από 72h επώαση.



Σχήμα 4. Βιωσιμότητα των DU145 and PC3 κυττάρων, τα οποία είχαν επωαστεί με διάφορες

συγκεντρώσεις των *oxCNDs@FCDs*, *oxCNDs@FCDs/DOX* και *DOX*. Η επιβίωση των κυττάρων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT μετά από 24, 48 και 72 ώρες επώαση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκαν νανοδίσκοι άνθρακα τροποποιημένοι με φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα. Η επιτυχής ενσωμάτωση των φθορίζουσών νανοτελειών στους οξειδωμένων νανοδίσκους άνθρακα επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπίες FTIR και XRS, ενώ με περίθλαση ακτίνων X αποδείχθηκε ότι οι νανοτελείες παρεμβάλλονται ανάμεσα στα γραφικά στρώματα των νανοδίσκων. Η δοξορουβικίνη (DOX), ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό φάρμακο, δεσμεύτηκε επιτυχώς στους τροποποιημένους νανοδίσκους κυρίως μέσω π-π αλληλεπιδράσεων. Η ενισχυμένη κυτταρική πρόσληψη της DOX όταν είναι δεσμευμένη στα *oxCNDs@FCDs* επιβεβαιώνεται με κυτταρομετρία ροής και απεικονίζεται με συνεστιακή μικροσκοπία. Βρέθηκε ότι τα *oxCNDs@FCDs* εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, ενώ η δεσμευμένη DOX εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα των κυττάρων, γεγονός που δηλώνει τη σταδιακή αποδέσμευση του φαρμάκου από τον φορέα. Η χορήγηση της δεσμευμένης DOX σε καρκινικά προστατικά κύτταρα DU145 και PC3, τα οποία είναι ανθεκτικά στην DOX, οδήγησε σε αυξημένη δραστηριότητα σε σχέση με την ελεύθερη DOX, ακόμα και σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις DOX (0,25 μΜ). Ως εκ τούτου αναμένεται να μειωθούν σημαντικά οι παρενέργειες που προκύπτουν από τη χορήγηση της DOX. Τέλος, διαπιστώθηκε πως οι φθορίζοντες νανοφορείς άνθρακα εμφανίζουν πολύ χαμηλή κυτταροτοξικότητα. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι οι τροποποιημένοι νανοδίσκοι άνθρακα με φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ως ένα αποτελεσματικό σύστημα ανίχνευσης και μεταφοράς φαρμάκων.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5002567), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] J. A. Barreto, et. al., Adv. Mater. 2011, 23, 18-40.
- [2] N. Jia, et. al., Nanotechnology 2010, 21, DOI:10.1088/0957-4484/21/4/045606.
- [3] A. D. Zhao, et. al., Carbon 2015, 85, 309-327.
- [4] Z. Lui, et. al., Materials Today 2011, 14, 316-323.
- [5] S. Lynum, et. al., (Patent) PCT/NO1998/000093, 18 Mar 2008.
- [6] P. Zygouri, RSC Adv. 2018, 8, 122-131.
- [7] C. Liu, et. al., Biomaterials 2012, 33, 3604-3613.
- [8] T. Tsoufis, et. al., Carbon 2013, 59, 100-108.
- [9] T. Tsoufis, et. al., Chem. Eur. J. 2014, 20, 8129-8137.
- [10] K. M. Laginha, et. al., Clinical Cancer Research 2005, 11, 6944-6949.