

ΑΡΙΣΤΕΙΑ Ι

ΕΡΓΟ: Λειτουργικές Αυτο-οργανούμενες Νανοδομές από Συμπολυμερή κατά Συστάδες και Πρωτεΐνες (NANOMACRO) 1129

ΕΝΟΤΗΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΕ5

ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ 5.2: Έκθεση αποτελεσμάτων σχετικά με αλληλεπιδράσεις νανοδομών με κύτταρα/ορό αίματος



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Στα πλαίσια του προγράμματος NANOMACRO πραγματοποιήθηκαν μελέτες σχετικά με αλληλεπιδράσεις υβριδικών νανοδομών με κύτταρα/ορό αίματος όπως αναλύεται παρακάτω.

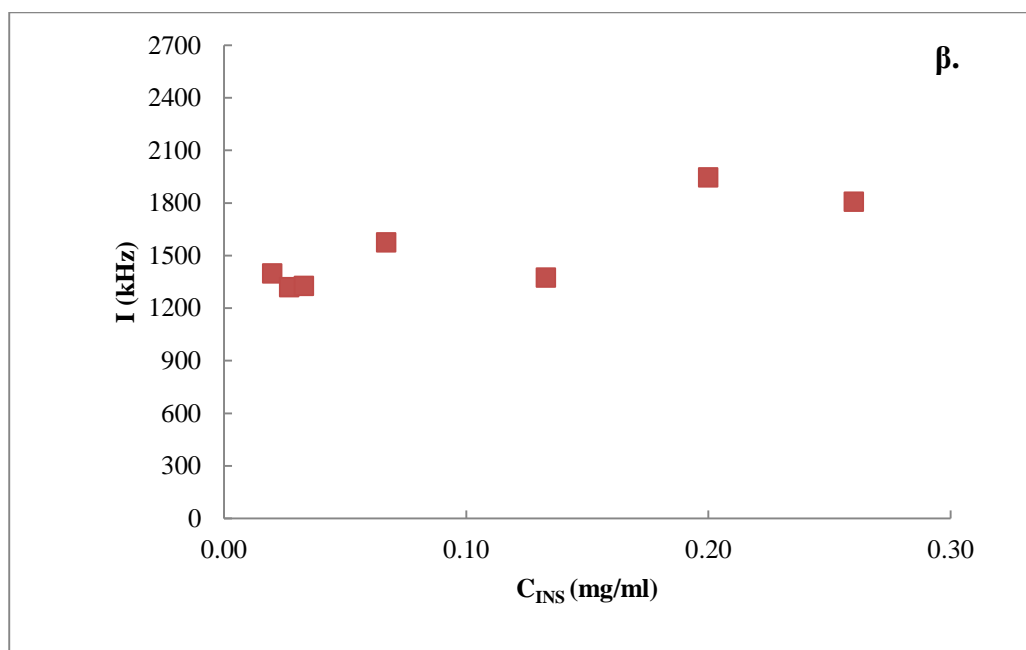
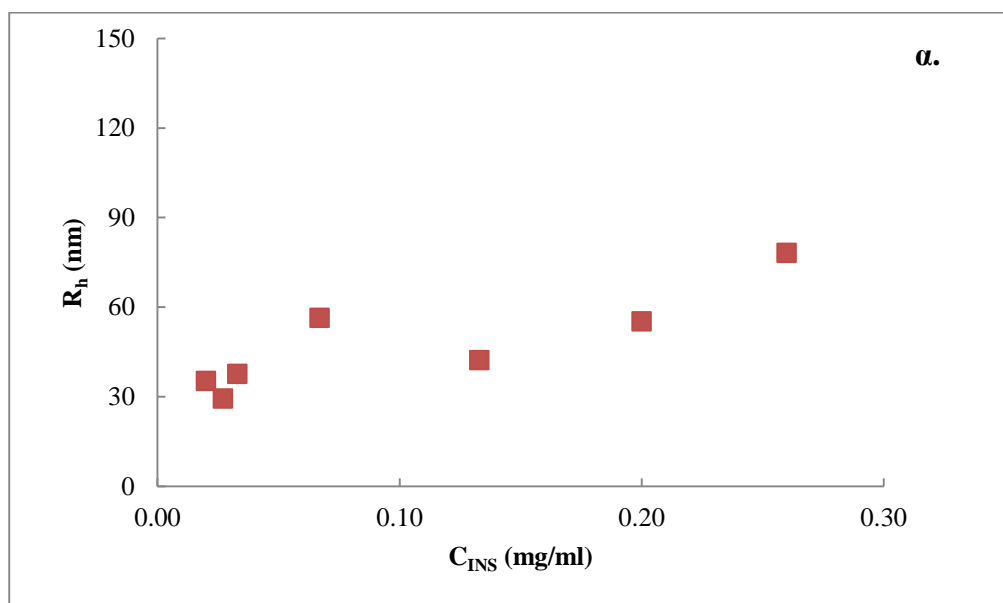
Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των σχηματισθέντων συμπλόκων PEG-b-PLys:INS σε βιολογικά μέσα διασποράς (FBS)

Είναι μείζονος σημασίας για την κλινική εφαρμογή ο χαρακτηρισμός των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των νανοδομών σε βιολογικά μέσα, όπως είναι ο ορός πλάσματος βοειδούς (fetal bovine serum- FBS) καθώς οι αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες του μέσου διασποράς (κυρίως την αλβουμίνη) αναμένεται να διαφοροποιήσει τα φυσικοχημικά και των μορφολογικά χαρακτηριστικά των κολλοειδών νανοδομών, κάτι που έχει ως επίδραση στη βιολογική τους σταθερότητα καθώς και στις ιδιότητες βιοκατανομής και κάθαρσης. Ο ορός πλάσματος βοειδούς περιέχει όλες τις πρωτεΐνες του πλάσματος του ανθρώπινου οργανισμού (αλβουμίνη, ανοσοσφαιρίνες κ.ά.) που συμβάλλουν στην διαδικασία της οψωνινοποίησης (σύνδεσης των πρωτεϊνών του πλάσματος με τους νανοφορείς) και τελικά της απομάκρυνσης τους από τη συστηματική κυκλοφορία. Οι μελέτες αυτές σκοπό έχουν να αποδείξουν κατά πόσο οι σχηματιζόμενοι νανοφορείς διαθέτουν ιδιότητες αποφυγής της αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και της απομάκρυνσης/απόκρισης από το ανοσοποιητικό σύστημα.

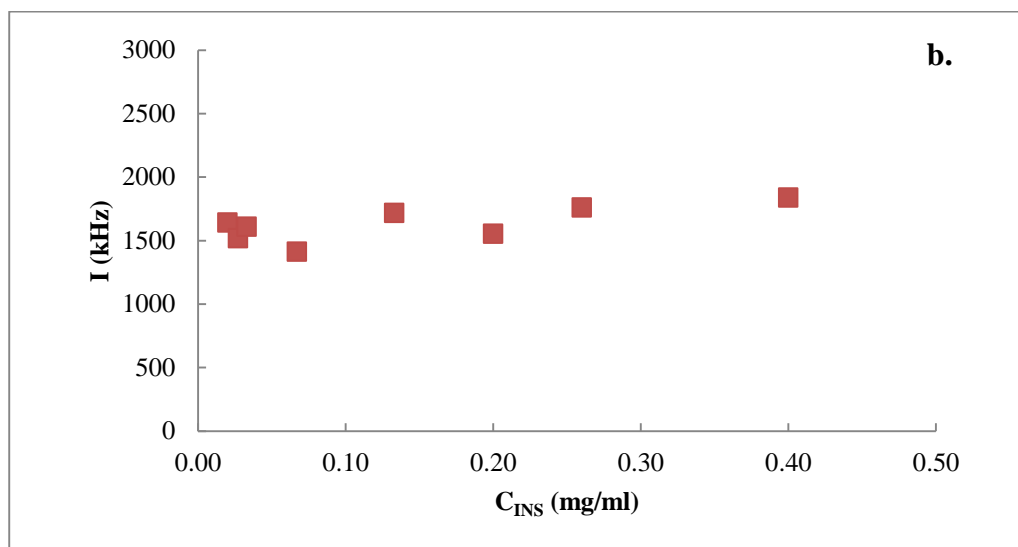
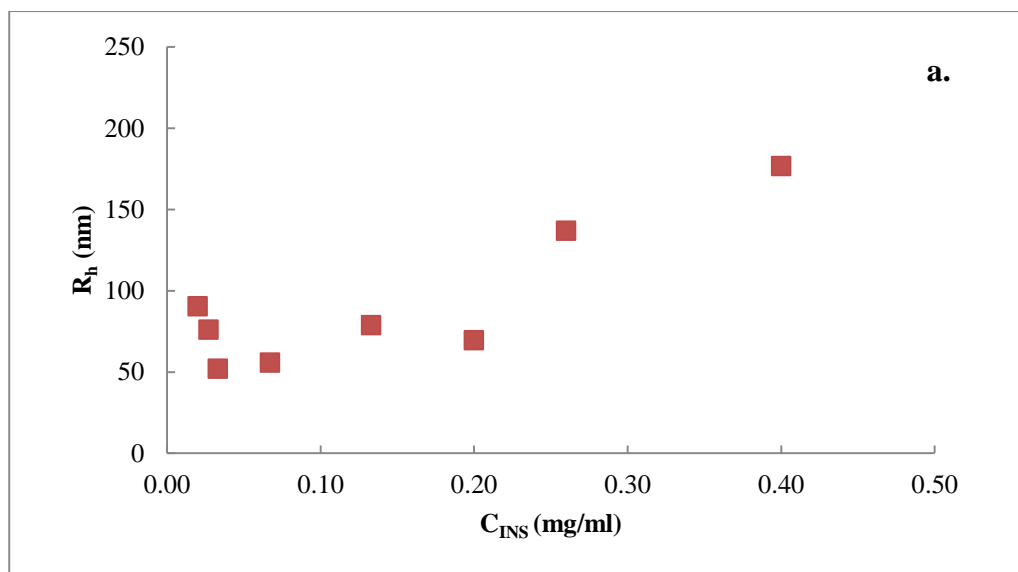
Τα σχηματισθέντα σύμπλοκα (3D νανοδομές) σε υδατικό μέσο διαλυτοποιήθηκαν σε FBS:PBS 10%/90% v/v, ώστε να μελετηθούν οι ιδιότητές τους σε βιολογικό μέσο. Το μέγεθος των συμπλόκων στο βιολογικό μέσο (FBS) παρουσιάζεται στα σχήματα 1 και 2. Το μέγεθος των συμπλόκων στο FBS μειώθηκε από 10 έως και 25 nm, για τα συμπλέγματα που σχηματίστηκαν σε δύο διαφορετικά μέσα, καθώς η μείωση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ήταν εντονότερη σε σύγκριση με τα υδατικά μέσα. Τα ληφθέντα αποτελέσματα υποδεικνύουν μία μερική κροκίδωση των υπερμοριακών συσσωματωμάτων (3D νανοδομές) εξαιτίας της αλληλεπίδρασης των συστατικών (PEG-b-PLys και ινσουλίνης) με τα συστατικά του ορού του πλάσματος, κυρίως με την αλβουμίνη. Η μείωση της υδροδυναμικής ακτίνας παρατηρείται πιθανώς εξαιτίας της ημι-διαπερατότητας σε μερικά ιόντα, η οποία προκαλείται από ωσμωτικές δυνάμεις, οδηγώντας στην εκκένωση του ύδατος από το εσωτερικό των κολλοειδών νανοσωματιδίων, σε χαμηλές συγκεντρώσεις ινσουλίνης και αυτό υποδεικνύει πως οι αλληλεπιδράσεις της ινσουλίνης είναι ισχυρότερες σε σχέση με τον πολυηλεκτρολύτη. Αυτή η παρατήρηση οδηγεί στο συμπέρασμα πως το συμπολυμερές PEG-b-PLys διαθέτει ιδιότητες που προσδίδουν βιολογική σταθερότητα και ιδιότητες αποφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος στα σύμπλοκα, εξαιτίας της παρουσίας της αλυσίδας πολυαιθυλενογλυκόλης, PEG.

Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μία μετατόπιση του ζ-δυναμικού σε αρνητικές τιμές εξαιτίας της σύνδεσης με της πρωτεΐνες, η οποία μπορεί να διαφοροποιήσει το μέγεθος και τις επιφανειακές ιδιότητες (η κύρια πρωτεΐνη συστατικό του FBS είναι η

αλβουμίνη, η οποία φέρει αρνητικό φορτίο σε φυσιολογικές συνθήκες). Συνεπώς, υπάρχει μία σημαντική μείωση στη ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από τα υπερμοριακά συμπλέγματα σύστασης πρωτεΐνες πλάσματος – PEG-b-PLys:INS (Σχήματα 1 και 2). Διαφοροποιήσεις στην ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας οφείλονται στη αλλαγή της μάζας των συμπλόκων (τα κολλοειδή πολυμερικά νανοσωματίδια και σύμπλοκα με τα συστατικά του FBS) και/ή αλλαγές στο ποσοστό των υπερμοριακών συσσωματωμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν μία αλλαγή στην εσωτερική δομή των συμπλόκων PEG-b-PLys:INS εξαιτίας της περιορισμένης αλληλεπίδρασης (πιθανή προσρόφηση και ενσωμάτωση) με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και της συσσωμάτωσής τους.



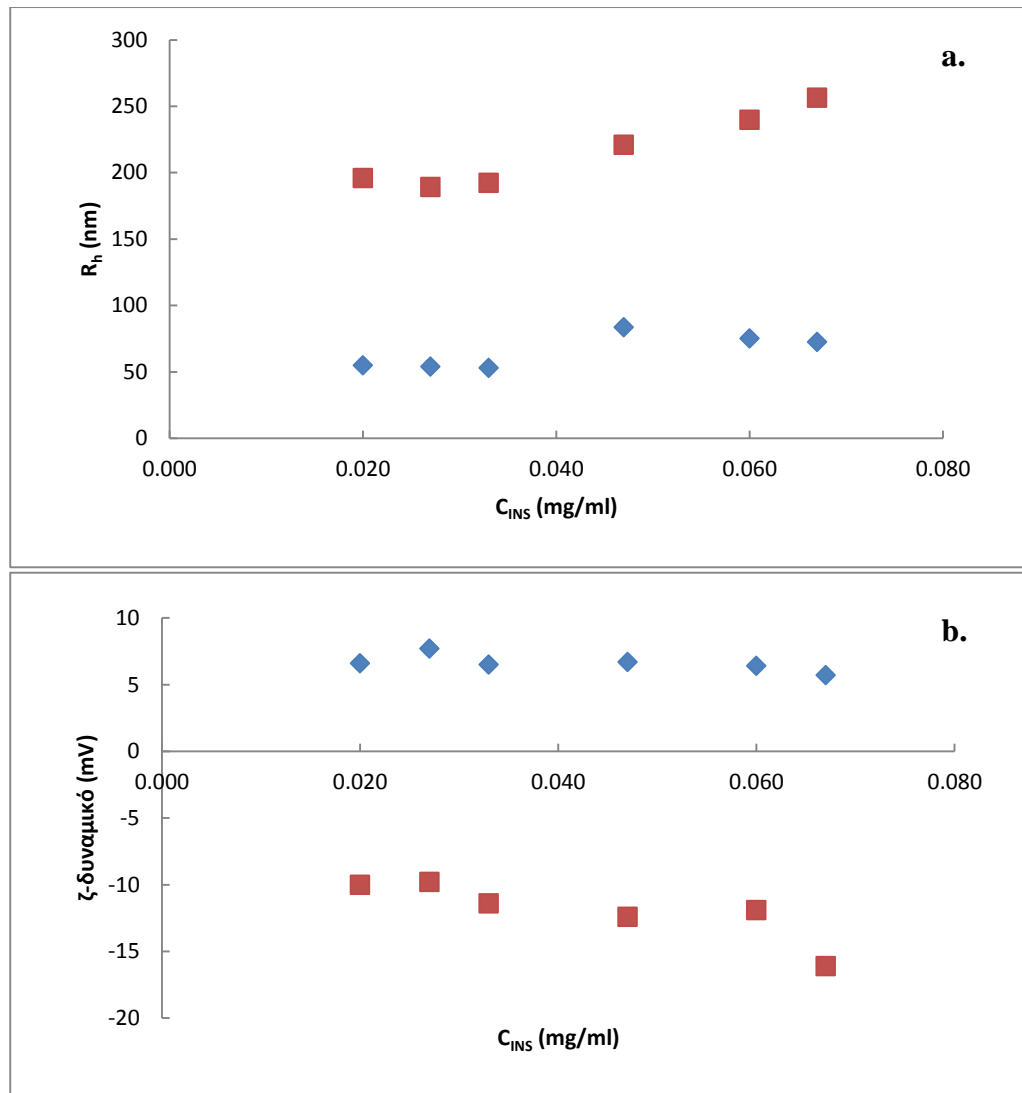
Σχήμα 1. (α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h και (β) ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας 90° , I , ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της ινσουλίνης C_{INS} , για τα διαλύματα των συμπλόκων PEG-b-PLys:INS που σχηματίστηκαν σε $pH=7$ και $IS=0.01M$, και αλληλεπίδρασαν με διάλυμα σύστασης FBS:PBS 10%/90% (v/v).



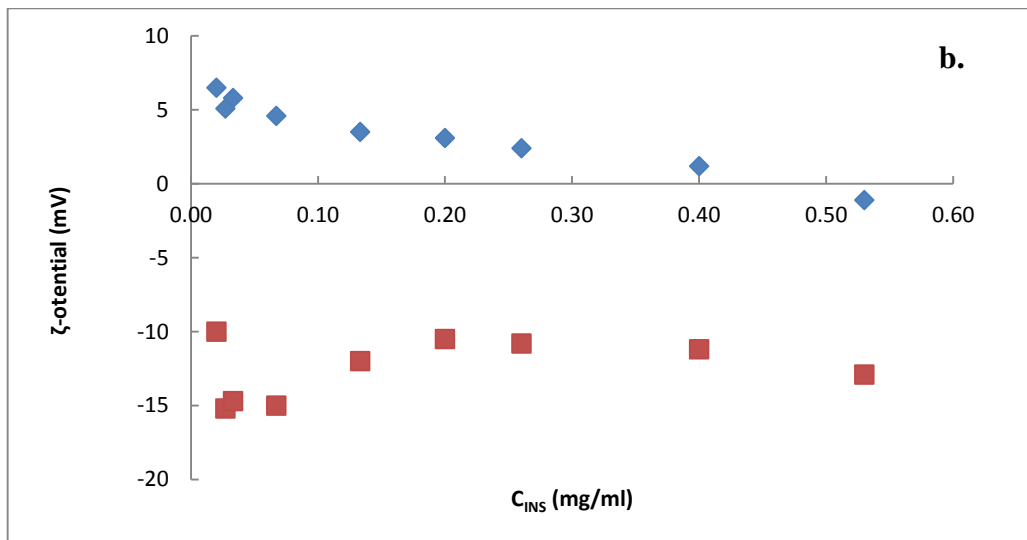
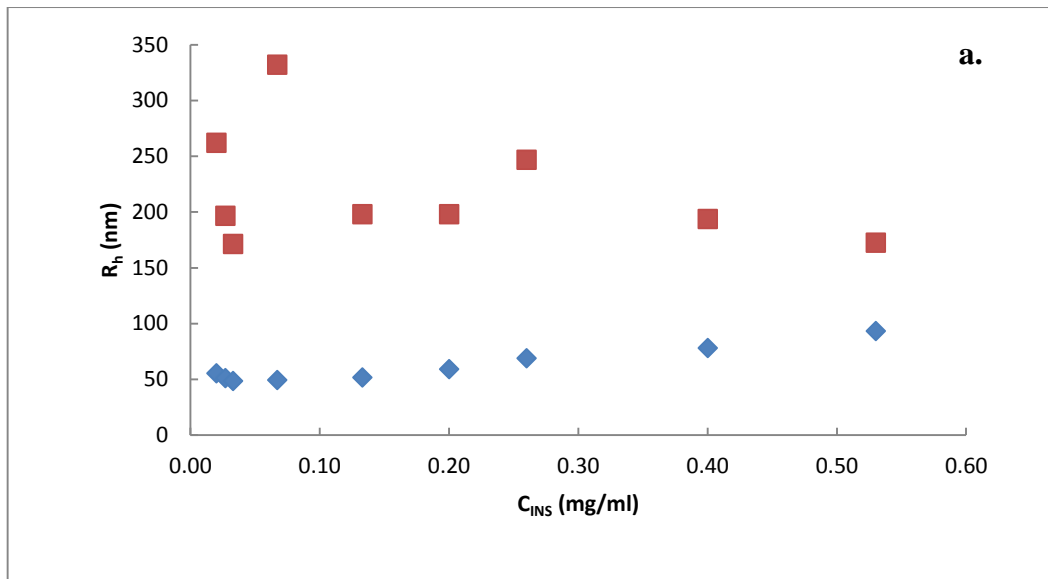
Σχήμα 2. (α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h και (β) ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας 90° , I , ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της ινσουλίνης C_{INS} , για τα διαλύματα των συμπλεγμάτων σύστασης PEG-b-PLys:INS που σχηματίστηκαν σε $pH=7.4$ και $IS=0.154M$, και αλληλεπίδρασαν με διάλυμα σύστασης FBS:PBS 10%/90% (v/v).

Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των συμπλόκων QNPHOSEO:INS σε βιολογικά μέσα διασποράς

Μελετήσαμε τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των συμπλόκων QNPHOSEO:INS σε Ορό Πλάσματος Βοοειδούς (Fetal Bovine Serum, FBS) (σχήματα 3 και 4). Το μέγεθος των συμπλόκων στο βιολογικό μέσο αυξήθηκε από 50 nm στα 200nm, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της INS, σε σύγκριση με τα αρχικά διαλύματα μετά τη διαδικασία σύμπλεξης. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα υπερμοριακά συσσωματώματα των φορέων της ινσουλίνης με τις πρωτεΐνες του πλάσματος παρέμειναν μικρότερα από 300 nm (η διατήρηση του μεγέθους στη νανομετρική κλίμακα είναι σημαντική για βιο-ιατρικούς σκοπούς). Οι τιμές της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, I_{90} , η οποία είναι ανάλογη με τη μάζα των συμπλόκων στο διάλυμα, δεν αυξήθηκε στο FBS, παρέχοντας ακόμη μία απόδειξη πως η σύμπλεξη των 3D νανοδομών συμπολυμερούς κατά συστάδες και ινσουλίνης με τα συστατικά του FBS, ειδικά στο PBS, δε μεταβλήθηκαν σημαντικά στατιστικά. Αυτή η παρατήρηση αποδεικνύει πως το συμπολυμερές προσδίδει ιδιότητες απόκρισης στα νανοσωματίδια (3D νανοδομές), οι οποίες τα καθιστούν αόρατα από το ανοσοποιητικό σύστημα. Μία μετατόπιση του ζ-δυναμικού σε αρνητικές τιμές παρατηρήθηκε εξαιτίας της σύμπλεξης - αρκετά περιορισμένης - με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, οι οποίες μπορούν να αλλάξουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες επιφανείας του κολλοειδούς συστήματος. Το αρνητικό ζ-δυναμικό επεξηγεί την απουσία της καθίζησης εξαιτίας της επιπρόσθετης ηλεκτροστατικής σταθεροποίησης των συσσωματωμάτων (3D νανοδομών). Αυτές οι διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές, αν και υπάρχει προσρόφιση των πρωτεϊνών στην επιφάνεια των συμπλεγμάτων, το μέγεθος και οι ιδιότητες της επιφανείας παραμένουν στα όρια που επιτρέπουν τη χρήση των παρόντων συστημάτων ως νανοφορέων ινσουλίνης.



Σχήμα 3. (α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h , and (β) ζ-δυναμικό ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της ινσουλίνης C_{INS} , για τα διαλύματα συμπλόκων QNPHOSEO:INS που σχηματίστηκαν σε pH=7 και 0.01M NaCl (μπλε σημεία) και μετά από αλληλεπίδραση με βιολογικό μέσο σύστασης FBS:PBS 10% (v/v) (κόκκινα σημεία).



Σχήμα 4. (α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h , and (β) ζ-δυναμικό ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της ινσουλίνης C_{INS} , για τα διαλύματα συμπλόκων QNPHOSEO:INS που σχηματίστηκαν σε pH=7.4 και 0.154M NaCl (μπλε σημεία) και μετά από αλληλεπίδραση με βιολογικό μέσο σύστασης FBS:PBS 10% (v/v) (κόκκινα σημεία).

Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των συμπλόκων QNPHOSEO:PCK σε βιολογικά μέσα διασποράς.

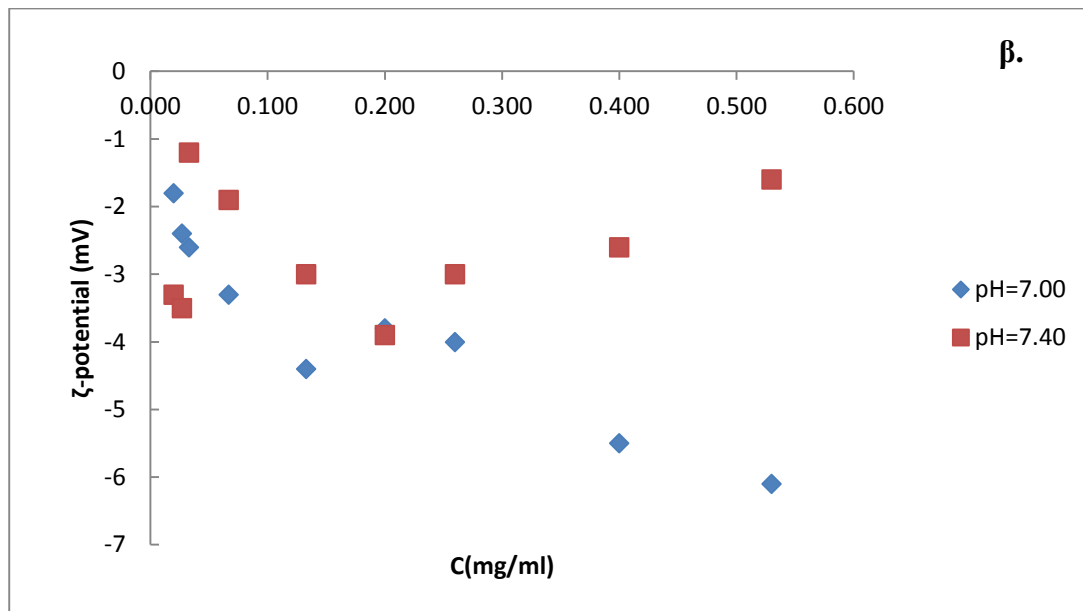
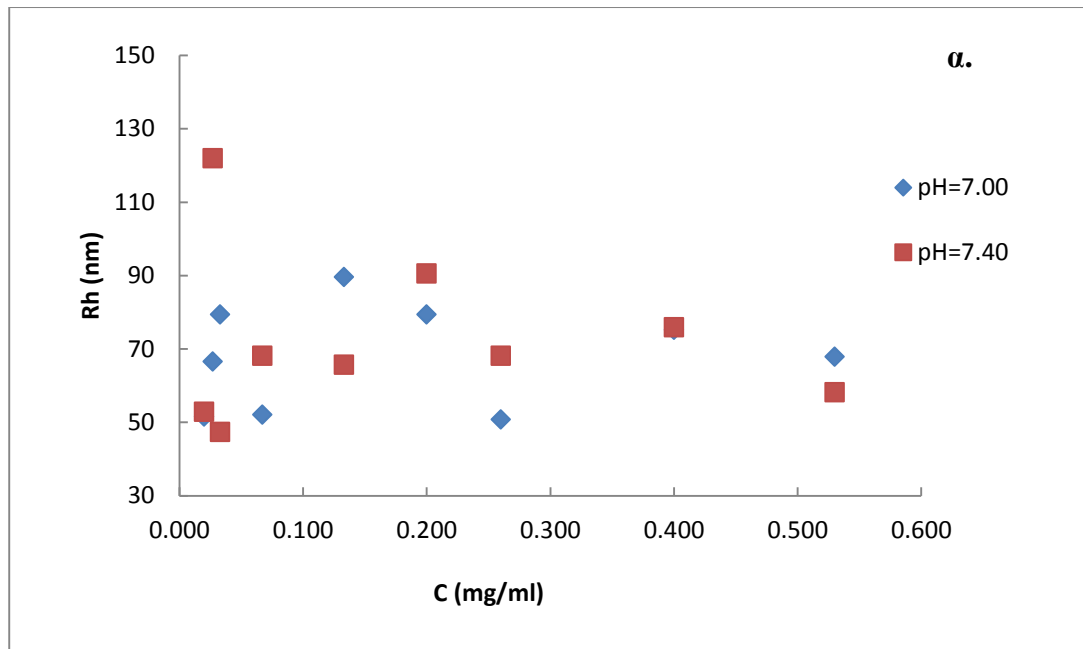
Αναπτύχθηκαν σφαιρικές 3D νανοδομές βασισμένες στο συμπολυμερές QNPHOSEO-PEO και την τιγαποσίδη (tigarotide - PCK), που είναι πεπτίδιο με κυτταροστατική και αντικαρκινική δράση. Ο εγκλωβισμός του σε νανοφορείς πραγματοποιήθηκε για τη μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών του και για στοχευμένη δράση στους καρκινικούς ιστούς. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των συμπλόκων (υδροδυναμική ακτίνα και ζ-δυναμικό) που σχηματίστηκαν στα δύο διαφορετικά υδατικά μέσα, προσδιορίστηκαν και μετά την μεταφορά των συμπλόκων σε μέσο που προσομοιάζει τα βιολογικά υγρά (μίγμα PBS/10%FBS). Χαρακτηριστικά αποτελέσματα δίδονται στο σχήμα 5.

Πραγματοποιήθηκαν μελέτες των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των σφαιρικών 3D νανοδομών σε βιολογικό μέσο βασισμένων στο συμπολυμερές κατά συστάδες (πολυηλεκτρολύτης κατά συστάδες) QNPHOSEO, τα οποία είχε συμπλεχθεί με το PCK. Ως βιολογικό μέσο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που αποτελούνταν από ορό πλάσματος βοοειδούς και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε αναλογία 10% κατά όγκο (FBS/PBS 10% v/v). Ο ορός πλάσματος βοοειδούς περιέχει όλες τις πρωτεΐνες του πλάσματος του ανθρώπινου οργανισμού (αλβουμίνη, ανοσοσφαιρίνες κ.ά.) που συμβάλλουν στην διαδικασία της οψωνινοποίησης (σύνδεσης των πρωτεϊνών του πλάσματος με τους νανοφορείς) και τελικά της απομάκρυνσής τους από τη συστηματική κυκλοφορία. Οι μελέτες αυτές σκοπό έχουν να αποδείξουν κατά πόσο οι σχηματιζόμενοι νανοφορείς διαθέτουν ιδιότητες αποφυγής της αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και της απομάκρυνσης/απόκρισης από το ανοσοποιητικό σύστημα. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για το φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των σχηματιζόμενων νανοδομών ήταν η Δυναμική, η Στατική και η Ηλεκτροφορητική Σκέδαση του Φωτός.

Όσον αφορά τα συστήματα QNPHOSEO:PCK, το μέγεθος των συμπλοκών σε βιολογικό μέσο (FBS) δεν αυξήθηκε σημαντικά (περίπου 30nm), ως συνάρτηση της συγκέντρωσης PCK. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα υπερμοριακά συσσωματώματα των συμπλόκων της ινσουλίνης με τις πρωτεΐνες του πλάσματος παρέμειναν μικρότερα από 300nm (εντός της κλίμακας των νανοσωματιδίων, που είναι σημαντική παράμετρος για βιοϊατρικές εφαρμογές). Οι τιμές της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, I_{90} , η οποία είναι ανάλογη προς τη μάζα του συμπλόκου στο διάλυμα, αυξήθηκε στο FBS/PBS 10% v/v, παρέχοντας απόδειξη πως πραγματοποιήθηκε συμπλοκοποίηση των νανοσωματιδίων με συστατικά του FBS, αλλά όχι σε μεγάλο βαθμό. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι το συμπολυμερές QNPHOSEO προσδίδει “stealth” ιδιότητες (δηλ. ιδιότητες απόκρυψης/αποφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος) και κολλοειδή σταθερότητα στα σύμπλοκα στο βιολογικό μέσο, λόγω της παρουσίας των PEO αλυσίδων που «θωρακίζουν» τα σύμπλοκα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε καθίζηση των συμπλοκών όταν αλληλεπίδρασαν με διαλύματα FBS/PBS 10% v/v.

Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε μια μετατόπιση του ζ-δυναμικού των συμπλοκών σε αρνητικές τιμές, πιθανόν λόγω κάποιας μερικής δέσμευσης των πρωτεϊνών του FBS στην επιφάνεια των συμπλοκών της ινσουλίνης, οι οποίες μπορούν να τροποποιήσουν το μέγεθος και τις επιφανειακές ιδιότητες των νανοσωματιδίων-3D νανοδομών (το κύριο συστατικό του FBS είναι η αλβουμίνη η οποία φέρει ένα αρνητικό φορτίο σε φυσιολογικές συνθήκες). Η μετατόπιση του ζ-δυναμικού σε αρνητικές τιμές εξηγεί την απουσία καθίζησης των συμπλοκών, λόγω της ηλεκτροστατικής σταθεροποίησης των υπερμοριακών συμπλεγμάτων των νανοσωματιδίων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Με βάση τις μελέτες, αποδείχθηκε πως τα σύμπλοκα του PCK με τον πολυηλεκτρολύτη QNPHOSEO χαρακτηρίζονται από stealth ιδιότητες, καθώς η αύξηση της υδροδυναμικής διαμέτρου των νανοσωματιδίων μετά την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες αυξήθηκε περίπου 15nm, ανεξάρτητα από το ποσοστό του ενσωματωμένου PCK στα σύμπλοκα. Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη πως τα σχηματισθέντα σύμπλοκα παραμένουν σχεδόν αόρατα από το ανοσοποιητικό σύστημα, αποφεύγοντας την φαγοκυττάρωση, καθώς η αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος είναι περιορισμένη. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι σημαντικό για τη χρήση των δεδομένων νανοσυστημάτων σαν συστήματα μεταφοράς του PCK.

Συμπερασματικά, οι σχηματισθέντες νανοφορείς του PCK παρουσίασαν βιολογική σταθερότητα σε μέσα που προσομοιάζουν τις συνθήκες του ανθρώπινου πλάσματος, ενθαρρύνοντας την περαιτέρω *in vivo* εφαρμογή τους.



Σχήμα 5. (α) Υδροδυναμική ακτίνα, R_h και (β) ζ-δυναμικό, ως συνάρτηση της $C_{PCK3145}$, για τα διαλύματα του συστήματος QNPHOSEO:PCK3145 σε pH=7.00 and 0.01M NaCl (μπλε σημεία) και σε pH=7.40 και 0.154M NaCl (κόκκινα σημεία) σε FBS.

In vitro δοκιμασίες πολλαπλασιασμού κυττάρων

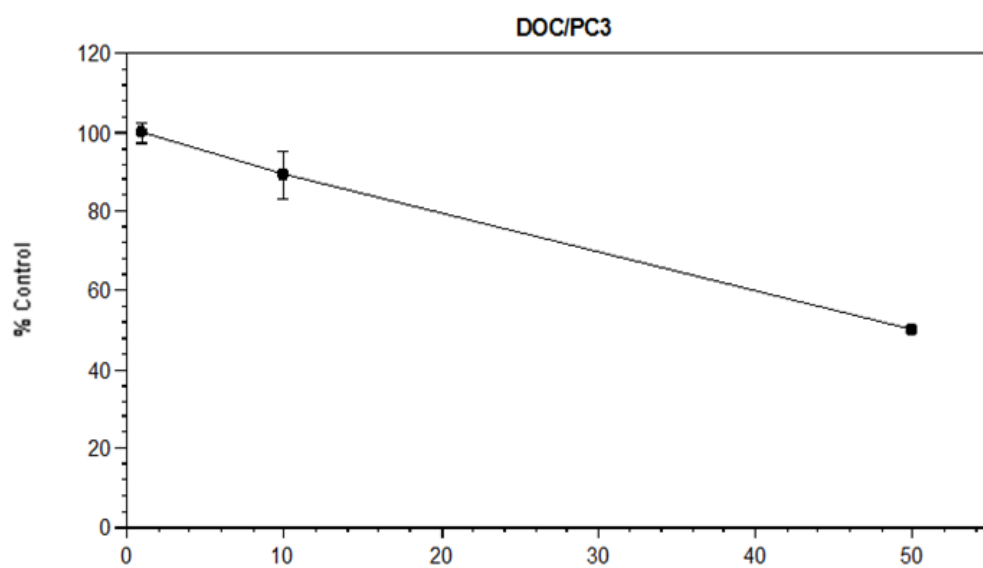
Θεραπείες κυττάρων PC3

Κύτταρα PC3 του προστάτη, μια κυτταρική γραμμή αδενοκαρκινώματος, υποβλήθηκαν σε θεραπεία με υδριδικούς νανοφορείς σύστασης QNPHOSEO και PCK, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του πεπτιδίου ($C_{PCK}=0,260$, $C_{PCK}=0,067$ και $C_{PCK}=0,027$). PC3 κύτταρα αναπτύχθηκαν σε 70-80% στο μέσο Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) συμπληρωμένο με 10% ορό πλάσματος βοειεδούς (FBS) σε πλάκες 96 φρεατίων. 24 ώρες μετά την σπορά των κυττάρων στα μέσα ανάπτυξης άλλαξε το μέσο σε 5% FBS για άλλες 24 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με νανοφορείς σε διάφορες συγκεντρώσεις ή PCK (0,01, 0,1, 1, 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$) ή Docetaxel (1, 10 και 50 ηM) για 24, 48 και 96 ώρες (σχήμα 6).

Η ανάπτυξη των κυττάρων

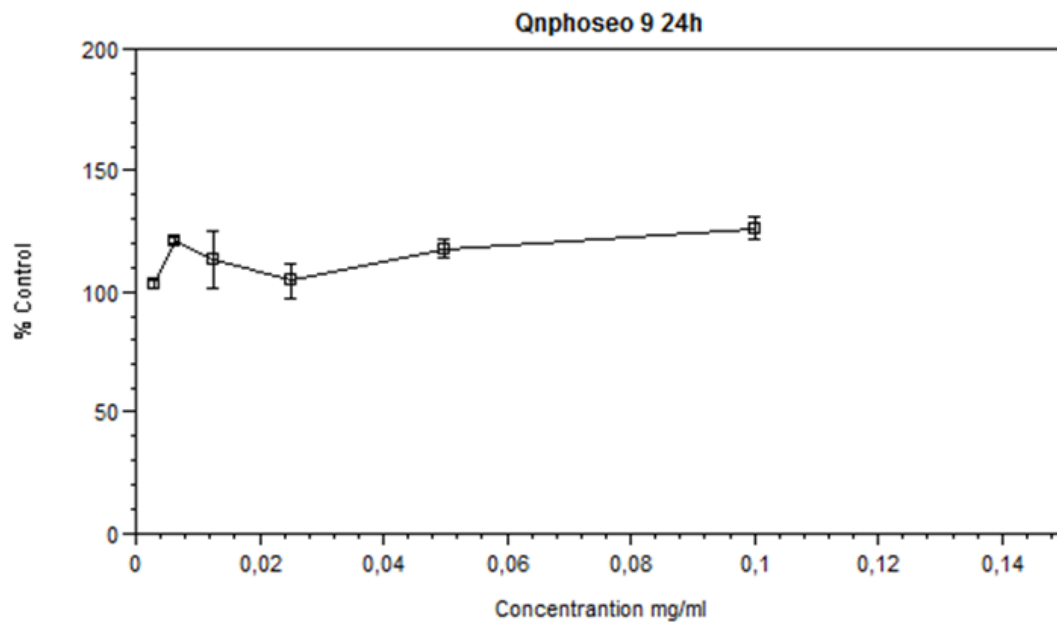
Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός / ανάπτυξη μετρήθηκε με χρήση του 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλτετραζωλίου (MTT/Sigma Ltd). PC-3 κύτταρα επιστρώθηκαν σε πλάκες 96 φρεατίων σε πυκνότητα κυττάρου των κυττάρων 2000 / φρεάτιο και αναπτύχθηκαν σε 150 μl / φρεάτιο μέσο συμπληρωμένο με 10% FBS. Μετά από 24 ώρες το μέσο άλλαξε σε 5% FBS για άλλες 24 ώρες, στη συνέχεια τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία επί 48 ώρες με νανοφορείς σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις 10% του MTT προστέθηκε σε κάθε φρεάτιο σε humidified ατμόσφαιρα (37 ° C, 5% CO₂). Μετά από 4 ώρες, οι πλάκες αναρροφήθηκαν/ 150 ml DMSO προστέθηκε στο καθένα. Ποσοτικοποίηση της χρωστικής φορμαζίνης που παράγεται από μεταβολικώς δραστικά κύτταρα διεξήχθη με πολλές εκβαθύνσεις σε φασματοφωτόμετρο με μέτρηση της απορρόφησης στα 450nm με μία μικροπλάκα ELISA reader (Versa max, Molecular Devices). Οι MMT προσδιορισμοί μετρούν κυρίως τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων σε καλλιέργεια, έμμεσα με την κατάσταση / βιωσιμότητα των κυττάρων.

Στις συγκεντρώσεις που δοκιμάσαμε τους φορείς βρέθηκε πως είναι όλοι τοξικοί για τα κύτταρα (σχήματα 7 και 8). Ιδιαίτερα μετά τις 48h τα ζωντανά κύτταρα ήταν λιγότερα από το 50% του control. Θα μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε μόνο το QNPHOSEO σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 0,003mg/ml με την προϋπόθεση πως αυτή η συγκέντρωση είναι αρκετή ώστε φέρει και το PCK.

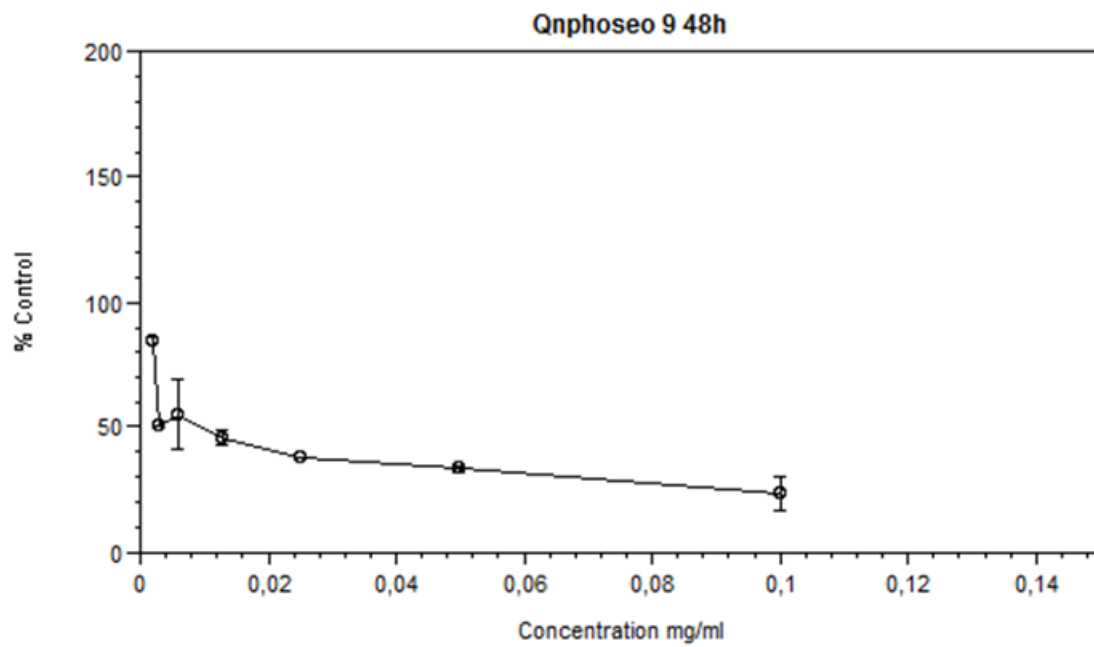


Σχήμα 6: Δοκιμασίες πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC3 σε επεξεργασία με Docetaxel (50nM,10nM,1nM) για 48h.

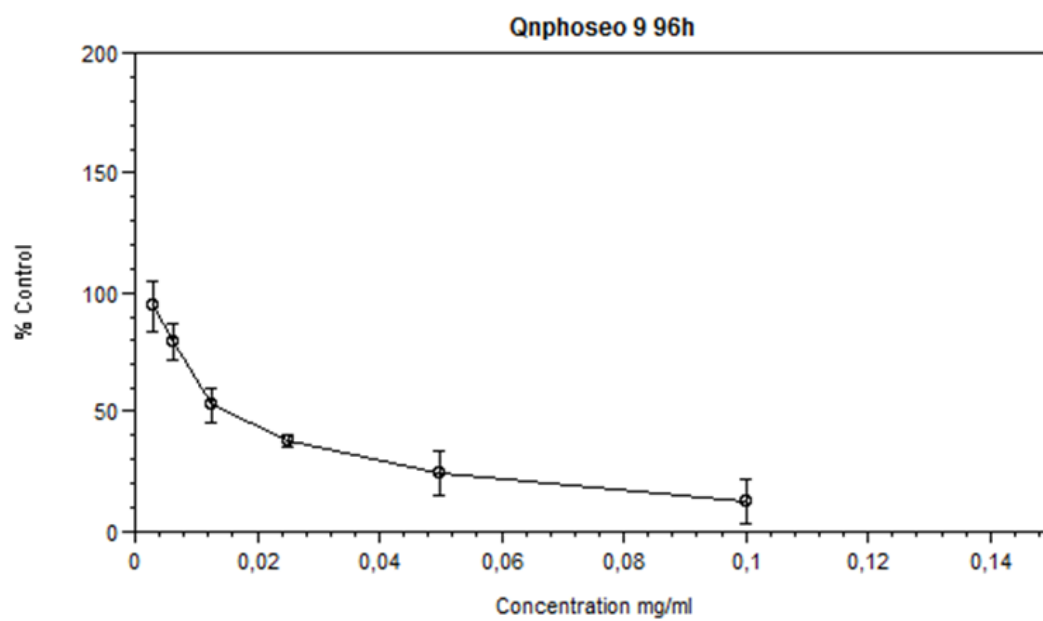
A.



B.

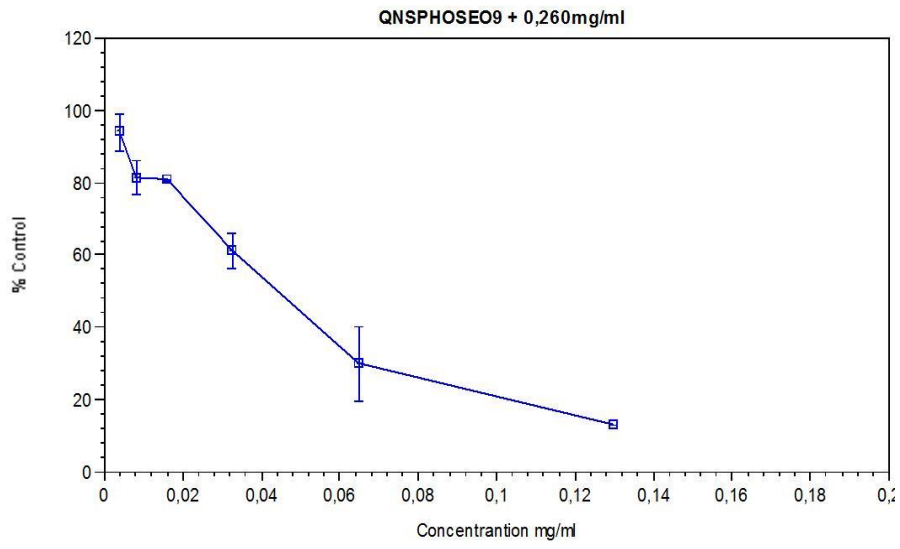


C.

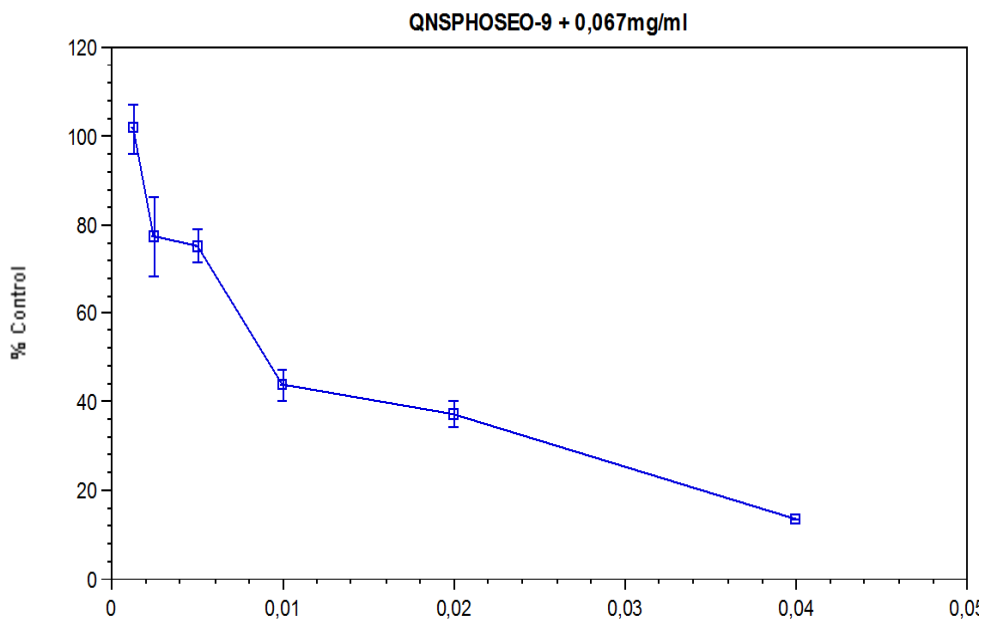


Σχήμα 7: Δοκιμασίες πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC3 σε επεξεργασία με QNPHOSEO-9 για 24 (A), 48 (B) και 96 ώρες (C).

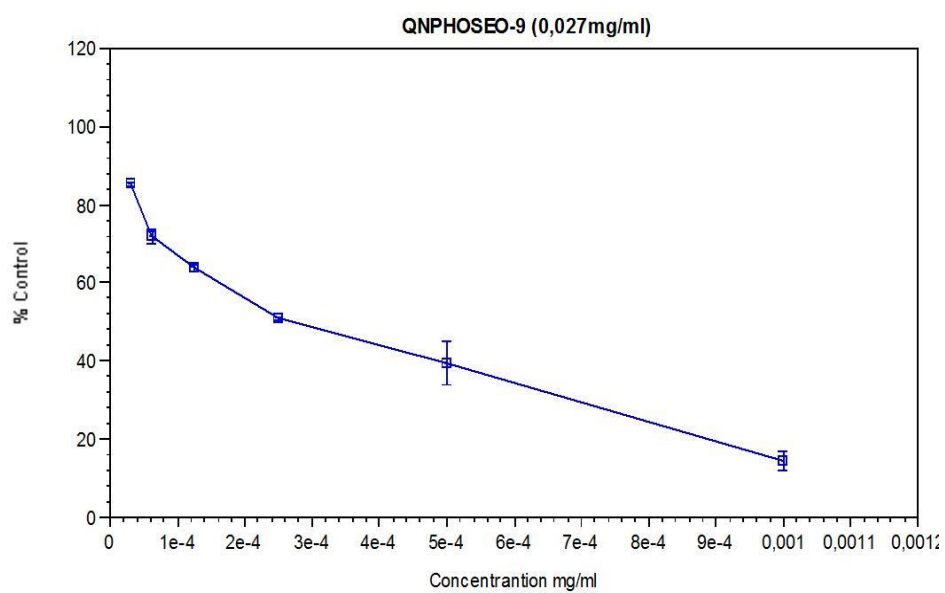
A.



B.



C.

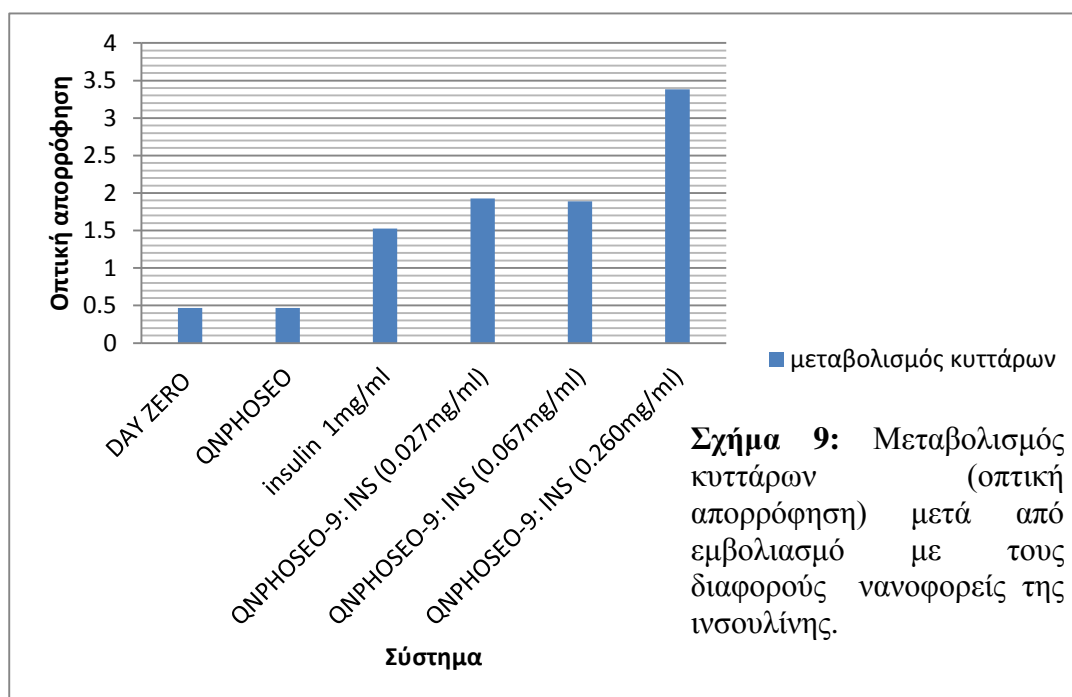


Σχήμα 8: Δοκιμασίες πολλαπλασιασμού των κυττάρων PC3 σε επεξεργασία με QNPHOSEO-9: PCK σε διαφορετικές συγκεντρώσεις PCK **A.** C=0.260 mg/ml **B.** C=0.067mg/ml και **C.** C=0.027mg/ml.

Πειράματα ελέγχου αποδέσμευσης της ινσουλίνης από τα σύμπλοκα με QNPHOSEO σε κύτταρα.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ελέγχου της αποδέσμευσης της ινσουλίνης από τους νανοφορείς με το συμπολυμερές QNPHOSEO. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα MCf10a (500 cells per well -96 well plate). Την ημέρα μηδέν (DAY ZERO) προστέθηκαν 10μl αντιδραστηρίου CCK8 ανά βοθρίο (well), επώαστηκαν και ο μεταβολισμός του προσδιορίστηκε με οπτική απορρόφηση. (ELISA στα 450nm). 48 ώρες μετά προστέθηκαν πάλι 10μl αντιδραστηρίου CCK8 ανά βοθρίο, επώαστηκαν και ο μεταβολισμός τους προσδιορίστηκε με οπτική απορρόφηση. Με τον ίδιο τρόπο προστέθηκαν και τα δείγματα προς μελέτη: συμπλέγματα ινσουλίνης με QNPHOSEO (όπου η αρχική συγκέντρωση της ινσουλίνης ήταν $C_{INS}=0.027$ mg/ml, $C_{INS}=0.067$ mg/ml και $C_{INS}=0.260$ mg/ml). Μέσο όρος έξι ανεξάρτητων πειραμάτων, $SD<10\%$.

Από το παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 9) παρατηρούμε πως και οι τρεις νανοφορείς αποδεσμεύουν την ινσουλίνη και αυτό αιτιολογείται από τη μεταβολική διεργασία των κυττάρων, ακόμα και 48 ώρες μετά την προσθήκη των νανοφορέων στην κυτταρική σειρά (καθώς η ινσουλίνη είναι απαραίτητη για το μεταβολισμό τους). Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι τα χρησιμοποιηθέντα κύτταρα έχουν αυξημένες απαιτήσεις σε ινσουλίνη. Από τα παρόντα αποτελέσματα δεν μπορούμε να γνωρίζουμε αν η αποδέσμευση της ινσουλίνης πραγματοποιείται εντός του κυτταροπλάσματος (ο νανοφορέας εισέρχεται στο κύτταρο) ή αν η αποδέσμευση της ινσουλίνης πραγματοποιείται στον εξωκυττάριο χώρο και έπειτα προσλαμβάνεται από τα κύτταρα. Με βάση το μεταβολισμό των κυττάρων η αποδέσμευση της ινσουλίνης από τον κάθε νανοφορέα ακολουθεί διαφορετική κινητική αποδέσμευσης καθώς η μεταβολική δραστηριότητα διαφοροποιείται. Οι νανοφορείς με $C_{INS}=0.260$ mg/ml εμφανίζουν μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα.



Σχήμα 9: Μεταβολισμός κυττάρων (οπτική απορρόφηση) μετά από εμβολιασμό με τους διαφορετικούς νανοφορείς της ινσουλίνης.

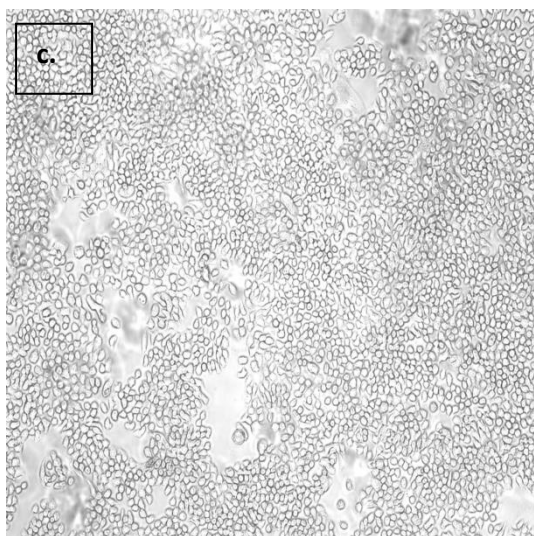
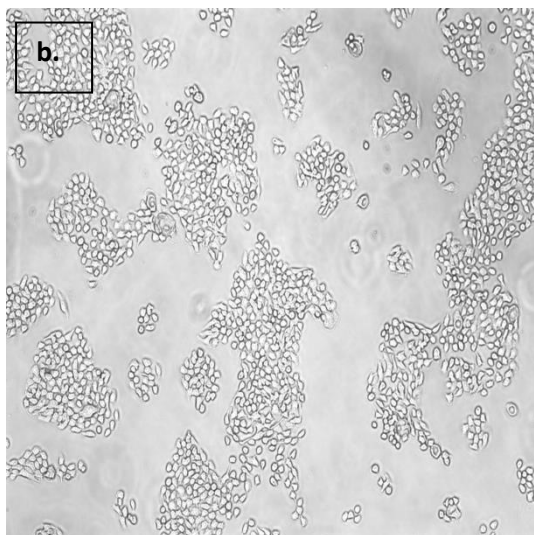
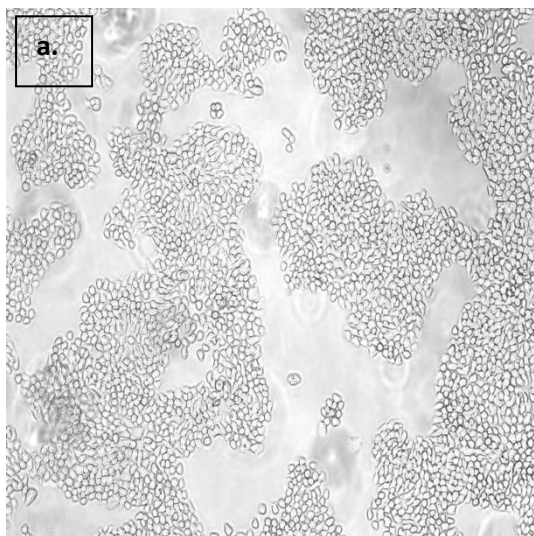
Πειράματα με κύτταρα σε 2D νανοδομές: έλεγχος προσκόλλησης των κυττάρων σε επιφάνειες ψευδο-2D από συμπολυμερή και πρωτεΐνες

Πειραματική πορεία

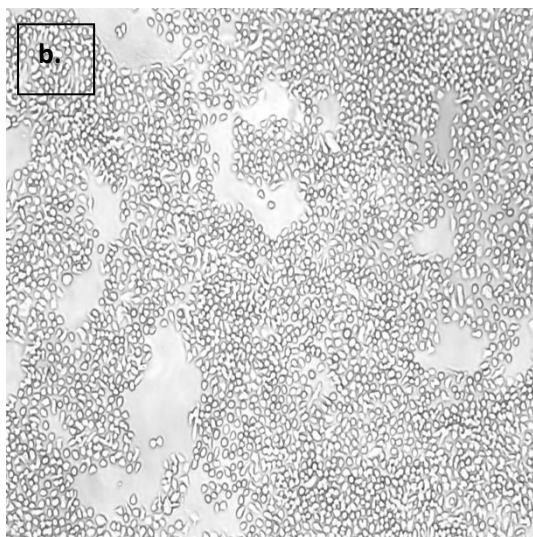
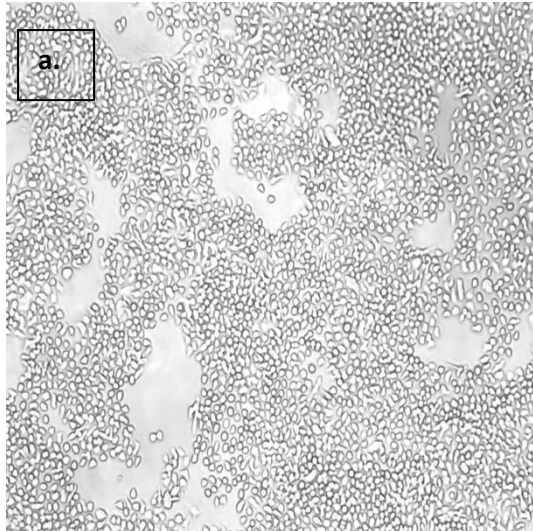
Πραγματοποιήθηκε μελέτη προσκόλλησης κυττάρων σε υβριδικές επιφάνειες συμπολυμερών/πρωτεϊνών. Τα συμπολυμερή που επιλέχθηκαν για αυτά τα πειράματα ήταν το δυσσταδικό συμπολυμερές πολυ(στυρένιο-b-βίνυλοπυριδίνη) (PS-b-P2VP) και το δυσσταδικό συμπολυμερές πολυ(ισοπρένιο-b-ακρυλικό οξύ) (PI-b-PAA), από τα οποία παρασκευάστηκαν λεπτά υμένα και στη συνέχεια προσροφήθηκαν στην επιφάνεια τους διαφορετικές πρωτεΐνες. Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής: αρχικά παρασκευάστηκαν διαλύματα των δύο συμπολυμερών με συγκέντρωση 5mg/mL σε διαλύτη THF. Λεπτά υμένα πάχους ~100nm των συμπολυμερών αυτών σχηματίστηκαν χρησιμοποιώντας την μέθοδο spin-coating. Η διαδικασία της προσρόφησης για την περίπτωση του PI-b-PAA περιλαμβάνει ένα αρχικό στάδιο εμβάπτισης σε υδατικό διάλυμα NaOH με pH 9 για 3 ώρες ώστε να αποπρωτονιωθούν οι καρβοξυλομάδες της συστάδας PAA και να δημιουργηθούν αρνητικά επιφανειακά φορτία. Εν συνεχεία, μετά από ξέπλυμα με νερό, έγινε εμβάπτιση σε διάλυμα λυσοζύμης (HEWL) 1 mg/ml pH 7 (buffer pH 7, 0.01 M, 200 ppm NaN₃) για 1 ώρα. Στην περίπτωση του PS-b-P2VP, τα λεπτά υμένα εμβάπτιστηκαν σε υδατικό διάλυμα HCl, με pH 3, για 3 ώρες ώστε να πρωτονιωθούν οι αμινομάδες της συστάδας P2VP και να δημιουργηθούν θετικά επιφανειακά φορτία. Τα λεπτά υμένα ξεπλύθηκαν με νερό και στη συνέχεια εμβάπτιστηκαν σε διαλύματα BSA και Ινωδογόνου με συγκέντρωση 1 mg/ml pH 7 (buffer pH 7, 0.01 M, 200 ppm NaN₃) για 1 ώρα.

Στο πείραμα ελέγχου της ικανότητας προσκόλλησης των κυττάρων σε επιφάνειες, ειδικά επιστρωμένες με τα πολυμερή υλικά-2D νανοδομές, χρησιμοποιήθηκε η καρκινική σειρά MDA-MB 231, που είναι μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά προερχόμενη από καρκίνο μαστού. Η πειραματική πορεία έχει ως εξής: Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS) και 2mM N-γλουταμίνη σε επωαστήρα σταθερής θερμοκρασίας 37°C. Μόλις έρθουν σε συμβολή, καλύψουν δηλαδή το 70-80% της επιφάνειας του τρυβλίου γίνεται αποκόλληση τους με τη χρήση θρυψίνης 0,05% κ.ό σε θρεπτικό μέσο απουσία ορού. Έπειτα τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στα 1400 rpm για 10 λεπτά και το κυτταρικό ίζημα επανεωρείται σε 1mL θρεπτικού ώστε να μετρηθεί ο ακριβής αριθμός τους, με τη χρήση του αιμοκυττόμετρου. Η τελική συγκέντρωση που επιλέχθηκε ήταν 500.000 κύτταρα ανά mL, τα οποία προστέθηκαν ανά τρυβλίο που περιείχε αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες επιστρωμένες με τα υπό εξέταση πολυμερή υλικά. Μετά το πέρας 12 ωρών οι καλυπτρίδες αφαιρέθηκαν από τα τρυβλία, ξεπλύθηκαν 3 φορές με PBS και εξετάστηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο φθορισμού ZEISS AxioPhot, από το οποίο προήλθαν και οι εικόνες που φαίνονται στα σχήματα 10 και 11.

Από τις εικόνες 10 και 11 συμπεραίνουμε πως κανένα από τα μελετηθέντα πολυμερή, μόνα τους ή παρουσία των πρωτεϊνών, δεν παρουσιάζουν τοξικότητα στις κυτταρικές σειρές. Η καλύτερη κυτταρική προσκόλληση (προσρόφηση) παρατηρήθηκε για το πολυμερές 1, PS-b-P2VP, παρουσία της αλβουμίνης και για το πολυμερές 2, PI-b-PAA, παρουσία της λυσοζύμης (HEWL).



Σχήμα 10: Απεικόνιση της προσκόλλησης κυττάρων MDA-MB 231 παρουσία επιφανειών a. PS-b-P2VP, b. PS-b-P2VP: Fibrinogen και c. PS-b-P2VP: BSA.



Σχήμα 11: Απεικόνιση της προσκόλλησης κυττάρων MDA-MB 231 παρουσία επιφανειών a. PI-b-PAA και b. PI-b-PAA:HEWL.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δεικνύουν τη δυνατότητα χρήσης ψευδο-2D νανοδομών, αποτελούμενων από ένα στρώμα συμπολυμερούς κατά συστάδες και ένα στρώμα πρωτεΐνης, σαν υποστρώματα για την ανάπτυξη κυττάρων για βιοτεχνολογικές εφαρμογές.