

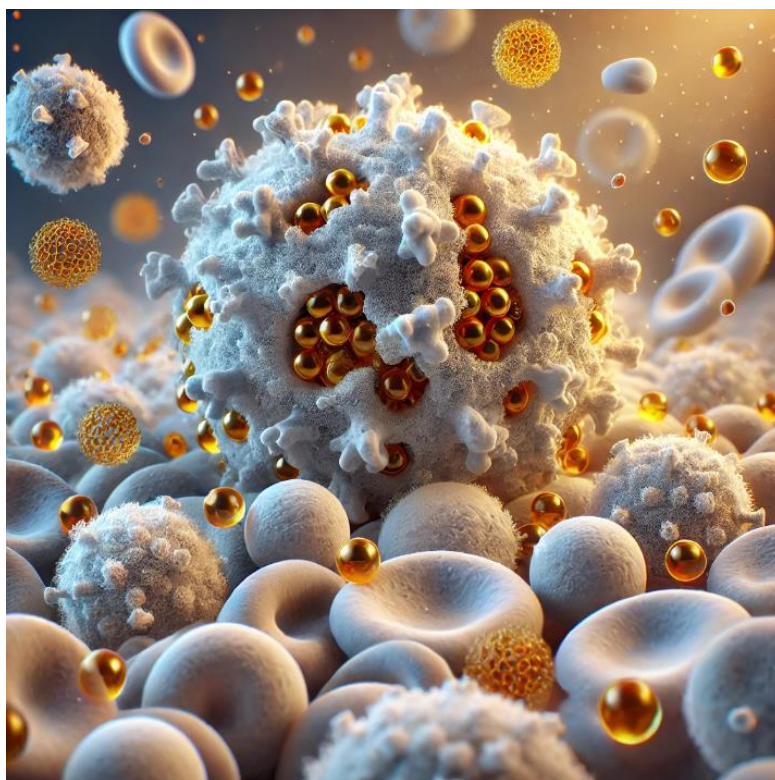


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ



## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

### Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΣΤΑ ΛΕΥΚΑ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΑ



**ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ:**

ΜΕΛΕΤΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

**ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗΤΡΩΟΥ:** 20678188

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

ΣΩΤΗΡΙΟΣ ΦΟΡΤΗΣ

**ΑΚΑΔ. ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ ΠΑΔΑ**

Αθήνα, 2024

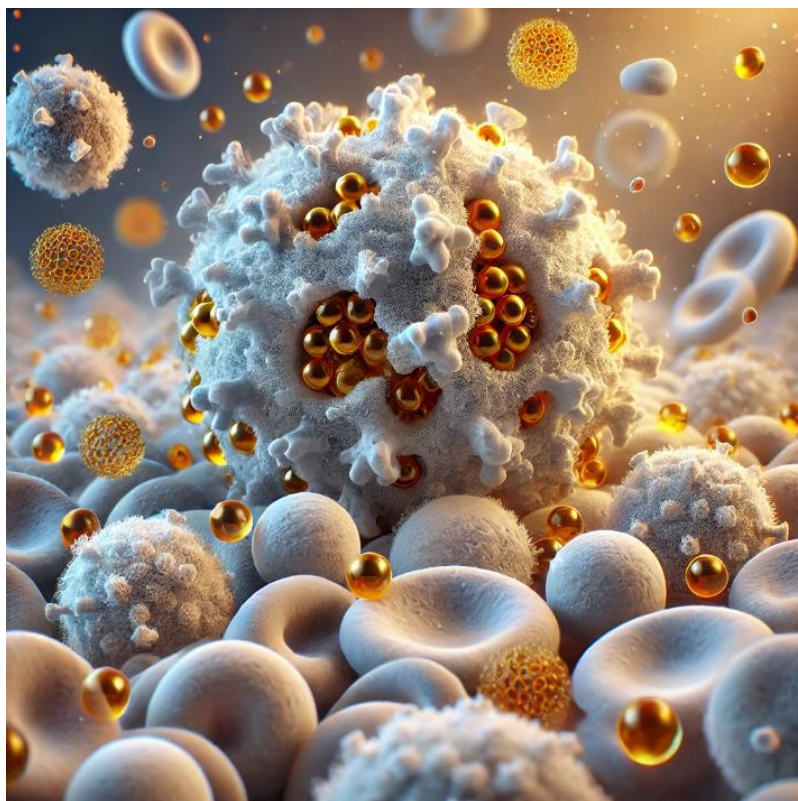


**UNIVERSITY OF WEST ATTICA**  
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES  
DIVISION OF MEDICAL LABORATORIES



## **DIPLOMA THESIS**

### **THE EFFECT OF NANOPARTICLES TO WHITE BLOOD CELLS**



**NAME OF STUDENT:**

MELETIS EVAGGELOS

**REGISTRATION NUMBER:** 20678188

**SUPERVISOR:**

SOTIRIOS FORTIS

**ACAD. ASSISTANT UNIWA**

**Athens, 2024**

## ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Ημερομηνία εξέτασης: Τρίτη 8 Οκτωβρίου 2024

Ονόματα Εξεταστών	Υπογραφή
Κριεμπάρδης Αναστάσιος	
Δρύλλης Γεώργιος	
Φόρτης Σωτήριος	

## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος **ΜΕΛΕΤΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ** του **ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ** με αριθμό μητρώου **20678188**, φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, του **Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών**, της **Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας**, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

*«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».*

**Όνομα φοιτητή**

**Μελέτης Ευάγγελος**

**Υπογραφή φοιτητή**



## Ευχαριστίες

Η παρούσα ερευνητική πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο «**Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία**», του Τμήματος των Βιοϊατρικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της εργασίας, **κ. Σωτήρη Φόρτη**, Ακαδημαϊκό Υπότροφο του τμήματος, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην ανάθεση και στην εκπόνηση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας και για την πολύτιμη καθοδήγηση και αφοσίωση του, όσο και για την υποστήριξη του σε οποιαδήποτε στιγμή τον χρειάστηκα στη διάρκεια του πειραματικού σταδίου και της συγγραφής της εργασίας μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του τμήματος και Διευθυντή του εργαστηρίου, **κ. Αναστάσιο Γ. Κριεμπάρδη**, ο οποίος συνείσφερε στην εργαστηριακή μου εκπαίδευση και εξέλιξη και μεριμνούσε συνεχώς για τη σωστή και ολοκληρωμένη λειτουργία του εργαστηρίου.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος, **κ. Δρύλλη Γεώργιο**, για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή εξέτασης.

Επιπλέον οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Μαρία-Ασπασία Κοσμά, Τεχνολόγο Ιατρικών Εργαστηρίων και Μεταπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος, για την άψογη συνεργασία που υπήρχε καθ' όλη τη διάρκεια, τη διάθεση της να μοιραστεί τις γνώσεις της, την επιμονή και υπομονή της και τις πολύτιμες συμβουλές της που ήταν καθοριστικές τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και προσωπικό επίπεδο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και να αφιερώσω παράλληλα τη συγκεκριμένη εργασία στους γονείς μου και στην αδερφή μου, για την αδιάκοπη στήριξη και ενθάρρυνση, όχι μόνο στην ολοκλήρωση της εργασίας, αλλά σε όλη τη διάρκεια της ακαδημαϊκής μου πορείας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία μελετά τη βιωσιμότητα των λευκών αιμοσφαιρίων μετά την έκθεση τους σε νανοσωματίδια, τα οποία ενδέχεται να χρησιμοποιηθούν ως φορείς φαρμάκων. Αναλυτικότερα, εστιάζει στην επίδραση νανοσωματιδίων αλγινικού οξέος και της πολυφαινολικής ένωσης χρυσίνης, είτε ως ελεύθερη ουσία είτε ως σύμπλοκο με τα νανοσωματίδια. Το αλγινικό οξύ, φυσικό βιοπολυμερές από φύκη, θεωρείται ιδανικό λόγω της βιοσυμβατότητας και χαμηλής τοξικότητάς του. Η χρυσίνη, φυσικό φλαβονοειδές με εξαιρετικές ιδιότητες, έχει περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα, αλλά τα σύμπλοκα με νανοσωματίδια είναι ικανά να αυξήσουν την αποτελεσματικότητας της.

Στόχος της εργασίας ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης της χρυσίνης και των νανοσωματιδίων αλγινικού οξέος στα λευκά αιμοσφαίρια. Η μεθοδολογία της έρευνας συνδύασε πρωτόκολλα απομόνωσης και καλλιέργειας λευκοκυττάρων, κυτταρομετρίας ροής και μικροσκόπησης. Μελετήθηκαν δείγματα υγιών ατόμων, ώστε να εκτιμηθεί η απόπτωση και οι πιθανές φαινοτυπικές αλλοιώσεις των λευκών αιμοσφαιρίων εξαιτίας της αλληλοεπίδρασης τους με τα νανοσυστήματα. Πιο συγκεκριμένα, με την κυτταρομετρία ροής μετρήθηκαν τα επίπεδα απόπτωσης των υποπληθυσμών των λευκοκυττάρων ύστερα από επώαση με τα νανοσυστήματα, ενώ πραγματοποιήθηκε και μικροσκοπική παρατήρηση για τον εντοπισμό πιθανών φαινοτυπικών αλλοιώσεων.

Τα αποτελέσματα της έρευνας υποστηρίζουν πως η επίδραση των νανοσυστημάτων διαφέρει στα λευκοκύτταρα ανάλογα με τον κυτταρικό υποπληθυσμό. Η βιωσιμότητα των κοκκιοκυττάρων φαίνεται να επηρεάζεται περισσότερο από εκείνη των λεμφοκυττάρων και μονοκυττάρων μετά από επώαση με τα νανοσυστήματα. Τέλος μετά την επώαση με κάποια από τα νανοσυστήματα παρατηρήθηκε αποκοκκίωση κοκκιοκυττάρων και παρουσιάστηκαν NETs.

**Λέξεις-κλειδιά:** Νανοσωματίδιο, αλγινικό οξύ, χρυσίνη, χορήγηση φαρμάκων, λευκά αιμοσφαίρια, αιμοσυμβατότητα

## **ABSTRACT**

The present study examines the viability of white blood cells after exposure to nanoparticles, which may potentially be used as drug carriers. More specifically, it focuses on the effect of alginic acid nanoparticles and the polyphenolic compound chrysin, either as a free substance or in complex with the nanoparticles. Alginic acid, a natural biopolymer derived from algae, is considered ideal due to its biocompatibility and low toxicity. Chrysin, a natural flavonoid with excellent properties, has limited bioavailability, but nanoparticle complexes are capable of increasing her effectiveness.

The aim of the study was to evaluate the effect of chrysin and alginic acid nanoparticles on white blood cells. The research methodology combined protocols for leukocyte isolation and culture, flow cytometry, and microscopy. Samples from healthy individuals were studied to assess apoptosis and possible phenotypic alterations of white blood cells due to their interaction with the nanosystems. More specifically, flow cytometry was used to measure apoptosis levels in leukocyte subpopulations after incubation with the nanosystems, and microscopic observation was conducted to detect potential phenotypic changes.

The research results suggest that the effect of the nanosystems on leukocytes varies depending on the cellular subpopulation. Granulocyte viability appears to be more affected than that of lymphocytes and monocytes after incubation with the nanosystems. Finally, after incubation with certain nanosystems, degranulation of granulocytes was observed, and NETs were detected.

**Keywords:** Nanoparticle, alginic acid, chrysin, drug delivery, white blood cells, hemocompatibility.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
<b>ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....</b>	<b>ix</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>1</b>
1.    ΑΙΜΑ .....	1
2.    ΛΕΥΚΑ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΑ .....	2
2.1.    Λειτουργία λευκών αιμοσφαιρίων .....	3
2.2.    Μορφολογία λευκών αιμοσφαιρίων .....	5
3.    ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ .....	12
3.1.    Χαρακτηριστικά νανοσωματιδίων .....	13
3.2.    Ταξινόμηση NPs.....	18
4.    ΑΙΜΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ NPs .....	26
4.1.    Αλληλεπίδραση NPs με πρωτεΐνες του πλάσματος .....	27
4.2.    Έμφυτη ανοσολογική απόκριση έναντι των NPs.....	30
5.    ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	36
5.2.    Χαρακτηριστικά ALGNPs.....	36
5.3.    ALG-NPs στη χορήγηση φαρμάκων.....	38
5.4.    Τοξικότητα των ALG-NPs.....	40
6.    ΧΡΥΣΙΝΗ ΚΑΙ NPs .....	41
6.1.    Χαρακτηριστικά χρυσίνης .....	41
6.2.    Σύμπλοκα Chr-NPs και τοξικότητα .....	44
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....</b>	<b>48</b>
1.    ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	48
2.    ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ .....	48
3.    ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	49
3.1.    Απομόνωση και εμπλουτισμός λευκών αιμοσφαιρίων .....	49
3.2.    Επώαση δειγμάτων με NPs.....	50
3.3.    Προετοιμασία δειγμάτων για κυτταρομετρία ροής.....	51
3.4.    Προετοιμασία δειγμάτων για μικροσκοπική ανάλυση .....	53
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 :ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>55</b>
3.1.    Γενικές αίματος.....	55
3.2.    Κυτταρομετρία ροής.....	55
3.3.    Μικροσκόπηση .....	60
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>63</b>
4.1.    Σχολιασμός αποτελεσμάτων .....	63
4.2.    Συμπεράσματα .....	65
4.3.    Προτάσεις μελλοντικών ερευνών .....	66
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>67</b>



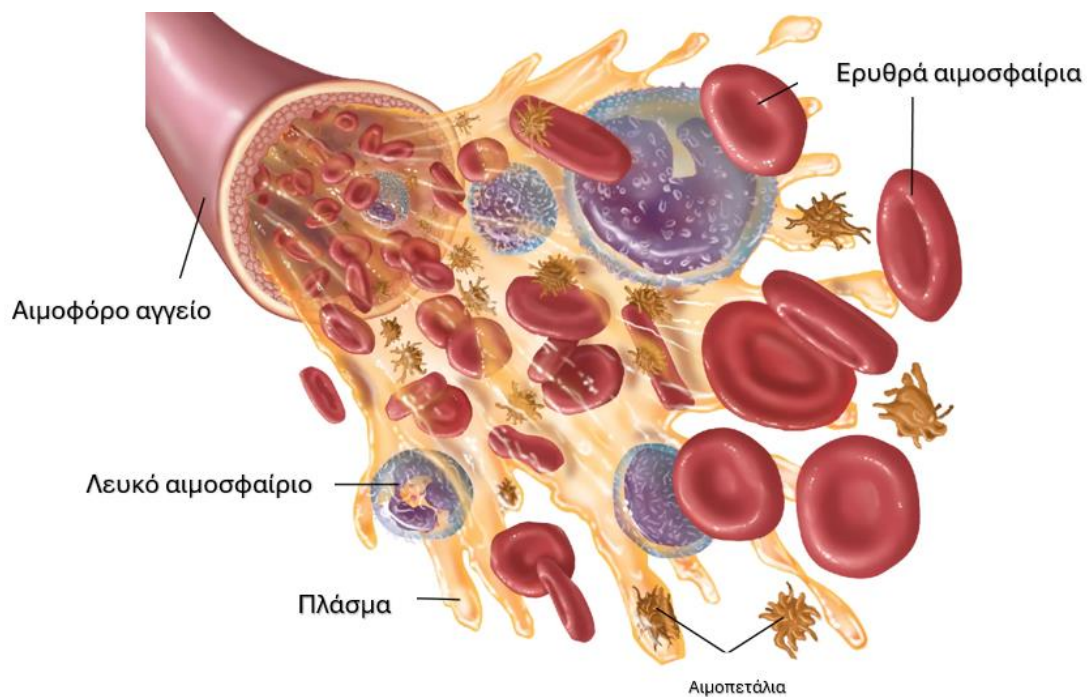
## **ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ**

	<i>Αγγλική ορολογία</i>	<i>Ελληνική ορολογία</i>
<b>WBCs</b>	White Blood Cells	Λευκά αιμοσφαίρια
<b>NPs</b>	Nanoparticles	Νανοσωματίδια
<b>ALG</b>	Alginate	Αλγινικό οξύ
<b>Chr</b>	Chrysin	Χρυσίνη
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων
<b>NETs</b>	Neutrophil Extracellular Traps	Εξωκυττάρειες παγίδες ουδετερόφιλων
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
<b>NE</b>	Neutrophil Elastase	Ουδετεροφιλική ελαστάση
<b>MPO</b>	Myeloperoxidase	Μυελοϋπεροξειδάση
<b>PC</b>	Protein Crown	Πρωτεϊνική κορόνα
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species	Δραστικές ρίζες οξυγόνου
<b>PLGA</b>	Poly (Lactic-co-Glycolic) Acid	Συμπολυμερές γαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ
<b>PEG</b>	Polyethylene glycol	Πολυαιθυλενογλυκόλη
<b>APCs</b>	Antigen Presenting Cells	Αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα
<b>NK</b>	Natural Killers	Φυσικοί φονείς
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation	Σύμπλεγμα διαφοροποίησης

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1. ΑΙΜΑ

Το αίμα είναι ένας συνδετικός ιστός που αποτελείται από κυτταρικά στοιχεία και ένα εξωκυττάριο υγρό, το οποίο καθιστά το αίμα μοναδικό μεταξύ των συνδετικών ιστών, επιτρέποντας στα στοιχεία να κυκλοφορούν στο σώμα μέσα από το καρδιαγγειακό σύστημα. Τα βασικά κυτταρικά στοιχεία του περιλαμβάνουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα κυτταρικά θραύσματα που ονομάζονται αιμοπετάλια (Εικόνα 1). Τα ερυθρά αιμοσφαίρια πραγματοποιούν τη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς του σώματος, συνεισφέροντας στη λειτουργία τους. Τα λευκά αιμοσφαίρια είναι υπεύθυνα για την ανοσοαπόκριση καθώς προστατεύουν από εξωτερικές απειλές που εισβάλλουν στον οργανισμό, όπως παθογόνα βακτήρια και ιοί, αλλά και από εσωτερικές, όπως κύτταρα με μεταλλαγμένο DNA τα οποία θα μπορούσαν να εξελιχθούν σε καρκινικές μορφές. Υπάρχουν πολλοί τύποι λευκών αιμοσφαιρίων, με τους κυριότερους να είναι τα ουδετερόφιλα, τα λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα. Τα αιμοπετάλια είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία θρόμβων στις περιοχές ρήξης των αιμοφόρων αγγείων, διατηρώντας την ισορροπία μεταξύ αιμόστασης και αιμορραγίας. Το εξωκυττάριο υγρό ονομάζεται πλάσμα και αποτελείται κυρίως από νερό στο οποίο βρίσκονται ουσίες όπως οργανικά θρεπτικά συστατικά, ηλεκτρολύτες και αέρια. Την πλειοψηφία των ουσιών έχουν οι πρωτεΐνες, οι οποίες συμμετέχουν στη μεταφορά συστατικών, στην ανοσία και στην αιμόσταση (Lindsay M. Biga et al., 2019).

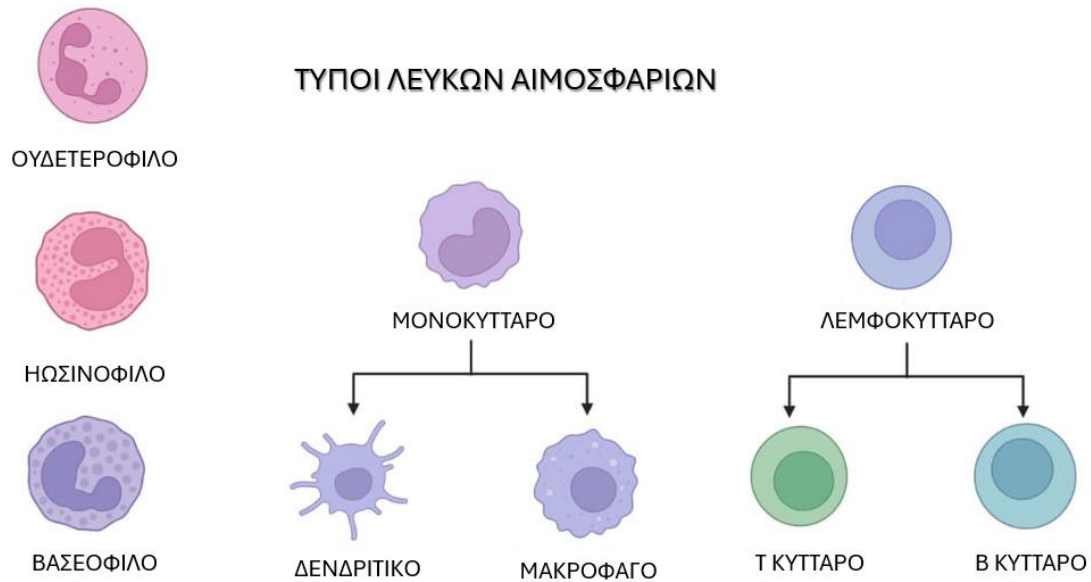


**Εικόνα 1:** Τα κύτταρα του αίματος. (Ανατύπωση από Encyclopedia Britannica, 2024)

## 2. ΛΕΥΚΑ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΑ

Τα λευκά αιμοσφαίρια ή λευκοκύτταρα (WBCs), είναι μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος και συμμετέχουν τόσο στις έμφυτες όσο και στις χυμικές ανοσολογικές αντιδράσεις (Εικόνα 2). Κυκλοφορούν στο αίμα και προκαλούν φλεγμονώδεις και κυτταρικές αντιδράσεις σε τραυματισμούς ή παθογόνα (Tigmer et al., 2024). Τα λευκά αιμοσφαίρια στερούνται αιμοσφαιρίνης, έχουν πυρήνα και κινητική ικανότητα, προστατεύουν το σώμα από λοιμώξεις και ασθένειες και από την επαφή με ξένα υλικά. Καταστρέφουν μολυσματικούς παράγοντες και καρκινικά κύτταρα ή παράγουν αντισώματα. Στους ενήλικες από το μυελό των οστών παράγεται το 60-70% των λευκοκυττάρων (κοκκιοκύτταρα). Οι λεμφικοί ιστοί όπως ο θύμος αδένας, ο σπλήνας και οι λεμφαδένες, παράγουν τα ώριμα λεμφοκύτταρα που αποτελούν το 20-30% των λευκοκυττάρων. Οι ιστοί του σπλήνα, του ήπατος και των λεμφαδένων παράγουν τα μονοκύτταρα. Ο απόλυτος αριθμός των WBCs κυμαίνεται μεταξύ 4500-11000 λευκά

αιμοσφαίρια ανά κυβικό χιλιοστό αίματος και ως ζωντανά κύτταρα, η επιβίωση τους εξαρτάται από τη συνεχή παροχή ενέργειας (Encyclopedia Britannica, 2024).



**Εικόνα 2:** Τύποι λευκών αιμοσφαιρίων. (Ανατύπωση από Babita Sharma, 2023)

## 2.1. Λειτουργία λευκών αιμοσφαιρίων

Τα WBCs εμπλέκονται στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, ο κάθε τύπος με συγκεκριμένο ρόλο. Όλοι οι τύποι περιέχουν πυρήνα, μιτοχόνδρια, συσκευή Golgi, φωσφολιπιδική μεμβράνη, κεντριόλια, αδρό και λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, ριβοσώματα και λυσοσώματα. Η λειτουργία, το σχήμα, το μέγεθος και οι ικανότητες σηματοδότησης διαφέρουν. Προστατεύουν το σώμα από ενδοτοξίνες, βακτήρια, ιούς και γενικότερα από καθετί ξένο (Sarah Knapp, 2021). Η μετανάστευση τους εξαρτάται από μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με παθογόνα (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) και με μικρόβια και κατεστραμμένους ιστούς (Damage-associated molecular patterns, DAMPs). Τα τοπικά φλεγμονώδη κύτταρα, όπως τα μακροφάγα και τα μαστοκύτταρα, ανιχνεύουν αυτά τα μοριακά πρότυπα και απελευθερώνουν κυτοκίνες, οι οποίες θα λειτουργήσουν ως σηματοδότες για τα λευκοκύτταρα να μεταναστεύσουν εκτός της κυκλοφορίας (Tigner et al., 2024). Κυτοκίνες όπως η IL-1,

η IL-6 και ο TNF- $\alpha$ , έχουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη και ρύθμιση της φλεγμονής, καθώς προσελκύουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και προάγουν τη διαστολή των αιμοφόρων αγγείων, διευκολύνοντας τη μετανάστευση των WBCs. Τα χημειοελκυστικά μόρια, όπως τα λευκοτριένια τα προσελκύουν επίσης στην περιοχή της φλεγμονής (MyHematology, 2020). Η ισταμίνη και η ηπαρίνη εξυπηρετούν στο άνοιγμα ενδοκυτταρικών συνδέσεων μεταξύ τριχοειδών και ενδοθηλιακών κυττάρων και απελευθερώνονται από τα μαστοκύτταρα τα οποία εντοπίζονται στην περιφέρεια των αιμοφόρων αγγείων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα από τη μεριά τους εκκρίνουν χημειοελκυστικά και εκφράζουν επιφανειακούς δείκτες, όπως της σελεκτίνης, της ιντεγκρίνης και των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης στον αυλό. Η έκφραση των τελευταίων προκαλεί την προσκόλληση των WBCs και την τελική τους μετανάστευση στους προσβληθέντες ιστούς (Tigner et al., 2024). Μια από τις βασικές λειτουργίες των WBCs είναι η αντιγονοπαρουσίαση, στην οποία τα αντιγόνα αναγνωρίζονται από τα κύτταρα ειδικής ανοσίας. Υπεύθυνα κύτταρα είναι τα αντιγονοπαρουσιαστικά (APCs) που διαχωρίζονται σε επαγγελματικά και μη επαγγελματικά APCs. Τα επαγγελματικά, όπως τα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα B κύτταρα, αναγνωρίζουν ένα ξένο αντιγόνο, το εσωτερικεύουν και παράγουν πρωτεϊνικούς δείκτες που εκθέτονται στις δικές τους μεμβρανικές πρωτεΐνες MHC II (Major histocompatibility complex II). Τα μη επαγγελματικά, δεν περιορίζονται στα λευκά αιμοσφαίρια, αλλά οποιοδήποτε κύτταρο με πυρήνα μπορεί να ανήκει σε αυτή την κατηγορία, ενώ εκθέτουν το ξένο αντιγόνο στις μεμβρανικές τους πρωτεΐνες MHC I και δεν εξουδετερώνουν μικροοργανισμούς, αλλά φαγοκυτταρώνουν νεκρά κύτταρα (Sarah Knapp, 2021). Η επιβίωση των WBCs εξαρτάται από τη συνεχή παροχή ενέργειας, καθώς διαθέτουν πιο περίπλοκες χημικές οδούς από τα ερυθροκύτταρα, ενώ είναι ικανά να συνθέσουν πρωτεΐνη, αφού διαθέτουν πυρήνα και επομένως παράγουν ριβονουκλεϊκό οξύ. Επιπλέον τα WBCs διαφοροποιούνται μόνο για τις χαρακτηριστικές λειτουργίες τους και δεν υποβάλλονται σε κυτταρική διαίρεση στην κυκλοφορία του αίματος, εκτός από ορισμένα (T, B λεμφοκύτταρα) (Encyclopedia Britannica, 2024).

## **2.2. Μορφολογία λευκών αιμοσφαιρίων**

Τα WBCs κατηγοριοποιούνται ανάλογα με βάση το αρχέγονο κύτταρο από το οποίο προέρχονται, σε μυελοειδή και λεμφοειδή. Τα μυελοειδή κύτταρα περιλαμβάνουν τις σειρές λευκοκυττάρων (κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα) και τα ερυθρά αιμοσφαίρια, ενώ τα T και B κύτταρα ανήκουν στη λεμφοειδή σειρά (Tigner et al., 2024). Με βάση την παρουσία ή την απουσία μικροσκοπικών κοκκίων στο κυτταρόπλασμα τους, όταν χρωματίζονται με χρώση Giemsa ή Leishman, ταξινομούνται σε κοκκιοκύτταρα και ακοκκιοκύτταρα.

### **2.2.1. Κοκκιοκύτταρα**

Τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα ανήκουν στα κοκκιοκύτταρα. Τα ουδετερόφιλα αποτελούν τον πιο συχνό τύπο κυττάρων στο αίμα. Τα κοκκιοκύτταρα είναι το κυριότερο μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος και έχουν σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση λοιμώξεων (Gigon et al., 2021). Συμμετέχουν στην αντιμετώπιση της αλλεργίας και της φλεγμονής (Encyclopedia Britannica, 2024). Ακόμα διαθέτουν ανώμαλους ή πολύλοβους πυρήνες και ανήκουν στη μυελοειδή σειρά των κυττάρων του αίματος (Babita Sharma, 2023).

#### **2.2.1.1. Ουδετερόφιλα**

Τα ουδετερόφιλα έχουν διάμετρο 12-15μm και πολύλοβους πυρήνες που συνήθως αποτελούνται από 3-5 λοβία και για αυτό χαρακτηρίζονται ως πολυμορφοπύρρηνα. (Tigner et al., 2024). Κατά το προμυελοκυτταρικό στάδιο της ανάπτυξης τους έχουν αζουρόφιλα κοκκία που περιέχουν τοξικούς διαμεσολαβητές, όπως ελαστάση και μυελοϋπεροξειδάση. Στο στάδιο των μεταμυελοκυττάρων εμφανίζουν ειδικά κοκκία που περιέχουν την γλυκοπρωτεΐνη λακτοφερίνη και δίνει στο κυτταρόπλασμα ανοιχτό ροζ χρώμα σε μικροσκοπία φωτός, ενώ περιέχουν και αντιβακτηριακές ουσίες. Τα κοκκία της ζελατινάσης, είναι τα μικρότερα και σχηματίζονται στο τελικό στάδιο ωρίμανσης τους. Στο τελικό στάδιο σχηματίζονται και τα εκκριτικά κυστίδια, τα οποία ενσωματώνουν πρωτεΐνες του πλάσματος (Gigon et al., 2021). Παράγονται κατά την αιμοποίηση στο μυελό των οστών και κυκλοφορούν 7-10 ώρες στο περιφερικό αίμα πριν εγκατασταθούν σε έναν ιστό, όπου θα επιζήσουν για λίγες ημέρες ή θα πεθάνουν

αμέσως μετά τη φαγοκυττάρωση. Αποτελούν το 40-75% των WBCs, με τον απόλυτο αριθμό τους να κυμαίνεται μεταξύ 2500-7500 ανά μl αίματος. Στις γυναίκες το 3% των πυρήνων παρουσιάζει σχηματισμό «τυμπάνου – ραβδιού», ο οποίος αντιπροσωπεύει τη φυλετική χρωματίνη των ανενεργών χρωμοσωμάτων X (Babita Sharma, 2023).

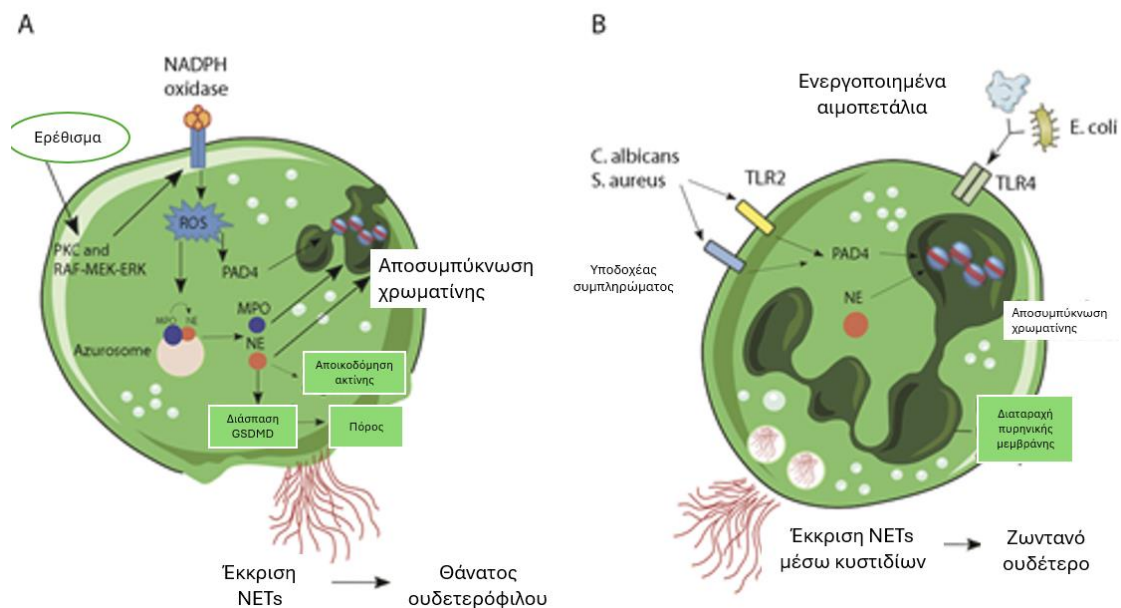
#### **2.2.1.2. Εξωκυττάρια παγίδες ουδετερόφιλων**

Οι εξωκυττάρια παγίδες ουδετερόφιλων (NETs) είναι δομές που μοιάζουν με ιστούς, που περιεγράφηκαν πρώτη φορά από τους Volker Brinkmann και Arturo Zuchlinsky το 2004 (Brinkmann et al., 2004). Είναι δομές ικανές να παγιδεύσουν βακτήρια, μύκητες και ιούς. Τα NETs αποτελούνται από ίνες DNA, ιστόνες, αντιμικροβιακές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες τελεστές από τις οποίες τα παθογόνα αδρανοποιούνται. Η NETosis είναι ένας τύπος κυτταρικού θανάτου διαφορετικός από την απόπτωση και τη νέκρωση και χαρακτηρίζεται από την ανεξέλεγκτη απελευθέρωση χρωματίνης και κοκκιώδους περιεχομένου. Ο σχηματισμός NETs συσχετίζεται με την αρνητική εξέλιξη και τη μετάσταση ενός καρκινικού όγκου (Masucci et al., 2020). Τα περισσότερα ερεθίσματα που ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα προκαλούν σχηματισμό λυτικού δικτύου και εξαρτώνται από την οξειδωση. Η διέγερση των ουδετερόφιλων έχει ως αποτέλεσμα ενεργοποίηση της οξειδάσης NADPH, μέσω της οδού σηματοδότησης της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) και Raf - MEK - ERK με την επακόλουθη παραγωγή οξειδωτικών ριζών (ROS). Στη συνέχεια ενεργοποιείται η απαμινάση της αργινίνης 4 (PAD4), η οποία προκαλεί αποσυμπύκνωση και αποπολυμερισμό της χρωματίνης. Η μυελοϋπεροξειδάση (MPO) και η ουδετεροφιλική ελαστάση (NE) απελευθερώνονται από τα κυτταροπλασματικά αζουρόφιλα κοκκία και στη συνέχεια μετατοπίζονται στον πυρήνα, συμβάλλοντας στην απελευθέρωση της χρωματίνης. Έπειτα διασπάται ο πυρηνικός φάκελος και το περιεχόμενο του έρχεται σε επαφή με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Η NE μετατρέπει την γαστρεμιδίνη D (GSDMD) στην ενεργό μορφή της GSDMD-NT, η οποία μεσολαβεί στο σχηματισμό πόρων στη μεμβράνη πλάσματος και πυρήνα, ενισχύοντας την απελευθέρωση του κοκκιώδους περιεχομένου. Τα NETs μπορούν να ανιχνευθούν στα 30 λεπτά μετά την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων, ενώ ο κυτταρικός θάνατος συμβαίνει στις 3-4 ώρες, οπότε παρατηρείται ανεξέλεγκτη

απελευθέρωση όλου του ενδοκυτταρικού περιεχομένου (Castanheira & Kubes, 2019), (Yujun Zhang, 2022).

Εκτός από τα λυτικού τύπου NETs παρατηρούνται και αυτά του μη λυτικού τύπου. Ο μη λυτικός σχηματισμός NETs προκαλείται από την αναγνώριση ερεθισμάτων μέσω υποδοχέων TLR2 ή TLR4 ή υποδοχέων συμπληρώματος. Παραδείγματα αποτελούν ο *S. aureus* και η *C. Albicans* που ενεργοποιούν τους υποδοχείς TLR2 και το *E. coli* με τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια που ενεργοποιούν τους υποδοχείς TLR4. Η συνέχεια είναι παρόμοια με του λυτικού τύπου, με την ενεργοποίηση της PAD4 και της NE, η οποία αποσυμπυκνώνει τη χρωματίνη και την αποβάλλει μέσω των κυστιδίων. Όλα συμβαίνουν χωρίς διαταραχή της μεμβράνης, με τα ουδετερόφιλα να εκκρίνουν NETs μέσω κυστιδίων και να παραμένουν ζωντανά για τις περαιτέρω φαγοκυτταρικές και χημειοτακτικές λειτουργίες (Castanheira & Kubes, 2019), (Yujun Zhang, 2022). (Εικόνα 3)





**Εικόνα 3:** Μηχανισμοί σχηματισμού NETs

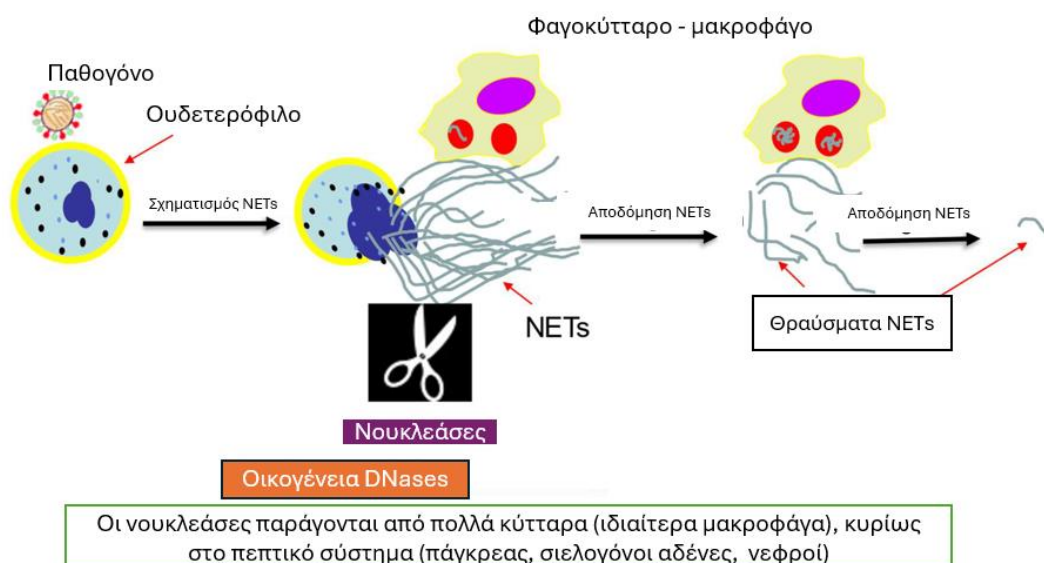
**A:** Σχηματισμός λυτικού τύπου. Τα περισσότερα ερεθίσματα που ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα, ενεργοποιούν την οδό PKC/RAF-MEK-ERK, μια οδό που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της οξειδάσης NADPH, με ακολουθούμενη παραγωγή ROS, που οδηγεί στην παραγωγή ενζύμων, από τα αζουρόφιλα κοκκία MPO και NE και στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης PAD4. Η πρωτεΐνη αυτή έχει το σημαντικότερο ρόλο στην αποσυμπύκνωση της χρωματίνης, η οποία βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα λόγω ρήξης του πυρηνικού φακέλου. Η MPO και η NE συμμετέχουν στην αποσυμπύκνωση, με τη NE να ενεργοποιεί παράλληλα την GSDMD, η οποία μεσολαβεί στη διάνοιξη μεμβρανικών πόρων και στην αποικοδόμηση της ακτίνης. Από τους πόρους εξέρχονται τα NETs, με το ουδετερόφιλο να πεθαίνει όταν συσσωρευθεί τοξική ποσότητα NETs.

**B:** Σχηματισμός μη λυτικού τύπου. Εξειδικευμένη περίπτωση σε ερεθίσματα, όπως *S. aureus*, *C. albicans* και ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. Τα δύο πρώτα δεσμεύονται στους TLR2, ενώ οι άλλες δύο περιπτώσεις στους TLR4. Η δέσμευση αυτή ενεργοποιεί την PAD4 προκαλώντας αποσυμπύκνωση της χρωματίνης. Εδώ δεν υπάρχει διάσπαση του πυρηνικού φακέλου, παρά διαταραχή από τη NE προς σχηματισμό κυστιδίων που περιέχουν NETs. Τα NETs εκκρίνονται με εξωκυττάρωση των κυστιδίων από το ουδετερόφιλο, το οποίο δεν πεθαίνει και διατηρεί τις λειτουργίες του. (Ανατύπωση από Castanheira & Kubes, 2019)

Η αποτελεσματική απομάκρυνση του εξωκυττάρου DNA είναι ζωτικής σημασίας για την ομοιοστάση των ιστών, την πρόληψη της φλεγμονής και την αποφυγή εμφάνισης αυτοαντιγόνων. Έρευνες αποδεικνύουν ότι η κατάτμηση της χρωματίνης γίνεται από εξωκυττάρους DNases και ακολουθεί αποδόμηση της από τα μακροφάγα. Τα ένζυμα αυτά έχουν τον κύριο ρόλο διάσπασης καθώς το DNA είναι συστατικό των NETs και

χωρίζονται στις δύο οικογένειες DNase I και DNase II, ανάλογα την ικανότητα υδρόλυσης των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA. Τα μακροφάγα εξασφαλίζουν την αποικοδόμηση και επομένως τη φαγοκυττάρωση των στοιχείων που απαρτίζουν τα NETs (Demkow, 2023). (Εικόνα 4)

## ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ NETs



**Εικόνα 4:** Η αποδόμηση των NETs, είναι μια διαδικασία που αναλαμβάνουν κυρίως τα μακροφάγα. Νουκλεάσες θρυμματίζουν το DNA, το βασικότερο στοιχείο των NETs και τα μακροφάγα ενδοκυττάρωνουν και φαγοκυττάρωνουν αυτά τα θραύσματα. (Ανατύπωση από Demkow, 2023)

### 2.2.1.3. Ηωσινόφιλα

Τα ηωσινόφιλα έχουν έναν πυρήνα δύο λοβών με μεγάλα κυτταροπλασματικά ειδικά κοκκία που χρωματίζονται κόκκινα / ροζ. Επιδρούν ως φλεγμονώδεις αγγειοδραστικοί μεσολαβητές και αποδομούν τα παράσιτα απελευθερώνοντας σημαντικές πρωτεΐνες όπως η κατιονική (Tigner et al., 2024). Τα κοκκία των ηωσινόφιλων ταξινομούνται σε πρωτογενή και δευτερογενή κοκκία. Τα μεν πρώτα περιέχουν την πρωτεΐνη Charcot-Leyden και την ηωσινόφιλη υπεροξειδάση (EPO), ενώ τα δευτερεύοντα κοκκία έχουν έναν κρυσταλλικό πυρήνα. Ταυτόχρονα τα κοκκία τους παράγουν πρωτεάσες όπως τα κοκκία των ουδετερόφιλων, ισταμίνη και λευκοτριένια (Gigon et al., 2021). Αποτελούν

περίπου το 1-4% των WBCs και εμπλέκονται στις χρόνιες φλεγμονές, στις αλλεργικές αντιδράσεις και στην ευαισθητοποίηση του ξενιστή έναντι παρασιτικών λοιμώξεων. Μαζί με τα ουδετερόφιλα και τα βασεόφιλα λειτουργούν ως φαγοκύτταρα (Tigner et al., 2024). Ο απόλυτος αριθμός των ηωσινόφιλων κυμαίνεται μεταξύ 100-400 ανά μl αίματος. Επιπλέον περιέχουν έναν επιφανειακό υποδοχέα για την IgE, ο οποίος όταν ενεργοποιηθεί προκαλείται φαγοκυττάρωση και απελευθέρωση των κοκκίων τους. Τα ηωσινόφιλα παράγονται στο μυελό των οστών, κυκλοφορούν για 10 ημέρες στο περιφερικό αίμα και έπειτα εγκαθίστανται σε διαφορετικούς ιστούς όπου επιβιώνουν για λίγες ημέρες, με κυριότερους αυτό του στομάχου και του εντέρου (Babita Sharma, 2023).

#### **2.2.1.4. Βασεόφιλα**

Τα βασεόφιλα έχουν διάμετρο 12-15μm, έχουν πυρήνες διπλού λοβού και περιέχουν κυτταροπλασματικά κοκκία μεγέθους 0.5μm που χρωματίζονται μπλε/μοβ. Το χρώμα οφείλεται στην παρουσία ηπαρίνης και θειωμένων γλυκοζαμινογλυκανών (Tigner et al., 2024). Και τα κοκκία των βασεόφιλων παράγουν ισταμίνη και λευκοτριένια όπως των ηωσινόφιλων, καθώς ανήκουν στην ίδια υποκατηγορία των μαστοκυττάρων ενώ και οι λειτουργίες τους είναι παρόμοιες (Gigon et al., 2021). Περιέχουν και αυτά τον υποδοχέα IgE, στον οποίο όταν συνδεθεί το αντιγόνο προκαλείται αύξηση αγγειακής διαπερατότητας και εμφανίζονται συμπτώματα άμεσης υπερευαισθησίας. Τα κοκκία των βασεόφιλων περιέχουν ένζυμο που βελτιώνει τη ροή του αίματος και αποτρέπει την πήξη του. Ο απόλυτος αριθμός τους κυμαίνεται μεταξύ 25-200 ανά μl αίματος και αποτελούν το 0-1% των WBCs (Babita Sharma, 2023).

#### **2.2.2. Ακοκκιοκύτταρα**

Τα ακοκκιοκύτταρα αποτελούνται από τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα και ενώ στερούνται συγκεκριμένων κοκκίων, περιέχουν αζουρόφιλα κοκκία.

##### **2.2.2.1. Λεμφοκύτταρα**

Τα λεμφοκύτταρα παράγονται από το μυελό των οστών. Στη συνέχεια ωριμάζουν και βγαίνουν στην κυκλοφορία του αίματος, καταλαμβάνοντας όλα τα μέρη του λεμφικού συστήματος και του αίματος. Μερικά λεμφοκύτταρα εγκαθίστανται στο θύμο αδένι και διαφοροποιούνται σε T, ενώ τα υπόλοιπα εγκαθίστανται στους λεμφαδένες και στα όργανα και διαφοροποιούνται σε B (Cleveland Clinic, 2022). Τα λεμφοκύτταρα

αποτελούν περίπου 25% των WBCs, εμφανίζουν ποικιλία μεγεθών και έχουν σφαιρικό πυρήνα. Τα μικρότερα έχουν παραπλήσιο μέγεθος με τα ερυθροκύτταρα, σφαιρικούς ετεροχρωματικούς πυρήνες και ελάχιστο κυτταρόπλασμα. Τα μεγαλύτερα, τα οποία χαρακτηρίζονται και ως ενεργοποιημένα, έχουν οδοντωτούς πυρήνες και διάμετρο 9-28μm, περισσότερο κυτταρόπλασμα, ενώ έχουν και αζουρόφιλα κοκκία (Tigner et al., 2024). Τα λεμφοκύτταρα ταξινομούνται περαιτέρω σε B, T και φυσικούς φονείς (NK). Τα B λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονται από την παρουσία του υποδοχέα B κυττάρων (BCR) και τα T λεμφοκύτταρα από τον υποδοχέα T (TCR) (MyHematology, 2020). Τα B είναι υπεύθυνα για την έκκριση αντισωμάτων, πραγματοποιώντας την καταστροφή των αντιγόνων. Αρχικά προηγείται η αναγνώριση του παθογόνου παράγοντα από τα T, τα οποία στη συνέχεια ενεργοποιούν τα B κύτταρα. Η αναγνώριση προέρχεται από τους επιτόπους που προέρχονται από παθογόνα και παρουσιάζονται στην επιφάνεια των APCs μέσω αλληλεπίδρασης με τον TCR υποδοχέα. Αναγνωρίζουν επίσης ιογενώς μολυσμένα ή καρκινικά κύτταρα, κάτι στο οποίο συμμετάσχουν και τα NK, τα οποία ονομάζονται έτσι λόγω της ικανότητας τους να σκοτώνουν μεγάλη ποικιλία κυττάρων-στόχων (Encyclopedia Britannica, 2024), παρέχοντας την πρώτη γραμμή άμυνας που ονομάζεται έμφυτη ανοσία. Διαφορετικοί τύποι T κυττάρων βοηθούν στη θανάτωση των μολυσμένων κυττάρων και ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση σε μια ξένη ουσία, όπως τα T κυτταροτοξικά κύτταρα (Tc) που σκοτώνουν τα μολυσμένα κύτταρα και συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των T βοηθητικών κυττάρων (Th), τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν τα B λεμφοκύτταρα για την παραγωγή αντισωμάτων έναντι του αντιγόνου (Babita Sharma, 2023). Ο τερματισμός της ανοσολογικής απόκρισης πραγματοποιείται από τα T ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs) όταν έχει ολοκληρωθεί πλέον η απομάκρυνση του αντιγόνου. Ορισμένα T λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται σε T κύτταρα «μνήμης», τα οποία θα ανταποκριθούν άμεσα σε επόμενη μόλυνση από το ίδιο αντιγόνο (MyHematology, 2020). Τα B λεμφοκύτταρα μετά την προσκόλληση τους με ένα αντιγόνο διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα και μερικά σε B κύτταρα μνήμης. Τα πλασματοκύτταρα παράγουν μεγάλη ποσότητα των αντισωμάτων, ενώ τα B κύτταρα μνήμης σε επόμενη έκθεση στο ίδιο αντιγόνο θα ευαισθητοποιηθούν άμεσα και θα παράγουν ταχύτερα το αντίσωμα. Το φυσιολογικό εύρος των λεμφοκυττάρων είναι μεταξύ 1500-2700 ανά μl αίματος και αποτελούν το 20-30% των WBCs. Παράγονται στο μυελό των οστών, έχουν μεγάλο πυρήνα που

καλύπτει σχεδόν όλο το κυτταρόπλασμα και χαρακτηρίζονται από απουσία κοκκίων. Αφότου ωριμάσουν κυκλοφορούν στο αίμα και στα μέρη του λεμφικού συστήματος (Babita Sharma, 2023).

#### **2.2.2.2. Μονοκύτταρα**

Τα μονοκύτταρα είναι κύτταρα του φαγοκυτταρικού συστήματος σε ανενεργή μορφή, έχουν διάμετρο 12-15 μm και αποτελούνται από χαρακτηριστικά μεγάλους πυρήνες οι οποίοι είναι κεντρικά τοποθετημένοι. Γύρω τους υπάρχει άφθονο κυτταρόπλασμα, στο οποίο βρίσκονται λυσοσωμικά κοκκία που προσδίδουν στο κυτταρόπλασμα ένα μπλε - γκρι χρώμα σε φωτονικό μικροσκόπιο (Tigner et al., 2024). Αποτελούν το 4-8% των WBCs και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, την ενεργό μορφή τους, μόνο όταν μετακινηθούν από το αίμα στα σημεία μόλυνσης. Τα μακροφάγα φαγοκυτταρώνουν ολόκληρους μικροοργανισμούς ή νεκρούς. Ορισμένα μακροφάγα είναι σημαντικά ως αντιγοπαρουσιαστικά, καθώς εκθέτουν τμήματα του αποικοδομημένου οργανισμού στα T λεμφοκύτταρα, επάγοντας την επίκτητη ανοσολογική απόκριση (Encyclopedia Britannica, 2024). Κάποιοι από τους ιστούς που εγκαθίστανται, αφού φύγουν από το αίμα και διαφοροποιηθούν, είναι ο πνεύμονας ως κυψελιδικά μακροφάγα, τα οστά ως οστεοκλάστες, ο εγκέφαλος ως μικρογλοιακά και το ήπαρ ως Kupffer (Tigner et al., 2024). Ορισμένα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε δενδριτικά κύτταρα, τα οποία αφού αναγνωρίσουν το αντιγόνο απελευθερώνουν κυτοκίνες που προσελκύουν άλλα λευκοκύτταρα στο σημείο της μόλυνσης. Ο αριθμός των μονοκυττάρων κυμαίνεται μεταξύ 100 και 700 ανά μl αίματος (Babita Sharma, 2023).

### **3. ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ**

Η νανοεπιστήμη είναι ένας κλάδος που απασχολείται με τη μελέτη των ιδιοτήτων της ύλης σε νανοκλίμακα (Joudeh & Linke, 2022). Η νανοτεχνολογία είναι ένα γνωστό πεδίο έρευνας από τον περασμένο αιώνα και πιο συγκεκριμένα από το 1959, όταν παρουσιάστηκε πρώτη φορά από τον βραβευμένο με Νόμπελ Richard P. Feynman κατά τη διάρκεια της διάσημης διάλεξης του «There's Plenty of Room at the Bottom». Από τότε οι εξελίξεις είναι ραγδαίες (Khan et al., 2019). Το 2008 ο Διεθνής Οργανισμός

Τυποποίησης ISO, όρισε ένα νανοσωματίδιο (NP) ένα διακριτό νανοαντικείμενο όπου οι τρεις καρτεσιανές διαστάσεις του είναι μικρότερες από 100nm. Ωστόσο, το 2011 η Επιτροπή της Ευρωπαϊκής Ένωσης ενέκρινε έναν ορισμό σύμφωνα με τον οποίο, ένα νανοαντικείμενο χαρακτηρίζεται νανοσωματίδιο όταν μία ή περισσότερες εξωτερικές διαστάσεις βρίσκονται μεταξύ μεγέθους 1nm-100nm (King et al., 2019).

### **3.1. Χαρακτηριστικά νανοσωματιδίων**

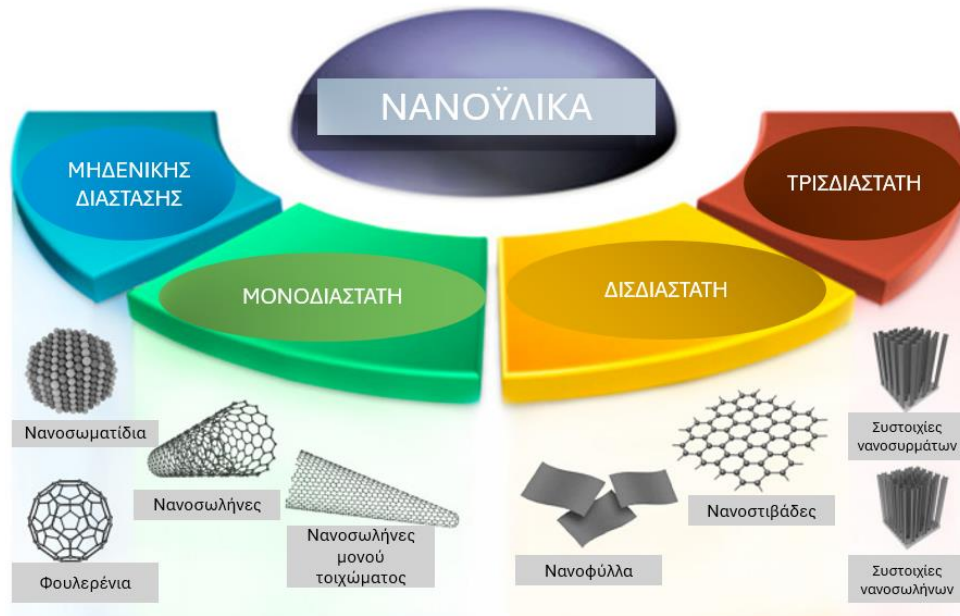
#### **3.1.1. Μέγεθος**

Το μέγεθος των NPs είναι ένα πολύ κρίσιμο χαρακτηριστικό για τον προσδιορισμό των ιδιοτήτων τους καθώς και των εφαρμογών – στόχων τους. Το μέγεθος επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη μέθοδο σύνθεσης τους και επηρεάζει το ρόλο τους σε διάφορες εφαρμογές (Sajid & Płotka-Wasyłka, 2020). Είναι σημαντικό χαρακτηριστικό σε ό,τι αφορά την παράδοση φαρμάκων, καθώς τόσο η ανοσολογική απόκριση όσο και οι φαρμακοκινητικές λειτουργίες - όπως η κυτταρική πρόσληψη, ο χρόνος ημίσειας ζωής και η βιοκατανομή - εξαρτώνται από αυτό. Τα NPs δεν απομακρύνονται εύκολα, λόγω του μεγέθους και επομένως εμφανίζουν παρατεταμένη παρουσία στη συστηματική κυκλοφορία. Το μικρό μέγεθος είναι ευεργετικό στην αποφυγή της ευαισθητοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος (Mutiso Kiiro & Park, 2020). Μικρά NPs, μικρότερα από 5nm, απομακρύνονται ταχέως μέσω νεφρικής κάθαρσης επειδή τα πειραματικά τριχοειδή τοιχώματα των νεφρών έχουν μέγεθος πόρων 4.5-5nm (Soo Choi et al., 2007). Μεγέθη 10-20nm αποβάλλονται ταχέως από το ήπαρ. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα NPs μεγέθους 30-50nm παρουσιάζουν αποτελεσματική πρόσληψη από τα καρκινικά κύτταρα, εξαιτίας της αυξημένης επιφάνειάς τους. Για παροχή επαρκούς ποσότητας φαρμάκων στους στόχους δράσης τους απαιτούνται μεγάλα μεγέθη 100-200nm, διότι δεν φιλτράρονται εύκολα όπως τα μικρότερα. Τα μεγέθη αυτά έχουν μεγάλη ικανότητα φόρτωσης φαρμάκων, αλλά προκαλούν ανοσολογικές αποκρίσεις όταν χορηγούνται ως σύμπλοκα, λόγω του μεγάλου μεγέθους (Mutiso Kiiro & Park, 2020). Θεραπευτικά NPs <100nm έχουν μεγάλο χρόνο παραμονής στην κυκλοφορία του αίματος (Yetisgin et al., 2020). Συνολικά είναι προφανές ότι πρέπει να γίνει μια διαλεύκανση για τον προσδιορισμό του επιθυμητού μεγέθους των NPs, λαμβάνοντας

υπόψιν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα σε ό,τι αφορά την ικανότητα φόρτωσης φαρμάκων, την ανοσολογική απόκριση, το χρόνο κυκλοφορίας και την πρόσληψη κυττάρων (Mutiso Kiio & Park, 2020).

### 3.1.2. Σχήμα

Εκτός από το μέγεθος των NPs, το σχήμα και η δομή είναι επίσης πολύ σημαντικά στις τεχνολογικές εφαρμογές. Έχει παρατηρηθεί ότι NPs του ίδιου υλικού με διαφορετικά σχήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διαφορετικές εφαρμογές (Sajid & Płotka-Wasyłka, 2020). Τα NPs με βάση τις διαστάσεις ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες. Πιο συγκεκριμένα: 1) NPs μηδενικών διαστάσεων (0-D) → σε αυτήν την κατηγορία τα NPs έχουν και τις τρεις διαστάσεις τους στο φάσμα της νανοκλίμακας [ $<100$  nm]. Στην κατηγορία ανήκουν οι κβαντικές κουκκίδες και τα φουλερένια. 2) Μονοδιάστατα NPs (1-D) → ανήκουν τα NPs τα οποία έχουν τη μία διάσταση τους εκτός νανοκλίμακας. Παραδείγματα είναι οι νανοσωλήνες, οι νανοϊνες, οι νανοράβδοι, τα νανοςύρματα και οι νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος. 3) Δισδιάστατα NPs (2-D) → τα NPs αυτής της κατηγορίας έχουν δύο διαστάσεις εκτός της νανοκλίμακας. Τα νανόφυλλα, τα νανοφίλμ και τα νανοστρώματα εντοπίζονται στην κατηγορία. 4) Τρισδιάστατα NPs (3-D) → Σε αυτή την κατηγορία τα NPs δεν περιορίζονται στη νανοκλίμακα σε καμία διάσταση, όπως σκόνες, συστοιχίες νανοκαλωδίων και νανοσωλήνων και διασπορές νανοσωματιδίων (Joudeh & Linke, 2022) (Εικόνα 5). Οι διασπορές NPs αναφέρονται στην ομοιόμορφη κατανομή των NPs εντός ενός μέσου, όπως υγρό, αέριο ή στερεό, αποφεύγοντας τις συσσωματώσεις. Χαρακτηρίζονται από κολλοειδής σταθερότητα (δυναμικό Zeta), βαρυτική και μακροσκοπική σταθερότητα και χρησιμοποιούνται σε τομείς, όπως αυτόν της ιατρικής (Sentis et al., 2024). Στην εργασία χρησιμοποιήθηκαν διασπορές NPs μέσα σε υγρό.



**Εικόνα 5:** Ταξινόμηση νανοϋλικών με βάση τις διαστάσεις τους και χαρακτηριστικά παραδείγματα. (Ανατύπωση από Joudeh & Linke, 2022).

Το σχήμα των NPs καθορίζει την ικανότητα τους να αλληλοεπιδρούν με τις κυτταρικές μεμβράνες. Τα NPs τα οποία χρησιμοποιούνται πιο συχνά ως συστήματα χορήγησης φαρμάκων έχουν σφαιρικό ή σχεδόν σφαιρικό σχήμα, χωρίς όμως να έχει καθιερωθεί το ιδανικό σχήμα με την καλύτερη θεραπευτική αποτελεσματικότητα. Τα σφαιρικά έχουν περιορισμένες θέσεις σύνδεσης για τους κυτταρικούς υποδοχείς, ενώ τα μη σφαιρικά επιτρέπουν πολλαπλές αλληλεπιδράσεις με τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και πιο αποτελεσματική κυτταρική πρόσληψη. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα NPs με μακρά δομή είναι εμπόδιο στις κυτταρικές αλληλεπιδράσεις συγκριτικά με τα βραχεία. Τα ραβδοειδή NPs εμφανίζουν πλεονεκτήματα στη στόχευση στα σημεία φλεγμονής, διότι διατηρούν τις αιμοδυναμικές δυνάμεις που τείνουν να τα αποσπούν από το ενδοθήλιο και χαρακτηρίζονται από μειωμένη ηπατική πρόσληψη. Μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι τα μη σφαιρικά NPs καθυστερούν την απελευθέρωση φαρμάκων, λόγω της μοναδικότητάς τους σε πορώδη δίκτυα. Ακόμα παρουσιάζουν παρατεταμένο χρόνο στην κυκλοφορία του αίματος, λόγω της ικανότητάς τους να αποφεύγουν βιολογικούς φραγμούς, όπως η νεφρική διήθηση του αίματος. Συνολικά έχουν παρατεταμένο χρόνο κυκλοφορίας στο αίμα, βελτιωμένη πρόσληψη από τα



κύτταρα και αυξημένη διείσδυση και συσσώρευση σε όγκους (Mutiso Kiio & Park, 2020).

### **3.1.3. Επιφάνεια**

Πολλές εφαρμογές των NPs οφείλονται στην επιφάνεια τους, καθώς είναι σημαντικές μεταξύ άλλων στην κατάλυση, στην προσρόφηση, στις ηλεκτροχημικές αντιδράσεις και στην αντιδραστικότητα (Sajid & Płotka-Wasyłka, 2020). Το επιφανειακό φορτίο (δυναμικό Zeta) των NPs επηρεάζει τη φαγοκυτταρική πρόσληψη και επομένως τη βιοκατανομή τους. Το δυναμικό της μεμβράνης ποικίλλει από κύτταρα σε κύτταρο, κυμαινόμενο από -90mV έως -20mV. Το επιφανειακό φορτίο των NPs σε συνδυασμό με το δυναμικό της κυτταρικής μεμβράνης ρυθμίζουν την κυτταρική εσωτερίκευση, τον εντοπισμό και τις λειτουργίες των NPs (Mutiso Kiio & Park, 2020). Η επιφανειακή λειτουργικότητα των NPs περιλαμβάνει μια διαδικασία που στοχεύει στη βελτίωση της χρήσης σε ιατρικές εφαρμογές. Η τροποποίηση της επιφάνειας των NPs μπορεί να γίνει με δύο διαφορετικές μεθόδους, την ομοιοπολική και τη μη ομοιοπολική σύζευξη η οποία βασίζεται στο μεγάλο αριθμό ασθενών αλληλεπιδράσεων, όπως δεσμοί van der Waals και μπορούν εύκολα να επηρεαστούν από μεταβλητές, όπως το pH και η ιοντική ισχύ. Οι δεσμοί πλεονεκτούν επειδή είναι σχετικά απλοί και δεν επηρεάζουν τη δομή των χρησιμοποιούμενων μορίων και την αλληλεπίδραση με τα κύτταρα. Η στρατηγική μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας πολλές εναλλακτικές προσεγγίσεις, ανάλογα τη σύνθεση των NPs και αξιοποιείται στη δημιουργία δομών με σύνθετες λειτουργίες. Μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις χρησιμοποιούνται στη φόρτωση των NPs με μόρια που πρόκειται να μεταφερθούν σε κύτταρα-στόχους, όπως φάρμακα, ενώ οι ομοιοπολικές για τη δέσμευση πεπτιδίων χρήσιμων για την επίτευξη στόχευσης και μείωσης της τοξικότητας των NPs (Sanità et al., 2020). Μπορεί να φέρουν πεπτίδια, αντισώματα, τρανσφερρίνες και σακχαρίτες στην επιφάνεια τους προκειμένου να επιτευχθούν επιθυμητές αλληλεπιδράσεις με τα κύτταρα-στόχους. Το δυναμικό Zeta, μεγαλύτερο από  $\pm 30$  mV φανερώνει μεγάλη σταθερότητα των NPs στα εναιωρήματά τους, καθώς υπάρχει μειωμένη συσσωμάτωση και επομένως μπορεί να εγκλωβιστεί ευκολότερα κάποιο δραστικό υλικό, όπως ένα φάρμακο. Έχει αποδειχθεί ότι η επικάλυψη της επιφάνειας με υδρόφοβα μόρια, όπως

πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), σχετίζεται με παρατεταμένη κυκλοφορία και μειωμένη φαγοκυττάρωση. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι σύζευξη πεπτιδίων - εξυπηρετούν την εισχώρηση τους εντός των κυττάρων (Cell-penetrating peptides, γνωστά ως CCPs) - με την επιφάνεια των NPs αυξάνει τη σταθερότητα του χορηγούμενου φαρμάκου μέσα στα κύτταρα, λόγω του μεγάλου επιφανειακού φορτίου. Αυτή η σύζευξη έχει αποφέρει επιτυχημένα αποτελέσματα σε ποικίλες ασθένειες, όπως δερματολογικές διαταραχές, καρκίνο και διαταραχές του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), λόγω της στοχευμένης εφαρμογής, της χαμηλής τοξικότητας, της υψηλής σταθερότητας και της ενδοκυτταρικής απορρόφησης (Silva et al., 2019). Γενικότερα ισχύει ότι τα θετικά φορτισμένα NPs εισέρχονται ευκολότερα στα κύτταρα, λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη. Αυτή η ισχυρή αλληλεπίδραση ωστόσο με τις αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες οψωνίνες επιταχύνει την κάθαρση τους από το αίμα. Τα NPs με ελαφρώς αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια είναι ευεργετικά, λόγω των μειωμένων αλληλεπιδράσεων τους με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, αυξάνοντας το χρόνο κυκλοφορίας τους στο αίμα. Έχουν προταθεί NPs με εναλλασσόμενα φορτία - εναλλάσσουν συνεχώς το φορτίο της επιφάνειάς τους με αποτέλεσμα να μην ολοκληρώνεται η οψωνοποίηση - ως λύση που μπορεί να αξιοποιήσει την επίδραση του φορτίου στη βελτίωση της φαρμακοκινητικής (Mutiso Kii & Park, 2020).

#### **3.1.4. Φυσικοχημικές ιδιότητες των NPs**

Τα NPs μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα μακρύ κατάλογο εφαρμογών, λόγω των μοναδικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων που δεν υπάρχουν στα ίδια υλικά μεγαλύτερων διαστάσεων (Joudeh & Linke, 2022). Παρακάτω αναφέρονται ορισμένες ιδιότητες των NPs.

Οι οπτικές και ηλεκτρονικές ιδιότητες των NPs είναι αλληλεξαρτώμενες σε σημαντικό βαθμό. Ορισμένα NPs, όπως τα μεταλλικά, παρουσιάζουν μια ισχυρή ζώνη ορατή στην υπεριώδη ακτινοβολία. Το φαινόμενο αυτό προκύπτει όταν η συχνότητα των προσπιπτόντων φωτονίων είναι σταθερή με τη συλλογική διέγερση των ηλεκτρονίων αγωγιμότητας και καλείται τοπικός επιφανειακός συντονισμός πλάσματος, γνωστός και ως LSPR. Η διέγερση έχει ως αποτέλεσμα ενισχυμένα τοπικά ηλεκτρομαγνητικά

πεδία κοντά στην επιφάνεια των NPs. Το μέγιστο μήκος κύματος του φάσματος LSPR εξαρτάται από το μέγεθος, το σχήμα και την απόσταση μεταξύ των σωματιδίων (Khan et al., 2019). Επιπλέον τα NPs χαρακτηρίζονται για τις μηχανικές ιδιότητες, όπως την ελαστικότητα, τη σκληρότητα και την ανθεκτικότητα. Τα περισσότερα ανόργανα, μη μεταλλικά υλικά είναι εύθραυστα και δεν έχουν σημαντικές ιδιότητες σκληρότητας και ελαστικότητας, σε αντίθεση με τα οργανικά. Επιπρόσθετα, εμφανίζουν θερμικές ιδιότητες, όπως η υψηλή θερμική αγωγιμότητα και θερμοηλεκτρική ισχύ. Επιπλέον παρουσιάζουν καταλυτικές ιδιότητες, όπως αντιδραστικότητα και εκλεκτικότητα, οι οποίες εξαρτώνται από το μέγεθος, το σχήμα, τη σύνθεση, την απόσταση μεταξύ των σωματιδίων και την κατάσταση οξείδωσης. Βρέθηκε ότι τα ημισφαιρικά NPs είναι πιο δραστικά συγκριτικά με τα σφαιρικά (Joudeh & Linke, 2022). Επιπλέον τα NPs έχουν χρησιμοποιηθεί ως αντιμικροβιακοί παράγοντες, λόγω των εξαιρετικών ιδιοτήτων τους. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν αναφορές στη χρήση νανοσωματιδίων αλγινικού οξέος σε εγκαύματα, πληγές και αντιβακτηριακές λοιμώξεις. Επίσης έχει αναφερθεί ότι πολυμερή NPs χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές υγειονομικής περίθαλψης μειώνοντας τις ασθένειες που εξαπλώνονται μέσω μολυσματικών επιφανειών ή καθετήρων σε νοσοκομειακούς χώρους (Sajid & Płotka-Wasyłka, 2020).

## **3.2. Ταξινόμηση NPs**

Με βάση τη σύνθεσή τους, τα NPs ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: τα οργανικά, τα ανόργανα και αυτά με βάση τον άνθρακα (Joudeh & Linke, 2022).

### **3.2.1. Οργανικά NPs**

Η κατηγορία περιλαμβάνει τα NPs που αποτελούνται από πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, πολυμερικά μόρια ή οποιεσδήποτε άλλες οργανικές ενώσεις. Τα NPs αυτά χαρακτηρίζονται από μη τοξικότητα, βιοδιάσπαση και από ευαισθησία στη θερμική και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Σχηματίζονται από μη ομοιοπολικές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, γεγονός που τα καθιστά πιο ασταθή στο περιβάλλον, ενώ το πεδίο εφαρμογής τους καθορίζεται, μεταξύ άλλων από τη μορφολογία επιφάνειας και τη σταθερότητα τους (Joudeh & Linke, 2022). Τα περισσότερα αποτελούνται από

οργανικά ή πολυμερή μόρια και χαρακτηρίζονται από δυναμικό χαρακτήρα και έχουν τη δυνατότητα να αλλάζουν μέγεθος και σχήμα. Ουσίες όπως τα φάρμακα μπορούν να εγκλωβιστούν στα οργανικά NPs είτε με σύζευξη στην επιφάνεια τους ή στον πυρήνα τους, είτε με φυσική ενθυλάκωση (Romero & Moya, 2012). Τα οργανικά χρησιμοποιούνται κυρίως στην ιατρική νανοτεχνολογία, στη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων και στη θεραπεία κατά του καρκίνου (Joudeh & Linke, 2022). Παρακάτω ακολουθεί αναφορά στα πιο σημαντικά οργανικά NPs .

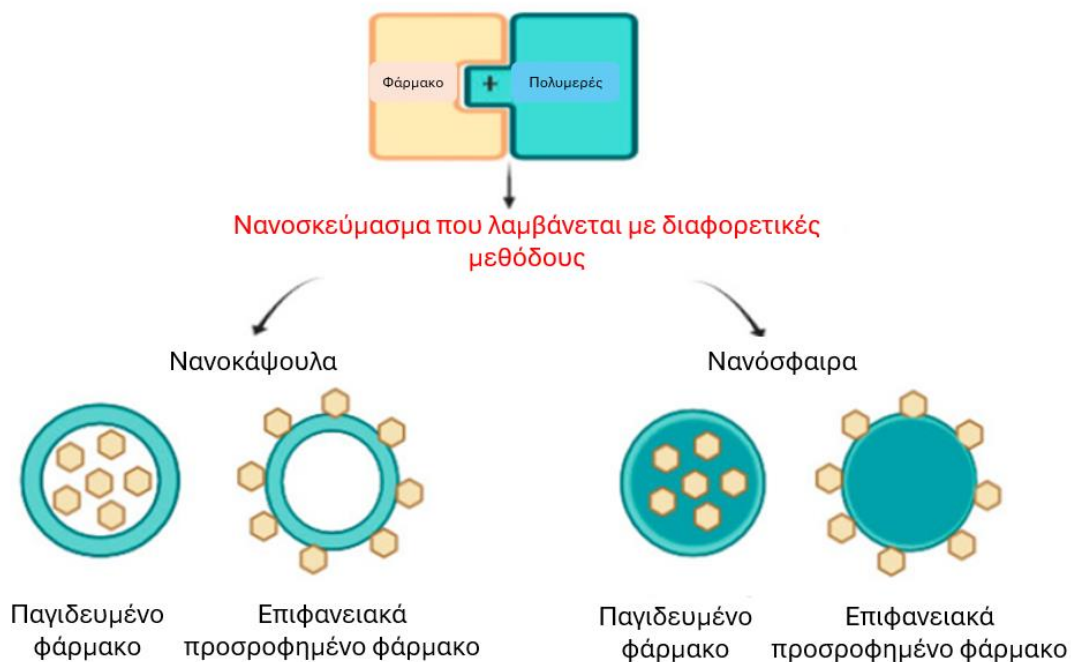
### **3.2.1.1. NPs με βάση τα λιπίδια**

Περιέχουν τμήματα λιπιδίων (LNPs) και χρησιμοποιούνται αποτελεσματικά σε πολλές βιοϊατρικές εφαρμογές, όπως ως φορείς φαρμάκων και στην απελευθέρωση RNA σε θεραπεία του καρκίνου. Η προσέγγιση στη θεραπεία του καρκίνου περιλαμβάνει την κωδικοποίηση καρκινικών αντιγόνων, υποδοχέων ανοσοκυττάρων, κυτοκινών και αντισωμάτων με τη μορφή mRNA, το οποίο εισέρχεται στο σώμα ενσωματωμένο σε LNPs, προκαλώντας την ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης έναντι των καρκινικών κυττάρων. Αυτή η μέθοδος ενσωμάτωσης σε LNPs αυξάνει τη σταθερότητα και την αποτελεσματικότητα χορήγησης του mRNA, καθιστώντας τη μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική για τη θεραπεία του καρκίνου (Han et al., 2023). Τα LNPs είναι σφαιρικού σχήματος με διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ 10-1000nm, διαθέτουν στερεό πυρήνα και ένα υδρόφοβο εσωτερικό από λιπόφιλα μόρια. Επιφανειοδραστικές ουσίες ή γαλακτωματοποιητές σταθεροποιούν την εξωτερική τους επιφάνεια (Khan et al., 2019). Ο υδάτινος πυρήνας τους και η διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων, καθιστά τη δομή αμφίφυλη και επιτρέπει το σχηματισμό ενός θερμοδυναμικά σταθερού NP. Η σταθερότητα της επιφάνειας ενισχύεται από την ενσωμάτωση χοληστερόλης (Cuffari, 2021). Τα LNPs έχουν έντονο ενδιαφέρον, λόγω των λιπιδικών τους ιδιοτήτων, όπως το υψηλό δυναμικό διαλυτοποίησης, η ευελιξία, η βιοσυμβατότητα και η ικανότητα τους να αποσυντίθενται μετά από αλληλεπιδράσεις με βιολογικά στοιχεία. Τα LCNPs είναι η κατηγορία των LNPs που διαθέτουν πυρήνα, ορίζονται και ταξινομούνται με βάση την κατάσταση των λιπιδικών συστατικών σε νανοσωματίδια υγρών λιπιδίων (LLNs), σε στερεών λιπιδίων (SLN) και σε νανοδομημένους φορείς λιπιδίων (NLCs). Η ιδιαίτερη μορφολογία των LNPs, τα καθιστά ικανούς φορείς φαρμάκων τα οποία είναι

ελάχιστα υδατοδιαλυτά, αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα τους στο αίμα. Ακόμα βελτιώνουν την από του στόματος χορήγηση φαρμάκων, λόγω της ικανότητας τους να ενισχύουν τη διαλυτότητα και την απορρόφηση των φαρμάκων στο γαστρεντερικό, καθώς και την εστιασμένη εφαρμογή τους (Graván et al., 2023).

#### **3.2.1.2. Πολυμερή NPs**

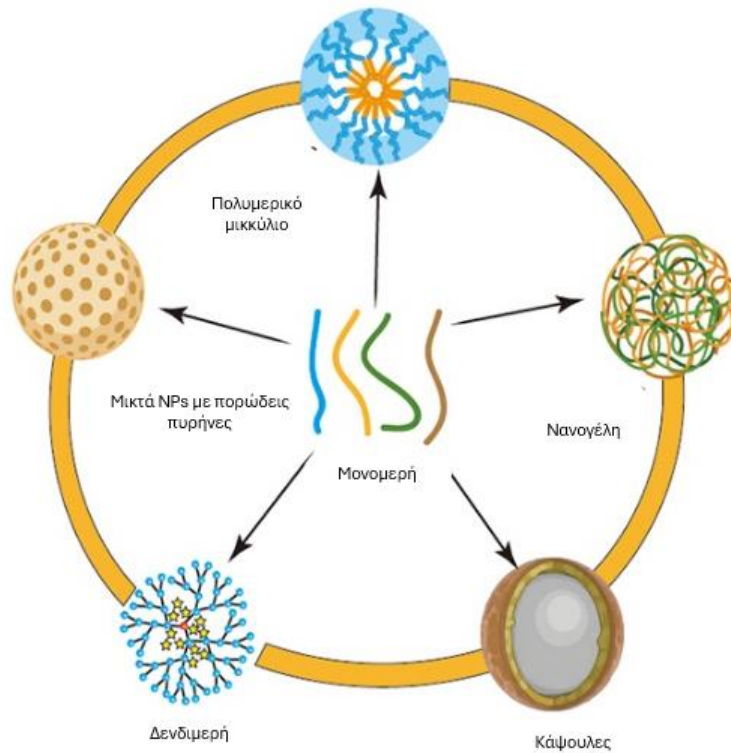
Τα πολυμερή NPs είναι στερεά κολλοειδή σωματίδια μεγέθους 10nm-1μm. Χρησιμοποιούνται ως φορείς φαρμάκων και χαρακτηρίζονται από το μικρό μέγεθος, την υδατοδιαλυτότητα, την έλλειψη τοξικότητας, την εξαιρετική σταθερότητα και τη μεγάλη διάρκεια ζωής τους. Ανάλογα τη μέθοδο σύνθεσης τους ταξινομούνται σε δυο κατηγορίες: Τα νανοσφαιρίδια τα οποία έχουν σφαιρικό σχήμα και στερεή δομή και τις νανοκάψουλες που έχουν ένα λεπτό στρώμα μεμβράνης πάχους 5nm (Sajid & Płotka-Wasyłka, 2020). Ως φορείς φαρμάκων μπορούν να παγιδεύσουν το φάρμακο διασκορπισμένο εντός του υδρόφοβου εσωτερικού ή προσροφημένο στην επιφάνεια τους. (Εικόνα 6)



**Εικόνα 6:** Διαφορετικές δυνατότητες συσχέτισης φαρμάκων με νανοσφαιρίδια και νανοκάψουλες. Οι νανόσφαιρες χαρακτηρίζονται για τη συμπαγή δομή τους, ενώ οι νανοκάψουλες για τη λεπτή μεμβράνη. (Ανατύπωση από Zielińska et al., 2020)

Για την παραγωγή των πολυμερικών NPs χρησιμοποιούνται δύο κύριες στρατηγικές. Η διασπορά προσχηματισμένων πολυμερών ή ο πολυμερισμός μονομερών (Zielińska et al., 2020). Οι πολυμερικοί φορείς αποτρέπουν την αλληλεπίδραση του φαρμάκου με μακρομόρια, τα οποία θα μπορούσαν να εμποδίσουν τα δραστικά συστατικά ώστε να αποτραπεί η άφιξη του φαρμάκου στα κύτταρα-στόχους (CD Bioparticles, 2024). Τα πολυμερή NPs μπορούν να χορηγηθούν από διάφορες οδούς, όπως από το στόμα, παρεντερικά, οφθαλμικά και πνευμονικά και διερευνώνται για πολλές θεραπευτικές εφαρμογές, όπως σε ασθένειες του ΚΝΣ, στον καρκίνο, στην γονιδιακή θεραπεία, στον εμβολιασμό και στην ανοσοποίηση. Στην αγορά κυκλοφορεί το Abraxane, ένα NP που συνδέεται με τη λευκωματίνη και χρησιμοποιείται στην θεραπεία του καρκίνου του μαστού (Maji et al., 2023). Με βάση τα δομικά χαρακτηριστικά τα πολυμερικά NPs ταξινομούνται ως εξής: (Εικόνα 7)

- 1) Τα νανοσωματίδια πολυμερούς, τα οποία είναι στερεά, κατασκευασμένα από πολυμερικές ενώσεις και χρησιμοποιούνται για τη χορήγηση φαρμάκων, όπως τα νανοσωματίδια αλγινικού οξέος.
- 2) Τα πολυμερή μικκύλια, που είναι αυτοσυναρμολογούμενα νανοσωματίδια με υδρόφοβο πυρήνα και υδρόφιλο περίβλημα και αξιοποιούνται για την παροχή φαρμάκων (CD Bioparticles, 2024). Το Genexol® PM, που κατασκευάζεται από την Samyang Holdings είναι το πρώτο εγκεκριμένο πολυμερές σκεύασμα με βάση το μικκύλιο που εγκρίθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Φαρμάκων και χρησιμοποιείται για τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Maji et al., 2023).
- 3) Τα πολυμερή νανοπηκτώματα αποτελούνται από ένα δίκτυο πολυμερών που μπορούν να διογκωθούν και να συγκρατήσουν νερό και χρησιμοποιούνται για την παράδοση φαρμάκων και τη μηχανική των ιστών.
- 4) Τα νανογαλακτώματα χαρακτηρίζονται από κολλοειδή συστήματα ελαίου και νερού σταθεροποιημένα από γαλακτωματοποιητικό πυρήνα.
- 5) Τα δενδριμερή, τα οποία είναι διακλαδισμένα NPs με καθορισμένη μορφή, αξιοποιούνται στη χορήγηση φαρμάκων και στην τεχνολογία τροφίμων (CD Bioparticles, 2024).



**Εικόνα 7:** Είδη πολυμερών NPs. Αποτελούνται από 2 ή περισσότερα μονομερή. Ανάλογα τη φύση της σύνθεσης τους ταξινομούνται στις αναφερθείσες κατηγορίες. (Ανατύπωση από CD Bioparticles, 2024).

Η πολυαμιδοαμίνη και η πολυπροπυλενίμη είναι εμπορικά διαθέσιμα δενδριμερή και έχουν διερευνηθεί εκτενώς (Maji et al., 2023). Μεταξύ των βιοσυμβατών πολυμερών, τα πολυϋδροξυαλκανοϊκά NPs (PHAs), που παράγονται από μικροοργανισμούς όπως το βακτήριο *Cupriavidus necator*, έχουν προσελκύσει ιδιαίτερα την προσοχή λόγω των μοναδικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων. Αξιοποιούνται στις ελεγχόμενες παραδόσεις υδρόφοβων φαρμάκων, πρωτεϊνών, εμβολίων, νουκλεϊκών οξέων και βιολογικών μακρομορίων. Χρησιμοποιούνται επίσης για την ενθυλάκωση αντινεοπλασματικών φαρμάκων στην θεραπεία του καρκίνου. Εκτός από τον ιατρικό τομέα, έχουν ευρεία χρήση και σε άλλους τομείς, όπως στη βιομηχανία τροφίμων, στη γεωργία και στη μηχανική (Tarrahi et al., 2020). Ακόμα ένα γνωστό πολυμερές για τη βιοσυμβατότητα και την ικανότητα διάσπασης του εντός του οργανισμού, είναι το συνθετικό συμπολυμερές γαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ (PLGA) που δεν συναντάται ελεύθερο



στη φύση. Είναι εγκεκριμένο από τον Παγκόσμιο και τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων και έχει μελετηθεί στη θεραπεία του καρκίνου, των καρδιαγγειακών παθήσεων και των νευροεκφυλιστικών διαταραχών αλλά και στην επούλωση πληγών και στα εμβόλια (Chavan et al., 2022). Ορισμένα πολυμερή που παράγονται στη φύση και ονομάζονται επίσης και βιοπολυμερή, είναι τα νανοσωματίδια χιτοζάνης που προέρχονται από τη χιτίνη και τα νανοσωματίδια κολλαγόνου, που απαρτίζουν τους συνδετικούς ιστούς και έχουν εφαρμογές στη χορήγηση φαρμάκων, στην επούλωση και μηχανική των ιστών. Τα νανοσωματίδια υαλουρονικού χρησιμοποιούνται επίσης στα καλλυντικά, ενώ τα νανοσωματίδια δεξτράνης προέρχονται από το άμυλο και χρησιμοποιούνται στην ιατρική απεικόνιση. Φυτικής προέλευσης νανοσωματίδια αποτελούν τα αλγινικά, τα οποία προέρχονται από φύκη και εφαρμόζονται και αυτά στη χορήγηση φαρμάκων (CD Bioparticles, 2024). Γενικότερα, τα πολυμερή NPs έχουν εξαιρετικό φαρμακοκινητικό έλεγχο και μπορούν να παγιδεύουν και να παραδίδουν ένα ευρύ φάσμα φαρμάκων.

### **3.2.2. Ανόργανα NPs**

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει NPs τα οποία δεν κατασκευάζονται από άνθρακα ή οργανικά υλικά. Τα κυριότερα παραδείγματα αυτής της τάξης είναι τα NPs μετάλλων, των ημιαγωγών, των κβαντικών κουκκίδων και των κεραμικών. Τα NPs μετάλλων είναι κατασκευασμένα από τα στοιχεία των μετάλλων του περιοδικού πίνακα και ανάλογα τη σύνθεση τους είναι μονομεταλλικά, διμεταλλικά ή πολυμεταλλικά (Joudeh & Linke, 2022). Τα μεταλλικά NPs διαθέτουν χημικές, οπτικές, ηλεκτρικές, θερμικές, μηχανικές και ηλεκτρομαγνητικές ιδιότητες, ενώ παράλληλα προσφέρουν μεγάλες επιφάνειες, κατάλληλο μέγεθος και μορφολογία. Λόγω των ιδιοτήτων τους έχουν χρησιμοποιηθεί μεταξύ άλλων, στη βιοϊατρική και στη μοριακή ανίχνευση. Τα NPs του χρυσού, του αργύρου και του πυριτίου έχουν ευρεία χρήση, ενώ χρησιμοποιούνται και μεταλλικά οξείδια όπως το οξείδιο του σιδήρου και το διοξείδιο του τιτανίου (Sajid & Płotka-Wasyłka, 2020). Τα NPs ημιαγωγών χαρακτηρίζονται από ιδιότητες μεταξύ μετάλλων και μη μετάλλων (Joudeh & Linke, 2022) και έχουν μοναδικές οπτικοηλεκτρονικές και μαγνητικές ιδιότητες εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους (1-20nm) και της μεγάλης επιφάνειας τους. Στοιχεία από τους νανοκρυστάλλους των ημιαγωγών των ομάδων

περιοδικού πίνακα IIIV ( $8^n-9^n-10^n$ ), ονομάζονται κβαντικές κουκκίδες (Quantum Dots, QDs) των ημιαγωγών και ανήκουν στην κατηγορία των NPs μηδενικών διαστάσεων (0-D). Έχουν κρίσιμο ρόλο σε πολλούς ερευνητικούς τομείς όπως της χημείας, της φυσικής και της επιστήμης υλικών και είναι χρήσιμα συστατικά της φωτοκατάλυσης, των ηλεκτρικών συσκευών και σε εφαρμογές διάσπασης νερού (Nayak et al., 2017). Μερικά γνωστά QDs ημιαγωγών είναι το σεληνιούχο κάδμιο και το σουλφίδιο του ψευδαργύρου. Τα κεραμικά NPs, είναι ανόργανα στερεά NPs και αποτελούνται κυρίως από οξείδια, καρβίδια, φωσφορικά και ανθρακικά άλατα μετάλλων και μεταλλοειδών όπως το ασβέστιο και το τιτάνιο. Χαρακτηρίζονται από την υψηλή αντοχή, τη σταθερότητα στη θερμότητα και στις συνθήκες PH και τη χημική τους αδράνεια, που τους επιτρέπει να χρησιμοποιούνται ευρέως. Παράδειγμα αποτελεί η χρήση τους στη χορήγηση φαρμάκων λόγω του μεγέθους τους, της λειτουργικότητας της επιφάνειάς τους, της πορώδους φύσης τους και της υψηλής ενσωμάτωσής τους στους όγκους. Ορισμένα μειονεκτήματα τους στον τομέα της χορήγησης φαρμάκων είναι η χαμηλή ικανότητα αποσύνθεσης τους μετά από τις αλληλεπιδράσεις με τα βιολογικά στοιχεία και η υψηλή τους πυκνότητα, γεγονός που μπορεί να αποφέρει τοξικότητα (Sajid & Plotka-Wasyłka, 2020).

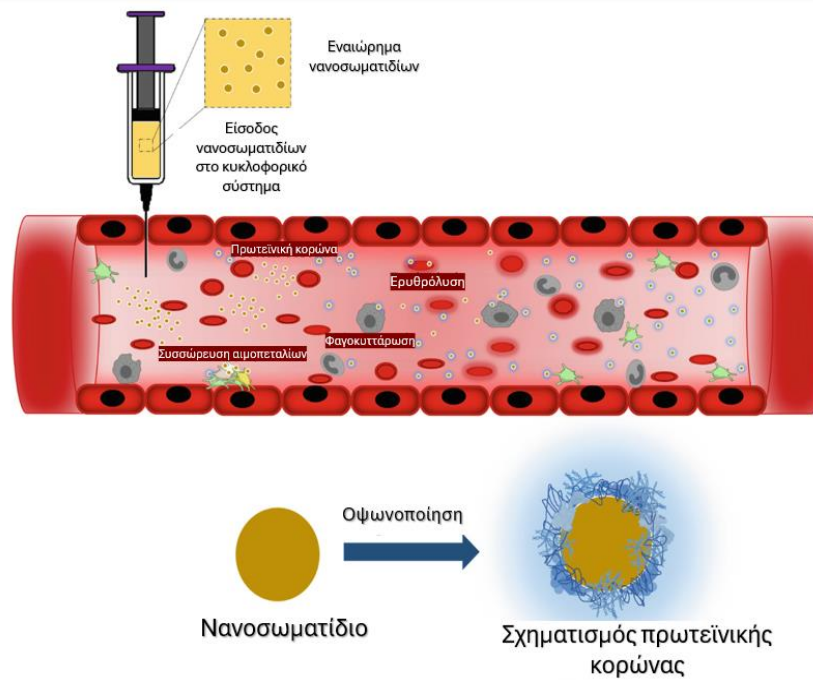
### **3.2.3. NPs με βάση των άνθρακα**

Η τρίτη μεγάλη κατηγορία περιλαμβάνει τα NPs που παρασκευάζονται αποκλειστικά από άτομα άνθρακα. Γνωστά παραδείγματα είναι τα φουλερένια, οι νανοσωλήνες άνθρακα, τα NPs της αιθάλης και τα QDs άνθρακα. Τα φουλερένια αποτελούνται από 60 άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε σφαιρική δομή, ενώ της αιθάλης σχηματίζουν δομή σταφυλιού. Τα QDs άνθρακα δεν ξεπερνούν τα 10 nm και αποτελούνται από εξαιρετικά συνταγμένα σφαιρικά σωματίδια (Joudeh & Linke, 2022). Οι νανοσωλήνες άνθρακα έχουν επιμήκη, σωληνοειδή δομή με διάμετρο 1-2nm. Έχουν αποκτήσει αξιοσημείωτο εμπορικό ενδιαφέρον, λόγω της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, της υψηλής αντοχής, της συγγένειας ηλεκτρονίων και της ευελιξίας τους (Khan et al., 2019). Τα NPs με βάση τον άνθρακα χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως στη χορήγηση φαρμάκων, στην αποθήκευση ενέργειας, στη βιοαπεικόνιση, σε φωτοβολταϊκές συσκευές και στην ανίχνευση μικροβιακών παθογόνων. Στη χορήγηση

φαρμάκων εφαρμόζονται συνήθως πιο πολύπλοκα NPs με βάση τον άνθρακα, όπως τα νανοδιαμάντια που έχουν χαμηλή τοξικότητα και καλή βιοσυμβατότητα (Joudeh & Linke, 2022).

#### **4. ΑΙΜΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑ NPs**

Στην ενδοφλέβια χορήγηση NPs, αυτά έρχονται σε πρώτη επαφή με το αίμα ώστε να φτάσουν στους ιστούς ή στα όργανα στόχους τους. Τη στιγμή που τα NPs εισέλθουν στο αίμα, έρχονται σε άμεση επαφή με τα κύτταρα του αίματος, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τις πρωτεΐνες του πλάσματος (Εικόνα 8) και μπορεί να επηρεαστεί η περίπλοκη δομή και οι κρίσιμες λειτουργίες αυτών των συστατικών του αίματος. Ο έλεγχος αιμοσυμβατότητας αναφέρεται στην αξιολόγηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ξένων υλικών και συστατικών του αίματος, με στόχο να προσδιοριστεί εάν μπορεί να προκύψουν ανεπιθύμητες ενέργειες από την έκθεση αυτών των ξένων υλικών στο αίμα. Καθένα από τα κύτταρα του αίματος έχει ιδιαίτερη φυσική δομή και μηχανισμούς με τους οποίους επιτελεί επιδέξια τις λειτουργίες του, με τα NPs να μπορούν εύκολα να επηρεάσουν τόσο τη δομή όσο και τη λειτουργία του. Είναι σημαντικό να διευκρινιστούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων του αίματος και NPs, για να αξιολογηθεί το πιθανό τοξικό δυναμικό τους, τόσο στο αίμα όσο και στους απομακρυσμένους ιστούς (de la Harpe et al., 2019).

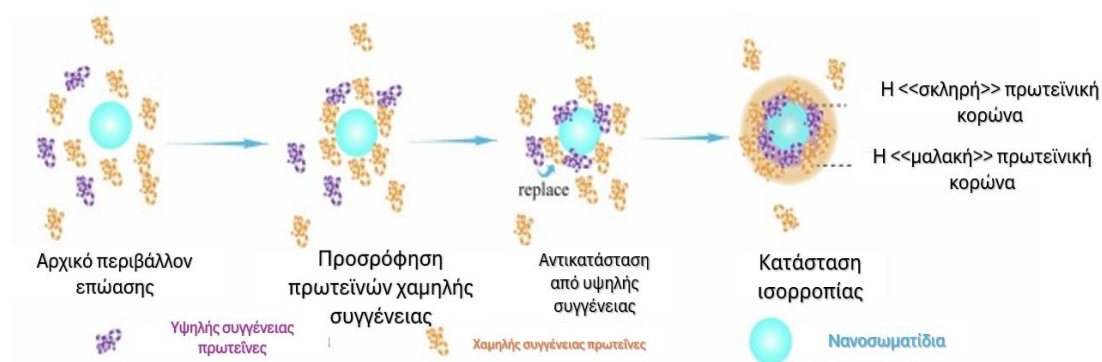


**Εικόνα 8:** Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης των NPs με τα κύτταρα του αίματος. Παρατηρείται ευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων και επιδράσεις με τα ερυθροκύτταρα. (Ανατύπωση από Arathi et al., 2023)

#### 4.1. Αλληλεπίδραση NPs με πρωτεΐνες του πλάσματος

Καθώς τα NPs διέρχονται από τη συστηματική κυκλοφορία, θα αλληλοεπιδράσουν άμεσα με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Αυτή η προσρόφηση πρωτεϊνών αποτελεί σημαντικό ζήτημα, όσον αφορά τη βιολογική απόκριση και καθορίζει την τύχη των NPs στην κυκλοφορία, επηρεάζοντας τη βιοκατανομή, την κυτταρική πρόσληψη και το χρόνο κυκλοφορίας τους στο αίμα (Gerardo González De La Cruz et al., 2017). Οι πρωτεΐνες αυτές προσκολλώνται στην επιφάνεια των NPs, σχηματίζοντας ένα στρώμα πρωτεΐνης που τα σταθεροποιεί σε κατάσταση χαμηλής ενέργειας. Αυτή η δομή είναι γνωστή ως «πρωτεΐνη κορώνα» “Protein Crown” (PC) (F. Guo et al., 2024). Μελέτες έδειξαν ότι η PC σχηματίζεται άμεσα κατά την επαφή των NPs με το αίμα σε χρόνο <30sec (Gerardo González De La Cruz et al., 2017). Η PC μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε «σκληρή» και «μαλακή». Κατά την είσοδο των NPs στο αίμα, άφθονες πρωτεΐνες, με κύρια τη λευκωματίνη του ορού, σχηματίζουν την αρχική PC. Αυτές οι πρωτεΐνες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από χαμηλή συγγένεια με την επιφάνεια, αντικαθίστανται από λιγότερο άφθονες και υψηλότερης συγγένειας (Li et al., 2021). Τέτοιες πρωτεΐνες

είναι οι ανοσοσφαιρίνες, η απολιπρωτεΐνη ApoA, η τρανσφερίνη και παράγοντες του συμπληρώματος. Αυτή η διαδικασία καλείται «φαινόμενο Vroman» και αποσκοπεί στη δυναμική ισορροπία που εξαρτάται από το χρόνο και τη συγκέντρωση των NPs. Το σύμπλεγμα NPs-πρωτεϊνών τελικά φτάνει σε μια σταθερή και μη αναστρέψιμη ελάχιστη ενεργειακή κατάσταση. Η πρωτεΐνη στο εσωτερικό στρώμα σχηματίζει μια ισχυρή δύναμη σύνδεσης με την επιφάνεια και ονομάζεται «σκληρή κορώνα», ενώ η πρωτεΐνη που βρίσκεται εξωτερικά έχει ασθενέστερη δύναμη σύνδεσης και είναι πιο πιθανό να αποκολληθεί και για αυτό αναφέρεται ως «μαλακή κορώνα» (F. Guo et al., 2024). (Εικόνα 9)

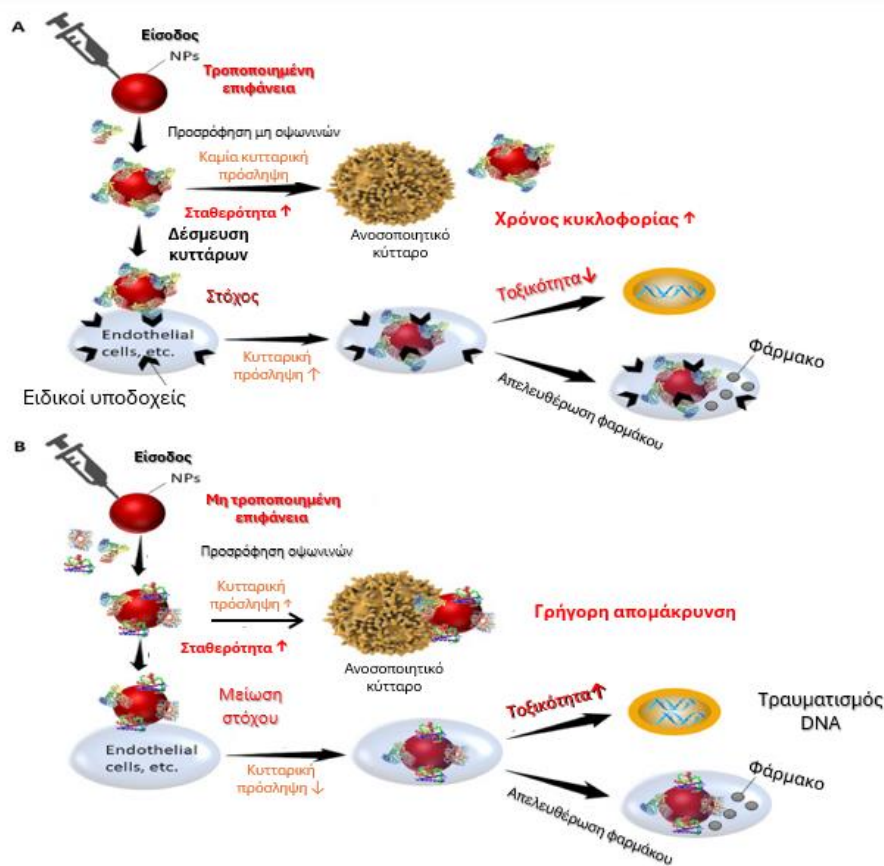


**Εικόνα 9:** Τα NPs στο πρώτο στάδιο κατά την είσοδο τους στο αίμα, αντιδρούν με τις πολυπληθείς πρωτεΐνες του πλάσματος που ενώνονται με χαμηλή συγγένεια με το νανοσωματίδιο. Με την πάροδο του χρόνου, οι αρχικές πρωτεΐνες αντικαθίστανται από υψηλής συγγένειας με την επιφάνεια, μέχρι τη δημιουργία ενός ενεργειακά σταθερού συμπλόκου. Στο εσωτερικό εντοπίζονται ισχυρά συνδεδεμένες πρωτεΐνες με το NP («σκληρή κορώνα») και στο εξωτερικό στρώμα, πρωτεΐνες που συνδέονται με ασθενέστερους δεσμούς («μαλακή κορώνα»). (Ανατύπωση από Guo et al., 2024).

#### 4.1.1. Τύποι πρωτεϊνών PC

Οι τύποι των πρωτεϊνών της PC διαχωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, οι οποίες είναι οι οψωνίνες και οι μη οψωνίνες. Οι οψωνίνες καθιστούν τα NPs αναγνωρίσιμα στα μακροφάγα, τα οποία απομακρύνουν τα NPs γρήγορα από την κυκλοφορία του αίματος καταστρέφοντας τα. Οι μη οψωνίνες αντιθέτως εμποδίζουν την αναγνώριση NPs στα μακροφάγα και έτσι παρατείνουν το χρόνο κυκλοφορίας τους. Η πιο άφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος, η αλβουμίνη, είναι μη οψωνίνη. Ακόμα η επικάλυψη των NPs με λευκωματίνη αναστέλλει σημαντικά την προσρόφηση οψωνινών, μειώνοντας

τη φαγοκυττάρωση και επεκτείνοντας το χρόνο που βρίσκονται στην κυκλοφορία. Μη οψωνίνες είναι ακόμα η απολιπρωτεΐνη ApoA και η τρανσφερρίνη, ενώ στην αντίθετη περίπτωση ως μείζονες οψωνίνες χαρακτηρίζονται οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος C3b και C4b, οι ανοσοσφαιρίνες IgG και IgM, το ινωδογόνο, η βιτρονεκτίνη και η φμπρονεκτίνη (Li et al., 2021). Υπάρχει περίπτωση, στην οποία οι αλληλεπιδράσεις NP-πρωτεΐνης προκαλούν αλλοιώσεις στην πρωτεΐνη, όπως την αλλαγή του σχήματος της και έτσι να ενεργοποιηθεί το ανοσοποιητικό σύστημα, εξαλείφοντας τόσο τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη όσο και το NP (Pondman et al., 2023). Όσες περισσότερες μη οψωνίνες διαθέτει μια PC, τόσο δυσκολότερα ανιχνεύεται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Έχει παρατηρηθεί πως τα μικρά σε μέγεθος NP και αυτά που έχουν χαμηλό επιφανειακό φορτίο σχηματίζουν τις πιο κατάλληλες PC, οι οποίες θα προστατέψουν τα NPs από την άμυνα του οργανισμού και θα τα βοηθήσουν να μεταφέρουν το φάρμακο στο στόχο τους (Gerardo González De La Cruz et al., 2017), (Li et al., 2021), (F. Guo et al., 2024). Η PC αποκρύπτει τις επιφανειακές ιδιότητες των NPs και αναστέλλει την τοξικότητα τους στα μακροφάγα, μειώνοντας την παραγωγή ROS και την έκκριση κυτοκινών. Η τροποποίηση της επιφάνειας των νανοϋλικών καθορίζει σε μέγιστο βαθμό τη φύση των πρωτεϊνών που θα προσκολληθούν σε αυτά και θα καθορίσουν τη μετέπειτα κατάληξη του (Li et al., 2021). (Εικόνες 10)



**Εικόνα 10:** Η επίδραση της προσρόφησης πρωτεϊνών στις λειτουργίες των NPs.

A. Με την προσρόφηση μη οψωνίνων πρωτεϊνών, τα NPs αποφεύγουν τη φαγοκυττάρωση παραμένοντας περισσότερο στην κυκλοφορία, με αποτέλεσμα να μπορούν να φτάσουν στους επιθυμητούς ιστούς με μειωμένη κυτταροτοξικότητα.

B. Η προσρόφηση οψωνίνων πρωτεϊνών προωθεί τη φαγοκυττάρωση, άρα τα NPs απομακρύνονται άμεσα από το αίμα χωρίς να φτάνουν στους συγκεκριμένους ιστούς, έχοντας παράλληλα υψηλή κυτταροτοξικότητα. (Ανατύπωση από Li et al., 2021).

## 4.2. Έμφυτη ανοσολογική απόκριση έναντι των NPs

### 4.2.1. Κυτταρική αναγνώριση

Τα θηλαστικά, μεταξύ των οποίων ο άνθρωπος, εκτίθενται περιβαλλοντικά συνεχώς σε μια σειρά νανοϋλικών ανά χιλιετίες χωρίς σημαντική εμφανή τοξικότητα, με τα ανοσολογικά συστήματα τους να έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αντοχής απέναντι στα καθημερινά σωματίδια. Πολλοί μηχανισμοί πρόσληψης NPs είναι ίδιοι με την έμφυτη ανοσολογική απόκριση σε παθογόνα. Μια ποικιλία εγγενών επιφανειακών υποδοχών, που ονομάζονται υποδοχείς αναγνώρισης και σχετίζονται με πρότυπα

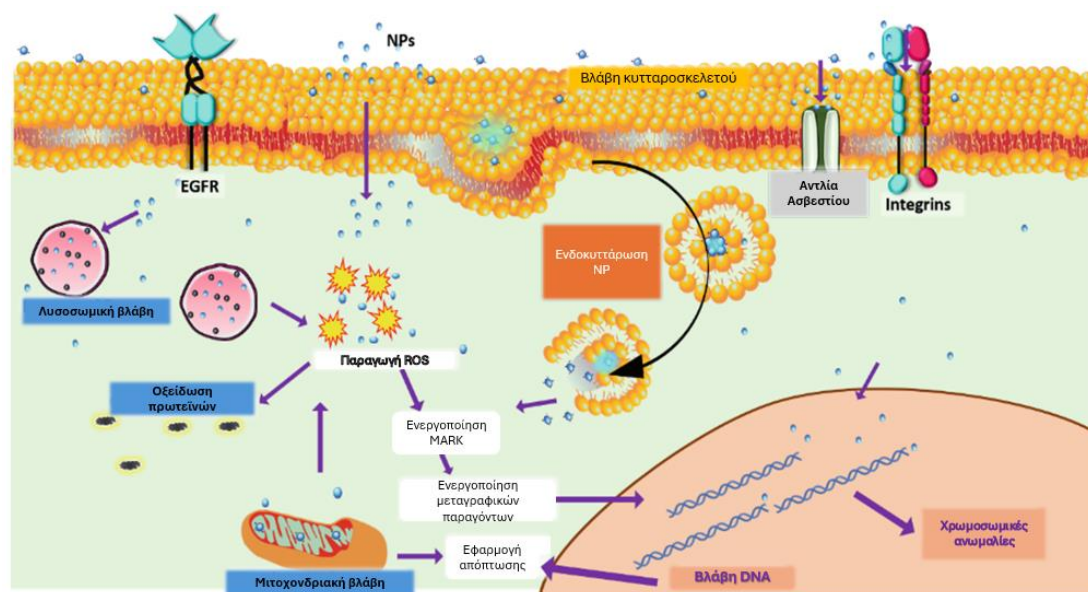
(PRRs), αναγνωρίζουν τα αντιγονικά πρότυπα από τις επιφάνειες παθογόνων ή κατεστραμμένων ιστών. Τα μοτίβα επιφάνειας παθογόνων εντοπίζονται σε πολλούς μικροοργανισμούς και ονομάζονται μοριακά πρότυπα PAMPs που σχετίζονται με παθογόνα, ενώ τα μοριακά μοτίβα DAMPs που σχετίζονται με βλάβες, αντιστοιχούν σε νεκρούς ιστούς ή σε μεταλλαγμένες μορφές και προκαλούν τοπική στρατολόγηση ανοσοκυττάρων. Τα νανοσωματίδια θα μπορούσαν να παρουσιάσουν ανάλογα μοριακά πρότυπα, λόγω της προσρόφησης πρωτεϊνών ή λόγω των δικών τους φυσικοχημικών ιδιοτήτων (Gustafson et al., 2015). Κοινοί στόχοι είναι μοριακά πρότυπα όπως το φορτίο, ουδέτερα σάκχαρα, ομάδες υδροξυλίου ή ακτελυμομάδες, οι οποίες υπάρχουν στα NPs, πριν και μετά την επικάλυψη τους από την PC (Pondman et al., 2023). Αυτά τα μοτίβα είναι ικανά να ενεργοποιήσουν την έμφυτη ανοσολογική απόκριση μέσω ευαισθητοποίησης των φαγοκυτταρικών κυττάρων. Η ενεργοποίηση τους οφείλεται στη δέσμευση των μοριακών προτύπων με τους φαγοκυτταρικούς υποδοχείς. Τέσσερις είναι οι βασικοί ειδικοί υποδοχείς επιφάνειας μακροφάγων: οι υποδοχείς τύπου toll (TLRs), οι υποδοχείς μαννόζης, οι υποδοχείς Fc και οι υποδοχείς τύπου σαρωτή (Gustafson et al., 2015).

#### **4.2.2. Κυτταρική πρόσληψη**

Η δραστηριότητα οποιουδήποτε μορίου εισέρχεται στα κύτταρα, καθορίζεται από την αλληλεπίδραση του με τη μεμβράνη. Η κυτταρική πρόσληψη ακολουθεί μια από τις δύο κύριες οδούς, τη διάχυση ή την ενδοκυττάρωση. Η διάχυση χαρακτηρίζεται ως μια ενεργειακά ανεξάρτητη διαδικασία που εξαρτάται από τη συγκέντρωση και τη διαλυτότητα. Μόρια όμως όπως τα NPs που δεν μπορούν να περάσουν την κυτταρική μεμβράνη με απλή διάχυση, απαιτούν ενέργεια για να επιτύχουν την είσοδο τους, οδός που ονομάζεται ενδοκυττάρωση και διαιρείται σε υποκατηγορίες, οι κυριότερες των οποίων αναφέρονται στη συνέχεια. Μετά την είσοδο τους στα κύτταρα, τα NPs ενεργοποιούν την οδό της ενεργοποιημένης με μιτογόνο δράση πρωτεϊνικής κινάσης (MARK), διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν την παραγωγή κυτοκινών και παρεμβαίνουν στην αντλία ασβεστίου μέσω της παραγωγής ROS. Τα υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες, προκαλούν τη δυσλειτουργία της ηλεκτρονιακής στιβάδας καταστρέφοντας τη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Τα ROS που παράγονται από την έκθεση σε NPs είναι ικανά να προκαλέσουν βλάβη στο DNA μέσω σπασίματος



κλώνων, ίνωση λόγω εναπόθεσης ασβεστίου, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και υπεροξείδωση λιπιδίων (Arathi et al., 2023). (Εικόνα 11)



**Εικόνα 11:** Σχηματική αναπαράσταση της τοξικότητας που προκαλείται από τα νανοσωματίδια στα κύτταρα. (Ανατύπωση από Arathi et al., 2023)

#### 4.2.2.1 Φαγοκυττάρωση

Η φαγοκυττάρωση είναι μια διαδικασία μέσω της οποίας τα κύτταρα, κυρίως τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, εγκλωβίζουν και αποδομούν ξένες ουσίες όπως βακτήρια, ιούς ή κυτταρικά υπολείμματα. Πρόκειται για έναν σημαντικό μηχανισμό της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού, καθώς εξυπηρετεί στην απομάκρυνση παθογόνων και κυτταρικών αποβλήτων. Η φαγοκυττάρωση είναι ένας μηχανισμός πρόσληψης NPs και χρησιμοποιείται ευρέως για την αναδιάρθρωση της ακτίνης και την περιτύλιξη μεγάλων σωμάτων με ψευδοπόδια. Κατά τη φαγοκυττάρωση, τα NPs περιτυλίγονται με κυτταρικά ψευδοπόδια που προέρχονται από την κυτταρική τους μεμβράνη σχηματίζοντας κυστίδια, τα οποία υφίστανται μειώσεις pH ικανές να τα καταστρέψουν. Ορισμένα κύτταρα έχουν αυτή την ικανότητα της κυτταροσκελετικής αναδιάρθρωσης, δηλαδή τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα (Gustafson et al., 2015). Η φαγοκυττάρωση των NPs μειώνεται όταν επικαλύπτονται με PEG, καθώς εμποδίζεται η οψωνοποίηση και όταν στην επιφάνεια τους φέρουν πρωτεΐνες που σηματοδοτούν τα NPs ως μόρια του οργανισμού, επιτρέποντας την αυξημένη κυτταρική τους πρόσληψη (Arathi et al., 2023).

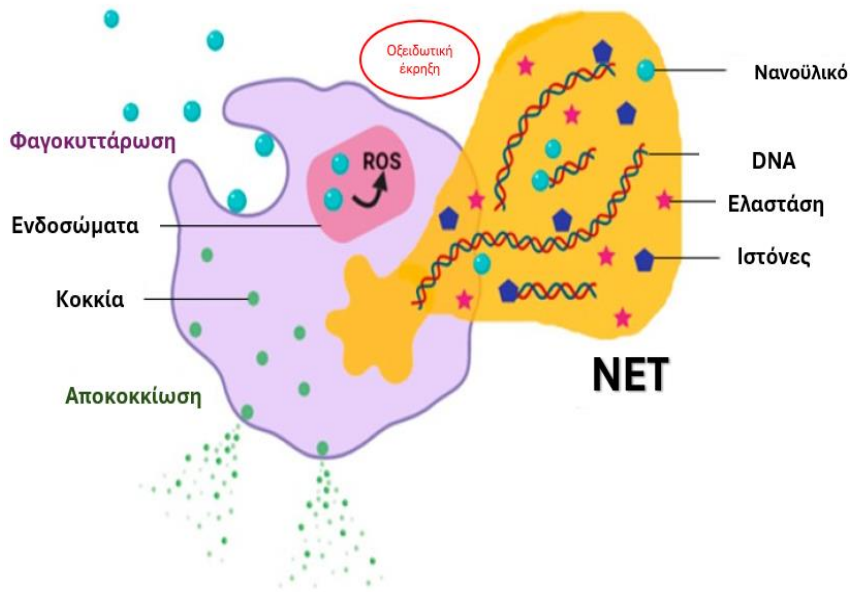
#### **4.2.2.2. Πινοκυττάρωση**

Από την άλλη η πινοκυττάρωση συμβαίνει από όλα τα κύτταρα των θηλαστικών. Τρείς είναι οι υποκατηγορίες πινοκυττάρωσης: Με μεσολάβηση κλαθρίνης, με μεσολάβηση σπηλαλίνης και η μακροπινοκυττάρωση. Κατά τη διαδικασία πινοκυττάρωσης μέσω κλαθρίνης, σχηματίζονται κοιλότητες μέσω της πρωτεΐνης κλαθρίνης στην κυτταρική μεμβράνη και τυλίγουν το σωματίδιο δημιουργώντας εσωτερικευμένα κυστίδια, τα οποία διακινούνται σε άλλα κυτταρικά μέρη, όπως τα λυσοσώματα. Η εσωτερίκευση από κλαθρίνη είναι υπεύθυνη για μεγέθη 100-350nm (Gustafson et al., 2015). Στην ενδοκυττάρωση μέσω σπηλαλίνης, όταν τα νανοσωματίδια φτάσουν στην κυτταρική επιφάνεια, η μεμβράνη δημιουργεί εγκολπώσεις 70nm και απορροφά τα σωματίδια χωρίς το σχηματισμό κυστιδίων. Κατά τη μακροπινοκυττάρωση, οι επεκτάσεις των νηματίων της ακτίνης τυλίγουν τα NPs, δημιουργώντας μακροπινοσώματα, τα οποία συντήκονται με λυσοσώματα σε μειωμένο PH (Arathi et al., 2023).

#### **4.2.3. Επίδραση NPs στα λευκοκύτταρα**

Μια μέθοδος με την οποία τα WBCs αντιδρούν με ξένα σώματα είναι η αποκοκκίωση και η απελευθέρωση των ενζύμων πέψης, όπως η ελαστάση και παραγόντων όπως κυτοκίνες και χημειοτακτικές πρωτεΐνες. Υποστηρίζεται, ότι οι ιδιότητες των NPs είναι αυτές που επηρεάζουν την αλληλεπίδραση τους με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος για να προκαλέσουν είτε επιθυμητές αντιδράσεις, είτε αναπόφευκτες τοξικές. Η παραγόμενη ελαστάση φανερώνει το βαθμό ενεργοποίησης των WBCs από την επαφή με τα NPs. Η ελαστάση έχει την ικανότητα να καταστρέφει τα κύτταρα προκαλώντας τραυματισμό ιστών και οργάνων. Σε συνδυασμό με την απελευθέρωση κυτοκινών, τα WBCs εξαλείφουν τα NPs με παραγωγή ROS, τα οποία είναι φυσικά υποπροϊόντα μεταβολισμού του οξυγόνου. Περιλαμβάνουν τα ανιόντα υπεροξειδίου και το υπεροξείδιο του υδρογόνου τα οποία αντιδρούν με το υποχλωριώδες οξύ προς σχηματισμό των ελεύθερων ριζών, που αποσκοπούν στην αποικοδόμηση των NPs. Η σημαντική αύξηση των επιπέδων ROS μπορεί να διαταράξει την ομοιόσταση και να προκληθεί κυτταρική βλάβη και τραυματισμός ιστών (de la Harpe et al., 2019). Η έκθεση ενός κυττάρου σε NPs μπορεί να προωθήσει παραγωγή ROS, να προκαλέσει βλάβη DNA, φλεγμονή, λυσοσωμική και μιτοχονδριακή βλάβη, αναστολή κυτταρικής

διαίρεσης και τον κυτταρικό θάνατο (Arathi et al., 2023). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ουδετερόφιλα μπορούν να συλλάβουν NPs απελευθερώνοντας NETs, ένα δίκτυο ινών χρωματίνης με αντιμικροβιακές πρωτεΐνες (Εικόνα 12). Για την απελευθέρωση των NETs απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις NPs (Pondman et al., 2023). Επίσης ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων φαίνεται να εξαρτάται από τη συγκέντρωση, ενώ το μέγεθος σχετίζεται με τις κυτταροτοξικές, γονιδοτοξικές και μεταλλαξιογόνες επιδράσεις. Έρευνα με βάση το πολυμερές PLGA, έδειξε ότι καταστάθηκε η πολλαπλασιαστική λειτουργία των λεμφοκυττάρων και η δραστηριότητα των κυττάρων NK, αλλά διεγέρθηκε η φαγοκυττάρωση από τα κοκκιοκύτταρα και τα μονοκύτταρα, καθώς και η αυξημένη παραγωγή ROS (Gerardo González De La Cruz et al., 2017).

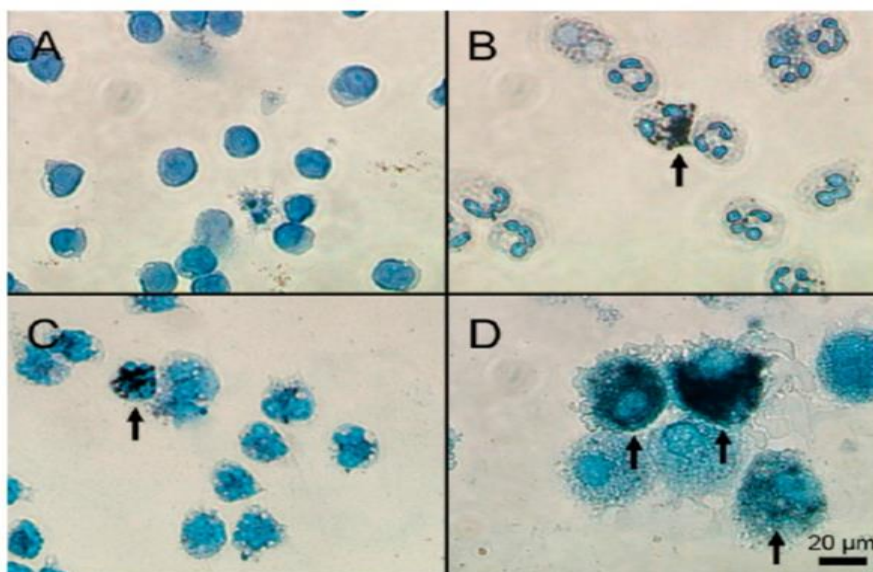


**Εικόνα 12:** Πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ ουδετερόφιλων και νανοϋλικών.

*A: Τα NPs μπορεί να φαγοκυτταρωθούν και να προκληθεί παραγωγή ROS με σκοπό την αποδόμηση τους.*

*B: Σε μεγάλες συγκεντρώσεις NPs, μπορεί να ενεργοποιηθεί η οδός παραγωγής NETs, παγίδες οι οποίες είναι ικανές να τα συλλάβουν. (Ανατύπωση από de la Harpe et al., 2019)*

Επίσης, εξαιτίας των μη οψωνίων πρωτεϊνών του πλάσματος που συσσωρεύονται στην επιφάνεια των NPs, υπάρχει υψηλή συγκέντρωσή τους μέσα στα λευκοκύτταρα (Εικόνα 13). Επομένως οι μη οψωνίνες χαρακτηρίζουν την αιμοσυμβατότητα, καθώς καλύπτουν αποτελεσματικά τα NPs και εμποδίζουν την αναγνώρισή τους ως ξένα και τους επιτρέπουν το διαμοιρασμό τους στους στόχους τους (de la Harpe et al., 2019). Τα NPs μπορούν να εξουδετερωθούν και με αυτοφαγία του λευκοκυττάρου. Αυτό μπορεί να αποδειχθεί επιζήμιο στην περίπτωση βιοανθεκτικών NPs καθώς μπορεί να προκληθεί συσσώρευση πολλών κυστιδίων, αυξάνοντας τον κυτταρικό θάνατο μέσω μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. Αν το κύτταρο είναι ικανό να μεταφέρει τα NPs σε αυτοφαγώματα, απομονωμένα από αλληλεπιδράσεις, τα τοξικά αποτελέσματα θα μειωθούν και το κύτταρο θα αποφύγει το θάνατο (Pondman et al., 2023).



**Εικόνα 13:** Συσώρευση NPs χρυσού σε λεμφοκύτταρα (A), ουδετερόφιλα (B), μονοκύτταρα (C), μακροφάγα (D). (de la Harpe et al., 2019)

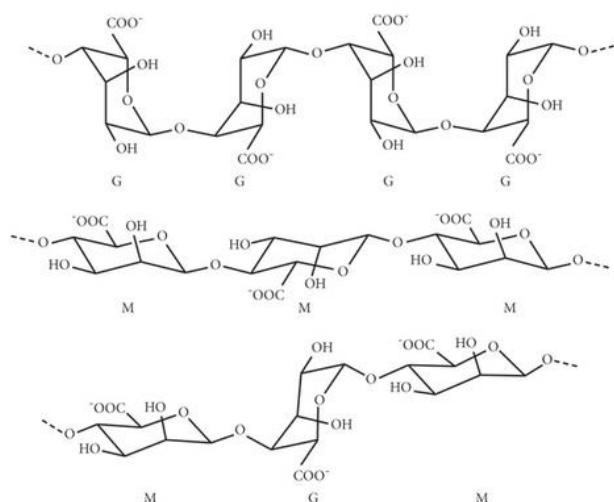
## 5. ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

### 5.2. Χαρακτηριστικά ALGNPs

Το αλγινικό (ALG) είναι ένας φυσικός πολυσακχαρίτης που παράγεται από τα καφέ φύκια, συμπεριλαμβανομένων των *Laminaria Hyperborea* και *Macrocystis pyrifera*. Αποτελείται από μια αλληλουχία δύο συνδεδεμένων μονομερών  $\alpha(1-4)$ -L-guluronate (G) και  $\beta(1-4)$ -D-μανουρονικού (M) (Εικόνα 14). Είναι ένα βιοσυμβατό πολυμερές με χαμηλή τοξικότητα και υψηλή διαλυτότητα και για αυτό καθίσταται ως ένα από τα βιοπολυμερή με την ευρύτερη βιοϊατρική εφαρμογή, όπως σε συστήματα χορήγησης φαρμάκων (Harijadi & Islam, 2020). Οι  $\alpha(1-4)$  δεσμών G και το μοριακό του βάρος καθορίζουν το ιώδες, το πορώδες και την ακαμψία των νανοσωματιδίων αλγινικού οξέος (ALG-NPs). Υψηλή περιεκτικότητα σε  $\beta(1-4)$  δεσμών M οδηγεί σε πιο σταθερά και ελαστικά ALG-NPs. Τα μικροδομικά βιοσυμβατά συμπολυμερή του ALG έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην ακινητοποίηση κυττάρων και μικροοργανισμών, σε

επιδέσμους τραυμάτων, στην αναγέννηση ιστών, στη χορήγηση φαρμάκων και στην κυτταροκαλλιέργεια. Επίσης χαρακτηρίζεται ως ανιονικό βιοπολυμερές, με ικανότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου παρουσία δισθενών κατιόντων (ως  $Ca^{+2}$ ) (Rostami, 2022). Η πηκτοματοποίηση είναι ικανότητα του ALG που αξιοποιείται στο σχηματισμό ιοντικής γέλης παρουσία πολυσθενών κατιόντων, με το ασβέστιο να είναι το πιο κοινό κατιόν που εφαρμόζεται για να σχηματίσει ιοντικά αλγινικά πηκτώματα (Zhang et al., 2021). Εξαιρετικά είναι τα ευρήματα της βιβλιογραφίας για τη χρήση του ALG στην θεραπεία τραυμάτων, λόγω των αιμοστατικών και αντιβακτηριακών ιδιοτήτων του και την ευρεία αξιοποίηση του σε επιδέσμους τραυμάτων, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από βιοσυμβατότητα, επουλωτικές ιδιότητες και μη τοξικότητα (Gheorghita Puscaselu et al., 2020). Γενικότερα το ALG παρουσιάζει χαμηλή ανοσογονικότητα και τοξικότητα και εξαιρετική βιοδιασπορά (Rostami, 2022). Ωστόσο, λόγω των χαρακτηριστικών του, το ALG έχει ορισμένους περιορισμούς, όπως μικρή σταθερότητα, χαμηλές μηχανικές ιδιότητες, ασυμβατότητα με βαρέα μέταλλα και αστάθεια θερμικής επεξεργασίας (Gheorghita Puscaselu et al., 2020). Επιπλέον οι λειτουργικές ομάδες υδροξυλομάδες και καρβοξυλομάδες του ALG είναι υπεύθυνες για την προσκόλληση των βλεννογόνων στην ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκων. Τα ALG-NPs έχουν μέσο μέγεθος 100-1000nm, είναι ευαίσθητα στο PH, οικονομικά αποδοτικά και φιλικά προς το περιβάλλον και μπορούν να χορηγούνται μέσω του στόματος, ενδοφλέβια, της μύτης, των οφθαλμών και του εντέρου (Rostami, 2022). Το ALG διακρίνεται ακόμα για την αντιοξειδωτική, την αντι-αναφυλακτική και την αντιφλεγμονώδη δράση του. Έχει παρατηρηθεί ότι αναστέλλει την παραγωγή ισταμίνης και ότι προστατεύει τα κύτταρα από οξειδωτική βλάβη, λόγω ικανότητας του να καταστρέφει τις ελεύθερες οξειδωτικές ρίζες. Βασικός μηχανισμός πίσω από την αντιφλεγμονώδη δράση των ALG-NPs, είναι η ικανότητα τους να ενθυλακώνουν και να μεταφέρουν αντιφλεγμονώδεις παράγοντες στο σημείο της φλεγμονής. Αυτή η στοχευμένη χορήγηση βοηθά στη μείωση της απαιτούμενης δοσολογίας και στην ελαχιστοποίηση των παρενεργειών (Rostami, 2022). Αναφορές υπάρχουν ακόμα για την αντιφλεγμονώδη δράση του, καθώς φαίνεται να μειώνει της δραστηριότητα της μυελοϋπεροξειδάσης (MPO) με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης των ουδετερόφιλων (X. Guo et al., 2020). Τέλος, έρευνα έδειξε ότι παρουσία συμπλόκου ALG-NPs-χιτοζάνης αναστέλλεται η παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών

IL-6 και IL-12 και ενισχύεται η αντιμικροβιακή δράση των ενθυλακωμένων φαρμάκων (Friedman et al., 2013).



**Εικόνα 14:** Χημικές δομές G-block, M-block και εναλλασσόμενου μπλοκ. (Hariyadi & Islam, 2020)

### 5.3. ALG-NPs στη χορήγηση φαρμάκων

Το ALG έχει σημαντικό ρόλο στη χορήγηση φαρμάκων, με την από του στόματος χορήγηση να είναι η πιο συχνή. Η ενθυλάκωση ορισμένων δραστικών ουσιών, μεταξύ των οποίων και τα φάρμακα, αποτρέπει την πρόωρη αδρανοποίηση του φαρμάκου και επιτρέπει την επιτυχημένη και ελεγχόμενη στόχευση του (Zhang et al., 2021). Τα χορηγούμενα από το στόμα φάρμακα, αντιμετωπίζουν την πρόκληση του χαμηλού χρόνου παραμονής τους στο στομάχι, με το μέγεθος τους να πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 1-2mm ώστε να διαπεράσουν όσο το δυνατό ταχύτερα από τον πυλωρικό σωλήνα του στομάχου στο λεπτό έντερο (Gheorghita Puscaselu et al., 2020). Για ορισμένα φάρμακα στα οποία απαιτείται μεγαλύτερη προστασία με προτιμώμενη απορρόφηση στον εντερικό σωλήνα, το αλγινικό πολυμερές λόγω των φορτισμένων με υψηλότερο από PH 3-4 καρβοξυλομάδων του αποτελεί την κατάλληλη λύση. Σε

όξινά περιβάλλοντα οι καρβοξυλομάδες του ALG πρωτονιώνονται περιορίζοντας την απελευθέρωση φαρμάκων (Hariyadi & Islam, 2020). Ορισμένα συστήματα χορήγησης φαρμάκων με βάση τα ALG-NPs, φαίνεται να μειώνουν τις κυτταροτοξικές επιδράσεις των καρκινικών κυττάρων στα φυσιολογικά. Τα συστήματα μπορούν να συνδεθούν με ορισμένους τύπους υποδοχέων στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων και να παραδώσουν το κυτταροτοξικό φάρμακο ειδικά σε αυτά. Οι παράγοντες στόχευσης που έχουν χρησιμοποιηθεί, είναι μεταξύ άλλων αντισώματα, βιταμίνες και πεπτίδια (Rostami, 2022). Τα ALG-NPs προκαλούν ελεγχόμενη αποδέσμευση σε φαρμακευτικές ουσίες όπως κουερσετίνη, ριφαμπικίνη, ινσουλίνη βοοειδών, ενώ μελέτες υπάρχουν και για πνευμονική, οφθαλμική και διαδερμική χορήγηση φαρμάκων (Hariyadi & Islam, 2020). Μελέτες μοντέλων *in vivo* έχουν αποδείξει πως τα σύμπλοκα ALG-NPs-χιτοζάνης βελτιώνουν τα επίπεδα γλυκόζης σε διαβητικούς, όταν χορηγήθηκαν από το στόμα ως φορείς ινσουλίνης, βελτιώνοντας τη διαπερατότητα και την απορρόφηση της στα κύτταρα (Gheorghita Puscaselu et al., 2020). Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την απελευθέρωση φαρμάκων από τα ALG-NPs, όπως η σύνθεση τους, το πορώδες των κυττάρων, τα χαρακτηριστικά του φαρμάκου, το μέγεθος τους, οι συνθήκες pH, η τροποποίηση των λειτουργικών ομάδων τους και η αναλογία μεταξύ φαρμάκου και πολυμερούς (Rostami, 2022). Άλλες πηγές αναφέρουν πως τα υβριδικά ALG-NPs-διδαιθυλαμινομεθακρυλικού αιθυλεστέρα με ενσωματωμένα NPs χρυσού (ALG-PDEA-Au) μπορούν να χρησιμεύσουν ως φορείς για τη χορήγηση του αντικαρκινικού φαρμάκου doxorubicin, το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Επίσης, έχει εξαιρετικές οπτικές ιδιότητες όταν εσωτερικεύεται σε καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου και λειτουργεί ως οπτικός παράγοντας αντίθεσης, με αποτέλεσμα την απεικόνιση των καρκινικών κυττάρων με οπτική μικροσκόπηση (R. Guo et al., 2009). Επιτυχημένα αποτελέσματα υπήρξαν και σε εφαρμογή αλγινικών νανοκαψουλών ως μέσο απελευθέρωσης φαρμάκων σε γαστρικές παθήσεις (X. Guo et al., 2020).



#### 5.4. Τοξικότητα των ALG-NPs

Η ανοσολογική απόκριση που προκαλείται από τα ALG-NPs ήταν ανέκαθεν τεράστιας σημασίας, με συνεχή συζήτηση σχετικά με τις βιολογικές αντιδράσεις τους *in vivo*. Έχει αναφερθεί ότι τα επίπεδα ανοσολογικής απόκρισης είναι χαμηλά ή και καθόλου και δεν προκύπτει εμφανής αντίδραση ξένου σώματος σε συνθήκες *in vivo*. Η ανοσολογική απόκριση μπορεί να αποδοθεί σε ακαθαρσίες που παραμένουν κατά τη σύνθεση, όπως πρωτεΐνες, βαρέα μέταλλα, ενδοτοξίνες και πολυφαινολικές ενώσεις (Zhang et al., 2021), (Lee & Mooney, 2012). Αξίζει να αναφερθεί πως το σύστημα χορήγησης μιλτεφοσίνης (MFS), ενθυλακωμένο σε ALG-NPs δεν παρουσίασε αιμολυτική δράση και τοξικότητα στις προνύμφες του *Galleria mellonella*. Επίσης η ενθυλάκωση της μεσαλαμίνης σε ALG-NPs, δεν απέδωσε ιστοπαθολογικά σημάδια εξέλκωσης και αιμορραγίας στο παχύ έντερο σε *in vivo* μελέτη (Gheorghita Puscaselu et al., 2020). Συγκριτικά με άλλα συστήματα νανοφορέων, όπως τα λιποσώματα, τα οποία αποικοδομούνται ταχέως από μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα, τα ALG-NPs έχουν δείξει καλύτερη ικανότητα αντοχής και προτιμώνται για την ενθυλάκωση πρωτεϊνών, ενζύμων και φαρμάκων, αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα τους (Fernando et al., 2020). Έχει παρατηρηθεί ότι τα αλγινικά υψηλής περιεκτικότητας χημικών δομών M-block είναι περίπου 10 φορές πιο ισχυρά στην πρόκληση παραγωγής κυτοκινών σε σύγκριση με αυτά υψηλής περιεκτικότητας σε χημικές δομές G-block. Γενικότερα το αλγινικό χαρακτηρίζεται για την ασφάλεια, τη βιοσυμβατότητα, τις απλές μεθόδους παρασκευής, την ικανότητα διάσπασης του εντός του οργανισμού και τη μη τοξικότητα του (Lee & Mooney, 2012). (Εικόνα 15)



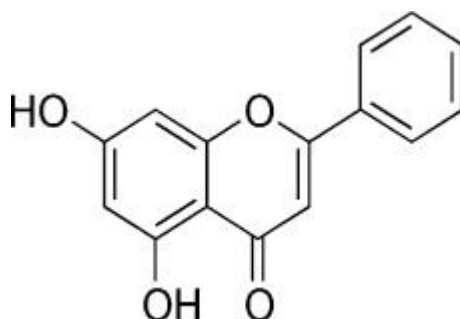
**Εικόνα 15:** Πλεονεκτήματα αλγινικού οξέος. (Ανατύπωση από Gheorghita Puscaselu et al., 2020)

## 6. ΧΡΥΣΙΝΗ ΚΑΙ NPs

### 6.1. Χαρακτηριστικά χρυσίνης

Η χρυσίνη (chr) ανήκει στην ομάδα των φυσικών πολυφαινολών. Εντοπίζεται μεταξύ άλλων στο μέλι, την πρόπολη και τους καρπούς. Χαρακτηρίζεται από ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων, συμπεριλαμβανομένης της πρόληψης του οξειδωτικού στρες, της φλεγμονής, του νευροεκφυλισμού και της καρκινογένεσης. Ακόμα έχει αντιαλλεργικές, ηπατοπροστατευτικές, αντιδιαβητικές, αντιμικροβιακές και αντιϊκές δράσεις (Stompor-Gorący et al., 2021). Πιο συγκεκριμένα ανήκει στην υποομάδα των πολυφαινολών, τα флаβονοειδή, τα οποία είναι ενώσεις με χαμηλό μοριακό βάρος που υπάρχουν ως δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών και βρίσκονται ευρέως σε πολλά φρούτα και λαχανικά. Με βάση τη χημική δομή, τα флаβονοειδή ταξινομούνται σε έξι τύπους, ένας εκ των οποίων είναι και ο τύπος της флаβόνης στον οποίο ανήκει. Η chr έχει δομή 15 ατόμων άνθρακα που σχηματίζουν δύο δακτυλίους βενζολίου και έναν ετεροκυκλικό δακτύλιο που περιέχει οξυγόνο (Adangale & Wairkar, 2022). Οι

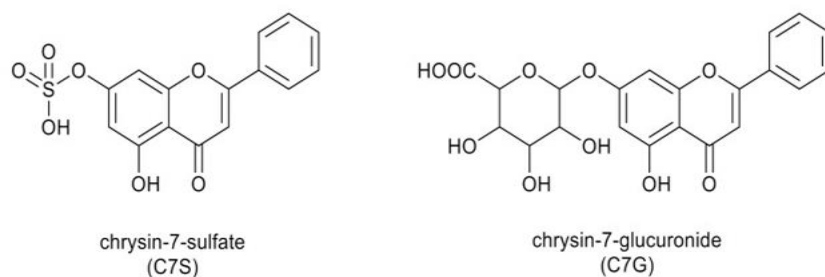
υδροξυλομάδες συνδέονται με τον αρωματικό δακτύλιο A στις θέσεις 5-OH και 7-OH (5,7-διυδροξυφλαβόνη) (Εικόνα 16). Οι υδροξυλομάδες αποτελούν τα αντιδραστικά κέντρα που χρησιμοποιούνται για τη λειτουργικότητα της ένωσης, προκαλώντας την αύξηση της υδατοδιαλυτότητας της, της βιοδιαθεσιμότητας και της βιολογικής της δραστηριότητας. Ο χημικός τύπος είναι C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> και η μοριακή μάζα 254,241 g/mol (Stompor-Gorący et al., 2021). Οι πιθανοί μηχανισμοί δράσης της στην καρκινογένεση, περιλαμβάνουν την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών και την τροποποίηση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στις οδούς κυτταρικής σηματοδότησης, ιδίως εκείνων που ρυθμίζουν την απόπτωση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων. Έντονο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι αναφορές στο ότι ασκεί επιλεκτική κυτταροτοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα έναντι των φυσιολογικών κυττάρων (Kasala et al., 2015). Τα φλαβονοειδή, όπως η chr, έχουν αποδειχτεί ότι αναστέλλουν την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, τα οποία είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση των T κυττάρων. Αρκετές μελέτες έχουν διαπιστώσει ότι τα φλαβονοειδή μειώνουν την απελευθέρωση ισταμίνης και προσταγλανδίνης από τα μαστοκύτταρα και αναστέλλουν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Μειώνεται επομένως η κυτταρική σηματοδότηση (Maleki et al., 2019). Ακόμα σύμφωνα με έρευνα, η chr έχει σημαντικό ρόλο στην φλεγμονή του ανοσοποιητικού συστήματος, μειώνοντας τις βλάβες που προκαλούνται από τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και άλλες ανοσοφλεγμονώδεις αποκρίσεις (Naz et al., 2019).



**Εικόνα 16:** Χημική δομή της χρυσίνης (5,7-διυδροξυφλαβόνη), Μοριακός τύπος: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>, Μοριακό βάρος: 254,24g/mol (Kasala et al., 2015)

### 6.1.1. Μεταβολισμός χρυσίνης

*In vivo* μελέτες σε ανθρώπους για την chr, έδειξαν ότι πρόκειται για μια ένωση που χαρακτηρίζεται από το γρήγορο μεταβολισμό της από το γαστρεντερικό σύστημα. Τα δύο κυρίαρχα προϊόντα του μεταβολισμού της είναι η 7-θειική χρυσίνη (C7S) και το χρυσιν-7-γλυκουρονίδιο (C7G) (Stompou-Goracy et al., 2021). (Εικόνα 17)



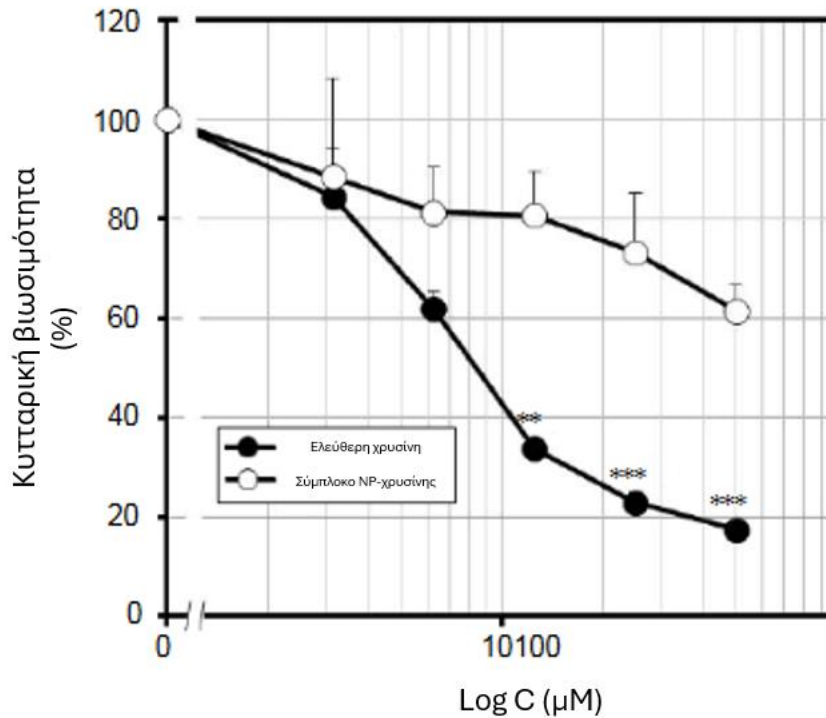
**Εικόνα 17:** Τα δύο κύρια προϊόντα του μεταβολισμού της χρυσίνης στον άνθρωπο. (Stompou-Goracy et al., 2021)

Η chr έχει προτιμώμενη ημερήσια δοσολογία 0.5-3g. Παρουσιάζει όμως χαμηλή υδατοδιαλυτότητα (0.1g/L), μικρή απορρόφηση και βιοδιαθεσιμότητα, λόγω του εκτεταμένου μεταβολισμού της στο ήπαρ και το έντερο (Adangale & Wairkar, 2022). Οι μεταβολίτες που σχηματίζονται στο ήπαρ μπορούν να μεταφερθούν στα κύτταρα στόχους, μπορούν να εισέλθουν εκ νέου στην εντεροηπατική κυκλοφορία ή μπορούν να απεκκριθούν μέσω ούρων ή κοπράνων (Maleki et al., 2019). Ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι μόνο 13 λεπτά στα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα (Kim et al., 2017). Έχει μελετηθεί ότι σε υγιείς εθελοντές, από τα 400 mg χορηγούμενης από του στόματος χρυσίνης, η συγκέντρωση της στο πλάσμα κυμαίνεται μεταξύ 3 και 16 ng/ml, με τη βιοδιαθεσιμότητα να εκτιμάται μεταξύ μόνο 0.003 και 0.02%. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της στο αίμα ήταν 4.6 ώρες και εντοπίστηκε ως συζευγμένο γλυκουρονίδιο και θειικά άλατα στο πλάσμα, στα ούρα και στα κόπρανα. Οι δύο αυτοί μεταβολίτες της chr μπορούν υποστούν υδρόλυση στο έντερο από σουλφατάσες και γλυκουρονιδάσες, σχηματίζοντας πάλι την αρχική ένωση, δικαιολογώντας την παρουσία αμετάβλητης chr στα κόπρανα (Adangale & Wairkar, 2022).

## 6.2. Σύμπλοκα Chr-NPs και τοξικότητα

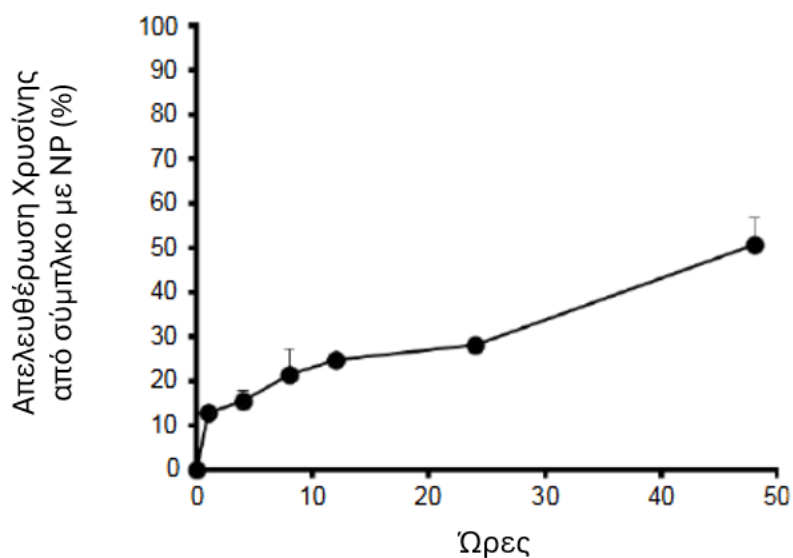
Όπως προαναφέρθηκε, η μικρή απορρόφηση της chr την εμποδίζει να εκτελέσει τις λειτουργίες της. Ως μέθοδος βελτίωσης της απορρόφησης της, έχει προταθεί η σύνθεση αποτελεσματικών σκευασμάτων τα οποία περιλαμβάνουν διαφορετικούς τύπους NPs που προορίζονται να μεταφέρουν τη chr στο σημείο στόχου (Stompor-Gorący et al., 2021). Το σύμπλοκο chr με το γνωστό πολυμερές PLGA εφαρμόζεται για αντιγλυκαιμική και αντι-υπερλιπιδική δράση, μειώνοντας στο πρώτο 24ωρο τα επίπεδα γλυκόζης έως και 46% (Adangale & Wairkar, 2022). Επιπλέον σε συνδυασμό με αντικαρκινικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου πρώτης γραμμής, όταν ενσωματώνονται στο συμπολυμερές PLGA-PEG-PLGA μπορεί να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα της θεραπείας, όπως στην περίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Το PLGA φορτωμένο με chr, φάνηκε ότι καταστείλει πνευμονικές και ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις καθώς και τις φλεγμονώδεις κυτοκίνες τόσο στον ορό όσο και στον πνευμονικό ιστό, πιο ισχυρά από την ελεύθερη chr (Stompor-Gorący et al., 2021). Αναφορές υπάρχουν επίσης στα ALG-NPs μετά από εγκλωβισμό φαινολικών ενώσεων, όπως η chr, με αποτέλεσμα να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα της αστάθειας και να βελτιωθεί η βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών ενώσεων (Doderio et al., 2021). Για την πρόκληση θανάτου καρκινικών κυττάρων, έχει μελετηθεί ο εγκλωβισμός chr σε πολυμερικά μικκυλιακά NPs. Έχει παρατηρηθεί ότι τα μικκύλια ενισχύουν τη βιοδιαθεσιμότητα και τη διαλυτότητα της επειδή την παγιδεύουν στο υδρόφοβο εσωτερικό τους, προστατεύοντας την από την απέκκριση και επιτρέποντας της την αποτελεσματική πρόσληψη από τα καρκινικά κύτταρα. Αποτελέσματα ερευνών έδειξαν το αυξημένο ποσοστό των αποπτωτικών καρκινικών κυττάρων μετά την επώαση τους με σύμπλοκα μικκυλιακών NPs–chr, συγκριτικά με την ελεύθερη chr (Oliyarour et al., 2023). Όσον αφορά στον εγκλεισμό της σε NPs με βάση τα λιπίδια, έχουν δοκιμαστεί σε ποντικούς και φαίνεται να επιδρούν στην τοξικότητα που προκαλείται από κάδμιο, βελτιώνοντας την ηπατική τοξικότητα λόγω βελτιωμένης διαλυτότητας και βιοδιαθεσιμότητας. Φόρτωση chr σε NPs, αξιοποιείται και στην επούλωση πληγών. Συγκεκριμένα οι επικαλυμμένες με PEG νανοϊνες, όταν φορτώθηκαν με chr, έδειξαν θετικές επιδράσεις σε κρίσιμα γονίδια που σχετίζονται με την επούλωση πληγών (Adangale & Wairkar, 2022). Σε έρευνα που εξέτασε την

επίδραση της εγκλωβισμένης chr σε πολυμερικά NPs στη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα A549, έδειξε ότι τα NPs με εγκλωβισμένη την chr δεν είχαν τόσο κυτταροτοξική δράση σε αυτά τα κύτταρα όσο η ελεύθερη chr, γεγονός που υποδηλώνει ότι η εγκλωβισμένη απορροφήθηκε πιο αργά συγκριτικά με την ελεύθερη. Επιπλέον η τοξικότητα των NPs-chr οφειλόταν στην chr και όχι στα NPs, καθώς τα μη φορτωμένα NPs βρέθηκαν να μην έχουν κυτταροτοξική επίδραση. Η έρευνα αυτή απέδειξε ακόμα τη μεγαλύτερη μείωση του μεγέθους και του βάρους του όγκου, αλλά και της μείωσης της καρκινικής εξάπλωσης που επέφερε η θεραπεία με ελεύθερη chr, συγκριτικά με την θεραπεία NPs-chr (Kim et al., 2017) (Εικόνα 18). Ίδιο αποτέλεσμα υπήρξε και σε άλλη έρευνα, όπου αποδείχθηκε ότι η ενθυλακωμένη chr σε πολυμερή NPs PLGA/PVA δεν εμφάνισε τόσο ισχυρή κυτταροτοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα MDA-MB-231 στον καρκίνο του μαστού, ενώ η θεραπεία με ίδια ποσότητα ελεύθερης chr έδειξε μεγαλύτερη και πιο άμεση επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Απαιτήθηκε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα εγκλωβισμένης chr για να επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα συγκριτικά με την ελεύθερη στον ίδιο χρόνο. Σε αυτό οφείλεται η καθυστερημένη απελευθέρωση της chr από τα σύμπλοκα NPs (Halevas et al., 2021). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε για να δείξει τις επιδράσεις της στα λευκά αιμοσφαίρια, διαπιστώθηκε ότι μπορεί να επηρεάσει τις ανοσολογικές αποκρίσεις ενισχύοντας τους πληθυσμούς των T και B κυττάρων, προωθώντας τη φαγοκυττάρωση και αυξάνοντας την κυτταροτοξικότητα των NK κυττάρων. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι έχει πιθανά οφέλη στη ρύθμιση των ανοσολογικών λειτουργιών και θα μπορούσε να είναι χρήσιμη σε θεραπείες ασθενειών των WBCs, όπως η λευχαιμία (Lin et al., 2012). Σημαντικό είναι, ότι το επιφανειακό φορτίο των NPs μπορεί να μεταβληθεί από την παρουσία της, το οποίο με τη σειρά του επηρεάζει την αντιδραστικότητα και την αλληλεπίδραση των NPs με τα βιολογικά συστήματα (Karimova et al., 2024).



**Εικόνα 18:** Η κυτταρική βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα A549, μετά από τη θεραπεία μόνο με χρυσίνη και τη θεραπεία μετά από τη χορήγηση ενθυλακωμένης χρυσίνης σε NP. Παρατηρείται πως η ελεύθερη chr επηρεάζει θετικά την εξέλιξη του όγκου καθώς αυξάνει τον κυτταρικό θάνατο και την εξάπλωση του, συγκριτικά με την εγκλωβισμένη chr. (Ανατύπωση από Kim et al., 2017)

Και σε *in vitro* συνθήκες προσομοίωσης των ανθρώπινων συνθηκών παρατηρήθηκε πως η εγκλωβισμένη πολυμερικά NPs chr απελευθερώθηκε στο 50% από το σύμπλοκο μετά από 48 ώρες επώασης στους 37°C. Αυτό εξηγεί και την καθυστερημένη δράση της εγκλωβισμένης chr στα καρκινικά κύτταρα (Kim et al., 2017). (Εικόνα 19)



**Εικόνα 19:** Επώαση συμπλόκου χρυσίνης-NP σε PBS PH=7,4 και θερμοκρασία 37°C. Παρατηρήθηκε την πρώτη ώρα γρήγορη απελευθέρωση, με το ρυθμό να επιβραδύνεται με το πέρας των ωρών. Μετά από 48 ώρες διαλυτοποιήθηκε το 50%. (Ανατύπωση από Kim et al., 2017)



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**

### **1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης σχεδιασμένων για φορείς φαρμάκων νανοσωματιδίων, στη βιωσιμότητα λευκοκυτταρικών υποπληθυσμών περιφερικού αίματος. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν νανοσωματίδια αλγινικού οξέος με εγκλωβισμένη χρυσίνη (ALG-NPs-Chr), ένα σύμπλοκο μεγέθους  $122,77 \pm 7,3 \text{ nm}$ , νανοσωματίδια αλγινικού οξέος μόνα τους (ALG-NPs) και ελεύθερη χρυσίνη διαλυμένη σε ισότονο διάλυμα PBS, ύστερα από επώαση στους  $37^\circ \text{C}$  για 4 ώρες. Για την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας πραγματοποιήθηκε αιμοληψία από 10 υγιείς δότες. Για την αναλυτική διαδικασία πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής και στη συνέχεια μικροσκοπική παρατήρηση.

Στόχο της παρούσας ερευνητικής εργασίας αποτελεί η ανάλυση των νεκρών και αποπτωτικών λευκών αιμοσφαιρίων με κυτταρομετρία ροής και ο προσδιορισμός πιθανών μορφολογικών αλλοιώσεων των κυτταρικών δομών, παρουσία των συμπλόκων ALG-NPs-Chr.

### **2. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Ο αριθμός των υγιών αιμοδοτών που συμμετείχαν στην εκπόνηση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, ανέρχεται στους 10. Οι αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν στο «Ερευνητικό Εργαστήριο Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία» του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, μετά από τη συγκατάθεση των συμμετεχόντων και την ενημέρωσή τους για το σκοπό της εργασίας. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε σωληνάρια γενικής αίματος EDTA και για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ένα σωληνάριο από τον κάθε δότη.

Μετά την αιμοληψία πραγματοποιήθηκε η γενική εξέταση αίματος. Στη συνέχεια ακολούθησε η εκτέλεση των πειραματικών διαδικασιών που αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω.

**Προετοιμασία των νανοσυστημάτων** τα οποία βρίσκονται σε διαλύματα φύλαξης στο ψυγείο στους 4 °C. Πριν χρησιμοποιηθούν επωάστηκαν σε κλίβανο στους 37 °C. Η κωδικοποίηση ήταν η ακόλουθη: NP1 για τα νανοσωματίδια αλγινικού οξέος με εγκλωβισμένη χρυσίνη (ALG-NPs-Chr) μεγέθους 122±7.3nm, NP2 για τα νανοσωματίδια αλγινικού οξέος μόνα τους (ALG-NPS) και NP3 για την ελεύθερη χρυσίνη διαλυμένη σε PBS. Για τη σήμανση των μαρτύρων χρησιμοποιήθηκε η σήμανση Ctrl και Ctrl37 °C για το δείγμα των μαρτύρων μετά την επώαση στους 37 °C χωρίς NPs.

### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1. Απομόνωση και εμπλουτισμός λευκών αιμοσφαιρίων**

##### **Αρχή μεθόδου**

Η μέθοδος απομόνωσης λευκοκυττάρων από το ολικό αίμα, βασίζεται στη λύση των ερυθροκυττάρων. Υπάρχουν πολλές τεχνικές που στηρίζονται στο διαχωρισμό με βάση την πυκνότητα των κυττάρων, όμως πολλά εργαστήρια προτιμούν μεθόδους λύσης και εξάλειψης των ερυθροκυττάρων από τα δείγματα, χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των ερυθροκυττάρων. Η λύση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης βασίζεται στο ωσμωτικό φαινόμενο (Dagur & McCoy, 2015). Με τον εμπλουτισμό των λευκοκυττάρων σε θρεπτικό υλικό πραγματοποιείται αύξηση της συγκέντρωσής τους, κάτι που θα εξυπηρετήσει σε πιο ολοκληρωμένη μελέτη.

##### **Υλικά/Αντιδραστήρια**

- Διάλυμα λύσης (Invitrogen™ eBioscience™ 1X RBC Lysis Buffer)
- Phosphate Buffered Saline 1X (PBS) (Gibco™-Thermo Fisher Scientific)
- Θρεπτικό υλικό RPMI-1640 (Gibco™-Thermo Fisher Scientific) εμπλουτισμένο 10% με εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS) (Biochrom AG) και 1X αντιβιοτικό (Life Technologies)
- Falcon 20ml

- Πιπέτες Pasteur
- Πιπέτες ακριβείας
- Falcon 20ml
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος

### **Πειραματική διαδικασία**

1. Μεταφέρθηκαν 2ml ολικού αίματος σε Falcon 20ml για κάθε δότη.
2. Προστέθηκαν 18ml λυτικού διαλύματος ερυθρών 1X σε κάθε Falcon.
3. Επώστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος.
4. Φυγοκεντρήθηκαν στις 1500 στροφές για 5 λεπτά στους 25°C.
5. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιήθηκε το ίζημα κυττάρων με 5 ml PBS.
6. Φυγοκεντρήθηκαν στις 1500 στροφές για 5 λεπτά στους 25°C.
7. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Σχηματισμός ιζήματος λευκών αιμοσφαιρίων.
8. Προστέθηκαν 3ml θρεπτικού υλικού RPMI 1640 εμπλουτισμένου με FBS και 1X αντιβιοτικό.
9. Τα κύτταρα μετρήθηκαν σε πλάκα Neubauer.

### **3.2. Επώαση δειγμάτων με NPs**

#### **Αρχή μεθόδου**

Για να διαπιστωθεί τυχόν μορφολογική αλλοίωση των κυττάρων και επιδράσεις στη βιωσιμότητα τους από την επαφή τους με τα νανοσυστήματα, απαιτείται επώαση μαζί τους σε *in vitro* συνθήκες προσομοίωσης ανθρώπινης κυκλοφορίας του αίματος για ένα χρονικό διάστημα στο οποίο κρίνεται ότι παρουσιάζεται αλληλοεπίδραση των νανοσυστημάτων με τα κύτταρα του αίματος.

#### **Υλικά/Αντιδραστήρια**

- Πλάκες των 24 φρεατίων (Corning®)
- Κρύο PBS

- Πιπέτες ακριβείας
- 5% CO<sub>2</sub>
- Επωαστικός κλίβανος
- Αναδευτήρας
- Ψυχόμενη φυγόκεντρος

### **Πειραματική διαδικασία**

Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε μια τετράδα φρεατίων.

1. Στα 4 φρεάτια προστέθηκαν περίπου  $3 \times 10^5$  λευκά αιμοσφαίρια σε θρεπτικό υλικό.
2. Στο ένα φρεάτιο προστέθηκε μόνο θρεπτικό υλικό (Ctrl37°C), στο δεύτερο προστέθηκε επιπλέον NP1, στο τρίτο NP2 και στο τέταρτο NP3.
3. Οι πλάκες επώαστηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub> για 4 ώρες, τοποθετημένα σε αναδευτήρα με σταθερή κίνηση.
4. Ακολούθησε συλλογή των κυττάρων κάθε φρεατίου σε σωληνάρια των 15 ml.
5. Τα φρεάτια πλύθηκαν με κρύο PBS, για να συλλεχθούν όλα τα κύτταρα.
6. Τα σωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν 2 φορές στις 1500 στροφές για 5 λεπτά.

### **3.3. Προετοιμασία δειγμάτων για κυτταρομετρία ροής**

#### **Αργή μεθόδου**

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνολογία που αναλύει γρήγορα μεμονωμένα κύτταρα ή σωματίδια καθώς διέρχονται από απλά ή πολλαπλά λέιζερ ενώ αιωρούνται σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα. Κάθε σωματίδιο αναλύεται με σκέδαση του φωτός σε δύο κατευθύνσεις, την κατεύθυνση προς τα εμπρός (Forward Scatter ή FSC) η οποία υποδεικνύει το σχετικό μέγεθος του κυττάρου και την κατεύθυνση στις 90° (Side Scatter ή SSC) που δείχνει την εσωτερική πολυπλοκότητα ή κοκκίωση του κυττάρου. Τα δείγματα προετοιμάζονται για μέτρηση φθορισμού μέσω αλληλεπίδρασης και έκφρασης φθορίζοντων πρωτεϊνών, χρώσης με φθορίζουσες βαφές ή χρώση με φθορίζοντα συζευγμένα αντισώματα, όπως στην παρούσα εργασία (McKinnon,2018).

Στην επιφάνεια των κυττάρων κατανέμονται ασύμμετρα, εσωτερικά και εξωτερικά της μεμβράνης λιπίδια. Ένα από τα σημαντικότερα λιπίδια είναι η φωσφατιδυλοσερίνη

(PS), η οποία εντοπίζεται στο εσωτερικό της. Διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο κατά της διάρκειας της απόπτωσης καθώς εκτίθεται στο εξωτερικό μέρος της μεμβράνης, χάνοντας την ασυμμετρία της. Η Annexin-V, είναι μια 36-kDa πρωτεΐνη δέσμησης ασβεστίου, η οποία συνδέεται με την PS στο εξωτερικό των αποπτωτικών κυττάρων. Η φθορίζουσα Annexin-V εκτός από τα αποπτωτικά κύτταρα, χρωματίζει και τα νεκρά, λόγω της εκτεταμένης αλλοίωσης της μεμβράνης τους. Η διάκριση των νεκρών από των αποπτωτικών κυττάρων γίνεται με συν-χρώση με ιωδιούχο προπίδιο (PI), επειδή αυτό εισέρχεται σε νεκρωτικά κύτταρα αλλά όχι σε αποπτωτικά (Crowley et al., 2016). Επομένως συν-χρώση φθοριζουσών Annexin-V και PI θα χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των αποπτωτικών και νεκρωτικών λευκοκυττάρων. Για την ανίχνευση των λευκοκυττάρων χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα CD45, που τα χαρακτηρίζει.

### **Υλικά/Αντιδραστήρια**

- 1X annexin-binding buffer (Invitrogen™ eBioscience™)
- σωληνάρια κυτταρομετρίας ροής (BD Biosciences®)
- anti-human CD45-FITC, clone 2D1 (Biolegend)
- AnnexinV-APC (Biolegend)
- PI-Per (Biolegend)
- Πιπέτες ακριβείας
- Vortex
- Πάγος
- κυτταρόμετρο BD FACSCanto™ (BD Biosciences®)
- ψυχόμενη φυγόκεντρος

### **Πειραματική διαδικασία**

1. Το ίζημα επαναιωρήθηκε με 100μl 1X annexin-binding buffer, έγινε ισχυρή ανάδευση και μεταφέρθηκε σε σωληνάρια κυτταρομετρίας ροής.
2. Προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες CD45-FITC, AnnexinV-APC και PI.

3. Τα σωληνάρια επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά, σε σκοτεινό μέρος.
4. Με το πέρας της επώασης, προστέθηκαν 400μl 1X annexin-binding buffer και έγινε ισχυρή ανάδευση.
5. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με ανάλυση των αποπτωτικών/νεκρών κυττάρων, με κυτταρομετρία ροής στο κυτταρόμετρο BD FACSCanto™, με το λογισμικό FlowJo V10.

### **3.4. Προετοιμασία δειγμάτων για μικροσκοπική ανάλυση**

#### **Αρχή μεθόδου**

Η χρώση May Grunwald-Giemsa είναι μια απλή και αποτελεσματική χρώση ανάδειξης κυτταρικών λεπτομερειών. Αποτελείται από μπλε του μεθυλενίου κι ηωσίνη, βάφει κυρίως ερυθροκύτταρα, πρωτόπλασμα εμπύρηνων κυττάρων και αιμοπετάλια σε αποχρώσεις του μπλε και του ροζ. Η Giemsa αποτελείται από μείγμα ηωσίνης και αζούρ Β, βάφει τον πυρήνα του κυττάρου, τα πρωτογενή κοκκία και τα κοκκία των βασεόφιλων σε αποχρώσεις του σκούρου μπλε και μοβ.

#### **Υλικά/Αντιδραστήρια**

- Χρώση May-Grunwald
- Χρώση Giemsa αραιωμένη 1/10
- Μεθανόλη
- Νερό
- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Πιπέτες ακριβείας
- Οπτικό μικροσκόπιο Olympus CX23 LED, με ενσωματωμένη κάμερα

#### **Πειραματική διαδικασία**

Η διαδικασία περιλάμβανε την επίστρωση δείγματος από κάθε φρεάτιο σε αντικειμενοφόρο πλάκα, το οποίο στη συνέχεια αφέθηκε να στεγνώσει. Για τη σταθεροποίηση των κυττάρων, οι πλάκες εμβαπτίστηκαν σε μεθανόλη για 5 λεπτά

και μετά από την απομάκρυνση της περίσσειας, τοποθετήθηκαν σε χρώση May-Grunwald για 4 λεπτά. Αφού απορρίφθηκε η περίσσεια της χρωστικής, οι πλάκες μεταφέρθηκαν σε χρώση Giemsa για 15 λεπτά. Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με άφθονο νερό και μόλις στέγνωσαν παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο. Η ανάλυση των λευκοκυττάρων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα προγράμματα INFINITY CAPTURE και INFINITY ANALYZE.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1. Γενικές αίματος

Όσον αφορά στους λευκοκυτταρικούς πληθυσμούς πριν από οποιοδήποτε χειρισμό των δειγμάτων, βρίσκονταν εντός των φυσιολογικών ορίων. Η αιματολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκε στον αιματολογικό αναλυτή **Convergys X3 NG**. Πιο συγκεκριμένα ο απόλυτος αριθμός των λευκοκυττάρων (WBCs) παρουσιάζεται σε φυσιολογικά όρια [ $4.78 \pm 1.282$  ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )], όπως και οι αριθμοί των υποπληθυσμών λευκοκυττάρων, λεμφοκυττάρων (LYM), μονοκυττάρων (MID) και κοκκιοκυττάρων (GRA) [ $1.54 \pm 0.4412$ ,  $0.2822 \pm 0.1072$ ,  $2.957 \pm 0.8442$  ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )]. Οι ποσοστιαίες τιμές (LYM%, MID%, GRA%) κυμαίνονται και αυτές στα φυσιολογικά επίπεδα [ $32.69 \pm 4.814$ ,  $5.889 \pm 1.163$ ,  $61.42 \pm 5.251$  ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) αντίστοιχα]. (Πίνακας 1)

	Donors (n=10)	Normal Range
WBC( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	$4.78 \pm 1.282$	5.0-11.6
LYM( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	$1.54 \pm 0.4412$	1.3-4.0
MID( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	$0.2822 \pm 0.1072$	0.3-1.0
GRA( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	$2.957 \pm 0.8442$	2.4-7.6
LYM %	$32.69 \pm 4.814$	19.1-48.5
MID %	$5.889 \pm 1.163$	4.5-12.1
GRA %	$61.42 \pm 5.251$	43.6-73.4

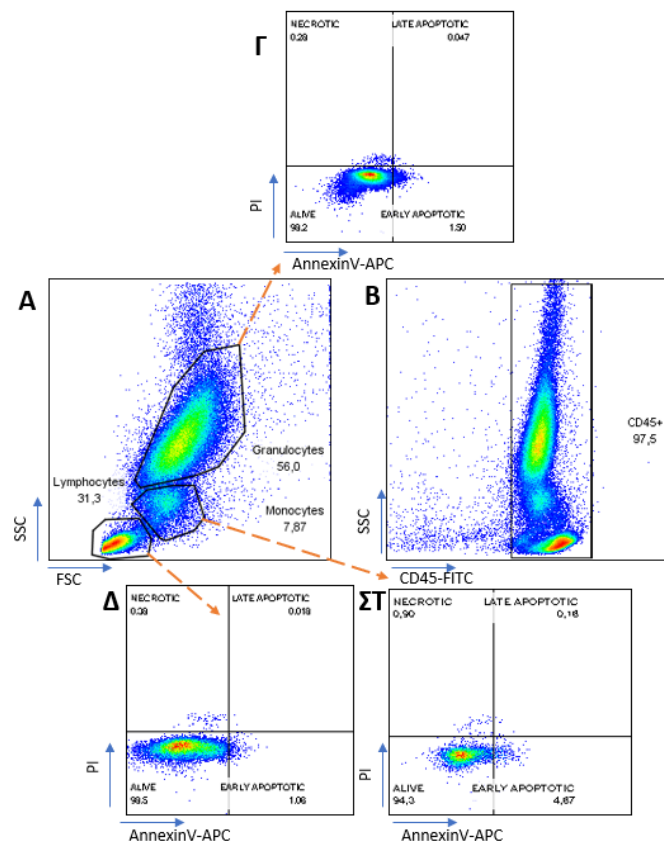
**Πίνακας 1:** Αιματολογική ανάλυση των δεικτών των λευκοκυτταρικών πληθυσμών των δοτών.

### 3.2. Κυτταρομετρία ροής

Ο έλεγχος της βιωσιμότητας των κυττάρων των υποπληθυσμών των WBCs πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής στο κυτταρόμετρο **BD FACSCanto™**. Τα γραφήματα και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα **GraphPad Prism 8.0.3**. Για την εκπόνηση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής έγινε χρήση της διαδοχικής οριοθέτησης πληθυσμών, γνωστή και ως «gating strategy». Οριοθετήθηκαν οι υποπληθυσμοί στο αρχικό στικτόγραμμα (Στικτόγραμμα 1), με βάση την έκφραση του CD45, που αποτελεί έναν δείκτη των λευκών αιμοσφαιρίων



(Στικτόγραμμα 2). Αφού επιλέχθηκε με βάση τα σκεδαστικά ο υποπληθυσμός των λεμφοκυττάρων, των μονοκυττάρων και των κοκκιοκυττάρων, οριοθετήθηκε ο κάθε υποπληθυσμός. Στη συνέχεια ο κάθε υποπληθυσμός αναλύθηκε για τον εντοπισμό αποπτωτικών/νεκρωτικών κυττάρων χρησιμοποιώντας AnnexinV-APC και PI. Για κάθε υποπληθυσμό αναλύθηκε το ποσοστό ζωντανών κυττάρων (ALIVE), πρώιμων αποπτωτικών (EARLY APOPTOTIC), νεκρωτικών (NECROTIC) και όψιμων αποπτωτικών (LATE APOPTOTIC) (Στικτόγραμμα 3, Στικτόγραμμα 4, Στικτόγραμμα 5). (Εικόνα 20)



**Εικόνα 20**

**A. Στικτόγραμμα 1:** Παρουσιάζονται οι τύποι των WBCs του περιφερικού αίματος. Στον άξονα x είναι ο πρόσθιος σκεδασμός και στον άξονα y ο πλάγιος σκεδασμός που μας δίνουν πληροφορίες για το μέγεθος και την κοκκίωση των κυττάρων, αντίστοιχα. Τα λεμφοκύτταρα είναι τα μικρότερα σε μέγεθος, ενώ τα μεγαλύτερα σε μέγεθος με πολλή κοκκίωση είναι τα κοκκιοκύτταρα που αποτελούν και το μεγαλύτερο ποσοστό των λευκών αιμοσφαιρίων. Ο υποπληθυσμός των μονοκυττάρων παρουσιάζεται μεταξύ των δύο, λόγω των ενδιάμεσων χαρακτηριστικών του.

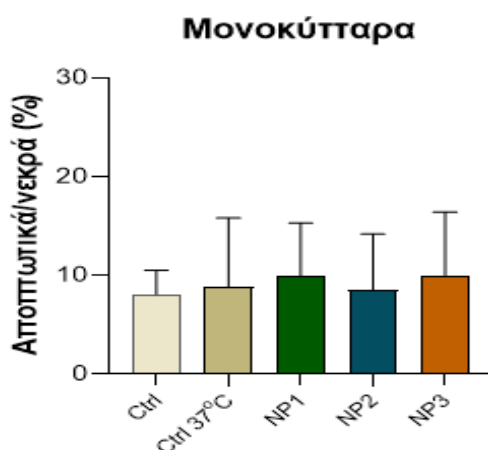
**B. Στικτόγραμμα 2:** Επιλογή CD45+ κυττάρων. Τα λευκοκύτταρα φέρουν στην επιφάνεια τους τον δείκτη CD45.

**Γ. Στικτόγραμμα 3:** Ενδεικτικό στικτόγραμμα απεικονίζει τη βιωσιμότητα του πληθυσμού των κοκκιοκυττάρων, μετά από χρώση με AnnexinV-APC και PI. Παρατηρείται ότι τα κοκκιοκύτταρα είναι στην πλειοψηφία τους ζωντανά κύτταρα, με τα αποπτωτικά/νεκρά να αποτελούν ένα μικρό ποσοστό.

**Δ. Στικτόγραμμα 4:** Ενδεικτικό στικτόγραμμα απεικονίζει τη βιωσιμότητα του πληθυσμού των λεμφοκυττάρων, μετά από χρώση με AnnexinV-APC και PI. Η πλειοψηφία των κυττάρων είναι ζωντανά, ενώ σε πρώιμη φάση απόπτωσης και νεκρά είναι ένας μικρός αριθμός.

**ΣΤ. Στικτόγραμμα 5:** Ενδεικτικό στικτόγραμμα απεικονίζει τη βιωσιμότητα του πληθυσμού των μονοκυττάρων, μετά από χρώση με AnnexinV-APC και PI. Παρατηρούνται τα περισσότερα κύτταρα να είναι ζωντανά, ένα μικρό ποσοστό να βρίσκεται σε πρώιμη αποπτωτική φάση, ενώ ελάχιστα είναι τα νεκρά.

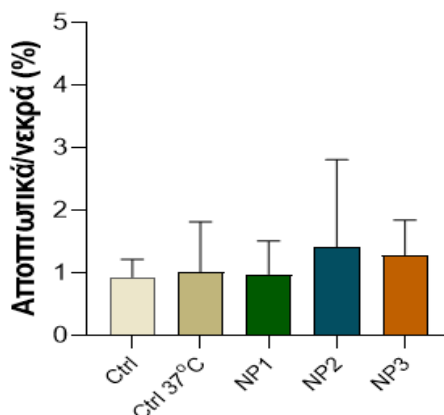
Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στη βιωσιμότητα μεταξύ των μονοκυττάρων των δοτών πριν και μετά την επώαση των 4 ωρών με τα νανοϋλικά. Πιο συγκεκριμένα το ποσοστό των αποπτωτικών/νεκρών μονοκυττάρων των μαρτύρων ( $8.094 \pm 2.425$ ), ήταν παραπλήσιο με το ποσοστό των μαρτύρων στους  $37^\circ\text{C}$  ( $8.799 \pm 7.025$ ), του NP1 ( $9.978 \pm 5.336$ ), του NP2 ( $8.546 \pm 5.650$ ) και του NP3 ( $10.02 \pm 6.379$ ) (Διάγραμμα 1).



**Διάγραμμα 1:** Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης των νανοϋλικών στον πληθυσμό των μονοκυττάρων. Δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά των ποσοστών των αποπτωτικών/νεκρών μονοκυττάρων μετά την επώαση τους με τα νανοϋλικά σε σχέση με τους μάρτυρες.

Δεν παρουσιάστηκε στατιστική διαφορά στη βιωσιμότητα των λεμφοκυττάρων μετά την επώαση με τα νανοϋλικά. Το ποσοστό των αποπτωτικών/νεκρών λεμφοκυττάρων των μαρτύρων ( $0.9344 \pm 0.2849$ ) και των μαρτύρων στους  $37^\circ\text{C}$  ( $1.013 \pm 0.8037$ ) ήταν σχεδόν ίδιο με τα ποσοστά των NP1 ( $0.9830 \pm 0.5281$ ), NP2 ( $1.410 \pm 1.399$ ) και NP3 ( $1.292 \pm 0.5535$ ) αντίστοιχα (Διάγραμμα 2).

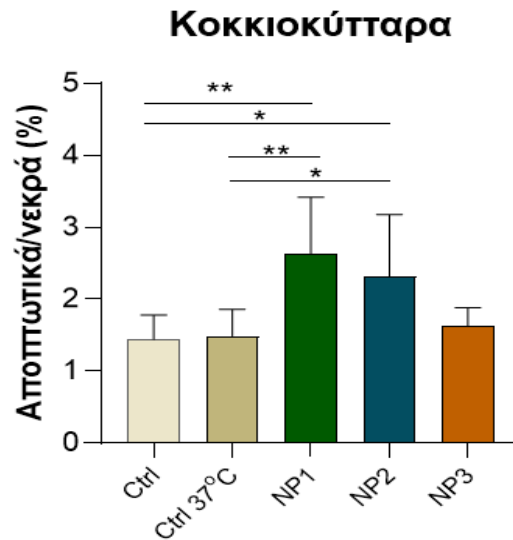
## Λεμφοκύτταρα



**Διάγραμμα 2:** Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης των νανοϋλικών στον πληθυσμό των λεμφοκυττάρων. Δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στα ποσοστά των αποπτωτικών/νεκρών λεμφοκυττάρων μετά επώαση τους με τα νανοϋλικά σε σχέση με τους μάρτυρες.

Τα δεδομένα των κοκκιοκυττάρων παρουσίασαν έντονο ενδιαφέρον.

Αναλυτικότερα το ποσοστό των αποπτωτικών/νεκρών κοκκιοκυττάρων των μαρτύρων ( $1.445 \pm 0.3356$ ) και αυτό των μαρτύρων στους  $37^\circ\text{C}$  ( $1.491 \pm 0.3680$ ), δεν εμφάνισαν σημαντική διαφορά με αυτό του NP3 ( $1.629 \pm 0.2507$ ). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά ανάμεσα στα ποσοστά των αποπτωτικών/νεκρών κυττάρων μετά την επώαση με NP1 ( $2.640 \pm 0.3680$ ) και μετά την επώαση με NP2 ( $2.316 \pm 0.8645$ ). Σημαντικές στατιστικές διαφορές εντοπίστηκαν μεταξύ των μαρτύρων στους  $37^\circ\text{C}$  και του NP1 ( $p=0.0020$ ) και μεταξύ των μαρτύρων και του NP1 ( $p=0.0039$ ). Σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν ακόμα ανάμεσα στους μάρτυρες και το NP2 ( $p=0.0117$ ) και μεταξύ μαρτύρων στους  $37^\circ\text{C}$  και NP2 ( $p=0.0273$ ). (Διάγραμμα 3)

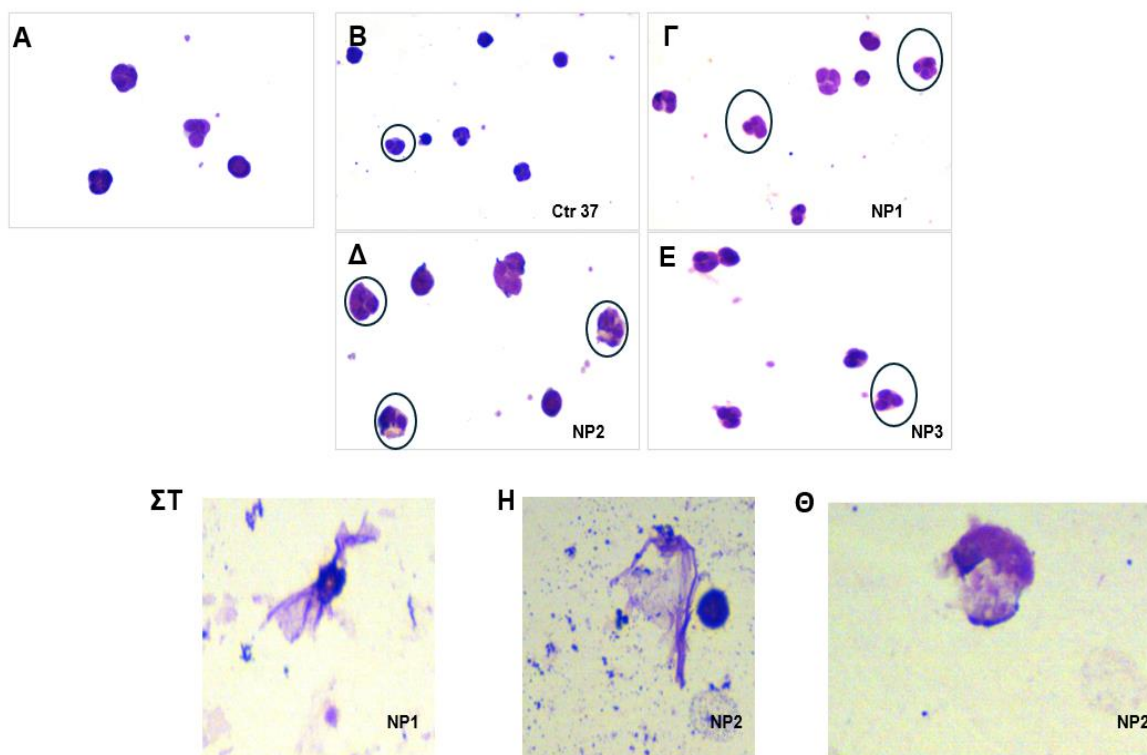


**Διάγραμμα 3:** Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης των νανοϋλικών στον πληθυσμό των κοκκιοκυττάρων. Παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά των αποπτωτικών και νεκρών κοκκιοκυττάρων, ύστερα από την επίδραση των NP1 και NP2, συγκριτικά με τις τιμές των μαρτύρων. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

### 3.3. Μικροσκόπηση

Ο έλεγχος των κυτταρικών αλλοιώσεων των υποπληθυσμών των WBCs μετά την επίδραση των νανοϋλικών πραγματοποιήθηκε με μικροσκόπηση στο οπτικό μικροσκόπιο Olympus CX23 LED. Τα αποτελέσματα λήφθηκαν με παρατήρηση των χρωματισμένων επιχρισμάτων των λευκών αιμοσφαιρίων με χρώση May Grunwald-Giemsa, με το λογισμικό INFINITY CAPTURE. Από τη μικροσκόπηση παρατηρήθηκε πως δεν υπήρχαν δομικές αλλοιώσεις των λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων και πιο συγκεκριμένα κατατμήσεις πυρήνων. Στα κοκκιοκύτταρα και πιο συγκεκριμένα στα ουδετερόφιλα, παρατηρήθηκαν μη φυσιολογικά κυτταρικά χαρακτηριστικά και πιο συγκεκριμένα εντοπίστηκαν αποκοκκιώσεις και NETs. Τέτοιες μη φυσιολογικές δομές δεν εντοπίστηκαν τόσο στα επιχρίσματα των μαρτύρων όσο και των μαρτύρων στους 37 °C. Στα δείγματα των μαρτύρων στους 37 °C βρέθηκαν λιγοστά ουδετερόφιλα με αποκοκκίωση. Στις επωάσεις των δειγμάτων με το NP3, δεν παρατηρήθηκε σε κανένα επίχρισμα τέτοιου είδους διαταραχή, ενώ μόνο λίγα ήταν τα κύτταρα με κατατμημένο πυρήνα. Η μικροσκόπηση των πλακών με τα επιχρίσματα δειγμάτων με

το NP1 παρουσίασαν περισσότερα κύτταρα με αποκοκκίωση, ενώ παράλληλα έγινε εντοπισμός NETs. Η μεγαλύτερη αλλοίωση των πυρηνικών δομών εντοπίστηκε στα δείγματα που επώαστηκαν με το NP2. Επίσης, αυξημένη ήταν και η παρατήρηση των NETs. (Εικόνα 21)



### Εικόνα 21

*A,B.* Μικροσκοπική παρατήρηση WBCs στα δείγματα μαρτύρων και μαρτύρων στους 37 °C. Δεν παρατηρήθηκαν αποκοκκιώσεις στα κύτταρα των μαρτύρων, με λιγιστές να εντοπίστηκαν σε αυτά των μαρτύρων στους 37 °C **(Εντός κύκλου)**.

*Γ.* Μικροσκοπική παρατήρηση WBCs σε δείγματα ύστερα από επώαση με NP1. Εντοπισμός περισσότερων ουδετερόφιλων με κατάτμηση πυρήνα **(Εντός κύκλου)**.

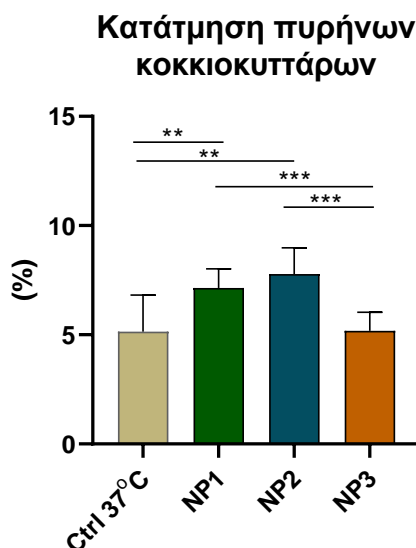
*Δ.* Μικροσκοπική παρατήρηση WBCs σε δείγματα μετά από επώαση με το NP2. Παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη επίδραση. Αυξημένη παρατήρηση ουδετερόφιλων με μη φυσιολογική δομή και κατατμημένους πυρήνες **(Εντός κύκλου)**.

*Ε.* Μικροσκοπική παρατήρηση WBCs σε δείγμα ύστερα από επώαση με NP3. Δεν εντοπίστηκε σημαντικός αριθμός μη φυσιολογικών ουδετερόφιλων, παρά μόνο ένα μικρό ποσοστό εμφάνισε αποκοκκίωση **(Εντός κύκλου)**.

**ΣΤ.** Παρατήρηση ουδετερόφилου και NETs, ύστερα από επώαση με NP1.

**Η,Θ.** Έντονη παρουσία NETs σε δύο διαφορετικούς δότες, ύστερα από επώαση με NP2.

Αναλυτικότερα, εμφανίστηκε σημαντική στατιστική διαφορά ( $p=0.0078$ ) μεταξύ των κοκκιοκυττάρων με κατάτμηση πυρήνα του δείγματος των μαρτύρων στους  $37^{\circ}\text{C}$  ( $5.148\pm 1.668$ ), με την αντίστοιχη μέτρηση των κοκκιοκυττάρων που επώαστηκαν με NP1 ( $7.148\pm 0.8678$ ). Ακόμα μεγαλύτερης στατιστικής σημασίας διαφορά ( $p=0.0039$ ) προέκυψε μεταξύ του δείγματος των μαρτύρων στους  $37^{\circ}\text{C}$  και του δείγματος που επώαστηκε με NP2 ( $7.778\pm 1,202$ ). Σε ό,τι αφορά το NP3 ( $5.185\pm 0.8586$ ), δεν παρατηρήθηκε διαφορά με τις τιμές των μαρτύρων στους  $37^{\circ}\text{C}$  ( $5.148\pm 1.668$ ). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του NP1 και NP3 ( $p=0.0004$ ) αλλά και μεταξύ του NP2 και NP3 ( $p=0.0002$ ). (Διάγραμμα 4)



**Διάγραμμα 4:** Διαγραμματική απεικόνιση της μικροσκόπησης των κοκκιοκυττάρων για έλεγχο κατάτμησης πυρήνων. Παρατηρείται αυξημένος αριθμός κοκκιοκυττάρων με αποκοκκίωση, έπειτα από την επίδραση των NP1 και NP2, συγκριτικά με τις τιμές των μαρτύρων και NP3. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

### **4.1. Σχολιασμός αποτελεσμάτων**

Στην παρούσα εργασία έγινε έλεγχος της επίδρασης των νανοϋλικών στα λευκά αιμοσφαίρια υγιών δοτών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε το ποσοστό αποπτωτικών/νεκρωτικών κυττάρων (λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα) μετά την επώαση με τα νανοϋλικά. Επιπλέον, έγινε μικροσκοπική παρατήρηση για την εύρεση πιθανών φαινοτυπικών αλλοιώσεων.

Κατά την είσοδο των NPs στην κυκλοφορία του αίματος, μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με τα ερυθροκύτταρα, προκαλώντας αιμόλυση, παραμόρφωση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης και διαταραχή στη μεταφορά οξυγόνου. Επίσης τα NPs, μπορούν να αυξήσουν τις συσσωρεύσεις των αιμοπεταλίων, προς σχηματισμό θρόμβου (Arathi et al., 2023). Στα λευκοκύτταρα, έχει παρατηρηθεί ισχυρή ανοσολογική απόκριση όταν η συγκέντρωση των NPs είναι υψηλή (Pondman et al., 2023), όπως και όταν το μέγεθος είναι 100-200nm (Mutiso Kii & Park, 2020). Τα ALG-NPs εμφανίζουν χαμηλή ανοσολογική απόκριση χωρίς αντιδράσεις (Rostami, 2022). Έχει παρατηρηθεί ότι με τροποποίηση της επιφάνειας των NPs, αναστέλλεται η τοξικότητα τους στα μονοκύτταρα, μειώνοντας την παραγωγή ROS και κυτοκινών από αυτά (Li et al., 2021). Τα μονοκύτταρα φάνηκε να μην επηρεάζονται και μετά από την επίδραση των μεσοπορόδων NPs με βάση το πυρίτιο (Fortis et al., 2024). Στα κοκκιοκύτταρα, έχει παρατηρηθεί ότι η επίδραση με NPs μπορεί να προκαλέσει αποκοκκίωση και παραγωγή NETs. Τα αυξημένα επίπεδα αποκοκκίωσης οφείλονται στις ιδιότητες των NPs (de la Harpe et al., 2019), ενώ κατατμήσεις στο DNA μπορούν να προκληθούν από αλληλοεπίδραση κοκκιοκυττάρων και NPs (Arathi et al., 2023). Τα ουδετερόφιλα, σε υψηλές συγκεντρώσεις NPs, παράγουν NETs με σκοπό να τα αποικοδομήσουν. Η συσσώρευση των NETs εξαρτάται και από το μέγεθος (Muñoz et al., 2016). Αποκοκκίωση και αυξημένη παραγωγή NETs παρατηρήθηκε και μετά από έρευνα μεσοπορόδων NPs με βάση το πυρίτιο (Fortis et al., 2024) Τα ουδετερόφιλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μεταφορά των NPs, όταν οι ιδιότητες των NPs δεν προκαλούν την ενεργοποίησή τους (Wang et al., 2021), (Bisso et al., 2018). Στα λεμφοκύτταρα, τα πολυμερικά NPs φαίνεται να αναστέλλουν την ενεργοποίησή τους



(Gerardo González De La Cruz et al., 2017), ενώ δεν εμφανίστηκε καμία επίδραση και μετά από επώαση με NPs με βάση το πυρίτιο (Fortis et al., 2024).

Η ελεύθερη χρυσίνη έχει σημαντικό ρόλο στην φλεγμονή, μειώνοντας τις βλάβες που προκαλούνται από μακροφάγα, ουδετερόφιλα και από άλλες ανοσο-φλεγμονώδεις αποκρίσεις (Naz et al., 2019), ενώ παράλληλα επηρεάζει τη σηματοδότηση των ανοσοποιητικών κυττάρων (Maleki et al., 2019). Η επίδραση της στα πολυμερικά NPs μπορεί να επηρεάσει τις ανοσολογικές αποκρίσεις, εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων με την επιφάνεια τους, όπως παρατηρήθηκε και βιβλιογραφικά (Oliyarour et al., 2023), (Karimova et al., 2024). Πιθανός ακόμα λόγος είναι ότι έχει αποδοθεί αυξημένη ανοσολογική απόκριση έναντι των ALG-NPs εξαιτίας προσμίξεων με πολυφαινολικές ενώσεις (Lee & Mooney, 2012).

Στην παρούσα έρευνα, βρέθηκε να μην επηρεάζεται η βιωσιμότητα και η μορφολογία των μονοκυττάρων μετά την επώαση τους με τα ALG-NPs, όπως παρατηρήθηκε και βιβλιογραφικά σε έλεγχο συμβατότητας μονοκυττάρων με άλλα NPs (Fortis et al., 2024), (Li et al., 2021), όπως και η βιωσιμότητα/μορφολογία των λεμφοκυττάρων δεν επηρεάστηκε (Gerardo González De La Cruz et al., 2017), (Fortis et al., 2024). Σε ό,τι αφορά τη βιωσιμότητα των κοκκιοκυττάρων παρατηρήθηκε ότι τα ALG-NPs προκαλούν αποκοκκίωση και κατατμήσεις πυρήνων των κοκκιοκυττάρων, εξαιτίας της αναγνώρισής τους ως ξένα - όπως αποδείχθηκε και σε πηγές με άλλα NPs (de la Harpe et al., 2019), (Fortis et al., 2024), (Arathi et al., 2023) - όπως και έκκριση NETs από τα ουδετερόφιλα (Castanheira & Kubes, 2019), (Muñoz et al., 2016), (Fortis et al., 2024). Η παρουσία NETs μετά τις 4 ώρες επώασης αιτιολογεί τον αυξημένο κυτταρικό θάνατο των κοκκιοκυττάρων, όπως παρατηρήθηκε και από την κυτταρομετρία ροής, καθώς η απελευθέρωση NETs συμβαίνει 3-4 ώρες μετά την ευαισθητοποίηση τους με υψηλή συγκέντρωση NPs (Castanheira & Kubes, 2019).

Η εντονότερη παρουσία NETs μετά από επώαση με την ενθυλακωμένη chr, πιθανώς να οφείλεται στις επιδράσεις που μπορεί να προκαλεί στην επιφάνεια πολυμερικών NPs (Oliyarour et al., 2023) και στην αυξημένη ανοσολογική απόκριση έναντι των ALG-NPs που προσδίδουν οι προσμίξεις με πολυφαινολικές ενώσεις (Lee & Mooney, 2012).

Παρουσία ελεύθερης χρυσίνης, δεν επηρεάστηκε η βιωσιμότητα των υποπληθυσμών των λευκοκυττάρων, επιβεβαιώνοντας το ρόλο της στην προστασία από αντιδράσεις φλεγμονής (Adangale & Wairkar, 2022), (Stompor-Gorący et al., 2021), (Kasala et al., 2015), (Maleki et al., 2019), (Naz et al., 2019).

#### **4.2. Συμπεράσματα**

Η φυσική πολυφαινόλη χρυσίνη, φαίνεται να έχει πολλές φαρμακολογικές ικανότητες όπως αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές και ανοσορυθμιστικές, ωστόσο περιορίζεται από το πρόβλημα της βιοδιαθεσιμότητας, κάτι που πρέπει να βελτιωθεί για να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητά της. Η χρήση της ως σύμπλοκο με ALG-NPs φαίνεται να λύνει το πρόβλημα της βιοδιαθεσιμότητας, με τη συγκεκριμένη μελέτη να παρέχει ένα δείγμα σχετικά με την επίδραση της εγκλωβισμένης χρυσίνης σε ALG-NPs στους υποπληθυσμούς WBCs. Το αλγινικό έχει διερευνηθεί ως πιθανός φορέας για τη χορήγηση φαρμάκων λόγω της ασφάλειας, της βιοσυμβατότητας, της βιοδιασποράς και της μη τοξικότητας του. Συμπεραίνουμε επομένως, πως τα χαρακτηριστικά των ALG-NPs που χρησιμοποιήσαμε για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης έρευνας προκαλούν επιπτώσεις στις αλληλεπιδράσεις με τους υποπληθυσμούς των WBCs και πιο συγκεκριμένα με αυτόν των πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων.

Η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των νανοϋλικών και των ουδετερόφιλων είναι σημαντική για την ανάπτυξη ασφαλών και αποτελεσματικών νανοϋλικών στις βιοϊατρικές εφαρμογές. Η αλληλεπίδραση μεταξύ ALG-NPs και συμπλόκων ALG-NPs-Chr με τα ουδετερόφιλα πρέπει να διερευνηθεί και να αξιολογηθεί περισσότερο.

### 4.3. Προτάσεις μελλοντικών ερευνών

Η ελεύθερη χρυσίνη σύμφωνα με τη βιβλιογραφία επιφέρει άμεση επίδραση στα κύτταρα-στόχους και προτιμάται έναντι της ενθυλακωμένης σε *in vitro* μελέτες, όμως *in vivo* η μικρή απορρόφηση δεν την καθιστά αποτελεσματική και χωρίς τα σύμπλοκα με νανοφορείς, η αξιοποίηση της δεν είναι η μέγιστη δυνατή. Μελλοντικές έρευνες χρειάζεται να επικεντρωθούν στο συνδυασμό του ελέγχου της κυτταροτοξικότητας των χαρακτηριστικών των NPs στα κύτταρα του αίματος και της βιοδιαθεσιμότητας / απορρόφησης της χρυσίνης, ώστε να προσεγγιστούν οι ιδανικές συγκεντρώσεις και οι ιδιότητες των νανοφορέων, οι οποίες θα επιτρέπουν τη στοχευμένη και μέγιστη απελευθέρωση της χρυσίνης στον οργανισμό.

Η διαλεύκανση των παραπάνω, θα οδηγήσει σε αποτελεσματικά πρωτόκολλα χρήσης νανοφορέων για διαγνωστικούς ή και θεραπευτικούς σκοπούς.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Adangale, S. C., & Wairkar, S. (2022).** Potential therapeutic activities and novel delivery systems of chrysin-a nature's boon. *Food Bioscience*, 45, 101316.
2. **Arathi, Megha, K. B., Joseph, X., & Mohanan, P. V. (2023).** Biological Safety and Cellular Interactions of Nanoparticles. In *Biomedical Applications and Toxicity of Nanomaterials* (pp. 559–587). Springer Nature Singapore.
3. **Babita Sharma. (2023).** Types of Leukocytes with Structure, Functions, Diagrams. *Microbe Notes*.
4. **Bisso, P. W., Gaglione, S., Guimarães, P. P. G., Mitchell, M. J., & Langer, R. (2018).** Nanomaterial Interactions with Human Neutrophils. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(12), 4255–4265.
5. **Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004).** Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, 303(5663), 1532–1535.
6. **Castanheira, F. V. S., & Kubes, P. (2019).** Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood*, 133(20), 2178–2185
7. **CD Bioparticles. (2024).** Polymeric Nanoparticles Production. Drug Delivery. *CD Bioparticles*.
8. **Chavan, Y. R., Tambe, S. M., Jain, D. D., Khairnar, S. V., & Amin, P. D. (2022).** Redefining the importance of polylactide-co-glycolide acid (PLGA) in drug delivery. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 80(5), 603–616.
9. **Cleveland Clinic. (2022).** Lymphocytes. *Cleveland Clinic*.
10. **Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., & Waterhouse, N. J. (2016).** Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(11).
11. **Cuffari, B. (2021).** *An Overview of Inorganic Nanomaterials*.
12. **Dagur, P. K., & McCoy, J. P. (2015).** Collection, Storage, and Preparation of Human Blood Cells. *Current Protocols in Cytometry*, 73(1).
13. **de la Harpe, K., Kondiah, P., Choonara, Y., Marimuthu, T., du Toit, L., & Pillay, V. (2019).** The Hemocompatibility of Nanoparticles: A Review of Cell–Nanoparticle Interactions and Hemostasis. *Cells*, 8(10), 1209.
14. **Demkow, U. (2023).** Molecular Mechanisms of Neutrophil Extracellular Trap (NETs) Degradation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4896.
15. **Dodero, A., Alberti, S., Gaggero, G., Ferretti, M., Botter, R., Vicini, S., & Castellano, M. (2021).** An Up-to-Date Review on Alginate Nanoparticles and Nanofibers for Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Advanced Materials Interfaces*, 8(22).
16. **Encyclopedia Britannica. (2024).** White blood cells. In *Britannica*.
17. **Fernando, I. P. S., Lee, W., Han, E. J., & Ahn, G. (2020).** Alginate-based nanomaterials: Fabrication techniques, properties, and applications. *Chemical Engineering Journal*, 391, 123823.
18. **Fortis, S. P., Batrinou, A., Georgatzakou, H. T., Tsamesidis, I., Alvanidis, G., Papageorgiou, E. G., Stamoulis, K., Gkiliopoulos, D., Pouroutzidou, G. K., Theocharidou, A., Kontonasaki, E., & Kriebardis, A. G. (2024).** Effect of silica-based mesoporous nanomaterials on human blood cells. *Chemico-Biological Interactions*, 387, 110784.
19. **Friedman, A. J., Phan, J., Schairer, D. O., Champer, J., Qin, M., Pirouz, A., Blecher-Paz, K., Oren, A., Liu, P. T., Modlin, R. L., & Kim, J. (2013).** Antimicrobial and Anti-Inflammatory Activity of Chitosan–Alginate Nanoparticles: A Targeted

- Therapy for Cutaneous Pathogens. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(5), 1231–1239.
20. Gerardo González De La Cruz, Patricia Rodríguez-Fragoso, Jorge Reyes-Esparza, Anahí Rodríguez-López, Rocío Gómez-Cansino, & Lourdes Rodríguez-Fragoso. (2017). *Interaction of Nanoparticles with Blood Components and Associated Pathophysiological Effects*.
  21. Gheorghita Puscaselu, R., Lobiuc, A., Dimian, M., & Covasa, M. (2020). Alginate: From Food Industry to Biomedical Applications and Management of Metabolic Disorders. *Polymers*, 12(10), 2417.
  22. Gigon, L., Yousefi, S., Karaulov, A., & Simon, H.-U. (2021). Mechanisms of toxicity mediated by neutrophil and eosinophil granule proteins. *Allergology International*, 70(1), 30–38.
  23. Graván, P., Aguilera-Garrido, A., Marchal, J. A., Navarro-Marchal, S. A., & Galisteo-González, F. (2023). Lipid-core nanoparticles: Classification, preparation methods, routes of administration and recent advances in cancer treatment. *Advances in Colloid and Interface Science*, 314, 102871.
  24. Guo, F., Luo, S., Wang, L., Wang, M., Wu, F., Wang, Y., Jiao, Y., Du, Y., Yang, Q., Yang, X., Yang, G., Yin Zhou Du, Qingliang Yang, Xiaoyan Yang, & Gensheng Yang. (2024). Protein corona, influence on drug delivery system and its improvement strategy: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 256, 128513.
  25. Guo, R., Li, R., Li, X., Zhang, L., Jiang, X., & Liu, B. (2009). Dual-Functional Alginic Acid Hybrid Nanospheres for Cell Imaging and Drug Delivery. *Small*, 5(6), 709–717.
  26. Guo, X., Wang, Y., Qin, Y., Shen, P., & Peng, Q. (2020). Structures, properties and application of alginic acid: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 618–628.
  27. Gustafson, H. H., Holt-Casper, D., Grainger, D. W., & Ghandehari, H. (2015). Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. *Nano Today*, 10(4), 487–510.
  28. Halevas, E., Kokotidou, C., Zaimai, E., Moschona, A., Lialiaris, E., Mitraki, A., Lialiaris, T., & Pantazaki, A. (2021). Evaluation of the Hemocompatibility and Anticancer Potential of Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) and Poly(3-Hydroxybutyrate) Microcarriers with Encapsulated Chrysin. *Pharmaceutics*, 13(1), 109.
  29. Han, J., Lim, J., Wang, C.-P. J., Han, J.-H., Shin, H. E., Kim, S.-N., Jeong, D., Lee, S. H., Chun, B.-H., Park, C. G., & Park, W. (2023). Lipid nanoparticle-based mRNA delivery systems for cancer immunotherapy. *Nano Convergence*, 10(1), 36.
  30. Hariyadi, D. M., & Islam, N. (2020). Current Status of Alginate in Drug Delivery. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2020, 1–16.
  31. Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 262.
  32. Karimova, A., Hajizada, S., Shirinova, H., Nuriyeva, S., Gahramanli, L., Yusuf, M. M., Bellucci, S., Reissfelder, C., & Yagublu, V. (2024). Surface Modification Strategies for Chrysin-Loaded Iron Oxide Nanoparticles to Boost Their Anti-Tumor Efficacy in Human Colon Carcinoma Cells. *Journal of Functional Biomaterials*, 15(2), 43.
  33. Kasala, E. R., Bodduluru, L. N., Madana, R. M., V. A. K., Gogoi, R., & Barua, C. C. (2015). Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. *Toxicology Letters*, 233(2), 214–225.
  34. Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. In *Arabian Journal of Chemistry* (Vol. 12, Issue 7, pp. 908–931). Elsevier B.V.

35. Kim, K. M., Lim, H. K., Shim, S. H., & Jung, J. (2017). Improved chemotherapeutic efficacy of injectable chrysin encapsulated by copolymer nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 12, 1917–1925.
36. King, S., Dobson, P., & Jarvie, H. (2019). Nanoparticle. *Encyclopedia Britannica*.
37. Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106–126.
38. Li, H., Wang, Y., Tang, Q., Yin, D., Tang, C., He, E., Zou, L., & Peng, Q. (2021). The protein corona and its effects on nanoparticle-based drug delivery systems. *Acta Biomaterialia*, 129, 57–72.
39. Lin, C.-C., Yu, C.-S., Yang, J.-S., Lu, C.-C., Chiang, J.-H., Lin, J.-P., Kuo, C.-L., & Chung, J.-G. (2012). Chrysin, a natural and biologically active flavonoid, influences a murine leukemia model in vivo through enhancing populations of T-and B-cells, and promoting macrophage phagocytosis and NK cell cytotoxicity. *In Vivo (Athens, Greece)*, 26(4), 665–670.
40. Lindsay M. Biga, Staci Bronson, Sierra Dawson, Amy Harwell, Robin Hopkins, Joel Kaufmann, Mike LeMaster, Philip Matern, Philip Matern, Kristen Oja, Devon Quick, & Jon Runyeon. (2019). 18.1 Functions of Blood. *Anatomy & Physiology*.
41. Maji, I., Mahajan, S., Sriram, A., Mehra, N. K., & Singh, P. K. (2023). Polymeric Nanomaterials: Fundamentals and Therapeutic Applications. In *Nanomaterial-Based Drug Delivery Systems* (pp. 33–64). Springer International Publishing.
42. Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 299, 125124.
43. Masucci, M. T., Minopoli, M., Del Vecchio, S., & Carriero, M. V. (2020). The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Tumor Progression and Metastasis. *Frontiers in Immunology*, 11.
44. McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*, 120(1).
45. Muñoz, L. E., Bilyy, R., Biermann, M. H. C., Kienhöfer, D., Maueröder, C., Hahn, J., Brauner, J. M., Weidner, D., Chen, J., Scharin-Mehlmann, M., Janko, C., Friedrich, R. P., Mielenz, D., Dumych, T., Lootsik, M. D., Schauer, C., Schett, G., Hoffmann, M., Zhao, Y., & Herrmann, M. (2016). Nanoparticles size-dependently initiate self-limiting NETosis-driven inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(40).
46. Mutiso Kiio, T., & Park, S. (2020). Physical properties of nanoparticles do matter. *Journal of Pharmaceutical Investigation*.
47. MyHematology. (2020). *White Blood Cells (WBCs)*. /
48. Nayak, M. K., Singh, J., Singh, B., Soni, S., Pandey, V. S., & Tyagi, S. (2017). Introduction to semiconductor nanomaterial and its optical and electronics properties. In *Metal Semiconductor Core-Shell Nanostructures for Energy and Environmental Applications* (pp. 1–33). Elsevier.
49. Naz, S., Imran, M., Rauf, A., Orhan, I. E., Shariati, M. A., Iahtisham-UI-Haq, IqraYasmin, Shahbaz, M., Qaisrani, T. B., Shah, Z. A., Plygun, S., & Heydari, M. (2019). Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties. *Life Sciences*, 235, 116797.
50. Oliyapour, Y., Dabiri, S., Molavi, O., Hejazi, M. S., Davaran, S., Jafari, S., & Montazersaheb, S. (2023). Chrysin and chrysin-loaded nanocarriers induced immunogenic cell death on B16 melanoma cells. *Medical Oncology*, 40(10), 278.
51. Pondman, K., Le Gac, S., & Kishore, U. (2023). Nanoparticle-induced immune response: Health risk versus treatment opportunity? *Immunobiology*, 228(2), 152317.
52. Romero, G., & Moya, S. E. (2012). Chapter 4 - Synthesis of Organic Nanoparticles. In *Frontiers of Nanoscience* (Vol. 14).

53. **Rostami, E. (2022).** Recent achievements in sodium alginate-based nanoparticles for targeted drug delivery. *Polymer Bulletin*, 79(9), 6885–6904.
54. **Sajid, M., & Plotka-Wasyłka, J. (2020).** Nanoparticles: Synthesis, characteristics, and applications in analytical and other sciences. *Microchemical Journal*, 154.
55. **Sanità, G., Carrese, B., & Lamberti, A. (2020).** Nanoparticle Surface Functionalization: How to Improve Biocompatibility and Cellular Internalization. In *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 7). Frontiers Media S.A.
56. **Sarah Knapp. (2021).** White Blood Cell. *Biology Dictionary*.
57. **Sentis, Matthias. P. L., Feltin, N., Lambeng, N., Lemahieu, G., Brambilla, G., Meunier, G., & Chivas-Joly, C. (2024).** Investigation of nanoparticle dispersibility and stability based on TiO<sub>2</sub> analysis by SMLS, DLS, and SEM. *Journal of Nanoparticle Research*, 26(3), 55.
58. **Silva, S., Almeida, A. J., & Vale, N. (2019).** Combination of cell-penetrating peptides with nanoparticles for therapeutic application: A review. In *Biomolecules* (Vol. 9, Issue 1). MDPI AG.
59. **Soo Choi, H., Liu, W., Misra, P., Tanaka, E., Zimmer, J. P., Ity Ipe, B., Bawendi, M. G., & Frangioni, J. V. (2007).** Renal clearance of quantum dots. *Nature Biotechnology*, 25(10), 1165–1170.
60. **Stompor-Gorać, M., Bajek-Bil, A., & Machaczka, M. (2021).** Chrysin: Perspectives on Contemporary Status and Future Possibilities as Pro-Health Agent. *Nutrients*, 13(6), 2038.
61. **Tarrahi, R., Fathi, Z., Seydibeyoğlu, M. Ö., Doustkhah, E., & Khataee, A. (2020).** Polyhydroxyalkanoates (PHA): From production to nanoarchitecture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, 596–619.
62. **Tigner, A., Ibrahim, S. A., & Murray, I. V. (2024).** *Histology, White Blood Cell*.
63. **Wang, H., Zang, J., Zhao, Z., Zhang, Q., & Chen, S. (2021).** The Advances of Neutrophil-Derived Effective Drug Delivery Systems: A Key Review of Managing Tumors and Inflammation. *International Journal of Nanomedicine, Volume 16*, 7663–7681.
64. **Yetişgin, A. A., Cetinel, S., Zuvin, M., Kosar, A., & Kutlu, O. (2020).** Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 9). MDPI AG.
65. **Yujun Zhang. (2022).** Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps in Gastrointestinal Tumors: A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences* 24(1):334 24(1):334.
66. **Zhang, H., Cheng, J., & Ao, Q. (2021).** Preparation of Alginate-Based Biomaterials and Their Applications in Biomedicine. *Marine Drugs*, 19(5), 264.
67. **Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020).** Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, 25(16), 3731.