



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Βιολογική Αξιολόγηση
τροποποιημένων και μη Μαγνητικών Νανοσωματιδίων
Οξειδίου του Σιδήρου για Βιολογικές Εφαρμογές**

**ΔΑΝΑΗ ΠΡΟΚΟΠΙΟΥ
ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΑΠΡΙΛΙΟΣ 2018

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Βιολογική Αξιολόγηση τροποποιημένων και μη Μαγνητικών Νανοδομημάτων Οξειδίου του Σιδήρου για Βιολογικές Εφαρμογές

ΔΑΝΑΗ ΠΡΟΚΟΠΙΟΥ

A.M.: 161811

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ελένη Ευθυμιάδου, Επίκουρος Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Ελένη Ευθυμιάδου, Επίκουρος Καθηγήτρια ΕΚΠΑ
2. Χριστιάνα Μητσοπούλου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ
3. Παναγιώτης Κυρίτσης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 18/05/2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια τα μαγνητικά νανοσωματίδια ελκύουν όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας εξαιτίας της πληθώρας εφαρμογών σε πολλά πεδία της βιοϊατρικής για την καταπολέμηση διαφόρων ασθενειών, όπως ο καρκίνος. Στη παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η μελέτη μαγνητικών νανοσωματιδίων γυμνών και επικαλυμμένων, καθώς και νανοσωματιδίων ενθυλακωμένων σε πολυμερικές νανόσφαιρες. Η σύνθεση των μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης ένυδρων αλάτων του Fe^{2+} και Fe^{3+} σε αλκαλικό περιβάλλον με την προσθήκη αμμωνίας, δημιουργώντας έτσι τα «γυμνά» μαγνητικά νανοσωματίδια (mNPs). Βασική πρόκληση είναι η προστασία τους από την οξείδωση, καθώς και η σταθεροποίησή τους ως κολλοειδή διαλύματα στα βιολογικά συστήματα. Για τον λόγο αυτό, με την ίδια μέθοδο της συγκαταβύθισης πραγματοποιήθηκε η σύνθεση δύο επιπλέον ειδών μαγνητικών νανοσωματιδίων, τα επικαλυμμένα με τρινάτριο άλας του κιτρικού οξέος (mNPs@citrate) και αυτά που εμπεριέχουν βοροϋδρίδιο του νατρίου (mNPs@NaBH₄). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ενθυλάκωση των μαγνητικών νανοσωματιδίων σε συμπολυμερή P(MMA-co-EGMA) με τη μέθοδο ριζικού πολυμερισμού καταβύθισης μέσω απόσταξης. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα μελέτης κυτταροτοξικότητας με τη χρωματομετρική μέθοδο MTT σε τέσσερις κυτταρικές σειρές, υγιών (NCTC, HEK-293) και καρκινικών (A375-M6, U87-MG) κυττάρων, καθώς και μελέτη της ακεραιότητας του κυτταροσκελετού σε δυο από αυτές (NCTC, A375-M6) μέσω της συνεστιακής μικροσκοπίας. Η μελέτη αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι μετά την κατεργασία των κυττάρων με mNPs, τα καρκινικά κύτταρα A375-M6 οδηγούνται σε απόπτωση. Τέλος, βιολογική αξιολόγηση των mNPs έγινε και με τη διαδικασία επούλωσης πληγών, ενός πειράματος που είναι εξειδικευμένο και απευθύνεται κυρίως σε επιδερμικά κύτταρα.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ : Νανοτεχνολογία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ : Σίδηρος, Οξείδια του σιδήρου, Κολλοειδή, Πολυμερή, Απεικόνιση,

Υπερθερμία, Καρκινικά κύτταρα, Τοξικότητα

ABSTRACT

In recent years, magnetic nanoparticles have become more and more attractive to the scientific community because of their applications on the field of biomedicine against many diseases such as cancer. These applications concern the use of magnetic nanoparticles for therapy, as contrast agents in the magnetic resonance imaging technique as well as ferro fluid in magnetic hyperthermia. The purpose of this work is the synthesis, characterization and biological evaluation of magnetic nanoparticle (mNPs). Based on that, bare, surface modified and encapsulated mNPs in polymeric nanospheres were synthesized. Moreover, biological evaluation was carried out in cells as well as hyperthermia studies performed in ferro fluids. In mNPs, the synthesis was carried out with co precipitation method in alkaline environment by using iron salts of Fe^{2+} and Fe^{3+} in water, thus creating "bare" magnetic nanoparticles (mNPs). The main challenge is to protect them from oxidation and their stability as colloids in biological systems. In order to achieve these properties, modified by citrate and sodium borohydride co-precipitation methodology it is used. Finally, three types of magnetic nanoparticles resulted, citrate-coated (mNPs@citrate) and sodium borohydride (mNPs@NaBH₄). Encapsulation of magnetic nanoparticles into P(MMA-co-EGMA) polymeric nanospheres was performed by distillation precipitation polymerization process. These spheres are capable of being used as drug delivery systems for cancer treatment, since in their cavity it will be able to encapsulate desirable drugs. Toxicity is a very important factor to be taken into account when nanoparticles are intended for biomedical applications. Cytotoxicity study were performed using the MTT assay in four cell lines, healthy (NCTC, HEK) and cancerous (A375-M6, U87) cells. To study the integrity of the cytoskeleton after treatment with mNPs in epidermal cell lines (NCTC, A375-M6) fluorescent microscopy was used. To sum up, after mNPs treatment, the cells led to apoptosis. Finally, an additional biological evaluation of mNPs was carried out in epidermal cells, called wound healing process.

SUBJECT AREA: Nanotechnology

KEYWORDS: Iron, Iron Oxides, Colloidal, Polymers, Contrast Agent, Hyperthermia, Toxicity, Cancer Cells

*Στους ανθρώπους που είναι πάντα εκεί για μένα και με στηρίζουν σε ό,τι
χρειαστώ, στους γονείς Βαγγέλη και Κατερίνα, την αδερφή μου Χριστίνα, καθώς
και τους παππούδες μου, Νίκο και Κασσιανή.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την υλοποίηση και διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου στην Επίκουρο Καθηγήτρια Βιοανόργανης Χημείας, Ελένη Ευθυμιάδου του Τομέα Ανόργανης Χημείας, Τμήμα Χημείας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και συνεργαζόμενη ερευνήτρια του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω το όνειρό μου, καθώς και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την ολοκλήρωση των πειραμάτων, την συνεχή παρουσία της σε κάθε βήμα, δίνοντάς μου πολύτιμες συμβουλές. Η καθοδηγησή της οδήγησε στην ολοκλήρωση της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Καθηγήτρια Χριστίνα-Άννα Μητσοπούλου, Καθηγήτρια Ανόργανης Χημείας, του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, καθώς και στον Αναπληρωτή Καθηγητή του τομέα της Ανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας Παναγιώτη Κυρίτση, που δέχτηκαν να είναι στην επιτροπή, καθώς και για τις χρήσιμες επισημάνσεις και διορθώσεις προκειμένου να βελτιωθεί η ποιότητα της παρούσας εργασίας.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της ομάδας του εργαστηρίου και φίλες μου, Μαρία Θεοδοσίου, Έλλη Μιχαηλίδη και Δώρα Κούτσικου, για την πολύτιμη βοήθειά τους και τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε κατά την διάρκεια αυτών των δύο χρόνων.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Dr. Anna Laurenzana, για τη συνεργασία της με την ομάδα του εργαστηρίου μας που πραγματοποιήθηκε μέσω της επισκεψής μου στο εργαστήριό της στο Τμήματος Βιοϊατρικής και Κλινικής Επιστήμης, του Πανεπιστημίου της Φλωρεντίας, και χρηματοδοτήθηκε από τη δράση COST (Cost Action TD1402- Multifunctional Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia and Indirect Radiation Therapy), το οποίο αφορά τη χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων για θεραπεία μέσω συνδυασμού υπερθερμίας και ραδιοθεραπείας. Τόσο η καθοδήγησή της, όσο και η υπέροχη φιλοξενία της στο εργαστήριο, με βοήθησε να αποκτήσω εμπειρία στα πειράματα βιολογικής αξιολόγησης.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τον φίλο μου Παναγιώτη, καθώς και τις παιδικές μου φίλες Δήμητρα και Βίκυ, για την αγάπη και την υπομονή τους την οποία εισπράττω καθημερινά και μου δίνουν τη δύναμη να συνεχίζω σε κάθε μου βήμα.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου, η οποία με την οικονομική αλλά και ψυχολογική τους υποστήριξη, με βοήθησαν να πραγματοποιήσω έναν από τους μεγαλύτερους στόχους της ζωής μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	21
Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	23
«Νανοτεχνολογία»	23
1.1 Ιστορική αναδρομή.....	23
1.2 Εισαγωγή στη νανοτεχνολογία.....	25
1.3 Νανοϋλικά-Ταξινόμηση και σύνθεση.....	26
1.4 Εφαρμογές την νανοτεχνολογίας	28
1.4.1.Εφαρμογές νανοτεχνολογίας στις βιοεπιστήμες.....	29
1.4.2. Εφαρμογές νανοτεχνολογίας στη νανοϊατρική	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	31
« Χημεία του σιδήρου»	31
2.1 Ιστορική αναδρομή μαγνητισμού.....	31
2.2 Φυσικοχημικές και μαγνητικές ιδιότητες σιδήρου	33
2.2.1 Μαγνητική ροπή.....	36
2.2.2 Μαγνήτιση.....	37
2.2.3. Μαγνητική διάκριση των υλικών-Σιδηρομαγνητικά υλικά	37
2.2.4 Βρόγχος υστέρησης.....	38
2.2.5 Μαγνητική ανισοτροπία	39
2.3 Μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου-Νανομαγνητισμός.....	39
2.3.1 Υπερμαγνητισμός (SPIONS)	41
2.3.2 Χρόνος εφησυχασμού.....	41
2.3.3 Θερμοκρασία ακινητοποίησης, T_B (Blocking Temperature)	42
2.4 Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων.....	43
2.4.1 Μέθοδος συγκαταβύθισης	45
2.4.2 Επικάλυψη και σταθεροποίηση μαγνητικών νανοσωματιδίων	48

2.5 Εφαρμογές μαγνητικών νανοσωματιδίων	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	52
«Βιοεφαρμογές νανοϋλικων»	52
3.1. Βιολογική σημασία του σιδήρου σε ζωντανούς οργανισμούς.....	52
3.2 Στοχευμένη θεραπεία κατά του καρκίνου	54
3.2.1 Σύγχρονη θεραπεία με χρήση νανοσωματιδίων	54
3.2.2 Αλληλεπιδράσεις νανοσωματιδίων με βιολογικά συστήματα	55
3.3 Πολυμερή.....	58
3.3.1. Επικάλυψη μαγνητικών νανοσωματιδίων με μόρια βιολογικού ενδιαφέροντος	60
3.4 Μαγνητικά νανοσωματίδια επικαλυμμένα με συμπολυμερές (MAA-g-PEG) για τη δημιουργία ‘κενών’ πολυμερικών μαγνητικών σφαιρών.....	61
3.5 Θεραπευτικές και διαγνωστικές εφαρμογές των νανοσωματιδίων του σιδήρου ...	64
3.5.1 Στοχευμένη θεραπεία παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου	64
3.5.2 Μαγνητική τομογραφία - Απεικόνιση με μαγνητικό συντονισμό (MRI)	65
3.5.3 Μαγνητική Υπερθερμία	66
3.5.4 Καταπολέμηση του καρκίνου με χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων από την εταιρία MagForce AG.....	68
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	70
«Τεχνικές Χαρακτηρισμού και αντιδραστήρια».....	70
4.1 Δομικός και μορφολογικός χαρακτηρισμός	70
4.1.1 Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμός Fourier (FT-IR)	70
4.1.2 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)	71
4.1.3 Περίθλαση Ακτίνων-X (X-Ray Diffraction, XRD)	71
4.1.4 Μαγνητομετρία δονούμενου δείγματος, Vibrating Sample Magnetometry (VSM)	73
4.1.5 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)	74
4.1.6 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)	75

4.1.7 Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM).....	76
4.2 Τεχνικές και μέθοδοι Βιολογικής αξιολόγησης.....	78
4.2.1 Συνεστιακή Μικροσκοπία Σάρωσης με Ακτίνες Laser (Confocal Laser Scanning Microscopy)	78
4.2.2 Δοκιμασία MTT	79
4.2.3 Δοκιμασία επούλωσης πληγών (wound healing assay).....	81
4.3 Αντιδραστήρια και Υλικά	83
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	84
«Σύνθεση Μαγνητικών νανοσωματιδίων».....	84
5.1 Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου.....	84
5.1.1 Σύνθεση «γυμνών» μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (mNPs), (1).....	84
5.1.2 Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με τρινάτριο άλατος του κιτρικού οξέος (mNPs@citrate), (2).....	85
5.1.3 Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με τρινάτριο άλατος του κιτρικού και βοροϋδρίδιο του νατρίου, (mNPs@NaBH ₄) (3)..	87
5.2 Σύνθεση πολυμερικών νανοσφαιρών και ενθυλάκωση μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου P(MAA-co-PEG)@mNPs, P(MAA-co-PEG)@mNPs@citrate, P(MAA-co-PEG)@mNPs@NaBH ₄	89
5.2.1 Σύνθεση σφαιρών πολύ-μεθακρυλικού οξέος P(MAA)	90
5.2.2 Σύνθεση του pH-ευαίσθητου κελύφους με διασταυρούμενη σύνδεση, P(MAA-co-PEG).....	90
5.2.3 Εκδίωξη του πυρήνα-Απομόνωση κενών νανοσφαιρών με ενθυλακωμένα νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου.....	91
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	92
«Δομικός και μορφολογικός χαρακτηρισμός των νανοϋλικών»	92
6.1 Μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (mNPs, mNPs@citrate, mNPs@NaBH ₄).....	92
6.1.1 Δομικός Χαρακτηρισμός	92

6.1.2 Μορφολογικός Χαρακτηρισμός των συνθετικών νανοσωματιδίων μέσω μικροσκοπίας διαπερατότητας (TEM).....	100
6.2 Πολυμερικές σφαίρες	101
6.2.1 Δομικός χαρακτηρισμός.....	101
6.2.2 Μορφολογικός χαρακτηρισμός μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM)	104
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	108
«Βιολογική αξιολόγηση – <i>In vitro</i> μελέτες».....	108
7.1 Κυτταρικές καλλιέργειες	108
7.2. Δοκιμασία MTT	109
7.2 Δοκιμασία επούλωσης πληγών (wound healing assay)	111
7.3 Συνεστιακή Μικροσκοπία Σάρωσης (Confocal).....	115
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.....	119
«Συμπεράσματα»	119
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	121
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	123
ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	125

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Συσχέτιση μορίων και υλικών στις διαστάσεις του νανομέτρου[3]	23
Εικόνα 2: Ταξινόμηση νανοϋλικών	27
Εικόνα 3: Α) Ηλεκτρονιακή δομή ατόμου σιδήρου και Β) κομμάτια σιδήρου[17]	33
Εικόνα 4: Σιδηρομαγνητική διάταξη των spin στον μαγνητίτη.....	34
Εικόνα 5: Κρυσταλλική δομή (Α) Μαγνητίτη (Β) Μαγκεμίτη (κόκκινα: άτομα οξυγόνου, πράσινα: άτομα Fe^{3+} , μαύρα: άτομα Fe^{2+})[20]	35
Εικόνα 6: Βρόγχος υστέρησης [22].....	39
Εικόνα 7: Απεικόνιση τμημάτων μαγνητικών νανοσωματιδίων	40
Εικόνα 8: Μέθοδος συγκαταβύθισης	46
Εικόνα 9: Ηλεκτροστατικές απωθήσεις μεταξύ των νανοσωματιδίων.....	50
Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση διαφόρων εφαρμογών, δομικών μετασχηματισμών και επιφανειακές αλληλεπιδράσεις νανοκλίμακας οξειδίου του σιδήρου νανοσωματίδια. ...	56
Εικόνα 11: Ο χημικός τύπος της πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG).....	61
Εικόνα 12: Ριζικός πολυμερισμός καθίζησης μέσω απόσταξης	62
Εικόνα 13: Μηχανισμός δημιουργίας ρίζας του AIBN κατά το στάδιο της εκκίνησης του πολυμερισμού	62
Εικόνα 14: Απεικόνιση μεθακρυλικού οξέος.....	63
Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση μαγνητικού τομογράφου.[70].....	66
Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση μερικών από τα μοναδικά πλεονεκτήματα των μαγνητικών νανοϋλικών για τη θεραπεία με βάση την υπερθερμία και την ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκων.	68
Εικόνα 17: Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης και μέρη τα οποία αποτελείται.....	71
Εικόνα 18: Περίθλαση ακτίνων Χ σε κρύσταλλο	72
Εικόνα 19: X-ray diffractometer Agilent Technologies Super Nova, με το οποίο πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις για την παρούσα ερευνητική εργασία.	73
Εικόνα 20: Διάγραμμα λειτουργίας ενός SEM	76
Εικόνα 21: Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM)	78
Εικόνα 22: Πλάκα επίστρωσης κυττάρων για την αξιολόγηση της ζωτικότητας των κυττάρων. Η ένταση του χρώματος σχετίζεται με την ζωτικότητα των κυττάρων.	81
Εικόνα 23: Ενζυμική αναγωγή MTT σε φορμαζάνη.....	81
Εικόνα 24: Μηχανισμός επούλωσης ιστών	82
Εικόνα 25: Καθαρισμός νανοσωματιδίων μέσω μαγνητικού διαχωρισμού	85
Εικόνα 26: Σχηματική αναπαράσταση των μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου χωρίς επικάλυψη	85
Εικόνα 27: Σχηματική αναπαράσταση κιτρικού ανιόντος.....	86
Εικόνα 28: Σχηματική αναπαράσταση των μαγνητικών νανοσωματιδίων επικαλυμμένων με τρινάτριο άλατος του κιτρικού οξέος (mNPs@citrate).....	87
Εικόνα 29: Μαγνητική συμπεριφορά των νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με τρινάτριο άλατος του κιτρικού οξέος, παρουσία μόνιμου μαγνήτη (mNPs@citrate).....	87
Εικόνα 30: Συντακτικός τύπος του βοροϋδριδίου του νατρίου.....	88

Εικόνα 31: Μαγνητική συμπεριφορά των νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με τρινάτριο άλατος του κιτρικού οξέος και βοροϋδρίδιο του νατρίου, παρουσία μόνιμου μαγνήτη (mNPs@NaBH ₄)	88
Εικόνα 32: Εικόνες TEM των mNPs, όπου το μέγεθος τους είναι 12nm.....	100
Εικόνα 33: Εικόνες TEM των mNPs@citrate των οποίων το μέγεθος είναι 9nm	100
Εικόνα 34: Εικόνες TEM mNPs@NaBH ₄ των οποίων το μέγεθος υπολογίστηκε περί τα 5nm	101
Εικόνα 35: SEM πολυμερικών νανοσφαιρών Α) P(MAA), Β) P(MAA-co-PEG), Γ) P(MAA-co-PEG) @mNPs	105
Εικόνα 36: SEM πολυμερικών νανοσφαιρών Α) P(MAA), Β) P(MAA-co-PEG), Γ) P(MAA-co-PEG) @mNPs@citrate	106
Εικόνα 37: SEM πολυμερικών νανοσφαιρών Α) P(MAA), Β) P(MAA-co-PEG), Γ) P(MAA-co-PEG) @mNPs@NaBH ₄	107
Εικόνα 38: Πείραμα επούλωσης πληγών για την κυτταρική σειρά NCTC την χρονική στιγμή t=0.....	112
Εικόνα 39: Πείραμα επούλωσης πληγών στα κύτταρα NCTC μετά από 24 ώρες επώαση	113
Εικόνα 40: NCTC μετά από 48 ώρες επώασης	113
Εικόνα 41: Κυτταρική σειρά A375-M6 την χρονική στιγμή t=0.....	114
Εικόνα 42: Πειράματα επούλωσης πληγών σε κύτταρα A375-M6 μετά από 24 ώρες επώαση.....	114
Εικόνα 43: Περιγραφή πρωτοκόλλου διαδικασίας συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης	116
Εικόνα 44: Συνεστιακή μικροσκοπία στα NCTC κύτταρα	117
Εικόνα 45: Παρατήρηση των A375-M6 και μελέτη του μηχανισμού δράσης.	118
Εικόνα 46: Μονοπάτια κυτταρικής απόπτωσης.....	118

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας σύνθεσης πολυμερικών νανοσφαιρών με εγκλωβισμένα νανοσωματίδια σιδήρου.....	89
Σχήμα 2: Διάγραμμα FT-IR των mNPs, mNPs@citrate, mNPs@NaBH ₄	93
Σχήμα 3: Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των mNPs, mNPs@citrate, mNPs@NaBH ₄	94
Σχήμα 4: Διαγράμματα XRD A) πρότυπο μαγνητίτη, B) mNPs, Γ) mNPs@citrate, Δ) mNPs@NaBH ₄	95
Σχήμα 5: Διάγραμμα βρόγχου υστέρησης των mNPs	96
Σχήμα 6: Διαγραμματική αναπαράσταση της θερμοκρασίας σε συνάρτηση με τον χρόνο	98
Σχήμα 7: Διαγράμματα δυναμικής σκέδασης φωτός, A) mNPs, B) mNPs@citrate, Γ) mNPs@NaBH ₄	99
Σχήμα 8: Διάγραμμα FT-IR των P(MAA-co-PEG)@mNPs, καθώς και mNPs	101
Σχήμα 9: Διάγραμμα FT-IR των P(MAA-co-PEG)@mNPs@citrate, καθώς και mNPs@citrate	102
Σχήμα 10: Διάγραμμα FT-IR P(MAA-co-PEG)@mNPs@NaBH ₄ , καθώς και mNPs@NaBH ₄	102
Σχήμα 11: Διαγράμματα δυναμικής σκέδασης φωτός, A) P(MAA-co-PEG)@ mNPs, B)P(MAA-co-PEG)@mNPs@citrate Γ) P(MAA-co-PEG)@mNPs@NaBH ₄	103
Σχήμα 12: Δοκιμασία MTT A), B) HEK, Γ), Δ)U-87, των νανοϋλικών	110
Σχήμα 13: Δοκιμασία MTT A), B) NCTC, Γ), Δ) A375-M6, των νανοϋλικών.....	111

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ιδιότητες οξειδίων του σιδήρου	36
Πίνακας 2: Απόδοση κορυφών φασματοσκοπίας UV-vis	94
Πίνακας 3: Αποτελέσματα από διαγράμματα δυναμικής σκέδασης φωτός.....	99
Πίνακας 4: Αποτελέσματα από διαγράμματα δυναμικής σκέδασης φωτός για τις πολυμερικές νανόσφαιρες	104
Πίνακας 5: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων	121
Πίνακας 6: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους.....	123

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε σε συνεργασία του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών του Τομέα Ανόργανης Χημείας και του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» με επιστημονική υπεύθυνη την Επ. Καθηγήτρια Ελένη Ευθυμιάδου του οποίου είναι επίσης επιστημονικός συνεργάτης. Το πειραματικό μέρος πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο «Sol-Gel» του οποίου προϊστάται ο Δρ. Γεώργιος Μήτρικας.

Μέρος των πειραμάτων βιολογικής αξιολόγησης πραγματοποιήθηκαν στο Πανεπιστήμιο της Φλωρεντίας του Τμήματος Βιοϊατρικής και Κλινικής Επιστήμης, με χρηματοδότηση στο πλαίσιο του προγράμματος, COST Action TD1402- Multifunctional Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia and Indirect Radiation Therapy (RADIOMAG).

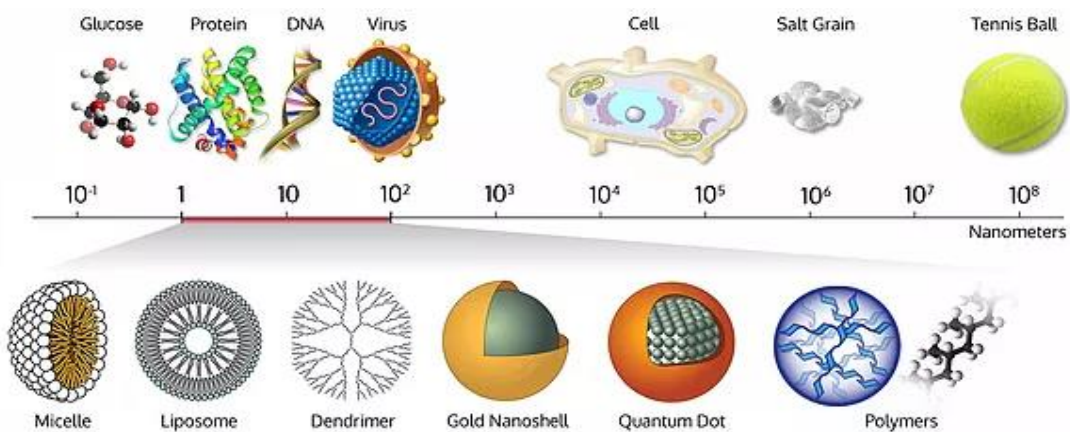
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

«Νανοτεχνολογία»

1.1 Ιστορική αναδρομή

Η επιστήμη της νανοτεχνολογίας ασχολείται με την έρευνα, την παραγωγή αλλά και την χρήση ιδιαίτερα μικρών δομών η οποία βασίζεται κατά κύριο λόγο στη χημεία των υλικών. Το πρόθεμα 'νάνο', τονίζει τις πολύ μικρές διαστάσεις των υλικών και οι όροι νανοτεχνολογία καθώς και νανοϋλικά, που θα αναλυθούν παρακάτω εκτενέστερα, το εμπεριέχουν. Ένα νανόμετρο είναι ένα εκατομμυριοστό του χιλιοστομέτρου, ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) και αντιστοιχεί στο ένα δεκακισχιλιοστό του πάχους μιας ανθρώπινης τρίχας. Οι παραπάνω διαστάσεις, λοιπόν, αφορούν τον μικρότερο τομέα των ατόμων και των μορίων.[2]



Εικόνα 1: Συσχέτιση μορίων και υλικών στις διαστάσεις του νανομέτρου[3]

Είναι γνωστό πως οι εφαρμογές της νανοτεχνολογίας, όπως συμβαίνει και με πολλές άλλες τεχνολογίες, βρίσκονταν σε χρήση αιώνες πριν οριστικοποιηθεί ο τομέας, χρησιμοποιώντας τον σε μεγάλο βαθμό στην αρχαιότητα, χωρίς να γνωρίζουν την ύπαρξή του. Αν και δεν ήταν γνωστά τότε τα φυσικά φαινόμενα ώστε να ερμηνευθούν, χρησιμοποιούσαν ωστόσο νανοσωματίδια χρυσού ένθετα σε γυαλί για να αλλάξουν τις οπτικές ιδιότητες υλικών. Γνωστό παράδειγμα, το οποίο χρονολογείται ήδη από τον 4^ο αιώνα μ.Χ., είναι η «Κούπα του Λυκούργου», η οποία αποτελείται από διχρωμική ύαλο, η οποία, ανάλογα με τη γωνία πρόσπτωσης του φωτός που πέφτει επάνω του, αλλάζει το

χρώμα του. Αντίστοιχες κατασκευές έγιναν την περίοδο του Μεσαίωνα από υαλοτεχνίτες για τη δημιουργία των βυτρώ, όπου γινόταν χρήση αλάτων διαφόρων μετάλλων μαζί με τετηγμένο γυαλί ώστε να του δώσουν διαφορετικά χρώματα.[4]

Ο τριχλωριούχος χρυσός για παράδειγμα, έδινε το κόκκινο χρώμα, ο νιτρικός άργυρος κίτρινο χρώμα, ενώ άλατα χαλκού μπλε ή πράσινο, ανάλογα με την οξειδωτική τους κατάσταση. Σήμερα γνωρίζουμε ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων επηρεάζει τις οπτικές τους ιδιότητες (quantum size effect) και κατά συνέπεια το χρώμα.

Από τους πρώτους συνεισφέροντες στον τομέα της νανοτεχνολογίας, είναι ο James Clark Maxwell, όταν πρότεινε πείραμα στο οποίο μια μικρή οντότητα ήταν ικανή να χειρίζεται μεμονωμένα μόρια και ιδιότητες.[5] Η πρώτη επιστημονική αναφορά της νανοτεχνολογίας έγινε σε ομιλία που έκανε ο Richard Feynman, το 1959, με τίτλο «Υπάρχει πολύς χώρος στον Πάτο», όπου και περιέγραψε μια διαδικασία με την οποία ήταν εφικτός ο χειρισμός μεμονωμένων ατόμων και μορίων σε μικρή κλίμακα, καθώς και πώς τα φυσικά φαινόμενα αλλάζουν την εκδήλωσή τους ανάλογα με την κλίμακα.[6]

Θεμέλιο στην εξέλιξη της νανοτεχνολογίας αποτέλεσε η ανακάλυψη του Michael Faraday του κολλοειδούς 'ρουμπινί' χρυσού. Στην παρουσίαση της εργασίας του, στις 5 Φεβρουαρίου 1857, με τίτλο «The Bakerian Lecture»-«Πειραματική Σχέση του Χρυσού, καθώς και άλλων μετάλλων με το Φως», συζήτησε την επίδραση του φωτός στα μεταλλικά σωματίδια, τα οποία ήταν πολύ μικρότερα από το μήκος κύματος του φωτός και ιδιαίτερα τα σωματίδια χρυσού, διότι «ήδη γνωστά φαινόμενα φάνηκαν να υποδεικνύουν ότι ακόμη και ελάχιστη μεταβολή του μεγέθους τους, οδηγούσε σε ποικιλία διαφορετικών χρωμάτων». Παρότι η έννοια των κολλοειδών ορίστηκε λίγο αργότερα, από τον Thomas Graham το 1861, η έρευνα του Faraday στάθηκε σημείο αναφοράς της επιστήμης των κολλοειδών και κυρίως όσον αφορά τη συμπεριφορά των μεταλλικών σωματιδίων, των εναιωρημάτων τους και τον επακόλουθο σχηματισμό μεταλλικών υμενίων.[7]

Ο ορισμός της νανοτεχνολογία διατυπώθηκε για πρώτη φορά από τον Norio Taniguchi, Καθηγητής του Πανεπιστημίου Επιστημών του Τόκυο το 1974 ως εξής: «Η νανοτεχνολογία αφορά κυρίως την επεξεργασία, το διαχωρισμό και την παραμόρφωση

υλικών από ένα άτομο ή ένα μόριο». Επίσης το 1974 αναπτύχθηκε από τους Dr. Tuomo Suntola και τους συνεργάτες τους στη Φινλανδία, η μέθοδος εναπόθεσης ατομικών στρωμάτων που χρησιμοποιείται στα λεπτά υμένια.[8]

Το 1980 ο όρος νανοτεχνολογία που είχε ως αντικείμενο τη μελέτη μεμονωμένων ατόμων και μορίων εξερευνήθηκε εις βάθος από τον Dr. K. Eric Drexler, ο οποίος προήγαγε την τεχνολογική σπουδαιότητα των συσκευών και φαινομένων της νανοκλίμακας μέσω διαφόρων ομιλιών και βιβλίων που εξέδωσε. Στη διάδοση του όρου νανοτεχνολογία βοήθησε η γένεση της επιστήμης των cluster, καθώς επίσης και η ανακάλυψη του μικροσκοπίου STM (Scanning Tunneling Microscope) που πραγματοποιήθηκε επίσης το 1980.

Σημαντική πρόοδος σημειώθηκε από την εταιρία IBM (International Business Machines), το 1990. Μια άλλη σημαντική ανακάλυψη ήρθε το 1985, με την εύρεση νέων σχημάτων για μόρια άνθρακα, τα οποία οδήγησαν το 1991 στην ανακάλυψη ενός μοριακού συστήματος γνωστού σήμερα ως νανοσωλήνες άνθρακα. Παράλληλα οι μελέτες των νανοκρυστάλλων (semiconductor nanocrystals), οδήγησαν στην ανάπτυξη κβαντικών τελειών (quantum dots).[9]

1.2 Εισαγωγή στη νανοτεχνολογία

Σήμερα, λοιπόν, ως νανοτεχνολογία ορίζεται η δυνατότητα ελέγχου αλλά και χειρισμού υλικών σε ατομική κλίμακα, με στόχο την παραγωγή δομών με πρωτότυπες ιδιότητες και λειτουργίες οι οποίες οφείλονται στο μέγεθος και στο σχήμα τους. Γενικά ενώ η νανοεπιστήμη βασίζεται στη μελέτη και κατανόηση της φύσης σε πολύ μικρή κλίμακα, νανοτεχνολογία σημαίνει η άμεση εφαρμογή της νανοεπιστήμης στην ανάπτυξη νέων προϊόντων, έρευνας και υψηλής τεχνολογίας, αποτελώντας έναν από τους κορυφαίους τομείς της έρευνας και ανάπτυξης στη σημερινή εποχή.

Στο πεδίο της νανοτεχνολογίας οι δομές συνήθως έχουν μέγεθος μικρότερο των 300 nm. Για παράδειγμα, εάν συγκριθεί η διατομή μιας ανθρώπινης τρίχας είναι περίπου 60.000 nm, ενός μορίου DNA από 2 έως 2,5 nm, και ενός μορίου νερού σχεδόν 0,3 nm. Ο σχεδιασμός, λοιπόν, καθώς και η σύνθεση των υλικών σε μοριακό αλλά και ατομικό επίπεδο μπορούν να θεωρηθούν ως κλάδοι της νανοτεχνολογίας.[10] Η ύλη, στα

επίπεδα που την μελετά η νανοτεχνολογία, εμφανίζει ιδιότητες κβαντικής φύσεως, διαφορετικές από τις ιδιότητες των μακροσκοπικών μεγεθών που συναντάνε συχνά οι άνθρωποι στην καθημερινή τους ζωή. Μπορεί λοιπόν να εξαχθεί το συμπέρασμα, ότι η νανοτεχνολογία, αποτυπώνεται με ένα διεπιστημονικό χαρακτήρα εξαιτίας του γεγονότος ότι επιτυγχάνεται κατάλληλος συνδυασμός με άλλες επιστήμες, όπως η χημεία, βιολογία και κβαντική φυσική. Οι παραπάνω επιστήμες διαθέτουν δομές που απαρτίζονται από την ίδια νανοκλίμακα.

Ο στόχος της νανοτεχνολογίας είναι να δώσει εξηγήσεις σε μέχρι σήμερα αναπάντητα ερωτήματα, καθώς και να επιλύσει πολλές προκλήσεις που έχουν απασχολήσει κατά καιρούς τον άνθρωπο, σε τομείς όπως η ιατρική, η προστασία του περιβάλλοντος και άλλα. Το κύριο ερώτημα που προκύπτει αφορά την χρήση της νανοτεχνολογίας σε καθημερινή βάση ούτως ώστε να βελτιωθεί η ζωή των ανθρώπων, καθώς και το επιστημονικό υπόβαθρο.

1.3 Νανοϋλικά-Ταξινόμηση και σύνθεση

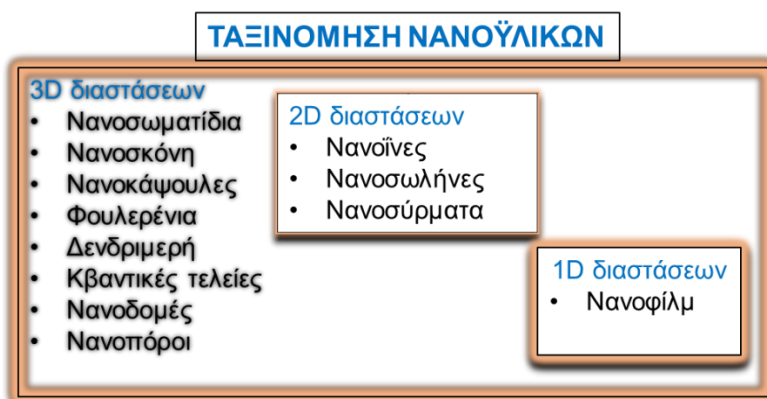
Ως νανοϋλικά ορίζονται οι φυσικές ουσίες οι οποίες έχουν τουλάχιστον τη μια από τις διαστάσεις τους μεταξύ 1-150 nm. Τα νανοϋλικά χωρίζονται σε δυο κατηγορίες:

1. Τα οργανικά, όπως τα φουλερένια, τα πολυμερικά μικκύλια και οι σταυροσυνδεδεμένες δομές. Τα φουλερένια, είναι αλλοτροπικές μορφές του άνθρακα που εννοιολογικά είναι φύλλα γραφενίου τυλιγμένα σε σωληνάκια ή σφαίρες. Αυτά περιλαμβάνουν νανοσωλήνες άνθρακα (ή νανοσωλήνες πυριτίου) που είναι ενδιαφέροντες εξαιτίας της μηχανικής τους αντοχής και των ηλεκτρικών τους ιδιοτήτων.
2. Ανόργανα, τα οποία παρασκευάζονται από άλατα μετάλλων.

Τα παραπάνω υλικά, εμφανίζουν ιδιότητες διαφορετικές από αυτές των ατόμων και των "bulk" ογκωδών υλικών, και η μελέτη της ανάπτυξής τους, συμβάλλει σε πολλά επιστημονικά πεδία προκειμένου να επιτευχθεί το βέλτιστο δυνατό αποτέλεσμα.[11]

Σύμφωνα με το χώρο τον οποίον καταλαμβάνουν, τα νανοϋλικά μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις διαστάσεις. Πιο αναλυτικά, ξεκινώντας από ένα ογκώδες υλικό με τις τρεις του διαστάσεις στη μακροκλίμακα, είναι δυνατό με κατάλληλη επεξεργασία να

μειωθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό ο όγκος του κατά μία συγκεκριμένη διάσταση, μέχρι το πάχος του να φτάσει κάτω από τα 100 nm. Σε μία τέτοια περίπτωση, το υλικό από τρισδιάστατο (3-D) θα μπορούσε να θεωρηθεί ως υλικό δύο διαστάσεων (2-D), όπου με τη σμίκρυνση τα τροποποιεί και τα οδηγεί σε αλλαγή των διαστάσεων. Παράδειγμα τέτοιων νανοϋλικών αποτελούν τα λεπτά υμένια με πάχος μέχρι 1000 nm. Τα νανοδομημένα υλικά μπορούν να καταταχθούν σε τρεις κατηγορίες, τα πολυστρωματικά υμένια (1D), διατεταγμένες νανοδομές (2D) και τα νανοσωματίδια (3D).[12]



Εικόνα 2: Ταξινόμηση νανοϋλικών

Τα νανοσωματίδια, λοιπόν, είναι σταθερά, οργανικά ή ανόργανα σωματίδια με μεγέθη στην περιοχή των 10-1000 nm. Οι εφαρμογές των νανοσφαιρών ποικίλουν εξαιτίας των πολλών ιδιοτήτων τους όπως, μαγνητικές, οπτικές, θερμικές, ενεργειακές, περιβαλλοντικές, ηλεκτρονικές, μηχανικές και βιοϊατρικές.

Οι νανοσφαίρες, είναι σφαιρικά σωματίδια στην κλίμακα του νανομέτρου. Μπορεί να αποτελούνται από διάφορα υλικά όπως μέταλλα (σίδηρος, νικέλιο, κοβάλτιο, χρυσός, αλουμίνιο, τιτάνιο, πλατίνα, πυρίτιο κλπ), από κράματα μετάλλων (νικέλιο/κοβάλτιο, νικέλιο/πλατίνα) αλλά και από πολυμερή όπως πολυστυρένιο (Polystyrene), πολυμεθακρυλικός μεθυλεστέρας (Polymethylmethacrylate–PMMA) και άλλα.

Συνήθως, κατά την παρασκευή μεταλλικών νανοσφαιρών, καθώς και των κραμάτων τους, οι οποίες προορίζονται για βιοϊατρικές εφαρμογές, χρησιμοποιείται ως πυρήνας ή ως εξωτερική επιφάνεια κάποιο πολυμερές, το οποίο προσδίδει βιοσυμβατότητα με τον ανθρώπινο οργανισμό. Η σύνθεσή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο μεθόδους

οι οποίες εξαρτώνται από το πολυμερές το οποίο θα χρησιμοποιηθεί. Οι μέθοδοι αυτές είναι οι εξής:

- A. Ο πολυμερισμός γαλακτωμάτων
- B. Ο διεπιφανειακός πολυμερισμός

Για τα προσχηματισμένα πολυμερή, όμως, όπως βιοδιασπώμενοι πολυεστέρες και τα συμπολυμερή τους με πολυαιθυλενογλυκόλη (Poly Ethylene Glycole - PEG), η οποία χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία, η παρασκευή των νανοσφαιρών μπορεί να επιτευχθεί με τεχνικές όπως:

1. Γαλακτωματοποίηση/Εξάτμιση διαλύτη
2. Γαλακτωματοποίηση/Διάχυση διαλύτη
3. Διαχωρισμός με τη βοήθεια αλάτων
4. Αντικατάσταση διαλύτη ή αλλιώς νανοκαθίζηση

Με λίγα λόγια, η γαλακτωματοποίηση/εξάτμιση διαλύτη περιλαμβάνει δύο στάδια εκ των οποίων το πρώτο σχετίζεται με τη γαλακτωματοποίηση του πολυμερικού διαλύματος στην υδάτινη φάση, ενώ το δεύτερο αφορά την εξάτμιση του διαλύτη το οποίο οδηγεί στην καταβύθιση του πολυμερούς με τη μορφή νανοσφαιρών. Η αντικατάσταση του διαλύτη και η διεπιφανειακή εναπόθεση είναι παρόμοιες μέθοδοι, οι οποίες βασίζονται στην αυτόματη γαλακτωματοποίηση της οργανικής φάσης που βρίσκεται στο εσωτερικό και περιέχει το διαλυμένο πολυμερές και η οποία περικλείεται από την υδάτινη εξωτερική φάση. Ωστόσο η αντικατάσταση του διαλύτη σχηματίζει νανοσφαίρες ή νανοκάψουλες, ενώ με τη διεπιφανειακή εναπόθεση σχηματίζονται μόνο νανοκάψουλες. Στην τεχνική της γαλακτωματοποίησης/διάχυσης διαλύτη, το πολυμερές το οποίο είναι εγκλωβισμένο στην κάψουλα διαλύεται σε έναν διαλύτη, ο οποίος με τη σειρά του διαλύεται μερικώς στο νερό, όπως το ανθρακικό προπυλένιο και διαβρέχεται με το νερό για να εξασφαλιστεί το αρχικό θερμοδυναμικό ισοζύγιο και των δύο υγρών.[13]

1.4 Εφαρμογές την νανοτεχνολογίας

Η σταδιακή εξέλιξη της νανοτεχνολογίας στις μέρες μας, έχει συμβάλει και στην ανάπτυξη πολλών επιστημονικών πεδίων, δυο εκ των οποίων είναι οι βιοεπιστήμες και η νανοϊατρική. Ο όρος βιοεπιστήμες αναφέρεται σε επιστήμες οι οποίες ασχολούνται με ζωντανούς οργανισμούς όπως η βιολογία και η βιοτεχνολογία, ενώ ο όρος νανοϊατρική,

ο οποίος εισήλθε στο προσκήνιο με την ανακάλυψη της νανοτεχνολογίας, αναφέρεται στην εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στην ιατρική. Μέσω της νανοτεχνολογίας, λοιπόν, έχει αναπτυχθεί μία πληθώρα εφαρμογών που στόχο έχουν τη διάγνωση και τη θεραπεία σοβαρών ασθενειών που απαντώνται συχνά στις μέρες μας, όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, η νόσος Alzheimer και άλλες, που διερευνώνται μέχρι και σήμερα.[14]

1.4.1.Εφαρμογές νανοτεχνολογίας στις βιοεπιστήμες

- Φαρμακογονιδιωματική και Παρασκευή Φαρμάκων

Είναι η μελέτη της γενετικής κληρονομικότητας ενός ατόμου, η οποία επηρεάζει την αντίδρασή του κατά την χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής. Κύριως στόχος της φαρμακογονιδιωματικής είναι η παρασκευή φαρμάκων, τα οποία θα προσαρμόζονται στο γενετικό υλικό του κάθε ανθρώπου ξεχωριστά.

- Γονιδιακή θεραπεία

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία αλλά και την εξάλειψη ασθενειών όπως ο καρκίνος, το AIDS, αντικαθιστώντας τα γονίδια που είναι ελαττωματικά με φυσιολογικά.

1.4.2. Εφαρμογές νανοτεχνολογίας στη νανοϊατρική

Οι εφαρμογές της νανοτεχνολογίας στην ιατρική ποικίλουν σε σύγκριση με εκείνες στις βιοεπιστήμες, καθώς με την ανακάλυψη της νέας αλλά και πρωτοπόρας αυτής επιστήμης, η ιατρική ευνοήθηκε, ανακαλύπτοντας μεθόδους αλλά και εφαρμογές όπως είναι:

- Συστήματα μεταφοράς

Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιούνται νανοσωματίδια διαφόρων μεγεθών, 5-500 nm, και μορφολογιών για τη μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών σε συγκεκριμένη κυτταρική περιοχή, με στόχο την αποτελεσματική τους θεραπεία. Η παρασκευή των νανοσωματιδίων γίνεται με τρόπο ώστε να προσκολλώνται μόνο στα νοσούντα κύτταρα και να μην επηρεάζουν καθόλου τα υγιή.

- Τεχνικές θεραπείας

Νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (μαγνητίτης ή μαγγεμίτης) χρησιμοποιούνται στην τεχνική της υπερθερμίας κατά την οποία η θερμοκρασία των μαγνητικών νανοπεριεκτών αυξάνεται όταν εφαρμόζεται σε αυτά εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο.

- Διαγνωστικές τεχνικές και τεχνικές απεικόνισης

Νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού (MRI).

- Αντιμικροβιακή δράση

Νανοπεριέκτες οι οποίοι αποτελούνται ή περιέχουν νανοσωματίδια χαλκού (Cu), ψευδαργύρου (Zn) και Αργύρου (Ag), έχει αποδειχθεί ότι έχουν αντιμικροβιακή δράση. Επίσης έρευνες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι η χρήση νανοσωματιδίων για την απελευθέρωση αέριου οξειδίου του αργύρου μειώνει σημαντικά τη δημιουργία φλεγμονής σε περιοχές που έχουν μολυνθεί από σταφυλόκοκκο.

- Επιδιόρθωση κυττάρων

Με βάση την ιδέα της φυσιολογικής διαδικασίας ίασης, θα μπορούσαν να παρασκευασθούν νανοσωματίδια (νάνο-ρομπότ) τα οποία θα είναι προγραμματισμένα να επιδιορθώνουν νοσούντα κύτταρα δρώντας με τρόπο παρόμοιο με τα αντισώματα.

Συνοψίζοντας, λοιπόν, μπορούμε να πούμε πως η νανοτεχνολογία άνοιξε έναν καινούριο δρόμο στην επιστήμη μέσω του οποίου θα μπορέσουν να λυθούν προβλήματα, στα οποία εδώ και χρόνια ταλανίζουν την επιστημονική κοινότητα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

« Χημεία του σιδήρου»

2.1 Ιστορική αναδρομή μαγνητισμού

Η ιστορία του μαγνητισμού έχει την ίδια ηλικία με την ιστορία της επιστήμης, αφού θεωρείται από τις πιο αρχαίες επιστήμες του ελληνικού πολιτισμού. Η ιστορία του μαγνητισμού χρονολογείται από περισσότερα από 600 π.Χ., αλλά μόλις τον εικοστό αιώνα οι επιστήμονες άρχισαν να κατανοούν την ύπαρξή του, καθώς και να αναπτύξουν τεχνολογίες βασισμένες σε αυτήν. Ο μαγνητισμός κατά πάσα πιθανότητα παρατηρήθηκε αρχικά σε μια μορφή ορυκτού μαγνητίτη (lodestone), το οποίο αποτελείται από οξειδίο του σιδήρου, όπως είναι το επιτεταρτοξειδίο του σιδήρου Fe_3O_4 , το οποίο κατατάσσεται στην κατηγορία των πετρωμάτων, και είναι πλούσιο σε μαγνητίτη. Οι αρχαίοι Έλληνες ήταν οι πρώτοι που γνώριζαν ότι χρησιμοποίησαν αυτό το ορυκτό, το οποίο ονόμασαν μαγνήτη λόγω της ικανότητάς του να προσελκύει άλλα κομμάτια του ίδιου υλικού καθώς και του σιδήρου.

Η έρευνα σχετικά με τον μαγνητισμό την περίοδο του 17^{ου} και 18^{ου} αιώνα ήταν κυρίως στρατιωτική υπόθεση, ιδιαίτερα του βρετανικού ναυτικού. Η πρώτη σημαντική εξέλιξη από μη στρατιωτικό, προήλθε από τον Ελβετό πολυμαθή Daniel Bernoulli. Ήταν η επινόηση του πεταλοειδούς μαγνήτη. Επρόκειτο να γίνει το μακροβιότερο αρχέτυπο του μαγνητισμού. Ο πεταλοειδής μαγνήτης είναι μια ευφυής επίλυση στο πρόβλημα της κατασκευής ενός άμορφου μαγνήτη (bulk), που δεν θα αυτοκαταστραφεί από το δικό του πεδίο απομαγνήτισης. Διατηρήθηκε ως η εικόνα του μαγνητισμού μέχρι σήμερα. Κόκκινος και σημειωμένος με «Βόρειο» και «Νότιο» πόλο, ο πεταλοειδής μαγνήτης ακόμη αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα των βιβλίων Φυσικής του Δημοτικού σε όλο τον κόσμο, παρά το γεγονός ότι δεν χρησιμοποιείται πλέον τα τελευταία 50 χρόνια.[15]

Σε επιστημονικό επίπεδο ο Άγγλος William Gilbert (1540-1603) ήταν ο πρώτος που διερεύνησε το φαινόμενο του μαγνητισμού συστηματικά, χρησιμοποιώντας επιστημονικές μεθόδους. Ανακάλυψε επίσης ότι η ίδια η Γη είναι ασθενής μαγνήτης.

Πρώιμες θεωρητικές έρευνες για τη φύση του μαγνητισμού της Γης πραγματοποιήθηκαν από τον Γερμανό Carl Friedrich Gauss (1777-1855). Οι ποσοτικές μελέτες των μαγνητικών φαινομένων ξεκίνησαν τον 18^ο αιώνα από τον Γάλλο Charles Coulomb (1736-1806), ο οποίος δηλώνει ότι, η ελκτική δύναμη μεταξύ δύο μαγνητισμένων αντικειμένων είναι άμεσα ανάλογη προς το προϊόν των επιμέρους πεδίων και αντιστρόφως ανάλογη προς το τετράγωνο της απόστασης μεταξύ τους.[15]

Ορόσημο στον τομέα του μαγνητισμού αποτέλεσε και η συμβολή του Δανού φυσικού Hans Christian Oersted (1777-1851), ο οποίος πρότεινε για πρώτη φορά τη διασύνδεση μεταξύ ηλεκτρισμού και μαγνητισμού. Τα πειράματα που αφορούσαν τις επιπτώσεις των μαγνητικών και ηλεκτρικών πεδίων μεταξύ τους στη συνέχεια διεξήχθησαν από τον Γάλλο Andre Marie Ampere (1775-1836) και τον Άγγλο Michael Faraday (1791-1869), αλλά ο Σκωτσέζος James Clerk Maxwell (1831-1879), ήταν εκείνος ο οποίος παρείχε το θεωρητικό υπόβαθρο στη φυσική του ηλεκτρομαγνητισμού τον δέκατο ένατο αιώνα, δείχνοντας ότι η ηλεκτρική ενέργεια και ο μαγνητισμός αντιπροσωπεύουν διαφορετικές πτυχές του ίδιου θεμελιώδους πεδίου δυνάμεων.[15]

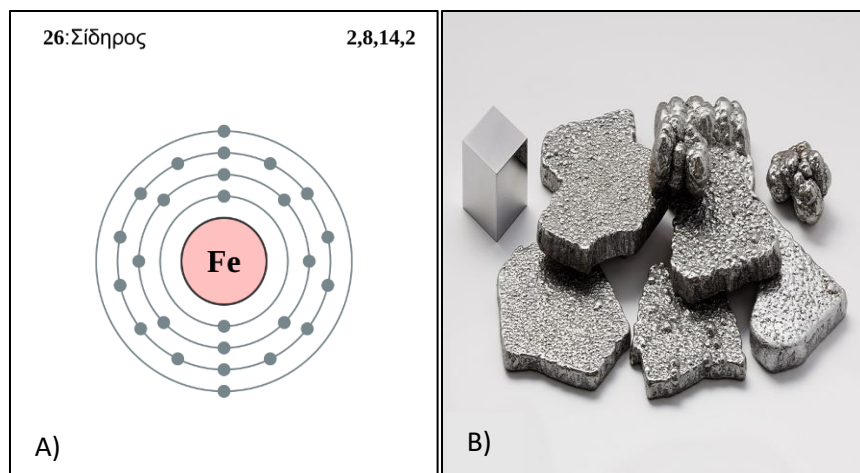
Η σύγχρονη κατανόηση των μαγνητικών φαινομένων σε συμπυκνωμένη ύλη προέρχεται από το έργο δύο Γάλλων: τον Pierre Curie (1859-1906), σύζυγο και επιστημονικό συνεργάτη της Madame Marie Curie (1867-1934) και τον Pierre Weiss (1865-1940). Ο Curie εξέτασε την επίδραση της θερμοκρασίας στα μαγνητικά υλικά και διαπίστωσε ότι ο μαγνητισμός εξαφανίζεται ξαφνικά πάνω από μια ορισμένη κρίσιμη θερμοκρασία σε υλικά όπως ο σίδηρος. Ο Weiss πρότεινε μια θεωρία μαγνητισμού με βάση ένα εσωτερικό μοριακό πεδίο, ανάλογο του μέσου μαγνητισμού που ευθυγραμμίζει αυθόρμητα τους ηλεκτρονικούς μικρομαγνήτες σε μαγνητική ύλη.[15]

Τέλος η σημερινή κατανόηση του μαγνητισμού με βάση τη θεωρία της κίνησης και τις αλληλεπιδράσεις των ηλεκτρονίων στα άτομα (που ονομάζεται κβαντική ηλεκτροδυναμική) προέρχεται από το έργο και τα θεωρητικά μοντέλα δύο Γερμανών, των Ernest Ising και Werner Heisenberg (1901-1976). Ο Werner Heisenberg ήταν επίσης ένας από τους ιδρυτές της σύγχρονης κβαντικής μηχανικής.[15]

2.2 Φυσικοχημικές και μαγνητικές ιδιότητες σιδήρου

Ποικίλες ενώσεις που βρίσκονται στη φύση έχουν μαγνητικές ιδιότητες, οι οποίες εξαρτώνται από τα ηλεκτρόνια των στοιχείων από τα οποία αποτελούνται τα υλικά. Ο σίδηρος τον οποίο μελετάμε εκτενώς στη παρούσα εργασία, αποτελεί το πιο μαγνητικό στοιχείο στη φύση. Είναι στοιχείο μετάπτωσης της 8^{ης} ομάδας του περιοδικού πίνακα, με ατομικό αριθμό 26 και ατομική μάζα 55,847. Μπορούμε να συναντήσουμε τον σίδηρο στη φύση, υπό τη μορφή διαφόρων οξειδίων.

Τα κυριότερα οξείδια είναι ο μαγνητίτης (Fe_3O_4) και ο μαγκεμίτης ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), ο αιματίτης ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ή και βουσίτης (FeO). Ο μαγνητίτης καθώς και ο μαγκεμίτης θεωρούνται δυο από τα πιο κύρια οξείδια του σιδήρου, διότι λόγω της υψηλής μαγνήτισής τους, αλλά και λόγω των εγγενών μαγνητικών τους ιδιοτήτων, καθίστανται τα πιο ευρείας μορφής κοινά σε χρήση, για ποικίλες εφαρμογές.[16]



Εικόνα 3: A) Ηλεκτρονιακή δομή ατόμου σιδήρου και B) κομμάτια σιδήρου[17]

Ο μαγνητίτης, είναι ορυκτό του σιδήρου και είναι το πιο μαγνητικό ορυκτό που υπάρχει στη Γη. Είναι σιδηρομαγνητικό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και έχει θερμοκρασία Curie 805 °K (η θερμοκρασία αλλαγής από τη σιδηρομαγνητική συμπεριφορά στην παραμαγνητική). Χημικώς αποτελείται από το επιτεταρτοξείδιο του σιδήρου (Fe_3O_4).

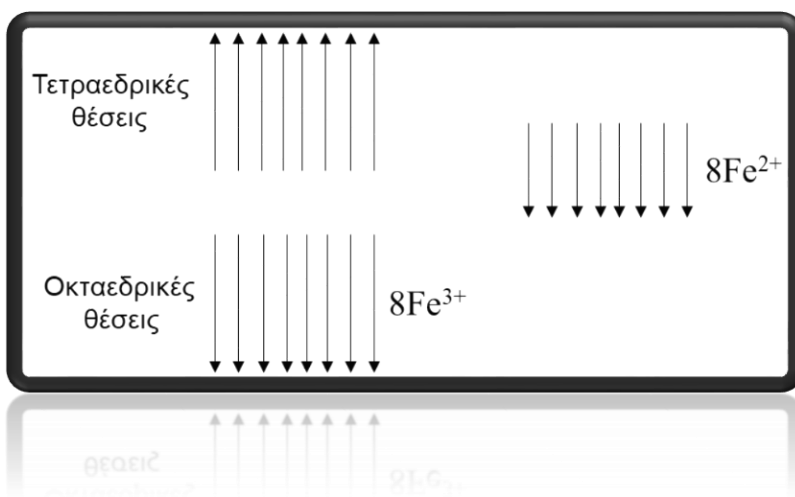
Το ορυκτό αυτό περιέχει περίπου 72,4% σίδηρο και 27,6% οξυγόνο. Ο μαγνητίτης κρυσταλλώνεται στο κυβικό σύστημα, έχει χρώμα μαύρο και μεταλλική λάμψη. Η δομή του είναι όπως φαίνεται στην Εικόνα 5, όπου παρομοιάζεται με αυτή του αντιστρόφου

σπινελίου. Η ιδιότητα που έχει ο μαγνητίτης να έλκει μικρά κομμάτια σιδήρου έκανε τον άνθρωπο από την αρχαιότητα να ανακαλύψει την έννοια του μαγνητισμού.[18]

Τα σπινέλια είναι μια κατηγορία μεικτών μεταλλικών οξειδίων με χημικό τύπο AB_2O_4 . Συνήθως το A είναι δισθενές άτομο, ατομικής ακτίνας 80-110 pm (Mg, Fe, Mn, Zn, Cu) και καταλαμβάνει θέσεις τετραεδρικής και οκταεδρικής συμμετρίας μέσα στον κρύσταλλο, ενώ το B είναι τρισθενές άτομο ακτίνας 75-90 pm (Ti, Fe, Al, Co) και καταλαμβάνει οκταεδρικές θέσεις. Τα αντίστροφα σπινέλια έχουν τα B άτομα στις τετραεδρικές θέσεις ενώ τα A και B στις οκταεδρικές.

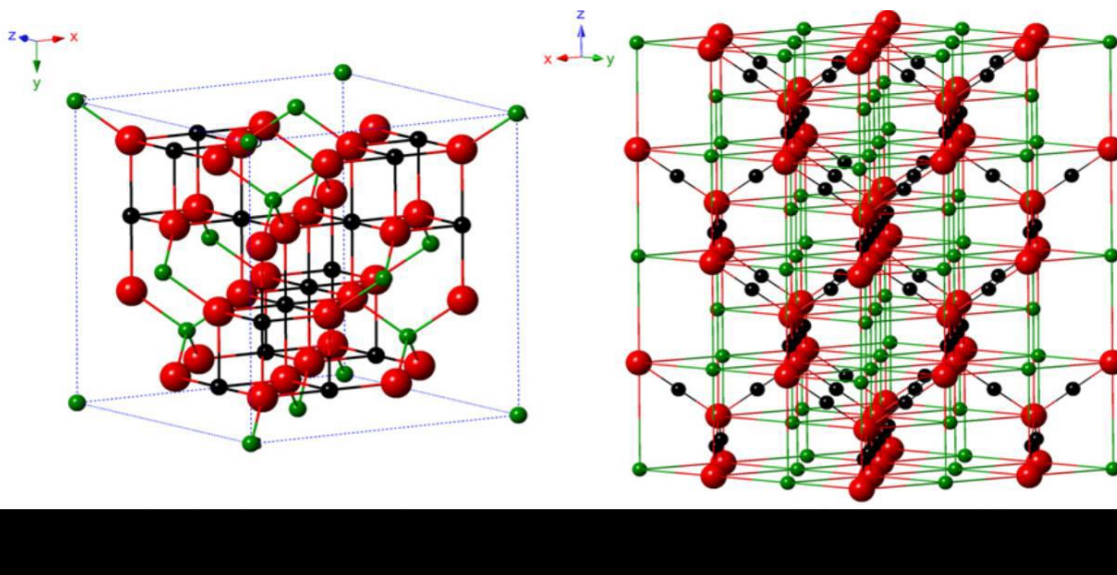
Το αντίστροφο αυτό μοντέλο προτάθηκε για τον μαγνητίτη έτσι ώστε να εξηγηθεί η γρήγορη διαπίδυση (hopping) και συνεχής ανταλλαγή ηλεκτρονίων μεταξύ των Fe^{2+} και Fe^{3+} στις οκταεδρικές θέσεις.

Τα spin των ηλεκτρονίων των ιόντων Fe^{3+} στις οκταεδρικές θέσεις προσανατολίζονται αντιπαράλληλα σε σχέση με αυτά των ιόντων Fe^{3+} στις τετραεδρικές θέσεις. Τα ιόντα Fe^{2+} τείνουν να ευθυγραμμίσουν τα spins τους παράλληλα με αυτά των παρακείμενων ιόντων Fe^{3+} στις οκταεδρικές θέσεις (Εικόνα 4). Αποτέλεσμα αυτής της διευθέτησης είναι ότι προκύπτει μια μαγνητική ροπή στον κρύσταλλο από τα ιόντα Fe^{2+} , ενώ η συνεισφορά του Fe^{3+} στη συνολική μαγνητική ροπή είναι μηδέν.



Εικόνα 4: Σιδηρομαγνητική διάταξη των spin στον μαγνητίτη

Ο μαγκεμίτης, από την άλλη πλευρά, μπορεί να θεωρηθεί ως η πλήρως οξειδωμένη κατάσταση του μαγνητίτη, εφόσον αποτελείται μόνον από τρισθενή ιόντα σιδήρου πάλι σε δομή ατελούς σπινελίου. Πιο συγκεκριμένα, απουσία δισθενών ιόντων σιδήρου το 1/3 των οκταεδρικών θέσεων είναι κενές. Στην κυβική κρυσταλλική δομή του μαγκεμίτη, οκτώ δισθενή ιόντα σιδήρου μοναδιαίας κυψελίδας βρίσκονται σε τετραεδρικές θέσεις και τα υπόλοιπα σε οκταεδρικές.[19]



Εικόνα 5: Κρυσταλλική δομή (Α) Μαγνητίτη (Β) Μαγκεμίτη (κόκκινα: άτομα οξυγόνου, πράσινα: άτομα Fe^{3+} , μαύρα: άτομα Fe^{2+})[20]

Ο σίδηρος, λοιπόν, είναι ένα μαγνητικό υλικό, που χρησιμοποιείται κατά κόρον στην παρασκευή και χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων, και ο οποίος βρίσκεται σε αφθονία στη φύση και μπορεί εύκολα να εξορυχθεί και να κατεργαστεί. Υπάρχουν πολλοί λόγοι για το μεγάλο ενδιαφέρον όσον αφορά στα νανοσωματίδια σιδήρου. Τα μαγνητικά νανοσωματίδια, γενικά, βρίσκονται στο επίκεντρο των επιστημονικών ερευνών τη σημερινή εποχή και ο σίδηρος συγκαταλέγεται στα πιο χρήσιμα μαγνητικά υλικά, όσον αφορά την εφαρμογή τους σε συστήματα όπως η υπερθερμία, και άλλα, στα οποία απαιτούνται για την εφαρμογή τους, οι πλήρεις μαγνητικές ιδιότητες των μετάλλων. Στη συνέχεια ακολουθεί ένας ο Πίνακας 1, με τις μαγνητικές και φυσικές ιδιότητες που έχουν τα οξειδία του σιδήρου.

Πίνακας 1: Ιδιότητες οξειδίων του σιδήρου

Ιδιότητες	Αιματίτης	Μαγνητίτης	Μαγκεμίτης
Μοριακός Τύπος	$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Fe_3O_4	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Πυκνότητα (g/cm^3)	5.26	5.18	4.87
Σημείο ζέσεως ($^{\circ}\text{C}$)	1350	1583-1597	-
Σκληρότητα	6.5	5.5	5
Τύπος Μαγνητισμού	Ελαφρώς σιδηρομαγνητικά ή αντισιδηρομαγνητικά	Σιδηρομαγνητικά	Σιδηριμαγνητικά
Θερμοκρασία Curie (K)	956	850	820-986

2.2.1 Μαγνητική ροπή

Είναι γνωστό πως η μαγνητική ροπή των ηλεκτρονίων εκφράζεται με τον τέταρτο κβαντικό αριθμό spin (m_s), και οφείλεται στην αυτοπεριστροφή τους, η οποία μπορεί να είναι δεξιόστροφη ή αριστερόστροφη. Όταν θέλουμε να ερμηνεύσουμε τη μαγνητική συμπεριφορά των υλικών, βασιζόμαστε κυρίως στη μαγνητική τους ροπή, η οποία οφείλεται κυρίως στην κίνηση των ηλεκτρονίων των ατόμων τους. Με βάση το πρότυπο του ατόμου, τα ηλεκτρόνια κινούνται σε κυκλικές τροχιές γύρω από τον πυρήνα. Η κίνηση αυτή του φορτισμένου αρνητικά ηλεκτρονίου σε κλειστή τροχιά γύρω από τον πυρήνα, ισοδυναμεί με έναν βρόγχο ρεύματος. Η μαγνητική ροπή μ ορίζεται ως το ρεύμα I που διαρρέει έναν βρόγχο επί την επιφάνεια του βρόγχου $S = \pi r^2$.

$$\mu = I S$$

Η συνολική μαγνητική ροπή ενός ατόμου, είναι η συνισταμένη μαγνητική ροπή των τροχιακών μαγνητικών ροπών και των μαγνητικών ροπών-spin των ηλεκτρονίων τους.

2.2.2 Μαγνήτιση

Ως μαγνήτιση μπορούμε να ορίσουμε το φαινόμενο κατά το οποίο ένα μαγνητικό σώμα έλκεται εντός μαγνητικού πεδίου από το πεδίο αυτό, δηλαδή είναι η μαγνητική ροπή ανά μονάδα όγκου του υλικού:

$$\mathbf{M} = n \boldsymbol{\mu}$$

όπου n είναι ο αριθμός των μαγνητικών διπολικών ροπών $\boldsymbol{\mu}$ ανά κυβικό μέτρο. Η μονάδα της μαγνήτισης είναι A/m.

2.2.3. Μαγνητική διάκριση των υλικών-Σιδηρομαγνητικά υλικά

Οι ελκτικές και οι απωστικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των μαγνητικών υλικών μπορούν να περιγραφούν ως αλληλεπιδράσεις μεταξύ μαγνητικών διπόλων. Τα μαγνητικά υλικά, ανάλογα με τον τρόπο προσανατολισμού των μαγνητικών ροπών παρουσία ή απουσία μαγνητικού πεδίου, ταξινομούνται σε: **παραμαγνητικά** και **σιδηρομαγνητικά** υλικά, τα άτομα των οποίων έχουν μόνιμα μαγνητική ροπή διάφορη του μηδενός, και τα **διαμαγνητικά** υλικά, τα άτομα των οποίων δεν έχουν μαγνητική ροπή.

Ο σίδηρος θεωρείται ένα από τα σπουδαιότερα σιδηρομαγνητικά μέταλλα, από το οποίο έχει πάρει και το όνομα η κατηγορία αυτή των υλικών. Η μαγνητική του λοιπόν συμπεριφορά, καθώς και όλων των άλλων σιδηρομαγνητικών υλικών, οφείλεται στην ύπαρξη μικροσκοπικών περιοχών (περιοχές Weiss) των οποίων οι ατομικές μαγνητικές ροπές είναι παράλληλες, όταν δεν επιδρά σε αυτά εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Δεδομένο αυτού, συμπεραίνουμε ότι τα σιδηρομαγνητικά υλικά δεν παρουσιάζουν μαγνητική ροπή χωρίς την εξωτερική επίδραση μαγνητικού πεδίου. Για την ακρίβεια όταν ένα σιδηρομαγνητικό υλικό εισαχθεί σε ένα μαγνητικό πεδίο, οι μαγνητικές ροπές όλων των περιοχών τείνουν να προσανατολιστούν προς τη διεύθυνση του πεδίου.

Όταν λοιπόν μαγνητικό πεδίο (H) εφαρμόζεται σε ένα υλικό, η απόκριση του υλικού καλείται μαγνητική επαγωγή (B) και το πεδίο που σχηματίζεται στο υλικό μαγνήτιση (M). Η σχέση που συνδέει τα δυο μεγέθη αυτά είναι :

$$B = \mu_0 (H + m/V) = \mu_0 (H + M)$$

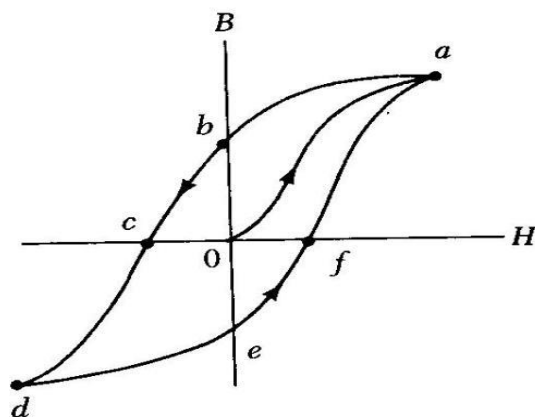
όπου μ_0 είναι η μαγνητική διαπερατότητα και m η μαγνητική ροπή ανά μονάδα όγκου V . [21]

2.2.4 Βρόγχος υστέρησης

Η μαγνητική συμπεριφορά των σιδηρομαγνητικών υλικών περιγράφεται από τον βρόγχο υστέρησης. Ένας συνηθισμένος βρόγχος υστέρησης προκύπτει από τη μέτρηση της μαγνήτισης ενός υλικού που λαμβάνεται παρουσία ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου σε θετικές και αρνητικές κατευθύνσεις. Στα υψηλά επίπεδα μαγνητικών πεδίων, η μαγνήτιση προσεγγίζει τη μέγιστη τιμή, η οποία ονομάζεται μαγνήτιση κορεσμού (M_s).

Σε αυτήν την κατάσταση, όλες οι μαγνητικές ροπές μέσα στο υλικό είναι προσανατολισμένες παράλληλα προς την κατεύθυνση του μαγνητικού πεδίου H . Με σταδιακή απομάκρυνση του μαγνητικού πεδίου έως ότου μηδενιστεί ($H=0$), η μαγνήτιση δεν μηδενίζεται αλλά διατηρεί μια θετική τιμή, η οποία ονομάζεται παραμένουσα μαγνήτιση (M_r). Μια ακόμα σημαντική παράμετρος είναι το συνεκτικό πεδίο (H_c) που δείχνει την ένταση του αντίστροφου πεδίου που απαιτείται έτσι ώστε να μηδενιστεί η τιμή της μαγνήτισης.

Επομένως με την αύξηση της μαγνητικής διέγερσης του μαγνητικού πεδίου (H), με συγκεκριμένη φορά, αυξάνεται η μαγνητική επαγωγή ή αλλιώς μαγνήτιση κορεσμού (B_{max}), με τις μαγνητικές ροπές να είναι προσανατολισμένες αντίστροφα και με την ίδια φορά με το πεδίο. Μειώνοντας αντίθετα το πεδίο μέχρι να μηδενιστεί, όπως είπαμε, έχουμε παραμένουσα μαγνήτιση με αντίθετη κατεύθυνση. Κατά τη διαδικασία αυτή εάν εφαρμόσουμε ξανά θετικό πεδίο, θα δούμε να συμπληρώνεται κλειστή καμπύλη όπως στην εικόνα 6. Η σχέση, λοιπόν, $B=f(H)$ παρουσιάζει μεγάλο πρακτικό ενδιαφέρον για τα σιδηρομαγνητικά υλικά.



Εικόνα 6: Βρόγχος υστέρησης [22]

Τα μαγνητικά υλικά ανάλογα, λοιπόν, με τον βρόγχο υστέρησης κατατάσσονται σε μαλακά και σκληρά. Τα μαλακά παρουσιάζουν μικρά συνεκτικά πεδία, ενώ τα σκληρά μεγάλα. Στα μαλακά μαγνητικά υλικά ανήκουν ο σίδηρος, το κράμα σίδηρος-κοβάλτιο, και τα οξειδία του σιδήρου μαγκεμίτης και μαγνητίτης. Στην κατηγορία των σκληρών μαγνητικών υλικών, από την άλλη, ανήκουν το κοβάλτιο και διμεταλλικά κράματα σιδήρου-λευκοχρύσου.[23]

2.2.5 Μαγνητική ανισοτροπία

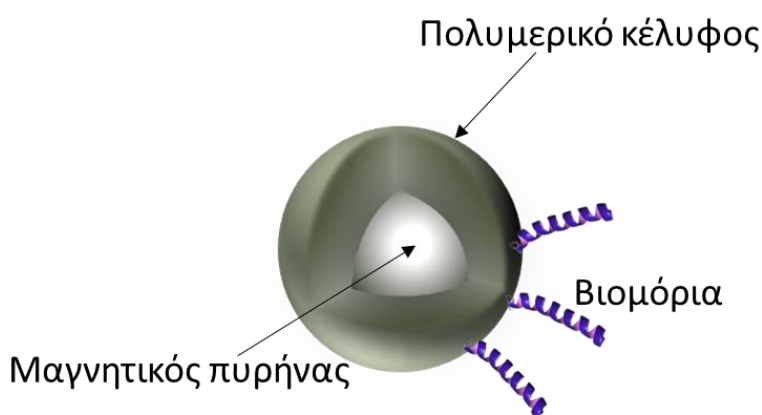
Η μαγνητική επιδεκτικότητα των υλικών περιγράφει κατά πόσο ένα υλικό μπορεί να μαγνητιστεί παρουσία ενός εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου εξαρτώμενη από τη διεύθυνση στην οποία μετράται. Αυτή η εξάρτηση είναι γνωστή ως μαγνητική ανισοτροπία και προέρχεται από την συμμετρία του κρυσταλλικού πλέγματος. Στην περίπτωση των μαγνητικών νανοσωματιδίων, η μαγνητική ανισοτροπία εξαρτάται και από τις ατέλειες που αναπτύσσονται στα όρια των νανοσωματιδίων.

2.3 Μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου-Νανομαγνητισμός

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια βρίσκονται στο επίκεντρο των ερευνών καθώς βρίσκουν μεγάλη απήχηση σε μια σειρά εφαρμογών, όπως τα μαγνητικά ρευστά, η κατάλυση, η βιοτεχνολογία/βιοϊατρική, η μαγνητική απεικόνιση, η αποθήκευση δεδομένων και η περιβαλλοντική αποκατάσταση. Η προϋπόθεση για τις παραπάνω εφαρμογές είναι η σταθερότητα των νανοσωματιδίων αυτών υπό την επίδραση διαφορετικών συνθηκών,

στις οποίες τα χρησιμοποιούμε, καθώς έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός κατάλληλων μεθόδων για τη σύνθεσή τους εμπιρεύοντας διαφορετικές συστάσεις.

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια, λοιπόν, τα οποία μελετούνται εκτενώς στην παρούσα εργασία, τα οποία προορίζονται για βιοϊατρικές εφαρμογές, απαρτίζονται κυρίως από τρία βασικά μέρη, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 7, το μαγνητικό πυρήνα, το πολυμερικό κέλυφος και την τροποποιημένη επιφάνειά τους, η οποία είναι απαραίτητη προκειμένου να αποκτήσουν οι μαγνητικοί νανοφορείς την απαραίτητη σταθερότητα σε βιοσυστήματα (π.χ. αίμα), και την ικανότητα να μεταφέρουν φαρμακευτικές ουσίες.[24]



Εικόνα 7: Απεικόνιση τμημάτων μαγνητικών νανοσωματιδίων

Τα νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου, κατά καιρούς έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον πολλών επιστημονικών πεδίων λόγω των ιδιαίτερων υπερπαραμαγνητικών ιδιοτήτων που εμφανίζουν στην συγκεκριμένη κλίμακα του νανομέτρου, στην οποία και κατατάσσονται. Μορφολογικά παρουσιάζουν ποικιλόμορφη ανισοτροπία καθώς μπορούμε να τα παράγουμε σε διάφορες μορφές όπως, σφαιρικά, κυβικά, νανολουλούδια, ραβδοειδή, κá. Επιπλέον, μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν με βιοεκλεκτικά μόρια, αυξάνοντας τη βιοσυμβατότητα και προσφέροντας την ικανότητα στόχευσης βιολογικών συστημάτων. Η επιφανειακή τροποποίηση είναι καθοριστική πρωτίστως για την ανάγκη σταθεροποίησης των νανοδομών οξειδίου του σιδήρου, σε υδατικά μέσα κατάλληλα για βιοεφαρμογές.[25]

Τα υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια θεωρούνται πολύ ελκυστικά για μια μεγάλη σειρά βιοϊατρικών εφαρμογών, επειδή μειώνεται ο κίνδυνος σχηματισμού

συσσωματωμάτων σε θερμοκρασία δωματίου, όπως γίνεται στα περισσότερα μαγνητικά νανοσωματίδια. Ο υπερμαγνητισμός θεωρείται ένα φαινόμενο που παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς είναι αποτέλεσμα της μείωσης του μεγέθους των μαγνητικών νανοσφαιρών. Με λίγα λόγια νανομαγνητισμός, ο μαγνητισμός δηλαδή που προκαλείται από τις νανοδιαστάσεις που μπορούν να πάρουν τα μαγνητικά υλικά, εμπεριέχει τα μαγνητικά φαινόμενα που έχουν τη δυνατότητα να συμβούν σε φυσικά μαγνητικά μόρια, όπως για παράδειγμα μόρια σιδήρου, ή σε συστάδες μορίων (clusters), ακόμα και σε τεχνητές νανοδομές μαγνητικών υλικών.

2.3.1 Υπερμαγνητισμός (SPIONS)

Ο υπερμαγνητισμός είναι μια ιδιότητα που εμφανίζεται συχνά σε μαγνητικά νανοσωματίδια. Για ένα συγκεκριμένο σωματίδιο μιας συγκεκριμένης περιοχής υπάρχει ένα μέγεθος, κάτω από το οποίο οι θερμικές αλληλεπιδράσεις αυξάνονται αρκετά. Η συγκεκριμένη διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα, η μαγνήτιση να παύει να είναι σταθερή, και το νανοσωματίδιο να συμπεριφέρεται υπερμαγνητικά.

Στα υπερμαγνητικά νανοσωματίδια, κάθε σωματίδιο έχει τη δική του μαγνητική ροπή, η οποία μπορεί εύκολα να κορεστεί παρουσία μαγνητικού πεδίου. Μετά όμως από την απομάκρυνση του πεδίου, οι θερμικές ταλαντώσεις που κυριαρχούν στο σύστημα επιτρέπουν στην τιμή της μαγνήτισης να μηδενιστεί. Οι θερμικές αυτές ταλαντώσεις δεν προέρχονται από ανεξάρτητα σπιν των ηλεκτρονίων αλλά από τη μαγνητική ροπή ολόκληρου του νανοσωματιδίου. Στην περίπτωση του μαγκεμίτη, όπου και μας ενδιαφέρει για την συγκεκριμένη εργασία, νανοσωματίδια με μέση διάμετρο γύρω στα 55 nm, παρουσιάζουν σε θερμοκρασία δωματίου σιδηρομαγνητική συμπεριφορά, ενώ μικρότερα σε μέγεθος σωματίδια, γύρω στα 12 nm εμφανίζουν υπερμαγνητική συμπεριφορά. Τα υπερμαγνητικά νανοσωματίδια, χαρακτηρίζονται από μηδενική συνολική μαγνήτιση, που οφείλεται στη μαγνητική ανισοτροπία των σωματιδίων.[26]

2.3.2 Χρόνος εφησυχασμού

Ο υπερμαγνητισμός θεωρείται ως ένα είδος μαγνητισμού που εμφανίζεται σε μικρά σιδηρομαγνητικά νανοσωματίδια. Η επίδραση της θερμοκρασίας εδώ μπορεί να αλλάξει γρήγορα την κατεύθυνση της μαγνήτισης. Ο χρόνος μεταξύ δυο διαδοχικών μεταπτώσεων ονομάζεται χρόνος εφησυχασμού και δηλώνει ουσιαστικά το χρονικό

διάστημα που απαιτείται έτσι ώστε το σύστημα να μηδενίσει τη μαγνήτισή του, ύστερα από την απομάκρυνση ενός εξωτερικά εφαρμοσμένου μαγνητικού πεδίου.

Νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου με μέση διάμετρο 4-12 nm, όπου είναι και όλα τα μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου στην παρούσα εργασία, έχουν χαρακτηριστικούς χρόνους εφησυχασμού που κυμαίνονται μεταξύ 10^{-8} και 10^{-6} s.[19]

$$\tau = \tau_0 \exp (KV/K_B T)$$

2.3.3 Θερμοκρασία ακινητοποίησης, T_B (Blocking Temperature)

Οι μαγνητικές ροπές των νανοσωματιδίων που εξηγήθηκαν παραπάνω, αντιστρέφονται, όταν χρησιμοποιούμε χρόνους εφησυχασμού μικρότερους από τους χρησιμοποιούμενους σε πειραματικές τεχνικές, και έτσι λέμε ότι το σύστημα βρίσκεται στην υπερμαγνητική κατάσταση. Η θερμοκρασία στην οποία διαχωρίζονται αυτές οι δύο καταστάσεις ονομάζεται θερμοκρασία ακινητοποίησης (T_B) και αποτελεί, κατά κύριο λόγο, τη θερμοκρασία μετάβασης από τη σιδηρομαγνητική στην υπερπαραμαγνητική κατάσταση. Η θερμοκρασία T_B εξαρτάται από το μαγνητικό πεδίο, αλλά και από το μέγεθος των νανοσωματιδίων, καθώς είναι μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους που καθορίζουν τη μαγνητική συμπεριφορά ενός υλικού.

Η θερμοκρασία T_B , σχετίζεται με τον όγκο των σωματιδίων (V) και την σταθερά ανισοτροπίας (K), και δίνεται από τον παρακάτω τύπο :

$$KV=25 k_B T_B$$

Συνοψίζοντας λοιπόν, τα μαγνητικά νανοσωματίδια είναι κυρίως σιδηρομαγνητικά υλικά που αποτελούνται από σωματίδια τα οποία περιέχουν μαγνητικές περιοχές. Προκειμένου να μελετηθεί η μαγνητική συμπεριφορά νανοσωματιδίων θα πρέπει τα νανοσωματίδια να μη συσσωματώνονται μεταξύ τους και να είναι ομοιόμορφα διεσπαρμένα. Ένας πρακτικός τρόπος να επιτυγχάνεται αυτό είναι να διασπείρουμε μικρής συγκέντρωσης νανοσωματίδια σε κατάλληλο διαλύτη.

Συμπερασματικά, λοιπόν, μπορούμε να πούμε πως και οι μαγνητικές ιδιότητες των μαγνητικών νανοσωματιδίων, όπως και η απόδοσή τους, εξαρτώνται από το μέγεθός τους καθώς και τη μορφολογία και την κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων στο

σύνολό τους. Είναι λοιπόν απαραίτητη η συμβολή της έρευνας στην εύρεση μεθόδων κατάλληλων που θα ελέγχουν το μέγεθος και κατά συνέπεια και τη συμπεριφορά των μαγνητικών μας νανοσωματιδίων. Στην παρούσα εργασία το μαγνητικό μέσο το οποίο χρησιμοποιείται για τη σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων είναι ο σίδηρος. Στη συνέχεια της εργασίας, ακολουθούν οι μέθοδοι σύνθεσης, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση του πειραματικού μέρους της παρούσας εργασίας.[19]

2.4 Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί πολλές διαφορετικές διαδικασίες σύνθεσης μαγνητικών νανοσωματιδίων. Κάποιες από αυτές πραγματοποιούνται σε ένα στάδιο και κάποιες σε περισσότερα. Όλες οι πορείες σύνθεσης εμφανίζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, ενώ καμία από αυτές δεν παρέχει μόνο έναν τρόπο σύνθεσης όλων των μαγνητικών νανοσωματιδίων.

Έχουν αναπτυχθεί φυσικές αλλά και χημικές μέθοδοι σύνθεσης μαγνητικών νανοσωματιδίων με ελεγχόμενη σύσταση, μέγεθος και σχήμα. Οι χημικές μέθοδοι είναι πολύ βασικές και πραγματοποιούνται κυρίως με δύο τεχνικές. Πρώτον σε διαλύματα με φυσική εναπόθεση ατμών και δεύτερον με μηχανική κατεργασία. Στην εναπόθεση ατμών, γνωστή και ως bottom-up τεχνική, η σύνθεση ξεκινά από την αλληλεπίδραση μεταλλικών ιόντων προς την δόμηση περίπλοκων δομών, ενώ στη μηχανική κατεργασία γνωστή ως top-down τεχνική, το δομικό υλικό διαβρώνεται σταδιακά μέσω φυσικοχημικών μεθόδων μέχρι να φτάσει στο επιθυμητό σχήμα και μέγεθος.[27]

Βασική προϋπόθεση, λοιπόν, κατά τη διαδικασία της σύνθεσης, είναι ότι πρέπει να γίνει ο απαιτούμενος καθορισμός των πειραματικών συνθηκών, που θα οδηγήσει σε έναν πληθυσμό μονοδιασποράς μαγνητικών κόκκων κατάλληλου μεγέθους, αλλά και σχήματος, προς αποφυγή συσσωματωμάτων. Έμφαση δίνεται στο μέγεθος των μαγνητικών νανοσωματιδίων, καθώς συσχετίζεται άμεσα με το ποσοστό μαγνήτισής τους. Πιο συγκεκριμένα, έρευνες έχουν αναφέρει[28] μια γραμμική συσχέτιση μεταξύ του κορεσμού μαγνήτισης και του μεγέθους των νανοσωματιδίων, γεγονός που υποδηλώνει ότι μικρά σε επιφάνεια σωματίδια, μπορούν να επηρεάσουν τις μαγνητικές τους ιδιότητες. Η καμπυλότητα της επιφάνειας του νανοσωματιδίου είναι πολύ μεγαλύτερη, για μικρότερου μεγέθους νανοσωματίδια, γεγονός που οδηγεί σε σημαντική μείωση της

παραμένουσας μαγνήτισης σε μικρότερα νανοσωματίδια. Ακόμα ένα σημαντικό σημείο είναι η επιλογή της διαδικασίας που θα πρέπει να επαναληφθεί, όπως για παράδειγμα, υπερφυγοκέντρωση ή μαγνητικός διαχωρισμός, προκειμένου να παραλάβουμε καθαρή όλη την ποσότητα των συντηθήμενων μαγνητικών νανοσωματιδίων.

Κατά τη σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων, το αποτέλεσμα που λαμβάνεται είναι ένα κολλοειδές διάλυμα και αυτό αποτελεί εν μέρει μειονέκτημα διότι κάνει περίπλοκη τη διαδικασία της σύνθεσης. Στη χημική μέθοδο όμως που πραγματοποιείται ευρέως σε διαλύματα, υπάρχει η δυνατότητα ελέγχου μεγέθους και σχήματος των νανοσωματιδίων, καθώς και μεγάλη ποικιλία επιφανειακής τροποποίησής, η οποία μπορεί να επιτευχθεί μόνο ρυθμίζοντας κάποιες κινητικούς παραμέτρους που την επηρεάζουν, όπως για παράδειγμα, το pH, ο ρυθμός ανάδευσης, η θερμοκρασία αντίδρασης και η συγκέντρωση των πρόδρομων ενώσεων.[29]

Έχοντας υπόψιν τις προαναφερθείσες αρχές σύνθεσης των μαγνητικών νανοσωματιδίων, οι μέθοδοι σύνθεσής τους, μπορούν να διαχωριστούν στις εξής δύο κατηγορίες, στις υδρολυτικές και στις μη υδρολυτικές τεχνικές. Στις υδρολυτικές τεχνικές συμπεριλαμβάνονται οι μέθοδοι :

1. Της συγκαταβύθισης
2. Των μικρογαλακτωμάτων
3. Η σύνθεση sol-gel
4. Η ηλεκτροχημική μέθοδος
5. Η σύνθεση με υπερήχους (βασίζονται σε υδρόλυση δισθενών και τρισθενών ιόντων σιδήρου)

Στις μη υδρολυτικές τεχνικές συμπεριλαμβάνονται οι μέθοδοι:

1. Της θερμόλυσης
2. Των πολυολών

Στη συνέχεια ακολουθεί αναλυτική επεξήγηση της μεθόδου της συγκαταβύθισης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

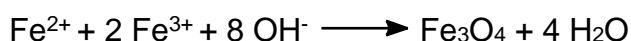
2.4.1 Μέθοδος συγκαταβύθισης

Η μέθοδος της συγκαταβύθισης, είναι μια διαδομένη τεχνική σύνθεσης μαγνητικών νανοσωματιδίων, και αποτελεί την πιο εύκολη και πιο αποδοτική τεχνική σύνθεσης νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου.[30] Η μέθοδος πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και τα υλικά που συντίθενται είναι κρυσταλλικά. Βασικά χαρακτηριστικά της μεθόδου της συγκαταβύθισης είναι ότι:

- Υπό συνθήκης κορεσμού του διαλύματος σχηματίζονται τα προϊόντα αντίδρασης
- Η πυρηνοποίηση αποτελεί το βασικότερο στάδιο για την συγκεκριμένη αντίδραση
- Η δημιουργία συσσωματωμάτων επηρεάζει τόσο το μέγεθος όσο και την μορφή των προϊόντων.

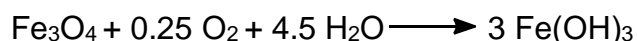
Στη περίπτωση λοιπόν του μαγνητίτη και μαγκεμίτη, που μελετώνται στην παρούσα εργασία, τα σωματίδια συνθέτονται από την συγκαταβύθιση υδροξειδίων από ένα υδατικό διάλυμα Fe^{3+} και Fe^{2+} ιόντων αλάτων σε αλκαλικό περιβάλλον.

Ο μαγκεμίτης συντίθεται με την ίδια ακριβώς διαδικασία, αλλά σε υψηλότερες θερμοκρασίες, περίπου στους 90 °C. Η σύνθεση του μαγνητίτη περιγράφεται από την παρακάτω αντίδραση:



Η συγκεκριμένη αντίδραση πραγματοποιείται σε αναλογία 2:1 και βάσει θερμοδυναμικών παραμέτρων, το pH υπολογίζεται να είναι περίπου από 8-14, όταν η αντίδραση πραγματοποιείται σε μη οξειδωτικό περιβάλλον.[31]

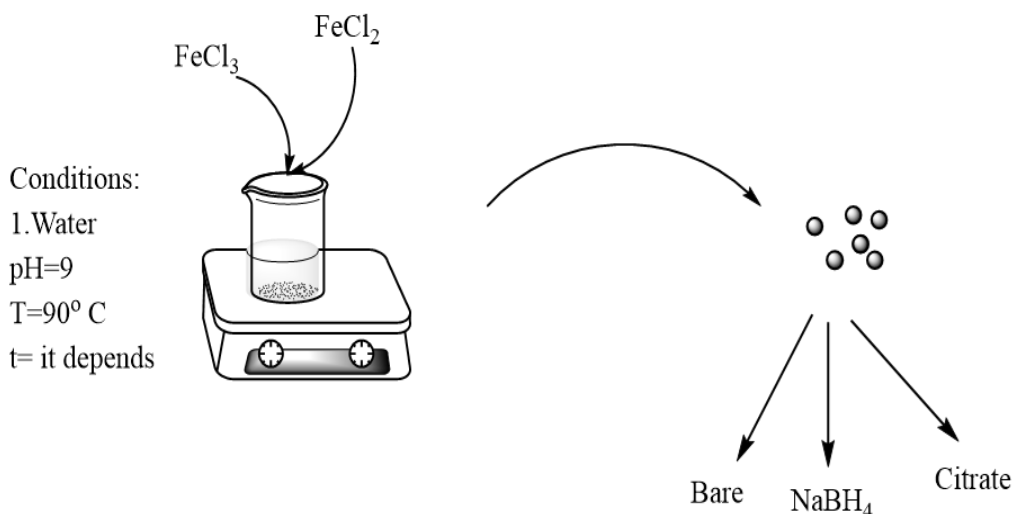
Ο μαγνητίτης μετασχηματίζεται σε μαγκεμίτη παρουσία οξυγόνου και η αντίδραση περιγράφεται παρακάτω:



Με την ανάμειξη αλάτων δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου σε στοιχειομετρική αναλογία σε υδατικό διάλυμα δημιουργούνται οξείδια του σιδήρου (Fe_3O_4 ή Fe_2O_3). Για την αποφυγή οξείδωσης στον αέρα καθώς και τη δημιουργία συσσωματωμάτων, τα Fe_3O_4 επικαλύπτονται με οργανικά ή ανόργανα μόρια κατά τη διάρκεια της καθίζησης, όπως θα δούμε και παρακάτω λίγο πιο αναλυτικά. [31]

Στη παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν τρεις μέθοδοι συγκαταβύθισης με βάση τον σίδηρο, για την παραγωγή τριών ειδών μαγνητικών νανοσωματιδίων, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 8. Τα τρία είδη είναι τα εξής :

- Γυμνά μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου
- Μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με τρινάτριο άλας του κιτρικού οξέος
- Μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με τρινάτριο άλας του κιτρικού οξέος παρουσία βοροϋδριδίου του νατρίου (ως αναγωγικό μέσο)



Εικόνα 8: Μέθοδος συγκαταβύθισης

Πιο αναλυτικά, κατά τη διαδικασία συγκαταβύθισης γίνεται ταχύτατος σχηματισμός πυρήνων όταν η συγκέντρωση φτάσει στο σημείο υπερκορεσμού και στη συνέχεια πραγματοποιείται αργή ανάπτυξη των πυρήνων με διάχυση των διαλυμένων ουσιών προς την επιφάνεια του κρυστάλλου. Ο στόχος είναι η σύνθεση μονοδιασπαρμένων νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου, και αυτό επιτυγχάνεται όταν τα παραπάνω στάδια διαχωριστούν. Ο έλεγχος του μεγέθους της μονοδιασποράς γίνεται σε πολύ μικρό διάστημα, γιατί δεν πραγματοποιείται περαιτέρω αλλαγή αν σχηματιστούν ξανά οι πυρήνες.

Ο Massart [32], ήταν από τους πρωτοπόρους που συνέθεσε υπερμαγνητικά νανοσωματίδια μαγνητίτη με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης αλάτων FeCl₃ και FeCl₂ σε

αλκαλικές συνθήκες. Τα σωματίδια αυτά που παρασκευάστηκαν ήταν σχεδόν σφαιρικά με μέση διάμετρο 8 nm. Έπειτα από αυτή τη σημαντική ανακάλυψη έγιναν περαιτέρω έρευνες που διαπίστωσαν την εξάρτηση των ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων, όπως η απόδοση της αντίδρασης τους, από παραμέτρους όπως η αναλογία των Fe^{2+} και Fe^{3+} , η συγκέντρωση των πρόδρομων ενώσεων του σιδήρου, το pH, καθώς και η ιοντική ισχύς του διαλύματος.

Πιο συγκεκριμένα, με την κατάλληλη ρύθμιση του pH και της ιοντικής ισχύος είναι εφικτό να ελέγξουμε το μέγεθος των σωματιδίων. Επομένως, η αύξησή του, οδηγεί σε μείωση του μεγέθους των σωματιδίων καθώς και στη μείωση του εύρους της κατανομής του μεγέθους, κάτι που οφείλεται στην επιρροή που ασκεί η χημική σύσταση της επιφάνειας του σωματιδίου στο pH και στην ιοντική ισχύ. Για το λόγο αυτό προτιμάται το αλκαλικό περιβάλλον στις συγκεκριμένες συνθέσεις. Σημαντική επίσης παράμετρος είναι και το είδος της βάσης που χρησιμοποιείται για τη συγκαταβύθιση των πρόδρομων ενώσεων του σιδήρου, όπως επίσης και η παρουσία διαφορετικών κατιόντων.[33] Επιτυγχάνεται λοιπόν, ανάλογα με το σύστημα που μελετάται, και την κατάλληλη χρήση ηλεκτρολυτών, καταβύθιση σωματιδίων διαφορετικών μεγεθών. Η αύξηση του ρυθμού ανάδευσης, θεωρείται ένας από τους παράγοντες που οδηγούν στη μείωση του μεγέθους των νανοσωματιδίων.[34] Τέλος σημαντική είναι η επίδραση της θερμοκρασίας που με την αύξησή της, μειώνεται ο σχηματισμός νανοσωματιδίων μαγνητίτη.

Πλεονέκτημα της μεθόδου της συγκαταβύθισης, είναι το γεγονός ότι δημιουργούνται μεγάλες ποσότητες νανοσωματιδίων σε ένα στάδιο που είναι διαλυτά σε υδατικά διαλύματα. Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη μέθοδος προτιμάται ευρέως για την ευκολία της. Εδώ η θερμοκρασία και ο χρόνος αντίδρασης είναι αρκετά μικρότερες συγκριτικά με άλλες μεθόδους, όπως για παράδειγμα η μέθοδος των πολυολών. Βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής, είναι ότι χρησιμοποιείται νερό ως διαλύτης που είναι φιλικός προς το περιβάλλον, άφθονο και καθόλου κοστοβόρο. Από την άλλη πλευρά, όμως τα μειονεκτήματα της τεχνικής είναι ο σχηματισμός συσσωματωμάτων, η σχετική ευρεία κατανομή μεγέθους και η δυσκολία ελέγχου του σχήματος των νανοσωματιδίων.[35]

2.4.2 Επικάλυψη και σταθεροποίηση μαγνητικών νανοσωματιδίων

Βασικό πρόβλημα, όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη υποενότητα αποτελεί η επίτευξη της κolloειδούς σταθερότητας των μαγνητικών νανοσωματιδίων που αντιμετωπίζεται με κατάλληλη επιφανειακή τροποποίηση και η οποία καθορίζεται από τρεις βασικές αλληλεπιδράσεις:

- 1) υδρόφοβη-υδρόφιλη
- 2) μαγνητική
- 3) Van der Waals.

Όταν νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου βρίσκονται σε διασπορά, ενισχύονται οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μικροσυμπλέγματα, τα οποία λόγω αλληλεπιδράσεων διπόλου-διπόλου μαγνητίζονται από γειτονικά συμπλέγματα, δημιουργώντας έτσι τα λεγόμενα συσσωματώματα, όπου αποτελούνται από πολλές σφαίρες μαζεμένες σε ένα σημείο του διαλύματος και τα οποία ενισχύονται όταν εφαρμόσουμε σε αυτά, ένα μαγνητικό πεδίο. Γενικότερα, τα νανοσωματίδια όταν βρίσκονται σε διασπορά τείνουν προς συσσωμάτωση λόγω των ελκτικών δυνάμεων Van der Waals, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η συνολική επιφανειακή τους ενέργεια. Η συσσωμάτωση αυτή όμως, αποτελεί ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα, καθώς είναι ανεπιθύμητη σε βιοεφαρμογές, όπου και για εκεί προορίζονται, διότι περιορίζεται η λειτουργικότητά τους. Τα συσσωματώματα αυτά, λοιπόν, αποτελούν πλέον ένα σύμπλεγμα νανοσωματιδίων με μεγάλο μέγεθος, το οποίο δεν είναι επιθυμητό εξαιτίας της παρεμπόδισης της διέλευσής τους, μέσα στους ανθρώπινους ιστούς. Επίσης, το επιφανειακό φορτίο μπορεί να επηρεάσει την κolloειδή σταθερότητα, αλλά και την αλληλεπίδραση με βιολογικές μεμβράνες, κοινώς κυτταρικές, καθώς εκείνες είναι αρνητικά φορτισμένες, λόγω της ύπαρξης των φωσφολιπιδίων.[36]

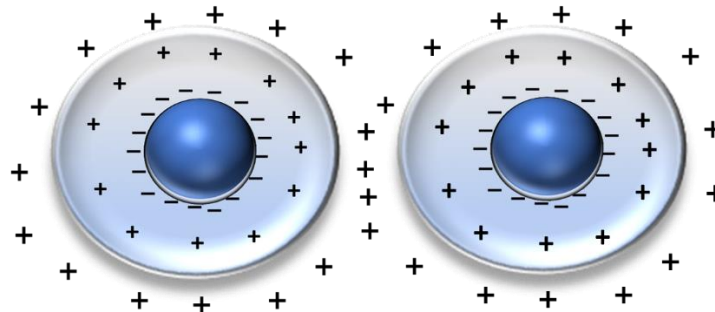
Είναι γεγονός πως για τη σταθεροποίηση των 'γυμνών' μαγνητικών σωματιδίων οξειδίου του σιδήρου, απαραίτητο είναι ένα υψηλό pH (>9), διότι πραγματοποιείται σχηματισμός υδροξειδίων του σιδήρου που με τη σειρά τους, εμποδίζουν την καθαρότητα των σχηματιζόμενων σωματιδίων του μαγνητίτη αλλά και του μαγκεμίτη. Προκειμένου να μην συμβεί ο σχηματισμός αυτός, μπορεί να σταθεροποιηθούν τα σχηματιζόμενα μαγνητικά νανοσωματίδια με διάφορα πολυμερή μέσω ηλεκτροστατικών

αλληλεπιδράσεων ή μέσω χημικής διασύνδεσης. Παραδείγματα τέτοιων πολυμερών είναι, βιοπολυμερή όπως οι υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες, και διάφορα σύνθετικά πολυμερή όπως πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), πολυμεθακρυλικό οξύ (PMAA) κ.α.[37]

Τέλος, έχουν μελετηθεί και διάφορα συμπολυμερή, που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή πυρήνας-κέλυφος. Ένα μεγάλο μειονέκτημα όμως που παρουσιάζουν τα μαγνητικά νανοσωματίδια που έχουν τροποποιηθεί πολυμερικά είναι το υψηλό οργανικό φορτίο, το οποίο και θεωρείται απαραίτητο για την παρασκευή σταθερών υδατοδιαλυτών υλικών, με αποτέλεσμα η τιμή της μαγνήτισης του σύνθετου πλέον υλικού να είναι κατά μεγάλο ποσοστό ελαττωμένη.

Εκτός από τα πολυμερή, υπάρχουν και άλλα μόρια τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη και την επικάλυψη νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου, τα οποία μπορούν να λειτουργούν ως παράγοντες σταθεροποίησης ελέγχου της σύστασης τους, αλλά και καταβύθισής τους. Τέτοια μόρια είναι το τρινάτριο άλας του κιτρικού οξέος, το οποίο χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία.[38] Τα μόρια του κιτρικού οξέος, λόγω των τριών καρβοξυλικών ομάδων που διαθέτουν προσδένονται σε κατάλληλο pH πολύ ισχυρά, στο θετικό φορτίο που έχουν στην επιφάνεια τους τα άτομα του σιδήρου, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η ανάπτυξη των συσσωματωμάτων. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να δημιουργήσουμε “γυμνά” ή επικαλυμμένα ανόργανα νανοσωματίδια, η σταθεροποίηση των οποίων πραγματοποιείται, με διαφορετικούς μηχανισμούς για κάθε μια από τις δύο κατηγορίες.[39]

Με τον όρο “γυμνά” νανοσωματίδια εννοούμε ανόργανα νανοσωματίδια, στην επιφάνεια των οποίων δεν υπάρχει κάποια οργανική ένωση συνδεδεμένη. Η σύνθεση “γυμνών” νανοσωματιδίων πραγματοποιείται παρουσία βάσεων επιτυγχάνοντας αλκαλικό περιβάλλον, διαλυμένων σε πολικό διαλύτη, με στόχο την σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων λόγω ηλεκτροστατικών απωθήσεων από τις στιβάδες ανιόντων και κατιόντων που σχηματίζει ο πολικός διαλύτης, όπως παρατηρείται και στην Εικόνα 9. Τα “γυμνά” νανοσωματίδια της παρούσας εργασίας, συντίθενται με την μέθοδο της συγκαταβύθισης, που αναλύθηκε σε προηγούμενο εδάφιο (βλ.παρ. 2.4.1).



Εικόνα 9: Ηλεκτροστατικές απωθήσεις μεταξύ των νανοσωματιδίων

Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται επιφανειοδραστικές ουσίες κατά την σύνθεση ανόργανων νανοσωματιδίων, η σταθεροποίηση τους επιτυγχάνεται μέσω αυτών, όπως ήδη αναφέρθηκε πιο πάνω, βασιζόμενοι στην ιδιότητά τους να προσροφώνται ή να συνδέονται ομοιοπολικά με την επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Αυτό γίνεται σε όλο το μήκος της επιφάνειας των νανοσωματιδίων και έτσι αυτά σταθεροποιούνται λόγω στερικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σχηματιζόμενων πυρήνων, και με αυτόν τον τρόπο αποτρέπεται η συσσωμάτωση.[24]

Η σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων, μέσω στερικών αλληλεπιδράσεων προσφέρει έλεγχο του μεγέθους των νανοσωματιδίων, με μεταβολή στην συγκέντρωση των επιφανειοδραστικών ουσιών στο διάλυμα. Η κάθε επιφανειοδραστική ουσία, προσδένεται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων με μοναδικό τρόπο. Μεγάλα οργανικά μόρια μπορούν να τυλίγονται γύρω από τα νανοσωματίδια, ενώ μικρότερες οργανικές ενώσεις προσδένονται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων και εκτείνονται έξω από αυτήν. Η σταθεροποίηση μέσω επιφανειοδραστικών ουσιών οδηγεί σε προϊόντα μεγάλης ομοιογένειας.[40]

2.5 Εφαρμογές μαγνητικών νανοσωματιδίων

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια είναι σημαντικοί υποψήφιοι για βιοϊατρικές εφαρμογές, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους. Αρχικά, έχοντας μεγέθη συγκρίσιμα με αυτά των ιών (20-500 nm), των πρωτεϊνών (5-50 nm) ή ενός γονιδίου (πλάτους 2 nm και μήκους 10-100 nm), μπορούν να πλησιάσουν οποιαδήποτε βιολογική περιοχή θέλουμε να μελετήσουμε, χωρίς να κινδυνεύσει να καταστραφεί.

Δεύτερον, τα νανοσωματίδια είναι μαγνητικά, υπακούουν δηλαδή στο νόμο Coulomb και μπορούν να δεχθούν την επίδραση ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου. Αυτή η “δράση από απόσταση” συνδυάζεται με την εν γένει διαπερατότητα των μαγνητικών πεδίων στους ανθρώπινους ιστούς. Με αυτό τον τρόπο, μπορούν να παραχθούν νανοσωματίδια με σκοπό την μεταφορά, κάποιου αντικαρκινικού φαρμάκου, ή μιας ομάδας που θα περιέχει ραδιοεπισήμανση, προορίζοντάς τα σε μια στοχευόμενη περιοχή του σώματος, όπως είναι ένας καρκινικός όγκος.

Τρίτον, τα μαγνητικά νανοσωματίδια μπορούν να παρασκευαστούν έτσι ώστε να ανταποκρίνονται σε χρονικά μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο, επιτυγχάνοντας τη μεταφορά ενέργειας από το μαγνητικό πεδίο στα νανοσωματίδια. Για παράδειγμα τα σωματίδια συνθέτονται έτσι ώστε να παρουσιάζουν θερμική ικανότητα, και αυτό οδηγεί στη χρησιμοποίησή τους στη μαγνητική υπερθερμία, παραδίδοντας “τοξικά” ποσά θερμικής ενέργειας σε ιστούς-στόχους, όπως είναι οι όγκοι και τα καρκινικά κύτταρα. Αυτές και πολλές άλλες εφαρμογές στον τομέα της βιοϊατρικής εκκινήθηκαν ως αποτέλεσμα των ειδικών φυσικών ιδιοτήτων των μαγνητικών νανοσωματιδίων.[41]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

«Βιοεφαρμογές νανοϋλικων»

3.1. Βιολογική σημασία του σιδήρου σε ζωντανούς οργανισμούς

Οι πρώτες ενδείξεις για την παρουσία του σιδήρου στο αίμα εμφανίστηκαν ήδη από τον 18^ο αιώνα. Παρόλα αυτά, έως τη δεκαετία του 1930, δεν ήταν γνωστές πολλές πληροφορίες σχετικά με τον μεταβολισμό του σιδήρου σε μοριακό επίπεδο. Η πρώτη ολοκληρωμένη ανασκόπηση για τον μεταβολισμό του σιδήρου δημοσιεύτηκε το 1958.[42] Τα τελευταία χρόνια, η γνώση σχετικά με την ομοιόσταση του σιδήρου, έχει βελτιωθεί και υπάρχει μεγάλη ερευνητική δραστηριότητα προς τον σχεδιασμό πρωτοπόρων στρατηγικών για την πρόληψη και τη θεραπεία σοβαρών παθολογικών καταστάσεων στον άνθρωπο. Παρ' όλα αυτά, οι γνώσεις σχετικά με τη βιολογία του σιδήρου, σε όλα τα επίπεδα τα οποία συνεισφέρει, παραμένουν εν πολλοίς ατελείς. Σημαντική, είναι η συμβολή του σιδήρου στο περιβάλλον, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο σε βιοχημικές οδούς ανάπτυξης των φυτών, κυρίως όμως χρησιμεύει ως συστατικό πολλών ενζύμων, όπως τα κυτοχρώματα.[43]

Ο σίδηρος λοιπόν εκτιμάται ως ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία του ανθρώπινου οργανισμού, καθώς αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά ενεργά κέντρα των ενζύμων, που παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίηση μιας σειράς βασικών βιοχημικών διεργασιών, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της ζωής, όπως για παράδειγμα στη μεταφορά του οξυγόνου, ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα και άλλα πολλά. Έχει επίσης τη δυνατότητα, κάτω από ορισμένες συνθήκες να εμφανίζει τρεις οξειδωτικές βαθμίδες +4, +5 και +6. Είναι λοιπόν ένα από τα σημαντικότερα βιοκαταλυτικά στοιχεία, λόγω αναστρέψιμης μετατροπής από Fe^{2+} σε Fe^{3+} και ικανότητας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αυτή η αλλαγή της οξειδωτικής του κατάστασης, τον καθιστά την κύρια εστία παραγωγής δραστικών ελεύθερων ριζών στον οργανισμό. Η μεγαλύτερη ποσότητα σιδήρου στο ανθρώπινο οργανισμό, βρίσκεται στις πρωτεΐνες αιμοσφαιρίνη και μυοσφαιρίνη. Ωστόσο, στις περιπτώσεις που τα επίπεδα σιδήρου είναι είτε πολύ χαμηλά είτε πολύ υψηλά, προκαλούνται σοβαρές επιπτώσεις σε ιστούς δημιουργώντας ασθένειες.[44]

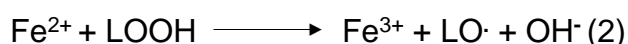
Πιο συγκεκριμένα, περίπου το 65% του σιδήρου βρίσκεται συμπλεγμένο με την αιμοσφαιρίνη και κοντά στο 10% βρίσκεται στη μυοσφαιρίνη, αντίστοιχα. Επίσης, ένα μέρος του σιδήρου (1-5% συνολικά) αποτελεί συστατικό ενζύμων και βιολογικών συστημάτων (όπως της μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια), ενώ ο υπόλοιπος σωματικός σίδηρος βρίσκεται στο αίμα ή είναι αποθηκευμένος (φερριτίνη). Τη ποσότητα όμως του σιδήρου που περιέχεται στον κάθε οργανισμό την καθορίζουν παράγοντες, όπως η ηλικία του ανθρώπου, το βάρος του, καθώς και το φύλο.

Είναι γνωστή και σε ερευνητικό μέχρι και σήμερα επίπεδο, η δημιουργία οξειδωτικών βλαβών, που πραγματοποιούνται σε βασικές περιοχές και συστατικά των κυττάρων, με αποτέλεσμα σοβαρών για τον άνθρωπο παθολογικών ασθενειών και καταστάσεων. Σημαντικό ρόλο σε αυτή τη «βλάβη», παίζει ο σίδηρος, ο οποίος έχει την ικανότητα να καταλύει την δημιουργία δραστικών ελευθέρων ριζών στον οργανισμό. Για τους παραπάνω λόγους, η φύση κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, μερίμνησε για την ανάπτυξη πολύπλοκων μηχανισμών, που έχουν ως στόχο την ακριβή ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου, τόσο σε κυτταρικό επίπεδο, όσο και σε οργανικό επίπεδο.

Με τον όρο ελεύθερη ρίζα μπορούμε να χαρακτηρίσουμε μόρια, ή άτομα, τα οποία ξεχωριστά το κάθε ένα, έχουν στην εξωτερική τους στοιβάδα ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Από την άλλη πλευρά είναι οι μη ελεύθερες ρίζες, των οποίων οι εξωτερικές στοιβάδες καλύπτονται από ζεύγη ηλεκτρονίων, με αντιπαράλληλο spin. Έτσι λοιπόν οι οξειδωτικές ρίζες, προκειμένου να συμπληρώσουν τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους στοιβάδας, έχουν την τάση να σχηματίζουν με πολύ μεγάλη ταχύτητα δεσμούς. Οι δεσμοί αυτοί, μπορεί να προέρχονται, είτε από αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, είτε ακόμα και από ομολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού. Αυτό έχει ως συνέπεια, τα ηλεκτρόνια που συμμετείχαν στον ομοιοπολικό δεσμό, να μοιράζονται, και έτσι να δημιουργούνται δυο ελεύθερες ρίζες.[45]

Η βιολογική δράση του σιδήρου λοιπόν, είναι απόρροια της χημικής του ικανότητας, ως στοιχείο μετάπτωσης, να λειτουργεί ταυτόχρονα ως δέκτης και ως δότης ηλεκτρονίων, μεταβάλλοντας με τον τρόπο αυτό, την οξειδωτική του κατάσταση, κυρίως μεταξύ της δισθενούς και της τρισθενούς μορφής του. Όταν τα ιόντα σιδήρου αποτελούν προσθετικές ομάδες πρωτεϊνών, η δραστηότητά τους ελέγχεται από την πρωτεΐνη, όταν

όμως είναι ελεύθερα ή συνδέονται χαλαρά σε θέσεις χαμηλής συγγένειας είναι δυνατόν να προκαλέσουν αρνητικές συνέπειες.[46] Η τοξικότητα των ιόντων σιδήρου, οφείλεται στην ικανότητά τους να συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου (αντίδραση 1), η οποία τους επιτρέπει να καταλύουν αντιδράσεις αυτοοξειδωσης μορίων, καθώς και διάσπασης υπεροξειδίων (αντιδράσεις Fenton), με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ριζών υδροξυλίου (OH[·]) και αλκοξυλο-ελεύθερων ριζών (LO[·]),(αντίδραση 2).[47]



Εκτός των ιόντων σιδήρου, υπάρχουν και άλλα μέταλλα μετάπτωσης, τα οποία έχουν την ικανότητα να καταλύουν αντιδράσεις “τύπου Fenton”, αλλά ο σίδηρος, είναι το πιο σημαντικό, διότι συναντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα βιολογικά συστήματα.[48]

3.2 Στοχευμένη θεραπεία κατά του καρκίνου

Είναι γεγονός πως ο καρκίνος στις μέρες μας, αποτελεί μια από τις πιο δύσκολες να καταπολεμηθούν, ασθένεια. Αποδίδεται σε μία ομάδα ασθενειών, που κοινό χαρακτηριστικό τους, είναι ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των κυττάρων, ο οποίος στόχο έχει τη δημιουργία μάζας ιστών ή όγκων, οι οποίοι μπορεί να είναι κακοήθεις ή καλοήθεις. Ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου και το στάδιο στο οποίο βρίσκεται, ακολουθείται συγκεκριμένη θεραπεία, ή συνδυασμός δύο θεραπειών, λεγόμενες και ως συμβατικές θεραπείες. Οι βασικότερες από αυτές, είναι η χειρουργική αφαίρεση του όγκου, η χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία και η βιολογική θεραπεία, η οποία περιλαμβάνει την ορμονοθεραπεία και την ανοσοθεραπεία.

3.2.1 Σύγχρονη θεραπεία με χρήση νανοσωματιδίων

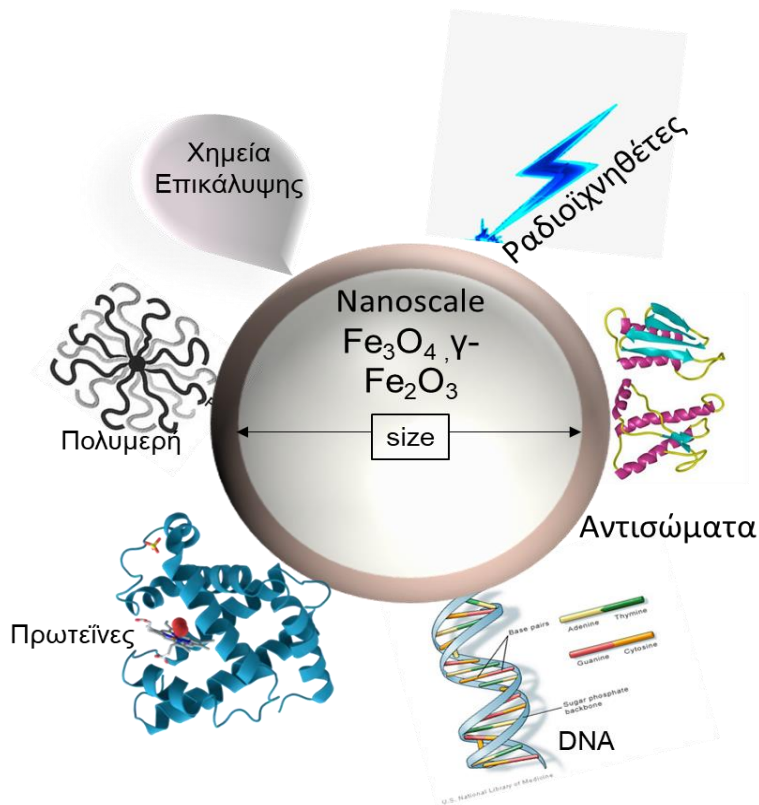
Μεγάλο μειονέκτημα, το οποίο εντοπίζεται στις προαναφερθείσες συμβατικές θεραπείες, είναι πως εκτός από τα καρκινικά κύτταρα, επηρεάζουν και τα υγιή, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργούνται παρενέργειες στον ασθενή κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Κάποιες από τις παρενέργειες που εμφανίζονται, είναι ρίγη, πυρετός, πόνος των μυών, αδυναμία, ανορεξία, ναυτία, εμετοί αλλά και διάρροια, εξαιτίας της λευκοπενίας και της τοξικότητας στον μυελό, που είναι ο κύριος παραγωγέας κυττάρων

του οργανισμού. Η λογική πίσω από τη χρήση της νανοτεχνολογίας στο συγκεκριμένο πεδίο, είναι η στοχευμένη χρήση αντικαρκινικών φαρμάκων, εκλεκτικά στην πάσχουσα περιοχή, δηλαδή στον καρκινικό όγκο. Ο στόχος αυτής της ιδέας, αποβλέπει στο να περιοριστεί η ποσότητα της γενικής κατανομής του κυτταροτοξικού φαρμάκου, μειώνοντας έτσι και τις συνδεόμενες παρενέργειες, καθώς και να ελαττωθεί η δοσολογία που απαιτείται, για αποτελεσματική τοπική στόχευση του φαρμάκου.[49]

Υπάρχουν πολλά είδη νανοσωματιδίων όπως: πολυμερικά (οργανικά) και μεταλλικά (ανόργανα) νανοσωματίδια, λιποσώματα, λιπίδια, κβαντικές τελείες, δενδριμερή, μικροκάψουλες, λιποπρωτεΐνες, κ.α., τα οποία λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν, μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στη διάγνωση και στη θεραπεία πολλών ασθενειών.[50]

3.2.2 Αλληλεπιδράσεις νανοσωματιδίων με βιολογικά συστήματα

Μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον, λόγω της ευελιξίας των εφαρμογών τους, όπως το μικρό μέγεθος των νανοσωματιδίων, καθώς και η ικανότητα επιφανειακής τροποποίησης τους με κατάλληλους υποδοχείς, δίνουν στα νανοσωματίδια την ικανότητα στόχευσης, σε μια συγκεκριμένη κυτταρική περιοχή.[51]



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση διαφόρων εφαρμογών, δομικών μετασχηματισμών και επιφανειακές αλληλεπιδράσεις νανοκλίμακας οξειδίου του σιδήρου νανοσωματίδια.

3.2.2.1 Μηχανισμοί εισαγωγής των νανοσωματιδίων στα κύτταρα

Αφού τα νανοσωματίδια εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό, για να αρχίσουν τη δράση τους, θα πρέπει να βρεθούν μέσα στο κύτταρο ή και στον πυρήνα του κυττάρου, αν πρόκειται για γονιδιακή θεραπεία. Έτσι, είναι πολύ σημαντική η μελέτη των οδών διέλευσης των διαφόρων μεμβρανών που διαθέτει ένα κύτταρο, διότι αν τα νανοσωματίδια δεν καταφέρουν να εισέλθουν σε αυτήν, θα θεωρείται αποτυχημένη η οποιαδήποτε χορήγηση φαρμάκου, και άρα η θεραπεία.

Υπάρχουν δύο ειδών μηχανισμών διέλευσης των μεμβρανών ενός κυττάρου, οι ενεργητικοί και οι παθητικοί.[52]

3.2.2.1.1 Ενεργητικοί μηχανισμοί

Ως ενεργητική στόχευση, χαρακτηρίζουμε την διευκολυνόμενη διάχυση, την ενεργητική μεταφορά και την ενδοκύττωση. Με την χρήση νανοσωματιδίων, είναι δυνατόν να

ελαχιστοποιηθεί η πρόσληψη των αντικαρκινικών φαρμάκων από φυσιολογικά κύτταρα, ελαχιστοποιώντας έτσι, και τις παρενέργειες της θεραπείας, βελτιώνοντας ταυτόχρονα το θεραπευτικό αποτέλεσμα.[53]

1. Διευκολυνόμενη Διάχυση

Το μηχανισμό αυτό, τον ακολουθούν κυρίως υδατάνθρακες, αμινοξέα καθώς επίσης και τα φάρμακα που είναι παράγωγά τους. Απαιτεί κατανάλωση ενέργειας από το κύτταρο, και είναι απαραίτητη η παρουσία ενός ειδικού μεμβρανικού φορέα, όπου θα μεταφέρει την “ξένη” για το κύτταρο ουσία, στο εσωτερικό του.

2. Ενεργητική μεταφορά

Αποτελεί σημαντικό μηχανισμό απορρόφησης, καθώς χαρακτηρίζεται από την μεταφορά με ειδικούς φορείς, και έχει σαν κύριο χαρακτηριστικό την κατανάλωση ενέργειας (κυτταρικής ενέργειας), για την πραγματοποίηση της μεταφοράς.

3. Ενδοκύτωση

Ονομάζεται και πινοκύτωση ή φαγοκύτωση (όταν η μεταφερόμενη ουσία, είναι στερεή και μεγαλύτερη από 500 nm). Αποτελεί πολύπλοκο μηχανισμό, που απαιτεί επίσης ενέργεια. Αφορά την απορρόφηση μεγαλομοριακών ουσιών, κυρίως πρωτεϊνικής φύσης, και αποτελεί ίσως τον κυρίαρχο μηχανισμό, με τον οποίο νανοσωματίδια, εισέρχονται στην εσωτερική επιφάνεια του κυττάρου. Ο μηχανισμός αυτός, αποτελείται από το στάδιο της εγκόλπωσης της ουσίας, στον εξωκυτταρικό χώρο, από ένα μικρό τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης και από το στάδιο της αποκοπής του τμήματος αυτού, με την εισαγωγή του περιεχομένου μέσα στο κύτταρο. Μπορεί να αποτελέσει διαδικασία μεσολάβησης, ή μη υποδοχέα, ή ακόμα και να διευκολυνθεί μέσω της τροποποίησης των νανοσωματιδίων με μόρια στόχους. Η τροποποίηση των νανοσωματιδίων, μπορεί να οδηγήσει σε προσκόλληση αυτών στον υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης, και την μη αποτελεσματική τους είσοδο στο κύτταρο.

3.2.2.1.2 Παθητικοί μηχανισμοί

Ως παθητικούς μηχανισμούς, χαρακτηρίζουμε τη διάχυση και τη διήθηση. Αποτελούν τον σημαντικότερο τρόπο με τον οποίο η πλειοψηφία των φαρμάκων διέρχεται μέσα στο κύτταρο.[53]

Για την επιτυχή παθητική στόχευση, τα ναοσωματίδια θα πρέπει να κυκλοφορούν στο αίμα για παρατεταμένη χρονική περίοδο, έτσι ώστε να υπάρξουν πολλαπλές δυνατότητες για να περάσουν τα ναοσωματίδια στην θέση στόχο. Ο κύκλος ζωής των ναοσωματιδίων, μπορεί να διπλασιαστεί με επικάλυψη από υδρόφιλα πολυμερή, όπως η πολυαιθυλενογλυκόλη.

1. Διάχυση

Ίσως ο πιο κοινός τρόπος διακίνησης μορίων δια μέσου των κυτταρικών μεμβρανών. Σε αντίθεση με τους παραπάνω τρόπους της ενεργητικής εισαγωγής μορίων στο κύτταρο, ο συγκεκριμένος, δεν απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας.

2. Διήθηση

Κατά τον μηχανισμό της διήθησης, υδατοδιαλυτές ουσίες διέρχονται μέσα από τους πόρους της μεμβράνης, λόγω βαθμίδας υδροστατικής ή ωσμωτικής πίεσης. Ακόμα και μη λιποδιαλυτά φάρμακα μικρού μοριακού βάρους, μπορούν να ακολουθήσουν τον συγκεκριμένο μηχανισμό, καθώς έχουν την δυνατότητα να παρασύρονται από το ποσοστό του νερού, με αποτέλεσμα να μπορούν τελικά να διέλθουν, δια μέσου των υδατικών πόρων των μεμβρανών.

Γενικά, ο συγκεκριμένος μηχανισμός, εξαρτάται κυρίως από τη διαφορά υδροστατικής πίεσης, μεταξύ του εξωτερικού και εσωτερικού διαμερίσματος, το πάχος της μεμβράνης, τον αριθμό των πόρων και το ηλεκτρικό τους φορτίο.

3.3 Πολυμερή

Τα μεγάλα μόρια των πολυμερών, δημιουργούνται από απλά μόρια, τα μονομερή (monomers), τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς, και σχηματίζουν τις χαρακτηριστικές μακριές αλυσίδες του πολυμερούς.[54] Το μονομερές που επαναλαμβάνεται σε όλη την δομή του πολυμερούς, ονομάζεται

επαναλαμβανόμενη μονάδα (repeating unit), ή δομική μονάδα (structural unit). Τα πολυμερή, λαμβάνονται μέσω χημικών διαμοριακών αντιδράσεων μεταξύ των μορίων των μονομερών. Ανάλογα με το είδος των αντιδρώντων μονομερών, το παραγόμενο μπορεί να είναι ομοπολυμερές, ή συμπολυμερές, και η χημική αντίδραση, λοιπόν, καλείται πολυμερισμός ή συμπολυμερισμός, αντίστοιχα.[55]

Τα πολυμερή με βάση την αρχιτεκτονική της πολυμερικής αλυσίδας διακρίνονται σε :

- Γραμμικά
- Διακλαδισμένα
- Δικτυωτά

Οι ιδιότητες του παραγόμενου συμπολυμερούς εξαρτώνται από την φύση του μονομερούς, τις συνθήκες παραγωγής του, το μήκος της μοριακής αλυσίδας, και το μοριακό του βάρος.[56]

Τα συμπολυμερή γενικά αποτελούνται από δύο ή περισσότερα είδη δομικών μονάδων, τα οποία διακρίνονται σε:

- Συνήθη συμπολυμερή, που αποτελούνται από μικρά ομοπολυμερή τμήματα και υποδιαιρούνται σε:

A) Τυχαία συμπολυμερή, στα οποία οι δομικές μονάδες εναλλάσσονται τυχαία.

B) Εναλλασσόμενα συμπολυμερή, στα οποία οι διαφορετικές δομικές μονάδες εναλλάσσονται στην αλυσίδα μια προς μία.

- Αδρομερή συμπολυμερή, τα οποία αποτελούνται από μεγάλα ομοπολυμερή τμήματα, που συνδέονται κατά μήκος της αλυσίδας.
- Εμβολιασμένα συμπολυμερή, τα οποία αποτελούνται από ένα βασικό κορμό ομοπολυμερούς, από τον οποίο αναπτύσσονται διακλαδώσεις από ομοπολυμερή τμήματα του άλλου είδους δομικών μονάδων.

Τα πολυμερικά νανοσωματίδια λοιπόν, είναι κολλοειδή, των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται από 10 μέχρι 1000 nm. Τα σχήμα τους μπορεί να είναι σφαιρικό, με

διακλαδώσεις ή ακόμη μπορεί να έχουν μορφή πυρήνα – κελύφους. Η σύνθεσή τους βασίζεται, είτε στον πολυμερισμό των μονομερών (σε γαλάκτωμα και πολυμερισμό διασποράς), είτε σε διασπορά των πολυμερών (γαλακτωματοποίηση και νανοκαθίζηση).[57]

3.3.1. Επικάλυψη μαγνητικών νανοσωματιδίων με μόρια βιολογικού ενδιαφέροντος

Για την χρήση των μαγνητικών νανοσωματιδίων σε βιοϊατρικές εφαρμογές, απαραίτητη είναι η επικάλυψη του μαγνητικού τους πυρήνα με πολυμερικό υλικό, προκειμένου να είναι βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα. Πολύ συχνά τα μαγνητικά νανοσωματίδια σε *in vivo* εφαρμογές, σχηματίζουν συσσωματώματα στο αίμα, και απομονώνονται από μακροφάγα. Η επικάλυψη θα πρέπει να τηρεί της παρακάτω προϋποθέσεις:

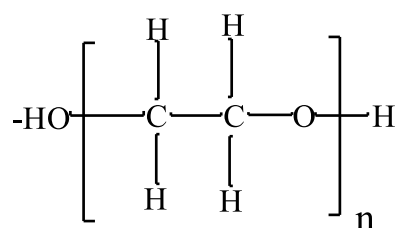
1. Ενίσχυση αντοχής στην οξειδωση
2. Κολλοειδή σταθερότητα
3. Ενίσχυση της λειτουργικότητας
4. Να μην συσσωματώνονται
5. Βιοσυμβατότητα

Τα πολυμερή αποτελούν τον πιο διαδεδομένο τρόπο επικάλυψης μαγνητικών νανοσωματιδίων, τα οποία μπορούν να τηρήσουν τις παραπάνω προϋποθέσεις. Τα μόρια αυτά αποκαλούμενα και ως, βιομόρια – στόχοι, μπορεί να είναι φάρμακα, πρωτεΐνες, αντισώματα, ραδιοϊχνηθέτες, ακόμα και μόρια DNA, προτιμώντας κυρίως αυτά που δημιουργούν ηλεκτροστατικούς δεσμούς, διότι η διαχείρισή τους είναι σχετικά απλή, με την προσθήκη ιόντων ή με τη ρύθμιση του pH.[57]

Νανοσωματίδια για ελεγχόμενη μεταφορά φαρμάκων, μελετώνται εκτενώς τα τελευταία χρόνια, διότι με τη χρήση τους, μπορούμε να επιφέρουμε έναν καλύτερο τρόπο στοχευμένης χορήγησης φαρμάκου στον οργανισμό. Η ενθυλάκωση των φαρμάκων στους πολυμερικούς νανοφορείς, μπορεί να βοηθήσει στη μεταφορά των φαρμάκων, μέσω των αιμοφόρων αγγείων στους όγκους, καθώς επίσης και να αυξάνει το χρόνο κυκλοφορίας από μερικά λεπτά έως αρκετές ώρες, αλλά και να μειώσει την κυτταρική πρόσληψη, κατά μήκος της ενδοκυτταρικής πορείας.[58]

Στόχος της χρήσης των μαγνητικών νανοσωματιδίων στη μεταφορά φαρμάκων, είναι η θετικά φορτισμένη επιφάνειά τους, να συνδεθεί με τις αντίθετα φορτισμένες ομάδες που διαθέτουν τα φάρμακα, με αποτέλεσμα το φάρμακο να φτάσει στον στόχο.

Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), εισήχθη για πρώτη φορά στην κλινική χρήση στις αρχές του 1990, και αποτελεί, ένα από τα πιο βιοσυμβατά προς κλινική χρήση υλικά. Υπάρχουν αυτή τη στιγμή έξι παραδείγματα των συζευγμάτων PEG-φάρμακο, που βρίσκονται σε κλινική χρήση. Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), είναι το πιο χρησιμοποιούμενο πολυμερές, που προσδίδει στα μαγνητικά νανοσωματίδια αρκετές σημαντικές ιδιότητες, όπως υψηλή διαλυτότητα, σταθερότητα σε υδατικά διαλύματα και ενισχύει την υδροφιλικότητα, βελτιώνοντας με αυτόν τον τρόπο, την βιοσυμβατότητα και παρατείνοντας τον χρόνο κυκλοφορίας τους αίματος.[59]

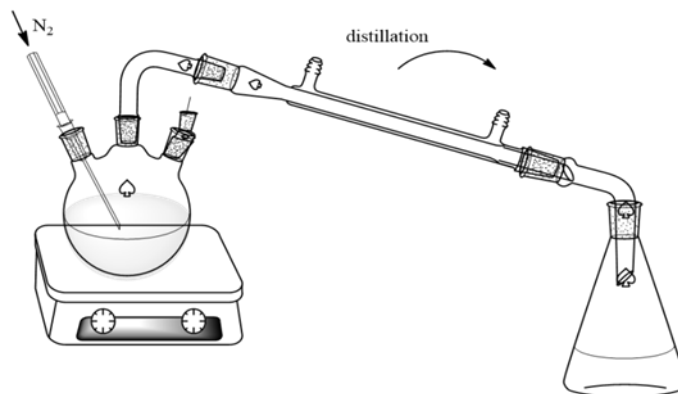


Εικόνα 11: Ο χημικός τύπος της πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG).

3.4 Μαγνητικά νανοσωματίδια επικαλυμμένα με συμπολυμερές (MAA-g-PEG) για τη δημιουργία ‘κενών’ πολυμερικών μαγνητικών σφαιρών

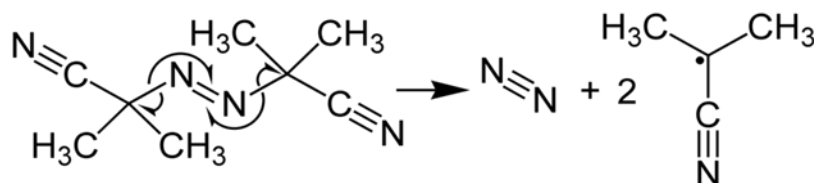
Στη παρούσα εργασία, εκτός από τις μαγνητικές σφαίρες οξειδίου του σιδήρου (γυμνές, επικαλυμμένες με τρινάτριο άλας του κιτρικού οξέος παρουσία και απουσία βοροϋδριδίου του νατρίου), συντέθησαν και όμοιες τους, επικαλυμμένες με συμπολυμερές μεθακρυλικού οξέος (MAA) εμβολιασμένου με αλυσίδες πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG), (MAA-co-PEG), με τη μέθοδο πολυμερισμού καταβύθισης μέσω απόσταξης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το ακετονιτρίλιο (ACN), το οποίο χρησιμοποιείται ως ένας πολικός απρωτικός διαλύτης, και το αζωδιισοβουτυλονιτριλίου (AIBN), ως εκκινητής του πολυμερισμού. Η διαδικασία αυτή, λοιπόν, περιλαμβάνει τρία βασικά συστατικά, τα μονομερή, τον εκκινητή και τον διαλύτη, καθώς και πραγματοποιείται σε τρία βασικά στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο της σύνθεσης αυτής τα μονομερή σχηματίζουν ρίζες, οι οποίες σταυροδέονται και

σχηματίζονται πυρήνες με τα μαγνητικά νανοσωματίδια στο εσωτερικό τους. Κατά τα επόμενα στάδια, τα σωματίδια αναπτύσσονται, και γίνονται μεγαλύτερα σε μέγεθος. [60]



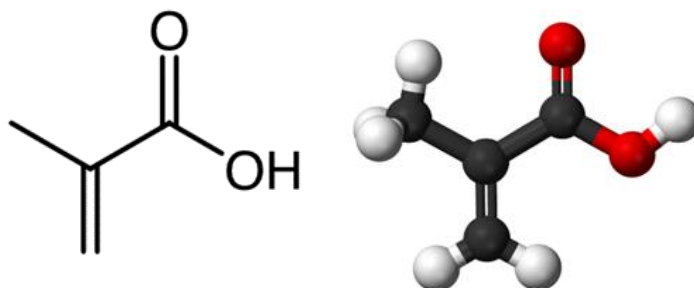
Εικόνα 12: Ριζικός πολυμερισμός καθίζησης μέσω απόσταξης

Στις αντιδράσεις πολυμερισμού ελευθέρων ριζών, όπως συμβαίνει στο συγκεκριμένο στάδιο για τη δημιουργία κενών μαγνητικών νανοσφαιρών, χρησιμοποιούνται τυπικοί εκκινητές όπως είναι το αζω-ισοβουτυρονιτρίλιο (AIBN). Αυτοί περιέχουν κάποιον «ασθενή» δεσμό στο μόριό τους, ο οποίος σε αυξημένη θερμοκρασία διασπάται, για να δώσει τις αρχικές ρίζες που είναι απαραίτητες για την έναρξη της αντίδρασης πολυμερισμού. Οι αρχικές αυτές ρίζες αντιδρούν με μόρια μονομερούς, δημιουργώντας τις μακρόριζες, οι οποίες «μεγαλώνουν» μέσω της αντίδρασης προόδου. Αυτές, τελικά, αντιδρούν μεταξύ τους προς σχηματισμό των μακρομορίων του πολυμερούς, μέσω της αντίδρασης τερματισμού. Στην Εικόνα 13, βλέπουμε τον μηχανισμό του AIBN, με στόχο την δημιουργία ελεύθερων ριζών, με σκοπό την συνέχεια του πολυμερισμού.[61]



Εικόνα 13: Μηχανισμός δημιουργίας ρίζας του AIBN κατά το στάδιο της εκκίνησης του πολυμερισμού

Πιο συγκεκριμένα το σύστημα που αναφέρθηκε παραπάνω, έχει μορφή κελύφους–πυρήνα. Ο πυρήνας, αποτελείται από μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου, ενώ το κέλυφος από το βιοσυμβατό συμπολυμερές P(MAA-co-PEG). Το μεθακρυλικό οξύ (MAA), είναι το μονομερές του συμπολυμερισμού. Πιο συγκεκριμένα, είναι ένα οργανικό οξύ με τη μορφή ενός άχρωμου και παχύρευστου υγρού. Είναι υδρόφιλο και κατά συνέπεια διαλυτό σε νερό, αλλά και αναμίξιμο με τους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Το μεθακρυλικό οξύ παράγεται βιομηχανικώς σε μεγάλη κλίμακα ως πρόδρομη ένωση εστέρων (μεθακρυλικού μεθυλεστέρα (MMA)).[62]



Εικόνα 14: Απεικόνιση μεθακρυλικού οξέος.

Η δημιουργία κενών πολυμερικών σφαιρών, έχει ως κυρίαρχο στόχο, τη δημιουργία νανοσφαιρών που αποτελούνται από έναν εξωτερικό φλοιό και έναν πυρήνα με τα μαγνητικά νανοσωματίδια, ο οποίος έχει σύσταση τέτοια ώστε να μπορεί εύκολα να εκδιωχθεί και να δημιουργηθεί η κενή εσωτερική σφαίρα. [63] Έτσι δημιουργείται πρώτα ο πυρήνας, ο οποίος αποτελείται από σφαίρες μεθακρυλικού οξέος (MAA), που έχουν μέσα τους τα μαγνητικά νανοσωματίδια και στη συνέχεια με τη βοήθεια του σταυροδέτη (MBA) και του PEG, συνθέτουμε τον βιοσυμβατό εξωτερικό φλοιό.[64]

Επομένως οι υπερπαραμαγνητικές ιδιότητες του συστήματος λόγω της ύπαρξης των οξειδίων του σιδήρου, σε συνδυασμό με τη δομή του πολυμερούς το οποίο διαθέτει στην επιφάνεια του ελεύθερες καρβοξυλομάδες και υδρόφοβες ομάδες, καθώς και η παρουσία της πολυαιθυλενογλυκόλης (η οποία ενισχύει την παραμονή των νανοσωματιδίων στο κυκλοφορικό σύστημα), καθιστούν τα συγκεκριμένα μαγνητικά νανοσωματίδια κατάλληλα συστήματα για στοχευμένη χορήγηση θετικά φορτισμένων φαρμάκων.[65]

Ακόμα ένα πλεονέκτημα που παρουσιάζουν, είναι ότι λόγω του μαγνητισμού των σφαιρών αυτών, έχουμε την δυνατότητα χρησιμοποίησης τους στη μέθοδο της υπερθερμίας.[66] Ο εγκλωβισμός του φαρμάκου σε αυτού του είδους τις πολυμερικές σφαίρες, μπορεί να επιτευχθεί μεταξύ διαφόρων αλληλεπιδράσεων, όπως μέσω διαμοριακών δυνάμεων ή επιφανειακής προσρόφησης του φαρμάκου στο πολυμερικό δίκτυο, ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

3.5 Θεραπευτικές και διαγνωστικές εφαρμογές των νανοσωματιδίων του σιδήρου

Τα νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για θεραπευτικούς αλλά και διαγνωστικούς σκοπούς αντίστοιχα. Οι εφαρμογές τους ταξινομούνται ανάλογα, με το εάν αυτές εφαρμόζονται σε ζωντανό οργανισμό (*in vivo* applications) ή σε τεχνητό περιβάλλον (*in vitro* applications). Αφετέρου, στις βασικότερες *in vivo* εφαρμογές συμπεριλαμβάνονται, η υπερθερμία και η στοχευμένη απελευθέρωση φαρμάκου, που χρησιμοποιούνται ως θεραπευτικές τεχνικές, και η μαγνητική τομογραφία (MRI) που αποτελεί μια καθαρά διαγνωστική εφαρμογή, η οποία βρίσκει χρήση ακόμα και σήμερα.[67]

Τα πλεονεκτήματα τους στις παραπάνω *in vitro* και *in vivo* εφαρμογές είναι τα εξής:

- 1) Είναι μαγνητικά, και αυτό μας δίνει τη δυνατότητα χειρισμού τους από απόσταση με εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, και τη συσσώρευσή τους γύρω από έναν στόχο (στοχευμένη μεταφορά φαρμάκου).
- 2) Μπορούμε να εκμεταλλευτούμε την μαγνητική τους ροπή με στόχο μεγαλύτερους ρυθμούς χαλάρωσης T_1 και T_2 (σκιαγραφικά/παράγοντες αντίθεσης στην τεχνική MRI).
- 3) Όταν υποβληθούν σε ένα εναλλασσόμενο, AC, μαγνητικό πεδίο, μετατρέπουν την απορροφούμενη ενέργεια σε θερμότητα (μαγνητική υπερθερμία).

3.5.1 Στοχευμένη θεραπεία παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου

Είναι γεγονός πως τα καρκινικά κύτταρα έχουν διαφορετική σύσταση και ιδιότητες από τα υγιή, και αυτό μας οδηγεί στη σκέψη, ότι αυτές οι ιδιότητες πρέπει να εκμεταλλευτούν προκειμένου να οδηγηθούν στη πλήρη απόπτωσή τους. Η στοχευμένη θεραπεία μπορεί

να επιτευχθεί παρουσία ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και θα μπορούσε να θεωρηθεί μια σωτήρια λύση στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Στόχος είναι ένα κυτταροτοξικό φάρμακο, να έρχεται σε επαφή με ένα βιοσυμβατό μαγνητικό φορέα νανοσωματιδίων, όπως είναι για παράδειγμα τα P(MAA-co-PEG)@mNPs και να πραγματοποιείται χορήγηση στον ασθενή, μέσω του κυκλοφορικού συστήματος. Κατά την εισαγωγή τους λοιπόν στο αίμα, χρησιμοποιείται ένα εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο, το οποίο μεταφέρει τα μαγνητικά νανοσωματίδια στην επιθυμητή περιοχή. Αφού το φάρμακο συγκεντρωθεί στο επιθυμητό σημείο, απελευθερώνεται μέσω μεταβολής του pH, αφού πρόκειται για pH ευαίσθητες σφαίρες.[68]

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής σχετίζεται με διάφορες φυσικές παραμέτρους (όπως η ένταση του μαγνητικού πεδίου και οι μαγνητικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων), υδροδυναμικές (όπως είναι ο ρυθμός ροής του αίματος, η συγκέντρωση των μαγνητικών σωματιδίων, η πορεία και το χρονικό διάστημα χορήγησης της φαρμακευτικής ουσίας) και φυσιολογικές παραμέτρους, όπως το βάθος του ιστού σε σχέση με την στοχευόμενη περιοχή (δηλαδή η απόσταση από την πηγή του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου).[69]

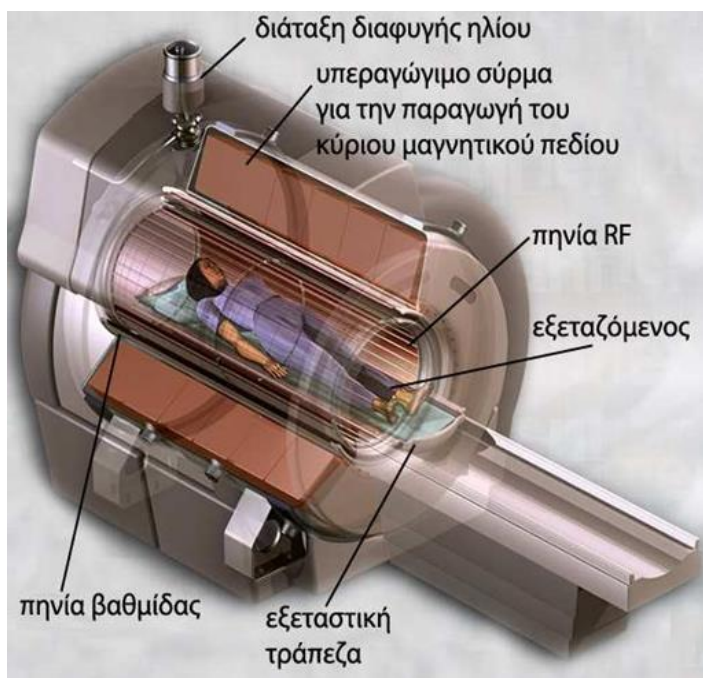
Σχετικά με την χορήγησή τους ενδοφλεβίως, τα νανοσωματίδια πρέπει να έχουν ένα μέγεθος μεταξύ 10-100 nm, διότι έχει αποδειχθεί πως είναι το καλύτερο και πιο ασφαλές μέγεθος, ώστε να αποφεύγουν το ενδοθηλιακό σύστημα του οργανισμού. Εάν όμως χορηγηθούν σωματίδια με μέγεθος μεγαλύτερο από 200 nm, τότε αυτά διαχωρίζονται από τον σπλήνα, και απομακρύνονται από τα φαγοκύτταρα, μειώνοντας έτσι το χρόνο παραμονή των σωματιδίων αυτών στο αίμα. Από την άλλη πλευρά, όταν τα σωματίδια είναι, μικρότερα των 10 nm, τότε απομακρύνονται πάρα πολύ γρήγορα από τα αγγεία, και τυχόν υπολείμματά τους καθαρίζονται από τα νεφρά. [70]

3.5.2 Μαγνητική τομογραφία - Απεικόνιση με μαγνητικό συντονισμό (MRI)

Η μαγνητική τομογραφία (MRI), αποτελεί την πιο σύγχρονη, αλλά και σε ερευνητικό ακόμα επίπεδο μέθοδο, η οποία μας δίνει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με απεικόνιση ιστών και ζωτικών οργάνων. Εκμεταλλευόμενη τον μαγνητικό πυρηνικό συντονισμό, με την τεχνική MRI, μπορεί να γίνει και εντοπισμός των βλαστοκυττάρων που μεταμοσχεύονται, ιδιαίτερα για την θεραπεία του καρκίνου του εγκεφάλου, που

αποτελεί, τη δυσκολότερη προς εξάλειψη και θεραπεία, νόσο. Με την εκμετάλλευση των ιδιοτήτων που έχουν τα παραμαγνητικά και υπερμαγνητικά υλικά, η μαγνητική τομογραφία μπορεί να απεικονίσει λειτουργικές διαδικασίες του σώματος, που σκοπό θα έχουν καλύτερη φωτοαντίθεση αλλά και καλύτερη ποιότητα εικόνας.[40, 71]

Η γενική λειτουργία του είναι πως στον μαγνητικό τομογράφο, εφαρμόζεται ισχυρό μαγνητικό πεδίο και σε συνδυασμό με ένα ηλεκτρομαγνητικό κύμα, με μορφή ραδιοσυχνότητων παράγονται λεπτομερείς εικόνες υψηλής ανάλυσης από το εσωτερικό του οργανισμού, χωρίς τη χρήση επιβλαβών ακτινοβολιών που χρησιμοποιούνται στις συμβατικές ακτινογραφίες και αξονικές τομογραφίες.



Τα μαγνητικά νανοσωματίδια έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί ως παράγοντες αντίθεσης στην τεχνική MRI για την ενίσχυση του σήματος, λόγω της ικανότητά τους να ενισχύουν το σήμα της φωτοαντίθεσης. Στους παράγοντες αντίθεσης, που χρησιμοποιούνται στην τεχνική MRI, προσδένονται κατάλληλα μόρια/υποκατάστατες ώστε να εξασφαλιστεί η εκλεκτική δέσμευση των κακοηθών ιστών.[1]

Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση μαγνητικού τομογράφου.[72]

3.5.3 Μαγνητική Υπερθερμία

Η υπερθερμία σαν έννοια είναι αρχαία, καθώς η πρώτη αναφορά σε αυτήν χρονολογείται γύρω στα 470-377 π.Χ., με μια επισήμανση του Ιπποκράτη. Μέχρι και σήμερα πολυάριθμες βασικές μελέτες έχουν δείξει, ότι η υπερθερμία αποτελεί μια από τις προτεινόμενες θεραπείες κατά του καρκίνου, η αρχή της οποίας βασίζεται στη μέση κυτταρική αδρανοποίηση, που προκαλείται με θέρμανση των ιστών ή και οργάνων σε θερμοκρασία υψηλότερη από 42 °C. Η μαγνητική υπερθερμία, είναι μια πολλά

υποσχόμενη μέθοδος θεραπείας του καρκίνου, η οποία προς το παρόν εφαρμόζεται σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες, όπως η χημειοθεραπεία και η ραδιοθεραπεία. Είναι μια μέθοδος υπερθέρμανσης των καρκινικών κυττάρων, όπου προκαλείται από έντονη τοπική αύξηση της θερμοκρασίας, που οδηγεί ένα σημαντικό ποσοστό τους στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, ή αλλιώς απόπτωση. Η χρήση της γίνεται κυρίως με μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου, μαγνητίτη (Fe_3O_4) και μαγκεμίτη ($\gamma-Fe_2O_3$), τα οποία από φύση τους, έχουν υψηλά επίπεδα μαγνήτισης.[73]

Το 1957, προτάθηκε για πρώτη φορά η εφαρμογή με ενέσιμη χορήγηση, μαγνητικών σωματιδίων σε καρκινικό ιστό, τα οποία υπό την επίδραση ενός εναλλασσόμενου μαγνητικού πεδίου, ήταν ικανά να προκαλέσουν την αύξηση της θερμοκρασίας στην περιοχή του όγκου. Διάφορα μαγνητικά σωματίδια χορηγούνται με μορφή σιδηρορρευτού, σε συγκεκριμένη τοποθεσία στον οργανισμό, η μεταφορά των οποίων μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες μεθόδους. Μια από αυτές, είναι η απευθείας έγχυση του ρευστού στον καρκινικό ιστό, όταν είναι γνωστή η θέση του, που πραγματοποιείται με έγχυση του, σε κατάλληλη αρτηρία που τροφοδοτεί με αίμα τον συγκεκριμένο ασθενή ιστό. Σε περίπτωση που δεν είναι γνωστή η τοποθεσία, τα μαγνητικά νανοσωματίδια διασπείρονται παντού στον οργανισμό. Ωστόσο, η θερμότητα μπορεί να περιοριστεί με την εφαρμογή ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, μόνο στην περιοχή που περιέχεται ένας καρκινικός όγκος.[74]

Η αποτελεσματικότητα της μαγνητικής υπερθερμίας ως θεραπεία, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες που σχετίζεται με τα χαρακτηριστικά, τόσο των μαγνητικών ρευστών όσο και των πειραματικών διατάξεων (ένταση πεδίου, συχνότητα). Πολλές έρευνες και μελέτες γίνονται κατά καιρούς, ούτως ώστε να βελτιωθεί η πολλά αυτή υποσχόμενη μέθοδος.



Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση μερικών από τα μοναδικά πλεονεκτήματα των μαγνητικών νανοϋλικών για τη θεραπεία με βάση την υπερθερμία και την ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκων.

3.5.4 Καταπολέμηση του καρκίνου με χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων από την εταιρία MagForce AG.

Απόδειξη των όσων έχουν ειπωθεί μπορεί να χαρακτηριστεί η εταιρία MagForce AG. Είναι μια εταιρία η οποία ιδρύθηκε στο Βερολίνο της Γερμανίας και η οποία θεωρείται πρωτοπόρος στον τομέα της θεραπείας του καρκίνου, καθώς το 2011 ξεκίνησε επιτυχώς τη χρήση της νανοτεχνολογίας σε ανθρώπινο επίπεδο (in vivo). Είναι η πρώτη εταιρία η οποία πήρε Ευρωπαϊκή έγκριση για τη χρήση ενός προϊόντος μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου. Τα θεραπευτικά αυτά κέντρα έχουν την επωνυμία NanoTherm®, η οποία θεωρείται αποτελεσματική για τη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος και του καρκίνου του προστάτη, και η εφαρμογή της έχει προχωρήσει και στις ΗΠΑ.

Η θεραπεία NanoTherm®, πραγματοποιείται με τη βοήθεια της συσκευής εφαρμογής μαγνητικού πεδίου, ονομαζόμενη ως Nano Activator®. Η συγκεκριμένη συσκευή όπως και σχεδόν όλα τα συστήματα υπερθερμίας, μπορούν να επιφέρουν με το κατάλληλο ρεύμα παλμού, και με βάση το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο που δημιουργείται, κατάλληλες θερμοκρασίες θεραπευτικής αγωγής εντός του όγκου. Η σχεδιαστική πορεία της θεραπείας γίνεται με τη βοήθεια του λογισμικού προσομοίωσης NanoPlan®, το οποίο χρησιμοποιεί την εξίσωση μεταφοράς της βιοθερμίας για να βοηθήσει τον θεραπευτή να υπολογίσει τις κατάλληλες θερμοκρασίες, καθώς και την καταλληλότητα του μαγνητικού πεδίου για την εξάλειψη του όγκου. Το λογισμικό απαιτεί την συμπλήρωση μιας σειράς ερωτήσεων σχετικά με τις παραμέτρους της θεραπείας. Στη συνέχεια, δημιουργείται μια τρισδιάστατη εικόνα η οποία απεικονίζει το εσωτερικό, για παράδειγμα του εγκεφάλου, που περιέχεται ο όγκος καθώς εμφανίζει και περιοχές αποθήκες νανοσωματιδίων. Μεταβάλλοντας αυτές τις παραμέτρους κατάλληλα αναλόγως τα αποτελέσματα που προκύπτουν, ο γιατρός έχει τη δυνατότητα να καθορίσει τις κατάλληλες τιμές, για τη βελτιστοποίηση ισχύς του πεδίου.[75]

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

«Τεχνικές Χαρακτηρισμού και αντιδραστήρια»

4.1 Δομικός και μορφολογικός χαρακτηρισμός

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια μπορούν να καθοριστούν με πολλές τεχνικές χαρακτηρισμού. Ο δομικός χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε μέσω της τεχνικής περίθλασης ακτίνων-Χ και την φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR), ενώ ο μορφολογικός πραγματοποιείται με την ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM), και την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM). Ο χαρακτηρισμός της υδροδυναμικής διαμέτρου νανοσωματιδίων, καθώς και το επιφανειοδραστικό φορτίο καθορίζεται από την δυναμική σκέδασης φωτός (DLS). Τέλος, μετρήσεις της μαγνήτισης που προσδιορίζουν τις μαγνητικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων, πραγματοποιήθηκαν σε ένα μαγνητόμετρο παλλομένου δείγματος (VSM). Στην παρούσα εργασία έχουν εκπονηθεί όλοι οι παραπάνω χαρακτηρισμοί και ακολουθεί η ανάλυση αλλά και η επεξήγηση στις παρακάτω παραγράφους.

4.1.1 Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμός Fourier (FT-IR)

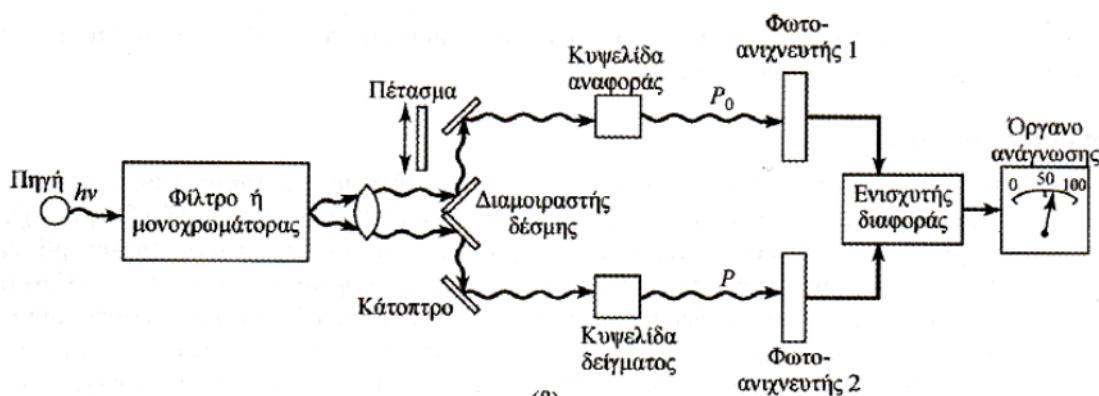
Η φασματοσκοπία υπερύθρου είναι μία αναλυτική τεχνική, η οποία μετράει την ένταση της ακτίνας του υπερύθρου σε σχέση με το μήκος κύματος (κυματάριθμος) του φωτός. Βασιζόμενοι στον κυματάριθμο, μπορούμε να κατηγοριοποιήσουμε το φως υπερύθρου σε άπω υπέρυθρο ($4\sim 400\text{ cm}^{-1}$), σε μέσο υπέρυθρο ($400\sim 4.000\text{ cm}^{-1}$) και σε εγγύς υπέρυθρο ($4.000\sim 14.000\text{ cm}^{-1}$). Η φασματοσκοπία υπερύθρου ανιχνεύει τα χαρακτηριστικά της δόνησης χημικών λειτουργικών ομάδων σε ένα δείγμα. Όταν το υπέρυθρο φως αλληλεπιδράσει με την ύλη, οι χημικοί δεσμοί θα ταλαντωθούν, θα έρθουν σε επαφή και θα λυγίσουν. Σαν αποτέλεσμα, μια χημική λειτουργική ομάδα αναμένεται να απορροφήσει την ακτινοβολία υπερύθρου σε ένα συγκεκριμένο εύρος κυματάριθμων ανεξάρτητα από τη δομή του υπόλοιπου μορίου.

Πιο συγκεκριμένα, τα φάσματα υπερύθρου οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις των οξειδίων του σιδήρου με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (φωτόνια). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές περιλαμβάνουν διέγερση των δονήσεων ή περιστροφή των

μορίων στη θεμελιώδη ηλεκτρονική τους κατάσταση και σχετίζονται με δονήσεις έκτασης των ενδοατομικών δεσμών καθώς επίσης και δονήσεις κάμψης μεταξύ των γωνιών που σχηματίζουν οι δεσμοί. Η συχνότητα της ακτινοβολίας η οποία απορροφάτε εξαρτάται από τα ενεργειακά επίπεδα περιστροφής και τις σταθερές δύναμης των δεσμών μεταξύ των ατόμων.

4.1.2 Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis)

Βασίζεται στην ικανότητα απορρόφησης φωτεινής ακτινοβολίας, της ορατής (400-780 nm) και υπεριώδους περιοχής (190-400 nm) από μόρια ευρισκόμενα στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων. Η απορρόφηση υπεριώδους (UV:190-400 nm), ή ορατής ακτινοβολίας (visual 400-800 nm), μπορεί να προκαλέσει μόνο ηλεκτρονικές διεγέρσεις, δηλαδή διεγέρσεις ηλεκτρονίων της στοιβάδας σθένους, που μεταβαίνουν από μια δεσμική σε μια αντιδεσμική κατάσταση, χωρίς να υπάρξει αλλαγή στον κύριο κβαντικό αριθμό.



Εικόνα 17: Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης και μέρη τα οποία αποτελείται

4.1.3 Περίθλαση Ακτίνων-X (X-Ray Diffraction, XRD)

Η μέθοδος XRD ή αλλιώς Τεχνική Περίθλασης Ακτίνων – X είναι μία αναλυτική τεχνική η οποία μπορεί να δώσει ποιοτικές πληροφορίες ως προς τη δομή (θέση ατόμων, μορίων ή ιόντων στο χώρο) ενός κρυστάλλου. Ακόμα, μας δίνει πληροφορίες σχετικά με τα κρυσταλλικά επίπεδα καθώς και τις διαστάσεις των μοναδιαίων κυψελίδων των κρυσταλλικών υλικών, διευκρινίζοντας μας επίσης εάν είναι άμορφα κρυσταλλικά, ή όχι.

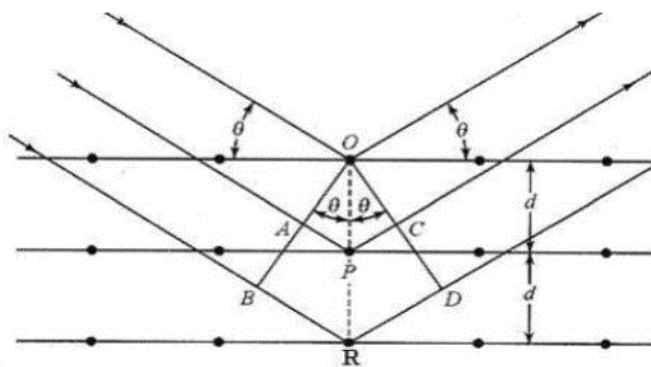
Η αρχή λειτουργίας της είναι η εξής: Όταν μία δέσμη ακτίνων-Χ προσπίπτει στην επιφάνεια ενός κρυστάλλου υπό γωνία θ , ένα τμήμα αυτής σκεδάζεται από το επιφανειακό στρώμα των ατόμων (1^ο πλεγματοειδές επίπεδο) ενώ το υπόλοιπο αυτής εισέρχεται στο δεύτερο στρώμα (2^ο πλεγματοειδές επίπεδο). Στο δεύτερο πλεγματοειδές επίπεδο πάλι ένα μέρος της δέσμης σκεδάζεται ενώ το υπόλοιπο διέρχεται αυτής και φτάνει στο τρίτο πλεγματοειδές επίπεδο και συνεχίζει.

Βασίζεται λοιπόν στην ελαστική σκέδαση μονοχρωματικής ακτινοβολίας ακτίνων Χ, έναντι της γωνίας Bragg, όπου πραγματοποιείται η πρόσπτωση των ακτίνων Χ στον κρύσταλλο και παρατηρείτε η μέγιστη αλληλεπίδραση.

Ένα γράφημα XRD παρέχει πληροφορίες σχετικά με την κρυσταλλική δομή σε ατομικό επίπεδο του υπό μέτρηση δείγματος. Οι πληροφορίες περιέχονται από συγκεκριμένους αριθμούς και έντασης κορυφών που παράγονται κατά την περίθλαση σε συγκεκριμένες γωνίες θ , σύμφωνα με την εξίσωση του Bragg, συνδέει το μήκος κύματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τη γωνία περίθλασης και την απόσταση μεταξύ των χωροθετημένων κέντρων του κρυστάλλου:

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

όπου, n σταθερός ακέραιος αριθμός που προσδιορίζει την τάξη της περίθλασης, λ το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, θ η γωνία σκέδασης και d η απόσταση μεταξύ των επιπέδων του κρυσταλλικού πλέγματος του δείγματος.



Εικόνα 18: Περίθλαση ακτίνων Χ σε κρύσταλλο

Οι προϋποθέσεις για να έχουμε περίθλαση ακτίνων Χ είναι οι εξής:

1. Θα πρέπει οι αποστάσεις μεταξύ των στρωμάτων των ατόμων πρέπει να είναι περίπου ίδιες με το μήκος κύματος ακτινοβολίας
2. Τα κέντρα σκέδασης πρέπει να κατανέμονται στο χώρο με υψηλή κανονικότητα.



Εικόνα 19: X-ray diffractometer Agilent Technologies Super Nova, με το οποίο πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις για την παρούσα ερευνητική εργασία.

4.1.4 Μαγνητομετρία δονούμενου δείγματος, Vibrating Sample Magnetometry (VSM)

Η μαγνητομετρία δονούμενου δείγματος (Vibrating Sample Magnetometry, VSM), χρησιμοποιείται σε μαγνητικά νανοσωματίδια για τη μελέτη των μαγνητικών τους ιδιοτήτων και βασίζεται κυρίως στη μεταβολή της ροής σε ένα πηνίο όταν ένα μαγνητικό δείγμα δονείται κοντά σε αυτό. Η μαγνητική ροή του πηνίου προκαλείται από την εφαρμογή ενός εξωτερικού ισχυρού μαγνητικού πεδίου.

Η διαδικασία στην οποία υποβάλλεται το δείγμα είναι ότι αρχικά τοποθετείται στο ένα άκρο μίας μη μαγνητικής ράβδου ενώ το άλλο άκρο της ράβδου είναι στερεωμένο σε έναν μηχανικό δονητή. Το ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο του κινούμενου δείγματος επάγει ένα εναλλασσόμενο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο (ΗΜΠ) ανάμεσα στα πηνία ανίχνευσης, το μέγεθος του οποίου είναι ανάλογο της μαγνητικής ροπής του δείγματος. Το ασθενές ΗΜΠ ενισχύεται με έναν lock-in ενισχυτή ο οποίος είναι ευαίσθητος μόνο σε σήματα της συχνότητας δόνησης. Τα πηνία ανίχνευσης ακυρώνουν σήματα τα οποία

προέρχονται από διακυμάνσεις του εφαρμοζόμενου πεδίου. Το σύστημα κίνησης δονείται συνήθως με συχνότητα μικρότερη των 40 Hz και το πλάτος της δόνησης είναι λίγα χιλιοστά του μέτρου.

Με τη μαγνητομετρία δονούμενου δείγματος λοιπόν μας δίνεται η δυνατότητα να μετρήσουμε μαγνητικές ιδιότητες (χρησιμοποιώντας τους βρόχους υστέρησης), όπως είναι η παραμένουσα μαγνήτιση και το συνεκτικό πεδίο ενός μαγνητικού δείγματος, κατά την εφαρμογή ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου σε αυτό. Οι μαγνητικές ιδιότητες μπορούν επίσης να μετρηθούν συναρτήσει της θερμοκρασίας.

4.1.5 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Με την δυναμική σκέδαση φωτός μετρούνται μεγέθη σωματιδίων από 2 nm έως 2 μm. Η τεχνική βασίζεται στη σκέδαση (Rayleigh) μίας μονοχρωματικής ακτινοβολίας, από νανοσωματίδια τα οποία βρίσκονται σε ένα κολλοειδές αιώρημα. Τα νανοσωματίδια μέσα στο αιώρημα εκτελούν τυχαία και συνεχή κίνηση (κίνηση Brown) εξαιτίας των πολλαπλών συγκρούσεων με τα μόρια του υγρού, τα οποία κινούνται λόγω της θερμικής τους ενέργειας. Χρήση μονοχρωματικής δέσμης λέιζερ, προκαλεί θερμικά εξαρτώμενες διακυμάνσεις στην ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, οι οποίες προέρχονται από την κίνηση Brown των νανοσωματιδίων σε διασπορά.

Οι μεταβολές της έντασης σχετίζονται με την ταχύτητα της κίνησης Brown και ως εκ τούτου, με το μέγεθος των σωματιδίων μέσω της σχέσης Stokes-Einstein :

$$DT = \frac{k_b T}{3\pi\eta(T)d_h}$$

όπου, D_T είναι ο συντελεστής διάχυσης, k_b είναι η σταθερά του Boltzmann, T είναι η απόλυτη θερμοκρασία σε Kelvin, $\eta(T)$ είναι το ιξώδες του εναιωρήματος το οποίο εξαρτάται ισχυρά από τη θερμοκρασία και d_h είναι η υδροδυναμική διάμετρος.

Το ζ-δυναμικό ενός κολλοειδούς διαλύματος νανοσωματιδίων περιγράφει την διαφορά δυναμικού μεταξύ του μέσου διασποράς και της ρευστής ακινητοποιημένης στοιβάδας στην επιφάνεια των διεσπαρμένων νανοσωματιδίων. Η τιμή του ζ-δυναμικού μπορεί να δώσει πληροφορίες για τον κατά προσέγγιση προσδιορισμό της σταθερότητας ενός κολλοειδούς διαλύματος. Γενικά εάν η απόλυτη τιμή ζ δυναμικού είναι πάνω από 30mV

θεωρείται αρκετά σταθερό κολλοειδές. Η μέτρηση πραγματοποιείται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου παράλληλα με μια μέτρηση DLS καθορίζοντας έτσι την ηλεκτροφορητική κίνηση η οποία είναι άμεσα σχετιζόμενη με το ζ-δυναμικό μέσω του τύπου:

$$\mu_e = \epsilon_r \epsilon_0 \zeta / \eta$$

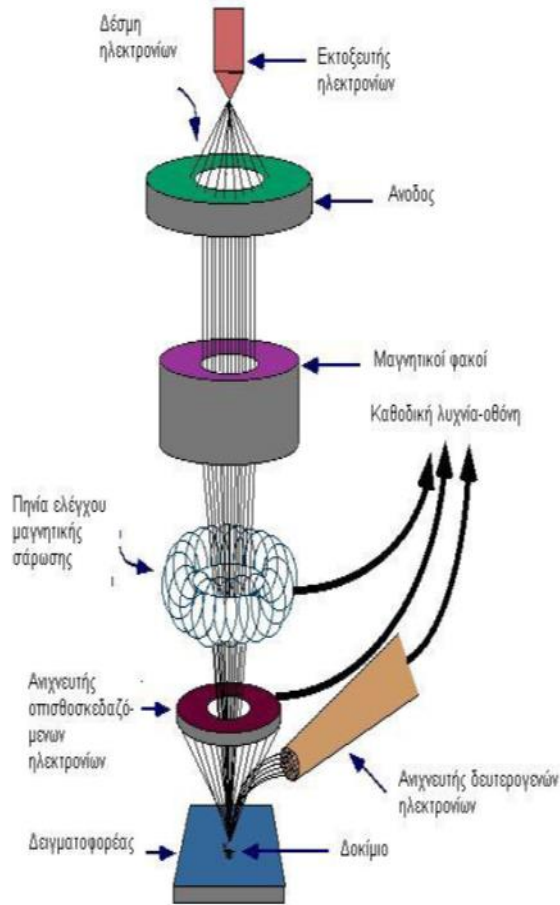
όπου, ϵ_r η διηλεκτρική σταθερά του μέσου διασποράς, ϵ_0 η διαπερατότητα του κενού και η το ιξώδες του μέσου διασποράς.

4.1.6 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) είναι μία ακόμα τεχνική, με την οποία μπορούμε να έχουμε, λεπτομερειακή γνώση της μορφολογίας των επιφανειών των νανοσωματιδίων. Η αρχή λειτουργίας βασίζεται στην εξέταση μίας επιφάνειας, με παλινδρομική σάρωση με μία εξαιρετικά εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων ή με ένα κατάλληλο δειγματολήπτη-ανιχνευτή και λειτουργεί με τον εξής τρόπο. Μια δέσμη ηλεκτρονίων:

- Σαρώνει μια επιφάνεια σε ευθεία γραμμή
- Επιστρέφει στην αρχική του θέση
- Μετατοπίζεται προς τα κάτω κατά ένα σταθερό διάστημα

Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως ότου σαρωθεί η επιθυμητή περιοχή της επιφάνειας. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της σάρωσης, λαμβάνεται σήμα που αντιστοιχεί στο δεδομένο σημείο της επιφάνειας (διεύθυνση z).



Εικόνα 20: Διάγραμμα λειτουργίας ενός SEM

Η μεγάλη δυνατότητα εστίασης και αλλαγής μεγέθυνσης σε ένα ευρύ πεδίο, η ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος, τα τρισδιάστατα διαγράμματα που προσφέρει το SEM και γενικότερα οι χρήσιμες πληροφορίες που προσφέρει το έχουν κάνει ένα απαραίτητο εργαλείο έρευνας. Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης παίρνουμε ποσοτικές αναλύσεις με λεπτομερείς γεωμετρικές πληροφορίες δίνοντας έτσι τη δυνατότητα στον ερευνητή να διακρίνει τις φάσεις. Η διάβρωση και επικάλυψη επιφανειών μελετώνται επίσης με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, χρησιμοποιώντας όλα τα πλεονεκτήματά του. Για τον χαρακτηρισμό των τύπων της διάβρωσης και της επικάλυψης και τη κινητική μελέτη των διεργασιών.

4.1.7 Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία βασίζεται γενικά στην αλληλεπίδραση της ύλης με δέσμη ηλεκτρονίων επιτρέποντας την λήψη εικόνων μεγαλύτερης ευκρίνειας από ένα οπτικό

Η λειτουργία του SEM στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις του προς εξέταση δείγματος και της προσπίπτουσας σε αυτό δέσμης ηλεκτρονίων. Οι βασικές διατάξεις που υπάρχουν στο μικροσκόπιο είναι το σύστημα παραγωγής δέσμης ηλεκτρονίων, το σύστημα κατεύθυνσης της δέσμης, το σύστημα πληροφοριών και τέλος το σύστημα κενού. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης χρησιμοποιείται ευρύτατα σε όλα τα πεδία που μας ενδιαφέρει η γεωμετρία και η σύσταση της μικροδομής. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μια μεγάλη ποικιλία δειγμάτων όπως, βιολογικά υλικά, φιλμ, μεμβράνες, φίλτρα, ίνες, ρητίνες, τέφρες, τσιμέντα, χρώματα, μεταλλικές επιφάνειες, κλπ.

μικροσκόπιο. Η κβαντική θεωρία του Max Plank και η θεωρία της σχετικότητας του Albert Einstein μετά από επεξεργασία τους από τον de Broglie οδήγησαν στην απόδειξη ότι κάθε σωματίδιο κινούμενο πλησίον της ταχύτητας του φωτός (300.000 km/sec), συνδέεται υπό μορφή ακτινοβολίας με τη σχέση:

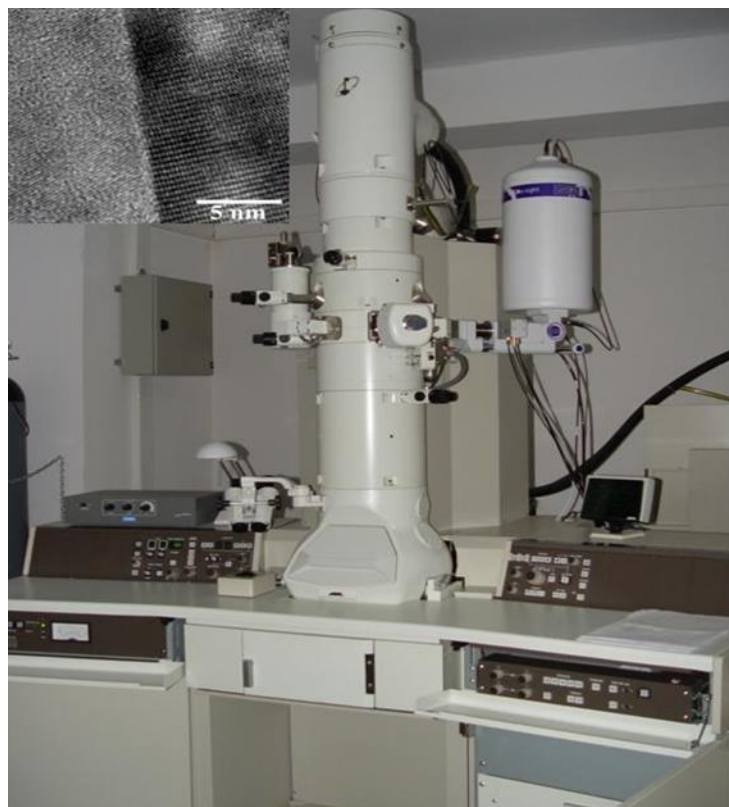
$$\lambda = h/mv$$

όπου, m η μάζα και v η ταχύτητα του σωματιδίου και h η σταθερά του Plank. Εάν αυτό το σωματίδιο είναι το ηλεκτρόνιο το μήκος κύματος λ είναι περίπου 0,005 Å, περίπου 100.000 φορές μικρότερο από την αντίστοιχη ορατή ακτινοβολία.

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης λοιπόν, είναι μια τεχνική μικροσκοπίας στην οποία αντί για φως χρησιμοποιείται δέσμη ηλεκτρονίων προκειμένου να δημιουργήσει μεγεθυμένα είδωλα των αντικειμένων που εξετάζονται. Είναι μια από τις σημαντικότερες τεχνικές εξαιτίας του γεγονότος ότι μια εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων, δίνει τη δυνατότητα πολύ μεγάλης διακριτικής ικανότητας που μπορεί να φτάσει περίπου και τα 2,5 Å. Κατά την τεχνική αυτή μια δέσμη ηλεκτρονίων διέρχεται από το δείγμα και η προβολή της αντιστοιχεί στο είδωλο του δείγματος.

Όπως και στην τεχνική περίθλασης ακτίνων Χ, έτσι και στην ηλεκτρονική μικροσκοπία θεωρείται ότι τα ηλεκτρόνια περιθλώνται, από τα κρυσταλλικά επίπεδα του υπό εξέταση δείγματος έτσι ώστε να ισχύει και ο νόμος Bragg, με τη διαφορά ότι το μήκος κύματος είναι πολύ μικρότερο. Η τεχνική TEM χρησιμοποιείται για να μελετήσει πολλά συστήματα και ιδιαίτερα στο πεδίο της νανοτεχνολογίας, δίνοντας την δυνατότητα του μορφολογικού χαρακτηρισμού των υλικών που συντίθενται. Τα προς μελέτη υλικά εναποτίθενται πάνω σε κατάλληλες επιφάνειες οι οποίες σκεδάζουν ελάχιστα την δέσμη ηλεκτρονίων. Η εναπόθεση γίνεται χρησιμοποιώντας αραιά διαλύματα των υλικών ώστε να είναι ομογενείς η διασπορά των νανοσωματιδίων.

Όπως αναφέραμε λοιπόν, οι πληροφορίες που λαμβάνονται από το TEM, αφορούν στην μορφολογία του δείγματος (μέγεθος, σχήμα, διάταξη σωματιδίων), στην κρυσταλλογραφική κατάσταση αυτού, στο βαθμό της δομικής τους τάξης καθώς και στην σύστασή του.



Εικόνα 21: Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM)

4.2 Τεχνικές και μέθοδοι Βιολογικής αξιολόγησης

Η διαδικασία της αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με βιολογικά συστήματα είναι από τις πιο σημαντικές καθώς και η βιολογική τους αξιολόγηση, καθώς απευθύνονται στον τομέα της ιατρικής και σε πολλές βιολογικές εφαρμογές.

4.2.1 Συνεστιακή Μικροσκοπία Σάρωσης με Ακτίνες Laser (Confocal Laser Scanning Microscopy)

Η συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης βασίζεται σε ένα συμβατικό οπτικό μικροσκόπιο, αλλά αντί μιας λάμπας, υπάρχει μια δέσμη λέιζερ η οποία επικεντρώνεται στο δείγμα. Η ένταση του φωτός λέιζερ ρυθμίζεται από φίλτρα ουδέτερης πυκνότητας και οδηγείται σε ένα σύνολο καθρεφτών σάρωσης που μπορούν να μετακινούνται με ακρίβεια και ταχύτητα. Στη συνέχεια η δέσμη μεταφέρεται στο οπίσθιο εστιακό επίπεδο του αντικειμενικού φακού, το οποίο εστιάζει πάνω στο δείγμα. Εάν το δείγμα είναι φθορίζον, μέρος του φωτός περνάει πίσω στον αντικειμενικό φακό. Αυτό το φως ταξιδεύει προς τα πίσω με την ίδια διαδρομή που κινείται το λέιζερ.

Η επίδραση των κατόπτρων σάρωσης σε αυτό το φως είναι να παράγει ένα σημείο φωτός που δεν προκαλεί σάρωση, αλλά στέκεται ακίνητο. Το λέιζερ που χρησιμοποιείται σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να είναι αργού ή/και ηλίου-νέου, ανάλογα με την περιοχή μέγιστης διέγερσης της φθορίζουσας ουσίας. Η ακτίνα λέιζερ λοιπόν αυτή διαπερνά το δείγμα, ενώ η εστίαση πραγματοποιείται σε πολύ μικρή έκταση με τη χρήση κατάλληλου διαφράγματος, αποκλείοντας κατ' αυτόν τον τρόπο το φωτισμό περιοχών εκτός εστίασης.

Η μέθοδος της μικροσκοπίας αυτής στη συγκεκριμένη εργασία, πραγματοποιήθηκε προκειμένου να παρατηρήσουμε με ποιο τρόπο τα μαγνητικά νανοσωματίδια επιδρούν στον κυτταροσκελετό των κυττάρων και αν αυτά το οδηγούν σε κυτταρική απόπτωση με βάση το πώς θα διαμορφωθεί ο σκελετός τους όταν επωαστούν με τα μαγνητικά νανοσωματίδια.

4.2.2 Δοκιμασία MTT

Η διερεύνηση της ζωτικότητας των κυττάρων αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη και αναγκαία προϋπόθεση σε περιπτώσεις μελέτης της κυτταροστατικής και κυτταροτοξικής δράσης των μαγνητικών νανοσωματιδίων καθώς και των φαρμάκων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν. Πραγματοποιείται προσδιορίζοντας ζωτικής σημασίας λειτουργίες των κυττάρων.

A. Ικανότητα ανάπτυξης κυττάρων.

Η διερεύνηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων αφορά τον προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων που διαιρούνται σε μία καλλιέργεια. Έτσι κύτταρα εμφυτεύονται σε συγκέντρωση 4×10^5 κύτταρα/mL, μετά από 24 ώρες επώασης στους 37 °C, προστίθεται τα μαγνητικά νανοσωματίδια και μετά από ποικίλα χρονικά διαστήματα έκθεσης σε αυτό, μετράται ο αριθμός των κυττάρων με αιμοκυττόμετρο. Από τις παραπάνω μετρήσεις προκύπτουν καμπύλες ανάπτυξης του κυτταρικού πληθυσμού παρουσία/απουσία φαρμάκου, που εκφράζουν την πολλαπλασιαστική ικανότητα του συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου και την αντιπολλαπλασιαστική δράση του αντίστοιχου φαρμάκου.

B. Ζωτικότητα κυττάρων

Η ζωτικότητα κυττάρων αναφέρεται στο ποσοστό των υγιών κυττάρων σε μία καλλιέργεια. Ο δείκτης αυτός, εξ'ορισμού ασαφής, προσδιορίζεται συνήθως ελέγχοντας ζωτικής σημασίας λειτουργίες όπως:

1. Τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων (MTT)
2. Τη δομική ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Χρώση Trypan Blue).

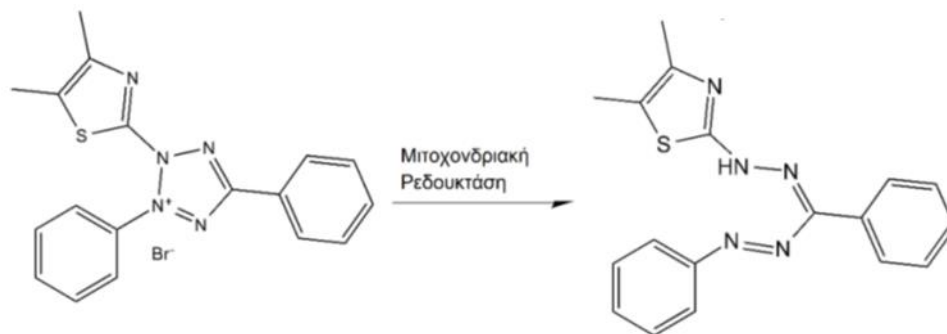
Αρχή μεθόδου MTT:

Η χρωματομετρική μέθοδος MTT μετράει τη μεταβολική δραστηριότητα των μιτοχονδρίων, βασισμένη στην μετατροπή του MTT (3-(4,5-διμέθυλο-θειαζόλ-2-ίλ)2,5-διφαινυλοτετραζόλιο) σε φορμαζάνη, από το ένζυμο ηλεκτρική αφυδρογονάση στα μιτοχόνδρια. Η φορμαζάνη απορροφά σε διαφορετικό μήκος κύματος (550-570 nm, χρώση ιώδες) από αυτό του MTT (400 nm, χρώση κίτρινο). Οι διαφορές στα επίπεδα φορμαζάνης που προσδιορίζονται αντανakλούν τη μεταβολική δραστηριότητα των μιτοχονδρίων παρουσία/απουσία φαρμάκου και επιτρέπουν να εκτιμηθεί το ποσοστό (%) των ζωτικών κυττάρων στην καλλιέργεια σε σχέση με το μάρτυρα. Θεωρείται ο ακριβέστερος δείκτης, με υψηλή ευαισθησία, ποιότητα και επαναληψιμότητα. Ο δείκτης των νεκρωτικών κυττάρων υπολογίζεται από το κλάσμα:

$$\frac{\text{αριθμός κυττάρων που έχουν χρωματιστεί}}{\text{συνολικό αριθμό κυττάρων}} * \%$$



Εικόνα 22: Πλάκα επίστρωσης κυττάρων για την αξιολόγηση της ζωτικότητας των κυττάρων. Η ένταση του χρώματος σχετίζεται με την ζωτικότητα των κυττάρων.

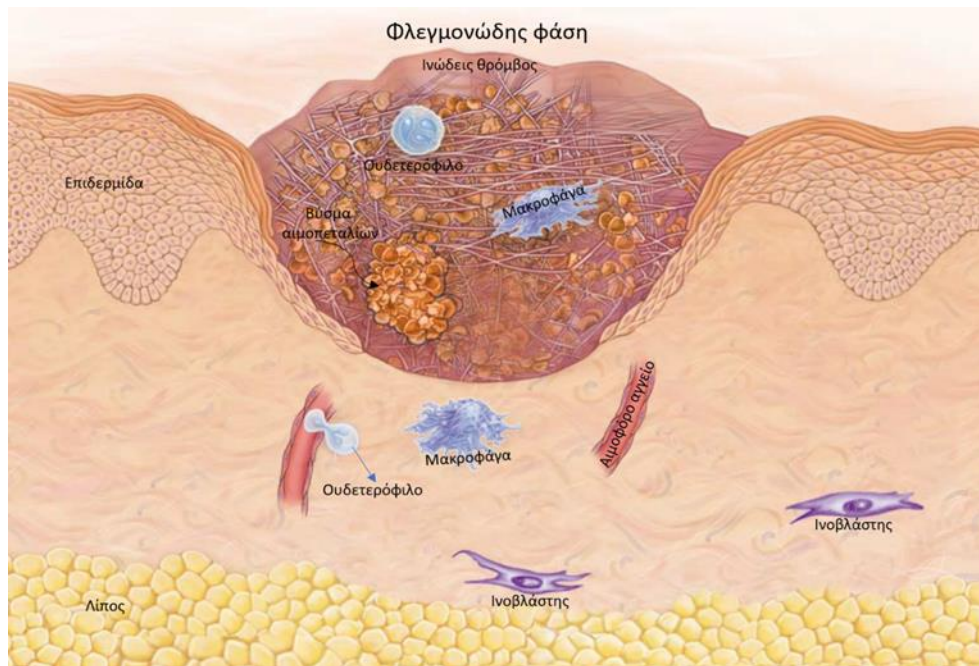


Εικόνα 23: Ενζυμική αναγωγή MTT σε φορμαζάνη

4.2.3 Δοκιμασία επούλωσης πληγών (wound healing assay)

Το δέρμα είναι το μέσο που διαχωρίζει το εσωτερικό περιβάλλον του ανθρώπινου οργανισμού, το οποίο είναι εξαιρετικά ευαίσθητο από τον εξωτερικό κόσμο, που μπορεί να λειτουργήσει επιθετικά παίζοντας το ρόλο του ξενιστή. Μετά από έναν βίαιο τραυματισμό μπορεί να επέλθει καταστροφή του δέρματος, με αποτέλεσμα να πάψει η προστατευτική λειτουργία. Ο οργανισμός αντιδρά άμεσα με σκοπό να επουλώσει το τραύμα. Η φάση τους επούλωσης ολοκληρώνεται σε τρία στάδια:

1. Στάδιο φλεγμονής: Μόλις συμβεί τους τραυματισμός εκκρίνονται διάφορες ουσίες στη περιοχή του τραύματος. Οι ουσίες αυτές αυξάνουν τοπικά τη ροή του αίματος προκαλώντας υπεραιμία και τα κύτταρα (φαγοκύτταρα) εξέρχονται πιο εύκολα από τις μεμβράνες διότι είναι πιο λεπτές. Έτσι τα φαγοκύτταρα κατευθύνονται προς τα μικρόβια και προσπαθούν να αντιμετωπίσουν την κατάσταση της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης.
2. Στάδιο αναδημιουργίας: Στο στάδιο αυτό ενεργοποιούνται οι ινοβλάστες, κύτταρα τα οποία παράγουν κολλαγόνο και βοηθάνε τους ιστούς να αναγεννηθούν.
3. Στάδιο επιθηλιοποίησης: Σε αυτό το στάδιο τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με γρήγορο ρυθμό, και αρχίζει να δημιουργείται μια νέα επιφάνεια ίδια με αυτήν που ήταν πριν τον τραυματισμό. Η διαδικασία αυτή δε σταματά μέχρις ότου να καλυφθεί με το νέο επιθήλιο όλη η έκταση του τραύματος.



Εικόνα 24: Μηχανισμός επούλωσης ιστών

Μερικοί οργανισμοί όμως, δεν είναι σε θέση να πραγματοποιήσουν τα παραπάνω στάδια σωστά, λόγω προβλημάτων που μπορεί να αντιμετωπίζουν, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ανεπιθύμητα αποτελέσματα, όπως χρόνιες φλεγμονές.

Η δοκιμασία επούλωσης τραύματος (would healing assay) είναι απλή, φθηνή και μία από τις πρώτες αναπτυγμένες μεθόδους για τη μελέτη της κυτταρικής μετανάστευσης *in vitro*. Αυτή η μέθοδος μιμείται τη μετανάστευση κυτάρων κατά τη διάρκεια της επούλωσης τραύματος *in vivo* που περιγράφηκε παραπάνω. Τα βασικά βήματα περιλαμβάνουν στρώσιμο κυτάρων, καθώς και τη δημιουργία μιας «πληγής» σε μια κυτταρική μονοστοιβάδα, στην καλλιέργεια, της οποίας εισάγουμε τα μαγνητικά νανοσωματίδια που εξετάζουμε. Γίνεται η λήψη των εικόνων στην αρχή και σε τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης κυτάρων για να κλείσει το τραύμα και πραγματοποιείται σύγκριση των εικόνων για να ποσοτικοποιηθεί ο ρυθμός μετανάστευσης των κυτάρων. Είναι ιδιαίτερα κατάλληλο για μελέτες σχετικά με τις επιδράσεις που προκαλούν οι αλληλεπιδράσεις κυτάρου-μήτρας και κυτάρου-κυτάρου στη μετανάστευση κυτάρων.

Γίνεται κυρίως σε επιδερμικά κύτταρα υγρή και καρκινικά και στη συγκεκριμένη εργασία η μέθοδος πραγματοποιήθηκε με τις εξής επιδερμικές κυτταρικές σειρές, κερατινοκύτταρα (NCTC) και μεταστατικά κύτταρα μελανώματος (A375-M6).

4.3 Αντιδραστήρια και Υλικά

Τα παρακάτω αντιδραστήρια αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich:

- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- Υδατικό διάλυμα NH_4OH 30%, πυκνή αμμωνία ($M_r = 17.03\text{g/mol}$)
- NaBH_4 βοροϋδρίδιο του νατρίου
- MAA, μεθακρυλικό οξύ: methacrylic acid 99% ($MW = 86.09$)
- CH_3CN , ακετονιτρίλιο: acetonitrile >99.9% ($MW = 41.05$)
- AIBN, 2,2'-αζω-διϊσοβουτυρονιτρίλιο: 2,2'-azobis-isobutyronitrile ($MW = 164.21$)
- Πολυ-(αιθυλενογλυκόλη) του μεθακρυλικού μεθυλαιθέρα, PEGMA: poly(ethyleneglycol) methylethermethacrylate ($M_n = 475$)

Το παρακάτω αντιδραστήριο αγοράστηκε από την Fischer Scientific :

- $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Τρινάτριο άλας του κιτρικού οξέος: tri-sodium citrate ($M_r = 294,10\text{g/mol}$, $d = 1,76\text{g/cm}^3$)

Το παρακάτω αντιδραστήριο αγοράστηκε από την Acros Organics :

- N,N'-μεθυλενοδιακρυλαμίδιο, MBA: N,N'-methylenebisacrylamide 96% εξαιρετικά καθαρό ($MW = 154.17$)

Όλες οι εκπλήξεις των συνθέσεων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία έγιναν με EtOH: απόλυτη αιθανόλη ($M.M = 46.07$) και απεσταγμένο νερό. Επίσης οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν κάτω από άνυδρη ατμόσφαιρα με τη χρήση αζώτου και χρησιμοποιήθηκε μαγνητική ανάδευση καθώς και εξωτερική θερμοκρασιακή παρακολούθηση μέσω θερμομέτρου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

«Σύνθεση Μαγνητικών νανοσωματιδίων»

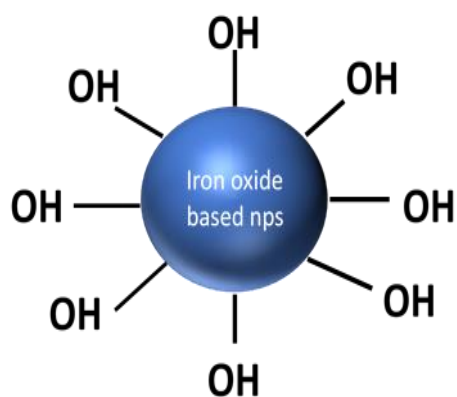
5.1 Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου

5.1.1 Σύνθεση «γυμνών» μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (mNPs), (1)

Η σύνθεση των γυμνών νανοσωματιδίων σιδήρου, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης, με την οποία παραλαμβάνονται νανοσωματίδια μαγκεμίτη ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), σφαιρικού σχήματος. Σε σφαιρική φιάλη των 250 mL, τοποθετούνται 100 mL απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια θερμαίνεται υπό ατμόσφαιρα αζώτου και συνεχή ανάδευση στους 70 °C, για 30 min έως ότου απαερωθεί τελείως για αποφυγή της οξείδωσης του σιδήρου. Μετά το πέρας 30 min προστίθενται σταδιακά σε αναλογία 2:1, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 g, 0.006 mol) και $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g 0.025 mol), και αφήνονται προς ανάδευση μέχρι τους 90 °C. Μετά τη διαλυτοποίησή τους, προστίθενται 8 mL πυκνής αμμωνίας (NH_3) για την εξασφάλιση αλκαλικού περιβάλλοντος και αφήνεται προς ανάδευση για μικρό χρονικό διάστημα. Η θέρμανση διακόπτεται και το μίγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Τα νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου συντέθησαν σε αλκαλικές συνθήκες (pH~12) και το χρώμα της αντίδρασης άλλαξε από πορτοκαλοκίτρινο σε μαύρο μετά το πέρας της αντίδρασης. Για τον καθαρισμό του προϊόντος και την απομάκρυνση της περίσσειας των αντιδραστηρίων πραγματοποιήθηκε μαγνητικός διαχωρισμός και έκπλυση του μαύρου ιζήματος. Οι εκπλύσεις πραγματοποιήθηκαν με απόλυτη αιθανόλη και απεσταγμένο νερό. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε (στις 3000 στροφές για 5 min) και ξηράνθηκε στους 40 °C για 5 h.



Εικόνα 25: Καθαρισμός νανοσωματιδίων μέσω μαγνητικού διαχωρισμού



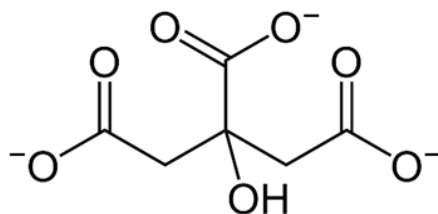
Εικόνα 26: Σχηματική αναπαράσταση των μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου χωρίς επικάλυψη

5.1.2 Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με τρινάτριο άλατος του κιτρικού οξέος (mNPs@citrate), (2)

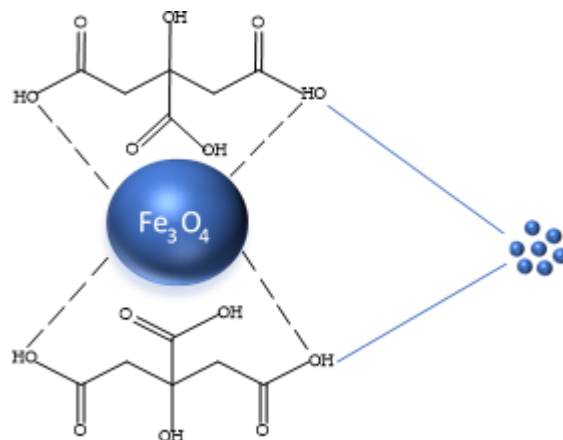
Η σύνθεση των μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίων του σιδήρου επικαλυμμένων με τρικιτρικό νάτριο, πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της συγκαταβύθισης δισθενούς και τρισθενούς άλατος του σιδήρου όπως περιγράφηκε στη σύνθεση 1. Το τρικιτρικό νάτριο διαθέτει τρεις καρβοξυλικές ομάδες όπως φαίνεται στην Εικόνα 27, οι οποίες στο pH της αντίδρασης αποπρωτονιώνονται και συμπλέκονται με τα επιφανειακά άτομα σιδήρου καθορίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη μορφολογία, το μέγεθος και την κολλοειδή συμπεριφορά του διαλύματος. Σε σφαιρική φιάλη των 250 mL εισάγεται 100 mL

απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια το δείγμα αφήνεται υπό ατμόσφαιρα αζώτου και συνεχή ανάδευση στους 70°C, για 30 min. Στη συνέχεια προστίθεται σταδιακά σε αναλογία 2:1, FeCl₃·6H₂O (1 g, 0,006 mol) και FeCl₂·4H₂O (0,5 g, 0.0025 mol) και το μίγμα αφήνεται μέχρι πλήρους διαλυτοποίησεως και έπειτα αυξάνεται η θερμοκρασία στους 90 °C. Στη συνέχεια προστίθενται 8 mL πυκνής αμμωνίας και αφήνονται για επιπλέον 30 min. Στο διάλυμα που προέκυψε προστέθηκε διάλυμα τρινατρίου άλατος του κιτρικού οξέος (100 mg/ml) και αφήνεται για επιπλέον 30 min. Το δείγμα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί το στάδιο του μαγνητικού διαχωρισμού και των εκπλύσεων με αιθανόλη και νερό και στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση του μαύρου ιζήματος (στις 3000 στροφές για 5 min), και τέλος ξηραίνεται στους 40 °C για 5h.

Με την προσθήκη τρινατρίου άλατος του κιτρικού οξέος εξασφαλίζεται η επικάλυψη των νανοσωματιδίων μέσω της σύμπλεξής τους με τα επιφανειακά άτομα του σιδήρου. Κατά την σύμπλεξη αφήνεται τουλάχιστον μια εκ των τριών ομάδων καρβοξυλικού οξέος αρνητικά φορτισμένη εξασφαλίζοντας τόσο την κολλοειδή συμπεριφορά των σωματιδίων λόγω των διαμοριακών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, όσο και την αποφυγή δημιουργίας συσσωματωμάτων.



Εικόνα 27: Σχηματική αναπαράσταση κιτρικού ανιόντος



Εικόνα 28: Σχηματική αναπαράσταση των μαγνητικών νανοσωματιδίων επικαλυμμένων με τρινάτριο άλατος του κιτρικού οξέος (mNPs@citrato)

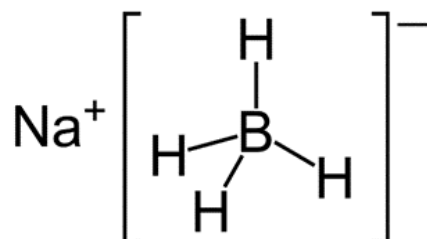


Εικόνα 29: Μαγνητική συμπεριφορά των νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με τρινάτριο άλατος του κιτρικού οξέος, παρουσία μόνιμου μαγνήτη (mNPs@citrato)

5.1.3 Σύνθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με τρινάτριο άλατος του κιτρικού και βοροϋδρίδιο του νατρίου, (mNPs@NaBH₄) (3)

Ακολουθώντας τη μέθοδο της συγκαταβύθισης συνετέθησαν μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου, στα οποία χρησιμοποιήθηκε ως αναγωγικό μέσο το βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH₄). Σε σφαιρική φιάλη των 250 mL, εισάγονται 100 mL απεσταγμένου νερού. Στη συνέχεια η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και θερμάνθηκε υπό ατμόσφαιρα αζώτου και υπο συνεχή ανάδευση στους 70°C, για 30 min. Ακολούθως, προστίθεται σταδιακά σε αναλογία 2:1 τα άλατα σιδήρου, FeCl₃·6H₂O (1 g, 0,006 mol) και FeCl₂·4 H₂O (0,5 g, 0.0025 mol) και μετά τη διαλυτοποίησή τους

προστίθενται 8 mL αμμωνίας και η θερμοκρασία αυξάνεται στους 90 °C. Μετά το πέρας 15 min προστίθενται το διάλυμα NaBH₄ (2 g, 0.05 mol) και παρατηρείται αντίστοιχη μεταβολή του χρώματος. Στη συνέχεια προστίθεται 5 mL διαλύματος τρικιτρικού νατρίου (40 mg/ml, 0,0017 mol).



Εικόνα 30: Συντακτικός τύπος του βοροϋδριδίου του νατρίου

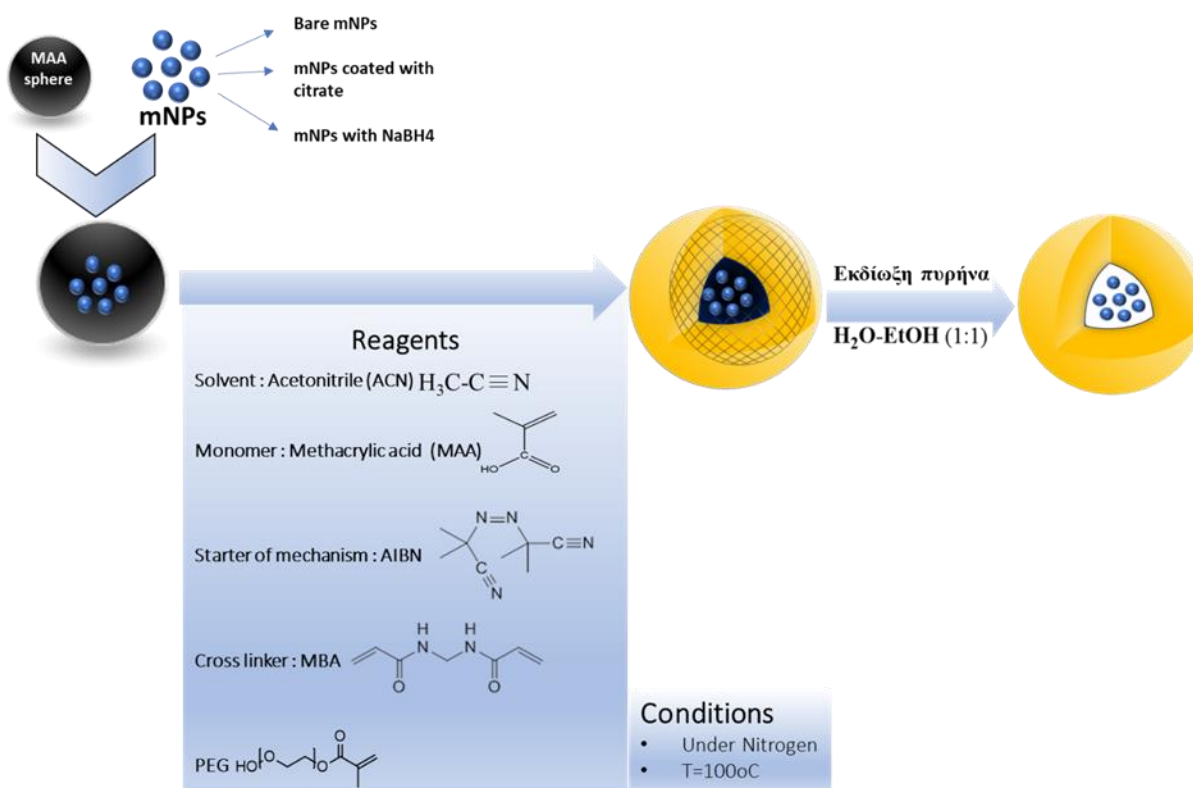
Η αντίδραση αφήνεται 12 ώρες, και στη συνέχεια σε θερμοκρασία δωματίου, στο διάλυμα πραγματοποιείται μαγνητικός διαχωρισμός, καθώς και έκπληση του μαύρου ιζήματος που ελήφθη με αιθανόλη και απεσταγμένο νερό. Το δείγμα φυγοκεντρείται σε μικρή φυγόκεντρο (στις 3000 στροφές για 5') και στη συνέχεια ξηράνθηκε με την βοήθεια φούρνου, για 5 h στους 40 °C.



Εικόνα 31: Μαγνητική συμπεριφορά των νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με τρινάτριο άλατος του κιτρικού οξέος και βοροϋδρίδιο του νατρίου, παρουσία μόνιμου μαγνήτη (mNPs@NaBH₄)

5.2 Σύνθεση πολυμερικών νανοσφαιρών και ενθυλάκωση μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου P(MAA-co-PEG)*@*mNPs, P(MAA-co-PEG)*@*mNPs*@*citrate, P(MAA-co-PEG)*@*mNPs*@*NaBH₄.

Η σύνθεση πολυμερικών νανοσφαιρών, πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία του ριζικού πολυμερισμού γαλακτώματος με απόσταξη. Στο Σχήμα 1, παρουσιάζεται διαγραμματικά η συνθετική πορεία, καθώς και τα επιμέρους βήματα που ακολουθούνται για τη σύνθεση των ενθυλακωμένων νανοσωματιδίων:



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας σύνθεσης πολυμερικών νανοσφαιρών με εγκλωβισμένα νανοσωματίδια σιδήρου.

Η συνθετική πορεία αποτελείται από τρία βασικά βήματα:

1. Δημιουργία PMAA σφαιρών στις οποίες πραγματοποιείται εγκλωβισμός των μαγνητικών νανοσωματιδίων που έχουν συντεθεί
2. Δημιουργία pH ευαίσθητου κελύφους με την παρουσία σταυροδέτη.

3. Τέλος, εκδίωξη του πυρήνα της σφαίρας, με σκοπό τη δημιουργία κενών pH ευαίσθητων μαγνητικών σφαιρών, οι οποίες έχουν την ικανότητα εγκλωβισμού φαρμάκου.

Τα παραπάνω βήματα, των οποίων η λεπτομερής περιγραφή γίνεται αμέσως μετά, πραγματοποιήθηκε για κάθε είδος μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου που έχουν προαναφερθεί.

5.2.1 Σύνθεση σφαιρών πολύ-μεθακρυλικού οξέος P(MAA)

Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη των 500 mL φέρονται 400 mL ακετονιτριλίου, ενός μη πρωτικού πολικού διαλύτη ($d=0.786 \text{ g/mL}$), η οποία τοποθετείται σε θερμομαγνητικό αναδευτήρα εντός ελαιόλουτρου, παρουσία αζώτου για 30 min, ώστε να πραγματοποιηθεί απαέρωση του διαλύματος. Στη συνέχεια προστέθηκαν 6 mL μεθακρυλικού οξέος ($d=1.015 \text{ g/mL}$, 0.14 mmol), το οποίο είναι υδρόφιλο μονομερές, καθώς και 20 mg από την ποσότητα των μαγνητικών νανοσωματιδίων που έχουν συντεθεί παραπάνω (σύνθεση 1, 2 και 3). Μετά το πέρας των 30 min και την σταθεροποίηση της θερμοκρασίας στους 70 °C, προστίθεται 120 mg του εκκινητή 2,2'-αζω-διϊσοβουτυρονιτρίλιο (AIBN). Περίπου 40 min αργότερα, στο διάλυμα παρουσιάστηκε θολερότητα και σταδιακά μετατράπηκε σε γαλακτώδες. Στη συνέχεια αυξήθηκε η θερμοκρασία στους 90 °C και πραγματοποιήθηκε απόσταξη του διαλύτη (~100 mL). Το διάλυμα απομονώθηκε και ακολούθησε καθαρισμός μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων φυγοκεντρήσεων και επαναδιασποράς με αιθανόλη (8000 στροφές $\times 5 \text{ min} \times 3 \text{ φορές}$).

5.2.2 Σύνθεση του pH-ευαίσθητου κελυφους με διασταυρούμενη σύνδεση, P(MAA-co-PEG)

Στην επιφάνεια των πολυμερικών σφαιρών PMAA, στις οποίες στο προηγούμενο βήμα έχει πραγματοποιηθεί εγκλωβισμός των μαγνητικών νανοσωματιδίων, αναπτύσσεται συμπολυμερές P(MAA-co-PEG) με διασταυρούμενη σύνδεση με την προσθήκη του N,N'-μεθυλενοδισακρυλαμίδιου (MBA) ως σταυροδέτη. Εν συντομία, η σύνθεση πραγματοποιήθηκε σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη στην οποία τοποθετήθηκαν 400 mL ακετονιτριλίου και 200 mg σφαιρών PMAA@mNPs, που συνέτεθησαν στο παραπάνω βήμα και διασπάρθηκαν με τη βοήθεια υπερήχων. Στη συνέχεια το μίγμα θερμάνθηκε

στους 70 °C, υπό ατμόσφαιρα αζώτου και συνεχή ανάδευση. Αφού αφέθηκε προς ανάδευση για μικρό χρονικό διάστημα, προστίθεται διαδοχικά το N,N'-μεθυλενοδισακρυλαμίδιο (MBA 140 mg), και το μεθακρυλικό οξύ (MAA, 100 μL, $d=1.015$ g/mL), πολύ-(αιθυλενογλυκόλη) του μεθακρυλικού μεθυλαιθέρα (PEGMA, 100 μL, $d=1.05$ g/mL) και τέλος 2,2'-αζω-διισοβουτυρονιτρίλιο (AIBN, 20 mg) με διατήρηση της θερμοκρασίας στους 80 °C. Τέλος η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά στους 90 °C, ώστε να πραγματοποιηθεί η απόσταξη του διαλύτη (~150 mL). Μετά το πέρας της αντίδρασης το γαλάκτωμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και πραγματοποιήθηκε όμοια διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού μέσω συνεχόμενων κύκλων φυγοκέντρησης και επαναδιασποράς σε αιθανόλη (8000 στροφές × 5 min × 3 φορές).

5.2.3 Εκδίωξη του πυρήνα-Απομόνωση κενών νανοσφαιρών με ενθυλακωμένα νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου

Σε ποτήρι ζέσεως των 250 mL προστίθενται 0,128 g, pH-ευαίσθητων σφαιρών που συνετέθησαν στο προηγούμενο στάδιο, σε διάλυμα H₂O:EtOH (50 mL:50 mL) αναλογίας 1:1 και ομογενοποιήθηκαν με τη βοήθεια υπερήχων για 30 min. Το διάλυμα αφέθηκε για 24 h υπό ανάδευση και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε (8000 στροφές × 5 min × 3 φορές), εκπλύθηκε και ξηράνθηκε σε κενό.

Περαιτέρω χαρακτηρισμός δομικός και μορφολογικός των προϊόντων που ελήφθησαν από τις παραπάνω συνθέσεις παρουσιάζεται στο επόμενο κεφάλαιο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

«Δομικός και μορφολογικός χαρακτηρισμός των νανοϋλικών»

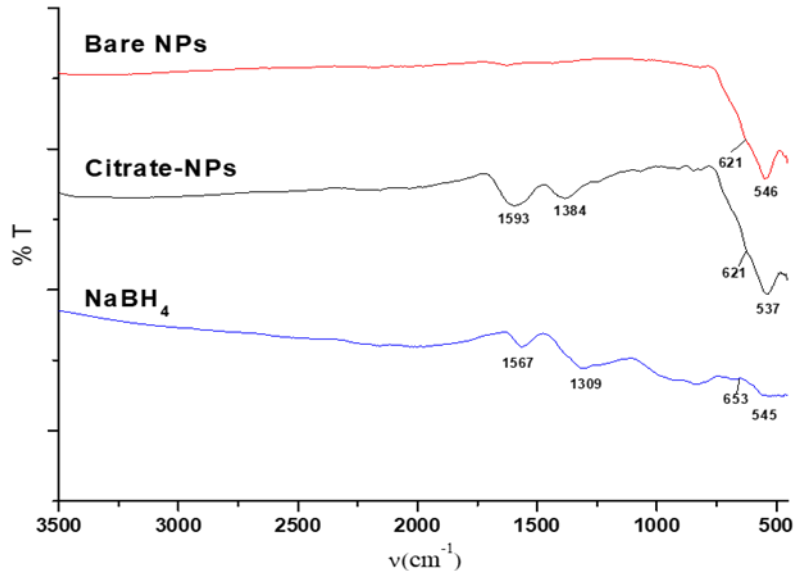
6.1 Μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (mNPs, mNPs@citrate, mNPs@NaBH₄).

6.1.1 Δομικός Χαρακτηρισμός

6.1.1.1 Φασματοσκοπία FT-IR

Ο δομικός χαρακτηρισμός τόσο των μαγνητικών νανοσωματιδίων όσο και των πολυμερικών νανοσφαιρών πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία FT-IR, μίας μεθόδου που κατηγοριοποιείται στον δομικό χαρακτηρισμό μιας ένωσης και συγκρίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές στο γράφημα του Σχήματος 2.

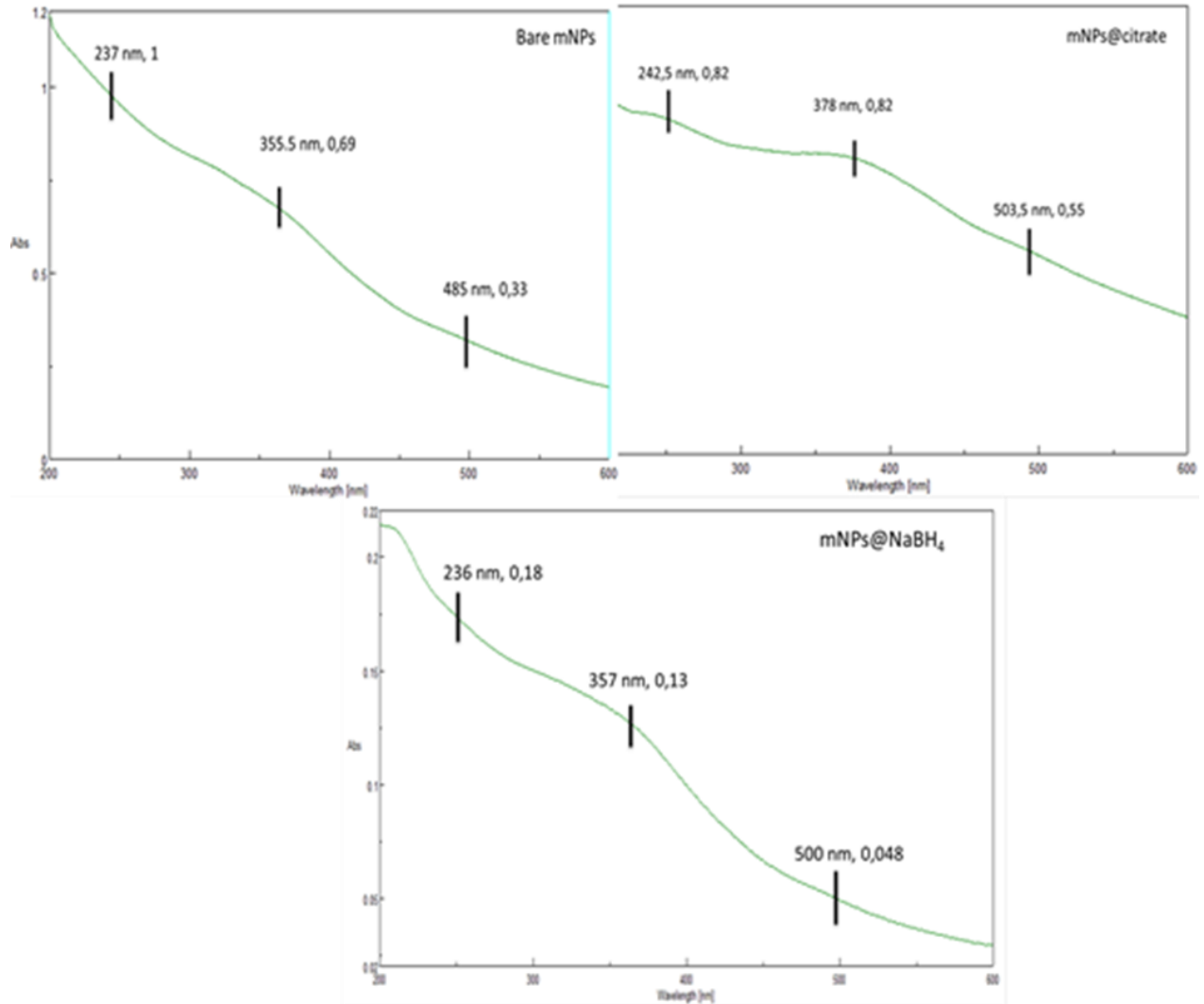
Αρχικά και στα τρία διαγράμματα του Σχήματος 2, παρατηρείται μια χαρακτηριστική κορυφή στα 546 cm⁻¹ ενδεικτική της ύπαρξης του δεσμού Fe-O-Fe του μαγνητίτη. Η κορυφή στα 1593 cm⁻¹ είναι χαρακτηριστική της συμμετρικής δόνησης του δεσμού του καρβονυλίου του καρβοξυλικού οξέος (-C=O), που εμφανίζουν τα καρβονύλια, στα 1600-1820 cm⁻¹, καθώς και μια κορυφή στα 1384 cm⁻¹, όπου είναι χαρακτηριστική κορυφή του δεσμού -COO-Fe, η οποία μπορεί να αποδοθεί στην αντίδραση των επιφανειακών ιόντων Fe²⁺ με τις καρβοξυλικές ομάδες του τρινατρίου του κιτρικού οξέος. Μέσω της αξιολόγησης των φασμάτων FT-IR μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η επιφάνεια των μαγνητικών νανοσωματιδίων Fe₃O₄, έχει επικαλυφθεί από μόρια κιτρικού οξέος μέσω των καρβοξυλικών ομάδων. Το ίδιο ισχύει και για την κορυφή που παρουσιάζεται στο επόμενο διάγραμμα όπου παρατηρείται η ίδια κορυφή, 1309 cm⁻¹, και αποδίδεται στην ασύμμετρη δόνηση του δεσμού των καρβοξυλίων με τον σίδηρο γεγονός που επιβεβαιώνει την σύμπλεξη του με το κιτρικό οξύ. Η διαφορά ΔV μεταξύ της συμμετρικής και ασύμμετρης δόνησης τάσης των καρβοξυλικών οξέων του κιτρικού οξέος υπολογίζεται από 205-216 cm⁻¹, διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί σε δυσχιδή σύμπλεξη του υποκαταστάτη με τα επιφανειακά άτομα του σιδήρου.[76]



Σχήμα 2: Διάγραμμα FT-IR των mNPs, mNPs@citrate, mNPs@NaBH₄.

6.1.1.2 Μελέτη των φασμάτων των νανοσωματιδίων με τη Φασματοσκοπία Υπεριώδους-Ορατού (UV-vis)

Μέσω της φασματοσκοπίας UV-Vis προσδιορίστηκαν οι ταινίες απορρόφησης των mNPs όπως φαίνεται στο Σχήμα 3 όπου στο συνεχές φάσμα από τα 300-800 nm, εμφανίζεται η χαρακτηριστική ταινία απορρόφησης του σιδήρου. Στο πρώτο διάγραμμα των γυμνών mNPs, παρατηρείται απορρόφηση του σιδήρου στα 485 nm, στο δεύτερο, mNPs@citrate στα 503 nm και τέλος mNPs@NaBH₄ στα 500 nm, όπου λόγω του μικρού μεγέθους των νανοσωματιδίων η απορρόφηση εμφανίζεται σε υψηλότερες τιμές συχνότητας. Η μικρή αυτή μετατόπιση της ταινίας απορρόφησης που παρατηρείται στο λ_{\max} (nm), οφείλεται στη διαφορά μεγέθους των νανοσωματιδίων μετά την επικάλυψη τους με το τρινάτριο άλας του κιτρικού οξέος.



Σχήμα 3: Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των mNPs, mNPs@citrate, mNPs@NaBH₄

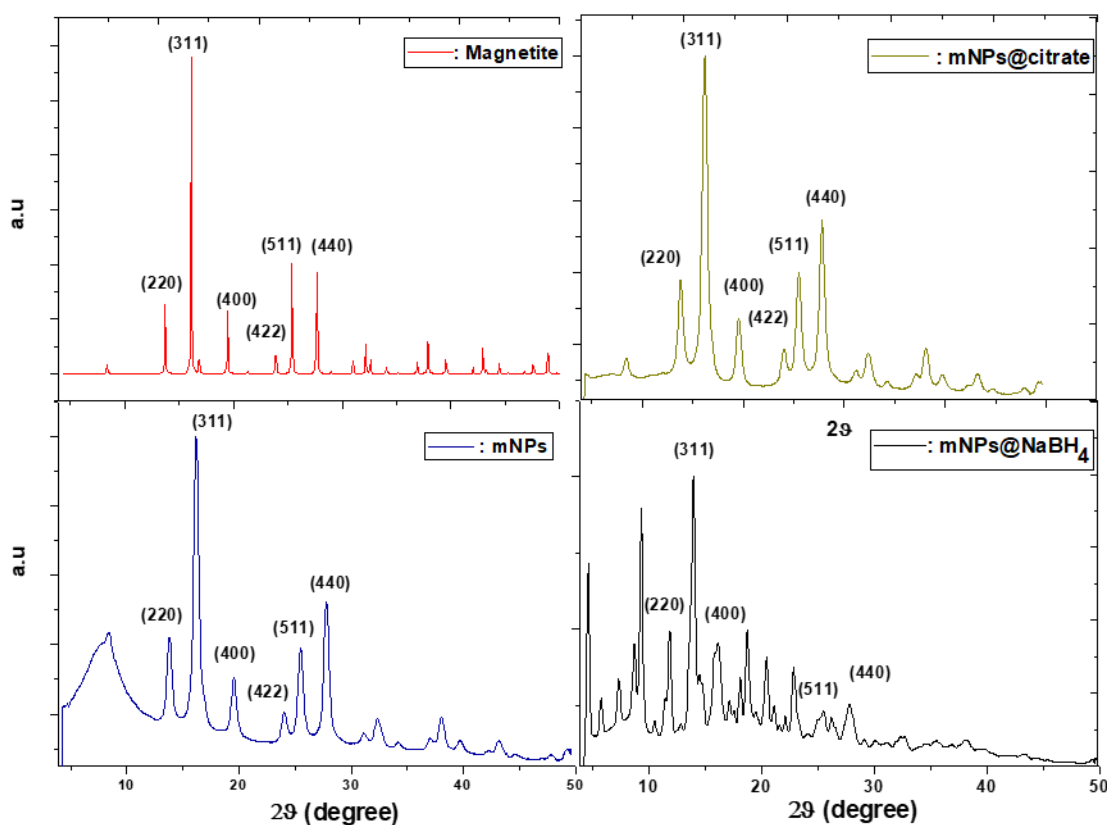
Πίνακας 2: Απόδοση κορυφών φασματοσκοπίας UV-vis

6.1.1.3 Δομικός χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων μέσω της περίθλαση Ακτίνων-Χ (X-Ray Diffraction, XRD)

Η διαδικασία προετοιμασίας για τον δομικό χαρακτηρισμό μέσω της περίθλασης ακτίνων Χ είναι απλή. Μικρή ποσότητα από κάθε δείγμα φέρεται στον υποδοχέα μέτρησης του οργάνου, και τοποθετείται σε κρυσταλλογραφικό σύστημα, το οποίο είναι ενσωματωμένο με πηγή μικρο-εστίασης μολυβδαινίου Mo ($k\alpha=0.7136 \text{ \AA}$).

Στη συνέχεια ακολουθούν τα διαγράμματα των μαγνητικών νανοσωματιδίων που έχουν συντεθεί. Οι θέσεις των κορυφών περίθλασης (220), (311), (400), (422), (511), (440) και

(533) που απεικονίζονται αντιστοιχούν με τις ταινίες των πρότυπων φασμάτων XRD του μαγνητίτη, υποδεικνύοντας ότι η κρυσταλλική φάση στην οποία βρίσκονται τα νανοσωματίδια, είναι καθαρός μαγνητίτης (Fe_3O_4), και το μέγεθος τους υπολογίζεται περίπου στα 12 nm. Στο τελευταίο διάγραμμα το οποίο έχουμε mNPs@NaBH_4 , διαφοροποιείται των άλλων λόγω του ότι παρατηρείται συγκρίνοντας βάσει των δεδομένων και της βιβλιογραφίας[77] μικρής έντασης κορυφές οι οποίες μπορούν να αποδοθούν στον δεσμό FeB και στον μεταλλικό σίδηρο Fe, ενώ κυρίως εμφανίζονται οι κορυφές του μαγνητίτη.

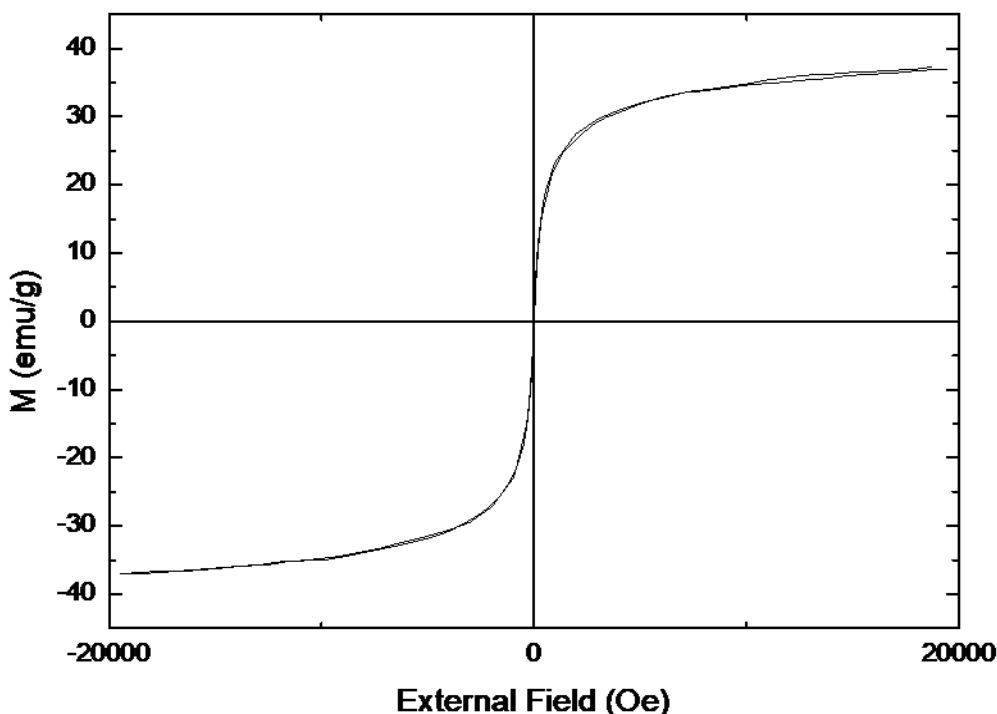


Σχήμα 4: Διαγράμματα XRD A) πρότυπο μαγνητίτη, B) mNPs, Γ) mNPs@citrate, Δ) mNPs@NaBH₄.

6.1.1.4 Μαγνητομετρία δονούμενου δείγματος, (Vibrating Sample Magnetometry, VSM)

Στο Σχήμα 5, παρουσιάζεται ο βρόγχος υστέρησης των «γυμνών» μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου. Η μορφή του βρόγχου υστέρησης είναι

χαρακτηριστική για σιδηρομαγνητικά υλικά όπως είναι ο μαγνητίτης. Το μικρό μέγεθος των μαγνητικών νανοσωματιδίων και οι χαμηλές τιμές του συνεκτικού πεδίου ($H_c = 12.26$ Oe) και της παραμένουσας μαγνήτισης ($M_s = 30$ emu/g), υποδεικνύουν ότι τα νανοσωματίδια πιθανόν να έχουν υπερπαραμαγνητικές ιδιότητες. Βιβλιογραφικά έχει αποδειχτεί ότι η παραμένουσα μαγνήτιση στα νανοδομημένα υλικά είναι μικρότερη από αυτή των άμορφων υλικών, κάτι το οποίο ευνοεί τις θεραπευτικές εφαρμογές με συστήματα εξωτερικού μαγνητικού πεδίου όπως η υπερθερμία. Η τιμή της παραμένουσας μαγνήτισης (M_s) στα νανοσωματίδια του μαγνητίτη έχει αποδειχτεί ότι κυμαίνεται από 30-50 emu/g, ενώ αντίστοιχων άμορφων, κοντά στα 90 emu/g. Συγκρίνοντας λοιπόν τις προαναφερθείσες τιμές με την παραμένουσα μαγνήτιση των συγκεκριμένων mNPs που μελετούνται στην παρούσα εργασία, λαμβάνοντας υπόψιν και την ανάλυση XRD μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα μαγνητικά νανοσωματίδια βρίσκονται υπό μορφή μαγνητίτη.

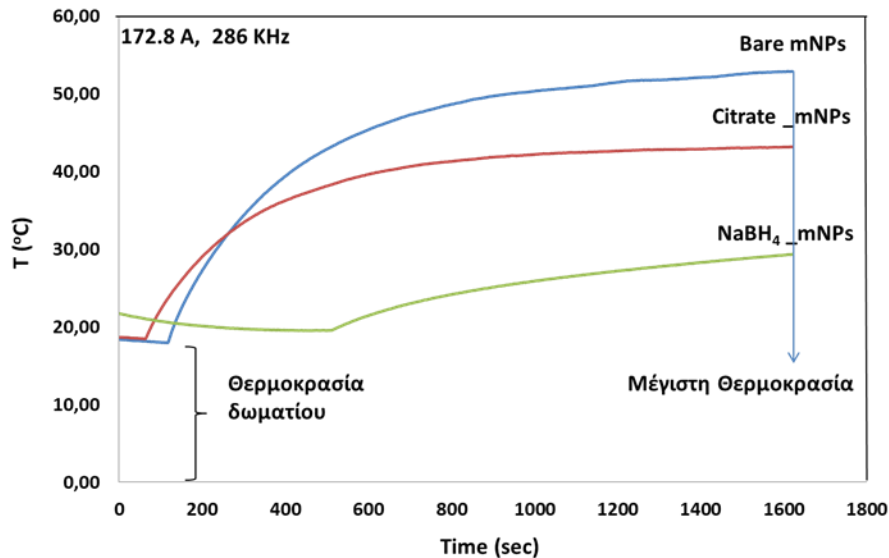


Σχήμα 5: Διάγραμμα βρόγχου υστέρησης των mNPs

6.1.1.5 Μελέτη υπερθερμίας με χρήση εναλλασσόμενου μαγνητικού πεδίου

Η μελέτη της υπερθερμίας όπως παρουσιάζεται και στο Σχήμα 6, πραγματοποιήθηκε στα mNPs, mNPs@citrate καθώς και στα mNPs@NaBH₄ στόχο είχε τη μελέτη της αύξησης της θερμοκρασίας των μαγνητικών νανοσωματιδίων με την εφαρμογή εναλλασσόμενου μαγνητικού πεδίου στις διασπορές αυτών. Το σύστημα μαγνητικής υπερθερμίας που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από δυο τμήματα, ένα επαγωγικό σύστημα θέρμανσης Easy Heat της Ambrel και μια οπτική ίνα της Yokogawa για την μέτρηση της θερμοκρασίας εντός των διαλυμάτων. Το σύστημα θέρμανσης φέρει πηνίο 3 σπειρών και διαμέτρου 4,7 cm και η ένταση του μαγνητικού πεδίου που εφαρμόσθηκε ήταν 172,8 A ενώ η συχνότητα 286 kHz. Κατά την μέτρηση το δείγμα φέρεται σε φιαλίδιο βοριοπυριτικής υάλου, τοποθετείται στο κέντρο του πηνίου, βυθίζοντας την οπτική ίνα στο κέντρο του διαλύματος.

Στο Σχήμα 6 ,παρουσιάζεται η εξάρτηση της θερμοκρασίας σε συνάρτηση με το χρόνο, για μια σταθερή τιμή συγκέντρωσης (20 mg/mL) μέχρι σταθεροποίησής της. Όπως αναφέρθηκε στο θεωρητικό κεφάλαιο η υπερθερμία σκοπό έχει τη θεραπεία του καρκίνου βασιζόμενη στο γεγονός ότι τα καρκινικά κύτταρα είναι ευπαθή σε θερμοκρασίες 40-45 °C, σε αντίθεση με τα υγιή που εμφανίζουν αντοχή ακόμη και σε υψηλότερες θερμοκρασίες.[74] Στο Σχήμα 6, μπορεί να παρατηρηθεί η μέγιστη θερμοκρασία που μπορεί να επιτευχθεί σε κάθε ένα από τα δείγματα που συνετέθησαν και την συσχέτιση της αύξησης με τον χρόνο.



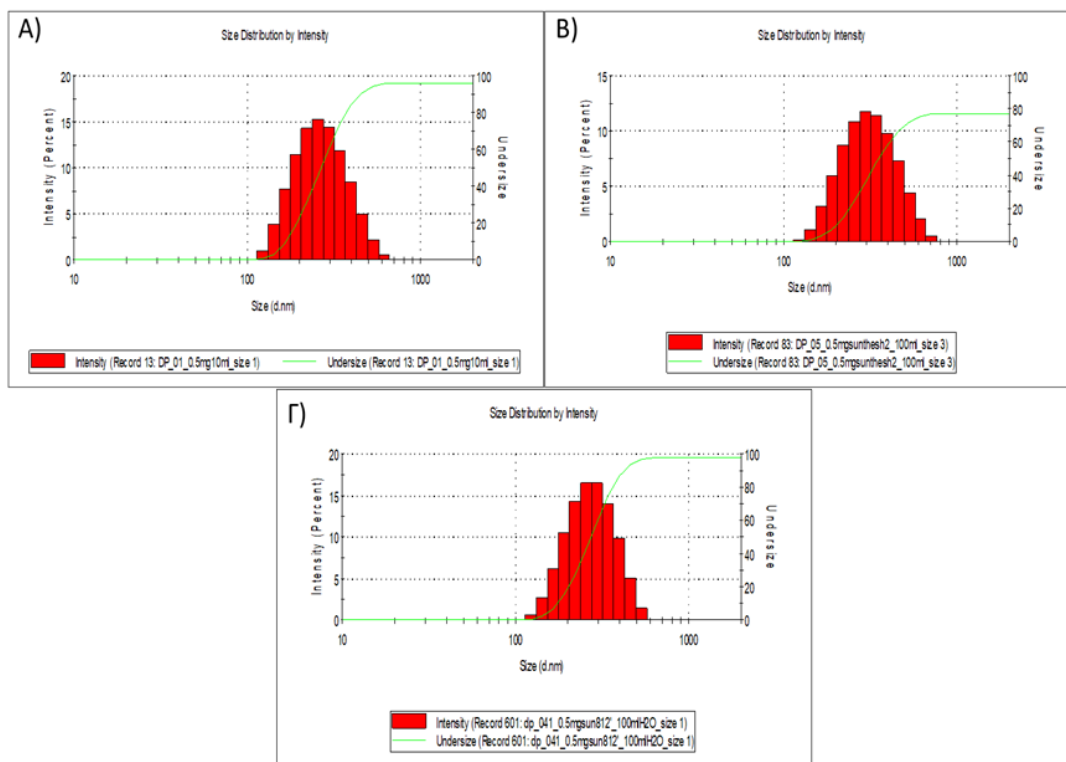
Σχήμα 6: Διαγραμματική αναπαράσταση της θερμοκρασίας σε συνάρτηση με τον χρόνο

Σε χρονικό διάστημα $t=26$ min μπορεί να παρατηρηθεί πως η θερμοκρασία των mNPs αγγίζει τους $T=55$ °C, τα mNPs@citrate σε $T=42$ °C και τα mNPs@NaBH₄ σε $T=28$ °C. Αν συγκριθούν οι τρεις θερμοκρασίες συσχετίζοντας το μέγεθος των νανοσωματιδίων συμπεραίνεται ότι ακολουθούν τις σχετικές αναφορές της βιβλιογραφίας.[78] Τα mNPs, επιτυγχάνουν υψηλότερες θερμοκρασίες στον ίδιο χρόνο διότι έχουν μεγαλύτερο ποσοστό μαγνήτισης, ενώ τα mNPs@citrate δεν παρουσιάζουν την ίδια συμπεριφορά εξαιτίας της επικάλυψής τους, η οποία επηρεάζει αρνητικά σε μικρό ποσοστό τα επίπεδα της μαγνήτισης. Επίσης αναμενόμενο αποτέλεσμα παρουσιάζεται για τα mNPs@NaBH₄, των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται μεταξύ των 4-5 nm και αγγίζουν τη θερμοκρασία των 28 °C, φανερά χαμηλότερη σε σύγκριση με τα άλλα δύο.

6.1.1.6 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Η μέθοδος της δυναμικής σκέδασης φωτός χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της υδροδυναμικής διαμέτρου καθώς και της κolloειδούς σταθερότητας των μαγνητικών νανοσωματιδίων. Όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 7, η υδροδυναμική διάμετρος εκφράζεται σε σχέση με την % ένταση του κolloειδούς διαλύματος. Κατά τη μελέτη της υδροδυναμικής διαμέτρου σε κάθε περίπτωση, προέκυψαν τα αποτελέσματα όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Τα γυμνά μαγνητικά νανοσωματίδια έχουν μέση υδροδυναμική διάμετρο 271.9 nm, τα επικαλυμμένα με κιτρικό έχουν μέγεθος 526.3 nm και τα νανοσωματίδια που έχουν παρασκευαστεί παρουσία του κιτρικού οξέος και NaBH_4 έχουν μέγεθος 500.2 nm. Η διαφορά στις τιμές αυτές με το μέγεθος των νανοσωματιδίων σε στερεά κατάσταση οφείλεται στη δημιουργία συσσωματωμάτων. Τα νανοσωματίδια για τις συγκεκριμένες μετρήσεις διασπείρονται σε νερό παρουσία υπερήχων. Το αυξημένο μέγεθος των νανοσωματιδίων οφείλεται στις ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των ίδιων και των ομάδων των γειτονικών νανοσωματιδίων.[79]



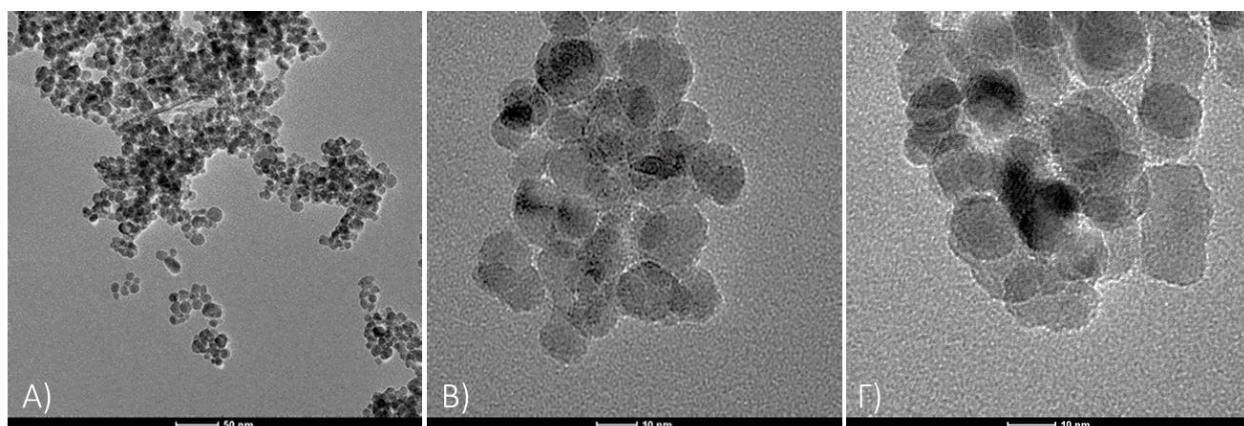
Σχήμα 7: Διαγράμματα δυναμικής σκέδασης φωτός, Α) mNPs, Β) mNPs@citrate, Γ) mNPs@NaBH₄.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα από διαγράμματα δυναμικής σκέδασης φωτός

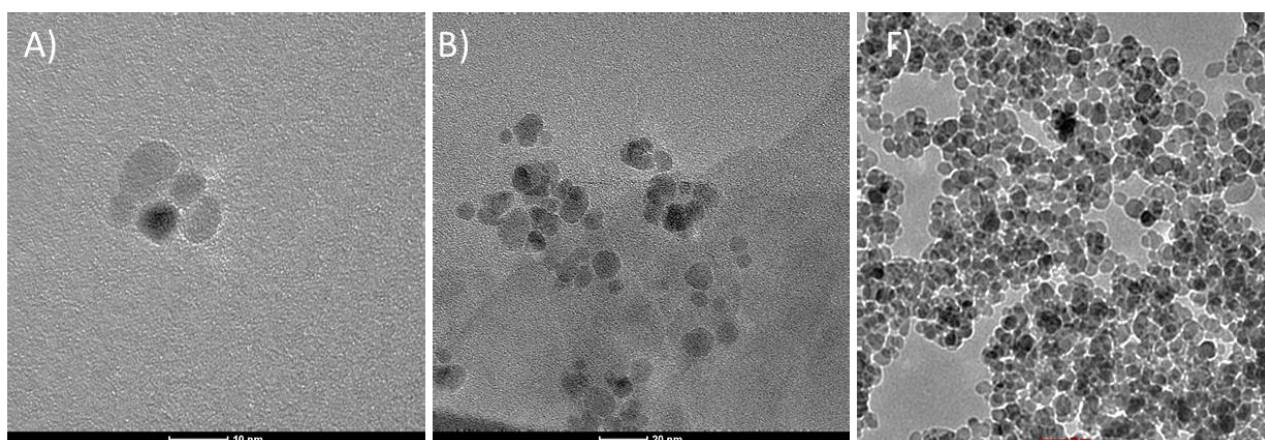
Μαγνητικά νανοσωματίδια	Μέγεθος (size)	Μέσος όρος (Pdi)	Zeta potential (ζ)
mNPs	274.4 ±4.388	0.226 ±0.008	-16.1±0.557
mNPs@citrate	573.2 ±62.08	0.521 ±0.056	-2.33 ±3.11
mNPs@NaBH ₄	522.8 ±22.60	0.482 ±0.024	-10.6 ±0.231

6.1.2 Μορφολογικός Χαρακτηρισμός των συνθετικών νανοσωματιδίων μέσω μικροσκοπίας διαπερατότητας (TEM)

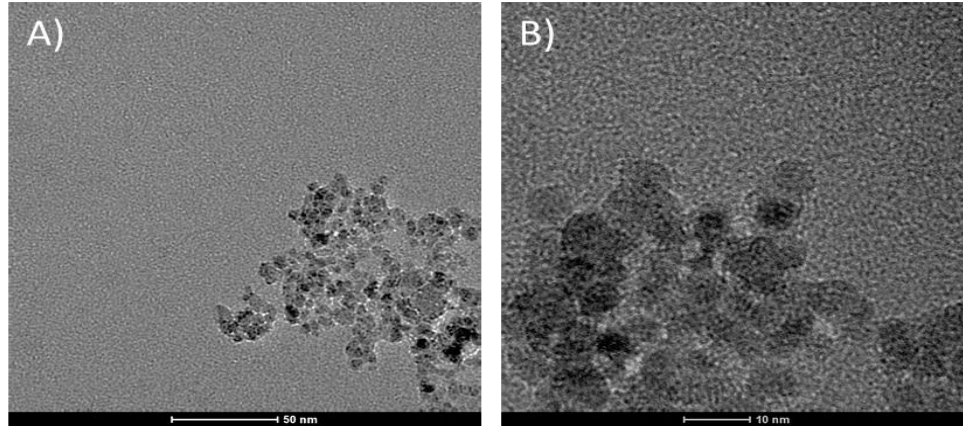
Οι εικόνες TEM που ακολουθούν επιβεβαιώνουν το σφαιρικό σχήμα των νανοσωματιδίων, καθώς και το μέγεθός τους σε στερεά κατάσταση. Οι εικόνες που ακολουθούν ελήφθησαν με το HRTEM του Πανεπιστημίου του Μπιάλιστοκ στη Πολωνία, με το μικροσκόπιο διέλευσης (TEM) – 200 kV TecnaiG2 X-TWIN.



Εικόνα 32: Εικόνες TEM των mNPs, όπου το μέγεθος τους είναι 12 nm



Εικόνα 33: Εικόνες TEM των mNPs@citrate των οποίων το μέγεθος είναι 9 nm



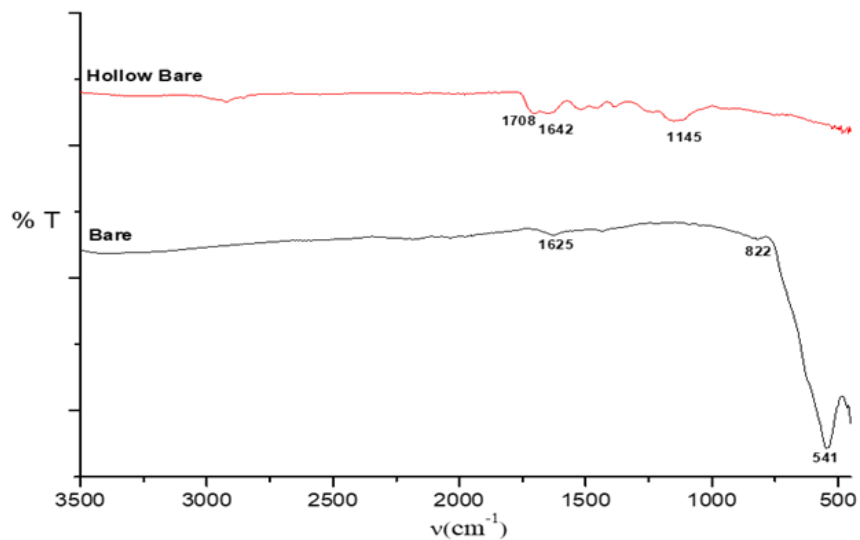
Εικόνα 34: Εικόνες TEM mNPs@citrate@NaBH₄ των οποίων το μέγεθος υπολογίστηκε 5 nm

6.2 Πολυμερικές σφαίρες

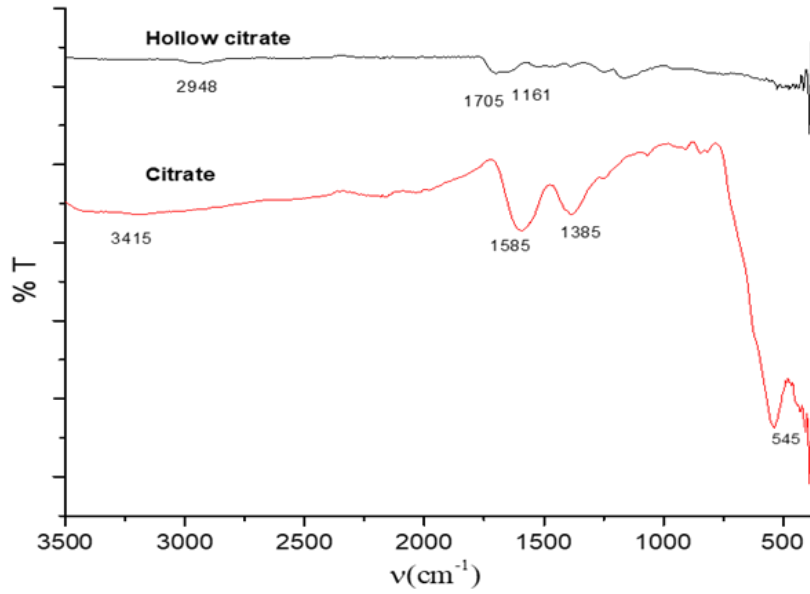
6.2.1 Δομικός χαρακτηρισμός

6.2.1.1 FT-IR

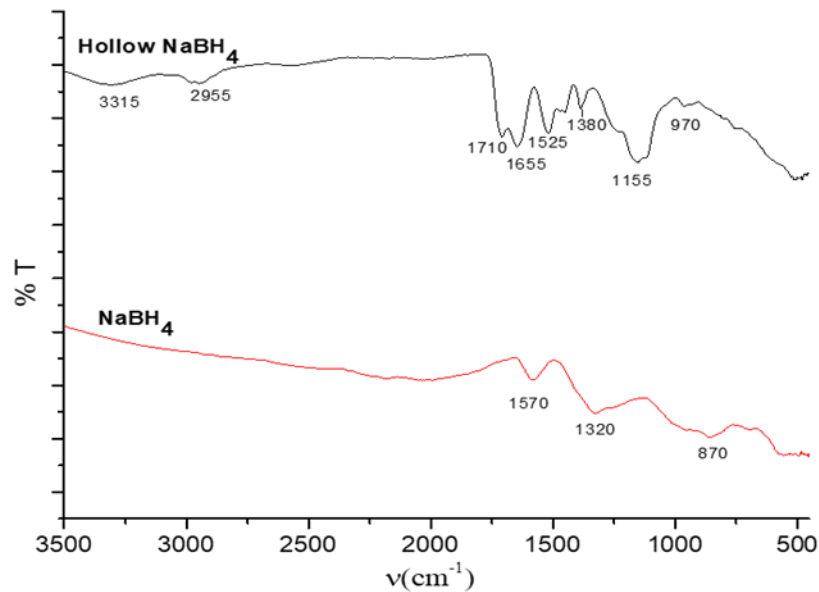
Οι πολυμερικές σφαίρες που συντέθησαν, όπως αναφέρθηκε παραπάνω παρουσιάζουν εσωτερική κοιλότητα με εγκλωβισμένα μαγνητικά νανοσωματίδια. Ακολουθεί συγκριτικό διάγραμμα αυτών, με τα αντίστοιχα μαγνητικά νανοσωματίδια σε κάθε περίπτωση.



Σχήμα 8: Διάγραμμα FT-IR των P(MAA-co-PEG)@mNPs, καθώς και mNPs



Σχήμα 9: Διάγραμμα FT-IR των P(MAA-co-PEG)*@*mNPs*@*citrate, καθώς και mNPs*@*citrate



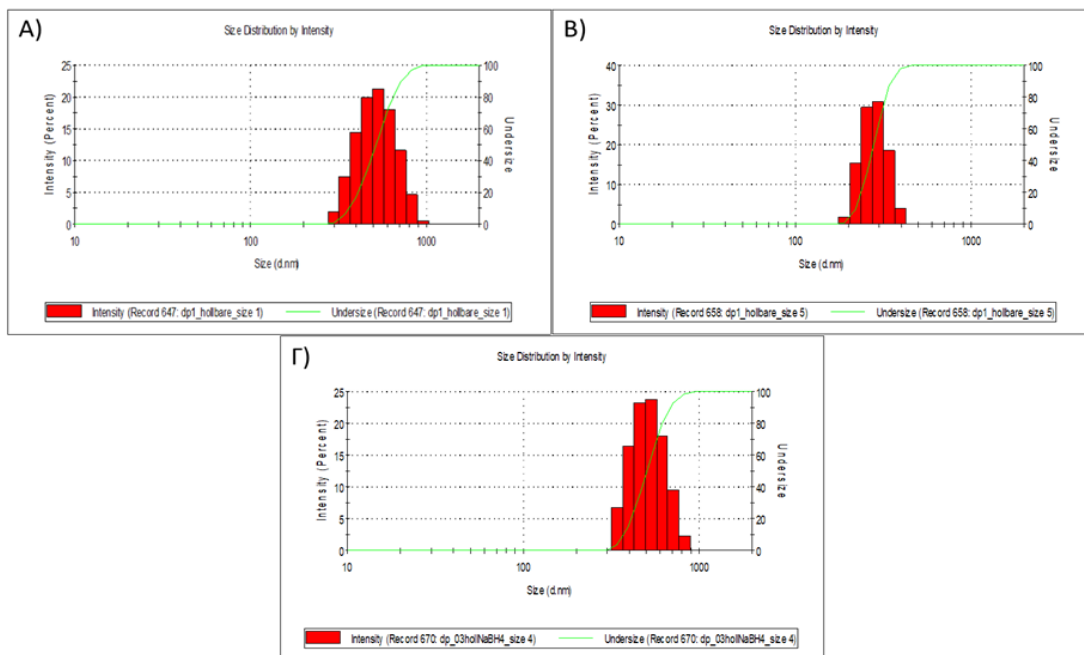
Σχήμα 10: Διάγραμμα FT-IRP(MAA-co-PEG)*@*mNPs*@* NaBH_4 , καθώς και mNPs*@*citrate*@* NaBH_4

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί και στα τρία Σχήματα (10, 11, 12) όλα τα πολυμερή έχουν πιο ευρείες κορυφές σε σύγκριση με τα άλλα που δεν είναι πολυμερικά. Οι κορυφές που σχηματίζονται φαίνεται ότι μπορούν να αποδοθούν στις χαρακτηριστικές κορυφές του πολυμερούς.

Πιο συγκεκριμένα, η δόνηση του δεσμού H-O, εμφανίζεται στα 2500-3300 cm^{-1} και οι κορυφές που παρατηρούνται στα 1670-1820 cm^{-1} αποδίδονται στις δονήσεις του διπλού δεσμού του καρβονυλίου του μεθακρυλικού οξέος. Επίσης οι κορυφές που παρατηρούνται στα 1210-1320 cm^{-1} , μπορεί να αποδοθούν στη δόνηση του δεσμού C-O. Επίσης επιβεβαιώνεται η συμμετοχή του MBA μέσω των κορυφών που βρίσκονται μεταξύ 1550-1640 cm^{-1} και αντιστοιχούν στη δόνηση του δεσμού N-H.

6.1.1.2 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Με την ίδια διαδικασία στις πολυμερικές σφαίρες με ενθυλακωμένα τα μαγνητικά νανοσωματίδια πραγματοποιείται διασπορά σε νερό με τη χρήση υπερήχων και γίνεται η μέτρηση της υδροδυναμικής τους διαμέτρου. Στην Α) περίπτωση η υδροδυναμική διάμετρος για τα mNPs είναι γύρω στα 770.3 nm, στο Β) mNPs@citrate είναι 963.6 nm και στο Γ) mNPs@citrate@NaBH₄ είναι στα 422 nm. Οι τιμές και σε αυτήν την περίπτωση διαφέρουν από το μέγεθος σε στερεά κατάσταση, και αυτό μπορεί να αποδοθεί στις απωστικές αλληλεπιδράσεις σφαιρών του μεθακρυλικού οξέος διαμοριακά και ενδομοριακά.



Σχήμα 11: Διαγράμματα δυναμικής σκέδασης φωτός, Α) P(MAA-co-PEG)@ mNPs, Β)P(MAA-co-PEG)@mNPs@citrate Γ) P(MAA-co-PEG)@mNPs@NaBH₄.

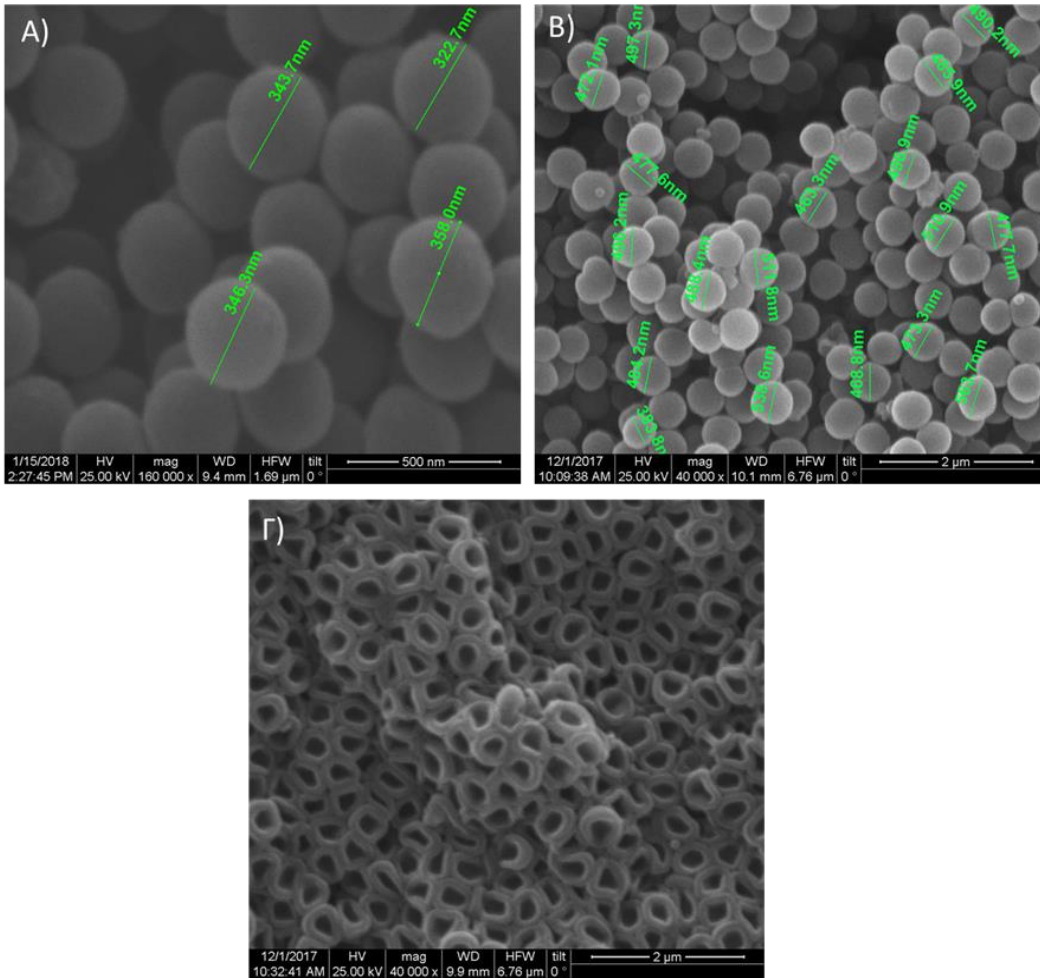
Συγκρίνοντας τα Σχήματα 7, και 11 που περιέχουν τις υδροδυναμικές διαμέτρους (nm), μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η υδροδυναμική διάμετρος των πολυμερικών μαγνητικών νανοσφαιρών είναι σαφώς μεγαλύτερη σε σύγκριση με τις τιμές που προέκυψαν από την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα από διαγράμματα δυναμικής σκέδασης φωτός για τις πολυμερικές νανόσφαιρες

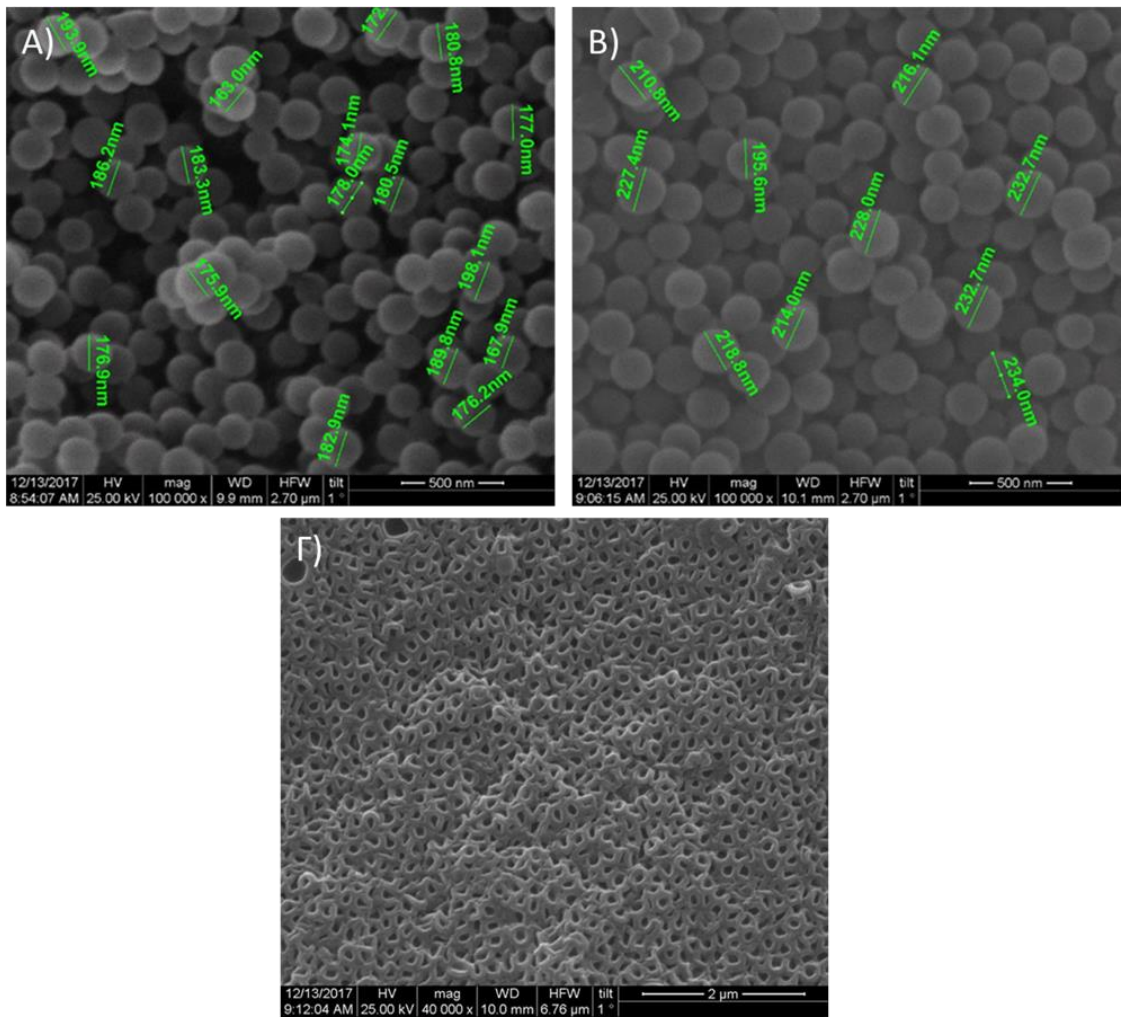
Πολυμερικές νανόσφαιρες	Μέγεθος (size)	Μέσος Όρος (Pdi)	Zeta potential
P(MAA-co-PEG) @ mNPs	819.8 ± 99.42	0.720 ± 0.309	-26.2 ± 3.40
P(MAA-co-PEG) @mNPs@citrate	710.1 ± 241.9	0.465 ± 0.211	-36.6 ± 0.351
P(MAA-co-PEG) @mNPs@NaBH ₄	487.5 ± 77.42	2.257 ± 0.157	-34.6 ± 2.80

6.2.2 Μορφολογικός χαρακτηρισμός μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM)

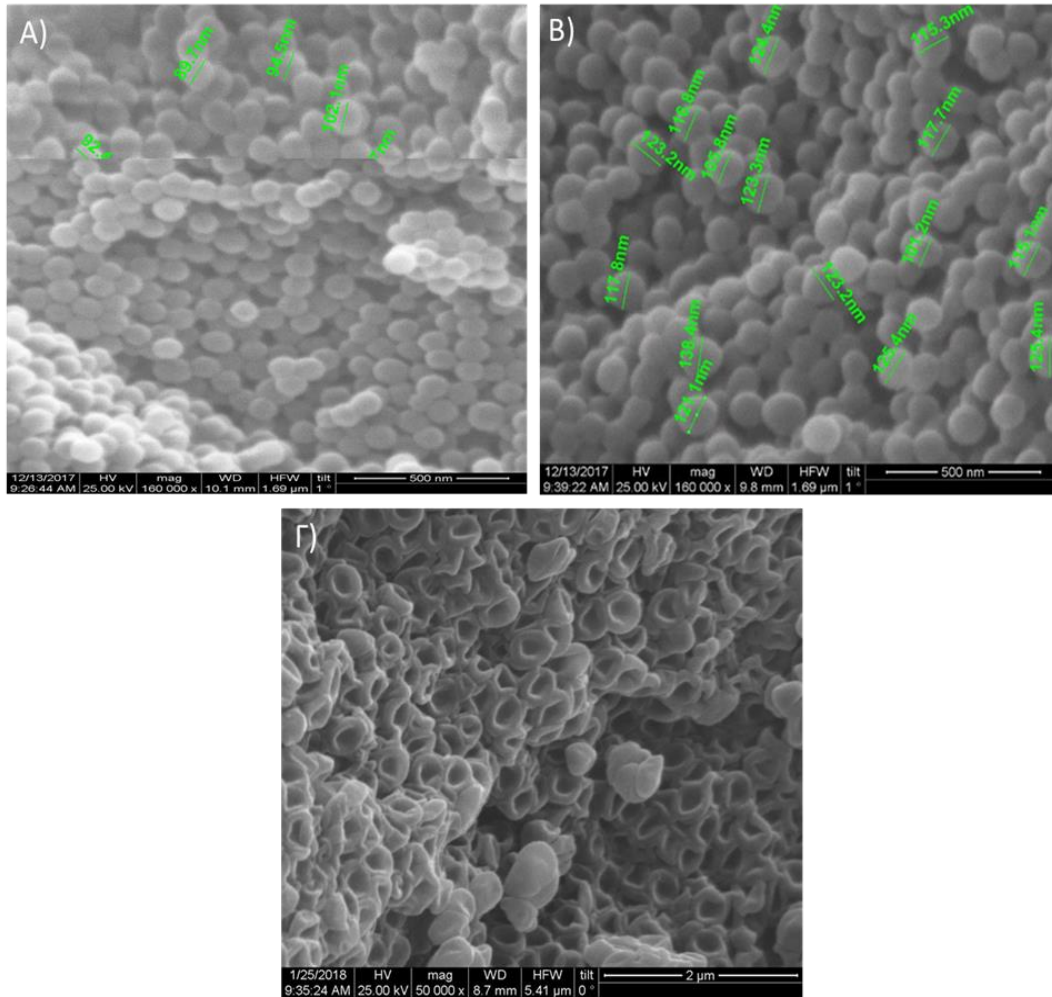
Ο μορφολογικός χαρακτηρισμός των πολυμερικών σφαιρών πραγματοποιείται μέσω της συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM). Όπως παρατηρείται στις Εικόνες 35,36,37, τα δείγματα αποτελούνται από ομοιόμορφες πολυμερικές σφαίρες P(MAA-co-PEG)@mNPs οι οποίες στο πρώτο στάδιο της σύνθεσης κυμαίνονται στα 350 nm. Μετά τη διασταυρωμένη σύνδεσή τους επί της επιφάνειας των σφαιρών, το μέγεθός τους αυξάνεται και η μικροσκοπία σάρωσης, συμφωνεί με το μέγεθος του επόμενου σταδίου της απομάκρυνσης του πυρήνα αφού σύμφωνα με την εικόνα 34B παρατηρούνται νανόσφαιρες με εσωτερική κοιλότητα.



Εικόνα 35: SEM πολυμερικών νανοσφαιρών Α)P(MAA), Β) P(MAA-co-PEG), Γ) P(MAA-co-PEG) @mNPs



Εικόνα 36: SEM πολυμερικών νανοσφαιρών A) P(MAA), B) P(MAA-co-PEG), Γ) P(MAA-co-PEG) @mNPs@citrate



Εικόνα 37: SEM πολυμερικών νανοσφαιρών A) P(MAA), B) P(MAA-co-PEG), Γ) P(MAA-co-PEG) @mNPs@citrate@NaBH₄

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

«Βιολογική αξιολόγηση – *In vitro* μελέτες»

7.1 Κυτταρικές καλλιέργειες

Οι κυτταρικές σειρές οι οποίες χρησιμοποιούνται στην παρούσα ερευνητική εργασία είναι οι εξής:

Υγιείς σειρές

- HEK-293 είναι μια ειδική κυτταρική σειρά αρχικά προερχόμενη από ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα νεφρών που αναπτύσσονται σε ιστοκαλλιέργεια
- NCTC επιδερμικά κερατινοκύτταρα

Καρκινικές σειρές

- U87-MG, έχουν επιθηλιακή μορφολογία και είναι καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου εγκεφάλου (αστροκύτωμα γλοιοβλαστώματος)
- A375-M6, μεταστατικά επιδερμικά καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου κακοήθους μελανώματος τα οποία αποτελούν την πιο θανατηφόρα μορφή καρκίνου του δέρματος και έχουν τα υψηλότερα μεταφορικά φορτία όλων των καρκίνων

Όλες οι βιολογικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν προέκυψαν από διαδοχικές ανακαλλιέργειες και επωάσεις. Με τον όρο κυτταροκαλλιέργεια ορίζουμε τη διατήρηση ή ανάπτυξη των κυττάρων για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από αυτό των 24 ωρών σε ελεγχόμενες συνθήκες. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τις κυτταροκαλλιέργειες είναι τα εξής: Θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης κυττάρων (DMEM εμπλουτισμένο με 2 mM γλουταμίνης, 0.85 g/L NaHCO₃, 25m MHEPES, 10% FBS, 6.8<pH<7.2), καθώς και διάλυμα διαχωρισμού κυττάρων (0.02% θρυψίνη-EDTA, 0.2% w/v στρεπτομυκίνη και 2*10³ U/mL πενικιλίνη σε PBS). Η θρυψίνη χρησιμοποιείται για την αποκόλληση και τον διαχωρισμό των μονόστιβων καλλιιεργειών, και η διαδικασία περιγράφεται ως εξής:

1. Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από την κυτταρική καλλιέργεια.

2. Προσθήκη διαλύματος διαχωρισμού κυττάρων και επώαση στους 37 °C για 4 min.
3. Απομάκρυνση του διαλύματος.
4. Προσθήκη εκ νέου 0.4 mL διαλύματος διαχωρισμού κυττάρων και επώαση στους 37 °C για 15-20 min, προκειμένου να γίνει αποκόλληση των κυττάρων από το ταπήτιο και διαχωρισμός των κυττάρων.
5. Προσθήκη θρεπτικού διαλύματος DMEM και ανάπτυξη των κυττάρων, ύστερα από επώαση στους 37 °C.

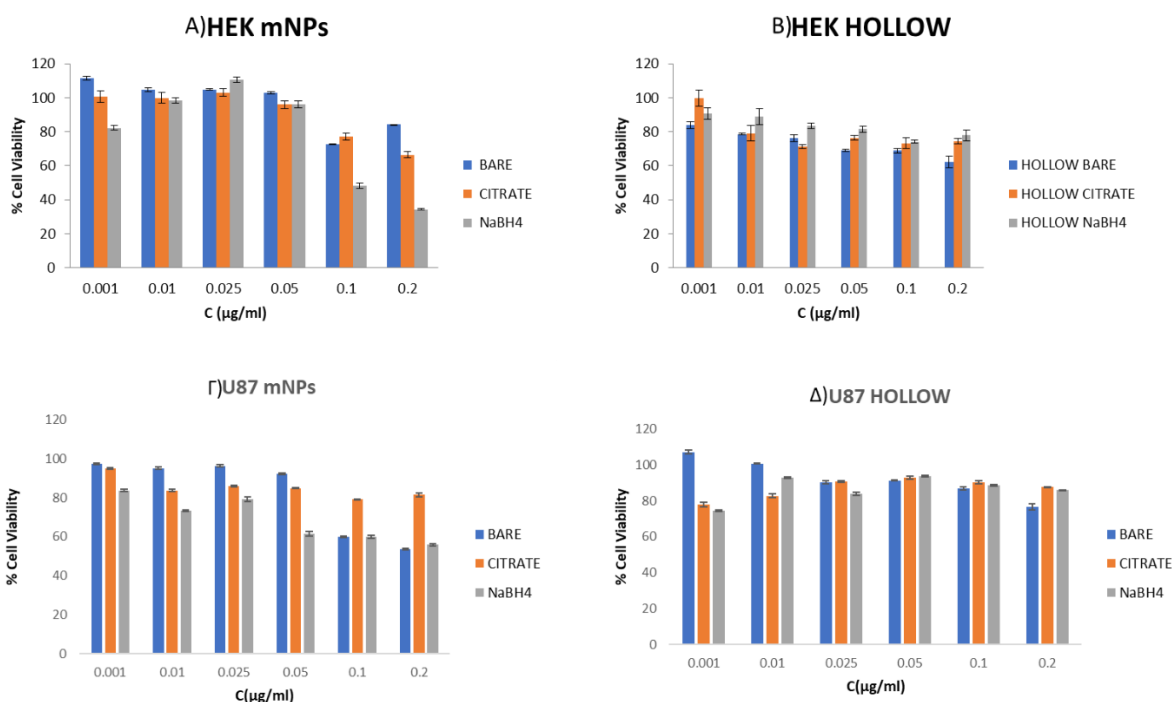
7.2. Δοκιμασία MTT

Με τη βοήθεια της χρωματομετρικής μεθόδου MTT μελετάμε την τοξικότητα που επιφέρουν στα κύτταρα τα μαγνητικά νανοσωματίδια τα οποία έχουν συντεθεί στην παρούσα ερευνητική εργασία. Η συγκεκριμένη μέθοδος έγινε σε όλες τις κυτταρικές σειρές που προαναφέρθηκαν, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με το κατά πόσο επιδρούν τα μαγνητικά νανοσωματίδια στην πολλαπλασιαστική ικανότητα υγιών και καρκινικών κυττάρων.

Αρχικά παρασκευάστηκαν σειρές διαλυμάτων των εκάστοτε μαγνητικών νανοσωματιδίων σιδήρου καθώς και των πολυμερών τους σε θρεπτικό υλικό, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις 0,2, 0,1, 0,025, 0,01, 0,001 mg/mL. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των κυττάρων σε πολυτριβλία 96 φρεατίων. Μετά από επώαση 24 h σε επωαστικό θάλαμο στους 37 °C παρουσία 5% CO₂, προστίθενται στα πολυτριβλία τα διαλύματα των μαγνητικών νανοσωματιδίων σιδήρου και των ενθυλακωμένων στις πολυμερικές νανόσφαιρες στις επιθυμητές συγκεντρώσεις σε στείρες συνθήκες. Σε κάθε ένα από αυτά υπάρχουν σειρές κυττάρων χωρίς νανοσωματίδια, τα οποία τα χρησιμοποιούμε ως δείγματα αναφοράς των κυττάρων για τον προσδιορισμό της επαγόμενης τοξικότητας μετά από 24 h κατεργασίας.

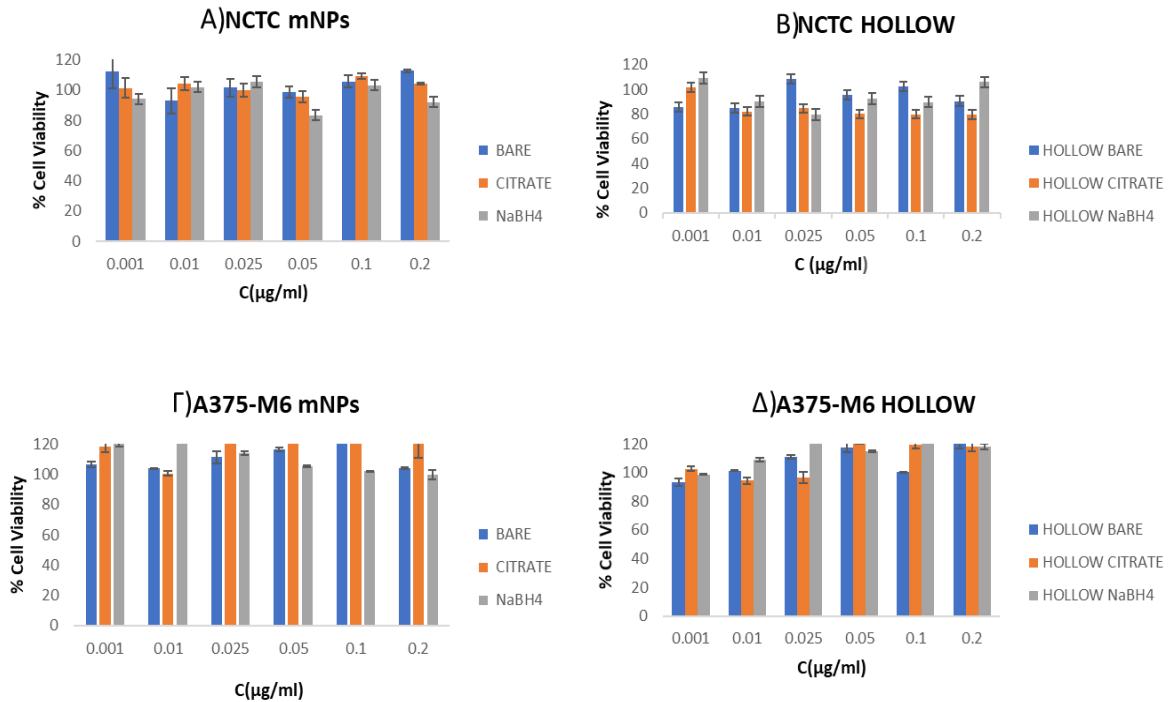
Μετά την 24 h επώαση, γίνεται αντικατάσταση του θρεπτικού μέσου με MTT (1 mg/mL) και τα κύτταρα επωάζονται παρουσία του για επιπλέον ~4 h όπου σκούροι μοβ κρύσταλλοι φορμαζάνης καθιζάνουν, ως ένδειξη παρουσίας ζώντων κυττάρων, και

διαλύονται με τη χρήση διεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO), μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου διαλύματος τετραζολίου με χρήση πολυπιπέτας. Τέλος, η απορρόφηση του διαλύματος σε DMSO κάθε φρεατίου του πολυτροβλίου, μετράται σε φασματοφωτόμετρο Eliza (540/620 nm). Τα αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας παρουσιάζονται στα διαγράμματα που ακολουθούν.



Σχήμα 12: Δοκιμασία MTT A), B) HEK, Γ), Δ)U-87, των νανοϋλικών

Στο Σχήμα 12, A) και B) παρατηρείται ότι στην υγιή κυτταρική σειρά HEK, τα μαγνητικά νανοσωματίδια δεν εμφανίζουν τοξικότητα, καθώς παρατηρούνται υψηλά επίπεδα στην επί τοις % ζωτικότητα των κυττάρων. Αντίθετα, στην καρκινική σειρά U-87, παρατηρείται μείωση της % ζωτικότητας των κυττάρων, εξάγωντας το συμπέρασμα σχετικά με την τοξική επίδραση των μαγνητικών νανοσωματιδίων σε αυτά.



Σχήμα 13: Δοκιμασία MTT A), B) NCTC, Γ), Δ) A375-M6, των νανοϋλικών

Στα διαγράμματα του Σχήματος 13, παρατηρείται η επί τοις % ζωτικότητα των κυττάρων στην υγιή κυτταρική σειρά NCTC-2544 η οποία είναι σε πολύ υψηλά επίπεδα. Παρόμοια είναι και τα αποτελέσματα ζωτικότητας στην καρκινική μεταστατική σειρά A375-M6.

7.2 Δοκιμασία επούλωσης πληγών (would healing assay)

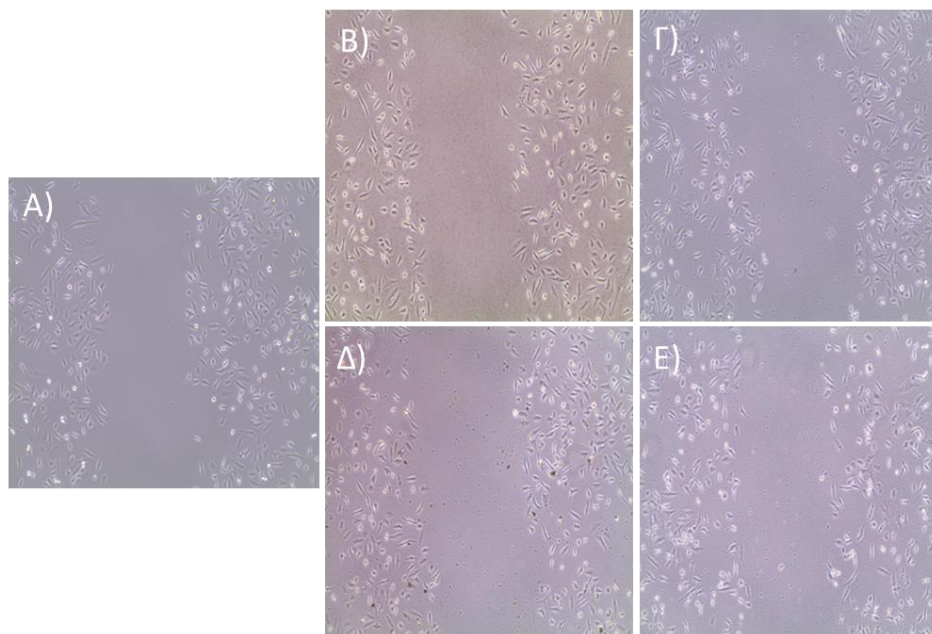
Για τη συγκεκριμένη δοκιμασία χρησιμοποιήθηκαν τα επιδερμικά κύτταρα των εξής δύο κυτταρικών σειρών, NCTC-2544 τα οποία είναι κερατινοκύτταρα καθώς και τα A375-M6 τα οποία είναι μελανώματος. Η διαδικασία που πραγματοποιείται περιλαμβάνει απλά βήματα, καθώς κατατάσσεται στις πιο εύκολες μεθόδους βιολογικής αξιολόγησης.

Αρχικά καλλιεργούνται τα κύτταρα σε πολυτριβλίο 6 φρεατίων και αφήνονται προς επώαση για 24 h. Αφού αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό πραγματοποιείται σχισμή εντός της καλλιέργειας, προσδιορίζοντας έτσι την «πληγή». Έτσι είναι εμφανής η απεικόνιση των δύο άκρων της «πληγής». Στη συνέχεια ξεπλένεται ακόμα το τρυβλίο με PBS ούτως ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα που ανασηκώθηκαν με την δημιουργία πληγής, και προστίθεται προς κατεργασία 2 mg/ml των μαγνητικών νανοσωματιδίων διεσπαρμένα

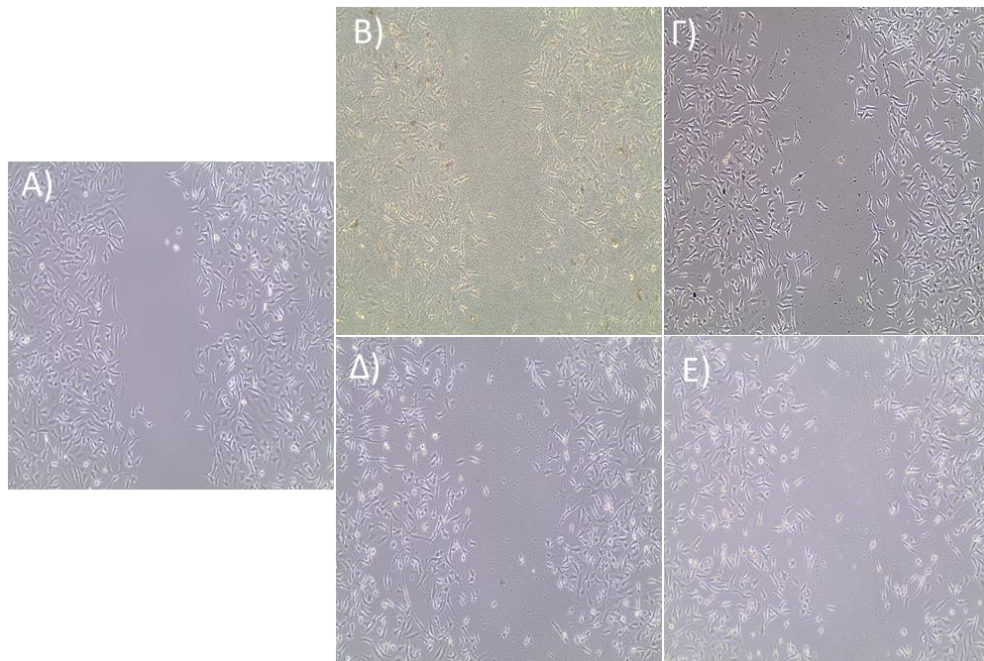
σε θρεπτικό και το διάλυμα και τρυβλίο αφήνεται για 24 ωρη επώαση και συγκρίνεται με το δείγμα αναφοράς το οποίο δεν κατεργάζεται με τα νανοσωματίδια.

Σκοπός είναι η αποτύπωση φωτογραφιών, καθώς και η καταγραφή του χρονικού διαστήματος από τη στιγμή που πραγματοποιήθηκε η «πληγή» ($t=0$), μέχρι την στιγμή που θα παρατηρηθεί ότι στο φρεάτιο με τα κύτταρα αναφοράς (control), έχει κλείσει τελείως. Στην συγκεκριμένη περίπτωση όπως φαίνεται στην Εικόνα 28, η διαδικασία ολοκληρώνεται και με το κλείσιμο της «πληγής» μετά από 24 h επώαση.

Οι εικόνες που ακολουθούν ελήφθησαν με το συνεστιακό μικροσκόπιο EVOS™ XLCoreImaging System (Thermofisher Scientific), στο Πανεπιστήμιο της Φλωρεντίας, και η σειρά των φωτογραφιών είναι ίδια σε όλες τις εικόνες και ακολουθείται ως εξής: A) το δείγμα αναφοράς της κάθε κυτταρικής σειράς, B) mNPs Γ) mNPs@citrate, Δ) P(MAA-co-PEG)@mNPs και E) P(MAA-co-PEG)@mNPs@citrate.

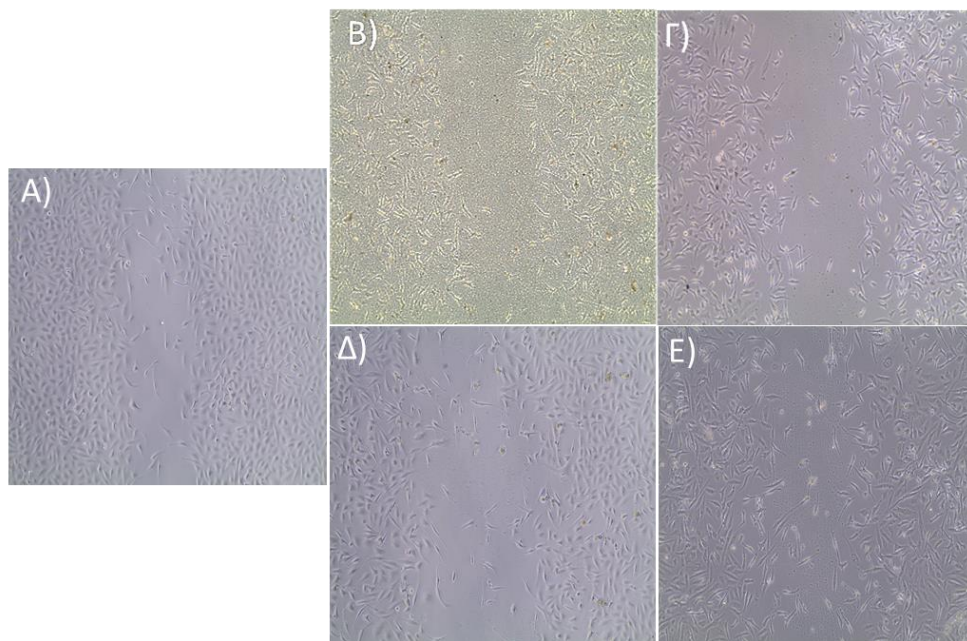


Εικόνα 38: Πείραμα επούλωσης πληγών για την κυτταρική σειρά NCTC την χρονική στιγμή $t=0$



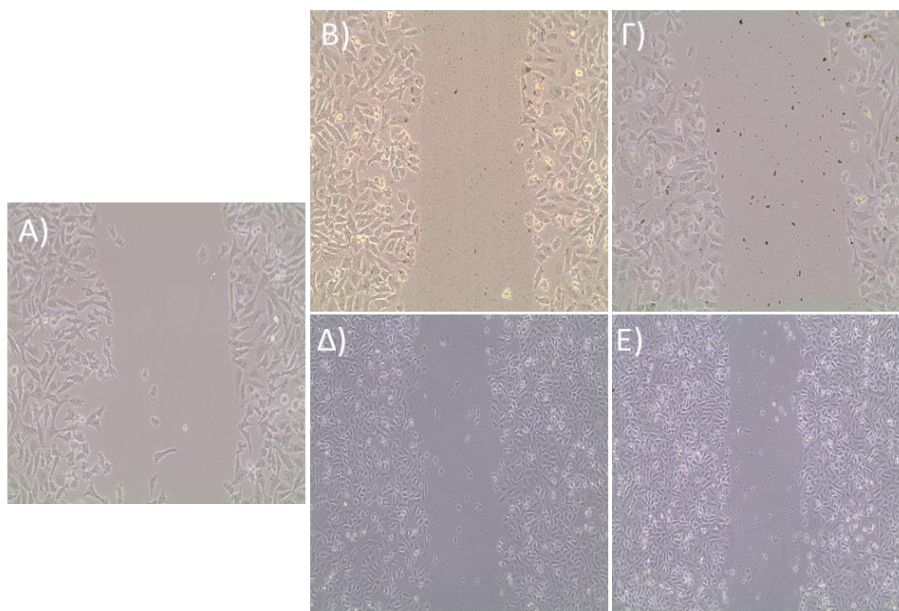
Εικόνα 39: Πείραμα επούλωσης πληγών στα κύτταρα NCTC μετά από 24 ώρες επώαση

Από την Εικόνα 39, παρατηρείται αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Το πείραμα συνεχίζεται και αφήνεται επιπρόσθετα 24 h, ώστε να μελετηθεί σε ποιο φρεάτιο παρατηρείται πλήρης επούλωση των πληγών.

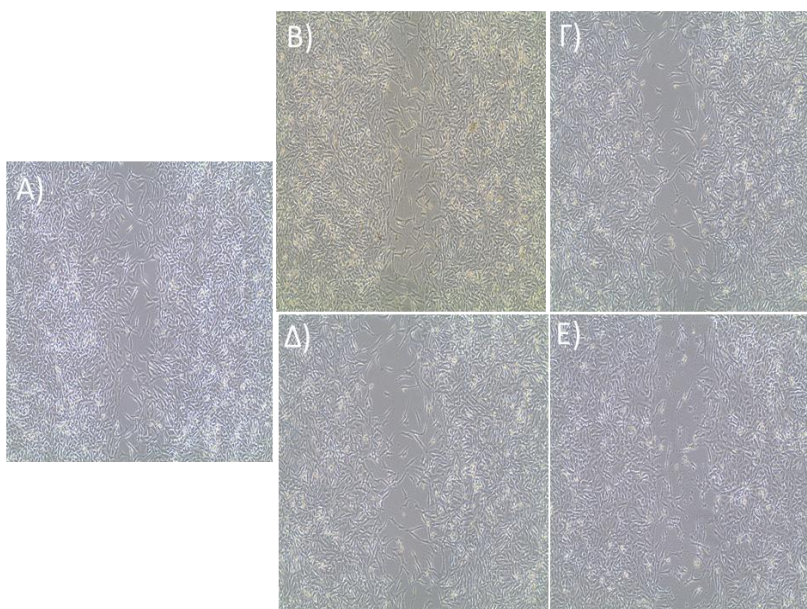


Εικόνα 40: NCTC μετά από 48 ώρες επώασης

Στην εικόνα 40E), παρουσιάζεται η επούλωση της πληγής μετά την επώαση με τις κενές πολυμερικές νανόσφαιρες, οι οποίες έχουν ενθυλακωμένα τα μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου επικαλυμμένα με κιτρικό. Αντίθετα, στο δείγμα αναφοράς 40A), δεν πραγματοποιείται επούλωση κατά την ολοκλήρωση του πειράματος.



Εικόνα 41: Κυτταρική σειρά A375-M6 την χρονική στιγμή $t=0$



Εικόνα 42: Πειράματα επούλωσης πληγών σε κύτταρα A375-M6 μετά από 24 ώρες επώαση

Στην Εικόνα 42, στην μεταστατική καρκινική σειρά A375-M6, παρατηρείται ότι στο δείγμα αναφοράς (Α) έχει προχωρήσει η μετανάστευση των κυττάρων κλείνοντας έτσι την «πληγή». Κατά την ολοκλήρωση του πειράματος συγκρίνονται οι εικόνες 42 Β), Γ), Δ) και Ε) με το δείγμα αναφοράς, όπου παρατηρούμε πως με τη χρήση των μαγνητικών νανοσωματιδίων καθυστερείται η επούλωση του τραύματος στην καρκινική σειρά A375-M6, καθώς μειώνεται η μετανάστευση των κυττάρων προς την πληγή.

Με την τεχνική αυτή, συμπεραίνουμε πως με τη θεραπεία των μαγνητικών νανοσωματιδίων για την επούλωση των «πληγών» καθυστέρησε το κλείσιμο τραύματος στα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα μελανώματος, παρουσία των mNPs. Αντιθέτως, δεν επηρεάστηκε εμφανώς η κυτταρική μετανάστευση στα NCTC, όπως φαίνεται στις Εικόνες 38-40, γεγονός που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

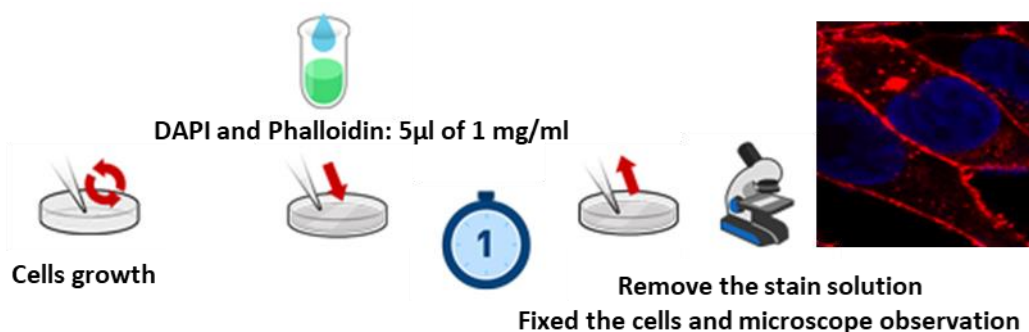
7.3 Συνεστιακή Μικροσκοπία Σάρωσης (Confocal)

Για τη συνεστιακή μικροσκοπία, προετοιμάζεται το δείγμα με την καλλιέργεια των κυττάρων σε πολυτριβλίο 6 φρεατίων και γίνεται επώαση για 24 ώρες. Οι κυτταρικές σειρές που καλλιεργήθηκαν είναι οι σειρές NCTC και A375-M6, οι οποίες περιέχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση (2 mg/ml) μαγνητικών νανοσωματιδίων. Μετά την επεξεργασία, τα κύτταρα σταθεροποιήθηκαν σε παραφορμαλδεΐδη σύμφωνα με τη μέθοδο της ανοσοκυτταροχημείας. Με τη βοήθεια μιας καλυπτρίδας, η οποία προηγουμένως έχει αποστειρωθεί, τοποθετούνται μια σε κάθε φρεάτιο και πάνω σε αυτές ίση ποσότητα κυττάρων, ούτως ώστε να μελετηθούν τα νανοσωματίδια. Στη συνέχεια τοποθετείται η καλυπτρίδα στην αντικειμενοφόρο πλάκα, στην οποία βάζουμε ειδικά φθορίζοντα αντιδραστήρια, προκειμένου να προκληθεί φθορισμός σε περιοχές του κυττάρου οι οποίες είναι επιθυμητό να διερευνηθούν, η αρτιότητα του κυτταροσκελετού στον πυρήνα του κυττάρου, προκειμένου να εξεταστεί το ενδεχόμενο τα μαγνητικά νανοσωματίδια να έχουν εσωτερικευτεί στο κύτταρο και να προσδιοριστεί η παραμόρφωση που έχουν προξενήσει.

Ο κυτταροσκελετός παίζει θεμελιώδη ρόλο στο κύτταρο. Ρυθμίζει την κυτταρική δυναμική και κινητικότητα, παρέχοντας μια πληθώρα αλληλεπιδράσεων στα γειτονικά κύτταρα και τελικά προσδιορίζεται το γενικό σχήμα των κυττάρων. Η απεικόνιση φθορισμού έχει αποδειχθεί ζωτικής σημασίας για την προώθηση της αρτιότητας του

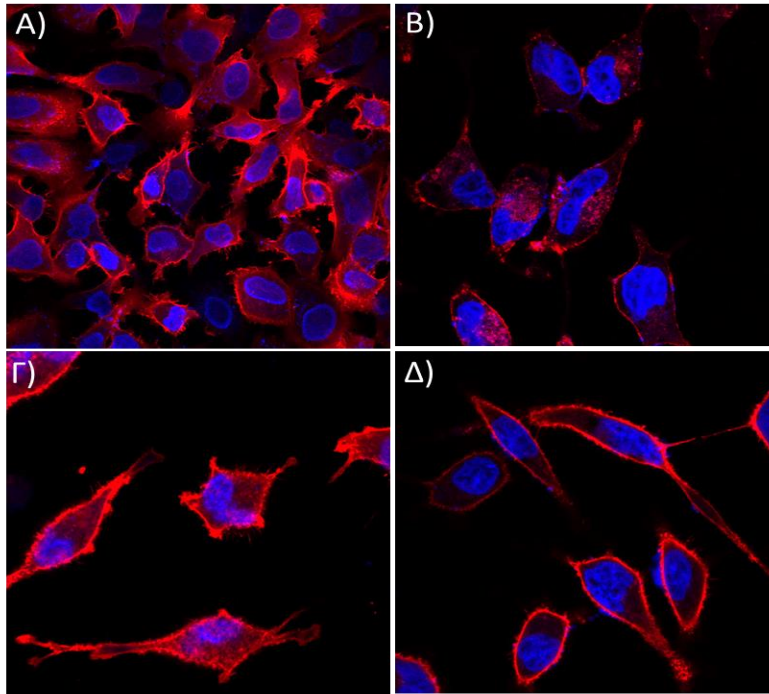
κυτταροσκελετού, και είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως από τους κυτταρικούς βιολόγους. Στο συγκεκριμένο πείραμα επικεντρώνουμε το ενδιαφέρον μας στον σκελετό του κυττάρου. Η φθορίζουσα με TRITC φαλλοϊδίνη (P1951, Sigma), ανήκει σε μια κατηγορία τοξινών που ονομάζονται φυλλοτοξίνες. Πρόκειται για ένα άκαμπτο δίκυκλικό επταπεπτιδίο, το οποίο βάφει κόκκινο τον κυτταρικό σκελετό, και η εφαρμογή του στα κύτταρα σκοπό είχε να απεικονίσει τη μορφολογία τους και τη διάταξη του κυτταροσκελετού. Οι πυρήνες χρωματίστηκαν με τη φθορίζουσα χρωστική Hoechst 33342 (DAPI) (4', 6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλιο) (10 µg/ml) (Invitrogen) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες που περιείχαν τα επισημασμένα κύτταρα τοποθετήθηκαν με ένα μέσο τοποθέτησης (Biomedica, Foster City, CA) και παρατηρήθηκαν κάτω από μικροσκόπιο σάρωσης λέιζερ Bio-Rad MRC 1024 ES (Bio-Rad, Hercules, CA) mW πηγή λέιζερ κρυπτόν/αργού για μετρήσεις φθορισμού. Τα κύτταρα εξετάστηκαν με έναν αντικειμενικό εμβολιασμό Nikon Plan Apo X60-oil χρησιμοποιώντας μήκος κύματος διέγερσης κατάλληλο για Alexa 488 (495 nm). Σειρά οπτικών τμημάτων (XY: 512*512 εικονοστοιχεία) ελήφθησαν έπειτα διαμέσου του βάθους των κυττάρων με πάχος 1 µm σε διαστήματα 0,8 µm. Οι εικόνες ελήφθησαν με υπέρθεση είκοσι οπτικών τμημάτων για κάθε παρατηρούμενο δείγμα.



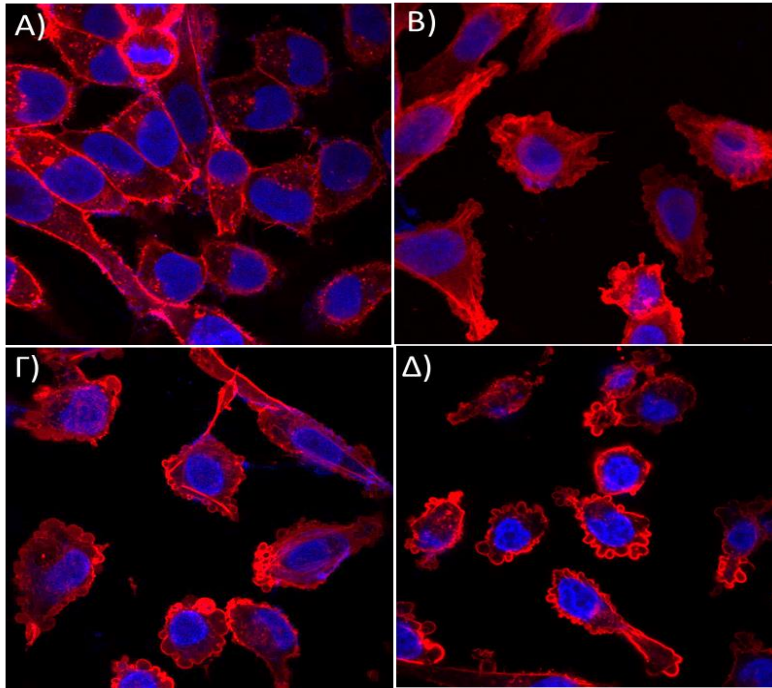
Εικόνα 43: Περιγραφή πρωτοκόλλου διαδικασίας συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης

Οι Εικόνες 44 και 45, Α) αντιπροσωπεύουν κάθε κυτταρική σειρά πριν την επώαση και οι υπόλοιπες, τα μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου Β) mNPs, Γ) mNPs@citrate, Δ) mNPs@citrate@NaBH₄.



Εικόνα 44: Συνεστιακή μικροσκοπία στα NCTC κύτταρα

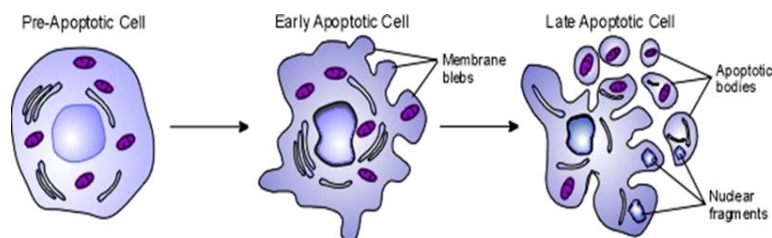
Στην Εικόνα 44, παρατηρούμε ότι ο κυτταρικός σκελετός των υγιών επιδερμικών κυττάρων, με την εισαγωγή των μαγνητικών νανοσωματιδίων, δεν έχει τροποποιηθεί σε σύγκριση με το δείγμα αναφοράς της Εικόνας 44A. Αυτό είναι ενδεικτικό πως τα μαγνητικά νανοσωματίδια δεν εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις στις οποίες έχει πραγματοποιηθεί η κατεργασία, και δεν οδηγούν τα κύτταρα σε κυτταρική απόπτωση.



Εικόνα 45: Παρατήρηση των A375-M6 και μελέτη του μηχανισμού δράσης.

Στην Εικόνα 45, στην οποία παρουσιάζεται το δείγμα αναφοράς A), παρατηρείται, η μορφολογία του κυτταροσκελετού να είναι φυσιολογική, χωρίς ενδείξεις απόπτωσης, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα δείγματα τα οποία περιέχουν τα μαγνητικά νανοσωματίδια. Παρατηρούμε ότι δημιουργούνται κύστες γύρω από τον κυτταρικό σκελετό κάθε κυτάρου. Αυτό υποδεικνύει την κυτταροτοξική επίδραση που έχουν τα μαγνητικά νανοσωματίδια στα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα.

Το στάδιο αυτό στο οποίο παρατηρούνται οι κύστες στο περίγραμμα του κυτάρου αποδεικνύει την έναρξη της απόπτωσης των κυτάρων. Στην Εικόνα 46, γίνεται πιο κατανοητή η μορφολογία ενός κυτάρου το οποίο οδηγείται σε κυτταρικό θάνατο.



Εικόνα 46: Μονοπάτια κυτταρικής απόπτωσης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

«Συμπεράσματα»

Τα μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου που παρασκευάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν στη παρούσα εργασία, φαίνεται να είναι σωματίδια μαγνητίτη. Η επιτυχής επικάλυψή τους με τρινάτριο άλας του κιτρικού οξέος, βελτίωσε τις ιδιότητες του υλικού κυρίως ως προς την κολλοειδή του συμπεριφορά. Τα μαγνητικά νανοσωματίδια που συνετέθησαν με αναγωγικό μέσο το βοροϋδρίδιο του νατρίου, έχουν πολύ μικρό μέγεθος (4 nm) σε σύγκριση με τα άλλα, και αυτό τα καθιστά ακατάλληλα για τη χρήση τους στην υπερθερμία, γεγονός που υποστηρίζεται τόσο βιβλιογραφικά αλλά και πειραματικά από τα πειράματα υπερθερμίας που πραγματοποιήθηκαν.

Επιπλέον συνετέθησαν με τη μέθοδο του ριζικού πολυμερισμού καταβύθισης μέσω απόσταξης, και χαρακτηρίστηκαν κενές πολυμερικές νανοσφαίρες στις οποίες έχουν ενθυλακωθεί τα μαγνητικά νανοσωματίδια. Μέσω του δομικού αλλά και μορφολογικού χαρακτηρισμού συμπεραίνεται ότι πρόκειται για μονοδιεσπαρμένες σφαίρες. Οι πολυμερικές νανοσφαίρες χρήζουν περισσότερης ανάλυσης, καθώς σκοπός είναι να ενθυλακωθεί φάρμακο στο εσωτερικό τους για την περαιτέρω χρήση τους ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκου. Κύριος λόγος της χρήσης τους είναι η βιοσυμβατότητα που έχουν εξαιτίας της επικάλυψής τους με PEG, το οποίο είναι ένα βιοσυμβατό πολυμερές και οδηγεί σε μεγαλύτερους χρόνους παραμονής στον οργανισμό.

Ένα μειονέκτημα της μεθόδου MTT, με την οποία αξιολογούνται βιολογικά τα μαγνητικά νανοσωματίδια είναι ότι δεν μπορεί να γίνει διαχωρισμός μεταξύ μίας κυτταροτοξικής (κυτταρικός θάνατος) και μίας κυτταροστατικής (μείωση ρυθμού ανάπτυξης) επίδρασης, και για αυτό το λόγο καταφεύγουμε σε επιπρόσθετες βιολογικές μελέτες. Η καρκινική σειρά A375-M6, κατά τη μελέτη της μέσω της διαδικασίας MTT, όμως δεν παρουσιάζει μεγάλο ποσοστό κυτταρικής απόπτωσης και αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε αντίθεση με τη συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης, όπου παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα

οδηγούνται σε απόπτωση. Ο χρόνος επώασης που πραγματοποιήθηκε η μελέτη σε όλα είναι 24 ώρες.

Πιο αναλυτικά, όσον αφορά τη βιολογική αξιολόγηση των παραπάνω mNPs, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα mNPs σε υγιή κύτταρα δεν είναι ιδιαίτεως τοξικά, και μετά την ενθυλάκωση τους στις πολυμερικές νανόσφαιρες δεν παρουσιάζουν καθόλου τοξικότητα, εν αντιθέσει με τις καρκινικές σειρές όπου δείχνουν να εμφανίζουν κυτταρική απόπτωση. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα υποστηρίζεται από τη συνεστική μικροσκοπία σάρωσης, στην οποία παρατηρείται ότι ο κυτταροσκελετός των μεταστατικών καρκινικών κυττάρων της σειράς A375-M6, παραμορφώνεται και τα κύτταρα οδηγούνται σε κυτταρική απόπτωση.

Όσον αφορά την υγιή επιδερμική κυτταρική σειρά NCTC, στο πείραμα της επούλωσης πληγών παρατηρείται το κλείσιμο της πληγής έπειτα από τη χορήγηση των μαγνητικών νανοσωματιδίων σε αυτά, το οποίο είναι συγκρίσιμο με το δείγμα αναφοράς. Επίσης στην επιδερμική μεταστατική σειρά των κυττάρων A375-M6, παρατηρείται καθυστέρηση στο κλείσιμο των πληγών με την κατεργασία με τα μαγνητικά νανοσωματίδια, κάτι το οποίο αποδεικνύει πως τα νανοσωματίδια αυτά καθυστερούν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 5: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος Όρος	Ελληνικός Όρος
Quantum size effect	Φαινόμενο κβαντικού μεγέθους
Clusters	Συστάδες
Semiconductor nanocrystals	Ημιαγωγοί νανοκρυστάλλων
Bulk	Ογκώδες
Polystyrene	Πολυστυρένιο
Polyethylenoglycole	Πολυαιθυλενογλυκόλη
Polymethacrylate	Πολυμεθακρυλικός μεθυλεστέρας
Hopping	Διαπίδυση
Spin	Στροφορμή
Bottom up	Από κάτω προς τα πάνω
Bottom down	Από πάνω προς τα κάτω

Sol-gel	Πήκτωμα -Λύμα
Monomers	Μονομερή
Repeating unit	Επαναλαμβανόμενη μονάδα
Structural unit	Δομική μονάδα
Statistical	Τυχαία συμπολυμερή
Alternating	Εναλλασσόμενα συμπολυμερή
Block	Αδρομερή συμπολυμερή
Graft	Εμβολιασμένα συμπολυμερή

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Πίνακας 6: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

SIM	Scanning Tunneling Microscope
IBN	International Business Machines
PMMA	Polymethylmethacrylate
PEG	Polyethylenoglycole
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MAA	Methacrylic Acid
MAA-co-PEG	Methacrylic Acid coated with Polyethylenoglycole
ACN	Acetonitrile
AIBN	Azobisisobutyronitrile
MBA	N, N'-methylene bis acrylamide
mNPs	Magnetic Nanoparticles
mNPs@citrate	Magnetic Nanoparticles coated citrate
mNPs@NaBH ₄	Magnetic Nanoparticles coated with sodium borohydride

P(MAA-co-PEG) @mNPs	Methacrylic Acid coated with Polyethylenoglycole with Magnetic nanoparticles
P(MAA-co-PEG) @citrate	Methacrylic Acid coated with Polyethylenoglycole with citrate
P(MAA-co-PEG) @NaBH ₄	Methacrylic Acid coated with Polyethylenoglycole with sodium borohydride

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Yue-Jian, C., T. Juan, X. Fei, Z. Jia-Bi, G. Ning, Z. Yi-Hua, D. Ye, and G. Liang, *Synthesis, self-assembly, and characterization of PEG-coated iron oxide nanoparticles as potential MRI contrast agent*. Drug Dev Ind Pharm, 2010. **36**(10): p. 1235-44.
2. Nanotechnology., T.L.C.-A.R., *Nanotechnology under the microscope*. Nanotechnology, 2003. **14**(9).
3. <http://www.wichlab.com/nanometer-scale-comparison-nanoparticle-size-comparison-nanotechnology-chart-ruler-2>.
4. Freestone, I., N. Meeks, M. Sax, and C. Higgitt, *The Lycurgus Cup - A Roman nanotechnology*. Gold Bulletin, 2007. **40**(4): p. 270-277.
5. W. D. Niven, M.A., F.R.S, *The Scientific Papers Of James Clerk Maxwell* p : 668.
6. Feynman R.P., *There's plenty Room at the Bottom*, Pasadena 1959.
7. Faraday, M., *Experimental Relations of Gold (and other Metals) to light*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1857. 147: p. 145-181.
8. Tuomo Suntola & Avril Styrman, *Scientific Models And a Comprehensive Picture Of Reality*, 2016.
9. Binnig, G.a.H.R., Scanning tunneling microscopy. IBM Journal of Research and Development, 1986. 30(4).
10. T. Braun, A.S., S. Zsindely, Nanoscience and nanotechnology on the balance, Scientometrics Vol. 38, No. 2 (1997): 321-325.
11. Christina Raab, Myrtill Simkó, *Production of nanoparticles and nanomaterials*. NanoTrust-Dossiers, 2011. **6**(1).
12. *Classification of Nanomaterials*. 2017: p. 27-56.
13. Rao, J.P. and K.E. Geckeler, *Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters*. Progress in Polymer Science, 2011. **36**(7): p. 887-913.
14. Hao, R., R. Xing, Z. Xu, Y. Hou, S. Gao, and S. Sun, *Synthesis, functionalization, and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles*. Adv Mater, 2010. **22**(25): p. 2729-42.
15. J.M.D.Coey, M.A.M., Published in the United States of America by Cambridge University Press, New York 2019.
16. de Montferrand, C., L. Hu, I. Milosevic, V. Russier, D. Bonnin, L. Motte, A. Brioude, and Y. Lalatonne, *Iron oxide nanoparticles with sizes, shapes and compositions resulting in different magnetization signatures as potential labels for multiparametric detection*. Acta Biomater, 2013. **9**(4): p. 6150-7.
17. <https://el.wikipedia.org/wiki>.
18. Mahmoudi, M., S. Sant, B. Wang, S. Laurent, and T. Sen, *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(1-2): p. 24-46.
19. El-Sayed, M.A., MAGNETIC NANOPARTICLES: From Fabrication to Clinical Applications, ed. N.T.K. Thanh. CRC Press, Taylor & Francis Group.
20. *Crystal Structure*. 2003: p. 9-38.

21. Χ.Ταπεινός, *Σύνθεση και χαρακτηρισμός νανοσφαιρών οξειδίων σιδήρου*,. Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης,, Τμήμα Επιστήμης των Υλικών,Πανεπιστήμιο Πατρών 2011.
22. <https://en.wikipedia.org/wiki/Hysteresis>.
23. Carolinede Montferrand, I.o.n.w.s., shapes and compositions resulting in different magnetization signatures as potential labels for multiparametric detection,Acta Biomaterialia, April 2013, Pages 6150-6157.
24. Siafaka, P.I., N. Ustundag Okur, E. Karavas, and D.N. Bikiaris, *Surface Modified Multifunctional and Stimuli Responsive Nanoparticles for Drug Targeting: Current Status and Uses*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(9).
25. Α.Πουλιόπουλος, *Πολυλειτουργικά νανοσωματίδια συνδυασμός διάγνωσης – θεραπείας*. Τμήμα Φυσικής, Θεσσαλονίκη 2011.
26. Wahajuddin and S. Arora, *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers*. Int J Nanomedicine, 2012. **7**: p. 3445-71.
27. Wang, Y. and Y. Xia, *Bottom-Up and Top-Down Approaches to the Synthesis of Monodispersed Spherical Colloids of Low Melting-Point Metals*. Nano Letters, 2004. **4**(10): p. 2047-2050.
28. Park, B.J., K.H. Song, and H.J. Choi, *Magnetic carbonyl iron nanoparticle based magnetorheological suspension and its characteristics*. Materials Letters, 2009. **63**(15): p. 1350-1352.
29. Ling, D., N. Lee, and T. Hyeon, *Chemical synthesis and assembly of uniformly sized iron oxide nanoparticles for medical applications*. Acc Chem Res, 2015. **48**(5): p. 1276-85.
30. Gupta, A.K. and M. Gupta, *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications*. Biomaterials, 2005. **26**(18): p. 3995-4021.
31. Teja, A.S. and P.-Y. Koh, *Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles*. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials, 2009. **55**(1-2): p. 22-45.
32. Massart, R., Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media, IEEE Trans. Magn., 1981, 17, 1247.
33. Avazzadeh, R., E. Vasheghani-Farahani, M. Soleimani, S. Amanpour, and M. Sadeghi, *Synthesis and application of magnetite dextran-spermine nanoparticles in breast cancer hyperthermia*. Prog Biomater, 2017.
34. Thanh, N.T., N. Maclean, and S. Mahiddine, *Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution*. Chem Rev, 2014. **114**(15): p. 7610-30.
35. Wu, W., Z. Wu, T. Yu, C. Jiang, and W.S. Kim, *Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications*. Sci Technol Adv Mater, 2015. **16**(2): p. 023501.
36. Coricovac, D.E., E.A. Moaca, I. Pinzaru, C. Citu, C. Soica, C.V. Mihali, C. Pacurariu, V.A. Tutelyan, A. Tsatsakis, and C.A. Dehelean, *Biocompatible Colloidal Suspensions Based on Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Toxicological Profile*. Front Pharmacol, 2017. **8**: p. 154.
37. Li, X., Y. Yang, Y. Jia, X. Pu, T. Yang, Y. Wang, X. Ma, Q. Chen, M. Sun, D. Wei, Y. Kuang, Y. Li, and Y. Liu, *Enhanced tumor targeting effects of a novel*

- paclitaxel-loaded polymer: PEG-PCCL-modified magnetic iron oxide nanoparticles*. Drug Deliv, 2017. **24**(1): p. 1284-1294.
38. Saraswathy, A., S.S. Nazeer, M. Jeevan, N. Nimi, S. Arumugam, V.S. Harikrishnan, P.R. Varma, and R.S. Jayasree, *Citrate coated iron oxide nanoparticles with enhanced relaxivity for in vivo magnetic resonance imaging of liver fibrosis*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2014. **117**: p. 216-24.
 39. Nigam, S., K.C. Barick, and D. Bahadur, *Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2011. **323**(2): p. 237-243.
 40. Amstad, E., S. Zurcher, A. Mashaghi, J.Y. Wong, M. Textor, and E. Reimhult, *Surface functionalization of single superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted magnetic resonance imaging*. Small, 2009. **5**(11): p. 1334-42.
 41. Andreas, K., R. Georgieva, M. Ladwig, S. Mueller, M. Notter, M. Sittinger, and J. Ringe, *Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking*. Biomaterials, 2012. **33**(18): p. 4515-25.
 42. Collins, J.F., J.R. Prohaska, and M.D. Knutson, *Metabolic crossroads of iron and copper*. Nutr Rev, 2010. **68**(3): p. 133-47.
 43. Rout, G.R. and S. Sahoo, *Role of Iron in Plant Growth and Metabolism*. Reviews in Agricultural Science, 2015. **3**(0).
 44. Winter, W.E., L.A. Bazydlo, and N.S. Harris, *The molecular biology of human iron metabolism*. Lab Med, 2014. **45**(2): p. 92-102.
 45. McCord, J.M., *The evolution of free radicals and oxidative stress*. Am J Med, 2000. **108**(8): p. 652-9.
 46. Weinberg, F., R. Hamanaka, W.W. Wheaton, S. Weinberg, J. Joseph, M. Lopez, B. Kalyanaraman, G.M. Mutlu, G.R. Budinger, and N.S. Chandel, *Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(19): p. 8788-93.
 47. Sarkar, A., M. Ghosh, and P.C. Sil, *Nanotoxicity: Oxidative Stress Mediated Toxicity of Metal and Metal Oxide Nanoparticles*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2014. **14**(1): p. 730-743.
 48. Luck, A.N. and A.B. Mason, *Transferrin-mediated cellular iron delivery*. Curr Top Membr, 2012. **69**: p. 3-35.
 49. Farokhzad, O.C., J. Cheng, B.A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P.W. Kantoff, J.P. Richie, and R. Langer, *Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(16): p. 6315-20.
 50. Chen, B., W. Wu, and X. Wang, *Magnetic iron oxide nanoparticles for tumor-targeted therapy*. Curr Cancer Drug Targets, 2011. **11**(2): p. 184-9.
 51. Curtis, A. and C. Wilkinson, *Nanotechniques and approaches in biotechnology*. Trends Biotechnol, 2001. **19**(3): p. 97-101.
 52. Danhier, F., O. Feron, and V. Preat, *To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery*. J Control Release, 2010. **148**(2): p. 135-46.
 53. Schleich, N., C. Po, D. Jacobs, B. Ucakar, B. Gallez, F. Danhier, and V. Preat, *Comparison of active, passive and magnetic targeting to tumors of*

- multifunctional paclitaxel/SPIO-loaded nanoparticles for tumor imaging and therapy.* J Control Release, 2014. **194**: p. 82-91.
54. Γ.Σιμιτζής, Τ., Λ. Ζουμπουλάκης, *Πολυμερή και σύνθετα υλικά.* ΕΜΠ Α΄ μέρος, Αθήνα, 2010.
 55. Hart R and Smets G. J Polymer Sci 5, 1950.
 56. Sperling L. H., I.t.p.p.s., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey 2006.
 57. Sun, Y., X. Ding, Z. Zheng, X. Cheng, X. Hu, and Y. Peng, *Magnetic separation of polymer hybrid iron oxide nanoparticles triggered by temperature.* Chemical Communications, 2006(26): p. 2765.
 58. Bai, F., B. Huang, X. Yang, and W. Huang, *Synthesis of monodisperse poly(methacrylic acid) microspheres by distillation-precipitation polymerization.* European Polymer Journal, 2007. **43**(9): p. 3923-3932.
 59. G.ölander C-G, H.J., Lim K, Claesson P, Stenius P, Andrade JD. Properties of immobilized PEG films and the interaction with proteins. In: Harris JM, editor. Poly(ethyleneglycol) chemistry, biotechnical and biomedical applications. New York: Plenum Press, 1992. p. 221-45.
 60. Xu, J.-S. and Y.-J. Zhu, *α -Fe₂O₃ hierarchically hollow microspheres self-assembled with nanosheets: surfactant-free solvothermal synthesis, magnetic and photocatalytic properties.* CrystEngComm, 2011. **13**(16): p. 5162.
 61. Xia, J. and K. Matyjaszewski, *Controlled/"Living" Radical Polymerization. Homogeneous Reverse Atom Transfer Radical Polymerization Using AIBN as the Initiator.* Macromolecules, 1997. **30**(25): p. 7692-7696.
 62. Tan, L., H. Pu, M. Jin, Z. Chang, D. Wan, and J. Yin, *Iron nanoparticles encapsulated in poly(AAm-co-MAA) microgels for magnetorheological fluids.* Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2010. **360**(1-3): p. 137-141.
 63. Nguyen, D.T. and K.S. Kim, *Template-free synthesis and characterization of monodisperse magnetite hollow nanoparticles through solvothermal process.* J Nanosci Nanotechnol, 2013. **13**(8): p. 5773-6.
 64. Huang, B., F. Bai, X.-l. Yang, and W.-q. Huang, *Synthesis of monodisperse hollow polymer microspheres with functional groups by distillation precipitation polymerization.* Chinese Journal of Polymer Science, 2010. **28**(2): p. 277-285.
 65. Bai, F., X. Yang, R. Li, B. Huang, and W. Huang, *Monodisperse hydrophilic polymer microspheres having carboxylic acid groups prepared by distillation precipitation polymerization.* Polymer, 2006. **47**(16): p. 5775-5784.
 66. Kumar, C.S. and F. Mohammad, *Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery.* Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(9): p. 789-808.
 67. Ali, A.A., F.T. Hsu, C.L. Hsieh, C.Y. Shiau, C.H. Chiang, Z.H. Wei, C.Y. Chen, and H.S. Huang, *Erlotinib-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles as a Smart Cancer-Targeted Theranostic Probe for MRI.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 36650.
 68. Sun, S., S. Anders, H.F. Hamann, J.-U. Thiele, J.E.E. Baglin, T. Thomson, E.E. Fullerton, C.B. Murray, and B.D. Terris, *Polymer Mediated Self-Assembly of Magnetic Nanoparticles.* Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(12): p. 2884-2885.

69. de Montferrand, C., L. Hu, I. Milosevic, V. Russier, D. Bonnin, L. Motte, A. Brioude, and Y. Lalatonne, *Iron oxide nanoparticles with sizes, shapes and compositions resulting in different magnetization signatures as potential labels for multiparametric detection*. *Acta Biomaterialia*, 2013. **9**(4): p. 6150-6157.
70. Figuerola, A., R. Di Corato, L. Manna, and T. Pellegrino, *From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications*. *Pharmacol Res*, 2010. **62**(2): p. 126-43.
71. Basly, B., D. Felder-Flesch, P. Perriat, C. Billotey, J. Taleb, G. Pourroy, and S. Begin-Colin, *Dendronized iron oxide nanoparticles as contrast agents for MRI*. *Chem Commun (Camb)*, 2010. **46**(6): p. 985-7.
72. <http://www.neurocenter.gr>.
73. Ito, A., M. Shinkai, H. Honda, and T. Kobayashi, *Medical application of functionalized magnetic nanoparticles*. *J Biosci Bioeng*, 2005. **100**(1): p. 1-11.
74. Martinez-Boubeta, C., K. Simeonidis, A. Makridis, M. Angelakeris, O. Iglesias, P. Guardia, A. Cabot, L. Yedra, S. Estrade, F. Peiro, Z. Saghi, P.A. Midgley, I. Conde-Leboran, D. Serantes, and D. Baldomir, *Learning from nature to improve the heat generation of iron-oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia applications*. *Sci Rep*, 2013. **3**: p. 1652.
75. <http://www.magforce.de/en/home.html>.
76. Chaki, S.H., T.J. Malek, M.D. Chaudhary, J.P. Tailor, and M.P. Deshpande, *Magnetite Fe₃O₄ nanoparticles synthesis by wet chemical reduction and their characterization*. *Advances in Natural Sciences-Nanoscience and Nanotechnology*, 2015. **6**(3).
77. Park, J., E. Lee, N.-M. Hwang, M. Kang, S.C. Kim, Y. Hwang, J.-G. Park, H.-J. Noh, J.-Y. Kim, J.-H. Park, and T. Hyeon, *One-Nanometer-Scale Size-Controlled Synthesis of Monodisperse Magnetic Iron Oxide Nanoparticles*. *Angewandte Chemie*, 2005. **117**(19): p. 2932-2937.
78. Dennis, C.L., A.J. Jackson, J.A. Borchers, P.J. Hoopes, R. Strawbridge, A.R. Foreman, J. van Lierop, C. Gruttner, and R. Ivkov, *Nearly complete regression of tumors via collective behavior of magnetic nanoparticles in hyperthermia*. *Nanotechnology*, 2009. **20**(39).
79. Lim, J., S.P. Yeap, H.X. Che, and S.C. Low, *Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering*. *Nanoscale Res Lett*, 2013. **8**(1): p. 381.