



## ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ  
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ - ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

Δ.Π.Μ.Σ. «ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

### ***Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος***

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Παπακρήστος Νικόλαος**

*Διπλωματούχος Μηχανικός Επιστήμης Υλικών  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων*

*Επιβλέποντες*

**Μακροπούλου Μ.**

*Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τομέας Φυσικής,  
Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών  
Ε.Μ.Π.*

**Σταμόπουλος Δ.**

*Συνεργαζόμενος Ερευνητής, Τομέας Επιστήμης Υλικών,  
Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας,  
Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ»*

Αθήνα, Ιούλιος 2014





## ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ  
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ - ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

Δ.Π.Μ.Σ. «ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

### **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Παπακρήστος Νικόλαος**

*Διπλωματούχος Μηχανικός Επιστήμης Υλικών  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων*

Εγκρίθηκε από την τριμελή Εξεταστική επιτροπή και τον  
Επιστημονικό Υπεύθυνο

Εξεταστική επιτροπή:

*Μακροπούλου Μ., Αν. Καθηγήτρια.*

*Σ.Ε.Μ.Φ.Ε. - Ε.Μ.Π.*

*Ράπτης Ι., Αν. Καθηγητής*

*Σ.Ε.Μ.Φ.Ε. - Ε.Μ.Π.*

*Ζεργιώτη Ι., Αν. Καθηγήτρια*

*Σ.Ε.Μ.Φ.Ε. - Ε.Μ.Π.*

Επιστημονικός υπεύθυνος:

*Σταμόπουλος Δ., Συνεργαζόμενος*

*Ερευνητής, Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης*

*και Νανοτεχνολογίας, Τομέας Επιστήμης*

*Υλικών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»*

Αθήνα, 25 Ιουλίου 2014



# Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

## Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια τα μεταλλικά νανοσωματίδια (ΝΣ) αλλά και διάφορα οξειδιά τους, ιδιαίτερα το οξείδιο του σιδήρου ( $Fe_2O_3$  ή  $Fe_3O_4$ ), χρησιμοποιούνται στην Ιατρική για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς. Τα ΝΣ οξειδίου του σιδήρου είναι ευρέως διαδεδομένα επειδή μπορούν να παρασκευαστούν σε διάφορες μορφολογίες (όπως σφαίρες, κύλινδροι και κύβοι), υπάρχει η δυνατότητα να τροποποιηθούν οι επιφανειακές τους ιδιότητες, προκειμένου να αποφευχθούν οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, κατά κανόνα παρουσιάζουν υπερπαραμαγνητική συμπεριφορά ενώ, τέλος, είναι βιοσυμβατά. Η βιοσυμβατότητά τους και ο μεγάλος λόγος επιφάνειας/όγκο, τα καθιστούν ελκυστικά για χρήση σε *in vivo* εφαρμογές, όπως η μαγνητική τομογραφία, η στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων και η υπερθερμία. Παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματα, υπάρχει ένα βασικό μειονέκτημα το οποίο είναι η ανοσοσυμβατότητα, ένας όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη συμβατότητα με το ανοσοποιητικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, ο όρος ανοσοσυμβατότητα χρησιμοποιείται για να περιγράψει την αντίδραση του οργανισμού όταν το ΝΣ αναγνωριστεί από το ανοσοποιητικό σύστημα, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα κυκλοφορίας στο καρδιαγγειακό σύστημα. Το χρονικό διάστημα αυτό εξαρτάται από τα φυσικά χαρακτηριστικά του ΝΣ και καθορίζει το χρόνο παραμονής του ΝΣ στον οργανισμό.

Στα πλαίσια της προσπάθειας να καταστούν τα ΝΣ ανοσοσυμβατά και να αυξηθεί ο χρόνος παραμονής τους στο καρδιαγγειακό σύστημα, αναπτύχθηκαν σχετικά πρόσφατα μερικές νέες μορφολογίες ΝΣ. Αυτές οι νέες μορφολογίες νανοσκοπικών διαστάσεων αποτελούνται από βιοσυμβατά σταυροδεμένα πολυμερή (νανογέλη), τα οποία συμπεριφέρονται σαν κάψουλες-φορείς στα οποία μπορεί να προσδεθεί είτε ποσότητα από ΝΣ οξειδίου του σιδήρου, είτε ποσότητα φαρμάκου για στοχευμένη χορήγηση. Τέτοιες οικογένειες βασίζονται στα πολυμερή poly (N-vinylcaprolactam) (PVCL) και poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) ενώ τελευταία έχουν αναπτυχθεί παρόμοιες νανοσκοπικές

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

κάψουλες-φορείς που βασίζονται στο poly (N,N'-diethyl aminoethyl methacrylate) (PDEAEMA). Τα συγκεκριμένα συστήματα παρουσιάζουν απόκριση σε μεταβολές εξωτερικών παραμέτρων όπως είναι η θερμοκρασία και το pH, οπότε και συρρικνώνονται, όταν η θερμοκρασία ή το pH υπερβούν μια συγκεκριμένη τιμή, απελευθερώνοντας το έγκλεισμα που αρχικά τοποθετήθηκε μέσα σε αυτά. Οι κρίσιμες θερμοκρασίες μετάβασης είναι κοντά στους 40° C, ενώ αντίστοιχα οι κρίσιμες τιμές του pH κοντά στο 7, τιμές που βρίσκονται εντός του εύρους που απαιτείται για χρήση σε *in vivo* εφαρμογές.

Ο σκοπός της παρούσης Μεταπτυχιακής Εργασίας είναι η μελέτη της μαγνητικής νανογέλης (MNG) που αποτελείται από το σταυροδεμένο πολυμερές από PDEAEMA (νανογέλη) και από ΝΣ οξειδίου του σιδήρου ( $Fe_2O_3$  ή  $Fe_3O_4$ ) με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος. Η μελέτη βασίζεται στην παρατήρηση αλλοιώσεων των μορφολογικών χαρακτηριστικών των κυττάρων του αίματος με προηγμένες τεχνικές απεικόνισης, τη Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (ΜΑΔ) και τη Μικροσκοπία Ηλεκτρονικής Σάρωσης (ΜΗΣ). Η Οπτική Μικροσκοπία (ΟΜ) χρησιμοποιείται σε μικρότερο βαθμό και μόνο κατά το στάδιο προετοιμασίας των δειγμάτων για τον έλεγχο της καταλληλότητάς τους για την περαιτέρω μελέτη με τις μεθόδους ΜΑΔ και ΜΗΣ.

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από 3 υγιείς και 2 ασθενείς δότες. Στα *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα Μεταπτυχιακή Εργασία διερευνήθηκαν μια σειρά από πειραματικές παραμέτρους. Συγκεκριμένα, τα δείγματα περιφερικού αίματος, ωρίμασαν με τη ΜΝΓ για (α) διαφορετικούς χρόνους, (β) διαφορετικές συγκεντρώσεις και (γ) διαφορετικό μέσο. Μετά την ωρίμανση παρασκευάστηκαν μονοστρωματικά υμένα δείγματος, τα οποία παρατηρήθηκαν στα προηγμένα ΜΑΔ και ΜΗΣ, που έχουν δυνατότητα μεγέθυνσης έως και  $\times 1.000.000$  φορές. Οι μεγάλες μεγεθύνσεις που προσφέρουν τα προηγμένα μικροσκόπια είναι απαραίτητες για τη μελέτη, προκειμένου να διερευνηθούν με μεγάλη ακρίβεια (α) οι πιθανές αλλοιώσεις όχι μόνο στη γενική μορφολογία και σχήμα των κυττάρων αλλά και στη

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

μορφολογία της μεμβράνης τους (κάτι που αναμένεται να συμβεί σε πρώιμο στάδιο) και (β) η πιθανή σύζευξη της ΜΝΓ με τα κύτταρα. Εκτός από αυτούς τους δείκτες, επικεντρώσαμε και στην πιθανότητα (α) λύσης κυρίως των ερυθροκυττάρων (ΕΚ), (β) στη φαγοκυττάρωση της ΜΝΓ από τα λευκοκύτταρα (ΛΚ) και (γ) στη δημιουργία συσσωματωμάτων στα αιμοπετάλια (ΑΠ), θεωρώντας και αυτούς ως δείκτες βιοσυμβατότητας.

Τα αποτελέσματα κατηγοριοποιούνται για τις τρεις ομάδες κυττάρων περιφερικού αίματος. Τα ΕΚ αποτελούν το πιο σημαντικό κομμάτι της μελέτης, λόγω του ότι αποτελούν τον πληθυσμό πλειονότητας στο αίμα και ενδεχομένως έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες αλληλεπίδρασης με τη ΜΝΓ. Φαίνεται ότι τα ΕΚ δεν επηρεάζονται μορφολογικά από την παρουσία της ΜΝΓ τόσο μετά την ωρίμανση σε πλάσμα, όσο και σε φυσιολογικό ορό. Η πιο σημαντική παρατήρηση είναι ότι υπάρχει σύζευξη με τη ΜΝΓ, η οποία συγκεντρώνεται κυρίως περιμετρικά του ΕΚ. Η παρατήρηση της σύζευξης είναι ευκολότερη όταν η ωρίμανση γίνεται σε φυσιολογικό ορό. Αφού επιτευχθεί η σύζευξη, και με τη χρήση ενός μαγνητικού πεδίου, το ΕΚ μπορεί με ακρίβεια να οδηγηθεί στον ιστό-στόχο. Στη συνέχεια η ΜΝΓ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως σκιαγραφικός παράγοντας (για τη Μαγνητική Τομογραφία) ή για ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκου (για την στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων).

Τα ΛΚ, είναι τα κύτταρα εκείνα που ενεργοποιούνται για να απομακρύνουν τα ξένα σώματα και τους παθογόνους οργανισμούς μέσω της διαδικασίας που ονομάζεται φαγοκυττάρωση. Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ΛΚ δεν αλληλεπιδρούν με τη ΜΝΓ, ούτε και να επηρεάζεται η μορφολογία τους από την παρουσία της, όταν η ωρίμανση γίνεται σε πλάσμα. Αντίθετα, όταν η ωρίμανση γίνεται σε φυσιολογικό ορό, τα ΛΚ καταστρέφονται λόγω των διαδικασιών όσμωσης στις οποίες υπόκεινται λόγω της παρουσίας του. Τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά επειδή δείχνουν ότι η ΜΝΓ μπορεί να έχει αυξημένο χρόνο κυκλοφορίας στο καρδιαγγειακό χωρίς να αναγνωρίζεται από το ανοσοποιητικό σύστημα αλλά και ότι δεν επηρεάζει τη λειτουργία των ΛΚ όταν η ωρίμανση γίνεται σε πλάσμα.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

Τα ΑΠ, παρά το πολύ μικρό ποσοστό που καταλαμβάνουν στο αίμα, μόλις 1%, έχουν πολύ χρήσιμο ρόλο στον οργανισμό λόγω του χαρακτηριστικού της συγκόλλησης που παρουσιάζουν μεταξύ τους, καθορίζοντας έτσι την αιμόσταση. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, αυτό το χαρακτηριστικό είναι επιθυμητό, για παράδειγμα στην επούλωση ενός τραύματος. Ωστόσο χρειάζεται να μελετηθεί η επίδραση της ΜΝΓ στην ιδιότητάς τους αυτή, προκειμένου να αποκλειστεί το ενδεχόμενο δημιουργίας θρόμβων στο αίμα. Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι τα ΑΠ δεν αλληλεπιδρούν με τη ΜΝΓ όταν η ωρίμανση γίνεται σε πλάσμα, μιας και δεν παρατηρούνται μεταβολές στη συγκόλληση μεταξύ τους, ούτε και αλλοιώσεις στη μορφολογία τους. Αντίθετα, τα ΑΠ καταστρέφονται, όπως και τα ΛΚ, κατά την ωρίμανση τους με τη ΜΝΓ σε φυσιολογικό ορό.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα αυτών των *in vitro* πειραμάτων συμπεραίνουμε ότι η ΜΝΓ είναι καταρχήν βιοσυμβατή για τις συνθήκες που μελετήθηκαν στα πλαίσια της Μεταπτυχιακής Εργασίας, μιας και δεν φαίνεται να επηρεάζεται η μορφολογία των κυτταρικών στοιχείων του αίματος. Προκύπτει επίσης ότι η σύζευξη μεταξύ ΜΝΓ και ΕΚ είναι ευκολότερο να καταγραφεί όταν το μέσο διασποράς είναι ο φυσιολογικός ορός και όχι το πλάσμα. Τα ΛΚ και τα ΑΠ καταστρέφονται από την παρουσία του φυσιολογικού ορού και δεν μπορούν να παρουσιάσουν δεδομένα για τη μορφολογία των ΛΚ και των ΑΠ μετά την ωρίμανση σε φυσιολογικό ορό. Θα πρέπει να τονιστεί ότι τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι εισαγωγικά και αφορούν μόνο στους συγκεκριμένους δότες. Εντούτοις, τα συμπεράσματα για τους 5 δότες είναι παρόμοια. Μια μικρή απόκλιση παρουσιάζει ένας ασθενής δότης, τα ΛΚ του οποίου επιβίωσαν σε ένα μικρό ποσοστό σε φυσιολογικό ορό, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους δότες όπου υπήρξε καταστροφή του πληθυσμού των ΛΚ και ΑΠ από το φυσιολογικό ορό.

Στα πλαίσια της παρούσης Μεταπτυχιακής Εργασίας, μελετήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις και μέσα διασποράς, σε κάθε περίπτωση όμως η θερμοκρασία της ΜΝΓ ήταν χαμηλότερη από την κρίσιμη  $\sim 37^\circ$  C. Παρά τα προκαταρκτικά ενθαρρυντικά συμπεράσματα



## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

και προκειμένου να εξαχθούν γενικευμένα συμπεράσματα θα πρέπει να αυξηθεί το δείγμα των δοτών, να εξεταστούν οι τιμές της συγκέντρωσης και του χρόνου ωρίμανσης σε μεγαλύτερο εύρος. Μια άλλη κρίσιμη παράμετρος που χρειάζεται να μελετηθεί, είναι η επίδραση της θερμοκρασίας και συγκεκριμένα όταν αυτή είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη θερμοκρασία μετάβασης της ΜΝΓ, οπότε και τα σωματίδια της ΜΝΓ συρρικνώνονται. Τέλος, θα πρέπει να μελετηθούν ηπιότερες μέθοδοι αντικατάστασης του πλάσματος από το φυσιολογικό ορό, προκειμένου να αποφευχθεί η καταστροφή των ΛΚ και των ΑΠ. Πιο συγκεκριμένα, αντί για απευθείας αντικατάσταση ολόκληρης της ποσότητας πλάσματος από φυσιολογικό ορό, θα μπορούσε να εξεταστεί η τμηματική αντικατάσταση του πλάσματος από το φυσιολογικό ορό κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης (για παράδειγμα σε 5 στάδια), ώστε οι βιοχημικές μεταβολές οι οποίες θα είναι ευκολότερα ανεκτές από τα ΛΚ και τα ΑΠ. Θα μπορούσε επίσης να εξεταστεί η υποκατάσταση του πλάσματος από κάποιο άλλο μέσο και όχι από φυσιολογικό ορό.

# Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

## Abstract

During the last years, metallic nanoparticles (NPs) and some of their oxides, especially iron oxides ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), are used in Medicine for diagnostic and therapeutic purposes. Iron oxide NPs are widely used because they can be produced in several shapes (like spheres, rods and cubes), their surface properties can be easily functionalized to avoid interactions among them, they are normally superparamagnetic and, finally, they are biocompatible. Their biocompatibility and their increased surface/volume ratio, make them attractive to be used for *in vivo* applications, like Magnetic Resonance Imaging, Targeted Drug Delivery and Hyperthermia. Despite the significant advantages, there is one major disadvantage that is their limited immunocompatibility, a term used to describe the compatibility with the immune system. Specifically, the term immunocompatibility is used to describe the reaction of the human body when the NPs are being recognized after some period while in circulation in the cardiovascular system. The so-called immunoresponse and the maximum period of NPs circulation depend on the physical properties of the NPs.

In order to make the NPs immunocompatible and increase the circulation time in the cardiovascular system, some new types of NPs have been recently developed. These nano-scaled systems are consisted of biocompatible cross-linked polymers (nanogels) that behave as carriers where the NPs or drug can. These nanogels are based on poly (N-vinylcaprolactam) (PVCL) and poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAM), while recently some carriers have been developed that are based on poly (N, N'-diethyl aminoethyl methacrylate) (PDEAEMA). These polymers are stimuli responsive to several parameters such as temperature and pH and they collapse (that is shrink) when the temperature or pH exceeds a critical value, while they release their content. Typical critical values are around 40° C for the temperature and around 7 for the pH, respectively. These

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

values fit nicely the range of human body conditions, thus these agents are promising candidates for *in vivo* applications.

The objective of this MSc Thesis is the investigation of the biocompatibility of a magnetic nanogel (MNG) which consists of cross-linked polymer PDEAEMA (nanogel) and iron oxide magnetic NPs ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  or  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) with the blood cells. The study is based on the observation of the cells' deteriorations, using advanced imaging techniques, specifically the Atomic Force Microscopy (AFM) and the Scanning Electron Microscopy (SEM). Optical Microscopy (OM) is used at less extent, during sample preparation to confirm their suitability for the investigation with the AFM and SEM.

For the completion of this study, samples of peripheral blood from 3 healthy and 2 patient donors were used. During the *in vitro* experiments a number of several parameters were studied. Specifically, the peripheral blood samples were matured with the MNG for (a) different durations, (b) different concentrations and (c) different mediums. After the maturation procedure, single-layered films of the samples were prepared for observation with the advanced AFM and SEM imaging techniques that can achieve magnifications up to  $\times 1.000.000$ . These high magnifications are necessary, to accurately observe (a) possible changes in the cells' shape as well as possible deteriorations on the cells' membrane (that is expected to take place at early stages) and (b) possible conjugation between the cells and the MNG. Apart from these indices, this study was focused on the possible (a) lysis of the Red Blood Cells (RBCs), (b) phagocytosis of the MNG from the White Blood Cells (WBCs) and (c) aggregation of Platelets (Plts), using also them as biocompatibility indices.

The results are categorized according to the cells type. RBCs are the most important cell line, because they constitute the majority population, thus they have increased possibility for interaction with the MNG. Our results show that the RBCs are not affected by the MNG whether the maturation procedure is performed in blood plasma or physiological saline. Most important, it has been observed that

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

there is conjugation between RBCs and MNG that predominantly are attached at the periphery of RBCs. The conjugation is pronounced when the maturation is performed in physiological saline. Once we have ‘magnetically-modified RBCs’ at hand, we can accurately drive them by means of a magnetic field to the target tissue. Then the MNG can be used either as diagnostic contrast (Magnetic Resonance Imaging) or for selective release of a drug (Drug Delivery).

The WBCs are the cells that are initially activated in order to remove the pathogens through the phagocytosis process. The introductory results of this MSc Thesis showed that the WBCs do not interact with the MNG, when the maturation process is completed in blood plasma. On the other hand, when we tried to accomplish the maturation process in physiological saline we observed that the WBCs were completely destroyed by the biochemical shock (osmotic processes that drive lysis of cells). These results are encouraging because it means that the MNG can achieve increased circulation time into the cardiovascular without being recognized by the immune system and it also does not affect the WBCs when the maturation process is completed in blood plasma.

Plts, despite their small percentage in the blood, only 1%, have a very useful role, because of their coagulation properties that define the so-called hemostasis. Under certain conditions, this process is welcome, e.g. for wound healing. However, the possible interference of the MNG with coagulation processes needs to be investigated, in order to exclude the possibility of motivation and/or promotion of undesired blood clots. The results of this study showed that the Plts do not interact with the MNG when the maturation process is completed in blood plasma, as we do not observe any changes in their shape or in the coagulation properties. However, we observed that the Plts are also destroyed during their maturation in physiological saline.

The overall conclusion of these *in vitro* experimental results is that the MNG is biocompatible for the specific conditions used during this study; the MNG does not affect the morphological and geometrical

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

characteristics of blood cells. It is also concluded that the conjugation between the MNG and the RBCs advances more easily when physiological saline is used as the medium for the maturation procedure (in comparison to blood plasma). The WBCs and the Plts are destroyed by the physiological saline, so there is no data to present about the shape of the WBCs and the Plts, after their maturation with the MNG in physiological saline. It should be emphasized that these preliminary results refer to only the specific donors. Notably, the results for all 5 donors are similar. The only exception is for one patient, whose WBCs were not completely destroyed after the maturation with the MNG in physiological saline.

During this MSc Thesis, different concentrations and mediums were investigated. In each case the temperature of the MNG was below 37° C, which is the critical temperature for the specific nanogel. Despite the encouraging results, we need to increase the number of the donors, investigate a wider range of concentrations and maturation duration with the MNG. Another crucial parameter that needs to be investigated is the effect of the maturation temperature of the MNG with blood cells especially when it exceeds the critical temperature where the MNG collapse (that is shrink). Finally, more mild plasma-replacement procedures need to be found to avoid the destruction of WBCs and Plts during their processing with physiological saline. For instance, instead of a single plasma-saline replacement round, successive rounds (e.g. 5 rounds) can be employed during which the partial replacement of blood plasma with physiological saline is expected to result in biochemical processes that will be more easily tolerated from both WBCs and Plts. Alternatively, different plasma-replacement mediums could be investigated, as well.

# **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Μετά από δύο ακαδημαϊκά έτη στο Δ.Π.Μ.Σ. «Μικροσυστήματα και Νανοδιατάξεις» του Ε.Μ.Π. αισθάνομαι τυχερός για την ευκαιρία που μου δόθηκε να παρακολουθήσω και να ολοκληρώσω το πρόγραμμα. Στο δίλλημα που είχα μπροστά μου πριν από δύο χρόνια επέλεξα να συνεχίσω τις σπουδές μου σε αυτό το υψηλού επιπέδου μεταπτυχιακό πρόγραμμα, πράγμα για το οποίο αισθάνομαι δικαιωμένος.

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Εργασία πραγματοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου στον Τομέα Επιστήμης Υλικών του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», υπό την επιστημονική επίβλεψη του Δρ Δημοσθένη Σταμόπουλου, Συνεργαζόμενου Ερευνητή του Ινστιτούτου. Για την ολοκλήρωσή της χρειάστηκαν περίπου 7 μήνες (Οκτώβριος 2013 – Απρίλιος 2014), οι οποίοι περιελάμβαναν την προετοιμασία, τη διεξαγωγή των πειραμάτων και την αξιολόγησή τους και περίπου ένας μήνας για τη συγγραφή της.

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω κατ' αρχήν τον Δρ. Δημοσθένη Σταμόπουλο για το συγκεκριμένο θέμα που μου εμπιστεύθηκε, την εκπαίδευσή μου πάνω στις πειραματικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν και τη μύηση μου στη διαχείριση κυττάρων περιφερικού αίματος βάσει ενός σαφούς πειραματικού πρωτόκολλου. Επίσης, πολύτιμη ήταν η γενικότερη καθοδήγηση που μου προσέφερε καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της Μεταπτυχιακής Εργασίας, λύνοντας αρκετές απορίες μου που αφορούσαν είτε τεχνικά είτε επιστημονικά θέματα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δρ. Μυρσίνη Μακροπούλου, η οποία είναι η ακαδημαϊκή υπεύθυνος για την παρούσα Μεταπτυχιακή Εργασία, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Αν. Καθηγητή Ιωάννη Ράπτη και την Αν. Καθηγήτρια Ιωάννα Ζεργιώτη.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Μάνο Ζεϊμπέκη και την Ειρήνη Αριστομενοπούλου, υποψήφιους διδάκτορες και συνεργάτες του Δρ Δ. Σταμόπουλου, η συμβολή των οποίων υπήρξε καθοριστική στην επίλυση πρακτικών προβλημάτων που κατά καιρούς ανέκυπταν.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

Επίσης, τον Δρ. Ευθύμιο Μάνιο για τις πολύτιμες υποδείξεις του στη χρήση του Μικροσκοπίου Ατομικής Δύναμης. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες μου στο προσωπικό του Τομέα Επιστήμης Υλικών, όπου ο καθένας με μικρή ή μεγάλη συμβολή βοήθησε στην περάτωση της εργασίας αυτής.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στην κα Aintzane Pikabea, υποψήφια διδάκτορα του Πανεπιστημίου της Χώρας των Βάσκων, για την παρασκευή και παραχώρηση της ΜΝΓ που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας Μεταπτυχιακής Εργασίας, καθώς και για τις πολύτιμες συζητήσεις κατά τη διάρκεια των χρονοβόρων μετρήσεων με τα προηγμένα μικροσκόπια. Ευχαριστίες οφείλω επίσης στην Dr Jacqueline Forcada, Καθηγήτρια στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου της Χώρας των Βάσκων, επικεφαλή της ομάδας που μας παρείχε τη ΜΝΓ.

Τέλος, τις θερμότερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην οικογένειά μου και όλους όσους με στήριξαν και με στηρίζουν στις επιλογές μου.

*Ιούλιος 2014*

*Παπαχρήστος Νίκος*





# **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

## Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή .....	1
1.1 Νανοσωματίδια: βασική έρευνα και εφαρμογές .....	1
1.2 Νανοσωματίδια: εφαρμογές στην κλινική πράξη .....	5
Στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων .....	6
Μαγνητικός διαχωρισμός κυττάρων .....	9
Υπερθερμία .....	11
Μαγνητική τομογραφία.....	15
1.3 Οξείδια του σιδήρου σε ασύζευκτη μορφή: σχέση των φυσικών ιδιοτήτων με τις κλινικές εφαρμογές .....	17
1.4 Οξείδια του σιδήρου σε μορφή γέλης: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα συγκριτικά με την ασύζευκτη μορφή.....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ειδικό μέρος και σκοπός της μεταπτυχιακής εργασίας .	23
2.1 Υφιστάμενες και μελλοντικές εφαρμογές των νανοσωματιδίων οξειδίων του σιδήρου στην κλινική πράξη .....	23
2.2 Αίμα: σύσταση και ιδιότητες .....	24
2.3 Αλληλεπίδραση της μαγνητικής νανογέλης με τα ερυθροκύτταρα ..	26
2.4 Αλληλεπίδραση μαγνητικής νανογέλης με τα λευκοκύτταρα.....	27
2.5 Αλληλεπίδραση μαγνητικής νανογέλης με τα αιμοπετάλια .....	28
2.6 Σκοπός μεταπτυχιακής εργασίας.....	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Πειραματικές τεχνικές και πρωτόκολλα .....	31
3.1 Πειραματικές τεχνικές .....	31
3.1.1 Τεχνική ανάπτυξης λεπτών υμενίων.....	31
3.1.2 Οπτικό Μικροσκόπιο .....	33
3.1.3 Υπέρηχοι .....	37
3.1.4 Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης.....	38
3.1.5 Μικροσκόπιο Ηλεκτρονιακής Σάρωσης.....	44
3.1.5.α Διαδικασία επιχρύσωσης μη αγώγιμων δειγμάτων.....	52
3.2 Παρασκευή της μαγνητικής νανογέλης και μεταβολή των ιδιοτήτων της σε σχέση με εξωτερικά αίτια .....	54
3.3 Πειραματικά πρωτόκολλα .....	56

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

3.3.1 Μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν την συγκόλληση και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων της μαγνητικής νανογέλης.....	56
3.3.2 Μελέτη σύζευξης της ΜΝΓ με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος .....	58
3.4 Μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν την συγκόλληση των έμμορφων στοιχείων του αίματος.....	63
3.4.1 Παράμετρος μαγνητικού πεδίου .....	63
3.4.2 Παράμετρος μέσου ωρίμανσης και επαναδιασποράς.....	64
3.5 Μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν τη λύση των έμμορφων στοιχείων του αίματος.....	65
3.5.1 Παράμετρος συγκέντρωσης μαγνητικής νανογέλης .....	65
3.5.1 Παράμετρος μέσου ωρίμανσης και επαναδιασποράς.....	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Αποτελέσματα και συζήτηση.....	67
4.1 Παρουσίαση αποτελεσμάτων για τις παραμέτρους που επηρεάζουν την συγκόλληση και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των σωματιδίων της μαγνητικής νανογέλης .....	67
4.1.1 Μορφολογία των σωματιδίων της μαγνητικής νανογέλης χωρίς καμία κατεργασία .....	67
4.1.2 Μορφολογία των σωματιδίων της μαγνητικής νανογέλης μετά την εφαρμογή μαγνητικού πεδίου .....	69
4.1.3 Μορφολογία των σωματιδίων της μαγνητικής νανογέλης μετά την εφαρμογή της υπερήχησης .....	71
4.2 Αποτελέσματα για τις διαφορετικές τιμές συγκέντρωσης της μαγνητικής νανογέλης και επίδραση της στη λύση των ερυθροκυττάρων .....	74
4.3 Μορφολογία των κυττάρων του αίματος μετά την ωρίμανση με τη μαγνητική νανογέλη – Αποτελέσματα από το ΜΑΔ και το ΜΗΣ.....	76
4.3.1 Ερυθροκύτταρα.....	76
4.3.2 Λευκοκύτταρα .....	87
4.3.3 Αιμοπετάλια .....	90
4.3.4 Σύνοψη των αποτελεσμάτων που παρουσιάστηκαν για την αλληλεπίδραση της ΜΝΓ με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος.....	92

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

4.4 Αποτελέσματα για τη χρονική εξέλιξη της σύζευξης μεταξύ της μαγνητικής νανογέλης και έμμορφων στοιχείων – λύση των έμμορφων στοιχείων του αίματος.....	94
4.4.1 Κυτταρικά στοιχεία – Ωρίμανση σε πλάσμα.....	94
4.4.2 Κυτταρικά στοιχεία – Επίδραση του μέσου ωρίμανσης και επαναδιασποράς .....	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι .....	104
ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΟΤΩΝ	



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή

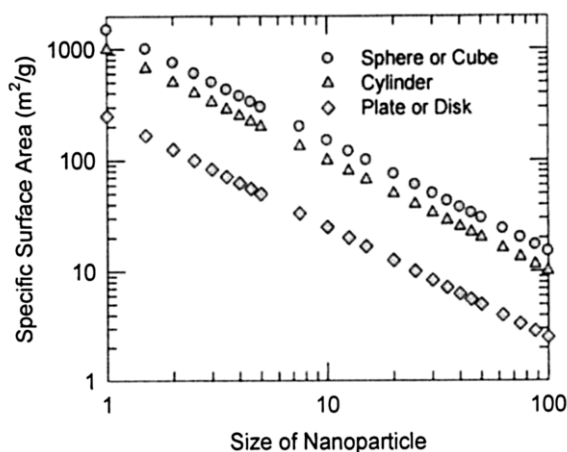
### 1.1 Νανοσωματίδια: βασική έρευνα και εφαρμογές

Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται μια σημαντική αύξηση του ενδιαφέροντος για τη μελέτη νανοϋλικών, δηλαδή υλικών με μέγεθος στο επίπεδο του νανομέτρου ( $10^{-9}$  m). Το ενδιαφέρον αυτό εντοπίζεται τόσο στο επίπεδο της βασικής έρευνας, όσο και στο επίπεδο των διαφόρων εφαρμογών. Από τα διάφορα νανοϋλικά που αυτή τη στιγμή μελετώνται, σημαντικό κομμάτι της έρευνας αφορά τα νανοσωματίδια (ΝΣ).

Αν και δεν υπάρχει κάποιος ορισμός που να είναι ευρέως αποδεκτός από την επιστημονική κοινότητα, με τον όρο ΝΣ έχει επικρατήσει να νοούνται τα σωματίδια διαφορετικών μορφολογιών, όπως σφαίρες, κύβοι, κύλινδροι, πλάκες, δίσκοι και άλλες, που έχουν και τις τρεις διαστάσεις τους μικρότερες από 100 nm [1]. Στην κατηγορία των ΝΣ περιλαμβάνονται και τα σωματίδια με διαστάσεις μεγαλύτερες των 100 nm, μιας και οι ιδιότητές τους παρουσιάζουν ομοιότητες με τα ΝΣ και σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις ιδιότητες που συναντώνται σε σωματίδια μεγαλύτερου όγκου.

Τα ΝΣ παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, σε σχέση με τα σωματίδια μεγαλύτερου όγκου, λόγω των διαφορετικών ιδιοτήτων που παρατηρούνται σε αυτά. Οι διαφορετικές ιδιότητες που επηρεάζουν τις θεμελιώδεις φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες των ΝΣ, σε σχέση με τα αντικείμενα μεγαλύτερου όγκου, οφείλονται σε δύο παράγοντες: ο πρώτος είναι ότι στα ΝΣ, παρατηρείται μεγάλη τιμή του λόγου της επιφάνειας ανά μονάδα όγκου, ενώ ο δεύτερος είναι ότι σε πολύ μικρές διαστάσεις επικρατούν κβαντομηχανικά φαινόμενα που αλλάζουν εντελώς τη συμπεριφορά των ΝΣ. Στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται οι σχετικοί υπολογισμοί για την τιμή του λόγου της επιφάνειας ανά μονάδα όγκου σε σχέση με το μέγεθος των ΝΣ, για διάφορες μορφολογίες.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 1: Υπολογισμός λόγου επιφάνειας ανά μονάδα όγκου συναρτήσει του μεγέθους για ΝΣ διαφορετικής μορφολογίας. Για τον υπολογισμό θεωρήθηκε ότι το μέγεθος των ατόμων/μορίων είναι 0,5 nm ενώ η συγκέντρωση των ΝΣ στο μέσο διασποράς θεωρήθηκε ίση με 1 gr/L

Από την σκοπιά της βασικής έρευνας παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η αλλαγή των ιδιοτήτων των ΝΣ με τη μεταβολή του μεγέθους τους. Μπορεί, για παράδειγμα, να μεταβληθούν οι ιδιότητες απορρόφησης και εκπομπής φωτός, ώστε να επιτευχθεί διαπερατότητα σε συγκεκριμένο μήκος κύματος αν το μέγεθος του ΝΣ μειωθεί κάτω από μια κρίσιμη τιμή [2].

Όσον αφορά τα μεταλλικά ΝΣ, παρατηρείται μείωση του σημείου τήξης τους όσο μειώνεται το μέγεθός τους, ενώ εάν τα μεταλλικά ΝΣ διασπαρθούν σε μια στερεή μήτρα, επιτυγχάνεται καλύτερη απαγωγή της θερμότητας από τη μήτρα. Σε κάποια μεταλλικά ΝΣ ή ΝΣ μεταλλικών οξειδίων, η μείωση του μεγέθους βελτιώνει τις μαγνητικές τους ιδιότητες, ενώ σε μεμονωμένα μεταλλικά μαγνητικά ΝΣ μπορεί να παρατηρηθεί υπερπαραμαγνητική συμπεριφορά.

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που αφορά τη βασική έρευνα πάνω στις ιδιότητες των ΝΣ, είναι η δυνατότητα επιφανειακής κατεργασίας των ΝΣ. Χαρακτηριστικές ιδιότητες που μπορούν να μεταβληθούν με την επιφανειακή κατεργασία είναι το ιοντικό δυναμικό τους ή η μεταβολή της ηλεκτρονιακής τους συγγένειας, με αποτέλεσμα τη μεταβολή των ιδιοτήτων μεταφοράς των ηλεκτρονίων στα ΝΣ.

Σε άλλο κομμάτι της βασικής έρευνας που αφορά τον έλεγχο της ταχύτητας μιας αντίδρασης μέσω της προσθήκης καταλυτών, έχει δειχτεί

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

ότι σημαντικό ρόλο παίζει η τιμή ειδικής επιφάνειας του καταλύτη. Η μεγάλη τιμή της ειδικής επιφάνειας των ΝΣ, είναι ο βασικός λόγος για τη μελέτη της επίδρασής τους στον έλεγχο της ταχύτητας μιας αντίδρασης, χρησιμοποιώντας τα ως καταλύτες [3].

Η μεγάλη ειδική επιφάνεια των ΝΣ, εκτός από την επίδρασή που μπορεί να έχει στην ταχύτητα μιας αντίδρασης, μπορεί να επιδρά επίσης στις μηχανικές, ηλεκτρικές και οπτικές ιδιότητες της μήτρας όταν ΝΣ διασπείρονται σε αυτήν [4]. Λόγω της μεγάλης ειδικής επιφάνειας των ΝΣ, δημιουργούνται διεπιφανειακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της μήτρας και των έγκλειστων ΝΣ, οι οποίες εξαρτώνται από το μέγεθος των ΝΣ, τη μορφολογία τους αλλά και από την επιφανειακή κατεργασία που έχουν υποστεί, μεταβάλλοντας τις ιδιότητες της μήτρας.

Με την έρευνα γύρω από τα ΝΣ να βρίσκεται σε εξέλιξη, το πλήθος των εφαρμογών που βρίσκουν ήδη τα ΝΣ αλλά και οι προτάσεις για την αξιοποίησή τους σε μελλοντικές εφαρμογές, είναι πολύ δύσκολο, αλλά και εκτός του σκοπού της εργασίας, να παρουσιαστεί αναλυτικά η κάθε μια από αυτές. Σε μια προσπάθεια να γίνει αντιληπτό το γιατί τα ΝΣ έχουν τραβήξει τόσο την προσοχή των ερευνητών, αλλά και το εύρος των εφαρμογών, θα αναφερθούν πιο κάτω κάποιες από τις προτεινόμενες εφαρμογές ή προτάσεις.

Μια από τις πρωτοπόρες εφαρμογές είναι η χρήση των ΝΣ για την αυτοϊαση διαφόρων υλικών. Με τη χρήση των ΝΣ, οι ρωγμές ή άλλες μηχανικές αστοχίες μπορούν να επιδιορθωθούν χωρίς εξωτερική παρέμβαση [5]. Για την αυτοϊαση, έχουν προταθεί κυρίως σύνθετα υλικά πολυμερικής μήτρας, στα οποία έχουν διασπαρθεί ΝΣ τα οποία διαφέρουν στο μέγεθος, την επιφανειακή κατεργασία και τη μορφολογία τους ανάλογα με την εφαρμογή. Συγκεκριμένα, τα ΝΣ πυριτίου ήδη χρησιμοποιούνται για την επαναφορά των μηχανικών ιδιοτήτων μετά από αστοχία ή παραμόρφωση. Σε άλλες εφαρμογές, όπου χρειάζεται να αποφευχθεί η επιφανειακή καταπόνηση ενός υλικού, χρησιμοποιούνται ΝΣ πυριτίας ( $\text{SiO}_2$ ), τα οποία εναποτίθενται σε μορφή λεπτού υμενίου πάνω στην επιφάνεια παρέχοντας αντιδιαβρωτική προστασία.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

Σε εφαρμογές κοσμητικής ιατρικής η παροχή αντιβακτηριδιακής προστασίας είναι η πρωταρχική απαίτηση για τα υλικά που χρησιμοποιούνται. Είναι γνωστό ότι τα ιόντα αργύρου παρέχουν αντιβακτηριδιακή προστασία, ωστόσο παρουσιάζουν κάποια μειονεκτήματα κυρίως λόγω της αλληλεπίδρασής τους με τα άλατα. Τελευταία, μελέτες προσπαθούν να εξετάσουν τη χρήση των ΝΣ αργύρου για αντίστοιχες εφαρμογές, λόγω της μεγάλης ειδικής επιφάνειας που ενισχύει την καταλυτική τους δράση [6].

Μια άλλη εφαρμογή των ΝΣ, είναι η χρήσης τους στην αντιμετώπιση της περιβαλλοντικής ρύπανσης [7], όπου χρησιμοποιούνται κυρίως τα ΝΣ χρυσού. Σε αντίθεση με τα συμπαγή και μεγάλα σωματίδια χρυσού, τα οποία θεωρούνται αδρανή, τα ΝΣ χρυσού λόγω της μεγάλης ειδικής επιφάνειας είναι πολύ ενεργά ως καταλύτες. Είναι χαρακτηριστικό ότι με την προσθήκη ΝΣ χρυσού σε επιφάνειες μεταλλικών οξειδίων, επιταχύνεται η μετατροπή του CO σε CO<sub>2</sub>. Άλλα ΝΣ που χρησιμοποιούνται στην απορρύπανση είναι τα ΝΣ του σιδήρου, τα οποία χρησιμοποιούνται για την αφαίρεση του τετραχλωράνθρακα (CCl<sub>4</sub>) από την ατμόσφαιρα.

Η παρουσίαση των εφαρμογών στις οποίες ήδη χρησιμοποιούνται τα ΝΣ, λόγω των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων τους, θα μπορούσε να περιλαμβάνει πολλές ακόμη. Ολοκληρώνοντας τη σύντομη ανασκόπηση, θα αναφερθεί ξεχωριστά η χρήση των διαφορετικών τύπων ΝΣ στις ιατρικές και βιολογικές εφαρμογές. Τα ΝΣ διαφόρων μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων, αλλά και άλλων υλικών τελευταία, μελετώνται και προτείνεται η χρήση τους σε εφαρμογές με ολοένα αυξανόμενο ρυθμό. Εκτός από την οικογένεια των ΝΣ του οξειδίου του σιδήρου, η οποία έχει βρει εφαρμογή σε ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών, ίσως το μεγαλύτερο σε σχέση με τα υπόλοιπα ΝΣ, υπάρχουν και εφαρμογές που χρησιμοποιούν τα ΝΣ του αργύρου, του δημητρίου και του χρυσού.

Κάποιες από τις πιο χαρακτηριστικές και ενδιαφέρουσες εφαρμογές που έχουν τα ΝΣ οξειδίου του σιδήρου είναι: η στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων, η χρήση τους σε νέους τύπους θεραπείες και η χρήση τους για να βελτιωθούν οι *in vivo* απεικονιστικές μέθοδοι στον



## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

οργανισμό, αλλά και στην ογκολογία [8]. Ένα μεγάλο κομμάτι της έρευνας, αφορά στις μελέτες που πραγματοποιούνται ώστε τα ΝΣ να μπορούν να χρησιμοποιούνται χωρίς να προκαλούν επιπλοκές στον οργανισμό κατά την αλληλεπίδρασή τους με ιστούς και άλλα όργανα. Ένα από τα πιο βασικά ερωτήματα είναι κατά πόσο τα ΝΣ είναι βιοσυμβατά, καθώς και ποιες τροποποιήσεις μπορούν να γίνουν καθιστώντας τα περισσότερο βιοσυμβατά, μιας και στην πλειοψηφία τους τα ΝΣ σε ασύζευκτη μορφή δεν είναι βιοσυμβατά.

Σε διάφορες ιατρικές εφαρμογές προτείνονται τα ΝΣ του οξειδίου του δημητρίου, τα οποία είναι γνωστά για την καταλυτική δράση τους, είναι βιοσυμβατά και χρησιμοποιούνται σαν αντιοξειδωτικά, ενώ φαίνεται ότι μπορούν να καταπολεμήσουν χρόνιες φλεγμονές [9]. Υπάρχουν, για παράδειγμα, περιπτώσεις μολύνσεων οι οποίες μπορούν να ξεκινήσουν από βλεννογόνες επιφάνειες. Σε αυτές τις περιπτώσεις, για την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των μολύνσεων, πραγματοποιείται εμβολιασμός με ΝΣ οξειδίου του δημητρίου, τα οποία δρουν ενισχυτικά στα T - λεμφοκύτταρα και βοηθούν τόσο στην πρόληψη, όσο και στην καταστολή της μόλυνσης [10].

### **1.2 Νανοσωματίδια: εφαρμογές στην κλινική πράξη**

Στην προηγούμενη παράγραφο, αναφέρθηκαν μερικές από τις εφαρμογές των ΝΣ οι οποίες είναι είτε σε πειραματικό στάδιο ακόμη, είτε έχουν ήδη αρχίσει να εφαρμόζονται. Επειδή τα ΝΣ χρησιμοποιούνται ευρέως σε ιατρικές και βιολογικές εφαρμογές, αλλά και επειδή τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός εμπορικά διαθέσιμων φαρμακευτικών σκευασμάτων που βασίζονται στα ΝΣ [11], θα ακολουθήσει σε αυτή την παράγραφο μια πιο αναλυτική ανασκόπηση στις εφαρμογές που βρίσκουν τα ΝΣ στην κλινική πράξη.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

### *Στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων*

Στις παραδοσιακές μεθόδους χορήγησης φαρμάκων, όπως η κατάποση ή η ενδοφλέβια χορήγηση, το φάρμακο διανέμεται μέσω του φλεβικού συστήματος σε ολόκληρο το σώμα. Στις περισσότερες περιπτώσεις μόνο μια μικρή ποσότητα του φαρμάκου καταφέρνει να φτάσει και να επιδράσει στον άρρωστο ιστό ή στο κύτταρο. Με την τεχνική της στοχευμένης χορήγησης του φαρμάκου, είναι δυνατό να επιτευχθεί αυξημένη συγκέντρωση του φαρμάκου που δρα πάνω στον άρρωστο ιστό, με ταυτόχρονη μείωση της επίδρασης σε γειτονικούς υγιείς ιστούς. Μέχρι σήμερα έχουν παρασκευαστεί αρκετά ΝΣ διαφορετικών μορφολογιών και σύστασης, κάποια από τα οποία έχουν δοκιμαστεί σε πειραματόζωα.

Τα πρώτα ΝΣ που έγινε προσπάθεια να παρασκευαστούν προσπάθησαν να αντιγράψουν τα φυσικά λιποσώματα. Τα λιποσώματα είναι σφαιρικά νανομετρικά κυστίδια που η μεμβράνη τους αποτελείται από μια διπλοστοιβάδα η οποία στη μία μεριά της είναι υδρόφιλη και στην άλλη υδρόφοβη. Τα συνθετικά λιποσώματα μπορούν να παρασκευαστούν στο εργαστήριο με σχετικά απλές μεθόδους σε επιθυμητές μορφολογίες, διαστάσεις και να έχουν πλήθος ελεγχόμενων ιδιοτήτων, γι' αυτό ήταν τα πρώτα συνθετικά ΝΣ που κατασκευάστηκαν με επιτυχία [12].

Η χρήση τους για χορήγηση φαρμάκων, οφείλεται στην ικανότητά τους να ενσωματώνουν υδρόφιλους και υδρόφοβους θεραπευτικούς παράγοντες, ανάλογα με το «στόχο» και να προστατεύουν αυτούς τους παράγοντες από τις διαφορετικές συνθήκες που επικρατούν έξω από τα λιποσώματα. Σημαντική παράμετρος, επίσης, είναι η δυνατότητα κατάλληλης επιφανειακής τροποποίησής τους, ώστε να προσκολλώνται επιλεκτικά σε συγκεκριμένα κύτταρα ή ιστούς προκειμένου να δράσει το φάρμακο που μεταφέρουν. Τα συνθετικά λιποσώματα μπορούν να επικαλυφθούν με αδρανείς και βιοσυμβατές ουσίες, ώστε να μην αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα και να αυξηθεί ο χρόνος ζωής του για τις *in vivo* εφαρμογές.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

Η δοξοκυκλίνη ήταν το πρώτο συνθετικό λιπόσωμα που πήρε έγκριση από τον Αμερικανικό οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων το 1995 και χρησιμοποιήθηκε στην καταπολέμηση του συνδρόμου επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS) [13]. Αργότερα, χρησιμοποιήθηκε σα μεταφορέας του αντικαρκινικού φαρμάκου δοξορουβοκίνη, το οποίο αποθηκεύεται στο εσωτερικό του λιποσώματος και μεταφέρεται μέχρι τον καρκινικό όγκο. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς του στον καρκινικό όγκο, δεν αλληλεπιδρά με το εξωτερικό περιβάλλον, λόγω της κατάλληλης επιφανειακής τροποποίησης, παρά μόνο με τον καρκινικό όγκο στο οποίο τελικά προσδένεται όπου και απελευθερώνει το φάρμακο. Το εξωτερικό στρώμα που περιβάλλει το συνθετικό λιπόσωμα βοηθά στο να μην αναγνωρίζεται από τα Τ-λεμφοκύτταρα και αυξάνει με αυτόν τον τρόπο ο χρόνος ζωής του φαρμάκου στον οργανισμό και η επίδρασή του πάνω στον όγκο.

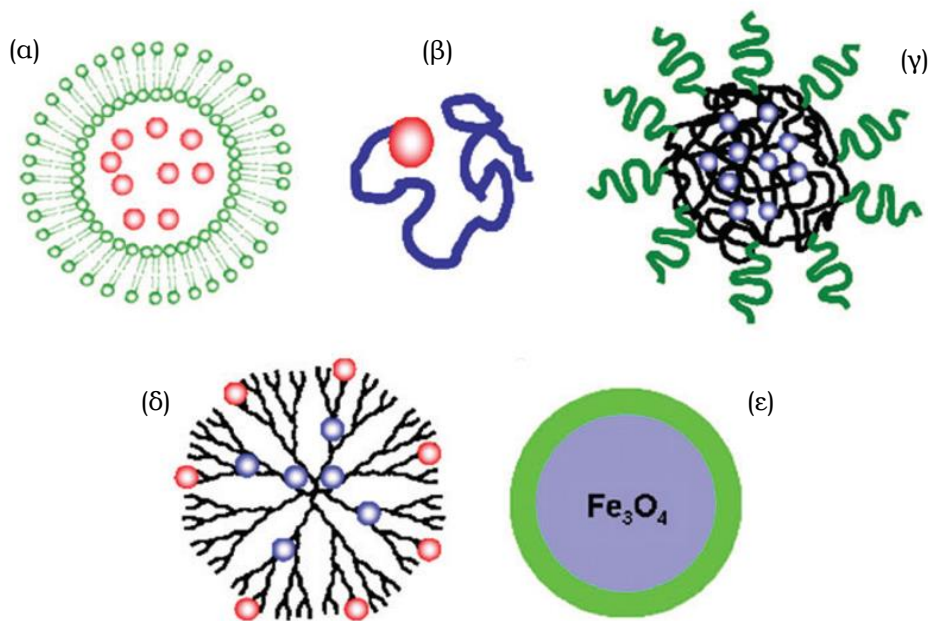
Μια άλλη μέθοδος παρασκευής που χρησιμοποιείται για τη στοχευμένη χορήγηση, περιλαμβάνει τη σύζευξη των φαρμάκων με κατάλληλα νανομετρικά πολυμερή. Η σύζευξη μικρών μορίων του αντικαρκινικού φαρμάκου, με πολυμερικούς νανομεταφορείς, συμβάλλει στη μείωση των μειονεκτημάτων που παρουσιάζει η συμβατική χορήγηση φαρμάκων.

Οι νανομεταφορείς αυτοί, είναι κατάλληλα τροποποιημένοι ώστε να αναγνωρίζουν μόνο τους καρκινικούς όγκους (ή άλλους παθολογικούς ιστούς και κύτταρα) και να προσκολλώνται μόνο σε αυτούς. Το βασικό μειονέκτημα, που είναι η μη βιοσυμβατότητά τους, ξεπερνιέται με την κατάλληλη επιφανειακή τροποποίηση του πολυμερούς. Με την τροποποίηση μπορεί να αυξηθεί ο χρόνος δράσης του φαρμάκου από μερικά λεπτά σε κάποιες ώρες, στοιχείο ιδιαίτερα σημαντικό για τη θεραπεία, κυρίως για ιστούς με διαπερατά αιμοφόρα αγγεία, όπως οι όγκοι και οι αρτηριοσκληρωτικές πλάκες. Εκτός της δυνατότητας επιφανειακής τροποποίησης ώστε να μην αναγνωρίζονται τα ΝΣ από το ανοσοποιητικό και να κυκλοφορούν ελεύθερα στον οργανισμό, υπάρχει και η δυνατότητα να προσκολλώνται σε συγκεκριμένα κύτταρα τα οποία λειτουργούν σα μεταφορείς των ΝΣ στο στόχο [14]. Ένα τέτοιο

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

παράδειγμα εφαρμογής των επιφανειακά τροποποιημένων ΝΣ, είναι η χρήση τους στη θεραπεία κατά του μη-Hodgkin λεμφώματος.

Το πρώτο πολυμερές που κατάφερε να εισαχθεί στην κλινική πράξη τη δεκαετία του '90 ήταν η πολυ-αιθυλενο-γλυκόλη (PEG). Σήμερα το PEG χρησιμοποιείται στη θεραπεία της ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS), της ωχράς κηλίδας, της ηπατίτιδας Α και C και στην οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία.



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση των ΝΣ που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη: (α) λιπόσωμα, (β) συζευγμένο πολυμερές με δραστικό φάρμακο, (γ) σταυροδεμένο πολυμερικό ΝΣ, (δ) πολυμερές δενδριτικής ανάπτυξης και (ε) ΝΣ οξειδίου του σιδήρου

Οι πιο πάνω δυνατότητες επιφανειακής τροποποίησης εφαρμόστηκαν και στα ΝΣ πολυ-αιθυλενο-γλυκόλης (PEG), αυξάνοντας τη χρήση τους σε κλινικές εφαρμογές. Παραδείγματα είναι η χρήση τους στη θεραπεία της δυσκοιλιότητας μετά από χρήση οπιούχων σκευασμάτων, στη θεραπεία του καρκίνου στο ήπαρ, και στην υπερουρική αιμία. Τα διαφορετικά ΝΣ που έχουν προταθεί και μελετώνται ή ήδη χρησιμοποιούνται για τη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων, φαίνονται πιο πάνω στην Εικόνα 2.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

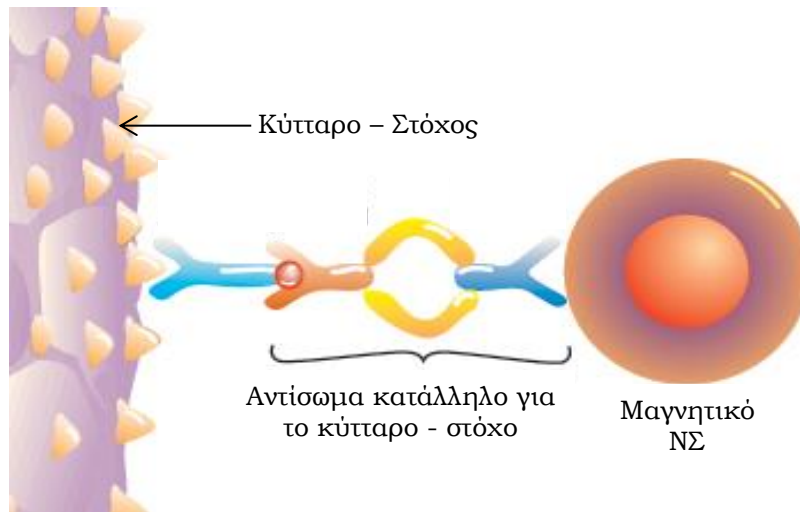
### *Μαγνητικός διαχωρισμός κυττάρων*

Στην κλινική πράξη, είναι συχνά χρήσιμο να γίνεται διαχωρισμός μεταξύ διαφορετικών βιολογικών δειγμάτων ή και των διαφορετικών ομάδων κυττάρων, από το φυσικό τους περιβάλλον προκειμένου να γίνει ξεχωριστή μελέτη του καθενός. Ο μαγνητικός διαχωρισμός τους, με τη χρήση μαγνητικών ΝΣ, είναι ένας από τους τρόπους για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός [15].

Η διαδικασία του μαγνητικού διαχωρισμού των κυττάρων, γίνεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, γίνεται η επισήμανση του βιολογικού υλικού ή των κυττάρων από τα μαγνητικά ΝΣ. Σχηματικά η διαδικασία της επισήμανσης φαίνεται στην Εικόνα 3. Στο δεύτερο στάδιο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός, με την απομάκρυνση των κυττάρων που έχουν επισημανθεί από τα μαγνητικά ΝΣ στο πρώτο στάδιο, με την εφαρμογή μιας μαγνητικής δύναμης.

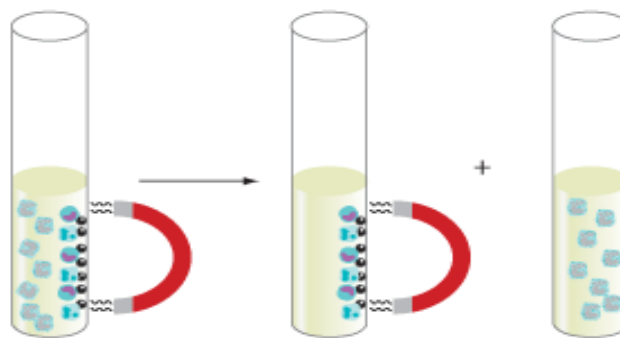
Η διαδικασία της επισήμανσης του βιολογικού υλικού γίνεται μέσω της επιφανειακής τροποποίησης των μαγνητικών ΝΣ με κατάλληλα βιοσυμβατά μόρια, ανάλογα με τα κύτταρα που πρόκειται να επισημανθούν, όπως η δεξτράνη, η πολυβυνιλική αλκοόλη ή άλλα φωσφολιπίδια. Στην επιφάνεια των κυττάρων υπάρχουν κατάλληλοι υποδοχείς ώστε να γίνεται η αναγνώριση τους από τα επιφανειακά τροποποιημένα μαγνητικά ΝΣ και να προσκολλώνται πάνω σε αυτά. Συχνά, επειδή το μέσο διασποράς δεν είναι κατάλληλο για το ΝΣ το οποίο χρησιμοποιείται, η επικάλυψη χρησιμεύει επίσης στο να αυξηθεί η σταθερότητα του ΝΣ μέσα στο μέσο διασποράς.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 3: Αναπαράσταση της επισήμανση του κυττάρου - στόχο με το ΝΣ. Το μαγνητικό ΝΣ έχει τροποποιηθεί επιφανειακά με το κατάλληλο αντίσωμα ώστε να αναγνωρίσει και να προσδεθεί στον υποδοχέα του κυττάρου - στόχου

Στο δεύτερο στάδιο, οι βιολογικοί ιστοί ή τα κύτταρα που έχουν επισημανθεί από τα ΝΣ, αφαιρούνται από το φυσικό τους διαλύτη, καθώς το υγρό μέσο διασποράς περνά από μια περιοχή όπου επικρατεί ένα ανομοιογενές μαγνητικό πεδίο. Αναπαράσταση της διαδικασίας απομάκρυνσης με την εφαρμογή μαγνητικής δύναμης φαίνεται στην Εικόνα 4.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της χρήσης του μαγνητικού πεδίου για την επιλεκτική απομάκρυνση των κυττάρων που έχουν επισημανθεί με τα ΝΣ μέσα σε ένα εναιώρημα

Όταν το υλικό που έχει επισημανθεί με τα μαγνητικά ΝΣ βρεθεί στην περιοχή που επικρατεί το μαγνητικό πεδίο, δέχεται μια μαγνητική δύναμη, ακινητοποιείται και τελικά απομακρύνεται από τη ροή του

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

υγρού στο οποίο βρίσκονταν αρχικά ως εναιώρημα. Μέχρι σήμερα, υπάρχουν αρκετές εφαρμογές των ΝΣ που χρησιμοποιούνται για την επιλεκτική απομάκρυνση διαφόρων ομάδων κυττάρων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η απομάκρυνση των ερυθροκυττάρων από το αίμα, καρκινικών κυττάρων από όγκους στους πνεύμονες, καρκινικών κυττάρων από το ουροποιητικό σύστημα αλλά και η απομάκρυνση διαφόρων κυστιδίων.

Ο μαγνητικός διαχωρισμός είναι μια πάρα πολύ ευαίσθητη τεχνική, πράγμα που την καθιστά πολύ χρήσιμη, ειδικά σε περιπτώσεις όπου χρειάζεται να διαχωριστεί ένας πολύ μικρός αριθμός κυττάρων ή άλλα βιολογικά μόρια πολύ μικρού μεγέθους. Είναι εφικτή με αυτό τον τρόπο η απομάκρυνση διαφόρων παρασίτων από το αίμα ή άλλων κυστιδίων χρησιμοποιώντας τις μαγνητικές τους. Η επισήμανση με μαγνητικά ΝΣ, έχει χρησιμοποιηθεί επίσης για την επισήμανση του DNA ώστε να είναι αναγνωρίσιμο κατά τη διάρκεια διαφόρων αντιδράσεων.

Μέσω της επισήμανσης διαφόρων ιστών και κυττάρων με τα μαγνητικά ΝΣ, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές οι οποίες μπορούν να υπολογίσουν τον αριθμό και τη θέση των κυττάρων [16]. Για να γίνει αυτό, αρχικά γίνεται επισήμανση του βιολογικού υλικού ή των κυττάρων από τα μαγνητικά ΝΣ, ενώ στη συνέχεια μετρώντας τη μαγνήτιση που παρατηρείται σε μια περιοχή ενδιαφέροντος, όπου έχουν χορηγηθεί ΝΣ για την επισήμανση, γίνεται υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων, ή η ακριβής θέση και το μέγεθος του βιολογικού ιστού που έχει επισημανθεί.

### *Υπερθερμία*

Με τον όρο υπερθερμία περιγράφεται η διαδικασία όπου τα κύτταρα βρίσκονται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τους 42° C. Η τεχνητή πρόκληση υπερθερμίας, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη πολλών συσκευών για την καταστροφή καρκινικών κυττάρων, αφήνοντας παράλληλα ανέπαφα τα γειτονικά υγιή κύτταρα. Τα πρώτα πειράματα με υπερθερμία, χρονολογούνται από το 1957, όπου οι Gilchrist *et al* [17],

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

χρησιμοποίησαν ένα εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο συχνότητας 1.2 MHz, για να θερμάνουν ΝΣ οξειδίου του σιδήρου, μεγέθους 20-100 nm τα οποία είχαν προσδεθεί πάνω σε διάφορα καρκινικά κύτταρα. Από τότε, πολλές διαφορετικές εκδοχές της υπερθερμίας έχουν παρουσιαστεί, για διαφορετικά μαγνητικά υλικά, διαφορετικές συχνότητες και εντάσεις του μαγνητικού πεδίου, αλλά και διαφορετικούς τρόπους χορήγησης των ΝΣ. Η τεχνική της υπερθερμίας, βασίζεται στη μαγνητική υστέρηση που παρατηρείται στα μαγνητικά υλικά.

Με την εφαρμογή μαγνητικού πεδίου σε ένα υλικό που βρίσκεται σε κατάσταση μηδενικής μαγνήτισης, προσανατολίζονται οι μαγνητικές περιοχές του υλικού παράλληλα με τη εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο, μέχρι η τιμή της μαγνήτισης του υλικού να λάβει μια μέγιστη τιμή που ονομάζεται *μαγνήτιση κόρου* ( $M_s$ ) ενώ το εξωτερικό πεδίο στο οποίο παρατηρείται η μαγνήτιση κόρου, ονομάζεται *πεδίο κορεσμού* ( $H_s$ ). Με την απομάκρυνση του μαγνητικού πεδίου, ωστόσο, η τιμή της μαγνήτισης του υλικού δεν μηδενίζεται, οπότε το υλικό έχει μια τιμή *παραμένουσας μαγνήτισης* ( $M_r$ ). Το φαινόμενο αυτό, ονομάζεται υστέρηση.

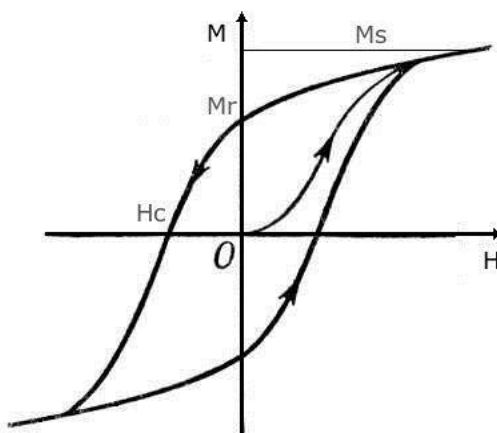
Για να μηδενιστεί η τιμή της μαγνήτισης του υλικού, χρειάζεται να εφαρμοστεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο αντίθετο στη μαγνητική ροπή του υλικού, για κάποια τιμή του οποίου η τιμή της μαγνήτισης του υλικού μηδενίζεται. Το πεδίο αυτό ονομάζεται *συνεκτικό πεδίο* ( $H_c$ ). Με την αύξηση της τιμής του εξωτερικά εφαρμοζόμενου πεδίου, οι μαγνητικές ροπές προσανατολίζονται και πάλι με το εξωτερικό πεδίο, αντίθετα όμως από το αρχικό πεδίο που εφαρμόστηκε.

Με την αντιστροφή της διαδικασίας μαγνήτισης, οι τιμές που καταγράφονται, αναπαριστώνται διάγραμμα μαγνήτισης συναρτήσεως του εξωτερικά εφαρμοζόμενου πεδίου, το οποίο ονομάζεται *βρόχος υστέρησης* και παρουσιάζεται στην Εικόνα 5. Το εμβαδόν που περιλαμβάνεται μεταξύ των γραμμών του βρόχου υστέρησης, είναι ίσο με την ενέργεια που αποθηκεύεται ανά μονάδα όγκου στο υλικό. Η ενέργεια αυτή απελευθερώνεται με τη μορφή θερμότητας στο περιβάλλον, με την



## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

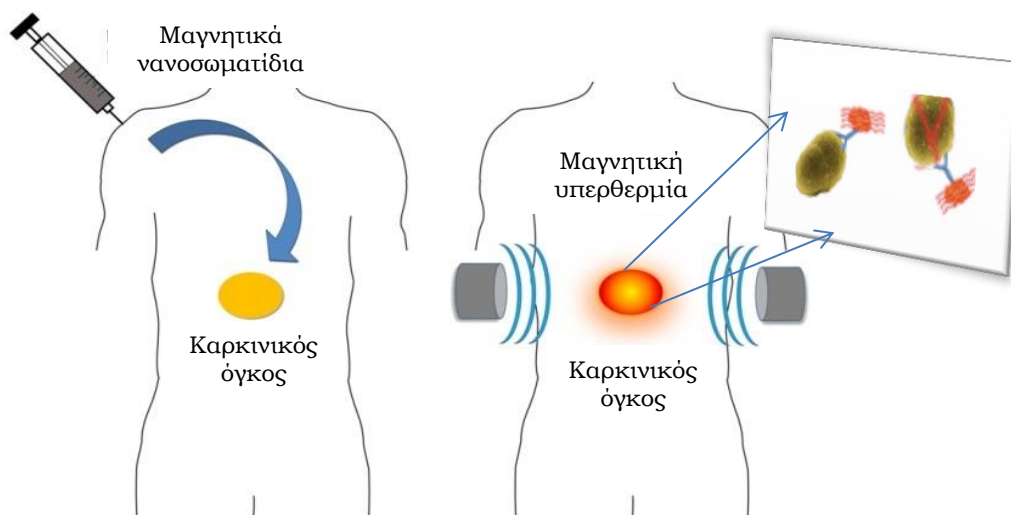
επαναλαμβανόμενη διαδικασία της μαγνήτισης-απομαγνήτισης του υλικού υπό την επίδραση ενός εναλλασσόμενου (AC) μαγνητικού πεδίου.



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση του βρόχου υστέρησης

Για να λειτουργήσει η τεχνική της υπερθερμίας, τα μαγνητικά ΝΣ διασπείρονται πάνω στον καρκινικό όγκο, ενώ στη συνέχεια εφαρμόζεται ένα AC μαγνητικό πεδίο κατάλληλης έντασης και συχνότητας, ώστε να θερμανθούν τα ΝΣ. Η θερμότητα που εκλύεται από τα ΝΣ, διοχετεύεται στον καρκινικό όγκο πάνω στον οποίο είναι κολλημένα, αυξάνοντας τη θερμοκρασία του στους 42° C για χρονικό διάστημα 30 λεπτών ή περισσότερο, με αποτέλεσμα την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Το σημαντικό πλεονέκτημα των ΝΣ στην υπερθερμία, είναι ότι η θερμότητα αναπτύσσεται στοχευμένα μόνο στα ΝΣ που έχουν προσδεθεί πάνω στον καρκινικό όγκο, αντίθετα με άλλες τεχνικές που καταστρέφουν και τους γύρω υγιείς ιστούς. Ένα μειονέκτημα της τεχνικής είναι η απομάκρυνση της θερμότητας από το αίμα που κυκλοφορεί, παίζοντας το ρόλο του ψυκτικού μέσου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένους χρόνους επιβολής του μαγνητικού πεδίου, όπου η συχνότητα και η ένταση του εξωτερικά επιβαλλόμενου μαγνητικού πεδίου πρέπει να παίρνουν τιμές που καθορίζονται από την απαίτηση να μη δημιουργούν παρενέργειες για το ανθρώπινο σώμα.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της θέρμανσης του καρκινικού όγκου με τη χρήση μαγνητικών ΝΣ και τη χρήση υπερθερμίας. Στο ένθετο σχήμα, απεικονίζονται γραφικά τα ΝΣ πάνω στον καρκινικό όγκο

Η ποσότητα του μαγνητικού υλικού που απαιτείται για να παραχθεί ικανό ποσό θερμότητας πάνω στον όγκο, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη μέθοδο χορήγησης. Όσον αφορά το είδος των ΝΣ που χρησιμοποιείται, τα οξείδια του σιδήρου, όπως ο μαγνητίτης ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) και ο μαγχαιμίτης ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), είναι αυτά που έχουν μελετηθεί περισσότερο, επειδή έχουν τις κατάλληλες μαγνητικές ιδιότητες και είναι τα περισσότερο βιοσυμβατά.

Τα ΝΣ του οξειδίου του σιδήρου παρασκευάζονται σαν εναιώρημα σε υδατικό διάλυμα, δημιουργώντας ένα «μαγνητικό υγρό». Όταν το μαγνητικό υγρό βρεθεί εκτός μαγνητικού πεδίου, η μαγνήτισή του γίνεται είναι μηδενική. Αν τα ΝΣ οξειδίου του σιδήρου προσανατολίσουν τη ροπή τους υπό την επίδραση ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και μετά αφεθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, τότε η μαγνήτιση εξαφανίζεται και πάλι (εφησυχασμός) εξαιτίας της θερμικής ενέργειας του περιβάλλοντος.

Ο εφησυχασμός μπορεί να οφείλεται είτε στη φυσική στροφή των ΝΣ μέσα στο υγρό (κίνηση Brown), είτε στη στροφή της μαγνητικής ροπής τους (Neel relaxation) μέσα στο κάθε ΝΣ. Και οι δύο μεταβάσεις αυτές, μπορούν να συμβαίνουν μέσα σε ένα «μαγνητικό υγρό»,

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

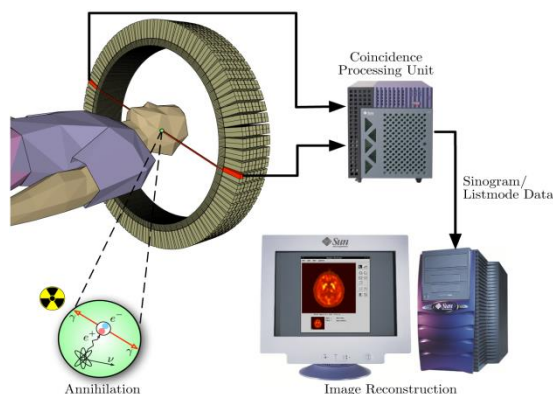
παράγοντας θερμότητα η οποία εκλύεται στο περιβάλλον. Τα ΝΣ έχει δείχτει ότι μπορούν να αναπτύξουν σημαντικά μεγάλα ποσά θερμότητας με πολύ μικρότερα πεδία συγκριτικά με τα σωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους, γι' αυτό και χρησιμοποιούνται περισσότερο.

### *Μαγνητική τομογραφία*

Οι βιολογικοί ιστοί περιέχουν πρωτόνια, τα οποία με την εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου προσανατολίζουν τη μαγνητική τους ροπή παράλληλα με το εξωτερικό πεδίο, επιτρέποντας τη μέτρηση της μαγνητικής τους απόκρισης. Η μαγνητική τομογραφία βασίζεται ακριβώς στην παρουσία πολλών πρωτονίων σε βιολογικούς ιστούς, που επιτρέπει τη μέτρηση μαγνητικής απόκρισης με την εφαρμογή ενός μεγάλου εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.

Στη μαγνητική τομογραφία, χρησιμοποιείται ένα εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο με συχνότητα στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων. Με την εφαρμογή του πεδίου προσανατολίζονται οι μαγνητικές ροπές των πρωτονίων, ενώ η μεταβολή στην τιμή της μαγνήτισης αυτή καταγράφεται από τον μαγνητικό τομογράφο, με τη χρήση ευαίσθητων πηνίων. Τα πηνία καταγράφουν τις πολύ μικρές τιμές μαγνήτισης και ενισχύουν ψηφιακά το σήμα το οποίο μετατρέπεται σε εικόνα με κατάλληλο λογισμικό. Ωστόσο το σήμα που καταγράφεται πολλές φορές είναι τόσο ασθενές σε βαθμό που δεν είναι ξεκάθαρο αν πρόκειται για σήμα ή για θόρυβο. Μια τυπική διάταξη μαγνητικού τομογράφου, φαίνεται στην Εικόνα 7.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 7: Τυπική διάταξη μαγνητικού τομογράφου. Ο ασθενής τοποθετείται σε μια περιοχή στην οποία επιβάλλεται ένα εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο και ένα σύστημα πηγών, καταγράφει την απόκριση στη μεταβολή της μαγνητικής ροπής των πρωτονίων και μέσω της ηλεκτρονικής μονάδας, μετατρέπεται το σήμα σε εικόνα στον Η/Υ

Για την ενίσχυση του σήματος που καταγράφεται από τα πηνία, χορηγούνται μαγνητικά ΝΣ, παρασκευασμένα κυρίως από γαδολίνιο αλλά και οξείδιο του σιδήρου, που δρουν ως σκιαγραφικοί παράγοντες, για την ενίσχυση της αντίθεσης μεταξύ διαφορετικών ιστών. Τα ΝΣ έχουν μεγάλες τιμές μαγνήτισης κόρου στην περιοχή των μαγνητικών πεδίων που χρησιμοποιούνται στη μαγνητική τομογραφία.

Τα επιφανειακά τροποποιημένα μαγνητικά ΝΣ, παρουσιάζουν επιλεκτική απορρόφηση από διαφορετικούς ιστούς ανάλογα με την κατεργασία που έχει προηγηθεί προκειμένου. Η απορρόφηση των ΝΣ έχει να κάνει και με το μέγεθος τους, καθώς για παράδειγμα τα ΝΣ με μέγεθος 30 nm ή μεγαλύτερα απορροφώνται εύκολα από το σπλήνα ή το συκώτι, ενώ ΝΣ μεγέθους 10 nm ή και λιγότερο, δεν αναγνωρίζονται και άρα δεν απορροφώνται τόσο εύκολα.

Τα ΝΣ τα οποία απορροφώνται από τους ιστούς, λειτουργούν όπως και τα πρωτόνια των ιστών, προσανατολίζοντας τις μαγνητικές τους ροπές παράλληλα με το εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο. Η απόκρισή τους στις μεταβολές του εξωτερικού πεδίου καταγράφονται από τα πηνία του μαγνητικού τομογράφου και έτσι σχηματίζεται η εικόνα, βασισμένη στην μεγάλη αντίθεση της μαγνήτισης μεταξύ των ιστών που έχουν προσδεθεί τα μαγνητικά ΝΣ και αυτών που δεν έχουν προσδεθεί τα ΝΣ.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

Ανάλογα με τον ιστό, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, χρησιμοποιούνται διαφορετικά μεγέθη ΝΣ. Τα μικρότερα ΝΣ για παράδειγμα που δεσμεύονται από τα δικτυοενδοθηλιακά κύτταρα μέσα στον οργανισμό, όπως τους λεμφαδένες και το μυελό των οστών, έχουν μεγαλύτερο χρόνο ζωής *in vivo* μέσα σε αυτά τα κύτταρα [18]. Παρόμοιοι σκιαγραφικοί παράγοντες έχουν χρησιμοποιούνται για να απεικονίσουν το αγγειακό και το κεντρικό νευρικό σύστημα.

Τα μαγνητικά ΝΣ ως σκιαγραφικοί παράγοντες στην μαγνητική τομογραφία χρησιμοποιούνται επίσης για την απεικόνιση διαφόρων καρκινικών όγκων. Με κατάλληλη επιφανειακή τροποποίηση των μαγνητικών ΝΣ αυτά προσδένονται πάνω στα καρκινικά κύτταρα ενισχύοντας το σήμα που προέρχεται από αυτά κατά τη μαγνητική τομογραφία. Αυτό επιτρέπει να απεικονιστεί η θέση και το μέγεθος του όγκου ευκολότερα από άλλες τεχνικές. Μπορεί με αυτό τον τρόπο να καταγραφεί μια κακοήθεια στους λεμφαδένες, στο συκώτι και στον εγκέφαλο, όπου δεν μπορούν εύκολα να χρησιμοποιηθούν άλλες τεχνικές.

### **1.3 Οξείδια του σιδήρου σε ασύζευκτη μορφή: σχέση των φυσικών ιδιοτήτων με τις κλινικές εφαρμογές**

Η συντριπτική πλειοψηφία των κλινικών εφαρμογών που χρησιμοποιούν ΝΣ, αφορά αυτά του οξειδίου του σιδήρου. Όλες σχεδόν οι κλινικές εφαρμογές, χρησιμοποιούν ΝΣ με μέγεθος μικρότερο από τα 100 nm, υψηλές τιμές μαγνήτισης κόρου, καθώς και δυνατότητα επιφανειακής τροποποίησης τους.

Η σύνθεση των ΝΣ, γενικά δεν είναι μια εύκολη διαδικασία. Όχι τόσο για την ίδια τη διαδικασία παρασκευής, αλλά για δύο βασικές απαιτήσεις που πρέπει να πληρούνται. Η πρώτη είναι ότι η ποσότητα που παρασκευάζεται πρέπει να είναι μεγάλη, αλλά και η κατανομή των μεγεθών να είναι μικρή ώστε να μην απαιτείται επανάληψη της διαδικασίας παρασκευής πολλές φορές. Η δεύτερη απαίτηση είναι ότι θα

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

πρέπει τα ΝΣ που παρασκευάζονται να μπορούν να διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους μετά τη διαδικασία. Και οι δύο απαιτήσεις αυτές έχουν στόχο την εξοικονόμηση χρόνου και τη μείωση του κόστους παρασκευής.

Η παρασκευή των ΝΣ οξειδίου του σιδήρου, έχει καταφέρει να ικανοποιήσει τις δύο πιο πάνω απαιτήσεις, αφού παρασκευάζονται εύκολα σε μεγάλες ποσότητες ενώ υπάρχουν πολλοί και εύκολοι τρόποι για να ελεγχθεί η κατανομή των μεγεθών τους. Αυτοί είναι και οι λόγοι που έχουν τραβήξει τόσο πολύ το ενδιαφέρον των ερευνητών. Ο σκοπός του κεφαλαίου είναι να επικεντρώσει στο γιατί έχουν επικρατήσει τα ΝΣ οξειδίου του σιδήρου έναντι άλλων και έχουν βρει τόσο μεγάλο πεδίο εφαρμογών.

Όσον αφορά τη διαδικασία παρασκευής των ΝΣ οξειδίου του σιδήρου, υπάρχει μια πολύ μεγάλη ποικιλία μεθόδων παρασκευής, ενώ συνεχώς προτείνονται καινούριες. Από την πληθώρα διαδικασιών παρασκευής των ΝΣ, πολύ δημοφιλής είναι η μέθοδος της συγκαταβύθισης, με τη χρήση αλάτων του σιδήρου σαν πρώτη ύλη, τα οποία αντιδρούν μέσα σε υδατικό διάλυμα με  $pH > 8$ . Το βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου συγκαταβύθισης, είναι η δυνατότητα να παρασκευαστεί μεγάλη ποσότητα ΝΣ ανά διαδικασία παρασκευής. Το μέγεθος των ΝΣ που παρασκευάζονται ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες παρασκευής. Η παρασκευή τους σε υδατικό διάλυμα, οδηγεί στη δημιουργία συσσωματωμάτων, αλλά και σε μεγάλη κατανομή μεγεθών, το οποίο είναι το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου. Επίσης, η κολλοειδής συμπεριφορά που παρουσιάζουν τα ΝΣ στο υδατικό διάλυμα, δυσκολεύει τη διαχείριση του τελικού προϊόντος.

Προκειμένου να ξεπεραστεί το πρόβλημα που δημιουργείται με τα συσσωματώματα και την κολλοειδή συμπεριφορά, σε μια παραλλαγή της μεθόδου πραγματοποιείται παρασκευή των ΝΣ σε γαλάκτωμα, όπου χρησιμοποιούνται έλαια αντί για υδατικό διάλυμα. Το βασικό πλεονέκτημα της παρασκευής των ΝΣ οξειδίου του σιδήρου σε γαλάκτωμα, είναι ότι μπορεί να ελεγχθεί η κατανομή των μεγεθών των

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

ΝΣ που παρασκευάζονται. Η κατανομή των μεγεθών καθορίζεται από τις συνθήκες που επικρατούν κατά τη διαδικασία παρασκευής.

Μια άλλη τεχνική παρασκευής που συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των δύο πιο πάνω, είναι η τεχνική λύματος-πηκτής (sol-gel). Είναι μια μέθοδος με την οποία μπορούν να παρασκευαστούν μεγάλες ποσότητες ΝΣ, ενώ ταυτόχρονα να υπάρχει μικρή κατανομή μεγεθών των ΝΣ ανάλογα με τις συνθήκες παρασκευής. Το σημαντικό στοιχείο που προσθέτει η τεχνική λύματος-πηκτής είναι ότι δίνεται η δυνατότητα να παρασκευαστούν ΝΣ μεγάλης κρυσταλλικότητας, λόγω των αυξημένων θερμοκρασιών που επικρατούν κατά την διαδικασία παρασκευής. Ο υψηλός βαθμός κρυσταλλικότητας, εξασφαλίζει μεγάλες τιμές μαγνήτισης κόρου για τα ΝΣ [19], πράγμα πολύ σημαντικό για τις εφαρμογές των ΝΣ οξειδίου του σιδήρου στην υπερθερμία, στη μαγνητική τομογραφία αλλά και στο μαγνητικό διαχωρισμό των κυττάρων.

Σε όλες τις πιο πάνω μεθόδους παρασκευής των ΝΣ παρατηρείται η δημιουργία συσσωματωμάτων, που όμως εμφανίζεται εντονότερα στα υδατικά διαλύματα. Τα συσσωματώματα δημιουργούνται λόγω των ηλεκτροστατικών και των δυνάμεων van der Waals που αναπτύσσονται τόσο μεταξύ τους, αλλά και μεταξύ των ΝΣ με τα μόρια του μέσου διασποράς, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνει η χρήση τους, τόσο στη μορφή εναιωρήματος όσο και στην ξηρή μορφή. Για το λόγο αυτό, τα ΝΣ οξειδίου του σιδήρου επικαλύπτονται από κάποιο μέσο που ελαχιστοποιεί την μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Αυτό το μέσο συνήθως είναι το πυρίτιο, ο χρυσός ή και το γαδολίνιο. Η επικάλυψη, αποτρέπει τη δημιουργία συσσωματωμάτων, επειδή ελαχιστοποιεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ΝΣ, ενώ παράλληλα δημιουργεί ένα κατάλληλο υπόστρωμα πάνω στην επιφάνεια του ΝΣ στο οποίο μπορούν να συζευχθούν κατάλληλα μόρια, όπως τα αντισώματα ή άλλες πρωτεΐνες, για να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση και τη σύνδεση των ΝΣ με το βιολογικό υλικό.

Τα ΝΣ του οξειδίου του σιδήρου σε ασύζευκτη μορφή, παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα. Παρασκευάζονται εύκολα με

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

πολλές μεθόδους που εξασφαλίζουν μεγάλη ποσότητα και μικρή κατανομή μεγεθών. Ωστόσο, ένα μεγάλο ζήτημα αποτελεί η ανοσοσυμβατότητα τους. Αν και γενικά τα ΝΣ οξειδίου του σιδήρου θεωρούνται βιοσυμβατά, αυτό μπορεί να εξαρτάται από διαφορετικούς παράγοντες όπως η συγκέντρωση, η χημική σύσταση του μέσου διασποράς, το μέγεθος και η δομή των ΝΣ αλλά και ο τρόπος χορήγησης.

Μετά από μεγάλο χρόνο παραμονής στο ανθρώπινο σώματα, τα ΝΣ μπορούν να προκαλέσουν δηλητηρίαση του οργανισμού, ενώ έχουν καταγραφεί ακόμη και περιπτώσεις καταστροφής κυττάρων από την παρουσία μεγάλης συγκέντρωσης ΝΣ οξειδίου του σιδήρου στον οργανισμό για μεγάλο χρονικό διάστημα [20]. Για τους πιο πάνω λόγους, μεγάλο βάρος δίνεται στη μελέτη της βιοσυμβατότητας των ΝΣ, συναρτήσει των παραγόντων που την επηρεάζουν.

### **1.4 Οξείδια του σιδήρου σε μορφή γέλης: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα συγκριτικά με την ασύζευκτη μορφή**

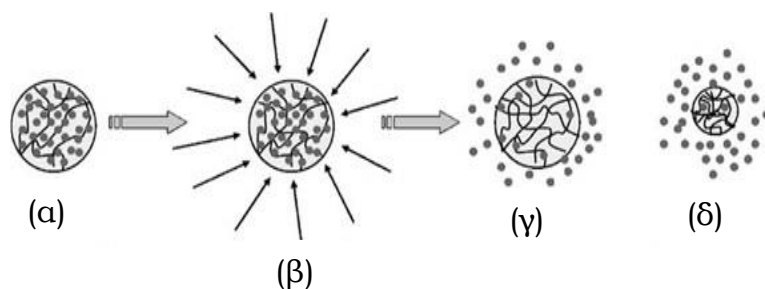
Το πρόβλημα της βιοσυμβατότητας των ΝΣ με το ανθρώπινα κύτταρα και τους ιστούς, όταν αυτά βρίσκονται στην ασύζευκτη μορφή τους, μπορεί να λυθεί χρησιμοποιώντας επικαλύψεις, όπως για παράδειγμα επικάλυψη με ένα στρώμα πολυμερούς ή άλλων βιοσυμβατών επικαλύψεων. Ωστόσο η έρευνα έχει στραφεί και σε άλλες λύσεις, όπως είναι η παρασκευή ΝΣ σε μορφή γέλης (νανογέλη) [21]. Με τον όρο νανογέλη περιγράφονται τα σταυροδεμένα πολυμερικά σωματίδια, που έχουν νάνο-διαστάσεις και η χαρακτηριστική τους ιδιότητα είναι ότι διογκώνονται σε έναν θερμοδυναμικά κατάλληλο διαλύτη [22]. Τα σωματίδια νανογέλης έχουν προταθεί για πάρα πολλές εφαρμογές ως τώρα, σαν αποτέλεσμα της χαρακτηριστικής ιδιότητάς τους να αποκρίνονται στις εξωτερικά μεταβαλλόμενες παραμέτρους όπως η θερμοκρασία, το pH και η ακτινοβολία. Από τα διάφορα είδη νανογέλης που έχουν παρασκευαστεί ως σήμερα, ιδιαίτερη σημασία έχει δοθεί σε



## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

αυτά που παρουσιάζουν απόκριση στη μεταβολή της θερμοκρασίας [23].

Η βιοσυμβατότητα της μαγνητικής νανογέλης είναι το κύριο πλεονέκτημα που έχει έναντι των άλλων ΝΣ οξειδίου του σιδήρου σε ασύζευκτη μορφή. Εκτός από τη βιοσυμβατότητα, η ικανότητα της μαγνητικής νανογέλης να μεταβάλλει την συμπεριφορά του ανάλογα με τα εξωτερικά ερεθίσματα, το κάνει ελκυστικό για να χρησιμοποιηθεί σε βιολογικές εφαρμογές, όπως στη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων, την μαγνητική τομογραφία και την υπερθερμία. Συγκεκριμένα τα σωματίδια της νανογέλης που αποκρίνονται στο ερέθισμα της θερμοκρασίας, διογκώνονται σε θερμοδυναμικά κατάλληλο διαλύτη, ενώ όταν η θερμοκρασία του διαλύτη ξεπεράσει μια ελάχιστη κρίσιμη θερμοκρασία ( $T_{crit}$ ) συρρικνώνονται σε πολύ μικρότερο όγκο. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας φαίνεται στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας απελευθέρωσης του φαρμάκου από τη νανογέλη κατά τη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων. Αρχικά (α) το ΝΣ «γεμίζει» με το φάρμακο, έπειτα (β) αφού φτάσει στον ιστό-στόχο, μεταβάλλεται η θερμοκρασία και σιγά σιγά επειδή το ΝΣ ελαττώνει τον όγκο του λόγω της μεταβολής της θερμοκρασίας (γ) απελευθερώνει το φάρμακο (δ) στο σημείο που χρειάζεται

Δύο από τα είδη νανογέλης που έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι αυτά που βασίζονται στο πολυμερές poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) και το poly (N-vinylcaprolactam) (PVCL) [24]. Ωστόσο, η χρήση του PNIPAM σε βιολογικές εφαρμογές είναι περιορισμένη μιας και παρουσιάζει μειωμένη βιοσυμβατότητα συγκριτικά με το πολυμερές που βασίζεται στο PVCL. Ειδικά για τη νανογέλη που βασίζεται στο PVCL, έχει δειχτεί η βιοσυμβατότητά της, γι' αυτό και προτείνεται περισσότερο σαν υλικό σε βιολογικές εφαρμογές. Τελευταία,

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

χρησιμοποιείται και το πολυμερές poly (N,N'-diethyl aminoethyl methacrylate) (PDEAEMA) για την παρασκευή νανογέλης.

Παρά τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η νανογέλη υπάρχουν δύο πολύ σημαντικά μειονεκτήματα. Το πρώτο έχει να κάνει με το αυξημένο κόστος παρασκευής, ενώ το δεύτερο είναι ότι μετά την συρρίκνωση, με την παραμονή τους στον οργανισμό μπορεί να απελευθερώσουν υπολείμματα από τα μονομερή που είχαν εγκλωβίσει κατά την παρασκευή και να αυξηθεί η τοξικότητά για το ανθρώπινο σώμα, ακυρώνοντας το σημαντικό πλεονέκτημα της βιοσυμβατότητας. Οι μελέτες που έχουν γίνει μέχρι τώρα, αφορούν σε συστήματα νανογέλης χωρίς την παρουσία άλλων σωματιδίων στο εσωτερικό τους ή με την παρουσία αντικαρκινικών φαρμάκων για την χρήση τους σε συστήματα στοχευμένης χορήγησης φαρμάκων.

Υπάρχει λοιπόν ένα ανοικτό ερώτημα που αφορά τη βιοσυμβατότητα των σωματιδίων νανογέλης, τα οποία έχουν συζευχθεί με ΝΣ οξειδίου του σιδήρου. Η παρουσία του οξειδίου του σιδήρου εξυπηρετεί στο να αποκτήσουν τα σωματίδια της νανογέλης μαγνητικές ιδιότητες. Η μελέτη της βιοσυμβατότητας της μαγνητικής νανογέλης (MNG) είναι το ζήτημα που θα ερευνήσει η παρούσα Μεταπτυχιακή Εργασία. Πιο συγκεκριμένα, η βιοσυμβατότητα με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος. Η βιοσυμβατότητα των ΝΣ είναι κρίσιμος παράγοντας, σε όλες τις εφαρμογές που η χορήγηση των ΝΣ πρέπει να γίνει ενδοφλέβια. Τέτοιες εφαρμογές μπορεί να είναι είτε η στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων είτε η χορήγηση για να λειτουργήσουν τα ΝΣ σα σκιαγραφικοί παράγοντες στη μαγνητική τομογραφία, είτε για τη χρήση της υπερθερμίας.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ειδικό μέρος και σκοπός της μεταπτυχιακής εργασίας

### 2.1 Υφιστάμενες και μελλοντικές εφαρμογές των νανοσωματιδίων οξειδίων του σιδήρου στην κλινική πράξη

Τα ΝΣ οξειδίου του σιδήρου, χρησιμοποιούνται ήδη σε κλινικές εφαρμογές όπως είναι η υπερθερμία, η μαγνητική τομογραφία, η στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων και ο μαγνητικός διαχωρισμός ομάδων κυττάρων. Οι εφαρμογές αυτές αναμένεται στο άμεσο μέλλον να πολλαπλασιαστούν μιας και οι έρευνες που πραγματοποιούνται για την αξιοποίηση των δυνατοτήτων τους οδηγούν συνεχώς σε νέα αποτελέσματα και προτάσεις αξιοποίησης των δυνατοτήτων τους.

Ένα από τα κύρια προβλήματα που προκύπτει και γίνεται προσπάθεια να αντιμετωπιστεί, σε σχέση με τη χρησιμότητα των ΝΣ σε διάφορες εφαρμογές, είναι η ανοσοσυμβατότητά τους. Για το λόγο αυτό, η έρευνα επικεντρώνεται είτε στην παρασκευή νέων ΝΣ με διάφορες επικαλύψεις που τα καθιστούν βιοσυμβατά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, είτε στην παρασκευή ΝΣ σε διαφορετικές μορφές όπως είναι η μαγνητική νανογέλη (MNG).

Αρκετές εφαρμογές των ΝΣ έχουν ήδη προταθεί, στις οποίες η πιθανότητα αντικατάστασης των ΝΣ από τη MNG θα μπορούσε να αυξήσει τη λειτουργικότητά τους. Ενδεικτικά, σε μία από τις εφαρμογές αυτές, τα ΝΣ που χρησιμοποιούν το γαδολίνιο σαν βάση μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν σκιαγραφικοί παράγοντες και να δώσουν μεγαλύτερη απεικονιστική ικανότητα στη μαγνητική τομογραφία για όργανα όπως το συκώτι, οι λεμφαδένες και ο μυελός των οστών.

Μια άλλη εφαρμογή που βασίζεται στα ΝΣ οξειδίου του σιδήρου, προτείνει ότι με κατάλληλη τροποποίηση της επιφάνειάς τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την *in vivo* απεικόνιση καρκινικών όγκων ακόμα και σε σημεία που μέχρι σήμερα η συμβατική μαγνητική τομογραφία δεν μπορεί να τα απεικονίσει με ακρίβεια. Θεωρείται επίσης

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

ότι θα μπορέσει να απεικονίσει πολύ μικρούς όγκους που μόλις έχουν αρχίσει να αναπτύσσονται σε πολύ αρχικό στάδιο, ή να έχουν κάνει μετάσταση.

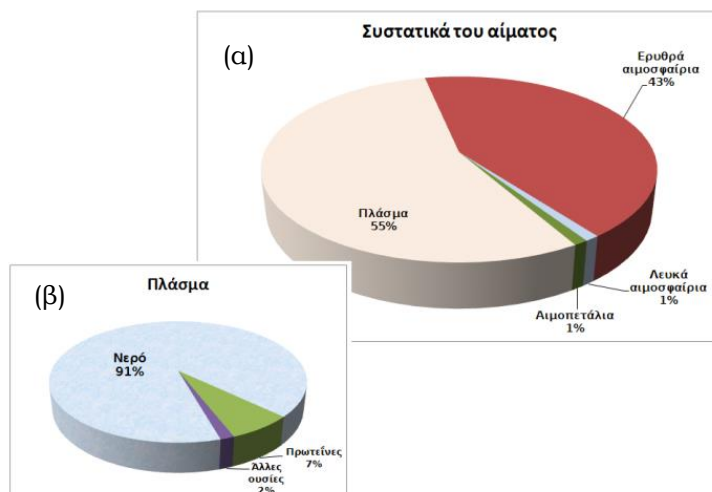
Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν οι νέες μορφές των ΝΣ, όπως η ΜΝΓ, χρειάζεται να γίνουν εκτεταμένες μελέτες που αφορούν τη βιοσυμβατότητά τους, προτού χρησιμοποιηθούν στην κλινική πράξη. Σκοπός της μελέτης, είναι να συμβάλει στην διερεύνηση αυτή με τη μελέτη της βιοσυμβατότητας των της ΜΝΓ με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος, προτού μπορέσει να προταθεί η χρήση της στη μαγνητική τομογραφία και τη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων.

### **2.2 Αίμα: σύσταση και ιδιότητες**

Το αίμα είναι το υγρό που κυκλοφορεί διαμέσου της καρδιάς, των αρτηριών, των φλεβών και των τριχοειδών αγγείων, και μεταφέρει θρεπτικά υλικά, ηλεκτρολύτες, ορμόνες, βιταμίνες, αντισώματα, θερμότητα και οξυγόνο στους ιστούς. Επίσης απομακρύνει αχρείαστα για τον οργανισμό υλικά αλλά και το διοξείδιο του άνθρακα. Επιπρόσθετα, παρέχει άμυνα κατά των λοιμώξεων μέσω της δράσης των λευκών αιμοσφαιρίων και των αντισωμάτων.

Το ανθρώπινο αίμα αποτελείται περίπου 55% από πλάσμα και 45% από κύτταρα και αποτελεί το 7% της μάζας του ανθρώπινου σώματος. Το πλάσμα είναι ένα υγρό που αποτελείται κυρίως από νερό, ιόντα, πρωτεΐνες, ορμόνες και λιπίδια. Τα κυτταρικά στοιχεία που αποτελούν το αίμα είναι τα ερυθροκύτταρα (ΕΚ), τα λευκοκύτταρα (ΛΚ) και τα αιμοπετάλια (ΑΠ).

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 9: Η σύσταση του ανθρώπινου αίματος (α) και του πλάσματος (β)

### Ερυθροκύτταρα

Τα ΕΚ είναι ο πιο πολυπληθής τύπος κυττάρου στο ανθρώπινο αίμα. Ένα τυπικό ανθρώπινο ΕΚ έχει δισκοειδή μορφή με διάμετρο μεταξύ 6-8  $\mu\text{m}$  ( $10^{-6}$  m), πάχος 2  $\mu\text{m}$  και είναι μικρότερο από τα άλλα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος. Τα ΕΚ αποτελούν το βασικό μηχανισμό για τη μεταφορά οξυγόνου ( $\text{O}_2$ ) στους διάφορους ιστούς του οργανισμού. Το οξυγόνο δεσμεύεται από τα ΕΚ στους πνεύμονες και μεταφέρεται στους ιστούς μέσα από τη ροή του αίματος.

Τα ανθρώπινα ΕΚ παράγονται μέσω της διαδικασίας της ερυθροποίησης. Από το στάδιο των καθορισμένων βλαστικών κυττάρων έως το στάδιο των ώριμων ΕΚ μεσολαβούν περίπου 7 ημέρες. Η μέση διάρκεια ζωής ενός ΕΚ είναι περίπου 120 ημέρες. Καθώς τα ΕΚ γερνούν και καθίστανται εύθραυστα απομακρύνονται από την κυκλοφορία από το ήπαρ, το σπλήνα και το μυελό των οστών.

### Λευκοκύτταρα

Τα ΛΚ είναι δισκοειδή κύτταρα που συναντώνται κυρίως στο αίμα. Έχουν διάμετρο που ποικίλει μεταξύ 7-20  $\mu\text{m}$ , και πάχος 600-800 nm. Παράγονται στο μυελό των οστών, ενώ η διάρκεια ζωής τους είναι 3-4

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

ημέρες στο ανθρώπινο σώμα. Τα ΛΚ αποτελούν περίπου το 1% του αίματος, ωστόσο μπορούν να βρεθούν σε όλο το σώμα.

Τα ΛΚ είναι τα πρωταρχικά κύτταρα για τη δράση του οργανισμού έναντι των λοιμώξεων και της ιστικής βλάβης. Δεν εξουδετερώνουν ή καταστρέφουν μόνο οργανισμούς, αλλά δρουν και ως καθαριστές, απομακρύνοντας κατεστραμμένα κύτταρα εξαιτίας της φαγοκυττάρωσης, ενώ διευκολύνουν την έναρξη της διαδικασίας αναδόμησης.

### *Αιμοπετάλια*

Τα ΑΠ είναι μικρά, δισκοειδή, διάφανα κύτταρα που δεν έχουν πυρήνα, με διάμετρο 2-3  $\mu\text{m}$ . Ο μέσος όρος ζωής τους είναι 5-9 μέρες. Τα ΑΠ κυκλοφορούν στο πλάσμα και συμμετέχουν στην αιμόσταση, οδηγώντας στο σχηματισμό θρόμβων αίματος. Οι θρομβώσεις αυτές, είναι χρήσιμες κυρίως για την επούλωση τραυμάτων.

Τα ΑΠ απελευθερώνουν πολλούς αυξητικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του αιμοπεταλιακού αυξητικού παράγοντα (platelet-derived growth factor, PDGF) και του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα -  $\beta$  (transforming growth factor beta TGF- $\beta$ ). Και οι δύο αυξητικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση και την αναγέννηση συνδετικών ιστών.

### 2.3 Αλληλεπίδραση της μαγνητικής νανογέλης με τα ερυθροκύτταρα

Τα ΕΚ αποτελούν τον πληθυσμό πλειονότητας των κυττάρων του αίματος, παίζοντας τον πολύ σημαντικό ρόλο της οξυγόνωσης του οργανισμού. Στη μελέτη, παρουσιάζει ενδιαφέρον η μελέτη της αλληλεπίδρασης της μαγνητικής νανογέλης (MNF) με τα ΕΚ επειδή αυτά λόγω της αυξημένης περιεκτικότητας έχουν περισσότερες πιθανότητες αλληλεπίδρασης με τη MNF.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

Αρχικά, παρουσιάζει ενδιαφέρον η επίδραση του χρόνου ωρίμανσης και της συγκέντρωσης της ΜΝΓ στην πιθανή λύση των ΕΚ. Ένα δεύτερο χαρακτηριστικό που θα μελετηθεί είναι η ενδεχόμενη επίδραση της ΜΝΓ στη μορφολογία των ΕΚ, στις αλλοιώσεις που πιθανά θα επιφέρει στη μεμβράνη τους. Επίσης, θα μελετηθεί η επίδραση που τυχόν θα έχει η ωρίμανση με τη ΜΝΓ στη δημιουργία συστάδων ΕΚ λόγω της παρουσίας της.

Η μεμβράνη των ΕΚ παρουσιάζει ελαστικότητα. Επίσης η μορφολογία της παρουσιάζει κάποια μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως εξελκώσεις οι οποίες άλλοτε χαρακτηρίζονται παθογενείς, ενώ άλλοτε χαρακτηρίζονται ως φυσιολογικές [25]. Η μεταβολή αυτών των χαρακτηριστικών είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επίσης θα μελετηθεί.

### **2.4 Αλληλεπίδραση μαγνητικής νανογέλης με τα λευκοκύτταρα**

Τα ΛΚ είναι τα κύτταρα με τον πιο θεμελιώδη ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα. Τα ΛΚ είναι επιφορτισμένα με το ρόλο της ανίχνευσης και της εξουδετέρωσης των ξένων, προς τον οργανισμό, συστατικών. Από την άποψη αυτή, η πιθανή αλληλεπίδραση της ΜΝΓ με τα ΛΚ παρουσιάζει ενδιαφέρον στα πλαίσια της μελέτης. Αρχικά θα πρέπει να διαπιστωθεί ένα επέρχεται λύση των ΛΚ μετά την ωρίμανση με τη ΜΝΓ.

Πιο συγκεκριμένα, το ενδιαφέρον της μελέτης για τα ΛΚ επικεντρώνεται σε δύο ερωτήματα. Το πρώτο είναι το εάν η παρουσία της ΜΝΓ μεταβάλλει την ικανότητα του ΛΚ να παίξει το ρόλο του. Το δεύτερο ερώτημα είναι το εάν η ΜΝΓ αναγνωρίζεται από το ανοσοποιητικό σύστημα ως ξένο ή/και παθογόνο σώμα και το ΛΚ προσπαθεί μέσω της φαγοκυττάρωσης να το απομακρύνει από τον οργανισμό. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης με τα ΛΚ θα γίνει συναρτήσει της συγκέντρωσης και του χρόνου ωρίμανσης.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

### 2.5 Αλληλεπίδραση μαγνητικής νανογέλης με τα αιμοπετάλια

Τα ΑΠ αν και έχουν μικρή συγκέντρωση στο αίμα, περίπου 1%, παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του οργανισμού λόγω των ιδιοτήτων συγκόλλησης που παρουσιάζουν τόσο μεταξύ τους όσο και με ξένα σώματα. Θα πρέπει να διαπιστωθεί κατ' αρχήν η πιθανή λύση των ΑΠ λόγω της παρουσίας της ΜΝΓ.

Το ενδιαφέρον για τα ΑΠ στα πλαίσια της μελέτης εστιάζεται στην πιθανότητα να αλληλεπιδρούν τα ΑΠ με τη ΜΝΓ, δημιουργώντας συσσωματώματα τα οποία θα μπορούσαν να προκαλέσουν ανεπιθύμητους θρόμβους. Για το λόγο αυτό, θα γίνει μελέτη της επίδρασης της ΜΝΓ στις συγκολλητικές τους ιδιότητες συναρτήσει της συγκέντρωσης και του χρόνου ωρίμανσης με τη ΜΝΓ.

### 2.6 Σκοπός μεταπτυχιακής εργασίας

Η ΜΝΓ είναι ένα καινοτόμο σύστημα το οποίο θα μπορούσε να προταθεί για κλινικές εφαρμογές όπως η χρήση της ως σκιαγραφικός παράγοντας στη μαγνητική τομογραφία ή η χρήση της ως κάψουλα-φορέας για τη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων. Η δυνατότητα των σωματιδίων της νανογέλης να μεταβάλλουν τον όγκο τους ανάλογα με τα εξωτερικά επιβαλλόμενα χαρακτηριστικά όπως η θερμοκρασία και το pH, σε συνδυασμό με τις μαγνητικές ιδιότητες των ΝΣ οξειδίου του σιδήρου, αποτελούν τα χαρακτηριστικά εκείνα που κάνουν ελκυστική τη χρήση τους στις παραπάνω εφαρμογές.

Ένας πολύ κρίσιμος παράγοντας που χρήζει μεγάλης προσοχής είναι η ανοσοσυμβατότητα της ΜΝΓ, δηλαδή ο μέγιστος χρόνος παραμονής στο σώμα, προτού ενεργοποιηθεί το ανοσοποιητικό σύστημα και αντιδράσει. Τα σωματίδια της ΜΝΓ αποτελούνται από το πολυμερές poly (N,N'-diethyl aminoethyl methacrylate) (PDEAEMA) και από μαγνητικά ΝΣ οξειδίου του σιδήρου, για τα οποία έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες που έχουν δείξει τη βιοσυμβατότητα του



## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

καθενός ξεχωριστά [26], [27] . Υπάρχουν, όμως, ανοικτά ερωτήματα τόσο για το PDEAEMA όσο και για τα ΝΣ οξειδίου του σιδήρου.

Για την παρασκευή του PDEAEMA χρησιμοποιείται το μονομερές 2-((diethylamino)ethyl) methacrylate, για το οποίο δεν υπάρχει κάποια μελέτη που να αποδεικνύει την βιοσυμβατότητά του. Κατά τον πολυμερισμό, ποσότητες από το μονομερές που δεν αντιδράει 100% εγκλωβίζονται στο τελικό προϊόν. Τα υπολείμματα αυτά ενδέχεται να απελευθερώνονται στον οργανισμό κατά τη συρρίκνωση των σωματιδίων της ΜΝΓ, δηλητηριάζοντας τα κύτταρα του οργανισμού. Τα ΝΣ οξειδίου του σιδήρου χρησιμοποιούνται ήδη στην κλινική πράξη και θεωρούνται βιοσυμβατά. Το ανοικτό ερώτημα είναι πόσος είναι ο μέγιστος χρόνος παραμονής στον οργανισμό καθώς και η ανώτατη συγκέντρωση των ΝΣ για το χρόνο αυτό. Το βασικό ερώτημα που καλείται να απαντήσει η παρούσα Μεταπτυχιακή Εργασία είναι το κατά πόσο είναι βιοσυμβατό το σύστημα της ΜΝΓ με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος. Χρειάζεται να εξακριβωθεί εάν η παρουσία της ΜΝΓ στο αίμα διαφοροποιεί τις τιμές της συγκέντρωσης των ΝΣ οξειδίου του σιδήρου για τις οποίες θεωρούνται βιοσυμβατά, αλλά και ποιος είναι το κατάλληλο χρονικό διάστημα ωρίμανσης με τη ΜΝΓ. Το χρονικό διάστημα αυτό θα καθορίζει ουσιαστικά το μέγιστο χρόνο παραμονής της ΜΝΓ στον οργανισμό.

Προκειμένου για κλινικές εφαρμογές, η χορήγηση γίνεται είτε ενέσιμα είτε από το στόμα, ενώ η κυκλοφορία πραγματοποιείται μέσω του καρδιαγγειακού. Είναι προφανές ότι η αλληλεπίδραση της ΜΝΓ με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος πρέπει να μελετηθεί διεξοδικά, ακριβώς επειδή μέσω του καρδιαγγειακού η ΜΝΓ οδηγείται στο στόχο, είτε για την απελευθέρωση του φαρμάκου κατά τη στοχευμένη χορήγηση είτε για να δράσει ως ενισχυτικός σκιαγραφικός παράγοντας κατά τη μαγνητική τομογραφία.

Η πιθανή σύζευξη της ΜΝΓ με τα ΕΚ είναι επιθυμητή, γιατί μέσω των ΕΚ μπορεί να οδηγείται στο στόχο με μεγάλη ακρίβεια. Τα ΕΚ επιτελούν τη διαδικασία της μεταφοράς οξυγόνου προς τα κύτταρα και απομάκρυνσης διοξειδίου του άνθρακα από αυτά. Είναι πολύ σημαντικό οι δυο λειτουργίες αυτές να μην επηρεάζονται και για το λόγο αυτό θα

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

πρέπει να εξεταστεί η επίδραση της ΜΝΓ στη μορφολογία και άρα στη λειτουργία των ΕΚ. Αντίθετα με τα ΕΚ, η αλληλεπίδραση της ΜΝΓ με τα ΛΚ και τα ΑΠ είναι ανεπιθύμητη. Τα ΛΚ είναι επιφορτισμένα με την αναγνώριση και απομάκρυνση των παθογόνων παραγόντων από τον οργανισμό, μια λειτουργία κομβικής σημασίας για την υγεία του οργανισμού, ενώ τα ΑΠ βοηθούν στην αιμόσταση και στη δημιουργία θρόμβων για την επούλωση ενός τραύματος. Όσον αφορά τα ΛΚ μια πιθανή αλληλεπίδραση με τη ΜΝΓ θα μπορούσε να σημαίνει ότι αυτή αναγνωρίζεται ως παθογόνος παράγοντας και απομακρύνεται από τον οργανισμό. Για τα ΑΠ, χρειάζεται να εξεταστεί το εάν μεταβάλλονται οι συγκολλητικές τους ιδιότητες προκειμένου να αποφευχθούν θρομβώσεις οι οποίες θα εμποδίζουν την κυκλοφορία του αίματος.

Η μελέτη θα επικεντρωθεί στη μορφολογία των ΕΚ, ΛΚ και ΑΠ μετά την ωρίμανση με τη ΜΝΓ, προκειμένου να καταγραφεί οποιαδήποτε μεταβολή στα χαρακτηριστικά τους θα μπορούσε να υποδεικνύει αλληλεπίδραση με τη ΜΝΓ. Οι διαφορετικοί παράγοντες που θα εξεταστούν είναι η συγκέντρωση της ΜΝΓ στο αίμα και ο χρόνος ωρίμανσης. Οι δύο παράγοντες αυτοί ενδιαφέρουν περισσότερο για διαφορετικούς λόγους ο καθένας. Η μεγάλη συγκέντρωση μπορεί να δώσει καλύτερο αποτέλεσμα στη μαγνητική τομογραφία ενώ ο αυξημένος χρόνος παραμονής στο καρδιαγγειακό μπορεί να οδηγήσει σε αποτελεσματικότερη δράση κατά τη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων.

Επιπρόσθετα, ένας παράγοντας που χρειάζεται να εξεταστεί για το εάν επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ΜΝΓ και των κυττάρων του αίματος, είναι το πλάσμα το οποίο αποτελεί το 55% περίπου του αίματος. Στη μελέτη θα πραγματοποιηθεί ωρίμανση των κυττάρων του αίματος τόσο σε πλάσμα όσο και σε φυσιολογικό ορό, προκειμένου να καταγραφούν, εάν υπάρχουν, οι διαφορές ανάλογα με το μέσο διασποράς. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι αλληλεπιδράσεις θα μελετηθούν με χρήση σύνθετων απεικονιστικών τεχνικών, προκειμένου να υπάρχει ακριβής καταγραφή των τυχόν μεταβολών στο σχήμα και στην μεμβράνη των κυττάρων του αίματος. Για την προκαταρκτική μελέτη θα χρησιμοποιηθεί αίμα από 3 υγιείς και 2 ασθενείς δότες.

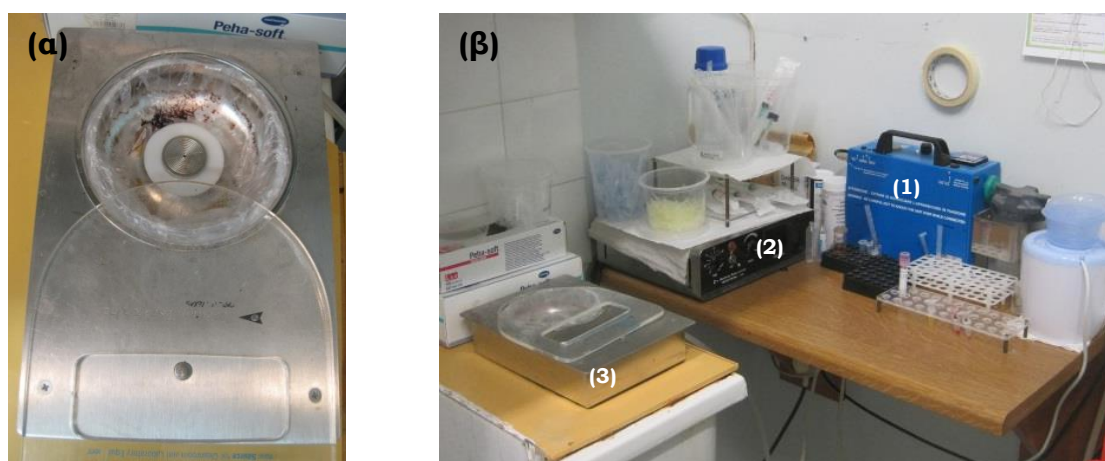
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Πειραματικές τεχνικές και πρωτόκολλα

### 3.1 Πειραματικές τεχνικές

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν έτοιμες διατάξεις και όργανα που βρίσκονται εγκατεστημένα στον Τομέα Επιστήμης Υλικών του Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας (I.N.N.) του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Ακολουθεί η παρουσίασή τους και ο τρόπος με τον οποίο συνέβαλαν στην πραγματοποίηση της μελέτης.

#### 3.1.1 Τεχνική ανάπτυξης λεπτών υμενίων

Προκειμένου να μελετηθούν τα δείγματα με τις απεικονιστικές τεχνικές, πρέπει να γίνει επίστρωση ενός λεπτού υμενίου πάνω σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα, με κατάλληλη επιφανειακή κάλυψη. Για την ανάπτυξη του υμενίου, χρησιμοποιήθηκε μια ηλεκτρονικά ρυθμιζόμενη πλατφόρμα (Headway Research INC, Garland, TX, USA), η οποία φαίνεται στην Εικόνα 10.



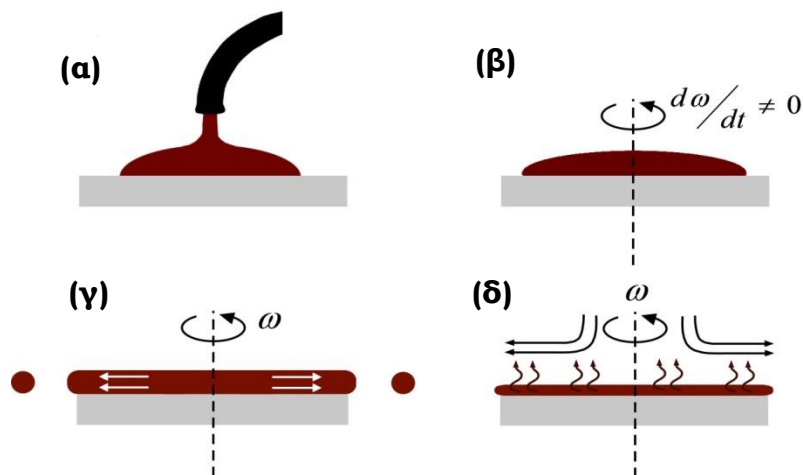
Εικόνα 10: Η διάταξη για την ανάπτυξη μονοστρωματικών υμενίων του I.N.N. του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Στην εικόνα (α) φαίνεται η πλατφόρμα πάνω στην οποία τοποθετείται η αντικειμενοφόρος πλάκα με την απόληξη της αντλίας κενού στο κέντρο. Στην εικόνα (β), διακρίνεται η αντλία (1), το τροφοδοτικό για να ρυθμίζεται η ταχύτητα και ο χρόνος περιστροφής (2) και η πλατφόρμα (3) πάνω στην οποία τοποθετείται το δείγμα

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

Τα επιμέρους τμήματα της διάταξης είναι η πλατφόρμα που περιστρέφει την πλάκα, η αντλία κενού ώστε η αντικειμενοφόρος πλάκα να παραμένει σε επαφή με την πλατφόρμα κατά τη διάρκεια της περιστροφής και το τροφοδοτικό μέσω του οποίου ρυθμίζεται η συχνότητα και η ταχύτητα περιστροφής.

Οι συνθήκες για την ανάπτυξη του μονοστρωματικού υμενίου, στην οποία θα υπάρχει ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα, καθορίζονται από τη συχνότητα και τη χρονική διάρκεια της περιστροφής. Μετά από εκτεταμένα πειράματα, η ιδανική κάλυψη προέκυψε όταν η παράμετρος της συχνότητας περιστροφής είναι ρυθμισμένη στις 2000 στροφές/λεπτό ενώ η χρονική διάρκεια στα 10 δευτερόλεπτα.

Οι συγκεκριμένες συνθήκες επιλέχθηκαν καταρχήν με κριτήριο την καλύτερη δυνατή κάλυψη της αντικειμενοφόρου πλάκας, αλλά και την απαίτηση να μην καταπονούνται μηχανικά τα κύτταρα αλλά ούτε να συγκολλούνται μεταξύ τους. Ιδιαίτερα η μηχανική καταπόνηση, όπως συμβαίνει με άλλες τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην αιματολογία, είναι αυτή που θα μπορούσε να επηρεάσει τη μελέτη, οπότε δόθηκε ιδιαίτερη σημασία στην αποφυγή της.



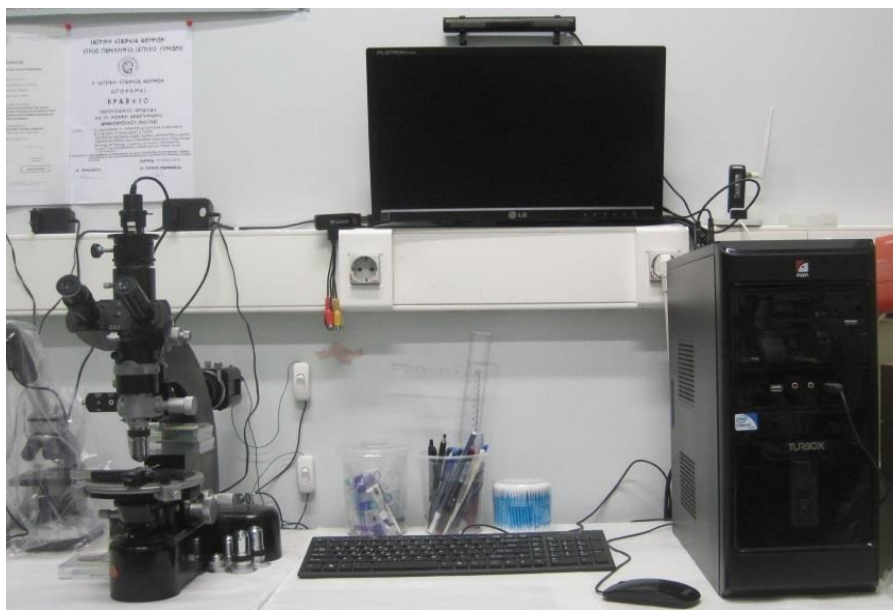
Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής ανάπτυξης λεπτών υμενίων. Αρχικά τοποθετείται το δείγμα του αίματος (α). Έπειτα, αρχίζει η περιστροφή της πλατφόρμας (β) και το δείγμα απλώνεται σε όλη την επιφάνεια του δείγματος (γ). Όσο διαρκεί η περιστροφή, η περίσσεια αίματος αποχύνεται στα άκρα και τελικά επιτυγχάνεται η ανάπτυξη λεπτού μονοστρωματικού υμενίου αίματος (δ) [28]

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

Η έναρξη της περιστροφής, γίνεται από το χρήστη μέσω ενός ποδοκίνητου μηχανισμού που βρίσκεται στο δάπεδο. Λόγω της απότομης μεταβολής στη στροφική ταχύτητα της, αρχικά ακίνητης, αντικειμενοφόρου πλάκας, η περίσσεια ποσότητα εκτινάσσεται στον γύρω χώρο, ενώ το υπόλοιπο δείγμα κατανέμεται ομοιόμορφα πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Κατά τη διαδικασία, ο χώρος της πλατφόρμας είναι καλυμμένος με μια γυάλινη πλάκα ώστε ο χρήστης να είναι προστατευμένος από πιθανή εκτίναξη είτε της πλάκας, είτε μέρους του δείγματος.

### 3.1.2 Οπτικό Μικροσκόπιο

Μετά την ανάπτυξη του λεπτού υμενίου, πρέπει να ελεγχθεί η κατανομή του δείγματος πάνω στο υμένιο. Για την παρατήρηση του υμενίου, χρησιμοποιήθηκε η έτοιμη διάταξη οπτικού μικροσκοπίου που βρίσκεται στο I.N.N. του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος».



Εικόνα 12: Το οπτικό μικροσκόπιο που είναι εγκατεστημένο στο I.N.N. του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Διακρίνεται το μικροσκόπιο στα αριστερά και ο Η/Υ με τον οποίο είναι συνδεδεμένο για τον έλεγχο των δειγμάτων σε πραγματικό χρόνο και την αποθήκευση της ψηφιακής εικόνας

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

Το οπτικό μικροσκόπιο (ΟΜ) ένα οπτικό σύστημα για την παρατήρηση αντικειμένων υπό μεγέθυνση. Η ανακάλυψή του χρονολογείται γύρω στο 1600, από τους Hans και Zacharias Janssen [29]. Το ΟΜ χρησιμοποιεί το ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, δηλαδή την περιοχή των μηκών κύματος από 380 nm έως 760 nm. Η παρατήρηση μπορεί να γίνεται είτε μέσω του φωτός που ανακλάται από το παρατηρούμενο αντικείμενο είτε μέσω του φωτός που διέρχεται μέσα από το παρατηρούμενο αντικείμενο. Ανάλογα με τη διάταξη των φακών και τον τρόπο παρατήρησης τα οπτικά μικροσκόπια διακρίνονται σε μικροσκόπια φωτεινού πεδίου, σκοτεινού πεδίου, αντίθεσης φάσεως και άλλα. Το οπτικό μικροσκόπιο από την ανακάλυψή του μέχρι σήμερα έχει χρησιμοποιηθεί σε πάρα πολλές εφαρμογές στην Φυσική, τη Χημεία, τη Βιολογία, την Ιατρική, την Επιστήμη των Υλικών αλλά και σε πολλές άλλες περιοχές των φυσικών - και μη - επιστημών.

Οι κύριες παράμετροι ενός ΟΜ είναι η μεγέθυνση, το αριθμητικό άνοιγμα, η διακριτική ικανότητα και το βάθος πεδίου. Η μεγέθυνση ( $M$ ) ενός οπτικού μικροσκοπίου δίνεται από τη σχέση:

$$M = m_1 \cdot m_2$$

όπου  $m_1$  και  $m_2$  είναι οι εγκάρσιες μεγεθύνσεις των δυο φακών, δηλαδή του προσοφθάλμιου και του αντικειμενικού. Υπάρχει ωστόσο ένα άνω όριο στη μεγέθυνση που μπορεί να επιτευχθεί, χωρίς να παραμορφωθεί το είδωλο του υπό παρατήρηση αντικειμένου. Η μεγέθυνση αυτή είναι συνάρτηση της ικανότητας του οπτικού μικροσκοπίου να διακρίνει δυο σημειακές φωτεινές πηγές που βρίσκονται πολύ κοντά η μια με την άλλη και ορίζεται ως διακριτική ικανότητα. Η διακριτική ικανότητα ( $d$ ) ενός οπτικού συστήματος δίνεται από τη σχέση:

$$d = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

όπου  $d$  είναι η διακριτική ικανότητα, το 0.61 ένας σταθερός όρος,  $\lambda$  το μήκος κύματος του φωτός (ή της ακτινοβολίας) που χρησιμοποιείται,  $n$  ο δείκτης διάθλασης του μέσου μεταξύ του υπό μελέτη αντικειμένου και του φακού και  $NA$  το αριθμητικό άνοιγμα του φακού το οποίο εξαρτάται αποκλειστικά από τη κατασκευή του φακού.

Το φως που χρησιμοποιείται από το ΟΜ έχει ένα μέσο μήκος κύματος  $\lambda = 500 \text{ nm}$ , ενώ το αριθμητικό άνοιγμα ενός πολύ καλού φακού είναι 1.6. Για τις τιμές αυτές, η διακριτική ικανότητα του οπτικού μικροσκοπίου δε μπορεί να ξεπεράσει τα 200 nm ενώ η μέγιστη μεγέθυνση είναι περίπου 1600x.

Η τελευταία σημαντική παράμετρος είναι το βάθος πεδίου, το οποίο ορίζεται ως η διαμήκης απόσταση στο πεδίο του δείγματος εντός της οποίας οι λεπτομέρειες του αντικειμένου απεικονίζονται με ένα αποδεκτό βαθμό εστίασης. Το βάθος πεδίου (Depth Of Field, DOF) συνδέεται με το μήκος κύματος  $\lambda$  της ακτινοβολίας φωτισμού, το αριθμητικό άνοιγμα  $NA$ , και το δείκτη διάθλασης  $n$  του μέσου που παρεμβάλλεται μεταξύ αντικειμενικού φακού και δείγματος, με τη σχέση:

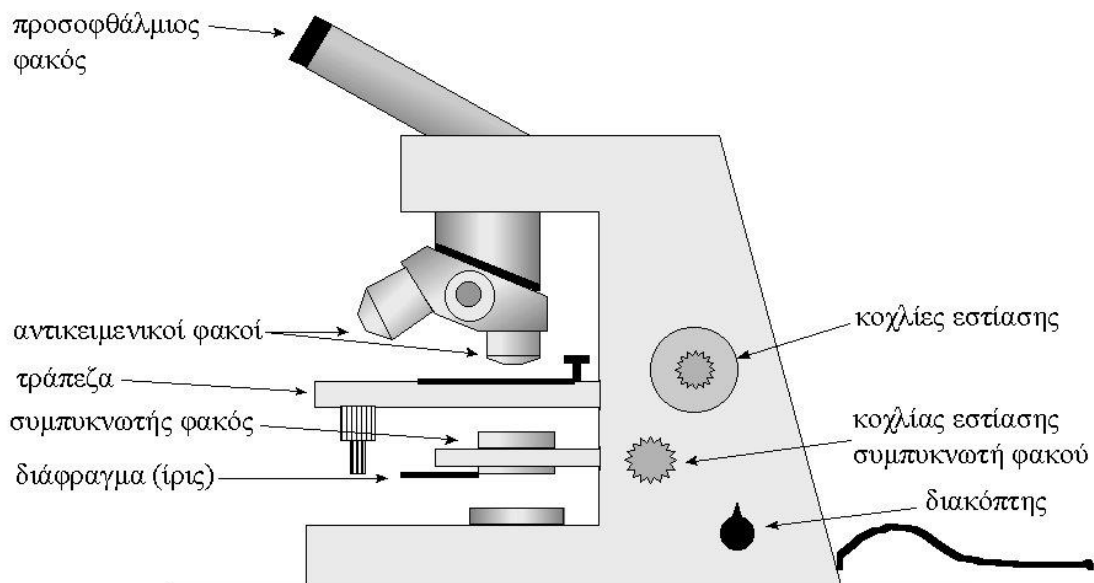
$$DOF = \lambda \frac{\sqrt{(n^2 - NA^2)}}{NA^2}$$

Στη συνέχεια ακολουθεί μια σύντομη περιγραφή των τμημάτων ενός οπτικού μικροσκοπίου, ενώ η σχηματική αναπαράσταση φαίνεται στην Εικόνα 13:

- *Προσοφθάλμιος φακός*, τοποθετείται στο πάνω μέρος του σωλήνα. Υπάρχουν τέσσερις διαφορετικοί τύποι προσοφθάλμιων φακών: Huygens, Ramsden, Kellner και αντισταθμιστικοί. Οι τελευταίοι είναι και οι πιο σύγχρονοι και επιτρέπουν την παρατήρηση χωρίς το μάτι να είναι σε επαφή με φακό. Η μεγέθυνση του προσοφθάλμιου φακού πολλαπλασιασμένη με τη μεγέθυνση αντικειμενικού φακού δίνει την τελική μεγέθυνση του μικροσκοπίου.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

- *Περιστρεφόμενη κεφαλή* με τους αντικειμενικούς φακούς. Συνήθως έχει θέσεις για 3 - 6 φακούς. Σε ορισμένα μικροσκόπια η περιστρεφόμενη κεφαλή μπορεί να αφαιρεθεί και να αντικατασταθεί με άλλη που έχει διαφορετικό set φακών. Οι αντικειμενικοί φακοί είναι τα πιο σημαντικά εξαρτήματα του συστήματος σχηματισμού εικόνας του μικροσκοπίου γιατί από αυτούς εξαρτάται η τελική διακριτική ικανότητα και η αρχική μεγέθυνση. Οι φακοί αυτοί έχουν κατασκευαστεί έτσι που οι εικόνες να μην έχουν σφαιρικά ή χρωματικά σφάλματα, και να μην έχουν αστιγματισμό.
- *Η τράπεζα του μικροσκοπίου*, η οποία μπορεί να είναι τετράγωνη σταθερή ή στρογγυλή περιστρεφόμενη και με σύστημα μικρομετρικών κοχλιών για τη μετακίνηση του δείγματος.
- *Μοχλός ρύθμισης της ίριδας* (διαφράγματος). Η ίριδα περιορίζει τον φωτεινό κώνο που φωτίζει το δείγμα έτσι που αυτό να δέχεται τις ακτίνες που δεν προέρχονται από περίθλαση ή διάθλαση.



Εικόνα 13: Τα επιμέρους τμήματα ενός τυπικού οπτικού μικροσκοπίου

- *Συγκεντρωτής φακός*. Ο φακός αυτός εστιάζει τη φωτεινή πηγή στο επίπεδο του δείγματος. Σε χαμηλές μεγεθύνσεις ο φακός αυτός δεν είναι απαραίτητος και μπορεί να αφαιρεθεί.



## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

- *Κοχλίες εστίασης.* Συνήθως υπάρχουν ξεχωριστά δυο κοχλίες και χρησιμοποιούνται για την εστίαση σε μεγάλη κλίμακα ο ένας και για μικρότερη κλίμακα ο άλλος
- *Βάση μικροσκοπίου* με (συνήθως) ενσωματωμένο σύστημα φωτισμού. Στα περισσότερα μικροσκόπια υπάρχει ροοστάτης για τη ρύθμιση της έντασης του φωτός.

Τέλος, για την αντιμετώπιση απλών προβλημάτων όρασης, όπως η μυωπία, χρησιμοποιείται η μικρομετρική ρύθμιση της εστίασης. Ωστόσο, προβλήματα όπως ο αστιγματισμός δε μπορούν να διορθωθούν από το μικροσκόπιο και απαιτείται η χρήση γυαλιών.

Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές του οπτικού μικροσκοπίου. Ανάλογα με τους τύπους των φακών και τη διάταξή τους, συναντώνται μικροσκόπια διαφορετικών τύπων. Ο λόγος που χρησιμοποιούνται διαφορετικές διατάξεις και τύποι φακών είναι ότι για την καλύτερη δυνατή παρατήρηση κάθε δείγματος, χρειάζεται να επιτυγχάνεται κάθε φορά η μέγιστη δυνατή αντίθεση.

### 3.1.3 Υπέρηχοι

Κατά την αποθήκευση της ΜΝΓ, ενδέχεται να σχηματίζονται συσσωματώματα λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Για το λόγο αυτό, αλλά και προκειμένου να γίνει μελέτη της επίδρασης της παραμέτρου της υπερήχησης στο μέγεθος των σωματιδίων της ΜΝΓ, χρησιμοποιήθηκε το λουτρό υπερήχων προκειμένου να διαχωριστούν τυχόν συσσωματώματα σε μικρότερα ΝΣ.

Τα βασικά στοιχεία ενός λουτρού υπερήχων περιλαμβάνουν τους μορφοτροπέις υπερήχων που βρίσκονται σε ένα ακτινωτό διάφραγμα, μια ηλεκτρική γεννήτρια και μια δεξαμενή με υδατικό διάλυμα. Το πιο σημαντικό στοιχείο είναι ο μορφοτροπέας υψηλής συχνότητας που παράγει τα μηχανικά κύματα. Ο μηχανισμός δόνησης που είναι ενσωματωμένος στη διάταξη και παράγει τα κύματα ελέγχεται από τροφοδοτικό.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 14: Τυπική διάταξη λουτρού υπερήχων (α). Διακρίνεται το λουτρό και το τροφοδοτικό για τις ρυθμίσεις του χρόνου και της έντασης των κυμάτων που παράγονται από τη μηχανική δόνηση. Στην φωτογραφία (β) διακρίνονται τα επιφανειακά κύματα που δημιουργούνται

Τα μηχανικά κύματα που παράγονται, διαδίδονται στην επιφάνεια του νερού, δημιουργώντας στάσιμα κύματα τα οποία μεταφέρουν ενέργεια στο αντικείμενο που βρίσκεται μέσα στο λουτρό και συγκεκριμένα στην επιφάνεια του νερού.

Ανάλογα με την εφαρμογή το υδατικό διάλυμα που τοποθετείται στο λουτρό, μπορεί να περιέχει και κάποιο χημικό καθαριστικό εάν πρόκειται να γίνει καθαρισμός. Στην περίπτωση της υπερήχησης της ΜΝΓ, χρησιμοποιήθηκε νερό.

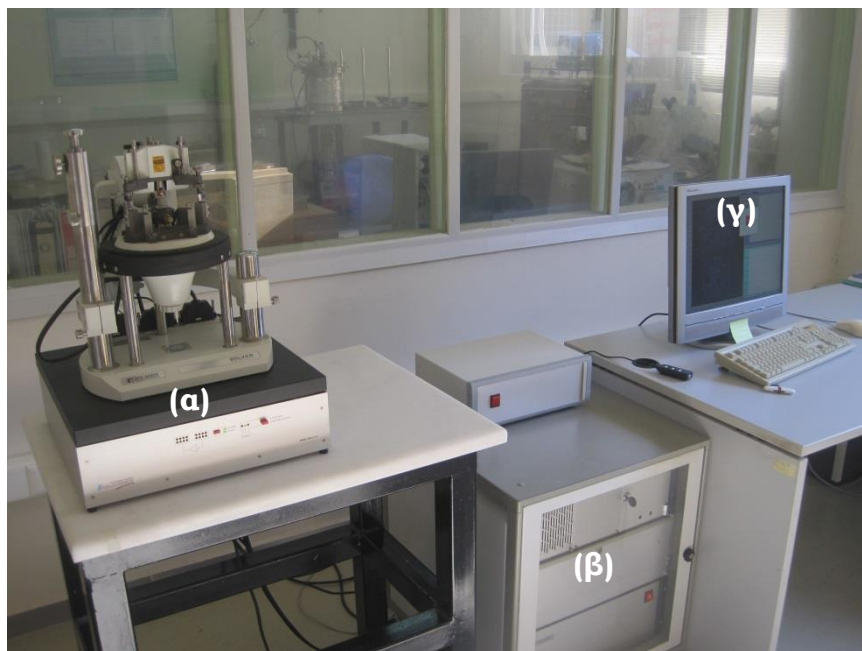
### 3.1.4 Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης

Για την παρατήρηση των έμμορφων στοιχείων του αίματος, των επιφανειών τους αλλά και την μορφολογία των σωματιδίων της μαγνητικής νανογέλης, χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί μια απεικονιστική τεχνική με πολύ μεγάλη ικανότητα μεγέθυνσης, η οποία να ξεπερνά κατά πολύ την μεγέθυνση του ΟΜ. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (ΜΑΔ), το οποίο έχει τη δυνατότητα μεγέθυνσης έως  $\times 1.000.000$ .

Το ΜΑΔ, ανήκει σε μια οικογένεια μικροσκοπίων, που χρησιμοποιούν μια αιχμηρή ακίδα για την επιφανειακή σάρωση του δείγματος, τα μικροσκόπια σάρωσης με ακίδα (ΜΣΑ). Τα ΜΣΑ είναι μια οικογένεια μικροσκοπίων που η εικόνα που παρατηρείται δεν βασίζεται

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

στην αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με το δείγμα, αλλά στην αλληλεπίδραση της αιχμηρής ακίδας με το δείγμα λόγω δυνάμεων Van der Waals είτε άλλων ηλεκτροστατικών δυνάμεων, είτε λόγω μαγνητικών δυνάμεων. Εκτός από το ΜΑΔ, άλλα μικροσκόπια της ίδιας οικογενείας είναι το μικροσκόπιο πλευρικής δύναμης (ΜΠΔ) και το μικροσκόπιο μαγνητικής δύναμης (ΜΜΔ).



Εικόνα 15: Η διάταξη του μικροσκοπίου ατομικής δύναμης που βρίσκεται εγκατεστημένη στο Ι.Ν.Ν. του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Διακρίνεται το μικροσκόπιο (α), η ηλεκτρονική μονάδα ελέγχου (β) και η οθόνη που ψηφιοποιεί την πληροφορία (γ)

Το ΜΑΔ παρουσιάστηκε το 1986 [30], αποτελώντας εξέλιξη του μικροσκοπίου σήραγγας (ΜΣ), το οποίο μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μόνο σε αγώγιμα υλικά. Το σημαντικό πλεονέκτημα του ΜΑΔ έναντι του ΜΣ είναι ότι μπορεί να μελετήσει και μη αγώγιμες επιφάνειες.

Το ΜΑΔ αποτελείται από δύο κύρια μέρη: την κεφαλή και τη βάση. Η βάση του αποτελείται από τρεις πιεζοκρυσταλλούς, που ελέγχουν την κίνηση της βάσης στις τρεις διαστάσεις, το σύστημα ανάδρασης καθώς και τα ηλεκτρονικά που συνδέουν το ΜΑΔ με τον ηλεκτρονικό υπολογιστή για να μεταφέρεται η εικόνα. Στην κεφαλή βρίσκεται ο πρόβολος πάνω στον οποίο είναι προσαρτημένη μια αιχμηρή ακίδα καθώς και η φωτοδίοδος για την ανίχνευση της δέσμης laser.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

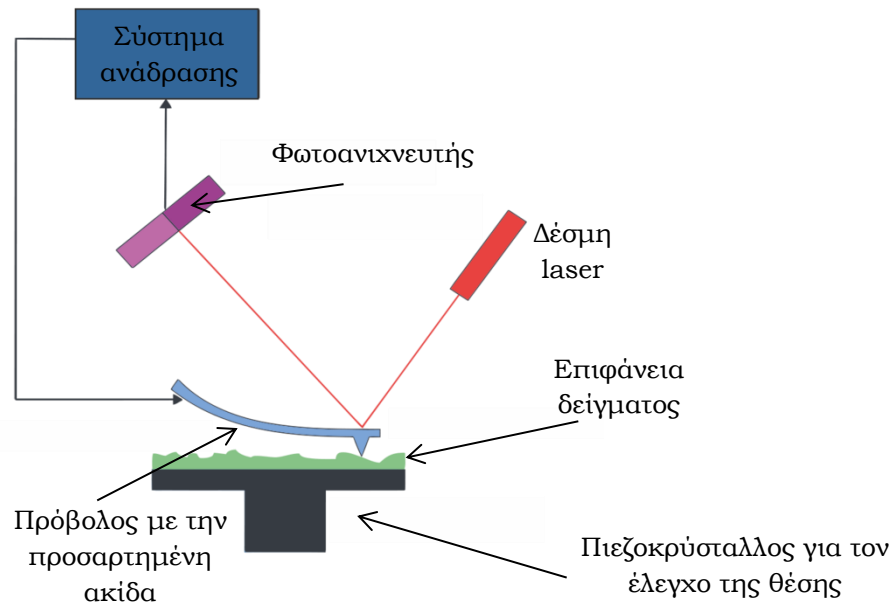
Η αρχή λειτουργίας του ΜΑΔ μοιάζει αρκετά με την αρχή λειτουργίας ενός φωνογράφου. Η αιχμηρή ακίδα, η οποία βρίσκεται στερεωμένη στην άκρη του προβόλου, σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος. Η σάρωση γίνεται με την κίνηση του δείγματος που βρίσκεται κάτω από την ακίδα. Κατά τη σάρωση της επιφάνειας αναπτύσσονται δυνάμεις ηλεκτροστατικής φύσης ή/και δυνάμεις Van der Waals, ανάλογα με τις ιδιότητες του εκάστοτε υλικού που μελετάται, οι οποίες μέσω του ηλεκτρονικού κυκλώματος μετατρέπονται σε τρισδιάστατη εικόνα. Για τη σάρωση του δείγματος, υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι σάρωσης.

Ο πρώτος τρόπος είναι η σάρωση με επαφή, όπου η ακίδα «προσγειώνεται» πάνω στο δείγμα, οπότε και βρίσκονται σε συνεχή επαφή, ενώ ο πρόβολος κάμπτεται ανάλογα με τα επιφανειακά χαρακτηριστικά του δείγματος. Πριν ξεκινήσει η σάρωση, επιλέγεται μια τάση (set point) που επιτρέπεται να ασκείται στον πρόβολο. Στο πίσω μέρος του προβόλου, το οποίο λειτουργεί σαν καθρέφτης, προσπίπτει μια δέσμη laser η οποία ανακλάται σε μια τετραστοιχία διόδων φώρασης. Στη θέση ηρεμίας, ο πρόβολος μένει άκαμπτος και η ανακλώμενη δέσμη προσπίπτει στο κέντρο του. Κατά τη λειτουργία σάρωσης με επαφή και καθώς η ακίδα σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος, λόγω της τοπογραφίας του δείγματος, αναγκάζεται να καμφθεί. Η κάμψη παρακολουθείται από ένα ηλεκτρονικό σύστημα ανάδρασης και έχει σαν αποτέλεσμα την εφαρμογή μιας ηλεκτρικής τάσης στον πιεζοκρύσταλλο, η οποία ρυθμίζει το ύψος του και ανάλογα προσεγγίζει ή απομακρύνει το δείγμα από την ακίδα. Στην Εικόνα 16 φαίνεται μια αναπαράσταση της λειτουργίας του ΜΑΔ.

Ο δεύτερος τρόπος είναι με περιοδική επαφή της ακίδας και του δείγματος (tapping mode). Σε αυτή την περίπτωση, ο πρόβολος πλησιάζει πολύ κοντά στο δείγμα και ταλαντώνεται με ένα προκαθορισμένο (set point) πλάτος πάνω από την επιφάνεια του δείγματος. Κατά τη σάρωση, το δείγμα και η ακίδα έρχονται περιοδικά σε επαφή, όπου ανάλογα με την τοπογραφία αναπτύσσονται ελκτικές ή

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

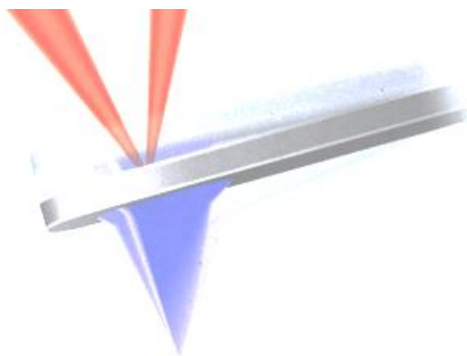
απωστικές δυνάμεις που τείνουν να μεταβάλουν το πλάτος της ταλάντωσης της ακίδας.



Εικόνα 16: Σχηματική αναπαράσταση της σάρωσης με επαφή. Ο πρόβολος κάμπτεται ανάλογα με την μορφολογία του δείγματος. Η δέσμη που προσπίπτει το πίσω μέρος, ανακλάται σε έναν φωτοανιχνευτή, όπου ανάλογα με την κάμψη του προβόλου, η ανακλώμενη ακτίνα καταγράφεται σε διαφορετική θέση

Κατα τη σάρωση με περιοδική επαφή, η δέσμη που προσπίπτει στο πίσω μέρος του προβόλου, ανακλάται στη φωτοδίοδο εκτελώντας ταλάντωση ίδιας συχνότητας με την ταλάντωση του προβόλου. Ανάλογα με τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, οι δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ δείγματος και ακίδας τείνουν να μεταβάλλουν το πλάτος της ταλάντωσης και η μεταβολή αυτή καταγράφεται από το φωτοανιχνευτή.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

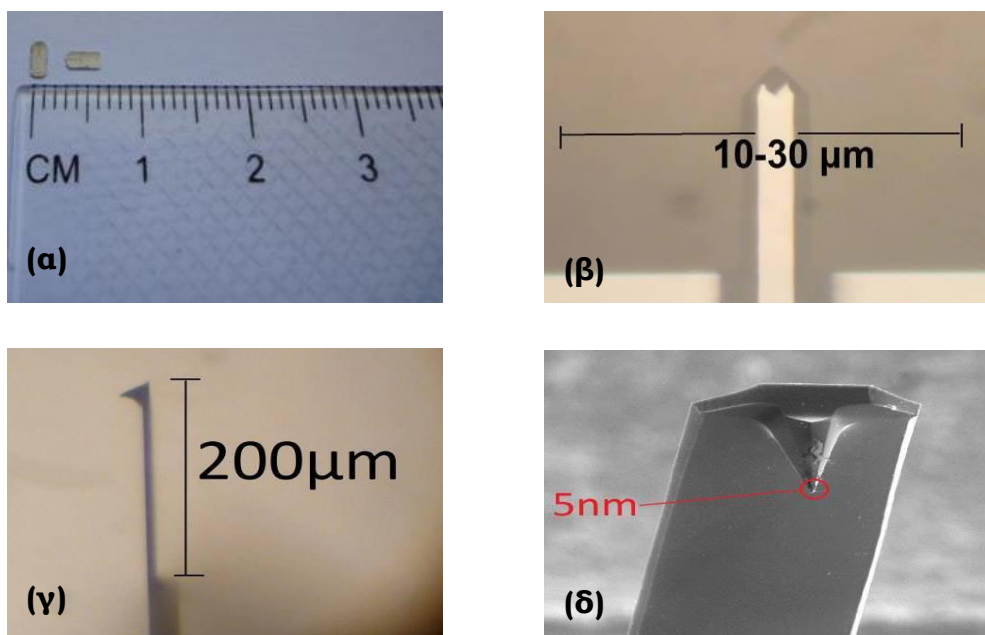


Εικόνα 17: Στην περίπτωση της σάρωσης με περιοδική επαφή, η ακίδα ταλαντώνεται. Η ανακλώμενη ακτίνα, αντίστοιχα, προσπίπτει στο φωτοανιχνευτή πραγματοποιώντας μια ταλάντωση. Αν το πλάτος της ταλάντωσης μεταβληθεί λόγω των ελκτικών ή απωστικών δυνάμεων, αλλάζει και το πλάτος της ταλάντωσης της ακτίνας του laser στο φωτοανιχνευτή

Η τοπογραφία της επιφάνειας και στους δύο τρόπους σάρωσης λαμβάνεται με την απαίτηση η τάση στον πρόβολο ή το πλάτος ταλάντωσης, να παραμένουν σταθερά. Λόγω των αλληλεπιδράσεων με την επιφάνεια, η τάση στον πρόβολο ή το πλάτος της ταλάντωσης τείνουν να μεταβληθούν. Το σύστημα ανάδρασης αντιλαμβάνεται τη μεταβολή μέσω της δέσμης που ανακλάται στο φωτοανιχνευτή και αναπροσαρμόζει κατάλληλα τη θέση του δείγματος προκειμένου η τάση που εφαρμόζεται στον πρόβολο ή το πλάτος της ταλάντωσης να παραμένουν σταθερά.

Η ακίδα, αν και είναι το πιο μικρό μέρος ενός ΜΑΔ είναι το πιο σημαντικό, καθώς από τη μορφολογία της καθορίζεται η διακριτική ικανότητα του ΜΑΔ. Συνήθως οι ακίδες που χρησιμοποιούνται σε ένα ΜΑΔ έχουν σχήμα πυραμίδας ή σφαιρικό ανάλογα με τα μελετώμενα δείγματα. Το πιο σύνηθες υλικό, από το οποίο κατασκευάζονται οι ακίδες καθώς και οι πρόβολοι είναι το πυρίτιο (Si) ή το νιτρίδιο του πυριτίου (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>), ανάλογα με το μελετώμενο δείγμα, ενώ ενδέχεται να υπάρχει και επικάλυψη της ακίδας με άλλο υλικό.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 18: Στο (α) διακρίνεται σε φωτογραφία ο πρόβολος πάνω στον οποίο είναι προσαρτημένη η αιχμηρή ακίδα. Στο (β) και το (γ) φαίνονται οι διαστάσεις της ακίδας. Οι φωτογραφίες (α), (β), (γ) είναι από το ΟΜ. Στην εικόνα (Δ) φαίνεται μια εικόνα από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, όπου διακρίνεται η ακίδα ή οποία στην άκρη της μπορεί να φτάσει και τα 5 nm διάμετρο

Ο σαρωτής αποτελεί το κεντρικό στοιχείο του ΜΑΔ, καθώς είναι αυτός που δημιουργεί την ελεγχόμενη επίπεδη κίνηση για τη σάρωση του δείγματος από την ακίδα. Η επίπεδη αυτή κίνηση είναι σύνθεση μιας παλινδρομικής κίνησης στον άξονα  $x$ , με μια ευθύγραμμη μετατόπιση στον άξονα  $y$ . Ο σαρωτής παράλληλα διορθώνει τη σχετική απόσταση ακίδας – επιφάνειας στον κατακόρυφο άξονα ανάλογα με το σήμα, το οποίο λαμβάνει από το σύστημα ανάδρασης. Για να είναι εφικτός ο έλεγχος της μετατόπισης και στις τρεις διαστάσεις, ο σαρωτής αποτελείται από τρεις ομάδες πιεζοκρυστάλλων, κάθε μία από τις οποίες ελέγχει τη μετατόπιση σε έναν από τους άξονες  $x, y, z$ .

Το σύμπλεγμα των πιεζοκρυστάλλων είναι συναρμολογημένο στη βάση του μικροσκοπίου, κάτω από τον κύλινδρο του σαρωτή, στον οποίο συνήθως τοποθετείται το δείγμα. Σε αυτή την περίπτωση είναι το δείγμα, το οποίο μετατοπίζεται, ενώ η ακίδα σαρώνει το δείγμα είτε ακίνητη είτε ταλαντωμένη στο επίπεδο  $x - y$ . Υπάρχουν άλλες διατάξεις ΜΑΔ στις οποίες ο σαρωτής καθοδηγεί την ακίδα, οπότε σε αυτή την περίπτωση

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

είναι το δείγμα που παραμένει ακίνητο. Τέλος, το σύστημα ανάδρασης, συλλέγει με ηλεκτρονικό τρόπο όσες τις παραμέτρους και μέσω κατάλληλης ψηφιακής επεξεργασίας τις μετατρέπει σε τρισδιάστατη εικόνα στον Η/Υ.

### **3.1.5 Μικροσκόπιο Ηλεκτρονιακής Σάρωσης**

Η μικροσκοπία ηλεκτρονιακής σάρωσης (ΜΗΣ) είναι μία από τις σύγχρονες και ευέλικτες μεθόδους ανάλυσης της μικροδομής μεγάλου αριθμού υλικών. Η απαίτηση για μεγαλύτερες μεγεθύνσεις για διάφορες εφαρμογές, όπως αυτή της εξέτασης του εσωτερικού του κυττάρου, αλλά και το μικρό βάθος πεδίου που έχει το κοινό οπτικό μικροσκόπιο (ΟΜ) οδήγησε στην ανάπτυξη και των ηλεκτρονικών μικροσκοπίων. Το μικροσκόπιο ηλεκτρονιακής διέλευσης (ΜΗΔ) ήταν το πρώτο είδος ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και στη συνέχεια ακολούθησε το μικροσκόπιο ηλεκτρονιακής σάρωσης (ΜΗΣ).

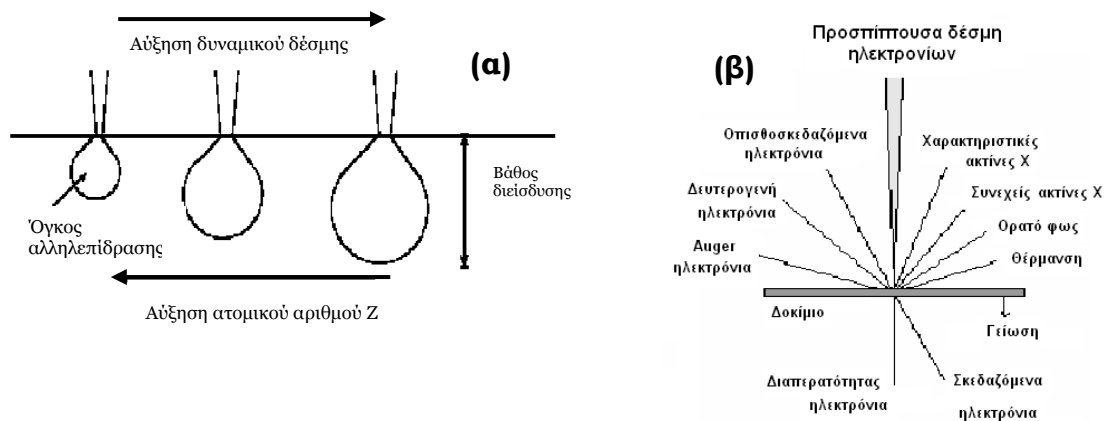
Το ΜΗΣ είναι ένα όργανο που λειτουργεί όπως περίπου και ένα οπτικό μικροσκόπιο μόνο που χρησιμοποιεί μια καλά εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας η οποία παράγεται σε συνθήκες κενού, αντί για φως. Η καλά εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων, σαρώνει την επιφάνεια τετραγωνικής διατομής, σε επάλληλες γραμμές. Η επιφάνεια σάρωσης καλύπτει το πολύ μέχρι λίγα χιλιοστά, ενώ μπορεί να φτάσει να σαρώσει μια επιφάνεια τετραγωνικής διατομής με διαστάσεις κλάσματος του χιλιοστού. Αυτή η πάρα πολύ μικρή επιφάνεια του δείγματος απεικονίζεται στην οθόνη του υπολογιστή δημιουργώντας μία πάρα πολύ μεγάλη μεγέθυνση, η οποία φτάνει τις  $\times 100.000$  φορές.

Με την αλληλεπίδραση της δέσμης ηλεκτρονίων με το δείγμα, εκπέμπονται από την επιφάνεια του υλικού κυρίως δευτερογενή (secondary) και οπισθοσκεδαζόμενα (backscattered) ηλεκτρόνια καθώς και ακτίνες Χ. Τα εκπεμπόμενα ηλεκτρόνια ανιχνεύονται από κατάλληλους ανιχνευτές και έτσι το ΜΗΣ δίνει πληροφορίες που αφορούν κυρίως στη μορφολογία και στη σύσταση της επιφανείας. Εφαρμόζοντας ένα σύστημα ανίχνευσης της διασποράς των ενεργειών των



## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

ακτινών X που δημιουργούνται στην επιφάνεια από την προσπίπτουσα δέσμη, μπορεί να γίνει στοιχειακή ανάλυση του υλικού.



Εικόνα 19: Όγκος αλληλεπίδρασης της δέσμης ηλεκτρονίων με το δείγμα (α) και τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης με το δείγμα (β)

Η βασική αρχή λειτουργίας του ΜΗΣ είναι η ακτινοβολήση του δείγματος με μια καλά εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων και η καταγραφή των αποτελεσμάτων από κατάλληλους ανιχνευτές. Η περιοχή όπου τα ενεργητικά ηλεκτρόνια αλληλεπιδρούν με το στερεό, εναποθέτοντας ενέργεια και παράγοντας εκείνες τις μορφές δευτερεύουσας ακτινοβολίας που ανιχνεύονται, ονομάζεται όγκος αλληλεπίδρασης.

Η διείσδυση της δέσμης στο δείγμα καθορίζεται από το πόσα ηλεκτρόνια υπάρχουν στην δέσμη καθώς και την κινητική τους ενέργεια, από τη διάμετρο της δέσμης και τέλος από τον ατομικό αριθμό του δείγματος. Λόγω των αλληλεπιδράσεων του δείγματος με τη δέσμη, παρατηρείται φόρτιση του δείγματος, γι' αυτό πρέπει να είναι αγώγιμο και συνδεδεμένο με γείωση. Άλλα αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεων είναι η ελαστική και η μη ελαστική σκέδαση των ηλεκτρονίων καθώς και θέρμανση του δείγματος.

Τα ηλεκτρόνια που προσπίπτουν στην επιφάνεια του δείγματος, ταξιδεύουν προς τυχαίες κατευθύνσεις μέσα στο δείγμα και συγκρούονται με τα άτομα του δείγματος. Όσα από τα ηλεκτρόνια συγκρούονται ελαστικά με τον πυρήνα του ατόμου σκεδάζονται προς οποιαδήποτε κατεύθυνση χωρίς σημαντική απώλεια της ενέργειάς τους και δεν ανιχνεύονται από το ΜΗΣ. Όσα από τα ηλεκτρόνια που

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

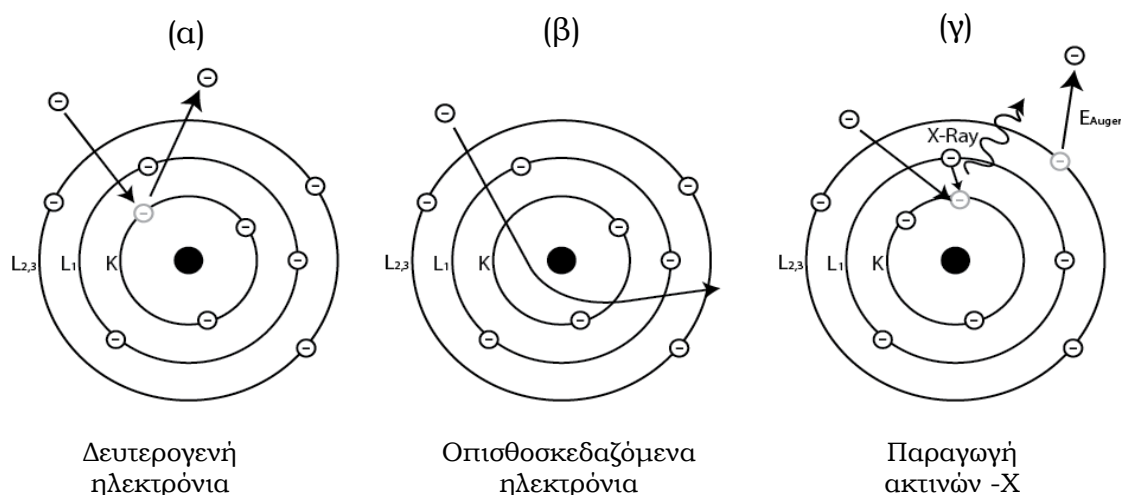
σκεδάζονται προς τα πίσω με γωνία  $180^\circ$  λέγονται οπισθοσκεδαζόμενα (backscattered electrons, BSE). Αυτά έχουν μεγαλύτερη ενέργεια και εκπέμπονται από μεγαλύτερο βάθος από το δείγμα και ανιχνεύονται από τον κατάλληλο ανιχνευτή στο ΜΗΣ.

Το ποσοστό των ηλεκτρονίων που εκπέμπονται οπισθοσκεδαζόμενα, εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό του ατόμου του δείγματος. Η αλλαγή του ποσοστού των οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων, διαφοροποιεί την εικόνα από το ΜΗΣ, ανάλογα με τον ατομικό αριθμό του δείγματος. Τα στοιχεία με μεγαλύτερο ατομικό αριθμό φαίνονται φωτεινότερα σε σχέση με τα στοιχεία που έχουν μικρότερο ατομικό αριθμό και τα οποία φαίνονται πιο σκούρα. Με τον τρόπο αυτό το ΜΗΣ δίνει πληροφορία για την σύσταση του δείγματος.

Τα ηλεκτρόνια που δε σκεδάζονται ελαστικά είναι δύο ειδών: Αυτά που δεν ανιχνεύονται από το ΜΗΣ επειδή απορροφούνται από το ίδιο το δείγμα και δεν επανεκπέμπονται και αυτά που ανιχνεύονται από το ΜΗΣ. Αυτά που ανιχνεύονται από το σύστημα ονομάζονται δευτερογενή ηλεκτρόνια (Secondary electrons, SE) και εκπέμπονται από μικρότερα βάθη της επιφάνειας του δείγματος. Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων αυτών φαίνονται στην Εικόνα 19.

Όταν τα ηλεκτρόνια της δέσμης συγκρούονται με τα ηλεκτρόνια του ατόμου μερικά από τα χαλαρά συγκρατούμενα ηλεκτρόνια μπορεί να φύγουν από το άτομο. Αυτά ονομάζονται δευτερογενή ηλεκτρόνια. Κάθε προσπίπτον ηλεκτρόνιο μπορεί να παράγει αρκετά δευτερογενή, ενώ κάθε ηλεκτρόνιο που εγκαταλείπει το άτομο μετά από σύγκρουση με άλλο υψηλότερης ενέργειας μπορεί να θεωρηθεί σαν ένα δευτερογενές ηλεκτρόνιο.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 20: Μηχανισμοί παραγωγής δευτερογενών (α) και οπισθοσκεδαζόμενων (β) ηλεκτρονίων, καθώς και ο μηχανισμός παραγωγής ακτίνων -X

Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια είναι χαμηλής ενέργειας, περίπου 50eV και εκπέμπονται από περιοχές κοντά στην επιφάνεια. Γι' αυτό τα δευτερογενή ηλεκτρόνια είναι χρήσιμα για την απεικόνιση της επιφάνειας του δείγματος. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια παράγονται με δύο κυρίως μηχανισμούς:

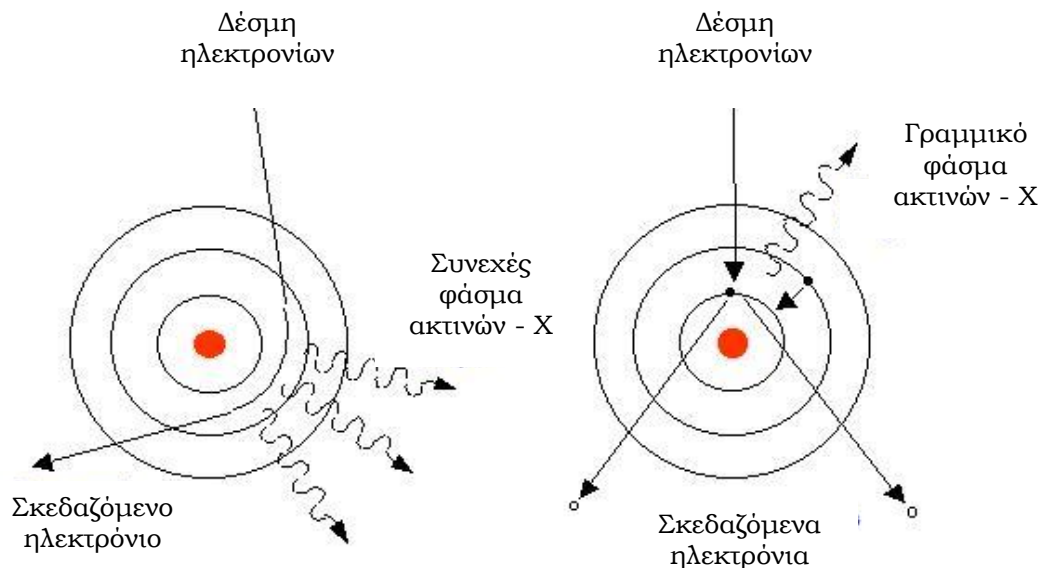
- Καθώς η δέσμη εισέρχεται στην επιφάνεια
- Καθώς η οπισθοσκεδαζόμενη δέσμη εξέρχεται από την επιφάνεια

Ο δεύτερος μηχανισμός είναι πιο πιθανός από τον πρώτο. Επομένως είναι αναμενόμενο να υπάρχει μεγαλύτερη εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων εκεί που είναι μεγάλη και η εκπομπή οπισθοσκεδαζόμενων. Γι' αυτό οι εικόνες των δευτερογενών και των οπισθοσκεδαζόμενων δεν διαφέρουν πολύ.

Όταν ένα ηλεκτρόνιο σκεδάζεται μη ελαστικά κατά την αλληλεπίδραση με τον πυρήνα ενός ατόμου, επιβραδύνεται και ένα μέρος έως και το σύνολο της ενέργειάς του αποδίδεται σαν ενέργεια ακτίνων X. Αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης είναι ένα ευρύ φάσμα ακτίνων X με μέγιστη ενέργεια εκείνη του προσπίπτοντος ηλεκτρονίου. Ωστόσο το φάσμα αυτό δεν χρησιμεύει στην στοιχειακή ανάλυση γιατί δεν είναι χαρακτηριστικό του στοιχείου. Οι χαρακτηριστικές ακτίνες X

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

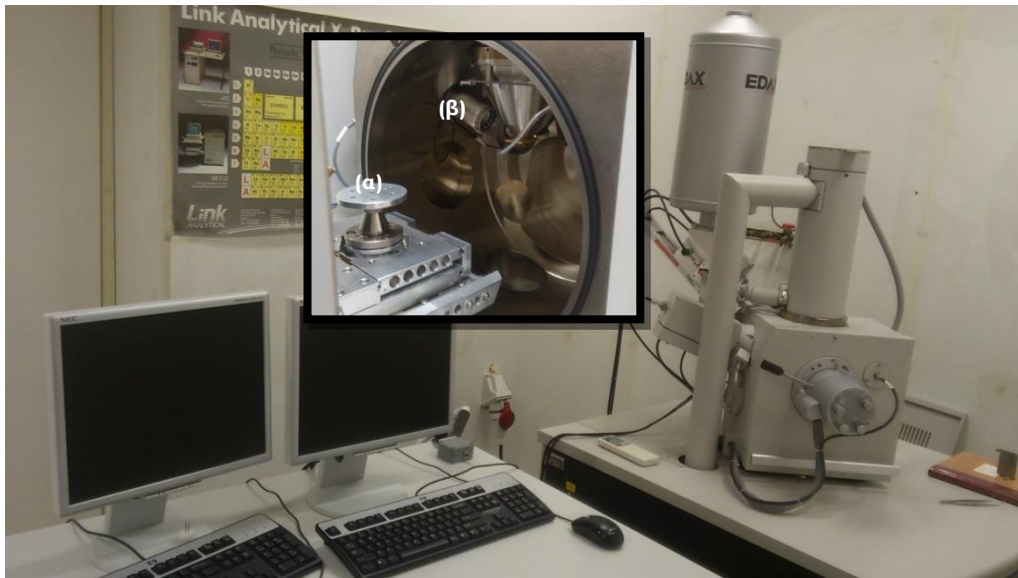
δημιουργούνται όταν ένα ηλεκτρόνιο φεύγει από εσωτερική στοιβάδα και ένα ηλεκτρόνιο από υψηλότερη ενεργειακή στοιβάδα καλύπτει το κενό πέφτοντας στην χαμηλότερη στοιβάδα και εκπέμπει την διαφορά ενέργειας με τη μορφή ακτίνων X. Η ενέργεια αυτών των ακτίνων είναι χαρακτηριστική της μετάπτωσης και κατά συνέπεια χαρακτηριστική του ατόμου.



Εικόνα 21: Μηχανισμός παραγωγής συνεχούς και γραμμικού φάσματος ακτίνων - X

Το ΜΗΣ αποτελείται από ένα σωλήνα κενού, στην κορυφή του οποίου βρίσκεται το νήμα από το οποίο παράγονται τα ηλεκτρόνια και στη βάση του η τράπεζα πάνω στην οποία τοποθετείται το δείγμα. Κατά μήκος του σωλήνα βρίσκονται τοποθετημένοι οι ηλεκτρομαγνητικοί φακοί που εστιάζουν τη δέσμη, ενώ περιφερειακά της τράπεζας βρίσκονται οι ανιχνευτές ηλεκτρονίων.

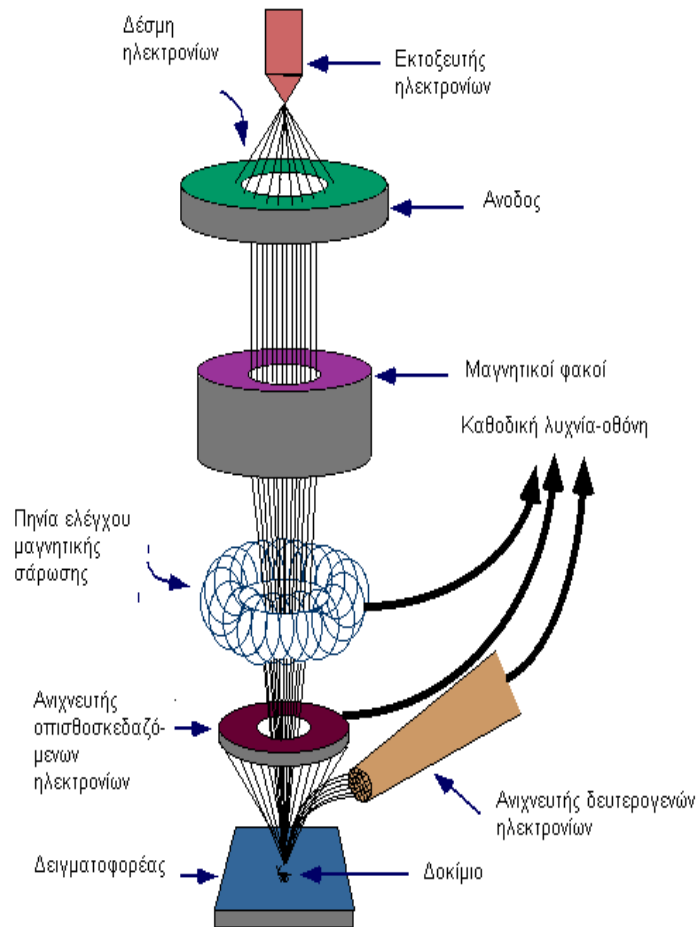
## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 22: Το Μικροσκόπιο Ηλεκτρονική Σάρωσης που είναι εγκατεστημένο στο Ι.Ν.Ν. του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος». Στην ένθετη φωτογραφία διακρίνεται ο ανοικτός θάλαμος, η τράπεζα των δειγμάτων (α) και ο ανιχνευτής δευτερογενών ηλεκτρονίων (β)

Τα ηλεκτρόνια παράγονται από ένα νήμα βολφραμίου, το οποίο λειτουργεί σαν κάθοδος. Καθώς το ρεύμα που περνάει μέσα από το νήμα αυξάνεται, εκπέμπονται ηλεκτρόνια τα οποία κατευθύνονται προς την άνοδο στην οποία εφαρμόζεται ένα δυναμικό 1 – 30 KV (accelerating voltage). Η άνοδος που είναι θετική όπως και το κύκλωμα δημιουργεί ισχυρές ελκτικές δυνάμεις στα ηλεκτρόνια, με αποτέλεσμα να κατευθύνει και να επιταχύνει τα ηλεκτρόνια.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 23: Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του ΜΗΣ

Ο αριθμός ηλεκτρονίων στην δέσμη ορίζεται σαν ρεύμα εκπομπής (emission current) και είναι περίπου 100  $\mu\text{A}$ . Καθορίζεται από την απόσταση ανάμεσα στην άκρη του νήματος (filament tip) και του ανοίγματος που υπάρχει στο καπάκι (Wehnelt cap aperture). Όσο πιο κοντά είναι τόσο περισσότερα ηλεκτρόνια έλκονται και τόσο μεγαλύτερο γίνεται το ρεύμα εκπομπής.

Τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται από την άνοδο και περνούν μέσα από ένα ηλεκτρομαγνητικό φακό συμπύκνωσης (condenser lens) που τα μετατρέπει σε δέσμη. Η ισχύς αυτού του φακού καθορίζει την διάμετρο της δέσμης (spot size). Άλλοι ηλεκτρομαγνητικοί φακοί ελέγχουν την εστίαση της δέσμης πάνω στην επιφάνεια του δείγματος.

Ένα πολύ σημαντικό στοιχείο του ΜΗΣ είναι η αντλία κενού. Ο σωλήνας και ο χώρος που βρίσκεται η τράπεζα με τα δείγματα,

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

χρειάζεται να βρίσκονται υπό κενό, ώστε να μην υπάρχουν αλληλεπιδράσεις της δέσμης με τα μόρια του αέρα και να διατηρείται σταθερή η δέσμη των ηλεκτρονίων. Το κενό επιτυγχάνεται με την χρήση δύο αντλιών που λειτουργούν σε σειρά, μιας μηχανικής και μιας αντλίας turbo, και είναι της τάξης του  $10^{-5}$  Torr.

Στο κάτω μέρος του σωλήνα, βρίσκεται το μελετώμενο δείγμα. Η δέσμη των ηλεκτρονίων προσπίπτει σε αυτό και παράγονται ακτινοβολίες οι οποίες ανιχνεύονται από τους ανιχνευτές δευτερογενών και οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων, αλλά και από τον ανιχνευτή ακτινών-X. Οι ανιχνευτές βρίσκονται στο κάτω μέρος του σωλήνα, περιμετρικά του δείγματος και σε κατάλληλη γωνία ώστε να ανιχνεύουν την αντίστοιχη ακτινοβολία που εκπέμπεται από το δείγμα.

Μετά την κατάλληλη ψηφιακή επεξεργασία, γίνεται μετατροπή της έντασης της ακτινοβολίας που ανιχνεύεται σε εικόνα η οποία μπορεί να αποθηκευτεί στον Η/Υ. Η εικόνα αποτελείται από σκοτεινές και φωτεινές περιοχές (άσπρο – μαύρο). Οι περιοχές αυτές, για τον ανιχνευτή οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων, αντιστοιχούν σε υψομετρικές διαφορές του δείγματος. Οι πιο φωτεινές αντιπροσωπεύουν μεγαλύτερο ύψος σε σχέση με τις σκοτεινές. Όταν η εικόνα προέρχεται από τον ανιχνευτή οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων, οι φωτεινές περιοχές αντιστοιχούν σε υλικό μεγάλου ατομικού αριθμού, ενώ οι σκοτεινές σε υλικό μικρού ατομικού αριθμού.

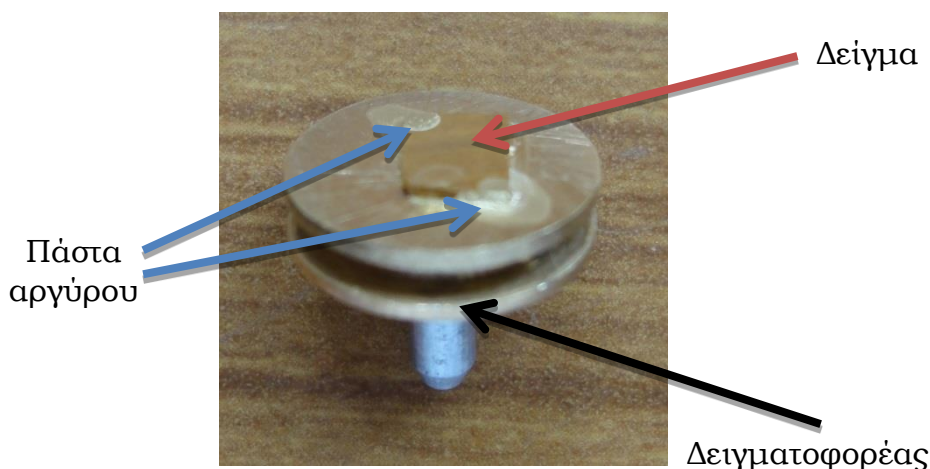
Η κύρια συμβολή του ΜΗΣ στην παρούσα Μεταπτυχιακή Εργασία, εντοπίζεται στην ικανότητά του να ταυτοποιεί χημικά τα στοιχεία που αποτελούν το δείγμα, μέσω της φασματοσκοπίας ενεργειακής διασποράς ακτινών-X (ΦΕΔΑ-X), δηλαδή από την ανίχνευση των ακτινών - X που παράγονται κατά την αλληλεπίδραση του με τη δέσμη.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

### 3.1.5.α Διαδικασία επιχρύσωσης μη αγώγιμων δειγμάτων

Καθώς η δέσμη ηλεκτρονίων σαρώνει το δείγμα, αυτό φορτίζεται τοπικά, θωρακίζοντας ηλεκτρικά την επιφάνεια (charging effect). Σε αυτή την περίπτωση δυσκολεύει η αλληλεπίδραση της δέσμης με την επιφάνεια, γι' αυτό χρειάζεται το δείγμα είναι αγώγιμο και συνδεδεμένο με γείωση. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η αγωγιμότητα στα βιολογικά δείγματα, χρειάζεται να αναπτυχθεί πάνω από το δείγμα ένα λεπτό στρώμα από χρυσό.

Για την ανάπτυξη του υμενίου, το δείγμα αρχικά στερεώνεται πάνω σε κατάλληλο δειγματοφορέα. Για να «κολλήσει» το δείγμα με το δειγματοφορέα χρησιμοποιείται πάστα αργύρου η οποία εξασφαλίζει αγωγιμότητα μεταξύ του δείγματος και του δειγματοφορέα. Στη συνέχεια ο δειγματοφορέας τοποθετείται στο θάλαμο όπου θα ολοκληρωθεί η εναπόθεση. Για την εναπόθεση, είναι απαραίτητη η δημιουργία πλάσματος.



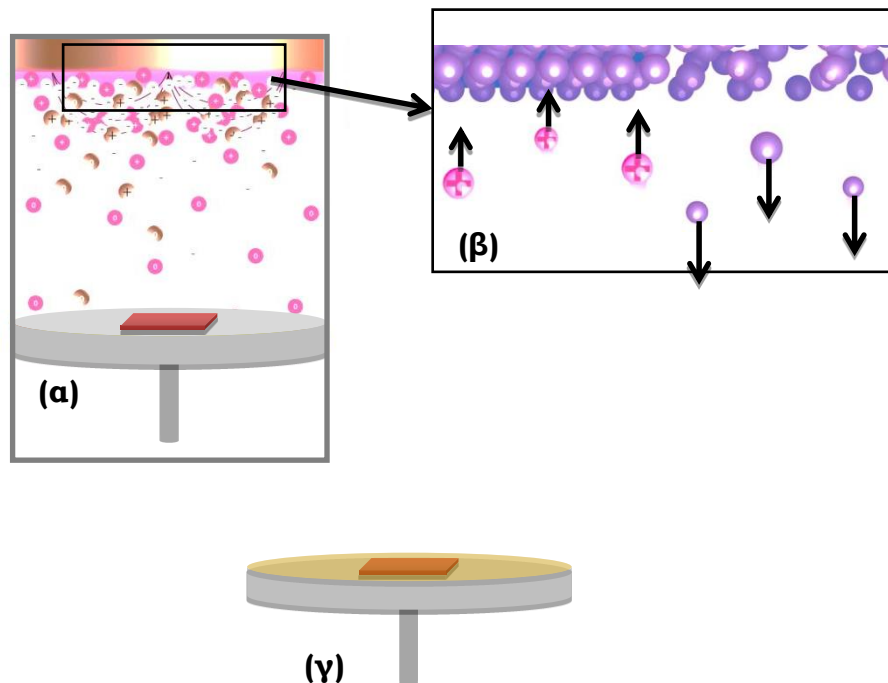
Εικόνα 24: Στην εικόνα διακρίνεται ο δειγματοφορέας, πάνω στον οποίο έχει «κολληθεί» το δείγμα με χρήση της πάστας αργύρου

Μετά την εισαγωγή του δειγματοφορέα στο θάλαμο, μια μηχανική αντλία δημιουργεί κενό της τάξης των  $10^{-2}$  Torr και το διατηρεί σταθερό καθ' όλη τη διάρκεια της εναπόθεσης. Δύο ηλεκτρόδια, το ένα εκ των οποίων είναι ο στόχος χρυσού, αναπτύσσουν μια τάση 10 – 20 kV η οποία ιονίζει το αέριο που έχει απομείνει στο θάλαμο. Τα ιόντα του



## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

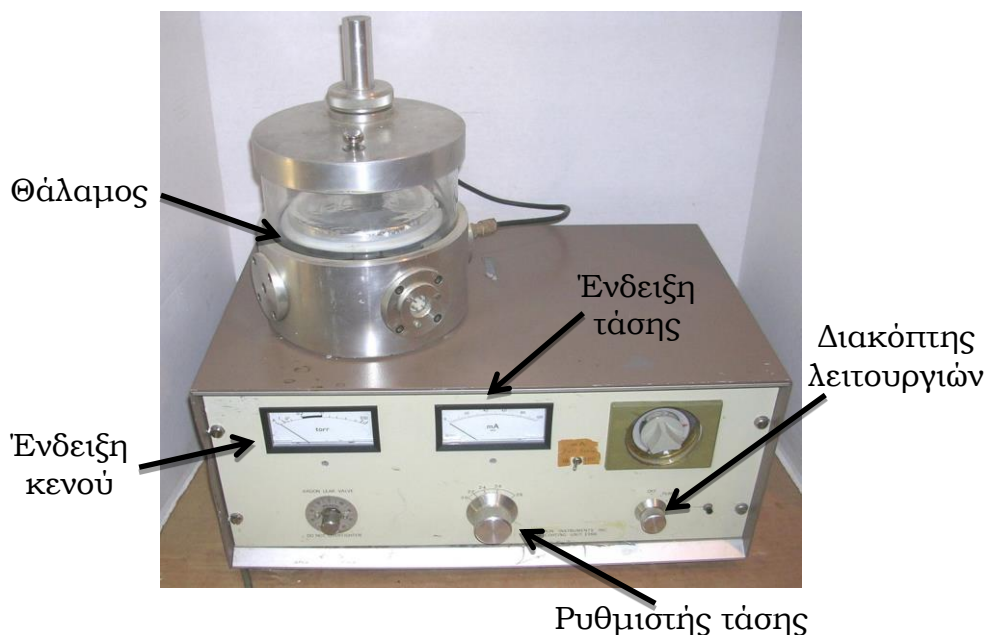
αερίου προσκρούουν στο στόχο του χρυσού όπου εξαχνώνουν τα μόρια τα οποία εναποτίθενται στην επιφάνεια του δείγματος που βρίσκεται απέναντι από το στόχο. Μια σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας φαίνεται στην επόμενη Εικόνα 25.



Εικόνα 25: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας εναπόθεσης. Τα ιόντα του αερίου προσπίπτουν στο στόχο του χρυσού (α), εξαχνώνοντας μόρια χρυσού τα οποία εναποτίθενται στην επιφάνεια του δείγματος. Στην ένθετη εικόνα (β) παρουσιάζεται η εικόνα κοντά στην επιφάνεια του στόχου. Στο (γ) φαίνεται το αποτέλεσμα μετά την επιχρύσωση, όπου ένα λεπτό στρώμα χρυσού έχει αναπτυχθεί πάνω από δείγμα

Ανάλογα με τις συνθήκες του κενού και της τάσης, μπορεί να μεταβληθεί ο ρυθμός εξαχνωσης, άρα και εναπόθεσης, του χρυσού πάνω στο δείγμα. Τυπικές χρονικές διάρκειες για μια εναπόθεση είναι από 30 δευτερόλεπτα μέχρι μερικά λεπτά, ανάλογα με τη μορφολογία του δείγματος. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας επιχρύσωσης είναι να αναπτυχθεί ένα πολύ λεπτό στρώμα χρυσού, το οποίο όμως επειδή δεν ξεπερνά σε πάχος τα μερικά δεκάδες nm δεν επηρεάζει σημαντικά την επιφανειακή μορφολογία του δείγματος. Ταυτόχρονα εξασφαλίζει την αγωγιμότητα της επιφάνειας ώστε να αποφεύγεται το φαινόμενο της ηλεκτρικής θωράκισης. Στην πιο κάτω Εικόνα 26 φαίνεται η διάταξη για την εναπόθεση του χρυσού.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 26: Η διάταξη για την εναπόθεση του χρυσού. Διακρίνεται ο θάλαμος και η μονάδα που καθορίζει την τάση που αναπτύσσεται, καθώς και οι ενδείξεις του κενού και της τάσης

### 3.2 Παρασκευή της μαγνητικής νανογέλης και μεταβολή των ιδιοτήτων της σε σχέση με εξωτερικά αίτια

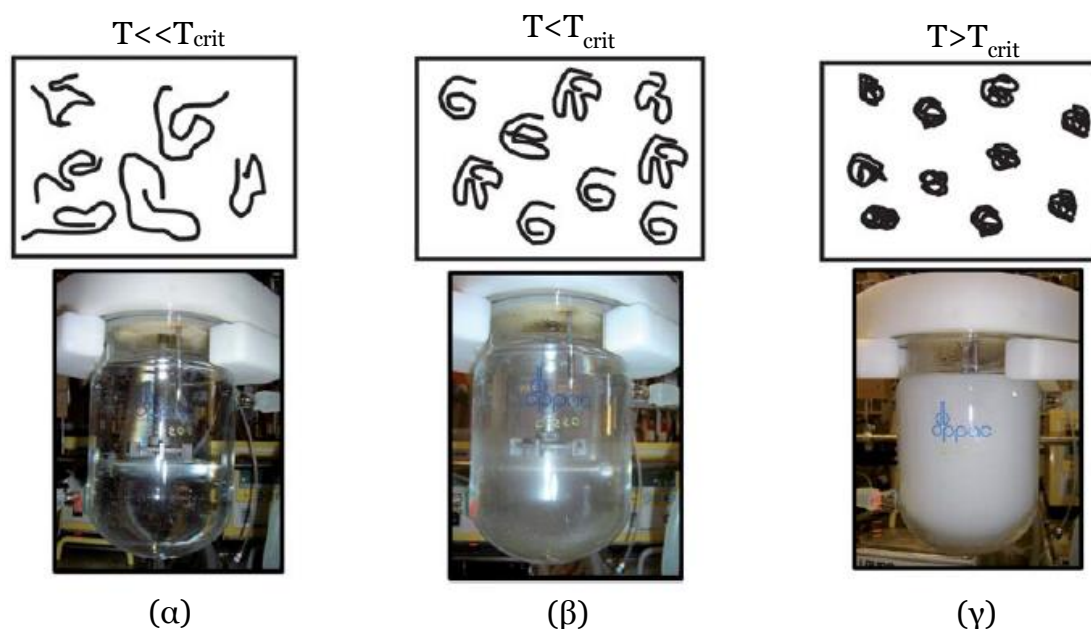
Στο κεφάλαιο αυτό, θα περιγραφεί η μέθοδος παρασκευής της ΜΝΓ. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παρασκευή της δεν πραγματοποιήθηκε στο Ι.Ν.Ν. του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», αλλά από ομάδα συνεργατών του εργαστηρίου [31].

Για τη σύνθεση της νανογέλης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του πολυμερισμού γαλακτώματος. Αρχικά στο γυάλινο αντιδραστήρα προστίθεται νερό, το μονομερές 2-((diethylamino)ethyl) methacrylate και το μέσο για την ανάπτυξη σταυροδεσμών (ethylene glycol) dimethacrylate. Στη συνέχεια στον αντιδραστήρα εισάγεται άζωτο προκειμένου να υπάρχει αδρανές περιβάλλον, ενώ καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία στους 70°C και προστίθεται ο εκκινητής της αντίδρασης (2,2'-azobis(*N,N*-dimethyleneisobutyramidine)dihydrochloride). Σε όλη τη διάρκεια το μείγμα βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση στις 300 στροφές/λεπτό. Η αντίδραση διαρκεί 2 ώρες και στη συνέχεια ελαττώνεται η θερμοκρασία στους 25° C. Από τη διαδικασία προκύπτουν

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

το poly (N,N'-diethyl aminoethyl methacrylate), συντομογραφικά PDEAEMA.

Τα σωματίδια της νανογέλης προκύπτουν ως εναιώρημα από το οποίο διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του νερού. Στη συνέχεια επαναδιασπείρονται σε διάλυμα που περιέχει τα ΝΣ οξειδίου του σιδήρου, προκειμένου να γίνει η μεταξύ τους πρόσδεση, η οποία επιτυγχάνεται λόγω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Τα σωματίδια της νανογέλης έχουν θετικό φορτίο, ενώ τα ΝΣ οξειδίου του σιδήρου, έχουν αρνητικό φορτίο λόγω του pH, το οποίο για την περίπτωση έχει καθοριστεί ίσο 6.



Εικόνα 27: Μεταβολή του διαφάνειας του διαλύματος που περιέχει τη νανογέλη συναρτήσει της θερμοκρασίας. Στο (α) όταν το διάλυμα βρίσκεται πολύ κάτω από την κρίσιμη θερμοκρασία μετάβασης, στο (β) όταν η θερμοκρασία είναι λίγο χαμηλότερα από την κρίσιμη θερμοκρασία μετάβασης, ενώ στο (γ) όταν το διάλυμα βρίσκεται πάνω από την κρίσιμη θερμοκρασία μετάβασης

Στα σύνθετα σωματίδια νανογέλης - οξείδια του σιδήρου (μαγνητική νανογέλη, ΜΝΓ) που παρασκευάστηκαν, έγιναν κάποια προκαταρκτικά πειράματα για να μελετηθεί η μεταβολή των ιδιοτήτων τους συναρτήσει διαφορετικών εξωτερικών ερεθισμάτων. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η μεταβολή της διαφάνειας και η μεταβολή του

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

υδροδυναμικού τους όγκου, συναρτήσει της θερμοκρασίας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 27.

Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος είναι κάτω από την κρίσιμη θερμοκρασία μετάβασης, διάλυμα είναι διαυγές και περατό στο φώς. Όσο η θερμοκρασία αυξάνεται, το διάλυμα θαμπώνει και φτάνει σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από την κρίσιμη ( $T > T_{crit}$ ), να μην είναι διαπερατό στο φώς. Στην κατάσταση αυτή, τα ΝΣ έχουν συρρικνωθεί σε πολύ μικρότερο όγκο.

### **3.3 Πειραματικά πρωτόκολλα**

Στο παρόν υποκεφάλαιο, θα παρουσιαστούν τα πειραματικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν κατά τη διαδικασία παρασκευής και μελέτης των δειγμάτων. Κάποια από τα πρωτόκολλα, όπως αυτό του διαχωρισμού των στοιχείων του αίματος σε στοιβάδες, χρησιμοποιείται καθημερινά σχεδόν σε διάφορα αιματολογικά εργαστήρια, ενώ άλλα αναπτύχθηκαν αποκλειστικά για τη χρήση τους στην παρούσα Μεταπτυχιακή Εργασία.

#### **3.3.1 Μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν την συγκόλληση και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων της μαγνητικής νανογέλης**

Στα προκαταρκτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά τη παρασκευή της ΜΝΓ, μελετήθηκε μόνο η επίδραση της θερμοκρασίας στη μορφολογία και τα άλλα χαρακτηριστικά της ΜΝΓ. Στα πλαίσια της παρούσας Μεταπτυχιακής Εργασίας, έγινε μελέτη για την επίδραση της θερμοκρασίας, της υπερήχησης και του μαγνητικού πεδίου στη μορφολογία της ΜΝΓ.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

### *3.3.1.α Παράμετρος θερμοκρασίας*

Για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στη μορφολογία της ΜΝΓ, προετοιμάστηκαν δύο δείγματα σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η κρίσιμη θερμοκρασία μετάβασης για τα σωματίδια της ΜΝΓ είναι οι 37° C, οπότε επιλέχθηκε μια θερμοκρασία μικρότερη και μία μεγαλύτερη από την κρίσιμη θερμοκρασία μετάβασης των 37°c.

Τα δύο δείγματα τοποθετήθηκαν σε διαφορετικό erpendorf, το καθένα από τα οποία περιείχε 1 ml ΜΝΓ. Το πρώτο τοποθετήθηκε σε θερμοκρασία 20° C, ενώ το δεύτερο σε θερμοκρασία 60°C για 5 ώρες το καθένα, προκειμένου να ολοκληρωθεί η αλλαγή φάσης. Στη συνέχεια, με την τεχνική ανάπτυξης λεπτών υμενίων που περιγράφηκε πιο πάνω, ετοιμάστηκαν δύο δείγματα για μελέτη στο ΜΑΔ.

### *3.3.1.β Παράμετρος υπερήχησης*

Για τη μελέτη της μεταβολής του μεγέθους των σωματιδίων που αποτελούν τη ΜΝΓ, συναρτήσει της παραμέτρου της υπερήχησης, ετοιμάστηκαν δύο erpendorf με ΜΝΓ ποσότητας 1 ml το καθένα. Και τα δυο erpendorf βρίσκονταν σε θερμοκρασία 20° C για 5 ώρες. Στο ένα από τα δύο erpendorf, έγινε κατεργασία στο λουτρό υπερήχων για χρόνο 2 λεπτών. Έπειτα ακολούθησε η ανάπτυξη ενός λεπτού υμενίου από το καθένα, προκειμένου να παρατηρηθούν οι μορφολογικές διαφορές λόγω της επεξεργασίας που πραγματοποιήθηκε στο λουτρό υπερήχων.

### *3.3.1.γ Παράμετρος μαγνητικού πεδίου*

Τελευταία παράμετρος που μελετήθηκε ήταν η επίδραση του μαγνητικού πεδίου στη μορφολογία της ΜΝΓ. Για να μελετηθούν οι μεταβολές, ετοιμάστηκαν δύο erpendorf που περιείχαν ποσότητα 1 ml ΜΝΓ και τα οποία τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία 20° C για 5 ώρες.

Στη συνέχεια στο ένα από τα δυο, εφαρμόστηκε με τη βοήθεια ενός μόνιμου μαγνήτη ένα ανομοιογενές μαγνητικό πεδίο μέγιστης

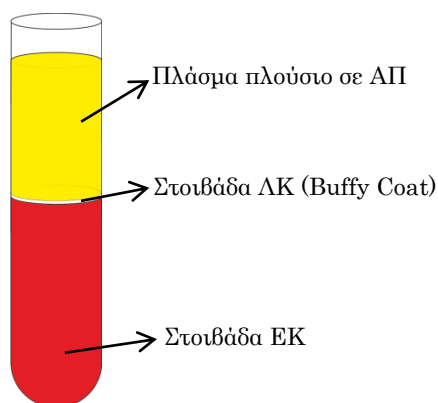
## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

έντασης 3 kOe για χρόνο 1 λεπτού. Έπειτα, με την τεχνική ανάπτυξης λεπτών υμενίων, ετοιμάστηκαν δυο δείγματα για μελέτη στο ΜΑΔ.

### 3.3.2 Μελέτη σύζευξης της ΜΝΓ με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

Τα ΕΚ, ΛΚ, ΑΠ, βρίσκονται στο πλάσμα με τη μορφή εναιωρήματος, οπότε πρέπει να απομονωθούν για να μελετηθεί ανεξάρτητα η αλληλεπίδρασή τους με τη ΜΝΓ. Ακολουθεί η διαδικασία διαχωρισμού.

Ποσότητα ολικού αίματος 3 ml τοποθετείται σε ειδικό σωληνάριο δειγματοληψίας, το οποίο περιέχει αντιπηκτικό. Το δείγμα φυγοκεντρίζεται για 2 λεπτά σε συνθήκες τεχνητής βαρύτητας  $\times 120$  g. Κατά τη φυγοκέντρωση, τα ΕΚ, λόγω της μεγαλύτερης μάζας τους ιζηματοποιούνται πιο εύκολα από τα ΛΚ και τα ΑΠ, δημιουργούν μια στοιβάδα ΕΚ στο κάτω μέρος του σωληναρίου.



Εικόνα 28: Σχηματική αναπαράσταση του σωληναρίου δειγματοληψίας μετά τη φυγοκέντρωση για το διαχωρισμό των συστατικών του αίματος σε στοιβάδες. Στο κάτω μέρος ιζηματοποιούνται τα ΕΚ, από πάνω τους δημιουργείται μια στοιβάδα αποτελούμενη από ΛΚ, ενώ στο υπερκείμενο παραμένει το πλάσμα το οποίο είναι πλούσιο σε ΑΠ

Τα ΛΚ, αν και έχουν μεγαλύτερη μάζα από τα ΕΚ, ιζηματοποιούνται δυσκολότερα λόγω του μεγαλύτερου όγκου τους. Δημιουργούν έτσι μια στοιβάδα πάνω από αυτή των ΕΚ. Στο υπερκείμενο παραμένει το πλάσμα το οποίο είναι πλούσιο σε ΑΠ. Σχηματικά, το

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

σωληνάριο της δειγματοληψίας μετά τη φυγοκέντρηση, παρουσιάζεται στην Εικόνα 28.

Έπειτα, για το διαχωρισμό του πλάσματος από τα ΑΠ, το υπερκείμενο τοποθετείται σε νέο erpendorf. Το πλούσιο σε ΑΠ πλάσμα φυγοκεντρίζεται για 2 λεπτά σε συνθήκες τεχνητής βαρύτητας  $\times 1200$  g. Μετά τη φυγοκέντρηση, τα ΑΠ ιζηματοποιούνται, οπότε το υπερκείμενο απομακρύνεται. Γίνεται με αυτό τον τρόπο διαχωρισμός των ΑΠ από το πλάσμα.

Για τη μελέτη της βιοσυμβατότητας, τα έμμορφα στοιχεία του αίματος, χρειάζεται να τροποποιηθούν μαγνητικά. Για να γίνει η τροποποίηση, το δείγμα χωρίζεται σε διαφορετικά erpendorfs ανάλογα με τη στοιβάδα που θα μελετηθεί και αφήνεται να ωριμάσει για χρονικό διάστημα με ποσότητα ΜΝΓ. Τα ΕΚ, ΛΚ και ΑΠ που έχουν ωριμάσει με τη ΜΝΓ, είναι αυτά που θα μελετηθούν στα πλαίσια της μεταπτυχιακής εργασίας.

### *3.3.2.a Μελέτη σύζευξης της μαγνητικής νανογέλης με τα ΕΚ*

Για τη μελέτη της σύζευξης της ΜΝΓ με τα ΕΚ, χρειάζεται η ανάπτυξη μονοστρωματικού υμενίου από ΕΚ πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Για να υπάρχει ικανοποιητική κάλυψη, χρειάζεται το δείγμα του ολικού αίματος να αραιωθεί σε ερυθροκυτταροκρίτη  $\sim 10\%$ .

Αρχικά τοποθετούνται 120  $\mu$ L ολικού αίματος, με αιματοκρίτη (Hct)  $\sim 45\%$ , σε ένα erpendorf. Μετά τη φυγοκέντρηση του σωληναρίου με το ολικό αίμα, προστίθενται στο erpendorf 400  $\mu$ L από το υπερκείμενο πλάσμα, ώστε ο αιματοκρίτης (Hct) να γίνει περίπου  $\sim 10\%$  σε αυτόλογο πλάσμα. Το συνολικό δείγμα των 520  $\mu$ L χωρίζεται σε δύο καινούρια erpendorfs ώστε να μελετηθεί η επίδραση της διαφορετικής συγκέντρωσης ΜΝΓ.

Κάθε erpendorf περιέχει 260  $\mu$ L αίμα με ερυθροκυτταροκρίτη  $\sim 10\%$ . Στο πρώτο erpendorf τοποθετείται ποσότητα μαγνητικής νανογέλης 25  $\mu$ L ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 10% σε ΜΝΓ, ενώ στο δεύτερο erpendorf τοποθετείται ποσότητα ΜΝΓ 50  $\mu$ L, ώστε να

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

επιτευχθεί συγκέντρωση 20% σε ΜΝΓ. Τα δύο δείγματα αφήνονται να ωριμάσουν με ελαφρά ανάδευση για χρόνο 5 λεπτών. Έπειτα, παρασκευάζονται με την τεχνική ανάπτυξης λεπτών υμενίων τα δύο διαφορετικά δείγματα για μελέτη στο ΜΑΔ και στο ΜΗΣ.

Για να μελετηθεί η επίδραση του μέσου διασποράς, θα γίνει υποκατάσταση του πλάσματος με φυσιολογικό ορό NaCl 0,9%. Για την υποκατάσταση, ακολουθείται η πιο κάτω διαδικασία. Αρχικά τοποθετείται ποσότητα ολικού αίματος 120  $\mu\text{L}$  σε ένα erpendorf. Προστίθεται ποσότητα 1 ml από φυσιολογικό ορό NaCl 0,9%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος για 2 λεπτά σε συνθήκες τεχνητής βαρύτητας  $\times 1200g$ . Έπειτα αφαιρείται το υπερκείμενο, προστίθεται νέα ποσότητα 1 ml φυσιολογικού ορού NaCl 0,9% και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία άλλες 2 φορές. Μετά από κάθε φυγοκέντρηση, επειδή τα ΕΚ έχουν ιζηματοποιηθεί, ακολουθεί επανδιασπορά με ελαφριά ανάδευση.

Μετά τις 3 διαδοχικές εκπλύσεις με φυσιολογικό ορό, στο erpendorf τοποθετείται ποσότητα 400  $\mu\text{L}$  φυσιολογικού ορού, ενώ ακολουθεί επανδιασπορά των ΕΚ στο φυσιολογικό ορό. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, στο erpendorf υπάρχει συνολικά ποσότητα 520  $\mu\text{L}$  με αιματοκρίτη (Hct)  $\sim 10\%$  σε φυσιολογικό ορό NaCl 0,9%.

Το δείγμα χωρίζεται σε δύο νέα erpendorfs, ποσότητας 260  $\mu\text{L}$  το καθένα. Στο πρώτο erpendorf τοποθετείται ποσότητα ΜΝΓ 25  $\mu\text{L}$  ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 10% σε ΜΝΓ, ενώ στο δεύτερο erpendorf τοποθετείται ποσότητα ΜΝΓ 50  $\mu\text{L}$ , ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 20% σε ΜΝΓ. Τα δύο δείγματα αφήνονται να ωριμάσουν υπό ελαφρά ανάδευση για χρόνο 5 λεπτών. Στη συνέχεια, παρασκευάζονται με την τεχνική ανάπτυξης λεπτών υμενίων τα δύο διαφορετικά δείγματα για μελέτη στο ΜΑΔ και στο ΜΗΣ.

Τόσο τα δείγματα που έχουν ωριμάσει σε αυτόλογο πλάσμα, όσο και αυτά που έχουν ωριμάσει σε φυσιολογικό ορό, παρατηρούνται στο ΟΜ ώστε να εξεταστεί η επιφανειακή κάλυψη. Η παρατήρηση βοηθάει



## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

στο να δοθεί μια πρώτη εικόνα για το αν τα ΕΚ, έχουν επηρεαστεί από την παρουσία του φυσιολογικού ορού και έχει επέλθει λύση τους.

### *3.3.2.β Μελέτη σύζευξης της μαγνητικής νανογέλης με τα ΛΚ*

Για τη μελέτη της σύζευξης της ΜΝΓ με τα ΛΚ, χρειάζεται η ανάπτυξη μονοστρωματικού υμενίου από ΛΚ πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Επειδή τα ΛΚ είναι περίπου 1% του ολικού αίματος, χρειάζεται το δείγμα από τη στοιβάδα των ΛΚ να παρατηρείται σε κάθε βήμα, ώστε να υπάρχει κάλυψη σε ΛΚ, περίπου 1-2 ανά οπτικό πεδίο στο ΟΜ. Η διαδικασία περιγράφεται πιο κάτω.

Μετά την αρχική φυγοκέντρηση, όπου τα στοιχεία του αίματος έχουν χωριστεί σε στοιβάδες, το υπερκείμενο πλάσμα αφαιρείται και τοποθετείται σε νέο erpendorf. Επειδή η στοιβάδα των ΛΚ είναι αρκετά λεπτή, αντλείται με προσοχή ποσότητα 300  $\mu\text{L}$  από τη στοιβάδα των ΛΚ και τοποθετείται σε νέο erpendorf. Λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης ΕΚ, στο erpendorf υπάρχει και ποσότητα ΕΚ, οπότε προστίθεται ποσότητα πλάσματος 500  $\mu\text{L}$ , που είχε αποθηκευτεί αρχικά, ώστε να επέλθει αραιώση του δείγματος και να είναι ορατά τα ΛΚ πιο εύκολα.

Το συνολικό δείγμα των 800  $\mu\text{L}$ , χωρίζεται σε τέσσερα νέα erpendorfs ποσότητας 200  $\mu\text{L}$ , ώστε να ετοιμαστούν διαφορετικά δείγματα προκειμένου να μελετηθεί τόσο η επίδραση της συγκέντρωσης, όσο και του μέσου διασποράς των ΛΚ.

Τα δύο πρώτα erpendorfs που περιέχουν ποσότητα ΛΚ, θα χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης της ΜΝΓ σε αυτόλογο πλάσμα. Στο πρώτο erpendorf τοποθετείται ποσότητα ΜΝΓ 20  $\mu\text{L}$  ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 10% σε ΜΝΓ, ενώ στο δεύτερο erpendorf τοποθετείται ποσότητα ΜΝΓ 40  $\mu\text{L}$ , ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 20% σε ΜΝΓ. Στη συνέχεια, παρασκευάζονται με την τεχνική ανάπτυξης λεπτών υμενίων τα δύο διαφορετικά δείγματα για μελέτη στο ΜΑΔ και στο ΜΗΣ.

Για τη μελέτη της επίδρασης του μέσου διασποράς, στα δύο erpendorf που δε χρησιμοποιήθηκαν αρχικά, έγινε υποκατάσταση του

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

πλάσματος με φυσιολογικό ορό NaCl 0,9%. Για την υποκατάσταση, ακολουθήθηκε η πιο κάτω διαδικασία.

Στα δύο erpendorfs που περιέχουν αρχικά ποσότητα 200  $\mu$ L δείγματος με ΛΚ το καθένα, προστίθενται 1 ml φυσιολογικού ορού NaCl 0,9%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος για 2 λεπτά σε συνθήκες τεχνητής βαρύτητας  $\times 1200g$ . Έπειτα αφαιρείται το υπερκείμενο, προστίθεται νέα ποσότητα 1 ml φυσιολογικού ορού NaCl 0,9% και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία 2 φορές. Κάθε φορά, γίνεται επαναδιασπορά των ΛΚ με ελαφριά ανάδευση. Στο τέλος της διαδικασίας, σε κάθε erpendorf προστίθεται 200  $\mu$ L φυσιολογικού ορού, γίνεται επαναδιασπορά των ΛΚ και το δείγμα αποθηκεύεται.

Μετά τις 3 διαδοχικές εκπλύσεις με φυσιολογικό ορό, στα δύο erpendorfs υπάρχει ποσότητα 200  $\mu$ L δείγματος ΛΚ σε φυσιολογικό ορό. Στο πρώτο erpendorf τοποθετείται ποσότητα ΜΝΓ 20  $\mu$ L ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 10% σε ΜΝΓ, ενώ στο δεύτερο erpendorf τοποθετείται ποσότητα ΜΝΓ 40  $\mu$ L, ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 20% σε ΜΝΓ. Στη συνέχεια, παρασκευάζονται με την τεχνική ανάπτυξης λεπτών υμενίων τα δύο διαφορετικά δείγματα για μελέτη στο ΜΑΔ και στο ΜΗΣ.

Τόσο τα δείγματα που έχουν ωριμάσει σε αυτόλογο πλάσμα, όσο και αυτά που έχουν ωριμάσει σε φυσιολογικό ορό, παρατηρούνται στο ΟΜ ώστε να εξεταστεί η επιφανειακή κάλυψη. Η παρατήρηση βοηθάει στο να δοθεί μια πρώτη εικόνα για το αν τα ΕΚ, έχουν επηρεαστεί από την παρουσία του φυσιολογικού ορού και έχει επέλθει λύση τους.

### *3.3.2.γ Μελέτη σύζευξης της μαγνητικής νανογέλης με τα ΑΠ*

Για τη μελέτη της σύζευξης της ΜΝΓ με τα ΑΠ, χρειάζεται να απομονωθούν τα ΑΠ από το πλάσμα και τα υπόλοιπα έμμορφα στοιχεία του αίματος. Η διαδικασία περιγράφεται σε αυτή την ενότητα.

Το φιαλίδιο της αιμοληψίας φυγοκεντρίζεται για 2 λεπτά σε συνθήκες τεχνητής βαρύτητας  $\times 1200g$ . Η στοιβάδα του πλάσματος αφαιρείται και τοποθετείται σε erpendorf. Το πλάσμα αυτό είναι πλούσιο

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

σε ΑΠ. Για να ιζηματοποιηθούν τα ΑΠ, ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος στο erpendorf για 10 λεπτά σε συνθήκες τεχνητής βαρύτητας x 2400g.

Μετά τη φυγοκέντρηση, έχει ιζηματοποιηθεί η μεγαλύτερη ποσότητα ΑΠ. Αφαιρείται κατάλληλη ποσότητα από το υπερκείμενο ώστε να γίνει επαναδιασπορά του ιζήματος των ΑΠ. Επειδή το δείγμα κάθε δότη δεν περιέχει την ίδια ποσότητα πλάσματος, οι τιμές διαφοροποιούνται ανάλογα με το δείγμα που παρασκευάζεται. Στο erpendorf προστίθεται κάθε φορά ποσότητα κατάλληλη ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση σε ΜΝΓ 10% ή 20% σε αυτόλογο πλάσμα.

Για τη μελέτη της επίδρασης του μέσου διασποράς, το erpendorf πριν από την τοποθέτηση της ποσότητας ΜΝΓ, εκπλένεται με φυσιολογικό ορό. Συγκεκριμένα για την έκπλυση, προστίθενται 1 ml φυσιολογικού ορού NaCl 0,9%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος για 2 λεπτά σε συνθήκες τεχνητής βαρύτητας x 1200g. Έπειτα αφαιρείται το υπερκείμενο, προστίθεται νέα ποσότητα 1 ml φυσιολογικού ορού NaCl 0,9% και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία 2 φορές. Κάθε φορά, γίνεται επαναδιασπορά των ΑΠ με ελαφριά ανάδευση. Στο τέλος της διαδικασίας, στο erpendorf προστίθεται κατάλληλη ποσότητα 50-70  $\mu$ L φυσιολογικού ορού, ανάλογα με το δείγμα, γίνεται επαναδιασπορά των ΑΠ και το δείγμα αποθηκεύεται. Στη συνέχεια προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ΜΝΓ, ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 10% ή 20% σε φυσιολογικό ορό.

### **3.4 Μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν την συγκόλληση των έμμορφων στοιχείων του αίματος**

#### **3.4.1 Παράμετρος μαγνητικού πεδίου**

Για τη μελέτη της συγκόλλησης των κυττάρων του αίματος, ακολουθείται η πιο κάτω διαδικασία. Αρχικά τοποθετείται σε ένα erpendorf ποσότητα ολικού αίματος 120  $\mu$ L. Στη συνέχεια

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

φυγοκεντρίζεται το φιαλίδιο της αιμοληψίας για 2 λεπτά σε συνθήκες τεχνητής βαρύτητας x 120g. Από το υπερκείμενο πλάσμα, αντλούνται 400  $\mu\text{L}$  και προστίθενται στο αρχικό erpendorf.

Έπειτα, στο erpendorf προστίθενται 50  $\mu\text{L}$  ΜΝΓ, ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση σε ΜΝΓ 10%. Το μείγμα αφήνεται να ωριμάσει για χρόνο 5 λεπτών υπό ήπια ανάδευση. Με την τεχνική ανάπτυξης λεπτών υμενίων, ετοιμάζεται ένα μονοστρωματικό υμένιο για μελέτη των ΕΚ, ΛΚ, ΑΠ στα ΜΑΔ και ΜΗΣ.

Έπειτα, στην ποσότητα που έμεινε στο erpendorf, εφαρμόζεται ένα μαγνητικό πεδίο 3 kOe για χρόνο 1 λεπτό, ενώ στη συνέχεια ετοιμάζεται ένα δεύτερο υμένιο, ώστε να γίνει η σύγκριση των συστατικών του αίματος. Παράλληλα καταγράφεται η μακροσκοπική μορφολογία του δείγματος, ώστε να καταγραφούν τυχόν διαφορές..

### **3.4.2 Παράμετρος μέσου ωρίμανσης και επαναδιασποράς**

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του μέσου ωρίμανσης στη συγκόλληση των στοιχείων του αίματος, θα γίνει ωρίμανση σε φυσιολογικό ορό και στη συνέχεια επαναδιασπορά σε αυτόλογο πλάσμα. Συγκεκριμένα, 120  $\mu\text{L}$  ολικό αίμα τοποθετούνται στο erpendorf. Προστίθεται 1 ml φυσιολογικού ορού NaCl 0,9% και το δείγμα φυγοκεντρίζεται για 2 λεπτά σε συνθήκες τεχνητής βαρύτητας x 1200g. Έπειτα, αφαιρείται το υπερκείμενο, τοποθετείται νέα ποσότητα 1 ml φυσιολογικού ορού NaCl 0,9% και η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές. Έπειτα, προστίθενται 400  $\mu\text{L}$  φυσιολογικού ορού NaCl και αποθηκεύεται.

Το αρχικό φιαλίδιο της αιμοληψίας φυγοκεντρίζεται για 2 λεπτά σε συνθήκες τεχνητής βαρύτητας x 120g. Το υπερκείμενο πλάσμα αποθηκεύεται σε ξεχωριστό erpendorf.

Στο αρχικό erpendorf υπάρχει συνολικό δείγμα 520  $\mu\text{L}$  διεσπαρμένο σε φυσιολογικό ορό NaCl 0,9%, με ερυθροκυτταροκρίτη ~10%. Προστίθενται 50  $\mu\text{L}$  ΜΝΓ, ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 10% σε ΜΝΓ. Το δείγμα αφήνεται να ωριμάσει για 5 λεπτά. Από το δείγμα

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

που βρίσκεται σε φυσιολογικό ορό ετοιμάζεται για παρατήρηση στο ΜΑΔ και το ΜΗΣ ένα μονοστρωματικό υμένιο ενώ στη συνέχεια το υπολειπόμενο δείγμα στο erpendorf φυγοκεντρίζεται για χρόνο 2 λεπτών σε συνθήκες τεχνητής βαρύτητας x 120g.

Στη συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο από το erpendorf, ποσότητας ~350  $\mu\text{L}$  και προστίθεται ποσότητα 350  $\mu\text{L}$  από το πλάσμα που έχει αποθηκευτεί στο δεύτερο erpendorf. Μετά την επαναδιασπορά και την ομογενοποίηση του δείγματος, ετοιμάζεται ένα δεύτερο μονοστρωματικό υμένιο για τη μελέτη στο ΜΑΔ και το ΜΗΣ.

### **3.5 Μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν τη λύση των έμμορφων στοιχείων του αίματος**

#### **3.5.1 Παράμετρος συγκέντρωσης μαγνητικής νανογέλης**

Προκειμένου να εξεταστεί η λύση των κυττάρων συναρτήσει της συγκέντρωσης, ετοιμάζονται δυο διαφορετικά erpendorfs με ποσότητα ολικού αίματος 120  $\mu\text{L}$ . Το φιαλίδιο της αιμοληψίας φυγοκεντρίζεται για 2 λεπτά σε συνθήκες τεχνητής βαρύτητας x 120g. Από το υπερκείμενο πλάσμα που προκύπτει αντλούνται 800  $\mu\text{L}$  και τοποθετούνται από 400  $\mu\text{L}$  σε κάθε erpendorf.

Στο κάθε erpendorf τοποθετείται διαφορετική ποσότητα ΜΝΓ. Συγκεκριμένα στο πρώτο προστίθεται 150  $\mu\text{L}$  ενώ στο δεύτερο προστίθενται 200  $\mu\text{L}$  ΜΝΓ ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 30% και 40% αντίστοιχα. Τα δείγματα αφήνονται υπό ελαφρά ανάδευση, καταγράφεται η μακροσκοπική τους συμπεριφορά, ενώ ετοιμάζονται μονοστρωματικά υμένα για παρατήρηση στο ΜΑΔ και το ΜΗΣ στις χρονικές στιγμές  $t = 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120$  λεπτά, προκειμένου να μελετηθεί η λύση.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

### 3.5.1 Παράμετρος μέσου ωρίμανσης και επαναδιασποράς

Προκειμένου να εξεταστεί η λύση των κυττάρων συναρτήσει του μέσου ωρίμανσης και επαναδιασποράς, τοποθετείται σε δύο erpendorf ποσότητα ολικού αίματος 120  $\mu$ L.

Προστίθεται 1 ml φυσιολογικού ορού NaCl 0,9% στο καθένα και τα δείγματα φυγοκεντρίζεται για 2 λεπτά σε συνθήκες τεχνητής βαρύτητας  $\times 1200$  g. Έπειτα, αφαιρείται το υπερκείμενο, τοποθετείται νέα ποσότητα 1 ml φυσιολογικού ορού NaCl 0,9% και η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές. Έπειτα, προστίθενται 400  $\mu$ L φυσιολογικού ορού NaCl στο κάθε δείγμα και αποθηκεύεται.

Το φιαλίδιο της αιμοληψίας φυγοκεντρίζεται για 2 λεπτά σε συνθήκες τεχνητής βαρύτητας  $\times 120$  g. Από το υπερκείμενο πλάσμα που προκύπτει αντλούνται και αποθηκεύονται 800  $\mu$ L σε νέο erpendorf.

Στα αρχικά erpendorf που περιέχουν το δείγμα διεσπαρμένο σε φυσιολογικό ορό NaCl 0,9%, τοποθετείται ποσότητα ΜΝΓ 150  $\mu$ L και 200  $\mu$ L προκειμένου να επιτευχθεί συγκέντρωση 30% και 40% αντίστοιχα. Από το κάθε δείγμα που βρίσκεται σε φυσιολογικό ορό ετοιμάζεται για παρατήρηση στο ΜΑΔ και το ΜΗΣ ένα μονοστρωματικό υμένιο ενώ στη συνέχεια τα υπολειπόμενα δείγματα στα erpendorf φυγοκεντρίζονται για χρόνο 2 λεπτών σε συνθήκες τεχνητής βαρύτητας  $\times 120$ g.

Αφαιρείται το υπερκείμενο, ποσότητας περίπου 300  $\mu$ L, και στο κάθε erpendorf τοποθετείται ποσότητα πλάσματος ίση με 300  $\mu$ L. Τα δύο δείγματα ομογενοποιούνται και αφήνονται υπό ελαφρά ανάδευση. Καταγράφεται η μακροσκοπική τους συμπεριφορά, ενώ ετοιμάζονται μονοστρωματικά υμένια για παρατήρηση στο ΜΑΔ και το ΜΗΣ στις χρονικές στιγμές  $t = 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120$  λεπτά, προκειμένου να μελετηθεί η λύση.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Αποτελέσματα και συζήτηση

Στο κεφάλαιο που ακολουθεί θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα των πειραμάτων που εκπονήθηκαν κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής εργασίας. Το πρώτο υποκεφάλαιο αφορά τα αποτελέσματα από τη μελέτη που έγινε για τους παράγοντες που επιδρούν στη μορφολογία και στις ιδιότητες συγκόλλησης των σωματιδίων της ΜΝΓ. Στα επόμενα υποκεφάλαια θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης της ΜΝΓ με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος για τις διαφορετικές συγκέντρωσης και για μεταβαλλόμενο χρόνο ωρίμανσης.

### 4.1 Παρουσίαση αποτελεσμάτων για τις παραμέτρους που επηρεάζουν την συγκόλληση και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των σωματιδίων της μαγνητικής νανογέλης

Είναι ήδη γνωστό ότι τα σωματίδια της ΜΝΓ παρουσιάζουν μεταβολή των χαρακτηριστικών τους όταν εκτίθενται σε εξωτερικά ερεθίσματα όπως η θερμοκρασία και το pH. Στα πλαίσια της μεταπτυχιακής εργασίας μελετήθηκε η επίδραση της εφαρμογής ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και η επεξεργασία με υπερήχηση. Πιο κάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα πριν και μετά την μεταβολή του κάθε εξωτερικού παράγοντα στη μορφολογία της ΜΝΓ. Σε όλες τις περιπτώσεις η θερμοκρασία της ΜΝΓ ήταν στους 20° C, εκτός από την περίπτωση που η θερμοκρασία ήταν στους 60°C και η οποία αναφέρεται ξεχωριστά. Το pH το μέσου διασποράς της ΜΝΓ είναι ίσο με 6.

#### 4.1.1 Μορφολογία των σωματιδίων της μαγνητικής νανογέλης χωρίς καμία κατεργασία

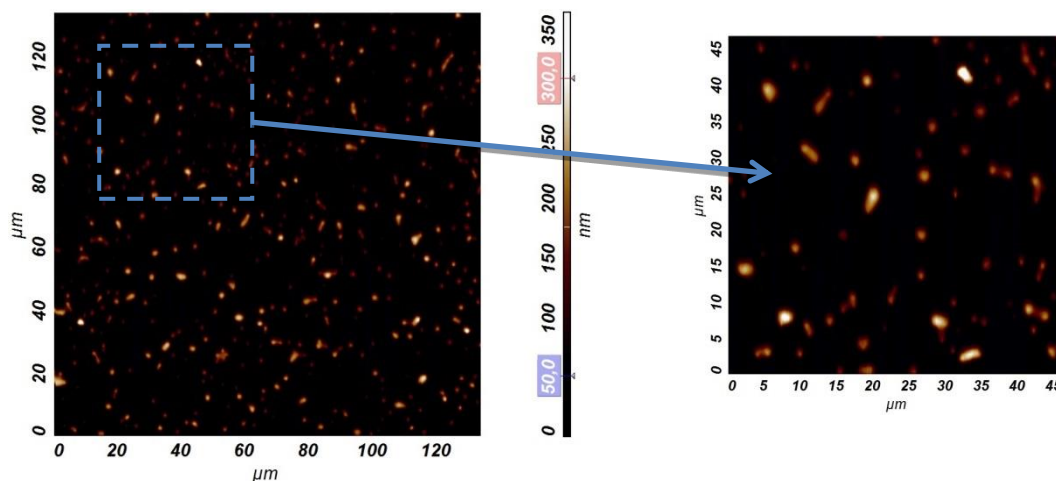
Αρχικά θα παρουσιαστεί η μορφολογία των σωματιδίων της ΜΝΓ χωρίς την επίδραση του μαγνητικού πεδίου ή της υπερήχησης. Αποτελεί το δείγμα αναφοράς και χρησιμοποιείται για να υπολογιστούν οι

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

μεταβολές που επέρχονται με την επίδραση των διαφορετικών παραγόντων.

Το λογισμικό που συνοδεύει το ΜΑΔ, η εφαρμογή NOVA, δίνει τη δυνατότητα στο χρήστη να λάβει ακριβείς τιμές για διάφορες παραμέτρους του δείγματος, όπως τις διαστάσεις των σωματιδίων. Υπάρχει επίσης η δυνατότητα να απεικονίσει το προφίλ κατά μήκος μιας γραμμής σάρωσης, όπου είναι εύκολο να προσδιοριστεί το μήκος και το ύψος των αντικειμένων που σαρώνονται κατά μήκος αυτής της γραμμής. Τα αποτελέσματα της μορφολογίας των σωματιδίων της ΜΝΓ παρουσιάζονται στην Εικόνα 29 και την Εικόνα 30, για τις οποίες χρησιμοποιήθηκε η σάρωση διαφορετικών περιοχών του δείγματος με το ΜΑΔ.

Για την ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε η τιμή του ύψους, μιας και αυτή λαμβάνεται από το ΜΑΔ με ακρίβεια της τάξης των 2 nm. Τα σωματίδια της ΜΝΓ έχουν σχήμα σχεδόν σφαιρικό, οπότε η τιμή του ύψους αντιστοιχεί στη διάμετρο του σωματιδίου. Από την ανάλυση μέσω του λογισμικού που ακολούθησε, προέκυψε ότι η μέση τιμή της διαμέτρου είναι  $130,29 \pm 25,15$  nm.



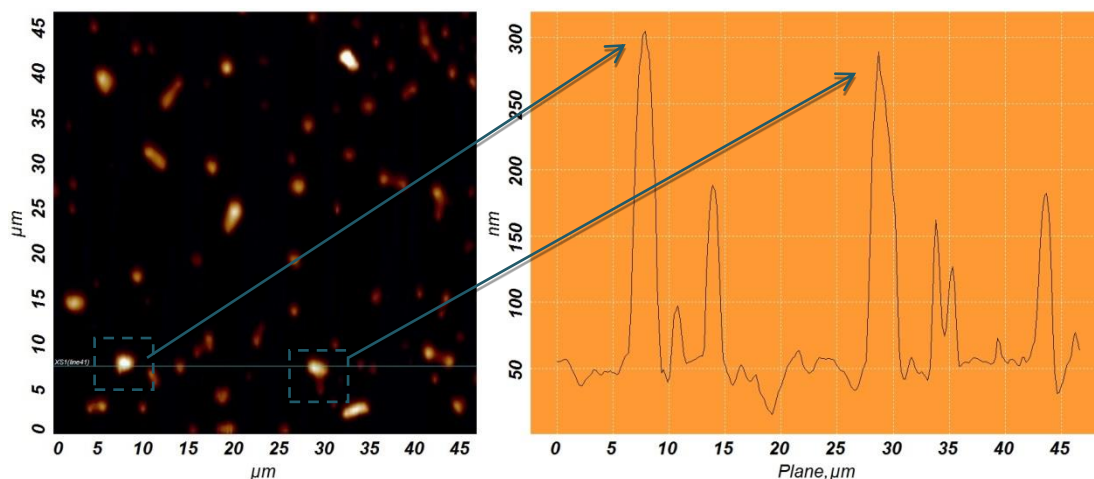
Εικόνα 29: Εικόνες από το ΜΑΔ, στις οποίες απεικονίζονται δυο περιοχές με τα σωματίδια της ΜΝΓ, πριν υποβληθεί σε οποιαδήποτε κατεργασία. Αριστερά φαίνεται μια περιοχή  $140 \times 140 \mu\text{m}^2$ , ενώ στα δεξιά μια μικρότερη περιοχή διαστάσεων  $45 \times 45 \mu\text{m}^2$

Η κρίσιμη θερμοκρασία μετάβασης για τη ΜΝΓ είναι περίπου  $37^\circ\text{C}$ . Τα σωματίδια που διακρίνονται στην Εικόνα 29 βρίσκονται στους



## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

20°C, συνεπώς κάτω από την κρίσιμη θερμοκρασία μετάβασης. Από την μέση τιμή της διαμέτρου φαίνεται ότι στο μέσο διασποράς όπου βρίσκεται αποθηκευμένη η ΜΝΓ είναι πιθανός ο σχηματισμός συσσωματωμάτων, λόγω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Το pH του μέσου διασποράς είναι ίσο με 6 και έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη φορτίου τόσο στις πολυμερικές αλυσίδες, όσο και στα ΝΣ οξειδίου του σιδήρου.



Εικόνα 30: Στην αριστερή εικόνα, φαίνεται μια περιοχή σάρωσης 45 x 45 μm<sup>2</sup>, όπως λήφθηκε από το ΜΑΔ. Το προφίλ κατά μήκος της γραμμής φαίνεται στα δεξιά, όπου διακρίνονται τα συσσωματώματα της ΜΝΓ που έχουν σχηματιστεί. Με τα βελάκια δείχνεται το ύψος για τα σωματίδια που έχουν σημειωθεί με το μπλε τετράγωνο στην εικόνα του ΜΑΔ

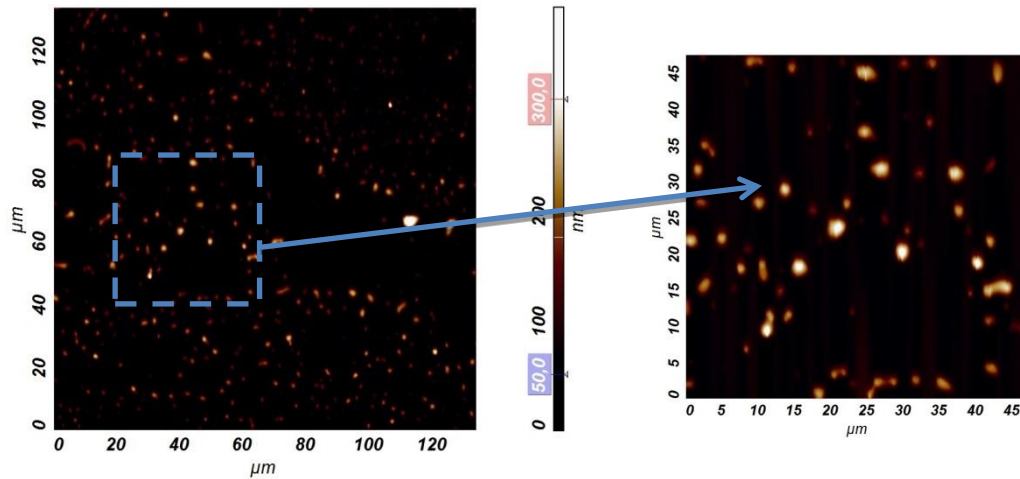
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 30, παρατηρούνται αντικείμενα με διαστάσεις που φτάνουν σε ύψος τα 300 nm ενώ το μήκος τους πλησιάζει τα 2 μm. Τα συγκεκριμένα ευρήματα είναι συσσωματώματα τα οποία έχουν αναπτυχθεί κατά την αποθήκευση της ΜΝΓ.

### 4.1.2 Μορφολογία των σωματιδίων της μαγνητικής νανογέλης μετά την εφαρμογή μαγνητικού πεδίου

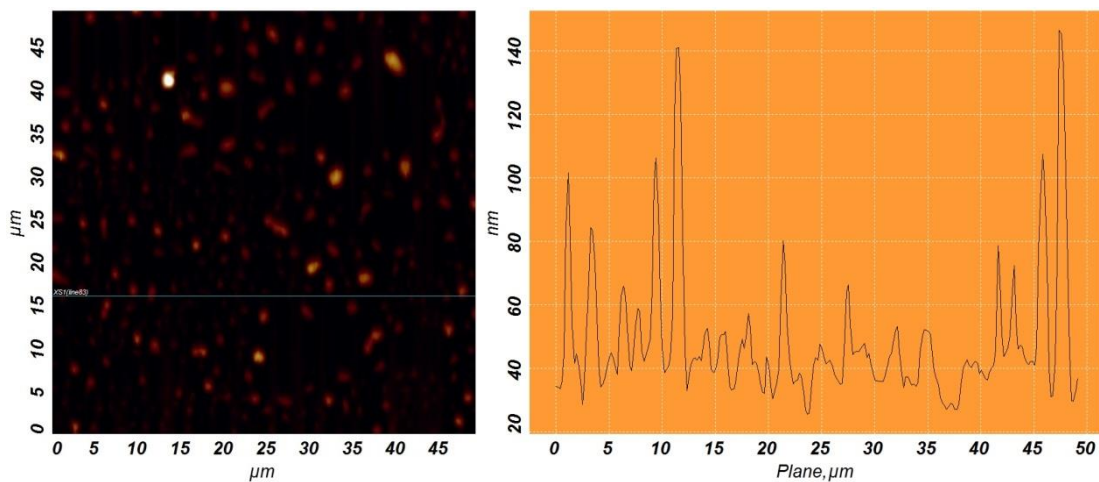
Σε αυτό το σημείο παρουσιάζεται η πρώτη από τις δύο παραμέτρους, των οποίων μελετήθηκε η επίδραση στη μορφολογία των σωματιδίων της ΜΝΓ. Σε ένα erpendorf που περιέχει ποσότητα ΜΝΓ σε θερμοκρασία 20°C,εφαρμόστηκε με τη βοήθεια ενός μόνιμου μαγνήτη ένα ανομοιογενές πεδίο, μέγιστης έντασης 3 kOe. Το χρονικό διάστημα

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

της εφαρμογής ήταν 2 λεπτά. Με τις εικόνες που λήφθηκαν από το ΜΑΔ, έγινε ανάλυση με τον ίδιο τρόπο μέσω της εφαρμογής NOVA για να προσδιοριστεί η μέση διάμετρος των σωματιδίων της ΜΝΓ.



Εικόνα 31: Εικόνα από το ΜΑΔ της μορφολογίας των σωματιδίων της ΜΝΓ μετά την εφαρμογή ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου 3 kOe. Στη εικόνα δεξιά εμφανίζεται μια περιοχή 140 x 140  $\mu\text{m}^2$ , ενώ αριστερά μια μικρότερη περιοχή διαστάσεων 45 x 45  $\mu\text{m}^2$



Εικόνα 32: Στην εικόνα φαίνεται μια περιοχή σάρωσης 45 x 45  $\mu\text{m}^2$  με το ΜΑΔ (α) ενώ στο προφίλ μιας γραμμής σάρωσης (β), φαίνεται ότι εκτός από τα μεγάλα σωματίδια υπάρχουν και άλλα μικρότερα, τα οποία δεν είναι ευδιάκριτα στην εικόνα (α)

Από την ανάλυση μέσω του λογισμικού του ΜΑΔ, προέκυψε ότι η μέση τιμή της διαμέτρου είναι  $114,94 \pm 20,38\text{nm}$ . Σε σχέση με το δείγμα που δεν έχει εφαρμοστεί το μαγνητικό πεδίο παρατηρείται μια μείωση στη μέση τιμή της διαμέτρου περίπου 11,8%.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

Η παρατηρούμενη μεταβολή, είναι μια ένδειξη ότι τα σωματίδια της ΜΝΓ αλληλεπιδρούν με το μαγνητικό πεδίο. Φαίνεται ότι υπό την επίδραση του μαγνητικού πεδίου, κάποια από τα συσσωματώματα της ΜΝΓ διασπώνται σε μικρότερα, ενώ πιθανά κάποια από τα μαγνητικά ΝΣ οξειδίου του σιδήρου αποσυνδέονται από τα σωματίδια της ΜΝΓ γι' αυτό και η μέση τιμή της διαμέτρου μειώνεται.

Η χρωματική κλίμακα που χρησιμοποιεί το ΜΑΔ και έχει επιλεγεί για την απεικόνιση της περιοχής σάρωσης, δεν επιτρέπει την εύκολη διάκριση των σωματιδίων που βρίσκονται στον ενδιάμεσο χώρο της Εικόνα 31. Για το λόγο αυτό, παρουσιάζεται στην Εικόνα 32 μια περιοχή στην οποία είναι ευδιάκριτα αρκετά σωματίδια μικρότερου μεγέθους. Για να γίνει ευκολότερα αντιληπτό, παρουσιάζεται στην εικόνα Εικόνα 32 (β) το προφίλ μιας γραμμής σάρωσης στην οποία διακρίνονται πολλά μικρότερα αντικείμενα από όσα διακρίνονται στην Εικόνα 32 (α).

### 4.1.3 Μορφολογία των σωματιδίων της μαγνητικής νανογέλης μετά την εφαρμογή της υπερήχησης

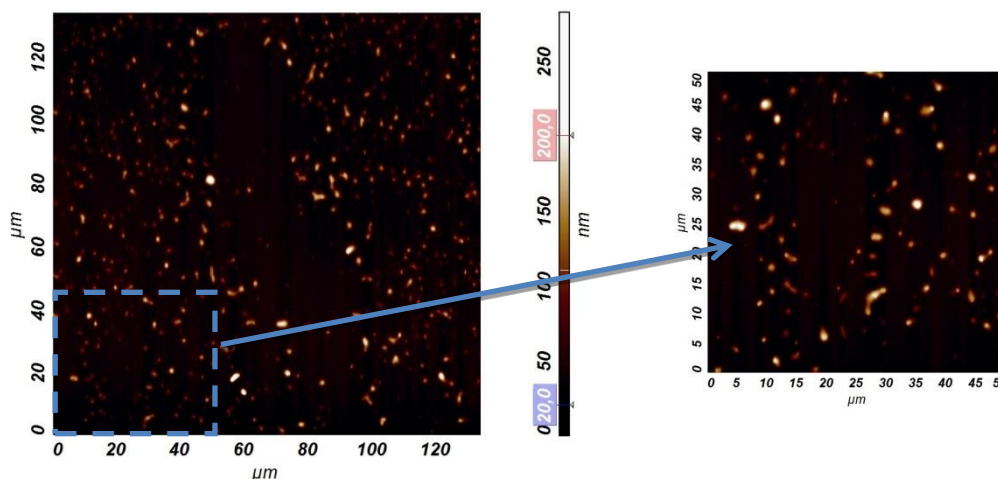
Στο σημείο αυτό παρουσιάζεται η επίδραση της δεύτερης παραμέτρου που εξετάστηκε, της υπερήχησης της ΜΝΓ. Με δεδομένο από το προηγούμενο πείραμα στο οποίο καταγράφηκε ότι η ΜΝΓ σχηματίζει συσσωματώματα λόγω της αποθήκευσης, η παράμετρος της υπερήχησης εκτιμήθηκε ότι θα επιδράσει στη μορφολογία των σωματιδίων της ΜΝΓ.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται για την παράμετρο της υπερήχησης αφορούν δύο διαφορετικές θερμοκρασίες. Στην πρώτη περίπτωση η ΜΝΓ βρίσκεται σε θερμοκρασία 20° C ενώ στη δεύτερη σε θερμοκρασία 60° C. Οι διαφορετικές θερμοκρασίες επιλέχθηκαν προκειμένου να παρουσιαστούν οι διαφορές στην μορφολογία των σωματιδίων της ΜΝΓ θερμοκρασίες μεγαλύτερες και μικρότερες της κρίσιμης θερμοκρασίας μετάβασης.

Μετά την επεξεργασία των εικόνων μέσω του λογισμικού NOVA για τα σωματίδια της ΜΝΓ που υπέστησαν υπερήχηση, προκύπτει ότι η μέση

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

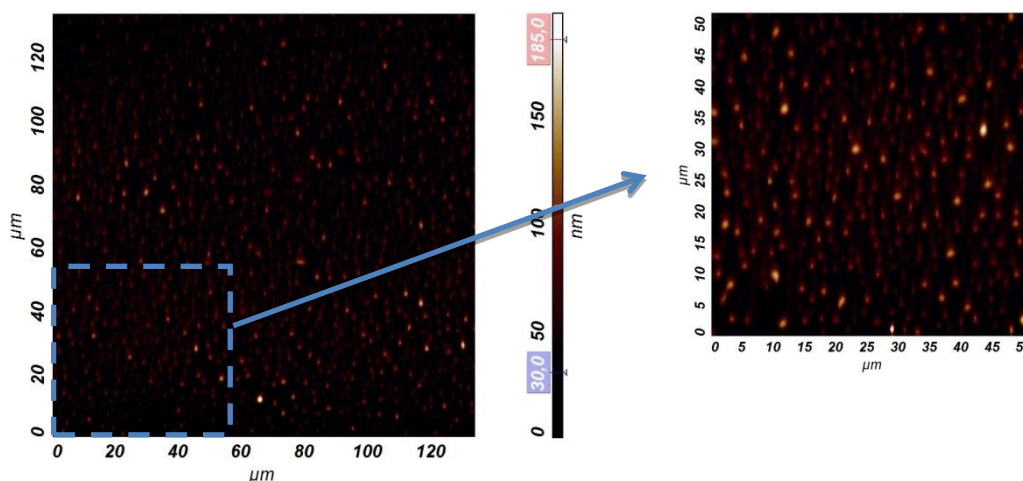
τιμή της διαμέτρου στη θερμοκρασία των 20° C είναι  $115,84 \pm 14,57\text{nm}$ . Το αξιοσημείωτο στοιχείο σε αυτή την περίπτωση είναι ότι η μείωση της διαμέτρου των σωματιδίων της ΜΝΓ περίπου ίδια σε σχέση με το δείγμα που ήταν στους 20°C και έχει αλληλεπιδράσει με το μαγνητικό πεδίο. Η ποσοστιαία μείωση του μεγέθους σε σχέση με το αρχικό δείγμα, στο οποίο δεν έχει επιδράσει καμία εξωτερική παράμετρος είναι 11,8%.



Εικόνα 33: Εικόνα από το ΜΑΔ για μια περιοχή  $140 \times 140 \mu\text{m}^2$ , η οποία λήφθηκε μετά την υπερήχηση της ΜΝΓ στους 20°C. Στη δεξιά μεριά, απεικονίζεται μια μικρότερη περιοχή της εικόνας. Διακρίνονται και κάποια πολύ μικρότερα σωματίδια που υπάρχουν στις περιοχές μεταξύ των μεγάλων συσσωματωμάτων που αποτελούν το δείγμα

Η διαδικασία της υπερήχησης δείχνει να ευνόησε το διαχωρισμό των συσσωματωμάτων αλλά και στην αποκόλληση μέρους των ΝΣ οξειδίου του σιδήρου από τα σωματίδια της ΜΝΓ. Για να γίνει καλύτερα η σύγκριση, στις επόμενες εικόνες παρουσιάζεται η μορφολογία των σωματιδίων της ΜΝΓ όταν αυτά βρίσκονται σε θερμοκρασία 60° C, αφού έχουν υποστεί υπερήχηση. Επειδή στη θερμοκρασία αυτή η ΜΝΓ βρίσκεται πάνω από την κρίσιμη θερμοκρασία μετάβασης, τα σωματίδια έχουν συρρικνωθεί και αναμένεται μια μείωση του μεγέθους τους.

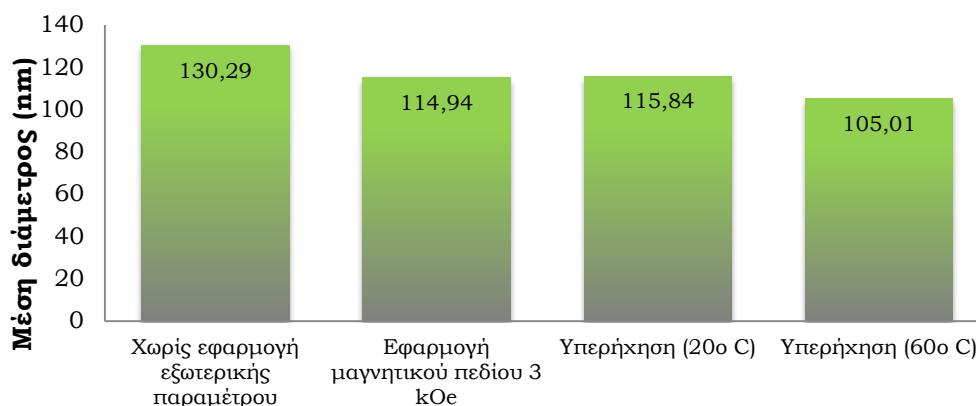
## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 34: Εικόνες από το ΜΑΔ, για τα σωματίδια της ΜΝΓ μετά από την υπερήχηση και ενώ βρίσκονται σε θερμοκρασία 60°C. Η επιφανειακή κάλυψη είναι πολύ μεγαλύτερη, ενώ οι διαστάσεις των σωματιδίων της ΜΝΓ είναι σημαντικά μικρότερες σε σχέση με τα προηγούμενα δείγματα, μιας και η ΜΝΓ βρίσκεται πάνω από την κρίσιμη θερμοκρασία μετάβασης

Από την ανάλυση που ακολούθησε μέσω του λογισμικού NOVA, προέκυψε ότι η μέση τιμή της διαμέτρου των σωματιδίων της ΜΝΓ είναι  $105,01 \pm 12,64$  nm. Σε σχέση με το αρχικό δείγμα που βρίσκονταν στους 20° C παρατηρείται μια μείωση της τιμής της διαμέτρου 19,4 %, ενώ η μεταβολή για θερμοκρασίες πάνω (60°C) και κάτω (20°C) από την κρίσιμη θερμοκρασία είναι 9%. Συνοπτικά οι τιμές για τη διάμετρο των σωματιδίων της ΜΝΓ, εμφανίζονται στην πιο κάτω Εικόνα 35.

### Μέση τιμή διαμέτρου



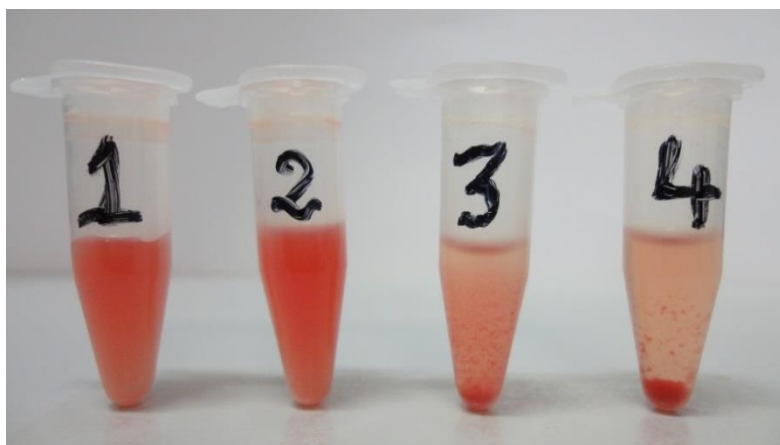
Εικόνα 35: Στο γράφημα απεικονίζεται συνοπτικά η μέση τιμή της διαμέτρου των σωματιδίων της ΜΝΓ για τις διαφορετικές εξωτερικές παραμέτρους

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

### 4.2 Αποτελέσματα για τις διαφορετικές τιμές συγκέντρωσης της μαγνητικής νανογέλης και επίδραση της στη λύση των ερυθροκυττάρων

Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων από τη μελέτη της σύζευξης της ΜΝΓ με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος, παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης της ΜΝΓ στη λύση των ΕΚ, για χρόνο ωρίμανσης ίσο με 5 λεπτά. Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν 10%, 20%, 30% και 40% σε ΜΝΓ. Στα δείγματα αυτά, το πλάσμα είχε υποκατασταθεί από φυσιολογικό ορό. Με τη διαδικασία της υποκατάστασης, απομακρύνεται η μεγαλύτερη ποσότητα από τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Έτσι, αυτό που τελικά μελετάται, είναι η επίδραση που έχει η συγκέντρωση της ΜΝΓ στη λύση μόνο των ΕΚ.

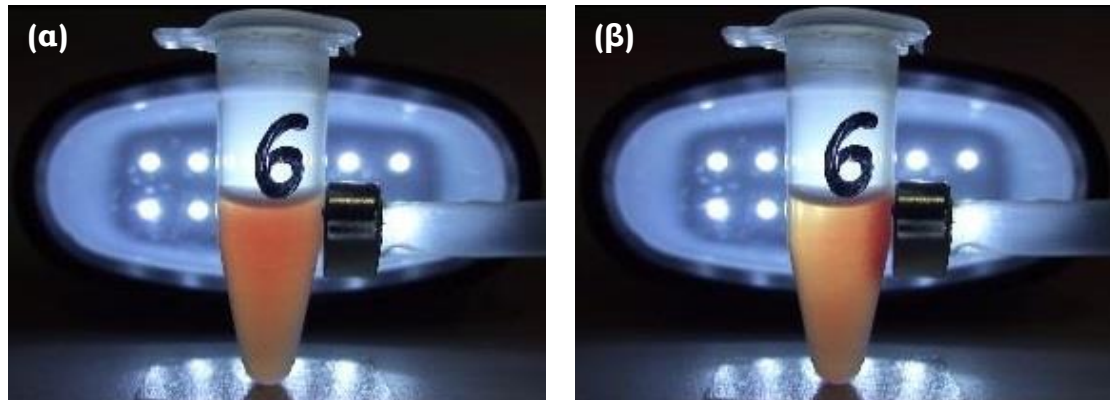
Στην Εικόνα 36 παρουσιάζονται τα δείγματα μετά από χρονικό διάστημα 30 λεπτών. Τα δείγματα με συγκέντρωση 30% και 40% σε ΜΝΓ φαίνονται να έχουν υποστεί ολική λύση των ΕΚ τους, οπότε δεν κρίθηκε σκόπιμο να γίνει περαιτέρω μελέτη των συγκεκριμένων συγκεντρώσεων.



Εικόνα 36: Στην εικόνα παρουσιάζονται τα μακροσκοπικά αποτελέσματα της επίδρασης της ΜΝΓ στο αίμα. Τα eppendorf που απεικονίζονται είναι περιεκτικότητας 10% (1), 20% (2), 30% (3) και 40% (4) σε ΜΝΓ. Τα δείγματα περιεκτικότητας 30% και 40% φαίνεται να έχουν υποστεί ολική λύση των ΕΚ, οπότε δε μελετήθηκαν περαιτέρω

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

Τα δείγματα που περιείχαν ΜΝΓ σε συγκέντρωση 10%, 20% καθώς και ένα νέο δείγμα συγκέντρωσης 25% σε ΜΝΓ υποβλήθηκαν σε ένα πείραμα, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπάρχει σύζευξη της ΜΝΓ με τα ΕΚ. Το πείραμα περιλάμβανε τη χρήση ενός μόνιμου μαγνήτη για να διαπιστωθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των συζευγμένων ΕΚ με το μαγνητικό πεδίο.



Εικόνα 37: Δείγμα με περιεκτικότητα 25% σε ΜΝΓ. Στην αριστερή εικόνα (α) φαίνεται αρχικά το δείγμα, ενώ στη δεξιά (β) φαίνεται το δείγμα μετά από χρόνο 1 λεπτό. Τα συζευγμένα ΕΚ πλησιάζουν το μαγνήτη λόγω της ελκτικής δύναμης που δέχεται το παραμαγνητικό οξείδιο του σιδήρου από το μαγνητικό πεδίο

Το δείγμα των ΕΚ σε φυσιολογικό ορό ωρίμασε για χρόνο 5 λεπτών με τη ΜΝΓ. Αρχικά τα ΕΚ είναι διεσπαρμένα σε φυσιολογικό ορό, ενώ στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ένας μόνιμος μαγνήτης ο οποίος τοποθετήθηκε δίπλα στο erpendorf. Μετά από χρονικό διάστημα 1 λεπτού, τα ΕΚ έχουν συγκεντρωθεί γύρω από το μαγνήτη, λόγω της ελκτικής δύναμης που ασκεί ο μαγνήτης στα σωματίδια οξειδίου του σιδήρου ( $Fe_3O_4$ ) που βρίσκεται γύρω και μέσα στα σωματίδια της ΜΝΓ και έχει συζευχθεί με τα ΕΚ. Το πιο πάνω πείραμα αποτελεί μια πρώτη σαφή ένδειξη ότι υπάρχει σύζευξη μεταξύ των σωματιδίων που αποτελούν τη ΜΝΓ με τα ΕΚ.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

### 4.3 Μορφολογία των κυττάρων του αίματος μετά την ωρίμανση με τη μαγνητική νανογέλη – Αποτελέσματα από το ΜΑΔ και το ΜΗΣ

Με βάση τα αρχικά πειράματα, τα οποία έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 20% σε ΜΝΓ καταστρέφουν τα ΕΚ, ακολούθησε λεπτομερέστερη μελέτη για την παρατήρηση της μορφολογίας των έμμορφων στοιχείων του αίματος με συγκεντρώσεις σε ΜΝΓ 10% και 20%. Ο χρόνος ωρίμανσης σε αυτά τα πειράματα ήταν 5 λεπτά και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται μέσα από εικόνες που λήφθηκαν με τη χρήση του ΜΑΔ και του ΜΗΣ. Τα αποτελέσματα κατηγοριοποιούνται ανά ομάδα κυττάρων (ΕΚ, ΛΚ και ΑΠ) και ανά μέσο διασποράς (πλάσμα και φυσιολογικός ορός).

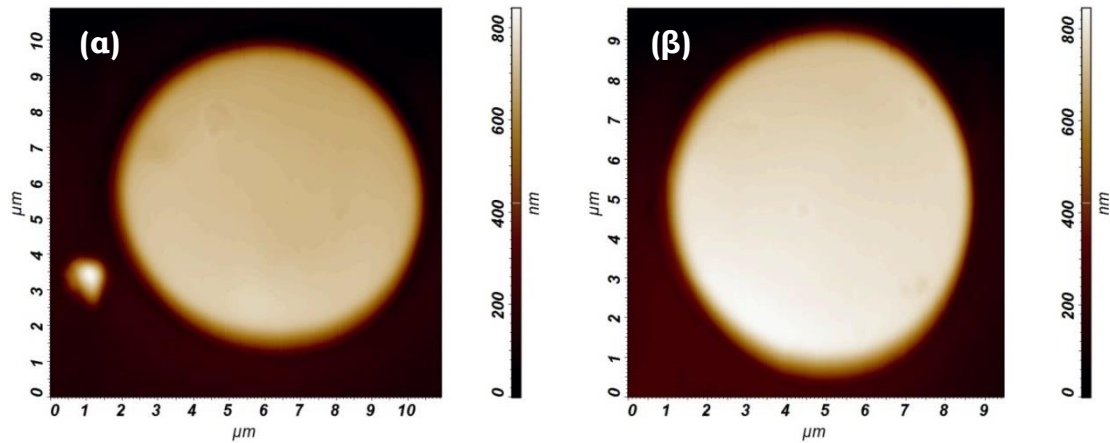
#### 4.3.1 Ερυθροκύτταρα

Στο σημείο αυτό, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τη μορφολογία των ΕΚ μετά την ωρίμανσή τους με τη ΜΝΓ σε πλάσμα. Τα αποτελέσματα έχουν καταγραφεί τόσο με το ΜΑΔ όσο και το ΜΗΣ. Τα δείγματα που παρουσιάζονται έχουν ωριμάσει για 5 λεπτά με τη ΜΝΓ, ενώ η συγκέντρωση σε ΜΝΓ είναι 10% και 20%.

Στις εικόνες που έχουν καταγραφεί από το ΜΑΔ, η πλειοψηφία των ΕΚ δεν φαίνεται να έχουν προσδεθεί σωματίδια στην επιφάνειά τους. Αυτό οφείλεται στο ότι το δείγμα περιέχει και αυτόλογο πλάσμα το οποίο αλληλεπιδρά με τη ΜΝΓ και δεν επιτρέπει την καταγραφή του από το ΜΑΔ.

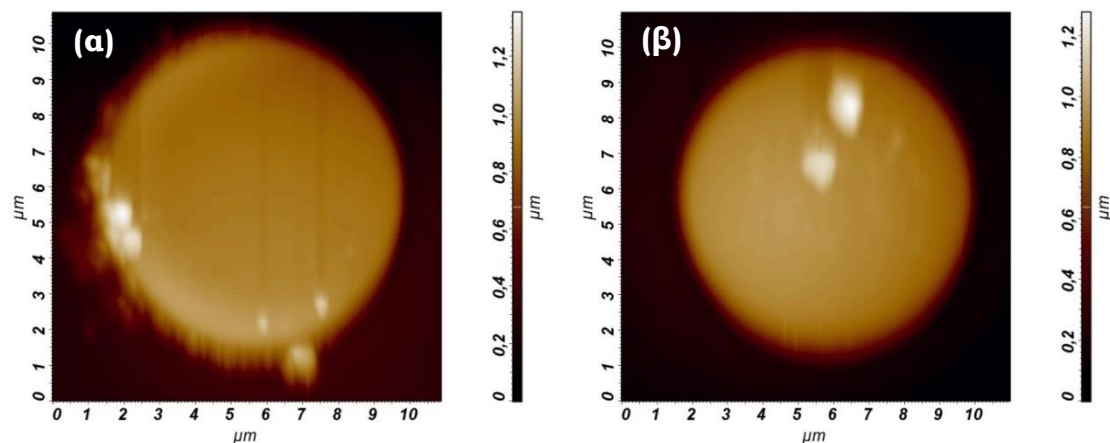


## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 38: Εικόνες από ΕΚ που έχουν ωριμάσει με τη ΜΝΓ για χρόνο 5 λεπτών σε πλάσμα. Τα κύτταρα που απεικονίζονται στην εικόνα, εμφανίζουν την τυπική δισκοειδή μορφολογία που παρουσιάζει ένα ΕΚ

Υπάρχουν όμως και αρκετά ΕΚ στα οποία φαίνεται να υπάρχουν πάνω στην επιφάνεια της μεμβράνης τους, είτε περιμετρικά κάποια αντικείμενα, τα οποία ωστόσο δεν μπορούμε να τα ταυτοποιήσουμε ως σωματίδια της ΜΝΓ χωρίς να έχουμε άλλες ενδείξεις. Πιθανόν να είναι κάποιο βιολογικό υλικό.



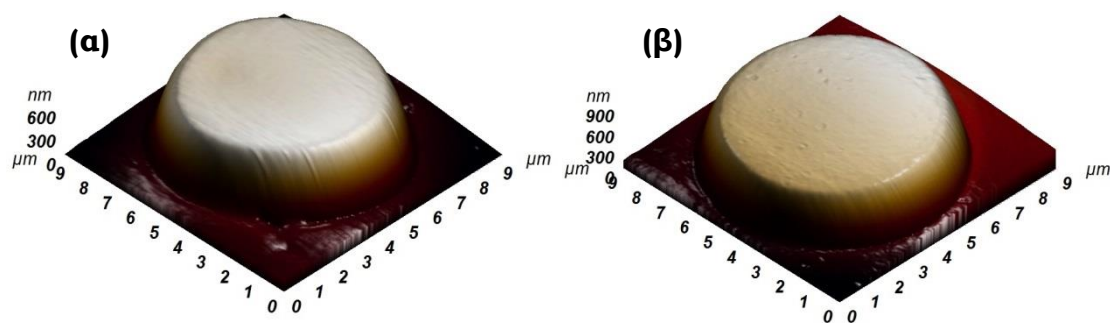
Εικόνα 39: Εικόνες που λήφθηκαν από το ΜΑΔ και απεικονίζουν τα ΕΚ σε αυτόλογο πλάσμα που έχουν ωριμάσει με τη ΜΝΓ. Κάποια σωματίδια έχουν καταγραφεί είτε στην επιφάνεια είτε περιμετρικά των ΕΚ

Η τυπική δισκοειδής μορφή των ΕΚ, δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την ωρίμανση με τη ΜΝΓ. Τόσο το σχήμα τους, όσο και η μορφολογία της μεμβράνης τους μετά από την ωρίμανση, δεν παρουσιάζουν αλλοιώσεις συγκριτικά με ένα ΕΚ που δεν έχει ωριμάσει

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

με τη ΜΝΓ. Προκειμένου να γίνει σύγκριση, μια τυπική μορφολογία της μεμβράνης των ΕΚ παρουσιάζεται σε τρισδιάστατη απεικόνιση στην Εικόνα 40.

Η μεμβράνη των ΕΚ είναι σχεδόν επίπεδη, ενώ κάποια από τα ΕΚ εμφανίζουν μικρές ή μεγαλύτερες οπές. Οι οπές αυτές παρατηρούνται στα ΕΚ τόσο πριν όσο και μετά την ωρίμανσή τους με τη ΜΝΓ. Η αύξηση του αριθμού των οπών ή των διαστάσεών τους είναι ένας δείκτης για τη βιοσυμβατότητα μεταξύ της ΜΝΓ και των ΕΚ. Στην συντριπτική πλειοψηφία των ΕΚ που μελετήθηκαν, τα χαρακτηριστικά και ο αριθμός των οπών δεν παρουσιάζει μεταβολή πριν και μετά την ωρίμανση με τη ΜΝΓ για χρονικό διάστημα 5 λεπτών.



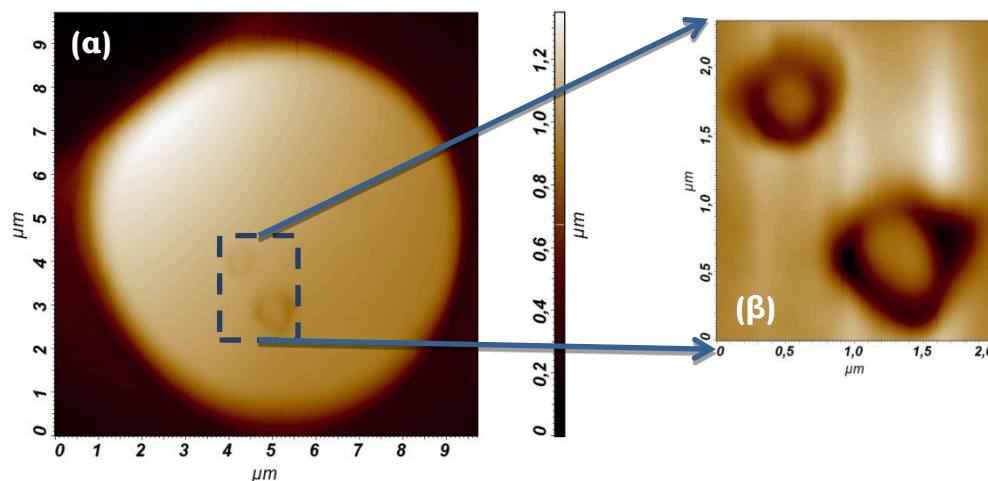
Εικόνα 40: Τυπικές μορφολογίες ΕΚ σε τρισδιάστατη απεικόνιση, τα οποία δεν έχουν αλληλεπιδράσει με τη ΜΝΓ. Και τα δύο ΕΚ (α) και (β) ανήκουν σε υγιείς δότες

Στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται πιο πάνω τα αντικείμενα που παρατηρούνται, βρίσκονται είτε πάνω στην επιφάνεια του ΕΚ, είτε περιμετρικά της μεμβράνης τους. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις ΕΚ που έχουν καταγραφεί στις οποίες φαίνεται να έχουν προσροφηθεί στην μεμβράνη κάποια αντικείμενα, για τα οποία δε μπορεί να γίνει ταυτοποίηση μόνο μέσω του ΜΑΔ. Μια ενδεικτική περίπτωση ενός ΕΚ που έχει καταγραφεί παρουσιάζεται πιο κάτω στην Εικόνα 41.

Το ΕΚ που παρουσιάζεται στην Εικόνα 41, δείχνει να έχει πάνω στη μεμβράνη του δύο αντικείμενα. Επειδή το συγκεκριμένο ΕΚ έχει ωριμάσει με τη ΜΝΓ, θα μπορούσε το συγκεκριμένο σιγμιότυπο να δημιουργεί την εντύπωση ότι απεικονίζει την ενδοκυττάρωση ή

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

εξωκυττάρωση σωματιδίων της ΜΝΓ. Ωστόσο, το πιθανότερο είναι τα αντικείμενα αυτά να αποτελούν βιολογικό υλικό και για το συγκεκριμένο θέμα θα επανέλθουμε αργότερα στη συζήτηση.

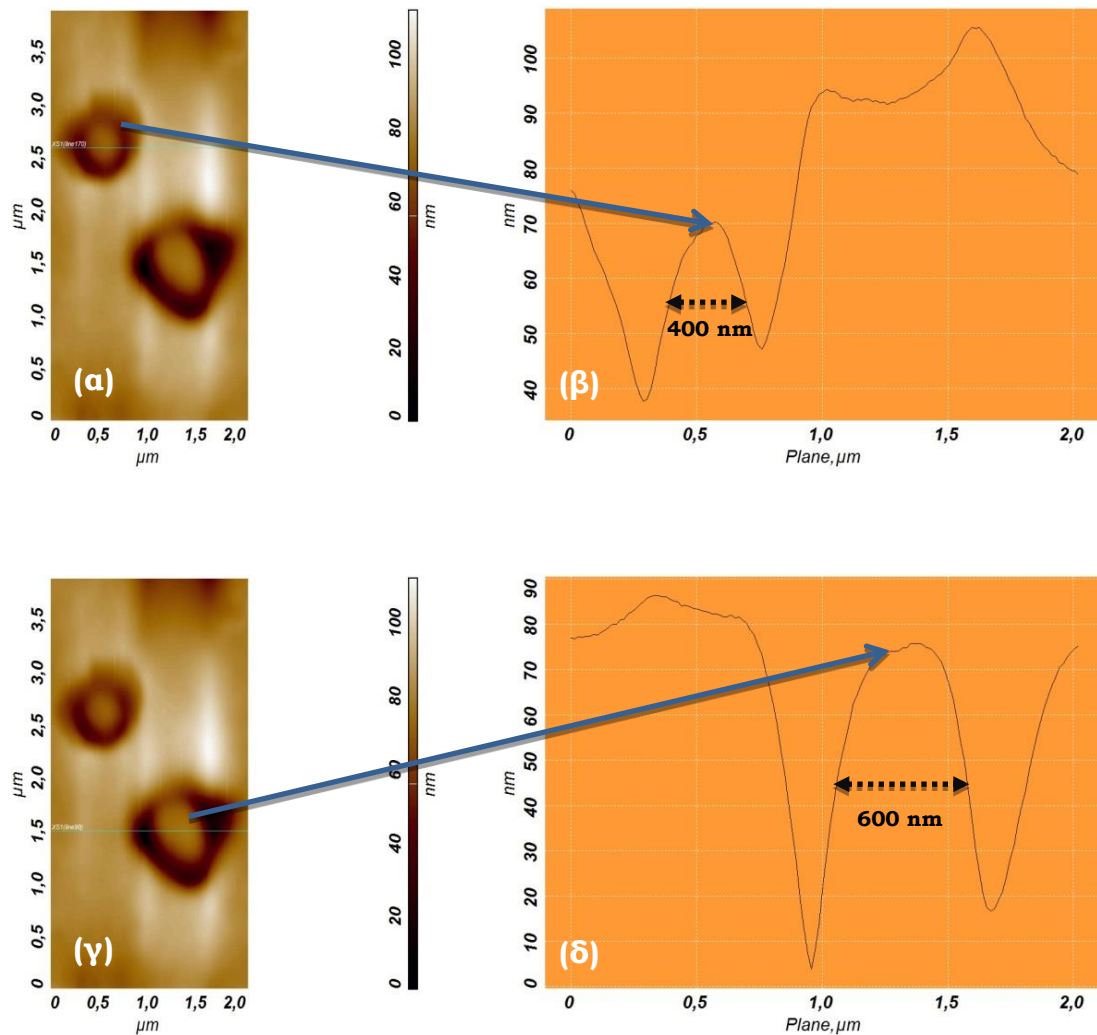


Εικόνα 41: Ένα ΕΚ, στη μεμβράνη του οποίου διακρίνονται δύο αντικείμενα, πιθανότατα βιολογικό υλικό. Αριστερά (α) το ΕΚ και δεξιά (β) μια εικόνα από σάρωση της επιφάνειας του ΕΚ που δείχνει από πιο κοντά τα σωματίδια που βρίσκονται πάνω στη μεμβράνη

Χρειάζεται να διευκρινιστεί ότι τα αντικείμενα αυτά θα πρέπει να ταυτοποιηθούν μέσω της στοιχειακής ανάλυσης από το ΜΗΣ, για το αν πρόκειται για σωματίδια της ΜΝΓ. Παρ' όλα αυτά, κρίθηκε σκόπιμο να γίνει ένας προσδιορισμός των διαστάσεών τους, προκειμένου να αποφευχθούν συγκύσεις σχετικά με άλλα ευρήματα παραπλήσιων διαστάσεων.

Για τον προσδιορισμό των διαστάσεων επιλέχθηκε μια γραμμή σάρωσης κατά μήκος της οριζόντιας διεύθυνσης για κάθε αντικείμενο που παρουσιάζεται, ώστε να μελετηθεί το προφίλ της. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 42, από το προφίλ κατά μήκος της γραμμής σάρωσης τα δύο σωματίδια που εμφανίζονται έχουν ύψος 70-80 nm και μήκος μεταξύ 400 – 600 nm. Χρειάζεται στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι το ύψος είναι μια εκτίμηση, μιας και το ΜΑΔ λόγω της γεωμετρίας της ακίδας δεν είναι δυνατό να διεισδύσει στη μεμβράνη, ώστε να δώσει την πραγματική τιμή του ύψους.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

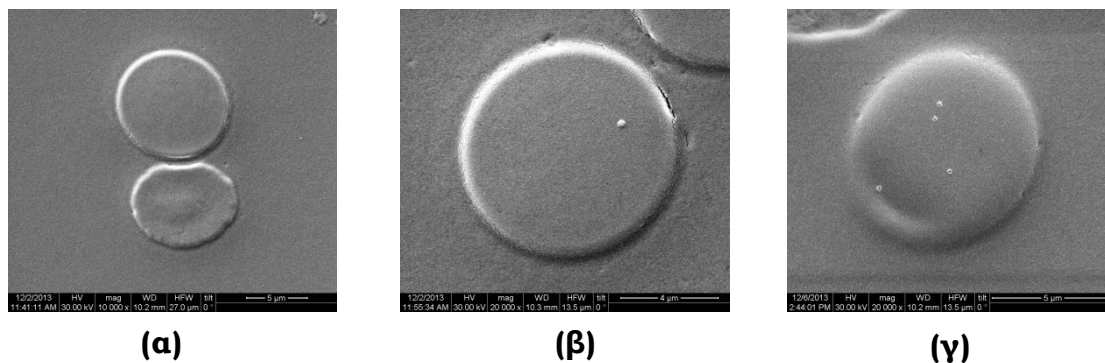


Εικόνα 42: Τα προφίλ σάρωσης κατά μήκος μιας γραμμής σάρωσης για κάθε ένα από τα δύο αντικείμενα, μπορεί να δώσει μια εκτίμηση για το ύψος, το οποίο είναι περίπου 70-80 nm και για το μήκος το οποίο είναι περίπου 400 – 600 nm

Τα δύο αντικείμενα που καταγράφονται στη μεμβράνη του ΕΚ, δείχνουν να έχουν ύψος που να ταιριάζει με το ύψος των σωματιδίων της ΜΝΓ, ωστόσο το μήκος δείχνει αρκετά μεγαλύτερο.

Τα αποτελέσματα τα οποία καταγράφηκαν με τη βοήθεια του ΜΗΣ, δείχνουν παρόμοια αποτελέσματα με αυτά από το ΜΑΔ. Τα περισσότερα ΕΚ δεν δείχνουν να έχουν υποστεί κάποια αλλοίωση στο σχήμα τους ή στην επιφάνεια της μεμβράνης τους, ενώ υπάρχουν και εδώ στιγμιότυπα όπου κάποια αντικείμενα βρίσκονται πάνω στη μεμβράνη των ΕΚ.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 43: Εικόνες που λήφθηκαν με το ΜΗΣ. Στο (α) παρουσιάζονται δύο ΕΚ που έχουν ωριμάσει με τη ΜΝΓ, ενώ στο (β) και στο (γ) παρουσιάζονται δύο ΕΚ που έχουν στην επιφάνειά τους κάποια αντικείμενα

Στην Εικόνα 43 (α), φαίνονται δύο ΕΚ που έχουν ωριμάσει με τη ΜΝΓ. Το ένα από τα δύο φαίνεται υγιές και άθικτο, ενώ το δεύτερο φαίνεται να έχει χάσει μέρος του κυτταροπλάσματος, πιθανά από την επεξεργασία ή και από φυσιολογικά αίτια. Επειδή η συντριπτική πλειοψηφία των ΕΚ που μελετήθηκαν με το ΜΗΣ δεν έχει αλλοιωθεί, μπορούμε να πούμε ότι δεν επηρέασε τη μορφολογία τους η παρουσία της ΜΝΓ.

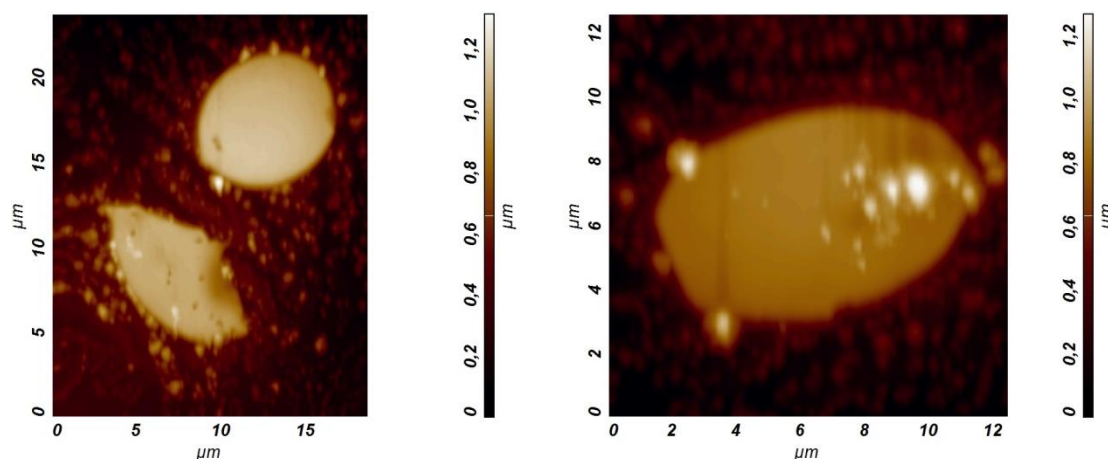
Στην Εικόνα 43 (β) και (γ) διακρίνονται κάποια αντικείμενα πάνω στη μεμβράνη των ΕΚ. Προκειμένου να ταυτοποιηθούν ως σωματίδια της ΜΝΓ, χρειάζεται να καταγραφεί το φάσμα εκπομπής ακτινών X από το συγκεκριμένο σημείο. Δυστυχώς, λόγω της μικρής επιφάνειας των αντικειμένων που βρίσκονται πάνω στη μεμβράνη, ήταν αδύνατο να καταγραφεί το φάσμα, οπότε το ερώτημα για την ταυτότητά τους παραμένει ανοικτό.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την ωρίμανση των ΕΚ με τη ΜΝΓ σε πλάσμα, δείχνει ότι η αλληλεπίδραση των ΕΚ με τη ΜΝΓ δεν είναι εύκολο να καταγραφεί στο ΜΑΔ λόγω της παρουσίας του πλάσματος. Το πλάσμα είναι ένα υγρό με πάρα πολλές πρωτεΐνες, λιπίδια και άλλα βιομόρια τα οποία θα μπορούσαν να δεσμεύουν τα σωματίδια της ΜΝΓ, ώστε να μην καταγράφεται η σύζευξη με τα ΕΚ. Όσον αφορά τις εικόνες από το ΜΗΣ, προκύπτει αδυναμία ταυτοποίησης

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

λόγω της μικρής επιφάνειας των σωματιδίων που παρατηρούνται πάνω στα ΕΚ.

Στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται πιο κάτω, το πλάσμα έχει υποκατασταθεί με φυσιολογικό ορό, προκειμένου να είναι ευκολότερη η καταγραφή της αλληλεπίδρασης των ΕΚ με τη ΜΝΓ. Η αντικατάσταση του μέσου διασποράς από πλάσμα σε φυσιολογικό ορό, αποκλείει την αλληλεπίδραση της ΜΝΓ με το πλάσμα, υπάρχει όμως η περίπτωση να αλληλεπιδρά με το φυσιολογικό ορό και τους κρυστάλλους που αυτός περιέχει. Να σημειωθεί ότι ο φυσιολογικός ορός είναι ισοτονικός, ώστε να προκαλεί την ελάχιστη δυνατή μεταβολή στη μορφολογία των ΕΚ. Μετά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων σχηματίζεται η εικόνα ότι στο δείγμα που βρίσκεται υπό μελέτη υπάρχουν διάφορα αντικείμενα – σωματίδια, πολλοί κρύσταλλοι μεταξύ των οποίων πιθανά να υπάρχει και ποσότητα από τη ΜΝΓ.

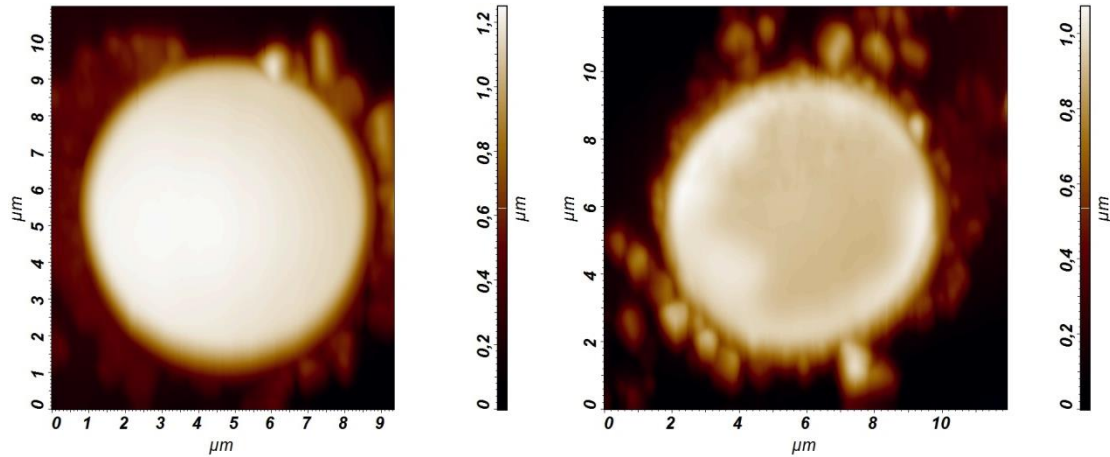


Εικόνα 44: Εικόνες από το ΜΑΔ, για ΕΚ που έχουν ωριμάσει με τη ΜΝΓ σε φυσιολογικό ορό. Ο χρόνος ωρίμανσης είναι 5 λεπτά. Διακρίνονται περιμετρικά των ΕΚ οι κρύσταλλοι των αλάτων που περιέχονται στο φυσιολογικό ορό, ενώ πιθανά περιέχεται και ποσότητα ΜΝΓ

Στην Εικόνα 44 και στην Εικόνα 45 διακρίνονται τρία ΕΚ που έχουν ωριμάσει με τη ΜΝΓ για χρονικό διάστημα 5 λεπτών σε φυσιολογικό ορό. Η μορφολογία αλλά και η μεμβράνη των ΕΚ δε δείχνει να έχει επηρεαστεί από την ωρίμανση με τη ΜΝΓ. Διακρίνονται κάποια μεγάλα σωματίδια τα οποία είναι οι κρύσταλλοι που περιέχονται στο

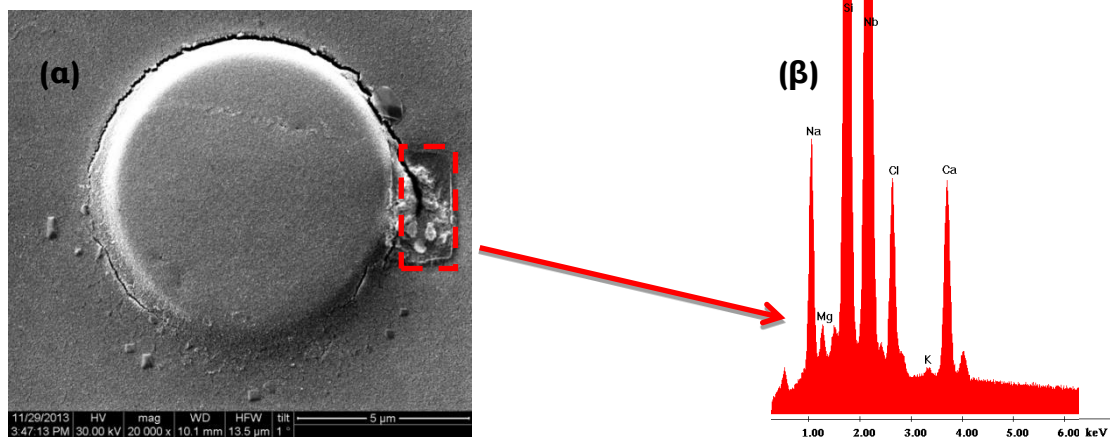
## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

φυσιολογικό ορό, ενώ υπάρχουν και μικρότερα σωματίδια τα οποία πιθανόν να αποτελούν τα σωματίδια της ΜΝΓ.



Εικόνα 45: Εικόνες ΕΚ που έχουν ωριμάσει με τη ΜΝΓ σε φυσιολογικό ορό. Διακρίνονται κάποια σωματίδια, πιθανόν κρύσταλλοι που περιέχονται στο φυσιολογικό ορό καθώς και άλλα μικρότερα σωματίδια τα οποία πιθανά αντιστοιχούν σε ποσότητες ΜΝΓ

Η πλειοψηφία των σωματιδίων που διακρίνονται περιμετρικά των ΕΚ είναι πιθανότατα κρύσταλλοι που περιέχονται στο φυσιολογικό ορό ενώ κάποια από τα μικρότερα σωματίδια θα μπορούσαμε να πούμε ότι είναι ποσότητες από τη ΜΝΓ.



Εικόνα 46: Εικόνα ενός ΕΚ (α) που έχει ωριμάσει για 5 λεπτά σε φυσιολογικό ορό με τη ΜΝΓ. Διακρίνονται περιμετρικά του ΕΚ κάποια σωματίδια. Στην εικόνα (β), φαίνεται το φάσμα της ΦΕΔΑ-Χ, το οποίο δίνει τη στοιχειακή ταυτότητα για τα σωματίδια δεξιά από το ΕΚ

Στην Εικόνα 46(α) διακρίνεται ένα ΕΚ που έχει ωριμάσει σε φυσιολογικό ορό με τη ΜΝΓ. Τα μεγέθη των κορυφών που παρουσιάζονται στο διάγραμμα είναι οι σχετικές εντάσεις που

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

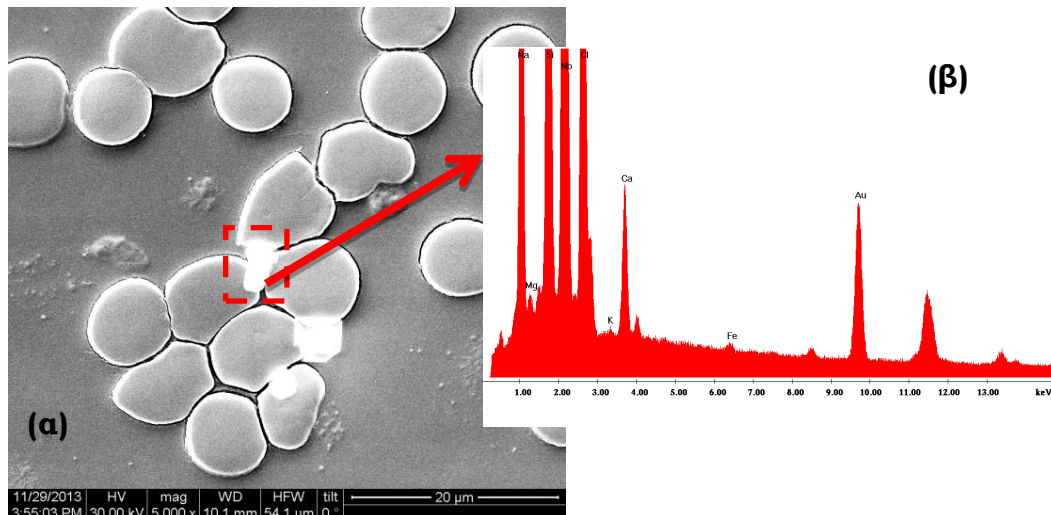
καταγράφονται από τον ανιχνευτή ακτινών-X για τη συγκεκριμένη περιοχή. Μετά την ανάλυση διαπιστώθηκε ότι η ταυτότητα των σωματιδίων δεξιά του ΕΚ, είναι κρύσταλλοι νατρίου και χλωρίου οι οποίοι περιέχονται στο φυσιολογικό ορό. Φαίνονται επίσης και ίχνη μαγνησίου, καλίου αλλά και ποσότητα ασβεστίου, τα οποία επίσης είναι χημικά στοιχεία που συναντώνται σε βιολογικά συστήματα.

Η παρουσία ΜΝΓ θα μπορούσε να ταυτοποιηθεί εάν στο διάγραμμα της ΦΕΔΑ-X εμφανιζόταν η κορυφή που αντιστοιχεί στο σίδηρο. Επειδή στο συγκεκριμένο διάγραμμα δεν παρουσιάζεται η κορυφή που αντιστοιχεί στο σίδηρο, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι είτε δεν υπάρχει ποσότητα ΜΝΓ στην περιοχή σάρωσης, είτε υπάρχει αλλά είναι τόσο μικρή που είναι αδύνατο να καταγραφεί από τον ανιχνευτή.

Η ταυτοποίηση μέσω της ΦΕΔΑ-X υποδεικνύει ότι τα μεγαλύτερα σε διαστάσεις αντικείμενα είναι κρύσταλλοι από άλατα που περιέχονται στο φυσιολογικό ορό, κυρίως νάτριο και χλώριο. Σε μερικές περιπτώσεις μεταξύ των ΕΚ παρατηρήθηκαν συσσωματώματα τα οποία λόγω του μεγάλου μεγέθους τους, πιθανά να παρουσιάζουν ποσότητες ΜΝΓ. Στην Εικόνα 47 φαίνεται το διάγραμμα ΦΕΔΑ-X για ένα τέτοιο συσσωμάτωμα που βρίσκεται στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ μιας ομάδας ΕΚ. Στο διάγραμμα της ΦΕΔΑ-X παρουσιάζονται οι σχετικές εντάσεις των κορυφών που αντιστοιχούν στα χημικά στοιχεία. Η κορυφή του σιδήρου που εμφανίζεται στα 6,3 keV περίπου είναι πολύ μικρότερη από τις κορυφές των στοιχείων νάτριο, χλώριο. Ωστόσο, είναι εμφανές ότι υπάρχει ποσότητα σιδήρου στη συγκεκριμένη περιοχή.

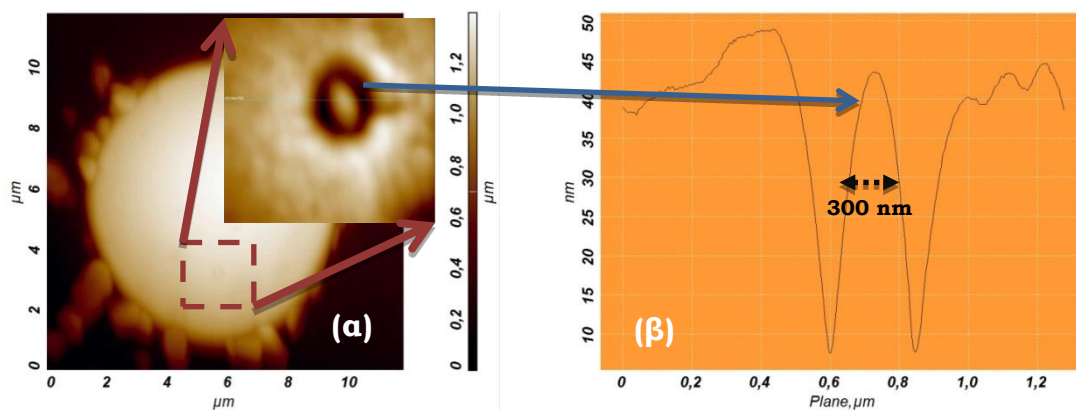


## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 47: Εικόνα (α) από το ΜΗΣ στην οποία διακρίνεται μια ομάδα ΕΚ. Στον ενδιάμεσο χώρο βρίσκεται μια ποσότητα κρυστάλλων και ΜΝΓ. Στα δεξιά (β) φαίνεται το διάγραμμα ΦΕΔΑ-Χ για την ποσότητα που περικλείεται από το κόκκινο ορθογώνιο, όπου διακρίνεται ποσότητα ΜΝΓ

Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το λογισμικό NOVA, υπάρχει ένα στιγμιότυπο αντίστοιχο με αυτό που συναντήθηκε σε ΕΚ που έχουν ωριμάσει σε πλάσμα. Υπάρχουν κύτταρα που φαίνονται και εδώ να ενδοκυτταρώνουν ή εξωκυτταρώνουν ένα αντικείμενο. Από την ανάλυση μέσω του λογισμικού NOVA φαίνεται ότι το αντικείμενο που απεικονίζεται, έχει ύψος περίπου 35 nm και μήκος περίπου 300 nm.

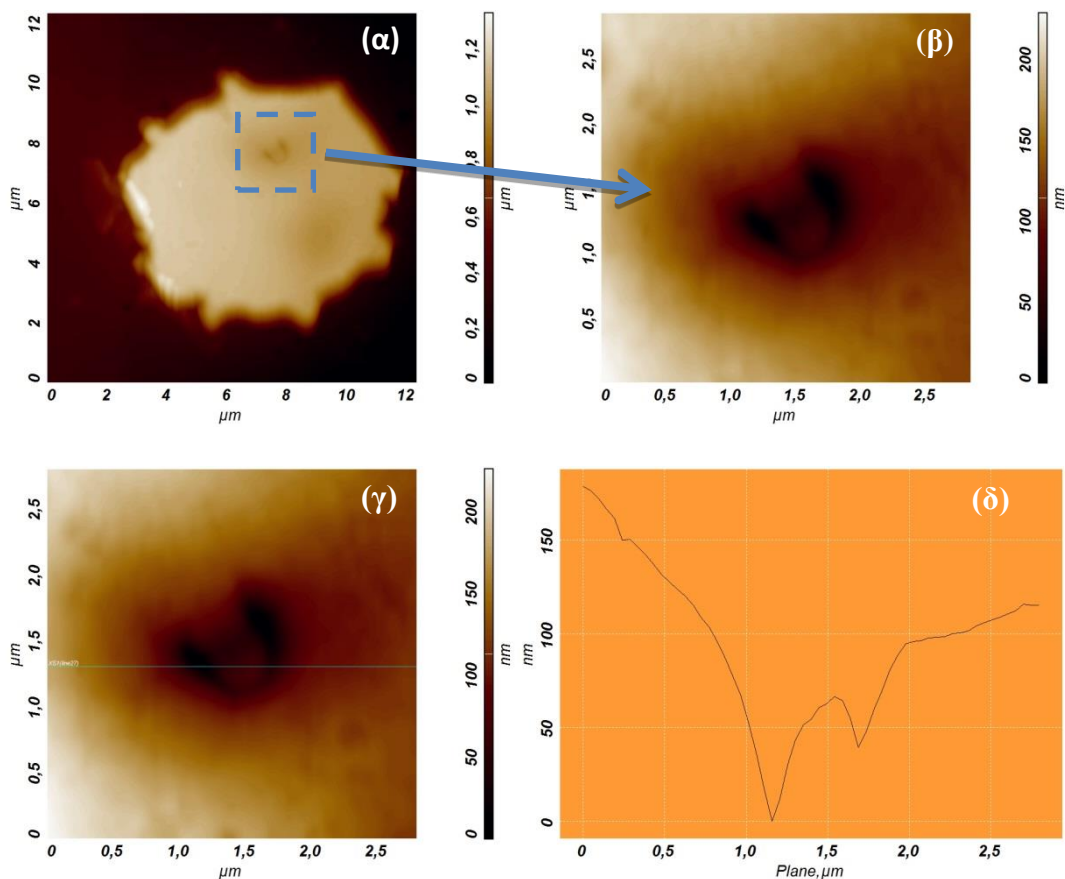


Εικόνα 48: Εικόνα από το ΜΑΔ ενός ΕΚ που έχει ωριμάσει με τη ΜΝΓ. Οι διαστάσεις του αντικειμένου που φαίνεται να έχει προσδεθεί στη μεμβράνη του ταιριάζουν με αυτές των σωματιδίων της ΜΝΓ

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

Αν και οι διαστάσεις που είναι παραπλήσιες με αυτές του ύψους των σωματιδίων που αποτελούν τη ΜΝΓ, διατηρούμε μια αμφιβολία μιας και το συγκεκριμένο δεν ταυτοποιήθηκε χημικά μέσω της ΦΕΔΑ-Χ του ΜΗΣ.

Στο σημείο αυτό επανερχόμαστε στο ζήτημα της ταυτοποίησης των ευρημάτων μόνο μέσω των διαστάσεων που προκύπτουν από το ΜΑΔ. Προκειμένου να γίνουν καλύτερα κατανοητές οι αμφιβολίες που προκύπτουν από την επεξεργασία μόνο με το λογισμικό NOVA αλλά και η ανάγκη να ταυτοποιηθεί η σύσταση των σωματιδίων από τη ΦΕΔΑ-Χ του ΜΗΣ, θα παρουσιαστεί μια εικόνα από ένα ΕΚ που δεν έχει ωριμάσει με τη ΜΝΓ. Το συγκεκριμένο ΕΚ δεν έχει υποστεί καμία επεξεργασία, ωστόσο δείχνει αρκετά όμοιο με το ΕΚ που παρουσιάστηκε στις εικόνες Εικόνα 41 και Εικόνα 48.



Εικόνα 49: Ένα ΕΚ (α) που δεν έχει ωριμάσει με τη ΜΝΓ. Διακρίνεται ένα αντικείμενο στη μεμβράνη του (β) το οποίο έχει περίπου 60-70 nm ύψος και μήκος περίπου 600 nm (γ), (δ)

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

Το ΕΚ που παρουσιάζεται στην Εικόνα 49, δεν έχει ωριμάσει με τη ΜΝΓ. Οι διαστάσεις του αντικειμένου που παρατηρείται στη μεμβράνη του, είναι περίπου 60-70 nm ύψος, ενώ το μήκος του είναι περίπου 600 nm. Το συγκεκριμένο πιθανότατα είναι βιολογικό υλικό που ενδοκυτταρώνει ή εξωκυτταρώνει το ΕΚ. Οι διαστάσεις του ταιριάζουν με αυτές του ευρήματος της Εικόνα 41. Το συγκεκριμένο στιγμιότυπο είναι ο λόγος για τον οποίο δεν μπορούμε να πούμε με σιγουριά ότι αυτό που διακρίνουμε σε όλες τις προηγούμενες εικόνες είναι σωματίδια της ΜΝΓ, βασιζόμενοι μόνο στην πληροφορία που παρέχεται από το ΜΑΔ.

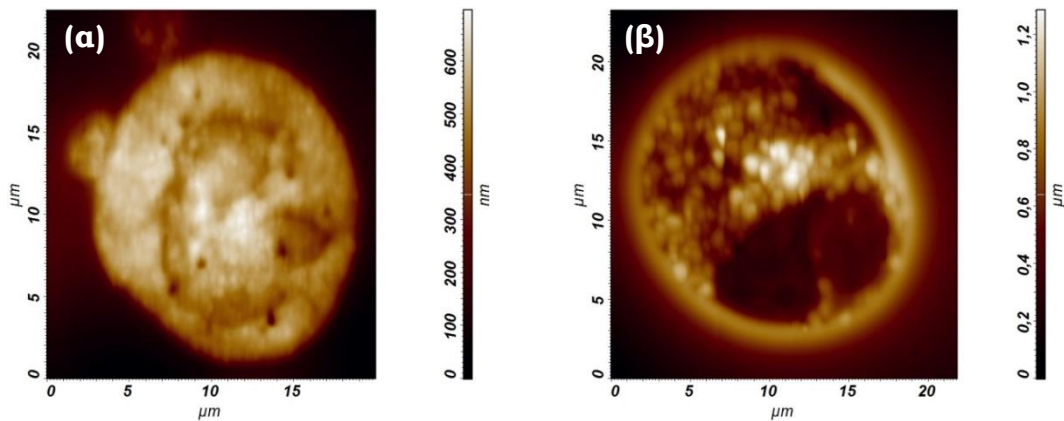
Συμπερασματικά, η παρουσία της ΜΝΓ δεν δείχνει επηρεάζει τη μορφολογία των ΕΚ, της μεμβράνης τους αλλά ούτε και τις οπές που παρατηρούνται πάνω σε αυτή. Υπάρχουν ενδείξεις, κυρίως από τα αποτελέσματα της ΦΕΔΑ-Χ, ότι τουλάχιστον περιμετρικά από τα ΕΚ υπάρχει ποσότητα ΜΝΓ, μιας και καταγράφεται στο φάσμα η κορυφή του σιδήρου. Επίσης, προκύπτει ότι είναι ευκολότερο να παρατηρηθούν τα μικρότερα αντικείμενα του δείγματος όπως τα σωματίδια της ΜΝΓ όταν αυτό βρίσκεται σε φυσιολογικό ορό και όχι σε πλάσμα.

### 4.3.2 Λευκοκύτταρα

Σε αυτό το σημείο θα παρουσιαστεί η μορφολογία των ΛΚ που έχουν ωριμάσει με τη ΜΝΓ σε πλάσμα. Αρχικά χρειάζεται να παρουσιαστεί η μορφολογία των άθικτων ΛΚ όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 50, ώστε να μπορεί να γίνει η σύγκριση με τη μορφολογία που παρουσιάζουν αφού ωριμάσουν με τη ΜΝΓ. Τα ΛΚ έχουν περίπου διπλάσια διάμετρο από τα ΕΚ και η επιφάνειά τους είναι κοκκοειδής.

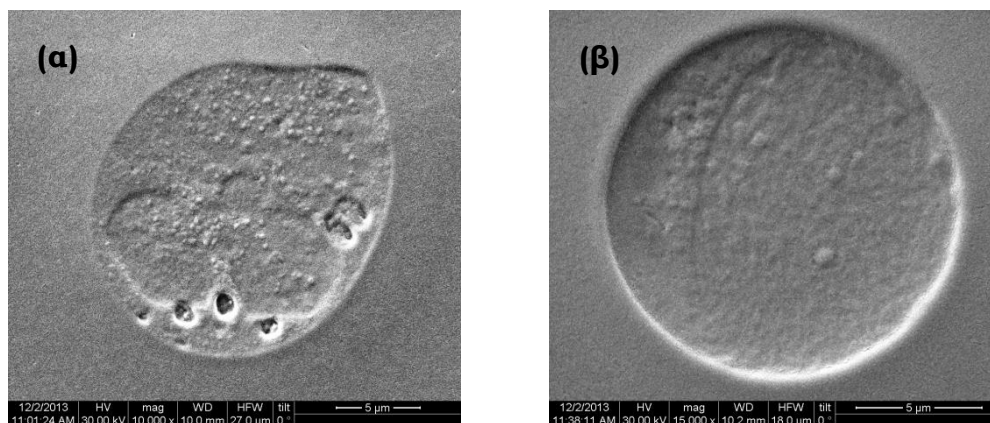
Επίσης, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρατηρήθηκε ότι ο φυσιολογικός ορός αν και δεν επηρεάζει τα ΕΚ, καταστρέφει σχεδόν ολόκληρο τον πληθυσμό των ΛΚ. Για το λόγο αυτό δεν θα παρουσιαστούν αποτελέσματα από την ωρίμαση των ΛΚ σε φυσιολογικό ορό.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 50: Τυπικές μορφολογίες ΛΚ όπως καταγράφονται από το ΜΑΔ, τα οποία δεν έχουν ωριμάσει με τη ΜΝΓ

Για τα ΛΚ που έχουν ωριμάσει για χρόνο 5 λεπτών με τη ΜΝΓ σε πλάσμα, φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται η μορφολογία τους από την παρουσία της ΜΝΓ, ενώ δεν αλληλεπιδρούν με τη ΜΝΓ. Τα αποτελέσματα αυτά καταγράφονται τόσο από το ΜΑΔ όσο και από το ΜΗΣ. Στην Εικόνα 51 παρουσιάζονται δυο στιγμιότυπα από το ΜΗΣ που δείχνουν ακριβώς αυτό, ότι δηλαδή η κοκκοειδής μορφολογία της επιφάνειας των ΛΚ διατηρείται.

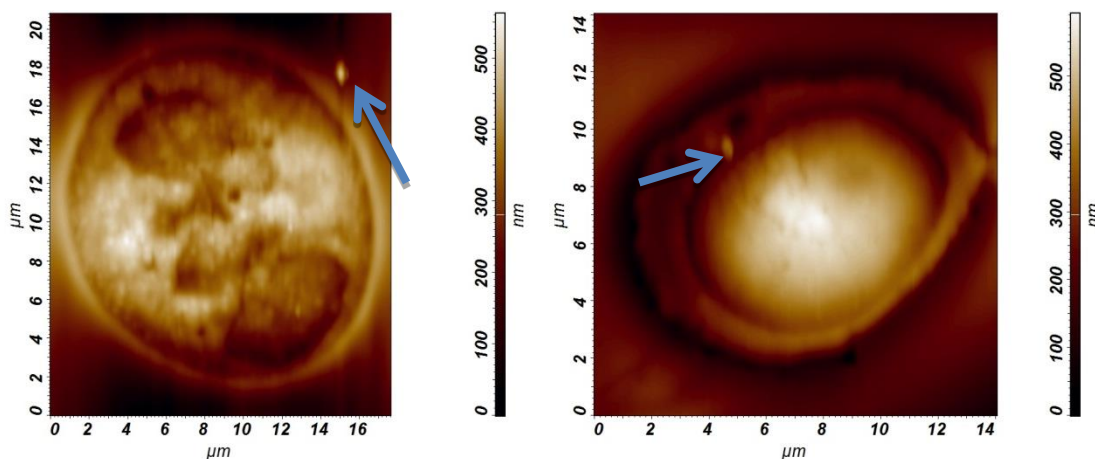


Εικόνα 51: Εικόνες από το ΜΗΣ για δύο ΛΚ τα οποία έχουν ωριμάσει για χρόνο 5 λεπτών με τη ΜΝΓ σε πλάσμα. Στο (α) διακρίνεται η κοκκώδης υφή του ΛΚ, ενώ στο (β) είναι πιο ομαλή η επιφάνεια του. Ωστόσο σε κανένα από τα δύο δε φαίνεται να έχει προσδεθεί ποσότητα ΜΝΓ

Υπάρχουν ελάχιστα στιγμιότυπα στα οποία εμφανίζονταν κάποια αντικείμενα γύρω από τα ΛΚ, ο αριθμός τους όμως δεν είναι ικανός για να αποτελέσει ασφαλή δείκτη ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ τους

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

και των ΛΚ. Επίσης, λόγω του πολύ μικρού μεγέθους των αντικειμένων δεν κατέστη δυνατή η χημική ταυτοποίησή τους. Δύο από τα στιγμιότυπα αυτά παρουσιάζονται στην Εικόνα 52. Το γεγονός ότι δεν υπάρχει αλλοίωση της μορφολογίας των ΛΚ ή της μεμβράνης τους, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ΜΝΓ είναι συμβατή με τα ΛΚ για χρόνο ωρίμανσης 5 λεπτών.

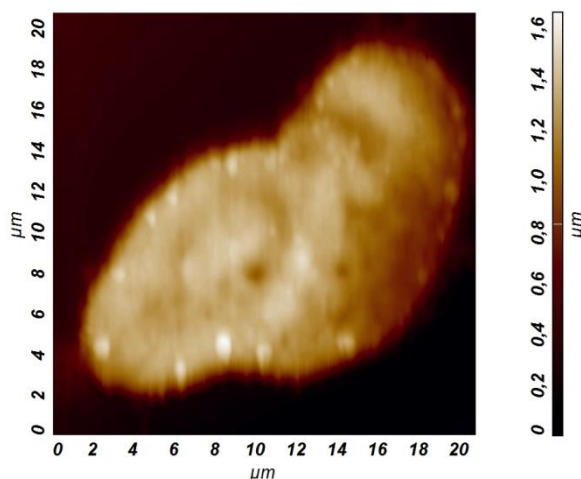


Εικόνα 52: ΛΚ που έχουν ωριμάσει με τη ΜΝΓ σε αυτόλογο πλάσμα. Εμφανίζονται στον χώρο γύρω από αυτά κάποια σωματίδια της ΜΝΓ, τα οποία υποδεικνύονται από τα βέλη

Στα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν πιο πάνω, το δείγμα των ΛΚ είχε ωριμάσει σε πλάσμα με τη ΜΝΓ. Όπως ήδη αναφέρθηκε, υπήρξε καταστροφή του πληθυσμού των ΛΚ όταν ωρίμασαν σε φυσιολογικό ορό. Εξαιρεση αποτέλεσε το δείγμα ενός ασθενούς δότη, ο οποίος παρουσίαζε αυξημένο αριθμό ΛΚ και ήταν το μοναδικό δείγμα στο οποίο δεν καταστράφηκε ολόκληρος ο πληθυσμός των ΛΚ. Τα αποτελέσματα της μορφολογίας των ΛΚ, παρουσιάζονται πιο κάτω, ώστε να γίνει η σύγκριση με τα αποτελέσματα των υπόλοιπων δοτών. Συγκεκριμένα στην Εικόνα 53 παρουσιάζεται ένα ΛΚ που επιβίωσε μετά την ωρίμανση για 5 λεπτά σε φυσιολογικό ορό με τη ΜΝΓ.

Στην Εικόνα 53 διακρίνονται κάποια μεγάλα αντικείμενα περιμετρικά του ΛΚ, τα οποία είναι πιθανότατα κρύσταλλοι οι οποίοι περιέχονται στο φυσιολογικό ορό, ενώ δε διακρίνονται σωματίδια της ΜΝΓ.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



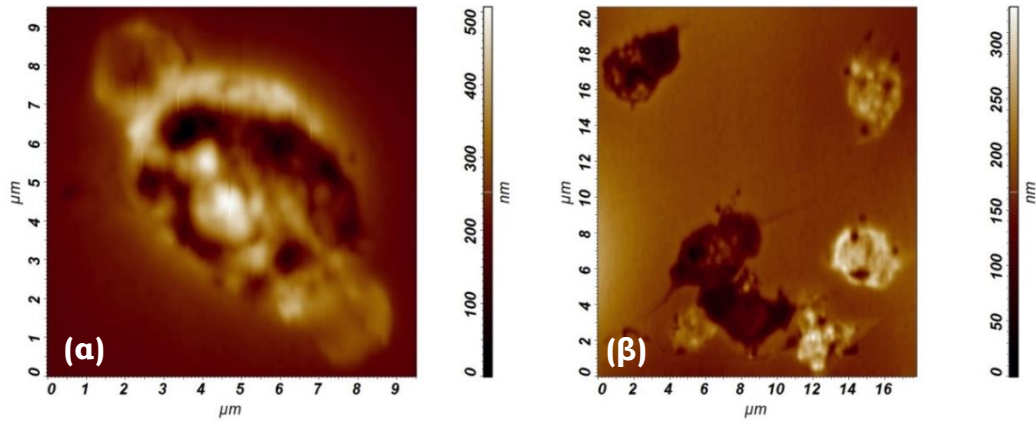
Εικόνα 53: ΛΚ που εμφανίζει περιμετρικά του κρυστάλλους μετά από την ωρίμανσή του μέσα σε φυσιολογικό ορό για χρονικό διάστημα 5 λεπτών

Συμπερασματικά, τα ΛΚ δεν αλληλεπιδρούν με τη ΜΝΓ ούτε σε πλάσμα ούτε σε φυσιολογικό ορό. Τα ΛΚ επίσης δε επηρεάζονται από την παρουσία της ΜΝΓ, οπότε μπορεί να ειπωθεί ότι δεν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των ΛΚ και της ΜΝΓ, για τους συγκεκριμένους δότες.

### 4.3.3 Αιμοπετάλια

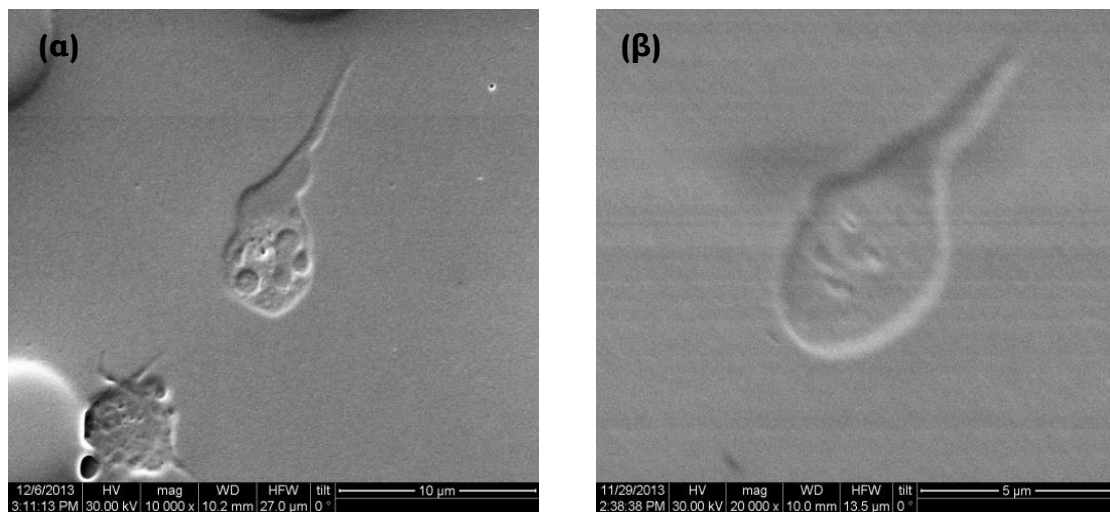
Σε αυτό το σημείο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μορφολογίας των ΑΠ μετά την αλληλεπίδραση με τη ΜΝΓ. Όπως και με τα ΛΚ, τα ΑΠ επίσης καταστρέφονται από την παρουσία του φυσιολογικού ορού. Για το λόγο αυτό τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αφορούν μόνο τα ΑΠ που έχουν ωριμάσει με ποσότητα ΜΝΓ για 5 λεπτά σε πλάσμα.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 54: Εικόνες από το ΜΑΔ για ΑΠ που έχουν ωριμάσει σε πλάσμα για 5 λεπτά με τη ΜΝΓ. Δε διακρίνεται να έχει προσκολληθεί ποσότητα ΜΝΓ στην επιφάνειά τους

Τα ΑΠ δεν φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τη ΜΝΓ όταν ωριμάζουν σε πλάσμα για χρόνο 5 λεπτών. Στιγμιότυπα φαίνονται στην Εικόνα 54. Υπάρχουν κάποια στιγμιότυπα κατά τα οποία τα αιμοπετάλια έχουν ενεργοποιηθεί και έχουν δημιουργήσει ψευδοπόδια.



Εικόνα 55: Εικόνες από το ΜΗΣ για αιμοπετάλια που έχουν ωριμάσει για 5 λεπτά με τη ΜΝΓ σε πλάσμα. Διακρίνονται και στις δύο εικόνες τα ψευδοπόδια που έχουν δημιουργήσει τα ΑΠ

Η ενεργοποίηση των ΑΠ, η οποία οδηγεί στην ανάπτυξη ψευδοποδίων, μπορεί να συμβεί για διάφορους λόγους χωρίς να συνδέεται απαραίτητα με την παρουσία της ΜΝΓ. Τα στιγμιότυπα που έχουν καταγραφεί δεν είναι ικανά να συσχετίσουν την ενεργοποίηση των ΑΠ με την παρουσία της ΜΝΓ.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

Όπως και στην περίπτωση των ΛΚ, τα ΑΠ δεν φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τη ΜΝΓ για χρόνο ωρίμανσης 5 λεπτών. Επίσης τα ΑΠ δε δείχνουν να σχηματίζουν συσσωματώματα υπό την παρουσία της ΜΝΓ, παρά τη συγκολλητική συμπεριφορά που γενικά παρουσιάζουν.

### **4.3.4 Σύνοψη των αποτελεσμάτων που παρουσιάστηκαν για την αλληλεπίδραση της ΜΝΓ με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

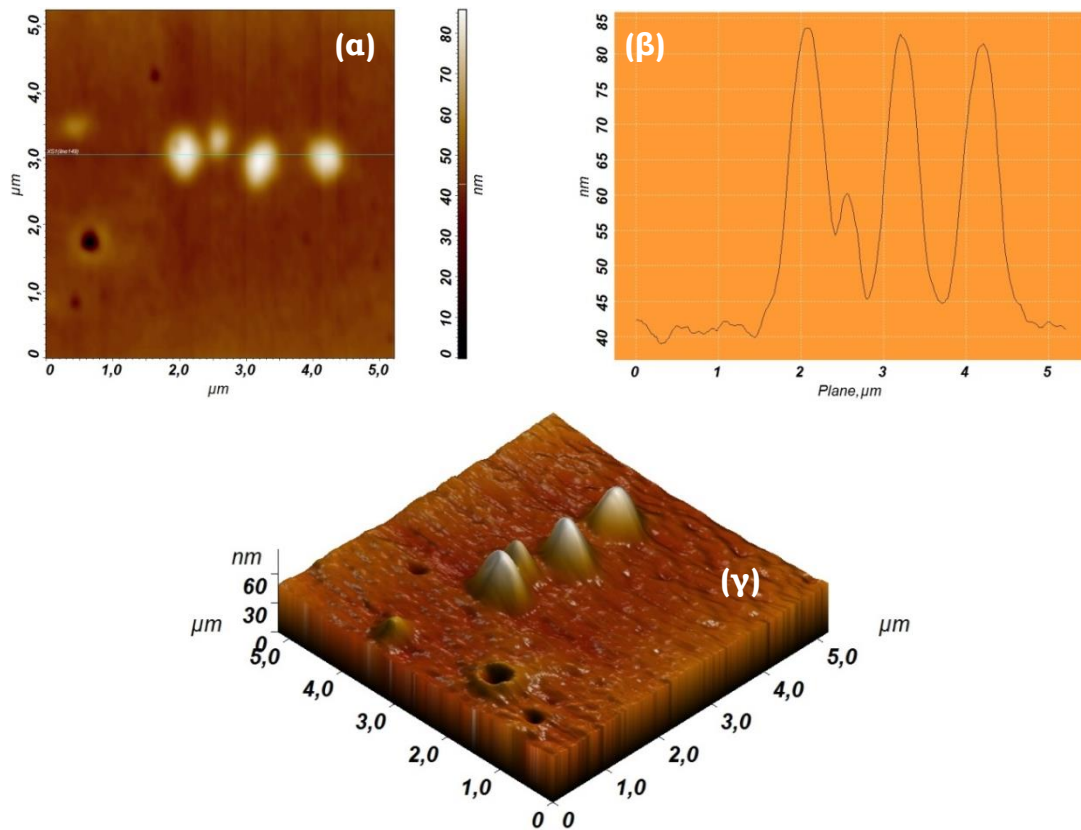
Από τα αποτελέσματα για την αλληλεπίδραση της ΜΝΓ με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος, για συγκεντρώσεις 10% και 20% σε ΜΝΓ, μπορούμε να κρατήσουμε την μη αλληλεπίδραση της με τα ΛΚ και τα ΑΠ. Η αλληλεπίδραση με τα ΕΚ, αν και από το αρχικό πείραμα με το μόνιμο μαγνήτη φαίνεται ότι υπάρχει, αυτό δεν κατέστη δυνατό να καταγραφεί από το ΜΑΔ και το ΜΗΣ, παρά μόνο σε ελάχιστες περιπτώσεις όπου καταγράφηκε ποσότητα ΜΝΓ περιμετρικά των ΕΚ σε συσσωματώματα που είχαν σχηματιστεί μεταξύ τους.

Η μη καταγραφή σύζευξης με τα ΛΚ και τα ΑΠ είναι πολύ σημαντική γιατί σημαίνει ότι η ΜΝΓ μπορεί να συζευχθεί μόνο με τα ΕΚ τα οποία θα αναλάβουν να οδηγήσουν τα σωματίδια της ΜΝΓ μέσω του καρδιαγγειακού στο στόχο, χωρίς αυτή να αναγνωρίζεται από το ανοσοποιητικό σύστημα, αφού δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά (άρα και να αναγνωρίζεται) με τα ΛΚ. Η μη καταγραφή αλληλεπίδρασης με τα ΑΠ οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν μεταβάλλονται οι συγκολλητικές ιδιότητες των ΑΠ λόγω της παρουσίας της ΜΝΓ άρα δε δημιουργείται κίνδυνος για θρομβώσεις από συσσωματώματα που θα μπορούσαν να δημιουργηθούν.

Τέλος, παρουσιάζονται κάποια από τα στιγμιότυπα που έχουν καταγραφεί και στα οποία παρατηρούνται σωματίδια της ΜΝΓ που έχουν παραμείνει στο πλάσμα ή στο φυσιολογικό ορό, χωρίς να έχουν αλληλεπιδράσει με κάποιο από τα κυτταρικά στοιχεία.



## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 56: Εικόνα από το ΜΑΔ (α), στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ των ΕΚ, όπου διακρίνεται στην επιφάνεια του πλάσματος ποσότητα από τη ΜΝΓ. Στο (β) φαίνεται το προφίλ για μια γραμμή σάρωσης από όπου φαίνονται οι διαστάσεις των σωματιδίων, ενώ στο (γ) μια τρισδιάστατη απεικόνιση της περιοχής σάρωσης. Το ύψος τους είναι περίπου 50 nm ενώ το πλάτος τους μεταξύ 400 – 600 nm

Στην Εικόνα 56, φαίνεται μια περιοχή σάρωσης από το ΜΑΔ στον ενδιάμεσο χώρο μεταξύ των ΕΚ, όπου διακρίνονται κάποια σωματίδια από τη ΜΝΓ. Από το προφίλ μιας γραμμής σάρωσης φαίνονται οι διαστάσεις για τα σωματίδια αυτά, με ύψος περίπου 80 nm και μήκος περίπου 400-600 nm. Επίσης παρουσιάζεται μια τρισδιάστατη απεικόνιση των σωματιδίων για να δοθεί μια καλύτερη αίσθηση της μορφολογίας των σωματιδίων της ΜΝΓ. Το μήκος είναι αρκετά μεγαλύτερο από το ύψος, πράγμα που μας οδηγεί στο συμπέρασμα είτε πρόκειται για συσσωματώματα, είτε ότι λόγω της γεωμετρίας της ακίδας του ΜΑΔ, υπάρχει μια υπερεκτίμηση στο μήκος του ευρήματος.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

### 4.4 Αποτελέσματα για τη χρονική εξέλιξη της σύζευξης μεταξύ της μαγνητικής νανογέλης και έμμορφων στοιχείων – λύση των έμμορφων στοιχείων του αίματος

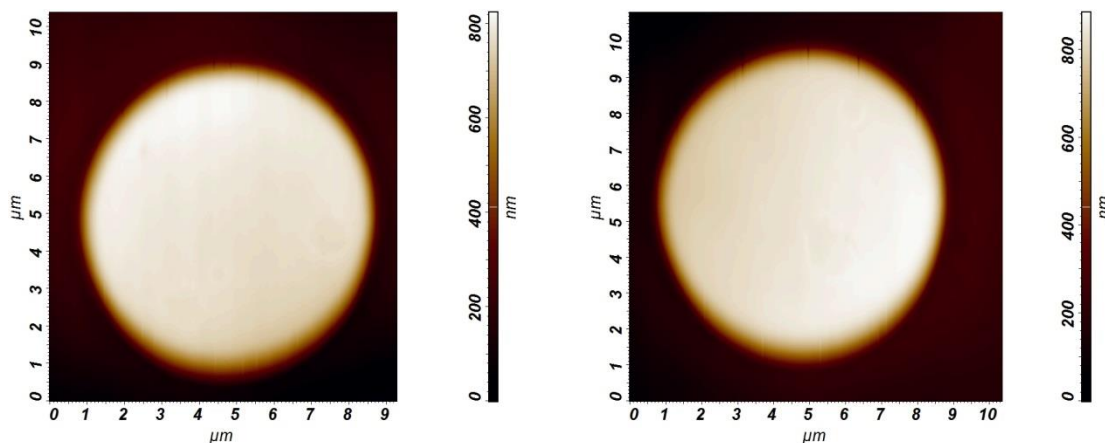
Η τελευταία παράμετρος που μελετήθηκε και παρουσιάζεται στο πιο κάτω κεφάλαιο αφορά τη μορφολογία των κυτταρικών στοιχείων του αίματος καθώς αυξάνει ο χρόνος ωρίμανσης των δειγμάτων με τη ΜΝΓ. Συγκεκριμένα παρουσιάζεται η μορφολογία των κυτταρικών στοιχείων μετά την αλληλεπίδραση μεταξύ της ΜΝΓ και των έμμορφων στοιχείων του αίματος για χρόνους ωρίμανσης 5, 15, 30, 60 και 120 λεπτών.

Τα πειράματα που προηγήθηκαν και παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, έδειξαν ότι είναι ευκολότερο να παρατηρηθεί η πρόσδεση της ΜΝΓ στην επιφάνεια του κυττάρου, όταν δεν υπάρχει αλληλεπίδραση με το πλάσμα και τα κύτταρα βρίσκονται σε φυσιολογικό ορό. Πιο κάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν την ωρίμανση σε αυτόλογο πλάσμα αλλά και σε φυσιολογικό ορό. Η συγκέντρωση της ΜΝΓ ήταν 10% είτε σε πλάσμα είτε σε φυσιολογικό ορό.

#### 4.4.1 Κυτταρικά στοιχεία – Ωρίμανση σε πλάσμα

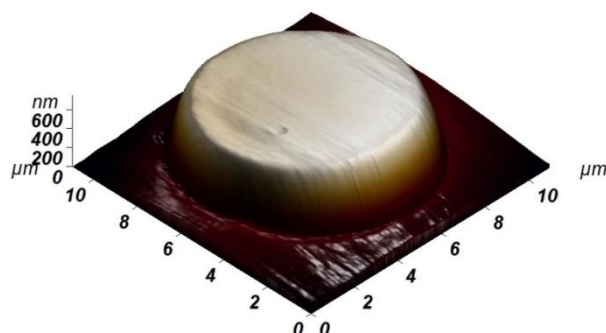
Φαίνεται ότι υπάρχει πρόσδεση μεταξύ της ΜΝΓ και των ΕΚ από τα πρώτα 5 λεπτά της ωρίμανσης, μέχρι και τα 120 λεπτά ωρίμανσης. Από τη μελέτη της μορφολογίας των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου φαίνεται ότι αυτή δεν επηρεάζεται μέχρι και το χρόνο των 120 λεπτών ωρίμανσης. Η μορφολογία των ΕΚ διατηρείται όμοια με αυτή ενός τυπικού ΕΚ που δεν έχει ωριμάσει με τη ΜΝΓ.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 57: EK που έχουν ωριμάσει για 5 λεπτά (α) και 120 λεπτά (β) με τη ΜΝΓ

Με την αύξηση του χρόνου ωρίμανσης, γίνεται παράλληλα παρατήρηση για τον αριθμό των EK που έχουν λυθεί, χρησιμοποιώντας ως δείκτη τον αριθμό των μεμβρανών των EK που παρατηρούνται στο δείγμα. Ο αριθμός των μεμβρανών που παρατηρούνται στο δείγμα, δεν παρουσιάζει μεταβολή με την αύξηση του χρόνου ωρίμανσης.

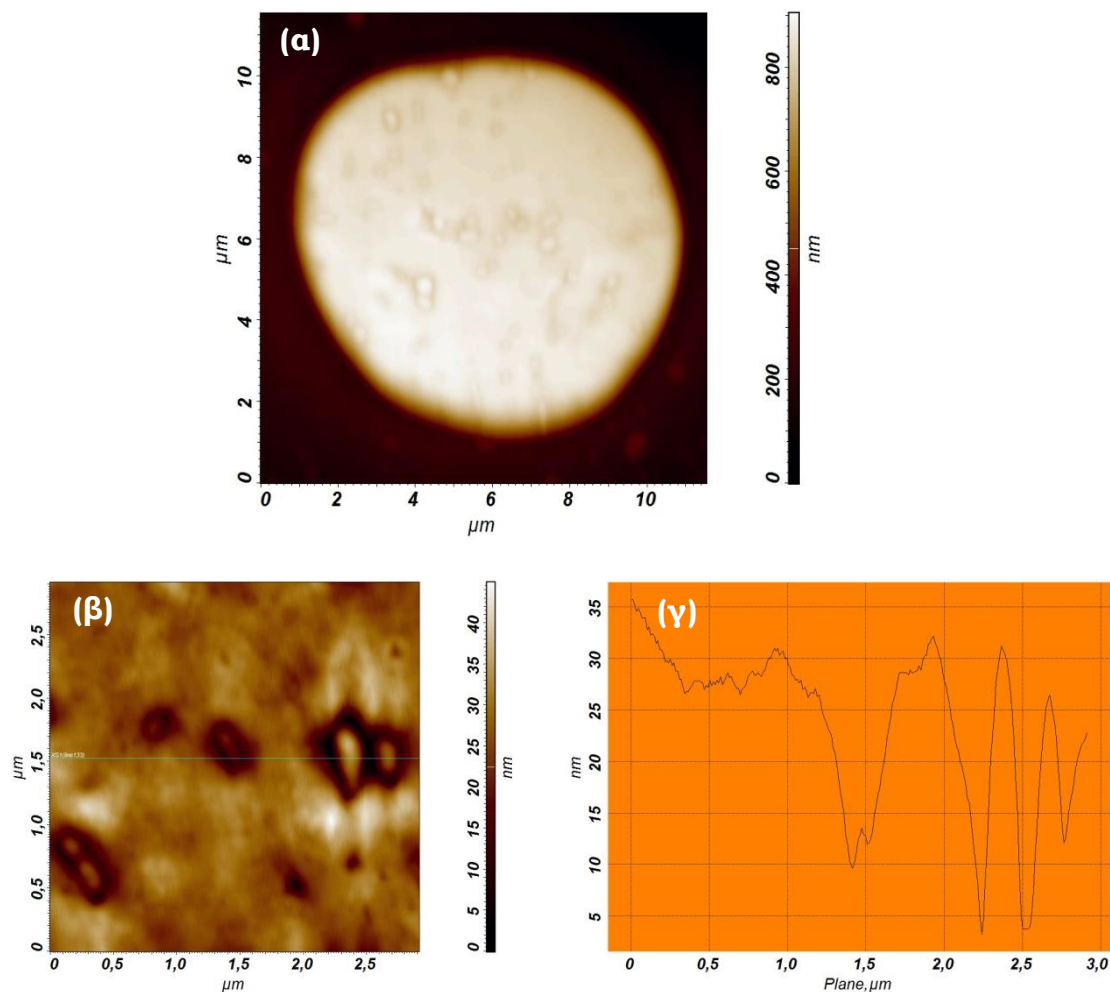


Εικόνα 58: Τρισδιάστατη απεικόνιση ενός EK που έχει ωριμάσει με τη ΜΝΓ για χρόνο 5 λεπτών. Διακρίνεται στην επιφάνειά του μια οπή

Για το χρονικό διάστημα ωρίμανσης των 5 λεπτών, οι επιφάνειες των EK δεν φαίνεται να έχουν υποστεί κάποια αλλοίωση. Υπάρχουν, όπως και στα προηγούμενα πειράματα, κάποιες ποσότητες ΜΝΓ που εμφανίζονται στο πλάσμα και όχι προσδεμένα πάνω στη μεμβράνη του EK. Κάποιες μικρές οπές στην εμφανίζονται στην επιφάνεια είναι φυσιολογικές και εμφανίζονται και σε EK τα οποία δεν έχουν ωριμάσει με τη ΜΝΓ. Οι οπές αυτές παρατηρούνται και σε EK που έχουν ωριμάσει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Με την αύξηση του χρόνου ωρίμανσης, δεν παρατηρείται κάποια μεταβολή στη μορφολογία των EK,

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

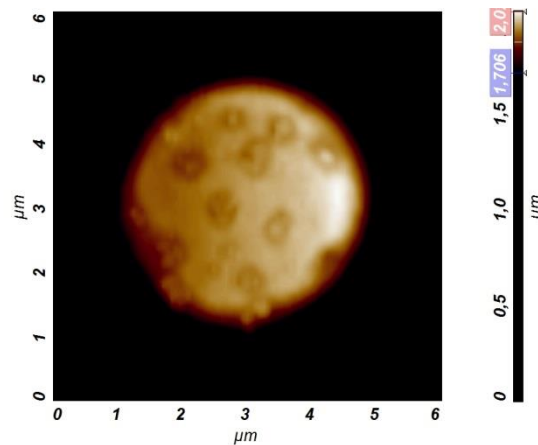
ούτε στον αριθμό και τις διαστάσεις των οπών που εμφανίζονται στην επιφάνεια της μεμβράνης τους.



Εικόνα 59: Ένα ΕΚ (α) μετά από χρόνο ωρίμανσης 30 λεπτών. Διακρίνεται στην επιφάνειά του μια ποσότητα από βιολογικό. Στην εικόνα (β) φαίνεται μια περιοχή της επιφάνειας, ενώ στο (γ) η τομή μιας γραμμής σάρωσης

Στην Εικόνα 59 παρουσιάζεται ένα ΕΚ το οποίο φαίνεται να έχει στη μεμβράνη του ποσότητα από βιολογικό υλικό το οποίο ενδοκυτταρώνεται ή εξωκυτταρώνεται. Απεικονίζεται μια περιοχή της μεμβράνης του (Εικόνα 59(β)) για την οποία εμφανίζεται και το προφίλ κατά μήκος μιας γραμμής σάρωσης (Εικόνα 59(γ)). Υπάρχει και σε αυτή την περίπτωση μια αμφιβολία για την ταυτότητα των αντικειμένων, μιας και δεν κατέστη δυνατό να καταγραφεί το ΦΕΔΑ-Χ. Για λόγους σύγκρισης θα παρουσιαστεί στην επόμενη εικόνα ένα ΕΚ, το οποίο αν και δεν έχει ωριμάσει με τη ΜΝΓ και παρουσιάζει ακριβώς την ίδια μορφολογία.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

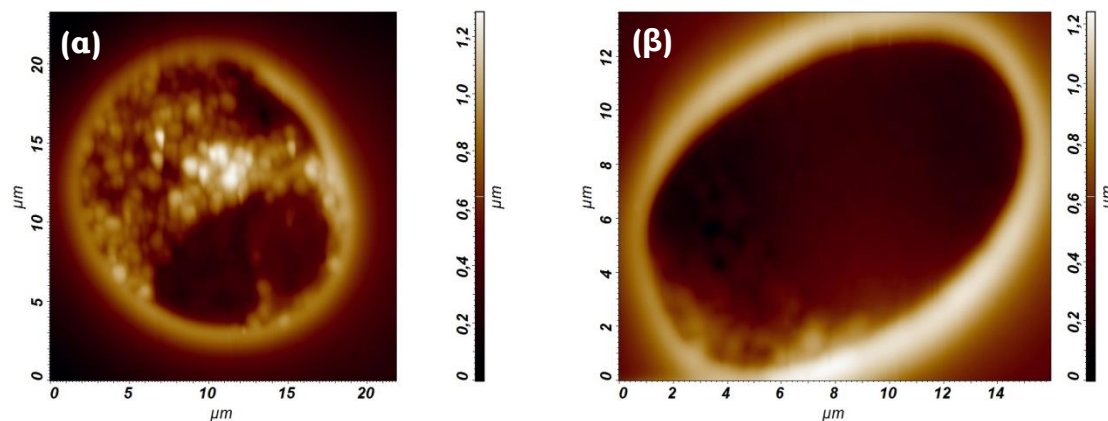


Εικόνα 60: Ένα ΕΚ, το οποίο δεν έχει ωριμάσει με τη ΜΝΓ. Διακρίνεται στη μεμβράνη του κάποιο βιολογικό, πιθανότατα, υλικό το οποίο ενδοκυτταρώνεται ή εξωκυτταρώνεται

Συγκρίνοντας τις δύο εικόνες Εικόνα 59 και Εικόνα 60, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι τα αντικείμενα που διακρίνονται στην μεμβράνη του ΕΚ είναι, πιθανότατα, βιολογικό υλικό. Επιπρόσθετα, δεν καταγράφηκε κάποιο αντίστοιχο στιγμιότυπο από το ΜΗΣ, ώστε να ταυτοποιηθεί η σύσταση των συγκεκριμένων σωματιδίων.

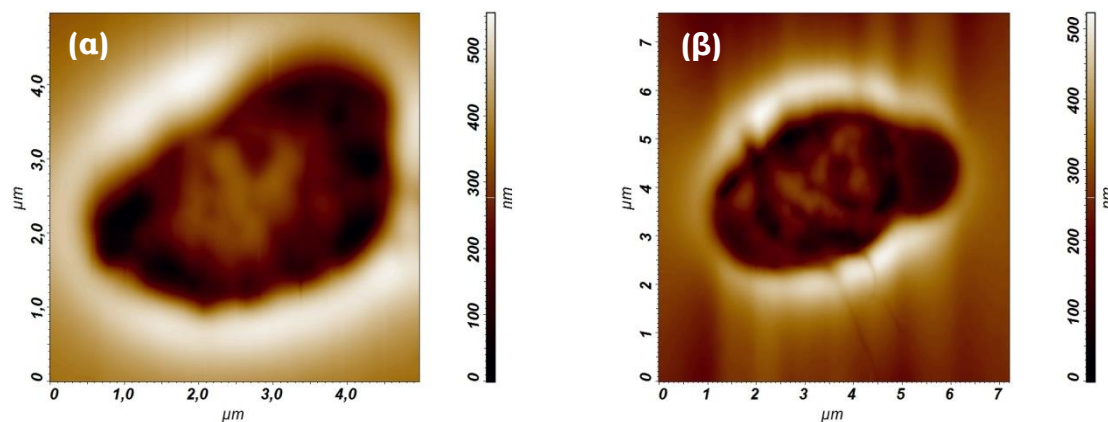
Όσον αφορά τα ΛΚ, δεν καταγράφεται κάποιο στιγμιότυπο στο οποίο να υπάρχει πρόσδεση μεταξύ της ΜΝΓ και των ΛΚ. Η κοκκώδης υφή τους δεν αλλοιώνεται με την αύξηση του χρόνου ωρίμανσης ενώ ο πληθυσμός τους δεν μειώνεται καθώς αυξάνει ο χρόνος ωρίμανσης. Στην πιο κάτω Εικόνα 61, παρουσιάζονται δυο ΛΚ για διαφορετικούς χρόνους ωρίμανσης. Το πρώτο έχει ωριμάσει για χρόνο 5 λεπτών, ενώ το δεύτερο για χρόνο 60 λεπτών. Και στα δύο δεν παρατηρείται κάποια αλλοίωση στη μορφολογία τους, το οποίο σημαίνει ότι δεν αλληλεπιδρούν με την ποσότητα της ΜΝΓ.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 61: ΛΚ που έχουν ωριμάσει για διαφορετικούς χρόνους. Το (α) έχει ωριμάσει για χρόνο 5 λεπτών ενώ το (β) για χρόνο 60 λεπτών με τη ΜΝΓ. Δεν υπάρχει πρόσδεση ΜΝΓ στην επιφάνειά τους, ούτε έχει προκληθεί κάποια αλλοίωση σε αυτά

Όσον αφορά τα ΑΠ, ούτε αυτά δείχνουν να αλληλεπιδρούν με τη ΜΝΓ καθώς αυξάνει ο χρόνος ωρίμανσης. Ο πληθυσμός τους παραμένει αμετάβλητος με την αύξηση του χρόνου ωρίμανσης, ενώ παράλληλα δεν παρατηρείται μεταβολή στη μορφολογία τους.



Εικόνα 62: Αιμοπετάλια που έχουν ωριμάσει για διαφορετικά χρονικά διαστήματα με τη ΜΝΓ. Στο (α) παρουσιάζεται ένα αιμοπετάλιο για χρόνο ωρίμανσης 15 λεπτών ενώ στο (β) ένα αιμοπετάλιο για χρόνο ωρίμανσης 60 λεπτών

Στην Εικόνα 62, φαίνονται δύο ΑΠ τα οποία έχουν ωριμάσει για διαφορετικούς χρόνους με τη ΜΝΓ. Συγκεκριμένα, οι χρόνοι είναι 15 λεπτά και 60 λεπτά. Δεν υπάρχει κάποια πρόσδεση μεταξύ των ΑΠ και της ΜΝΓ, ούτε κάποια μεταβολή στη μορφολογία τους. Αυτό δείχνει ότι τα ΑΠ δεν αλληλεπιδρούν με τη ΜΝΓ ενώ δεν υπάρχει ένδειξη ότι σχηματίζουν συσσωματώματα που θα μπορούσαν να προκαλέσουν

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

θρόμβο. Συμπερασματικά, τα ΛΚ και τα ΑΠ δεν αλληλεπιδρούν με τη ΜΝΓ για χρόνους ωρίμανσης μέχρι και 120 λεπτά.

### 4.4.2 Κυτταρικά στοιχεία – Επίδραση του μέσου ωρίμανσης και επαναδιασποράς

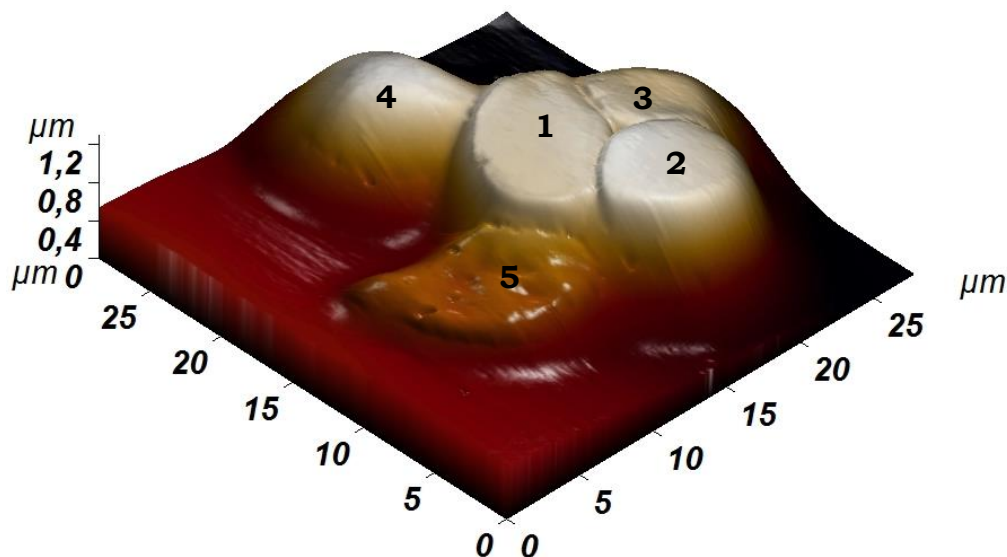
Σε αυτό το σημείο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την επίδραση του μέσου στο οποίο έγινε η πρόσδεση με τη ΜΝΓ και επαναδιασποράς για την ωρίμανση. Συγκεκριμένα, η ωρίμανση έγινε για χρόνο 10 λεπτών σε φυσιολογικό ορό, ο οποίος στη συνέχεια αντικαταστάθηκε από πλάσμα. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αφορούν τους ίδιους χρόνους με το προηγούμενο πείραμα, δηλαδή 5, 15, 30, 60 και 120 λεπτά. Να σημειωθεί ότι το δείγμα των 5 λεπτών είναι πριν την αλλαγή του φυσιολογικού ορού με πλάσμα.

Φαίνεται ότι η παρουσία του φυσιολογικού ορού επηρεάζει το χρόνο ζωής των ΕΚ. Η μορφολογία τους στα πρώτα 5 λεπτά της ωρίμανσης, γίνεται σφαιρική λόγω της αλλαγής του μέσου διασποράς από πλάσμα σε φυσιολογικό ορό. Με την αύξηση του χρόνου ωρίμανσης, επανέρχονται στη φυσιολογική τους δισκοειδή μορφή, αν και αρκετά από αυτά φαίνεται να υπόκεινται σε λύση με αποτέλεσμα να παρατηρείται αύξηση του αριθμού των μεμβρανών από τα κύτταρα αυτά στο δείγμα, καθώς αυξάνει ο χρόνος ωρίμανσης.

Η παρουσία του φυσιολογικού ορού επηρεάζει και τη βιωσιμότητα των ΛΚ, τα οποία καταστρέφονται από την παρουσία του. Τα ΛΚ που ωρίμασαν σε φυσιολογικό ορό, έχουν υποστεί λύση σχεδόν στο σύνολό τους, γι' αυτό και δεν υπάρχουν στιγμιότυπα από ΛΚ μέχρι και το χρόνο των 10 λεπτών σε φυσιολογικό ορό. Στα δείγματα που παρασκευάστηκαν για να μελετηθεί η επίδραση του μέσου επαναδιασποράς, το πλάσμα που χρησιμοποιήθηκε για την επαναδιασπορά ήταν πλούσιο σε ΑΠ, ενώ υπήρχε και μικρή ποσότητα από ΛΚ. Για το λόγο αυτό, εμφανίζονται ΛΚ και ΑΠ στα δείγματα, όμως για χρόνο μεγαλύτερο από 10 λεπτά οπότε έγινε η αλλαγή του μέσου διασποράς.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

Για τα ΛΚ και τα ΑΠ δεν παρουσιάζονται αποτελέσματα για το χρονικό διάστημα πριν την αλλαγή του μέσου διασποράς, ενώ μετά την αλλαγή του μέσου διασποράς τόσο ΛΚ όσο και τα ΑΠ φαίνεται ότι δεν αλληλεπιδρούν με τη ΜΝΓ όπως και στην περίπτωση της ωρίμανσης με το αυτόλογο πλάσμα.



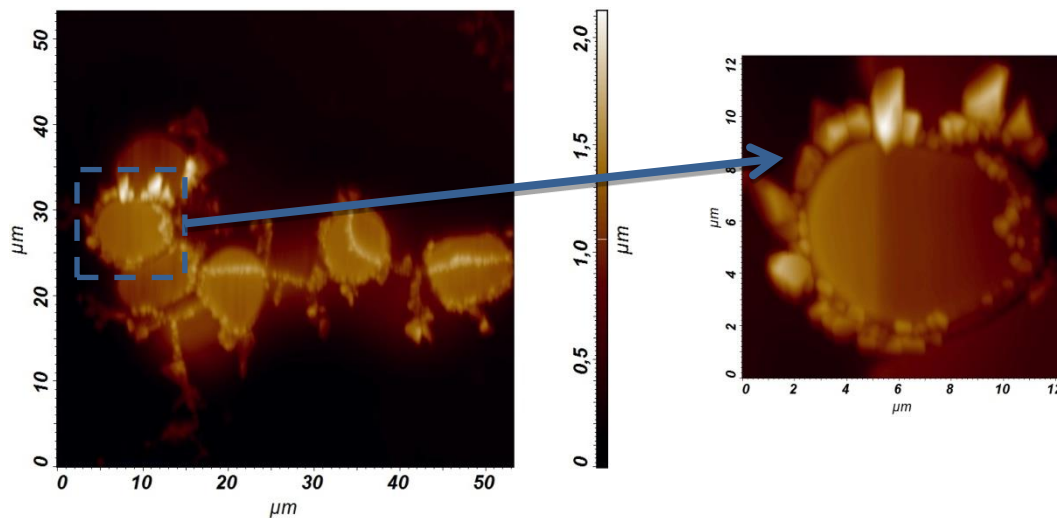
Εικόνα 63: Τρισδιάστατη απεικόνιση ομάδας ΕΚ που έχουν ωριμάσει σε φυσιολογικό ορό για χρόνο 10 λεπτών με τη ΜΝΓ. Διακρίνονται τρία ΕΚ (1), (2), (3), με φυσιολογική μορφολογία, ένα σφαιροκύτταρο (4) και ένα ΕΚ που έχει υποστεί λύση (5)

Αρχικά, για το χρονικό διάστημα που το δείγμα έχει ως μέσο διασποράς το φυσιολογικό ορό, γύρω από τα ΕΚ προσκολλώνται διάφοροι κρύσταλλοι οι οποίοι υπάρχουν στο φυσιολογικό ορό αλλά και σωματίδια της ΜΝΓ. Μετά την αλλαγή του μέσου διασποράς, παρατηρείται ότι εξαφανίζονται οι ογκώδεις κρύσταλλοι που υπήρχαν αρχικά γύρω από τα ΕΚ.

Μετά την αλλαγή του μέσου διασποράς, στο δείγμα παρατηρείται και μικρός αριθμός ΛΚ και ΑΠ, τα οποία βρίσκονταν στο πλάσμα που αντικατέστησε το φυσιολογικό ορό, μετά τα 10 λεπτά του χρόνου ωρίμανσης. Αυτά τα ΛΚ και τα ΑΠ όμως, δεν έχουν αλληλεπίδραση με τη ΜΝΓ, μιας και δεν έχουν καταγραφεί στιγμιότυπα που να υποδεικνύουν ότι υπάρχει πρόσδεση μεταξύ των ΛΚ και των ΑΠ με τη ΜΝΓ.

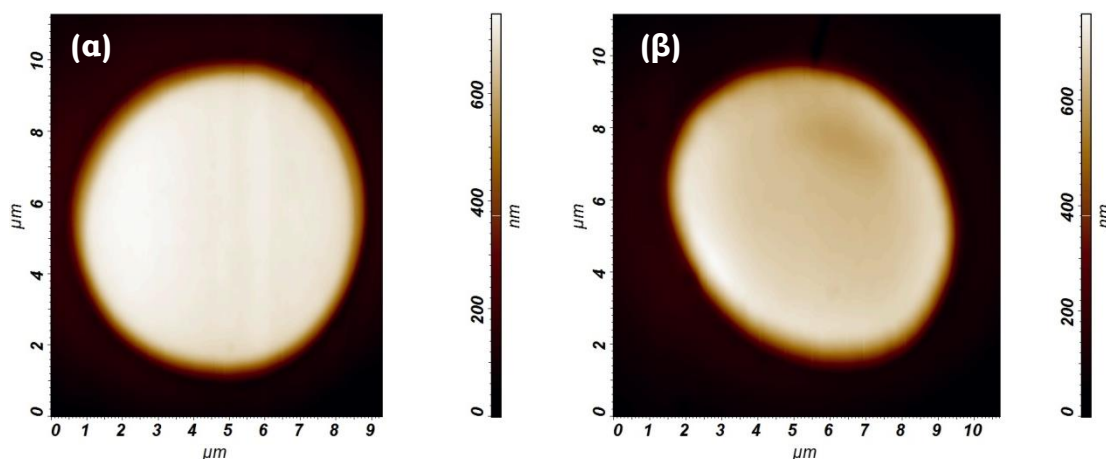


## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 64: Ομάδα ΕΚ που έχουν ωριμάσει σε φυσιολογικό ορό. Στην ένθετη φωτογραφία απεικονίζεται ένα από τα κύτταρα που εμφανίζει περιμετρικά του ομάδες κρυστάλλων από το φυσιολογικό ορό

Μετά την αντικατάσταση του φυσιολογικού ορού από αυτόλογο πλάσμα, οι ογκώδεις κρύσταλλοι εξαφανίζονται. Τα ΕΚ επανέρχονται στο φυσιολογικό τους σχήμα, ενώ εμφανίζεται και μικρός αριθμός ΛΚ και ΑΠ που όμως βρίσκονταν στο πλάσμα, το οποία αντικατέστησε το φυσιολογικό ορό. Επίσης, όσο αυξάνει ο χρόνος, εμφανίζεται και αριθμός μεμβρανών από ΕΚ που έχουν υποστεί λύση.

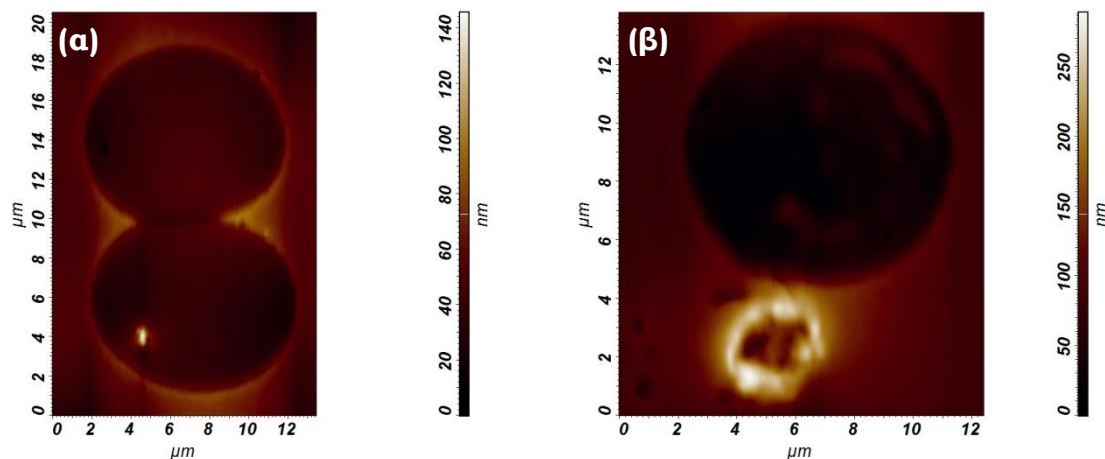


Εικόνα 65: Εικόνες του ΜΑΔ που απεικονίζουν ΕΚ τα οποία έχουν ωριμάσει σε φυσιολογικό ορό με τη ΜΝΓ και έπειτα έγινε αντικατάσταση του με αυτόλογο πλάσμα. Το (α) έχει ωριμάσει για χρόνο 15 λεπτών ενώ το (β) για 120 λεπτά

Φαίνεται στην Εικόνα 65 ότι δεν έχει επηρεαστεί η μεμβράνη των ΕΚ ούτε σε χρόνο 15 λεπτών (Εικόνα 65(α)) ούτε για το χρόνο των 120

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος

λεπτών (Εικόνα 65(β)). Στην επόμενη Εικόνα 66, παρουσιάζονται κάποιες από τις μεμβράνες των ΕΚ που έχουν υποστεί λύση. Σε κάποιες από αυτές τις μεμβράνες διακρίνονται κάποια σωματίδια, οι διαστάσεις των οποίων ταιριάζουν με τη ΜΝΓ, να έχει προσκολληθεί πάνω σε αυτές.

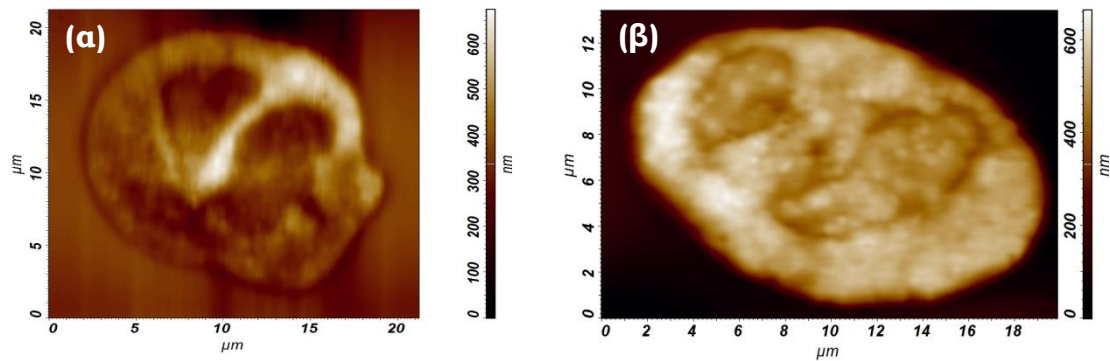


Εικόνα 66: Μεμβράνες ΕΚ από κύτταρα που έχουν υποστεί λύση. Στην εικόνα (α) για το δείγμα των 15 λεπτών, ενώ στη (β) για το δείγμα των 120 λεπτών. Στο (β) διακρίνεται και ένα ΑΠ στο κάτω μέρος

Στην Εικόνα 66 (α) διακρίνεται στο κάτω μέρος μια μεμβράνη ενός ΕΚ που έχει υποστεί λύση. Το σωματίδιο που υπάρχει πάνω στη μεμβράνη είναι πιθανόν σωματίδιο της ΜΝΓ το οποίο αρχικά είχε προσκολληθεί στο ΕΚ. Στην Εικόνα 66 (β) διακρίνεται η μεμβράνη ενός ΕΚ και ένα ΑΠ. Το ΑΠ δεν έχει αλληλεπιδράσει με τη ΜΝΓ μιας και έχει την κανονική του μορφή.

Μετά από την αλλαγή του μέσου διασποράς από φυσιολογικό ορό σε πλάσμα, εμφανίζονται στο δείγμα και μικρές ποσότητες ΛΚ και ΑΠ, τα οποία φαίνεται ότι δεν επηρεάζονται από την παρουσία της ΜΝΓ, μιας και διατηρούν τη μορφολογία τους. Ειδικά για τα ΛΚ, παρουσιάζουν την φυσιολογική τους κοκκώδη υφή.

## Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος



Εικόνα 67: Εικόνες από ΛΚ που εμφανίζονται στο δείγμα μετά την αλλαγή του μέσου διασποράς. Για χρόνο 15 λεπτών (α) και για χρόνο 120 λεπτών (β)

Τα ΛΚ που παρουσιάζονται στην Εικόνα 67, εμφανίζονται στο δείγμα μετά τα 10 λεπτά ωρίμανσης. Κατά το χρονικό διάστημα αυτό ο φυσιολογικός ορός κατέστρεψε την πλειοψηφία των λευκοκυττάρων που υπήρχε στο δείγμα, οπότε τα ΛΚ αυτά είναι από την ποσότητα που είχε παραμείνει στο πλάσμα. Η μορφή τους είναι φυσιολογική, καθώς δε φαίνεται να έχουν επηρεαστεί από την παρουσία της ΜΝΓ. Ο χρόνος κατά τον οποίο έρχονται σε επαφή με τη ΜΝΓ ήταν 15 για το ΛΚ της Εικόνα 67(α) και 120 λεπτά για το αντίστοιχο της Εικόνα 67(β).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι

Στην παρούσα Μεταπτυχιακή Εργασία μελετήθηκε η βιοσυμβατότητα της ΜΝΓ που αποτελείται από πολυμερικά νανοσωματίδια poly (N,N'-diethyl aminoethyl methacrylate) (PDEAEMA) στα οποία έχουν προσδεθεί με φυσικό τρόπο ΝΣ οξειδίου του σιδήρου ( $Fe_3O_4$ ), με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι προηγμένες απεικονιστικές τεχνικές της ΜΑΔ και ΜΗΣ, προκειμένου να καταγραφούν οι αλλοιώσεις στη μορφολογία των ΕΚ, των ΛΚ και των ΑΠ μετά την ωρίμανση τους με τη ΜΝΓ.

Η μελέτη χωρίστηκε σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος μελετήθηκαν οι παράμετροι που επηρεάζουν τη μορφολογία της ΜΝΓ και συγκεκριμένα η επίδραση ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, της θερμοκρασίας και της υπερήχησης. Στο δεύτερο μέρος μελετήθηκε η αλληλεπίδραση μεταξύ της ΜΝΓ και των έμμορφων στοιχείων του αίματος, συναρτήσει διαφόρων παραμέτρων. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν η συγκέντρωση, ο χρόνος ωρίμανσης και το μέσο διασποράς.

Σχετικά με το πρώτο μέρος, όπου μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας και του μαγνητικού πεδίου στη μορφολογία της ΜΝΓ, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ανάπτυξης λεπτών υμενίων, προκειμένου να παρασκευαστούν δείγματα προς μελέτη σε διαφορετικές θερμοκρασίες, 20° C και 60° C. Με δεδομένο ότι η κρίσιμη θερμοκρασία μετάβασης της νανογέλης είναι 37° C οι διαφορετικές θερμοκρασίες επιλέχθηκαν προκειμένου να καταγραφούν οι μορφολογικές διαφορές της ΜΝΓ. Έγινε επίσης μελέτη της επίδρασης της παραμέτρου υπερήχησης καθώς και μελέτη της επίδρασης ενός μαγνητικού πεδίου μέγιστης έντασης 3 kOe.

Τα αποτελέσματα της μελέτης της μορφολογίας της ΜΝΓ:

- Η αποθήκευση της ΜΝΓ οδηγεί στην ανάπτυξη συσσωματωμάτων

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

- Το μαγνητικό πεδίο και η υπερήχηση επιδρούν στη μείωση των διαστάσεων των σωματιδίων της ΜΝΓ, κυρίως λόγω της διάσπασης των συσσωματωμάτων που αναπτύσσονται κατά την αποθήκευση
- Η θερμοκρασία επιδρά στη μείωση των διαστάσεων των σωματιδίων της ΜΝΓ, λόγω της απόκρισης που παρουσιάζουν τα πολυμερικά σωματίδια στη θερμοκρασία

Το δεύτερο μέρος της μελέτης αφορά την επίδραση της ΜΝΓ στη μορφολογία των κυττάρων του αίματος (ΕΚ, ΛΚ και ΑΠ), μετά την ωρίμανση τους για διαφορετικές συγκεντρώσεις, χρόνους και μέσο διασποράς. Τα δείγματα μελετήθηκαν με τη χρήση του ΟΜ, του ΜΑΔ και του ΜΗΣ. Για τα δείγματα του ΜΗΣ προηγήθηκε η ανάπτυξη ενός υποστρώματος νιοβίου προκειμένου να επιτευχθούν οι βέλτιστες συνθήκες απεικόνισης.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου που μελετήθηκε. Πιο συγκεκριμένα, για τα ΕΚ:

- Παρατηρείται σύζευξη, τουλάχιστον μακροσκοπικά, των ΕΚ με τη ΜΝΓ. Η σύζευξη είναι πιο εύκολο να παρατηρηθεί όταν το μέσο διασποράς είναι ο φυσιολογικός ορός.
- Τα ΕΚ φαίνεται να μην επηρεάζονται από την παρουσία της ΜΝΓ, μιας και δεν μεταβάλλεται η μορφολογία τους, σε συγκεντρώσεις 10% και 20% σε ΜΝΓ είτε σε πλάσμα είτε σε φυσιολογικό ορό.
- Τα ΕΚ παραμένουν ανεπηρέαστα από τη ΜΝΓ για χρονική διάρκεια μέχρι και 120 λεπτά σε πλάσμα.
- Παρατηρείται αύξηση του αριθμού των μεμβρανών των ΕΚ με την αύξηση του χρόνου ωρίμανσης σε φυσιολογικό ορό.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

Όσον αφορά τα ΛΚ, τα αποτελέσματα συνοψίζονται στα εξής:

- Δεν παρατηρείται σύζευξη μεταξύ των ΛΚ και της ΜΝΓ, για τις συγκεντρώσεις 10% και 20% σε ΜΝΓ, όταν η ωρίμανση γίνεται σε πλάσμα.
- Τα ΛΚ δεν επηρεάζονται από τη ΜΝΓ για χρόνους μέχρι 120 λεπτά, όταν η ωρίμανση γίνεται σε πλάσμα.
- Τα ΛΚ καταστρέφονται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης από την παρουσία του φυσιολογικού ορού.

Τέλος για τα ΑΠ, τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι:

- Τα ΑΠ δεν αλληλεπιδρούν με τη ΜΝΓ για τις συγκεντρώσεις 10% και 20% όταν η ωρίμανση γίνεται σε πλάσμα.
- Οι ιδιότητες και η μορφολογία των ΑΠ δεν μεταβάλλεται για χρόνους ωρίμανσης με τη ΜΝΓ μέχρι και 120 λεπτά, σε πλάσμα.
- Τα ΑΠ καταστρέφονται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης από την παρουσία του φυσιολογικού ορού.

Αυτά τα πρώτα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά μιας και δείχνουν ότι για τις συνθήκες που μελετήθηκαν η ΜΝΓ μπορεί να χαρακτηριστεί ως βιοσυμβατή.

Οι μελλοντικοί στόχοι που τίθενται προκειμένου να εξαχθούν ασφαλέστερα συμπεράσματα είναι:

- Αύξηση του αριθμού των δοτών, προκειμένου να αυξηθεί η στατιστική των ΕΚ, ΛΚ και ΑΠ που μελετώνται και να μπορούν τα αποτελέσματα να γενικευθούν.
- Επέκταση των χρόνων ωρίμανσης καθώς και των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν, προκειμένου να προσδιοριστεί η μέγιστη συγκέντρωση και ο μέγιστος χρόνος ωρίμανσης με τη ΜΝΓ.

## **Βιοσυμβατότητα μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου σε μορφή γέλης με τα έμμορφα στοιχεία του αίματος**

- Μελέτη βιοσυμβατότητας με τα στοιχεία του αίματος όταν η θερμοκρασία της ΜΝΓ είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη, η οποία είναι  $T_{crit} \approx 37^\circ \text{C}$  και μέχρι  $42^\circ \text{C}$  που είναι το άνω όριο για το ανθρώπινο σώμα. Στη παρούσα μελέτη, η θερμοκρασία της ΜΝΓ ήταν μικρότερη από την κρίσιμη ( $20^\circ \text{C}$ ).
- Προτυποποίηση της δόσης της ΜΝΓ ώστε να είναι γνωστή η ακριβής ποσότητα ΝΣ οξειδίου του σιδήρου και πολυμερούς που εισάγεται στον αίμα.
- Μελέτη της σταδιακής αντικατάστασης, για παράδειγμα σε 5 στάδια, του πλάσματος από το φυσιολογικό ορό στην επίδραση της βιωσιμότητας των ΛΚ και των ΑΠ.





## ΠΙΝΑΚΑΣ ΔΟΤΩΝ

Δότης 1	Σταμόπουλος Δημοσθένης
Δότης 2	Παπαμιχαλοπούλου Ελένη
Δότης 3	Υψηλάντης Γιώργος
Δότης 4	Παπαχρήστος Νικόλαος
Δότης 5	Aintzane Pikabea



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] European Committee on the Environment, Public Health and Food Safety, "Regulatory aspects of nanomaterials," European Committee, Brussels, 2009.
- [2] R. Nagarajan, "Nanoparticles: Building Blocks for Nanotechnology," in *Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization*, Washington, DC, American Chemical Society, 2008.
- [3] A. T. Bell, "The Impact of Nanoscience on Heterogeneous Catalysis," *Science*, vol. 299, no. 5613, pp. 1688-1691, 2003.
- [4] G. Schmidt and M. M. Malwitz, "Properties of polymer-nanoparticle composites," *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, p. 103-108, 2003.
- [5] T. Engel and G. KICKELBICK, "Self-healing nanocomposites from silica - polymer core - shell nanoparticles," *Polymer International*, 2013.
- [6] J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J.-H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C.-Y. Hwang, Y.-K. Kim, Y.-S. Lee, D. H. Jeong and M.-H. Cho, "Antimicrobial effects of silver nanoparticles," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 3, no. 1, pp. 95-101, 2007.
- [7] H. Masatake, "Catalysis of Gold Nanoparticles Deposited on Metal Oxides," *CATTECH*, vol. 6, no. 3, pp. 102-115, 2002.
- [8] R. Weissleder, A. Moore, U. Mahmood, R. Bhorade, H. Benveniste, E. A. Chiocca and J. P. Basilion, "In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression," *Nature Medicine*, vol. 6, no. 3, pp. 351-355, 2000.
- [9] I. Celardo, J. Z. Pedersen, E. Traversa and L. Ghibelli, "Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles," *Nanoscale*, vol. 3, no. 4, pp. 1411-1420, 2011.
- [10] M. S. Hirst, A. S. Karakoti, R. D. Tyler, N. Sriranganathan, S. Seal and C. M. Reilly, "Anti-inflammatory Properties of Cerium Oxide Nanoparticles," *Nanotherapeutics*, vol. 5, no. 24, p. 2848-2856, 2009.
- [11] K. S. Murthy, "Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 2, no. 2, pp. 129-141, 2007.
- [12] E. J. W. Verwey and J. T. G. Overbeek, *Theory of stability of lyophobic colloids*, Amsterdam: Elsevier, 1948.
- [13] D. W. Northfelt, B. J. Dezube, J. A. Thommes, B. J. Miller, M. A. Fischl, A. Friedman-Kien, L. D. Kaplan, C. Du Mond, R. D. Mamelok and D. H. Henry, "Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: results of a randomized phase III

- clinical trial," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 16, no. 7, pp. 2445-2451, 1998.
- [14] R. Duncan, "Polymer conjugates as anticancer nanomedicines," *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, no. 9, pp. 688-701, 2006.
- [15] R. S. Molday and D. MacKenzie, "Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells," *Journal of immunological methods*, vol. 52, no. 3, pp. 353-367, 1982.
- [16] C. Del Gratta, S. Della Penna, P. Battista, L. D. Donato, P. Vitullo, G. L. Romani and S. Di Luzio, "Detection and counting of specific cell populations by means of magnetic markers linked to monoclonal antibodies," *Physics in medicine and Biology*, vol. 40, no. 4, pp. 671-681, 1995.
- [17] R. K. Gilchrist, R. Medal, W. D. Shorey, R. C. Hanselman, J. C. Parrot and C. B. Taylor, "Selective Inductive Heating of Lymph Nodes," *Annals of Surgery*, vol. 146, no. 4, p. 596-606, 1957.
- [18] C. Chun-Yan, S. Ying-Ying, W. Jian-Dong, L. Li and L. Gao-Ling, "Controlled intracellular self-assembly of gadolinium nanoparticles as smart molecular MR contrast agents," *Scientific Reports*, vol. 3, pp. 1024-1041, 2013.
- [19] P. Tartaj, M. P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. Gonzalez-Carreno and C. J. Serna, "Synthesis, properties and biomedical applications of magnetic nanoparticles," in *Handbook of Magnetic Materials*, Amsterdam, Elsevier, 2006.
- [20] V. Dusset, C. Gomez, K. G. Petry, C. Delalande and J. M. Caille, "Dose and scanning delay using USPIO for central nervous system macrophage imaging," *MAGMA*, vol. 8, no. 3, pp. 185-189, 1999.
- [21] J. Forcada and H.-A. Roque, "Functionalized Polymer Colloids: Synthesis and Colloidal Stability," *Current Organic Chemistry*, vol. 9, no. 11, 2005.
- [22] B. R. Saunders and B. Vincent, "Microgel particles as model colloids: theory, properties and applications," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 80, no. 1, pp. 1-25, 1999.
- [23] L. Jun, W. Bochu and W. Yazhoo, "Thermo-Sensitive Polymers for Controlled-Drug Delivery Systems," *International journal of pharmacology*, vol. 2, no. 5, pp. 513-519, 2006.
- [24] H. Vihola, A. Laukkanen, L. Valtola, H. Tenhu and J. Hirvonen, "Cytotoxicity of thermosensitive polymers poly(N-isopropylacrylamide), poly(N-vinylcaprolactam) and amphiphilically modified poly(N-vinylcaprolactam)," *Biomaterials*, vol. 26, no. 16, pp. 3055-3064, 2005.
- [25] Y. Park, C. A. Best, K. Badizadegan, R. R. Dasari, M. S. Feld, T. Kuriabova, M. L. Henle, A. J. Levine and G. Popescu, "Measurement of red blood cell mechanics during morphological changes," *PNAS*, vol. 107, no. 15, pp. 6731-6736, 2010.
- [26] X. Huang, Y. Xiao and M. Lang, "Self-assembly of pH-sensitive

- mixed micelles based on linear and star copolymers for drug delivery," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 364, no. 1, pp. 92-99, 2011.
- [27] A. Hanini, A. Schmitt, K. Kacem, F. Chau, S. Ammar and J. Gevard, "Evaluation of iron oxide nanoparticle biocompatibility," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 6, p. 787-794, 2011.
- [28] S. L. Hellstrom, Stanford University, 28 Oct 2007. [Online]. Available:  
<http://large.stanford.edu/courses/2007/ph210/hellstrom1/>. [Accessed 17 Feb 2014].
- [29] Encyclopedia Britannica, "Encyclopedia Britannica," 21 06 2014. [Online]. Available:  
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/380582/microscope/275736/History-of-optical-microscopes>.
- [30] G. Binning, C. Quate and C. Gerber, "Atomic Force Microscope," *Physical Review Letters*, vol. 56, no. 9, pp. 930 - 933, 3 March 1986.
- [31] A. Pikabea, J. Ramos and J. Forcada, "Production of Cationic Nanogels With Potential Use in Controlled Drug Delivery," *Particle & Particle Systems Characterization*, pp. 101-109, 2013.