



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

**ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

---

**Σύνθεση και διερεύνηση αντικαρκινικής δράσης  
χημικά τροποποιημένων νανοσωματιδίων  $\text{TiO}_2$**

*Διπλωματική Εργασία*



**Καλιαμπάκου Χριστίνα**  
**A.M. 05113060**

*Επιβλέπουσα*  
Ε. Α. Παυλάτου, Καθηγήτρια

**ΑΘΗΝΑ 2018**

*Σε όλους όσους δίνουν αυτή τη σκληρή μάχη...*

## Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Χημείας, της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. και στο Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, του τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2017-1018, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας, Ευαγγελίας Παυλάτου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου Καθηγήτρια, Ευαγγελία Παυλάτου, που αφουγκράστηκε τις επιθυμίες μου και μου ανέθεσε ένα θέμα που εντοπίζεται στη διεπιφάνεια της Χημικής Μηχανικής και των Ιατρικών Επιστημών. Η στήριξή της, καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας και, κυρίως, οι κρίσιμες συμβουλές της σε καθοριστικές καμπές, υπήρξαν πολύτιμες για την τελική έκβαση της εργασίας μου. Κυρίως, όμως την ευχαριστώ από καρδιάς για την ευκαιρία και την ώθηση που μου έδωσε στην εξερεύνηση μονοπατιών νέων και συνάμα πολύ ελκυστικών για εμένα.

Σε αυτά τα μονοπάτια δε θα μπορούσα να «περιπλανηθώ» χωρίς την αμέριστη βοήθεια της μεταδιδακτορικής ερευνήτριας κ. Νεφέλης Λαγοπάτη. Βρέθηκε στο πλευρό μου, κάθε στιγμή, από την αρχή μέχρι το τέλος, με τις ευρύτατες γνώσεις της, τις οποίες απλόχερα μου προσέφερε σε κάθε βήμα που μαζί κάναμε. Την ευχαριστώ για το άφθονο χρόνο που μου αφιέρωσε, και τον γλυκό και δημιουργικό τρόπο που υπέμεινε το άγχος μου. Θα είναι για μένα, και στη συνέχεια, πρότυπο και πηγή έμπνευσης.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στον Καθηγητή του τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Ε.Κ.Π.Α., Βασίλειο Γοργούλη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Ιστολογίας- Εμβρυολογίας, και στον Επίκουρο Καθηγητή της ίδιας Σχολής, Αθανάσιο Κοτσίνα, καθώς και σε όλη την ομάδα, που με υποδέχτηκαν θερμά και μου παραχώρησαν τον εξοπλισμό και τις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της αντικαρκινικής δράσης του  $TiO_2$ . Ευχαριστώ, επίσης, την Καθηγήτρια Μαρία Γαζούλη του Εργαστηρίου Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής για τη διάθεση απαραίτητου πειραματικού εξοπλισμού.

Ορισμένοι ακόμη άνθρωποι συνέβαλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας. Ευχαριστώ θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια, της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων – Μεταλλουργών, Ε.Μ.Π., Μαρία Περράκη, για την πολύτιμη βοήθεια στη χρήση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων του Ηλεκτρονικού

Μικροσκοπίου, τη Δρ. Πηνελόπη Γύφτου, Ε.Δ.Ι.Π., της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., για τη βοήθειά της στις αναλύσεις με Φασματοσκοπία Raman, τον κ. Νικόλαο Παναγιώτου, ΕΔ.Ι.Π. της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. και την υποψήφια διδάκτορα Ευδοκία Γαλατά, για τη βοήθειά τους στις αναλύσεις περίθλαση Ακτίνων Χ και τον Δρ. Α. Μαυρίκο, Ε.Δ.Ι.Π. της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων – Μεταλλουργών, Ε.Μ.Π. για την πολύτιμη βοήθειά του.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Αναστασία Δέτση και τον Καθηγητή, Χαράλαμπο Σαρίμβεη που πλαισίωσαν την τριμελή επιτροπή μου και αφιέρωσαν χρόνο, στη μελέτη και εξέταση της εν λόγω διπλωματικής εργασίας.

Σε αυτή την τελευταία στροφή των προπτυχιακών μου σπουδών, στη Σχολή Χημικών Μηχανικών, δεν μπορώ να μην αναφερθώ στους φίλους μου και συμφοιτητές μου. Όλους αυτούς που μαζί δουλεύαμε, μαζί αγωνιούσαμε, μαζί χαρήκαμε.

Τέλος, δεν έχω λόγια να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την απεριόριστη στήριξή τους σε αυτό το στάδιο της ζωής μου, όπως και σε κάθε άλλο. Τους ευχαριστώ για τον τρόπο που μόνο εκείνοι ξέρουν να είναι μαζί μου και όχι απλώς δίπλα μου, σε κάθε βήμα.

Καλιαμπάκου Χριστίνα,

Αθήνα 2018

## Κατάλογος Εικόνων και Σχημάτων

Σχήμα 1. Οι 4 μεγάλοι τεχνολογικοί τομείς που αναμένεται να συνδράμουν καθοριστικά σε κάθε κλάδο της κοινωνικής ζωής τα επόμενα χρόνια [4]...... Error! Bookmark not defined.....	<b>20</b>
Σχήμα 2: Ενεργειακό Διάγραμμα για (Α) Αγωγούς, (Β) Μονωτές και (Γ) Ημιαγωγούς ((Γ1) Ενδογενείς, (Γ2) Εξωγενείς p-Τύπου και (Γ3) Εξωγενείς n-τύπου)[21]......	<b>46</b>
Σχήμα 3. Η εξέλιξη των φωτοκαταλυτών με βάση το TiO <sub>2</sub> (N <sup>3-</sup> , M <sup>5+</sup> ). Τα πλεονεκτήματα (κάτω) και τα μειονεκτήματα (πάνω) [42]......	<b>59</b>
Εικόνα 4. Μοντέλα κρυσταλλικής κυψελίδας διπλά τροποποιημένου TiO <sub>2</sub> με Ag και N [39]......	<b>63</b>
Σχήμα 5. Σχηματική απεικόνιση των τεσσάρων διαφορετικών φάσεων (G1, S, G2, M) του κυτταρικού κύκλου [48]......	<b>68</b>
Εικόνα 6. Διαφορές που παρατηρούνται κατά τον κυτταρικό θάνατο με τη νέκρωση (αριστερά) και κατά την απόπτωση (δεξιά) [43]......	<b>70</b>
Εικόνα 7. Επίδραση παραγόντων προσβολής του DNA μέσω της αυξημένης παραγωγής ROS [57]......	<b>84</b>
Εικόνα 8. Συντακτικός και μοριακός τύπος του αλκοξειδίου τιτανίου.....	<b>85</b>
Σχήμα 9. Σχηματική αναπαράσταση Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης.....	<b>88</b>
Εικόνα 10. Απεικόνιση του Δείγματος 1 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x500).....	<b>93</b>
Εικόνα 11. Απεικόνιση του Δείγματος 1 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x1000).....	<b>93</b>
Εικόνα 12. Απεικόνιση του Δείγματος 1 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x2000).....	<b>94</b>
Εικόνα 13. Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 6 (Δείγμα 1).....	<b>94</b>
Εικόνα 14. Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 7 (Δείγμα 1).....	<b>96</b>
Εικόνα 15. Απεικόνιση του Δείγματος 2 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x500).....	<b>98</b>
Εικόνα 16. Απεικόνιση του Δείγματος 2 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x1000).....	<b>98</b>
Εικόνα 17. Απεικόνιση του Δείγματος 2 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x2000).....	<b>99</b>
Εικόνα 18. Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 1 (Δείγμα 2).....	<b>99</b>
Εικόνα 19. Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 2 (Δείγμα 2).....	<b>101</b>
Εικόνα 20. Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 2 (Δείγμα 2).....	<b>102</b>
Εικόνα 21. Απεικόνιση του Δείγματος 3 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x500).....	<b>104</b>
Εικόνα 22. Απεικόνιση του Δείγματος 3 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x1000).....	<b>104</b>
Εικόνα 23. Απεικόνιση του Δείγματος 3 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x2000).....	<b>105</b>
Εικόνα 24. Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 3 (Δείγμα 3).....	<b>105</b>
Εικόνα 25. Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 4 (Δείγμα 3).....	<b>106</b>

Εικόνα 26. Απεικόνιση του Δείγματος 4 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x500).....	<b>108</b>
Εικόνα 27. Απεικόνιση του Δείγματος 4 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x1500) .....	<b>108</b>
Εικόνα 28. Απεικόνιση του Δείγματος 4 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x2000) .....	<b>108</b>
Εικόνα 29. Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 3 (Δείγμα 4).....	<b>109</b>
Εικόνα 30. Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 1 (Δείγμα 4).....	<b>109</b>
Σχήμα 31. Οργανολογία φασματοσκοπίας περίθλασης Ακτίνων Χ [12] .....	<b>121</b>
Εικόνα 32. Φασματόμετρο Περίθλασης Ακτίνων Χ, Σχολής Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα .....	<b>122</b>
Εικόνα 33. Σχηματική απεικόνιση οπτικού μικροσκοπίου[1].....	<b>128</b>
Εικόνα 34. Άποψη των κυττάρων MDA-MB-468 από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο: α)36 ώρες μετά την ανακαλλιέργεια και β) 36 ώρες πριν τη νέα ανακαλλιέργεια .....	<b>131</b>
Εικόνα 35. Αιμοκυτταρόμετρο. Α. Πλάγια όψη και κάτοψη τυπικού αιμοκυτταρόμετρου, που φέρει δύο πλέγματα μέτρησης. Β. Μεγεθυμένη άποψη του πλέγματος μέτρησης. Γ. Μεγεθυμένο μικρό τετράγωνο. Από τα κύτταρα που εφάπτονται στη περίμετρο, μετρούμε μόνον εκείνα που υπάρχουν στην επάνω και στην αριστερή πλευρά του τετραγώνου .....	<b>135</b>
Εικόνα 36. Φιάλη με χρωστική μπλε τρυπάνης.....	<b>137</b>
Εικόνα 37. Πλάκα 96 φρεατίων μετά από τη δοκιμή ΜΤΤ. Από τα αριστερά προς τα δεξιά, κάθε στήλη με τετράδα όμοιων δειγμάτων: (α) αρνητικός μάρτυρας του πειράματος (control), (β) 0,05 mg/ml Ag/N/TiO <sub>2</sub> , (γ) 0,1 mg/ml Ag/N/TiO <sub>2</sub> , (δ)0,2 mg/ml Ag/N/TiO <sub>2</sub> , (ε) 2 mg/ml Ag/N/TiO <sub>2</sub> , (στ) 20 mg/ml Ag/N/TiO <sub>2</sub> .....	<b>145</b>

## Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Πυκνότητα Καταστάσεων (Projected Density of States –PDOS) για α) καθαρό TiO <sub>2</sub> b) (Ag) TiO <sub>2</sub> c) (N) TiO <sub>2</sub> d) (Ag,N)- TiO <sub>2</sub> [39].....	62
Διάγραμμα 2. Πυκνότητα Καταστάσεων (Projected Density of States –PDOS) για α) καθαρό TiO <sub>2</sub> b) (Ag) – TiO <sub>2</sub> c) (N) – TiO <sub>2</sub> d) (Ag, –N)- TiO <sub>2</sub> [39].....	62
Διάγραμμα 3. Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 6 (Δείγμα 1) ..	95
Διάγραμμα 4. Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 7 (Δείγμα 1) ..	97
Διάγραμμα 5. Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 1 (Δείγμα 2) ..	100
Διάγραμμα 6. Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 2 (Δείγμα 2) ..	102
Διάγραμμα 7: Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 2 (Δείγμα 2) ..	103
Διάγραμμα 8. Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 3 (Δείγμα 3) ..	106
Διάγραμμα 9. Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 4 (Δείγμα 3) ..	107
Διάγραμμα 10. Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 3 (Δείγμα 4)..	109
Διάγραμμα 11. Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 1 (Δείγμα 4)..	110
Διάγραμμα 12: Τυπικό φάσμα σκέδασης Raman, στο οποίο φαίνονται η ζώνη ελαστικής σκέδασης .....	111
Διάγραμμα 13. Χαρακτηριστικό φάσμα Raman του υλικού, βάσει του οποίου ταυτοποιείται η παρουσία του ανατάση από την κύρια κορυφή στους 142 κυματαριθμούς (σημείο 1) .....	116
Διάγραμμα 14. Χαρακτηριστικό φάσμα Raman του υλικού, βάσει του οποίου ταυτοποιείται η παρουσία του ανατάση από την κύρια κορυφή στους 142 κυματαριθμούς (σημείο 2).....	117
Διάγραμμα 15. Χαρακτηριστικό φάσμα Raman του υλικού, βάσει του οποίου ταυτοποιείται η παρουσία του ανατάση από την κύρια κορυφή στους 142 κυματαριθμούς (σημείο 3).....	117
Διάγραμμα 16. Ακτινοδιαγράμματα ανατάση.....	124
Διάγραμμα 17. Περιθλασιόγραμμα ακτίνων-X του υλικού, στο οποίο διακρίνονται οι ανακλάσεις του ανατάση με κόκκινο .....	124
Διάγραμμα 18. Διάγραμμα ροής μελέτης αντικαρκινικής δράσης.....	127
Διάγραμμα 19. Καμπύλες ανάπτυξης στα κύτταρα MDA-MB-468 παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης Ag/N/TiO <sub>2</sub> .....	139
Διάγραμμα 20. Καμπύλες ανάπτυξης στα κύτταρα MDA-MB-468 παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης Ag/N/TiO <sub>2</sub> και μετά από φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία.....	140
Διάγραμμα 21. Καμπύλες ανάπτυξης στα κύτταρα MDA-MB-468 με και χωρίς φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία.....	141
Διάγραμμα 22. Καμπύλες ανάπτυξης στα κύτταρα MDA-MB-468 παρουσία 0,05mg/ml Ag/N/TiO <sub>2</sub> με και χωρίς φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία...	141
Διάγραμμα 23. Καμπύλες ανάπτυξης στα κύτταρα MDA-MB-468 παρουσία 0,1mg/ml Ag/N/TiO <sub>2</sub> με και χωρίς φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία.....	142

Διάγραμμα 24. Καμπύλες ανάπτυξης στα κύτταρα MDA-MB-468 παρουσία 0,2mg/ml Ag/N/TiO <sub>2</sub> με και χωρίς φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία.....	142
Διάγραμμα 25. Καμπύλες ανάπτυξης στα κύτταρα MDA-MB-468 παρουσία 2mg/ml Ag/N/TiO <sub>2</sub> με και χωρίς φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία.....	143
Διάγραμμα 26. Καμπύλες ανάπτυξης στα κύτταρα MDA-MB-468 παρουσία 20 mg/ml Ag/N/TiO <sub>2</sub> με και χωρίς φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία.....	143
Διάγραμμα 27. Μελέτη βιωσιμότητας των κυττάρων MDA-MB-468, παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης Ag/N/TiO <sub>2</sub> , με και χωρίς φωτοενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία.....	146
Διάγραμμα 28. Μελέτη βιωσιμότητας των κυττάρων MDA-MB-468, παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης Ag/N/TiO <sub>2</sub> , με και χωρίς φωτοενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία.....	147



## **Κατάλογος Πινάκων**

Πίνακας 1. Ποσοστό αποτελεσματικότητας φαρμάκων που χορηγούνται σε ασθενείς [10].....	<b>24</b>
Πίνακας 2: Κύριες Δομές Πολυμορφισμού του $\text{TiO}_2$ και τα χαρακτηριστικά τους...	<b>41</b>
Πίνακας 3. Δείγματα που μελετήθηκαν με SEM .....	<b>91</b>
Πίνακας 4. Πρότυπες γωνίες περίθλασης του $\text{TiO}_2$ .....	<b>126</b>

## Περίληψη

Η επιστημονική κοινότητα προσεγγίζει την πολυπαραγοντική νεοπλασματική νόσο, ποικιλοτρόπως. Η εύρεση εναλλακτικών μορφών θεραπείας του καρκίνου είναι ζήτημα ανοιχτό και γεμάτο προκλήσεις. Η πιθανή θεραπευτική χρήση των νανοδομημένων υλικών σε κάποιες μορφές καρκίνου μελετάται διεξοδικά τα τελευταία χρόνια, με σκοπό να αντικατασταθούν οι συμβατικές θεραπείες και φυσικά να εκλείψουν οι ανεπιθύμητες παρενέργειες που τις συνοδεύουν.

Πλήθος ερευνητικών εργασιών υποστηρίζουν ότι το διοξείδιο του τιτανίου ( $\text{TiO}_2$ ), αυτό το πρότυπο φωτοκαταλυτικό νανοϋλικό, με το πλήθος των εφαρμογών, είναι πολλά υποσχόμενος αντικαρκινικός παράγοντας, μέσω της φωτοδυναμικής θεραπείας, που θα μπορούσε να είναι μια σύγχρονη και αποτελεσματική θεραπεία, αφού σχετίζεται με πρόκληση οξειδωτικού στρες και προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Είναι πολλές οι μελέτες που εστιάζουν στην τροποποίηση πολλών φυσικοχημικών παραμέτρων του διοξειδίου του τιτανίου, με σκοπό να ελέγξουν καλύτερα τα χαρακτηριστικά που φαίνεται να αυξάνουν τη φωτοκαταλυτική του απόδοση. Συχνά αυτό καθίσταται δυνατό, με τη χημική τροποποίηση. Πολλές από αυτές τις προσπάθειες φαίνεται να έχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, όπως προκύπτει από πλήθος δημοσιευμένων ερευνητικών άρθρων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, στόχος είναι η σύνθεση διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άργυρο και άζωτο,  $\text{Ag/N/TiO}_2$ , ώστε να επιτευχθεί μικρότερο μέγεθος νανοσωματιδίων, με τη δυνατότητα να φωτο-ενεργοποιούνται στο ορατό τμήμα του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και όχι μόνο στο υπεριώδες, που είναι εφικτό για το καθαρό διοξείδιο του τιτανίου, και που δεν ενδείκνυται για ιατρικούς σκοπούς, αφού δημιουργεί και το ίδιο προβλήματα που πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν. Τελικός σκοπός είναι η διερεύνηση της αντικαρκινικής δράσης των παραγόμενων νανοσωματιδίων.

Έτσι πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του  $\text{Ag/N/TiO}_2$  και ο χαρακτηρισμός του με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, με *micro-Raman* φασματοσκοπία και με περίθλαση ακτίνων Χ. Στη συνέχεια δοκιμάστηκε σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, με και χωρίς φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία, σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού, που καλλιεργούνται για τον σκοπό αυτό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει αύξηση της τοξικότητας του διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άργυρο και άζωτο, στα κύτταρα, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωσή του. Δεν

παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη βελτίωση αυτής της ικανοποιητικής επίδρασης, μετά τη φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία. Η έρευνα αυτή θα μπορούσε να επεκταθεί αρχικά με τη διερεύνηση της πιθανής τροποποίησης της μεθόδου σύνθεσης ή παραμέτρων αυτής, όπως είναι η αλλαγή πρόδρομης ένωσης, ο έλεγχος της επίδρασης της περιεκτικότητας νιτρικού αργύρου ( $\text{AgNO}_3$ ), η αλλαγή της πηγής του φορέα τροποποίησης αζώτου (N), η μεταβολή της θερμικής διεργασίας. Σίγουρα θα μπορούσε να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση του διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άργυρο και άζωτο, στο βιολογικό σύστημα και η αντικαρκινική του δράση, με διερεύνηση μοριακών μηχανισμών. Επίσης θα μπορούσε να βελτιωθεί το πρωτόκολλο μετρήσεων μελέτης βιωσιμότητας, μέσω αλλαγής κάποιων παραγόντων όπως είναι η αύξηση του χρόνου ακτινοβολήσης των δειγμάτων, με σκοπό τη φωτο-ενεργοποίηση.

### **Λέξεις Κλειδιά**

Διοξείδιο του τιτανίου, Άργυρος, Άζωτο, Χημική Τροποποίηση, Φωτοκατάλυση, Αντικαρκινική Δράση, Καρκινικά Επιθηλιακά Κύτταρα Μαστού (MDA-MB-468), MTT, κυτταροτοξικότητα.

## Abstract

The scientific community approaches the multivariate cancer disease in many ways. There are still aspects of the research field of alternative cancer treatments that remains to be discovered, focusing on the elimination of the undesirable consequences of the conventional treatment methods and shedding light on the possible therapeutic use of nanostructured materials.

Recent studies demonstrate the photocatalytic properties of titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ )-mediated toxicity, which seems to eradicate cancer cells, via the mechanism of oxidative stress, inducing apoptosis.  $\text{TiO}_2$  is considered as an ideal photocatalyst with the potential to be used in a variety of advanced applications. Among other it could be a promising anticancer agent, via its use on the photodynamic therapy.

Many studies focus on the modification of some of the physical and chemical properties of  $\text{TiO}_2$  in order to control its photocatalytic efficiency. This can be achieved partly through chemical doping. The results are quite interesting, and this is demonstrated via the increased number of published research articles in this field.

The aim of this study is the synthesis of co-doped nanoparticles of  $\text{TiO}_2$  with silver and nitrogen,  $\text{Ag/N/TiO}_2$ , with satisfactorily small size with the potential to photo-induce anticancer effect, in the presence of visible light, in contrast to pure  $\text{TiO}_2$  which can be photo-activated only with UV light, which is proven to be dangerous for human tissues.

For this reason, the development of  $\text{Ag/N/TiO}_2$  and the full characterization if it, was undergone with Scanning Electron Microscope (SEM), micro-Raman spectroscopy, and X rays diffraction method (XRD). Subsequently, different concentrations of  $\text{Ag/N/TiO}_2$  were tested on cultured breast cancer epithelial cells, in the presence of visible light. The primary results showed that there is remarkable increase of the toxicity of  $\text{Ag/N/TiO}_2$  as the concentration increases. There is no significant improvement of this effect after the photo-excitement of  $\text{Ag/N/TiO}_2$  with visible light.

Our future perspectives include the optimization of synthesis method. This can be achieved by minor changes in the preparation process or changes in some important parameters, such as the use of another precursor and or other chemical compound as a source of dopant (N), regulation of the content of silver nitrate or other thermal process protocol. Furthermore from a biological point of view, it could be interesting to investigate the molecular mechanisms of cell death. Also it is important to optimize the

methodology of the experimental procedure by increasing of time of photo-activation upon irradiation with visible light

### **Key Words**

Titanium Dioxide, Silver, Nitrogen, Chemical Doping, Photocatalysis, Anticancer Effect, Breast Cancer Epithelial Cells (MDA-MB-468), MTT, cytotoxicity.

## Πίνακας Περιεχομένων

Πρόλογος - Ευχαριστίες .....	iii
Κατάλογος Εικόνων και Σχημάτων .....	v
Κατάλογος Διαγραμμάτων.....	vii
Κατάλογος Πινάκων.....	ix
Περίληψη.....	x
Λέξεις Κλειδιά .....	xi
Abstract .....	xii
Key Words.....	xiii
Πίνακας Περιεχομένων .....	xiv
Σχηματική αναπαράσταση υλοποίησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας .....	xviii
A. Εισαγωγή.....	19
A.1. Τεχνολογία στο Σύγχρονο Κόσμο .....	19
A.1.1. Έρευνα και Τεχνολογία .....	19
A.1.2. Βιοτεχνολογία.....	20
A.1.2.1. Κόκκινη Βιοτεχνολογία ( ή Βιοϊατρική Μηχανική) .....	21
A.1.3. Νανοτεχνολογία.....	25
A.2.3. Άλλες εφαρμογές της νανοτεχνολογίας .....	30
B. Καρκίνος.....	32
B.1. Γενικά.....	32
B.2. Καρκίνος του Μαστού .....	34
B.3. Καινοτομίες στην αντιμετώπιση του καρκίνου.....	36
B.4. Η πρόοδος στην αντιμετώπιση του καρκίνου σήμερα.....	37
Γ. Διοξείδιο Του Τιτανίου.....	39
Γ.1. Τιτάνιο .....	39
Γ.1.1. Γενικά Χαρακτηριστικά.....	39
Γ.2. Διοξείδιο του Τιτανίου.....	40
Γ.2.1. Γενικά Χαρακτηριστικά.....	40
Γ.2.2. Εφαρμογές .....	42
Δ. Ενεργειακές Ζώνες και Αγωγιμότητα των Κρυσταλλικών Υλικών.....	46
Δ.1. Γενικά.....	46
Δ.1.1. Ημιαγωγοί.....	47

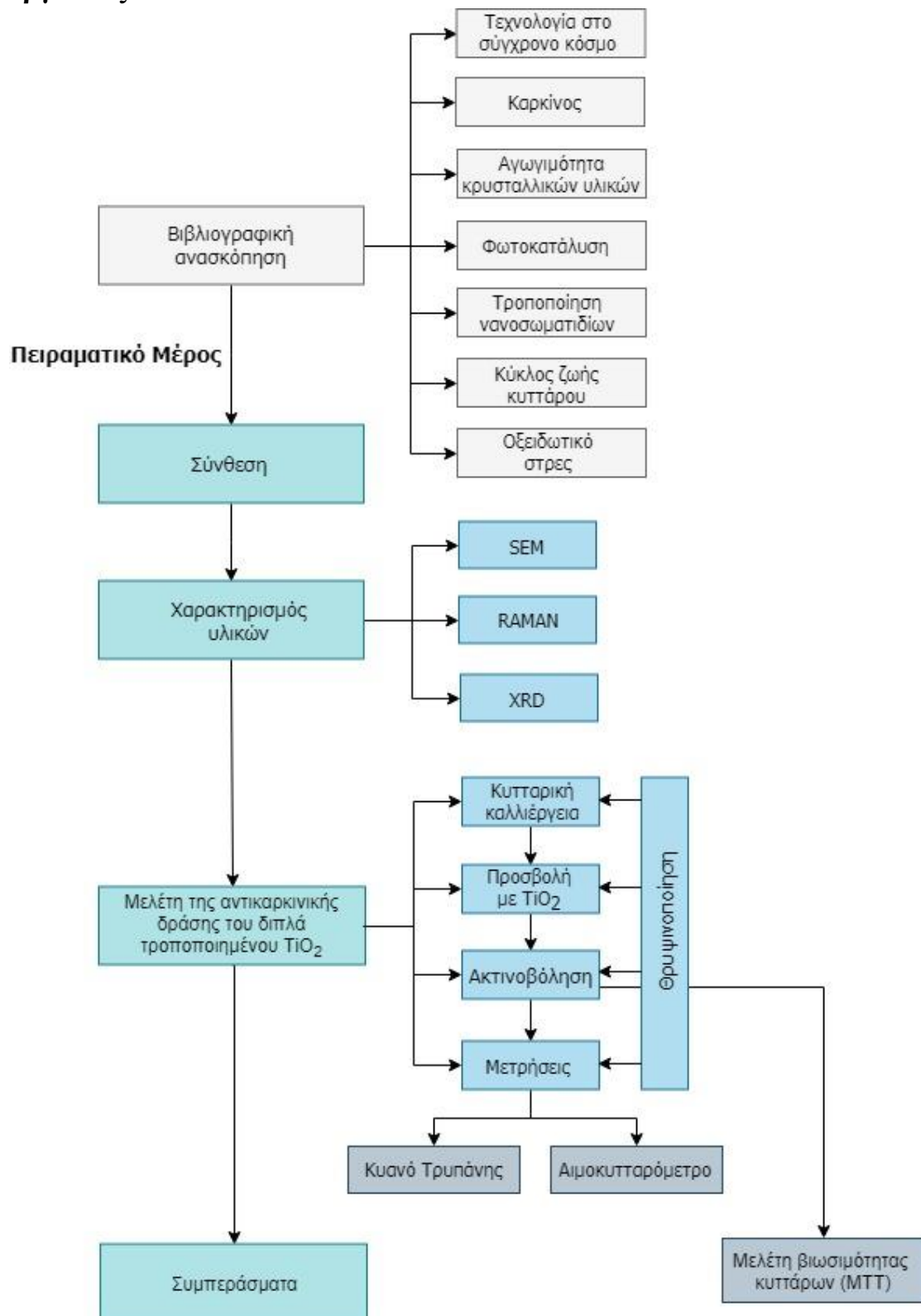
E. Φωτοκατάλυση .....	50
E.1. Γενικά.....	50
E.2. Φωτοκαταλύτες .....	50
E.2.1. Κριτήρια επιλογής φωτοκαταλύτη .....	50
E.3. Μηχανισμός Φωτοκατάλυσης .....	51
ΣΤ. Τροποποίηση Νανοδομημάτων για Βέλτιστη Φωτοκαταλυτική Απόδοση .....	53
ΣΤ.1. Χημική τροποποίηση νανοδομημάτων (Doping).....	53
ΣΤ.1.1. Χημική Τροποποίηση του TiO <sub>2</sub> με Άργυρο .....	56
ΣΤ.1.2. Χημική Τροποποίηση του TiO <sub>2</sub> με Άζωτο .....	57
ΣΤ.2. Διπλή Χημική Τροποποίηση Νανοδομημάτων (Co-doping) .....	58
ΣΤ.2.1. Διπλή τροποποίηση του TiO <sub>2</sub> με Άζωτο - Μέταλλο .....	59
ΣΤ.3. Εφαρμογές της τροποποίησης νανοδομημάτων TiO <sub>2</sub> στον τομέα της Βιοϊατρικής .....	63
ΣΤ.3.1. Αντικαρκινική δράση τροποποιημένων νανοδομημάτων TiO <sub>2</sub> .....	64
Z. Κύκλος Ζωής Κυττάρου .....	66
Z.1. Κυτταρικός Κύκλος.....	66
H. Οξειδωτικό Στρες.....	75
H.1. Γενικά .....	75
H.2. Ελεύθερες Ρίζες ή Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) .....	77
H.3. Επίδραση Οξειδωτικού Στρες στα Κύτταρα .....	78
H.3.1. Οξειδωτικό στρες και καρκινογένεση .....	79
H.4. Αντιοξειδωτικά .....	80
H.5. Οξειδωτικό στρες και αντικαρκινική δράση .....	82
Θ. Πειραματικό Μέρος – Σύνθεση TiO <sub>2</sub> .....	85
Θ.1. Σύνθεση .....	85
Θ.1.1. Σύνθεση διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άζωτο και άργυρο, Ag/N/TiO <sub>2</sub> .....	85
Θ.1.1.1. Υλικά .....	85
Θ.1.1.2. Μέθοδος.....	85
Θ.1.2. Μέθοδος.....	85
Θ.2. Χαρακτηρισμός Δειγμάτων .....	87
Θ.2.1. Χαρακτηρισμός με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Electron Microscope- SEM) .....	87
Θ.2.1.1. Αρχή λειτουργίας.....	87
Θ.2.1.2. Προετοιμασία Δείγματος.....	89

Θ.2.1.3. Εφαρμογές.....	90
Θ.2.1.4. Χαρακτηρισμός δειγμάτων της παρούσας μελέτης με SEM .....	91
Θ.2.1.4.1. Εξοπλισμός – Τεχνικά Χαρακτηριστικά.....	91
Θ.2.1.5. Αποτελέσματα από την ανάλυση σε SEM .....	93
Θ.2.1.5.1. Αποτελέσματα από την ανάλυση διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άζωτο (πηγή προέλευσης: ουρία) και άργυρο, Ag/N/TiO <sub>2</sub> (ουρία) (Δείγμα 1) .....	93
Θ.2.1.5.2. Αποτελέσματα από την ανάλυση διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άζωτο (πηγή προέλευσης: αμμωνία) και άργυρο, Ag/N/TiO <sub>2</sub> (αμμωνία) (Δείγμα 2) .....	98
Θ.2.1.5.3. Αποτελέσματα από την ανάλυση τροποποιημένου διοξειδίου του Τιτανίου με Άζωτο (πηγή προέλευσης: ουρία), N/TiO <sub>2</sub> (ουρία) (Δείγμα 3)....	104
Θ.2.1.5.4. Αποτελέσματα από την ανάλυση τροποποιημένου διοξειδίου του Τιτανίου με Άργυρο, Ag/TiO <sub>2</sub> (Δείγμα 4) .....	107
Θ.2.1.6. Παρατηρήσεις.....	110
Θ.2.2. Χαρακτηρισμός δειγμάτων με φασματοσκοπία Raman .....	111
Θ.2.2.1. Αρχή Λειτουργίας.....	111
Θ.2.2.2. Οργανολογία.....	112
Θ.2.2.3. Εφαρμογές.....	113
Θ.2.2.4. Χαρακτηρισμός δείγματος διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άζωτο και άργυρο, Ag/N/TiO <sub>2</sub> με ανάλυση micro-Raman.....	116
Θ.2.2.4.1. Αποτελέσματα από την ανάλυση του διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άζωτο και άργυρο, Ag/N/TiO <sub>2</sub> με ανάλυση micro-Raman.....	116
Θ.2.3. Χαρακτηρισμός δειγμάτων με Φασματοσκοπία Ακτίνων X .....	118
Θ.2.3.1. Αρχή Λειτουργίας.....	118
Θ.2.3.2. Οργανολογία.....	120
Θ.2.3.3. Εφαρμογές.....	122
Θ.2.3.4. Χαρακτηρισμός δείγματος διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άζωτο και άργυρο, Ag/N/TiO <sub>2</sub> με περίθλαση ακτίνων X .....	123
Θ.2.3.4.1. Αποτελέσματα από την ανάλυση του διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άζωτο και άργυρο, Ag/N/TiO <sub>2</sub> με περίθλαση ακτίνων X.....	123
I. Πειραματικό Μέρος – Αντικαρκινική δράση.....	127
I.1. Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης του διπλά τροποποιημένου Ag/N/TiO <sub>2</sub> .....	127
I.1.1. Διάγραμμα Ροής .....	127
I.1.2. Οπτικό Μικροσκόπιο.....	127



I.1.2.1. Γενικά.....	127
I.1.2.2. Τα μέρη του οπτικού μικροσκοπίου .....	128
I.1.2.3. Χρήση Οπτικού Μικροσκοπίου .....	129
I.1.3. Καλλιέργεια Κυττάρων και συντήρηση κυττάρων.....	131
I.1.4. Μέτρηση Κυττάρων .....	134
I.1.4.1. Μέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο.....	134
I.1.5. Χορήγηση δείγματος στην Καλλιέργεια Κυττάρων .....	136
I.1.6. Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας μέσω αποκλεισμού Κυανού Τρυπάνης	136
I.1.6.1. Δημιουργία καμπύλης ανάπτυξης, με και χωρίς την προσθήκη Ag/N/TiO <sub>2</sub> .....	138
I.1.7. Μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων - MTT colorimetric assay .....	144
<b>K. Ανακεφαλαίωση – Συμπεράσματα.....</b>	<b>148</b>
<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>150</b>

## Σχηματική αναπαράσταση υλοποίησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας



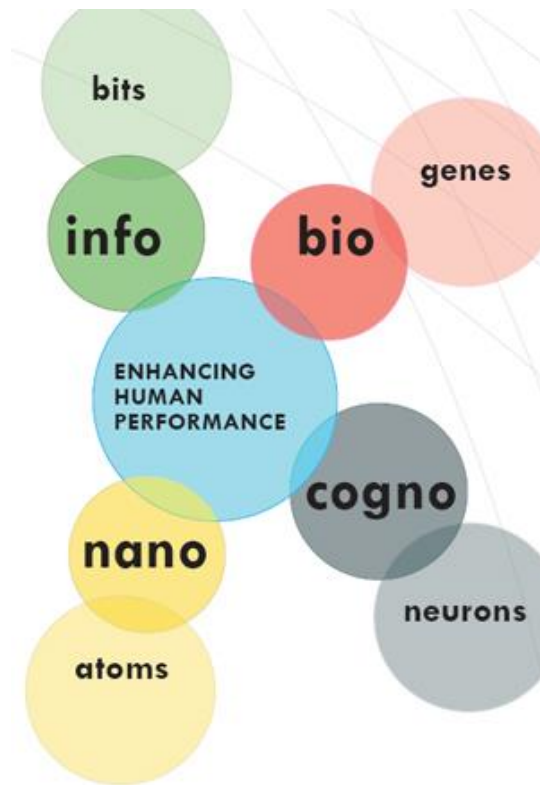
## **A. Εισαγωγή**

### **A.1. Τεχνολογία στο Σύγχρονο Κόσμο**

#### **A.1.1. Έρευνα και Τεχνολογία**

Η τεχνολογία και η επιστήμη εξελίσσονται με ραγδαίους ρυθμούς και αυτό επηρεάζει την καθημερινότητα όλου σχεδόν του πληθυσμού της Γης. Η επιστημονική κοινότητα εμφανίζεται ασυνήθιστα διευρυμένη αριθμητικά, ενώ παράλληλα πολλαπλασιάζονται παγκοσμίως, οι διαθέσιμοι πόροι για την έρευνα και την τεχνολογία. Ακόμη, ο χρόνος μεταξύ μιας επιστημονικής ανακάλυψης και της πρακτικής εφαρμογής της έχει μειωθεί αισθητά, με αποτέλεσμα να μπορεί πολύ σύντομα ένα νέο τεχνολογικό επίτευγμα να αποτελεί πραγματικό οικονομικό και υλικό αγαθό, αλλάζοντας και βελτιώνοντας τη ζωή δεσεκατομμυρίων κατοίκων του πλανήτη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ταχύτατη διάδοση της κινητής τηλεφωνίας. Μάλιστα αναμένεται στα επόμενα δύο χρόνια, σύμφωνα με τη μελέτη του P. Sharma (2013), να εισαχθούν τα ασύρματα συστήματα 5ης γενιάς (5G) [1].

Σχεδόν όλοι οι επιστημονικοί κλάδοι βρίσκονται σε ανάπτυξη. Όμως, είναι ευρέως αποδεκτό, όπως αναλύεται και στις δημοσιεύσεις των S .A. Zhironkin κ.ά. (2017), και H. R. Jamali κ.ά. (2018), ότι τέσσερις μεγάλοι τεχνολογικοί τομείς, η Νανοτεχνολογία, η Βιοτεχνολογία, η Πληροφορική και Τεχνητή Νοημοσύνη (Nano-Bio-Info-Cogno-NBIC), θα επιδράσουν καθοριστικά όχι μόνο στη διαμόρφωση του επιστημονικού γίγνεσθαι αλλά και στο ίδιο το μέλλον του πλανήτη, αφού αναμένεται να επιδράσουν καταλυτικά όχι μόνο σε κάθε τεχνολογικό κλάδο αλλά και σε κάθε πλευρά της κοινωνικής ζωής. Ένα πρόσθετο ενδιαφέρον στοιχείο για τις τεχνολογίες αυτές είναι ότι έχουν μεταξύ τους πολλές διεπιφάνειες. Για το λόγο αυτό συχνά αναφέρονται ως Συγκλίνουσες Τεχνολογίες (Converging Technologies). Όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στο Σχήμα 1, η Πληροφορική, με θεμελιώδη μονάδα της το δυαδικό ψηφίο (bit), η Βιοτεχνολογία, με το γονίδιο, η Νανοτεχνολογία, με το άτομο και η Τεχνητή Νοημοσύνη, με τους νευρώνες, συγκλίνουν με κοινό στόχο τη βελτίωση της ανθρώπινης απόδοσης. Ο όρος αυτός είναι ευρύτατος, αφού συμπεριλαμβάνει πολλές συνιστώσες που καθορίζουν σημαντικά στοιχεία που επηρεάζουν την ποιότητα ζωής του ανθρώπου, έως και την παραγωγικότητα μεγάλων τεχνολογικών κλάδων [2, 3].



**Σχήμα 1.** Οι 4 μεγάλοι τεχνολογικοί τομείς που αναμένεται να συνδράμουν καθοριστικά σε κάθε κλάδο τη κοινωνικής ζωής τα επόμενα χρόνια [4].

Στη συνέχεια ακολουθεί σύντομη παρουσίαση των βασικών χαρακτηριστικών της Βιοτεχνολογίας και της Νανοτεχνολογίας, που σχετίζονται με το αντικείμενο της παρούσας εργασίας καθώς, επίσης, και της Νανοβιοτεχνολογίας, που αποτελεί σημείο συνάντησής τους.

### **A.1.2. Βιοτεχνολογία**

Η Βιοτεχνολογία είναι ο διεπιστημονικός κλάδος που αφορά στην αξιοποίηση των κυττάρων (μικροβιακών, ζωϊκών, φυτικών) και των συστατικών τους (ενζύμων) ή/και ολόκληρων οργανισμών με στόχο την παραγωγή προϊόντων, αγαθών και την προσφορά υπηρεσιών.

Ο τομέας της Βιοτεχνολογίας, συμβατικά, διακρίνεται σε 4 κλάδους:

**Λευκή Βιοτεχνολογία:** Χρήση βιολογικών συστημάτων σε αντικατάσταση της παραδοσιακής χημείας (ζυμώσεις-βιοκατάλυση, συνθετική βιολογία/ βιοτεχνολογία και πλήθος άλλων εφαρμογών).

Κόκκινη Βιοτεχνολογία: Χρήση βιοδιεργασιών για την παραγωγή προϊόντων και υπηρεσιών ιατρικών εφαρμογών

Πράσινη Βιοτεχνολογία: Χρήση βιοδιεργασιών για την παραγωγή προϊόντων αγροτικών εφαρμογών

Μπλε Βιοτεχνολογία: Χρήση βιοδιεργασιών για την αξιοποίηση πρώτων υλών από τον θαλάσσιο οικοσύστημα [5, 8, 9].

#### **A.1.2.1. Κόκκινη Βιοτεχνολογία ( ή Βιοϊατρική Μηχανική)**

Η Βιοϊατρική Μηχανική είναι ένας σχετικά νέος διεπιστημονικός τομέας, που συνδυάζει την τεχνογνωσία των επιστημών του μηχανικού και των επιστημών υγείας. Ξεκίνησε ως μια διεπιστημονική εξειδίκευση, αλλά στις Η.Π.Α. (και σε πολλές άλλες περιοχές του κόσμου) θεωρείται πλέον ξεχωριστό επιστημονικό πεδίο, με περισσότερα από ενενήντα πανεπιστήμια να παρέχουν προπτυχιακά προγράμματα σπουδών στην Βιοϊατρική Μηχανική. Στην άνθηση αυτού του επιστημονικού πεδίου συνετέλεσαν η ύπαρξη σημαντικών χρηματοδοτήσεων από δημόσιες (National Institutes of Health) και ιδιωτικές πηγές (Whitaker, Coulter Foundations και άλλες) αλλά και οι προβλέψεις για σημαντική αύξηση της ζήτησης μηχανικών της βιοϊατρικής μέσα στην επομένη δεκαετία (άνω του 60%). Η ανάπτυξη της Βιοϊατρικής Μηχανικής βασίστηκε κυρίως σε μηχανικούς διαφόρων ειδικοτήτων (Χημικοί, Ηλεκτρολόγοι, Μηχανολόγοι, Μηχανικοί Υπολογιστών), με τους Χημικούς Μηχανικούς να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στους τομείς της μηχανικής των κυττάρων και των ιστών, στα βιοϋλικά και στη μοντελοποίηση συστημάτων και διεργασιών. Ο όρος βιοτεχνολογία, όπως συναντάται στον τομέα της Ιατρικής, αναφέρεται στη χρήση ζωντανών συστημάτων ή μοριακής μηχανικής για τη δημιουργία και την κατασκευή βιολογικών θεραπειών και προϊόντων για τη φροντίδα των ασθενών. Χρησιμοποιείται πλέον ευρέως και καλύπτει ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών, αξιοποιώντας τα επιτεύγματα της μοριακής βιολογίας αλλά και άλλων τεχνολογιών αιχμής όπως η γενετική μηχανική και η ιστομηχανική.

Σημαντικές ερευνητικές προσπάθειες σημειώνονται με σκοπό την αντιμετώπιση επικίνδυνων ασθενειών, όπως οι αιματολογικές διαταραχές (θρομβοπενική πορφύρα και άλλες), τα αυτοάνοσα νοσήματα (ερυθηματώδης λύκος και άλλα), η λευχαιμία, διάφορες μορφές καρκίνου, η νευροεκφυλιστική νόσος Αλτσχάιμερ και άλλες. Η

ανάπτυξη μοριακά τροποποιημένων εμβολίων, μεγάλων πρωτεϊνικών μορίων, πεπτιδίων, χημικών και βιολογικών αντιδραστηρίων, η τεχνητή κατασκευή ιστών και οργάνων, η γονιδιακή θεραπεία γενετικών νόσων, η προεμφυτευτική διάγνωση, η μελέτη του φαινομένου της γήρανσης και η έρευνα για τη δημιουργία ιστών από πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα είναι μόνο μερικά από τα σύγχρονα επιτεύγματα της βιοτεχνολογίας στην ιατρική. Κατά τους R. Evens και K. Kaitin (2015), η πιο διαδεδομένη συμβολή της Βιοϊατρικής Μηχανικής, στη σύγχρονη ιατρική πρακτική είναι η αντιμετώπιση του καρκίνου, μέσω της απομόνωσης ουσιών στον καρκινικό ιστό ή στο αίμα των ασθενών, μεγιστοποιώντας τα οφέλη της χορηγούμενης θεραπείας. Τα βιοτεχνολογικά φάρμακα λειτουργούν αυτοδύναμα ή και συμπληρωματικά με τα συμβατικά, προσφέροντας μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στις χορηγούμενες θεραπείες [5].

Η δυναμική ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας στο σύγχρονο κόσμο φαίνεται και από τα ακόλουθα ενδεικτικά ποσοτικά δεδομένα. Τα τελευταία τουλάχιστον τριάντα πέντε χρόνια, η βιομηχανία της βιοτεχνολογίας έχει σημειώσει εξαιρετική πρόοδο, η οποία περιλαμβάνει την ανάπτυξη περισσότερων από είκοσι καινοτόμων τεχνολογιών που οδηγούν στην ανάπτυξη νέων προϊόντων, την έγκριση περισσότερων από 260 νέων θεραπειών για περισσότερες από 230 ασθένειες ή συμπτώματα, τη δημιουργία περισσότερων από 4600 εταιρειών βιοτεχνολογίας και πωλήσεις άνω των 175 δισεκατομμυρίων δολαρίων το 2013, παγκοσμίως [5].

Κατά τους Y. Flores και B.M. Tangney (2017), οι πλέον δυναμικές ανακαλύψεις στον τομέα της βιοτεχνολογίας που θα έχουν δραστικές συνέπειες στην περαιτέρω έρευνα, αλλά και στην εφαρμοσιμότητα των αποτελεσμάτων είναι:

- *DNA Sequencing (Αλληλούχιση Γονιδιώματος)*: Ως αποτέλεσμα της μελέτης του γονιδιώματος, σχεδιάστηκαν αλληλουχίες επόμενης γενιάς (NGS) και πλατφόρμες αλληλουχίας τρίτης γενιάς. Αποτέλεσμα είναι η αύξηση της ταχύτητας περισσότερο από 500 φορές και η μείωση του κόστους κατά 10000 φορές, στην αλληλούχιση ενός ανθρώπινου γονιδιώματος, όπως προκύπτει με σύγκριση των δεδομένων μεταξύ του 2004 και του 2017.
- *Νέες μέθοδοι σύνθεσης DNA*: Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, οι παραδοσιακές μέθοδοι σύνθεσης DNA *de novo* έχουν βελτιωθεί σημαντικά αλλά η εισαγωγή νέας σύνθεσης DNA με μικροτσιπ αντιπροσωπεύει μια πραγματικά ανατρεπτική τεχνολογία σε αυτόν τον κλάδο, διότι επιτρέπει τη

μικρογραφία και την αυτοματοποιημένη παραγωγή, με μείωση κατά 100 φορές του κόστους της γονιδιακής σύνθεσης.

- *Γονιδιωματική Μηχανική*: Η εμφάνιση του CRISPR / Cas9 ως τεχνολογίας επεξεργασίας γονιδιώματος το 2013 σηματοδότησε την αρχή μιας νέας εποχής γενετικής-μηχανικής. Το CRISPR / Cas9 έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό σε πλήθος οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων. Η ανώτερη αποτελεσματικότητα και ακρίβεια σε συνδυασμό με την απλότητα και το χαμηλό κόστος προκάλεσε επανάσταση στον τομέα της γονιδιωματικής μηχανικής και επέτρεψε την ευρεία υιοθέτησή του στην έρευνα και τη βιομηχανία.
- *Μαθηματική Μοντελοποίηση*: Σημαντικές εξελίξεις στη μαθηματική μοντελοποίηση σύνθετων βιολογικών συστημάτων επέτρεψαν την αύξηση της ταχύτητας και της αξιοπιστίας ανάπτυξης βιολογικών εφαρμογών, με αντίστοιχη μείωση των χρονοβόρων και δαπανηρών πειραμάτων [6].

Τέλος, μια από τις δυναμικότερα αναπτυσσόμενες τάσεις στη βιοτεχνολογία που αξίζει ιδιαίτερης μνείας είναι η ανάπτυξη της φαρμακογονιδιωματικής, η οποία εντάσσεται στο πλαίσιο της εξατομικευμένης ιατρικής.

Φαρμακογονιδιωματική είναι ο κλάδος της επιστήμης που μελετά τη γενετική αιτιολογία της διαφορετικής ανταπόκρισης ενός ατόμου/ασθενούς σε μια συγκεκριμένη θεραπευτική αγωγή, με απώτερο σκοπό την επίτευξη εξατομικευμένης θεραπείας. Η Εξατομικευμένη Ιατρική χρησιμοποιεί τα γονιδιωματικά δεδομένα ενός ατόμου / ασθενούς για την καλύτερη χορήγηση θεραπευτικής αγωγής, τον προσδιορισμό της προδιάθεσης σε μια συγκεκριμένη νόσο, με στόχο τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ανθρώπων αλλά και τη μείωση του κόστους της ιατροφαρμακευτικής περίθαλψης. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη του γονιδιώματος του ασθενούς μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για την ανταπόκριση του σε συγκεκριμένες βιολογικές θεραπείες και, επομένως, μπορεί να επιτρέψει την κατάλληλη προσαρμογή της φαρμακευτικής, περιλαμβάνοντας φάρμακα με μεγαλύτερη πιθανότητα αποτελεσματικότητας και αποφεύγοντας άλλα που ενδέχεται να παρουσιάσουν σημαντικές παρενέργειες ή χαμηλή αποτελεσματικότητα. Η ανάπτυξη της φαρμακογονιδιωματικής κρίθηκε απαραίτητη, στη βάση κάποιων ιδιαίτερα ανησυχητικών ευρημάτων, που αφορούν στη γενική (μη εξατομικευμένη) χρήση των φαρμάκων. Ενδεικτικά αναφέρονται τα εξής:

- Περίπου 3 εκατομμύρια (σε σύνολο 3,5 δισεκατομμύρια) συνταγογραφήσεις στις Η.Π.Α. σε ετήσια βάση είναι εσφαλμένες, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ασθενείς υπόκεινται σε λανθασμένη ή αναποτελεσματική φαρμακευτική αγωγή.
- Περισσότεροι από 100.000 ασθενείς πεθαίνουν κάθε χρόνο στις Η.Π.Α. από παρενέργειες της φαρμακευτικής αγωγής.
- Η μεγάλη πλειονότητα των φαρμακευτικών ουσιών δρα αποτελεσματικά σε περίπου 30-50% των ασθενών, όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στον Πίνακα 1 [5, 7, 10].

**Πίνακας 1. Ποσοστό αποτελεσματικότητας φαρμάκων που χορηγούνται σε ασθενείς [10]**

<b>Ασθένεια</b>	<b>Αποτελεσματικότητα φαρμάκου (%)</b>
Νόσος Alzheimer	30
Άσθμα	60
<b>Ογκολογία</b>	<b>25</b>
Σχιζοφρένεια	60

Η ανάπτυξη φαρμακευτικών προϊόντων, με βιοτεχνολογική βάση, θα συνεχίσει να εξελίσσεται. Σύμφωνα με ανασκόπηση των R. Evens και K. Kaitin (2015), ογδόντα οκτώ πλήρως ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα ήταν σε κλινική ανάπτυξη το 2010, μαζί με έναν παρόμοιο αριθμό χμαιοκλωνικών γονιδίων. Συνολικά, περισσότερα από 900 μόρια που σχετίζονται με τη βιοτεχνολογία βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές σε όλο τον κόσμο (κυρίως, μονοκλωνικά αντισώματα και εμβόλια, με 431 και 276 μόρια, αντίστοιχα) [5]. Κατά τους R. Evens και K. Kaitin (2015) και Y. Flores και B.M. Tangney (2017), η πρόοδος που αναμένεται να επιτευχθεί στον τομέα της βιοτεχνολογίας τα επόμενα χρόνια θα είναι ραγδαία, μεγαλύτερη από αυτήν που έχει συντελεστεί την τελευταία χιλιετία [5, 6].

Όμως, σε κάθε νέο «βήμα» του κλάδου της Βιοτεχνολογίας, εγείρονται και νέα ηθικά ερωτήματα. Έτσι, παράλληλα με τον κλάδο της Βιοτεχνολογίας, αναπτύσσεται, ως επιτακτική ανάγκη και ασφαλιστική δικλείδα, και ο κλάδος της Βιοηθικής. Η Βιοηθική, ως το πεδίο κριτικής προσέγγισης και επαναθεώρησης των αρχών και



κριτηρίων της πράξης στην εποχή της Βιοτεχνολογίας, αποτελεί κανονιστική διερεύνηση των ηθικών ζητημάτων που απορρέουν από τις βιοϊατρικές καινοτομίες και τις εφαρμογές τους. Αναφορικά με τη φαρμακογονιδιωματική, που προαναφέρθηκε, και ειδικά σε σχέση με τις ασφαλιστικές εταιρείες, προκύπτουν τα εξής ερωτήματα:

- Ποιες φαρμακογενετικές αναλύσεις θα καλύπτονται;
- Κάποιες από αυτές έχουν ιδιαίτερα υψηλό κόστος. Αυτές θα καλύπτονται;
- Πώς θα αποφευχθεί ο στιγματισμός και ο αποκλεισμός ασθενών από το ασφαλιστικό σύστημα;
- Η εφαρμογή των σύγχρονων κατευθύνσεων της Βιοηθικής στο συγκεκριμένο θέμα, σχετικά με την προστασία των προσωπικών, δεδομένων των ασθενών οδηγεί σε χρήση «ανώνυμων» δεδομένων, ειδικά σε επιδημιολογικές μελέτες.
- Χρήση μοντέλων και αλγορίθμων για την απόκρυψη των ευαίσθητων προσωπικών δεδομένων από τα υπόλοιπα γενετικά και φαινοτυπικά δεδομένα.
- Έλεγχος στην πώληση «προγνωστικών» δοκιμασιών, κατευθείαν στους πολίτες [μέσω τηλεφωνικής προώθησης, διαδικτύου και άλλων μεθόδων] [10].

### **A.1.3. Νανοτεχνολογία**

Πολλοί θεωρούν ότι η διάλεξη του διάσημου θεωρητικού φυσικού Richard Feynman, το 1959, στην Αμερικάνικη Εταιρεία Φυσικής με θέμα «Υπάρχει άφθονος χώρος στο κατώτατο σημείο» (“There ’s Plenty of Room at the Bottom”) είναι ευρέως αποδεκτή ως δίδουσα το έναυσμα για μια αποφασιστική στροφή της έρευνας στη νανοκλίμακα. Ο όρος, όμως, Νανοτεχνολογία δημιουργήθηκε από τον καθηγητή του Πανεπιστημίου Επιστημών του Τόκιο, Norio Taniguchi, το 1974, στην εργασία του με τίτλο «Σχετικά με τη βασική έννοια της Νανοτεχνολογίας», η οποία είχε ως αντικείμενο την ακρίβεια κατασκευής στα όρια του -νανόμετρου (nm,  $10^{-9}$  m).

Σήμερα, ο όρος Νανοτεχνολογία χρησιμοποιείται για να περιγράψει:

- Την ανάπτυξη της έρευνας και της τεχνολογίας στο ατομικό, μοριακό και μακρομοριακό επίπεδο, σε κλίμακα μεγέθους από 1 έως 100 nm.
- Την ανάπτυξη και χρήση κατασκευών, συσκευών και συστημάτων που έχουν ιδιαίτερες ιδιότητες και λειτουργίες εξαιτίας του πολύ μικρού μεγέθους τους.
- Την ικανότητα ρύθμισης και χειρισμού της ύλης στην ατομική κλίμακα.

- Το συνδυασμό όλων των παραπάνω, με βάση τις αρχές της Φυσικής, της Χημείας και της Βιολογίας για την παραγωγή διατάξεων και συστημάτων στη νανοκλίμακα [11, 15, 16].

Η Νανοτεχνολογία είναι ένας τομέας που περιλαμβάνεται στα ταχύτερα αναπτυσσόμενα ερευνητικά πεδία στον επιστημονικό και τεχνικό τομέα (Εθνικό Συμβούλιο Επιστήμης και Τεχνολογίας, 2006). Βιβλιογραφικά (Meyer και Persson, 1998, Schummer, 2004, Rafols και Meyer, 2007, Islam και Miyazaki, 2009), θεωρείται ως ένα διεπιστημονικό αντικείμενο, αφού απαιτείται η συνεισφορά γνώσεων από πολλές επιστήμες (φυσικής, χημείας, μηχανικών, υλικών, φαρμακευτικής και άλλων). Ο όρος χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευρύτητα, αφού περιλαμβάνει οτιδήποτε συμβαίνει στις διαστάσεις του νανομέτρου [16].

Πολλοί ερευνητές (Kautt και συνεργάτες, 2007, Walsh και Elders, 2003, Binns Driscoll, 1999) κατηγοριοποιούν τις νανοτεχνολογίες ανάλογα με τον τρόπο σύνθεσης των νανοδομών. Συχνά οι μέθοδοι σύνθεσης διαιρούνται σε δύο κύριους τύπους, τις Επαγωγικές (Bottom Up) και της Παραγωγικές (Top Down) Μεθόδους [14, 16].

#### **Επαγωγικές μέθοδοι (Bottom up methods)**

Οι επαγωγικές μέθοδοι («από κάτω προς τα πάνω») περιλαμβάνουν τη συγκέντρωση των ατόμων ή μορίων σε νανοδομικές διατάξεις. Σε αυτές τις μεθόδους, οι πρώτες ύλες μπορεί να είναι στη μορφή αερίων, υγρών ή στερεών. Απαιτείται, επίσης, κάποιο είδος αποδόμησης των πρώτων υλών, πριν την ενσωμάτωσή τους σε μια νανοδομή. Οι μέθοδοι αυτές χωρίζονται γενικά σε δύο κατηγορίες: τυχαίες και ελεγχόμενες.

#### **Παραγωγικές μέθοδοι (Top down methods)**

Οι επαγωγικές μέθοδοι παραμένουν ακόμη σε πρώιμα στάδια, σε σχέση με τις παραγωγικές μεθόδους («από πάνω προς τα κάτω») οι οποίες έχουν δώσει, μέχρι τώρα, τα πιο ώριμα προϊόντα νανοτεχνολογίας (όπως τα σύγχρονα CPUs. Ένα τυπικό παράδειγμα μιας παραγωγικής τεχνικής είναι η χρήση οργάνων (όπως ένας σύγχρονος αποτυπωτής (stepper) για την, υπό κλίμακα, μεταφορά ενός μακροσκοπικού σχεδίου στη νανοκλίμακα [14].

Σύμφωνα με τους N. Islam, K. Miyazaki (2010), η Νανοτεχνολογία μπορεί να διακριθεί σε τέσσερις βασικούς τομείς: τη Νανοηλεκτρονική (Nanoelectronics), τα Νανοϋλικά (Nanomaterials), τη Νανοβιοτεχνολογία (Bionanotechnology) και τη Νανοκατασκευαστική (Nanomanufacturing) [16].

## **Νανοκατασκευαστική**

Η νανο-κατασκευαστική ασχολείται με την κατασκευή εξελιγμένων και πολύπλοκων νανοδομών καθώς, επίσης, και με την κατασκευή εργαλείων τόσο για τον χαρακτηρισμό όσο και τον έλεγχο των νανοσωματιδίων [16].

## **Νανοηλεκτρονική**

Νανοηλεκτρονική ονομάζεται ο κλάδος που χρησιμοποιεί νανομετρικές διατάξεις σε εφαρμογές της Ηλεκτρονικής. Η Ηλεκτρονική, σύμφωνα το Ν. Κονοφάο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Α.Π.Θ.), ορίζεται ως το σύνολο των τεχνικών που χρησιμοποιούν τις μεταβολές ηλεκτρικών μεγεθών (ηλεκτρομαγνητικών πεδίων, πληθυσμών φωτονίων, ηλεκτρικών φορέων και άλλα) για να συλλάβουν, να διαβιβάσουν και να αξιοποιήσουν μια πληροφορία. Σύμφωνα με τον ορισμό αυτό, η ηλεκτρονική ξεφεύγει από τον περιορισμένο κόσμο των κυκλωμάτων, των ηλεκτρονικών διατάξεων, των καλωδίων και των αντιστάσεων, και ανάγεται σε τεχνολογία της πληροφορίας. Έτσι η έννοια της πληροφορίας συνιστά τον κεντρικό πυρήνα ανάπτυξης της ηλεκτρονικής τις τελευταίες δεκαετίες.

## **Νανοϋλικά**

Το 2011, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή υιοθέτησε τον παρακάτω ορισμό ενός του νανοϋλικού: «Νανοϋλικό είναι ένα φυσικό ή κατασκευασμένο υλικό που περιέχει σωματίδια, σε αδέσμευτη κατάσταση ή ως συσσωματώματα, για το οποίο ισχύει ότι το 50% ή περισσότερο των σωματιδίων έχουν μια ή περισσότερες εξωτερικές διαστάσεις στην περιοχή 1 nm – 100 nm». Σε ιδιαίτερες περιπτώσεις, όταν δικαιολογούνται ανησυχίες (περιβαλλοντικές, υγείας, ασφάλειας και άλλες) το όριο του 50% της κατανομής μεγέθους μπορεί να αντικατασταθεί από ένα όριο μεταξύ 1 και 50% [13].

Τα βιομηχανικά νανοϋλικά (engineered nanomaterials, ENMs) είναι χημικές ουσίες ή υλικά που παρασκευάζονται και χρησιμοποιούνται σε πολύ μικρές διαστάσεις. Το μέγεθός τους κυμαίνεται μεταξύ 1 και 100 nm. Τα νανοϋλικά παρουσιάζουν ειδικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και κβαντικές ιδιότητες σε σύγκριση με τα υλικά που έχουν συμβατικές διαστάσεις. Ήδη, είναι εμπορικά διαθέσιμα διάφορα προϊόντα νανοτεχνολογίας, όπως μπαταρίες, αντιβακτηριακά προϊόντα, ενδύματα, καλλυντικά, πρόσθετα τροφίμων, μικροηλεκτρονικές συσκευές, φαρμακευτικά προϊόντα και πολλά άλλα. Η ταχύτερη αύξηση της χρήσης τους, όμως, έχει δώσει βάση για σοβαρές

ανησυχίες ως προς τους πιθανούς περιβαλλοντικούς ή άλλους κινδύνους (υγείας και ασφάλειας εργαζομένων, καταναλωτών και άλλους) [13].

### **Νανοβιοτεχνολογία**

Η Νανοβιοτεχνολογία είναι ένας ραγδαία αναπτυσσόμενος κλάδος της σύγχρονης νανοτεχνολογίας, στον οποίον βρίσκουν εφαρμογή τα εργαλεία και οι διεργασίες κατασκευής νανοδομών και νανοσυστημάτων που προορίζονται για τη μελέτη ή την επίδραση σε βιολογικά συστήματα. Εξαιτίας της σημασίας της για την παρούσα εργασία, στη συνέχεια δίνεται μια αναλυτικότερη περιγραφή για τον κλάδο της νανοβιοτεχνολογίας.

Σε διαστάσεις νανομέτρου μπορούν σήμερα να κατασκευαστούν διάφορες δομές και συστήματα τα οποία επιτρέπουν μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με τα βιολογικά συστήματα. Κάποιες χαρακτηριστικές εφαρμογές της Νανοβιοτεχνολογίας αναπτύσσονται είναι:

Διαγνωστική: Στις Επιστήμες Υγείας, επιδιώκεται συνεχώς η βελτίωση των ερευνητικών μεθόδων βιοανάλυσης, μέσα από τη χρήση νανοδομών και νανοσυστημάτων. Με τον τρόπο αυτό έχει επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στην εξοικονόμηση χρόνου και στην αύξηση της διαγνωστικής ακρίβειας του κόστους σε πλήθος εφαρμογών, όπως η ανάλυση δειγμάτων DNA, αίματος, δειγμάτων ιστών και άλλα.

Εργαστηριακές (*in vitro*) εφαρμογές: Οι βιοαισθητήρες (biosensors), αποτελούν μια τεχνολογία αιχμής στην νανοβιοτεχνολογία. Οι βιοαισθητήρες αξιοποιούν επιτεύγματα προηγμένων νανοϋλικών (nanowires, νανοσωματίδια και άλλα). Με τον τρόπο αυτό δίνεται η δυνατότητα, για παράδειγμα, να ανιχνευθούν πρωτεΐνες σε μοριακή κλίμακα. Έτσι, μπορούν να ανιχνευθούν και να ταυτοποιηθούν μέχρι και ξεχωριστά μόρια σε ένα δείγμα σωματικών υγρών.

Για την *ex vivo* ανάλυση βιολογικών δειγμάτων χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι φασματοσκοπίας και μικροσκοπίας (imaging mass spectroscopy, scanning probe microscopy), που ανοίγουν νέες προοπτικές για τη μοριακή παθολογία και τα υψηλής ευαισθησίας biochips.

Με τη βοήθεια της Νανοτεχνολογίας, τέλος, η *in vivo* απεικόνιση συνεισφέρει στην έγκαιρη διάγνωση και την παρακολούθηση της εξέλιξης των ασθενειών (μεταστάσεις κακοήθων όγκων). Οι τεχνικές απεικόνισης περιλαμβάνουν την οπτική απεικόνιση και φασματοσκοπία, την απεικόνιση πυρηνικής ιατρικής, με τη βοήθεια ραδιενεργών

ανιχνευτών, την απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού, την τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων και άλλες μεθόδους. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται ως επικαλύψεις νανοσωματιδίων, ή που δομούνται σε μακρομοριακό επίπεδο (λιποσώματα, δένδρομερή), σε συνδυασμό με τις εξελίξεις στις οπτικές μεθόδους νανο-απεικόνισης, οδηγούν στη σημαντική βελτίωση των διαγνωστικών μεθόδων, ώστε να αποφεύγονται προβλήματα επιβάρυνσης των ασθενών, εξαιτίας της τοξικότητας των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται.

**Θεραπευτική:** Διακρίνεται σε δύο κυρίως τομείς: στη στοχευμένη θεραπεία (targeted delivery) και την αναγεννητική ιατρική (regenerative medicine).

Η πρώτη συνίσταται στην *in vivo* μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών με χρήση νανοσωματιδίων όπως νανοκρύσταλλοι, νανοσφαίρες και νανοκάψουλες. Το κύριο πλεονέκτημά των νανοσωματιδίων σχετίζεται με τις διαστάσεις τους, που τους επιτρέπουν να διαπεράσουν κάθε βιολογικό «φραγμό» και να απορροφηθούν στην κυκλοφορία του αίματος. Έτσι επιτυγχάνεται μεταφορά μεγάλης δόσης φαρμάκων σε μια αυστηρά προσδιορισμένη περιοχή, ελαττώνοντας την επιζήμια ολική συγκέντρωση του φαρμάκου στον οργανισμό, η οποία συχνά μπορεί να έχει και επικίνδυνες παρενέργειες. Με τη χρήση της νανοβιοτεχνολογίας μπορεί να επιταχυνθεί η θεραπευτική ικανότητα των φαρμάκων (πρωτεϊνικά και μακρομοριακά φάρμακα για την καταπολέμηση του καρκίνου).

Κάποιοι από τους άμεσους στόχους της νανοβιοτεχνολογίας είναι ο σχεδιασμός κατάλληλων νανοδομών (ως προς το σχήμα, τις διαστάσεις, τα χημικά χαρακτηριστικά και άλλες παραμέτρους) που θα απορροφώνται καλύτερα από τα κύτταρα, η *in vivo* μεταφορά, ο έλεγχος της κατανομής και η αποβολή των νανοδομών από το σώμα, η αιμοσυμβατότητα των νανοδομών και άλλοι. Επίσης, ο τρόπος εισαγωγής των νανοδομών στον οργανισμό αποτελεί ένα σημαντικό ερευνητικό αντικείμενο και ήδη έχουν επιτευχθεί διάφοροι τρόποι, όπως η χρήση νανοβελόνων, νανοβελόνες, biochips που εμφυτεύονται στο σώμα και άλλα.

Η νανοβιοτεχνολογία αναμένεται να προσφέρει αποτελεσματική αντιμετώπιση σε ασθένειες όπως η οστεοαρθρίτιδα, οι ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις, μέσω της μηχανικής των ιστών (tissue engineering) και της βιομημητικής στρατηγικής (δηλαδή της διαδικασίας προσομοίωσης των φαινομένων που συμβαίνουν στη φύση). Νανοϋλικά με ενισχυμένες μηχανικές ιδιότητες μπορούν να αντικαταστήσουν αυτά που χρησιμοποιούνται στα ορθοπεδικά

εμφυτεύματα τώρα, τα οποία παρουσιάζουν αδυναμίες στην αντιμετώπιση των υψηλών πιέσεων που αναπτύσσονται εντός του οργανισμού. Νανοϋλικά με ελεγχόμενες ηλεκτρικές ιδιότητες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία νευρικών παθήσεων. Επίσης, η νανοτεχνολογία θα βοηθήσει στην ανάπτυξη βιοενεργών υλικών που απελευθερώνουν μόρια-σήματα με ελεγχόμενες δόσεις και ρυθμούς καθώς και στην ανάπτυξη συστημάτων στόχευσης για τις θεραπείες μέσω βλαστικών κυττάρων. Όλες αυτές οι εφαρμογές συνιστούν το πεδίο της αναγεννητικής ιατρικής.

Βιοϊατρικές συσκευές: Οι νανοσυσκευές ανοίγουν νέους ορίζοντες στην ιατρική διαγνωστική και θεραπεία. Στον τομέα της θεραπείας του καρκίνου, όπως και στην στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων, τα νανοσωματίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην τοπική καταστροφή ιστών, χρησιμοποιώντας φως ή θερμότητα για να προκαλέσουν θερμικό φορτίο, ή για να μεταφέρουν και να αποθέσουν στοχευμένα χημειοθεραπευτικές ουσίες [11, 12].

### **A.2.3. Άλλες εφαρμογές της νανοτεχνολογίας**

Κάποιες από τις πλέον δυναμικές εφαρμογές στον τομέα της Νανοτεχνολογίας περιγράφονται παρακάτω.

#### *Ανάπτυξη οργανικών ημιαγωγών*

Τα οργανικά αυτά υλικά αυτά έχουν τη δυνατότητα να απορροφούν το φως και να το μετατρέπουν σε ηλεκτρικό ρεύμα, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η ανάπτυξη φωτοβολταϊκών στοιχείων μεγάλων διαστάσεων. Έδωσαν, επίσης, τη δυνατότητα ανάπτυξης οργανικών φωτοβολταϊκών σε εύκαμπτα πλαστικά υποστρώματα. Μια άλλη εφαρμογή των οργανικών ημιαγωγών είναι η παραγωγή λευκού φωτός για φωτισμό, και η παραγωγή φωτός για εφαρμογές κινούμενης εικόνας.

#### *Παραγωγή έξυπνων υφασμάτων*

Τα έξυπνα κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα (λειτουργικά υφάσματα και ενδύματα) έχουν τη δυνατότητα να αλλάζουν χαρακτηριστικά ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες, προσφέροντας άνεση και οικονομία.

#### *Παραγωγή βιοσυμβατών νανοϋλικών*

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα βιοσυμβατά νανοϋλικά αποτελούν ήδη μια σημαντική τεχνολογική επανάσταση στην ιατρική, σε τέτοιο βαθμό που χρησιμοποιείται πια ευρέως ο όρος νανοϊατρική. Τέλος, στον 21<sup>ο</sup> αιώνα, η Νανοτεχνολογία θεωρείται τεχνολογία «κλειδί» για τη μοριακή και την ατομική μηχανική, η οποία, κατά την άποψη των Roco και Bainbridge (2002), θα μπορούσε να οδηγήσει σε σαρωτικές αλλαγές σε σχεδόν όλους τους τομείς της ανθρώπινης ζωής [15].

## **B. Καρκίνος**

### **B.1. Γενικά**

Ο καρκίνος αποτελεί μια κατηγορία ασθενειών που χαρακτηρίζονται από την εκτός ελέγχου ανάπτυξη κυττάρων. Υπάρχουν πάνω από 100 γνωστοί, διαφορετικοί τύποι καρκίνου, και ο καθένας χαρακτηρίζεται από τον τύπο του κυττάρου που επηρεάζεται αρχικά.

Τα φυσιολογικά κύτταρα στο σώμα ακολουθούν μια ομαλή πορεία ανάπτυξης, διαίρεσης και θανάτου. Ο καρκίνος είναι τελικά μία παθογενής κατάσταση που προκύπτει ως το αποτέλεσμα του ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της «αθανатоποίησης» τους. Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ονομάζεται απόπτωση. Η απόπτωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορα στάδια της εμβρυϊκής ζωής, αλλά και της διατήρησης της ομοιόστασης του οργανισμού μεταγενέστερα. Σε περίπτωση εμφάνισης προβλήματος σε κάποιο εξελικτικό στάδιο, στη ζωή ενός κυττάρου, τότε υπάρχουν πολλά πιθανά ενδεχόμενα. Πιθανά το κύτταρο, εξαιτίας των μηχανισμών ελέγχου και των επιδιορθωτικών μηχανισμών που διαθέτει, μπορεί να εντοπίσει και να επιδιορθώσει τη βλάβη που θα διαπιστώσει και να συνεχίσει ομαλά την πορεία προς τη μίτωση. Σε άλλη πιθανή περίπτωση, μπορεί να μην εντοπίσει το λάθος που υπάρχει και να συνεχίσει τον κυτταρικό κύκλο, φέροντας μετάλλαξη, που μπορεί να αποβεί μοιραία. Μπορεί επίσης, να εντοπίσει την βλάβη, να ξεκινήσει τη διαδικασία επιδιόρθωσης και να μην την ολοκληρώσει επιτυχώς, και να συνεχίσει τη διαιώνιση με λανθασμένη επιδιόρθωση, δηλαδή με μετάλλαξη. Άλλη εκδοχή είναι να εντοπίσει τη βλάβη και να κατανοήσει ότι δεν είναι εφικτή η ορθή επιδιόρθωση. Έτσι, θα «θυσιαστεί» - «αυτοκτονώντας», με συντονισμένο και προγραμματισμένο τρόπο, που ονομάζεται απόπτωση. Έχει αποδειχτεί ότι η σταδιακή συσσώρευση μεταλλάξεων οδηγεί σε γενωμική αστάθεια, που οδηγεί σε καρκινογένεση. Αν ο μηχανισμός της απόπτωσης καταρρεύσει είναι πιθανή η καρκινογένεση. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κύτταρα, τα καρκινικά κύτταρα δεν συνεχίζουν να αναπτύσσονται και να διαιρούνται, δημιουργώντας μια μάζα μη φυσιολογικών κυττάρων που ξεφεύγει από τον έλεγχο.

Ο καρκίνος βλάπτει το σώμα όταν τα αλλοιωμένα κύτταρα διαχωρίζονται ανεξέλεγκτα για να σχηματίσουν θρόμβους ή μάζες ιστών που ονομάζονται όγκοι (εκτός από την περίπτωση λευχαιμίας, όπου ο καρκίνος απαγορεύει την κανονική λειτουργία του αίματος εξαιτίας της ανώμαλης κυτταρικής διαίρεσης στην κυκλοφορία του αίματος). Οι όγκοι μπορούν να αναπτυχθούν και να παρεμποδίσουν το πεπτικό,



νευρικό και κυκλοφορικό σύστημα ή να απελευθερώσουν ορμόνες που μεταβάλλουν τη λειτουργία του σώματος. Οι όγκοι που παραμένουν σε ένα σημείο και παρουσιάζουν περιορισμένη ανάπτυξη θεωρούνται γενικά καλοήθεις.

Οι πιο επικίνδυνοι, ή κακοήθεις, όγκοι σχηματίζονται όταν:

- ένα καρκινικό κύτταρο καταφέρνει να μεταφερθεί σε όλο το σώμα χρησιμοποιώντας το αίμα ή τα λεμφικά συστήματα, καταστρέφοντας τον υγιή ιστό σε μια διαδικασία που ονομάζεται εισβολή
- όταν ένα κύτταρο καταφέρνει να διαιρεθεί και να αναπτυχθεί, και ταυτόχρονα δημιουργεί νέα αιμοφόρα αγγεία που το συντηρούν με μια διαδικασία που ονομάζεται αγγειογένεση.

Το στάδιο κατά το οποίο ένας όγκος εξαπλώνεται σε άλλα μέρη του σώματος και αναπτύσσεται, εισβάλλει και καταστρέφει άλλους υγιείς ιστούς ονομάζεται μετάσταση. Αυτό το στάδιο του καρκίνου έχει ως αποτέλεσμα μια σοβαρή κατάσταση για τον οργανισμό, που είναι πολύ δύσκολο να αντιμετωπιστεί. Ο καρκίνος θεωρείται μία από τις κύριες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organisation-WHO), ο αριθμός των νέων περιπτώσεων καρκίνου αναμένεται να αυξηθεί κατά περίπου 70% τα επόμενα 20 χρόνια.

Οι πιο συχνά απαντώμενοι τύποι καρκίνου στους άνδρες είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, του προστάτη, του παχέος εντέρου, του ορθού, του στομάχου και του ήπατος, ενώ στις γυναίκες είναι ο καρκίνος του μαστού, του παχέος εντέρου, του ορθού, του πνεύμονα, του τραχήλου της μήτρας και του στομάχου.

Ενδεικτικά, παρακάτω παρατίθενται και κάποια στοιχεία για τον καρκίνο στις Η.Π.Α. (2016):

- Περισσότεροι από 575.000 άνθρωποι πεθαίνουν από καρκίνο και πάνω από 1.5 εκατομμύρια άνθρωποι διαγιγνώσκονται με καρκίνο ετησίως.
- Το οικονομικό κόστος του καρκίνου υπολογίζεται σε 263,8 δισεκατομμύρια δολάρια σε ιατρικό κόστος και σε απώλεια παραγωγικότητας.
- Η θνησιμότητα των Αφροαμερικανών στον καρκίνο είναι υψηλότερη από αυτή οποιασδήποτε άλλης φυλής ή εθνικότητας [17].

#### *Πρόληψη του καρκίνου*

Ένα σημαντικό ποσοστό των καρκίνων θα μπορούσε να αποφευχθεί, συμπεριλαμβανομένων όλων των μορφών καρκίνου που προκαλούνται από τη χρήση καπνού ή άλλων ανθυγιεινών συμπεριφορών. Σύμφωνα με μελέτη της Αμερικανικής

Εταιρείας Καρκίνου, τουλάχιστον το 42% των πρόσφατα διαγνωσθέντων περιπτώσεων καρκίνου στις Η.Π.Α. - περίπου 729.000 περιπτώσεις το 2018 – θα μπορούσαν να είχαν αποφευχθεί (το 19% που έχει ως αιτία πρόκλησης το κάπνισμα και το 18% που προκλήθηκε από το συνδυασμό υπερβολικού σωματικού βάρους, σωματικής αδράνειας, υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ, καπνίσματος και κακής διατροφής). Επίσης, περισσότερες από τις 5 εκατομμύρια περιπτώσεις καρκίνου του δέρματος που διαγιγνώσκονται ετησίως θα μπορούσαν να αποφευχθούν, προστατεύοντας το δέρμα από τον υπερβολική έκθεση στον ήλιο. Επομένως, πιστεύεται ότι ο κίνδυνος καρκίνου μπορεί να μειωθεί σε σημαντικό βαθμό με τον έλεγχο του σωματικού βάρους, τον περιορισμό της χρήσης αλκοόλ, την αποφυγή του καπνίσματος, τον περιορισμό της έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία και τη διατήρηση ενός υγιούς τρόπου ζωής σε συνδυασμό με τακτική ιατρική παρακολούθηση [17, 18]. Προφανώς, άλλες αιτίες όπως είναι οι κληρονομικές γενετικές μεταλλάξεις μπορούν να δράσουν ταυτόχρονα ή σε σειρά για την εμφάνιση η την ταχύτητα εξέλιξης του καρκίνου.

Επίσης, τα είδη των καρκίνων που προκαλούνται από μολυσματικούς παράγοντες, όπως είναι ο ιός των Ανθρωπίνων Θηλωμάτων (HPV), ο Ιός της Ηπατίτιδας Β (HBV), ο Ιός της Ηπατίτιδας C (HCV) και το ελικοβακτήριο του πυλωρού (*Helicobacter pylori* (H. Pylori)) μπορούν να προληφθούν μέσω εμβολιασμών ή θεραπεία για τη λοίμωξη. Έτσι μπορεί να επιτευχθεί σημαντική πρόοδος στην αντιμετώπιση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, του κόλπου, του αιδοίου, του στόματος και του ήπατος [1, 2]. Ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας, του παχέος εντέρου και του μαστού μπορούν να εντοπιστούν σε ένα πρώιμο στάδιο που επιδέχεται επιτυχούς θεραπείας. Σήμερα, η έγκαιρη διάγνωση επιτρέπει την απομάκρυνση ακόμη και των προκαρκινικών βλαβών. Για τη μείωση των ποσοστών θνησιμότητας, εκτός των παραγόντων που αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι αναγκαία και η προσωπική παρακολούθηση για τυχόν παραμορφώσεις σε μέρη του σώματος, όπως το στήθος, το δέρμα, το στόμα, τα μάτια, ή τα γεννητικά όργανα.

## **B.2. Καρκίνος του Μαστού**

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μια από τις συνηθέστερες μορφές καρκίνου στις γυναίκες. Στις ΗΠΑ (2018), αναμένεται συνολικά να διαγνωσθούν 266.120 περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου του μαστού γυναικών και

2.550 περιστατικά καρκίνου του μαστού σε άνδρες, καθώς και επιπλέον άλλες 63.960 περιπτώσεις εντοπίσιμων αλλοιώσεων του μαστού σε γυναίκες. Από τα περιστατικά αυτά, εκτιμάται ότι 40.920 γυναίκες, 480 άνδρες θα χάσουν τελικά τη ζωή τους. Από το 2005 έως το 2014, το πιο πρόσφατο διάστημα 10 ετών για το οποίο υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα, το ποσοστό εμφάνισης αυτού του τύπου καρκίνου στις έγχρωμες γυναίκες αυξήθηκε ελαφρώς (κατά 0,3% ετησίως).

Όσον αφορά στο ποσοστό θνησιμότητας γυναικών με καρκίνου του μαστού αυτό κορυφώθηκε στα 33,2 (ανά 100.000 γυναίκες) το 1989, στη συνέχεια μειώθηκε κατά 39% σε 20,3 το 2015. Αυτή η πρόοδος, η οποία αποδίδεται στη πρόοδο της στην έγκαιρης ανίχνευσης και θεραπείας, μεταφράζεται σε 322.600 λιγότερους θανάτους. Το πιο κοινό σημάδι του καρκίνου του στήθους είναι η εμφάνιση μιας μάζας. Άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν επίμονες αλλαγές στο στήθος, όπως πάχυνση, οίδημα, παραμόρφωση, ευαισθησία, ερεθισμός του δέρματος, ερυθρότητα, φαγούρα, και ανωμαλίες θηλών ή αυθόρμητη εκκένωση θηλών. Ο πρώιμος καρκίνος του μαστού συνήθως δεν έχει συμπτώματα και η διάγνωσή του συνήθως γίνεται μέσω μαστογραφικής εξέτασης.

Η θεραπεία συνήθως περιλαμβάνει είτε τη διατήρηση του στήθους κατά τη χειρουργική επέμβαση, με χειρουργική απομάκρυνση του όγκου και του γύρω ιστού (lumpectomy), είτε τη μαστεκτομή (χειρουργική αφαίρεση του μαστού), ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του όγκου (μέγεθος, υποδοχέας ορμόνης, κατάσταση και έκταση της εξάπλωσης) και την γενική κατάσταση των ασθενών. Η θεραπεία με ιοντίζουσες ακτινοβολίες στο στήθος, σε συνδυασμό με τη χειρουργική επέμβαση, συνιστάται για τις περισσότερες ασθενείς που δεν επιθυμούν να προχωρήσουν σε μαστεκτομή. Στις γυναίκες που η διάγνωση είναι έγκαιρη και ο καρκίνος βρίσκεται σε πρώιμα στάδια θεωρείται ότι η χειρουργική επέμβαση και η ακτινοθεραπεία έχουν μακροπρόθεσμα αποτελέσματα, αντίστοιχα με αυτά της μαστεκτομής. Ακτινοβολία συνιστάται μερικές φορές και μετά τη μαστεκτομή στην περίπτωση μεγαλύτερων όγκων ή εμπλεκόμενων κόμβων καρκίνου του μαστού, όπως είναι κάποιοι λεμφαδένες.

Η θεραπεία μπορεί επίσης να περιλαμβάνει χημειοθεραπεία (πριν ή μετά τη χειρουργική επέμβαση), θεραπεία με ορμόνες (αντι-οιστρογόνα) και / ή στοχευμένη θεραπεία. Πολλές στοχευμένες θεραπείες είναι διαθέσιμες για τη θεραπεία του 14% περίπου των γυναικών που έχουν όγκους του μαστού. Τα σχετικά ποσοστά επιβίωσης των 5 και 10 ετών για τον καρκίνο του μαστού είναι 90% και 83% αντίστοιχα. Πλέον, πολλές περιπτώσεις (62%) διαγιγνώσκονται σε τοπικό ακόμα στάδιο, χωρίς εξάπλωση.

Στις Η.Π.Α., τα ποσοστά επιβίωσης έχουν βελτιωθεί με την πάροδο του χρόνου, τόσο λευκές όσο και έγχρωμες γυναίκες, αλλά παραμένουν περίπου κατά 10% χαμηλότερα (σε απόλυτες τιμές) για τις έγχρωμες γυναίκες [18].

### **B.3. Καινοτομίες στην αντιμετώπιση του καρκίνου**

Η έρευνα για την αντιμετώπιση του καρκίνου είναι εντατική σε ολόκληρο τον κόσμο. Στη συνέχεια, αναφέρονται εν συντομία, κάποιες πρόσφατες καινοτομίες που είναι ενδεικτικές των σύγχρονων τρόπων διάγνωσης ή θεραπείας του καρκίνου.

Μία νέα μέθοδος διάγνωσης καρκίνου, που βρίσκεται ακόμη σε πειραματικό στάδιο, είναι η χρήση μαγνητικού καλωδίου. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, οι μαγνήτες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στο σώμα για να ανιχνεύσουν κύτταρα όγκου που δε θα μπορούσαν να ανιχνευθούν από τις άλλες διαγνωστικές τεχνικές. Σύμφωνα με τον Saplakoglu (Live Science, Ιούλιος 2018), Ερευνητές της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου του Στάνφορντ (Nature Biomedical Engineering), δημιούργησαν ένα μαγνητικό σύρμα το οποίο θα μπορούσε, θεωρητικά, να εισαχθεί στη φλέβα ενός ατόμου, το οποίο θα μπορούσε να έλξει κύτταρα όγκου που έχουν μαγνητιστεί από ειδικά νανοσωματίδια. Η συσκευή δεν έχει δοκιμαστεί ακόμη σε ανθρώπους, αλλά διαπιστώθηκε ότι στα χοιρίδια το μαγνητικό σύρμα ανίχνευσε 10 έως 80 φορές περισσότερα καρκινικά κύτταρα στο αίμα από ό,τι θα μπορούσε να γίνει με μια τυπική αιμοληψία. Τα καρκινικά κύτταρα που συγκρατεί το μαγνητικό σύρμα είναι κύτταρα που χωρίζονται από τους όγκους και κυκλοφορούν μέσω του αίματος. Αυτός ο τύπος εξέτασης καρκίνου ονομάζεται υγρή βιοψία. Η μέθοδος αντιμετωπίζει αποτελεσματικά το πρόβλημα ότι τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα είναι τόσο λίγα που σε μια τυπική αιμοληψία το δείγμα, πιθανά, δεν θα περιείχε ούτε ένα καρκινικό κύτταρο [19].

Μια νέα ριζοσπαστική μέθοδος θεραπείας, σύμφωνα με τους Sample και Gleza (The Guardian, Ιούνιος 2018), εφαρμόστηκε σε μια γυναίκα ασθενή, 49 ετών, με προχωρημένο καρκίνο του μαστού, σε μεταστατικό στάδιο στο ήπαρ και σε άλλες περιοχές. Όταν είχε διαγνωσθεί η ασθένεια και το στάδιό της, το προσδόκιμο όριο ζωής ήταν 3 χρόνια. Στην ασθενή εφαρμόστηκε μια θεραπεία που εκμεταλλεύτηκε το ίδιο το ανοσοποιητικό της σύστημα, με στόχο την καταπολέμηση των όγκων. Η θεραπεία υπήρξε επιτυχής, τα καρκινικά κύτταρα εξαλείφθηκαν τόσο αποτελεσματικά, ώστε τώρα η ασθενής είναι απαλλαγμένη από τη νόσο, τα τελευταία δύο χρόνια. Είναι η πρώτη φορά που ένας ασθενής με καρκίνο του μαστού σε μεταγενέστερο στάδιο έχει

θεραπευτεί επιτυχώς με μια μορφή ανοσοθεραπείας που χρησιμοποιεί τα κύτταρα του ανοσοποιητικού του ασθενούς.

Για να αναπτύξουν τη θεραπεία, οι γιατροί πήραν τμήματα του ιστού των όγκων και μελέτησαν το DNA για να εντοπίσουν μεταλλάξεις που συνδέονταν με τον καρκίνο. Επικεντρώθηκαν σε μεταλλάξεις που επέδρασαν σε τέσσερα γονίδια, με αποτέλεσμα την παραγωγή μια σειρά μη φυσιολογικών πρωτεϊνών στους όγκους. Πιο συγκεκριμένα, τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- Πραγματοποιήθηκαν βιοψίες του πρωτεύοντος όγκου και των μεταστάσεων
- Από το υλικό βιοψίας εξήχθησαν τα ανοσοκύτταρα που είχαν διεισδύσει στον ιστό του όγκου και αναπτύχθηκαν σε καλλιέργειες στο εργαστήριο.
- Η αλληλουχία των γονιδίων του ιστού του όγκου αποκάλυψε τις κύριες μεταλλάξεις που τον χαρακτήριζαν.
- Τα ανοσοκύτταρα υποβάλλονται σε διαλογή για να εντοπιστούν εκείνα που στοχεύουν τη βασική μετάλλαξη του καρκίνου
- Τα επιλεγμένα ανοσοκύτταρα εισάγονται εκ νέου στον ασθενή και στη συνέχεια επιτίθενται και σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα [20].

Είναι μία μέθοδος που θέτει το ανοσοποιητικό σύστημα σε κατάσταση επαναπρογραμματισμού, ώστε να οδηγηθεί σε αυτό-ίαση.

#### **B.4. Η πρόοδος στην αντιμετώπιση του καρκίνου σήμερα**

Ασφαλής δείκτης της προόδου στην αντιμετώπιση του καρκίνου είναι το ποσοστό θανάτου από καρκίνο. Το ποσοστό αυτό αυξάνονταν κατά το μεγαλύτερο μέρος του 20ου αιώνα, κυρίως λόγω της «επιδημίας» του καπνού. Το 1991 εκτιμήθηκαν 215 θάνατοι από καρκίνο ανά 100.000 άτομα, ενώ το 2015 ο αριθμός μειώθηκε σε 159 ανά 100.000 (μείωση της 26%), λόγω του περιορισμού του καπνίσματος καθώς και της προόδου που σημειώθηκε στην έγκαιρη ανίχνευση και θεραπεία. Αυτό μεταφράζεται σε περισσότερο από 2,3 εκατομμύρια λιγότερους θανάτους από καρκίνο, από το 1991 έως το 2015, λόγω της ταχείας και σημαντικής πτώσης των ποσοστών θνησιμότητας στα τέσσερα πιο κοινά είδη καρκίνου: καρκίνος του πνεύμονα, του παχέος εντέρου, του μαστού και του στομάχου [2]. Τα ποσοστά όμως παραμένουν πολύ υψηλά. Σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Υγείας (WHO), υπολογίζεται ότι σήμερα σημειώνονται, στον κόσμο, περίπου 7,5 εκατομμύρια θάνατοι από καρκίνο ετησίως, το οποίο μεταφράζεται σε 20.000 θανάτους ημερησίως. Το 2018 αναμένεται συνολικά να διαγνωσθούν 1,7

εκατομμύρια περιπτώσεις καρκίνου. Η εκτίμηση αυτή δεν περιλαμβάνει το τοπικό καρκίνωμα (μη επεμβατικός καρκίνος) οποιασδήποτε περιοχής εκτός από την ουροδόχο κύστη, ούτε περιλαμβάνει το καρκίνωμα του δέρματος, κυττάρων του πλακούντα, επειδή αυτά τα περιστατικά δεν καταγράφονται στα μητρώα καρκίνου. Αυτή τη στιγμή 24,6 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από καρκίνο και μέχρι το 2020 αναμένεται να διαγνωσθούν 16 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις και 10 εκατομμύρια θάνατοι κάθε χρόνο [17, 18].

Σύμφωνα με τα παραπάνω, παρά τις τεράστιες προσπάθειες για την αντιμετώπιση του καρκίνου, διεθνώς, η ασθένεια παραμένει ως ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα του σύγχρονου κόσμου.

## **Γ. Διοξείδιο Του Τιτανίου**

### **Γ.1. Τιτάνιο**

Το τιτάνιο μπορεί να θεωρηθεί σχετικά νέο υλικό για την εφαρμοσμένη μηχανική, καθώς ανακαλύφθηκε πολύ αργότερα (Ουίλιαμ Γκρέγκορ, 1971) από τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα μέταλλα. Το όνομα αποδόθηκε από τον Γερμανό χημικό Μάρτιν Χάινριχ Κλάπροθ το 1794 και προέρχεται από το ελληνικό μυθολογικό όνομα «Τιτάν». Στις αρχές της δεκαετίας του 1950 το τιτάνιο άρχισε να χρησιμοποιείται για στρατιωτικούς λόγους και κυρίως σε εφαρμογές αεροναυπηγικής. Γρήγορα η στρατηγική σημασία αυτού του μετάλλου έγινε γνωστή και άρχισαν οι προσπάθειες για την εμπορευματοποίησή του. Το τιτάνιο θεωρήθηκε πολύ σημαντικό υλικό από την αμερικανική κυβέρνηση. Ένα μεγάλο απόθεμα σπογγοειδούς τιτανίου διατηρήθηκε στο Κέντρο Εθνικών Αμυντικών Αποθεμάτων μέχρι το 2005. Σήμερα παράγεται κυρίως στη ρωσική εταιρία VSMPO-Avisma.

#### **Γ.1.1. Γενικά Χαρακτηριστικά**

Το χημικό στοιχείο τιτάνιο είναι ένα πολύ ανθεκτικό, αργυρόλευκο, όλκιμο μέταλλο μικρής πυκνότητας. Ανήκει στην τέταρτη ομάδα του περιοδικού πίνακα και στην πρώτη κύρια σειρά των στοιχείων μετάπτωσης. Ο ατομικός του αριθμός είναι 22 και η σχετική ατομική του μάζα είναι 47,867. Αποτελεί το 9ο πιο άφθονο στοιχείο της γης όπου καταλαμβάνει το 0,6% w/w του στερεού φλοιού της. Βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα έμβια όντα, τα πετρώματα, τα υδατικά συστήματα και τα εδάφη. Στη φύση εμφανίζεται σε ορυκτά σχηματίζοντας ενώσεις με το οξυγόνο.

Το τιτάνιο είναι ένα μη τοξικό μέταλλο. Η ευρεία χρήση του σε ιατρικές εφαρμογές, αλλά και πολλές μελέτες αποδεικνύουν ότι είναι αδρανές και βιοσυμβατό, τόσο για τους ανθρώπους όσο και για τα ζώα. Έχει παρατηρηθεί όμως ότι ορισμένες ενώσεις του αλλά και το ίδιο το μέταλλο, κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις, μπορούν να δημιουργήσουν προβλήματα στον ανθρώπινο οργανισμό. Συνδυάζει μικρό βάρος και ανθεκτικότητα στη διάβρωση, χρησιμοποιείται σε πολλά προϊόντα καθημερινής χρήσης όπως τρυπάνια, ποδήλατα, φορητοί υπολογιστές, κοσμήματα, κινητά τηλέφωνα. Σήμερα η ετήσια κατανάλωσή του υπερβαίνει τα 3 εκατομμύρια τόνους. Μόνο, όμως, το 5% της ετήσιας παγκόσμιας παραγωγής ορυκτών τιτανίου προορίζεται για παραγωγή μεταλλικού τιτανίου. Το υπόλοιπο 95% χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή λευκής χρωστικής ουσίας με τύπο  $TiO_2$  [21, 24].

## Γ.2. Διοξείδιο του Τιτανίου

Το διοξείδιο του τιτανίου - επίσης γνωστό ως οξείδιο του τιτανίου (IV) ή τιτανία - είναι η φυσικά απαντώμενη ένωση που δημιουργείται όταν το τιτάνιο αντιδρά με το οξυγόνο του αέρα. Ως οξείδιο, το τιτάνιο βρίσκεται στα ορυκτά του φλοιού της γης. Ο χημικός τύπος του είναι  $TiO_2$ , που σημαίνει ότι αποτελείται από ένα άτομο τιτανίου και δύο άτομα οξυγόνου. Διαθέτει αριθμό καταχώρησης CAS (Chemical Abstracts Service) 13463-67-7 .

Η κύρια φυσική πηγή διοξειδίου του τιτανίου είναι η εξόρυξη λαμινίτη, το οποίο περιέχει 45-60%  $TiO_2$ . Από αυτό, ή από το εμπλουτισμένο παράγωγό του (γνωστό ως σκωρία τιτανίου), το καθαρό  $TiO_2$  μπορεί να παραχθεί χρησιμοποιώντας δύο μεθόδους που βασίζονται στο χλώριο και στο θείο, αντίστοιχα. Από τις δύο μεθόδους εξόρυξης, αυτή που βασίζεται στο θείο είναι σήμερα η πιο δημοφιλής μέθοδος παραγωγής  $TiO_2$  στην Ευρωπαϊκή Ένωση, και χρησιμοποιείται από το 70% των μονάδων παραγωγής του. Το υπόλοιπο 30% εκατό είναι το αποτέλεσμα της διαδικασίας χλωρίωσης. Σε παγκόσμιο επίπεδο, εκτιμάται ότι το 40-45% της παγκόσμιας παραγωγής βασίζεται στη διαδικασία χλωριούχων αλάτων.




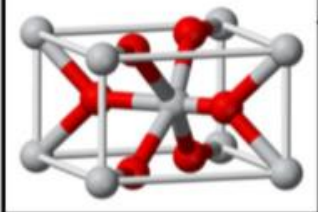
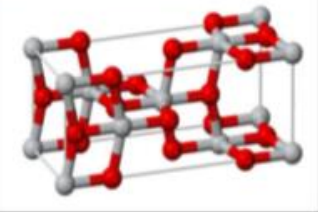
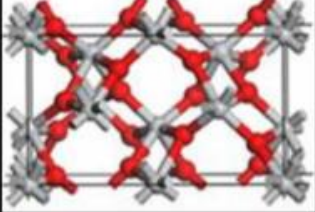
### Γ.2.1. Γενικά Χαρακτηριστικά

Βρίσκεται συνήθως σε μορφή σκόνης λευκού χρώματος, η οποία είναι χημικώς αδρανής, μη τοξική και φιλική προς το περιβάλλον. Παρουσιάζει χαμηλό κόστος ενώ παράγεται εύκολα και σε μεγάλες ποσότητες. Έχει εξαιρετικά υψηλό σημείο τήξης  $1.843\text{ }^{\circ}\text{C}$  και σημείο βρασμού  $2.972\text{ }^{\circ}\text{C}$ , συναντάται ως στερεό και, ακόμη και υπό μορφή σωματιδίων, είναι αδιάλυτο στο νερό. Είναι σημαντικό ότι το διοξείδιο του τιτανίου έχει επίσης πολύ υψηλό δείκτη διάθλασης, ακόμη υψηλότερο από το διαμάντι. Αυτό το καθιστά μια πολύ φωτεινή ουσία και ένα ιδανικό υλικό για αισθητική χρήση. Μια άλλη σημαντική ιδιότητά του είναι ότι μπορεί να επιδείξει φωτοκαταλυτική δραστηριότητα υπό υπεριώδες φως. Τέλος, η σταθερότητά του στη θερμότητα, το φως και τις καιρικές συνθήκες, εμποδίζουν την υποβάθμιση των υλικών που επικαλύπτει. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν το  $TiO_2$  έναν από τους πιο σημαντικούς, από πρακτική άποψη, ημιαγωγούς. Κρυσταλλογραφικά απαντάται σε 3 κύριες δομές πολυμορφισμού οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετική διευθέτηση των ατόμων στο χώρο: Ανατάση (anatase), Ρουτιλίου (rutile) και Μπρουκίτη (brookite). Στον



Μπρουκίτη οι κρύσταλλοι είναι ορθορομβικοί, ενώ στις 2 άλλες μορφές είναι τετραγωνικοί.

Πίνακας 2: Κύριες Δομές Πολυμορφισμού του  $\text{TiO}_2$  και τα χαρακτηριστικά τους

ΡΟΥΤΙΛΙΟ	ΑΝΑΤΑΞΗΣ	ΜΠΡΟΥΚΙΤΗΣ
		
		
τετραγωνικό πλέγμα $\rho=4.13\text{g/cm}^3$ $E_g=3.2\text{eV}$	τετραγωνικό πλέγμα $\rho=3.80\text{g/cm}^3$ $E_g=3.0\text{eV}$	ορθορομβικό πλέγμα $\rho=3.99\text{g/cm}^3$ $E_g=3.14\text{eV}$

Οι δομές του Ανατάσης και του Ρουτιλίου είναι οι πιο συνήθεις και έχει αποδειχθεί ότι ο Ανατάσης είναι ο πιο ενεργός για την οξειδωτική και φωτοκαταλυτική αντίδραση. Επίσης συναντάται και ως άμορφο υλικό. Τέλος, το  $\text{TiO}_2$  ενυδατώνεται εύκολα καθώς επαμφοτερίζοντα χαρακτήρα, δρα δηλαδή τόσο ως οξύ και ως βάση κατά Bronstead-Lowry [21-24].

Το  $\text{TiO}_2$  έχει διαφορετικές ιδιότητες ανάλογα με το αν παράγεται ως χρωστική ή ως νανοϋλικό. Και οι δύο μορφές είναι άγευστες, άοσμες και αδιάλυτες. Τα σωματίδια  $\text{TiO}_2$  που χρησιμοποιούνται ως χρωστική έχουν μέγεθος περίπου 200-350 nm και αυτή η μορφή αντιπροσωπεύει το 98% της συνολικής παραγωγής. Το Nano ή το εξαιρετικά λεπτό  $\text{TiO}_2$  αποτελείται από πρωτογενή σωματίδια μεγέθους μικρότερου των 100 nm. Σε αυτή την κατηγορία, το διοξείδιο του τιτανίου είναι διαφανές (άχρωμο) και διαθέτει βελτιωμένες ιδιότητες σκέδασης και απορρόφησης από την υπεριώδη ακτινοβολία σε σύγκριση με τα  $\text{TiO}_2$  με μεγαλύτερο μέγεθος σωματιδίων.

### Γ.2.2. Εφαρμογές

Το διοξείδιο του τιτανίου χρησιμοποιείται σαν πηγμα ή νανοςύνθετο σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Ανάλογα με την εφαρμογή του, χρησιμοποιείται είτε ως σκόνη είτε ως εναιώρημα, είτε μέσω ακινητοποίησης του πάνω σε οποιοδήποτε υπόστρωμα. Λόγω της εξαιρετικής λευκότητας και του υψηλού δείκτη διάθλασης, το  $\text{TiO}_2$  είναι η κυρίαρχη λευκή χρωστική ουσία για βαφές, χαρτί, επιχρίσματα, πλαστικές ύλες, καουτσούκ, οδοντόπαστες, τρόφιμα, φαρμακευτικά προϊόντα, αντηλιακά και διάφορα άλλα υλικά. Έχει επίσης μια σειρά από λιγότερο γνωστές ιδιότητες που το καθιστούν ένα εξαιρετικά χρήσιμο και σημαντικό συστατικό στη μάχη για την καταπολέμηση της οικολογικής καταστροφής αλλά και για την πρόληψη ή θεραπεία του καρκίνου.

Το  $\text{TiO}_2$  είναι ένα δημοφιλές συστατικό που εμφανίζεται σε εκατοντάδες προϊόντα καθημερινής χρήσης, προσφέροντας εξαιρετικά λευκό χρώμα, ικανότητα σκέδασης του φωτός και αντοχής στην υπεριώδη ακτινοβολία.

Μετά την ανακάλυψη των Fujishima και Honda για τη φωτοκαταλυτική διάσπαση του νερού σε ηλεκτρόδια  $\text{TiO}_2$  χωρίς τη χρήση ηλεκτρισμού, άρχισε η μελέτη του, ως φωτοκαταλύτης. Οι πρώτες έρευνες έγιναν κατά το τέλος της δεκαετίας του 1960 σε πανεπιστήμια στο Τόκιο με φωτοηλεκτροχημικές ηλιακές κυψελίδες. Πλέον και μάλιστα τα Την τελευταία δεκαετία, η βιομηχανία έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στην τεχνολογία της φωτοκατάλυσης για την αποικοδόμηση υγρών και αέριων ρύπων. Το  $\text{TiO}_2$  ως φωτοκαταλυτικό υλικό έχει την ικανότητα να αποσυνθέτει ρύπους, δυσώδεις χημικές ουσίες, τοξικές χημικές ουσίες, βακτήρια και άλλα και μπορεί να προστεθεί σε χρώματα, τσιμέντα, πλακάκια και διάφορες άλλες επιφάνειες προκειμένου να αποσυντεθούν οι περιβαλλοντικοί ρύποι.

Χάρει σε αυτές του τις ιδιότητες, έχει σημαντικά οφέλη τόσο στην οικονομία όσο και στη συνολική ποιότητα ζωής [22, 24].

#### *Χρώματα, επιχρίσματα και πλαστικά*

Όταν χρησιμοποιείται ως χρωστική ουσία σε χρώματα, το  $\text{TiO}_2$  ονομάζεται λευκό τιτάνιο, Pigment White 6 ή CI 77891. Είναι επίσης γνωστό ως «το τέλειο λευκό» ή «το λευκόχρωμο λευκό» λόγω των ισχυρών, καθαρότερων χαρακτηριστικών λεύκανσης.

Μέχρι την αλλαγή της νομοθεσίας στη δεκαετία του 1920, οι περισσότεροι εμπορικοί κατασκευαστές χρωμάτων χρησιμοποιούσαν άκρως τοξικό λευκό μόλυβδο ως λευκαντικό αποφεύγοντας τη χρήση διοξειδίου του τιτανίου, εν μέρει λόγω του

υψηλότερου κόστους. Το οξείδιο του ψευδαργύρου (ZnO) χρησιμοποιείται επίσης ως λευκή χρωστική ουσία αλλά δεν είναι τόσο αποτελεσματικό.

Το διοξείδιο του τιτανίου είναι πλέον ένα από τα πιο κοινά χρώματα σε παγκόσμια κλίμακα και αποτελεί τη βάση για τα περισσότερα χρώματα βαφής. Βρίσκεται επίσης σε επικαλύψεις και πλαστικά. Αυτές οι χρήσεις του διοξειδίου του τιτανίου αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 50% της παγκόσμιας χρήσης του. Ο υψηλός δείκτης διάθλασής του σημαίνει ότι, ως χρωστική ουσία, μπορεί να προκαλέσει σκέδαση του ορατού φωτός. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα όταν εφαρμόζεται ή ενσωματώνεται σε μία επιφάνεια ή προϊόν με αδιαφανές χρώμα, να δημιουργεί μια φωτεινή, ανακλαστική ποιότητα.

Ένα βασικό παράδειγμα χρήσης του σε αυτές τις εφαρμογές είναι ως επικάλυψη για ανεμογεννήτριες, παρέχοντας τόσο κατάλληλο λευκό χρώμα όσο και προστασία από την υποβάθμιση τους, λόγω της υπεριώδους ακτινοβολίας. Για τους ίδιους λόγους, βρίσκεται επίσης σε πλαστικά κουφώματα.

#### *Τρόφιμα*

Στα τρόφιμα, το TiO<sub>2</sub> χρησιμοποιείται σε ένα βαθμό ως χρωστική και ονομάζεται E171. Σε πολλά τρόφιμα λειτουργεί ως λευκαντικό, αλλά και ως ενισχυτής χρώματος και υφής. Μπορεί να συμβάλει στην ομοιογένεια και στη λείανση όταν χρησιμοποιείται σε μερικές σοκολάτες και άλλα γλυκά.

#### *Καλλυντικά και φροντίδα του δέρματος*

Σε προϊόντα φροντίδας δέρματος και μακιγιάζ, το διοξείδιο του τιτανίου χρησιμοποιείται τόσο ως χρωστική ουσία όσο και ως σταθεροποιητής για κρέμες. Ως αντηλιακό, χρησιμοποιείται εξαιρετικά λεπτό TiO<sub>2</sub> λόγω της διαφάνειας και των απορροφητικών ικανοτήτων του σε UV.

#### *Περιβαλλοντικά οφέλη*

Όταν χρησιμοποιείται για τη βαφή στο εξωτερικό τμήμα των κτιρίων σε ζεστά και τροπικά κλίματα, οι λευκές ιδιότητες του TiO<sub>2</sub> που αντανακλούν το φως, μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντική εξοικονόμηση ενέργειας, καθώς μειώνει την ανάγκη για κλιματισμό.

Ως φωτοκαταλύτης, χρησιμοποιείται για την αποσύνθεση περιβαλλοντικών ρύπων σε επιφάνειες καθώς μπορεί να πραγματοποιήσει και υδρόλυση, και το συλλεχθέν

υδρογόνο να χρησιμοποιηθεί ως καύσιμο. Ως νανοϋλικό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας κρίσιμος καταλύτης DeNO<sub>x</sub> στα συστήματα καυσαερίων για αυτοκίνητα, φορτηγά και σταθμούς ηλεκτροπαραγωγής, ελαχιστοποιώντας έτσι τις περιβαλλοντικές τους επιπτώσεις [22].

#### *Αντιβακτηριακή Δράση*

Λόγω των φωτοκαταλυτικών αντιδράσεων είναι δυνατή η καταπολέμηση ανάπτυξης οργανισμών (βακτήρια και ιοί) χωρίς την απαίτηση για χημική απολύμανση. Αναπτύσσονται χάρη σε αυτή την ιδιότητα αυτό-καθαριζόμενες επιφάνειες και αντιβακτηριακά υλικά. Για παράδειγμα, η αντιβακτηριακή του δράση βρίσκει πρακτικές εφαρμογές για την κατασκευή νοσοκομειακών εγκαταστάσεων, στις οποίες οι χώροι, που είναι απαραίτητο να είναι πάντα αποστειρωμένοι (χειρουργεία, μονάδες εντατικής θεραπείας) κατασκευάζονται με φωτοκαταλυτικά δομικά υλικά, με αποτέλεσμα την αυτό-αποστείρωση του χώρου με τη βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας [24].

#### *Αντικαρκινική Δράση*

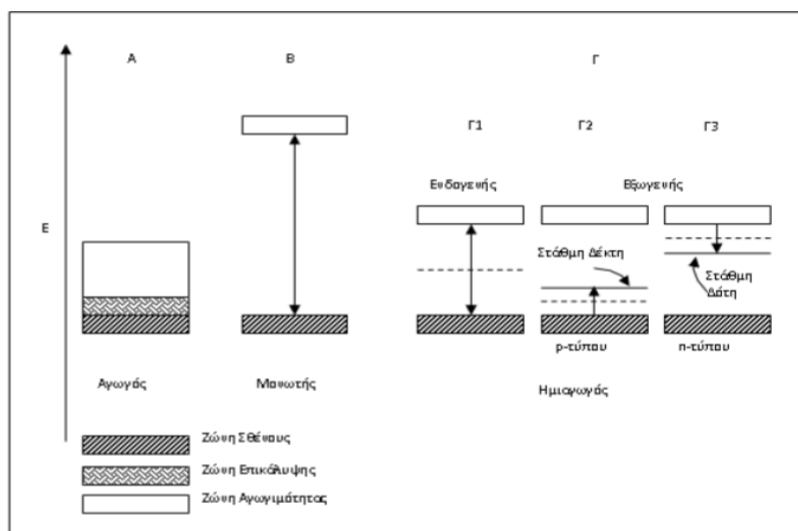
Τα τελευταία χρόνια, πολλές εργασίες, μεταξύ των οποίων και η παρούσα μελέτη, εστιάζουν στην πιθανή χρήση του TiO<sub>2</sub> σε ιατρικές εφαρμογές που στοχεύουν στη θεραπεία του καρκίνου. Νέες προοπτικές διαφάνηκαν στο ερευνητικό αυτό πεδίο αυτό, όταν αναγνωρίστηκε ότι οι μηχανισμοί ρύθμισης του κυτταρικού θανάτου παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση με τους μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η απόπτωση αποτελεί ένα ενδογενές πρόγραμμα κυτταρικής αυτοκτονίας απαραίτητο για την εξάλειψη ανεπιθύμητων κυττάρων και για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών. Οι διάφορες μορφές θεραπείας του καρκίνου (χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ορμονοθεραπεία) είναι σε θέση, κάτω από ορισμένες συνθήκες, να προάγουν την απόπτωση. Νέες δυνατότητες θεραπευτικής παρέμβασης δημιουργούνται με την εφαρμογή τροποποιημένων υλικών TiO<sub>2</sub> σε καρκινικά κύτταρα και ενεργοποίησής τους με ορατή ακτινοβολία γιατί εξασφαλίζεται ο έλεγχος της οπτικής πρόσβασης των κυττάρων ενώ παράλληλα αποφεύγονται οι επιπτώσεις της υπεριώδους ακτινοβολίας στα υγιή κύτταρα. Στόχος της εφαρμογής αυτών των υλικών είναι αφενός μεν, η αύξηση του αυθόρμητου κυτταρικού θανάτου στα κύτταρα του όγκου και αφετέρου, η μείωση της αντοχής των νεοπλασματικών κυττάρων στις διάφορες μορφές θεραπείας. Έχει διαπιστωθεί ότι το TiO<sub>2</sub>, στη μορφή

νανοσωματιδίων, παρουσία UV ακτινοβολίας μήκος κύματος  $< 390$  nm, οδηγεί σε σχηματισμό ζευγών ηλεκτρονίων – οπών, οι οποίες με το νερό και το οξυγόνο σχηματίζουν ROS (reactive oxygen species), με αποτέλεσμα την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Οι μηχανισμοί όμως, μέσω των οποίων λειτουργεί το  $\text{TiO}_2$ , ως αντικαρκινικός παράγοντας, εξακολουθούν να μην είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι [21].

## Δ. Ενεργειακές Ζώνες και Αγωγιμότητα των Κρυσταλλικών Υλικών

### Δ.1. Γενικά

Τα υλικά μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την κανονικότητα με την οποία διευθετούνται τα άτομα ή τα ιόντα μεταξύ τους. *Κρυσταλλικά υλικά* ονομάζονται τα υλικά των οποίων τα άτομα ή τα ιόντα εμφανίζουν τάξη μακράς εμβέλειας μεταξύ τους. Αντίθετα, στα *άμορφα υλικά*, σε μεγάλη κλίμακα δεν εμφανίζεται τάξη. Τα κρυσταλλικά υλικά παρουσιάζουν ενεργειακό διάγραμμα που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενεργειακών ζωνών. Μεταξύ της υψηλότερα κατειλημμένης ενεργειακής ζώνης που ονομάζεται *Ζώνη Σθένους (valence band, VB)* και της χαμηλότερα κενής, που ονομάζεται *Ζώνη Αγωγιμότητας (conduction band, CB)*, πραγματοποιείται ανταλλαγή ηλεκτρονίων. Στους αγωγούς η Ζώνη Σθένους και η Ζώνη Αγωγιμότητας επικαλύπτονται και επομένως η μεταπήδηση των ηλεκτρονίων στις κενές θέσεις γίνεται αυθόρμητα. Όταν όμως πρόκειται για ημιαγωγό ή μονωτή, ανάμεσα στις ζώνες αυτές, παρεμβάλλεται μία περιοχή κενή από ενεργειακές στάθμες. Η περιοχή με το ενεργειακό χάσμα ( $<4\text{eV}$ ) ονομάζεται *Ζώνη Χάσματος ή Απαγορευμένη Ζώνη (bandgap energy,  $E_g$ )*. Για να μεταπηδήσουν τα ηλεκτρόνια από τη μία ζώνη στην άλλη, χρειάζονται ενέργεια. Η ελάχιστη ενέργεια που χρειάζονται καθορίζεται από το μέγεθος της Ζώνης Χάσματος. Επομένως, σε αυτά τα υλικά, απαιτείται κάποια θερμική διέγερση, ενέργειας ίσης ή μεγαλύτερης από την τιμή του ενεργειακού χάσματος για τη μετακίνησή τους (Σχήμα (2)).



Σχήμα 2. Ενεργειακό Διάγραμμα για (Α) Αγωγούς, (Β) Μονωτές και (Γ) Ημιαγωγούς ((Γ1) Ενδογενείς, (Γ2) Εξωγενείς p-Τύπου και (Γ3) Εξωγενείς n-τύπου) [21]

Όταν ένα ηλεκτρόνιο μετακινείται από τη ζώνη σθένους, προς τη ζώνη αγωγιμότητας, δημιουργείται μια κενή θέση που ονομάζεται *οπή* (*hole*), η οποία είναι θετικά φορτισμένη. Κατά σύμβαση, όπως τα ηλεκτρόνια της ζώνης αγωγιμότητας, έτσι και οι οπές της ζώνης σθένους είναι φορείς φορτίου, δηλαδή φορείς αγωγιμότητας.

Η βασική ιδιότητα που επιτρέπει μια τέτοια εξήγηση είναι το γεγονός ότι η οπή συμπεριφέρεται σαν ένα θετικά φορτισμένο σωματίδιο που μπορεί να «κινείται» ελεύθερα στη ζώνη σθένους. Η κενή θέση του ηλεκτρονίου που έφυγε καταλαμβάνεται από ένα γειτονικό ηλεκτρόνιο, το οποίο με τη σειρά του δημιουργεί μια οπή. Έτσι, η οπή κινείται μέσα στη ζώνη σθένους, αντίθετα με την κίνηση του ηλεκτρονίου στη ζώνη αγωγιμότητας.

### Δ.1.1. Ημιαγωγοί

Οι καθαροί *ημιαγωγοί*, χωρίς προσμίξεις, ονομάζονται *ενδογενείς* (intrinsic semiconductors). Βασικό χαρακτηριστικό τους είναι η εξάρτηση της αγωγιμότητάς τους από τη θερμοκρασία. Σε θερμοκρασία  $T=0$  K και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες η ζώνη αγωγιμότητας είναι εντελώς άδεια από ελεύθερα ηλεκτρόνια και η ζώνη σθένους πλήρως κατειλημμένη. Τα υλικά συμπεριφέρονται σαν μονωτές. Χαρακτηρίζονται, επίσης, από μικρό ενεργειακό χάσμα, με αποτέλεσμα, σε θερμοκρασία δωματίου ένας σημαντικός αριθμός ηλεκτρονίων αποκτούν αρκετή θερμική ενέργεια ώστε να μεταπηδήσουν από τη ζώνη σθένους στη ζώνη αγωγιμότητας.

Στους καθαρούς ημιαγωγούς, η συγκέντρωση των ηλεκτρονίων στη ζώνη αγωγιμότητας ( $n$ ) είναι ίση με τη συγκέντρωση των οπών στη ζώνη σθένους ( $p$ ). Παίρνοντας υπόψη το σύνολο των παραγόντων που αφορούν την αγωγιμότητα ενός καθαρού (ενδογενούς) ημιαγωγού, δηλαδή τη συγκέντρωση των ηλεκτρονίων στη ζώνη αγωγιμότητας ( $n$ ), τη συγκέντρωση των οπών στη ζώνη σθένους ( $p$ ), την ευκινησία των ηλεκτρονίων ( $\mu_n$ ) και την ευκινησία των οπών ( $\mu_p$ ), η *αγωγιμότητα*  $\sigma$  ορίζεται ως:

$$\sigma = n \cdot e \cdot \mu_n + p \cdot e \cdot \mu_p = e \cdot (n \cdot \mu_n + p \cdot \mu_p) \quad (1)$$

Γνωρίζοντας τις διαθέσιμες ενεργειακές καταστάσεις στις ζώνες σθένους και αγωγιμότητας αντίστοιχα, έχουμε:

$$dn(E) = g(E)f(E)dE \quad (2)$$

και ολοκληρώνοντας με ενεργειακά όρια ολοκλήρωσης τον πυθμένα της ζώνης αγωγιμότητας  $E_c$  και το άπειρο, καταλήγουμε στο ότι η συγκέντρωση  $n$  των ηλεκτρονίων στη ζώνη αγωγιμότητας δίνεται από τη σχέση:

(3)

$$n = N_c e^{\frac{E_c - E_f}{kT}} \quad \text{και} \quad N_c = 2 \left( \frac{2\pi m_n^* kT}{h^2} \right)^{\frac{3}{2}}$$

όπου  $m_n^*$ : η ενεργός μάζα του ηλεκτρονίου,

$h$ : η σταθερά του Planck,

$k$ : η σταθερά του Boltzmann

Η ποσότητα  $N_c$  εξαρτάται ασθενώς από τη θερμοκρασία ( $\sim T^{3/2}$ ) και ονομάζεται ενεργή πυκνότητα της ζώνης αγωγιμότητας.

Στους εξωγενείς ημιαγωγούς, δηλαδή σε αυτούς που έχουν προσμίξεις, όπως η περίπτωση που εξετάζεται, οι στάθμες ενέργειας προσφέρουν περισσότερους φορείς φορτίου. Αυτές οι στάθμες ενέργειας δημιουργούνται από την ασυμμετρία στον κρύσταλλο, λόγω της έλλειψης στοιχειομετρικής αναλογίας, ή λόγω της ίδιας της πρόσμιξης (doping) με κάποιο ξένο στοιχείο.

Οι εξωγενείς ημιαγωγοί, διακρίνονται σε *n-τύπου* και *p-τύπου* ανάλογα με τον επικρατούντα φορέα φορτίου, δηλαδή τα ηλεκτρόνια ή τις οπές, αντίστοιχα.

Στους *n-τύπου* ημιαγωγούς, η περίσσεια αρνητικού φορτίου, οφείλεται σε ενεργειακές στάθμες δοτών, λόγω των ατελειών. Τα ηλεκτρόνια της στάθμης ενός δότη μπορούν εύκολα να μεταπηδήσουν στη ζώνη αγωγιμότητας. Τα ελεύθερα πλέον ηλεκτρόνια (φορείς πλειονότητας), υπερβαίνουν αριθμητικά τις θερμικά παραγόμενες οπές στη ζώνη σθένους (φορείς μειονότητας), με αποτέλεσμα η αγωγιμότητα να οφείλεται στους φορείς αρνητικού φορτίου. Αντίθετα, στους *p-τύπου* ημιαγωγούς, η έλλειψη φορέων αρνητικού φορτίου οφείλεται σε ενεργειακές στάθμες αποδεκτών. Στην περίπτωση αυτή τα ηλεκτρόνια μπορούν να μεταπηδήσουν εύκολα από τη ζώνη σθένους στη στάθμη αποδέκτη, δημιουργώντας οπές. Οι θετικές οπές της ζώνης σθένους υπερβαίνουν αριθμητικά τα θερμικά διεγερμένα ηλεκτρόνια της ζώνης αγωγιμότητας, επομένως, η αγωγιμότητα σε αυτήν την περίπτωση οφείλεται στους φορείς θετικού φορτίου [21].



Η αγωγιμότητα των ημιαγωγών, όπως το  $\text{TiO}_2$ , το οποίο είναι ημιαγωγός n-τύπου, αλλάζει χαρακτηριστικά στην περίπτωση των νανοσωματιδίων. Τα νανοσωματίδια αντιπροσωπεύουν το κομμάτι της ύλης που εντάσσεται στη μεταβατική περιοχή μεταξύ μορίων και άρτια δομημένων, εκτενών στερεών σωμάτων [16]. Έχει αποδειχθεί ότι οι φυσικοχημικές ιδιότητες των υλικών εξαρτώνται από το μέγεθος των νανοσωματιδίων, καθώς αυτές μεταβάλλονται από το επίπεδο μορίου στο επίπεδο του στερεού. Οι διαστάσεις των νανοσωματιδίων καθορίζουν τη διαθέσιμη επιφάνειά τους, αλλά και τον τρόπο με τον οποίο σχηματίζονται οι νανοκρυσταλλικές δομές. Κατά τον τρόπο αυτό, επηρεάζουν τη μορφολογία και τις φυσικοχημικές ιδιότητες, και ανάμεσα σε αυτές και την αγωγιμότητα των υλικών. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στους ημιαγωγούς, επιδρούν στις οπτικές, ηλεκτρονικές και καταλυτικές ιδιότητες των νανοδομημένων ημιαγωγών. Προφανώς, με την αύξηση του μεγέθους του νανοσωματιδίου σε κάποιο επίπεδο το νανοσωματίδιο χάνει τις επιπλέον ιδιότητες και συμπεριφέρεται ως τυπικός ημιαγωγός, αφού το πλήθος των ενεργειακών επιπέδων αυξάνεται τόσο που πρακτικά παρατηρούνται μόνο οι δύο κλασικές ζώνες των ημιαγωγών (σθένους και αγωγιμότητας). Η διαφοροποίηση αυτή καταργείται σε διαφορετικές διαστάσεις, ανάλογα με τη φύση κάθε ημιαγωγού.

Στο πειραματικό μέρος της εργασίας μελετώνται νανοσωματίδια  $\text{TiO}_2$ , με ικανό μέγεθος, ώστε να χαρακτηρίζονται από την ενεργειακή φύση ενός τυπικού ημιαγωγού, δηλαδή από πλήρες διάγραμμα ζώνης σθένους, ζώνης αγωγιμότητας και ενεργειακού χάσματος.

## **E. Φωτοκατάλυση**

### **E.1. Γενικά**

Η *φωτοκατάλυση* ορίζεται ως η «επιτάχυνση μιας φωτοαντίδρασης υπό την παρουσία καταλύτη». Ένας καταλύτης δεν αλλάζει, τροποποιείται ή καταναλώνεται κατά τη διάρκεια της χημικής αντίδρασης. Ο ορισμός περιλαμβάνει φωτοευαισθητοποίηση, μια διαδικασία στην οποία μία φωτοχημική μεταβολή λαμβάνει χώρα σε μία μοριακή ουσία ως αποτέλεσμα της απορρόφησης ακτινοβολίας από μια άλλη μοριακή ουσία που ονομάζεται *φωτοευαισθητοποιητής* [24].

Οι φωτοκαταλυτικές αντιδράσεις διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες, ανάλογα με τη φύση του καταλύτη και του καταλυόμενου συστήματος: (α) στις Ομογενείς και (β) στις Ετερογενείς φωτοκαταλυτικές αντιδράσεις. Όταν ο φωτοκαταλύτης βρίσκεται στην ίδια φάση με το φωτοκαταλυόμενο σύστημα, τότε η φωτοκατάλυση είναι ομογενής, ενώ όταν βρίσκεται σε διαφορετική φάση είναι ετερογενής [25].

### **E.2. Φωτοκαταλύτες**

Ως φωτοκαταλύτες ορίζονται τα υλικά εκείνα που μπορούν να επάγουν αντιδράσεις παρουσία φωτός και δεν καταναλώνονται κατά τη διαδικασία αυτή. Κατά κανόνα είναι ημιαγωγοί.

#### **E.2.1. Κριτήρια επιλογής φωτοκαταλύτη**

Ένας καλός φωτοκαταλύτης πρέπει να είναι:

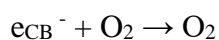
- φωτοενεργός
- να έχει τη δυνατότητα να αξιοποιεί φως στο ορατό ή υπεριώδες φάσμα
- βιολογικά και χημικά αδρανής
- φωτοσταθερός
- χαμηλού κόστους
- μη τοξικός

Διάφορα απλά οξειδία και σουλφίδια ημιαγωγών έχουν αρκετή ενέργεια για να προάγουν ή να καταλύσουν ένα μεγάλο αριθμό χημικών αντιδράσεων περιβαλλοντολογικού ενδιαφέροντος.

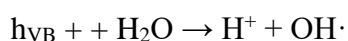
- Οι ημιαγωγοί οι οποίοι έχουν ως επί το πλείστον χρησιμοποιηθεί για φωτοκαταλυτικές εφαρμογές είναι οι:  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{SrTiO}_3$ ,  $\text{WO}_3$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZnS}$ ,  $\text{CdS}$ .
- Το  $\text{TiO}_2$  στην κρυσταλλική μορφή του ανατάση και το  $\text{ZnO}$  αποτελούν τους πλέον δραστικούς ημιαγωγούς για την οξειδωτική καταστροφή των οργανικών ενώσεων.
- Το διοξείδιο του τιτανίου ( $\text{TiO}_2$ ) ή το τροποποιημένο (doped)  $\text{TiO}_2$  είναι ο πιο κοινά χρησιμοποιούμενος καταλύτης για τη φωτοκαταλυτική οξείδωση [24, 26].

### E.3. Μηχανισμός Φωτοκατάλυσης

Η έναρξη του μηχανισμού της φωτοκαταλυτικής διεργασίας σε νανοσωματίδια διοξειδίου του τιτανίου (πρόκειται για τον φωτοκαταλύτη που θα μας απασχολήσει), γίνεται με την απορρόφηση φωτονίων με ενέργεια μεγαλύτερη από εκείνη του ενεργειακού χάσματος του ημιαγωγού ( $E_{\text{h\nu}} \geq E_{\text{g}} = 3.2 \text{ eV} \Rightarrow \lambda \leq 387.5 \text{ nm}$ ). Ως αποτέλεσμα αυτής της διέγερσης, ηλεκτρόνια από τη ζώνη σθένους του διεγείρονται στη ζώνη αγωγιμότητας του δημιουργώντας ζεύγος αντίθετα φορισμένων (φωτοεπαγόμενων) φορτίων: φωτοηλεκτρόνια ( $e_{\text{CB}}^-$ ) στη ζώνη αγωγιμότητας CB και θετικές οπές ( $h_{\text{VB}}^+$ ) στη ζώνη σθένους VB, αντίστοιχα). Τα φορτία αυτά μπορούν είτε να επανασυνδεθούν (recombination), μετατρέποντας την ενέργεια των φωτονίων σε θερμική, είτε να «ταξιδέψουν» στην επιφάνεια του ημιαγωγού, λόγω του εκτεταμένου δικτύου δεσμικών και αντιδεσμικών τροχιακών του νανοσωματιδίου, όπου μπορούν να αντιδράσουν με μόρια δότες [μοριακό οξυγόνο (διοξυγόνο)] και δέκτες ηλεκτρονίων αντίστοιχα (νερό), σχηματίζοντας ισχυρές οξειδωτικές ρίζες, σύμφωνα με τις αντιδράσεις:



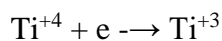
(4)



(5)

Αναλυτικά η πορεία σχηματισμού των ενδιάμεσων ριζών είναι η ακόλουθη:

Τα ηλεκτρόνια ( $e^-$ ) τα οποία έχουν διεγερθεί στη στοιβάδα αγωγιμότητας μπορούν να παγιδευτούν από κατιόντα  $Ti^{+4}$  στο κρυσταλλικό πλέγμα (στην επιφάνεια ή εσωτερικά) σύμφωνα με την αντίδραση:



(6)

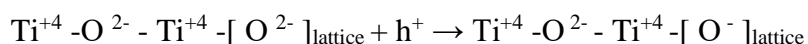
Τα επιφανειακά κατιόντα  $Ti^{+3}$  αλληλεπιδρούν με τα προσροφημένα μόρια  $O_2$  προς τον σχηματισμό υπεροξειδικών ιόντων ( $O_2^-$ ) σύμφωνα με την αντίδραση:



Το  $O_2^-$  έχει πολύ μεγάλο χρόνο ζωής αφού μπορεί εύκολα να πρωτονιώνεται στην επιφάνεια του αγωγού σχηματίζοντας ρίζες υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) σύμφωνα με την αντίδραση:

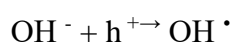


Από την άλλη πλευρά, οι θετικές οπές ( $h^+$ ), οι οποίες έχουν σχηματιστεί στην ζώνη σθένους του ημιαγωγού μπορούν να παγιδευτούν στην επιφάνεια του καταλύτη αντιδρώντας είτε με ιόντα οξυγόνου του πλέγματος σύμφωνα με την αντίδραση:



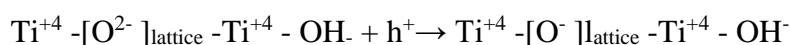
(9)

είτε με τις υδροξυλικές ομάδες στην επιφάνεια προς σχηματισμό ριζών υδροξυλίου ( $OH^-$ ):



(10)

Επίσης, οι θετικές οπές μπορούν να σταθεροποιηθούν από τα επιφανειακά ιόντα ( $OH^-$ ) σε πλεγματοειδή οξυγόνο κάτω από την επιφάνεια:



(11)

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, αποδεικνύεται ότι η απόδοση του φωτοκαταλυτικού μηχανισμού εξαρτάται από δύο κυρίως διεργασίες: τον αποδοτικό διαχωρισμό των αντίθετων φωτοεπαγόμενων φορτίων και τη διεπιφανειακή μεταφορά

φορτίου προς δημιουργία των ιδιαίτερα οξειδωτικών ελευθέρων ριζών. Η ρύθμιση αυτών των παραγόντων δύναται να προκαλέσει κατακόρυφη αύξηση της απόδοσης του ποσοστού μετατροπής της φωτεινής ενέργειας σε χημική. Τέτοιες ρυθμίσεις προκαλούνται με τον έλεγχο στον τρόπο παρασκευής (επιφανειακά χαρακτηριστικά), στο μέγεθος των νανοσωματιδίων του διοξειδίου του τιτανίου, στη χημική τροποποίηση (doping) του κρυσταλλικού πλέγματος και τον περιορισμό απενεργοποίησης του καταλύτη [24].

## **ΣΤ. Τροποποίηση Νανοσωματιδίων για Βέλτιστη Φωτοκαταλυτική Απόδοση**

Με σκοπό να αναπτυχθούν νέες ιδιότητες στα νανοσωματίδια ή για τη βελτίωση των ήδη υπάρχουσών, ακολουθούνται διάφορες τεχνικές που τροποποιούν κάποια από τα βασικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων, όπως είναι η δομή ή η κρυσταλλικότητά τους.

Μια από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές, είναι ο έλεγχος του μεγέθους του. Για παράδειγμα, όταν μειώνεται το μέγεθος ενός νανοσωματιδίου αυξάνεται η ενεργός επιφάνεια του υλικού, ή αλλιώς η ενεργός διατομή, και επομένως μεγαλύτερος αριθμός χημικών ειδών (π.χ. μορίων) μπορούν να αντιδράσουν με τα ζεύγη φορτίων (ηλεκτρονίων και οπών), αυξάνοντας τελικά την απόδοση της διεργασίας, στην οποία χρησιμοποιείται, επί παραδείγματι ως καταλύτης [21]. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στη φωτοκαταλυτική δραστηριότητα του  $\text{TiO}_2$ , αυτή αυξάνεται όσο μειώνεται το μέγεθος, αλλά πιθανά παρουσιάζει κάποιο μέγιστο στην περιοχή των 100 nm [27]. Αυτό προκύπτει από την αλληλεπίδραση μεταξύ του νανοσωματιδίου και των φωτονίων που απορροφώνται, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται αρνητικά η φωτοκαταλυτική δράση.

Μια δεύτερη, ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος βελτίωσης των νανοσωματιδίων είναι η χημική τροποποίηση (doping).

### **ΣΤ.1. Χημική τροποποίηση νανοσωματιδίων (Doping)**

Η τροποποίηση (doping) είναι η εισαγωγή προσμείξεων στα νανοσωματίδια με στόχο τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους.

Η τροποποίηση του  $\text{TiO}_2$  στοχεύει στη βελτίωση της φωτοκαταλυτικής του δράσης, μέσω της εξ ολοκλήρου αξιοποίησης του φάσματος της ηλιακής ακτινοβολίας,

συμπεριλαμβανομένης και της ορατής περιοχής του φάσματος της ηλιακής ακτινοβολίας και ταυτόχρονα στη μείωση του μεγέθους των νανοσωματιδίων.

Η ανάπτυξη των καταλυτών ορατού φωτός (Visible Light Catalysts- VLCs) με βάση το  $\text{TiO}_2$  αποτελεί ένα σημαντικό τομέα έρευνας, με εφαρμογές τόσο στην αντιρρυπαντική τεχνολογία όσο και άλλες εφαρμογές. Αυτές περιλαμβάνουν την παραγωγή υδρογόνου από το νερό, την απομάκρυνση οργανικών ή και τοξικών ενώσεων από τα λύματα ή τον αέρα, την αυτόματη αποσύνθεση πλαστικών σκουπιδιών, την αποστείρωση και πλήθος άλλων εφαρμογών.

Αρχικά, η φωτεινή ενέργεια που απορροφάται από τα υλικά VLC με βάση το  $\text{TiO}_2$ , δημιουργεί ζεύγη ηλεκτρονίων - οπών. Αυτοί οι φωτοδιεγερμένοι φορείς στη συνέχεια μεταναστεύουν στις επιφάνειες των VLCs και αντιδρούν χημικά με διάφορους στόχους. Αυτή η απλή φωτοκαταλυτική διαδικασία εξαρτάται από τρία κρίσιμα στάδια: (α) την ικανότητα απορρόφησης φωτός των VLCs με βάση το  $\text{TiO}_2$ , η οποία καθορίζει πόση ενέργεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά από τους VLCs, (β) τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των ζευγών ηλεκτρονίων-οπών, που καθορίζει τον αριθμό των ενεργών αναγωγικών / οξειδωτικών ριζών που είναι διαθέσιμες για τις χρήσιμες χημικές αντιδράσεις και (γ) την απόσταση μετανάστευσης και τη διάρκεια ζωής των φωτοδιεγερμένων φορέων. Οι μεγαλύτερες αποστάσεις και η μικρότερη διάρκεια ζωής είναι προφανώς ανεπιθύμητες και μειώνουν την φωτοκαταλυτική δράση [42].

Ο αριθμός των νέων δημοσιεύσεων, που σχετίζονται με αυτό το θέμα, συμπεριλαμβανομένων των διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας, σύμφωνα με την Zaleska (2008), αυξάνεται εκθετικά από το 2000, ως αποτέλεσμα κυρίως της έρευνας που αναπτύχθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 70.

Μια από τις πρώτες καινοτομίες αφορούσε μια Ιαπωνική αίτηση για δίπλωμα ευρεσιτεχνίας η οποία περιγράφει μια μέθοδο για την κρυστάλλωση λεπτού υμενίου  $\text{TiO}_2$  και ελασματοποιημένου μετάλλου που έχει λεπτό φιλμ  $\text{TiO}_2$  με πρόσμιξη μετάλλου. Μία άλλη καινοτομία αναφέρεται σε φωτοκαταλυτικό γαλάκτωμα νανο- $\text{TiO}_2$  επιχρισμένο με μεταλλικά ιόντα. Όσον αφορά στη μέθοδο παρασκευής, η οπτική διαφανής λοσιόν (γαλάκτωμα) περιέχει από 0,5 έως 10%  $\text{TiO}_2$ , με προσθήκη V, Sn, Zn, Fe.

Η φωτοκαταλυτική οξείδωση των οργανικών ενώσεων σε υδατικό περιβάλλον συνιστά μια σημαντική ερευνητική δραστηριότητα, ενώ ταχέως αυξανόμενο ενδιαφέρον παρουσιάζεται και για την οξείδωση πτητικών οργανικών ή ανόργανων ενώσεων στην αέρια φάση, συμπεριλαμβανομένων των  $\text{NO}_x$  και  $\text{SO}_x$ . Γενικότερα, η

φωτοκαταλυτική δράση του  $TiO_2$  σε συνδυασμό με τη συμβολή του στις αντικαρκινικές θεραπείες αποτελούν τους κύριους ερευνητικούς τομείς.

Πιο συγκριμένα, κυρίως στην Ιαπωνία αλλά και στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής και στη συνέχεια στην Κίνα αναπτύσσονται συνεχώς εμπορικές εφαρμογές φωτοκαταλυτικών προϊόντων  $TiO_2$ . Στην Ιαπωνία, η δραστηριότητα αυτή ξεκίνησε στα μέσα της δεκαετίας του '90. Ο συγκεκριμένος βιομηχανικός κλάδος περιλαμβάνει περισσότερες από 2000 εταιρείες με προϊόντα όπως εξωτερικά δομικά υλικά (αυτοκαθαριζόμενα πλακάκια, ακόμη και αυτοκαθαριζόμενα πλαστικά προϊόντα για σκηνές ή τέντες), δομικά υλικά εσωτερικού χώρου (αυτοκαθαριζόμενα και αντιβακτηριδιακά πλακάκια, ταπετσαρίες και περσίδες παραθύρων), υλικά κατασκευής οδικών έργων (αυτοκαθαριζόμενα υλικά επικάλυψης σηράγγων, ηχομονωτικά υλικά και καλύμματα λαμπτήρων), υλικά καθαρισμού εγκαταστάσεων (φίλτρα αέρα, φίλτρα για το σύστημα αποχέτευσης ή τις πισίνες) και είδη οικιακής χρήσης (αντιβακτηριακές ίνες, ρούχα). Στο τέλος της πρώτης δεκαετίας του 2000, στην Ιαπωνία, διατίθεται στο εμπόριο, φωτοκαταλύτης ορατού φωτός με βάση το  $TiO_2$ , MPT-621, ο οποίος παρασκευάζεται με κατεργασία του  $TiO_2$  με ένωση λευκόχρυσου. Το τροποποιημένο νανοσωματίδιο, έτσι, μπορεί να ενεργοποιηθεί από τις ακτινοβολίες του ορατού φάσματος και να χρησιμοποιηθεί για εφαρμογές όπως οι αντιβακτηριακές και αυτοκαθαριζόμενες επιφάνειες εσωτερικών χώρων και για τον καθαρισμό του νερού. Ένα σημαντικό πρόβλημα που εμφανίζεται στο τροποποιημένο  $TiO_2$ , είναι η απώλεια της φωτοευαισθησίας του, είτε μετά την ανακύκλωσή του είτε μετά από μακροχρόνια αποθήκευση. Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις η απόδοσή του πέφτει κάτω από τα επίπεδα του μη τροποποιημένου  $TiO_2$ , εξαιτίας τη μη σταθερότητάς στον διαχωρισμό των ζευγών ηλεκτρονίων - οπών. Τέλος, το τροποποιημένο με αμέταλλο  $TiO_2$  παρουσιάζει χαμηλότερη φωτοκαταλυτική δραστηριότητα στην περιοχή του ορατού φωτός από ό,τι στην περιοχή του υπεριώδους. Ως εκ τούτου, η βελτίωση των υφιστάμενων φωτοκαταλυτών που εμφανίζουν δραστηριότητα στο φάσμα του ορατού φωτός, με στόχο την επίτευξη υψηλής χημικής και φυσικής σταθερότητας είναι μεγάλης σημασίας για την ανάπτυξη σε εμπορικών εφαρμογών. Τέτοια υλικά, μαζί με την ανάπτυξη εφαρμόσιμων τεχνικών επίστρωσης σε βασικά υποστρώματα όπως πολυμερή, γυαλί, κεραμικά ή μέταλλα, αναμένεται, σύμφωνα με την Zaleska (2008), να φέρουν ριζικές αλλαγές στον τομέα αυτό, βελτιώνοντας δραστικά την οικονομική βιωσιμότητα, άρα και την εφαρμοσιμότητα μια σειράς καινοτόμων εφαρμογών.

Μία από τις μείζονες προκλήσεις για την επιστημονική και τη βιομηχανική κοινότητα που συμμετέχει στην φωτοκαταλυτική έρευνα, όπως αναφέρθηκε, είναι η αύξηση της φασματικής ευαισθησίας των φωτοκαταλυτών με βάση το  $\text{TiO}_2$ . Γενικότερα, στόχος στον τομέα της κατάλυσης με βάση την τιτανία είναι ένα χημικά και φυσικά σταθερό  $\text{TiO}_2$  με προβλέψιμη φωτοενεργότητα στο φάσμα του ορατού και του υπεριώδους. Επίσης, σημαντικοί ερευνητικοί στόχοι είναι, επίσης, η ανάπτυξη νέων πρόσθετων ουσιών, η ανάπτυξη νέων μεθόδων ενσωμάτωσης προσμείξεων καθώς και η ανάπτυξη νέων εφαρμογών για την περιβαλλοντική τεχνολογία [29].

Ο περιοδικός πίνακας περιέχει ένα ευρύ φάσμα στοιχείων και μια κατάλληλη επιλογή του παράγοντα προσμίξεων είναι ζωτικής σημασίας για τη μετατόπιση του άκρου απορρόφησης και την αύξηση της φωτοκαταλυτικής δραστηριότητας. Αυτό συμβαίνει γιατί, ορισμένες φορές, το άτομο της πρόσμιξης εισάγει ελεύθερες θέσεις στη Ζώνη Χάσματος που διευκολύνουν την απορρόφηση του ορατού φωτός. Ωστόσο, αυτό δεν συνεπάγεται αυτόματα αύξηση στη φωτοκαταλυτική δράση, επειδή το δημιουργημένο ζεύγος ηλεκτρονίων - οπών μπορεί να είναι άμεσα διαθέσιμο για επανασύνδεση, εξαιτίας μη κατειλημμένων θέσεων στη Ζώνη Χάσματος. Από την άλλη πλευρά, η ιονική ακτίνα του παράγοντα πρόσμιξης έχει επίσης σημασία, αφού μεγάλες διαφορές στην ιονική ακτίνα προκαλούν παραμόρφωση του πλέγματος, η οποία επηρεάζει σοβαρά την κρυσταλλικότητα του τελικού προϊόντος. Ο συνδυασμός ενός μετάλλου με ένα μη μέταλλο ως παράγοντες προσμίξεων μπορεί να βελτιώσει τη φωτοκαταλυτική δράση [31].

### **ΣΤ.1.1. Χημική Τροποποίηση του $\text{TiO}_2$ με Άργυρο**

Σύμφωνα με τη Λαγοπάτη (2013), η τροποποίηση του  $\text{TiO}_2$  με Άργυρο έχει ως στόχο τη μείωση ή την αναστολή της επανασύνδεσης των φωτοηλεκτρονίων της ζώνης αγωγιμότητας με τις οπές της ζώνης σθένους του ημιαγωγού. Έτσι, διευκολύνεται η δημιουργία δραστικών ελευθέρων οξειδωτικών ριζών, αφού ο χρόνος ζωής του ζεύγους φωτοηλεκτρονίων – οπών αυξάνεται.

Η δράση των σωματιδίων του αργύρου εξηγείται με διαφορετικές ερμηνείες:

α) Τα σωματίδια αργύρου δρουν σαν παγίδες φωτοηλεκτρονίων, αφού αποτελούν ευέλικτο και αποτελεσματικό οξειδοαναγωγικό ζεύγος ( $\text{Ag}^0/\text{Ag}^+$ ).



β) Η παρουσία αργύρου εμφανίζει ένα τοπικό θετικό ηλεκτροστατικό πεδίο, το οποίο διευκολύνει ενεργειακά τη μετάβαση ηλεκτρονίων από τη ζώνη σθένους του ημιαγωγού στη ζώνη αγωγιμότητας, υπό την επίδραση ακτινοβολίας ενώ εμποδίζει την επανασύνδεσή τους.

γ) Η εισαγωγή νανο-συσσωματωμάτων αργύρου σε ολόκληρη τη μάζα του ημιαγωγού, επηρεάζει την επιφανειακή διαμόρφωση, αυξάνοντας την επιφάνεια του καταλύτη.

Έχει αναφερθεί από τους Khan και συνεργάτες (2017), ότι ένα κατιονικό ζεύγος προσμίξεων στο  $\text{TiO}_2$  βελτιώνει τη φωτοκαταλυτική δράση του, ελαχιστοποιώντας τη δομική παραμόρφωση. Το  $\text{TiO}_2$  με τροποποίηση Ag συντίθεται μέσω διαφόρων τεχνικών, όπως είναι sol-gel, μικρογαλακτώματος και φωτοαναγωγής  $\text{Ag}^+$  σε εναιώρημα  $\text{TiO}_2$ . Η τροποποίηση αυτή βρέθηκε ότι είναι επιτυχής στη μετατόπιση του άκρου απορρόφησης του  $\text{TiO}_2$  προς το ορατό φως και στη βελτίωση της φωτοκαταλυτικής του απόδοσης [31].

Όμως, η τροποποίηση του  $\text{TiO}_2$  με μέταλλα οδηγεί σε αύξηση της φωτοκαταλυτικής του δράσης υπό την επίδραση του υπεριώδους φωτός, αλλά όχι και στην ορατή περιοχή. Αυτό γίνεται εφικτό με την συν-τροποποίηση με αμέταλλα (N, C, S, F) [21].

### **ΣΤ.1.2. Χημική Τροποποίηση του $\text{TiO}_2$ με Άζωτο**

Κατά τη Λαγοπάτη (2013), η τροποποίηση ενός ημιαγωγού, και ειδικά του  $\text{TiO}_2$  με άζωτο, προτιμάται από την τροποποίησή του με άλλα αμέταλλα, όπως ο άνθρακας (C) ή το θείο (S), εξαιτίας κάποιων πλεονεκτημάτων που συνοψίζονται ακολούθως:

- Το άζωτο έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει πολλές ενώσεις (οργανικές και ανόργανες) με χαμηλό κόστος.
- Η τροποποίηση του ημιαγωγού με άζωτο επιτυγχάνεται σχετικά γρήγορα, αρκετά εύκολα και χωρίς την ανάγκη ακριβών και εξειδικευμένων πειραματικών διατάξεων.
- Με την τροποποίηση του ημιαγωγού με άζωτο προκαλείται αλλαγή του χρώματος από λευκό σε υποκίτρινο. Αυτό επιτρέπει ένα εύκολο πρώτο έλεγχο της πραγματοποίησής της.
- Ελέγχεται με αρκετά καλή ακρίβεια το ποσοστό του αζώτου στο τελικό υλικό.

- Τα υλικά που παράγονται από τροποποίηση με άζωτο εμφανίζουν υψηλή φωτοκαταλυτική απόδοση, υπό την επίδραση της ορατού φωτός, επιτρέποντας τη χρήση τους σε καθημερινές εφαρμογές.
- Κατά τη χημική τροποποίηση με άζωτο είναι δυνατό να παραχθούν περισσότερες από μία δομές.
- Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το άζωτο επιτυγχάνει τα μεγαλύτερα ποσοστά τροποποίησης [21].

Πρόσφατες πειραματικές μελέτες (Morgade και Cabeza, 2017), έδειξαν ότι η απλή/μονή τροποποίηση με χρήση κατιόντων ή ανιόντων δεν έχει φτάσει την αναμενόμενη απόδοση όσον αφορά στη βελτίωση της φωτοκαταλυτικής δράσης της τιτανίας, ενώ εμφανίζει σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες όπως:

- Ασταθές σύστημα
- Τάση προς επανασύνδεση των φωτοδιεγερμένων ζευγών ηλεκτρονίων-οπών,
- Μείωση κινητικότητας κατά τη μεταφορά των φωτοδιεγερμένων μορίων

Για τον λόγο αυτό προκρίνεται η ιδέα της διπλής τροποποίησης, η οποία μπορεί να βελτιώσει τις φωτοκαταλυτικές ιδιότητες του ημιαγωγού.

## **ΣΤ.2. Διπλή Χημική Τροποποίηση Νανοδομημάτων (Co-doping)**

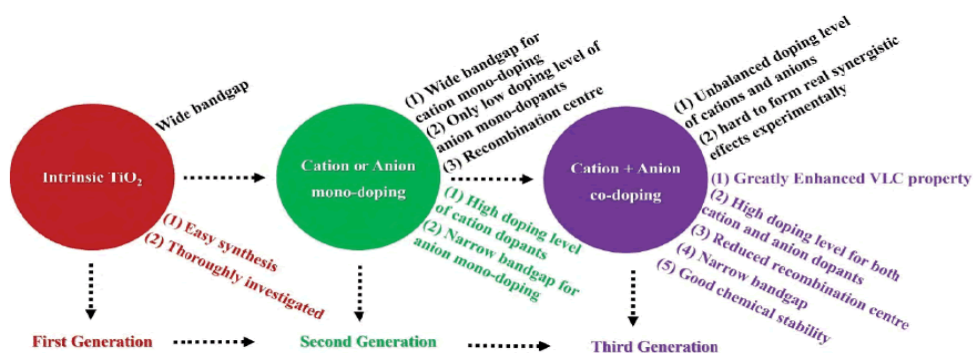
Η *διπλή τροποποίηση* (co-doping) είναι η εισαγωγή δύο διαφορετικών προσμείξεων στα νανοδομημάτια με στόχο τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους.

Η απλή τροποποίηση με μεταλλικά ή μη μεταλλικά άτομα μπορεί να ενισχύσει τη φωτοκαταλυτική δράση του  $\text{TiO}_2$ . Όμως, ενεργεί και αντίστροφα, αφού έχει ως αποτέλεσμα οι προσμίξεις σχεδόν πάντα να ενεργούν ως κέντρα επανασύνδεσης των ηλεκτρονίων - οπών. Σύμφωνα με τη Ν. Λαγοπάτη (2013), έχει αναγνωριστεί θεωρητικά ότι η διπλή τροποποίηση με τη χρήση δύο ή περισσότερων στοιχείων μπορούν να παθητικοποιήσουν τις ζώνες προσμείξεων και να μειώσουν το σχηματισμό κέντρων επανασύνδεσης, αυξάνοντας τη θετική δράση των προσμείξεων στη φωτοκαταλυτική συμπεριφορά. Επιπλέον, η διπλή τροποποίηση μπορεί να επιδράσει θετικά και στην ισορροπία φορτίου. Κατά συνέπεια, μπορεί να ενισχύσει αποτελεσματικά την φωτοκαταλυτική δραστηριότητα. Ανεξάρτητα από το αν η τροποποίηση βασίζεται σε μεμονωμένα ή συζευγμένα ετεροάτομα έχει σημαντική

επίδραση τόσο στο φάσμα της απορροφούμενης ακτινοβολίας, όσο και στην κινητικότητα και τη σταθερότητα των φωτοδιεγερμένων ζευγών. Ως εκ τούτου, η εισαγωγή διαφορετικών πρόσθετων, τα οποία μπορούν να έχουν συνεργιστική δράση αποτελεί ίσως έναν εξαιρετικά ενδιαφέροντα ερευνητικό τομέα στο αντικείμενο [30].

Κατά τους Fei κ.ά. (2016), τα στοιχεία που εισάγονται στο πλέγμα του  $\text{TiO}_2$ , επιφέροντας αλλαγές στην ηλεκτρονική δομή και στην ενέργεια χάσματος, συμπεριλαμβάνουν και τους τρεις πιθανούς συνδυασμούς: α) δύο μη μεταλλικών στοιχείων β) ενός μεταλλικού και ενός μη μεταλλικού στοιχείου γ) δύο μεταλλικών στοιχείων.

Ένα παράδειγμα της εξέλιξης φωτοκαταλύτη με βάση το  $\text{TiO}_2$ , της μονής τροποποίησής του (δεύτερη γενιά) και της διπλής τροποποίησής του (τρίτη γενιά) καθώς και των πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων που παρουσιάζουν δίνεται στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3. Η εξέλιξη των φωτοκαταλυτών με βάση το  $\text{TiO}_2$  ( $\text{N}^{3-}$ ,  $\text{M}^{5+}$ ). Τα πλεονεκτήματα (κάτω) και τα μειονεκτήματα (πάνω) [42].

### ΣΤ.2.1. Διπλή τροποποίηση του $\text{TiO}_2$ με Άζωτο - Μέταλλο

Σύμφωνα με τους Huang κ.ά. (2016), πολλές έρευνες για το διπλά τροποποιημένο  $\text{TiO}_2$  με μέταλλο και Άζωτο, δείχνουν ότι το μέταλλο στο πλέγμα του  $\text{TiO}_2$  υποβοηθά το N και ενισχύει την μετατόπιση του άκρου απορρόφησης στην περιοχή ορατού φωτός. Συνήθως, επιλέγονται μέταλλα όπως τα La, Ti, Zn, W, Cu, Fe, Ni, V, Cr, Ce και Mn. Όταν το ιόν του μετάλλου ενσωματώνεται στο πλέγμα ή βρίσκεται διασκορπισμένο στην επιφάνεια του  $\text{TiO}_2$  μπορεί να ενισχύσει τον ρυθμό διαχωρισμού των ζευγών ηλεκτρονίων-οπών. Υπό την επίδραση του ορατού φωτός ή από άλλη χαμηλή ακτινοβολία, το ηλεκτρόνιο μπορεί να διεγερθεί από το επίπεδο της πρόσμειξης

N, στο επίπεδο πρόσμειξης μεταλλικού ιόντος ή από το επίπεδο πρόσμειξης N, στη Ζώνη Αγωγιμότητας, ή από τη Ζώνη Σθένους στο επίπεδο πρόσμειξης μεταλλικού ιόντος. Αυτή η τεχνική έχει υιοθετηθεί εκτεταμένα για τον σχεδιασμό καταλυτών ορατού φωτός με υψηλή αποδοτικότητα [30].

Παρακάτω παρατίθεται από τους Huang κ.ά. (2016), μια σειρά εφαρμογών της διπλής τροποποίησης TiO<sub>2</sub> με πρόσθετα τύπου 2 (μετάλλου - αμετάλλου), στις οποίες το Άζωτο αποτελεί την πηγή των μη μεταλλικών ατόμων.

- La/N/TiO<sub>2</sub>

Οι Sun κ.ά. και οι Yu κ.ά. διερεύνησαν την αλληλεπίδραση μεταξύ υποκαταστατών αζώτου και εμφυτευμένου Λανθανίου στις (101) και (001) όψεις του TiO<sub>2</sub> και με τη χρήση της αρχής του διακριτού μετασχηματισμού Fourier (discrete Fourier transform - DFT) ανέλυσαν την προέλευση της ενισχυμένης φωτοκαταλυτικής δραστηριότητας στο ορατό φως του (N, La) τροποποιημένου TiO<sub>2</sub>.

- Ti<sup>3+</sup>/N/TiO<sub>2</sub>

Οι Li κ.ά. ανέπτυξαν μια αποδοτική και εύκολα εφαρμόσιμη τεχνική για να πραγματοποιήσουν ταυτόχρονα τροποποίηση με άζωτο και auto-doping με Ti<sup>3+</sup> σε TiO<sub>2</sub> κρυστάλλους.

- Zn/N/TiO<sub>2</sub>

Ένας νέος τύπος (N, Zn) διπλά τροποποιημένου φωτοκαταλύτη TiO<sub>2</sub> παρασκευάστηκε από τους Wang και συνεργάτες, μέσω σύνθεσης με απλή τεχνική sol-gel, η οποία παρουσίασε υψηλότερη φωτοκαταλυτική δράση από ότι το καθαρό TiO<sub>2</sub>, το απλά τροποποιημένο με άζωτο, TiO<sub>2</sub> και το απλά τροποποιημένο με Κασσίτερο, TiO<sub>2</sub>, υπό αμφότερες την ορατή ακτινοβολία και την ακτινοβολία UV.

- W/N/TiO<sub>2</sub>

Σύμφωνα με τους Lai και Wu, ο τύπος (N, W) διπλά τροποποιημένου φωτοκαταλύτη TiO<sub>2</sub> είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος βελτίωσης της συμπεριφοράς των φωτοδιεγερμένων φορέων. Οι Lai και Wu παρασκεύασαν nanobelt από διπλά τροποποιημένο με άζωτο και βολφράμιο, TiO<sub>2</sub> μέσω μιας απλής διαδικασίας που απαιτεί χαμηλή θερμοκρασία και ακολούθως πύρωση. Το προϊόν παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα από τις μονές τροποποιήσεις του TiO<sub>2</sub>, τόσο με βολφράμιο,

όσο και με άζωτο, ως προς την αντοχή του στην φωτο-αποικοδόμησή του και χαμηλή ενέργεια χάσματος. Γενικά, τα θετικά αποτελέσματα συναινούν υπέρ της άποψης για θετική συνεργιστική δράση των (N, W).

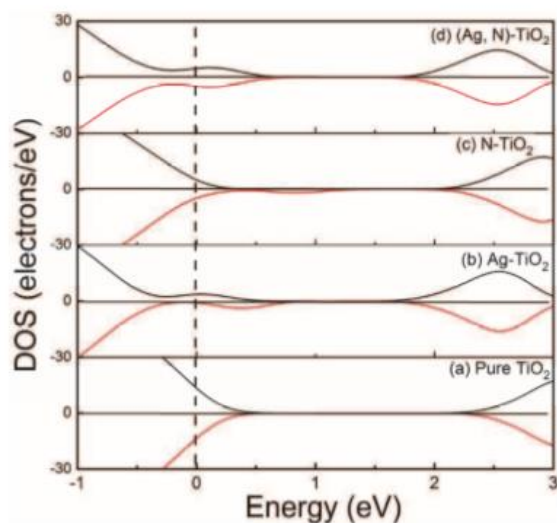
- Cu/N/TiO<sub>2</sub>

Πρόσφατα, ορισμένοι ερευνητές αναπτύσσουν νέους διπλά τροποποιημένους με άζωτο και χαλκό φωτοκαταλύτες TiO<sub>2</sub> με θετικά αποτελέσματα ως προς την φωτοκαταλυτική του δράση. Για παράδειγμα οι Wang κ.ά. (2016), διαπίστωσαν ότι το TiO<sub>2</sub> (N, Cu) απορρόφησε το 7,7% της ακτινοβολίας του μπλε του μεθυλίου, έναντι του 5,9% του δείγματος ελέγχου.

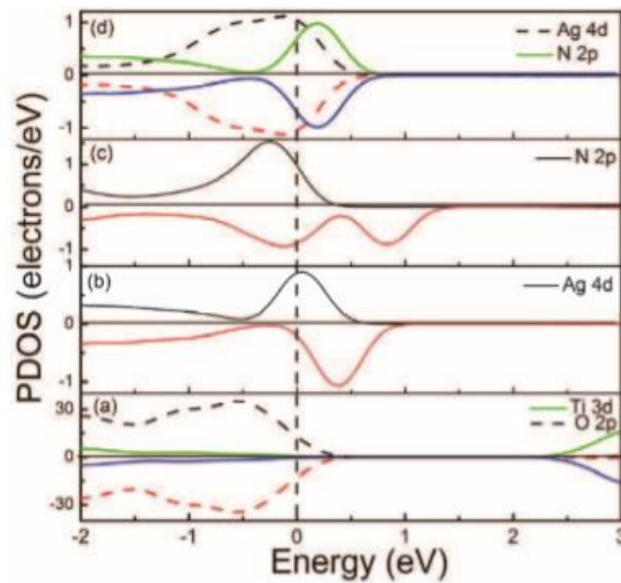
- Fe/N/TiO<sub>2</sub>

Οι Zhang κ.ά. (χρονολογία) παρασκεύασαν νανοσωλήνες TiO<sub>2</sub> με διπλή τροποποίηση με σίδηρο και άζωτο. Σε σύγκριση με τις εμπορικές σκόνες TiO<sub>2</sub> και τους καθαρούς νανοσωλήνες TiO<sub>2</sub>, οι νανοσωλήνες TiO<sub>2</sub> (N, Fe) παρουσίασαν ισχυρότερη ικανότητα απορρόφησης ορατού φωτός και ενισχυμένη φωτοκαταλυτική δράση υπό ακτινοβολία ορατού φωτός [30].

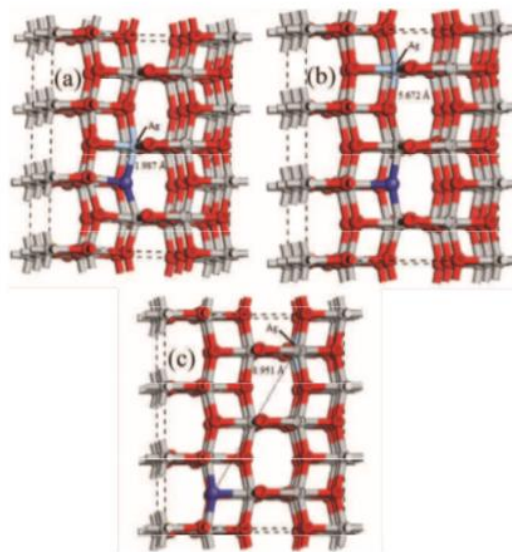
Η επίδραση της μονής τροποποίησης της τιτανίας με άργυρο ή άζωτο, καθώς και της σύγκρισής της με τη διπλή τροποποίηση με άργυρο και άζωτο φαίνεται χαρακτηριστικά στα διαγράμματα 1 και 2, με αποτέλεσμα τόσο την μεταφορά της απορροφούμενης ακτινοβολίας προς το ορατό φως, όσο και την τροποποίηση της κρυσταλλικής δομής του νανοσωματιδίου.



**Διάγραμμα 1. Ποκνότητα Καταστάσεων (Projected Density of States –PDOS) για α) καθαρό TiO<sub>2</sub> b) (Ag) TiO<sub>2</sub> c) (N) TiO<sub>2</sub> d) (Ag,N)- TiO<sub>2</sub> [39].**



**Διάγραμμα 2. Ποκνότητα Καταστάσεων (Projected Density of States –PDOS) για α) καθαρό TiO<sub>2</sub> b) (Ag) – TiO<sub>2</sub> c) (N) – TiO<sub>2</sub> d) (Ag, –N)- TiO<sub>2</sub> [39].**



**Εικόνα 4. Μοντέλα κρυσταλλικής κυψελίδας διπλά τροποποιημένου TiO<sub>2</sub> με Ag και N [39].**

### **ΣΤ.3. Εφαρμογές της τροποποίησης νανοσωματιδίων TiO<sub>2</sub> στον τομέα της Βιοϊατρικής**

Υπάρχει σημαντική ερευνητική δραστηριότητα που σχετίζεται με τη χρήση τροποποιημένων νανοσωματιδίων TiO<sub>2</sub> σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Στη συνέχεια γίνεται αναφορά σε κάποιες από αυτές.

Οι Gaidau κ.ά. (2016), ερευνούν φωτοκαταλύτες με βάση τα νανοσωματίδια Ag-TiO<sub>2</sub> και Ag-N-TiO<sub>2</sub>, που συντίθενται μέσω της ηλεκτροχημικής μεθόδου, και την εφαρμογή τους στο δέρμα. Η μέθοδος ηλεκτροχημικής σύνθεσης επιτρέπει τον έλεγχο των χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος μέσω του ελέγχου της πυκνότητας του ρεύματος, της θερμοκρασίας και του pH. Στην έρευνα αποδείχθηκε ισχυρή φωτοκαταλυτική δράση των Ag-N-TiO<sub>2</sub> NPs υπό την επίδραση του ορατού φωτός, με εφαρμογή τον αυτοκαθαρισμό σε επιδερμικούς λεκέδες μελανιού στυλό, χρώματος Orange II και κυανού του μεθυλενίου. Επίσης, αποδείχθηκε εξαιρετικά αποτελεσματική αντιμικροβιακή δράση των Ag-N-TiO<sub>2</sub> NPs έναντι των *Candida albicans* ATCC 26790, *Candida albicans* 1760 και καλή έναντι του *Epidermophyton floccosum*. Επίσης, αποτελεσματική αντιμικροβιακή δράση των νανοσωματιδίων Ag-N-TiO<sub>2</sub> και Ag-TiO<sub>2</sub> αποδείχθηκε έναντι των *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Οι παραπάνω ιδιότητες αποδόθηκαν στις φωτοκαταλυτικά διεγερόμενες υδρόφιλες ιδιότητες που προσδίδονται στην επιφάνεια του δέρματος υπό την επίδραση N-TiO<sub>2</sub> NPs.

Βελτιωμένες ιδιότητες αυτοκαθαρισμού και αντιμικροβιακής δράσης με χρήση TiO<sub>2</sub> NPs έχουν, επίσης, αποδειχθεί και σε άλλες έρευνες. Γενικά, ο τομέας των εφαρμογών των φωτοκαταλυτών για τη βελτίωση της ανθεκτικότητας του δέρματος αλλά και για τον αυτοκαθαρισμό φαίνεται πολλά υποσχόμενος [40].

Λόγω της συνεχούς αυξανόμενης ζήτησης στην αγορά, προβλέπεται ότι η ετήσια παραγωγή των TiO<sub>2</sub> NPs θα φτάσει τους περίπου 2,5 εκατομμύρια τόνους μέχρι το 2025, λόγω του αυξανόμενου ενδιαφέροντος για τα NPN (ημιαγωγοί τύπου n) TiO<sub>2</sub> σε βιοϊατρικούς τομείς, όπως η κυτταρική απεικόνιση, η φωτοδυναμική θεραπεία και οι βιοαισθητήρες.

### ΣΤ.3.1. Αντικαρκινική δράση τροποποιημένων νανοσωματιδίων TiO<sub>2</sub>

Όπως έχει αναφερθεί, το TiO<sub>2</sub> είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο νανοϋλικό, τόσο σε βιομηχανικές εφαρμογές όσο και σε εφαρμογές στον τομέα των βιοϊατρικών επιστημών.

Ωστόσο, υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με τη βιολογική δράση των NP του TiO<sub>2</sub>. Αρκετές μελέτες διαπίστωσαν ότι προκαλούν φλεγμονή, κυτταροτοξικότητα και γονιδιοτοξικότητα [7-9]. Αντίθετα, άλλες μελέτες έδειξαν ότι τα NP του TiO<sub>2</sub> δεν ήταν τοξικά για αρκετές κυτταρικές σειρές [10-12]. Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με την τοξικολογική δράση των NP TiO<sub>2</sub> θα μπορούσαν να οφείλονται στη χρήση διαφορετικών φυσικών και χημικών ιδιοτήτων αυτού του υλικού [2, 13]. Γενικά, φαίνεται ότι τα TiO<sub>2</sub> NPs του ανατάση έχουν, εκτός της μεγαλύτερης φωτοκαταλυτικής δραστηριότητας και ισχυρότερη βιολογική δράση σε σύγκριση με αυτά του ρουτιλίου [36].

Σύμφωνα με τους Ahamed κ.ά. (2017), το μέγεθος των νανοσωματιδίων καθώς και η ενέργεια της ζώνης χάσματος, εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του πρόσθετου Αργύρου. Το μέγεθος (15 nm έως 9 nm) και η ενέργεια διάκενου ζώνης (3,32 eV έως 3,15 eV) των TiO<sub>2</sub> NPs μειώθηκαν με την αύξηση της συγκέντρωσης του Ag. Στο πειραματικό μέρος αποδείχθηκε ότι το Ag-doped TiO<sub>2</sub> NP προκαλεί κυτταροτοξικότητα και απόπτωση σε καρκινικά ηπατικά ανθρώπινα κύτταρα (HepG2). Η τοξική δράση των NPs TiO<sub>2</sub> αυξάνεται με την αύξηση της ποσότητας του Ag. Τα (Ag) TiO<sub>2</sub> NPs βρέθηκαν περαιτέρω ότι προκαλούν την παραγωγή Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και την εξάντληση των αντιοξειδωτικών. Η τοξικότητα που προκαλείται από NP τροποποιημένο TiO<sub>2</sub> σε κύτταρα HepG2 αντιμετωπίζεται αποτελεσματικά με αντιοξειδωτική Ν-ακετυλοκυστεΐνη (απορροφητής ROS). Επίσης, διαπιστώθηκε ότι τα (Ag)/TiO<sub>2</sub> NPs προκαλούν κυτταροτοξικότητα και οξειδωτικό στρες σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου πνεύμονα (A549) και μαστού (MCF7). Μεγάλο, μάλιστα, ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα ότι NP των TiO<sub>2</sub> με πρόσμιξη Ag δεν προκαλούν μεγάλη τοξικότητα σε φυσιολογικά κύτταρα, όπως ηπατικά κύτταρα πρωτογενών αρουραίων και ινοβλάστες ανθρώπινου πνεύμονα. Συνολικά, διαπιστώθηκε ότι τα NP των TiO<sub>2</sub> με πρόσμιξη Ag έχουν την δυνατότητα να θανατώνουν επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα, ενώ δεν επιδρούν στα φυσιολογικά κύτταρα. Αυτή η μελέτη ενίσχυσε την έρευνα σχετικά με το αντικαρκινικό



δυναμικό των NP των  $\text{TiO}_2$  με πρόσμιξη Ag σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων και μοντέλα *in vivo*.

Άλλη μια τροποποίηση του  $\text{TiO}_2$  που παρουσιάζει ενδιαφέρον για την αντικαρκινική της δράση είναι αυτή με Άζωτο και Φολικό Οξύ.

Το N- $\text{TiO}_2$ -FA επώαστηκε σε κύτταρα ανθρώπινου ρινοφαρυγγικού καρκινώματος (KB) και ανθρώπινου πνευμονικού αδενοκαρκινώματος (A549) από τους Xie και συνεργάτες (2016). Το N- $\text{TiO}_2$ -FA φαίνεται να έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στα κύτταρα KB (διπλάσια από τα κύτταρα A549). Τέλος, το N- $\text{TiO}_2$ -FA δεν παρουσιάζει κυτταροτοξικότητα και έχει καλύτερη φωτοκαταστολή (photokilling) στα κύτταρα KB υπό ακτινοβολία ορατού φωτός [37].

Μια συστηματική προσπάθεια μελέτης της επίδρασης των NPs  $\text{TiO}_2$  στα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζεται στη διδακτορική διατριβή της Λαγοπάτη (2013). Οι σειρές πειραμάτων εστιάζουν στη διερεύνηση των κυτταρο-τοξικών αποτελεσμάτων του  $\text{TiO}_2$  σε δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές που προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα μαστού, η μία μη μεταστατική (MCF-7) και η άλλη μεταστατική (MDA-MB-468). Στόχος ήταν η μελέτη της βιολογικής επίδρασης του  $\text{TiO}_2$ , μέσω του ελέγχου της επίδρασης ειδικών παραμέτρων, όπως είναι η ποσοστιαία σύσταση φάσεων ανατάση - ρουτιλίου, το μέγεθος των νανοσωματιδίων, η συγκέντρωση, η καθαρότητα και άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με τη φύση, τη μορφή και τα χαρακτηριστικά του νανοϋλικού. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό ακτινοβολία UV-A (350nm) ή ορατού φωτός.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δράση των νανοσωματιδίων  $\text{TiO}_2$  εξαρτάται από την τελική συγκέντρωση στην κυτταρική καλλιέργεια, αλλά και από τον βαθμό κακοήθειας των κυττάρων. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, η τιτανία, σε κάθε μορφή της, δεν επιδρά σημαντικά στα MCF-7 κύτταρα, ενώ εμφανίζει σημαντική τοξικότητα στα κύτταρα MDA-MB-468. Τα συμπεράσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με ευρήματα άλλων ερευνών που μελετούν την ίδια ουσία σε άλλες κυτταρικές σειρές. Για παράδειγμα, η εργασία των Kiss και συνεργατών (2008) δείχνει πως το  $\text{TiO}_2$  επιδρά σε κυτταρικές λειτουργίες όπως είναι η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση σε ανθρώπινα δερματικά κύτταρα. Οι Thevenot κ.ά. (2008) αποδεικνύουν ότι τα νανοσωματίδια  $\text{TiO}_2$  εμφανίζουν εξειδικευμένη δράση, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, που εξαρτάται από την τελική συγκέντρωση του  $\text{TiO}_2$ . Οι Warheit κ.ά. (2007) υποστηρίζουν ότι οι αλληλεπιδράσεις κυττάρου και νανοσωματιδίων σχετίζονται, σε μεγάλο βαθμό, με τις ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης.

Περίληπτικά, μερικά από τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τη σχετική βιβλιογραφική επισκόπηση και τα οποία αποτέλεσαν βάση για την έναρξη της παρούσας διπλωματικής εργασίας συνοψίζονται ως εξής:

- Το sol-gel  $\text{TiO}_2$  είναι πιο δραστικό από τα εναιωρήματα, επίσης, είναι περισσότερο ομοιογενές από τα υπόλοιπα εναιωρήματα, επιτρέποντας ακριβέστερη εκτίμηση της τελικής συγκέντρωσης  $\text{TiO}_2$  στα δείγματα. Επιπλέον, η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων σε μορφή sol-gel, δείχνει ότι κατά μέσο όρο είναι πολύ μικρότερα στο τελικό διάλυμα συγκρινόμενα με τα εναιωρήματα, αφού σε μορφή εναιωρήματος ευνοείται ο σχηματισμός συσσωματωμάτων, που αυξάνει το μέγεθος των σωματιδίων.
- Το N-doped  $\text{TiO}_2$  παρά το γεγονός ότι δεν επέδειξε θεαματική κυτταροτοξική δράση, εν τούτοις προσφέρει αποτελέσματα ιδιαίτερα ενθαρρυντικά, αφού επιτρέπει την ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία. Το Ag-doped  $\text{TiO}_2$  είναι αρκετά δραστικό.
- Η κυτταροτοξικότητα του φωτο-ενεργοποιημένου  $\text{TiO}_2$  σχετίζεται με τον μηχανισμό της απόπτωσης.
- Η βελτιστοποίηση της μεθόδου θα μπορούσε να περιλαμβάνει την προσπάθεια αντικατάστασης της ακτινοβολίας UV-A, με ορατό φως. Αυτό επιτυγχάνεται με τροποποίηση του  $\text{TiO}_2$  με άζωτο, αλλά με μέθοδο που να ενισχύει τη δραστικότητά του.

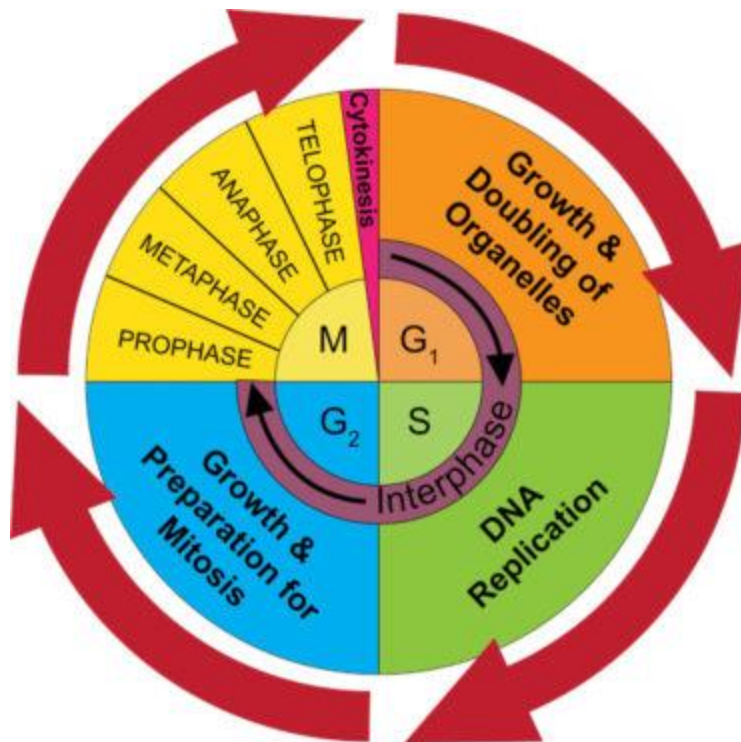
## **Z. Κύκλος Ζωής Κυττάρου**

### **Z.1. Κυτταρικός Κύκλος**

Ένα τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο διαιρείται κάθε 24 περίπου ώρες. Κατά τη μικροσκοπική εξέταση του κυτταρικού κύκλου διακρίνονται δύο κύριες διακριτές φάσεις, η μίτωση (mitosis) και η μεσόφαση (interphase). Η μίτωση (πυρηνική διαίρεση) αντιστοιχεί στο διαχωρισμό των θυγατρικών χρωμοσωμάτων και, συνήθως, καταλήγει σε κυτταρική διαίρεση (κυτταροκίνηση, cytokinesis). Το 95% περίπου της διάρκειας του κυτταρικού κύκλου καλύπτεται από τη μεσόφαση, η οποία είναι η περίοδος ανάμεσα σε δύο διαδοχικές μιτώσεις. Κατά τη μεσόφαση, τα χρωμοσώματα αποσυμπυκνώνονται και καταλαμβάνουν ολόκληρο τον πυρήνα, ο οποίος εμφανίζει σχετικά ομοιόμορφη μορφολογία. Σε μοριακό επίπεδο, η μεσόφαση είναι η περίοδος κατά την οποία διεξάγεται, τόσο η κυτταρική αύξηση όσο και η αντιγραφή του DNA καθώς το κύτταρο προετοιμάζεται για την επικείμενη διαίρεση. Κατά τη μεσόφαση, η

κυτταρική αύξηση γίνεται με σταθερό ρυθμό ώστε τα περισσότερα διαιρούμενα κύτταρα να διπλασιάζονται σε μέγεθος ανάμεσα σε δύο μίτωσεις. Αντίθετα, η σύνθεση του DNA γίνεται μόνο κατά τη διάρκεια ενός τμήματος της μεσόφασης. Έτσι, η χρονική περίοδος της σύνθεσης του DNA χωρίζει τον κύκλο των ευκαρυωτικών κυττάρων σε τέσσερις διακριτές φάσεις (Σχήμα 4). Η φάση M (M phase) του κύκλου αντιστοιχεί στη μίτωση, η οποία συνήθως ακολουθείται από την κυτταροκίνηση. Μετά τη φάση M ακολουθεί η φάση G1 (G1 phase, Gap 1 phase: φάση 1ου διαστήματος), η οποία αντιστοιχεί στο ενδιάμεσο χρονικό διάστημα μεταξύ της μίτωσης και της έναρξης της αντιγραφής του DNA. Κατά την G1, το κύτταρο είναι μεταβολικά ενεργό και αυξάνεται συνεχώς χωρίς να αντιγράφεται το DNA του. Η G1 ακολουθείται από τη φάση S (S phase, Synthesis phase: φάση σύνθεσης), κατά την οποία διεξάγεται η αντιγραφή του DNA. Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του DNA ξεκινά η φάση G2 (G2 phase, Gap 2 phase: φάση 2ου διαστήματος), κατά την οποία συνεχίζεται η κυτταρική αύξηση και συντίθενται πρωτεΐνες καθώς το κύτταρο προετοιμάζεται για τη μίτωση.

Η διάρκεια των φάσεων του κυτταρικού κύκλου εμφανίζει σημαντικές διαφορές σε διαφορετικά είδη κυττάρων. Σε ένα διαιρούμενο, τυπικό ανθρώπινο κύτταρο με συνολική διάρκεια κύκλου 24 ωρών, η φάση G1 μπορεί να διαρκέσει περίπου 11 ώρες, η S περίπου 8 ώρες, η G2 περίπου 4 ώρες και η M περίπου 1 ώρα. Ωστόσο, άλλα κύτταρα μπορεί να διαιρούνται ταχύτερα όπως τα κύτταρα πρώιμων εμβρύων αμέσως μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου. Όμως, στην περίπτωση αυτή, το κυτταρόπλασμα του ωαρίου απλώς διαιρείται σε μικρότερα κύτταρα χωρίς να συμβαίνει κυτταρική ανάπτυξη. Δεν διακρίνονται οι φάσεις G1 και G2 και η αντιγραφή του DNA διεξάγεται ταχύτατα. Επομένως, στα πρώιμα έμβρυα οι κυτταρικοί κύκλοι χαρακτηρίζονται από πολύ σύντομες φάσεις S που εναλλάσσονται με φάσεις M. Σε αντίθεση με τον ταχύτατο πολλαπλασιασμό των εμβρυϊκών κυττάρων, ορισμένα ενήλικα ζωικά κύτταρα (π.χ. τα νευρικά κύτταρα) παύουν οριστικά να διαιρούνται, ενώ πολλά άλλα κύτταρα διαιρούνται κατά περίπτωση, όταν χρειάζεται η αντικατάσταση κυττάρων που έχουν χαθεί εξαιτίας τραυματισμού ή κυτταρικού θανάτου.



Σχήμα 5. Σχηματική απεικόνιση των τεσσάρων διαφορετικών φάσεων (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M) του κυτταρικού κύκλου [48].

## Z.2. Κυτταρικός Θάνατος

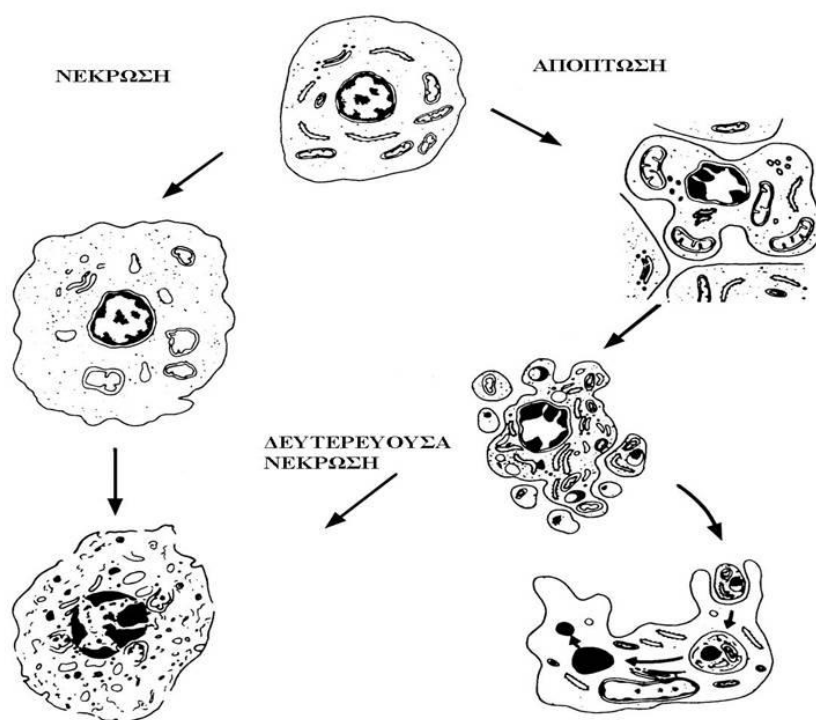
Υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι θανάτου του ευκαρυωτικού κυττάρου, η νέκρωση και η απόπτωση.

Η νέκρωση ή τυχαίος κυτταρικός θάνατος (accidental cell death) είναι η μορφή κυτταρικού θανάτου που προκαλείται από απότομες κυτταρικές βλάβες, όπως είναι η ισχαιμία, η υπερθερμία, η υποξία, ο φυσικός ή χημικός τραυματισμός. Χαρακτηρίζεται από ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, οίδημα του κυτταροπλάσματος και των μιτοχονδρίων, διαρροή κυταροπλασματικού περιεχομένου και πλήρη λύση του κυττάρου. Η νέκρωση, σε αντίθεση με την απόπτωση, οδηγεί συχνά σε οξεία φλεγμονώδη αντίδραση.

Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος (apoptosis ή programmed cell death, PCD) είναι φυσιολογική μορφή «αυτοκτονίας» του κυττάρου, που εμφανίζεται κατά την εμβρυική ανάπτυξη και την εξέλιξη των οργάνων. Χαρακτηρίζεται από βιοχημικές και μορφολογικές αλλαγές, όπως την ταχεία δημιουργία μαλακής προεκβολής της πλασματικής μεμβράνης (blebbing), χωρίς απώλεια της ακεραιότητάς της, τη διάλυση του πυρηνίσκου και του κυτταροσκελετού,

την εκτεταμένη καταστροφή στη χρωματίνη, την κατάτμηση του DNA σε ολιγονουκλεοσώματα, τη συμπύκνωση του πυρήνα, την απώλεια μιτοχονδριακής λειτουργίας και τη συρρίκνωση του κυττάρου. Η διάτρηση της κυτταρικής επιφάνειας έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία «αποπτωτικών σωματιδίων» διαφόρων μεγεθών και σύστασης, τα οποία παραμένουν συνδεδεμένα με τη μεμβράνη, φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά κύτταρα και διασπώνται από λυσοσωματικά ένζυμα.

Η μορφή του κυτταρικού θανάτου (νεκρωτική, αποπτωτική ή νεκροαποπτωτική) εξαρτάται από την ένταση και τη διάρκεια των τραυματικών ερεθισμάτων και από τα ενεργειακά αποθέματα του κυττάρου. Σε αντίθεση με την απόπτωση, η νέκρωση δεν απαιτεί ενέργεια (Εικόνα 6) [43].



Εικόνα 6. Διαφορές που παρατηρούνται κατά τη νέκρωση (αριστερά) και κατά την απόπτωση (δεξιά) [43].

## Z.2.1. Απόπτωση

### Z.2.1.1. Γενικά Στοιχεία

Το DNA υφίσταται βλάβες, οι οποίες, αφού αναγνωριστούν, ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια που έχουν ως αποτέλεσμα:

- την απόπτωση του κυττάρου
- τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου
- τη μεταγραφή ειδικών γονιδίων
- την επιδιόρθωση της βλάβης [44]

Όταν το κύτταρο αδυνατεί να επιδιορθώσει τις βλάβες του DNA, τότε είναι δυνατό να προβεί σε προγραμματισμένο θάνατο ή απόπτωση.

Σύμφωνα με τους Ανδρίκουλα και Βαρθολομάτο, η απόπτωση είναι η μορφή του κυτταρικού θανάτου που παρατηρείται όταν ο θάνατος είναι επιθυμητό ή προγραμματισμένο γεγονός. Είναι ο πρώτος χαρακτηρισμός ενός ενεργητικά ρυθμιζόμενου μηχανισμού κυτταρικού θανάτου στα θηλαστικά, που διαφέρει μορφολογικά και βιοχημικά από τη νέκρωση. Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι ένα στερεοτυπικό πρόγραμμα κυτταρικής «αυτοκτονίας», με το οποίο οι πολυκυτταρικοί οργανισμοί εξαλείφουν γηρασμένα, κατεστραμμένα ή μολυσμένα κύτταρα [43]. Τα προϊόντα των γονιδίων που ελέγχουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, αναγνωρίστηκαν και μελετήθηκαν καλύτερα στο νηματοειδή σκώληκα *C. Elegans*. Το ενδιαφέρον των ερευνητών για τον έλεγχο της απόπτωσης γίνεται όλο και μεγαλύτερο, καθώς αναγνωρίστηκε ο ζωτικός ρόλος της στη φυσιολογική ανάπτυξη, στην ομοιοστάση των ιστών και στην άμυνα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Ταυτόχρονα, έγινε αντιληπτό ότι η διαταραχή της ισορροπίας κυτταρικού πολλαπλασιασμού-προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου μπορεί να οδηγήσει στον καρκίνο, καθώς και σε αυτοάνοσα και εκφυλιστικά νοσήματα. Η κατανόηση των μοριακών και κυτταρικών χαρακτηριστικών της αποπτωτικής διαδικασίας μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη και εφαρμογή περισσότερο αποτελεσματικών θεραπευτικών στρατηγικών, στις οποίες βασικό ρόλο θα έχει η επαγωγή ή η αναστολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, ανάλογα με την περίπτωση.

Η απόπτωση ενεργοποιείται από διάφορα σήματα όπως είναι η ακτινοβόληση του κυττάρου, η απομάκρυνση απαραίτητων αυξητικών παραγόντων, τα γλυκοκορτικοειδή, η ενεργοποίηση κυτταρικού υποδοχέα από προσδέτη και η

προσβολή από κυτταροτοξικό λεμφοκύτταρο. Στα ενήλικα άτομα ο κυτταρικός θάνατος πρέπει να εξισορροπείται από την κυτταρική ανανέωση. Οι περισσότεροι ιστοί διαθέτουν βλαστικά κύτταρα που μπορούν να αντικαταστήσουν εκείνα που χάνονται [44].

Η διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ της ανάκλησης θετικών σημάτων, όπως αυτών της επιβίωσης, και της λήψης αρνητικών σημάτων, μπορεί να αποτρέψει ή να υποκινήσει την απόπτωση.

Στα θετικά σήματα περιλαμβάνονται:

- Αυξητικοί παράγοντες για τους νευρώνες
- Ιντερλευκίνη 2, ένας βασικός παράγοντας για τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων

Στα αρνητικά σήματα περιλαμβάνονται:

- Αύξηση των επιπέδων οξειδωτικών στο κύτταρο.
- Καταστροφή του DNA από οξειδωτικά ή άλλα αίτια (υπεριώδη ακτινοβολία, ακτίνες – X, φάρμακα χημειοθεραπείας).
- Συσσώρευση πρωτεϊνών, οι οποίες αδυνατούν να διατηρήσουν την τεταρτοταγή δομή τους.
- Μόρια που συνδέονται σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και επάγουν το φαινόμενο της απόπτωσης (TNF- $\alpha$ , Lymphotoxin ή TNF- $\beta$ , FasL) [45].

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι επίσης απαραίτητος προκειμένου να απομακρυνθούν κύτταρα τα οποία είναι επικίνδυνα για το εσωτερικό του οργανισμού. Παράδειγμα τέτοιων κυττάρων είναι κύτταρα μολυσμένα με ιούς. Μία από τις μεθόδους με τις οποίες τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTLs) σκοτώνουν τα μολυσμένα με ιούς κύτταρα είναι η πρόκληση απόπτωσης. Άλλη κατηγορία είναι τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Καθώς η κυτταρική ανοσολογική αντίδραση μειώνεται, θα πρέπει τα δραστικά κύτταρα να απομακρυνθούν προκειμένου να τα εμποδίσουν να στραφούν έναντι των συστατικών του οργανισμού. Τα CTLs επάγουν απόπτωση τόσο σε άλλα κύτταρα όσο και στον εαυτό τους. Η μειωμένη ικανότητα απόπτωσης μπορεί να γίνει αιτία για την εμφάνιση αυτοάνοσων νοσημάτων, όπως του ερυθρηματώδους λύκου ή της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Ακόμη, κύτταρα με

βλάβες στο DNA μπορεί να αποδειχτούν πολύ επικίνδυνα για το μέλλον ενός οργανισμού. Εξαιτίας βλαβών στο γονιδίωμα μπορεί να ένα κύτταρο να μετατραπεί σε καρκινικό, ή να δημιουργηθεί βλάβη στο γονιδίωμα, προκειμένου να σταματήσει την ανάπτυξη ενός ελαττωματικού εμβρύου. Επίσης τα καρκινικά κύτταρα είναι εξαιρετικά επικίνδυνα αν δεν ενεργοποιηθούν σωστά λειτουργικά και χρονικά τα ογκοκατασταλτικά γονίδια που ρυθμίζουν τον περιορισμό του πολλαπλασιασμού. Χημικές ουσίες και ακτινοβολίες, που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου επάγουν την απόπτωση ορισμένων τύπων καρκινικών κυττάρων.

### **Z.2.1.2. Ο μηχανισμός της απόπτωσης**

Όπως αποδίδεται από τον Στασινάκη (2009), υπάρχουν τρεις μηχανισμοί με τους οποίους ένα κύτταρο μπορεί να οδηγηθεί σε απόπτωση.

*Μέσω μηχανισμών που ενεργοποιούνται από εσωτερικά σήματα του κυττάρου*

Σε ένα υγιές κύτταρο, η εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων εκθέτει την πρωτεΐνη Bcl-2, η οποία αναστέλλει την απόπτωση του κυττάρου. Εσωτερική καταστροφή του κυττάρου, προκαλείται από τη μετανάστευση της πρωτεΐνης Bax στην επιφάνεια του μιτοχονδρίου, όπου αυτή αναστέλλει την προστατευτική δράση της Bcl-2, προκαλώντας οπές στην εξωτερική επιφάνειά του με αποτέλεσμα την έξοδο του κυτοχρώματος c. Το απελευθερωμένο κυτόχρωμα c συνδέεται με την πρωτεΐνη Araf-1 (apoptotic protease activating factor-1). Τα συμπλέγματα αυτά σχηματίζουν τα αποπτωτικά σωματίδια, τα οποία στη συνέχεια συνδέονται και ενεργοποιούν την caspase-9. Η caspase-9 ανήκει σε μία οικογένεια πρωτεασών με περίπου 12 μέλη. Η caspase-9 ενεργοποιεί τις caspase-3 και caspase-7. Η ενεργοποίηση αυτών έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση έντονης πρωτεολυτικής δραστηριότητας που οδηγεί στην πέψη δομικών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα, στην αποδόμηση του χρωμοσωμικού DNA και στη φαγοκύτωση του κυττάρου.

*Μέσω μηχανισμών που κατευθύνονται από παράγοντες που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο και προσδένονται στην κυτταρική επιφάνεια*

Η σύνδεση των υποδοχέων TNF και Fas (ενδομεμβρανικές πρωτεΐνες) του κυττάρου, με τους παράγοντες FasL και TNF έχει ως αποτέλεσμα την μεταφορά μηνύματος στο



κυτταρόπλασμα που προκαλεί την ενεργοποίηση της caspase 8, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στη φαγοκύτωση του κυττάρου. Όταν τα T λεμφοκύτταρα αναγνωρίσουν το στόχο τους παράγουν περισσότερους παράγοντες FasL στην επιφάνειά τους και, μετά την σύνδεση αυτών με τους υποδοχείς Fas του κυττάρου στόχου, το οδηγούν στην απόπτωση.

*Μέσω μηχανισμών που κατευθύνονται από επικίνδυνα ενεργά είδη οξυγόνου*

Οι νευρώνες, ίσως και κάποια άλλα κύτταρα, οδηγούνται σε απόπτωση χωρίς τη συμμετοχή των κασπασών. Ο παράγοντας που προκαλεί απόπτωση (AIF) είναι μία πρωτεΐνη που φυσιολογικά βρίσκεται στον ενδομεμβρανικό χώρο των μιτοχονδρίων. Εάν στο κύτταρο φθάσει το σήμα ότι πρέπει να πεθάνει, τότε ο AIF απελευθερώνεται από τα μιτοχόνδρια, μεταναστεύει στον πυρήνα, προσδένεται στο DNA και προκαλεί την αποδόμησή του και το θάνατο του κυττάρου [45].

### **Z.2.1.3. Απόπτωση και καρκίνος**

Ορισμένοι ιοί που σχετίζονται με τον καρκίνο χρησιμοποιούν διάφορα τεχνάσματα, προκειμένου να προστατεύσουν το κύτταρο που έχουν μολύνει, από την απόπτωση. Παράδειγμα είναι ο ιός των Ανθρωπίνων Θηλωμάτων (HPV), ενοχοποιούνται για τον καρκίνο του τραχήλου. Ένας από αυτούς, παράγει μια πρωτεΐνη (E6) η οποία προσδένεται στον υποκινητή του p53. Επίσης, ο ιός Epstein Barr (EBV), που προκαλεί την μονοπυρήνωση και σχετίζεται με ορισμένα λεμφώματα, παράγει μία πρωτεΐνη παρόμοια με την Bcl-2, και μία άλλη που προκαλεί αύξηση της παραγωγής της Bcl-2 του κυττάρου. Και οι δύο αυτές διαδικασίες καθιστούν το κύτταρο ανθεκτικό στην απόπτωση.

Τα καρκινικά κύτταρα που προκύπτουν χωρίς τη συμμετοχή ιών χρησιμοποιούν επίσης διάφορα τεχνάσματα, προκειμένου να αποφύγουν την απόπτωση. Ορισμένα B-λεμφοκύτταρα λευχαιμιών ή λεμφωμάτων παράγουν μεγάλες ποσότητες Bcl-2, μπλοκάροντας έτσι τα σήματα που λαμβάνουν για απόπτωση. Κύτταρα μελανώματος αποφεύγουν την απόπτωση αναστέλλοντας την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Araf-1. Ορισμένα καρκινικά κύτταρα, ειδικά καρκίνων του πνεύμονα και του εντέρου, εκκρίνουν υψηλά επίπεδα ενός διαλυτού μορίου «παγίδα», που προσδένεται στο FasL, εμποδίζοντας αυτό να συνδεθεί με τον υποδοχέα Fas. Έτσι, τα

T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CTL) δεν μπορούν να καταστρέψουν τα καρκινικά κύτταρα με του μηχανισμούς που αναφέρθηκαν. Άλλα καρκινικά κύτταρα παράγουν μεγάλες ποσότητες μορίων FasL, και μπορούν καταστρέψουν κάθε κυτταροτοξικό T λεμφοκύτταρο που προσπαθεί να τα θανατώσει, διότι τα CTL διαθέτουν υποδοχείς Fas (προστατεύονται όμως από τα δικά τους μόρια FasL) [45].

## **H. Οξειδωτικό Στρες**

### **H.1. Γενικά**

Σύμφωνα με τους Breitenback και Eckl (2015), ο όρος «στρες» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στη βιοϊατρική βιβλιογραφία ως περιγραφή της υπερδραστηριότητας στο ορμονικό σύστημα, ιδιαίτερα όσον αφορά τα κορτικοστεροειδή του φλοιού των επινεφριδίων [50].

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ουσιών του κυττάρου και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών.

Οι δραστικές ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού. Είναι γνωστές ως προοξειδωτικά και παίζουν διττό ρόλο, αφού άλλοτε είναι ευεργετικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς και άλλοτε βλαπτικές. Οι ευεργετικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου παρατηρούνται σε χαμηλές/μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικούς ρόλους στην κυτταρική απόκριση στο στρες, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή και στην απόπτωση. Οι βλαβερές δράσεις των δραστικών ριζών οξυγόνου ασκούνται στα βιομόρια, στις πρωτεΐνες, στα νουκλεϊνικά οξέα, στα λιπίδια και μπορεί να προκαλέσουν κυτταρική/ ιστική βλάβη, από την οποία ο οργανισμός προστατεύεται με μια σειρά αντιοξειδωτικών ουσιών. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες παράγονται ενδογενώς ή προέρχονται από εξωτερικές πηγές και περιλαμβάνουν ένζυμα όπως η καταλάση, η δισμουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, η αναγωγή της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, μέταλλα όπως το Se, το Mn, ο Cu και ο Zn, βιταμίνες όπως οι A, C και E, καθώς και άλλες ουσίες όπως η γλουταθειόνη. Το οξειδωτικό στρες όπως αναφέρεται παραπάνω, ενοχοποιείται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων όπως στρες της αθηροσκλήρυνσης, της στεφανιαίας νόσου, της καρδιακής ανεπάρκειας, του σακχαρώδους διαβήτη, της αρτηριακής υπέρτασης, της νόσου Alzheimer, της νόσου του Parkinson, της παγκρεατίτιδας, του συνδρόμου ισχαιμίας/επαναιμάτωσης, 66 της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος, της προεκλαμψίας, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και του συνδρόμου επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS). Το στρες επίσης σχετίζεται με τη διεργασία της γήρανσης. Για τους παραπάνω λόγους, παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον η

προσπάθεια φαρμακολογικής τροποποίησης της απόκρισης των οργανισμών στο οξειδωτικό στρες.

Τα αίτια των βλαβερών ιδιοτήτων του οξυγόνου ήταν άγνωστα πριν από τη δημοσίευση της θεωρίας των Gershman και συνεργατών το 1954, σύμφωνα με την οποία η τοξικότητα του οξυγόνου οφειλόταν σε μερικώς αναχθείσες μορφές οξυγόνου. Η παρουσία δραστικών ριζών οξυγόνου στα βιολογικά υλικά περιγράφηκε για πρώτη φορά πριν από 60 χρόνια περίπου. Το 1956, ο Harman διατύπωσε την υπόθεση ότι οι ρίζες οξυγόνου μπορεί να παράγονται *in vivo* ως παραπροϊόντα των βιολογικών αντιδράσεων, προκαλώντας κυτταρική βλάβη, μεταλλαξιγένεση, καρκίνο και εκφυλιστικές διεργασίες που σχετίζονται με τη βιολογικής γήρανσης.

Ήδη από τις αρχές του 21ου αιώνα έχει γίνει σαφές όχι μόνον ότι οι ζώντες οργανισμοί έχουν προσαρμοστεί στα αυξημένα επίπεδα ελευθέρων ριζών οξυγόνου, αλλά και ότι έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για τη χρησιμοποίηση αυτών σε μεγάλο αριθμό φυσιολογικών λειτουργιών. Είναι πλέον γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και παίζουν διττό ρόλο, αφού άλλοτε είναι ευεργετικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς και άλλοτε επιβλαβείς. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι κύριες πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών οξυγόνου είναι η διαρροή ηλεκτρονίων από τις μιτοχονδριακές και τις μικροσωματικές αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων, η φαγοκυττάρωση και τα ενδογενή ενζυμικά συστήματα. Οι ευεργετικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου παρατηρούνται σε χαμηλές/μέτριες συγκεντρώσεις. Οι ανεπιθύμητες δράσεις των δραστικών ριζών οξυγόνου και αζώτου, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν βιολογική βλάβη, είναι γνωστές ως οξειδωτικό στρες και στρες αζώτου, αντίστοιχα. Το οξειδωτικό στρες συμβαίνει στα βιολογικά συστήματα, όταν από τη μια πλευρά υπάρχει υπερπαραγωγή δραστικών ριζών ενώ από την άλλη πλευρά ανεπάρκεια των ενζυμικών και των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Με άλλα λόγια, ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ουσιών του κυττάρου και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών [49].

## Η.2. Ελεύθερες Ρίζες ή Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)

Η *ελεύθερη ρίζα* ορίζεται ως ένα άτομο ή μόριο με δυνατότητα αυτοδύναμης υπαρξής, το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Η έννοια του ασύζευκτου ηλεκτρονίου υποδηλώνει ότι ένα ηλεκτρόνιο κινείται μόνο του σε μία τροχιά, γύρω από τον πυρήνα του ατόμου, σε αντίθεση με το σύνηθες φαινόμενο της υπαρξής ζεύγους ηλεκτρονίων, τα οποία παρουσιάζουν αντίθετη ιδιοστροφορμή ή spin (μαγνητική ροπή που δημιουργείται από την περιστροφή του ηλεκτρονίου γύρω από τον άξονά του). Η παρουσία ασύζευκτου ηλεκτρονίου προσδίδει στις ρίζες οξυγόνου ιδιαίτερη δραστικότητα και μπορούν είτε να δώσουν ένα ηλεκτρόνιο είτε να λάβουν ηλεκτρόνιο από άλλα μόρια, συμπεριφερόμενες έτσι ως οξειδωτικές ή αναγωγικές ουσίες. Τέτοιες ενεργές ρίζες οξυγόνου περιλαμβάνουν όχι μόνο τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου, όπως τη ρίζα του υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ) και τη ρίζα του υπεροξειδίου ( $\text{O}_2^-$ ), αλλά και άλλες οντότητες χωρίς ασύζευκτα ηλεκτρόνια, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [43, 44].

Κατά τους Nita και Grzybowski (2015), οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) σχηματίζονται ως προϊόντα της μερικής διάσπασης του μοριακού οξυγόνου, υπό φυσιολογικές συνθήκες. Οι ROS προκύπτουν με πολλούς τρόπους ως προϊόν της αναπνευστικής αλυσίδας στα μιτοχόνδρια, στις φωτοχημικές και ενζυματικές αντιδράσεις, ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε υπεριώδες φως, σε ιονίζουσα ακτινοβολία ή ιόντα βαρέων μετάλλων. Το υπεροξείδιο παράγεται απευθείας από τη διάσπαση του οξυγόνου και στη συνέχεια μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι ένα μόριο χαμηλής αντιδραστικότητας, αλλά μπορεί εύκολα να διεισδύσει στις μεμβράνες των κυττάρων και να δημιουργήσει την πιο δραστική μορφή στην οποία υπάρχει οξυγόνο, τη ρίζα υδροξυλίου, μέσω της αντίδρασης του Fenton [55]:



Το ανιόν του υπεροξειδίου, το οποίο παράγεται είτε από τις μεταβολικές διεργασίες είτε από την ενεργοποίηση του οξυγόνου διά της φυσικής ακτινοβολίας, θεωρείται η κύρια ελεύθερη ρίζα οξυγόνου. Αυτό μπορεί στη συνέχεια να αντιδράσει με άλλα μόρια και να οδηγήσει στη γένεση δευτερογενών δραστικών μορφών οξυγόνου είτε άμεσα, είτε κυρίως μέσω διεργασιών που καταλύονται από μέταλλα και ένζυμα. Η προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στο μοριακό οξυγόνο δημιουργεί την ελεύθερη ρίζα του ανιόντος του

υπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ). *In vivo*, το  $O_2^{\cdot-}$  παράγεται τόσο ενζυμικά όσο και μη ενζυμικά. Τα μιτοχόνδρια φαίνεται να αποτελούν την κύρια κυτταρική πηγή  $O_2^{\cdot-}$ .

Η ρίζα υδροξυλίου ( $\cdot OH$ ) είναι ιδιαίτερα δραστική, με χρόνο ημιζωής *in vivo* περίπου  $10^{-27}$  s. Συνεπώς, όταν παράγεται *in vivo*, αντιδρά πλησίον της θέσης σχηματισμού της [49].

### Η.3. Επίδραση Οξειδωτικού Στρες στα Κύτταρα

Όπως αναφέρθηκε, οι δραστικές μορφές οξυγόνου, σε υψηλές συγκεντρώσεις, είναι δυνητικά επιβλαβείς για τα συστατικά του κυττάρου. Ενοχοποιούνται για εκτεταμένη οξειδωτική βλάβη των λιπιδίων των μεμβρανών, του DNA, των πρωτεϊνών, καθώς και για υπεροξειδωση των λιποπρωτεϊνών. Η ρίζα υδροξυλίου αντιδρά με όλα τα συστατικά του μορίου του DNA, προκαλεί βλάβες στις βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης, αλλά και στο σκελετό δεοξυριβόζης. Η μόνιμη τροποποίηση του γενετικού υλικού από αυτή την οξειδωτική βλάβη αποτελεί το πρώτο βήμα στην καρκινογένεση, τη μεταλλαξιογένεση, και τη γήρανση [21, 49, 51].

Κατά τη Λαγοπάτη (2013), η αυξημένη ποσότητα των ROS είναι ικανή να δράσει σε οποιοδήποτε κυτταρικό στοιχείο, προκειμένου να του αφαιρέσει ηλεκτρόνια για να αποκτήσει σταθερότητα. Αυτή η διαδικασία πυροδοτεί μια αλυσιδωτή αντίδραση και, αν δεν αναχαιτιστεί, θα καταλήξει σε λειτουργική ή δομική βλάβη του κυττάρου. Οι μακροπρόθεσμες κυτταρικές βλάβες που προκαλούνται με τον τρόπο αυτό αποδίδονται κυρίως στην προσβολή του DNA. Όταν η συγκέντρωσή τους αυξηθεί υπέρμετρα, οι ROS προσβάλλουν τα μόρια του ATP και το κύτταρο, ανίκανο να ακολουθήσει το δρόμο του αποπτωτικού θανάτου, υφίσταται λύση.

Κατά τους Nita και Grzybowski (2015), οι ROS μπορούν να αντιδράσουν με τα νουκλεϊνικά οξέα και να προσβάλλουν τις αζωτούχες βάσεις και το σκελετό του φωσφορικού σακχάρου και μπορούν να προκαλέσουν θραύσεις στο δίκλωνο DNA. Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι ένα ομοιοπολικά κλειστό, δίκλωνο μόριο, που κωδικοποιεί 13 πρωτεΐνες της οξειδωτικής αλυσίδας φωσφορυλίωσης, 22 tRNAs και 2 rRNAs. Το mtDNA είναι πιο ευαίσθητο στην οξειδωτική βλάβη από το αντίστοιχο πυρηνικό, καθώς βρίσκεται πολύ κοντά στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, η οποία αποτελεί ένα κύριο σημείο παραγωγής ROS, καθώς δεν προστατεύεται από ιστόνες ή άλλες συσχετιζόμενες πρωτεΐνες, έχει υψηλό ρυθμό

μεταγραφής και έχει υψηλότερη ευαισθησία στις οξειδωτικές τροποποιήσεις στην αλληλουχία της. Η καταστροφή του DNA που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες μπορεί να επηρεάσει την περιοχή κωδικοποίησης πρωτεΐνης του mtDNA και να επηρεάσει την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Οι μεταλλάξεις mtDNA μπορούν να προκαλέσουν διαταραχές στην αναπνευστική αλυσίδα καθώς και την απώλεια ελέγχου της παραγωγής ROS. Το πολύ λιγότερο αποτελεσματικό σύστημα επισκευής για βλάβη mtDNA μπορεί να είναι η αιτία συσσώρευσης του οξειδωτικού στρες μαζί με τις συνέπειές του.

Η αδυναμία του κυττάρου να αποκαταστήσει τη ζημία που προκαλείται μπορεί να προκαλέσει θάνατο (απόπτωση) γενετικά προγραμματισμένων κυττάρων ή μεταλλάξεις στο DNA, γεγονός που οδηγεί σε καρκινογένεση ή ανάπτυξη πολλών νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Τα Αυξημένα επίπεδα ROS και η οξειδωτική βλάβη των κυτταρικών συστατικών παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία γήρανσης. Η ποσότητα της συσσωρευμένης βλάβης αυξάνεται με την ηλικία λόγω των βλαβών στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA και του εντατικοποιημένου οξειδωτικού στρες, καθώς και με την μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα [55].

### **H.3.1. Οξειδωτικό στρες και καρκινογένεση**

Σύμφωνα με τη Γιαννακοπούλου (2009), ήδη από την πρώτη δεκαετία του 21ου αιώνα ήταν γνωστό ότι το οξειδωτικό στρες συμμετέχει στην έναρξη του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων. Σύμφωνα με τους Saha κ.ά. (2017), η σχέση μεταξύ οξειδωτικού στρες και κυτταρικής αλλοίωσης αναγνωρίστηκε αρχικά το 1981 όταν διαπιστώθηκε ότι η ινσουλίνη αύξησε τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του  $H_2O_2$  και πολλαπλασίασε τα κύτταρα του όγκου. Η έρευνά τους οδηγεί στο συμπέρασμα ότι αυξημένα ROS ενισχύουν την εξέλιξη του καρκίνου, είτε παίζοντας το ρόλο των στοιχείων σηματοδότησης είτε διεγείροντας μεταβολές στο γονιδιωματικό DNA ή προκαλώντας βλάβες του DNA [55].

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το οξειδωτικό στρες συνεισφέρει στη διεργασία της καρκινογένεσης παραμένει άγνωστος. Δύο διαφορετικοί μηχανισμοί φαίνεται να εμπλέκονται στην οξειδωτική βλάβη και στην ανάπτυξη της καρκινογένεσης. Ο πρώτος μηχανισμός αφορά στη γονιδιακή έκφραση. Επιγενετικές δράσεις στην έκφραση γονιδίων μπορούν να οδηγήσουν σε διέγερση του πολλαπλασιασμού. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου επιδρούν στις οδούς μεταγωγής σήματος, με αποτέλεσμα την

τροποποίηση της έκφρασης γονιδίων αναγκαίων για τον πολλαπλασιασμό. Σύμφωνα με τον άλλο μηχανισμό, οι ελεύθερες ρίζες επάγουν γενετικές αλλαγές όπως μεταλλάξεις και χρωμοσωμικούς ανασυνδυασμούς που παίζουν ρόλο στην έναρξη της καρκινογένεσης [49].

Σε αυξημένα επίπεδα, οι ROS υποκινούν την κυτταρική βλάβη και τον κυτταρικό θάνατο. Σε αυτή την περίπτωση, τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να ξεπεράσουν τα αυξημένα επίπεδα ROS, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια της εξέλιξης του καρκίνου. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι στα προ-νεοπλασματικά κύτταρα αναπτύσσονται ισχυροί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί. Αντίστοιχα, κατά τη διαδικασία της μετάστασης, τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να επιβιώσουν κατά τη μετανάστευση σε μακρινά όργανα. Έτσι, τα καρκινικά κύτταρα έχουν, τυπικά, υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα, που ελέγχει τα επίπεδα ROS αρκετά υψηλότερη από την αντιοξειδωτική ικανότητα των φυσιολογικών κυττάρων.

Όπως αναφέρεται στη δημοσίευση των Pages κ.ά. (2015), η μετάσταση του όγκου είναι η κύρια αιτία θανάτου σε ασθενείς με καρκίνο. Από όλα τα καρκινικά κύτταρα που φτάνουν στην κυκλοφορία, μόνο λίγα είναι σε θέση να δημιουργούν μεταστάσεις σε μακρινά όργανα. Η έρευνά τους δείχνει ότι το στρες παίζει σημαντικό ρόλο για τον κακοήγη μετασχηματισμό και την μετάσταση του πρωτογενούς όγκου, ακριβώς γιατί σχετίζεται με σημαντική επίδραση στις οξειδωτικές δράσεις εντός του κυττάρου. Επίσης, οι Piskounova κ.ά., σε μια σχετικά πρόσφατη δημοσίευση στο Nature (2015), αποδεικνύουν ότι η αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου είναι απαραίτητη για να μπορέσει να διατηρηθεί ένα εξαιρετικά μεταστατικός φαινότυπος καρκινικών κυττάρων [54].

#### **H.4. Αντιοξειδωτικά**

Η συνεχής έκθεση στις βλαπτικές δράσεις των ελευθέρων ριζών έχει οδηγήσει τους οργανισμούς στην ανάπτυξη μιας σειράς προστατευτικών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν σε προληπτικούς μηχανισμούς, σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης, σε φυσικά μέτρα προστασίας και σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία, η οποία, όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων.



Όπως αναφέρθηκε, οι ελεύθερες ρίζες (ROS) αποτελούν δυνητικά επικίνδυνους παράγοντες, εναντίον των οποίων δρα το αμυντικό σύστημα. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει ένζυμα, βιταμίνες, μικροστοιχεία και άλλα. Η διάκρισή τους γίνεται με βάση την προέλευσή τους (εξωγενή ή ενδογενή), τη διαλυτότητά τους (υδρόφιλα ή υδρόφοβα) και τη χημική τους φύση (ενζυμική ή μη ενζυμική). Καλύτερη ταξινόμηση των παραγόντων του αμυντικού συστήματος γίνεται με βάση τον τρόπο δράσης τους σε αναχαιτιστές των αντιοξειδωτικών, εκκαθαριστές των ελευθέρων ριζών, παράγοντες επανόρθωσης και ρυθμιστικούς παράγοντες. Στους αναχαιτιστές των ROS ανήκουν η τρανσφερίνη, η λακτοφερίνη, η απτοσφαιρίνη, η σερουλοπλασμίνη και η λευκωματίνη. Στους εκκαθαριστές των ROS ανήκουν τα καρωτενοειδή, η υπεροξειδική δισμουτάση, οι καταλάσες, οι γλουταθειονικές υπεροξειδάσες και η γλουταθειονική τρανσφεράση. Στους εκκαθαριστές των ελευθέρων ριζών ανήκουν, ακόμη, το ασκορβικό άλας, το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη, η λευκωματίνη, η τοκοφερόλη και τα καρωτενοειδή. Στους επισκευαστικούς παράγοντες του αμυντικού οξειδωτικού συστήματος ανήκουν διάφορα ένζυμα, όπως λιπάσες, πρωτεάσες, τρανσφεράσες και ένζυμα επισκευής του DNA. Μέσα σε ένα ζωντανό οργανισμό, το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα κατανέμεται ισότιμα. Στο εξωκυττάριο τμήμα και, συγκεκριμένα, στο πλάσμα, όλα τα στοιχεία που είναι ικανά να δώσουν άτομα υδρογόνου ή ηλεκτρόνια, για να ικανοποιήσουν την ανάγκη των ελευθέρων ριζών, αποτελούν κομμάτι του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος. Σε αυτό περιλαμβάνονται η λευκωματίνη, η χολερυθρίνη, το ουρικό οξύ και όλα τα εξωγενώς χορηγούμενα διαιτητικά ή φαρμακολογικά αντιοξειδωτικά, όπως το ασκορβικό άλας, η τοκοφερόλη, τα βιοφλαβονοειδή.

Ενδοκυττάρια, το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα κατανέμεται ισότιμα στις μεμβράνες και στο κυτταρόπλασμα. Επειδή η πλειονότητα των ελευθέρων ριζών παράγεται σε τμήματα όπου υπάρχουν λιπίδια, τα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά (βιταμίνη E, β-καρωτένιο) εντοπίζονται στις μεμβράνες και αποτελούν την πρώτη γραμμή του αμυντικού συστήματος. Στις επόμενες γραμμές του αμυντικού συστήματος ανήκουν η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C, μερικά μέλη του συμπλέγματος βιταμινών B, τα βιοφλαβονοειδή, τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η γλουταθειονική ρεδοκτάση και τα συνένζυμά τους, ή τα προσθετικά στοιχεία, όπως το σελήνιο, η δισμουτάση του υπεροξειδίου και οι καταλάσες [21].

Οι αντιοξειδωτικές ουσίες όχι μόνο δεσμεύουν τις δραστικές ρίζες οξυγόνου, αλλά και συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Η τροποποίηση των οδών

μεταγωγής σήματος από τις αντιοξειδωτικές ουσίες θα μπορούσε να οδηγήσει σε πρόληψη του καρκίνου με τους ακόλουθους μηχανισμούς: (α) διατήρηση της φυσιολογικής ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, (β) αναστολή του πολλαπλασιασμού και επαγωγή της απόπτωσης, (γ) αναστολή της διήθησης και της αγγειογένεσης, (δ) καταστολή της φλεγμονής. Ο κυτταρικός κύκλος χαρακτηρίζεται από διακυμάνσεις στο οξειδοαναγωγικό περιβάλλον του κυττάρου, οι οποίες ρυθμίζονται από τις ενδοκυττάρια μεταβολές στις συγκεντρώσεις της γλουταθειόνης. Κατά κανόνα, ένα περισσότερο αναγωγικό περιβάλλον διεγείρει τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου, ενώ μετατόπιση προς ήπια οξειδωτικό περιβάλλον αποτελεί το έναυσμα για την έναρξη της κυτταρικής διαφοροποίησης. Μετατόπιση προς ένα περισσότερο οξειδωτικό περιβάλλον οδηγεί στην απόπτωση και τη νέκρωση. Συνεπώς, το οξειδοαναγωγικό περιβάλλον αποτελεί τον κύριο παράγοντα για την πυροδότηση της απόπτωσης [49].

## **H.5. Οξειδωτικό στρες και αντικαρκινική δράση**

Ενδεικτικό της σημασίας του οξειδωτικού στρες είναι το γεγονός ότι, σύμφωνα με τους Breitenback και Eckl, μόνο το χρονικό διάστημα 2013-2015, εμφανίστηκαν 59 βιβλία που ασχολούνται με το συγκεκριμένο αντικείμενο. Η πλειονότητα αυτών είναι ιατρικά και εξετάζουν τη σχέση του οξειδωτικού στρες με ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών ασθενειών [50]. Κατά τον Selye [38], «εάν μόνο το οξειδωτικό στρες μπορούσε να παρατηρηθεί, να απομονωθεί και να μετρηθεί, είμαι βέβαιος ότι θα μπορούσαμε να επιμηκύνουμε σε πολύ μεγάλο βαθμό το μέσο ορό ζωής για τους ανθρώπους» [όπως αποδίδεται από τον Seis (2015)].

Πιο συγκεκριμένα για τη σημασία της μελέτης του οξειδωτικού στρες στην αντιμετώπιση του καρκίνου, οι Meher και Mishra (2017), αναφέρουν ότι είναι σημαντικό να εντοπιστεί και να ποσοτικοποιηθεί το οξειδωτικό στρες στα κύτταρα και στους ιστούς για τον σχεδιασμό στρατηγικών για την πρόληψη του καρκίνου. Έχουν εντοπιστεί αρκετοί δείκτες σχετιζόμενοι με το οξειδωτικό στρες και την επίδρασή σε κύτταρα, ιστούς, ούρα και αίμα. Το ROS μεσολαβεί στην καταστροφή του οξειδωτικού στρες στα ζωτικά κυτταρικά μόρια όπως το DNA, τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και άλλα ζωτικής σημασίας βιομόρια. Η κυτταρική μεμβράνη είναι ένας από τους πρωταρχικούς στόχους του οξειδωτικού στρες. Αποτελείται από λιπιδική διπλοστοιβάδα και πρωτεΐνες των οποίων η τροποποίηση αυξάνει τον κίνδυνο κυτταρικού θανάτου μέσω

απόπτωσης ή νέκρωσης. Μελέτες από την ομάδα ερευνών μας κατέδειξαν ότι η ραδιο-οξειδωτική βλάβη που προκαλείται στη μεμβράνη, επάγει απόπτωσης σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα.

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση, η οποία μπορεί να ανοίξει νέους δρόμους για τη βελτίωση των θεραπειών, είναι ότι η περίσσεια των ενδοκυτταρικών ROS που παράγονται ως απόκριση στις θεραπείες δρουν ως κυτταροτοξικά που επηρεάζουν τη διακοπή της κυτταρικής ανάπτυξης, την απόπτωση και τη νέκρωση. Η μελέτη της κυτταρικής οξειδοαναγωγής έχει τόσο διαγνωστική όσο και προγνωστική σημασία και μελέτες αναφέρουν ότι, συνήθως, στους περισσότερους καρκινοπαθείς ασθενείς απαντώνται χαμηλή αντιοξειδωτική άμυνα και αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες. Μελέτες έδειξαν ότι η ακτινοθεραπεία, σε συνδυασμό με αρκετά φυσικά αντιοξειδωτικά, φλαβονοειδή και πολυφαινόλες, αυξάνει την παραγωγή ROS και προκαλεί απόπτωση σε αρκετές κυτταρικές σειρές όγκων.

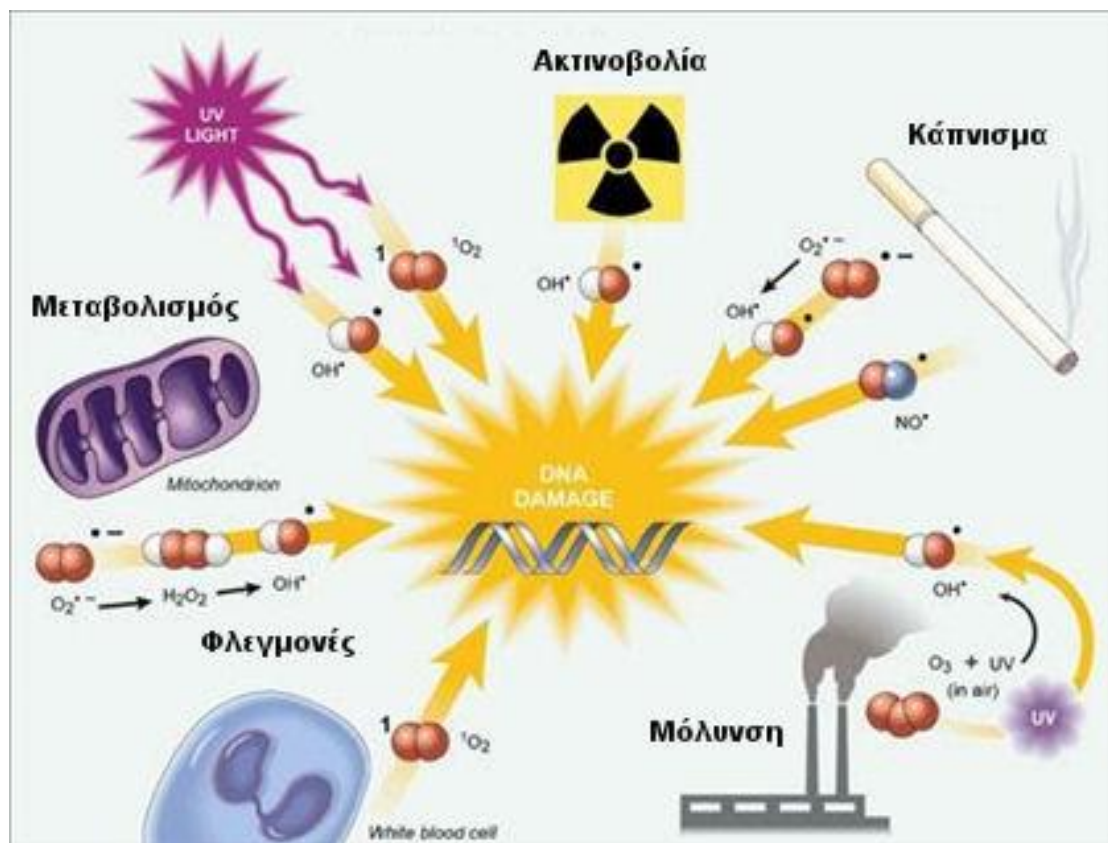
Σύμφωνα με τους Liu και Wang (2015), τα καρκινικά κύτταρα φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητα από τα φυσιολογικά κύτταρα στη αύξηση της συγκέντρωσης των ROS. Κατά συνέπεια, η αύξηση του οξειδωτικού στρες με εξωγενή θεραπεία που παράγει ROS, μπορεί να επιφέρει την εκλεκτική θανάτωση των καρκινικών κυττάρων χωρίς να επηρεάζονται τα φυσιολογικά κύτταρα. Έτσι, οι μηχανισμοί οξειδοαναγωγικής ρύθμισης παίζουν κεντρικό ρόλο στην αντικαρκινική θεραπεία.

Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και σε άλλες μελέτες. Η συνισταμένη των προσπαθειών φαίνεται να εστιάζει στην τεχνητή ενίσχυση της συγκέντρωσης των ROS, ώστε αυτή να φθάσει σε ένα επίπεδο που να ξεπερνάει τους ενισχυμένους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των καρκινικών κυττάρων και να μπορεί να θανατώνει επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα, χωρίς να επηρεάζει τα φυσιολογικά κύτταρα.

Πολλοί αντινεοπλασματικοί χημειοθεραπευτικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των ταξανίων, των αλκαλοειδών και των συμπλόκων λευκόχρυσου, χρησιμοποιούνται επί του παρόντος για την επαγωγή υψηλών επιπέδων ROS με στόχο τον κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων.

Συμπερασματικά, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται φυσιολογικά σε απόκριση μιας ποικιλίας καθημερινών λειτουργιών του οργανισμού (αναπνοή, ηπατική αποτοξίνωση, ανοσοαπόκριση). Σε μερικές περιπτώσεις δρουν προστατευτικά (αντιβακτηριακή δράση), αλλά εάν δεν απομακρυνθούν γρήγορα από τον οργανισμό μπορεί να γίνουν καταστροφικές και να υποκινήσουν μια σειρά σοβαρών παθήσεων, ανάμεσα σε αυτές και την καρκινογένεση. Όμως, αυξημένη παραγωγή ROS παρατηρείται και από

εξωτερικούς παράγοντες (Εικόνα 7), όπως μετά από έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, εξαιτίας της περιβαλλοντικής ρύπανσης, της έκθεσης σε βαρέα μέταλλα, το κάπνισμα, την έκθεση σε ορισμένες φαρμακευτικές ουσίες, την υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, αλλά ακόμη και μετά από υπερβολική άσκηση ή, το αντίθετο, σε υπερβολικά καθιστική ζωή. Τέλος, επειδή πρόκειται για ένα ισοζύγιο δράσης- αντίδρασης, η μειωμένη πρόσληψη ή και η μειωμένη σύνθεση ή η αυξημένη κατανάλωση αντιοξειδωτικών, είναι καταστάσεις υπεύθυνες για τη δημιουργία οξειδωτικού στρες, λόγω μειωμένης αντιοξειδωτικής άμυνας [21, 56].



Εικόνα 7. Επίδραση παραγόντων προσβολής του DNA μέσω της αυξημένης παραγωγής ROS [57].

## 8Θ. Πειραματικό Μέρος – Σύνθεση $\text{TiO}_2$

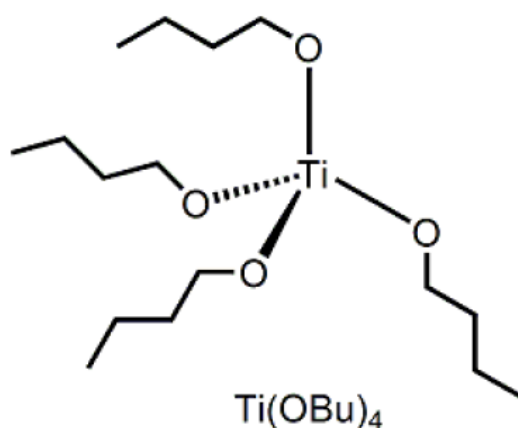
### Θ.1. Σύνθεση

#### Θ.1.1. Σύνθεση διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άζωτο και άργυρο, $\text{Ag/N/TiO}_2$

##### Θ.1.1.1. Υλικά

Για την πειρατική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα εξής: αλκοξειδίου τιτανίου ( $\text{Ti}(\text{OBu})_4$ ), νιτρικός άργυρος ( $\text{AgNO}_3$ ), διάλυμα αμμωνίας ( $\text{NH}_3$ ), αιθανόλη ( $\text{EtOH}$ ), νιτρικό Οξύ ( $\text{HNO}_3$ ), υπερκάθαρο νερό αντίστασης  $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ , pH 5,68, ποτήρια ζέσεως των 100 ml, μαγνήτης, μαγνητικός αναδευτήρας, ογκομετρικός κύλινδρος των 100 ml, σιφώνιο των 5ml με πουάρ, ηλεκτρονική πιπέτα με τιπ και σταγονόμετρο, ηλεκτρονικό πεχάμετρο, ζυγός ακριβείας

Ως πρόδρομη ένωση για το διοξείδιο του τιτανίου, στη χημική τροποποίηση με άζωτο και άργυρο, στην εν λόγω διπλωματική εργασία, χρησιμοποιείται το ισοπροποξειδίου του τιτανίου ( $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{O}_4\text{Ti}$ ). Ο συντακτικός τύπος παρουσιάζεται στην εικόνα 8.



Εικόνα 8. Συντακτικός και μοριακός τύπος του αλκοξειδίου τιτανίου.

##### Θ.1.2. Μέθοδος

Αρχικά, 10 ml αλκοξειδίου τιτανίου [ $\text{Ti}(\text{OBu})_4$ ] διαλύονται σε αιθανόλη με αναλογία όγκου 1:3 και προκύπτει διάλυμα Α.

Στη συνέχεια παρασκευάζεται ένα υδατικό διάλυμα τελικού όγκου 100 ml, που περιέχει αναλογία  $\text{Ag} + / \text{Ti}^{4+}$ , 1%. Συγκεκριμένα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα  $\text{AgNO}_3$  και το pH ρυθμίζεται με την προσθήκη  $\text{HNO}_3$ , ώστε να σταθεροποιηθεί το pH στην τιμή 3 (διάλυμα Β).

Το διάλυμα Α προστίθεται στάγδην στο διάλυμα Β και παράλληλα προστίθεται στάγδην βραδέως και διάλυμα αμμωνίας 2 ml, με αναλογία όγκου 1:4. Κατά την προσθήκη των δύο διαλυμάτων, το διάλυμα Β αναδεύεται έντονα με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 20 ° C). Μετά από συνεχή ανάδευση για 30 λεπτά, το μίγμα αυτό τοποθετείται κατά τη διάρκεια της νύχτας σε υδατόλουτρο στους 80 ° C, και στη συνέχεια ξηραίνεται για 48 ώρες υπό κενό σε 100 ° C και κονιορτοποιείται. Τέλος, η σκόνη τοποθετείται σε φούρνο στους 450 ° C για 3 ώρες. Ακολούθως λυοφιλοποιείται και φυλάσσεται σε δροσερό και σκιερό μέρος. Η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε, απουσία φωτός.

## **Θ.2. Χαρακτηρισμός Δειγμάτων**

Το παρόν κεφάλαιο συνοψίζει όλες τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των παραγόμενων νανοσωματιδίων διοξειδίου του τιτανίου. Αρχικά, παρατίθεται η περιγραφή των βασικών αρχών της κάθε μεθόδου χαρακτηρισμού και έπειτα παρουσιάζεται η πειραματική διαδικασία μέτρησης. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν είναι η παρατήρηση με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Electron Microscope- SEM), η φασματοσκοπία Raman και η περίθλαση ακτίνων X (XRD).

Είναι πολύ σημαντικό να χαρακτηρίζεται κάθε παραγόμενο υλικό, πριν την οποιαδήποτε εφαρμογή του, με σκοπό να είναι γνωστά τα χαρακτηριστικά του και κάποιες σημαντικές φυσικοχημικές του ιδιότητες, τόσο για την επαλήθευση της ορθότητας της σύνθεσης, με βάση το επιλεγόμενο πρωτόκολλο, αλλά και για την αξιοποίηση αυτών των πληροφοριών στη συνολική δράση του υλικού αυτού. Στην προκειμένη περίπτωση, είναι σημαντικό να είναι γνωστά κάποια από τα χαρακτηριστικά αυτά, για να μπορέσουν να συνυπολογιστούν στη βιολογική επίδρασή τους σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού.

### **Θ.2.1. Χαρακτηρισμός με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Electron Microscope- SEM)**

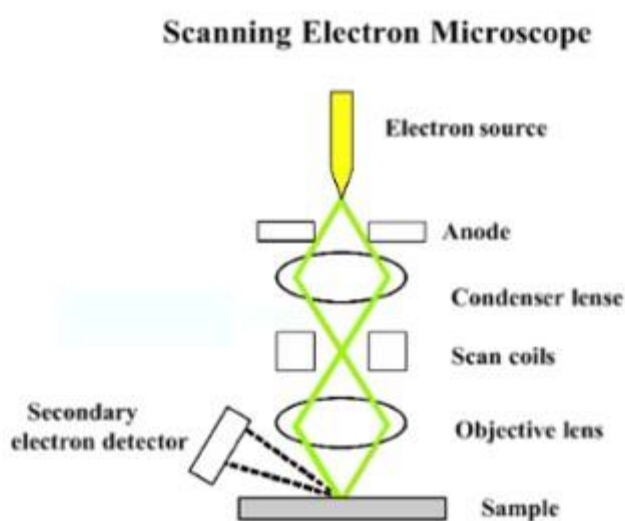
#### **Θ.2.1.1. Αρχή λειτουργίας**

Ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) χρησιμοποιεί εστιασμένες δέσμες ηλεκτρονίων για την απόδοση τρισδιάστατων εικόνων υψηλής ανάλυσης. Αυτές οι εικόνες παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την τοπογραφία, τη μορφολογία και τη σύνθεση [2].

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) – ένας εξειδικευμένος τύπος ηλεκτρονικού μικροσκοπίου - είναι σχεδιασμένο για απευθείας μελέτη των επιφανειών στερεών αντικειμένων. Για τη λειτουργία του, χρησιμοποιεί δέσμη συγκεντρωμένων ηλεκτρονίων σχετικά χαμηλής ενέργειας ως ανιχνευτή ηλεκτρονίων που σαρώνονται πάνω στο δείγμα. Η πηγή ηλεκτρονίων και οι ηλεκτρομαγνητικοί φακοί που παράγουν τα ηλεκτρόνια και εστιάζουν τη δέσμη είναι παρόμοιοι με αυτούς που περιγράφονται για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μετάδοσης (Transmission Electron Microscope- TEM). Η δράση της δέσμης ηλεκτρονίων διεγείρει την εκπομπή των ηλεκτρονίων

υψηλής ανάλυσης καθώς και των δευτερευόντων ηλεκτρονίων χαμηλής ενέργειας από την επιφάνεια του δείγματος [59].

Όπως φαίνεται στη σχηματική αναπαράσταση, του Σχήματος 9, δημιουργούνται ηλεκτρόνια στην κορυφή της στήλης από την πηγή ηλεκτρονίων. Η πηγή ηλεκτρονίων είναι νήμα βολφραμίου. Ακολούθως επιταχύνεται η στήλη που βρίσκεται υπό κενό, πράγμα που βοηθά στην αποτροπή της αλληλεπίδρασης με την δέσμη ηλεκτρονίων των ατόμων και των μορίων που υπάρχουν στη στήλη και εξασφαλίζει καλή ποιότητα απεικόνισης.



**Σχήμα 9. Σχηματική αναπαράσταση Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης**

Οι ηλεκτρομαγνητικοί φακοί χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της διαδρομής των ηλεκτρονίων. Ο συμπυκνωτής ορίζει το μέγεθος της δέσμης ηλεκτρονίων (που ορίζει την ανάλυση), ενώ ο κύριος ρόλος του αντικειμενικού φακού είναι η εστίαση της δέσμης στο δείγμα. Οι σπείρες σάρωσης χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη της δέσμης πάνω στο δείγμα. Σε πολλές περιπτώσεις, τα ανοίγματα συνδυάζονται με τους φακούς προκειμένου να ελέγχεται το μέγεθος της δέσμης.

Διαφορετικοί τύποι ηλεκτρονίων εκπέμπονται από τα δείγματα κατά την αλληλεπίδραση με τη δέσμη ηλεκτρονίων. Ένας ανιχνευτής Back Scattered Electron (BSE) τοποθετείται πάνω από το δείγμα για να βοηθήσει στην ανίχνευση των ηλεκτρονίων που έχουν υποστεί εκ νέου σπάσιμο. Οι εικόνες δείχνουν πληροφορίες αντίθεσης μεταξύ περιοχών με διαφορετικές χημικές συνθέσεις καθώς τα βαρύτερα



στοιχεία (υψηλός ατομικός αριθμός), φαίνονται πιο φωτεινά. Ένας ανιχνευτής δευτερογενούς ηλεκτρονίου (Secondary Electron - SE) τοποθετείται στην πλευρά του θαλάμου ηλεκτρονίων, υπό γωνία, προκειμένου να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης δευτερογενούς ηλεκτρονίου, η οποία μπορεί να παρέχει πιο λεπτομερείς πληροφορίες επιφάνειας, όπως είναι η γεωμετρία και το ανάγλυφο.

#### **Θ.2.1.2. Προετοιμασία Δείγματος**

Στο SEM δεν απαιτούνται περίπλοκες τεχνικές προετοιμασίας των δειγμάτων για εξέταση. Επίσης, μπορούν να τοποθετηθούν μεγάλα και ογκώδη δείγματα. Είναι επιθυμητό το δείγμα να είναι ηλεκτρικά αγώγιμο ώστε να ληφθεί μια ευκρινής εικόνα. Η αγωγιμότητα επιτυγχάνεται συνήθως με την επίστρωση ενός πολύ λεπτού φιλμ από μέταλλο, όπως χρυσού, πάχους 50-100 Å (angstroms) πάνω στο δείγμα σε κενό (τέτοιο πάχος δεν επηρεάζει ουσιαστικά την ανάλυση των λεπτομερειών επιφάνειας). Εάν, εντούτοις, το SEM μπορεί να λειτουργήσει και σε διαφορά δυναμικού 1-3 kV (kilovolts), στην περίπτωση αυτή, ακόμη και τα μη αγώγιμα δείγματα μπορούν να εξεταστούν χωρίς την ανάγκη για μεταλλική επίστρωση [59].

Ο όρος επιμετάλλωση αναφέρεται σε όλες τις τεχνικές επιφανειακής κάλυψης, στις οποίες ένα μέταλλο (metal) επικαλύπτει μια στερεή επιφάνεια. Οι τεχνικές εναπόθεσης λεπτού - φιλμ (thin-film deposition), μπορούν να πετύχουν επιμετάλλωση σε κλίμακες τόσο μικρές, όσο το πλάτος ενός ατόμου. Έτσι, ορθά ορισμένες εφαρμογές επιμετάλλωσης θεωρούνται ότι ερευνητικά αποτελούν μία εφαρμογή του πεδίου της νανοτεχνολογίας (nanotechnology) [61].

Η χημική επιμετάλλωση χρησιμοποιεί μια αντίδραση μείωσης για να αποθεθεί μέταλλο πάνω σε ένα αντικείμενο χωρίς τη διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος. Επειδή επιτρέπει μια σταθερή συγκέντρωση μεταλλικών ιόντων να διαβρέχει όλα τα μέρη του αντικειμένου, εναποθέτει μέταλλο ομοιόμορφα κατά μήκος των άκρων, μέσα σε τρύπες και πάνω από αντικείμενα ακανόνιστου σχήματος, τα οποία είναι δύσκολο να επιμεταλλωθούν με την ηλεκτρο-επιμετάλλωση. Η χημική επιμετάλλωση χρησιμοποιείται επίσης για την εναπόθεση μιας αγώγιμης επιφάνειας πάνω σε ένα μη αγώγιμο αντικείμενο, ώστε να επιτρέψει την ηλεκτρο-επιμετάλλωσή του [61].

### **Θ.2.1.3. Εφαρμογές**

Τα SEMs μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ποικίλες βιομηχανικές, εμπορικές και ερευνητικές εφαρμογές.

#### *Επιστήμη Υλικών*

Τα SEMs χρησιμοποιούνται στην επιστήμη των υλικών για την έρευνα, τον ποιοτικό έλεγχο και την ανάλυση αστοχίας. Στη σύγχρονη επιστήμη των υλικών οι έρευνες για τους νανοσωλήνες και τις νανοϊνες, οι υπεραγωγοί υψηλής θερμοκρασίας και τα χαρακτηριστικά των κραμάτων βασίζονται σε μεγάλο βαθμό στη χρήση των SEM. Στην πραγματικότητα, σχεδόν οποιαδήποτε βιομηχανία επιστήμης των υλικών, από την αεροδιαστημική και τη χημική έως την ηλεκτρονική και ενεργειακή υλοποιήθηκε πάνω στην πρόοδο που έγινε δυνατή μέσω της χρήσης των SEM. Στη συνέχεια δίδονται ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα:

#### *Έλεγχος ηλεκτρικών υλικών*

Η αξιόπιστη απόδοση των ημιαγωγών απαιτεί ακριβείς τοπογραφικές πληροφορίες. Οι τρισδιάστατες εικόνες υψηλής ανάλυσης που παράγονται από τα SEMs παρέχουν μια γρήγορη και ακριβή μέτρηση της σύνθεσης του ημιαγωγού. Σχεδόν σε όλες τις διεργασίες παραγωγής πλακιδίων, τα SEM είναι ένα από τα τρία βασικά εργαλεία ελέγχου ποιότητας που χρησιμοποιούνται. Στην περίπτωση επαναλαμβανόμενων καθημερινών ποιοτικών ελέγχων, οι μεγαλύτερες οθόνες (19 ίντσες) έχουν αποδειχθεί ότι μειώνουν την οπτική κόπωση για τους επιθεωρητές [60].

#### *Κατασκευή Microchip*

Η παραγωγή των μικροσίπ εξαρτάται όλο και περισσότερο από τα SEMs για την βελτίωση των μεθόδων κατασκευής. Με τις ολοένα και μικρότερες κλίμακες των διαστάσεων των υλικών, καθώς και με τις δυνατότητες των σύνθετων πολυμερών αυτόματης συναρμολόγησης, η τρισδιάστατη χωρητικότητα SEMs υψηλής ανάλυσης είναι εξαιρετικά σημαντική για το σχεδιασμό και την παραγωγή μικροσίπ [60].

#### **Θ.2.1.4. Χαρακτηρισμός δειγμάτων της παρούσας μελέτης με SEM**

##### **Θ.2.1.4.1. Εξοπλισμός – Τεχνικά Χαρακτηριστικά**

Στην περίπτωση της συγκεκριμένης έρευνας, χρησιμοποιήθηκε το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης του Κέντρου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων Μεταλλουργών για τον χαρακτηρισμό των δειγμάτων μετά την τροποποίησή τους.

Το σύστημα αναλυτικού ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης – SEM τύπου JEOL6380LV καλύπτει εκπαιδευτικές και ερευνητικές ανάγκες και περιλαμβάνει:

- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM, Scanning Electron Microscopy) με δυνατότητα ονομαστικής μεγέθυνσης από 10 μέχρι 300.000 φορές, για μορφολογική παρατήρηση γεωλογικών, μεταλλουργικών, πολυμερών και άλλων δειγμάτων και λήψη εικόνων μεγάλης ευκρίνειας δευτερογενών (Secondary Electron Images) και (Backscattered Electron Images) ηλεκτρονίων οπισθοσκέδασης, και
- Σύστημα για στοιχειακή μικροανάλυση με φασματόμετρο ακτίνων Χ διασπαρμένης ενέργειας (EDS, Energy Dispersive System), για ποιοτική και ποσοτική μικροανάλυση και χαρτογράφηση κατανομής στοιχείων (element mapping) [62].

**Πίνακας 3: Δείγματα που μελετήθηκαν με SEM**

<b>Δείγμα 1</b>	Διπλά τροποποιημένο Διοξείδιο του Τιτανίου με Άργυρο και Άζωτο : N/Ag/TiO <sub>2</sub> (πηγή Αζώτου: Ουρία)
<b>Δείγμα 2</b>	Διπλά τροποποιημένο Διοξείδιο του Τιτανίου με Άργυρο και Άζωτο : N/Ag/TiO <sub>2</sub> (πηγή Αζώτου: Αμμωνία)
<b>Δείγμα 3</b>	Τροποποιημένο Διοξείδιο του Τιτανίου με Άζωτο: N/TiO <sub>2</sub> (πηγή Αζώτου: Ουρία)
<b>Δείγμα 4</b>	Τροποποιημένο Διοξείδιο του Τιτανίου με Άργυρο: Ag/TiO <sub>2</sub>

Για τη μελέτη των δειγμάτων, στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, τα δείγματα συνήθως επιμεταλλώνονται για να μετατραπούν σε αγωγίμα και να αποφευχθεί σημειακή φόρτιση. Για τα δείγματα που μελετήθηκαν, επειδή είναι ημιαγωγίμα κρίθηκε ότι δεν ήταν απαραίτητη η επιμετάλλωσή τους. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν επάνω σε δειγματοφορέα με διπλή ταινία άνθρακα (αγωγήμη).

Μια πολύ μικρή ποσότητα δείγματος απαιτείται να τοποθετηθεί στο δειγματοφορέα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το δείγμα δεν μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί. Το δείγμα απλώνεται με σπάτουλα πάνω στο δειγματοφορέα, ο οποίος είναι καλυμμένος με την ταινία γραφίτη που αναφέρθηκε. Η σκόνη απομακρύνεται επιμελώς από τον υποδοχέα, καθώς λόγω υψηλού κενού είναι πιθανή η ρόφησή της από το μικροσκόπιο.

Με την εντολή Vent επιτρέπεται ο αερισμός και επομένως το μικροσκόπιο μπορεί να ανοίξει. Υπό άλλες συνθήκες, λόγω κενού, προκαλείται ισχυρή πίεση που δεν επιτρέπει το άνοιγμά του.

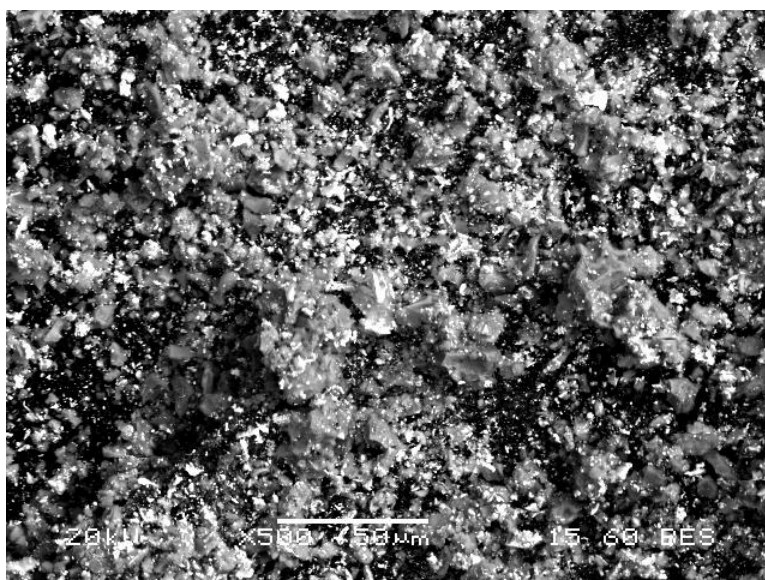
Το δείγμα τοποθετείται. Με την εντολή Evac δημιουργείται και πάλι κενό. Στη συνέχεια εφαρμόζεται ισχυρή διαφορά δυναμικού. Η απόσταση του δείγματος από τον ανιχνευτή (Working Distance ) επιλέχθηκε στα 15mm. Αρχικά επιλέχθηκε ο μέγιστος χρόνος σάρωσης για τη λήψη εικόνων μέγιστης ανάλυσης. Όπου εμφανιζόταν σημειακή φόρτισης, επιλεγόταν μικρότερος χρόνος σάρωσης. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης στοιχείων βαρύτερων του βηρυλλίου.

Στις διαβαθμίσεις του γκρι, τα πιο βαριά στοιχεία, ή γενικότερα οι πιο βαριές ενώσεις, εμφανίζονται με ανοιχτόχρωμες αποχρώσεις προσεγγίζοντας το άσπρο, ενώ τα ελαφριά με σκουρόχρωμες, προσεγγίζοντας το μαύρο.

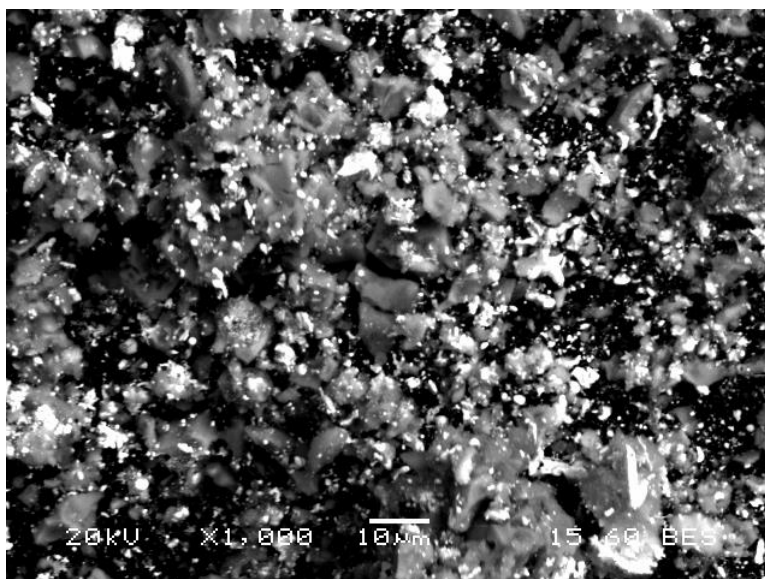
### Θ.2.1.5. Αποτελέσματα από την ανάλυση σε SEM

#### Θ.2.1.5.1. Αποτελέσματα από την ανάλυση διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άζωτο (πηγή προέλευσης: ουρία) και άργυρο, Ag/N/TiO<sub>2</sub> (ουρία) (Δείγμα 1)

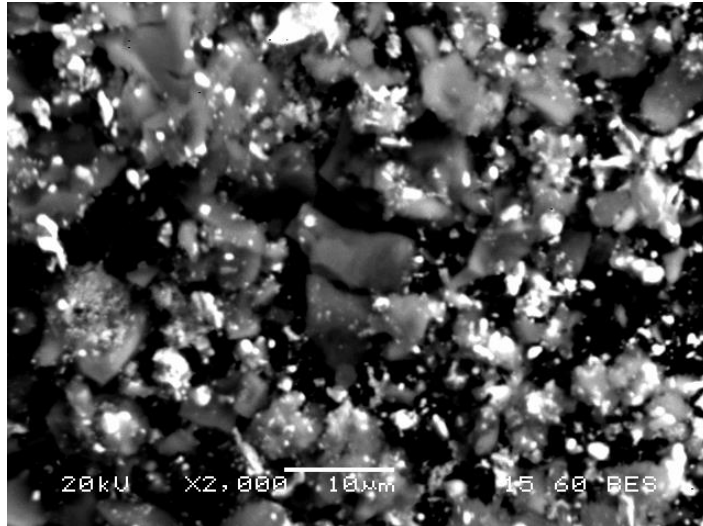
Ακολούθως παρουσιάζονται ενδεικτικές εικόνες που ελήφθησαν με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.



Εικόνα 10. Απεικόνιση του Δείγματος 1 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x500)



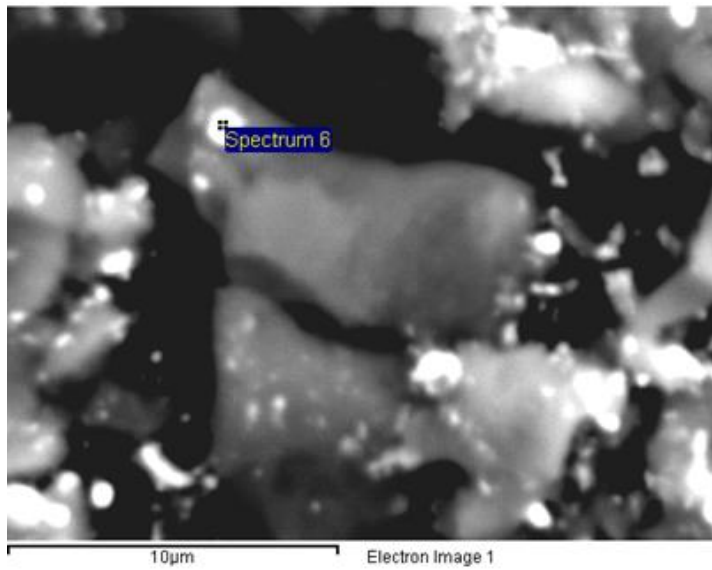
Εικόνα 11. Απεικόνιση του Δείγματος 1 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x1000)



**Εικόνα 12. Απεικόνιση του Δείγματος 1 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x2000)**

Όπως φαίνεται και στις Εικόνες 10 έως 12, πολλά σημεία είναι ιδιαίτερα λευκά, επομένως αντιστοιχούν σε βαρύτερα στοιχεία ή ενώσεις. Στο δείγμα αυτό, οι λευκές περιοχές είτε είναι ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, δηλαδή ενώσεις και των τριών στοιχείων, είτε καθαρός άργυρος, καθώς αυτό το στοιχείο εκ των τριών έχει το μεγαλύτερο μοριακό βάρος.

Για τον ακριβέστερο χαρακτηρισμό του δείγματος ακολούθησε σημειακή ανάλυση. Ανάλογα με το χρώμα τους, επιλέγονται τα σημεία ενδιαφέροντος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση επιλέχθηκαν αρχικά τα λευκά σημεία, καθώς σκοπός είναι να ανιχνευθεί η διπλή τροποποίηση. Με δεξί κλικ στο κάθε σημείο εμφανίζονται οι κορυφές και τα ποσοστά των στοιχείων που περιέχονται σε αυτό, ή σε ένα μικρό εύρος γύρω από αυτό, καθώς απόλυτη ακρίβεια, εντοπισμένη σε ένα σημείο, δεν είναι δυνατή.



**Εικόνα 13. Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 6 (Δείγμα 1)**

Συνθήκες:

Spectrum processing : No peaks omitted

Processing option: All elements analyzed (Normalized)

Number of iterations = 4

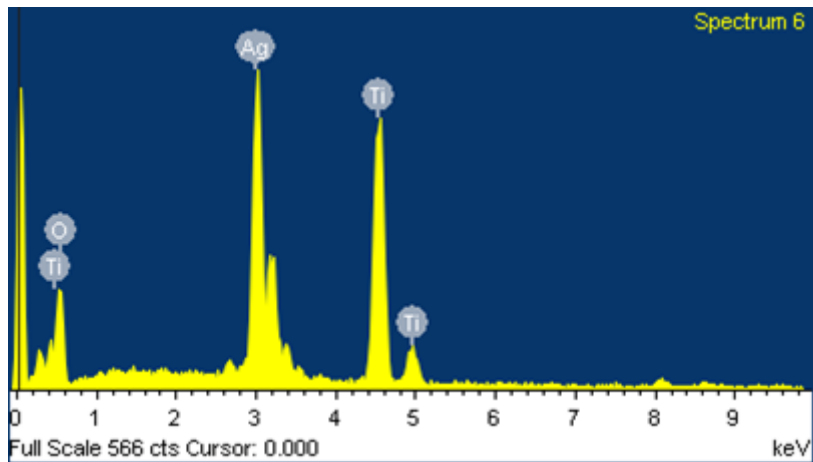
Standard:

O SiO<sub>2</sub> 1-Jun-1999 12:00 AM

Ti Ti 1-Jun-1999 12:00 AM

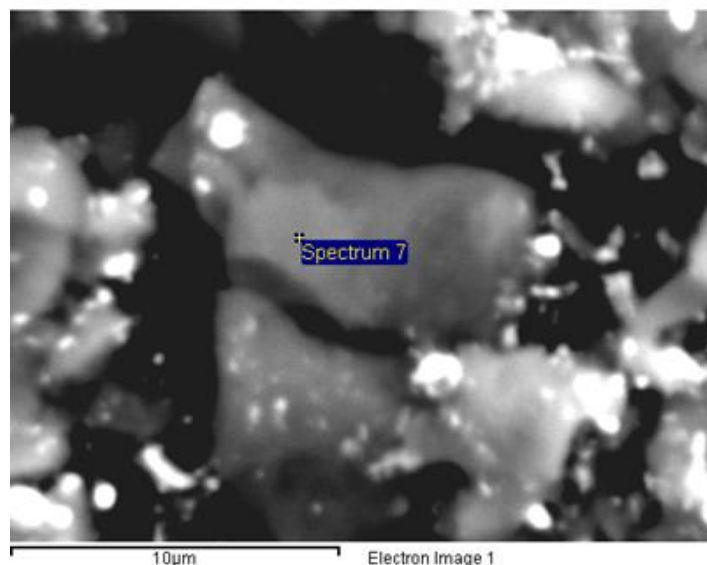
Ag Ag 1-Jun-1999 12:00 AM

Element	Weight%	Atomic%
O K	38.21	73.05
Ti K	26.55	16.96
Ag L	35.24	9.99
Totals	100.00	



**Διάγραμμα 3. Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 6 (Δείγμα 1)**

Όπως είναι αναμενόμενο, επειδή το σημείο είναι λευκό, ανιχνεύεται Τιτάνιο, Οξυγόνο και κυρίως Άργυρος που είναι το βαρύτερο στοιχείο. Επομένως, μπορεί επιβεβαιωθεί η τροποποίηση με Άργυρο. Εφόσον όμως στο δείγμα έχει γίνει διπλή τροποποίηση με Άργυρο και με Άζωτο, στόχος ήταν να ανιχνευτεί και το Άζωτο. Το Άζωτο είναι πολύ δύσκολο ανιχνεύσιμο με αυτήν τη μέθοδο, εξαιτίας του πολύ μικρού ατομικού του βάρους. Ωστόσο, στο διάγραμμα 3, η χαμηλή κορυφή δίπλα στην πρώτη κορυφή του Τιτανίου που δεν ανιχνεύεται ως κάποιο διαφορετικό στοιχείο, πιθανώς να είναι κορυφή Άζώτου. Για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης, στη συνέχεια μελετήθηκε δείγμα τροποποιημένο μόνο με Άζωτο. Αν σε αυτό το δείγμα, η συγκεκριμένη κορυφή ανέβει, τότε πρόκειται όντως για Άζωτο.



**Εικόνα 14. Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 7 (Δείγμα 1)**



Συνθήκες:

Spectrum processing: No peaks omitted

Processing option: All elements analyzed (Normalized)

Number of iterations = 4

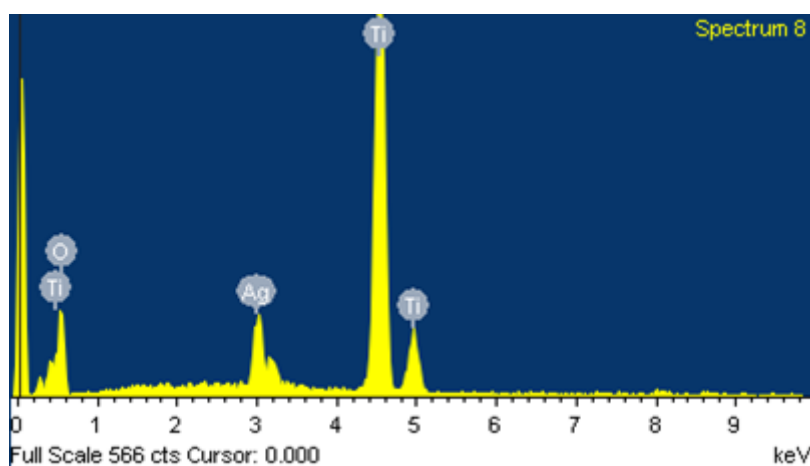
Standard:

O SiO<sub>2</sub> 1-Jun-1999 12:00 AM

Ti Ti 1-Jun-1999 12:00 AM

Ag Ag 1-Jun-1999 12:00 AM

Element	Weight%	Atomic%
O K	43.74	72.06
Ti K	46.41	25.54
Ag L	9.85	2.41
Totals	100.00	

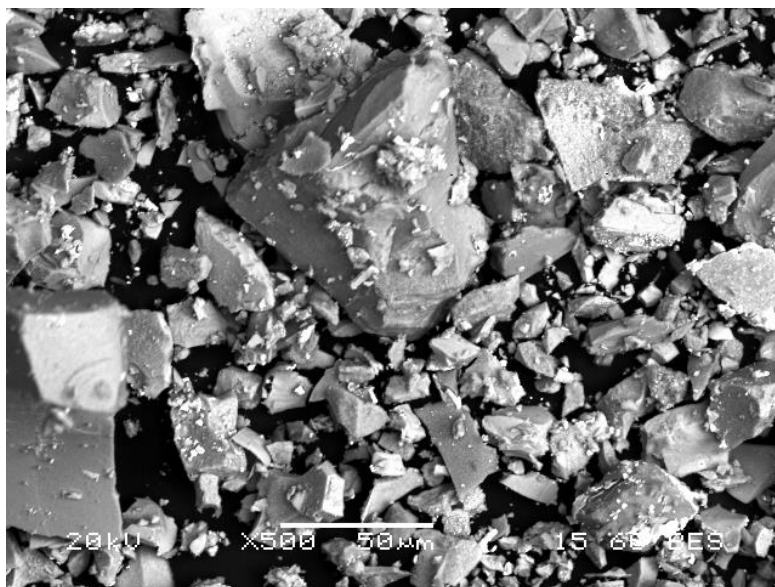


Διάγραμμα 4. Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 7 (Δείγμα 1)

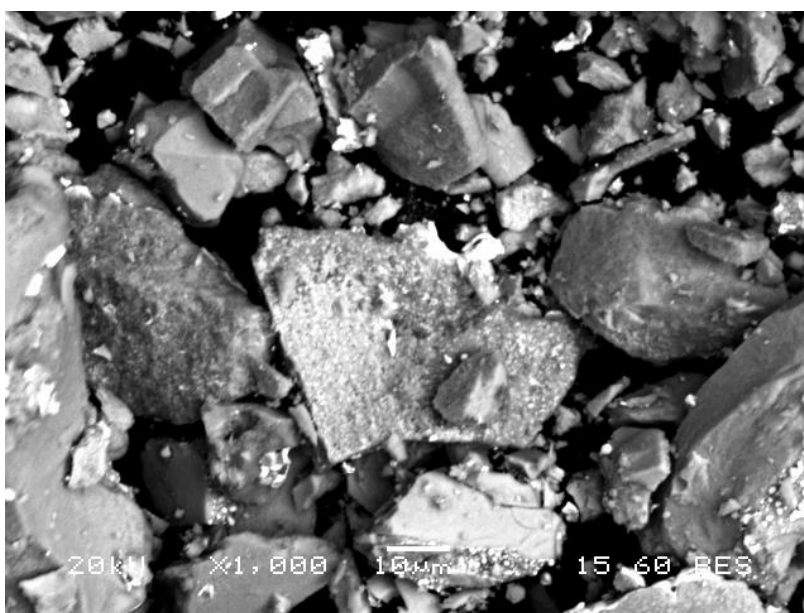
Το σημείο αυτό που εμφανίζεται με σκούρο γκρι χρώμα, ανιχνεύεται κυρίως Τιτάνιο, δηλαδή στοιχείο με σχετικά μικρό μοριακό βάρος και μικρότερη ποσότητα Αργύρου.

**Θ.2.1.5.2. Αποτελέσματα από την ανάλυση διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άζωτο (πηγή προέλευσης: αμμωνία) και άργυρο, Ag/N/TiO<sub>2</sub> (αμμωνία) (Δείγμα 2)**

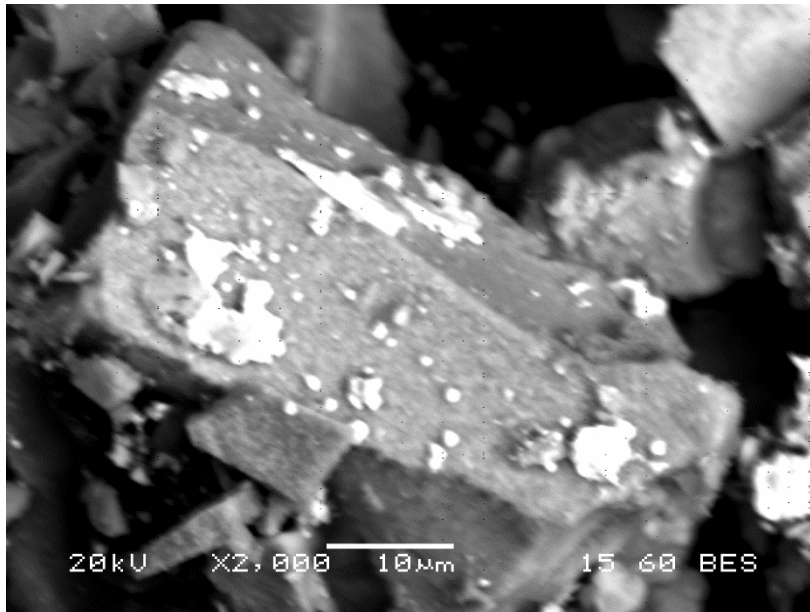
Παρουσιάζονται ενδεικτικά μερικές εικόνες που ελήφθησαν με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης για το δείγμα 2.



**Εικόνα 15. Απεικόνιση του Δείγματος 2 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x500)**



**Εικόνα 16. Απεικόνιση του Δείγματος 2 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x1000)**

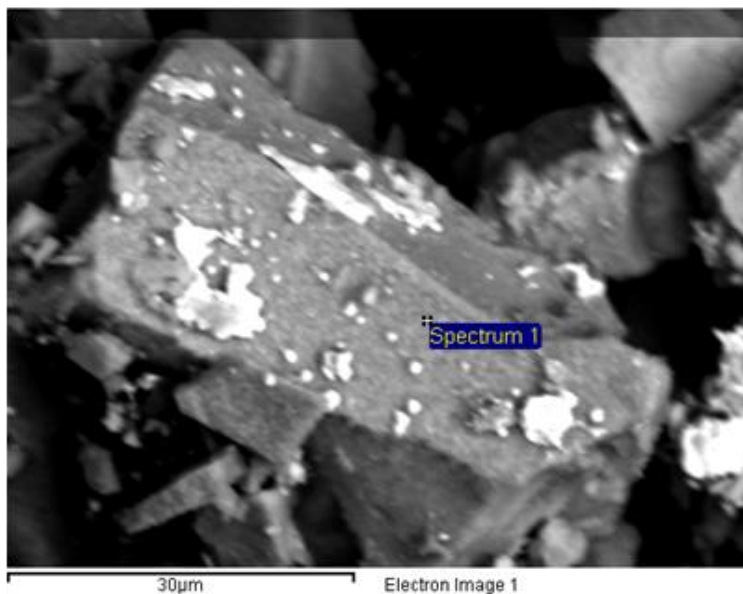


**Εικόνα 17.** Απεικόνιση του Δείγματος 2 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x2000)

Και αυτό το δείγμα έχει προκύψει πειραματικά από διπλή τροποποίηση του Διοξειδίου του Τιτανίου με Άζωτο και Άργυρο. Η διαφορά έγκειται στη πηγή του Αζώτου. Στο Δείγμα 1 η πηγή είναι η ουρία, ενώ στο Δείγμα 2 η αμμωνία.

Το συγκεκριμένο δείγμα δεν είναι τόσο λεπτόκοκκο όσο τα υπόλοιπα δείγματα.

Με τη σημειακή ανάλυση αναμένεται να εντοπιστεί Άργυρος και Άζωτο.



**Εικόνα 18.** Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 1 (Δείγμα 2)

Συνθήκες:

Spectrum processing: No peaks omitted

Processing option: All elements analyzed (Normalized)

Number of iterations = 4

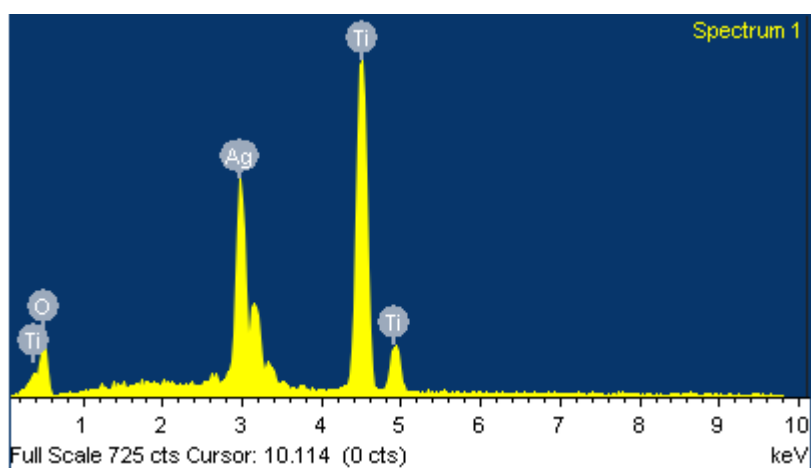
Standard:

O SiO<sub>2</sub> 1-Jun-1999 12:00 AM

Ti Ti 1-Jun-1999 12:00 AM

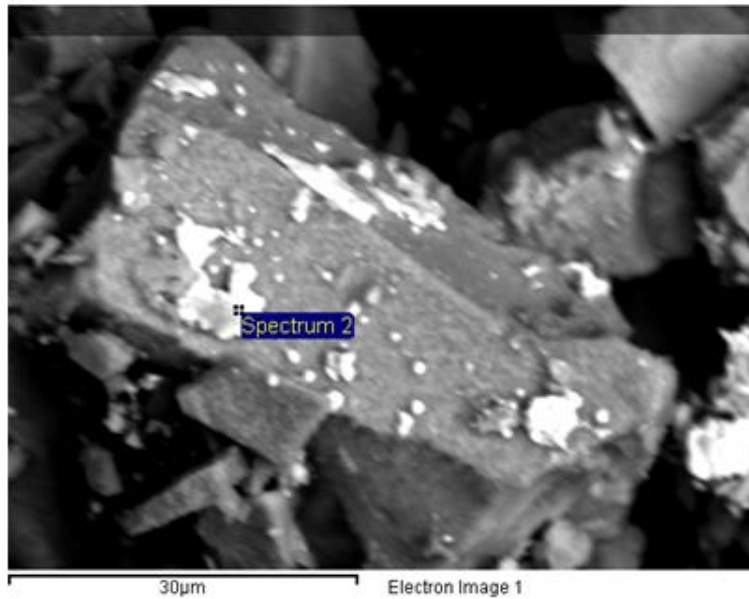
Ag Ag 1-Jun-1999 12:00 AM

Element	Weight%	Atomic%
O K	29.17	61.80
Ti K	40.52	28.68
Ag L	30.30	9.52
Totals	100.00	



Διάγραμμα 5. Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 1 (Δείγμα 2)

Το σημείο ανήκει σε σκουρόχρωμη περιοχή, οπότε αναμένεται να περιέχει μεγάλη ποσότητα Τιτανίου και μικρότερη Αργύρου.



**Εικόνα 19. Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 2 (Δείγμα 2)**

Συνθήκες:

Spectrum processing: No peaks omitted

Processing option: All elements analyzed (Normalized)

Number of iterations = 4

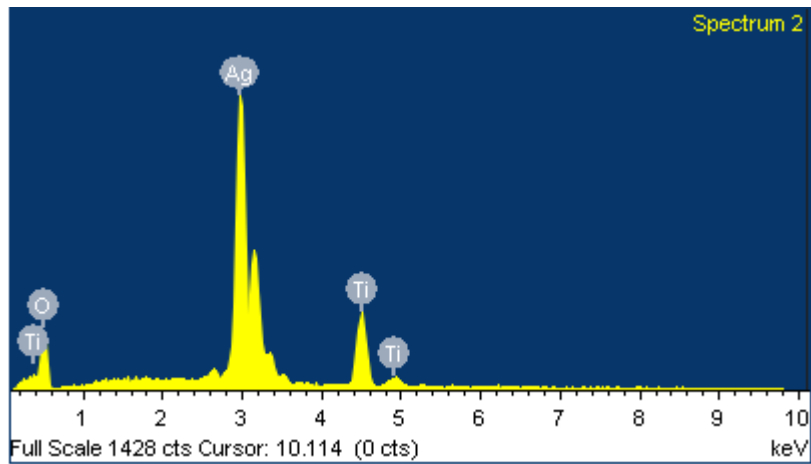
Standard:

O SiO<sub>2</sub> 1-Jun-1999 12:00 AM

Ti Ti 1-Jun-1999 12:00 AM

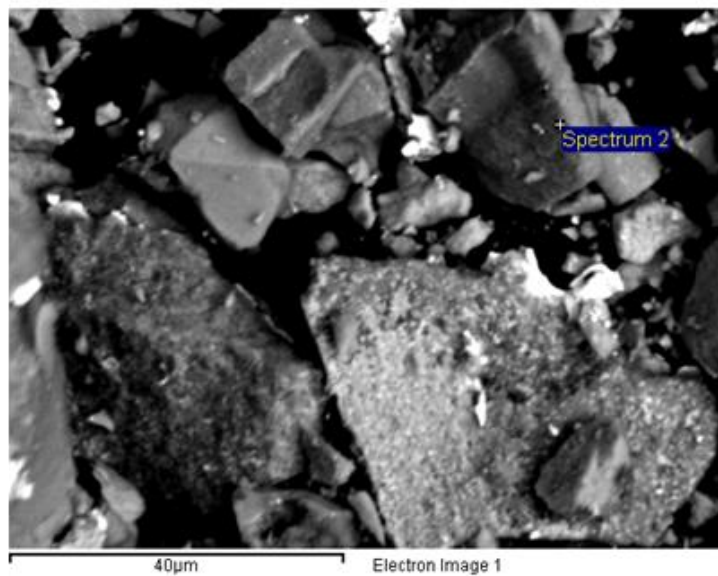
Ag Ag 1-Jun-1999 12:00 AM

Element	Weight%	Atomic%
O K	31.66	71.97
Ti K	11.84	8.99
Ag L	56.50	19.05
Totals	100.00	



**Διάγραμμα 6. Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 2 (Δείγμα 2)**

Αντίθετα, σε αυτό το λευκό σημείο -Spectrum 2-, εντοπίζεται πολύ μεγαλύτερη ποσότητα Αργύρου.



**Εικόνα 20. Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 2 (Δείγμα 2)**

Συνθήκες:

Spectrum processing: No peaks omitted

Processing option: All elements analyzed (Normalized)

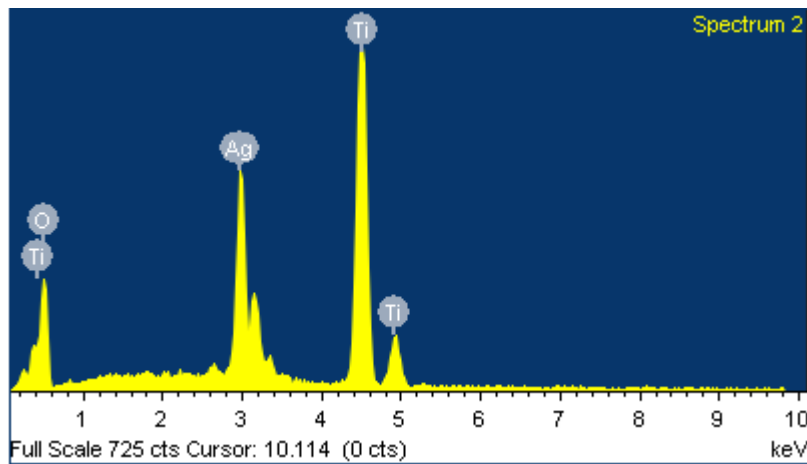
Number of iterations = 4

Standard:

O SiO<sub>2</sub> 1-Jun-1999 12:00 AM

Ti Ti 1-Jun-1999 12:00 AM

Element	Weight%	Atomic%
O K	42.17	74.01
Ti K	33.58	19.68
Ag L	24.25	6.31
Totals	100.00	

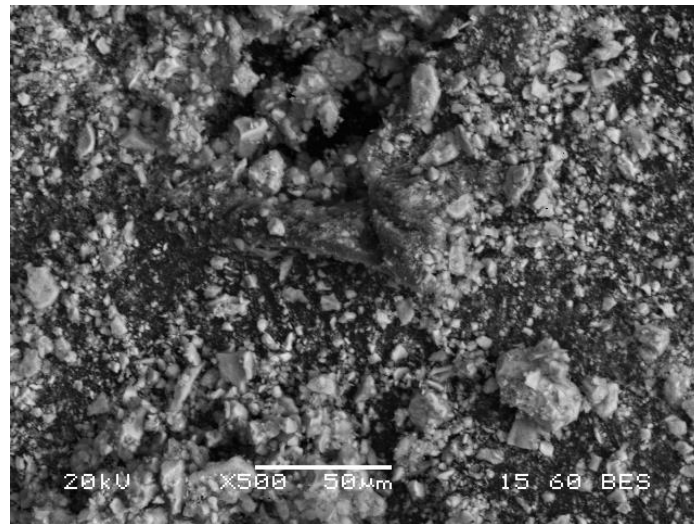


Διάγραμμα 7. Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 2 (Δείγμα 2)

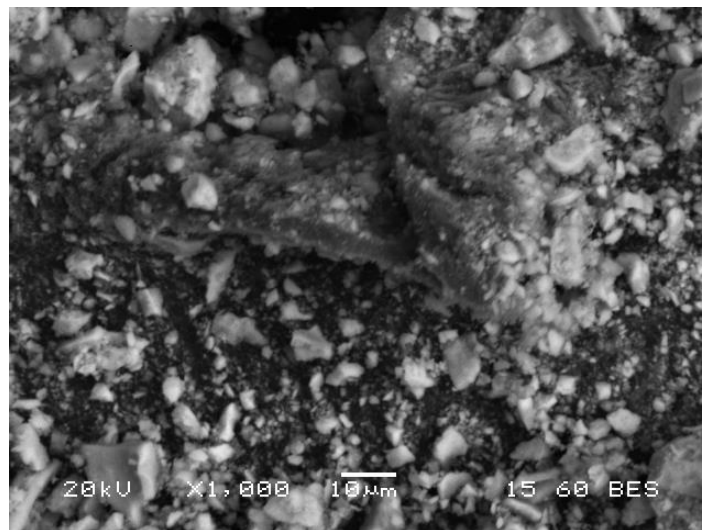
Στην Εικόνα 2 κρίθηκε απαραίτητη και η μελέτη ενός ακόμα σημείου σε μία πιο σκουρόχρωμη περιοχή, στην οποία αναμένεται να εντοπισθούν τα πιο ελαφριά στοιχεία. Όπως παρατηρείται, αριστερά της πρώτης κορυφής Τιτανίου εντοπίζεται και πάλι μία «άγνωστη» κορυφή. Το πιθανότερο είναι, όπως και στο Δείγμα 1, να πρόκειται είτε για μικρότερη κορυφή Τιτανίου είτε για κορυφή Αζώτου. Για τον χαρακτηρισμό των κορυφών αυτών στα Δείγματα 1 και 2, ακολούθησε ανάλυση δείγματος τροποποιημένου Διοξειδίου του Τιτανίου με άζωτο (διάγραμμα 8).

**Θ.2.1.5.3. Αποτελέσματα από την ανάλυση τροποποιημένου διοξειδίου του Τιτανίου με Άζωτο (πηγή προέλευσης: ουρία), N/TiO<sub>2</sub> (ουρία) (Δείγμα 3)**

Παρουσιάζονται ενδεικτικά μερικές εικόνες που ελήφθησαν με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης για το δείγμα 3 (Εικόνες 21-23).

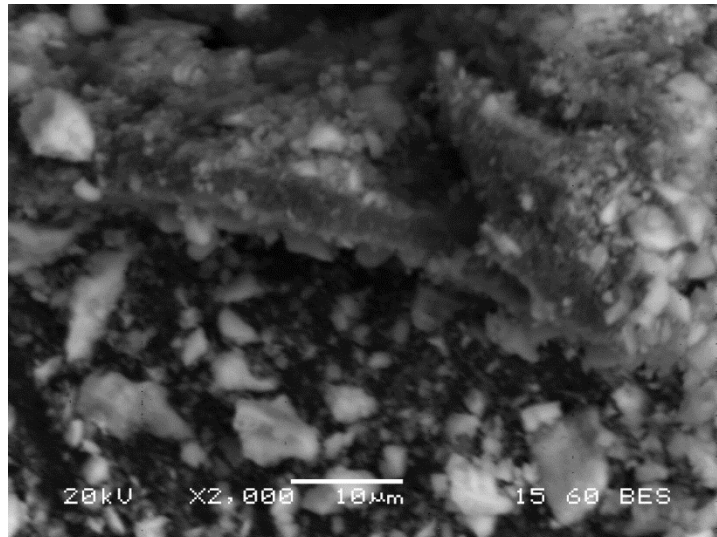


**Εικόνα 21** Απεικόνιση του Δείγματος 3 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x500)



**Εικόνα 22.** Απεικόνιση του Δείγματος 3 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x1000)



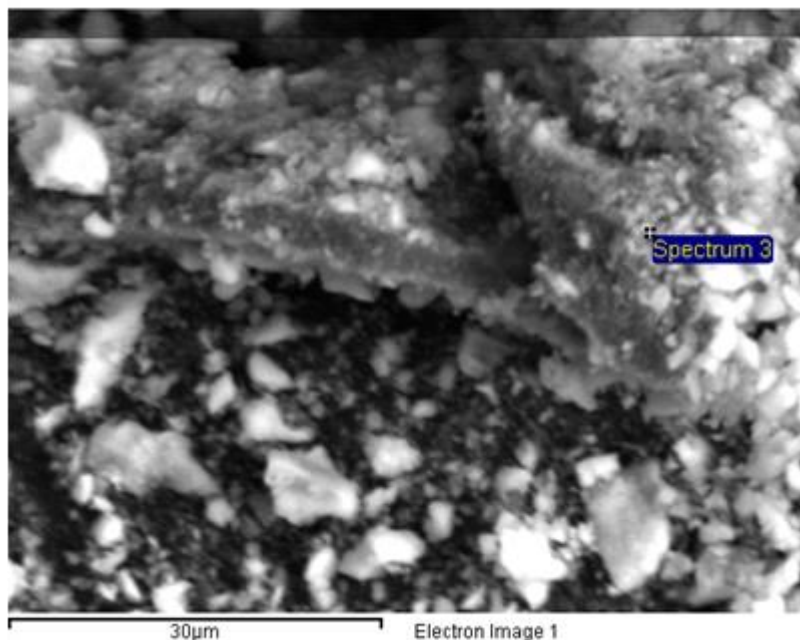


**Εικόνα 23. Απεικόνιση του Δείγματος 3 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x2000)**

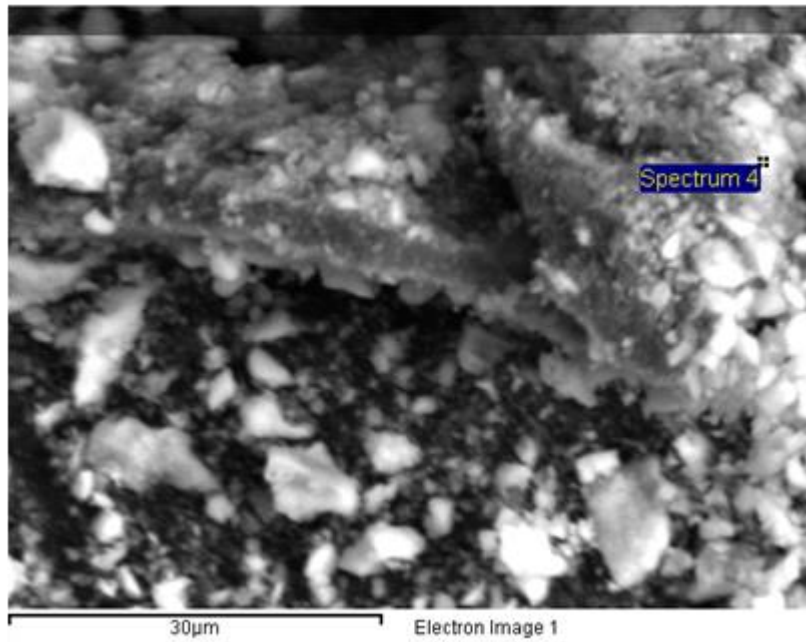
Όπως φαίνεται στις Εικόνες 21 έως και 23, επικρατούν οι σκουρόχρωμοι τόνοι, καθώς ελλείπει ένα στοιχείο με μεγάλο μοριακό βάρος, όπως ο Άργυρος.

Με στόχο την επιβεβαίωση της ανίχνευσης Αζώτου στα Δείγματα 1 και 2 ακολούθησε σημειακή ανάλυση σύστασης στο Δείγμα 3.

Επιλέγονται δύο τυχαία σημεία (Spectrum 3 και 4).

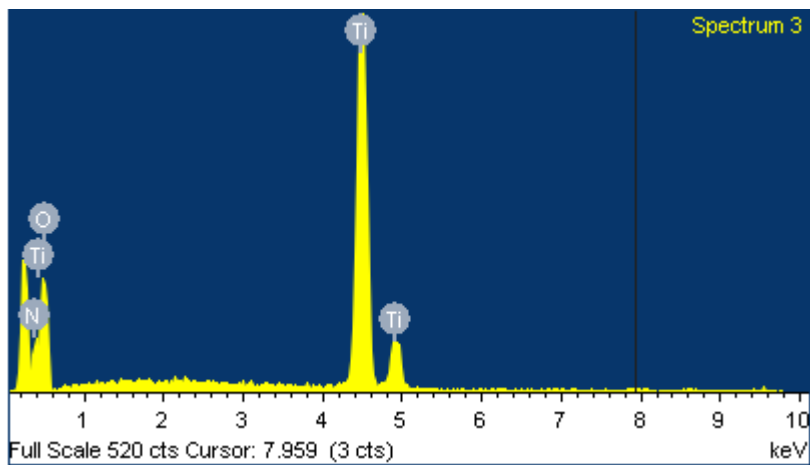


**Εικόνα 24. Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 3 (Δείγμα 3)**

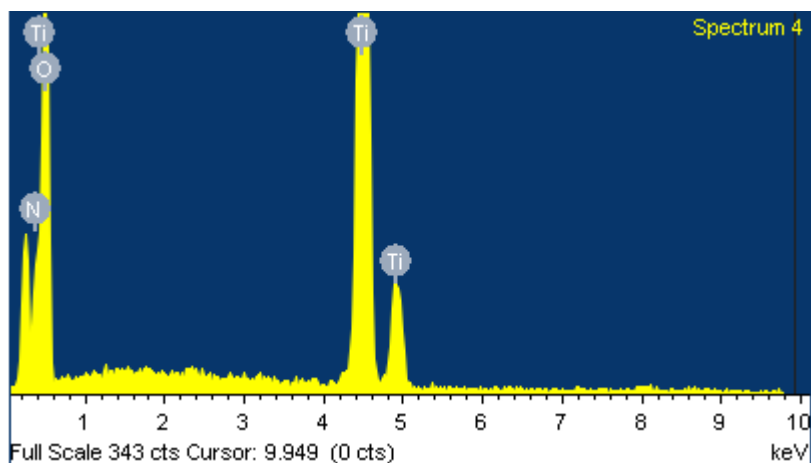


Εικόνα 25. Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 4 (Δείγμα 3)

Τα σημεία Spectrum 3 και 4 δίνουν αντίστοιχα τις παρακάτω κορυφές.



Διάγραμμα 8. Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 3 (Δείγμα 3)



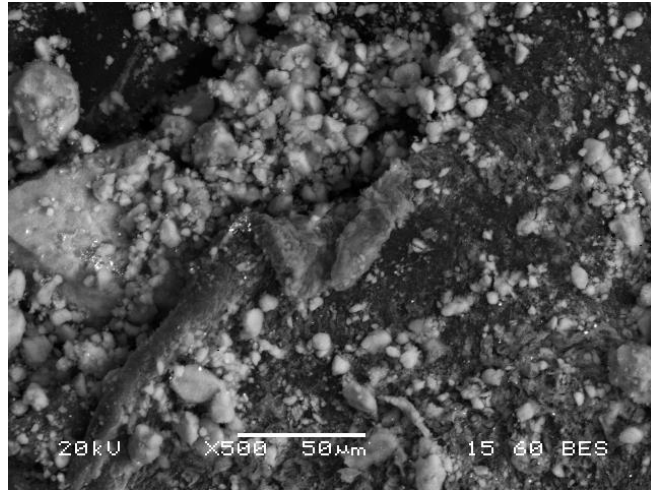
**Διάγραμμα 9. Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 4 (Δείγμα 3)**

Σύμφωνα και με τα δύο διαγράμματα (8,9), η κορυφή που βρίσκεται πριν την πρώτη κορυφή του Τιτανίου, παρουσιάζει σημαντική αύξηση. Το δείγμα αυτό περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα Άζωτου από τα διπλά τροποποιημένα δείγματα με Άζωτο και Άργυρο. Επομένως, η πιθανότητα η κορυφή αυτή, αν και δεν ανιχνεύεται λόγω μικρού ατομικού βάρους, να αντιστοιχεί σε Άζωτο, είναι υψηλή και, επομένως, επιβεβαιώνει με υψηλό βαθμό πιθανότητας τη διπλή τροποποίηση των Δειγμάτων 1 και 2.

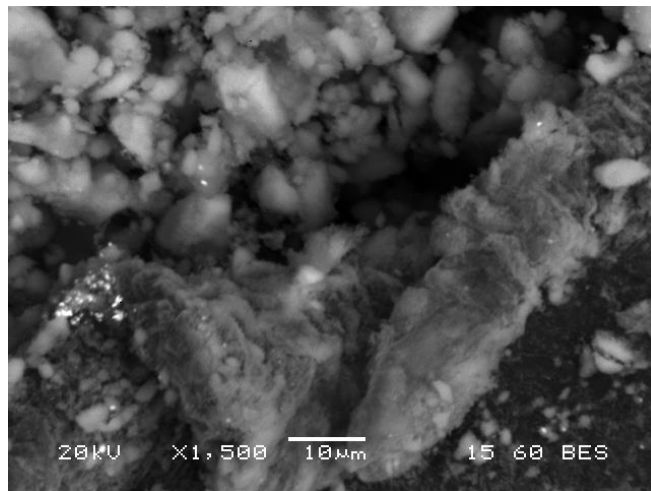
Για την επιβεβαίωση και διασταύρωση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε, επίσης, χαρακτηρισμός δείγματος διοξειδίου του Τιτανίου τροποποιημένου με Άργυρο.

#### **Θ.2.1.5.4. Αποτελέσματα από την ανάλυση τροποποιημένου διοξειδίου του Τιτανίου με Άργυρο, Ag/TiO<sub>2</sub> (Δείγμα 4)**

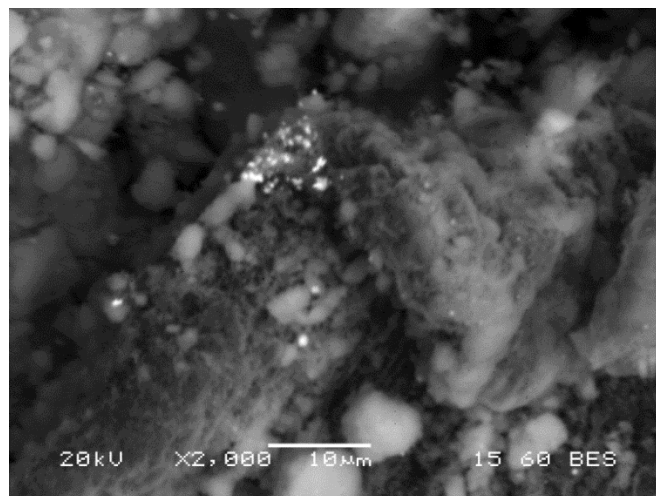
Ενδεικτικά, παρουσιάζονται μερικές εικόνες που ελήφθησαν με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης για το δείγμα 4.



**Εικόνα 26.** Απεικόνιση του Δείγματος 4 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x500)

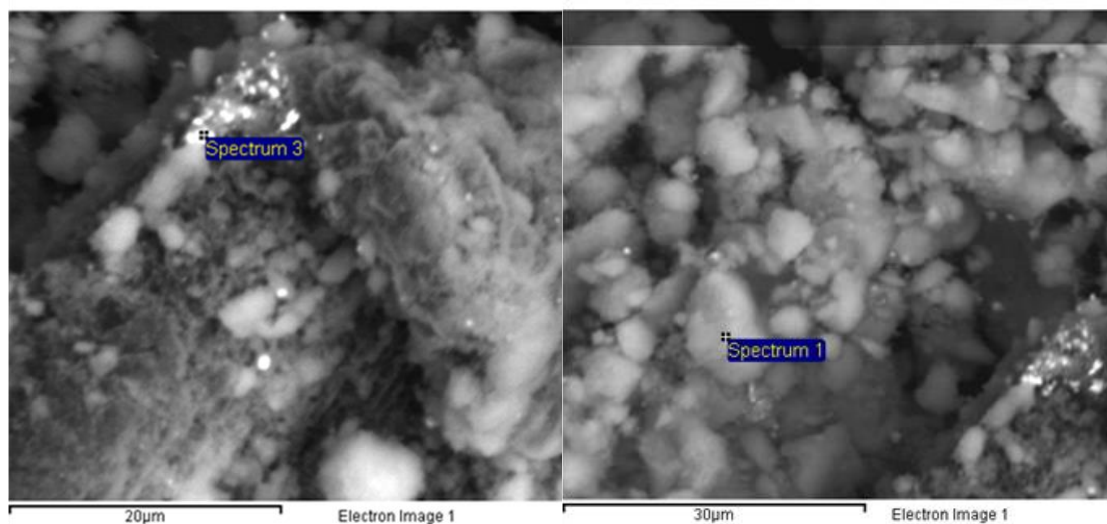


**Εικόνα 27.** Απεικόνιση του Δείγματος 4 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x1500)



**Εικόνα 28.** Απεικόνιση του Δείγματος 4 σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Μεγέθυνση: x2000)

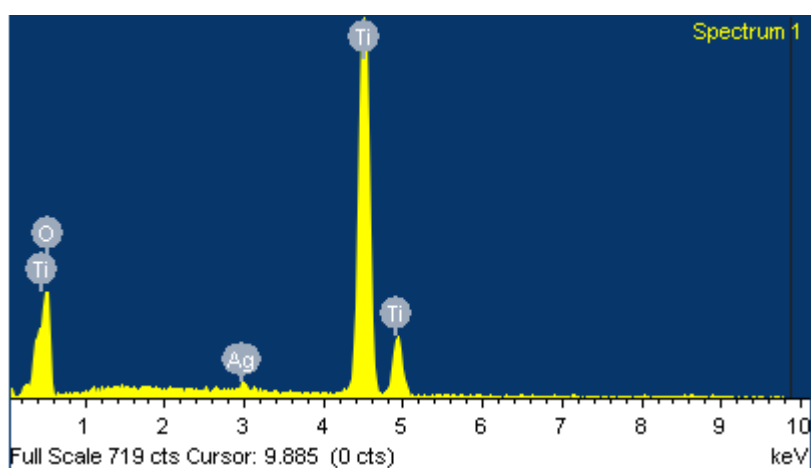
Στο Δείγμα 4 παρατηρούνται έντονες οπτικές διαφορές, με αρκετά λευκά σημεία. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση σύστασης στα τυχαία σημεία Spectrum 1 και Spectrum 3 του Δείγματος 4, που παρουσιάζουν σημαντική οπτική διαφοροποίηση.



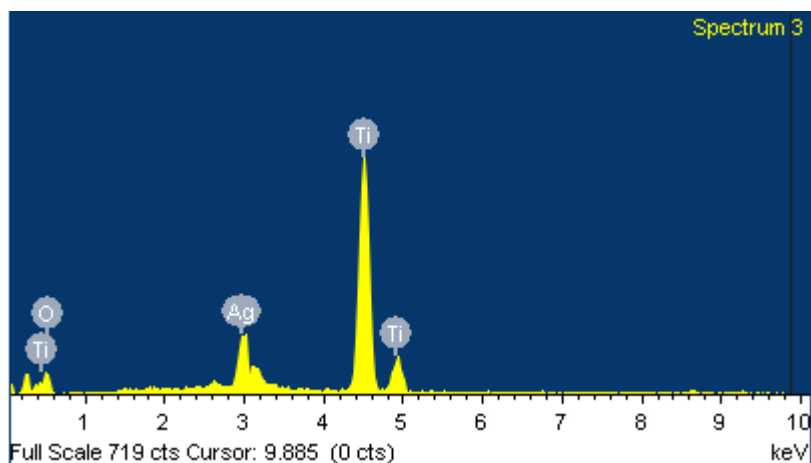
Εικόνα 29. Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 3 (Δείγμα 4)

Εικόνα 30. Ανάλυση σύστασης σημείου Spectrum 1 (Δείγμα 4)

Η ανάλυση σύστασης των σημείων Spectrum 1 και 3 φαίνεται στα διαγράμματα 10 και 11.



Διάγραμμα 10. Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 3 (Δείγμα 4)



**Διάγραμμα 11.** Κορυφές ανάλυσης σύστασης του σημείου Spectrum 1 (Δείγμα 4)

Όπως είναι αναμενόμενο, στο σημείο Spectrum 1 που ανήκει σε γκρίζα περιοχή, οι κορυφές του Τιτανίου είναι πολύ έντονες, ενώ ο Άργυρος οριακά ανιχνεύεται. Αντίθετα, στο σημείο Spectrum 3, που ανήκει σε λευκή περιοχή παρατηρείται αισθητή αύξηση του Αργύρου.

#### **Θ.2.1.6. Παρατηρήσεις**

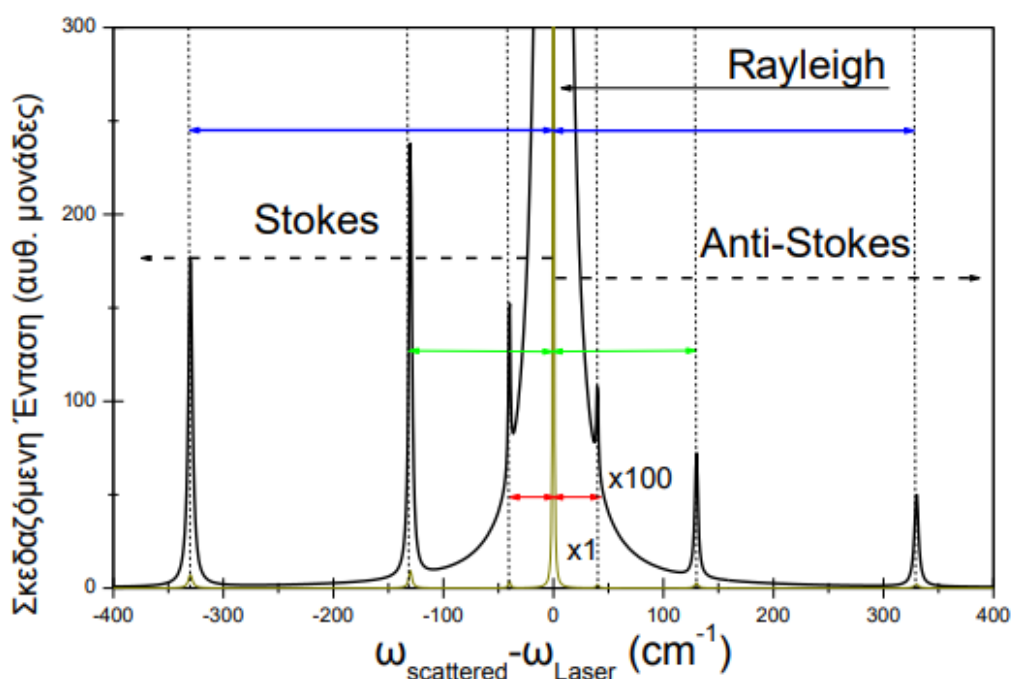
Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης ανιχνεύθηκε ο Άργυρος και με ισχυρή πιθανότητα και το Άζωτο, επιβεβαιώνοντας την τροποποίηση των νανοσωματιδίων του Διοξειδίου του Τιτανίου. Με τη μέθοδο αυτή δεν είναι δυνατόν να αντληθούν περαιτέρω στοιχεία π.χ. αν ο Άργυρος και το Άζωτο είναι ελεύθερα, αν βρίσκονται στην επιφάνεια του Διοξειδίου του Τιτανίου ή έχουν εισέλθει στο πλέγμα. Στην παρούσα φάση, ζητούμενο είναι η επιβεβαίωση της τροποποίησης.

Κατά την ανάλυση των δειγμάτων, εμφανίστηκαν και λίγες, χαμηλές κορυφές Χλωρίου, σε διάφορα σημεία. Το Χλώριο είναι η πιο συνήθης επιμόλυνση και προέρχεται, κατά κύριο λόγο, από τα χέρια του πειραματιστή. Η επιμόλυνση με χλώριο δεν είναι καθοριστικής σημασίας για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, καθώς το χλώριο αποτελεί ένα από τα βασικά συστατικά του θρεπτικού υλικού των κυττάρων.

## Θ.2.2. Χαρακτηρισμός δειγμάτων με φασματοσκοπία Raman

### Θ.2.2.1. Αρχή Λειτουργίας

Η σκέδαση Raman είναι ένα από τα φαινόμενα που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση ακτινοβολίας και ύλης. Η φασματοσκοπία Raman παίρνει το όνομά της από το αντίστοιχο φαινόμενο, το φαινόμενο Raman και πρόκειται για μη-ελαστική σκέδαση φωτός. Κατά το φαινόμενο Raman, όταν κάποιο υλικό σύστημα (αέριο, υγρό, στερεό, άμορφο ή κρυσταλλικό), ακτινοβολείται με μονοχρωματική ακτινοβολία, συνήθως, από την περιοχή του ορατού φάσματος, τότε η διάχυτη ακτινοβολία που σκεδαζείται (σε διευθύνσεις, διαφορετικές από τη διεύθυνση πρόσπτωσης, διέλευσης ή ανάκλασης, χωρίς αυτό να είναι απαραίτητος ο γενικός κανόνας), περιέχει νέες φασματικές περιοχές. Επομένως, ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της σκέδασης Raman είναι η αλλαγή στην συχνότητα του σκεδαζόμενου φωτός. Η συχνότητα, δηλαδή, της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι διαφορετική από αυτήν της προσπίπτουσας. Ένα φάσμα Raman, στο οποίο καταγράφεται η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, συναρτήσει της συχνότητας, έχει τη μορφή που φαίνεται στην Εικόνα 35 [63-64].



Διάγραμμα 12. Τυπικό φάσμα σκέδασης Raman, στο οποίο φαίνονται η ζώνη ελαστικής σκέδασης (Rayleigh) και οι ζώνες μη-ελαστικής σκέδασης (Stokes και Anti-Stokes)[5].

Οι πλευρικές ζώνες σκέδασης των φασμάτων Raman ερμηνεύονται ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης της εισερχόμενης μονοχρωματικής ακτινοβολίας με τις διεγέρσεις του υλικού συστήματος. Οι διεγέρσεις αυτές μπορεί να είναι είτε μονοσωματιδιακές κινήσεις, (κίνηση ελευθέρων ηλεκτρονίων, κινήσεις απομονωμένων ατόμων ή προσμίξεων), είτε συλλογικές, (πλεγματικές ταλαντώσεις – φωνόνια, ταλαντώσεις πλάσματος – πλασμόνια, ταλαντώσεις μαγνητικών ροπών – μαγνόνια). Ανάλογα με τον τρόπο που περιγράφονται οι κινήσεις αυτές και η αλληλεπίδρασή τους με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διέγερσης, πρόκειται για μία κλασική ή μία κβαντική περιγραφή – ερμηνεία του φαινομένου Raman [63].

Η φασματοσκοπία Raman έχει ορισμένα σημαντικά πλεονεκτήματα όπως:

- Ανάλυση χωρίς επαφή με το δείγμα και χωρίς καταστροφή του.
- Υψηλή διακριτική ικανότητα που φτάνει σε διαστάσεις κάτω του μm.
- Σε βάθος ανάλυση διαφανών δειγμάτων μέσω ομο-εστιακού συστήματος φακών.
- Το δείγμα δε χρειάζεται ειδική προετοιμασία.
- Είναι δυνατή η ανάλυση τόσο οργανικών όσο και ανόργανων ουσιών.
- Είναι δυνατή η ανάλυση δειγμάτων σε διάφορες καταστάσεις όπως αέριο, υγρό, διάλυμα, στερεό, κρύσταλλος, γαλάκτωμα.
- Συνήθως, απαιτούνται μόνο 10 msec έως 1 δευτερόλεπτο έκθεσης του δείγματος για τη λήψη ενός φάσματος Raman [66].

#### **Θ.2.2.2. Οργανολογία**

Μια τυπική φασματοσκοπική τεχνική Raman αποτελείται από τις εξής συνιστώσες:

- Μονοχρωματική πηγή ακτινοβολίας (συνήθως LASER συνεχούς ακτινοβολίας)
- Σύστημα κατεύθυνσης, προσανατολισμού και πόλωσης της ακτινοβολίας
- Υποδοχή τοποθέτησης του υπό μελέτη δείγματος (οπτικός φούρνος ή κρυστάτης)
- Διπλός ή τριπλός μονοχρωμάτορας για την ανάλυση του σκεδαζόμενου φωτός
- Ηλεκτρονικό σύστημα ανίχνευσης, ενίσχυσης και καταγραφής του σήματος



Απαραίτητη προϋπόθεση για την καταγραφή των κορυφών που οφείλονται στα δονητικά επίπεδα του υλικού είναι η παρουσία μιας αρκετά ισχυρής και μονοχρωματικής ακτινοβολίας. Τέτοια δυνατότητα παρέχεται από τα LASERs. Τα πλέον διαδεδομένα LASERs αερίου ( $\text{Ar}^+$  και  $\text{Kr}^+$ ) χρησιμοποιούνται ευρέως για φασματοσκοπικούς σκοπούς.

Το σύστημα κατεύθυνσης, προσανατολισμού και πόλωσης της ακτινοβολίας αποτελείται από τα εξής οπτικά στοιχεία: (i) Καθρέπτες υψηλής ανακλαστικότητας (ii) Φακοί για την εστίαση της δέσμης του LASER (iii) Πολωτές και αναλυτές για την επιλογή της κατάλληλης γεωμετρίας πόλωσης.

Η ανάγκη για την μελέτη των υλικών στις διάφορες φάσεις τους (στερεά, υγρή, αέρια) έχει ωθήσει στην δημιουργία συσκευών ελέγχου θερμοκρασίας. Έτσι, φούρνοι χρησιμοποιούνται όταν θέλει κανείς να καταγράψει τα φάσματα Raman σε θερμοκρασίες αρκετά υψηλότερες από αυτήν του περιβάλλοντος (τήγματα, αέρια) και κρυοστάτες για την επίτευξη πολύ χαμηλών θερμοκρασιών (για ενώσεις που είναι υγρά στην θερμοκρασία περιβάλλοντος και για άμορφα υλικά, όταν ενδιαφέρουν οι ιδιότητες των πολύ χαμηλών θερμοκρασιών).

Ο μονοχρωμάτορας αποτελεί το μέσο ανάλυσης ή διασποράς της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Αποτελείται από καθρέπτες και φράγματα περίθλασης τα οποία είναι και τα οπτικά στοιχεία που διαχωρίζουν το σκεδαζόμενο φως σε μικρές παράλληλες δέσμες διαφορετικής ενέργειας. Μεταξύ των φραγμάτων περίθλασης και των καθρεπτών του μονοχρωμάτορα παρεμβάλλονται σχισμές, το μέγεθος των οποίων είναι μεταβλητό καθορίζοντας έτσι την αναλυτική (διακριτική) ικανότητα του οργάνου.

Το αναλυμένο σήμα όταν εξέλθει από τον μονοχρωμάτορα είναι αρκετά ασθενές, για τον σκοπό αυτό η πρόσπτωσή του πάνω στην ευαίσθητη επιφάνεια ενός ανιχνευτή συνοδεύεται από ηλεκτρονική ενίσχυση. Στην θέση του ανιχνευτή μπορεί να υπάρχει φωτοπολλαπλασιαστής.

Τέλος, η χρήση κατάλληλου λογισμικού στον υπολογιστή είναι απαραίτητη για την συλλογή και επεξεργασία του φάσματος.

### **Θ.2.2.3. Εφαρμογές**

Κάθε χημική ουσία δίνει το δικό του χαρακτηριστικό δονητικό φάσμα Raman, εφόσον παρατηρείται μεταβολή στην πολωσιμότητα του χημικού είδους κατά τη διάρκεια των δονητικών κινήσεων, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό

προσδιορισμό του δείγματος. Γενικά, το φάσμα ενός είδους επηρεάζεται ελάχιστα από την ανάμιξη του με άλλα είδη, επομένως η συγκεκριμένη μέθοδος ανάλυσης έχει ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών [65].

Ενδεικτικά, το φάσμα Raman χρησιμοποιείται στους παρακάτω κλάδους:

- Δομική χημεία
- Αρχαιολογία
- Μελέτη στερεάς κατάστασης
- Αναλυτική χημεία
- Εφαρμοσμένη ανάλυση υλικών
- Έλεγχος διαδικασιών
- Μικρο-φασματογραφία/ απεικόνιση
- Περιβαλλοντικές εφαρμογές
- Βιοϊατρική [65]

Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται για τους ακόλουθους σκοπούς:

#### *Προσδιορισμός άγνωστης ουσίας*

Όταν ανακαλύπτεται άγνωστο, ξένο υλικό - οργανικό ή ανόργανο - στην επιφάνεια των μεταποιημένων προϊόντων ή μέσα σε μια διαφανή μεμβράνη, μπορεί να ληφθεί ένα φάσμα Raman για αναγνώριση.

#### *Προσδιορισμός κρυσταλλικού πολυμορφισμού*

Η ιδιότητα μιας ένωσης να εμφανίζει διαφορετικές κρυσταλλικές δομές, ενώ ο χημικός της τύπος παραμένει σταθερός, ονομάζεται κρυσταλλικός πολυμορφισμός. Η φασματοσκοπία Raman επιτρέπει την ανάλυση του κρυσταλλικού πολυμορφισμού, καθώς οι κορυφές των διαφορετικών κρυσταλλικών μορφών παρουσιάζουν μικρές διαφορές ως προς τη θέση και την ένταση, οι οποίες είναι επαρκείς για ταυτοποίηση.

#### *Παρακολούθηση αλλαγών στις μοριακές δομές*

Τόσο ο πολυμερισμός όσο και η καταστροφή της μοριακής δομής επιταχύνονται μέσω ακτινοβολίας από υπεριώδεις ακτίνες. Καταγράφοντας το φάσμα Raman με την πάροδο του χρόνου, οι αλλαγές στη μοριακή δομή του δείγματος μπορούν να γίνουν αντιληπτές. Για παράδειγμα, σε ένα πολυμερές ο δεσμός  $C = C$  μπορεί να σχηματιστεί

με την ακτινοβολία των υπεριωδών ακτινών, έτσι οι αλλαγές μπορούν να παρακολουθούνται εστιάζοντας στην αλλαγή στην αντίστοιχη ένταση κορυφής.

#### *Παρακολούθηση της αλλαγής της κρυσταλλικότητας*

Σε μια ουσία της οποίας η κρυσταλλικότητα αλλάζει με τη θέρμανση, οι αλλαγές μπορούν να αναλυθούν χρησιμοποιώντας το πλήρες πλάτος στη μισή ένταση του μεγίστου (Full Width at Half Maximum, FWHM) της κορυφής που εμφανίζεται στο φάσμα Raman, ως μία μέθοδος ποσοστικής ανάλυσης των αλλαγών.

#### *Αξιολόγηση του μεγέθους της εφελκυστικής ή θλιπτικής τάσης*

Κάτω από την επιβολή πίεσης ή τάσης, μια κρυσταλλική δομή παραμορφώνεται. Οι κορυφές Raman που αντιστοιχούν σε μια συγκεκριμένη κρυσταλλική δομή και οι μοριακές δονήσεις της ουσίας θα μετατοπιστούν κάτω από εφελκυστική ή θλιπτική καταπόνηση. Γενικά ο εφελκυσμός μετατοπίζει τις κορυφές προς χαμηλότερες συχνότητες ενώ αντιθέτως η θλίψη προς υψηλότερες συχνότητες.

#### *Μελέτη του προσανατολισμού των μορίων*

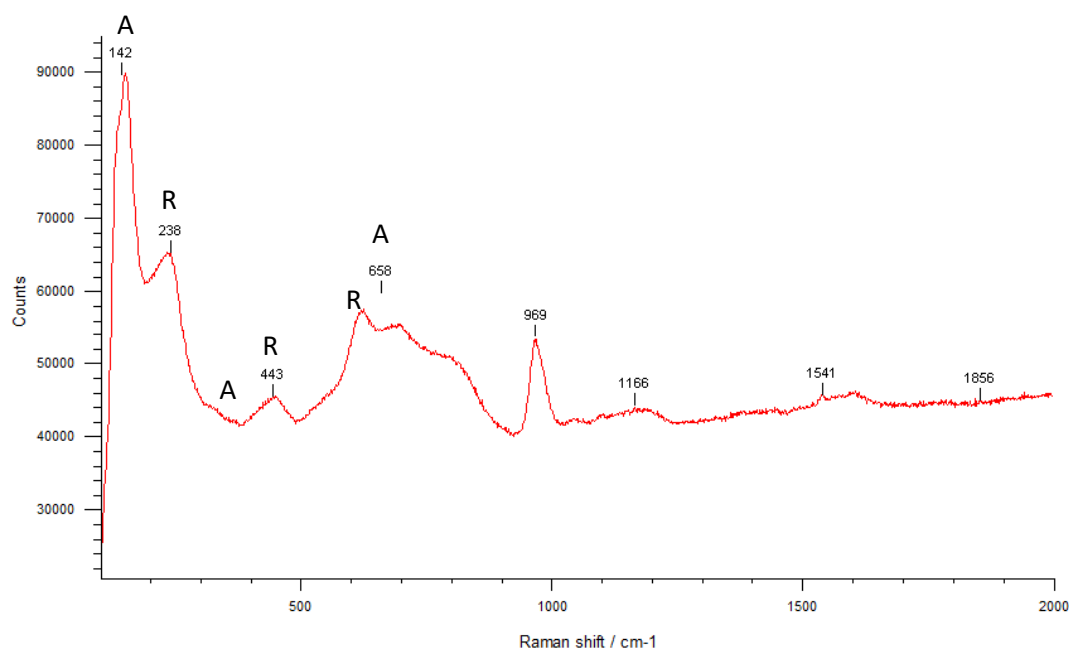
Η τάνυση μιας μεμβράνης σε μια ορισμένη κατεύθυνση προσανατολίζει τις αλυσίδες του πολυμερούς προς αυτή την κατεύθυνση. Με τις πολωμένες μετρήσεις Raman μπορούν να αξιολογηθούν ο προσανατολισμός και η μορφή της ευθυγράμμισης της αλυσίδας [8].

#### Θ.2.2.4. Χαρακτηρισμός δείγματος διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άζωτο και άργυρο, Ag/N/TiO<sub>2</sub> με ανάλυση micro-Raman

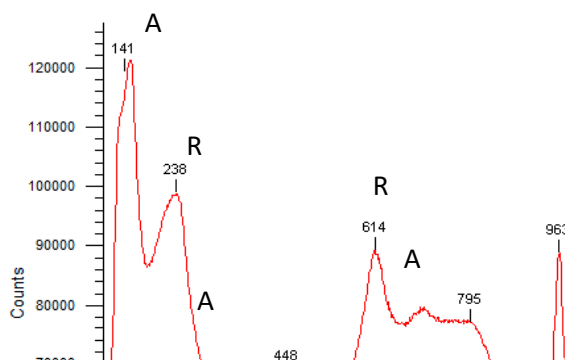
##### Θ.2.2.4.1. Αποτελέσματα από την ανάλυση του διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άζωτο και άργυρο, Ag/N/TiO<sub>2</sub> με ανάλυση micro-Raman

Για τον χαρακτηρισμό με φασματοσκοπία micro-Raman χρησιμοποιήθηκε διάταξη που βρίσκεται στη Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.. Το μικροσκόπιο είναι της εταιρείας Renishaw, και συγκεκριμένα το μοντέλο inVia (Σχήμα 38). Χρησιμοποιήθηκαν 2 πηγές διέγερσης, λέιζερ, αυτή του Ar<sup>+</sup> ( $\lambda=514,5$  nm, 2,41 eV) και λέιζερ εγγύς υπέρυθρης ακτινοβολίας NIR ( $\lambda=785$  nm, 1,58 eV) με μέγιστη ισχύ 1W.

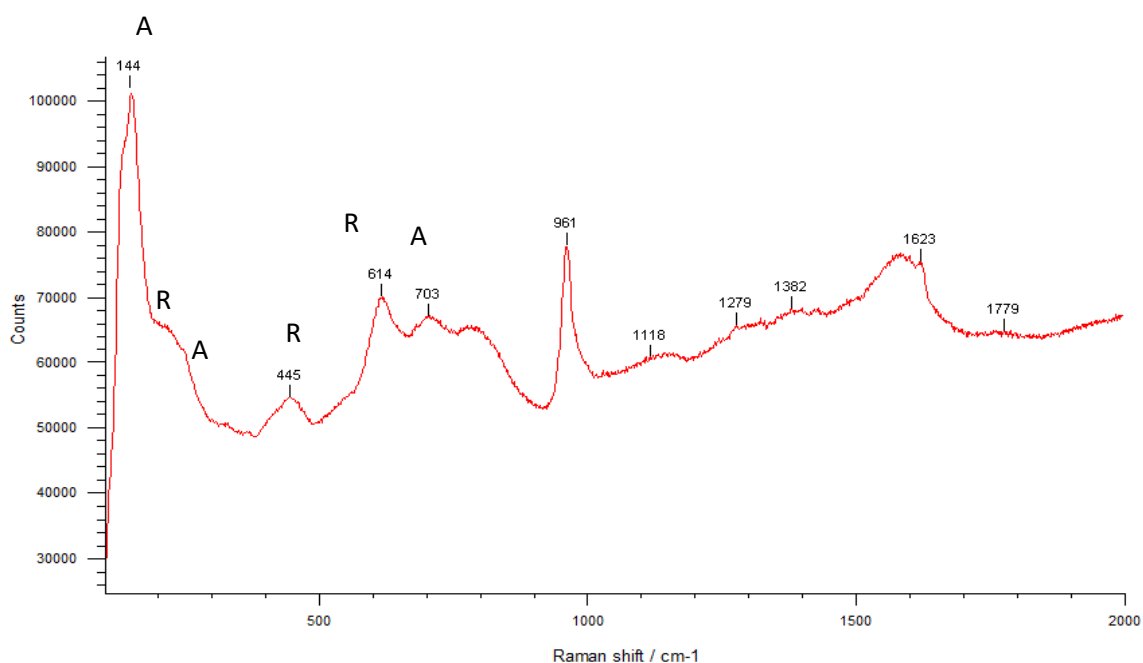
Στα διαγράμματα που παραλαμβάνονται, ο άξονας x είναι η μετατόπιση κατά Raman και ο άξονας των y η ένταση των κορυφών. Τα διαγράμματα micro-Raman του δείγματος που παράχθηκαν δίνουν πληροφορίες για τις διαφορετικές φάσεις της τιτανίας που παρουσιάζονται.



Διάγραμμα 13. Χαρακτηριστικό φάσμα Raman του υλικού, βάσει του οποίου ταυτοποιείται η παρουσία του ανατάση από την κύρια κορυφή στους 142 κυματριθμούς (σημείο 1).



**Διάγραμμα 14.** Χαρακτηριστικό φάσμα Raman του υλικού, βάσει του οποίου ταυτοποιείται η παρουσία του ανατάση από την κύρια κορυφή στους 142 κυματαριθμούς (σημείο 2).



**Διάγραμμα 15.** Χαρακτηριστικό φάσμα Raman του υλικού, βάσει του οποίου ταυτοποιείται η παρουσία του ανατάση από την κύρια κορυφή στους 142 κυματαριθμούς (σημείο 3).

Από τη μελέτη του φάσματος Raman του υλικού (Διαγράμματα 13 -15), ταυτοποιείται κυρίως η παρουσία  $\text{TiO}_2$  με τη μορφή του ανατάση (τετραγωνικό  $\text{TiO}_2$ ), βάσει της χαρακτηριστικής κορυφής (δόνηση) στους 140-145 κυματαριθμούς ( $\text{cm}^{-1}$ ). Η μικρή μετατόπιση προς μεγαλύτερους κυματαριθμούς που παρατηρείται στην κύρια κορυφή μπορεί να αποδοθεί σε φαινόμενο συντονισμού Raman (resonant Raman effect) που προκαλείται από την εναπόθεση Ag στο  $\text{TiO}_2$  (Jafaar et al. 2015). Οι

κορυφές στους ~385 και 620 κυματαριθμούς αντιστοιχούν, επίσης, στον ανατάση, ενώ οι ασθενείς κορυφές στους ~240, 444 και 610 κυματαριθμούς μπορούν αποδοθούν στο ρουτίλιο. Η παρουσία βρουκίτη δεν ταυτοποιήθηκε, αφού απουσιάζει κορυφή στους ~152 κυματαριθμούς.

### **Θ.2.3. Χαρακτηρισμός δειγμάτων με Περίθλαση Ακτίνων X**

#### **Θ.2.3.1. Αρχή Λειτουργίας**

Η μελέτη του φάσματος και της κατανομής της ενέργειας στα διάφορα μήκη κύματος επιτυγχάνεται, κυρίως, με δύο μεθόδους:

- της διάθλασης από πρίσματα και
- της περίθλασης από κατάλληλο φράγμα.

Επειδή, όμως, και οι δύο μέθοδοι παρουσιάζουν δυσκολίες, η κυριότερη μέθοδος έρευνας του φάσματος στηρίζεται στην περίθλαση των Ακτίνων X από τους κρυστάλλους οι οποίοι ενεργούν ως φυσικά τρισδιάστατα φράγματα.

Ο William L. Bragg έδειξε (1912) ότι οι Ακτίνες X μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής, όταν αυτές περιθλώνται σε έναν κρύσταλλο. Η διασπορά από ένα μέσο συνεχές σε δύο διαστάσεις, όπως ένα επίπεδο ατόμων σε μια δομή κρυστάλλου, καλείται ανάκλαση. Εντούτοις, οι όροι περίθλαση και ανάκλαση μπορούν να χρησιμοποιηθούν αδιακρίτως και οι δύο. Έτσι, αν Ακτίνες X πέσουν σε ένα επίπεδο ατόμων με γωνία πρόσπτωσης  $\theta$ , οι ακτίνες θα διαπεράσουν τα στρώματα των ατόμων και θα δώσουν την απεικόνιση τους.

Η χρησιμοποίηση αυτή των κρυστάλλων είναι άμεση συνέπεια της θεώρησης του φαινομένου της περίθλασης από τον Bragg ως ισοδύναμου με ανάκλαση της προσπίπτουσας δέσμης από τα διάφορα δικτυωτά επίπεδα του κρυστάλλου. Ο νόμος

του Bragg συνδέει το μήκος κύματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τη γωνία διαθλάσεως και την απόσταση των πλεγμάτων σε ένα κρυσταλλικό δείγμα και, για τις περιθλώμενες ακτίνες που βρίσκονται σε φάση, εκφράζεται από τη σχέση:

$$n\lambda = 2d_{(hkl)} \sin \theta$$

(13)

, όπου:  $n$  ακέραιος αριθμός (1, 2, ...)

$\lambda$  το μήκος κύματος των ακτίνων X,

$d_{(hkl)}$  η απόσταση μεταξύ των Κρυσταλλογραφικών επιπέδων (hkl)

$\theta$  η γωνία πρόσπτωσης

#### *Μέθοδος και αρχή μέτρησης*

Οι παράμετροι που βρίσκονται στην διάθεση ενός πειραματικού ερευνητή είναι το μήκος κύματος  $\lambda$  της ακτινοβολίας και η γωνία  $\theta$ . Ζητούμενο είναι οι διαφορετικές αποστάσεις των κρυσταλλογραφικών επιπέδων  $d_{(hkl)}$ . Έτσι, τυπικά, μπορεί να μεταβάλλεται είτε το μήκος κύματος της ακτινοβολίας με σταθερή γωνία είτε τη γωνία με σταθερό μήκος κύματος μέχρι να λάβει χώρα σύμφωνη σκέδαση. Έτσι

- διατηρείται σταθερό το  $\theta$  και μεταβάλλεται το  $\lambda$  (Μέθοδος Laue)
- διατηρείται σταθερό το  $\lambda$  και μεταβάλλεται η γωνία  $\theta$  (Μέθοδοι κόνεως και περιστροφής).

Η μέθοδος κόνεων αποτελεί τη συνηθέστερη μέθοδο της περίθλασης ακτίνων X, σε βιομηχανικό ή ερευνητικό επίπεδο. Στη μέθοδο κόνεων το δείγμα δεν πρέπει απαραίτητα να βρίσκεται σε μορφή σκόνης για να εξετασθεί. Όμως, οι κόκκοι οι οποίοι το αποτελούν πρέπει να είναι μεγέθους της τάξης ολίγων μικρών ( $\mu\text{m}$ ). Δείγματα σε μορφή ελασμάτων, επίσης, εξετάζονται εύκολα και με καλά αποτελέσματα.

Το χαρακτηριστικό πρότυπο περίθλασης ακτίνων X που παράγεται σε μια τυπική ανάλυση XRD παρέχει ένα μοναδικό «δακτυλικό αποτύπωμα» των κρυστάλλων που υπάρχουν στο δείγμα. Όταν ερμηνεύεται σωστά, σε σύγκριση με πρότυπα αναφοράς

και μετρήσεις, αυτό το αποτύπωμα επιτρέπει την αναγνώριση της κρυσταλλικής μορφής του δείγματος [67, 68, 69].

#### *Πλεονεκτήματα της μεθόδου*

- Ισχυρή και ταχεία ανάλυση για την ταυτοποίηση ενός άγνωστου δείγματος
- Σαφής ποσοτικός προσδιορισμός
- Ελάχιστη προετοιμασία δειγμάτων
- Διαθεσιμότητα μονάδων XRD
- Απλή ερμηνεία των δεδομένων [69]

#### *Περιορισμοί της μεθόδου*

- Το δείγμα πρέπει να είναι ομοιογενές και μονοφασικό για την καλύτερη αναγνώρισή του
- Απαιτείται πρόσβαση σε ένα πρότυπο αρχείο αναφοράς ανόργανων ενώσεων (d-spacing, hkl's)
- Απαιτείται μια ελάχιστη ποσότητα του υλικού προς εξέταση (δέκατα του) γραμμαρίου του υπό ανάλυση υλικού, υπό μορφή σκόνης
- Για τα μικτά υλικά, το όριο ανίχνευσης μιας ουσίας είναι να βρίσκεται σε περιεκτικότητα τουλάχιστον 2% του δείγματος
- Είναι πιθανό να συμβεί επικάλυψη κορυφής, πράγμα που δυσχεραίνει την ταυτοποίηση του δείγματος [69]

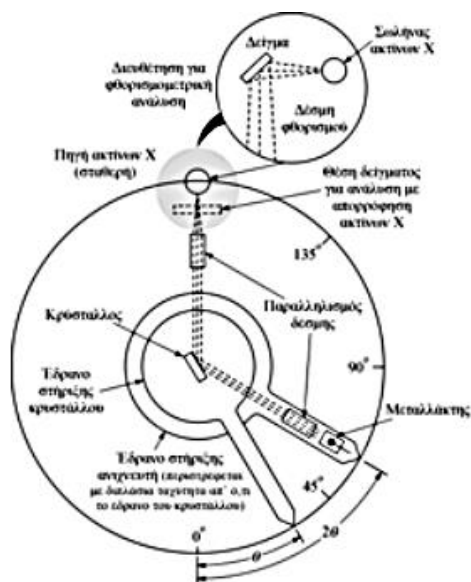
### **Θ.2.3.2. Οργανολογία**

Τα περιθλασιόμετρα ακτίνων X αποτελούνται από τρία βασικά στοιχεία: έναν σωλήνα ακτίνων X, έναν υποδοχέα δείγματος και έναν ανιχνευτή ακτίνων X. Οι ακτίνες X δημιουργούνται σε έναν σωλήνα καθοδικής ακτινοβολίας με θέρμανση ενός νήματος για την παραγωγή ηλεκτρονίων. Ακολουθεί επιτάχυνση των ηλεκτρονίων προς έναν στόχο με εφαρμογή τάσης.

Στη διάταξη αυτή, η αποκλίνουσα δέσμη Ακτίνων – X αφού υποστεί τους κατάλληλους περιορισμούς με διαφράγματα ή με πιο πολύπλοκες διατάξεις (divergent slit, soller slit scatter slit στο σχήμα 31), προσπίπτει στο δείγμα (sample σχήμα 31) περιθλάται (ανακλάται), καθίσταται συγκλίνουσα και κατευθύνεται στον ανιχνευτή (Detector), όπου περισυλλέγεται. Αν η γωνία πρόσπτωσης της δέσμης επί του



δείγματος είναι  $\theta$ , τότε η γωνία προσπίπτουσας με την ανακλωμένη δέσμη είναι πάντα  $2\theta$ . Οι δυνατότητες των οργάνων για τη γεωμετρία Bragg-Brentano είναι να χρησιμοποιούν κάθετη διάταξη  $\theta/2\theta$ , οριζόντια  $\theta/2\theta$  ή κάθετη  $\theta/\theta$ .

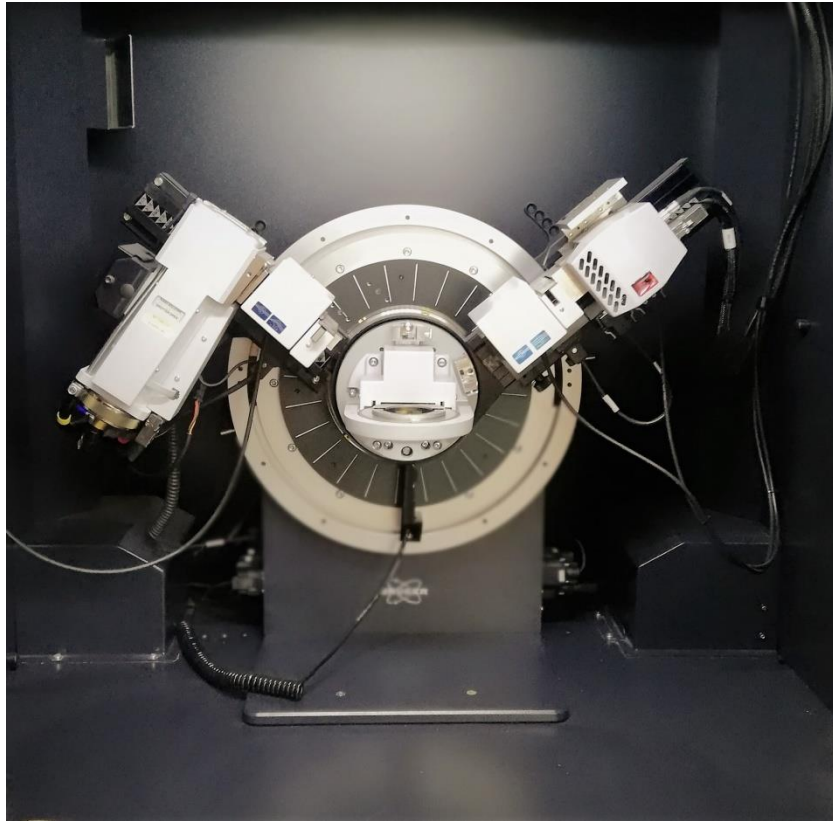


Σχήμα 31. Οργανολογία φασματοσκοπίας περίθλασης Ακτίνων X [12].

Όταν ακτινοβοληθεί μονοκρύσταλλος, για να δώσει όλες τις δυνατές ανακλάσεις πρέπει να περιφερθεί κατά τρεις διαφορετικές διαστάσεις ώστε σταδιακά να έλθουν σε γωνία ανακλάσεως (σχέση Bragg) όλα τα επίπεδα και να δώσει όλες τις δυνατές ανακλάσεις.

Όταν τα ηλεκτρόνια έχουν επαρκή ενέργεια για να εκτοπίσουν τα εσωτερικά ηλεκτρόνια του υλικού-στόχου, παράγονται χαρακτηριστικά φάσματα Ακτίνων X. Ένας ανιχνευτής καταγράφει και επεξεργάζεται αυτό το σήμα Ακτίνων X και μετατρέπει το σήμα σε ρυθμό μέτρησης έντασης, ο οποίος στη συνέχεια εξάγεται μέσω εκτυπωτή ή οθόνης υπολογιστή.

Η γεωμετρία ενός περιθλασίμετρου ακτίνων X είναι τέτοια, ώστε το δείγμα να περιστρέφεται στην τροχιά της ακτινικής δέσμης ακτίνων X υπό γωνία  $\theta$ , ενώ ο ανιχνευτής ακτίνων X είναι τοποθετημένος σε έναν βραχίονα για τη συλλογή των διαθλασμένων ακτίνων X και περιστρέφεται υπό γωνία  $2\theta$ . Το όργανο που χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της γωνίας και την περιστροφή του δείγματος ονομάζεται γωνιόμετρο [67, 69].



Εικόνα 32. Φασματόμετρο Περίθλασης Ακτίνων X, Σχολής Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα

### Θ.2.3.3. Εφαρμογές

Η περίθλαση ακτίνων X μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για ποιοτική και για ποσοτική ανάλυση.

Η διάθλαση ακτίνων X σε σκόνη χρησιμοποιείται ευρύτερα για την ταυτοποίηση άγνωστων κρυσταλλικών υλικών (ανόργανα συστατικά, ανόργανες ενώσεις). Ο προσδιορισμός άγνωστων στερεών είναι κρίσιμος για τις μελέτες της γεωλογίας, της επιστήμης του περιβάλλοντος, της επιστήμης των υλικών, της μηχανικής και της βιολογίας.

Άλλες εφαρμογές περιλαμβάνουν:

- Χαρακτηρισμό κρυσταλλικών υλικών
- Ταυτοποίηση λεπτόκοκκων ορυκτών όπως είναι οι Άργιλοι
- Μέτρηση της καθαρότητας του δείγματος
- Ανάλυση δομής
- Προσδιορισμό τάσης σε μέταλλα

- Προσδιορισμό μεγέθους μορίων
- Αναγνώριση και αξιολόγηση πρώτων υλών [68, 69]

Με εξειδικευμένες τεχνικές, το XRD μπορεί να χρησιμοποιηθεί για:

- Προσδιορισμό των κρυσταλλικών δομών χρησιμοποιώντας τη βελτίωση του Rietveld
- Ποσοτική ανάλυση σύστασης ορυκτών
- Χαρακτηρισμό δειγμάτων λεπτών ταινιών [69].

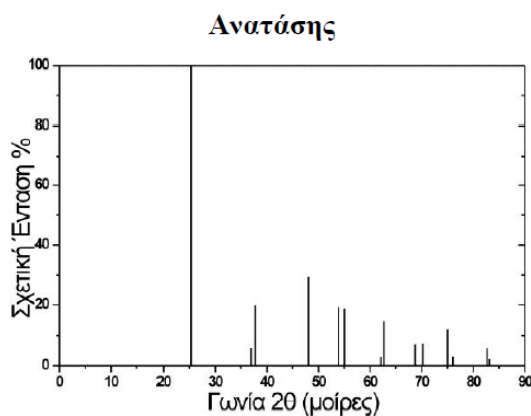
#### **Θ.2.3.4. Χαρακτηρισμός δείγματος διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άζωτο και άργυρο, Ag/N/TiO<sub>2</sub> με περίθλαση ακτίνων X**

##### **Θ.2.3.4.1. Αποτελέσματα από την ανάλυση του διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άζωτο και άργυρο, Ag/N/TiO<sub>2</sub> με περίθλαση ακτίνων X**

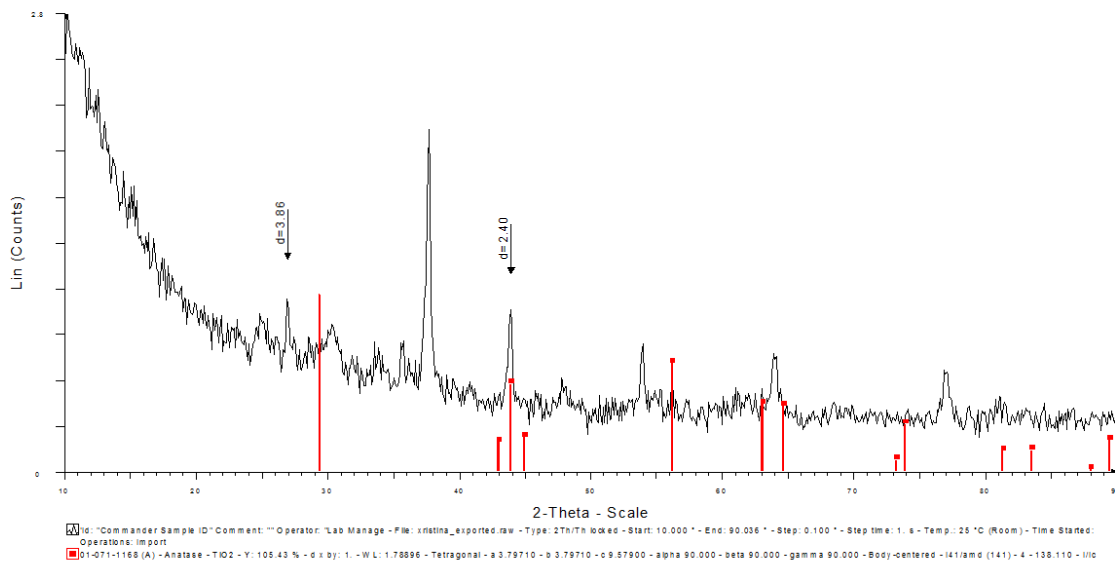
Οι μετρήσεις για την περίθλαση ακτίνων X πραγματοποιήθηκαν στο Ε.Μ.Π. με τη συσκευή XRD Bruker D8 Advance. Οι μετρήσεις έγιναν υπό γωνία 2θ και εύρος 20° έως 100°, με ταχύτητα σάρωσης 0,1°/min. Το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας Cu-Kα (40 kV, 35 mA) που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1,542 Å.

Στο ακτινογράφημα περίθλασης ακτίνων X που παραλαμβάνεται, ο κάθετος άξονας αντιπροσωπεύει την περιθλώμενη ένταση των κορυφών σε μετρήσεις ανά δευτερόλεπτο (Cps) και ο οριζόντιος τη γωνία 2θ.

Με την περίθλαση ακτίνων X (XRD), έγινε μελέτη της κρυσταλλικότητας των νανασωματιδίων. Για την αποτίμηση των διαγραμμάτων, απαραίτητες κρίνονται οι γωνίες 2θ που αναμένονται από τον ανατάση, ως βάση αναφοράς (βλ. Διάγραμμα 16).



**Διάγραμμα 16. Ακτινοδιαγράμματα ανατάση**



**Διάγραμμα 17. Περιθλασιόγραμμα ακτίνων-X του υλικού, στο οποίο διακρίνονται οι ανακλάσεις του ανατάση με κόκκινο.**

Με χρήση των παραπάνω πληροφοριών, του πίνακα 3 και των ακτινοδιαγραμμάτων 16 και 17 μπορούν να εξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες.

Από τη μελέτη του υλικού με περιθλασιμετρία ακτίνων-X (XRD), ταυτοποιήθηκαν οι φάσεις ανατάση, από τις ανακλάσεις  $d = 2.40, 1.90$ .

Επίσης μπορεί να γίνει εκτίμηση του μεγέθους  $d$  των κρυσταλλιτών του παραγόμενου διοξειδίου του τιτανίου. Ο προσδιορισμός της τιμής αυτής γίνεται με την εξίσωση Scherrer:

$$d = \frac{0,9 \cdot \lambda}{B \cdot \cos \theta} \quad (13)$$

όπου:  $\theta$ : η γωνία Bragg πρόσπτωσης των ακτίνων X (rad)

$\lambda$ : το μήκος κύματος της προσπίπτουσας στο δείγμα ακτινοβολίας (0,1542 nm)

B: το εύρος (πλάτος) της κορυφής στο ήμισυ του μεγίστου της κορυφής (FWHM, rad)

Το μέγεθος των νανοσωματιδίων του διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άργυρο και άζωτο εκτιμήθηκε στα 25 nm, χρησιμοποιώντας τη γραμμή περίθλασης (101).



Πίνακας 4. Πρότυπες γωνίες περίθλασης του TiO<sub>2</sub>.

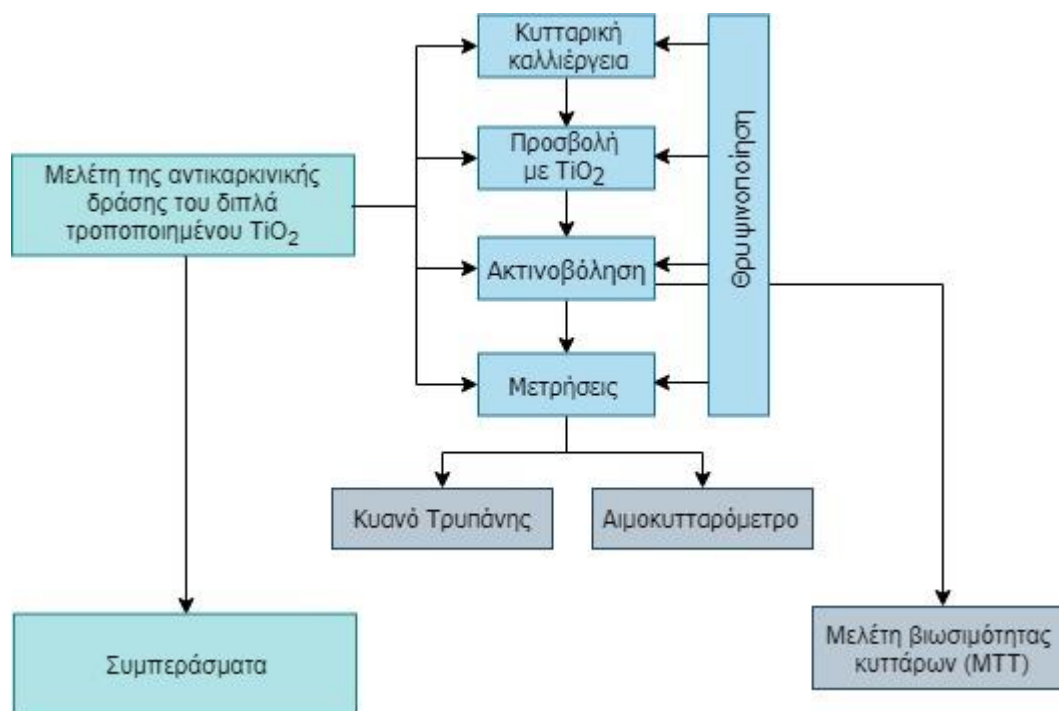
Ανατάσης			Ρουτίλιο		
2θ Γωνία	Σχετική % Ένταση	Κρυσταλλικό Επίπεδο	2θ γωνία	Σχετική % Ένταση	Κρυσταλλικό Επίπεδο
25,30°	100	1 0 1	27,30°	100	1 1 0
36,95°	6,0	1 0 3	35,86°	44,9	1 0 1
37,79°	19,8	0 0 4	38,99°	6,5	2 0 0
48,04°	29,3	2 0 0	41,00°	17,7	1 1 1
53,88°	19,2	1 0 5	43,82°	6,1	2 1 0
55,06°	18,8	2 1 1	54,01°	50,6	2 1 1
62,11°	3,0	2 1 3	56,33°	14,9	2 2 0
62,68°	14,5	2 0 4	62,33°	6,8	0 0 2
68,75°	7,1	1 1 6	63,70°	6,9	3 1 0
70,28°	7,5	2 2 0	68,60°	16,5	3 0 1
75,04°	11,8	2 1 5	69,33°	8,1	1 1 2
76,03°	3,1	3 0 1	76,02°	1,6	2 0 2
82,67°	5,9	2 2 4	81,83°	3,2	3 2 1
83,16°	2,2	3 1 2	83,75°	2,2	4 0 0
			88,92°	5,1	2 2 2

## I. Πειραματικό Μέρος – Αντικαρκινική δράση

### I.1. Μελέτη της αντικαρκινικής δράσης του διπλά τροποποιημένου Ag/N/TiO<sub>2</sub>

#### I.1.1. Διάγραμμα Ροής

Η μεθοδολογία της μελέτης της αντικαρκινικής δράσης του Ag/N/TiO<sub>2</sub> παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 18.



Διάγραμμα 18. Διάγραμμα ροής μελέτης αντικαρκινικής δράσης

#### I.1.2. Οπτικό Μικροσκόπιο

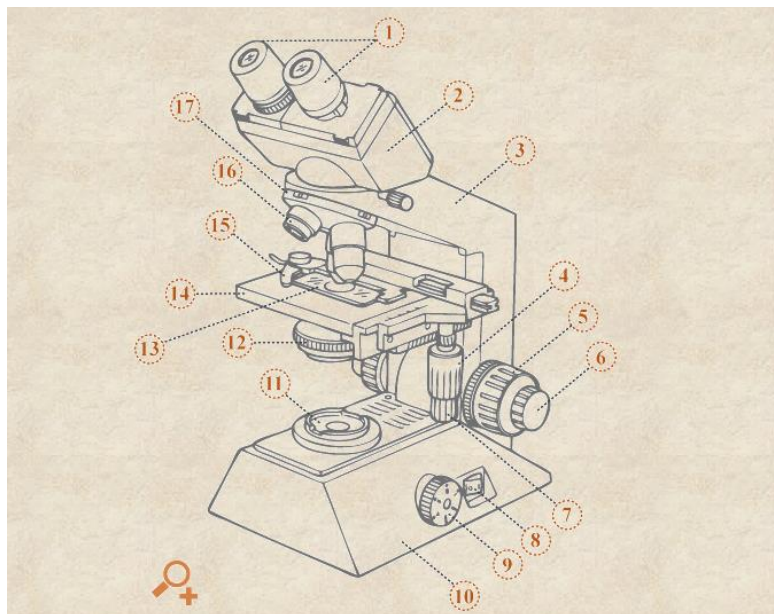
Για τη μελέτη των κυττάρων, απαραίτητη είναι η χρήση οπτικού μικροσκοπίου σε κάθε στάδιο της πειραματικής διαδικασίας.

##### I.1.2.1. Γενικά

Το μικροσκόπιο είναι μια διάταξη φακών με την οποία επιτυγχάνεται η μεγέθυνση διαφόρων αντικειμένων. Το οπτικό μικροσκόπιο είναι χρήσιμο όταν εξετάζουμε αντικείμενα, με διαστάσεις από 1000μm – 0,1μm. Ως οπτικά ή φωτονικά αναφέρονται τα μικροσκόπια εκείνα όπου χρησιμοποιούν το τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που είναι ορατό, δηλαδή από 380 – 760 nm. Ανάλογα με την διάταξη των

φακών και τον τρόπο παρατήρησης τα οπτικά μικροσκόπια διακρίνονται σε μικροσκόπια φωτεινού πεδίου, αντίθεσης φάσεως, μικροσκόπια σκοτεινού πεδίου, πολωτικά μικροσκόπια, μικροσκόπια αντίθεσης διαφορικής συμβολής, μικροσκόπια φθορισμού και άλλα [1-2].

### 1.1.2.2. Τα μέρη του οπτικού μικροσκοπίου



Εικόνα 33. Σχηματική απεικόνιση οπτικού μικροσκοπίου [1]

1. προσοφθάλμιοι φακοί,
2. διοφθάλμιος οπτικός σωλήνας
3. βραχίονας (ή λαβή) του μικροσκοπίου
4. κοχλίας οριζόντιας μετακίνησης της αντικειμενοφόρου πλάκας
5. κοχλίας μακρομετρικής κίνησης της τράπεζας μικροσκόπησης (μακρομετρικός κοχλίας)
6. κοχλίας μικρομετρικής κίνησης της τράπεζας μικροσκόπησης (μικρομετρικός κοχλίας)
7. κοχλίας κάθετης μετακίνησης της αντικειμενοφόρου πλάκας
8. διακόπτης φωτός
9. κοχλίας ρύθμισης της έντασης του φωτός,
10. βάση του μικροσκοπίου
11. φωτεινή πηγή



12. συμπυκνωτής - διάφραγμα ίριδας
13. αντικειμενοφόρος πλάκα
14. τράπεζα μικροσκόπησης,
15. άγκιστρο του οδηγητή παρασκευασμάτων
16. αντικειμενικός φακός
17. δίσκος περιστροφής των αντικειμενικών φακών (περίστρεπτο σύστημα) [1]

### **I.1.2.3. Χρήση Οπτικού Μικροσκοπίου**

Η καλή μικροσκόπηση εξαρτάται από:

- την διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου

Η διακριτική ικανότητα είναι η «ικανότητα» του μικροσκοπίου να δείχνει δύο πολύ κοντινά σημεία ως δύο καθαρά ξεχωριστά σημεία.

- την μεγέθυνση του μικροσκοπίου

Η μεγέθυνση δείχνει πόσες φορές μπορεί το μικροσκόπιο να μεγεθύνει το είδωλο του αντικειμένου.

- την αντίθεση ανάμεσα στα μέρη του αντικειμένου

Τα μέρη του αντικειμένου γίνονται διακριτά (και επομένως ορατά), όταν υπάρχει επαρκής αντίθεση μεταξύ τους. Σε περίπτωση που οι βιολογικές δομές είναι πολύ διαφανείς, η αντίθεση ενισχύεται με την χρήση χρωστικών.

Στον οπτικό σωλήνα προσαρμόζεται το σύστημα των φακών, των προσοφθάλμιων και των αντικειμενικών. Η εναλλαγή των αντικειμενικών φακών εξασφαλίζεται με τον χειρισμό του περίστρεπτου συστήματος. Η μεγέθυνση που επιτυγχάνουν οι φακοί κυμαίνεται μεταξύ 6x και 25x για τους προσοφθάλμιους και 2,5x έως 100x για τους αντικειμενικούς. Κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση, η τελική μεγέθυνση του αντικειμένου παρατήρησης ισούται με το γινόμενο των μεγεθύνσεων που εξασφαλίζουν ο αντικειμενικός και ο προσοφθάλμιος φακός.

Η μεγέθυνση ενός οπτικού μικροσκοπίου δίνεται από τον τύπο :

$$M = m_1 \cdot m_2 \quad (14)$$

όπου  $m_1$  και  $m_2$  είναι οι εγκάρσιες μεγεθύνσεις των δύο φακών, δηλαδή του προσοφθάλμιου και του αντικειμενικού. Οι μεγεθύνσεις  $m_1$  και  $m_2$  αναγράφονται από τον κατασκευαστή στα αντίστοιχα στοιχεία του μικροσκοπίου και με κατάλληλο συνδυασμό επιτυγχάνεται η επιθυμητή ολική μεγέθυνση.

Η μέγιστη χρήσιμη μεγέθυνση, όπως αναφέρθηκε, είναι συνάρτηση της διακριτικής ικανότητας του οργάνου που ορίζεται ως η ικανότητά του να διακρίνει δύο σημειακές φωτεινές πηγές που βρίσκονται πολύ κοντά η μία με την άλλη.

Η διακριτική ικανότητα ( $d$ ) ενός οπτικού συστήματος δίνεται από τον τύπο:

$$d = 0.61 \frac{\lambda}{n \sin a} \quad (15)$$

όπου  $d$  είναι η διακριτική ικανότητα, 0.61 ένας σταθερός αριθμός,  $\lambda$  το μήκος κύματος του φωτός (ή της ακτινοβολίας) που επιλέγεται,  $n$  ο δείκτης διάθλασης του μέσου μεταξύ παρασκευάσματος και φακού και το  $a$  το μισό της γωνίας του φωτεινού κώνου που δέχεται ο φακός.

Το αντικείμενο της μικροσκοπικής παρατήρησης, παρασκεύασμα, τοποθετείται σε μία μικρή γυάλινη πλάκα, την αντικειμενοφόρο πλάκα, πάχους 1mm περίπου (εικ. 19). Το παρασκεύασμα καλύπτεται από ένα διάφανο, λεπτό και επίπεδο πλακίδιο (μήκους 18-22mm και πάχους 0,15-0,22mm συνήθως), την καλυπτρίδα. Το σχήμα της είναι συνήθως τετράγωνο και η χρήση της συμβάλλει στην ομοιόμορφη κατανομή του αντικειμένου παρατήρησης στην αντικειμενοφόρο πλάκα, στην επίτευξη μεγαλύτερης ευκρίνειας κατά την παρατήρηση και στην προστασία των αντικειμενικών φακών του μικροσκοπίου από το περιεχόμενο του μικροσκοπικού παρασκευάσματος.

Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετείται στην τράπεζα μικροσκόπησης και συγκρατείται με το άγκιστρο του οδηγητή. Η μετακίνησή της στους άξονες  $x$  και  $y$  επιτυγχάνεται με την περιστροφή δύο κοχλίων προσαρμοσμένων στην τράπεζα του μικροσκοπίου (κοχλίες οριζόντιας και κάθετης μετακίνησης της αντικειμενοφόρου πλάκας).

Η παρατήρηση των μικροσκοπικών παρασκευασμάτων πραγματοποιείται είτε άμεσα είτε μετά από την επεξεργασία τους με κατάλληλες ουσίες (π.χ. φορμόλη), που εξασφαλίζουν τη διατήρηση του παρασκευάσματος για μεγάλο χρονικό διάστημα (προσωρινά και μόνιμα παρασκευάσματα αντίστοιχα).

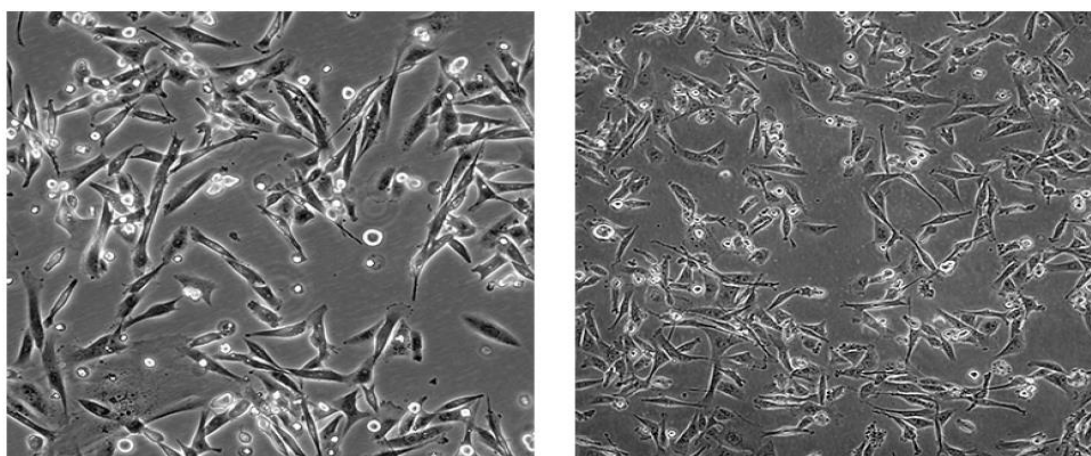
Μικροσκοπικά παρασκευάσματα που προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς περιέχουν νερό σε μεγάλο ποσοστό, χαρακτηριστικό που τα καθιστά δυσδιάκριτα κατά την παρατήρησή τους. Για τη βελτίωση της ευκρίνειάς τους, εφαρμόζονται κατάλληλες τεχνικές χρώσεις, μέσω των οποίων μπορεί να επιτευχθεί ο ομοιόμορφος χρωματισμός του παρασκευάσματος ή και η επιλεκτική χρώση συγκεκριμένων τμημάτων του [70-71].

### **I.1.3. Καλλιέργεια Κυττάρων και συντήρηση κυττάρων**

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε η καρκινική κυτταρική σειρά, που προέρχεται από επιθηλιακά κύτταρα μαστού και είναι έντονα μεταστατική: MDA-MB-468, της εταιρίας ATCC.

Η σειρά MDA-MB-468 απομονώθηκε το 1977 από την ομάδα του R. Cailleau, με πλευριτική συλλογή, από έγχρωμη γυναίκα 51 ετών, που είχε διαγνωστεί για μεταστατικό αδenoκαρκίνωμα μαστού.

Η ανάπτυξη της καλλιέργειας είναι συμπαγής μονόστοιβη με πολλές διακυτταρικές συνδέσεις. *In vitro* τα MDA-MB-468 κύτταρα (Εικόνα 34). εμφανίζουν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού και επιπροσθέτως παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα σχηματισμού αποικίας, αυξημένη συγκολλητική ικανότητα μεταξύ τους, για σχηματισμό ταπητίου και έντονη διήθηση.



**Εικόνα 34. Αποψη των κυττάρων MDA-MB-468 από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο: α) 36 ώρες μετά την ανακαλλιέργεια και β) 36 ώρες πριν τη νέα ανακαλλιέργεια.**

Τα κύτταρα φυλάσσονται σε κατάσταση βαθιάς κατάψυξης, σε ειδικά δοχεία υγρού αζώτου της THERMO FISHER SCIENTIFIC (Rockford, Illinois USA), στους  $-196^{\circ}\text{C}$ . Σε αυτή τη θερμοκρασία, κάθε βιολογική διαδικασία, ακόμη και αυτές που θα οδηγούσαν υπό φυσιολογικές συνθήκες, στον κυτταρικό θάνατο, σταματά, επί της ουσίας.

Κατά την απόψυξη των κυττάρων απαιτείται απότομο πέρασμα των κυττάρων από τη χαμηλή θερμοκρασία στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Για το λόγο αυτό όταν τα φιαλίδια ανασύρονται από το υγρό άζωτο, επωάζονται στους  $37^{\circ}\text{C}$  σε υδατόλουτρο της εταιρείας HETOFRIG CB60VS (Germany) και το περιεχόμενό τους μεταφέρεται γρήγορα σε σωλήνες που περιέχουν πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο έχει επίσης εξισορροπηθεί σε θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια φυγοκεντρώνεται στους 1200 rpm για 10 λεπτά, με στόχο την απομάκρυνση του DMSO (κρυοπροστατευτικής ουσίας, διμέθυλο – σουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide)). Έπειτα, τα κύτταρα αναδιαλύονται σε νέο θρεπτικό υλικό σε τριβλία καλλιέργειας και μεταφέρονται στον ειδικό επωαστήρα.

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τριβλία καλλιέργειας, σε θερμοκρασία  $37^{\circ}\text{C}$  σε ειδικό επωαστήρα (Incubator Thermo Forma, Series II water jacketed,  $\text{CO}_2$  Incubator, HEPA filter), σε περιβάλλον με περιεκτικότητα σε  $\text{CO}_2$  5% και 100% υγρασία. Η θερμοκρασία των  $37^{\circ}\text{C}$  είναι απαραίτητη για την επιτάχυνση των κυττάρων στον κυτταρικό τους κύκλο και το  $\text{CO}_2$  απαιτείται για τη διατήρηση του pH μεταξύ 6,8 και 7,2 (ουδέτερο pH), έτσι ώστε να είναι εφικτή η ανάπτυξη των κυττάρων. Αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό μέσο βάσης Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM), με προσθήκη 10% θερμικά αδρανικοποιημένου βόειου ορού (FBS, Fetal Bovine Serum), 2 mM L-γλουταμίνη (L-Glutamine), 1 mM πυροσταφυλικό νάτριο (Sodium Pyruvate), 100 Units/ml πενικιλίνη (penicillin), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  στρεπτομυκίνη (streptomycin). Το FBS παρέχει τους απαραίτητους για τα κύτταρα αυξητικούς παράγοντες. Τα αντιβιοτικά δρουν ανασταλτικά στις τυχόν μολύνσεις, ενώ το αμινοξύ L-γλουταμίνη δρα σαν βοηθητικός παράγοντας στον αναδιπλασιασμό του DNA κατά τη φάση της σύνθεσης (S). Για τη συντήρηση της καλλιέργειας, τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται, κατά μέσο όρο, μία φορά την εβδομάδα.

### ***Θρυψινοποίηση (Split)***

Όταν το τριβλίο με τα κύτταρα είναι κατά 75% γεμάτο (75% confluent), τότε η καλλιέργεια θεωρείται έτοιμη για την πραγματοποίηση της θρυψινοποίησης. Κατά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης, η θρυψίνη επιδρά πρωτεολύοντας πρωτεΐνες που

συμμετέχουν στην προσκόλληση των κυττάρων τόσο στην επιφάνεια της φλάσκας ή του τριβλίου, όσο και σε γειτονικά τους κύτταρα. Αυτό είναι αναγκαίο σε περιπτώσεις κορεσμού (κάλυψης της επιφάνειας της φλάσκας κατά 80-90%), σε περιπτώσεις πολλών και μεγάλων συσσωματωμάτων αλλά και πριν από τους περισσότερους χειρισμούς που απαιτείται η χρήση ή η μεταφορά κυττάρων. Στόχος της θρυψινοποίησης για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία είναι η μεταφορά των κυττάρων σε άλλο τριβλίο μεγαλύτερου μεγέθους. Η κάθε θρυψινοποίηση αντιστοιχεί σε ένα πέρασμα (passage).

Σε πρώτο στάδιο αφαιρείται με αναρρόφηση με σιφόνιο το θρεπτικό υλικό καθώς ο ορός που περιέχεται σε αυτό αποτρέπει τη δράση της θρυψίνης. Ακολουθεί πλύση με 3 mL PBS, αναρρόφηση και απομάκρυνσή τους. Το PBS (Phosphate-buffered saline) είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται συνήθως στη βιολογική έρευνα. Πρόκειται για ένα διάλυμα άλατος με βάση το νερό που περιέχει όξινο φωσφορικό νάτριο, χλωριούχο νάτριο και, σε μερικές συνθέσεις, χλωριούχο κάλιο και δισόξινο φωσφορικό κάλιο. Το buffer διατηρεί σταθερό pH. Η οσμωτικότητα και η συγκέντρωση ιόντων των διαλυμάτων ταιριάζουν με εκείνες του ανθρώπινου σώματος (ισοτονική).

Στη συνέχεια τοποθετείται 1 mL θρυψίνη. Η φλάσκα κλείνει και με ήπιες κινήσεις, επιδιώκεται όλα τα κύτταρα να διαβρέχονται από θρυψίνη. Η φλάσκα άμεσα τοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο για 1-2 λεπτά. Μετά το πέρας (συνήθως του πρώτου λεπτού), εξετάζονται τα κύτταρα στο μικροσκόπιο: ιδανικό είναι όλα τα κύτταρα να επιπλέουν, έχοντας πλέον στρογγυλό σχήμα. Αν αυτό δεν συμβαίνει, προτείνεται εκ νέου ανακίνηση της φλάσκας με κινήσεις αριστερά δεξιά υπό γωνία και ξανά παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο ή επανατοποθέτηση για μισό λεπτό και πάλι στον κλίβανο. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στον χρόνο έκθεσης των κυττάρων στη θρυψίνη, γιατί η παρατεταμένη πρωτεόλυση των μεμβρανικών πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε κυτταροτοξική δράση. Κατόπιν, τοποθετείται η φλάσκα σε όρθια θέση στο hood και προστίθενται σε αυτή 10 ml θρεπτικού μέσου, τα οποία και σταματούν τη δράση της θρυψίνης. Έπειτα, όλο το περιεχόμενο της φλάσκας μεταφέρεται σε σωλήνα (falcon tube) των 15ml και φυγοκεντρείται (5min 1000rpm, 20-25 °C). Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται περαιτέρω ή επανατοποθετούνται στη φλάσκα ανάπτυξης, η οποία συμπληρώνεται έπειτα με θρεπτικό υλικό.

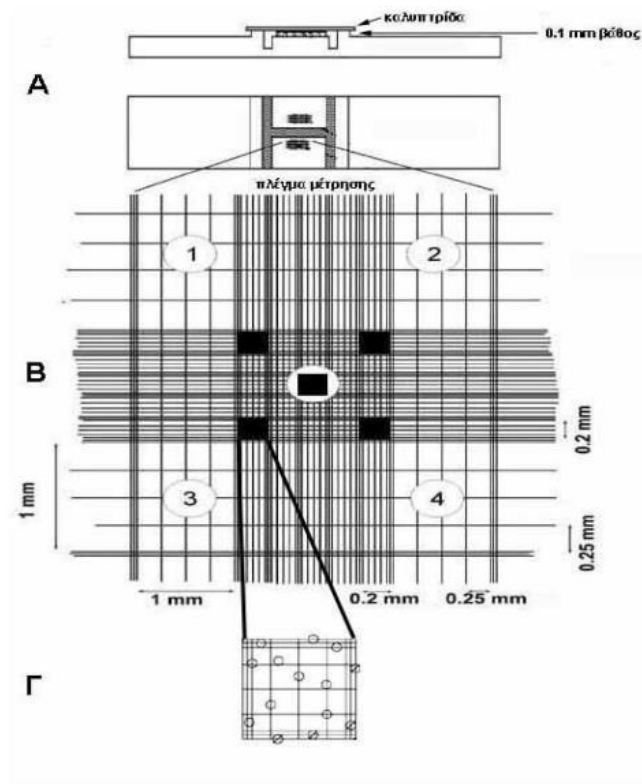
Η διαδικασία της θρυψινοποίησης επαναλαμβάνεται σε πυκνότητα κυττάρων, ανάλογη με τις πειραματικές απαιτήσεις που προκύπτουν από τον εβδομαδιαίο σχεδιασμό πειραμάτων.

#### **I.1.4. Μέτρηση Κυττάρων**

Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων ενός πληθυσμού, καθώς και ο έλεγχος της βιωσιμότητάς τους, χρησιμοποιείται ευρύτατα, σε ποικίλα πεδία επιστημονικά πεδία, όπως στην ανάπτυξη και διατήρηση κυτταροκαλλιιεργιών, σε αναλύσεις αίματος, σε μετρήσεις για προσδιορισμό κυτταρικής αύξησης, στην επίδραση διαφόρων φυσικών, χημικών και βιολογικών παραγόντων στις κυτταρικές λειτουργίες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται ειδικές αντικειμενοφόρες πλάκες, τα αιμοκυτταρόμετρα (haemocytometers), στις οποίες είναι δυνατή η μέτρηση κυττάρων όπως αιμοσφαιρίων, ζύμης και άλλων που βρίσκονται σε εναιώρημα. Έτσι, μετράται ο αριθμός των κυττάρων σε ένα μικρό δείγμα, και έπειτα ανάγεται στο συνολικό όγκο του εναιωρήματος.

##### **I.1.4.1. Μέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο**

Τα διάφορα αιμοκυτταρόμετρα περιέχουν ένα ή δύο πλέγματα μέτρησης κυττάρων (εικ. 34A). Κάθε πλέγμα υποδιαιρείται σε 9 μεγάλα τετράγωνα με πλευρά μήκους 1 mm (εικ. 34B). Τα μεγάλα γωνιακά εξωτερικά τετράγωνα υποδιαιρούνται σε 16 μικρότερα τετράγωνα των οποίων η κάθε πλευρά έχει μήκος 0,25 mm. Το μεγάλο κεντρικό τετράγωνο υποδιαιρείται σε 25 μικρά τετράγωνα καθένα από τα οποία έχει μήκος 0,20 mm. Τέλος κάθε ένα από τα 25 μικρότερα τετράγωνα υποδιαιρείται σε 16 ακόμα μικρότερα τετράγωνα (εικ. 34Γ). Το κεντρικό δηλαδή τετράγωνο αποτελείται από  $16 \times 25 = 400$  πολύ μικρά τετράγωνα κάθε ένα από τα οποία έχει πλευρά μήκους 0,05 mm. Τέλος το επίπεδο κάθε πλέγματος είναι 0,1 mm χαμηλότερα από το επίπεδο στήριξης 42 της καλυπτρίδας (εικ. 34A). Επομένως μεταξύ πλέγματος και καλυπτρίδας δημιουργείται ένας χώρος, ύψους 0,1 mm, στον οποίο εισέρχεται το εναιώρημα των κυττάρων. Στα 4 μεγάλα ακραία τετράγωνα γίνεται η μέτρηση των κυττάρων.



Εικόνα 35. Αιμοκυτταρόμετρο. Α. Πλάγια όψη και κάτοψη τυπικού αιμοκυτταρόμετρου, που φέρει δύο πλέγματα μέτρησης. Β. Μεγεθυμένη άποψη του πλέγματος μέτρησης. Γ. Μεγεθυμένο μικρό τετράγωνο. Από τα κύτταρα που εφάπτονται στη περίμετρο, μετρούμε μόνον εκείνα που υπάρχουν στην επάνω και στην αριστερή πλευρά του τετραγώνου

Στη συγκεκριμένη εργασία η καταμέτρηση των κυττάρων έγινε με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου και πλάκας Neubauer, σε μικροσκόπιο OLYMPUS IM. Συγκεκριμένα, λαμβάνονται 10  $\mu\text{l}$  κυτταρικού ελαιωρήματος και τοποθετούνται στην ειδική εγκοπή της πλάκας Neubauer, αφού πρώτα σκεπαστεί με ειδική καλυπτρίδα. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται στα 4 γωνιακά τετράγωνα (που περιλαμβάνουν 16 μικρότερα τετράγωνα το καθένα) της πλάκας. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές, με αποτέλεσμα να έχουμε συνολικά 8 μετρήσεις από τα γωνιακά τετράγωνα. Από αυτές τις μετρήσεις προκύπτει μία μέση τιμή. Ο αριθμός των κυττάρων προκύπτει από την εξίσωση 16:

$$\text{Αριθμός κυττάρων} = \text{Μέση τιμή κυττάρων (από τις 8 μετρήσεις)} \cdot \lambda \cdot 10^4 \quad (16)$$

Ο συντελεστής διόρθωσης  $10^4$  αφορά τον όγκο που συγκρατείται σε κάθε ένα από τα τετράγωνα, κι έχει υπολογιστεί σε  $10^{-4}$  ml και 1/λ είναι η αραιώση του δείγματος. Στην περίπτωση που δεν έχει γίνει, θεωρείται ίσος με τη μονάδα.

### **I.1.5. Χορήγηση δείγματος στην Καλλιέργεια Κυττάρων**

Για τις ανάγκες των πειραμάτων, μετά τη θρυψινοποίηση εκτιμήθηκε ο αριθμός των κυττάρων και χρησιμοποιήθηκαν πλάκες 6 φρεατίων (6-well plates), με συγκέντρωση περίπου 100.000 κυττάρων, ανά φρεάτιο.

Τα κύτταρα παρατηρούνται για 5 μέρες μετά την προσθήκη του Ag/N/TiO<sub>2</sub>. Σε κάθε ημέρα αντιστοιχούν 2 πλάκες των 6 φρεατίων, με τη μόνη διαφορά ότι η μία πλάκα υφίσταται 20 λεπτά ακτινοβολήσης σε ορατό φως. Σε κάθε πλάκα σε 1 φρεάτιο από τα 6 δεν χορηγείται εναιώρημα του δείγματος (αρνητικός μάρτυρας του πειράματος / negative control), ενώ στα υπόλοιπα 5 χορηγούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων χρησιμοποιείται ο νόμος της αραιώσης ενώ λαμβάνονται υπόψη τα παρακάτω:

- Μέγιστος τελικός όγκος: 2.5 mL.
- Μέγιστος προστιθέμενος όγκος για να μην αραιωθεί σημαντικά το θρεπτικό υλικό: 100 μl.

Η εκτίμηση των επιθυμητών κατά προσέγγιση συγκεντρώσεων έγινε βάσει των προηγούμενων βιβλιογραφικών εργασιών.

Επιλέχθηκαν και χορηγήθηκαν οι παρακάτω συγκεντρώσεις:

$$20\frac{mg}{ml}, 2\frac{mg}{ml}, 0,2\frac{mg}{ml}, 0,1\frac{mg}{ml} \text{ και } 0,05\frac{mg}{ml}.$$

Οι καλλιέργειες επώαστηκαν για 24 ώρες.

### **I.1.6. Έλεγχος κυτταρικής βιωσιμότητας μέσω αποκλεισμού Κυανού Τρυπάνης**

Η δοκιμή αποκλεισμού χρωστικών ουσιών χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων που υπάρχουν σε ένα κυτταρικό εναιώρημα (συσσωμάτωμα 5-1000 κυττάρων). Βασίζεται στην αρχή ότι τα ζωντανά κύτταρα διαθέτουν ανέπαφες κυτταρικές μεμβράνες που αποκλείουν ορισμένες χρωστικές ουσίες, όπως μπλε τρυπάνης, ηωσίνη ή προπίδιο.



Σε αυτή τη δοκιμή, ένα κυτταρικό εναιώρημα αναμειγνύεται απλά με χρωστική Κυανού Τρυπάνης (Trypan Blue) (Εικόνα 35) και στη συνέχεια εξετάζεται οπτικά με σκοπό να προσδιοριστεί αν τα κύτταρα απορροφούν ή αποκλείουν τη βαφή. Στο πρωτόκολλο που παρουσιάζεται εδώ, πρακτικά, κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση, ένα βιώσιμο κύτταρο θα έχει ένα διαυγές κυτταρόπλασμα, ενώ ένα μη βιώσιμο κύτταρο θα έχει ένα κυτταρόπλασμα κυανό.



**Εικόνα 36. Φιάλη με χρωστική μπλε τρυπάνης**

Για τη δοκιμή βιωσιμότητας απαιτείται 0,4% μπλε τρυπάνης (αποθηκεύεται σε σκοτεινή φιάλη). Ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

1. Φυγοκέντρηση ενός κλάσματος κυτταρικού εναιωρήματος που ελέγχεται για βιωσιμότητα 5 λεπτά στις 1200 στροφές/λεπτό και απόρριψη του υπερκείμενου υγρού.

Το μέγεθος του κλάσματος εξαρτάται από τον κατά προσέγγιση αριθμό των κυττάρων που υπάρχουν. Το κλάσμα θα πρέπει να περιέχει έναν κατάλληλο αριθμό κυττάρων για να μετρηθεί σε αιμοκυτταρόμετρο μετά την αραιώσή του με 1 mL PBS και την ανάμιξη του με 0.4% μπλε τρυπανίου.

2. Αναδιάλυση του σφαιριδίου των κυττάρων σε 1 ml PBS ή πλήρες μέσο χωρίς ορό. Οι πρωτεΐνες του ορού κηλιδώνονται με κυανό του τρυπανίου και μπορούν να παράγουν παραπλανητικά αποτελέσματα, επομένως, οι προσδιορισμοί πρέπει να γίνονται σε διάλυμα χωρίς ορό. Στη σειρά των πειραμάτων μας επιλέχθηκε η αναδιάλυση του κυτταρικού εναιωρήματος να γίνεται με PBS.

3. Ανάμιξη 1:1 του 0,4% μπλε της τρυπάνης με το κλάσμα του κυτταρικού εναιωρήματος (αραίωση κυττάρων), και επώαση μίγματος για περίπου 3 λεπτά σε

θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα πρέπει να μετρώνται εντός 3 έως 5 λεπτών από την ανάμιξη με κυανό του τρυπανίου, καθώς οι μεγαλύτερες περιόδους επώασης θα είναι μεγαλύτερη οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο και σε μειωμένους αριθμούς βιωσιμότητας.

Η ανάμιξη μπορεί να πραγματοποιηθεί σε εγκοπή μιας πλάκας μικροτιτλοδότησης ή εντός μικρού πλαστικού σωλήνα (Eppendorf) χρησιμοποιώντας 10 έως 20 μl του κυτταρικού εναιωρήματος και του κυανού της τρυπάνης.

4. Εφαρμογή μιας σταγόνας του μείγματος κυανού τρυπανίου - κυττάρων σε ένα αιματοκυτταρόμετρο, το οποίο τοποθετείται κάτω από διοφθαλμικό μικροσκόπιο.

5. Καταμέτρηση των βιώσιμων (μη χρωματισμένων) και βιώσιμων (χρωματισμένων) κυττάρων, χωριστά στο αιμοκυτταρόμετρο. Λόγω της αραίωσης, για να ληφθεί ο συνολικός αριθμός βιώσιμων κυττάρων ανά ml δείγματος, διπλασιάζεται το σύνολο των βιώσιμων κυττάρων.

6. Υπολογισμός του ποσοστού των βιώσιμων κυττάρων:

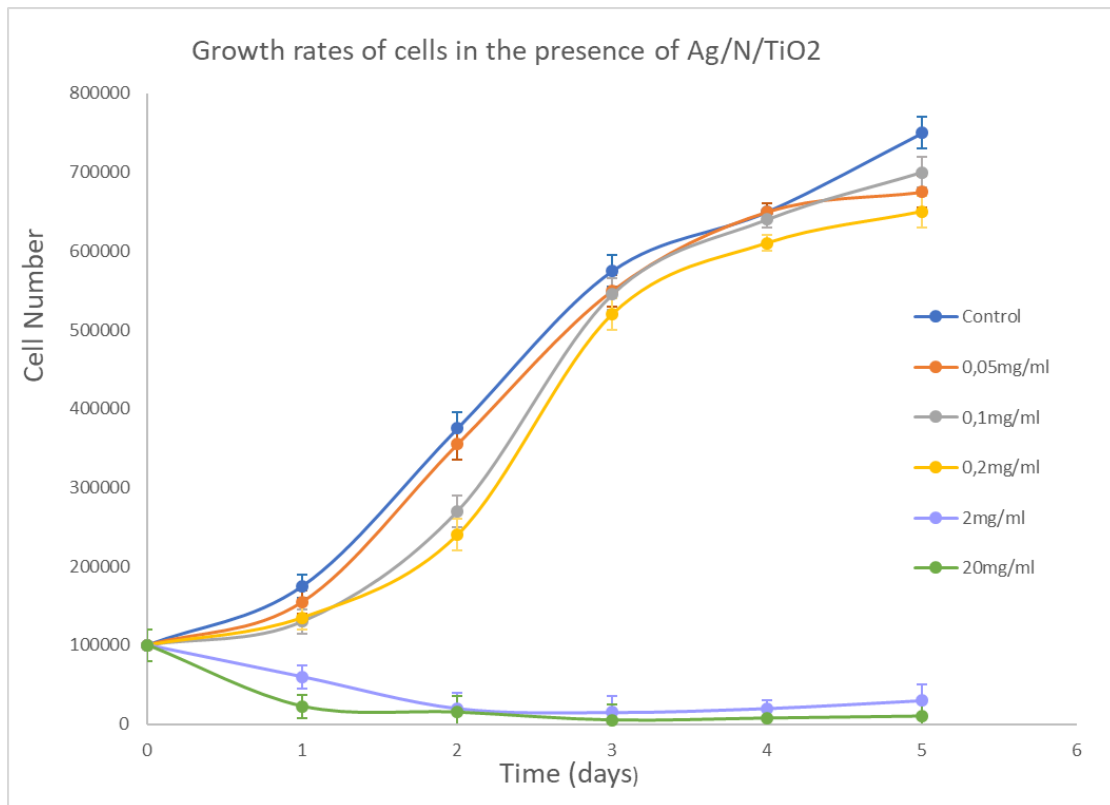
$$\text{Βιωσιμότητα \%} = \frac{\text{ολικός αριθμός αχρωμάτιστων κυττάρων}}{\text{ολικός αριθμός κυττάρων}} \times 100 \quad (17)$$

Η τεχνική μέτρησης της βιωσιμότητας των κυττάρων μέσω χρωστικής είναι μια απλή και γρήγορη μέθοδος, η οποία υπόκειται σε κάποια προβλήματα. Το πρώτο, αφορά στην υποκειμενικότητα της μεθόδου, καθώς εξαρτάται από τον παρατηρητή. Κατά δεύτερον, μια μη ακέραιη μεμβράνη δεν σημαίνει πάντα ένα νεκρό κύτταρο, αφού υπάρχει η πιθανότητα να καταφέρει να επιδιορθώσει την μεμβράνη. Επίσης, ένα νεκρό κύτταρο μπορεί να μην έχει ακόμη κατεστραμμένη μεμβράνη. Σε κάθε περίπτωση, οι αδυναμίες αυτές δεν ακυρώνουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου [72-73].

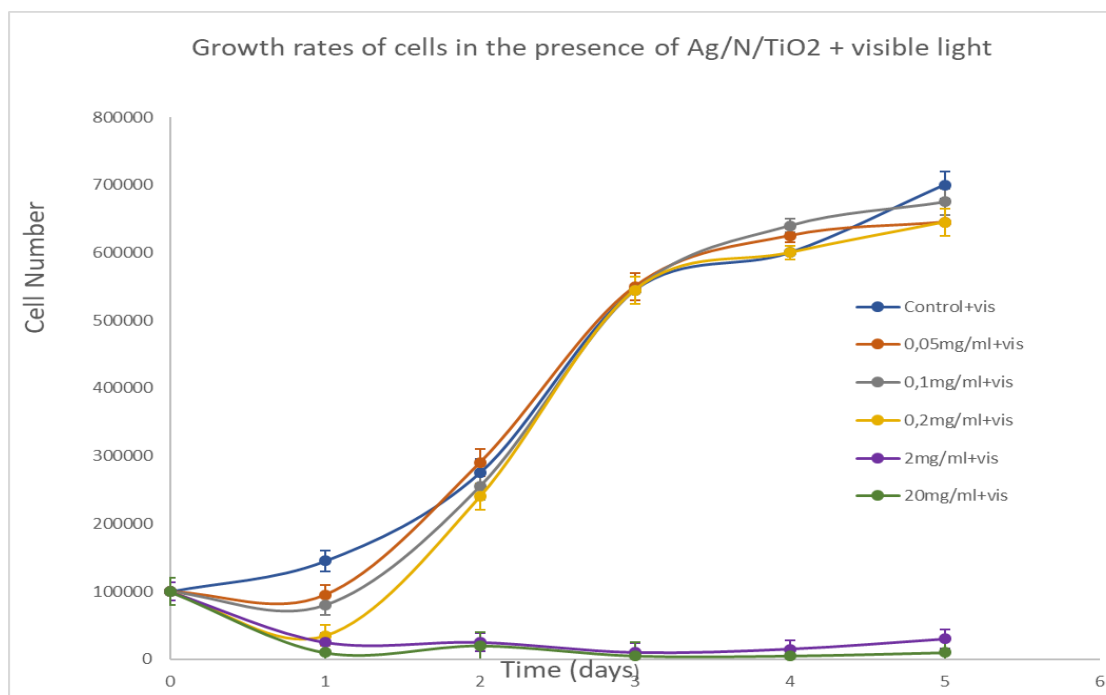
#### **I.1.6.1. Δημιουργία καμπύλης ανάπτυξης, με και χωρίς την προσθήκη Ag/N/TiO<sub>2</sub>**

Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις των κυττάρων σε διάστημα 6 ημερών με ή χωρίς την προσθήκη Ag/N/TiO<sub>2</sub> σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (διάγραμμα ...),

παρουσιάζονται ακολούθως με την μορφή καμπυλών ανάπτυξης και χωριστά για τα δείγματα που ακτινοβολήθηκαν με ορατή ακτινοβολία.

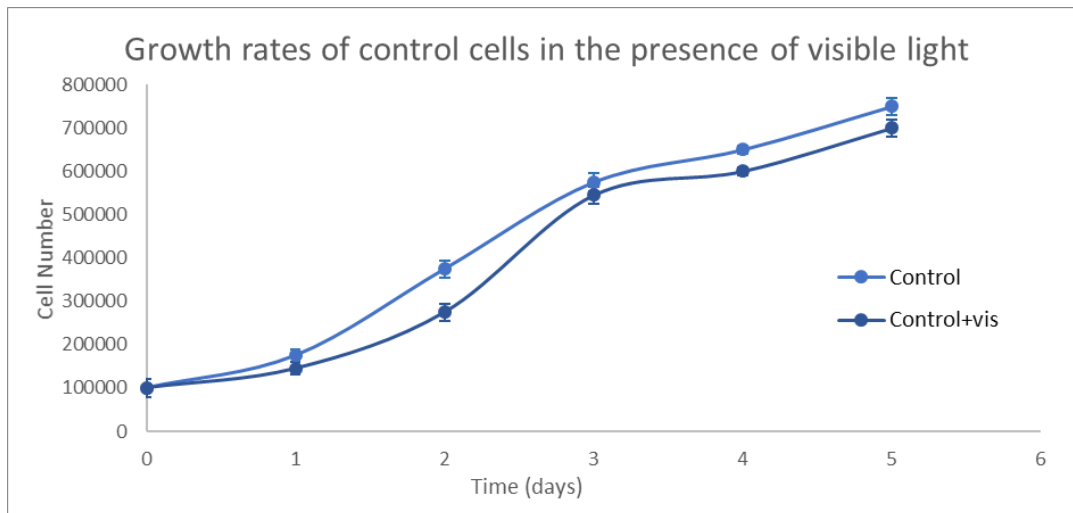


**Διάγραμμα 19.** Καμπύλες ανάπτυξης στα κύτταρα MDA-MB-468 παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης Ag/N/TiO<sub>2</sub>.



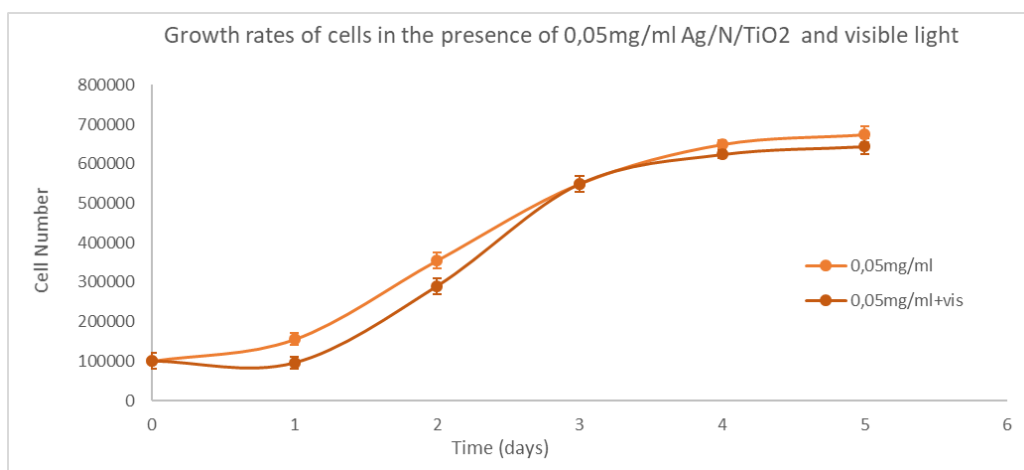
**Διάγραμμα 20.** Καμπύλες ανάπτυξης στα κύτταρα MDA-MB-468 παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης Ag/N/TiO<sub>2</sub> και μετά από φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία.

Είναι φανερό από τα διαγράμματα 19 και 20 ότι ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων χωρίς την προσθήκη του Ag/N/TiO<sub>2</sub> ακολουθεί μια σχεδόν εκθετική αύξηση, όπως είναι και το αναμενόμενο, με βάση τα θεωρητικά δεδομένα για την κυτταρική μίτωση. Μετά από την ακτινοβολία φαίνεται ελάχιστα να επηρεάζεται αυτός ο ρυθμός κυτταρικής αύξησης. Αυτή η ελάχιστη διαφορά μπορεί να αποδοθεί σε σφάλματα μέτρησης κατά την αρχική διαδικασία προσθήκης κυττάρων στα τριβλία, κατά τη διάρκεια της θρυψινοποίησης, μπορεί να χάθηκε ένας αριθμός κυττάρων, ή μπορεί να υπάρχει σφάλμα κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση. Επίσης, είναι πιθανό τα κύτταρα να υφίστανται στρες, αφού βρίσκονται, έστω και για αυτό το μικρό χρονικό διάστημα σε συνθήκες, διαφορετικές από αυτές του κλίβανου. Καλύτερη σύγκριση των δύο διαφορετικών συνθηκών, με και χωρίς ακτινοβολία, προσφέρει και το διάγραμμα 21.



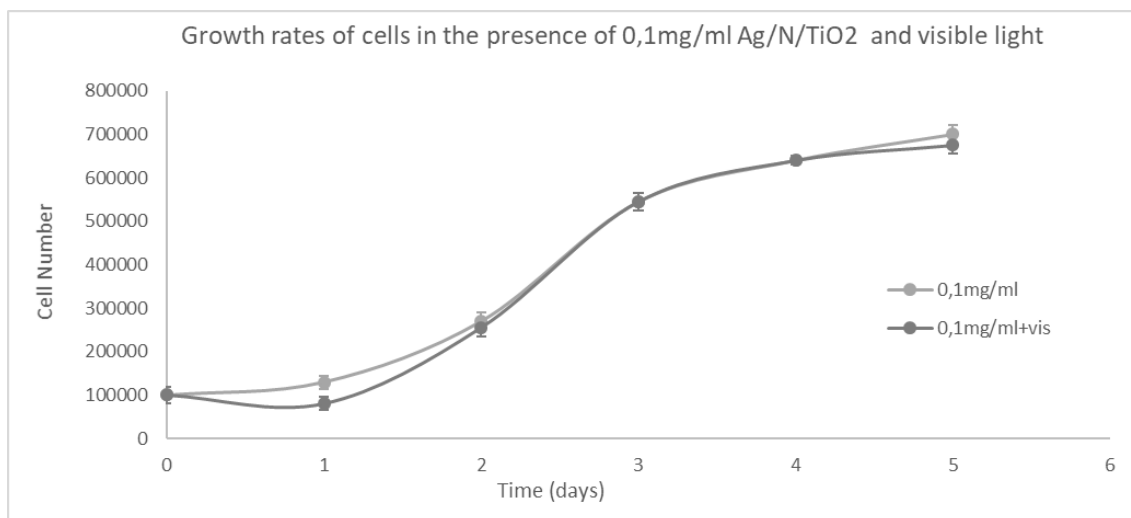
**Διάγραμμα 21.** Καμπύλες ανάπτυξης στα κύτταρα MDA-MB-468 με και χωρίς φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία.

Παρατηρούμε ότι παρουσία 0,05mg/ml Ag/N/TiO<sub>2</sub> υπάρχει μία πολύ μικρή μείωση του πληθυσμού των κυττάρων, που γίνεται λίγο σημαντικότερη μετά από φωτο-ενεργοποίηση κατά το πρώτο εικοσιτετράωρο. Ίσως να υπάρχει ένα αρχικό σοκ στα κύτταρα, που αναστέλλει σε ένα μικρό βαθμό τον πολλαπλασιασμό τους, που όμως τελικά φαίνεται να συνεχίζεται ομαλά, συγκριτικά με τα κύτταρα που δεν καλλιεργήθηκαν παρουσία Ag/N/TiO<sub>2</sub>. Αυτό δείχνει ότι οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί των κυττάρων τέθηκαν σε λειτουργία και στη συνέχεια επανήλθε η πρότερη φυσιολογική ανάπτυξη του κυτταρικού πληθυσμού. Αυτά φαίνονται λίγο καθαρότερα στο διάγραμμα 22.



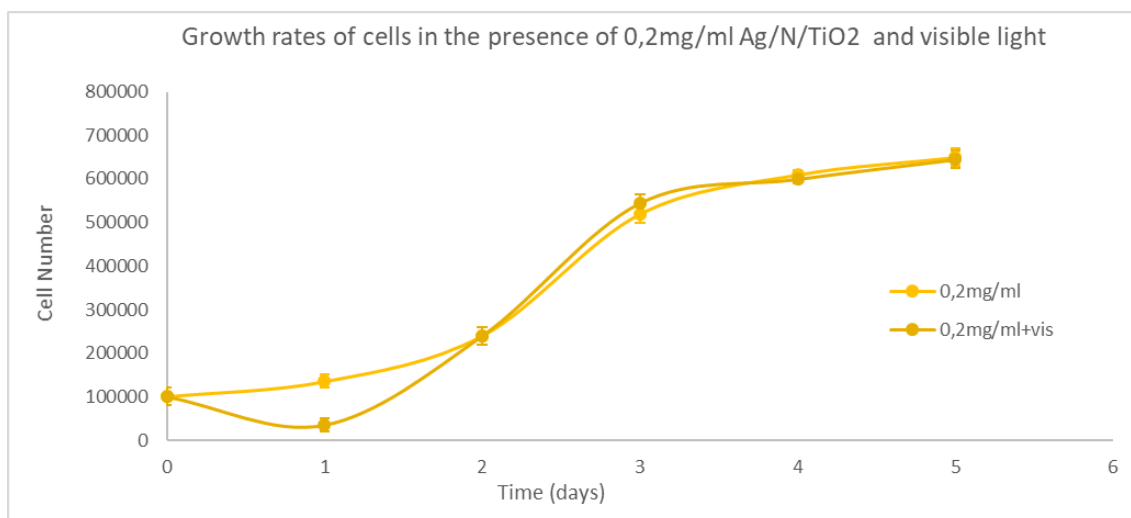
**Διάγραμμα 22.** Καμπύλες ανάπτυξης στα κύτταρα MDA-MB-468 παρουσία 0,05mg/ml Ag/N/TiO<sub>2</sub> με και χωρίς φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία.

Αντίστοιχες παρατηρήσεις προκύπτουν και για τη συγκέντρωση 0,1 mg/ml Ag/N/TiO<sub>2</sub>. Οι διαφορές είναι αισθητές σε σύγκριση με το δείγμα που καλλιεργήθηκε χωρίς Ag/N/TiO<sub>2</sub> αλλά είναι ανύπαρκτες μεταξύ του δείγματος που φωτο-ενεργοποιήθηκε και αυτού που δεν ακτινοβολήθηκε. Πιο καθαρά φαίνεται αυτή η παρατήρηση και στο διάγραμμα 23.



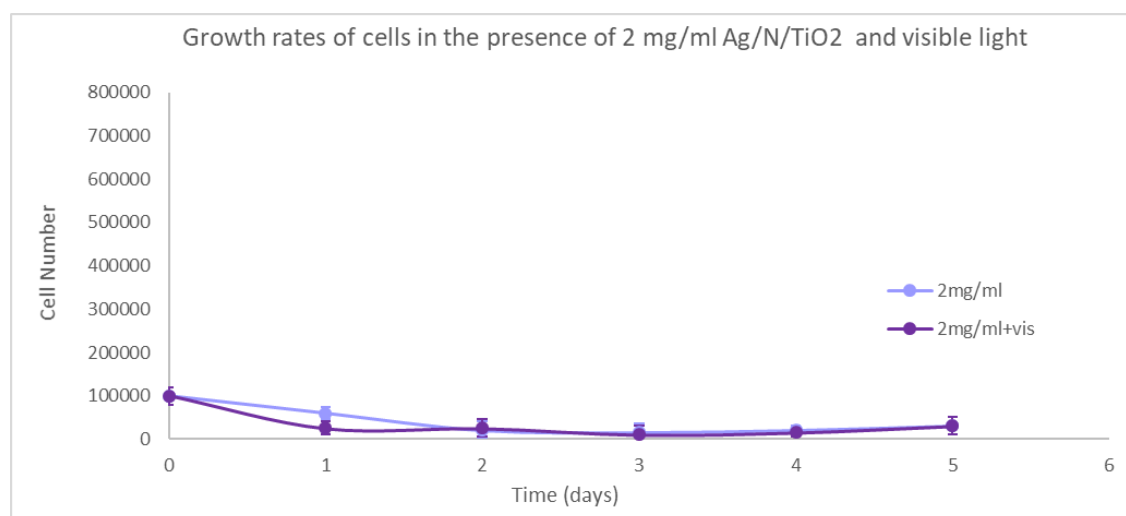
**Διάγραμμα 23.** Καμπύλες ανάπτυξης στα κύτταρα MDA-MB-468 παρουσία 0,1mg/ml Ag/N/TiO<sub>2</sub> με και χωρίς φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία.

Λίγο πιο σημαντική μείωση στον κυτταρικό πληθυσμό φαίνεται παρουσία 0,2 mg/ml Ag/N/TiO<sub>2</sub> τόσο με όσο και χωρίς φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία. Αντίστοιχα φαίνονται αυτές οι επισημάνσεις και στο διάγραμμα 24 .



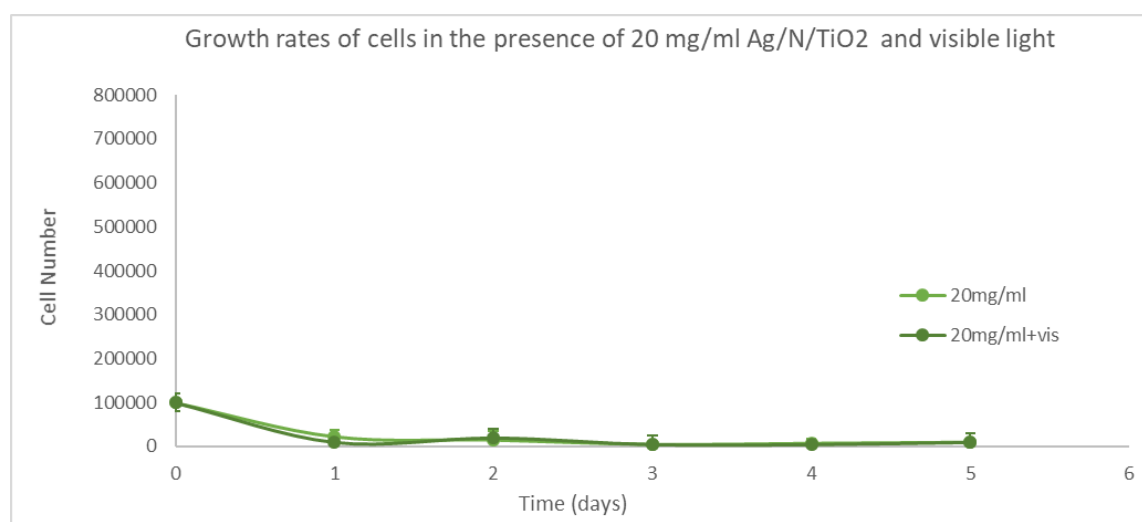
**Διάγραμμα 24.** Καμπύλες ανάπτυξης στα κύτταρα MDA-MB-468 παρουσία 0,2mg/ml Ag/N/TiO<sub>2</sub> με και χωρίς φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία.

Η δράση του Ag/N/TiO<sub>2</sub> σε συγκέντρωση 2mg/ml είναι ξεκάθαρα τοξική για τα κύτταρα και αυτό μάλιστα είναι το ίδιο έντονο πριν και μετά την φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία. Αυτό φαίνεται στο διάγραμμα 25.



**Διάγραμμα 25.** Καμπύλες ανάπτυξης στα κύτταρα MDA-MB-468 παρουσία 2mg/ml Ag/N/TiO<sub>2</sub> με και χωρίς φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία.

Τέλος, όπως είναι αναμενόμενο σε ακόμη μεγαλύτερη συγκέντρωση, όπως είναι αυτή των 20mg/ml Ag/N/TiO<sub>2</sub>, η δραστηριότητα του Ag/N/TiO<sub>2</sub> είναι επίσης έντονη, με αποτέλεσμα όλος σχεδόν ο κυτταρικός πληθυσμός να πεθάνει. Η διαφορά και πάλι δεν γίνεται σημαντικότερη μετά τη φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία (διάγραμμα 26).



**Διάγραμμα 26.** Καμπύλες ανάπτυξης στα κύτταρα MDA-MB-468 παρουσία 20 mg/ml Ag/N/TiO<sub>2</sub> με και χωρίς φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία.

Μπορούμε επομένως να διαπιστώσουμε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του Ag/N/TiO<sub>2</sub> παρατηρείται αύξηση της τοξικότητας που είτε οδηγεί σε θάνατο σημαντικό μέρος του κυτταρικού πληθυσμού είτε προκαλεί την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Δεν διαπιστώνουμε να είναι σημαντικότερη η επίδραση μετά τη φωτοενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία για 20 λεπτά. Αυτό μπορεί να ερμηνευτεί ποικιλοτρόπως. Είτε απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος ακτινοβολήσης, από αυτόν που επιλέχθηκε για αυτή τη σειρά πειραμάτων. Βέβαια αυτό δεν είναι απολύτως ενδεδειγμένο, αφού τα κύτταρα θα παραμείνουν για αρκετή ώρα εκτός του κλίβανου και των απολύτως ελεγχόμενων συνθηκών που είναι υποχρεωτικές για την ομαλή τους ανάπτυξη και αυτό θα τα φέρει σε κατάσταση στρες, ή θα τα εκθέσει σε μικροβιακό περιβάλλον με αβέβαια αποτελέσματα. Άλλη κάπως πιο τολμηρή ερμηνεία θα ήταν ότι το υλικό πιθανά να έχει ήδη φωτο-ενεργοποιηθεί ακούσια, παρά τα μέτρα που ελήφθησαν προκειμένου να εξασφαλιστούν οι συνθήκες σκότους, σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας, δηλαδή κατά τη σύνθεση, το χαρακτηρισμό, αλλά και τα πειράματα ελέγχου της κυτταροτοξικότητας.

#### **I.1.7. Μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων - MTT colorimetric assay**

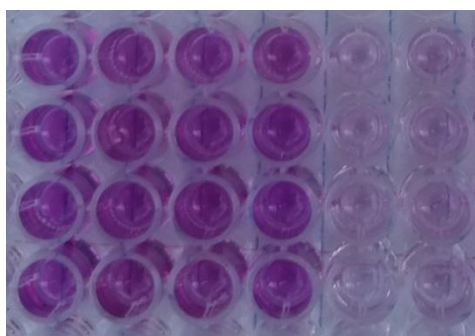
Η μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο MTT. Η μέθοδος MTT είναι μια χρωματομετρική μέθοδος (MTT colorimetric assay), που περιλαμβάνει την χρήση ενός άλατος, του (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του ποσοστού των ζωντανών κυττάρων σε κυτταρικό ελαιώρημα. Η μέθοδος παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεθόδους μέτρησης κυττάρων, μεταξύ των οποίων ο χρόνος έκβασής της. Δεν απαιτεί εκπλύσεις, δεν χρησιμοποιεί ραδιενεργά στοιχεία και οι μετρήσεις γίνονται εύκολα σε φασματοφωτόμετρο, για μεγάλο αριθμό δειγμάτων και με μεγάλη ακρίβεια.

Η μέθοδος MTT εκμεταλλεύεται τη μετατροπή των αλάτων τετραζολίου σε μη διαλυτά παράγωγα φορμαζάνης. Το κίτρινου χρώματος άλας τετραζολίου, MTT, οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσεις των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και παράγονται έγχρωμοι κρύσταλλοι φορμαζάνης (ιώδεις), οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου. Η οξείδωση του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης πραγματοποιείται μόνο στα βιώσιμα κύτταρα. Το έγχρωμο



προϊόν της αντίδρασης, η φορμαζάνη, είναι μερικώς διαλυτό στα θρεπτικά υγρά ή το νερό, οπότε διάλυση με αλκοολικό διάλυμα παράγει διάλυμα φορμαζάνης, έτοιμο προς μέτρηση. Το προϊόν της αντίδρασης διαλυτοποιείται με την προσθήκη (DMSO, dimethylsulphoxide) και το χρώμα που παράγεται υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά σε ELISA reader (στα 570 nm και στα 650 nm). Η ένταση του χρώματος είναι επομένως γραμμικά ανάλογη με την ποσότητα της φορμαζάνης και κατ' επέκταση γραμμικά ανάλογη με τη δραστικότητα των μιτοχονδριακών ενζύμων και κατά συνέπεια με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων και αντιστρόφως ανάλογη με την τοξικότητα του υλικού (εικόνα 37).

(α) (β) (γ) (δ) (ε) (στ)

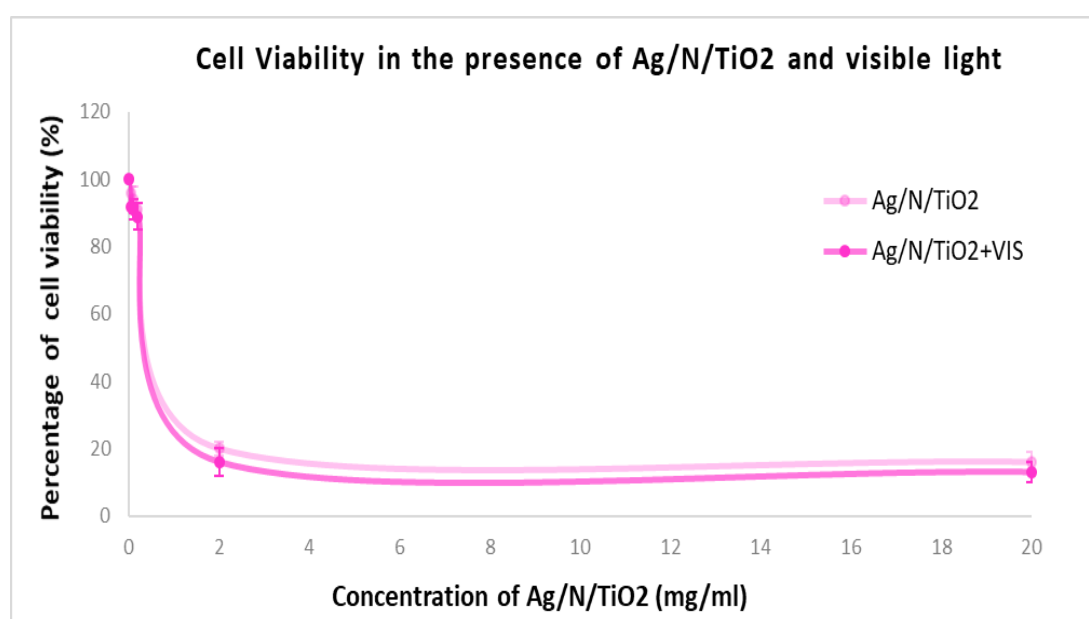


Εικόνα 37. Πλάκα 96 φρεατίων μετά από τη δοκιμή MTT. Από τα αριστερά προς τα δεξιά, κάθε στήλη με τετράδα όμοιων δειγμάτων: (α) αρνητικός μάρτυρας του πειράματος (control), (β) 0,05 mg/ml Ag/N/TiO<sub>2</sub>, (γ) 0,1 mg/ml Ag/N/TiO<sub>2</sub>, (δ) 0,2 mg/ml Ag/N/TiO<sub>2</sub>, (ε) 2 mg/ml Ag/N/TiO<sub>2</sub>, (στ) 20 mg/ml Ag/N/TiO<sub>2</sub>

Για τις ανάγκες της μελέτης της βιωσιμότητας των κυττάρων, διατηρείται καλλιέργεια σε πλάκες 96 φρεατίων (96-well plates) σε συγκέντρωση περίπου 10.000 κυττάρων ανά φρεάτιο, για 24 ώρες. Κατόπιν, στην πρώτη σειρά πειραμάτων προστίθεται εναιώρημα του δείγματος σε διάφορες συγκεντρώσεις και ακολουθεί ακτινοβόληση για 20 λεπτά σε φωτο-αντιδραστήρα ορατού φωτός. Μετά από επώαση 24 ωρών, απομακρύνεται το υπερκείμενο, και προστίθεται νέο θρεπτικό υλικό (100μl/well) και 10μl διαλύματος 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-terazolium bromide (MTT) solution σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS (phosphate buffer saline - PBS) (5 mg/ml), σε κάθε δείγμα και ακολουθεί επώαση για 3 ώρες στους 37°C. Μετά το πέρας αυτού του χρόνου, αφαιρούνται με προσοχή τα 110 μl θρεπτικού υλικού – διαλύματος MTT και συμπληρώνονται 100μl DMSO (dimethyl sulfoxide), σε κάθε φρεάτιο. Ακολουθεί ήπια ανάδευση των πλακών για 30 λεπτά σε αναδευτήρα Titertek Flow Laboratories). Στη συνέχεια γίνεται η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στα 570 nm, σε ELISA reader. Επίσης γίνεται μέτρηση και στα 650 nm,

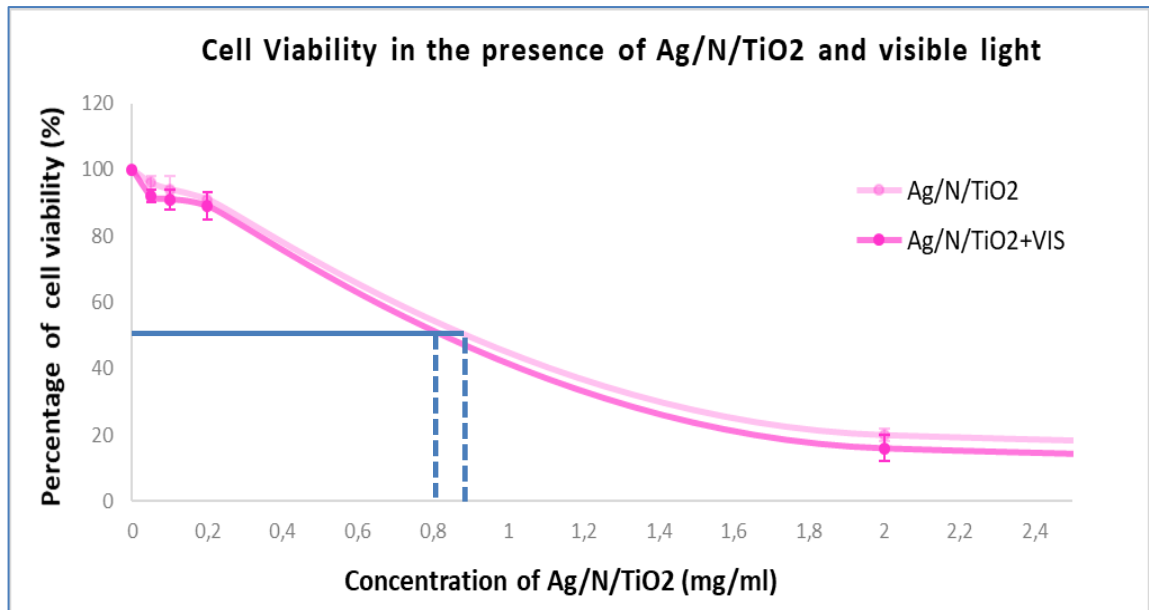
για την εκτίμηση του υπόβαθρου, αφού σε αυτό το μήκος κύματος δεν μπορεί να μετρηθεί η οπτική πυκνότητα του ιώδους παραγώγου. Το ποσοστό των κυττάρων που επιβίωσαν υπολογίζεται ως λόγος επί τοις εκατό, της οπτικής πυκνότητας του υπό μελέτη δείγματος, ως προς την οπτική πυκνότητα του δείγματος που θεωρείται ως αρνητικός μάρτυρας του πειράματος και εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό, σύμφωνα με τη σχέση: 
$$Cell\ Viability = \frac{O.D.treated}{O.D.untreated} \cdot 100\% \quad (18)$$

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο ακόλουθο διάγραμμα 27. Φαίνεται και πάλι, ότι πρακτικά δεν παρατηρείται διαφορά μετά τη φωτοενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία, πιθανά για λόγους προαναφέρθηκαν.



**Διάγραμμα 27.** Μελέτη βιωσιμότητας των κυττάρων MDA-MB-468, παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης Ag/N/TiO<sub>2</sub>, με και χωρίς φωτοενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία.

Προκειμένου να εξαχθούν κάποια ακόμη συμπεράσματα και εφόσον μετά τα 2mg/ml, η τοξικότητα είναι τόσο έντονη, ώστε έχει χαθεί το 80-90% του κυτταρικού πληθυσμού, περιορίζουμε τις εκτιμήσεις μας στην περιοχή, πριν τα 2mg/ml (διάγραμμα 28).



**Διάγραμμα 28.** Μελέτη βιωσιμότητας των κυττάρων MDA-MB-468, παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης Ag/N/TiO<sub>2</sub>, με και χωρίς φωτοενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία.

Παρατηρούμε ότι απαιτείται συγκέντρωση περίπου 0,85-0,9 mg/ml Ag/N/TiO<sub>2</sub> για να επιφέρει το θάνατο στο 50% του κυτταρικού πληθυσμού. Η συγκέντρωση αυτή είναι γνωστή ως LD50% (Lethal Dose<sub>50</sub>). Μετά τη φωτοενεργοποίηση είναι λίγο μικρότερη η δόση που προκαλεί το ίδιο αποτέλεσμα, δηλαδή 0,8 mg/ml.

## **K. Ανακεφαλαίωση – Συμπεράσματα**

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε προσπάθεια να αναπτυχθούν νανοσωματίδια διοξειδίου του τιτανίου με κάποια επιθυμητά χαρακτηριστικά. Τα χαρακτηριστικά αυτά σχετίζονται με το μέγεθος και τη δυνατότητα φωτο-ενεργοποίησης με ορατή ακτινοβολία. Έτσι επιλέχθηκε η διπλή τροποποίηση με άργυρο και άζωτο, που συγκεντρώνουν αυτά τα πλεονεκτήματα που επιδιώκονται. Έτσι επιλέχθηκε με προσοχή, μετά από διερεύνηση σύγχρονης βιβλιογραφίας, και μετά από δοκιμές σε διάφορα πρωτόκολλα, η κατάλληλη τεχνική σύνθεσης. Η σύνθεση έγινε με τη δέουσα προσοχή, τόσο ως προς τα μέτρα ασφαλείας, όσο ως προς τον προσεκτικό χειρισμό των συσκευών και την απαραίτητη προσοχή στους υπολογισμούς, στις δοσολογίες και σε κάθε βήμα. Ακολούθησε ο χαρακτηρισμός των παραγόμενων νανοσωματιδίων, με σκοπό να επαληθευτεί η επιτυχής σύνθεση του υλικού με τα απαιτούμενα χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), με σκοπό να επιβεβαιωθεί η χημική τροποποίηση με άργυρο και με άζωτο και να εκτιμηθεί η ομοιογένεια των δειγμάτων. Πράγματι, εντοπίστηκαν οι απαιτούμενες κορυφές, που αποδεικνύουν την ύπαρξη των συγκεκριμένων χημικών στοιχείων και σε γενικές γραμμές φαίνεται πως υπήρχε ικανοποιητική ομοιογένεια σε όλη την έκταση του υπό μελέτη δείγματος. Στη συνέχεια, έγινε εκτίμηση της κρυσταλλικής φάσης με τη εφαρμογή της *micro-Raman* φασματοσκοπίας. Ταυτοποιήθηκαν οι κυριότερες κορυφές του φάσματος και αποδείχθηκε ότι είναι κυρίως σε μορφή ανατάση, ενώ ένα πολύ μικρό ποσοστό είναι ρουτίλιο. Ακολούθησε η περίθλαση ακτίνων X, για την εκτίμηση του μεγέθους των νανοσωματιδίων και μία επιπλέον επιβεβαίωση της κρυσταλλικής φάσης του υλικού. Αποδείχθηκε ότι πρόκειται για μεγέθη της τάξης των 25 nm.

Μετά τα πειράματα που σχετίζονταν με το χαρακτηρισμό, ακολούθησε ο σχεδιασμός και η εφαρμογή των νανοσωματιδίων σε μορφή εναιωρήματος στο βιολογικό σύστημα, με σκοπό την αξιολόγηση της βιολογικής δράσης τους. Έτσι επιλέχθηκαν για τα πειράματά μας, καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού, που καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο. Δοκιμάστηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις Ag/N/TiO<sub>2</sub> και εξετάστηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων με και χωρίς φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία. Τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά, ως προς το γεγονός ότι παρατηρήθηκε μία αυξανόμενη κυτταροτοξικότητα, με την αύξηση της συγκέντρωσης του Ag/N/TiO<sub>2</sub>. Έτσι,

αποδεικνύεται ότι ειδικά μετά τη συγκέντρωση των 2mg/ml η τοξικότητα είναι εξαιρετικά μεγάλη. Δεν είναι απολύτως σαφές αν η τοξικότητα αυτή οδηγεί σε θάνατο σημαντικό μέρος του κυτταρικού πληθυσμού ή προκαλεί την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Μετά την ακτινοβολήση, δεν παρατηρήθηκαν σοβαρές διαφορές. Πιθανά ο χρόνος αυτός δεν επαρκεί για να φωτο-ενεργοποιηθεί το Ag/N/TiO<sub>2</sub>. Δεν είναι βέβαια πολύ καλή επιλογή ένας πολύ μεγαλύτερος χρόνος, αφού τα κύτταρα θα παραμείνουν για αρκετή ώρα εκτός του κλίβανου και των ελεγχόμενων συνθηκών που απαιτούνται για την ομαλή τους ανάπτυξη και αυτό θα τα φέρει σε κατάσταση στρες, ή θα τα εκθέσει σε μικροβιακό περιβάλλον, που μπορεί να θέσει σε κίνδυνο τόσο την ίδια καλλιέργεια, όσο και άλλες καλλιέργειες που φιλοξενούνται στο χώρο. Άλλη ερμηνεία που μπορεί να δοθεί είναι πως το υλικό πιθανά να έχει ήδη φωτο-ενεργοποιηθεί ακούσια, παρά τα μέτρα που ελήφθησαν προκειμένου να εξασφαλιστούν οι συνθήκες σκότους, σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας, δηλαδή κατά τη σύνθεση, το χαρακτηρισμό, αλλά και τα πειράματα ελέγχου της κυτταροτοξικότητας.

Σίγουρα απαιτείται βελτιστοποίηση της μεθόδου τόσο στο χημικό, όσο και στο βιολογικό μέρος. Τεχνικά θα μπορούσαν να γίνουν πολλές βελτιώσεις. Αρχικά θα μπορούσε να γίνει διερεύνηση της πιθανής τροποποίησης της μεθόδου σύνθεσης ή παραμέτρων αυτής, όπως είναι η αλλαγή πρόδρομης ένωσης, ο έλεγχος της επίδρασης της περιεκτικότητας νιτρικού αργύρου (AgNO<sub>3</sub>), η αλλαγή της πηγής του φορέα τροποποίησης αζώτου (N), η μεταβολή της θερμικής διεργασίας). Επίσης θα μπορούσε να επιτευχθεί περαιτέρω μείωση του μεγέθους των νανοσωματιδίων, με χρήση υπερήχων πριν την εφαρμογή στα κύτταρα. Θα ήταν επίσης πολύ σημαντικό να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση του διπλά τροποποιημένου διοξειδίου του τιτανίου με άργυρο και άζωτο, στο βιολογικό σύστημα και η αντικαρκινική του δράση, με διερεύνηση μοριακών μηχανισμών. Το πρωτόκολλο μετρήσεων και μελέτης βιωσιμότητας θα μπορούσε να βελτιωθεί, μέσω αλλαγής κάποιων παραγόντων όπως είναι η αύξηση του χρόνου ακτινοβολήσης των δειγμάτων, με σκοπό τη φωτο-ενεργοποίηση.

Σε κάθε περίπτωση, αυτή η σειρά αποτελεσμάτων μπορεί να αξιοποιηθεί για περαιτέρω διερεύνηση. Απώτερος στόχος αυτής της προσπάθειας είναι να δοθεί φως στην πιθανότητα να αξιοποιηθούν άλλες εναλλακτικές μορφές θεραπείας, με υλικά, που είναι σχετικά απλό να τροποποιηθούν και να χρησιμοποιηθούν σαν αντικαρκινικοί παράγοντες, με επιλεκτική δράση.

## Βιβλιογραφία

1. P. Sharma. (2013). Evolution of Mobile Wireless Communication Networks-1G to 5G as well as Future Prospective of Next Generation Communication Network, *International Journal of Computer Science and Mobile Computing*, Vol. 2, Issue. 8, August 2013, pg.47 – 53
2. H. Jamali. & Azadi-Ahmadabadi, G. & S.Asadi (2018). Interdisciplinary relations of converging technologies: Nano–Bio–Info–Cogno (NBIC), *Scientometrics* (2018) 116:1055–1073
3. S. Zhironkin et al (2017). NBIC-Convergence of Machinery and Basic Technologies as the Ecological Factor of Wellbeing, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 50 (2017) 012011
4. S. Orca (2010). Nano-Bio-Info-Cogno: Paradigm for the Future, *H+ Magazine*, February 12, 2010 (<http://hplusmagazine.com/2010/02/12/nano-bio-info-cogno-paradigm-future/>)
5. R.Evens. & Kenneth Kaitin, K. (2015). The Evolution Of Biotechnology And Its Impact On Health Care. *Health Affairs*, 34, no.2 (2015):210-219
6. Y. Bueso & M. Tangey. (2017). Synthetic Biology in the Driving Seat of the Bioeconomy, *Trends Biotechnol.* (2017) 35(5):373-378.
7. Y. Mai. (2010). Μελέτη της απήχησης και της κατανόησης του ρόλου των υπηρεσιών γενετικής και φαρμακογενετικής ανάλυσης στην ελληνική αγορά., Πανεπιστήμιο Πατρών. Διπλωματική Εργασία
8. <http://www.efbiotechnology.org/> (τελευταία πρόσβαση 29.7.2018)
9. Το ΒΗΜΑ Team. (2014). Η νέα εποχή της βιοτεχνολογίας. Το Βήμα (31/05/2014) <https://www.tovima.gr/2014/05/31/society/i-nea-epoxi-tis-biotexnologias/> (τελευταία πρόσβαση 29.7.2018)
10. Φαρμακογονιδιωματική. <https://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/default.htm>. (τελευταία πρόσβαση 21.6.2018)
11. Τι ακριβώς είναι η νανοτεχνολογία και οι νανοεπιστήμες [http://nn.physics.auth.gr/index.php?option=com\\_content&view=article&id=303%3A2013-11-05-14-19-06&catid=68%3A2010-09-03-21-09-19&Itemid=96&lang=el](http://nn.physics.auth.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=303%3A2013-11-05-14-19-06&catid=68%3A2010-09-03-21-09-19&Itemid=96&lang=el). (τελευταία πρόσβαση 21.6.2018)
12. Νανοϊατρική - Νανοβιοτεχνολογία - Βιοηλεκτρονική :Συνδέοντας τη Νανοτεχνολογία με τα Βιολογικά Συστήματα [http://nn.physics.auth.gr/index.php?option=com\\_content&view=article&id=158&Itemid=54&lang=el](http://nn.physics.auth.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=158&Itemid=54&lang=el). (τελευταία πρόσβαση 21.6.2018)
13. Θ. Βλαχογιάννη & Σ. Λωρίδας & Κ. Φιωτάκης & Α. Βαλαβανίδης. (2014). Μηχανικά Νανοϋλικά και Εφαρμογές Νανοτεχνολογίας: Προβλήματα Υγιεινής και Ασφάλειας από Έκθεση σε Νανοσωματίδια και Νανοϋλικά και η Επίδρασή τους στη Ρύπανση του Περιβάλλοντος. [http://195.134.76.37/scinews/Reports/Rep\\_nanomaterials.htm](http://195.134.76.37/scinews/Reports/Rep_nanomaterials.htm). (τελευταία πρόσβαση 25.6.2018).

14. P. Hollister. & C.Roman Vas. & T. Harper.(2003 October). Bottom- up production techniques. Technology White Papers, nr. 15. [http://www.romnet.net/ro/e-newsletter/e-newsletter13/FreeNanotechnology-download/bottom-up\\_techniques\\_WP.pdf](http://www.romnet.net/ro/e-newsletter/e-newsletter13/FreeNanotechnology-download/bottom-up_techniques_WP.pdf). (τελευταία πρόσβαση 18.4.2018).
- 15.[http://lyk-peir-anavr.att.sch.gr/Lessons/05TECHNOLOGY/ComputerScience/StudentWorks/03\\_Asimakopoulos\\_Nanotechnology.pdf](http://lyk-peir-anavr.att.sch.gr/Lessons/05TECHNOLOGY/ComputerScience/StudentWorks/03_Asimakopoulos_Nanotechnology.pdf)
16. N. Islam. & K. Miyazaki. (2010). An empirical analysis of nanotechnology research domains, *Technovation* **30** (2010) 229–237
17. MNT Editorial Team (2016). Cancer: What you need to know. *Medical. News Today*.<https://www.medicalnewstoday.com/info/cancer-oncology>.(τελευταία πρόσβαση 2.8.2018).
18. R.Altari et al.(2018). Cancer Facts & Figures 2018.<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf>.(τελευταία πρόσβαση 2.8.2018)
19. Saplakoglu, Y. (2018). This Magnetic Wire Could One Day Pull Cancer Cells from Your Blood.LIVESCIENCE. <https://www.livescience.com/63078-magnetic-wire-cancer-diagnosis.html>.(τελευταία πρόσβαση 2.8.2018)
20. <https://www.theguardian.com/science/2018/jun/04/doctors-hail-world-first-as-womans-advanced-breast-cancer-is-eradicated> Sample, I. & Glenza, J. (2018, 4 Jun). Doctors hail world first as woman’s advanced breast cancer is eradicated. *The Guardian*
21. Ν. Λαγοπάτη (2013). Φωτοκαταλυτική Αντικαρκινική Δράση Διοξειδίου του Τιτανίου (TiO<sub>2</sub>): Μηχανισμοί και Εφαρμογές. Αθήνα. Ε.Κ.Π.Α. Διδακτορική Διατριβή
22. What is titanium dioxide.[https://tdma.info/what-is-titanium-dioxide/?gclid=CjwKCAjwoMPcBRAWEiwAiAqZh0pHPSpmgFZ2q1NP9vFql3alWeATH5rZ7xplXZP1u9g-JLzgVbpBQxoCzUYQAvD\\_BwE](https://tdma.info/what-is-titanium-dioxide/?gclid=CjwKCAjwoMPcBRAWEiwAiAqZh0pHPSpmgFZ2q1NP9vFql3alWeATH5rZ7xplXZP1u9g-JLzgVbpBQxoCzUYQAvD_BwE)(τελευταία πρόσβαση 2.6.2018)
- 23.MSDS.<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9925268>(τελευταία πρόσβαση 16.8.2018)
24. Δ. Αθανασίου. (2014). Σχεδιασμός και βελτιστοποίηση φωτοκαταλυτικού αντιδραστήρα οπτικών ιών και μεμβράνης για καθαρισμό νερού. Αθήνα, ΕΜΠ, Διπλωματική Εργασία
25. Γ. Λέκκας,. Ετερογενής φωτοκατάλυση. Μια νέα μέθοδος επεξεργασίας υγρών αποβλήτων.
26. Τεχνολογία Περιβάλλοντος: Επεξεργασία Βιομηχανικών Υγρών Αποβλήτων.  
<https://eclass.upatras.gr/modules/units/?course=CMNG2170&id=5660>.(τελευταία πρόσβαση 16.8.2018)
27. V. Yuri. Synthesis, doping and size effects of synthesis, doping and size effects of inorganic nanoparticles (2009). Fritz Haber Institute.<http://www.fhi->

berlin.mpg.de/acnew/department/pages/teaching/pages/teaching\_\_wintersemester\_\_2009\_2010/yury\_kolenko\_\_synthesis\_of\_nanoparticles\_\_091106.pdf(τελευταία πρόσβαση 2.7.2018)

28. Π. Χρήστου.( 2013). Παρασκευή Νανοσύνθετων Υλικών που Βασίζονται σε Βιοαποικοδομήσιμα Πολυμερή με Εγκλείσματα Οργανικών Νανοσωματιδίων. Πάτρα.Πανεπιστήμιο Πατρών. Μεταπτυχιακή Εργασία.

29. F. Huang & A. Yan & H. Zhao. (2016).Influences of Doping on Photocatalytic Properties of TiO<sub>2</sub> Photocatalyst. INTECH, Chapter 2.

30. A. Zaleska. (2008). Doped-TiO<sub>2</sub>: A Review. Recent Patents on Engineering 2008, 2, 157-164.

31. M. Khan et al. (2014). Density functional theory calculations for the investigation of (Ag, N) codoping effect on the electronic and optical properties of anatase TiO<sub>2</sub>. International Journal of Modern Physics B Vol. 28, No. 18 (2014) 1450112 (13 pages).

32. C. Morgade & G. Cabeza. (2017).First-principles study of codoping TiO<sub>2</sub> systems capable of improving the improving surface area and the dissociation of H<sub>2</sub>O to generate H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> . Computational Materials Science, 127 (2017) 204 - 210.

33. M. Vasilopoulou et al. (2017). Hydrogen and nitrogen codoping of anatase TiO<sub>2</sub> for efficiency enhancement in organic solar cells. Scientific Reports, volume 7, Article number: 17839 (2017).

34.file:///C:/Users/DKAL/Downloads/khan2015.pdf M. Khan. (2015). Preparation, characterization and visible light photocatalytic activity of silver, nitrogen codoped TiO<sub>2</sub> photocatalyst. IOPscience, IP Address: 155.69.4.4 (18/06/2015 at 03:58).

35. K. Guesh et al. (2014). Effect of Ag-N co-doping in nanosize TiO<sub>2</sub> on photo-catalytic degradation of methyl orange Dye. Journal of Surface Science and Technology, 29(3):1-14 · January 2014

36. M. Ahamed et al. (2017). Ag-doping regulates the cytotoxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles via oxidative stress in human cancer cells. *Scientific Reports*, (Published online: 15 December 2017).

38. Juan Mou et al. (2017). A New Green Titania with Enhanced NIR Absorption for Mitochondria-Targeted Cancer Therapy. *Theranostics* 2017, Vol. 7, Issue 6.

39. M. Khan et al. (2017). Enhancing the photoactivity of TiO<sub>2</sub> by codoping with silver and molybdenum: the effect of dopant concentration on the photoelectrochemical propertie.

40. C. Gaidau et al. (2014). Enhanced photocatalysts based on Ag-TiO<sub>2</sub> and Ag-N-TiO<sub>2</sub> nanoparticles for multifunctional leather surface coating. *Open Chem*.

41. S. Sulaiman et al. (2018). Effects of photocatalytic activity of metal and nonmetal doped TiO<sub>2</sub> for Hydrogen production enhancement - A Review. *J. Phys.: Conf. Ser.* 1027 012006.

42. S. Qingbo et al. (2017). (N<sup>3-</sup>, M<sup>5+</sup>) Co-Doping Strategies for the Development of TiO<sub>2</sub>-Based Visible Light Catalysts. *Res Rev Electrochemistry*.



43. Μ. Ανδρικούλα & Γ. Βαρθολομάτος. (2001). Απόπτωση. Ο κυτταρικός θάνατος προϋπόθεση για τη ζωή . Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 2001.
44. Χ. Παναγιωτίδης. Απόπτωση ή Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Θεσσαλονίκη, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα, ΕΣΠΑ 2007 – 2013.
45. Π. Στασινάκης. Απόπτωση - Προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Βιοεπιστήμη. 3 Νοεμβρίου 2009.
46. E. Minikel. Cell Biology. (2013). 11: Apoptosis & Necrosis.  
[http://www.cureffi.org/2013/04/28/cell-biology-11-apoptosis-necrosis/..](http://www.cureffi.org/2013/04/28/cell-biology-11-apoptosis-necrosis/) (Τελευταία πρόσβαση: 8.8.2018).
47. Ο κυτταρικός κύκλος.  
[http://eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/SEYC170/Cooper\\_chapter%2016%20Κυτταρικός%20κύκλος.pdf](http://eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/SEYC170/Cooper_chapter%2016%20Κυτταρικός%20κύκλος.pdf) (Τελευταία πρόσβαση: 8.8.2018).
48. <https://www.livingoceansfoundation.org/education/portal/course/life-cycle/figure-6-3/> (Τελευταία πρόσβαση: 8.8.2018)
49. Ε. Γιαννακοπούλου. (2009). Οξειδωτικό stress – αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί. Κλινική σημασία. Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής 2009.
50. M. Breitenbach & P. Eckl. (2015). Introduction to Oxidative Stress in Biomedical and Biological Research. *Biomolecules* 2015, **5**, 1169-1177; doi:10.3390/biom5021169.
51. Ε. Ντουνούση et al. (2009). Οξειδωτικό στρες, μηχανισμοί δράσης και ο ρόλος του στη χρόνια νεφρική νόσο. *Ελληνική Νεφρολογία* 2009; 21 (1): 34 - 45.
52. Helmut Sies. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine (Τελευταία πρόσβαση: 8.8.2018). *Redox Biology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>.
53. S. Saha et al. (2017). Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, **18**, 1544; doi:10.3390/ijms18071544.
54. M. Pages et al. (2015). Metastasis and Oxidative Stress: Are Antioxidants a Metabolic Driver of Progression? *Cell Metabolism* 22, December 1, 2015 ©2015 Elsevier Inc..
55. M. Nita & A.Grzybowski.(2016). The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume **2016**, Article ID 3164734, 23 pages, <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/3164734/> (τελευταία πρόσβαση 26.7.2018)
56. Οξειδωτικό Στρες - Αιτία Ασθενειών και Πρόωρης Γήρανσης.  
<https://nutrilabs.gr/okseidotiko-stres/>. (τελευταία πρόσβαση 26.7.2018)
57. P. K. Meher & K. P. Mishra.(2017). Radiation oxidative stress in cancer induction and prevention. *Journal of Radiation and Cancer Research*. <http://www.journalrcr.org/article.asp?issn=09730168;year=2017;volume=8;issue=1;spage=44;epage=52;aulast=Meher>. (τελευταία πρόσβαση 6.7.2018)

58. J. Liu & Z. Wang. (2015) Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Volume 2015, Article ID 294303. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/294303><https://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/294303/> (τελευταία πρόσβαση 6.7.2018)
59. S. Swapp. Scanning Electron Microscopy (SEM). University of Wyoming. [https://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/techniques/SEM.html](https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html) (τελευταία πρόσβαση 15.7.2018)
60. SEM & Imaging: the applications and practical uses of scanning electron microscopes (2017). <http://www.atascientific.com.au/sem-imaging-applications-practical-uses-scanning-electron-microscopes/> (τελευταία πρόσβαση 14.7.2018)
61. Π. Πασχαλάκης, Γ. Τσαγγάρης, Ν. Δασκαλάκης. (2000). Χημική Επιμετάλλωση. Αθήνα. ΕΜΠ
62. Ι. Ράπτης. (2016). Συμπληρωματικές Σημειώσεις για το Εργαστήριο «Φασματοσκοπία Raman» του μαθήματος «Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Υλικών». Αθήνα. ΕΜΠ. [http://www.physics.ntua.gr/ergasthria/askhseis\\_ergasthriou/fasmatoskopia\\_Raman.pdf](http://www.physics.ntua.gr/ergasthria/askhseis_ergasthriou/fasmatoskopia_Raman.pdf). (τελευταία πρόσβαση 28.7.2018)
63. Γ. Βογιατζής & Σ. Γιαννόπουλος & Γ. Παπαθεοδώρου. (1999). Στοιχεία Φασματοσκοπίας Raman. Κρήτη. Πανεπιστήμιο Κρήτης. [http://tccc.iesl.forth.gr/AMS\\_EPEAEK/courses/VGP/ICEHT-Lab\\_Course.htm](http://tccc.iesl.forth.gr/AMS_EPEAEK/courses/VGP/ICEHT-Lab_Course.htm). (τελευταία πρόσβαση 30.7.2018)
64. Χ. Κοντογιάννης. Ενόργανη Ανάλυση ΙΙ: Φασματοσκοπία Raman. Πάτρα. Πανεπιστήμιο Πατρών.
65. What is Raman Spectroscopy. <https://www.nanophoton.net/raman/raman-spectroscopy.html>. (τελευταία πρόσβαση 2.8.2018)
66. Γ. Στεργιούδης. (2007-2008). Ακτίνες – Χ (XRD). Θεσσαλονίκη. ΑΠΘ.
67. X-Ray Diffraction-XRD. <http://particle.dk/methods-analytical-laboratory/xrd-analysis/>. (τελευταία πρόσβαση 3.8.2018)
68. X-ray Powder Diffraction (XRD). [https://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/techniques/XRD.html](https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/XRD.html) (τελευταία πρόσβαση 2.8.2018)
69. Φασματοσκοπία ακτίνων Χ. Αθήνα. ΕΚΠΑ.
70. Οπτικό Μικροσκόπιο. [http://kpe-kastor.kas.sch.gr/ergastiriakos\\_odigos/introduction/optical.htm](http://kpe-kastor.kas.sch.gr/ergastiriakos_odigos/introduction/optical.htm). (τελευταία πρόσβαση 25.9.2018)
71. Α. Εισαγωγή στη Μικροσκοπία – Η Έννοια της Μεγέθυνσης. <http://ikee.lib.auth.gr/record/114361/files/ptuxiakh2.pdf> (τελευταία πρόσβαση 25.9.2018)

72. Υπολογισμός αριθμού και βιωσιμότητας κυτταρικού πληθυσμού. Εργαστηριακές Ασκήσεις. Πάτρα. Πανεπιστήμιο Πατρών.

73. W. Strober. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. Basic Protocol. National Institute of Allergy and Infectious Diseases.

74. N.F. Jaafar et al. (2015). Direct in situ activation of Ag nanoparticles in synthesis of Ag/TiO<sub>2</sub> and its photoactivity. *Applied Surface Science* **338** (2015) 75–84