



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Φωτοκαταλυτική Αντικαρκινική Δράση
Διοξειδίου του Τιτανίου (TiO_2): Μηχανισμοί και
Εφαρμογές

Διδακτορική Διατριβή

Νεφέλης Π. Λαγοπάτη

(Φυσικού, Ακτινοφυσικού Ιατρικής)

Αθήνα 2013



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

*Φωτοκαταλυτική Αντικαρκινική Δράση
Διοξειδίου του Τιτανίου (TiO_2): Μηχανισμοί και Εφαρμογές*

Διδακτορική Διατριβή

Νεφέλης Π. Λαγοπάτη

(Φυσικού, Ακτινοφυσικού Ιατρικής)

Αθήνα 2013



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



NATIONAL & KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY
DEPARTMENT OF ANIMAL AND HUMAN PHYSIOLOGY

*Photocatalytic - Anticancer Activity of Titanium Dioxide
(TiO₂):
Related Mechanisms and Applications*

Doctorate (Ph. D.) Thesis
by
Nefeli P. Lagopati

Physicist, Medical Physicist

Athens 2013



European Union
European Social Fund



OPERATIONAL PROGRAMME
EDUCATION AND LIFELONG LEARNING
investing in knowledge society
MINISTRY OF EDUCATION & RELIGIOUS AFFAIRS, CULTURE & SPORTS
MANAGING AUTHORITY



NSRF
2007-2013
programme for development
EUROPEAN SOCIAL FUND

Co- financed by Greece and the European Union

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Υποτροφία «Ηράκλειτος II»-ΕΣΠΑ

Θεματική ενότητα: Βιολογικές και ιατρικές επιστήμες

Τελική Βαθμολογία αξιολόγησης πρότασης: 10

Αριθμός έργου: 11002

Χρηματοδότηση: Σεπτέμβριος 2010 - Δεκέμβριος 2012

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών (ΣΘΕ), του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα» (Ν. 5343/1932, άρθρο 202).

Στοιχεία Διατριβής

Αίτηση για εισαγωγή στο Π.Μ.Σ. του τμήματος Βιολογίας που χορηγεί Διδακτορικό Δίπλωμα: **09-02-2009**

Επικύρωση επιλογής ως υποψήφια διδάκτορα και ορισμός τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, από τη γενική συνέλευση του τμήματος: **18-02-2009**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Παπαζαφείρη Παναγιώτα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Γαϊτανάκη Αικατερίνη, Καθηγήτρια

Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τσιλιμπάρη Έφη, Ερευνήτρια Α΄, Διευθύντρια του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Επικεφαλής Εργαστηρίου Βιοχημείας/Παθοβιολογίας Κυττάρων και Εξωκυττάρου Χώρου, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

Θέμα Διδακτορικής Έρευνας: **«Φωτοκαταλυτική Αντικαρκινική Δράση Διοξειδίου του Τιτανίου (TiO₂): Μηχανισμοί και εφαρμογές»**

Παρουσίαση 1ης έκθεσης προόδου: **22-12-2010**

Παρουσίαση 2ης έκθεσης προόδου: **04-04-2012**

Παρουσίαση 3ης έκθεσης προόδου: **20-02-2013**

Ανοιχτό Σεμινάριο: **11-03-2013**

Ορισμός επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, από τη γενική συνέλευση του τμήματος: **17-04-2013**

Υποστήριξη διδακτορικής διατριβής: **14-05-2013**

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Παναγιώτα Παπαζαφείρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)
Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Ε.Κ.Π.Α.
e-mail: rparaz@biol.uoa.gr
τηλέφωνο: 2107274665

Αικατερίνη Γαϊτανάκη, Καθηγήτρια
Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, Ε.Κ.Π.Α.
e-mail: cgaitan@biol.uoa.gr
τηλέφωνο: 2107274136

Έφη Τσιλιμπάρη, Ερευνήτρια Α' (Διευθύντρια Ερευνών)
Διευθύντρια Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»
e-mail: effie@bio.demokritos.gr
τηλέφωνο: 2106503583

Πολύκαρπος Φαλάρας, Ερευνητής Α' (Διευθυντής Ερευνών)
Ινστιτούτο Προηγμένων Υλικών, Φυσικοχημικών Διεργασιών, Νανοτεχνολογίας και Μικροσυστημάτων, Τομέας Φυσικοχημείας, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»
e-mail: pari@chem.demokritos.gr
τηλέφωνο: 2106503644

Ευαγγελία Παυλάτου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., Τομέας Χημικών Επιστημών
e-mail: ravlatou@chemeng.ntua.gr
τηλέφωνο: 2107723110

Ανδρέας Σκορίλας, Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας, Ε.Κ.Π.Α.
e-mail: ascorilas@biol.uoa.gr
τηλέφωνο: 210 7274306

Αθανάσιος Φιλιππόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής
Τμήμα Χημείας, Τομέας Ανόργανης Χημείας, Ανόργανης Χημικής Τεχνολογίας και Περιβαλλοντικής Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.
e-mail: atphilip@chem.uoa.gr
τηλέφωνο: 2107274697

Στην οικογένειά μου

"Αν δεν μπορέσω να το δεις κι εσύ, μοιάζει σα να μη το 'χω"
Γιάννης Ρίτσος

"Natura nihil fit in frustra" - η Φύση δεν κάνει τίποτα χωρίς λόγο

"Minima maxima sunt" - τα ελάχιστα είναι μέγιστα

"ΑΥΤΟΣ ο κόσμος ο μικρός, ο μέγας!"
Οδυσσεάς Ελύτης

Ες αύριον τα σπουδαία.
Αρχίας, Θηβαίος ηγέτης

"Aut viam inveniam aut faciam"
Ή θα τον βρούμε το δρόμο ή θα τον φτιάξουμε
Αννίβας

"Post tenebras lux"
Μετά το σκοτάδι...φως

"Que sai-je?"
Τι γνωρίζω;
Μονταίν

Κάνε άλμα πιο γρήγορο από την φθορά"
Οδυσσεάς Ελύτης



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών (Ε.Κ.Ε.Φ.Ε.) «Δημόκριτος», επισήμως, κατά το χρονικό διάστημα 2009-2013, σε συνεργασία με τον τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αποτελεί προσπάθεια υλοποίησης μιας προϋπάρχουσας ιδέας που απαιτούσε συνεργασία του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών και του Ινστιτούτου Φυσικοχημείας, που πλέον αποτελεί έναν από τους τρεις τομείς του ενοποιημένου Ινστιτούτου Προηγμένων Υλικών, Φυσικοχημικών Διεργασιών, Νανοτεχνολογίας και Μικροσυστημάτων, όπως προέκυψε από τη συγχώνευση, βάσει του νόμου βάσει του Ν. 4051/2012. Συγκεκριμένα, ήταν αναγκαία αυτή η συνεργασία, διότι στην προσπάθεια ελέγχου της βιολογικής δράσης του νανοδομημένου TiO_2 είναι αναγκαία η συμβολή του φυσικοχημικού υπόβαθρου, που αξιοποιείται σε όλη τη διαδικασία, από την παρασκευή, την τροποποίηση, το χαρακτηρισμό των υλικών, όσο και στη γενική θεώρηση και τον τρόπο σκέψης, αλλά φυσικά και το βιολογικό περιβάλλον, στο οποίο πραγματώνεται και ολοκληρώνεται πειραματικά η ερευνητική προσπάθεια.

Επιβλέποντες Ερευνητές ήταν η **Δρ. Έφη Τσιλιμπάρη**, M.D., Ερευνήτρια Α', Διευθύντρια του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», Διευθύντρια Ερευνών του Εργαστηρίου Βιοχημείας/Παθοβιολογίας Κυττάρων και Εξωκυττάρου Χώρου, στο οποίο εκπονήθηκε το μεγαλύτερο μέρος της πειραματικής διαδικασίας, και που είναι μεγάλη μου τιμή να συμμετέχει και στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή, και ο **Δρ. Πολύκαρπος Φαλάρας**, Ερευνητής Α', Διευθυντής Ερευνών του Εργαστηρίου Φωτο-οξειδοαναγωγικής Μετατροπής και Αποθήκευσης της Ηλιακής Ενέργειας, του Τομέα Φυσικοχημείας, του Ινστιτούτου Προηγμένων Υλικών, Φυσικοχημικών Διεργασιών, Νανοτεχνολογίας και Μικροσυστημάτων, στο οποίο εκπονήθηκε το μέρος τη πειραματικής διαδικασίας που σχετίζεται με τα νανοσωματίδια που δοκιμάστηκαν και που με τιμά ιδιαίτερα με τη συμμετοχή του στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή της παρούσας διατριβής.

Θερμά ευχαριστώ και τους δύο, που αρχικά μου με εμπιστεύθηκαν, και μου έδωσαν την πολύτιμη ευκαιρία να δραστηριοποιηθώ στο «μαγικό» χώρο της έρευνας, ήδη από το

2007, που ουσιαστικά, ξεκίνησε η πρώτη επαφή με τα δύο εργαστήρια και η εκπαίδευση - εξοικείωσή μου, πριν την επίσημη έναρξη της διατριβής. Στη συνέχεια τους ευχαριστώ για την επιστημονική τους καθοδήγηση, το ιδιαίτερο ενδιαφέρον, την υπομονή και την ενθάρρυνσή τους σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής, μέχρι σήμερα.

Οφείλω και επιθυμώ να ευχαριστήσω θερμότατα τη **Δρ. Παρασκευή Κίτσιου, Ερευνήτρια Β΄**, στο Ινστιτούτο Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» για την ουσιαστική της συμβολή σε όλη την προσπάθεια, τη γενική εποπτεία, τις πολύτιμες συμβουλές, τη συμπαράσταση, την κατανόηση και τη βοήθεια σε όλα τα στάδια της διατριβής.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες μου στην κ. **Παναγιώτα Παπαζαφείρη**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την τιμή που μου έκανε, συμμετέχοντας στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή, και μάλιστα ως επιβλέπουσα της παρούσας διατριβής, για τις πολύτιμες επισημάνσεις και παρατηρήσεις, την καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη και την άψογη συνεργασία.

Ευχαριστώ, επίσης, θερμά την κ. **Αικατερίνη Γαϊτανάκη**, Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ιδιαίτερη τιμή να συμμετέχει στην Τριμελή Συμβουλευτική Επιτροπή και για τις ουσιαστικές επιστημονικές συμβουλές και παρεμβάσεις, που συνέβαλαν καθοριστικά στη διαμόρφωση της τελικής προφορικής υποστήριξης της διατριβής.

Στη συνέχεια ευχαριστώ την κ. **Ευαγγελία Παυλάτου**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, της Σχολής Χημικών Μηχανικών, Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (Ε.Μ.Π.), για την τιμή να συμμετέχει στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή της παρούσας διατριβής, αλλά και για τη πολύτιμη βοήθεια στο μέρος της διατριβής που αφορά στον χαρακτηρισμό των υλικών και για την προθυμία, την καλοπροαίρετη στάση και τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στον κ. **Ανδρέα Σκορίλα**, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας, του Τομέα Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την τιμή να συμμετέχει στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή της παρούσας διατριβής και για τις πολύτιμες επισημάνσεις του.

Ακόμη ευχαριστώ τον κ. **Αθανάσιο Φιλιππόπουλο**, Επίκουρο Καθηγητή, του Τμήματος Χημείας, του Τομέα Ανόργανης Χημείας, Ανόργανης Χημικής Τεχνολογίας και Περιβαλλοντικής Χημείας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την τιμή να συμμετέχει στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή της παρούσας διατριβής και για τις πολύτιμες διορθώσεις και επισημάνσεις.

Στη συνέχεια οφείλω να ευχαριστήσω τον Δρ. **Παναγιώτη Βενιεράτο**, που υπομονετικά με καθοδήγησε και με βοήθησε στα πρώτα μου βήματα στο χώρο του Εργαστηρίου Βιοχημείας/Παθοβιολογίας Κυττάρων και Εξωκυττάριου Χώρου, αλλά και όλα τα μέλη του εργαστηρίου, τη Δρ. **Αθηνά Τζίνια**, Ερευνήτρια Β', τη Δρ. **Γαρυφαλλιά Δροσοπούλου**, Ερευνήτρια Γ', για την αρμονική συνύπαρξη και για την ουσιαστική βοήθεια και συμβουλές που όταν χρειάστηκε πρόθυμα παρείχαν σε ό,τι αφορά κυρίως τεχνικά θέματα που ανέκυπταν σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Θερμά ευχαριστώ την κ. **Ελένη Κωτσοπούλου**, MSc, Ειδική Λειτουργική Επιστήμονα, του Εργαστηρίου Βιοχημείας/Παθοβιολογίας Κυττάρων και Εξωκυττάριου Χώρου, για τη βοήθεια και συμπαράσταση, αλλά και το σύζυγό της κ. **Παναγιώτη Κουρουμπλή**, για τη συνολική του συμβολή.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τους συναδέλφους, Δρ. **Αποστολία Φραγκούλη**, κ. **Νικόλαο Τσοτάκο**, Δρ. **Ιωάννα Τσαγκαράκη**, κ. **Μυρτώ Κωστομοίρη**, κ. **Ιωάννη Δάφνη**, που παράλληλα αγωνιστήκαμε, ανταλλάξαμε απόψεις και κοινούς προβληματισμούς. Ακόμη ευχαριστώ τον Δρ. **Αθανάσιο Γ. Κόντο**, Ερευνητή Β' του Εργαστηρίου Φωτο-οξειδοαναγωγικής Μετατροπής και Αποθήκευσης της Ηλιακής Ενέργειας, του Τομέα Φυσικοχημείας, το Δρ. **Βλάση Λυκοδήμο**, Επίκουρο Καθηγητή τμήματος Φυσικής Ε.Κ.Π.Α., τον κ. **Δημήτρη Τσούκληρη**, τον κ. **Νίκο Μουστάκα** και τον Δρ. **Αθανάσιο Ι. Κοντό** αλλά και όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του Δρ. Πολύκαρπου Φαλάρα και της Δρ. Τσιλιμπάρη.

Ευχαριστώ το τεχνικό και διαχειριστικό προσωπικό των δύο Ινστιτούτων και ιδιαίτερα την κ. **Μαργαρίτα Παπαδάκη**, Γραμματέα του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών και την κ. **Δουβαρα Βασιλική**, Γραμματέα του Τομέα Φυσικοχημείας, του Ινστιτούτου Προηγμένων Υλικών, Φυσικοχημικών Διεργασιών, Νανοτεχνολογίας και Μικροσυστημάτων.

Πάντοτε, ευχαριστώ τους καθηγητές, που είχα την τύχη να συναντήσω, στα μαθητικά και φοιτητικά μου χρόνια, και που με ενέπνευσαν να επιλέξω και να συνεχίσω

τις σπουδές μου στη φυσική, στην ιατρική φυσική - ακτινοφυσική, τη βιολογία, τη νανοτεχνολογία, αλλά και τη μουσική και ζωγραφική.

Θα ήθελα στο σημείο αυτό να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. **Αγγελόπουλο Άγγελο**, Αφυπ. Καθηγητή Τμήματος Φυσικής, Ε.Κ.Π.Α., για τη διαχρονική του υποστήριξη και καθοδήγηση και την κ. **Μαρία Γεωργοσοπούλου Λύρα**, Ακτινοφυσικό Ιατρικής, Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής, Ε.Κ.Π.Α. για την συνεχή καθοδήγηση και τις συμβουλές της και γιατί αποτελούν πηγή γνώσης και έμπνευσης αλλά και πρότυπα επιστημόνων για μένα.

Οφείλω θερμές ευχαριστίες, για την προσωπική οικονομική ενίσχυση, μέσω της υποτροφίας «**Ηράκλειτος II**», που είχα την τύχη να μου χορηγηθεί, με τη συγχρηματοδότηση από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (**ΕΣΠΑ**) – στο πεδίο των Βιολογικών και Ιατρικών Επιστημών.

Ευχαριστώ, τελειώνοντας, για την ανεκτίμητη προσφορά τους, τους γονείς μου, **Παναγιώτη** και **Αντωνία**, που με την αγάπη τους, με συντροφεύουν, με καθοδηγούν και με στηρίζουν ηθικά και οικονομικά, την αδερφή μου, **Ειρήνη**, για τη αγάπη και τη συμπαράστασή της και τον αγαπημένο μου **Μπάμπη**, για την κατανόηση, την αγάπη και τις συμβουλές του και γιατί όλοι τους είναι πάντα δίπλα μου, στηρίζοντας τις επιλογές μου και κάνοντας όμορφη την καθημερινότητά μου.

Νεφέλη Λαγοπάτη

Μάιος 2013



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- A.O.:** αριθμός οξείδωσης
- ΕΔ:** ενδοπλασματικό δίκτυο
- Acetate:** Αιθανικό Οξύ (CH₃COOH) (Acetic acid)
- AIF :** παράγοντας που επάγει την απόπτωση (apoptosis inducing factor)
- ALDH:** αλδεϋδική αφυδρογονάση
- Apaf-1:** παράγοντας ενεργοποίησης της απόπτωσης-1 (apoptosis activating factor-1)
- APS:** υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate)
- ARF:** παράγοντας ριβοζυλίωσης του ADP (ADP ribosylation factor)
- Arg:** αργινίνη
- ASK1/2:** κινάση που ρυθμίζει το σήμα της απόπτωσης 1/2 (apoptosis signal-regulating kinase 1/2)
- Asp112:** ασπαραγίνη 112, ασπαραγινικό οξύ
- ATP:** τριφωσφορική αδενοσίνη (adenosine triphosphate)
- Bad:** σχετιζόμενος με τις πρωτεΐνες Bcl-2 υποκινητής θανάτου (Bcl-2 associated death promoter)
- BAF:** παράγοντας ενεργοποίησης των Β λεμφοκυττάρων (B-cell activating factor)
- Bax:** σχετιζόμενη με τις πρωτεΐνες Bcl-2, πρωτεΐνη x (Bcl-2 associated protein x)
- BCC:** χωροκεντρωμένο κυβικό κρυσταλλικό σύστημα (body centered cubic)
- Bcl-2:** πρωτεΐνη λεμφώματος Β κυττάρων (B-cell lymphoma-2)
- Bcl-xL:** πολύ μεγάλη Bcl πρωτεΐνη (Bcl extra large)
- BCRP:** πρωτεΐνη αντοχής στον καρκίνο του μαστού (Breast Cancer Resistance Protein)
- BH:** επικράτεια ομολογίας των πρωτεϊνών Bcl-2 (Bcl-2 homology domain)
- Bid:** αγωνιστής θανάτου, που αλληλεπιδρά με την επικράτεια BH3 (BH3-interacting domain death agonist)
- bp:** ζεύγη βάσεων (base pairs)
- BrdU:** βρωμοδεοξουριδίνη (5-Bromo-2-deoxyUridine)
- BSA:** αλβουμίνη ορού βοός (bovine serum albumin)
- Ca²⁺:** ιόντα ασβεστίου
- CAD:** DNάση ενεργοποιούμενη από κασπάση (caspase-activated DNase)
- caspases:** οικογένεια πρωτεολυτικών ενζύμων, που φέρουν το αμινοξύ κυστεΐνη στο ενεργό τους κέντρο και διασπούν τα υποστρώματά τους, πρωτεολύοντας τα μετά από ασπαραγινικό οξύ (cysteine - aspartic acid proteases)
- CB:** ζώνη αγωγιμότητας (conduction band)
- CCD:** ανιχνευτής charge-coupled device (CCD), ή «συσκευή (ή διάταξη) συζευγμένου φορτίου»

CD44: διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, που μεσολαβεί στην προσκόλληση κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-εξωκυττάρου στρώματος

CD133: γλυκοπρωτεΐνη – καρκινικός δείκτης

Chaps: Chaps Cell Extract Buffer

CPP32: κασπάση – 3

CYP1A1: κυτόχρωμα P450, οικογένεια 1, υποοικογένεια A, πολυπεπίδιο 1, (cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1)

Cyt c: κυτόχρωμα c (cytochrome c)

DD: επικράτεια θανάτου (death domain)

DISC: σύμπλοκο σηματοδότησης που επάγει το θάνατο (death inducing signaling complex)

DLS: Δυναμική μέτρηση σκέδασης φωτός (Dynamic light scattering)

DMEM: τροποποιημένο θρεπτικό υλικό Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium)

DMSO: διμέθυλο-σουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide)

DNA: δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (deoxyribonucleic acid)

DR5: υποδοχέας θανάτου 5 (death receptor 5)

DTT: διθειοθρεϊτόλη (dithiothreitol)

ECL: ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (enhanced chemiluminescence)

EDTA: αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ (ethylene diamine tetra acetic acid)

E_g: ζώνη χάσματος (ή απαγορευμένη ζώνη) (bandgap energy)

EGF: επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor)

EGFR: υποδοχέας του EGF (EGF receptor)

EGTA: αιθυλενο-γλυκο-τετραοξικό οξύ (ethylene-glycol-tetra acetic acid)

ELISA: ανοσοενζυμική Μέθοδος (Enzyme – linked immunosorbent assay)

ERK: ρυθμιζόμενη από εξωκυττάρια σήματα πρωτεϊνική κινάση (extracellular signal regulated protein kinase)

EtBr: βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide)

FACS: κυτταρομετρία ροής (Fluorescence Activated Cell Sorting)

FADD: πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον Fas και φέρνει επικράτεια θανάτου (Fas-associated protein with death domain)

Fas: Παράγοντας ενεργοποίησης του εξωενζύμου S (factor activating exoenzyme S)

FasL: προσδέτης του υποδοχέα Fas (Fas ligand)

FCC: εδροκεντρωμένο κυβικό κρυσταλλικό σύστημα (face centered cubic)

F-dUTPs: επισημασμένα νουκλεοτίδια τριφωσφορικής δεοξουριδίνης (fluorescent-tagged deoxyuridine triphosphate nucleotides)

- FH-1:** παράγοντας που παρεμποδίζει τον HIF-1 (factor inhibiting HIF-1)
- FBS:** ορός εμβρύου βοός (fetal bovine serum)
- FSC:** Εμπρόσθια Σκέδαση (Forward Scatter)
- G₀:** φάση ηρεμίας (quiescence)
- G₁:** Gap 1, φάση του κυτταρικού κύκλου που μεσολαβεί ανάμεσα στη μίτωση και τη σύνθεση
- G₂:** Gap 2, φάση του κυτταρικού κύκλου που μεσολαβεί ανάμεσα στη σύνθεση και τη σύνθεση
- Gdna:** γονιδιακό DNA – genomic DNA
- GLUT1:** μεταφορέας γλυκόζης 1 (glucose transporter 1)
- G6PD:** αφυδρογονάση της φωσφορικής-6-γλυκόζης, glucose-6-phosphate dehydrogenase
- His:** ιστιδίνη
- HRP:** υπεροξειδάση χρένου (horseradish peroxidase)
- IAPs:** πρωτεΐνες αναστολείς της απόπτωσης (inhibitors of apoptosis proteins)
- ICAD:** αναστολέας της CAD (inhibitor of CAD)
- IGF-1:** ομοιάζων με την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας-1 (insulin-like growth factor-1)
- IG:** ανοσοσφαιρίνη (immunoglobulin)
- IgG:** Immunoglobulin G
- M:** μίτωση
- MAPKKK:** κινάση της MAPKK (MAPKK kinase)
- MDA:** μαλονδιαλδεΐδη (malondialdehyde)
- Mg²⁺:** ιόντα μαγνησίου
- mRNA:** αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA)
- mTOR:** στόχος της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά (mammalian target of rapamycin)
- MTT:** βρωμιούχο 3-(4, 5-διμεθυλο-θειαζόλιο)-2, 5-διφαινυλο-τετραζόλιο [3-(4, 5-dimethylthiazole-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide]
- NGF:** αυξητικός παράγοντας νευρώνων (nerve growth factor)
- NP-40:** νονυλ-φαινοξυπολυαιθοξυλαιθανόλη - 40 (nonyl phenoxy polyethoxy ethanol-40)
- O.D.:** οπτική πυκνότητα (optical density)
- PARP:** πολυμεράση της πολυ(ADP-ριβόζης) (Poly(ADP-Ribose) Polymerase)
- PBS:** διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffered saline)
- PCD:** φωτοκαταλυτική διαδικασία αποδόμησης (photocatalytic degradation process)
- PK1:** κινάση εξαρτώμενη από την PIP3 (PIP3-dependent kinase)
- PH:** ομολογία πλεκστρίνης (pleckstrin homology)
- PHD:** επικράτεια υδροξυλάσης προλίνης (prolyl-hydroxylase domain)
- PI:** Ιωδιούχο Προπίδιο (Propidium Iodide)

- PIP3:** 3, 4, 5-τριφωσφορική φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate)
- PKB/Akt:** πρωτεϊνική κινάση B/Akt (protein kinase B/Akt)
- PKC:** πρωτεϊνική κινάση C (protein kinase C)
- PMSF:** φαίνυλο-μεθανο-σουλφονυλο-φθορίδιο (phenyl-methane-sulfonyl-fluoride)
- PS:** φωσφατιδυλοσερίνη
- PUFA:** πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids, PUFAs)
- QACXG:** πενταπεπτιδίο γύρω από το ενεργό κέντρο κυστεΐνης
- Raf:** πρωτεΐνη ταχέως εξελισσόμενου ινοσαρκώματος (rapidly accelerated fibrosarcoma)
- Ras:** πρωτεΐνη σαρκώματος αρουραίου (rat sarcoma)
- RIP1:** πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με υποδοχέα (receptor-interacting protein)
- RNA:** ριβονουκλεϊκό οξύ (Ribonucleid Acid)
- ROS:** δραστικές μορφές οξυγόνου Δ.Μ.Ο. (reactive oxygen species)
- rpm:** στροφές ανά λεπτό (rounds per minute)
- rRNA:** ριβοσωμικό RNA (ribosomal RNA)
- RTK:** υποδοχέας με δράση κινάσης τυροσίνης (receptor tyrosine kinase)
- S:** φάση της σύνθεσης στον κυτταρικό κύκλο
- SC:** απλό κυβικό κρυσταλλικό σύστημα (simple cubic)
- SCCs:** καρκινικοί δείκτες εμβρυονικών κυττάρων (SCCs markers - cancer stem cells)
- SD:** τυπική απόκλιση (standard deviation)
- SDS:** δωδεκυλο-θειικό νάτριο (sodium dodecyl-sulphate)
- SDS-PAGE:** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, παρουσία SDS (SDS -polyacrylamide gel electrophoresis)
- Smac:** δεύτερος προερχόμενος από τα μιτοχόνδρια ενεργοποιητής των κασπασών (second mitochondria-derived activator of caspases)
- snRNA:** Μικρό πυρηνικό RNA (small nuclear RNA)
- SOC:** διάυλος εξαρτώμενος από αποθήκες (store-operated channel)
- SOD:** υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase)
- SSC:** Πλάγια Σκέδαση (Side Scatter)
- TAD:** περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (transactivation domain)
- TAE:** αλατούχο διάλυμα ρυθμιζόμενο με Tris (Tris-Acetate-EDTA)
- TAK1:** ενεργοποιούμενη από τον TGF-β κινάση 1 (TGF-β activated kinase-1)
- TBE:** αλατούχο διάλυμα ρυθμιζόμενο με Tris (Tris-Buffer EDTA)
- TBS:** αλατούχο διάλυμα ρυθμιζόμενο με Tris (Tris-buffered saline)
- (TdT):** τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση (deoxynucleotidyl transferase)

- TEMED:** τετραμεθυλ-μεθυλ-αιθυλενο-διαμίνη (tetramethyl-ethylene-diamine)
- TGF:** αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (transforming growth factor)
- TLC:** χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin layer chromatography)
- TNF:** παράγοντας νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor)
- TNFR:** υποδοχέας του TNF (TNF receptor)
- TNF-α:** παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (tumor necrosis factor-α)
- TRAF:** παράγοντας που σχετίζεται με τον υποδοχέα του TNF (TNF receptor associated factor)
- Tris:** τρις (υδροξυλομεθυλο) αμινομεθάνιο [tris (hydroxymethyl) aminomethane]
- Triton X-100:** πολυοξυαιθυλεν-οκτυλο-φαινυλαιθέρας (polyoxyethylene-octyl-phenylether)
- tRNA:** Μεταφορικό RNA (transfer RNA)
- Tween 20:** γαλακτωματοποιητής – ουδέτερο απορρυπαντικό με δωδεκανοϊκό οξύ (emulsifier)
(Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate)
- UV:** υπεριώδης ακτινοβολία (ultra violet)
- v/v:** συγκέντρωση κατ' όγκο (ml διαλυμένης ουσίας ανά 100ml διαλύτη)
- VB:** ζώνη σθένους (valence band)
- w/v:** συγκέντρωση κατά βάρος (g διαλυμένης ουσίας ανά 100ml διαλύτη)
- Zn²⁺:** ιόντα ψευδάργυρου

*Πίνακας
Εικόνων και
Διαγραμμάτων*

Πίνακας Εικόνων και Διαγραμμάτων		
Σχήμα 1.1	Ομάδες ατόμων επαναλαμβάνονται περιοδικά, οικοδομώντας τον κρύσταλλο. Το θεμελιώδες πολύεδρο ονομάζεται μοναδιαία κυψελίδα και είναι το μικρότερο σχήμα που αποδίδει πλήρως τη συμμετρία της κρυσταλλικής δομής.	43
Σχήμα 1.2	Σχήμα 1.2. Αναπαράσταση κρυσταλλικής κυψελίδας.	44
Σχήμα 1.3	Τα 14 Πλέγματα Bravais στις τρεις διαστάσεις.	45
Σχήμα 1.4	Τα 14 Πλέγματα Bravais που υπάγονται σε 7 κρυσταλλικά συστήματα.	46
Σχήμα 1.5	Ενεργειακό Διάγραμμα για (Α) Αγωγούς, (Β) Μονωτές και (Γ) Ημιαγωγούς ((Γ1) Ενδογενείς, (Γ2) Εξωγενείς p-Τύπου και (Γ3) Εξωγενείς n-τύπου).	48
Σχήμα 1.6	Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου της φωτοκατάλυσης.	53
Εικόνα 1.7	William Gregor.	55
Εικόνα 1.8	Franz Joseph Muller.	55
Εικόνα 1.9	Martin Heinrich Klaproth.	56
Εικόνα 1.10	Κρυσταλλικές δομές (α) ρουτίλιου, (β) ανατάση και (γ) μπρουκίτη.	57
Εικόνα 1.11	Νανοσωλήνες TiO_2 .	61
Εικόνα 1.12	Αποικοδόμηση βακτηρίων με φωτοκαταλυτική διαδικασία.	61
Σχήμα 1.13	Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου.	64
Σχήμα 1.14	Σχηματική απεικόνιση των τεσσάρων διαφορετικών φάσεων (G_1 , S, G_2 , M) του κυτταρικού κύκλου και των βασικότερων σημείων ελέγχου (cell cycle checkpoints) μεταξύ αυτών.	65
Εικόνα 1.15	Φωτογραφία νεκρωτικού κυττάρου από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.	68
Σχήμα 1.16	Μορφολογικές κυτταρικές μεταβολές κατά τη νέκρωση.	69
Εικόνα 1.17	Απόπτωση – πτώση των φύλλων από τα δέντρα.	69
Σχήμα 1.18	Μορφολογικές κυτταρικές μεταβολές κατά την απόπτωση.	70
Εικόνα 1.19	Φωτογραφία αποπτωτικού κυττάρου από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.	71
Εικόνα 1.20	Διαδοχικές Μορφολογικές κυτταρικές μεταβολές κατά την απόπτωση.	71
Σχήμα 1.21	Διαδοχικά στάδια κατά την απόπτωση.	73
Σχήμα 1.22	Σχηματική απεικόνιση της κασπάσης-3.	74
Σχήμα 1.23	Πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα συγκροτούν τις πλατφόρμες για την ενεργοποίηση των κασπασών Α) στο μονοπάτι των «υποδοχέων θανάτου» και Β) στο μιτοχονδριακό μονοπάτι	76
Σχήμα 1.24	Σχηματική απεικόνιση της Araf-1.	77
Σχήμα 1.25	Σχηματική απεικόνιση της Α) Bcl-2 και Β) Bcl-x _l	77
Σχήμα 1.26	Οδοί της αποπτωτικής διαδικασίας.	78
Σχήμα 1.27	H ADP-ριβόζη.	79
Σχήμα 1.28	Μηχανισμός Δράσης PARP.	79
Σχήμα 1.29	Νεοπλάσματα.	88
Σχήμα 3.1	Παρασκευή υδατικού εναιωρήματος TiO_2 με τη μέθοδο λύματος πηκτής (sol - gel)..	101
Εικόνα 3.2	Κατανομή της υδροδυναμικής ακτίνας των νανοσωματιδίων υδατικών εναιωρημάτων TiO_2 με τη μέθοδο sol – gel.	101
Σχήμα 3.3	Παρασκευή τροποποιημένου με άζωτο TiO_2 .	103

Εικόνα 3.4	Διάταξη <i>micro-Raman</i> τύπου <i>Renishaw inVia Reflex</i> .	105
Σχήμα 3.5	Αναπαράσταση εστίασης <i>laser</i> στο δείγμα κατά τη φασματοσκοπία <i>micro-Raman</i> .	106
Σχήμα 3.6	Σχηματική παράσταση της διάταξης <i>micro-Raman</i> .	107
Σχήμα 3.7	Σχηματική παράσταση της λειτουργίας <i>DLS</i> .	108
Σχήμα 3.8	Η ακτινοβολία που συλλέγεται, από την αλληλεπίδραση της Η/Μ ακτινοβολίας με ένα σωματίδιο.	109
Σχήμα 3.9	Η ακτινοβολία που συλλέγεται από την αλληλεπίδραση της Η/Μ ακτινοβολίας με δύο σωματίδια: Α) όταν η σκεδαζόμενη ακτινοβολία από τα σωματίδια είναι σε φάση Β) όταν η σκεδαζόμενη ακτινοβολία από τα σωματίδια δεν είναι σε φάση.	109
Σχήμα 3.10	Η ακτινοβολία που συλλέγεται από την αλληλεπίδραση της Η/Μ ακτινοβολίας με μεγάλο πλήθος σωματιδίων.	110
Εικόνα 3.11	Γραφική αναπαράσταση μιας τυπική συνάρτησης αυτοσυσχέτισης σε συνάρτηση με το χρόνο.	110
Σχήμα 3.12	Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε.	112
Εικόνα 3.13	Άποψη των κυττάρων <i>MDA-MB-468</i> από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο: α) 36 ώρες μετά την ανακαλλιέργεια και β) 36 ώρες πριν τη νέα ανακαλλιέργεια.	115
Εικόνα 3.14	Άποψη των κυττάρων <i>MCF-7</i> , από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο: α) 36 ώρες μετά την ανακαλλιέργεια και β) 36 ώρες πριν τη νέα ανακαλλιέργεια.	116
Σχήμα 3.15	Αναπαράσταση αιμοκυτταρόμετρου.	119
Σχήμα 3.16	Το <i>MTT</i> ανάγεται από ζωντανά κύτταρα σε φορμαζάνη μωβ χρώματος, σύμφωνα με την χημική αντίδραση που απεικονίζεται.	121
Σχήμα 3.17	Η οξείδωση του <i>MTT</i> πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης πραγματοποιείται μόνο στα βιώσιμα κύτταρα.	122
Σχήμα 3.18	Σχηματική απεικόνιση του συστήματος δεσμών <i>laser</i> που διαπερνούν τη ροή του κυτταρικού εναιωρήματος.	125
Σχήμα 3.19	Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας προετοιμασίας δειγμάτων πρωτεΐνης για ηλεκτροφόρηση και ανάλυση κατά <i>Western</i> .	138
Σχήμα 3.20	Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας προετοιμασίας της ηλεκτροφόρησης για ανάλυση κατά <i>Western</i> .	139
Σχήμα 3.21	Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας προετοιμασίας της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών για ανάλυση κατά <i>Western</i> .	141
Σχήμα 3.22	Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ανασοεντοπισμού των πρωτεϊνών.	142
Εικόνα 3.23	Συσκευή <i>Image Analyser LAS-4000</i> .	143
Σχήμα 3.24	Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας έκθεσης της μεμβράνης και ανάλυσης των αποτελεσμάτων ανοσοαποτύπωσης.	143
Σχήμα 3.25	Δομή της αγαρόζης.	146
Σχήμα 3.26	Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης <i>DNA</i> σε πήκτωμα αγαρόζης.	151
Εικόνα 4.1	Το φάσμα εκπομπής του <i>sol-gel TiO₂</i> καταγράφεται στην περιοχή μηκών κύματος 300 - 500 nm. Ένα μέρος του, αντιστοιχεί στο υπεριώδες τμήμα, ενώ το υπόλοιπο αντιστοιχεί στην ορατή περιοχή του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Στην ένθετη εικόνα (α) παρατίθεται η σχέση μεταξύ της ενέργειας των φωτονίων	153

Εικόνα 4.2	$h\nu$ (eV) και του μεγέθους $(ah\nu)^{1/2}$. Το φάσμα Raman του sol – gel TiO_2 , πριν και μετά από ανόπτηση στους 450°C για 2 ώρες. Η μετατόπιση και η πλάτυνση της καμπύλης στην περίπτωση του ακατέργαστου sol–gel TiO_2 πιθανότατα σχετίζεται με το δραστικό φαινόμενο περιορισμού των φωνονίων (phonon confinement) στις οριακές περιοχές των νανοκρυστάλλων.	155
Εικόνα 4.3	Η κατανομή των υδροδυναμικών ακτίνων R_h σε διαφορετικές γωνίες σκέδασης δείχνει ότι υπάρχουν δύο πληθυσμοί νανοσωματιδίων. Ο πρώτος, με μέγεθος $(2R_h)$ στα 5–6 nm και ο δεύτερος με μέγεθος περίπου στα 40–45 nm.	157
Εικόνα 4.4	Η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος TiO_2 (Evonik P25). Εμφανίζεται μία μόνο κορυφή, με μέση τιμή στα 138.5 nm.	158
Εικόνα 4.5	Η κατανομή του ζ δυναμικού των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος TiO_2 (Evonik P25). Εμφανίζονται δύο περιοχές μεγίστων, ένα τοπικό και ένα ολικό μέγιστο, στην καμπύλη της κατανομής. Η πρώτη εμφανίζεται στην περιοχή των -23.7 mV και η δεύτερη στα -9,09 mV. Συνολικά, το ζ δυναμικό, όπως λαμβάνεται από τη συσκευή μέτρησης, υπολογίζεται ως: $ZP = (-11.7 \pm 8)$ mV.	159
Εικόνα 4.6	Η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος TiO_2 (Sigma Aldrich). Εμφανίζεται μία μόνο κορυφή, με μέση τιμή στα 111.3 nm.	161
Εικόνα 4.7	Η κατανομή του ζ δυναμικού των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος TiO_2 (Sigma Aldrich). Εμφανίζονται τέσσερις περιοχές μεγίστων, τρία τοπικά και ένα ολικό μέγιστο, στην καμπύλη της κατανομής. Η πρώτη εμφανίζεται στην περιοχή των -33.1 mV, η δεύτερη στα -20.8 mV, η τρίτη στα -10.9 mV και η τέταρτη στα -2 mV. Συνολικά, το ζ δυναμικό, όπως λαμβάνεται από τη συσκευή μέτρησης, υπολογίζεται ως: $ZP = (-16.7 \pm 9)$ mV.	162
Εικόνα 4.8	Η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος του τροποποιημένου με άζωτο TiO_2 (N-doped TiO_2). Εμφανίζεται μία μόνο κορυφή, με μέση τιμή στα 129.2 nm.	163
Εικόνα 4.9	Η κατανομή του ζ δυναμικού των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος TiO_2 (Sigma Aldrich). Εμφανίζονται ένα μέγιστο, στην καμπύλη της κατανομής στην περιοχή των -11.4 mV. Συνολικά, το ζ δυναμικό, όπως λαμβάνεται από τη συσκευή μέτρησης, υπολογίζεται ως: $ZP = (-11.4 \pm 7)$ mV.	164
Εικόνα 4.10	Η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος του τροποποιημένου με Άργυρο TiO_2 (Ag-doped TiO_2). Εμφανίζεται μία μόνο κορυφή, με μέση τιμή στα 144.5 nm.	165
Εικόνα 4.11	Η κατανομή του ζ δυναμικού των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος TiO_2 . Εμφανίζονται ένα μέγιστο, στην καμπύλη της κατανομής στην περιοχή των -14.8 mV. Συνολικά, το ζ δυναμικό, όπως λαμβάνεται από τη συσκευή μέτρησης, υπολογίζεται ως: $ZP = (-14.8 \pm 8)$ mV.	166
Εικόνα 4.12	Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου sol-gel TiO_2 στη βιωσιμότητα των κυττάρων – Καμπύλες Επιβίωσης. Κύτταρα MCF-7 και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες sol-gel TiO_2 . Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με UVA ακτινοβολία για 20 λεπτά και επώαστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ΜΤΤ. (Α) Επίδραση της συγκέντρωσης του sol-gel TiO_2 , στη βιωσιμότητα των	169

Εικόνα 4.13	<p>κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργοποιημένου με UV-A sol-gel TiO₂, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως L±δL, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.</p>	170
Εικόνα 4.14	<p>Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου sol-gel TiO₂ στη βιωσιμότητα των κυττάρων - ραβδογράμματα. Κύτταρα MCF-7 και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες sol-gel TiO₂. Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με UVA ακτινοβολία για 20 λεπτά και επώαστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT. (A) Επίδραση της συγκέντρωσης του sol-gel TiO₂, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργοποιημένου με UV-A sol-gel TiO₂, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως L±δL, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.</p>	172
Εικόνα 4.15	<p>Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου TiO₂ Evonik P25, στη βιωσιμότητα των κυττάρων – Καμπύλες Επιβίωσης. Κύτταρα MCF-7 και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες TiO₂ Evonik P25. Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με UVA ακτινοβολία για 20 λεπτά και επώαστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT. (A) Επίδραση της συγκέντρωσης του TiO₂ Evonik P25, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργοποιημένου με UV-A TiO₂ Evonik P25, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως L±δL, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.</p>	173
Εικόνα 4.16	<p>Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου TiO₂ Sigma Aldrich, στη βιωσιμότητα των κυττάρων - ραβδογράμματα. Κύτταρα MCF-7 και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες TiO₂ Sigma Aldrich. Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με UVA ακτινοβολία για 20 λεπτά και επώαστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT. (A) Επίδραση της συγκέντρωσης του TiO₂ Sigma Aldrich, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργοποιημένου με UV-A TiO₂ Sigma Aldrich, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως L±δL, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.</p>	175

Εικόνα 4.17	<p>Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου TiO_2 Sigma Aldrich, στη βιωσιμότητα των κυττάρων - ραβδογράμματα. Κύτταρα MCF-7 και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες TiO_2 Sigma Aldrich. Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με UVA ακτινοβολία για 20 λεπτά και επώαστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT. (A) Επίδραση της συγκέντρωσης του TiO_2 Sigma Aldrich, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργοποιημένου με UV-A TiO_2 Sigma Aldrich, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $L \pm \delta L$, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.</p>	176
Εικόνα 4.18	<p>Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου TiO_2, τροποποιημένου με άζωτο (N-doped TiO_2), στη βιωσιμότητα των κυττάρων – Καμπύλες Επιβίωσης. Κύτταρα MCF-7 και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες N-doped TiO_2. Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με ορατή ακτινοβολία για 20 λεπτά και επώαστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT. (A) Επίδραση της συγκέντρωσης του N-doped TiO_2 στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργοποιημένου με ορατή ακτινοβολία N-doped TiO_2, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $L \pm \delta L$, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.</p>	177
Εικόνα 4.19	<p>Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου TiO_2, τροποποιημένου με άζωτο (N-doped TiO_2), στη βιωσιμότητα των κυττάρων - ραβδογράμματα. Κύτταρα MCF-7 και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες N-doped TiO_2. Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με ορατή ακτινοβολία για 20 λεπτά και επώαστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT. (A) Επίδραση της συγκέντρωσης του N-doped TiO_2, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργοποιημένου με ορατή ακτινοβολία, N-doped TiO_2, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $L \pm \delta L$, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.</p>	178
Εικόνα 4.20	<p>Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου TiO_2, τροποποιημένου με Άργυρο TiO_2 (Ag -doped TiO_2), στη βιωσιμότητα των κυττάρων – Καμπύλες Επιβίωσης. Κύτταρα MCF-7 και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες Ag-doped TiO_2. Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με ακτινοβολία UV-A για 20 λεπτά και επώαστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT. (A) Επίδραση της συγκέντρωσης του Ag-doped TiO_2 στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργοποιημένου με ακτινοβολία UV-A, Ag-doped TiO_2, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $L \pm \delta L$, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.</p>	180

Εικόνα 4.21	Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου TiO_2 , τροποποιημένου Άργυρο TiO_2 (Ag -doped TiO_2), στη βιωσιμότητα των κυττάρων - ραβδογράμματα. Κύτταρα MCF-7 και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες Ag-doped TiO_2 . Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με ακτινοβολία UV-A για 20 λεπτά και επώαστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT. (A) Επίδραση της συγκέντρωσης του Ag-doped TiO_2 , στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργοποιημένου με ακτινοβολία UV-A, Ag-doped TiO_2 , στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $L \pm \delta L$, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.	181
Εικόνα 4.22	Τυπική εικόνα κυτταρομετρίας ροής, για ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, με βάση το περιεχόμενο ενός πληθυσμού κυττάρων, σε DNA, μετά από χρώση με PI.	183
Εικόνα 4.23	Επίδραση του φωτο-ενεργοποιημένου sol-gel TiO_2 στον κυτταρικό κύκλο - Αποτελέσματα από την Κυτταρομετρία Ροής. Κύτταρα MDA-MB-468 και MCF-7 επώαστηκαν παρουσία φωτοενεργοποιημένου με ακτινοβολία UV-A sol-gel TiO_2 (15 μ M) για 48 ώρες και μονιμοποιήθηκαν. Ακολούθησε η ποσοτικοποίηση DNA με χρώση με PI και κυτταρομετρία ροής (FACSscan). (A) Αποτελέσματα από το FACS, για τα MCF-7 κύτταρα. Μετρήθηκαν 6000 γεγονότα ανά δείγμα. Ο δείκτης M2 υποδηλώνει το πλήθος των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G_1 και ο M3, το πλήθος των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις G_2/M : (a) control κύτταρα, (b) κύτταρα στα οποία προστέθηκαν 15 μ M sol-gel TiO_2 , (c) κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν με UV-A, (d) κύτταρα στα οποία προστέθηκε φωτο-ενεργοποιημένο sol-gel TiO_2 . (B) Αποτελέσματα από το FACS, για τα MDA-MB-468 κύτταρα. Μετρήθηκαν 6000 γεγονότα ανά δείγμα. (a) control κύτταρα, (b) κύτταρα στα οποία προστέθηκαν 15 μ M sol-gel TiO_2 , (c) κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν με UV-A, (d) κύτταρα στα οποία προστέθηκε φωτο-ενεργοποιημένο sol-gel TiO_2 .	185
Εικόνα 4.24	Συγκριτικά ραβδογράμματα που απεικονίζουν το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις G_1 και G_2 του κυτταρικού κύκλου, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από την κυτταρομετρία ροής, τα οποία παρουσιάζονται ως $\bar{x} \pm \delta x$, όπως προέκυψαν από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.	186
Εικόνα 4.25	Πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό της ποσότητας της πρωτεΐνης κάθε δείγματος.	187
Εικόνα 4.26	Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης TiO_2 από ανάλυση κατά Western. Το φωτο - ενεργοποιημένο TiO_2 επάγει την θραύση του PARP στα κύτταρα MDA-MB-468. Κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO_2 (15 μ M) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η θραύση του PARP, με ανοσοαποτύπωση και αντίσωμα που αναγνωρίζει την ανέπαφη PARP, αλλά και τα πρωτεολυτικά θραύσματα του μορίου (A και C). Στην εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης ζώνης για την ανέπαφη PARP, αλλά και τα πρωτεολυτικά θραύσματα του μορίου. Ως θετικοί μάρτυρες, για τον έλεγχο της θραύσης της	189

	<p>PARP, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων, στα οποία προστέθηκαν 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη λύση, όπως και κύτταρα από καλλιέργεια που απουσίαζε ο ορός. Το ποσό της τουμπουλίνης, που εμφανίζεται στο φιλμ αυτοραδιογραφίας για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων της υπό εξέταση πρωτεΐνης. (B και D) Ποσοτικοποίηση της οπτικής πυκνότητας του λόγου θραύσμα PARP/ανέπαφη PARP/προς τουμπουλίνη. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το $*P < 0.05$, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.</p>	
<p>Εικόνα 4.27</p>	<p>Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης TiO_2 στα κύτταρα MDA-MB-468, από ανάλυση κατά Western. Κύτταρα MDA-MB-468 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO_2 (15μM) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάσθηκε η έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων, με ανοσοαποτύπωση. Ως θετικοί μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων, στα οποία προστέθηκαν 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη λύση, όπως και κύτταρα από καλλιέργεια που απουσίαζε ο ορός. Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO_2 σε μορφή sol-gel, στα κύτταρα MDA-MB-468, οδηγεί σε μείωση της Bcl-2 και αύξηση της Bax, γεγονός που αποτελεί ένδειξη για αποπτωτική δραστηριότητα. Το ποσό της τουμπουλίνης, που εμφανίζεται στο φιλμ αυτοραδιογραφίας για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών.</p>	<p>191</p>
<p>Εικόνα 4.28</p>	<p>Αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης κατά Western κατά τη μελέτη της ρύθμισης και έκφρασης των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Κύτταρα MDA-MB-468 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO_2 (15μM). Ως θετικοί μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων, στα οποία προστέθηκαν 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη λύση, όπως και κύτταρα από καλλιέργεια που απουσίαζε ο ορός. Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO_2 σε μορφή sol-gel, στα κύτταρα MDA-MB-468, οδηγεί σε μείωση της Bcl-2 και αύξηση της Bax, γεγονός που αποτελεί ένδειξη για αποπτωτική δραστηριότητα. Το ποσό της τουμπουλίνης, που εμφανίζεται στο φιλμ αυτοραδιογραφίας για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το $*P < 0.05$, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.</p>	<p>192</p>
<p>Εικόνα 4.29</p>	<p>Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης TiO_2 στα κύτταρα MCF-7, από ανάλυση κατά Western. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO_2 (15μM) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάσθηκε η έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων, με ανοσοαποτύπωση. Ως θετικοί μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων, στα οποία προστέθηκαν 200 nM</p>	<p>193</p>

	<p>σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη λύση, όπως και κύτταρα από καλλιέργεια που απουσίαζε ο ορός. Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO_2 σε μορφή sol-gel, στα κύτταρα MCF-7 δεν προκαλεί αλλαγή στην έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων. Το ποσό της τουμπουλίνης, που εμφανίζεται στο φιλμ αυτοραδιογραφίας για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το $*P < 0.05$, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.</p>	
<p>Εικόνα 4.30</p>	<p>Αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης κατά Western κατά τη μελέτη της ρύθμισης και έκφρασης των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO_2 (15μM). Ως θετικοί μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων, στα οποία προστέθηκαν 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη λύση, όπως και κύτταρα από καλλιέργεια που απουσίαζε ο ορός. Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO_2 σε μορφή sol-gel, στα κύτταρα MCF-7, δεν προκαλεί αλλαγή στην έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων. Το ποσό της τουμπουλίνης, που εμφανίζεται στο φιλμ αυτοραδιογραφίας για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το $*P < 0.05$, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.</p>	<p>194</p>
<p>Εικόνα 4.31</p>	<p>. Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης του εναιωρήματος TiO_2 (Evonik P25), από ανάλυση κατά Western. Το φωτο-ενεργοποιημένο TiO_2 (Evonik P25) επάγει την θραύση του PARP στα κύτταρα MDA-MB-468. Κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO_2 (15μM) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η θραύση του PARP, με ανοσοαποτύπωση και αντίσωμα που αναγνωρίζει την ανέπαφη PARP, αλλά και τα πρωτεολυτικά θραύσματα του μορίου (A και C). Στην εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης ζώνης για την ανέπαφη PARP, αλλά και τα πρωτεολυτικά θραύσματα του μορίου. Ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο της θραύσης της PARP, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων της υπό εξέταση πρωτεΐνης. (B και D). Ποσοτικοποίηση της οπτικής πυκνότητας του λόγου θραύσμα PARP/ανέπαφη PARP/προς τουμπουλίνη. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το $*P < 0.05$, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.</p>	<p>195</p>
<p>Εικόνα 4.32</p>	<p>Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης του εναιωρήματος TiO_2 (Sigma Aldrich), από ανάλυση κατά Western. Το</p>	<p>196</p>

	<p>φωτο - ενεργοποιημένο TiO_2 (Sigma Aldrich) επάγει την θραύση του 1PARP στα κύτταρα MDA-MB-468. Κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών επωάστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO_2 (15μM) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η θραύση του PARP, με ανοσοαποτύπωση και αντίσωμα που αναγνωρίζει την ανέπαφη PARP, αλλά και τα πρωτεολυτικά θραύσματα του μορίου (A και C). Στην εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης ζώνης για την ανέπαφη PARP, αλλά και τα πρωτεολυτικά θραύσματα του μορίου. Ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο της θραύσης της PARP, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Το ποσό της τουμπουλίνης, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων της υπό εξέταση πρωτεΐνης. (B και D). Ποσοτικοποίηση της οπτικής πυκνότητας του λόγου θραύσμα PARP/ανέπαφη PARP/προς τουμπουλίνη. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean\pmSD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το *P < 0.05, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.</p>	
<p>Εικόνα 4.33</p>	<p>Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης TiO_2 στα κύτταρα MDA-MB-468, από ανάλυση κατά Western. Κύτταρα MDA-MB-468 επωάστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO_2 και των δύο τύπων (Evonik P25 και Sigma Aldrich) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων, με ανοσοαποτύπωση. Ως θετικός, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ναοκρυστάλλων TiO_2 (Evonik P25) ή (Sigma Aldrich) σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα MDA-MB-468, οδηγεί σε αύξηση της Bax, γεγονός που αποτελεί ένδειξη για αποπτωτική δραστηριότητα. Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών.</p>	<p>198</p>
<p>Εικόνα 4.34</p>	<p>Αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης κατά Western κατά τη μελέτη της ρύθμισης και έκφρασης των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Κύτταρα MDA-MB-468 επωάστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO_2 (15μM) και των δύο τύπων (Evonik P25 και Sigma Aldrich). Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ναοκρυστάλλων TiO_2 (Evonik P25) ή (Sigma Aldrich) σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα MDA-MB-468, οδηγεί σε αύξηση της Bax, γεγονός που αποτελεί ένδειξη για αποπτωτική δραστηριότητα. Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean\pmSD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το *P</p>	<p>199</p>

Εικόνα 4.35	<p>< 0.05, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.</p> <p>Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης TiO_2 στα κύτταρα MCF-7, από ανάλυση κατά Western. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO_2 και των δύο τύπων (Evonik P25 και Sigma Aldrich) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων, με ανοσοαποτύπωση. Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτοενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ναοκρυστάλλων TiO_2 (Evonik P25) ή (Sigma Aldrich) σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα MCF-7, δεν προκαλεί μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνών που μελετώνται. Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών.</p>	200
Εικόνα 4.36	<p>Αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης κατά Western κατά τη μελέτη της ρύθμισης και έκφρασης των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO_2 (15μM) και των δύο τύπων (Evonik P25 και Sigma Aldrich). Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτοενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ναοκρυστάλλων TiO_2 (Evonik P25) ή (Sigma Aldrich) σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα MCF-7, δεν προκαλεί μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνών που μελετώνται. Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Το ποσό της τουμπουλίνης, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean±SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το *P < 0.05, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.</p>	201
Εικόνα 4.37	<p>Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης του εναιωρήματος N-doped TiO_2, από ανάλυση κατά Western. Το φωτο – ενεργοποιημένο, με ορατή ακτινοβολία N-doped TiO_2, επάγει την θραύση του PARP στα κύτταρα MDA-MB-468. Κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου ή μη N-doped TiO_2 (40μM) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η θραύση του PARP, με ανοσοαποτύπωση και αντίσωμα που αναγνωρίζει την ανέπαφη PARP, αλλά και τα πρωτεολυτικά θραύσματα του μορίου (A και C). Στην εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης ζώνης. Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων της PARP (B και D). Ποσοτικοποίηση της οπτικής πυκνότητας του λόγου θραύσμα PARP/ανέπαφη PARP/προς τουμπουλίνη. Τα δεδομένα παρουσιάζονται</p>	203

<p>Εικόνα 4.38</p>	<p>ως $mean \pm SD$ από τρία ανεξάρτητα πειράματα, με επίπεδο σημαντικότητας το $*P < 0.05$, για τη σύγκριση με τα control δείγματα. Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης του εναιωρήματος Ag-doped TiO_2, από ανάλυση κατά Western. Το φωτο-ενεργοποιημένο, με UV-A ακτινοβολία (20 min) Ag-doped TiO_2, επάγει την θραύση του PARP στα κύτταρα MDA-MB-468. Κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου ή μη Ag-doped TiO_2 (20μM) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η θραύση του PARP, με ανοσοαποτύπωση και αντίσωμα που αναγνωρίζει την ανέπαφη PARP, αλλά και τα πρωτεολυτικά θραύσματα του μορίου (A και C). Στην εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης ζώνης. Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων της PARP (B και D). Ποσοτικοποίηση της οπτικής πυκνότητας του λόγου θραύσμα PARP/ανέπαφη PARP/προς τουμπουλίνη. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από τρία ανεξάρτητα πειράματα, με επίπεδο σημαντικότητας το $*P < 0.05$, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.</p>	<p>204</p>
<p>Εικόνα 4.39</p>	<p>Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης TiO_2 στα κύτταρα MDA-MB-468, από ανάλυση κατά Western. Κύτταρα MDA-MB-468 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου ή μη (με ορατή ακτινοβολία) N-doped TiO_2 (40μM) ή φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη Ag-doped TiO_2 (20μM) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων, με ανοσοαποτύπωση. Ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο της χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ορατή ακτινοβολία, ναοκρυστάλλων N-doped TiO_2, σε μορφή εναιωρήματος, οδηγεί σε μία πολύ μικρή αύξηση της Bax, που αποτελεί ένδειξη για αποπτωτική δραστηριότητα. Η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ή μη, ναοκρυστάλλων Ag-doped TiO_2, σε μορφή εναιωρήματος, οδηγεί σε μείωση της Bcl-2, και σε αύξηση της Bax. Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών.</p>	<p>205</p>
<p>Εικόνα 4.40</p>	<p>Αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης κατά Western κατά τη μελέτη της ρύθμισης και έκφρασης των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Κύτταρα MDA-MB-468 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου ή μη (με ορατή ακτινοβολία) N-doped TiO_2 (40μM) ή φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη Ag-doped TiO_2 (20μM) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων, με ανοσοαποτύπωση. Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ορατή ακτινοβολία, ναοκρυστάλλων N-doped TiO_2, στα κύτταρα MDA-MB-468, οδηγεί σε μία πολύ μικρή αύξηση της</p>	<p>206</p>

	<p><i>Bax</i>. Η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ή μη, νανοκρυστάλλων Ag-doped TiO₂, σε μορφή εναιωρήματος, οδηγεί σε μείωση της Bcl-2, και σε αύξηση της Bax. Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Το ποσό της τουμπουλίνης, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean±SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το *P < 0.05, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.</p>	
<p>Εικόνα 4.41</p>	<p>Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης TiO₂ στα κύτταρα MCF-7, από ανάλυση κατά Western. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου ή μη (με ορατή ακτινοβολία) N-doped TiO₂ (40μM) ή φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη Ag-doped TiO₂ (20μM) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάσθηκε η έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων, με ανοσοαποτύπωση. Ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο της χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ορατή ακτινοβολία, νανοκρυστάλλων N-doped TiO₂, ή η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ή μη, νανοκρυστάλλων Ag-doped TiO₂, σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα MCF-7, δεν προκαλεί μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνών που μελετώνται. Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών.</p>	<p>207</p>
<p>Εικόνα 4.42</p>	<p>Αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης κατά Western κατά τη μελέτη της ρύθμισης και έκφρασης των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου ή μη (με ορατή ακτινοβολία) N-doped TiO₂ (40μM) ή φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη Ag-doped TiO₂ (20μM) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάσθηκε η έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων, με ανοσοαποτύπωση. Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ορατή ακτινοβολία, νανοκρυστάλλων N-doped TiO₂, ή η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ή μη, νανοκρυστάλλων Ag-doped TiO₂, σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα MCF-7, δεν προκαλεί μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνών που μελετώνται. Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Το ποσό της τουμπουλίνης, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean±SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το *P < 0.05, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.</p>	<p>208</p>
<p>Εικόνα 4.43</p>	<p>Εικόνες που λαμβάνονται από την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών MDA-MB-468</p>	<p>210</p>

Εικόνα 4.44	<p>(εικόνα A) και MCF-7 (εικόνα B) επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO₂ (15μM) και στη συνέχεια απομονώθηκε το ολικό DNA). Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες της ηλεκτροφόρησης του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Το φωτο-ενεργοποιημένο με ακτινοβολία UV-A (350 nm) TiO₂ σε μορφή sol-gel, προκαλεί DNA laddering στα κύτταρα MDA-MB-468 (A), αλλά όχι και στα MCF-7 (B). Ως θετικός μάρτυρας, για την εκτίμηση του κατακερματισμού του γενετικού υλικού, χρησιμοποιήθηκε δείγμα DNA από κύτταρα, στα οποία προστέθηκαν 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη διαδικασία απομόνωσης.</p>	211
Εικόνα 4.45	<p>Εικόνες που λαμβάνονται από την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Κύτταρα MDA-MB-468 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου, με UV-A ή μη Ag-doped TiO₂ (20μM) ή φωτοενεργοποιημένου με UV-A, ή μη TiO₂ (Sigma Aldrich) (S) ή TiO₂ (Evonik P25) (D) ή φωτοενεργοποιημένου με ορατή ακτινοβολία ή μη N-doped TiO₂ και στη συνέχεια απομονώθηκε το ολικό DNA. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες της ηλεκτροφόρησης του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Φαίνεται ότι προκαλείται DNA laddering στα κύτταρα MDA-MB-468, υπό τη δράση των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ναοκρυστάλλων Ag-doped TiO₂, ή των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ναοκρυστάλλων TiO₂ (Sigma Aldrich) και σε μικρότερο ποσοστό, υπό τη δράση των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ναοκρυστάλλων TiO₂ (Evonik P25) ή των φωτο-ενεργοποιημένων με ορατή ακτινοβολία, ναοκρυστάλλων N-doped TiO₂ ή μη φωτο-ενεργοποιημένων ναοκρυστάλλων Ag-doped TiO₂. Ως θετικός μάρτυρας, για την εκτίμηση του κατακερματισμού του γενετικού υλικού, χρησιμοποιήθηκε δείγμα DNA από κύτταρα, στα οποία προστέθηκαν 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη διαδικασία απομόνωσης.</p>	212
Εικόνα 5.1	<p>Εικόνες που λαμβάνονται από την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου, με UV-A ή μη Ag-doped TiO₂ (20μM) ή φωτοενεργοποιημένου με UV-A, ή μη TiO₂ (Sigma Aldrich) ή TiO₂ (Evonik P25) ή φωτοενεργοποιημένου με ορατή ακτινοβολία ή μη N-doped TiO₂ και στη συνέχεια απομονώθηκε το ολικό DNA. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες της ηλεκτροφόρησης του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Φαίνεται ότι δεν παρατηρείται κατακερματισμός του DNA στα κύτταρα MCF-7 υπό τη δράση των ουσιών αυτών. Ως θετικός μάρτυρας, για την εκτίμηση του κατακερματισμού του γενετικού υλικού, χρησιμοποιήθηκε δείγμα DNA από κύτταρα, στα οποία προστέθηκαν 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη διαδικασία απομόνωσης.</p>	221
Εικόνα 5.2	<p>Συγκριτικά αποτελέσματα από τη δοκιμή MTT. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MCF-7 επώάζονται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων TiO₂ sol-gel, TiO₂ Evonik P25, TiO₂ Sigma Aldrich (100% anatase), N-doped TiO₂ και Ag-doped TiO₂ για 48 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean±SD από πέντε ανεξάρτητα πειράματα.</p> <p>Συγκριτικό ραβδόγραμμα από τη δοκιμή MTT. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MCF-7 επώάζονται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων TiO₂ sol-gel, TiO₂ EvonikP25, TiO₂ Sigma Aldrich (100% anatase), N-doped TiO₂ και Ag-doped TiO₂ για 48 ώρες. Τα δεδομένα</p>	222

	παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από πέντε ανεξάρτητα πειράματα.	
Εικόνα 5.3	Συγκριτικά αποτελέσματα από την δοκιμή MTT. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MDA-MB-468 επωάζονται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων TiO_2 sol-gel, TiO_2 Evonik P25 ή TiO_2 Sigma Aldrich (100% anatase), N-doped TiO_2 και Ag-doped TiO_2 για 48 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από πέντε ανεξάρτητα πειράματα.	223
Εικόνα 5.4	Συγκριτικό ραβδόγραμμα από τη δοκιμή MTT. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MDA-MB-468 επωάζονται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων TiO_2 sol-gel, TiO_2 Evonik P25 ή TiO_2 Sigma Aldrich (100% anatase), N-doped TiO_2 και Ag-doped TiO_2 για 48 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από πέντε ανεξάρτητα πειράματα.	224
Εικόνα 5.5	Συγκριτικά αποτελέσματα από την δοκιμή MTT. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MCF-7 επωάζονται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων φωτο-ενεργοποιημένου (με UV-A για 20 min), TiO_2 sol-gel, TiO_2 Evonik P25, TiO_2 Sigma Aldrich (100% anatase) N-doped TiO_2 (ορατή ακτινοβολία για 20 min) και Ag-doped TiO_2 (UV-A για 20 min), για 48 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από πέντε ανεξάρτητα πειράματα.	225
Εικόνα 5.6	Συγκριτικό ραβδόγραμμα από την δοκιμή MTT. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MCF-7 επωάζονται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων φωτο-ενεργοποιημένου (με UV-A για 20 min), TiO_2 sol-gel, TiO_2 Evonik P25, TiO_2 Sigma Aldrich (100% anatase), N-doped TiO_2 (ορατή ακτινοβολία για 20 min) και Ag-doped TiO_2 (UV-A για 20 min), για 48 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από πέντε ανεξάρτητα πειράματα.	225
Εικόνα 5.7	Συγκριτικά αποτελέσματα από την δοκιμή MTT. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MDA-MB-468 επωάζονται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων φωτο-ενεργοποιημένου (με UV-A για 20 min), TiO_2 sol-gel, TiO_2 Evonik P25, TiO_2 Sigma Aldrich (100% anatase) N-doped TiO_2 (ορατή ακτινοβολία για 20 min) και Ag-doped TiO_2 (UV-A για 20 min), για 48 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από πέντε ανεξάρτητα πειράματα.	226
Εικόνα 5.8	Συγκριτικό ραβδόγραμμα από την δοκιμή MTT. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MDA-MB-468 επωάζονται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων φωτο-ενεργοποιημένου (με UV-A για 20 min), TiO_2 sol-gel, TiO_2 Evonik P25, TiO_2 Sigma Aldrich (100% anatase) N-doped TiO_2 (ορατή ακτινοβολία για 20 min) και Ag-doped TiO_2 (UV-A για 20 min), για 48 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από πέντε ανεξάρτητα πειράματα.	227

<i>Πίνακας Περιεχομένων</i>		Σελ
Πρόλογος		8
Συντμήσεις		13
Πίνακας Εικόνων και Διαγραμμάτων		19
<i>Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή – Μέρος Α'</i>		39
Μέρος Α		40
A.1.1. Οξείδια		40
A.1.2. Βασικές Έννοιες στη Φυσική της Στερεάς Κατάστασης		42
A.1.2.1. Πλέγματα Bravais		44
A.1.2.2. Ενεργειακές Ζώνες και Αγωγιμότητα των Κρυσταλλικών Υλικών		47
A.1.3. Φωτοκατάλυση		52
A.1.3.1. Οι Φωτοκαταλύτες και τα χαρακτηριστικά τους		52
A.1.3.2. Μηχανισμός Φωτοκατάλυσης		53
A.1.4. Το διοξείδιο του Τιτανίου (TiO ₂)		55
A.1.4.1. Ιστορική αναδρομή		55
A.1.4.2. Φυσικοχημεία του Διοξειδίου του Τιτανίου (TiO ₂)		56
A.1.5. Παράγοντες φωτοκαταλυτικής απόδοσης		58
A.1.5.1. Μέγεθος νανοσωματιδίων		58
A.1.5.2. Χημική τροποποίηση TiO ₂		58
A.1.5.2.1 Τροποποίηση του TiO ₂ με Άργυρο		58
A.1.5.2.2 Τροποποίηση του TiO ₂ με Άζωτο		59
A.1.6. Εφαρμογές TiO ₂		60
A.1.7. Το TiO ₂ ως αντικαρκινικός παράγοντας		61
<i>Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή – Μέρος Β'</i>		63
Μέρος Β		63
B.1.1. Κυτταρικός κύκλος		63
B.1.1.1. Γενικά		63
B.1.2.1. Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου		63
B.1.2. Κυτταρικός Θάνατος		68
B.1.2.1. Νέκρωση		68
B.1.2.2. Απόπτωση		69
B.1.2.2.1 Μορφολογικές μεταβολές της απόπτωσης		71
B.1.2.2.2. Βιοχημικές μεταβολές της απόπτωσης		74
B.1.3. Οξειδωτικό Στρες		79
B.1.3.1 Γενικά		79

B.1.3.2. Ελεύθερες Ρίζες	80
B.1.3.3. Οι συνέπειες της παραγωγής των ελευθέρων ριζών στους οργανισμούς - Οξειδωτικό στρες	83
B.1.3.4. Το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα	85
B.1.3.5. Συνέπειες οξειδωτικού στρες	86
B.1.4. Καρκίνος	88
B.1.4.1. Γενικά	88
B.1.4.2. Ορολογία	90
B.1.4.3. Αίτια	90
B.1.4.4. Συμπτωματολογία	91
B.1.4.5. Διάγνωση	92
B.1.4.6. Αντιμετώπιση	92
B.1.4.7. Καρκίνος του μαστού	92
B.1.4.7.1. Στοιχεία εμβρυολογίας, ανατομικής και φυσιολογίας	92
B.1.4.7.2. Επιδημιολογία	93
B.1.4.7.3. Αιτιοπαθογένεση	93
B.1.4.7.4. Βιολογία και διασπορά	94
B.1.4.7.5. Κλινική εικόνα	94
B.1.4.7.6. Διάγνωση	95
Κεφάλαιο 2. Σκοπός της Μελέτης	
2. Σκοπός της Μελέτης	97
Κεφάλαιο 3. Υλικά & Μέθοδοι	
3.1. Παρασκευή και Χαρακτηρισμός TiO ₂	100
3.1.1. Παρασκευή TiO ₂	100
3.1.1.1. Παρασκευή υδατικού εναιωρήματος TiO ₂ με τη μέθοδο λύματος πηκτής (sol - gel)	100
3.1.1.2. Παρασκευή του εναιωρήματος TiO ₂ Evonik P25 – (75% ανατάσης / 25% ρουτίλιο), μέγεθος <30nm, SSA: 55 m ² /g)	102
3.1.1.3. Παρασκευή του εναιωρήματος TiO ₂ Sigma Aldrich (100% ανατάσης), μέγεθος <25nm, SSA: 200–220 m ² /g)	103
3.1.1.4. Τροποποίηση με Άζωτο	103
3.1.1.4.1. Παρασκευή τροποποιημένου με Άζωτο, TiO ₂ (N-doped TiO ₂)	103
3.1.1.4.2. Παρασκευή του εναιωρήματος τροποποιημένου με άζωτο TiO ₂ (N-doped TiO ₂)	104
3.1.1.5. Τροποποίηση με Άργυρο	104
3.1.1.5.1. Παρασκευή τροποποιημένου με Άργυρο, TiO ₂ (Ag-doped TiO ₂)	104
3.1.1.4.2. Παρασκευή του εναιωρήματος τροποποιημένου με Άργυρο, TiO ₂ (Ag -doped TiO ₂)	104

3.1.1.6. Πειραματικές Διατάξεις - Όργανα	104
3.1.2 Χαρακτηρισμός TiO ₂	105
3.1.2.1. Χαρακτηρισμός του λύματος - πηκτής (sol – gel) TiO ₂	105
3.1.2.2 Χαρακτηρισμός του εναιωρήματος TiO ₂ Evonik P25.	111
3.1.2.3 Χαρακτηρισμός του εναιωρήματος TiO ₂ Sigma Aldrich	112
3.1.2.4. Χαρακτηρισμός του εναιωρήματος τροποποιημένου με άζωτο TiO ₂ (N-doped TiO ₂)	112
3.1.2.5. Χαρακτηρισμός του εναιωρήματος τροποποιημένου με Άργυρο TiO ₂ (Ag-doped TiO ₂)	112
3.2. Αντισώματα και Ειδικά Αντιδραστήρια	113
3.2.1. Αντισώματα	113
3.2.2. Χημικά Αντιδραστήρια και Αναλώσιμα	113
3.3. Κυτταρικές Καλλιέργειες	114
3.3.1. MDA-MB-468	115
3.3.2. MCF-7	116
3.3.3. Συνθήκες Καλλιέργειας	117
3.3.3.1 Καλλιέργεια και συντήρηση κυττάρων	117
3.3.3.1.1. Μέτρηση κυττάρων με χρήση αιμοκυτταρόμετρου	118
3.3.3.2. Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων	119
3.4. Μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων - MTT colorimetric assay.	120
3.5. Κυτταρομετρία Ροής – FACScan	123
3.6. Απομόνωση πρωτεϊνών	128
3.6.1. Εκχύλιση πρωτεϊνών από κύτταρα	128
3.6.2. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών – Bradford Assay	131
3.6.2.1. Σχεδιασμός πρότυπης καμπύλης	132
3.6.2.2. Φωτομέτρηση δειγμάτων	132
3.6.3. Ηλεκτροφόρηση	133
3.6.3.1. Ανάλυση κατά Western (Western Blotting)	135
3.6.3.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS - PAGE)	135
3.6.3.3. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	139
3.6.3.4. Ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών με χρήση χημειοφωταύγειας	141
3.6.3.5. Πυκνομετρική ανάλυση	144
3.7. Μέθοδος ποσοτικοποίησης του κατακερματισμένου DNA (DNA fragmentation) – Κατάτμηση DNA (DNA laddering)	145
3.7.1. Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης	146
3.7.1.1. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	146

3.8. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	151
Κεφάλαιο 4. Αποτελέσματα	152
4.1. Χαρακτηρισμός TiO ₂	153
4.1.1. Χαρακτηρισμός του λύματος - πηκτής (sol – gel) TiO ₂	153
4.1.2. Χαρακτηρισμός του εναιωρήματος TiO ₂ Evonik P25	157
4.1.3. Χαρακτηρισμός του εναιωρήματος TiO ₂ (Sigma Aldrich)	160
4.1.4. Χαρακτηρισμός του εναιωρήματος τροποποιημένου με άζωτο TiO ₂ (N-doped TiO ₂)	162
4.1.5. Χαρακτηρισμός του εναιωρήματος τροποποιημένου με Άργυρο TiO ₂ (Ag-doped TiO ₂)	164
4.2. Μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων - MTT colorimetric assay	166
4.2.1. Μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων υπό την επίδραση λύματος - πηκτής (sol – gel) TiO ₂	168
4.2.2. Μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων υπό την επίδραση του εναιωρήματος TiO ₂ (Evonik P25)	171
4.2.3. Μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων υπό την επίδραση του εναιωρήματος TiO ₂ (Sigma Aldrich)	173
4.2.4. Μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων υπό την επίδραση του εναιωρήματος του τροποποιημένου με άζωτο TiO ₂ (N-doped TiO ₂)	176
4.2.5. Μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων υπό την επίδραση του εναιωρήματος του τροποποιημένου με Άργυρο TiO ₂ (Ag-doped TiO ₂)	179
4.3. Κυτταρομετρία Ροής – FACScan	181
4.3.1. Χρώση με PI (Propidium Iodide) - Κυτταρομετρία ροής (Επίδραση του φωτο-ενεργοποιημένου sol-gel TiO ₂ στον κυτταρικό κύκλο)	182
4.4. Απομόνωση πρωτεϊνών	186
4.4.1. Εκχύλιση πρωτεϊνών από κύτταρα - Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών	186
4.4.2. Ανάλυση κατά Western (Western Blotting) (Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS - PAGE) - Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης)	187
4.4.3. Έλεγχος αποπτωτικής δράσης του sol-gel TiO ₂	188
4.4.3.1. Επίδραση του sol-gel TiO ₂ στην ενεργοποίηση της PARP	188
4.4.3.2. Επίδραση του sol-gel TiO ₂ στη ρύθμιση και έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών	190
4.4.4. Έλεγχος αποπτωτικής δράσης των εναιωρημάτων TiO ₂ (Evonik P25) και TiO ₂ (Sigma Aldrich)	194
4.4.4.1. Επίδραση του εναιωρήματος TiO ₂ (Evonik P25) στην ενεργοποίηση της PARP	195
4.4.4.2. Επίδραση του εναιωρήματος TiO ₂ (Sigma Aldrich) στην ενεργοποίηση της PARP	196
4.4.4.3. Επίδραση των εναιωρημάτων TiO ₂ (Evonik P25) και TiO ₂ (Sigma Aldrich) στη ρύθμιση και έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών	197

4.4.5. Έλεγχος αποπτωτικής δράσης των εναιωρημάτων του τροποποιημένου με άζωτο TiO ₂ (N-doped TiO ₂) και του τροποποιημένου με Άργυρο TiO ₂ (Ag-doped TiO ₂)	201
4.4.5.1. Επίδραση του εναιωρήματος του τροποποιημένου με άζωτο TiO ₂ (N-doped TiO ₂) στην ενεργοποίηση της PARP	202
4.4.5.2. Επίδραση του εναιωρήματος του τροποποιημένου με Άργυρο TiO ₂ (Ag-doped TiO ₂) στην ενεργοποίηση της PARP	203
4.4.5.3. Επίδραση των εναιωρημάτων του τροποποιημένου με άζωτο TiO ₂ (N-doped TiO ₂) και του τροποποιημένου με Άργυρο TiO ₂ (Ag-doped TiO ₂) στη ρύθμιση και έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών	205
4.5. Μέθοδος ποσοτικοποίησης του κατακερματισμένου DNA - Κατάτμηση DNA (DNA laddering) - Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	209
4.5.1. Εκτίμηση του κατακερματισμού του DNA υπό την επίδραση του sol-gel TiO ₂	209
4.5.2. Εκτίμηση του κατακερματισμού του DNA υπό την επίδραση εναιωρημάτων TiO ₂ (Evonik P25), TiO ₂ (Sigma Aldrich), του N-doped TiO ₂ και του Ag-doped TiO ₂	210
Κεφάλαιο 5. Συζήτηση Αποτελεσμάτων	213
5. Συζήτηση Αποτελεσμάτων	214
Βιβλιογραφία	237
Περίληψη στην ελληνική γλώσσα	251
Περίληψη στην αγγλική γλώσσα	255
Βιογραφικό Σημείωμα	260

Εισαγωγή

Κεφάλαιο

1

Εισαγωγή

Κεφάλαιο 1^ο**Μέρος Α' – Φυσικοχημεία****A.1.1 Οξείδια**

Οξείδια ονομάζονται οι ενώσεις των χημικών στοιχείων με το οξυγόνο.

Τα οξείδια είναι είτε μοριακές ενώσεις, όταν το στοιχείο είναι αμέταλλο, είτε ιοντικές ενώσεις, όταν το στοιχείο είναι δραστικό μέταλλο [1].

Τα οξείδια έχουν ως ηλεκτραρνητικό τμήμα το ιόν O^{2-} και μπορούν να παρασταθούν με το γενικό τύπο ως εξής :



, όπου Σ = χημικό στοιχείο,

x = ένας από τους θετικούς αριθμούς οξείδωσης του Σ και

y = αριθμός οξείδωσης του οξυγόνου που μπορεί να είναι -2, -1, $-\frac{1}{2}$.

Τα οξείδια ταξινομούνται με διάφορα κριτήρια [2], [3]:

- **Με βάση την ποσότητα του οξυγόνου**

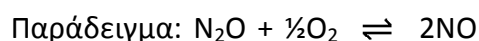
Κανονικά οξείδια: Σε αυτά, η ποσότητα του οξυγόνου που περιέχεται, αντιστοιχεί στους συνηθισμένους αριθμούς οξείδωσης (Α. Ο.) του στοιχείου. Το οξυγόνο έχει στα κανονικά οξείδια Α.Ο. = -2.

Παραδείγματα : Ο άνθρακας (C) έχει κυρίως Α.Ο. +4 οπότε το κανονικό του οξείδιο είναι το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) και όχι το μονοξείδιο του άνθρακα (CO).

Υποξείδια: Σε αυτά το οξυγόνο που περιέχεται είναι λιγότερο από αυτό που αντιστοιχεί στους Α. Ο. του στοιχείου.

Παραδείγματα : CO (ο C έχει Α.Ο. = +2), N_2O (το N έχει Α. Ο. = +1)

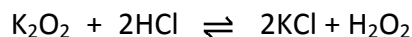
Τα υποξείδια τείνουν να γίνουν κανονικά με πρόσληψη οξυγόνου



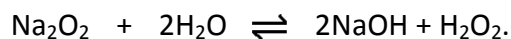
Υπεροξείδια: Περιέχουν περισσότερο οξυγόνο από αυτό που αντιστοιχεί στο μεγαλύτερο Α.Ο. του στοιχείου. Τα υπεροξείδια περιέχουν την υπεροξειδική γέφυρα ή υπεροξυ-δεσμό ή υπεροξυ-ομάδα : -O-O- ή O_2^{2-} όπου κάθε άτομο οξυγόνου έχει Α.Ο.= -1.

Παραδείγματα: υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 (με δομή H-O-O-H), Na_2O_2 (Na-O-O-Na).

Τα υπεροξείδια αντιδρούν με τα αραιά διαλύματα οξέων :



αλλά και με το νερό :



Μικτά ή σύνθετα οξείδια: Λέγονται και επιτεταρτοξείδια. Σε αυτά το στοιχείο εμφανίζεται με δύο διαφορετικούς α. ο. Π.χ. Fe_3O_4 ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{FeO}$), Mn_3O_4 ($\text{MnO}_2 \cdot 2\text{MnO}$).

▪ Με βάση τη χημική τους συμπεριφορά

Οξείδια αμετάλλων ή ανυδρίτες οξέων ή όξινα ή οξεογόνα ή ομοιοπολικά οξείδια: Είναι τα κανονικά οξείδια των αμετάλλων και τα οξείδια των μετάλλων, στα οποία το μέταλλο έχει Α.Ο. μεγαλύτερο του +3, όπως για παράδειγμα τα SO_3 , N_2O_5 , P_2O_5 και άλλα. Συνήθως έχουν στο μόριό τους διπλό δεσμό όπως π.χ. το CO_2 που έχει σύνταξη $\text{O}=\text{C}=\text{O}$. Υπάρχουν όμως και όξινα οξείδια με απλούς δεσμούς. Τα όξινα οξείδια μπορούν να προκύψουν με απόσπαση νερού από τα οξέα.

Παράδειγμα $\text{H}_2\text{SO}_4 - \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_3$ για αυτό λέγονται και ανυδρίτες οξέων.

Τα οξείδια αυτά λέγονται και όξινα ή οξεογόνα γιατί πολλά από αυτά αντιδρούν με το νερό και δίνουν τα αντίστοιχα οξέα

Παράδειγμα $\text{N}_2\text{O}_5 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{HNO}_3$.

Εξαιρεση αποτελούν οι δυσδιάλυτοι ανυδρίτες SiO_2 , B_2O_3 που δεν αντιδρούν με νερό. Τα όξινα οξείδια είναι οξέα κατά Lewis, είτε βρίσκονται σε υδατικό διάλυμα είτε όχι. Όμως είναι οξέα κατά Arrhenius και Brønsted-Lowry μόνο σε υδατικό διάλυμα.

Οξείδια μετάλλων ή ανυδρίτες βάσεων ή βασικά ή ιονικά ή μεταλλικά οξείδια: Είναι τα κανονικά οξείδια μετάλλων όπου το μέταλλο έχει Α.Ο. +1 ή +2, όπως είναι τα: K_2O , CaO , BaO . Λέγονται και ανυδρίτες βάσεων γιατί προκύπτουν από τα υδροξείδια των αντίστοιχων μετάλλων με αφαίρεση νερού.

Παράδειγμα $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaO}$.

Τα οξείδια Li_2O , Na_2O , K_2O , CaO , BaO , MgO αυτά λέγονται και βασεογόνα γιατί αντιδρούν με το νερό και δίνουν τις αντίστοιχες βάσεις: $\text{K}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{KOH}$.

Τα βασικά οξείδια είναι οξέα κατά Lewis και Brønsted-Lowry είτε βρίσκονται σε υδατικό διάλυμα είτε όχι. Όμως είναι οξέα κατά Arrhenius μόνο σε υδατικό διάλυμα. Ο σχηματισμός ενός μεταλλικού οξειδίου απαιτεί αρκετή ενέργεια ($> 1000 \text{ kJ/mol}$) και η σταθερότητά τους οφείλεται στη μεγάλη τιμή της ενέργειας του κρυσταλλικού πλέγματος.

Τα οξείδια των μετάλλων διακρίνονται σε δύο κατηγορίες [4]:

α) Τα οξείδια ημιαγωγούς, δηλαδή τους ενδογενείς, τα μη στοιχειομετρικά οξείδια και τους ημιαγωγούς προσθήκης, όπως τα Cu_2O , NiO , CoO , CuO , ZnO , FeO , TiO_2 , Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , Cr_2O_3 και άλλα, δηλαδή οξείδια μετάλλων μετάπτωσης των αμέσως επόμενων ομάδων.

β) Τα στοιχειομετρικά οξείδια, τους μονωτές, όπως τα MgO , Al_2O_3 , SiO_2 .

Τα διοξείδιο του Τιτανίου (TiO_2) που πραγματεύεται η παρούσα εργασία, ανήκει στην πρώτη κατηγορία.

Επαμφοτερίζοντα οξείδια: Είναι ορισμένα κανονικά οξείδια μετάλλων τα οποία όταν υποστούν επεξεργασία με κάποιο οξύ, συμπεριφέρονται ως βάσεις και όταν υποστούν κατεργασία με βάση τότε συμπεριφέρονται ως οξέα.

Ουδέτερα οξείδια: Αυτά δεν αντιδρούν με το νερό για να δώσουν οξέα ή βάσεις, ούτε προέρχονται απ' αυτές τις ενώσεις με αφαίρεση νερού. Ένα τέτοιο οξείδιο είναι το CO . Άλλα είναι τα υποοξείδια (π.χ. N_2O), τα υπεροξείδια (π.χ. Na_2O_2) και τα μικτά οξείδια.

A.1.2 Βασικές Έννοιες στη Φυσική της Στερεάς Κατάστασης

Κρυσταλλικά Στερεά

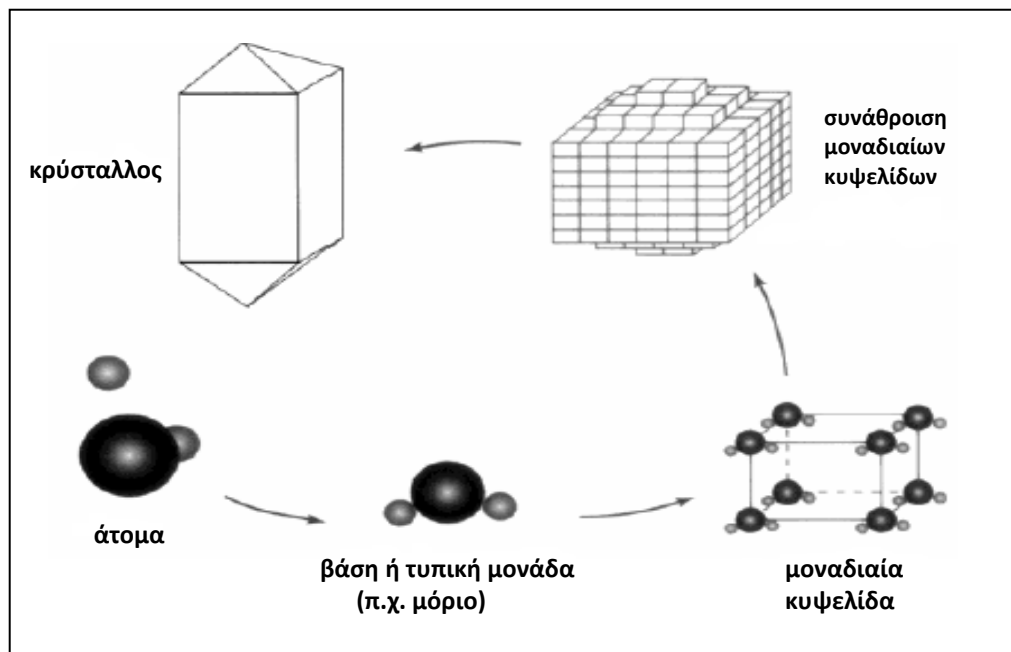
Ένας **κρύσταλλος** ή ακριβέστερα ένας μονοκρύσταλλος, μπορεί να οριστεί μακροσκοπικά ως ένα στερεό αντικείμενο με ομοιόμορφη χημική σύσταση, που διαμορφώνεται από επίπεδες έδρες, οι σχέσεις των οποίων δείχνουν μια τυπική συμμετρία, δηλαδή, σχηματίζουν μεταξύ τους επακριβώς προσδιορισμένες γωνίες [5].

Ο κρύσταλλος μιας χημικής ουσίας είναι το κανονικό πολυεδρικό σώμα που προκύπτει με τη μετάβαση της, υπό κατάλληλες συνθήκες, από την υγρή ή την αέρια κατάσταση στη στερεή. Κρυσταλλικά σώματα είναι π.χ. ο πάγος, ο ασβεστίτης, το αλάτι και τα περισσότερα ορυκτά. Τα πραγματικά μη κρυσταλλικά ή άμορφα στερεά είναι πολύ λίγα. Η

δομή των στερεών εξαρτάται από το είδος των δεσμών και από τη γεωμετρική διεύθυνση των ατόμων ή μορίων ή ιόντων στη μάζα τους και διακρίνεται σε κρυσταλλική και άμορφη [6], [7].

Ως **κρυσταλλική δομή**, ορίζεται μια διάταξη ατόμων, η οποία παρουσιάζει περιοδικότητα και στις τρεις διαστάσεις. Δηλαδή, κρυσταλλική δομή είναι η κανονική, γεωμετρική διάταξη στην οποία διευθετούνται οι δομικές μονάδες ενός στερεού. Αν ένα στερεό δεν παρουσιάζει μια ορισμένη γεωμετρική διάταξη, τότε είναι **άμορφο** και όπως είναι λογικό, δε μπορεί να προβλεφθεί η θέση των ατόμων, από τα οποία αποτελείται και επομένως καθίσταται αδύνατος ο ακριβής καθορισμός της δομής του [6], [8].

Η δομή των στερεών υλικών μελετάται με μεθόδους όπως περίθλαση με ακτίνες – Χ, περίθλαση ηλεκτρονίων και περίθλαση νετρονίων.

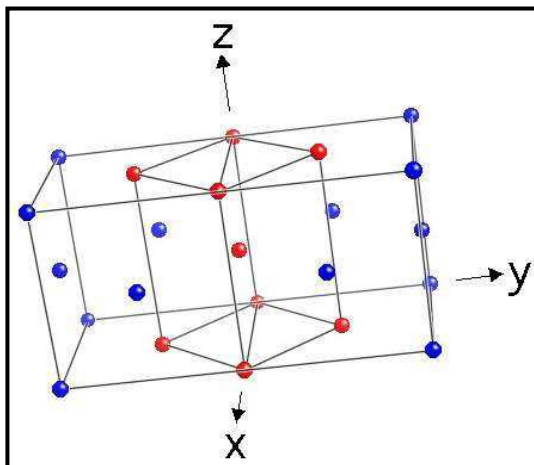


Σχήμα 1.1. Ομάδες ατόμων επαναλαμβάνονται περιοδικά, οικοδομώντας τον κρύσταλλο. Το θεμελιώδες πολύεδρο ονομάζεται μοναδιαία κυψελίδα και είναι το μικρότερο σχήμα που αποδίδει πλήρως τη συμμετρία της κρυσταλλικής δομής (ανατύπωση από[9], τροποποιημένη).

Η τρισδιάστατη συμμετρική διεύθυνση των ατόμων αποτελεί το κρυσταλλικό πλέγμα του υλικού. Όταν εξετάζουμε τις κρυσταλλικές δομές, τα άτομα ή ιόντα θεωρούνται σαν σκληρές σφαίρες με καθορισμένες διαμέτρους. Αυτό είναι γνωστό ως ατομικό μοντέλο σκληρών σφαιρών πλέγματος. Τα άτομα (ή ιόντα) αποτελούν τα σημεία του πλέγματος [5], [10].

Το κρυσταλλικό πλέγμα διαφέρει από υλικό σε υλικό ως προς τη μορφή και το μέγεθος των ατόμων και το είδος των δεσμών μεταξύ των ατόμων. Η κρυσταλλική δομή υλικού αναφέρεται στο μέγεθος, το σχήμα και τη διάταξη των ατόμων στο πλέγμα.

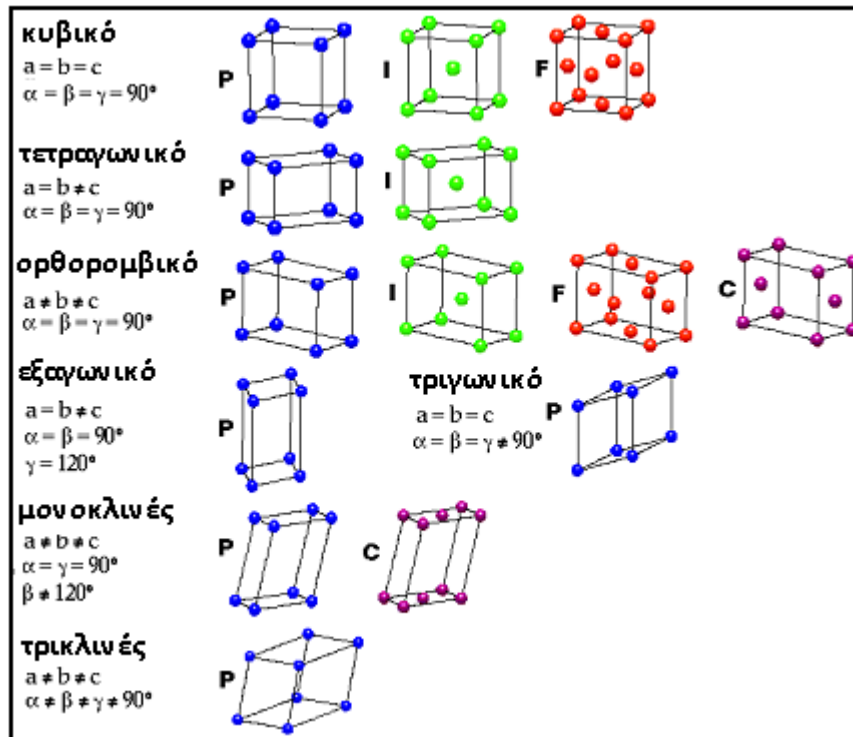
Το μικρότερο σύνολο ατόμων, η διάταξη των οποίων, επαναλαμβανόμενη κατά τις τρεις διαστάσεις, δημιουργεί την κρυσταλλική δομή, ονομάζεται μοναδιαία κυψελίδα. Η **κρυσταλλική κυψελίδα** ουσιαστικά είναι μια υποδιαίρεση του πλέγματος, που διατηρεί όλα τα στοιχεία συμμετρίας του και έτσι θεωρείται ως η βασική δομική μονάδα της κρυσταλλικής δομής, αφού με επανάληψη μεγάλου αριθμού ίδιων κρυσταλλικών κυψελίδων προκύπτει τελικά το κρυσταλλικό πλέγμα του υλικού [5], [10], [11]. **Κρυσταλλικό πλέγμα** ή πλέγμα Bravais είναι μια απεριόριστη διάταξη διακεκριμένων σημείων με το ίδιο ακριβώς περιβάλλον, που εκτείνεται κανονικά στο χώρο. Τα σημεία αυτά αναπαριστούν τις θέσεις των ατόμων.



Σχήμα 1.2. Αναπαράσταση κρυσταλλικής κυψελίδας (ανατύπωση από [5], τροποποιημένη).

A.1.2.1 Πλέγματα Bravais

Το 1848, ο Auguste Bravais απέδειξε ότι σε ένα σύστημα τριών διαστάσεων υπάρχουν δεκατέσσερα δυνατά πλέγματα, που ταξινομούνται σε επτά κρυσταλλικά συστήματα [5].



Σχήμα 1.3. Τα 14 Πλέγματα Bravais στις τρεις διαστάσεις
(ανατύπωση από [5], τροποποιημένη).

Τα επτά κρυσταλλικά συστήματα

Κυβικό: Το γεωμετρικό σχήμα της κυψελίδας είναι κύβος.

Τετραγωνικό: Το γεωμετρικό σχήμα κυψελίδας είναι ορθογώνιο παραλληλεπίπεδο με βάση τετράγωνο.

Ορθορομβικό: Το γεωμετρικό σχήμα κυψελίδας είναι ορθογώνιο παραλληλεπίπεδο με βάση ορθογώνιο.

Τριγωνικό (ή Ρομβοεδρικό): Το γεωμετρικό σχήμα κυψελίδας είναι παραλληλεπίπεδο με όλες τις έδρες του ίσους ρόμβους.

Μονοκλιές: Το γεωμετρικό σχήμα κυψελίδας είναι παραλληλεπίπεδο με τις δύο βάσεις του και το ένα ζεύγος παράλληλων εδρών ορθογώνια, ενώ το τρίτο ζεύγος παράλληλων εδρών απλά παραλληλόγραμμα.

Τρικλιές: Το γεωμετρικό σχήμα κυψελίδας είναι παραλληλεπίπεδο με όλες τις έδρες του παραλληλόγραμμα [7].

Εξαγωνικό: Το γεωμετρικό σχήμα του είναι ορθό κανονικό εξαγωνικό πρίσμα, η δε κυψελίδα του είναι ορθό πρίσμα με βάση ρόμβο.

Οι τέσσερις τρόποι διάταξης των πλεγματικών σημείων στη μοναδιαία κυψελίδα

Απλή ή Πρωτογενής ή Θεμελιώδης (P): Πλεγματικά σημεία μόνο στις 8 κορυφές

Χωροκεντρωμένη (I): Περιλαμβάνει ένα πλεγματικό σημείο στο κέντρο και 8 στις κορυφές

Εδροκεντρωμένη (F): Περιλαμβάνει ένα πλεγματικό σημείο στο κέντρο κάθε έδρας του και 8 στις κορυφές

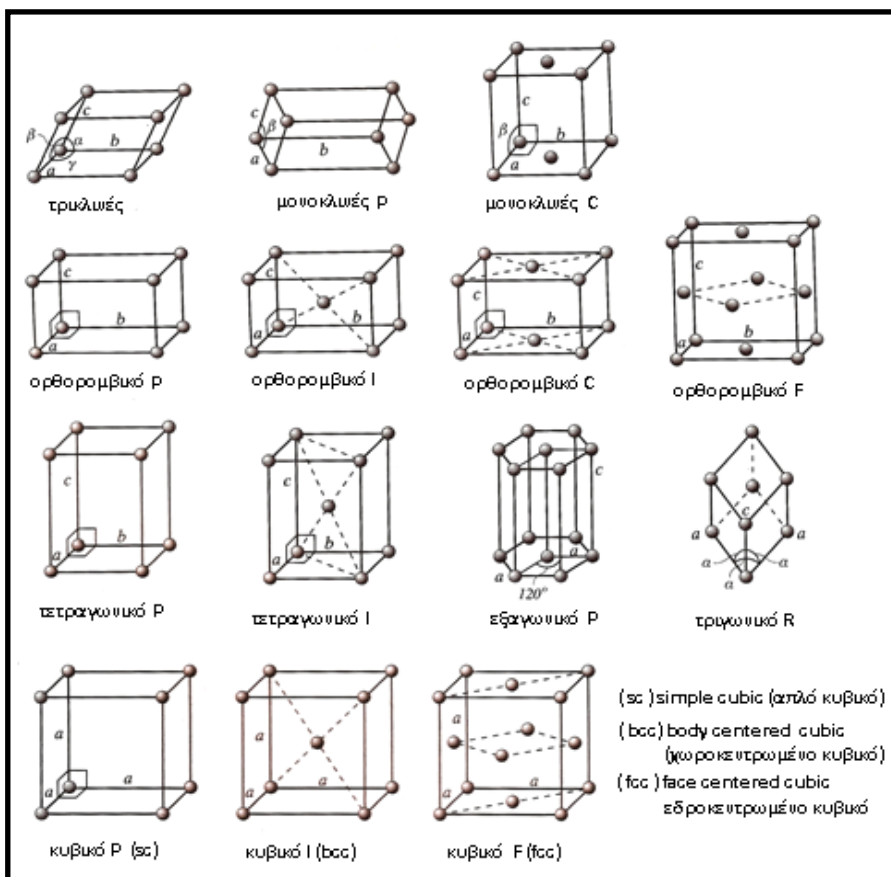
Βασικεντρωμένη (A/B/C): Περιλαμβάνει ένα πλεγματικό σημείο στο κέντρο βάρους μόνο των δύο βάσεων του και 8 στις κορυφές

Μέγιστης πυκνότητας: Χρησιμοποιείται μόνο για το εξαγωνικό πλέγμα. Πρόκειται για βασικεντρωμένο πλέγμα που έχει επιπλέον άλλα 3 άτομα στο μέσο της απόστασης (ύψος) που ενώνει τα κέντρα βάρους των απέναντι τριγώνων που σχηματίζονται από τις διαγώνιους των εξαγωνικών βάσεων και δεν γειτνιάζουν μεταξύ τους (πάνω στη βάση που ανήκουν) [12].

Τρόποι Κρυστάλλωσης

Κυβικοί κρύσταλλοι

1. Απλό κυβικό (P) - SC, 2. Χωροκεντρωμένο κυβικό (I) – BCC
3. Εδροκεντρωμένο κυβικό (F) – FCC



Σχήμα 1.4. Τα 14 Πλέγματα Bravais που υπάγονται σε 7 κρυσταλλικά συστήματα (ανατύπωση από, [5], τροποποιημένη).

A.1.2.2 Ενεργειακές Ζώνες και Αγωγιμότητα των Κρυσταλλικών Υλικών

Τα κρυσταλλικά υλικά παρουσιάζουν ενεργειακό διάγραμμα που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενεργειακών ζωνών.

Η υψηλότερα κατειλημμένη ενεργειακή ζώνη ονομάζεται *Ζώνη Σθένους* (valence band), (VB) ενώ η χαμηλότερα κενή ονομάζεται *Ζώνη Αγωγιμότητας* (conduction band) (CB). Μεταξύ τους πραγματοποιείται ανταλλαγή ηλεκτρονίων.

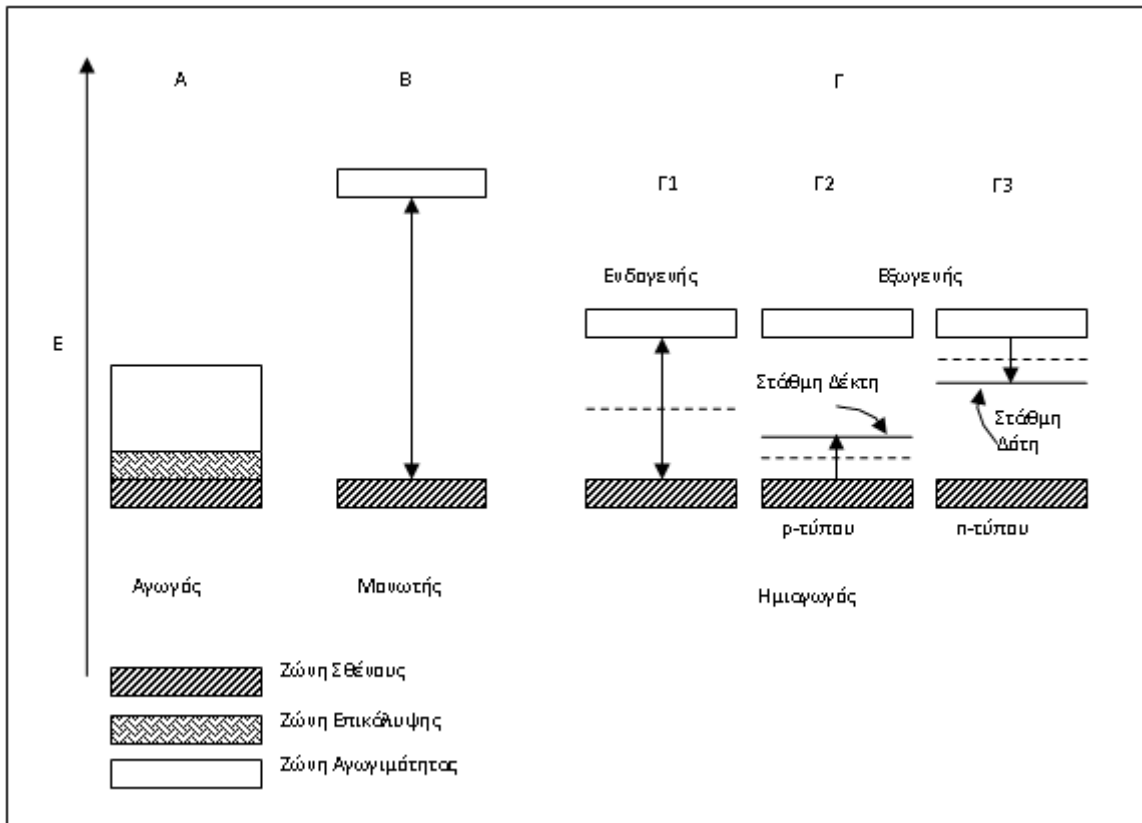
Στους ημιαγωγούς και τους μονωτές, οι δύο αυτές ζώνες διαχωρίζονται ή καλύτερα διαμεσολαβούνται από ένα ενεργειακό χάσμα (περιοχή κενή από ενεργειακές στάθμες), που ονομάζεται *Ζώνη Χάσματος* (ή *Απαγορευμένη Ζώνη*) (bandgap energy) (E_g). Το μέγεθος αυτού του χάσματος καθορίζει την ελάχιστη ενέργεια που πρέπει να δοθεί στο σύστημα από το περιβάλλον, ώστε τα ηλεκτρόνια να μεταπηδήσουν από τη μία ζώνη στην άλλη. Αντίθετα στους αγωγούς, δεν υπάρχει ζώνη χάσματος, επειδή οι δύο ζώνες αγωγιμότητας και σθένους) επικαλύπτονται. Σχηματικά αυτό παρουσιάζεται καλύτερα στο σχήμα 1.5 [13].

Η ίδια η ύπαρξη, αλλά και το μέγεθος του ενεργειακού χάσματος, αποτελεί κριτήριο διάκρισης των υλικών σε αγωγούς, μονωτές και ημιαγωγούς. Επειδή στους αγωγούς, οι κενές στάθμες είναι ενωμένες με τις κατειλημμένες, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, η μεταπήδηση των ηλεκτρονίων στις κενές, είναι αυθόρμητη.

Στους ημιαγωγούς, λόγω του ενεργειακού χάσματος (<4eV), σε χαμηλές θερμοκρασίες, τα ηλεκτρόνια δεν μπορούν να μεταπηδήσουν από τη ζώνη σθένους στη ζώνη αγωγιμότητας, χωρίς κάποια θερμική διέγερση, ενέργειας, ίσης ή μεγαλύτερης από την τιμή του ενεργειακού χάσματος.

Κατά τη μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου στη ζώνη αγωγιμότητας, δημιουργείται μια κενή θέση στη ζώνη σθένους, που ονομάζεται οπή (hole) και είναι θετικά φορτισμένη.

Κατά σύμβαση, όπως τα ηλεκτρόνια της ζώνης αγωγιμότητας, έτσι και οι οπές της ζώνης σθένους, είναι φορείς φορτίου, δηλαδή φορείς αγωγιμότητας. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί, αν σκεφτούμε ότι η οπή συμπεριφέρεται σαν ένα θετικά φορτισμένο σωματίδιο που μπορεί να «κινείται» ελεύθερα στη ζώνη σθένους.



Σχήμα 1.5. Ενεργειακό Διάγραμμα για (Α) Αγωγούς, (Β) Μονωτές και (Γ) Ημιαγωγούς ((Γ1) Ενδογενείς, (Γ2) Εξωγενείς p-Τύπου και (Γ3) Εξωγενείς n-τύπου) (ανατύπωση από [14], τροποποιημένη).

Αυτό γίνεται γιατί η κενή θέση του ηλεκτρονίου που έφυγε καταλαμβάνεται από ένα γειτονικό ηλεκτρόνιο το οποίο δημιουργεί με την σειρά του μια οπή και έτσι η οπή κινείται μέσα στην ζώνη σθένους αντίθετα με την κίνηση του ηλεκτρονίου στην ζώνη αγωγιμότητας. Οι καθαροί ημιαγωγοί, χωρίς προσμίξεις, ονομάζονται ενδογενείς (intrinsic semiconductors)[15]. Βασικό τους χαρακτηριστικό είναι η εξάρτηση της αγωγιμότητας τους από την θερμοκρασία. Σε θερμοκρασία $T=0$ K και σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες η ζώνη αγωγιμότητας είναι εντελώς άδεια και η ζώνη σθένους πλήρως κατειλημμένη. Τα υλικά συμπεριφέρονται σαν μονωτές. Το ενεργειακό χάσμα είναι συνήθως μικρό. Έτσι σε θερμοκρασία δωματίου ένας σημαντικός αριθμός ηλεκτρονίων μπορούν να αποκτήσουν αρκετή θερμική ενέργεια και να μεταπηδήσουν από την ζώνη σθένους στην ζώνη αγωγιμότητας.

Στην περίπτωση καθαρών ημιαγωγών, η συγκέντρωση των ηλεκτρονίων στη ζώνη αγωγιμότητας (n) είναι ίση με τη συγκέντρωση των οπών στη ζώνη σθένους (p).

Έχοντας πλέον υπ' όψιν ότι η αγωγιμότητα οφείλεται στα δύο αυτά είδη φορέων (τα ηλεκτρόνια και τις οπές), μπορούμε να γενικεύσουμε τα συμπεράσματα για την αγωγιμότητα των αγωγών και να δούμε την επίδραση των δύο αυτών φορέων και της θερμοκρασίας στην αγωγιμότητα του ενδογενούς ημιαγωγού.

Εάν n είναι η συγκέντρωση των ηλεκτρονίων στη ζώνη αγωγιμότητας, p η συγκέντρωση των οπών στη ζώνη σθένους μ_n η ευκινησία των ηλεκτρονίων και μ_p η ευκινησία των οπών, η αγωγιμότητα σ εκφράζεται ως άθροισμα της συνεισφοράς των επί μέρους φορέων και ορίζεται ως:

$$\sigma = n \cdot e \cdot \mu_n + p \cdot e \cdot \mu_p = e \cdot (n \cdot \mu_n + p \cdot \mu_p) \quad (2)$$

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

$$dn(E) = g(E)f(E)dE \quad (3)$$

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

$$n = N_c e^{-\frac{E_c - E_F}{kT}} \quad \text{και} \quad N_c = 2 \left(\frac{2\pi m_n^* kT}{h^2} \right)^{\frac{3}{2}} \quad (4)$$

όπου m_n^* : η ενεργός μάζα του ηλεκτρονίου,

h : η σταθερά του Planck,

k : η σταθερά του Boltzmann (βλ. Παράρτημα)

Με ανάλογους υπολογισμούς μπορούμε να βρούμε τη συγκέντρωση των οπών στη ζώνη σθένους, ολοκληρώνοντας με ενεργειακά όρια από τον πυθμένα της ζώνης σθένους $E=0$ έως την κορυφή της E_v . Έτσι:

$$p = N_v e^{-\frac{E_F - E_v}{kT}} \quad \text{και} \quad N_v = 2 \left(\frac{2\pi m_p^* kT}{h^2} \right)^{\frac{3}{2}} \quad (5)$$

Οι ποσότητες N_c και N_v που εξαρτώνται ασθενώς από την θερμοκρασία ($\sim T^{3/2}$) ονομάζονται ενεργές πυκνότητες της ζώνης αγωγιμότητας και σθένους αντίστοιχα.

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

n-τύπου και p-τύπου, ανάλογα με τον επικρατούντα φορέα φορτίου, ηλεκτρόνια ή οπές, αντίστοιχα.

Εάν $n \gg p$, τότε ο ημιαγωγός χαρακτηρίζεται ως τύπου n. 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 σε αριθμό τις θερμικά παραγόμενες οπές στη ζώνη σθένους (φορείς μειονότητας). Επομένως η αγωγιμότητα οφείλεται στους φορείς αρνητικού φορτίου.

Στους p-τύπου ημιαγωγούς, η έλλειψη φορέων αρνητικού φορτίου, οφείλεται σε ενεργειακές στάθμες αποδεκτών. Τα ηλεκτρόνια μπορούν να μεταπηδήσουν εύκολα από τη ζώνη σθένους στη στάθμη αποδέκτη, δημιουργώντας οπές. Οι θετικές οπές της ζώνης σθένους (φορείς πλειονότητας) υπερβαίνουν σε αριθμό τα θερμικά διεγερμένα ηλεκτρόνια της ζώνης αγωγιμότητας (φορείς μειονότητας). Άρα η αγωγιμότητα στην προκειμένη περίπτωση οφείλεται στους φορείς θετικού φορτίου.

Στην παρούσα εργασία μελετάται το TiO_2 σε νανοσωματιδιακή μορφή, που όπως θα δούμε παρακάτω είναι ημιαγωγός n-τύπου. 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 και μεταβάλλονται από επίπεδο μορίου σε επίπεδο στερεού. Σε επίπεδο ημιαγωγού, οι διαστάσεις των νανοσωματιδίων, καθορίζουν τη διαθέσιμη επιφάνειά τους, αλλά και τον τρόπο με τον οποίο σχηματίζονται οι νανοκρυσταλλικές δομές, επηρεάζοντας έτσι, τη μορφολογία, τις μηχανικές ιδιότητες και την αγωγιμότητα φορτίου των υλικών. Αυτό οδηγεί σε επίδραση στις οπτικές, ηλεκτρονικές και καταλυτικές ιδιότητες των νανοδομημένων ημιαγωγών. Καθώς αυξάνεται σε μέγεθος το νανοσωματίδιο, κάποια στιγμή, το πλήθος των ενεργειακών επιπέδων αυξάνεται τόσο, που πρακτικά παρατηρούνται μόνο οι δύο κλασικές ζώνες των ημιαγωγών (σθένους και αγωγιμότητας) και το ίδιο το νανοσωματίδιο συμπεριφέρεται πλέον ως ημιαγωγός.

Η διαφοροποίηση ενός ημιαγωγού και ενός νανοσωματιδίου, λόγω μεγέθους, εντοπίζεται στη φύση του ημιαγωγού. Για σωματίδια TiO_2 μεγαλύτερα από 3 nm, θεωρείται δεδομένη η ανάπτυξη ζωνών σθένους και αγωγιμότητας [17]. Μικρότερου μεγέθους νανοσωματίδια,

ονομάζονται κβαντικές τελείες (quantum dots) [18] και ενεργειακά, βρίσκονται σε κατάσταση περίπου ενδιάμεση από αυτή των μορίων και των ημιαγωγών.

Στο πειραματικό μέρος της εργασίας μελετώνται νανοσωματίδια TiO_2 , αρκετά μεγάλα, ώστε να έχουν την ενεργειακή φύση ενός ημιαγωγού, δηλαδή πλήρες σχήμα ζώνης σθένους, ζώνης αγωγιμότητας και ενεργειακού χάσματος.

Φωτεινή Ακτινοβολία – ο κύριος μηχανισμός διέγερσης ημιαγωγών

Η θερμική διέγερση είναι ένας μηχανισμός παραγωγής ευκίνητων φορέων φορτίου. Αυτός ο μηχανισμός είναι σημαντικός για ημιαγωγούς με μικρό ενεργειακό χάσμα ($<0.5\text{eV}$). Αυτό συμβαίνει διότι η μέση θερμική ενέργεια σε θερμοκρασία δωματίου είναι 0.026eV ($=kT$). Ένα ηλεκτρόνιο μπορεί να μεταβεί από τη ζώνη σθένους στη ζώνη αγωγιμότητας και με οπτική διέγερση, δηλαδή με απορρόφηση ενός φωτονίου, δημιουργώντας ζεύγος ηλεκτρονίου – οπής. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ενέργεια του φωτονίου να υπερβαίνει την ενέργεια του ενεργειακού χάσματος (E_g), δηλαδή:

$$h \cdot \nu \geq E_g \quad (6)$$

Μέσα στον ημιαγωγό, η απορρόφηση του φωτός ακολουθεί τον εκθετικό νόμο [16]:

$$I = I_0 \cdot e^{-\alpha x} \quad (7)$$

όπου α : ο συντελεστής απορρόφησης

x : το βάθος εντός του υλικού

I : η ένταση σε βάθος x και

I_0 : η ένταση της εισερχόμενης ακτινοβολίας

και ισχύει ότι: $\ln I = \ln I_0 - \alpha x$ ή $\alpha x = \ln I_0 - \ln I$ ή $a = \frac{\ln(\frac{I_0}{I})}{x}$.

Ειδικά για το TiO_2 , η τιμή του α είναι $2.6 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-1}$ στα 320nm .

Ένα κριτήριο για την επιλογή του κατάλληλου ημιαγωγού σε φωτοκαταλυτική εφαρμογή, είναι να απορροφά σε μεγάλο εύρος του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής προσπίπτουσας ακτινοβολίας, ώστε να αξιοποιείται όσο το δυνατό μεγαλύτερο ποσοστό της ηλιακής ακτινοβολίας.

A.1.3 Φωτοκατάλυση

Ο ορισμός της φωτοκατάλυσης αποτελεί πεδίο έρευνας και σημείο διαφωνίας μεταξύ των επιστημόνων που ασχολούνται με το αντικείμενο αυτό και τις ποικίλες εφαρμογές του, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει μια απόλυτα κοινή πρόταση. Σύμφωνα με την κυρίαρχη άποψη «φωτοκατάλυση είναι η επιτάχυνση μιας φωτοαντίδρασης με την παρουσία ενός καταλύτη» [19], [20].

Τη φωτοκατάλυση στην πλειονότητα των περιβαλλοντικών εφαρμογών θα μπορούσαμε, εκ του αποτελέσματος, να την ορίσουμε ως τη διαδικασία παραγωγής οξειδωτικών μορίων (κυρίως OH^*) από ένα υδατικό μέσο, παρουσία ενός στερεού (ετερογενούς) καταλύτη και φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος [21], [22].

Η οξειδωτική δράση των παραγόμενων κατά τη φωτοκατάλυση οξειδωτικών μορίων πάνω σε οργανικές και ανόργανες ενώσεις αλλά και ζωντανούς οργανισμούς ορίζεται ως φωτοκαταλυτική διαδικασία αποδόμησης (photocatalytic degradation process) (PCD).

A.1.3.1 Οι Φωτοκαταλύτες και τα χαρακτηριστικά τους

Ως φωτοκαταλύτες ορίζονται τα στερεά εκείνα που μπορούν να επάγουν αντιδράσεις παρουσία φωτός και δεν καταναλώνονται κατά τη διαδικασία αυτή [23]. Ένας καλός φωτοκαταλύτης πρέπει να είναι:

- i. Φωτοενεργός
- ii. Να έχει τη δυνατότητα να αξιοποιεί φως στην ορατή ή υπεριώδη περιοχή του φάσματος της ηλιακής ακτινοβολίας
- iii. Φωτοσταθερός
- iv. Χαμηλού κόστους
- v. Μη τοξικός

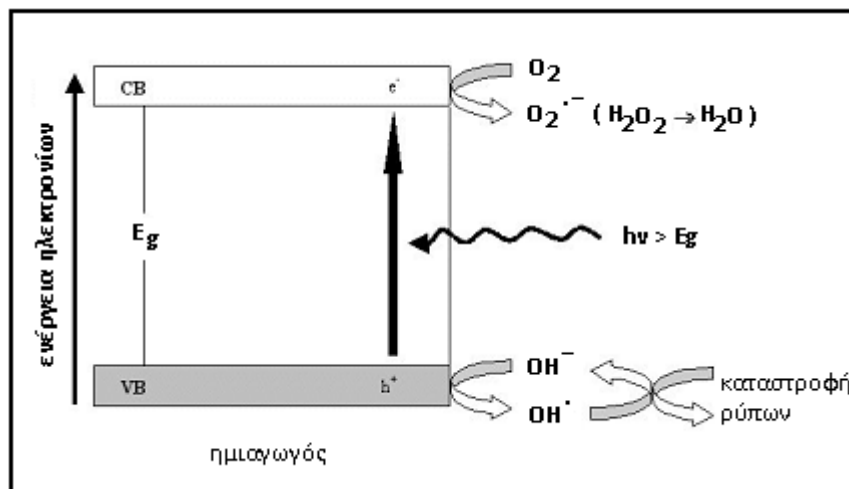
Ο φωτοκαταλύτης βασίζει τη δραστηριότητά του στο γεγονός ότι όταν φωτόνια ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος προσπίπτουν στην επιφάνεια του, τα ηλεκτρόνια προάγονται από τη ζώνη σθένους και μεταφέρονται στη ζώνη αγωγιμότητας.

Αυτό δημιουργεί θετικά φορτισμένες οπές στη στοιβάδα σθένους που αντιδρά με το υδατικό μέσο παράγοντας ρίζες υδροξυλίου (OH^*), που είναι τα πλέον οξειδωτικά μόρια [24].

A.1.3.2 Μηχανισμός Φωτοκατάλυσης

Ουσιαστικά, ως διαδικασία δε διαφέρει δραματικά από κάποια άλλη μορφή κατάλυσης, όπως για παράδειγμα η ενζυμική και θερμική κατάλυση. Για το λόγο αυτό και κάθε περιγραφή της φωτοκατάλυσης θα πρέπει να αντιστοιχεί στη γενικότερη θεώρηση του φαινομένου της κατάλυσης.

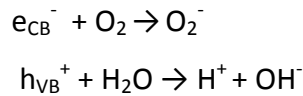
Μια απλοποιημένη αλλά αρκετά επεξηγηματική αναπαράσταση της φωτοκατάλυσης παρουσιάζεται στο σχήμα 1.6.



Σχήμα 1.6.
Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου της φωτοκατάλυσης (ανατύπωση από [25]).

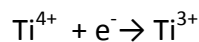
Σύμφωνα με το διάγραμμα αυτό, η πρόπτωση πάνω σε ένα φωτοκαταλύτη που τις περισσότερες φορές είναι ένα ημιαγωγός (π.χ. TiO_2) ακτινοβολίας είτε από μια μονάδα UV ή από τον ήλιο έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίησή του [23]. Η ενεργοποίηση αυτή είναι δυνατή μόνο στην περίπτωση που η προσπίπτουσα ενέργεια είναι μεγαλύτερη από την ενέργεια ενεργοποίησης ή ενέργεια του ενεργειακού χάσματος (E_g). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από τη ζώνη σθένους στη ζώνη αγωγιμότητας. Η μεταφορά αυτή έχει επάγει τη δημιουργία μιας θετικά φορτισμένης οπής (hole, h^+) στην επιφάνεια του καταλύτη, κοντά στην VB [23] (A. Mills, 1997), [24]. Επομένως κάθε διέγερση συνοδεύεται από την παραγωγή ενός ζεύγους αντίθετα φορτισμένων σωματιδίων: φωτοηλεκτρόνια (e_{CB}^-) στη Ζώνη Αγωγιμότητας και θετικές οπές (h_{VB}^+) στη Ζώνη Σθένους [26]. Τα φορτία αυτά μπορούν να επανασυνδεθούν (recombination) μετατρέποντας την ενέργεια των φωτονίων σε θερμική, είτε να κινηθούν στην επιφάνεια του ημιαγωγού, λόγω του εκτεταμένου δικτύου δεσμικών και αντιδεσμικών τροχιακών του νανοσωματιδίου, περιοχές, στις οποίες, μπορούν να αντιδράσουν με μόρια δότες (μοριακό

οξυγόνο) και δέκτες ηλεκτρονίων (νερό), αντίστοιχα, σχηματίζοντας ισχυρές οξειδωτικές ρίζες, σύμφωνα με τις αντιδράσεις [27]:

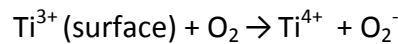


Αναλυτικά η πορεία σχηματισμού των ενδιάμεσων ριζών είναι η ακόλουθη [28]:

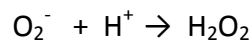
Τα ηλεκτρόνια (e^-) που έχουν διεγερθεί στη στιβάδα αγωγιμότητας, μπορούν να παγιδευτούν από κατιόντα Ti^{4+} στο κρυσταλλικό πλέγμα (στην επιφάνεια ή εσωτερικά), σύμφωνα με την αντίδραση:



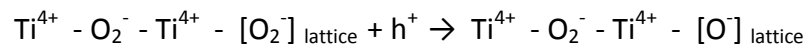
Τα επιφανειακά κατιόντα Ti^{3+} αλληλεπιδρούν με τα προσροφημένα μόρια O_2 προς σχηματισμό υπεροξειδικών ιόντων (O_2^-), σύμφωνα με την αντίδραση:



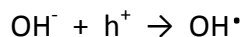
Το O_2^- έχει πολύ μεγάλο χρόνο ζωής, αφού μπορεί εύκολα να σχηματίσει ρίζες υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), σύμφωνα με την αντίδραση:



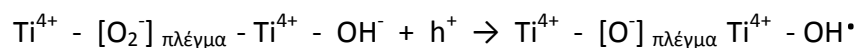
Αντίστοιχα, οι θετικές οπές (h^+), οι οποίες έχουν σχηματιστεί στη ζώνη σθένους του ημιαγωγού, μπορούν να παγιδευτούν στην επιφάνεια του καταλύτη, αντιδρώντας, είτε με ιόντα οξυγόνου του πλέγματος (lattice), σύμφωνα με την αντίδραση:



είτε με τις υδροξυλικές ομάδες, στην επιφάνεια, προς σχηματισμό ριζών υδροξυλίου (OH^\bullet):



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



Επομένως, φαίνεται ότι η απόδοση του φωτοκαταλυτικού μηχανισμού εξαρτάται από δύο μηχανισμούς: τον αποδοτικό διαχωρισμό των αντίθετων φωτοεπαγόμενων φορτίων και τη διεπιφανειακή μεταφορά φορτίου προς δημιουργία των ιδιαίτερα οξειδωτικών ελευθέρων ριζών [29].

Η ρύθμιση αυτών των παραγόντων μπορεί να προκαλέσει κατακόρυφη αύξηση της απόδοσης του ποσοστού μετατροπής της φωτεινής ενέργειας σε χημική. Αυτό επιτυγχάνεται με τον έλεγχο του τρόπου παρασκευής και το μέγεθος των νανοσωματιδίων, τη χημική τροποποίηση του κρυσταλλικού πλέγματος και τον περιορισμό απενεργοποίησης του φωτοκαταλύτη.

A.1.4 Το διοξείδιο του Τιτανίου (TiO_2)

A.1.4.1 Ιστορική αναδρομή

Το τιτάνιο ανακαλύφθηκε σαν κράμα μετάλλου από τον William Gregor, στην Αγγλία το 1791. Ο Gregor παρατήρησε την παρουσία ενός νέου στοιχείου μέσα στον ιλμενίτη και αντιλαμβανόμενος ότι το μέταλλο που εντόπισε, δεν ταίριαζε με τις ιδιότητες οποιουδήποτε άλλου γνωστού στοιχείου μέχρι τότε, εξέθεσε τα συμπεράσματά του στη «Βασιλική Γεωλογική Κοινότητα» της Κορνουάλλης και στο γερμανικό επιστημονικό περιοδικό Annalen Crell [30].



Εικόνα 1.7.

William Gregor

(ανατύπωση από [31])

Περίπου την ίδια χρονική περίοδο, ο Franz Joseph Muller, παρήγαγε μια παρόμοια ουσία, που επίσης δεν μπορούσε να προσδιορίσει. Το διοξείδιο (TiO_2) ανακαλύφθηκε πάλι, ανεξάρτητα το 1795 από τον Γερμανό φαρμακοποιό Martin Heinrich Klaproth, σαν ορυκτό, στην Ουγγαρία. Ο Klaproth διαπίστωσε ότι το στοιχείο ήταν νέο και το ονόμασε τιτάνιο



Εικόνα 1.8.

Franz Joseph Muller

(ανατύπωση από [31])

από τους μυθικούς Τιτάνες, τους γιους της θεάς Γης. Αφού πληροφορήθηκε για την προηγούμενη ανακάλυψη του Gregor, έλαβε ένα δείγμα από το Μάνακαν και επιβεβαίωσε ότι περιείχε τιτάνιο [32].

Κατά τις δεκαετίες 1950 και 1960, η Σοβιετική Ένωση καινοτόμησε χρησιμοποιώντας το τιτάνιο στις στρατιωτικές και στις υποβρύχιες εφαρμογές [33]. Από τις αρχές της δεκαετίας του 1950, το τιτάνιο άρχισε να χρησιμοποιείται εκτενώς για στρατιωτικούς λόγους και

κυρίως σε εφαρμογές αεροναυπηγικής, ιδιαίτερα σε υψηλής απόδοσης αεριωθούμενα, όπως στα αεροσκάφη F100 Super Sabre and Lockheed A-12. Στις

Η.Π.Α., το Υπουργείο Άμυνας αντιλήφθηκε από νωρίς τη στρατηγική σημασία αυτού του μετάλλου και υποστήριξε τις πρόωρες προσπάθειες για την εμπορευματοποίησή του. Κατά τη διάρκεια της περιόδου του ψυχρού πολέμου, το τιτάνιο θεωρήθηκε στρατηγικό υλικό από την Αμερικανική κυβέρνηση, και ένα μεγάλο απόθεμα σπογγοειδούς τιτανίου διατηρήθηκε από το Κέντρο Εθνικών Αμυντικών Αποθεμάτων, το οποίο μειώθηκε τελικά το 2005 [34].

Σήμερα, ο μεγαλύτερος παραγωγός σε παγκόσμιο επίπεδο, η ρωσική εταιρία VSMPO-Avisma, υπολογίζεται ότι κατέχει περίπου το 29% του μεριδίου της παγκόσμιας αγοράς.

Συνοψίζοντας, το τιτάνιο μπορεί να θεωρηθεί σχετικά νέο υλικό για την εφαρμοσμένη μηχανική. Ανακαλύφθηκε πολύ αργότερα από τα υπόλοιπα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα μέταλλα, ενώ η εμπορική του εφαρμογή αρχίζει προς το τέλος της δεκαετίας του 1940.



Εικόνα 1.9.

Martin Heinrich Klaproth




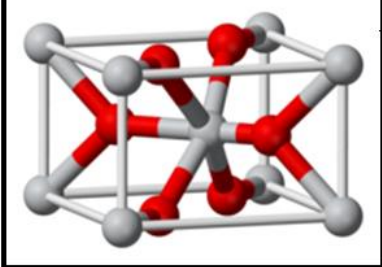
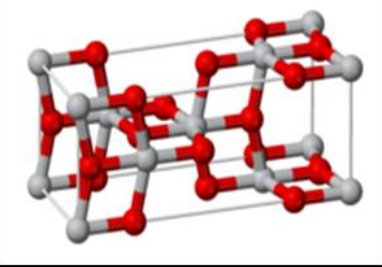
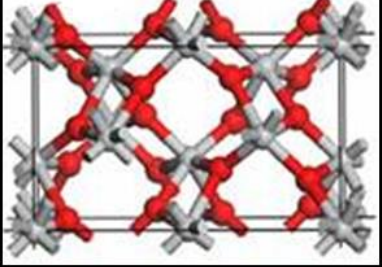
(ανατύπωση από [31])

A.1.4.2 Φυσικοχημεία του Διοξειδίου του Τιτανίου (TiO_2)

Το διοξείδιο του Τιτανίου (TiO_2) ή τιτανία είναι ένα υλικό με ένα ευρύ φάσμα κοινών εφαρμογών, αλλά και εφαρμογών υψηλής τεχνολογίας. Έχει χαμηλό κόστος, είναι χημικά σταθερό, μη τοξικό και βιοσυμβατό. Κρυσταλλώνεται σε διάφορες μορφές: ρουτίλιο (rutile), ανατάση (anatase) και μπρουκίτη (brookite). Η πιο κοινή και πιο μελετημένη δομή είναι αυτή του ρουτιλίου, καθώς είναι και η πιο σταθερή [35], [36].

Στις δύο πρώτες, που είναι και οι συνηθέστερες δομές, οι κρύσταλλοι είναι τετραγωνικοί, ενώ στην τρίτη είναι ορθορομβικοί.

Σε χαμηλές θερμοκρασίες, συνήθως του TiO_2 δεν κρυσταλλώνεται και υπάρχει σε άμορφη κατάσταση. Το TiO_2 μπορεί να παρασκευαστεί σε μορφή μονοκρυστάλλου, σκόνης, κεραμικού και λεπτού υμενίου.

ΡΟΥΤΙΛΙΟ	ΑΝΑΤΑΣΗΣ	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 $\rho=3.99\text{g/cm}^3$ $E_g=3.14\text{eV}$

Εικόνα 1.10. Κρυσταλλικές δομές (α) ρουτιλίου, (β) ανατάση και(γ) μπρουκίτη (ανατύπωση από [37], τροποποιημένη).

Πίνακας Α.1. Βασικά Χαρακτηριστικά του TiO_2

Χρώμα	Λευκό
Μορφή	Κρυσταλλικό στερεό
Μοριακός Τύπος	TiO_2
Σημείο Τήξης	1800°C
Πυκνότητα	$4,23\text{ g/cm}^3$

TiO_2 - n-τύπου ημιαγωγός

Το TiO_2 είναι ένας ημιαγωγός n-τύπου, με ενεργειακό χάσμα 3 – 3.2 eV [38],[39]. Αυτό σημαίνει ότι για τη διέγερσή του απαιτείται ακτινοβολήση στο υπεριώδες.

Το TiO_2 , όπως προαναφέρθηκε βρίσκεται συνήθως σε μορφή σκόνης συνήθως, λευκού χρώματος, μη τοξική και φιλική προς το περιβάλλον. Είναι εύκολη η παραγωγή της και χαμηλό το κόστος της. Έτσι αυτομάτως, για πρακτικούς λόγους, συγκεντρώνοντας αυτά τα χαρακτηριστικά, καθίσταται ως ιδιαίτερος σημαντικός φωτοκαταλύτης.

Το TiO_2 έχει επίσης επαμφοτερίζοντα χαρακτήρα, δηλαδή συμπεριφέρεται ως οξύ, αλλά και ως βάση. Αυτή η συμπεριφορά του, οδηγεί στην εύκολη ενυδάτωσή του. Καθώς το

νερό που προσροφάται, δίσταται, το υδροξύλιο (OH^-) σχηματίζει βασικές ομάδες Ti-OH και το πρωτόνιο (H^+) όξινες ομάδες $\text{Ti-OH}^+-\text{Ti}$. Σε επαφή με οργανικά οξέα, εκδηλώνεται ο βασικός χαρακτήρας.

A.1.5 Παράγοντες φωτοκαταλυτικής απόδοσης

A.1.5.1. Μέγεθος νανοσωματιδίων

Το μέγεθος των νανοσωματιδίων επηρεάζει σημαντικά τη φωτοκαταλυτική δραστηριότητα του διοξειδίου του Τιτανίου. Καθώς μειώνεται το μέγεθος, αυξάνεται η ενεργή επιφάνεια του καταλύτη, ή αλλιώς η ενεργός διατομή, και επομένως μεγαλύτερος αριθμός μορίων μπορούν να αντιδράσουν με τα ζεύγη φορτίων (ηλεκτρονίων και οπών) και συνεπώς αυξάνεται η απόδοση της διεργασίας. Με τη μείωση του μεγέθους των νανοσωματιδίων, αλλάζουν οι δομικές και οπτο-ηλεκτρονικές ιδιότητές του υλικού, αυξάνοντας τη δραστηριότητά του [40], [41].

A.1.5.2. Χημική τροποποίηση TiO_2

Η τροποποίηση (doping) του TiO_2 στοχεύει στη χρήση του σε καθημερινές φωτοεπαγόμενες εφαρμογές με την εξ ολοκλήρου αξιοποίηση φάσματος της ηλιακής ακτινοβολίας, συμπεριλαμβανομένης και της ορατής περιοχής του φάσματος της ηλιακής ακτινοβολίας. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν μέταλλα όπως ο άργυρος [42].

Η τροποποίηση του 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 τροποποίηση με αμέταλλα (N, C, S, F) [43] και εισάγει την ιδέα της χρήσης του υλικού αυτού και σε κλειστό χώρο.

A.1.5.2.1 Τροποποίηση του TiO_2 με Άργυρο

Θεωρητικά η τροποποίηση έχει ως στόχο, τη μείωση ή την αναστολή της επανασύνδεσης των φωτοηλεκτρονίων της ζώνης αγωγιμότητας με τις οπές της ζώνης σθένους του ημιαγωγού. έτσι προωθούνται οι διεργασίες της δημιουργίας δραστικών οξειδωτικών ελευθέρων ριζών, αφού ο χρόνος ζωής του ζεύγους φωτοηλεκτρονίων – οπών αυξάνεται [44], [45], [46].

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 (Ag^0/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 [47].

γ) Η εισαγωγή νανο-συσσωματωμάτων αργύρου σε ολόκληρη τη μάζα του ημιαγωγού, επηρεάζει την επιφανειακή διαμόρφωση, αυξάνοντας την επιφάνεια του καταλύτη [48], [49], [50].

A.1.5.2.2 Τροποποίηση του TiO_2 με Άζωτο

Η τροποποίηση ενός ημιαγωγού και ειδικά του TiO_2 με άζωτο, προτιμάται από την τροποποίησή του με άλλα αμέταλλα, όπως ο άνθρακας (C) ή το θείο (S), εξαιτίας κάποιων πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει και που συνοψίζονται ακολούθως:

- Το άζωτο είναι ένα στοιχείο που λόγω της θέσης του στον Περιοδικό Πίνακα, 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 την καθημερινή τους χρήση.
- 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 [51].

A.1.6 Εφαρμογές TiO₂

Το TiO₂ χρησιμοποιείται ευρέως στην καθημερινή ζωή, σε πλήθος εφαρμογών.

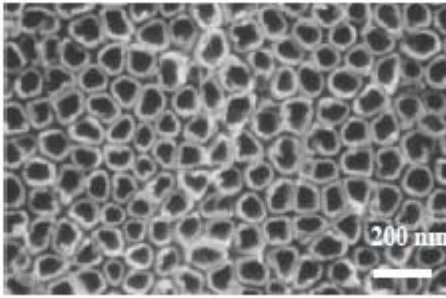
Χρησιμοποιείται ευρέως στα λευκά χρώματα¹ λόγω της λάμψης του και του υψηλού δείκτη διάθλασης. Σε μορφή λεπτού υμενίου, ο δείκτης διάθλασής του και το χρώμα του, το καθιστούν εξαιρετικό υλικό για οπτικές επιστρώσεις σε διηλεκτρικούς καθρέπτες και σε πολύτιμους λίθους. Το TiO₂ σε μορφή σκόνης, λόγω της αδιαφάνειάς του χρησιμοποιείται σε χρώματα, πλαστικά, χαρτιά, μελάνια, τρόφιμα, καλλυντικά (π.χ. αντιηλιακά), φάρμακα (χάπια και ταμπλέτες) και σε οδοντόπαστες [52].

Το TiO₂ κυρίως στη δομή του ανατάση, χρησιμοποιείται και σε ηλιακές κυψελίδες τύπου Graetzel [53].

Το TiO₂ βρίσκει εφαρμογή στη βιομηχανία σε καθαρισμό τοξικών αποβλήτων. Ο περιβαλλοντικός καθαρισμός με τη χρήση TiO₂ σαν φωτοκαταλύτη, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, παράλληλα με την τροποποίηση ενός μεγάλου αριθμού περιβαλλοντικών προβλημάτων στην κοινωνία. Τα τελευταία χρόνια, αυτή η εφαρμογή, έχει επικεντρωθεί στον καθαρισμό και την επεξεργασία του νερού και του ατμοσφαιρικού αέρα, που αποτελούν μόνιμα ερευνητικά ζητήματα σχετικά με την προστασία του περιβάλλοντος. Ανάλογα με την εφαρμογή, ο καταλύτης χρησιμοποιείται, άλλοτε σε μορφή σκόνης, άλλοτε σε μορφή εναιωρήματος και άλλες φορές σε μορφή λύματος πηκτής [54] ή υμενίου. Σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους οξείδωσης, η τεχνολογία απορρύπανσης, που βασίζεται στην αξιοποίηση της φωτοκαταλυτικής δράσης του TiO₂ εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως η ευκολία προσέγγισης της θερμοκρασίας περιβάλλοντος, μικρή κατανάλωση ενέργειας και συνεπακόλουθα χαμηλό κόστος [55].

Ακόμη το TiO₂ χρησιμοποιείται ως αισθητήρας αερίων (π.χ. αισθητήρας λ για την ανίχνευση οξυγόνου) σε μορφή λεπτού υμενίου και κυρίως σε δομή νανοσωλήνων. Επίσης, καθώς είναι βιοσυμβατό υλικό, επιτρέπει την ενοποίηση μεταξύ τεχνητού εμφυτεύματος και οστών [55].

¹ περίπου 4 εκατομμύρια τόνοι καταναλώνονται ετησίως για αυτή τη χρήση



Εικόνα 1.11. Νανοσωλήνες TiO_2
ανατύπωση από [56])

Επιπροσθέτως, τα φωτοκαταλυτικά υλικά είναι ιδιαίτερος αποτελεσματικά στην καταπολέμηση ανάπτυξης μικροοργανισμών (ιών, βακτηρίων και άλλα). Μέσω φωτοκαταλυτικών αντιδράσεων αποικοδομούνται σχετικά εύκολα ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί, χωρίς να απαιτείται χημική απολύμανση. Αυτή η δράση του TiO_2 βρίσκει ήδη εφαρμογή σε σύγχρονες εγκαταστάσεις, που χρήζουν συνεχούς αποστείρωσης, όπως νοσοκομειακοί χώροι, εργαστήρια, χειρουργεία, μονάδες εντατικής θεραπείας. Συγκριμένα, επιλέγονται φωτοκαταλυτικά δομικά υλικά (πλακάκια δαπέδου, τοίχου, ψευδοροφές) και επιτυγχάνεται αυτοαποστείρωση του χώρου, με τη βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας.



Εικόνα 1.12. Αποικοδόμηση βακτηρίων με
φωτοκαταλυτική διαδικασία
(ανατύπωση από [56])

A.1.7 Το TiO_2 ως αντικαρκινικός παράγοντας

Το επιστημονικό ενδιαφέρον σχετικά με τη μελέτη των εφαρμογών του TiO_2 στρέφεται και προς την προσπάθεια καλύτερης θεμελίωσης της σχέσης μεταξύ των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των νανοσωματιδίων (π.χ. μέγεθος, ενεργός επιφάνεια, φάση κρυστάλλωσης κ.τ.λ.) και της πιθανής τοξικότητάς τους [52], [57], [58]. Έτσι εισήχθη και ο όρος «νανοτοξικότητα». Τα τελευταία χρόνια, πολλές εργασίες, μεταξύ

των οποίων και η παρούσα μελέτη, εστιάζουν στην πιθανή χρήση του TiO_2 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. Απόπτωση συναντάται στα περισσότερα κακοήθη νεοπλάσματα και υψηλός αποπτωτικός δείκτης έχει παρατηρηθεί σε ταχέως αναπτυσσόμενους όγκους [59]. 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_2 σε καρκινικά κύτταρα και ενεργοποίησης τους με ορατή ακτινοβολία γιατί εξασφαλίζεται ο έλεγχος της οπτικής πρόσβασης των κυττάρων ενώ παράλληλα αποφεύγονται οι επιπτώσεις της υπεριώδους ακτινοβολίας στα υγιή κύτταρα, [60], [61]. 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 [62].

Έχει διαπιστωθεί ότι το TiO_2 , στη μορφή νανοσωματιδίων, παρουσία UV ακτινοβολίας με μήκος κύματος < 390 nm, οδηγεί σε σχηματισμό ζευγών ηλεκτρονίων – οπών που αντιδρούν με το νερό και το οξυγόνο σχηματίζοντας ROS (reactive oxygen species) με αποτέλεσμα την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων [63], [64]. Οι μηχανισμοί όμως, μέσω των οποίων λειτουργεί το TiO_2 , ως αντικαρκινικός παράγοντας, εξακολουθούν να μην είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι.

Εισαγωγή

Κεφάλαιο 1^ο

Μέρος Β' – Βιολογία

B.1.1 Κυτταρικός κύκλος

B.1.1.1 Γενικά

Το κύτταρο είναι η θεμελιώδης δομική και λειτουργική μονάδα από την οποία απαρτίζονται οι ζώντες οργανισμοί. Τα κύτταρα εμφανίζουν όλες τις λειτουργίες που είναι συνυφασμένες με τη ζωή, μεταξύ των οποίων είναι η «διαφύλαξη» των κληρονομήσιμων γενετικών πληροφοριών σε κατάλληλες γενετικές δομές (DNA) και η μεταβίβασή τους στην επόμενη γενιά κυττάρων (κληρονομικότητα). Η μεταβίβαση αυτή επιτυγχάνεται μέσω της κυτταρικής διαίρεσης. Η κυτταρική διαίρεση έχει χαρακτηριστεί ως η θεμελιώδης αρχή που διέπει την αύξηση και ανάπτυξη όλων των ζωικών και φυτικών οργανισμών, αποτελεί τη βάση της κληρονομικότητας [65], [66] και ταυτόχρονα αποτελεί μέρος μιας αυστηρά ελεγχόμενης διαδικασίας που ονομάζεται κυτταρικός κύκλος.

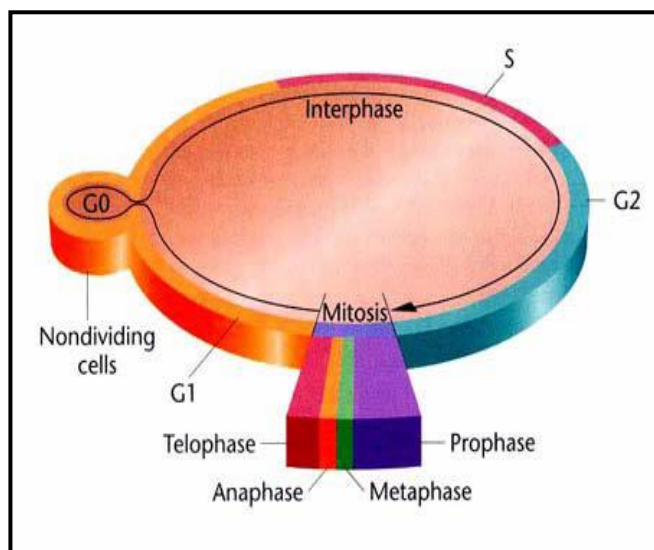
Ο κυτταρικός κύκλος (cell cycle) αποτελεί το βασικό μηχανισμό με τον οποίο (i) αναπαράγονται τα έμβια όντα, (ii) αναπτύσσονται οι πολυκύτταροι οργανισμοί, (iii) αντικαθίστανται τα νεκρά κύτταρα των ιστών, (iv) διανέμεται η γενετική πληροφορία στα θυγατρικά κύτταρα.

B.1.2.1 Οι φάσεις του κυτταρικού κύκλου

Η πρώτη διάκριση του κυτταρικού κύκλου σε επιμέρους χρονικά διαστήματα ή φάσεις έγινε με την παρατήρηση κυτταρικών διαιρέσεων στο μικροσκόπιο. Έτσι, διακρίθηκαν δύο φάσεις που αντιστοιχούν σήμερα στη μίτωση-κυτταροκίνηση και τη μεσόφαση, κατά την οποία μπορούσε να παρατηρηθεί μόνο η αύξηση του μεγέθους του κυττάρου. Η παρατήρηση της εμφάνισης και του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων από τον Flemming το 1879 οδήγησε στην πρώτη απόπειρα διάκρισης της κυτταρικής διαίρεσης σε τρεις φάσεις, που οριοθετούνταν από την εμφάνιση των χρωμοσωμάτων, τον αποχωρισμό των αδερφών χρωματίδων, την κίνησή τους προς τους αντίθετους πόλους του κυττάρου και τέλος την εξαφάνισή τους - καθώς η χρωματίνη μεταπίπτει σε λιγότερο συμπυκνωμένη μορφή. Μόνο όταν ανακαλύφθηκε η χημική σύσταση του γενετικού υλικού [67] κατέστη δυνατή η χρονική τοποθέτηση του διπλασιασμού του μέσα στον κυτταρικό κύκλο.

Η μέτρηση της ποσότητας του DNA του κυττάρου με τη χρήση ραδιενεργών ισotόπων κατά τη διάρκεια του κύκλου [68], [69], ανέδειξε ότι το γενετικό υλικό διπλασιάζεται σε μια συγκεκριμένη χρονική φάση η οποία προηγείται αρκετά του διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων [70], [71].

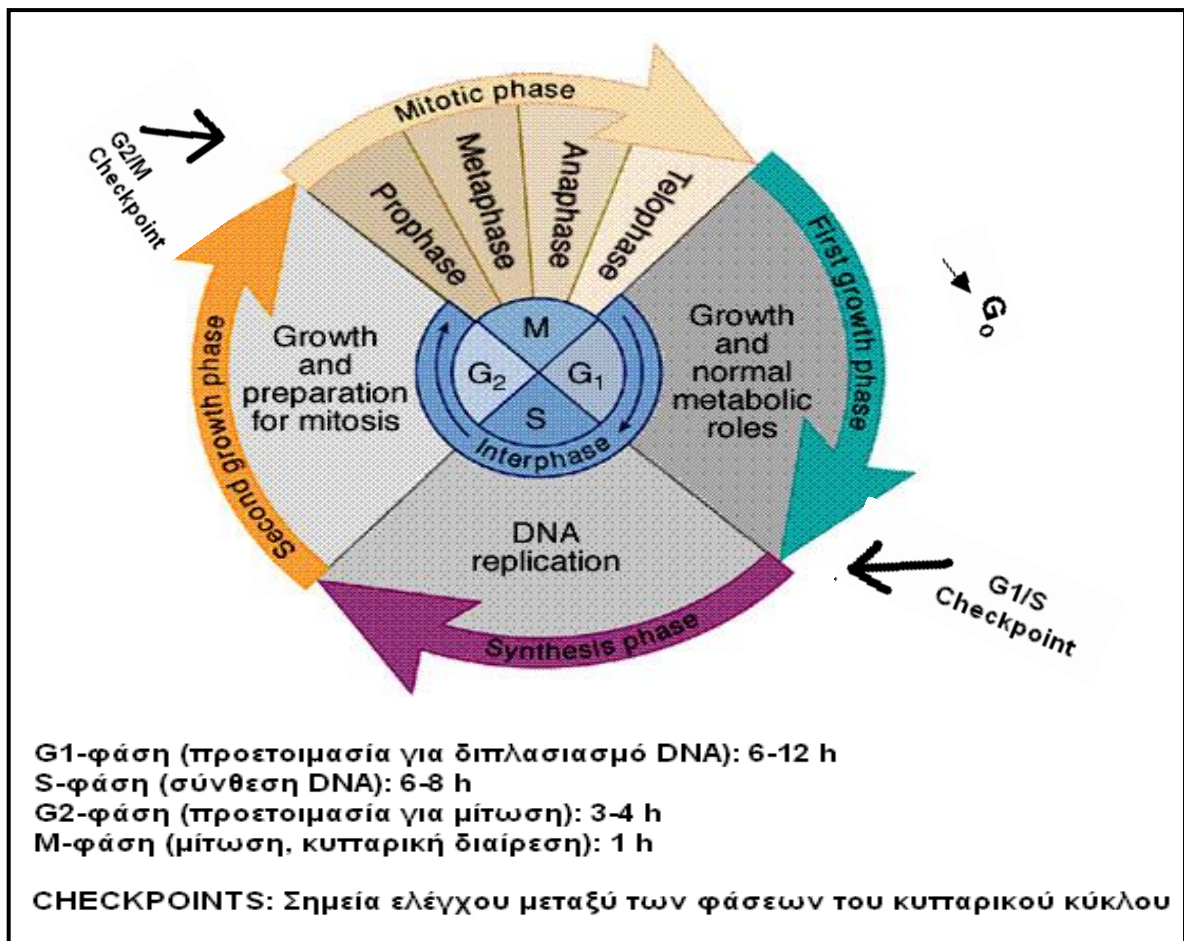
Έτσι, ο κυτταρικός κύκλος διαιρέθηκε πλέον στις τέσσερις φάσεις που αναγνωρίζουμε ως σήμερα: τη φάση S (Synthesis), τη φάση M (μίτωση –(διαίρεση χρωμοσωμάτων) - κυτταροκίνηση (κυτταροπλασματική διαίρεση)) και στις φάσεις G₁ και G₂ (Gap 1 και Gap 2), που αποτελούν τα διαστήματα μεταξύ των φάσεων M και S (Σχήμα 1.13).



Επειδή η μίτωση αποτελεί τη φάση με τα πιο δραματικά γεγονότα που καταλήγει-συνήθως-στο διαχωρισμό των δυο κυττάρων κατά την κυτταροκίνηση και είναι η μόνη που αναγνωρίζεται στο μικροσκόπιο, όλες οι υπόλοιπες φάσεις (G₁, S και G₂) αναφέρονται συνολικά και ως μεσόφαση. Η διάκριση μεταξύ τους βασίζεται σε Σχήμα 1.13. Οι φάσεις του

κυτταρικού κύκλου βιοχημικά κριτήρια, όπως η (ανατύπωση από [72]). ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης ή βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU) ή η μέτρηση του περιεχόμενου DNA ανά κύτταρο με FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter).

Η μίτωση διακρίνεται σε τέσσερις επιμέρους φάσεις: την πρόφαση, τη μετάφαση, την ανάφαση και την τελόφαση (Σχήμα 1.14).



Σχήμα 1.14. Σχηματική απεικόνιση των τεσσάρων διαφορετικών φάσεων (G_1 , S , G_2 , M) του κυτταρικού κύκλου και των βασικότερων σημείων ελέγχου (cell cycle checkpoints) μεταξύ αυτών. (Ανατύπωση από [73], τροποποιημένη)

Η φάση G_0 , η οποία αναφέρεται και ως φάση ηρεμίας (quiescence), είναι μια κατάσταση στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα που αποσύρονται προσωρινά από τον κυτταρικό κύκλο. Τα κύτταρα αυτά παραμένουν μεταβολικά ενεργά, αν και έχουν μικρότερο ρυθμό σύνθεσης μακρομορίων και έχουν τη δυνατότητα να ξαναμπούν στον κύκλο, αν δεχτούν τα κατάλληλα ερεθίσματα. Η έξοδος στη φάση G_0 μπορεί να συμβεί κάτω από ειδικές συνθήκες, όπως για παράδειγμα μετά από απουσία αυξητικών παραγόντων από το θρεπτικό μέσο κυττάρων σε καλλιέργεια ή κατά την έναρξη διαφοροποίησης των κυττάρων ([74] Pardee, 1974).

Η διάρκεια των φάσεων του κυτταρικού κύκλου ποικίλει φυσιολογικά τόσο μεταξύ οργανισμών όσο και μεταξύ των κυττάρων του ίδιου οργανισμού ανάλογα με τον

ιστολογικό τύπο ή το αναπτυξιακό στάδιο. Στο ένα άκρο του φάσματος βρίσκονται οι ταχύτερες διαιρέσεις των πρώτων σταδίων της εμβρυογένεσης – όπου συμβαίνει αλληλοδιαδοχή διπλασιασμού του γενετικού υλικού και μίτωσης χωρίς διακριτές G_1 και G_2 φάσεις - ενώ στο άλλο άκρο, ο κύκλος των ενήλικων σωματικών κυττάρων, όπου η G_1 φάση παρατείνεται σημαντικά. Οι διαφορές της διάρκειας του κύκλου μεταξύ των κυττάρων αντανakλούν, γενικά, διαφορές στη διάρκεια της φάσης G_1 .

Επομένως, ο κύκλος του κυττάρου αποτελείται από τη φάση της κυτταρικής διαίρεσης και από τη μεσόφαση, που υποδιαιρείται στις φάσεις G_1 , S και G_2 (Σχήματα 1.13 και 1.14). Στη G_1 -φάση που είναι η μεγαλύτερη σε διάρκεια (συνήθως 6-12 ώρες) φάση του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιείται η βιοσύνθεση των mRNA, tRNA, ριβοσωμάτων και πρωτεϊνών. Στη φάση της σύνθεσης (S-φάση, διάρκειας περίπου 7-9 ώρες), πραγματοποιείται ο διπλασιασμός του κυτταρικού DNA και κατά τη G_2 -φάση (διάρκειας περίπου 3-4 ώρες) το κύτταρο προετοιμάζεται για τη διαδικασία της μίτωσης (διάρκεια 1 ώρα) κατά την οποία πραγματοποιείται η διαίρεση σε θυγατρικά κύτταρα με τον ίδιο αριθμό χρωμοσωμάτων [73].

Αναφορικά με τη δομή της χρωματίνης, στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου σωματικών κυττάρων, παρουσιάζεται με διαφορετικές μορφές ανάλογα με το βαθμό συμπύκνωσης. Ο μέγιστος βαθμός συμπύκνωσης παρατηρείται στη φάση της μετάφασης όπου η χρωματίνη οργανώνεται στα χρωμοσώματα για τη διαίρεση του κυττάρου. Μετά το τέλος της κυτταρικής διαίρεσης τα χρωμοσώματα αποσυσπειρώνονται και παίρνουν ξανά τη μορφή της χρωματίνης, προκειμένου να αντιγραφεί και να εκφραστεί η γενετική πληροφορία του DNA. Ο βαθμός συμπύκνωσης και αποσυμπύκνωσης της χρωματίνης ρυθμίζεται μέσω των φαινομένων φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης (δηλαδή της προσθήκης-αφαίρεσης φωσφορικής ομάδας) των πρωτεϊνών της χρωματίνης (ιστόνης H1), η οποία με τη σειρά της ελέγχεται από παράγοντες του κυτταρικού κύκλου (επί παραδείγματι, συμπλέγματα κυκλινών και κινασών) [74]. Τα φαινόμενα φωσφορυλίωσης, λαμβάνουν χώρα καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου με μέγιστη δραστηριότητα κυρίως στη G_2 -φάση του κυτταρικού κύκλου και τη Μίτωση, κατά την οποία παρατηρούνται και τα υψηλότερα επίπεδα συμπύκνωσης της χρωματίνης και ενεργότητας του παράγοντα που προωθεί τη μίτωση, MPF (mitosis promoting factor) [73].

Η επαγωγή χρωμοσωμικών αλλοιώσεων και γενικότερα αλλαγών στο γενετικό υλικό του κυττάρου προκαλεί ενεργοποίηση, ανάλογα με το είδος της γενετικής βλάβης, των κατάλληλων μηχανισμών επιδιόρθωσης με σκοπό τη διατήρηση της γενετικής ακεραιότητας. Σε περίπτωση που οι βλάβες του γενετικού υλικού διαφύγουν του ελέγχου των επιδιορθωτικών μηχανισμών, το κύτταρο είτε οδηγείται σε κυτταρικό θάνατο είτε επιβιώνει φέροντας συγκεκριμένες μεταλλάξεις οι οποίες μπορεί να αποτελέσουν αίτιο καρκινογένεσης. Για τη διασφάλιση της αμιγούς μεταφοράς της γενετικής πληροφορίας στα θυγατρικά κύτταρα το κύτταρο διαθέτει μία σειρά από μηχανισμούς ελέγχου μεταξύ των διαδοχικών φάσεων του κυτταρικού κύκλου, τα λεγόμενα σημεία ελέγχου (cell cycle checkpoints) [73]. Τέτοια σημεία ελέγχου, υπάρχουν μεταξύ των φάσεων G_1 και S (G_1/S checkpoint) και μεταξύ της φάσης της προετοιμασίας του κυττάρου για Μίτωση (G_2 -φάση) και της φάσης της Μίτωσης (G_2/M checkpoint). Η ανεπιτυχής επιδιόρθωση βλαβών που προκύπτουν στο γενετικό υλικό είναι δυνατό να επάγει καθυστέρηση του κυτταρικού κύκλου στα σημεία ελέγχου, κυτταρικό θάνατο ή ακόμη και την επιβίωση του κυττάρου με συγκεκριμένες μεταλλάξεις και απρόβλεπτες συνέπειες εξέλιξης. Για το λόγο αυτό ο ρόλος των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου αποδεικνύεται καθοριστικός για τη διασφάλιση της σωστής κυτταρικής λειτουργίας. Ειδικότερα, το σημείο ελέγχου G_2/M συμβάλλει ουσιαστικά στη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας (genomic integrity) επιτρέποντας στο κύτταρο την επιδιόρθωση τυχόν βλαβών μετά από επίδραση χημικών παραγόντων ή ακτινοβολίας πριν προχωρήσει στη διαίρεσή του.

Συνεπώς, ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου μέσω της λειτουργικότητας των σημείων ελέγχου είναι θεμελιώδους σημασίας. Η σπουδαιότητα της λειτουργίας των σημείων ελέγχου στον κυτταρικό κύκλο υπογραμμίζεται και από τα αποτελέσματα πρόσφατων ερευνών τα οποία έδειξαν πως ανεπαρκής λειτουργία των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου συσχετίζονται τόσο με γενετικές ασθένειες (ataxia telangiectasia) [75] όσο και με διάφορες μορφές καρκίνου (καρκίνος του πνεύμονα, καρκίνος του οισοφάγου) [76], [77], [78].

Σε ό,τι αφορά την ευαισθησία των κυττάρων στη δράση των χημικών παραγόντων ή της ακτινοβολίας, ιδιαίτερο ρόλο παίζει η φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρισκόταν το κύτταρο όταν εκτέθηκε. Γενικά, η πιο ευαίσθητη φάση είναι αυτή της μίτωσης και η G_2 , ενώ υπάρχει μια τάση τα κύτταρα κατά την φάση S της συνθέσεως

του DNA και ιδιαίτερα κατά το τελικό της τμήμα να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην ακτινοβολία. Η αύξηση της αντιστάσεως στην S σχετίζεται με τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς οι οποίοι παρεμβαίνουν κατά τη σύνθεση του DNA, ενώ η μικρή αντίσταση της G₂ οφείλεται μάλλον στη μικρή διάρκεια της φάσεως, που δεν επιτρέπει την πλήρη δράση των επιδιορθωτικών μηχανισμών.

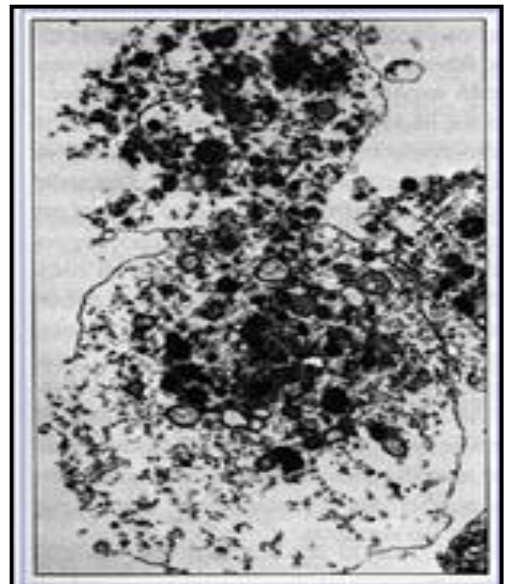
B.1.2 Κυτταρικός Θάνατος

Ο κυτταρικός θάνατος επιτελείται μέσω δύο κυρίαρχων μηχανισμών: α) τη νέκρωση και β) την απόπτωση.

B.1.2.1 Νέκρωση

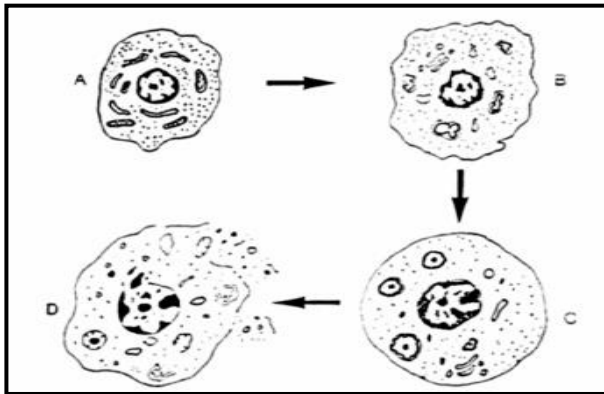
Η νέκρωση αποτελεί μη ειδικό ορισμό που περιλαμβάνει μια ποικιλία τύπων κυτταρικού θανάτου με κοινό χαρακτηριστικό τον «παθητικό» ρόλο του κυττάρου κατά την καταστροφή του. Πρόκειται για μία πάντοτε παθολογική διαδικασία που συνήθως ακολουθεί οξεία και μείζονα κυτταρική/ιστική βλάβη, όπως υποξία, υπερθερμία, ιϊκή προσβολή, έκθεση σε τοξίνες.

Πρόκειται για μια βίαιη και ταχεία μορφή εκφυλισμού. Χαρακτηρίζεται από πρόιμη



Εικόνα 1.15. Φωτογραφία νεκρωτικού κυττάρου από της ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (ανατύπωση από [79]).

διόγκωση (οίδημα) του κυτταροπλάσματος και ανεπάρκεια των μιτοχονδρίων, δυσλειτουργία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, απώλεια της κυτταρικής ομοιόστασης, καταστροφή των οργανιδίων, κυτταρικό οίδημα και διάρρηξη της πλασματικής μεμβράνης (Εικόνα 1.15). Η απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου, κυρίως πρωτεασών και λυσοσωμικών ενζύμων, στον εξωκυττάριο χώρο πυροδοτεί απελευθέρωση κυτταροκινών από τα γειτονικά κύτταρα (μακροφάγα) και τοπική φλεγμονώδη αντίδραση (Σχήμα 1.16) [80], [81].



Σχήμα 1.16. Μορφολογικές κυτταρικές μεταβολές κατά τη νέκρωση (ανατύπωση από [79]).

B.1.2.2 Απόπτωση

Ένας δεύτερος τύπος κυτταρικού θανάτου, καθαρά ευδιάκριτος από τη νέκρωση, ονομάστηκε απόπτωση (apoptosis). Ο ορισμός «απόπτωση» έχει αρχαία ελληνική προέλευση και έχει ανευρεθεί σε Ιπποκρατικά και Γαληνικά συγγράμματα καθώς και σε συγγράμματα ρωμαίων ιατρών. Το 1972, οι Kerr και Searle, εμπνεόμενοι από την Ιλιάδα, θεώρησαν ότι η εκλεκτική και προγραμματισμένη απομάκρυνση των κυττάρων από τον οργανισμό προσομοιάζει με «τα φύλλα που ο άνεμος χέει» και πρότειναν να ονομαστεί το φαινόμενο αυτό απόπτωση (Εικόνα 1.17) [82].

Η απόπτωση ή αλλιώς προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι μια θεμελιώδης, φυσιολογική διαδικασία που παίζει κρίσιμο ρόλο στον έλεγχο του αριθμού των κυττάρων κατά την ανάπτυξη και κατά τη διάρκεια της ζωής των οργανισμών. Ουσιαστικά αναφέρεται σε έναν γενετικά προκαθορισμένο εσωτερικό αυτοκαταστροφικό μηχανισμό, ο οποίος ενεργοποιείται κάτω από διάφορες καταστάσεις όπως είναι η μορφογένεση, η φυσιολογική ανανέωση κυττάρων σε ιστούς, η ανοσολογική ρύθμιση, η αποστέρηση ορμονών και άλλων τροφικών παραγόντων, οι περιβαλλοντικοί κίνδυνοι και τα κακοήθη νεοπλάσματα [83].

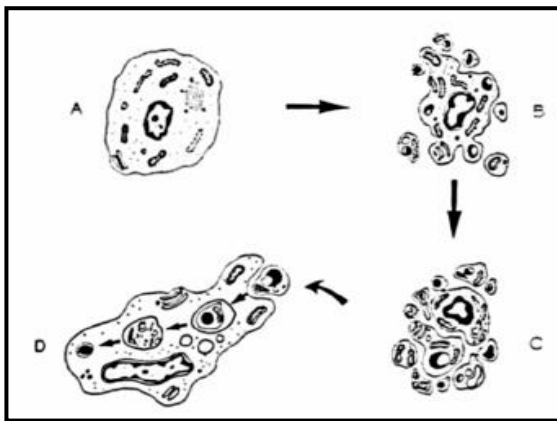


Εικόνα 1.17. Απόπτωση – πτώση των φύλλων από τα δέντρα

Πιο συγκεκριμένα, η σηματοδότηση των κυττάρων προς τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο λαμβάνει χώρα για παράδειγμα κατά την εμβρυογένεση, όταν τα κύτταρα παράγονται σε υπεραφθονία [84], [85] κατά την μεταμόρφωση [86] ή την

ενηλικίωση [87], όταν τα κύτταρα δεν είναι πια χρήσιμα ή λειτουργικά αντίστοιχα. Με αυτόν τον τρόπο, διατηρείται η ακεραιότητα και η ομοιόσταση των πολυκύτταρων οργανισμών. Κύτταρα με δυναμική πρόκλησης βλάβης στον οργανισμό, όπως είναι μολυσμένα με ιούς κύτταρα ή κύτταρα με βλάβες στο γενετικό τους υλικό, δύνανται να σηματοδοτηθούν προς κυτταρικό θάνατο. Έτσι, η κύρια συμβολή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου κατά την ανάπτυξη περιλαμβάνει την απαλοιφή ανεπιθύμητων κυττάρων [88].

Σε αντίθεση με τη νέκρωση, η απόπτωση είναι *ενεργητική κυτταρική διαδικασία* που δεν πυροδοτεί φλεγμονώδη αντίδραση, καθώς τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνονται άμεσα από τα γειτονικά φαγοκύτταρα χωρίς την απελευθέρωση κυτοκινών αλλά ούτε και πρωτεολυτικών ενζύμων στον εξωκυττάριο χώρο (Σχήμα 1.18) [80, 81].



Σχήμα 1.18. Μορφολογικές κυτταρικές μεταβολές κατά την απόπτωση

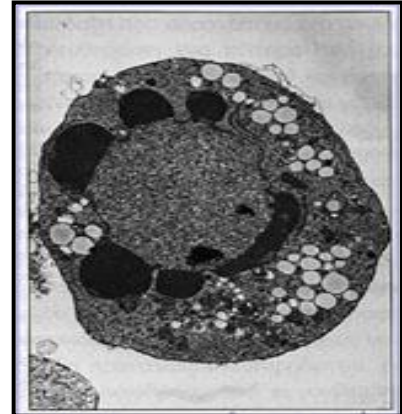
Η πιθανή δυσλειτουργία της αποπτωτικής διαδικασίας επηρεάζει την παθογένεια μιας ευρείας κλίμακας ανθρώπινων παθολογικών καταστάσεων [89]. Για παράδειγμα, η απόπτωση σχετίζεται με αυξημένη τάση προς νευροεκφυλιστικές νόσους όπως η Alzheimer's, η Huntington's και η Parkinson's, καθώς και μερικώς με την ιστική καταστροφή που λαμβάνει χώρα μετά από αγγειακά εμφράγματα στον εγκέφαλο και την καρδιά [90], [91].

Αντίθετα, η μειωμένη τάση για αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο έχει κυρίως σχετισθεί με αυτοάνοσα νοσήματα και ιογενείς λοιμώξεις, ενώ ακόμη φαίνεται να είναι σημαντική για την ανάπτυξη όγκων και για επίκτητη αντίσταση στη χημειοθεραπεία [92].

Την τελευταία δεκαετία η βασική έρευνα για τον καρκίνο έχει να επιδείξει αξιοσημείωτες προόδους στην κατανόηση της βιολογίας και της γενετικής του καρκίνου. Ένα από τα πιο σπουδαία επιτεύγματα είναι η συνειδητοποίηση πως η απόπτωση και τα γονίδια που την ελέγχουν, έχουν σημαντική επίδραση στον κακοήθη φαινότυπο. Η κατανόηση της απόπτωσης έχει εξασφαλίσει τη βάση για νέες στοχευμένες θεραπείες που επάγουν το θάνατο των καρκινικών κυττάρων ή τα

καθιστούν ευαίσθητα στους καθιερωμένους κυτταροτοξικούς παράγοντες και την ακτινοθεραπεία. Αυτοί οι νέοι παράγοντες περιλαμβάνουν αυτούς που στοχεύουν το εξωγενές μονοπάτι της απόπτωσης και αυτούς που στοχεύουν το ενδογενές.

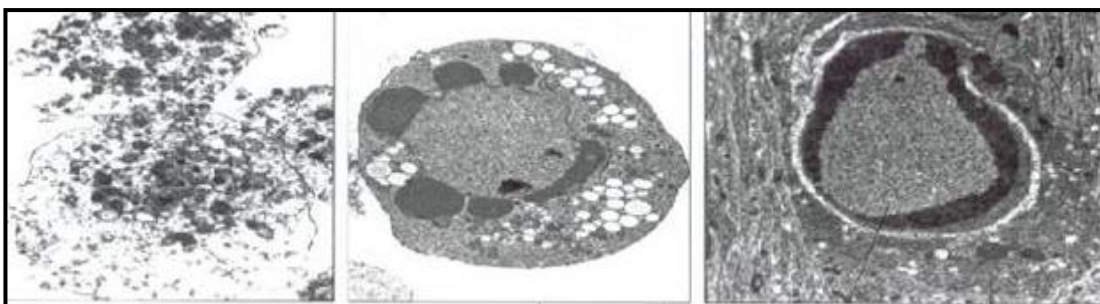
Εικόνα 1.19. Φωτογραφία αποπτωτικού κυττάρου από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (ανατύπωση από[79])



B.1.2.2.1 Μορφολογικές μεταβολές της απόπτωσης

Τα κύτταρα που υφίστανται αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο παρουσιάζουν διαδοχικές μεταβολές στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα και στην κυτταρική μεμβράνη. Ο χρόνος που μεσολαβεί από την επίδραση του προ-αποπτωτικού ερεθίσματος έως την έναρξη της απόπτωσης ποικίλει, όμως οι μεταβολές συμβαίνουν εντός ολίγων λεπτών.

Αρχικά, τα αποπτωτικά κύτταρα χάνουν την επαφή με τα γειτονικά τους κύτταρα, στη συνέχεια πραγματοποιείται «διαστολή» του ενδοπλασματικού δικτύου και εξοίδηση της δεξαμενής του που σχηματίζει κυστίδια. Η απώλεια ύδατος και ιόντων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του κυτταρικού όγκου και αύξηση της πυκνότητας του κυττάρου.



Εικόνα 1.20. Διαδοχικές Μορφολογικές κυτταρικές μεταβολές κατά την απόπτωση (ανατύπωση από «Molecular Biology of the Cell», Alberts, Bray, Lewis, Raff, Roberts, Watson)

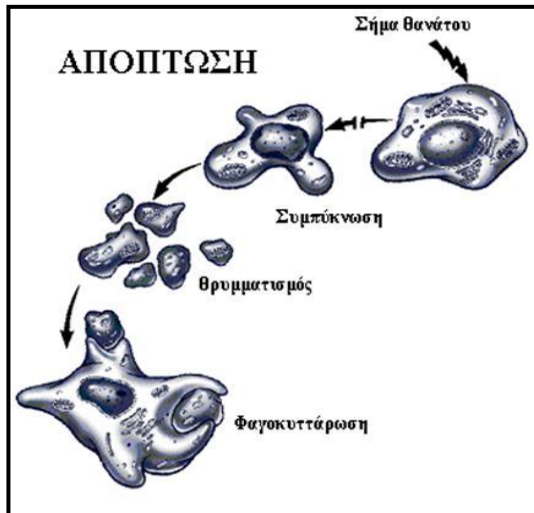
Ο πυρήνας συμπυκνώνεται και η χρωματίνη σχηματίζει συμπυκνωμένες-συμπαγείς δομές κάτω από την, προς το παρόν, άθικτη πυρηνική μεμβράνη, ενώ ενδονουκλεάσες

την αποδομούν. Στην επιφάνεια του κυττάρου οι κυτταρικές συνδέσεις καταργούνται, ενώ η κυτταροπλασματική μεμβράνη «συσπειρώνεται» και αποκτά φυσαλιδώδη εμφάνιση. Σε όλη αυτή τη διάρκεια, τα μιτοχόνδρια και τα ριβοσώματα διατηρούν αδρά τη δομή τους κι εν μέρει τη λειτουργικότητά τους. Προοδευτικά, καταστρέφεται ο κυτταροσκελετός και το κύτταρο συρρικνώνεται.

Τελικά, ο πυρήνας κατακερματίζεται σε πολλαπλά τμήματα που περιβάλλονται από πυρηνική μεμβράνη. Ακολουθεί η διάσπαση του κυττάρου στα «αποπτωσώματα», που επίσης περιβάλλονται από κυτταροπλασματική μεμβράνη και κάποια από τα οποία εμπεριέχουν πυρηνικά θραύσματα (Σχήμα 1.21). Τα αποπτωσώματα φαγοκυτταρώνονται ταχέως από τα γειτονικά κύτταρα και μακροφάγα, χωρίς την ανάπτυξη φλεγμονώδους αντίδρασης και παραμένουν εντός των φαγοσωμάτων ορατά στο οπτικό μικροσκόπιο για λίγες ώρες [80], [81].

Ειδικό μορφολογικό χαρακτηριστικό της απόπτωσης αποτελεί ο κατακερματισμός του DNA από ενδονουκλεάσες. Αρχικά ανιχνεύονται μεγάλου μεγέθους θραύσματα DNA, 50 έως 300 kbp, που είναι παροδικά και πιθανά αποτελούν ροζέτες και αγκύλες χρωματίνης που απελευθερώνονται από την καθηλωμένη πυρηνική μήτρα. Ταχέως, περαιτέρω κατακερματισμός του DNA στις ενδονουκλεοσωμικές συνδετικές περιοχές λαμβάνει χώρα δημιουργώντας πολλαπλά ολιγονουκλεοτίδια 150-200 bp (ένα νουκλεόσωμα = 150 bp). Τα θραύσματα αυτά του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος απεικονίζονται χαρακτηριστικά ως «ολιγονουκλεοσωμική κλίμακα» ή «DNA ladder» κατά την ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης [93]. Πρέπει να σημειωθεί ότι το μιτοχονδριακό DNA δεν καταστρέφεται κατά τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο, υποδηλώνοντας ότι ο κατακερματισμός του DNA αποτελεί ειδικό πυρηνικό συμβάν [94].

Στα χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την απόπτωση, περιλαμβάνονται η μερική αναστροφή της κυτταρικής μεμβράνης με την εμφάνιση του φωσφολιπιδίου φωσφατιδυλοσερίνη (PS), [94], και η πρωτεολυτική κατάτμηση ενός αριθμού ενδοκυτταρικών υποστρωμάτων [95]. Συνοπτικά, οι μορφολογικές κυτταρικές μεταβολές κατά τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.



Σχήμα 1.21. Διαδοχικά στάδια κατά την απόπτωση (ανατύπωση από [79])

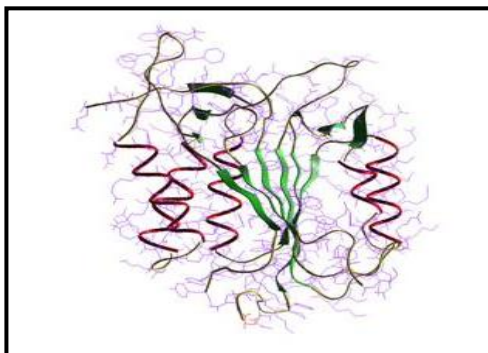
Πίνακας Β.1. Μορφολογικές κυτταρικές μεταβολές κατά την απόπτωση

ΠΥΡΗΝΑΣ	<ul style="list-style-type: none"> ▪ συρρίκνωση και αποδόμηση (καρρυόρρηξη) ▪ υπολείμματα πυρηνίων παρατηρούνται, ως διάσπαρτο λεπτοκοκκιώδες υλικό, ή ως συμπαγείς κοκκιώδεις μάζες, προσκείμενες στην εσωτερική επιφάνεια της συμπυκνωμένης χρωματίνης ▪ σχηματισμός αποπτωσωματίων, που περιβάλλονται από μεμβράνη, έχουν λεία επιφάνεια και περιέχουν ακέραια οργανίδια και τμήματα του πυρήνα
ΧΡΩΜΑΤΙΝΗ	<ul style="list-style-type: none"> ▪ συμπύκνωση σε λεπτοκοκκιώδεις μάζες ομογενούς υφής, που συγκεντρώνεται στην εσωτερική επιφάνεια της πυρηνικής μεμβράνης
ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ	<ul style="list-style-type: none"> ▪ απώλεια των μεσοκυττάρων συνδέσεων και των εξειδικευμένων δομών της κυτταρικής επιφάνειας και δημιουργία ακανόνιστων κυτταροπλασματικών προεκβολών
ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ DNA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ διανουκλεοσωματική
ΦΑΓΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗ	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ταχεία διάλυση των αποπτωσωματίων από φαγοκύτταρα και γειτονικά κύτταρα
ΕΞΙΔΡΩΜΑΤΙΚΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ	<ul style="list-style-type: none"> ▪ στα αποπτωτικά κύτταρα δεν εμφανίζεται φλεγμονώδης αντίδραση

B.1.2.2.2 Βιοχημικές μεταβολές της απόπτωσης

Η απόπτωση είναι μία διαδικασία που μεσολαβείται από τις κασπάσες, ανεξαρτήτως του αρχικού αποπτωτικού σήματος. Η δράση των κασπασών προκαλεί μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές στο κύτταρο, μέσω διάσπασης κομβικών υποστρωμάτων τους. Οι αλλαγές αυτές είναι χαρακτηριστικές των αποπτωτικών κυττάρων όπως θραύση του DNA, συσσωμάτωση της χρωματίνης, σχηματισμός προεξοχών στη μεμβράνη και αποπτωσωμάτων. Οι κασπάσες είναι μία οικογένεια πρωτεολυτικών ενζύμων, που φέρουν το αμινοξύ κυστεΐνη στο ενεργό τους κέντρο και διασπούν τα υποστρώματά τους, πρωτεολύοντας τα μετά από ασπαραγινικό οξύ (**caspases: cysteine, aspartic acid proteases**). Πρόκειται για μία ομάδα κυστεϊνικών πρωτεασών, οι οποίες απαιτούν Ca^{2+} και Mg^{2+} για την ενεργοποίησή τους, ενώ η δράση τους καταστέλλεται από Zn^{2+} . Η δράση τους είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένη και ο ρόλος τους καθοριστικός στα τελικά στάδια της απόπτωσης. Μέχρι σήμερα τουλάχιστον 14 διαφορετικές κασπάσες έχουν ταυτοποιηθεί, οι οποίες διακρίνονται για τις ομοιότητες τους στην αλληλουχία των αμινοξέων που τις αποτελούν, αλλά και στη δομή και στην ειδικότητα των υποστρωμάτων που αποικοδομούν [96].

Οι κασπάσες που συμμετέχουν στην απόπτωση χωρίζονται γενικά σε δύο κατηγορίες: τις εναρκτήριες κασπάσες (initiator), στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι κασπάσες-2, -8, -9, και -10, και τις εκτελεστικές κασπάσες (effector), στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι κασπάσες-3, -6, και -7. Ακόμη υπάρχει μία υποκατηγορία κασπασών όπου ανήκουν οι κασπάσες-1, -4, -5, -11, -12, -13 οι οποίες αποικοδομούν



Σχήμα 1.22. Σχηματική απεικόνιση της κασπάσης-3

διάφορες κυτταροκίνες (φλεγμονώδεις κασπάσες).

Οι κασπάσες παράγονται στα κύτταρα ως καταλυτικά ανενεργά προένζυμα που περιέχουν τρεις διακριτές περιοχές (domains): μια αμινοτελική πρόδρομη περιοχή (prodomain), μια μεγάλη υπομονάδα που περιέχει το ενεργό κέντρο κυστεΐνης, μέσα στο συντηρημένο μοτίβο αμινοξέων QACXG, και μια μικρή καρβοξυτελική

υπομονάδα [97].

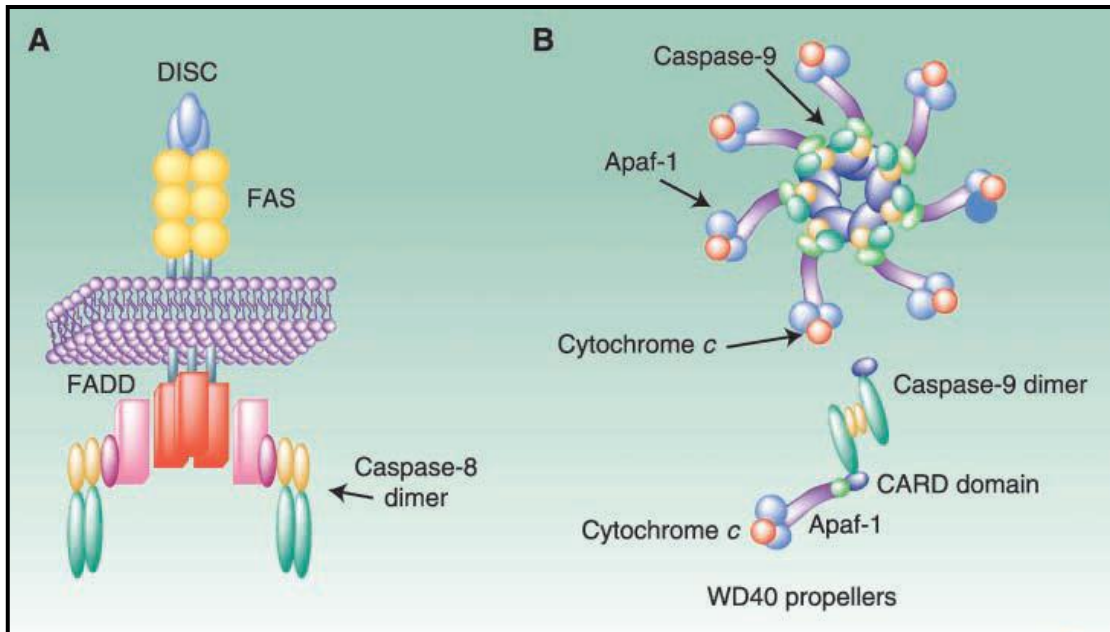
Η ρύθμιση της ενεργοποίησης των κασπασών με την παραγωγή των προενζύμων είναι απαραίτητη, καθώς αυξημένη ενεργότητα των κασπασών θα ήταν θανατηφόρα για το κύτταρο.

Η ρύθμιση της ενεργοποίησης των κασπασών με την παραγωγή των προενζύμων είναι απαραίτητη, καθώς αυξημένη ενεργότητα των κασπασών θα ήταν θανατηφόρα για το κύτταρο. Συγκεκριμένα, η κασπάση-3 (επίσης γνωστή και ως CPP32, aporain και Yama) απαντάται σε δύο ισομορφές των 17 και 19 kDa που προέρχονται από την πρωτεόλυση της πρόδρομης μορφής της, της προκασπάσης-3 κατά την αποπτωτική διαδικασία από άνωθεν αυτής πρωτεάσες συμπεριλαμβανομένων των κασπασών -6 και -8. Αποδεδειγμένα, η συνολική ποσότητα ενεργοποιημένης κασπάσης-3 αποτελεί δείκτη του βαθμού απόπτωσης των κυττάρων.

Έχουν περιγραφεί δύο κύρια μονοπάτια που ενεργοποιούν τις κασπάσες: το μονοπάτι των «υποδοχέων θανάτου» (death receptor pathway) και το μιτοχονδριακό μονοπάτι (mitochondrial pathway).

Το μονοπάτι των «υποδοχέων θανάτου»

Η απόπτωση σηματοδοτείται μέσω ειδικών υποδοχέων θανάτου που βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια, όπως ο Fas και οι TNFRs. Για παράδειγμα η σύνδεση της εξωκυτταρικής περιοχής του Fas υποδοχέα με τον Fas προσδέτη οδηγεί στην πρόσδεση του προσαρμοστικού μορίου FADD (**Fas-associated protein with death domain**) στον Fas υποδοχέα, διαμέσου αλληλεπιδράσεων ομόλογων «περιοχών θανάτου» στα δύο μόρια (Σχήμα 1.25A). Μετά την πρόσδεση του FADD στον Fas υποδοχέα, η FADD πρωτεΐνη προσδέεται στην πρόδρομη περιοχή (prodomain) της προκασπάσης-8, αυτή τη φορά μέσω ομοτυπικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ περιοχών που καλούνται «εκτελεστικές περιοχές θανάτου» (death effector domains). Το σύμπλοκο που δημιουργείται ονομάζεται DISC (**death-inducing signaling complex**). Σύμφωνα με τις μέχρι τώρα έρευνες, η «στρατολόγηση» των μορίων προκασπάσης-8 στο σύμπλοκο Fas-FADD προσελκύει πολλαπλά προένζυμα προκασπάσης-8, έχοντας ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της προκασπάσης-8 [98].

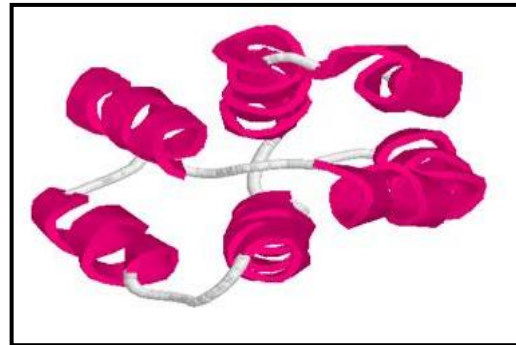


Σχήμα 1.23. Πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα συγκροτούν τις πλατφόρμες για την ενεργοποίηση των κασπασών A) στο μονοπάτι των «υποδοχέων θανάτου» και B) στο μιτοχονδριακό μονοπάτι (ανατύπωση από [99])

Το μιτοχονδριακό μονοπάτι

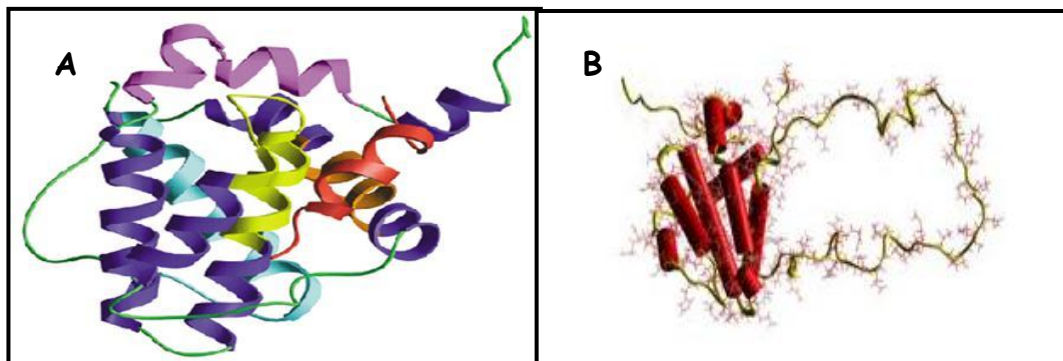
Το μιτοχονδριακό μονοπάτι απομακρύνει τα κύτταρα που έχουν υποστεί στέρση αυξητικών παραγόντων ή έχουν υποστεί βλάβη των μιτοχονδρίων τους ή έχουν επεξεργαστεί με χημειοθεραπευτικά φάρμακα και ακτινοβολία. Το μιτοχονδριακό μονοπάτι ενεργοποίησης των κασπασών έχει ως αποτέλεσμα τα μιτοχόνδρια να γίνονται διαπερατά και να απελευθερώνονται πολλά πεπτίδια. Ένα από αυτά είναι η πρωτεΐνη μεταφορέας ηλεκτρονίων το κυτόχρωμα c. Το κυτόχρωμα c συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα, όπου δεσμεύεται με την πρωτεΐνη Apaf-1 (**a**por**t**otic **p**rotease-**a**ctivating **f**actor-1), προκαλώντας εξαρτώμενη από ATP (ή dATP) αλλαγή της διαμόρφωσης της Apaf-1 που οδηγεί στον ολιγομερισμό της (Σχήμα 1.25B). Η δέσμευση της προκασπάσης-9 στα ολιγομερή της Apaf-1, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός μεγαλομοριακού συμπλόκου που ονομάζεται αποπτώσωμα (apoptosome). Η αλληλεπίδραση αυτή μεταξύ Apaf-1 και προκασπάσης-9 προκαλεί την ενεργοποίηση της προκασπάσης-9 [100].

Έχει βρεθεί ότι στη ρύθμιση και τη διεξαγωγή της απόπτωσης παίζουν κρίσιμο ρόλο τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Πρόκειται για μία οικογένεια μορίων που αριθμεί πάνω από 20 μέλη με σημαντική ομολογία μεταξύ τους, τα οποία ρυθμίζουν τη διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το κύριο προαποπτωτικό μόριο είναι το Bax, το οποίο σχηματίζει πόρους στη μεμβράνη του μιτοχονδρίου και οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση.



Σχήμα 1.24. Σχηματική απεικόνιση της Araf-1
(ανατύπωση από [100])

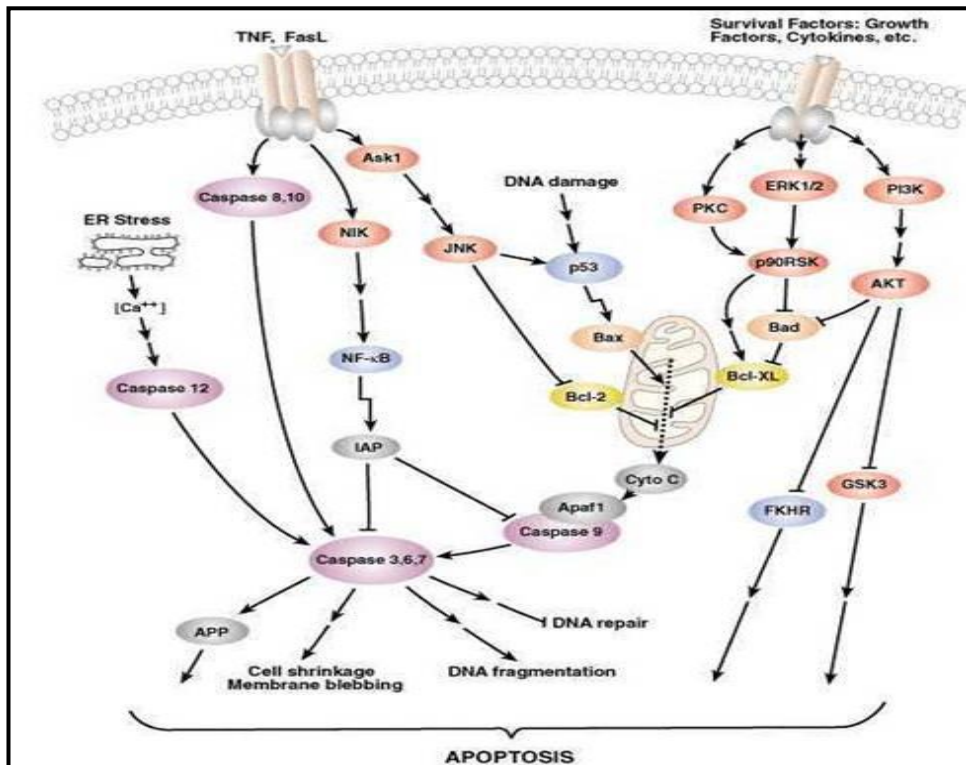
Αντίθετα, τα Bcl-2 και Bcl-x_L έχουν αντιαποπτωτική δράση, αφού καθένα από αυτά δεσμεύεται στο Bax και αναστέλλει τη δράση του.



Σχήμα 1.25. Σχηματική απεικόνιση της A) Bcl-2 και B) Bcl-x_L
(ανατύπωση από [102])

Ακόμη, το προ-αποπτωτικό Bad που δεσμεύεται στα Bcl-2 ή Bcl-x_L με αποτέλεσμα τα τελευταία να μη μπορούν να αναστείλουν την αποπτωτική δράση του Bax [101], [102].

Η ρύθμιση και έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων καθορίζει το αν ένα κύτταρο θα οδηγηθεί σε απόπτωση ή σε κυτταρική επιβίωση.

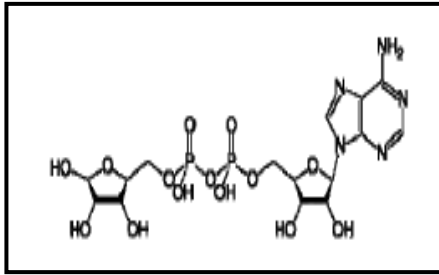


Σχήμα 1.26. Οδοί της αποπτωτικής διαδικασίας.
(ανατύπωση από [96])

Ενεργοποίηση της PARP

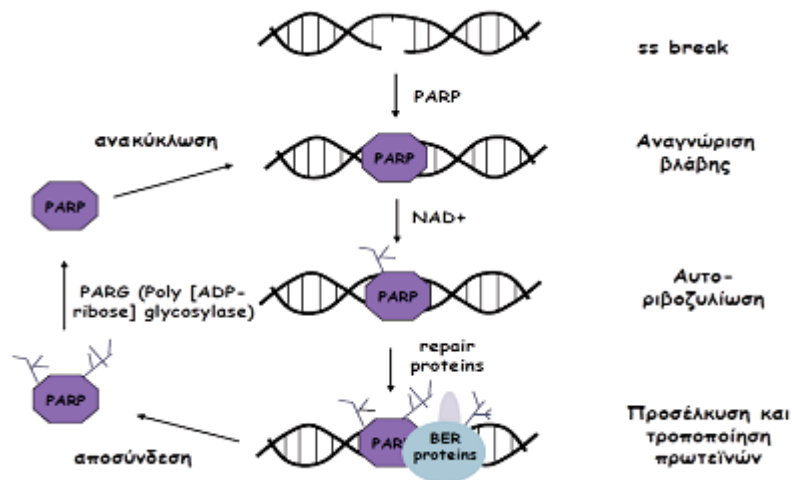
Η διαδικασία μέσω της οποίας τα κύτταρα οδηγούνται στην απόπτωση εκτελείται από την οικογένεια των κασπασών, όπως έχει προαναφερθεί, συμπεριλαμβανομένης και της κασπάσης -3. Η ενεργοποίηση των κασπασών σχετίζεται με τα μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά που αποκτά ένα αποπτωτικό κύτταρο. Ένας από τους κύριους στόχους της κασπάσης-3 είναι η PARP [(Poly (ADP-Ribose) Polymerase) - (Πολυμεράση της πολυ(ADP-ριβόζης))] με μοριακό βάρος 113 kDa, που συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA κυττάρων που έχουν υποστεί στρες [103] και απαντάται στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Συγκεκριμένα, δραστηριοποιείται στην επισκευή των ss breaks (single-strand breaks - ρήγμα μονής έλικας του DNA). Προσδέεται σε σπασίματα του DNA και συνθέτει αλυσίδες όλιγο- ή πόλυ-(ADP-ριβόζης) χρησιμοποιώντας NAD^+ . Τις αλυσίδες αυτές τις προσθέτει ομοιοπολικά στον εαυτό της ή άλλες πρωτεΐνες-στόχους. Η ενεργότητα της ρυθμίζεται από τα επίπεδα αυτοτροποποίησής της (αλυσίδες ADP-ριβόζης). Για πλήρη ενεργότητα, απαιτείται πρόσδεση της PARP σε σπασίματα του DNA.

Η PARP μετατρέπεται από την ενεργοποιημένη κασπάση-3 σε προϊόντα μικρότερου μοριακού βάρους. Η διάσπαση της PARP διευκολύνει την αποδόμηση και αποσυγκρότηση του κυττάρου και επομένως ο εντοπισμός της μας προσφέρει τη δυνατότητα να έχουμε ένα δείκτη της απόπτωσης [103], [104], [105]. Η δράση αυτού του ενζύμου είναι εξαιρετικά υψηλή στα καρκινικά



Σχήμα 1.27. Η ADP-ριβόζη
(ανατύπωση από [103])

κύτταρα, επειδή εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ενεργό λειτουργία του DNA τους. Με την παρουσία της PARP, τα κύτταρα μπορούν να διορθώσουν πιθανά λάθη τους, που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης. Αντιστρόφως, αν η PARP δεν δρα επαρκώς, τότε παρατηρείται κατακερματισμός του DNA και, συνεπώς, απόπτωση. Πολλά αντικαρκινικά φάρμακα στοχεύουν στην αναστολή της λειτουργίας του PARP με αποτέλεσμα η επιδιόρθωση του DNA να είναι μειωμένη.



Σχήμα 1.28. Μηχανισμός Δράσης PARP
(ανατύπωση από [105])

B.1.3 Οξειδωτικό Στρες

B.1.3.1 Γενικά

Από το 1954 είχε προταθεί ότι οι τοξικές επιδράσεις του O₂ που παρατηρούνταν, σε συνδυασμό με ταυτόχρονη δράση ιονίζουσας ακτινοβολίας μπορούν να αποδοθούν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών (free radicals) οξυγόνου [106]. Από τότε, η διαρκής έρευνα στο νέο αυτό πεδίο της βιοχημείας, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη της

απαραίτητης τεχνολογίας, λόγω της παράλληλης προόδου της φυσικής, της χημείας και των μαθηματικών, υπογράμμισε μια εξαιρετικά σύνθετη συμμετοχή των ελευθέρων ριζών στο μεταβολισμό των αερόβιων οργανισμών. Η αναπόφευκτη παρουσία των δραστικών αυτών μορίων στη ζωή των οργανισμών συνδέθηκε με φυσιολογικές βιοχημικές πορείες και δράσεις, όπως είναι η μετάδοση δευτερογενών κυτταρικών σημάτων, οι βιολογικές αντιδράσεις πολυμερισμού, η διαστολή και συστολή των αγγείων, η απόπτωση, αλλά και με πλήθος ασθενειών όπως ο διαβήτης, η κυστική ίνωση, ο καρκίνος, πολλές νευροεκφυλιστικές και άλλες ασθένειες [106].

B.1.3.2. Ελεύθερες Ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα (free radical) ορίζεται κάθε είδος ατόμου ή μορίου που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Η οντότητα αυτή μπορεί να είναι είτε ουδέτερη είτε φορτισμένη. Το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο των ελευθέρων ριζών είναι συνήθως εξαιρετικά ανταλλάξιμο, γεγονός που αποτελεί τη χημική και τη φυσική αιτία για τη δραστηριότητα και την αστάθεια των περισσοτέρων ελευθέρων ριζών [38].

Επί της ουσίας, μια ελεύθερη ρίζα (με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο), ανάλογα με την αναγωγική/οξειδωτική της ικανότητα, τείνει να αποσπά ένα ηλεκτρόνιο από ένα γειτονικό μόριο για να αποκτήσει δική της σταθερότητα και το μόριο-στόχος, με τη σειρά του, γίνεται μια νέα ρίζα. Υποστηρίζεται ότι η δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών εξαρτάται από τη σχέση όγκου/επιφάνειας. Με αυτό το δεδομένο, η ρίζα του υδροξυλίου (OH^{\bullet}) θεωρείται μια πολύ δραστική ρίζα. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου (πίνακας Β.2) [107], [108]. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κατηγορίες: (i) ελεύθερες ρίζες, (ii) ιόντα (iii) συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων, και (iv) μόρια.

Στη βιολογία, κεντρικό ρόλο παίζουν οι ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου. Είναι γνωστό ότι το οξυγόνο αποτελεί το βασικό χημικό στοιχείο της ζωής, όμως σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως κατά τη διάρκεια της αναπνοής, το οξυγόνο είναι ικανό να δημιουργήσει μια σειρά χημικά ενεργών ουσιών που θεωρούνται υπεύθυνες για το οξειδωτικό στρες (stress) [109]. Τέτοιες ενεργές ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS) περιλαμβάνουν όχι μόνο τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου, όπως τη ρίζα του υδροξυλίου (OH^{\bullet}) και τη ρίζα του υπεροξειδίου (O_2^{\square}), αλλά και άλλες οντότητες

χωρίς ασύζευκτα ηλεκτρόνια, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και τη μονή ρίζα του οξυγόνου ($^1O_2^{\square}$).

Όλες οι ROS έχουν κοινή ικανότητα να αποσπούν ένα ηλεκτρόνιο από το μόριο-στόχο, και συνεπώς να προκαλούν οξειδωση [110]. Επομένως δρουν ως οξειδωτικά. Στους ζωντανούς οργανισμούς μπορούν να οξειδώσουν όλα τα οργανικά μόρια (υδατάνθρακες, λιπίδια, αμινοξέα, πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια) προκαλώντας μια σειρά βιοχημικών αλλαγών [111].

Τόπος Παραγωγής Οξειδωτικών Ριζών

Στο εσωτερικό των κυττάρων, οι ROS παράγονται κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής μεταβολικής δραστηριότητας, είτε αυθόρμητα, είτε ως αποτέλεσμα αντιδράσεων που καταλύονται από ένζυμα ή από μέταλλα μεταφορείς, όπως είναι ο σίδηρος ή ο χαλκός. Σε ορισμένες περιπτώσεις, κάποιοι εξωγενείς παράγοντες είναι ικανοί να αυξήσουν την παραγωγή των ελευθέρων ριζών [108], [112].

Πίνακας Β.2 Παραδείγματα ελευθέρων ριζών

Όνομα	Μοριακός Τύπος	Παρατηρήσεις
Ρίζα υδρογόνου	$H\cdot$	Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα
Trichloromethyl radical ρίζα τριχλωρομεθυλίου)	$CCl_3\cdot$	Αποτέλεσμα του μεταβολισμού του CCl_4
Superoxide radical (ρίζα υπεροξειδίου)	O_2^{\square}	Ρίζα με κεντρικό άτομο το οξυγόνο
Hydroxyl radical (ρίζα υδροξυλίου)	$OH\cdot$	Πολύ δραστική, αντιδρά με όλα τα βιομόρια
Thiyl/perthiyl radical (θειλική/υπερθειλική ρίζα)	$RS\cdot/ RSS\cdot$	Ρίζες με κεντρικό άτομο το θείο, αντιδρά με όλα τα βιομόρια
Peroxyl radical (υπεροξυλική ρίζα)	$RO_2\cdot$	Δημιουργούνται κατά τη διάσπαση οργανικών υπεροξειδίων και από αντιδράσεις ριζών άνθρακα με O_2
Alkoxy radical (ρίζα αλκοξειδίου)	$RO\cdot$	
Οξείδια αζώτου	$NO\cdot, NO_2\cdot$	Το $NO\cdot$ παράγεται in vivo από L- αργινίνη, το $NO_2\cdot$ από την αντίδραση $NO\cdot$ με O_2
Στοιχεία μετάπτωσης	Fe, Cu, ...	Ισχυροί καταλύτες αντιδράσεων ελεύθερων ριζών χάρη στην ιδιότητά τους να αλλάζουν αριθμό οξείδωσης

Η κυτταρική μεμβράνη εμπλέκεται στην παραγωγή οξειδωτικών ριζών, κυρίως κατά τη διάρκεια φλεγμονής και λοιμώξεων. Τα μιτοχόνδρια όμως αποτελούν κύρια πηγή οξειδωτικών ριζών, γιατί σε αυτά βρίσκεται η αλυσίδα των αναπνευστικών ενζύμων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την οξειδωτική φωσφορύλιωση. Στην πραγματικότητα, η μεταφορά ηλεκτρονίων δεν καταλήγει αποκλειστικά στη δημιουργία του μορίου του νερού, ενώ μικρά αλλά σημαντικά ποσά των ηλεκτρονίων (1–2%) μεταφέρονται από τα ένζυμα της αναπνευστικής αλυσίδας κατευθείαν στο μοριακό οξυγόνο, δημιουργώντας ανιόντα υπεροξειδίου ή ρίζες υδροξυλίου ή υπεροξειδία του υδρογόνου. Έχει υπολογιστεί ότι κατά τη διάρκεια σημαντικής άσκησης στους σκελετικούς μυς, το ποσό των ηλεκτρονίων που διαφεύγει κατά αυτόν τον τρόπο μπορεί να μειώσει άμεσα το 15% του μιτοχονδριακού οξυγόνου [109].

Στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενεργός παραγωγή ριζών γίνεται μέσω του κυτοχρώματος P₄₅₀, που είναι γνωστό ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αποτοξίνωσης. Το κυτόχρωμα P₄₅₀ είναι μια αιμοπρωτεΐνη που έχει τη δυνατότητα να καταλύει αντιδράσεις υδροξυλίωσης για την παραγωγή ενεργών οξειδωτικών ριζών.

Γίνεται σαφές ότι σε κάθε σημείο του κυττάρου η παραγωγή των ριζών έχει μια ειδική λειτουργία, όχι μόνο στο μεταβολισμό του κυττάρου αλλά και σε άλλες διαδικασίες, όπως οι λοιμώξεις και οι φλεγμονές.

Συμπερασματικά, οι ελεύθερες ρίζες είναι απαραίτητα ενδιάμεσα στοιχεία στον κυτταρικό μεταβολισμό. Η παραγωγή τους είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ανθρώπινη ζωή, ενώ επηρεάζεται και από εξωγενείς παράγοντες. Διάφοροι φυσικοί, χημικοί ή βιολογικοί παράγοντες μπορούν να πυροδοτήσουν την έναρξη της παραγωγής τους, ενώ μπορούν ακόμη και να την αυξήσουν [113].

Η ιονίζουσα και η υπεριώδης ακτινοβολία αποτελούν παράδειγμα φυσικού παράγοντα που ευνοεί την παραγωγή ελευθέρων ριζών, με τη ραδιόλυση και φωτόλυση, αντίστοιχα, του νερού, που αποτελεί βασικό συστατικό των ζωντανών οργανισμών. Άλλοι χημικοί παράγοντες, όπως οι αρωματικοί πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες και μερικά φάρμακα, δρουν με έμμεσο μηχανισμό και, συγκεκριμένα, μέσω ενεργοποίησης του κυτοχρώματος P₄₅₀. Τέλος, παράδειγμα βιολογικού παράγοντα παραγωγής ριζών είναι τα βακτήρια και άλλοι μολυσματικοί παράγοντες, καθώς και μερικά αντισώματα.

B.1.3.3 Οι συνέπειες της παραγωγής των ελευθέρων ριζών στους οργανισμούς - Οξειδωτικό στρες

Οι ελεύθερες ρίζες, και κυρίως οι πολύ δραστικές, όπως η ρίζα υδροξυλίου μπορούν να προσβάλλουν μεγάλη ποικιλία μορίων όπως σάκχαρα, αμινοξέα, φωσφολιπίδια και γενικά λιπίδια, βάσεις DNA και οργανικά οξέα. Οι λιγότερο δραστικές ελεύθερες ρίζες μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή δραστικότερων καταλήγοντας τελικά στο ίδιο αποτέλεσμα. Γενικότερα η διαταραχή της ισορροπίας προ-οξειδωτών και αντιοξειδωτών προς όφελος των πρώτων, καταλήγοντας σε οξειδωτικές βλάβες (oxidative damage), ονομάζεται οξειδωτικό στρες (oxidative stress). Παρακάτω θα αναφερθούν οι σημαντικότεροι τρόποι οξειδωτικών βλαβών στα σημαντικότερα βιομόρια του κυττάρου [110], [114].

Οξειδωτικές βλάβες στο DNA

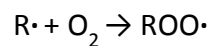
Οι δραστικές μορφές οξυγόνου, όπως η ρίζα υπεροξειδίου και η ρίζα υδροξυλίου μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο πυρηνικό, μιτοχονδριακό DNA, καθώς και στο DNA των χλωροπλαστών. Οι βλάβες μπορεί να είναι εγκοπές (fragments), καθώς επίσης και πληθώρα χημικών τροποποιήσεων στις βάσεις πουρίνη και πυριμιδίνη. Επιπρόσθετα, σπασίματα στο DNA μπορεί να προκληθούν από τη δράση νουκλεασών κατά τη διαδικασία της επιδιόρθωσης του DNA, καθώς και κατά την απόπτωση ή νέκρωση των κυττάρων [114]. Επιπλέον, η προσβολή των πρωτεϊνών του DNA από ελεύθερες ρίζες μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό ομοιοπολικών ενώσεων DNA-πρωτεϊνών (DNA-protein cross-links), όπως για παράδειγμα μεταξύ θυμίνης και τυροσίνης, ενώ η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) μπορεί να προκαλέσει ομοιοπολική δέσμευση και διμερισμό μεταξύ γειτονικών πυριμιδινών (pyrimidine dimers). Άμεσο επακόλουθο της βλάβης του DNA είναι η μεταλλαξιγένεση που με τη σειρά της οδηγεί σε δυσλειτουργία του κυττάρου και καρκινογένεση.

Οξειδωτικές βλάβες στα λιπίδια

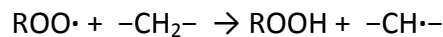
Ένας από τους κύριους στόχους των ελευθέρων ριζών και λοιπών δραστικών μορφών οξυγόνου που σχηματίζονται στο κύτταρο είναι η φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα της κυτταροπλασματικής και των ενδοκυττάρων μεμβρανών. Τα πολυακόρεστα λιπαρά

οξέα (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) συνεισφέρουν σημαντικά στη ρευστότητα των μεμβρανών, η οποία είναι άρρηκτα συνυφασμένη με όλες σχεδόν τις βιολογικές τους λειτουργίες. Όμως τα PUFAs είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στην οξειδωτική προσβολή από διάφορα είδη δραστικών μορφών οξυγόνου, με την οποία ξεκινά μια αλληλουχία αντιδράσεων ελευθέρων ριζών με καταστροφικά αποτελέσματα για τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα των μεμβρανών γνωστή ως υπεροξειδωση λιπιδίων.

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων αποτελεί, αν όχι την πιο σημαντική, τουλάχιστον την πιο μελετημένη εκδήλωση του οξειδωτικού στρες και των αλληλεπιδράσεων ελευθέρων ριζών στα κύτταρα. Περιλαμβάνει το στάδιο έναρξης (initiation) και το στάδιο διάδοσης (propagation stage). Η συνήθης τύχη της ρίζας άνθρακα που σχηματίζεται ($R\cdot$) είναι να συνδυαστεί με ένα μόριο O_2 με επακόλουθη παραγωγή υπεροξυλικής ρίζας κατά την αντίδραση:



Η ελεύθερη υπεροξυλική ρίζα είναι πολύ δραστική και μπορεί να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου από κάποιο γειτονικό μόριο PUFA, μετατρέπόμενη στο αντίστοιχο υδροϋπεροξειδίο ($ROOH$):



Η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας νέας ελεύθερης ρίζας άνθρακα, η οποία μπορεί να αντιδράσει με O_2 και να δώσει εκ νέου υπεροξυλική ρίζα, που με τη σειρά της μπορεί να αποσπάσει ένα υδρογόνο από άλλο μόριο PUFA, συνεχίζοντας έτσι την αλυσίδα αντιδράσεων που ξεκίνησε από την προσβολή ενός αρχικού μορίου PUFA από $OH\cdot$.

Οξειδωτικές βλάβες στις πρωτεΐνες

Ο σχηματισμός υπεροξειδίων, είτε στον πεπτιδικό κορμό, είτε στις πλευρικές αλυσίδες ορισμένων αμινοξέων αποτελεί έναν μόνο από τους πολλούς τύπους οξειδωτικών βλαβών που έχουν παρατηρηθεί στις πρωτεΐνες. Παρ' όλα αυτά, ο όρος υπεροξειδωση πρωτεϊνών έχει προσλάβει μια ευρύτερη έννοια και δηλώνει, κατά αναλογία με τα λιπίδια, όλα τα είδη ομοιοπολικών τροποποιήσεων που προκαλούνται στις πρωτεΐνες από τα διάφορα είδη ΔMO ($OH\cdot$, $ONOO^-$, $HClO$, 1O_2) ή άλλα παραπροϊόντα του οξειδωτικού στρες.

Οι χημικές μεταβολές που επέρχονται στις πρωτεΐνες ως συνέπεια του οξειδωτικού στρες ποικίλουν ανάλογα με το προσβαλλόμενο σε κάθε περίπτωση αμινοξύ αλλά και το είδος του δραστικού μορίου που επιφέρει τη βλάβη. Τα κυριότερα είδη οξειδωτικών τροποποιήσεων που παρατηρούνται στις πρωτεΐνες, είναι η οξείδωση θειολικών ομάδων, ο σχηματισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ο σχηματισμός διτυροσινών, η χλωρινίωση, η νιτροσιλίωση, η υδροξυλίωση, διάφορες τροποποιήσεις της τρυπτοφάνης, η συμπλοκοποίηση, η διάσπαση πεπτιδικών δεσμών και άλλες πολλές.

B.1.3.4. Το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα

Το οξειδωτικό στρες αντιπροσωπεύει μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αδρανοποιεί τα τοξικά αυτά μόρια και να επισκευάζει τις βλάβες που προκαλούν [115].

Συνεπώς, 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: αναχαιτιστές των αντιοξειδωτικών, εκκαθαριστές των ελευθέρων ριζών, παράγοντες επανόρθωσης, ρυθμιστικοί παράγοντες. Στους αναχαιτιστές των ROS ανήκουν η τρανσφερίνη, η λακτοφερρίνη, η απτοσφαιρίνη, η σεουλοπλασμίνη και η λευκωματίνη [116]. 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

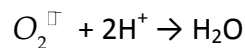
ανάγκη των ελευθέρων ριζών, αποτελούν κομμάτι του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος. Σε αυτό περιλαμβάνονται η λευκωματίνη, η χολερυθρίνη, το ουρικό οξύ και όλα τα εξωγενώς χορηγούμενα διαιτητικά ή φαρμακολογικά αντιοξειδωτικά, όπως το ασκορβικό άλας, η τοκοφερόλη, τα βιοφλαβονοειδή.

Ενδοκυττάρια, το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα κατανέμεται ισότιμα στις μεμβράνες και στο κυτταρόπλασμα. Επειδή η πλειοψηφία 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, βιοφλαβονοειδή, αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η γλουταθειονική υπεροξειδάση και ρεδοκτάση και τα συνένζυμά τους, ή τα προσθετικά στοιχεία, όπως το σελήνιο, η δισμουτάση του υπεροξειδίου και οι καταλάσες.

Αδρανοποίηση ROS

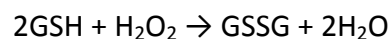
Έτσι, συμπληρώνοντας όσα προαναφέρθηκαν, χρήσιμο είναι να τονιστεί ότι τα κυριότερα αντιοξειδωτικά όπλα που διαθέτει το κύτταρο είναι:

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SuperOxide Dismutase - SOD), που καταλύει την αντίδραση:



Η καταλάση, που καταλύει την αντίδραση: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, που καταλύει την αντίδραση:



B.1.3.5 Συνέπειες οξειδωτικού στρες

Όταν βλάβες που προκλήθηκαν από το οξειδωτικό στρες, μεταφέρονται από το κυτταρικό στο ιστικό επίπεδο, τότε είναι υπεύθυνες για την πρόωμη γήρανση και διάφορα νοσήματα, όπως εγκεφαλικά επεισόδια, καρδιαγγειακές παθήσεις, εμφράγματα, σακχαρώδης διαβήτης, οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) στο αγγειακό ενδοθήλιο που αποτελεί προάγγελο της δημιουργίας αθηρωματικών πλακών, παχυσαρκία, ρευματοειδής αρθρίτιδα, νόσος του Crohn, νόσος του Parkinson, νόσος του Alzheimer, νόσος του Huntington και άλλες. Βέβαια, δεν είναι

πάντα δυνατόν να εξακριβωθεί αν οι ελεύθερες ρίζες είναι η αιτία ή το αποτέλεσμα των βλαβών που παρατηρούνται.

Αυξημένη παραγωγή των ROS παρατηρείται μετά από έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, περιβαλλοντική μόλυνση, έκθεση σε βαριά μέταλλα, κάπνισμα τσιγάρου, μετά από υπερβολική άσκηση ή, το αντίθετο, σε υπερβολικά καθιστική ζωή. Η μειωμένη πρόσληψη ή και η μειωμένη σύνθεση ή η αυξημένη κατανάλωση αντιοξειδωτικών είναι καταστάσεις υπεύθυνες για τη δημιουργία οξειδωτικού stress λόγω μειωμένης αντιοξειδωτικής άμυνας. Η αυξημένη ποσότητα των ROS είναι ικανή να δράσει σε οποιοδήποτε κυτταρικό στοιχείο, προκειμένου να του αφαιρέσει ηλεκτρόνια για να αποκτήσει τη σταθερότητά της [117]. 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.

Ευεργετικές ιδιότητες

Ορισμένες ελεύθερες ρίζες, όπως είναι το NO·, δρουν ως αγγελιοφόροι. Συγκεκριμένα, παρατηρείται δράση του NO· ως αγγειοδιασταλτικού παράγοντα. Επιπροσθέτως, είναι επιβεβαιωμένη η ενεργοποίηση του H₂O₂ κατά τη σύνθεση θυροξίνης.

Οξειδωτικό στρες που έχει μικρή χρονική διάρκεια παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβράδυνση της διαδικασίας της γήρανσης, μέσω ενός μηχανισμού που ονομάζεται «όρμηση», σύμφωνα με τον οποίο, χρόνια έκθεση σε μικρές δόσεις από κάποιον τοξικό παράγοντα, επιφέρουν ευεργετικό αποτέλεσμα, ενεργοποιώντας τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς που προστατεύουν τον εκτιθέμενο από εμφάνιση νόσου που θα σχετιζόταν με έκθεση σε μεγαλύτερη δόση του παράγοντα αυτού (αρχή μιθριδατισμού) [118], [119].

B.1.4 Καρκίνος

B.1.4.1.Γενικά

Ο όρος **καρκίνος** αφορά μια ομάδα ασθενειών, στην οποία τα κύτταρα ενός οργανισμού καθίστανται «υπερδραστήρια» (αναπτύσσονται και διαιρούνται ανεξέλεγκτα), «επιθετικά» (εισβάλλουν και καταστρέφουν παρακείμενους ιστούς) και συχνά «μεταστατικά» (εξαπλώνονται σε άλλα σημεία του σώματος).

Ο καρκίνος μπορεί να προσβάλει άτομα όλων των ηλικιών, ακόμη και έμβρυα, ωστόσο ο κίνδυνος εμφάνισής του αυξάνεται με την ηλικία. Το 13% των θανάτων παγκοσμίως οφείλεται σε καρκίνο [120], ποσοστό που μεταφράζεται σε 7,6 εκατομμύρια θανάτους ετησίως σε όλων τον κόσμο [121].

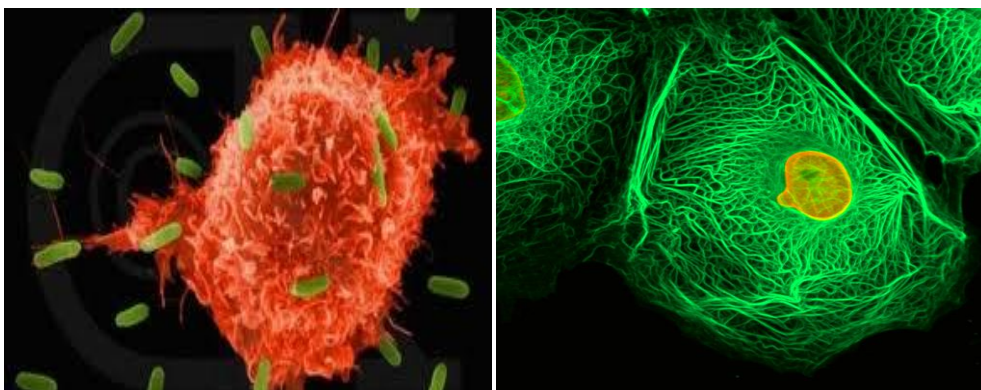
Εκτός από τους ανθρώπους, διάφορες μορφές καρκίνου μπορεί να προσβάλλουν τόσο ζώα, όσο και φυτά.

Σχεδόν όλες οι καρκινικές μορφές οφείλονται σε γενετικές ανωμαλίες, λόγω της επίδρασης διάφορων καρκινογόνων παραγόντων, όπως το κάπνισμα, ακτινοβολίες, χημικοί ή μολυσματικοί παράγοντες.

Ο όρος **όγκος** χρησιμοποιήθηκε αρχικώς για να προσδιορίσει μια φλεγμονώδους αιτιολογίας διόγκωση.

Εν τούτοις, στη σύγχρονη ιατρική η λέξη «όγκος» αναφέρεται σε μια μάζα μη φυσιολογικού ιστού, προκύπτουσα από έναν αυτόνομο και ανώμαλο πολλαπλασιασμό κυττάρων, ο οποίος εμμένει και μετά την απομάκρυνση του εναρκτηρίου ερεθίσματος [120].

Ο όρος **νεόπλασμα** είναι συνώνυμος του «όγκου» και προτιμάται, επειδή αφ' ενός είναι σαφέστερος και αφ' ετέρου ηχεί λιγότερο ανησυχητικά στους ασθενείς.



Σχήμα 1.29. Νεοπλάσματα (Ανατύπωση από [120])

Πίνακας Β.3: Στατιστικά στοιχεία που αφορούν ποσοστά εμφάνισης και θνησιμότητας για διάφορες μορφές καρκίνου [123]

Άνδρες		Γυναίκες	
Συνήθεις Μορφές Καρκίνου (%εμφάνισης)	Συνήθεις Μορφές Καρκίνου (% θνησιμότητας)	Συνήθεις Μορφές Καρκίνου (%εμφάνισης)	Συνήθεις Μορφές Καρκίνου (% θνησιμότητας)
Καρκίνος Προστάτη (33%)	Καρκίνος Πνεύμονα (31%)	Καρκίνος Μαστού (32%)	Καρκίνος Πνεύμονα (27%)
Καρκίνος Πνεύμονα (13%)	Καρκίνος Προστάτη (10%)	Καρκίνος Πνεύμονα (12%)	Καρκίνος Μαστού (15%)
Καρκίνος Παχέος Εντέρου (10%)	Καρκίνος Παχέος Εντέρου (10%)	Καρκίνος Παχέος Εντέρου (11%)	Καρκίνος Παχέος Εντέρου (10%)
Καρκίνος Ουροδόχου Κύστης (7%)	Καρκίνος στο Πάγκρεας (5%)	Καρκίνος Ενδομητρίου (6%)	Καρκίνος Ωοθηκών (6%)
Μελανώματα Δέρματος	Λευχαιμία (4%)	Non - Hodgkin	Καρκίνος στο Πάγκρεας

Άλλες γενετικές ανωμαλίες που οδηγούν σε καρκινογένεση είναι επίκτητες, όπως λάθη στην αντιγραφή του DNA, και άλλες είναι κληρονομικές, επομένως και παρούσες σε όλα τα κύτταρα από την γέννηση. Πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινογόνων παραγόντων και του γονιδιώματος εξηγούν το λόγο για τον οποίο ένα ποσοστό ενός πληθυσμού προσβάλλεται από καρκίνο μετά από έκθεση σε κάποιον από τους παράγοντες που προαναφέρθηκαν [122], [78].

Οι γενετικές ανωμαλίες που προκαλούν καρκίνο αφορούν δυο κατηγορίες γονιδίων, τα ογκογόνα που προκαλούν καρκίνο και τα ογκοκατασταλτικά.

Τα ογκογόνα που είναι υπεύθυνα για την καρκινογένεση, είναι συνήθως ενεργοποιημένα στα καρκινικά κύτταρα, προσδίδοντας τους νέες ιδιότητες, όπως υπερδραστήρια ανάπτυξη και διαίρεση, προστασία έναντι του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, απώλεια της ικανότητας να παραμένουν στα όρια ενός ιστού και την ικανότητα να αναπτύσσονται σε διαφορετικού είδους ιστούς. Τα γονίδια καταστολής των όγκων είναι συνήθως ανενεργά στα καρκινικά κύτταρα, με αποτέλεσμα απώλεια φυσιολογικών λειτουργιών τους, όπως ακριβή αντιγραφή DNA, έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, παραμονή στον ιστό όπου ανήκουν και συνεργασία με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η κάθε μορφή καρκίνου παίρνει το όνομα της από τον ιστό στον οποίο πρωτοεμφανίζεται, όπως και από τα φυσιολογικά κύτταρα με τα οποία μοιάζουν περισσότερο.

B.1.4.2. Ορολογία

Νεοπλασίες: μη φυσιολογική ανάπτυξη γενετικά διαφοροποιημένων κυττάρων. Διακρίνονται σε καλοήθεις (όγκοι που σταματούν να αναπτύσσονται από μόνοι τους, δεν προσβάλλουν γειτονικούς ιστούς και δεν προκαλούν μεταστάσεις) και κακοήθεις (καρκίνος)

Καρκινώματα (in situ): κακοήθεις όγκοι, προερχόμενοι από επιθηλιακά κύτταρα. Πρόκειται για την πιο κοινή μορφή καρκίνου, για παράδειγμα καρκίνος του στήθους, του προστάτη και των πνευμόνων.

Σαρκώματα: κακοήθεις όγκοι προερχόμενοι από συνδετικό ιστό ή κύτταρα μεσεγχύματος

Λέμφωμα και λευχαιμία: κακοήθεις στα αιμοποιητικά κύτταρα

Όγκοι γενετικών κυττάρων: όγκοι οι οποίοι στους ενήλικες εντοπίζονται στους όρχεις ή τις ωοθήκες και στα νεογνά και τα έμβρυα στη σπονδυλική στήλη [120].

B.1.4.3. Αίτια

Ο καρκίνος είναι μια ομάδα διάφορων ασθενειών, που διαφέρουν ευρέως ως προς τα αίτια και την βιολογία τους. Το κοινό χαρακτηριστικό σε αυτές τις μορφές είναι οι ανωμαλίες στο γενετικό υλικό του καρκινικού ιστού και οι επιπτώσεις που αυτές επιφέρουν. Η έρευνα πάνω στη παθογενετική του καρκίνου εστιάζεται σε τρία σημεία. Πρώτον, στους λόγους που προκαλούν ή ευνοούν γενετικές αλλαγές στα κύτταρα και τελικά οδηγούν στον καρκίνο. Δεύτερον, στη φύση της γενετικής βλάβης και τα γονίδια που έχουν επηρεαστεί. Και, τρίτον, στις συνέπειες των γενετικών αλλαγών στη βιολογία του κυττάρου, τόσο όσον αφορά στις νέες ιδιότητες των κυττάρων, όσο και στο αν ευνοούνται περαιτέρω διαφοροποιήσεις.

Χημικά καρκινογόνα

Ουσίες που προκαλούν καρκίνο ονομάζονται καρκινογόνες ή, επειδή η δημιουργία του καρκίνου οφείλεται σε μεταλλάξεις στο DNA, μεταλλαξογόνα. Διάφορες τέτοιες ουσίες έχουν χαρακτηριστεί επικίνδυνες, όπως ο καπνός του τσιγάρου, που συνδέεται άμεσα με τον καρκίνο των πνευμόνων και της ουροδόχου κύστης. Παρατεταμένη έκθεση σε αμίαντο συνδέεται με εμφάνιση μεσοθηλιώματος.

Ιονίζουσα ακτινοβολία

Πηγές ιονίζουσας ακτινοβολίας, όπως αέριο ραδόνιο, μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο. Παρατεταμένη έκθεση στην ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία προκαλεί μελάνωμα και άλλες κακοήθειες στο δέρμα.

Μολυσματικά αίτια

Πολλές μορφές καρκίνου προέρχονται από ιικές μολύνσεις, κυρίως σε ζώα όπως τα πουλιά, αλλά και στον άνθρωπο. Το 15% των κρουσμάτων καρκίνου παγκοσμίως οφείλεται σε τέτοιες μολύνσεις, οι οποίες ως αποτέλεσμα αποτελούν την δεύτερη πιο συχνή αιτία καρκινογένεσης μετά το κάπνισμα [125]. Οι κύριοι ιοί που ευθύνονται είναι ο Human papillomavirus, ο ιός της ηπατίτιδας Β και C, ο ιός Epstein-Barr και ο T-lymphotropic virus.

B.1.4.4. Συμπτωματολογία

Τα συμπτώματα του καρκίνου μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις κατηγορίες:

Τοπικά συμπτώματα: ασυνήθη εξογκώματα ή πρηξίματα, αιμορραγίες, πόνος ή/και έλκη.

Συμπτώματα μετάστασης: διογκωμένοι λεμφαδένες, βήχας και αιμόπτυση, ηπατομεγαλία, ευαισθητα σε κατάγματα οστών και νευρολογικές διαταραχές.

Συστηματικά συμπτώματα: απώλεια βάρους, μειωμένη όρεξη, κόπωση, καχεξία, έντονες εφιδρώσεις, αναιμία, θρόμβωση, ορμονικές διαταραχές [121].

B.1.4.5. Διάγνωση

Στις περισσότερες μορφές καρκίνου, η διάγνωση γίνεται από την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Η ακριβής διάγνωση απαιτεί εξέταση με μεθόδους όπως εξετάσεις αίματος, ακτινογραφίες, αξονικές τομογραφίες.

B.1.4.6. Αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση του καρκίνου μετά την διάγνωση μπορεί να περιλαμβάνει εγχείρηση, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, βραχυθεραπεία, ανοσοθεραπεία ή χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Σε κάποιες μορφές καρκίνου αναστέλλεται ή επιβραδύνεται η εξέλιξη του ενώ σε άλλες θεραπεύεται.

Στόχος των χειρουργικών θεραπειών είναι η απόλυτη αφαίρεση των όγκων. Η εμφάνιση μεταστάσεων όμως μειώνει την αποτελεσματικότητα αυτών των μεθόδων. Επίσης, η αποτελεσματικότητα των χημειοθεραπειών συχνά περιορίζεται από την τοξική τους δράση έναντι φυσιολογικών κυττάρων του οργανισμού. Οι ακτινοβολίες προκαλούν, αναπόφευκτα, βλάβες στους φυσιολογικούς ιστούς. Λόγω αυτών των ανεπιθύμητων παρενεργειών δεν υπάρχει καθολική θεραπεία για τον καρκίνο, αλλά εξειδικευμένη αντιμετώπιση κάθε μορφής του.

Η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας εξαρτάται από την περιοχή του σώματος, το στάδιο της ασθένειας, την ηλικία και την κατάσταση της υγείας του ασθενούς. Καθώς η επιστήμη εξελίσσεται, νέες μέθοδοι στοχευμένης θεραπείας αναπτύσσονται, οι οποίες δρουν ειδικά ενάντια σε μοριακές ανωμαλίες και παράλληλα ελαχιστοποιούν τον κίνδυνο για τα φυσιολογικά κύτταρα.

B.1.4.7 Καρκίνος του μαστού

B.1.4.7.1 Στοιχεία εμβρυολογίας, ανατομικής και φυσιολογίας

Οι μαστοί αποτελούν εξαρτήματα του δέρματος. Μέσα στη δερματική πτυχή βρίσκεται ο μαζικός αδένας, ο οποίος περιβάλλεται από λίπος εκτός από το τμήμα του που βρίσκεται αμέσως κάτω από τη θηλή και τη θηλαία άλω. Η οπίσθια επιφάνεια, υπόκοιλη, επικάθεται στην περιτονία του μείζονος θωρακικού μυός, με την παρεμβολή ινολιπώδους ιστού. Η περιφέρειά του δεν είναι αυστηρώς κυκλοτερής αλλά φέρει μια απόφυση προς την μασχαλιαία κοιλότητα (ουρά του μαζικού αδένα ή απόφυση του

Spence) [126]. Στην κατασκευή του είναι σύνθετος σωληνο-κυψελώδης αδένας. Αποτελείται από 6-8 λόβια που το κάθε ένα παροχετεύει στο δικό του εκφορητικό πόρο, ο οποίος εκβάλλει στη θηλή. Στο άκρο των γαλακτοφόρων πόρων το επιθήλιο είναι πλακώδες. Οι πόροι περιβάλλονται από μυοεπιθηλιακά κύτταρα, τα οποία όταν συστέλλονται συνθλίβουν τους πόρους και προωθούν το περιεχόμενό τους [127]. Το περιμαστικό λίπος αποτελεί συνέχεια του υποδόριου λίπους και είναι αυτό που δίνει το σχήμα στο μαστό. Είναι άφθονο την πρόσθια επιφάνεια του αδένος, μεταξύ των καθεκτηρίων δεσμίδων ενώ στην οπίσθια είναι ελάχιστο.

Για λόγους τοπογραφικούς ο μαστός χωρίζεται σε πέντε τμήματα. Το κεντρικό που περιλαμβάνει τη θηλή και την άλω και τέσσερα τεταρτημόρια τα άνω έσω και έξω και τα κάτω έσω και έξω.

B.1.4.7.2 Επιδημιολογία

Ο καρκίνος του μαστού εκτός του ότι είναι η συχνότερη κακοήθης πάθηση της γυναίκας στην Ευρώπη και την Αμερική την τελευταία πενήκονταετία, αποτελεί και την κύρια αιτία θανάτου της. Η νόσος έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία 40 χρόνια και η θνησιμότητα από τη νόσο παραμένει στα ίδια περίπου επίπεδα, παρότι έχει σαφώς αυξηθεί ο χρόνος επιβίωσης [127]. Ο καρκίνος του μαστού είναι σπάνιος κάτω από την ηλικία των 25 ετών ενώ αυξάνεται σταθερά όσο αυξάνει η ηλικία. Αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου στις γυναίκες 35-50 ετών. Από άποψη νοσηρότητας στις ηλικίες άνω των 45 ετών ο καρκίνος του μαστού εμφανίζει την μεγαλύτερη συχνότητα. Ποσοστό 1% περίπου όλων των καρκινωμάτων του μαστού αφορά τους άνδρες [126].

B.1.4.7.3 Αιτιοπαθογένεση

Τα αίτια που προκαλούν τον καρκίνο του μαστού, ουσιαστικά είναι άγνωστα.

Σήμερα όμως μετά από διάφορες επιδημιολογικές μελέτες καθώς και στατιστικές έρευνες, είναι δυνατό να κατατάσσονται ορισμένες γυναίκες σε ομάδες υψηλού κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού με βάση τους γνωστούς επιδημιολογικούς παράγοντες, που είναι: α) η διατροφή, β) το οικογενειακό ιστορικό [128], γ) το ιστορικό θεραπείας για καρκίνο του μαστού, δ) το ιστορικό ύπαρξης άλλου καρκίνου, ε) η

έμμηνος ρύση, [129], στ) ο τοκετός [130], στ) ο θηλασμός [131], ζ) η λήψη ορμονών [132], η) τα αντισυλληπτικά [133] και θ) οι καλοήθειες παθήσεις του μαστού [134].

B.1.4.7.4. Βιολογία και διασπορά

Ο καρκίνος του μαστού, αν ληφθεί υπόψη ο χρόνος διπλασιασμού του όγκου, είναι δυνατόν να θεωρηθεί ως χρόνια νόσος. Είναι γεγονός ότι ο όγκος 1cm, μέγεθος κλινικά διαγνώσιμο: περιέχει 10^9 κύτταρα, έχει υποστεί τις 30 υποδιαιρέσεις, από τις 40 που θα υποστεί τελικά, και από τη γένεση του πρώτου καρκινικού κυττάρου μέχρι ο όγκος να φθάσει αυτό το μέγεθος έχουν μεσολαβήσει 2-17 έτη (μέση χρονική διάρκεια 5-7 έτη). Η χρονική διάρκεια εξέλιξης του όγκου είναι ανάλογη με το ρυθμό διαίρεσης των κυττάρων, το ποσοστό των ευρισκομένων κυττάρων σε ενεργό διαίρεση, τη συχνότητα θανάτου αυτών, την αναλογία κυττάρων/συνδετικού ιστού και άλλα.

Η βιολογική συμπεριφορά των καρκινωμάτων του μαστού σχετίζεται άμεσα με το βαθμό κακοήθειας που καθορίζεται σε ιστολογικό επίπεδο από τη διαφοροποίηση, τον πολυμορφισμό και τον αριθμό μιτώσεων των νεοπλασματικών κυττάρων καθώς και με το κλινικό στάδιο της νόσου (σύστημα TNM, Tumor-Nodes-Metastases).

Ο καρκίνος του μαστού μεθίσταται στα οστά, τους πνεύμονες, το ήπαρ και τον εγκέφαλο [135]. Δεν αποκλείεται βέβαια μετάσταση και σε οποιοδήποτε άλλο σημείο του σώματος.

B.1.4.7.5. Κλινική εικόνα

Η κλινική εικόνα του καρκίνου του μαστού είναι συνήθως ένα ανώδυνο ψηλαφητό οζίδιο στο μαστό, σκληρό, με ανώμαλα όρια [68].

Άλλα κλινικά σημεία που πιθανόν να συνοδεύουν τη νόσο, είναι: η εισολκή της θηλής, η διάβρωσή της ή η έκκριση από αυτήν υγρού, αιματηρού ή όχι, ο πόνος ή η πάχυνση του δέρματος. Ένα ακόμη κλινικό σημείο που γίνεται αντιληπτό κατά την αυτοεξέταση, είτε από τον ιατρό, είναι η ύπαρξη ψηλαφητών μασχαλιαίων λεμφαδένων [126].

B.1.4.7.6 Διάγνωση

Η διάγνωση του καρκίνου του μαστού σε ασυμπτωματικό προκλινικό στάδιο είναι ο στόχος των προγραμμάτων υγείας που ασχολούνται με το μαστό. Η αλληλοεξάρτηση καλύτερης πρόγνωσης και μικρού σταδίου έχει οδηγήσει στην προσπάθεια της πρώιμης διάγνωσης.

Οι βασικοί τρόποι ανίχνευσης του καρκίνου του μαστού είναι:

- I) Η αυτοεξέταση
- II) Η ιατρική εξέταση
- III) Η μαστογραφία
- IV) Άλλες διαγνωστικές ιατρικές πράξεις

Σκοπός της Μελέτης

Κεφάλαιο

2

Σκοπός της παρούσας διατριβής

Τα τελευταία χρόνια, νέες προοπτικές διαφαίνονται στο πεδίο της έρευνας για τη θεραπεία του καρκίνου, αφού έχει αναγνωριστεί ότι οι μηχανισμοί ρύθμισης του κυτταρικού θανάτου παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση με τους μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Η απόπτωση, όπως ήδη έχει αναφερθεί, αποτελεί ένα ενδογενές πρόγραμμα κυτταρικής αυτοκτονίας, απαραίτητο για την εξάλειψη ανεπιθύμητων κυττάρων και για τη διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών. Απόπτωση συναντάται στα περισσότερα κακοήθη νεοπλάσματα και υψηλός αποπτωτικός δείκτης έχει παρατηρηθεί σε ταχέως αναπτυσσόμενους όγκους. 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_2 σε καρκινικά κύτταρα και ενεργοποίησης τους με ορατή ακτινοβολία γιατί εξασφαλίζεται ο έλεγχος της οπτικής πρόσβασης των κυττάρων ενώ παράλληλα αποφεύγονται οι επιπτώσεις της υπερϊώδους ακτινοβολίας στα υγιή κύτταρα [128], [134].

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 [129]. Έχει διαπιστωθεί ότι το TiO_2 , στη μορφή νανοσωματιδίων, παρουσία UV ακτινοβολίας με μήκος κύματος < 390 nm, οδηγεί σε σχηματισμό ζευγών ηλεκτρονίων–οπών που αντιδρούν με το νερό και το οξυγόνο σχηματίζοντας ROS (reactive oxygen species) με αποτέλεσμα την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων [126]. Οι μηχανισμοί όμως, μέσω των οποίων λειτουργεί το TiO_2 , ως αντικαρκινικός παράγοντας, εξακολουθούν να μην είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι.

Σκοπός της επιμέρους μελέτης είναι να διερευνηθεί η πιθανή κυτταροτοξική δράση της φωτο-ενεργοποιημένης κρυσταλλικής φάσης της τιτανίας (ανατάσης ή ρουτίλιο) στα καρκινικά κύτταρα. Έτσι, το TiO_2 , στη μορφή νανοσωματιδίων μπορεί να εμφυτευτεί σε καρκινικά κύτταρα και εν συνεχεία να χρησιμοποιηθεί για την πυροδότηση ενδοκυτταρικών βιοχημικών αντιδράσεων μέσω ενεργοποίησης με υπερϊώδη ή και ορατή ακτινοβολία. Δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές που προέρχονται

από επιθηλιακά κύτταρα μαστού, η μία χαμηλής (MCF-7) και η άλλη εντονότερης (MDA-MB-468) διαφοροποίησης, χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση σύνθετων υλικών TiO_2 - μέσω της μελέτης ειδικών παραμέτρων, όπως είναι η ποσοστιαία σύσταση φάσεων ανατάση - ρουτιλίου, το μέγεθος των νανοσωματιδίων, η συγκέντρωση, η καθαρότητα και άλλοι - παρουσία ακτινοβολίας UV-A (350nm) ή ορατού φωτός, στην επιβίωση των κυττάρων.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση λύματος-πηκτής (sol-gel) αλλά και εναιωρημάτων TiO_2 , ή χημικά τροποποιημένου TiO_2 , σε διαφορετικές φάσεις κρυστάλλωσης, διαφορετικά μεγέθη και συγκεντρώσεις, μετά από πλήρη χαρακτηρισμό (micro Raman και DLS). Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν ήταν το MTT assay, η κυτταρομετρία ροής (χρώση με P.I.), η τεχνική Western Blotting και η ανίχνευση του κατακερματισμένου DNA (DNA laddering).

Υλικά & Μέθοδοι

οάλαιο

3

3.1 Παρασκευή και Χαρακτηρισμός TiO₂

Στην παρούσα ενότητα περιγράφονται οι πειραματικές διαδικασίες και οι τεχνικές σύνθεσης και χαρακτηρισμού των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική δραστηριότητα. Σε κάθε περίπτωση τηρήθηκαν οι απαραίτητοι κανόνες εργασίας, υγιεινής και ασφάλειας, στους οποίους οφείλει να συμμορφώνεται κάθε σύγχρονο εργαστήριο χημικής σύνθεσης.

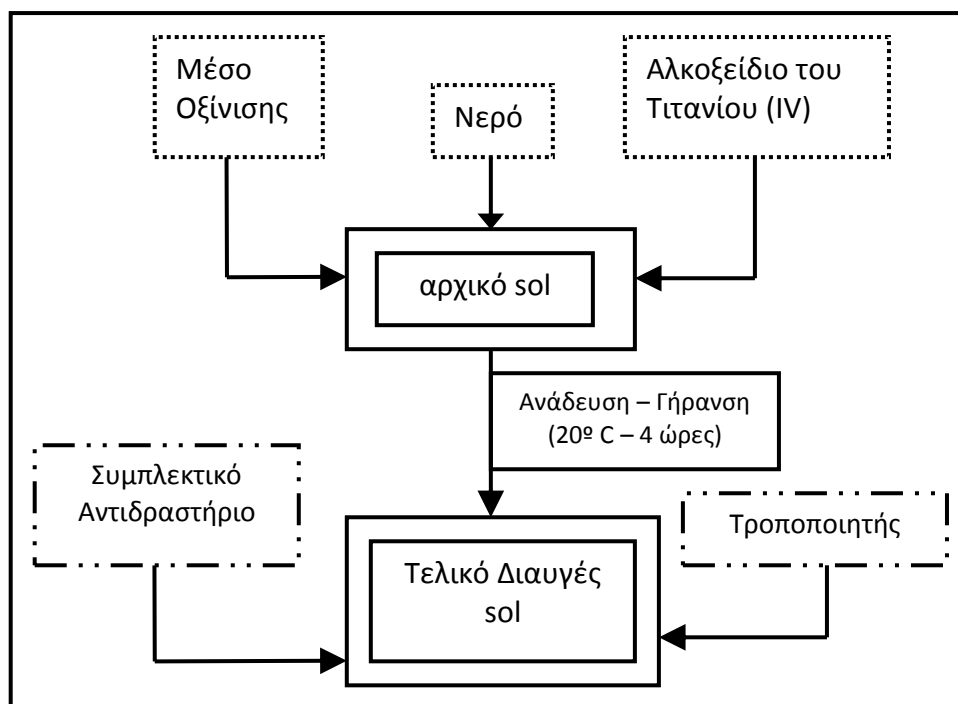
3.1.1 Παρασκευή TiO₂

3.1.1.1 Παρασκευή υδατικού εναιωρήματος TiO₂ με τη μέθοδο λύματος πηκτής (sol - gel)

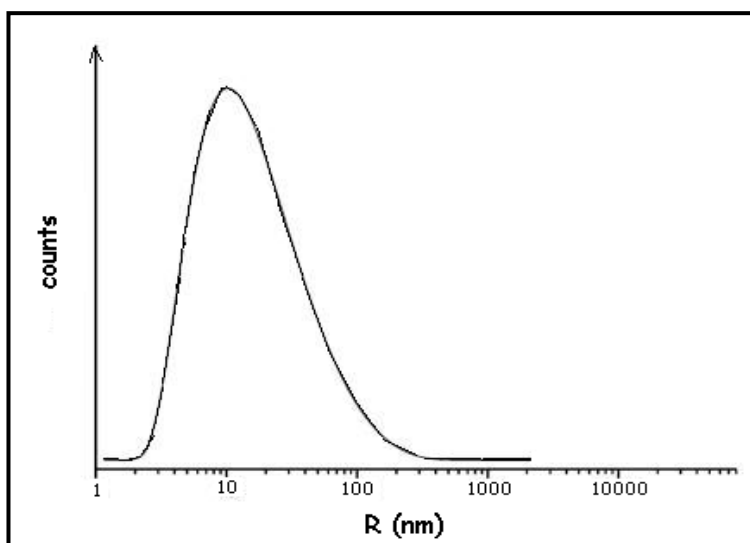
Με τον όρο sol – gel περιγράφουμε την τεχνική της οποίας τα στάδια είναι:

1. Παρασκευή ομογενούς διαλύματος (ιοντικού ή μοριακού) μιας πρόδρομης ένωσης, ώστε να επιτραπεί σε ατομική κλίμακα η ανάμειξη των συστατικών.
2. Σχηματισμός του sol (λύμα), με ρύθμιση της ενεργότητας των ιόντων H⁺ και OH⁻.
3. Μετατροπή του sol σε gel (πηκτή ή πήκτωμα), με τη ρύθμιση παραμέτρων όπως το pH, η ιοντική ισχύς, η θερμοκρασία, ο χρόνος παραμονής και άλλες.
4. Μορφοποίηση του gel, ώστε να αποκτήσει το τελικό σχήμα το κεραμικό υλικό.
5. Θερμική κατεργασία του gel και παρασκευή του τελικού προϊόντος.

Για την παρασκευή υδατικού εναιωρήματος TiO₂ με τη μέθοδο λύματος πηκτής (sol - gel) ακολουθούνται τα εξής βήματα: 3 ml νιτρικού οξέος (HNO₃, Mr= 63.013 g·mol⁻¹, 65%, Carlo Erba) προστίθενται σε 200 ml διπλά απεσταγμένου (υπερκαθαρού) νερού (H₂O). Στη συνέχεια στο διάλυμα αυτό, προστίθενται στάγδην 15ml διαλύματος πρόδρομης ένωσης τιτανίου, συγκεκριμένα, αλκοξειδίο του Τιτανίου (IV) (tetrabutyl orthotitanate) (Aldrich 97%) [60]. Το λευκό κολλοειδές διάλυμα που προκύπτει αναδεύεται έντονα για 4 ώρες, έτσι ώστε να γίνει απόλυτα διαυγές και σταθερό. Η πειραματική πορεία παρουσιάζεται στο σχήμα 3.1. Η κατανομή της υδροδυναμικής ακτίνας των νανοσωματιδίων υδατικών εναιωρημάτων TiO₂ με τη μέθοδο sol – gel, παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.2 και φαίνεται πως παρουσιάζει μέγιστο στην περιοχή 7 - 15 nm [136].

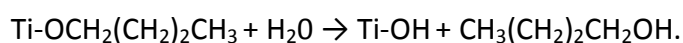


Σχήμα 3.1. Παρασκευή υδατικού εναιωρήματος TiO_2 με τη μέθοδο λύματος πηκτής (sol - gel)



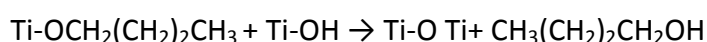
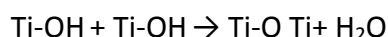
Εικόνα 3.2. Κατανομή της υδροδυναμικής ακτίνας των νανοσωματιδίων υδατικών εναιωρημάτων TiO_2 με τη μέθοδο sol - gel (ανατύπωση από [137])

Επομένως, μία πιο αναλυτική περιγραφή της μεθόδου, από χημική σκοπιά, είναι η εξής: το πρώτο στάδιο της μεθόδου αποτελεί η υδρόλυση της ένωσης (αλκοξείδιο του Τιτανίου (IV) (tetrabutyl orthotitanate), σύμφωνα με την αντίδραση:



Η αντίδραση αυτή είναι ποσοτική και ταχύτατη, με αποτέλεσμα να καταβυθίζεται αρχικά λευκό κρυσταλλικό ίζημα. Η υδρόλυση ξεκινά με την αποχώρηση μίας οργανικής ομάδας και επεκτείνεται ταυτόχρονα σε όλες τις οργανικές ομάδες, εξασφαλίζοντας την πολλαπλή εισαγωγή υδροξυλομάδων. Η προσθήκη του οξέος (HNO₃) είναι απαραίτητη για την όξινη κατάλυση της αντίδρασης.

Η υδρόλυση ολοκληρώνεται όταν δημιουργηθεί, μετά την ανάδευση το κολλοειδές διάλυμα. Οι αντιδράσεις συμπύκνωσης που υφίστανται είναι οι εξής:



Έτσι δημιουργείται ένα τρισδιάστατο ανόργανο πολυμερές. Η υδροδυναμική του ακτίνα ελέγχεται ώστε να μην υπερβεί τα 100 nm [138].

3.1.1.2 Παρασκευή του εναιωρήματος TiO₂ Evonik P25 – (75% ανατάσης / 25% ρουτίλιο), μέγεθος (εμπορικό) <30nm, SSA: 55 m²/g)

Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα TiO₂ Evonik P25, (κατόπιν ζύγισης (σε ζυγό ακριβείας)), σε υπερκαθαρό νερό (συγκεκριμένα, με δεδομένο ότι M_r (TiO₂)= 79,866g/mol, προστέθηκαν 0,8 mg TiO₂ σε 100ml ddH₂O), σκοπό να σχηματιστεί πυκνό εναιώρημα συγκέντρωσης 100μM, ώστε στη συνέχεια, με διαδοχικές αραιώσεις, να έχουμε τη δυνατότητα επιλογής και επίτευξης διαφόρων μικρότερων συγκεντρώσεων. Ακολουθεί ανάδευση για περίπου 30 λεπτά. Στη συνέχεια, επειδή στη μορφή εναιωρήματος ευνοείται η δημιουργία συσσωματωμάτων, κάτι που μειώνει τη δραστηριότητα των νονασωματιδίων, πραγματοποιήθηκε θραύση τους, με χρήση υπερήχων τύπου SONICS vibra cell, σε μέγιστη ένταση, για μία ώρα.

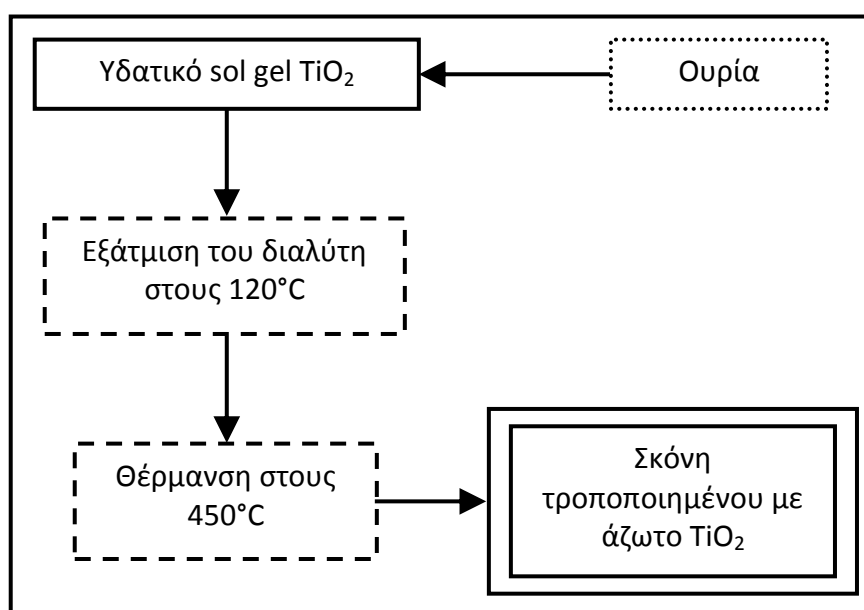
3.1.1.3 Παρασκευή του εναιωρήματος TiO_2 Sigma Aldrich (100% ανατάσης), μέγεθος (εμπορικό) $<25\text{nm}$, SSA: $200\text{--}220\text{ m}^2/\text{g}$

Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα TiO_2 Sigma Aldrich, σε υπερκαθαρό νερό, με σκοπό να σχηματιστεί πυκνό εναιώρημα συγκέντρωσης $100\mu\text{M}$ ($0,8\text{ mg TiO}_2$ σε $100\text{ml ddH}_2\text{O}$) ώστε στη συνέχεια, με διαδοχικές αραιώσεις, να έχουμε τη δυνατότητα επιλογής διαφόρων μικρότερων συγκεντρώσεων. Ακολουθεί ανάδευση για περίπου 30 λεπτά. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε θραύση των συσσωματωμάτων, με χρήση υπερήχων τύπου SONICS vibra cell, σε μέγιστη ένταση, για μία ώρα.

3.1.1.4 Τροποποίηση με Άζωτο

3.1.1.4.1 Παρασκευή τροποποιημένου με Άζωτο, TiO_2 (N-doped TiO_2)

Σε 100ml υδατικού sol-gel τιτανίας προστίθενται 25g ουρίας. Το μίγμα ομογενοποιείται υπό ισχυρή ανάδευση και στη συνέχεια θερμαίνεται στους 120°C μέχρι την πλήρη εξάτμιση του διαλύτη. Ακολουθεί θέρμανση του προϊόντος από τους 120°C στους 450°C (περίπου για δεκαπέντε λεπτά) και παραμονή του στην τελική θερμοκρασία για δύο ώρες. Με τον τρόπο αυτό λαμβάνεται το τροποποιημένο με άζωτο διοξείδιο του Τιτανίου σε μορφή σκόνης υποκίτρινου χρώματος. Τα διαδοχικά στάδια της πειραματικής διαδικασίας παρουσιάζονται στο σχήμα 3.3. Η όλη διαδικασία είναι σκόπιμο να γίνει απουσία φωτός [139].



Σχήμα 3.3. Παρασκευή τροποποιημένου με άζωτο TiO_2

3.1.1.4.2 Παρασκευή του εναιωρήματος τροποποιημένου με άζωτο TiO₂ (N-doped TiO₂)

Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα τροποποιημένου με άζωτο TiO₂, (N-doped TiO₂) σε υπερκαθαρό νερό, με σκοπό να σχηματιστεί πυκνό εναιώρημα συγκέντρωσης 200μM, ώστε στη συνέχεια, με διαδοχικές αραιώσεις, να έχουμε τη δυνατότητα επιλογής διαφόρων μικρότερων συγκεντρώσεων. Ακολουθεί ανάδευση για περίπου 30 λεπτά και θραύση των συσσωματωμάτων, με χρήση υπερήχων τύπου SONICS vibra cell, σε μέγιστη ένταση, για μία ώρα.

3.1.1.5 Τροποποίηση με Άργυρο

3.1.1.5.1 Παρασκευή τροποποιημένου με Άργυρο, TiO₂ (Ag-doped TiO₂)

Η τροποποίηση του TiO₂ σε ιόντα αργύρου γίνεται σε αναλογία 1:100. Έτσι, προστίθεται 0.01 mol AgNO₃ σε 100ml υπερκαθαρό νερό και στη συνέχεια 0.99 mol TiO₂. Ακολουθεί έντονη ανάδευση για τουλάχιστον μία ώρα. Το εναιώρημα στη συνέχεια αφήνεται για 24 ώρες σε ηρεμία. Στη συνέχεια επιβάλλεται θέρμανση στους 100°C για περίπου 12 ώρες, μέχρι να εξατμιστεί πλήρως το νερό. Έπειτα τα στερεά ιζήματα, τοποθετούνται σε κατάλληλο γουδί και θερμαίνονται στους 400°C για 6 ώρες [140], [141]. Η όλη διαδικασία είναι σκόπιμο να γίνει απουσία φωτός.

3.1.1.5.2 Παρασκευή του εναιωρήματος τροποποιημένου με Άργυρο, TiO₂ (Ag -doped TiO₂)

Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα τροποποιημένου με άργυρο TiO₂, (Ag-doped TiO₂) σε υπερκαθαρό νερό, με σκοπό να σχηματιστεί πυκνό εναιώρημα συγκέντρωσης 100μM, ώστε στη συνέχεια, με διαδοχικές αραιώσεις, να έχουμε τη δυνατότητα επιλογής διαφόρων μικρότερων συγκεντρώσεων. Ακολουθεί ανάδευση για περίπου 30 λεπτά και θραύση των συσσωματωμάτων, με χρήση υπερήχων τύπου SONICS vibra cell, σε μέγιστη ένταση, για μία ώρα.

3.1.1.6 Πειραματικές Διατάξεις - Όργανα

Οι ζυγίσεις έγιναν σε ζυγό ακριβείας Mettler AC 100 (ακρίβεια εκατομμυριοστού).

Η συσκευή υπερήχων είναι SONICS vibra cell.

Το ηλεκτρονικό πεχάμετρο είναι ORION RESEARCH digital pH / mill volt meter 611.

3.1.2 Χαρακτηρισμός TiO_2

3.1.2.1. Χαρακτηρισμός του λύματος - πηκτής (sol – gel) TiO_2

Σταγόνες sol – gel TiO_2 τοποθετήθηκαν σε κρυστάλλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 10 mm. Στη συνέχεια εισήχθησαν σε φασματόμετρο Hitachi 3010 και τα φάσματα εκπομπής τους καταγράφηκαν με τεχνική φασματομετρίας, στην περιοχή μηκών κύματος μεταξύ 300 – 500 nm.

Η προσπάθεια χαρακτηρισμού του λύματος - πηκτής δεν ήταν επιτυχής μέσω μέτρησης Raman. Έτσι επιλέχθηκε η τεχνική micro-Raman (Φωτοηλεκτροχημική Φασματοσκοπία – spectrophotoelctrochemistry), για τις ανάγκες της οποίας, δημιουργήθηκε στην επιφάνεια ενός αποστειρωμένου τριβλίου (petri dish), ένα λεπτό στρώμα από μικρές σταγόνες του sol-gel, που αφέθηκαν να στεγνώσουν για να δημιουργήσουν μία λευκή μεμβράνη (film) [142]. Στη συνέχεια ακολούθησε micro-Raman φασματομετρία, με φασματόμετρο διασποράς, Renishaw InVia – Reflex, σε διάταξη οπισθοσκέδασης. Η διέγερση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση laser ιόντων Αργού που εκπέμπει στα 514.5 nm.

Το σήμα λαμβάνεται από ανιχνευτή CCD (charge-coupled device) («συσκευή (ή διάταξη) συζευγμένου φορτίου»), υψηλής ευαισθησίας και προβάλλεται στην οθόνη υπολογιστή.



Εικόνα 3.4. Διάταξη micro-Raman
τύπου Renishaw inVia Reflex
(ανατύπωση από [143])

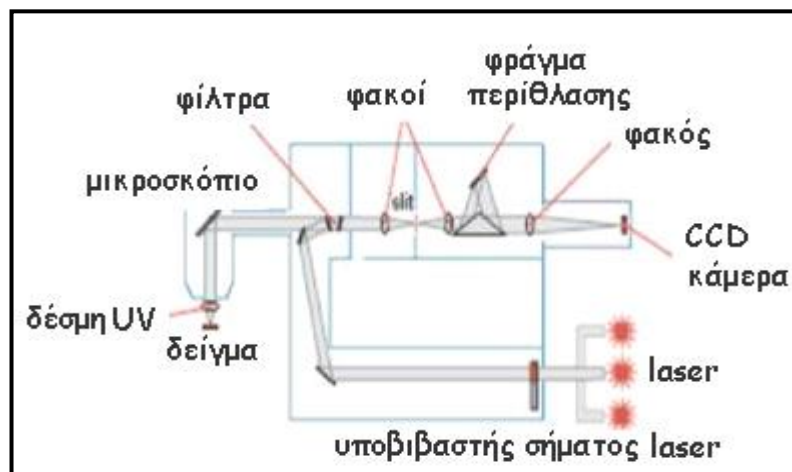
Συνοπτική Περιγραφή Μεθόδου micro-Raman

Αναλυτικότερα, η δέσμη laser κατευθύνεται μέσω κατόπτρων στο ολογραφικό φίλτρο, που την ανακλά πλήρως και τη στέλνει στο δείγμα, μέσω μικροσκοπίου (σχήμα 3.5). Από το συνολικό σκεδαζόμενο φως που επιστρέφει στο φίλτρο, η ελαστική συνιστώσα (Rayleigh) ανακλάται εκ νέου, ενώ η ανελαστική συνιστώσα Raman διέρχεται από τα φίλτρα

αποκοπής και εστιάζεται με ένα φακό στην είσοδο του τμήματος του φασματομέτρου που κάνει το διασκεδάσμό του φωτός [144].

Στην είσοδο του φασματογράφου, υπάρχει φακός που ρυθμίζει τη δέσμη, ώστε μετά την ανάκλασή της σε ένα πρισματικό καθρέφτη, να προσπίπτει παράλληλα στο φράγμα περίθλασης. Μετά τη σκέδασή της η δέσμη ανακλάται και πάλι, στη άλλη πλευρά του κατοπτρικού πρίσματος και εστιάζεται με ένα τελευταίο φακό στον ανιχνευτή CCD. Το μήκος εστίασης του φακού αυτού είναι 250 mm.

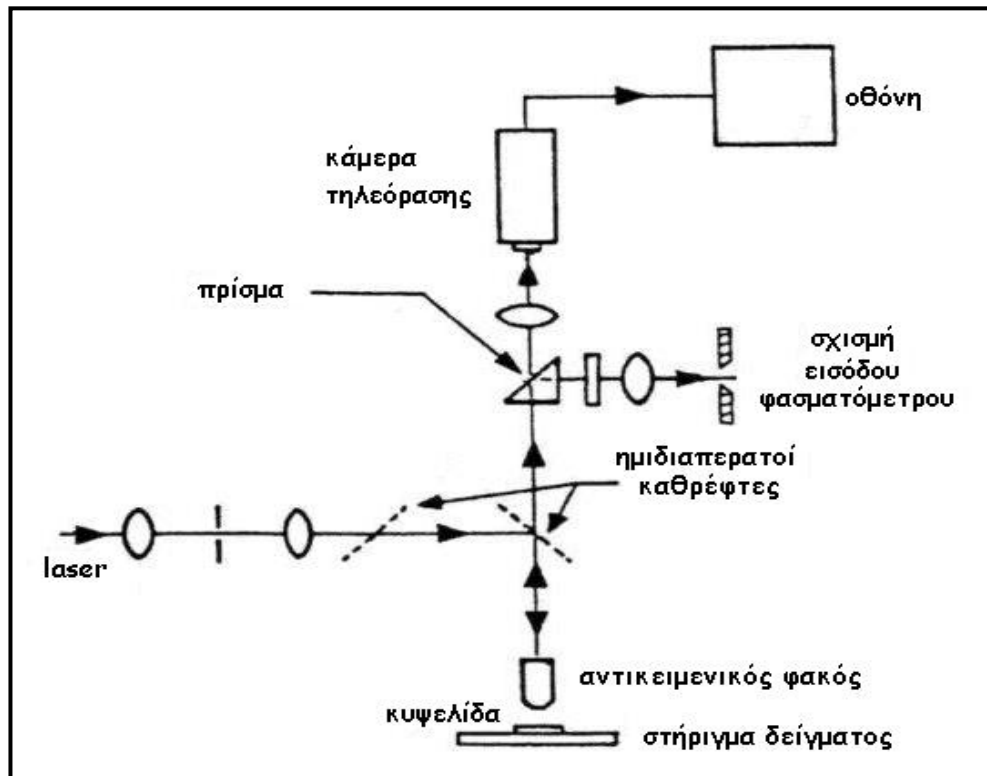
Ο αντικειμενικός φακός που χρησιμοποιείται στη διάταξη (x50) ρυθμίζει τη δέσμη laser, ώστε να προσπίπτει πάνω στο δείγμα σε επιφάνεια $1\mu\text{m}^2$. Ακόμη χρησιμοποιείται και για να συλλέξει το σκεδαζόμενο φως σε γωνία 180° σε σχέση με την ακτινοβολία διέγερσης (τυπική γεωμετρία οπισθοσκέδασης, όπως προαναφέρθηκε).



Σχήμα 3.5. Αναπαράσταση εστίασης laser στο δείγμα κατά τη φασματοσκοπία *micro-Raman* (ανατύπωση από [144])

Η ρύθμιση της ισχύος γίνεται αυτόματα. Ουσιαστικά, όμως η ισχύς εξόδου του laser είναι αρχικά περίπου στα 50 mW και καθώς διέρχεται μέσα από το οπτικό σύστημα του μικροσκοπίου τελικά στο δείγμα φτάνει με ισχύ, ελαττωμένη κατά μία τάξη μεγέθους. Συνήθως η ισχύς της δέσμης στο δείγμα είναι γύρω στα 10 mW, αλλά χρησιμοποιούνται φίλτρα οπτικής πυκνότητας 10:1 (OD=1), ώστε η τελική ισχύς να είναι 1 mW. Στις μετρήσεις μας, υπολογίζεται στα 0.2 mW σε «σποτ» (περιοχή εστίασης) $1\mu\text{m}$ στην μεμβράνη. Η ψηφιακή επεξεργασία και η απεικόνιση του φάσματος πραγματοποιούνται με τη βοήθεια ενός υπολογιστή που είναι εξοπλισμένος με κατάλληλο λογισμικό. Μία ασπρόμαυρη κάμερα είναι τοποθετημένη ανάμεσα στο φακό και το υποστήριγμα του

δείγματος και επιτρέπει την οπτικοποίηση του σημείου πρόσπτωσης της δέσμης laser πάνω στο δείγμα (σχήμα 3.6).



Σχήμα 3.6. Σχηματική παράσταση της διάταξης *micro-Raman* (ανατύπωση από [144] -τροποποιημένη)

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συμπεριλαμβάνεται το γεγονός ότι επιτρέπει τη λήψη φασμάτων ακόμη και από πολύ μικρές ποσότητες δειγμάτων.

Στη συνέχεια, ακολούθησε δυναμική μέτρηση σκέδασης φωτός (Dynamic light scattering (DLS)) σε «γηρασμένα» sol-gels, 10 μέρες μετά την παρασκευή τους (aged sols), μετά από φιλτράρισμα, με μεμβράνη πορώδους 0,45 μm (Millipore). Για τις ανάγκες των μετρήσεων αυτών, χρησιμοποιήθηκε ένα πλήρες σύστημα DLS, εξοπλισμένο με γωνιόμετρο ALV/CGS-3 (ALV GmbH, Germany), laser He-Ne, με μήκος κύματος εκπομπής στα 632.8 nm και συνδεδεμένο με κατευθυντήρα ALV-5000/EPP multi-tau με 288 κανάλια και μία ηλεκτρονική μονάδα σκέδασης φωτός ALV/LSE-5003 με έλεγχο ορίου και κινητήρα, ρυθμιζόμενο με διακόπτη.

Οι μετρήσεις έγιναν σε γωνίες 90° , 45° και 135° .

Η μέση τιμή της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας των δειγμάτων καταγράφηκε και τα δεδομένα επεξεργάστηκαν από το ίδιο το σύστημα με ειδικές συναρτήσεις συσχέτισης

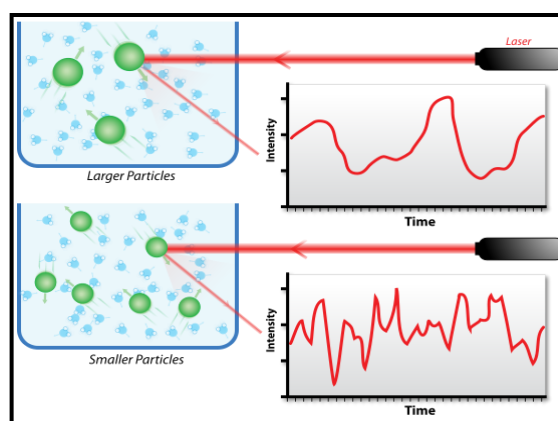
πληροφοριών, με τελικό σκοπό να λάβουμε τη φαινόμενη τιμή της υδροδυναμικής ακτίνας των νανοσωματιδίων [145].

Στο σημείο αυτό ίσως είναι σκόπιμο, να περιγραφούν, λίγο πιο αναλυτικά οι αρχές λειτουργίας της δυναμικής μέτρησης σκέδασης φωτός.

Περιγραφή Μεθόδου *Dynamic light scattering (DLS)*

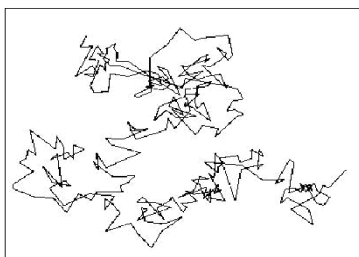
Η δυναμική σκέδαση του φωτός (*Dynamic Light Scattering*) DLS είναι μια από τις τεχνικές (μαζί με τις μικροσκοπικές τεχνικές SEM, TEM, κ.α.) για την μέτρηση του μεγέθους νανοσωματιδίων, αφού προσφέρει την δυνατότητα να μετρήσουμε το μέγεθος σωματιδίων σε κάποιο διάλυμα ή εναίωρημα, απαιτώντας πολύ λίγο χρόνο και μικρή, σχετικά, προετοιμασία των δειγμάτων [146].

Η DLS ανάλυση, ουσιαστικά είναι μια μέθοδος που προσπαθεί να υπολογίσει την κίνηση Brown² των σωματιδίων και στη συνέχεια, με την συσχέτιση που αυτή έχει με το μέγεθος τους, υπολογίζει και την υδροδυναμική τους ακτίνα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ακτινοβολήση του δείγματος και ανάλυση της σκεδαζόμενης έντασης [148].



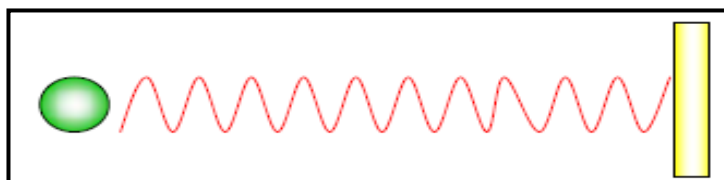
Σχήμα 3.7. Σχηματική παράσταση της λειτουργίας DLS (ανατύπωση από [146] - τροποποιημένη)

² Κίνηση Brown, είναι το φαινόμενο της αδιάκοπης και άτακτης κίνησης σωματιών μέσα σε ένα μέσον. Πήρε το όνομα από το Σκωτσέζο βοτανολόγο Robert Brown (1773-1858) που μελέτησε, με τη βοήθεια του μικροσκοπίου, το φαινόμενο της άτακτης κίνησης που εκτελούσαν οι κόκκοι γύρης μέσα σε μια σταγόνα νερού. Παρατήρησε, λοιπόν, ότι η κίνηση των κόκκων γύρης έμοιαζε με περπάτημα ενός μεθυσμένου. Το ίδιο φαινόμενο μπορεί να παρατηρήσει κανείς με το μικροσκόπιο αν εισάγει καπνό από τσιγάρο σε ένα κουτί που φωτίζεται από το πλάι: οι «κόκκοι» καπνού κινούνται διαρκώς και ακανόνιστα. Σύμφωνα με την εξήγηση του Einstein (1905) οι κόκκοι γύρης και οι «κόκκοι» καπνού πραγματοποιούν μια **χαοτική κίνηση** που οφείλεται στον αδιάκοπο βομβαρδισμό τους από όλες τις μεριές από μυριάδες μικρότερα σωματίδια (μόρια νερού ή μόρια αέρα) [147].



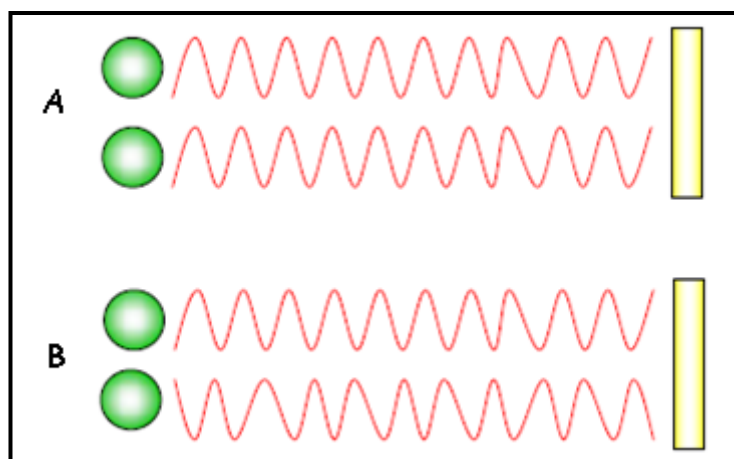
Κίνηση Brown των σωματιδίων (ανατύπωση από [147])

Όταν σε ένα σωματίδιο προσπίπτει ακτινοβολία από μια πηγή, όπως ένα laser, το σωματίδιο θα σκεδάσει την ακτινοβολία προς όλες τις κατευθύνσεις. Αν τοποθετήσουμε στη διάταξή μας, μία οθόνη πού θα συλλέγει την σκεδαζόμενη ακτινοβολία το αποτέλεσμα θα είναι αυτό που φαίνεται στο σχήμα 3.8 [146], [149].



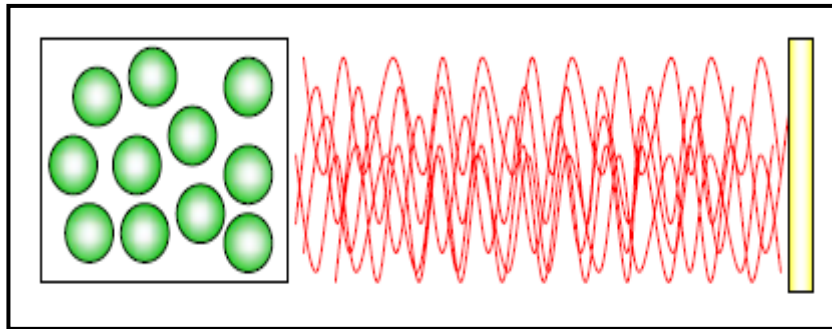
Σχήμα 3.8. Η ακτινοβολία που συλλέγεται, από την αλληλεπίδραση της Η/Μ ακτινοβολίας με ένα σωματίδιο

Αν αντί για ένα σωματίδιο, η ακτινοβολία αλληλεπιδράσει με δυο σωματίδια το αποτέλεσμα είναι αυτό που φαίνεται στο σχήμα 3.9. Όπως φαίνεται, είναι πιθανό να βρεθούν σωματίδια που η σκεδαζόμενη ακτινοβολία από αυτά είναι σε φάση και το αποτέλεσμα θα είναι ενίσχυση στην ένταση της ακτινοβολίας που συλλέγεται (σχήμα 3.9-A) και σωματίδια που η σκεδαζόμενη ακτινοβολία δεν είναι σε φάση, οπότε η ακτινοβολία που συλλέγεται εμφανίζεται μειωμένη (σχήμα 3.9-B) [146].



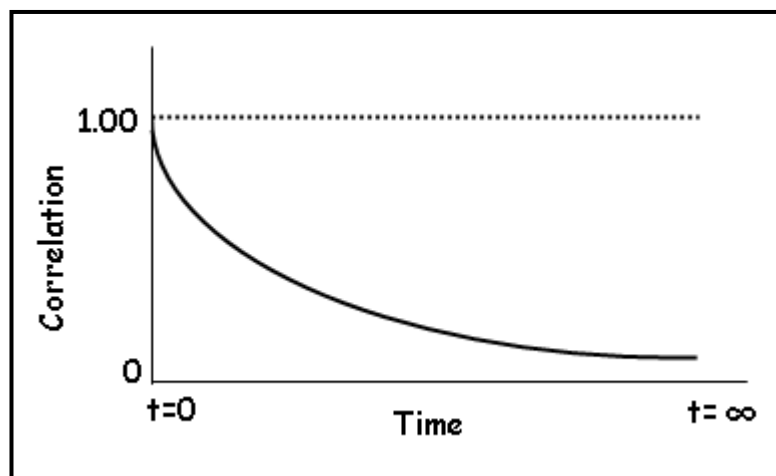
Σχήμα 3.9. Η ακτινοβολία που συλλέγεται από την αλληλεπίδραση της Η/Μ ακτινοβολίας με δύο σωματίδια: Α) όταν η σκεδαζόμενη ακτινοβολία από τα σωματίδια είναι σε φάση Β) όταν η σκεδαζόμενη ακτινοβολία από τα σωματίδια δεν είναι σε φάση (ανατύπωση από [146])

Στην περίπτωση που υπάρχει ένα πολύ μεγάλο πλήθος σωματιδίων το αποτέλεσμα θα είναι σχηματικά αυτό που φαίνεται στο σχήμα 3.10.



Σχήμα 3.10. Η ακτινοβολία που συλλέγεται από την αλληλεπίδραση της Η/Μ ακτινοβολίας με μεγάλο πλήθος σωματιδίων (ανατύπωση από [146])

Η πληροφορία που συλλέγεται με την ανάλυση DLS αντικατοπτρίζει τις μεταβολές της συνολικής έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από όλο το πλήθος των σωματιδίων που αποτελούν το προς μελέτη μέσο σε συνάρτηση με το χρόνο. Αν συγκρίνουμε τη συνολική ένταση που σκεδάζεται σε χρόνο t και σε χρόνο $t+\Delta t$, βλέπουμε ότι υπάρχει μια ισχυρή συσχέτιση των δυο αυτών διαδοχικών εντάσεων. Όσο όμως ο χρόνος περνά και το Δt γίνεται $2\Delta t$, $3\Delta t$, $4\Delta t$,..., η συσχέτιση αυτή ελαττώνεται συνεχώς. Συνήθως με το DLS το Δt είναι της τάξης των micro ή ακόμα και των nano-δευτερολέπτων (μs ή ns) και το αποτέλεσμα που προκύπτει ονομάζεται συνάρτηση αυτοσυσχέτισης και έχει την μορφή που φαίνεται στην εικόνα 3.11 [146], [148].



Εικόνα 3.11. Γραφική αναπαράσταση μιας τυπική συνάρτησης αυτοσυσχέτισης σε συνάρτηση με το χρόνο

Η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης είναι κανονικοποιημένη και όταν η τιμή της είναι 1, έχουμε απόλυτη συσχέτιση των εντάσεων ενώ όταν είναι 0 δεν υπάρχει καμιά συσχέτιση. Με την βοήθεια της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης υπολογίζεται ο συντελεστής διάχυσης και τελικά

λαμβάνοντας υπ' όψιν και την εξίσωση Stokes-Einstein³, υπολογίζεται η υδροδυναμική ακτίνα R_h των σωματιδίων που υπάρχουν στο μέσο που μελετάται [150].

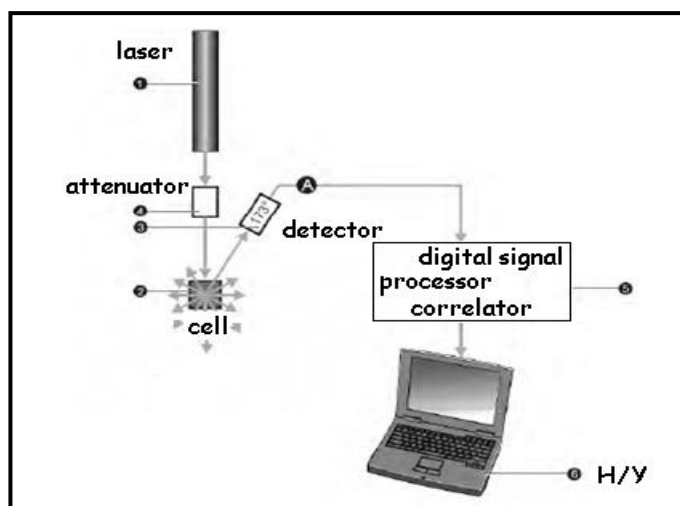
3.1.2.2 Χαρακτηρισμός του εναιωρήματος TiO_2 Evonik P25

Παρασκευάστηκε εναιώρημα TiO_2 περίπου 20μM, με σκοπό το χαρακτηρισμό του (εκτίμηση μεγέθους και ηλεκτρικού φορτίου), με ανάλυση DLS, σε θερμοκρασία 25°C. Ακολούθησε ανάδευση για 30 λεπτά. Λόγω της έντονης δημιουργίας συσσωματωμάτων, προκειμένου να επιτευχθεί θραύση αυτών, χρησιμοποιήθηκαν υπέρηχοι σε μέγιστη ένταση για μία ώρα. Στη συνέχεια μετρήθηκε το pH και ακολούθησαν διαδοχικά οι μετρήσεις του ηλεκτροκινητικού δυναμικού ζ (zeta potential), αλλάζοντας λίγο τη διάταξη και τοποθετώντας μία ειδική κυψελίδα με κατάλληλους αισθητήρες – ηλεκτρόδια.

Ζ δυναμικό είναι το συνολικό φορτίο που αποκτά το σωματίδιο σε συγκεκριμένο μέσο και προσδιορίζεται από την ταχύτητα διάχυσης του φορτισμένου σωματιδίου στο εφαρμοζόμενο συνεχές ηλεκτρικό πεδίο [152]. Ουσιαστικά η μέτρησή του βασίζεται στο γεγονός ότι τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου και η κατεύθυνση της κίνησής τους συνδέεται άμεσα με το φορτίο των σωματιδίων [153]. Κατά κάποιον τρόπο, το ζ-δυναμικό είναι μέτρο της σταθερότητας του εναιωρήματος.

Σύμφωνα με ένα γενικό κανόνα, υψηλές τιμές ζ-δυναμικού ($|\zeta| > 30$ mV) αντιστοιχούν σε σταθερές διασπορές, ενώ χαμηλές τιμές ζ-δυναμικού είναι ενδεικτικές της αστάθειας της διασποράς και μπορούν να οδηγήσουν σε συσσωμάτωση του εναιωρήματος [154]. Μικρές αλλαγές στο pH ή τη συγκέντρωση των ιόντων μπορούν να μεταβάλλουν σημαντικά το ζ-δυναμικό.

³ Εξίσωση Stokes – Einstein: $D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$, όπου **T**: η απόλυτη θερμοκρασία
(D: συντελεστής διάχυσης) **k** – η σταθερά Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$)
η – το ιξώδες του διαλύτη
R(h) – η υδροδυναμική ακτίνα του σωματιδίου [151]



Σχήμα 3.12.

Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε.

Για τη μέτρηση του μεγέθους, ο ρυθμός μέτρησης είναι περίπου 170 κcps και ο εξασθενητής (attenuator) ρυθμίζεται αυτόματα στο επίπεδο 7. Το κάθε δείγμα μετράται τρεις φορές και κάθε μία από αυτές τις μετρήσεις που έγιναν συμπεριλαμβάνει 20 σαρώσεις διάρκειας 80 s.

Για τη μέτρηση του ζ δυναμικού ο ρυθμός είναι περίπου 300 κcps, ο εξασθενητής στο επίπεδο 7 και γίνονται 12 σαρώσεις στην κάθε μία από τις τρεις μετρήσεις που πραγματοποιούνται, για κάθε δείγμα.

3.1.2.3 Χαρακτηρισμός του εναιωρήματος TiO_2 Sigma Aldrich

Ακολουθήθηκε όμοια διαδικασία με αυτή που περιγράφηκε στη ενότητα 2.1.2.2.

3.1.2.4. Χαρακτηρισμός του εναιωρήματος τροποποιημένου με άζωτο TiO_2 (N-doped TiO_2)

Ακολουθήθηκε όμοια διαδικασία με αυτή που περιγράφηκε στη ενότητα 2.1.2.2. με ιδιαίτερη φροντίδα, στο ζήτημα της απουσίας φωτός.

3.1.2.5 Χαρακτηρισμός του εναιωρήματος τροποποιημένου με Άργυρο TiO_2 (Ag-doped TiO_2)

Ακολουθήθηκε όμοια διαδικασία με αυτή που περιγράφηκε στη ενότητα 2.1.2.2. με ιδιαίτερη φροντίδα, στο ζήτημα της απουσίας φωτός.

3.2 Αντισώματα και Ειδικά Αντιδραστήρια

3.2.1 Αντισώματα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντισώματα: Πολυκλωνικά αντισώματα έναντι: α) της ενεργοποιημένης κασπάσης-3 (ανοσογόνο/επίτοπος: Συνθετικό πεπτίδιο των αμινοξικών καταλοίπων της περιοχής γύρω από την Asp112 της κασπάσης-3 ανθρώπινης προέλευσης) και β) της αέραιας και αποικοδομημένης μορφής του PARP (ανοσογόνο/επίτοπος: Συνθετικό πεπτίδιο της περιοχής-στόχου προς αποικοδόμηση, της κασπάσης-3 ανθρώπινης προέλευσης) της CELL SIGNALING TECHNOLOGY (Danvers, Massachusetts, US) [155].

Πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιού έναντι: α) του Bcl-2 (ανοσογόνο/επίτοπος: Αμινοξέα 1-205 του Bcl-2 ανθρώπινης προέλευσης), β) του Bcl-xL (ανοσογόνο/επίτοπος: Καρβοξυτελικό πεπτίδιο Bcl-xL ανθρώπινης προέλευσης) γ) του Bad (ανοσογόνο/επίτοπος: Αμινοτελικό πεπτίδιο Bad ποντικού) και δ) του Bax (ανοσογόνο/επίτοπος: Αμινοξέα 1-171 του καρβοξυτελικού άκρου Bax ποντικού) από την εταιρεία SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY (Santa Cruz, California, US) [156].

Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της β-τουμπουλίνης από την εταιρεία Sigma, (προερχόμενο από τον κλώνο υβριδωμάτων TUB 2.1).

Αντισώματα έναντι ανοσοσφαιρινών IgG (Immunoglobulin G) ποντικού και κουνελιού συζευγμένα με την υπεροξειδάση του μαύρου ρεπανιού από την εταιρεία AMERSHAM BIOSCIENCES (Pittsburgh, Pennsylvania, US) [157].

3.2.2 Χημικά Αντιδραστήρια και Αναλώσιμα

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια και αναλώσιμα:

Σταυροσπορίνη από την εταιρεία CELL SIGNALING TECHNOLOGY (Danvers, Massachusetts, US) [155].

Αντιδραστήρια υψηλής καθαρότητας (ethanol 95%, absolute ethanol 100%) από τις εταιρείες MERCK & Co. (Whitehouse Station, New Jersey, US) [158] και SIGMA - ALDRICH (St. Luis, Missouri, US) [159].

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) από την εταιρεία SIGMA - ALDRICH (St. Luis, Missouri, US) [159].

Αντιδραστήριο για την μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών (Coomassie Plus Protein Assay Reagent) καθώς και σειρά αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας από την εταιρεία THERMO FISHER SCIENTIFIC – Pierce Protein Biology Products (Rockford, Illinois USA) [160].

Στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης AMERSHAM BIOSCIENCES (Pittsburgh, Pennsylvania, US) [157], μίγμα πρωτεϊνικών δεικτών γνωστών μοριακών βαρών και ποσότητας FERMENTAS INTERNATIONAL (Ontario, Canada) (πλέον αποτελεί τμήμα της THERMO FISHER SCIENTIFIC) (Rockford, Illinois USA) [161] και η έκθεση της μεμβράνης, κατά την πρώτη σειρά πειραμάτων, έγινε σε φωτογραφικό φιλμ Super RX 23 X 17 της εταιρίας AGFA (Mortsel, Belgium) [162].

Πρωτεάση - Protease (Proteinase K) από την εταιρεία SIGMA - ALDRICH (St. Luis, Missouri, US) [159], δείκτες DNA γνωστού μήκους και χρωστική ουσία (loading dye) για DNA ladder FERMENTAS INTERNATIONAL (Ontario, Canada).

Τα πλαστικά καλλιέργειας, δηλαδή οι φλάσκες, τα τριβλία και οι πλάκες πολλαπλών φρεατίων είναι από τον οίκο GREINER BIO-ONE (Germany) [163].

Οι σύριγγες των 5 ml που χρησιμοποιήθηκαν είναι της εταιρείας TERUMO MEDICAL CORPORATION (Somerset, NJ, US). [164], ενώ των 2.5 ml και από την εταιρεία PENTAFERTE ITALY (Ferrara, Italy) [165].

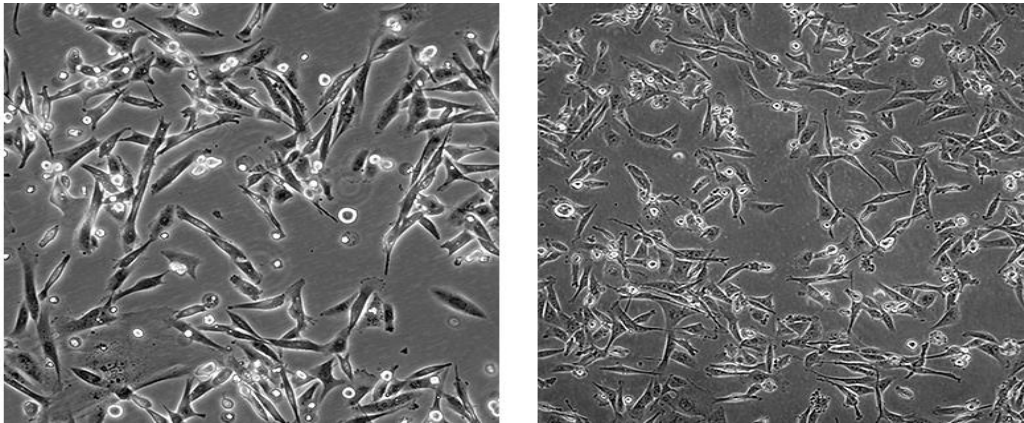
Τα θρεπτικά υλικά καλλιέργειας, ο βόειος ορός καθώς και τα συμπληρώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι της εταιρείας BIOCHROM AG (Berlin, Germany) [166].

3.3 Κυτταρικές Καλλιέργειες

Στην παρούσα πειραματική δραστηριότητα χρησιμοποιήθηκαν δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές, που προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα μαστού: η MDA-MB-468, που πρόκειται για έντονα μεταστατική κυτταρική σειρά και η MCF-7, που είναι ηπιότερης κακοήθειας, και οι δύο της εταιρίας ATCC.

3.3.1 MDA-MB-468

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 αδενοκαρκίνωμα μαστού [167].



Εικόνα 3.13. Άποψη των κυττάρων MDA-MB-468 από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο: α) 36 ώρες μετά την ανακαλλιέργεια και β) 36 ώρες πριν τη νέα ανακαλλιέργεια (ανατύπωση από [169])

Παρ' όλο που η δότης ιστού ήταν ετερόζυγη για τα G6PD αλληλόμορφα, η κυτταρική σειρά, κατ' επανάληψη έδειξε μόνο το G6PD A φαινότυπο. Ο EGF receptor εμφανίζεται σε ποσοστό $1 \cdot 10^6$ ανά κύτταρο. Πρόκειται για έντονα μεταστατική κυτταρική σειρά (*in vivo*), αφού, μετά από υποδόρια έγχυση περίπου 10^7 κυττάρων σε ποντίκια, σε διάστημα 21 ημερών και σε συχνότητα 100%, δηλαδή 5 στα 5, ανέπτυξαν πλήρως όγκους [167].

Επίσης, εμφανίζουν μία $a G \rightarrow A$ μεταλλαγή, στο κωδικόνιο 273 του γονιδίου p53, που καταλήγει σε αντικατάσταση (Αργινίνη) Arg \rightarrow (Ιστιδίνη) His [169].

Η ανάπτυξη της καλλιέργειας είναι συμπαγής μονόστοιβη με πολλές διακυτταρικές συνδέσεις. *In vitro* τα MDA-MB-468 κύτταρα εμφανίζουν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού και επιπροσθέτως παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα σχηματισμού αποικίας, αυξημένη συγκολλητική ικανότητα μεταξύ τους, για σχηματισμό ταπητίου και έντονη διήθηση [170].

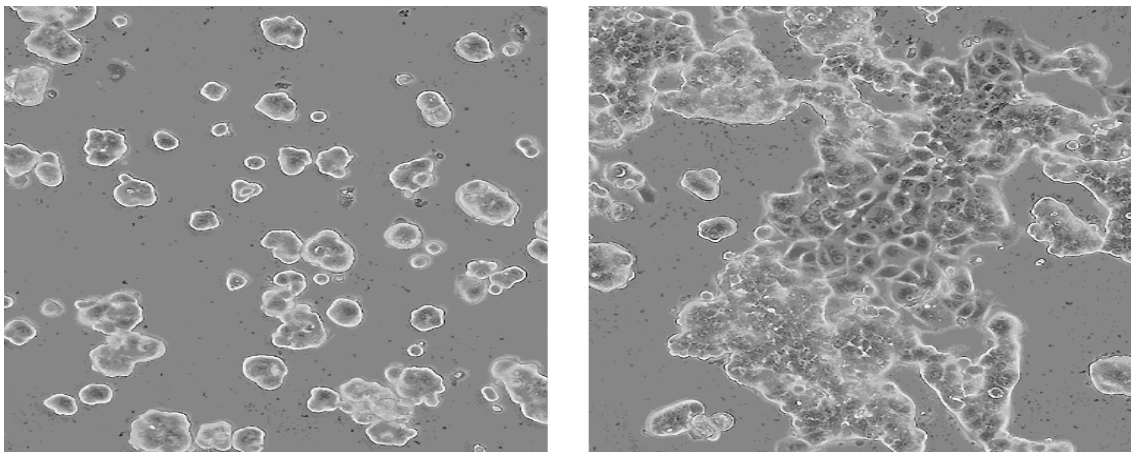
Παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά με τα εμβρυονικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένης της έντονης έκφρασης των καρκινικών (SCCs markers - cancer

stem cells (SCCs)) δεικτών CD44/CD133⁴ και της υψηλής δραστηριότητας της (ALDH⁵) αλδεϋδικής αφυδρογονάσης, που σχετίζεται με την άμυνα των εμβρυονικών κυττάρων [171].

3.2.2 MCF-7

Η σειρά MCF-7 απομονώθηκε από τον C.M. McGrath, με πλευριτική συλλογή, από λευκή γυναίκα 69 ετών, που είχε διαγνωστεί για μεταστατικό αδenoκαρκίνωμα μαστού [174].

In vitro, τα κύτταρα MCF-7 εμφανίζουν σχετικά ήπιο ρυθμό πολλαπλασιασμού, με χρόνο υποδιπλασιασμού περίπου στις 29 ώρες και η ανάπτυξη της καλλιέργειας είναι συμπαγής και μονόστοιβη. Παρουσιάζουν έντονη συγκολλητική ικανότητα μεταξύ τους για σχηματισμό ταπητίου.



Εικόνα 3.14. Άποψη των κυττάρων MCF-7, από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο:

α) 36 ώρες μετά την ανακαλλιέργεια και β) 36 ώρες πριν τη νέα ανακαλλιέργεια
(ανατύπωση από [169])

Εμφανίζουν πολλά χαρακτηριστικά διαφοροποιημένων επιθηλιακών κυττάρων μαστού, ανάμεσα στα οποία σημειώνεται η ικανότητα επεξεργασίας της οιστραδιόλης, μέσω

⁴ CD44 και CD133 δείκτες: σχετίζεται με όγκους της κεφαλής και του λαιμού, του πεπτικού συστήματος, του δέρματος, του μαστού, γυναικολογικούς όγκους, όγκους του ουροποιητικού συστήματος, οφθαλμικών όγκους και νεοπλασίες αιμοποιητικών οργάνων [172].

⁵ Οι αλδεϋδικές αφυδρογονάσεις είναι ένζυμα με κοινή δομή και χαρακτηριστικά που καταλύουν τις αντιδράσεις οξείδωσης ενός ευρέου - φάσματος αλειφατικών και αρωματικών αλδεϋδών [173]. Αποτελούν επίσης καρκινικούς δείκτες, για τις ίδιες περιπτώσεις που αναφέρθηκαν για τους CD44/CD133.

υποδοχέων οιστρογόνων. Η ανάπτυξη των MCF-7 κυττάρων αναστέλλεται από τον παράγοντα νέκρωσης όγκων – TNF - alpha⁶ (tumor necrosis factor alpha).

Είναι ανθεκτικά σε πολλές φαρμακευτικές ουσίες, λόγω του ξενοβιοτικού μεταφορέα (BCRP⁷) που διαθέτουν [175]. *In vivo* δεν είναι μεταστατικά.

3.3.3 Συνθήκες Καλλιέργειας

3.3.3.1 Καλλιέργεια και συντήρηση κυττάρων

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε φλάσκες καλλιέργειας των 75 cm² (ή 25 cm²), σε θερμοκρασία 37°C σε ειδικό επωαστήρα (Incubator Thermo Forma, Series II water jacketed, CO₂ Incubator, HEPA filter), σε περιβάλλον με περιεκτικότητα σε CO₂ 5% και 100% υγρασία. Η θερμοκρασία των 37°C είναι απαραίτητη για την επιτάχυνση των κυττάρων στον κυτταρικό τους κύκλο και το 5% του CO₂ στον αέρα απαιτείται για τη διατήρηση του pH μεταξύ 6,8 και 7,2 (ουδέτερο pH), ώστε να είναι εφικτή η ανάπτυξη των κυττάρων.

Αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό μέσο βάσης Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM), με προσθήκη 10% θερμικά αδρανοποιημένου βόειου ορού (FBS, Fetal Bovine Serum), 2 mM L-γλουταμίνη (L-Glutamine), 1 mM πυροσταφυλικό νάτριο (Sodium Pyruvate), 100 Units/ml πενικιλίνη (penicillin), 100 µg/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 την φάση της

⁶ Ο Tumor Necrosis Factor (TNF-α, Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων) είναι γνωστός για την αντικαρκινική του δράση. Πρόκειται για μία κυτταροκίνη η οποία παράγεται και ενεργοποιείται από τα T-κύτταρα και τα μακροφάγα, δηλαδή τα κύτταρα τα οποία διευθύνουν τη φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού. Η κυτταροκίνη αυτή επηρεάζει σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως η ανοσολογική απόκριση, η φλεγμονή, η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση. Κατά συνέπεια η ρύθμιση της παραγωγής της και της ενεργοποίησής της, εμπλέκεται στην παθογένεια μιας σειράς ασθενειών όπως η σήψη, ο σακχαρώδης διαβήτης, ο καρκίνος, η οστεοπόρωση και φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες ασθένειες (Chen and Goeddel, 2002 [176]).

⁷ BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) είναι η πρωτεΐνη αντοχής στον καρκίνο του μαστού [177] σε φαρμακευτικές αγωγές και προκειμένου να επιτευχθεί μία θεραπεία, χορηγούνται προηγούμενες αναστολείς της BCRP.

σύνθεσης (S). Για την συντήρηση της καλλιέργειας, τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται, κατά μέσο όρο, μία φορά την εβδομάδα.

Κατά την ανακαλλιέργεια, η αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα επιτυγχάνεται με διάλυμα θρυψίνης 0.05% (w/v) / EDTA 0.02% (w/v) της Gibco BRL, LIFE TECHNOLOGIES).

Πιο συγκεκριμένα, τα κύτταρα αφού πλυθούν με πλήρες θρεπτικό υλικό, επώάζονται με το διάλυμα θρυψίνης για 3 λεπτά στους 37°C, με σκοπό να αποκοπούν οι διακυτταρικές συνδέσεις, καθώς και οι συνδέσεις των κυττάρων με το υπόστρωμα. Στη συνέχεια προστίθεται στα κύτταρα, υλικό που περιέχει περίσσια ορού (10%), ώστε να αδρανοποιηθεί η θρυψίνη και συλλέγονται για να μεταφερθούν για φυγοκέντρηση, σε φυγόκεντρο Function Line Heraeus Instruments, Labofuge 400R). Μετά από φυγοκέντρηση στις 1200 rpm για 10 λεπτά, επαναιωρούνται σε 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και μοιράζονται σε φλάσκες καλλιέργειας, αφού καταμετρηθούν με αιμοκυτταρόμετρο, με διαδικασία, που περιγράφεται ακολούθως. Στις φλάσκες των 25 cm² μοιράζονται περίπου 10⁶ κύτταρα, ενώ στις φλάσκες καλλιέργειας των 75 cm² μοιράζονται περίπου 2 x 10⁶ κύτταρα. Και οι δύο κυτταρικές σειρές, πριν χρησιμοποιηθούν σε οποιοδήποτε πειραματική δοκιμασία ανακαλλιεργούνται σε φλάσκες, τουλάχιστον 2 φορές.

Η διαχείριση των καλλιεργειών γίνεται σε απαγωγό ανάστροφης ροής αέρα, (MICROFLOW ADVANCED BIOSAFETY CABINET – CLASS II).

3.3.3.1.1 Μέτρηση κυττάρων με χρήση αιμοκυτταρόμετρου

Η καταμέτρηση των κυττάρων έγινε με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρου και πλάκας Neubauer σε μικροσκόπιο OLYMPUS IM. Συγκεκριμένα, λαμβάνονται 10 μl κυτταρικού εναιωρήματος 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.

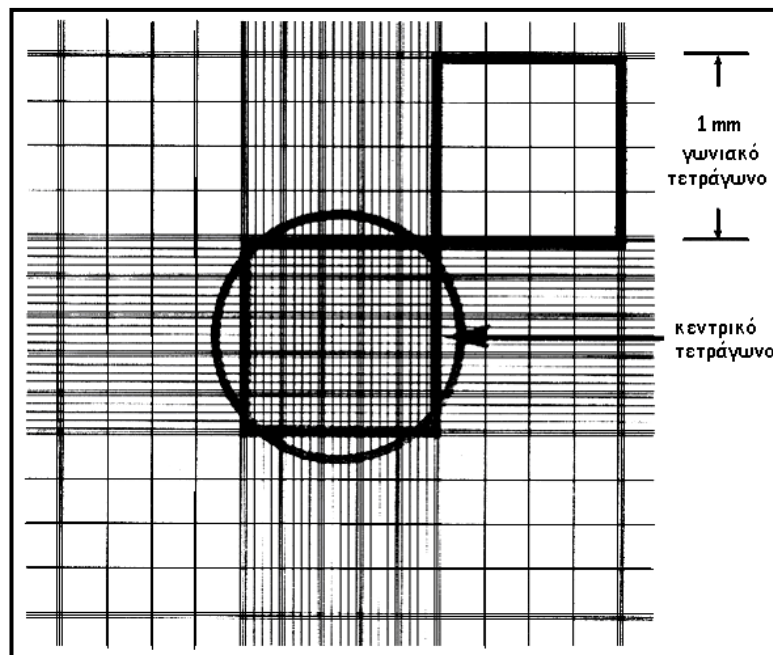
Η διαδικασία επαναλαμβάνεται 2 φορές, με αποτέλεσμα να έχουμε συνολικά 8 μετρήσεις από τα γωνιακά τετράγωνα. Από αυτές τις μετρήσεις προκύπτει μία μέση τιμή. Ο αριθμός των κυττάρων προκύπτει από την εξίσωση:

Αριθμός κυττάρων = Μέση τιμή κυττάρων (από τις 8 μετρήσεις) · λ · 10⁴

Ο συντελεστής διόρθωσης 10⁴ 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, εάν έχει γίνει (με PBS). Στην περίπτωση που δεν έχει γίνει, θεωρείται ίσος με τη μονάδα.

3.3.3.2 Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων

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



Σχήμα 3.15. Αναπαράσταση αιμοκυτταρόμετρου (Ανατύπωση από [178] τροποποιημένη)

Τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν στο υγρό άζωτο για μεγάλο χρονικό διάστημα, στην κατάσταση που βρίσκονταν κατά την στιγμή της κατάψυξης.

Με σκοπό την αποφυγή της καταστροφής μεγάλου αριθμού κυττάρων, ως αποτέλεσμα του σχηματισμού κρυστάλλων νερού, στο εσωτερικό ή το εξωτερικό των κυττάρων με επακόλουθη καταστροφή κυτταρικών μεμβρανών και οργανιδίων από την αλλαγή του pH και της συγκέντρωσης των ηλεκτρολυτών κατά την κατάψυξη, πρέπει η όλη διαδικασία να γίνει σταδιακά. Επίσης, το κυτταρικό εναιώρημα υαλοποιείται με την προσθήκη της κρυσπροστατευτικής ουσίας διμέθυλο – σουλφοξείδιο (**dimethyl sulfoxide – DMSO**), που χαμηλώνει το σημείο τήξης του εναιωρήματος και αυξάνει το ιξώδες, ώστε να μην δημιουργηθούν κρύσταλλοι [179], [180]. Τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια της φλάσκας με θρυψινοποίηση, με τη μέθοδο που προαναφέρθηκε στην παράγραφο 3.3.3.1, επαναιωρούνται σε πλήρες θρεπτικό υλικό και φυγοκεντρώνται στις 1200 rpm για 10 λεπτά.

Αφού αφαιρεθεί το θρεπτικό υλικό, το ίζημα αναδιαλύεται σε 1-2 ml υλικού κατάψυξης (90% v/v FBS, 10% v/v DMSO) και τοποθετείται σε ειδικά αποστειρωμένα φιαλίδια (cryovials). Ακολουθεί διαδοχική ψύξη των κυττάρων από τη θερμοκρασία των -80° C για 24 ώρες στην τελική των -196°C στο υγρό άζωτο.

Κατά την απόψυξη των κυττάρων απαιτείται απότομο πέρασμα των κυττάρων από την χαμηλή θερμοκρασία στους 37°C. Για το λόγο αυτό όταν τα φιαλίδια ανασύρονται από το υγρό άζωτο, επωάζονται στους 37°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°C και μεταφέρονται για φυγοκέντρηση στους 1200 rpm για 10 λεπτά, με στόχο την απομάκρυνση του DMSO. Στη συνέχεια τα κύτταρα αναδιαλύονται σε νέο θρεπτικό υλικό σε φλάσκες καλλιέργειας και μεταφέρονται τον ειδικό επωαστήρα.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, και οι δύο κυτταρικές σειρές, πριν χρησιμοποιηθούν σε οποιοδήποτε πειραματική δοκιμασία ανακαλλιεργούνται σε φλάσκες, τουλάχιστον 2 φορές, ώστε να επανέλθουν στη φυσιολογική τους κατάσταση.

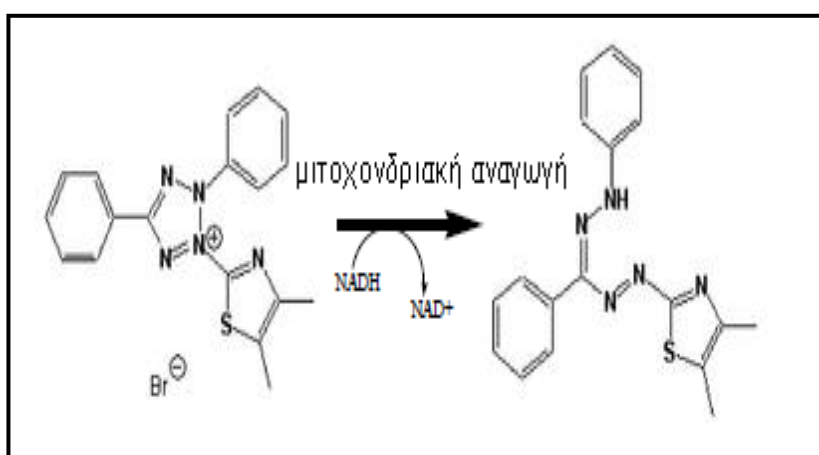
3.4 Μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων - MTT colorimetric assay

Η μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο MTT. Η μέθοδος MTT είναι μια χρωματομετρική μέθοδος, που περιλαμβάνει την χρήση ενός άλατος, του (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) και χρησιμοποιείται

για την εκτίμηση μέτρηση των ζωντανών κυττάρων σε κυτταρικό εναιώρημα [181]. 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 (MTT colorimetric assay) εκμεταλλεύεται τη μετατροπή των αλάτων τετραζολίου σε μη διαλυτά παράγωγα φορμαζάνης. Το κίτρινου χρώματος άλας τετραζολίου, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσες των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και παράγονται έγχρωμοι κρύσταλλοι φορμαζάνης (ιώδεις), οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου (σχήμα 3.16) [182]. Η οξείδωση του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης πραγματοποιείται μόνο στα βιώσιμα κύτταρα (σχήμα 3.17) [183].

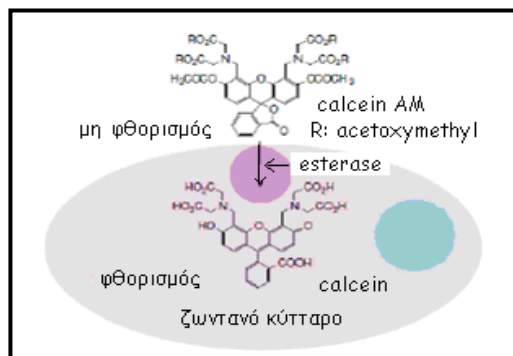
Το έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης, η φορμαζάνη, είναι μερικώς διαλυτό στα θρεπτικά υγρά ή το νερό, οπότε διάλυση με αλκοολικό διάλυμα παράγει διάλυμα φορμαζάνης, έτοιμο προς μέτρηση. Το προϊόν της αντίδρασης διαλυτοποιείται με την προσθήκη (DMSO, dimethylsulphoxide) και το χρώμα που παράγεται υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά σε ELISA reader (στα 450 nm αλλά και στα 405 nm για καρκινικά κύτταρα) [184].



Σχήμα 3.16. Το MTT ανάγεται από ζωντανά κύτταρα σε φορμαζάνη μωβ χρώματος, σύμφωνα με την χημική αντίδραση που απεικονίζεται (ανατύπωση από [185])

Η ένταση του χρώματος είναι επομένως γραμμικά ανάλογη με την ποσότητα της φορμαζάνης και κατ' επέκταση γραμμικά ανάλογη με τη δραστηριότητα των

μιτοχονδριακών ενζύμων και κατά συνέπεια με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων και αντιστρόφως ανάλογη με την τοξικότητα του υλικού [185].



Σχήμα 3.17. Η οξείδωση του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικώς ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης πραγματοποιείται μόνο στα βιώσιμα κύτταρα (ανατύπωση από [184])

Η μέθοδος MTT εκτιμά τον αριθμό κυττάρων από τη μεταβολική δραστηριότητα. Αυτό σε κάποιες περιπτώσεις αποδεικνύεται δυσλειτουργικό, αφού μπορεί να λάβουμε παρόμοια αποτελέσματα από ένα μικρό έντονα ενεργό, μεταβολικά, κυτταρικό πληθυσμό και από ένα σχετικά μεγάλο αριθμό λιγότερο ενεργών κυττάρων.

Για τις ανάγκες της μελέτης της βιωσιμότητας των κυττάρων, διατηρείται καλλιέργεια και από τις δύο κυτταρικές σειρές, σε πλάκες 96 φρεατίων (96-well plates) σε συγκέντρωση περίπου 6000 κυττάρων ανά φρεάτιο, για 24 ώρες. Κατόπιν, στην πρώτη σειρά πειραμάτων προστίθεται sol-gel TiO₂ σε διάφορες συγκεντρώσεις και ακολουθεί ακτινοβολία για 20 λεπτά με ακτινοβολία UV-A (350nm) (4 λάμπες UV SYLVANIA – Blacklight Blue – F15W/BLB-T8 και μονάδα ακτινοβολίας UV-120 UV-LIGHT RADIATION UNIT, απόσταση λάμπας – βάσης τοποθέτησης πλακών πολλαπλών φρεατίων: 10.5 cm). Μετά από επώαση 48 ωρών, απομακρύνεται το υπερκείμενο, και προστίθεται νέο θρεπτικό υλικό (100μl/well) και 10μl διαλύματος 3-(4,5-dimethylthiazol-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 590 nm, σε ELISA reader. 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.

Το πείραμα επαναλαμβάνεται πολλές φορές με στόχο να επιλεχθεί ο μικρότερος δυνατός χρόνος ακτινοβολήσης και η μικρότερη δυνατή συγκέντρωση του TiO_2 και αφού επιλέγονται οι επιθυμητές συνθήκες, τότε ακολουθούν πέντε ανεξάρτητα πειράματα με τετραπλά δείγματα ανά συνθήκη. Ως θετικός μάρτυρας του πειράματος ορίζεται δείγμα, στο οποίο εισάγεται σταυροσπορίνη (200 nM).

Ακριβώς η ίδια διαδικασία ακολουθείται για καθένα από τα εναιωρήματα TiO_2 , TiO_2 Evonik P25, TiO_2 Sigma - Aldrich (100% ανατάσης), τροποποιημένο με Άργυρο, TiO_2 (Ag-doped TiO_2), δηλαδή προστίθενται στις κυτταρικές καλλιέργειες αυξανόμενες συγκεντρώσεις των εναιωρημάτων των νανοσωματιδίων και ακολουθεί ακτινοβολήση με UV-A για 20 λεπτά και επώαση 48 ωρών, ενώ για το τροποποιημένο με Άζωτο TiO_2 (N-doped TiO_2) η ακτινοβολήση έγινε με ακτινοβολία ορατού φωτός (λάμπες PHILIPS TLD 15W/53 και ίδια συσκευή ακτινοβολήσης και συνθήκες) για 20 λεπτά και επώαση 48 ωρών. Ως θετικός μάρτυρας του πειράματος ορίζεται δείγμα, στο οποίο εισάγεται cis-platin (1 mg/ml). Όλες οι σειρές πειραμάτων πραγματοποιούνται αφού έχει ολοκληρωθεί η μελέτη του χαρακτηρισμού κάθε είδους TiO_2 .

3.5 Κυτταρομετρία Ροής – FACSscan

Η κυτταρομετρία ροής FACS (Fluorescence-activated cell sorting) είναι μία τεχνική που παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης των φυσικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών μεγάλου αριθμού κυττάρων, σε ρέον υγρό, με αξιοσημείωτα μεγάλη ταχύτητα⁸, αφού επιτρέπει την ταυτόχρονη ανάλυση πολλών παραμέτρων που σχετίζονται με τα κύτταρα, τα οποία ρέουν διαμέσου μιας οπτικής συσκευής [186].

Με τη χρήση πολύ-παραμετρικών δεδομένων από τη σκέδαση του φωτός, ως αποτέλεσμα της επαφής μιας ακτίνας laser με το κάθε κύτταρο και της εκπομπής ακτινοβολίας από μόρια φθορίζουσας ουσίας, η τεχνική αυτή μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με τον κυτταρικό κύκλο και την πιθανή απόπτωση ενός

⁸ Οι σύγχρονες συσκευές κυτταρομετρίας ροής έχουν τη δυνατότητα ανάλυσης μερικών χιλιάδων σωματιδίων το δευτερόλεπτο, σε «πραγματικό χρόνο».

κυτταρικού πληθυσμού. Μπορεί ακόμη να διαχωρίσει τον πληθυσμό αυτό, με βάση τα φυσικά και τα αντιγονικά τους χαρακτηριστικά [187], [188].

Στη βασική της εκδοχή, μια συσκευή ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής αποτελείται από μία πηγή εκπομπής laser (συγκεκριμένου μήκους κύματος), που διαπερνά το κυτταρικό εναιώρημα, που συνιστά μια υδροδυναμικά συγκλίνουσα ροή υγρού. Η επαφή κάθε κυττάρου, ξεχωριστά, με τη δέσμη, προκαλεί τη σκέδαση της δέσμης, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του ή τον τρόπο απορρόφησής του, ή την απορρόφησή του από τα φθορίζοντα μόρια, με τα οποία κάποια συστατικά του κυττάρου έχουν επισημανθεί [189].

Η εκπομπή ή η σκέδαση του φωτός από κάθε κύτταρο ανιχνεύεται συνολικά, από έναν ανιχνευτή, ευθυγραμμισμένο με την ακτίνα laser, ο οποίος καταγράφει την εμπρόσθια συνιστώσα της σκεδάζουσας ακτινοβολίας (forward scatter ή FSC), από αριθμό ανιχνευτών, που βρίσκονται τοποθετημένοι σε κάθετη διάταξη, ως προς την ακτίνα laser, που καταγράφουν την πλάγια σκέδαση (side scatter ή SSC) και από έναν ή περισσότερους ανιχνευτές φθορισμού. Η εμπρόσθια σκέδαση FSC σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση SSC εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης) [190], [191].

Οι πληροφορίες που συλλέγονται από τους ανιχνευτές του οργάνου μεταφράζονται με χρήση κατάλληλου λογισμικού στην οθόνη ενός υπολογιστή, σε μορφή που επιτρέπει την ανάλυση και την επεξεργασία από το χρήστη.

Η χρήση κυτταρομετρίας ροής παρέχει τη δυνατότητα δύο τύπων μετρήσεων. Ο πρώτος τύπος μέτρησης αφορά στην ποσοτική ανάλυση κάποιου κυτταρικού συστατικού σε έναν κυτταρικό πληθυσμό, μέσω σήμανσης ενός κυτταρικού συστατικού, επί παραδείγματι του πυρηνικού DNA, από ειδικό χρωμοφόρο μόριο, το οποίο όταν διεγερθεί από ακτινοβολία συγκεκριμένης συχνότητας από την πηγή laser, εκπέμπει σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, που καταγράφεται από τον ανιχνευτή του οργάνου. Το σήμα φθορισμού του επισημασμένου DNA είναι ευθέως ανάλογο με τη συνολική ποσότητα DNA στον πυρήνα [192].

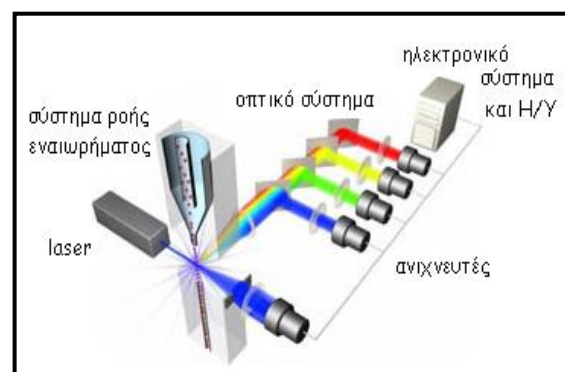
Ο δεύτερος τύπος μετρήσεων αφορά στην ανάλυση της σκέδασης της ακτινοβολίας, ως αποτέλεσμα της επαφής της δέσμης laser με το κύτταρο.

Κάθε σωματίδιο μεγέθους, μεταξύ 0.2 μm και 150 μm , αιωρούμενο στο υγρό που περνά, διαμέσου της δέσμης, σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από εκτενείς, αλλά ιδιαίτερα γρήγορες, αναλύσεις είναι δυνατή η λήψη πληροφοριών, σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου [193].

Το πρότυπο σκέδασης φέρει διαφορετικά χαρακτηριστικά διάχυσης, διάθλασης και ανάκλασης, ανάλογα με κάποια φυσικά χαρακτηριστικά του κυττάρου, όπως το μέγεθος, η πυκνότητα και η ομαλότητα της κυτταρικής μεμβράνης.

Ο συνδυασμός των δύο τύπων μέτρησης, ονομάζεται πολύ-παραμετρικός, όπως προαναφέρθηκε, και επιτρέπει να ταξινομηθεί, ένας ανομοιογενής πληθυσμός, ως προς τα επιλεγμένα από εμάς, βιοχημικά ή φυσικά χαρακτηριστικά του.

Σχήμα 3.18. Σχηματική απεικόνιση του συστήματος δεσμών laser που διαπερνούν τη ροή του κυτταρικού εναιωρήματος (ανατύπωση από [193] τροποποιημένη)



Μια συνήθης σύγχρονη συσκευή κυτταρομετρίας ροής αποτελείται συνήθως από πέντε κύρια συστατικά μέρη:

- μία ροή υγρού περιβλήματος (sheath fluid), η οποία μεταφέρει και διευθετεί τα κύτταρα έτσι ώστε να περνούν ένα-ένα από τη δέσμη του φωτός λέιζερ
- ένα οπτικό σύστημα - συνήθως χρησιμοποιούνται λαμπτήρες (υδραργύρου, ξένου)· υγρόψυκτα laser υψηλής ισχύος (αργού, κρυπτού, χρωστικό laser)· αερόψυκτα laser χαμηλής ισχύος (αργού (488nm), ερυθρού-He-Ne (633nm), πράσινο-He-Ne, He-Cd

(υπεριώδες))· laser διόδου (κυανό, πράσινο, ερυθρό και ιώδες) - που παράγει φωτεινά σήματα

- έναν ανιχνευτή και ένα σύστημα τροποποίησης σήματος από αναλογικό σε ψηφιακό (Analogue-to-Digital Conversion - ADC) - το οποίο μετατρέπει σήματα πρόσθιας (FSC) και πλάγιας (SSC) σκέδασης καθώς και σήματα φθορισμού από το φως, σε ηλεκτρικά σήματα τα οποία μπορούν να επεξεργαστούν από τον Η/Υ
- ένα σύστημα ενίσχυσης - δυνατότητα γραμμικής ή λογαριθμικής απεικόνισης
- έναν Η/Υ για την ανάλυση των σημάτων [194].

Τα σύγχρονα όργανα κυτταρομετρίας ροής διαθέτουν πολλαπλά laser και ανιχνευτές φθορισμού (το τρέχον ρεκόρ για όργανο που κυκλοφορεί στην αγορά είναι 4 laser και 18 ανιχνευτές φθορισμού). Ορισμένα όργανα μπορούν ακόμα και να φωτογραφήσουν μεμονωμένα κύτταρα επιτρέποντας τον προσδιορισμό της πηγής του σήματος φθορισμού εντός ή επί της επιφανείας των κυττάρων [195].

Εν συντομία, μία από τις εφαρμογές της κυτταρομετρίας στις βιολογικές επιστήμες, περιλαμβάνει την ανάλυση φυσικών και βιοχημικών δεικτών απόπτωσης, όπως είναι:

- ❖ η συρρίκνωση των αποπτωτικών κυττάρων, του κυτταροπλάσματος και της χρωματίνης, που αντικατοπτρίζονται στις αλλαγές του FSC, που όπως αναφέρθηκε, σχετίζεται με το μέγεθος των κυττάρων και του SSC που σχετίζεται με την κοκκίωση και την πυκνότητάς τους
- ❖ η έκφραση αντιγόνων ή ειδικών μορίων, που είναι μοναδικά για τα αποπτωτικά κύτταρα, που ανιχνεύεται μέσω επισήμανσής τους με ειδικές φθορίζουσες ουσίες
- ❖ ο κατακερματισμός του DNA (DNA laddering), που ανιχνεύεται έμμεσα με χρήση ειδικής χρωστικής, όπως το ιωδιούχο προπιδίο (Propidium Iodide, PI), λόγω της απώλειας τμημάτων DNA μικρού μοριακού βάρους, μέσω της διάχυσής τους στο διάλυμα, διαμέσου των πυρηνικών πόρων ή άμεσα μέσω διασύνδεσης των 3' υδροξυτελικών περιοχών μονόκλωνου ή δίκλωνου κατακερματισμένου DNA με επισημασμένα νουκλεοτίδια τριφωσφορικής δεοξουριδίνης (fluorescent-tagged deoxyuridine triphosphate nucleotides, F-dUTPs), μέσω της δράσης του ενζύμου deoxynucleotidyl transferase (TdT) με τη μέθοδο TUNEL [196].

Χρώση με PI (Propidium Iodide) - Κυτταρομετρία ροής

Στην παρούσα εργασία, η τεχνική της κυτταρομετρίας χρησιμοποιήθηκε, με στόχο τη μελέτη της επίδρασης των νανοδομημένων σωματίων TiO₂ στον κυτταρικό κύκλο. Εφαρμόστηκε μέθοδος χρώσης DNA (DNA staining) - Κυτταρομετρία ροής.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η κυτταρομετρία ροής επιτρέπει να εκτιμηθεί το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε φάση του κύκλου (ανάλυση του κυτταρικού κύκλου) αλλά και το ολικό περιεχόμενο του DNA ενός κυτταρικού πληθυσμού (περιεκτικότητα των κυττάρων σε DNA ή DNA πλοειδία).

Η σύνδεση DNA-χρωστικής είναι στοιχειομετρική, δηλαδή το ποσό της χρωστικής που συνδέεται είναι ανάλογο του ποσού του DNA στο κύτταρο [197].

Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού είναι ανάλογη του ποσού της χρωστικής που έχει δεσμευθεί από το DNA. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη χρωστική είναι το ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide, PI), το οποίο ενώ δεν είναι απόλυτα ειδικό για το DNA, έχει καλά φασματικά χαρακτηριστικά, που το καθιστούν κατάλληλο για πολυπαραμετρικές μετρήσεις.

Για το σκοπό αυτό, κύτταρα (1.000.000-2.000.000) (MCF-7 και MDA-MB-468) καλλιεργούνται για 24 ώρες σε τριβλία διαμέτρου 10 cm, σε πλήρες θρεπτικό υλικό (DMEM, 10% FBS, πενικιλίνη (100units/ml), στρεπτομυκίνη (100μg/ml), L-glutamine (2mM), και sodium pyruvate (1mM)) σε ειδικό επωαστήριο με 5% περιεκτικότητα σε CO₂ στους 37°C. Κατόπιν προστίθενται 15 μM sol-gel TiO₂ και τα κύτταρα ακτινοβολούνται για 20 min με ακτινοβολία UV-A (350nm). Σε όλες τις συνθήκες που εξετάζονται, πραγματοποιούνται δύο σειρές με τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα η καθεμία, και με διπλά δείγματα. Στην πρώτη σειρά πειραμάτων επιλέγεται ένας αρχικός αριθμός 1.000.000 κυττάρων ανά τριβλίο. Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων επιλέγεται ο αριθμός των 2.000.000 κύτταρα ανά τριβλίο. Τα αποτελέσματα δεν φαίνεται να επηρεάζονται από αυτή την επιλογή. Μετά από επώαση 48 ωρών, τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και φυγοκεντρώνονται στις 1200 rpm για 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί μέτρησή τους και μονιμοποίηση με 70% αιθανόλη και 30% PBS (σε τελικό όγκο 1ml). Αφήνονται κατά τη διάρκεια της νύχτας στους -20°C. Κατόπιν τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στις 1400 rpm για 5 min, απομακρύνεται η αιθανόλη και τα κύτταρα χρωματίζονται με το διάλυμα βαφής P.I. [(20 μg/ml) - RNάση A (200 μg/ml) – PBS (σε τελικό όγκο 1,5ml ανά δείγμα)] και παραμένουν σε

θερμοκρασία δωματίου, απουσία φωτός για 30 min. Στη συνέχεια ακολουθεί η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACScan, Beckton-Dickinson, BD Biosciences, US [198], μήκος κύματος εκπομπής: 617 nm, μήκος κύματος απορρόφησης: 535 nm).

3.6 Απομόνωση πρωτεϊνών

3.6.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών από κύτταρα

Ειδικής βαρύτητας είναι η επιλογή της μεθόδου λύσης των κυττάρων, για την απομόνωση των πρωτεϊνών. Θα πρέπει οι πρωτεΐνες να διαλυτοποιούνται σε τέτοια μορφή, ώστε να παραμένουν ανοσοδραστικές και να μην υφίστανται αποικοδόμηση. Έτσι, ιδιαίτερα ουσιαστικό ρόλο παίζουν το είδος αλλά και η συγκέντρωση του απορρυπαντικού που χρησιμοποιείται, το pH και η ιοντική ισχύς του διαλύματος κυτταρικής λύσης καθώς επίσης η παρουσία δισθενών κατιόντων και άλλων συμπαραγόντων [199]. Η εκχύλιση υδρόφοβων και διαμεμβρανικών πρωτεϊνών επηρεάζεται λίγο από την ιοντική ισχύ. Πολλές μέθοδοι, κυρίως αυτές που χρησιμοποιούν μηχανική καταστροφή των κυττάρων, προκαλούν την απελευθέρωση ενδοκυτταρικών πρωτεασών που μπορεί να αποικοδομήσουν τις πρωτεΐνες [200].

Η ευκολία αποικοδόμησης των πρωτεϊνών δεν είναι πάντοτε η ίδια. Οι διαμεμβρανικές και εκκρινόμενες πρωτεΐνες είναι, κατά το πλείστον, πιο ανθεκτικές από τις ενδοκυτταρικές. Όλες οι διαδικασίες θα πρέπει να γίνονται σε αρκετά χαμηλές θερμοκρασίες (4°C) και να περιέχονται στα διαλύματα λύσης αναστολείς πρωτεασών, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η μείωση της πρωτεολυτικής ενεργότητας στα κυτταρικά εκχυλίσματα. Οι αναστολείς πρωτεασών σε συνδυασμό με τη χαμηλή θερμοκρασία λύσης, παρεμποδίζουν τη δράση ενδοκυτταρικών πρωτεασών που απελευθερώνονται κατά τη λύση, αποτρέποντας έτσι την αποικοδόμηση κυτταρικών πρωτεϊνών. Η επιλογή των συνθηκών και τα ρυθμιστικά διάλυμα λύσης βασίστηκε σε δημοσιευμένα πρωτόκολλα [201].

Για τις ανάγκες των πειραμάτων μας κύτταρα MDA-MB-468 και MCF-7 καλλιεργούνται σε πλάκες έξι φρεατίων (περίπου 600.000 κύτταρα, ανά φρεάτιο), για 24 ώρες. Στη συνέχεια, στην περίπτωση του sol-gel TiO₂, προστίθεται ποσότητα 15μM και ακολουθεί ακτινοβολία με ακτινοβολία UV-A (350nm) για 20 λεπτά και επώαση 48 ωρών. Στην περίπτωση των εναιωρημάτων TiO₂ Evonik P25, TiO₂ Sigma - Aldrich (100% ανατάσης)

και τροποποιημένου με Άργυρο, TiO_2 (Ag-doped TiO_2) προστίθεται αντίστοιχη ποσότητα 15 μM και ακολουθεί ακτινοβόληση με UV-A για 20 λεπτά και επώαση 48 ωρών, ενώ για το τροποποιημένο με Άζωτο TiO_2 (N-doped TiO_2) η ακτινοβόληση γίνεται με ακτινοβολία ορατού φωτός για 20 λεπτά και επώαση 48 ωρών. Πραγματοποιούνται τρεις ανεξάρτητες σειρές πειραμάτων, με διπλά δείγματα, ανά συνθήκη.

Η κυτταρική λύση, που σχετίζεται με τα πειράματα μελέτης της ενεργοποίησης της κασπάσης - 3 ή της PARP, πραγματοποιείται με διάλυμα κυτταρικής εκχύλισης Chaps (Chaps Cell Extract Buffer) (Πίνακας 3.1) CELL SIGNALING TECHNOLOGY (Danvers, Massachusetts, US) [31] σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνει η εταιρεία. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα πλένονται τρεις φορές με ψυχρό (4°C) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS. Αποκολλούνται με προσεκτική απόξεση από το υπόστρωμα και φυγοκεντρούνται. Στη συνέχεια το κυτταρικό ίζημα αναδιαλύεται σε διάλυμα κυτταρικής λύσης Chaps σε αναλογία 1:1 (%v/v) (Πίνακας 3.1.). Ακολουθούν τρεις διαδοχικοί κύκλοι κατάψυξης – απόψυξης των κυττάρων σε υγρό άζωτο [202]. Με τον τρόπο αυτό, τα κύτταρα υφίστανται λύση, ως αποτέλεσμα της δημιουργίας κρυστάλλων πάγου στο εσωτερικό τους. Στη συνέχεια τα κυτταρικά λύματα φυγοκεντρούνται στις 14000 rpm, σε φυγόκεντρο EPPENDORF CENTRIFUGE 5417R, για 20 λεπτά στους 4°C. Ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford σε δείγμα από το υπερκείμενο, όπου είναι διαλυμένες οι κυτταρικές πρωτεΐνες, με τη μέθοδο που περιγράφεται ακολούθως. Τα κυτταρικά λύματα (lysates) φυλάσσονται στους -80 °C για μετέπειτα χρήση.

Πίνακας 3. 1

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων	Chaps Cell Extract Buffer
136.8 mM NaCl	1 :10 (v) Chaps
2.68 mM KCl	5 mM DTT
6.46 mM Na_2HPO_4	1 mM PMSF
2 mM KH_2PO_4	9:10 (v) ddH ₂ O
pH 7.4	

Το PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, protease inhibitor) είναι της εταιρείας THERMO FISHER SCIENTIFIC – Pierce Protein Biology Products (Rockford, Illinois USA). Ο αναστολέας πρωτεασών σερίνης PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride ή phenylmethylsulphonyl fluoride) προσδένεται ειδικά στο ενεργό κατάλοιπο σερίνης της πρωτεάσης, χωρίς να προσδένεται σε οποιοδήποτε κατάλοιπο σερίνης στην πρωτεΐνη [203].

Σε όλα τα υπόλοιπα πειράματα που έγιναν με στόχο να διερευνηθεί η ενεργοποίηση των μελών της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών, η διαδικασία της λύσης περιγράφεται ακολούθως.

Το διάλυμα της κυτταρικής λύσης, περιέχει μίγμα αναστολέων πρωτεασών ευρείας εξειδίκευσης (SIGMA P8340), όπως 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), pepstatin, bestatin, leupeptin, aprotinin κατάλληλων για την αναστολή πρωτεασών σερίνης, κυστεΐνης, ασπαρτικού οξέος και αμινοπεπτιδασών. Ακόμη, περιέχει τους αναστολείς φωσφατασών, φθοριούχο νάτριο (NaF), ορθοβαναδικό νάτριο (sodium orthovanadate (Na₂VO₄)), που αναστέλλει τη δράση φωσφατασών τυροσίνης (όπως επίσης αναστέλλει τη δράση αλκαλικών φωσφατασών και ορισμένων ATPασών), τον χηλικό παράγοντα Na₂EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, (HO₂CCH₂)₂NCH₂CH₂N(CH₂CO₂H)₂), με σκοπό την απενεργοποίηση ενζύμων εξαρτώμενα από ιόντα μετάλλων, καθώς και καθορισμένη συγκέντρωση αλάτων και Tris-HCl (pH 7.4) (tris(hydroxymethyl)aminomethane, (HOCH₂)₃CNH₂), για διατήρηση της κατάλληλης αλατότητας και pH, όπως και απορρυπαντικό (Triton X-100) [202], [203].

Το απορρυπαντικό είναι απαραίτητο για την διαλυτοποίηση των μεμβρανών, ενώ τα άλατα διαμορφώνουν κατάλληλο pH και κατάλληλη ιονική ισχύ στο διάλυμα λύσης, ώστε να παραμείνουν διαλυτές οι κυτταρικές πρωτεΐνες.

Κατά την πειραματική διαδικασία, αφαιρείται από τις κυτταρικές καλλιέργειες το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα λούονται τρεις φορές με ψυχρό PBS (4°C). Ακολουθεί προσθήκη του διαλύματος κυτταρικής λύσης (Πίνακας 3.2) με άμεση μετάγγιση στα φρεάτια καλλιέργειας σε συγκέντρωση περίπου 50μl διαλύματος / 10⁶ κύτταρα και παραμονή του για μία ώρα στους 4°C, υπό ήπια ανάδευση. Έπειτα, το περιεχόμενο περισυλλέγεται και φυγοκεντρείται στις 10.000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C.

Πίνακας 3.2

διάλυμα κυτταρικής λύσης
20 mM Tris (pH 7.5)
150 mM NaCl
1 mM EDTA (pH 8.0)
10 mM NaF
1 mM Na ₂ VO ₄
1 mM PMSF
1% Triton X-100
μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Sigma P8340)

3.6.2 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών – Bradford Assay

Η συγκέντρωση του διαλύματος πρωτεϊνών προσδιορίστηκε με μια τροποποίηση της μεθόδου Bradford (Bradford, 1976) [197]. Η μέθοδος αυτή, αποτελεί φασματοφωτομετρική μέθοδο προσδιορισμού πρωτεϊνών με τη χρήση του αντιδραστηρίου Coomassie Brilliant Blue και είναι γενικώς μια γρήγορη και ακριβής μέθοδος. Η χρωστική Coomassie προσδέεται σε αμινοξέα που φέρουν βασικές ή αρωματικές πλευρικές ομάδες, με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, με τη συμμετοχή δεσμών Van der Waals αλλά και με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, μεταξύ σουλφονικών ομάδων της χρωστικής και καταλοίπων κυρίως αργινίνης, καθώς επίσης ιστιδίνης, λυσίνης, τυροσίνης, τρυπτοφάνης και φαινυλαλανίνης [204]. Η χρωστική απαντάται σε δύο μορφές ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος μέσου. Στο όξινο διάλυμα του αντιδραστηρίου η κατιονική μορφή της χρωστικής παρουσιάζει ένα μέγιστο οπτικής απορρόφησης στα 465 nm. Μετά τη δημιουργία συμπλόκου, από τη δέσμευση των πρωτεϊνών, σταθεροποιείται η ανιονική μορφή της χρωστικής, της οποίας η οπτική απορρόφηση τελικά, παρουσιάζει μέγιστο σε μήκος κύματος 595nm.

Η μέθοδος πραγματοποιείται σε δύο βήματα: το σχεδιασμό της καμπύλης αναφοράς ή πρότυπης καμπύλης και τη φωτομέτρηση των δειγμάτων.

3.6.2.1 Σχεδιασμός πρότυπης καμπύλης

Για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε κοινή πρωτεΐνη. Συνήθως, χρησιμοποιούνται, η οροαλβουμίνη βοδιού (BSA – bovine serum albumin) ή η ανοσοσφαιρίνη γ (IgG – immunoglobulin G). Αυτή αποθηκεύεται στους -20°C σε διαλύματα συγκέντρωσης 1mg/ml. Αυτά τα διαλύματα πρέπει να έχουν απορρόφηση 0.66 στα 280nm. Ετοιμάζεται ένα διάλυμα αλβουμίνης συγκέντρωσης 100μg/ml [197]. Το διάλυμα αυτό θα χρησιμεύσει ως βάση για την προετοιμασία άλλων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης, στα οποία θα προστεθεί αντιδραστήριο Bradford για να μετρηθεί η οπτική τους απορρόφηση σε φασματοφωτόμετρο. Το όργανο μηδενίζεται με τυφλό διάλυμα που θα περιέχει μόνο απεσταγμένο νερό και αντιδραστήριο Bradford. Ακολούθως ετοιμάζεται ένα διάγραμμα συγκέντρωσης-απορρόφησης στα 595nm, το οποίο θα είναι η καμπύλη αναφοράς (πρότυπη καμπύλη). Ανά τακτά χρονικά διαστήματα η καμπύλη επανεξετάζεται και τροποποιείται, με νέα βαθμονόμηση [204].

3.6.2.2 Φωτομέτρηση δειγμάτων

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.2.2, στη σειρά των πειραμάτων ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκε έτοιμο αντιδραστήριο Coomassie Brilliant Blue (Coomassie Plus Protein Assay Reagent) THERMO FISHER SCIENTIFIC – Pierce Protein Biology Products (Rockford, Illinois USA) [160] και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο με ευαισθησία ανίχνευσης από 100-1500 μg/ml πρωτεΐνης. Έτσι, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ποσότητας της ολικής πρωτεΐνης στα δείγματα, ετοιμάζουμε διπλά δείγματα (duplicates). Σε 1ml απεσταγμένο νερό προσθέτουμε τα 5μl του κάθε δείγματος πρωτεΐνης (άγνωστης, ακόμη, συγκέντρωσης), που εκχυλίστηκε από τα κύτταρα και 1ml αντιδραστηρίου Coomassie Brilliant Blue [160], [204]. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 595 nm, αφού πρώτα ανακινήθηκαν. Σαν τυφλό δείγμα, για το καλιμπράρισμα (μηδενισμό και βαθμονόμηση) του οργάνου μέτρησης, χρησιμοποιήθηκε 1ml H₂O στο οποίο είχε προστεθεί 1 ml αντιδραστηρίου, δηλαδή δείγμα, χωρίς διάλυμα πρωτεϊνών. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης έγινε συγκρίνοντας τις τιμές οπτικής απορρόφησης των

δειγμάτων, με τιμές δειγμάτων γνωστής απορρόφησης, σύμφωνα με πρότυπη καμπύλη (BSA).

3.6.3. Ηλεκτροφόρηση

Αποτελεί μια πολύτιμη αναλυτική μέθοδο για διαχωρισμό ιονισμένων σωματιδίων, κυρίως βιομακρομορίων, όπως είναι οι πρωτεΐνες και το DNA και είναι ένα από τα σημαντικότερα και θεμελιώδη εργαλεία στην εργαστηριακή διαγνωστική ιατρική και τη μοριακή βιολογία. Χρησιμοποιείται ευρύτατα για το διαχωρισμό πεπτιδίων, πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος, των αιμοσφαιρινών, των ισοενζύμων, των λιποπρωτεϊνών αλλά και στην έρευνα για διαχωρισμό και ταυτοποίηση πρωτεϊνών, DNA και RNA. Βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων σωματιδίων, σε ένα υγρό μέσο, υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου [205].

Θεωρητική Βάση της τεχνικής

Μόρια που φέρουν ηλεκτρικό φορτίο, κινούνται προς την άνοδο (+) ή την κάθοδο (-), όταν τοποθετηθούν σε ηλεκτρικό πεδίο, ανάλογα με είδος του φορτίου τους. Οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊνικά οξέα είναι βιομόρια, με φυσικοχημικές ιδιότητες αμφολυτών, δηλαδή συμπεριφέρονται άλλοτε ως οξέα και άλλοτε ως βάσεις. Οι ομάδες που ιονίζονται και συμβάλλουν στην αμφολυτική τους συμπεριφορά, ανήκουν κυρίως στα πολικά αμινοξέα (στις πρωτεΐνες) ή φωσφορικές ομάδες (στα νουκλεϊνικά οξέα) [206]. Η ταχύτητα μετακίνησης (u) κάθε ορίου σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο (q) του μορίου και το συντελεστή τριβής (f), σύμφωνα με τη σχέση:

$$u = \frac{Eq}{f} \quad (3.1)$$

Η ηλεκτροστατική δύναμη $E \cdot z$ που κατευθύνει το φορτισμένο μόριο προς το αντίθετο φορτισμένο ηλεκτρόδιο, όπως είναι λογικό, είναι αντίθετης διεύθυνσης από την τριβή $f \cdot u$ που εμφανίζεται μεταξύ του μορίου και του μέσου. Ο συντελεστής f εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από το ιξώδες (η) του μέσου [207].

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό είναι:

- ✚ το pH (αφού τα βιομακρομόρια είναι αμφολύτες, μικρή μεταβολή του pH, μπορεί να προκαλέσει μεταβολή στο συνολικό ηλεκτρικό πεδίο και να επιδράσει στο διαχωρισμό).
- ✚ η θερμοκρασία (η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος (I) που διαρρέει τη συσκευή κατά την ηλεκτροφόρηση, προκαλεί απελευθέρωση θερμότητας, σύμφωνα με το φαινόμενο Joule, που είναι: $Q = V \cdot I \cdot t$, όπου t ο χρόνος ηλεκτροφόρησης και V η διαφορά δυναμικού που προκαλεί αύξηση της αγωγιμότητας. Με σταθερή τάση, η αύξηση της έντασης, αυξάνει την ταχύτητα κίνησης των βιομορίων, την εξάτμιση του νερού από το ρυθμιστικό διάλυμα, που με τη σειρά της προκαλεί την ελάττωση της αντίστασης και περαιτέρω αύξηση της έντασης, άρα και της θερμοκρασίας, που ίσως προκαλέσει βλάβες στα βιομόρια (μετουσίωση και καταστροφή)) [206], [207].
- ✚ η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (επηρεάζει άμεσα την πραγματική απόσταση που διανύουν τα βιομόρια σε δεδομένο χρόνο. Υπό την επίδραση ισχυρού πεδίου, επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός. Όσο αυξάνεται το δυναμικό και η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος, τόσο περισσότερη ηλεκτρική ενέργεια μετατρέπεται σε θερμότητα Joule).
- ✚ το μέγεθος και το σχήμα του βιομορίου (η ηλεκτροφόρηση γίνεται σχεδόν πάντα σε πήκτωμα, που λειτουργεί ως ηθμός, ενισχύοντας το διαχωρισμό. Τα μικρά μόρια, σε σχέση με τους πόρους του πηκτώματος, μετακινούνται εύκολα, ενώ τα μεγάλα μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες) [206].
- ✚ η φύση του ρυθμιστικού διαλύματος (η διαφορετική ιοντική ισχύς και οι διαφορετικές χημικές ιδιότητες των ρυθμιστικών διαλυμάτων επιδρούν διαφορετικά στις διάφορες πρωτεΐνες. Η ιοντική ισχύς επηρεάζει την ταχύτητα κίνησης, προβάλλοντας αντίσταση στην κίνηση του μορίου. Υψηλή ιοντική ισχύς οδηγεί σε απελευθέρωση μεγάλου ποσού θερμότητας, με κίνδυνο για καταστροφή των μορίων. Αύξηση της ιοντικής ισχύος, εντός ορίων, όμως, δίνει καλύτερα διαχωριζόμενα κλάσματα).
- ✚ το είδος του ηλεκτροφορητικού υλικού – ηλεκτροενδόσμωση (μερικά ηλεκτροφορητικά υλικά, σε επαφή με το νερό, φορτίζονται αρνητικά, οπότε έλκουν θετικά φορτισμένα σωματίδια του διαλύματος και σχηματίζουν μια

διπλοστιβάδα, όπου υπάρχουν και τα θετικά φορτισμένα σωματίδια, επίσης ακινητοποιημένα στο ηλεκτροφορητικό υλικό. Κατά την ηλεκτροφόρηση αυτά τα σωματίδια κινούνται προς την κάθοδο (-). Το φαινόμενο αυτό λέγεται ηλεκτροενδόσμωση και επηρεάζει την κίνηση των αρνητικά φορτισμένων σωματιδίων που κινούνται προς την άνοδο (+). Έτσι είναι πιθανό, αρνητικά φορτισμένα σωματίδια να παραμένουν ακίνητα, ή ακόμη και να ακολουθούν θετικά φορτισμένα προς την κάθοδο [207]. Το χαρτί και το άγαρ έχουν υψηλή ηλεκτροενδόσμωση, ενώ το πήκτωμα αγαρόζης και το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

3.6.3.1 Ανάλυση κατά Western (Western Blotting)

Η μέθοδος Western Blotting βασίζεται στην ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών ακινητοποιημένων σε φίλτρα νιτροκυτταρίνης, μέσα από μίγμα μεγάλου αριθμού άλλων πρωτεϊνών, που προέρχονται από δείγματα κυτταρικής λύσης, ή υπερκείμενου κυτταροκαλλιεργειών, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων, μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών [206]. Η ανίχνευση επιτυγχάνεται με διαχωρισμό των πρωτεϊνών του μίγματος, με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, οι οποίες αμέσως μετά, μεταφέρονται και ακινητοποιούνται σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, διατηρώντας όλα τα χαρακτηριστικά τους. Μετά ακολουθεί η επώαση με κατάλληλα αντισώματα, που τις αναγνωρίζουν, προσδένονται σε αυτές και με κατάλληλους ιχνηθέτες, επιτρέπουν στη συνέχεια τον εντοπισμό και την απεικόνιση αυτού. Η διαδικασία, επομένως περιλαμβάνει τρία στάδια: το διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση, τη μεταφορά των διαχωρισμένων πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη και τον εντοπισμό τους, με ειδικά επισημασμένα αντισώματα [208].

3.6.3.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS - PAGE)

Η ολική πρωτεΐνη από τα λύματα κυττάρων αναλύεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου/N,N methylene bisacrylamide, παρουσία του απορρυπαντικού SDS (δωδέκυλοθειικό νάτριο - sodium dodecyl sulphate, SDS).

Τα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου αποτελούνται από αλυσίδες πολυμερισμένου ακρυλαμιδίου που διασυνδέονται μεταξύ τους με τη βοήθεια του N, N' - methylenebisacrylamide. Ο πολυμερισμός γίνεται, λόγω της παρουσίας υπερθειικού

αμμωνίου (ammonium persulfate, APS), που περιέχει ελεύθερες ρίζες. Επιταχύνεται όμως, με την προσθήκη N,N,N',N' – tetramethylenediamine (TEMED), που καταλύει το σχηματισμό τους. Η διαδικασία αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία πόρων στο πήκτωμα. Το μέγεθος των πόρων καθώς και το αποτελεσματικό εύρος διαχωρισμού του πηκτώματος εξαρτώνται, κατά κύριο λόγο, από την συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου [209].

Η τελική συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου (N, N methylene bisacrylamide) στο πήκτωμα καθορίζεται από το μέγεθος των πρωτεϊνών που αναλύονται με ηλεκτροφόρηση.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται κάτω από συνθήκες, τέτοιες ώστε να εξασφαλίζεται η αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις πολυπεπτιδικές υπομονάδες, με τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους με βάση το μοριακό τους βάρος και όχι με βάση την τριτοταγή ή τη τεταρτοταγή δομή τους. Για ο λόγο αυτό επιλέγεται η χρήση του ισχυρού ανιονικού απορρυπαντικού SDS. Αυτό, σε συνδυασμό με τη διαδικασία του βρασμού, προωθεί την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Το αρνητικά φορτισμένο SDS προσδένεται στις αποδιαταγμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες σε αναλογία μάζας 4:1, προσδίδοντας τους αρνητικό φορτίο. Η παρουσία αναγωγικού παράγοντα, που συνήθως είναι η μερκαπτοαιθανόλη (σε κάποιες περιπτώσεις επιλέγεται η διθειοθρεϊτόλη DTT dithiothreitol), βοηθάει στην αποδιάταξη μιας πρωτεΐνης καταστρέφοντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, οι φορτισμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες κινούνται μέσα στους πόρους του πηκτώματος προς την κάθοδο με διαφορετική κινητικότητα που εξαρτάται από το μοριακό τους βάρος. Αυτή η διαφορετική κινητικότητα των πρωτεϊνών στο πήκτωμα επιτρέπει το διαχωρισμό τους [202], [208].

Δύο συστήματα διαλύματος είναι γνωστά στην SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, το συνεχές και το ασυνεχές. Στο πρώτο, τα δείγματα τοποθετούνται σε ενιαίο πήκτωμα στο οποίο γίνεται ο διαχωρισμός. Το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται για τα δείγματα, το πήκτωμα και την συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Αντίθετα, στο ασυνεχές σύστημα χρησιμοποιούνται διαφορετικά, ως προς τη σύσταση και το pH, ρυθμιστικά διαλύματα, στο πήκτωμα και στη συσκευή ηλεκτροφόρησης [209]. Τα δείγματα τοποθετούνται σε πήκτωμα μεγάλων πόρων, το πήκτωμα επιστοιβάξης (stacking gel), το οποίο πολυμερίζεται πάνω σε πήκτωμα μικρότερων

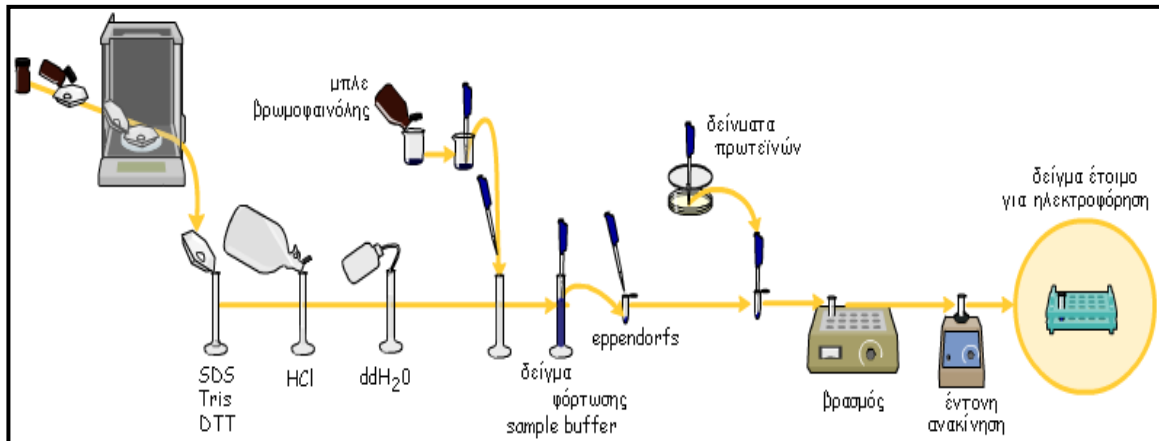
πόρων, το πήκτωμα διαχωρισμού (resolving/separating gel). Στο ασυνεχές σύστημα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σχετικά μεγάλοι όγκοι πρωτεϊνικών δειγμάτων στο πήκτωμα, διατηρώντας πολύ καλή ανάλυση των συστατικών τους. Αυτό συμβαίνει διότι, οι πρωτεΐνες επιστοιβάζονται κατά την διάρκεια της μετακίνησής τους, υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου, μέσα στο πήκτωμα επιστοιβάξης, και σχηματίζουν μια μικρή ζώνη πριν την είσοδό τους στο πήκτωμα διαχωρισμού [208]. Στο ασυνεχές σύστημα το οποίο χρησιμοποιείται πιο συχνά, τα δείγματα και το πήκτωμα επιστοιβάξης περιέχουν Tris-HCl (pH 6.8), το πήκτωμα διαχωρισμού Tris-HCl (pH 8.8) και το διάλυμα ηλεκτροφόρησης Tris-γλυκίνη (pH 8.3), ενώ όλα περιέχουν 0.1 % w/v SDS (Πίνακας 3.3).

Η ανάλυση των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του εργαστηριακού οδηγού «Molecular Cloning» [204] που βασίζεται σε τροποποιήσεις δημοσιευμένων πρωτοκόλλων [205].

Αναλυτικότερα, ισόποσα πρωτεϊνικά δείγματα κυτταρικών λυμάτων, που συλλέχθηκαν μετά από πειραματική διαδικασία, αναδιαλύονται σε διάλυμα φόρτωσης παρουσία 5% β-μερκαπτοαιθανόλης (αναγωγικές συνθήκες ηλεκτροφόρησης) (Πίνακας 3.3).

Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει τους αποδιατακτικούς παράγοντες, που αναφέρθηκαν, αλλά και τη χρωστική κυανό της βρωμοφαινόλης. Αυτή η χρωστική χρησιμεύει ως δείκτης κατά τη διαδικασία φόρτωσης των πρωτεϊνών και ως δείκτης της πορείας τους, καθώς το μέτωπο της χρωστικής προπορεύεται των πρωτεϊνών στο πήκτωμα. Ακόμη περιέχει γλυκερόλη, για την αύξηση της πυκνότητας του δείγματος. Έτσι αυτό επικάθεται στη βάση του φρεατίου φόρτωσης και κατά αυτόν τον τρόπο ελαχιστοποιείται η απώλεια πρωτεϊνών, μέσω διάχυσης στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

Τα δείγματα τοποθετούνται στα φρεάτια του πηκτώματος επιστοιβάξης 5%, μετά από βρασμό για 5 λεπτά στους 90°C-100°.



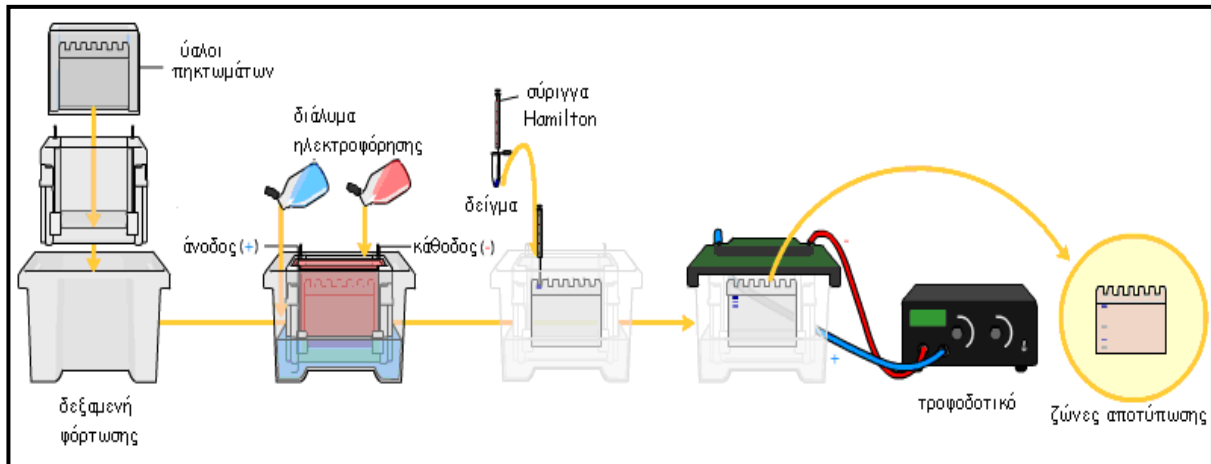
Σχήμα 3.19. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας προετοιμασίας δειγμάτων πρωτεΐνης για ηλεκτροφόρηση και ανάλυση κατά Western (ανατύπωση από [209])

Τα δείγματα των πρωτεϊνικών διαλυμάτων αναλύονται σε πήκτωμα διαχωρισμού, περιεκτικότητας σε πολυακρυλαμίδιο 7.5% ή 12%, ανάλογα με το μοριακό βάρος της, προς ανίχνευση, πρωτεΐνης. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Πίνακας 3.3), με σταθερή εφαρμοζόμενη τάση 150 V σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να διαχωριστούν ικανοποιητικά οι πρωτεΐνες και στη συνέχεια με τάση 80 V (με τροφοδοτικό BIORAD – PowerPac Basic).

Πίνακας 3. 3

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης	Διάλυμα φόρτωσης	Πήκτωμα επιστοίβαξης 5%	Πήκτωμα διαχωρισμού 7.5%
250 mM Tris-HCl (pH 8.3) 192 mM Γλυκίνη 0.1 % (w/v) SDS	50 mM Tris-HCl (pH 6.8) 2% (w/v) SDS 0.1 % (w/v) κυανότης βρωμοφαινόλης 10% (v/v) γλυκερόλη 20% β - μερκαπτοαιθανόλη	0.125M Tris-HCl (pH 6.8) 5% (w/v) N,N methylene bisacrylamide 0.1% (w/v) APS 0.1% SDS 0.1% TEMED	0.375M Tris-HCl (pH 8.8) 7.5% (w/v) N,N methylene bisacrylamide* 0.1% (w/v) APS 0.1% SDS 0.05% TEMED

* αντίστοιχα προσαρμόζεται η ποσοστιαία σύσταση για πήκτωμα 12%



Σχήμα 3.20. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας προετοιμασίας της ηλεκτροφόρησης για ανάλυση κατά Western (ανατύπωση από [209])

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, απομακρύνεται το πήκτωμα επιστοίβαξης και το πήκτωμα διαχωρισμού χρησιμοποιείται για την μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Για την ταυτοποίηση της μοριακής μάζας της πρωτεΐνης που εντοπίζεται μετά την ανοσοαποτύπωση ή μετά από χρώση, χρησιμοποιείται μίγμα πρωτεϊνικών δεικτών γνωστών μοριακών βαρών και ποσότητας το οποίο αναλύεται παράλληλα στο ίδιο πήκτωμα.

3.6.3.3 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Οι πρωτεΐνες στη συνέχεια μεταφέρονται από το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, για να αυξηθεί η προσβασιμότητα των διαχωρισμένων πρωτεϊνών στα ειδικά αντισώματα κατά τη διαδικασία ανίχνευσής τους. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης έχει την ιδιότητα να δεσμεύει πρωτεΐνες με μη-ειδικό τρόπο και να τις ακινητοποιεί, επιτρέποντάς τους να διατηρούν όλες τις ιδιότητες. Η δέσμευση των πρωτεϊνών πάνω στη μεμβράνη, επιτυγχάνεται, μέσω υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τη μεμβράνη και ο εντοπισμός τους είναι δυνατός με την χρήση κατάλληλων ιχνηθετών [208].

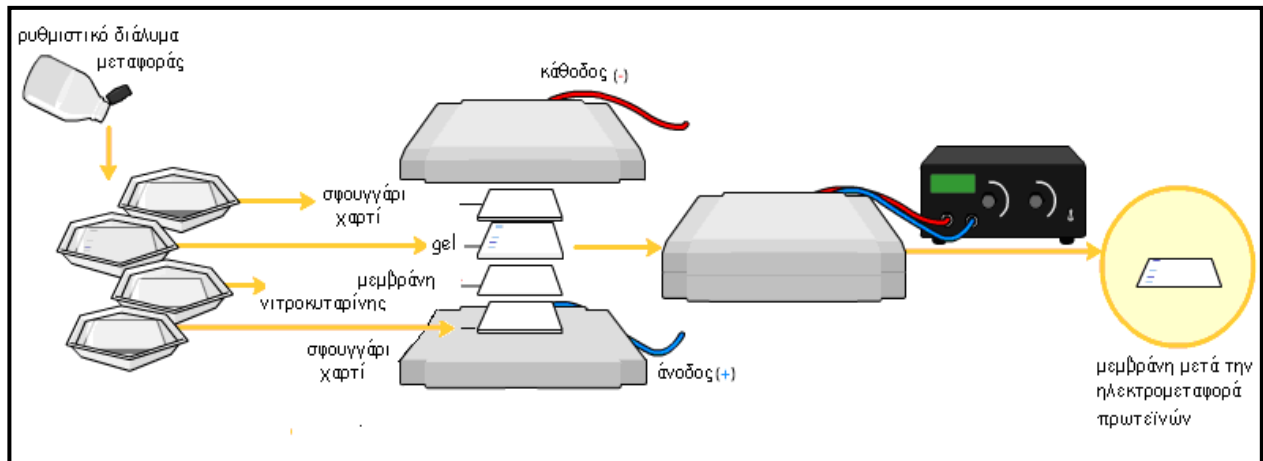
Η μεταφορά των πρωτεϊνικών ζωνών από το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης στο φίλτρο νιτροκυτταρίνης, γίνεται με επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, αφού προηγουμένως απομακρυνθεί το SDS από το πήκτωμα. Η απομάκρυνση του SDS από το πήκτωμα

γίνεται με επώαση του πήκτωματος σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Πίνακας 3.4) που περιέχει μεθανόλη. Η παραμονή του αρνητικά φορτισμένου SDS στις πρωτεϊνικές ζώνες του πήκτωματος, ενώ διευκολύνει τη μεταφορά τους, μετριάζει ωστόσο την ικανότητα πρόσδεσης στο φίλτρο. Η μεθανόλη απομακρύνει το SDS από το πήκτωμα και αυξάνει την ικανότητα πρόσδεσης των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς είναι αρκετά αλκαλικό (περίπου 8.3) και έτσι το φορτίο των πρωτεϊνών παραμένει αρνητικό αφού γενικά το pH των πρωτεϊνών είναι μικρότερο από 8.3. Η επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί την κίνηση των ζωνών προς την κάθοδο (θέση στην οποία έχει τοποθετηθεί το φίλτρο νιτροκυτταρίνης) [202]. Η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του εργαστηριακού οδηγού της Amersham και της BioRad που δίνονται συμπληρωματικά με τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και τη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς αντίστοιχα, και βασίζονται σε τροποποιήσεις ήδη δημοσιευμένων πρωτοκόλλων [206].

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα και το φίλτρο νιτροκυτταρίνης παραμένουν για 20 λεπτά στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Ακολουθεί η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνικών ζωνών στο φίλτρο νιτροκυτταρίνης για 2 ώρες (περίπου), με εφαρμοζόμενο ρεύμα έντασης 390 mA στους 40°C, υπό συνεχή ανάδευση. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με τη χρήση χημειοφωταύγειας.

Πίνακας 3. 4

Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς
25 mM Tris (pH 8.3) 192 mM Γλυκίνη 20% (v/v) Μεθανόλη



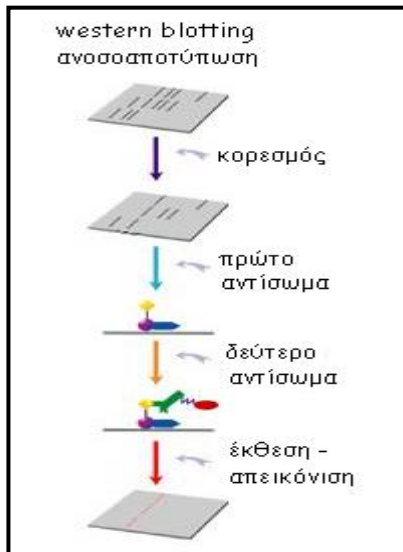
Σχήμα 3.21. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας προετοιμασίας της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών για ανάλυση κατά Western (ανατύπωση από [209])

3.6.3.4 Ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών με χρήση χημειοφωταύγειας

Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης που μελετάται πάνω στο φίλτρο νιτροκυτταρίνης, γίνεται έμμεσα με μονοκλωνικό/πολυκλωνικό αντίσωμα που συνδέεται με την πρωτεΐνη-αντιγόνο και με δεύτερο μονοκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει και προσδένεται στο Fc τμήμα του πρώτου αντισώματος. Το δεύτερο μονοκλωνικό αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (horseradish peroxidase). Η HRP οξειδώνεται παρουσία του H_2O_2 και η αντίδραση του οξειδωμένου ενζύμου με το υπόστρωμα λουμινόλη (luminol) προκαλώντας την εκπομπή φωτονίων [116] (σχήμα 3.22).

Τελικά η παραγωγή των φωτονίων αποτυπώνεται ως μια μαύρη ζώνη σε φιλμ αυτοραδιογραφίας. Η θέση αποτύπωσης της ζώνης στο φιλμ, αντιστοιχεί στη θέση του σχηματιζόμενου συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος στη μεμβράνη. Η οπτική πυκνότητα της ζώνης καθορίζεται από τη ποσότητα του αντιγόνου. Έτσι, μεταβολές της πυκνότητας των ζωνών που αντιστοιχούν στο ίδιο αντιγόνο, ανάμεσα σε δυο ισόποσα δείγματα ολικής πρωτεΐνης που αναλύονται με ανοσοαποτύπωση, αντιστοιχούν σε σχετική μεταβολή της ποσότητας του αντιγόνου [210]. Για να αποφευχθεί η μη ειδική διασύνδεση του αντισώματος πάνω στη μεμβράνη, η οποία έχει την ιδιότητα να δεσμεύει αδιακρίτως όλα τα είδη πρωτεϊνών, πριν την επώαση με το πρώτο αντίσωμα, γίνεται επώαση με παράγοντες που αποκλείουν αυτή την πρόσδεση, μέσω κορεσμού όλων των μη-ειδικών θέσεων πρόσδεσης της μεμβράνης. Συγκεκριμένα η επώαση γίνεται με άπαχο γάλα, παρουσία μικρής ποσότητας ήπιου απορρυπαντικού, όπως είναι το Tween 20 (Polysorbate 20 ή Polyoxyethylene (20) Sorbitan monolaurate),

(Πίνακας 3.5) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, σε ήπια ανάδευση (σε αναδευτήρα Stuart Bioline Scientific – see-saw-rocker).



Η διαδικασία αυτή (blocking) στοχεύει στη μείωση του «θορύβου» στην τελική εικόνα που λαμβάνεται μετά την ανοσοαποτύπωση και κυρίως στην αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων ανίχνευσης πρωτεϊνών.

Όλες οι επώσεις με τα αντισώματα γίνονται παρουσία άπαχου γάλακτος.

Σχήμα 3.22. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ανασοεντοπισμού των πρωτεϊνών

Ο ανοσοεντοπισμός των υπό εξέταση πρωτεϊνών γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του εργαστηριακού οδηγού της THERMO FISHER SCIENTIFIC – Pierce Protein Biology Products (Rockford, Illinois USA) [160], που δίνεται συμπληρωματικά με τη σειρά έτοιμων αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας.

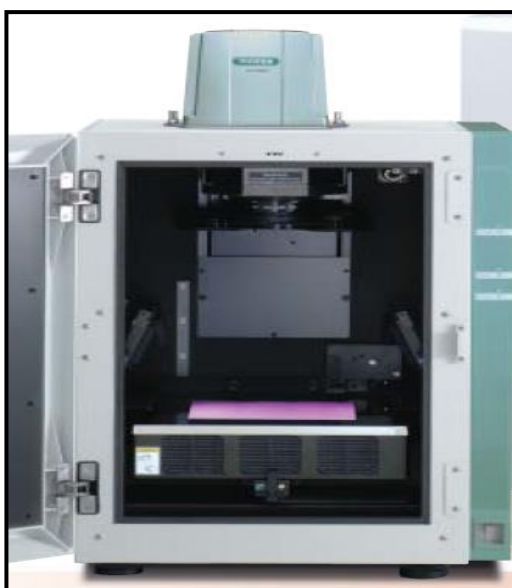
Η κάθε μεμβράνη πλένεται αρχικά για 15 λεπτά και στη συνέχεια δύο διαδοχικές φορές για 5 λεπτά με το διάλυμα πλύσης (Πίνακας 3.5). Στη συνέχεια, η μεμβράνη επώαζεται καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (περίπου 16 ώρες) σε θερμοκρασία 4°C, υπό ήπια ανακίνηση με διάλυμα επώασης (Πίνακας 3.4), στο οποίο προστέθηκε, σε κατάλληλη αραιώση, το αντίσωμα έναντι της υπό εξέταση πρωτεΐνης. Μετά το τέλος της επώασης ακολουθούν διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης με το διάλυμα πλύσης (Πίνακας 3.5) [116].

Η μεμβράνη επώαζεται για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανακίνηση με το διάλυμα επώασης (Πίνακας 3.5) στο οποίο προστέθηκε το δεύτερο αντίσωμα, σε κατάλληλη συγκέντρωση. Το δεύτερο αντίσωμα, όπως προαναφέρθηκε είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP. Ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις της μεμβράνης με το διάλυμα πλύσης (Πίνακας 3.5) και επώαση για 5 λεπτά με το μίγμα έτοιμων αντιδραστηρίων χημειοφωταύγειας που περιέχουν H₂O₂ και λουμινόλη. Η HRP οξειδώνεται παρουσία H₂O₂, αντιδρά με τη λουμινόλη, οξειδώνοντάς την, και προκαλεί

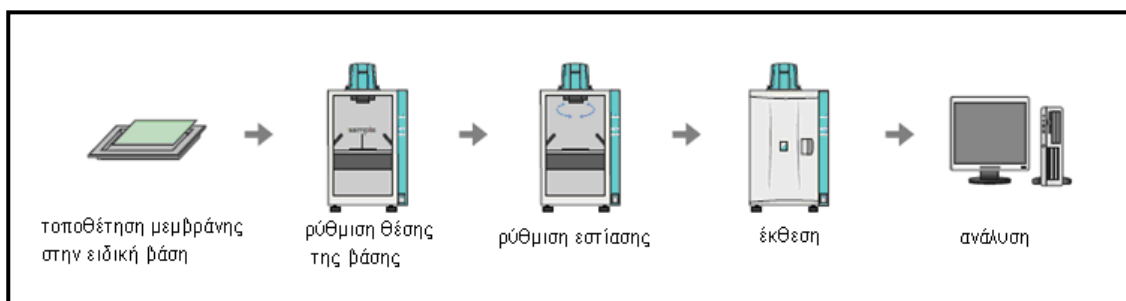
εκπομπή φωτονίων, η διάρκεια της οποίας ενισχύεται, με την παρουσία κάποιου ενισχυτή, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία του συστήματος [210].

Η έκθεση της μεμβράνης, στην πρώτη σειρά πειραμάτων, που αφορούσαν στις μετρήσεις για το TiO_2 sol-gel, έγινε σε φιλμ αυτοραδιογραφίας. Ο χρόνος έκθεσης εξαρτάται από την ένταση της ζώνης του συμπλέγματος, που καθορίζεται τόσο από τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης, όσο και από την συγγένεια που παρουσιάζει το χρησιμοποιούμενο πρωτογενές αντίσωμα με την πρωτεΐνη.

Στα επόμενα πειράματα η έκθεση της μεμβράνης έγινε σε συσκευή Luminescent Image Analyser LAS-4000 (Εικόνα 3.23), εξοπλισμένη με κάμερα τύπου CCD chip και ειδικό λογισμικό LAS-4000 Image Reader για έλεγχο όλης της διαδικασίας, ανάλυση και αποθήκευση εικόνων και λογισμικό AIDA Image Analyser για μετατροπή εικόνων σε επεξεργάσιμη, από κοινό υπολογιστή, μορφή [211].



Εικόνα 3.23. Συσκευή
Image Analyser LAS-4000
(ανατύπωση από [211])



Σχήμα 3.24. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας έκθεσης της μεμβράνης και ανάλυσης των αποτελεσμάτων ανοσοαποτύπωσης (ανατύπωση από [211])

Στην περίπτωση ανίχνευσης των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, το ισόποσο φόρτωμα μεταξύ των δειγμάτων ελέγχθηκε ως εξής: μετά την πρώτη εμφάνιση του φιλμ, η εκάστοτε μεμβράνη επώαστηκε για 20 λεπτά με έτοιμο αντιδραστήριο απομάκρυνσης αντισωμάτων (RE-BLOT PLUS Western Blot Stripping Solution – MILLIPORE, Billerica, Massachusetts, US) [208] και ανοσοαποτυπώθηκε με αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης, με την ίδια διαδικασία ξεκινώντας από το στάδιο του κορεσμού. Το ποσό της τουμπουλίνης, που εμφανίζεται για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων της υπό εξέταση πρωτεΐνης στα δείγματα που αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση.

Πίνακας 3.4

ρυθμιστικό διάλυμα	διάλυμα	διάλυμα	διάλυμα
TBS	κορεσμού	πλύσης	ετώασης
20 mM Tris-HCl (pH 7.6)	TBS (pH 7.6)	TBS (pH 7.6)	TBS (pH 7.6)
137 mM NaCl	5% άπαχο γάλα	0.1% Tween-20	5% άπαχο γάλα
	0.1% Tween-20		

3.6.3.5 Πυκνομετρική ανάλυση

Τα αποτελέσματα από τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western που έγιναν με έκθεση των μεμβρανών σε φιλμ αυτοραδιογραφίας, μεταφέρθηκαν σε αρχεία προς επεξεργασία, με scanner HP Photosmart C4180 All-in-One και οι πυκνότητες των ζωνών χημειοφωταύγειας αναλύθηκαν με τη χρήση δύο διαφορετικών ειδικών λογισμικών επεξεργασίας εικόνας (IDL και ImageJ).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που έγιναν στη συσκευή Luminescent Image Analyser LAS-4000, FujiFilm, παρελήφθησαν σε επεξεργάσιμη μορφή, από το ίδιο σύστημα και η ανάλυση των οπτικών πυκνοτήτων έγινε και πάλι με τη χρήση των λογισμικών επεξεργασίας εικόνας, που προαναφέρθηκαν (IDL και ImageJ).

3.7 Μέθοδος ποσοτικοποίησης του κατακερματισμένου DNA (DNA fragmentation) - Κατάτμηση DNA (DNA laddering)

Κατά την απόπτωση, τα κύτταρα καταλήγουν να έχουν κατακερματισμένο DNA, εξαιτίας της δράσης κυτταρικών ενδονουκλεασών. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία τμημάτων DNA μεγέθους 200–480 ζευγών βάσεων.

Πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση και την εκτίμηση του κατακερματισμένου (fragmented) DNA, ως ένδειξη αποπτωτικού θανάτου του, προς μελέτη δείγματος. Ανάμεσα στις πιο γνωστές ποιοτικές μεθόδους, είναι και η ανίχνευση των χαρακτηριστικών ζωνών του κατακερματισμένου DNA σε πήκτωμα αγαρόζης [209], και το Comet assay [116].

Υπάρχουν επίσης και οι ακόλουθες μέθοδοι για τη μέτρηση του κατακερματισμένου DNA (α) έμμεσα, μετρώντας τον αριθμό των εγκοπών (DNA nicks) και (β) άμεσα, ποσοτικοποιώντας το κατακερματισμένο DNA που έχει απομονωθεί από την υπόλοιπη άθικτη χρωματίνη με φυγοκέντρηση:

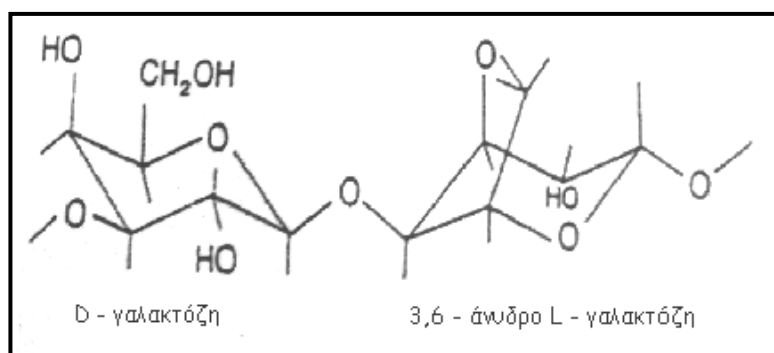
(α₁) η μέθοδος TUNEL (TdT-mediated X-dUTP nick endlabeling) που επιτυγχάνεται από τη λειτουργία του ενζύμου τελική δεοξυριβονουκλεοτίδυλο- τρανσφεράση (terminal deoxynucleotidyl transferase), που προσθέτει τεχνητά φθορίζοντα νουκλεοτίδια σε περιοχές θραύσης της μίας έλικας του DNA (single nicks), αλλά και σε περιοχές όπου έχουν κοπεί και οι δύο έλικες του DNA (double breaks) [210], (α₂) η μέθοδος εκτύλιξης του DNA, (DNA unwinding assay), όπου η ανθεκτικότητα στην εκτύλιξη του DNA, κάτω από αλκαλικές συνθήκες είναι αντιστρόφως ανάλογη με τον αριθμό εγκοπών της μίας έλικας του DNA, αλλά και με τον αριθμό σπασμάτων και στις δύο έλικες του DNA [212], (α₃) η μέθοδος ενσωμάτωσης [3H]-θυμιδίνης στο DNA πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, όπου ανιχνεύεται η ραδιενέργεια των κατακερματισμένων θραυσμάτων DNA, ύστερα από το διαχωρισμό τους από την υπόλοιπη χρωματίνη με φυγοκέντρηση [213] και η μη ραδιενεργός παραλλαγή αυτής της μεθόδου με την DNA-ενσωμάτωση 5-βρωμο-2-δεοξουριδίνης (BrdU incorporation assay) και ανοσοανίχνευση (ELISA) [214], (β₁) η μέθοδος της διφαινυλαμίνης, όπου το κατακερματισμένο DNA απομονώνεται από την υπόλοιπη χρωματίνη με φυγοκέντρηση και ανιχνεύεται φωτομετρικά από το προϊόν αντίδρασης της διφαινυλαμίνης με τις ριβόζες [215], (β₂) η μέθοδος απομόνωσης του κατακερματισμένου DNA από πήκτωμα αγαρόζης και ποσοτικοποίησης του με τη φθορίζουσα χρωστική Hoechst [216].

3.7.1 Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος αγαρόζης

Η τεχνική χρησιμοποιείται ευρύτατα για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών του ορού, των ισοενζύμων, των κλασμάτων των λιποπρωτεϊνών, καθώς και των νουκλεϊνικών οξέων.

Η αγαρόζη εξάγεται από τα φύκια. Είναι ένα γραμμικό πολυμερές, του οποίου η βασική δομή φαίνεται στο σχήμα 3.25.

Το πήκτωμα αγαρόζης αποτελείται από πυκνό δίκτυο ουδέτερων πολυσακχαριτών, των οποίων οι αλυσίδες σχηματίζουν πόρους κατά το σχηματισμό του [217].



Σχήμα 3.25. Δομή της αγαρόζης (ανατύπωση από [217])

Διάλυμα αγαρόζης σε θερμοκρασία 100°C πολυμερίζεται, δημιουργώντας ένα κολλοειδές διάλυμα που πήζει σε θερμοκρασία μικρότερη των 45°C. Το πήκτωμα αγαρόζης, λόγω των μεγάλων πόρων που σχηματίζονται κατά τον πολυμερισμό, αποτελεί ένα ικανοποιητικό ηλεκτροφορητικό υλικό, που δεν εμποδίζει στερεοχημικά την ελεύθερη μετακίνηση των βιομακρομορίων [217].

3.7.1.1 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίζει μίγμα τμημάτων DNA, που δεν διαχωρίζονται επαρκώς με άλλες μεθόδους. Στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA, σε ουδέτερο pH, είναι αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων του. Έτσι, τα διάφορα μόρια DNA, μετακινούνται κατά την ηλεκτροφόρηση προς το θετικό ηλεκτρόδιο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων τους [218]. Δηλαδή, τα μικρότερα μόρια, μετακινούνται γρηγορότερα από τα πιο μεγάλα και έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός μορίων διαφορετικού μήκους. Το πήκτωμα εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων και έτσι τα μόρια διαφορετικού

μήκους διαχωρίζονται σε «ζώνες». Οι ζώνες καθίστανται ορατές, κατόπιν σύνδεσης του DNA με ειδικά μόρια (επί παραδείγματι βρωμιούχο αιθίδιο - EtBr), τα οποία έχουν την ικανότητα να παρεμβάλλονται στη διπλή έλικα και να σχηματίζουν φθορίζοντα σύμπλοκα με το DNA. Έτσι, είναι στη διακριτική ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει ακόμη και ποσότητα 1 ng DNA, με άμεση εξέταση του πηκτώματος, μετά από διεγερσή του με ακτινοβολία UV [219].

Παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα μετακίνησης του DNA

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα μετακίνησης του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης είναι:

- ✚ το μοριακό μέγεθος του DNA (γραμμικά μόρια δίκλωνου DNA μετακινούνται με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογάριθμου (\log_{10}) του αριθμού των ζευγών βάσεων τους. τα μεγαλύτερα μόρια κινούνται πιο αργά, λόγω μεγαλύτερης τριβής και λόγω του γεγονότος ότι διαπερνούν δυσκολότερα τους πόρους του πηκτώματος) [207], [220].
- ✚ η διαμόρφωση του DNA (κλειστά κυκλικά (μορφή I), κυκλικά με κομμένη τη μία αλυσίδα (μορφή II) και γραμμικά DNA του ίδιο μοριακού βάρους μετακινούνται στο πήκτωμα με διαφορετικές ταχύτητες. Οι σχετικές ταχύτητες των μορίων αυτών, σχετίζονται με τη συγκέντρωση της αγαρόζης, την τάση του εφαρμοζόμενου ρεύματος, την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και την πυκνότητα των υπερελικωμένων στροφών στη μορφή I του DNA. Υπό ορισμένες συνθήκες η μορφή I και υπό άλλες συνθήκες η σειρά αντιστρέφεται) [207], [220].
- ✚ η συγκέντρωση της αγαρόζης (ένα δεδομένο τμήμα DNA τρέχει με διαφορετική ταχύτητα σε πηκτές με διαφορετική συγκέντρωση αγαρόζης. Υπάρχει μία γραμμική σχέση μεταξύ του λογαρίθμου της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του DNA (μ) και της συγκέντρωσης του πηκτώματος σε αγαρόζη (τ):

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_r \tau \quad (3.2)$$

- ✚ , όπου μ_0 είναι η ελεύθερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα και K_r ο συντελεστής καθυστέρησης που σχετίζεται με τις ιδιότητες του πηκτώματος και το μέγεθος και το σχήμα των μορίων DNA. Έτσι χρησιμοποιώντας πηκτές διαφορετικών

συγκεντρώσεων, διαχωρίζονται τμήματα DNA με μεγάλο εύρος. Στον πίνακα 3.6 φαίνεται η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης της αγαρόζης και το μέγεθος του DNA που διαχωρίζει ικανοποιητικά [207], [220].

Πίνακας 3.6

Αγαρόζη (%w/v)	DNA (kb)
0.3	5 - 60
0.6	1 - 20
0.7	0.8 - 10
0.9	0.5 - 7
1.2	0.4 - 6
1.5	0.2 - 3
2.0	0.1 - 2

- ✚ η εφαρμοζόμενη τάση (σε χαμηλή τάση, η ταχύτητα μετακίνησης του γραμμικού DNA είναι ανάλογη προς την εφαρμοζόμενη τάση. Όμως, καθώς η τάση αυξάνεται, η κινητικότητα των τμημάτων του DNA με μεγάλο μοριακό βάρος, αυξάνεται διαφορικά. Άρα αυξανόμενης της τάσης, μειώνεται ο αποτελεσματικός διαχωρισμός των τμημάτων του DNA).
- ✚ η παρουσία παρεμβαλλόμενων χρωστικών (το EtBr είναι φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Μειώνει την ηλεκτροφορητική κινητικότητα κατά 15%).
- ✚ η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης (η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA επηρεάζεται από τη σύσταση και την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται. Τα συνήθη ρυθμιστικά διαλύματα είναι τα TAE (Tris – Acetate – EDTA ή Tris/οξικό οξύ (CH₃COOH)/EDTA), TPE (Tris – Phosphate – EDTA ή Tris/ φωσφορικό οξύ (H₃PO₄) /EDTA) και TBE (Tris - Borate (H₃BO₃) - EDTA ή Tris/βορικό οξύ/EDTA) [207], [220].
- ✚ η σύσταση των βάσεων και η θερμοκρασία (η ηλεκτροφορητική συμπεριφορά του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (σε αντίθεση με το πήκτωμα

πολυακρυλαμιδίου), δεν επηρεάζεται σημαντικά ούτε από τη σύσταση βάσεων του DNA, ούτε από τη θερμοκρασία στη οποία διαδραματίζεται η πειραματική διαδικασία. Έτσι σε θερμοκρασίες 4°C - 30°C οι σχετικές ηλεκτροφορητικές κινητικότητες των θραυσμάτων DNA διαφορετικών μεγεθών δεν αλλάζουν σημαντικά. Συνήθως η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου) [207], [220].

Μετά από δοκιμές σε διάφορα πρωτόκολλα που προτείνονται για απομόνωση DNA, όπως επί παραδείγματι μεθοδολογία διαχωρισμού του ανέπαφου τμήματος του βιομορίου, από το κατακερματισμένο μέρος του, διαπιστώθηκε ότι είναι καλύτερο στην εφαρμογή του το πρωτόκολλο που οδηγεί στην απομόνωση του ολικού DNA, και αυτή εφαρμόστηκε μετέπειτα σε όλες τις σειρές πειραμάτων. Έτσι, για τις ανάγκες του ελέγχου του κατακερματισμού του DNA των κυττάρων, διατηρείται καλλιέργεια και από τις δύο κυτταρικές σειρές, σε πλάκες 6 φρεατίων (6-well plates) για 24 ώρες. Κατόπιν, στην πρώτη σειρά πειραμάτων προστίθεται sol-gel TiO₂ (15μM) και ακολουθεί ακτινοβολία για 20 λεπτά με ακτινοβολία UV-A (350nm), ενώ ως θετικός μάρτυρας του πειράματος ορίζεται δείγμα, στο οποίο εισάγεται σταυροσπορίνη (200 nM). Ακριβώς η ίδια διαδικασία ακολουθείται για καθένα από τα εναιωρήματα TiO₂, TiO₂ Evonik P25 (20μM), TiO₂ Sigma - Aldrich (100% ανατάσης) (20μM), τροποποιημένο με Άργυρο, TiO₂ (Ag-doped TiO₂) (20μM), ενώ για το τροποποιημένο με Άζωτο TiO₂ (N-doped TiO₂) (40μM) η ακτινοβολία έγινε με ακτινοβολία ορατού φωτός (λάμπες για 20 λεπτά και επώαση 48 ωρών. Ως θετικός μάρτυρας των πειραμάτων με τα εναιωρήματα TiO₂ ορίζεται δείγμα, στο οποίο εισάγεται cis-platin (1 mg/ml). Όλες οι σειρές πειραμάτων πραγματοποιούνται αφού έχει ολοκληρωθεί η μελέτη του χαρακτηρισμού κάθε είδους TiO₂.

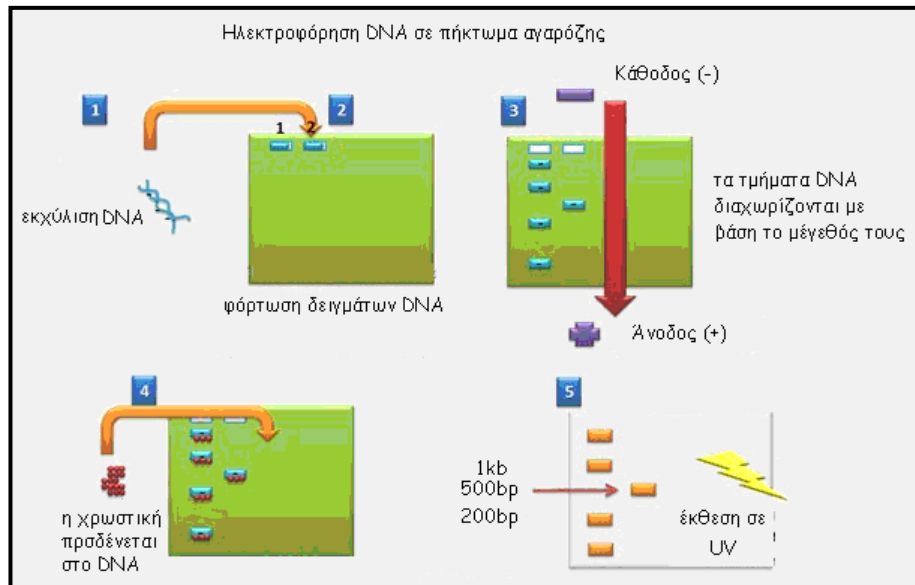
Σύμφωνα με το πρωτόκολλο που τελικά επιλέχθηκε, τα κύτταρα αρχικά αποκολλούνται με προσεκτική απόξεση από το υπόστρωμα και φυγοκεντρώνονται στις 1000rpm για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, τα κύτταρα πλένονται σε 1 ml PBS, μεταφέρονται σε μικροσωλήνα erpendorf (χωρητικότητας 1.5 ml) και φυγοκεντρώνονται στις 1000rpm για 5 λεπτά. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται ποσότητα 90 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης DNA (DNA extraction buffer) (Πίνακας 3.7) σε κάθε δείγμα. Επαναλαμβάνονται μερικές

προσεχτικές αναρροφήσεις με πιπέτα, με τρόπο ώστε να μην πληγωθεί ή κατακερματιστεί το gDNA (γονιδιακό DNA – genomic DNA). Τελικά προκύπτει ένα αρκετά παχύρρευστο προϊόν, στο οποίο προστίθενται 10μl RNase A (τελική συγκέντρωση 5 μg/μl). Αναμιγνύεται καλά με επαναλαμβανόμενες αναρροφήσεις και αφήνεται προς επώαση για 2 ώρες στους 56 °C. Έπειτα προστίθενται σε κάθε δείγμα Proteinase K (τελική συγκέντρωση 1 μg/μl), αναμιγνύεται καλά και επώάζεται για 18 ώρες περίπου (κατά τη διάρκεια της νύχτας) στους 50°C.

Στη συνέχεια ακολουθεί η κατακρήμνιση του DNA. Συγκεκριμένα, προστίθενται και αναμιγνύονται σχολαστικά 65 μl οξικού αμμωνίου (ammonium acetate $\text{CH}_3\text{COONH}_4$) και αμέσως μετά προστίθεται παγωμένη αιθανόλη (500 μl) και τα δείγματα αφήνονται για μία ώρα στους -80°C. Ακολούθως φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά στις 16000rpm. Το ίζημα πλένεται με 500 μl παγωμένης αιθανόλης 80% και αφήνεται για 10 λεπτά, μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη και στη συνέχεια επαναδιαλύεται σε 50 μl διαλύματος TE (Tris –EDTA) (Πίνακας 3.7). Αφήνονται στους 4°C για 24 (ή 48) ώρες. Ακολουθεί ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA (σύμφωνα με την αναλογία των οπτικών πυκνοτήτων $A_{260}/A_{280} = 1.8 - 2.0$, $O.D_{260}=50\text{mg DNA}$) και παρασκευάζεται το πήκτωμα αγαρόζης (1.5-2% w/v) της ηλεκτροφόρησης. Αφού αναμιχθούν τα απαραίτητα συστατικά (Πίνακας 3.7) θερμαίνονται, μέχρι να διαλυθεί εντελώς η αγαρόζη στους 100°C και μετά το διάλυμα παγώνει μέχρι τους 60°C, όπου και μεταφέρεται στη συσκευή πήξης και αφήνεται, αφού έχουν τοποθετηθεί φόρμες δημιουργίας πολλαπλών υποδοχών, για να εξελιχθεί σε πήκτωμα. Στη συνέχεια μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και καλύπτεται πλήρως από ρυθμιστικό διάλυμα TAE.

Ταυτόχρονα προετοιμάζονται τα δείγματα. Αρχικά φυγοκεντρώνονται έντονα (quick spin) και στη συνέχεια μεταφέρονται 25 μl από το καθένα σε μικρούς σωλήνες και προστίθεται χρωστική ουσία (loading dye) FERMENTAS INTERNATIONAL (Ontario, Canada). Ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων και των κατάλληλων δεικτών DNA γνωστού μήκους και η ηλεκτροφόρηση με σταθερή τάση 100V (προτείνεται τάση 4-5 Volts / cm συσκευής). Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα EtBr (0.5 μg/ml) και το πήκτωμα βάφεται για μία περίπου ώρα (για εξοικονόμηση χρόνου αυτή η χρώση μπορεί να γίνει παράλληλα με την τελευταία ώρα της ηλεκτροφόρησης).

Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει την έκθεση του πηκτώματος σε ακτινοβολία UV και λήψη εικόνων.



Σχήμα 3.26. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (ανατύπωση από [221])

Πίνακας 3.7

ρυθμιστικό διάλυμα εγχύλισης DNA	ρυθμιστικό διάλυμα TE	ρυθμιστικό διάλυμα TAE (10x)	πήκτωμα αγαρόζης (2% w/v)	ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης	διάλυμα χρώσης
1% NP-40	1mM EDTA	10mM EDTA	10% TAE	10% TAE	TAE (pH 8)
1% SDS	10 mM	0.4 M Tris acetate	2% αγαρόζη		EtBr (0.5 µg/ml)
10 mM EDTA	Tris-HCl (pH 7.4)				
50 mM					
Tris-HCl (pH 7.5)					

3.8 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Οι μέσες τιμές των αποτελεσμάτων προέκυψαν μετά από επανάληψη των δοκιμασιών τουλάχιστον τρεις φορές. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA - **AN**alysis **O**f **V**ariance), με τη χρήση του λογισμικού SPSS. Επιπρόσθετα εφαρμόστηκε και ο απαραμετρικός έλεγχος των Kruskal-Wallis, που εφαρμόζεται όταν δεν πληρούνται οι προϋποθέσεις εφαρμογής του παραμετρικού ελέγχου ANOVA, για έλεγχο της ορθότητας της ανάλυσης που προηγήθηκε.

Αποτελέσματα

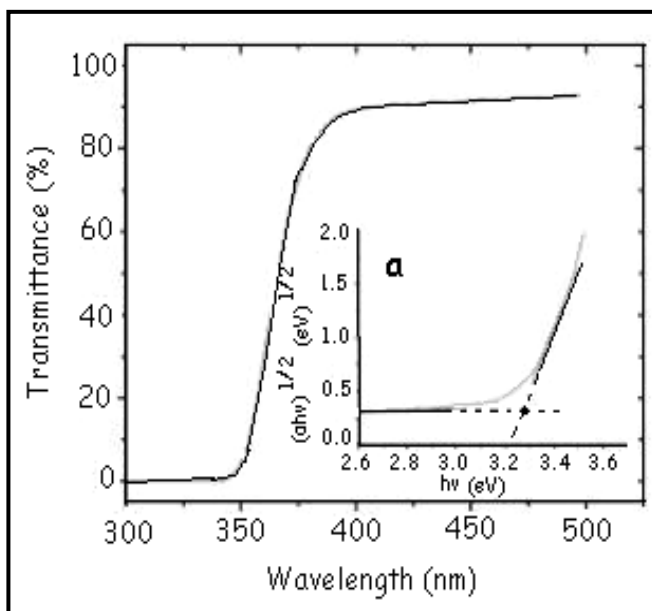
ύλαιο

4

Αποτελέσματα

Κεφάλαιο 4^ο4.1 Χαρακτηρισμός TiO₂4.1.1. Χαρακτηρισμός του λύματος - πηκτής (sol – gel) TiO₂

Σταγόνες sol – gel TiO₂ τοποθετήθηκαν σε κρυστάλλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 10 mm και στη συνέχεια εισήχθησαν σε φασματόμετρο Hitachi 3010. Τα φάσματα εκπομπής τους καταγράφηκαν με τεχνική φασματομετρίας, στην περιοχή μηκών κύματος μεταξύ 300 – 500 nm (εικόνα 4.1). Το pH του sol – gel TiO₂ είναι 1.5.



Εικόνα 4.1. Το φάσμα εκπομπής του sol – gel TiO₂ καταγράφεται στην περιοχή μηκών κύματος 300 - 500 nm. Ένα μέρος του, αντιστοιχεί στο υπεριώδες τμήμα, ενώ το υπόλοιπο αντιστοιχεί στην ορατή περιοχή του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Στην ένθετη εικόνα (α) παρατίθεται η σχέση μεταξύ της ενέργειας των φωτονίων $h \cdot \nu$ (eV) και του μεγέθους $(\alpha h \nu)^{1/2}$.

Για να εκτιμηθεί η απορρόφηση του ενεργειακού χάσματος, δηλαδή η ενέργεια που πρέπει να δοθεί στο σύστημα, ώστε να επιτευχθεί μετάβαση των ηλεκτρονίων από τη ζώνη σθένους στη ζώνη αγωγιμότητας, υπολογίζεται ο συντελεστής απορρόφησης α από τη σχέση $\alpha = -\log(T)$, όπου T ο συντελεστής εκπομπής. Στη συνέχεια γίνεται η γραφική παράσταση του μεγέθους $(\alpha h \nu)^{1/2}$ σαν συνάρτηση της ενέργειας ($h \cdot \nu$) των φωτονίων (ένθετη εικόνα 1α), που προκύπτει από εκτίμηση σε έμμεση μετάβαση από τη ζώνη χάσματος που γενικώς είναι αποδεκτή για το TiO₂ [222]. Προεκτείνοντας το γραμμικό τμήμα της γραφικής παράστασης της συνάρτησης $(\alpha h \nu)^{1/2}$, στις χαμηλές και τις υψηλές ενέργειες, το σημείο τομής των δύο ευθειών φαίνεται πως είναι 3.28 eV (ένθετη εικόνα 4. 1α) [223].

Αυτή η τιμή που προκύπτει προσεγγίζει ικανοποιητικά την αντίστοιχη τιμή της κρυσταλλικής μορφής του ανατάση, που αντιστοιχεί στα 3.25 eV [223].

Αυτή η μικρή διαφορά των 0.03 eV, μπορεί να σχετίζεται με την επίδραση του μεγέθους των νανοσωματιδίων [224]. Φυσικά, τα αποτελέσματα αυτά δεν συμπεριλαμβάνουν το άμορφο TiO₂. Στην περίπτωση αυτή, η αντίστοιχη τιμή είναι αισθητά μεγαλύτερη, αφού αγγίζει τα 3.5 eV. Μάλιστα, αυτή η διαφορά στην τιμή του ενεργειακού κατωφλίου, συνηθίζεται να αποτελεί κριτήριο για την αξιολόγηση του είδους της κρυσταλλικής φάσης του sol-gel, αφού είναι μάλλον εύκολος και σίγουρα αρκετά αξιόπιστος τρόπος [225].

Η προσπάθεια χαρακτηρισμού του λύματος - πηκτής δεν ήταν ιδιαίτερα επιτυχής μέσω μέτρησης Raman. Έτσι επιλέχθηκε η τεχνική micro-Raman. Στην επιφάνεια ενός αποστειρωμένου τριβλίου, δημιουργήθηκε ένα λεπτό στρώμα από μικρές σταγόνες του sol - gel, που αφέθηκαν να στεγνώσουν για να δημιουργήσουν μία λευκή μεμβράνη. Ακολούθησε micro-Raman φασματοσκοπία, με φασματόμετρο διασποράς, Renishaw InVia - Reflex, σε διάταξη οπιοσθοσκέδασης. Η διέγερση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση laser ιόντων Αργού (εκπομπή στα 514.5 nm).

Η διάταξη περιλαμβάνει ανιχνευτή CCD (charge-coupled device) («συσκευή (ή διάταξη) συζευγμένου φορτίου») υψηλής ευαισθησίας, για τη λήψη σήματος, που τελικά προβάλλεται στην οθόνη ενός υπολογιστή.

Ουσιαστικά το sol-gel TiO₂ αξιολογήθηκε, με μία ακόμη μέθοδο, ως προς τη κρυσταλλική του φάση. Το φάσμα που πρόεκυψε φαίνεται στην εικόνα 4.2.

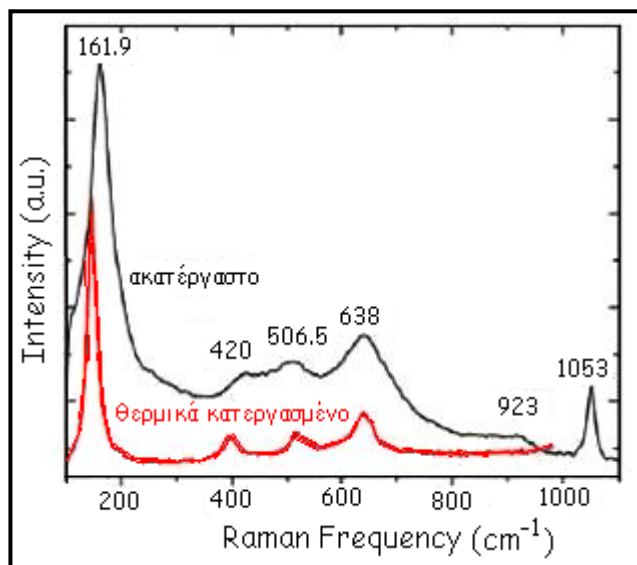
Παρατίθεται και το φάσμα του sol-gel TiO₂ μετά από ανόπτηση⁹ στους 450°C για 2 ώρες, για περαιτέρω σύγκριση. Η εικόνα που λαμβάνεται από αυτό, το θερμικά κατεργασμένο sol-gel TiO₂, δηλαδή η συχνότητα και το εύρος, προσεγγίζει τα χαρακτηριστικά του φάσματος που προκύπτει από φασματομετρία σε μεγαλύτερου μεγέθους νανοσωματίδια (μεγαλύτερα από 10nm) [60], [226].

Φαίνεται πως, μετά την ανόπτηση, τα νανοσωματίδια συγκρούονται, σχηματίζοντας μεγαλύτερους νανοκρυστάλλους ανατάση.

Το φάσμα του ακατέργαστου sol-gel TiO₂, παρουσιάζει ομοιότητες στο πλήθος των κορυφών και στις περιοχές εμφάνισής τους και σε σχετικές τιμές έντασης (intensity), με

⁹ Ανόπτηση είναι η θερμική επεξεργασία που υφίστανται συχνά κάποια μέταλλα ή κράματα στην τελική φάση, για να βελτιωθούν μερικά τεχνικά χαρακτηριστικά τους. Επιτυγχάνεται με θέρμανση σε θερμοκρασία χαμηλότερη του βαθμού τήξης και με αργό ρυθμό απόψυξης. Σε κάποιες περιπτώσεις σκοπός είναι η ομογενοποίηση των κραμάτων, η ελάττωση των διαστάσεων των μεταλλικών κόκκων και η εξάλειψη των εσωτερικών τάσεων που δημιουργούνται από ομοιόμορφη ψύξη ή και στις επεξεργασίες ελίκωσης και ελασματοποίησης.

το φάσμα του θερμικά κατεργασμένου sol-gel TiO_2 , επιβεβαιώνοντας ότι είναι κρυσταλλωμένο στη μορφή του ανατάση.



Εικόνα 4.2. Το φάσμα Raman του sol – gel TiO_2 , πριν και μετά από ανόπτηση στους 450°C για 2 ώρες. Η μετατόπιση και η πλάτυνση της καμπύλης στην περίπτωση του ακατέργαστου sol-gel TiO_2 πιθανότατα σχετίζεται με το δραστικό φαινόμενο περιορισμού των φωνονίων² (phonon confinement) στις οριακές περιοχές των νανοκρυστάλλων.

Η αισθητή μετατόπιση και η πλάτυνση της καμπύλης στην περίπτωση του ακατέργαστου sol-gel TiO_2 πιθανότατα σχετίζεται με το δραστικό φαινόμενο περιορισμού των φωνονίων¹⁰ (phonon confinement) στις οριακές περιοχές των νανοκρυστάλλων μικρού μεγέθους. Γενικώς, οι αλλαγές στο φάσμα Raman, του ανατάση, τη φάση που απαντάται συχνότερα σε συνθήκες περιβαλλοντικές συνθήκες, σχετίζονται κυρίως με το φαινόμενο του περιορισμού των φωνονίων (phonon confinement) [228], [229], [230], αλλά και με την έλλειψη στοιχειομετρίας στα υλικά (non-stoichiometry) [231].

Έτσι, από την πρώτη (κύρια) κορυφή του φάσματος (θέση: 161.9 cm^{-1} και εύρος: 41 cm^{-1}) με κατάλληλους υπολογισμούς, μπορεί να εκτιμηθεί κατά μέσο όρο, το μέγεθος των νανοσωματιδίων. Υπολογίζεται περίπου στα 2 nm, σύμφωνα με το μοντέλο του περιορισμού των φωνονίων.

¹⁰ Η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με ένα κρύσταλλο, συμπεριλαμβάνει και την κίνηση των συστατικών ατόμων στο πλέγμα.

Το πλέγμα έχει ένα σύνολο από διακριτούς ρυθμούς δόνησης, γνωστούς ως κβάντα ενέργειας ταλάντωσης ή φωνόνια (Phonons). Οι μεταβολές στην κατάσταση δόνησης του κρυστάλλου μπορεί να συνοδεύονται από μεταβολές στην διπολική ροπή, επιτρέποντας να συμβεί μια σύζευξη μεταξύ των ατομικών κινήσεων και του προσπίπτοντος πεδίου ακτινοβολίας προκαλώντας απορρόφηση. Αυτή η αλληλεπίδραση καθορίζει σε σημαντικό βαθμό, τις οπτικές ιδιότητες των στερεών (κυρίως στο εύρος του μήκους κύματος από 10-100 μm).

Τα φωνόνια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και για τις αλληλεπιδράσεις αυτές ισχύουν οι βασικές αρχές της διατήρησης της ενέργειας και τη ορμής [227].

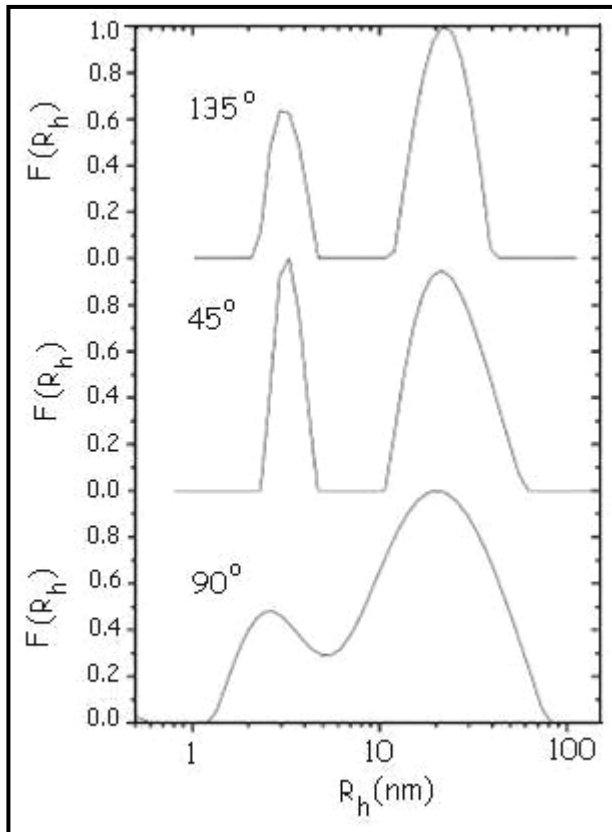
Τέτοιου μεγέθους νανοσωματίδια ανατάση, έχουν μελετηθεί ενδελεχώς φασματοσκοπικά με Raman φασματομετρία [225], [228], αποκαλύπτοντας παρόμοια φασματομετρικά χαρακτηριστικά. Οι κορυφές που σχηματίζονται στις θέσεις 923 και 1053 cm^{-1} σχετίζονται με δονήσεις τύπου $\nu(\text{N}-(\text{OH}))$ και $\nu_{15}(\text{NO}_3)$, του νιτρικού οξέος (HNO_3) μέσα στο sol-gel [230].

Για τον πλήρη χαρακτηρισμό του sol-gel TiO_2 ακολούθησε, στη συνέχεια, δυναμική μέτρηση σκέδασης φωτός (Dynamic light scattering (DLS)) σε «γηρασμένα» sol-gel, 10 μέρες μετά την παρασκευή τους (aged sols), μετά από φιλτράρισμα, με μεμβράνη πορώδους $0,45\ \mu\text{m}$ (Millipore).

Στην εικόνα 4.3 παρουσιάζεται η κατανομή των υδροδυναμικών ακτίνων στις 90° για το sol-gel. Εμφανίζονται δύο διαφορετικά περιοχές διάχυσης, μετά από την ανάλυση των αποτελεσμάτων και τη μετατροπή σε ένταση, σταθμισμένη ως προς την κατανομή των υδροδυναμικών ακτίνων.

Η πρώτη παρουσιάζει μία μέση τιμή περίπου στα 2.6 nm και αρκετά στενό εύρος και απεικονίζει προφανώς την κατανομή του μεγέθους των μεμονωμένων νανοσωματιδίων. Η δεύτερη εμφανίζει μία μέση τιμή περίπου στα 20 nm και πιο μεγάλο εύρος, προφανώς αντικατοπτρίζει τα συσσωματώματα των νανοσωματιδίων. Τα μεγάλα συσσωματώματα σκεδάζουν περισσότερο την ακτινοβολία της δέσμης laser, από ό,τι τα μικρότερα και αυτό σημαίνει ότι το πλήθος των συσσωματωμάτων που πραγματικά υπάρχουν είναι πολύ μικρότερο, από αυτό το φαινόμενο (στιγμιαίο) πλήθος, που λαμβάνεται ως αποτέλεσμα. Δηλαδή, εις γνώση μας, υφίσταται μία υπερεκτίμηση του πραγματικού πλήθους τους. Επομένως, υπό αυτό το πρίσμα, είναι λογικό να θεωρούμε ότι ο αριθμός των μικρών σωματιδίων (2–3 nm) είναι σημαντικά μεγαλύτερος από τον αριθμό των συσσωματωμάτων (~20 nm). Αυτοί οι δύο «πυρήνες» σκέδασης, των μικρών και των μεγάλων νανοσωματιδίων, επιβεβαιώνονται και κατά τη δυναμική μέτρηση σκέδασης φωτός, σε διαφορετικές γωνίες (45° και 135°) (εικόνα 4.3). Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι δύο περιοχές είναι ακόμη πιο καλά διαχωρισμένες και οι σχετικές εντάσεις αισθητά διαφορετικές, μεταξύ τους.

Η μέτρηση της υδροδυναμικής ακτίνας των νανοσωματιδίων, ως εκτίμηση του μεγέθους τους, με DLS οδηγεί πάντοτε σε αποτέλεσμα μεγαλύτερο από αυτό που λαμβάνεται με τη φασματομετρία Raman και αυτό βασίζεται σε βιβλιογραφικά δεδομένα [230].



Εικόνα 4.3. Η κατανομή των υδροδυναμικών ακτίνων R_h σε διαφορετικές γωνίες σκέδασης δείχνει ότι υπάρχουν δύο πληθυσμοί νανοσωματιδίων. Ο πρώτος, με μέγεθος ($2R_h$) στα 5–6 nm και ο δεύτερος με μέγεθος περίπου στα 40–45 nm.

4.1.2. Χαρακτηρισμός του εναιωρήματος TiO_2 Evonik P25

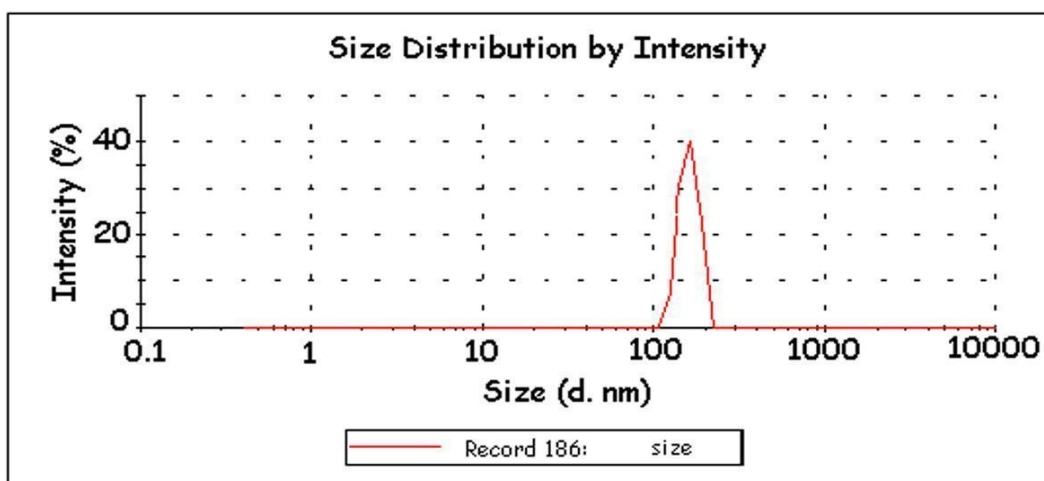
Παρασκευάστηκε εναιώρημα TiO_2 περίπου 20μM και ακολούθησε ανάδευση για 30 λεπτά. Έγιναν κάποιες δοκιμαστικές μετρήσεις DLS, σε θερμοκρασία 25°C, αλλά διαπιστώθηκε έντονη δημιουργία συσσωματωμάτων. Έτσι, προκειμένου να επιτευχθεί θραύση αυτών, χρησιμοποιήθηκαν υπέρηχοι σε μέγιστη ένταση για μία ώρα. Στη συνέχεια μετρήθηκε το pH του εναιωρήματος, το οποίο βρέθηκε να είναι 7.1 και πραγματοποιήθηκαν ξανά μετρήσεις για την εκτίμηση του μεγέθους νανοσωματιδίων, με ανάλυση DLS, σε θερμοκρασία 25°C.

Για τη μέτρηση του μεγέθους, ο ρυθμός μέτρησης είναι περίπου στα 170 kcps και ο εξασθενητής (attenuator) ρυθμίζεται αυτόματα στο επίπεδο 7. Το κάθε δείγμα μετράται τρεις φορές και κάθε μία από αυτές τις μετρήσεις που έγιναν συμπεριλαμβάνει 20 σαρώσεις διάρκειας 80 s.

Στην εικόνα 4.4 παρουσιάζεται η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος TiO_2 (Evonik P25). Η κατανομή έγινε με βάση την ένταση της

σκεδαζόμενης δέσμης. Αντίστοιχα αποτελέσματα λαμβάνονται για την κατανομή τους, με βάση τον όγκο και με βάση τον αριθμό. Ουσιαστικά πρόκειται για μια εσωτερική κανονικοποίηση του οργάνου, ως προς τη καθεμία παράμετρο και γίνεται αυτόματα (επειδή το αποτέλεσμα που λαμβάνεται σε κάθε περίπτωση είναι πρακτικά το ίδιο, παραλείπονται σε αυτήν την ενότητα οι αντίστοιχες εικόνες και παρατίθενται για λόγους αξιοπιστίας και επιστημονικής αρτιότητας στο παράρτημα).

Σε κάθε περίπτωση ως αποτέλεσμα, που μπορεί να αξιολογηθεί, είναι φανερό ότι υπάρχει μόνο μία κορυφή, με μέση τιμή στα 138.5 nm. Το εύρος δεν είναι αρκετά στενό (70 nm) και σε αυτό παίζει σημαντικό ρόλο η τάση αυτών των νανοσωματιδίων, να δημιουργούν συσσωματώματα, οπότε αν ανά τακτά διαστήματα περνούν από τον ανιχνευτή, σωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους, από τα μονοσωματίδια, είναι φυσικό ότι χάνεται η ακρίβεια και αυτό έχει αντίκτυπο στο εύρος της κορυφής, που αντικατοπτρίζει τη διασπορά, ως προς το μέγεθος, που εμφανίζει ο υπό εξέταση πληθυσμός σωματιδίων. Παρ' όλα αυτά ο συντελεστής μεταβλητότητας εκτιμάται ως $CV=9.8\%$, καθιστώντας το δείγμα ομοιογενές, ως προς το μέγεθος των νανοσωματιδίων.



Εικόνα 4.4. Η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος TiO_2 (Evonik P25). Εμφανίζεται μία μόνο κορυφή, με μέση τιμή στα 138.5 nm.

Ακολούθησαν διαδοχικά οι μετρήσεις και ηλεκτρικού φορτίου, με μικρή αλλαγή της διάταξης (τοποθέτηση μίας ειδικής κυψελίδας με κατάλληλους αισθητήρες – ηλεκτρόδια), που ουσιαστικά προκύπτουν έμμεσα, από την εκτίμηση του ηλεκτροκινητικού δυναμικού ζ (zeta potential), που είναι το συνολικό φορτίο που

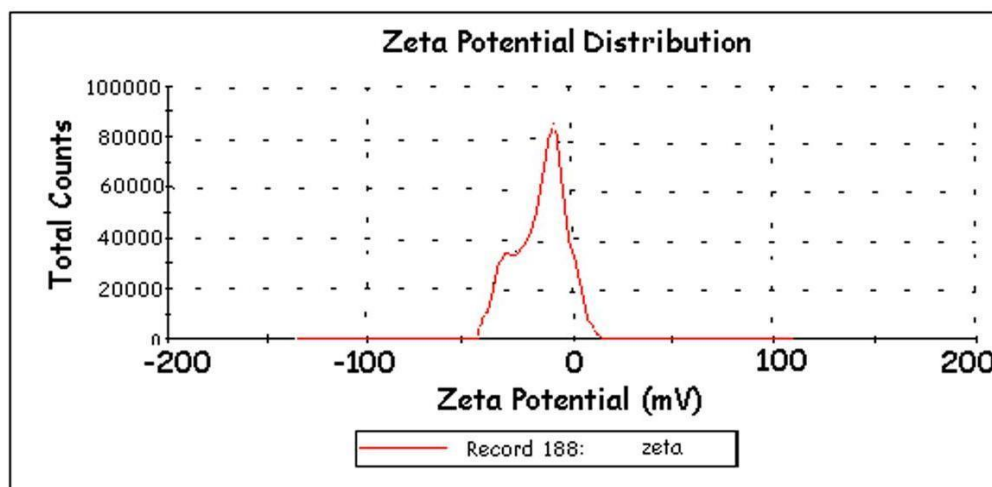
αποκτά το σωματίδιο σε συγκεκριμένο μέσο και προσδιορίζεται από την ταχύτητα διάχυσης του φορτισμένου σωματιδίου στο εφαρμοζόμενο συνεχές ηλεκτρικό πεδίο [231], που βασίζεται στο γεγονός ότι τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου και η κατεύθυνση της κίνησής τους συνδέεται άμεσα με το φορτίο των σωματιδίων [230].

Για τη μέτρηση του ζ δυναμικού ο ρυθμός είναι περίπου 300 kcps, ο εξασθενητής στο επίπεδο 7 και γίνονται 12 σαρώσεις στην κάθε μία από τις τρεις μετρήσεις που πραγματοποιούνται, για κάθε δείγμα.

Στην εικόνα 4.5 παρουσιάζεται η κατανομή του ζ δυναμικού των νανοσωματιδίων του ελαιωρήματος TiO_2 (Evonik P25), βασισμένη στο πλήθος των νανοσωματιδίων που ανιχνεύεται. Παρατηρείται ότι υπάρχουν δύο περιοχές μεγίστων, ένα τοπικό και ένα ολικό μέγιστο, στην καμπύλη της κατανομής. Η πρώτη εμφανίζεται στην περιοχή των -23.7 mV και η δεύτερη στα -9.09 mV.

Η συνολική εκτίμηση του ζ δυναμικού, όπως λαμβάνεται από τη συσκευή μέτρησης, υπολογίζεται ως: $ZP = (-11.7 \pm 8)$ mV. (Ο συντελεστής μεταβλητότητας εκτιμάται ως $CV = 68.37\%$, καθιστώντας το δείγμα εξαιρετικά ανομοιογενές, ως προς την ταχύτητα διάχυσής του και κατά συνέπεια, ως προς το ζ δυναμικό.

Δεν πραγματοποιήθηκε φασματομετρία Raman, στα πλαίσια του χαρακτηρισμού του ελαιωρήματος, για την εκτίμηση της κρυσταλλικής φάσης του TiO_2 , αφού ήταν ήδη γνωστό, ότι η αναλογία των δύο φάσεων στο τελικό προϊόν της σκόνης (πούδρας) TiO_2 , είναι ανατάσης 75% / ρουτίλιο 25%.



Εικόνα 4.5. Η κατανομή του ζ δυναμικού των νανοσωματιδίων του ελαιωρήματος TiO_2 (Evonik P25). Εμφανίζονται δύο περιοχές μεγίστων, ένα τοπικό και ένα ολικό μέγιστο, στην καμπύλη της

κατανομής. Η πρώτη εμφανίζεται στην περιοχή των -23.7 mV και η δεύτερη στα $-9,09\text{ mV}$. Συνολικά, το ζ δυναμικό, όπως λαμβάνεται από τη συσκευή μέτρησης, υπολογίζεται ως: $ZP = (-11.7 \pm 8)\text{ mV}$.

4.1.3. Χαρακτηρισμός του εναιωρήματος TiO_2 (Sigma Aldrich)

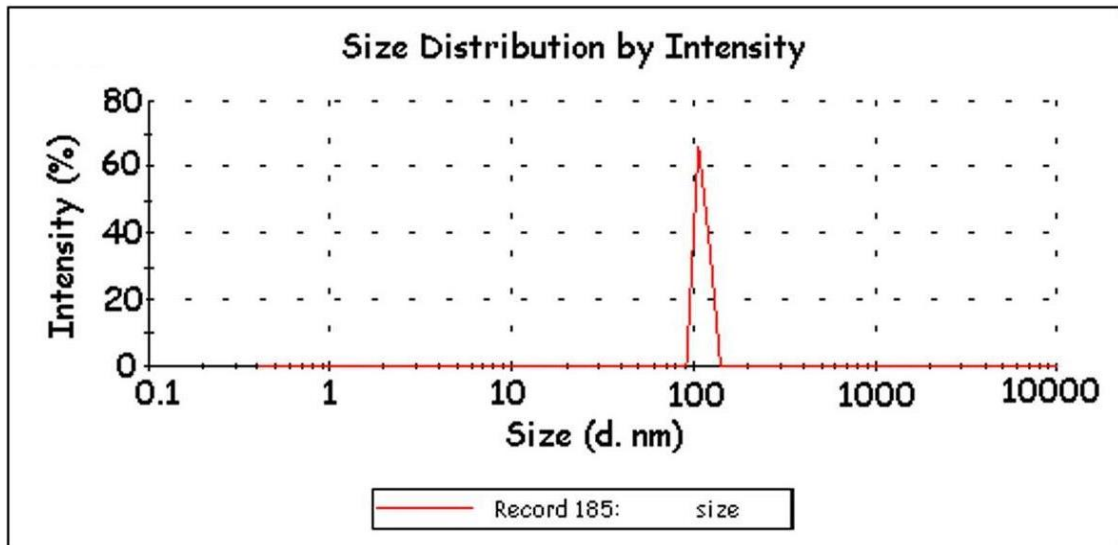
Παρασκευάστηκε εναιώρημα TiO_2 περίπου $20\mu\text{M}$ και ακολούθησε ανάδευση για 30 λεπτά και θραύση των πιθανών συσσωματωμάτων με υπερήχους, σε μέγιστη ένταση για μία ώρα. Στη συνέχεια μετρήθηκε το pH του εναιωρήματος, το οποίο είναι 6.8 και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις εκτίμησης του μεγέθους νανοσωματιδίων, με ανάλυση DLS, σε θερμοκρασία 25°C .

Για τη μέτρηση του μεγέθους, ο ρυθμός μέτρησης είναι περίπου στα 170 kcps και ο εξασθενητής (attenuator) ρυθμίζεται αυτόματα στο επίπεδο 7. Το κάθε δείγμα μετράται τρεις φορές και κάθε μία από αυτές τις μετρήσεις που έγιναν συμπεριλαμβάνει 20 σαρώσεις διάρκειας 80 s.

Στην εικόνα 4.6 παρουσιάζεται η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος TiO_2 (Sigma Aldrich).

Η κατανομή έγινε με βάση την ένταση της σκεδαζόμενης δέσμης.

Είναι φανερό ότι υπάρχει μόνο μία κορυφή, με μέση τιμή στα 111.3 nm . Το εύρος είναι αρκετά στενό (7.892 nm) και αυτό συμβαίνει, γιατί γενικώς παρατηρείται ομοιογένεια στο δείγμα, ως προς το μέγεθος. Επομένως η ακρίβεια είναι ικανοποιητική και η διασπορά, ως προς το μέγεθος, που εμφανίζει ο υπό εξέταση πληθυσμός σωματιδίων, σχετικά μικρή. Σε αυτό παίζει ρόλο η αρχική μορφή της σκόνης του TiO_2 - Sigma Aldrich, που είναι κοκκιώδης και όχι σε μορφή πούδρας, όπως στο TiO_2 - Evonik P25. Ο συντελεστής μεταβλητότητας εκτιμάται ως $CV=1.38\%$, καθιστώντας το δείγμα εξαιρετικά ομοιογενές, ως προς το μέγεθος των νανοσωματιδίων.



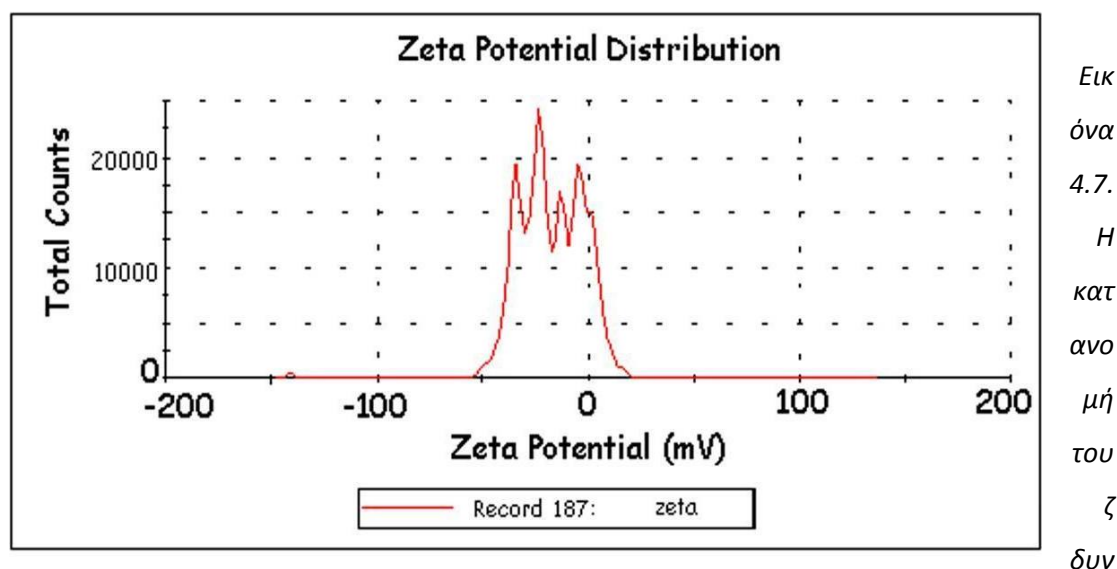
Εικόνα 4.6. Η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος TiO_2 (Sigma Aldrich). Εμφανίζεται μία μόνο κορυφή, με μέση τιμή στα 111.3 nm.

Ακολούθησαν διαδοχικά οι μετρήσεις και ηλεκτρικού φορτίου. Για τη μέτρηση του ζ δυναμικού ο ρυθμός είναι περίπου 300 kcps, ο εξασθενητής στο επίπεδο 7 και γίνονται 12 σαρώσεις στην κάθε μία από τις τρεις μετρήσεις που πραγματοποιούνται, για κάθε δείγμα.

Στην εικόνα 4.7 παρουσιάζεται η κατανομή του ζ δυναμικού των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος TiO_2 (Sigma Aldrich), βασισμένη στο πλήθος των νανοσωματιδίων που ανιχνεύεται.

Παρατηρείται ότι υπάρχουν τέσσερις περιοχές μεγίστων, τρία τοπικά και ένα ολικό μέγιστο, στην καμπύλη της κατανομής. Η πρώτη εμφανίζεται στην περιοχή των -33.1 mV, η δεύτερη στα -20.8 mV, η τρίτη στα -10.9 mV και η τέταρτη στα -2 mV.

Η συνολική εκτίμηση του ζ δυναμικού, όπως λαμβάνεται από τη συσκευή μέτρησης, υπολογίζεται ως: $ZP = (-16.7 \pm 9)$ mV. Ο συντελεστής μεταβλητότητας εκτιμάται ως $CV = 53.89\%$, καθιστώντας το δείγμα ιδιαίτερα ανομοιογενές, ως προς το ζ δυναμικό.



αμικού των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος TiO_2 (Sigma Aldrich). Εμφανίζονται τέσσερις περιοχές μεγίστων, τρία τοπικά και ένα ολικό μέγιστο, στην καμπύλη της κατανομής. Η πρώτη εμφανίζεται στην περιοχή των -33.1 mV , η δεύτερη στα -20.8 mV , η τρίτη στα -10.9 mV και η τέταρτη στα -2 mV . Συνολικά, το ζ δυναμικό, όπως λαμβάνεται από τη συσκευή μέτρησης, υπολογίζεται ως: $ZP = (-16.7 \pm 9) \text{ mV}$.

Δεν πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπία Raman, στα πλαίσια του χαρακτηρισμού του εναιωρήματος, για την εκτίμηση της κρυσταλλικής φάσης του TiO_2 , αφού ήταν ήδη γνωστό, ότι πρόκειται για TiO_2 , σε μορφή 100% ανατάση.

4.1.4 Χαρακτηρισμός του εναιωρήματος τροποποιημένου με άζωτο TiO_2 (N-doped TiO_2)

Η διαδικασία είναι όμοια, με αυτή που περιγράφηκε στις ενότητες 4.1.2 και 4.1.3 με μόνη διαφορά την ιδιαίτερη προσοχή που δόθηκε στο ζήτημα της απουσίας φωτός. Δηλαδή, παρασκευάστηκε το εναιώρημα TiO_2 και ακολούθησε ανάδευση για 30 λεπτά, έγινε θραύση των συσσωματωμάτων με υπερήχους σε μέγιστη ένταση για μία ώρα και στη συνέχεια μετρήθηκε το pH του εναιωρήματος, το οποίο είναι 6.5. Πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις DLS, σε θερμοκρασία 25°C .

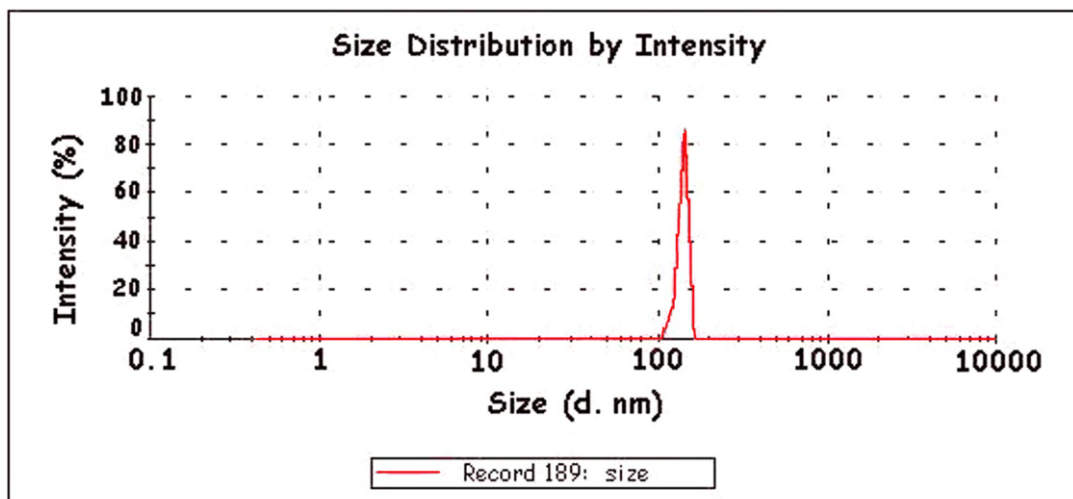
Για τη μέτρηση του μεγέθους, ο ρυθμός μέτρησης είναι περίπου στα 170 kcps και ο εξασθενητής (attenuator) στο επίπεδο 7 (αυτόματα). Το κάθε δείγμα μετράται τρεις φορές και κάθε μία από αυτές τις μετρήσεις που έγιναν συμπεριλαμβάνει 20 σαρώσεις διάρκειας 80 s.

Στην εικόνα 4.8 παρουσιάζεται η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος του τροποποιημένου με άζωτο TiO_2 (N-doped TiO_2), η οποία βασίζεται στην ένταση της σκεδαζόμενης δέσμης.

Φαίνεται ότι στην κατανομή εμφανίζεται μόνο μία κορυφή, με μέση τιμή στα 129.2 nm. Το εύρος είναι αρκετά στενό (~5 nm) συνεπώς παρατηρείται ομοιογένεια στο δείγμα, ως προς το μέγεθος, η ακρίβεια αρκετά καλή και η διασπορά, ως προς το μέγεθος, του υπό εξέταση πληθυσμού σωματιδίων είναι σχετικά μικρή. Ο συντελεστής μεταβλητότητας εκτιμάται ως $CV=0.7\%$, καθιστώντας το δείγμα ιδιαίτερα ομοιογενές, ως προς το μέγεθος των νανοσωματιδίων.

Ακολούθησαν διαδοχικά οι μετρήσεις και ηλεκτρικού φορτίου. Για τη μέτρηση του ζ δυναμικού ο ρυθμός είναι περίπου 300 kcps, ο εξασθενητής ρυθμίζεται αυτόματα στο επίπεδο 7 και γίνονται 12 σαρώσεις στην κάθε μία από τις τρεις μετρήσεις που πραγματοποιούνται, για κάθε δείγμα.

Στην εικόνα 4.9 παρουσιάζεται η κατανομή του ζ δυναμικού των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος του τροποποιημένου με άζωτο TiO_2 (N-doped TiO_2). Βασισμένη στο πλήθος των νανοσωματιδίων που ανιχνεύεται.

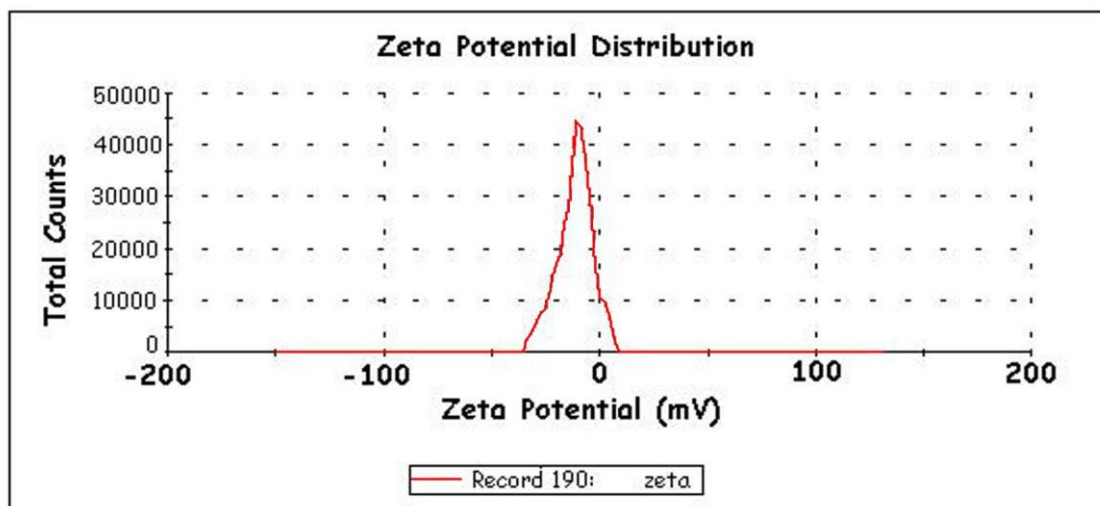


Εικόνα 4.8. Η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος του τροποποιημένου με άζωτο TiO_2 (N-doped TiO_2). Εμφανίζεται μία μόνο κορυφή, με μέση τιμή στα 129.2 nm.

Παρατηρείται ένα ολικό μέγιστο στην καμπύλη της κατανομής, στην περιοχή των -11.4 mV.

Η συνολική εκτίμηση του ζ δυναμικού, όπως λαμβάνεται από τη συσκευή μέτρησης, υπολογίζεται ως: $ZP = (-11.4 \pm 7)$ mV. Ο συντελεστής μεταβλητότητας εκτιμάται ως $CV = 61.4\%$, καθιστώντας το δείγμα ιδιαίτερα ανομοιογενές, ως προς το ζ δυναμικό.

Δεν πραγματοποιήθηκε φασματομετρία Raman, στα πλαίσια του χαρακτηρισμού του εναιωρήματος, για την εκτίμηση της κρυσταλλικής φάσης του TiO_2 , αφού ήταν ήδη γνωστό, ότι το TiO_2 που τροποποιήθηκε με άζωτο ήταν σε μορφή 100% ανατάση (Sigma Aldrich).



Εικόνα 4.9. Η κατανομή του ζ δυναμικού των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος TiO_2 (Sigma Aldrich). Εμφανίζονται ένα μέγιστο, στην καμπύλη της κατανομής στην περιοχή των -11.4 mV. Συνολικά, το ζ δυναμικό, όπως λαμβάνεται από τη συσκευή μέτρησης, υπολογίζεται ως: $ZP = (-11.4 \pm 7)$ mV.

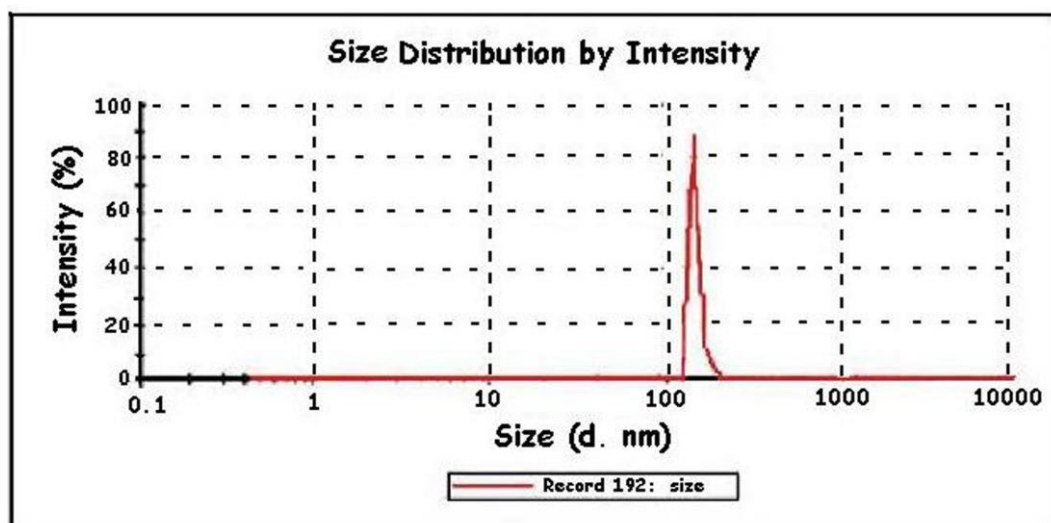
4.1.5 Χαρακτηρισμός του εναιωρήματος τροποποιημένου με Άργυρο TiO_2 (Ag-doped TiO_2)

Η διαδικασία είναι όμοια, με αυτή που περιγράφηκε στις προηγούμενες ενότητες (4.1.2, 4.1.3, 4.1.4). Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στο ζήτημα της απουσίας φωτός. Έτσι, παρασκευάστηκε το εναιώρημα TiO_2 , ακολούθησε ανάδευση για 30 λεπτά, έγινε θραύση των συσσωματωμάτων με υπερήχους σε μέγιστη ένταση για μία ώρα και στη συνέχεια μετρήθηκε το pH του εναιωρήματος, το οποίο είναι 6.7. Πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις DLS, σε θερμοκρασία 25°C.

Για τη μέτρηση του μεγέθους, ο ρυθμός μέτρησης είναι περίπου στα 170 kcps και ο εξασθενητής (attenuator) στο επίπεδο 7 (αυτόματα). Το κάθε δείγμα μετράται τρεις φορές και κάθε μία από αυτές τις μετρήσεις που έγιναν συμπεριλαμβάνει 20 σαρώσεις διάρκειας 80 s.

Στην εικόνα 4.10 παρουσιάζεται η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος του τροποποιημένου με Άργυρο TiO_2 (Ag-doped TiO_2) η οποία βασίζεται στην ένταση της σκεδαζόμενης δέσμης που λαμβάνεται από τον ανιχνευτή.

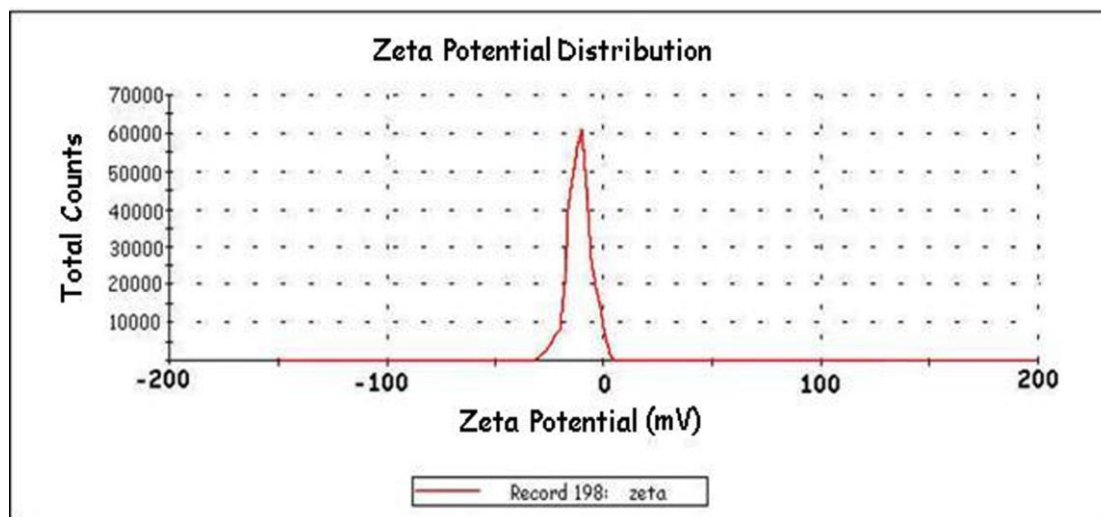
Εμφανίζεται μόνο μία κορυφή, με μέση τιμή στα 144.5 nm. Το εύρος είναι αρκετά στενό (7.317 nm) συνεπώς παρατηρείται ομοιογένεια στο δείγμα, ως προς το μέγεθος, δηλαδή η ακρίβεια είναι αρκετά καλή και η διασπορά, ως προς το μέγεθος, του υπό εξέταση πληθυσμού σωματιδίων είναι σχετικά μικρή. Ο συντελεστής μεταβλητότητας εκτιμάται ως $CV=0.99\%$, καθιστώντας το δείγμα εξαιρετικά ομοιογενές, ως προς το μέγεθος των νανοσωματιδίων.



Εικόνα 4.10. Η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος του τροποποιημένου με Άργυρο TiO_2 (Ag-doped TiO_2). Εμφανίζεται μία μόνο κορυφή, με μέση τιμή στα 144.5 nm.

Ακολούθησαν διαδοχικά οι μετρήσεις και ηλεκτρικού φορτίου. Για τη μέτρηση του ζ δυναμικού ο ρυθμός είναι περίπου 300 kcps, ο εξασθενητής ρυθμίζεται αυτόματα στο επίπεδο 7 και γίνονται 12 σαρώσεις στην κάθε μία από τις τρεις μετρήσεις που πραγματοποιούνται, για κάθε δείγμα.

Στην εικόνα 4.11 παρουσιάζεται η κατανομή του ζ δυναμικού των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος του τροποποιημένου με Άργυρο TiO_2 (Ag-doped TiO_2). βασισμένη στο πλήθος των νανοσωματιδίων που ανιχνεύεται.



Εικόνα 4.11. Η κατανομή του ζ δυναμικού των νανοσωματιδίων του εναιωρήματος TiO_2 . Εμφανίζονται ένα μέγιστο, στην καμπύλη της κατανομής στην περιοχή των -14.8 mV . Συνολικά, το ζ δυναμικό, όπως λαμβάνεται από τη συσκευή μέτρησης, υπολογίζεται ως: $\text{ZP} = (-14.8 \pm 8) \text{ mV}$.

Παρατηρείται ένα ολικό μέγιστο στην καμπύλη της κατανομής, στην περιοχή των -14.8 mV . Η συνολική εκτίμηση του ζ δυναμικού, όπως λαμβάνεται από τη συσκευή μέτρησης, υπολογίζεται ως: $\text{ZP} = (-14.8 \pm 8) \text{ mV}$.

Ο συντελεστής μεταβλητότητας εκτιμάται ως $\text{CV} = 54\%$, καθιστώντας το δείγμα ιδιαίτερα ανομοιογενές, ως προς το ζ δυναμικό.

Δεν πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπία Raman, στα πλαίσια του χαρακτηρισμού του εναιωρήματος, για την εκτίμηση της κρυσταλλικής φάσης του TiO_2 , αφού ήταν ήδη γνωστό, ότι το TiO_2 που τροποποιήθηκε με Άργυρο ήταν σε μορφή 100% ανατάση (Sigma Aldrich).

4.2 Μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων - MTT colorimetric assay

Η μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο MTT, που συμπεριλαμβάνει και φασματοφωτομέτρηση σε ELISA reader.

Η ένταση του χρώματος που λαμβάνεται ανά δείγμα, κατά τη φωτομέτρηση, είναι γραμμικά ανάλογη με την ποσότητα της φορμαζάνης που υπάρχει, ως προϊόν της

οξειδωσης των αλάτων τετραζολίου. Κατ' επέκταση είναι 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 [185].

Το πείραμα επαναλαμβάνεται πολλές φορές με στόχο να επιλεχθεί ο μικρότερος δυνατός χρόνος ακτινοβολησης και η μικρότερη δυνατή συγκέντρωση του TiO_2 . Επιλέγονται οι επιθυμητές συνθήκες και ακολουθούν πέντε ανεξάρτητα πειράματα με τετραπλά δείγματα ανά συνθήκη.

Το ποσοστό των κυττάρων που επιβίωσαν (L), 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.

Η μέση τιμή της βιωσιμότητας των κυττάρων (Cell viability (%)) (L), υπολογίστηκε από

τον τύπο:

$$L = \frac{ABS_{treated}}{ABS_{untreated}} \cdot 100\% \quad (4.1)$$

1)

, όπου $ABS_{treated}$ είναι η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης που μετρήθηκε φασματομετρικά με ELISA reader, για τα δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε η δοκιμασία (TiO_2 , ακτινοβοληση, κ.τ.λ.) και $ABS_{untreated}$ η αντίστοιχη μέση τιμή που προέκυψε από τη μέτρηση των δειγμάτων που θεωρούνται αρνητικοί μάρτυρες (control) δείγματα.

Το σφάλμα της μέσης τιμής για τη βιωσιμότητας των κυττάρων, υπολογίστηκε με διάδοση σφαλμάτων, με τον ακόλουθο τρόπο:

$$\delta L = \sqrt{\left(\frac{\partial L}{\partial ABS_{treated}} \delta ABS_{treated}\right)^2 + \left(\frac{\partial L}{\partial ABS_{untreated}} \delta ABS_{untreated}\right)^2}$$

$$\delta L = \sqrt{\left(\frac{1}{ABS_{untreated}} 100\% \cdot \delta ABS_{treated}\right)^2 + \left(-\frac{1}{(ABS_{untreated})^2} 100\% \cdot ABS_{treated} \cdot \delta ABS_{untreated}\right)^2}$$

, όπου $\delta ABS_{treated}$ είναι το σφάλμα της μέσης τιμής των δειγμάτων, στα οποία εφαρμόστηκε η δοκιμασία και $\delta ABS_{untreated}$ είναι το σφάλμα της μέσης τιμής των

δειγμάτων που θεωρούνται αρνητικοί μάρτυρες (control) δείγματα. Η μερική παράγωγος της συνάρτησης (4.1) ως προς τη μέση τιμή των δειγμάτων, στα οποία εφαρμόστηκε η δοκιμασία δίνεται από τη σχέση $\frac{\partial L}{\partial ABS_{\text{treated}}}$ και η $\frac{\partial L}{\partial ABS_{\text{untreated}}}$ είναι η αντίστοιχη μερική παράγωγος της (3.1) ως προς τη μέση τιμή των δειγμάτων που θεωρούνται αρνητικοί μάρτυρες (control) δείγματα.

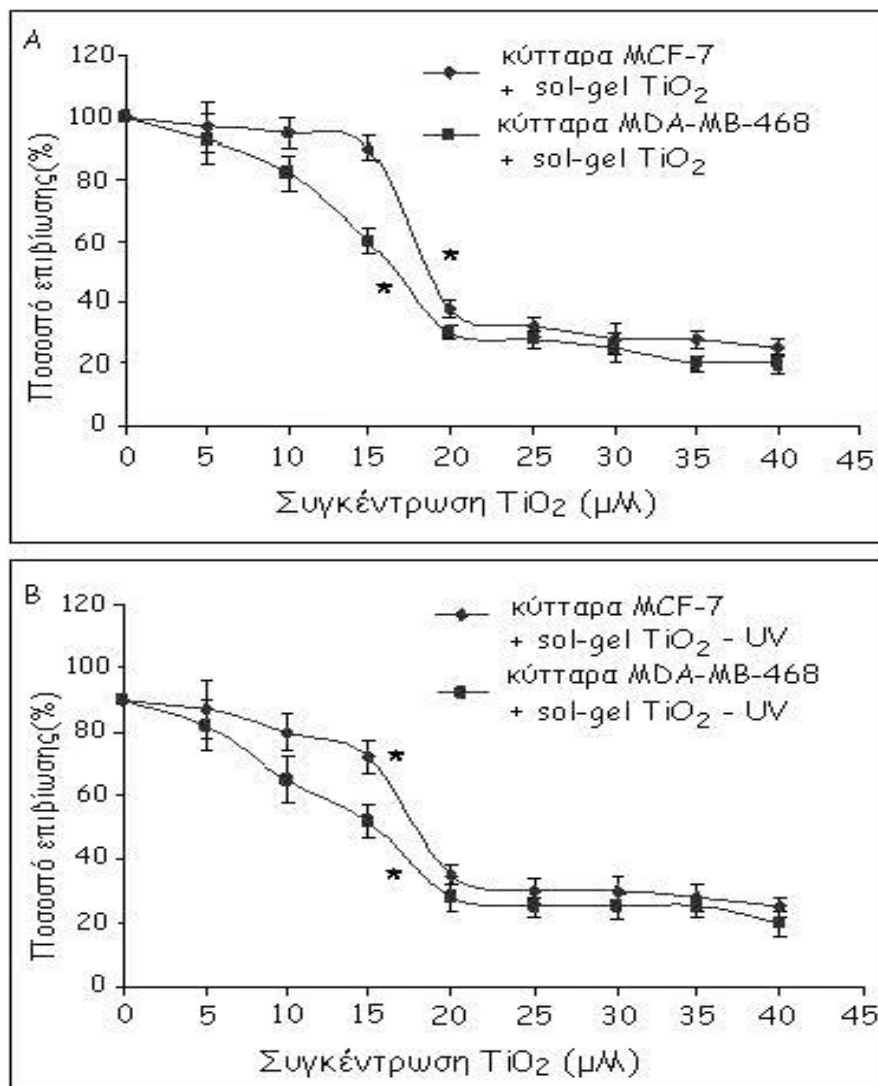
Και έτσι το τελικό αποτέλεσμα, λαμβάνεται για κάθε συνθήκη ως $L \pm \delta L$.

4.2.1 Μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων υπό την επίδραση λύματος - πηκτής (sol – gel) TiO_2

Για τις ανάγκες της μελέτης της βιωσιμότητας των κυττάρων, υπό την επίδραση λύματος - πηκτής (sol – gel) TiO_2 , διατηρείται καλλιέργεια και από τις δύο κυτταρικές σειρές, σε πλάκες 96 φρεατίων, σε συγκέντρωση περίπου 6000 κυττάρων ανά φρεάτιο, για 24 ώρες. Κατόπιν, προστίθεται sol-gel TiO_2 σε διάφορες συγκεντρώσεις και ακολουθεί ακτινοβολία για 20 λεπτά με ακτινοβολία UV-A (350nm). Μετά από επώαση 48 ωρών, ακολουθείται το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην ενότητα 3.4 και γίνεται η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων στα 590 nm, σε ELISA reader. Ως θετικός μάρτυρας του πειράματος ορίζεται δείγμα, στο οποίο εισάγεται σταυροσπορίνη (200 nM). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στις καμπύλες επιβίωσης της εικόνας 4.12.

Παρατηρείται ότι υπάρχει τοξική δράση του sol-gel TiO_2 , και στις δύο κυτταρικές σειρές. Συγκεκριμένα αυτή η τοξικότητα καθορίζεται από τη συγκέντρωση του sol-gel TiO_2 και είναι πιο έντονη στα κύτταρα MDA-MB-468. Είναι φανερή η βαθμιαία μείωση της κυτταρικής επιβίωσης, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του sol-gel TiO_2 (Εικόνα 4.12 A). Φαίνεται πως μία ποσότητα περίπου στα 16μM TiO_2 , είναι αποτελεσματική, με την έννοια ότι επάγει το θάνατο στο 50% του πληθυσμού των κυττάρων MDA-MB-468 cells, αφήνοντας ένα σημαντικό πλήθος των κυττάρων MCF-7 σχεδόν ανεπηρέαστο, αφού, στην ίδια συγκέντρωση επιβιώνει το 80% του πληθυσμού. Η επίδραση της ακτινοβολίας UV-A στην κυτταρική επιβίωση παρουσιάζεται στην εικόνα 4.12. Η ίδια η ακτινοβολία UV-A επιδρά στην κυτταρική επιβίωση σε ένα μικρό ποσοστό.

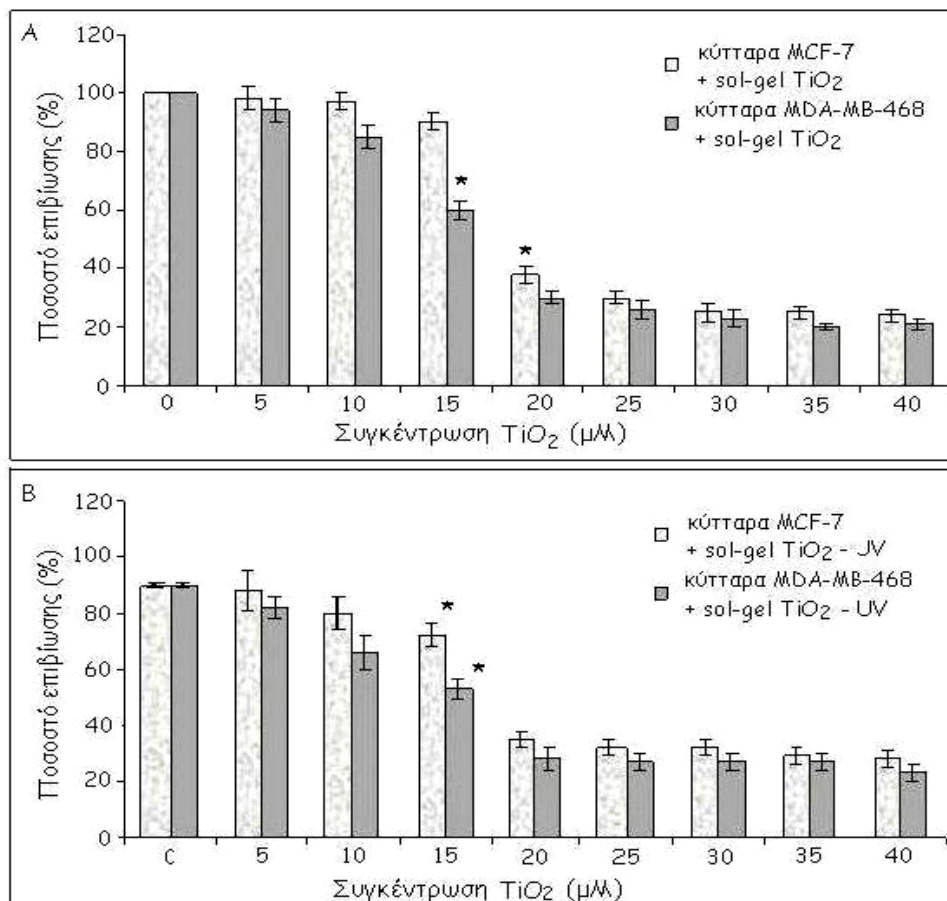
Συγκεκριμένα σχεδόν το 10% του πληθυσμού των κυττάρων πλήττεται, παρουσία της UV-A, χωρίς την προσθήκη του sol-gel TiO_2 .



Εικόνα 4.12. Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου sol-gel TiO_2 στη βιωσιμότητα των κυττάρων – Καμπύλες Επιβίωσης. Κύτταρα MCF-7 και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες sol-gel TiO_2 . Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με UVA ακτινοβολία για 20 λεπτά και επώαστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT. (A) Επίδραση της συγκέντρωσης του sol-gel TiO_2 , στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργοποιημένου με UV-A sol-gel TiO_2 , στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $L \pm \delta L$, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.

Και το φωτοενεργοποιημένο TiO_2 επιδρά εντονότερα, αυξανόμενης της συγκέντρωσής του. Το εύρος των συγκεντρώσεων TiO_2 που αποδεικνύονται δραστικές, κυμαίνεται μεταξύ 10 μM και 16 μM , στην περίπτωση των κυττάρων MDA-MB-468. Συγκεκριμένα, παρατηρείται σημαντική απώλεια κυτταρικού πληθυσμού, αφού σε αυτές τις συγκεντρώσεις, επιβιώνει τελικά περίπου το 50–60% των κυττάρων, ενώ για τις ίδιες συγκεντρώσεις TiO_2 , η βιωσιμότητα των MCF-7 παραμένει σχετικά υψηλή, αφού επιβιώνει το 75–85% του συνόλου τους (Εικόνα 4.12 Β). Συνεπώς τα κύτταρα υψηλότερης διαφοροποίησης πλήττονται περισσότερο. Είναι περισσότερο ευάλωτα στη δράση του sol-gel TiO_2 και φυσικά του φωτοενεργοποιημένου με UV-A ακτινοβολία, sol-gel TiO_2 , συγκρινόμενα με τα MCF-7 κύτταρα.

Τα αποτελέσματα παρατίθενται και σε ραβδογράμματα (Εικόνα 4.13).



Εικόνα 4.13. Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου sol-gel TiO_2 στη βιωσιμότητα των κυττάρων - ραβδογράμματα. Κύτταρα MCF-7 και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες sol-gel TiO_2 . Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με UVA ακτινοβολία για 20 λεπτά και επώαστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT. (Α) Επίδραση της

συγκέντρωσης του *sol-gel* TiO_2 , στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργοποιημένου με UV-A *sol-gel* TiO_2 , στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $L \pm \delta L$, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.

4.2.2 Μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων υπό την επίδραση του εναιωρήματος TiO_2 (Evonik P25)

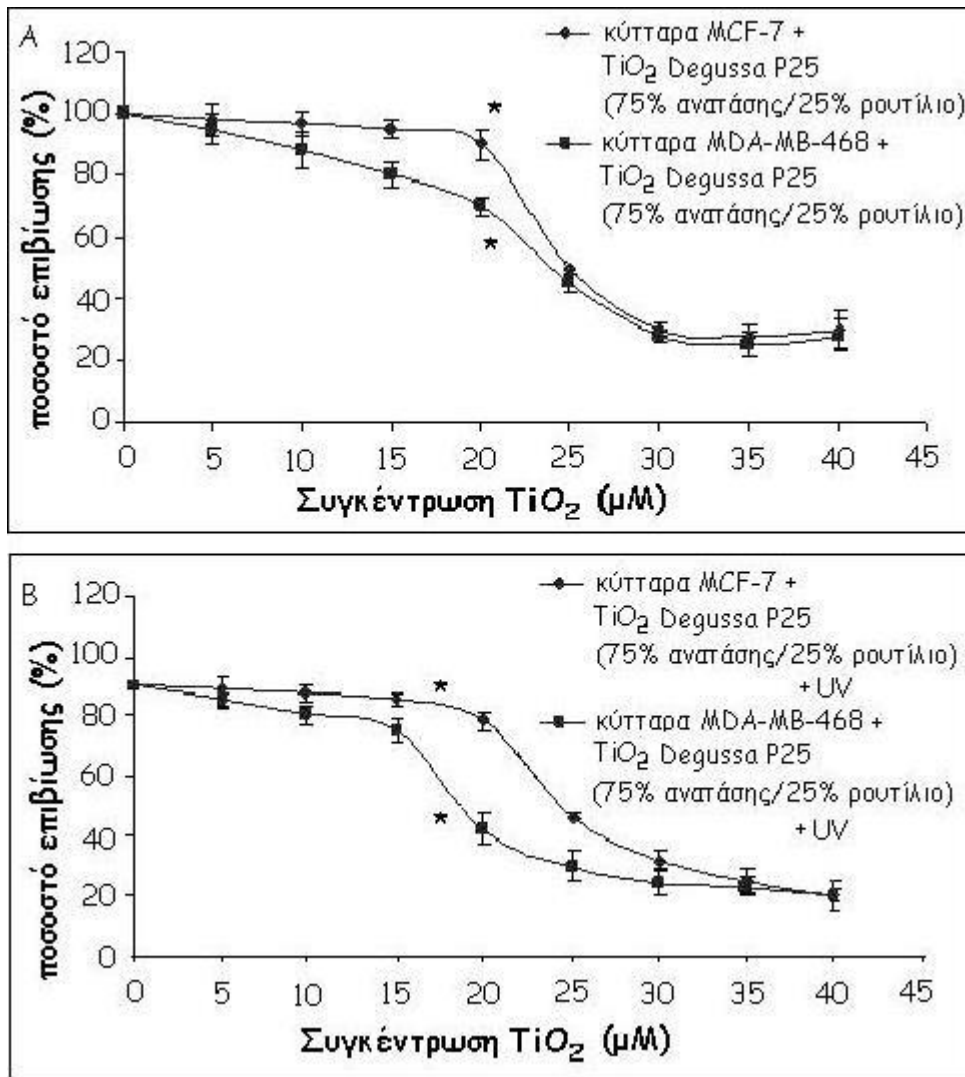
Ακριβώς η ίδια πειραματική διαδικασία ακολουθείται για το εναιώρημα TiO_2 Evonik P25, (75% ανατάσης / 25% ρουτίλιο). Ως θετικός μάρτυρας του πειράματος ορίζεται δείγμα, στο οποίο εισάγεται *cis-platin* (1 mg/ml). Όλες οι σειρές πειραμάτων πραγματοποιούνται αφού έχει ολοκληρωθεί η μελέτη του χαρακτηρισμού κάθε είδους TiO_2 . Τα αποτελέσματα προκύπτουν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα και συνοψίζονται στις καμπύλες επιβίωσης της εικόνας 4.14 και τα ραβδογράμματα της εικόνας 4.15.

Μια αναλογική μείωση στην επιβίωση των κυττάρων παρατηρείται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του TiO_2 Evonik P25. Αυτό επιτυγχάνεται σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 20 μ M TiO_2 Evonik P25.

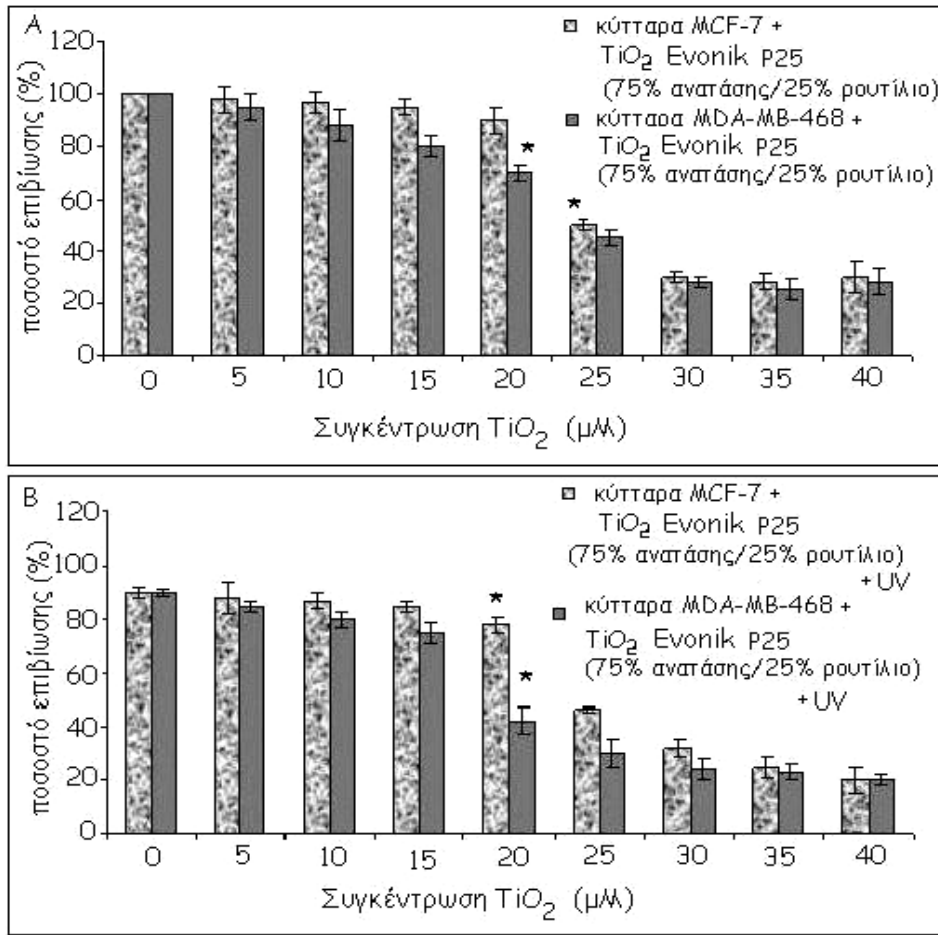
Συγκεκριμένα για συγκέντρωση περίπου 22 μ M επιβιώνει το 60% των κυττάρων MDA-MB-468, ενώ για την ίδια δόση επιβιώνει περισσότερο από το 80% των MCF-7 (Εικόνα 4.14 A).

Το ενεργοποιημένο - με UV – A ακτινοβολία TiO_2 Evonik P25 επιδρά σχεδόν ανάλογα με τη δόση (Εικόνα 4.14 B). Συγκεκριμένα δόσεις μεταξύ των 15-20 μ M του TiO_2 Evonik P25 έχουν σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων (ποσοστό επιβίωσης 50 - 60%) για τα MDA-MB-468, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό επιβίωσης για τις ίδιες συνθήκες στα MCF-7 είναι μεγαλύτερο από 80%. Η ίδια η ακτινοβολία UV – A, επιφέρει θάνατο σε ένα περίπου 10% των κυττάρων.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα MDA-MB-468 κύτταρα εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στα φωτο-ενεργοποιημένα ή μη, νανοσωματίδια TiO_2 Evonik P25 σε σχέση με τα MCF-7, χωρίς τα δεύτερα να μένουν εντελώς ανεπηρέαστα.



Εικόνα 4.14. Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου TiO_2 Ενοπικ P25, στη βιωσιμότητα των κυττάρων – Καμπύλες Επιβίωσης. Κύτταρα MCF-7 και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες TiO_2 Ενοπικ P25. Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με UVA ακτινοβολία για 20 λεπτά και επωάστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT. (A) Επίδραση της συγκέντρωσης του TiO_2 Ενοπικ P25, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργοποιημένου με UV-A TiO_2 Ενοπικ P25, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $L \pm \delta L$, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.



Εικόνα 4.15. Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου TiO₂ Evonik P25, στη βιωσιμότητα των κυττάρων - ραβδογράμματα. Κύτταρα MCF-7 και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες TiO₂ Evonik P25. Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με UVA ακτινοβολία για 20 λεπτά και επωάστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT. (A) Επίδραση της συγκέντρωσης του TiO₂ Evonik P25, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργοποιημένου με UV-A TiO₂ Evonik P25, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως L±δL, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.

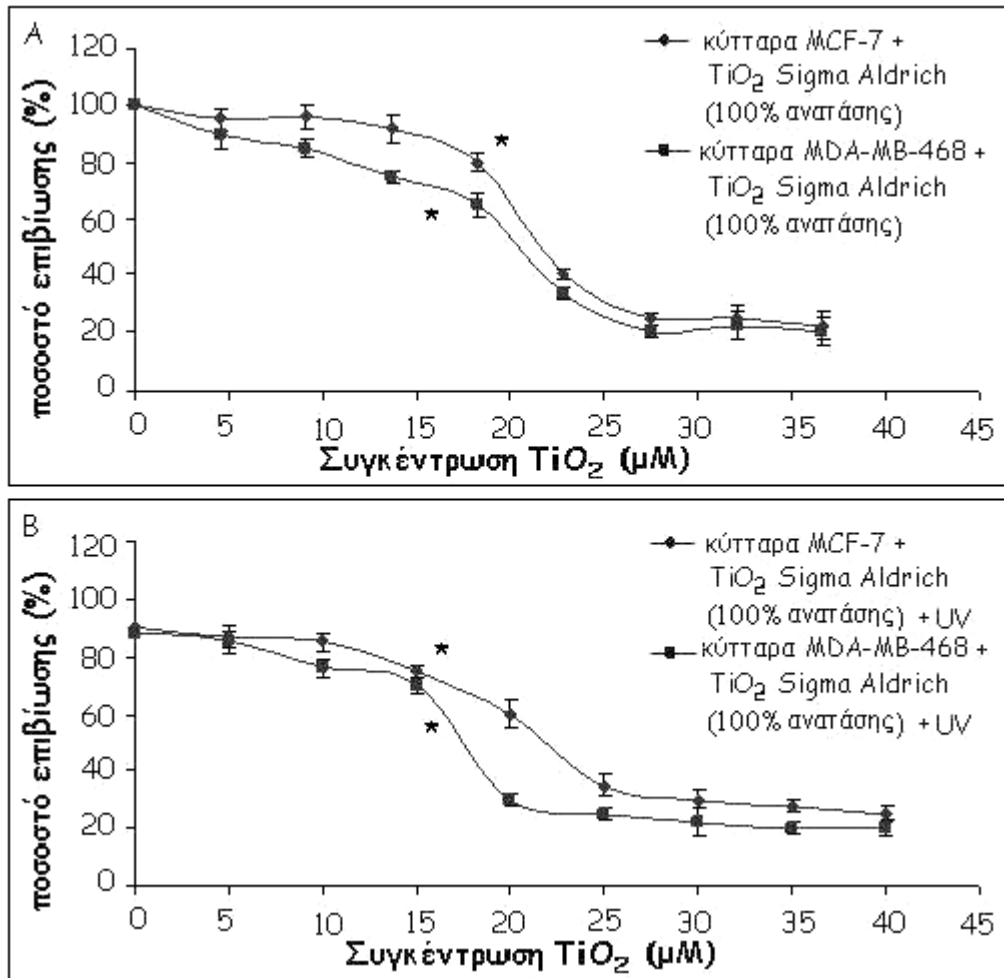
4.2.3 Μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων υπό την επίδραση του εναιωρήματος TiO₂ (Sigma Aldrich)

Ακολουθείται η ίδια πειραματική διαδικασία για το εναιώρημα TiO₂ Sigma Aldrich (100% ανατάσης). Ως θετικός μάρτυρας του πειράματος ορίζεται δείγμα, στο οποίο εισάγεται cis-platin (1 mg/ml). Όλες οι σειρές πειραμάτων πραγματοποιούνται αφού

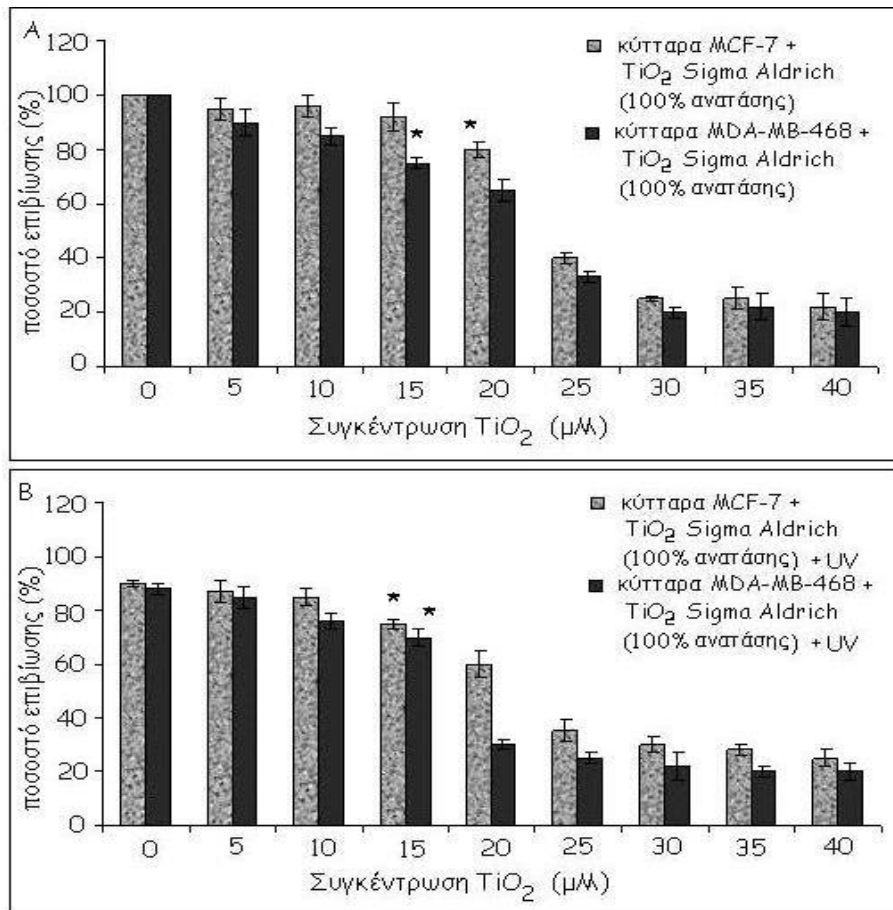
έχει ολοκληρωθεί η μελέτη του χαρακτηρισμού κάθε είδους TiO_2 . Τα αποτελέσματα προκύπτουν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα και συνοψίζονται στις καμπύλες επιβίωσης της εικόνας 4.16 και τα ραβδογράμματα της εικόνας 4.17.

Παρατηρείται βαθμιαία μείωση στην επιβίωση των κυττάρων καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του. Συγκεκριμένα για συγκέντρωση TiO_2 μεγαλύτερη από 20 μM επιβιώνει το 50% των κυττάρων MDA-MB-468, ενώ για την ίδια δόση επιβιώνει περίπου το 70% των MCF-7 (εικόνα 4.16 A). Το ενεργοποιημένο - με UV – A ακτινοβολία TiO_2 Sigma Aldrich (100% anatase) επιδρά εντονότερα με την αύξηση της δόσης (εικόνα 4.16 B). Συγκεκριμένα δόσεις μεταξύ των 15-20 μM του TiO_2 έχουν σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων (ποσοστό επιβίωσης 70 - 30%) για τα MDA-MB-468, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό επιβίωσης για τις ίδιες συνθήκες στα MCF-7 το ποσοστό επιβίωσης είναι 80% έως 65% αντίστοιχα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα MDA-MB-468 κύτταρα εμφανίζουν πιο έντονη ευαισθησία στα φωτο-ενεργοποιημένα ή μη, νανοσωματίδια TiO_2 Sigma Aldrich (100% anatase). Τα MCF-7, ενώ δεν παραμένουν, πληθυσμιακά τουλάχιστον, ανέπαφα, ωστόσο, σε σχέση με τα MDA-MB-468, πλήττονται λιγότερο. Η ακτινοβολία UV – A, από μόνη της επιφέρει θάνατο σε ένα περίπου 10% των κυττάρων.



Εικόνα 4.16. Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου TiO_2 Sigma Aldrich, στη βιωσιμότητα των κυττάρων – Καμπύλες Επιβίωσης. Κύτταρα MCF-7 και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες TiO_2 Sigma Aldrich. Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με UVA ακτινοβολία για 20 λεπτά και επωάστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT. (A) Επίδραση της συγκέντρωσης του TiO_2 Sigma Aldrich στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργοποιημένου με UV-A TiO_2 Sigma Aldrich, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $L \pm \delta L$, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.



Εικόνα 4.17. Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου TiO_2 Sigma Aldrich, στη βιωσιμότητα των κυττάρων - ραβδογράμματα. Κύτταρα MCF-7 και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες TiO_2 Sigma Aldrich. Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με UVA ακτινοβολία για 20 λεπτά και επώαστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT. (A) Επίδραση της συγκέντρωσης του TiO_2 Sigma Aldrich, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργοποιημένου με UV-A TiO_2 Sigma Aldrich, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $L \pm \delta L$, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.

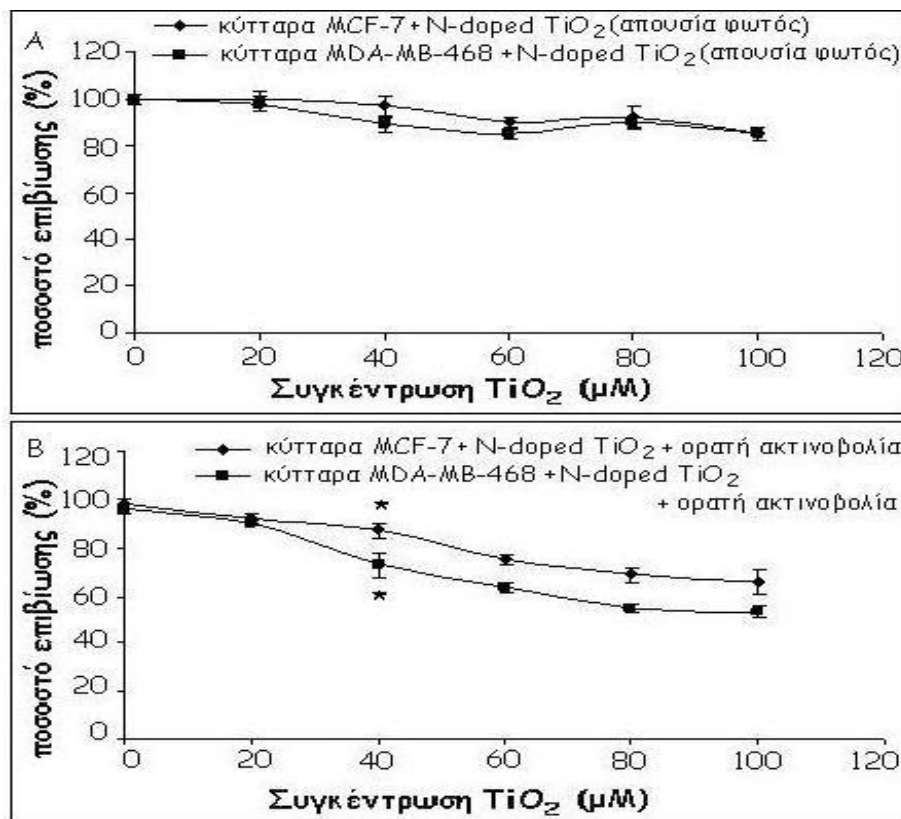
4.2.4 Μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων υπό την επίδραση του εναιωρήματος του τροποποιημένου με άζωτο TiO_2 (N-doped TiO_2)

Ακολουθείται η ίδια πειραματική διαδικασία για το εναιώρημα του τροποποιημένου με άζωτο TiO_2 (N-doped TiO_2). Ως θετικός μάρτυρας του πειράματος ορίζεται δείγμα, στο οποίο εισάγεται cis-platin (1 mg/ml). Όλες οι σειρές πειραμάτων πραγματοποιούνται αφού έχει ολοκληρωθεί η μελέτη του χαρακτηρισμού κάθε είδους TiO_2 . Ιδιαίτερη φροντίδα δίνεται στο ζήτημα απουσίας φωτός κατά την προσθήκη του N-doped TiO_2 .

Ακόμη η ακτινοβόληση γίνεται με ορατή ακτινοβολία για 20 λεπτά. Τα αποτελέσματα προκύπτουν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα και συνοψίζονται στις καμπύλες επιβίωσης της εικόνας 4.18 και τα ραβδογράμματα της εικόνας 4.19.

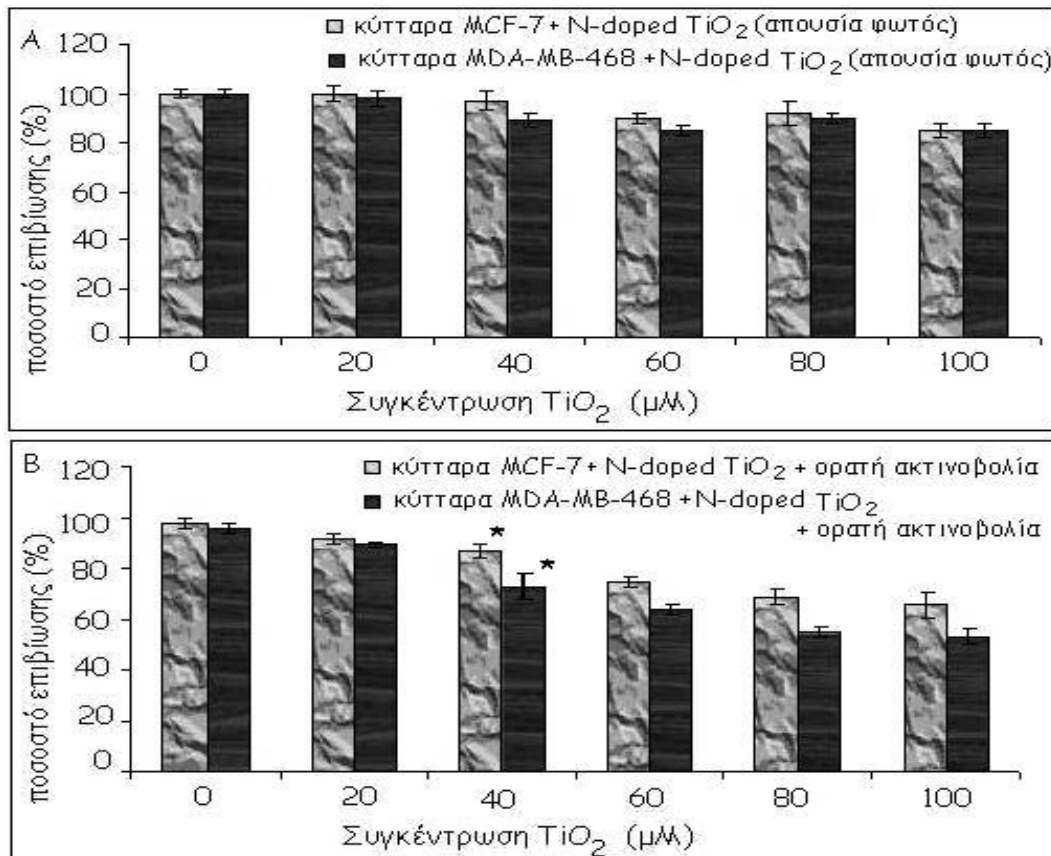
Παρατηρείται ότι αυξανόμενης της συγκέντρωσης του τροποποιημένου με άζωτο TiO_2 , απουσία φωτός, δεν μειώνεται, παρά ελάχιστα, ο αριθμός των κυττάρων που επιβιώνουν, αφού φαίνεται πως για συγκεντρώσεις ακόμη και 100 μM επιβιώνει περισσότερο από το 80% του πληθυσμού των κυττάρων και των δύο κυτταρικών σειρών, όταν το πείραμα γίνει στο σκοτάδι (Εικόνα 4.18 Α).

Στην περίπτωση φωτο-ενεργοποιημένου με ορατή ακτινοβολία, τροποποιημένου με άζωτο TiO_2 , παρατηρείται βαθμιαία μείωση του πληθυσμού των κυττάρων και των δύο κυτταρικών σειρών, με ελαφρά εντονότερη δράση στα MDA-MB-468. Συγκεκριμένα παρατηρείται στα 40 μM μια επιβίωση του πληθυσμού των MDA-MB-468, της τάξης του 75%, ενώ αντίστοιχα 85% για τα MCF-7. Αντίστοιχα, σταθερά παρατηρείται μία διαφορά περίπου στο 10%, μεταξύ της συμπεριφοράς των δύο κυτταρικών σειρών, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση (Εικόνα 4.18 Β).



Εικόνα 4.18. Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου TiO_2 , τροποποιημένου με άζωτο (N-doped TiO_2), στη βιωσιμότητα των κυττάρων – Καμπύλες Επιβίωσης. Κύτταρα MCF-7

και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες N-doped TiO_2 . Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με ορατή ακτινοβολία για 20 λεπτά και επώαστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT. (A) Επίδραση της συγκέντρωσης του N-doped TiO_2 στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργουποιημένου με ορατή ακτινοβολία N-doped TiO_2 στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $L\pm\delta L$, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.



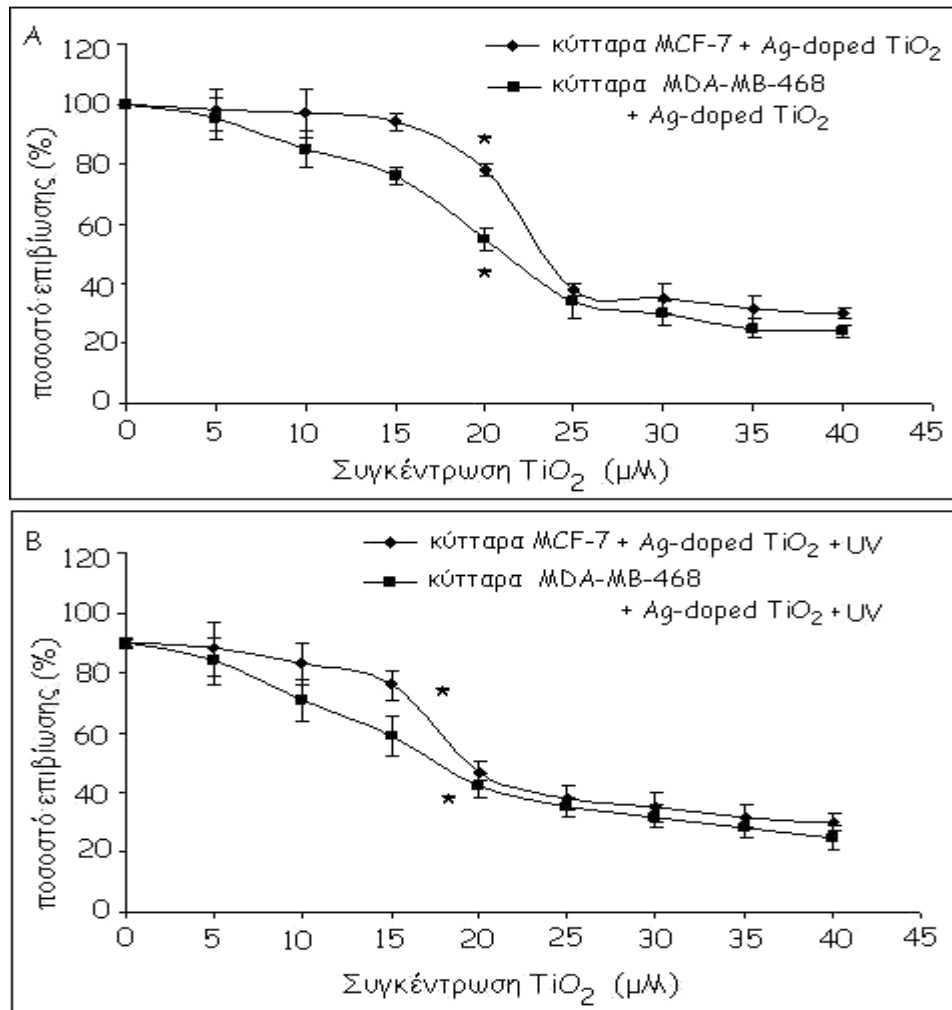
Εικόνα 4.19. Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργουποιημένου TiO_2 , τροποποιημένου με άζωτο (N-doped TiO_2), στη βιωσιμότητα των κυττάρων - ραβδογράμματα. Κύτταρα MCF-7 και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες N-doped TiO_2 . Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με ορατή ακτινοβολία για 20 λεπτά και επώαστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT. (A) Επίδραση της συγκέντρωσης του N-doped TiO_2 στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργουποιημένου με ορατή ακτινοβολία, N-doped TiO_2 στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $L\pm\delta L$, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.

4.2.5 Μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων υπό την επίδραση του εναιωρήματος του τροποποιημένου με Άργυρο TiO_2 (Ag-doped TiO_2)

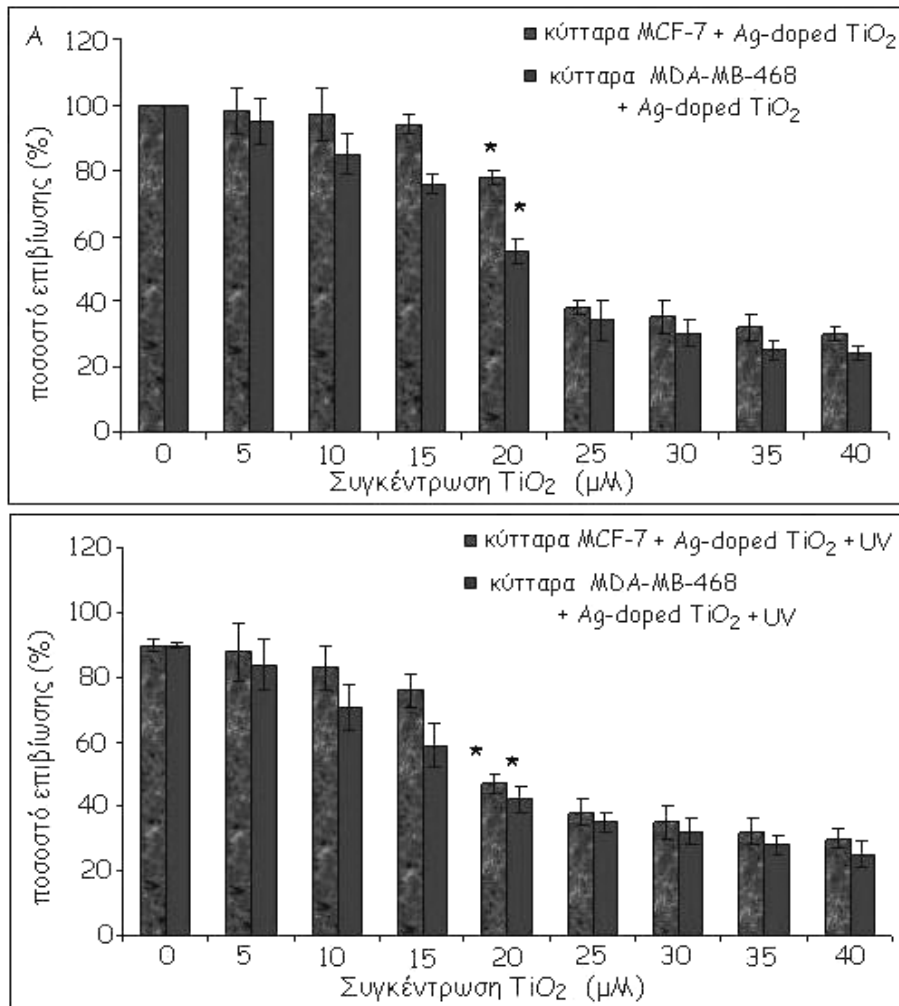
Ακολουθείται η γνωστή πειραματική διαδικασία για το εναιώρημα του τροποποιημένου με Άργυρο TiO_2 (Ag-doped TiO_2). Η ακτινοβολία γίνεται με ακτινοβολία UV – A. Ως θετικός μάρτυρας του πειράματος ορίζεται δείγμα, στο οποίο εισάγεται cis-platin (1 mg/ml). Όλες οι σειρές πειραμάτων πραγματοποιούνται αφού έχει ολοκληρωθεί η μελέτη του χαρακτηρισμού κάθε είδους TiO_2 . Τα αποτελέσματα προκύπτουν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα και συνοψίζονται στις καμπύλες επιβίωσης της εικόνας 4.20 και τα ραβδογράμματα της εικόνας 4.21.

Παρατηρείται ότι υπάρχει τοξική δράση του τροποποιημένου με Άργυρο TiO_2 (Ag-doped TiO_2) και στις δύο κυτταρικές σειρές. Η τοξικότητα αυτή καθορίζεται από τη συγκέντρωση του Ag-doped TiO_2 και είναι πιο έντονη στα κύτταρα MDA-MB-468. Είναι φανερό η βαθμιαία μείωση της κυτταρικής επιβίωσης, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του TiO_2 (Εικόνα 4.20 A). Φαίνεται πως μία ποσότητα περίπου στα 20 μM TiO_2 , είναι αποτελεσματική, με την έννοια ότι επάγει το θάνατο στο 50% του πληθυσμού των κυττάρων MDA-MB-468, αφήνοντας ένα σημαντικό πλήθος των κυττάρων MCF-7 σχεδόν ανεπηρέαστο, αφού, στην ίδια συγκέντρωση επιβιώνει το 80% του πληθυσμού. Η ίδια η ακτινοβολία UV-A επιδρά στην κυτταρική επιβίωση σε ένα μικρό ποσοστό. Συγκεκριμένα σχεδόν το 10% του πληθυσμού των κυττάρων πλήττεται, παρουσία της UV-A, χωρίς την προσθήκη του Ag-doped TiO_2 .

Και το φωτοενεργοποιημένο Ag-doped TiO_2 επιδρά εντονότερα, αυξανόμενης της συγκέντρωσής του. Το εύρος των συγκεντρώσεων Ag-doped TiO_2 που αποδεικνύονται δραστικές, κυμαίνεται μεταξύ 18 μM και 20 μM , στην περίπτωση των κυττάρων MDA-MB-468. Συγκεκριμένα, παρατηρείται σημαντική απώλεια κυτταρικού πληθυσμού, αφού σε αυτές τις συγκεντρώσεις, επιβιώνει τελικά περίπου το 50–60% των κυττάρων, ενώ για τις ίδιες συγκεντρώσεις Ag-doped TiO_2 , η βιωσιμότητα των MCF-7 παραμένει σχετικά υψηλή, αφού επιβιώνει το 70–80% του συνόλου τους (Εικόνα 4.20 B). Συνεπώς τα κύτταρα υψηλότερης διαφοροποίησης πλήττονται περισσότερο, δηλαδή είναι περισσότερο ευάλωτα στη δράση του Ag-doped TiO_2 και φυσικά του φωτοενεργοποιημένου με UV-A ακτινοβολία, Ag-doped TiO_2 , συγκρινόμενα με τα MCF-7 κύτταρα.



Εικόνα 4.20. Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου TiO_2 , τροποποιημένου με Άργυρο TiO_2 (Ag -doped TiO_2), στη βιωσιμότητα των κυττάρων – Καμπύλες Επιβίωσης. Κύτταρα $MCF-7$ και $MDAMB-468$ καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες Ag -doped TiO_2 . Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με ακτινοβολία $UV-A$ για 20 λεπτά και επωάστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT . (A) Επίδραση της συγκέντρωσης του Ag -doped TiO_2 στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργοποιημένου με ακτινοβολία $UV-A$, Ag -doped TiO_2 , στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $L \pm \delta L$, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως 95%.



Εικόνα 4.21. Επίδραση των νανοσωματιδίων φωτοενεργοποιημένου TiO₂, τροποποιημένου Άργυρο TiO₂ (Ag-doped TiO₂), στη βιωσιμότητα των κυττάρων - ραβδογράμματα. Κύτταρα MCF-7 και MDAMB-468 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες και προστέθηκαν στις καλλιέργειες, αυξανόμενες ποσότητες Ag-doped TiO₂. Κάποια δείγματα ακτινοβολήθηκαν με ακτινοβολία UV-A για 20 λεπτά και επώαστηκαν για 48 ώρες. Η κυτταρική επιβίωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ΜΤΤ. (Α) Επίδραση της συγκέντρωσης του Ag-doped TiO₂, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. (Β) Επίδραση της συγκέντρωσης του φωτοενεργοποιημένου με ακτινοβολία UV-A, Ag-doped TiO₂, στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως L±δL, όπως προέκυψαν από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.

4.3 Κυτταρομετρία Ροής – FACSscan

Η χρήση κυτταρομετρίας ροής παρέχει τη δυνατότητα ποσοτικής ανάλυσης κάποιου κυτταρικού συστατικού σε έναν πληθυσμό κυττάρων, μέσω σήμανσης του συστατικού

αυτού, με ειδικό χρωμοφόρο μόριο. Το μόριο αυτό διεγερόμενο, από ακτινοβολία συγκεκριμένης συχνότητας από την πηγή laser, εκπέμπει σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, που καταγράφεται από τον ανιχνευτή του οργάνου. Το σήμα φθορισμού του επισημασμένου DNA είναι ευθέως ανάλογο με τη συνολική ποσότητα DNA στον πυρήνα [186]. Ταυτόχρονα επιτρέπει την ανάλυση της σκέδασης της ακτινοβολίας, ως αποτέλεσμα της επαφής της δέσμης laser με το κύτταρο. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από εκτενείς, αλλά ιδιαίτερα γρήγορες, αναλύσεις είναι δυνατή η λήψη πληροφοριών, σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου [188].

Ο συνδυασμός των δύο τύπων μέτρησης, ονομάζεται πολύ-παραμετρικός, και επιτρέπει να ταξινομηθεί, ένας ανομοιογενής πληθυσμός, ως προς τα επιλεγμένα από εμάς, βιοχημικά ή φυσικά χαρακτηριστικά του.

4.3.1 Χρώση με PI (Propidium Iodide) - Κυτταρομετρία ροής

(Επίδραση του φωτο-ενεργοποιημένου sol-gel TiO₂ στον κυτταρικό κύκλο)

Στην παρούσα εργασία, η τεχνική της κυτταρομετρίας χρησιμοποιήθηκε, με στόχο τη μελέτη της επίδρασης των νανοδομημένων σωματιών TiO₂ στον κυτταρικό κύκλο. Εφαρμόστηκε μέθοδος χρώσης DNA (DNA staining) - Κυτταρομετρία ροής.

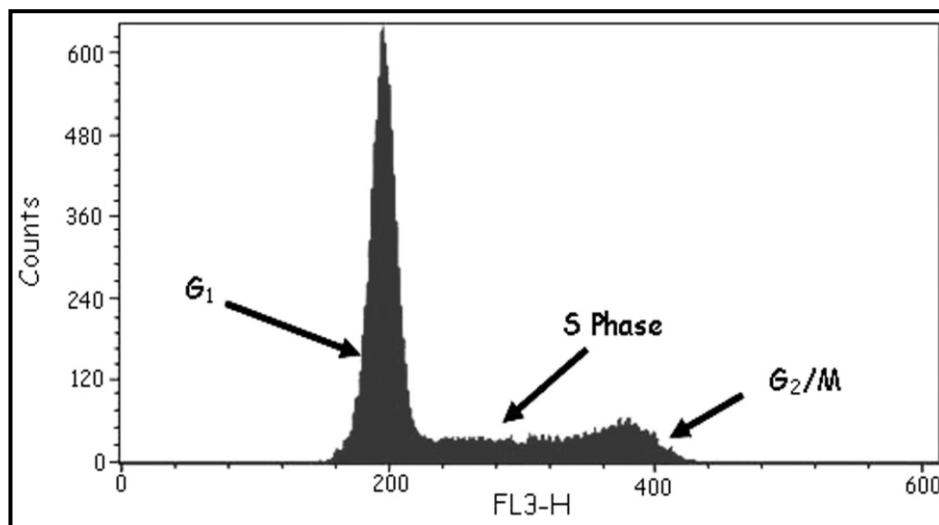
Όπως ήδη έχει αναφερθεί στην ενότητα 2.5, η κυτταρομετρία ροής επιτρέπει να εκτιμηθεί το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται σε κάθε φάση του κύκλου (ανάλυση του κυτταρικού κύκλου) αλλά και το ολικό περιεχόμενο του DNA ενός κυτταρικού πληθυσμού (περιεκτικότητα των κυττάρων σε DNA ή DNA πλοειδία).

Η σύνδεση DNA-χρωστικής είναι στοιχειομετρική, δηλαδή το ποσό της χρωστικής που συνδέεται είναι ανάλογο του ποσού του DNA στο κύτταρο [20].

Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού είναι ανάλογη του ποσού της χρωστικής που έχει δεσμευθεί από το DNA. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη χρωστική είναι το ιωδίδιο του προπιδίου (Propidium Iodide, PI), το οποίο ενώ δεν είναι απόλυτα ειδικό για το DNA, έχει καλά φασματικά χαρακτηριστικά, που το καθιστούν κατάλληλο για πολυπαραμετρικές μετρήσεις.

Στα διαγράμματα που προκύπτουν από την κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 4.22) γίνεται ένας διαχωρισμός των κυττάρων ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου

στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα (κυρίως δίνεται έμφαση στη G_1 , S και G_2 φάση). Όπως ήδη έχει αναφερθεί, ο κύκλος ζωής του κυττάρου αποτελείται από τη φάση της κυτταρικής διαίρεσης (φάση -M, μετάφαση) και από τη μεσόφαση. Η μεσόφαση υποδιαιρείται στις φάσεις G_1 , S και G_2 . Στη G_1 -φάση που είναι η μεγαλύτερη σε διάρκεια (6-12 ώρες) φάση του κυτταρικού κύκλου πραγματοποιείται η βιοσύνθεση του mRNA, του tRNA, των ριβοσωμάτων και των πρωτεϊνών. Στη φάση της σύνθεσης (S-φάση, διάρκειας 7-9 ώρες), πραγματοποιείται ο διπλασιασμός του κυτταρικού DNA και κατά τη G_2 - φάση (διάρκειας 3-4 ώρες) το κύτταρο προετοιμάζεται για τη διαδικασία της μίτωσης (διάρκεια 1 ώρα) κατά την οποία πραγματοποιείται η διαίρεση σε θυγατρικά κύτταρα με τον ίδιο αριθμό χρωμοσωμάτων. Η πρώτη κορυφή σε κάθε διάγραμμα που λαμβάνεται από ένα κυτταρικό πληθυσμό, μετά την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής, δίνει το πλήθος των κυττάρων που βρίσκεται στη φάση G_1 , η δεύτερη το πλήθος αυτών που βρίσκεται στη φάση G_2 και η περιοχή μεταξύ των δύο κορυφών δίνει τον αριθμό αυτών που βρίσκονται στη φάση S (Εικόνα 4.22).



Εικόνα 4.22. Τυπική εικόνα κυτταρομετρίας ροής, για ανάλυση του κυτταρικού κύκλου, με βάση το περιεχόμενο ενός πληθυσμού κυττάρων, σε DNA, μετά από χρώση με PI.

Για τις ανάγκες του πειράματος, κύτταρα, MCF-7 και MDA-MB-468 καλλιεργούνται για 24 ώρες σε τριβλία διαμέτρου 10 cm, σε πλήρες θρεπτικό υλικό, σε ειδικό επωαστήρα με 5% περιεκτικότητα σε CO_2 στους $37^\circ C$. Κατόπιν προστίθενται $15 \mu M$ sol-gel TiO_2 και τα κύτταρα ακτινοβολούνται για 20 min με ακτινοβολία UV-A (350nm). Σε όλες τις συνθήκες που εξετάζονται, πραγματοποιούνται δύο σειρές με τέσσερα ανεξάρτητα

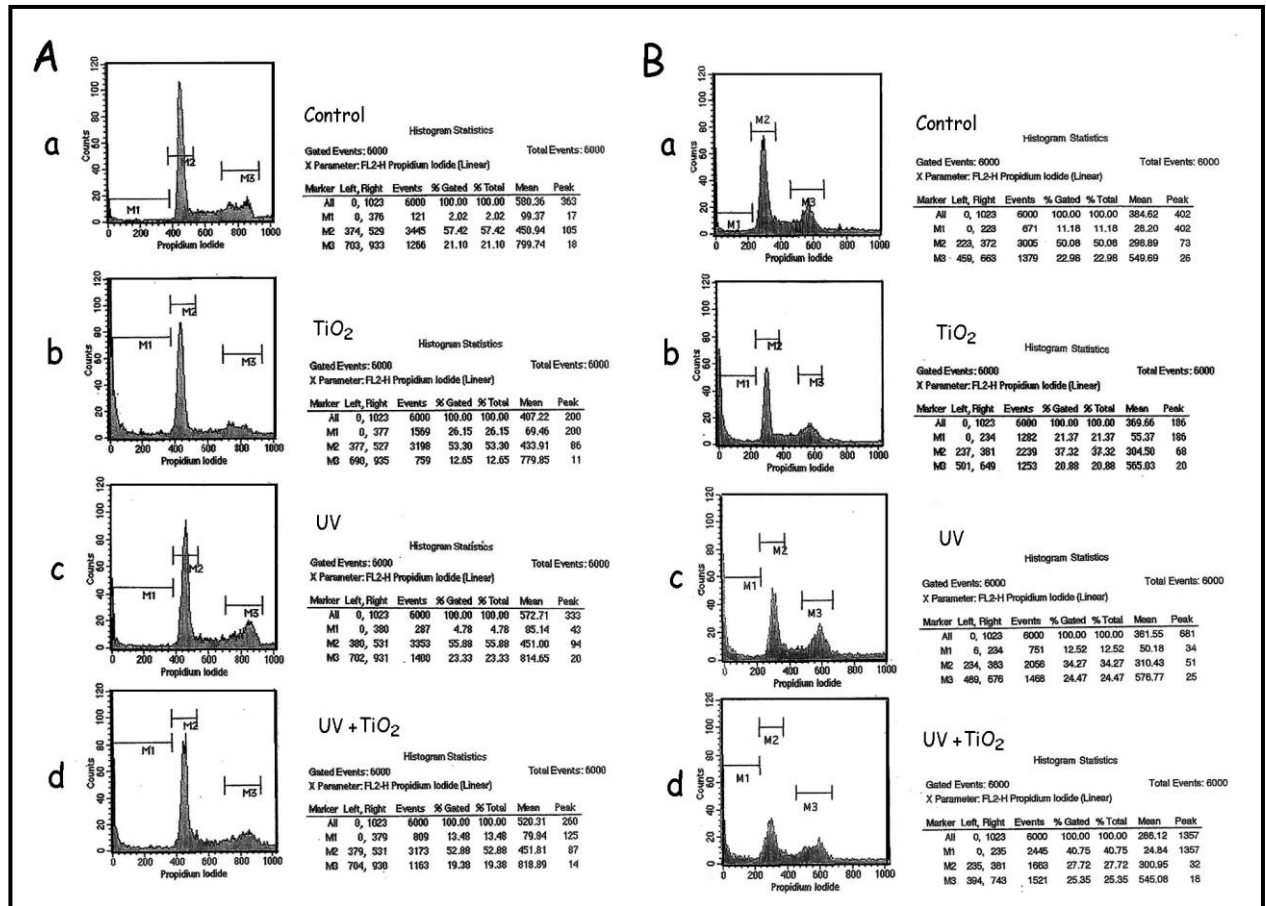
πειράματα η καθεμία, και με διπλά δείγματα. Στην πρώτη σειρά πειραμάτων επιλέγεται ένας αρχικός αριθμός 1.000.000 κυττάρων ανά τριβλίο. Στη δεύτερη σειρά πειραμάτων επιλέγεται ο αριθμός των 2.000.000 κύτταρα ανά τριβλίο. Τα αποτελέσματα δεν φαίνεται να επηρεάζονται από αυτή την επιλογή. Μετά από επώαση 48 ωρών, ακολουθείται το πρωτόκολλο που έχει ήδη περιγραφεί, στην ενότητα 2.5 και η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACScan, Beckton-Dickinson, BD Biosciences, US [187], μήκος κύματος εκπομπής: 617 nm, μήκος κύματος απορρόφησης: 535 nm).

Λόγω του γεγονότος ότι ο σκοπός αυτού πειράματος ήταν ο έλεγχος της δράσης των νανοσωματιδίων TiO_2 σε μορφή sol-gel, στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, δεν υπήρχε λόγος να συγχρονίσουμε την καλλιέργειά μας, αφαιρώντας τον ορό από το θρεπτικό υλικό πριν το πείραμα. Επιπλέον κατά αυτόν τον τρόπο έχουμε μια καλύτερη προσέγγιση της κανονικής συμπεριφοράς ενός πληθυσμού κυττάρων που πολλαπλασιάζεται.

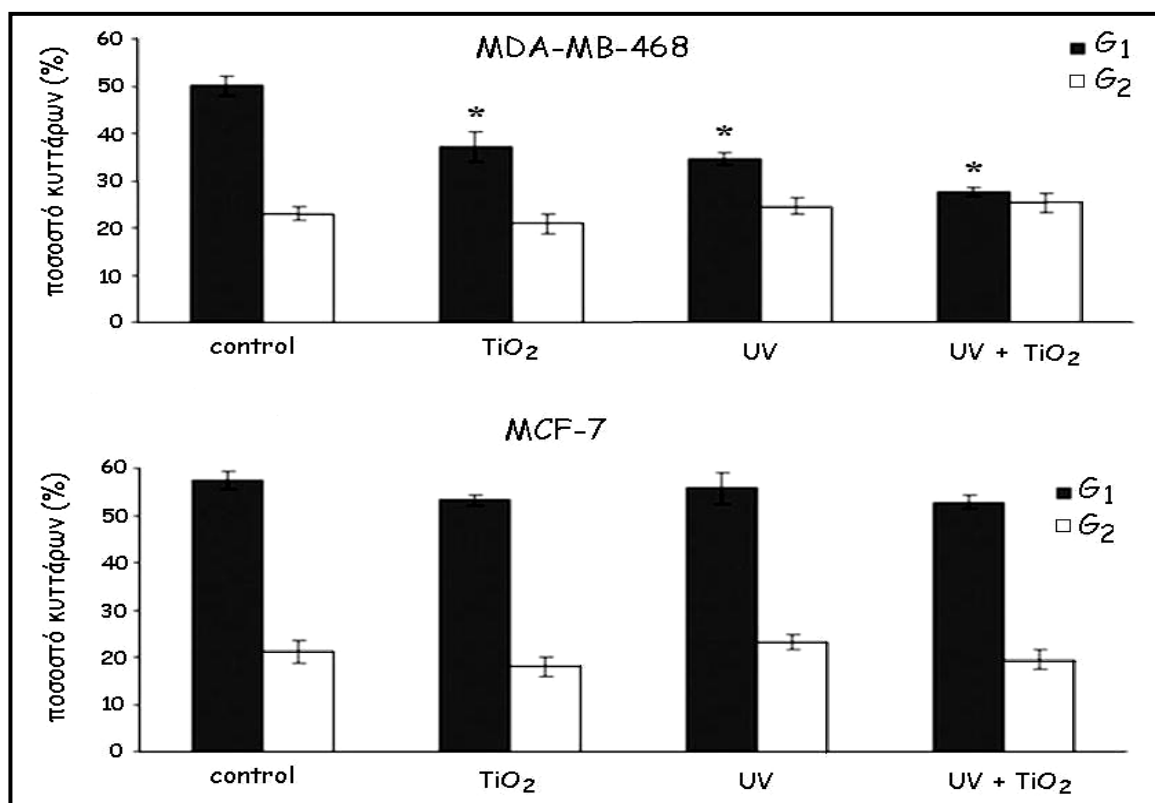
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 4.23, όπως αυτά προκύπτουν από την κυτταρομετρία ροής και στην εικόνα 4.24 παρατίθενται τα ραβδογράμματα που συγκρίνουν το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στη G_1 , και G_2 φάση του κυτταρικού κύκλου και για τις δύο κυτταρικές σειρές, με βάση τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής.

Φαίνεται ότι υπάρχει μια επιλεκτική δράση του sol-gel TiO_2 στα κύτταρα MDA-MB-468, που παρουσιάζουν μεγαλύτερου βαθμού κακοήθεια, ενώ τα MCF-7 δεν δείχνουν να έχουν επηρεαστεί σοβαρά από το TiO_2 . Παρατηρώντας τις κορυφές στα διαγράμματα του σχήματος 4.23, προκύπτει ξεκάθαρα το συμπέρασμα ότι στα MDA-MB-468 κύτταρα, η προσθήκη του TiO_2 ή ακτινοβολήση με UV-A (απουσία του φωτοκαταλύτη) οδήγησε σε μείωση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G_1 (Εικόνα 4.23 B (b), (c) - M2 δείκτης) σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες (Εικόνα 4.23 B (α) - M2 δείκτης). Οι αντίστοιχες συνθήκες δεν φαίνεται να επηρέασαν τα MCF-7 κύτταρα (Εικόνα 4.23 A (b), (c) - M2 δείκτης). Η επίδραση των νανοσωματιδίων του TiO_2 δείχνει να είναι εντονότερη στην περίπτωση ακτινοβολήσης των MDA-MB-468 κυττάρων παρουσία του sol-gel TiO_2 . Συγκεκριμένα μια μείωση της τάξης του 70% παρατηρείται στον αριθμό των κυττάρων που βρίσκονται στη G_1 φάση (Εικόνα 4.23 B (d) - M2 δείκτης). Δεν παρατηρείται αντίστοιχη δράση στα MCF-7 (Εικόνα 4.23 A (d)).

Συνοψίζοντας, τα MDA-MB-468 κύτταρα εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στα ενεργοποιημένα με UV-A ακτινοβολία νανοσωματίδια TiO_2 συγκριτικά με τα MCF-7 και η ευαισθησία αυτή τα οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (νέκρωση ή απόπτωση).



Εικόνα 4.23. Επίδραση του φωτο-ενεργοποιημένου sol-gel TiO_2 στον κυτταρικό κύκλο - Αποτελέσματα από την Κυτταρομετρία Ροής. Κύτταρα MDA-MB-468 και MCF-7 επώασθηκαν παρουσία φωτοενεργοποιημένου με ακτινοβολία UV-A sol-gel TiO_2 (15 μ M) για 48 ώρες και μονιμοποιήθηκαν. Ακολούθησε η ποσοτικοποίηση DNA με χρώση με PI και κυτταρομετρία ροής (FACSscan). (A) Αποτελέσματα από το FACS, για τα MCF-7 κύτταρα. Μετρήθηκαν 6000 γεγονότα ανά δείγμα. Ο δείκτης M2 υποδηλώνει το πλήθος των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G_1 και ο M3, το πλήθος των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις G_2/M : (a) control κύτταρα, (b) κύτταρα στα οποία προστέθηκαν 15 μ M sol-gel TiO_2 , (c) κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν με UV-A, (d) κύτταρα στα οποία προστέθηκε φωτο-ενεργοποιημένο sol-gel TiO_2 . (B) Αποτελέσματα από το FACS, για τα MDA-MB-468 κύτταρα. Μετρήθηκαν 6000 γεγονότα ανά δείγμα. (a) control κύτταρα, (b) κύτταρα στα οποία προστέθηκαν 15 μ M sol-gel TiO_2 , (c) κύτταρα που ακτινοβολήθηκαν με UV-A, (d) κύτταρα στα οποία προστέθηκε φωτο-ενεργοποιημένο sol-gel TiO_2 .



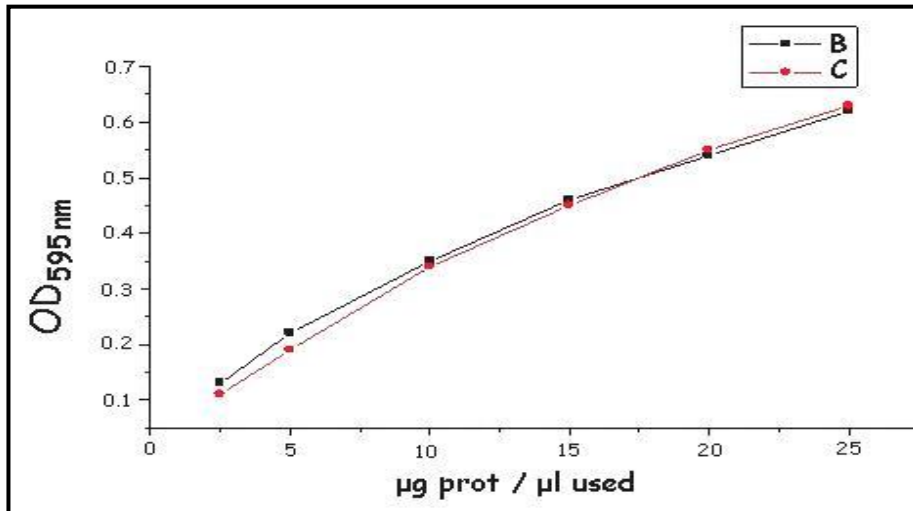
Εικόνα 4.24. Συγκριτικά ραβδογράμματα που απεικονίζουν το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις G₁ και G₂ του κυτταρικού κύκλου, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από την κυτταρομετρία ροής, τα οποία παρουσιάζονται ως $\bar{x} \pm \delta x$, όπως προέκυψαν από τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται ως το 95%.

4.4 Απομόνωση πρωτεϊνών

4.4.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών από κύτταρα - Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Η επιλογή των συνθηκών εκχύλισης πρωτεϊνών και τα ρυθμιστικό διάλυμα λύσης βασίζεται σε δημοσιευμένα πρωτόκολλα [190] και σχετίζεται με τις πρωτεΐνες που πρόκειται να διερευνηθεί η ενεργοποίησή τους.

Η συγκέντρωση του διαλύματος πρωτεϊνών προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά, με τη χρήση του αντιδραστηρίου Coomassie Brilliant Blue και τα αποτελέσματα συγκρίνονται με την πρότυπη καμπύλη, για το σχεδιασμό της οποίας, χρησιμοποιείται οποιαδήποτε κοινή πρωτεΐνη (συνήθως οροαλβουμίνη βοδιού (BSA – bovine serum albumin) ή ανοσοσφαιρίνη γ (IgG – immunoglobulin G)). Σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα 3.4.2, ετοιμάζεται ένα διάγραμμα συγκέντρωσης-απορρόφησης στα 595nm, το οποίο αποτελεί την καμπύλη αναφοράς (εικόνα 4.25).



Εικόνα 4.25. Πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό της ποσότητας της πρωτεΐνης κάθε δείγματος

4.4.2 Ανάλυση κατά Western (Western Blotting) (Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS - PAGE) - Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης)

Η ολική πρωτεΐνη από τα λύματα κυττάρων αναλύεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Η τελική της συγκέντρωση στο πήκτωμα διαχωρισμού, καθορίζεται από το μέγεθος των πρωτεϊνών (δηλαδή από το μοριακό βάρος) που πρόκειται να ανιχνευτούν (πήκτωμα 12% για: κασπάση-3, Bcl-2, Bcl-X_L, Bad και Bax και 7.5% για την PARP).

Με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, οι φορτισμένες πολυπεπτιδικές αλυσίδες κινούνται μέσα στους πόρους του πηκτώματος (προς την κάθοδο) με διαφορετική κινητικότητα που εξαρτάται από το μοριακό τους βάρος και έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους [195], [196].

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται, με σταθερή εφαρμοζόμενη τάση 150 V σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι να διαχωριστούν ικανοποιητικά οι πρωτεΐνες και στη συνέχεια με τάση 80 V. Οι πρωτεΐνες, στη συνέχεια, μεταφέρονται από το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, με εφαρμοζόμενο ρεύμα έντασης 390 mA στους 40°C, υπό συνεχή ανάδευση. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται με τη χρήση χημειοφωταύγειας. Τελικά η παραγωγή των φωτονίων αποτυπώνεται ως μια μαύρη ζώνη, η οπτική πυκνότητα της οποίας καθορίζεται από τη ποσότητα του

αντιγόνου. Οι μεταβολές της πυκνότητας των ζωνών που αντιστοιχούν στο ίδιο αντιγόνο, ανάμεσα σε δυο ισόποσα δείγματα ολικής πρωτεΐνης που αναλύονται με ανοσοαποτύπωση, αντιστοιχούν σε σχετική μεταβολή της ποσότητας του αντιγόνου [195].

Μετά την πρώτη εμφάνιση των ζωνών, η κάθε μεμβράνη επωάζεται για 20 λεπτά με έτοιμο αντιδραστήριο απομάκρυνσης αντισωμάτων (RE-BLOT PLUS Western Blot Stripping Solution – MILLIPORE, Billerica, Massachusetts, US) [196] και ανοσοαποτυπώνεται με αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης.

Το ποσό της τουμπουλίνης, που εμφανίζεται για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων της υπό εξέταση πρωτεΐνης στα δείγματα που αναλύονται με ανοσοαποτύπωση.

4.4.3 Έλεγχος αποπτωτικής δράσης του sol-gel TiO₂

Για τις ανάγκες των πειραμάτων, καλλιεργούνται σε πλάκες έξι φρεατίων, κύτταρα MDA-MB-468 και MCF-7, για 24 ώρες. Στη συνέχεια, προστίθεται sol-gel TiO₂, ακολουθεί ακτινοβολία με ακτινοβολία UV-A (350nm) για 20 λεπτά και επώαση 48 ωρών. Ως θετικοί μάρτυρες για τον έλεγχο της θραύσης της PARP, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων, στα οποία προστέθηκαν 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη λύση, όπως και κύτταρα από καλλιέργεια που απουσίαζε ο ορός. Πραγματοποιούνται τρεις ανεξάρτητες σειρές πειραμάτων, με διπλά δείγματα, ανά συνθήκη. Τα αποτελέσματα από τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western που έγιναν με έκθεση των μεμβρανών σε φιλμ αυτοραδιογραφίας, μεταφέρθηκαν σε αρχεία προς επεξεργασία, με scanner HP Photosmart C4180 All-in-One και οι πυκνότητες των ζωνών χημειοφωταύγειας αναλύθηκαν με τη χρήση δύο διαφορετικών ειδικών λογισμικών επεξεργασίας εικόνας (IDL και ImageJ).

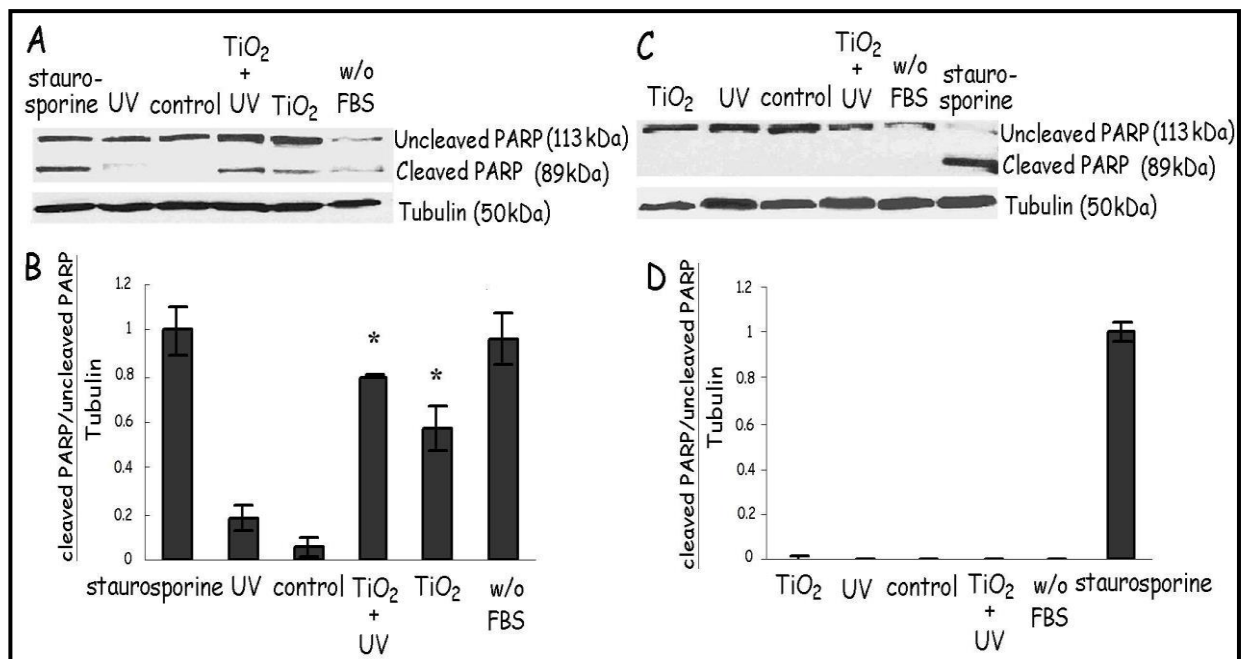
4.4.3.1 Επίδραση του sol-gel TiO₂ στην ενεργοποίηση της PARP

Τα κύτταρα οδηγούνται στην απόπτωση, μέσω μιας διαδικασίας που διαμεσολαβείται από την οικογένεια των κασπασών, όπως έχει προαναφερθεί, συμπεριλαμβανομένης και της κασπάσης-3. Ένας από τους κύριους στόχους της κασπάσης-3 είναι η PARP [(Poly (ADP-Ribose) Polymerase) - (Πολυμεράση της πολυ(ADP-ριβόζης))] με μοριακό

βάρος 113 kDa, που συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA κυττάρων που έχουν υποστεί στρες [219] και απαντάται στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η PARP μετατρέπεται, από την ενεργοποιημένη κασπάση-3, σε προϊόντα μικρότερου μοριακού βάρους. Η διάσπαση της PARP διευκολύνει την αποδόμηση και αποσυγκρότηση του κυττάρου και επομένως ο εντοπισμός της μας προσφέρει τη δυνατότητα να έχουμε ένα δείκτη της απόπτωσης [220], [221], [222].

Η εικόνα 4.26 A-B δείχνει ότι η επίδραση των φωτο-ενεργοποιημένων ή μη, νανοκρυστάλλων TiO_2 σε μορφή sol-gel, στα MDA-MB-468, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της θραύσης της PARP σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, αφού ανιχνεύεται το θραύσμα στα 85 kDa.

Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, στα MCF-7 κύτταρα, δεν ανιχνεύεται το θραύσμα της PARP (Εικόνα 4.26 C-D). Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το φωτο-ενεργοποιημένα ή μη, νανοσωματίδια TiO_2 σε μορφή sol-gel επάγουν απόπτωση κυρίως στα MDA-MB-468 κύτταρα.



Εικόνα 4.26. Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης TiO_2 από ανάλυση κατά Western. Το φωτο - ενεργοποιημένο TiO_2 επάγει την θραύση του PARP στα κύτταρα MDA-MB-468. Κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO_2 (15 μ M) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η θραύση του PARP, με ανοσοαποτύπωση και αντίσωμα που αναγνωρίζει την ανέπαφη PARP, αλλά και τα πρωτεολυτικά θραύσματα του μορίου (A και C). Στην εικόνα

παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης ζώνης για την ανέπαφη PARP, αλλά και τα πρωτεολυτικά θραύσματα του μορίου. Ως θετικοί μάρτυρες, για τον έλεγχο της θραύσης της PARP, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων, στα οποία προστέθηκαν 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη λύση, όπως και κύτταρα από καλλιέργεια που απουσίαζε ο ορός. Το ποσό της τουμπουλίνης, που εμφανίζεται στο φιλμ αυτοραδιογραφίας για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων της υπό εξέταση πρωτεΐνης. (B και D) Ποσοτικοποίηση της οπτικής πυκνότητας του λόγου θραύσμα PARP/ανέπαφη PARP/προς τουμπουλίνη. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το $*P < 0.05$, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.

4.4.3.2 Επίδραση του sol-gel TiO_2 στη ρύθμιση και έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών

Τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών παίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση και τη διεξαγωγή της απόπτωσης. Το κύριο προαποπτωτικό μόριο είναι το Bax, το οποίο σχηματίζει πόρους στη μεμβράνη του μιτοχονδρίου και οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση. Αντίθετα, τα Bcl-2 και Bcl-x_L έχουν αντιαποπτωτική δράση, αφού καθένα από αυτά δεσμεύεται στο Bax και αναστέλλει τη δράση του.

Τέλος, υπάρχουν και μόρια-ρυθμιστές όπως το Bad που δεσμεύονται στα Bcl-2 ή Bcl-x_L με αποτέλεσμα τα τελευταία να μη μπορούν να αναστείλουν την αποπτωτική δράση του Bax [101], [102].

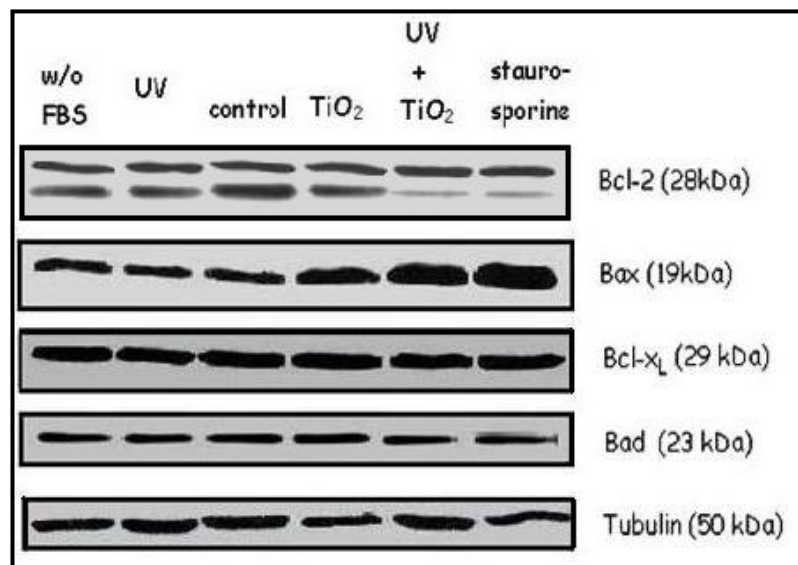
Η ρύθμιση και έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων καθορίζει το αν ένα κύτταρο θα οδηγηθεί σε απόπτωση ή σε κυτταρική επιβίωση.

Για τη μελέτη αυτή εκτελέστηκε η ίδια πειραματική διαδικασία.

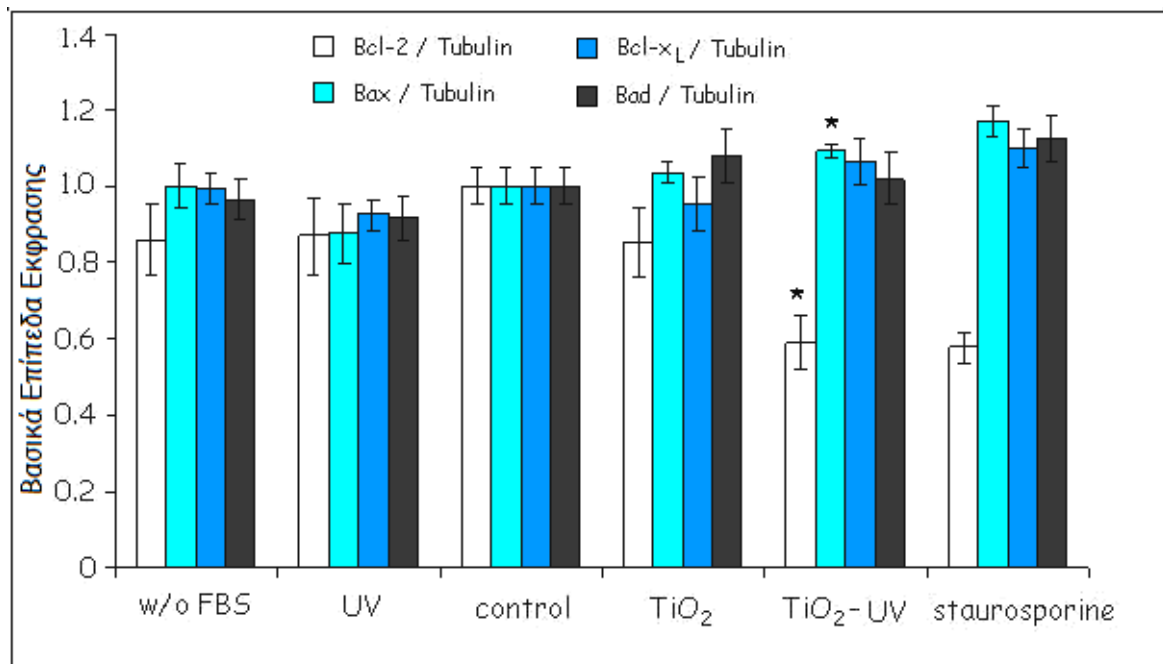
Στην εικόνα 4.27 και στο ραβδόγραμμα της εικόνας 4.28, φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO_2 σε μορφή sol-gel, στα κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης MDA-MB-468, οδηγεί σε μείωση της Bcl-2, γεγονός που αποτελεί ένδειξη για αποπτωτική δραστηριότητα και ταυτόχρονα αύξηση στην Bax, επιβεβαιώνοντας το παραπάνω συμπέρασμα. Τα επίπεδα των Bcl-x_L και Bad παραμένουν αμετάβλητα.

Η τουμπουλίνη χρησιμεύει ως επίπεδο αναφοράς για την ποσότητα των πρωτεϊνών που αναλύεται κατά Western και με βάση τα επίπεδά της κανονικοποιούνται όλα τα

αποτελέσματα. Στη συνέχεια γίνεται μία ακόμη κανονικοποίηση ως προς την οπτική πυκνότητα του δείγματος που αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα, η οποία θεωρείται αυθαίρετα ότι εμφανίζει O.D=1 και τα αποτελέσματα των υπολοίπων συνθηκών συμπαράσφρονται, κάτω αυτή τη μετατροπή, σε μία νέα σειρά τιμών, ανάλογων προς τις απόλυτες τιμές της οπτικής του πυκνότητας. Αυτή η διαδικασία προσφέρει τη δυνατότητα μιας πιο ακριβούς και αξιόπιστης σύγκρισης, μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών του πειράματος, η οποία εν συνεχεία διατρανώνεται και με στατιστική ανάλυση.

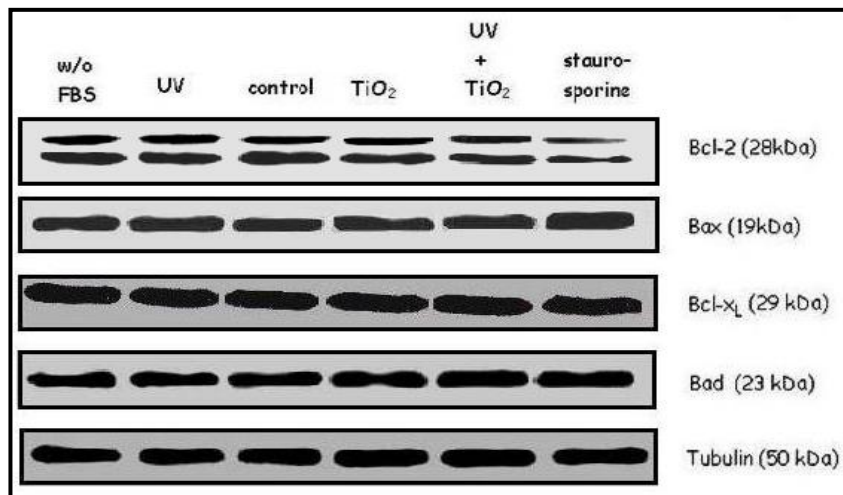


Εικόνα 4.27. Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης TiO₂ στα κύτταρα MDA-MB-468, από ανάλυση κατά Western. Κύτταρα MDA-MB-468 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO₂ (15μM) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων, με ανοσοαποτύπωση. Ως θετικοί μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων, στα οποία προστέθηκαν 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη λύση, όπως και κύτταρα από καλλιέργεια που απουσίαζε ο ορός. Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτοενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO₂ σε μορφή sol-gel, στα κύτταρα MDA-MB-468, οδηγεί σε μείωση της Bcl-2 και αύξηση της Bax, γεγονός που αποτελεί ένδειξη για αποπτωτική δραστηριότητα. Το ποσό της τουμπουλίνης, που εμφανίζεται στο φιλμ αυτοραδιογραφίας για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών.

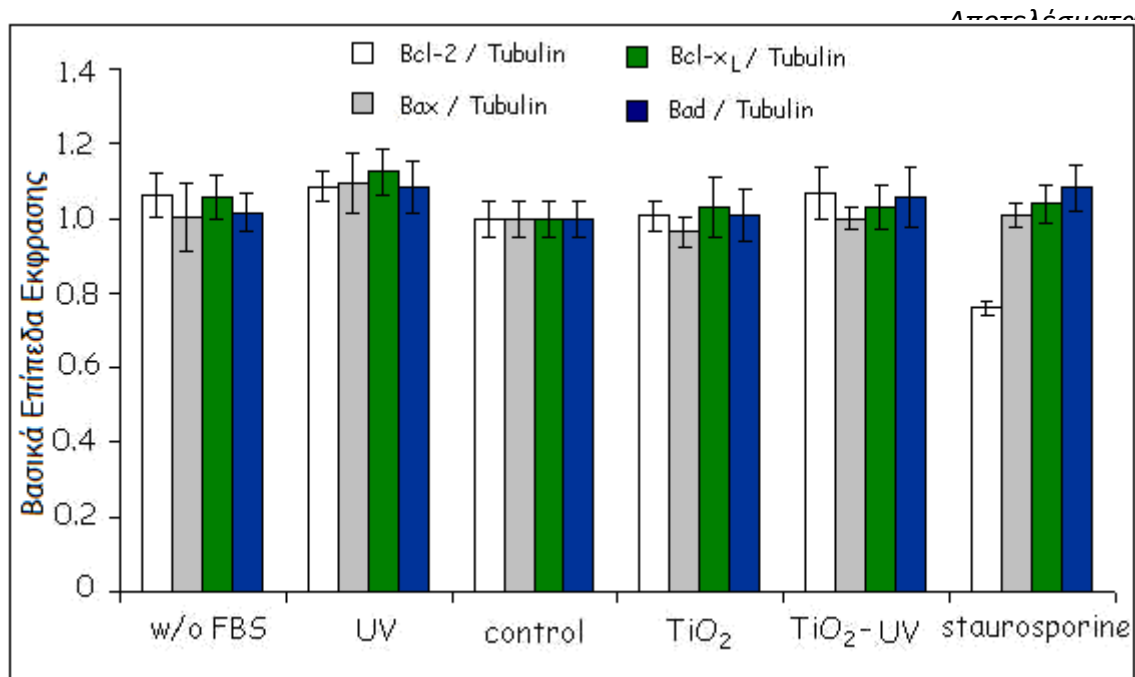


Εικόνα 4.28. Αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης κατά Western κατά τη μελέτη της ρύθμισης και έκφρασης των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Κύτταρα MDA-MB-468 επωάστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO₂ (15μM). Ως θετικοί μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων, στα οποία προστέθηκαν 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη λύση, όπως και κύτταρα από καλλιέργεια που απουσίαζε ο ορός. Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτοενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO₂ σε μορφή sol-gel, στα κύτταρα MDA-MB-468, οδηγεί σε μείωση της Bcl-2 και αύξηση της Bax, γεγονός που αποτελεί ένδειξη για αποπτωτική δραστηριότητα. Το ποσό της τουμπουλίνης, που εμφανίζεται στο φιλμ αυτοραδιογραφίας για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean±SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το *P < 0.05, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.

Αντίστοιχα δεν παρουσιάζεται αξιοσημείωτη αυξομείωση στα επίπεδα των μελών της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών, κάτω από τις ίδιες συνθήκες για την περίπτωση των κυττάρων MCF-7, όπως φαίνεται στις εικόνες 4.29 και 4.30.



Εικόνα 4.29. Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης TiO_2 στα κύτταρα MCF-7, από ανάλυση κατά Western. Κύτταρα MCF-7 επωάστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO_2 (15 μ M) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάσθηκε η έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων, με ανοσοαποτύπωση. Ως θετικοί μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων, στα οποία προστέθηκαν 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη λύση, όπως και κύτταρα από καλλιέργεια που απουσίαζε ο ορός. Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτοενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO_2 σε μορφή sol-gel, στα κύτταρα MCF-7 δεν προκαλεί αλλαγή στην έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων. Το ποσό της τουμπουλίνης, που εμφανίζεται στο φιλμ αυτοραδιογραφίας για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το $*P < 0.05$, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.



Εικόνα 4.30. Αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης κατά Western κατά τη μελέτη της ρύθμισης και έκφρασης των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO₂ (15μM). Ως θετικοί μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων, στα οποία προστέθηκαν 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη λύση, όπως και κύτταρα από καλλιέργεια που απουσίαζε ο ορός. Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO₂ σε μορφή sol-gel, στα κύτταρα MCF-7, δεν προκαλεί αλλαγή στην έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων. Το ποσό της τουμπουλίνης, που εμφανίζεται στο φιλμ αυτοραδιογραφίας για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean±SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το *P < 0.05, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.

4.4.4 Έλεγχος αποπτωτικής δράσης των εναιωρημάτων TiO₂ (Evonik P25) και TiO₂ (Sigma Aldrich)

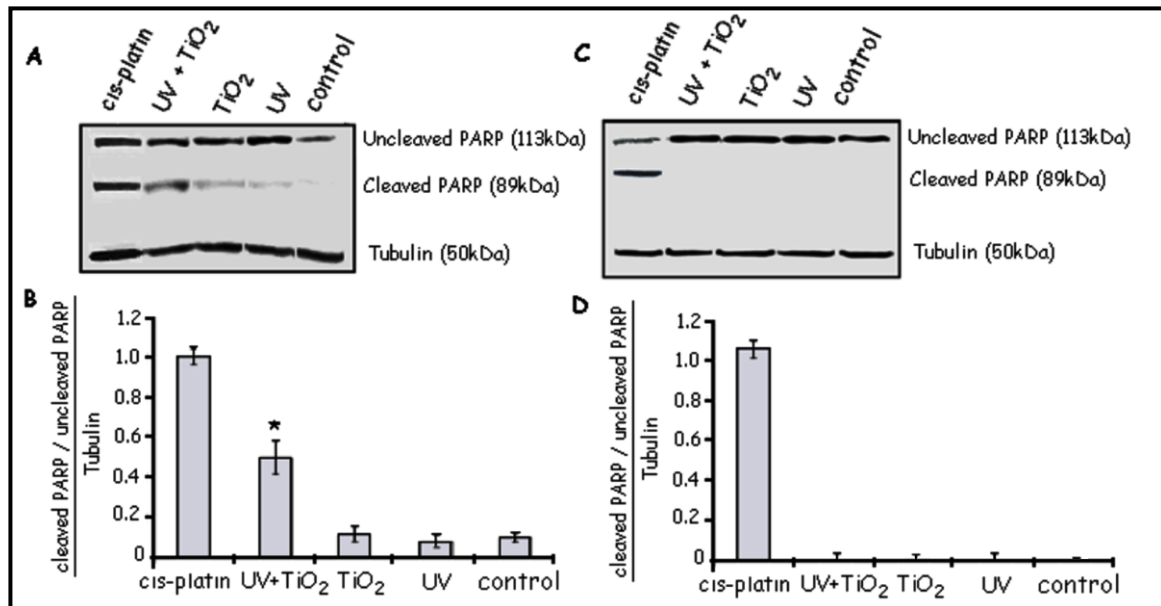
Για τις ανάγκες των πειραμάτων, καλλιεργούνται σε πλάκες έξι φρεατίων, κύτταρα MDA-MB-468 και MCF-7, για 24 ώρες. Στη συνέχεια, προστίθεται το εναιώρημα TiO₂ (Evonik P25) ή το εναιώρημα TiO₂ (Sigma Aldrich) και ακολουθεί ακτινοβολία με ακτινοβολία UV-A (350nm) για 20 λεπτά και επώαση 48 ωρών. Ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο της θραύσης της PARP, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) με επώαση 24 ωρών. Η έκθεση των μεμβρανών γίνεται σε συσκευή Luminescent Image Analyser LAS-4000, εξοπλισμένη με

κάμερα τύπου CCD chip και ειδικό λογισμικό LAS-4000 Image Reader για τον έλεγχο όλης της διαδικασίας, ανάλυση και αποθήκευση εικόνων και λογισμικό AIDA Image Analyser για μετατροπή εικόνων σε επεξεργάσιμη, από κοινό υπολογιστή, μορφή [211]. Πραγματοποιούνται τρεις ανεξάρτητες σειρές πειραμάτων, με διπλά δείγματα, ανά συνθήκη.

4.4.4.1 Επίδραση του εναιωρήματος TiO_2 (Evonik P25) στην ενεργοποίηση της PARP

Η εικόνα 4.31 A-B δείχνει ότι η επίδραση του φωτο-ενεργοποιημένου εναιωρήματος TiO_2 (Evonik P25), στα MDA-MB-468, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της θραύσης της PARP σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, και αυτό φαίνεται από την ανίχνευση του θραύσματος της PARP στα 85 kDa.

Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, στα MCF-7 κύτταρα, δεν ανιχνεύεται το θραύσμα της PARP (Εικόνα 4.31 C-D). Έτσι, είναι φανερό ότι τα φωτο-ενεργοποιημένα νανοσωματίδια TiO_2 (Evonik P25), σε μορφή εναιωρήματος επάγουν απόπτωση στα MDA-MB-468 κύτταρα.



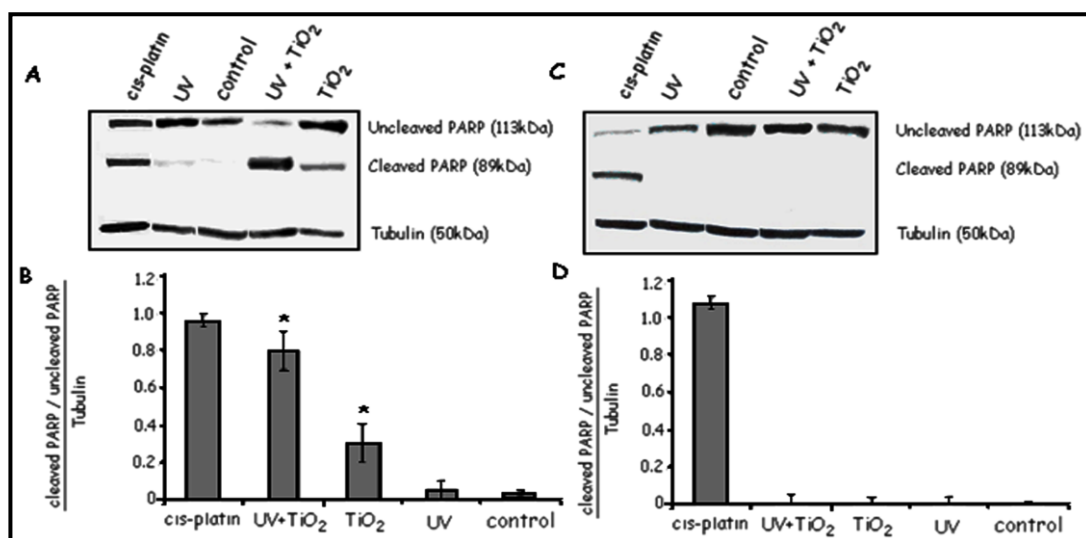
Εικόνα 4.31. Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης του εναιωρήματος TiO_2 (Evonik P25), από ανάλυση κατά Western. Το φωτο - ενεργοποιημένο TiO_2 (Evonik P25) επάγει την θραύση του PARP στα κύτταρα MDA-MB-468. Κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών επωάστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO_2 (15 μM) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η θραύση του PARP, με ανοσοαποτύπωση και αντίσωμα που αναγνωρίζει την ανέπαφη PARP, αλλά και τα πρωτεολυτικά θραύσματα του

μορίου (A και C). Στην εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης ζώνης για την ανέπαφη PARP, αλλά και τα πρωτεολυτικά θραύσματα του μορίου. Ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο της θραύσης της PARP, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί *cis-platin* (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων της υπό εξέταση πρωτεΐνης. (B και D). Ποσοτικοποίηση της οπτικής πυκνότητας του λόγου θραύσμα PARP/ανέπαφη PARP/προς τουμπουλίνη. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το $*P < 0.05$, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.

4.4.4.2 Επίδραση του εναιωρήματος TiO_2 (Sigma Aldrich) στην ενεργοποίηση της PARP

Η εικόνα 4.32 A-B δείχνει ότι η επίδραση του φωτο-ενεργοποιημένου ή μη, TiO_2 (Sigma Aldrich), σε μορφή εναιωρήματος στα MDA-MB-468, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της θραύσης της PARP σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, και αυτό φαίνεται από την ανίχνευση του θραύσματος της PARP στα 85 kDa.

Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, στα MCF-7 κύτταρα, δεν ανιχνεύεται το θραύσμα της PARP (Εικόνα 4.32 C-D). Έτσι, είναι φανερό ότι τα φωτο-ενεργοποιημένα νανοσωματίδια TiO_2 (Sigma Aldrich), σε μορφή εναιωρήματος, επάγουν απόπτωση στα MDA-MB-468 κύτταρα.



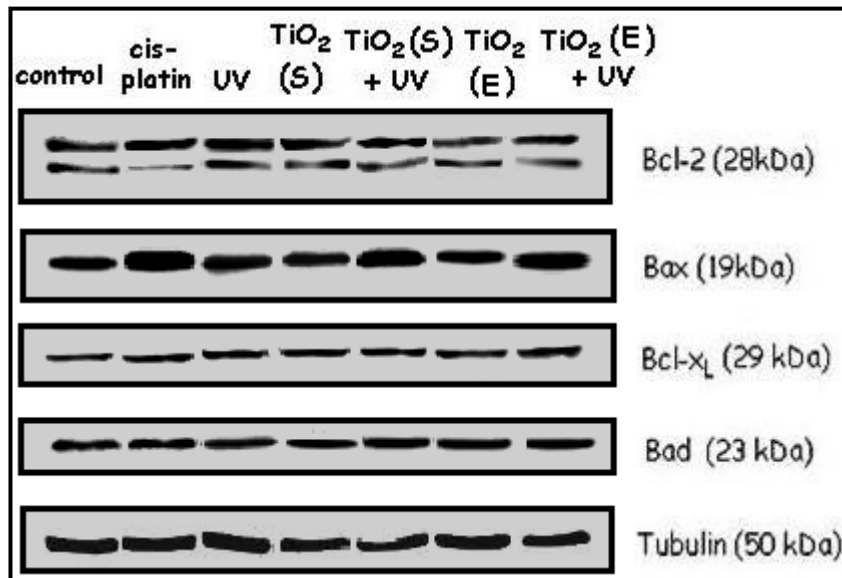
Εικόνα 4.32. Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης του εναιωρήματος TiO_2 (Sigma Aldrich), από ανάλυση κατά Western. Το φωτο-ενεργοποιημένο TiO_2 (Sigma Aldrich)

επάγει την θραύση του PARP στα κύτταρα MDA-MB-468. Κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών επωάστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO₂ (15μM) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η θραύση του PARP, με ανοσοαποτύπωση και αντίσωμα που αναγνωρίζει την ανέπαφη PARP, αλλά και τα πρωτεολυτικά θραύσματα του μορίου (A και C). Στην εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης ζώνης για την ανέπαφη PARP, αλλά και τα πρωτεολυτικά θραύσματα του μορίου. Ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο της θραύσης της PARP, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί *cis-platin* (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Το ποσό της τουμπουλίνης, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων της υπό εξέταση πρωτεΐνης. (B και D). Ποσοτικοποίηση της οπτικής πυκνότητας του λόγου θραύσμα PARP/ανέπαφη PARP/προς τουμπουλίνη. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το $*P < 0.05$, για τη σύγκριση με τα control δείγματα

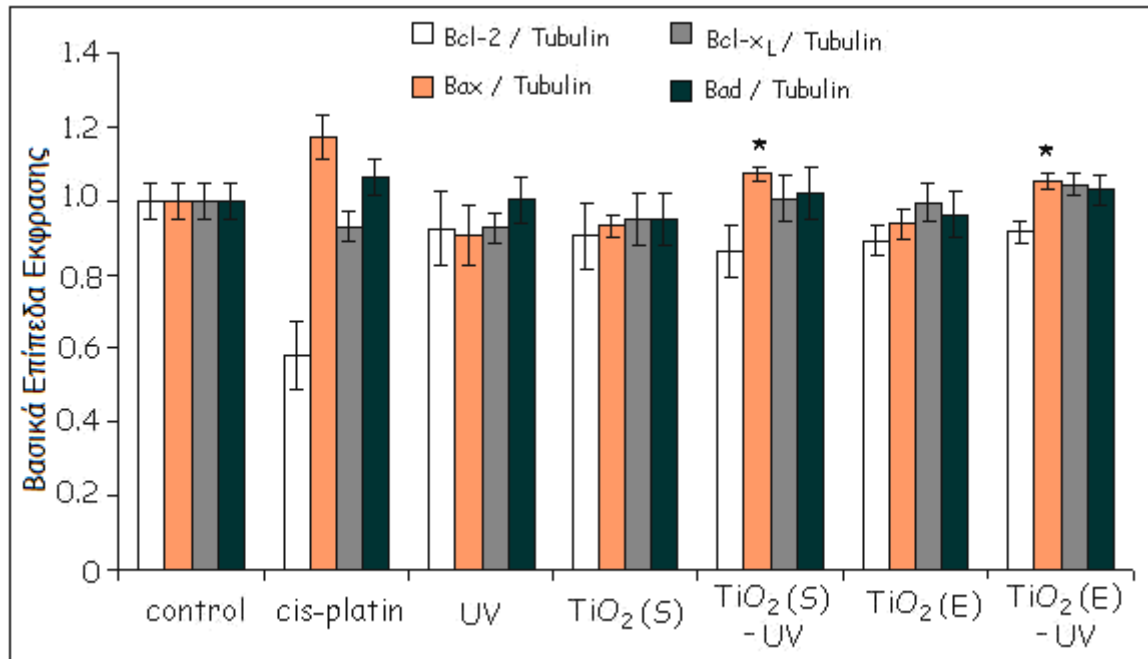
4.4.4.3 Επίδραση των εναιωρημάτων TiO₂ (Evonik P25) και TiO₂ (Sigma Aldrich) στη ρύθμιση και έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών

Η ίδια πειραματική διαδικασία εκτελείται για τη μελέτη της ρύθμισης και έκφρασης των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών.

Στις εικόνες 4.33 και 4.34, φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO₂ (Evonik P25) σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης MDA-MB-468, δεν οδηγεί σε μείωση της Bcl-2, αλλά μόνο σε μικρή αύξηση της Bax, που αποτελεί ένδειξη για αποπτωτική δραστηριότητα. Τα επίπεδα των Bcl-x_L και Bad παραμένουν αμετάβλητα. Η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO₂ (Sigma Aldrich) σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης MDA-MB-468, επίσης δεν οδηγεί σε μείωση της Bcl-2, αλλά μόνο σε μικρή αύξηση της Bax, ενώ τα επίπεδα των Bcl-x_L και Bad παραμένουν αμετάβλητα. Η τουμπουλίνη χρησιμεύει ως επίπεδο αναφοράς για την ποσότητα των πρωτεϊνών που αναλύεται κατά Western και με βάση τα επίπεδά της κανονικοποιούνται όλα τα αποτελέσματα, τα οποία κανονικοποιούνται και ως προς την οπτική πυκνότητα του δείγματος που αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα.



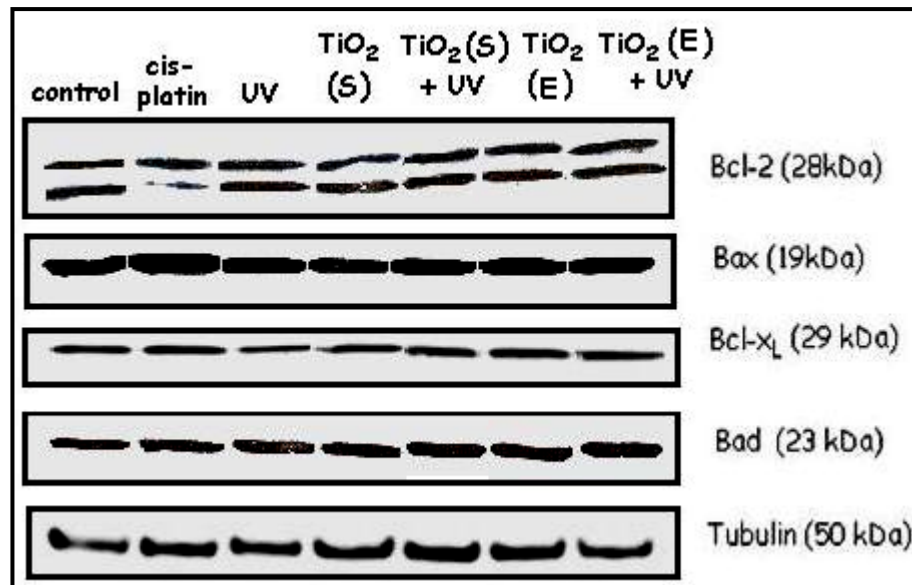
Εικόνα 4.33. Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης TiO_2 στα κύτταρα MDA-MB-468, από ανάλυση κατά Western. Κύτταρα MDA-MB-468 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO_2 και των δύο τύπων (Evonik P25 και Sigma Aldrich) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάσθηκε η έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων, με ανοσοαποτύπωση. Ως θετικός, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO_2 (Evonik P25) ή (Sigma Aldrich) σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα MDA-MB-468, οδηγεί σε αύξηση της Bax, γεγονός που αποτελεί ένδειξη για αποπτωτική δραστηριότητα. Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών.



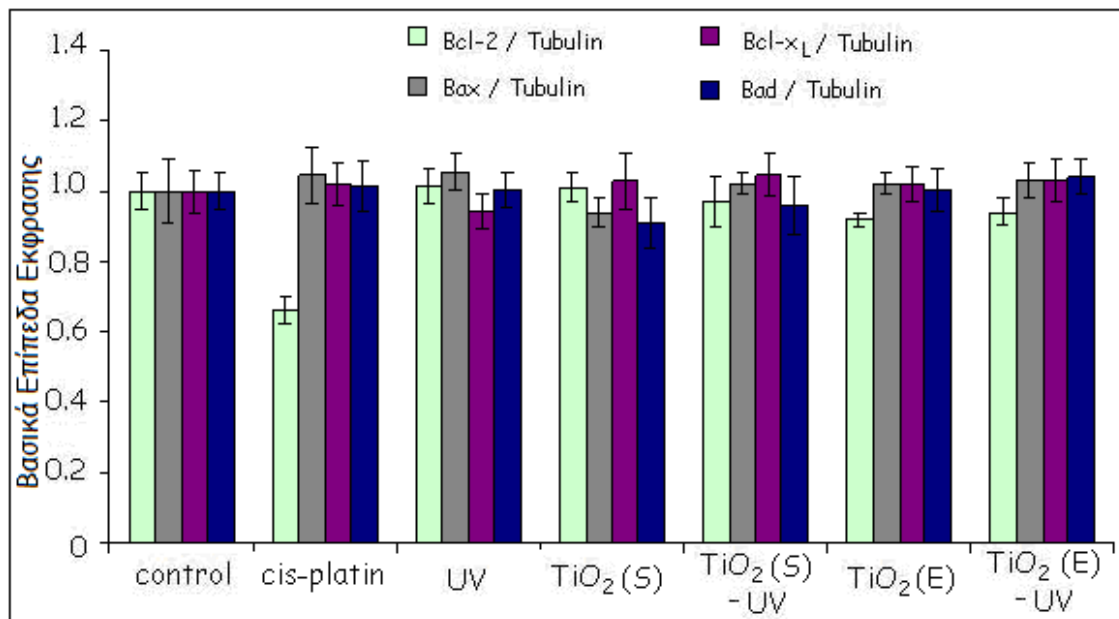
Εικόνα 4.34. Αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης κατά Western κατά τη μελέτη της ρύθμισης και έκφρασης των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Κύτταρα MDA-MB-468 επωάστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO₂ (15μM) και των δύο τύπων (Evonik P25 και Sigma Aldrich). Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO₂ (Evonik P25) ή (Sigma Aldrich) σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα MDA-MB-468, οδηγεί σε αύξηση της Bax, γεγονός που αποτελεί ένδειξη για αποπτωτική δραστηριότητα. Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Το ποσό της τουμπουλίνης, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean±SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το *P < 0.05, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.

Αντίστοιχα, δεν παρουσιάζεται αξιοσημείωτη μεταβολή στα επίπεδα των μελών της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών, κάτω από τις ίδιες συνθήκες για την περίπτωση των

κυττάρων MCF-7, για καθένα από τα δυο εναιωρήματα TiO_2 , που χρησιμοποιήθηκαν, όπως φαίνεται στις εικόνες 4.35 και 4.36.



Εικόνα 4.35. Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης TiO_2 στα κύτταρα MCF-7, από ανάλυση κατά Western. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO_2 και των δύο τύπων (Evonik P25 και Sigma Aldrich) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάσθηκε η έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων, με ανοσοαποτύπωση. Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO_2 (Evonik P25) ή (Sigma Aldrich) σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα MCF-7, δεν προκαλεί μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνών που μελετώνται. Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών.



Εικόνα 4.36. Αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης κατά Western κατά τη μελέτη της ρύθμισης και έκφρασης των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO₂ (15μM) και των δύο τύπων (Evonik P25 και Sigma Aldrich). Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO₂ (Evonik P25) ή (Sigma Aldrich) σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα MCF-7, δεν προκαλεί μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνών που μελετώνται. Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Το ποσό της τουμπουλίνης, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean±SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το *P < 0.05, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.

4.4.5 Έλεγχος αποπτωτικής δράσης των εναιωρημάτων του τροποποιημένου με άζωτο TiO₂ (N-doped TiO₂) και του τροποποιημένου με Άργυρο TiO₂ (Ag-doped TiO₂)

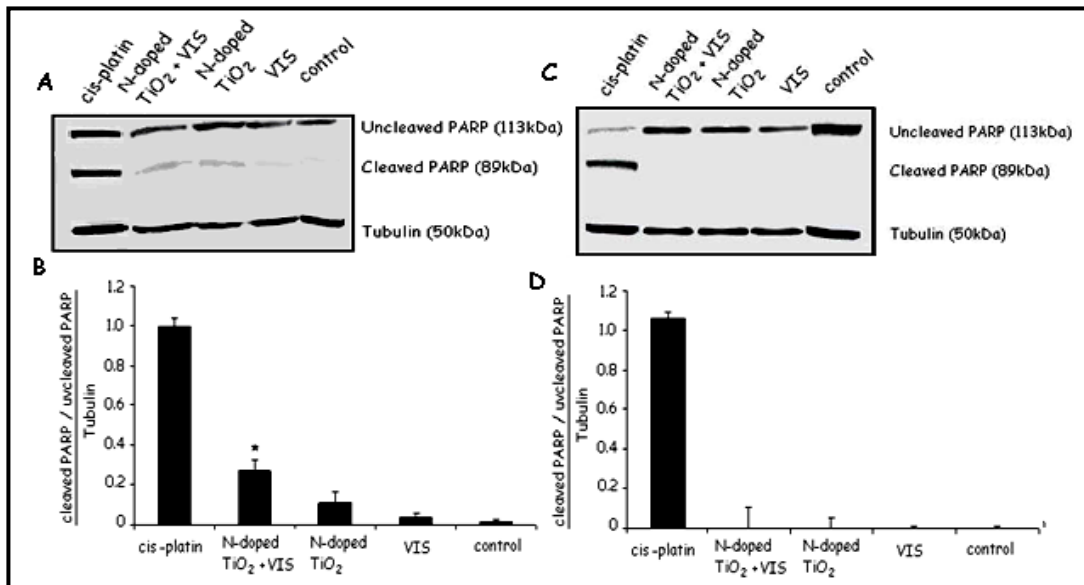
Για τις ανάγκες των πειραμάτων, καλλιεργούνται, κατά τα γνωστά, σε πλάκες έξι φρεατίων, κύτταρα MDA-MB-468 και MCF-7, για 24 ώρες. Στη συνέχεια, προστίθεται το

εναιώρημα TiO_2 του τροποποιημένου με άζωτο TiO_2 (N-doped TiO_2) ή το εναιώρημα του τροποποιημένου με Άργυρο TiO_2 (Ag-doped TiO_2) TiO_2 και ακολουθεί ακτινοβολία με ακτινοβολία UV-A (350nm) για 20 λεπτά ή ορατή ακτινοβολία, αντίστοιχα για την κάθε περίπτωση και επώαση 48 ωρών. Ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο της θραύσης της PARP, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) με επώαση 24 ωρών. Η έκθεση των μεμβρανών γίνεται σε συσκευή Luminescent Image Analyser LAS-4000, εξοπλισμένη με κάμερα τύπου CCD chip και ειδικό λογισμικό LAS-4000 Image Reader για τον έλεγχο όλης της διαδικασίας, ανάλυση και αποθήκευση εικόνων και λογισμικό AIDA Image Analyser για μετατροπή εικόνων σε επεξεργάσιμη, από κοινό υπολογιστή, μορφή. Πραγματοποιούνται τρεις ανεξάρτητες σειρές πειραμάτων, με διπλά δείγματα, ανά συνθήκη.

4.4.5.1 Επίδραση του εναιωρήματος του τροποποιημένου με άζωτο TiO_2 (N-doped TiO_2) στην ενεργοποίηση της PARP

Η εικόνα 4.37 A-B δείχνει ότι η επίδραση του φωτο-ενεργοποιημένου με ορατή ακτινοβολία τροποποιημένου με Άζωτο TiO_2 , σε μορφή εναιωρήματος, στα MDA-MB-468, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της θραύσης της PARP σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, αλλά σε μικρό ποσοστό και αυτό φαίνεται από την ανίχνευση του θραύσματος της PARP στα 85 kDa.

Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, στα MCF-7 κύτταρα, δεν ανιχνεύεται το θραύσμα της PARP (Εικόνα 4.37 C-D). Έτσι, είναι φανερό ότι το φωτο-ενεργοποιημένα νανοσωματίδια τροποποιημένου με Άζωτο TiO_2 , σε μορφή εναιωρήματος επάγουν, σε ένα μικρό ποσοστό, απόπτωση στα MDA-MB-468 κύτταρα.



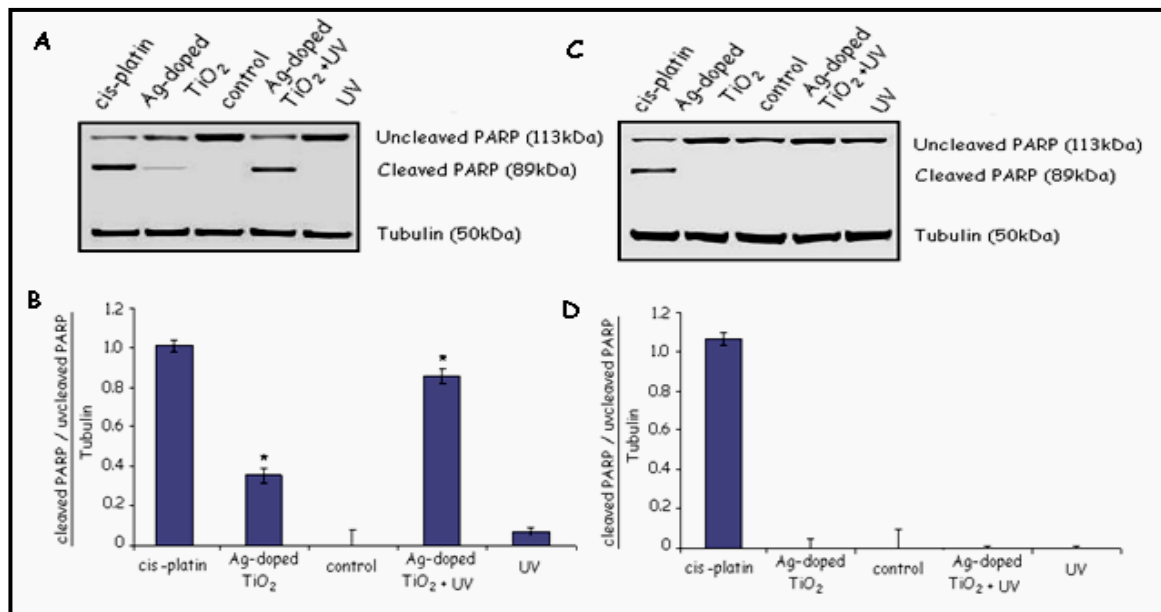
Εικόνα 4.37. Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης του εναιωρήματος *N-doped TiO₂*, από ανάλυση κατά Western. Το φωτο – ενεργοποιημένο, με ορατή ακτινοβολία *N-doped TiO₂*, επάγει την θραύση του PARP στα κύτταρα MDA-MB-468. Κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου ή μη *N-doped TiO₂* (40μM) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάσθηκε η θραύση του PARP, με ανοσοαποτύπωση και αντίσωμα που αναγνωρίζει την ανέπαφη PARP, αλλά και τα πρωτεολυτικά θραύσματα του μορίου (A και C). Στην εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης ζώνης. Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί *cis-platin* (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων της PARP (B και D). Ποσοτικοποίηση της οπτικής πυκνότητας του λόγου θραύσμα PARP/ανέπαφη PARP/προς τουμπουλίνη. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από τρία ανεξάρτητα πειράματα, με επίπεδο σημαντικότητας το $*P < 0.05$, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.

4.4.5.2 Επίδραση του εναιωρήματος του τροποποιημένου με Άργυρο *TiO₂* (Ag-doped *TiO₂*) στην ενεργοποίηση της PARP

Η εικόνα 4.38 A-B δείχνει ότι η επίδραση του φωτο-ενεργοποιημένου με ακτινοβολία UV-A και τροποποιημένου με Άργυρο, *TiO₂*, σε μορφή εναιωρήματος, στα MDA-MB-468, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της θραύσης της PARP σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, και αυτό προκύπτει από την ανίχνευση του θραύσματος της PARP στα 85

kDa. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, στα MCF-7 κύτταρα, δεν ανιχνεύεται το θραύσμα της PARP (Εικόνα 4.38 C-D).

Έτσι, είναι φανερό ότι τα φωτο-ενεργοποιημένα νανοσωματίδια τροποποιημένου με Άργυρο TiO_2 , σε μορφή εναιωρήματος, επάγουν απόπτωση, ειδικά, στα MDA-MB-468 κύτταρα.

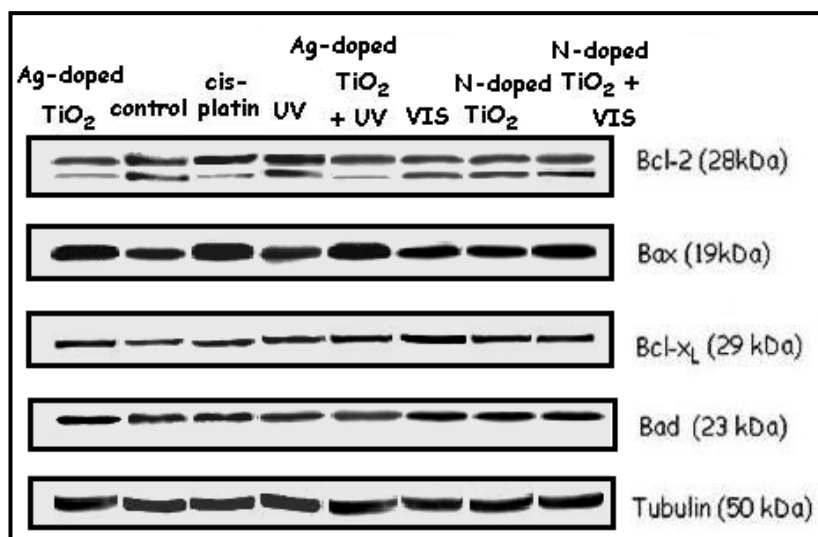


Εικόνα 4.38. Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης του εναιωρήματος Ag-doped TiO_2 , από ανάλυση κατά Western. Το φωτο – ενεργοποιημένο, με UV-A ακτινοβολία (20 min) Ag-doped TiO_2 , επάγει την θραύση του PARP στα κύτταρα MDA-MB-468. Κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου ή μη Ag-doped TiO_2 (20 μM) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάσθηκε η θραύση του PARP, με ανοσοαποτύπωση και αντίσωμα που αναγνωρίζει την ανέπαφη PARP, αλλά και τα πρωτεολυτικά θραύσματα του μορίου (A και C). Στην εικόνα παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοαποτύπωσης ζώνης. Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων της PARP (B και D). Ποσοτικοποίηση της οπτικής πυκνότητας του λόγου θραύσμα PARP/ανέπαφη PARP/προς τουμπουλίνη. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean \pm SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα, με επίπεδο σημαντικότητας το * $P < 0.05$, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.

4.4.5.3 Επίδραση των εναιωρημάτων του τροποποιημένου με άζωτο TiO_2 (N-doped TiO_2) και του τροποποιημένου με Άργυρο TiO_2 (Ag-doped TiO_2) στη ρύθμιση και έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών

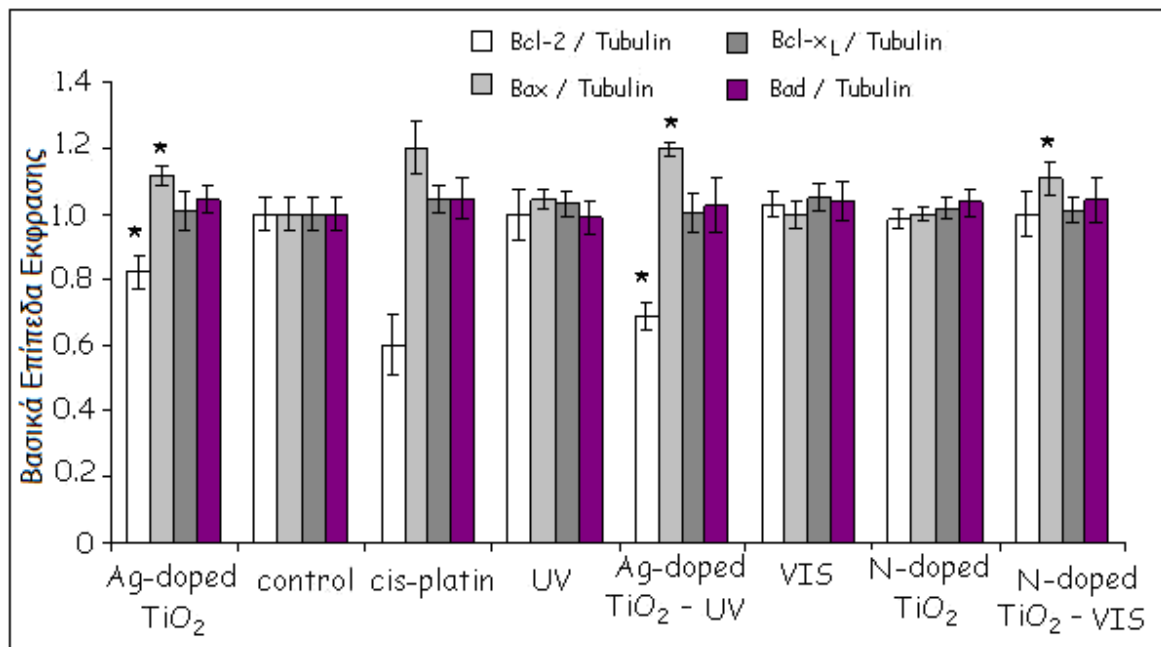
Η ίδια πειραματική διαδικασία εκτελείται και για τη μελέτη της ρύθμισης και έκφρασης των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών, παρουσία των εναιωρημάτων του N-doped TiO_2 και του Ag-doped TiO_2 .

Στις εικόνες 4.39 και 4.40, φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ορατή ακτινοβολία, ναοκρυστάλλων N-doped TiO_2 , σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης, MDA-MB-468, δεν οδηγεί σε μείωση της Bcl-2, αλλά μόνο σε μία πολύ μικρή αύξηση της Bax, που αποτελεί ένδειξη για αποπτωτική δραστηριότητα. Τα επίπεδα των Bcl- χ_L και Bad παραμένουν αμετάβλητα. Η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ή μη, ναοκρυστάλλων Ag-doped TiO_2 , σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα MDA-MB-468, οδηγεί σε μείωση της Bcl-2, και σε αύξηση της Bax, ενώ τα επίπεδα των Bcl- χ_L και Bad παραμένουν αμετάβλητα. Η ποσότητα των πρωτεϊνών που αναλύεται κατά Western κανονικοποιείται ως προς την ποσότητα της τουμπουλίνης και στη συνέχεια τα αποτελέσματα κανονικοποιούνται και ως προς την οπτική πυκνότητα του δείγματος που αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα.



Εικόνα 4.39. Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης TiO_2 στα κύτταρα MDA-MB-468, από ανάλυση κατά Western. Κύτταρα MDA-MB-468 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου ή μη (με ορατή ακτινοβολία) N-doped TiO_2 (40 μM) ή φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη Ag-doped TiO_2 (20 μM) και στα κυτταρικά

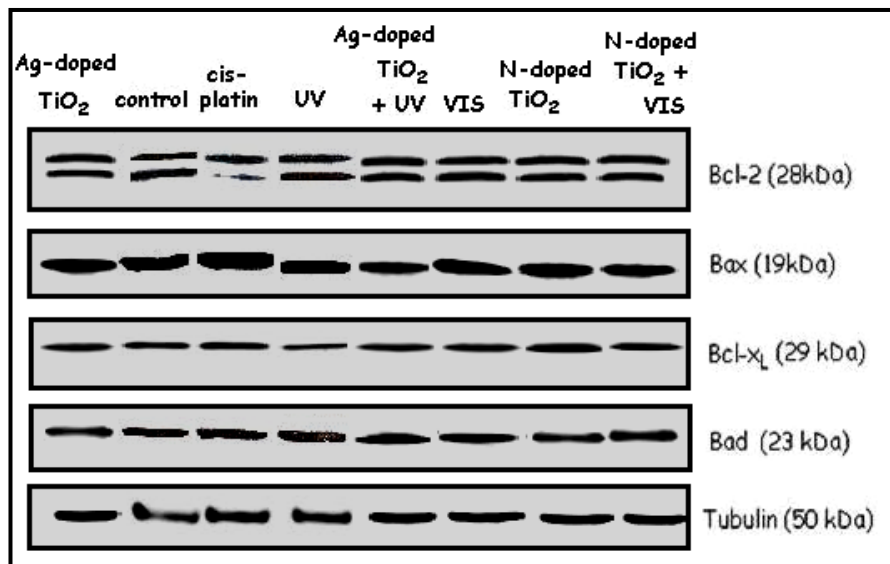
εκχυλίσματα εξετάστηκε η έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων, με ανοσοαποτύπωση. Ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο της χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί *cis-platin* (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ορατή ακτινοβολία, νανοκρυστάλλων *N-doped TiO₂*, σε μορφή εναιωρήματος, οδηγεί σε μία πολύ μικρή αύξηση της *Bax*, που αποτελεί ένδειξη για αποπτωτική δραστηριότητα. Η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ή μη, νανοκρυστάλλων *Ag-doped TiO₂*, σε μορφή εναιωρήματος, οδηγεί σε μείωση της *Bcl-2*, και σε αύξηση της *Bax*. Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών.



Εικόνα 4.40. Αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης κατά Western κατά τη μελέτη της ρύθμισης και έκφρασης των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των *Bcl-2* πρωτεϊνών. Κύτταρα *MDA-MB-468* επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου ή μη (με ορατή ακτινοβολία) *N-doped TiO₂* (40μM) ή φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη *Ag-doped TiO₂* (20μM) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάστηκε η έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων, με ανοσοαποτύπωση. Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί *cis-platin* (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ορατή ακτινοβολία, νανοκρυστάλλων *N-doped TiO₂*, στα κύτταρα *MDA-MB-468*, οδηγεί σε μία πολύ μικρή αύξηση της *Bax*. Η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ή μη, νανοκρυστάλλων

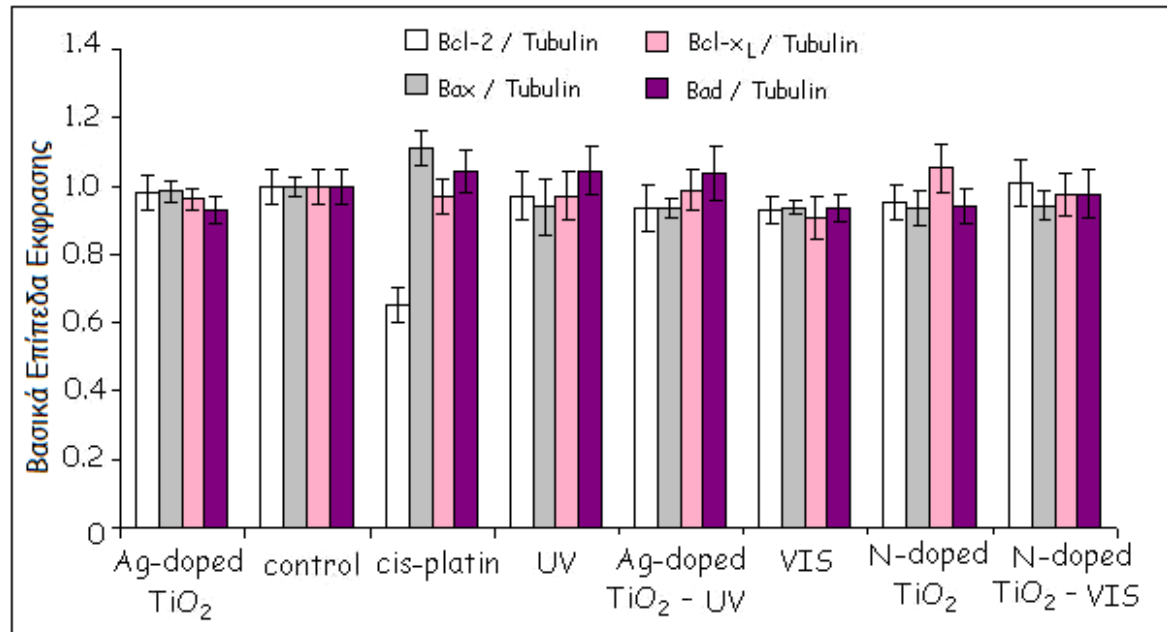
Ag-doped TiO_2 , σε μορφή εναιωρήματος, οδηγεί σε μείωση της Bcl-2, και σε αύξηση της Bax. Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Το ποσό της τουμπουλίνης, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το $*P < 0.05$, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.

Αντίστοιχα, δεν παρουσιάζεται αξιοσημείωτη μεταβολή στα επίπεδα των μελών της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών, κάτω από τις ίδιες συνθήκες για την περίπτωση των κυττάρων MCF-7, για καθένα από τα δυο εναιωρήματα του N-doped TiO_2 και του Ag-doped TiO_2 , που χρησιμοποιήθηκαν, όπως φαίνεται στις εικόνες 4.41 και 4.42.



Εικόνα 4.41. Αποτελέσματα από τον έλεγχο της αποπτωτικής δράσης TiO_2 στα κύτταρα MCF-7, από ανάλυση κατά Western. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου ή μη (με ορατή ακτινοβολία) N-doped TiO_2 (40 μ M) ή φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη Ag-doped TiO_2 (20 μ M) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάσθηκε η έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων, με ανοσοαποτύπωση. Ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο της χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ορατή ακτινοβολία, νανοκρυστάλλων N-doped TiO_2 , ή η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ή μη, νανοκρυστάλλων Ag-doped TiO_2 , σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα MCF-7, δεν προκαλεί μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνών που μελετώνται. Το ποσό της τουμπουλίνης,

για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών.



Εικόνα 4.42. Αποτελέσματα από την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης κατά Western κατά τη μελέτη της ρύθμισης και έκφρασης των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου ή μη (με ορατή ακτινοβολία) N-doped TiO₂ (40μM) ή φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη Ag-doped TiO₂ (20μM) και στα κυτταρικά εκχυλίσματα εξετάσθηκε η έκφραση των αντιαποπτωτικών και προαποπτωτικών μορίων, με ανοσοαποτύπωση. Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) (επώαση 24 ωρών). Στην εικόνα φαίνεται ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ορατή ακτινοβολία, νανοκρυστάλλων N-doped TiO₂, ή η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ή μη, νανοκρυστάλλων Ag-doped TiO₂, σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα MCF-7, δεν προκαλεί μεταβολή στα επίπεδα των πρωτεϊνών που μελετώνται. Το ποσό της τουμπουλίνης, για κάθε δείγμα, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Το ποσό της τουμπουλίνης, αποτελεί την ποσότητα αναφοράς για την κανονικοποίηση των ποσοτήτων των υπό εξέταση πρωτεϊνών. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean±SD από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Ως επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται το *P < 0.05, για τη σύγκριση με τα control δείγματα.

4.5 Μέθοδος ποσοτικοποίησης του κατακερματισμένου DNA - Κατάτμηση DNA (DNA laddering) - Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

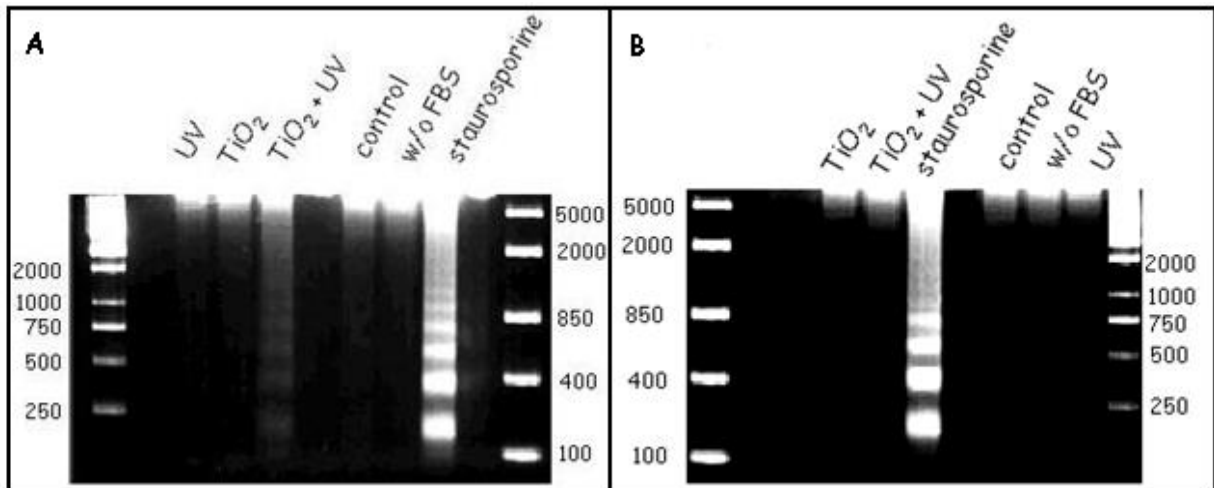
Κατά την απόπτωση, τα κύτταρα εμφανίζουν κατακερματισμένο DNA, εξαιτίας της δράσης κυτταρικών ενδονουκλεασών. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία τμημάτων DNA μεγέθους 200–480 ζευγών βάσεων.

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης είναι ευρέως διαδεδομένη τεχνική για το διαχωρισμό μίγματος τμημάτων DNA. Στηρίζεται στο γεγονός ότι το DNA, σε ουδέτερο pH, είναι αρνητικά φορτισμένο, και τα διάφορα μόρια DNA, μετακινούνται κατά την ηλεκτροφόρηση προς το θετικό ηλεκτρόδιο, με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του αριθμού των βάσεων τους [225]. Το πήκτωμα εμποδίζει την τυχαία διάχυση των μορίων και έτσι τα μόρια διαφορετικού μήκους διαχωρίζονται σε «ζώνες». Οι ζώνες καθίστανται ορατές, κατόπιν σύνδεσης του DNA με το μόρια του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), τα οποία έχουν την ικανότητα να παρεμβάλλονται στη διπλή έλικα και να σχηματίζουν φθορίζοντα σύμπλοκα με το DNA.

Για τις ανάγκες των πειραμάτων της παρούσας διατριβής, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που οδηγεί στην απομόνωση του ολικού DNA, το οποίο περιγράφεται αναλυτικά στη ενότητα 3.7.1.1, αφού εκτελέστηκε η πειραματική διαδικασία, που κατ' επανάληψη έχει περιγραφεί.

4.5.1 Εκτίμηση του κατακερματισμού του DNA υπό την επίδραση του sol-gel TiO₂

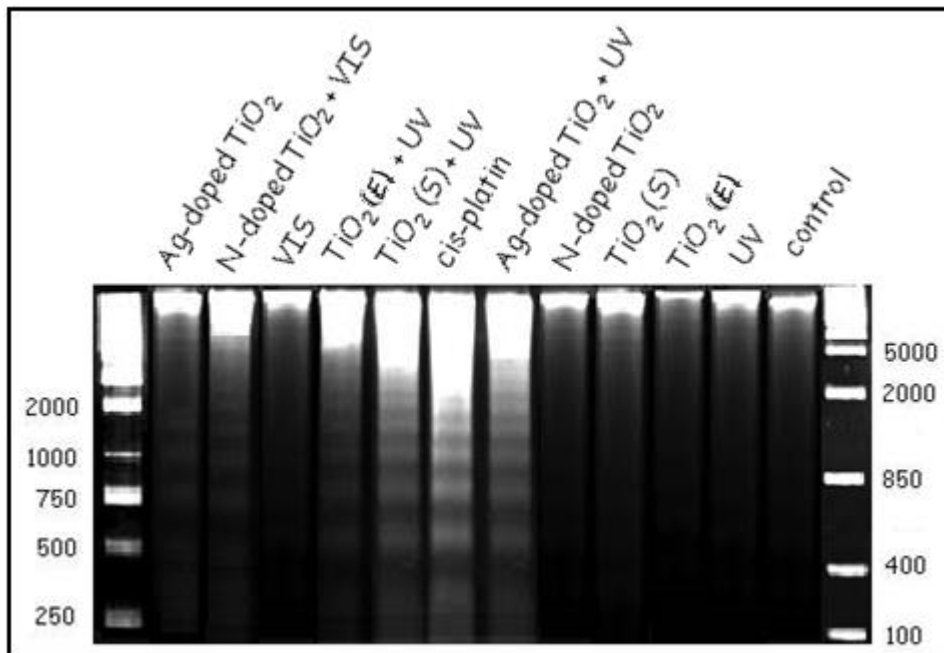
Στην εικόνα 4.43 φαίνεται πως το φωτο-ενεργοποιημένο με ακτινοβολία UV-A (350 nm) TiO₂, σε μορφή sol-gel, προκαλεί DNA laddering στα κύτταρα MDA-MB-468 (εικόνα 4.43 A), αλλά όχι και στα MCF-7 (εικόνα 4.43 B). Αυτό προκύπτει από την παρατήρηση της χαρακτηριστικής εικόνας «κλίμακας» που εμφανίζουν τα δείγματα των αποπτωτικών πληθυσμών. Ως θετικός μάρτυρας θεωρήθηκε δείγμα κυττάρων στο οποίο είχαν προστεθεί 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη διαδικασία απομόνωσης του DNA. Φαίνεται πως αντίστοιχη εικόνα, με αυτή του θετικού μάρτυρα, παρουσιάζει μόνο το δείγμα DNA, που προέρχεται από τον κυτταρικό πληθυσμό που πλήττεται από το φωτο-ενεργοποιημένο με ακτινοβολία UV-A TiO₂, σε μορφή sol-gel, μόνο για την περίπτωση των κυττάρων υψηλή διαφοροποίησης.



Εικόνα 4.43. Εικόνες που λαμβάνονται από την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Κύτταρα και των δύο κυτταρικών σειρών MDA-MB-468 (εικόνα A) και MCF-7 (εικόνα B) επωάστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου (με UV-A-για 20 min) ή μη TiO₂ (15μM) και στη συνέχεια απομονώθηκε το ολικό DNA). Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες της ηλεκτροφόρησης του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Το φωτο-ενεργοποιημένο με ακτινοβολία UV-A (350 nm) TiO₂, σε μορφή sol-gel, προκαλεί DNA laddering στα κύτταρα MDA-MB-468 (A), αλλά όχι και στα MCF-7 (B). Ως θετικός μάρτυρας, για την εκτίμηση του κατακερματισμού του γενετικού υλικού, χρησιμοποιήθηκε δείγμα DNA από κύτταρα, στα οποία προστέθηκαν 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη διαδικασία απομόνωσης.

4.5.2 Εκτίμηση του κατακερματισμού του DNA υπό την επίδραση εναιωρημάτων TiO₂ (Evonik P25), TiO₂ (Sigma Aldrich), του N-doped TiO₂ και του Ag-doped TiO₂

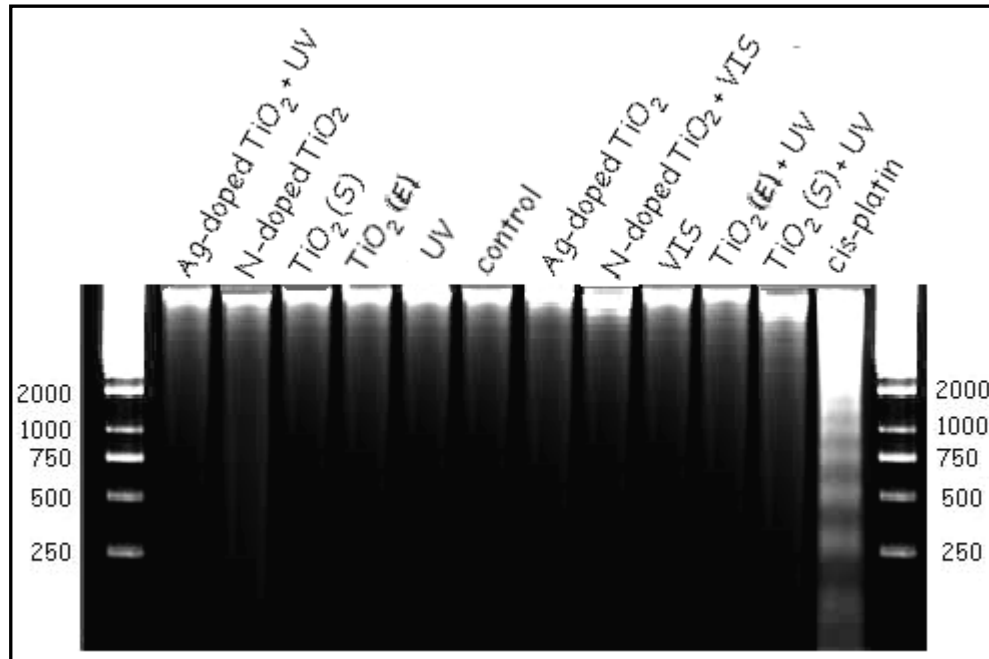
Στην εικόνα 4.44 φαίνεται ότι προκαλείται DNA laddering στα κύτταρα MDA-MB-468, υπό τη δράση των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ναοκρυστάλλων Ag-doped TiO₂, ή των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ναοκρυστάλλων TiO₂ (Sigma Aldrich) και σε μικρότερο ποσοστό, υπό τη δράση των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ναοκρυστάλλων TiO₂ (Evonik P25) ή των φωτο-ενεργοποιημένων με ορατή ακτινοβολία, ναοκρυστάλλων N-doped TiO₂ ή μη φωτο-ενεργοποιημένων ναοκρυστάλλων Ag-doped TiO₂.



Εικόνα 4.44. Εικόνες που λαμβάνονται από την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Κύτταρα MDA-MB-468 επωάστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου, με UV-A ή μη Ag-doped TiO_2 (20 μ M) ή φωτοενεργοποιημένου με UV-A, ή μη TiO_2 (Sigma Aldrich) (S) ή TiO_2 (Evonik P25) (E) ή φωτοενεργοποιημένου με ορατή ακτινοβολία ή μη N-doped TiO_2 και στη συνέχεια απομονώθηκε το ολικό DNA. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες της ηλεκτροφόρησης του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Φαίνεται ότι προκαλείται DNA laddering στα κύτταρα MDA-MB-468, υπό τη δράση των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων Ag-doped TiO_2 , ή των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO_2 (Sigma Aldrich) και σε μικρότερο ποσοστό, υπό τη δράση των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO_2 (Evonik P25) ή των φωτο-ενεργοποιημένων με ορατή ακτινοβολία, νανοκρυστάλλων N-doped TiO_2 ή μη φωτο-ενεργοποιημένων νανοκρυστάλλων Ag-doped TiO_2 . Ως θετικός μάρτυρας, για την εκτίμηση του κατακερματισμού του γενετικού υλικού, χρησιμοποιήθηκε δείγμα DNA από κύτταρα, στα οποία προστέθηκαν 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη διαδικασία απομόνωσης.

Αντίστοιχα, κάτω από τις ίδιες συνθήκες δεν παρατηρείται κατακερματισμός του DNA στα κύτταρα MCF-7 (εικόνα 4.45).

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα DNA, προερχόμενο από κύτταρα, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) με επώαση 24 ωρών, πριν τη διαδικασία απομόνωσης του DNA.



Εικόνα 4.45. Εικόνες που λαμβάνονται από την ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Κύτταρα MCF-7 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία φωτοενεργοποιημένου, με UV-A ή μη Ag-doped TiO_2 (20 μM) ή φωτοενεργοποιημένου με UV-A, ή μη TiO_2 (Sigma Aldrich) ή TiO_2 (Evonik P25) ή φωτοενεργοποιημένου με ορατή ακτινοβολία ή μη N-doped TiO_2 και στη συνέχεια απομονώθηκε το ολικό DNA. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες της ηλεκτροφόρησης του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης. Φαίνεται ότι δεν παρατηρείται κατακερματισμός του DNA στα κύτταρα MCF-7 υπό τη δράση των ουσιών αυτών. Ως θετικός μάρτυρας, για την εκτίμηση του κατακερματισμού του γενετικού υλικού, χρησιμοποιήθηκε δείγμα DNA από κύτταρα, στα οποία προστέθηκαν 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη διαδικασία απομόνωσης.

Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Κεφάλαιο

5

Συζήτηση Αποτελεσμάτων**Κεφάλαιο 5^ο**

Το TiO_2 είναι ευρέως χρησιμοποιούμενο νανοϋλικό, τόσο σε βιομηχανικές εφαρμογές, όσο και σε εφαρμογές στον τομέα των βιοϊατρικών επιστημών [232], [233].

Τα νανοσωματίδια του TiO_2 φαίνεται πως αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη, χωρίς να είναι εντελώς σαφής αυτός ο μηχανισμός. Η παρούσα διατριβή αποτελεί μία προσπάθεια προς αυτή την κατεύθυνση, αφού όλες οι σειρές πειραμάτων εστιάζουν στη διερεύνηση των κυτταρο-τοξικών αποτελεσμάτων του 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 TiO_2 , μέσω του ελέγχου της συνεισφοράς, 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, στην επίδραση αυτή. Λόγω της γνωστής φωτοκαταλυτικής δράσης του TiO_2 , τα πειράματα, έγιναν παρουσία ακτινοβολίας UV-A (350nm) ή ορατού φωτός, όπως αναλυτικά έχει περιγραφεί σε προηγούμενα κεφάλαια.

Τα αποτελέσματα έδειξαν η δράση των νανοσωματιδίων 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. Σαν συμπέρασμα, συνάδει με τα αποτελέσματα αρκετών δημοσιευμένων εργασιών, που μελετούν την ίδια ουσία σε άλλες κυτταρικές σειρές. Για παράδειγμα, η εργασία των Kiss et al. [234] δείχνει πως το TiO_2 επιδρά σε κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση σε ανθρώπινα δερματικά κύτταρα. Οι Thevenot et al. [235] διατείνονται ότι τα νανοσωματίδια TiO_2 εμφανίζουν εξειδικευμένη δράση, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, που εξαρτάται από την τελική συγκέντρωση του TiO_2 . Οι D. Warheit et al. [236] υποστηρίζουν ότι οι αλληλεπιδράσεις κυττάρου και νανοσωματιδίων σχετίζονται, σε μεγάλο βαθμό, με τις ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης.

Επί της ουσίας, οι αλληλεπιδράσεις αυτές δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί. Κάποιες εργασίες υποστηρίζουν ότι τα νανοσωματίδια TiO_2 εμφανίζουν αρνητικό φορτίο σε περιβάλλον με pH 7 και προσκολλώνται επιλεκτικά στα αμινοξέα, που διαθέτουν τις ρίζες $-\text{OH}$, $-\text{NH}$ και $-\text{NH}_2$ στις πεπτιδικές αλυσίδες [237], [238], θεωρώντας κατά αυτό τον τρόπο, ότι η αλληλεπίδραση γίνεται μεταξύ του TiO_2 και των μεμβρανικών πρωτεϊνών και από εκεί πυροδοτείται ο μηχανισμός που οδηγεί τα κύτταρα σε απόπτωση. Η διαφορετική επίδραση του TiO_2 στην κάθε κυτταρική σειρά και συγκεκριμένα η επιλεκτική του δράση στα μεταστατικά κύτταρα MDA-MB-468, πιθανώς οφείλεται στη διαφορετική σύνθεση των μεμβρανικών πρωτεϊνών και κατ' επέκταση στη διαφορετική συμπεριφορά τους, κατά την αλληλεπίδραση με το νανοϋλικό [235]. Δηλαδή, φαίνεται πως η αλληλεπίδραση, στην περίπτωση των κυττάρων MCF-7, είναι ασθενής και για αυτό το λόγο, παραμένουν υψηλά τα επίπεδα επιβίωσης των κυττάρων μετά από επώαση, παρουσία συγκεντρώσεων TiO_2 , που αποδεικνύονται ικανές ώστε να επιφέρουν το θάνατο σε σημαντικά ποσοστά κυττάρων MDA-MB-468.

Το γεγονός αυτό, μπορεί να συσχετιστεί εν μέρει, με τα χαρακτηριστικά των κυττάρων MDA-MB-468, που προσεγγίζουν τα εμβρυονικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένης της έντονης έκφρασης των καρκινικών [SCCs markers - cancer stem cells (SCCs)] δεικτών CD44/CD133 και της υψηλής δραστηριότητας της (ALDH) αλδεϋδικής αφυδρογονάσης, που σχετίζεται με την άμυνα των εμβρυονικών κυττάρων [171], όπως έχει ήδη αναφερθεί (ενότητα 3.3.1). *In vitro*, τα κύτταρα MDA-MB-468 εμφανίζουν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού, παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα σχηματισμού αποικίας και αυξημένη συγκολλητική ικανότητα μεταξύ τους, για σχηματισμό ταπητίου [170], ενώ, *in vivo*, είναι έντονα μεταστατικά. Αντίθετα, η ανθεκτικότητα που συναντάται στα κύτταρα MCF-7, μπορεί να αποδοθεί, στην ύπαρξη του ξενοβιοτικού μεταφορέα (BCRP) που διαθέτουν [175] και τα καθιστά ανθεκτικά σε πολλές φαρμακευτικές ουσίες.

Αρκετές εργασίες υποστηρίζουν ότι στις συμβατικές χημειοθεραπείες το νανοδομημένο TiO_2 σταθεροποιεί τη ποσότητα του αντικαρκινικού παράγοντα, που συσσωρεύεται στην περιοχή – στόχο, με αποτέλεσμα να δρα συμπληρωματικά στην θεραπεία, καταστέλλοντας την ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν τα κύτταρα σε τοξικούς παράγοντες [236]. Σε αυτή τη βάση, σε συνδυασμό με κάποιο άλλο

παράγοντα, πιθανόν να υπήρχε σημαντικότερο ποσοστό κυττάρων MCF-7 που αποπίπτουν.

Σημαντικό μέρος της παρούσας προσπάθειας αποτελεί η διερεύνηση του μηχανισμού, μέσω του οποίου τα κύτταρα οδηγούνται στο θάνατο. Έτσι, έγινε έλεγχος καθιερωμένων αποπτωτικών δεικτών, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι επάγεται προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος στα κύτταρα, παρουσία του φωτοενεργοποιημένου TiO_2 , και όχι νέκρωση. Συγκεκριμένα, με την τεχνική western blotting, διερευνάται η ύπαρξη θραύσματος της PARP, που αποτελεί ένδειξη απόπτωσης και τα αποτελέσματα δείχνουν ότι αυτό συμβαίνει μόνο στα κύτταρα MDA-MB-468 και όχι στα MCF-7, κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα αυτά εναρμονίζονται πλήρως με δημοσιεύσεις, σε συναφές πεδίο έρευνας, όπως οι εργασίες των Y. Lee et al. [238] που εστιάζουν στη χρήση του TiO_2 , έρευνα που σχετίζεται με τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και των J. Seo et al. [239], που πραγματεύεται την εφαρμογή του σε πιθανή θεραπευτική αγωγή για το κακόηθες μελάνωμα.

Πρόσφατες έρευνες που αφορούν στη στοχευμένη φωτοδυναμική θεραπεία, εστιάζουν στην πιθανή δημιουργία «έξυπνων» φαρμάκων, τα οποία θα αποτελούνται από νανοσωματίδια TiO_2 , συνδεδεμένα με κατάλληλα μόρια-βιομόρια που θα δίνουν τη δυνατότητα στο TiO_2 να προσδένεται επιλεκτικά στην περιοχή-στόχο, καταστρέφοντάς τα καρκινικά κύτταρα [240].

Ο μηχανισμός, μέσω του οποίου, το TiO_2 επάγει τον κυτταρικό θάνατο, διαμεσολαβείται από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species (ROS)), που δημιουργούν οξειδωτικό κυτταρικό στρες. Ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να είναι προγραμματισμένος ή μη [241]. Η συγκέντρωση των ROS, αυξάνεται αυξανόμενης της συγκέντρωσης του TiO_2 [242], [243] ακόμη και χωρίς την ακτινοβόλησή του με ακτινοβολία UV [244]. Κατά την ακτινοβόληση με UV-A του TiO_2 , παράγονται ελεύθερες ρίζες, που είναι ιδιαίτερα δραστικές και αλληλεπιδρούν κυρίως με την κυτταρική μεμβράνη, αλλά και με κυτταρικά οργανίδια και με το DNA, και αποδεδειγμένα επιδρούν αρνητικά στην κυτταρική επιβίωση [235], [245], [246], [247].

Ουσιαστικά, ο μηχανισμός δράσης του TiO_2 , λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο, τα νανοσωματίδια TiO_2 προσδένονται στην κυτταρική μεμβράνη και μέσω της

δημιουργίας των φωτοεπαγόμενων οπών, ως αποτέλεσμα της αντίδρασης της φωτοκατάλυσης, την καταστρέφουν τοπικά, καθιστώντας την διαπερατή. Όμως κατά το στάδιο αυτό, δεν παρατηρείται σημαντική μείωση στη βιωσιμότητα του κυτταρικού πληθυσμού. Κατά το δεύτερο στάδιο, τα νανοσωματίδια διαχέονται στον ενδοκυττάριο χώρο και πλήττουν στοχευμένα τον πυρήνα ή/και τα κυτταρικά οργανίδια [246].

Καθώς, τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας δείχνουν πως τα φωτοενεργοποιημένα νανοσωματίδια TiO_2 μειώνουν σημαντικά την επιβίωση των κύτταρων MDA-MB-468, αλλά όχι των MCF-7, θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε ότι είναι αποτελεσματικότερα κατά τα προχωρημένα στάδια της νόσου ή σε πιο μεταστατικές μορφές καρκίνου.

Η εξέλιξη της ιδέας της εφαρμογής του φωτο-ενεργοποιημένου TiO_2 στη θεραπεία του καρκίνου θα μπορούσε να περιλαμβάνει τοπική επίδραση, με έγχυση TiO_2 και στοχευμένη ακτινοβολία με διάταξη που θα το επιτρέπει, όπως οπτικές ίνες ή laser εκπομπής στο επιθυμητό μήκος κύματος (<390 nm) με ημιεπεμβατική μέθοδο ή ενδοσκοπικά, σε άλλες περιπτώσεις καρκίνου.

Κατηγοριοποιώντας τα αποτελέσματα, φαίνεται πως υπάρχει τοξική δράση των νανοσωματιδίων TiO_2 , σε μορφή sol-gel, και στις δύο κυτταρικές σειρές, που εξαρτάται από την τελική συγκέντρωση στην κυτταρική καλλιέργεια, αλλά και από τον βαθμό κακοήθειας των κυττάρων. Συγκεκριμένα τα 16 μM sol-gel TiO_2 είναι μία καθοριστική συγκέντρωση, η οποία δεν επιδρά σημαντικά στα MCF-7 κύτταρα, αφήνοντας το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού κυττάρων ανεπηρέαστο (επιβιώνει το 80% του πληθυσμού), ενώ κάτω από τις ίδιες συνθήκες, εμφανίζει σημαντική τοξικότητα στα κύτταρα MDA-MB-468, αφού επάγει το θάνατο στο 50% του πληθυσμού των κυττάρων. Η ίδια η ακτινοβολία UV-A επιδρά στην κυτταρική επιβίωση σε μικρό ποσοστό. Σχεδόν 10% των κυττάρων πλήττεται, παρουσία της UV-A.

Το φωτοενεργοποιημένο sol-gel TiO_2 επιδρά εντονότερα, αυξανόμενης της συγκέντρωσής του. Συγκεντρώσεις 10 μM – 16 μM δρουν σημαντικά στα MDA-MB-468, αφού επιβιώνει περίπου το 50–60% των κυττάρων, ενώ για τις ίδιες συγκεντρώσεις TiO_2 , η βιωσιμότητα των MCF-7 παραμένει σχετικά υψηλή, αφού επιβιώνει το 75–85% του συνόλου τους. Συνεπώς τα κύτταρα υψηλότερης διαφοροποίησης πλήττονται περισσότερο, αφού είναι περισσότερο ευάλωτα στη δράση του sol-gel TiO_2 και φυσικά

του φωτοενεργοποιημένου με UV-A ακτινοβολία, sol-gel TiO₂, συγκρινόμενα με τα MCF-7 κύτταρα.

Αντίστοιχα, παρατηρείται μείωση στην επιβίωση των κυττάρων καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του TiO₂ Evonik P25, σε μορφή εναιωρήματος, όμως αυτό επιτυγχάνεται σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 20 μM TiO₂ Evonik P25. Σε συγκέντρωση περίπου 22 μM επιβιώνει το 60% των κυττάρων MDA-MB-468, ενώ για την ίδια δόση επιβιώνει περισσότερο από το 80% των MCF-7. Το ενεργοποιημένο - με UV – A ακτινοβολία TiO₂ Evonik επιδρά εντονότερα καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση. Συγκεκριμένα δόσεις μεταξύ των 15-20 μM του TiO₂ Evonik P25 έχουν σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων (ποσοστό επιβίωσης 50 - 60%) για τα MDA-MB-468, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό επιβίωσης για τις ίδιες συνθήκες στα MCF-7 είναι μεγαλύτερο από 80%. Δηλαδή, και πάλι, τα MDA-MB-468 κύτταρα εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στα φωτο-ενεργοποιημένα ή μη, νανοσωματίδια TiO₂ Evonik P25 σε σχέση με τα MCF-7, χωρίς τα δεύτερα να μένουν εντελώς ανεπηρέαστα.

Βαθμιαία μείωση στην επιβίωση των κυττάρων, παρατηρείται καθώς αυξάνεται και η συγκέντρωση του εναιωρήματος TiO₂ Sigma Aldrich. Σε συγκέντρωση TiO₂ μεγαλύτερη από 20 μM επιβιώνει το 50% των κυττάρων MDA-MB-468, ενώ για την ίδια δόση επιβιώνει περίπου το 70% των MCF-7. Το ενεργοποιημένο - με UV – A ακτινοβολία TiO₂ Sigma Aldrich επιδρά εντονότερα με την αύξηση της δόσης. Συγκεκριμένα δόσεις μεταξύ των 15-20 μM του TiO₂ έχουν σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων (ποσοστό επιβίωσης 70 - 30%) για τα MDA-MB-468, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό επιβίωσης για τις ίδιες συνθήκες στα MCF-7 το ποσοστό επιβίωσης είναι 80% έως 65% αντίστοιχα. Έτσι, τα MDA-MB-468 κύτταρα εμφανίζουν πιο έντονη ευαισθησία στα φωτο-ενεργοποιημένα ή μη, νανοσωματίδια TiO₂ Sigma Aldrich (100% anatase). Τα MCF-7, ενώ δεν παραμένουν, πληθυσμιακά τουλάχιστον, ανέπαφα, ωστόσο, σε σχέση με τα MDA-MB-468, πλήττονται λιγότερο.

Παρατηρείται ότι αυξανόμενης της συγκέντρωσης του τροποποιημένου με άζωτο TiO₂, απουσία φωτός, δεν μειώνεται, παρά ελάχιστα, ο αριθμός των κυττάρων που επιβιώνουν, αφού φαίνεται πως για συγκεντρώσεις ακόμη και 100μM επιβιώνει περισσότερο από το 80% του πληθυσμού των κυττάρων και των δύο κυτταρικών σειρών, όταν το πείραμα γίνει στο σκοτάδι.

Στην περίπτωση φωτο-ενεργοποιημένου με ορατή ακτινοβολία, τροποποιημένου με άζωτο TiO_2 , παρατηρείται βαθμιαία μείωση του πληθυσμού των κυττάρων και των δύο κυτταρικών σειρών, με ελαφρά εντονότερη δράση στα MDA-MB-468. Συγκεκριμένα παρατηρείται στα 40 μM μια επιβίωση του πληθυσμού των MDA-MB-468, της τάξης του 75%, ενώ αντίστοιχα 85% για τα MCF-7. Αντίστοιχα, σταθερά παρατηρείται μία διαφορά περίπου στο 10%, μεταξύ της συμπεριφοράς των δύο κυτταρικών σειρών, καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση.

Υπάρχει τοξική δράση και του τροποποιημένου με Άργυρο TiO_2 (Ag-doped TiO_2) και στις δύο κυτταρικές σειρές. Η τοξικότητα αυτή καθορίζεται από τη συγκέντρωση του Ag-doped TiO_2 και είναι πιο έντονη στα κύτταρα MDA-MB-468. Είναι φανερό η βαθμιαία μείωση της κυτταρικής επιβίωσης, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του TiO_2 , αφού μία ποσότητα περίπου στα 20 μM TiO_2 είναι αποτελεσματική, με την έννοια ότι επάγει το θάνατο στο 50% του πληθυσμού των κυττάρων MDA-MB-468, αφήνοντας ένα σημαντικό πλήθος των κυττάρων MCF-7 σχεδόν ανεπηρέαστο, αφού, στην ίδια συγκέντρωση επιβιώνει το 80% του πληθυσμού. Η ίδια η ακτινοβολία UV-A επιδρά στην κυτταρική επιβίωση σε ένα μικρό ποσοστό. Συγκεκριμένα σχεδόν το 10% του πληθυσμού των κυττάρων πλήττεται, παρουσία της UV-A, χωρίς την προσθήκη του Ag-doped TiO_2 .

Και το φωτοενεργοποιημένο Ag-doped TiO_2 επιδρά εντονότερα, αυξανόμενης της συγκέντρωσής του. Το εύρος των συγκεντρώσεων Ag-doped TiO_2 που αποδεικνύονται δραστικές, κυμαίνεται μεταξύ 18 μM και 20 μM , στην περίπτωση των κυττάρων MDA-MB-468. Συγκεκριμένα, παρατηρείται σημαντική απώλεια κυτταρικού πληθυσμού, αφού σε αυτές τις συγκεντρώσεις, επιβιώνει τελικά περίπου το 50–60% των κυττάρων, ενώ για τις ίδιες συγκεντρώσεις Ag-doped TiO_2 , η βιωσιμότητα των MCF-7 παραμένει σχετικά υψηλή, αφού επιβιώνει το 70–80% του συνόλου τους. Συνεπώς τα κύτταρα υψηλότερης διαφοροποίησης πλήττονται περισσότερο, δηλαδή είναι περισσότερο ευάλωτα στη δράση του Ag-doped TiO_2 και φυσικά του φωτοενεργοποιημένου με UV-A ακτινοβολία, Ag-doped TiO_2 , συγκρινόμενα με τα MCF-7 κύτταρα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα φανερώνουν την εξάρτηση της δραστηριότητας του TiO_2 , από τη συγκέντρωση και την επιλεκτική του τοξικότητα στα κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του TiO_2 , σε κάθε μορφή, τόσο

αυξάνεται η τοξικότητά του. Ακόμη είναι φανερό πως σημαντικό ρόλο παίζει η μορφή και ο τρόπος παρασκευής του TiO_2 , αφού το sol-gel TiO_2 , είναι αρκετά δραστικότερο από τη μορφή εναιωρήματος. Αυτό αποτελεί ταυτόχρονα και συγκριτική μελέτη, ως προς τη δραστικότητα του TiO_2 , που σχετίζεται με το μέγεθος των νανοσωματιδίων, αφού κατά μέσο όρο τα νανοσωματίδια σε μορφή sol-gel είναι από 5 nm μέχρι 50 nm, όπως προέκυψε από το χαρακτηρισμό, ενώ σε κάθε άλλο εναιώρημα ξεπερνά τα 100 nm. Επομένως, η δραστικότητα καθορίζεται και από το μέγεθος των νανοσωματιδίων. Αυτό επιβεβαιώνεται από πολλές μελέτες που εστιάζουν σε αυτό το πεδίο [236]. Συγκεκριμένα, υπογραμμίζεται το γεγονός ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων καθορίζει την ποσότητα των ROS που δημιουργούνται και ως αποτέλεσμα επηρεάζει τη δραστικότητά τους [245], [247], [248].

Σύμφωνα με τους Jiang et al [60], η μεγαλύτερη συγκέντρωση ROS ανά μονάδα επιφάνειας, του νανοκρύσταλλου, συναντάται σε νανοσωματίδια μεγέθους περίπου 30 nm. Για μεγέθη μεγαλύτερα από αυτό, είναι αρκετά μικρότερη η συγκέντρωση των ROS, αλλά αυτή η συμπεριφορά δείχνει να είναι σταθερή, δηλαδή, δεν παρατηρείται μείωση των ROS καθώς αυξάνεται κι άλλο το μέγεθος των νανοσωματιδίων. Παρατηρείται αύξηση στην παραγωγή των ROS, για μεγέθη από 10 nm μέχρι και 30 nm, όπου συναντάται η μεγαλύτερη δραστηριότητα στη δημιουργία ROS. Τα νανοσωματίδια, με πολύ μικρό μέγεθος, με τιμές κάτω από τα 10 nm, εμφανίζουν μία σταθερή συμπεριφορά.

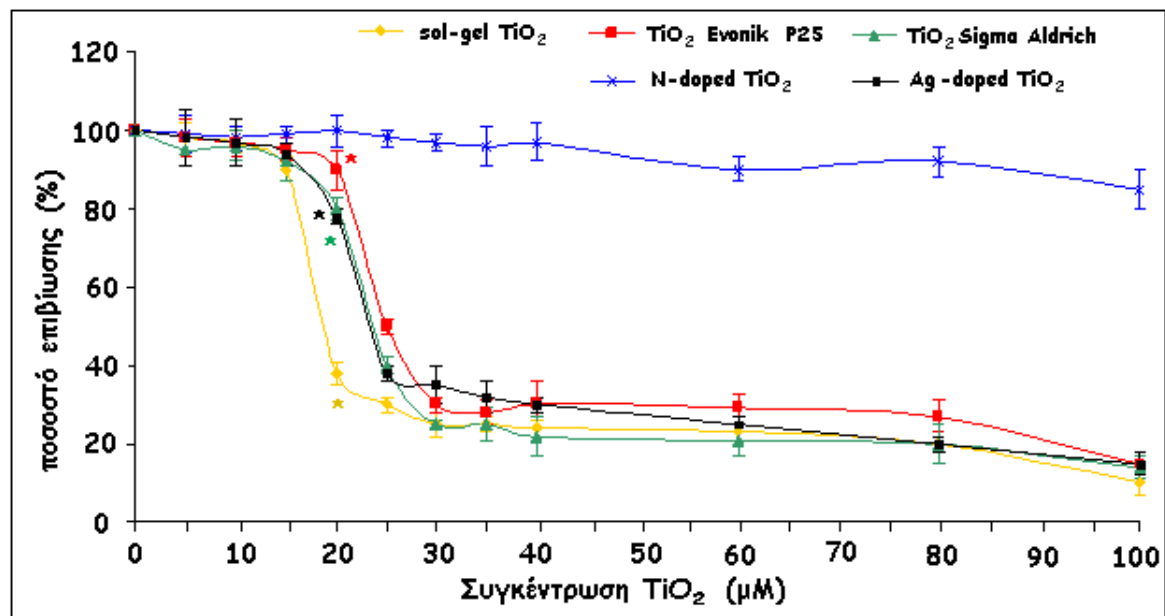
Σημαντικές παράμετροι που σχετίζονται με τη δραστικότητα είναι α) η ενεργός επιφάνεια (δηλαδή η διαθέσιμη επιφάνεια για τις αλληλεπιδράσεις τους) και β) η συνολική επιφάνεια του νανοκρύσταλλου, αλλά και η συνολική επιφάνεια πρόσδεσης, δηλαδή, εν προκειμένω, το «εμβαδό» του ταπητίου που σχηματίζουν τα κύτταρα στα φρεάτια καλλιέργειας [249], [250].

Σύμφωνα με τις εργασίες των Jiang et al [60], Almquist et al [249], Biswas et al [251], καθώς παρατηρείται αυτή η συμπεριφορά στη δραστικότητα του TiO_2 , με την αλλαγή του μεγέθους, συνήθως τίθενται ως σημεία αναφοράς, τα 10nm και τα 30nm, δημιουργώντας περιοχές μελέτης, κάτω από τα 10 nm, μεταξύ 10nm και 30nm, και πάνω από 30 nm, αφού όπως προαναφέρθηκε, για μεγέθη μικρότερα των 10nm ή μεγαλύτερα των 30nm, η παραγωγή των ROS ανά μονάδα επιφάνειας από τα

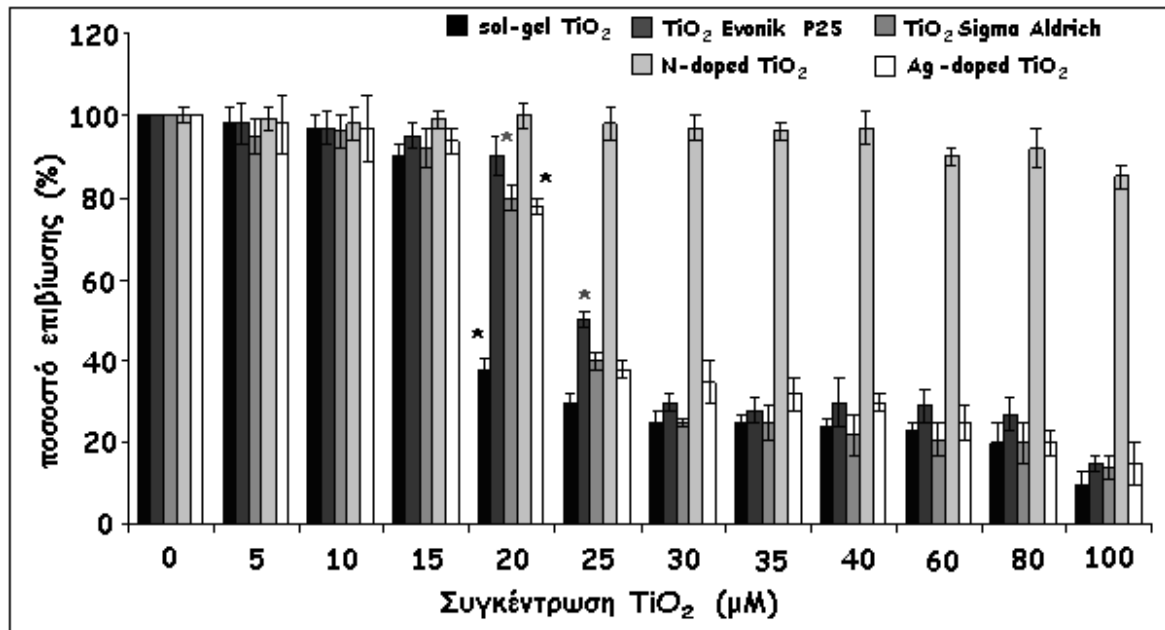
νανοσωματίδια TiO_2 είναι σταθερή, ενώ στην ενδιάμεση περιοχή υπάρχει αναλογική αύξηση με μέγιστο στα 30nm.

Μελετώντας την επίδραση του μεγέθους των νανοσωματιδίων, φαίνεται πως τα νανοσωματίδια TiO_2 σε μορφή sol-gel, με μέγεθος, 5–45 nm, είναι πολύ δραστικότερα από κάθε άλλο είδος που δοκιμάστηκε. Αυτό σχετίζεται με τον τρόπο παρασκευής, που τελικά επηρεάζει και το μέγεθος, αφού όλα τα άλλα είδη που δοκιμάστηκαν ήταν σε μορφή εναιωρημάτων και το μέγεθος των νανοσωματιδίων πάντοτε ξεπερνούσε τα 100 nm.

Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι στην περίπτωση των κυττάρων MCF-7, σε συγκέντρωση 18-19 μM sol-gel TiO_2 , έχουμε επιβίωση του 50% του πληθυσμού, ενώ για να επιτευχθεί το ίδιο ποσοστό επιβίωσης μετά την προσθήκη εναιωρήματος TiO_2 Sigma Aldrich απαιτούνται περίπου 23 μM , ενώ τουλάχιστον 25 μM στην περίπτωση του TiO_2 Evonik (Εικόνες 5.1 και 5.2).

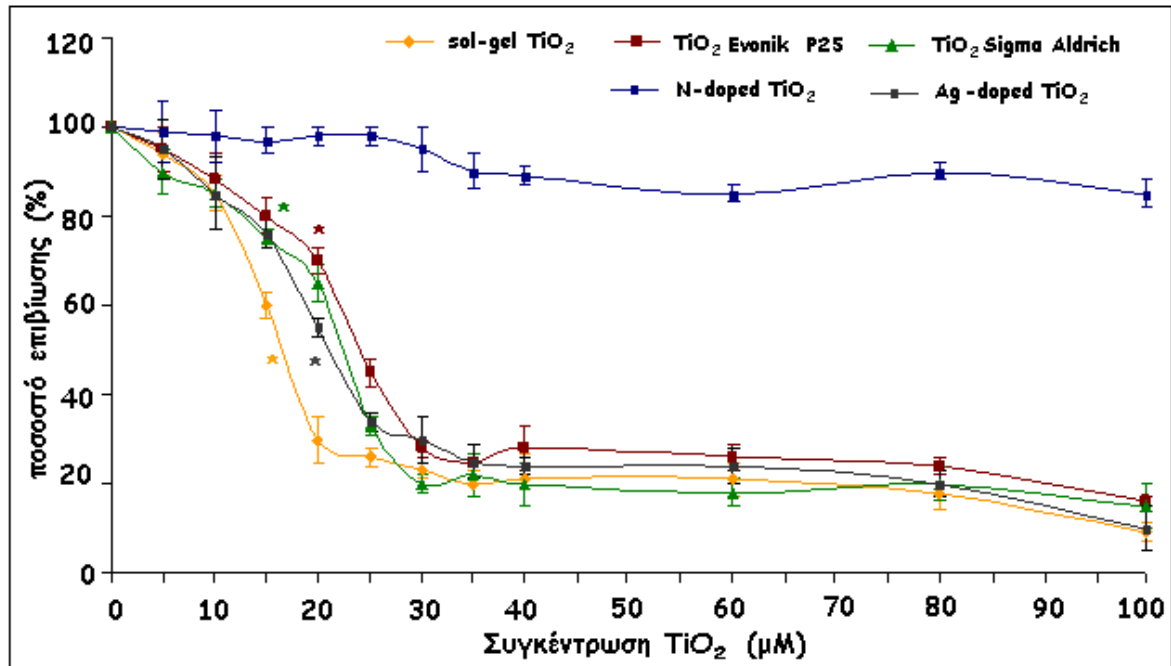


Εικόνα 5.1. Συγκριτικά αποτελέσματα από τη δοκιμή MTT. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MCF-7 επωάζονται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων TiO_2 sol-gel, TiO_2 Evonik P25, TiO_2 Sigma Aldrich (100% anatase), N-doped TiO_2 και Ag-doped TiO_2 για 48 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $mean \pm SD$ από πέντε ανεξάρτητα πειράματα.

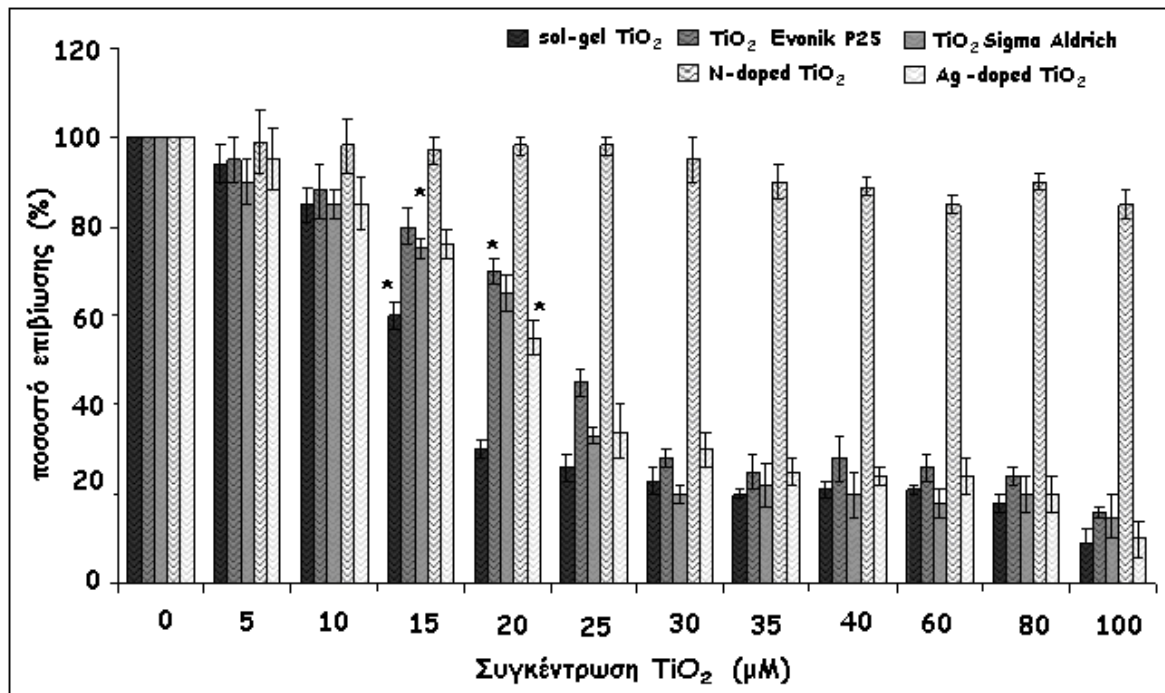


Εικόνα 5.2. Συγκριτικό ραβδόγραμμα από τη δοκιμή MTT. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MCF-7 επωάζονται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων TiO₂ sol-gel, TiO₂ Evonik P25, TiO₂ Sigma Aldrich (100% anatase), N-doped TiO₂ και Ag-doped TiO₂ για 48 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean±SD από πέντε ανεξάρτητα πειράματα.

Αντίστοιχα, για την περίπτωση των κυττάρων MDA-MB-468, σε συγκέντρωση 16 μM sol-gel TiO₂ επιβιώνει το 50% του πληθυσμού, ενώ το ίδιο αποτέλεσμα έχουμε με προσθήκη 22 μM εναιωρήματος TiO₂ Sigma Aldrich ή 25 μM εναιωρήματος TiO₂ Evonik P25 (Εικόνες 5.3 και 5.4).

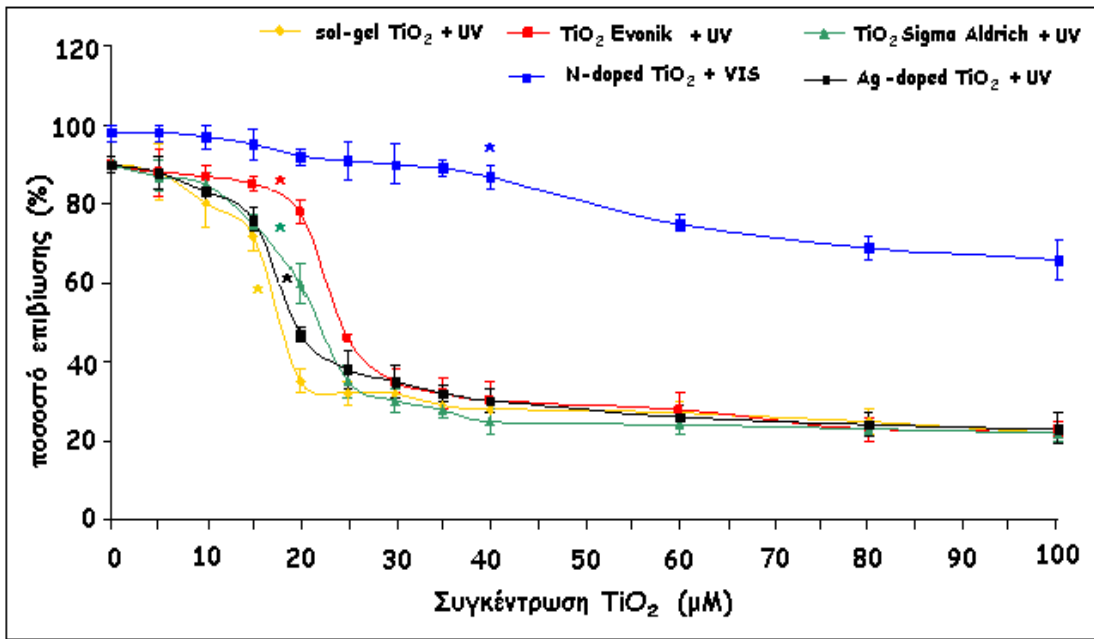


Εικόνα 5.3. Συγκριτικά αποτελέσματα από την δοκιμή MTT. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MDA-MB-468 επωάζονται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων TiO₂ sol-gel, TiO₂ Evonik P25 ή TiO₂ Sigma Aldrich (100% anatase), N-doped TiO₂ και Ag-doped TiO₂ για 48 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean±SD από πέντε ανεξάρτητα πειράματα.

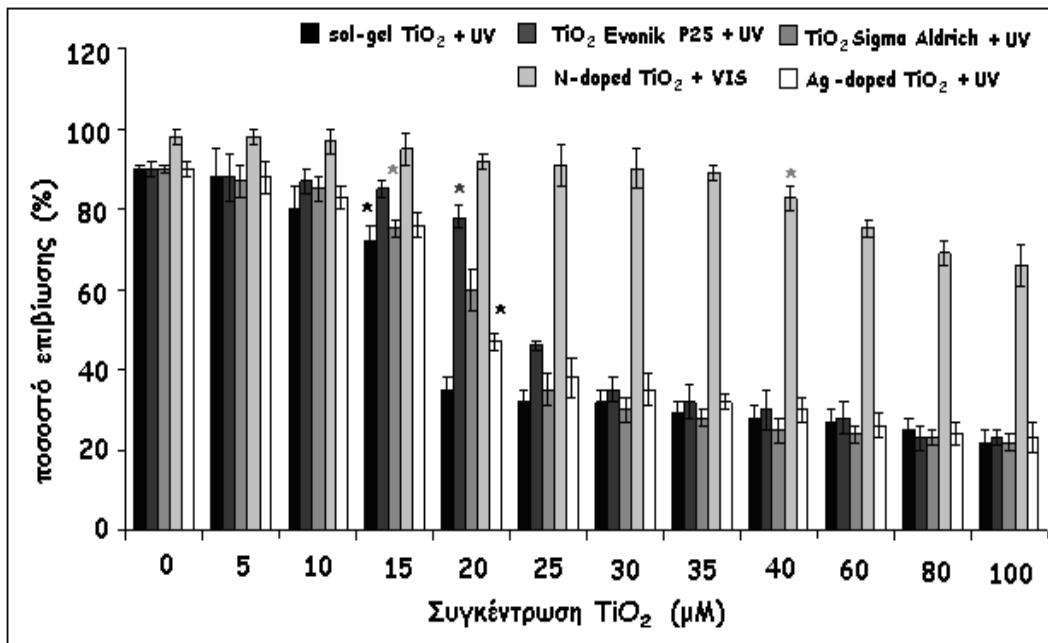


Εικόνα 5.4. Συγκριτικό ραβδόγραμμα από τη δοκιμή MTT. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MDA-MB-468 επωάζονται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων TiO₂ sol-gel, TiO₂ Evonik P25 ή TiO₂ Sigma Aldrich (100% anatase), N-doped TiO₂ και Ag-doped TiO₂ για 48 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean±SD από πέντε ανεξάρτητα πειράματα.

Η δράση του ενεργοποιημένου - με UV – Α ακτινοβολία TiO₂ είναι και πάλι ανάλογη της δόσης. Σε συγκέντρωση περίπου 17 μM TiO₂ sol-gel, έχουμε επιβίωση του 50% του πληθυσμού των κυττάρων MCF-7, ενώ απαιτούνται 22 μM εναιωρήματος TiO₂ Sigma Aldrich ή 25 μM εναιωρήματος TiO₂ Evonik P25 για το ίδιο αποτέλεσμα (Εικόνες 5.5 και 5.6).

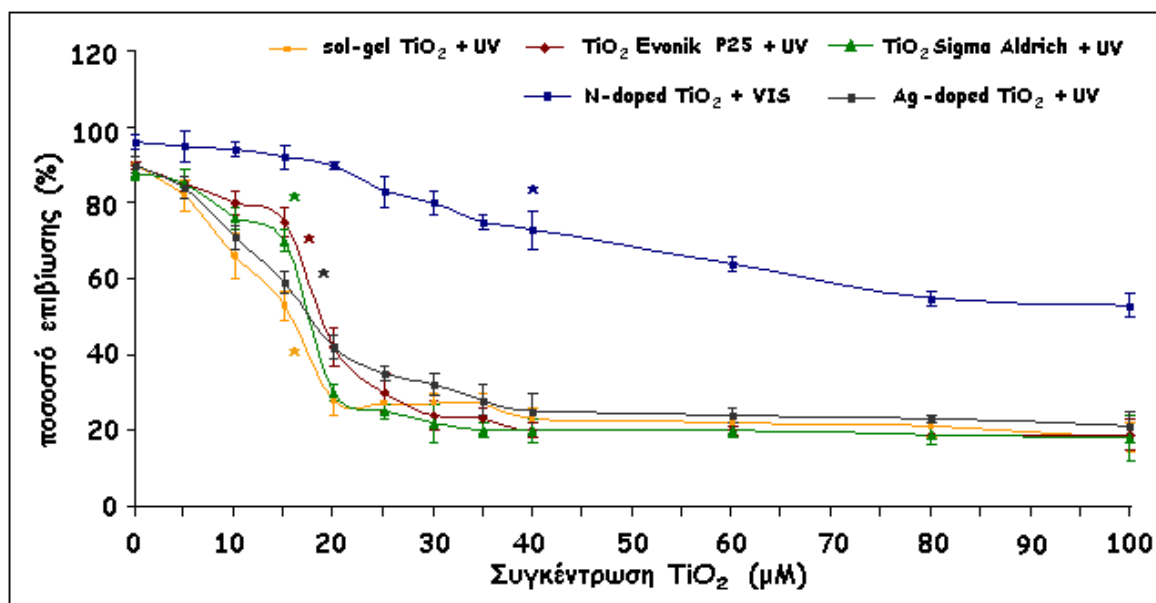


Εικ.5.5. Συγκριτικά αποτελέσματα από την δοκιμή MTT. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MCF-7 επώάζονται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων φωτο-ενεργοποιημένου (με UV-A για 20 min), TiO₂ sol-gel, TiO₂ Evonik P25, TiO₂ Sigma Aldrich (100% anatase) N-doped TiO₂ (ορατή ακτινοβολία για 20 min) και Ag-doped TiO₂ (UV-A για 20 min), για 48 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean±SD από πέντε ανεξάρτητα πειράματα.

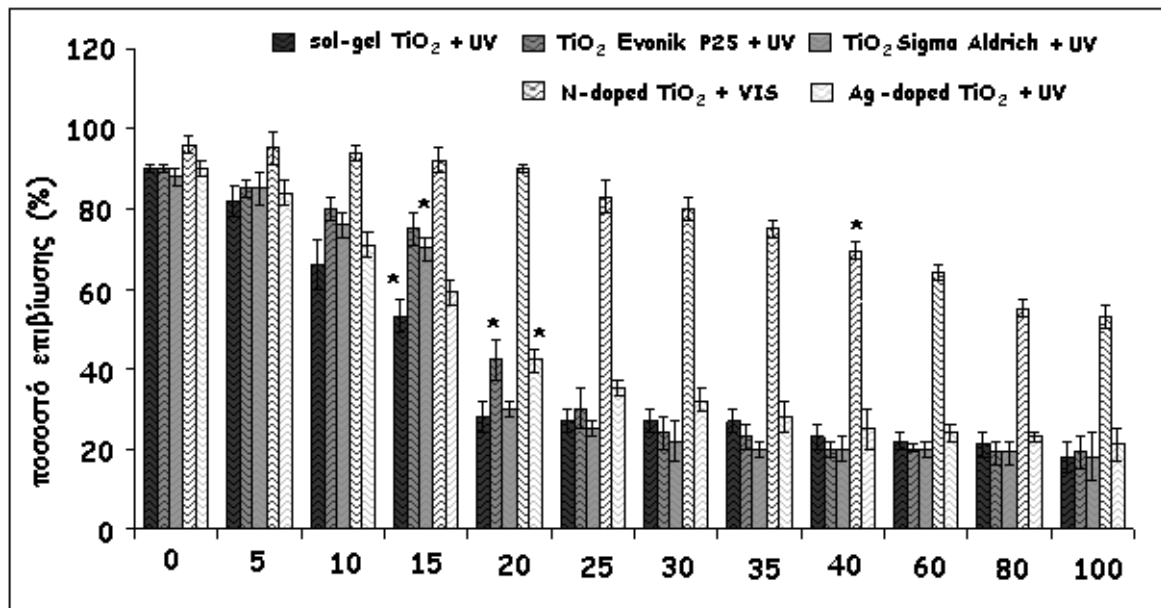


Εικ.5.6. Συγκριτικό ραβδόγραμμα από την δοκιμή MTT. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MCF-7 επώάζονται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων φωτο-ενεργοποιημένου (με UV-A για 20 min), TiO₂ sol-gel, TiO₂ Evonik P25, TiO₂ Sigma Aldrich (100% anatase), N-doped TiO₂ (ορατή ακτινοβολία για 20 min) και Ag-doped TiO₂ (UV-A για 20 min), για 48 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean±SD από πέντε ανεξάρτητα πειράματα.

Αντίστοιχα, για τα MDA-MB-468, δόσεις μεταξύ των 10-16 μM φωτο-ενεργοποιημένου sol-gel TiO_2 έχουν σαν αποτέλεσμα σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων (ποσοστό επιβίωσης 50 - 60%), ενώ χρειάζονται 16-17 μM εναιωρήματος TiO_2 Sigma Aldrich ή 18-20 μM εναιωρήματος Evonik για το ίδιο αποτέλεσμα (Εικόνες 4.7 και 4.8).



Εικ.5.7. Συγκριτικά αποτελέσματα από την δοκιμή MTT. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MDA-MB-468 επωάζονται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων φωτο-ενεργοποιημένου (με UV-A για 20 min), TiO_2 sol-gel, TiO_2 Evonik P25, TiO_2 Sigma Aldrich (100% anatase) N-doped TiO_2 (ορατή ακτινοβολία για 20 min) και Ag-doped TiO_2 (UV-A για 20 min), για 48 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως $\text{mean} \pm \text{SD}$ από πέντε ανεξάρτητα πειράματα.



Εικ.5.8. Συγκριτικό ραβδόγραμμα από την δοκιμή MTT. Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού MDA-MB-468 επώζονται παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων φωτο-ενεργοποιημένου (με UV-A για 20 min), TiO₂ sol-gel, TiO₂ Evonik P25, TiO₂ Sigma Aldrich (100% anatase) N-doped TiO₂ (ορατή ακτινοβολία για 20 min) και Ag-doped TiO₂ (UV-A για 20 min), για 48 ώρες. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean±SD από πέντε ανεξάρτητα πειράματα.

Το TiO₂ σε μορφή sol-gel, παρουσιάζει μεγαλύτερη ομοιογένεια (μικρά σωματίδια, με διάμετρο 5–45 nm), σε σχέση με τα εναιωρήματα TiO₂ Evonik P2 5ή Sigma Aldrich. Κατά αυτόν τον τρόπο, επιτρέπεται η ακριβέστερη εκτίμηση της τελικής συγκέντρωσης TiO₂ στα δείγματα, σε σχέση με τα εναιωρήματα, στα οποία δεν υπάρχει ίδια συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας, ανά μονάδα όγκου. Στην περίπτωση του sol-gel, προσεγγίζονται τα χαρακτηριστικά ενός ομογενούς διαλύματος, παρ' όλο που η φύση του διαφέρει αρκετά. Αυτό δίνει σε σημαντικό βαθμό απάντηση στο γεγονός ότι το sol-gel TiO₂ είναι αρκετά δραστικότερο (Εικόνες 5.1 - 5.8).

Επίσης, όπως ήδη προαναφέρθηκε, κατά το χαρακτηρισμό των σωματιδίων, διαπιστώθηκε ότι σε μορφή εναιωρήματος ευνοείται ο σχηματισμός συσσωματωμάτων, που διαφοροποιεί ιδιαίτερα το μέγεθος των σωματιδίων, σε σχέση με το αναμενόμενο, με βάση τα εμπορικά χαρακτηριστικά των ουσιών. Για αυτόν το λόγο, συστηματικά χρησιμοποιήθηκαν υπέρηχοι, που διέσπασαν τα συσσωματώματα

σε μικρότερα μεγέθη. Η έκθεση σε υπερήχους, με βαθμιαία αύξηση του χρόνου έκθεσης των σκευασμάτων (Sigma Aldrich, Evonik) μέχρι το σημείο, όπου η θολότητα του διαλύματος αντικαταστάθηκε κατά το δυνατόν από ικανοποιητική διαύγεια (ένδειξη διάσπασης συσσωματωμάτων), δίνει τη δυνατότητα αντικειμενικής σύγκρισης ανάμεσα στις ουσίες, για τις οποίες επιτεύχθηκε το τελικό μέγεθος των νανοσωματιδίων τους, να είναι ίδιας τάξης μεγέθους, πριν την χρήση τους σε συστήματα κυτταροκαλλιιεργειών.

Σχετικά με τα δύο εναιωρήματα, παρουσιάζεται μεγαλύτερη δραστικότητα του εναιωρήματος TiO_2 Sigma Aldrich, σε σχέση με το Evonik P25. Αυτό πιθανώς σχετίζεται με τη φάση κρυστάλλωσης της κάθε ουσίας. Στην περίπτωση του TiO_2 Sigma Aldrich, έχουμε 100% ανατάση, ενώ στη Evonik, έχουμε συνύπαρξη φάσεων και συγκεκριμένα 75% ανατάση και 25% ρουτίλιο. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες [251], [252], [253], η ύπαρξη φάσης ρουτιλίου στο τελικό σχηματισμό της ουσίας αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για τη συνολική δραστικότητας της. Πιο συγκεκριμένα, η καθαρή μορφή ανατάση (100%) TiO_2 επάγει την αύξηση της ποσότητας των ROS σε σύγκριση με τα σωματίδια στα οποία συνυπάρχουν ανατάσης και ρουτίλιο, για παρόμοια μεγέθη σωματιδίων.

Με την αύξηση του λόγου (ποσοστού) του ρουτιλίου προς τον ανατάση παρατηρείται μείωση της δραστικότητας. Σύμφωνα με προϋπάρχουσες μελέτες, το ρουτίλιο παράγει λιγότερα ROS σε σχέση με άλλες μορφές TiO_2 [252], [253].

Επομένως, η οξειδωτική δράση του TiO_2 σχετίζεται με τη φάση κρυστάλλωσης, δεδομένου ότι προηγούμενες έρευνες [252], [253], [254], [255], [256] δείχνουν ότι η δραστικότητα του TiO_2 μειώνεται καθώς μεταβαίνουμε από το άμορφο TiO_2 , στον καθαρό ανατάση, στον ανατάση/ρουτίλιο και τέλος στο καθαρό ρουτίλιο.

Το τροποποιημένο με άζωτο TiO_2 , συγκρινόμενο με τα άλλα εναιωρήματα δε δείχνει να είναι αρκετά αποτελεσματικό, δεδομένου ότι σε συγκεντρώσεις 10-100 μM και απουσία φωτός επιβιώνει σχεδόν το 90% του πληθυσμού των κυττάρων και στις δύο κυτταρικές σειρές (εικόνες 5.1 - 5.4).

Στην περίπτωση του φωτο-ενεργοποιημένου με ορατή ακτινοβολία TiO_2 για 20 λεπτά, και τροποποιημένο με άζωτο TiO_2 επιβιώνει το 90% των κυττάρων σε συγκεντρώσεις

10-20 μ M, το 70-90% σε συγκεντρώσεις 20-40 μ M, περίπου 70% σε συγκεντρώσεις 40-60 μ M, και πρέπει η συγκέντρωση των σωματιδίων να είναι περίπου 80-100 μ M για να μειωθεί η επιβίωση των MDA-MB-468 κυττάρων σε 60%. Μικρές διαφορές εμφανίζουν τα MCF-7 κύτταρα. Παρατηρούμε ότι είναι ελαφρώς ανθεκτικότερα στην κυτταροτοξική δράση των TiO₂ σωματιδίων (Εικόνες 5.5 - 5.8).

Επομένως, αν και παρατηρήθηκε βελτίωση της μεθόδου, ως προς την απαλλαγή από την τοξική δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας, δεν ήταν εφικτή η επιλεκτική κυτταροτοξική δράση του TiO₂ στα υψηλής διαφοροποίησης επιθηλιακά κύτταρα.

Αντίθετα, η τροποποίηση του TiO₂ με Άργυρο, φαίνεται πως λειτουργεί ικανοποιητικά, αφού υπάρχει τοξική δράση του τροποποιημένου με Άργυρο TiO₂ (Ag-doped TiO₂) και στις δύο κυτταρικές σειρές. Η τοξικότητα αυτή καθορίζεται από τη συγκέντρωση του Ag-doped TiO₂ και είναι πιο έντονη στα κύτταρα MDA-MB-468. Είναι φανερό η βαθμιαία μείωση της κυτταρικής επιβίωσης, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του TiO₂.

Φαίνεται πως μία ποσότητα περίπου στα 20 μ M TiO₂, είναι αποτελεσματική, με την έννοια ότι επάγει το θάνατο στο 50% του πληθυσμού των κυττάρων MDA-MB-468 (Εικόνες 5.3 - 5.4), αφήνοντας ένα σημαντικό πλήθος των κυττάρων MCF-7 σχεδόν ανεπηρέαστο, αφού, στην ίδια συγκέντρωση επιβιώνει το 80% του πληθυσμού (Εικόνες 5.1 - 5.2). Δηλαδή, είναι σχεδόν το ίδιο αποτελεσματική με το TiO₂ σε μορφή 100% ανατάση, περισσότερο αποτελεσματικό από τη Evonik P25, λιγότερο δραστικό από το sol-gel και πολύ πιο αποτελεσματικό από το τροποποιημένο με άζωτο TiO₂.

Και το φωτοενεργοποιημένο Ag-doped TiO₂ επιδρά εντονότερα, αυξανόμενης της συγκέντρωσής του. Το εύρος των συγκεντρώσεων Ag-doped TiO₂ που αποδεικνύονται δραστικές, κυμαίνεται μεταξύ 18 μ M και 20 μ M, στην περίπτωση των κυττάρων MDA-MB-468 (Εικόνες 5.7 - 5.8). (αφού παρατηρείται σημαντική απώλεια κυτταρικού πληθυσμού, της τάξης του 40-50%, ενώ για τις ίδιες συγκεντρώσεις Ag-doped TiO₂, η βιωσιμότητα των MCF-7 παραμένει σχετικά υψηλή, αφού επιβιώνει το 70-80% του συνόλου τους (Εικόνες 5.5 - 5.6). Συνεπώς τα κύτταρα υψηλότερης διαφοροποίησης πλήττονται περισσότερο, δηλαδή είναι περισσότερο ευάλωτα στη δράση του Ag-doped TiO₂ και φυσικά του φωτοενεργοποιημένου με UV-A ακτινοβολία, Ag-doped TiO₂, συγκρινόμενα με τα MCF-7 κύτταρα.

Από την κυτταρομετρία ροής και τη δοκιμή του TiO_2 σε μορφή sol-gel, δεν προέκυψε η σαφής εικόνα απόπτωσης, που υποστηρίζεται βιβλιογραφικά, με μία διακριτή κορυφή αποπτωτικού πληθυσμού κυττάρων, να προηγείται από αυτή που αντιστοιχεί στο πληθυσμό που βρίσκεται στη φάση G_2 του κυτταρικού κύκλου. Παρατηρήθηκε ότι στα MDA-MB-468 κύτταρα, η προσθήκη του TiO_2 ή ακτινοβολήση με UV-A (απουσία του φωτοκαταλύτη) οδήγησε σε μείωση του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G_1 σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, ενώ οι αντίστοιχες συνθήκες δεν φαίνεται να επηρέασαν τα MCF-7 κύτταρα. Η επίδραση των φωτο-ενεργοποιημένων νανοσωματιδίων του TiO_2 είναι εντονότερη στην περίπτωση ακτινοβολήσης των κυττάρων MDA-MB-468 παρουσία του sol-gel TiO_2 . Συγκεκριμένα, παρατηρείται μια μείωση της τάξης του 70% στον αριθμό των κυττάρων που βρίσκονται στη G_1 φάση, δεν παρατηρείται αντίστοιχη δράση στα MCF-7.

Στα πειράματα κυτταρομετρίας ροής που εκτελέστηκαν, με στόχο τη μελέτη της επίδρασης των εναιωρημάτων TiO_2 Evonik P25, TiO_2 Sigma Aldrich (100% anatase), N-doped TiO_2 και Ag-doped TiO_2 στον κυτταρικό κύκλο, δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση, ίσως λόγω του γεγονότος ότι είναι λιγότερο δραστικά από τη μορφή sol-gel.

Η μελέτη της επαγόμενης απόπτωσης, ως αποτέλεσμα της δημιουργίας των ROS, που προκύπτουν μέσω της διαδικασίας της φωτοκατάλυσης, δείχνει ότι η επίδραση των φωτο-ενεργοποιημένων ή μη, νανοκρυστάλλων TiO_2 σε μορφή sol-gel, στα κύτταρα MDA-MB-468, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της θραύσης της PARP σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, αφού ανιχνεύεται το θραύσμα στα 85 kDa. Ως θετικοί μάρτυρες, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων, στα οποία προστέθηκαν 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη λύση, όπως και κύτταρα από καλλιέργεια που απουσίαζε ο ορός. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, στα κύτταρα MCF-7, δεν ανιχνεύεται το θραύσμα της PARP, δηλαδή επάγεται απόπτωση επιλεκτικά στα MDA-MB-468 κύτταρα. Αυτό παρατήρησαν και οι J. Zhao et al. [255], μελετώντας τη δράση του TiO_2 , σε καρκινικά κύτταρα επιδερμίδας ποντικού, οι Z. Msiska et al. [256], σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα των μικρών αεραγωγών του αναπνευστικού συστήματος, και πολλές άλλες ερευνητικές ομάδες.

Τα μέλη της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών παίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση και τη διεξαγωγή της απόπτωσης. Η ρύθμιση και έκφραση των αντι-αποπτωτικών και προ-

αποπτωτικών μορίων καθορίζει το αν ένα κύτταρο θα οδηγηθεί σε απόπτωση ή σε κυτταρική επιβίωση. Η μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών δείχνει ότι η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO_2 σε μορφή sol-gel, στα κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης MDA-MB-468, οδηγεί σε μείωση της Bcl-2, γεγονός που αποτελεί ένδειξη για αποπτωτική δραστηριότητα. Αυτό το αποτέλεσμα συμβαδίζει με πολλές δημοσιευμένες εργασίες που μελετούν επίσης την επίδραση του TiO_2 , όπως είναι οι εργασίες των J. Zhao et al. [255], που δοκιμάζουν τη δράση του TiO_2 , σε επιδερμικά κύτταρα ποντικού, των N. Li et al. [257], που ελέγχουν την επίδραση και την αποπτωτική δράση του TiO_2 , σε κύτταρα σπλήνα ποντικού, και που επιβεβαιώνουν ότι η παρουσία των νανοσωματιδίων TiO_2 , οδηγεί σε μείωση της Bcl-2. Ταυτόχρονα, παρατηρείται αύξηση στην πρωτεΐνη Bax, κάτι που επιβεβαιώνεται και από πολλές άλλες εργασίες, όπως είναι των N. Li et al. [257], που προαναφέρθηκε, των R. Shukla et al. [258], που μελετούν την τοξικότητα και την αποπτωτική δράση του TiO_2 σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα και των Y. S. Lee et al. [259], με εφαρμογή σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα H1299. Τα επίπεδα των Bcl- χ_L και Bad παραμένουν αμετάβλητα.

Αντίστοιχα δεν παρουσιάζεται αξιοσημείωτη αυξομείωση στα επίπεδα των μελών της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών, κάτω από τις ίδιες συνθήκες για την περίπτωση των κυττάρων MCF-7, παρουσία sol-gel TiO_2 .

Η επίδραση του φωτο-ενεργοποιημένου εναιωρήματος TiO_2 Evonik (75% ανατάση / 25% ρουτίλιο), στα MDA-MB-468, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της θραύσης της PARP σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, και αυτό φαίνεται από την ανίχνευση του θραύσματος της PARP στα 85 kDa, όταν κάτω από τις ίδιες συνθήκες, στα MCF-7 κύτταρα, δεν ανιχνεύεται το θραύσμα της PARP. Έτσι, είναι φανερό ότι τα φωτο-ενεργοποιημένα νανοσωματίδια TiO_2 (Evonik P25), σε μορφή εναιωρήματος επάγουν απόπτωση στα MDA-MB-468 κύτταρα. Ως θετικός μάρτυρας για τον έλεγχο της θραύσης της PARP, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) με επώαση 24 ωρών.

Αλλά και το εναιώρημα TiO_2 (Sigma Aldrich) (100% ανατάση), φωτο-ενεργοποιημένο ή μη, επάγει τη θραύση της PARP και επομένως οδηγεί σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Είναι πιθανό ότι η μεγαλύτερη δραστηριότητά του, ακόμη και χωρίς την

ακτινοβόλησή του με ακτινοβολία UV-A, συγκρινόμενο με το αντίστοιχο εναιώρημα TiO₂ (Evonik P25), σχετίζεται με τη φάση κρυστάλλωσής του, αφού όπως προαναφέρθηκε η φάση ρουτιλίου αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα ως προς την τοξικότητα της ουσίας, σε αντίθεση με τη μορφή ανατάση, που είναι πολύ δραστικότερη [251], [252], [253].

Η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO₂ (Evonik P25) σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης MDA-MB-468, οδηγεί σε μικρή αύξηση της Bax, που αποτελεί ένδειξη για αποπτωτική δραστηριότητα, ενώ τα επίπεδα των Bcl-2, Bcl-x_l και Bad παραμένουν αμετάβλητα. Ακριβώς η ίδια συμπεριφορά παρατηρείται και παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO₂ (Sigma Aldrich) σε μορφή εναιωρήματος, στην ίδια κυτταρική σειρά.

Αντίστοιχα, δεν παρουσιάζεται αξιοσημείωτη μεταβολή στα επίπεδα των μελών της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών, κάτω από τις ίδιες συνθήκες για την περίπτωση των κυττάρων MCF-7, για καθένα από τα δυο αυτά εναιωρήματα TiO₂.

Η επίδραση του φωτο-ενεργοποιημένου με ορατή ακτινοβολία τροποποιημένου με Άζωτο TiO₂, σε μορφή εναιωρήματος, στα MDA-MB-468, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της θραύσης της PARP στα 85 kDa, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, αλλά σε μικρό ποσοστό. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, στα MCF-7 κύτταρα, δεν παρατηρείται αυτή η δράση. Επομένως, τα φωτο-ενεργοποιημένα νανοσωματίδια τροποποιημένου με Άζωτο TiO₂, σε μορφή εναιωρήματος επάγουν, σε ένα μικρό ποσοστό, απόπτωση στα MDA-MB-468 κύτταρα.

Το φωτο-ενεργοποιημένο με ακτινοβολία UV-A, και τροποποιημένο με Άργυρο TiO₂, σε μορφή εναιωρήματος, στα MDA-MB-468, έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της θραύσης της PARP σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, και αυτό προκύπτει από την ανίχνευση του θραύσματος της PARP στα 85 kDa, ενώ στα κύτταρα MCF-7 δεν ανιχνεύεται το θραύσμα της PARP. Έτσι, συνεπάγεται ότι τα φωτο-ενεργοποιημένα νανοσωματίδια τροποποιημένου με Άργυρο TiO₂, σε μορφή εναιωρήματος, επάγουν απόπτωση, ειδικά, στα MDA-MB-468 κύτταρα.

Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε δείγμα εκχυλίσματος κυττάρων, στα οποία είχε προστεθεί cis-platin (1 mg/ml) με επώαση 24 ωρών, και για τις δύο περιπτώσεις χημικά τροποποιημένων νανοσωματιδίων TiO₂.

Η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ορατή ακτινοβολία, νανοκρυστάλλων N-doped TiO₂, σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα υψηλής διαφοροποίησης, MDA-MB-468, οδηγεί σε μία πολύ μικρή αύξηση της Bax, που αποτελεί ένδειξη για αποπτωτική δραστηριότητα, ενώ τα επίπεδα των Bcl-2, Bcl-x_L και Bad παραμένουν αμετάβλητα.

Η παρουσία των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, ή μη, νανοκρυστάλλων Ag-doped TiO₂, σε μορφή εναιωρήματος, στα κύτταρα MDA-MB-468, οδηγεί σε μείωση της Bcl-2, και σε αύξηση της Bax, ενώ τα επίπεδα των Bcl-x_L και Bad παραμένουν αμετάβλητα.

Δεν παρουσιάζεται αξιοσημείωτη μεταβολή στα επίπεδα των μελών της οικογένειας των Bcl-2 πρωτεϊνών, κάτω από τις ίδιες συνθήκες για την περίπτωση των κυττάρων MCF-7, για καθένα από τα δυο εναιωρήματα του N-doped TiO₂ και του Ag-doped TiO₂, που χρησιμοποιήθηκαν.

Κατά την εκτίμηση του κατακερματισμού του DNA υπό την επίδραση του sol-gel TiO₂, μετά από ηλεκτροφόρηση του ολικού DNA, διαπιστώθηκε ότι το φωτο-ενεργοποιημένο με ακτινοβολία UV-A TiO₂, σε μορφή sol-gel, προκαλεί DNA laddering στα κύτταρα MDA-MB-468 αλλά όχι και στα MCF-7. Αυτό προκύπτει από την παρατήρηση της χαρακτηριστικής εικόνας «κλίμακας» που εμφανίζουν τα δείγματα των αποπτωτικών πληθυσμών. Ως θετικός μάρτυρας θεωρήθηκε δείγμα κυττάρων στο οποίο είχαν προστεθεί 200 nM σταυροσπορίνης για 24 ώρες, πριν τη διαδικασία απομόνωσης του DNA. Η διαπίστωση της επαγωγής DNA laddering, παρουσία TiO₂, συμβαδίζει με πλήθος εργασιών, όπως των R. Meena et al. [260] που μελετούν τη δράση του TiO₂ σε κύτταρα HEK, που από πολλές απόψεις εμφανίζουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τις δύο κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία. Επίσης η ομάδα των D. Zhang et al. [261] παρατήρησε αντίστοιχη συμπεριφορά, δηλαδή εικόνα κατακερματισμού DNA, παρουσία TiO₂, όπως και οι M. Ghosh et al. [262], που παρατήρησαν ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του TiO₂, είναι εντονότερη η επίδρασή του στον κατακερματισμό του DNA, δηλώνοντας την επαγωγή απόπτωσης στον κυτταρικό πληθυσμό που πλήττεται.

Επίσης, προκαλείται DNA laddering στα κύτταρα MDA-MB-468, υπό τη δράση των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων Ag-doped TiO₂, ή των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO₂ (Sigma Aldrich) και σε μικρότερο ποσοστό, υπό τη δράση των φωτο-ενεργοποιημένων με ακτινοβολία UV-A, νανοκρυστάλλων TiO₂ (Evonik P25) ή των φωτο-ενεργοποιημένων με ορατή ακτινοβολία, νανοκρυστάλλων N-doped TiO₂ ή των μη φωτο-ενεργοποιημένων νανοκρυστάλλων Ag-doped TiO₂.

Αντίστοιχα, κάτω από τις ίδιες συνθήκες δεν παρατηρείται κατακερματισμός του DNA στα κύτταρα MCF-7.

Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τα όσα ήδη έχουν αναφερθεί για την επίδραση των εναιωρημάτων αυτών στο ποσοστό επιβίωσης των κυτταρικών πληθυσμών, αλλά και στην αποπτωτική τους δράση, μέσω της μελέτης της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2, αλλά και μέσω της μελέτης της θραύσης της PARP.

Η παρούσα μελέτη ολοκληρώνει έναν κύκλο πειραμάτων που σχετίζονται με την επίδραση του TiO₂ στον κυτταρικό κύκλο, στην κυτταρική επιβίωση, αλλά και με το είδος θανάτου που επάγεται στα κύτταρα, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι εξαντλεί τις δυνατότητες για ακόμη πιο ενδελεχή ανάλυση των φαινομένων αυτών. Δεδομένης της ιδιαίτερης αύξησης του ενδιαφέροντος γύρω από τη χρήση του TiO₂, σαν αντικαρκινικό παράγοντα, πολλά ακόμη πειράματα θα μπορούσαν να σχεδιαστούν για μελέτη τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*.

Απώτερος στόχος θα πρέπει να είναι η βελτιστοποίηση της μεθόδου, με στόχο την τελειοποίηση της τεχνικής της χημικής τροποποίησης του TiO₂, με άζωτο, που παρ' όλο που τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας δεν ήταν ιδιαίτερος ενθαρρυντικά, ως προς την αποτελεσματικότητα της εν λόγω μορφής του TiO₂, παρ' όλα αυτά παραμένει ως ένα πεδίο – ερευνητικής πρόκλησης, αφού επιτρέπει τη φωτοκατάλυση, με ακτινοβολία με ορατή ακτινοβολία, αποτρέποντας έτσι κάθε πιθανή παρενέργεια που σχετίζεται με την ίδια την ακτινοβολία UV-A, που αξιοποιείται σε κάθε άλλη μορφή TiO₂.

Επίσης μελλοντικά, θα ήταν σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί και μία απολύτως φυσιολογική κυτταρική σειρά προερχόμενη από επιθηλιακά κύτταρα μαστού, για τον πλήρη έλεγχο τη δράσης του TiO_2 σε υγιή ιστό.

Θα αποτελούσε έναν εξαιρετικό τρόπο αντιμετώπισης αυτού του τόσο συχνά απαντώμενου τύπου καρκίνου που πλήττει ένα σημαντικό μέρος του ανθρώπινου πληθυσμού, αν μπορούσε να αναπτυχθεί σωστά μία μέθοδος που θα αξιοποιούσε τα αποτελέσματα της παρούσας, αλλά και πλήθος άλλων εργασιών, πάνω σε αυτό το πεδίο έρευνας.

Συγκριμένα, θα ήταν σκόπιμο, αρχικά να αναπτυχθεί και να εξελιχθεί το TiO_2 ως «έξυπνο» φάρμακο, που θα βασίζεται στη γενική αρχή της νανοτεχνολογίας, που τονίζει την ανάγκη για επιλεκτική πρόσδεση του εκάστωτε θεραπευτικού παράγοντα στην περιοχή - στόχος για αύξηση της αποτελεσματικής του δράσης, και μείωση των επιπτώσεων στις γύρω υγιείς περιοχές. Αυτό μπορεί να προκύψει, αν μπορούσε να συνδεθεί με κάποιο βιομόριο, που επιλεκτικά θα μπορούσε να προσκολληθεί στον επιθηλιακό ιστό του μαστού.

Στη συνέχεια θα ήταν κρίσιμης σημασίας, να αναπτυχθεί μία διάταξη που θα επιτρέπει να ακτινοβοληθεί τοπικά η περιοχή, ίσως με κάποια δέσμη laser ή οπτική ίνα, με στόχο την εκπομπή ακτινοβολίας συγκεκριμένου μήκους κύματος, που θα στοχεύει στην περιοχή ενδιαφέροντος και μόνο σε αυτή, με τρόπο ημιεπεμβατικό, αφού τόσο η ορατή ακτινοβολία, όσο και η ακτινοβολία UV-A, δεν μπορούν να διαπεράσουν την ανθρώπινη επιδερμίδα.

Με δεδομένη τη σημερινή, συμβατική μέθοδο αντιμετώπισης του καρκίνου του μαστού, που περιλαμβάνει ανάλογα με την περίπτωση, τον τύπο καρκίνου και το στάδιο, χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία ή ορμονοθεραπεία και ακτινοθεραπευτικό σχήμα, και που στηρίζεται κυρίως στην πρόληψη και στον έγκαιρο εντοπισμό του προβλήματος, παρά στην αποτελεσματική αντιμετώπισή του, είναι λογικό να συμπεράνει κανείς ότι μία εναλλακτική μέθοδος, από κάθε σκοπιά και κυρίως ραδιοβιολογική, θα ήταν λιγότερο επιβλαβής για όλο τον οργανισμό, αφού δεν θα στηριζόταν σε χρήση ραδιενεργών ισotόπων και ιονίζουσας ακτινοβολίας. Επομένως η πρόκληση είναι υπαρκτή και ο σχεδιασμός μιας θεραπείας του καρκίνου του μαστού, αλλά και γενικώς νεοπλασμάτων κάθε είδους, που θα βελτιώνει τόσο το

θεραπευτικό αποτέλεσμα, όσο και την ποιότητα ζωής του ασθενούς, στην περίπτωση επιβίωσής του, αποτρέποντας οποιοδήποτε πρόβλημα θα σχετιζόταν με τη δράση ιονίζουσας ακτινοβολίας, άμεσης ή έμμεσης, θα πρέπει να απασχολεί όλους τους ερευνητές που δραστηριοποιούνται στο πεδίο έρευνας της δράσης τόσο του TiO_2 , ως αντικαρκινικό παράγοντα, όσο και πολλών άλλων νανοϋλικών.

Αν και το πεδίο της νανοτεχνολογίας πρόσφατα άρχισε να αναπτύσσεται ουσιαστικά, οι δυνατότητες της είχαν αρχίσει να γίνονται εμφανείς ήδη από την εποχή που ο φυσικός Richard Feynman έδωσε μία διάλεξη με τίτλο «There's Plenty of Room at the Bottom», μιλώντας για τα μεγάλα περιθώρια που αφήνουν οι νόμοι της φύσης για τον έλεγχο της ύλης σε ατομικό επίπεδο και τις αναρίθμητες εφαρμογές που θα μπορούσε να προσφέρει.

Ουσιαστικά δεν πρόκειται για επιστημονική επανάσταση, αν και έτσι μοιάζει, αλλά για φυσική εξέλιξη, αφού τα περισσότερα θέματα που η νανοτεχνολογία περικλείει, προκύπτουν σα λογική συνέπεια της εξέλιξης της επιστήμης και της τεχνολογίας, που επιτρέπει πια, την έρευνα σε όλο και μικρότερη κλίμακα.

Παρ' όλα αυτά, η νανοτεχνολογία, αποτελεί το μέλλον της φυσικοχημείας, της βιολογίας, της φαρμακευτικής, της ιατρικής αλλά και κάθε επιστήμης...και αυτό το μέλλον σύντομα θα πρέπει να γίνει...παρόν!

Βιβλιογραφία

ύλαιο

6

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Γ. Πνευματικάκης, Χ. Μητσοπούλου, Κ. Μεθενίτης, Βασικές αρχές ανόργανης χημείας, Εκδόσεις Σταμούλη, 2006
- [2] D. Ebbing, S. Gammon, Γενική Χημεία, Τραυλός, 2002
- [3] Ν. Κλούρας, Βασική Ανόργανη Χημεία, Τραυλός, 2002
- [4] Γ.Ε. Πετρούτσος, Κατάλυση με οξείδια μετάλλων, Δ' Έκδοση, ΕΜΠ, Αθήνα 1993
- [5] Π. Βαρώτσος, Κ. Αλεξόπουλος, Φυσική της Στερεάς Κατάστασης, Εκδόσεις Σαββάλα
- [6] C. Kittel Εισαγωγή στη φυσική της στερεάς κατάστασης, 5η έκδοση, Εκδόσεις Γ. Πνευματικού, Αθήνα
- [7] Ζ.Γ. Λοΐζος, Γενική Χημεία 1. Γενικό Μέρος, ΕΜΠ, Αθήνα 2002
- [8] Ε. Ν. Οικονόμου, Φυσική Στερεάς Κατάστασης, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, Τόμος Ι, (1997), Τόμος ΙΙ (2003).
- [9] Μ.Σ. Μπουρουσιάν, Χημεία Στερεάς Κατάστασης, ΕΜΠ, Αθήνα 2005
- [10] Γ.Μ. Τσαγκάρης, Δομή και Ιδιότητες της Στερεάς Κατάστασης, ΕΜΠ, Αθήνα, 2001
- [11] I.L. Raff, Principles of Physical Chemistry, Prentice Hall, 2001
- [12] B. O'Regan, M. Grätzel, D. Fitzmaurice, Chem. Phys. Letters, 183 (1991) 89
- [13] Δ. Κατάκης, «Πανεπιστημιακή Ανόργανη Χημεία», Αθήνα 1990
- [14] W. D. Callister "Επιστήμη και Τεχνολογία των Υλικών» Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη, 2004. Κεφάλαιο 19.
- [15] A.Fujishima, T.N.Rao, D.A.Tryk, J.Photochem.Photobiol.C: Photochem.Rev., 1 (2000) 1
- [16] Z. B. Zhang, C. C. Wang, R. Zakaria, J. Y. Ying, J. Phys. Chem. B. 1998, 102, 10871
- [17] H. Weller, Adv. Mater., 5 (1993) 88
- [18] S. Nakabayashi, A. Kira, J. Phys. Chem. 94 (1990) 7571
- [19] A. Mills and S. Le Hunte, An overview of semiconductor photocatalysis. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 108 (1997) 1-35
- [20] N. Seprone and A.V. Emeline, Suggested terms and definitions in photocatalysis and radiocatalysis. International Journal of Photoenergy, 4 (2002) 91-131
- [21] R.J. Bull, C.P. Gebra and R.R Trussell, Evaluation of the health risks associated with disinfection. Critical Reviews in Environmental Control, 20 (1990) 77-114
- [22] K.T. Pickering L.A. Owen, An introduction to global environmental issues, Published by Routledge, London, UK, (1997)
- [23] A. Mills, R.H Davies and D. Worsley, Water purification by semiconductor photocatalysis, Chemical Society Reviews, 22 (1997) 417-425
- [24] D.S. Bharkhande, V.G. Pangarkar and A.A.C.M. Beenackers, Photocatalytic degradation for environmental applications – a review. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 77 (2001) 102-116.
- [25] Warwick, Department of Chemistry, <http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/chemistry>, (ημερομηνία προσπέλασης: 25/11/2012)
- [26] M. Abdullah, K.C.L. Gary and R.W. Matthews, Effect of common inorganic anions on rates of photocatalytic oxidation of hydrocarbons over illuminated TiO₂. Journal of Physical Chemistry, 94, (1990), 6620 – 6825
- [27] B. Ohatani, Y. Okugawa, S. Nishimoto and T. Kagiya, Photocatalytic activity of TiO₂ powders suspended in aqueous silver nitrate solution: correlation with pH-dependent surface structures. Journal of Physical Chemistry, 91 (1987) 3550 – 3555
- [28] H. Weller, Quantized Semiconductor Particles: A novel state of matter for materials science, Adv. Mater., 5 (1993) 88
- [29] A.G. Rincon and C. Pulgarin, Photocatalytic inactivation of E. coli: effect of (continuous-intermittent) light density and of (suspended-fixed) TiO₂ concentration. Applied Catalysis B-Environmental, 44 (2003) 263-284
- [30] U.S. Department of Transportation Federal Aviation Administration, Manufacturing Technology for Aerospace Structural Materials, January 2003

- [31] GensonScience, gensonscience.wikispaces.com, (ημερομηνία προσπέλασης: 15/12/2012)
- [32] C. Leyens and M. Peters, Titanium and Titanium Alloys, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003
- [33] Gerd Lutjering James C. Williams, Titanium, Springer 2nd edition, 2002
- [34] ASTM E120 - 00 Standard Test Methods for Chemical Analysis of Titanium and Titanium Alloys (Withdrawn 2003), Scope, <http://www.astm.org>, ASTM International (ημερομηνία προσπέλασης: 15/09/2012)
- [35] M. Abbasnejad, E. Shojaee, M. R. Mohammadzadeh, M. Alaei, Ryo Maezono, Quantum Monte Carlo study of high-pressure cubic TiO₂, Appl. Phys. Lett. 100 (2012) 261902-1–261902-4
- [36] K. Mizushima, M. Tanaka, A. Asai, S. Iida, J.B. Goodenough, Impurity levels of iron-group ions in TiO₂ (II), Journal of Physics and Chemistry of Solids 40 (1979) 1129-1140
- [37] Α. Δρόσου, Κινητική μελέτη της φωτοκαταλυτικής διάσπασης της φαρμακευτικής ουσίας σουλφαμεθοξαζόλιο σε υδατικές μήτρες, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά 2009
- [38] A. Bally, PhD Thesis, Electronic properties of nanocrystalline titanium dioxide thin films, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, 1999
- [39] J. Zhao and X. Yang, Photocatalytic oxidation for indoor air purification: a literature review, Building and Environment 38 (2003) 645-654
- [40] J. Jiang, G. Oberdörster, A. Elder, R. Gelein, P. Mercer and P. Biswas, Does Nanoparticle Activity Depend upon Size and Crystal Phase?, Nanotoxicology. 2008 2(1): 33–42.
- [41] I.M. Arabatzis, T. Stergiopoulos, M.C. Bernard, D. Labou, S.G. Neophytides and P. Falaras. Appl. Catal. B 42 (2003) 187, [2] R. Asahi, T. Morikawa, T. Ohwaki, K. Aoki, and Y. Taga: Science 293 (2001) 269
- [42] M.R.V. Sahyun, N. Serpone, Laser direct write of silver nanoparticles from solution onto glass substrates for surface-enhanced Raman spectroscopy, Langmuir, 13 (1997) 5082-5084
- [43] Y. Zhou, C.Y. Wang, H.J. Liu, Y.R. Zhu, Z.Y. Chen, Sol–Gel Synthesis and Magnetic Studies of Titanium Dioxide Doped with 10% M (M=Fe, Mn and Ni), Mater. Sci. Eng. B. , 67 (1999) 501-513
- [44] I. Ilisz, A. Dombi, Investigation of the photodecomposition of phenol in near-UV-irradiated aqueous TiO₂ suspensions. I: Effect of charge-trapping species on the degradation kinetics, Appl. Catal. A: General, 180 (1999) 25-33
- [45] Interaction between Ti-gel and silver, copper, as well as nickel compounds under ultrasound irradiation, Research on Chemical Intermediates 20040901, Volume 30, Issue 7-8, pp 793-805
- [46] E. Stathatos, T. Petrova, P. Lianos, Highly efficient nanocrystalline titania films made from organic/inorganic nanocomposite gels, Microporous and Mesoporous Materials 75 (2004) 255–260
- [47] D. Gong, W. C. J. Hoa, Y. Tanga, Q. Taya, Y. Lai, J. G. Highfield, Z. Chena, Silver decorated titanate/titania nanostructures for efficient solar driven photocatalysis, Journal of Solid State Chemistry 189 (2012) 117–122
- [48] Z. Li, L. Mi, P-N Wang and J-Y Chen, Study on the visible-light-induced Photokilling effect of nitrogen-doped TiO₂ nanoparticles on cancer cells, Nanoscale Research Letters 2011, 6:356
- [49] I.M. Arabatzis, T. Stergiopoulos, M.C. Bernard, D. Labou, S.G. Neophytides, P. Falaras, Silver-modified titanium dioxide thin films for efficient photodegradation of methyl orange, Applied Catalysis B: Environmental 42 (2003) 187-201
- [50] O.K. Varghese, D. Gong, M. Paulose, K.G. Ong, E.C. Dickey, G.A. Grimes, Extreme changes in the electrical resistance of titania nanotubes with hydrogen exposure Advanced Materials 15 (2003) 624-627
- [51] D.F. Ollis, H. Al – Ekabi, (Eds.): Photocatalytic Purification and Treatment of Water and Air, Elsevier, Amsterdam, 1993
- [52] A. Fujishima, K. Hashimoto, T. Watanabe: TiO₂ Photocatalysis, Fundamentals and Applications, BKC, Inc., Tokyo, 1999

- [53] Oberdorster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology* 2005a; 2:8
- [54] Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Persp* 2005b; 113:823–839
- [55] Oberdorster G, Stone V, Donaldson K. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology* 2007; 1:2–25
- [56] τιτάνιο, gensonscience.wikispaces.com (ημερομηνία προσπέλασης: 20/12/2012)
- [57] C.M. Sayes, R. Wahi, P.A. Kurian, Y. Liu, J.L. West, K.D. Ausman, D.B. Warheit, V.L. Colvin, Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells, *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 92 (2006) 174–185.
- [58] M.L. Wang, R. Tuli, P.A. Manner, P.F. Sharkey, D.J. Hall, R.S. Tuan, Direct and indirect induction of apoptosis in human mesenchymal stem cells in response to titanium particles, *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society* 21 (2003) 697–707.
- [59] H. Choi, E. Stathatos, D.D. Dionysiou, Sol–gel preparation of mesoporous photocatalytic TiO₂ films and TiO₂/Al₂O₃ composite membranes for environmental applications, *Applied Catalysis B: Environmental* 63 (2006) 60–67.
- [60] A.I. Kontos, A.G. Kontos, D.S. Tsoukleris, G.D. Vlachos, P. Falaras, Superhydrophilicity and photocatalytic property of nanocrystalline titania sol–gel films, *Thin Solid Films* 515 (2007) 7370–7375.
- [61] J.A. Plumb, Cell sensitivity assays: the MTT assay, *Methods in Molecular Medicine* 88 (2004) 165–169.
- [62] [J.Jiang, G. Oberdörster, A. Elder, R. Gelein, P. Mercer, P. Biswas, Does Nanoparticle Activity Depend upon Size and Crystal Phase? *Nanotoxicology*. 2008 2\(1\): 33–42](#)
- [63] K. Donaldson, R. Aitken, L. Tran, V. Stone, R. Duffin, G. Forrest, et al. Carbon nanotubes: A review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol Sci* 2006; 92:5–22.
- [64] A. Nel, T. Xia, L. Madler, N. Li, Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006; 311:622–627. [PubMed: 16456071]
- [65] P. Nurse, A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100:71-18, 2000 [b]
- [66] P. Nurse, The incredible life and times of biological cells. *Science* 289: 1711-1716, 2000 [a].
- [67] O.T. Avery, C.M. Macleod, M. McCarty, Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exper. Med.* 79:137-158, 1944
- [68] H. Swift, The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 36:643-654, 1950
- [69] A. Howard, S. Pelc, Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* 6:261-273, 1953
- [70] P.M.B. Walker, H.B. Yates, Nuclear components of dividing cells. *Proc. R. Soc. B.* 140:274-299, 1952
- [71] K. Nasmyth, A prize for proliferation. *Cell* 107:689-701, 2001
- [72] J. Darnell, H. Lodish, D. Baltimore, *Molecular Cell Biology*, Scientific American, Books, 1986.
- [73] R. L. Furler, «Why Is Glucose Metabolized Differently Throughout The Cell Cycle?», *Microbiology, Immunology & Molecular Genetics*, <http://www.robertlfurler.com>, 2012
- [74] A.B. Pardee, A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:1286-1290, 1974
- [75] G.I. Terzoudi, K.N. Manola, G.E. Pantelias, G. Iliakis (2005). Checkpoint abrogation as a cause of the enhanced G2-chromosomal radiosensitivity of AT cells. *Cancer Research* 2005, 65: (24) 2005.

- [76] T. Wu, J. Malinverni, N. Ruiz, S. Kim, T.J. Silhavy, D. Kahne, Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*, *Cell*. 2005 121(2): 235-45.
- [77] Z. Shao, S. Graf, O.Y. Chaga, D. V. Lavrov, Mitochondrial genome of the moon jelly *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa): A linear DNA molecule encoding a putative DNA-dependent DNA polymerase
- [78] M. Löbrich, PA Jeggo, The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction, *Nat Rev Cancer*. 2007 Nov;7(11):861-9.
- [79] Alberts, *Molecular Biology of the Cell*, Bray, Lewis, Raff, Roberts, Watson
- [80] C.O. Bellamy, R.D. Malcomson, D.J. Harrison, A.H. Wyllie, Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1995;6 (1):3-16.
- [81] Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *Oncologist* 1999;4 (4):332-9.
- [82] J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-257
- [83] *Protocols & Applications Guide*, www.promega.com, rev. 3/07
- [84] R. Lockshin, A. Alles, N. Kodaman, Z.F. Zakeri, Programmed cell death and apoptosis: early DNA degradation does not appear to be prominent in either embryonic cell death or metamorphosis of insects. *FASEB J* 5 pp. A518–A525, 1991
- [85] R.A. Lockshin, Z.F. Zakeri, Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 545-550, 2001
- [86] J.F.R Kerr, B. Harmon, J. Searle, An electron microscope study of cell deletion in the anuran tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis in striated muscle fibers. *J Cell Sci* 14 pp. 571–585, 1974
- [87] S.L. Newman, J.E. Henson, P.M. Henson, Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J Exp Med* 156 pp. 430–442, 1982
- [88] MD. Jacobson, M. Weil, M.C. Raff., Programmed cell death in animal development. *Cell* (1997), 88: 347-354.
- [89] C.B. Thompson, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462, 1995
- [90] W.G. Tatton, R. Chalmers-Redman, D. Brown, N. Tatton, *Ann. Neurol.* (2003), 53: S61-S72. Review
- [91] D.W. Nicholson, ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. *Nature Biotechnol.* 14, 297-301, 1996
- [92] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation *Cell* (2000), 100: 57-70. Review
- [93] G.M. Cohen, X.M. Sun, H. Fearnhead, M. Macfarlane, D.G. Brown, R.T. Snowden, D. Dinsdale, Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J Immunology* 153, 507-516, 1994
- [94] S.J. Martin, C.P. Reutelingsperger, A.J. McGahon, J.A. Rader, R.C. van Schie, D.M. LaFace, D.R. Green, Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182, 1545-1556, 1995
- [95] S.J. Martin, D.R. Green, Protease activation during apoptosis: death by a thousand of cuts? *Cell* 89,175-184, 1995a
- [96] M.G. Grutter, Caspases: key players in programmed cell death. *Current Opinion in Structural Biology* (2000), 10: 649-655.
- [97] K.C. Zimmermann, C. Bonzon, D.R. Green, The machinery of programmed cell death *Pharmacology and Therapeutics* (2001), 92: 57-70.
- [98] J.B. Denault, G.S. Salvesen, Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem. Rev.* (2002), 102: 4489-4499. Review

- [99] N.N Danial, BCL-2 Family Proteins: Critical Checkpoints of Apoptotic Cell Death, *Clin Cancer Res* 2007; 13 (24) 2007, 7254-7263.
- [100] Hengartner M.O., The biochemistry of apoptosis. *Nature* (2000), 407: 770-776. Review
- [101] S.S Martin, K. Vuori, Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis. *Biochim Biophys Acta.* (2004), 5: 145. Review
- [102] H. Hui, F. Dotta, U. Di Mario, R. Perfetti, Role of caspases in the regulation of apoptotic pancreatic islet beta-cells death, *Journal of Cellular Physiology* 200 (2004) 177–200.
- [103] M. Tewari, L.T. Quan, L.T. O'Rourke, S. Desnoyers, Z. Zeng, D.R. Beidler, G.G. Poirier, G.S. Salvesen, V.M. Dixit, Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly (ADP-ribose) polymerase, *Cell* 81 (1995) 801–809.
- [104] M.S. Satoh, T. Lindahl, Role of poly (ADP-ribose) formation in DNA repair, *Nature* 356 (1992) 356–358.
- [105] F.J. Oliver, G. de la Rubia, V. Rolli, M.C. Ruiz-Ruiz, G. de Murcia, J.M. Murcia, Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis, Lesson from an uncleavable mutant, *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1998) 33533–33539.
- [106] B. Halliwell and C.M.J. Gutteridge, *Free Radicals In Biology and Medicine*, New York, Oxford University Press, (1999)
- [107] I. Gerogianni, K.I. Gourgoulianis, Oxidative stress and lung diseases, *Archives of Hellenic Medicine* 2006, 23(5):444–454
- [108] L. Wlodek, Beneficial and harmful effects of thiols. *Pol. J. Pharmacol.* 54: (2002) 215-223
- [109] N. Patsoukis, D.C. Georgiou, Determination of the thiol redox state of organisms: new oxidative stress indicators. *Anal. Bioanal. Chem.* 378: (2004) 1783-1792
- [110] N. Patsoukis, G. Zervoudakis, T.N. Panagopoulos, D.C. Georgiou, F. Angelatou, A.N. Matsokis, Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience Lett.* 357: (2004). 83-86
- [111] N. Patsoukis, D.C. Georgiou, Fluorometric determination of thiol redox state. *Anal. Bioanal. Chem.* 383: (2005) 923-929
- [112] N.Patsoukis, I.Papapostolou, C.Georgiou, Interference of non-specific peroxidases in the fluorescence detection of superoxide radical by hydroethidine oxidation: a new assay for H₂O₂. *Anal. Bioanal. Chem.* 381: (2005). 1065-1072.
- [113] G. Da Vela, M.C. Casini, R. Della Lena, F. Gozzi, From the theoretical research to clinical practice: Free radicals in some pathological situations, usefulness, limits and perspectives, *Etruria Medica* 1995, 2:29–34
- [114] C. Georgiou, N. Patsoukis, I. Papapostolou, Assay for the quantification of small-sized fragmented genomic DNA. *Anal. Biochem.* 339: (2005). 223-230
- [115] U. Cornelli, M. Cornelli, R. Terranova, S. Luca, G. Belcaron, Ageing and free radicals. *Nutrition* 2000, 3:37–50
- [116] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, Oxford Clarendon Press, 1996
- [117] J.D Crapo, D.F. Tierney, Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity. *Am J Physiol* 1974, 226:1401–1407
- [118] E. Le Bourg, «Hormesis, aging and longevity», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790 (10): 1030-1039.
- [119] K. Shen, Y. Lu, X. Tang, C. Zhang, X. Chen, J. Shi, Q. Lin, Y. Chen, «Hormesis response of marine and freshwater luminescent bacteria to metal exposure», *Biological Research*, 2009, 42: 183-187.
- [120] R.A. Willis, *The spread of tumors in the human body*, London, 1952, Butterworth
- [121] S. Soignet, A. Fleischauer, T. Polyak et al. All-trans retinoic acid significantly increases 5-year survival in patients with acute promyelocytic leukemia: long-term follow-up of the New York study. *Cancer, Chemother. Pharmacology*, 40 (suppl): S25-S29 (1997)

- [122] WHO, Feb 2006, Cancer, World Health Organization. Retrieved on 25/06/2007
- [123] American Cancer Society, December 2007. Reuters. Retrieved on 17/12/2011
- [124] H.B. Shao, Z.S. Liang, M.A. Shao, Osmotic regulation of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at soil water deficits. *Biointer.* 47: (2006). 132-139.
- [125] A. Jemal A, T. Murray, E. Ward, A. Samuels, R.C. Tiwary, A. Ghafoor, E.J. Feuer, Thun MJ (2005). Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 55 (1): 10–30. PMID 15661684
- [126] Α. Ζυγογιάννη, Ακτινοθεραπεία στον καρκίνο μαστού σταδίου T1-2NO-1MO με επιταχυνόμενο σχήμα υποκερματισμού δόσης: έλεγχος ανταπόκρισης και εκτίμηση άμεσης και όψιμης τοξικότητας, Αθήνα 2009
- [127] C.A. Perez, M.E. Taylor ME. Breast: Stage Tis, T1 and T2 Tumors. In: C.A. Perez, L.W. Brady, editors. *Principles and practice of Radiation Oncology*. Philadelphia: Lipincott-Raven 1998:1390-2
- [128] G. Bonadonna, U. Veronesi, C. Brambilla, L. Ferrari, A. Luini, M. Greco, C. Bartoli, G. Coopmans de Yoldi, R. Zucali, F. Rilke, S. Andreola, R. Silvestrini, G. Di Fronzo, P. Valagussa, Primary Chemotherapy To Avoid Mastectomy in Tumors With Diameters of Three Centimeters or More, *Oxford JournalsMedicine JNCI J Natl Cancer Inst Volume 82, Issue 19*Pp. 1539-1545
- [129] U. Veronesi, G. Bonadonna, S. Zurrada, V. Galimberti, M. Greco, C. Brambilla, A. Luini, S. Andreola, F. Rilke, R. Raselli, M. Merson, V. Sacchini, R. Agresti, Conservation Surgery After Primary Chemotherapy in Large Carcinomas of the Breast, *Annals of Surgery*, 222: 5 (2205) 612-618
- [130] D.W. Kinne, D.B. Kopans: Physical examination and mammography in the diagnosis of breast diseases, chap 3, In Harris JR, Hellman S, Henderson IC, Kinne DW (Eds): *Breast Disease*. Philadelphia, Pa, JB Lippincott, 1987, pp 54-86
- [131] J.N. Wolfe, Breast patterns as an index of risk for developing breast cancer, *AJR Am J Roentgenol*, 126:6 (1976) 1130-1137
- [132] E.A. Sickles, Nonpalpable, circumscribed, noncalcified solid breast masses: likelihood of malignancy based on lesion size and age of patient, *Radiology*, 192(2): (1994)439-42
- [133] E.A. Sickles, Periodic mammographic follow-up of probably benign lesions: results in 3,184 consecutive cases, *Radiology*, 179(2): (1991)463-8
- [134] B. Fisher, S. Andeson, C. K. Redmond, N. Wolmark, D. Lawrence Wickerham, W.M. Cronin, Reanalysis and Results after 12 Years of Follow-up in a Randomized Clinical Trial Comparing Total Mastectomy with Lumpectomy with or without Irradiation in the Treatment of Breast Cancer, *N Engl J Med* 333: (1995) 1456-1461
- [135] D. C. Sullivan, Needle core biopsy of mammographic lesions, *AJR Am J Roentgenol*. Mar;162(3): (1994)601-8.
- [136] A.I. Vogel, B.S. Furniss, A.J. Hannaford, P.W.G. Smith, *Textbook of Practical Organic Chemistry*, Prentice Hall, 1989
- [137] Μ. Δεμέστιχα, Μέτρηση Μεγέθους Νανοσωματιδίων με διαφορεικό αναλυτή ηλεκτρικής κινητικότητας (differential mobility analyzer), *Θεσσαλονίκη* 2008
- [138] M. Klare, J. Scheen, K. Vogelsang, H. Jacobs, J.A.C. Broekaert, Degradation of short-chain alkyl- and alkanolamines by TiO₂- and Pt/TiO₂-assisted photocatalysis, *Chemosphere* 41:3 (2000), 353–362.
- [139] Z. Li, L. Mi, P-N Wang and J-Y Chen, Study on the visible-light-induced Photokilling effect of nitrogen-doped TiO₂ nanoparticles on cancer cells, *Nanoscale Research Letters* 6 (2011) 356
- [140] C. Sahoo, A.K. Gupta, Anjali Pal, Photocatalytic degradation of Methyl Red dye in aqueous solutions under UV irradiation using Ag⁺ doped TiO₂, *Desalination* 181 (2005) 91-100.
- [141] K.V. Subba Rao, B. Lavedrine and P. Boule, J. Photochemistry Photobiology A: Chemistry, 154 (2003) 189-193.
- [142] N. Lagopati, P.V. Kitsiou, A.I. Kontos, P. Venieratos, E. Kotsopoulou, A.G. Kontos, D.D. Dionysiou, S. Pispas, E.C. Tsilibary, P. Falaras, Photo-induced treatment of breast epithelial

- cancer cells using nanostructured titanium dioxide solution, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 214 (2010) 215–223.
- [143] Renishaw: enhancing efficiency in manufacturing and healthcare, <http://www.renishaw.com> [ημερομηνία προσπέλασης: 24/09/2012]
- [144] Θ. Στεργιόπουλος, Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός Φωτοηλεκτροχημικών Ηλιακών Κυψελίδων, Διδακτορική Διατριβή, 2006, Πάτρα
- [145] A. Meristoudi, S. Pispas, N. Vainos, Self-assembly in solutions of block and random copolymers during metal nanoparticle formation, *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics* 46 (2008) 1515–1524.
- [146] Α. Μανίκας, Ανάπτυξη νέας τεχνικής επιφανειακής ενίσχυσης της σκέδασης Raman (SERS) για ποσοτικές μετρήσεις ενεργών ουσιών σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, Διδακτορική Διατριβή, 2011, Πάτρα
- [147] Ν. Δαπόντες (1989): Η διδασκαλία της Logo στη Δευτεροβάθμια Εκπαίδευση, εκδόσεις Gutenberg, Αθήνα. www.darontes.gr, [ημερομηνία προσπέλασης 28/09/2012]
- [148] T. Georgalis, A. Michtopoulos, “AXIOS-150/EX (Version 1.0) Users Manual”
- [149] Ι. Τσόγκας, Υπερμοριακά συστήματα σχηματιζόμενα από την αλληλεπίδραση λιποσωμάτων με δένδριτικά πολυμερή, Διδακτορική Διατριβή, 2007, Αθήνα
- [150] S. Pispas, Self-assembled nanostructures in mixed anionic-neutral double hydrophilic block copolymer/cationic vesicle-forming surfactant solutions, *Soft Matter* 2011, 7, 474.
- [151] Η. D. Young, Πανεπιστημιακή Φυσική, Μηχανική – Θερμοδυναμική, Τόμος Α', Εκδόσεις Παπαζήση
- [152] Κ. Ν. Δεμέτζος, Σταθερότητα φαρμακοτεχνικών μορφών λυοφιλοποίηση φαρμακευτικών προϊόντων, (2011), Αθήνα
- [153] W.C. Hinds, *Aerosol Technology, Properties, Behavior and Measurement of Airborne Particles* Second edition, John Wiley & Sons Inc, 1999
- [154] S.K. Friedlander, 2000, *Smoke, Dust and Haze, Fundamentals of Aerosol Dynamics* Second Edition, New York, Oxford, Athens: Oxford University Press.
- [155] CELL SIGNALING TECHNOLOGY, <http://www.cellsignal.com>, ημερομηνία προσπέλασης 2/10/2012
- [156] SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, <http://www.scbt.com>, ημερομηνία προσπέλασης 2/10/2012
- [157] AMERSHAM BIOSCIENCES, <http://www.selectscience.net>, ημερομηνία προσπέλασης 2/10/2012
- [158] MERCK & Co., <http://www.merck.com>, ημερομηνία προσπέλασης 2/10/2012
- [159] SIGMA - ALDRICH, <http://www.sigmaaldrich.com>, ημερομηνία προσπέλασης 2/10/2012
- [160] THERMO FISHER SCIENTIFIC, <http://www.thermofisher.com>, ημερομηνία προσπέλασης 2/10/2012
- [161] FERMENTAS INTERNATIONAL, <http://www.thermoscientificbio.com/fermentas>, ημερομηνία προσπέλασης 2/10/2012
- [162] AGFA, <http://www.agfaphoto.com>, ημερομηνία προσπέλασης 2/10/2012
- [163] GREINER BIO-ONE, <http://www.greinerbioone.com>, ημερομηνία προσπέλασης 2/10/2012
- [164] TERUMO MEDICAL CORPORATION, <http://www.terumomedical.com>, ημερομηνία προσπέλασης 2/10/2012
- [165] PENTAFERTE ITALY, <http://www.pentaferte.com>, ημερομηνία προσπέλασης 2/10/2012
- [166] BIOCHROM AG, <http://www.biochrom.de/en>, ημερομηνία προσπέλασης 2/10/2012
- [167] Cailleau, R., et al. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* 14: 911-915, 1978
- [168] ATCC - <http://www.atcc.org>, (ημερομηνία προσπέλασης: 03/10/2012)
- [169] B.R. Brinkley, et al. Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro, *Cancer Res.* 40: (1980) 3118-3129

- [170] M.J. Siciliano, et al. Mutually exclusive genetic signatures of human breast tumor cell lines with a common chromosomal marker. *Cancer Res.* 39: (1979) 919-922
- [171] A. Croker, D. Goodale, J. Chu, C. Postenka, B. Hedley, D. Hess, A. Allan, High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability, *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13 (2009) 2236–2252
- [172] Φ. Τζωρτζάτου-Σταθοπούλου, Το καρκινικό αρχέγονο κύτταρο, ανασκόπηση, Δελτ Α' Παιδιατρ Κλιν Πανεπ Αθηνών 57, 2010
- [173] R. Lindahl, Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27 (1992) 283-335
- [174] Product Information Sheet for ATCC HTB-22™, Cell Line Designation: MCF-7
- [175] M. Song, R. Zhanga, Y. Dai, F. Gao, H. Chi, G. Lv, B. Chen, X. Wang, The in vitro inhibition of multidrug resistance by combined nanoparticulate titanium dioxide and UV irradiation, *Biomaterials* 27 (2006) 4230–4238
- [176] G. Chen, D.V. Goeddel, TNF-R1 signaling: a beautiful pathway, *Science* 296: (2002) 1634-1635. Review
- [177] A. Aszalos, P-glycoprotein-based drug-drug interactions: preclinical methods and relevance to clinical observations. *Archives of Pharmacal Research* 27(2) (2004) 127-35
- [178] Π. Ζαγανά, Λιποσώματα που ενσωματώνουν αρσονολιπίδια. Επίδραση της λιπιδικής σύστασης ή / και επικάλυψης της λιποσωμικής μεμβράνης με πολυαιθυλενογλυκόλη στη σταθερότητά τους, στην αλληλεπίδρασή τους με κύτταρα (in vitro) και στη βιοκατανομή τους
- [179] F.M. Ausubel, *Current protocols in molecular biology*. Published by Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience: J. Wiley, New York, 1989, pp. 2 v. (loose leaf)
- [180] R.I. Freshney, *Culture of animal cells: a manual of basic technique*, 3rd ed. Wiley-Liss, New York, 1994
- [181] M. Cornelis, C.H. Dupont, J. Wepierre, Prediction of eye irritancy potential of surfactants by cytotoxicity tests in vitro in cultures of human skin fibroblasts and keratinocytes. *Toxicol In Vitro* 1992, 6: 119-128
- [182] L.M. Green, J.L. Reade, C.F. Ware, Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines, *J Immunol Methods*. 1984 May 25;70(2):257-68
- [183] F. Denizot, R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J Immunol Methods*. 1986 May 22;89(2):271-7
- [184] J.A. Plumb, Cell sensitivity assays: the MTT assay, *Methods in Molecular Medicine* 88 (2004) 165–169
- [185] T. Fabre, M. Schappacher, R. Bareille, B. Dupuy, A. Soum, J. Bertrand-Barat, C. Baquey, Study of a (trimethylenecarbonate-co-ε-caprolactone) polymer - Part 2: in vitro cytocompatibility analysis and in vivo ED1 cell response of a new nerve guide, *Biomaterials* 22 (2001) 2951-2958
- [186] Ελληνική Εταιρεία Κυτταρομετρίας, <http://www.kyttarometria.gr/index.html>, (ημερομηνία προσπέλασης: 07/10/2012)
- [187] A. Longobardi Givan, *Flow Cytometry: First Principles*, Second edition, Wiley-Liss, 2001, Canada
- [188] L. A. Sklar, *Flow Cytometry in Biotechnology*, Oxford University Press, 2005, New York
- [189] Fluorescence Tutorials/Life Technologies <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html>, (ημερομηνία προσπέλασης: 05/10/2012)
- [190] M.J. Jaroszeski, Radcliff G., *Fundamentals of flow cytometry*, *Mol Biotechnol*, 11(1): (1999) 37-53

- [191] Z. Darzynkiewicz, S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M.A. Hotz, P. Lassota, F. Traganos, Features of apoptotic cells measured by flow cytometry, *Cytometry* 13 (1992) 795–808
- [192] Beckton-Dickinson, BD Biosciences <http://www.bdbiosciences.com/home.jsp>, (ημερομηνία προσπέλασης: 05/10/2012)
- [193] J. C. Riemersma, The effect of pH and temperature on the lysis of yeast cells by cationic dyes and surfactants, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 18: 9 (1966) 602–610
- [194] A.K. Tzinia, P.V. Kitsiou, A.A. Talamagas, A. Georgopoulos, E.C. Tsilibary, Effects of collagen IV on neuroblastoma cell matrix-related functions. *Exp Cell Res* 274 (2002) 169-77
- [195] P. Venieratos, The effect of high glucose concentrations in pancreatic b-cell signalling and physiology, PhD Thesis, Athens, 2009
- [196] T.J. Gordon, Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers, *Analytical Biochemistry*, Volume 86, Issue 2, 1 June 1978, Pages 574–579
- [197] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 (1976) 248-54
- [198] Experimental Biosciences, Resources for introductory & intermediate level laboratory courses, <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bradford.html>
- [199] Τεχνικές μοριακής βιολογίας, [http://www.news-medical.net/health/Molecular-Biology-Techniques-\(Greek\).aspx](http://www.news-medical.net/health/Molecular-Biology-Techniques-(Greek).aspx)
- [200] R.J. Simpson, *Proteins and Proteomics: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. (2003)
- [201] R. Westermeier, *Electrophoresis in practice*. 2nd edition, Weinheim, Germany(1997)
- [202] A. Talamagas, Integrin-mediated regulation of collagenases (MMPs) by β amyloid protein. A putative function of collagenase B (MMP-9) in amyloid precursor protein (APP) metabolism, PhD Thesis, Athens, 2008
- [203] Ηλεκτροφόρηση Πρωτεϊνών, “SDS PAGE” και “2D Ηλεκτροφόρηση”, *BioMed LabS Mag Community* June 5, 2009
- [204] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989
- [205] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-5
- [206] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979) 4350-4
- [207] Abcam, <http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/WB-beginner.pdf>, (ημερομηνία προσπέλασης: 05/10/2012)
- [208] Millipore - Biomanufacturing and Life Science Research, <http://www.millipore.com>, (ημερομηνία προσπέλασης: 07/10/2012)
- [209] A.H. Wyllie, Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 10;284(5756): (1980) 555–556
- [210] Y. Gavrieli, Y. Sherman, S.A. Ben-Sasson, Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: (1992) 493-501
- [211] Fujifilm, Life science, Luminescent Image Analyser LAS-4000, manual, <http://abstracts.aapspharmaceutica.com>
- [212] M.P. Kanter, S.H. Schwartz, A fluorescence enhancement assay for cellular DNA damage, *Mol. Pharmacol.* 22: (1982) 145-151
- [213] D.P. Jones, E. Maellaro, S. Jiang, A.F. G. Slater, S. Orrenius, Effects of N-acetyl-L-cysteine on T-cell apoptosis are not mediated by increased cellular glutathione. *Immunol. Lett.* 45: (1995) 205-209
- [214] R. C. Jonas, R.T. Ziegler, H.L. Gu, D.P. Jones, Extracellular thiol/disulfide redox state affects proliferation rate in a human colon carcinoma (Caco2) cell line. *Free Radic. Biol. Med.* 33: (2002)1499-1506

- [215] K. Arita, Y. Yamamoto, Y. Takehara, T. Utsumi, T. Kanno, C. Miyaguchi, J. Akiyama, T. Yoshioka, K. Utsumi, Mechanisms of enhanced apoptosis in HL-60 cells by UVirradiated n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Free Radic. Biol. Med.* 35: (2003) 189-199
- [216] M. Weller, K. Frei, P. Groscurth, H.P. Krammer, Y. Yonekawa, A. Fontana, AntiFas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of cultured human glioma cells. Induction and modulation of sensitivity by cytokines. *J. Clin. Invest.* 94: (1991) 954-964
- [217] D. Voytas, Agarose gel electrophoresis, *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2, Unit2, 5A, John Wiley & Sons Inc, USA (2003)
- [218] C.D. Viljoen, B.D. Wingfield, M.J. Windfield, Agar an alternative to agarose in analytical gel electrophoresis, *Biotechnology Techniques*, 7(10): (1993) 723-726
- [219] P. Upcroft, J.A. Upcroft, Comparison of properties of agarose for electrophoresis of DNA, *Journal of Chromatography*, 618(1-2): (1993) 79-93
- [220] G. Stift, M. Pachner, T. Lelley Comparison of RAPD Fragment Separation in Agarose and Polyacrylamide Gel by Studying Cucurbita Species, *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 26: (2003) 62-65
- [221] Molecular station, <http://www.molecularstation.com/agarose-gel-electrophoresis/>
- [222] A.I. Kontos, A.G. Kontos, Y.S. Raptis, P. Falaras, Nitrogen modified nanostructured titania: electronic, structural and visible-light photocatalytic properties, *Physica Status Solidi (RRL)* 2 (2008) 83–85
- [223] A. Welte, C. Waldauf, C. Brabec, P.J. Wellmann, Application of optical absorbance for the investigation of electronic and structural properties of sol-gel processed TiO₂ films, *Thin Solid Films* 516 (2008) 7256–7725
- [224] N. Serpone, D. Lawless, R. Khairutdinov, Size effects on the photophysical properties of colloidal anatase TiO₂ particles: size quantization versus direct transitions in this indirect semiconductor? *Journal of Physical Chemistry* 99 (1995) 16646–16654
- [225] K.R. Zhu, M.S. Zhang, Q. Chen, Z. Yin, Size and phonon-confinement effects on low-frequency Raman mode of anatase TiO₂ nanocrystal, *Physics Letters A* 340(2005) 220–227
- [226] S. Kelly, F. H. Pollak, M. Tomkiewicz, Raman Spectroscopy as a Morphological Probe for TiO₂ Aerogels, *J. Phys. Chem. B* 101 (1997) 2730
- [227] D. Bersani, P. P. Lottici, and Xing-Zhao Ding, Phonon confinement effects in the Raman scattering by TiO₂ nanocrystals, *Appl. Phys. Lett.* 72 (1998) 73
- [228] W. F. Zhang, Y. L. He, M. S. Zhang, Z. Yin, Q. Chen, Raman scattering study on anatase TiO₂ nanocrystals, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 33 (2000) 912
- [229] J. C. Parker, R. W. Siegel, Calibration of the Raman spectrum to the oxygen stoichiometry of nanophase TiO₂, *Appl. Phys. Lett.* 57 (1990) 943
- [230] V. Swamy, A. Kuznetsov, L.S. Dubrovinsky, R.A. Caruso, D.G. Shchukin, B.C. Muddle, Finite-size and pressure effects on the Raman spectrum of nanocrystalline anatase TiO₂, *Physical Review B* 71 (2005) 184302.
- [231] C.E. Lund Myhre, H. Grothe, A.A. Gola, C.J. Nielsen, Optical constants of HNO₃/H₂O and H₂SO₄/HNO₃/H₂O at low temperatures in the infrared region, *Journal of Physical Chemistry A* 109 (2005) 7166–7171
- [232] K. Arshak, D. Morris, A. Arshak, O. Korostynska, E. Jafer, Evaluating the suitability of thick-film TiO₂ capacitors for use in a wireless pressure measurement system, *Materials Science and Engineering* 26C (2006) 1077–1081
- [233] F. Agar, I. Justicia, R. Gerbasi, G. Battiston, N. McSparran, A. Figueras, RBS analysis of substoichiometric TiO₂-anatase thin films for visible light photocatalysis, *Nuclear Instruments and Methods in Physical Research* 249B (2006) 490–492
- [234] B. Kiss, T. Biro, G. Czifra, B. Toth, Z. Kertesz, Z. Szikszai, A. Kiss, I. Juhasz, C. Zouboulis, J. Hunyadi, Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells, *Experimental Dermatology* 17 (2008) 659–667

- [235] P. Thevenot, Jai Cho, D. Wavhal, R. Timmons, L. Tang, Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO₂ nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 4 (2008) 226–236
- [236] D. Warheit, T. Webb, K. Reed, S. Frerichs, C. Sayes, Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties, *Toxicology* 230 (2007) 90–104
- [237] E. Topoglidis, B. Discher, C. Moser, P. Dutton, J. Durrant, Functionalizing nanocrystalline metal oxide electrodes with robust synthetic redox proteins, *Chembiochem* 4 (2003) 1332–1339
- [238] Y. Lee, S. Yoon, H. Yoon, K. Lee, H. Yoon, J. Lee, C. Song, Inhibitor of differentiation 1 (Id1) expression attenuates the degree of TiO₂-induced cytotoxicity in H1299 non-small cell lung cancer cells, *Toxicology Letters* 189 (2009) 191–199
- [239] J. Seo, H. Chung, M. Kim, J. Lee, I. Choi, J. Cheon, Development of water-soluble single-crystalline TiO₂ nanoparticles for photocatalytic cancer-cell treatment, *Small* 3 (2007) 850–853
- [240] J. Xu, Y. Sun, J. Huang, C. Chen, G. Liu, Y. Jiang, Y. Zhao, Z. Jiang, Photokilling cancer cells using highly cell-specific antibody–TiO₂ bioconjugates and electroporation, *Bioelectrochemistry* 71 (2007) 217–222
- [241] V. Gogvadze, S. Orrenius, B. Zhivotovsky, Mitochondria as targets for chemotherapy, *Apoptosis* 14 (2009) 624–640
- [242] T.C. Long, J. Tajuba, P. Sama, N. Saleh, C. Swartz, J. Parker, S. Hester, G.V. Lowry, B. Veronesi, Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro, *Environmental Health Perspectives* 115 (2007) 1631–1637
- [243] T.C. Long, N. Saleh, R.D. Tilton, G.V. Lowry, B. Veronesi, Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 4346–4352
- [244] D.P. Pioletti, H. Takei, S.Y. Kwon, D. Wood, K.L. Sung, The cytotoxic effect of titanium particles phagocytosed by osteoblasts, *Journal of Biomedical Materials Research* 46 (1999) 399–407
- [245] Q. Rahman, M. Lohani, E. Dopp, H. Pemsel, L. Jonas, D.G. Weiss, D. Schiffmann, Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts, *Environmental Health Perspectives* 110 (2002) 797–800
- [246] L. Wang, J. Mao, G.H. Zhang, M.J. Tu, Nano-cerium-element doped titanium dioxide induces apoptosis of Bel 7402 human hepatoma cells in the presence of visible light, *World Journal of Gastroenterology* 13 (29) (2007) 4011–4014
- [247] C.I. Vamanu, M.R. Cimpan, P.J. Høi, S. Sornes, S.A. Lie, N.R. Gjerdet, Induction of cell death by TiO₂ nanoparticles: studies on a human monoblastoid cell line, *Toxicology In Vitro* 22 (2008) 1689–1696
- [248] J. Chandra, A. Samali, S. Orrenius, Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine* 29 (3/4) (2000) 323–333
- [249] Almquist CB, Biswas P. Role of synthesis method and particle size of nanostructured TiO₂ on its photoactivity. *J Catal* 2002; 212:145–156
- [250] Biswas P, Wu CY. Critical Review: Nanoparticles and the environment. *J Air Waste Manage* 2005; 55:708–746
- [251] G. Oberdorster, V. Stone, K. Donaldson, Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology* 1 (2007) 2–25
- [252] K. Donaldson, R. Aitken, L. Tran, V. Stone, R. Duffin, G. Forrest, et al. Carbon nanotubes: A review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol Sci* 92 (2006) 5–22
- [253] A. Nel, T. Xia, L. Madler, N. Li, Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311 (2006) 622–627

- [254] G. Oberdorster, A. Maynard, K. Donaldson, V. Castranova, J. Fitzpatrick, K. Ausman, et al, Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology* 2 (2005a) 8.
- [254] G. Oberdorster, E. Oberdorster, J. Oberdorster, Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Persp* 113 (2005b) 823–839
- [255] Jinshun Zhao, Linda Bowman, Xingdong Zhang, Val Vallyathan, Shih-Houng Young, Vincent Castranova and Min Ding, Titanium Dioxide (TiO₂) Nanoparticles Induce JB6 Cell Apoptosis Through Activation of the Caspase-8/Bid and Mitochondrial Pathways, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues, Volume 72, Issue 19, 2009, 1141-1149*
- [256] Z. Msiska, M. Pacurari, A. Mishra, S.S. Leonard, V. Castranova, V. Vallyathan, DNA Double-Strand Breaks by Asbestos, Silica, and Titanium Dioxide. Possible Biomarker of Carcinogenic Potential?, *American Journal of respiratory cell and molecular biology*, vol43, 2010, 210-219
- [257] Na Li, Yanmei Duan, Mengmeng Hong, Lei Zheng, Min Fei, Xiaoyang Zhao, Jue Wang, Yaling Cui, Huiting Liu, Jingwei Cai, Songjie Gong, Han Wang, Fashui Hong, Spleen injury and apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticules, *Toxicology Letters, Volume 195, Issues 2–3, 2010, 161–168*
- [258] Ritesh K. Shukla, Ashutosh Kumar, Deepak Gurbani, Alok Pandey, Shashi Singh and Alok Dhawan, TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells, *Nanotoxicology*, 2013, Vol. 7, No. 1, 48-60
- [259] Young Sook Lee, Seokjoo Yoon, Hea Jin Yoon, Kyuhong Lee, Hyoun Kyoung Yoon, Jeung-Hoon Lee, Chang Woo Song, Inhibitor of differentiation 1 (Id1) expression attenuates the degree of TiO₂-induced cytotoxicity in H1299 non-small cell lung cancer cells, *Toxicology Letters, Volume 189, Issue 3, 2009, 191–199*
- [260] R. Meena, M. Rani, R. Pal, P. Rajamani, Nano-TiO₂-induced apoptosis by oxidative stress-mediated DNA damage and activation of p53 in human embryonic kidney cells, *Appl Biochem Biotechnol*, 2012 167 (4), 791-808
- [261] D. Zhang, M. Hartsky, D. Warheit, Time course of quartz and TiO₂ particle –induced pulmonary inflammation and neutrophil apoptotic responses in rats, *Experimental Lung Research*, 2002 28: 641-670
- [262] M. Ghosh, M. Bandyopadhyay, A. Mukherjee, Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes, *Chemosphere* 81 (2010) 1253–1262

*Περίληψη διδακτορικής
διατριβής*

(στην ελληνική & την αγγλική γλώσσα)



ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΩΝ & ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

**«Φωτοκαταλυτική αντικαρκινική δράση διοξειδίου του τιτανίου (TiO_2):
Μηχανισμοί και εφαρμογές»**

Υποψήφια Διδάκτωρ:

Νεφέλη Π. Λαγοπάτη

Φυσικός, Ακτινοφυσικός Ιατρικής

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Παπαζαφείρη Παναγιώτα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

Γαϊτανάκη Αικατερίνη, Καθηγήτρια

Τσιλιμπάρη Έφη, Ερευνήτρια Α', Διευθύντρια Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών,
Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

ΑΘΗΝΑ 2013

Περίληψη Διδακτορικής διατριβής

Το διοξείδιο του Τιτανίου (TiO_2) είναι ένα υλικό με ευρύ φάσμα κοινών εφαρμογών, αλλά και εφαρμογών υψηλής τεχνολογίας. Κρυσταλλώνεται σε μορφή ρουτιλίου, ανατάση και μπρουκίτη, ενώ σε χαμηλές θερμοκρασίες υπάρχει σε άμορφη κατάσταση. Χαρακτηρίζεται ως ημιαγωγός η τύπου. Χρησιμοποιείται σε χρώματα, πλαστικά, τρόφιμα, καλλυντικά, φάρμακα, τεχνητά εμφυτεύματα οστών (λόγω της βιοσυμβατότητάς του), σε οπτικές επιστρώσεις σε διηλεκτρικούς καθρέπτες, στον καθαρισμό τοξικών αποβλήτων, στην καταπολέμηση ανάπτυξης μικροοργανισμών, σε αποστειρώσεις χώρων.

Τα τελευταία χρόνια, εργασίες που εστιάζουν στο πεδίο της έρευνας για τη θεραπεία του καρκίνου, υποστηρίζουν ότι οι μηχανισμοί ρύθμισης του κυτταρικού θανάτου και συγκριμένα η απόπτωση, παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση με τους μηχανισμούς ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Απόπτωση συναντάται στα περισσότερα κακοήγη νεοπλάσματα, ενώ εντονότερη αποπτωτική δραστηριότητα εμφανίζεται σε ταχέως αναπτυσσόμενους όγκους. Οι διάφορες μορφές θεραπείας του καρκίνου (χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ορμονοθεραπεία), υπό συνθήκη, επάγουν την απόπτωση. Πρόσφατα, πολλές έρευνες, μεταξύ των οποίων και η παρούσα μελέτη, εστιάζουν στην πιθανή χρήση του, φωτο-ενεργοποιημένου με υπεριώδη ακτινοβολία, TiO_2 σε ιατρικές εφαρμογές που στοχεύουν στη θεραπεία του καρκίνου. Δεδομένης της υψηλής συχνότητας του καρκίνου του μαστού, εισάγεται η ιδέα της δοκιμής της επίδρασης του TiO_2 σε νεοπλασίες αυτής της μορφής. Στόχος είναι η αύξηση του αυθόρμητου κυτταρικού θανάτου στα κύτταρα του όγκου (το φωτο-ενεργοποιημένο (με UV-A) TiO_2 , οδηγεί σε σχηματισμό ζευγών ηλεκτρονίων-οπών, που αντιδρούν με το νερό και το οξυγόνο, σχηματίζοντας ROS (reactive oxygen species) που τελικά οδηγούν σε οξειδωτικό στρες) αλλά και η μείωση της αντοχής των νεοπλασματικών κυττάρων στις διάφορες μορφές θεραπείας.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση της πιθανής κυτταροτοξικής δράσης του φωτο-ενεργοποιημένου TiO_2 στα καρκινικά κύτταρα. Έτσι, το TiO_2 εισάγεται στα κύτταρα και εν συνεχεία πυροδοτεί ενδοκυτταρικές βιοχημικές αντιδράσεις, καθώς ενεργοποιείται με υπεριώδη ή και ορατή ακτινοβολία. Δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές που προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα μαστού, η μία χαμηλής (MCF-7) και η άλλη εντονότερης (MDA-MB-468) διαφοροποίησης, χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του TiO_2 , μέσω της μελέτης ειδικών παραμέτρων (ποσοστιαία σύσταση φάσεων ανατάση / ρουτιλίου, μέγεθος των νανοσωματιδίων, συγκέντρωση, χημική τροποποίηση), παρουσία ακτινοβολίας UV-A ή ορατού φωτός, στην επιβίωση των κυττάρων. Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση λύματος-πηκτής (sol-gel) αλλά και εναιωρημάτων TiO_2 , ή χημικά τροποποιημένου TiO_2 , σε διαφορετικές φάσεις κρυστάλλωσης, διαφορετικά μεγέθη και συγκεντρώσεις, μετά από πλήρη χαρακτηρισμό (micro Raman και DLS). Οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν ήταν το MTT

assay, η κυτταρομετρία ροής (χρώση με P.I.), η τεχνική Western Blotting και η ανίχνευση του κατακερματισμένου DNA (DNA laddering).

Παρατηρήθηκε επιλεκτική δράση του sol-gel TiO₂ (2.6nm - 20nm) στα κύτταρα MDA-MB-468, ενώ τα MCF-7 δεν πλήττονται σοβαρά. Το φωτο-ενεργοποιημένο TiO₂, οδήγησε σε μείωση (70%) του ποσοστού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G₁. Η επιβίωση των κυττάρων μειώνεται βαθμιαία, αυξανόμενη της συγκέντρωσης του TiO₂. Σε συγκέντρωση 16 μM TiO₂ επιβιώνει το 50% των κυττάρων MDA-MB- 468 και το 80% των MCF-7. Επιπλέον, συγκεντρώσεις μεταξύ των 14-15 μM φωτο-ενεργοποιημένου TiO₂ οδηγούν σε ποσοστό επιβίωσης 40-50% για τα MDA-MB- 468, ενώ για τα MCF-7 το ποσοστό είναι 75–85%. Η επίδραση του φωτο-ενεργοποιημένου ή μη, TiO₂ επάγει τη θραύση της PARP, που αποτελεί έναν αποπτωτικό δείκτη. Επιπλέον, οδηγεί σε μείωση της έκφρασης της Bcl-2, και ταυτόχρονη αύξηση της έκφρασης της Bax, επιβεβαιώνοντας το παραπάνω συμπέρασμα (τα επίπεδα των Bcl-xL και Bad παραμένουν αμετάβλητα). Τέλος, προκαλεί κατακερματισμό (laddering) του DNA στα κύτταρα MDA-MB-468.

Η επιβίωση των κυττάρων μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του εναιωρήματος TiO₂ Evonik P25 (ανατάσης 75%/ρουτίλιο 25%) (138.5 nm και ζ δυναμικό: ZP=(-11.7±8) mV), για συγκεντρώσεις >20μM. Σε συγκέντρωση 24μM επιβιώνει το 50% των MDA-MB-468 και ποσοστό ~70% των MCF-7. Σε συγκέντρωση 19 μM φωτο-ενεργοποιημένου (με UV-A) TiO₂ Evonik P25 επιβιώνει το 50% των MDA-MB-468 και ποσοστό ~80% των MCF-7 κυττάρων. Το φωτο-ενεργοποιημένο εναιώρημα TiO₂ στα MDA-MB-468, επάγει τη θραύση της PARP, οδηγεί σε μικρή αύξηση της Bax και προκαλεί ασθενές DNA laddering.

Η επιβίωση των κυττάρων μειώνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του εναιωρήματος TiO₂ (Sigma Aldrich) (ανατάσης 100%) (111.3 nm και ζ δυναμικό: ZP=(-16.7±9) mV). Για συγκέντρωση >20 μM επιβιώνει το 50% των κυττάρων MDA-MB-468 και το 70% των MCF-7. Σε συγκέντρωση 17 μM φωτο-ενεργοποιημένου (με UV-A) TiO₂ Sigma Aldrich επιβιώνει το 50% των MDA-MB-468 και το 75% των MCF-7 κυττάρων. Η επίδραση του φωτο-ενεργοποιημένου ή μη, TiO₂ (Sigma Aldrich), στα MDA-MB-468, επάγει τη θραύση της PARP, οδηγεί σε μικρή αύξηση της Bax και προκαλεί DNA laddering.

Για συγκεντρώσεις ακόμη και 100μM εναιωρήματος τροποποιημένου με άζωτο TiO₂ (N-doped TiO₂) (129.2 nm) και ζ δυναμικό: ZP=(-11.4±7) mV) επιβιώνει περισσότερο από το 80% των κυττάρων MDA-MB-468 και των MCF-7. Το φωτο-ενεργοποιημένο με ορατή ακτινοβολία, N-doped TiO₂, μειώνει βαθμιαία τον πληθυσμό των κυττάρων και των δύο κυτταρικών σειρών, με ελαφρά εντονότερη δράση στα MDA-MB-468. Σε συγκέντρωση 40μM επιβιώνει το 70% του πληθυσμού των MDA-MB-468 και το 90% των MCF-7 κυττάρων. Επάγεται η θραύση της PARP, σε πολύ μικρό ποσοστό, οδηγεί σε πολύ μικρή αύξηση της Bax και προκαλεί ασθενές DNA laddering.

Η συγκέντρωση 21 μ M εναιωρήματος τροποποιημένου με Άργυρο TiO₂ (Ag-doped TiO₂) (144.5 nm) και ζ δυναμικό: ZP=(-14.8 \pm 8) mV), επάγει το θάνατο στο 50% των κυττάρων MDA-MB-468, αφήνοντας το 80% των κυττάρων MCF-7 σχεδόν ανεπηρέαστο. Σε συγκέντρωση 18 μ M φωτο-ενεργοποιημένου (με UV-A) Ag-doped TiO₂ επιβιώνει τελικά περίπου το 50% των κυττάρων MDA-MB-468 και το 70% των MCF-7. Το φωτο-ενεργοποιημένο με UV-A ή μη, Ag-doped TiO₂ επάγει τη θραύση της PARP, οδηγεί σε μείωση της Bcl-2, σε αύξηση της Bax και προκαλεί DNA laddering.

Συμπερασματικά, τα σημαντικότερα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής συνοψίζονται ως εξής:

- Το sol-gel TiO₂, είναι πιο δραστικό από όλα τα εναιωρήματα που δοκιμάστηκαν. Είναι περισσότερο ομοιογενές από τα εναιωρήματα, επιτρέποντας ακριβέστερη εκτίμηση της τελικής συγκέντρωσης TiO₂ 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 εναιώρημα TiO₂ Sigma Aldrich είναι δραστικότερο από το Degussa P25, λόγω της διαφορετικής φάσης κρυστάλλωσης. Το Sigma Aldrich, είναι 100% ανατάσης, ενώ στο Degussa P25, συνυπάρχουν ανατάσης (75%) και ρουτίλιο (25%). Η ύπαρξη φάσης ρουτίλιου μειώνει τη δραστικότητα. Ο καθαρός ανατάσης αυξάνει την ποσότητα των ROS. Η δραστικότητα του TiO₂ μειώνεται μεταβαίνοντας από το άμορφο TiO₂, στον καθαρό ανατάσης, στον ανατάσης/ρουτίλιο και τέλος στο καθαρό ρουτίλιο.
- Το N-doped TiO₂ παρ' όλο που δεν έδειξε θεαματική κυτταροτοξική δράση, εν τούτοις προσφέρει αποτελέσματα ιδιαίτερα ενθαρρυντικά, αφού επιτρέπει την ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία. Το Ag-doped TiO₂ είναι αρκετά δραστικό.
- Η κυτταροτοξικότητα του φωτο-ενεργοποιημένου TiO₂ σχετίζεται με το μηχανισμό της απόπτωσης. Το φωτο-ενεργοποιημένο TiO₂ επάγει τη θραύση της PARP στα κύτταρα MDA-MB-468, αλλά όχι και στα MCF-7, ενώ η μείωση της Bcl-2 και η αύξηση της Bax, επιβεβαιώνουν κατά περίπτωση, το συμπέρασμα αυτό, σε συνδυασμό με την εικόνα του κατακερματισμένου DNA.
- Η επιλεκτική τοξικότητα των νανοσωματιδίων TiO₂ μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών, πιθανώς σχετίζεται με τις ιδιότητες της επιφάνειας των κυττάρων. Η διαφορετική σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης ίσως διαφοροποιεί και τις αλληλεπιδράσεις μεμβρανικών πρωτεϊνών με το TiO₂, που για τα MCF-7 είναι μάλλον ασθενέστερες, με αποτέλεσμα τον επιλεκτικό θάνατο των MDA-MB-468.
- Η βελτιστοποίηση της μεθόδου θα μπορούσε να περιλαμβάνει την προσπάθεια αντικατάστασης της ακτινοβολίας UV-A, με ορατό φως. Αυτό επιτυγχάνεται με τροποποίηση του TiO₂ με άζωτο, αλλά με μέθοδο που να συμβάλλει στη δραστικότητά του.



NATIONAL & KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY
Department of Animal & Human Physiology

Doctorate (Ph. D.) Thesis Abstract:
***Photocatalytic - Anticancer Activity of Titanium Dioxide (TiO₂):
Related Mechanisms and Applications***

Doctorate (Ph. D.) Candidate

Nefeli P. Lagopati

Physicist, Medical Physicist

Three-member consulting committee:

PAPAZAFIRI PANAGIOTA, Associate Professor (Supervisor)

GAITANAKI CATHERINE, Professor

TSILIBARY EFFIE, Researcher A', Director of Biosciences & Applications, N.C.S.R. "DEMOKRITOS"

Athens 2013

Doctorate (Ph. D.) Thesis Abstract

Titanium Dioxide (TiO₂) is a material with a wide range of common as well as state-of-the-art applications. Actually it is demonstrably used in paints, plastics, cosmetics, artificial bone implants and also in optical coatings on dielectric mirrors. Furthermore, titanium dioxide is widely used in biomedical applications, due to its mechanical properties, biocompatibility and of course for photocatalysis purposes. It is now well established that photoexcited titanium dioxide (TiO₂) can drive various chemical reactions due to its strong oxidizing and reducing ability and can also affect cellular activity, including applications in cancer cells treatment, and self-sterilized surfaces. It is crystallized in the form of rutile, anatase and brookite, while at low temperatures, it exists in amorphous condition. It is characterized as n-type semiconductor.

Recently, many studies, in the field of cancer treatment research, suggest that the regulatory mechanisms of apoptotic-cell death play an important role in carcinogenesis as control mechanisms of cell proliferation do. Apoptosis is relevant to the majority of malignant tumorigenesis. The apoptotic activity occurs in a more vigorous rate in rapidly growing tumors. The usual applied treatments (chemotherapy, radiotherapy, hormonotherapy), conditionally aim to induce apoptosis. Recent studies demonstrated that TiO₂ induces death by apoptosis in different types of cells, such as mesenchymal stem cells, osteoblasts and many others. Furthermore, the photocatalytic properties of TiO₂-mediated toxicity have been shown to eradicate cancer cells, upon irradiation with light whose wavelength is <390 nm (UV-A), via the mechanism of oxidative stress. Photon energy generates pairs of electrons and holes which react with water and oxygen into the cells to yield reactive oxygen species (ROS), which have been proved to significantly damage cancer cells. Consequently, many scientific groups, including ours, have focused on the use of TiO₂ as an anticancer agent in the presence of UV-A light. Given the high incidence of breast cancer (especially in Europe and United States of America) during the last decades, this neoplastic type was selected in order to examine the effects of TiO₂ on breast cancer epithelial cells.

The ultimate objective is to increase the spontaneous cell death of tumor cells, leaving unaffected the adjacent healthy cells and additionally to decrease the resistance of cancer cells to various treatments.

The aim of this Ph. D. Thesis was to examine the possible toxicity of nanostructured TiO₂ on breast cancer epithelial cells. Thus, cell toxicity of photo-activated TiO₂ nanoparticles was assessed in two cancer cell lines, the MDA-MB-468 and the MCF-7, both derived from breast epithelium. Cells were irradiated, using UV-A light, in the presence of nanostructured titania. In recent years, it has been an increased concern about the nanotoxicology and the factors, which are intertwined with it. Due to the importance of this size class of particles, there is a need of clarification and

establishment of the dependence between nanoparticle physicochemical properties and their cytotoxic potential. In this regard, specific parameters (percentage of crystal phase of anatase and rutile in the TiO₂ formulation, particle size, concentration, chemical modification (doping) were studied in different types of TiO₂ sol-gel and dispersions, after a complete characterization of nanoparticles (using micro Raman and Dynamic Light Scattering (DLS)). MTT colorimetric assay was employed to estimate the percentage of viable cells after each treatment. Propidium iodide (PI) flow cytometric (FACScan) assay permitted the examination of treatment effects on the cell cycle. Western blot analysis of proteins (caspase-mediated PARP cleavage, Bcl-2, Bcl-xL, Bax and Bad) expression and characterization as well as DNA laddering assay were used to detect cell apoptosis.

We demonstrated that cell viability gradually decreases as the concentration of TiO₂ sol-gel (2.6 - 20nm) increases, specifically in the highly malignant MDA-MB-468 cancer cells, whereas MCF-7 cells were not considerably affected. In particular, a concentration of about 16 μM TiO₂ induces a reduction of about 50% in MDA-MB-468 cell population, while the same dose leaves 80% of the MCF-7 cells intact. A concentration of about 14-15 μM of UV-A-irradiated TiO₂ reduced MDA-MB-468 cell viability by 40-50% while the relevant percentage of MCF-7 cell viability is 75%-85. Also, photo-excited TiO₂ decreased the percentage of MDA-MB-468 cells (~70%), existing in G₁ phase. PARP (113 kDa) is one of the main cleavage targets of activated caspases and participates in DNA repair, in a post stress plight. Cleavage of PARP no longer support the enzymatic DNA repair function, thus providing a marker of cells undergoing apoptosis. Photo-excited TiO₂ sol-gel induced caspase-mediated PARP cleavage in MDA-MB-468 cells, compared with the control group. Also, Bcl-2 family proteins play a pivotal role in the regulation of cell apoptosis. Photo-excited TiO₂ sol-gel was proven to decrease Bcl-2, and simultaneously increase Bax expression (confirmed apoptosis indices). Bcl-x_L and Bad expression was not significantly affected by photo-excited TiO₂ nanoparticles. These results are in agreement with the observed increase in PARP cleavage. Finally, photo-excited TiO₂ induced DNA laddering in MDA-MB-468 cells.

Cell viability gradually decreases as the concentration of TiO₂ Evonik P25 dispersion (anatase 75%/rutile 25%) (138.5 nm, zeta potential: ZP = (-11.7±8) mV) increases. In particular, a concentration of more than 24 μM TiO₂ Evonik P25 induces a reduction of about 50% in MDA-MB-468 cell population, while the same dose leaves 70% of the MCF-7 cells intact. A concentration of about 19 μM of UV-A-irradiated TiO₂ Evonik P25 reduced MDA-MB-468 cell population by 50%, leaving viable the 80% of MCF-7. Photo-excited TiO₂ Evonik P25 induced PARP cleavage, increased Bax expression and DNA laddering in MDA-MB-468 cells.

The viability of both cells lines gradually decreases as the concentration of TiO₂ (Sigma Aldrich) dispersion (anatase 100%) (111.3 nm, ZP =(-16.7±9) mV) increases. In particular, a concentration of more than 20 μM TiO₂ induces a reduction of about 50% in

MDA-MB-468 cell population, while the same dose leaves 70% of the MCF-7 cells intact. A concentration of about 17 μM of UV-A-irradiated TiO_2 reduced MDA-MB-468 cell population by 50%, leaving viable the 75% of MCF-7. TiO_2 or photo-excited TiO_2 (anatase 100%) induced PARP cleavage, increased Bax expression and DNA laddering in MDA-MB-468 cells.

Concentrations of about 100 μM N-doped TiO_2 (129.2 nm, $\text{ZP}=(-11.4\pm 7)$ mV) leave almost viable and functional more than 80% of both cell populations. Photo-excited, with visible light, N-doped TiO_2 decreases gradually cell viability, and this effect is more intense on MDA-MB-468 cells, than MCF-7. In the presence of 40 μM photo-excited N-doped TiO_2 , 70% of MDA-MB-468 is viable and approximately 90% of MCF-7 cells. Photo-excited N-doped TiO_2 induced a slight increase in PARP cleavage, increased Bax expression and DNA laddering in MDA-MB-468 cells.


Our results also demonstrated that a concentration of 21 μM Ag-doped TiO_2 (144.5 nm, $\text{ZP}=(-14.8\pm 8)$ mV) induced a decrease of 50% in MDA-MB-468 cells, leaving intact about 80% of MCF-7. In the presence of 18 μM photo-excited Ag-doped TiO_2 , 50% of MDA-MB-468 cells and 70% of MCF-7 is still viable. Ag-doped or photo-excited Ag-doped TiO_2 induced PARP cleavage, decreased Bcl-2 expression, increased Bax expression and DNA laddering in MDA-MB-468 cells.

In conclusion, the most important results of this doctorate thesis are summarized as follows:

- Sol-gel TiO_2 was proven to be the most effective form of TiO_2 . This could be attributed to its homogeneity, compared to that of dispersions, which allows accurate estimation of the final TiO_2 concentration in cell cultures. Also, size distribution showed that sol-gel nanoparticles size was smaller than the others, on average, since aggregates formation was established in the case of dispersions, which increase the final size of nanoparticles.
- TiO_2 Sigma Aldrich dispersion is more effective than the TiO_2 Evonik P25, due to the different crystal phase. Sigma Aldrich is crystallized as anatase at 100%, while TiO_2 Evonik P25 is an anatase/rutile mixture. The general trend appears to be that amorphous TiO_2 particles produce more ROS than anatase TiO_2 particles with the same size. In addition, 100% anatase TiO_2 particles have higher ROS activities than anatase/rutile mixtures with the same sizes and pure rutile TiO_2 particles. Thus, ROS activity of anatase/rutile TiO_2 decreased as the fraction of rutile increased.
- N-doped TiO_2 showed a slight cytotoxic effect. However, our results are very encouraging and promising, as N-doping allows the replacement of UV-A with tissue - friendly visible light.
- Doping TiO_2 with silver is proven to be effective.
- The molecular mechanism of TiO_2 nanoparticles cytotoxicity was associated with increased pro-apoptotic Bax expression, decrease anti-apoptotic Bcl-2 expression

and caspase-mediated poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage thus resulting in DNA fragmentation and programmed cell death-apoptosis.

- Our data also demonstrated that the cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles is cell-dependent, since MCF-7 cells showed no significant response to TiO₂ particles of both dispersions, compared to MDA-MB-468. These differences may be attributed to protein composition of the cell membrane and the manner that membrane proteins interact with the TiO₂ particles. Weak TiO₂ particle-membrane interactions in MCF-7 cells, could explain the high survival rates of particle-exposed cells. In contrast, TiO₂ nanoparticles exerted significant toxicity on MDA-MB-468 cells, possibly as a result of increased and intense interactions between the TiO₂ particles and the cell membrane.
- Further studies, aiming at the development of visible-light-activated TiO₂ nanoparticles, doped with nitrogen and other non-metals, for targeted cancer therapy, are in progress, thus avoiding UV-A irradiation, which is quite harmful for cells.



ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	
Όνομα / Επίθετο:	Νεφέλη Λαγοπάτη
Ημερομηνία Γέννησης:	10-05-1983
Τόπος Γέννησης:	Αθήνα
Οικογ. Κατάσταση:	Άγαμη
Διεύθυνση Κατοικίας:	Δρόμος 15, αρ.3, Άρτεμις, Αθήνα, 19016
Τηλέφωνο:	6937604790
e-mail:	nefeli.lagopati@gmail.com
ΣΠΟΥΔΕΣ - ΕΠΙΜΟΡΦΩΣΗ	
[2009 - 2013]:	Υποψήφια Διδάκτωρ του τμήματος Βιολογίας , Σχολής Θετικών Επιστημών, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.) Θέμα Διατριβής: «Φωτοκαταλυτική Αντικαρκινική Δράση Διοξειδίου του Τιτανίου (TiO ₂): Μηχανισμοί και Εφαρμογές» με υποτροφία ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ ΙΙ
[2007 - 2010]:	Μεταπτυχιακή Ειδίκευση (MSc) στην Ιατρική Φυσική - Ακτινοφυσική , Ε.Κ.Π.Α., Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, τριετές Διαπανεπιστημιακό Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών (συνεργασία των τμημάτων Φυσικής, Βιολογίας και Ιατρικής των Πανεπιστημίων Αθηνών, Ιωαννίνων, Θεσσαλονίκης, Κρήτης, Θράκης). Βαθμός : Άριστα (9,42) Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας: «Εκτίμηση ατομικού δείκτη ακτινοευαισθησίας σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού για εξατομικευμένη ακτινοθεραπεία» (εκπόνηση στο εργαστήριο Ραδιοβιολογίας και Βιοδοσιμετρίας στο Ινστιτούτο Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» και στο τμήμα Ακτινοθεραπείας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου «Αττικόν»)
[2006 - 2007]:	Ερευνητική Δραστηριότητα στο Ινστιτούτο Βιολογίας , του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών (Ε.Κ.Ε.Φ.Ε.) « Δημόκριτος », και στο Ινστιτούτο Φυσικοχημείας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος»
[2001 - 2006]:	Πτυχίο Τμήματος Φυσικής , Σχολής Θετικών Επιστημών, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.) Βαθμός Πτυχίου: Λίαν Καλώς (6,94) Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας: «Μελέτη Ιονιζουσών Ακτινοβολιών με τη χρήση του πακέτου προσομοίωσης MCNPX»
[1995 - 2001]:	Πειραματικό Μουσικό Γυμνάσιο - Λύκειο Παλλήνης Βαθμός Απολυτηρίου: Άριστα (18,5)
[1990 - 2006]	Πτυχίο Κλασικής κιθάρας - ισότιμο πτυχίου Α.Ε.Ι. Ωδείο Ζωγράφου Βαθμός πτυχίου: Λίαν Καλώς

ΑΠΑΣΧΟΛΗΣΗ - ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ	
[2006 - 2012]:	Ερευνητική Δραστηριότητα στο εργαστήριο Βιοχημείας/Παθοβιολογίας Κυττάρων και Εξωκυττάρου Χώρου, στο Ινστιτούτο Βιολογίας, του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», με αντικείμενο τη βιολογική δράση καινοτόμων νανοϋλικών σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού, για διαγνωστική και θεραπευτική χρήση.
Ιουν. - Σεπ. 2009:	Πρακτική Άσκηση στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο «Αττικόν» στον τομέα της Ακτινοδιάγνωσης
Φεβ. - Μαι. 2009:	Υπεύθυνη δύο (2) Εργαστηριακών Ασκήσεων στο υποχρεωτικό εργαστήριο του μαθήματος «Εισαγωγή στην Πυρηνική Φυσική και τα Στοιχειώδη Σωματίδια» του τμήματος Φυσικής Ε.Κ.Π.Α., ως μεταπτυχιακή επιβλέπουσα φοιτήτρια (τίτλοι ασκήσεων: 1) Δοσμετρία γ-ακτινοβολίας, Στοιχεία ακτινοπροστασίας 2) Στατιστική μελέτη ραδιενεργών διασπάσεων και εισαγωγή στη μέθοδο προσομοίωσης Monte Carlo) και επίβλεψη εισαγωγικού εργαστηρίου Υπολογιστών υπό την καθοδήγηση του κ. Άγγελόπουλου (βλ. Συστάσεις)
Φεβ - Μαι 2009:	Πρακτική Άσκηση στο Αρεταίειο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών στον τομέα της Πυρηνικής Ιατρικής
Μαρ 2009:	Πρακτική Άσκηση στο Αρεταίειο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών στον τομέα των laser και των Υπερήχων
Οκτ 2008 - Ιαν 2009:	Πρακτική Άσκηση στο Αρεταίειο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών στον τομέα της Ακτινοθεραπείας
Οκτ 2008 - Ιαν 2009:	Υπεύθυνη Εργαστηριακής Άσκησης στο εργαστήριο του μαθήματος επιλογής «Υγαιοφυσική» του τμήματος Φυσικής Ε.Κ.Π.Α., ως μεταπτυχιακή επιβλέπουσα φοιτήτρια και διόρθωση γραπτών του ίδιου μαθήματος κατά την εξεταστική περίοδο
Νοε - Δεκ 2007:	Δίμηνη σύμβαση έργου με χρηματοδότηση από το Περιφερειακό Επιχειρησιακό Πρόγραμμα (ΠΕΠ) Αττικής ως εξωτερικός συνεργάτης για Ερευνητική Δραστηριότητα στο εργαστήριο Βιοχημείας / Παθοβιολογίας Κυττάρων και Εξωκυττάρου Χώρου, στο Ινστιτούτο Βιολογίας , του (Ε.Κ.Ε.Φ.Ε.) «Δημόκριτος» , με αντικείμενο τη βιολογική δράση καινοτόμων νανοϋλικών σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού, για διαγνωστική και θεραπευτική χρήση
[2002 - 2004]:	Εθελοντική Διδασκαλία Μαθηματικών, Φυσικής και Χημείας σε οικονομικά αδύνατους μαθητές γυμνασίου και λυκείου
[2000 - 2009]:	Διδασκαλία Μαθημάτων ζωγραφικής, σχεδίου και χειροτεχνίας σε δημοτικά σχολεία της Αττικής (περιοχές Ερυθρού Σταυρού και Αρτέμιδος) σε συνεργασία με τους αντίστοιχους συλλόγους γονέων και κηδεμόνων

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ	
Αγγλικά	Άριστη Γνώση (επίπεδο Proficiency)
Ισπανικά	Μέτρια Γνώση (επίπεδο D.E.L.E. A1)
ΓΝΩΣΕΙΣ Η / Υ	
Γνώση και χειρισμός Η/Υ:	Windows, Office, LaTeX, LibreOffice (Internet, Word, Mathtype, Excel, Access, PowerPoint) - κάτοχος ευρωπαϊκού διπλώματος ECDL
Γλώσσες Προγραμματισμού:	FORTRAN, C, (Pascal)
Εξειδικευμένα Προγράμματα	MCNPX, FLUKA, SIMIND, Geant3, GATE, VMC (προγράμματα προσομοίωσης Monte Carlo) IDL, Visual Editor, MATLAB (προγράμματα επεξεργασίας και ανακατασκευής εικόνας) SPSS (πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης) MATHEMATICA (υπολογιστικό λογισμικό) PLATO (πρόγραμμα κατασκευής πλάνου ακτινοθεραπείας) MIRDOSE, OLINDA (προγράμματα δοσιμετρίας για πυρηνική ιατρική) IKAROS (Metasystems) (υπολογιστικό σύστημα για επεξεργασία εικόνας στην κυτταρογενετική (καρυότυπο))
Σχεδιαστικά Πακέτα:	ImageJ, PAW, GnuPlot, Origin, Adobe Photoshop, CorelDraw
ΑΛΛΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ	
[2003 - 2006]:	Πτυχίο Κλασικής κιθάρας - Ωδείο Ζωγράφου Βαθμός πτυχίου: Λίαν Καλώς (Διδάσκουσα: Ελένη Ασπρούδη)
[2004 - 2006]:	Μαθήματα Μουσικής δωματίου
[1990 - 2002]:	Μαθήματα κλασικής κιθάρας, θεωρίας, αρμονίας, σολφέζ, ιστορίας μουσικής, μορφολογίας Εθνικό Ωδείο Αθηνών
[1995 - 2001]:	Μαθήματα Ελεύθερου, Γραμμικού Σχεδίου, Ζωγραφικής και Χειροτεχνίας, Αγγειοπλαστικής και Σχεδιασμού Κοσμημάτων
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	
Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά (με σύστημα ανώνυμων κριτών)	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ N. Lagopati, P.V. Kitsiou, A.I. Kontos, P.Venieratos, E.Kotsopoulou, A.G. Kontos, D.D. Dionysiou, S. Pispas, E.C. Tsilibary and P. Falaras «Photo-induced treatment of breast epithelial cancer cells using nanostructured titanium dioxide solution», Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 2010, Vol 214, Issues 2-3, 215-223 ▪ I. Vamvakas, N. Lagopati, M. Andreou, M. Sotiropoulos, A. Gatzis, G. Limouris, C. Antypas and M. Lyra, «Patient specific computer automated dosimetry calculations during therapy with ¹¹¹In Octreotide», European Journal of Radiography, Volume 1, Issue 4, December 2009, Pages 180-183 ▪ Maria Lyra, Nefeli Lagopati, Paraskevi Charalabatu and Ioannis Vamvakas, «Patient - specific dosimetry in radionuclide therapy», Radiation Protection Dosimetry, 2011, pp 1-6 	

<ul style="list-style-type: none"> ▪ M. Andreou, N. Lagopati and M. Lyra, "Re-186 and Sm-153 dosimetry based on scintigraphic imaging data in skeletal metastasis palliative treatment and Monte Carlo simulation", 2011, Journal of Physics: Ser 317, 012013
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nefeli Lagopati and Maria Lyra, «Hormesis - Exposure to Low levels of Ionizing radiation», Atomium Culture, 2011
<ul style="list-style-type: none"> ▪ N. Lagopati, P. Papazafiri, E. Pavlatou, E. Kotsopoulou, P. Falaras, E.C. Tsilibary, P.V. Kitsiou, Effect of nanostructured TiO₂ crystal phase on photo-induced apoptosis of breast cancer epithelial cells, Journal of Biomedical Nanotechnology, under reviewing
<ul style="list-style-type: none"> ▪ N. Lagopati, M. Sotiropoulos, J. Striligas, M. Gavrilleli, M. Lyra, Applied Numerical Mathematics, Special Issue: NUMAN 2012, under reviewing
Δημοσιεύσεις σε βιβλία - επίλεκτα πρακτικά συνεδρίων
Κεφάλαια σε βιβλία
<ul style="list-style-type: none"> • M.E. Lyra, N. Lagopati, M. Sotiropoulos, Ch. Chatzigiannis and M. Gavrilleli «The impact of scattering and peak spectrum of I-123 in scintigraphy by I-123 MIBG», Advanced Topics in Scattering Theory and Biomedical Engineering, Editors: A. Charalambopoulos, D.E.Fotiadis, D. Polyzos, World Scientific, 2009
<ul style="list-style-type: none"> • M.E. Lyra, M. Andreou, A.Georgantzoglou, S.D. Kordolaimi, N. Lagopati, A. Plousi, A.- L. N. Salvara and I. Vamvakas, «Radionuclides used in Nuclear Medicine Therapy – From Production to Dosimetry» Bentham Science Publishers, Current Medical Imaging Reviews, 2010
<ul style="list-style-type: none"> • M. Lyra, M. Andreou, A. Georgantzoglou, S. Kordolaimi, N. Lagopati, A. Ploussi, A.-L. Salvara and Ioannis Vamvakas, " Nuclear Medicine Therapy - Radioisotopes Production and Dosimetry, booklet, 2011, pp 1-52, www.medimaging.gr/tutorials/booklet%20Radionuclide_therapy.pdf
Δημοσιεύσεις σε επίλεκτα πρακτικά συνεδρίων
2007
<ul style="list-style-type: none"> • N. Lagopati, A.I. Kontos, P. Venieratos, P. Kitsiou, P.F. Tsilibari and P. Falaras, «Photoinduced Cancer Treatment Using Nanostructured Titanium Dioxide Solution» Proceedings του International Conference on Nanomedicine, «Nanotechnology for health» 9-11 Σεπτεμβρίου 2007, Χαλκιδική, Session DD-3, 50-56
2009
<ul style="list-style-type: none"> • M.E. Lyra, N. Lagopati, M. Sotiropoulos, Ch. Chatzigiannis, M. Andreou, M. Gavrilleli and Ch. Antypas, «The impact of scattering and peak spectrum of I-123 in scintigraphy by I-123 MIBG», Advanced Topics in Scattering Theory and Biomedical Engineering - eProceedings of the 9th International Workshop on Mathematical Methods in Scattering Theory and Biomedical Engineering, Achaia Beach Hotel, Patras, Greece, October 9 – 11, 2009, World Scientific (Connecting great minds), http://eproceedings.worldscinet.com/9789814322034/9789814322034_0008.html)
<ul style="list-style-type: none"> • M. Sotiropoulos, A. Zygogianni, N. Lagopati, C. Antypas, C. Arbillia, J. Kouvaris and M. E. Lyra, «Radiation Effects Quantification in Breast Radiotherapy by Mammography Image Processing» IFMBE Proceedings, Dössel Olaf – Schlegel Wolfgang C., Vol 25/5, 362-364, Springer, 2009, (http://www.springerlink.com/content/xj88t76p1672x535/)
2010
<ul style="list-style-type: none"> • M. Lyra, M. Sotiropoulos, N. Lagopati and M. Gavrilleli, «Quantification of myocardial perfusion in 3D SPECT images - stress/rest volume differences», 31 – 35, 2010 (http://ieeexplore.ieee.org/xpl/freeabs_all.jsp?arnumber=5548486)

<ul style="list-style-type: none"> • ME Lyra, N Lagopati, P Charalabatou, E. Vasoura, A. Antoniou, C. Georgosopoulos, K. Skouroliakou, "Texture characterization in ultasonograms of the thyroid gland", 2010, 10th IEEE International Conference on Information Technology and Applications in Biomedicine (ITAB), 2010, "ieeexplore.ieee.org", pp.1-4
<ul style="list-style-type: none"> • Lyra M., Striligas J., Gavrilleli M. and Lagopati N., Volume Quantification of I-123 DaTSCAN Imaging by MatLab for the Differentiation and Grading of Parkinsonism and Essential Tremor, <i>International Conference on Science and Social Research</i>, Kuala Lumpur, Malaysia, December 5-7, 2010. http://edas.info/p8295
2011
<ul style="list-style-type: none"> • Nefeli Lagopati, Maria Andreou and Maria Lyra, «Scintigraphic imaging data in skeletal metastasis treatment and Monte Carlo simulation, Re-186 and Sm-153 dosimetry» eProceedings of the International Conference "Image Optimisation in Nuclear Medicine" (OptiNM2011), Ayia Napa, Cyprus, March 23 - 26, 2011 (http://campbe.org/optinm/presentations/)
ΕΤΕΡΟΑΝΑΦΟΡΕΣ
Το δημοσιευμένο ερευνητικό έργο αναφέρεται 35 φορές, σε 17 ερευνητικές εργασίες σε διεθνή περιοδικά με το σύστημα των κριτών. h index=3, g index=5
ΣΥΝΕΔΡΙΑ
2012
Nanotexnology 2012, International Exhibition & Conferences on Nanotechnologies & Organic Electronics, 30 June-7 July 2012, Thessaloniki, Greece Poster (Παρουσίαση με αφίσα) «Photocatalytic treatment of breast epithelial cancer cells using nanostructured titanium dioxide (TiO ₂)», N. Lagopati , P.V. Kitsiou, E. Kotsopoulou, E.C. Tsilibary, P. Falaras
5th Conference on Numerical Analysis (NumAn 2012), recent approaches to numerical analysis: theory. methods and applications September 5 – 8, 2012, Ioannina, Greece Προφορική Παρουσίαση «Quantitation of volume differences in 3D SPECT stress / rest images in myocardium tests», N. Lagopati, M. Sotiropoulos, J. Striligas, M. Gavrilleli, M. Lyra
European Medical Physics and engineering conference – incorporating - 11th BSBPE National Conference Biomedical Physics and Engineering - 6th European Conference of Medical Physics, October 18 – 20, 2012, Sofia, Bulgaria Προφορική Παρουσίαση «I – 123 DaTSCAN SPECT image process by MatLab, for Parkinsonism and essential tremor evaluation», M. Lyra, N. Lagopati , A. Plousi, I. Baka, J. Striligas, M. Sotiropoulos
Euroecho and other Imaging Modalities 2012, December 5 – 8, 2012, Athens, Greece Προφορική Παρουσίαση « Quantification of volume differences in 3D SPECT stress / rest images» N. Lagopati , M. Sotiropoulos, I. Baka, A. Ploussi, M. Lyra Georgosopoulou
2011
Image Optimization in Nuclear Medicine, March 23 - 26, 2011, Ayia Napa, Cyprus Προφορική Παρουσίαση «Scintigraphic imaging data in skeletal metastasis treatment and Monte Carlo simulation, Re-186 and Sm-153 dosimetry», Nefeli Lagopati , Maria Andreou and Maria Lyra

IBUS: International Breast Ultrasound Course, May 2 - 4, 2011, Athens, Greece Παρακολούθηση
«Δοσιμετρία και Ακτινοπροστασία σε νεότερες Ραδιοϊσοτοπικές Θεραπευτικές Εφαρμογές», Παρασκευή 24 Ιουνίου 2011, Αρεταίειον Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών, «Radionuclides used in Nuclear Medicine Therapy – From Production to Dosimetry» Προφορική Παρουσίαση «OLINDA – 2 ^{ns} γενιάς λογισμικό εσωτερικής δοσιμετρίας και Monte Carlo δοσιμετρικοί υπολογισμοί στην θεραπεία οστικών μεταστάσεων» Νεφέλη Λαγοπάτη
Ημερίδα ενημέρωσης και ανταλλαγής απόψεων με θέμα «Οι πρώτοι μήνες μετά το πυρηνικό ατύχημα στην Ιαπωνία. Ενέργειες και μετρήσεις στη χώρα μας» Ελληνική Επιτροπή Ατομικής Ενέργειας (Ε.Ε.Α.Ε.) Πέμπτη 7 Ιουλίου 2011, Τεχνόπολις, Αθήνα Παρακολούθηση
Nanotex 2011, Expo, Conference and Summer School, July 9 - 16, 2011, Thessaloniki, Greece Poster (Παρουσίαση με αφίσα) «Photo-induced treatment of breast epithelial cancer cells using nanostructured titanium dioxide (TiO ₂) solution» N. Lagopati, P.V. Kitsiou, E. Kotsopoulou, E.C. Tsilibary and P. Falaras
Ημερίδα για τις θεματικές προτεραιότητες «Υγεία» και «Τρόφιμα, Γεωργία & Αλιεία, και βιοτεχνολογία» του 7ου Προγράμματος Πλαισίου, Τετάρτη 14 Σεπτεμβρίου 2011, Αθήνα Παρακολούθηση
1st International Meeting of Medical Olympicus Association, September 23 - 25, 2011, Thessaloniki, Greece Προφορική Παρουσίαση «Bone Pain Palliation and Quality of Life Improvement for patients with Bone Metastasis: Individualized Dosimetry evaluation of ¹⁸⁶ Re-HEDP and ¹⁵³ Sm-EDTMP therapy» Nefeli Lagopati, Maria Andreou, Marios Sotiropoulos, Antonis Georgantzoglou and Maria Lyra
1st International Meeting of Medical Olympicus Association, September 23 - 25, 2011, Thessaloniki, Greece Προφορική Παρουσίαση «Patient Specific Dosimetry in Targeted Molecular Radionuclide therapy – ¹¹¹ In octreotide therapy» Maria Andreou, Nefeli Lagopati, Paraskevi Charalabatu, Ioannis Vamvakas and Maria Lyra
Annual Congress of the EANM 2009, October 15 - 19, 2011, Birmingham, UK Poster (Παρουσίαση με αφίσα) «Image improvement in I-123-MIBG adrenals scintigraphy by scattering corrections» N. P. Lagopati, M. A. Sotiropoulos and M. E. Lyra
Annual Congress of the EANM 2009, October 15 - 19, 2011, Birmingham, UK Poster (Παρουσίαση με αφίσα) «3D SPECT Myocardium Volume differences at Stress / Rest – MatLab Algoritmm» M. A. Sotiropoulos, N. P. Lagopati and M. E. Lyra
2010
21 ^o Συνέδριο Πυρηνικής Ιατρικής, 7 - 9 Μαΐου 2010, Ιατρική Σχολή Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη Προφορική Παρουσίαση «Κίνδυνοι από χαμηλές δόσεις Ακτινοβολιών. Κατώφλι, γραμμική σχέση, hormesis, δράση σε κυτταρικό επίπεδο» Νεφέλη Λαγοπάτη και Μαρία Λύρα

<p>IEEE International Conference on Imaging Systems and Techniques (IST), July 1 - 2, 2010, Thessaloniki, Greece</p> <p>Προφορική Παρουσίαση</p> <p>«Quantification of myocardial perfusion in 3D SPECT images- stress/rest volume differences»</p> <p>M. Lyra, M. Sotiropoulos, N. Lagopati and M.Gavrilleli</p>
<p>International Conference on Radiation Protection in Medicine, September 1 - 3, 2010, Varna, Bulgaria</p> <p>Προφορική Παρουσίαση</p> <p>«Patient specific dosimetry in radionuclide therapy. Cumulative Activity - Cumulative Dose - Dose Volume Histogram»</p> <p>N. Lagopati, V. Charalabistou, I. Vamvakas and M. Lyra</p>
<p>International Conference on Radiation Protection in Medicine, September 1 - 3, 2010, Varna, Bulgaria</p> <p>e - Poster (Παρουσίαση με ηλεκτρονική αφίσα)</p> <p>«Radiation Protection of staff in In-111 radionuclide therapy. Is the lead apron shielding effective?»</p> <p>M. Lyra, V. Charalabistou, M. Sotiropoulos and N. Lagopati</p>
<p>10th I.E.E.E. International Conference on Information Technology and Applications in Biomedicine, November 2 - 5, 2010, ITAB 2010, Corfu, Greece</p> <p>Προφορική Παρουσίαση</p> <p>«Texture Characterization in Ultrasonograms of the Thyroid Gland»</p> <p>Nefeli Lagopati, Maria Lyra, Paraskevi Charalabistou, Efrosini Vasoura, Aristides Antoniou, Costas Georgosopoulos and Katerina Skouroliakou</p>
<p>2009</p>
<p>15^o Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας «Διεπιστημονική Προσέγγιση στην Ογκολογία», 26 - 28 Μαρτίου 2009, Athens Hilton, Αθήνα</p> <p>Poster (Παρουσίαση με αφίσα)</p> <p>« Χαρτογράφηση μαστογραφιών μετά από ακτινοθεραπεία – Αναγνώριση Δομής Μαστού και ταξινόμηση»</p> <p>A. Ζυγογιάννη, M. Λύρα, I. Βαμβακάς, X. Αντύπας, X. Αρμπιλιά, M. Σωτηρόπουλος, N. Λαγοπάτη και I. Κούβαρης</p>
<p>15^o Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας «Διεπιστημονική Προσέγγιση στην Ογκολογία», 26 - 28 Μαρτίου 2009, Athens Hilton, Αθήνα</p> <p>Poster (Παρουσίαση με αφίσα)</p> <p>«Θεραπεία με In-111 Octreotide μέσω καθετηριασμού. Ακριβείς Δοσιμετρικοί υπολογισμοί με χρήση σπινθηρογραφήματος»</p> <p>M. Λύρα, I. Βαμβακάς, N. Λαγοπάτη και Γ. Λυμούρης</p>
<p>5^o Διεθνές Συνέδριο Βιοτεχνολογίας, 8 - 9 Μαΐου 2009, Ζάππειο Μέγαρο, Αθήνα, IGBF</p> <p>Παρακολούθηση</p>
<p>Ακτινοθεραπευτική Ογκολογία: Επαναπροσδιορίζοντας το Μέλλον....Σήμερα</p> <p>16 - 17 Μαΐου 2009, Athens Hilton, Όμιλος Υγεία, Αθήνα</p> <p>Παρακολούθηση</p>
<p>IBUS: International Breast Ultrasound Course, May 27 - 29, 2009, Athens, Greece</p> <p>Παρακολούθηση</p>
<p>Breast Imaging Workshops, June 12 - 13, Hotel Metropolitan, Athens, Greece</p> <p>Παρακολούθηση</p>

<p>Ημερίδα για τις θεματικές προτεραιότητες «Υγεία» και «Τρόφιμα, Γεωργία & Αλιεία, και βιοτεχνολογία» του 7ου Προγράμματος Πλαισίου, Παρασκευή 17 Ιουλίου, Αθήνα</p> <p>Παρακολούθηση</p>
<p>11th International Congress of the IUPESM - Medical Physics and Biomedical Engineering World Congress 2009 - For the benefit of the Patient Program, September 7 - 12, 2009, Munich, Germany.</p> <p>Poster (Παρουσίαση με αφίσα) «Radiation Effects Quantification in Breast Radiotherapy by Mammography Image Processing» Marios Sotiropoulos (University of Athens, Greece), Anna Zygogianni (M.D., Greece), Nefeli Lagopati (Radiation Physics, University of Athens, Greece) and Maria Lyra (University of Athens, Greece)</p>
<p>5th International Conference on Imaging Technologies in Biomedical Sciences (ITBS 2009) From Physiology and Cellular Biology to Pathology through Imaging, September 13 - 16, 2009, Milos Island, Greece</p> <p>Poster (Παρουσίαση με αφίσα) «Radiopharmaceutical (Sm 153 - EDTMP) bone palliative treatment and Monte Carlo simulation» N. Lagopati, M. Sotiropoulos, M. Andreou, J. Vamvakas, G. S. Limouris and M. Lyra</p>
<p>34th European Society of Neuroradiology Annual Meeting, September 17 - 20, 2009, Athens Hilton, Athens, Greece</p> <p>Προφορική Παρουσίαση «Quantification of [123I] - FP - CIT (DATSCAN) Volume Imaging by MATLAB For the differentiation and grading of Parkinsonism and essential tremor» M.E. Lyra, M. Sotiropoulos, N. Lagopati, E. Kapaki, A. Gouliamos and G. S. Limouris</p>
<p>9th Workshop on Mathematical Methods in Scattering Theory and Biomedical Engineering, October 9-11, Achaia Beach – Patras, Greece</p> <p>Προφορική Παρουσίαση «The impact of scattering and peak spectrum of I-123 in scintigraphy by I-123 MIBG» M.E. Lyra, N. Lagopati, M. Sotiropoulos, Ch. Chatzigiannis, M. Andreou, M. Gavrielli and Ch. Antypas</p>
<p>Annual Congress of the EANM 2009, October 10 - 14, 2009, Barcelona, Spain</p> <p>Poster (Παρουσίαση με αφίσα) «Individualized Dosimetry methods and Monte Carlo Simulation in Sm 153- EDTMP Palliative Treatment» N. Lagopati, G. Papanikolos, M. Sotiropoulos, C. Panayides, J. Vamvakas, G. S. Limouris and M. E. Lyra</p>
<p>9th International Conference on Information Technology and Applications in Biomedicine, November 5 - 7, 2009, ITAB 2009, Larnaca, Cyprus</p> <p>Προφορική Παρουσίαση «Patient specific computer automated dosimetry calculations during therapy with 111In octreotide» I. Vamvakas, N. Lagopati, M. Andreou, M. Sotiropoulos, A. Gatzis, G. Limouris, C. Antypas, and M. Lyra</p>
<p>Ημερίδα Ένωσης Φυσικών Ιατρικής Ελλάδας (Ε.Φ.Ι.Ε.) με θέμα: «Σύγχρονη Ακτινοθεραπεία», Α.Ο.Ν.Α. Αγ. Σάββας, 28 Νοεμβρίου 2009, Αθήνα</p> <p>Παρακολούθηση</p>

2007
International Conference on Nanomedicine, «Nanotechnology for health», September 9 - 11, 2007, Chalkidiki, Greece Προφορική Παρουσίαση «Photoinduced Cancer Treatment Using Nanostructured Titanium Dioxide Solution», N. Lagopati , A.I. Kontos, P. Venieratos, P. Kitsiou, E.F. Tsilibari and P. Falaras Institute of Biology, NCSR “Demokritos”, Institute of Physical Chemistry, N.C.S.R. “Demokritos”
ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ - ΣΥΝΕΧΗΣ ΕΠΙΜΟΡΦΩΣΗ
Θέμα: Εισαγωγή στο SPSS - Βασικές στατιστικές μετρήσεις - Διαχείριση Δεδομένων, 18 - 19 Μαΐου 2011, Αθήνα Φορέας: Ε.Κ.Π.Α, Τμήμα Υπολογιστών και Τηλεπικοινωνιών
Θέμα: Διήμερο networking technology school , 23 - 24 Φεβρουαρίου 2009, Αθήνα Φορέας: Ε.Κ.Π.Α, Τμήμα Υπολογιστών και Τηλεπικοινωνιών
Θέμα: Teaching with MATLAB: Ανάπτυξη Αλγορίθμων, Μοντελοποίηση και Υλοποίηση Δυναμικών Συστημάτων , Μάιος 2009, Αθήνα Φορέας: The Mathworks, MATLAB & SIMULINK, Athens
Θέμα: Βασική Υποστήριξη της Ζωής (Basic Life Support (BLS)) & Αυτόματη Εξωτερική Απινίδωση (Automated External Defibrillation (AED)) BLS/AED, 11 Ιουλίου 2009, Άρτεμις, Αθήνα Φορέας: European Resuscitation Council
Θέμα: Mathworks Product Overview , Οκτώβριος 2009, Αθήνα Φορέας: The Mathworks, MATLAB & SIMULINK, Athens
Θέμα: Κύκλος σεμιναρίων στην Ακτινοθεραπεία, Ακτινοπροστασία, την Πυρηνική Ιατρική, τη Ραδιοβιολογία, 2008-2009, Αθήνα Φορέας: Ε.Κ.Π.Α, Αρεταίειο Νοσοκομείο
Θέμα: Διημερίδα «Προχωρημένα Θέματα σε Τεχνολογίες Πλέγματος» , 11 - 12 Δεκεμβρίου 2008, Τμήμα Υπολογιστών και Τηλεπικοινωνιών, Ε.Κ.Π.Α., Αθήνα Φορέας: Ε.Κ.Π.Α, Τμήμα Υπολογιστών και Τηλεπικοινωνιών
Τέσσερις (4) Κύκλοι Σεμιναρίων ποικίλων θεμάτων, 2007 - 2010, Αθήνα Φορέας: Ινστιτούτο Βιολογίας Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος
Θέμα : Λήψη απόφασης και επίλυσης προβλημάτων στην επαγγελματική σταδιοδρομία, Οκτώβριος 2006, Αθήνα Φορέας: Γραφείο Διασύνδεσης Πανεπιστημίου Αθηνών
Θέμα : Συμπλήρωση Βιογραφικού σημειώματος, Οκτώβριος 2006, Αθήνα Φορέας: Γραφείο Διασύνδεσης Πανεπιστημίου Αθηνών
Θέμα: Σεμινάριο Κλασικής κιθάρας (καθηγητής κλασικής κιθάρας και σολίστ: Κατινάκης Διονύσης), Μάρτιος 2004, Ζωγράφου, Αθήνα Φορέας: Ωδείο Ζωγράφου
Θέμα : Επιμόρφωση Υπευθύνων για την Απογραφή πληθυσμού 2001 Φορέας: Εθνική Στατιστική Υπηρεσία

ΒΡΑΒΕΙΑ	
Γ' Βραβείο για την προφορική παρουσίαση και την εργασία: «Patient Specific Dosimetry in Targeted Molecular Radionuclide therapy – ¹¹¹ In octreotide therapy», στο 1st International Meeting of Medical Olympicus Association, September 23 - 25, 2011, Thessaloniki, Greece	
Έπαινος για την προφορική παρουσίαση και την εργασία: «Bone Pain Palliation and Quality of Life Improvement for patients with Bone Metastasis: Individualized Dosimetry evaluation of ¹⁸⁶ Re-HEDP and ¹⁵³ Sm-EDTMP therapy», στο 1st International Meeting of Medical Olympicus Association, September 23 - 25, 2011, Thessaloniki, Greece	
Υποτροφία ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ ΙΙ με άριστη αξιολόγηση (10) θέματος και πρότασης	
Β' Βραβείο Μουσικής σε Πανελλήνιους Μουσικούς Αγώνες (2000), με συμμετοχή στην κατηγορία μουσικής δωματίου	
Β' Βραβείο ζωγραφικής – Mattel Corporation (1995)	
ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ	
2011	Κάτοχος άδειας ασκήσεως επαγγέλματος ως ακτινοφυσικός ιατρικής στην περιοχή μη ιονιζουσών ακτινοβολιών (laser, υπέρηχοι, μαγνητικός τομογράφος, τηλεπικοινωνίες, radar)
2009 - 2011	Μέλος της Ένωσης Φυσικών Ιατρικής Ελλάδας (Ε.Φ.Ι.Ε.)
2009 - 2011	Μέλος της Εθελοντικής Ομάδας Αντιμετώπισης Καταστροφών (Ε.ΟΜ.Α.Κ.)
2006 - 2010	Μέλος της Ένωσης Ελλήνων Φυσικών (Ε.Ε.Φ.) και της Ευρωπαϊκής Ένωσης Φυσικών (Ε.Ε.Φ)
2010	Κάτοχος άδειας ασκήσεως επαγγέλματος ως καθηγήτρια σε φροντιστήρια μέσης εκπαίδευσης
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ	
Βιολογική δράση καινοτόμων νανοϋλικών σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού, για διαγνωστική και θεραπευτική χρήση Απόπτωση, νέκρωση, οξειδωτικό stress, καλλιέργειες in vitro Καρκίνος, Ακτινοβολίες, Πυρηνική Ιατρική, Δοσιμετρία	
ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΙΚΑΝΟΤΗΤΕΣ	
Εμπειρία σε εργαστήρια Φυσικής και Βιολογίας	
ΆΛΛΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ	
Ζωγραφική	
Μουσική	
Ταξίδια	
ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ (διαθέσιμες εφόσον ζητηθούν)	
κ. Άγγελου Αγγελόπουλου, Καθηγητή στο Τμήμα Φυσικής, Πανεπιστημίου Αθηνών, στον τομέα Πυρηνικής Φυσικής και Στοιχειωδών Σωματιδίων	
κ. Μαρίας Λύρα, Αναπληρώτριας Καθηγήτριας στο Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστημίου Αθηνών, στον Κλινικοεργαστηριακό τομέα	
κ. Έφης Τσιλιμπάρη, διευθύντριας του Ινστιτούτου Βιολογίας στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»	
κ. Ασπρούδη Ελένης, Καθηγήτριας Κλασικής Κιθάρας	

