

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙΝΟΤΟΜΩΝ ΝΑΝΟΪΛΙΚΩΝ ΜΕ ΦΩΤΟΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

**Ν. Λαγοπάτη^{1,2}, Ε. Γαλατά^{1,#}, Μ.-Ε. Κασσαλιά^{1,#}, Ν. Παπαδοπούλου-Φέρμελη^{1,#},
Β. Γ. Γοργούλης², Ε. Α. Παυλάτου^{1,*}**

¹Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εργαστήριο Γενικής Χημείας, ΕΜΠ, Αθήνα, Ελλάδα

²Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Ομάδα Μοριακής Καρκινογένεσης,
ΕΚΠΑ, Αθήνα, Ελλάδα

(* pavlatou@chemeng.ntua.gr)

Ισοδύναμη συμβολή στην παρούσα μελέτη

* Επιστημονική Υπεύθυνη

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το διοξείδιο του τιτανίου (TiO₂) χρησιμοποιείται σε πλήθος βιοϊατρικών εφαρμογών, λόγω της βιοσυμβατότητάς του. Στόχος της παρούσας μελέτης αποτελεί η σύνθεση νανοσωματιδίων με φωτο-επαγόμενες ιδιότητες στην περιοχή του ορατού φωτός, με ταυτόχρονη μελέτη κυτταροτοξικότητας σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού. Για τον λόγο αυτό, το TiO₂ τροποποιείται χημικά με άζωτο (N-doped TiO₂), με σίδηρο (Fe-doped TiO₂) και συν-τροποποιείται με άζωτο και σίδηρο (N-Fe co-doped TiO₂), για την ενεργοποίησή του με ορατή ακτινοβολία και τη βελτίωση της φωτοκαταλυτικής του απόδοσης. Επίσης, επιτυγχάνεται ενθουλάκωση εμπορικής τιτανίας με νανοσωματίδια εναιωρήματος δικτυωμένης-διασταυρωμένης μικροπηκτής συμπολυμερισμένου θερμοαπο-κρίσιμου πολυμερούς (πόλυ(ν-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) ή P-NiPam), για την ανάπτυξη συστήματος μεταφοράς φαρμάκων. Για τη μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης των νανοσωματιδίων, διατηρούνται καρκινικές κυτταρικές σειρές. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι φωτοκαταλυτικά, τη βέλτιστη αποικοδόμηση του ρύπου Μπλε του Μεθυλενίου παρουσιάζει η σκόνη Fe-doped, ενώ σημαντικός πληθυσμός των κυττάρων χάνει τη λειτουργικότητά του, με συνέπεια τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρουσία των σκονών N-doped.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πολυπαραγοντική νεοπλασματική νόσος προσεγγίζεται ποικιλοτρόπως, με σκοπό την εύρεση εναλλακτικών μορφών θεραπείας, που θα ελαχιστοποιούν τις ανεπιθύμητες συνέπειες συμβατικές μεθόδους θεραπείας^[1]. Το TiO₂ αξιοποιείται σε πολλές φωτοκαταλυτικές εφαρμογές^[2], αλλά και σε βιοϊατρικές εφαρμογές, λόγω της βιοσυμβατότητάς του^[3]^[4].

Τα φωτο-ενεργοποιημένο, με υπεριώδη ακτινοβολία, TiO₂, εμφυτευόμενο σε καρκινικά κύτταρα, επάγει τη δημιουργία ηλεκτρονίων-οπών, που οδηγούν στη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Τα ROS δημιουργούν βλάβες σε κρίσιμα βιομόρια, οδηγώντας τα κύτταρα σε απόπτωση^[5]. Το φωτο-ενεργοποιημένο με υπεριώδη ακτινοβολία, TiO₂ είναι ένας υποσχόμενος αντικαρκινικός παράγοντας^[6]. Συχνά επιδιώκεται η αντικατάσταση της υπεριώδους ακτινοβολίας με άλλη φιλικότερη επιλογή^[7]. Η απόκριση του TiO₂ στην ορατή φασματική περιοχή και η βελτίωση της φωτοκαταλυτικής του απόδοσης, είναι εφικτή με τη χημική τροποποίηση με άζωτο (N-doped TiO₂), με σίδηρο (Fe-doped TiO₂) και με την συν-τροποποίηση με άζωτο και σίδηρο (N-Fe co-doped TiO₂)^[8]. Στην εργασία αυτή προτείνεται η ενθουλάκωση εμπορικής τιτανίας Evonik P25 σε νανοσωματίδια εναιωρήματος δικτυωμένης-διασταυρωμένης μικροπηκτής συμπολυμερισμένου θερμοαποκρίσιμου πολυμερούς (πόλυ(ν-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) ή P-NiPam), για την ανάπτυξη συστήματος μεταφοράς φαρμάκων^[9]. Ακολουθεί πλήρης χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων (περίθλαση ακτίνων Χ (XRD), φασματοσκοπία micro-Raman, φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), δυναμική σκέδαση φωτός (DLS), μελέτη φωτοκαταλυτικής δράσης και ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)). Για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας, διατηρούνται κυτταρικές καλλιέργειες, προερχόμενες από καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού, τα MDA-MB-231 (έντονα μεταστατικά) και τα MCF-7 (με ήπιο ρυθμό πολλαπλασιασμού)^[10]. Μικροσκοπική παρατήρηση των

μορφολογικών διαφορών και εκτίμηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων γίνεται με σκοπό να δημιουργηθούν καμπύλες ανάπτυξης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Σύνθεση νανοσωματιδίων

Σύνθεση N-doped TiO₂

Η σύνθεση γίνεται με τη μέθοδο sol-gel. Ως πρόδρομη ένωση τιτανίου χρησιμοποιείται το tetrabutyl orthotitanate, με μετέπειτα τροποποίηση με άζωτο. Το διάλυμα θερμαίνεται, μέχρι εξάτμισης του διαλύτη. Το gel, ψήνεται και η τελική σκόνη λειοτριβείται και καθαρίζεται με έκπλυση και φυγοκέντρωση.

Σύνθεση Fe-doped TiO₂

Εφαρμόζεται η μέθοδος sol-gel, με πρόδρομες ενώσεις, το αλκοξείδιο titanium isopropoxide και τον νιτρικό σίδηρο Fe(NO₃)₃·9H₂O. Το μίγμα υδρολύεται με θέρμανση και ακολουθεί φυγοκέντρωση. Έπειτα, γίνεται ξήρανση για απομάκρυνση των διαλυτών, έψηση και λειοτρίβηση.

Σύνθεση N-Fe co-doped TiO₂

Εφαρμόζεται η μέθοδος sol-gel. Ο φορέας τιτανίας (tetrabutyl orthotitanate) αναμιγνύεται με σκόνη Fe(NO₃)₃·9H₂O. Υδροχλωρική υδροξυλαμίνη αναμιγνύεται με αποσταγμένο νερό και άνυδρη αιθανόλη. Το τελικό sol-gel εκπλένεται, ξηραίνεται, ψήνεται και λειοτριβείται για την παραλαβή της νανο-σκόνης.

Σύνθεση P-NiPam

Το μονομερές NIPAM, προστίθεται σε υδατικό διάλυμα άλατος του πολυακρυλικού οξέος, που βρίσκεται στους 70°C σε φιάλη με δυνατότητα αεροστεγούς σφράγισης. Προστίθεται ο παράγοντας διασταύρωσης (cross linker)-μεθυλενμπισακρυλαμίδιο (MBA). Η φιάλη σφραγίζεται αεροστεγώς και έπειτα το σύστημα απαερώνεται για μία ώρα με δυνατή ροή αζώτου υπο ανάδευση. Εισάγεται ο εκκινητής του πολυμερισμού KPS (υπερθεϊκό κάλιο). Το σύστημα παραμένει υπο θέρμανση και ισχυρή ανάδευση. Ο πολυμερισμός λαμβάνει τέλος, ξεσφραγίζοντας τη φιάλη με την εισαγωγή αέρα.

Ενθυλάκωση TiO₂ Evonik P25 σε P-NiPam

Κατόπιν της σύνθεσης δικτυωμένης μικροπηκτής πολυ-ισοπροπυλακρυλαμιδίου, σκοπός είναι η ενθυλάκωση σωματιδίων TiO₂ στα πολυμερικά σωματίδια. Συντίθεται υδατικό εναιώρημα διοξειδίου του τιτανίου και παραμένει, υπο δυνατή ανάδευση για μία ώρα. Το pH ρυθμίζεται στο 1,5. Στη συνέχεια το εναιώρημα προστίθεται ταχιάως σε όγκο πολυμερικού υδατικού διαλύματος. Τα σύνθετα σωματίδια δημιουργούνται και εμφανίζεται υπερκείμενο διαυγές υγρό.

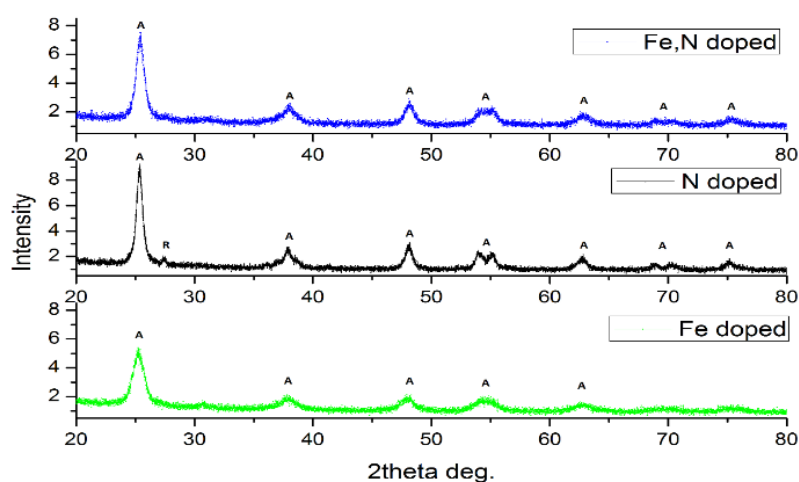
Κυτταρικές Καλλιέργειες

Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα μαστού (MDA-MB-231 και MCF-7) διατηρούνται σε θρεπτικό μέσο DMEM, εμπλουτισμένο με ορό (37°C, CO₂ 5%). Οι καμπύλες ανάπτυξης (χρώση με trypan blue) δημιουργούνται, με εκτίμηση του αριθμού των κυττάρων με χρήση αιμοκυτταρόμετρου, 24 ως 72 ώρες μετά την ανακαλλιέργειά, με και χωρίς την προσθήκη TiO₂.

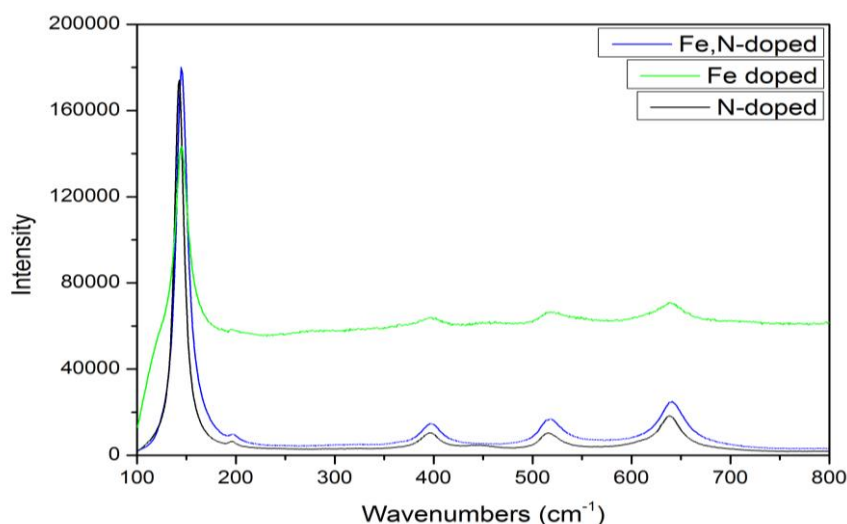
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αποτελέσματα Χαρακτηρισμού

Το ποσοστό του ρουτιλίου σε όλα τα ακτινοδιαγράμματα είναι μικρότερη του 1% και ως κυρίαρχη εμφανίζεται η δομή του ανατάση. Το ποσοστό ανατάση συναντάται με μεγαλύτερη ένταση στο N-doped TiO₂, στη συνέχεια στο Fe-N co-doped TiO₂ και τέλος στο Fe-doped TiO₂. Στη φωτοκαταλυτική δράση, ενεργό ρόλο παίζει και το μέσο μέγεθος του κρυσταλλίτη, που εξάγεται επίσης από τα διαγράμματα Περίθλασης Ακτίνων Χ (Πίνακας 1). Το Fe-doped TiO₂ παρουσιάζει το μικρότερο μέσο μέγεθος κρυσταλλιτών, και αυτό υποδεικνύει καλύτερη φωτο-επαγόμενη συμπεριφορά.



Σχήμα 1. Συγκριτικό διάγραμμα περίθλασης ακτίνων Χ.



Σχήμα 2. Συγκριτικά φάσματα *micro-Raman*.

Στα φάσματα Raman παρατηρήθηκαν διαφορές στις σχετικές εντάσεις των μελετούμενων ειδών. Συγκεκριμένα, υψηλότερη σχετική ένταση παρουσιάζεται στη σκόνη Fe-N doped TiO₂, έπειτα στη N-doped TiO₂ και τέλος στην Fe-doped TiO₂ (Σχήμα 2). Σημειώνεται ότι η ένταση των κορυφών στην περίπτωση του Fe-doped επηρεάζεται και από τον φθορισμό που απαντάται στο δείγμα αυτό.

Πίνακας 1. Συγκεντρωτικός πίνακας εκτίμησης μέσου μεγέθους κρυσταλλιτών

Δείγμα	Μέγεθος Κρυσταλλιτών (nm)
N-doped	≈ 16,3
Fe-doped	≈ 7,71
N-Fe-doped	≈ 11,1

Πίνακας 2. Συγκεντρωτικός πίνακας εκτίμησης ενεργειακού διάκενου

Δείγμα	Ενεργειακό διάκενο (eV)	Μήκος κύματος (nm)
N-doped	2,87	432
Fe-doped	2,12	584
N,Fe-doped	2,38	521

Ο καθαρός ανατάσης διαθέτει ενεργειακό χάσμα 3,2 eV. Με τη φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), παρατηρήθηκαν μειώσεις του ενεργειακού χάσματος. Η μεγαλύτερη μείωση

εμφανίζεται στο Fe-doped TiO₂, ακολουθεί το Fe-N-co-doped TiO₂ και τέλος το N-doped TiO₂ (Πίνακας 2). Επομένως, αναμένεται ότι το Fe-doped TiO₂ θα εμφανίζει καλύτερη φωτοκαταλυτική συμπεριφορά στην περιοχή του ορατού φωτός.

Από μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός σε υδατικά διαλύματα διασποράς, προκύπτουν αποτελέσματα εκτίμησης της υδροδυναμικής ακτίνας (Πίνακας 3) και της τιμής του ηλεκτροκινητικού δυναμικού ζ (z potential) (Πίνακας 4). Διαπιστώθηκε ότι η ύπαρξη του αζώτου, ως φορέα τροποποίησης ευνοεί τη μείωση μεγέθους των νανοσωματιδίων. Κατά τη μέτρηση DLS, το δείγμα μετράται σε μορφή υδατικού εναιωρήματος, που ευνοεί το σχηματισμό συσσωματωμάτων, ακόμη και μετά την υπερηχητική υποβάθμιση του μεγέθους. Από τις τιμές του ηλεκτροκινητικού δυναμικού ζ φαίνεται ότι τα εναιωρήματα είναι αρκετά σταθερά.

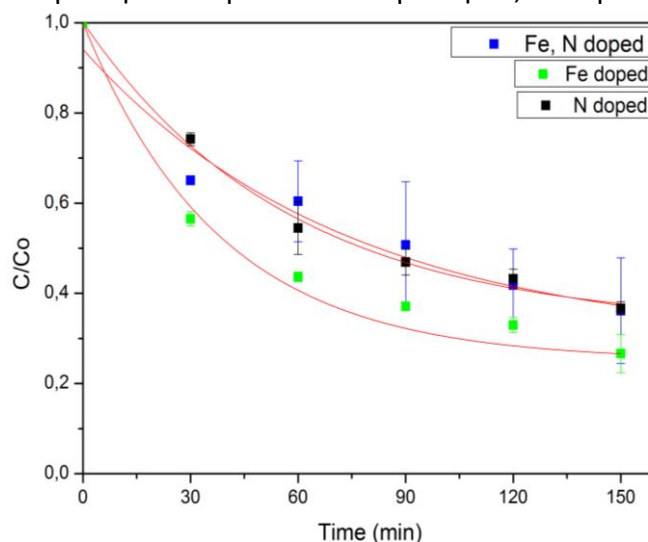
Πίνακας 3. Συγκεντρωτικός πίνακας εκτίμησης μέσης υδροδυναμικής ακτίνας TiO₂ σωματιδίων σε υδατικά διαλύματα διασποράς.

Δείγμα	Z-Average (nm)	Pdl
N-doped TiO ₂	236,9	0,327
Fe-doped TiO ₂	413,7	0,468
Fe-N-doped TiO ₂	190,5	0,351

Πίνακας 4. Συγκεντρωτικός πίνακας εκτίμησης τιμής ηλεκτροκινητικού δυναμικού ζ σε pH=6.

Δείγμα	Zeta potential (mV)	Zeta Deviation (mV)
N-doped TiO ₂	-20	4,92
Fe-doped TiO ₂	-24,6	3,74
Fe-N-doped TiO ₂	-30	0,351

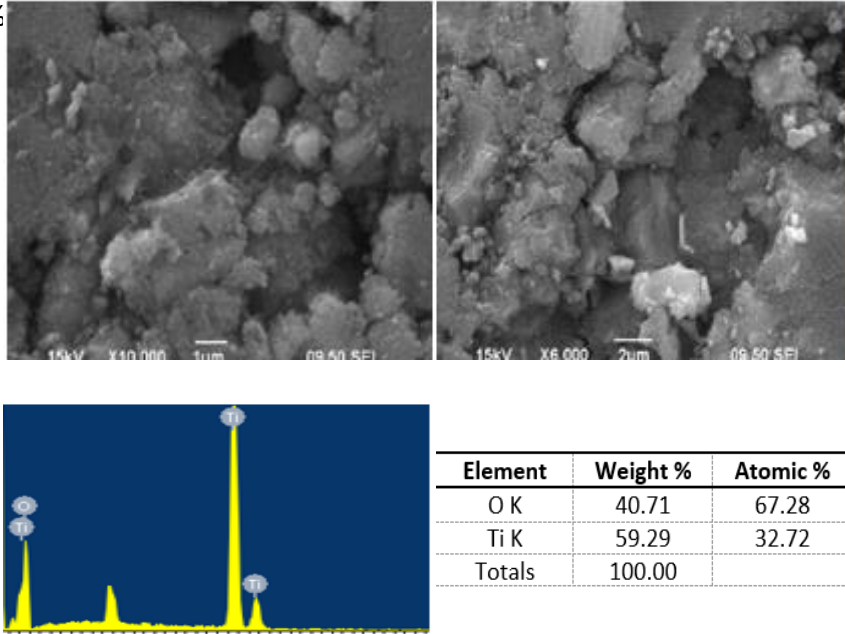
Η φωτοκαταλυτική δράση των τροποποιημένων νανοσωματιδίων TiO₂, εξετάστηκε μέσω της μελέτης του ρυθμού διάσπασης του ρύπου μπλε του μεθυλενίου. Η φωτοκαταλυτική δράση του Fe-doped TiO₂, παρουσιάζεται ικανοποιητικότερη σε σχέση με τα N-doped TiO₂ και Fe-N-doped TiO₂ υπό συνθήκες ορατού (Σχήμα 3). Στα 150 min το ποσοστό αποικοδόμησης του ρύπου είναι 64% για την N-doped, 73% για την Fe-doped και 64% για την N,Fe-doped.



Σχήμα 3. Συγκριτικό διάγραμμα φωτοκαταλυτικής δράσης των N-doped, Fe-N doped και Fe-doped TiO₂.

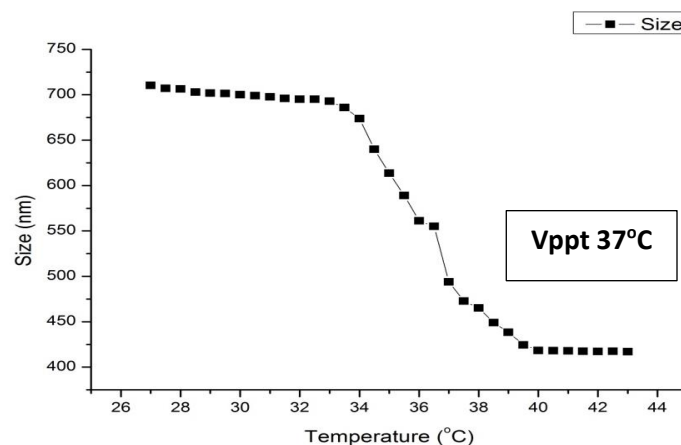
Παρατίθενται ενδεικτικά οι εικόνες που προέκυψαν από την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωση (SEM) για το χημικά τροποποιημένο N-doped TiO₂ (Σχήμα 4). Διαπιστώνονται συσσωματώματα, τα

οποία παρατηρήθηκαν και στα υπόλοιπα δύο δείγματα. Στη στοιχειομετρική ανάλυση του N-doped, εμφανίζεται έλλειψη του αζώτου γιατί η κορυφή που αντιστοιχεί στο άζωτο ταυτίζεται με την κορυφή του Τιτανίου και επικαλύπτεται. Στις άλλες σκόνες, ο σίδηρος κυμαίνεται περίπου σε ποσοστό $\approx 0,2$ wt%



Σχήμα 4. Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) για τα νανοσωματίδια N-doped TiO_2 .

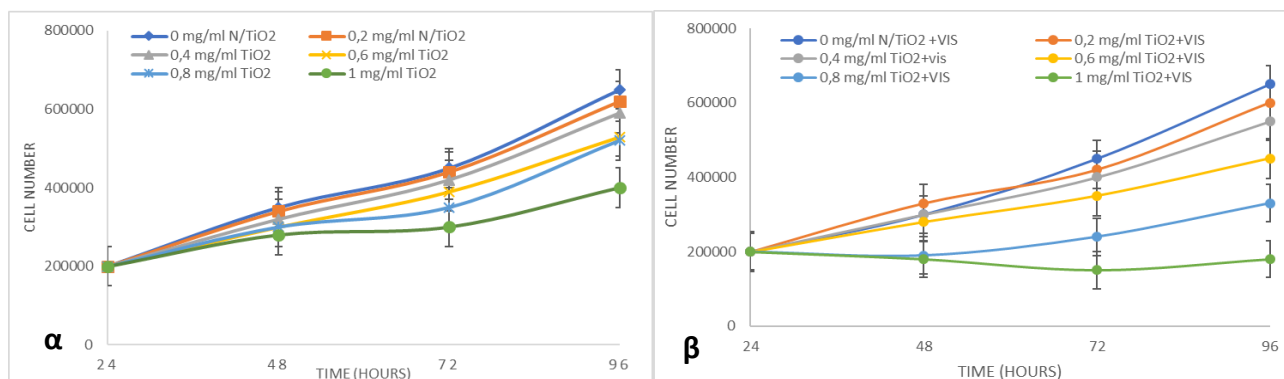
Αναφορικά με την υδροδυναμική διάμετρο των σωματιδίων του θερμοαποκρίσιμου πολυμερούς, παρατηρείται αναμενόμενη συμπεριφορά καθώς με την αύξηση της θερμοκρασίας υπάρχει συρρίκνωση των σωματιδίων. Η θερμοκρασία v_{pvt} (κρίσιμη θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης όγκου volume phase transition temperature) του συστήματος υπολογίστηκε στους 37°C , όπου βιβλιογραφικά επαληθεύεται, ότι πάνω από αυτή τη θερμοκρασία παρατηρείται ταχεία ποσοστιαία απελευθέρωση (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Υδροδυναμική διάμετρος σωματιδίων p-NiPat σε σχέση με τη θερμοκρασία.

Μετά από μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων και των δύο κυτταρικών σειρών, προκύπτει ότι παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων Fe-doped TiO_2 και Fe-N-doped TiO_2 και μετά από ακτινοβολία με ορατή ακτινοβολία για 2 ώρες, δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές, αφού οι καμπύλες δεν διέφεραν από αυτές που εμφανίζουν τα κύτταρα χωρίς την επίδραση κάποιου παράγοντα. Όμως, η παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων N-doped TiO_2 φαίνεται να επιδρά σε

συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0,6 mg/ml μετά από φωτο-ενεργοποίηση (Σχήμα 6) μόνο στα έντονα μεταστατικά κύτταρα MDA-MB-231, ενώ στα MCF-7, δεν παρατηρείται κάποια σημαντική επίδραση.



Σχήμα 6. Καμπύλες ανάπτυξης των έντονα μεταστατικών επιθηλιακών κυττάρων μαστού MDA-MB-231, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων N-doped TiO₂ (α) πριν και (β) μετά την φωτο-ενεργοποίηση με ορατή ακτινοβολία. Οι μέσες τιμές των αποτελεσμάτων προκύπτουν μετά από 3 επαναλήψεις των δοκιμασιών. Πραγματοποιείται ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA), με λογισμικό SPSS.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Φαίνεται ότι οι συνθέσεις των νανοσωματιδίων προσέδωσαν στα παραγόμενα νανοσωματίδια τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως προέκυψε από τις τεχνικές χαρακτηρισμού που επιλέχθηκαν. Αναφορικά με τη μέθοδο ενθυλάκωσης, δείχνει να είναι υποσχόμενη επιλογή για δημιουργία συστήματος μεταφοράς φαρμάκων. Σχετικά με την κυτταροτοξικότητα, αποδεικνύεται ότι εμφανίζει αντικαρκινική δράση το N-doped TiO₂ μετά από φωτο-ενεργοποίηση. Πιθανά να απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος ακτινοβολήσης. Σε εξέλιξη είναι πειράματα κυτταροτοξικότητας, με τη χρωματομετρική μέθοδο MTT, πειράματα χημικής τροποποίησης με άλλους τροποποιητές και πειράματα ενθυλάκωσης των τροποποιημένων νανοσωματιδίων TiO₂ στο προαναφερθέν πολυμερές, με σκοπό την αριστοποίηση της πειραματικής διαδικασίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε με υποτροφία του ΙΚΥ, η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «Ενίσχυση Μεταδιδακτόρων Ερευνητών/Ερευνητριών», από τους πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση» με άξονες προτεραιότητας 6, 8, 9 και συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο -ΕΚΤ και το ελληνικό δημόσιο».

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Y. Zhang, A. Unnikrishnan, S.S. Deepa, Y. Liu, Y. Li, Y. Ikeno, D. Sosnowska, H. Van Remmen, A. Richardson. *Redox Biol.* 11 (2017) 30–37.
- [2] A. Fujishima, *Comptes Rendus Chimie*, 9 (2006) 750–760.
- [3] N. Wu, Y. Wang, Y. Lei, B. Wang. *CERAM INT*, 40 (2014) 2017–2022.
- [4] Z.F. Yin, L. Wu, H.G. Yang, Y.H. Su. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (14) (2013) 4844–4858.
- [5] R. Fagan, D. McCormack, S. Pillai, D. Dionysiou. *Mat. Sci. Semicon. Proc.* 42 (2016) 2–14.
- [6] A. Yousefi, A. Allahverdi, P. Hejazi. *Constr Build Mater.* 41 (2013) 224–230.
- [7] W. H. Suh, K.S. Suslick, G.D. Stucky, Y.H. Suh. *Prog Neurobiol.*, 87 (3) (2009) 133–170.
- [8] C.A. Coutinho, R.K. Harrinath, V.K. Gupta *Colloids Surf. A Physicochem Eng. Asp.* 318 (1–3) (2008) 111–121.
- [9] B. Strachota, A. Strachota, M. Slouf, J. Brus, V. Cimrova. *Soft Matter*, 15 (2019) 752–769.
- [10] N. Lagopati, E.P. Tsilibary, P. Falaras, P. Papazafiri, E.A. Pavlatou, E. Kotsopoulou, P. Kitsiou. *Int. J. Nanomedicine* 9 (2014) 3219–3230.