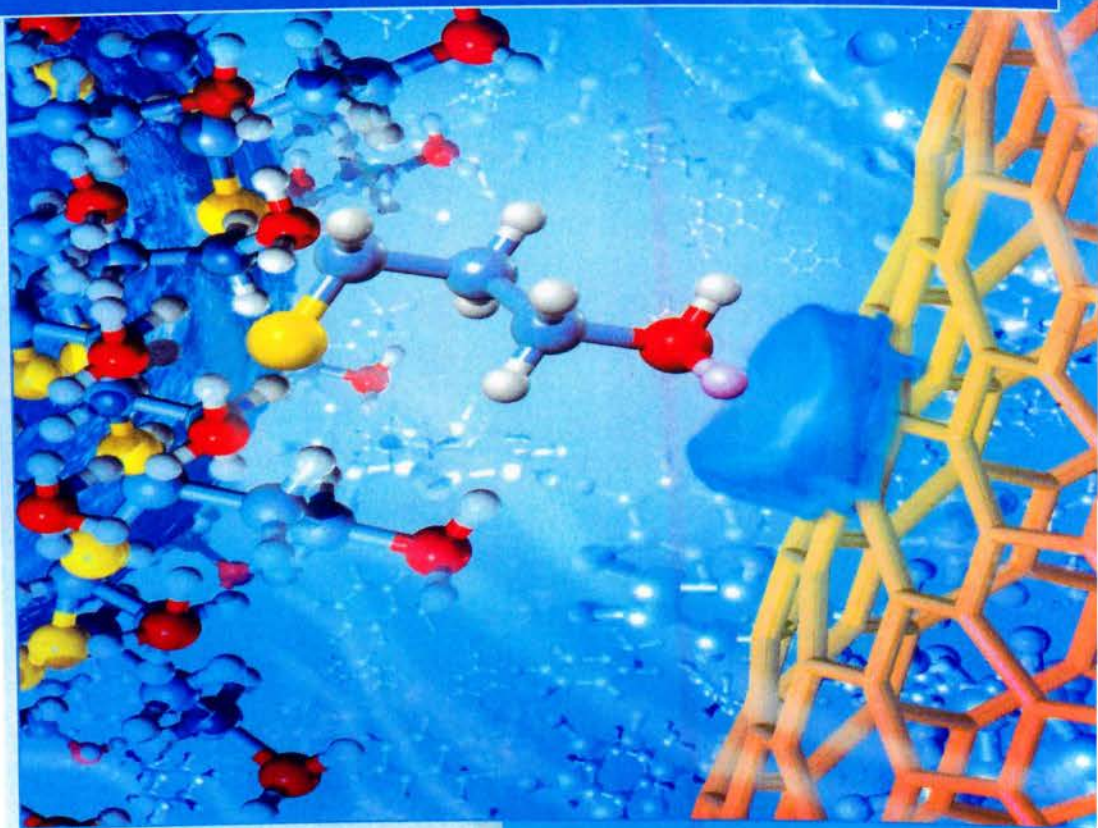


ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

561
ΚΑ

ΤΕΙ ΠΕΙΡΑΙΑ

ΟΙ ΑΝΘΡΑΚΟΪΝΕΣ ΚΑΙ ΤΑ ΑΝΘΡΑΚΟΝΗΜΑΤΑ ΩΣ
ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ
ΙΑΤΡΙΚΗ



ΤΜΗΜΑ ΚΛΩΣΤΟΪΦΑΝΤΟΥΡΓΙΑΣ

ΟΝΟΜΑΤΑ ΣΠΟΥΔΑΣΤΩΝ: Γκάση Ελένη
Σιούγρο Κωνσταντίνα

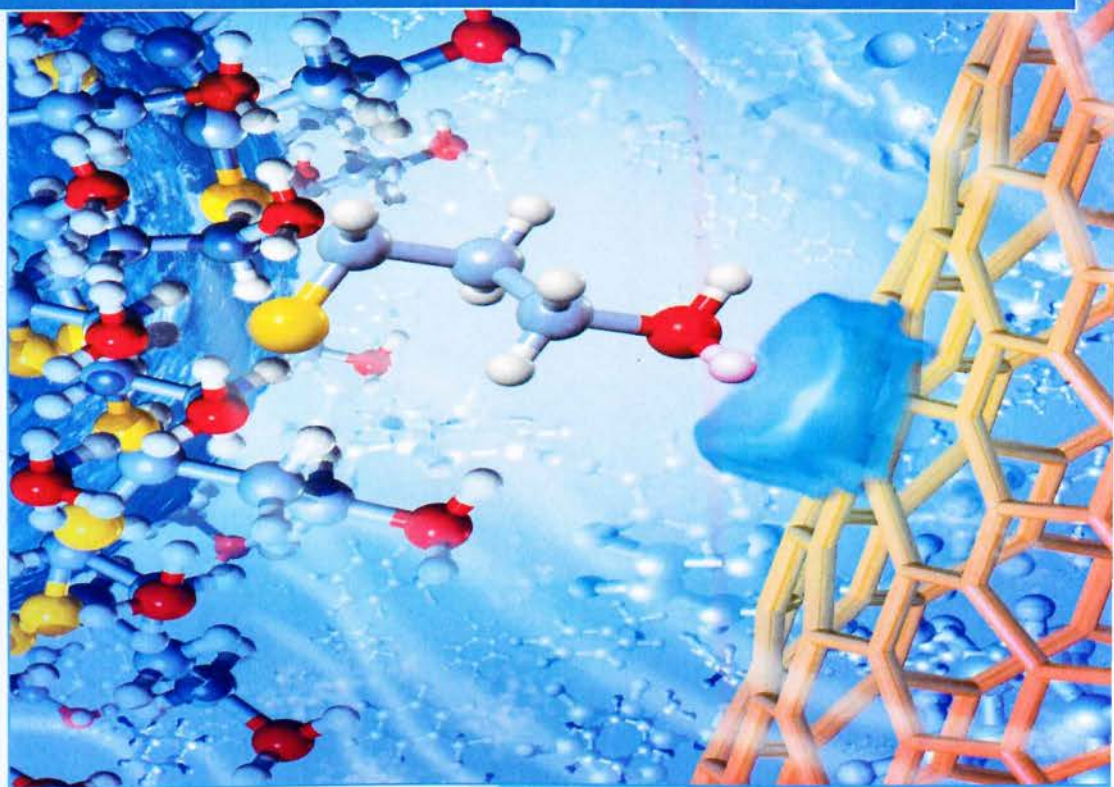
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Τσουτσαίος Αθανάσιος

[ΑΚΑΔ. ΕΤΟΣ 2011-2012]

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΕΙ ΠΕΙΡΑΙΑ

ΟΙ ΑΝΘΡΑΚΟΪΝΕΣ ΚΑΙ ΤΑ ΑΝΘΡΑΚΟΝΗΜΑΤΑ ΩΣ
ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ
ΙΑΤΡΙΚΗ



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΤΕΙ ΠΕΙΡΑΙΑ

ΤΜΗΜΑ ΚΛΩΣΤΟΥΦΑΝΤΟΥΡΓΙΑΣ

ΟΝΟΜΑΤΑ ΣΠΟΥΔΑΣΤΩΝ: Γκάση Ελένη
Σιούγρο Κωνσταντίνα

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Τσουτσαίος Αθανάσιος

[ΑΚΑΔ. ΕΤΟΣ 2011-2012]

"Για την εκπόνηση της εργασίας αυτής θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον καθηγητή Αθανάσιο Τσουτσαίο για την ανάθεση της παρούσας εργασίας και την εμπιστοσύνη που μας έδειξε, καθώς και για τις ιδέες και συμβουλές που μας παρείχε κατά την διάρκεια της εργασίας."

SUMMARY

Carbon nanotubes (CNTs) are considered potential biomedical materials because of their flexible structure and propensity for chemical functionalization. Carbon nanotubes and carbon nanofibers have long been investigated for applications in composite structural materials, semiconductor devices, and sensors. With the recent well-documented ability to chemically modify nanofibrous carbon materials to improve their solubility and biocompatibility properties a whole new class of bioactive carbon nanostructures has been created for biological applications. This dissertation focuses on the latest applications of carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine and medical textiles.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ανθρακονήματα εξετάζονται ως πιθανά βιοϊατρικά υλικά, λόγω της ευέλικτης δομής τους και της δυνατότητας χημικής επεξεργασίας. Εδώ και καιρό οι ανθρακοΐνες και τα ανθρακονήματα έχουν διερευνηθεί για διάφορες εφαρμογές σε σύνθετα δομικά υλικά, σε συσκευές ημιαγωγών και σε αισθητήρες. Με την πρόσφατη καλά τεκμηριωμένη ικανότητα των νανοϊνώδων υλικών από άνθρακα να προκαλούν χημική μετατροπή για να βελτιωθεί η διαλυτότητά τους και τις ιδιότητες της βιοσυμβατότητάς τους, μία νέα κατηγορία των βιοενεργών νανοδομών από άνθρακα έχουν δημιουργηθεί για βιολογικές εφαρμογές. Η πτυχιακή εργασία επικεντρώνεται στις τελευταίες εφαρμογές των ανθρακοϊνών και των ανθρακονημάτων στην αναγεννητική ιατρική και στα «έξυπνα» ιατρικά υφάσματα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πολλοί ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη των βασικών ιδιοτήτων των ανθρακοϊνών (CNF) και των ανθρακονημάτων (CNT) και έχουν διερευνήσει τις δυνατότητες της χρήσης τους για διάφορες τεχνολογικές εφαρμογές στον κόσμο της ιατρικής έρευνας. Γίνονται έρευνες ιδιαίτερα στους τομείς της αποτελεσματικής χορήγησης των φαρμάκων και των μεθόδων με ικρίωματα για τη θεραπεία ασθενειών και την παρακολούθηση της υγείας. Οι έρευνες έχουν αποδείξει ότι οι νανοσωλήνες άνθρακα έχουν τη δυνατότητα να αλλάξουν τον τρόπο χορήγησης των φαρμάκων και να βελτιώσουν τις μεθόδους με ικρίωματα.

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη και η ανάλυση των εφαρμογών των ανθρακοϊνών (CNF) και των ανθρακονημάτων (CNT) στην ιατρική. Τα νανοϋλικά αυτά χρησιμοποιούνται ως ικρίωματα για την επίλυση προβλημάτων στην αναγέννηση των μελών του ανθρώπινου οργανισμού, όπως είναι τα οστά και οι νευρικοί ιστοί. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται ως μεταφορείς των φαρμάκων και των γονιδίων στους προσβεβλημένους ιστούς.

- Στο **πρώτο κεφάλαιο** περιγράφεται η σύνθεση των ανθρακοϊνών και των αναθρακονημάτων. Αρχικά, γίνεται η αναφορά στα φουλερένια, τα οποία είναι η βασική δομή τους και στη συνέχεια αναφέρονται οι τύποι και η διαδικασία παραγωγής των ανθρακονημάτων.
- Στο **δεύτερο κεφάλαιο** περιγράφονται οι επεξεργασίες των ανθρακοϊνών και ανθρακονημάτων για την βιοσυμβατότητά τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Συγκεκριμένα, λόγω της μη διαλυτοποίησή τους στους περισσότερους διαλύτες και της τάσης τους να συρρικνώνονται όταν έρχονται σε επαφή με αυτούς, έχει ως αποτέλεσμα να δυσκολεύεται η βιοσυμβατότητά τους με τα βιολογικά συστήματα.
- Στο **τρίτο κεφάλαιο** μελετάται η χρήση των ανθρακοϊνών και ανθρακονημάτων στην αναγέννηση των οστών. Έχοντας εξαιρετική μηχανική αντοχή, τα ανθρακονήματα και οι ανθρακοϊνες χρησιμοποιούνται ως ικρίωματα στον σχηματισμό των οστικών ιστών.

- Στο **τέταρτο κεφάλαιο** αναλύονται οι εφαρμογές των ανθρακοϊνών και ανθρακονημάτων στην αναγέννηση των νευρικών ιστών. Τα νανοχαρακτηριστικά τους, καθώς και οι εξαιρετικές ηλεκτρικές, μηχανικές, και βιοσυμβατικές ιδιότητες, είναι κατάλληλα για την βελτίωση των νευρικών ιστών και για την ανάπτυξη νέων βιολογικών ικριωμάτων.
- Στο **πέμπτο κεφάλαιο** αναλύεται η διαδικασία μεταφοράς των φαρμάκων και των γονιδίων με τη χρήση των ανθρακοϊνών και ανθρακονημάτων. Περιγράφεται ο τρόπος που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την στοχοθετημένη χορήγηση των φαρμάκων, αναλύονται οι μηχανισμοί για το πώς τα ανθρακονήματα εισέρχονται στα κύτταρα, καθώς και οι εφαρμογές τους στην παράδοση των θεραπευτικών ουσιών και γονιδίων.
- Τέλος, στο **έκτο κεφάλαιο** της εργασίας γίνεται αναφορά στις επιπτώσεις της τοξικότητας των ανθρακοϊνών και ανθρακονημάτων στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι τοξικότητές τους ήταν αναμενόμενες λόγω της μη βιοαποικοδομησιμότητας και της βελονοειδής μορφής με μέγεθος και σχήμα που μοιάζουν με αμιάντο. Είναι γνωστό ότι η εισπνοή του αμιάντου μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ασθένειες.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Κεφάλαιο 1 : Δομή των ανθρακονημάτων (CNT) και ανθρακοϊνών (CNF).....12

1.1. Φουλερένια

.....12

1.2. Ανθρακονήματα (CNT) και ανθρακοϊνες (CNF)

.....13

1.3. Μονοφλοιικά ανθρακονήματα (simple walled carbonanotubes, SWCNT) και πολυφλοιικά ανθρακονήματα (multi walled carbonanotubes, MWCNT)

.....17

Κεφάλαιο 2 : Η λειτουργικότητα των ανθρακονημάτων (CNT).....21

2.1. Οι ανάγκες των επεξεργασιών των ανθρακονημάτων (CNT) και των ανθρακοϊνών (CNF)

.....21

2.1.1. Οι επεξεργασίες των ανθρακονημάτων (CNT) και των ανθρακοϊνών (CNF)

.....22

2.1.2. Συγκεκριμένες εφαρμογές των ανθρακονημάτων (CNT) και των ανθρακοϊνών (CNF)

.....24

2.1.3. Η λειτουργικότητα των ανθρακονημάτων (CNT) και των ανθρακοϊνών (CNF) για την αναγέννηση των οστών

.....24

2.1.4. Η λειτουργικότητα των ανθρακονημάτων (CNT) και των ανθρακοϊνών (CNF) για την αναγέννηση των νεύρων

.....27

Κεφάλαιο 3 : Εφαρμογές των ανθρακονημάτων (CNT) και των ανθρακοϊνών (CNF) για την αναγέννηση των οστών.....32

3.1. Τα ανθρακονήματα (CNT) και οι ανθρακοϊνες (CNF) ως ικρίωματα
.....34

3.1.1. Πιθανοί μηχανισμοί της αυξημένης βιοσυμβατότητας των ανθρακονημάτων (CNT) και των ανθρακοϊνών (CNF) ως ικρίωματα

.....36

Κεφάλαιο 4 : Εφαρμογές των ανθρακονημάτων (CNT) και των ανθρακοϊνών (CNF) για την αναγέννηση των νευρικών ιστών.....43

4.1. Προβλήματα και προκλήσεις για τα προβλήματα των νευρικών ιστών και οι θεραπείες.

.....44

4.1.1. Οι ανθρακοϊνες (CNF) για την αναγέννηση των νευρικών ιστών
.....46

4.1.2. Τα ανθρακονήματα (CNT) για την αναγέννηση των νευρικών ιστών
.....50

Κεφάλαιο 5 : Μεταφορά φαρμάκων και γονιδίων μέσω των ανθρακονημάτων (CNT).....57

5.1. Κυτταρική απορρόφηση μέσω των ανθρακονημάτων (CNT).....58

5.1.1. Εσωτερίκευση των ανθρακονημάτων (CNT) μέσω της ενδοκύττωσης.....59

5.1.2. Εσωτερίκευση των ανθρακονημάτων (CNT) μέσω ανεξάρτητων υποδοχέων (ενδοκύττωση): παρεμβολή και διάχυση μέσω των διπλοστοιβάδων των λιπιδίων.....61

5.1.3. Εφαρμογές των ανθρακοϊνών (CNF) και των ανθρακονημάτων (CNT) στην μεταφορά γονιδίων.....64

α. Μεταφορά των χημειοθεραπευτικών ουσιών.....64

β. Μεταφορά των γονιδίων.....66

Κεφάλαιο 6 : Οι επιπτώσεις των ανθρακονημάτων (CNT) και των ανθρακοϊνών (CNF) στον ανθρώπινο οργανισμό.....76

6.1. Η τοξικότητα των ανθρακονημάτων (CNT) και των ανθρακοϊνών (CNF) στους πνεύμονες.....76

6.1.1 Μηχανισμοί και παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα των ανθρακονημάτων (CNT) και των ανθρακοϊνών (CNF).....80

Συμπεράσματα.....86

Προτάσεις για μελλοντικές εργασίες.....87

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Κεφάλαιο 1^ο

Εικόνα 1.1.: Νανοσωλήνας άνθρακα	12
Εικόνα 1.2.: Φουλερένιο	13
Εικόνα 1.3.: Ιδανική μορφή	13
Εικόνα 1.4.: Τύποι νανοσωλήνων	14
Εικόνα 1.5.: Σχηματισμός νανοσωλήνα	14
Εικόνα 1.6.: Τύποι νανοσωλήνων	15
Εικόνα 1.7.: Τα φύλλα που αποτελούν έναν πολυφλοιικό νανοσωλήνα (MWCNT)	17
Εικόνα 1.8.: Μονοφλοιικός νανοσωλήνας (SWCNT) και πολυφλοιικός νανοσωλήνας (MWCNT)	18

Κεφάλαιο 2^ο

Εικόνα 2.1.: Σχηματική Παράσταση των SWCNT	22
Εικόνα 2.2.: Οξειδωση με καρβοξυλικές ομάδες	23

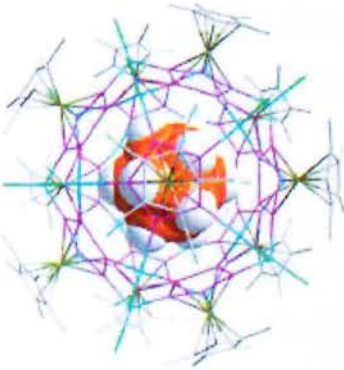
Εικόνα 2.3.: Εικόνες του HA	26
Εικόνα 2.4.: Ανάπτυξη και διακλάδωση των νευρικών ιστών	28
Κεφάλαιο 3⁰	
Εικόνα 3.1.: Ικρίωμα οστού	32
Εικόνα 3.2.: Μηχανική υποστήριξη οστών	33
Εικόνα 3.3.: Αγγείωση και αναδιοργανοποίηση του οστού	33
Εικόνα 3.4.: Μυοβλαστικά κύτταρα	36
Εικόνα 3.5.: Οστική αναγέννηση με προσθήκη θεραπευτικών ή οστεογενών ουσιών	37
Εικόνα 3.6.: Στάδια αναγέννησης οστών	39
Κεφάλαιο 4⁰	
Εικόνα 4.1.: Η βέλτιστη επέκταση νευρικών κυττάρων για PCU/CNF νανοσύνθετα	48
Εικόνα 4.2.: Σάρωση νανοσύνθετων ηλεκτρονίων CNF.	49
Εικόνα 4.3.: Η αυτό-οργάνωση των νευρικών δικτύων σε μικρές συστοιχίες CNT.	51
Κεφάλαιο 5⁰	
Εικόνα 5.1.: Εικόνες της HeLa	60

Εικόνα 5.2.: Εικόνες κυττάρων που επωάζονται	60
Εικόνα 5.3.: a) CNTs που δεν έχουν οδηγηθεί και b) CNTs που έχουν οδηγηθεί στα κύτταρα από τα μαγνητικά πεδία	63
Εικόνα 5.4.: Σχηματική παράσταση ενός συζευγμένου CNT για την παράδοση ΡΤΧ	65
Εικόνα 5.5.: Ο θάνατος των καρκινικών κυττάρων από τα συζευγμένα CNT	69
Εικόνα 5.6.: Η μέθοδος VACNFs που καλλιεργείται σε υποστρώματα	70
Εικόνα 5.7.: Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού GFP όπου δείχνει την «αποικία» κυττάρων (Κινέζικων χάμστερ) μετά από 22 ημέρες καλλιέργειας	71
Κεφάλαιο 6⁰	
Εικόνα 6.1.: Παρακολούθηση και η παράδοση των γονιδίων σε δυο κυτταρικούς πληθυσμούς	77
Εικόνα 6.2.: Ιστοπαθολογία του ιστού των πνευμόνων από ποντίκια	78
Εικόνα 6.3.: Τα μήκη των ινών που μπορούν να επηρεάσουν την κάθαρση από τα μακροφάγα.	81
Εικόνα 6.4.: Η μειωμένη επιβίωση των ανθρώπινων ινοβλαστικών κυττάρων	82

Κεφάλαιο 1

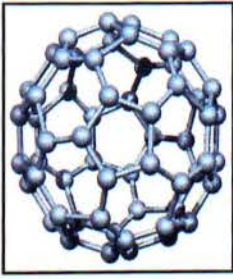
Δομή των ανθρακοϊνών και ανθρακονημάτων

1.1. Φουλερένια

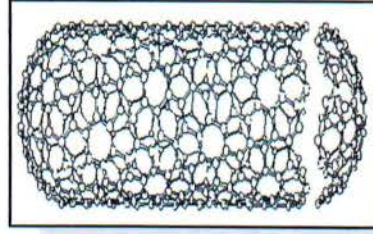


Εικ.1.2. Φουλερένιο

Τα φουλερένια είναι ανθρακικές δομές με σφαιρικό σχήμα. Το 1985, ο Kroto, ο Heath, Brien, Curl και ο Smalley ανακάλυψαν ότι όταν εξαερώνεται ο γραφίτης υπό την επίδραση μιας δέσμης λέιζερ μέσα σε ρεύμα ηλίου (He), δημιουργούνται μόρια αρκετά σταθερά, που αποτελούνται από έναν μεγάλο (32-90) αριθμό ατόμων άνθρακα. Το πιο γνωστό φουλερένιο είναι το C_{60} που είναι το σταθερότερο και αποτελείται από 60 άτομα άνθρακα. Η συλλογή όλων των C_{60} ονομάστηκαν φουλερένια. Το όνομά τους το πήραν από τον αρχιτέκτονα **Buckminster Fuller** που είχε κατασκευάσει παρόμοιες δομές.



(α)

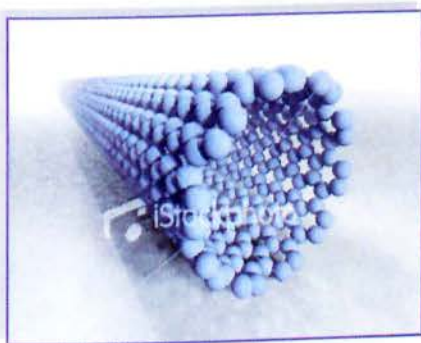


(β)

Εικ.1.2. Ιδανική δομή (α) του C₆₀ και (β) ενός SWCNT (μονοφλοιϊκού νάνο-σωλήνα άνθρακα)

Η διάμετρος τους κυμαίνεται μεταξύ 0,7 και 1,5 nm. Με βάση τη διάμετρό τους θεωρούνται μεγάλα μόρια, συγκριτικά όμως με τα οργανικά μόρια είναι αρκετά μικρά. Τα μόρια αυτά γενικά, είναι σταθερά και για να διασπαστούν οι δεσμοί μεταξύ των ανθράκων απαιτούνται θερμοκρασίες 1000 °C και άνω. Η επιφάνειά τους αποτελείται από πενταμελείς και εξαμελείς δακτυλίους άνθρακα. Οι πενταμελείς δακτύλιοι άνθρακα δίνουν την απαραίτητη θετική καμπυλότητα για να πάρει σφαιρική μορφή το μόριο. Για τον σκοπό αυτό αρκούν το πολύ 12 πενταμελείς δακτύλιοι. Σημαντικό ρόλο παίζει και η θέση των πενταμελών δακτυλίων για την σταθερότητα του μορίου. Όταν οι πενταμελείς δακτύλιοι συνορεύουν, τότε το μόριο δεν είναι σταθερό. Για να σταθεροποιηθούν, χρησιμοποιούνται άτομα της ΙΑ ομάδας του περιοδικού πίνακα για να σχηματίσουν δεσμούς με τους άνθρακες του μορίου.

1.1.2. Ανθρακονήματα (CNT) και ανθρακοΐνες (CNF)

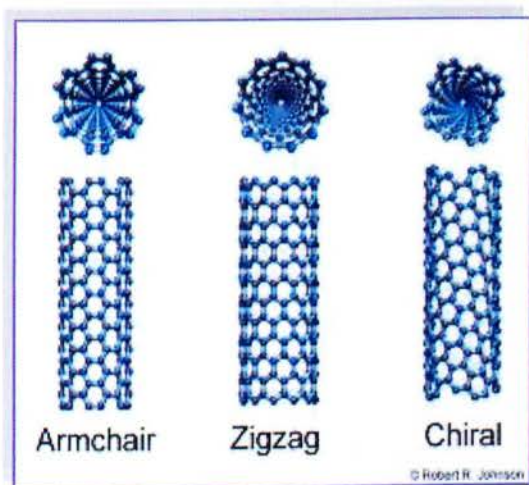


Οι νανοσωλήνες άνθρακα (Carbon-NanoTubes, CNTs) ανακαλύφθηκαν το 1991 από τον Iijima. Ανάλογα με τη διαδικασία της ανάπτυξης, οι νανοσωλήνες, μπορούν επιλεκτικά να παραχθούν με ιδιότητες που κυμαίνονται από 1 έως 15 μm σε μήκος και διάμετρο 2 έως 100 nm.

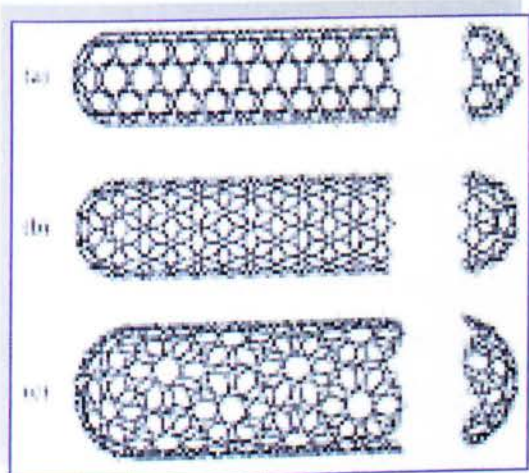
Εικ.1.3. Νανοσωλήνας άνθρακα Είναι περίπου 10.000 φορές λεπτότεροι από μια

ανθρώπινη τρίχα. Είναι ομόκεντροι κύλινδροι από γραφίτη, κλειστοί σε κάθε άκρο με πενταμελείς δακτυλίους. Όταν οι νανοσωλήνες ομαδοποιούνται έχουμε τις λεγόμενες συστοιχίες νανοσωλήνων. Όμως ο τρόπος αναδίπλωσης του φύλλου γραφίτη δεν είναι μοναδικός. Ανάλογα με τον τρόπο διπλώματος προκύπτει η ονοματολογία και ο χαρακτηρισμός του νανοσωλήνα.

Αν η δεξιά πλευρά ενός φύλλου γραφίτη, περιστραφεί κατά την οριζόντια διεύθυνση ώστε να συμπέσει με την δεξιά πλευρά, τότε προκύπτει ο νανοσωλήνας zig-zag. Αν περιστραφεί η άνω πλευρά κατά την κάθετη διεύθυνση ώστε να συμπέσει με την κάτω πλευρά, τότε δημιουργείται ο σωλήνας τύπου armchair. Αν η περιστροφή γίνεται με οποιοδήποτε άλλο τρόπο, πχ. με τέτοιο τρόπο ώστε το άνω αριστερό άκρο να ενωθεί με το κάτω δεξιό, τότε σχηματίζεται ο σωλήνας τύπου chiral.



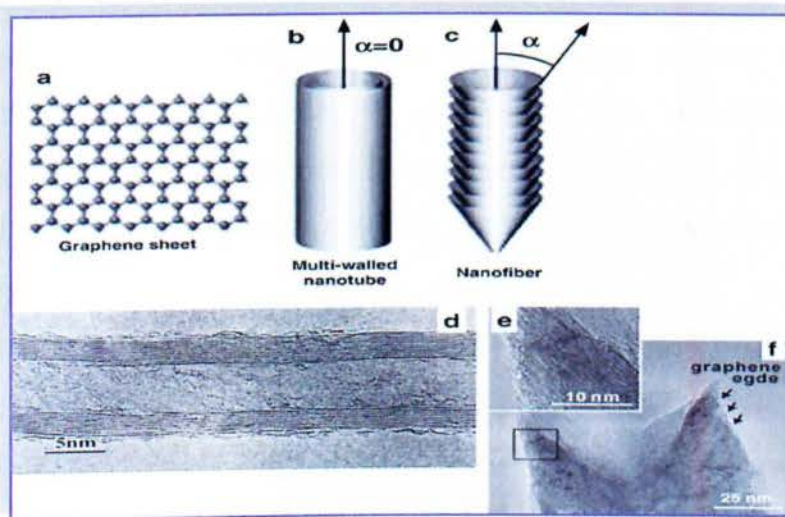
Εικ.1.4. Τύποι νανοσωλήνων (a) armchair, (b) zig-zag, (c) chiral [βιβλ.27]



Εικ.1.5. Σχηματισμός νανοσωλήνα ύστερα από δίπλωμα ενός φύλλου γραφίτη και κάλυμμα κάθε άκρου με το μισό ενός μορίου φουλερενίου [βιβλ.26]

Μπορούμε να φανταστούμε τα ανθρακονήματα ως φόρμα, όταν ένα φύλλο γραφενίου είναι τυλιγμένο μέσα σε ένα κύλινδρο. Μεταξύ των διαφόρων ειδών των νανοϋλικών, τα ανθρακονήματα και οι ανθρακοΐνες έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τις μηχανικές, ηλεκτρικές, θερμικές, οπτικές και δομικές τους ιδιότητες. Τα ανθρακονήματα έχουν καλά οργανωμένα τα άτομα. Οι κυκλικές νανοδομές, που αποτελούνται από άτομα άνθρακα συνδεδεμένα μεταξύ τους μέσω sp^2 , το οποίο είναι ισχυρότερο από τα sp και sp^3 , και είναι ο βασικότερος παράγοντας που καθιστά τα ανθρακονήματα να έχουν εξαιρετική μηχανική δύναμη και υψηλή ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα.

Αντίθετα, οι ανθρακοΐνες έχουν λιγότερο οργανωμένα τα άτομα. Η ανθρακοΐνα σχηματίζεται, όταν ένα φύλλο γραφενίου κάνει καμπύλη με γωνία α , έτσι ώστε να δημιουργηθούν στοίβες κύβων άνθρακα, ενώ τα ανθρακονήματα δεν έχουν γωνία ($\alpha=0$). Τα μεγέθη των ανθρακοΐνων μπορούν να είναι από 3,5 nm μέχρι εκατοντάδες νανόμετρα σε διάμετρο και μερικά μικρόμετρα σε μήκος.



Εικ.1.6. (α) φύλλο γραφενίου, (β) CNT, (γ) CNF, (δ) MWCNT, (ε) και (ς)CNF [βιβλ.1,2,3]

Στα άκρα των κυλίνδρων γραφίτη δεν υπάρχουν ελεύθεροι δεσμοί, αλλά αυτά καλύπτονται από κατάλληλες ημισφαιρικές δομές παρόμοιες με αυτές των φουλερενίων. Φανταζόμαστε, ένα νανοσωλήνα σαν ένα στρώμα γραφίτη, το οποίο έχει τυλιχτεί κατά τέτοιο τρόπο ώστε η αρχή και το τέλος του να συμπέσουν.

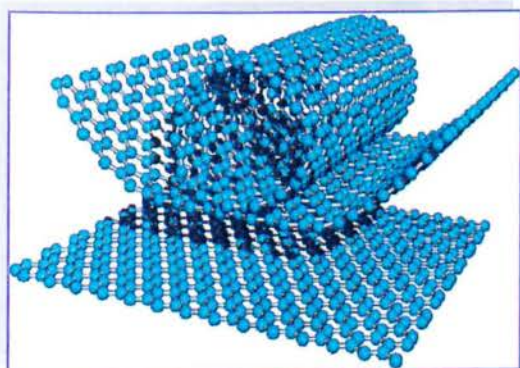
Οι νανοσωλήνες χαρακτηρίζονται τόσο από πενταμελείς όσο και εξαμελείς δακτυλίους άνθρακα. Αν οι πενταμελείς δακτύλιοι βρίσκονται απέναντι από επταμελείς τότε ο νανοσωλήνας αποκτά κυρτότητα. Ωστόσο, η απόκλιση από τον εξαμελή αποτελούν και οι επταμελείς δακτύλιοι, οι οποίοι σε αντίθεση με τους πενταμελείς, δίνουν αρνητική καμπυλότητα στο νανοσωλήνα. Επίσης, ο σωστός συνδυασμός πενταμελών και επταμελών δακτυλίων μπορούν να κάνουν εφικτή την ένωση ενός νανοσωλήνα με κάποιον άλλον, διαφορετικής δομής. Κατά αυτό τον τρόπο μπορούν να δημιουργηθούν ετεροεπαφές όπως μετάλλου - ημιαγωγού.

Οι νανοσωλήνες άνθρακα μπορούν να παρασκευαστούν μέσω των παρακάτω τεχνικών:

- Εξάχνωση ηλεκτροδίων άνθρακα με τη χρήση ηλεκτρικού τόξου εκκένωσης.
- Φωτοδιάσπαση γραφίτη με τη χρήση λέιζερ. Ένα κομμάτι άνθρακα εξατμίζεται με ακτινοβολία από λέιζερ σε υψηλή θερμοκρασία και αδρανή ατμόσφαιρα. Οι παραγόμενοι σωλήνες έχουν μικρή διασπορά ως προς τη διάμετρο.
- Καταλυτική χημική απόθεση από ατμό. Αέριες ενώσεις του άνθρακα (συνήθως υδρογονανθράκων ή μονοξειδίου του άνθρακα) διασπώνται καταλυτικά με τη χρήση μεταλλικών καταλυτών (Fe, Co, Ni) υποστηριγμένων σε υποστρώματα οξειδίων μετάλλων ή αιωρούμενων στην αέρια φάση.

Τα προϊόντα μπορούν να είναι πολυφλοιικοί νανοσωλήνες ή μονοφλοιικοί ανάλογα με τις παραμέτρους της μεθόδου. Γενικά, ενώ οι πολυφλοιικοί νανοσωλήνες μπορούν να συντεθούν και χωρίς τη χρήση καταλύτη, οι μονοφλοιικοί απαιτούν την παρουσία του. Το μέγεθος μάλιστα των καταλυτικών σωματιδίων καθορίζει και τη διάμετρο του νανοσωλήνα.

1.1.3. Μονοφλοιικά (simple-walled carbon nanotubes, SWCNT) και πολυφλοιικά (multi-walled carbon nanotubes, MWCNT)



Οι νανοσωλήνες άνθρακα έχουν εξωτερικές διαμέτρους από 4 μέχρι 30nm και μήκος μέχρι 1μm. Οι σωλήνες αυτοί αποτελούνται από με ένα κεντρικό σωλήνα όπου περιβάλλεται από έναν ή

Εικ.1.7. φύλλα γραφίτη [βιβλ.24] περισσότερους μη συνδεδεμένους κυλίνδρους γραφίτη ομόκεντρα τοποθετημένους. Οι εσωτερικοί σωλήνες έχουν διαμέτρους της τάξης των 2,2 nm. Η ανάλυση διάθλασης ηλεκτρονίων έδειξε ότι ο άξονας κρυστάλλου από τα φύλλα γραφίτη σε μερικούς σωλήνες είχαν μια ελικοειδή στοίχιση σχετικά με τον άξονα των σωλήνων. Αυτού του είδους οι νανοσωλήνες ονομάστηκαν πολυφλοιικοί νανοσωλήνες άνθρακα (MWCNTs) λόγω της κλίμακας μεγέθους των διαμέτρων τους. Η απόσταση μεταξύ των διαδοχικών στρωμάτων άνθρακα στους πολυφλοιικούς νανοσωλήνες μπορεί να πάρει διάφορες τιμές.

Οι μονοφλοιικοί νανοσωλήνες άνθρακα (SWCNTs) δημιουργούνται από ένα ενιαίο φύλλο γραφίτη. Οι διάμετροί τους κυμαίνονται από 0,4 ως 2-3 nm, και το μήκος τους είναι συνήθως της τάξης των μικρομέτρων. Όταν οι νανοσωλήνες ομαδοποιούνται έχουμε τις λεγόμενες συστοιχίες νανοσωλήνων (nanotubes bundles).

Αυτές οι μοναδικές δομές οδηγούν σε μοναδικές ιδιότητες, για παράδειγμα έχουν αντοχή μεγαλύτερη από αυτή του χάλυβα και πυκνότητα μικρότερη από αυτή του αλουμινίου.



SWNT



MWNT

Εικ.1.8. Τα είδη των νανοσωλήνων (αριστερά ο μονοφλοιικός νανοσωλήνας (SWNT) και δεξιά ο πολυφλοιικός νανοσωλήνας (MWNT))

Βιβλιογραφία 1ου Κεφαλαίου

1. E.T. Thostenson, Z. Ren, T.-W. Chou, Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review, *Compos. Sci. Technol.* 61 (2001) σσ.1899-1912.
2. A.Yokoyama, Y. Sato, Y. Nodasaka, S. Yamamoto, T. Kawasaki, M. Shindoh, T. Kohgo, T. Akasaka, M. Uo, F. Watari, K. Tohji, Biological behavior of hat-stacked carbon nanofibres in the subcutaneous tissue in rats, *Nano Lett.* 5 (2005) σσ.157-161.
3. K.L. Klein, A.V. Melechko, T.E. McKnight, S.T. Retterer, P.D. Rack, J.D. Fowlkes, D.C. Joy, M.L. Simpson, Surface characterization and functionalization of carbon nanofibres, *J. Appl. Phys.* 103 (2008) σσ.061301-061326.
4. H. Dai, Carbon nanotubes: synthesis, integration, and properties, *Acc. Chem. Res.* 35 (2002) σσ.1035-1044.
5. N.M. Rodriguez, A review of catalytically grown carbon nanofibres, *J. Mater. Res.* 8 (12) (1993) σσ.3233-3250 DOE Project.
6. Qian, E.C. Dickey, R. Andrews, T. Rantell, Load transfer and deformation mechanisms in carbon nanotube-polystyrene composites, *Appl. Phys. Lett.* 76 (2000) σσ.2868-2870.
7. R.Z. Ma, J. Wu, B.Q. Wei, J. Liang, D.H. Wu, Processing and properties of carbon nanotubes -nano-SiC ceramic, *J. Mater. Sci.* 33 (1998) σσ.5243-5246.
8. W. Joseph, Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: a review, *Electro- analysis* 17 (2005) σσ.7-14.
9. P.G. Collins, K. Bradley, M. Ishigami, A. Zettl, Extreme oxygen sensitivity of electronic properties of carbon nanotubes, *Science* 287 (2000) σσ.1801 - 1804.
10. W.A. de Heer, A. Châtelain, D. Ugarte, A carbon nanotube field-emission electron source, *Science* 270 (1995) σσ.1179-1180.
11. A.G. Rinzler, J.H. Hafner, P. Nikolaev, P. Nordlander, D.T. Colbert, R.E. Smalley, L. Lou, S.G. Kim, D. Tomanek, Unraveling nanotubes: field emission from an atomic wire, *Science* 269 (1995) σσ.1550-1553.
12. Y. Chen, D.T. Shaw, X.D. Bai, E.G. Wang, C. Lund, W.M. Lu, D.D.L. Chung, Hydrogen storage in aligned carbon nanotubes, *Appl. Phys. Lett.* 78 (2001) σσ.2128-2130.
13. A.C. Dillon, M.J. Heben, Hydrogen storage using carbon adsorbents: past, present and future, *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Proc.* 72 (2001) σσ.133-142.
14. E.S. Snow, P.M. Campbell, J.P. Novak, Single-wall carbon nanotube atomic force microscope probes, *Appl. Phys. Lett.* 80 (2002) σσ.2002-2004.
15. E.S. Snow, P.M. Campbell, J.P. Novak, Atomic force microscopy using single-wall C nanotube probes, *J. Vac. Sci. Technol., B, Microelectron. Nanometer Struct.* 20 (2002) σσ.822-827.
16. M. Menon, D. Srivastava, Carbon nanotube "t junctions": nanoscale

- metal- semiconductor-metal contact devices, *Phys. Rev. Lett.* 79 (1997) σσ.4453.
17. L. Chico, V.H. Crespi, L.X. Benedict, S.G. Louie, M.L. Cohen, Pure carbon nanoscale devices: nanotube heterojunctions, *Phys. Rev. Lett.* 76 (1996) σσ.971.
 18. E.W. Wong, P.E. Sheehan, C.M. Lieber, Nanobeam mechanics: elasticity, strength, and toughness of nanorods and nanotubes, *Science* 277 (1997) σσ.1971-1975.
 19. M.M.J. Treacy, T.W. Ebbesen, J.M. Gibson, Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes, *Nature* 381 (1996) σσ.678-680.
 20. M.F. Yu, O. Lourie, M.J. Dyer, K. Moloni, T.F. Kelly, R.S. Ruoff, Strength and breaking mechanism of multiwalled carbon nanotubes under tensile load, *Science* 287 (2000) σσ.637-640.
 21. M.F. Yu, B.S. Files, S. Arepalli, R.S. Ruoff, Tensile loading of ropes of single wall carbon nanotubes and their mechanical properties, *Phys Rev Lett* 84 (2000) σσ.5552-5555.
 22. S. Louie, *Electronic properties, junctions, and defects of carbon nanotubes, carbon nanotubes* (2001) σσ.113-145.
 23. Z. Yao, C.L. Kane, C. Dekker, High-field electrical transport in single-wall carbon nanotubes, *Phys. Rev. Lett.* 84 (2000) σσ.2941.
 24. <http://what-when-how.com/nanoscience-and-nanotechnology/carbon-nanotubes-and-other-carbon-materials-part-1-nanotechnology/> (18/11/2011)
 25. <http://ScienceDirect - Advanced Drug Delivery Reviews Carbon nanofibres and ανθρακονήματα in regenerative medicine.htm> (20/1/2011)
 26. <http://cnx.org/content/m22580/latest/Tubes%20type.jpg> (23/11/2010)
 27. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/nanotube/> (23/11/2010)
 28. http://nanosciencenet.org/articles/article_CNT.htm (23/11/2010)
 29. <http://www.internetchemie.info/news/2009/may09/images/carbon-free-fullerene.jpg> (28/11/2010)
 30. http://www-ibmc.u-strasbg.fr/ict/images/SWNT_MWNT.jpg (28/11/2010)
 31. <http://www.informaworld.com/ampp/image?path=/713172968/713557329/F0001.png> (28/11/2010)
 32. <http://www.scientificamerican.com/media/inline/blog/Image/Water-and-nanotube-blog.jpg> (28/11/2010)
 33. <http://mrsec.wisc.edu/Edetc/nanoquest/carbon/images/3nanotubes.gif> (28/11/2010)
 34. <http://eosl.gtri.gatech.edu/Portals/8/c60.gif> (28/11/2010)
 35. <http://cnx.org/content/m22580/latest/Tubes%20type.jpg> (28/11/2010)
 36. <http://jnm.snmjournals.org/content/48/7/1039/F1.expansion.html> (28/11/2010)

Κεφάλαιο 2

Η λειτουργικότητα των ανθρακονημάτων (CNT)

2.1. Οι ανάγκες των επεξεργασιών των ανθρακονημάτων (CNT) και των ανθρακοϊνών (CNF)

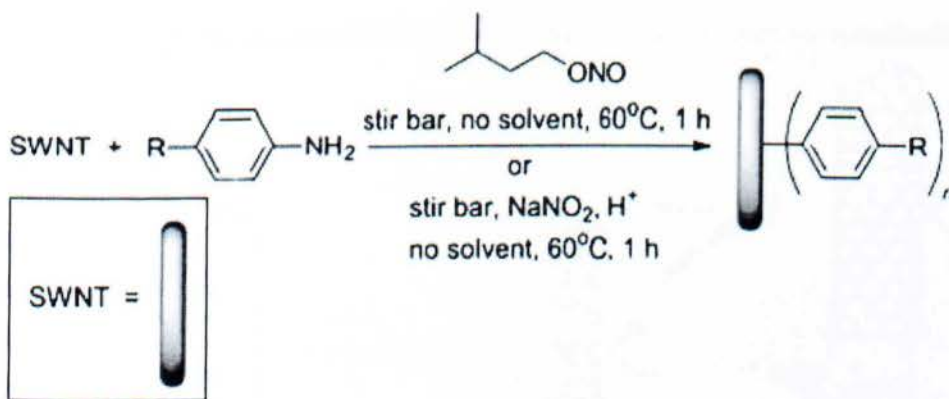
Αρχικά, όταν παράγονται τα ανθρακονήματα, τότε αυτά τείνουν να συσσωρευτούν και είναι αδιάλυτα στους περισσότερους διαλύτες δυσκολεύοντας την χρήση τους στα βιολογικά συστήματα. Επιπλέον, τα περισσότερα ανθρακονήματα μη επεξεργασμένα θεωρούνται τοξικά. Η κυτταροτοξικότητα των μη επεξεργασμένων ανθρακονημάτων οφείλεται στα υπολείμματα των μεταλλικών καταλυτών και στην μη διαλυτοποίησή τους. Επομένως, για να εισχωρήσουν τα ανθρακονήματα στα βιολογικά συστήματα θα πρέπει πρώτα να υποστούν επεξεργασία. Με την επεξεργασία των ανθρακονημάτων επιτυγχάνεται η διαλυτοποίησή τους και η βελτίωση των ιδιοτήτων τους στην βιοσυμβατότητα. Ακόμη, μέσω της επεξεργασίας, οι βιοενεργές ουσίες μπορούν να ενωθούν με τα ανθρακονήματα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μεταφορείς φαρμάκων, αντιγόνων και γονιδίων.

2.1.1. Οι επεξεργασίες των ανθρακονημάτων (carbon nanotubes (CNT)) και των ανθρακοϊνών (carbon nanofibres (CNF))

Υπάρχουν διάφορων ειδών επεξεργασίες των ανθρακονημάτων όπου διακρίνονται σε δυο κύριες κατηγορίες:

1. Οι αντιδράσεις προσθήκης στα πλευρικά τοιχώματα και στα άκρα των ανθρακονημάτων
2. Η οξειδωση με βάση τους καρβοξυλικούς δεσμούς.

Στην πρώτη περίπτωση, οι αντιδράσεις προσθήκης χρησιμοποιούνται για να αποδώσουν κάποιες οργανικές ομάδες στα πλευρικά τοιχώματα ή/και στις άκρες των ανθρακονημάτων. Η διαδικασία αυτή φαίνεται σχηματικά στην παρακάτω εικόνα.

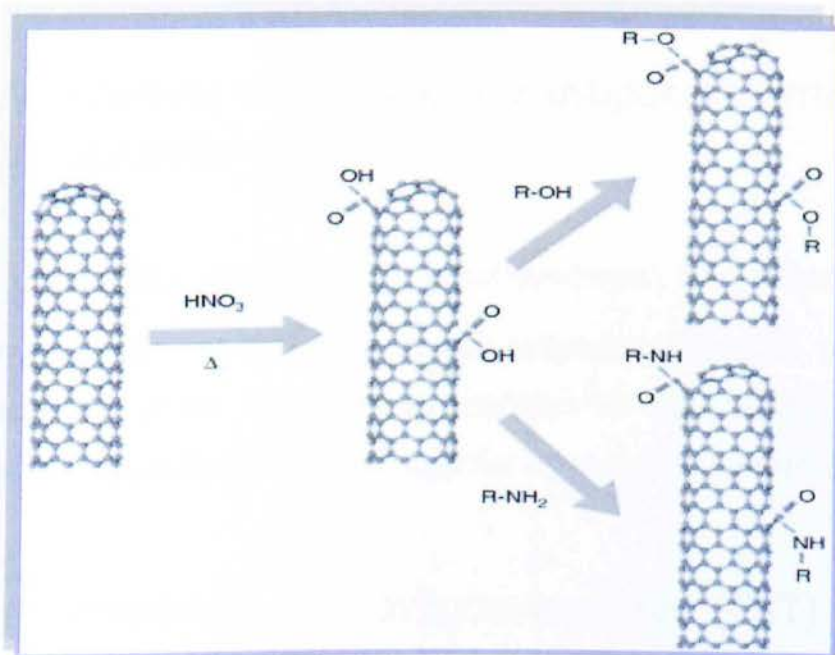


Εικ. 2.1 Σχηματική αναπαράσταση της επεξεργασίας των μονοφλοιικων νανοσωλήνων (SWCNT) με πρόσθετες αντιδράσεις. [βιβλ.7]

Εν συντομία, στην καθαρή τους μορφή τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα (SWCNT) και η ανιλίνη αναμειγνύονται μεταξύ τους. Υπό πίεση διαφόρων δυνάμεων, οι εξερχόμενοι από τη δέσμη νανοσωλήνες που θα «ζυγιστούν» και θα εκτεθούν στην αντιδραστική ουσία. Έτσι, οι μεμονωμένοι σωλήνες είναι ομοιοπολικά επεξεργασμένα, έτσι ώστε να εμποδίζουν την ομαδοποίησή τους με άλλους

σωλήνες. Η πρόληψη της ομαδοποίησης είναι σημαντική για την επιφανειακή περιοχή των ανθρακονημάτων, η οποία είναι διαθέσιμη για την σύνδεση με ενεργά μόρια και η διαλυτότητα των ανθρακονημάτων βελτιώνεται. Τα πλεονεκτήματα αυτής της κατηγορίας περιλαμβάνουν την απλότητα της χρήσης της για την παραγωγή ισχυρών διαλυτών υλικών και την ευκολία της εφαρμογής της σε βιομηχανική κλίμακα. Ωστόσο, έχει το μειονέκτημα να εμποδίζει μερικές επιθυμητές τροποποιήσεις των σωλήνων.

Στην δεύτερη περίπτωση, η οξείδωση με βάση τους καρβοξυλικούς δεσμούς, δημιουργεί ανοίγματα στους δεσμούς των σωλήνων και σχηματίζει τρύπες στα πλευρικά τοιχώματα. Επιπλέον, η οξείδωση εισχωρεί στους δεσμούς και στα πλευρικά τοιχώματα με καρβοξυλικές ομάδες για να ενισχύσουν τη διαλυτότητα των ανθρακονημάτων σε υδατικά διαλύματα. Οι καρβοξυλικές ομάδες επιτρέπουν την σύνδεση των ομοιοπολικών δεσμών μαζί με άλλα μόρια μέσω των αμιδίων και των εστέρων.



Εικ. 2.2. Οξείδωση με καρβοξυλικές ομάδες. Οι σωλήνες οξειδώνονται από ισχυρό οξύ και στη συνέχεια αντιδρά με τις καρβοξυλικές ομάδες [βιβλ.32]

Μέσω αυτής της μεθόδου, τα ανθρακονήματα μπορούν να συζευχθούν με διάφορες λειτουργικές ομάδες, όπως οι βιοενεργές ουσίες (για παράδειγμα τα πεπτίδια, οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα) και οι θεραπευτικές ουσίες (για παράδειγμα τα αντικαρκινικά φάρμακα). Το σημαντικότερο, από την σύνδεση με κατάλληλες ομάδες, είναι ότι τα ανθρακονήματα μπορούν να γίνουν διαλυτά σε υδατικά ή οργανικά διαλύματα. Η παρουσία των καρβοξυλικών ομάδων στα πλευρικά τοιχώματα μειώνει τις αλληλεπιδράσεις των δεσμών Van der Waals στους σωλήνες επιτρέποντας τον διαχωρισμό των δεσμών των νανοσωλήνων σε επιμέρους σωλήνες.

Η επεξεργασία των ανθρακοϊνών είναι περίπου ίδια με αυτή των ανθρακονημάτων, η οποία πρόσφατα έχει αναθεωρηθεί. Η μικρή διαφορά των επεξεργασιών των ανθρακοϊνών είναι ότι οι περισσότερες αντιδράσεις συμβαίνουν στην επιφάνεια των ινών. Ενώ, στα ανθρακονήματα, υπάρχει η δυνατότητα οι χημικές αντιδράσεις να γίνονται και στα πλευρικά τοιχώματα, αλλά και στα καλύμματα των σωλήνων.

2.1.2 Συγκεκριμένες εφαρμογές των ανθρακονημάτων (CNT) και των ανθρακοϊνών (CNF)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η λειτουργικότητα των ανθρακονημάτων στοχεύει την ενίσχυση της διαλυτότητας των ανθρακονημάτων και την σύζευξη τους με βιοενεργά μόρια. Στο επόμενο κεφάλαιο θα συζητηθούν πρόσφατες συναρπαστικές εφαρμογές των ανθρακονημάτων στην ιατρική κοινότητα.

2.1.3 Λειτουργικότητα των ανθρακονημάτων (CNT) και των ανθρακοϊνών (CNF) για την αναγέννηση των οστών

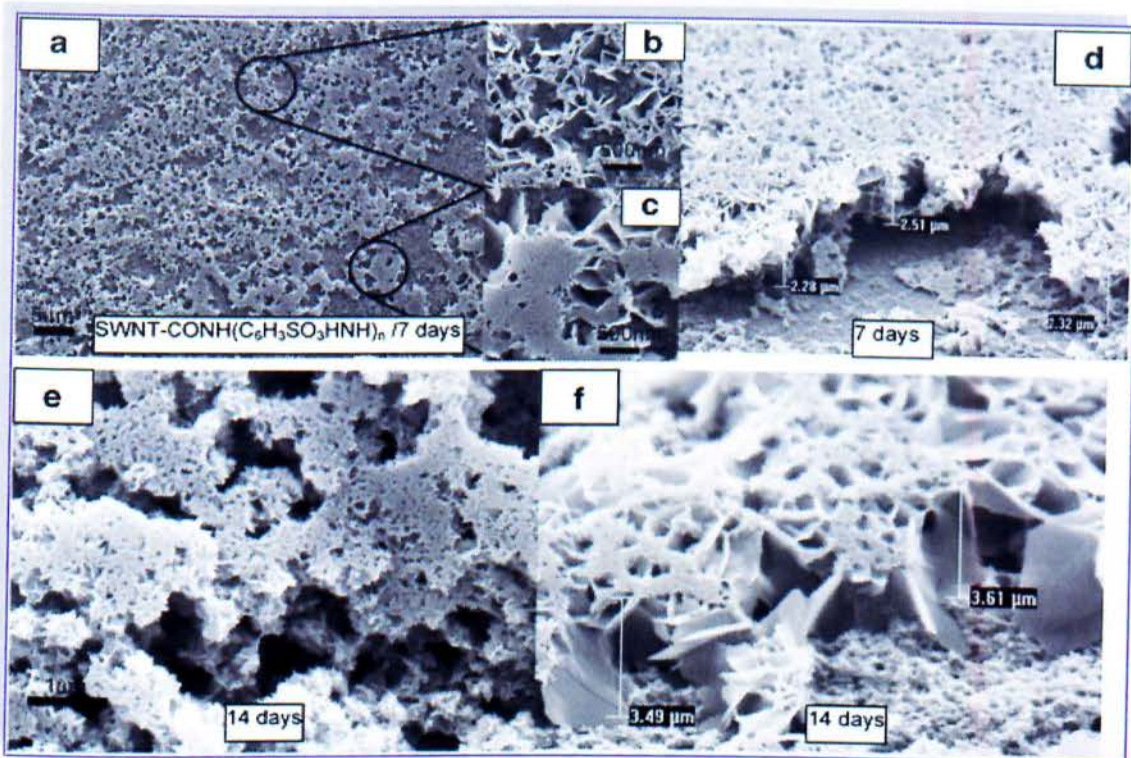
Για εφαρμογές, όπως τα ικρίωματα, για την αναγέννηση των οστών, τα ανθρακονήματα είναι ιδανικοί υποψήφιοι λόγω των εξαιρετικών μηχανικών τους

ιδιοτήτων. Επιπλέον, τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα (SWCNT) είναι μακριές και λεπτές ίνες (από 100 μέχρι 300 nm), με διάμετρο που κυμαίνεται τυπικά από 0,5 μέχρι 1,5 nm, το οποίο είναι κοντά στο μέγεθος του τριπλού έλικα των ινών του κολλαγόνου, τα οποία έχουν 1,5 nm πλάτος και 300 nm μήκος και έχουν περιοδικότητα 67 nm. Έτσι, τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα, γεωμετρικά, είναι κατάλληλοι για να μιμηθούν το μέγεθος του κολλαγόνου ως ικρίωματα για πυρήνωση και ανάπτυξη του υδροξυαπατίτη (HA, η μεγαλύτερη ανόργανη σύνθεση του οστού).

Ωστόσο, τα αρχικά μονοφλοιικά ανθρακονήματα δεν έχουν καμία έμφυτη ιδιότητα που να υποστηρίζει την ανάπτυξη του καινούργιου οστού. Συγκεκριμένα, τα αρχικά μονοφλοιικά ανθρακονήματα δεν περιέχουν λειτουργικές ομάδες που να μπορούν να προσελκύσουν τα κατιόντα ασβεστίου, για να εισαχθεί η κρυστάλλωση του HA. Συνεπώς, στην περίπτωση που χρησιμοποιηθούν ανθρακονήματα ως ικρίωμα για την αναγέννηση των οστών, ένα μόνο ανθρακόνημα μπορεί να συζευχθεί με κάποιες λειτουργικές ομάδες, οι οποίες προσελκύουν τα κατιόντα ασβεστίου. Για παράδειγμα, τα μονοφλοιικά επεξεργάζονται με (αμινοβενζονο σουλφονικό οξύ) (PABS, polyaminobenzene sulfonic acid) αμιδίωση των ομάδων των καρβοξυλικών οξέων πάνω στα SWCNT (CNT-COOH) με αμίνες PABS μέσω του ακυλο χλωριδίου (CNT-COCl):

SWCNT-COOH -> SWCNT-COCl -> SWCNT-PABS

Λεπτές μεμβράνες του κάθε SWCNT-COOH ή SWCNT επεξεργασμένα με PABS (SWCNT-PABS) είναι τοποθετημένα πάνω σε γυάλινες διαφάνειες. Μετά από επτά ημέρες εμποτίζονται οι μεμβράνες σε διάλυμα CaCl_2 και Na_2HPO_4 , οι ερευνητές ανακάλυψαν ένα μεγάλο πλήθος των HA κρυστάλλων με μέγεθος της πλάκας καθ' όλη την επιφάνεια του SWCNT-PABS, οι λεπτές μεμβράνες και το πάχος του στρώματος του HA έπρεπε να είναι 2,4μm. Το στρώμα των κρυστάλλων του HA πάνω στο SWCNT-PABS αναπτύχθηκαν πάχους 3,5μm μετά από δεκατέσσερις ημέρες.



Εικ. 2.3. Εικόνες του HA που σχηματίζεται πάνω στα υποστρώματα του SWCNT-PABS για 7 ημέρες (a-d) και για 14 ημέρες(e-f) από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο [βιβλ.20]

Οι λεπτές μεμβράνες του SWCNT-COOH, από την άλλη πλευρά, δεν αυξήθηκαν στην ορυκτοποίηση μεταξύ των επτά και δεκατεσσάρων ημερών. Στον έλεγχο (γυάλινες επιφάνειες) δεν παρατηρήθηκε κανένας σχηματισμός των κρυστάλλων του HA, μετά των επτά και δεκατεσσάρων ημερών. Αυτό το πείραμα απέδειξε μια μέθοδο που μπορεί να σχεδιάσει τα ανθρακονήματα, η οποία υποστηρίζει την ορυκτοποίηση του HA μέσω την επεξεργασία του σωλήνα με ομάδες φορτισμένες αρνητικά. Η λειτουργικότητα των ανθρακονημάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ικρίωμα για την αναγέννηση των οστών.

2.1.4 Λειτουργικότητα των ανθρακονημάτων (CNT) και των ανθρακοϊνών (CNF) για την αναγέννηση των νεύρων

Οι άριστες μηχανικές και ηλεκτρικές ιδιότητες των ανθρακονημάτων και των ανθρακοϊνών μπορούν να αξιοποιηθούν στις βιολογικές εφαρμογές, στον σχεδιασμό ενός ηλεκτρικά αγώγιμου ικρίωματος, όπως είναι ο μηχανισμός των νευρικών ιστών. Για την αναγέννηση των νεύρων, χρειάζεται ένα ικρίωμα που δεν θα διεξάγει μόνο ηλεκτρικό ρεύμα αλλά θα στηρίζει και την ανάπτυξη του νεύρου. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την επεξεργασία μπορεί να βελτιώσει την βιοδραστικότητα των ανθρακονημάτων και ανθρακοϊνών με βάση τα ικρίωματα. Υπάρχουν δύο κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αναγέννηση των νευρικών ιστών:

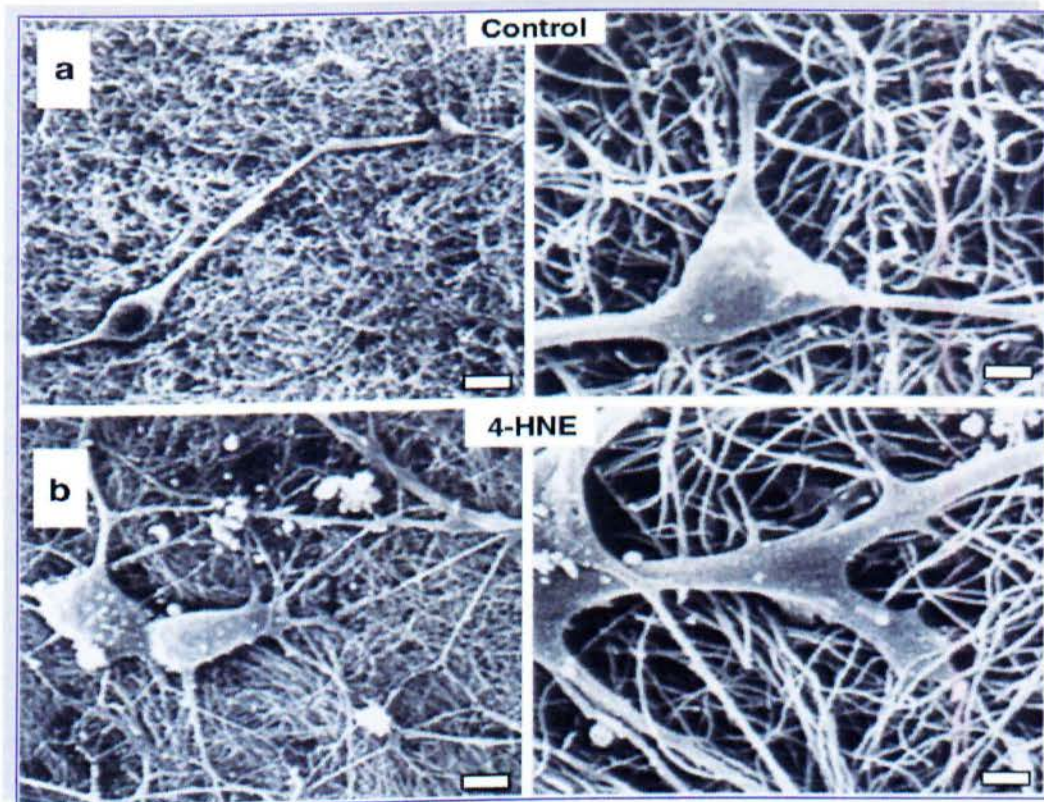
1. Η επικάλυψη βιοενεργών μορίων στους σωλήνες
2. Η κάθετη ευθυγράμμιση των ανθρακοϊνών (vertically aligned carbon nanofibers, VACNFs), όπου τυλίγονται με ταινίες Polypyrrole (PPY).

Η μέθοδος επεξεργασίας των ανθρακονημάτων για την υποστήριξη της ανάπτυξης του νεύρου, είναι η επικάλυψη βιοενεργών μορίων (όπως η αλδεΐδη 4-υδροξυνονεναλ (4-HNE)) στους σωλήνες.

Σύμφωνα με τον Mattson, έχει γίνει γνωστό ότι οι επιπτώσεις της 4-HNE αυξάνει τα επίπεδα ενδοκυτταρικού Ca^{2+} (ασβεστίου), η οποία τροποποιεί τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και σηματοδοτεί τους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την απόφυση των νευρικών κυττάρων. Χρησιμοποιώντας αυτή την μέθοδο, τα πολυφλοιικά ανθρακονήματα (MWCNTs) επικαλύφθηκαν με την 4-HNE (επιάζοντας τα πολυφλοιικά ανθρακονήματα μέσα σε όξινο περιβάλλον (pH 5.0) αιθανόλης 50% και 200μM 4-HNE) για την προώθηση της λειτουργίας των νευρικών κυττάρων.

Εμβρυϊκά εγκεφαλικά κύτταρα ποντικών καλλιεργήθηκαν σε μη τροποποιημένα πολυφλοιικά ανθρακονήματα και σε τροποποιημένα πολυφλοιικά ανθρακονήματα, τα οποία είναι επικαλυμμένα με 4-HNE. Αποδείχθηκε ότι η ανάπτυξη των νευρικών

ιστών πάνω σε μη τροποποιημένα πολυφλοιικά ανθρακονήματα έχουν μόνο ένα ή δύο νευρίτες (δηλαδή, η ένδειξη των επιπέδων διακλάδωσης και η συνάφεια σε μια νευρική επιφάνεια).



Εικ. 2.4. Η ανάπτυξη και η διακλάδωση των νευρικών ιστών πάνω σε μη τροποποιημένα (a) και τροποποιημένα (b) υποστρώματα ανθρακονημάτων μετά από 3 ημέρες της *in vitro* καλλιέργεια. [βιβλ.21]

Αντίθετα τα νεύρα που καλλιεργούνται σε τροποποιημένα πολυφλοιικά ανθρακονήματα επικαλυμμένα με την 4-HNE έχουν 4 έως 6 νευρίτες. Το συνολικό μήκος των νευρικών κυττάρων αυξήθηκε 2 φορές από το αρχικό του μήκος και ο αριθμός διακλαδώσεων των νευρικών κυττάρων αυξήθηκαν 3 φορές σε σχέση με τα μη τροποποιημένα πολυφλοιικά ανθρακονήματα. Συλλογικά τα αποτελέσματα του πειράματος, έδειξαν ότι τα πολυφλοιικά ανθρακονήματα μπορούν να επεξεργαστούν για να υποστηρίξουν την ανάπτυξη των νεύρων και των διακλαδώσεων που παίζουν σημαντικό ρολό στην αναγέννηση των νεύρων.

Η άλλη μέθοδος αναγέννησης νεύρων είναι να ευθυγραμμίζονται κάθετες

ανθρακοΐνες (όπου τότε ονομάζονται VACNFs), όπου τυλίγονται με ταινίες Polyglyrole (PPY) από ηλεκτροχημική εναπόθεση όπου θα χρησιμοποιηθούν ως ηλεκτρόδια σε ηλεκτρική διέγερση. Τα VACNFs έχουν γίνει πολύ ελκυστικά διότι δημιουργούν διασυνδέσεις μεταξύ ηλεκτροδίων και των τοπικών νευρικών ιστών σε ηλεκτρική διέγερση. Εφαρμόζεται σε βαθιά εγκεφαλική διέγερση (DBS, η οποία χρησιμοποιείται για την θεραπεία ασθενών με κινητικές διαταραχές όπως η νόσος του Πάρκινσον, η επιληψία και η διανοητική καθυστέρηση), η κατακόρυφη αύξηση των μικροκυκλωμάτων ανθρακοΐνων όπου είναι κατασκευασμένο από πυρίτιο το καθιστούν κατάλληλο για χρήση και σε ηλεκτρικές εφαρμογές. Οι ανθρακοΐνες μπορούν να έχουν μικρή αύξηση του μεγέθους 80nm και να γίνει λεπτομερειακή έρευνα στους νευρικούς ιστούς σε τρισδιάστατη μορφή, εξαγοντας και διαμορφώνοντας το νευρικό σήμα με μεγαλύτερη ακρίβεια και με μικρότερη βλάβη στον ιστό απ' ότι οι συστοιχίες των μικροηλεκτροδίων (των οποίων η διάμετρος είναι 100μm ή μεγαλύτερα).

Για να δημιουργηθεί μίας νανοσυστοιχίας ανθρακοΐνων, τοποθετείται μια ανθρακοΐνα με μια ομοιόμορφη ταινία ενός ηλεκτρικά αγωγίμου πολυμερούς (PPY). Η ανθρακοΐνα επαλείφεται με ρευστή ουσία PPY και στη συνέχεια επικαλύπτεται από ένα λεπτό στρώμα κολλαγόνου τύπου IV για την βελτίωση της συμβατότητας των ανθρακοΐνων. Η δημιουργία των κυττάρων με αυτό τον τρόπο είναι πολύ πιο διαδεδομένη απ' ότι με τη γυμνή ανθρακοΐνα ή μόνο επαλειμμένο με PPY.

Αυτή η βελτιωμένη βιοσυμβατότητα της λειτουργικότητας των VACNFs μαζί με τις τρισδιάστατες νανοδομές, τις ηλεκτρικές και μηχανικές ιδιότητές τους, τα καθιστούν κατάλληλα για νευρικές εφαρμογές, όπως η λειτουργική ηλεκτρική διέγερση .

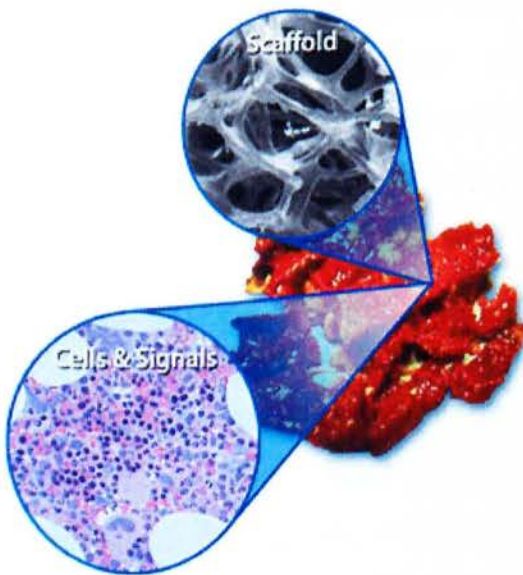
Βιβλιογραφία 2^{ου} Κεφαλαίου

1. W. Liang, M. Bockrath, D. Bozovic, J.H. Hafner, M. Tinkham, H. Park, Fabry-Perot interference in a nanotube electron waveguide, *Nature* 411 (2001) σσ.665-669.
2. D. Tasis, N. Tagmatarchis, V. Georgakilas, M. Prato, Soluble carbon nanotubes, *Chem.-A Eur. J.* 9 (2003) σσ.4000-4008.
3. V.L. Colvin, The potential environmental impact of engineered nanomaterials, *Nat. Biotech.* 21 (2003) σσ.1166-1170.
4. A.Shvedova, V. Castranova, E. Kisin, D. Schwegler-Berry, A. Murray, V. Gandelsman, A. Maynard, P. Baron, Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells, *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* 66 (2003) σσ.1909-1926.
5. D.B. Warheit, B.R. Laurence, K.L. Reed, D.H. Roach, G.A.M. Reynolds, T.R. Webb, Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats, *Toxicol. Sci.* 77 (2004) σσ.117-125.
6. Bianco, K. Kostarelos, C.D. Partidos, M. Prato, Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes, *Chem. Commun.* (2005) σσ.571 -577.
7. C.A. Dyke, J.M. Tour, Overcoming the insolubility of carbon nanotubes through high degrees of sidewall functionalization, *Chem.-A Eur. J.* 10 (2004) σσ.812-817.
8. J. Liu, A.G. Rinzler, H. Dai, J.H. Hafner, R.K. Bradley, P.J. Boul, A. Lu, T. Iverson, K. Shelimov, C.B. Huffman, F. Rodriguez-Macias, Y.-S. Shon, T.R. Lee, D.T. Colbert, R.E. Smalley, Fullerene Pipes, *Science* 280 (1998) σσ.1253-1256.
9. M.B. Kannan Balasubramanian, Chemically functionalized carbon nanotubes, *Small* 1 (2005) σσ.180-192.
10. D. Pantarotto, J.-P. Briand, M. Prato, A. Bianco, Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes, *Chem. Commun.* (2004) σσ.16-17.
11. D. Pantarotto, C.D. Partidos, R. Graff, J. Hoebeke, J.-P. Briand, M. Prato, A. Bianco, Synthesis, structural characterization, and immunological properties of carbon nanotubes functionalized with peptides, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) σσ. 6160-6164.
12. N.W. Shi Kam, T.C. Jessop, P.A. Wender, H. Dai, Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube protein conjugates into mammalian cells, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) σσ.6850-6851.
13. L. Lacerda, A. Bianco, M. Prato, K. Kostarelos, Carbon nanotube cell translocation and delivery of nucleic acids in vitro and in vivo, *J. Mater. Chem.* 18 (2008) σσ. 17-22.
14. K.V. Singh, R.R. Pandey, X. Wang, R. Lake, C.S. Ozkan, K. Wang, M. Ozkan, Covalent functionalization of single walled carbon nanotubes with peptide nucleic acid: nanocomponents for molecular level electronics, *Carbon* 44 (2006) σσ.1730-1739.
15. Z. Liu, K. Chen, C. Davis, S. Sherlock Q. Cao, X. Chen, H. Dai, Drug

- delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment, *Cancer Res.* 68 (2008) σσ. 6652-6660.
16. G. Pastorin, W. Wu, S. Wieckowski, J.-P. Briand, K. Kostarelos, M. Prato, A. Bianco, Double functionalisation of carbon nanotubes for multimodal drug delivery, *Chem. Commun.* (2006) σσ.1182-1184.
 17. K.A. Fernando, Y. Lin, Y.P. Sun, High aqueous solubility of functionalized singlewalled carbon nanotubes, *Langmuir* 20 (2004) σσ. 4777-4778.
 18. J. Chen, A.M. Rao, S. Lyuksyutov, M.E. Itkis, M.A. Hamon, H. Hu, R.W. Cohn, P.C. Eklund, D.T. Colbert, R.E. Smalley, R.C. Haddon, Dissolution of full-length singlewalled carbon nanotubes, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) σσ.2525-2528.
 19. J.B. Park, R.S. Lakes, *Biomaterials: an introduction*, Plenum, New York, 1993.
 20. B.Zhao, H. Hu, S.K. Mandal, R.C. Haddon, A bone mimic based on the self-assembly of hydroxyapatite on chemically functionalized single-walled carbon nanotubes, *Chem. Mater.* 17 (2005) σσ. 3235-3241.
 21. M. Mattson, R. Haddon, A. Rao, Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth, *J. Mol. Neurosci.* 14 (2000) σσ. 175-182.
 22. R.J. Mark M.A. Lovell, W.R. Markesbery, K. Uchida, M.P. Mattson, A role for 4- hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid-peptide, *J. Neurochem.* 68 (1997) σσ.255-264.
 23. M.P. Mattson, W. Fu, G. Waeg, K. Uchida, 4-Hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, inhibits dephosphorylation of the microtubule-associated protein tau, *Neuroreport* 8 (1997) σσ. 2275-2281.
 24. M.P. Mattson, S.B. Kater, Calcium regulation of neurite elongation and growth cone motility, *J. Neurosci.* 7 (1987) σσ.4034-4043.
 25. T.D.B. Nguyen-Vu, H. Chen, Alan M. Cassell, R. Andrews, M. Meyyappan, J. Li, Vertically aligned carbon nanofiber arrays: an advance toward electrical-neural interfaces, *Small* 2 (2006) σσ. 89-94.
 26. J. Li, Q. Ye, A. Cassell, H.T. Ng, R. Stevens, J. Han, M. Meyyappan, Bottom-up approach for carbon nanotube interconnects, *Appl. Phys. Lett.* 82 (2003) σσ. 2491-2493.
 27. J. Li, H.T. Ng, A. Cassell, W. Fan, H. Chen, Q. Ye, J. Koehne, J. Han, M. Meyyappan, Carbon nanotube nanoelectrode array for ultrasensitive DNA detection, *Nano Lett.* 82 (2003) σσ. 597-602.

Κεφάλαιο 3

Εφαρμογές των ανθρακονημάτων (carbon nanotubes (CNT)) και των ανθρακοϊνών (carbon nanofibres (CNF)) στην αναγέννηση των οστών

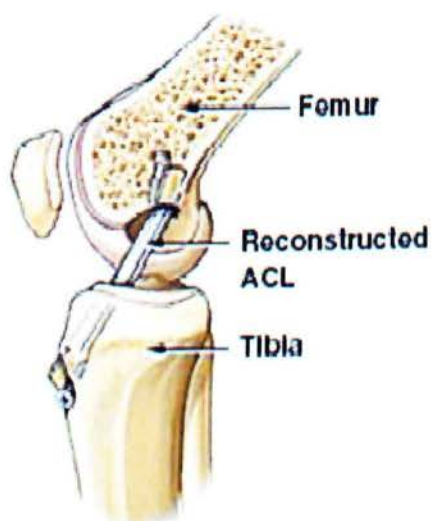


Εικ.3.1. Ικρίωμα οστού

Τα ανθρακονήματα έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορους τομείς, όπως τα σύνθετα υλικά, για την ανάπτυξη ιδιαίτερων λειτουργικών υλικών. Κατέχουν μεγάλο ενδιαφέρον όσον αφορά σε βιοϋλικά, ιδίως εκείνων που πρόκειται να έρθουν σε επαφή με οστά, όπως τεχνητά μέλη, ορθοπλαστική, λαμαρίνες ή βίδες για την σταθεροποίηση του κατάγματος, συστήματα για την χορήγηση φαρμάκων,

καθώς και ικρίωματα στην οστική αναγέννηση. Κατά συνέπεια, η συμβατότητα των ανθρακονημάτων στους οστικούς ιστούς και η επίδραση των ανθρακονημάτων στον σχηματισμό του οστού είναι ένα σημαντικός παράγοντας. Η χρήση των

ανθρακονημάτων είναι αναδρομική στα βιοϋλικά που εφαρμόζονται στα οστά, μπορούν να βελτιώσουν τις συνολικές μηχανικές ιδιότητές τους και προβλέπεται να λειτουργεί ως ικρίωμα για την προώθηση και καθοδήγηση της αναγέννησης των οστικών ιστών.

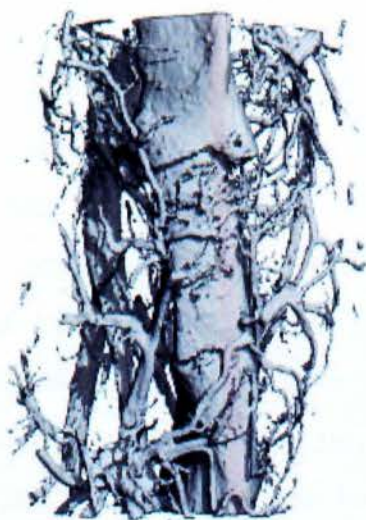


Εικ.3.2. Μηχανική υποστήριξη οστών

Το οστό είναι ένας σκληρός ιστός που παρέχει μηχανική υποστήριξη στον οργανισμό μας, προστατεύει τα εσωτερικά όργανα καθώς και αποθηκεύει τα κύτταρα του αίματος στο μυελό των οστών. Κατά τον σχεδιασμό του υλικού για να χρησιμοποιηθεί ένα κόκαλο ως ικρίωμα, ένα από τα πρώτα και κύρια κριτήρια που πρέπει να ληφθούν υπόψη είναι οι μηχανικές ιδιότητες του υλικού.

Λαμβάνοντας υπόψη την εξαιρετική μηχανική αντοχή των ανθρακοϊνών και ανθρακονημάτων

είναι φυσικό ότι υπάρχουν πολλές μελέτες που εστιάζουν στην χρησιμοποίηση των νανοδομών άνθρακα ενισχύοντας με τις ουσίες σύνθετων υλικών και ειδικά στο μυελό των ικριωμάτων. Επιπλέον, σε σύγκριση με άλλα μεταλλικά ή κεραμικά ικρίωματα οστών που χρησιμοποιούνται στην ορθοπεδική (πχ. τιτάνιο, ανοξειδωτος χάλυβας, αλουμίνιο κλπ.) τα μονοφλοϊικά ανθρακονήματα είναι λιγότερο πυκνά και κατά συνέπεια μπορούν να καταστήσουν ελαφρύτερα ικρίωματα με πολύ υψηλή αντοχή. Είναι επίσης εξαιρετικά ευέλικτα και έχουν υψηλό μέτρο δυσκαμψίας, στην περιοχή terapascals (Tpa). Όπως αναφέρθηκε, τα ανθρακονήματα και οι ανθρακοϊνες μπορούν να λειτουργήσουν με διαφορετικές ομάδες, οι οποίες μπορούν να βελτιώσουν τις ιδιότητες βιοσυμβατότητας ή και μηχανικής αντοχής των σωλήνων και των ινών ικριωμάτων. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι η επιφάνεια των υλικών ασκεί επιρροή συνοχής του κυττάρου με ελεύθερη ενέργεια, ως εκ



Εικ.3.3. Αγγείωση και ανοργανοποίηση του οστού

τούτου όμως μπορεί να επηρεάσει την λειτουργία των διαφορετικών τύπων κυττάρων που οδηγεί στην αναγέννηση οστών μεγαλύτερων μεγεθών. Με την αλλαγή του περιεχομένου των ανθρακοϊνών σε σύνθετο, μπορεί να δημιουργηθεί διαφορετική επιφάνεια ελευθέρων πηγών ενέργειας.

Διαμορφώνοντας το περιεχόμενο μιας σύνθετης ανθρακοϊνας σε ικρίωμα μπορεί να ενισχύσει επιλεκτικά τις λειτουργίες ενός τύπου κυττάρου και να μειώσει τις λειτουργίες ενός άλλου. Η ευελιξία των εν λόγω σύνθετων υλικών συνεπάγονται στα βιολογικά ικρίωματα σε πολυάριθμες εφαρμογές και ειδικότερα σε ορθοπεδικές εφαρμογές.

3.1. Τα ανθρακονήματα (carbon nanotubes (CNT)) και οι ανθρακοϊνες (carbon nanofibres (CNF)) ως ικρίωματα

Μια από τις πρώτες μελέτες που χρησιμοποιούν οι ανθρακοϊνες σε ικρίωματα για την αναγέννηση ιστών είναι αυτή του ερευνητή Price. Σε αυτή την *in vitro* μελέτη, οι ερευνητές διασκόρπισαν ανθρακοϊνες μέσα σε διάλυμα πολυανθρακικής ουρεθάνης για να δημιουργήσουν σύνθετες ανθρακοϊνες και στη συνέχεια δοκίμασαν την πρόσφυση των οστεοβλαστών (κύτταρα που σχηματίζουν το οστό), ινοβλαστών (μαλακός ιστός για τον σχηματισμό κυττάρων), χονδροκυττάρων (σύνθεση κυττάρων για το σχηματισμό χόνδρου) και των λειών μυϊκών ινών πάνω σε σύνθετα ικρίωματα. Διαπίστωσαν ότι τα σύνθετα με την μικρότερη κλίμακα ινών άνθρακα προωθούνται για την προσκόλληση των οστεοβλαστών, αλλά δεν προωθούνται για την προσκόλληση άλλων κυττάρων. Το πιο εντυπωσιακό ήταν ότι οι προσκολλημένες λείες μυϊκές ίνες, ινοβλάστες και τα χονδροκύτταρα μειώθηκαν, όταν αυξήθηκε η επιφανειακή ενέργεια στις ανθρακοϊνες. Η επιφανειακή ενέργεια είναι μια σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την πρόσφυση των κυττάρων και συνεπώς και άλλες λειτουργίες τους. Αντίθετα, τα άτομα/ μόρια μέσα σε ένα υλικό έχουν στην επιφάνεια τους ελεύθερους δεσμούς, επομένως έχουν ενεργειακό δυναμικό και προσπαθούν να το

μειώσουν μέσω της αλληλεπίδρασης με άλλα μόρια. Ο Price ανέφερε ότι όσο μεγαλύτερη είναι η αναλογία βάρους και ενέργειας στα ανώτερα στρώματα επιφάνειας των ανθρακονημάτων μέσα σε PCU/CNF τόσο αυξάνεται η προσκόλληση των οστεοβλαστών, ενώ την ίδια στιγμή μειώνεται η προσρόφηση των ινοβλαστών. Ένα υλικό μπορεί να προωθήσει την προσκόλληση των οστεοβλαστών και ταυτόχρονα να μειώσει την ανταγωνιστική προσκόλληση των κυττάρων, το οποίο είναι επιθυμητό για τα ορθοπεδικά εμφυτεύματα. Για παράδειγμα, το υλικό μπορεί να οδηγήσει στην ταχύτερη ενσωμάτωση του εμφυτεύματος στην επιφάνεια του οστού. Αυτή η μελέτη έδειξε την ευελιξία της χρήσης των ανθρακοϊνών να προσαρμόσει την δομή επιφάνειας, την χημεία επιφάνειας ή/και την επιφανειακή ενέργεια του ικρίωματος για την επιλεκτική προώθηση της πρόσφυσης ενός τύπου κυττάρου καθώς και την αναστολή της λειτουργίας των άλλων τύπων κυττάρων.

Στις ορθοπεδικές εφαρμογές, όπως η κυτταρική προσκόλληση, είναι κρίσιμες διότι οι μεταγενέστερες λειτουργίες των κυττάρων επηρεάζονται από αυτές. Συνεπώς, αν κάποιος επιθυμεί να σχεδιάσει εμφύτευμα που μπορεί να ενισχύσει την πρόσφυση των οστεοβλαστών και να δώσει τα επιθυμητά χαρακτηριστικά γνωρίσματα, μπορεί να τροποποιήσει την απλή ανθρακοϊνα σε σύνθετη. Ενώ, αν επιθυμεί να δημιουργήσει ένα οστό θα πρέπει να αυξήσει τη σύνθεση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, την δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφάτασης και της απόθεσης του ασβεστίου που περιέχουν τα μέταλλα. Αυτός ο στόχος επιτεύχθηκε με την χρήση των ανθρακοϊνών σε ένα ικρίωμα.

Σε ένα άλλο πείραμα κατασκευάστηκαν και συμπιέστηκαν ανθρακονήματα, δηλαδή κατασκευάστηκαν ανθρακονήματα σε νανοφάση, (δηλαδή οι διαστάσεις τους ήταν 100nm και λιγότερο) καθώς και συμβατικές ίνες (μεγαλύτερες των 100 nm), και στη συνέχεια συγκρίθηκαν μακροπρόθεσμα οι κυτταρικές λειτουργίες και των δυο. Οι οστεοβλάστες καλλιεργούνται στα συμπυκνωμένα σε νανοφάση και στις συμβατικές συμπυκνωμένες ίνες. Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι στα συμπυκνωμένα σε νανοφάση, οι οστεοβλάστες συνέθεταν περισσότερη αλκαλική φωσφάταση (ένας πολύ σημαντικός δείκτης για τον σχηματισμό των οστών) και προκαταβάλλουν περισσότερο εξωτερικό ασβέστιο από ότι στις

συμβατικές συμπυκνωμένες ίνες. Παρουσιάζεται ιδιαίτερο ενδιαφέρον ανάμεσα στην αύξηση της συμπιεσμένης περιεκτικότητας σε ασβέστιο των εξωτερικών κυττάρων και στην μείωση της διαμέτρου των ανθρακονημάτων. Βέβαια, το μέγεθος των ανθρακοϊνών παίζει σημαντικό ρόλο στην αύξηση των λειτουργιών των οστεοβλαστών σε αυτά τα πειράματα από ότι η λειτουργικότητα των βιοδραστικών μορίων των ανθρακοϊνών, ενώ αποδείχτηκαν καινοφανής ιδιότητες στην ακατέργαστη κατάστασή τους.

3.1.1 Πιθανοί μηχανισμοί της αυξημένης βιοσυμβατότητας των νανοσωλήνων άνθρακα (carbon nanotubes (CNT)) και των νανοϊνών άνθρακα (carbon nanofibres (CNF)) (βασισμένο στα ικρίώματα: ο ρόλος της προσρόφησης της κολλώδους πρωτεΐνης)



Εικ.3.4. Μυοβλαστικά κύτταρα

Έχει αποδειχθεί ότι τα ανθρακονήματα και οι ανθρακοϊνες επηρεάζουν τη συμπεριφορά των κυττάρων και αυτή η επίδραση είναι χρήσιμη αν κάποιος θέλει να σχεδιάσει ένα υλικό για την αναγέννηση των οστών. Οι μηχανισμοί των λειτουργιών των κυττάρων επηρεάζονται από τα ανθρακονήματα και οι ανθρακοϊνες, παραμένουν ανεξερεύνητοι και αποτελούν αντικείμενο πολλών μελετών. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η αυξημένη προσρόφηση πρωτεϊνών στα πολυφλοιικά ανθρακονήματα ήταν ο υποκειμενικός μηχανισμός για

την ενίσχυση των μυοβλαστικών κυττάρων των ποντικών. Σε αυτό το πείραμα συνετέθησαν είτε συμπιεσμένα πολυφλοιικά ανθρακονήματα είτε συμπιεσμένος γραφίτης (GP). Κατά την σύνθεση των πρωτεϊνών πάνω στα πολυφλοιικά

αθρακονήματα βρέθηκε ότι ήταν περισσότερα από ότι πάνω στον γραφίτη. Τα μυοβλαστικά κύτταρα ποντικών (C2C12) καλλιεργήθηκαν και έδειξαν καλύτερη προσκόλληση των κυττάρων, διάδοση και διαφοροποίηση στα συμπιεσμένα πολυφλοιικά αθρακονήματα από ότι στο συμπιεσμένο γραφίτη.



Εικ.3.5. Οστική αναγέννηση με προσθήκη θεραπευτικών ή/και οστεογεννών ουσιών

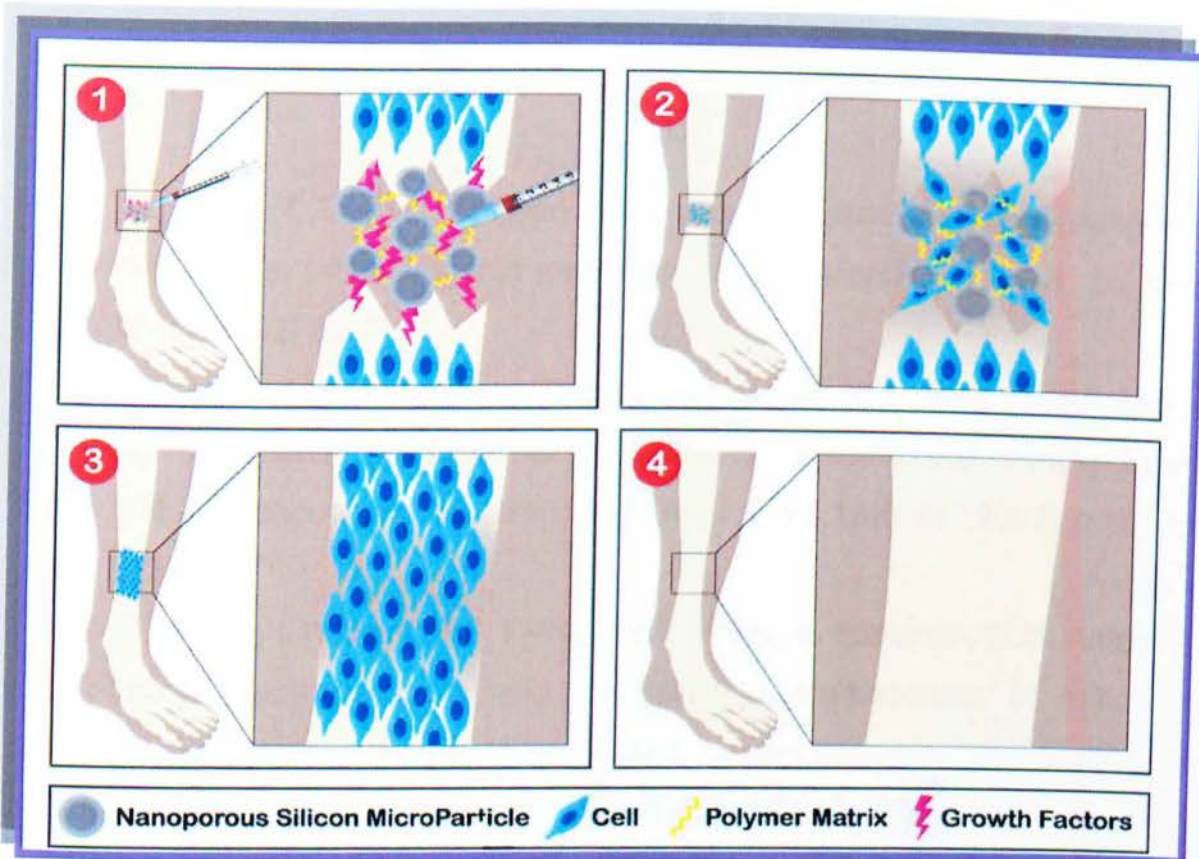
Οι ερευνητές παρατήρησαν ότι αυξήθηκε η προσρόφηση της πρωτεΐνης από διάλυμα βοείου εμβρυακού ορού (FBS) μέσα στα συμπυκνωμένα πολυφλοιικά αθρακονήματα από ότι στο συμπυκνωμένο γραφένιο και στην καλλιέργεια πλακών. Υπέθεσαν ότι αυτή η αυξημένη προσρόφηση των πρωτεϊνών στα συμπυκνωμένα πολυφλοιικά αθρακονήματα οδήγησαν στην αύξηση των λειτουργιών των κυττάρων. Απέδειξαν τις υποθέσεις τους βυθίζοντας τα συμπυκνωμένα (συμπιεσμένα πολυφλοιικά αθρακονήματα, συμπιεσμένο GP και καλλιέργειες σε πλάκες) σε καλλιέργεια που περιέχει 50% FBS πριν χρησιμοποιηθούν στα πειράματα κυττάρων. Οι ερευνητές διαπίστωσαν την ίδια αύξηση της ολικής πρωτεΐνης και της ALP σύνθεσης σε όλες τις επιφάνειες σε σύγκριση με τις συμβατικές κυτταροκαλλιέργειες. Ωστόσο, τα πολυφλοιικά αθρακονήματα έχουν την πιο σημαντική αύξηση (από 11-18 φορές μεγαλύτερη από το συμπυκνωμένο γραφένιο και την καλλιέργεια πλακών μετά από 4 και 7 ημέρες). Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι μεγάλο πλήθος πρωτεϊνών αυξήθηκαν πάνω στα πολυφλοιικά αθρακονήματα, τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για την λειτουργία των κυττάρων.

Τα μυοβλαστικά κύτταρα είναι μια πανίσχυρη γραμμή κυττάρων που είναι ικανά να εξατομικεύσουν προς διαφορετικούς φαινότυπους υπό την επίδραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών , χημικών ή βιολογικών παραγόντων. Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος έδειξαν επίσης ότι, μετά από καλλιέργεια, η χημική αντίδραση της αλκαλικής φασφάτασης των C2C12 κυττάρων πάνω σε πολυφλοιικά αθρακονήματα ήταν σημαντικά υψηλότερα από ότι πάνω σε GP, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα πολυφλοιικά αθρακονήματα μπορούν να προκαλέσουν την διαφοροποίηση των C2C12 κυττάρων μέσα σε οστεογενή κύτταρα περισσότερα από ότι τα GP. Με αυτή την έννοια, τα πολυφλοιικά αθρακονήματα μπορούν να

θεωρηθούν ως οστεοπαραγωγικά υλικά (δηλαδή, ένα υλικό που μπορεί να δημιουργήσει ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά κύτταρα στην επιφάνεια του υλικού) και είναι επιθυμητά στα ορθοπεδικά εμφυτεύματα, δεδομένου ότι προωθούν την ταχύτερη ένδειξη των οστών με τα επιφανειακά εμφυτεύματα.

Η διαπίστωση αυτή σχετικά με την αυξημένη προσρόφηση πρωτεϊνών που οδηγούν στην καλύτερη προσκόλληση των κυττάρων, στο πολλαπλασιασμό και στη διαφοροποίηση των νανοϋλικών είναι σύμφωνα με τη θεωρία του ερευνητή Webster. Ο Webster και οι συνεργάτες του μελέτησαν τις λειτουργίες των οστεοβλαστών με κεραμικά σε νανοφάση (δηλαδή σκευάσματα με μέγεθος κόκκου το πολύ 100nm) και διαπίστωσαν ότι αυξήθηκε η προσρόφηση της fibronectin και/ή της vitronectin (τα οποία είναι δυο σημαντικές πρωτεΐνες που μεσολαβούν για την πρόσφυση οστεοβλαστών για τα επιφανειακά εμφυτεύματα) πάνω στα κεραμικά σε νανοφάση. Η αύξηση αυτή των προσροφημένων πρωτεϊνών οδήγησε σε βελτιωμένες λειτουργίες των οστεοβλαστών (όπως, από πρόσφυση σε πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και εναπόθεση του ασβεστίου που περιέχουν ανόργανα άλατα) πάνω στα κεραμικά σε νανοφάση. Δεν είναι μόνο η αύξηση του πλήθους των προσροφημένων πρωτεϊνών στην επιφάνεια των εμφυτευμάτων και η επιρροή στην κυτταρική προσκόλληση, αλλά και η αυξημένη διαμόρφωση της απορροφημένης πρωτεΐνης για την προώθηση των κυτταρικών λειτουργιών. Ενώ στη περίπτωση των αλουμινίων σε νανοφάση ότι το ξετύλιγμα των vitronectin πάνω σε αυτά αυξήθηκε σε σύγκριση με τα συμβατικά αλουμινίου για να εκθέσει περισσότερους τομείς των κολλοειδών κυττάρων.

Η προσρόφηση των πρωτεϊνών κι η διάπλωση για τη δημιουργία των νανοδομημένων υλικών, και ιδιαίτερα υλικά των ανθρακοϊνών και ανθρακονημάτων, παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση της βιοδραστικότητας των νανοδομημένων υλικών. Επιπλέον, οι ανθρακοϊνες και τα ανθρακονήματα έχουν μέγεθος νανοκλίμακας, μιμούνται το σχήμα της εξωκυτταρικής ουσίας στους διάφορους ιστούς και μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τις λειτουργίες των κυττάρων, που οδηγούν στην βελτίωση της βιοσυμβατότητας των ινών.



Εικ.3.5.Στάδια αναγέννησης οστών

- 1) Εμφυτεύεται το σύνθετο υλικό στο οστό και προσλαμβάνει τα κύτταρα του ασθενούς.
- 2) Το σύνθετο υλικό μειώνεται σταδιακά, ενώ αυξάνονται τα κύτταρα.
- 3) Το συνθετικό υλικό εξαλείφεται και ξεκινάει η λειτουργική αποκατάσταση του οστού.
- 4) Μετά από αρκετούς μήνες γίνεται η πλήρη αποκατάσταση του οστού.

Βιβλιογραφία 3^{ου} Κεφαλαίου

1. T.T. Erik C.Tsu-Wei, Aligned multi-walled carbon nanotube-reinforced composites: processing and mechanical characterization, *J. Phys. D: Appl. Phys.* (2002) σσ.77.
2. M. Cadek, J.N. Coleman, V. Barron, K. Hedicke, W.J. Blau, Morphological and mechanical properties of carbon-nanotube-reinforced semicrystalline and amorphous polymer composites, *Appl. Phys. Lett.* 81 (2002) σσ.5123-5125.
3. S. Xinfeng, L.H. Jared, P.S. Patrick, M.T. James, K. Ramanan, G.M. Antonios, Rheological behaviour and mechanical characterization of injectable poly(propylene fumarate)/single-walled carbon nanotube composites for bone tissue engineering, *Nanotechnology* (2005) σσ.531.
4. K. Balani, R. Anderson, T. Laha, M. Andara, J. Tercero, E. Crumpler, A. Agarwal, Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts in vitro, *Biomaterials* 28 (2007) σσ.618-624.
5. S. Iijima, C. Brabec, A. Maiti, J. Bernholc, Structural flexibility of carbon nanotubes, *J. Chem. Phys.* 104 (1996) σσ. 2089-2092.
6. L.P. Zanello, B. Zhao, H. Hu, R.C. Haddon, Bone cell proliferation on carbon nanotubes, *Nano Lett.* 6 (2006) σσ. 562-567.
7. X. Shi, J.L. Hudson, P.P. Spicer, J.M. Tour, R. Krishnamoorti, A.G. Mikos, Injectable nanocomposites of single-walled carbon nanotubes and biodegradable polymers for bone tissue engineering, *Biomacromolecules* 7 (2006) σσ. 2237-2242.
8. Khang, S.Y. Kim, P. Liu-Snyder, G.T.R. Palmore, S.M. Durbin, T.J. Webster, Enhanced fibronectin adsorption on carbon nanotube/poly(carbonate) urethane: independent role of surface nano-roughness and associated surface energy, *Biomaterials* 28 (2007) σσ.4756-4768.
9. Khang, J. Lu, C. Yao, K.M. Haberstroh, T.J. Webster, The role of nanometer

- and sub-micron surface features on vascular and bone cell adhesion on titanium, *Biomaterials* 29 (2008) σσ. 970-983.
10. N.J. Hallab, K.J. Bundy, K. O'Connor, R.L. Moses, J.J. Jacobs, Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion, *Tissue Eng.* 7 (2001) σσ. 55-71.
 11. R.L. Price, M.C. Waid, K.M. Haberstroh, T.J. Webster, Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibres, *Biomaterials* 24 (2003) σσ. 1877-1887.
 12. K.L. Elias, R.L. Price, T.J. Webster, Enhanced functions of osteoblasts on nanometer diameter carbon fibers, *Biomaterials* 23 (2002) σσ. 3279-3287.
 13. X. Li, H. Gao, M. Uo, Y. Sato, T. Akasaka, Q. Feng, F. Cui, X. Liu, F. Watari, Effect of carbon nanotubes on cellular functions in vitro, *J. Biomed. Mater. Res. A* (2008).
 14. P.A. Tran, L. Sarin, R.H. Hurt, T.J. Webster, Opportunities for Nanotechnology-Enabled Bioactive Bone Implants, *Journal of Materials Chemistry* (2008 In press).
 15. T.J. Webster, C. Ergun, R.H. Doremus, R.W. Siegel, R. Bizios, Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics, *J. Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) σσ. 475-483.
 16. T.J. Webster, L.S. Schadler, R.W. Siegel, R. Bizios, Mechanisms of enhanced osteoblast adhesion on nanophase alumina involve vitronectin, *Tissue Eng.* 7 (2001) σσ. 291-301.
 17. <http://www.spineuniverse.com/professional/resource-center/vitoss/introduction-vitoss> (10/03/2011)
 18. <http://images.sciencedaily.com/2005/02/050223161830.jpg> (17/03/2011)
 19. http://www.spineuniverse.com/imagebrowser/view/image/31907/_original (17/03/2011)
 20. http://bp0.blogger.com/_yR9k0PjfT1w/R2FQu8IOp7I/AAAAAAAAAJM/6G7rW5kC_7c/s400/PaTen5.jpg (17/03/2011)
 21. <http://www.rsc.org/ejga/DT/2006/b610219k-ga.gif> (17/03/2011)
 22. <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/51/4/1066/F1.large.jpg>

(17/03/2011)

23. http://t1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSTPGYstVv_MfsK0hQD2CqVPI9NurGsA924d8E7x9zHasduEB1i&t=1 (17/03/2011)

Κεφάλαιο 4

Εφαρμογές των ανθρακονημάτων (carbon nanotubes (CNT)) και των των ανθρακοϊνών (carbon nanofibres (CNF)) για την αναγέννηση των νευρικών ιστών

Στο διεπιστημονικό πεδίο, ο μηχανισμός των νευρικών ιστών έχει προκαλέσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της πολυπλοκότητας του νευρικού συστήματος, της ανατομίας και της λειτουργίας του, καθώς και την βελτίωση των ήδη υπάρχοντων, τα οποία επαναφέρονται διατηρώντας ή βελτιώνοντας τις λειτουργίες των νευρολογικών ιστών. Εφόσον, οι φυσικοί νευρικοί ιστοί έχουν δημιουργηθεί με πολυάριθμα νανοχαρακτηριστικά (όπως εξωκυττάρια μήτρες, οι οποίες αντιδρούν με το νευρικό κύτταρο), οι ανθρακοϊνες και τα ανθρακονήματα, τα οποία έχουν κι αυτά νανοχαρακτηριστικά, καθώς και εξαιρετικές ηλεκτρικές, μηχανικές, και βιοσυμβατικές ιδιότητες, είναι κατάλληλα για την διόρθωση των νευρικών ιστών. Συγκεκριμένα, με την ταχεία ανάπτυξη της τεχνολογίας στην παραγωγή ποικιλίας διαστάσεων των ανθρακονημάτων (από νανόμετρα μέχρι χιλιοστά), έχουν δημιουργηθεί και διερευνηθεί για τις διάφορες νευρολογικές λειτουργίες τους. Οι

ανθρακοΐνες έχουν πολύ καλές ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των ανθρακονημάτων, αλλά λόγω του χαμηλότερου κόστους και της ευκολότερης παραγωγικής διαδικασίας, οι ανθρακοΐνες έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στις εφαρμογές των μηχανικών λειτουργιών τους για την αναγέννηση των νευρικών ιστών. Παρακάτω αναφέρονται οι ενδεχόμενες νευρολογικές λειτουργίες όπως η βιομίμηση των ανθρακοϊών και ανθρακονημάτων.

4.1. Προβλήματα και προκλήσεις για την θεραπεία των προβληματικών νεύρων και οι θεραπείες τους

Οι νευρολογικές παθήσεις θεωρούνται πολύπλοκες καθώς και σοβαρό κλινικό πρόβλημα σ' όλο τον κόσμο. Για παράδειγμα, στην Αμερική, υπάρχουν 250.000-400.000 άνθρωποι που ζουν με τραυματισμό στο νωτιαίο μυελό και περίπου 13.000 άνθρωποι τραυματίζονται κάθε χρόνο. Με την αύξηση της ηλικίας και την παγκόσμια μόλυνση, το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών θα χρειαστούν νευρικά εμφυτεύματα. Παρόλα αυτά, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι λόγω της πολυπλοκότητας του νευρικού συστήματος, της ανατομίας και της λειτουργίας του, η επιδιόρθωση των κατεστραμμένων νεύρων, αλλά και η ανάκτηση ολόκληρης της λειτουργίας των τραυματισμένων νευρικών ιστών, έχουν γίνει πρόκληση, σε σύγκριση με την επιδιόρθωση άλλων ιστών (όπως τα όστα).

Το κεντρικό νευρικό σύστημα (central nervous system, CNS), όπως ο εγκέφαλος και ο νωτιαίος μυελός και τα δευτερεύοντα συστήματα (peripheral nervous system, PNS), όπως ο νωτιαίος, είναι τα δύο κύρια συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού. Το κεντρικό νευρικό σύστημα (CNS) είναι το τμήμα του νευρικού συστήματος που ενσωματώνει τις πληροφορίες που λαμβάνει από όλα τα τμήματα των οργάνων των σπονδυλωτών ζώων και συντονίζει τη δραστηριότητά τους. Περιλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του νευρικού συστήματος και αποτελείται από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό. Στο κεντρικό νευρικό σύστημα μερικές φορές περιλαμβάνεται, επίσης, και ο αμφιβληστροειδής και τα κρνιακά νεύρα. Το

κεντρικό νευρικό σύστημα περιλαμβάνεται μέσα στη ραχιαία κοιλότητα, στην κρανιακή κοιλότητα και στη νωτιαία κοιλότητα. Στα σπονδυλωτά, ο εγκέφαλος προστατεύεται από το κρανίο, ενώ ο νωτιαίος μυελός προστατεύεται από τους σπονδύλους, και οι δύο είναι κλειστοί στις μήνιγγες. Το περιφερικό νευρικό σύστημα (PNS) αποτελείται από τα νεύρα και τα γάγγλια. Η κύρια λειτουργία του είναι να συνδέει το κεντρικό νευρικό σύστημα με τα άκρα και τα όργανα. Σε αντίθεση με το κεντρικό νευρικό σύστημα, το περιφερικό σύστημα δεν προστατεύεται από το οστό της σπονδυλικής στήλης και του κρανίου, ή από το αιματοεγκεφαλικό φράγμα με αποτέλεσμα να εκτίθεται σε τοξίνες και μηχανικές βλάβες. Το περιφερικό νευρικό σύστημα διαιρείται σε αυτόνομο νευρικό σύστημα και σε αισθητήριο σύστημα. Το περιφερικό νευρικό σύστημα μαζί με το κεντρικό σύστημα έχουν έναν θεμελιώδη ρόλο στον έλεγχο συμπεριφοράς.

Στο περιφερικό νευρικό σύστημα, η καταστροφή του νευρικού άξονα μπορεί να καλυφθεί από τους εξής τρόπους:

- τον πολλαπλασιασμό των Schwann κυττάρων.
- την φαγοκυττάρωση μυελίνης από τα μακροφάγα.
- μονοκύτταρα που σχηματίζουν ζώνες Bünger από την βλάστηση στους άξονες των άνω τμημάτων.

Το κεντρικό νευρικό σύστημα στερείται κύτταρα Schwann για να προωθήσουν την ανάπτυξη του νευρικού άξονα και το πάχος της νευρογλοιακής ουλής. Η ανάπτυξη αυτή μπορεί να σχηματισθεί κυρίως από τα αστροκύτταρα και την μυνιγγική δραστηριότητα των κυττάρων μέσα σε ένα δυσμενές περιβάλλον, το οποίο αναστέλλει τη νευρική αναγέννηση. Το νεύρο επιδιορθώνει τις διεργασίες στο κεντρικό νευρικό σύστημα, το οποίο είναι πιο δύσκολο από ότι στο περιφερικό νευρικό σύστημα. Από την άλλη πλευρά, τα παραδοσιακά εμφυτεύματα νεύρων και η χειρουργική, όπως η χρησιμοποίηση των autografts, xenografts, allografts και ανιχνευτές από σιλικόνη για τη συνεχή διάγνωση και θεραπεία των νευρικών ιστών και άλλων βιοϋλικών εμβόλιμων μηχανισμών των νευρικών μοσχευμάτων, έχουν πολλά προβλήματα που δεν ανταποκρίνονται στις υψηλές αποδόσεις που απαιτούνται για τον σημερινό ασθενή.

1. Στα autografts, τα εμφυτεύματα που χρησιμοποιούνται είναι δότες νεύρων από άλλα μέρη του σώματος, όπως νεύρα-αισθητήρες των άνω άκρων. Είναι δύσκολο να αποκτήσει ο ασθενής αρκετούς δότες νεύρων και αυτή η έλλειψη έχει ως αποτέλεσμα την δυσλειτουργία τους.
2. Στην περίπτωση των allografts και xenografts υπάρχει η πιθανότητα να μεταφερθεί η ασθένεια στο ξένο σώμα και αυτό με τη σειρά του να ανταποκριθεί, με αποτέλεσμα να υπάρχουν συχνά μεγάλα ποσοστά αποτυχίας στα εμφυτεύματα.
3. Οι ανιχνευτές από σιλικόνη ή άλλα κράματα μετάλλων βασισμένα σε ηλεκτρόδια είναι συχνά ενσωματωμένα από πυκνούς νευρογλοιακούς ουλώδεις ιστούς στον εγκέφαλο, οι οποίοι αυξάνουν την ηλεκτρική αντίσταση μεταξύ των ανιχνευτών και του ιστού. Μερικές φορές παρακωλύουν την αποδοτικότητα της ηλεκτρικής διέγερσης και αχρηστεύουν τους ανιχνευτές κατά την διάρκεια της θεραπείας.
4. Άλλα βιοϋλικά, με εξαίρεση κάποια συνθετικά πολυμερή, έχουν παραχθεί ως νευρικοί αγωγοί, τα οποία μπορούν να είναι περιορισμένα, λόγω των χαμηλότερων μηχανικών και ηλεκτρικών ιδιοτήτων, όπως η βιοσυμβατότητα.

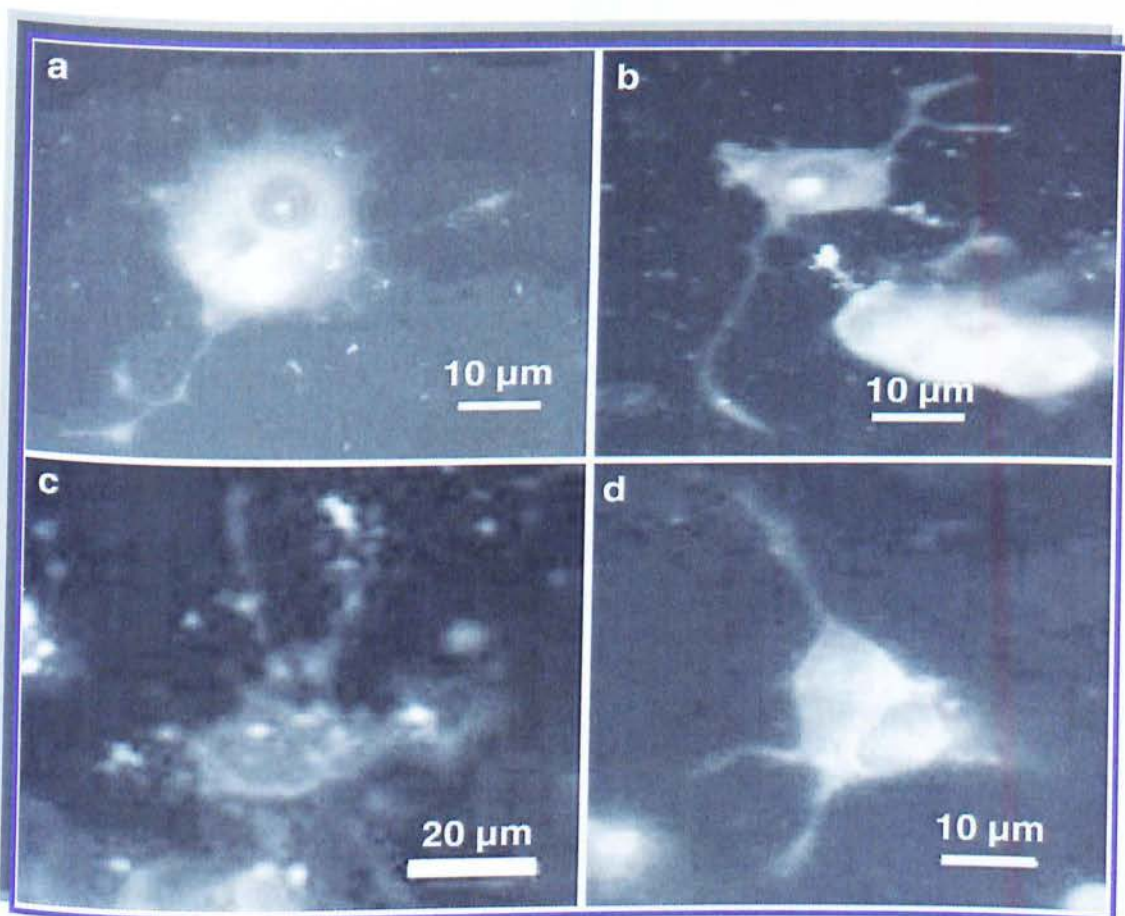
4.1.1 Οι ανθρακοΐνες (carbon nanofibres (CNF)) για την αναγέννηση των νευρικών ιστών

Οι ανθρακοΐνες έχουν την ικανότητα να ενισχύουν τα πολυμερή ικρίωματα. Παράγουν εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες και χρησιμεύουν ως διαρθρωτικό στήριγμα μεγάλης διάρκειας για την αναγέννηση των νεύρων. Επιπλέον, λόγω της υψηλής ηλεκτρικής αγωγιμότητας μερικών βιοϋλικών είναι μια σημαντική ιδιότητα για επιτυχείς νευρολογικές εφαρμογές. Η εξαιρετική αγωγιμότητα των ανθρακοϊνών, κάτω από ηλεκτρική διέγερση και την αποτελεσματική καθοδήγηση στην διόρθωση των νευρικών ιστών, συμβάλει στην διέγερση και στον έλεγχο των

νευρικών δραστηριοτήτων. Έχει αποδειχθεί ότι η νανοδόμηση των ανθρακοϊνών μιμείται φυσιολογικά τις πρωτεΐνες και τους ιστούς στις νανοδιαστάσεις τους και είναι κυτταροσυμβατή με διάφορους ιστούς. Επομένως, υπάρχουν πολλές μελέτες οι οποίες έχουν ξεκινήσει να εξερευνούν τις δυνατότητες των ανθρακοϊνών στην αναγέννηση νεύρων.

Για την διόρθωση του κατεστραμμένου εγκεφάλου ή νωτιαίου μυελού, σχεδιάζεται η προσθήκη νεύρου ως πομπός όπου είναι απαραίτητο ένα εμφυτευμένο ηλεκτρόδιο μικρού μεγέθους με εξαιρετική ηλεκτρική αγωγιμότητα, για την σωστή διάγνωση και διέγερση διορθωμένου ιστού. Ωστόσο, κατά τον σχηματισμό πυκνού νευρογλοιακού ουλώδους ιστού πάνω σε συμβατικό πυρίτιο και κράματα μετάλλου για νευρικά εμφυτεύματα εμφανίζονται συχνά με αποτέλεσμα να μειώνεται η αποτελεσματικότητα της ηλεκτρικής διέγερσης και αχρηστεύουν τους ανιχνευτές κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Ο Nguyen-Vu και οι συνεργάτες του παρήγαγαν κάθετη ευθυγράμμιση συστοιχίας των ανθρακοϊνών (VACNF) ηλεκτροδίων επικαλυμμένα με ένα λεπτό στρώμα από ηλεκτρονικά αγωγίμα polyglycole πολυμερή για νευρικά εμφυτεύματα. Τα νανοηλεκτρόδια έχουν πιο ανοιχτές και δυνατές 3D δομές και καλύτερη ηλεκτρική αγωγιμότητα. Οι μελέτες έδειξαν ότι οι κάθετες συστοιχίες ανθρακοϊνών βοηθούν να σχηματιστεί οικείο νεύρο – ηλεκτρική διεπαφή μεταξύ του κυττάρου και των νανοϊνών ζωτικής σημασίας για την πρόσθεση νεύρων. Επίσης, ο Mcknight παρήγαγε δυο ειδών VACNF συστοιχίες ηλεκτροδίων με υψηλή ανάλυση εικόνας και δοκίμασε την διαφορετικότητα των νευρικών κυττάρων. Σύμφωνα με τις ηλεκτροαναλύσεις στα διακριτά ηλεκτρόδια μετά από μακροχρόνια καλλιέργεια κυττάρων, έδειξαν ότι αυτές οι συστοιχίες ηλεκτροδίων ανταποκρίνονταν καλύτερα στην ανίχνευση των οξειδωμένων ειδών που παράγονται από τα καλλιεργημένα κύτταρα. Έτσι, τα ανθρακικά ηλεκτρόδια μπορούν να αντικαταστήσουν μόνιμα τα μεταλλικά ηλεκτρόδια. Παρόλα αυτά, πολλοί ερευνητές έχουν παράγει διάφορες πατέντες και τυχαία νανοςύνθετες από ανθρακοϊνες για μόνιμους ιστούς αναγέννησης λειτουργίες. Για παράδειγμα, από τότε που οι σχηματισμοί των νευρογλοιακών ουλών ιστών γύρω από εμφυτεύματα νευρικών καθετήρων είναι ένας από τους λόγους που έχει ηγετική θέση στις αποτυχίες των εμφυτευμάτων , ο McKenzie

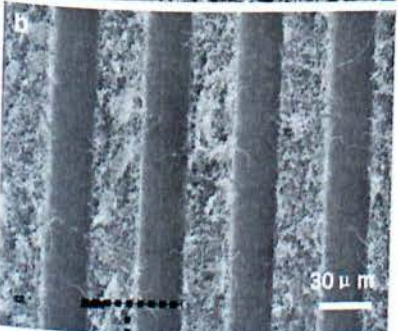
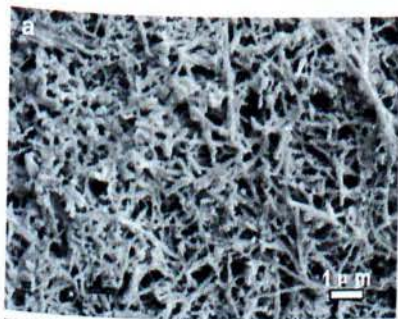
διερευνά σε αστροκύτταρο (ένα από τα κύτταρα σχηματισμού νευρογλοιακών ουλώδων ιστών) για την λειτουργία ανθρακοϊνών -polycarbonate urethane σύνθεση. Αποδείχθηκε για πρώτη φορά ότι η προσκόλληση του αστροκυττάρου μπορεί να εμποδίσει αποτελεσματικά, όταν ενσωματώνεται και αυξάνεται η επιφανειακή ενέργεια των ανθρακοϊνών στα σύνθετα πολυμερή. Επιπλέον, τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι μειώνεται εκθετικά η ηλεκτρική αντίσταση των σύνθετων ανθρακοϊνών με την αύξηση του βάρους των ανθρακοϊνών αναλογία 2%- 25%.



Εικ.4.1. Η βέλτιστη επέκταση νευρικών κυττάρων για PCU/CNF νανοσύνθετα με αναλογία:(α)100/0, (β)98/2, (γ)75/25 και (δ)0/100 (PCU/CNFκ.β.%.). [βιβλ.23]

Έτσι μπορεί κανείς να χρησιμοποιήσει ανθρακοϊνες για να σχεδιάσει καθετήρες νεύρων με διαφορετικές αγωγιμότητες σε διάφορα σημεία του καθετήρα μέσω

απλού ελέγχου του βάρους των ανθρακοϊνών ποσοστά σύνθετα πολυμερή. Ακόμη, οι ανθρακοϊνες μπορούν να υποστηρίξουν και την ανάπτυξη των νευρών και την επέκταση νευρικών κυττάρων. Μελέτες έχουν αποδείξει εξαιρετική ανάπτυξη των νευρικών κυττάρων από νευρώνες που καλλιεργούνται σε διάφορα βάρη ανάλογα με τις σύνθετες ανθρακοϊνες. Επιπλέον, από τότε που τα βλαστικά κύτταρα είχαν την ευθύνη για την διαφορετικότητα μέσα σε διάφορα είδη κυττάρων με εξαίρεση τους νευρώνες, είναι απαραίτητη πηγή για την αναγέννηση ιατρικής για την θεραπεία νευρολογικών διαταραχών. Ακόμα πιο σημαντικό, μελέτες όπου οι ανθρακοϊνες εμποτισμένες με βλαστοκύτταρα έχουν πετύχει να προγραμματίζουν, να ελέγχουν την συλλογή της διαφορετικότητας, των βλαστοκυττάρων μέσα σε ευνοϊκούς τύπους νευρικών κυττάρων στην βλάβη νευρικού ιστού. Συγκεκριμένα, σε *in vitro* μελέτη ανακαλύφθηκε ότι ο σχηματισμός νευρογλοιακού ουλώδους ιστού και η διαφορετικότητα των νευρικών βλαστοκυττάρων, μετά από εισαγωγή είτε υδρόφοβων είτε υγροσκοπικών ανθρακοϊνών με βλαστοκύτταρα, προκάλεσαν εγκεφαλικό επεισόδιο σε αρουραίους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά από τρεις εβδομάδες εμφυτεύματος, τα βλαστοκύτταρα διαφοροποιήθηκαν μέσα σε νευρώνες και η κινητική λειτουργία μετατράπηκε σε εγκεφαλικό επεισόδιο, όπου προκλήθηκε σε αρουραίους με μικρό ουλώδες ιστό που περιβάλλεται από



ανθρακοϊνες. Ωστόσο, τέτοια αποτελέσματα δεν παρατηρήθηκαν χρησιμοποιώντας μόνο τα βλαστοκύτταρα. Έτσι, τα αποτελέσματα υπόσχονται την μελλοντική χρήση των ανθρακοϊνών για την θεραπεία διαφόρων νευρικών διαταραχών και ασθενειών.

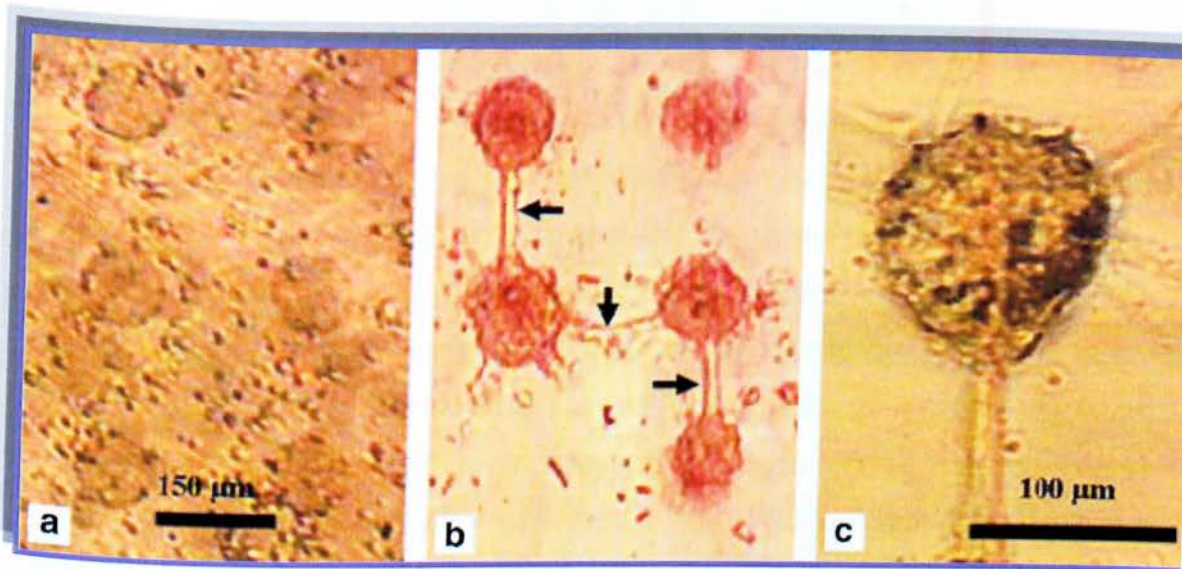
Εικ.4.2. Σάρωση νανοσύνθετων ηλεκτρονίων CNF.

(a) Πολυανθρακική ουρεθάνη(PCU) και CNF 60nm όπου έχει την υψηλότερη επιφανειακή ενέργεια
(b) Η ευθυγράμμιση των CNF με βάση το πρότυπο της PCU.
[βιβλ.22]

4.1.2 Τα ανθρακονήματα (carbon nanotubes (CNT)) για την αναγέννηση των νευρικών ιστών

Από τότε που ανακάλυψε ο Iijima τα ανθρακονήματα, υπήρξε αξιοσημείωτη αύξηση του προσδιορισμού της δυνατότητας της χρήσης των ανθρακονημάτων (συμπεριλαμβανομένων των μονοφλοιικών και πολυφλοιικών ανθρακονημάτων) για την θεραπεία ασθενειών και για την προώθηση της αναγέννησης των ιστών. Για παράδειγμα, όπως περιγράφει ο ερευνητής Mattson, παρέχει τα πρώτα αποδεικτικά στοιχεία ότι τα πολυφλοιικά ανθρακονήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να υποστηρίξουν την σύνδεση και την ανάπτυξη ενός νευρικού κυττάρου. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι τα ανθρακονήματα, λειτουργούν χημικά με διάφορα βιοενεργά μόρια βελτιώνοντας την δραστηριότητα για την αναγέννηση των νευρών, συμπεριλαμβανομένη και η νευρωνική διακλάδωση, απόφυση και κατάσχεση της ανάπτυξη κώνων 18-19% των μονοφλοιικών μαζί με συμπολυμερές (polyethyleneimine, PEI) έχουν συντεθεί σε ένα αποτελεσματικό μακρύ νευρώνα και έχουν αυξηθεί το υποσύνολο των νευρώνων περίπου συγκρίσιμη με αυτή του PEI. Ο ερευνητής Matsumoto απέδειξε ότι τα πολυφλοιικών ανθρακονημάτων μπορούν να ρυθμιστούν και να προωθήσουν την απόφυση νευρώνων, όταν συνδέεται ομοιοπολικά με νευροτροφίνες. Επιπλέον, η υψηλή αγωγιμότητα των ανθρακονημάτων μπορεί να ενισχύσει το δικτυακό κύκλωμα της νευρωνικής δραστηριότητας. Ο ερευνητής Lovat ανέφερε ότι η μεταφορά των ηλεκτρικών κυμάτων στο νευρωνικό δίκτυο μπορεί να βελτιωθεί χρησιμοποιώντας πολυφλοιικά ανθρακονήματα στην καθαρή μορφή τους. Στη μελέτη, τα υποστρώματα των ανθρακονημάτων αυξήθηκαν hippocampal αυθόρμητα συνοπτικά ρεύματα και η αυθόρμητη δραστηριότητα συγκρίνονται για να ελεγχθούν τα υποστρώματα. Πρόσφατα, ο Keefner χρησιμοποίησε πολυφλοιικών ανθρακονημάτων ως επένδυση στα συμβατικά βολφραμίου και σύρματα από ανοξειδωτο ατσάλι για ηλεκτρόδια. Από αυτά προκύπτουν ότι τα επιχρίσματα των ανθρακονημάτων προωθούνται για την εγγραφή και την ηλεκτρική διέγερση των χαρακτηριστικών των νευρικών ηλεκτροδίων.

Επιπλέον, τα διάφορα μέρη των ανθρακονημάτων, όπως η μήτρα και η λεπτή μεμβράνη, έχουν παραχθεί για την βελτίωση νευρικών λειτουργιών. Ειδικά, ο Gabay παρήγαγε σε μικρό μέγεθος πρότυπα υποστρώματα που αποτελούνται από μέρη ανθρακονημάτων. Μετά από την ανάπτυξη νευρικών κυττάρων μιας ημέρας από φλοιούς αρουραίων Charles River πάνω στα σημεία των υποστρωμάτων ανθρακονημάτων, αναπτύχθηκε ένα καλά οργανωμένο δίκτυο όπως δείχνει η εικόνα.



Εικ.4.3. Η αυτό-οργάνωση των νευρικών δικτύων σε μικρές συστοιχίες CNT. (a). Τα κύτταρα είναι τυχαία διασκορπισμένα. Μετά την χορήγηση των CNT οι συστοιχίες διαμορφώνουν ομάδες CNT όπου ενώνονται με κάποιους νευρώνες, όπως φαίνεται και στις εικόνες (b) και (c). Η ανάλυση στις εικόνες (a) και (b) γίνεται σε κλίμακα μπαρ, σε απόσταση 150mm, ενώ η (c) σε 100mm. [βιβλι.31]

Ειδικότερα, τα προτιμότερα κύτταρα συγκεντρώνονται στα σημεία των ανθρακονημάτων. Στη συνέχεια τα νευρικά κύτταρα μεταξύ των 2 γειτονικών σημείων ανθρακονημάτων αναπτύχθηκαν άξονες, όπως οι δενδρίτες, και συνδέει το ένα με το άλλο, έτσι τα κύτταρα σχηματίζουν ένα νευρολογικό δίκτυο στα σημεία των ανθρακονημάτων. Επιπλέον για να ξεπεραστεί η μηχανική αποτυχία των πολυμερών/ Σύνθετων ανθρακονημάτων τα οποία προέρχονται από αδύναμη συνδεσιμότητα των ανθρακονημάτων μέσα στα σύνθετα. Ο Mamedon προετοίμασε ανεξάρτητα μονοφλοιικά ανθρακονήματα/μεμβράνες polyelectrolyte μέσω συνδεσμολογίας από επίπεδο σε επίπεδο. Τα ανεξάρτητα μονοφλοιικά

ανθρακονήματα/μεμβράνες polyelectrolyte έχουν εξαιρετική αντοχή στον εφελκυσμό και προσεγγίζουν την αντοχή των σκληρών κεραμικών. Επιπλέον, η βιωσιμότητα των νευρικών κυττάρων έχει δοκιμαστεί στην προσκόλληση και στην διαφορετικότητα της ανεξάρτητης συναρμολόγησης από επίπεδο σε επίπεδο των μονοφλοιικών ανθρακονημάτων/μεμβράνες polyelectrolyte με πολύ λεπτή μεμβράνη. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα / πολυμερή φιλμ προκάλεσαν ευνοϊκή σύνδεση και διαφορετικότητα των NG108-15 κυττάρων, οι νευρίτες καθοδηγούνται σε προέκταση και κατευθύνονται για πιο εξεζητημένες διακλαδώσεις συγκριτικά με τον έλεγχο πάνε σε δισκία για καλλιέργεια. Επιπλέον μια άλλη μελέτη εκτέλεσε ηλεκτρική διέγερση στα νευρικά κύτταρα διαφοροποιημένα στη συνδεσμολογία των ανεξάρτητων πολυεπίπεδων μονοφλοιικών φιλμ. Η μελέτη αυτή αποκάλυψε ότι τα πολυεπίπεδα μονοφλοιικών φιλμ όχι μόνο διατήρησαν της ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες των νεύρων, αλλά διέγειραν ηλεκτρικά τα νευρικά κύτταρα για την διόρθωση των κατεστραμμένων νεύρων. Παρομοίως οι ανθρακοΐνες μπορούν δυνητικά να χρησιμεύσουν ως υποστρώματα στο εμπότισμό τον προγονικών κυττάρων (όπως βλαστοκύτταρα) και να διαφοροποιηθούν εκλεκτικά μέσα σε ευνοϊκά κύτταρα στην προβληματική περιοχή. Για παράδειγμα, ο Jan ανέφερε ότι η συνδεσμολογία των ανεξάρτητων μονοφλοιικά ανθρακονημάτων/μεμβράνες polyelectrolyte βελτίωσαν την διαφορετικότητα των εμβρυικών νευρικών βλαστοκυττάρων των ποντικών μέσα σε νευρώνες όπως τα αστροκύτταρα και βοήθησαν στην απόφυση των νευρίτων. Μετά από επτά ημέρες καλλιέργειας, τα επιλεκτικά σύνθετα προωθούν περισσότερο τα νεύρα και λιγότερο τα αστροκύτταρα από ότι το κοινό υπόστρωμα poly-L-ornitine που χρησιμοποιήθηκε για νευρικές μελέτες. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα σύνθετα ανθρακονήματα όχι μόνο δεν ήταν κυτταροσυμβατά για την ανάπτυξη στα βλαστοκύτταρα, αλλά συνέβαλαν στην διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων στα νευρικά κύτταρα.

Βιβλιογραφία 4^{ου} κεφαλαίου

1. L. Zhang, T.J. Webster, Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration, *Nano Today* 4 (2009) σσ. 66-80.
2. K. Hata, D.N. Futaba, K. Mizuno, T. Namai, M. Yumura, S. Iijima, Water-assisted highly efficient synthesis of impurity-free single-walled carbon nanotubes, *Science* 306 (2004) σσ.1362-1364.
3. S.K. Seidlits, J.Y. Lee, C.E. Schmidt, Nanostructured scaffolds for neural applications, *Nanomedicine* 3 (2008) σσ.183-199.
4. B.S. Harrison, A. Atala, Carbon nanotube applications for tissue engineering, *Biomaterials* 28 (2007) σσ.344-353.
5. Kim, Y.I. Jeong, B.T.N. Ngoc, K.S. Yang, M. Kojima, Y. Ahm, K. Morinobu, E.J.-W. Lee, Synthesis and characterization of porous carbon nanofibres with hollow cores through the thermal treatment of electrospun copolymeric nanofiber webs, *Small* 3(2007) σσ.91-95.
6. Marquez-Lucero, J.A. Gomez, R. Caudillo, M. Miki-Yoshida, M. Jose-Yacaman, A method to evaluate the tensile strength and stress-strain relationship of carbon nanofibres, carbon nanotubes, and C-chains, *Small* 1 (2005) σσ.640-644.
7. <http://www.travisroyfoundation.org/pages/resources-stats.htm>, Accessed 12/4/2011.
8. N. Zhang, H. Yan, X. Wen, Tissue-engineering approaches for axonal guidance, *Brain Res. Rev.* 49 (2005) σσ.48-64.
9. Y.-C. Huang, Y.-Y. Huang, Biomaterials and strategies for nerve regeneration, *Artif. Organs* 30 (2006) 514-522.
10. R.D.E. Gregory, Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs, *Anatom. Rec.* 263 (2001) σσ.396-404.
11. H. Millesi, Indications and techniques of nerve grafting, in: R.H. Gelbertman (Ed.), *Operative Nerve Repair and Reconstruction*, Lippincott J.B., Philadelphia, 1991, pp. 525-544.
12. J.K. Terzis, D.D. Sun, P.K. Thanos, Historical and basic science review: past,

- present, and future of nerve repair, *J. Reconstr. Microsurg.* 13 (1997) σσ.215-225.
13. R.B. James, Peripheral nerve and neuromuscular allotransplantation: current status, *Microsurgery* 20 (2000) σσ.384-388.
 14. A.A. Zalewski, A.K. Gulati, Rejection of nerve allografts after cessation of immunosuppression with cyclosporin A, *Transplantation* 31 (1981) σσ.88-89.
 15. J.N. Turner, W. Shain, D.H. Szarowski, M. Andersen, S. Martins, M. Isaacson, H. Craighead, Cerebral astrocyte response to micromachined silicon implants, *Exp. Neurol.* 156 (1999) σσ. 33-49.
 16. D.J. Edell, V.V. Toi, V.M. McNeil, L.D. Clark Factors influencing the biocompatibility of insertable silicon microshafts in cerebral cortex, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 39 (1992) σσ.635-643.
 17. T.D. Nguyen-Vu, H. Chen, A.M. Cassell, R.J. Andrews, M. Meyyappan, J. Li, Vertically aligned carbon nanofiber architecture as a multifunctional 3-D neural electrical interface, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 54 (2007) σσ.1121-1128.
 18. J. Li, R.J. Andrews, Trimodal nanoelectrode array for precise deep brain stimulation: prospects of a new technology based on carbon nanofiber arrays, *Operat. Neuro- modulat* (2007) σσ. 537-545.
 19. T.E. McKnight, A.V. Melechko, B.L. Fletcher, S.W. Jones, D.K. Hensley, D.B. Peckys, G.D. Griffin, M.L. Simpson, M.N. Ericson, Resident neuroelectrochemical interfacing using carbon nanofiber arrays, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) σσ.15317-15327.
 20. Z. Yu, T.E. McKnight, M.N. Ericson, A.V. Melechko, M.L. Simpson, B. Morrison, Vertically aligned carbon nanofiber arrays record electrophysiological signals from hippocampal slices, *Nano Lett.* 7 (2007) σσ.2188-2195.
 21. J.L. McKenzie, M.C. Waid, R. Shi, T.J. Webster, Decreased functions of astrocytes on carbon nanofiber materials, *Biomaterials* 25 (2004) 1309-1317.

22. D.Khang, M. Sato, R.L. Price, A.E. Ribbe, T.J. Webster, Selective adhesion and mineral deposition by osteoblasts on carbon nanofiber patterns, *Int. J. Nanomedicine* 1 (2006) σσ.65-72.
23. T.J. Webster, M.C. Waid, J.L. McKenzie, R.L. Price, J.U. Ejiolor, Nanobiotechnology: carbon nanofibres as improved neural and orthopaedic implants, *Nanotechnol- ogy* 48 (2004).
24. J.E. Lee, J.H. Kim, J.Y. Kim, D. Khang, T.J. Webster, Repair of stroke induced neural tissue damage through implantation of carbon nanofibres impregnated with stem cells, *International journal of nanomedicine* (2009) In press.
25. L. Zhang, B. Ercan, T.J. Webster, Carbon nanotubes and nanofibers for tissue engineering applications, in: C. Liu (Ed.), *Carbon*, Research Signpost, Trivandrum, 2009.
26. W. Wei, A. Sethuraman, C. Jin, N.A. Monteiro-Riviere, R.J. Narayan, Biological properties of carbon nanotubes, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7 (2007) σσ.1284-1297.
27. H. Hu, Y. Ni, S.K. Mandal, V. Montana, B. Zhao, R.C. Haddon, V. Parpura, Polyethyl- eneimine functionalized single-walled carbon nanotubes as a substrate for neuronal growth, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) σσ.4285-4289.
28. K. Matsumoto, C. Sato, Y. Naka, A. Kitazawa, R.L. Whitby, N. Shimizu, Neurite outgrowths of neurons with neurotrophin-coated carbon nanotubes, *J. Biosci. Bioeng.* 103 (2007) σσ.216-220.
29. V. Lovat, D. Pantarotto, L. Lagostena, B. Cacciari, M. Grandolfo, M. Righi, G. Spalluto, M. Prato, L. Ballerini, Carbon nanotube substrates boost neuronal electrical signaling, *Nano Lett.* 5 (2005) σσ.1107-1110.
30. E.W. Keefer, B.R. Botterman, M.I. Romero, A.F. Rossi, G.W. Gross, Carbon nanotube coating improves neuronal recordings, *Nat Nanotechnol.* 3 (2008) σσ.434-439.
31. T.Gabay, E. Jakobs, E. Ben-Jacob, Y. Hanein, Engineered self-organization of neural networks using carbon nanotube clusters, *Phys. A: Stat. Mechan. Appl.* 350 (2005) 611-621.

32. A.A. Mamedov, N.A. Kotov, M. Prato, D.M. Guldi, J.P. Wicksted, A. Hirsch, Molecular design of strong single-wall carbon nanotube/polyelectrolyte multilayer composites, *Nat. Mater.* 1 (2002) σσ.190-194.
33. M.K. Gheith, V.A. Sinani, J.P. Wicksted, R.L. Matts, N.A. Kotov, Single-walled carbon nanotube polyelectrolyte multilayers and freestanding films as a biocompatible platform for neuroprosthetic implants, *Adv. Mater.* 17 (2005) σσ.2663-2670.
34. M.K. Gheith, T.C. Pappas, A.V. Liopo, V.A. Sinani, B.S. Shim, M. Motamedi, J.P. Wicksted, N.A. Kotov, Stimulation of neural cells by lateral currents in conductive layer-by-layer films of single-walled carbon nanotubes, *Adv. Mater.* 18 (2006) σσ.2975-2979.
35. E. Jan, N.A. Kotov, Successful differentiation of mouse neural stem cells on layer-by-layer assembled single-walled carbon nanotube composite, *Nano Lett.* 7 (2007) σσ. 1123-1128

Κεφάλαιο 5

Μεταφορά φαρμάκων και γονιδίων μέσω των ανθρακονημάτων (carbon nanotubes (CNT))

Η χορήγηση φαρμάκων είναι ένας αναδυόμενος τομέας που επικεντρώνεται στην στόχευση των φαρμάκων ή γονιδίων σε μια επιθυμητή ομάδα κυττάρων. Ο στόχος αυτής της στοχευόμενης παράδοσης είναι να μεταφέρει μια κατάλληλη ποσότητα φαρμάκων στις επιθυμητές περιοχές (όπως στους όγκους, τους προσβεβλημένους ιστούς, κ.λπ.) και παράλληλα να ελαχιστοποιεί τις ανεπιθύμητες παρενέργειες των φαρμάκων σε άλλους ιστούς. Σε αυτή την ενότητα, θα αναφερθεί ο τρόπος που μπορούν οι ανθρακοϊνες και τα ανθρακονήματα να είναι οι καλύτεροι υποψήφιοι για την στοχοθετημένη χορήγηση των φαρμάκων, οι μηχανισμοί για το πώς τα ανθρακονήματα εισέρχονται στα κύτταρα, καθώς και οι εφαρμογές των ανθρακοϊνών και ανθρακονημάτων στην παράδοση των θεραπευτικών ουσιών και γονιδίων.

5.1. Κυτταρική απορρόφηση μέσω των ανθρακονημάτων (carbon nanotubes (CNT))

Τα επεξεργασμένα ανθρακονήματα έχουν δείξει σε πολλές μελέτες ότι είναι ικανά να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες. Η ικανότητά τους αυτή τους επέτρεψε να υπάρξει ιδιαίτερα μεγάλο ενδιαφέρον για τον τρόπο διανομής των φαρμάκων. Στόχος είναι η παράδοση των φαρμάκων στα κύτταρα. Τα φάρμακα είναι τα πρώτα που συνδέονται με τον μεταφορέα είτε με ομοιοπολική είτε με μη ομοιοπολική συγκόλληση. Η μεταφορά των συζυγή φαρμάκων, κατευθύνεται προς τα κύτταρα-στόχους μέσω:

- παθητικών μεθόδων στόχευσης. Δηλαδή, η μέθοδος αυτή αυξάνει την αναλογία του στοχευόμενου ή μη στοχευόμενου ποσού μεταφερόμενων φαρμάκων από τις ελάχιστες μη ειδικές αλληλεπιδράσεις μαζί με μη στοχευόμενα όργανα, ιστούς και κύτταρα.
- δραστικών μεθόδων στόχευσης. Δηλαδή, η μέθοδος με την οποία ο θεραπευτικός παράγοντας παραδίδεται σε όγκους με την σύνδεση του αντιπροσώπου, με έναν συνδέτη που συνδέεται με ειδικούς υποδοχείς που είναι ταχείας μεταφοράς στα κύτταρα-στόχους.

Μετά την επίτευξη της στοχοθετημένης τοποθεσίας (τα όργανα, οι ιστοί ή τα κύτταρα), υπάρχουν δύο δυνατότητες:

- I. το φάρμακο να εισέρχεται στα κύτταρα, χωρίς να γίνεται εσωτερίκευση του μεταφορέα.
- II. όσο το φάρμακο, τόσο και ο μεταφορέας να εσωτερικεύεται. Η μέθοδος αυτή παρέχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα παράδοσης. Μετά την είσοδό τους στα κύτταρα, στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον, θα υποβαθμίσει το συζυγές σύμπλοκο του φαρμάκου-φορέα απελευθερώνοντας μόρια φαρμάκων μέσα στα κύτταρα.

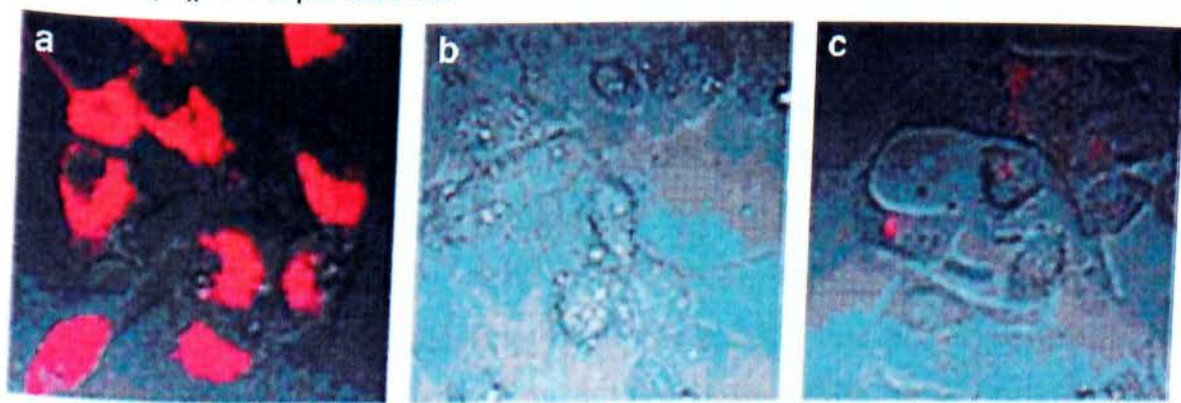
Στον πρώτο τρόπο εσωτερίκευσης, το εξωκυττάριο περιβάλλον συμβάλλει στην υποβάθμιση του συζυγή φαρμάκου-φορέα, το φάρμακο θα διασχίσει τα λιπίδια και τη μεμβράνη και θα εισέλθει στα κύτταρα.

Τα ανθρακονήματα με την ικανότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες είναι καλοί υποψήφιοι για να χρησιμεύσουν ως φορείς χορήγησης φαρμάκων στα κύτταρα με υψηλή αποτελεσματικότητα. Έχει αποδειχθεί ότι υπάρχουν δύο πιθανοί μηχανισμοί της εσωτερίκευσης των ανθρακονημάτων: (α) μέσω του υποδοχέα της ενδοκύττωσης και (β) μέσω της ενδοκύττωση-ανεξάρτητη δίοδος.

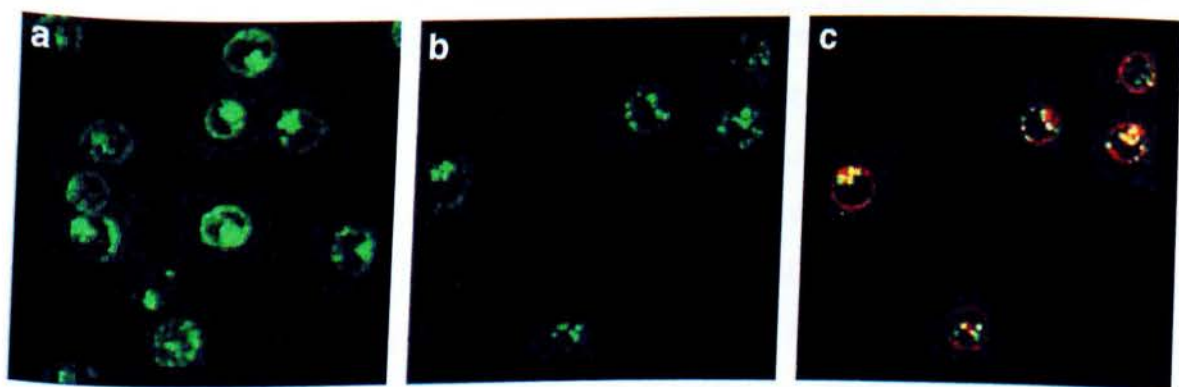
5.1.1. Εσωτερίκευση των ανθρακονημάτων (CNT) μέσω της ενδοκύττωσης

Η ενδοκύττωση είναι μια διαδικασία στην οποία τα κύτταρα εμπεριέχουν ένα υλικό από το εξωτερικό περιβάλλον, εσωκλείοντας το υλικό σε μια μικρή περιοχή της μεμβράνης του κυττάρου για να διαμορφώσει μια κύστη. Η κύστη, στο εσωτερικό του κυττάρου, συγχωνεύεται με άλλες κύστες (όπως ενδοσώματα και λυσοσώματα). Δεδομένου ότι η ενδοκύττωση είναι εξαρτημένη, σε περιβάλλον χαμηλής ενέργειας (όπως οι θερμοκρασίες χαμηλότερες από 37°C ή η εξάντληση του ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη)) αναστέλλει τη διαδικασία της ενδοκύττωσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα ανθρακονήματα μπορούν να εισέλθουν μέσα στα κύτταρα μέσω της διαδικασίας της ενδοκύττωσης. Η εσωτερίκευση των ανθρακονημάτων ή τα συζευγμένα ανθρακονήματα συνήθως παρακολουθούνται μέσω φθορισμού και καταγράφονται οι κινήσεις των ανθρακονημάτων ή των συζευγμένων ανθρακονημάτων. Διαπιστώθηκε ότι τα συζευγμένα μονοφλοιικά ανθρακονήματα μαζί είτε με τις πρωτεΐνες (όπως η λευκωματίνη βόειου ορού ή βιοτίνη) ή με το DNA (όπως CATCCGAGTGTCCA Cy3) ήταν σε θέση να εισχωρήσουν στα κύτταρα (τα ανθρώπινα προμυελοκυτταρική λευχαιμία(HL60) κύτταρα ή τα κύτταρα του καρκίνου του τραχήλου (HeLa)) μετά από επώαση 1 ώρας στους 37 ° C, αλλά η πρωτεΐνη ή το DNA από μόνα τους δεν βρέθηκαν στο εσωτερικό των κυττάρων υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες .Ειδικά, όταν επωάζονται σε θερμοκρασία 4 ° C (που είναι η θερμοκρασία απόφραξης της ενδοκυττάρωσης) ή με τα κύτταρα που επωάστηκαν προηγουμένως με NaN_3 (που είναι γνωστό ότι αναστέλλει την παραγωγή της ATP

στα κύτταρα), η κυτταρική πρόσληψη συζευγμένων μονοφλοιικών ανθρακονημάτων ή μονοφλοιικών ανθρακονημάτων ήταν σημαντικά μειωμένη. Η εσωτερίκευση των ενδοκυττάρωσης των μονοφλοιικών ανθρακονημάτων είναι άμεσα ορατή χρησιμοποιώντας ένα «κόκκινο δείκτη» (FM 4-64), χρωματίζοντας και σχηματίζοντας ενδοσώματα γύρω από τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα κατά τη διαδικασία εσωτερίκευσης. Παρατηρήθηκε κίτρινη απόχρωση στο εσωτερικό των κυττάρων λόγω της αλληλοεπικάλυψης του φθορίζοντος πράσινου (σύμπλοκα μονοφλοιικών ανθρακονημάτων) και των «κόκκινων» ενδοσωμάτων. Επιπλέον, η ενδοκύττωση είναι η εσωτερίκευση των ανθρακονημάτων και αποδείχθηκε ότι μεσολαβεί στη μεταφορά στο αισθητήριο νεύρο Clathrin.

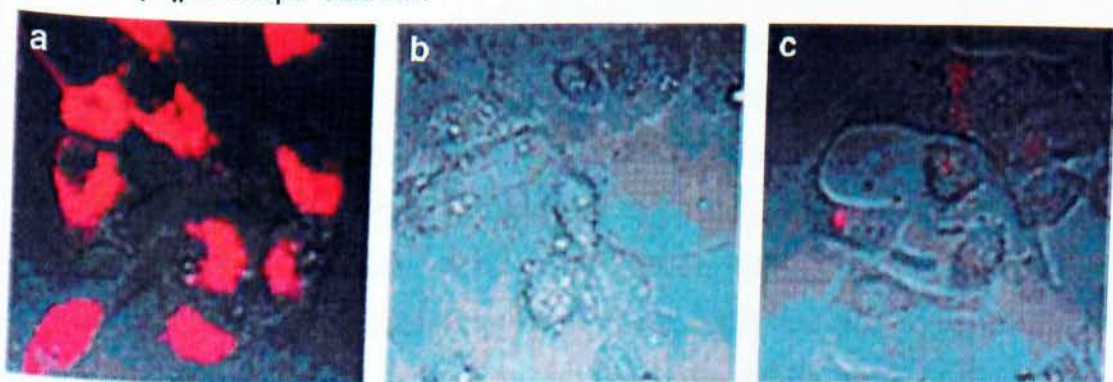


Εικ5.1. Εικόνες της HeLa, μετά την επώαση του DNA-SWCNT σε θερμοκρασίες: a) 37 °C, b) 4 °C και c) επώαση κυττάρων με NaN_3 (κόκκινο χρώμα: φθορίζουσα ουσία προσκολλημένη στο DNA-SWCNT). [βιβλ.3]

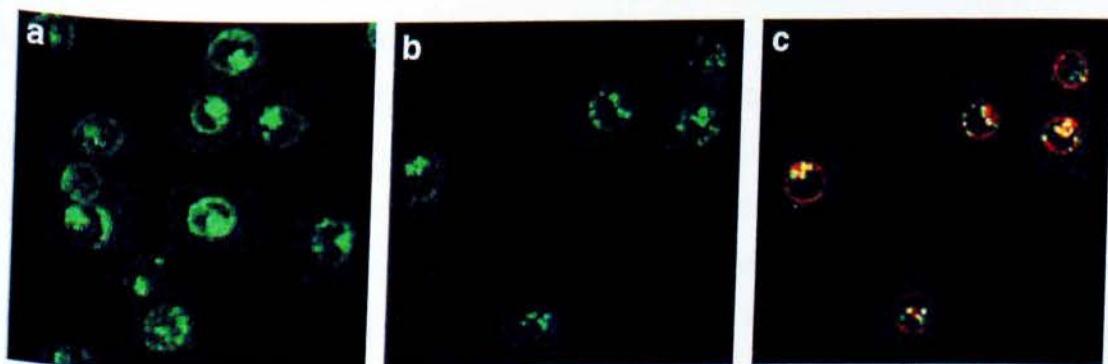


Εικ.5.2. Εικόνες κυττάρων που επωάζονται a) με φθορίζουσα συζυγή SWCNT, b) με μη φθορίζουσας συζυγή SWCNT και κόκκινο δείκτη ενδοκύττωσης στους 37 °C (μόνο το φθορίζον πράσινο έχει αναρτηθεί), c) το ίδιο με το (b) με επιπλέον φθορίζον κόκκινο λόγω ενδοσωμάτων [βιβλ.5]

στα κύτταρα), η κυτταρική πρόσληψη συζευγμένων μονοφλοιικών ανθρακονημάτων ή μονοφλοιικών ανθρακονημάτων ήταν σημαντικά μειωμένη. Η εσωτερίκευση της ενδοκυττάρωσης των μονοφλοιικών ανθρακονημάτων είναι άμεσα ορατή χρησιμοποιώντας ένα «κόκκινο δείκτη» (FM 4-64), χρωματίζοντας και σχηματίζοντας ενδοσώματα γύρω από τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα κατά τη διαδικασία εσωτερίκευσης. Παρατηρήθηκε κίτρινη απόχρωση στο εσωτερικό των κυττάρων λόγω της αλληλοεπικάλυψης του φθορίζοντος πράσινου (σύμπλοκα μονοφλοιικά ανθρακονήματα) και των «κόκκινων» ενδοσωμάτων. Επιπλέον, η ενδοκύτωση είναι η εσωτερίκευση των ανθρακονημάτων και αποδείχθηκε ότι μεσολαβεί στη μεταφορά στο αισθητήριο νεύρο Clathrin.



Εικ5.1. Εικόνες της HeLa, μετά την επώαση του DNA-SWCNT σε θερμοκρασίες: a) 37 °C, b) 4 °C και c) επώαση κυττάρων με NaN_3 (κόκκινο χρώμα: φθορίζουσα ουσία προσκολλημένη στο DNA-SWCNT). [βιβλ.3]



Εικ.5.2. Εικόνες κυττάρων που επωάζονται a) με φθορίζουσα συζυγή SWCNT, b) με μείγμα φθορίζουσας συζυγή SWCNT και κόκκινο δείκτη ενδοκύτωσης στους 37 °C (μόνο το φθορίζον πράσινο έχει αναρτηθεί), c) το ίδιο με το (b) με επιπλέον φθορίζον κόκκινο λόγω ενδοσωμάτων [βιβλ.5]

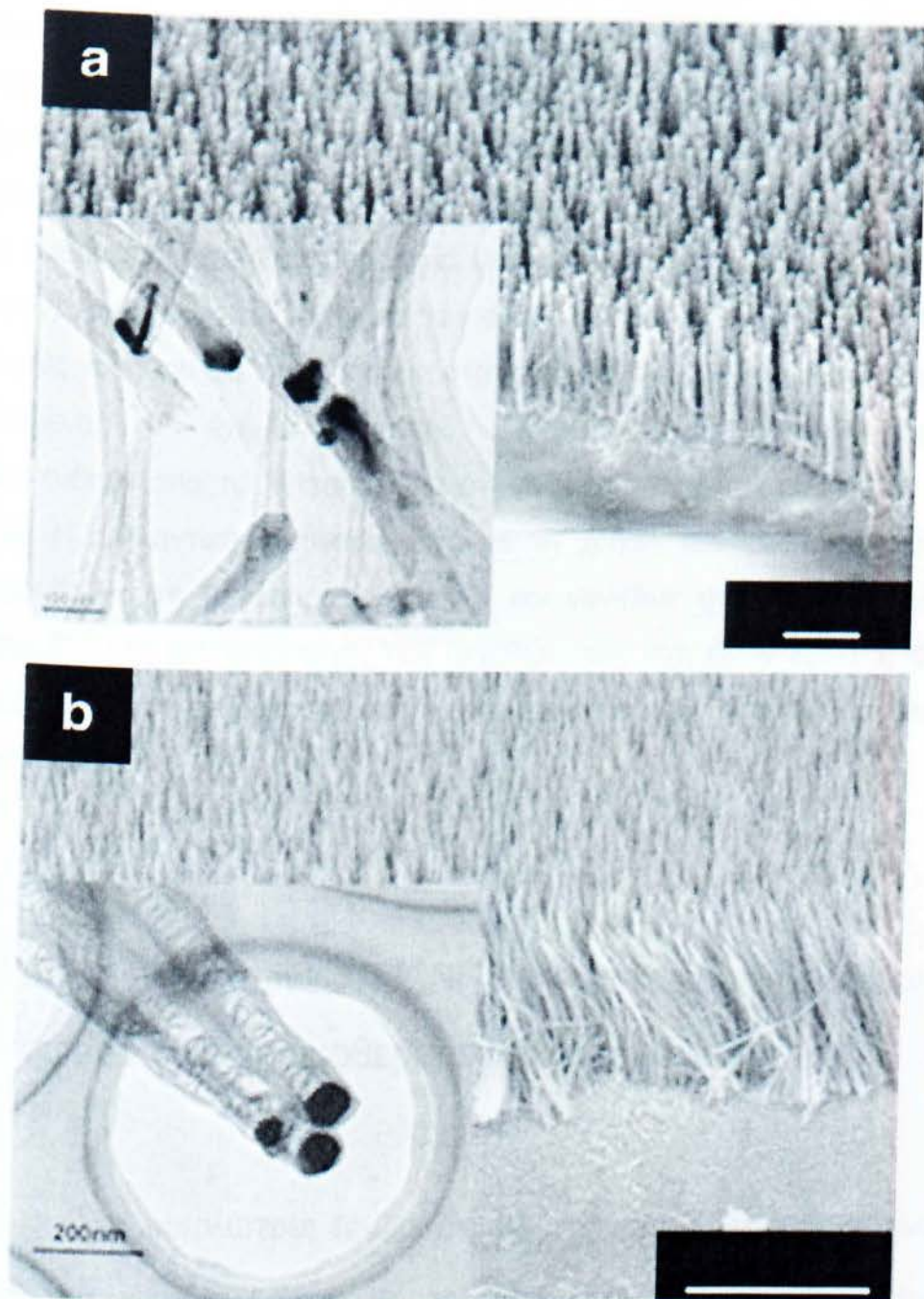
5.1.2. Εσωτερίκευση των ανθρακονημάτων (CNT) μέσω ανεξάρτητων υποδοχέων (ενδοκύττωση): παρεμβολή και διάχυση μέσω των διπλοστοιβάδων των λιπιδίων

Πειράματα έχουν δείξει ότι τα ανθρακονήματα μπορούν να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες μέσω της ενδοκύττωσης-ανεξάρτητων διόδων. Σε ένα πείραμα, οι λειτουργικότητες των ανθρακονημάτων επισημανθήκαν με μια πράσινη φθορίζουσα ουσία (FITC) και παρακολουθούνται από τα μικροσκόπια επιφθορισμού και συνεστιακών. Μετά από μια ώρα επώασης, είτε μόνο με φλουορεσκεΐνη είτε με την φθορίζουσα ουσία πάνω στα ανθρακονήματα, όπου βρίσκονται πάνω στα κύτταρα (του ανθρώπου και ποντικού 3T6 3T3 ινοβλάστες), τα ανθρακονήματα βρέθηκαν μέσα στα κύτταρα, ενώ η φλουορεσκεΐνη (fluorescein (FITC)) από μόνη της δεν ήταν σε θέση να εισέλθει στα κύτταρα. Η εσωτερίκευση αυτών των ανθρακονημάτων δεν εμποδίστηκε από τη θερμοκρασία (μεταξύ 4 ° C και 37 ° C) ή την παρουσία ενός αναστολέα ενδοκύττωσης (άλας του αζιδίου). Συνεπώς, τα ανθρακονήματα ενδέχεται να εισέλθουν στα κύτταρα μέσω ενδοκύττωσης από ανεξάρτητη δίοδο.

Ένας από τους μηχανισμούς που χρησιμοποιείται για να εισέλθουν τα ανθρακονήματα στα κύτταρα είναι μέσω της διόδου εισαγωγής και διάδοσης, ο οποίος ακόμα θεωρείται δυσνόητος. Ορισμένες θεωρητικές μελέτες προτείνουν μια διαδικασία δύο σταδίων κατά την οποία, στο πρώτο οι σωλήνες "φιλοξενούνται" πάνω στην κυτταρική μεμβράνη των λιπιδίων και, στη συνέχεια, προσανατολίζονται για να υιοθετήσουν το «transmembrane διαμόρφωσης». Σε αυτή την περίπτωση, η εσωτερίκευση των νανοσωλήνων στα κύτταρα γίνεται αυτόματα. Με τη μεσολάβηση της μεμβράνης των λιπιδίων και τις υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις ή στατικές αλληλεπιδράσεις φορτίου μεταξύ των σωλήνων και μεμβράνης των λιπιδίων οδήγησε στη μετατόπιση των νανοσωλήνων .

Ένας άλλος μηχανισμός που τα ανθρακονήματα εισάγονται στα κύτταρα είναι η εφαρμογή των εξωτερικών μαγνητικών πεδίων. Ο καταλύτης των κατάλοιπων

σωματιδίων νικελίου (που είναι σιδηρομαγνητικά) βρίσκονται στις άκρες των ανθρακονημάτων και παράγονται από το πλάσμα με ενισχυμένη χημική εναπόθεση ατμών (PECVD). Δίνει στα ανθρακονήματα την ικανότητα να ανταποκριθούν σε ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Ως εκ τούτου, με τη χρήση ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, είναι δυνατόν να οδηγήσουν τα ανθρακονήματα να εισέλθουν στα κύτταρα φέρνοντας μαζί τους φορτισμένα φορτία όπως τα φάρμακα ή τα γονίδια. Ωστόσο, δεν παράγονται όλα τα ανθρακονήματα από PECVD και δεν είναι σε θέση να ανταποκριθούν σε ένα μαγνητικό πεδίο. Διαπιστώθηκε ότι μόνο τα ανθρακονήματα που είναι μικρά (κάτω από 2 μ m) έχουν σωματίδια νικελίου (ενσωματωμένα στις άκρες των ανθρακονημάτων) με αναλογίες εικόνας περίπου 2,9 (Εικ. 5.3 a) μπορούν να κατευθυνθούν από ένα μαγνητικό πεδίο σε κύτταρα. Τα μεγαλύτερα ανθρακονήματα (από 15 μ m και άνω) που έχουν και αυτά τα σωματίδια νικελίου με αναλογίες όπως της εικόνας ,της τάξης του 0,7 (Εικ. 5.3 β), δεν ανταποκρίνονται σε ένα μαγνητικό πεδίο. Αυτή η μέθοδος της παρεμβολής των ανθρακονημάτων στα κύτταρα αποδείχθηκε στα Bal17B-λέμφωμα, ex vivo B κύτταρα, και στους πρωτογενείς νευρώνες και έδειξε πολύ υψηλή απόδοση παροχής πλασμιδιακού DNA σε κύτταρα. Ο μηχανισμός αυτής της μεθόδου χρησιμοποιεί απλά ένα περιστρεφόμενο μαγνητικό πεδίο για τη λειτουργία των ανθρακονημάτων στα κύτταρα και στη συνέχεια να χρησιμοποιεί ένα στατικό μαγνητικό πεδίο για να αναγκάσει τα ανθρακονήματα να διεισδύσουν βαθύτερα μέσα στα κύτταρα. Αυτός ο απλός μηχανισμός οδήγησε στην αύξηση της αποτελεσματικότερη παράδοση των ανθρακονημάτων στα κύτταρα.



Εικ.5.3. a) CNTs που έχουν οδηγηθεί και b) CNTs που δεν έχουν οδηγηθεί στα κύτταρα από τα μαγνητικά πεδία. [βιβλ.14]

Υπάρχει διαφωνία μεταξύ των δύο μηχανισμών για το πώς τα ανθρακονήματα θα πραγματοποιούν την εσωτερική τους στα κύτταρα. Δηλαδή, μέσω της ενδοκύττωσης και μέσω ενδοκύττωσης με ανεξάρτητη πορεία. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην κυτταρική πρόσληψη των

ανθρακονημάτων. Πρώτον, οι ιδιότητες της επιφάνειας των ανθρακονημάτων μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την αλληλεπίδρασή τους, με τα κύτταρα. Για παράδειγμα, υπάρχουν υδρόφοβες και υδρόφιλες περιφέρειες στις μεμβράνες των κυττάρων, η υδρόφοβη ή υδρόφιλη αλληλεπίδραση των κυττάρων με τα ανθρακονήματα θα επηρεαστεί από την υδροφιλικότητα των σωλήνων. Δεύτερον, το μέγεθος και το σχήμα των ανθρακονημάτων παίζουν σημαντικό στις ικανότητές τους για να εισχωρήσουν στα κύτταρα. Τα ανθρακονήματα που είναι σκορπισμένα και έχουν μικρότερο μέγεθος, θα είναι πιθανότερο να εσωτερικευθούν από τα κύτταρα, από ότι τα ανθρακονήματα που έχουν μεγάλο μέγεθος. Η μελλοντική έρευνα σχετικά με τη χρήση των ανθρακονημάτων ως μεταφορέας για τη μεταφορά φαρμάκων και γονιδίων στα κύτταρα πρέπει να επικεντρωθεί στη βελτιστοποίηση των μεγεθών, των σχημάτων και στις ιδιότητες της επιφάνειας των ανθρακονημάτων για να μεγιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα της παράδοσης.

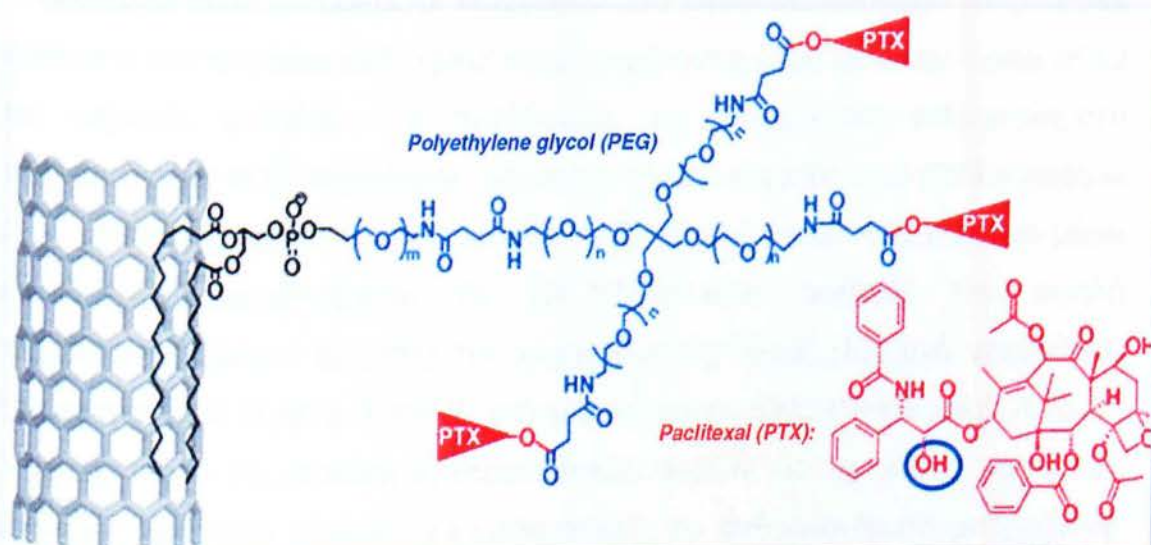
5.1.3. Εφαρμογές των CNT/CNF στην μεταφορά γονιδίων

α. Μεταφορά των χημικοθεραπευτικών ουσιών

Μια από τις μεγαλύτερες εφαρμογές των μεταφορών φαρμάκων είναι στη θεραπεία του καρκίνου, όπου με τα κατάλληλα φάρμακα θα πρέπει να κατευθυνθούν μόνο στο συγκεκριμένο ιστό, έτσι ώστε να αποτραπούν οι δυσάρεστες συνέπειες των φαρμάκων στους υγιείς ιστούς.

Ένας τρόπος για τη μεταφορά φαρμάκων στο σημείο όπου βρίσκεται ο όγκος είναι η ενίσχυση της διαπερατότητας και η συγκράτηση των αποτελεσμάτων (EPR). Το EPR οφείλεται στην διαρροή των αγγειακών δομών και στο σύστημα μειωμένης παροχέτευσης των όγκων. Τα αιμοφόρα αγγεία σε ένα υγιές ιστό έχουν πόρους μεγέθους που κυμαίνεται από 2-6nm, ενώ σε ένα ιστό του όγκου έχουν πόρους

100-800nm. Συνεπώς, τα νανοσωματίδια με μέγεθος 100-700nm δεν μπορούν να διεισδύσουν στα αιμοφόρα αγγεία του υγιούς ιστού, αλλά θα περάσουν από τους πόρους των αιμοφόρων αγγείων του όγκου και θα συσσωρευτούν εκεί. Τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα μπορούν να συζευχθούν με τις θεραπευτικές ουσίες και το συνολικό μέγεθος της σύζευξης μπορεί να είναι από 100 μέχρι 700nm, έτσι ώστε η σύζευξη να μπορεί να διεισδύσει στον όγκο μέσω του EPR. Σημειώνεται ότι τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα έχουν συζευχθεί με πακλιταξελή (PTX), όπου χρησιμοποιείται συνήθως στα φάρμακα για χημειοθεραπεία για την αντιμετώπιση του καρκίνου. Έδειξαν ότι είχε μεγάλη αποτελεσματικότητα αναστέλλοντας την ανάπτυξη του όγκου στα ποντίκια. Σε μια μελέτη, τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα έχουν επεξεργαστεί πρώτα με αλυσίδες poly(ethylene glycol) (PEG) και στη συνέχεια το PTX συνδέεται με το EPR μέσω των δεσμών αμιδίου.



Εικ.5.4. Σχηματική παράσταση ενός συζευγμένου CNT για την παράδοση PTX. Επεξεργασμένα SWNT από τα φωσφολιπίδια με διακλαδισμένη αλυσίδα PEG, η οποία συνδέθηκε με το PTX. Ο μπλε δακτύλιος δείχνει την αντίδραση του PTX κατά την επισύναψή του με την PEG. [βιβλ.30]

Οι αλυσίδες PEG έχουν επιλεχτεί για να επεξεργαστούν τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα, γιατί έχει αποδειχθεί ότι με την ενδοφλέβια ένεση τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα, που είναι επικαλυμμένα με PEG μέσα στα ποντίκια, δεν

παρουσιάστηκε καμία τοξική παρενέργεια για μερικούς μήνες. Οι συνθέσεις των SWCNT-PTX-PEG μπορούν να παραμείνουν στο αίμα για περισσότερο χρονικό διάστημα ($81,4 \pm 7,4$ min) από ότι το Taxol (φάρμακο που μοιάζει με PTX) ($18,9 \pm 1,5$ min) και το PTX με επικάλυψη PEG ($22,8 \pm 1,0$ min). Ο παρατεταμένος χρόνος μαζί με το EPR επιτρέπουν πολύ υψηλότερη διείσδυση του φαρμάκου στα σημεία του όγκου (10 φορές υψηλότερη από ότι το Taxol και 6 φορές υψηλότερη από ότι το PEG-PTX μετά από 2 ώρες αφότου έγινε η ένεση και 6 και 4 φορές υψηλότερη, αντίστοιχα, μετά από 24 ώρες). Η υψηλή αποτελεσματικότητα της μεταφοράς του PTX από τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα απέδειξαν την αναστολή του όγκου από τα SWCNT-PTX (5mg/kg PTX) στο μοντέλο όγκου 4T₁ το οποίο είναι γνωστό για την αντίσταση του στα συστατικά του PTX. Στην αντίθετη περίπτωση, τα ανθρακονήματα έχουν συζευχθεί με ένα ligand, το οποίο δεσμεύει τον υποδοχέα όπου μεταφέρεται κατευθείαν στα καρκινικά κύτταρα. Τα φάρμακα συνδέονται στη σύνθεση CNT-ligand και μεταφέρονται στον ιστό του όγκου μέσω μιας ενεργούς μεθόδου. Για παράδειγμα, τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα επικαλυμμένα με PEG συνδέθηκαν με arginine-glycine-aspartic acid (RGD) peptide για τη μεταφορά της σύνθεσης intergrine $\alpha_v\text{-}\beta_3$ - θετικό όγκων στα ποντίκια μέσω των δεσμών ligand-integrin. Το SWCNT-PEG-RGD απέδειξε την υψηλή απορρόφηση (περίπου 10-15%) της χορηγούμενης δόσης (ID) ανά γραμμάριο, σημαντική αύξηση περίπου 3-4% ID ανά γραμμάριο για SWCNT-PEG χωρίς RGD.

Στην περίπτωση της μεταφοράς θεραπευτικών ουσιών για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων (δηλαδή χημειοθεραπεία), τα ανθρακονήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην θεραπεία του καρκίνου με υπερθερμία. Η υπερθερμία χρησιμοποιείται για τον έλεγχο στην αυξημένη θερμότητα για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα είναι πιο ευπαθή στην αύξηση της θερμότητας από ότι τα υγιή, επειδή τα καρκινικά κύτταρα περιβάλλονται από αιμοφόρα αγγεία που έχουν ανώμαλη ροή και διαχέουν λιγότερη θερμότητα συγκριτικά με τα υγιή κύτταρα. Ωστόσο, για να λιγοστέψει ο κίνδυνος τραυματισμού των υγιών κυττάρων, η θερμότητα χρειάζεται να μεταφερθεί επιλεκτικά στα κύτταρα του όγκου. Αυτός ο στόχος έχει επιτευχθεί με την χρήση νανοσωματιδίων (όπως τα μαγνητικά νανοσωματίδια) στα κύτταρα του όγκου και

στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας εξωτερικά πεδία (όπως το υπερηχογράφημα, οι ραδιοσυχνότητες και άλλα) για να ζεσταθούν τα σωματίδια. Τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα έχουν και εσωτερικές ιδιότητες οι οποίες ταιριάζουν για την μεταφορά της θερμότητας στα κύτταρα του όγκου. Αρχικά, τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα έχουν μεγάλη απορροφητικότητα στην υπέρυθρη περιοχή (NIR 700-1100nm). Η NIR είναι μια ειδική περιοχή όπου η απορρόφηση είναι ελάχιστη, ενώ η διείσδυση είναι η βέλτιστη και συνεπώς, η χρήση της NIR μπορεί να θερμάνει αποτελεσματικά τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα σε *in vivo* περιβάλλον. Ακόμη, the high aspect ratios των μονοφλοιικών ανθρακονημάτων ταιριάζουν για την σύνδεση τους με ligands όπου δεσμεύονται με ορισμένους υποδοχείς που βρίσκονται στα καρκινικά κύτταρα. Τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα επεξεργάζονται με φολικό οξύ (FA) μέσω αλυσίδων PEG και φωσφολιπίδια (PL) για να δημιουργηθούν τα υποστρώματα SWCNT-PEG-FA. Το FA δεσμεύεται σε φολικούς υποδοχείς (FR) του καρκινικού δείκτη, τα οποία βρίσκονται σε πολλών ειδών καρκίνων (όπως ο καρκίνος του πνεύμονα). Η σύνθεση SWCNT-PEG-FA στόχευσε επιτυχώς στο FR-θετικό των HeLa κυττάρων (καρκινικά κύτταρα του τραχήλου). Οι συνθέσεις βρέθηκαν μέσα στα καρκινικά κύτταρα, αλλά όχι στα φυσιολογικά κύτταρα. Στη συνέχεια, τα καρκινικά κύτταρα καταστρέφονται από την έκθεση τους στην NIR περιοχή των 808nm με λέιζερ ($1,4W/cm^2$) για 2 λεπτά. Μετά από λίγο, τα υγιή κύτταρα με την ίδια μεταχείριση έζησαν και είχαν κανονικά σχήματα.

β. Μεταφορά των γονιδίων

Η γονιδιακή θεραπεία είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται σε ένα γονίδιο για να προωθήσει τα κύτταρα να παράγουν από μόνα τους θεραπευτικές πρωτεΐνες. Οι μέθοδοι για την μεταφορά των γονιδίων στα κύτταρα μπορούν να χωριστούν σε δυο κύριες κατηγορίες:

1. μεταφορά ιογενών γονιδίων

2. μεταφορά μη ιογενών γονιδίων

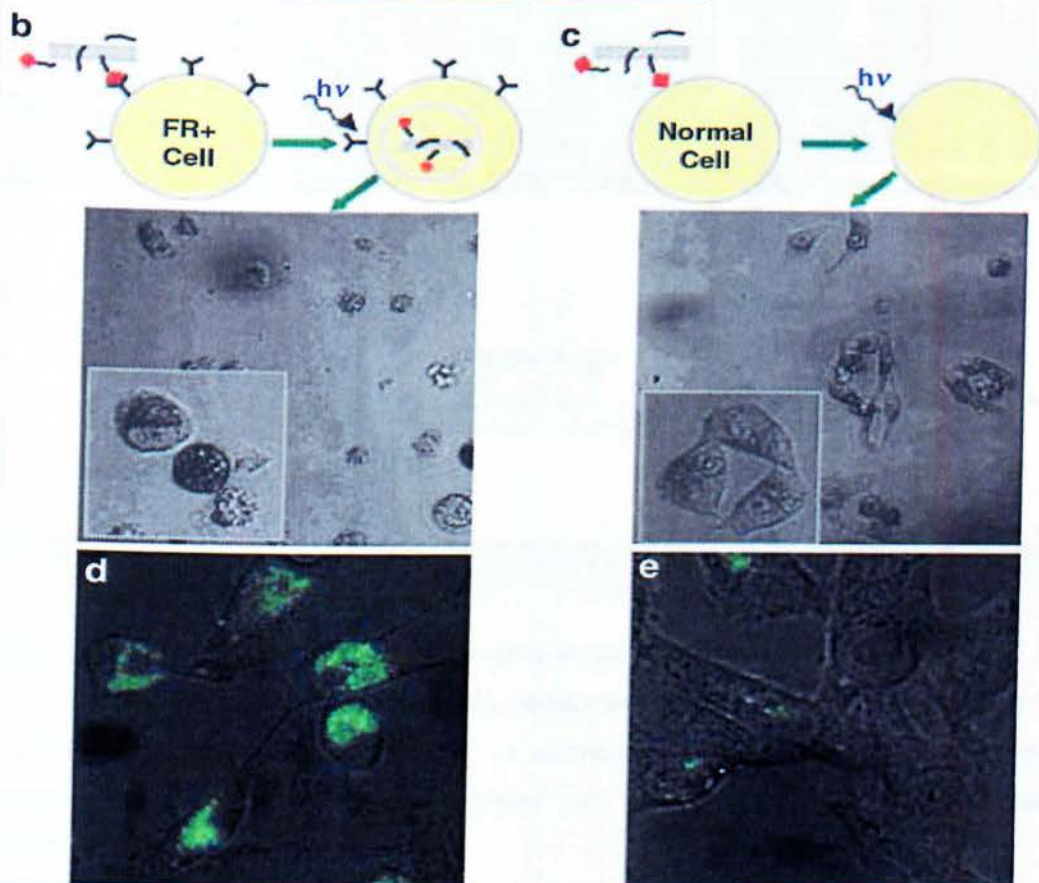
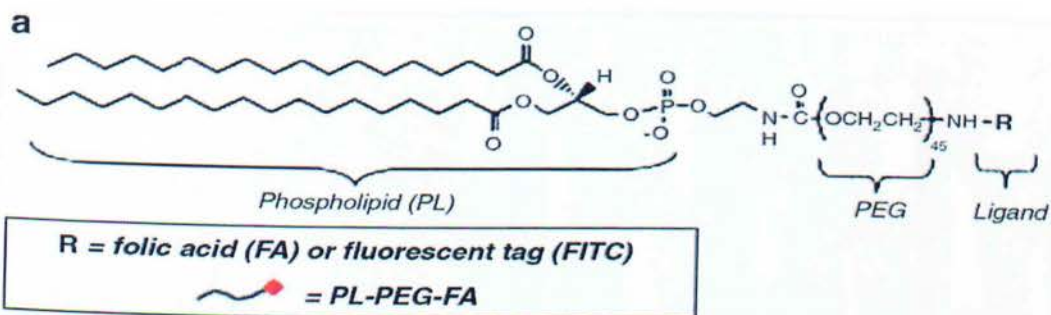
Στην πρώτη περίπτωση, τα γονίδια μεταφέρονται μέσα στα κύτταρα μέσω ιού, διότι ο ιός μπορεί να εισχωρήσει εύκολα στο εσωτερικό του κυττάρου. Στα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου συμπεριλαμβάνεται η υψηλή αποδοτικότητα στη μεταφορά και το υψηλό επίπεδο της ταχύτητας των γονιδίων. Ωστόσο, μερικά από τα μειονεκτήματα, όπως το ανοσοποιητικό και οι αντιδράσεις φλεγμονής στον υποδοχέα του ιστού, έχουν σταματήσει τις εφαρμογές των φορέων ιού στον άνθρωπο. Στη δεύτερη περίπτωση, χρησιμοποιούνται άλλες λειτουργίες για την μεταφορά των γονιδίων μέσα στα κύτταρα. Η μεταφορά των μη ιογενών γονιδίων γίνονται είτε με φυσικές είτε με χημικές εφαρμογές. Στις φυσικές δυνάμεις, τα γονίδια πιέζονται για να εισέρθουν σε ένα κύτταρο, ενώ στις χημικές αναμιγνύονται με άλλες ουσίες που διεισδύουν μαζί με τα γονίδια και τα κατευθύνουν προς τα κύτταρα.

Ένας στόχος των μη ιογενών είναι η επίτευξη υψηλού ποσοστού μεταφοράς γονιδίων. Υπάρχουν αρκετά εμπόδια για:

1. την μεταφορά του DNA στα στοχευόμενα κύτταρα
2. την εσωτερίκευση του DNA από τα κύτταρα
3. την μεταφορά του DNA για την δημιουργία θαλάμων.

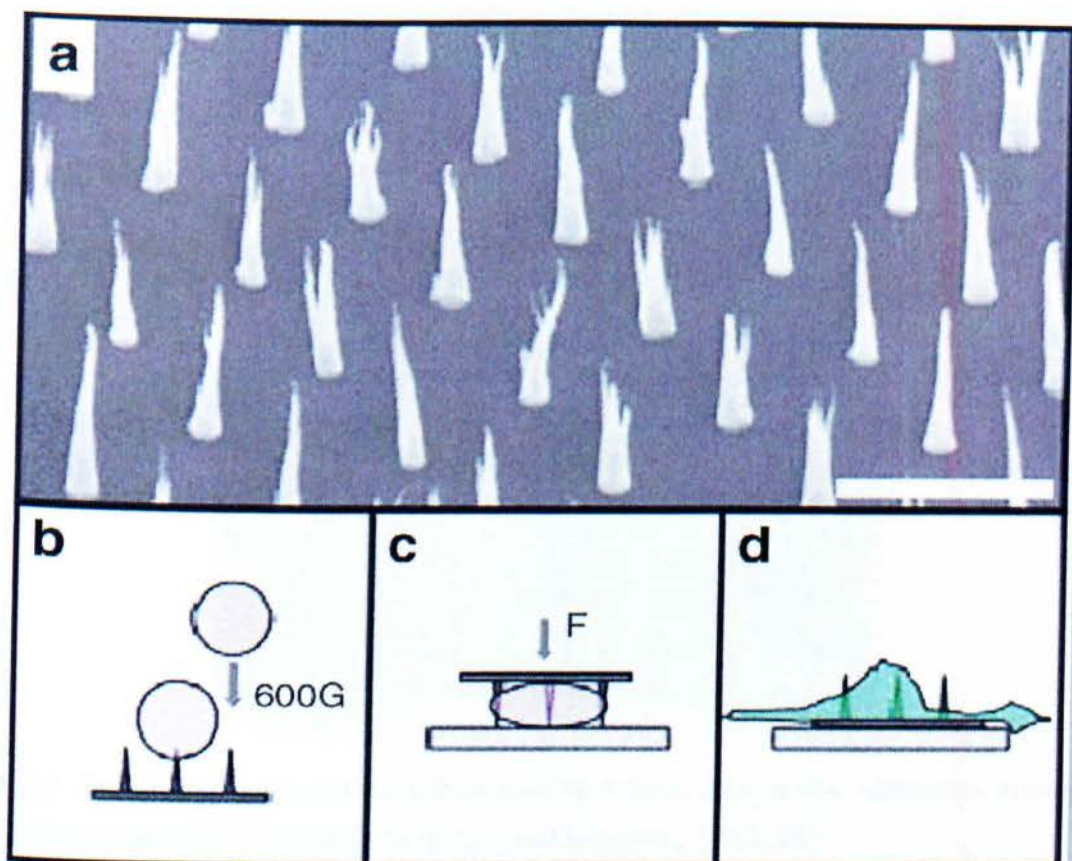
Αυτά τα εμπόδια συμπεριλαμβάνουν, τα φυσικά εμπόδια, όπως το ενδοθήλιο, και τα χημικά εμπόδια, όπως τα εξωκυττάρια. Συνεπώς, η μικροέγχυση είναι μια μέθοδος επικοινωνίας, η οποία μπορεί να παρακάμψει τα φυσικά και τα χημικά εμπόδια κατά την μεταφορά του DNA. Ωστόσο, η μικροέγχυση έχει μειονεκτήματα στην παραποίηση κυττάρων ένα κάθε φορά που βρίσκονται κάτω από το μικροσκόπιο και το μικρό-μέγεθος της άκρης των ακτινών μπορούν να καταστρέψουν την κυτταρική μεμβράνη.

Πρόσφατα, η ανάπτυξη των ανθρακοϊνών με κάθετη ευθυγράμμιση σε επίπεδα υποστρώματα (VACNF) έχουν χρησιμοποιηθεί για την μεταφορά του DNA στα κύτταρα. Τα VACNF έχουν επικαλυφθεί με DNA και στη συνέχεια πιέζονται στο πυρήνα του κυττάρου.



Εικ.5.5. Ο θάνατος των καρκινικών κυττάρων από τα συζευγμένα CNT.

α) Δομές των PL-PEG-ligand (ligand μπορεί να είναι ή FA ή FITC). Τα μόρια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την διαλυτοποίηση των SWCNT, τη στόχευση και την θανάτωση των κυττάρων του όγκου (με την χρήση της ακτινοβολίας NIR). β) (πάνω εικόνα) σχηματική αναπαράσταση της PL-PEG-FA-SWCNT που εισέρχονται στα καρκινικά κύτταρα. (κάτω εικόνα) Θανάτωση των κυττάρων με ακτινοβολία λέιζερ. γ) (πάνω εικόνα) Σχηματική αναπαράσταση της καλλιεργημένης PL-PEG-FA-SWCNT με φυσιολογικά κύτταρα. (κάτω εικόνα) Κύτταρα που παρέμειναν ανέπαφα με την ίδια αγωγή λέιζερ. δ) Καρκινικά κύτταρα με συζευγμένα SWCNT με PL-PEG-FA και PL-PEG-FITC. ε) Φυσιολογικά κύτταρα που παρουσίασαν μικρή απορρόφηση των SWCNT. [βιβλ.1]



Εικ.5.6. Η μέθοδος VACNFs που καλλιεργείται σε υποστρώματα.

Στην εικόνα (a) απεικονίζεται σχηματική παράσταση. (b) γυρίζοντας τα κύτταρα πάνω στο VACNFs υπόστρωμα, (c) πιέζοντας τα κύτταρα με μεγαλύτερη πίεση στο VACNFs υπόστρωμα, και (d) η τελική καλλιέργεια των κυττάρων σε VACNFs υπόστρωμα. [βιβλ.26]

Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι το ελάχιστο ποσοστό διάσπασης της κυτταρικής μεμβράνης (λόγω του μικρού μεγέθους των άκρων του ανθρακοϊνών περίπου 30nm) και η ικανότητα της ταυτόχρονης μεταφοράς του DNA σε μεγάλο αριθμό κυττάρων. Οι συστοιχίες των VACNF διαπερνούν τα πολλαπλά κύτταρα, ενώ τα κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται μετά από 48 ώρες. Το πιο σημαντικό είναι ότι οι "αποικίες" εκφράζουν την μεταφορά φαρμάκων, η οποία περιέχει μια ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (eGFP) που παρατηρήθηκε μετά από 22 μέρες.



Εικ.5.7. Εικόνα από μικροσκόπιο φθορισμού GFP όπου δείχνει την «αποικία» κυττάρων (Κινέζικων χάμστερ) μετά από 22 ημέρες καλλιέργειας. [βιβλ.26]

Ένα άλλο πλεονεκτήματα της χρήσης των συστοιχιών VACNF για τη μεταφορά του DNA είναι ότι οι συστοιχίες μπορούν να καταταχθούν και (μετά την πίεση μέσα στον πυρήνα του κυττάρου) να παραμείνουν στη θέση τους. Έτσι, επιτρέπεται η παρακολούθηση της κάθε μεταφοράς γονιδίων και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σε μία άλλη αναφορά του McKnight, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν συστοιχίες VACNF και μπορούσαν να παρακολουθήσουν την ανάπτυξη των κυττάρων και την ταχύτητα μεταφοράς του DNA.

Τα ανθρακονήματα έχουν χρησιμοποιηθεί κι αυτά για την μεταφορά του DNA στα κύτταρα. Το DNA μπορεί να συνδεθεί με τα επεξεργασμένα ανθρακονήματα μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και μεταφέρονται στα κύτταρα. Το επίπεδο της ταχύτητας του γονιδίου ήταν 10 φορές υψηλότερο από ότι όταν ήταν συνδεδεμένο το γονίδιο μόνο με το DNA. Κατά τον ίδιο τρόπο, τα αμινοεπεξεργασμένα MWCNT (NH_2 -MWCNT) διεισδύουν με το DNA και μεταφέρεται το GFP γονίδιο μέσα σε καλλιεργημένα ενδοθηλάκια κυττάρων από φλέβα ομφάλιου

λώρου του ανθρώπου. Η δυναμική προσομοίωση των μορίων έχουν προταθεί ότι η επαφή του μηχανισμού του DNA με τα ανθρακονήματα μπορεί αυθόρμητα να παρεμβάλει λόγω των αλληλεπιδράσεων των δυνάμεων Van der Waals.

Βιβλιογραφία 5^{ου} κεφαλαίου

1. N.W.S. Kam, M. O'Connell, J.A. Wisdom, H. Dai, Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 11600–11605.
2. P.A. Tran, T.J. Webster, Nanotechnologies for Cancer Diagnostics and Treatment, in: C.J. Dixon, O.W. Curtines (Eds.), *Nanotechnology: Nanofabrication, Patterning, and Self Assembly*, Nova Publishers, 2009 In press.
3. N.W.S. Kam, Z.L.H. Dai, Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and Pathway13, *Angewandte Chemie International Edition* 45 (2006) 577–581.
4. N.W.S. Kam, H. Dai, Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 6021–6026.
5. N.W. Shi Kam, T.C. Jessop, P.A. Wender, H. Dai, Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube–protein conjugates into mammalian cells, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 6850–6851.
6. S.C. Silverstein, R.M. Steinman, Z.A. Cohn, Endocytosis, *Annu. Rev. Biochem.* 46 (1977) 669–722.
7. T.A. Vida, S.D. Emr, A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast, *J. Cell Biol.* 128 (1995) 779–792.
8. M.A. Herweijer, J.A. Berden, A. Kemp, E.C. Slater, Inhibition of energy-transducing reactions by 8-nitreno-ATP covalently bound to bovine heart submitochondrial particles: direct interaction between ATPase and redox enzymes, *Biochim. Biophys. Acta* 809 (1985) 81–89.
9. E. Smythe, Clathrin-coated vesicle formation: a paradigm for coated-vesicle formation, *Biochem. Soc. Trans.* 31 (2003) 736–739.
10. D. Pantarotto, R. Singh, D. McCarthy, M. Erhardt, J.P. Briand, M. Prato, K. Kostarelos, A. Bianco, Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA
11. A. Bianco, K. Kostarelos, M. Prato, Applications of carbon nanotubes in drug delivery, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9 (2005) 674–679.
12. C.F. Lopez, S.O. Nielsen, P.B. Moore, M.L. Klein, Understanding nature's design for a nanosyringe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 4431–4434.
13. J.G. Wen, Z.P. Huang, D.Z. Wang, J.H. Chen, S.X. Yang, Z.F. Ren, J.H. Wang, L.E. Calvet, J. Chen, J.F. Klemic, M.A. Reed, Growth and characterization of aligned carbon nanotubes from patterned nickel nanodots and uniform thin films, *J. Mater. Res.* 16 (2001) 3246–3253.
14. D. Cai, J.M. Mataraza, Z.-H. Qin, Z. Huang, J. Huang, T.C. Chiles, D. Carnahan, K. Kempa, Z. Ren, Highly efficient molecular delivery into

- mammalian cells using carbon nanotube spearing, *Nat Meth* 2 (2005) 449–454.
15. F. Yuan, M. Dellian, D. Fukumura, M. Leunig, D.A. Berk, V.P. Torchilin, R.K. Jain, Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size, *Cancer Res.* 55 (1995) 3752 – 3756.
 16. S.K. Hobbs, W.L. Monsky, F. Yuan, W.G. Roberts, L. Griffith, V.P. Torchilin, R.K. Jain, Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and micro-environment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 4607 –4612.
 17. M.L. Schipper, N. Nakayama-Ratchford, C.R. Davis, N.W.S. Kam, P. Chu, Z. Liu, X. Sun, H. Dai, S.S. Gambhir, A pilot toxicology study of single-walled carbon nano-tubes in a small sample of mice, *Nat. Nano* 3 (2008) 216–221.
 18. M.M. Janat-Amsbury, J.W. Yockman, M. Lee, S. Kern, D.Y. Furgeson, M. Bikram, S.W. Kim, Combination of local, nonviral IL12 gene therapy and systemic paclitaxel treatment in a metastatic breast cancer model, *Mol. Ther.* 9 (2004) 829–836.
 19. Z. Liu, W. Cai, L. He, N. Nakayama, K. Chen, X. Sun, X. Chen, H. Dai, In vivo bio-distribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice, *Nat. Nano* 2 (2007) 47 – 52.
 20. C. Chen, S. Hayek, V. Mohite, H. Yuan, J. Chatterjee, Y. Haik, Nanomagnetics and magnetic hyperthermia, in: H.S. Nalwa, T.J. Webster (Eds.), *Scientific Publishers, California*, 2007, pp. 160– 191.
 21. M.J. O'Connell, S.M. Bachilo, C.B. Huffman, V.C. Moore, M.S. Strano, E.H. Haroz, K.L. Rialon, P.J. Boul, W.H. Noon, C. Kittrell, J. Ma, R.H. Hauge, R.B. Weisman, R.E. Smalley, Band gap fluorescence from individual single-walled carbon nanotubes, *Science* 297(2002) 593–596.
 22. R. Weissleder, A clearer vision for in vivo imaging, *Nat. Biotech.* 19 (2001) 316–317.
 23. K. Konig, Multiphoton microscopy in life sciences, *J. Microsc.* 200 (2000) 83 – 104.
 24. D. Lechardeur, G.L. Lukacs, Intracellular barriers to non-viral gene transfer, *Curr. Gene Ther.* 2 (2002) 183 –194.
 25. S. Mehier-Humbert, R.H. Guy, Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 733– 753.
 26. E.M. Timothy, V.M. Anatoli, D.G. Guy, A.G. Michael, I.M. Vladimir, S. Francisco, K.H. Dale, J.D. Mitchel, H.L. Douglas, L.S. Michael, Intracellular integration of synthetic nanostructures with viable cells for controlled biochemical manipulation, *Nano-technology* 551 (2003).
 27. T.E. McKnight, A.V. Melechko, D.K. Hensley, D.G.J. Mann, G.D. Griffin, M.L. Simpson, Tracking gene expression after DNA delivery using spatially indexed nanofiber arrays, *Nano Lett.* 4 (2004) 1213–1219.
 28. L. Gao, L. Nie, T. Wang, Y. Qin, Z. Guo, D. Yang, X. Yan, Carbon nanotube delivery of the GFP gene into mammalian cells, *ChemBioChem* 7 (2006) 239 –242.

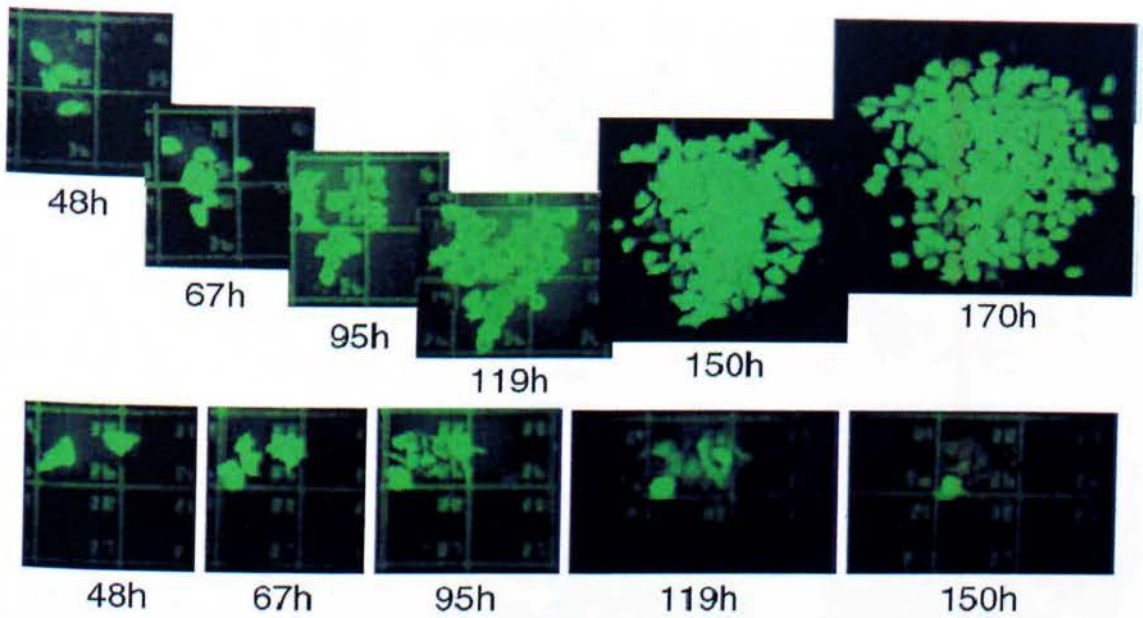
29. H. Gao, Y. Kong, D. Cui, C.S. Ozkan, Spontaneous insertion of DNA oligonucleotides into carbon nanotubes, *Nano Lett.* 3 (2003) 471–473.
30. Z. Liu, K. Chen, C. Davis, S. Sherlock, Q. Cao, X. Chen and H. Dai, Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment, *Cancer Res.* 68(2008), 6652-6660.

Κεφάλαιο 6

Οι επιπτώσεις των ανθρακονημάτων (CNT) και των ανθρακοϊνών (CNF) στον ανθρώπινο οργανισμό

6.1. Η τοξικότητα των ανθρακονήματα (CNT) και carbon nanofibres (CNF) στους πνεύμονες

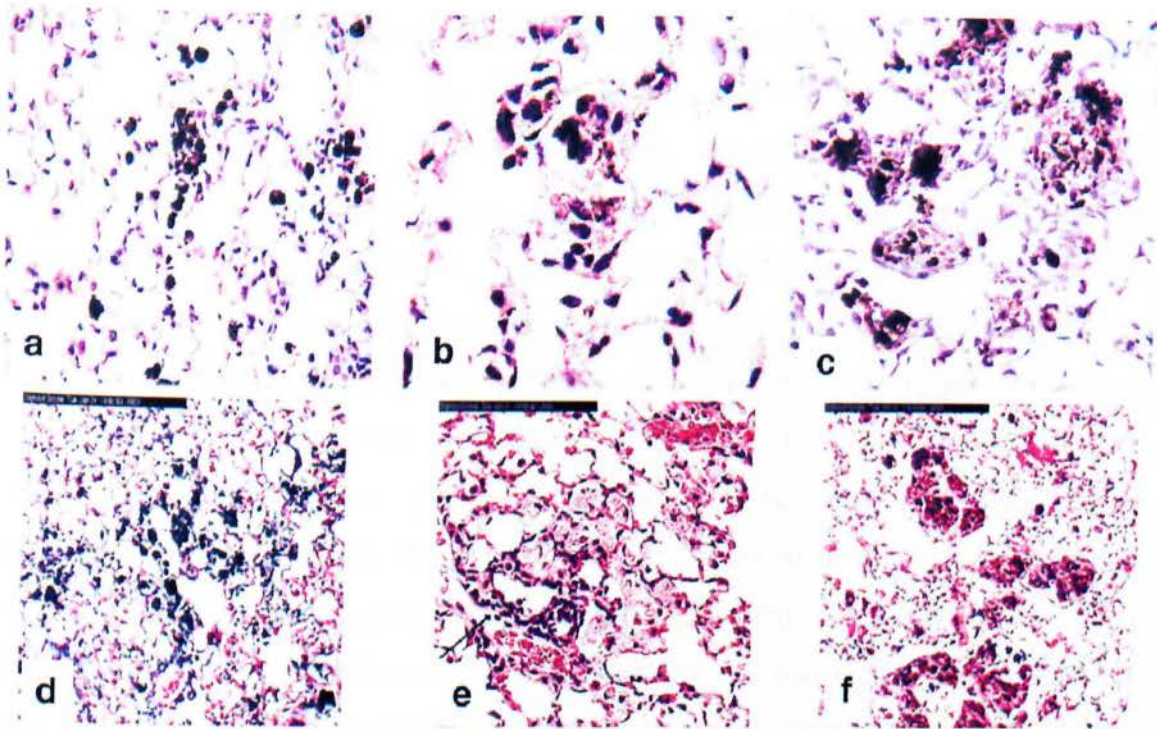
Από τότε που οι ανθρακοϊνες και τα ανθρακονήματα έχουν διερευνηθεί για πάρα πολλές λειτουργίες, έχουν γίνει εξαιρετικά χρήσιμα και μπορεί να γίνει μαζική παραγωγή. Η αξιολόγηση του ρίσκου της υγείας με τα νανοϋλικά θεωρείται πολύ σημαντική. Μία από τις μεγαλύτερες ανησυχίες για τις συνέπειες είναι η τοξικότητα των ανθρακοϊνών και ανθρακονημάτων κατά την χρησιμοποίησή τους στον ανθρώπινο οργανισμό καθώς και στο περιβάλλον. Οι κύριοι τρόποι εισαγωγής των νανοδομημένων υλικών στο ανθρώπινο σώμα είναι η εισπνοή και η επαφή με το δέρμα. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την τοξικότητα των ανθρακοϊνών και ανθρακονημάτων στους πνεύμονες.



Εικ.6.1. Η παρακολούθηση και η παράδοση των γονιδίων σε δυο κυτταρικούς πληθυσμούς που καλλιεργούνται σε συστοιχίες VACNF. Οι αριθμοί κάτω από τις εικόνες δείχνουν τον χρόνο που πέρασε από την παράδοση(ώρες).

Όλες οι έρευνες επισημαίνουν την δημιουργία φλεγμονώδων αντιδράσεων και τον σχηματισμό κοκκιωμάτων, τα οποία είναι μικρές, στρογγυλές (περίπου 0,5mm με 2mm) δομές και αποτελούνται από ανοσοποιητικά κύτταρα, όπως τα μακροφάγα. Το κοκκίωμα υποδεικνύει τον τραυματισμό ιστών και προκαλεί πολλές ασθένειες όπως φυματίωση, ιστοπλασμάτωση, κρυπτοκόκκιση ακόμη και καρκίνο του πνεύμονα.

Ο ερευνητής Lam, σε μια μελέτη του τοποθέτησε τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα στους πνεύμονες των ποντικών και μελέτησε την ιστοπαθολογία των πνευμόνων μετά από 7 και 90 μέρες. Χρησιμοποιήθηκε αιθάλη και χαλαζα (μοιάζει με την σκόνη του άνθρακα) ως ελεγκτές. Μετά από 7 μέρες, παρατηρήθηκε ότι στους πνεύμονες υπήρχαν κοκκιώματα και χορηγήθηκε 0,5mg CNT ανά ποντίκι και το κοκκίωμα ήταν γύρω από τις δομές των CNT.



Εικ.6.2. Η εικόνα απεικονίζει την ιστοπαθολογία του ιστού των πνευμόνων από ποντίκια. Στην εικόνα (a) χορηγήθηκε αιθάλη 0,5mg, όπως και στην (b) πυριτικός χαλαζίας και στην (c) CNT όπου μετά το πέρας 7 ημερών εμφανίστηκαν στον πνεύμονα κοκκιώματα. Οι εικόνες (d), (e), (f) δείχνουν τους πνεύμονες που έλαβαν θεραπεία μετά από 90 μέρες και αποδείχτηκε ότι ο πνεύμονας της εικόνας (f) όπου είχε χορηγηθεί με CNT είχε πολύ πιο έντονα κοκκιώματα. [βιβλ.2]

Στους πνεύμονες που χορηγήθηκε αιθάλη θεωρήθηκαν ως “μικροσκοπικά κανονικά”. Ωστόσο, μετά από 90 μέρες εμφανίστηκαν κοκκιώματα στους πνεύμονες των ποντικιών, στους οποίους χορηγήθηκαν ξανά ανθρακονήματα. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι εάν τα ανθρακονήματα φθάσουν στους πνεύμονες, τότε μπορούν να γίνουν πιο τοξικά και από την αιθάλη και από τον χαλαζία.

Σε άλλες μελέτες, όπως αυτή του ερευνητή Warheit, χορηγήθηκε μία δόση των 1mg ή 5 mg/kg. Ιστοπαθολογικά, τα μονοφλοϊκά ανθρακονήματα αποκάλυψαν τον σχηματισμό των κοκκιωμάτων γύρω από τα ανθρακονήματα. Ωστόσο, σε έντονη αντίθεση με τα αποτελέσματα του Lam, βρήκαν ότι υπάρχει μια ποσότητα ανθρακονημάτων ελεύθερη από διάφορες αντιδράσεις (συμπεριλαμβανομένου και του κοκκιώματος) και δεν υπήρχε προοδευτικότητα των κοκκιωμάτων για περίπου

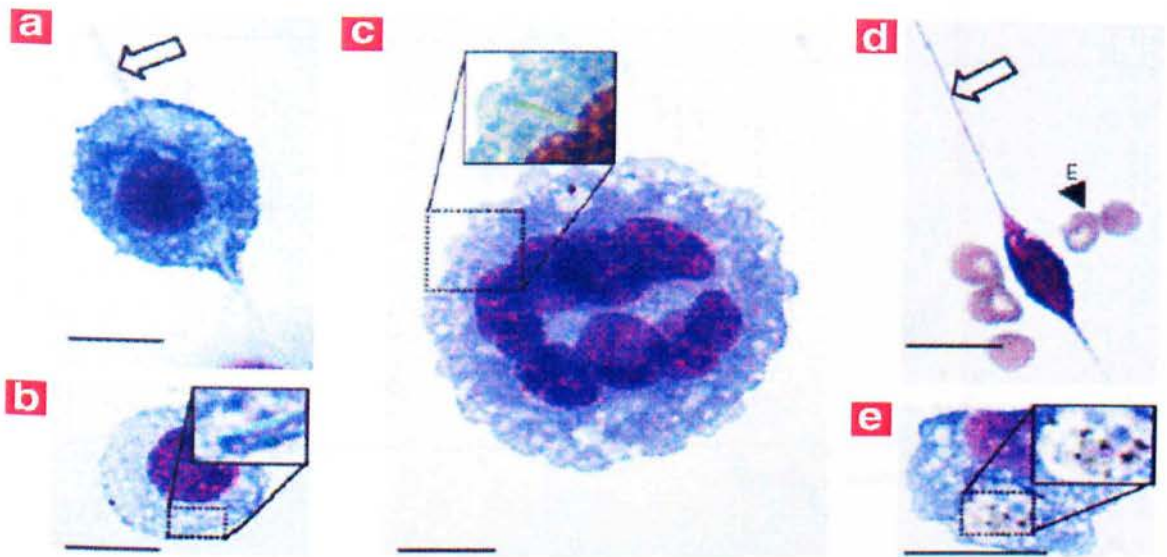
ένα μήνα μετά από την εκβολή των μονοφλοιικών ανθρακονημάτων.

Μια πρόσφατη έρευνα της Shvedova αξιολόγησε την πνευμονική τοξικότητα των μονοφλοιικών ανθρακονημάτων στα ποντίκια και αφαίρεσε με προσοχή τα υπολείμματα μετάλλων με καταλύτη. Η χρήση των καθαρών ανθρακονημάτων (τα οποία δεν χρησιμοποιούνται συχνά στις μελέτες τοξικότητας των ανθρακονημάτων) έχουν επεξεργασθεί για να έχουν λιγότερο από 0,3% σίδηρο σε βάρος, έτσι ώστε να έχουν την ικανότητα να αποδώσουν την τοξικότητα στους νανοσωλήνες και όχι στα μεταλλικά κατάλοιπα. Και στις τρεις μελέτες παρατηρήθηκε ότι έχουν βρεθεί κοκκιώματα γύρω από τις δομές των ανθρακονημάτων. Ωστόσο, διαφωνούν με τα αποτελέσματα του Warheit ότι υπήρχαν ελεύθερα κοκκιώματα για περίπου 60 μέρες μετά την εκβολή.

Η τοξικότητα των πολυφλοιικών ανθρακονημάτων σε αρουραίους έχει μελετηθεί παράλληλα με την έρευνα των μονοφλοιικών ανθρακονημάτων. Στη μελέτη του Muller αξιολογήθηκε η τοξικότητα των πολυφλοιικών ανθρακονημάτων στους πνεύμονες των αρουραίων. Χρησιμοποίησαν τα μη επεξεργασμένα πολυφλοιικά ανθρακονήματα και τα υπολείμματά τους χορηγήθηκαν ενδοτραχειακά (0,5, 2 ή 5mg) στους αρουραίους. Μετά από 2 μήνες, τα κοκκιώματα βρέθηκαν στους πνεύμονες των αρουραίων μαζί με τα πολυφλοιικά ανθρακονήματα, εκ των οποίων τα υπολείμματα προκάλεσαν πιο ομοιόμορφη κατανομή των κοκκιωμάτων, λόγω του μικρότερου μήκους και την καλύτερη διασπορά στους πνεύμονες. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα πολυφλοιικά ανθρακονήματα θα είναι βιοανθεκτικά και τοξικά για τους πνεύμονες και συνιστάται αυστηρά την απαιτούμενη υγιεινή σε αυτούς που εργάζονται πάνω σε αυτά. Κατά την διαφωνία στα αποτελέσματα για την τοξικότητα παραμένει η μελλοντική in vivo μελέτη των ανθρακοϊνών και ανθρακονημάτων στους πνεύμονες, όπου πρέπει να δημιουργηθεί ξεχωριστός ρόλος στην τοξική ίνα και ξεχωριστός ρόλος στην τοξικότητα των υπολειμμάτων των μεικτών μετάλλων.

6.1.1 Μηχανισμοί και παράγοντες που επηρεάζουν την τοξικότητα των ανθρακονημάτων (CNT) και των ανθρακοϊνών (CNF)

Από τότε που ανακαλύφθηκαν οι ανθρακοΐνες και τα ανθρακονήματα, οι τοξικότητές τους ήταν αναμενόμενες λόγω της μη βιοαποδομησιμότητας, της βελονοειδής μορφής, με μέγεθος και σχήμα που μοιάζουν με αμίαντο. Ο αμίαντος είναι ένα φυσικό ορυκτό και έχει μακριές και λεπτές ίνες με κρυσταλλικές δομές, όπως η χρυσοσίλη και ο αμοσίτης. Είναι γνωστό ότι η εισπνοή του αμιάντου μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ασθένειες συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του πνεύμονα. Μπορεί να είναι ένας λόγος όπου γίνονται πολλές έρευνες στην τοξικότητα των ανθρακοϊνών και ανθρακονημάτων πάνω στους πνεύμονες. Μια μελέτη του ερευνητή Poland επιβεβαίωσε ότι μοιάζουν με τον αμίαντο, με ανεξάρτητο μήκος και έχουν παθογόνες συμπεριφορές, όταν η κοιλιακή κοιλότητα των ποντικιών εκτίθεται στα πολυφλοιικά ανθρακονήματα μέσω της εκβολής. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της ενέσιμης αιθάλης στην κοιλιακή κοιλότητα, αυξήθηκε η φλεγμονώδης αντίδραση, όπου εμφανίστηκε στα ποντίκια που έχουν μακριές ίνες είτε λόγω των πολυφλοιικών ανθρακονημάτων είτε του αμιάντου 24 ώρες μετά την εκβολή. Εφτά μέρες μετά την εκβολή, ο σχηματισμός του κοκκιώματος γύρω από τα πολυφλοιικά ανθρακονήματα ή τις ίνες αμιάντου παρατηρήθηκαν μόνο στα δείγματα των μακριών ινών. Ο Poland έδειξε τη διαφορά της τοξικότητας των κοντών και μακριών ινών των πολυφλοιικών ανθρακονημάτων, όπου τα μακροφάγα δεν μπορούν να καταπιούν επιτυχώς τα μακριά ανθρακονήματα.



Εικ.6.3. Τα μήκη των ινών που μπορούν να επηρεάσουν την κάθαρση από τα μακροφάγα.

(a) μια ελλειπείς φαγοκυττάρωση που αποτελείται από μακριές ίνες.

(b) μια επιτυχής φαγοκυττάρωση όπου οι ίνες του είναι κόντες.

(c) παρουσία ξένων κυττάρων με μεγάλα μεγέθη μετά την έγχυση των CNT με μακριές ίνες.

(d) μια αποτυχημένη φαγοκυττάρωση όπως στην εικόνα (a).

(e) μια επιτυχή περικύκλωση των CNT από τα μακροφάγα.

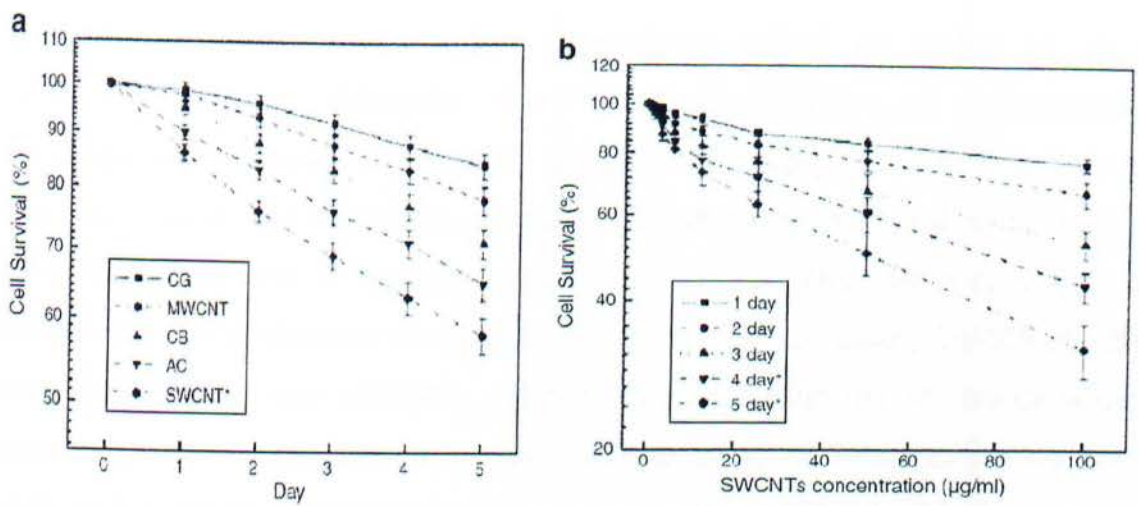
[βιβλ.8]

Οι ερευνητές βρήκαν ότι η τοξικότητα εξαρτάται και από την επιφάνεια των ανθρακοϊνών και ανθρακονημάτων. Ο Tian δοκίμασε την κυτταροτοξικότητα σε 5 είδη ανθρακικών υλικών πάνω σε ανθρώπινους ινοβλάστες. Τα είδη είναι:

- γραφίτης
- πολυφλοιικά ανθρακονήματα
- μονοφλοιικά ανθρακονήματα
- αιθάλη
- ενεργός άνθρακας

Οι ινοβλάστες αναπτύχθηκαν και θεραπεύτηκαν με τα παραπάνω υλικά.

Παρατήρησαν ότι και στα 5 είδη μειώθηκε η επιβίωση των κυττάρων και υπήρχε απότομη μείωση στην περίπτωση των μονοφλοιικών.



Εικ.6.4. Η μειωμένη επιβίωση των ανθρώπινων ινοβλαστικών κυττάρων που έλαβαν θεραπεία με πέντε είδη άνθρακα.(α) Κύτταρα που έλαβαν θεραπεία με 25 mg CG, MWCNT, CB, AC και SWCNTs για 5 ημέρες.(β) Κύτταρα που έλαβαν θεραπεία με SWCNTs σε συγκεντρώσεις της τάξης του 0,8, 1,61, 3,125, 6,25, 12,5, 25,50 και 100mg/ml για 5 μέρες. [βιβλ.9]

Στην περίπτωση της αύξησης του θανάτου του κυττάρου, η μορφολογία των ινοβλαστών άλλαξε μέσα στα κύτταρα που θεραπεύτηκαν με μονοφλοιικά ανθρακονήματα. Ειδικότερα, τα θεραπευμένα κύτταρα εμφανίστηκαν με στρογγυλοποιημένο σχήμα και ακανόνιστες κυτταρικές μεμβράνες, συγκριτικά με τα κανονικά κύτταρα. Ο ερευνητής Tian σημείωσε τις επιδράσεις της τοξικότητας και των 5 ειδών στην επιφάνεια τους. Τα μονοφλοιικά ανθρακονήματα έχουν υψηλό επίπεδο τοξικότητας, επειδή έχουν μικρότερη επιφάνεια. Οι ερευνητές υπέθεσαν ότι η διασπορά των υδροφοβικών νανοϋλικών μαζί με μικρές επιφανειακές περιοχές έχουν ισχυρές τοξικές επιδράσεις. Παρατήρησαν τους μηχανισμούς των ανθρακονημάτων στην τοξικότητα, όπου ενεργοποίησαν την εξωκυττάρια πρωτεΐνη στέλνοντας σήμα, με αποτέλεσμα να γίνονται αλλαγές μέσα στο κυτταροσκελετό, να εκτοπίζονται τα organelles και να παραμορφώνεται η κυτταρική μεμβράνη, οδηγώντας, τελικά, σε κυτταρικό θάνατο. Παρατήρησαν, επίσης, ότι σε σύγκριση με την επιφάνεια, η τοξικότητα προσδιορίζεται από την χημική της δομή (όπως στην περίπτωση της τοξικότητας που προκαλείται από εξευγενισμένα και μη μονοφλοιικά ανθρακονήματα). Βρήκαν ότι τα εξευγενισμένα

μονοφλοιικά ανθρακονήματα είναι περισσότερο τοξικά σε σχέση με τα μη εξευγενισμένα και εξήγησαν ότι τα συγκεντρωμένα μη εξευγενισμένα δημιουργούν δεσμούς που έχουν μεγαλύτερη επιφάνεια από ότι τα καλά διασκορπισμένα εξευγενισμένα μονοφλοιικά ανθρακονήματα και είναι λιγότερο επιβλαβείς. Ένα από τα εμπόδια της μελέτης του Tian είναι ότι οι ερευνητές δεν μπορούσαν να αποδώσουν το λόγο του θανάτου των κυττάρων, δηλαδή εάν ήταν από απόπτωση ή από νέκρωση, ωστόσο είχαν αποδείξει ότι τα ανθρακονήματα προκαλούν την απόπτωση σε μερικά κύτταρα όπως τα T-λεμφοκύτταρα και τα εμβρυικά κύτταρα νεφρού (human embryonic kidney, HEK293). Έδειξαν ακόμη ότι τα γονίδια συνδέονται με την απόπτωση στην G1 φάση.

Στην περίπτωση της τοξικότητας των ανθρακονημάτων, ανεξάρτητα από το μήκος των ινών και την επιφάνεια, οι ερευνητές έδειξαν ότι κατά την διάρκεια της θεραπείας με αυτά επηρεάζεται η τοξικότητα στα βιολογικά συστήματα. Για παράδειγμα, η οξειδωση των επεξεργασμένων μονοφλοιικών ανθρακονημάτων (σε θεραπεία με νιτρικό οξύ) έδειξαν υψηλότερη τοξικότητα στα T-λεμφοκύτταρα από ότι τα μη επεξεργασμένα, αντίστοιχα. Ο ερευνητής Botttini υπέθεσε ότι τα ανθρακονήματα διασκορπίστηκαν περισσότερο στο διάλυμα, λόγω της οξειδωσής τους. Παρόλα αυτά, τα κύτταρα εκτίθενται σε υψηλότερη συγκέντρωση των ελεύθερων ανθρακονημάτων με παρόμοιο μέγεθος ανά όγκο δόσης συγκριτικά με τα μη επεξεργασμένα όπου συναθροίστηκαν περισσότερο και διασκορπίστηκαν λιγότερο σε ένα διάλυμα. Σε μια άλλη μελέτη, του ερευνητή Margez, αποδείχτηκε ότι όταν οι καρβονυλικές (CO), καρβοξυλικές (COOH) και υδροξυλικές (OH) ομάδες δημιουργήθηκαν στην επιφάνεια των ανθρακοϊνών και των ανθρακονημάτων από χημική αντίδραση, η τοξικότητα των ανθρακονημάτων ήταν σημαντικά υψηλότερη από ότι τα ακατέργαστα ανθρακονήματα και η αύξηση της τοξικότητας των ανθρακοϊνών ήταν μέτρια.

Επομένως, η τοξικότητα των νανοϋλικών, γενικά, αλλά και των ανθρακοϊνών και των ανθρακονημάτων είναι ανεξάρτητα από το μέγεθος, το σχήμα, την επιφάνεια και την χημική δομή των υλικών. Για παράδειγμα, στην περίπτωση των ανθρακοϊνών και των ανθρακονημάτων, λόγω της βελονοειδής μορφής των δομών των μακρών ινών, η κάθαρση από την περικύκλωση των μακροφάγων

παρεμποδίζεται και συνεπώς προκύπτει ο τραυματισμός των κυττάρων και των ιστών. Πως μπορεί να μειωθεί η τοξικότητα αυτών των υλικών είναι ένα αμφιλεγόμενο θέμα. Γενικά, θεωρείται ότι δημιουργώντας κοντύτερες ίνες γίνονται λιγότερο τοξικές. Μερικοί πιστεύουν ότι οι ίνες θα πρέπει να μην είναι ομαδοποιημένες, άλλα καλά διασκορπισμένες σε υδατικό διάλυμα με καλύτερη κάθαρση από τα κύτταρα kidneys και μείωση συσσώρευσης στους ιστούς. Ωστόσο, κάποιοι άλλοι πιστεύουν ότι η οξειδωση των επεξεργασμένων ανθρακοϊνών και των ανθρακονημάτων (δηλαδή να γίνουν περισσότερο διαλυτά σε υδατικά διαλύματα ή η επεξεργασία τους να γίνονται με βιοενεργά μόρια) ή η μεγαλύτερη διασπορά τους γίνονται περισσότερο τοξικά από τα μη επεξεργασμένα ή μη ομαδοποιημένα. Εάν ισχύει η παραπάνω θεωρία, τότε η θεραπεία μπορεί να επιτευχθεί με τις επεξεργασμένες ανθρακοϊνες και ανθρακονήματα για βιοιατρικές εφαρμογές όταν δεν γίνονται τοξικά. Μια άλλη πηγή της τοξικότητας των ανθρακοϊνών και των ανθρακονημάτων είναι τα υπολείμματα μετάλλων, όπως είναι το Νί στις ίνες, τα οποία είναι γνωστά για την τοξικότητα τους στα βιολογικά συστήματα και δεν θα πρέπει να αγνοηθούν όταν αξιολογείται η τοξικότητα των ανθρακοϊνών και των ανθρακονημάτων.

Βιβλιογραφία 6^{ου} Κεφαλαίου

1. <http://www.meddean.luc.edu/lumen/MEdEd/Radio/sarc/granulo.htm>. (3/19/09)
2. C.W. Lam, J.T. James, R. McCluskey, R.L. Hunter, Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation, *Toxicol. Sci.* 77 (2004) 126–134.
3. D.B. Warheit, B.R. Laurence, K.L. Reed, D.H. Roach, G.A.M. Reynolds, T.R. Webb, Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats, *Toxicol. Sci.* 77 (2004) 117–125.
4. A.A. Shvedova, E.R. Kisin, R. Mercer, A.R. Murray, V.J. Johnson, A.I. Potapovich, Y.Y. Tyurina, O. Gorelik, S. Arepalli, D. Schwegler-Berry, A.F. Hubbs, J. Antonini, D.E. Evans, B.K. Ku, D. Ramsey, A. Maynard, V.E. Kagan, V. Castranova, P. Baron, Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nano-tubes in mice, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 289 (2005) L698–708.
5. J. Muller, F. Huaux, N. Moreau, P. Misson, J.-F. Heilier, M. Delos, M. Arras, A. Fonseca, J.B. Nagy, D. Lison, Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207 (2005) 221–231.
6. K. Kostarelos, The long and short of carbon nanotube toxicity, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 774–776.
7. <http://www.epa.gov/asbestos/pubs/help.html#Info> . (3/19/09)
8. C.A. Poland, R. Duffin, I. Kinloch, A. Maynard, W.A.H. Wallace, A. Seaton, V. Stone, S. Brown, W. MacNee, K. Donaldson, Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study, *Nat. Nano* 3 (2008) 423–428.
9. F. Tian, D. Cui, H. Schwarz, G.G. Estrada, H. Kobayashi, Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts, *Toxicol. In Vitro* 20 (2006) 1202–1212.
10. N.A. Monteiro-Riviere, R.J. Nemanich, A.O. Inman, Y.Y. Wang, J.E. Riviere, Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes, *Toxicol Lett.* 155 (2005) 377–384.
11. D. Cui, F. Tian, C.S. Ozkan, M. Wang, H. Gao, Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells, *Toxicol. Lett.* 155 (2005) 73–85.
12. M. Bottini, S. Bruckner, K. Nika, N. Bottini, S. Bellucci, A. Magrini, A. Bergamaschi, T. Mustelin, Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis, *Toxicol. Lett.* 160 (2006) 121–126.
13. A. Magrez, S. Kasas, V. Salicio, N. Pasquier, J.W. Seo, M. Celio, S. Catsicas, B. Schwaller, L. Forro, Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials, *Nano Lett.* 6 (2006) 1121–1125

Συμπεράσματα

Οι ανθρακοΐνες και τα ανθρακονήματα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ιατρική έρευνα λόγω της μεγάλης αντοχής τους στον εφελκυσμό και του υψηλού μέτρου ελαστικότητας, των ηλεκτρικών και δομικών τους ιδιοτήτων. Στον τομέα της αναγεννητικής ιατρικής έχουν αυξημένο ενδιαφέρον από τη στιγμή που μπορούν να τροποποιηθούν, έτσι ώστε να ενσωματωθούν στον ανθρώπινο οργανισμό για την προώθηση της αναγέννησης των νευρικών ιστών, οστών καθώς και τη μεταφορά φαρμάκων και γονιδίων για την θεραπεία διαφόρων ασθενειών.

Η εργασία αυτή αναφέρθηκε για μερικές από τις πολλές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την βελτίωση της βιοσυμβατότητάς τους, όπως είναι οι αντιδράσεις προσθήκης στα πλευρικά τοιχώματα και στα άκρα των ανθρακονημάτων και η οξειδωση με βάση τους καρβοξυλικούς δεσμούς. Η συμβατότητα των ανθρακοΐνων και των ανθρακονημάτων στους οστικούς ιστούς και η επίδραση τους στον σχηματισμό του οστού είναι ένας σημαντικός παράγοντας. Η χρήση τους είναι αναδρομική στα βιοϋλικά που εφαρμόζονται στα οστά. Μπορούν να βελτιώσουν τις συνολικές μηχανικές ιδιότητές τους και προβλέπεται να λειτουργούν ως ικρίωμα για την προώθηση και καθοδήγηση της αναγέννησης των οστικών ιστών.

Οι άριστες ιδιότητες των ανθρακοΐνων και ανθρακονημάτων μπορούν να αξιοποιηθούν στις βιολογικές εφαρμογές, στον σχεδιασμό ενός ηλεκτρικά αγωγίμου ικρίωματος, όπως είναι ο μηχανισμός των νευρικών ιστών. Για την αναγέννηση των νεύρων, χρειάζεται ένα ικρίωμα που δεν θα διεξάγει μόνο ηλεκτρικό ρεύμα αλλά θα στηρίζει και την ανάπτυξη του νεύρου. Οι ανθρακοΐνες και τα ανθρακονήματα έχουν την ικανότητα να ενισχύουν τέτοιου είδους ικρίωματα. Η εξαιρετική αγωγιμότητα τους κάτω από ηλεκτρική διέγερση και την αποτελεσματική καθοδήγηση τους στην διόρθωση των νευρικών ιστών, συμβάλουν στην διέγερση και στον έλεγχο των νευρικών δραστηριοτήτων.

Η χορήγηση φαρμάκων επικεντρώνεται στην στόχευση των φαρμάκων ή γονιδίων

σε μια επιθυμητή ομάδα κυττάρων. Ο στόχος αυτής της στοχευόμενης παράδοσης είναι να μεταφέρει μια κατάλληλη ποσότητα φαρμάκων στις επιθυμητές περιοχές, αφού είναι ικανά να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες μέσω της ενδοκύττωσης, και παράλληλα να ελαχιστοποιεί τις ανεπιθύμητες παρενέργειες των φαρμάκων σε άλλους ιστούς. Εκτός από τις τεράστιες δυνατότητες των ανθρακοϊνών και ανθρακονημάτων, η τοξικότητα αυτών των υλικών είναι ένα από τα θέματα που χρειάζεται να μελετηθεί πλήρως. Ο κύριος παράγοντας στην προώθηση της τοξικότητας είναι η παρουσία των μη αντιδρώντων καταλυτών στις ανθρακοΐνες και στα ανθρακονήματα.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η παρούσα εργασία αδυνατεί προφανώς να καλύψει πλήρως το θέμα της χρήσης των ανθρακοϊνών και ανθρακονημάτων ως ικρίώματα και μεταφορείς στην αναγεννητική ιατρική. Παρατίθενται, λοιπόν, κάποιες προτάσεις που αφορούν την περαιτέρω διερεύνηση του θέματος:

Προτείνεται η διεξαγωγή σειρών πειραμάτων που θα εξετάζουν καινοτόμες μεθόδους στη δημιουργία έξυπνων βιοϋλικών για την αναγέννηση των οστικών ιστών. Οι βασικές παράμετροι που καθορίζουν την οστική αναγέννηση είναι οι ακόλουθες:

- ✚ Επιλογή υλικού με τα κατάλληλα χαρακτηριστικά ακαμψίας και μεγέθους των πόρων του, ώστε να διατηρεί τον επιθυμητό χώρο για την επούλωση και να ευνοεί τη σταθεροποίηση του οστικού ιστού
- ✚ Υγιές οστικό υπόστρωμα με καλή αγγείωση
- ✚ Καλή προσαρμογή και ακινητοποίηση του υλικού και διατήρηση της κάλυψης των μαλακών ιστών
- ✚ Επαρκής χρόνος επούλωσης

Σύμφωνα με τα παραπάνω θα μπορούσε να σχεδιαστεί ένα κλωστοϋφαντουργικό

πολυμερές ως ικρίωμα υπό μορφή μεμβράνης. Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η υψηλή αντοχή, η ευελιξία και το υψηλό μέτρο δυσκαμψίας, στην περιοχή terapascals (Tra) κατά τον σχεδιασμό του πολυμερούς. Όμως, το υλικό μιας μεμβράνης θα πρέπει να ικανοποιεί και μια σειρά πρόσθετων απαιτήσεων που απορρέουν από τις βιολογικές, μηχανικές και κλινικές παραμέτρους της διαδικασίας.

Αυτές οι απαιτήσεις είναι:

- ✚ Βιοσυμβατότητα του υλικού
- ✚ Αποφρακτική ικανότητα
- ✚ Ικανότητα δημιουργίας και διατήρησης χώρου
- ✚ Ικανότητα ενσωμάτωσης με τους περιβάλλοντες ιστούς
- ✚ Κλινική χρηστικότητα
- ✚ Ενσωμάτωση συστημάτων αποδέσμευσης φαρμάκων και γονιδίων στο υλικό

Η τοποθέτηση της μεμβράνης θα επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην επούλωση της οστικής βλάβης, καθώς θα απομονώνει στο εξωτερικό τμήμα τους μαλακούς ιστούς και θα προσφέρει στο εσωτερικό τις κατάλληλες συνθήκες. Με αποτέλεσμα να προκληθεί η αναγέννηση του ελλείποντα οστικού ιστού.

Στην περίπτωση της αναγέννησης των νευρικών ιστών θα μπορούσε να δημιουργηθεί ένα βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές. Τα βιοαποικοδομήσιμα έξυπνα βιοϋλικά (π.χ. επιθέματα) θα πρέπει να περιέχουν βιοδραστικές επιφάνειες και ελεγχόμενους ρυθμούς αποικοδόμησης, όπου η μηχανική ιστών θα εμφανίζεται στο προσκήνιο. Η μηχανική ιστών θα περιλαμβάνει τη χρήση κυττάρων για τη δημιουργία τεχνητών δομών με στόχο την αντικατάσταση προβληματικών ιστών και οργάνων του ανθρώπινου οργανισμού. Θα κατασκευάζονται από ανθρακονήματα σε σωληνοειδή μορφή και θα μεταγάουν ηλεκτρισμό, ενεργοποιώντας τους μηχανισμούς επούλωσης και ίασης νευρικών ιστών, όπου θα εφαρμόζονται απειροελάχιστες ποσότητες ηλεκτρισμού στα κατεστραμμένα κύτταρα για την επιδιόρθωση τους. Επιπλέον, η τεχνολογία παρασκευής των βιοϋλικών θα επιτρέπει τον εύκολο εγκλεισμό φαρμακευτικών ουσιών, θα χορηγούνται με όσο το δυνατόν πιο ανώδυνο τρόπο, θα ανιχνεύονται εύκολα και θα επιτρέπουν την απελευθέρωση του φαρμάκου στο επιθυμητό σημείο με

απόλυτη ακρίβεια. Θα περιλαμβάνει την απόθεση/ανάπτυξη κυττάρων σε πορώδη, βιοαποικοδομήσιμα «έξυπνα» επιθέματα, τα οποία στη συνέχεια θα διαφοροποιούνται αποκτώντας μορφή φυσικών ιστών ικανά να μιμηθούν τις λειτουργίες αυτών. Οι τεχνητές αυτές δομές θα εμφυτεύονται στη συνέχεια σε ασθενείς με στόχο την αντικατάσταση ασθενικών ή κατεστραμμένων νευρικών ιστών. Με την πάροδο του χρόνου, τα ικριώματα θα αφομοιώνονται από τον ανθρώπινο οργανισμό και στη θέση τους θα αναπτύσσονται ιστοί οι οποίοι θα φέρουν αιμοφόρα αγγεία και νεύρα.

Εκτός από τις τεράστιες δυνατότητες των ανθρακοϊνών και ανθρακονημάτων, η τοξικότητα αυτών των υλικών είναι ένα από τα θέματα που χρειάζεται να μελετηθεί πλήρως. Επιπλέον, η παρουσία των μη αντιδρώντων καταλυτών στις ανθρακοϊνες και στα ανθρακονήματα είναι ο κύριος παράγοντας στην προώθηση της τοξικότητας, όπου θα πρέπει να ληφθεί όταν συνθέτονται οι ανθρακοϊνες και τα ανθρακονήματα. Τέλος, τα αποτελέσματα της τοξικότητας τους όταν εμφυτεύονται ή εγχέουν χρειάζονται περισσότερη έρευνα. Με συνεχή εργασία των ερευνητών, αναμφίβολα τα υλικά αυτά θα γίνουν εύχρηστα και ασφαλή για να χρησιμοποιηθούν στην ενίσχυση της ανθρώπινης υγείας.