



ΔΙΕΘΝΕΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ

ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

**Διερεύνηση των Βημάτων του Πρωτοκόλλου της In Vitro Δοκιμής
Συμβατότητας Νανοςωματιδίων σε Ερυθροκύτταρα**

Πτυχιακή εργασία

ΣΤΥΛΙΑΝΗ Α. ΑΞΥΠΟΛΙΤΟΥ

Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Βασίλειος Παπαλιάγκας, MD/MSc, PhD, Νευρολόγος,
Διδάκτωρ Ιατρικής Σχολής ΑΠΘ, Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Δι.Πα.Ε

Συν Επιβλέπων Καθηγητής: Δρ Ιωάννης Τσαμεσίδης, MScs, Ph.D. Post-doc Researcher,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Διεθνές Πανεπιστήμιο Ελλάδος.

2023

Ευχαριστίες,

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή μου Δρ. Βασίλειο Παπαλιάγκα που με στήριξε στην εκπόνηση της εργασίας μου με ένα θέμα που δεν σχετίζεται άμεσα με το αντικείμενό του, που ήταν πολύ δεκτικός και πρόθυμος να με βοηθήσει, καθώς επίσης τον συνεπιβλέπων καθηγητή μου Δρ. Ιωάννη Τσαμεσίδη για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω μια ερευνητική εργασία. Για την στήριξη και την υπομονή του, καθώς και για την καθοδήγηση του σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας και που μου έμαθε καινούριες δεξιότητες.

Η εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο προσθετικής της Οδοντιατρικής σχολής του ΑΠΘ. Έτσι θα ήθελα να ευχαριστήσω την υπεύθυνη του εργαστηρίου Δρ. Ελέανα Κοντονασάκη που με δέχθηκε και μου επέτρεψε να χρησιμοποιήσω τον εξοπλισμό τους και ένα μέρος των νανοϋλικών του εργαστηρίου. Επίσης, τη Διδάκτορα ΑΠΘ Γεωργία Πουρουτζίδου που μου επέτρεψε να χρησιμοποιήσω το νανοϋλικό που είχε συνθέσει.

Ευχαριστώ τους υπεύθυνους του Αιμοδοτικού Κέντρου Νάουσας για την παροχή των δειγμάτων αίματος καθώς και όλους τους εθελοντές δότες για την προσφορά τους.

Ευχαριστώ τον Διδάκτορα ΑΠΘ Δημήτρη Γκιλιόπουλο που μου επέτρεψε να χρησιμοποιήσω το μηχάνημα ηχητικού ανιχνευτή (probe sonication) και μου έδειξε την διαδικασία.

Τέλος ευχαριστώ, το Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης ‘Θεαγένειο’ για όσα μου έμαθε κατά την διάρκεια της πρακτικής μου άσκησης, η οποία γινόταν σε ένα βαθμό παράλληλα με τα πειράματα της εργασίας.

Κλείνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω την συμφοιτήριά μου Καρκαβίτσα Μυρτώ, την βοηθό μου στο εργαστήριο, Μαρία Σίμογλου που μου προσέφερε βοήθεια στις εργαστηριακές πρακτικές και την ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος, τον άνθρωπο μου Ιορδάνη, για την ψυχολογική στήριξη και την πολύτιμη βοήθεια στην ολοκλήρωση της πτυχιακής μου, καθώς επίσης την οικογένειά μου για την στήριξη τους κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

Abstract

When a research procedure is carried out in which biomaterials and parts of the organism take part, the main question that arises is whether these materials are compatible with the organism. Nanoparticles are materials which in recent years have dominated the medical community, due to their properties and their targeted action, which is why they are used in many applications. By extension, the investigation of the compatibility of nanomaterials is crucial for the course of the experiment and for the license of their use in living organisms, because, in some situations they may greatly worsen the condition of a patient or even lead to conditions incompatible with life. The purpose of this study was to set up a protocol using standard techniques to overcome nanoparticles aggregation and to learn the interactions of Nanoakermanite with normal red blood cells after submitting the material to some procedures such as bath sonication and probe sonication in order to develop a hemocompatibility protocol. Also, we wanted to understand the action of Nanoakermanite on red blood cells and the effect of ultrasound on the material, and to create a Protocol that will contribute to the safer use of nanoparticles. The results showed that Nanoakermanite is not compatible with red blood cells at high concentrations, while it is at the lowest. In the bath sonication it was found that at 20 minutes in the majority of the experiments there was maximum hemolysis, while the temperature makes our material even more hemolytic. Lastly, probe sonication doesn't play a special role in hemolysis compared to the material that had not undergone the procedure.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	-6-
A. Θεωρητικό Μέρος.....	-7-
Κεφάλαιο 1: Νανοτεχνολογία.....	-7-
1.1.Ορισμός.....	-7-
1.2. Ιστορική Αναδρομή.....	-7-
1.3. Εφαρμογές της Νανοτεχνολογίας.....	-8-
Κεφάλαιο 2: Νανοςωματίδια.....	-11-
2.1. Ορισμός.....	-11-
2.2. Κατηγορίες Νανοςωματιδίων.....	-11-
2.3. Σύνθεση των Νανοςωματιδίων.....	-13-
2.3.1. Bottom-up method (Μέθοδος από κάτω προς τα πάνω).....	-14-
2.3.2. Top-down method (Μέθοδος από πάνω προς τα κάτω).....	-15-
2.4. Εφαρμογές των νανοςωματιδίων.....	-17-
Κεφάλαιο 3 Αίμα – Αιμοσυμβατότητα.....	-20-
3.1. Αίμα.....	-20-
3.2. Συστατικά του Αίματος.....	-20-
3.3. Φυσιολογία Ερυθρού Αιμοσφαιρίου – Ερυθροποίηση.....	-21-
3.4. Λειτουργία ερυθρών αιμοσφαιρίων.....	-23-
3.5. Αιμοσυμβατότητα.....	-26-
3.6. Αιμοσυμβατότητα και Νανοτεχνολογία.....	-27-
3.7. Ιστορική αναδρομή των ανακαλύψεων του αίματος.....	-29-
B. Πειραματικό Μέρος.....	-34-
Κεφάλαιο 4. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας.....	-34-
4.1. Υλικά και μέθοδοι.....	-34-
4.1.1. Δείγματα αίματος.....	-34-
4.1.2. Υλικό Νανοςωματιδίων.....	-34-
4.2. Επεξεργασία των Αιμοσφαιρίων.....	-35-
4.3. Μέθοδος Υπερήχησης - Ηχητικού Ανιχνευτή.....	-35-
4.4. Μεθοδολογία Αιμοσυμβατότητας.....	-36-

Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα.....	42-
Κεφάλαιο 6. Συζήτηση.....	52-
Κεφάλαιο 7. Συμπεράσματα.....	54-
Βιβλιογραφία.....	55-

Εισαγωγή

Η εκτέλεση των πειραμάτων, για την παρούσα ερευνητική εργασία, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Προσθητικής του τμήματος Οδοντιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης σε συνεργασία με το Αιμοδοτικό Κέντρο Νάουσας, που μας παρείχαν τα δείγματα αίματος. Μέσω της εργασίας ο στόχος ήταν η εξοικείωση με τις εργαστηριακές τεχνικές, την επεξεργασία δειγμάτων αίματος όπως διαχωρισμός, καθαρισμός, συντήρηση, φυγοκέντριση, την εξοικείωση με τις τεχνικές του ελέγχου της αιμοσυμβατότητας και πιο συγκεκριμένα τον έλεγχο της αιμόλυσης, αλλά και τις διαδικασίες επεξεργασίας νανοϋλικών όπως υπερήχηση σε λουτρό και ηχητικό ανιχνευτή. Επιπρόσθετα, την εξοικείωση με πρακτικές για την στατιστική ανάλυση και την επεξεργασία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Σε θεωρητικό επίπεδο στόχος της εργασίας ήταν η εξοικείωση με την βιβλιογραφική έρευνα και την αξιολόγηση των πηγών και των ευρημάτων, ο εμπλουτισμός γνώσεων σχετικά με την Νανοτεχνολογία, τα νανοσωματίδια, τις εφαρμογές και τον τρόπο σύνθεσής τους. Άλλα και με την αιμοσυμβατότητα και τον ρόλο που διαδραματίζουν σε αυτά τα νανοσωματίδια αλλά και την διαδικασία δημιουργίας ενός πρωτοκόλλου.

Τέλος, συμπληρωματικά με τα ανωτέρω, επιτεύχθηκε η καλύτερη κατανόηση για τον τρόπο λειτουργίας μιας ερευνητικής ομάδας και ενός εργαστηρίου, έγινε αντιληπτή η αναγκαιότητα του ομαδικού πνεύματος και της συνεργασίας στην ομάδα, η λήψη αποφάσεων και η ανάληψη της ευθύνης για τα αποτελέσματα κάθε πράξης.

A. Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1: Νανοτεχνολογία

1.1. Ορισμός

Η νανοτεχνολογία μπορεί να οριστεί ως η επιστήμη και η μηχανική που εμπλέκονται στο σχεδιασμό, τη σύνθεση, τον χαρακτηρισμό και την εφαρμογή υλικών, δομών, συσκευών και συστημάτων των οποίων η μικρότερη λειτουργική οργάνωση, τουλάχιστον σε μία διάσταση, είναι στην κλίμακα νανομέτρων δηλαδή στο ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου (10^{-9}). Σε αυτές τις κλίμακες, η εξέταση μεμονωμένων μορίων και ομάδων μορίων που αλληλεπιδρούν σε σχέση με τις μαζικές μακροσκοπικές ιδιότητες του υλικού ή της συσκευής καθίσταται σημαντική, καθώς έχει έλεγχο στη θεμελιώδη μοριακή δομή, η οποία επιτρέπει τον έλεγχο των μακροσκοπικών χημικών και φυσικών ιδιοτήτων. [1-3]

Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνο το τελευταίο τέταρτο του αιώνα κατέστη δυνατό να τροποποιηθούν ενεργά και σκόπιμα μόρια και δομές εντός του εύρους της νανοκλίμακας αν και στον φυσικό κόσμο υπάρχουν πολλά παραδείγματα δομών που υπάρχουν με διαστάσεις νανομέτρων. Συμπεριλαμβανομένων: βασικών μορίων στο ανθρώπινο σώμα, συστατικών των τροφίμων, και πολλών τεχνολογιών που εμπλέκουν δομές νανοκλίμακας για πολλά χρόνια. Αυτός ο έλεγχος σε νανομετρική κλίμακα είναι που διακρίνει τη νανοτεχνολογία από άλλους τομείς της τεχνολογίας. [3]

Η νανοτεχνολογία υπόσχεται επιστημονική πρόοδο σε πολλούς τομείς όπως η ιατρική, τα καταναλωτικά προϊόντα, η ενέργεια, τα υλικά και η κατασκευή.

1.2. Ιστορική Αναδρομή

Οι ιδέες και οι έννοιες πίσω από τη νανοεπιστήμη και τη νανοτεχνολογία ξεκίνησαν με μια ομιλία με τίτλο *“There's Plenty of Room at the Bottom”* από τον φυσικό Richard Feynman σε μια συνάντηση της Αμερικανικής Φυσικής Εταιρείας στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας της Καλιφόρνια (CalTech) στις 29 Δεκεμβρίου 1959, πολύ πριν χρησιμοποιηθεί ο όρος νανοτεχνολογία. Σε αυτή τη διάλεξη, ο Feynman έκανε την υπόθεση *“Γιατί δεν μπορούμε να γράψουμε ολόκληρους τους 24 τόμους της Εγκυκλοπαίδειας Britannica στο κεφάλι μιας καρφίτσας;”* και περιέγραψε ένα όραμα χρήσης μηχανών για την κατασκευή μικρότερων μηχανών, μέχρι το μοριακό επίπεδο. Αυτή η νέα ιδέα έδειξε ότι οι υποθέσεις του Feynman έχουν αποδειχθεί σωστές και για αυτούς τους λόγους, θεωρείται ο πατέρας της σύγχρονης νανοτεχνολογίας. Μετά από δεκαπέντε χρόνια, στις εξερευνησεις του στη μηχανική

κατεργασία υπερακρίβειας, ο καθηγητής Norio Taniguchi, ήταν ο πρώτος που χρησιμοποίησε και όρισε τον όρο «νανοτεχνολογία» το 1974 ως: “*Η νανοτεχνολογία αποτελείται κυρίως από την επεξεργασία του διαχωρισμού, της ενοποίησης και της παραμόρφωσης υλικών από ένα άτομο ή ένα μόριο*”. Μόλις το 1981, με την ανάπτυξη του μικροσκοπίου σάρωσης σήραγγας που μπορούσε να απεικονίζει μεμονωμένα άτομα, ξεκίνησε η σύγχρονη νανοτεχνολογία. [4-7]

1.3. Εφαρμογές της Νανοτεχνολογίας

Μετά από περισσότερα από 20 χρόνια βασικής έρευνας στη νανοεπιστήμη και περισσότερα από δεκαπέντε χρόνια εστιασμένης έρευνας και ανάπτυξης στο πλαίσιο της Εθνικής Πρωτοβουλίας Νανοτεχνολογίας, οι εφαρμογές της αποδίδουν τόσο με αναμενόμενο όσο και με απροσδόκητο τρόπο την υπόσχεσή της να ωφελήσει την κοινωνία. [8]

Η νανοτεχνολογία συμβάλλει στη σημαντική βελτίωση, ακόμη και στην επανάσταση, πολλών τομέων τεχνολογίας και βιομηχανίας όπως:

- Καθημερινά Υλικά και Διαδικασίες

Πολλά οφέλη της νανοτεχνολογίας εξαρτώνται από το γεγονός ότι είναι δυνατή η προσαρμογή των δομών των υλικών σε εξαιρετικά μικρές κλίμακες για την επίτευξη συγκεκριμένων ιδιοτήτων, επεκτείνοντας έτσι σε μεγάλο βαθμό την εργαλειοθήκη της επιστήμης των υλικών. Χρησιμοποιώντας τη νανοτεχνολογία, τα υλικά μπορούν αποτελεσματικά να γίνουν ισχυρότερα, ελαφρύτερα, πιο ανθεκτικά, πιο αντιδραστικά, ή καλύτεροι ηλεκτρικοί αγωγοί, μεταξύ πολλών άλλων χαρακτηριστικών. Πολλά καθημερινά εμπορικά προϊόντα είναι επί του παρόντος στην αγορά και σε καθημερινή χρήση βασίζονται σε υλικά και διαδικασίες νανοκλίμακας. [8]

- Ηλεκτρονικά και Εφαρμογές Πληροφορικής

Η νανοτεχνολογία έχει συμβάλει εξαιρετικά σε σημαντικές προόδους στους υπολογιστές και τα ηλεκτρονικά, οδηγώντας σε ταχύτερα, μικρότερα και πιο φορητά συστήματα που μπορούν να διαχειρίζονται και να αποθηκεύουν όλο και μεγαλύτερες ποσότητες πληροφοριών. Στις μέρες μας πωλούνται οθόνες και τηλεοράσεις εξαιρετικά υψηλής ευκρίνειας που χρησιμοποιούν κβαντικές κουκκίδες για να παράγουν πιο ζωντανά χρώματα ενώ είναι πιο ενεργειακά αποδοτικές. Τα τρανζίστορ, οι βασικοί διακόπτες που υπάρχουν σε όλους τους σύγχρονους υπολογιστές, έχουν γίνει όλο και μικρότερα μέσω της νανοτεχνολογίας. Στις αρχές του αιώνα, ένα τυπικό τρανζίστορ είχε μέγεθος 130 έως 250 νανόμετρα ενώ το 2016 το Εθνικό Εργαστήριο Lawrence Berkeley παρουσίασε ένα τρανζίστορ ενός νανομέτρου!. Ως εκ

τούτου, η νανοηλεκτρονική μπορεί να βοηθήσει στην επίτευξη του στόχου που ορίζεται στο νόμο του Moore, ο οποίος προβλέπει τη συνεχιζόμενη τάση μείωσης του μεγέθους των ολοκληρωμένων κυκλωμάτων. Η νανοηλεκτρονική είναι ένας πολυεπιστημονικός τομέας που αποτελείται από κβαντική φυσική, ανάλυση συσκευών, ολοκλήρωση συστήματος και ανάλυση κυκλώματος. [8,14]

- Ενεργειακές Εφαρμογές

Ένας ακόμη τομέας στον οποίο βρίσκει εφαρμογή η νανοτεχνολογία καθώς, βελτιώνει τις παραδοσιακές πηγές ενέργειας αλλά και ενισχύει σημαντικά τις εναλλακτικές προσεγγίσεις για να βοηθήσει στην κάλυψη των αυξανόμενων ενεργειακών απαιτήσεων του κόσμου. Για παράδειγμα επιτρέπει τη χρήση ενέργειας υδρογόνου με πολύ μεγαλύτερη χωρητικότητα. Οι κυψέλες καυσίμου υδρογόνου, ενώ δεν αποτελούν οι ίδιες πηγή ενέργειας, επιτρέπουν την αποθήκευση ενέργειας από το ηλιακό φως και άλλες ανανεώσιμες πηγές με φιλικό προς το περιβάλλον τρόπο χωρίς εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα . Πολλοί επιστήμονες αναζητούν επίσης τρόπους για να αναπτύξουν καθαρές, προσιτές και ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, μαζί με μέσα για τη μείωση της κατανάλωσής της,τη μείωση των επιβαρύνσεων τοξικότητας στο περιβάλλον και τον καθαρισμό περιβαλλοντικών ρύπων. [8-9]

- Εφαρμογές Ιατρικής και Υγείας

Η νανοϊατρική, η εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στην ιατρική, βασίζεται στη φυσική κλίμακα των βιολογικών φαινομένων για να παράγει ακριβείς λύσεις για την πρόληψη, τη διάγνωση και τη θεραπεία ασθενειών. Οι εμπορικές εφαρμογές έχουν προσαρμόσει νανοσωματίδια χρυσού ως ανιχνευτές για τον εντοπισμό στοχευμένων αλληλουχιών των νουκλεϊκών οξέων αλλά διερευνώνται επίσης κλινικά ως πιθανές θεραπείες για τον καρκίνο αλλά και για άλλες ασθένειες. Ο σχεδιασμός και η μηχανική προηγμένων υλικών νανοπόρων στερεάς κατάστασης θα μπορούσε να επιτρέψει την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών αλληλουχίας γονιδίων που επιτρέπουν την ανίχνευση ενός μορίου με χαμηλό κόστος και υψηλή ταχύτητα με ελάχιστη προετοιμασία δειγμάτων και οργάνων. Η καλύτερη απεικόνιση και τα διαγνωστικά εργαλεία που ενεργοποιούνται από τη νανοτεχνολογία ανοίγουν το δρόμο για έγκαιρη διάγνωση, για πιο εξατομικευμένες επιλογές θεραπείας και καλύτερα ποσοστά θεραπευτικής επιτυχίας. Ειδικότερα, συμβάλει σημαντικά τόσο στη διάγνωση όσο και στη θεραπεία της αθηροσκλήρωσης ή της συσσώρευσης πλάκας στις αρτηρίες. Σε μια τεχνική, οι ερευνητές δημιούργησαν ένα νανοσωματίδιο που μιμείται την «καλή» χοληστερόλη του σώματος, γνωστή ως HDL (λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας), η οποία βοηθά στη συρρίκνωση της πλάκας. Μια ακόμη τεχνική που εργάζονται οι ερευνητές είναι σε μια σειρά διαφορετικών θεραπευτικών μεθόδων όπου ένα νανοσωματίδιο μπορεί να

ενθυλακώσει ή να βοηθήσει με άλλο τρόπο στην παροχή φαρμάκου απευθείας στα καρκινικά κύτταρα και να ελαχιστοποιήσει τον κίνδυνο βλάβης στον υγιή ιστό. Τα αποτελέσματα είναι τόσο ελπιδοφόρα που τα νανοϋλικά μπορεί να γίνουν η εναλλακτική στην παραδοσιακή θεραπεία του καρκίνου. Αυτό έχει τη δυνατότητα να αλλάξει τον τρόπο με τον οποίο τον αντιμετωπίζουν οι γιατροί και να μειώσει δραματικά τις τοξικές επιπτώσεις της χημειοθεραπείας. Η έρευνα στη χρήση της νανοτεχνολογίας για την αναγεννητική ιατρική καλύπτει πολλούς τομείς εφαρμογής, συμπεριλαμβανομένης της μηχανικής των οστών και των νευρικών ιστών. Για παράδειγμα, νέα υλικά μπορούν να κατασκευαστούν ώστε να μιμούνται την κρυσταλλική ορυκτή δομή του ανθρώπινου οστού ή να χρησιμοποιηθούν ως επανορθωτική ρητίνη για οδοντιατρικές εφαρμογές, καθώς αυτά δεν θα είναι μόνο αποτελεσματικά, αλλά και καλά ανεκτά από το ανθρώπινο σώμα. Οι ερευνητές αναζητούν επίσης τρόπους για την ανάπτυξη πολύπλοκων ιστών με στόχο μια μέρα να μεγαλώσουν ανθρώπινα όργανα για μεταμόσχευση. Αλλά και την χρήση νανοκορδέλων γραφενίου για να βοηθήσουν στην αποκατάσταση των τραυματισμών του νωτιαίου μυελού. Η προκαταρκτική έρευνα δείχνει ότι οι νευρώνες αναπτύσσονται καλά στην επιφάνεια του αγωγίμου γραφενίου. Τέλος, εξετάζουν τρόπους με τους οποίους η νανοτεχνολογία μπορεί να βελτιώσει τα εμβόλια, συμπεριλαμβανομένης και της διανομής τους χωρίς τη χρήση βελόνων. Προσπαθούν να δημιουργήσουν ένα καθολικό ικρίωμα εμβολίου για το ετήσιο εμβόλιο της γρίπης που θα κάλυπτε περισσότερα στελέχη και θα απαιτούσε λιγότερους πόρους για να αναπτυχθεί κάθε χρόνο. [8,10-13]

Κεφάλαιο 2 : Νανοδοματίδια

2.1. Ορισμός

Ένα νανοδοματίδιο ορίζεται συνήθως ως ένα δοματίδιο ύλης που έχει διάμετρο μεταξύ 1 και 100 νανόμετρων. Ο όρος “νανοδοματίδιο” είναι ένας συνδυασμός των λέξεων «nanos» (ελληνικά: νάνος) και «particulum» (λατινικά: δοματίδιο). Στο επιστημονικό πλαίσιο, το «nano» αναφέρεται κυρίως σε μια συγκεκριμένη τάξη μεγέθους, δηλαδή 10^{-9} στο μετρικό σύστημα. [15,16]

2.2. Κατηγορίες Νανοδοματιδίων

Τα νανοδοματίδια έχουν διαφορετικό σχήμα, μέγεθος και δομή. Αυτό μπορεί να είναι σφαιρικό, κυλινδρικό, σωληνωτό, κωνικό, με κοίλο πυρήνα, σπειροειδές, επίπεδο ή ακανόνιστο. Ενώ η επιφάνεια μπορεί να είναι ομοιόμορφη ή ακανόνιστη με διαφοροποιήσεις. Ορισμένα νανοδοματίδια επίσης μπορεί να είναι κρυσταλλικά με μονοκρυσταλλική ή πολυκρυσταλλική δομή στερεά ή άμορφα, και χαλαρά είτε συσσωματωμένα. [19,22]

2.2.1. Με βάση τις διαστάσεις τους, τα νανοϋλικά κατατάσσονται σε τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες:

1. Νανοϋλικά μηδενικών διαστάσεων (0-D): Αυτός ο ορισμός προκύπτει από το γεγονός ότι όλες οι διαστάσεις τους δηλαδή το μήκος, το πλάτος και το ύψος είναι σταθερά σε ένα μεμονωμένο σημείο στην περιοχή της νανοκλίμακας. Παραδείγματα είναι οι κβαντικές κουκκίδες, τα φουλερένια και τα νανοδοματίδια .
2. Μονοδιάστατα νανοϋλικά (1-D): Είναι αυτά τα οποία έχουν μια διάσταση μεγαλύτερη από τη νανοκλίμακα. Παραδείγματα είναι οι νανοδομήνες, νανοϊνες, νανοράβδοι, νανοςύρματα, νανοκέρατα και το γραφένιο
3. Δισδιάστατα νανοϋλικά (2-D): Ορίζονται αυτά τα οποία έχουν δύο διαστάσεις μεγαλύτερες από τη νανοκλίμακα. Παραδείγματα είναι τα νανοφύλλα, νανοφίλμ, οι νανοδομήσεις και οι νανοδομήνες άνθρακα
4. Τρισδιάστατα νανοϋλικά (3-D) ή νανοϋλικά χύδη: Σε αυτήν την κατηγορία τα υλικά δεν περιορίζονται στη νανοκλίμακα σε καμία διάσταση. Αυτή η κατηγορία περιέχει χύδη σκόνης, διασπορές νανοδοματιδίων, συστοιχίες νανοδομημάτων και νανοδομήνων και νανοδοματίδια από χρυσό. [19,21,23,24]

2.2.2. Με βάση τη σύνθεσή τους γενικά χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: οργανικά, με βάση τον άνθρακα και ανόργανα.

- Οργανικά νανοσωματίδια

Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει νανοσωματίδια που αποτελούνται από πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, πολυμερή ή οποιεσδήποτε άλλες οργανικές ενώσεις. Τα πιο σημαντικά παραδείγματα αυτής της κατηγορίας είναι τα δενδριμερή, τα λιποσώματα, τα μικκύλια και τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα όπως η φερριτίνη. Αυτά τα νανοσωματίδια είναι τυπικά μη τοξικά, βιοαποδομήσιμα και μπορούν σε ορισμένες περιπτώσεις, π.χ. για τα λιποσώματα, να έχουν κοίλο πυρήνα. Τα οργανικά νανοσωματίδια είναι ευαίσθητα στη θερμική και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία όπως η θερμότητα και το φως. Επιπλέον, συχνά σχηματίζονται από μη ομοιοπολικές διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, γεγονός που τα καθιστά πιο ασταθή στη φύση και προσφέρει μια οδό απομάκρυνσης από το σώμα. [19,23,26,27]

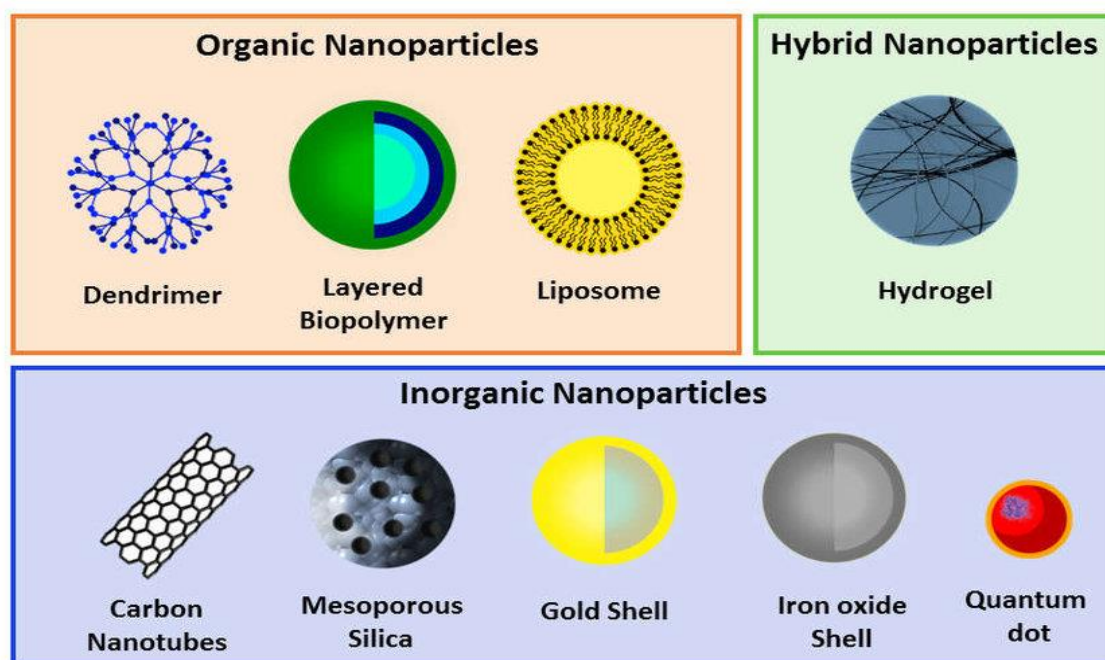
- Νανοσωματίδια με βάση τον άνθρακα

Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει νανοσωματίδια που κατασκευάζονται αποκλειστικά από άτομα άνθρακα. Σημαντικά παραδείγματα αυτής της κατηγορίας είναι τα φουλερένια, τα μαύρα νανοσωματίδια του άνθρακα και οι κβαντικές κουκκίδες άνθρακα. Τα φουλερένια είναι μόρια άνθρακα που χαρακτηρίζονται από μια συμμετρική δομή κλειστού κλωβού. Κάποιοι από τους τύπους που έχουν περιγραφεί είναι τα φουλερένια C₆₀ που αποτελούνται από 60 άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε σχήμα μπάλας ποδοσφαίρου, αλλά και τα C₇₀ και C₅₄₀. Τα μαύρα νανοσωματίδια του άνθρακα είναι συσσωματώματα που μοιάζουν με σταφύλι από εξαιρετικά συντηγμένα σφαιρικά σωματίδια, ενώ οι κβαντικές κουκκίδες άνθρακα αποτελούνται από διακριτά, κάτι σαν σφαιρικά νανοσωματίδια άνθρακα με μεγέθη κάτω των 10 nm. [23,28-31]

- Ανόργανα Νανοσωματίδια

Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει νανοσωματίδια που δεν είναι κατασκευασμένα από άνθρακα ή οργανικά υλικά. Τα τυπικά παραδείγματα αυτής της κατηγορίας είναι τα μεταλλικά, τα οξειδία μετάλλων, τα κεραμικά και οι ημιαγωγοί. Τα μεταλλικά νανοσωματίδια κατασκευάζονται καθαρά από πρόδρομες ουσίες μετάλλων. Σχεδόν όλα τα μέταλλα μπορούν να συντίθενται στα νανοσωματίδια τους και μπορεί να είναι μονομεταλλικά, διμεταλλικά ή πολυμεταλλικά. Τα μέταλλα που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη σύνθεση των νανοσωματιδίων είναι αλουμίνιο (Al), κάδμιο (Cd), κοβάλτιο (Co), χαλκός (Cu), χρυσός (Au), σίδηρος (Fe), μόλυβδος (Pb), ασήμι (Ag) και ψευδάργυρος (Zn). Τα νανοσωματίδια με βάση το οξείδιο μετάλλου συντίθενται για να τροποποιήσουν τις ιδιότητες των αντίστοιχων

μεταλλικών νανοσωματιδίων. Για παράδειγμα τα νανοσωματίδια σιδήρου (Fe) οξειδώνονται αμέσως σε οξείδια του σιδήρου (Fe_2O_3) παρουσία οξυγόνου σε θερμοκρασία δωματίου κάτι που αυξάνει την αντιδραστικότητά τους σε σύγκριση με τα νανοσωματίδια σιδήρου. Τα πιο κοινά συντιθέμενα είναι: οξείδιο του αργιλίου (Al_2O_3), οξείδιο του δημητρίου (CeO_2), οξείδιο του σιδήρου (Fe_2O_3), μαγνητίτης (Fe_3O_4), διοξείδιο του πυριτίου (SiO_2), οξείδιο τιτανίου (TiO) και οξείδιο ψευδαργύρου (ZnO). Αυτά τα νανοσωματίδια έχουν εξαιρετικές ιδιότητες σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μεταλλικά τους και συντίθενται κυρίως λόγω της αυξημένης αντιδραστικότητας και αποτελεσματικότητάς τους. Τα κεραμικά νανοσωματίδια είναι ανόργανα στερεά κατασκευασμένα από ανθρακικά, καρβίδια, φωσφορικά άλατα και οξείδια μετάλλων και μεταλλοειδών, όπως το τιτάνιο και το ασβέστιο. Συνήθως συντίθενται μέσω θερμότητας και διαδοχικής ψύξης και μπορούν να βρεθούν σε άμορφες, πολυκρυσταλλικές, πυκνές, πορώδεις ή κοίλες μορφές. Τέλος τα νανοσωματίδια ημιαγωγών είναι κατασκευασμένα από ημιαγωγικά υλικά, τα οποία διαθέτουν ιδιότητες μεταξύ μετάλλων και μη μετάλλων. [19,23,32-34]



Εικόνα 1 : Κατηγορίες Νανοσωματιδίων

[Πηγή: Silva, S., Almeida, A.J. and Vale, N. (2019). Combination of Cell-Penetrating Peptides with Nanoparticles for Therapeutic Application: A Review. *Biomolecules*, 9(1), p.22. doi:10.3390/biom9010022.]

2.3. Σύνθεση των Νανοδοματιδίων

Πολυάριθμες μέθοδοι σύνθεσης είτε αναπτύσσονται είτε βελτιώνονται για την ενίσχυση των ιδιοτήτων και μείωση του κόστους παραγωγής. Ορισμένες μέθοδοι τροποποιούνται για να επιτευχθούν νανοδοματίδια συγκεκριμένης διεργασίας τα οποία αυξάνουν τις οπτικές, μηχανικές, φυσικές και χημικές τους ιδιότητες. [19]

2.3.1. Bottom-up method (Μέθοδος από κάτω προς τα πάνω)

Η μέθοδος από κάτω προς τα πάνω ή εποικοδομητική είναι η συσσώρευση του υλικού από άτομο, σε συστάδες έως νανοδοματίδια. Sol-gel, spinning, χημική εναπόθεση ατμών (CVD), πυρόλυση και βιοσύνθεση είναι οι περισσότερο κοινώς χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την Bottom-up παραγωγή νανοδοματιδίων

- Sol-gel. (κολλοειδές πήγμα)

Sol (κολλοειδές διάλυμα) είναι ένα διάλυμα στερεών αιωρούμενων σε υγρή φάση. Το gel είναι ένα στερεό μακρομόριο βυθισμένο σε διαλύτη. Το Sol-gel είναι η πιο προτιμώμενη μέθοδος για Bottom-up παραγωγή λόγω της απλότητάς της αλλά και καθώς τα περισσότερα από τα νανοδοματίδια μπορούν να συντεθούν από αυτή τη μέθοδο. Είναι μια υγρό-χημική διεργασία που περιέχει ένα χημικό διάλυμα που δρα ως πρόδρομος για ένα ολοκληρωμένο σύστημα διακριτών δοματιδίων. Τα οξειδία μετάλλων και τα χλωρίδια είναι τα πρόδρομα μόρια που χρησιμοποιούνται συνήθως στη διεργασία του κολλοειδούς πήγματος. Στην συνέχεια αυτά διασπείρονται σε έναν υγρό ξενιστή είτε με ανακίνηση, ανάδευση ή υπερήχηση. Το σύστημα που προκύπτει περιέχει μια υγρή και μια στερεή φάση και τελικά πραγματοποιείται διαχωρισμός των φάσεων για την ανάκτηση των νανοδοματιδίων με διάφορες μεθόδους όπως η καθίζηση, η διήθηση και η φυγοκέντρωση ενώ η υγρασία αφαιρείται περαιτέρω με ξήρανση. [19,35]

- Spinning (Περιστροφή)

Η σύνθεση των νανοδοματιδίων με περιστροφή πραγματοποιείται από έναν αντιδραστήρα περιστρεφόμενου δίσκου (SDR) ο οποίος περιέχει έναν περιστρεφόμενο δίσκο μέσα σε ένα θάλαμο/αντιδραστήρα όπου οι φυσικές παράμετροι όπως π.χ η θερμοκρασία μπορούν να ελεγχθούν. Ο αντιδραστήρας είναι κυρίως γεμάτος με άζωτο ή άλλα αδρανή αέρια προκειμένου να αφαιρεθεί το οξυγόνο από το εσωτερικό και αποφευχθούν οι χημικές αντιδράσεις. Η περιστροφή προκαλεί τη σύντηξη των ατόμων ή των μορίων τα οποία κατακρημνίζονται, συλλέγονται και ξηραίνονται. [37,38]

- Εναπόθεση χημικών ατμών (CVD)

Η εναπόθεση χημικών ατμών είναι η συγκέντρωση μιας λεπτής μεμβράνης αέριων αντιδραστηρίων σε ένα υπόστρωμα. Η χημική αντίδραση συμβαίνει όταν ένα θερμαινόμενο υπόστρωμα έρχεται σε επαφή με συνδυασμό μορίων αερίου. Αυτή η αντίδραση παράγει ένα λεπτό φιλμ προϊόντος στην επιφάνεια του υποστρώματος όπου ανακτάται και χρησιμοποιείται. Η θερμοκρασία του υποστρώματος είναι ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει την CVD.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι τα εξαιρετικά καθαρά, ομοιόμορφα, σκληρά και ισχυρά νανοσωματίδια. Ενώ τα μειονεκτήματα είναι η απαίτηση ειδικού εξοπλισμού και τα αέρια υποπροϊόντα τα οποία είναι εξαιρετικά τοξικά. [19,39,40]

- Πυρόλυση

Η πυρόλυση είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη διαδικασία σε βιομηχανίες για την παραγωγή μεγάλης κλίμακας νανοσωματιδίων. Περιλαμβάνει την καύση ενός πρόδρομου μορίου με φλόγα. Το πρόδρομο μόριο είναι είτε υγρό είτε ατμός και τροφοδοτείται στον κλίβανο σε υψηλή πίεση μέσω μιας μικρής οπής όπου καίγεται. Η καύση ή τα αέρια παραπροϊόντα ταξινομούνται στη συνέχεια στον αέρα για την ανάκτηση των νανοσωματιδίων. Μερικοί από τους κλιβάνους χρησιμοποιούν λέιζερ και πλάσμα αντί για φλόγα για να παράγουν υψηλή θερμοκρασία για πιο εύκολη εξάτμιση. Τα πλεονεκτήματα της πυρόλυσης είναι η απλή, αποτελεσματική, οικονομικά αποδοτική και συνεχής διαδικασία με υψηλή απόδοση. [19,41]

- Βιοσύνθεση

Η βιοσύνθεση είναι μια πράσινη και φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση για τη σύνθεση νανοσωματιδίων που είναι μη τοξικά και βιοαποδομήσιμα. Η βιοσύνθεση χρησιμοποιεί βακτήρια, φυτικά εκχυλίσματα, μύκητες κ.λπ. μαζί με τις πρόδρομες ουσίες για την παραγωγή νανοσωματιδίων αντί για τις συμβατικές χημικές ουσίες για σκοπούς βιομείωσης και κάλυψης. Τα βιοσυντηθέμενα νανοσωματίδια έχουν μοναδικές και ενισχυμένες ιδιότητες που χρησιμοποιούνται σε βιοϊατρικές εφαρμογές. [18,19]

2.3.2. Top-down method (Μέθοδος από πάνω προς τα κάτω)

Η μέθοδος από πάνω προς τα κάτω ή καταστροφική μέθοδος είναι η αναγωγή ενός όγκου υλικού σε σωματίδια νανομετρικής κλίμακας. Η μηχανική άλεση, η νανολιθογραφία, η αφαίρεση με λέιζερ, η θερμική αποσύνθεση και το sputtering είναι μερικές από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους σύνθεσης νανοσωματιδίων.

- Μηχανική Άλεση

Η μηχανική άλεση είναι μια οικονομικά αποδοτική μέθοδος για την παραγωγή υλικών σε επίπεδο νανοκλίμακας από χύδην υλικά. Κατά τη διάρκεια της σύνθεσης διαφορετικά στοιχεία αλέθονται σε αδρανή ατμόσφαιρα ενώ στην συνέχεια υπόκεινται σε θερμική κατεργασία. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη μηχανική άλεση είναι η πλαστική παραμόρφωση που οδηγεί ξανά σε σχήμα σωματιδίου και η ψυχρή συγκόλληση που οδηγεί σε αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων. [40,42]

- Νανολιθογραφία

Η νανολιθογραφία είναι η μελέτη της κατασκευής δομών νανομετρικής κλίμακας με τουλάχιστον μια διάσταση στην περιοχή μεγέθους από 1 έως 100 nm. Υπάρχουν διάφορες νανολιθογραφικές διεργασίες για παράδειγμα οπτική, δέσμη ηλεκτρονίων, πολυφωτόνιο, νανοαποτύπωμα και ανιχνευτής σάρωσης λιθογραφίας. Γενικά η λιθογραφία είναι η διαδικασία εκτύπωσης ενός απαιτούμενου σχήματος ή μιας δομής σε ένα φωτοευαίσθητο υλικό που αφαιρεί επιλεκτικά ένα μέρος του υλικού για να δημιουργήσει το επιθυμητό σχήμα. Τα κύρια πλεονεκτήματα της νανολιθογραφίας είναι η παραγωγή ενός συμπλέγματος από ένα μόνο νανοσωματίδιο με το επιθυμητό σχήμα και μέγεθος. Τα μειονεκτήματα, είναι η απαίτηση περίπλοκου εξοπλισμού και το μεγάλο κόστος. [19,40]

- Laser Ablation (Αφαίρεση με λέιζερ)

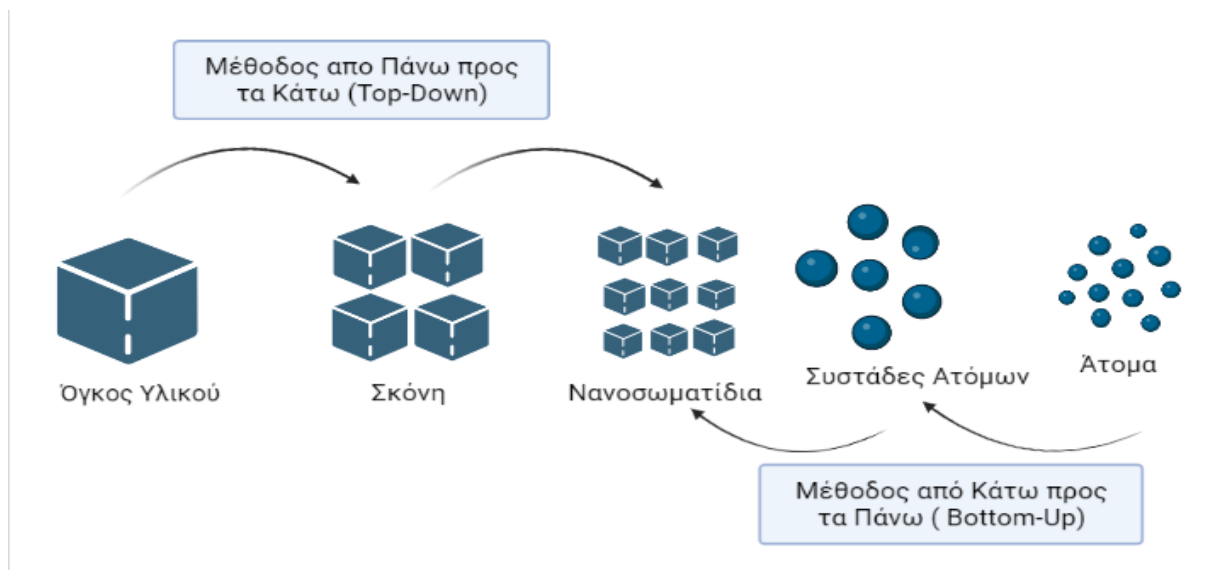
Το Laser Ablation Synthesis in Solution (LASiS) είναι μια κοινή μέθοδος για παραγωγή νανοσωματιδίων από διάφορους διαλύτες, χρησιμοποιώντας μια ισχυρή δέσμη λέιζερ που χτυπά το υλικό στόχο. Κατά τη διαδικασία αφαίρεσης με λέιζερ, το υλικό πηγής ή το πρόδρομο μόριο εξατμίζεται λόγω της υψηλής ενέργειας της ακτινοβολίας λέιζερ, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό νανοσωματιδίων. Η χρήση της μεθόδου για τη δημιουργία νανοσωματιδίων ευγενών μετάλλων μπορεί να θεωρηθεί ως μια πράσινη τεχνική, καθώς παρέχει μια σταθερή σύνθεση νανοσωματιδίων σε οργανικούς διαλύτες και νερό και έτσι δεν υπάρχει ανάγκη για σταθεροποιητικούς παράγοντες ή άλλες χημικές ουσίες. [19,40]

- Θερμική αποσύνθεση

Η θερμική αποσύνθεση είναι μια ενδόθερμη χημική μέθοδος που παράγεται από την θερμότητα που εκλύεται όταν σπάνε οι χημικοί δεσμοί σε μια ένωση. Η συγκεκριμένη θερμοκρασία στην οποία ένα στοιχείο διασπάται χημικά είναι η θερμοκρασία αποσύνθεσης. [40,43]

- Sputtering (Επιμετάλλωση)

Το Sputtering είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για την παραγωγή νανοϋλικών μέσω βομβαρδισμού στερεών επιφανειών με σωματίδια υψηλής ενέργειας όπως το πλάσμα ή το αέριο. Η επιμετάλλωση θεωρείται αποτελεσματική μέθοδος για την παραγωγή λεπτών μεμβρανών νανοϋλικών. Στη διαδικασία εναπόθεσης με διασκορπισμό, τα ενεργητικά αέρια ιόντα βομβαρδίζουν την επιφάνεια στόχο, προκαλώντας τη φυσική εκτόξευση μικρών συστάδων ατόμων ανάλογα με την προσπίπτουσα ενέργεια αυτών. Το πάχος της επιφάνειας, η θερμοκρασία, ο τύπος του υποστρώματος κ.λπ. καθορίζουν το σχήμα και το μέγεθος των νανοσωματιδίων. [19,40,44]



Εικόνα 2: Σύνθεση των Νανοςωματιδίων

[Πηγή : Pareek, V., Bhargava, A., Gupta, R., Jain, N. and Panwar, J. (2017). *Synthesis and Applications of Noble Metal Nanoparticles: A Review*. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 9(7), pp.527–544. doi:10.1166/asem.2017.2027.]

2.4. Εφαρμογές των νανοσωματιδίων

Μη ανιχνεύσιμα από το ανθρώπινο μάτι, τα νανοσωματίδια μπορούν να παρουσιάσουν σημαντικά διαφορετικές φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες σε σύγκριση με τα χύδην υλικά που βρίσκονται στις υψηλότερες κλίμακες όπως η χημική αντιδραστικότητα, η απορρόφηση ενέργειας και η βιολογική κινητικότητα. Οι μοναδικές αυτές ιδιότητες που εξαρτώνται από το μέγεθος καθιστούν αυτά τα υλικά ανώτερα και απαραίτητα σε πολλούς τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας. [15,17,36]

- Ηλεκτρονικά

Στις μέρες μας η όλο και μεγαλύτερη αναγκαιότητα για οθόνες υπολογιστών και τηλεοράσεων μεγάλου μεγέθους και υψηλής φωτεινότητας ενθαρρύνουν τη χρήση νανοσωματιδίων στην τεχνολογία απεικόνισης. Πολλά είναι τα σωματίδια τα οποία χρησιμοποιούνται σαν δίοδοι εκπομπής φωτός (LED) των σύγχρονων οθονών . Επιπλέον η ανάπτυξη φορητών ηλεκτρονικών ειδών ευρείας κατανάλωσης όπως τα κινητά τηλέφωνα και οι φορητοί υπολογιστές οδήγησε στην τεράστια ζήτηση για συμπαγείς, ελαφριές και υψηλής χωρητικότητας μπαταρίες. Τα νανοσωματίδια είναι η ιδανική επιλογή καθώς μπορούν να αποθηκεύουν πολύ περισσότερη ενέργεια σε σύγκριση με παραδοσιακές μπαταρίες λόγω της δομής τους. Μπαταρίες κατασκευασμένες από νανοκρυσταλλικό νικελίου και τα υβρίδια μετάλλων, λόγω της μεγάλης επιφάνειάς τους απαιτούν λιγότερη επαναφόρτιση και διαρκούν περισσότερο. [19]

- Ανανεώσιμες πηγές ενέργειας και περιβαλλοντική αποκατάσταση

Οι μοναδικές φυσικές και χημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων τα έχουν κάνει ιδανική επιλογή να χρησιμοποιούνται σήμερα στην περιβαλλοντική αποκατάσταση και στη βελτίωση της απόδοσης των ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Τα νανοσωματίδια απαντώνται στη φύση και μερικά από αυτά έχει βρεθεί ότι “θεραπεύουν” το περιβάλλον. Η περιβαλλοντική αποκατάσταση με την χρήση νανοσωματιδίων χρησιμοποιείται με επιτυχία στην επεξεργασία ή την απολύμανση του αέρα, του νερού και του εδάφους για πάνω από μια δεκαετία. Η νανοαποκατάσταση είναι μια από τις πιο αποτελεσματικές λύσεις καθώς προσφέρει in situ επεξεργασία εξαλείφοντας την ανάγκη άντλησης των υπόγειων υδάτων άλλα και την ανάγκη για ανασκαφή με σκοπό να φτάσει στον προορισμό-στόχο. Τα νανοσωματίδια εγχέονται στην επιθυμητή θέση, μεταφέρονται κατά μήκος της ροής των υπόγειων υδάτων και απολυμαίνουν το νερό ακινητοποιώντας τους ρύπους. Ο γενικός μηχανισμός που χρησιμοποιείται στην απολύμανση είναι οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Τα νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται επίσης και για τον καθαρισμό των επιφανειακών υδάτων. Μερικοί από τους ρυπαντές είναι πιθανό να είναι βαρέα μέταλλα, παθογόνα και οργανικοί ρύποι. Η

πετρελαιοκηλίδα για παράδειγμα είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα παγκοσμίως καθώς μπορεί να εξαπλωθεί σε πολύ μεγάλες αποστάσεις. Το καθάρισμα με συμβατικές μεθόδους είναι δύσκολο και χρονοβόρο κάτι που κάνει την κατάσταση χειρότερη καθώς μπορεί να εξαπλωθεί περισσότερο. Η μόλυνση του εδάφους είναι επίσης μια αυξανόμενη ανησυχία. Το μολυσμένο χώμα καθαρίζεται ή επεξεργάζεται χρησιμοποιώντας νανοσωματίδια, με έγχυση αυτών σε συγκεκριμένες θέσεις-στόχους για μόλυνση με βαρέα μέταλλα, τοξικά βιομηχανικά απόβλητα κ.λπ. Επιπρόσθετα, η μεγαλύτερη επιφάνεια ορισμένων νανοσωματιδίων έχει χρησιμοποιηθεί ως νανοκαταλύτης σε αέριες αντιδράσεις κυρίως στα εργοστάσια για μείωση του επιπέδου των ρύπων στα προκαθορισμένα όρια ή για την πλήρη απομάκρυνσή τους μειώνοντας έτσι την ατμοσφαιρική ρύπανση. [20,25,45]

- Βιομηχανία Τροφίμων

Η βελτίωση στην παραγωγή, επεξεργασία, προστασία και συσκευασία των τροφίμων επιτυγχάνεται με την ενσωμάτωση της νανοτεχνολογίας. Για παράδειγμα, μια νανοσύνθετη επίστρωση στη διαδικασία συσκευασίας τροφίμων μπορεί να εισάγει απευθείας τις αντιμικροβιακές ουσίες στην επικαλυμμένη επιφάνεια του φιλμ. Ένα από τα παραδείγματα είναι ότι η βιομηχανία παραγωγής του λαδιού canola συμπεριλαμβάνει νανοσταγόνες, ένα πρόσθετο που έχει σχεδιαστεί για τη μεταφορά των βιταμινών και μετάλλων στα τρόφιμα. [46]

- Ιατρική

Τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν μια εξαιρετικά ελκυστική πλατφόρμα για μια ποικίλη σειρά βιολογικών εφαρμογών. Οι ιδιότητες της επιφάνειας και του πυρήνα αυτών των συστημάτων μπορούν να κατασκευαστούν για μεμονωμένες και πολυτροπικές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της βιομοριακής αναγνώρισης, της θεραπευτικής παροχής, των βιοαισθητήρων και της βιοαπεικονιστικής. Τα νανοσωματίδια έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Ειδικότερα, νέα καινοτόμα πρότυπα αισθητήρων που βασίζονται σε νανοσωλήνες, νανοσύρματα, ή μικροσκοπία ατομικής δύναμης εφαρμόζονται σε διαγνωστικές συσκευές/αισθητήρες. Ο στόχος αυτών των αισθητήρων είναι η βελτίωση της ευαισθησίας, η μείωση του κόστους παραγωγής ή η μέτρηση νέων αναλυτών (π.χ. πλάκες Alzheimer) που δεν είχαν ανιχνευθεί μέχρι πρόσφατα. Επιπλέον η χρήση κβαντικών κουκκίδων στη θεραπεία του καρκίνου είναι μια μεγάλη πρόοδος στον τομέα της Ιατρικής. Οι κβαντικές κουκκίδες λάμπουν όταν εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία, έτσι όταν εγχυθούν, εισχωρούν στον καρκινικό όγκο και ο χειρουργός μπορεί να δει τον λαμπερό όγκο. Σε μια πρόσφατη μελέτη, συζευγμένα με αντισώματα μαγνητικά νανοσωματίδια πολυ-(d,l-lactide-co-glycolide) (PLGA) με

δοξορουβικίνη (DOX) συντέθηκαν για την ταυτόχρονη στοχευμένη ανίχνευση και θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Το DOX και τα μαγνητικά νανοσωματίδια ενσωματώθηκαν στα νανοσωματίδια PLGA, με το DOX να χρησιμεύει ως αντικαρκινικό φάρμακο και τα νανοσωματίδια Fe_2O_3 να χρησιμοποιούνται ως παράγοντας απεικόνισης. Επιπρόσθετα, η νανοτεχνολογία έχει παίξει καθοριστικό ρόλο στην παροχή των αντιρετροϊκών φαρμάκων. Η μόλυνση από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), εάν δεν αντιμετωπιστεί, μπορεί να οδηγήσει σε σύνδρομο επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS), μια επιζήμια ασθένεια όπου το ανοσοποιητικό σύστημα ενός ατόμου σχεδόν καταστρέφεται. Όταν αναπτύχθηκε για πρώτη φορά η θεραπεία για αυτήν την ασθένεια, ήταν αρκετά επίπονη, καθώς οι περισσότεροι ασθενείς λάμβαναν 30-40 χάπια την ημέρα. Την τελευταία δεκαετία, υπήρξαν εξελίξεις στη θεραπεία για τη μείωση των χαπιών σε λίγα μόνο κάθε μέρα. Η έρευνα έχει δείξει έναν τρόπο να γίνει αυτή η θεραπεία ακόμη πιο αποτελεσματική δημιουργώντας πολυμερή νανοσωματίδια που παρέχουν αντιρετροϊκά (ARV) φάρμακα ενδοκυτταρικά καθώς και στον εγκέφαλο. Αυτή η τεχνολογία μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τους εμβολιασμούς και για την πρόληψη μολύνσεων από τον HIV. [19,40,47-49]

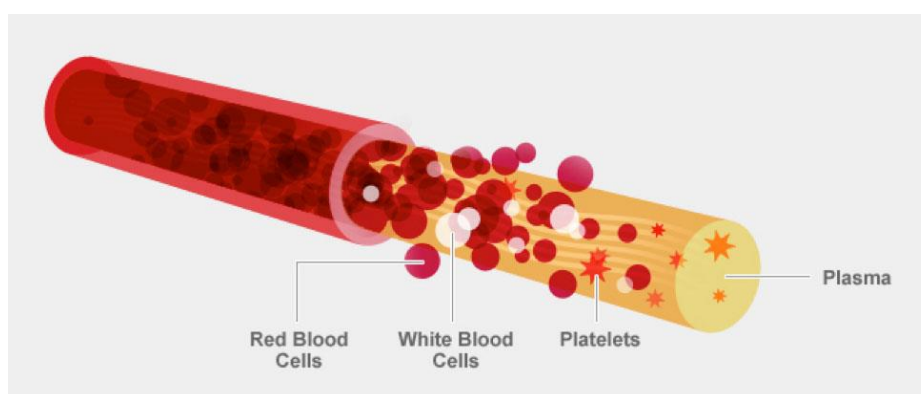
Κεφάλαιο 3 Αίμα - Αιμοσυμβατότητα

3.1. Αίμα

Το αίμα είναι ένα σωματικό υγρό, το οποίο κυκλοφορεί στο αγγειακό σύστημα των ανθρώπων και άλλων σπονδυλωτών. Η κυκλοφορία του διαμέσου της καρδιάς, των αρτηριών, των φλεβών και των τριχοειδών αγγείων επιτελεί διάφορες ενέργειες οι οποίες είναι απαραίτητες για την ορθή λειτουργία του οργανισμού όπως η μεταφορά οξυγόνου στα όργανα και τους ιστούς και η απομάκρυνση διοξειδίου του άνθρακα και άχρηστων ουσιών που παράγονται κατά τον μεταβολισμό. Επιπλέον μεταφέρει θρεπτικές ουσίες, ορμόνες, βιταμίνες, παρέχει θερμότητα, και προστασία στους ιστούς. Σχηματίζει θρόμβους για την πρόληψη της υπερβολικής απώλειας αίματος και παρέχει άμυνα κατά των λοιμώξεων μέσω της δράσης των λευκών αιμοσφαιρίων και των αντισωμάτων. Έχει ελαφρώς αλκαλικό pH 7,35-7,45 και αποτελεί το 7-8% του συνολικού σωματικού βάρους των ενηλίκων. Εάν η ροή του σταματήσει, ο θάνατος θα επέλθει μέσα σε λίγα λεπτά λόγω των επιπτώσεων ενός δυσμενούς περιβάλλοντος σε εξαιρετικά ευαίσθητα κύτταρα. [50-52]

3.2. Συστατικά του Αίματος

Το αίμα που διατρέχει τις φλέβες, τις αρτηρίες και τα τριχοειδή αγγεία είναι γνωστό ως ολικό αίμα και αποτελεί έναν εξαιρετικά εξειδικευμένο κυκλοφορούντα ιστό, ο οποίος συντίθεται από το πλάσμα (άμορφο συστατικό), μέσα στο οποίο εναιωρούνται τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια (έμμορφα στοιχεία).



Εικόνα 3: Συστατικά του Αίματος

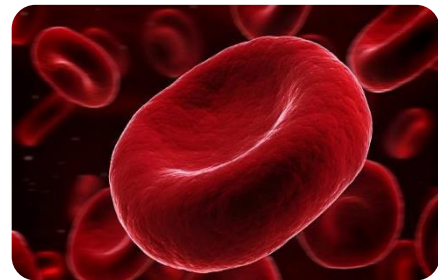
[Πηγή : OneBlood and Solodev (2018). *What is Blood?* | OneBlood. [online]

- Πλάσμα

Είναι το μεγαλύτερο και κύριο συστατικό του αίματος και αποτελεί το 55% του συνολικού όγκου του. Είναι ένα υποκίτρινο υγρό και αποτελείται ως επί το πλείστον από νερό (92% κατ' όγκο) μέσω του οποίου μεταφέρονται θρεπτικά συστατικά, γλυκόζη, μεταλλικά ιόντα, αέρια όπως οξυγόνο, άζωτο και διοξείδιο του άνθρακα, αντισώματα, πρωτεΐνες πήξης, χημικοί αγγελιοφόροι όπως ορμόνες και πρωτεΐνες που βοηθούν στη διατήρηση της ισορροπίας των υγρών του σώματος, αλλά και άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού. [50-53]

- Ερυθρά αιμοσφαίρια

Γνωστά για το έντονο κόκκινο χρώμα τους, τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι τα πιο άφθονα κύτταρα στο αίμα, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 40 με 45 τοις εκατό του όγκου του με φυσιολογικές τιμές 4,5–6,2 εκατομμύρια στους άνδρες και 4,0–5,2 εκατομμύρια στις γυναίκες ανά μικρόλιτρο αίματος. Το σχήμα ενός ώριμου ερυθροκυττάρου περιγράφεται ως ένας αμφίκυρτος δίσκος με πεπλατυσμένο κέντρο, με μέση διάμετρο τα 8μm. Σε αντίθεση με πολλά άλλα κύτταρα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια δεν έχουν πυρήνα και μπορούν εύκολα να αλλάξουν σχήμα, βοηθώντας τα με αυτόν τον τρόπο να χωρέσουν στα διάφορα αιμοφόρα αγγεία του σώματος. Ωστόσο, ενώ η έλλειψη πυρήνα κάνει ένα ερυθρό αιμοσφαίριο πιο ευέλικτο, ταυτόχρονα, περιορίζει τη ζωή του κυττάρου καθώς όπως ταξιδεύει μέσα από τα μικρότερα αιμοφόρα αγγεία, καταστρέφει τις μεμβράνες του και εξαντλεί τα ενεργειακά του αποθέματα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια να επιβιώνουν κατά μέσο όρο μόνο 120 ημέρες. [51-55]



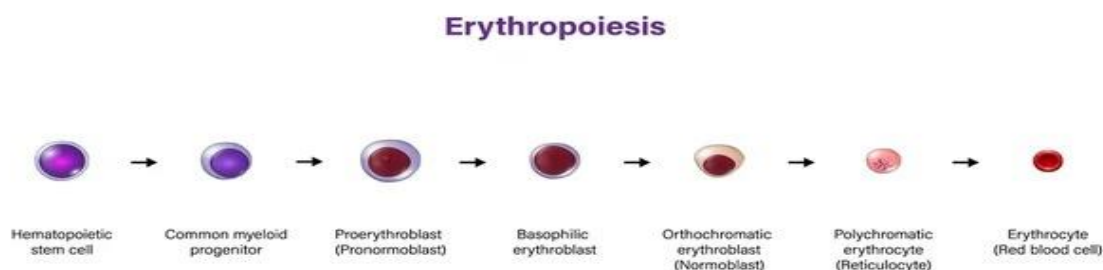
Εικόνα 4: Φυσιολογικό Ερυθρό Αιμοσφαίριο

[Πηγή: Australian National University *Distortion of human blood cells related to pathological conditions*].

3.3. Φυσιολογία Ερυθρού Αιμοσφαιρίου – Ερυθροποίηση

Η διαδικασία της παραγωγής των ερυθρών αιμοσφαιρίων ξεκινά στο μυελό των οστών κατά την οποία ένα άωρο πολυδύναμο κύτταρο ωριμάζει σε ένα πλήρως ώριμο ερυθρό αιμοσφαίριο. Από τα δεσμευμένα προγονικά κύτταρα τις ερυθράς σειράς, θα προέλθει το πρώτο μορφολογικά αναγνωρίσιμο κύτταρο, η προερυθροβλάστη. Από κάθε προερυθροβλάστη με δύο μιτωτικές διαιρέσεις προκύπτουν τέσσερις βασεόφιλες ερυθροβλάστες, οι οποίες διαιρούνται και αποδίδουν οκτώ ενδιάμεσες ή πολυχρωματόφιλες ερυθροβλάστες. Από αυτό το στάδιο και μετά, συνήθως, δεν επιτελείται πολλαπλασιασμός

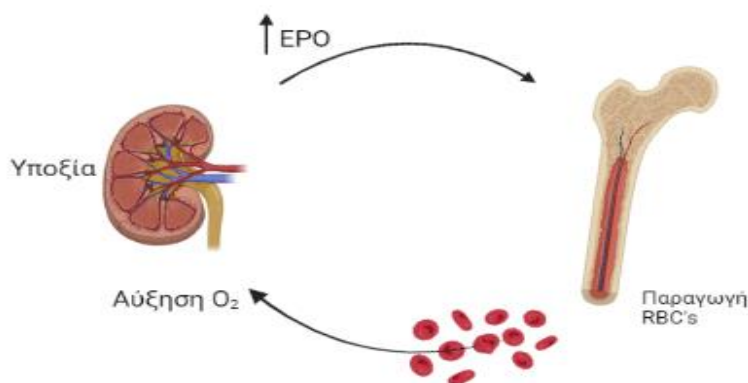
αλλά μόνο ωρίμανση και έτσι προκύπτουν οι ώριμες ή οξεόφιλες ερυθροβλάστες. Στην συνέχεια οι ώριμες αποβάλλουν τον πυρήνα τους και μεταπίπτουν στα δικτυοερυθροκύτταρα τα οποία εξέρχονται από τον μυελό των οστών, αποβάλλουν το περιεχόμενό τους και μεταπίπτουν στα ώριμα ερυθροκύτταρα.



Εικόνα 5: Στάδια Ερυθροποίησης

[Πηγή: Shutterstock illustrations "Hemopoiesis"]

Η διαδικασία αυτή διεγείρεται από μια γλυκοπρωτεϊνική κυτοκίνη, την ερυθροποιητίνη που εκκρίνεται κυρίως από τα νεφρά ως απόκριση στην κυτταρική υποξία. Χαμηλά επίπεδα ερυθροποιητίνης (EPO), περίπου 10 mU/mL εκκρίνονται συνεχώς σε επαρκείς ποσότητες για να αντισταθμίσουν τη φυσιολογική ανανέωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ωστόσο, εάν το επίπεδο των ερυθροκυττάρων γίνει ανεπαρκές, το αίμα γίνεται σχετικά υποξικό. Ως απόκριση, υπάρχει μια αύξηση στην παραγωγή EPO, η οποία δρα στον μυελό των οστών διεγείροντας την αυξημένη παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων. Αυτό προκαλεί αύξηση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης, προκαλώντας στη συνέχεια αύξηση μερικής πίεσης οξυγόνου pO_2 και συνεπώς πτώση των επιπέδων EPO.



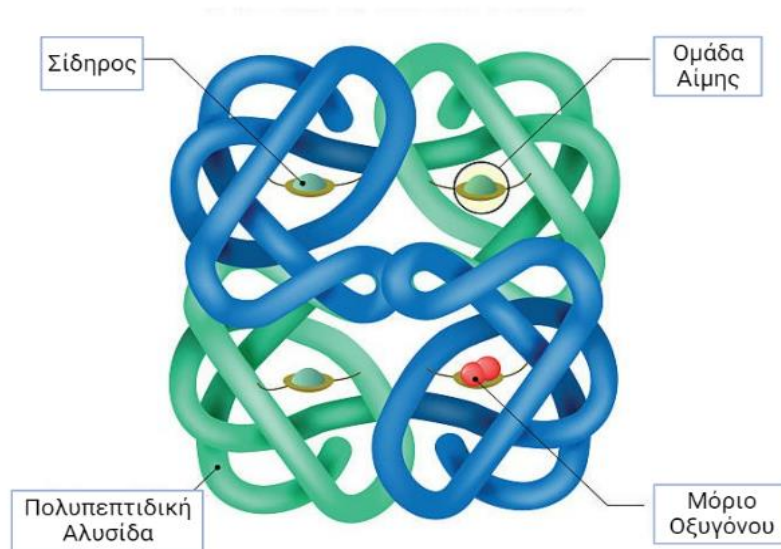
Εικόνα 6 : Μηχανισμός Δράσης της Ερυθροποιητίνης,

[Πηγή: Urology (2018). Anemia of Chronic Kidney Disease]

3.4. Λειτουργία ερυθρών αιμοσφαιρίων

Η λειτουργία του ερυθροκυττάρου και της αιμοσφαιρίνης που περιέχει, είναι να μεταφέρει οξυγόνο από τους πνεύμονες σε όλους τους ιστούς του σώματος και να επιστρέφει το διοξείδιο του άνθρακα, ένα απόβλητο προϊόν του μεταβολισμού, στους πνεύμονες, όπου και απεκκρίνεται. Ειδικότερα, η αιμοσφαιρίνη είναι μια χρωμοπρωτεΐνη η οποία αποτελείται από την αίμη, ένα χρωμογόνο το οποίο προσδίδει στα κύτταρα το κόκκινο χρώμα και τις σφαιρίνες, δηλαδή πρωτεΐνες. Το μόριο της αίμης, αποτελείται από τέσσερις τετραपुरολικούς δακτυλίους που συνδέονται ανα δύο μεταξύ τους και όλοι μαζί με ένα άτομο δισθενούς σιδήρου στο κέντρο του μορίου. Η αίμη συντίθεται στα μιτοχόνδρια των ερυθρών αιμοσφαιρίων άλλα και των ηπατικών κυττάρων, και μετά από μια σειρά διαδικασιών παράγεται η πρωτοπορφυρίνη IX η οποία συνδέεται με ένα άτομο δισθενούς σιδήρου και σχηματίζει τελικά το μόριο. Η σφαιρίνη αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες είναι ανά δύο όμοιες μεταξύ τους. Στον ενήλικα πραγματοποιείται φυσιολογικά η σύνθεση τεσσάρων ειδών αλυσίδων, οι α, β, γ και δ αλυσίδες, ενώ στο έμβρυο συντίθεται επιπλέον οι ε και ζ. Ανάλογα με το είδος των πολυπεπτιδικών αλυσίδων και τον συνδυασμό τους υπάρχουν διάφορα είδη αιμοσφαιρινών. Η κύρια αιμοσφαιρίνη των ενηλίκων είναι η A (Hb A) η οποία αποτελείται από 2α και 2β πολυπεπτιδικές αλυσίδες και συγκροτεί το 97-98 % του συνόλου των αιμοσφαιρινών. Η επόμενη σε ποσοστό αιμοσφαιρίνη είναι η A2 (Hb A2) , μόλις 2-3,5 % και αποτελείται από 2α και 2δ αλυσίδες. Η αιμοσφαιρίνη F (HbF) αποτελούμενη από 2α και 2γ αλυσίδες, ονομάζεται και εμβρυϊκή γιατί είναι η κύρια αιμοσφαιρίνη στο έμβρυο , περίπου στο 100% κατά την γέννηση και ελαττώνεται συνήθως μέχρι το 1ο έτος , ενώ παραμένει καθ' όλη την διάρκεια της ζωής σε ποσοστά μικρότερα του 2%.

Πιο συγκεκριμένα, το μόριο της αιμοσφαιρίνης A, όπως αναφέρθηκε, αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες ανά δύο όμοιες. Κάθε μια από τις αλυσίδες σχηματίζει εσωτερικά έναν θύλακα όπου συνδέεται ένα μόριο αίμης. Κάθε μόριο αίμης φέρει ένα άτομο Fe⁺⁺, επομένως ένα μόριο αιμοσφαιρίνης έχει και τέσσερα άτομα δισθενούς σιδήρου. Κατά την διαδικασία της αναπνοής το οξυγόνο προσκολλάται χαλαρά στο ιόν του σιδήρου και σχηματίζεται η οξυαιμοσφαιρίνη η οποία παραδίδει το οξυγόνο στο σώμα. [56-63]



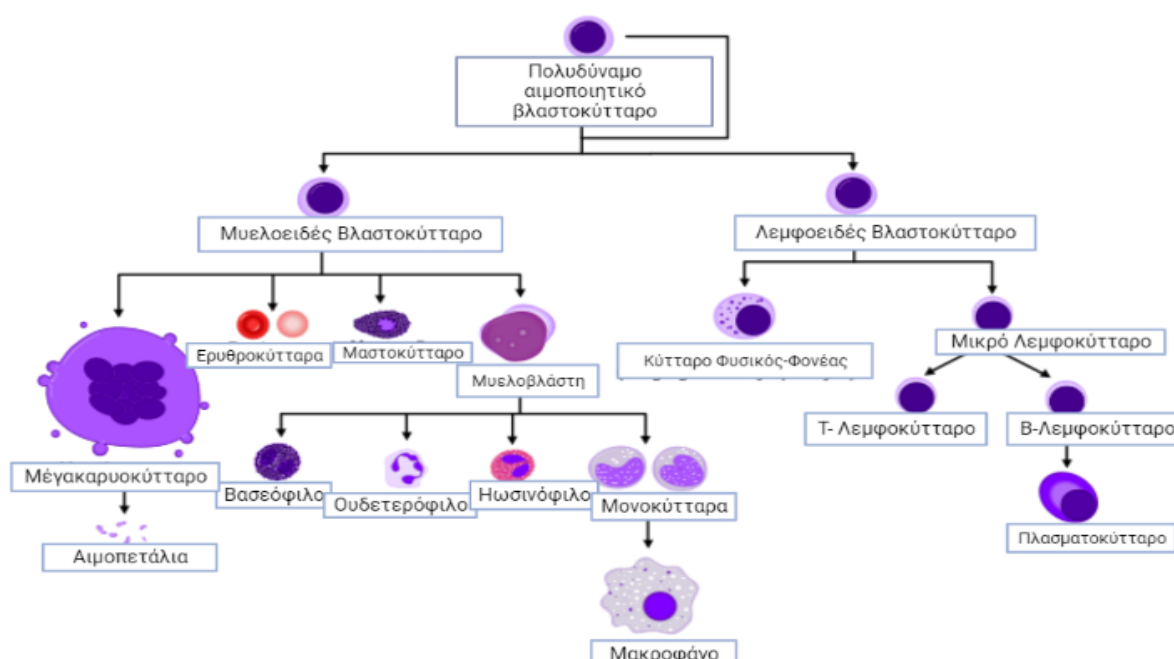
Εικόνα 7: Δομή της Αιμοσφαιρίνης

[Πηγή: Vector Stock illustrations “Hemoglobin Molecule”]

- Λευκά αιμοσφαίρια

Τα λευκά αιμοσφαίρια, που ονομάζονται επίσης λευκοκύτταρα, είναι τα λιγότερα σε ποσότητα κύτταρα καθώς αποτελούν περίπου το 1% της περιεκτικότητας στο αίμα σε έναν υγιή ενήλικα. Ο φυσιολογικός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων είναι συνήθως μεταξύ 4.000 έως 11.000 ανά μικρόλιτρο αίματος. Ωστόσο, αυτό το 1% του αίματος κάνει μεγάλη διαφορά στην υγεία, γιατί από αυτό εξαρτάται η ανοσία και η προστασία του σώματος τόσο από μολυσματικές ασθένειες όσο και από ξένους εισβολείς. Η αύξηση του αριθμού των λευκοκυττάρων πάνω από τα ανώτερα όρια ονομάζεται λευκοκυττάρωση και είναι φυσιολογική όταν αποτελεί μέρος υγιών ανοσολογικών αποκρίσεων όπως μόλυνση ή φλεγμονή, οι οποίες συμβαίνουν συχνά. Ενώ είναι περιστασιακά μη φυσιολογική, όταν είναι νεοπλασματικής ή αυτοάνοσης προέλευσης. Αντίθετα, μια μείωση κάτω από το κατώτερο όριο ονομάζεται λευκοπενία και συνήθως υποδηλώνει εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Όλα τα λευκά αιμοσφαίρια παράγονται στον μυελό των οστών και προέρχονται από αρχέγονα πολυδύναμα κύτταρα γνωστά ως αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, ενώ έχουν πυρήνες, κάτι που τα διακρίνει από τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs) και τα αιμοπετάλια. Τα διαφορετικά είδη λευκών αιμοσφαιρίων ταξινομούνται συνήθως κατά κυτταρική γενεαλογία δηλαδή μυελοειδή κύτταρα ή λεμφικά κύτταρα. Ειδικότερα, τα μυελοειδή κύτταρα (μυελοκύτταρα) περιλαμβάνουν τα ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα και μονοκύτταρα ενώ τα μονοκύτταρα υποδιαιρούνται περαιτέρω σε δενδριτικά κύτταρα και μακροφάγα. Από την άλλη, τα λεμφοειδή κύτταρα (λεμφοκύτταρα) περιλαμβάνουν τα T-κύτταρα, B-κύτταρα

και τα κύτταρα φυσικού φονέα. Τα T- λεμφοκύτταρα υποδιαιρούνται σε βοηθητικά T κύτταρα, T κύτταρα μνήμης, κυτταροτοξικά T κύτταρα, και τα B κύτταρα υποδιαιρούνται σε πλασματοκύτταρα και B κύτταρα μνήμης. Ιστορικά, τα λευκά αιμοσφαίρια αρχικά ταξινομήθηκαν με βάση τα φυσικά τους χαρακτηριστικά σε κοκκιοκύτταρα και ακοκκιοκύτταρα, αλλά αυτό το σύστημα ταξινόμησης χρησιμοποιείται λιγότερο συχνά τώρα. Τέλος, ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των λευκοκυττάρων είναι η κίνησή τους . Σε αντίθεση με τα ερυθροκύτταρα τα οποία περνούν τις μέρες τους κυκλοφορώντας μέσα στα αιμοφόρα αγγεία, τα λευκοκύτταρα συνήθως εγκαταλείπουν την κυκλοφορία του αίματος για να εκτελέσουν τις αμυντικές τους λειτουργίες στους ιστούς του σώματος. [51-53, 64-69]



Εικόνα 8: Διάγραμμα που δείχνει την ανάπτυξη διαφορετικών κυττάρων αίματος από αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα έως ώριμα κύτταρα

[Πηγή: A.Rad.(2006). Hematopoiesis (human) diagram]

- Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια, που ονομάζονται επίσης θρομβοκύτταρα, παράγονται στο μυελό των οστών, όπως τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα περισσότερα λευκά αιμοσφαίρια και δημιουργούνται από πολύ μεγάλα κύτταρα του μυελού που ονομάζονται μεγακαρυοκύτταρα. Τα μεγακαρυοκύτταρα προέρχονται από μυελοειδή βλαστοκύτταρα και είναι μεγάλα, τυπικά 50–100 μm σε διάμετρο και περιέχουν έναν διευρυμένο, λοβωτό πυρήνα. Η θρομβοποιητίνη, μια γλυκοπρωτεΐνη που εκκρίνεται από τα νεφρά και το ήπαρ, διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των μεγακαρυοβλαστών, οι οποίοι ωριμάζουν σε μεγακαρυοκύτταρα. Αυτά, παραμένουν μέσα στον ιστό του μυελού των οστών και τελικά σχηματίζουν προεκτάσεις πρόδρομων

αιμοπεταλίων που εκτείνονται μέσω των τοιχωμάτων των τριχοειδών αγγείων του μυελού για να απελευθερώσουν στην κυκλοφορία χιλιάδες κυτταροπλασματικά θραύσματα όπου το καθένα από αυτά περικλείεται από ένα κομμάτι πλασματικής μεμβράνης. Αυτά τα κλειστά θραύσματα είναι τα αιμοπετάλια. Κάθε μεγακαροκύτταρο απελευθερώνει 2000–3000 αιμοπετάλια κατά τη διάρκεια της ζωής του. Μετά την απελευθέρωση αιμοπεταλίων, τα υπολείμματα μεγακαρυοκυττάρων, τα οποία είναι λίγο περισσότερα από έναν κυτταρικό πυρήνα, καταναλώνονται από τα μακροφάγα. Τα αιμοπετάλια είναι σχετικά μικρά, διαμέτρου 2–4 μm, αλλά πολυάριθμα, με φυσιολογικές τιμές 150.000–400.000 ανά μL αίματος. Μετά την είσοδο στην κυκλοφορία, περίπου το ένα τρίτο μεταναστεύει στον σπλήνα για αποθήκευση και την μετέπειτα απελευθέρωσή τους ως απόκριση σε οποιαδήποτε ρήξη σε ένα αιμοφόρο αγγείο. Στη συνέχεια ενεργοποιούνται για να εκτελέσουν την κύρια λειτουργία τους, που είναι μαζί με τους παράγοντες πήξης ο σχηματισμός θρόμβων αίματος για να επιβραδύνουν ή να σταματήσουν την αιμορραγία και να βοηθήσουν στην επούλωση των πληγών. Η διάρκεια της ζωής τους είναι αρκετά σύντομη καθώς τα αιμοπετάλια παραμένουν στον οργανισμό μόνο για 10 ημέρες και στη συνέχεια φαγοκυτταρώνονται από μακροφάγα. [64,65,70-77]

3.5. Αιμοσυμβατότητα

Η συμβατότητα αίματος ορίζεται ως η ικανότητα ενός υλικού να παραμένει σε επαφή με το αίμα για ένα κλινικά σημαντικό χρονικό διάστημα χωρίς να αλλοιώνει το αίμα ή τα συστατικά αυτού. Αυτός ο ορισμός υπονοεί ότι όλα τα υλικά έρχονται σε επαφή με το αίμα άμεσα ή έμμεσα.

Καθώς αναδύονται νέα υλικά/ιατρικές συσκευές, η έννοια της συμβατότητας αίματος εγκαθιδρύει νέα εποχή και είναι ένα από τα πιο σημαντικά κριτήρια για την *in vivo* εφαρμογή οποιουδήποτε βιοϋλικού που έρχεται σε επαφή με το αίμα. Αυτό συμβαίνει διότι η αιμο-ασυμβατότητα μπορεί να οδηγήσει σε διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος και να έχει ως αποτέλεσμα θανατηφόρα υπερευαισθησία. Ειδικότερα, επαφή μεταξύ αίματος και ενός βιοϋλικού μπορεί να ενεργοποιήσει τα αιμοστατικά και φλεγμονώδη συστήματα δύο αλληλένδετες παθοφυσιολογικές διεργασίες που επηρεάζουν σημαντικά η μία την άλλη [78-79].

Ο έλεγχος της αιμοσυμβατότητας είναι τυποποιημένος και πιστοποιείται από τον Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης (International Organization for Standardization) με το πρότυπο ISO 10993-4: 2017 ο οποίος καθορίζει τις γενικές απαιτήσεις για την αξιολόγηση των αλληλεπιδράσεων των ιατροτεχνολογικών προϊόντων με το αίμα. [122]

3.6. Αιμοσυμβατότητα και Νανοτεχνολογία

Με την πάροδο των χρόνων νέες τεχνολογίες και εφαρμογές έχουν έρθει στο προσκήνιο με σκοπό να βελτιώσουν την καθημερινότητα και να δώσουν λύσεις σε προβλήματα που απασχολούν καιρό την ανθρωπότητα. Η νανοτεχνολογία και κατ' επέκταση τα νανοσωματίδια είναι δύο πολύ καινοτόμες έννοιες που όπως αναφέρθηκε και στα προηγούμενα κεφάλαια βρίσκουν εφαρμογή σε πολλούς τομείς της ιατρικής. Παρά τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η νανοτεχνολογία, ο πιθανός κίνδυνος της σκόπιμης αλλά και της ακούσιας ανθρώπινης έκθεσης σε νανοϋλικά αυξάνεται. Τα νέα νανοϋλικά χρησιμοποιούνται επί του παρόντος ευρέως, χωρίς να αξιολογούνται διεξοδικά οι πιθανοί κίνδυνοι για την υγεία. Ενώ, οι γνώσεις σχετικά με το τοξικό τους δυναμικό είναι ακόμη περιορισμένες, χωρίς να έχουν εφαρμοστεί τα κατάλληλα ρυθμιστικά μέτρα. Έτσι, η αξιολόγηση κινδύνου και η τοξικολογική ανάλυση των νανοσωματιδίων, ιδίως των αιωρούμενων σωματιδίων, αλλά και των ιατρικά εφαρμοζόμενων παρασκευασμάτων είναι μεγίστης σημασίας. Η ταξινόμηση της τοξικότητας των νανοσωματιδίων στο ανθρώπινο σώμα *in vitro* περιλαμβάνει μια πληθώρα αναλύσεων, συμπεριλαμβανομένης της κυτταροτοξικότητας, της γονοτοξικότητας και της αιμοτοξικότητας και έχει διερευνηθεί σε πολύ μικρό βαθμό. [80-83,85,99]

Πιο συγκεκριμένα, το αίμα δεν είναι μόνο η πρώτη επαφή για νανοσωματίδια (NPs) που χορηγούνται ενδοφλεβίως, αλλά και η πύλη για όλα τα υπόλοιπα, που χορηγούνται μέσω άλλων οδών, για να φτάσουν στους ιστούς ή τα όργανα στόχους τους. Το μέγεθος των νανοσωματιδίων τους επιτρέπει να κατανέμονται εύκολα σε όλο το σώμα, να διασχίζουν βιολογικούς φραγμούς και να εισέρχονται στη συστηματική κυκλοφορία όπου μπορούν να διεισδύσουν εύκολα στα κύτταρα. Τα καθιστά επίσης πιο βιολογικά ενεργά από σωματίδια μικρού μεγέθους, επιτρέποντας τη διάσπαση του κανονικού κυτταρικού βιοχημικού περιβάλλοντος. Οι αλληλεπιδράσεις με συστατικά του αίματος είναι, επομένως, όχι μόνο αναπόφευκτες αλλά και δυνητικά επικίνδυνες και η αιμοσυμβατότητα θα πρέπει να είναι ένα από τα κύρια προβλήματα στο σχεδιασμό και την ανάπτυξη των νανοσωματιδίων με θεραπευτικές εφαρμογές. [86-88]

Λόγω του μεγάλου μεγέθους και της αφθονίας τους στο αίμα, τα ερυθροκύτταρα συμβάλλουν κυρίως στην αιμόσταση και τη θρόμβωση μέσω των ρεολογικών τους ιδιοτήτων. Η αιμορρολογία αναφέρεται στην επίδραση της ροής του αίματος στην αιμόσταση και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ιξώδες του αίματος και τους ρυθμούς διάτμησης. Τα ερυθροκύτταρα δεν είναι μόνο οι κύριοι παράγοντες που συμβάλλουν στον όγκο του αίματος και ο κύριος καθοριστικός παράγοντας του ιξώδους του αίματος, αλλά έχουν επίσης ξεχωριστές ιδιότητες που επηρεάζουν τη ροή, που δίνουν στο αίμα την

ικανότητα να δρα ως μη νευτώνειο υγρό. Τα ερυθροκύτταρα έχουν την τάση να κινούνται προς τα κάτω στο κέντρο του αιμοφόρου αγγείου, ωθώντας τα αιμοπετάλια προς την περιφέρεια, όπου μπορούν εύκολα να αλληλεπιδράσουν με τα αγγεία για να σχηματίσουν ένα αιμοστατικό βύσμα. Αυτό το φαινόμενο, που ονομάζεται αξονική περιθωριοποίηση, εξαρτάται από το ιξώδες του αίματος και μπορεί να επηρεάσει την κατανομή των αιμοπεταλίων και των νανοσωματιδίων εντός του αγγείου. Η αύξηση του ιξώδους του αίματος θα ενισχύσει την περιθωριοποίηση των αιμοπεταλίων, η οποία θα εντείνει τις συγκρούσεις μεταξύ των αιμοπεταλίων και του αγγειακού τοιχώματος, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο σχηματισμού θρόμβου. Η αξονική περιθωριοποίηση των νανοσωματιδίων από την άλλη πλευρά, έχει σημαντικές επιπτώσεις για τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα αρκετών τεχνολογιών χορήγησης φαρμάκων σε νανοκλίμακα που βασίζονται σε μεγάλο βαθμό σε αυτή την περιθωριοποίηση για την επίτευξη των θεραπευτικών τους στόχων. [90-93]

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν το ιξώδες του αίματος, ένας από αυτούς είναι ο αιματοκρίτης ο οποίος μπορεί να μεταβληθεί από τις αλληλεπιδράσεις νανοσωματιδίων και ερυθροκυττάρων. Ο αιματοκρίτης, αναφέρεται στο ποσοστό των ερυθροκυττάρων ως συνάρτηση του όγκου του αίματος και προκαλεί μια εκθετική αύξηση του ιξώδους του αίματος στα μεγάλα αιμοφόρα αγγεία σε σύγκριση με μια γραμμική αύξηση στα μικρά αγγεία. Ο αιματοκρίτης επηρεάζεται άμεσα από την αιμόλυση δηλαδή, τη μη φυσιολογική ρήξη ή καταστροφή των ερυθροκυττάρων και την απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα. Η επαγόμενη αιμόλυση θα μειώσει τον αιματοκρίτη και έχει συνδεθεί με αρκετές θανατηφόρες κλινικές καταστάσεις όπως η διάχυτη ενδαγγειακή πήξη (DIC) και η δρεπανοκυτταρική αναιμία (SCD). Η αιμόλυση είναι μια θεμελιώδης παράμετρος στον έλεγχο αιμοσυμβατότητας των βιοϋλικών και μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις για την κλινική χρήση τους. Ωστόσο, οι μέθοδοι με τις οποίες τα νανοσωματίδια αλληλεπιδρούν με τα ερυθροκύτταρα για να προκαλέσουν λύση δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί, συμπεριλαμβανομένων των αλληλεπιδράσεων με τη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων, της κυτταρικής πρόσληψης, της εσωτερίκευσης και του οξειδωτικού στρες. Επιπρόσθετα, η αιμολυτική δράση των περισσότερων νανοσωματιδίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση, τη δομή, το μέγεθος και το σχήμα. Η τοξικότητα του πυριτίου, για παράδειγμα, είναι ευθέως ανάλογη με την ποσότητα των δραστικών ομάδων σιλανόλης που εκτίθενται στην επιφάνεια του, η οποία εξαρτάται τόσο από το μέγεθος όσο και από τη γεωμετρία του. Σύμφωνα με τους Shang et al., το μέγεθος είναι ωστόσο ο πιο σημαντικός από αυτούς τους παράγοντες και ο μοναδικός καθοριστικός παράγοντας της αποτελεσματικής πρόσληψης των νανοσωματιδίων από τα ερυθροκύτταρα. [84,94-98, 100-101]

Συμπερασματικά, οι ερευνητές θα πρέπει να καταβάλλουν κάθε δυνατή προσπάθεια για τη διεξαγωγή ενδεδειγμένων μελετών αιμοσυμβατότητας σε πρόσφατα κατασκευασμένα νανοσωματίδια που αξιολογούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών και των τριών κυτταρικών συστατικών του αίματος. Αυτό όχι μόνο θα οδηγήσει σε νανοσωματίδια με ανώτερη αιμοσυμβατότητα, αλλά μπορεί επίσης να απλοποιήσει τις κλινικές δοκιμές που μπορεί να ακολουθήσουν και να επιταχύνουν τη διαδικασία παραγωγής νέων προϊόντων που βασίζονται σε αυτά στην αγορά. [100]

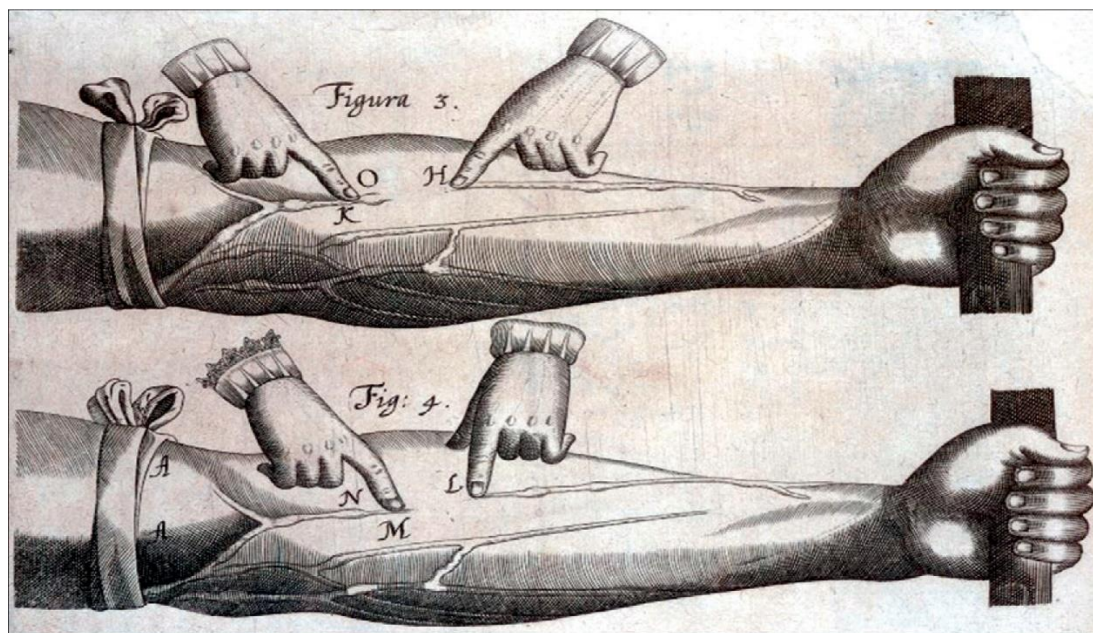
3.7. Ιστορική αναδρομή των ανακαλύψεων του αίματος.

Από τα πρώτα χρόνια, οι άνθρωποι κατάλαβαν τη σημασία του αίματος για τη ζωή. Αλλά οι γνώσεις για το τι είναι το αίμα και τον ρόλο που παίζει στο σώμα έχουν αλλάξει με τους αιώνες. Το χυμικό σύστημα της ιατρικής, που εφαρμόστηκε στην Ευρώπη για εκατοντάδες χρόνια, όριζε το αίμα ως ένα από τα τέσσερα ζωτικά σωματικά υγρά, κίτρινη χολή, μαύρη χολή, λευκό φλέγμα και κόκκινο αίμα και το ανθρώπινο σώμα ήταν κατανοητό ως δοχείο για αυτά. Το καθένα αντιστοιχούσε σε ένα από τα τέσσερα κλασικά στοιχεία φωτιά, γη, νερό και αέρας, από τα οποία θεωρήθηκε ότι φτιάχτηκαν τα πάντα στον κόσμο. Προκειμένου να διατηρηθεί η καλή υγεία και να θεραπευθούν οι ασθένειες, πιστευόταν ότι οι τέσσερις ουσίες ή τα χιούμωρ, όπως τα αποκαλούσαν, έπρεπε να διατηρούνται σε ισορροπία. [102,108]

Σύμφωνα με τον γιατρό Γαληνό του δεύτερου αιώνα, το αίμα παραγόταν στο συκώτι από τροφές και ποτά που μεταφέρονταν από το πεπτικό σύστημα. Αυτό το «φυσικό» αίμα μπορούσε να εισέλθει στις φλέβες και να μεταφερθεί, ρέοντας, σε όλα τα μέρη του σώματος. Το αίμα πιστεύεται ότι καταναλώνεται συνεχώς από τους ιστούς και στη συνέχεια αναπληρώνεται σε κάθε γεύμα, ενώ η κύρια λειτουργία της καρδιάς ήταν να παράγει θερμότητα. Ο Γαληνός σκέφτηκε ότι το αίμα στην αριστερή πλευρά της καρδιάς προερχόταν απευθείας από τη δεξιά πλευρά μέσω των πόρων στο διάφραγμα ή μέσω διαρροών από τους πνεύμονες. [103]

Η πρώτη σημαντική ανακάλυψη για το αίμα συνέβη αρκετές χιλιετίες μετά, το 1628 όπου το παράδειγμα του Γαληνού καταργήθηκε με τη δημοσίευση «*An Anatomical Essay on the Motion of the Heart and Blood in Animals*», από τον Άγγλο γιατρό William Harvey. Η επαναστατική αντίληψη του Harvey ανέφερε ότι το αίμα κυκλοφορούσε από την αριστερή πλευρά της καρδιάς μέσω των αρτηριών και επέστρεφε στη δεξιά πλευρά μέσω των φλεβών. Ακόμη πιο αξιοσημείωτο είναι ότι έφτασε στην ανακάλυψή του με εμπειρική παρατήρηση και επαγωγή, τον πυρήνα της σύγχρονης επιστημονικής μεθόδου. Ο Harvey αποστράγγισε το αίμα από πρόβατα και χοίρους και ανακάλυψε ότι ο όγκος του αίματος που περιείχαν ήταν

πολύ μεγαλύτερος από τον όγκο της τροφής που είχαν καταπιεί. Κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το αίμα δεν καταναλώθηκε και δεν απορροφήθηκε, αλλά πρέπει, να κυκλοφορεί συνεχώς. Σε μια δημόσια επίδειξη, ο Harvey έκοψε ένα ζωντανό φίδι για να δείξει πώς λειτουργούσε αυτή η κυκλοφορία. Όταν η φλέβα στην καρδιά συμπιέστηκε, η καρδιά συρρικνώθηκε σε μέγεθος, στη συνέχεια, όταν η καρδιά άνοιξε, οι θάλαμοί της δεν περιείχαν αίμα. Χρησιμοποιώντας τουρνικέ, ο Harvey έδειξε περαιτέρω πώς εμποτίστηκαν οι φλέβες και απέδειξε ότι το αίμα σε αυτές μπορούσε να κινηθεί μόνο προς μία κατεύθυνση, προς την καρδιά. [104,105]



Εικόνα 9 : Βαλβίδες στο αντιβράχιο από την ανατομική άσκηση του William Harvey σχετικά με την κίνηση της καρδιάς και του αίματος στα ζώα.

[Πηγή: Wright, T. (2013). William Harvey goes back to the future. *The Lancet*, 381(9867), pp.620–621. doi:10.1016/s0140-6736(13)60335-9.]

Οπλισμένοι με αυτή τη γνώση, οι γιατροί άρχισαν να εξετάζουν το ενδεχόμενο μεταγγίσεων αίματος. Το 1666, στη Βασιλική Εταιρεία, στο Λονδίνο, ο Richard Lower παρουσίασε την πρώτη επιστημονική έκθεση για τη μετάγγιση. Είχε κάνει μετάγγιση αίματος μεταξύ δύο σκύλων, χρησιμοποιώντας ένα πτερύγιο χήνας για να συνδέσει μια αρτηρία στο λαιμό του ενός με τη σφαγίτιδα φλέβα στο λαιμό του άλλου. Η πρώτη μετάγγιση σε άνθρωπο ασθενή έγινε τον επόμενο χρόνο από τον Jean Baptiste Denis, έναν Γάλλο γιατρό. Τον Νοέμβριο του ίδιου έτους, ο Lower έκανε μετάγγιση αίματος από αρνί στην κυκλοφορία του αίματος ενός κληρικού ονόματι Άρθουρ Κόγκα. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν και από τους δύο ερευνητές ήταν παρόμοιες, αλλά ο ασθενής του Denis πέθανε λόγω αιμολυτικής αντίδρασης. Η πρακτική αυτή λόγω των θανάτων που αναφέρθηκαν έγινε παράνομη και για τα επόμενα 150 χρόνια δεν καταγράφηκαν μελέτες στη μετάγγιση αίματος. [106,107]

Το 1795 ο Αμερικανός γιατρός Philip Syng Physick, στη Φιλαδέλφεια, έκανε την πρώτη μετάγγιση ανθρώπινου αίματος, ωστόσο δεν την δημοσίευσε ποτέ.

Η πρώτη επιτυχής μετάγγιση καταγράφηκε το 1818. Πραγματοποιήθηκε από τον James Blundell, Βρετανό μαιευτήρα, σε μια μητέρα που υπέστη σοβαρή αιμορραγία μετά τον τοκετό. Αίμα από τον σύζυγό της λήφθηκε με σύριγγα και εγχύθηκε με επιτυχία στην ασθενή. Μεταξύ 1825 και 1830 πραγματοποίησε δέκα από αυτές τις μεταγγίσεις, με πέντε από τους ασθενείς να παρουσιάζουν κλινικά οφέλη. Ωστόσο κατά την διαδικασία παρουσιάστηκαν δύο προβλήματα. Το πρώτο ήταν ότι το αίμα έπηξε συχνά κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, καθώς δεν χρησιμοποιούνταν αντιπηκτικά, ενώ το δεύτερο πρόβλημα ήταν ότι περίπου οι μισοί από τους μεταγγισμένους ασθενείς είχαν σοβαρές αντιδράσεις, μερικές από τις οποίες οδήγησαν στο θάνατο. [107]



Εικόνα 10 : Πρώτη επιτυχημένη Μετάγγιση Αίματος

Πηγή : Shelin, S. (2018). *Blood Transfusion History: Infusing Life* | Shannon Selin. [online]

Η ανακάλυψη ήρθε το 1900 όταν ο Karl Landsteiner, ένας Αυστριακός επιστήμονας, έκανε το πρώτο βήμα προς την ανακάλυψη των τύπων αίματος. Έλεγε τον ορό του αίματος, από έξι υγιείς άνδρες (πέντε συναδέλφους και τον ίδιο) και διαπίστωσε ότι οι οροί από ορισμένους δότες προκάλεσαν τη συσσώρευση ερυθρών αιμοσφαιρίων σε άλλους. Ο Landsteiner συμπέρανε ότι πρέπει να υπάρχουν διαφορετικοί τύποι αίματος και ότι θα μπορούσαν να ταξινομηθούν με βάση αυτές τις παρατηρούμενες συγκολλήσεις. Τα επόμενα χρόνια, ο Landsteiner και οι συνεργάτες του εντόπισαν τις κύριες ομάδες αίματος που γνωρίζουμε σήμερα—A, B, AB και O—και έδειξαν ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους καθόριζαν εάν μια μετάγγιση θα ήταν ασφαλής. Οι φορείς αίματος AB ήταν καθολικοί λήπτες, ικανοί να λάβουν αίμα από οποιονδήποτε δότη. Οι φορείς O, όπως ο ίδιος ο Landsteiner, ήταν καθολικοί δωρητές. Τώρα το αίμα θα μπορούσε να χορηγηθεί με

μεγαλύτερη ασφάλεια στους ασθενείς. Στην πραγματικότητα, για πρώτη φορά από την εποχή των αλχημιστών, το αίμα έγινε ξανά φάρμακο. [109-110]

Ακολούθησαν περισσότερες ανακαλύψεις. Το 1914, διαπιστώθηκε ότι το κιτρικό νάτριο εμπόδιζε την πήξη του αίματος, επιτρέποντάς του να ανακτηθεί από έναν δότη και να αποθηκευτεί έως ότου χρειαστεί ο λήπτης. Στον Πρώτο Παγκόσμιο Πόλεμο, αυτή η ανακάλυψη έσωσε τις ζωές αμέτρητων τραυματισμένων στρατιωτών. [107]

Αν και η ανακάλυψη του συστήματος ομάδων αίματος ABO μείωσε δραματικά τον αριθμό των θανάτων μετά από μετάγγιση αίματος, παρατηρήθηκαν αρκετές άλλες αντιδράσεις μετάγγισης, όπως για παράδειγμα πυρετός. Αυτές, προκλήθηκαν από άλλα συστήματα ομάδων αίματος, τα οποία έπρεπε ακόμη να ανακαλυφθούν. Το πιο σημαντικό από αυτά τα συστήματα ήταν το σύστημα Rhesus (RH). Αυτή η ανακάλυψη έγινε από τον Philip Levine και τον R.E. Stetson το 1939. Παρατήρησαν ότι αφού μια μητέρα γέννησε ένα νεκρό παιδί και στη συνέχεια μεταγγίστηκε το αίμα του συζύγου της, υπέστη μια σοβαρή αντίδραση στο αίμα. Τόσο η μητέρα όσο και ο σύζυγος ήταν ομάδα O. Οι δύο επιστήμονες εξήγησαν την παρουσία ενός νέου παράγοντα ως αιτία. ωστόσο δεν του δόθηκε όνομα. Το όνομα δόθηκε το 1940 από τους Karl Landsteiner και Alex Weiner, καθώς διεξήγαγαν μια μελέτη στην οποία έκαναν ένεση αίματος από τον πίθηκο «*Maccacus rhesus*» σε κουνέλια και ινδικά χοιρίδια. Στη συνέχεια, συλλέχθηκε το αίμα από τα κουνέλια και τα ινδικά χοιρίδια και ο ορός ο οποίος περιείχε τον παράγοντα anti-Rh (πρωτεΐνη που συνδέεται με το αντιγόνο rhesus), αναμίχθηκε με τα ερυθρά αιμοσφαίρια ενός αριθμού δειγμάτων από άτομα του πληθυσμού της Νέας Υόρκης. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια από το 85% αυτού του πληθυσμού συγκολλήθηκαν με τον ορό, και ο πληθυσμός ονομάστηκε Rhesus θετικός (Rh Positive). Ενώ, το υπόλοιπο 15% που δεν είχε καμία συγκόλληση ονομάστηκε Rhesus αρνητικό (Rh Negative). Άλλα σημαντικά συστήματα ομάδων αίματος ανακαλύφθηκαν τα επόμενα χρόνια.[107,111]

Ο Edwin Cohn, Αμερικανός επιστήμονας, το 1940 επίσης, ανέπτυξε μια κλασμάτωση ψυχρής αιθανόλης η οποία είναι η διαδικασία διάσπασης του πλάσματος σε συστατικά και προϊόντα. Η λευκωματίνη, η γ-σφαιρίνη και το ινωδογόνο απομονώθηκαν και έγιναν διαθέσιμα για κλινική χρήση. Μια τεχνική για τη μακροχρόνια διατήρηση του πλάσματος του αίματος με διαχωρισμό των υγρών ερυθρών αιμοσφαιρίων από το σχεδόν στερεό πλάσμα και κατάψυξη των δύο συστατικών χωριστά τεκμηριώθηκε επίσης από τον Charles Drew, έναν Αμερικανό γιατρό κατά τη διάρκεια του ίδιου έτους. Η κρυοσυντήρηση επέτρεψε τη διατήρηση και την ανασύσταση του αίματος σε μεταγενέστερη ημερομηνία. [112,113]

Μια άλλη επανάσταση στην επιστήμη η οποία άλλαξε την τέχνη της διάγνωσης είναι η τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA το 1972 η οποία επέτρεψε την ευκολότερη κλωνοποίηση

και αλληλούχιση των γονιδίων. Οι ασθένειες, με τη σειρά τους, θα μπορούσαν να εντοπιστούν πιο εύκολα σε συγκεκριμένες μεταλλάξεις στον γενετικό κώδικα, ενώ οι αιματολόγοι δεν εξαρτώνται πλέον από την απλή έρευνα των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Αντίθετα, μπορούν να αναλύσουν το αίμα σε μοριακό επίπεδο, προκειμένου να εντοπίσουν τις υποκείμενες ανωμαλίες που προκαλούν λευχαιμία, λέμφωμα και άλλες ασθένειες. Αναπτύχθηκαν νέα φάρμακα που στόχευαν τέτοιες μεταλλάξεις και ήταν σε θέση να επιτύχουν ύφεση πολλών καρκίνων του αίματος που ήταν ανθεκτικοί ακόμη και στην πιο εντατική χημειοθεραπεία. Τα τελευταία χρόνια, οι τεχνικές γονιδιακής υποκατάστασης έχουν προχωρήσει σε σημείο που μπορούν να θεραπεύσουν συγγενείς διαταραχές του αίματος, όπως η αιμορροφιλία και η θαλασσαιμία. Και τα ίδια τα κύτταρα του αίματος έχουν υποστεί γενετική χειραγώγηση για να χρησιμεύσουν ως όπλα κατά των καρκίνων, σε μια διαδικασία που ονομάζεται θεραπεία T-κυττάρων CAR, τα κύτταρα T-λεμφοκυττάρων του ίδιου του σώματος μπορούν να κατασκευαστούν για να αναγνωρίζουν και να καταπολεμούν τη λευχαιμία, τον καρκίνο του πνεύμονα και τη νόσο του Hodgkin. Οι πρωτεΐνες που κατευθύνουν τα βλαστοκύτταρα να ωριμάσουν σε λευκά αιμοσφαίρια, ερυθρά αιμοσφαίρια ή αιμοπετάλια μπορούν τώρα να κινητοποιηθούν για να επιταχύνουν την παραγωγή αίματος σε ασθενείς με χαμηλές μετρήσεις αίματος και να βελτιώσουν τις τοξικές επιδράσεις της χημειοθεραπείας και της μεταμόσχευσης μυελού των οστών, αποτρέποντας θανατηφόρες λοιμώξεις και αιμορραγία. [107, 114-115]

Στις αρχές τις δεκαετίας του 1980 ανακαλύφθηκαν τα πρώτα κρούσματα του Συνδρόμου Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (AIDS), γίνεται αντιληπτό ότι η μόλυνση μπορεί να μεταδοθεί σεξουαλικά και να προκληθεί από τον ιό HIV. Περιστατικά αναφέρονται σε λήπτες μετάγγισης αίματος και το 1985 αναπτύσσονται τεστ για τον έλεγχο των αιμοδοτών και την εξάλειψη του μολυσμένου αίματος από τις τράπεζες μετάγγισης τα οποία εφαρμόστηκαν παρόμοια και για την ηπατίτιδα Β και C. [103,107,116]

Σήμερα, με την ραγδαία ανάπτυξη της τεχνολογίας και την εμφάνιση νέων τεχνολογιών οι επιστήμονες έχουν στα χέρια τους πολύτιμα εργαλεία, που τους δίνουν την δυνατότητα να δουλεύουν σε νανομετρική κλίμακα, προκειμένου να καταπολεμήσουν και να βρουν θεραπεία για ανίατες ασθένειες ώστε να καλυτερεύσουν την ζωή δισεκατομμύρια ανθρώπων.

B. Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 4. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Όταν πραγματοποιείται μια ερευνητική διαδικασία στην οποία παίρνουν μέρος βιοϋλικά και τμήματα του οργανισμού το κύριο ερώτημα που προκύπτει είναι εάν αυτά τα υλικά είναι συμβατά με τον οργανισμό. Τα νανοσωματίδια, είναι υλικά τα οποία τα τελευταία χρόνια έχουν κυριαρχήσει στην ιατρική κοινότητα, λόγω των ιδιοτήτων τους και της στοχευμένης δράσης τους γι' αυτό και χρησιμοποιούνται σε πολλές εφαρμογές. Κατ' επέκταση η διερεύνηση της συμβατότητας νανοϋλικών είναι κρίσιμη για την πορεία του πειράματος και για την άδεια χρήσης τους σε ζωντανούς οργανισμούς καθώς, εάν χορηγηθούν μπορεί σε κάποιες καταστάσεις να επιδεινώσουν κατά πολύ την κατάσταση ενός ασθενούς ή ακόμα και να οδηγήσουν σε καταστάσεις ασύμβατες με τη ζωή. Σκοπός λοιπόν αυτής της εργασίας ήταν να αναπτύξουμε ένα πρωτόκολλο χρησιμοποιώντας συγκεκριμένες τεχνικές με σκοπό να λύσουμε το πρόβλημα της συσσωμάτωσης που προκαλούν τα νανοσωματίδια, αλλά και να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις του Νανοακερμανίτη με φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια. Το υλικό υποβλήθηκε σε κάποιες διαδικασίες όπως υπερήχηση σε λουτρό, σπάσιμο με γουδί και υπερήχηση σε ηχητικό ανιχνευτή. Τα αποτελέσματα της έρευνας έχουν ως στόχο την καλύτερη κατανόηση της δράσης του Νανοακερμανίτη στα ερυθρά αιμοσφαίρια, την κατανόηση της επίδρασης της υπερήχησης στο υλικό και την δημιουργία Πρωτοκόλλου το οποίο θα συμβάλει στην ασφαλέστερη χρήση των νανοσωματιδίων.

4.1. Υλικά και μέθοδοι

4.1.1. Δείγματα αίματος

Για την διεκπεραίωση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα φλεβικού αίματος σε σωληνάρια αιμοληψίας με αντιπηκτικό EDTA από εθελοντές και των δυο φύλων χωρίς κάποια αιματολογική διαταραχή.

Τα 8 δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν συνολικά, τα προμηθευτήκαμε από το Αιμοδοτικό Κέντρο Νάουσας, με την συγκατάθεση των εθελοντών.

4.1.2. Υλικό Νανοσωματιδίων

Το υλικό των νανοσωματιδίων που χρησιμοποιήθηκε είναι ο νανοακερμανίτης ($\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$), συντέθηκε με την μέθοδο sol-gel και παραχωρήθηκε από την μονάδα σύνθεσης του τμήματος Προσθετικής της Οδοντιατρικής Σχολής του ΑΠΘ.

4.2. Επεξεργασία των Αιμοσφαιρίων

Αρχικά έγινε έκπλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με προσθήκη 20 ml PBS (Phosphate-buffered saline 1x) και φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές το λεπτό για 10 λεπτά. Έπειτα έγινε αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη πάλι 20 ml PBS και φυγοκέντρηση στις 3200 στροφές το λεπτό για 7 λεπτά. Η διαδικασία αυτή έχει ως σκοπό τα ερυθρά αιμοσφαίρια να διαχωριστούν από το πλάσμα και τα υπόλοιπα στοιχεία αλλά και να απομακρυνθούν τυχόν ουσίες που μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα του πειράματος όπως λευκά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, αντιγόνα, πρωτεΐνες και χημικές ουσίες. Το αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά (PBS) είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα (pH ~ 7,4) που χρησιμοποιείται συνήθως στη βιολογική έρευνα. Είναι ένα διάλυμα άλατος με βάση το νερό που περιέχει όξινο φωσφορικό δινάτριο, χλωριούχο νάτριο και, σε ορισμένες συνθέσεις, χλωριούχο κάλιο και διόξινο φωσφορικό κάλιο. Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα βοηθά στη διατήρηση ενός σταθερού pH.

4.3. Μέθοδος Υπερήχησης - Ηχητικού Ανιχνευτή

Με σκοπό την δημιουργία ενός πρωτοκόλλου αιμοσυμβατότητας χρειάστηκε να υποβάλουμε το υλικό μας σε κάποιες διαδικασίες προκειμένου να δούμε πως αντιδρά με τα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η διαδικασία η οποία πραγματοποιήθηκε στην πλειονότητα των πειραμάτων είναι η υπερήχηση σε λουτρό (bath sonication).

Ο υπέρηχος είναι ηχητικά κύματα με συχνότητες υψηλότερες από το ανώτερο ακουστικό όριο της ανθρώπινης ακοής, ενώ οι συσκευές υπερήχων λειτουργούν με συχνότητες από 20 kHz έως αρκετά gigahertz. Η υπερήχηση χρησιμοποιείται συνήθως στη νανοτεχνολογία για την ομοιόμορφη διασπορά των νανοσωματιδίων σε υγρά, αλλά και για την επιτάχυνση της διάλυσης, σπάζοντας τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη όταν δεν είναι δυνατή η ανάδευση του δείγματος.

Σε ένα από τα πειράματα χρησιμοποιήσαμε και το μηχάνημα του ηχητικού ανιχνευτή (Probe Sonicator). Η συσκευή υπερήχων είναι ένα ισχυρό κομμάτι εργαστηριακού εξοπλισμού με ηλεκτρική γεννήτρια υπερήχων που δημιουργεί ένα σήμα για την τροφοδοσία ενός μορφοτροπέα. Ο μορφοτροπέας μετατρέπει το ηλεκτρικό σήμα δημιουργώντας μια μηχανική δόνηση. Η συσκευή υπερήχων διατηρεί και ενισχύει τη δόνηση μέχρι να περάσει στον ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής κινείται και μεταδίδει την δόνηση στο διάλυμα. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, κύκλοι πίεσης σχηματίζουν χιλιάδες μικροσκοπικές φυσαλίδες κενού στο διάλυμα, οι οποίες καταρρέουν σε μια διαδικασία γνωστή ως σπηλαιώση. Αυτό προκαλεί ισχυρά κύματα δόνησης που απελευθερώνουν μια τεράστια ενεργειακή δύναμη στο πεδίο της σπηλαιώσης, η οποία διαταράσσει τις μοριακές αλληλεπιδράσεις, όπως για παράδειγμα οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων νερού, διαχωρίζει τις συστάδες σωματιδίων και διευκολύνει την ανάμειξη. Η ενέργεια από τα ηχητικά κύματα δημιουργεί επίσης, τριβή στο διάλυμα, η οποία έχει ως αποτέλεσμα θερμότητα. Για την αποτροπή της θέρμανσης τοποθετήσαμε το δείγμα σε πάγο κατά την διάρκεια της υπερήχησης.

4.4. Μεθοδολογία Αιμοσυμβατότητας

Για τον έλεγχο της συμβατότητας των ερυθρών αιμοσφαιρίων με τα Νανοσωματίδια σε όλα τα πειράματα παρασκευάστηκαν: διάλυμα των NP με PBS 1x με συγκέντρωση 5mg/mL, και εναιώρημα με τα πλυμένα ερυθρά και PBS με τελική συγκέντρωση ερυθρών 5%. Στην συνέχεια το διάλυμα των νανοσωματιδίων τοποθετήθηκε σε μέρος του εναιωρήματος των πλυμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1mg/mL, 0.75mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL, 0.125mg/mL) σε σωληνάρια eppendorf (Εικόνα 11) σύμφωνα με τον Πίνακα 1. Παράλληλα, το διάλυμα νανοσωματιδίων και ερυθρών αιμοσφαιρίων τοποθετήθηκε και σε πλάκα κυτταροκαλιέργειας 24 βοθρίων (Εικόνα 11), σε συγκεντρώσεις (1mg/mL, 0.75mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL, 0.125mg/mL) σύμφωνα με τον Πίνακα 2. Παρασκευάστηκαν ο θετικός μάρτυρας, 1mL εναιωρήματος ερυθρών αιμοσφαιρίων 5% το οποίο φυγοκεντρήθηκε στις 1600 στροφές το λεπτό για 5 λεπτά, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε νερό για την λύση των κυττάρων, και ο αρνητικός μάρτυρας, 1 mL

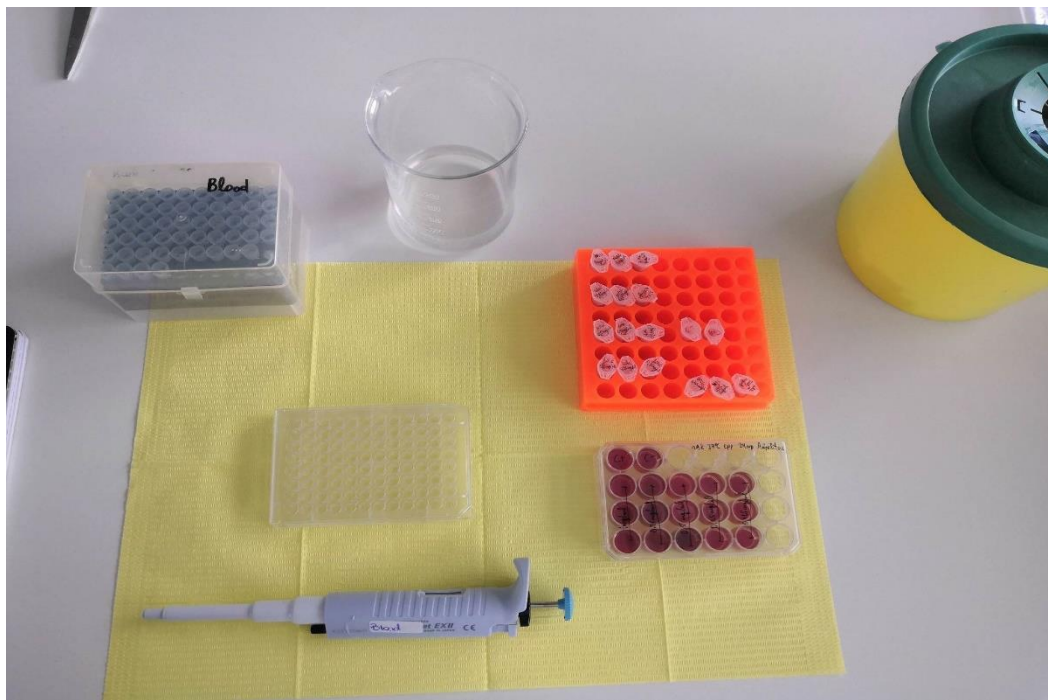
εναιωρήματος ερυθρων αιμοσφαιριων 5%. Μετά την επώαση, το υπερκείμενο από την πλάκα κυτταροκαλλιέργειας τοποθετήθηκε σε πλάκα μικροτιλοδότησης 96 βοθρίων, ενώ τα δείγματα από τα erpendorf φυγοκεντρήθηκαν στις 1.600 στροφές/ λεπτό για 5 λεπτά και το υπερκείμενο τοποθετήθηκε επίσης στην πλάκα και μετρήθηκε φωτομετρικά σε φωτόμετρο στα 540 nm.

Το ποσοστό της αιμόλυσης υπολογίστηκε με τον ακόλουθο τύπο: (Τύπος 1)

$$\text{Αιμόλυση \%} = \frac{\text{Απορρόφηση δείγματος} - \text{απορρόφηση αρνητικού μάρτυρα}}{\text{Απορρόφηση θετικού} - \text{απορρόφηση αρνητικού μάρτυρα}} \times 100$$

Συγκέντρωση Τελικού Δείγματος	Ποσότητα εναιωρήματος ερυθροκυττάρων 5%	Ποσότητα από το διάλυμα των Νανοδοματιδίων (5mg/mL)
1mg/mL	800μL	200 μL
0.75mg/mL	850 μL	150 μL
0.5mg/mL	900 μL	100 μL
0.25mg/mL	950 μL	50 μL
0.125mg/mL	975 μL	25 μL

Πίνακας 1: Παρουσιάζονται οι ακριβείς ποσότητες των δύο επί μέρους διαλυμάτων για την παρασκευή του κοινού διαλύματος ερυθρών αιμοσφαιριών και νανοδοματιδίων.



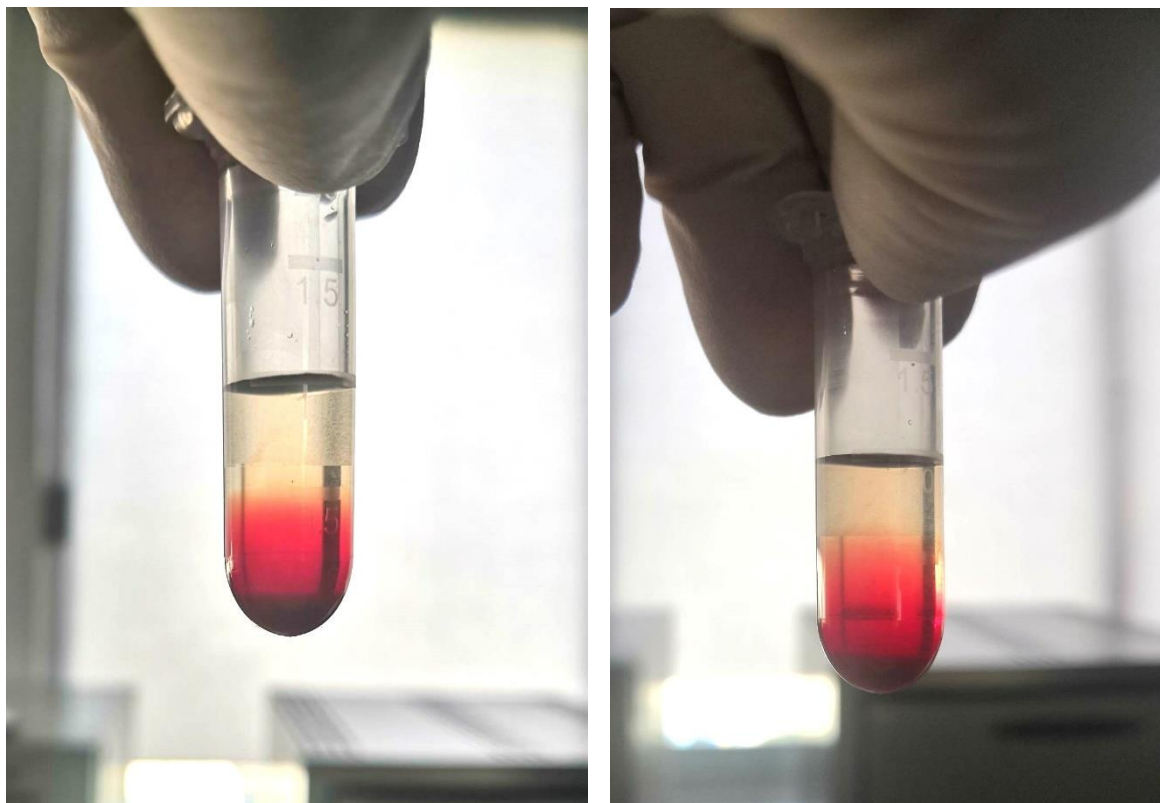
Εικόνα 11: Παρουσιάζεται ο πάγκος εργασίας, φαίνονται τα erpendorf και η πλάκα κυτταροκαλιέργειας 24 βοθρίων όπου έχει τοποθετηθεί το κοινό διάλυμα ερυθρών αιμοσφαιρίων και νανοσωματιδίων

Συγκέντρωση Τελικού Δείγματος	Ποσότητα εναιωρήματος ερυθροκυττάρων 5%	Ποσότητα από το διάλυμα των Νανοσωματιδίων (5mg/mL)
1mg/mL	1.600μL	400 μL
0.75mg/mL	1.700 μL	300 μL
0.5mg/mL	1.800 μL	200 μL
0.25mg/mL	1.900 μL	100 μL
0.125mg/mL	1.950 μL	50 μL

Πίνακας 2: Παρουσιάζονται οι ακριβείς ποσότητες των δύο επί μέρους διαλυμάτων για την παρασκευή του κοινού διαλύματος ερυθρών αιμοσφαιρίων και νανοσωματιδίων.

Στο επόμενο σετ πειραμάτων, παρασκευάστηκαν: διάλυμα των NP με PBS 1x με συγκέντρωση 5mg/mL, και εναιώρημα με τα πλυμένα ερυθρά και PBS με τελική συγκέντρωση ερυθρών 5%. Το διάλυμα των NP σε πέντε πειράματα υποβλήθηκε σε υπερήχους σε λουτρό (bath sonication) σε διαφορετικούς χρόνους για 5, 10, 20, 30 και 60 λεπτά και θερμοκρασίες 37°C, 50°C, και 70°C και τοποθετήθηκε έπειτα σε μέρος του εναιωρήματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1mg/mL, 0.75mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL, 0.125mg/mL) (Πίνακας 1). Το διάλυμα των ερυθρών με τα NP επώαστηκε στην συνέχεια για 24 ώρες και σε ένα πείραμα για 48 ώρες σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C. Παρασκευάστηκαν ο θετικός μάρτυρας, 1mL εναιωρήματος ερυθρών αιμοσφαιρίων 5% το οποίο φυγοκεντρήθηκε στις 1600 στροφές το λεπτό για 5 λεπτά,

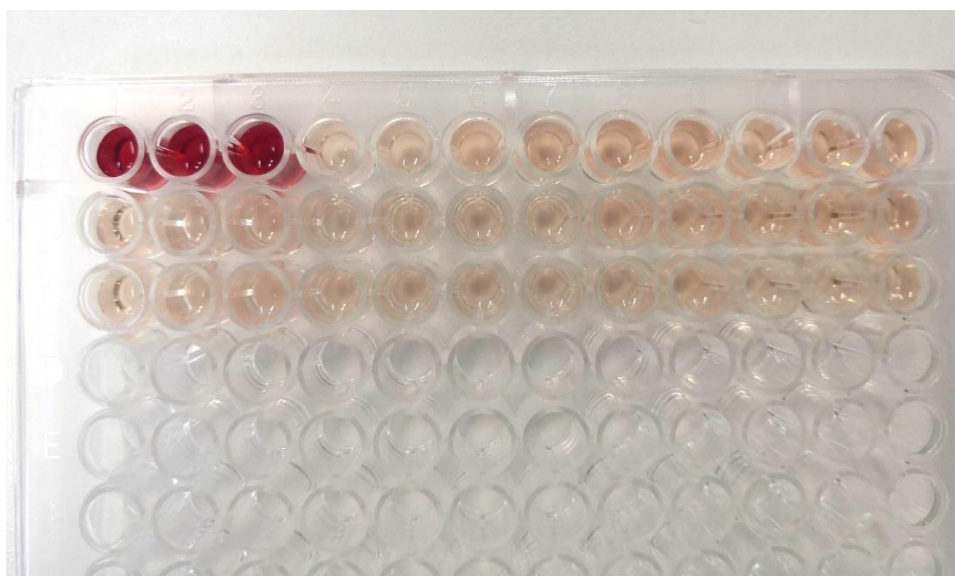
αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε νερό για την λύση των κυττάρων, και ο αρνητικός μάρτυρας, 1 mL εναιωρήματος ερυθρών αιμοσφαιρίων 5%. Όλα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν μετά την επώαση στις 1.600 στροφές/ λεπτό για 5 λεπτά και το υπερκείμενο τοποθετήθηκε πλάκα μικροτιτλοδότησης 96 βοθρίων και μετρήθηκε φωτομετρικά σε φωτόμετρο στα 540nm. Το ποσοστό αιμόλυσης υπολογίστηκε με τον Τύπο1.



Εικόνες 12 & 13 : Δείγμα ερυθρών αιμοσφαιρίων και νανοσωματιδίων μετά την επώαση στα οποία φαίνεται η αιμόλυση.

Σε ένα από τα πειράματα η σκόνη των νανοσωματιδίων τοποθετίθηκε σε γουδί, δέχτηκε 50 ήπιες πιέσεις και παρασκευάστηκε διάλυμα με PBS 1x με συγκέντρωση 5mg/mL, ενώ παρασκευάστηκε και ένα δεύτερο διάλυμα των νανοσωματιδίων με PBS 1x χωρίς να δεχτεί τις πιέσεις από το γουδί προκειμένου να δούμε αν θα υπάρχει διαφορά στην συμβατότητα. Στη συνέχεια τα διαλύματα προστέθηκαν σε μέρος του εναιωρήματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1mg/mL, 0.75mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL, 0.125mg/mL) , παρασκευάστηκαν ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας με τον τρόπο που αναφέρθηκε προηγουμένως, και επώαστηκαν για 24 ώρες στον κλίβανο στους 37°C. Όλα τα δείγματα μετά την επώαση φυγοκεντρήθηκαν στις 1.600 στροφές/ λεπτό για 5 λεπτά και το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε πλάκα μικροτιτλοδότησης 96 βοθρίων και

μετρήθηκε φωτομετρικά σε φωτόμετρο στα 540 nm. Το ποσοστό αιμόλυσης υπολογίστηκε με τον Τύπο 1.



Εικόνα 14: Πλάκα μικροτιτλοδότησης με το υπερκείμενο των δειγμάτων πριν την φωτομέτρηση.

Σε ένα επόμενο πείραμα παρασκευάστηκε διάλυμα των NP με PBS 1x με συγκέντρωση 5mg/mL και υποβλήθηκε σε υπερήχους με ηχητικό ανιχνευτή (probe sonicator) για 30 λεπτά. Κατά την διάρκεια της υπερήχησης το υλικό τοποθετήθηκε σε πάγο με σκοπό να μην αναπτύξει θερμοκρασία, η οποία παράγεται από τον υπέρηχο. (Εικόνα 11). Έπειτα από μια ώρα το διάλυμα τοποθετήθηκε σε μέρος του εναιωρήματος των ερυθρών με PBS 1x (με τελική συγκέντρωση ερυθρών 5%) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1mg/mL, 0.75mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL, 0.125mg/mL). Ταυτόχρονα παρασκευάστηκε ένα δεύτερο διάλυμα NP με PBS 1x με συγκέντρωση 5mg/mL, το οποίο δεν είχε υποβληθεί στην διαδικασία του probe sonication και τοποθετήθηκε στο εναιώρημα με τα πλυμένα ερυθρά και PBS στις ίδιες συγκεντρώσεις. Η διαδικασία αυτή είχε ως στόχο την διερεύνηση αν με το probe sonication υπάρχει διαφορά στην αιμοσυμβατότητα. Παρασκευάστηκαν επίσης ο θετικός και αρνητικός μάρτυρας και τα δείγματα επώαστηκαν στον κλίβανο στους 37°C για 1 ώρα, 24 ώρες και 5 ημέρες. Όλα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν μετά την επώαση στις 1.600 στροφές / λεπτό για 5 λεπτά και το υπερκείμενο τοποθετήθηκε πλάκα μικροτιτλοδότησης 96 βοθρίων και μετρήθηκε φωτομετρικά σε φωτόμετρο στα 540 nm. Το ποσοστό αιμόλυσης υπολογίστηκε με τον Τύπο 1.



Εικόνα 15: Το μηχάνημα του ηχητικού ανιχνευτή (Probe Sonicator)

Στο τελευταίο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα των NP που είχαν υποστεί probe sonication και είχε διατηρηθεί στο ψυγείο για μια εβδομάδα (Εικόνα 12) και τοποθετήθηκε σε μέρος του εναιωρήματος των πλυμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων με PBS 1x (με τελική συγκέντρωση ερυθρών 5%) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1mg/mL, 0.75mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL, 0.125mg/mL). Ταυτόχρονα παρασκευάστηκε ένα δεύτερο διάλυμα NP με PBS 1x με συγκέντρωση 5mg/mL, (Εικόνα 13) το οποίο δεν είχε υποβληθεί σε καμία διαδικασία υπερήχησης και τοποθετήθηκε σε μέρος του εναιωρήματος με τα πλυμένα ερυθρά και PBS στις ίδιες συγκεντρώσεις. Παρασκευάστηκαν επίσης ο θετικός και αρνητικός μάρτυρας και τα δείγματα επώαστηκαν στον κλίβανο στους 37°C για 1 ώρα και 24 ώρες. Παράλληλα, το διάλυμα των NP που είχε υποστεί probe sonication και είχε διατηρηθεί στο ψυγείο τοποθετήθηκε στο λουτρό υπερήχων (bath sonication) για 5, 10, 20 και 30 λεπτά. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε μέρος του εναιωρήματος των πλυμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων με PBS 1x (με τελική συγκέντρωση ερυθρών 5%) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1mg/mL, 0.75mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL, 0.125mg/mL), και όλα τα δείγματα επώαστηκαν επίσης στον κλίβανο στους 37°C για 1 ώρα και 24 ώρες. Όλα τα δείγματα μετά την επώαση φυγοκεντρήθηκαν στις 1.600 στροφές/ λεπτό για 5 λεπτά και το υπερκείμενο τοποθετήθηκε σε πλάκα μικροτιλοδότησης 96 βοθρίων και μετρήθηκε φωτομετρικά σε φωτόμετρο στα 540nm. Το ποσοστό αιμόλυσης υπολογίστηκε με τον Τύπο 1.



Εικόνα 16: Διάλυμα των NP που είχαν υποστεί probe sonication



Εικόνα 17: Διάλυμα των NP που δεν έχει υποστεί υπερήχηση.

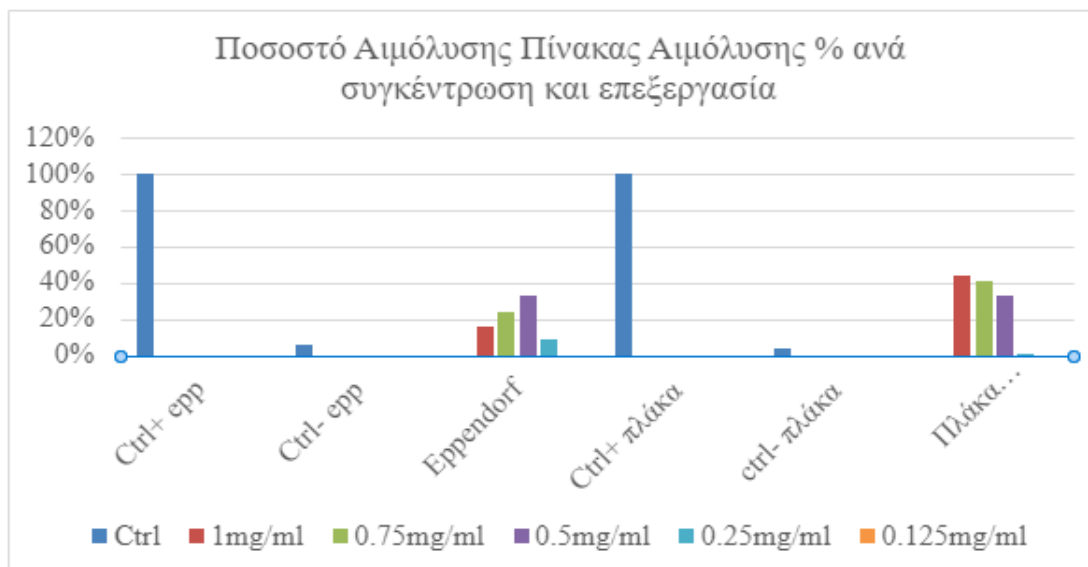
Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων και την δημιουργία των διαγραμμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Microsoft Office Excel. Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, δηλαδή κατά πόσο η αιμόλυση που παρουσιάστηκε είναι σημαντική χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο ASTM F 756-08 (ASTMF-756, 2009), σύμφωνα με το οποίο αιμόλυση < 2% δεν λαμβάνεται υπόψη και το υλικό χαρακτηρίζεται μη αιμολυτικό, υλικό που προκαλεί αιμόλυση μεταξύ 2%-5% χαρακτηρίζεται μετρίως αιμολυτικό και για αιμόλυση >5% χαρακτηρίζεται αιμολυτικό.

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του $\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$ σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1mg/mL, 0.75mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL, 0.125mg/mL) στα ερυθρά αιμοσφαίρια και με διαφορετική επεξεργασία καθώς χρησιμοποιήθηκαν eppendorf και πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 24 βοθρίων. Στον Πίνακα 3 αναγράφεται συνολικά το ποσοστό της αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση σε σύγκριση με τον θετικό και τον αρνητικό μάρτυρα και ακολουθεί το γράφημα 1 με την σχηματική αναπαράσταση. Ωστόσο περισσότερα πειράματα χρειάζεται να γίνουν για να μπορέσουμε να φτάσουμε σε ένα ασφαλές συμπέρασμα.

	Ctrl	1mg/ml	0.75mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg/ml	0.125mg/ml
Ctrl+ epp	100%					
Ctrl- epp	6%					
Eppendorf		16%	24%	33%	9%	0%
Ctrl+ πλάκα	100%					
ctrl- πλάκα	4%					
Πλάκα κυτταροκαλλιέργειας		44%	41%	33%	1%	0%

Πίνακας 3: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση στην επεξεργασία με eppendorf και πλάκα κυτταροκαλλιέργειας 24 βοθρίων.

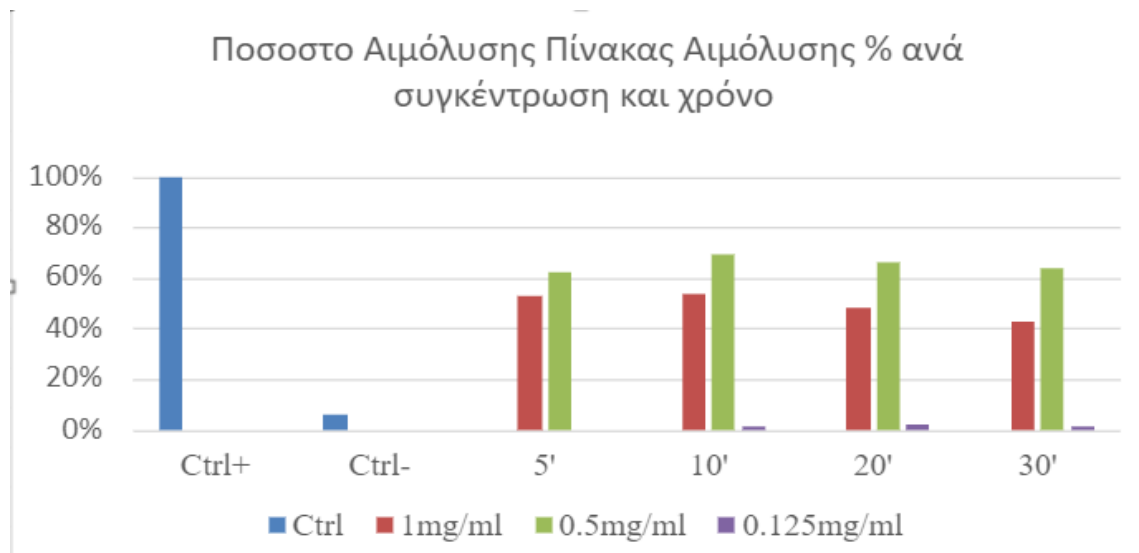


Γράφημα 1: Ποσοστό αιμόλυσης % που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση και ανά επεξεργασία

Ακολούθησαν 3 κύκλοι πειραμάτων στους οποίους το υλικό των Νανοσωματιδίων υποβλήθηκε σε υπερήχους σε λουτρό (bath sonication) σε διαφορετικούς χρόνους για 5,10,20 και 30 λεπτά και θερμοκρασίες 37°C, 50°C, και 70°C και τοποθετήθηκε έπειτα σε μέρος του εναιωρήματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1mg/mL, 0.5mg/mL, 0.125mg/mL). Σκοπός μας ήταν να εξετάσουμε τον ρόλο που διαδραματίζει η υπερήχηση στο υλικό των NP σε διαφορετικούς χρόνους και θερμοκρασίες στην αιμόλυση. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στους πίνακες 4, 5 και 6 και στα γραφίματα 2, 3 και 4.

	Ctrl	1mg/ml	0.5mg/ml	0.125mg/ml
Ctrl+	100%			
Ctrl-	6%			
5'		53%	62%	0%
10'		54%	69%	1%
20'		48%	66%	2%
30'		43%	64%	1%

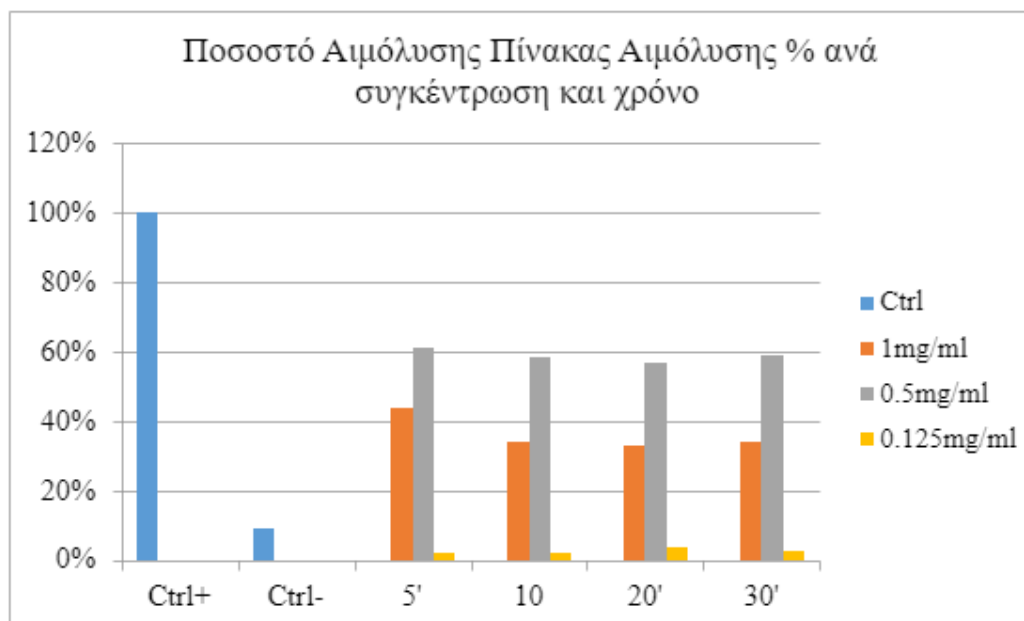
Πίνακας 4: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση και χρόνο μετά από υπερήχηση του υλικού των NP στους 37°C



Γράφημα 2: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση και χρόνο μετά από υπερήχηση του υλικού των NP στους 37°C

	Ctrl	1mg/ml	0.5mg/ml	0.125mg/ml
Ctrl+	100%			
Ctrl-	9%			
5'		44%	61%	2%
10		34%	59%	2%
20'		33%	57%	4%
30'		34%	59%	3%

Πίνακας 5: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση και χρόνο μετά από υπερήχηση του υλικού των NP στους 50°C

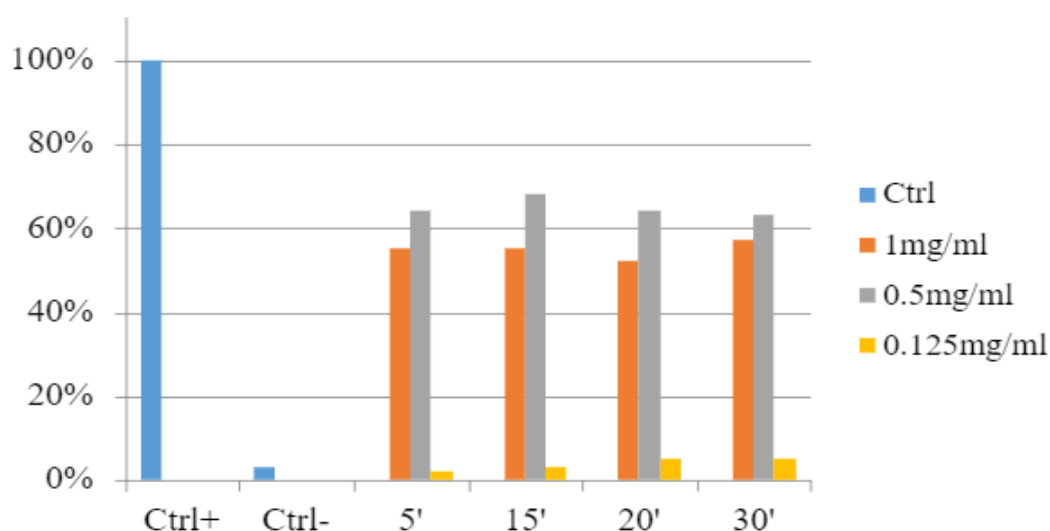


Γράφημα 3: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση και χρόνο μετά από υπερήχηση του υλικού των NP στους 50°C

time/concentration	Ctrl	1mg/ml	0.5mg/ml	0.125mg/ml
Ctrl+	100%			
Ctrl-	3%			
5'		55%	64%	2%
15'		55%	68%	3%
20'		52%	64%	5%
30'		57%	63%	5%

Πίνακας 6: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση και χρόνο μετά από υπερήχηση του υλικού των NP στους 70°C

Ποσοστό Αιμόλυσης Πίνακας Αιμόλυσης% ανά συγκέντρωση και χρόνο

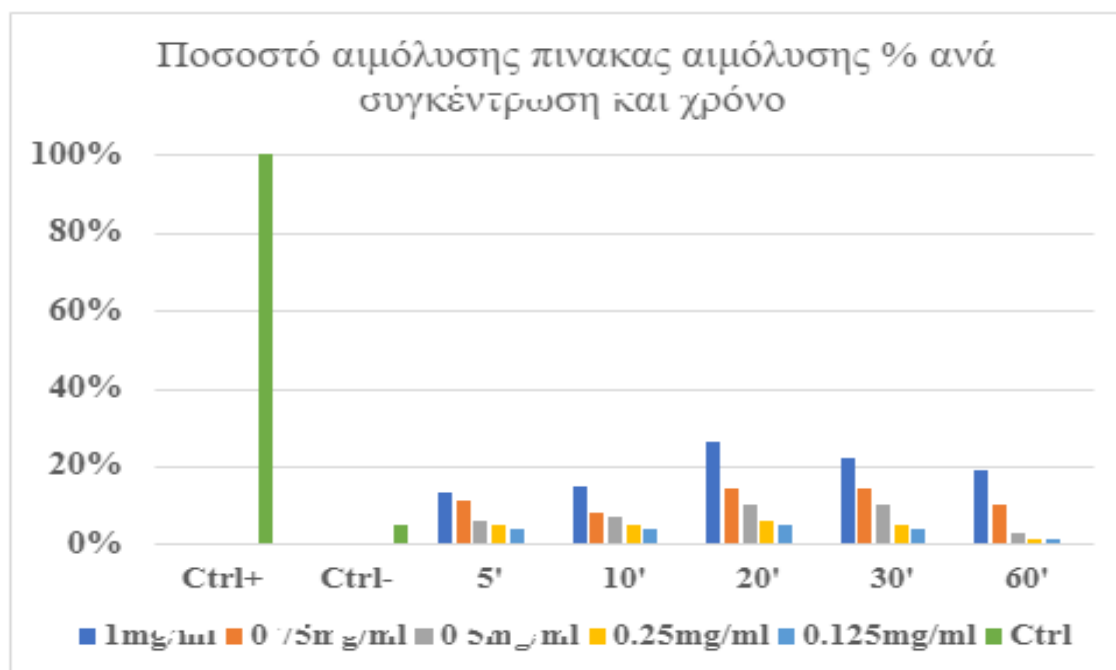


Γράφημα 4: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση και χρόνο μετά από υπερήχηση του υλικού των NP στους 70°C

Στο επόμενο πείραμα το υλικό των Νανοδομημάτων υποβλήθηκε σε υπερήχους σε λουτρό (bath sonication) σε διαφορετικούς χρόνους για 5,10,20, 30 και 60 λεπτά και θερμοκρασία 37°C και τοποθετήθηκε έπειτα σε μέρος του εναιωρήματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1mg/mL, 0.75mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL, 0.125mg/mL) και επωάστηκε για 48 ώρες. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 7 και στο γράφημα 5.

Χρόνος / Συγκέντρωση		1mg/ml	0.75mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg/ml	0.125mg/ml
Ctrl+	100%					
Ctrl-	5%					
5'		13%	11%	6%	5%	4%
10'		15%	8%	7%	5%	4%
20'		26%	14%	10%	6%	5%
30'		22%	14%	10%	5%	4%
60'		19%	10%	3%	1%	1%

Πίνακας 7: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση και χρόνο μετά από υπερήχηση του υλικού των NP στους 37°C και επώαση για 48 ώρες.



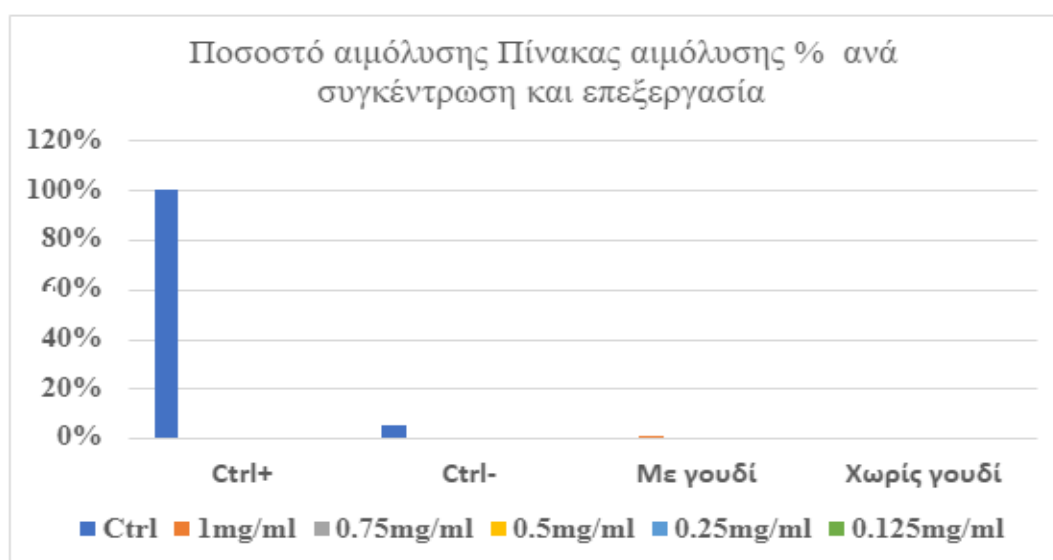
Γράφημα 5: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση και χρόνο μετά από υπερήχηση του υλικού των NP στους 37°C και επώαση για 48 ώρες.

Στο επόμενο πείραμα η σκόνη των νανοσωματιδίων τοποθετήθηκε σε γουδί, δέχτηκε 50 ήπιες πιέσεις και παρασκευάστηκε διάλυμα με PBS 1x με συγκέντρωση 5mg/mL, ενώ παρασκευάστηκε και ένα δεύτερο διάλυμα των νανοσωματιδίων με PBS 1x χωρίς να δεχτεί τις πιέσεις από το γουδί προκειμένου να δούμε αν θα υπάρχει διαφορά στην συμβατότητα. Στη συνέχεια τα διαλύματα προστέθηκαν σε μέρος του εναιωρήματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1mg/mL, 0.75mg/mL, 0.5mg/mL,

0.25mg/mL, 0.125mg/mL) και επώαστηκαν για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 8 και το γράφημα 6 .

Επεξεργασία / Συγκέντρωση		1mg/ml	0.75mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg/ml	0.125mg/ml
Ctrl+	100%					
Ctrl-	5%					
Με γουδί		1%	0%	0%	0%	0%
Χωρίς γουδί		0%	0%	0%	0%	0%

Πίνακας 8 : Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση και επεξεργασία.

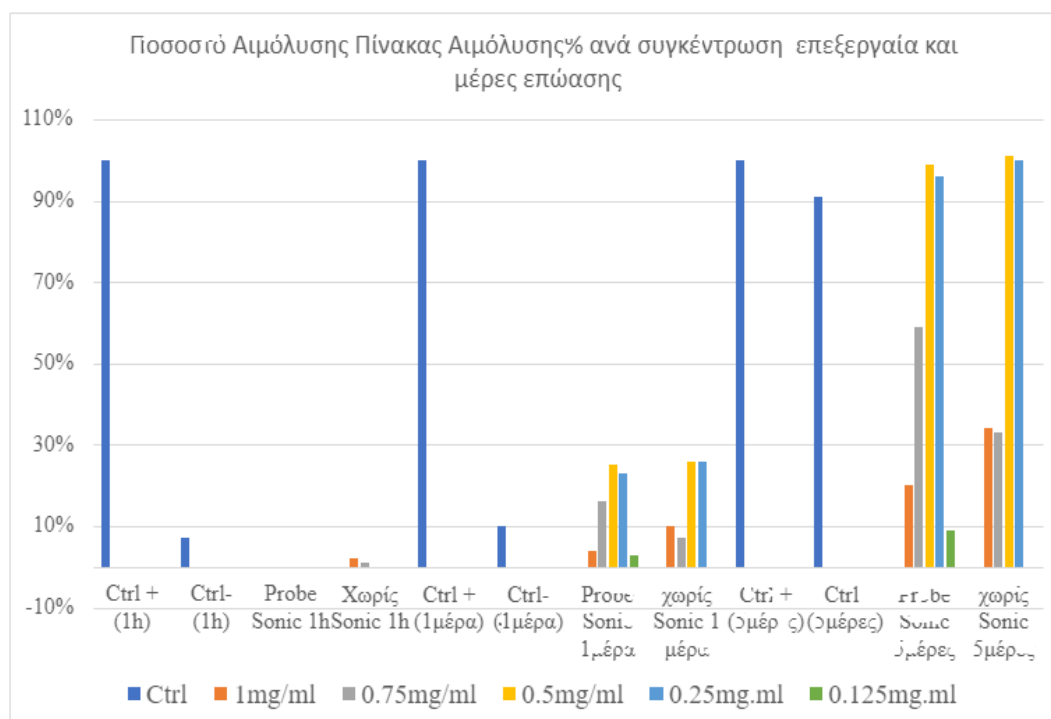


Γράφημα 6: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε ανά συγκέντρωση και επεξεργασία.

Σε ένα επόμενο πείραμα παρασκευάστηκε διάλυμα των NP με PBS 1x με συγκέντρωση 5mg/mL και υποβλήθηκε σε υπερήχους με ηχητικό ανιχνευτή (probe sonicator) για 30 λεπτά. Έπειτα από μια ώρα το διάλυμα τοποθετήθηκε σε μέρος του εναιωρήματος των ερυθρών με PBS 1x (με τελική συγκέντρωση ερυθρών 5%) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1mg/mL, 0.75mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL, 0.125mg/mL). Ταυτόχρονα παρασκευάστηκε ένα δεύτερο διάλυμα NP με PBS 1x με συγκέντρωση 5mg/mL, το οποίο δεν είχε υποβληθεί στην διαδικασία του probe sonication και τοποθετήθηκε στο εναιώρημα με τα πλυμένα ερυθρά και PBS στις ίδιες συγκεντρώσεις. Στην συνέχεια έγινε επώαση των δειγμάτων και μέτρηση μετά από 1 ώρα, 24 ώρες και 5 ημέρες. Σκοπός του πειράματος ήταν η διερεύνηση εάν η υπερήχηση του υλικού με ηχητικό ανιχνευτή θα παρουσιάζει διαφορές στην αιμόλυση. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον Πίνακα 9 και Γράφημα 7.

	Ctrl	1mg/ml	0.75mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg.ml	0.125mg.ml
Ctrl + (1h)	100%					
Ctrl- (1h)	7%					
Probe Sonic 1h		0%	0%	0%	0%	0%
Χωρίς Sonic 1h		2%	1%	0%	0%	0%
Ctrl + (1μέρα)	100%					
Ctrl- (1μέρα)	10%					
Probe Sonic 1μέρα		4%	16%	25%	23%	3%
χωρίς Sonic 1 μέρα		10%	7%	26%	26%	0%
Ctrl + (5μέρες)	100%					
Ctrl- (5μέρες)	91%					
Probe Sonic 5μέρες		20%	59%	99%	96%	9%
χωρίς Sonic 5μέρες		34%	33%	100%	100%	0%

Πίνακας 9: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε στα διαλύματα ερυθρών αιμοσφαιρίων -NP ανά συγκέντρωση, επεξεργασία και μέρες επώασης.



Γράφημα 7: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε στα διαλύματα ερυθρών αιμοσφαιρίων -NP ανά συγκέντρωση, επεξεργασία και μέρες επώασης.

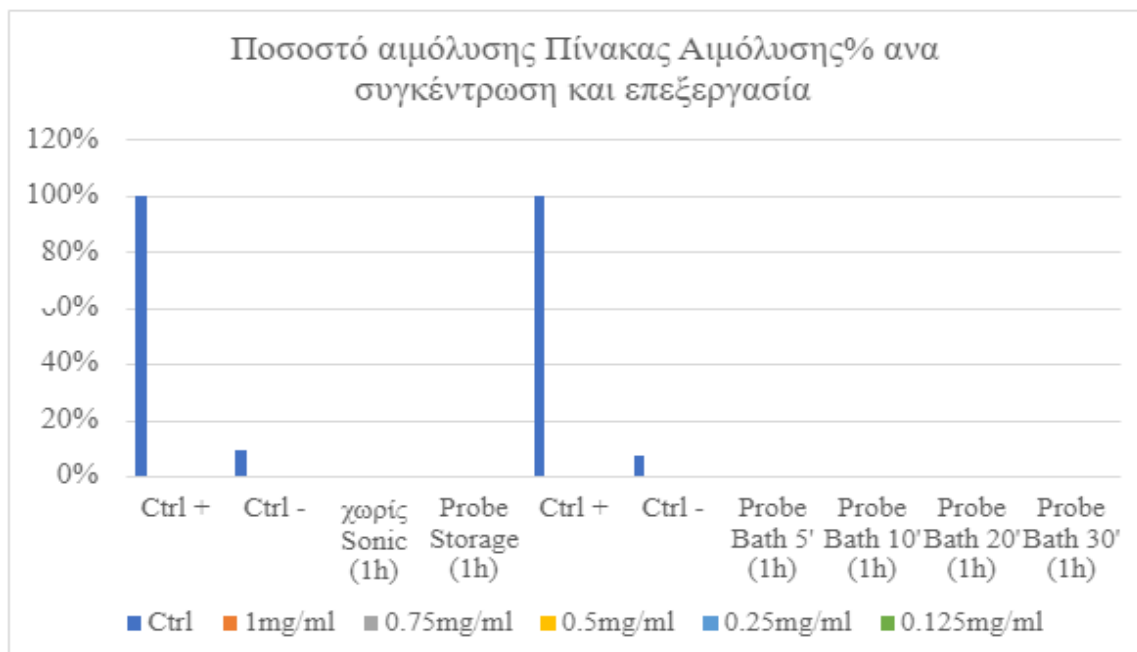
Στο τελευταίο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα των NP που είχαν υποστεί probe sonication και είχε διατηρηθεί στο ψυγείο για μια εβδομάδα και τοποθετήθηκε σε μέρος του εναιωρήματος των πλυμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων με PBS 1x (με τελική συγκέντρωση ερυθρών 5%) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1mg/mL, 0.75mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL, 0.125mg/mL). Ταυτόχρονα παρασκευάστηκε ένα δεύτερο διάλυμα NP με PBS 1x με συγκέντρωση 5mg/mL, το οποίο δεν είχε υποβληθεί σε καμία διαδικασία υπερήχων και τοποθετήθηκε σε μέρος του εναιωρήματος με τα πλυμένα ερυθρά και PBS στις ίδιες συγκεντρώσεις. Τα δείγματα επώαστηκαν στον κλίβανο στους 37°C για 1 ώρα και 24 ώρες.

Παράλληλα, το διάλυμα των NP που είχε υποστεί probe sonication και είχε διατηρηθεί στο ψυγείο τοποθετήθηκε στο λουτρό υπερήχων (bath sonication) για 5, 10, 20 και 30 λεπτά. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε μέρος του εναιωρήματος των πλυμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων με PBS 1x (με τελική συγκέντρωση ερυθρών 5%) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (1mg/mL, 0.75mg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL, 0.125mg/mL), και όλα τα δείγματα επώαστηκαν επίσης στον κλίβανο στους 37°C για 1 ώρα και 24 ώρες.

Τα αποτελέσματα παρατίθενται στους Πίνακες 10 & 11 και στα γραφήματα 8 & 9.

	Ctrl	1mg/ml	0.75mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg/ml	0.125mg/ml
Ctrl +	100%					
Ctrl -	9%					
χωρίς Sonic (1h)		0%	0%	0%	0%	0%
Probe Storage (1h)		0%	0%	0%	0%	0%
Ctrl +	100%					
Ctrl -	7%					
Probe Bath 5' (1h)		0%	0%	0%	0%	0%
Probe Bath 10' (1h)		0%	0%	0%	0%	0%
Probe Bath 20' (1h)		0%	0%	0%	0%	0%
Probe Bath 30' (1h)		0%	0%	0%	0%	0%

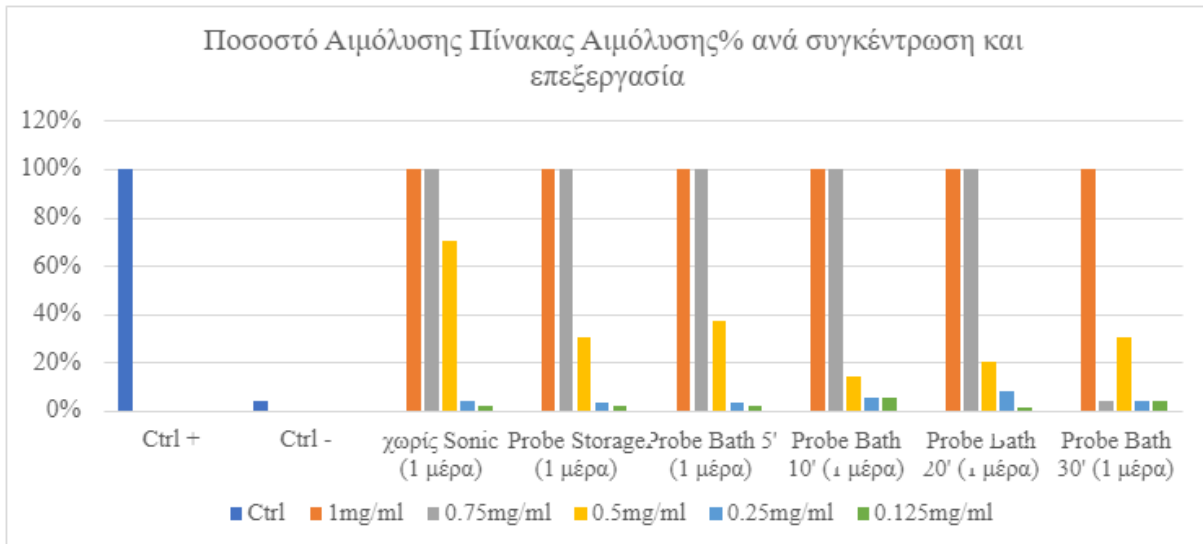
Πίνακας 10: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε στα διαλύματα ερυθρών αιμοσφαιρίων -NP ανά συγκέντρωση και επεξεργασία μετά από 1 ώρα επώασης.



Γράφημα 8: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε στα διαλύματα ερυθρών αιμοσφαιρίων -NP ανά συγκέντρωση και επεξεργασία μετά από 1 ώρα επώασης.

	Ctrl	1mg/ml	0.75mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg/ml	0.125mg/ml
Ctrl +	100%					
Ctrl -	4%					
χωρίς Sonic (1 μέρα)		100%	100%	70%	4%	2%
Probe Storage (1 μέρα)		100%	100%	30%	3%	2%
Probe Bath 5' (1 μέρα)		100%	100%	37%	3%	2%
Probe Bath 10' (1 μέρα)		100%	100%	14%	5%	5%
Probe Bath 20' (1 μέρα)		100%	100%	20%	8%	1%
Probe Bath 30' (1 μέρα)		100%	4%	30%	4%	4%

Πίνακας 11: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε στα διαλύματα ερυθρών αιμοσφαιρίων -NP ανά συγκέντρωση και επεξεργασία μετά από 1 ημέρα επώασης.



Γράφημα 9: Ποσοστό αιμόλυσης που παρουσιάστηκε στα διαλύματα ερυθρών αιμοσφαιρίων -NP ανά συγκέντρωση και επεξεργασία μετά από 1 ημέρα επώασης.

Κεφάλαιο 6. Συζήτηση

Παρόμοιες μελέτες οι οποίες να αναφέρουν τις αλληλεπιδράσεις και την συμβατότητα των νανοσωματιδίων με συστατικά του αίματος, αλλά και το πως ο Νανοακερμανίτης χρησιμοποιείται σε αρκετές διαδικασίες βρέθηκαν ανά τον κόσμο και αναλύονται παρακάτω.

Ο ακερμανίτης είναι ένα υλικό το οποίο χρησιμοποιείται στην οδοντιατρική στην προσθετική αποκατάσταση με όψεις πορσελάνης. Μελέτες επίσης έχουν δείξει πως ο ακερμανίτης διαθέτει αναπλαστικές ιδιότητες καθώς οι Lunguo Xia et al., έδειξαν ότι ο ακερμανίτης θα μπορούσε να καταστείλει τον σχηματισμό οστεοκλαστών, με σημαντικές τις επιδράσεις των ιόντων Mg και Si στην οστεογένεση, την αγγειογένεση και την οστεοκλαστογένεση, ενώ τον χαρακτηρίζουν σαν ένα πολλά υποσχόμενο βιοϋλικό για την οστεοπορωτική αναγέννηση των οστών. [117,118]

Μια άλλη μελέτη των Fangfang Wang et al., αναφέρει πως το βιοκεραμικό ακερμανίτης ενισχύει την επούλωση των τραυμάτων με επιταχυνόμενη επαναεπιθηλιοποίηση προάγοντας τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη δημιουργία βλαστών των επιδερμικών κυττάρων. Χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα ποντικών με έγκαυμα, και η τοπική θεραπεία με ακερμανίτη επιτάχυνε σημαντικά την επούλωση του τραύματος, προώθησε τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων, διατηρώντας περισσότερα κύτταρα στις φάσεις S και G2/M του κυτταρικού κύκλου. [119]

Την σημασία του φρέσκου αίματος κατά την διαδικασία της αιμοσυμβατότητας τονίζει η ερευνητική ομάδα των Sjoerd Leendert Johannes Blok et al., καθώς παρατήρησαν πως η αποθήκευση του αίματος σε θερμοκρασία δωματίου για έως και 4 ώρες επηρεάζει συγκεκριμένα αιμοπετάλια και λευκά αιμοσφαίρια.

Παρατήρησαν ότι η αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου για έως και 4 ώρες επηρεάζει συγκεκριμένα αιμοπετάλια και λευκά αιμοσφαίρια. Αν και η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και η λειτουργία των αιμοπεταλίων επηρεάστηκαν μετρίως, η ενεργοποίηση των λευκών αιμοσφαιρίων ήταν παρόμοια με την ενεργοποίηση που μετρήθηκε στο αίμα που είχε κυκλοφορήσει σε κυκλώματα PVC. Η στάσιμη αποθήκευση ολικού αίματος σε θερμοκρασία δωματίου έως και 4 ώρες πριν από την έναρξη των δοκιμών αιμοσυμβατότητας φαίνεται δυσμενής. Συγκεκριμένα, το αίμα από υγιείς εθελοντές συλλέχθηκε και αναλύθηκε με ελάχιστη καθυστέρηση, μετά από 30 λεπτά και μετά από 60 λεπτά αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου, 30 και 37°C. Επιπλέον, το αίμα αναλύθηκε μετά από 1, 2 ή 4 ώρες αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου. Ο αριθμός των αιμοπεταλίων, ο μέσος όγκος των αιμοπεταλίων, η ικανότητα δέσμευσης αιμοπεταλίων στο κολλαγόνο και η θρομβοξάνη B2 μετρήθηκαν για την αξιολόγηση της λειτουργίας των αιμοπεταλίων, το σύμπλεγμα συμπληρώματος C5b-9 και η ελαστάση μετρήθηκαν για την αξιολόγηση της ενεργοποίησης του συστήματος φλεγμονώδους απόκρισης και η θρομβίνη-αντιθρομβίνη III μετρήθηκε για την αξιολόγηση της ενεργοποίησης της πήξης. Επιπλέον, η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη μετρήθηκε σε πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια ως δείκτης βλάβης των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Τα αποτελέσματά τους δείχνουν ότι η βραχυπρόθεσμη αποθήκευση ηπαρινισμένου ολικού αίματος επηρεάζει σημαντικά τους βιοδείκτες με την πάροδο του χρόνου, ειδικά στους 30 και 37 C σε σύγκριση με τη θερμοκρασία δωματίου. Ωστόσο, επηρεάζεται επίσης το αίμα που αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 4 ώρες. Ειδικότερα, η λειτουργία των αιμοπεταλίων και η δραστηριότητα των λευκών αιμοσφαιρίων επηρεάζονται σημαντικά μετά από 4 ώρες στάσιμης αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου. Ως εκ τούτου, οι συγγραφείς προτείνουν ότι οι εξετάσεις αιμοσυμβατότητας θα πρέπει να ξεκινούν εντός 4 ωρών από τη συλλογή αίματος, με βέλτιστο χρόνο τις 2 ώρες. [120]

Τέλος η ίδια ομάδα των Sjoerd Leendert Johannes Blok et al., μελέτησαν τον βέλτιστο χρόνο επώασης για τον *in vitro* έλεγχο αιμοσυμβατότητας μέσω του μοντέλου Haemobile. Για να αποσαφηνιστεί ο βέλτιστος χρόνος επώασης για τον *in vitro* έλεγχο αιμοσυμβατότητας, χρησιμοποιήσαμε το μοντέλο κυκλοφορίας Haemobile με ανθρώπινο πλήρες αίμα. Το αίμα από υγιείς εθελοντές επώαστηκε *in vitro* υπό παλμική ροή με φυσιολογικές συνθήκες διατημητικής τάσης τοιχώματος στους 37°C για 30, 60, 120 ή 240 λεπτά. Δοκιμαστικοί βρόχοι που περιείχαν πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας και πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο χρησίμευαν ως υλικά χαμηλής και υψηλής αναφοράς, δηλαδή αιμοσυμβατά και αιμοσυμβατά βιοϋλικά, αντίστοιχα. Επιπλέον, οι κενοί βρόχοι χρησίμευσαν ως αρνητική αναφορά. Συγκρίθηκαν η θρομβογένεση, η λειτουργία των αιμοπεταλίων, η φλεγμονώδης απόκριση, η πήξη και η αιμόλυση μεταξύ των αναφορών και των χρόνων επώασης.

Συμπερασματικά, υποστηρίζουν ότι οι *in vitro* επώσεις για αξιολογήσεις αιμοσυμβατότητας που χρησιμοποιούν μοντέλα κυκλοφορίας με ανθρώπινο πλήρες αίμα στους 37°C πρέπει να διαρκούν 60 λεπτά. [121]

Κεφάλαιο 7. Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα ανωτέρω αποτελέσματα συμπεραίνουμε πως το υλικό του νανοακερμανίτη δεν είναι συμβατό με τα ερυθρά αιμοσφαίρια σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Συγκεκριμένα, στο πρώτο πείραμα τα δείγματα στην πλάκα κυτταροκαλλιέργειας παρουσιάζουν περισσότερη αιμόλυση σε σχέση με τα erperdorf. Από αυτό συμπεραίνουμε πως η διαδικασία στα erpendorf είναι βέλτιστη σε σχέση με την πλάκα.

Η διαδικασία της υπερήχησης του υλικού σε λουτρό στους 37°C έδειξε πολύ υψηλά ποσοστά αιμόλυσης σε όλους τους χρόνους, με τα υψηλότερα να βρίσκονται στην μεσαία συγκέντρωση (0.5mg/ml). Αυτό συμβαίνει διότι το υλικό παρουσιάζει συσσωματώματα τα οποία με την υπερήχηση σπάνε και τα νανοσωματίδια προσροφώνται καλύτερα στο ερυθρό αιμοσφαίριο και προκαλούν λύση. Στην μικρότερη συγκέντρωση το ποσοστό αιμόλυσης ήταν μέσα στα όρια, αυτό μας δείχνει πως το υλικό μας και κατ'επέκταση η αιμόλυση που προκαλεί εξαρτάται από την συγκέντρωση.

Στο επόμενο πείραμα και την υπερήχηση του υλικού σε λουτρό στους 50°C είχαμε το ίδιο μοτίβο με τα υψηλότερα ποσοστά αιμόλυσης να βρίσκονται στην μεσαία συγκέντρωση (0.5mg/ml), ενώ το ποσοστό αιμόλυσης στην μικρότερη συγκέντρωση (0.125mg/ml) αυξήθηκε σε σχέση με το προηγούμενο πείραμα.

Στην διαδικασία υπερήχησης του υλικού σε λουτρό στους 70°C έχουμε πάλι το ίδιο μοτίβο με τα υψηλότερα ποσοστά αιμόλυσης να βρίσκονται στην μεσαία συγκέντρωση (0.5mg/ml), και την αύξηση του ποσοστού αιμόλυσης στην μικρότερη συγκέντρωση (0.125mg/ml), συμπεραίνοντας πως η θερμοκρασία στην υπερήχηση κάνει το υλικό μας ακόμα πιο αιμολυτικό.

Στο πείραμα της υπερήχησης του υλικού των NP στους 37°C και επώαση για 48 ώρες παρατηρούμε πως τα 60 λεπτά επώασης δεν προσδίδουν κάποια παραπάνω αιμολυτική δράση στο δείγμα μας, αντίθετα το ποσοστό αιμόλυσης μειώνεται, ενώ υψηλότερα ποσοστά αιμόλυσης παρατηρούνται στα 20 λεπτά υπερήχησης.

Στη επεξεργασία του δείγματος με γουδί βλέπουμε πως το γουδί δεν διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην αιμόλυση καθώς και τα δύο υλικά παρουσιάζουν την ίδια αιμόλυση. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως όλα τα δείγματα έχουν μηδενική αιμόλυση.

Στο επόμενο πείραμα με τον ηχητικό ανιχνευτή παρατηρούμε πως μετά από 1 ώρα επώασης δεν υπάρχει αιμόλυση στα δείγματα, ενώ μετά από 1 ημέρα παρατηρείται μέγιστη αιμόλυση στην μεσαία συγκέντρωση (0.5mg/ml) και υψηλότερα ποσοστά αιμόλυσης στο δείγμα που δεν είχε υποστεί υπερήχηση. Αυτό συμβαίνει καθώς στο δείγμα χωρίς υπερήχηση μπορεί να υπάρχουν μεγαλύτερα κομμάτια των νανοσωματιδίων τα οποία αλληλεπιδρούν με τα ερυθρά αιμοσφαίρια και προκαλούν λύση της μεμβράνης. Ο ηχητικός ανιχνευτής (probe sonicator) από την άλλη φάνηκε ότι σπάει τα νανοσωματίδια και διευκολύνει την είσοδο στα κύτταρα, προκαλώντας την καταστροφή τους. Στις 5 ημέρες επώασης παρατηρούμε πως συμβαίνει το ίδιο καθώς υπάρχει μέγιστη αιμόλυση στην μεσαία συγκέντρωση (0.5mg/ml).

Στο τελευταίο πείραμα παρατηρούμε επίσης πως μετά την μια ώρα επώασης δεν υπάρχει αιμόλυση σε κανένα δείγμα, ενώ την επόμενη μέρα στις υψηλές συγκεντρώσεις έχουμε 100% αιμόλυση, η οποία μειώνεται όσο μικραίνουν οι συγκεντρώσεις. Αυτό το γεγονός μας δείχνει ότι η αιμολυτική ικανότητα του υλικού μας εξαρτάται από την ποσότητα.

Βιβλιογραφία

- [1] Saini, R., Saini, S. and Sharma, S. (2010). Nanotechnology: The future medicine. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, [online] 3(1), p.32. doi:10.4103/0974-2077.63301.
- [2] Silva, G.A. (2004). Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surgical Neurology*, 61(3), pp.216–220. doi:10.1016/j.surneu.2003.09.036.
- [3] Europa.eu. (2019). 1. What is nanotechnology? [online]
- [4] Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M. and Rizzolio, F. (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, [online] 25(1), p.112. doi:10.3390/molecules25010112.
- [5] National Nanotechnology Initiative (2019). What is Nanotechnology? [online] Nano.gov.
- [6] Feynman R.P. (1960) There’s plenty of room at the bottom. *Eng. Sci.* ;23:22–36.
- [7] Taniguchi N., Arakawa C., Kobayashi T.(1974) On the basic concept of nano-technology; Proceedings of the International Conference on Production Engineering; Tokyo, Japan. 26–29 August
- [8] National Nanotechnology Initiative (n.d.). Applications of Nanotechnology | National Nanotechnology Initiative. [online] www.nano.gov.
- [9] Sarno, M. (2020). Chapter 22 - Nanotechnology in energy storage: the supercapacitors. [online] ScienceDirect.
- [10] Zdrojewicz, Z., Waracki, M., Bugaj, B., Pypno, D. and Cabała, K. (2015). Medical applications of nanotechnology. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, [online] 69, pp.1196–1204. doi:10.5604/17322693.1177169.
- [11] Pelaz, B., Alexiou, C., Alvarez-Puebla, R.A., Alves, F., Andrews, A.M., Ashraf, S., Balogh, L.P., Ballerini, L., Bestetti, A., Brendel, C., Bosi, S., Carril, M., Chan, W.C.W., Chen, C., Chen, X., Chen, X., Cheng, Z., Cui, D., Du, J. and Dullin, C. (2017). Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano*, [online] 11(3), pp.2313–2381. doi:10.1021/acsnano.6b06040.
- [12] Soo Park, K., Sun, X., Aikins, M.E. and Moon, J.J. (2020). Non-viral COVID-19 vaccine delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. [online] doi:10.1016/j.addr.2020.12.008

- [13] Debele, T.A., Yeh, C.-F. and Su, W.-P. (2020). Cancer Immunotherapy and Application of Nanoparticles in Cancers Immunotherapy as the Delivery of Immunotherapeutic Agents and as the Immunomodulators. *Cancers*, 12(12), p.3773. doi:10.3390/cancers12123773
- [14] Raza, H. (2019). *Nanoelectronics fundamentals : materials, devices and systems*. Cham, Switzerland: Springer.
- [15] Murthy, S.K. (2007). Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. *International journal of nanomedicine*, [online] 2(2), pp.129–41.
- [16] Mehlhorn, H. (2016). Nanoparticles – Definitions. *Nanoparticles in the Fight Against Parasites*, pp.1–14. doi:10.1007/978-3-319-25292-6_1.
- [17] TWI (2021). What are Nanoparticles? Definition, Size, Uses and Properties. [online]
- [18] Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.-H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M. and Schué, F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, [online] 84(2), pp.377–410. doi:10.1351/pac-rec-10-12-04.
- [19] Anu Mary Ealia, S. and Saravanakumar, M.P. (2017). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263(3), p.032019. doi:10.1088/1757-899x/263/3/032019
- [20] Assessment R 2007 Nanoparticles in the Environment
- [21] Cho E J, Holback H, Liu K C, Abouelmagd S A, Park J and Yeo Y (2013). Nanoparticle characterization : State of the art , challenges , and emerging technologies
- [22] Machado S, Pacheco J G, Nouws H P A, Albergaria J T and Delerue-Matos C (2015). Characterization of green zero-valent iron nanoparticles produced with tree leaf extracts *Sci. Total Environ.* 533 76–81
- [23] Joudeh, N. and Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1). doi:10.1186/s12951-022-01477-8.
- [24] Kolahalam, L.A., Kasi Viswanath, I.V., Diwakar, B.S., Govindh, B., Reddy, V. and Murthy, Y.L.N. (2019). Review on nanomaterials: Synthesis and applications. *Materials Today: Proceedings*, 18, pp.2182–2190. doi:10.1016/j.matpr.2019.07.371.
- [25] Tiwari D K, Behari J and Sen P (2008). Application of Nanoparticles in Waste Water Treatment. 3 417–33

- [26] Pan, K. and Zhong, Q. (2016). Organic Nanoparticles in Foods: Fabrication, Characterization, and Utilization. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7(1), pp.245–266. doi:10.1146/annurev-food-041715-033215.
- [27] Ng, K.K. and Zheng, G. (2015). Molecular Interactions in Organic Nanoparticles for Phototheranostic Applications. *Chemical Reviews*, 115(19), pp.11012–11042. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00140.
- [28] Long, C.M., Nascarella, M.A. and Valberg, P.A. (2013). Carbon black vs. black carbon and other airborne materials containing elemental carbon: Physical and chemical distinctions. *Environmental Pollution*, 181, pp.271–286. doi:10.1016/j.envpol.2013.06.009.
- [29] Dresselhaus, M.S., Dresselhaus, G. and Eklund, P.C. (1993). Fullerenes. *Journal of Materials Research*, 8(8), pp.2054–2097. doi:10.1557/jmr.1993.2054.
- [30] Yuan, X., Zhang, X., Sun, L., Wei, Y. and Wei, X. (2019). Cellular Toxicity and Immunological Effects of Carbon-based Nanomaterials. *Particle and Fibre Toxicology*, [online] 16(1). doi:10.1186/s12989-019-0299-z.
- [31] Lu, K.-Q., Quan, Q., Zhang, N. and Xu, Y.-J. (2016). Multifarious roles of carbon quantum dots in heterogeneous photocatalysis. *Journal of Energy Chemistry*, [online] 25(6), pp.927–935. doi:10.1016/j.jechem.2016.09.015.
- [32] Toshima, N. and Yonezawa, T. (1998). Bimetallic nanoparticles—novel materials for chemical and physical applications. *New Journal of Chemistry*, 22(11), pp.1179–1201. doi:10.1039/a805753b.
- [33] Thomas, S.C., Harshita, Mishra, P.K. and Talegaonkar, S. (2015). Ceramic Nanoparticles: Fabrication Methods and Applications in Drug Delivery. *Current pharmaceutical design*, [online] 21(42), pp.6165–88. doi:10.2174/1381612821666151027153246.
- [34] Khan, I., Saeed, K. and Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7). doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011.
- [35] Mann, S., Burkett, S.L., Davis, S.A., Fowler, C.E., Mendelson, N.H., Sims, S.D., Walsh, D. and Whilton, N.T. (1997). Sol–Gel Synthesis of Organized Matter. *Chemistry of Materials*, 9(11), pp.2300–2310. doi:10.1021/cm970274u.
- [36] Nasimi, P. and Haidari, M. (2013). Medical Use of Nanoparticles. *International Journal of Green Nanotechnology*, 1, p.194308921350697. doi:10.1177/1943089213506978.

- [37] Tai, C.Y., Tai, C.-T., Chang, M.-H. and Liu, H.-S. (2007). Synthesis of Magnesium Hydroxide and Oxide Nanoparticles Using a Spinning Disk Reactor. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46(17), pp.5536–5541. doi:10.1021/ie060869b.
- [38] Mohammadi, S., Harvey, A. and Boodhoo, K.V.K. (2014). Synthesis of TiO₂ nanoparticles in a spinning disc reactor. *Chemical Engineering Journal*, 258, pp.171–184. doi:10.1016/j.cej.2014.07.042.
- [39] Bhaviripudi, S., Mile, E., Steiner, S.A., Zare, A.T., Dresselhaus, M.S., Belcher, A.M. and Kong, J. (2007). CVD Synthesis of Single-Walled Carbon Nanotubes from Gold Nanoparticle Catalysts. *Journal of the American Chemical Society*, 129(6), pp.1516–1517. doi:10.1021/ja0673332.
- [40] Baig, N., Kammakakam, I. and Falath, W. (2021). Nanomaterials: a review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances*, 2(6), pp.1821–1871. doi:10.1039/d0ma00807a.
- [41] D’Amato, R., Falconieri, M., Gagliardi, S., Popovici, E., Serra, E., Terranova, G. and Borsella, E. (2013). Synthesis of ceramic nanoparticles by laser pyrolysis: From research to applications. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104, pp.461–469. doi:10.1016/j.jaap.2013.05.026.
- [42] Prasad Yadav, T., Manohar Yadav, R. and Pratap Singh, D. (2012). Mechanical Milling: a Top Down Approach for the Synthesis of Nanomaterials and Nanocomposites. *Nanoscience and Nanotechnology*, 2(3), pp.22–48. doi:10.5923/j.nn.20120203.01.
- [43] Salavati-Niasari, M., Davar, F. and Mir, N. (2008). Synthesis and characterization of metallic copper nanoparticles via thermal decomposition. *Polyhedron*, 27(17), pp.3514–3518. doi:10.1016/j.poly.2008.08.020.
- [44] Shah, P. and Gavrin, A. (2006). Synthesis of nanoparticles using high-pressure sputtering for magnetic domain imaging. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 301(1), pp.118–123. doi:10.1016/j.jmmm.2005.06.023.
- [45] Liu, W.-T. (2006). Nanoparticles and their biological and environmental applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(1), pp.1–7. doi:10.1263/jbb.102.1.
- [46] Laad, M. and Jatti, V.K.S. (2018). Titanium oxide nanoparticles as additives in engine oil. *Journal of King Saud University - Engineering Sciences*, 30(2), pp.116–122. doi:10.1016/j.jksues.2016.01.008.

- [47] Doleyres, Y. (2020). Benefits of Branched Polymeric Nanoparticles for Enhanced Targeted Drug Delivery. *Nanomedicine & Nanotechnology Open Access*, 5(3). doi:10.23880/nnoa-16000187.
- [48] Rizvi, S.A.A. and Saleh, A.M. (2018). Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(1), pp.64–70. doi:10.1016/j.jsps.2017.10.012.
- [49] Nam, N.H. and Luong, N.H. (2019). Nanoparticles: synthesis and applications. *Materials for Biomedical Engineering*, pp.211–240. doi:10.1016/b978-0-08-102814-8.00008-1.
- [50] OneBlood and Solodev (2018). What is Blood? | OneBlood. [online]
- [51] American Society of Hematology (2021). Blood Basics. [online]
- [52] Schwartz, R.S. and C. Lockard Conley (2019). blood | Definition, Composition, & Functions. In: *Encyclopædia Britannica*.
- [53] Felman, A. (2017). Blood: Components, functions, groups, and disorders. [online]
- [54] National Cancer Institute (2019). NCI Dictionary of Cancer Terms. [online] National Cancer Institute.
- [55] Cleveland Clinic (2021). Red Blood Cells: Function & Role. [online]
- [56] Biga, L.M., Dawson, S., Harwell, A., Hopkins, R., Kaufmann, J., LeMaster, M., Matern, P., Morrison-Graham, K., Quick, D. and Runyeon, J. (2019). 18.3 Erythrocytes. [online]
- [57] Smith, C. (2022). Erythropoiesis - Process - Regulation. [online]
- [58] PÜNTENER, A. G., & SCHLESINGER, U. (2000). Natural Dyes. *Colorants for Non-Textile Applications*, 382–455. doi:10.1016/b978-044482888-0/50040-4
- [59] Ouellette, R. J., & Rawn, J. D. (2018). Amino Acids, Peptides, and Proteins. *Organic Chemistry*, 929–971. doi:10.1016/b978-0-12-812838-1.50029-3
- [60] Krieger, G. R., & Philips, S. D. (2005). Blood. *Encyclopedia of Toxicology*, 323–329. doi:10.1016/b0-12-369400-0/00141-1
- [61] Gell, D.A. (2018). Structure and function of haemoglobins. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, [online] 70, pp.13–42. doi:10.1016/j.bcnd.2017.10.006.
- [62] Cleveland Clinic. (2022). Erythropoiesis: What It Is & Process Stages.
- [63] Singh, A. K. (2018). Erythropoiesis. *Textbook of Nephro-Endocrinology*, 207–215. doi:10.1016/b978-0-12-803247-3.00012-x

- [64] Encyclopedia Britannica. (2023). Blood - Production of red blood cells (erythropoiesis). [online]
- [65] Biga, L.M., Dawson, S., Harwell, A., Hopkins, R., Kaufmann, J., LeMaster, M., Matern, P., Morrison-Graham, K., Quick, D. and Runyeon, J. (2019). 18.4 Leukocytes and Platelets. [online]
- [66] University of Rochester Medical Center (2019). What Are White Blood Cells? - Health Encyclopedia - University of Rochester Medical Center. [online] Rochester.edu.
- [67] Monga I, Kaur K, Dhanda S (March 2022). "Revisiting hematopoiesis: applications of the bulk and single-cell transcriptomics dissecting transcriptional heterogeneity in hematopoietic stem cells". *Briefings in Functional Genomics*. 21 (3): 159–176. doi:10.1093/bfpg/elac002. PMID 35265979.
- [68] Alberts B, Johnson A, Lewis M, Raff M, Roberts K, Walter P (2002). "Leukocyte also known as macrophages functions and percentage breakdown". *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). New York: Garland Science. ISBN 0-8153-4072-9.
- [69] Cleveland Clinic (2021). White Blood Cells: What Are They, Normal Ranges, Role & Function. [online]
- [70] Machlus, K.R., Thon, J.N. and Italiano, J.E. (2014). Interpreting the developmental dance of the megakaryocyte: a review of the cellular and molecular processes mediating platelet formation. *British Journal of Haematology*, 165(2), pp.227–236. doi:10.1111/bjh.12758.
- [71] Berridge, M.J. (2014). Module 11: Cell Stress, Inflammatory Responses and Cell Death. *Cell Signalling Biology*, doi:10.1042/csb0001011.
- [72] Williams, M. (2021). What are Platelets and Why are They Important? [online] www.hopkinsmedicine.org.
- [73] University of Rochester Medical Center (2019). What Are Platelets? - Health Encyclopedia - University of Rochester Medical Center.
- [74] Cleveland Clinic. (2022). Platelets: What Is Their Function & Why Are They Important. [online]
- [75] Karpac, C. (2011). Platelets. [online]
- [76] Mayo Clinic (2018). Thrombocytopenia (low Platelet count) - Symptoms and Causes. [online] Mayo Clinic.

- [77] Medlineplus (2019). Platelet Disorders. [online] Medlineplus.gov.
- [78] Bhatt, A., P Nair, R., R. R., Raju, R., Geeverghese, R. and P, L. (2022). 17 - Product evaluation: blood compatibility studies. [online]
- [79] Pidhatika, B. (2019). Hemocompatibility study of surface-attached antibiofouling polymer monolayers. *Journal of Physics: Conference Series*, 1282, p.012069. doi:10.1088/1742-6596/1282/1/012069.
- [80] Maitz, M. F., Sperling, C., Wongpinyochit, T., Herklotz, M., Werner, C., & Seib, F. P. (2017). Biocompatibility assessment of silk nanoparticles: hemocompatibility and internalization by human blood cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(8), 2633–2642. doi:10.1016/j.nano.2017.07.012
- [81] Fedel, M. (2020). Hemocompatibility of Carbon Nanostructures. C — *Journal of Carbon Research*, 6(1), p.12. doi:10.3390/c6010012.
- [82] P.V. Mohanan (2022). *Biomedical Product and Materials Evaluation*. Woodhead Publishing.
- [83] Paula, A.J., Martinez, D.S.T., Araujo Júnior, R.T., Souza Filho, A.G. and Alves, O.L. (2012). Suppression of the hemolytic effect of mesoporous silica nanoparticles after protein corona interaction: independence of the surface microchemical environment. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(10), pp.1807–1814. doi:10.1590/s0103-50532012005000048.
- [84] Yu, T., Malugin, A. and Ghandehari, H. (2011). Impact of Silica Nanoparticle Design on Cellular Toxicity and Hemolytic Activity. *ACS Nano*, 5(7), pp.5717–5728. doi:10.1021/nn2013904.
- [85] Neun, B.W. and Dobrovolskaia, M.A. (2010). Method for Analysis of Nanoparticle Hemolytic Properties In Vitro. *Methods in Molecular Biology*, pp.215–224. doi:10.1007/978-1-60327-198-1_23.
- [86] Mayer, A., Vadon, M., Rinner, B., Novak, A., Wintersteiger, R. and Fröhlich, E. (2009). The role of nanoparticle size in hemocompatibility. *Toxicology*, 258(2-3), pp.139–147. doi:10.1016/j.tox.2009.01.015.
- [87] Matus, M.F., Vilos, C., Cisterna, B.A., Fuentes, E. and Palomo, I. (2018). Nanotechnology and primary hemostasis: Differential effects of nanoparticles on platelet responses. *Vascular Pharmacology*, 101, pp.1–8. doi:10.1016/j.vph.2017.11.004.
- [88] Brash, J.L. (2018). Chapter 2 - Blood compatibility of nanomaterials.

- [89] Sun, H., Lv, L., Bai, Y., Yang, H., Zhou, H., Li, C. and Yang, L. (2018). Nanotechnology-enabled materials for hemostatic and anti-infection treatments in orthopedic surgery. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 13, pp.8325–8338. doi:10.2147/ijn.s173063.
- [90] Huskens, D., Maas, C., Al Dieri, R., de Groot, P., de Laat, B. and Du, V. (2013). New Insights into the Role of Erythrocytes in Thrombus Formation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 40(01), pp.072–080. doi:10.1055/s-0033-1363470.
- [91] Mehri, R., Mavriplis, C. and Fenech, M. (2018). Red blood cell aggregates and their effect on non-Newtonian blood viscosity at low hematocrit in a two-fluid low shear rate microfluidic system. *PLOS ONE*, 13(7), p.e0199911. doi:10.1371/journal.pone.0199911.
- [92] Walton, B.L., Lehmann, M., Skorzewski, T., Holle, L.A., Beckman, J.D., Cribb, J.A., Mooberry, M.J., Wufsus, A.R., Cooley, B.C., Homeister, J.W., Pawlinski, R., Falvo, M.R., Key, N.S., Fogelson, A.L., Neeves, K.B. and Wolberg, A.S. (2017). Elevated hematocrit enhances platelet accumulation following vascular injury. *Blood*, 129(18), pp.2537–2546. doi:10.1182/blood-2016-10-746479.
- [93] Brass, L.F., Tomaiuolo, M., Welsh, J., Poventud-Fuentes, I., Zhu, L., Diamond, S.L. and Stalker, T.J. (2019). 20 - Hemostatic Thrombus Formation in Flowing Blood.
- [94] Byrnes, J.R. and Wolberg, A.S. (2017). Red blood cells in thrombosis. *Blood*, [online] 130(16), pp.1795–1799. doi:10.1182/blood-2017-03-745349.
- [95] L'Acqua, C. and Hod, E. (2014). New perspectives on the thrombotic complications of haemolysis. *British Journal of Haematology*, 168(2), pp.175–185. doi:10.1111/bjh.13183.
- [96] Das, B., Tripathy, S., Adhikary, J., Chattopadhyay, S., Mandal, D., Dash, S.K., Das, S., Dey, A., Dey, S.K., Das, D. and Roy, S. (2017). Surface modification minimizes the toxicity of silver nanoparticles: an in vitro and in vivo study. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 22(6), pp.893–918. doi:10.1007/s00775-017-1468-x.
- [97] Chen, L.Q., Fang, L., Ling, J., Ding, C.Z., Kang, B. and Huang, C.Z. (2015). Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. *Chemical Research in Toxicology*, [online] 28(3), pp.501–509. doi:10.1021/tx500479m.
- [98] Shang, L., Nienhaus, K. and Nienhaus, G. (2014). Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology*, [online] 12(1), p.5. doi:10.1186/1477-3155-12-5.

- [99] Khalili Fard, J., Jafari, S. and Eghbal, M.A. (2015). A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(4), pp.447–454. doi:10.15171/apb.2015.061.
- [100] De la Harpe, K., Kondiah, P., Choonara, Y., Marimuthu, T., du Toit, L. and Pillay, V. (2019). The Hemocompatibility of Nanoparticles: A Review of Cell–Nanoparticle Interactions and Hemostasis. *Cells*, 8(10), p.1209. doi:10.3390/cells8101209.
- [101] Yedgar, S., Barshtein, G. and Gural, A. (2022). Hemolytic Activity of Nanoparticles as a Marker of Their Hemocompatibility. *Micromachines*, [online] 13(12), p.2091. doi:10.3390/mi13122091.
- [102] Science Museum. (2019). Blood. [online]
- [103] Groopman, J. (2019). The History of Blood. [online] *The New Yorker*.
- [104] Ribatti, D. (2009). William Harvey and the discovery of the circulation of the blood. *Journal of Angiogenesis Research*, 1(1), p.3. doi:10.1186/2040-2384-1-3.
- [105] Friedland, G. (2009). Discovery of the function of the heart and circulation of blood. *Cardiovascular journal of Africa*, [online] 20(3), p.160.
- [106] Fastag, E., Varon, J. and Sternbach, G. (2013). Richard Lower: The Origins of Blood Transfusion. *The Journal of Emergency Medicine*, [online] 44(6), pp.1146–1150. doi:10.1016/j.jemermed.2012.12.015.
- [107] Deputyprimeminister.gov.mt. (2019). History of Blood. [online]
- [108] Encyclopedia Britannica. (2023). Humour | ancient physiology. [online]
- [109] NobelPrize.org. (2019). The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1930. [online]
- [110] Farhud, D.D. (2018). Karl Landsteiner (1868–1943). *Iranian Journal of Public Health*, [online] 47(6), pp.777–778.
- [111] Dean, L. (2015). The Rh blood group. [online] *Nih.gov*.
- [112] Edwin J. Cohn. (1953). *New England Journal of Medicine*, 249(20), pp.824–825. doi:10.1056/nejm195311122492012.
- [113] Smithsonian.(1995). Again and Again in World War II, Blood Made The Difference. [online]
- [114] Science History Institute (2017). Herbert W. Boyer and Stanley N. Cohen. [online] *Science History Institute*.

- [115] Genome.gov. (2013). 1972: First Recombinant DNA. [online]
- [116] CANFAR. History of HIV/AIDS. [online]
- [117] El-Mowafy, O., El-Aawar, N. and El-Mowafy, N. (2018). Porcelain veneers: An update. *Dental and Medical Problems*, 55(2), pp.207–211. doi:10.17219/dmp/90729.
- [118] Xia, L., Yin, Z., Mao, L., Wang, X., Liu, J., Jiang, X., Zhang, Z., Lin, K., Chang, J. and Fang, B. (2016). Akermanite bioceramics promote osteogenesis, angiogenesis and suppress osteoclastogenesis for osteoporotic bone regeneration. *Scientific Reports*, [online] 6(1). doi:10.1038/srep22005.
- [119] Wang, F., Wang, X., Ma, K., Zhang, C., Chang, J. and Fu, X. (2019). Akermanite bioceramic enhances wound healing with accelerated reepithelialization by promoting proliferation, migration, and stemness of epidermal cells. *Wound Repair and Regeneration*. doi:10.1111/wrr.12742.
- [120] Blok, S.L.J., Engels, G.E. and van Oeveren, W. (2016). In vitro hemocompatibility testing: The importance of fresh blood. *Biointerphases*, 11(2), p.029802. doi:10.1116/1.4941850.
- [121] Blok, S.L.J., Oeveren, W. and Engels, G.E. (2019). The optimal incubation time for in vitro hemocompatibility testing: Assessment using polymer reference materials under pulsatile flow with physiological wall shear stress conditions. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 107(7), pp.2335–2342. doi:10.1002/jbm.b.34326.
- [122] ISO.2017. ISO10993-4: 2017 [online]