



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

**Εκτίμηση των επιπτώσεων χημικών παραγόντων με ιδιαίτερο περιβαλλοντικό
ενδιαφέρον στο μοντέλο οργανισμό zebrafish (*Danio rerio*)**

ΧΟΥΣΙΔΗΣ ΙΕΡΕΜΙΑΣ

MSc ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας - 2^{ος} Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης





UNIVERSITY OF IOANNINA

SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL APPLICATIONS AND TECHNOLOGY

**Assessment of the effects of chemical agents with environmental impact using the
model organism zebrafish (*Danio rerio*)**

Chousidis Ieremias

MSc Biologist

Doctorate Thesis

IOANNINA 2022

This research is co-financed by Greece and the European Union (European Social Fund-ESF) through the Operational Programme «Human Resources Development, Education and Lifelong Learning» in the context of the project “Strengthening Human Resources Research Potential via Doctorate Research – 2nd Cycle” (MIS-5000432), implemented by the State Scholarships Foundation (IKY).



Ευρωπαϊκή Ένωση
European Social Fund

Operational Programme
Human Resources Development,
Education and Lifelong Learning

Co-financed by Greece and the European Union



Προτεινόμενη βιβλιογραφική αναφορά:

Χουσίδης Ι., 2022. Εκτίμηση των επιπτώσεων χημικών παραγόντων με ιδιαίτερο περιβαλλοντικό ενδιαφέρον στο μοντέλο οργανισμό zebrafish (*Danio rerio*). Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Ιωάννινα. 197 σελ.

Suggested citation format:

Chousidis I., 2022. Assessment of the effects of chemical agents with environmental impact using the model organism zebrafish (*Danio rerio*). Doctarate thesis, University of Ioannina, Department of Biological Applications and Technology, Ioannina. 197 p.

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Συνέλευση: 230/29-2-2016

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων: Λεονάρδος Ιωάννης, Καθηγητής, Τμ. Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών

Μέλη: Κωνσταντίνος Σταλίκας, Καθηγητής Τμ. Χημείας, Παν/μιο Ιωαννίνων

Παπαμαρκάκη Θωμαΐς, Καθηγήτρια, Τμ. Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος από τη Συνέλευση: 231/24-3-2016,

Θέμα: «Εκτίμηση των επιπτώσεων χημικών παραγόντων με ιδιαίτερο περιβαλλοντικό ενδιαφέρον στο μοντέλο οργανισμό zebrafish (*Danio rerio*)»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΕΛΕΥΣΗ: 284/18-12-2020

1. Λεονάρδος Ιωάννης, Καθηγητής, Τμ. Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών
2. Κωνσταντίνος Σταλίκας, Καθηγητής Τμ. Χημείας, Παν/μιο Ιωαννίνων
3. Παπαμαρκάκη Θωμαΐς, Καθηγήτρια, Τμ. Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
4. Τσίκληρας Αθανάσιος, Καθηγητής, Τμ. Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
5. Κουτράκης Εμμανουήλ, Δ/ντής Ερευνών στο Ινστιτούτο Αλιευτικής Έρευνας (ΙΝΑΛΕ)
6. Αντωνοπούλου Ευθυμία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμ. Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
7. Κουμουνδούρος Γεώργιος, Καθηγητής, Τμ. Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Ο Πρόεδρος του Τμήματος Βιολογικών

Εφαρμογών και Τεχνολογιών

Μαραγκός

Η Γραμματέας του Τμήματος Πέτρος

Υφαντή Άννα

Πίνακας περιεχομένων

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	15
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	17
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	19
ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ	23
EXTENDED SUMMARY	27
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	32
1.1 ΝΑΝΟΪΛΙΚΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΚΟΥΚΚΙΔΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ	32
1.1.1 Νανοκουκκίδες άνθρακα (CNDs)	34
1.2 ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ ΧΛΩΡΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΝΕΡΟΥ	51
1.2.1 Αλογονοβενζοκινόνες	53
1.3 ΤΟ ΖΕΒΡΑΦΙΣH (<i>DANIO RERIO</i>)	55
1.3.1 Προέλευση και φυσική εξάπλωση του zebrafish	55
1.3.2 Συστηματική κατάταξη	56
1.3.3 Μορφολογικά χαρακτηριστικά	57
1.3.4 Κύκλος ζωής και αναπαραγωγή στο φυσικό περιβάλλον	58
1.3.5 Στάδια εμβρυικής ανάπτυξης του zebrafish	60
1.3.6 Το zebrafish ως οργανισμός μοντέλο	65
1.4 ΟΙΚΟΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ	67
1.4.1 Μελέτη της τοξικότητας στον οργανισμό μοντέλο zebrafish	67
1.4.2 Το zebrafish (<i>D. rerio</i>) ως μοντέλο μελέτης της τοξικότητας και τα πλεονεκτήματα του έναντι άλλων οργανισμών μοντέλων	68

1.5 Η ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ.....	68
1.5.1 Γενικά στοιχεία	68
1.5.2 Φασματοσκοπία NMR (Nuclear magnetic resonance) στη μεταβολομική	70
1.5.3 Βάσεις δεδομένων.....	70
1.5.4 Μεταβολομικά εργαλεία.....	72
1.5.5 Η μεταβολομική και η σημασία της στη βιολογία.....	72
1.5.6 Η μεταβολομική στην παρούσα διδακτορική διατριβή.....	74
1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	76
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	78
2.1 ΝΑΝΟΚΟΥΚΚΙΔΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ (CNDs)	78
2.1.1 Συνθέσεις νανοκουκκίδων άνθρακα (CNDs)	78
2.1.2 Διατήρηση πληθυσμού zebrafish	80
2.1.3 Αναπαραγωγική Διαδικασία.....	81
2.1.4 Μηχανική απομάκρυνση του χορίου.....	83
2.1.5 Πειράματα τοξικότητας	84
2.1.6 Οπτική παρατήρηση	86
2.1.7 Επίδραση στην συμπεριφορά των ατόμων zebrafish μετά την έκθεση στις CNDs	88
2.1.8 In vivo πειράματα- Δήλωση ηθικής	89
2.1.9 Στατιστική ανάλυση.....	89
2.2 Η ΑΛΟΓΟΝΟΒΕΝΖΟΚΙΝΟΝΗ 2,6-DCBQ-OH.....	91
2.2.1 Παρασκευή διαλύματος ελέγχου και μελέτη της σταθερότητας της 2,6-δίχλωρο- 1,4-βενζοκινόνης (2,6-DCBQ-OH)	92
2.2.2 Πειράματα τοξικότητας-Εύρος συγκεντρώσεων ελέγχου	93
2.2.3 Ανάπτυξη και λειτουργία καρδιακού μυός.....	93

2.2.4 Επίδραση στην συμπεριφορά των ατόμων zebrafish	94
2.2.5 Επίδραση της 2,6-DCBQ-OH στην απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα... 95	
2.2.6 Μεταβολομική ανάλυση	97
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	102
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΤΟΥ ZEBRAFISH ΣΤΙΣ CNDS	102
3.1.1 Χαρακτηρισμός CNDS	102
3.1.2 Πειράματα τοξικότητας	105
3.1.3 Οπτική παρατήρηση.....	107
3.1.4 Επίδραση στην συμπεριφορά των ατόμων zebrafish μετά την έκθεση στις CNDS	111
3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΤΟΥ ZEBRAFISH ΣΤΗΝ 2,6-DCBQ-OH	115
3.2.1 Πειράματα τοξικότητας	115
3.2.2 Μορφολογικές ανωμαλίες	116
3.2.3 Ανάπτυξη και λειτουργία καρδιακού μυός	119
3.2.4 Επίδραση στην συμπεριφορά των ατόμων zebrafish	120
3.2.5 Μεταβολομική ανάλυση- Αλλαγές του μεταβολώματος μετά την έκθεση του zebrafish στο 2,6-DCBQ-OH	128
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	140
4.1 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ CNDS ΣΤΟ ZEBRAFISH	140
4.2 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ 2,6-DCBQ-OH ΣΤΟ ZEBRAFISH	145
4.2.1 Μεταβολομική ανάλυση μετά την έκθεση στην 2,6-DCBQ-OH.....	151
5. ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	157
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	161
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	183
ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ CNDS.....	183

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ FT-IR	187
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	193
ΛΙΣΤΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ.....	193

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1. Κλίμακα μεγεθών διαφόρων σωματιδίων και νανοϋλικών (Ως νανοϋλικά ορίζονται με μέγεθος μεταξύ 1 και 100 nm) [11].	33
Εικόνα 2. Κατηγορίες νανοϋλικών με βάση τη διάταξη στο χώρο [5].	34
Εικόνα 3. Ταξινόμηση φθορίζουσών νανοκουκκίδων.	36
Εικόνα 4. Φυσική εξάπλωση του zebrafish (<i>Danio rerio</i>) [98].	56
Εικόνα 5. Αρσενικό άτομο zebrafish (επάνω) και θηλυκό άτομο (κάτω) (https://cdn.mos.cms.futurecdn.net/25nFio5GQK3kVNxyssZEN5-1920-80.jpg.webp).	58
Εικόνα 6. Σχεδιαστική απεικόνιση της ανατομίας λεκιθοφόρου νύμφης zebrafish zebrafish 5 ημερών [106].	59
Εικόνα 7. Τα στάδια ανάπτυξης του zebrafish (24 hpf – ενήλικο άτομο) [104].	60
Εικόνα 8. Συνοπτική απεικόνιση του κύκλου ζωής του zebrafish [107].	62
Εικόνα 9. Στάδια εμβρυικής ανάπτυξης του zebrafish [104]. Η ελληνική απόδοση των όρων δίνεται στην Εικόνα 8 και στον Πίνακα 4.	64
Εικόνα 10. Αριθμός άρθρων ανά έτος σχετικά με το zebrafish σε διεθνή περιοδικά με κριτές (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov).	66
Εικόνα 11. Γραφική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας για την μελέτη των επιπτώσεων των CNDs σε έμβρυα zebrafish.	78
Εικόνα 12. Το σύστημα διατήρησης zebrafish Active Blue στο εργαστήριο Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Tecniplast S.A).	81
Εικόνα 13. Σύστημα αναπαραγωγής iSPAWN-S (αριστερά) και δοχεία αναπαραγωγής που εφαρμόζουν στις δεξαμενές διατήρησης (δεξιά) (Tecniplast).	82
Εικόνα 14. Η τεχνητή αναπαραγωγή του zebrafish (http://www.aquaticslabservices.com/s/9-Spawning-and-Reproduction-2018.pdf).	83
Εικόνα 15. Το σύστημα μελέτης συμπεριφοράς DanioVision με τη μονάδα ρύθμισης της θερμοκρασίας (αριστερά) και την ψηφιακή κάμερα υψηλής ανάλυσης (δεξιά).	89

Εικόνα 16. Γραφική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την μελέτη των επιπτώσεων της 2,6-δichλωρο-3-υδροξυ-1,4-βενζοκινόνης (2,6-DCBQ-OH) σε έμβρυα zebrafish.....	91
Εικόνα 17. Ο εγκατεστημένος μηχανισμός πιστόνι στο εσωτερικό της μονάδας καταγραφής συμπεριφοράς Daniovision που προκαλεί το κρουστικό ερέθισμα στο πλακάκι που φέρει τις προνύμφες zebrafish.	96
Εικόνα 18. Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Transition Electron Microscopy TEM).....	103
Εικόνα 19. Εικόνες TEM από A. Non doped, B. N-doped και C. N,S co-doped CNDs. Κλίμακα: 20 nm.....	104
Εικόνα 20. Εκτιμώμενες καμπύλες τοξικότητας για τις CNDs.....	106
Εικόνα 21. Μορφολογικές ανωμαλίες των εμβρύων zebrafish (96hrpf-144hrpf)) μετά την έκθεση σε CNDs. (A-D) άτομα ελέγχου, (E-H) εκτεθειμένα σε 150, 250, 300, 600 µg/mL αντίστοιχα σε Non doped CNDs με χαρακτηριστικό περικαρδιακό οίδημα και κύρτωση ουράς, (I-L) εκτεθειμένα σε 150, 250, 300, 600 µg/mL αντίστοιχα σε N-doped CNDs με χαρακτηριστικό περικαρδιακό οίδημα και κύρτωση ουράς, (M-T) εκτεθειμένα σε 75, 100, 300, 400 µg/mL αντίστοιχα σε N,S-doped CNDs με χαρακτηριστικό περικαρδιακό οίδημα και κύρτωση ουράς. Οι μορφολογικές ανωμαλίες υποδεικνύονται με τα βέλη.	108
Εικόνα 22. Διακύμανση του μήκους (mm) μετά την έκθεση σε Non doped (A), N-doped (B) και N,S- doped CNDs (C) σε σχέση με την συγκέντρωση και τον χρόνο.....	110
Εικόνα 23. Επίδραση της έκθεσης σε Non doped, N-doped, and N,S-doped CNDs στην συνολική κολυμβητική δραστηριότητα (cm) υπό την επίδραση του ερεθίσματος του φωτός στις 144 hrpf.	113
Εικόνα 24. Επίδραση της έκθεσης στις διαφορετικές συγκεντρώσεις Non doped CND (300, 400, 500, 600 µg/mL) στην συνολική κολυμβητική δραστηριότητα (cm) υπό την επίδραση του ερεθίσματος του φωτός στις 144 hrpf.	113

Εικόνα 25. Επίδραση της έκθεσης στις διαφορετικές συγκεντρώσεις N- doped CND (150, 200, 300 µg/mL) στην συνολική κολυμβητική δραστηριότητα (cm) υπό την επίδραση του ερεθίσματος του φωτός στις 144 hpf.	114
Εικόνα 26. Επίδραση της έκθεσης στις διαφορετικές συγκεντρώσεις Non doped CND (32.5, 75, 150, 200 µg/mL) στην συνολική κολυμβητική δραστηριότητα (cm) υπό την επίδραση του ερεθίσματος του φωτός στις 144 hpf.....	114
Εικόνα 27. Εκτιμώμενες καμπύλες τοξικότητας για 2,6-DCBQ-OH.	116
Εικόνα 28. Μορφολογικές ανωμαλίες των εμβρύων zebrafish μετά την έκθεση σε 2,6-DCBQ-OH. (A-C) άτομα ελέγχου, (D-F) εκτεθειμένα σε 10 µg/L με μικρές αλλοιώσεις όπως κύρτωση ουράς, (G-I) εκτεθειμένα σε 100 µg/L με χαρακτηριστικό περικαρδιακό οίδημα και κύρτωση ουράς, (J-L) εκτεθειμένα σε 200 µg/L με χαρακτηριστικό περικαρδιακό οίδημα και κύρτωση ουράς, (M-O) εκτεθειμένα σε 300 µg/L με οξεία περικαρδιακά οιδήματα, (P-R) εκτεθειμένα σε 400 µg/L με οξεία περικαρδιακά οιδήματα, κύρτωση ουράς και αποσύνθεση σώματος. Οι μορφολογικές ανωμαλίες υποδεικνύονται με τα βέλη.	118
Εικόνα 29. Επίδραση της συγκέντρωσης της 2,6-DCBQ-OH στον καρδιακό παλμό στις 48, 72 & 96 hpf.....	120
Εικόνα 30. Καταγραφή της κολυμβητικής δραστηριότητας (cm) μετά την έκθεση σε 2,6-DCBQ-OH και σε χρονικά διαστήματα 2 λεπτών.	122
Εικόνα 31. Συγκριτική επίδραση της έκθεσης σε 2,6-DCBQ-OH στην κολυμβητική δραστηριότητα (cm) μεταξύ διαστήματος φωτός και σκοταδιού.....	122
Εικόνα 32. Καταγραφή της μέσης ταχύτητας (cm/s) των ατόμων μετά την έκθεση σε 2,6-DCBQ-OH στο φως και στο σκοτάδι.....	123
Εικόνα 33. Αποτύπωση της κινητικότητας των εμβρύων zebrafish υπό φωτεινές και σκοτεινές συνθήκες και στις διαφορετικές συγκεντρώσεις 2,6-DCBQ-OH (με κόκκινη γραμμή παρουσιάζονται οι κινήσεις των ατόμων για τα περασμένα 2 min).....	124
Εικόνα 34. Διανυθείσα απόσταση (cm) για 10 sec μετά την εφαρμογή του κρουστικού ερεθίσματος στις διαφορετικές συγκεντρώσεις 2,6-DCBQ-OH.....	126

Εικόνα 35. Χρόνος απόκρισης (msec) στο κρουστικό ερέθισμα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις 2,6-DCBQ-OH..... 127

Εικόνα 36. Φάσματα ^1H NMR των μεταβολωμάτων των δειγμάτων ελέγχου (μωβ φάσμα) και των δειγμάτων που εκτέθηκαν σε 200 $\mu\text{g/L}$ (κόκκινο φάσμα), 300 $\mu\text{g/L}$ (μπλε φάσμα) και 500 $\mu\text{g/L}$ (πράσινο φάσμα) της 2,6-DCBQ-OH..... 128

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1. Συνοπτική καταγραφή των διαφορών και των ομοιοτήτων μεταξύ των ειδών των Νανοκουκκίδων Άνθρακα.	37
Πίνακας 2. Αναλυτικά τα παραπροϊόντα χλωρίωσης του νερού.	52
Πίνακας 3. Συστηματική κατάταξη του zebrafish (<i>Danio rerio</i>) (ITIS, Integrated Taxonomic Information System).	57
Πίνακας 4. Στάδια της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης του zebrafish [104].	63
Πίνακας 5. Ορισμοί εννοιών σχετικά με την μεταβολομική και κατηγορίες αυτής [122–124].	69
Πίνακας 6. Εύρος συγκεντρώσεων ελέγχου CNDs.	84
Πίνακας 7. Οι υπό μελέτη φαινότυποι δυσμορφιών και τα κριτήρια αξιολόγησης τους.	87
Πίνακας 8. Εύρος συγκεντρώσεων ελέγχου 2,6-DCBQ-OH.	93
Πίνακας 9. Αναλυτικά τα αποτελέσματα τοξικότητας των πειραμάτων για τις Non doped CNDs.	105
Πίνακας 10. Αναλυτικά τα αποτελέσματα τοξικότητας των πειραμάτων για τις N-doped CNDs.	105
Πίνακας 11. Αναλυτικά τα αποτελέσματα τοξικότητας των πειραμάτων για τις N,S-doped CNDs.	105
Πίνακας 12. Τιμές LC ₅₀ , LC ₂₅ , LC ₇₅ για τις CNDs.	106
Πίνακας 13. Αναλυτικά τα αποτελέσματα τοξικότητας των πειραμάτων για 2,6-DCBQ-OH.	115
Πίνακας 14. Τιμές LC ₅₀ , LC ₂₅ , LC ₇₅ για την 2,6-DCBQ-OH.	116
Πίνακας 15. Απόσταση κολύμβησης (cm) και χρόνος αντίδρασης (sec) μετά το κρουστικό ερέθισμα.	125

Πίνακας 16. Μεταβολίτες που βρέθηκαν στο σύνολο των δειγμάτων (με ✓ συμβολίζεται η ανίχνευση μεταβολίτη). 129

Πίνακας 17. Τα μεταβολικά μονοπάτια που προέκυψαν από την ανάλυση των μεταβολιτών (με ✓ συμβολίζεται η ανίχνευση μεταβολικού μονοπατιού). 133

Πίνακας 18. Κατάταξη των μεταβολικών μονοπατιών που βρέθηκαν σε α) ανεπηρέαστα, β) που αποσιωπήθηκαν και γ) που ενεργοποιήθηκαν μόνο μετά την έκθεση (Με **έντονη γραμματοσειρά** σημαίνονται τα μονοπάτια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή συμπερασμάτων) 137

Κατάλογος Συντομογραφιών

hpf	Hours post fertilization, ώρες μετά την γονιμοποίηση
h	Hours
CNDs	Carbon NanoDots
2,6-DCBQ	2,6-δichλωρο-1,4-βενζοκινόνη
2,6-DCBQ-OH	2,6-δichλωρο-3-υδροξυ-1,4-βενζοκινόνη
Non doped	Χωρίς ένθεση
N doped	Ένθεση με άζωτο
N,S doped	Ένθεση με άζωτο και θείο
LC ₅₀	Lethal Concentration 50%, Θανατηφόρα συγκέντρωση για το 50% του πληθυσμού
LC ₇₅	Lethal Concentration 75%, Θανατηφόρα συγκέντρωση για το 75% του πληθυσμού
LC ₂₅	Lethal Concentration 25%, Θανατηφόρα συγκέντρωση για το 25% του πληθυσμού
DDW	Double Distilled Water, δις απεσταγμένο ύδωρ
bmp	Beats per minute, καρδιακοί παλμοί ανά λεπτό
fps	Frames per second, πλαίσιο εικόνας ανά δευτερόλεπτο
ppm	Parts per million

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή με τίτλο: “Εκτίμηση των επιπτώσεων χημικών παραγόντων με ιδιαίτερο περιβαλλοντικό ενδιαφέρον στο μοντέλο οργανισμό zebrafish (*Danio rerio*)” εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ζωολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Λεονάρδου Ιωάννη. Για την υλοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής χορηγήθηκε υποτροφία από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.).

Δοθείσης της ευκαιρίας, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε ανθρώπους οι οποίοι με βοήθησαν, ο καθένας με τον δικό του ξεχωριστό τρόπο, όχι μόνο να ολοκληρώσω τη παρούσα έρευνα αλλά να αποκτήσω επιστημονική σκέψη και υπόσταση.

Ο πρώτος άνθρωπος που θα ήθελα να ευχαριστήσω είναι ο καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Λεονάρδος Ιωάννης. Η πορεία μου με τον κ. καθηγητή Λεονάρδο Ιωάννη είναι κοινή από την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας το 2013. Το 2016, με δέχτηκε στο εργαστήριο Ζωολογίας σε μία πολύ κομβική στιγμή για την σταδιοδρομία και την ζωή μου και μου έδωσε την ευκαιρία να εκπονήσω την διδακτορική μου διατριβή. Ήταν πάντα εκεί, από την πρώτη ημέρα έως και την σημερινή, συμβουλευοντας, προτρέποντας, δίνοντας λύση σε ό,τι πρόβλημα εμφανίζονταν. Η επιστημονική του καθοδήγηση, όχι μόνο στην παρούσα διατριβή αλλά και σε όλα αυτά τα χρόνια σε οποιοδήποτε έργο, ήταν καθοριστική για την επιστημονική μου ωρίμανση. Οι ευκαιρίες που μου δόθηκαν όλα αυτά τα χρόνια, ήταν και είναι αμέτρητες και τον ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου και ελπίζω να στάθηνά όσο το δυνατόν περισσότερο αντάξιος σε ότι μου ζητήθηκε.

Συνεχίζοντας, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Σταλίκια Κωνσταντίνο, καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε, όποια στιγμή την χρειάστηκα. Ο κ. καθηγητής Σταλίκας Κωνσταντίνος από την πρώτη στιγμή με δέχτηκε στο εργαστήριο του και με βοήθησε σε κάθε πτυχή της παρούσας διδακτορικής διατριβής και όχι μόνο. Τον ευχαριστώ θερμά για όλη την βοήθεια. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια του Τμήματος Ιατρικής κα.

Παπαμαρκάκη Θωμάϊς, με την οποία είχαμε άψογη συνεργασία σε όλη την διάρκεια της διδακτορικής διατριβής και όποτε χρειάστηκα οτιδήποτε ήταν πάντοτε στην διάθεση μου.

Η διδακτορική διατριβή σίγουρα θα ήταν διαφορετική χωρίς τις συζητήσεις και πολύωρες εργαστηριακές αναλύσεις που κάναμε μαζί με τον μεταδιδακτορικό ερευνητή του εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Χατζημητάκο Θεόδωρο. Η βοήθεια και στήριξη που μου παρείχε υπήρξε πολύτιμη και καθοριστική και τον ευχαριστώ θερμά. Καθοριστική συμβολή στην ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής είχε και η κα. Κασούνη Αθανασία, μεταδιδακτορική ερευνήτρια στο Εργαστήριο Φυσικοχημείας Βιολογικών Συστημάτων του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και την ευχαριστώ θερμά για τις συμβουλές και τις συζητήσεις που είχαμε από την αρχή μέχρι το τέλος της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κα. Οικονόμου Ανθή μεταδιδακτορική ερευνήτρια του ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ. η οποία οποιαδήποτε στιγμή και σε οτιδήποτε της ζήτησα, επιστημονικό ή μη, χωρίς κανένα δισταγμό μου το παρείχε πάντοτε.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την προϊσταμένη του ιχθυογεννητικού σταθμού Ιωαννίνων, κα. Δρ Τσουμάνη Μαρία-Μιράντα, της οποίας η συμβολή σε όλη αυτή την πορεία ήταν καθοριστική.

Ακόμα, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ζωολογίας που συνεργάστηκα όλα αυτά τα χρόνια, είτε για την εκπόνηση πτυχιακών εργασιών είτε σε διάφορα ερευνητικά προγράμματα.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) για την υποτροφία που μου χορήγησε.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου. Ο Χουσίδης Νικόλαος και η Αναστασιάδου Φωτεινή όλα αυτά τα χρόνια μου έδωσαν την δυνατότητα να καταφέρω να φτάσω μέχρι την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής. Μου παρείχαν όλα εκείνα τα εφόδια σε καιρούς δύσκολους και δεν σκέφτηκαν στιγμή αν κάνουν το σωστό ή το λάθος. Τους ευχαριστώ για αυτό που με έχουν κάνει σήμερα και για το ότι ποτέ δεν υπήρξαν στο πλάι μου για να μου χαϊδεύουν τα αυτιά αλλά αποτελούσαν τον σκληρότερο κριτή μου.

Στους γονείς μου...

Εκτεταμένη περίληψη

Τα νανοϋλικά είναι μια κατηγορία υλικών με μοναδικές ιδιότητες και πολλά υποσχόμενα χαρακτηριστικά καθώς και πολλές εφαρμογές στους τομείς της υγείας, της τεχνολογίας και των περιβαλλοντικών επιστημών. Τα τελευταία χρόνια, μια συγκεκριμένη κατηγορία νανοϋλικών, οι νανοκουκκίδες άνθρακα (Carbon NanoDots, CNDs) έχουν τραβήξει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας και τα επόμενα χρόνια αναμένεται να αντικαταστήσουν τις κουκκίδες άνθρακα που προκύπτουν από βαρέα μέταλλα. Σε αντίθεση με τις κβαντικές κουκκίδες βαρέων μετάλλων, οι CNDs προκύπτουν από φυσικές, μη τοξικές πρώτες ύλες ή καθαρές χημικές ουσίες αποτελούμενες από βασικά στοιχεία (άνθρακα, υδρογόνο, οξυγόνο, άζωτο, θείο κ.α.) διατηρώντας, παράλληλα, όλα τα πλεονεκτήματα των συμβατικών κουκκίδων. Παρόλο, όμως, που οι CNDs θεωρούνται ως πιο φυσικά, μη τοξικά υλικά έναντι των κουκκίδων των βαρέων μετάλλων, υπάρχει η ανάγκη για μελέτη των επιπτώσεων τους, στους οργανισμούς και το περιβάλλον καθώς όπως φαίνεται, τα επόμενα χρόνια θα χρησιμοποιούνται ευρέως. Οι παραπάνω νανοκουκκίδες άνθρακα αποτελούν ένα μέρος της διατριβής.

Ένα άλλο μέρος της διδακτορικής διατριβής αφορά την τοξικότητα των αλογονομένων βενζοκινονών. Οι ενώσεις αυτές προκύπτουν υπό την επίδραση του υποχλωριώδους νατρίου στην οργανική ύλη που υπάρχει στο νερό. Η χλωρίωση του νερού αποτελεί, εδώ και πολλά χρόνια, μία επιτυχημένη μέθοδο απολύμανσης και προστασίας της δημόσιας υγείας. Μέσω της χλωρίωσης απομακρύνονται από αυτό παθογόνοι μικροοργανισμοί ώστε αυτό να καταστεί ασφαλές. Ωστόσο, η χλωρίωση οδηγεί στη δημιουργία παραπροϊόντων που δυνητικά αποτελούν κίνδυνο για την δημόσια υγεία. Σε αυτά τα προϊόντα ανήκουν οι αλογονοβενζοκινόνες, όπως διχλωρο-, τριχλωρο-, διχλωροβρωμοβενζοκινόνες κ.α, με ενδείξεις καρκινογόνου δράσης και πρόκλησης δερματικών ασθενειών στον άνθρωπο, σε εγκαταστάσεις όπως κολυμβητήρια. Αν και τέτοιου είδους χημικοί παράγοντες παράγονται στο χλωριωμένο νερό λόγω της απολύμανσης, μέχρι πρόσφατα δεν ήταν δυνατή η ανίχνευσή τους. Αυτό, τελικά, έγινε πραγματικότητα λόγω των εξελίξεων στη σύγχρονη χημική οργανολογία (π.χ. φασματομετρία μάζας). Οι πρώτες μελέτες τοξικότητας των ενώσεων αυτών εγείρουν ανησυχία και υπάρχει ανάγκη για μελέτη της τοξικότητάς τους στους οργανισμούς. Οι μελέτες αυτές κάνουν λόγο για

καρκινογόνο δράση και πρόκληση δερματικών ασθενειών στον άνθρωπο σε εγκαταστάσεις όπως κολυμβητήρια.

Για την μελέτη της τοξικότητας διαφόρων χημικών παραγόντων τα τελευταία 20 χρόνια, μεταξύ άλλων, χρησιμοποιούνται οι ιχθύες. Οι ιχθύες προτιμώνται έναντι άλλων οργανισμών μοντέλων καθώς η χρήση τους συνοδεύεται από σημαντικά πλεονεκτήματα. Με την μελέτη της τοξικότητας στους ιχθύες δίνεται η δυνατότητα να μελετηθούν οι διαταραχές που προκαλούνται σε έναν ανώτερο οργανισμό και να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα αναφορικά με τις επιπτώσεις διαφορών χημικών παραγόντων.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή επικεντρώθηκε στη μελέτη της τοξικότητας δυο σημαντικών και αναδυόμενων χημικών παραγόντων: α) των νανοκουκκίδων άνθρακα (CNDs) και β) των αλογονοβενζοκινονών. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι διαταραχές στην εμβρυική ανάπτυξη του zebrafish μετά από την έκθεση σε νανοκουκκίδες άνθρακα (CNDs) καθώς και στην 2,6-διχλωρο-3-υδροξυ-1,4-βενζοκινόνη (2,6-DCBQ-OH). Διερευνήθηκαν οι επιπτώσεις όσο αφορά την ανάπτυξη, τη συμπεριφορά και συγκεκριμένες μεταβολικές διεργασίες.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε στο επίκεντρο μελέτης δύο ομάδες χημικών παραγόντων. Πέρα από τα συμπεράσματα που προέκυψαν για τις ομάδες αυτές, σκοπός ήταν να προκύψει μια ακολουθία διαδικασιών και πειραματικών τεχνικών που θα χρησιμοποιείται από επιστήμονες και φορείς που προβαίνουν στην εκτίμηση τοξικότητας διαφόρων ουσιών.

Οι νανοκουκκίδες άνθρακα (CNDs) που χρησιμοποιήθηκαν συντέθηκαν από απλές οργανικές πρόδρομες ενώσεις (κιτρικό οξύ, γλυκόζη) ως η βασική πηγή άνθρακα. Συνολικά, έγινε σύνθεση τριών παραλλαγών των εξεταζόμενων ουσιών: Non doped (χωρίς ένθεση), N-doped (ένθεση με άζωτο), N,S-doped (ένθεση με άζωτο και θείο). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, αποδείχθηκε πως η έκθεση στις CNDs οδήγησε σε τοξικότητα κατά την εμβρυική ανάπτυξη, προκάλεσε μορφολογικές ανωμαλίες, μείωση του ρυθμού αύξησης και διαταραχές στην συμπεριφορά των ατόμων zebrafish. Η τοξικότητα των CNDs αυξανόταν με την ένθεση με άζωτο (N) και θείο (S). Η τοξικότητα αυξανόταν, επιπλέον και με την αύξηση της συγκέντρωσης. Οι τιμές για τις θνησιγόνες δόσεις για το 50% των ατόμων για το κάθε υλικό, βρέθηκαν στα 584,48 µg/mL, 399,95 µg/mL, 149,92 µg/mL για

τις Non doped CNDs, N-doped CNDs και N,S-doped CNDs, αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές χαρακτηρίζονται ως υψηλότερες σε σχέση με τις τιμές τοξικότητας των νανοκουκκίδων βαρέων μετάλλων(οι μελετώμενες CNDs προκαλούν χαμηλότερη θνησιμότητα). Η χαμηλότερη τοξικότητα των CNDs που μελετήθηκαν, πιθανά να οφείλεται στο ότι πρόκειται για υλικά των οποίων η σύνθεση προκύπτει από απλά και φυσικά, μη τοξικά υλικά. Οι μορφολογικές ανωμαλίες που παρατηρήθηκαν στα άτομα zebrafish κατά την διάρκεια της έκθεσης στα CNDs αυξανόταν κατά την ένθεση με άζωτο (N) και θείο (S) και με την αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμάτων, όπως ακριβώς αυξανόταν η θνησιμότητα. Επιπλέον, η έκθεση στις CNDs προκάλεσε σοβαρή μείωση του ρυθμού αύξησης, το οποίο συνδέθηκε με τα χαμηλά ποσοστά επιβίωσης μετά το πέρας της έκθεσης. Τα αποτελέσματα από τον έλεγχο της επίδρασης της έκθεσης στην συμπεριφορά των ατόμων zebrafish έδειξαν ότι τα άτομα εμφάνιζαν υπερδραστηριότητα. Μετά την έκθεση στις νανοκουκκίδες με την μεγαλύτερη τοξικότητα (N,S-doped CNDs) παρατηρήθηκε πολύ υψηλή κινητικότητα των εκτεθειμένων ατόμων, ακολουθούσαν τα εκτεθειμένα άτομα στις νανοκουκκίδες με μεσαία τοξικότητα (N-doped CNDs) και τελευταία σε κινητικότητα βρέθηκαν τα εκτεθειμένα άτομα στις λιγότερο τοξικές νανοκουκκίδες (Non doped CNDs).

Η μελέτη της τοξικότητας της 2,6-DCBQ διεξήχθη μετά την μελέτη της σταθερότητας της ένωσης. Έγιναν μελέτες σχετικά για τον έλεγχο της σταθερότητας της ένωσης και εξετάστηκαν οι περιβαλλοντικοί παράμετροι που οδηγούν στην μετατροπή της 2,6-DCBQ στην υδροξυλιωμένη μορφή (2,6-DCBQ-OH). Εξετάστηκαν διαφορετικές συνθήκες φωτισμού, διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας και διαφορετικές τιμές pH. Ενδεικτικά διαπιστώθηκε ότι η 2,6-DCBQ εντός 2 ωρών μετατρέπεται στην υδροξυλιωμένη της μορφή, 2,6-DCBQ-OH. Αποδείχθηκε ότι η υδροξυλιωμένη μορφή της ένωσης είναι αυτή που συναντάται στο περιβάλλον και με την οποία οι οργανισμοί όπως έρχονται σε επαφή. Επιλέχθηκε να μελετηθεί η τοξικότητα αυτής την μορφής. Αποδείχθηκε πως κατά την έκθεση προκλήθηκε δόσοεξαρτώμενη τοξικότητα, μορφολογικές, αναπτυξιακές και συμπεριφορικές ανωμαλίες. Συγκεκριμένα, οι τιμές για την θνησιγόνο δόση για το 50% των ατόμων (LC₅₀) βρέθηκε στα 186,072 μg/L. Ακόμα μελετήθηκε η ανάπτυξη και η λειτουργία της καρδιάς διαμέσου της εξέτασης του καρδιακού ρυθμού. Ο μέσος καρδιακός ρυθμός ήταν σημαντικά διαφοροποιημένος μεταξύ των εκτεθειμένων ατόμων

σε σχέση με τα μη εκτεθειμένα (control). Η έκθεση προκάλεσε σημαντική βραδυκαρδία στα zebrafish που εξετάστηκαν. Τα zebrafish που εκτέθηκαν στην μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφάνισαν τον χαμηλότερο καρδιακό ρυθμό.

Από τη μελέτη των μεταβολωμάτων του zebrafish μετά την έκθεσή του στη 2,6-DCBQ-OH προέκυψε πως υπάρχουν διαφορές τόσο σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, όσο και μεταξύ των ατόμων που εκτέθηκαν στις διάφορες συγκεντρώσεις. Η μεταβολομική ανάλυση επικεντρώθηκε σε εκείνα τα μεταβολικά μονοπάτια που είτε εμφανίζονται μόνο στα εκτεθειμένα άτομα zebrafish είτε αποσιωπώνται στα εκτεθειμένα σε σχέση με τα άτομα ελέγχου. Σε όλα τα εκτεθειμένα άτομα βρέθηκε η ενεργοποίηση του μεταβολικού μονοπατιού της γλουταθειόνης. Οι διαταραχές σε αυτό το μονοπάτι συνδέονται σε άλλες μελέτες με την πρόκληση οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, η αποσιώπηση του μεταβολισμού της β-αλανίνης σε όλα τα εκτεθειμένα άτομα πιθανά μπορεί να συνδέεται με τις συμπεριφορικές, κινητικές διαταραχές και με τις βλάβες στην απόκριση των ατόμων σε εξωτερικά ερεθίσματα. Ακόμα αποδείχθηκε η αποσιώπηση μονοπατιών βιοσύνθεσης γλυκεροφωσφολιπιδίων. Η αποσιώπηση του μεταβολισμού των γλυκεροφωσφολιπιδίων σε όλα τα εκτεθειμένα άτομα zebrafish πιθανά να συνδέεται με την πρόκληση ενδοκρινικής διαταραχής. Τέλος, παρατηρήθηκε συνολική απορρύθμιση και μεταβολική κατάρρευση του οργανισμού και σε αυτή αποδίδονται οι αναπτυξιακές, μορφολογικές, συμπεριφορικές και άλλες διαταραχές που περιγράφηκαν.

Συμπερασματικά, στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιώντας το zebrafish, εξετάστηκαν οι βλάβες που προέκυψαν μετά από την έκθεση σε χημικούς παράγοντες (CNDs, 2,6-DCBQ-OH). Η επιλογή των CNDs έγινε καθώς είναι χημικοί παράγοντες που εμφανίστηκαν τα τελευταία χρόνια, έχουν πολύ καλές ιδιότητες, αναμένεται ότι θα αντικαταστήσουν τις συμβατικές κουκκίδες βαρέων μετάλλων ενώ δεν έχει μελετηθεί η τοξικότητά τους. Η επιλογή της 2,6-DCBQ-OH έγινε καθώς παρόλο που δημιουργείται στο χλωριωμένο στο νερό εδώ και πάρα πολλές δεκαετίες, ανιχνεύτηκε πολύ πρόσφατα (2010) και μέχρι σήμερα υπάρχουν ελάχιστες μελέτες για την τοξικότητά της. Μελετώντας τις επιδράσεις αυτών των χημικών παραγόντων σε μέρος του κύκλου ζωής του zebrafish προέκυψαν σημαντικά συμπεράσματα που συμβάλουν στην κάλυψη κενών αναφορικά με τις επιπτώσεις των δύο αυτών ουσιών.

Extended Summary

Nanomaterials are a class of materials with unique properties and promising characteristics, offering several applications in the fields of medicine (bioimaging, drug delivery), technology (biosensing) and environmental sciences (energy conversion and energy storage). In the most recent years, a specific class of nanomaterials, carbon nanodots (CNDs) have drawn intensive attention and triggered substantial investigation. They consist of carbon, hydrogen, oxygen, nitrogen, sulfur and other common elements and manifest superior merits including excellent biocompatibility both *in vitro* and *in vivo*, resistance to photobleaching, easy surface functionalization and bio-conjugation, outstanding colloidal stability, eco-friendly synthesis and low cost. In this Ph.D. dissertation the effects of doping CNDs with alternative functional groups (dopants) were evaluated during the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*).

Chlorination is a necessary process to remove the microbial load of drinking water and halobenzoquinones are by-products that have only recently become known. Halobenzoquinones are considered highly toxic when tested *in vitro* but up until now very few studies focused on their effects to living organisms. It is widely accepted that halobenzoquinones are released in the environment and in this Ph.D. thesis the aim was to investigate those effects on a living organism (zebrafish). One of the most detected halobenzoquinone in aquatic environments is 2,6-dichloro-1,4-benzoquinone (2,6-DCBQ). The potential toxicity of 2,6-dichloro-1,4-benzoquinone (2,6-DCBQ) was also studied in detail in the present study.

Carbon nanodots (CNDs) were synthesized using simple and low-cost sources: Non doped (citric acid was used as the carbon source), nitrogen-doped (N-doped) and nitrogen, sulfur-co-doped (N,S-doped). Carbon nanodots (CNDs) induced significant toxicity to zebrafish (>150 µg/mL) and the toxic effects were dose-dependent. The N,S-doped CNDs were the most toxic (LC₅₀=149.92 µg/mL), followed by the N-doped CNDs (LC₅₀=399.95 µg/mL) while Non doped CNDs were the least toxic (LC₅₀= 548.48 µg/mL). Growth rate (GR), which is expressed as total body length (TL, cm) was affected following the toxicity pattern (GR_{N,S-doped} < GR_{N-doped} < GR_{Non doped} < GR_{blanc}), which, in turn, greatly depends on the type of dopant. Morphological malformations, such as pericardial edema, yolk sac edema, tail and spinal

curvature were observed to zebrafish embryos as the toxicity and concentration and exposure time to the nanomaterial increased. Behavioral analysis showed that activity increased when larvae were treated with the more toxic nanomaterial. The differences in toxicity, growth rate and malfunctions of CNDs are attributed to their doping with different heteroatoms. The N,S-doped CNDs, unequivocally, exhibit the most pronounced effects.

Regarding halobenzoquinones, our results prove that exposure to 2,6-DCBQ-OH induces dose-dependent toxicity, morphological, developmental, and behavioral abnormalities. Specifically, the LC_{50} value was found to be 186.072 $\mu\text{g/L}$. Toxicity increases as exposure concentration increases. Individuals exposed to 2,6-DCBQ-OH show dose-dependent morphological alterations. Referring to the heart muscle, exposure causes significant bradycardia in the individuals. In addition, our behavioral study concludes that individuals' swimming activity decreases as the concentration to which individuals were exposed increases. This reduced swimming activity can be attributed to the morphological abnormalities that were provoked. Moreover, it is proved that as the exposure concentration to 2,6-DCBQ-OH increased, individuals were more irritable with increased alertness. Moreover, conclusions were drawn about the effect of 2,6-DCBQ-OH on the zebrafish metabolic network. It is apparent that the exposure of zebrafish to 2,6-DCBQ-OH is accompanied by multiple metabolic alterations. Metabolomic study proved that many metabolic alterations occur between control and exposed individuals. Activation of the glutathione metabolism pathway was found in all exposed individuals, proving that the 2,6-DCBQ-OH can cause oxidative stress. In addition, the downregulation of beta-alanine metabolism can be associated with behavioral motor and reflex damage in the individuals. Furthermore, the observed downregulation of glycerophospholipids suggest that 2,6-DCBQ-OH can act as an endocrine disruptor. Thus, a total deregulation and metabolic collapse of the organism was observed, and all these can be attributed to the developmental, morphological, behavioral, and other abnormalities described above.

In conclusion, this study examines the toxicity of two substances (CNDs, 2,6-DCBQ-OH). Carbon nanodots (CNDs) are emerging nanomaterials with excellent optical properties that will substitute heavy metal quantum dot but up until now there are not many studies to evaluate their toxicity. On the other hand, 2,6-DCBQ-OH is released to aquatic ecosystems

since the use of chlorination, but it was only in the last years that the detection was possible. Studies regarding 2,6-DCBQ-OH toxicity are very few. Therefore, in this study the gaps regarding the toxicity of those substances are covered through a comprehensive study using the model organism zebrafish.

Lastly, while this Ph.D. thesis established several experimental techniques that can be used in the future by scientists that carry out toxicity assessment of various substances.

1^ο Κεφάλαιο

Εισαγωγή

1. Εισαγωγή

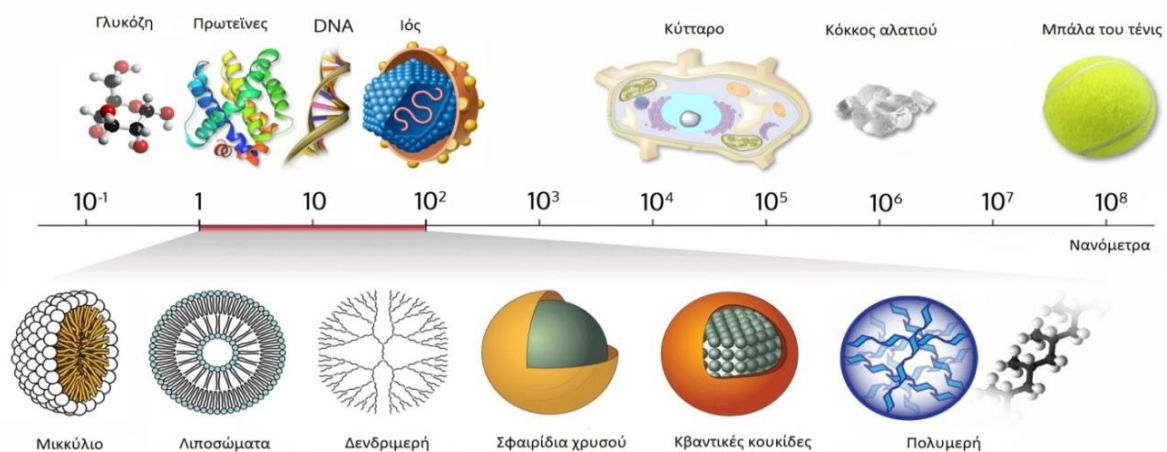
Με την συνεχή εξέλιξη της τεχνολογίας, νέοι χημικοί παράγοντες προκαλούν το ενδιαφέρον συνεχώς, με αποτέλεσμα η επιστήμη να ακολουθεί τις εξελίξεις. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες, μπορεί να είναι είτε νέα κατασκευασμένα υλικά είτε ουσίες που ανιχνευθήκαν πρόσφατα και μέχρι τώρα δεν ήταν γνωστοί. Για τέτοιους παράγοντες δεν έχουν γίνει επαρκείς μελέτες για τις επιπτώσεις τους στο περιβάλλον και τον άνθρωπο [1], [2], [3]. Οι επιπτώσεις που προκύπτουν από την παρουσία τους μπορεί να είναι πολύπλευρες καθώς η απελευθέρωση και η κατάληξή τους στο υδάτινο περιβάλλον προκαλεί υποβάθμιση των οικοσυστημάτων, αυξημένη θνησιμότητα, μορφολογικές ανωμαλίες, διαταραχές στον κύκλο ζωής και συσσώρευση στο σύνολο των υδρόβιων οργανισμών. Όλα αυτά δυνητικά θα μπορούσαν να προκαλέσουν προβλήματα στην δημόσια υγεία καθώς ο τελικός αποδέκτης είναι ο άνθρωπος ή άλλα ζώα. Οι προς μελέτη χημικοί παράγοντες (CNDs και 2,6-DCBQ-OH) εμφανίζουν ιδιαίτερες ιδιότητες (μικρό μέγεθος, εξαιρετικές οπτικές ιδιότητες, χαμηλή σταθερότητα κ.α.) [4], [5], [6], και οι επιπτώσεις τους για την δημόσια υγεία θα πρέπει να μελετηθούν [7].

Λαμβάνοντας υπόψη αυτά, η παρούσα διατριβή επικεντρώθηκε στη μελέτη της τοξικότητας δυο σημαντικών και αναδυόμενης σημασίας χημικών παραγόντων: α) των νανοκουκκίδων, τα οποία είναι νεοεμφανιζόμενα νανοϋλικά με πολλαπλές εφαρμογές, και β) των αλογονοβενζοκινονών, οι οποίες κατατάσσονται στα παραπροϊόντα χλωρίωσης του νερού, με μεγάλη αστάθεια και ανησυχητικές επιπτώσεις σε οικοσυστήματα και οργανισμούς.

1.1 Νανοϋλικά και νανοκουκκίδες άνθρακα

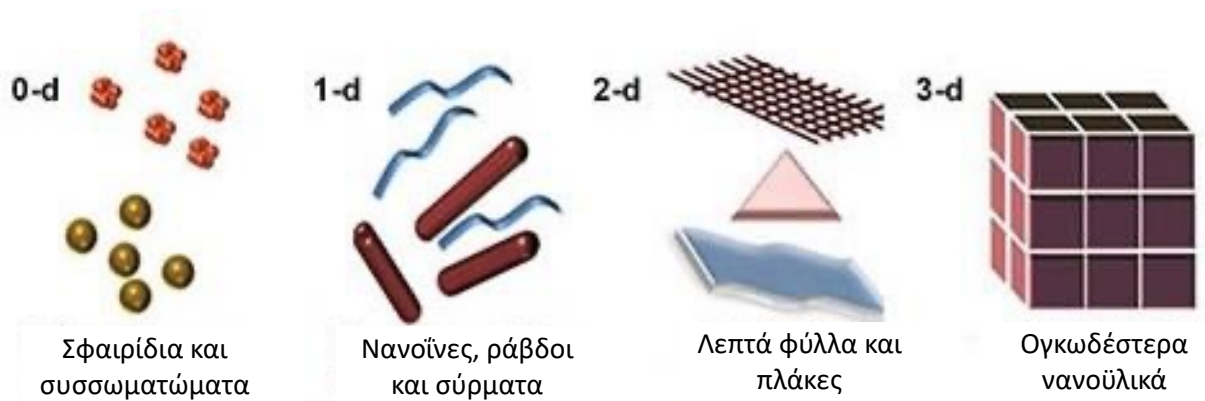
Η επιστήμη και η τεχνολογία των νανοδομών είναι ένας ευρύτατος διεπιστημονικός τομέας έρευνας, που έχει σημειώσει εκρηκτική ανάπτυξη σε όλο τον κόσμο τα τελευταία χρόνια. Έχει φέρει την επανάσταση στους τρόπους με τους οποίους δημιουργούνται διάφορα υλικά και προϊόντα, καθώς διέπεται από ένα μεγάλο φάσμα λειτουργιών και χρήσεων και έχει επιφέρει ήδη σημαντικό εμπορικό ενδιαφέρον, το οποίο και αναμένεται να ενταθεί στο μέλλον [8], [9].

Τα νανοϋλικά, σήμερα, θεωρούνται ακρογωνιαίοι λίθοι της νανοεπιστήμης και της νανοτεχνολογίας. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή Περιβάλλοντος, (European Commissioner for the Environment) [10], τα νανοϋλικά ορίζονται ως «τα φυσικά, τυχαία ή κατασκευασμένα υλικά που περιέχουν σωματίδια, σε αδέσμευτη κατάσταση, ως συσσωματώματα ή ως ένα συσσωμάτωμα, όπου το 50% ή περισσότερο των σωματιδίων, με βάση την κατανομή μεγέθους τους, έχουν μία ή περισσότερες εξωτερικές διαστάσεις που κυμαίνονται μεταξύ 1 nm και 100 nm». Σήμερα, η κατάταξη ενός υλικού ως νανοϋλικό παρεκκλίνει σημαντικά από αυτό τον αυστηρό ορισμό και νανοϋλικά θεωρούνται όλα εκείνα τα οποία έχουν μέγεθος μεταξύ του 1 nm και 100 nm. **(Εικόνα 1).**



Εικόνα 1. Κλίμακα μεγεθών διαφόρων σωματιδίων και νανοϋλικών (Ως νανοϋλικά ορίζονται με μέγεθος μεταξύ 1 και 100 nm) [11].

Τα νανοϋλικά μπορούν να διακριθούν με βάση τη σύσταση και τη διάταξή τους στο χώρο. Ως προς τη σύστασή τους, η διάκριση γίνεται σε: α) Υλικά με βάση τον άνθρακα, β) Υλικά με βάση τα μέταλλα, γ) Δενδριμερή και δ) Σύνθετα νανοϋλικά [11], [12], [13], [14]. Ως προς την διάταξή τους στο χώρο, τα νανοϋλικά χωρίζονται σε υλικά μηδενικής διάστασης (0-D), μονοδιάστατα (1-D), δισδιάστατα (2-D) και τρισδιάστατα (3-D), όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 2** [12], [15].



Εικόνα 2. Κατηγορίες νανοϋλικών με βάση τη διάταξη στο χώρο [5].

Λόγω του μεγέθους τους, τα νανοϋλικά μπορεί να έχουν μοναδικές χημικές, φυσικές, ηλεκτρικές και μηχανικές ιδιότητες [16], [17]. Οι εφαρμογές στις οποίες έχουν αξιοποιηθεί τα νανοϋλικά είναι αναρίθμητες και συνεχώς αυξάνονται [8]. Η αξιοποίησή τους έχει πολλαπλά πλεονεκτήματα και οφέλη για την κοινωνία, βελτιώνοντας τομείς, όπως, της ενέργειας, του περιβάλλοντος, της πληροφορικής, των τροφίμων, της γεωργίας αλλά και των τομέων της υγείας και της βιοϊατρικής [8], [18].

1.1.1 Νανοκουκκίδες άνθρακα (CNDs)

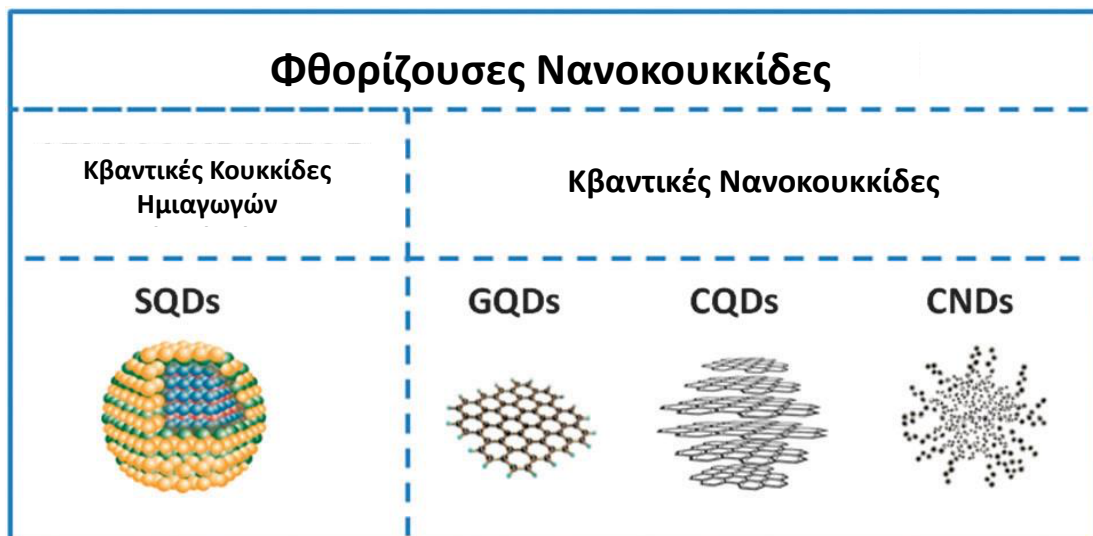
Οι νανοκουκκίδες άνθρακα (Carbon nanodots, CNDs) που επιλέχθηκαν να μελετηθούν, είναι νανοσωματίδια τα οποία συντίθενται με βάση τον άνθρακα και έχουν διάμετρο μικρότερη από 10 nm [5], [19]. Ο άνθρακας είναι ένα από τα πιο άφθονα στοιχεία του σύμπαντος και έχει χαρακτηριστεί ως «το βασικό στοιχείο των ουσιών των ζωντανών ουσιών». Αυτό οφείλεται κυρίως στην ικανότητα του άνθρακα να συνδέεται με άλλα μόρια άνθρακα και να σχηματίζει ολιγομερή και πολυμερή. Οι νέες τεχνολογίες έχουν οδηγήσει στην αξιοποίηση του άνθρακα ώστε να παραχθούν νέα νανοϋλικά με ιδιότητες που ανοίγουν νέους ορίζοντες. Το ερώτημα που εγείρεται είναι το κατά πόσο αυτά τα νανοϋλικά μπορούν να αντικαταστήσουν άλλα τα οποία έχουν σημαντικές ιδιότητες αλλά συνοδεύονται από αποδεδειγμένη τοξικότητα [20], [21].

Οι νανοκουκκίδες άνθρακα (CNDs), έκαναν την εμφάνισή τους τα τελευταία 10 έτη ως αντικαταστάτες των κβαντικών νανοκουκκίδων βαρέων μετάλλων, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως έως σήμερα. Οι προερχόμενες από βαρέα μέταλλα έχουν πολλές εφαρμογές στην ιατρική (κυτταρική στόχευση φαρμακευτικών συσκευασμάτων,

στόχευση αντισωμάτων και πρωτεϊνών, ιδιαίτερες οπτικές ιδιότητες φθορισμού) και στη βιομηχανία (υλικό των φωτοβολταϊκών συστημάτων) και εμφανίζουν ιδιαίτερα αποδοτικές ιδιότητες αποθήκευσης ενέργειας [7]. Ωστόσο, η αυξημένη τοξικότητα που παρουσιάζουν οι κουκκίδες βαρέων μετάλλων [7], [22], [23], οδήγησε την βιομηχανία στο να αντικαταστήσει αυτές μέσω της σύνθεσης CNDs. Οι CNDs αναμένεται να προτιμηθούν, ως υλικά με καλύτερες οπτικές ιδιότητες, μεγαλύτερη σταθερότητα, μεγαλύτερη ευκολία στην σύνθεση, καλύτερες ιδιότητες στην αποθήκευση ενέργειας και ενδείξεις για μειωμένη τοξικότητα σε σχέση με τις νανοκουκκίδες βαρέων μετάλλων [24]. Ωστόσο, οι μέχρι σήμερα έλεγχοι τοξικότητας για τις CNDs περιορίζονται μόνο σε μεμονωμένες μελέτες σε επίμυες, όπου προκάλεσαν χαμηλή τοξικότητα [20]. Έχοντας υπόψη όλα αυτά, κρίθηκε αναγκαία η περαιτέρω μελέτη της τοξικότητας που θα οδηγούσε σε ασφαλή συμπεράσματα αναφορικά με την χρήση τους και για τυχόν συγκριτικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων υλικών.

Στις πρώτες επιστημονικές δημοσιεύσεις που αφορούν τις φθορίζουσες νανοκουκκίδες με βάση τον άνθρακα, ο όρος «κβαντικές κουκκίδες άνθρακα» αποδίδεται σε όλους τους αναδυόμενους τύπους νανοκουκκίδων φθορισμού άνθρακα χωρίς να παρέχει επαρκώς λεπτομερή αξιολόγηση των απαιτήσεων που ονομάζονται «κβαντικές κουκκίδες». Ο όρος «κβαντική κουκκίδα» (QD), που επινοήθηκε αρχικά από τον Mark Reed, αναφερόταν αρχικά σε ημιαγωγικά νανοσωματίδια με μέγεθος που περιορίζεται σε κβαντικό περιορισμένο σχήμα [25].

Οι υπόλοιπες «κουκκίδες άνθρακα», λαμβάνοντας υπόψη παράγοντες όπως η διάταξη των ατόμων άνθρακα και η κρυσταλλική δομή ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 3** σε α) άμορφες ημι-σφαιρικές νανοκουκκίδες άνθρακα «Carbon NanoDots» (CNDs) (οι οποίες μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή), β) σφαιρικές κβαντικές κουκκίδες «Carbon Quantum Dots» (CQDs) και γ) νανοκουκκίδες με το p-συζευγμένο φύλλο γραφενίου που αναφέρονται ως «Graphene Quantum Dots» (GQDs) [25].



Εικόνα 3. Ταξινόμηση φθορίζουσών νανοκουκκίδων.

Μεταξύ τους τα διάφορα είδη των νανοκουκκίδων άνθρακα παρουσιάζουν ομοιότητες αλλά και αξιοσημείωτες διαφορές, στις οποίες οφείλεται και η διαφορετική ονομασία (Πίνακας 1) [25].

Πίνακας 1. Συνοπτική καταγραφή των διαφορών και των ομοιοτήτων μεταξύ των ειδών των Νανोकουκκίδων Άνθρακα.

	SQDs	GQDs	CQDs	CNDs
Χρονολογία ανακάλυψης	1981	2006	2004	
Φύση	Ανόργανα στοιχεία	Ανθρακικά υλικά	Ανθρακικά υλικά με Οξυγόνο(5-50%)	
Δομή	Κρυσταλλική	Μικρά θραύσματα από φύλλα γραφίτη	Κρυσταλλική δομή κυρίως γραφιτικός άνθρακας sp^2	Άμορφη
Σχήμα	Σφαιρικό	Δίσκοι από φύλλα GO	Ημισφαιρικό	
Κβαντικός περιορισμός	ΝΑΙ			ΟΧΙ
Διαλυτότητα	Κυρίως υδροφοβικό (με τροποποίηση γίνεται υδροφιλικό)	Υδροφιλικό		
Τοξικότητα	Με Βαρέα Μέταλλα: ΥΨΗΛΗ Χωρίς Βαρέα Μέταλλα: ΧΑΜΗΛΗ	ΧΑΜΗΛΗ		
Απορρόφηση φωτός	Στο UV/Vis ευρεία μπάντα απορρόφησης	Κύρια κορυφή ~ 230 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) Μικρή κορυφή ~ 300 nm ($\sigma \rightarrow \pi^*$) Πολύ μεγάλη ζώνη απορρόφησης	Στη περιοχή του UV (260-350 nm) Πολύ μεγάλη ζώνη απορρόφησης	
Σύνθεση	«από τη βάση προς τη κορυφή»	«από βάση προς τη κορυφή» και «από κορυφή προς τη βάση»		
Κοινές ιδιότητες	Οπτοηλεκτρικές Μεγάλη δραστική περιοχή Αντοχή στη φωτοευαισθητοποίηση Καλή φωτοσταθερότητα			

1.1.2 Σύνθεση των CNDs

Η σύνθεση των νανοκουκκίδων άνθρακα (CNDs) μπορεί να επιτευχθεί μέσω χημικών, ηλεκτροχημικών ή φυσικών τεχνικών. Οι κουκκίδες που συντίθενται μπορούν να βελτιστοποιηθούν κατά τη διάρκεια ή μετά τη σύνθεσή τους [24]. Οι επιφανειακές τροποποιήσεις είναι ιδιαίτερα σημαντικές καθώς μπορούν να προσδώσουν διαφορετικές ιδιότητες στο τελικό προϊόν, με αποτέλεσμα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διαφορετικές εφαρμογές [21], [59]. Οι συνθετικές μέθοδοι διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τις “top-down” και τις “bottom-up”. Η “top-down” συνθετική πορεία αναφέρεται στο σπάσιμο μεγαλύτερων δομών άνθρακα, όπως ο γραφίτης. Η “bottom-up” συνθετική πορεία περιλαμβάνει τη σύνθεση των CNDs από μικρές πρόδρομες ενώσεις όπως οι υδατάνθρακες, μέσω υδροθερμικής κατεργασίας και συνθετικών πορειών με χρήση μικροκυμάτων [24]. Η “bottom up” συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε στην παρούσα διατριβή ακολουθεί μεθόδους φιλικές προς το περιβάλλον με φθηνές πρώτες ύλες (π.χ. κιτρικό οξύ) οδηγώντας σε υλικά που εξυπηρετούν την πράσινη ενέργεια και τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας (Α.Π.Ε.).

1.1.2.1 Η χρήση βιολογικών πηγών για τη σύνθεση νανοκουκκίδων άνθρακα

Πρόσφατα, υδατάνθρακες όπως η γλυκόζη, η σακχαρόζη και το άμυλο χρησιμοποιήθηκαν ως πρόδρομες ενώσεις παρουσία ισχυρών οξέων για την παρασκευή CNDs. Η διαδοχική επεξεργασία αυτών των διαλυμάτων με νιτρικό οξύ οδήγησε στη διάσπαση των ενώσεων του άνθρακα για να σχηματίσουν νανοϋλικά άνθρακα (συμπεριλαμβανομένων των CNDs) και για να εισαχθούν ομάδες οξυγόνου (καρβοξυλοομάδες, υδροξυλοομάδες, επόξυομάδες κλπ.) καθώς και ετεροάτομα όπως το άζωτο (N) και το θείο (S) στις επιφάνειές τους. Η επιφανειακή ένθεση με πολυμερή ή οργανικά μόρια απαιτήθηκε για την ενίσχυση της έντασης του φθορισμού τους [26].

Πρώτη φορά το 2016 αναφέρεται η χρήση βιολογικών πρώτων υλών ως πηγή άνθρακα για τη σύνθεση νανοκουκκίδων άνθρακα. Τον Ιούλιο του 2016, ο Ramanah και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν φυτοπλαγκτονικούς οργανισμούς, οι οποίοι σχηματίστηκαν κατά τον ευτροφισμό λίμνης, για τη σύνθεση νανοκουκκίδων άνθρακα [27].

Επιπρόσθετα, ο Hua και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν τα βακτήρια *Staphylococcus aureus* και το *Escherichia coli* για τη σύνθεση μη τοξικών νανοκουκίδων άνθρακα μέσω της υδατοθερμικής μεθόδου, με χαμηλό κόστος έναντι των κοινών φθορίζουσων ουσιών [28]. Αργότερα, τον Φεβρουάριο του 2018 δημοσιεύτηκε η σύνθεση βιοσυμβατών νανοκουκίδων άνθρακα με τη χρήση του μικροοργανισμού *Lactobacillus plantarum* μέσω της υδατοθερμικής μεθόδου. Τον Σεπτέμβριο της ίδιας χρονιάς, ο Placido και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν βιοκάρβουνο από μικροάλη, δηλαδή τα απόβλητα των μικροαλγών, για τη σύνθεση νανοκουκίδων άνθρακα. [29]. Τέλος, το 2019 ο Zhang και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν άλη για τη σύνθεση νανοκουκίδων άνθρακα με την υδατοθερμική μέθοδο με σκοπό την αξιοποίησή τους ως ανιχνευτές H₂O₂ [30].

Οι μικροοργανισμοί ως πηγές άνθρακα για τη σύνθεση νανοκουκίδων άνθρακα συνοδεύονται από σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως είναι η αφθονία τους στο περιβάλλον και το χαμηλό κόστος με το οποίο αποκτώνται. Επιπρόσθετα, οι νανοκουκίδες που προκύπτουν είναι συνήθως διαλυτές στο νερό, χαρακτηρίζονται από χαμηλή τοξικότητα και είναι συμβατές με τους ζωντανούς ιστούς.

Συνοψίζοντας, υπάρχει πολύ έντονη ερευνητική προσπάθεια από την επιστημονική κοινότητα να αντικαταστήσει τις κουκκίδες βαρέων μετάλλων με νέες που προκύπτουν από απλά υλικά, που βρίσκονται σε αφθονία στο περιβάλλον και που πιθανότατα αποτελούν πιο ασφαλή υλικά και με λιγότερες αρνητικές επιπτώσεις κατά την απελευθέρωση στο περιβάλλον. Είναι κρίσιμο να μελετηθούν αυτές οι επιπτώσεις πριν ακόμα οι CNDs αντικαταστήσουν πλήρως τις συμβατικές κουκκίδες βαρέων μετάλλων. Αυτό το κενό καλύφθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

1.1.3 Ιδιότητες των νανοκουκίδων άνθρακα (CNDs)

Η πλειονότητα των παραγόμενων νανοκουκίδων άνθρακα (CNDs) έχει κοινές ιδιότητες, οι οποίες τα καθιστούν αξιοποιήσιμα σε ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών. Η συνοπτική παρουσίαση των ιδιοτήτων των CNDs στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι σημαντική καθώς αυτές είναι πιθανό να επηρεάζουν τον οργανισμό κατά την έκθεση (σταθερότητα κατά τις ημέρες της έκθεσης, μελέτη της εισόδου στον οργανισμό μέσω των ιδιοτήτων φθορισμού, μεταβολή του pH κ.α.) και πρέπει να ληφθούν υπόψη. Παρακάτω θα γίνει μια σύντομη αναφορά στις πιο σημαντικές ιδιότητες.

1.1.3.1 Φθορισμός

Η εκπομπή φθορισμού είναι η πιο σημαντική οπτική ιδιότητα των CNDS. Ωστόσο, ο μηχανισμός εμφάνισης φθορισμού παραμένει υπό αμφισβήτηση. Υπάρχουν διάφοροι αναφερόμενοι μηχανισμοί, συμπεριλαμβανομένου της επίδρασης του κβαντικού μεγέθους, των επιφανειακών ατελειών και μοριακών καταστάσεων. Σύμφωνα με τελευταίες έρευνες, έχει αποδειχθεί πως ο φθορισμός των CNDS σε ορισμένες περιπτώσεις, οφείλεται στην μοριακή κατάσταση (molecular like state) ειδικά για τις CNDS που προέρχονται από το κιτρικό οξύ [31].

1.1.3.2 Απορρόφηση στην UV ακτινοβολία

Βασική ιδιότητα των CNDS είναι η απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Συνήθως, οι CNDS έχουν ισχυρή απορρόφηση που εκτείνεται στην ορατή περιοχή. Ωστόσο, εντοπίζονται διαφορές στα φάσματα υπεριώδους ακτινοβολίας τους, που εξαρτώνται από τις χρησιμοποιούμενες πρόδρομες ουσίες και τη συνθετική διαδικασία [19]. Οι περισσότερες από τις CNDS δείχνουν μια ζώνη απορρόφησης γύρω στα 280 nm, η οποία είναι χαρακτηριστική των π αρωματικών συστημάτων. Αυτή η κορυφή αποδίδεται κυρίως στις μεταβάσεις π-π* και n-π* των δεσμών C = C και C = O, αντίστοιχα, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις εμφανίζεται μια κορυφή περίπου στα 300 nm λόγω n-π* π-π* μεταβάσεων των δεσμών COO⁻ ή C-O-C, αντίστοιχα [6].

1.1.3.3 Φωτοφωταύγεια– Photoluminescence (PL)

Η φωτοφωταύγεια των CNDS είναι από τις πιο σημαντικές ιδιότητές τους, η οποία χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά σε όλες τις εφαρμογές. Γενικά, η PL περιγράφει τις μεταβάσεις του χάσματος ζώνης, λόγω συζευγμένων πεδίων p. Μετά τη διέγερση, τα ηλεκτρόνια μεταπηδούν στις (επιτρεπτές) διεγερμένες καταστάσεις και στη συνέχεια, όταν επιστρέφουν στην βασική κατάσταση, απελευθερώνεται ενέργεια είτε εκπέμποντας το φως είτε όχι. Στην περίπτωση των διαδικασιών με ακτινοβολία, έχουμε down-conversion και up-conversion PL, ανάλογα με την ενέργεια του εκπεμπόμενου φωτονίου [32].

1.1.3.4 Φωτοσταθερότητα

Η φωτοσταθερότητα ή η σταθερότητα PL είναι βασικός παράγοντας για τη χρήση των CNDs σε όλες τις εφαρμογές που βασίζονται σε PL. Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί τύποι μετρούμενης φωτοσταθερότητας: η σταθερότητα μετά από μακρόχρονη συνεχή διέγερση, η σταθερότητα ενός διαλύματος μετά από αρκετές ημέρες και η σταθερότητα των CNDs σε σχέση με το χρόνο αποθήκευσης (αποθήκευση σε μορφή σκόνης). Σχεδόν όλες οι παραγόμενες CNDs έχουν καλή φωτοσταθερότητα μετά από συνεχή ακτινοβολία για τουλάχιστον 1 ή 2 ώρες, ή ακόμη και μετά από ακτινοβόληση 7 ωρών με λαμπτήρα 500W Xe. Όσον αφορά τη φωτοσταθερότητα στην διάρκεια του χρόνου, τα διαλύματα είναι σταθερά σε διάρκεια μιας εβδομάδας έως και 6 μηνών [6].

1.1.3.5 Εξάρτηση από το pH

Μια άλλη πτυχή της PL είναι η ευαισθησία στο pH. Λόγω της περιεκτικότητάς τους σε ιονιζόμενες ομάδες, όπως ομάδες καρβοξυλίου, αμινομάδες και υδρόξυλομάδες, το τοπικό περιβάλλον επιφάνειας μεταβάλλεται σύμφωνα με το pH του διαλύματος. Έτσι, η PL ποικίλλει αναλόγως. Τυπικά, οι περισσότερες CNDs έχουν μια σταθερή εκπομπή PL σε μια περιοχή pH μεταξύ 4 και 10. Πέρα από αυτό το εύρος, η εκπομπή PL μειώνεται δραματικά. Σε ορισμένες άλλες περιπτώσεις, οι CNDs αποδείχθηκαν σταθερές σε διαφορετικές τιμές pH. Στην πραγματικότητα, λόγω της υψηλής ευαισθησίας των CNDs στο pH, χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη ενός δείκτη pH, ο οποίος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και σε βιολογικά συστήματα. Η τελευταία παράμετρος, που συχνά εξετάζεται, είναι η αντοχή των CNDs σε άλατα ή με άλλα λόγια η επίδραση της ιοντικής ισχύος στην εκπομπή PL. Τυπικά, οι CNDs είναι σταθερές σε διαλύματα υψηλής περιεκτικότητας σε άλατα. Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε σχετικές εφαρμογές, όπου η υψηλή ιοντική ισχύς μπορεί να αποτελεί πρόκληση [6].

1.1.4 Εφαρμογές των CNDs

Ως μια νέα κατηγορία φθοριζουσών νανοϋλικών άνθρακα, οι CNDs κατέχουν ελκυστικές ιδιότητες, όπως υψηλή σταθερότητα ως προς το χρόνο, καλή αγωγιμότητα, χαμηλή τοξικότητα, φιλικότητα προς το περιβάλλον και παρασκευάζονται συνήθως, με απλές συνθετικές πορείες [24]. Το γεγονός αυτό τις καθιστά προτιμώμενα υλικά για εφαρμογές, όπως η βιοαπεικόνιση, η (βιο)ανίχνευση και η παροχή φαρμάκων. Βασισμένες στις εξαιρετικές οπτικές και ηλεκτρονικές τους ιδιότητες, οι CNDs μπορούν, επίσης, να βρουν εφαρμογές στην κατάλυση, στους αισθητήρες και στον τομέα της οπτοηλεκτρονικής. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι CNDs χρησιμοποιούνται ως μέσο απεικόνισης φθορισμού, ωστόσο, ένας περιορισμένος αριθμός μελετών επικεντρώθηκε, επίσης, στη φωτοακουστική απεικόνιση [33].

Παρακάτω, παρουσιάζονται συνοπτικά οι βασικές εφαρμογές των CNDs. Οι εφαρμογές των CNDs αναδεικνύουν την σημασία τους για την επιστήμη και γίνεται σαφές πως τα επόμενα χρόνια θα χρησιμοποιούνται σε πολλούς τομείς. Αυτό σημαίνει πως άμεσα και με σαφήνεια πρέπει να δοθούν απαντήσεις αναφορικά με τις επιπτώσεις τους στους οργανισμούς.

1.1.4.1 Βιοαπεικόνιση

Οι CNDs μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιοαπεικόνιση λόγω της εκπομπής φθορισμού και της βιοσυμβατότητας τους. Με την έγχυση CNDs σε ζωντανούς οργανισμούς, μπορούν να ληφθούν εικόνες *in vitro* με στόχο την ανίχνευση ή διάγνωση. Ο Ya-Ping Sun και οι συνεργάτες του διεξήγαγαν πρωτοποριακές εργασίες για τη βιοχημική απεικόνιση των κουκκίδων άνθρακα [34]. Όταν οι κουκκίδες άνθρακα, σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα, επώαστηκαν με καρκινική κυτταρική σειρά (καρκίνος του μαστού) και διεγέρθηκαν με λέιζερ στα 800 nm, ήταν ικανές να επισημάνουν τόσο την κυτταρική μεμβράνη όσο και το κυτταρόπλασμα χωρίς να φτάσουν στον πυρήνα [66], [67]. Για περαιτέρω προκλινικές και δυνητικές κλινικές εφαρμογές, οι κουκκίδες άνθρακα πρέπει να πληρούν τις απαιτήσεις της αμερικανικής Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration-FDA), όπου οι παράγοντες που εγχέονται στο ανθρώπινο σώμα πρέπει να απομακρύνονται πλήρως σε εύλογο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε οι ενέσιμοι παράγοντες δεν μπορούν να συσσωρευθούν στο σώμα και ο χρόνος κυκλοφορίας τους πρέπει να

βελτιστοποιηθεί [19]. Οι CNDs χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία σε μια ποικιλία απεικονίσεων μεταμόσχευσης κυττάρων, όπως HeLa [35], [36], [37], ανθρώπινα νευρικά βλαστοκύτταρα [38], 4 T1 [39], NIH-3T3 [40], A549 [41], HepG-2 [42], κτλ. Οι CNDs εισήχθησαν κυρίως στα κύτταρα μέσω ενδοκυττάρωσης και συγκεντρώθηκαν στο κυτταρόπλασμα. Υπάρχουν κάποιες αναφορές πως οι CNDs εισέρχονται στον πυρήνα των κυττάρων [43]. Ο Wu και οι συνεργάτες του ανέφεραν ένα νέο σύστημα βασισμένο στις CNDs για απεικόνιση εξωγενούς και ενδογενούς NO σε ζωντανά κύτταρα [33], [42].

Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία των CNDs θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην *in vivo* βιοαπεικόνιση, επιτρέποντας έτσι τη δυνατότητα διερεύνησης της βιοκατανομής και της αποβολής τους στα ζώα [19]. Τα zebrafish χρησιμοποιούνται ευρέως για την επιστήμη της ιατρικής [44]. Ο Kang YF και οι συνεργάτες του επέλεξαν το zebrafish ως πειραματικό μοντέλο για τη φθορισμομετρική απεικόνιση και βρήκαν ότι οι CNDs συσσωρεύτηκαν επιλεκτικά στα μάτια και στον λεκιθικό σάκο [76], [78].

1.1.4.2 Φωτοακουστική απεικόνιση

Η φωτοακουστική απεικόνιση είναι ένας νέος τύπος τεχνικών βιοαπεικόνισης που βασίζεται στο φωτοακουστικό φαινόμενο κατά το οποίο συμβαίνει μετατροπή του φωτός σε ακουστικά κύματα λόγω της απορρόφησης των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων και της εντοπισμένης θερμικής διέγερσης. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η φωτοακουστική απεικόνιση μπορεί να είναι πολύ χρήσιμο εργαλείο για βιοαπεικόνιση *in vivo*, συμπεριλαμβανομένης της απεικόνισης όγκων, της χαρτογράφησης οξυγόνωσης του αίματος, της μέτρησης της αιμοσφαιρίνης, της λειτουργικής απεικόνισης του εγκεφάλου, της ανίχνευσης του μελανώματος του δέρματος κλπ. [46]. Ο Pan και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι για πρώτη φορά οι κουκκίδες άνθρακα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη φωτοακουστική απεικόνιση των λεμφαδένων του δείκτη SLN (sentinel lymph nodes) και μπορούν να παρέχουν κρίσιμες πληροφορίες για την πρόοδο της καρκινικής νόσου [33].

1.1.4.3 (Βιο) ανίχνευση

Οι CNDs εφαρμόζονται, επίσης, στη (βιο)ανίχνευση ως φορείς (βιο)αισθητήρων λόγω της ευκολίας τους ως προς την τροποποίηση, την υψηλή διαλυτότητα στο νερό, την χαμηλή τοξικότητα, την καλή φωτοσταθερότητα και την εξαιρετική βιοσυμβατότητα τους [26]. Η

αλληλεπίδραση μεταξύ των κουκκίδων άνθρακα και των χημικών ουσιών έχει ως αποτέλεσμα την απόσβεση/ενίσχυση της εκπομπής των κουκκίδων άνθρακα. Μια μεγάλη ποικιλία βιολογικών/χημικών αισθητήρων αναπτύχθηκε με βάση τις ιδιότητες φθορισμού και τις επιφανειακές λειτουργικές ομάδες των κουκκίδων άνθρακα [43].

1.1.4.4 Υποβοηθούμενη χορήγηση φαρμάκων

Τα τελευταία χρόνια, τα συστήματα χορήγησης φαρμάκων με βάση τη νανοτεχνολογία (Drug delivery systems-DDSs) έχουν αναπτυχθεί ευρέως και έχουν διερευνηθεί διάφορα νανοϋλικά όπως τα οξείδια του γραφενίου, τα πολυμερή νανοσωματίδια, η μεσοπορώδης σίλικα και τα νανοσωματίδια χρυσού (gold nanoparticles, AuNPs) ως οχήματα παροχής φαρμάκων [47]. Τα AuNPs ήταν τα πλέον διερευνημένα νανοσωματίδια ως συστήματα χορήγησης φαρμάκων, αλλά λόγω των προβλημάτων τοξικότητας και βιοσυμβατότητάς τους, αντιμετώπισαν περιορισμούς στις κλινικές εφαρμογές.

Οι κουκκίδες άνθρακα έχουν ήδη εδραιώσει την παρουσία τους στον τομέα της νανοϊατρικής ως φορείς φαρμάκων και γονιδίων [33]. Η εξαιρετική βιοσυμβατότητα και η αποκόλληση φαρμάκων και γονιδίων από τις CNDs ικανοποιούν την προϋπόθεση για *in vivo* εφαρμογές. Οι πλούσιες και ρυθμιζόμενες λειτουργικές ομάδες, όπως τα αμινοξέα, το καρβοξύλιο ή το υδροξύλιο, μπορούν να δώσουν κουκκίδες άνθρακα με την ικανότητα να μεταφέρουν θεραπευτικούς παράγοντες, δημιουργώντας τις νανοσωματίνες-theranostic nanomedicines [48], [49], [50]. Η εκπομπή ακτινοβολίας των κουκκίδων άνθρακα παρέχει την ευκαιρία παρακολούθησης της κατανομής και της αντίδρασης του φαρμάκου σε πραγματικό χρόνο [19].

Αν και ο καρκίνος και άλλες ασθένειες έχουν αντιμετωπιστεί συμβατικά με χημειοθεραπεία, μια τέτοια προσέγγιση, γενικά, στερείται εξειδίκευσης και μπορεί να προκαλεί προβλήματα τοξικότητας και αντοχής σε πολλαπλά φάρμακα [51]. Ως εκ τούτου, επιδιώχθηκαν μέθοδοι βασισμένες στην στοχοθετημένη παράδοση φαρμάκων ως εναλλακτικές λύσεις για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας των φαρμάκων με ταυτόχρονη μείωση των παρενεργειών [85], [86]. Ωστόσο, σε τέτοιες εναλλακτικές μεθόδους, οι παράγοντες στόχευσης επηρεάζονται, επίσης, από την πρόωρη απελευθέρωση προτού φθάσει στο στόχο [54], [55].

Οι κουκκίδες άνθρακα που συντέθηκαν με τη θερμική πυρόλυση του κιτρικού οξέος και της πολυενοπολυαμίνης χρησιμοποιήθηκαν από τον Zheng και τους συνεργάτες του ώστε να φέρουν την οξαλιπλατίνη, ένα φάρμακο με βάση την πλατίνα, καθώς τα φάρμακα με βάση την πλατίνα είναι τα πιο αποτελεσματικά αντικαρκινικά φάρμακα και χρησιμοποιούνται σε περισσότερες από 50% χημειοθεραπειών για κλινικούς ασθενείς με καρκίνο [56]. Ο Tang και οι συνεργάτες του περιέγραψαν για πρώτη φορά την παροχή φαρμάκων με βάση τη Μεταφορά Ενέργειας Συντονισμού (FRET) για κυτταρική απεικόνιση και παρακολούθηση απελευθέρωσης φαρμάκου [48], [51]. Για να χορηγηθεί η δοξορουβικίνη (doxorubicin-DOX), ένα αντικαρκινικό φάρμακο, ανέπτυξαν ένα σύστημα CDs με βάση το FRET το οποίο μπορεί να μεταφέρει αποτελεσματικά το DOX στην περιοχή ενδιαφέροντος [33]. Το σύστημα αυτό αποδείχθηκε πολύ αποτελεσματικό και η χορήγηση του στα καρκινικά κύτταρα ήταν καλά στοχοθετημένη. Το σήμα FRET τερματίζεται όταν τα μόρια DOX απελευθερώνονται από την επιφάνεια των κουκκίδων άνθρακα. Ο φθορισμός των κουκκίδων άνθρακα ανακτάται [15], [39]. Σε μια παρόμοια μελέτη, συντέθηκαν CDs από ολιγοαιθυλενιμίνη και β-κυκλοδεξτρίνη χρησιμοποιώντας μια απλή μέθοδο θέρμανσης με φωσφορικό οξύ. Δημιούργησαν φθορίζοντα νανοσύμπλοκα CDs με υαλουρονικό οξύ για να στοχεύσουν τα καρκινικά κύτταρα και έπειτα “φόρτωσαν” το αντικαρκινικό φάρμακο DOX στα νανοσύμπλοκα και έδειξαν ότι το νανοσύμπλοκο με DOX έχει πιο ενισχυμένο κυτταροτοξικό αποτέλεσμα από ότι το ελεύθερο DOX, έναντι των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα H1299 [58], [33].

1.1.4.5 CNDs στην παράδοση γονιδίων/πρωτεϊνών

Οι CNDs χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, στο πεδίο της χορήγησης και μεταφοράς γονιδίων. Η γονιδιακή θεραπεία θα μπορούσε να είναι μια καλή επιλογή για τη θεραπεία πολλών ασθενειών (σε αυτή τη θεραπεία, γονίδια καταστολής όγκων εισάγονται στα κύτταρα όγκου που αναστέλλουν την ανάπτυξη), αλλά χρειάζεται ένας αποτελεσματικός νανοφορέας για την παροχή θεραπευτικά ωφέλιμων φορτίων. Ο Zhang και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν μια εύκολη στη χρήση, bottom-up μέθοδο για τη σύνθεση πολυλειτουργικών κουκκίδων άνθρακα με υαλουρονικό (hyaluronate-HA) και πολυαιθυλενιμίνη (polyethyleneimine-PEI). Οι προκύπτουσες κουκκίδες άνθρακα είχαν υψηλότερη βιοσυμβατότητα, φωταύγεια και υψηλότερη ικανότητα διασποράς. Αυτές οι

κουκκίδες άνθρακα ενσωματώθηκαν γρήγορα και εύκολα στο CD44 των καρκινικών κυττάρων (το αντιγόνο CD44 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη κυτταρικής επιφάνειας που εμπλέκεται στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου, στην κυτταρική προσκόλληση και τη μετανάστευση) [57], [59].

1.1.4.6 Άλλες εφαρμογές

- Οπτοηλεκτρονική (opto-electronics)
- Φωτοκατάλυση
- Δίοδοι εκπομπής φωτός (LEDs)
- Βιοϊατρικές εφαρμογές

1.1.5 Επιπτώσεις της νανοτεχνολογίας στο περιβάλλον και στον άνθρωπο

Η επιστήμη της νανοτεχνολογίας ορίζεται ως η έρευνα, η ανάπτυξη, η παραγωγή και η επεξεργασία δομών και υλικών σε νανομετρική κλίμακα σε διάφορους τομείς της επιστήμης, της τεχνολογίας, της υγείας, της βιομηχανίας και της γεωργίας. Αποτελεί επί του παρόντος έναν από τους τομείς έρευνας με την υψηλότερη προτεραιότητα σε πολλές χώρες, λόγω της τεράστιας οικονομικής της σημασίας [60]. Με την πρόοδο της νανοτεχνολογίας, λοιπόν, τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες, υπάρχει ένας αυξανόμενος ρυθμός εισαγωγής των νανοϋλικών σε διάφορες πτυχές της ζωής μας [61]. Σύμφωνα με τις πληροφορίες που συλλέχθηκαν από την Εθνική Πρωτοβουλία Νανοτεχνολογίας των Η.Π.Α. (National Nanotechnology Initiative), η παραγωγή και οι εφαρμογές υλικών νανοκλίμακας αυξάνονται αξιοσημείωτα κάθε χρόνο [62].

Όπως ήδη αναφέραμε, τα νανοϋλικά εφαρμόζονται όλο και περισσότερο σε πολλούς τομείς, όπως η οικολογία, η ιατρική, η μόδα, τα καλλυντικά, η επιστήμη των υλικών κλπ. [63], [64]. Μεταξύ των διαφόρων τύπων νανοϋλικών, αυτά με βάση τον άνθρακα είναι από τα πιο σημαντικά και έχουν δυνητικά εκτεταμένες εφαρμογές. Αφ'ετέρου, η αυξανόμενη χρήση των νανοϋλικών επιτείνει και την πιθανότητα έκθεσης οργανισμών σε αυτά με άμεσο και έμμεσο τρόπο, γεγονός που αναμφισβήτητα θα έχει αρνητικές επιπτώσεις [3], [60]. Έχουν εκφραστεί ανησυχίες σχετικά με την τύχη, τη μεταφορά και τον μετασχηματισμό των νανοϋλικών που απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Η αναγνώριση των δυνητικών κινδύνων των νανοϋλικών για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία

είναι εξαιρετικά σημαντική για τη συνέχιση της ανάπτυξής τους στο μέλλον. Υπάρχουν αρκετές αναφορές για τις αρνητικές επιπτώσεις αυτών των υλικών σε βιολογικά συστήματα και κυτταρικές σειρές καθώς η τοξικότητα και οι παρενέργειες αυτών των υλικών έχουν λάβει πρόσφατα σημαντική προσοχή [62]. Παρακάτω παρουσιάζεται η πορεία κατά την απόρριψη νανοϋλικών α) στο περιβάλλον, β) στον αέρα, γ) στο έδαφος, δ) στο υδάτινο περιβάλλον και οι επιπτώσεις στο άνθρωπο και σε άλλους οργανισμούς. Οι χημικοί παράγοντες προς μελέτη ανήκουν στα νανοϋλικά και αναμένεται όταν χρησιμοποιηθούν σε μεγάλη κλίμακα να ακολουθούν την ίδια πορεία κατά την απόρριψη τους.

1.2.5.1 Περιβάλλον

Τα νανοϋλικά που ανιχνεύονται στο περιβάλλον προέρχονται είτε από διάφορες φυσικές δραστηριότητες (π.χ. ηφαιστειακές δραστηριότητες, δασικές πυρκαγιές, διάβρωση εδάφους, καταιγίδες,) είτε από ανθρωπογενείς δραστηριότητες (π.χ. καύση ορυκτών καυσίμων, εξόρυξη/κατεδάφιση, κυκλοφορία αυτοκινήτων και απόρριψη νανοϋλικών). Τα νανοϋλικά, συσσωρεύονται στον αέρα, το νερό, το χώμα και τα ιζήματα [60], [65].

1.2.5.2 Αέρας

Εξακολουθούν να υπάρχουν μεγάλα κενά γνώσης όσον αφορά την περιβαλλοντική τύχη των νανοϋλικών, ιδίως μετά την απελευθέρωση στον αέρα. Σε κάθε χρήση νανοϋλικών υπάρχει η πιθανότητα απελευθέρωσης στον ατμοσφαιρικό αέρα. Τα νανοϋλικά στην ατμόσφαιρα εκλύονται από τις εξατμίσεις των μέσων μεταφοράς, της καύσης, της έκρηξης και της οξειδωσης των ατμοσφαιρικών αερίων [49], [50].

Τα νανοϋλικά που εισέρχονται στην ατμόσφαιρα τείνουν να εκτίθενται σε ηλιακό φως και μήκη κύματος υπεριώδους ακτινοβολίας σε σημαντικά υψηλότερους βαθμούς από αυτά που απελευθερώνονται σε άλλα τμήματα του περιβάλλοντος [68]. Η έκθεση αυτή είναι πιθανό να προκαλέσει φυσικοχημικές αλλαγές στα νανοϋλικά.

1.2.5.3 Έδαφος

Τα νανοϋλικά μπορούν να εισέλθουν στο έδαφος διαμέσου διαφορετικών πηγών και μονοπατιών, όπως για παράδειγμα με χρήση λιπασμάτων και φυτοπροστατευτικών προϊόντων [66]. Το έδαφος είναι μια μήτρα πολυστρωματικής και πολύπλοκης

αλληλεπίδρασης μεταξύ της ύλης (π.χ. αέρια- στερεά-υδατικά-οργανικά/ανόργανα συστατικά) και των οργανισμών. Τα νανοϋλικά περνούν μέσα από τους πόρους του εδάφους και προσκολλώνται στα σωματίδια του εδάφους λόγω της μεγάλης επιφάνειας τους.

Επιπλέον, συσσωματώματα των νανοϋλικών μπορούν να ακινητοποιηθούν με καθίζηση ή διήθηση. Η κινητικότητα των νανοϋλικών στο έδαφος βασίζεται σε διάφορες μεταβλητές (π.χ. φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων, χαρακτηριστικά του εδάφους και του περιβάλλοντος και αλληλεπιδράσεις των νανοϋλικών με φυσικά κολλοειδή).

Προηγούμενες μελέτες έχουν, επίσης, αναφέρει ότι τα φυτά μπορούν να προσλαμβάνουν και να μεταφέρουν τα νανοϋλικά από το έδαφος, τα οποία μπορεί να επηρεάσουν τη βλάστηση και την ανάπτυξη των φυτών. Ο Ge και οι συνεργάτες του (2011) διαπίστωσαν δυσμενείς επιπτώσεις των TiO_2 και ZnO στη βιοποικιλότητα των κοινοτήτων των μικροοργανισμών του εδάφους [42], [53]. Τα νανοϋλικά, σε ορισμένες συγκεντρώσεις μπορούν να μειώσουν την ανάπτυξη και την αναπαραγωγική ικανότητα των φυτών και μειώνουν τη φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα των φυτικών κυττάρων και μεταβάλλουν την περιεκτικότητα των φυτικών χρωστικών ουσιών [78], [63].

1.2.5.4 Υδάτινο περιβάλλον

Τα νανοϋλικά μπορούν να εισέλθουν άμεσα στο υδάτινο περιβάλλον μέσω βιομηχανικής αποδέσμευσης, απόρριψης αποβλήτων επεξεργασίας λυμάτων ή/και μέσω επιφανειακών απορροών από εδάφη. Η τύχη των νανοϋλικών στο υδάτινο σύστημα επηρεάζεται έτσι, από διάφορες διαδικασίες, όπως συσώρευση, διάσπαση, διάχυση, αλληλεπίδραση με άλλα συστατικά (και υδρόβιους οργανισμούς), βιολογική αποδόμηση (αερόβια και αναερόβια) και αβιοτική αποδόμηση (συμπεριλαμβανομένης της φωτόλυσης και της υδρόλυσης) [60], [70].

Τα νανοϋλικά μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με άλλα αιωρούμενα σωματίδια, οργανική ύλη και κολλοειδή, οδηγώντας σε συσσωμάτωση και πιθανώς καθίζηση [71]. Η συσσωμάτωση των νανοϋλικών με άλλους χημικούς παράγοντες στο νερό τους επιτρέπει συχνά να αλληλεπιδρούν με διαφορετικά στερεά αντί να διασπείρονται σε εναιωρήματα. Επιπλέον, ο βαθμός συσσωμάτωσης εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των σωματιδίων

(π.χ. μέγεθος, τύπος και ιδιότητες επιφάνειας) και του περιβαλλοντικού συστήματος (δηλ. ιοντική ισχύς, pH και περιεκτικότητα σε διαλυμένο οργανικό άνθρακα) [72]. Μερικές μελέτες έχουν αναφέρει τις ανεπιθύμητες ενέργειες της έκθεσης των νανοϋλικών σε υδρόβιους οργανισμούς (όπως βλάβες DNA, θνησιμότητα, οξειδωτικό στρες και μείωση της ανάπτυξης) [56], [57]. Ωστόσο, οι μελέτες αυτές, οξείας τοξικότητας διεξήχθησαν εργαστηριακά, ενώ οι οργανισμοί σε πραγματικά οικοσυστήματα είναι πιο πιθανό να παρουσιάσουν χρόνια έκθεση σε πολυάριθμα νανοϋλικά.

Σύμφωνα, λοιπόν, με τοξικολογικές έρευνες, τα νανοϋλικά μπορούν να επηρεάσουν μονοκύτταρους υδρόβιους οργανισμούς και ζώα (π.χ. *Daphnia magna* και ιχθύες) [73]. Η επίδραση διαφόρων νανοϋλικών στον πλαγκτονικό οργανισμό *Daphnia magna* ερευνήθηκε για να εκτιμηθεί το επίπεδο τοξικότητάς του. Τα αποτελέσματα έδειξαν την εξαρτώμενη από τη δόση τοξικότητα στη *D. magna*, αυξημένη δραστηριότητα της υπεροξειδάσης και οξειδωτική βλάβη σε υψηλότερα επίπεδα.

Έχει αποδειχθεί, επιπλέον, πως άλλα νανοϋλικά παρουσιάζουν τοξικές επιδράσεις σε θαλάσσιους οργανισμούς, π.χ. *Thalassiosira pseudonana*, *Tigriopus japonicas* και *Oryzias melastigma* [74]. Διαφορετικοί τύποι νανοϋλικών ή ακόμη και το ίδιο είδος νανοϋλικών σε διαφορετικά μεγέθη διαπιστώθηκε ότι έχουν διαφορετική τοξική επίδραση σε ορισμένους οργανισμούς [63]. Ως εκ τούτου, η επιβάρυνση των υδάτων που προκαλείται από τα υλικά αυτά μπορεί να είναι επιβλαβής για την υδρόβια ζωή και είναι αναγκαία η διερεύνηση των επιπτώσεών τους.

1.2.6 Ο άνθρωπος και άλλα θηλαστικά σε σχέση με τα νανοϋλικά

Υπάρχει αυξανόμενη ανησυχία όσον αφορά την τοξικότητα και την έκθεση στα νανοϋλικά, καθώς αυτά μπορούν να εισέλθουν στις κυτταρικές μεμβράνες των θηλαστικών. Ο ρυθμός απορρόφησης των νανοϋλικών από κύτταρα εξαρτάται από το μέγεθός τους, το βαθμό συσσωμάτωσης και καθίζησης τους [75]. Η απορρόφηση των νανοϋλικών συμβαίνει με ενδοκύττωση ή φαγοκύττωση [76]. Οι οδοί έκθεσης των νανοϋλικών είναι ποικίλες και περιλαμβάνουν τη στοματική, τη δερματική, την αναπνευστική ή/και τη γαστρεντερική οδό ενώ χρησιμοποιούνται και σε ευρείας χρήσης προϊόντα όπως αντηλιακά, προϊόντα φροντίδας του δέρματος, χρώματα και επιχρίσματα, συμπληρώματα διατροφής και υγείας, πρόσθετα τροφίμων και χρωστικές τροφίμων [77]. Επιπλέον, σε ορισμένες

περιπτώσεις, τα νανοϋλικά εγγέονται σκόπιμα στο ανθρώπινο σώμα για ιατρικές εφαρμογές. Με την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) προκαλείται οξειδωτική βλάβη και προκαλούνται αρνητικές επιδράσεις στην υγεία. Τα νανοϋλικά μπορεί, επίσης, να λειτουργούν ως αλλεργιογόνα κατά τα πρώτα στάδια της ζωής του ανθρώπου, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος με αλλεργική φλεγμονή σε μεταγενέστερα στάδια της ζωής [42], [63].

Έχει αποδειχθεί συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης του νεογνού (1ος μήνας μετά τη γέννηση) και της αυξημένης έξαρσης του άσθματος, της μειωμένης πνευμονικής λειτουργίας και του βήχα χωρίς λοίμωξη [79]. Τα εισπνεόμενα νανοϋλικά μπορούν να κατανεμηθούν σε όλο το σώμα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναφέρει ότι οι επιβλαβείς καρδιαγγειακές συνέπειες, όπως η μεταβολή της πήξης του αίματος, η οποία μπορεί να προκαλέσει εναλλαγή στη συχνότητα και τη λειτουργία του καρδιακού συστήματος, μπορεί να προκύψουν εξαιτίας της έκθεσης στα νανοϋλικά. Σε μία μελέτη, ο Becker και οι συνεργάτες του κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι νανοσωλήνες άνθρακα και τα νανοσωματίδια TiO_2 μπορούν να προκαλέσουν όγκους σε ζώα [80]. Τα νανοϋλικά έχουν τοξικές επιδράσεις στους ινοβλάστες και στα επιδερμικά κερατινοκύτταρα και επιπλέον, μπορούν να μεταβάλλουν την έκφραση γονιδίων ή πρωτεϊνών. Μερικά νανοϋλικά έχουν επιδείξει τοξικές επιδράσεις στα ανθρώπινα κύτταρα και όργανα δημιουργώντας βλάβη στο DNA και στην κυτταρική μεμβράνη, καταστροφή της γλουταθειόνης, αλλαγή δομής/μορφολογίας των μιτοχονδρίων και φλεγμονή.

Είναι εμφανές ότι τα νανοϋλικά έχουν πολλά πλεονεκτήματα στην ανθρώπινη ζωή, αλλά μπορούν, επίσης, να έχουν καταστροφικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, ειδικά όταν τα νανοϋλικά έχουν ως βάση σύνθεσης βαρέα μέταλλα. Επομένως, η κατανόηση των επιπτώσεων των νανοϋλικών συνολικά αποτελεί μία πρόκληση του σήμερα όχι μόνο στην περιβαλλοντική αλλά και στην ανθρώπινη τοξικολογία ακόμη και αν αυτά προκύπτουν από φαινομενικά πιο φιλικές προς το περιβάλλον πηγές.

1.2 Παραπροϊόντα χλωρίωσης του νερού

Το νερό, το ύψιστης σημασίας αυτό αγαθό για τον άνθρωπο, θεωρείται επικίνδυνο όταν δεν λαμβάνονται τα κατάλληλα μέτρα ώστε να πληροί ορισμένους κανόνες υγιεινής [81]. Μέχρι τις αρχές του 1900, υπήρχε έλλειψη του μικροβιολογικού ελέγχου του πόσιμου νερού [82], με αποτέλεσμα η ανθρωπότητα να πληγεί σε μεγάλο βαθμό καθώς εκατομμύρια άνθρωποι νόσησαν και κατέληξαν από λοιμώξεις λόγω κατανάλωσης ακατάλληλου νερού [81]. Ακόμα και σήμερα, που είναι γνωστή η σημασία της απολύμανσης του νερού για την δημόσια υγεία, ο αριθμός των λοιμώξεων που προκαλούνται από την κατανάλωση ακατάλληλου νερού, εξακολουθεί να είναι μεγάλος και είναι γνωστό πως στις αναπτυσσόμενες χώρες αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου των παιδιών [83].

Η ρύπανση (επιβάρυνση με ύλη ή ενέργεια) ή μόλυνση (επιβάρυνση με παθογόνους οργανισμούς για τον άνθρωπο και τα ζώα) των επιφανειακών και υπόγειων νερών αποτελεί σοβαρό πρόβλημα. Απασχολεί τους επιστήμονες, τις κυβερνήσεις, αλλά και τους απλούς πολίτες σε όλο τον κόσμο, καθώς οι ανάγκες σε νερό αυξάνονται συνέχεια, ενώ οι διαθέσιμοι υδάτινοι πόροι είναι πεπερασμένοι. Η δυνατότητα αυτοκαθαρισμού του νερού μέσω του υδρολογικού κύκλου είναι, επίσης, περιορισμένη. Συνεπώς, η επεξεργασία του νερού πριν την κατανάλωση ή την οποιαδήποτε χρήση του κρίνεται αναγκαία.

Η χλωρίωση του νερού αποτελεί την πιο επιτυχημένη μέθοδο απολύμανσης του νερού καθώς είναι οικονομική και αποτελεσματική [84]. Μέσω της χλωρίωσης απομακρύνονται από αυτό παθογόνοι μικροοργανισμοί ώστε αυτό να καταστεί ασφαλές [85]. Κατά την διαδικασία της χλωρίωσης, επάγεται η σύνθεση παραπροϊόντων που δυνητικά αποτελούν κίνδυνο για την δημόσια υγεία. Σε αυτά τα προϊόντα ανήκουν οι αλογονοβενζοκινόνες, όπως διχλωρο-, τριχλωρο-, διχλωροβρωμο-βενζοκινόνες κ.α. [86].

Παρόλο που είναι σαφές πως η απολύμανση του νερού είναι μεγάλης σημασίας για την δημόσια υγεία, η χρήση του χλωρίου ως απολυμαντικού μέσου ενέχει σημαντικούς κινδύνους. Αυτό συμβαίνει είτε όταν τα επίπεδα του χλωρίου υπερβούν τα επιτρεπόμενα όρια, είτε κατά τις αντιδράσεις του χλωρίου με το οργανικό φορτίο που υπάρχει στο νερό, παράγοντας παραπροϊόντα. Η ανίχνευση παραπροϊόντων δεν ήταν εφικτή πριν την

ανακάλυψη της αέριας χρωματογραφίας και φασματοφωτομετρίας μάζας κατά την δεκαετία του 1960. Μέσω αυτών των μεθόδων έγινε δυνατός ο προσδιορισμός ορισμένων παραπροϊόντων της χλωρίωσης του νερού και έπειτα ακολούθησε η μελέτη των επιπτώσεων τους. Οι επιπτώσεις πολλών παραπροϊόντων της χλωρίωσης είναι πολύ σημαντικές με ορισμένες να προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές και άλλες καρκινική δράση.

Ακόμη και μέχρι σήμερα με την ανάπτυξη νέων τεχνικών ανιχνεύονται χημικοί παράγοντες στο νερό που προκύπτουν από την χλωρίωση που η ύπαρξη τους δεν ήταν γνωστή. Κατ' επέκταση οι επιπτώσεις των ουσιών αυτών στους οργανισμούς έως και σήμερα δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς.

Παρακάτω παρατίθεται ο κατηγοριοποιημένος πίνακας των παραπροϊόντων της χλωρίωσης του νερού μέχρι σήμερα (**Πίνακας 2**).

Πίνακας 2. Αναλυτικά τα παραπροϊόντα χλωρίωσης του νερού.

Τριαλογονοπαράγωγα του μεθανίου (THMs)
Χλωροφόρμιο CHCl_3 Διχλωροβρωμομεθάνιο CHCl_2Br Διβρωμοχλωρομεθάνιο CHBr_2Cl Τριβρωρομεθάνιο ή Βρωμοφόρμιο CHBr_3
Αλογονοπαράγωγα του οξικού οξέος (HAAs)
Μονοχλωροοξικό οξύ (MCA) Μονοβρωμοοξικό οξύ (MBA) Διχλωροοξικό οξύ (DCA) Βρωμοχλωροοξικό οξύ (BCA) Τριχλωροοξικό οξύ (TCA) Διβρωμοοξικό οξύ (DBA) Διβρωμοχλωροοξικό οξύ (DBCA) Τριβρωμοοξικό οξύ (TBA)
Αλογονοακετονιτρίλια (HANs)

<p>Μονοχλωροακετονιτρίλιο (MCAN)</p> <p>Τριχλωροακετονιτρίλιο (TCAN)</p> <p>Διχλωροακετονιτρίλιο (DCAN)</p> <p>Μονοβρωμοακετονιτρίλιο (MBAN)</p> <p>Βρωμοχλωροακετονιτρίλιο (BCAN)</p> <p>Διβρωμοακετονιτρίλιο (DBAN)</p>
Αλογονοκετόνες (HKs)
<p>1,1-Διχλωροπροπανάνη (1,1-DCP)</p> <p>1,3-Διχλωροπροπανάνη (1,3-DCP)</p> <p>1,1,1-Τριχλωροπροπανάνη (1,1,1-TCP)</p>
Αλογονοβενζοκινόνες (HBQs)
<p>2,6-Δίχλωρο-1,4-βενζοκινόνη (2,6-DCBQ),</p> <p>2,3,6-Τριχλωρο-1,4-βενζοκινόνη (TriCBQ),</p> <p>2,6-Δίβρωμο-1,4-βενζοκινόνη(2,6-DBBQ),</p> <p>2,6-Δίχλωρο-3-μεθυλο-1,4-βενζοκινόνη</p>

1.2.1 Αλογονοβενζοκινόνες

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε μελέτη της τοξικότητας μίας χημικής ουσίας που ανήκει στην ομάδα των αλογονοβενζοκινονών. Οι αλογονοβενζοκινόνες είναι μια κατηγορία παραπροϊόντων που ανιχνευθήκαν τα τελευταία χρόνια και ανιχνεύονται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις στο νερό [90], [92]. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η 2,6-DCBQ.

Οι αλογονοβενζοκινόνες είναι μια κατηγορία χημικών ουσιών που προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά το 2010 [89]. Οι αλογονοβενζοκινόνες είναι παραπροϊόντα της διαδικασίας της χλωρίωσης του νερού και ανιχνεύονται σε νερό βρύσης σε επίπεδα της τάξης ng/mL [90] και σε αντίστροφα συστήματα χλωρίωσης του νερού (πισίνες, βιολογικούς καθαρισμούς κ.ά.) [91]. Η ανίχνευση τους έγινε δυνατή μόλις το 2010 μέσω της ανάπτυξης νέων χημικών μεθόδων προσδιορισμού και χαρακτηρισμού όπως η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας (LC)-διπλής φασματοφωτομετρίας μάζας (MS / MS) [89]. Οι αλογονοβενζοκινόνες απελευθερώνονται για πολλά χρόνια στα οικοσυστήματα, έρχονται σε επαφή με οργανισμούς και τον άνθρωπο με άγνωστες επιπτώσεις.

Μέχρι τώρα υπάρχουν ορισμένες ενδείξεις σε κυτταρικές σειρές επίμυων (CHO-K1) και σε ανθρώπινες καρκινικές και νευρικές σειρές κυττάρων. Αποδεικνύεται πως η έκθεση στις αλογονοβενζοκινόνες συνδέεται με διαταραχές στα αναπτυξιακά στάδια και με ενδοκρινικές διαταραχές [92], [93], [94]. Προκαλούν οξειδωτικό στρες μέσω των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) εμποδίζοντας τις αντιοξειδωτικές λειτουργίες των κυττάρων και, έτσι, τα κύτταρα οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο [92]. Επιπλέον τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σε ολοκληρωμένα *in vivo* συστήματα οργανισμών (λ.χ. επίμυες, zebrafish) με πολύ ανησυχητικά αποτελέσματα [88]. Επιπλέον, άλλες μελέτες δείχνουν πως οι αλογονοβενζοκινόνες έχουν καρκινογόνο δράση και προκαλούν δερματικές ασθένειες όταν έρχονται σε επαφή με τον άνθρωπο σε δημόσιες εγκαταστάσεις όπως κολυμβητήρια [4], [9], [96], [35], [36].

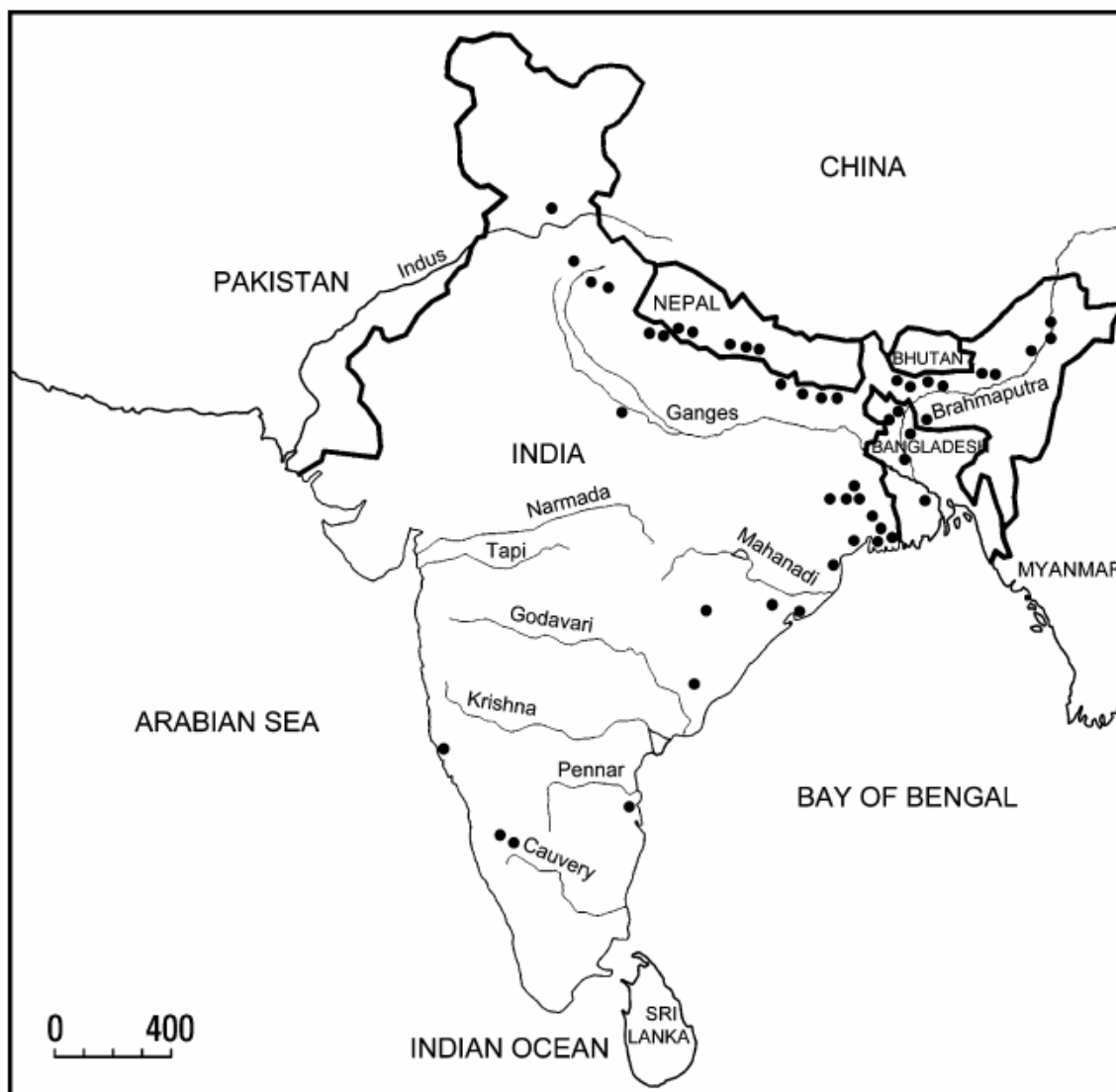
Η επαφή του ανθρώπου με τις αλογονοβενζοκινόνες μπορεί να προκληθεί με πολλούς τρόπους όπως με την κατανάλωση του πόσιμου νερού, με την επαφή σε εγκαταστάσεις όπως τα κολυμβητήρια μέσω του δέρματος. Ακόμα, σε εγκαταστάσεις όπως τα κολυμβητήρια όπου απελευθερώνονται προϊόντα καθημερινής χρήσης του ανθρώπου (αποσμητικά, καλλυντικά κ.α.), τα επίπεδα σύνθεσης των αλογονοβενζοκινονών αυξάνονται [91].

Έχοντας όλα αυτά υπόψη κρίνεται αναγκαία η μελέτη επιπτώσεων σε ανώτερους οργανισμούς (λ.χ. zebrafish) έτσι ώστε να καλυφθεί το γνωσιακό κενό αναφορικά με τις επιπτώσεις τους.

1.3 Το zebrafish (*Danio rerio*)

1.3.1 Προέλευση και φυσική εξάπλωση του zebrafish

Το zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822), είναι ένας μικρός τροπικός ιχθύς των εσωτερικών υδάτων. Το όνομα του γένους προέρχεται από τη λέξη «dhanī» που στη γλώσσα Bengali σημαίνει «από τον ορυζώνα» [97]. Η φυσική περιοχή εξάπλωσής του βρίσκεται στις λεκάνες απορροής γύρω από τους ποταμούς Γάγγη και Βραχμαπούτρα στην Ινδία, το Μπαγκλαντές, το Νεπάλ, τη Μιανμάρ και το Πακιστάν (**Εικόνα 4**) [98], [99]. Η γεωγραφική αυτή περιοχή χαρακτηρίζεται από κλίμα τροπικών μουσώνων με έντονες βροχερές και ξηρές εποχές, γεγονός που δημιουργεί μεγάλες διακυμάνσεις στις παραμέτρους των οικοτόπων. Το zebrafish συναντάται κατά κύριο λόγο σε μικρές υδατοσυλλογές χαμηλής ροής και τεχνητές λίμνες αν και έχει επίσης αναφερθεί η παρουσία του σε ρυάκια και μεγαλύτερα ποτάμια [100], [99]. Έχοντας συνυπάρξει με τους ανθρώπους για χιλιάδες χρόνια, εντοπίζεται, συχνά, ακόμη και σε ορυζώνες, όπου έρχεται αντιμέτωπο με τις επιπτώσεις της ρύπανσης [101]. Το μεγάλο φάσμα οικοτόπων της διασποράς του, περιλαμβάνει περιοχές με υψόμετρο από 8 έως 1576 m και ποικίλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ($T = 12-39\text{ }^{\circ}\text{C}$ και $\text{pH} = 5,9-9,8$), αντικατοπτρίζοντας την προσαρμοστική ικανότητα του είδους [99].



Εικόνα 4. Φυσική εξάπλωση του zebrafish (*Danio rerio*) [98].

1.3.2 Συστηματική κατάταξη

Το zebrafish ανήκει στην οικογένεια των Κυπρινοειδών, η οποία αριθμεί περισσότερα από 3.000 είδη και είναι η πιο πολυάριθμη των σπονδυλωτών (www.FishBase.org) (Πίνακας 3). Τα Κυπρινοειδή είναι ιχθύες των εσωτερικών υδάτων με μόνο 2 είδη εξ' αυτών, να διαβιούν σε θαλάσσια οικοσυστήματα. Εντοπίζονται στην Νότια Αμερική, την Αφρική, την Ευρώπη και την Ασία με τα είδη του γένους *Danio* να συναντώνται κυρίως στην Νότια και Ν.Α. Ασία [98].

Πίνακας 3. Συστηματική κατάταξη του zebrafish (*Danio rerio*) (ITIS, Integrated Taxonomic Information System).

Συστηματική Κατάταξη	
Βασίλειο	Ζώα
Φύλο	Χορδωτά
Υποφύλο	Σπονδυλωτά
Υπερομοταξία	Γναθόστομα
Ομοταξία	Ακτινοπτερύγιοι
Υφομοταξία	Τελεόστεοι
Τάξη	Κυπρινόμορφοι
Οικογένεια	Κυπρινοειδή
Γένος	<i>Danio</i>
Είδος	<i>Danio rerio</i>

1.3.3 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το zebrafish οφείλει την κοινή του ονομασία στο ιδιαίτερο πρότυπο εναλλαγής σκουρόχρωμων και ανοιχτόχρωμων ριγών κατά μήκος του σώματός του, το οποίο προσομοιάζει με το χρωματικό πρότυπο της ζέβρας. Οι χαρακτηριστικές οριζόντιες ρίγες εκτείνονται από την κεφαλή μέχρι το τέλος του ουραίου πτερυγίου, ακόμη και στο εδρικό πτερύγιο. Οι διαφορετικοί χρωματισμοί οφείλονται σε τρεις τύπους κυττάρων: τα μελανοφόρα (μάυρο), τα ξανθοφόρα (χρυσό) και τα ιριδοφόρα (ασημί) κύτταρα [101]. Κατά την ανάπτυξη διαμορφώνονται αρχικά οι δύο κεντρικές ρίγες μελανοφόρων κυττάρων και οι επόμενες διατάσσονται επάνω και κάτω από τις ήδη υπάρχουσες [102]. Πρόκειται για ένα μικρό σε μέγεθος ιχθύ με τα ενήλικα άτομα να φτάνουν σε μήκος 3-5 cm, ωστόσο, σε εργαστηριακές συνθήκες σπάνια ξεπερνούν τα 4 cm. Το σώμα του είναι πλευρικά πιεσμένο και το στόμα του έχει κλίση προς τα επάνω. Τα ενήλικα άτομα εμφανίζουν φυλετικό διμορφισμό καθώς τα αρσενικά έχουν τορπιλόμορφο σχήμα με χρυσές-ροζ ρίγες ανάμεσα στις μπλε, ενώ τα θηλυκά εμφανίζουν διογκωμένη την περιοχή

της κοιλιάς, χαρακτηριστικό υπόλευκο χρώμα κοιλιάς και ασημένιες αντί για χρυσές ρίγες (Εικόνα 5) [98].



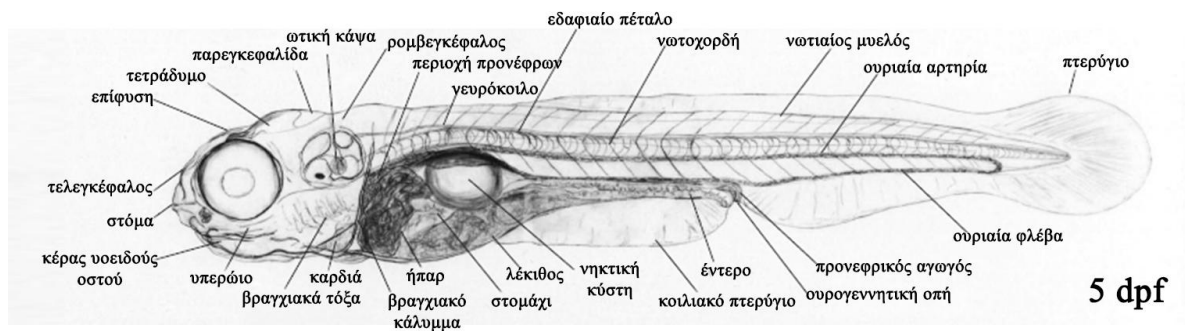
*Εικόνα 5. Αρσενικό άτομο zebrafish (επάνω) και θηλυκό άτομο (κάτω)
(<https://cdn.mos.cms.futurecdn.net/25nFio5GQK3kVNxyssZEN5-1920-80.jpg>.webp).*

1.3.4 Κύκλος ζωής και αναπαραγωγή στο φυσικό περιβάλλον

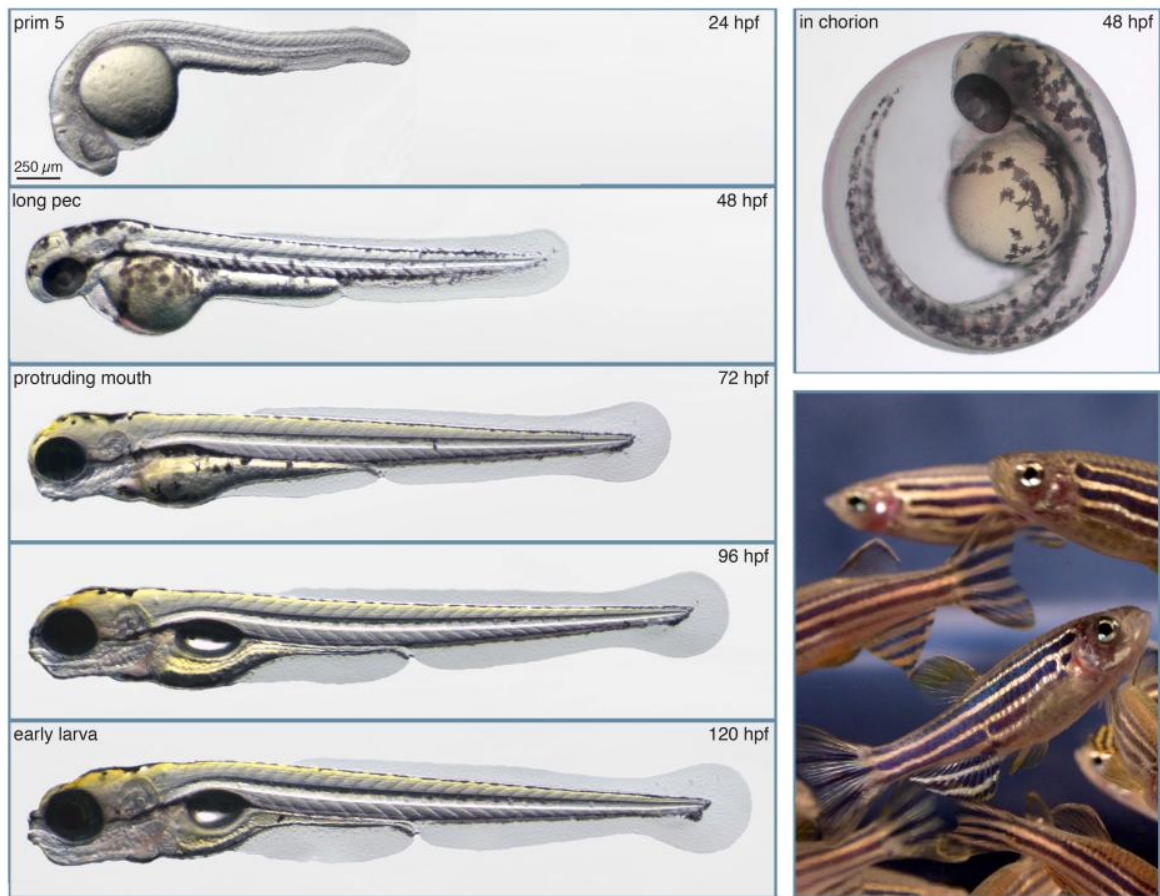
Τα zebrafish αναπαράγονται σε μικρές ομάδες, ενώ η στρατηγική εναπόθεσης αυγών που ακολουθούν είναι ασύγχρονη. Η γονιμοποίηση γίνεται εξωτερικά με τα θηλυκά να απελευθερώνουν τα αυγά τους πάνω στο υπόστρωμα και τα αρσενικά να τα γονιμοποιούν με ψεκασμό σπέρματος [103]. Σε συνθήκες αιχμαλωσίας, τα θηλυκά γεννούν καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου με διαλείμματα 2-3 ημερών. Στη φύση η ωοτοκία παρουσιάζει μια εποχικότητα η οποία συμπίπτει με την έναρξη των βροχοπτώσεων. Ωστόσο, βάσει ορισμένων παρατηρήσεων θεωρείται πως είναι πιθανότερο η εποχικότητα της αναπαραγωγής να εξαρτάται από την διαθέσιμη ποσότητα τροφής, η οποία μεταβάλλεται ανάλογα με την εποχή στο φυσικό περιβάλλον [100].

Ένα θηλυκό zebrafish μπορεί να γεννήσει «παρτίδες» αρκετών εκατοντάδων αυγών σε κάθε ωοτοκία, ο αριθμός των οποίων σχετίζεται θετικά τόσο με το μέγεθος του θηλυκού

όσο και με το χρονικό διάστημα που παρεμβάλλεται μεταξύ δυο ωτοκυβίων [98]. Η ανάπτυξη του εμβρύου πραγματοποιείται απουσία γονικής φροντίδας και είναι ραγδαία, αφού η εκκόλαψη συμβαίνει περίπου 48-72 ώρες μετά τη γονιμοποίηση στους 28°C (Εικόνα 6, 7) [104]. Η λεκιθοφόρος νύμφη zebrafish που θα προκύψει προσκολλάται αρχικά σε σκληρά υποστρώματα και φυτά, ενώ σταδιακά ανέρχεται σε υψηλότερα επίπεδα ώστε να φτάσει τελικά στην επιφάνεια για να γεμίσει με αέρα τη νηκτική της κύστη [105].



Εικόνα 6. Σχεδιαστική απεικόνιση της ανατομίας λεκιθοφόρου νύμφης zebrafish 5 ημερών [106].



Εικόνα 7. Τα στάδια ανάπτυξης του zebrafish (24 hpf – ενήλικο άτομο) [104].

1.3.5 Στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης του zebrafish

Η διαφάνεια των εμβρύων του zebrafish αμέσως μετά τη γονιμοποίηση επιτρέπει την λεπτομερή μελέτη των αναπτυξιακών του σταδίων. Ο διαχωρισμός των σταδίων γίνεται βάσει κάποιων καθοριστικών αλλαγών στην ανάπτυξη του εμβρύου. Στην περίπτωση του zebrafish διακρίνονται 7 στάδια εμβρυογένεσης: ζυγωτό (zygote), περίοδος της αυλάκωσης (cleavage), βλαστίδιο (blastula), γαστρίδιο (gastrula), μεταμερισμός (segmentation), φυλοτυπικό στάδιο (pharyngula) και εκκόλαψη (hatching), οι οποίες περιγράφονται συνοπτικά στον **Πίνακα 4** [104].

Το νεογονιμοποιηθέν αυγό βρίσκεται στο στάδιο του ζυγωτού μέχρι να συμβεί η πρώτη κυτταρική διαίρεση. Οι κυτταρικές διαιρέσεις είναι μεροβλαστικές καθώς επιτελούνται μόνο στην περιοχή του ζωικού πόλου και συμβαίνουν με συγχρονισμένο τρόπο κάθε 15 περίπου min. Οι πέντε πρώτες διαιρέσεις από τις οποίες προκύπτει ένα έμβryo 32

κυττάρων είναι κάθετες, ενώ η έκτη αυλάκωση είναι συνήθως οριζόντια. Περίπου 2 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (στάδιο 64 κυττάρων) ο βλαστόδισκος αποκτά μία πιο σφαιρική δομή, οπότε και εισέρχεται στο στάδιο του βλαστιδίου [104].

Στο στάδιο του βλαστιδίου, τα κύτταρα αρχικά συνεχίζουν να διαιρούνται με συγχρονισμένο τρόπο, ενώ στην πορεία οι διαιρέσεις συμβαίνουν λιγότερο συγχρονισμένα και παράλληλα αυξάνεται η διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και ενισχύεται η κινητικότητα των κυττάρων. Οι αλλαγές αυτές σηματοδοτούν τη μετάβαση του μεσοβλαστιδίου (Mid-blastula Transition, MBT) κατά την οποία τα εξωτερικά βλαστομερίδια που φέρουν κυτταροπλασματικές συνδέσεις με το λεκιθικό κύτταρο να βυθίζονται μέσα σε αυτό σχηματίζοντας την λεκιθική συγκυτιακή στιβάδα (Yolk Syncytial Layer, YSL). Λίγο μετά την MBT, το βλαστόδερμα επεκτείνεται σταδιακά και καλύπτει το λεκιθικό σάκο σε μια διαδικασία γνωστή ως επιβολή (epiboly). Στο zebrafish για τον χαρακτηρισμό των επιμέρους σταδίων χρησιμοποιείται το ποσοστό της επιβολής [104].

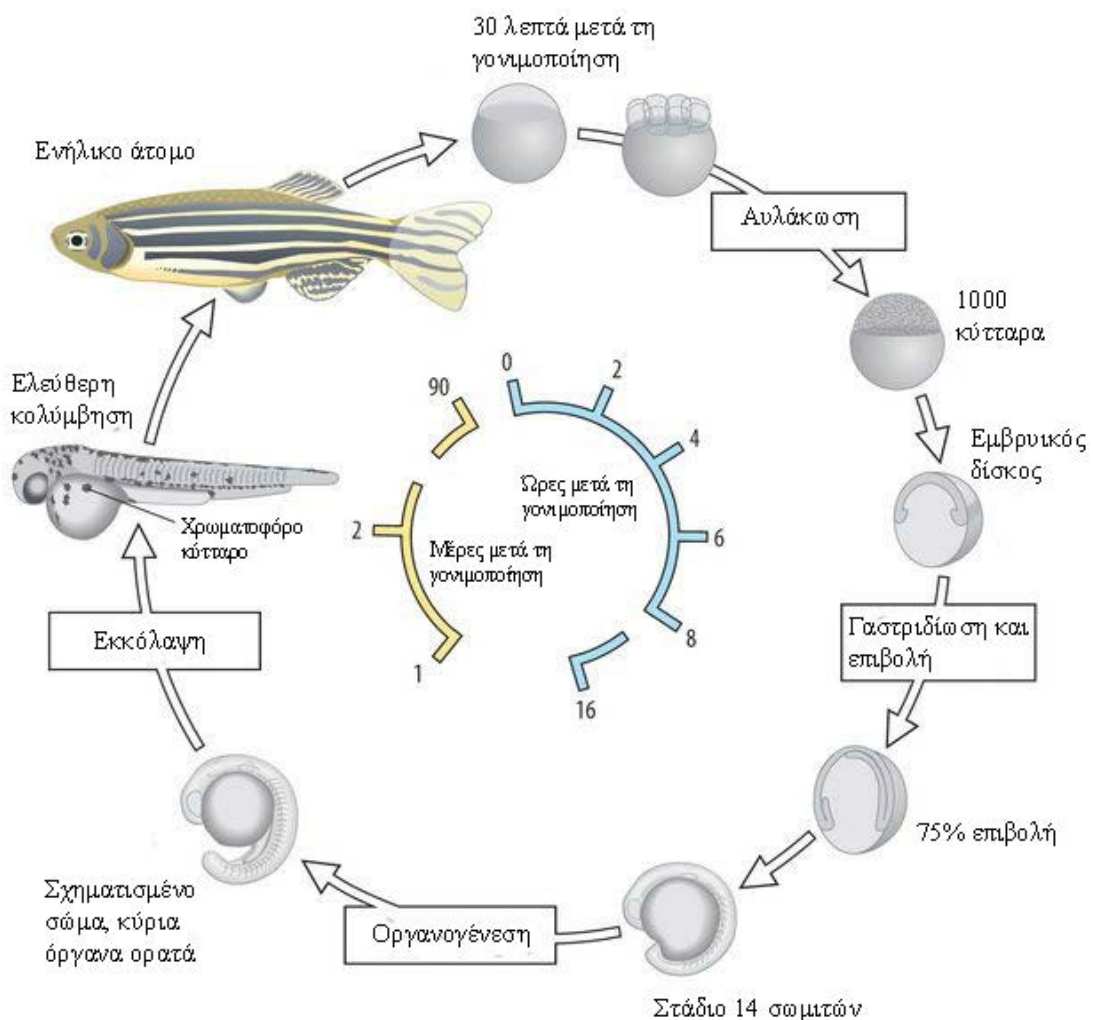
Στο 50% της επιβολής ξεκινάει η γαστριδίωση. Με τον όρο αυτό περιγράφεται η κίνηση αναδίπλωσης του μεσοδέρματος. Ως αποτέλεσμα της αναδίπλωσης εμφανίζεται στο βλαστόδερμα μια πάχυνση, η οποία ονομάζεται βλαστόδισκος (germ ring). Εντός του βλαστικού δακτυλίου υπάρχουν δύο στιβάδες: η επιβλάστη (epiblast) και η υποβλάστη (hypoblast) με την πρώτη να τροφοδοτεί τα κύτταρα της δεύτερης. Στο τέλος της γαστριδίωσης, τα εναπομείναντα κύτταρα της επιβλάστης αντιστοιχούν στο εξώδερμα από το οποίο προκύπτουν ιστοί όπως η επιδερμίδα, το κεντρικό νευρικό σύστημα και η νευρική ακρολοφία, ενώ η υποβλάστη θα δώσει το μεσόδερμα και το ενδόδερμα [104].

Αμέσως μετά τη γαστριδίωση ακολουθεί το στάδιο του μεταμερισμού κατά τη διάρκεια του οποίου λαμβάνουν χώρα πολλές μορφογενετικές κινήσεις. Ενδεικτικά, αναπτύσσονται οι σωμίτες, τα αρχέγονα όργανα γίνονται ορατά όπως και ο οφθαλμός, τα πρώτα κύτταρα διαφοροποιούνται μορφολογικά, το έμβρυο επιμηκύνεται, ενώ εμφανίζονται και οι πρώτες κινήσεις του σώματος [104].

Με την ολοκλήρωση του πρώτου 24ώρου, το έμβρυο εισέρχεται στο φυλοτυπικό στάδιο, όπου εμφανίζονται τα πρώτα χρωματοφόρα κύτταρα στους οφθαλμούς και το δέρμα, αναπτύσσεται το κυκλοφορικό σύστημα με τους καρδιακούς χτύπους να είναι εμφανείς.

Η ανάπτυξη της νωτοχορδής έχει σχεδόν ολοκληρωθεί, ενώ το νευρικό σύστημα διαφοροποιείται περαιτέρω.

Τέλος, η εκκόλαψη των εμβρύων συμβαίνει 2-3 μέρες μετά τη γονιμοποίηση έχοντας ολοκληρωθεί ο σχηματισμός των βραγχιακών σχισμών και των βραγχιακών τόξων, ενώ η διαδικασία της οργανογένεσης συνεχίζεται για 1-2 μέρες ακόμα. Από την 3^η μέρα και μετά τα έμβρυα αποκαλούνται λεκιθοφόρες νύμφες. Σχηματική απεικόνιση της εμβρυϊκής ανάπτυξης παρουσιάζεται στην **Εικόνα 8** και αναλυτικά τα στάδια στον **Πίνακα 4** και **Εικόνα 9**.



Εικόνα 8. Συνοπτική απεικόνιση του κύκλου ζωής του zebrafish [107].

Πίνακας 4. Στάδια της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης του zebrafish [104].

Περίοδος	Ώρες μετά την γονιμοποίηση (hpf)	Περιγραφή
Ζυγωτό	0	Το νεογονιμοποιηθέν αυγό μέχρι και την ολοκλήρωση του πρώτου ζυγωτικού κυτταρικού κύκλου.
Αυλάκωση	$\frac{3}{4}$	Οι έξι πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις πραγματοποιούνται με συγχρονισμένο τρόπο.
Βλαστίδιο	$2 \frac{1}{4}$	Μετασυγχρονισμένες κυτταρικές διαιρέσεις ακολουθούμενες από μη συγχρονισμένες μεγαλύτερης διάρκειας κατά τη μετάβαση του μεταβλαστίδιου, έναρξη της επιβολής.
Γαστριδίωση	$5 \frac{1}{4}$	Μορφογενετικές κινήσεις αναδίπλωσης και συγκλίνουσας επέκτασης σχηματίζουν την επιβλάστη, την υποβλάστη και το νευρικό άξονα.
Μεταμερισμός	10	Σχηματισμός σωματιών, σπλαχνικών τόξων και νευρομεριδίων. Πρωτογενής οργανογένεση, πρώτες κινήσεις και εμφάνιση της ουράς.
Pharyngula	24	Φυλοτυπικό στάδιο εμβρύου. Ο άξονας του σώματος αποβάλλει την αρχική του καμπυλότητα. Ανάπτυξη του κυκλοφορικού συστήματος και των πτερυγίων και εμφάνιση των χρωματοφόρων.
Εκκόλαψη	48	Ολοκλήρωση της μορφογένεσης των βασικών οργανικών συστημάτων. Ανάπτυξη του χόνδρου στο κεφάλι και στα θωρακικά πτερύγια. Μη συγχρονισμένη εκκόλαψη.
Πρώιμη προνύμφη zebrafish	72	Διόγκωση της νηκτικής κύστης, αναζήτηση τροφής και εμφάνιση ενεργητικής συμπεριφοράς αποφυγής.

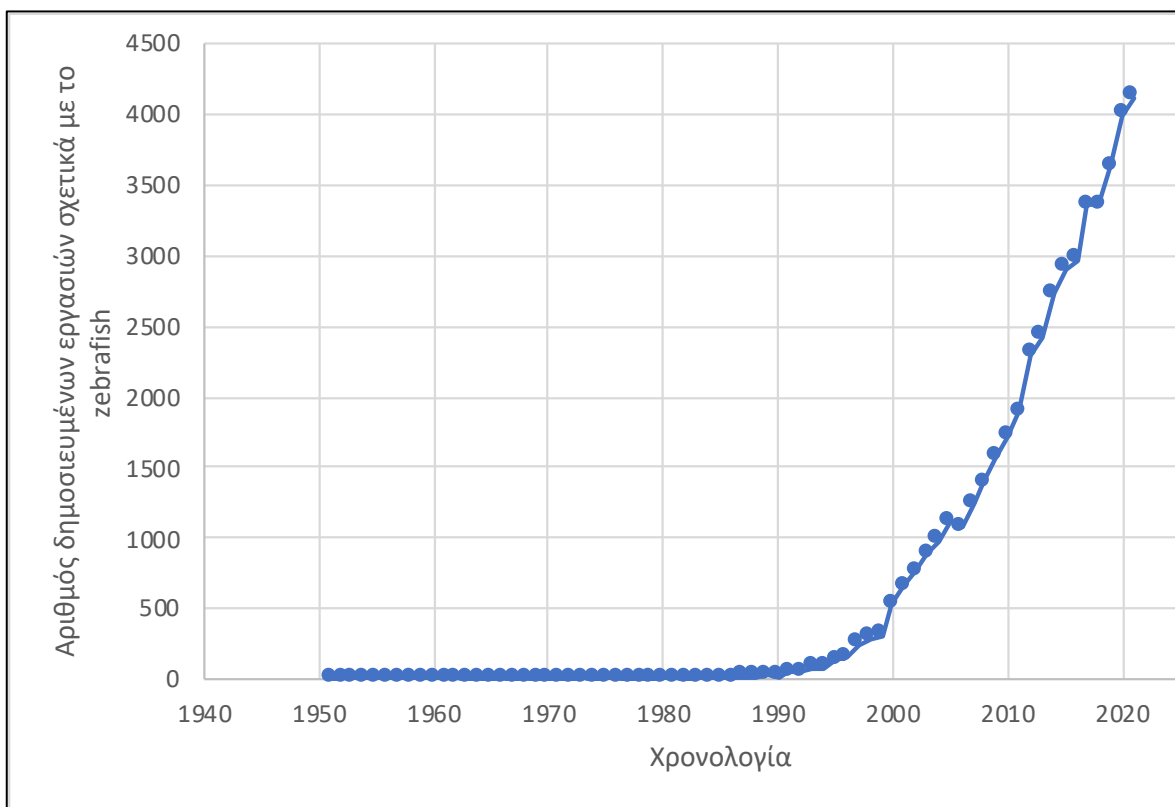


Εικόνα 9. Στάδια εμβρυικής ανάπτυξης του zebrafish [104]. Η ελληνική απόδοση των όρων δίνεται στην Εικόνα 8 και στον Πίνακα 4.

1.3.6 Το zebrafish ως οργανισμός μοντέλο

Ένας οργανισμός μοντέλο πρέπει να προσφέρει ορισμένα πλεονεκτήματα ώστε να επιτρέπει και να διευκολύνει τη μελέτη των βασικών βιολογικών λειτουργιών, των μηχανισμών μέσω των οποίων αυτές εξυπηρετούνται, αλλά και τις πιθανές τροποποιήσεις. Ακόμη, ένας τέτοιος οργανισμός πρέπει να διαθέτει χαρακτηριστικά έτσι ώστε να μπορεί να είναι αντιπροσωπευτικός για μια μεγαλύτερη ομάδα οργανισμών. Το zebrafish, όντας ένα από τους ελάχιστους ιχθύες των οποίων το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί, διαθέτει τα μοναδικά αυτά χαρακτηριστικά που το καθιστούν ως ένα εξαιρετικό μοντέλο σπονδυλωτών για την αξιολόγηση της τοξικότητας νέων χημικών ενώσεων, ρυπαντών και φαρμακευτικών προϊόντων, ενώ πρόσφατα αναδείχθηκε η αξιοποίηση του στη γενετική καθώς και τη μελέτη ανθρώπινων ασθενειών [108], [109], [110].

Το zebrafish για μεγάλο χρονικό διάστημα αποτέλεσε βασικό εργαλείο στη μελέτη ερευνητικών ερωτημάτων της αναπτυξιακής βιολογίας και έπειτα χρησιμοποιήθηκε εκτενώς σε όλους τους τομείς της βιολογίας. Σήμερα, έχει καθιερωθεί ως ένας οργανισμός μοντέλο που αξιοποιείται στην Νευροβιολογία, τη Γενετική, την Τοξικολογία, την Οικοτοξικολογία και γενικότερα αποτελεί αξιόπιστο μοντέλο σε μια πληθώρα επιστημονικών κλάδων. Απόρροια όλων αυτών είναι πως τα τελευταία χρόνια έχει καταγραφεί μια κατακόρυφη αύξηση των δημοσιεύσεων σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά που σχετίζονται με το zebrafish και η χρήση του ως οργανισμός μοντέλο συνεχώς αυξάνεται (**Εικόνα 10**).



Εικόνα 10. Αριθμός άρθρων ανά έτος σχετικά με το zebrafish σε διεθνή περιοδικά με κριτές (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>).

Η συνεχώς αυξανόμενη χρήση του zebrafish οφείλεται σε σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων οργανισμών. Το μικρό μέγεθος, η γρήγορη εμβρυϊκή ανάπτυξη και ο μικρός χρόνος γενεάς, η διαφάνεια κατά την πρώιμη εμβρυογένεση και η υψηλή γονιμότητα σε συνδυασμό με την εξωτερική γονιμοποίηση είναι μερικές μόνο από τις ευνοϊκές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν το είδος και συνεπώς διευκολύνουν το χειρισμό του [3], [15]. Στην θετική αξιολόγηση του zebrafish ως πειραματόζωο συμβάλλει και η λεπτομερής γνώση των αναπτυξιακών του σταδίων καθώς και η υψηλή ομολογία που εντοπίζεται μεταξύ ιχθύων και θηλαστικών, αφού κρίσιμα μονοπάτια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη είναι εξαιρετικά συντηρημένα στις δυο ομάδες οργανισμών [111]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι περίπου το 70% των γονιδίων που αντιστοιχούν σε ανθρώπινες ασθένειες διαθέτουν λειτουργικά ομόλογα στο zebrafish επιτρέποντας τη διερεύνηση των πιθανών κινδύνων που καλείται να αντιμετωπίσει τόσο ο άνθρωπος όσο και το περιβάλλον παρουσία διαφόρων ρυπαντών [112]. Τέλος, χαρακτηριστικά όπως εύκολη και χαμηλού κόστους εκτροφή, ευκολία διατήρησης σε εργαστηριακές συνθήκες, λιγότερο αυστηροί νομικοί περιορισμοί όσο αφορά τη χρήση του ως πειραματόζωου σύμφωνα με τη

νομοθεσία της Ε.Ε. [113], [114], [115], συνηγορούν στην καταλληλότητα του ως ένα αξιόπιστο πειραματικό μοντέλο ικανό να περιορίσει τη χρήση των τρωκτικών σε τοξικολογικές και αναπτυξιακές μελέτες.

1.4 Οικοτοξικολογία

Η μελέτη και η λεπτομερής εξακρίβωση των επιπτώσεων χημικών παραγόντων στο περιβάλλον και στους οργανισμούς που διαβιούν σε αυτό αποτέλεσαν το αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής και εντάσσονται στην επιστήμη της οικοτοξικολογίας. Η οικοτοξικολογία αποτελεί συνδυασμό επιστημών που μελετά τις επιβλαβείς επιπτώσεις που προκαλούνται από χημικούς παράγοντες (τοξικολογία) σε ζωντανούς οργανισμούς (οικολογία). Μέχρι σήμερα, η οικοτοξικολογία επικεντρώνεται κυρίως στις επιβλαβείς επιδράσεις χημικών παραγόντων στους ανθρώπους, π.χ. στις επιπτώσεις των βιομηχανιών στις αστικές κοινότητες. Ωστόσο, η περιβαλλοντική τοξικολογία με την ευρύτερη έννοια καλύπτει, επίσης, τις επιπτώσεις των χημικών παραγόντων στα οικοσυστήματα. Έτσι, η οικοτοξικολογία αποτελεί έναν κλάδο στο ευρύτερο πεδίο της περιβαλλοντικής τοξικολογίας [116], και ορίζεται ως η μελέτη των επιβλαβών επιπτώσεων των χημικών παραγόντων στα οικοσυστήματα και στους οργανισμούς που ζουν σε αυτά.

1.4.1 Μελέτη της τοξικότητας στον οργανισμό μοντέλο zebrafish

Η αξιοποίηση υδρόβιων οργανισμών και συγκεκριμένα ιχθύων στην οικοτοξικολογία έχει ξεκινήσει τα τελευταία 20 χρόνια [117]. Για πολλά χρόνια για διάφορους λόγους, όχι κυρίως βιολογικών, θεωρούνταν πως η απόκριση των ιχθύων σε διάφορους περιβαλλοντικούς ρυπαντές δεν αποτελούσε δείκτη έτσι ώστε να αξιοποιηθεί ως μοντέλο για την εκτίμηση κινδύνου [118–120]. Στην συνέχεια, όμως, αποδείχθηκε πως η έκθεση υδρόβιων οργανισμών σε χημικούς παράγοντες μπορεί να μας δώσει αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα σε μεγάλο μέρος του κύκλου ζωής ενός οργανισμού (ανάπτυξη, μορφολογία, συμπεριφορά κ.α.). Για αυτούς του λόγους ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός για την Οικονομική συνεργασία και την ανάπτυξη (The Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) θέσπισε συγκεκριμένα πρωτόκολλα ελέγχου και εκτίμησης τοξικότητας στους υδρόβιους οργανισμούς. Σύμφωνα με αυτά, ορίστηκε ρητά, η μεθοδολογία που πρέπει να ακολουθείται έτσι ώστε να εξαγονται ασφαλή συμπεράσματα και να υπάρχει κοινή αποδοχή των αποτελεσμάτων τοξικότητας

στην επιστημονική κοινότητα για την κάθε ουσία που εξετάζεται [121]. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται πιστότητα των αποτελεσμάτων και τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα και αντιπροσωπευτικά.

1.4.2 Το zebrafish (*D. rerio*) ως μοντέλο μελέτης της τοξικότητας και τα πλεονεκτήματα του έναντι άλλων οργανισμών μοντέλων

Ο έλεγχος της τοξικότητας στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο zebrafish (*Danio rerio*), το οποίο αποτελεί οργανισμό- μοντέλο μελέτης της τοξικότητας ουσιών και των μηχανισμών δράσης διαφόρων παραγόντων και ασθενειών [36], [37].

Για την υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής, η διατήρηση και εκτροφή πραγματοποιήθηκε στο πλήρως αυτοματοποιημένο σύστημα του Εργαστηρίου Ζωολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Το zebrafish (*D. rerio*) συνοδεύεται από συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τα οποία το καθιστούν ιδανικό ως μοντέλο για την μελέτη της τοξικότητας χημικών παραγόντων. Συνοπτικά, τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει έναντι άλλων οργανισμών-μοντέλων είναι:

- Μικρό κόστος κτήσης και διατήρησης πληθυσμού
- Ευκολία στην διατήρηση των ατόμων
- Δυνατότητα συνεχών γονιμοποιήσεων (ανά 2 έως 3 ημέρες) και μεγάλου αριθμού απογόνων σε κάθε αναπαραγωγή.
- Ευδιάκριτα στάδια ανάπτυξης με μεγάλα διάφανα αυγά
- Αντιμετώπιση των προβλημάτων βιοηθικής τα οποία προκύπτουν από την χρήση άλλων οργανισμών-μοντέλων.

1.5 Η μεταβολομική

1.5.1 Γενικά στοιχεία

Από τους τέσσερις βασικούς κλάδους των –ομικών επιστημών, η μεταβολομική είναι αυτή που εξηγεί καλύτερα τον φαινότυπο του εκάστοτε οργανισμού. Η μεταβολομική αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο της βιολογίας συστημάτων και το καταληκτικό σημείο, με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, ανάμεσα σε όλες τις -ομικές τεχνολογίες [122]. Ως μεταβολομική ορίζεται, η συστηματική μελέτη των μοναδικών χημικών αποτυπωμάτων, που είναι αποτέλεσμα της δυναμικής, πολυπαραμετρικής απόκρισης ενός οργανισμού που ζει σε

φυσιολογικές συνθήκες ή υπόκειται σε παθοφυσιολογικά ερεθίσματα [122]. Η μεταβολομική, επικεντρώνεται στην αυστηρή μελέτη του μεταβολώματος. Ανάλογα με τη μελέτη που διεξάγεται χωρίζεται σε μεταβολομική και μεταβονομική (**Πίνακας 5**), ενώ με βάση την κατηγορία των μεταβολιτών την οποία εξετάζει, χωρίζεται σε διάφορες υποκατηγορίες, όπως η λιπιδομική, πρωτεομική [123] [124].

Παρόλο που η μεταβολομική χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο για να δώσει εξηγήσεις σε φαινοτυπικές αλλαγές, δεν έχει αναπτυχθεί ακόμα μια πειραματική διάταξη, αποτελούμενη από ένα μόνο όργανο, ικανή να επιτελέσει μια ολοκληρωμένη ανάλυση του μεταβολικού πρότυπου. Αυτό οφείλεται στην περιπλοκότητα και την ετερογένεια των δειγμάτων. Αρκετές είναι οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων.

Πίνακας 5. Ορισμοί εννοιών σχετικά με την μεταβολομική και κατηγορίες αυτής [122–124].

Μεταβολίτες	Μικρά μόρια, που συμμετέχουν στις μεταβολικές αντιδράσεις και είναι απαραίτητα για την συντήρηση, την ανάπτυξη και τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου
Μεταβόλωμα	Το πλήρες σύνολο των μεταβολιτών, ενώσεων μικρού μοριακού βάρους, που υπάρχει μέσα σε έναν οργανισμό
Μεταβολομική	Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός του μεταβολώματος ενός κυττάρου
Μεταβονομική	Ποσοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών, ως ανταπόκριση σε μια βιολογική διατάραξη
Μεταβολικό προφίλ	Ποσοτική ανάλυση, του συνόλου των μεταβολιτών, ενός βιοχημικού μεταβολικού μονοπατιού. Περιλαμβάνει την ανάλυση, ενός πολύ περιορισμένου αριθμού μεταβολιτών
Μεταβολικό αποτύπωμα	Ολιστική μελέτη που κατηγοριοποιεί τα δείγματα, με βάση μεταβολικά πρότυπα ή αποτυπώματα, τα οποία αλλάζουν, αποκρινόμενα σε περιβαλλοντικές ή γενετικές διαταραχές, με απώτερο σκοπό τον προσδιορισμό διακριτών μεταβολιτών

Μεταβολικό ίχνος	Ποιοτική ανάλυση, των εξω-κυτταρικών μεταβολιτών, στο θρεπτικό υλικό μιας κυτταρικής καλλιέργειας, η οποία αντικατοπτρίζει την έκκριση ή την πρόσληψη μεταβολιτών από τα κύτταρα
-----------------------------	--

1.5.2 Φασματοσκοπία NMR (Nuclear magnetic resonance) στη μεταβολομική

Η φασματοσκοπία NMR είναι μια από τις τεχνικές που παρέχει τις περισσότερες πληροφορίες στον τομέα της μεταβολομικής. Παρέχει μια ολιστική απεικόνιση του μεταβολώματος, καθώς μπορεί να μετρήσει απευθείας ένα βιολογικό δείγμα χωρίς αυτό να χρειάζεται ιδιαίτερη προετοιμασία και χωρίς να το καταστρέφει. Επιπλέον, είναι μη εκλεκτική τεχνική, που σημαίνει ότι δίνει πληροφορίες για όλους τους μεταβολίτες που υπάρχουν στο δείγμα (αποτύπωμα του δείγματος). Είναι μια καθολική τεχνική, από την οποία μπορούμε εύκολα να υπολογίσουμε την απόλυτη συγκέντρωση του κάθε μεταβολίτη. Έχει εξαιρετική επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα. Η διακριτική ικανότητα της τεχνικής είναι σχετικά υψηλή αλλά εξαρτάται από την ένταση του μαγνητικού πεδίου με αποτέλεσμα να ποικίλει ανάλογα με το εκάστοτε όργανο. Δίνει την δυνατότητα παρακολούθησης διαφορετικών ατόμων στις ενώσεις, όπως ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , αυξάνοντας έτσι κατά πολύ το εύρος των ενώσεων που μπορούν να ταυτοποιηθούν. Τέλος, η αποτελεσματικότητα του NMR μπορεί να βελτιωθεί χρησιμοποιώντας υπερπόλωση ή χρησιμοποιώντας δισδιάστατες, τρισδιάστατες ή υψηλότερων διαστάσεων τεχνικές πολλαπλής συχνότητας. Παρόλα αυτά, η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται από χαμηλή ευαισθησία, γεγονός που μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρήση κρυοκαθετήρων [125–128].

1.5.3 Βάσεις δεδομένων

Οι βάσεις δεδομένων είναι, διαδικτυακές ή μη διαδικτυακές πλατφόρμες συλλογής, αποθήκευσης και οργάνωσης των πληροφοριών. Επιτρέπουν την εύκολη πρόσβαση στα δεδομένα τους και με τον τρόπο αυτό προάγουν την ανάπτυξη και την εξέλιξη της έρευνας. Έχουν δημιουργηθεί διάφορες ολοκληρωμένες βάσεις δεδομένων που περιλαμβάνουν δεδομένα για μεταβολίτες οργανισμών.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον όμως, έχει η βάση δεδομένων Human Metabolome Database (HMDB) (<https://hmdb.ca>). Πρόκειται για την πιο ολοκληρωμένη, άρτια επιμελημένη, ελεύθερης πρόσβασης, διαδικτυακή βάση δεδομένων που περιέχει εκτενή στοιχεία για όλους τους ενδογενείς μεταβολίτες που μπορούν να βρεθούν στον άνθρωπο αλλά και σε άλλους οργανισμούς. Τα στοιχεία που παρέχονται είναι βασισμένα σε πειραματικά δεδομένα ή σε βιβλιογραφικά δεδομένα που προέρχονται είτε από βιβλία, είτε από επιστημονικά περιοδικά, είτε από άλλες ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων. Συνολικά, παρέχει στοιχεία για περισσότερους από 220.000 μεταβολίτες και 1.500 μεταβολικές οδούς. Παρέχει μια πλήρη λίστα με όλους τους μεταβολίτες που μπορούν δυνητικά να υπάρχουν ή να δημιουργηθούν από οργανισμούς, κάτω από διάφορες συνθήκες ανάπτυξης.

Κάθε καταχώρηση της λίστας μπορούν να εμφανιστούν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον συγκεκριμένο μεταβολίτη. Ανάμεσα στις πληροφορίες που παρέχονται, συγκαταλέγονται πληροφορίες για την αναγνώριση, την ταξινόμηση, για τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες του μεταβολίτη, καθώς και των ενζύμων που σχετίζονται με αυτόν. Οι πληροφορίες αυτές, συνοδεύονται και από εξωτερικούς συνδέσμους (Links) οι οποίοι επιτρέπουν την εύκολη πρόσβαση σε περαιτέρω πληροφορίες σε άλλες βάσεις δεδομένων. Πέρα από αυτές τις πληροφορίες, υπάρχουν παραπάνω από 11 εκατομμύρια φάσματα NMR και MS(Mass Spectrometry) για την ταυτοποίηση τους και πληροφορίες για τη συγκέντρωση του κάθε μεταβολίτη στο μεταβολικό πρότυπο. Τέλος, κάθε καταχώρηση έρχεται μαζί με έναν σύνδεσμο που επιτρέπει στο χρήστη να έχει πρόσβαση στον χάρτη της μεταβολικής οδού, στην οποία ο μεταβολίτης συμμετέχει. Όλα τα μεταβολικά μονοπάτια συνδέονται σε έναν μεγάλο μεταβολικό χάρτη, που επιτρέπει την ελεύθερη περιήγηση σε αυτόν, και περιέχει υπερσυνδέσμους (hyperlinks) προς κάθε μεταβολικό μονοπάτι. Ο μεταβολικός χάρτης παρέχει οπτικές πληροφορίες σχετικά με όλες τις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα καθώς και όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για μια πιο σαφή και ολοκληρωμένη μελέτη αυτών. Εκτός από την κανονική επιλογή αναζήτησης, που αναφέρθηκε παραπάνω, μέσω της οποίας ο χρήστης μπορεί να προσπελάσει τις φασματικές πληροφορίες του κάθε μεταβολίτη ξεχωριστά, η βάση δεδομένων παρέχει και εργαλεία αναζήτησης NMR και MS.

Τα εργαλεία αυτά αποσκοπούν στην υποστήριξη της ταυτοποίησης και του χαρακτηρισμού των μεταβολιτών με φασματοσκοπίες NMR και MS. Τα πειραματικά φασματικά δεδομένα εισάγονται στα αντίστοιχα εργαλεία αναζήτησης και η βάση δεδομένων συγκρίνει τα δικά της φασματικά δεδομένα με σκοπό να «ταιριάξει» τα δεδομένα και να προσφέρει τέλος μια λίστα με τους μεταβολίτες που ανταποκρίνονται στα πειραματικά δεδομένα [129].

1.5.4 Μεταβολομικά εργαλεία

Η χρήση τέτοιων εργαλείων διευκολύνει πολύ την μεταβολομική έρευνα και προσφέρει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Επιπλέον, μπορούν να προσφέρουν τα ίδια αποτελέσματα σε σημαντικά μικρότερο χρόνο, της τάξης των μερικών λεπτών, τη στιγμή που ένα ταίριασμα των φασμάτων από έναν ερευνητή μπορεί να διαρκέσει ημέρες. Μια μηχανή μεταβολομικών εργαλείων είναι και το MetaboAnalyst 5.0. Πρόκειται για μια διαδικτυακή συλλογή από εργαλεία που αποσκοπούν στην ανάλυση και την ερμηνεία μεταβολομικών δεδομένων. Απαρτίζεται από τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες εργαλείων:

- Επεξεργασία δεδομένων
- Στατιστική ανάλυση
- Λειτουργική ανάλυση εμπλουτισμού
- Ανάλυση μεταβολικών οδών

Χρησιμοποιώντας το τελευταίο εργαλείο γίνεται εφικτή η λήψη μιας συνολικής εικόνας όλων των μεταβολικών οδών, στις οποίες οι ενώσεις μεταβολίζονται. Είναι ένας εύκολος, γρήγορος και αξιόπιστος τρόπος να συνδέσει κανείς τους μεταβολίτες με τα μεταβολικά μονοπάτια. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται σε ένα διαδραστικό γράφημα, μέσω του οποίου ο χρήστης μπορεί να δει όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες [130].

1.5.5 Η μεταβολομική και η σημασία της στη βιολογία

Η μεταβολομική είναι η επιστημονική μελέτη χημικών διεργασιών που περιλαμβάνουν μεταβολίτες. Συγκεκριμένα, η μεταβολική είναι η «συστηματική μελέτη των μοναδικών χημικών δακτυλικών αποτυπωμάτων που αφήνουν πίσω τους συγκεκριμένες κυτταρικές διεργασίες» [131]. Οι μεταβολίτες είναι τα ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού. Ο όρος

μεταβολίτης συνήθως περιορίζεται σε μόρια μικρού μοριακού βάρους. Στο πλαίσιο της μεταβολομικής, ένας μεταβολίτης ορίζεται συνήθως ως οποιοδήποτε μόριο μικρότερο από 1 kDa [132]. Ωστόσο, υπάρχουν εξαιρέσεις σε αυτό, ανάλογα με το δείγμα και τη μέθοδο ανίχνευσης. Οι μεταβολίτες έχουν ποικίλες δράσεις στις λειτουργίες των ενζύμων μεταξύ των οποίων διακρίνονται: μεταβολές στην δομή, στην σηματοδότηση, στις λειτουργίες διεγερτικών και ανασταλτικών μονοπατιών τους, επηρεάζουν την άμυνα και τις αλληλεπιδράσεις με άλλους οργανισμούς και αποτελούν το κύριο ενεργειακό απόθεμα τους. Στα μεταβολικά συστήματα με βάση τα φυτά, είναι κοινή η αναφορά σε "πρωτογενείς" και "δευτερογενείς" μεταβολίτες. Ένας πρωτογενής μεταβολίτης εμπλέκεται άμεσα στη φυσιολογική ανάπτυξη και αναπαραγωγή. Ένας δευτερογενής μεταβολίτης δεν εμπλέκεται άμεσα σε αυτές τις διεργασίες, αλλά συνήθως έχει σημαντική οικολογική σημασία όπως τα αντιβιοτικά και οι χρωστικές ουσίες [133]. Αντίθετα, στη μεταβολομική ανάλυση που γίνεται στον άνθρωπο, είναι πιο συνηθισμένη η περιγραφή των μεταβολιτών είτε ως ενδογενών (που παράγονται από τον οργανισμό), είτε ως εξωγενών. Οι μεταβολίτες ξένων ουσιών, όπως τα φάρμακα, ονομάζονται ξενομεταβολίτες. Ο μεταβολίτης σχηματίζει ένα μεγάλο δίκτυο μεταβολικών αντιδράσεων, όπου τα προϊόντα μιας ενζυμικής χημικής αντίδρασης είναι αντιδρώντα σε άλλες χημικές αντιδράσεις.

Το μεταβόλωμα αντιπροσωπεύει το πλήρες σύνολο των μεταβολιτών, σε ένα κύτταρο, ιστό, όργανο ή οργανισμό, οι οποίοι είναι τα τελικά προϊόντα των κυτταρικών διεργασιών [134]. Τα δεδομένα έκφρασης γονιδίου mRNA και οι πρωτεϊνικές αναλύσεις αποκαλύπτουν το σύνολο των γονιδιακών προϊόντων που παράγονται στο κύτταρο, δεδομένα που αντιπροσωπεύουν μια πλευρά της κυτταρικής λειτουργίας. Αντιθέτως, το μεταβολικό προφίλ μπορεί να δώσει ένα στιγμιότυπο της φυσιολογίας αυτού του κυττάρου, κι έτσι, η μεταβολομική παρέχει μια άμεση λειτουργική ανάγνωση της φυσιολογικής κατάστασης ενός οργανισμού.

Σε σύγκριση με τη γονιδιωματική και την πρωτεομική, η μεταβολομική είναι ένα σχετικά νέο πεδίο, αλλά γίνεται όλο και πιο σημαντικό εργαλείο στην ιατρική. Το μεταβόλωμα είναι ίσως το πιο στενά συνδεδεμένο με τον φαινότυπο και έτσι μπορεί να παρέχει πληροφορίες για φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, καθώς και για την επίδραση

και την ανταπόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα [135]. Πράγματι, η μελέτη των παραλλαγών του μεταβολώματος έχει σημαντικά πλεονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένης της δυνατότητας: (i) βελτίωσης της κατανόησης της παθοφυσιολογίας μιας νόσου σε μοριακό επίπεδο και προσπάθεια για δημιουργία νέων υποθέσεων για τους μηχανισμούς της νόσου, (ii) προσδιορισμού βιολογικών δεικτών, πρόβλεψης και διάγνωσης του κινδύνου ασθένειας, (iii) αξιολόγησης της εξέλιξης της νόσου, (iv) ερμηνείας της επίδρασης της έκθεσης του περιβάλλοντος και του τρόπου ζωής σε ασθένειες, v) αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας, της τοξικότητας και των ανεπιθύμητων ενεργειών φαρμάκων. Τα μεταβολικά προφίλ μπορούν να μετρηθούν σε εύκολα διαθέσιμα βιολογικά υγρά ή ιστούς, γεγονός που αποτελεί ένα επιπλέον πλεονέκτημα. Η συσχέτιση με τα αποτελέσματα των ασθενειών είναι ισχυρότερη στη μεταβολομική από ότι στη γονιδιωματική. Έτσι, οι μεταβολικές μελέτες απαιτούν μικρότερα μεγέθη δειγμάτων από τις γενετικές μελέτες [136]. Αυτή η μέθοδος ελέγχου χρησιμοποιεί συνδυασμούς μη στοχευμένων, ημι-στοχευμένων και στοχευμένων αναλύσεων.

1.5.6 Η μεταβολομική στην παρούσα διδακτορική διατριβή

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή η μεταβολομική ανάλυση πραγματοποιήθηκε έτσι ώστε να συνδεθούν οι διαταραχές μετά από την έκθεση των zebrafish στην 2,6-DCBQ-OH με τα μεταβολικά μονοπάτια. Με την μελέτη των μεταβολικών μονοπατιών μπορούν να αποκαλυφθούν οι μηχανισμοί πρόκλησης της τοξικότητας [137], [138]. Η μεταβολομική ανάλυση μας οδήγησε στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών τοξικότητας μέσω της ανίχνευσης των μονοπατιών που επηρεάζονται κατά την έκθεση σε χημικούς παράγοντες. Η αξιοποίηση της τεχνικής αυτής και των εργαλείων της θα συμβάλει στην ανάπτυξη και στην επίλυση σημαντικών ερωτημάτων αναφορικά με τους μηχανισμούς πρόκλησης τοξικότητας.

Η μελέτη των μεταβολικών μονοπατιών έγινε μέσω της απομόνωσης των μεταβολιτών και εισαγωγής αυτών σε βάσεις δεδομένων έτσι ώστε να προκύψουν τα μεταβολικά μονοπάτια που επηρεάζονται. Έπειτα πραγματοποιήθηκε σύνδεση των μονοπατιών με τους φαινοτύπους.

Χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ (1D) μιας διάστασης και συμπληρωματικά, χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία μάζας ώστε να τακτοποιηθούν με μεγαλύτερη

βεβαιότητα οι μεταβολίτες [123], [139], [140]. Στη συνέχεια με τη βοήθεια δύο μεταβολομικών βάσεων δεδομένων, έγινε μερική ταυτοποίηση των μεταβολιτών. Τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν μεταξύ τους καθώς και με το δείγμα ελέγχου ούτως ώστε να προκύψουν συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση της 2,6-DCBQ-OH στα μεταβολικά μονοπάτια του zebrafish.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, η μελέτη μεταβολικών διαταραχών στο zebrafish είναι μεγάλης σημασίας. Με αυτή την μελέτη επιτεύχθηκε μια πιο ολοκληρωμένη αποτύπωση των διαταραχών μετά από την έκθεση στους υπό μελέτη χημικούς παράγοντες. Έγινε συσχέτιση παρατηρούμενων φαινοτύπων με τις διαταραχές στα μεταβολικά μονοπάτια και προσδιορίστηκαν διαταραχές στα μεταβολικά μονοπάτια που δεν οδηγούν απαραίτητα σε διαταραχές στον φαινότυπο.

1.6 Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση της επίδρασης συγκεκριμένων χημικών παραγόντων με ιδιαίτερο περιβαλλοντικό ενδιαφέρον, στην επιβίωση και ανάπτυξη ενός υδρόβιου οργανισμού μοντέλου, το zebrafish.

Η επιλογή των δυο χημικών παραγόντων που επιλέχθηκαν προς εξέταση έγινε για τους παρακάτω λόγους :

- Καταλήγουν στα υδάτινα οικοσυστήματα
- Άμεσα και έμμεσα έρχονται σε επαφή με οργανισμούς
- Δεν έχουν μελετηθεί οι επιπτώσεις τους στους οργανισμούς

Συγκεκριμένα, οι παράγοντες που επιλέχθηκαν ήταν οι νανοκουκκίδες άνθρακα (CNDs) και η αλογονοβενζοκινόνη 2,6-DCBQ-OH. Τα CNDs είναι νεοεμφανιζόμενα νανοϋλικά και η 2,6-DCBQ-OH είναι παραπροϊόν της χλωρίωσης του νερού και απελευθερώνεται στα οικοσυστήματα από τις απαρχές της χρήσης της χλωρίωσης. Η ανίχνευση της όμως κατέστη δυνατή μόλις τα τελευταία χρόνια.

Ειδικότεροι στόχοι της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση των επιπτώσεων των χημικών παραγόντων μέσω της μελέτης:

- της επιβίωσης
- του ρυθμού αύξησης
- των μορφολογικών ανωμαλιών
- της συμπεριφοράς των zebrafish μετά από την έκθεση στις ουσίες
- των επιπτώσεων στον μεταβολισμό των ατόμων

Επιπλέον προέκυψαν συμπεράσματα αναφορικά με την συνολική αποτύπωση των επιπτώσεων κατά τα κρίσιμα στάδια της ανάπτυξης μετά από την έκθεση στους συγκεκριμένους χημικούς παράγοντες.

2^ο Κεφάλαιο

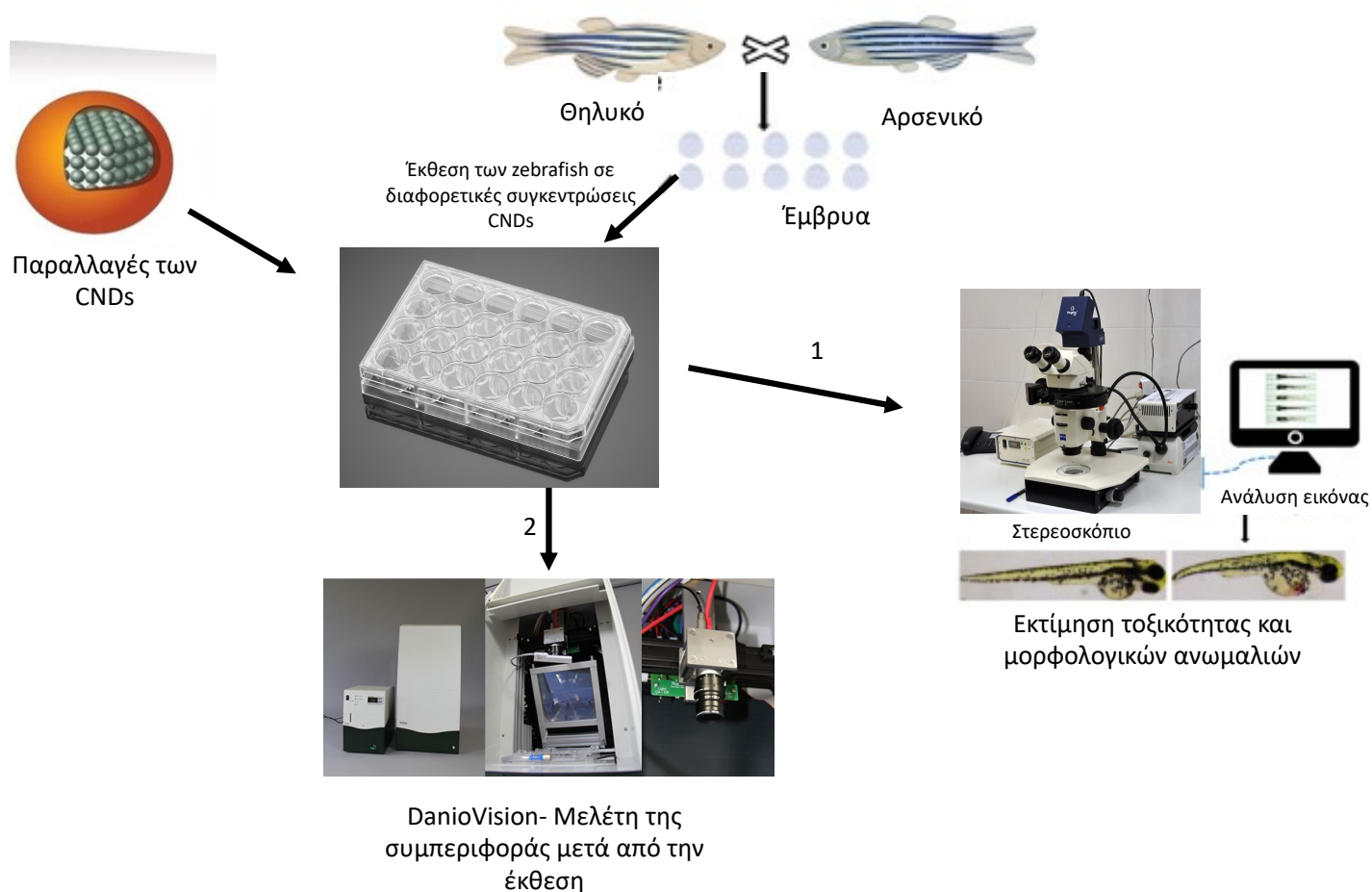
Υλικά και Μέθοδοι



2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Νανοκουκκίδες άνθρακα (CNDs)

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την μελέτη των επιπτώσεων των νανοκουκκίδων άνθρακα απεικονίζεται γραφικά στην **Εικόνα 11**. Αναλυτικά η πειραματική διαδικασία παρουσιάζονται στα επόμενα κεφάλαια (κεφ. 2.1.1 έως 2.1.9).



Εικόνα 11. Γραφική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας για την μελέτη των επιπτώσεων των CNDs σε έμβρυα zebrafish.

2.1.1 Σύνθεσεις νανοκουκκίδων άνθρακα (CNDs)

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η τοξικότητα των CNDs. Η σύνθεση των νανοκουκκίδων άνθρακα (CNDs) προέκυψε από απλό οργανικό υπόστρωμα (κιτρικό οξύ, γλυκόζη) ως η κύρια πηγή άνθρακα. Η σύνθεση έγινε μέσω υδροθερμικών πορειών των πρόδρομων συστατικών μέσα σε μεταλλικό αυτόκλειστο. Έπειτα επιλέχθηκαν ενθέσεις των νανοκουκκίδων άνθρακα (CNDs) με άζωτο και συνδυασμό αζώτου-θείου. Συνολικά,

έγινε σύνθεση τριών παραλλαγών των εξεταζόμενων ουσιών: Non doped (χωρίς ένθεση), N-doped (ένθεση με άζωτο), N,S-doped (ένθεση με άζωτο και θείο). Τα υλικά τα οποία συντέθηκαν χαρακτηρίστηκαν μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών, όπως UV-Vis, φθορισμός και υπέρυθρος μετασχηματισμός Fourier (FT-IR).

Σύνθεση 1η (Non doped CNDs, χωρίς ένθεση): Ζυγίστηκαν 0,20 g κιτρικού οξέος (CA) και μεταφέρθηκαν σε αυτόκλειστο Teflon. Στη συνέχεια το αυτόκλειστο τοποθετήθηκε σε φούρνο, η θερμοκρασία του οποίου αυξανόταν με ρυθμό 10 °C/min, μέχρι τους 200 °C. Μετά από 3 ώρες, η οβίδα τοποθετήθηκε στην απαγωγό εστία όπου και παρέμεινε έως ότου να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου. Το παχύρρευστο υγρό που προέκυψε συλλέχθηκε με μικρή ποσότητα δις απεσταγμένου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στη τιμή περίπου 7 με χρήση διαλύματος NaOH. Τέλος, έγινε απομάκρυνση του διαλύτη με λυοφιλίωση και το εναπομείναν στερεό αποθηκεύτηκε σε σκοτεινό μέρος, στη θερμοκρασία του δωματίου, μέχρι την χρήση του.

Σύνθεση 2η (N-doped CNDs, ένθεση με άζωτο): Ζυγίστηκαν 0,13 g CA και 0,11 g ουρίας σε ποτήρι ζέσεως και διαλύθηκαν σε 3 mL δις απεσταγμένο ύδωρ (Double Distilled Water, DDW). Το διάλυμα έπειτα μεταφέρθηκε σε αυτόκλειστο Teflon και το αυτόκλειστο τοποθετήθηκε σε προθερμασμένο φούρνο. Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν στους 160 °C. Μετά από 8 ώρες, η οβίδα τοποθετήθηκε στην απαγωγό εστία και αφέθηκε να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου. Το παχύρρευστο υγρό που προέκυψε συλλέχθηκε με μικρή ποσότητα δις απεσταγμένου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στη τιμή περίπου 7 με χρήση διαλύματος NaOH. Τέλος, έγινε απομάκρυνση του διαλύτη με λυοφιλίωση και το εναπομείναν στερεό αποθηκεύτηκε σε σκοτεινό μέρος, στη θερμοκρασία του δωματίου, μέχρι την χρήση του.

Σύνθεση 3η (N,S-doped CNDs, ένθεση με άζωτο και θείο): Ζυγίστηκαν 0,10 g CA και 0,11 g θειουρίας. Οι ποσότητες μεταφέρθηκαν σε γουδί για ομογενοποίηση. Έπειτα, το μίγμα μεταφέρθηκε σε αυτόκλειστο Teflon, το οποίο τοποθετήθηκε σε προθερμασμένο φούρνο σε θερμοκρασία 200 °C. Μετά από 2 ώρες, η οβίδα τοποθετήθηκε στην απαγωγό εστία και αφέθηκε να κρυώσει έως τη θερμοκρασία του δωματίου. Το παχύρρευστο υγρό που προέκυψε συλλέχθηκε με μικρή ποσότητα δις απεσταγμένου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στη τιμή περίπου 7 με χρήση διαλύματος NaOH. Τέλος, έγινε

απομάκρυνση του διαλύτη με λυοφιλίωση και το εναπομείναν στερεό αποθηκεύτηκε σε σκοτεινό μέρος, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μέχρι τη χρήση του.

Ακολούθησε η έκθεση των zebrafish στα διαλύματα CNDs. Πραγματοποιήθηκε η παρασκευή διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων μέσω διαδοχικών αραιώσεων των πρότυπων διαλυμάτων. Οι διαδοχικές αραιώσεις έγιναν σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα εμβρύων E3 (5 mmol/L NaCl, 0,33 mmol/L CaCl₂, 0,33 mmol/L MgSO₄·7H₂O, 0,17 mmol/L KCl) [141] το οποίο χρησιμοποιήθηκε και ως διάλυμα ελέγχου (control) σύμφωνα με τα θεσπισμένα Ευρωπαϊκά πρωτόκολλα εξακρίβωσης τοξικότητας στο zebrafish.

2.1.2 Διατήρηση πληθυσμού zebrafish

Τα έμβρυα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της τοξικότητας των CNDs προέρχονταν από διασταύρωση ενήλικων ατόμων zebrafish αγρίου τύπου ατόμων zebrafish (wild type strain) τα οποία διατηρούνταν σε σύστημα εκτροφής με αυτόματη ανανέωση νερού (ZebTec Active Blue, Tecniplast, **Εικόνα 12**). Η θερμοκρασία του νερού συστήματος εκτροφής διατηρούνταν σταθερά στους $27 \pm 1^\circ \text{C}$ με τη βοήθεια θερμοστατών. Το pH και η αγωγιμότητά του διατηρούνταν σταθερά σε τιμές 7 ± 1 και $500 \pm 50 \mu\text{S/cm}$ αντίστοιχα, με τη βοήθεια ρυθμιστικών διαλυμάτων αλάτων. Η φωτοπερίοδος ρυθμιζόταν σε 14 h φως: 10 h σκοτάδι.

Στο εν λόγω σύστημα το νερό της ύδρευσης υπόκειτο σε πρώτη επεξεργασία με αντίστροφη ώσμωση, διέλευση από φίλτρο άνθρακα συγκράτησης αιωρούμενων σωματιδίων. Στη συνέχεια εισέρχονταν στο σύστημα εκτροφής όπου φιλτράρονταν διαδοχικά από: φίλτρο υαλοβάμβακα (κατακράτηση μεγάλων σωματιδίων), βιολογικό φίλτρο *siroga* (ανάπτυξη νιτροποιητικών βακτηρίων για την οξείδωση τοξικών ενώσεων αζώτου, προς λιγότερο τοξικές ενώσεις), μηχανικό φίλτρο ινών πολυπροπυλενίου (κατακράτηση μικρότερου μεγέθους σωματιδίων και αιωρημάτων), φίλτρο ενεργού άνθρακα (δέσμευση και απομάκρυνση οργανικών και χημικών ενώσεων) και φίλτρο UV (απολύμανση του νερού). Η διαδικασία του διαδοχικού φιλτραρίσματος συμβάλει στο να καταστεί το νερό κατάλληλο για τη διαβίωση των ιχθύων σε αυτό. Στη συνέχεια, το νερό τροφοδοτούσε τις δεξαμενές μέσα στις οποίες βρίσκονται οι ιχθύες. Σκοπός των παραπάνω ήταν να παραμένουν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού στα ιδανικά επίπεδα για την

διαβίωση των ιχθύων και κατά συνέπεια η αναπαραγωγική τους επιτυχία να είναι η υψηλότερη δυνατή (<http://aquaticsolutions.it/products/zebteactiveblue.html>).



Εικόνα 12. Το σύστημα διατήρησης zebrafish Active Blue στο εργαστήριο Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Tecniplast S.A).

2.1.3 Αναπαραγωγική Διαδικασία

Η αναπαραγωγική διαδικασία στο εργαστήριο σχεδιάστηκε έτσι ώστε να έχει τη μεγαλύτερη δυνατή επιτυχία. Τα δοχεία που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της αναπαραγωγής ήταν δύο τύπων: α) δοχείο κυλινδρικού σχήματος ISPawn-S 30L και β) δοχεία (γεννήστρες) που εφαρμόζουν στο εσωτερικό δεξαμενής εκτροφής (**Εικόνα 13**).

Τα δοχεία αναπαραγωγής ISPawn γέμιζαν με νερό του συστήματος εκτροφής και οι ιχθύες τοποθετούνταν εντός, κατά τις απογευματινές ώρες. Η τοποθέτηση γινόταν ως εξής: στο κάτω μέρος τοποθετούνταν τα θηλυκά άτομα. Στη συνέχεια, τοποθετούνταν διάτρητο διαχωριστικό και άνωθεν αυτού τοποθετούνταν τα αρσενικά άτομα (αναλογία: 1 αρσενικό: 2 θηλυκά). Οι ιχθύες τοποθετούνταν κατά αυτό τον τρόπο έτσι ώστε κατά την διάρκεια της νύχτας να ανταλλάξουν αναπαραγωγικές ορμόνες, να αναπτυχθεί η αναπαραγωγική συμπεριφορά και να επιτευχθεί η αναπαραγωγική επιτυχία. Την επόμενη

ημέρα με το πρώτο άνοιγμα του φωτός, το διαχωριστικό αφαιρούνταν και ξεκινούσε η διαδικασία της αναπαραγωγής. Κατά την αναπαραγωγή, τα αυγά απελευθερώνονταν και κατέληγαν στον πυθμένα της δεξαμενής. Η αναπαραγωγική διαδικασία διαρκούσε 2 έως 3 ώρες. Κατά το τέλος της αναπαραγωγής, οι ιχθύες απομακρύνονταν και τα αυγά συλλέγονταν και τοποθετούνταν σε δισκία Petri (**Εικόνα 14**). Έπειτα εμβαπτιζόνταν σε ρυθμιστικό διάλυμα εμβρύων E3 (5 mmol/L NaCl, 0,33 mmol/L CaCl₂, 0,33 mmol/L MgSO₄·7H₂O, and 0,17 mmol/L KCl). Τα γονιμοποιημένα αυγά τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο για 24h.



Εικόνα 13. Σύστημα αναπαραγωγής iSPAWN-S (αριστερά) και δοχεία αναπαραγωγής που εφαρμόζουν στις δεξαμενές διατήρησης (δεξιά) (Tecniplast).



Εικόνα 14. Η τεχνητή αναπαραγωγή του zebrafish (<http://www.aquaticslabservices.com/s/9-Spawning-and-Reproduction-2018.pdf>).

2.1.4 Μηχανική απομάκρυνση του χορίου

Τα έμβρυα zebrafish, πριν την εκκόλαψη, περιβάλλονται από έναν ακυτταρικό φάκελο, το χόριο. Πρόκειται για μια δομή πάχους περίπου 3,5 μm που συγκροτείται από 3 επιμέρους στιβάδες πολυπρωτεϊνικής φύσεως και λειτουργεί ως φραγμός προστατεύοντας το έμβρυο κατά την έκθεση σε χημικές ενώσεις [142], [143]. Οι στιβάδες του χορίου είναι διάτρητες από πόρους-κανάλια τα οποία επιτρέπουν ή εμποδίζουν την είσοδο των ενώσεων στο εσωτερικό περιβάλλον του εμβρύου, ανάλογα με το μέγεθος τους [144]. Το χόριο απομακρύνθηκε έτσι ώστε να εξασφαλιστεί πως οι υπό μελέτη χημικοί παράγοντες θα έρθουν σε άμεση επαφή με το έμβρυο. Υπάρχουν 2 τρόποι αποχορίωσης, ο ενζυμικός που βασίζεται στη χρήση του ενζύμου της προνάσης και ο μηχανικός. Η μηχανική απομάκρυνση του χορίου πραγματοποιείται με τη χρήση ανατομικών λαβίδων και στερεοσκοπίου. Αρχικά, δημιουργείται μια οπή στο χόριο ώστε να εξισορροπηθεί η εσωτερική με την εξωτερική πίεση. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται προσεκτική διάνοιξη της οπής και κατόπιν η ανύψωση και αναστροφή του χορίου επιτρέπουν την ασφαλή απελευθέρωση του εμβρύου. Κατά τη διάρκεια των χειρισμών πρέπει να αποφεύγεται οποιαδήποτε πίεση επί του εμβρύου ώστε να αποφευχθεί ο τραυματισμός και η

θανάτωση των εμβρύων. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή ακολουθήθηκε η μέθοδος μηχανικής απομάκρυνσης του χορίου.

2.1.5 Πειράματα τοξικότητας

2.1.5.1 Προκαταρκτικά πειράματα ελέγχου

Μετά την αποχορίωση τα έμβρυα 24 hpf στους 28 °C τοποθετήθηκαν σε πλάκες 24^{ων} πηγαδίων επίπεδου πυθμένα (24 well plates). Τοποθετήθηκαν 2 έμβρυα ανά πηγάδι με 1,5 mL διαλύματος των παραλλαγών των CNDs (Non doped CNDs, N-doped CNDs, N,S-doped CNDs) έτσι ώστε να διεξαχθούν τα προκαταρκτικά πειράματα ελέγχου. Στόχος των προκαταρκτικών πειραμάτων ήταν να εντοπιστεί το εύρος εντός του οποίου προκαλούνταν τιμές θνησιμότητας μεταξύ 0 και 100%. Τα αποτελέσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ώστε να προκύψει το εύρος συγκεντρώσεων όπου έπειτα εξετάστηκε η τοξικότητα (**Πίνακας 6**). Τα πειράματα αυτά είχαν μεγάλη σημασία καθώς ήταν αυτά στα οποία βασίστηκαν όλες οι αναλύσεις για την εκτίμηση της τοξικότητας. Για την διεξαγωγή των προκαταρκτικών πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε ικανοποιητικός αριθμός εμβρύων zebrafish για κάθε παραλλαγή των CNDs.

Πίνακας 6. Εύρος συγκεντρώσεων ελέγχου CNDs.

ΥΛΙΚΟ	Εύρος συγκεντρώσεων ελέγχου ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Non doped	150-1200
N-doped	250-1000
N, S-doped	75-400

2.1.5.2 Προσδιορισμός της τοξικότητας

Έχοντας προσδιορίσει το εύρος των συγκεντρώσεων για κάθε CNDs διεξήχθησαν πειράματα εκτίμησης της τοξικότητας. Για κάθε παραλλαγή εξετάστηκαν τουλάχιστον

2.500 έμβρυα zebrafish. Αναλυτικά ο αριθμός ατόμων zebrafish που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα τοξικότητας παρουσιάζεται στο κεφ. 3.1.2. Η διάρκεια του κάθε πειράματος ορίστηκε στις 96h ξεκινώντας από το στάδιο σχηματισμού 26 σωματιών κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Τα άτομα zebrafish τοποθετούνταν σε πλάκες πηγαδιών επίπεδου πυθμένα (24 well plates). Τοποθετούνταν 1 άτομο zebrafish σε κάθε πηγάδι μαζί με 1,5 mL του διαλύματος έκθεσης των CNDs (όμοια με την διεξαγωγή των προκαταρκτικών πειραμάτων).

Η ανανέωση των διαλυμάτων έκθεσης ήταν καθημερινή. Με την καθημερινή ανανέωση των διαλυμάτων αυξανόταν η ευαισθησία της μεθόδου και αποκλείστηκαν φαινόμενα έμμεσης προκαλούμενης θνησιμότητας μέσω π.χ. της αύξησης του pH και όχι λόγω της τοξικής δράσης των CNDs. Τα αποτελέσματα θεωρούνταν αποδεκτά όταν η επιβίωση στα άτομα ελέγχου ήταν άνω του 90%. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν εις τριπλούν, ώστε να υπάρχει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αξιοπιστία.

2.1.5.3 Θνησιμότητα

Ως δείκτες θνησιμότητας χρησιμοποιήθηκαν 4 σημαντικές παρατηρήσεις, σύμφωνα με το πρωτόκολλο Zebrafish Acute Toxicity Test (ZFET) [121]:

- Θανάτωση του εμβρύου (Coagulation of the embryo)

Τα μη γονιμοποιημένα έμβρυα φέρουν ένα γαλακτώδες χρώμα το οποίο φαίνεται μαύρο στο οπτικό μικροσκόπιο. Ο αριθμός των πηγμένων εμβρύων εκτιμάται μετά από 24, 48, 72 και 96 ώρες.

- Έλλειψη σχηματισμού σωματιών (Lack of somite formation)

Σε ένα φυσιολογικά αναπτυσσόμενο έμβρυο, 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση παρατηρούνται 20 σωμίτες, η παρουσία των οποίων υποδεικνύεται από τις αυθόρμητες κινήσεις του εμβρύου. Η απουσία σωματιών εκτιμάται μετά από 24, 48, 72 και 96 ώρες.

- Μη αποκόλληση της ουράς (Non-Detachment of the tail-bud)

Σε ένα φυσιολογικά αναπτυσσόμενο έμβρυο παρατηρείται αποκόλληση της ουράς από τη λέκιθο, ακολουθούμενη από οπίσθια επιμήκυνση του εμβρυϊκού σώματος. Η απουσία αποκόλλησης της ουράς καταγράφεται μετά από 24, 48, 72 και 96 ώρες.

- Απουσία καρδιακού παλμού (Lack of heart beat)

Ο καρδιακός παλμός των φυσιολογικά αναπτυσσόμενων εμβρύων είναι εμφανής 48 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Ο ελάχιστος χρόνος παρατήρησης για την επιβεβαίωση της παρουσίας ή μη καρδιακού παλμού είναι ένα λεπτό, καθώς ασθενείς και «ακανόνιστοι» παλμοί δεν κρίνονται ως θανατηφόροι. Η απουσία καρδιακού παλμού καταγράφεται μετά από 48, 72 και 96 ώρες.

Η καταγραφή της θνησιμότητας γινόταν κάθε 24 ώρες κατά την διάρκεια των 96h της συνολικής έκθεσης. Ως νεκρά προσδιορίζονταν τα άτομα που ενέπιπταν στις παραπάνω τέσσερις προϋποθέσεις. Τα δεδομένα θνησιμότητας που προέκυψαν από το σύνολο των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της μέσης θανατηφόρου συγκέντρωσης (50% Lethal Concentration, LC₅₀). Η τιμή LC₅₀ αντιστοιχεί στη συγκέντρωση της ουσίας η οποία εκτιμάται ότι θα προκαλέσει το θάνατο του 50% του ελεγχόμενου πληθυσμού. Γενικά, μια χαμηλή τιμή LC₅₀ είναι ένδειξη αυξημένης τοξικότητας. Τα νεκρά άτομα απομακρύνονταν καθημερινά από τις πλάκες 24^{wv} πηγαδιών (24 well plates).

2.1.6 Οπτική παρατήρηση

2.1.6.1 Μορφολογικές ανωμαλίες των zebrafish κατά την έκθεση

Κάθε 24 ώρες κατά την διάρκεια της έκθεσης γινόταν έλεγχος των αναπτυξιακών και μορφολογικών ανωμαλιών. Η οπτική παρατήρηση των εξεταζόμενων ατόμων zebrafish πραγματοποιήθηκε με τη χρήση στερεοσκοπίου ψυχρού φωτισμού (OLYMPUS BX43, KL300 LED light) το οποίο ήταν εξοπλισμένο με ψηφιακή κάμερα (Basler MED ace 2.3 MP 164 color, Basler Microscopy Software V2.1). Η επεξεργασία των εικόνων έγινε διαμέσου υπολογιστικού προγράμματος επεξεργασίας εικόνας (Image-Pro Plus 7, Media Cybernetics). Η οπτική παρατήρηση είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς τα πρώτα στάδια ανάπτυξης είναι και τα πιο κρίσιμα και σε αυτά αναμένονται να παρατηρηθούν οι διαταραχές που θα προκληθούν από την έκθεση στους υπό μελέτη χημικούς παράγοντες. Οι μορφολογικές ανωμαλίες σε αυτά τα στάδια ανάλογα με τον βαθμό που εμφανίζονται αποτέλεσαν κριτήριο επιβίωσης.

Διερευνώντας την μορφολογία των εμβρύων, μελετήθηκαν συνολικά 6 φαινότυποι δυσμορφιών: περικαρδιακό οίδημα (Pericardial Edema, PE), οίδημα λεκιθικού σάκου (Yolk

Sac Edema, YSE), λόρδωση (Spinal Lordosis, SL) και κύφωση της σπονδυλικής στήλης (Spinal Kyphosis, SK), δυσμορφία της ουράς (Tail Malformation, TM) και αιμορραγία (Hemorrhage, H) (Πίνακας 7). Στις περιπτώσεις πολλαπλών ανωμαλιών γινόταν καταγραφόταν ως πολλαπλές σκελετικές ανωμαλίες. Οι φαινότυποι της κύφωσης και της λόρδωσης της σπονδυλικής στήλης, καθώς και της δυσμορφίας της ουράς, συγκαταλέγονται στις σκελετικές ανωμαλίες.

Πίνακας 7. Οι υπό μελέτη φαινότυποι δυσμορφιών και τα κριτήρια αξιολόγησης τους.

Φαινότυπος	Κριτήρια
Περικαρδιακό οίδημα	Συσσώρευση υγρών και διόγκωση του περικαρδιακού σάκου
Οίδημα λεκιθικού σάκου	Συσσώρευση υγρών και διόγκωση του λεκιθικού σάκου
Κύφωση της σπονδυλικής στήλης	Κάμψη της σπονδυλικής στήλης προς τα μέσα
Λόρδωση της σπονδυλικής στήλης	Κάμψη της σπονδυλικής στήλης προς τα έξω
Δυσμορφία της ουράς	Μη φυσιολογική διάπλαση του ουραίου τμήματος
Αιμορραγία	Συσσώρευση αίματος σε εσωτερικές κοιλότητες του σώματος

2.1.6.2 Ρυθμός αύξησης των zebrafish κατά την έκθεση

Παράλληλα με τον έλεγχο των μορφολογικών ανωμαλιών κατά την έκθεση στις CNDs πραγματοποιήθηκε μελέτη του ρυθμού αύξησης. Κάθε ημέρα λαμβάνονταν 15 άτομα ανά συγκέντρωση CNDs και το καθένα τοποθετούνταν σε δισκίο Petri. Με τη βοήθεια στερεοσκοπίου (OLYMPUS BX43, KL 300 Led light) εξοπλισμένου με ψηφιακή κάμερα (Basler MED ace 2.3 MP 164 color, Basler Microscopy Software V2.1) γίνονταν μέτρηση του μήκους (mm) του κάθε ατόμου zebrafish. Η μέτρηση γίνονταν με την δυνατόν λιγότερη καταπόνηση των ατόμων. Με το τέλος της μέτρησης επιστρέφονταν στην πλάκα 24^{ωv}

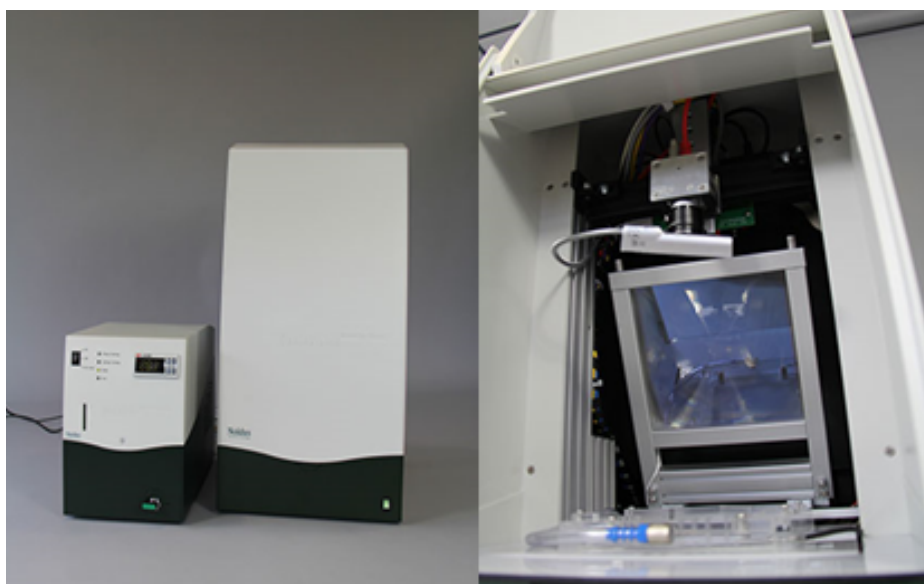
πηγαδιών (24 well plates). Η μέτρηση του μήκους ανά ημέρα χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του ρυθμού αύξησης σε σχέση με τον χρόνο έκθεσης, την συγκέντρωση των CNDs. Η εικόνα επεξεργάζονταν με υπολογιστικό πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας (Image-Pro Plus 7, Media Cybernetics) και με αυτό γινόταν οι μετρήσεις μήκους. Όλες οι καταγραφές πραγματοποιούνται την ίδια ώρα κάθε ημέρα έτσι ώστε να μην διαταράσσεται ο κερκαδικός ρυθμός των zebrafish και να υπάρχει ομοιογένεια στα αποτελέσματα.

2.1.7 Επίδραση στην συμπεριφορά των ατόμων zebrafish μετά την έκθεση στις CNDs

Μετά το τέλος της έκθεσης και την έκτη ημέρα (144 hpf) ακολούθησε η καταγραφή της συμπεριφοράς των εκτεθειμένων ατόμων. Τα zebrafish που επιλέχθηκαν για την μελέτη της συμπεριφοράς ήταν αυτά τα οποία επιβίωσαν από την έκθεση στις CNDs, δεν είχαν εμφανείς μορφολογικές ανωμαλίες και είχαν φυσιολογικό καρδιακό παλμό. Τα zebrafish μεταφέρθηκαν σε ειδικό δωμάτιο καταγραφής της συμπεριφοράς τουλάχιστον μία ώρα πριν την καταγραφή ώστε να επιτευχθεί ο εγκλιματισμός. Τοποθετούνταν ένα (1) άτομο σε κάθε πηγάδι (πλάκας 24^{ων} πηγαδιών) και εισάγονταν στο ειδικό σύστημα καταγραφής της συμπεριφοράς (DanioVision, Noldus Inc., Wageningen, The Netherlands) (**Εικόνα 15**). Κατά την καταγραφή της συμπεριφοράς γίνεται καταγραφή της κινητικότητας των zebrafish μετά την έκθεση και προκύπτουν σημαντικά συμπεράσματα αναφορικά με την λειτουργία του Κ.Ν.Σ. (Κεντρικού Νευρικού Συστήματος) και την ανάπτυξη των νευρώνων. Όλες οι καταγραφές πραγματοποιούνται την ίδια ώρα κάθε ημέρα έτσι ώστε να μην διαταράσσεται ο κερκαδικός ρυθμός των zebrafish και να υπάρχει ομοιογένεια στα αποτελέσματα. Κατά την καταγραφή της συμπεριφοράς η θερμοκρασία στον θάλαμο καταγραφής διατηρούνταν σταθερή στους 28°C. Τα πρωτόκολλα ελέγχου της συμπεριφοράς σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να ελέγχουν την συμπεριφορά σε συνεχόμενα χρονικά διαστήματα αλλά και υπό την επίδραση κάποιου εξωτερικού ερεθίσματος (φως/σκοτάδι).

Ο κύκλος καταγραφής ρυθμίστηκε ώστε τα υπό μελέτη άτομα να εκτεθούν σε μία αλληλουχία 10 min σκοτάδι-10 min φως-10 min σκοτάδι και με συνολική διάρκεια 30 min. Μετά τις καταγραφές υπολογίστηκε η συνολική απόσταση (cm) που διανύουν τα άτομα και η μέση ταχύτητα που αναπτύσσουν (cm/s). Οι καταγραφές και η αποτύπωση των

αποτελεσμάτων έγινε με το ειδικό λογισμικό ανάλυσης συμπεριφοράς, Ethovision XT 14 (DanioVision, Noldus Inc., Wageningen, The Netherlands). Το EthoVision XT είναι ένα λογισμικό το οποίο επιτρέπει την ταυτόχρονη παρακολούθηση του συνόλου των ατόμων zebrafish σε πλάκες 24^{ωv} πηγαδιών και την διερεύνηση της συμπεριφοράς κάτω από την επίδραση διαφόρων ερεθισμάτων όπως το φως και οι κραδασμοί.



Εικόνα 15. Το σύστημα μελέτης συμπεριφοράς DanioVision με τη μονάδα ρύθμισης της θερμοκρασίας (αριστερά) και την ψηφιακή κάμερα υψηλής ανάλυσης (δεξιά).

2.1.8 *In vivo* πειράματα- Δήλωση ηθικής

Τα έμβρυα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ήταν ηλικίας μικρότερης των 6 ημερών. Ως εκ τούτου, δεν απαιτούνταν ξεχωριστή άδεια και η έρευνα ήταν σύμφωνη με τους νομικούς κανονισμούς της Ε.Ε. (Directive 86/609/EEC and EU Directive 2010/63/EU) [145]. Οι παραπάνω οδηγίες επιτρέπουν τη χρήση εμβρύων και λεκιθοφόρων νυμφών zebrafish σε πειράματα μέχρι τη στιγμή της ελεύθερης διαβίωσης (περίπου 5-7 ημερών).

2.1.9 Στατιστική ανάλυση

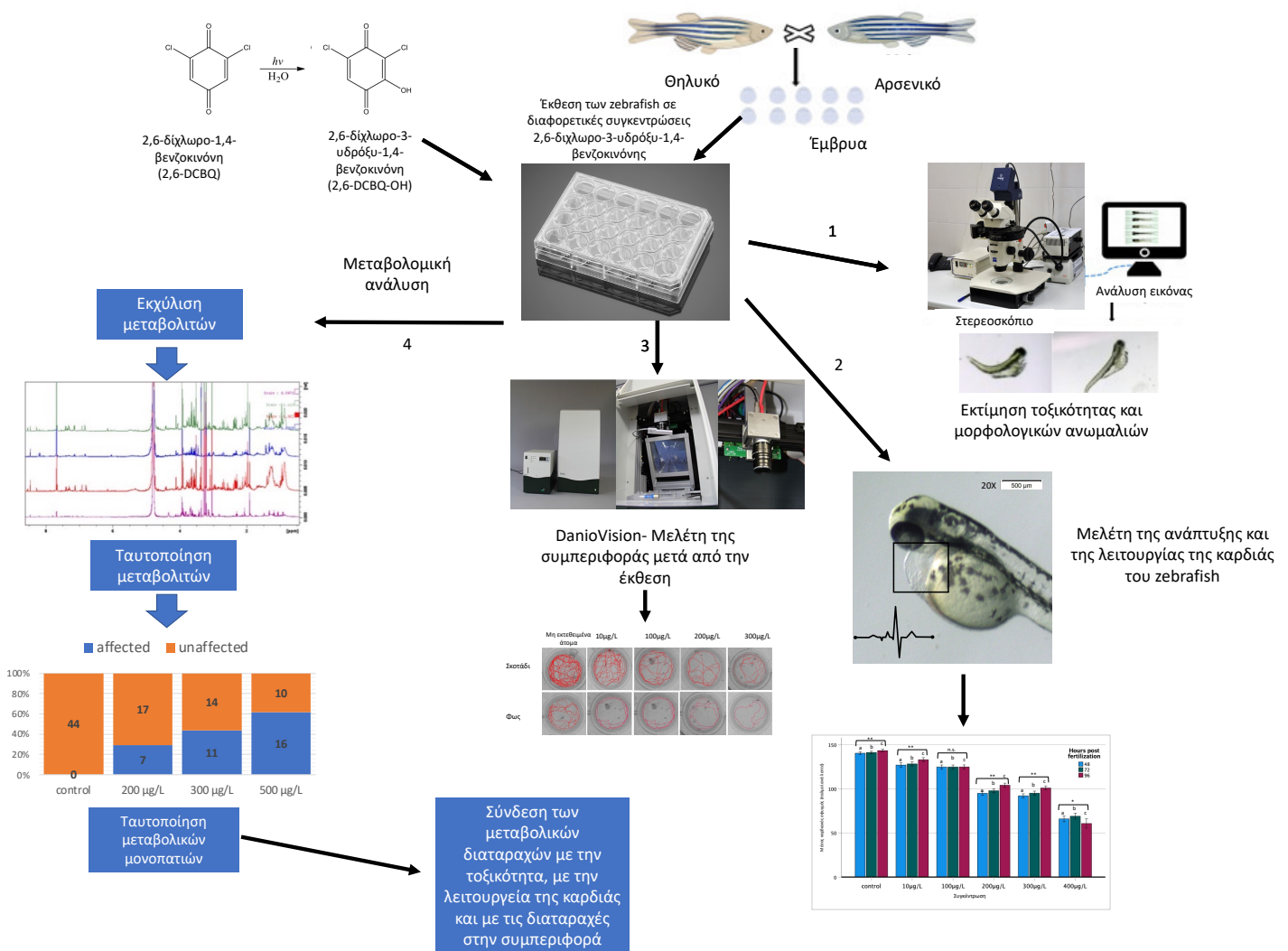
Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν, εισάχθηκαν σε υπολογιστικά φύλλα Excel (Microsoft Office Excel 365). Ο υπολογισμός της τιμής LC₅₀ πραγματοποιήθηκε μέσω της Probit ανάλυσης του στατιστικού πακέτου SPSS ver. 28 (IBM Corp, 2022). Για την μελέτη των στατιστικών διαφορών των δεδομένων έγινε έλεγχος της κανονικότητας. Όσα δεδομένα ενέπυταν στην κανονικότητα οδηγήθηκαν σε παραμετρικό έλεγχο κατά ένα παράγοντα

και σε έλεγχο κατά δύο παράγοντες GLM. Όσα δεδομένα δεν ενέπιπταν στην κανονικότητα οδηγήθηκαν σε μη παραμετρικό έλεγχο Kruskal-Wallis κατά ένα παράγοντα. Για την ανάλυση κατά δύο παράγοντες (GLM) για τα δεδομένα που δεν ενέπιπταν στην κανονικότητα, προηγήθηκε η λογαρίθμιση τους. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές για $P < 0,001$ και οριακά στατιστικά σημαντικές για $P < 0,05$. Όσον αφορά τα δεδομένα από τον έλεγχο της συμπεριφοράς, η στατιστική επεξεργασία έγινε αρχικά με το λογισμικό EthoVision XT 14 που υποστηρίζει το DanioVision και εν συνεχεία σε υπολογιστικά φύλλα Excel (Microsoft Office 365).

2.2 Η αλογοβενζοκινόνη 2,6-DCBQ-OH

Οι μέθοδοι ελέγχου της τοξικότητας, των μορφολογικών ανωμαλιών, της συμπεριφοράς και η στατιστική ανάλυση είναι όμοιες με αυτές που ακολουθήθηκαν για τις νανοκουκκίδες (κεφ. 2.1). Αναλυτικά περιγράφονται παρακάτω(κεφ. 2.2.1 έως 2.2.6) μόνο οι συμπληρωματικές αναλύσεις που διεξήχθησαν για την μελέτη των επιπτώσεων της 2,6-DCBQ-OH.

Στην **Εικόνα 16** γίνεται περιγραφική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την μελέτη των επιπτώσεων της 2,6-DCBQ-OH.



Εικόνα 16. Γραφική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την μελέτη των επιπτώσεων της 2,6-δichλωρο-3-υδροξυ-1,4-βενζοκινόνης (2,6-DCBQ-OH) σε έμβρυα zebrafish.

2.2.1 Παρασκευή διαλύματος ελέγχου και μελέτη της σταθερότητας της 2,6-δichλωρο-1,4-βενζοκινόνης (2,6-DCBQ-OH)

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα 2,6-DCBQ (97%, w/w) (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany) συγκέντρωσης 1,0 mg/mL με ζύγιση 10 mg στερεής 2,6-DCBQ και διαλυτοποίηση της σε μερικά mL δις-απεσταγμένου ύδατος, εντός ογκομετρικής φιάλης χωρητικότητας 10 mL. Ακολούθως, η ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 5 min, για την πλήρη διαλυτοποίηση της ουσίας. Τέλος, αφού ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τα 10 mL μεταφέρθηκε σε γυάλινο δοχείο με βιδωτό πώμα και αποθηκεύτηκε ως πρότυπο διάλυμα μέχρι τη χρήση.

Η παρασκευή διαλυμάτων διαφορετικών συγκεντρώσεων πραγματοποιήθηκε μέσω διαδοχικών αραιώσεων του πρότυπου διαλύματος. Οι διαδοχικές αραιώσεις έγιναν σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα εμβρύων E3 (5 mmol/L NaCl, 0,33 mmol/L CaCl₂, 0,33 mmol/L MgSO₄·7H₂O, 0,17 mmol/L KCl) το οποίο χρησιμοποιήθηκε και ως διάλυμα ελέγχου (control) σύμφωνα με τα θεσπισμένα Ευρωπαϊκά πρωτόκολλα εξακρίβωσης τοξικότητας στο zebrafish.

Μετά την σύνθεση του διαλύματος της υπό μελέτη ένωσης έγινε ο χαρακτηρισμός της ένωσης και έπειτα μελετήθηκε εκτενώς η σταθερότητα της. Η ένωση αυτή παρουσιάζει πολύ μεγάλη αστάθεια και άμεσα μετατρέπεται σε 2,6-DCBQ-OH. Για αυτό το λόγο, διεξήχθησαν πειράματα μελέτης της μετατροπής της ουσίας στην υδροξυλιωμένη της μορφή όπου εξετάστηκαν όλες οι παράμετροι που οδηγούν στην μετατροπή στην υδροξυλιωμένη μορφή. Η ουσία εκτέθηκε σε διαφορετικές συνθήκες, φωτός, θερμοκρασίας και pH για να διαπιστωθεί η σταθερότητα της. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι σε λιγότερο από 2 ώρες η 2,6-DCBQ είχε μετατραπεί πλήρως σε 2,6-DCBQ-OH.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα και μην έχοντας την δυνατότητα να εξετάσουμε την μετατροπή στην υδροξυλιωμένη μορφή σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας και pH, διότι αυτές οι τιμές θα ήταν απαγορευτικές για την επιβίωση του zebrafish πραγματοποιήθηκε μελέτη των επιπτώσεων της 2,6-DCBQ-OH, η οποία παραμένει σταθερή στις συνθήκες όπου πραγματοποιείται η έκθεση. Η υδροξυλιωμένη μορφή της ένωσης είναι και η μορφή η οποία συναντάται στο περιβάλλον και με την οποία οι οργανισμοί έρχονται σε επαφή. Με την εξέταση της υδροξυλιωμένης μορφής σε μέρος του κύκλου ζωής του zebrafish

επιτεύχθηκαν πιο αντιπροσωπευτικά συμπεράσματα καθώς αποτυπώθηκε πλήρως η εικόνα που επικρατεί στο περιβάλλον. Παρόμοια προσέγγιση συναντάμε και σε άλλες μελέτες που εξέτασαν την επίδραση των αλογονοβενζοκινονών [85], [94], [146], [87].

2.2.2 Πειράματα τοξικότητας-Εύρος συγκεντρώσεων ελέγχου

Με σκοπό την εκτίμηση της τοξικότητας της 2,6-DCBQ-OH προηγήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα ελέγχου. Διεξήχθησαν πειράματα όπου zebrafish εκτέθηκαν σε εύρος συγκεντρώσεων ώστε να επιτευχθεί θνησιμότητα από 0-100% για να εκτιμηθούν οι θνησιγόνες και οι υποθνησιγόνες δόσεις. (Πίνακας 8). Τα πειράματα αυτά είχαν μεγάλη σημασία καθώς σε αυτά βασίστηκαν όλες οι αναλύσεις για την εκτίμηση της τοξικότητας. Για τη διεξαγωγή των προκαταρκτικών πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ικανοποιητικός αριθμός εμβρύων zebrafish.

Πίνακας 8. Εύρος συγκεντρώσεων ελέγχου 2,6-DCBQ-OH.

Χημική ουσία	Εύρος συγκεντρώσεων ελέγχου (μg/L)
2,6-DCBQ-OH	10-500

Μετά τον προσδιορισμό τους εύρους των συγκεντρώσεων ακολούθησε η διεξαγωγή των πειραμάτων του ελέγχου της τοξικότητας. Αναλυτικά ο αριθμός ατόμων zebrafish που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα τοξικότητας παρουσιάζεται στο κεφ. 3.2.1.

2.2.3 Ανάπτυξη και λειτουργία καρδιακού μυός

Σε αυτό το κεφάλαιο διεξήχθη μελέτη της επίδρασης της έκθεσης στην ανάπτυξη και την λειτουργία του καρδιακού μυός μέσω της οπτικής παρατήρησης και της μέτρησης του καρδιακού ρυθμού αντίστοιχα. Τα zebrafish κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης είναι διαφανή και ήταν δυνατή η μελέτη της μορφολογίας της καρδιάς και η μέτρηση του καρδιακού ρυθμού. Η μελέτη της ανάπτυξης της καρδιάς και η μέτρηση του καρδιακού παλμού έγινε για κάθε συγκέντρωση έκθεσης στην 2,6-DCBQ-OH.

Οι καταγραφές γινόταν κάθε 24 ώρες και ως τέλος της έκθεσης (120 hpf), σε δωμάτιο με ελεγχόμενη θερμοκρασία. Η μέτρηση έγινε την ίδια ώρα της ημέρας. Για την μελέτη της

μορφολογίας της καρδιάς και την μέτρηση του καρδιακού ρυθμού των εκτεθειμένων zebrafish χρησιμοποιήθηκε στερεοσκόπιο με ψυχρό φωτισμό (OLYMPUS BX43, KL300 LED light) το οποίο είναι εξοπλισμένο με ψηφιακή κάμερα (Basler MED ace 2.3 MP 164 color, Basler Microscopy Software V2.1). Πριν από κάθε καταγραφή, τα εκτεθειμένα άτομα που βρισκόταν σε πλακάκια 24^{ων} πηγαδιών με επίπεδο πυθμένα (24 well plates), μεταφέρονταν στο δωμάτιο καταγραφής όπου προηγούταν εγκλιματισμός για 15 min. Η μέτρηση του καρδιακού ρυθμού έγινε σε άτομα που εκτέθηκαν σε 5 συγκεντρώσεις (10, 100, 200, 300, 400 µg/L) και δεν χρησιμοποιήθηκαν άτομα εκτεθειμένα στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (500 µg/L) καθώς η επιβίωση ήταν πολύ χαμηλή και τα αποτελέσματα δεν θα ήταν αντιπροσωπευτικά.

Για την μέτρηση του καρδιακού ρυθμού χρησιμοποιήθηκαν 40 άτομα ανά συγκέντρωση έκθεσης 2,6-DCBQ-OH. Κάθε άτομο τοποθετούνταν σε αντικειμενοφόρο πλάκα με επαρκή ποσότητα νερού και μέσα σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα γινόταν η καταγραφή του καρδιακού ρυθμού. Έγινε καταγραφή βίντεο (1 min. video, 1 fps) με σκοπό τη μέτρηση της καρδιακής συχνότητας (παλμοί ανά λεπτό, bpm).

2.2.4 Επίδραση στην συμπεριφορά των ατόμων zebrafish

Η καταγραφή και η μελέτη της συμπεριφοράς των εκτεθειμένων μετά από την έκθεση πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τις μεθόδους που παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο 2.1.7. Μελετήθηκε η συνολική διανυθείσα απόσταση (cm) για τα 30 min της καταγραφής και η μέση ταχύτητα (cm/s) των ατόμων.

2.2.4.1 Λήψη στατικής εικόνας πηγαδιών κατά την καταγραφή της κινητικότητας των zebrafish

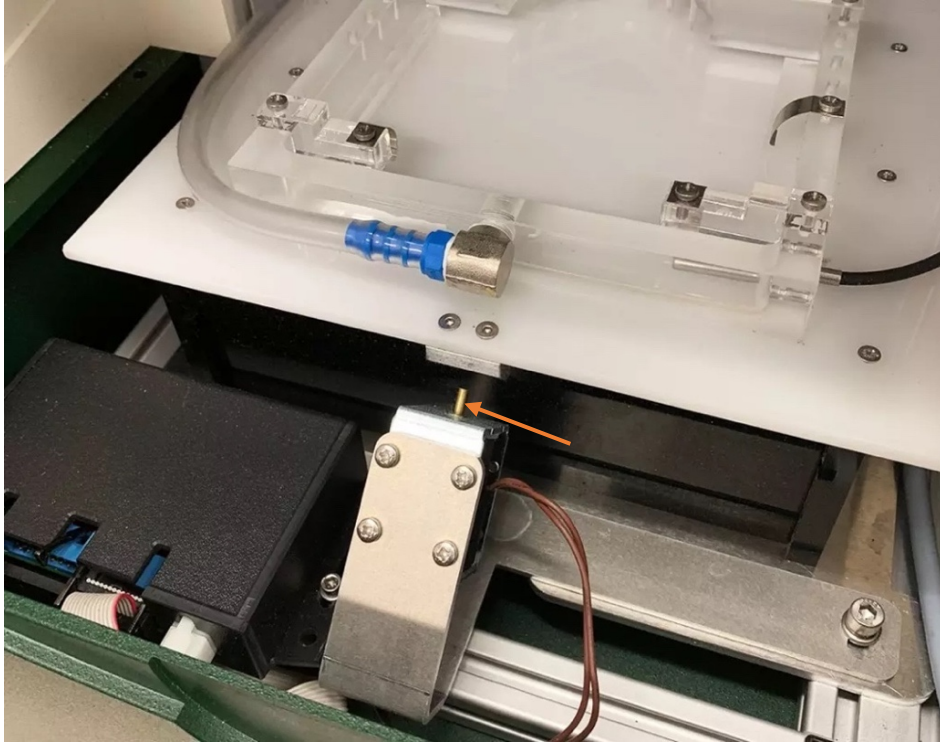
Σε αυτό το κεφάλαιο έγινε αποτύπωση της κινητικότητας των ατόμων κατά την διάρκεια της καταγραφής της συμπεριφοράς. Αυτό έγινε μέσω της λήψης εικόνας (still frame) κατά την συνολική καταγραφή των 30 λεπτών που γίνεται από το σύστημα καταγραφής συμπεριφοράς (DanioVision, Noldus Inc., Wageningen, The Netherlands) (**Εικόνα 15**, κεφ. 2.1.7). Με αυτή την ανάλυση, μας δινόταν η δυνατότητα να παγώσουμε την εικόνα και να αποτυπωθεί σε κάθε πηγάδι επίπεδου πυθμένα, μέσω κόκκινης γραμμής, η κίνηση του

ατόμου zebrafish για 2 min. Με αυτή την ανάλυση επιτεύχθηκε η οπτικοποίηση των παρατηρούμενων αποτελεσμάτων της ανάλυσης συμπεριφοράς.

2.2.5 Επίδραση της 2,6-DCBQ-OH στην απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα

Σε αυτό το κεφάλαιο, εξετάστηκε η επίδραση της ουσίας στην απόκριση του zebrafish σε εξωτερικά ερεθίσματα. Η εξέταση πραγματοποιήθηκε μετά το πέρας της έκθεσης. Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε το κρουστικό ερέθισμα. Αυτό προκλήθηκε μέσω ενός εμβόλου εγκατεστημένο μέσα στο σύστημα καταγραφής συμπεριφοράς (DanioVision Tapping Device DVOC-004x/T, Noldus, Wageningen, The Netherlands) (**Εικόνα 17**). Για την ανάλυση της απόκρισης χρησιμοποιήθηκε το EthoVision XT14 (Noldus, Wageningen, The Netherlands).

Τα άτομα zebrafish μεταφέρθηκαν κατά την ημέρα της καταγραφής μία ώρα πριν την έναρξη του πειράματος στο δωμάτιο καταγραφής συμπεριφοράς έτσι ώστε να επιτευχθεί ο εγκλιματισμός. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε πλακάκια 24 πηγαδιών επίπεδου πυθμένα όπου τοποθετούνταν ένα άτομο zebrafish σε κάθε πηγάδι. Το κάθε πηγάδι περιείχε 1,5 mL ρυθμιστικού διαλύματος E3. Μετά από μία ώρα εγκλιματισμού, πραγματοποιήθηκαν καταγραφές βίντεο 2 λεπτών με ταχύτητα 60 καρέ ανά δευτερόλεπτο. Η εφαρμογή του κρουστικού ερεθίσματος γίνονταν μέσω του χτύπου του εμβόλου στο πλακάκι που φέρει τα άτομα zebrafish, στην έναρξη της δίλεπτης καταγραφής. Η απόκριση στο κρουστικό ερέθισμα αναλύθηκε για κάθε μεμονωμένο άτομο zebrafish μετρώντας την απόσταση (cm) που διένυσε για περίοδο 10 δευτερολέπτων μετά τον χτύπο και τον χρόνο αντίδρασης (msec) στο χτύπημα. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Noldus Inc., EthoVision και το στατιστικό πακέτο SPSS ver. 28 (IBM Corp., 2022). Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά όπου $P < 0,001$ και οριακά στατιστικά σημαντικά όπου $P < 0,05$.



Εικόνα 17. Ο εγκατεστημένος μηχανισμός πιστόνι στο εσωτερικό της μονάδας καταγραφής συμπεριφοράς Daniovision που προκαλεί το κρουστικό ερέθισμα στο πλακάκι που φέρει τις προνύμφες zebrafish.

2.2.6 Μεταβολομική ανάλυση

2.2.6.1 Εκχύλιση των μεταβολιτών

Για την απομόνωση των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκαν εκτεθειμένα άτομα zebrafish στις συγκεντρώσεις 200 µg/L, 300 µg/L, 500 µg/L της 2,6-DCBQ-OH καθώς και μη εκτεθειμένα άτομα ελέγχου. Χρησιμοποιήθηκαν 150 άτομα ανά συγκέντρωση και 150 μη εκτεθειμένα άτομα ελέγχου. Ακριβώς μετά το πέρας της έκθεσης τα άτομα απομακρύνθηκαν από τις πλάκες 24^{ωv} πηγαδιών και τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια φυγοκέντρου τύπου Falcon 15 mL με βιδωτό πώμα το οποίο περιείχε μικρή ποσότητα νερού από το σύστημα εκτροφής. Αμέσως μετά τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν σε δοχείο με ξηρό πάγο σε μορφή κιμωλίας έτσι ώστε να υπάρξει ακαριαία θανάτωση των ατόμων. Με την ακαριαία θανάτωση στον ξηρό πάγο αποκλείστηκε η περίπτωση να προκληθούν μεταβολικές διαταραχές λόγω στρες κατά τον αργό θάνατο από την απευθείας ψύξη στους -80°C. Έπειτά τα παγωμένα σωληνάρια φυγοκέντρου τύπου Falcon αποθηκευτήκαν σε υπερκατάψυξη στους -80°C μέχρι να γίνει η εκχύλιση των μεταβολιτών.

Για την εκχύλιση των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε μία παραλλαγή της μεθόδου εκχύλισης Bligh Dyer (με μεθανόλη, απεσταγμένο νερό και χλωροφόρμιο σε αναλογία 2:1:2) [147]. Στα λυοφιλιωμένα άτομα zebrafish προστέθηκε 1 mL χλωροφόρμιο (CHCl₃) και 2 mL μεθανόλη (MeOH) και το μίγμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 3 min. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 mL CHCl₃ και το μίγμα αναδεύτηκε για 30 δευτερόλεπτα στο Vortex. Προστέθηκε 1 mL H₂O και η ανάμιξη συνεχίστηκε για άλλα 30 δευτερόλεπτα. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 5 min και εμφανίστηκε ένα διφασικό σύστημα, το χλωροφορμικό στρώμα του οποίου (κάτω φάση) περιέχει τα λιπίδια και το στρώμα μεθανόλης-νερού (άνω φάση) περιέχει τους μεταβολίτες. Συλλέχθηκε η άνω φάση του διαλύματος, η οποία εξατμίστηκε μέχρι ξηρού με τη βοήθεια ρεύματος αζώτου. Το δείγμα αποθηκεύτηκε στους -80 °C μέχρι τη χρήση του.

2.2.6.2 Λήψη των φασμάτων

Για την λήψη φασμάτων NMR τα δείγματα αποψύχθηκαν και στο καθένα προστέθηκε 500 µL D₂O. Το διάλυμα αναδεύτηκε σε vortex και μεταφέρθηκε σε γυάλινο σωλήνα NMR 5 mm και προστέθηκαν (0,02 mmol L⁻¹) TSP-d₄ ως ένωση αναφοράς. Το σύστημα ελέγχονταν

από το λογισμικό TopSpin 2.1. Όλα τα φάσματα λήφθηκαν με τις εξής πειραματικές συνθήκες:

- Καταγραφή φασμάτων στους 298 K.
- Χρόνος μέτρησης: 4,1 sec
- Χρόνος ηρεμίας: 5.000 sec
- Σημεία δεδομένων: 64 K
- Μήκος παλμού: 90°
- Αριθμός σαρώσεων: 512

Για τη λήψη φασμάτων μάζας έγινε επαναιώρηση του δείγματος σε 100 μL ακετονιτρίλιο και το δείγμα εισήχθη σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας για διαχωρισμό και λήψη των φασμάτων. Για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα UHPLC Accela LC (Thermo Fisher Scientific, Inc. GmbH, Bremen, Germany). Ο υβριδικός ανιχνευτής μαζών αποτελούνταν από μια τετραπολική παγίδα ιόντων (LTQ) και από μια παγίδα ιόντων τύπου Orbitrap (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Οι διαχωρισμοί των συστατικών έγιναν σε στήλη Hypersil GOLD (100 mm \times 2,1 mm εσωτερική διάμετρος και 1,9 μm μέγεθος σωματιδίων). Η θερμοκρασία της στήλης ήταν σταθερή στους 30 °C. Η κινητή φάση αποτελούνταν από νερό (A) και ακετονιτρίλιο (B), που περιείχαν φορμικό οξύ 0,1%. Ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης ήταν 300 $\mu\text{L min}^{-1}$. Χρησιμοποιήθηκε ένα βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης των ουσιών για τον καλύτερο διαχωρισμό τους. Το πρόγραμμα είχε ως εξής: 0 – 13,78 min, 20 – 90% B, 13,78 – 15,28 min, 90% B, 15,28 – 18,06 min, 90 – 20% B, 18,06 – 20,06 min, 20% B που ακολουθείται από μία περίοδο 2 λεπτών επανεξισορρόπησης της στήλης. Χρησιμοποιήθηκε ένα φασματομέτρο μάζας με τετράπολο (LTQ) Orbitrap (LTQ- Orbitrap XL 2.5.5 SP1, Thermo Fisher Scientific, Inc. GmbH, Bremen, Γερμανία). Το όργανο ήταν εξοπλισμένο με ένα σύστημα ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης και με σύστημα ηλεκτροψεκασμού. Οι εκλουόμενες ουσίες από την χρωματογραφική στήλη μεταφέρονταν στην πηγή ιόντων με τη βοήθεια αζώτου και ηλίου ως φέρον και βοηθητικό αέριο με ροές 35,00 και 10,00 mL min^{-1} αντίστοιχα.

Για την ανάλυση των ουσιών, δοκιμάστηκαν δυο μέθοδοι ιονισμού, ο θετικός και ο αρνητικός. Για τον θετικό ιονισμό των ουσιών, οι πειραματικές συνθήκες ήταν: όγκος δείγματος: 2,5 μL , τάση πηγής: 3,40 kV, φακοί του σωλήνα: 110 V, θερμαινόμενη

τριχοειδής τάση: 40 V, ενώ η θερμοκρασία παρέμενε σταθερή στους 320 °C. Για τον αρνητικό ιονισμό των ουσιών, οι πειραματικές συνθήκες ήταν: όγκος δείγματος: 10 μ L, τάση πηγής: 3,70 kV, φακοί του σωλήνα: 120 V, θερμαινόμενη τριχοειδής τάση: -30,00 V, ενώ η θερμοκρασία παρέμενε σταθερή στους 320 °C. Και στις δυο μεθόδους, εφαρμόστηκαν δυο τύποι σαρώσεων, μια πλήρης σάρωση με ανάλυση 60.000 και εύρος μαζών (m/z) 50 – 1.500 και μια σάρωση για το πιο έντονο ιόν με ανάλυση 7.500 (θρυμματισμός MS/MS από το πλέον άφθονο ιόν). Η λειτουργία του οργάνου, η καταγραφή και η επεξεργασία δεδομένων έγιναν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Thermo Xcalibur 2.5.0.

2.2.6.3 Ανάλυση δεδομένων

Ο έλεγχος και η επεξεργασία των φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό TopSpin 2.1. Η φάση και η γραμμή της βάσης διορθώθηκαν χειροκίνητα μετά από μετασχηματισμό Fourier των αποτελεσμάτων. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του εργαλείου “1D NMR Search” της Human Metabolome Database (HMDB) όπου οι κορυφές «μεταφράστηκαν» στους αντίστοιχους μεταβολίτες. Πιο συγκεκριμένα στην βάση δεδομένων HMDB τοποθετήθηκαν οι κορυφές (ppm) των φασμάτων NMR και ρυθμίστηκε το Peak Tolerance στο $\pm 0,01$. Στη συνέχεια λήφθηκαν οι μεταβολίτες και καταγράφηκαν. Τα δείγματα εισήχθησαν και σε σύστημα UHPLC-LTQ-OrbitrapMS. Με τον τρόπο αυτό, πραγματοποιήθηκε ένας βασικός διαχωρισμός με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας και λήφθηκαν τα φάσματα μάζας με ανιχνευτή μάζας. Τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν αναλύθηκαν για τις ακριβείς μάζες των πιθανών μεταβολιτών που προέκυψαν από την επεξεργασία των φασμάτων NMR. Η ύπαρξη των μεταβολιτών ταυτοποιήθηκε με το ακριβές μοριακό βάρος (ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων) και με βάση τα φάσματα μάζας τους. Οι ταυτοποιημένοι μεταβολίτες εισήχθησαν στο εργαλείο “pathway analysis” της βάσης δεδομένων MetaboAnalyst 5.0 και με χρήση της βιβλιοθήκης: zebrafish (*Danio rerio*) λήφθηκαν τα μεταβολικά μονοπάτια στα οποία ενέχονται οι μεταβολίτες των zebrafish.

3^ο Κεφάλαιο

Αποτελέσματα



3. Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα μετά την έκθεση του zebrafish στις CNDs

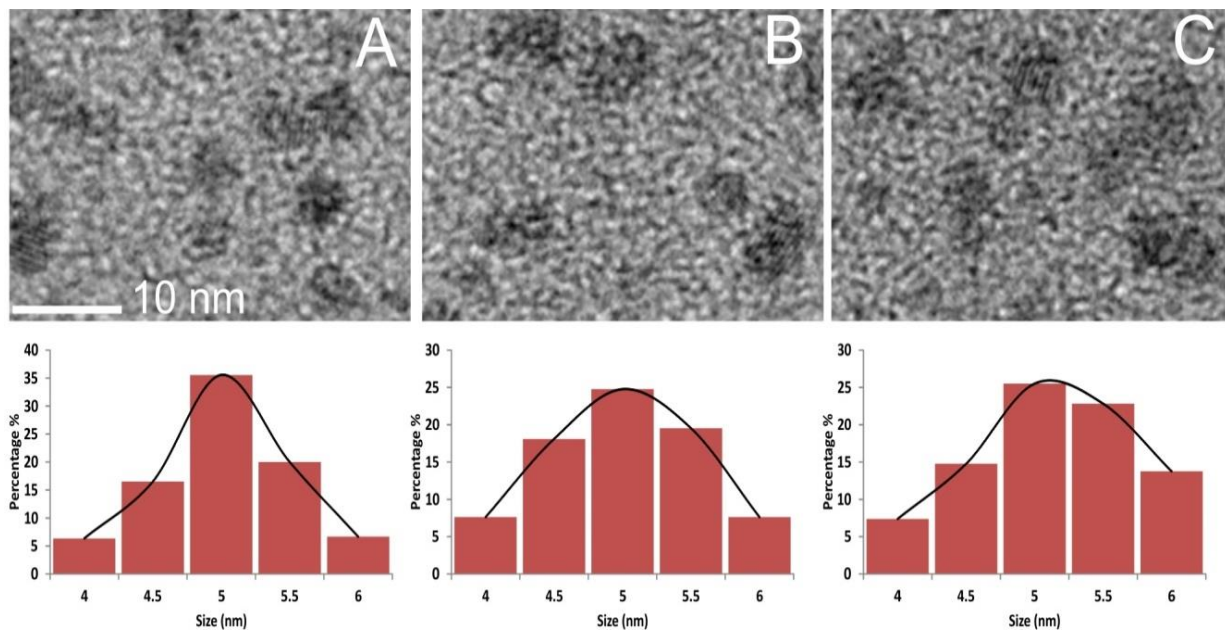
3.1.1 Χαρακτηρισμός CNDs

Τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis που λήφθηκαν για τις Non doped CNDs, N-doped CNDs, και N,S- doped CNDs παρουσιάζονται στο Παράρτημα Ι. Σε όλες τις περιπτώσεις εμφανίστηκε μια κορυφή περίπου στα 230 nm που και μια κορυφή περίπου στα 340 nm. Οι κορυφές στα 230 nm αντιστοιχούν σε π-π* μεταπτώσεις των sp^2 ηλεκτρονίων και οι κορυφές στα 340 nm αντιστοιχούν σε n-π* μεταπτώσεις ηλεκτρονίων [148].

Επιπλέον, προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα για τις λειτουργικές ομάδες καθώς και για την ποιοτική σύσταση του εκάστοτε υλικού, λήφθηκαν τα φάσματα FT-IR για κάθε υλικό. Τα στοιχεία που συλλέχθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στο Παράρτημα Ι.

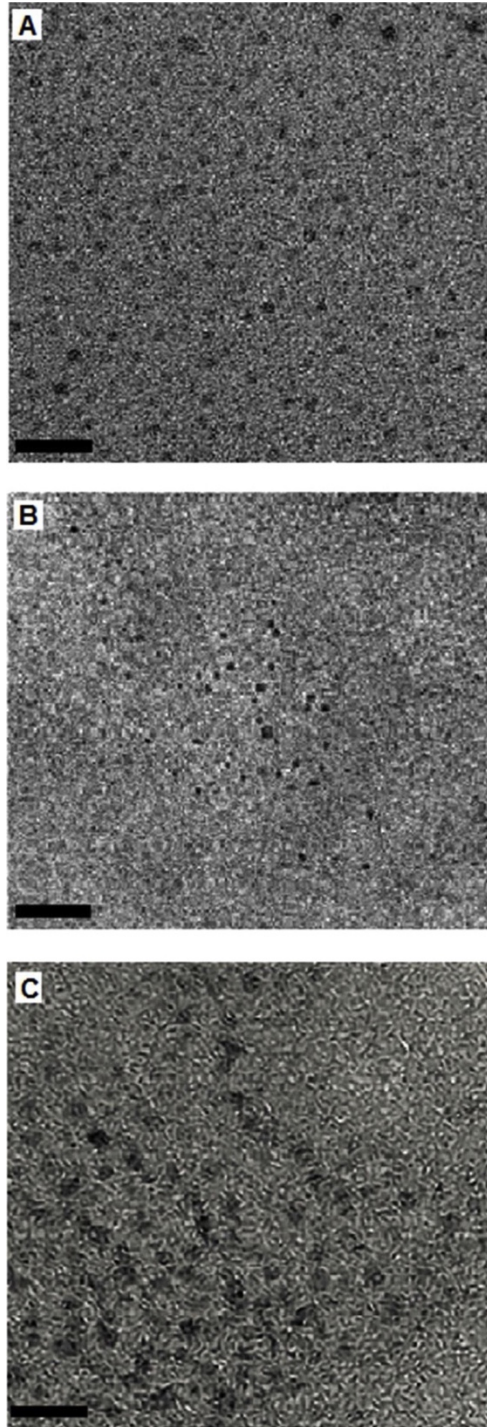
Στη συνέχεια, λήφθηκαν τα φάσματα εκπομπής του φθορισμού των Non doped CNDs, N-doped CNDs και N,S doped CNDs αντίστοιχα, για διάφορα μήκη κύματος διέγερσης στην περιοχή 290-400 nm. Αναλυτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα στο Παράρτημα Ι.

Από τις κατανομές μεγέθους των σωματιδίων φαίνεται ότι οι Non doped, N-doped και N,S doped CNDs είχαν πολύ μικρή διακύμανση, 4 nm, 2,5 nm και 8 nm αντίστοιχα (**Εικόνα 18, 19**).



Εικόνα 18. Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Transition Electron Microscopy TEM).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα από τις φασματοσκοπίες UV-Vis και FT-IR, τη φθορισμομετρική μελέτη και το μέγεθος των σωματιδίων ήταν σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία για τον χαρακτηρισμό των συγκεκριμένων νανοκουκκίδων [149], [150], [151].



Εικόνα 19. Εικόνες TEM από A. Non doped, B. N-doped και C. N,S co-doped CNDs. Κλίμακα: 20 nm.

3.1.2 Πειράματα τοξικότητας

3.1.2.1 Προσδιορισμός LC₅₀

Με την διεξαγωγή των πειραμάτων τοξικότητας μελετήθηκε η θνησιμότητα των ατόμων κατά την έκθεση στα CNDs σε σχέση με την πάροδο του χρόνου έκθεσης. Παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικά η θνησιμότητα ανά συγκέντρωση και ανά νανοϋλικό (Πίνακας 9, 10, 11), οι εκτιμώμενες καμπύλες θνησιμότητας για κάθε νανοϋλικό (Εικόνα 20) και οι τιμές LC₂₅, LC₅₀ και LC₇₅ (Πίνακας 12).

Πίνακας 9. Αναλυτικά τα αποτελέσματα τοξικότητας των πειραμάτων για τις Non doped CNDs.

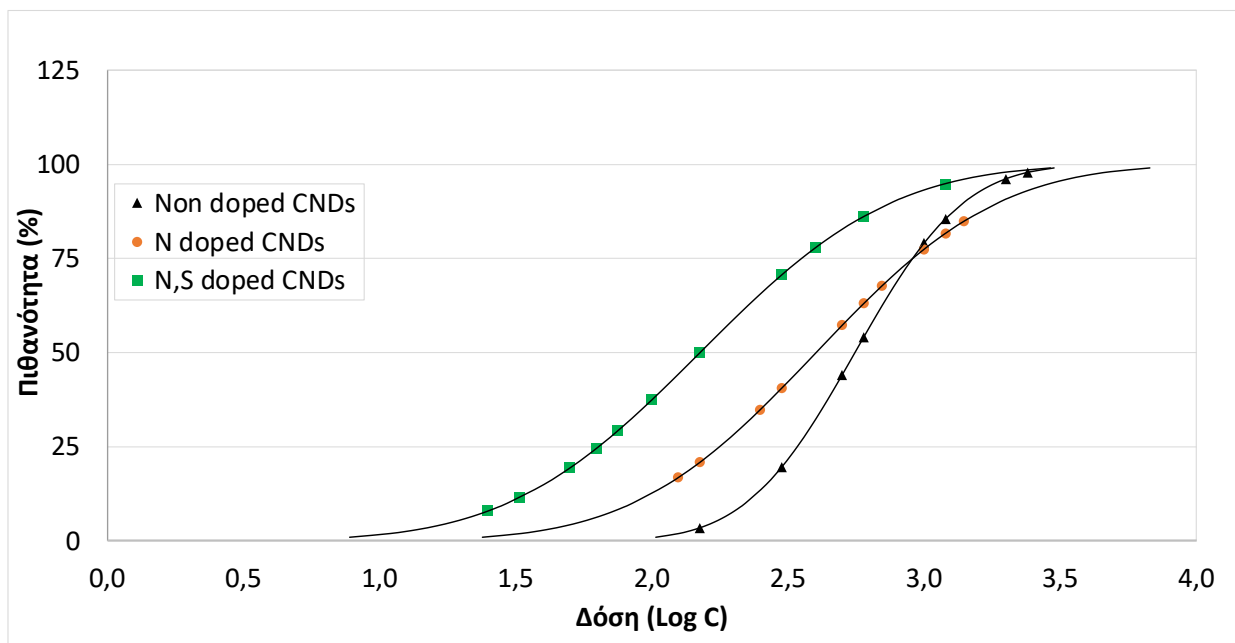
		Non doped CNDs							
Συγκέντρωση (µg/mL)	μάρτυρας	150	300	500	600	1000	1200	2000	2400
Σύνολο ατόμων που εκτέθηκαν (N) (τρεις επαναλήψεις)	480	480	480	480	480	480	480	480	480
Παρατηρούμενη θνησιμότητα (N)	28	43	97	186	219	348	427	480	480
Ποσοστό θνησιμότητας(%)	5,8	8,9	20,2	38,7	45,6	72,5	88,9	100	100

Πίνακας 10. Αναλυτικά τα αποτελέσματα τοξικότητας των πειραμάτων για τις N-doped CNDs.

		N-doped CNDs									
Συγκέντρωση (µg/mL)	μάρτυρας	125	150	250	300	500	600	700	1000	1200	1400
Σύνολο ατόμων που εκτέθηκαν (N) (τρεις επαναλήψεις)	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240	240
Παρατηρούμενη θνησιμότητα (N)	14	63	68	81	89	96	112	145	175	227	240
Ποσοστό θνησιμότητας(%)	5,4	26,25	28,3	33,75	37,1	40	46,6	60,4	72,9	94,5	100

Πίνακας 11. Αναλυτικά τα αποτελέσματα τοξικότητας των πειραμάτων για τις N,S-doped CNDs.

		N, S-doped CNDs										
Συγκέντρωση (µg/mL)	μάρτυρας	25	32,5	50	62,5	75	100	150	300	400	600	1200
Σύνολο ατόμων που εκτέθηκαν (N) (τρεις επαναλήψεις)	579	96	192	192	288	96	96	144	144	288	144	48
Παρατηρούμενη θνησιμότητα (N)	51	12	26	34	63	28	44	75	87	206	144	48
Ποσοστό θνησιμότητας(%)	8,8	12,5	13,5	17,7	21,8	29,1	45,8	52,1	60,4	71,5	100	100



Εικόνα 20. Εκτιμώμενες καμπύλες τοξικότητας για τις CNDs.

Πίνακας 12. Τιμές LC_{50} , LC_{25} , LC_{75} για τις CNDs.

	Non doped	N-doped	N, S-doped
LC_{50}	584,48 $\mu\text{g/mL}$	399,95 $\mu\text{g/mL}$	149,92 $\mu\text{g/mL}$
LC_{25}	341,35 $\mu\text{g/mL}$	176,486 $\mu\text{g/mL}$	63,468 $\mu\text{g/mL}$
LC_{75}	906,93 $\mu\text{g/mL}$	905,73 $\mu\text{g/mL}$	354,047 $\mu\text{g/mL}$

Η τοξική δράση των CNDs εμφάνισε αυξητική τάση και ήταν συνδεδεμένη με τον τύπο της ένθεσης (doping) του υλικού καθώς και με την συγκέντρωση των CNDs. Η τοξικότητα αυξανόταν όσο η ένθεση ήταν πιο σύνθετη και όσο αυξανόταν η συγκέντρωση έκθεσης για το κάθε νανοϋλικό. Το Non doped νανοϋλικό είχε την μικρότερη τοξικότητα, ακολουθούσε το N-doped με μέση τοξικότητα μεταξύ των νανοϋλικών και το N,S-doped εμφάνισε την μεγαλύτερη τοξικότητα. Συγκεκριμένα οι καμπύλες τοξικότητας του κάθε νανοϋλικού εμφανίζονται στην **Εικόνα 20**.

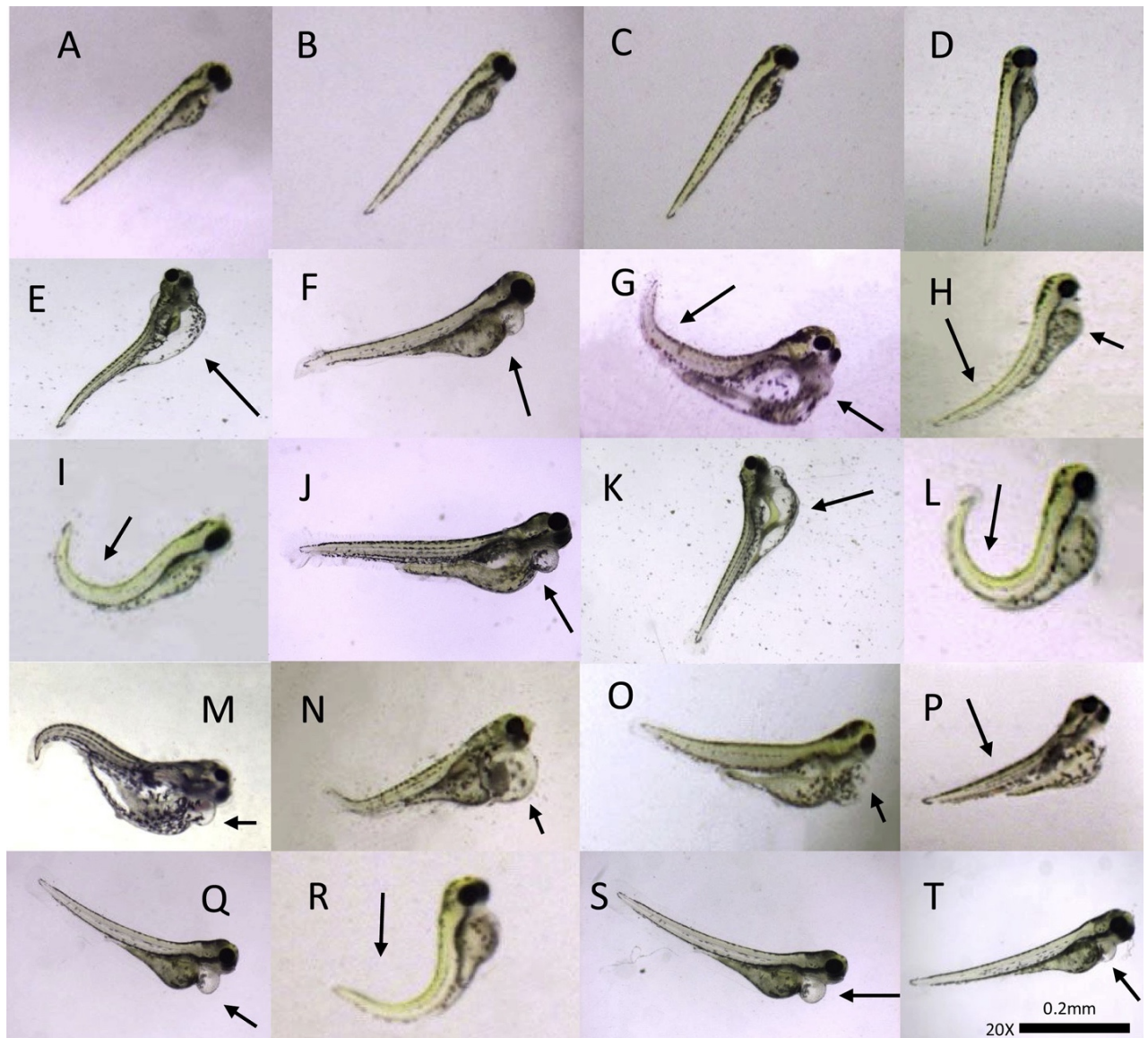
Τα αποτελέσματα αυτά παρόλο που υποδεικνύουν μειωμένη τοξικότητα, αυτή εμφανίζει δοσοεξαρτώμενη αύξηση. Στο μέλλον, η χρήση και κατά συνέπεια η απελευθέρωση των CNDs στο περιβάλλον θα είναι αυξημένη. Έχοντας προσδιορίσει τις θνησιγόνες δόσεις για

τα CNDs θα μπορούν να λαμβάνονται μέτρα κατά την απελευθέρωση τους στο περιβάλλον πριν ακόμα αυτή αποτελέσει πρόβλημα.

3.1.3 Οπτική παρατήρηση

3.1.3.1 Μορφολογικές ανωμαλίες

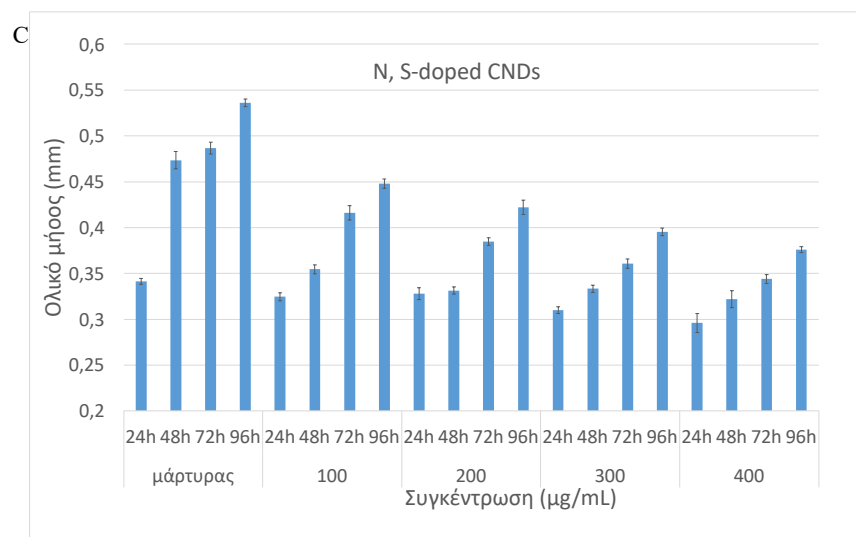
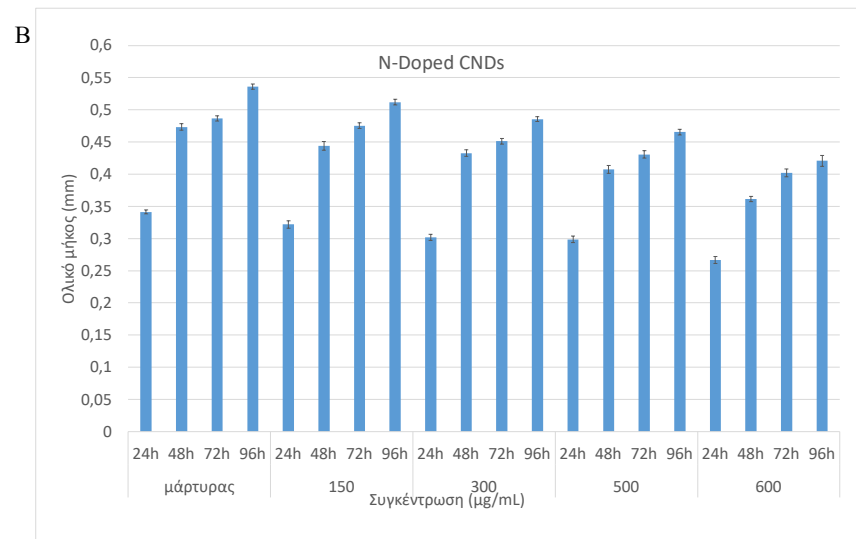
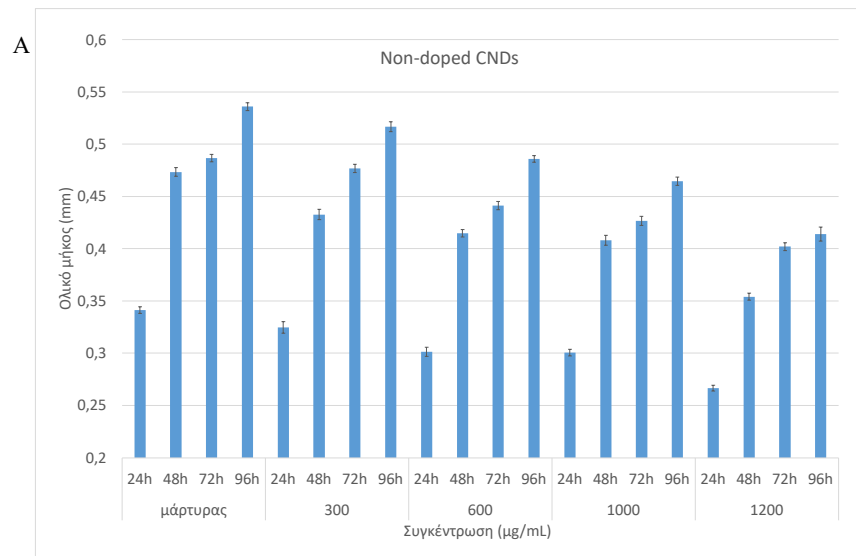
Οι κυριότερες μορφολογικές ανωμαλίες οι οποίες παρατηρήθηκαν κατά την διάρκεια της έκθεσης στα νανοϋλικά περιλάμβαναν περικαρδιακό οίδημα και οίδημα του λεκιθικού σάκου. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν εκτεταμένες ανατομικές ανωμαλίες όπως κύρτωση και μη αποκόλληση ουράς. Στην ομάδα ατόμων που εκτέθηκαν στο Non doped νανοϋλικό, το οποίο ήταν το λιγότερο τοξικό, παρατηρήθηκε οίδημα στο λεκιθικό σάκο, κυρίως κατά την τελευταία ημέρα της έκθεσης και στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, συγκέντρωση που προκαλούσε θνησιμότητα 45%) (**Εικόνα 21E-H**). Στην ομάδα όπου εκτέθηκε στο N-doped, παρατηρήθηκαν σημαντικές ανωμαλίες ακόμη και κατά τις 24 πρώτες ώρες της έκθεσης. Σοβαρά και μεγάλης έκτασης οιδήματα και κύρτωση ουράς παρατηρήθηκαν σε συγκεντρώσεις 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (που προκαλούσε θνησιμότητα 28%). Αυτά γινόταν πιο εμφανή όσο αύξανε η συγκέντρωση έκθεσης (**Εικόνα 21I-L**). Τέλος, στα άτομα που εκτέθηκαν στο N,S-doped παρατηρήθηκαν παρόμοιες μορφολογικές ανωμαλίες, με την διαφορά πως αυτές ήταν σημαντικές σε πολύ χαμηλότερη συγκέντρωση έκθεσης (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, συγκέντρωση που προκαλούσε θνησιμότητα 29%) (**Εικόνα 21M-T**).



Εικόνα 21. Μορφολογικές ανωμαλίες των εμβρύων zebrafish (96hpf-144hpf) μετά την έκθεση σε CNDs. (A-D) άτομα ελέγχου, (E-H) εκτεθειμένα σε 150, 250, 300, 600 µg/mL αντίστοιχα σε Non doped CNDs με χαρακτηριστικό περικαρδιακό οίδημα και κύρτωση ουράς, (I-L) εκτεθειμένα σε 150, 250, 300, 600 µg/mL αντίστοιχα σε N-doped CNDs με χαρακτηριστικό περικαρδιακό οίδημα και κύρτωση ουράς, (M-T) εκτεθειμένα σε 75, 100, 300, 400 µg/mL αντίστοιχα σε N,S-doped CNDs με χαρακτηριστικό περικαρδιακό οίδημα και κύρτωση ουράς. Οι μορφολογικές ανωμαλίες υποδεικνύονται με τα βέλη.

3.1.3.2 Ρυθμός αύξησης των ατόμων υπό την επίδραση των CNDs

Η μελέτη του ρυθμού αύξησης έγινε μέσω της μέτρησης του μήκους του κάθε εκτεθειμένου ατόμου για κάθε ημέρα έκθεσης. Μέσω της μέτρησης του μήκους προέκυψε ο ρυθμός αύξησης σε σχέση με τον χρόνο έκθεσης. Μελετήθηκε η συσχέτιση του ρυθμού αύξησης με τον χρόνο, την συγκέντρωση των υπό μελέτη νανοϋλικών και την αλληλεπίδραση αυτών. Η μέτρηση του μήκους των zebrafish έγινε σε αυτά που εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις 300, 600, 1000, 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ των Non doped CNDs που προκαλούσαν 20, 45, 72,5 και 88% θνησιμότητα αντίστοιχα, για αυτά που εκτέθηκαν σε N-doped CNDs σε συγκεντρώσεις 150, 300, 500, 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ που προκαλούσαν 28, 37, 40 και 46,6% θνησιμότητα αντίστοιχα και για αυτά που εκτέθηκαν σε N,S-doped CNDs σε συγκεντρώσεις 150, 300, 500, 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ που προκαλούσαν 45, 55, 60 και 71,5% θνησιμότητα αντίστοιχα. Αποδείχθηκε πως η επίδραση του κάθε νανοϋλικού στο ολικό μήκος (mm) και στον ρυθμό αύξησης ήταν σημαντική. Το σύνολο των ατόμων τα οποία εκτέθηκαν στα υπό μελέτη νανοϋλικά εμφάνισαν μείωση στο ρυθμό αύξησης. Η μείωση του ρυθμού αύξησης συσχετιζόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης έκθεσης καθώς η μείωση ήταν πιο σημαντική στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, όσο αυξάνονταν η συγκέντρωση έκθεσης για το κάθε νανοϋλικό, τόσο μειωνόταν ο ρυθμός αύξησης. Η μείωση του ρυθμού αύξησης παρέμεινε στατιστικά σημαντική μεταξύ των διαφορετικών ομάδων έκθεσης ($P < 0,05$). Για την ομάδα ατόμων που εκτέθηκαν στο Non doped υλικό, ο ρυθμός αύξησης επηρεάστηκε σημαντικά από το χρόνο έκθεσης ($F = 1668,614$, $P < 0,001$), την συγκέντρωση του υλικού ($F = 299,332$, $P < 0,001$) και από την αλληλεπίδραση του χρόνου και της συγκέντρωσης του υλικού ($F=2,927$, $P = 0,01$), όπως φαίνεται στην **Εικόνα 22A**. Αντίστοιχα για τα άτομα που εκτέθηκαν στο N-doped υλικό παρατηρήθηκε μεγάλη συσχέτιση μεταξύ της μείωσης του ρυθμού αύξησης και του χρόνου έκθεσης ($F = 1066,356$, $P < 0,0001$) και την συγκέντρωση του υλικού ($F = 173,295$, $P < 0,0001$) (**Εικόνα 22B**). Στα άτομα που εκτέθηκαν στο N,S-doped παρατηρήθηκε πως ο ρυθμός αύξησης επηρεάστηκε σημαντικά από τον χρόνο έκθεσης ($F = 310,190$, $P < 0,001$), την συγκέντρωση του υλικού ($F = 209,174$, $P < 0,001$) και την αλληλεπίδραση χρόνου και συγκέντρωσης του υλικού ($F = 11,31$, $P < 0,001$) (**Εικόνα 22C**).



Εικόνα 22. Διακύμανση του μήκους (mm) μετά την έκθεση σε Non doped (A), N-doped (B) και N,S-doped CNDs (C) σε σχέση με την συγκέντρωση και τον χρόνο.

3.1.4 Επίδραση στην συμπεριφορά των ατόμων zebrafish μετά την έκθεση στις CNDs

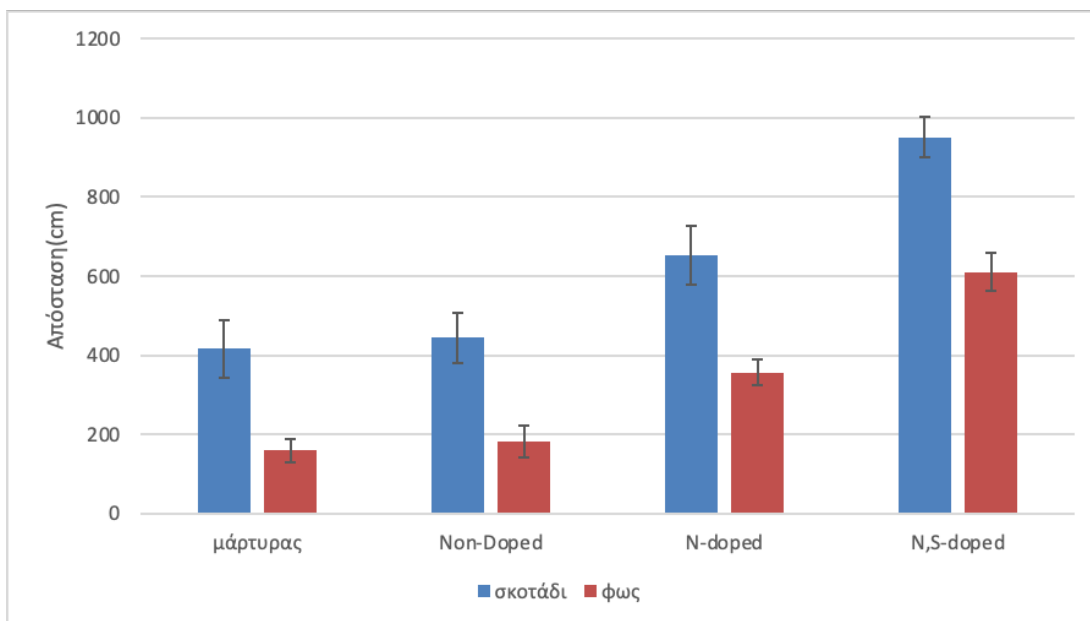
Κατά το πέρας της έκθεσης και συγκεκριμένα στις 144 hpf πραγματοποιήθηκε η καταγραφή της συμπεριφοράς των εκτεθειμένων ατόμων μέσω της καταγραφής της κινητικής δραστηριότητας. Η μελέτη της συμπεριφοράς διαμέσου καταγραφής της κινητικής δραστηριότητας ακολουθείται τα τελευταία χρόνια στα πειράματα τοξικότητας καθώς έτσι μπορούν να προσδιοριστούν μόνιμες διαταραχές των εκτεθειμένων ατόμων μετά από την έκθεση [152–155]. Τα άτομα που επιλέχθηκαν για την μελέτη της συμπεριφοράς ήταν αυτά τα οποία επιβίωσαν από την έκθεση στις CNDs, δεν είχαν εμφανείς μορφολογικές ανωμαλίες και είχαν φυσιολογικό καρδιακό παλμό.

Η έκθεση στα νανοϋλικά προκάλεσε, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, σημαντική επίδραση στις παραμέτρους συμπεριφοράς σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου. Κατά τις περιόδους φωτός, η συνολική κολυμβητική δραστηριότητα (cm) αυξάνονταν ανάλογα με την τοξικότητα των υλικών (Non doped < N-doped < N,S-doped) ($F = 3733,8$, $P < 0,001$) (**Πίνακας 12**). Δηλαδή, τα άτομα zebrafish που είχαν εκτεθεί στην ουσία με την μεγαλύτερη τοξικότητα εμφάνισαν αυξημένη κολυμβητική δραστηριότητα. Επιπλέον, σημαντική αύξηση της κολυμβητικής δραστηριότητας παρατηρήθηκε σε συνθήκες σκοταδιού σε σύγκριση με την κολυμβητική δραστηριότητα που καταγράφηκε σε συνθήκες φωτός σε όλα τα άτομα ($F=1575,3$, $P < 0,001$). Η υπερδραστηριότητα η οποία παρατηρήθηκε σε συνθήκες σκοταδιού ήταν πιο εμφανής στα άτομα που είχαν εκτεθεί στο υλικό με την μεγαλύτερη τοξικότητα. Σημαντικό είναι να αναφερθεί πως κατά την έκθεση στο πιο τοξικό νανοϋλικό, οι διαφορές της κινητικότητας μεταξύ του διαστήματος φωτός και σκοταδιού ήταν πιο σημαντικές (**Εικόνα 23**).

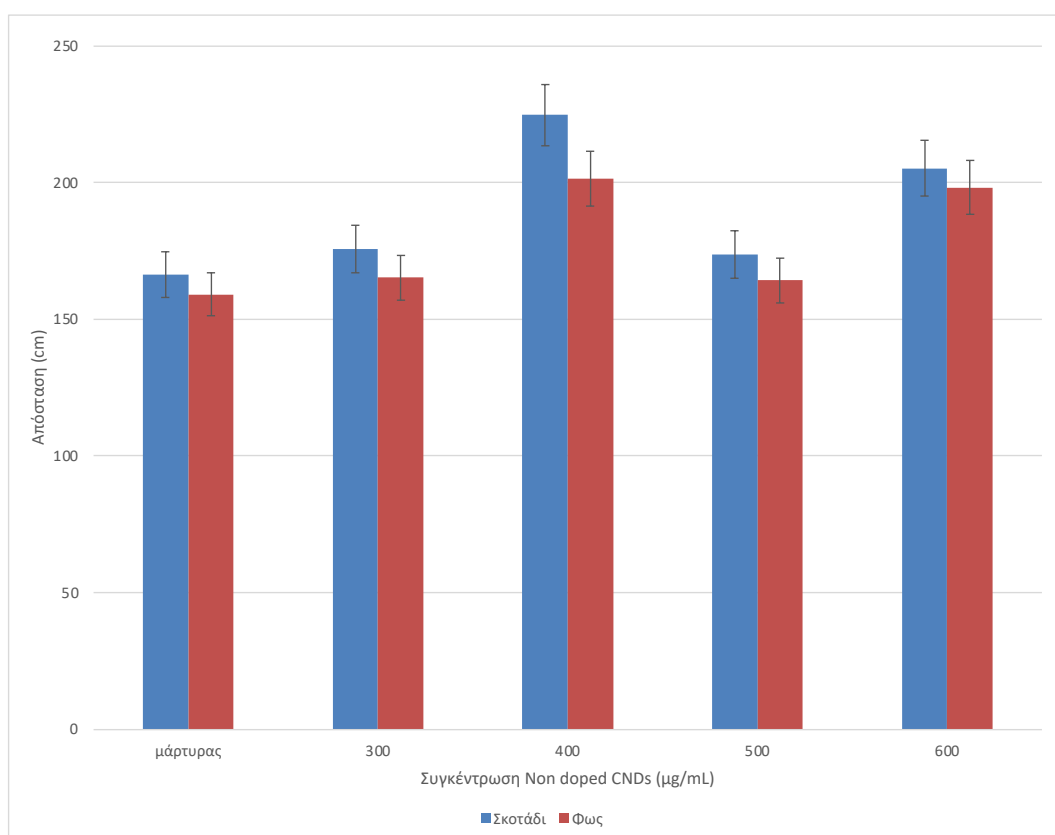
Στις **Εικόνες 24, 25, 26**, παρουσιάζονται τα επιμέρους αποτελέσματα για τα zebrafish σε κάθε συγκέντρωση έκθεσης σε CNDs. Στα εκτεθειμένα zebrafish σε Non doped CNDs δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην κινητικότητα σε σχέση με τον μάρτυρα και στο σκοτάδι και στο φως και σε οποιαδήποτε συγκέντρωση έκθεσης (**Εικόνα 24**). Στα εκτεθειμένα zebrafish σε N-doped η κινητικότητα αυξανόταν όσο αυξανόταν η συγκέντρωση έκθεσης. Τα άτομα zebrafish στα οποία εξετάστηκε η μέση συνολική απόσταση που διανύθηκε (cm) καθώς και η ταχύτητα κολύμβησης (cm/s) είχαν εκτεθεί σε συγκεντρώσεις 150, 200, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ N-doped που προκαλούσαν 28-38% θνησιμότητα (βλ.

κεφ. 3.1.2.1). Στα εκτεθειμένα σε N,S-doped αυξανόταν η κινητικότητα όσο αυξανόταν η συγκέντρωση έκθεσης με παρόμοιο πρότυπο. Όμοια για τις N,S-doped CNDs, εξετάστηκαν άτομα zebrafish που είχαν εκτεθεί σε 32,5, 75, 150, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ N,S-doped, που προκαλούσαν 13-52% θνησιμότητα (βλ. κεφ. 3.1.2.1). Αυτό απέδειξε πως παρόλο που οι CNDs έχουν σχετικά χαμηλή τοξικότητα (LC_{50} =584,48 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 399,95 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 149,92 $\mu\text{g}/\text{mL}$ για Non doped, N-doped και N,S-doped CNDs αντίστοιχα) μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές και δόσοεξαρτώμενες συμπεριφορικές διαταραχές ακόμα και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από το LC_{50} .

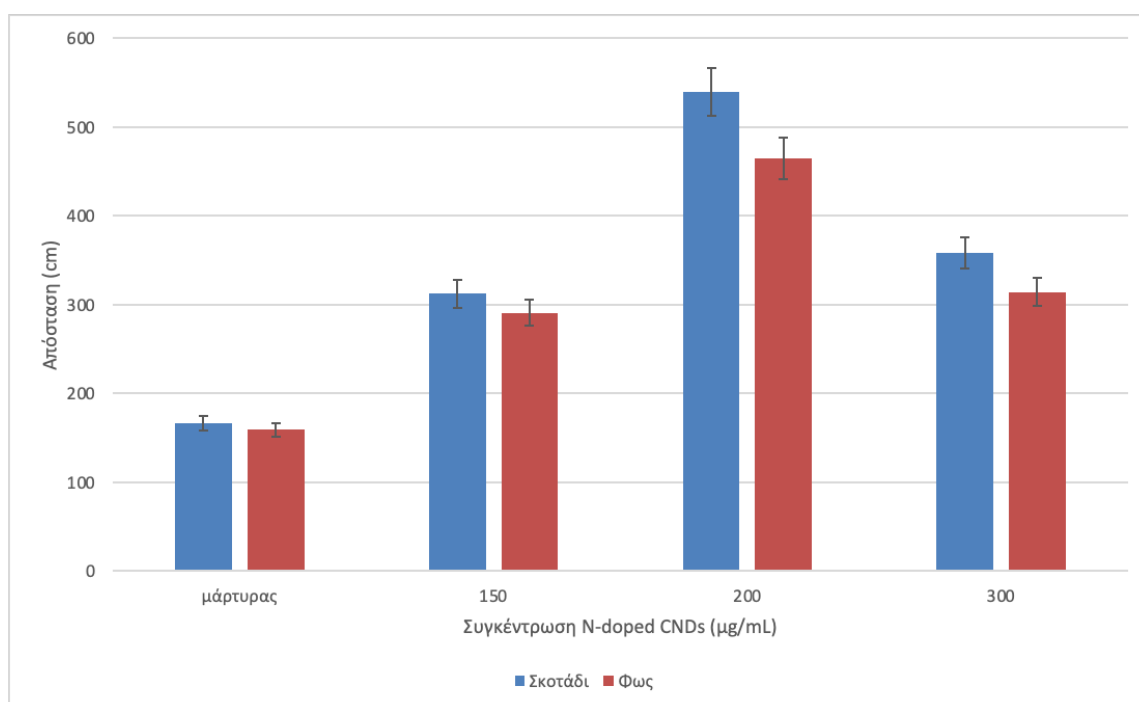
Από την μελέτη της μέσης ταχύτητας (cm/s) που ανέπτυξαν τα άτομα κατά την τριαντάλεπτη καταγραφή δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.



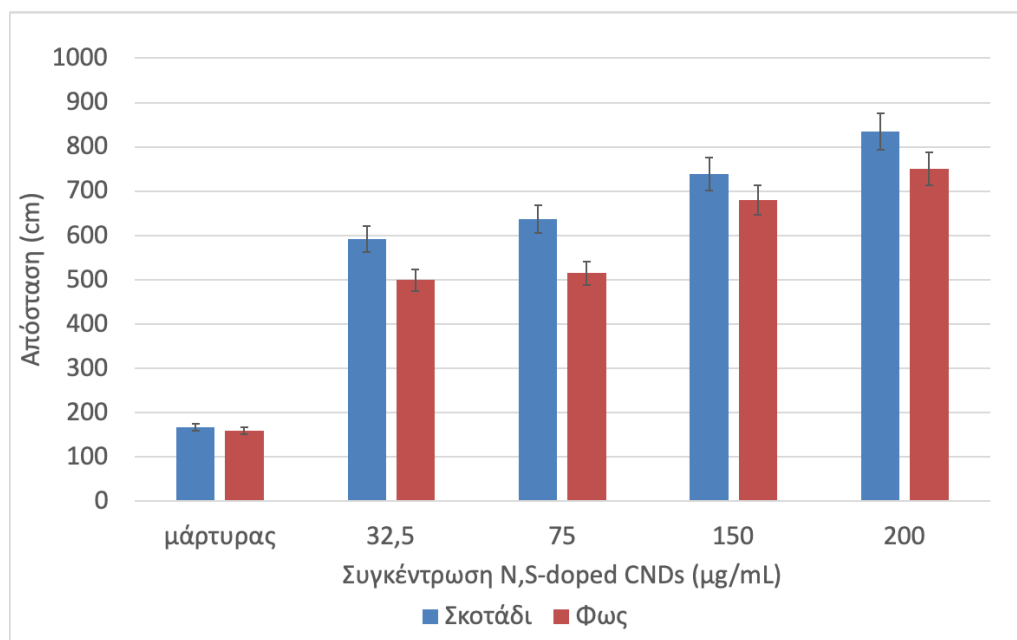
Εικόνα 23. Επίδραση της έκθεσης σε Non doped, N-doped, and N,S-doped CNDs στην συνολική κολυμβητική δραστηριότητα (cm) υπό την επίδραση του ερεθίσματος του φωτός στις 144 hrf.



Εικόνα 24. Επίδραση της έκθεσης στις διαφορετικές συγκεντρώσεις Non doped CND (300, 400, 500, 600 μg/mL) στην συνολική κολυμβητική δραστηριότητα (cm) υπό την επίδραση του ερεθίσματος του φωτός στις 144 hrf.



Εικόνα 25. Επίδραση της έκθεσης στις διαφορετικές συγκεντρώσεις N- doped CND (150, 200, 300 μg/mL) στην συνολική κολυμβητική δραστηριότητα (cm) υπό την επίδραση του ερεθίσματος του φωτός στις 144 hpf.



Εικόνα 26. Επίδραση της έκθεσης στις διαφορετικές συγκεντρώσεις Non doped CND (32,5, 75, 150, 200 μg/mL) στην συνολική κολυμβητική δραστηριότητα (cm) υπό την επίδραση του ερεθίσματος του φωτός στις 144 hpf.

3.2 Αποτελέσματα μετά από την έκθεση του zebrafish στην 2,6-DCBQ-OH

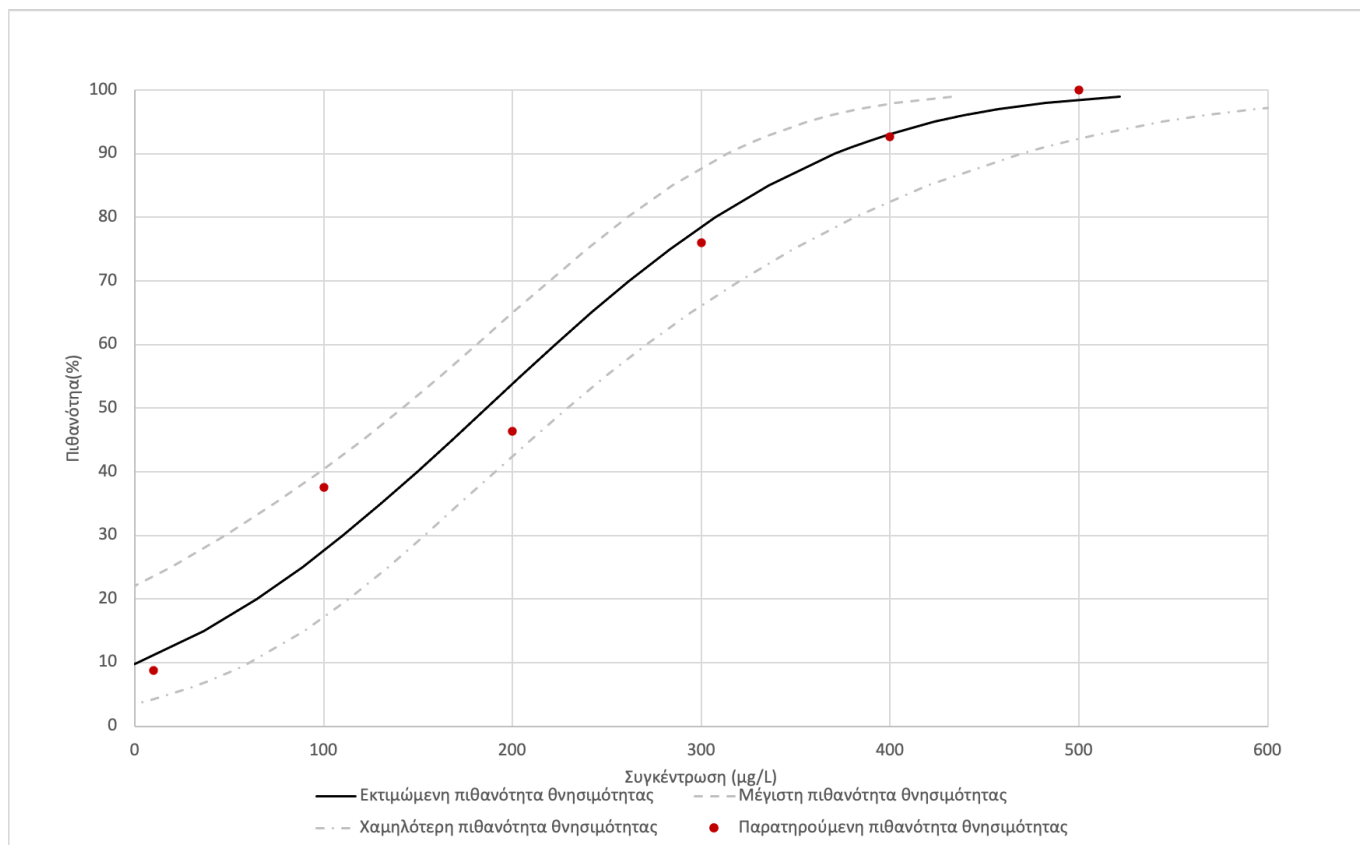
3.2.1 Πειράματα τοξικότητας

3.2.1.1 Προσδιορισμός LC₅₀

Η τοξικότητα της 2,6-DCBQ-OH εμφάνισε δοσοεξαρτώμενη αύξηση καθώς αυξανόταν ανάλογα με την συγκέντρωση της ένωσης. Η τοξικότητα ήταν σημαντική από την χαμηλότερη συγκέντρωση (10 µg/L) και υπήρχε απότομη αύξηση στην συγκέντρωση των 100 µg/L. Η τοξικότητα κορυφώθηκε στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (500 µg/L). Στον **Πίνακα 13**, στην **Εικόνα 27** και στον **Πίνακα 14** παρουσιάζονται τα αναλυτικά αποτελέσματα κατά τον έλεγχο της τοξικότητας, η καμπύλη της εκτιμώμενης τοξικότητας και οι θνησιγόνες δόσεις όπως υπολογίστηκαν αντίστοιχα.

Πίνακας 13. Αναλυτικά τα αποτελέσματα τοξικότητας των πειραμάτων για 2,6-DCBQ-OH.

		2,6-DCBQ-OH					
Συγκέντρωση (µg/L)	μάρτυρας	10	100	200	300	400	500
Σύνολο ατόμων που εκτέθηκαν (N) (τρεις επαναλήψεις)	229	192	192	192	192	96	224
Παρατηρούμενη θνησιμότητα (N)	11	17	71	89	146	89	224
Ποσοστό θνησιμότητας(%)	4,8	8,8	37,5	46,3	76	92,7	100



Εικόνα 27. Εκτιμώμενες καμπύλες τοξικότητας για 2,6-DCBQ-OH.

Πίνακας 14. Τιμές LC_{50} , LC_{25} , LC_{75} για την 2,6-DCBQ-OH.

Εκτιμώμενες θνησιγόνες δόσεις	2,6-DCBQ-OH
LC_{50}	186,072 µg/L
LC_{25}	88,757 µg/L
LC_{75}	283,386 µg/L

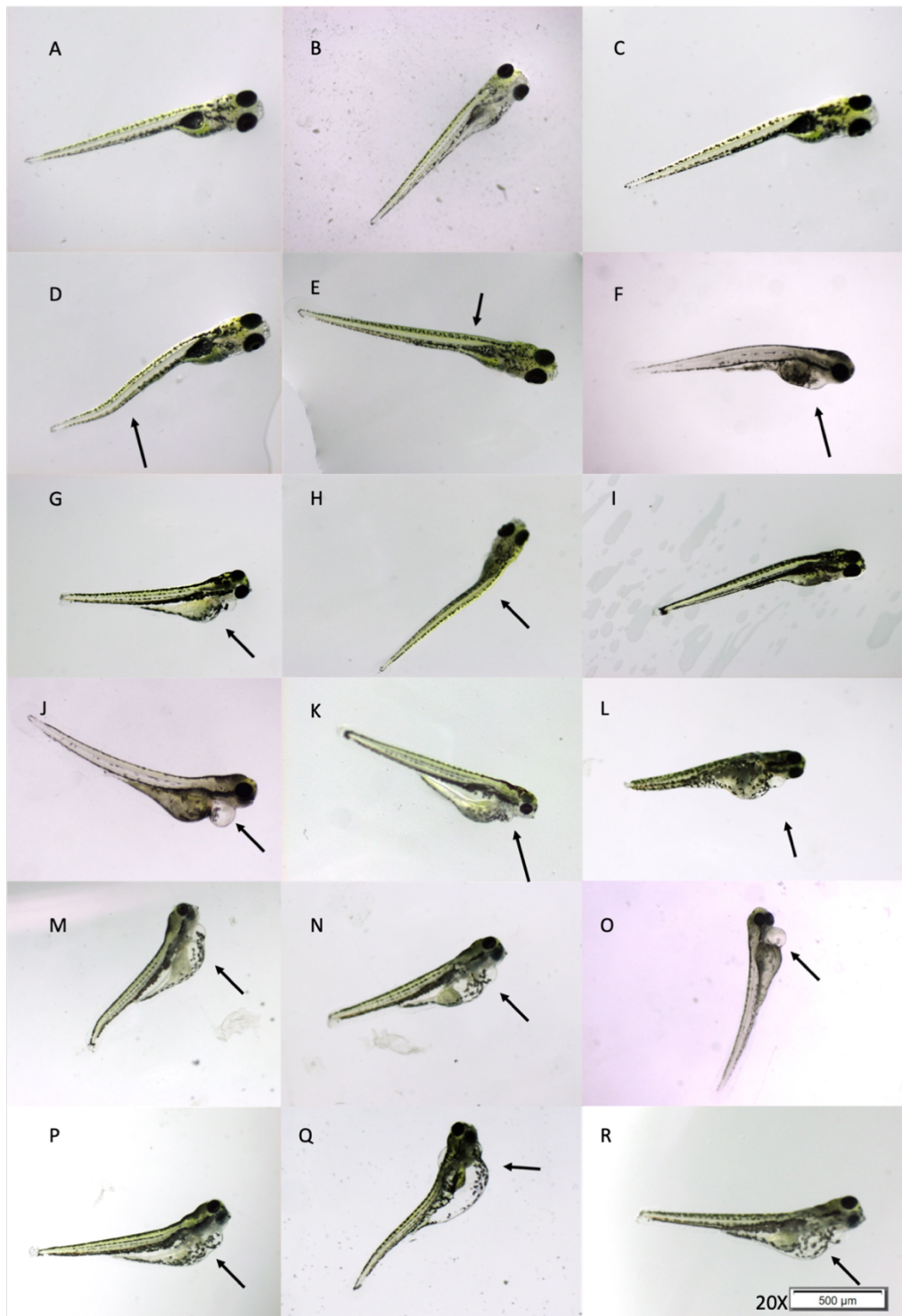
3.2.2 Μορφολογικές ανωμαλίες

Κατά την έκθεση, τα άτομα ελέγχθηκαν για μορφολογικές ανωμαλίες. Τα άτομα που εκτέθηκαν σε 2,6-DCBQ-OH εμφάνισαν δοσοεξαρτώμενες μορφολογικές αλλοιώσεις. Δεν παρατηρήθηκαν μορφολογικές παραμορφώσεις στην ομάδα ελέγχου και δεν υπήρξαν παραμορφώσεις στην ομάδα αυτή καθ' όλη τη διάρκεια της δοκιμαστικής περιόδου (Εικόνα 28Α-Γ). Τα έμβρυα που εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις 2,6-DCBQ-OH, χαμηλότερες

από το LC₅₀ παρουσίασαν ορισμένες σημαντικές αναπτυξιακές παραμορφώσεις όπως μικρή κάμψη της ουράς και περικαρδικά οιδήματα (**Εικόνα 28D-I**).

Πάνω από την τιμή LC₅₀, καταγράφηκαν προοδευτικά πιο έντονες μορφολογικές αλλοιώσεις όπως πολύ σοβαρά περικαρδικά οιδήματα και εμφανής κύρτωση ουράς (**Εικόνα 28J-R**). Τα περικαρδικά οιδήματα παρατηρήθηκαν μετά από 24 hpf και ήταν πιο σοβαρά μετά από 72 hpf.

Στην συγκέντρωση των 400 µg/L περισσότερο από το 90 % των επιζώντων εμβρύων παρουσίασαν σοβαρές δυσπλασίες του σώματος. Καταγράφηκαν έντονα οιδήματα στην καρδιά και σε όλα τα ζωτικά όργανα. Υπήρχε έντονη αποσύνθεση στην περιοχή του κρανίου και της καρδιάς. Η καρδιά δεν ήταν καλοσχηματισμένη και εμφανιζόταν διογκωμένη. Αποσύνθεση εμφάνισαν τα άτομα και σε άλλες περιοχές του σώματος (π.χ. ουρά) (**Εικόνα 28P-R**).



Εικόνα 28. Μορφολογικές ανωμαλίες των εμβρύων zebrafish μετά την έκθεση σε 2,6-DCBQ-OH. (A-C) άτομα ελέγχου, (D-F) εκτεθειμένα σε 10 µg/L με μικρές αλλοιώσεις όπως κύρτωση ουράς, (G-I) εκτεθειμένα σε 100 µg/L με χαρακτηριστικό περικαρδιακό οίδημα και κύρτωση ουράς, (J-L) εκτεθειμένα σε 200 µg/L με χαρακτηριστικό περικαρδιακό οίδημα και κύρτωση ουράς, (M-O) εκτεθειμένα σε 300 µg/L με οξεία περικαρδιακά οιδήματα, (P-R) εκτεθειμένα σε 400 µg/L με οξεία περικαρδιακά οιδήματα, κύρτωση ουράς και αποσύνθεση σώματος. Οι μορφολογικές ανωμαλίες υποδεικνύονται με τα βέλη.

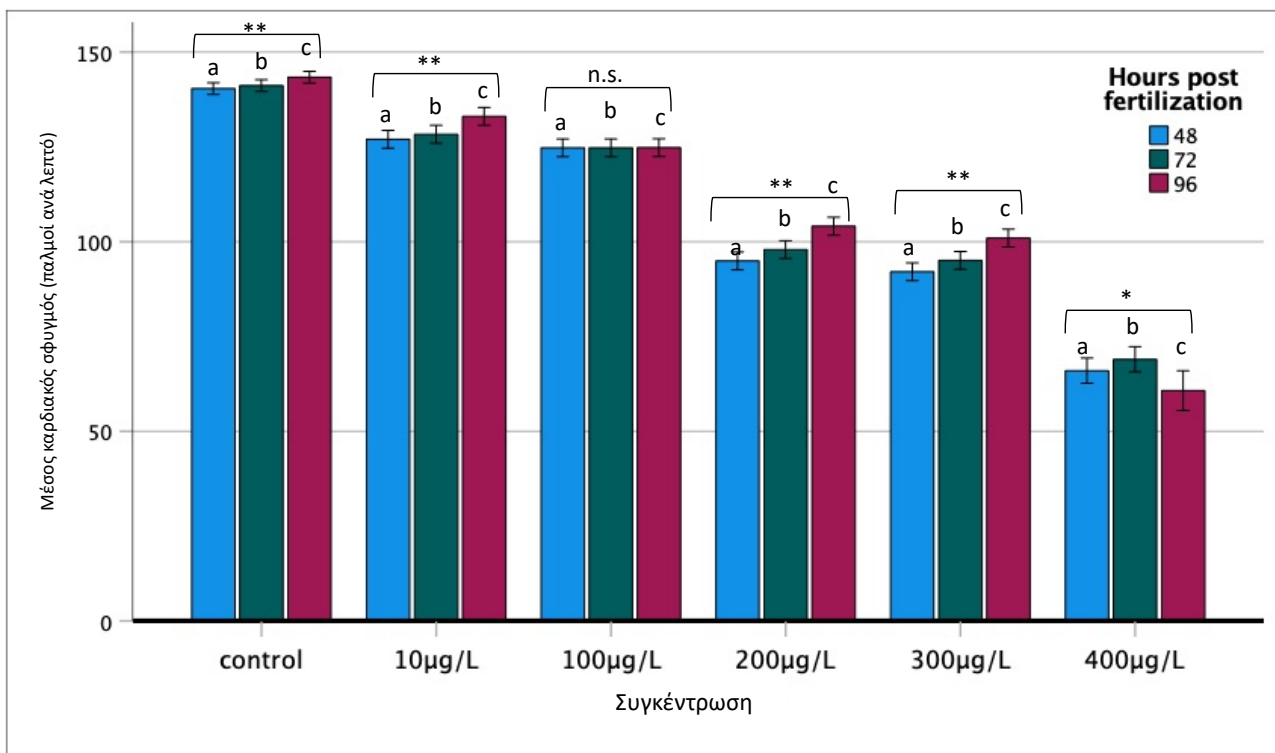
3.2.3 Ανάπτυξη και λειτουργία καρδιακού μυός

Παράλληλα με τις μορφολογικές ανωμαλίες και τις ανωμαλίες στην ανάπτυξη του καρδιακού μυός, μελετήθηκε η επίδραση της 2,6-DCBQ-OH στην λειτουργία του καρδιακού μυός διαμέσου της μέτρησης του καρδιακού παλμού.

Ο μέσος καρδιακός ρυθμός των ατόμων της ομάδας ελέγχου στις 48 hpf ήταν 140,64 bpm ($\pm 3,07$) (N = 46), στις 72 hpf 141,61 bpm ($\pm 1,33$) (N = 46) και στις 96 hpf ήταν 143,13 bpm ($\pm 3,07$) (N= 46). Συμφώνα με αυτά, αποδείχθηκε πως υπάρχει αυξητική τάση του καρδιακού παλμού των ατόμων κατά την διάρκεια της οντογενετικής ανάπτυξης υπό φυσιολογικές συνθήκες.

Ο μέσος καρδιακός ρυθμός ήταν σημαντικά διαφοροποιημένος μεταξύ των εκτεθειμένων ατόμων σε σχέση με τα μη εκτεθειμένα. Η έκθεση προκάλεσε σημαντική βραδυκαρδία στα άτομα που εξετάστηκαν και αυτή ήταν πιο εμφανής όσο αυξανόταν η συγκέντρωση έκθεσης της 2,6-DCBQ-OH (**Εικόνα 29**). Αποδείχθηκε πως η μείωση του καρδιακού ρυθμού εξαρτάται σημαντικά από την συγκέντρωση ($F=8727,279$, $P=0$), τον χρόνο έκθεσης ($F=69,328$, $P<0,001$) καθώς και από την αλληλεπίδραση της συγκέντρωσης και του χρόνου έκθεσης ($F=24,841$, $P<0,001$).

Στην **Εικόνα 29** φαίνεται ότι και στα άτομα που εκτέθηκαν σε κάθε συγκέντρωση, αυξάνονταν ο καρδιακός ρυθμό τους όσο λάμβανε χώρα η οντογενετική ανάπτυξη, όπως και τα μη εκτεθειμένα. Τα άτομα zebrafish στα οποία εξετάστηκε ο καρδιακός παλμός είχαν εκτεθεί σε συγκεντρώσεις 10, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{g/L}$ οι οποίες προκάλούσαν 8,8, 37,5, 46,3, 76 και 92,7% θνησιμότητα αντίστοιχα (βλ. κεφ. 3.2.1.1). Στην υψηλότερη συγκέντρωση (400 $\mu\text{g/L}$, 92,7% θνησιμότητα), τα άτομα zebrafish παρουσίασαν πιο έντονη βραδυκαρδία στην πάροδο των ημέρων έκθεσης. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στις διαταραχές που προκλήθηκαν από την έκθεση στην υψηλότερη συγκέντρωση. Τα περισσότερα άτομα που εκτέθηκαν σε αυτή την συγκέντρωση (400 $\mu\text{g/L}$) μετά το πέρας των 144 hpf δεν επιβίωναν.



Εικόνα 29. Επίδραση της συγκέντρωσης της 2,6-DCBQ-OH στον καρδιακό παλμό στις 48, 72 & 96 hpf.

3.2.4 Επίδραση στην συμπεριφορά των ατόμων zebrafish

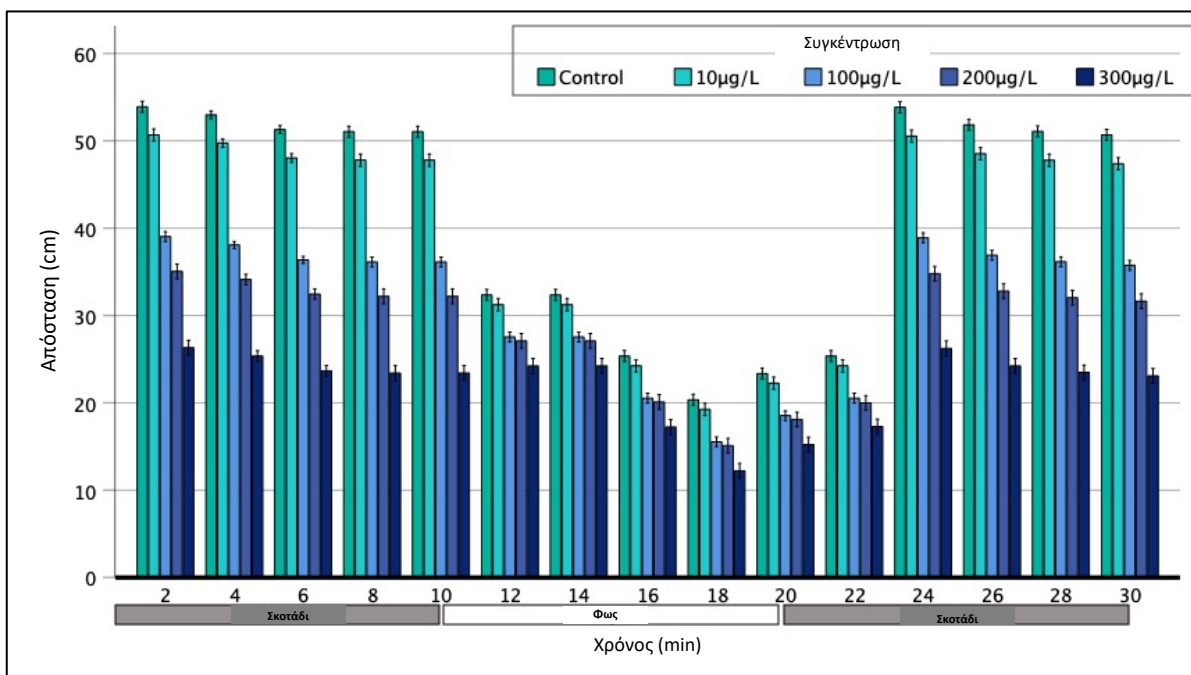
Η μελέτη της συμπεριφοράς μέσω της καταγραφής της κολυμβητικής δραστηριότητας σε περιόδους φωτός και σκοταδιού (10 min σκοτάδι, 10 min φως, 10 min σκοτάδι) έδειξε πως υπήρξε υψηλότερη κινητικότητα στις περιόδους σκοταδιού και χαμηλότερη στην περίοδο του φωτός. Διαπιστώθηκε επίσης ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο σκοτεινών περιόδων (0-10 min και 20-30 min) που σημαίνει ότι δεν υπήρξε εξοικείωση κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (**Εικόνα 30**).

Μετά την έκθεση στις διάφορες συγκεντρώσεις 2,6-DCBQ-OH παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη μέση συνολική απόσταση που διανύθηκε (cm) καθώς και την ταχύτητα κολύμβησης (cm/s) μεταξύ των ατόμων που εκτέθηκαν και των μη εκτεθειμένων. Τα άτομα zebrafish στα οποία εξετάστηκε η μέση συνολική απόσταση που διανύθηκε (cm) καθώς και η ταχύτητα κολύμβησης (cm/s) είχαν εκτεθεί σε συγκεντρώσεις 10, 100, 200, 300 µg/L οι οποίες προκαλούσαν 8,8, 37,5, 46,3, και 76% θνησιμότητα αντίστοιχα (βλ. κεφ. 3.2.1.1). Μεταξύ των ατόμων που εκτέθηκαν στις ίδιες συγκεντρώσεις

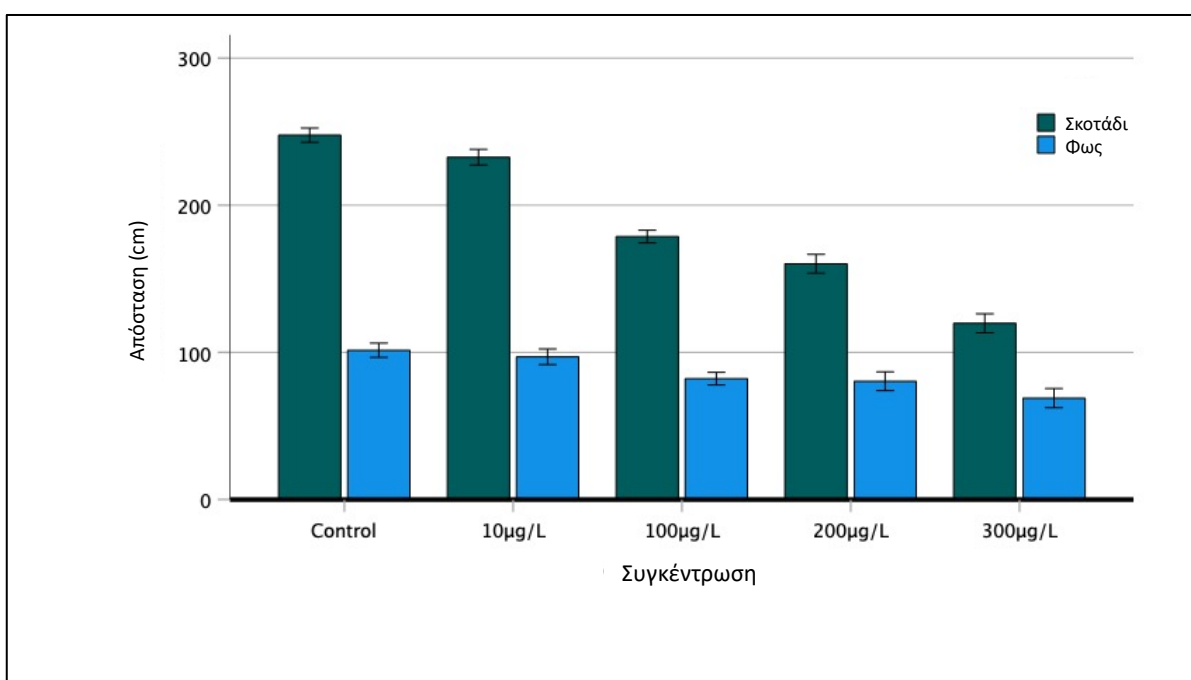
2,6-DCBQ-OH, η απόσταση που διένυσαν κατά τη σκοτεινή περίοδο ήταν πολύ μεγαλύτερη από εκείνη στην περίοδο φωτός, για τον ίδιο χρόνο έκθεσης.

Συγκεκριμένα, τόσο στην περίοδο του σκοταδιού όσο και στην περίοδο του φωτός, η απόσταση που διένυσαν τα άτομα μειωνόταν σημαντικά καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση της 2,6-DCBQ-OH. Επίσης, ο ρυθμός μείωσης της διανυθείσας απόστασης, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της 2,6-DCBQ-OH κατά την περίοδο του σκοταδιού (κλίση της καμπύλης), ήταν υψηλότερος από αυτόν στην περίοδο φωτός. Αυτό έδειξε ότι, η συμπεριφορά των zebrafish στο σκοτάδι επηρεάστηκε περισσότερο από ότι στο φως (**Εικόνα 31**). Η ανάλυση GLM έδειξε ότι η συγκέντρωση και οι περίοδοι φωτός/σκοταδιού καθώς και η αλληλεπίδραση των δύο είχαν στατιστικά σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα των zebrafish (συγκέντρωση: $F(4,657)=6804,52$, $P<0,001$, περίοδος φωτός-σκοταδιού: $F(1,657)=84299,37$, $P<0,001$, αλληλεπίδραση: $F(4,657)=2414,63$, $P<0,001$).

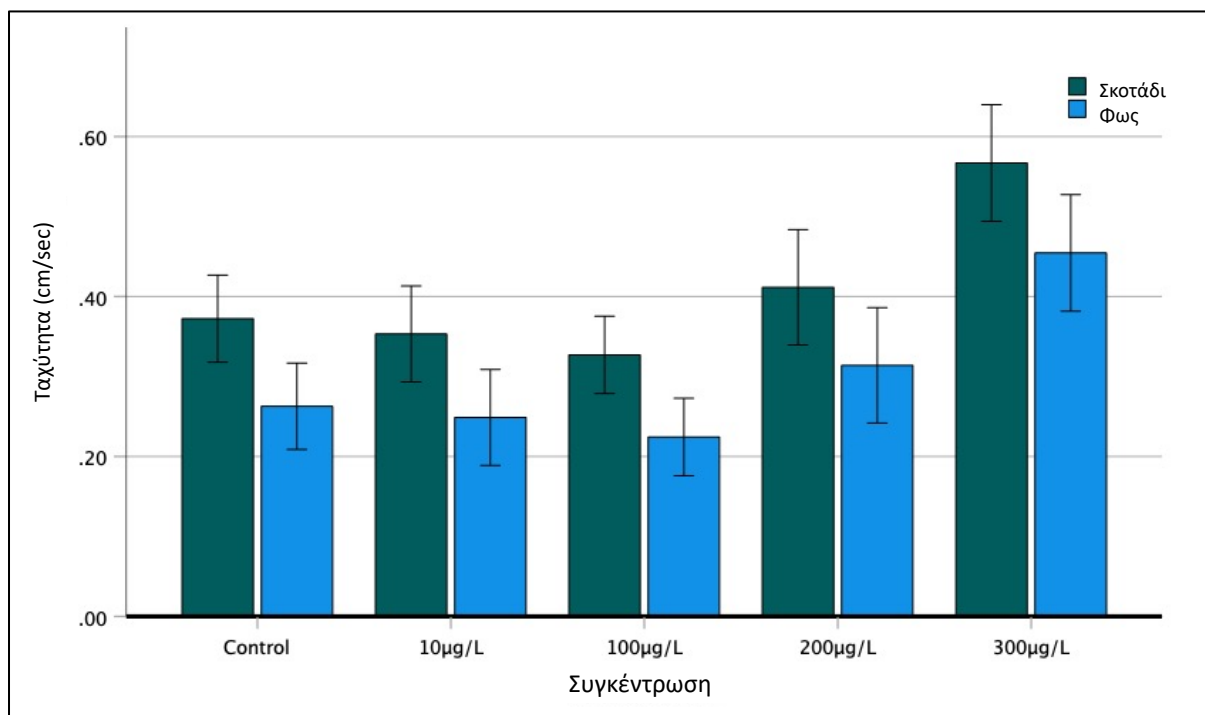
Με μελέτη της ταχύτητας (cm/s) αποδείχθηκε πως μετά την έκθεση προκλήθηκαν πιο σύνθετες διαταραχές από αυτές που ήδη περιγράφηκαν από την μελέτη της διανυθείσας απόστασης. Τόσο στις περιόδους του σκοταδιού όσο και στην περίοδο του φωτός, υπήρξε μικρή μείωση της ταχύτητας στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις 2,6-DCBQ-OH (στην 10μg/L που συνδέεται με 8% θνησιμότητα και στην 100 μg/L που συνδέεται με 37,5% θνησιμότητα) και αύξηση στις υψηλότερες (στην 200μg/L που συνδέεται με 46% θνησιμότητα και στην 300 μg/L που συνδέεται με 76% θνησιμότητα) (**Εικόνα 32**). Ως γενική τάση, η ταχύτητα στην περίοδο του σκοταδιού ήταν σημαντικά υψηλότερη από εκείνη στην περίοδο φωτός ανεξάρτητα από την έκθεση στην 2,6-DCBQ-OH. Όσο η συγκέντρωση αυξανόταν και μέχρι τα 100 μg/L (37,5% θνησιμότητα), η ταχύτητα μειωνόταν τόσο στην περίοδο του σκοταδιού όσο και του φωτός. Απότομη αύξηση της ταχύτητας εμφανιζόταν όταν η συγκέντρωση αυξάνονταν στα 200 μg/L. Η ανάλυση GLM έδειξε ότι η συγκέντρωση και η εναλλαγή φωτός και σκοταδιού είχαν στατιστικά σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα των zebrafish (συγκέντρωση: $F(4,657)=715,43$, $P<0,001$, περίοδοι φωτός/σκοταδιού: $F(1,657)=715,43$, $P<0,001$). Αποδείχθηκε πως η αλληλεπίδραση των παραπάνω παραμέτρων δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση ($F(4,657) =0,379$, $P=0,824$).



Εικόνα 30. Καταγραφή της κολυμβητικής δραστηριότητας (cm) μετά την έκθεση σε 2,6-DCBQ-OH και σε χρονικά διαστήματα 2 λεπτών.



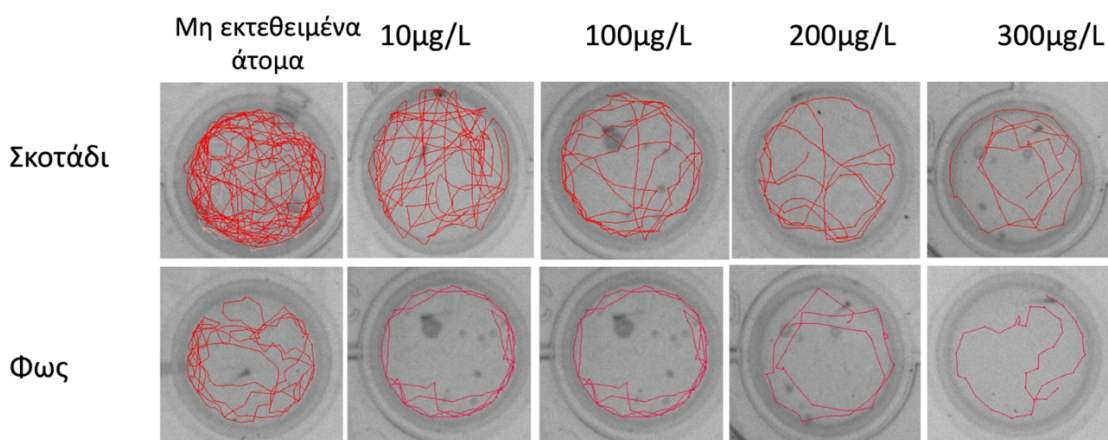
Εικόνα 31. Συγκριτική επίδραση της έκθεσης σε 2,6-DCBQ-OH στην κολυμβητική δραστηριότητα (cm) μεταξύ διαστήματος φωτός και σκοταδιού.



Εικόνα 32. Καταγραφή της μέσης ταχύτητας (cm/s) των ατόμων μετά την έκθεση σε 2,6-DCBQ-OH στο φως και στο σκοτάδι.

3.2.4.1 Λήψη στατικής εικόνας πηγαδιών κατά την καταγραφή της κινητικότητας των zebrafish

Επιπλέον κατά την διάρκεια της καταγραφής της συμπεριφοράς λήφθηκαν στατικές εικόνες (still frame) της κινητικότητας των ατόμων zebrafish για 2 min (**Εικόνα 33**). Τα άτομα zebrafish για τα οποία λήφθηκε η στατική εικόνα είχαν εκτεθεί σε συγκεντρώσεις 10, 100, 200, 300 $\mu\text{g/L}$ οι οποίες προκαλούσαν 8,8, 37,5, 46,3 και 76% θνησιμότητα αντίστοιχα (βλ. κεφ. 3.2.1.1). Με κόκκινη γραμμή φαίνονται οι κινήσεις του κάθε ατόμου για τα περασμένα 2 min. Αποτυπώθηκε με διαφορετικό τρόπο πως η κινητικότητα ήταν μεγαλύτερη σε συνθήκες έλλειψης φωτός (όπως αποδείχθηκε στο κεφ. 3.2.4). Διαπιστώθηκε επίσης, πως η κινητικότητα μειώνονταν ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης (όπως αποδείχθηκε στο κεφ. 3.2.4). Τέλος, φαίνεται ότι τα άτομα που εκτέθηκαν σε αυξημένες συγκεντρώσεις της 2,6-DCBQ-OH, κινούνταν στα τοιχώματα των πηγαδιών επίπεδου πυθμένα ενώ απέφευγαν την κίνηση στο κέντρο.



Εικόνα 33. Αποτύπωση της κινητικότητας των εμβρύων zebrafish υπό φωτεινές και σκοτεινές συνθήκες και στις διαφορετικές συγκεντρώσεις 2,6-DCBQ-OH (με κόκκινη γραμμή παρουσιάζονται οι κινήσεις των ατόμων για τα περασμένα 2 min).

3.2.4.2 Επίδραση της 2,6-DCBQ-OH στην απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα

Τέλος, εξετάστηκε η επίδραση της ουσίας στην απόκριση του zebrafish σε εξωτερικά ερεθίσματα.

Τα άτομα zebrafish στα οποία εξετάστηκε η μέση συνολική απόσταση που διανύθηκε (cm) μετά την εφαρμογή κρουστικού ερεθίσματος καθώς ο χρόνος απόκρισης σε αυτό (s) είχαν

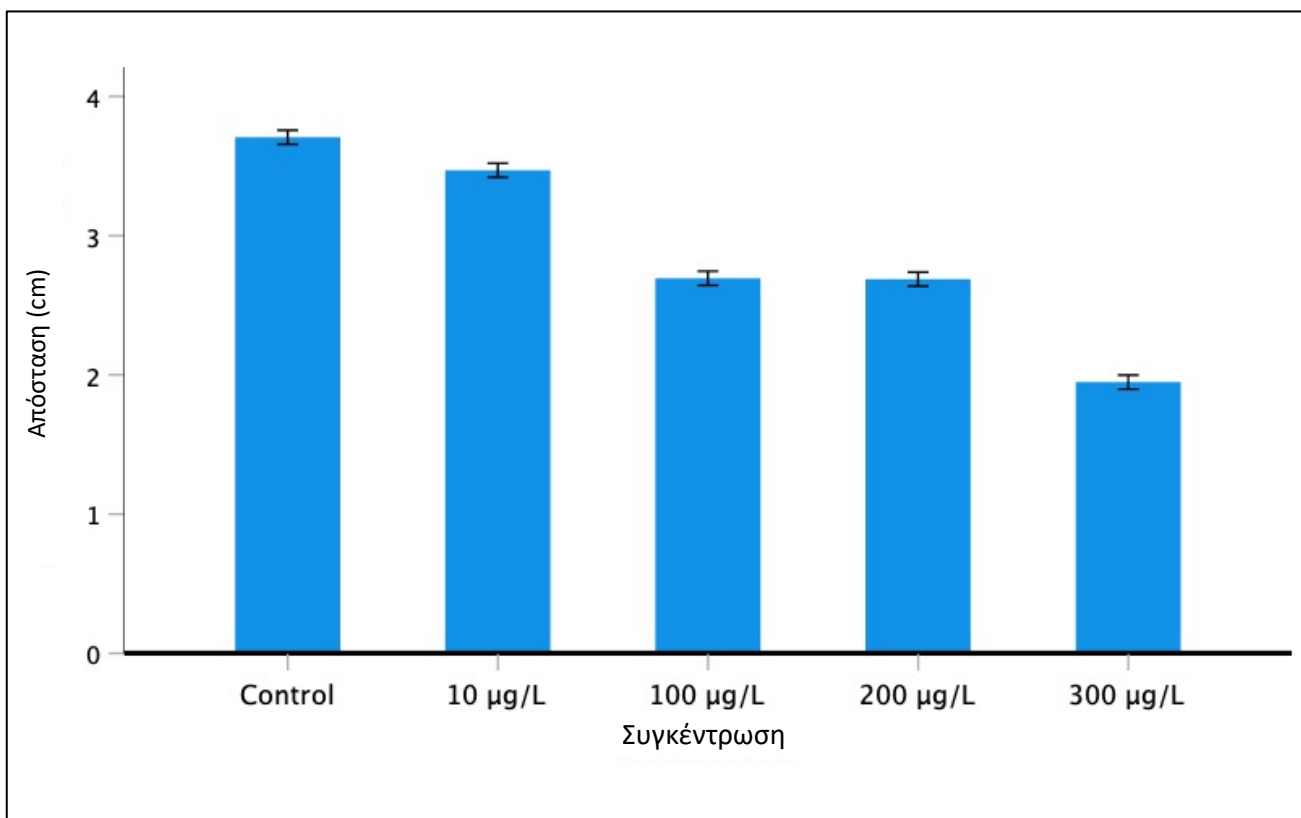
εκτεθεί σε συγκεντρώσεις 10, 100, 200, 300 µg/L οι οποίες προκαλούσαν 8,8, 37,5, 46,3 και 76% θνησιμότητα αντίστοιχα (βλ. κεφ. 3.2.1.1). Τα άτομα εμφάνισαν σημαντική μείωση στην απόσταση που κάλυψαν όσο αυξανόταν η συγκέντρωση στην οποία είχαν εκτεθεί μετά την εφαρμογή της κρούσης (**Πίνακας 15, Εικόνα 34**). Η μείωση στην διανυθείσα απόσταση μετά την εφαρμογή του κρούσης αποδείχθηκε πως ήταν στατιστικά σημαντική ($F=4824,75$, $P<0,001$).

Επιπλέον, όσο αυξανόταν η συγκέντρωση έκθεσης στην 2,6-DCBQ-OH τόσο μειωνόταν ο χρόνος αντίδρασης στο ερέθισμα μετά την κρούση (**Πίνακας 15, Εικόνα 35**). Η αύξηση του χρόνου αντίδρασης μετά την κρούση αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική ($F=2603,673$, $P<0,001$).

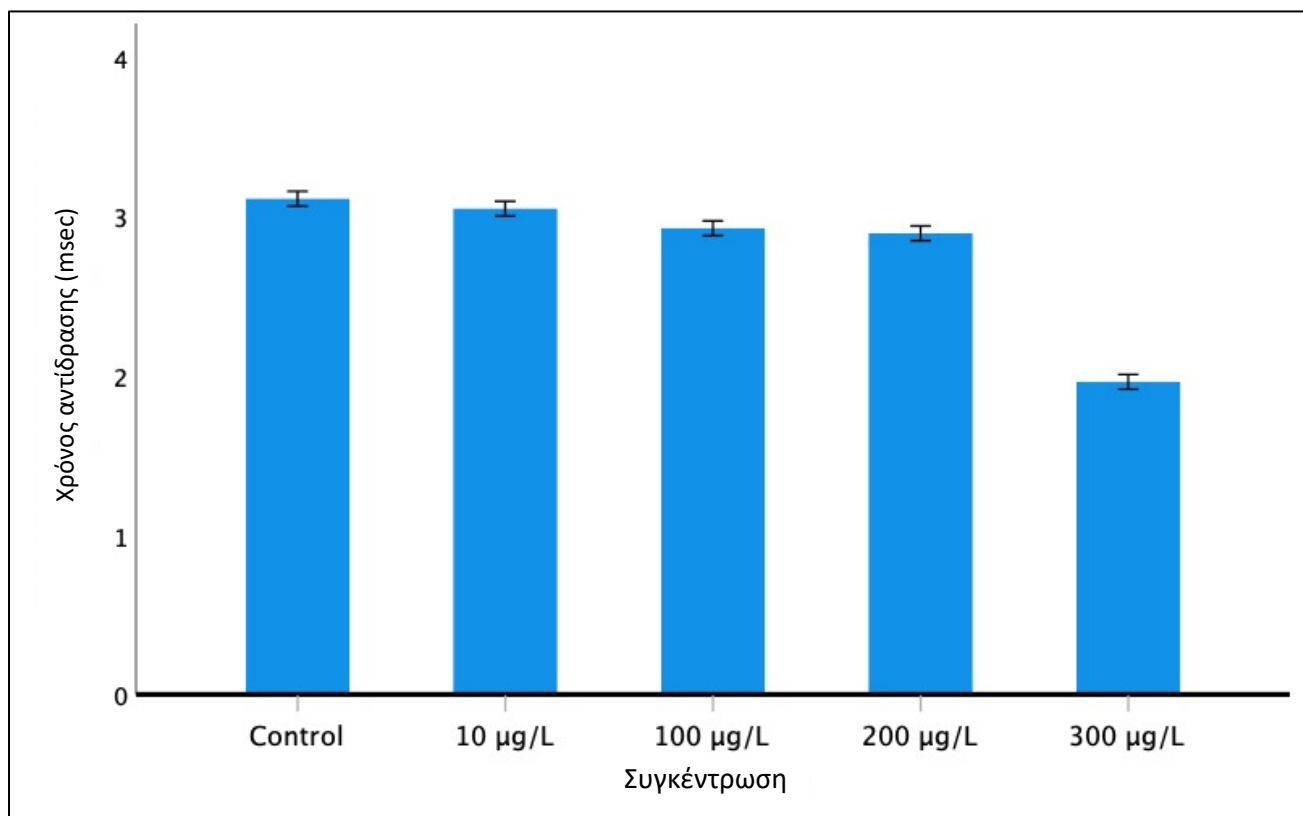
Συνοψίζοντας, τα άτομα μετά την κρούση εμφάνισαν μειωμένη διανυθείσα απόσταση όσο αυξανόταν η συγκέντρωση 2,6-DCBQ-OH στην οποία είχαν εκτεθεί ενώ και ο χρόνος αντίδρασης τους μειωνόταν. Ο μειωμένος χρόνος αντίδρασης μας δείχνει πως τα άτομα ανταποκρινόταν στο ερέθισμα γρηγορότερα όσο αυξανόταν η συγκέντρωση της έκθεσης εμφανίζοντας όμως μειωμένη κολυμβητική δραστηριότητα.

Πίνακας 15. Απόσταση κολύμβησης (cm) και χρόνος αντίδρασης (sec) μετά το κρουστικό ερέθισμα.

Συγκέντρωση	N	Μέση διανυθείσα απόσταση για 10 sec μετά το ερέθισμα (cm)	Τυπική απόκλιση μέσης διανυθείσας απόστασης	Μέσος χρόνος αντίδρασης στο ερέθισμα (sec)	Τυπική απόκλιση μέσου χρόνου αντίδρασης
control	15	3,70	0,009	$3,11 \cdot 10^{-3}$	0,009
10	15	3,47	0,005	$3,04 \cdot 10^{-3}$	0,006
100	15	2,69	0,012	$2,92 \cdot 10^{-3}$	0,011
200	15	2,68	0,009	$2,89 \cdot 10^{-3}$	0,008
300	15	1,94	0,011	$1,96 \cdot 10^{-3}$	0,009



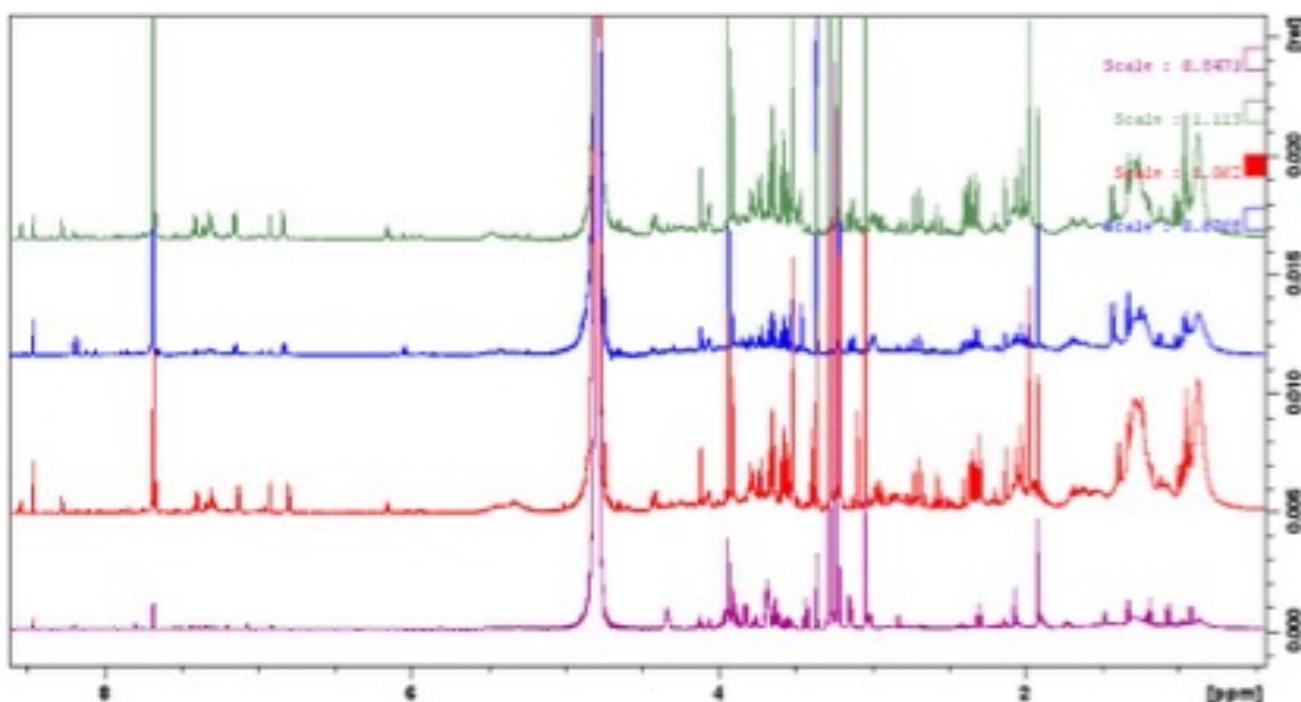
Εικόνα 34. Διανυθείσα απόσταση (cm) για 10 sec μετά την εφαρμογή του κρουστικού ερεθίσματος στις διαφορετικές συγκεντρώσεις 2,6-DCBQ-OH.



Εικόνα 35. Χρόνος απόκρισης (msec) στο κρουστικό ερέθισμα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις 2,6-DCBQ-OH.

3.2.5 Μεταβολομική ανάλυση- Αλλαγές του μεταβολώματος μετά την έκθεση του zzebrafish στο 2,6-DCBQ-OH

Αρχικά, λήφθηκαν τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ (1D) για όλα τα δείγματα (**Εικόνα 36**). Όπως ήταν αναμενόμενο, τα φάσματα είναι αρκετά πολύπλοκα εξαιτίας του μεγάλου αριθμού μεταβολιτών. Με μία πρώτη ματιά εντοπίστηκαν διαφορές στα φάσματα που αντιπροσωπεύουν τα μεταβολώματα των ατόμων zebrafish πριν και μετά την έκθεσή τους στο 2,6-DCBQ-OH και στις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα άτομα zebrafish στα οποία εξετάστηκαν οι διαταραχές στον μεταβολισμό είχαν εκτεθεί σε συγκεντρώσεις 200, 300, 500 $\mu\text{g/L}$ οι οποίες προκαλούσαν 46,3, 76, 92,7% και 100% θνησιμότητα αντίστοιχα (βλ. κεφ. 3.2.1.1). Οι διαφορές εντοπίστηκαν κυρίως στη περιοχή 6-9 ppm και 1-3 ppm. Συνεπώς, αναμένονται αλλαγές σε μεταβολίτες που περιέχουν είτε πολύ αποπροστατευμένα πρωτόνια (π.χ. αλκοόλες και καρβοξυλικά οξέα) είτε πολύ προστατευμένα (αλειφατικά μόρια).



Εικόνα 36. Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ των μεταβολωμάτων των δειγμάτων ελέγχου (μωβ φάσμα) και των δειγμάτων που εκτέθηκαν σε 200 $\mu\text{g/L}$ (κόκκινο φάσμα), 300 $\mu\text{g/L}$ (μπλε φάσμα) και 500 $\mu\text{g/L}$ (πράσινο φάσμα) της 2,6-DCBQ-OH.

Στη συνέχεια, τα δεδομένα (φασματικές κορυφές, ppm) αναλύθηκαν με τη χρήση του εργαλείου “1D NMR Search” της Human Metabolome Database (HMDB). Οι μεταβολίτες που προέκυψαν ταυτοποιήθηκαν περαιτέρω με χρήση UHPLC-LTQ-OrbitrapMS (**Πίνακας 16**). Ακολουθώντας αυτή τη πειραματική πορεία για το σύνολο των δειγμάτων, ταυτοποιήθηκαν 82 διαφορετικοί μεταβολίτες. Στον **Πίνακα 16** παρουσιάζονται αναλυτικά οι ταυτοποιημένοι μεταβολίτες του zebrafish για τα μη εκτεθειμένα άτομα καθώς και για τα εκτεθειμένα άτομα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις 2,6-DCBQ-OH. Οι μεταβολίτες που εντοπίστηκαν σε αυτό το σημείο χρησιμοποιήθηκαν στο επόμενο στάδιο έτσι ώστε να προσδιοριστούν τα μεταβολικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται στα μη εκτεθειμένα άτομα ελέγχου και στις διάφορες συγκεντρώσεις της 2,6-DCBQ-OH.

Πίνακας 16. Μεταβολίτες που βρέθηκαν στο σύνολο των δειγμάτων (με ✓ συμβολίζεται η ανίχνευση μεταβολίτη).

Μεταβολίτες	Μη εκτεθειμένα άτομα ελέγχου	200 µg/L	300 µg/L	500 µg/L
5(R)-Lactate	✓	✓		
(S)-3-Methyl-2-oxopentanoic acid	✓			
11-Deoxycorticosterone	✓			
11-Deoxycortisol	✓			
2-Oxobutanoate		✓		✓
3-Methoxytyramine			✓	
3-Methyl-2-oxobutanoic acid	✓	✓	✓	✓
3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine			✓	

3,5-Diiodo-L-tyrosine		✓		
4-Hydroxyphenylacetate	✓		✓	
5-Hydroxy-L-tryptophan			✓	
6-Deoxy-L-galactose		✓		✓
Adenosine				✓
Adrenosterone	✓			
Agmatine			✓	
beta-Alanyl-N(pi)-methyl-L-histidine		✓	✓	✓
beta-Carotene	✓	✓	✓	✓
beta-Sitosterol				✓
Bilirubin			✓	✓
Butanoic acid	✓			
Cadaverine	✓			
Chenodeoxycholate			✓	✓
Cholesterol sulfate	✓			
Corticosterone				✓
Cortisone				✓
CTP	✓			
Cytidine			✓	
D-Ribose 5-phosphate			✓	
dADP	✓			

Decanoic acid	✓	✓	✓	
Deoxyinosine		✓		
Deoxyuridine		✓		
Dodecanoic acid	✓			
Estrone	✓	✓	✓	
Ethanolamine				✓
Folate	✓	✓		
Guanosine		✓		
Hexadecanoic acid	✓			
Histamine				✓
Homovanillate				✓
Indole-3-acetate		✓		
Inosine			✓	
L-Adrenaline		✓		
L-Alanine	✓			✓
L-Arginine				✓
L-Citrulline	✓			
L-Histidine	✓			
L-Leucine			✓	
L-Methionine				✓
L-Noradrenaline		✓		
L-Phenylalanine				✓
L-Selenomethionine	✓	✓	✓	✓

L-Threonine		✓		✓
L-Tryptophan		✓	✓	
L-Valine	✓		✓	
Linoleic acid	✓			
Maltose				✓
Methylmalonate		✓	✓	✓
N-Acetyl-L-glutamate	✓	✓	✓	
NAD+				✓
Octadecanoic acid	✓			
Pantothenate	✓		✓	
Phenethylamine	✓		✓	✓
Phenylacetic acid			✓	✓
Propanoate			✓	
Pyridoxal		✓		
Pyridoxine		✓		
Retinoate		✓		✓
Retinoic acid	✓			
Serotonin		✓	✓	
sn-Glycerol 3-phosphate				✓
Sphingomyelin	✓			
Squalene				✓
Taurine				✓
Tetradecanoic acid	✓			

Thiamine			✓	
Thymidine	✓		✓	
Thyroxine		✓		✓
Tryptamine		✓		
Tyramine				✓
Valine	✓			

3.2.5.1 Μεταβολικά μονοπάτια

Αφού ολοκληρώθηκε η ταυτοποίηση των μεταβολιτών, συσχετίστηκαν οι μεταβολίτες με τις μεταβολικές οδούς στις οποίες συμμετέχουν. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο “pathway analysis” της ηλεκτρονικής πλατφόρμας MetaboAnalyst 4.0. Αφού εισήχθησαν οι μεταβολίτες στην μηχανή αναζήτησης, επιλέχθηκε η κατάλληλη βιβλιοθήκη μεταβολικών οδών για το zebrafish (*Danio rerio*) και λήφθηκαν τα μεταβολικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν οι μεταβολίτες των ατόμων zebrafish. Τα μεταβολικά μονοπάτια που προέκυψαν από την παραπάνω ανάλυση φαίνονται στον **Πίνακα 17**.

Πίνακας 17. Τα μεταβολικά μονοπάτια που προέκυψαν από την ανάλυση των μεταβολιτών (με ✓ συμβολίζεται η ανίχνευση μεταβολικού μονοπατιού).

Μεταβολικά μονοπάτια	Μη εκτεθειμένα άτομα ελέγχου	200 µg/L	300 µg/L	500 µg/L
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	✓	✓	✓	✓
Histidine metabolism	✓	✓	✓	✓
Purine metabolism	✓	✓	✓	✓
Retinol metabolism	✓	✓	✓	✓
Selenocompound metabolism	✓	✓	✓	✓

Steroid hormone biosynthesis	✓	✓	✓	✓
Tyrosine metabolism	✓	✓	✓	✓
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	✓	✓	✓	✓
Valine, leucine and isoleucine degradation	✓	✓	✓	✓
Phenylalanine metabolism	✓	✓	✓	✓
Fatty acid biosynthesis	✓	✓	✓	
Pantothenate and CoA biosynthesis	✓	✓	✓	
Arginine biosynthesis	✓	✓	✓	
Pyrimidine metabolism	✓	✓	✓	
One carbon pool by folate	✓	✓		
Pyruvate metabolism	✓	✓		
Folate biosynthesis	✓	✓		
beta-Alanine metabolism	✓			
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	✓			
Butanoate metabolism	✓			
Fatty acid elongation	✓			
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	✓			

Linoleic acid metabolism	✓			
Sphingolipid metabolism	✓			
Glutathione metabolism		✓	✓	✓
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism		✓	✓	✓
Cysteine and methionine metabolism		✓	✓	✓
Fructose and mannose metabolism		✓	✓	✓
Glycine, serine and threonine metabolism		✓	✓	✓
Tryptophan metabolism		✓	✓	
Propanoate metabolism		✓	✓	
Vitamin B6 metabolism		✓		
Arginine and proline metabolism			✓	✓
Pentose phosphate pathway			✓	✓
Porphyrin and chlorophyll metabolism			✓	✓
Primary bile acid biosynthesis			✓	✓
Thiamine metabolism			✓	✓
Glycerolipid metabolism				✓

Glycerophospholipid metabolism				✓
Nicotinate and nicotinamide metabolism				✓
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis				✓
Starch and sucrose metabolism				✓
Steroid biosynthesis				✓
Taurine and hypotaurine metabolism				✓

Πίνακας 18. Κατάταξη των μεταβολικών μονοπατιών που βρέθηκαν σε α) ανεπηρέαστα, β) που αποσιωπήθηκαν και γ) που ενεργοποιήθηκαν μόνο μετά την έκθεση (Με έντονη γραμματοσειρά σημαίνονται τα μονοπάτια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή συμπερασμάτων)

Ανεπηρέαστα μεταβολικά μονοπάτια	Μεταβολικά μονοπάτια που αποσιωπήθηκαν	Μεταβολικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται μόνο μετά την έκθεση
<i>Aminoacyl-tRNA biosynthesis</i> <i>Histidine metabolism</i> <i>Purine metabolism</i> <i>Retinol metabolism</i> <i>Selenocompound metabolism</i> <i>Steroid hormone biosynthesis</i> <i>Tyrosine metabolism</i> <i>Valine, leucine and isoleucine biosynthesis</i> <i>Valine, leucine and isoleucine degradation</i> <i>Phenylalanine metabolism</i>	beta-Alanine metabolism Biosynthesis of unsaturated fatty acids Butanoate metabolism Fatty acid elongation Alanine, aspartate and glutamate metabolism Linoleic acid metabolism Sphingolipid metabolism	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism Cysteine and methionine metabolism Fructose and mannose metabolism Glutathione metabolism Glycine, serine and threonine metabolism Tryptophan metabolism Propanoate metabolism Vitamin B6 metabolism Arginine and proline metabolism Pentose phosphate pathway Porphyrin and chlorophyll metabolism Primary bile acid biosynthesis Thiamine metabolism Glycerolipid metabolism Glycerophospholipid metabolism Nicotinate and nicotinamide metabolism Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis Starch and sucrose metabolism Steroid biosynthesis Taurine and hypotaurine metabolism

Στην ομάδα ελέγχου βρέθηκαν 24 μονοπάτια και από αυτά μόνο τα 10 παραμένουν ανεπηρέαστα, 7 αποσιωπήθηκαν και 20 ενεργοποιήθηκαν από την έκθεση στις συγκεντρώσεις της 2,6-DCBQ-OH (Πίνακας 17, 18). Αυτό είναι ενδεικτικό των διαταραχών που προκύπτουν μετά από την έκθεση είτε μέσω της αποσιώπησης κρίσιμων για τον οργανισμό μονοπατιών, είτε μέσω της εμφάνισης νέων μετά από την έκθεση. Συγκεκριμένα, στην μικρότερη συγκέντρωση (200 µg/L) 17 μεταβολικά μονοπάτια ήταν όμοια με τα άτομα ελέγχου ενώ εμφανίστηκαν 8 νέα. Στην αμέσως επόμενη μεγαλύτερη συγκέντρωση (300 µg/L) 14 μεταβολικά μονοπάτια ήταν όμοια με την ομάδα ελέγχου ενώ εμφανίστηκαν 12 νέα. Τέλος, στην μεγαλύτερη συγκέντρωση (500 µg/L) μόνο 10 μεταβολικά μονοπάτια βρέθηκαν όμοια με την ομάδα ελέγχου ενώ 17 νέα έκαναν την εμφάνιση τους (Πίνακας 17, 18). Για την εξαγωγή συμπερασμάτων, λήφθηκαν υπόψη

μόνο εκείνα τα μεταβολικά μονοπάτια που είτε αποσιωπήθηκαν μετά από την έκθεση είτε εκείνα που εμφανίστηκαν μόνο στα εκτεθειμένα άτομα (**Πίνακας 18**).

4^ο Κεφάλαιο

Συζήτηση



4 Συζήτηση

4.1 Επιπτώσεις των CNDs στο zebrafish

Η έκθεση των οργανισμών σε νανοϋλικά είναι αναπόφευκτη καθώς πλέον χρησιμοποιούνται στην καθημερινή ζωή. Η απελευθέρωση τέτοιων υλικών στο περιβάλλον έχει οδηγήσει στην στοχευμένη έρευνα για την εξακρίβωση των πιθανών επιπτώσεων από την έκθεση σε τέτοιες ουσίες. Μέχρι σήμερα, μικρός αριθμός μελετών έχει διεξαχθεί σχετικά με την μελέτη των επιπτώσεων των νανοϋλικών, και οι περισσότερες εξετάζουν τέτοιες ουσίες *in vitro*. Μέσω της *in vitro* εξέτασης, που ακολουθείται από την επιστημονική κοινότητα για πολλές δεκαετίες προκύπτουν πολύ σημαντικά συμπεράσματα. Έχει αποδειχθεί όμως, πως μέσω των *in vitro* πειραμάτων δεν παρέχεται η πλήρης εικόνα όταν θέλουμε να εξετάσουμε τις επιπτώσεις σε επίπεδο οργανισμού [156]. Για την διεξαγωγή μίας μελέτης από την οποία θα προκύπτουν συμπεράσματα σε επίπεδο οργανισμού χρησιμοποιούνται μοντέλα θηλαστικών (π.χ. επίμυες) τα οποία όμως εγείρουν πολλά ερωτήματα βιοηθικής και απαιτούν μεγάλο κόστος για την διατήρηση και εκτροφή των πληθυσμών. Το zebrafish ως ένας οργανισμός μικρού μεγέθους έχει επιτρέψει την μελέτη της επίδρασης τέτοιων ουσιών *in vivo* παρακάμπτοντας σημαντικά βιοηθικά ζητήματα και με σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων οργανισμών τα οποία έχουν ήδη αναφερθεί. Λαμβάνοντάς υπόψη, την απελευθέρωση νανοϋλικών στο περιβάλλον, τα πλεονεκτήματα που συνοδεύουν την χρήση του zebrafish ως οργανισμό μοντέλο και την ανάγκη για την μελέτη των επιπτώσεων νεοεμφανιζόμενων ουσιών όπως οι CNDs, ένα αντικείμενο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη των επιπτώσεων των CNDs στον κύκλο ζωής του zebrafish.

Πριν από την εξέταση των επιπτώσεων των νανοϋλικών, προηγήθηκε ο χαρακτηρισμός τους μέσω φασματοσκοπίας, φθορισμού και εικόνων TEM ώστε να εξασφαλιστεί η πλήρης γνώση των λειτουργικών ομάδων, της σταθερότητας και του μεγέθους των υλικών που εξετάζονται. Έπειτα ακολούθησε η μελέτη των επιπτώσεων στα άτομα zebrafish.

Τα αποτελέσματα απέδειξαν πως η έκθεση οδήγησε σε χαμηλή τοξικότητα κατά την εμβρυική ανάπτυξη, προκαλώντας δοσοεξαρτώμενες μορφολογικές ανωμαλίες, μείωση του ρυθμού αύξησης και διαταραχές στην συμπεριφορά των ατόμων. Οι μελέτες μέχρι

σήμερα [20], [45], επιβεβαιώνουν χαμηλή τοξικότητα των CNDS σε κυτταρικές σειρές. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η τοξικότητα των CNDS αυξανόταν με την ένθεση με άζωτο (N) και θείο (S) και με την αύξηση της συγκέντρωσης των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την έκθεση. Συγκεκριμένα, οι τιμές για τις θνησιγόνες δόσεις στο 50% των ατόμων (LC₅₀) για το κάθε υλικό, βρέθηκαν στα 584,48 μg/mL, 399,95 μg/mL, 149,92 μg/mL για τις Non doped CNDS, N-doped CNDS και N,S-doped CNDS αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με παρόμοιες μελέτες επιπτώσεων διαφόρων νανοϋλικών [156], [157] και η προκαλούμενη τοξικότητα των CNDS αποδείχθηκε χαμηλή. Οι τιμές θνησιμότητας χαρακτηρίζονται χαμηλότερες σε σχέση με νανοϋλικά που χρησιμοποιούν ως πηγή σύνθεσης τα βαρέα μέταλλα. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι, η σύνθεσή τους γίνεται από μη τοξικές, φυσικές πρώτες ύλες. Μέχρι σήμερα δεν έχει διεξαχθεί κάποια μελέτη προσδιορισμού των συγκεντρώσεων CNDS που υπάρχουν στο περιβάλλον, καθώς δεν έχει αναπτυχθεί κάποια μέθοδος ανίχνευσης και επιπλέον οι CNDS δεν χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό ακόμα. Τα επόμενα χρόνια αναμένεται να υπάρξει αύξηση της χρήσης τους και είναι πολύ σημαντικό που πριν ακόμα αυξηθεί η χρήση τους έχουν προσδιοριστεί τα όρια τοξικότητας και η διαταραχές που προκαλούν.

Η εμφάνιση των μορφολογικών ανωμαλιών κατά την διάρκεια της έκθεσης αυξανόταν ανάλογα με την παρατηρούμενη τοξικότητα μεταξύ των νανοϋλικών. Παρατηρήθηκαν ανωμαλίες όπως, η κύρτωση και μη αποκόλληση της ουράς, οιδήματα στο σώμα και την καρδιά, δυσπλαστικός λεκιθικός σάκος, καμπυλότητα της σπονδυλικής στήλης και άλλες σημαντικές αναπτυξιακές ανωμαλίες (**Εικόνα 21**). Οι ανωμαλίες αυτές ήταν πιο έντονες κατά την έκθεση στο πιο τοξικό νανοϋλικό και ήταν ανάλογες της συγκέντρωσης.

Ακολούθησε η μελέτη του ρυθμού αύξησης των εκτεθειμένων ατόμων στις CNDS. Οι ιχθύες ζώντας συνεχώς σε μεταβαλλόμενο περιβάλλον επηρεάζονται άμεσα από τις μεταβολές σε αυτό. Οι μεταβολές που καλούνται να αντιμετωπίσουν τα οδηγούν σε πληθώρα προσαρμογών με σκοπό την επιβίωση και στην κάλυψη μόνο των ζωτικών λειτουργιών υπό περιβαλλοντικές πιέσεις. Στους ιχθύες που βρίσκονται σε ιδανικές συνθήκες ο ρυθμός της αύξησης του μήκους τους μειώνεται σταθερά σε σχέση με τον χρόνο. Έχει αποδειχθεί πως όταν δέχονται περιβαλλοντικές πιέσεις η μείωση του ρυθμού

είναι πιο μεγάλη σε σχέση με το χρόνο [46], [127]. Εδώ εξετάσαμε πως επηρεάστηκε ο ρυθμός αύξησης των ατόμων μετά από την έκθεση σε νανοϋλικά έχοντας προσδιορίσει προηγουμένως την τοξική τους δράση. Η μείωση του ρυθμού αύξησης ήταν μεγαλύτερη στο πιο τοξικό νανοϋλικό. Η μείωση του ρυθμού αύξησης ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ των διαφορετικών ομάδων έκθεσης. Σε όλες τις ομάδες έκθεσης η μείωση του ρυθμού αύξησης επηρεάζονταν από την συγκέντρωση του κάθε υλικού, τον χρόνο έκθεσης και την αλληλεπίδραση του χρόνου έκθεσης και της συγκέντρωσης. Τα αποτελέσματα αυτά απέδειξαν πως η έκθεση στις CNDs προκαλεί μείωση του ρυθμού αύξησης. Η μείωση του ρυθμού αύξησης είναι καθοριστική για την επιβίωση των οργανισμών. Ακόμη και αν τα άτομα που εκτέθηκαν καταφέραν να επιβιώσουν κατά την διάρκεια της έκθεσης στις ουσίες, πιθανότατα αμέσως μετά τις 96 ώρες έκθεσης να μην επιβίωναν. Έχει αποδειχτεί πως η απότομη μείωση του ρυθμού αύξησης των ατόμων που εκτίθενται σε χημικούς παράγοντες επηρεάζει άμεσα τα ποσοστά επιβίωσης μετά το πέρας της έκθεσης [159].

Οι περισσότερες *in vitro* και *in vivo* μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα, εστιάζουν στην εκτίμηση της τοξικότητας κυρίως μελετώντας την επιβίωση κατά την έκθεση σε χημικούς παράγοντες. Αυτές οι μελέτες, καταλήγουν στον προσδιορισμό των θνησιγόνων δόσεων [19], [60], [131]. Παρόλο που τέτοιες μελέτες δίνουν σημαντικές πληροφορίες για την τοξική δράση των ουσιών, δεν δίνουν πληροφορίες για τις διαταραχές που προκαλούνται αμέσως μετά το τέλος της έκθεσης. Για αυτό το σκοπό στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση στην συμπεριφορά των οργανισμών ακριβώς μετά την έκθεση (144 hpf). Τα αποτελέσματα από τον έλεγχο της επίδρασης της έκθεσης στην κολυμβητική δραστηριότητα έδειξαν πως η συνολική διανυθείσα απόσταση (cm) αυξάνονταν όσο αυξάνονταν η τοξικότητα. Μετά την έκθεση στο νανοϋλικό με την μεγαλύτερη τοξικότητα (N, S-doped CNDs) παρατηρήθηκε πολύ υψηλή κολυμβητική δραστηριότητα των ατόμων σε σχέση με τα μη εκτεθειμένα. Στα άτομα που εκτέθηκαν στο επόμενο στην κλίμακα της τοξικότητας νανοϋλικό (N-doped CNDs), παρατηρήθηκε αυξημένη κολυμβητική δραστηριότητα των ατόμων σε σχέση με τα μη εκτεθειμένα ενώ παρατηρήθηκε χαμηλότερη κολυμβητική δραστηριότητα σε σχέση με τα εκτεθειμένα στο N,S-doped. Τα άτομα που εκτέθηκαν στο λιγότερο τοξικό νανοϋλικό (Non doped CNDs), εμφάνισαν αυξημένη κολυμβητική δραστηριότητα σε σχέση με τα μη εκτεθειμένα ενώ

παρατηρήθηκε χαμηλότερη κολυμβητική δραστηριότητα σε σχέση με τα δύο παραπάνω νανοϋλικά (N-doped CNDs, N,S-doped CNDs) (**Εικόνα 23, 24, 25, 26**).

Κατά την σύγκριση της κολυμβητικής δραστηριότητας μεταξύ των δύο περιόδων φωτισμού προκύπτει πως τα άτομα εμφάνισαν μεγαλύτερη κινητικότητα κατά την περίοδο του σκοταδιού. Επιπλέον, η κολυμβητική δραστηριότητα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στην περίοδο του σκοταδιού μεταξύ των νανοϋλικών (**Εικόνα 23**). Σε συνέχεια, όσο πιο τοξικό ήταν το νανοϋλικό η διαφορά της κινητικότητας μεταξύ των δύο περιόδων φωτισμού αύξανε (**Εικόνα 23**). Σε συνέχεια, όσο πιο τοξικό ήταν το νανοϋλικό η διαφορά της κινητικότητας μεταξύ των δύο περιόδων φωτισμού αύξανε (**Εικόνα 23**). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έρχονται σε συμφωνία με ανάλογες μελέτες όπου ελέγχεται η επίδραση στην συμπεριφορά ατόμων zebrafish μετά από την έκθεση σε διάφορους χημικούς παράγοντες [153], [155], [161], [162] και οι παρατηρούμενες διαταραχές σε αυτές τις μελέτες αποδίδονται στην επίδραση στη νευρο-συμπεριφορά των ατόμων zebrafish. Αυτή η προκαλούμενη υπερδραστηριότητα σύμφωνα με τον Maximino και συνεργάτες [163] [164], ερμηνεύεται ως συμπεριφορά stress και άγχους. Άλλες μελέτες αποδίδουν την συμπεριφορά αυτή (υπερδραστηριότητα) σε οξειδωτικό stress από δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species) όπου παράγονται μετά την έκθεση σε χημικούς παράγοντες και οδηγούν σε απόπτωση και κυτταρικό θάνατο [92], [23]. Δεδομένα όπως τα παραπάνω, που αποδεικνύουν διαταραχές στο φαινότυπο ενός οργανισμού (π.χ. συμπεριφορά) μετά από την έκθεση σε μία ουσία είναι πολύ σημαντικά καθώς προκύπτουν συμπεράσματα για την επίδραση μιας ουσίας στο σύνολο ενός οργανισμού [164]. Η μελέτη της συμπεριφοράς και οι διαταραχές μετά από έκθεση σε υποθησιγόνες δόσεις αποτελεί σημαντικό εργαλείο με υψηλή ευαισθησία για τις τοξικολογικές μελέτες [165].

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θεωρούνται πολύ σημαντικά καθώς μας δίνουν μια πλήρη εικόνα για την επίδραση χημικών παραγόντων μετά την έκθεση ενός οργανισμού και αντίστοιχες μελέτες θα μας οδηγούσαν σε σημαντικά συμπεράσματα για την επίδραση ουσιών στο περιβάλλον και για την προστασία της δημόσιας υγείας.

Στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε πως η τοξικότητα των CNDs είναι σχετικά χαμηλή σε σχέση με τις νανοκουκκίδες βαρέων μετάλλων. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκαν δόσοεξαρτώμενες διαταραχές κατά την διάρκεια και μετά την έκθεση στο zebrafish. Συνεπώς θα πρέπει να ληφθούν μέτρα για την απελευθέρωση ακόμα και των πιο φιλικών προς το περιβάλλον νανοϋλικών, όπως των εξεταζόμενων, καθώς οι διαταραχές που προκαλούν είναι πολλαπλές. Τέλος, η τελική συγκέντρωση των νανοϋλικών που συσσωρεύονται σε ένα οικοσύστημα μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με τις βιοτικές και αβιοτικές παραμέτρους που επικρατούν και μένει να μελετηθούν στο μέλλον όταν αυτά θα χρησιμοποιούνται εκτενώς [66], [101].

4.2 Επιπτώσεις της 2,6-DCBQ-OH στο zebrafish

Η 2,6-DCBQ είναι μια ουσία η οποία εντοπίζεται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με άλλες αλογονοβενζοκινόνες μετά από την χλωρίωση του νερού. Απελευθερώνεται στα υδάτινα οικοσυστήματα και κατά συνέπεια οι οργανισμοί έρχονται σε επαφή με αυτή. Ο άνθρωπος επίσης εκτίθεται σε αυτή, καθώς εντοπίζεται σε δημόσιες εγκαταστάσεις (κολυμβητήρια κ.α.). Επιπλέον, το οργανικό φορτίο που φέρει ο άνθρωπος από τα προϊόντα καθημερινής χρήσης (αποσμητικά, αφρόλουτρα, αρώματα κ.α.) αντιδρά με τις αλογονοβενζοκινόνες και παράγονται νέα παραπροϊόντα όπως η 2,6-DCBQ-OH, που επίσης απελευθερώνονται στο περιβάλλον [91].

Γίνεται αντιληπτό πως η επαφή ουσιών, όπως η 2,6-DCBQ-OH, με τους οργανισμούς είναι δεδομένη και μάλιστα αυτή δεν αποτελεί φαινόμενο των τελευταίων ετών αλλά συμβαίνει από τότε που χρησιμοποιείται η χλωρίωση για την απολύμανση του νερού. Σήμερα όμως, με την ανάπτυξη νέων ευαίσθητων τεχνικών δόθηκε η δυνατότητα να ανιχνευθεί και έτσι η εκτίμηση των κινδύνων για τους οργανισμούς και φυσικά τον άνθρωπο είναι αναγκαία. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν οι επιπτώσεις μετά από την έκθεση του οργανισμού- μοντέλο zebrafish στην αλογονοβενζοκινόνη, 2,6-DCBQ-OH. Μελετήθηκαν οι επιπτώσεις στην επιβίωση, τη μορφολογία, την καρδιακή ανάπτυξη και λειτουργία, τη συμπεριφορά, την ανάπτυξη και λειτουργία αισθητήριων οργάνων και διαταραχές στο μεταβολικό πρότυπο μετά από την έκθεση.

Τα αποτελέσματα δείχνουν πως μετά την έκθεση στην 2,6-DCBQ-OH προέκυψε δόσοεξαρτώμενη τοξικότητα, μορφολογικές, αναπτυξιακές και συμπεριφορικές ανωμαλίες. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν ήδη καταγραφεί σε αντίστοιχες μελέτες τοξικότητας των αλογονοβενζοκινονών είτε σε κυτταρικές σειρές, είτε σε zebrafish [44], [94], [166], [167].

Η τιμή LC_{50} που βρέθηκε για την 2,6-DCBQ-OH ήταν 186,072 $\mu\text{g/L}$ στις 96h έκθεσης. Η τιμή που βρέθηκε είναι υψηλότερη (χαμηλότερη τοξική δράση της ουσίας) από αυτή που βρέθηκε από Sun και συνεργάτες [166] και χαμηλότερη (υψηλότερη τοξική δράση της ουσίας) από αυτή που βρέθηκε από Wang και συνεργάτες [91]. Η Sun και συνεργάτες κατέγραψε την LC_{50} 94,4 $\mu\text{g/L}$ και ο Wang και συνεργάτες 1,2 mg/L . Στην πρώτη περίπτωση οι διαφορές με την παρούσα διδακτορική διατριβή πιθανά οφείλονται στην χαμηλότερη

διάρκεια έκθεσης (72h) που ακολούθησε η Sun και συνεργάτες και πως η έκθεση πραγματοποιήθηκε μέσα σε δοχεία χωρίς την καθημερινή ανανέωση των διαλυμάτων έκθεσης. Η μη ανανέωση διαλυμάτων και η τοποθέτηση των zebrafish σε δοχείο με διάλυμα πιθανά αυξάνει την παρατηρούμενη τοξικότητα. Στην δεύτερη περίπτωση ο Wang και συνεργάτες παρατήρησε σημαντικά χαμηλότερη θνησιμότητα και πιθανά αυτό να οφείλεται στην μη απομάκρυνση του χορίου που ακολούθησε. Αποδεδειγμένα το χόριο λειτουργεί ως προστατευτικός φραγμός [168] για το zebrafish και κατ' επέκταση παρατηρήθηκε χαμηλότερη τοξικότητα.

Οι αναπτυξιακές ανωμαλίες και η αύξηση της τοξικότητας ακολουθούσαν αντίστοιχο δοσοεξαρτώμενο πρότυπο κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες. Πιο αναλυτικά, συγκεντρώσεις υψηλότερες από την τιμή LC_{50} προκάλεσαν έντονες μορφολογικές ανωμαλίες όπως κύρτωση ουράς, οιδήματα σε όλο το μήκος του σώματος, περικαρδιακά οιδήματα και προβλήματα στην ανάπτυξη της καρδιάς (**Εικόνα 28**). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, παρατηρήθηκε πως τα άτομα που εκτέθηκαν σε τιμές συγκεντρώσεων μικρότερες της LC_{50} εμφάνισαν πολύ μικρές μορφολογικές ανωμαλίες. Τα άτομα που εκτέθηκαν σε τιμές υψηλότερες από την LC_{50} εμφάνισαν πολύ σοβαρές ανωμαλίες αμέσως μετά τις 48 hpf όπου άρχισαν να εμφανίζονται έντονα περικαρδιακά οιδήματα. Επιπλέον, τα άτομα εμφάνιζαν σημάδια αποσύνθεσης στην περιοχή της κεφαλής και της ουράς σε συγκεντρώσεις πάνω από 400 $\mu\text{g/L}$. Αυτά τα αποτελέσματα είναι ενδεικτικά της τοξικότητας και των ανωμαλιών που προκάλεσε η 2,6-DCBQ-OH. Τα αποτελέσματα αυτά, είναι σε απόλυτη συμφωνία με άλλες μελέτες όπου μελετήθηκαν οι μορφολογικές ανωμαλίες μετά από την έκθεση των zebrafish στην ίδια χημική ουσία όπου παρατηρήθηκαν έντονες μορφολογικές ανωμαλίες, ρήξη του περικαρδίου και πρόκληση οιδημάτων [4], [166], [141].

Επίσης, μελετήθηκε η ανάπτυξη και η λειτουργία της καρδιάς καθώς αποτελεί όργανο από το οποίο εξαρτάται η επιβίωση του οργανισμού. Η καρδιά στο zebrafish όπως και σε όλα τα σπονδυλόζωα είναι το πρώτο όργανο που σχηματίζεται και ξεκινά να λειτουργεί [170]. Ο σχηματισμός της ξεκινά πριν από τη φάση της γαστριδίωσης. Ο βασικός τρόπος της ροής του αίματος στους ιχθύες περιλαμβάνει μια αντλία που ωθεί το αίμα από την καρδιά στα βράγχια και από εκεί στο σώμα και πίσω στην καρδιά. Σε αντίθεση με την καρδιά των θηλαστικών που φέρουν δυο κοιλίες και δύο κόλπους, η καρδιά στο zebrafish είναι δίχωρη

και αποτελείται από μια κοιλία και έναν κόλπο όπως και όλων των ιχθύων [170–172]. Τα μοριακά μονοπάτια μεταξύ του zebrafish και άλλων ασπόνδυλων είναι συντηρημένα και ακολουθούνται παρόμοιες γενετικές διαδικασίες. Ένας αρτηριακός βολβός βρίσκεται μπροστά από την κοιλία, και ο κόλπος δέχεται αίμα από το φλεβώδη κόλπο που είναι ο πρώτος θάλαμος που δέχεται το αίμα από την ηπατική κυκλοφορία. Στην φλεβική περιοχή, πριν από τον κόλπο, υπάρχει ο φλεβώδης κόλπος, ο οποίος παρέχει μια σταθερή ροή του αίματος προς την καρδιά. Στην αρτηριακή περιοχή, η κοιλία της καρδιάς ακολουθείται από τον αορτικό βολβό, ο οποίος είναι ένας λεπτότοιχος θάλαμος, τα τοιχώματα του οποίου αποτελούνται από λείες μυϊκές ίνες και στερείται βαλβίδων [170–172]. Η λειτουργία του είναι σημαντική αφού διατηρεί σταθερή τη ροή του αίματος προς τα αγγεία των βραγχίων κατά την καρδιακή σύσπαση μέσω του μηχανισμού που διαθέτει για να διαστέλλεται και να επανέρχεται στο αρχικό του σχήμα. Η ανάπτυξη και η λειτουργία της καρδιάς ελέγχθηκε συνολικά σε όλη την διάρκεια της έκθεσης στην 2,6-DCBQ-OH και έγινε σύγκριση με τα μη εκτεθειμένα άτομα και η μέτρηση των καρδιακών παλμών πραγματοποιήθηκε μέσω βιντεοσκοπίας.

Όσο αφορά την μορφολογία της καρδιάς των εκτεθειμένων ατόμων, διαπιστώθηκαν αλλοιώσεις. Η καρδιά δεν ήταν καλοσχηματισμένη και το περικάρδιο εμφανιζόταν σημαντικά διογκωμένο. Άλλες μελέτες αποδίδουν τέτοιες ανωμαλίες στον σχηματισμό της καρδιάς σε απορρυθμισμένα γονίδια υπεύθυνα για την καρδιακή ανάπτυξη (*krit1*) [173].

Μετά την μελέτη των αναπτυξιακών διαταραχών της καρδιάς εξετάστηκε και η λειτουργία της μέσω της εξέτασης του καρδιακού ρυθμού. Παρόμοια μελέτη της επίδρασης της 2,6-DCBQ-OH συγκεκριμένα δεν έχει προηγηθεί αλλά ο τρόπος επίδρασης της ουσίας στην λειτουργία είναι παρόμοιος με την επίδραση που έχουν άλλοι χημικοί παράγοντες στον καρδιακό ρυθμό [174], προκαλώντας βραδυκαρδία στα εκτεθειμένα άτομα σε σύγκριση με τα μη εκτεθειμένα. Ο μέσος καρδιακός ρυθμός βρέθηκε σημαντικά διαφοροποιημένος μεταξύ των εκτεθειμένων ατόμων και της ομάδας ελέγχου. Διαπιστώθηκε σημαντική βραδυκαρδία στα εκτεθειμένα άτομα, η οποία ήταν πιο εμφανής όσο αυξανόταν η συγκέντρωση της υπό μελέτη ουσίας (**Εικόνα 29**). Η παρατηρούμενη βραδυκαρδία θα μπορούσε να αποδοθεί στις διαταραχές της ανάπτυξης της καρδιάς που παρουσιάστηκαν. Ακόμα, μελετήθηκε η επίδραση της έκθεσης στη συμπεριφορά προέκυψε πως η συνολική διανυθείσα απόσταση (cm) μειωνόταν όσο αυξανόταν η συγκέντρωση έκθεσης. Μεταξύ

των περιόδων φωτός/σκοταδιού βρέθηκε πως τα άτομα εμφάνιζαν μικρότερη δραστηριότητα στα διαστήματα του φωτός. Η μείωση ήταν πιο εμφανής στα άτομα που είχαν εκτεθεί στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Σε άλλες μελέτες έχει αποδειχθεί πως το zebrafish σε περιόδους σκοταδιού παρουσιάζει εντονότερη δραστηριότητα σε σχέση με τις περιόδους φωτός [153], [155], [161], [135], [148]. Διαπιστώθηκε ότι η κολυμβητική δραστηριότητα των ατόμων μειώνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση στην οποία έχουν εκτεθεί τα άτομα (**Εικόνα 30, 31**). Σε άλλες μελέτες, η μειωμένη κολυμβητική δραστηριότητα αποδίδεται στις μορφολογικές ανωμαλίες [152–155] και σε μεταβολικές διαταραχές [176], [177] που προκλήθηκαν μετά από την έκθεση στην εκάστοτε ουσία που μελετάται.

Διαπιστώθηκε ότι η ταχύτητα (cm/s) των ατόμων συγκριτικά για τις δύο περιόδους φωτός/σκοταδιού ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στην περίοδο του σκότους για όλες τις ομάδες συγκεντρώσεων καθώς και στα μη εκτεθειμένα άτομα. Η ταχύτητα ήταν στα ίδια επίπεδα με αυτή των μη εκτεθειμένων ατόμων στις μικρότερες συγκεντρώσεις (10 µg/L και 100 µg/L) ενώ στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εμφάνιζε σημαντική και απότομη αύξηση (200 µg/L και 300 µg/L) (**Εικόνα 32**). Άλλες μελέτες αποδεικνύουν πως απότομη αύξηση της ταχύτητας των zebrafish παρατηρείται μετά από έκθεση σε διάφορους χημικούς παράγοντες και οφείλεται στο αυξημένο stress που προκαλείται από την έκθεση στις υψηλές συγκεντρώσεις [178], [164].

Επίσης, μελετήθηκε η αντίδραση των ατόμων σε κρουστικά ερεθίσματα. Με αυτή τη μελέτη, ελέγχεται η επίδραση των υπό μελέτη ουσιών στην ανάπτυξη αισθητήριων οργάνων. Η μελέτη της απόκρισης στα εξωτερικά ερεθίσματα έγινε με την εφαρμογή του κρουστικού ερεθίσματος. Με αυτή την ανάλυση επιτεύχθηκε εκτός από την μέτρηση της δραστηριότητας κατά την εφαρμογή του κρουστικού ερεθίσματος των zebrafish και ο έλεγχος της ανάπτυξης των αισθητήριων οργάνων των ατόμων. Αν είχε προκληθεί μόνιμη βλάβη των αισθητήριων οργάνων μετά την έκθεση τα άτομα δεν θα αντιδρούσαν καθόλου στα προκαλούμενα ερεθίσματα. Στην παρούσα περίπτωση, τα άτομα ανταποκρίθηκαν στο κρουστικό ερέθισμα μετά από την έκθεση σε όλες τις συγκεντρώσεις. Αυτό απέδειξε πως δεν έχει προκληθεί κάποια μόνιμη βλάβη στα αισθητήρια όργανα των ατόμων μετά από την έκθεση. Σύμφωνα με άλλες μελέτες, με την μελέτη της επίδρασης της κρούσης μπορεί να ελεγχθεί η κινητική λειτουργία, η λειτουργία των αισθητήριων οργάνων καθώς και

βασικές μαθησιακές λειτουργίες [179] καθώς έχει αποδειχθεί πως μετά από ένα ισχυρό ερέθισμα, στα φυσιολογικά πειραματόζωα προκαλούνται συσπάσεις μυών που ακολουθούνται από ταχείς και ακανόνιστες κινήσεις [179].

Για την μελέτη της αντίδρασης των ατόμων zebrafish μετά από την έκθεση, μελετήθηκε η απόσταση που διανύθηκε μετά το εξωτερικό ερέθισμα (κρούση) και η ταχύτητα αντίδρασης μετά από αυτό το ερέθισμα. Μετά την εφαρμογή της κρούσης μετρήθηκε η απόσταση κολύμβησης για 10 sec καθώς και ο χρόνος απόκρισης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μετά την εφαρμογή της κρούσης, προέκυψε πως τα εκτεθειμένα άτομα εμφάνισαν χαμηλότερο χρόνο αντίδρασης όσο αύξανε η συγκέντρωση έκθεσης σε σχέση με τα μη εκτεθειμένα (**Εικόνα 35**). Το παραπάνω, υποδηλώνει υπερευαισθησία των ατόμων μετά από την έκθεση. Σύμφωνα με τον Maximino και συνεργάτες [163], η γρήγορη εκκίνηση στην κολυμβητική δραστηριότητα, μπορεί να ονομαστεί «ετοιμότητα γρήγορης εκκίνησης» («quick start readiness»), η οποία είναι μια κοινή διαταραχή κατά την εξέταση τοξικότητας ουσιών στο zebrafish. Ο Maximino και συνεργάτες [163] απέδειξαν πως αυτή η «ετοιμότητα γρήγορης εκκίνησης» οφείλεται σε μια μετάλλαξη στο γονίδιο *space cadet* (*src*), μια μετάλλαξη που συνδέεται με συμπεριφορές αυξημένου άγχους και φόβου στο zebrafish. Επιπλέον έχει αποδειχθεί πως η εξοικείωση, η προσαρμοστικότητα και οι διαδικασίες μάθησης επηρεάζονται σημαντικά υπό την επίδραση τοξικών ουσιών [34], [136]. Αν υποθέσουμε πως μετά την έκθεση τα άτομα έχουν μειωμένη προσαρμοστικότητα σε ερεθίσματα μπορούμε να αποδώσουμε σε αυτό την γρήγορη απόκριση («ετοιμότητα γρήγορης εκκίνησης», «quick start readiness») μετά την κρούση καθώς τα εκτεθειμένα άτομα δεν έχουν την δυνατότητα να εξοικειωθούν στην εφαρμογή ερεθισμάτων.

Ακόμα, διερευνήθηκε η κολυμβητική δραστηριότητα για 10 sec από την εφαρμογή της κρούσης. Διαπιστώθηκε ότι η απόσταση που διανύουν τα άτομα μειώνεται όσο αυξάνεται η συγκέντρωση έκθεσης (**Εικόνα 34**). Η έκθεση στην ουσία 2,6-DCBQ-OH προκαλεί διαταραχές στην κολυμβητική ικανότητα ενδεχομένως εξαιτίας των μορφολογικών ανωμαλιών και μεταβολικών διαταραχών.

Συνολικά μπορούμε να πούμε πως από τον έλεγχο της επίδρασης της κρούσης προκαλούνται συμπεριφορές άγχους και χαμηλή δραστηριότητα των ατόμων. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, τέτοιες συμπεριφορές μπορεί να έχουν προκληθεί από νευροτοξικά

συμβάντα κατά την ανάπτυξη των νευρώνων [180]. Ακόμα, σε άλλες μελέτες διαταραχές όμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή (αυξημένη εγρήγορση και χαμηλή κολυμβητική ικανότητα, «ετοιμότητα γρήγορης εκκίνησης») πέρα από αλλαγές στον φαινότυπο μπορούν να συνδεθούν με οικολογικές δυσλειτουργίες καθώς επηρεάζουν την θήρευση και την ευπάθεια των ατόμων σε οποιαδήποτε απειλή [181].

Συμπερασματικά, έγινε μια συνολική μελέτη των επιπτώσεων της 2,6-DCBQ-OH στα πρώιμα στάδια ζωής του zebrafish. Αποδείχθηκε πως οι προκαλούμενες διαταραχές είναι σημαντικές και πρέπει να ληφθούν μέτρα κατά την απελευθέρωση τέτοιων ουσιών στο περιβάλλον και σε περιπτώσεις που έρχεται σε επαφή ο άνθρωπος με αυτές. Το πιο ανησυχητικό που προκύπτει από την μελέτη της τοξικότητας της 2,6-DCBQ-OH είναι πως αυτή είναι μία μόνο ουσία από την πληθώρα αλογονοβενζοκινονών που παράγονται κατά την χλωρίωση του νερού και απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Επίσης πρέπει να ληφθεί υπόψη, πως οι αλογονοβενζοκινόνες είναι μια ομάδα ουσιών που απελευθερώνεται στο περιβάλλον από την εποχή που χρησιμοποιήθηκε η χλωρίωση για την απολύμανση του νερού και συνεπώς η επαφή των οργανισμών με αυτές είναι μακροχρόνια.

4.2.1 Μεταβολομική ανάλυση μετά την έκθεση στην 2,6-DCBQ-OH

Από τη μελέτη των μεταβολωμάτων του zebrafish μετά την έκθεσή στην 2,6-DCBQ-OH προέκυψε ότι εμφανίζονται ποικίλες διαφορές τόσο σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, όσο και μεταξύ των συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν. Όπως αναμένεται, στη μεγαλύτερη συγκέντρωση παρατηρήθηκαν περισσότερες μεταβολές στα μεταβολικά μονοπάτια. Αυτό πιθανά οφείλεται στην στρεσογόνο κατάσταση που υπόκεινται τα άτομα zebrafish και κατά συνέπεια ενεργοποιούνται όλα τα απαραίτητα μεταβολικά μονοπάτια προκειμένου να αποφευχθεί ο θάνατος. Παρακάτω, παρουσιάζονται αναλυτικά τα μεταβολικά μονοπάτια τα οποία αποσιωπήθηκαν μετά από την έκθεση σε όλες τις συγκεντρώσεις 2,6-DCBQ-OH, καθώς και ορισμένα μεταβολικά μονοπάτια που εμφανίστηκαν μόνο στα άτομα που εκτέθηκαν στην 2,6-DCBQ-OH.

4.2.1.1 Μεταβολισμός β-αλανίνης

Ο μεταβολισμός της β-αλανίνης είναι ένα πολύ σημαντικό μεταβολικό μονοπάτι για την φυσιολογική λειτουργία των οργανισμών. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η β-αλανίνη μετατρέπεται στα μυϊκά κύτταρα σε καρνοσίνη [182], η οποία με την σειρά της λειτουργεί ως ρυθμιστικό διάλυμα για την απομάκρυνση του γαλακτικού οξέος που παράγεται κατά την μυϊκή καταπόνηση και κόπωση των οργανισμών [183]. Μετά την έκθεση των zebrafish στην 2,6-DCBQ-OH διαπιστώθηκε βραδυκινησία υπό οποιοσδήποτε συνθήκες φωτισμού (βλ. κεφ. 3.2.4) και καθυστερημένη αντίδραση και βραδυκινησία μετά από κρουστικό ερέθισμα (βλ. 3.2.4.2) σε σχέση με τα άτομα ελέγχου. Η μειωμένη κινητικότητα και εγρήγορση που παρουσίασαν τα άτομα συνοδεύεται με χαμηλότερη κόπωση και χαμηλότερο μυϊκό κάματο και πιθανά μπορεί να συνδέεται με την αποσιώπηση του μονοπατιού του μεταβολισμού της β-αλανίνης σε όλες τις συγκεντρώσεις.

4.2.1.2 Βιοσύνθεση ακόρεστων λιπαρών οξέων-γλυκεροφωσfolιπίδια-σφιγγολιπίδια

Τα λιπίδια, αποτελούν τα δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και του νευρικού ιστού. Πρόκειται για πολύ σημαντικές πηγές ενέργειας, που αποθηκεύονται σε διάφορα μέρη του σώματος [184]. Τα γλυκερολιπίδια είναι μια δομικά ετερογενής ομάδα λιπιδίων που παίζουν βασικούς δομικούς και λειτουργικούς ρόλους σε βακτηριακές, φυτικές και ζωικές μεμβράνες [185]. Τα γλυκεροφωσfolιπίδια είναι αμφίφιλα λιπίδια και

βρίσκονται σε αφθονία σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα. Ο δομικός τους ρόλος στο σχηματισμό της διπλοστοιβάδας των βιολογικών μεμβρανών και της μονοστοιβάδας των λιποπρωτεϊνών είναι πολύ σημαντικός [184].

Τα λιπαρά οξέα διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των λιπαρών ακετυλοσυνεζύμων Α τα οποία συμμετέχουν στον μεταβολισμό των γλυκεροφωσφολιπιδίων [186]. Τα γλυκεροφωσφολιπίδια συμμετέχουν σε πολλές διεργασίες των οργανισμών όπως η γενετική ωρίμανση των οργανισμών (βιτελογεννίνη) [184].

Επιπλέον, παρατηρήθηκε η αποσιώπηση του μεταβολισμού των σφιγγολιπιδίων σε όλα τα εκτεθειμένα άτομα zebrafish. Σφιγγολιπίδια όπως, η σφιγγομυελίνη διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εγκεφάλου και την λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού καθώς και της λευκής ουσίας του εγκεφάλου [187]. Αυτό σημαίνει πως πολύ σημαντικά γλυκεροφωσφολιπίδια που βοηθούν στην ανάπτυξη του οργανισμού αποσιωπήθηκαν μετά από την έκθεση στην 2,6-DCBQ-OH. Αυτό πιθανά μπορεί να συνδέεται με την αύξηση των μορφολογικών βλαβών, την μειωμένη κινητικότητα και τη χαμηλή επιβίωση των εκτεθειμένων ατόμων. Τέλος, η αποσιώπηση σε γλυκεροφωσφολιπιδίων σε όλες τις συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει ενδοκρινικές διαταραχές [118]. Σε άλλες μελέτες έχει αποδειχθεί πως η 2,6-DCBQ-OH δρα ως ενδοκρινικός διαταράκτης [167], [188], [189].

4.2.1.3 Μεταβολισμός βουτανοϊκού (βουτυρικού οξέος)

Το βουτυρικό οξύ είναι ένας μεσολαβητής μεταξύ της μικροχλωρίδας του εντέρου και της μεταβολικής υγείας του ξενιστή. Το βουτυρικό οξύ ρυθμίζει το σωματικό βάρος, τη σύσταση του σώματος και την ομοιόσταση της γλυκόζης στον άνθρωπο [177]. Δεσμεύεται και μεταβολίζεται από ιστούς και κύτταρα του πεπτικού συστήματος και συμβάλει με ποικίλους τρόπους στις μεταβολικές διαδικασίες [177]. Συνοπτικά, το βουτυρικό είναι υπεύθυνο για την αύξηση του βάρους και την ανάπτυξη των οργανισμών. Το μονοπάτι του μεταβολισμού του βουτυρικού αποσιωπήθηκε μετά από την έκθεση σε όλες τις συγκεντρώσεις. Πιθανά να συνδέεται με την συνολική μεταβολική κατάρρευση των zebrafish που δεν παρουσιάζουν φυσιολογική ανάπτυξη υπό την παρουσία της 2,6-DCBQ-OH, έχουν σημαντικές μορφολογικές ανωμαλίες και οδηγούνται στο θάνατο.

4.2.1.4 Επιμήκυνση λιπαρών οξέων

Η επιμήκυνση των λιπαρών οξέων είναι ζωτικής σημασίας για την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Τα λιπαρά οξέα μακριάς αλυσίδας συμμετέχουν στην σύσταση των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών, επηρεάζουν την επικοινωνία μεταξύ των μεμβρανών και επηρεάζουν τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην μεταφορά, την μετάδοση σημάτων και σε πολλές ενζυμικές διαδικασίες [190]. Γίνεται αντιληπτό πόσο σημαντικό ρόλο διαδραματίζει ένα τέτοιο μονοπάτι μεταξύ άλλων στην επιβίωση, λειτουργία και ανάπτυξη ενός οργανισμού. Στην παρούσα περίπτωση το μονοπάτι αυτό αποσιωπήθηκε στα εκτεθειμένα άτομα σε όλες τις συγκεντρώσεις και εμφανίζεται μόνο στα άτομα ελέγχου.

4.2.1.5 Μεταβολισμός γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη αποτελεί βασικό αντιοξειδωτικό παράγοντα ο οποίος βοηθά στην εξουδετέρωση των ενεργών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και ευνοεί την αποκατάσταση της ισορροπίας οξειδωτικών παραγόντων στο zebrafish [191]. Ανήκει στις απαραίτητες για τον οργανισμό ουσίες που μπορεί να συνθέσει ο οργανισμός από τα αμινοξέα που την αποτελούν (γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη). Η σουλφυδρυλική ομάδα (-SH) της κυστεΐνης χρησιμεύει ως δότης πρωτονίων και είναι υπεύθυνη για τη βιολογική της δράση [137]. Πρωταρχικό καθήκον της, είναι να βοηθήσει τον οργανισμό να προστατευθεί από τις ελεύθερες ρίζες και όλες τις επιβλαβείς ουσίες, ενώ μπορεί να ανανεώνει και να διατηρεί όλα τα άλλα αντιοξειδωτικά του οργανισμού και είναι ζωτικής σημασίας για την υγεία του ήπατος [183], [184]. Η γλουταθειόνη παρέχει προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες, συμμετέχοντας απευθείας στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και των ενεργών μορφών του οξυγόνου ενώ συντηρεί και προσλαμβάνόμενα αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες C και E στις ανηγμένες (ενεργές) μορφές τους [137]. Μετά την έκθεση, ο μεταβολισμός της γλουταθειόνης εντοπίστηκε μόνο στα εκτεθειμένα άτομα και σε όλες τις συγκεντρώσεις. Αυτό μπορεί να σημαίνει πως η έκθεση στην 2,6-DCBQ-OH μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες οδηγώντας σε αναπτυξιακές, μορφολογικές και συμπεριφορικές ανωμαλίες.

4.2.1.6 Μεταβολισμός αλανίνης, ασπαρτικού και γλουταμικού

Στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεση του zebrafish, το σύνολο των αμινοξέων θεωρούνται απαραίτητα. Το γεγονός ότι αποσιωπήθηκε ο μεταβολισμός των σημαντικών αμινοξέων στα εκτεθειμένα άτομα σε όλες τις συγκεντρώσεις, οφείλεται πιθανότατα στην αδυναμία του οργανισμού να ανταποκριθεί ταυτόχρονα στην οργανογένεση και στην παρουσία της τοξικής ένωσης [176]. Έχοντας εξαντλήσει όλα τα αποθέματα αμινοξέων που διαθέτει και μη μπορώντας να εξασφαλίσει άλλα μέσω του λεκιθικού σάκου σταματά ο μεταβολισμός τους και προκαλούνται ανωμαλίες και τα άτομα αντιμετωπίζουν προβλήματα επιβίωσης [174].

4.2.1.7 Μεταβολισμός λινολεϊκού οξέος

Το λινολεϊκό οξύ ανήκει στα Ω-6 λιπαρά οξέα. Το λινολεϊκό οξύ συμβάλλει στην ανάπτυξη και λειτουργία των οστών, στην ρύθμιση του μεταβολισμού και στην καλή λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος στον άνθρωπο [192]. Το λινολεϊκό οξύ αποτελεί βασικό συστατικό του λεκιθικού σάκου στο zebrafish [193]. Μπορούμε να υποθέσουμε, λαμβάνοντας υπόψη πως το συγκεκριμένο μονοπάτι εντοπίστηκε μόνο στα άτομα ελέγχου και αποσιωπήθηκε στα εκτεθειμένα σε όλες τις συγκεντρώσεις, πως τα εκτεθειμένα άτομα βρίσκονται σε stress και δεν αξιοποιούν πόρους του λεκιθικού σάκου για την ανάπτυξη τους. Αυτό τα οδηγεί σε συνολική κατάρρευση και στις παρατηρούμενες διαταραχές που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 3.2.

4.2.1.8 Άλλες μεταβολικές αλλαγές

Μεταξύ άλλων παρατηρήθηκε πως στα εκτεθειμένα άτομα σε όλες τις συγκεντρώσεις ενεργοποιήθηκε το μονοπάτι της βιοσύνθεση της αργινίνης. Η βιοσύνθεση της αργινίνης οδηγεί στην παραγωγή ορνιθίνης [194]. Τα γλυκεροφωσfolιπίδια (των οποίων ο μεταβολισμός ενεργοποιείται επίσης στα εκτεθειμένα δείγματα) είναι συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης [187]. Τα γλυκεροφωσfolιπίδια ενισχύουν τη κυτταρική μεμβράνη. Άρα, τα κύτταρα ενεργοποιούν τα συγκεκριμένα μονοπάτια προκειμένου είτε να επιδιορθώσουν βλάβες στις κυτταρικές μεμβράνες (οι οποίες θα μπορούσαν να οφείλονται στο οξειδωτικό στρες) είτε να τις ενισχύσουν προκειμένου να μειωθεί η

διαπερατότητά τους και να ελαχιστοποιηθεί η εισροή της ένωσης στον ενδοκυττάριο χώρο [195].

Ανακεφαλαιώνοντάς, σε όλα τα εκτεθειμένα άτομα βρέθηκε η ενεργοποίηση του μονοπατιού του μεταβολισμού της γλουταθειόνης κάτι που αποδεικνύει πως η ουσία είναι ικανή να προκαλέσει οξειδωτικό στρες [191]. Επιπλέον, αποσιωπάται σε όλες τις συγκεντρώσεις το μονοπάτι του μεταβολισμού της β-αλανίνης, στο οποίο αποδίδονται οι συμπεριφορικές, κινητικές βλάβες και βλάβες στα αισθητήρια όργανα που εμφανίζουν τα άτομα [171], [172]. Ακόμα μέσω της αποσιώπησης γλυκεροφωσfolιπιδίων σε όλες τις συγκεντρώσεις υπάρχουν ενδείξεις πως η ουσία μπορεί να προκαλέσει ενδοκρινικές διαταραχές [173], [174]. Συμπληρωματικά, παρατηρήθηκε μία συνολική απορρύθμιση και μεταβολική κατάρρευση του οργανισμού. Σε όλα αυτά μπορούν να αποδοθούν, οι αναπτυξιακές, μορφολογικές, συμπεριφορικές και άλλες ανωμαλίες που περιγράφηκαν αναλυτικά.

Συμπερασματικά, σε αυτό το κεφάλαιο έγινε σύνδεση των παρατηρούμενων διαταραχών μετά από την έκθεση των ατόμων zebrafish στην 2,6-DCBQ-OH με τον μεταβολισμό των ατόμων. Συνδέθηκε ουσιαστικά ο παρατηρούμενος φαινότυπος με τον μεταβολισμό του οργανισμού. Με αυτόν τον τρόπο καλύφθηκε ένα πολύ σημαντικό κενό σε κάποιους από τους μηχανισμούς πρόκλησης διαταραχών και θνησιμότητας.

5. Τελικά συμπεράσματα

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή στόχος ήταν, να εξεταστούν οι διαταραχές που προέκυψαν μετά από την έκθεση σε επιλεγμένους χημικούς παράγοντες με τη χρήση ενός γνωστού οργανισμού μοντέλου (zebrafish). Οι χημικοί παράγοντες που επιλέχθηκαν καλύπτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά: (α) καταλήγουν στα υδάτινα οικοσυστήματα, β) άμεσα και έμμεσα έρχονται σε επαφή με οργανισμούς, γ) δεν έχουν μελετηθεί οι επιπτώσεις τους στους οργανισμούς. Θεωρούμε λοιπόν πως τα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης είναι ιδιαίτερα σημαντικά και μπορούν να συμβάλουν στην διατήρηση της καλής ποιότητας των υδάτων και την προστασίας της δημόσιας υγείας.

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας δεν έχουν προκύψει δεδομένα αναφορικά με τις επιπτώσεις των εξεταζόμενων ή συναφών χημικών παραγόντων. Επομένως τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι επίκαιρα και αποτελούν σημαντικό επιστημονικό τεκμήριο.

Αναφορικά με την κάλυψη των ειδικότερων στόχων, αποδείχθηκε πως η έκθεση στις νανοκουκκίδες άνθρακα (CNDs) οδηγεί σε χαμηλή τοξικότητα σε σχέση με τις νανοκουκκίδες βαρέων μετάλλων. Οι διαταραχές που προκλήθηκαν, μετά από την έκθεση των ατόμων zebrafish ήταν δόσοεξαρτώμενες. Παρατηρήθηκαν, μορφολογικές, αναπτυξιακές και συμπεριφορικές διαταραχές στα εκτεθειμένα άτομα zebrafish. Αυτό σημαίνει πως, παρόλες τις ιδιότητες που προσδίδονται στις νανοκουκκίδες άνθρακα (CNDs), οι οποίες τις καθιστούν ανερχόμενες, πολλά υποσχόμενες, φιλικές προς το περιβάλλον (καθώς παράγονται από πολύ απλά και αβλαβή υλικά) και λιγότερο τοξικές, πρέπει να χρησιμοποιούνται με συγκεκριμένους κανόνες. Ιδίως κατά την απελευθέρωση στα υδάτινα οικοσυστήματα η οποία θα γίνεται σε μεγάλο βαθμό στο μέλλον, θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα.

Όσο αφορά την αλογονοβενζοκινόνη (2,6-DCBQ-OH), οι επιπτώσεις ήταν πιο έντονες σε σχέση με τις νανοκουκκίδες άνθρακα (CNDs). Έχοντας υπόψη πως η 2,6-DCBQ-OH είναι μια ουσία που και εδώ και πολλά χρόνια απελευθερώνεται στο περιβάλλον τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ ανησυχητικά. Η τοξικότητα που βρέθηκε ήταν υψηλή και συνοδεύταν από μορφολογικές και αναπτυξιακές ανωμαλίες από τις πρώτες ώρες της

έκθεσης. Επιπλέον, κατά την διάρκεια της έκθεσης στην 2,6-DCBQ-OH, οι μορφολογικές αλλοιώσεις ήταν πιο έντονες σε σχέση με τα εκτεθειμένα άτομα στις CNDs. Εμφανείς ήταν και οι συμπεριφορικές διαταραχές. Η κινητικότητα μετά την έκθεση στην 2,6-DCBQ-OH, μειωνόταν σημαντικά σε σχέση με τα μη εκτεθειμένα άτομα. Ακόμα, οι μεταβολικές διαταραχές των ατόμων που εκτέθηκαν στην 2,6-DCBQ-OH αποδείχθηκαν πολύ σημαντικές και υπάρχουν ενδείξεις πως η 2,6-DCBQ-OH προκαλεί ενδοκρινικές διαταραχές.

Μελλοντικά, παρόλο που τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την παρούσα διδακτορική διατριβή είναι σημαντικά για τις επιπτώσεις των χημικών παραγόντων που εξετάστηκαν, θα πρέπει να μελετηθούν εις βάθος και σε μοριακό επίπεδο οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην πρόκληση όλων των διαταραχών που παρατηρήθηκαν.

Επιπλέον, στην παρούσα διδακτορική διατριβή, δεν έγινε χρήση του οργανισμού διεκπεραιωτικά, ως μέσο για την δοκιμή τοξικότητας χημικών παραγόντων. Πραγματοποιήθηκε, εξέταση των επιπτώσεων χημικών παραγόντων με επίκεντρο το zebrafish, το οποίο έχει το ρόλο του τελικού αποδέκτη στα υδάτινα οικοσυστήματα όπως το σύνολο των ιχθύων. Μέσω αυτής της προσέγγισης, προέκυψε μια ολοκληρωμένη μελέτη των επιπτώσεων σε επίπεδο οικοσυστήματος.

Τέλος, η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε (ευρωπαϊκό πρωτόκολλο εκτίμησης τοξικότητας στο zebrafish) αποτελεί ένα εργαλείο που δίνει ταχείς απαντήσεις σε ερωτήματα που έχουν να κάνουν με την τοξικότητα χημικών παραγόντων και ακολουθείται τα τελευταία 15 χρόνια. Σκοπός είναι, να προλαμβάνονται οι αρνητικές επιπτώσεις πριν γίνουν ορατές στα οικοσυστήματα. Οι συμπληρωματικές αναλύσεις που ακολουθήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή σε σχέση με το ευρωπαϊκό πρωτόκολλο εκτίμησης τοξικότητας στο zebrafish (μελέτη της λειτουργίας της καρδιάς, της συμπεριφοράς και του μεταβολισμού) μας δίνουν επιπλέον σημαντικές πληροφορίες για τις διαταραχές που προκαλούν χημικοί παράγοντες και αποδείχθηκε ότι συνδέονται με την τοξικότητα. Συνεπώς, θα μπορούσαν να αποτελέσουν συμπληρωματικά δεδομένα συνοδευτικά στο ευρωπαϊκό πρωτόκολλο και οδηγό για μελλοντικές μελέτες. Με αυτό τον τρόπο η επιστημονική κοινότητα θα μπορεί να προπορεύεται των εξελίξεων στην τεχνολογία και στην βιομηχανία. Όλα αυτά, είναι ύψιστης σημασίας, καθώς σήμερα η

ισορροπία μεταξύ ανθρώπου και περιβάλλοντος είναι πιο εύθραυστη από ποτέ με τις περιβαλλοντικές κρίσεις να κάνουν σε τακτά χρονικά διαστήματα την εμφάνιση τους.

6. Βιβλιογραφία

1. Maynard AD, Warheit DB, Philbert MA. The new toxicology of sophisticated materials: Nanotoxicology and beyond. *Toxicol Sci.* 2011, 120(SUPPL.1).
2. Stone V, Johnston HJ, Balharry D, Gernand JM, Gulumian M. Approaches to Develop Alternative Testing Strategies to Inform Human Health Risk Assessment of Nanomaterials. *Risk Anal.* Αύγουστος 2016, 36(8):1538–50.
3. Pattan G, Kaul G. Health hazards associated with nanomaterials. *Toxicol Ind Health.* 2014, 30(6):499–519.
4. Li J, Zhang H, Han Y, Chao H, Ma M, Yang M. Cytotoxicity and genotoxicity assays of halobenzoquinones disinfection byproducts using different human cell lines. *Environ Mol Mutagen.* 2020, 61(5):526–33.
5. Baker SN, Baker GA. Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights. *Angew Chemie Int Ed [Διαδίκτυο]*. 10 Σεπτέμβριος 2010, 49(38):6726–44. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1002/anie.200906623>
6. Chatzimitakos TG, Stalikas CD. Carbon nanodots from natural (re)sources: A new perspective on analytical chemistry [Διαδίκτυο]. *Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry: Modern Trends in Analysis.* Elsevier Inc., 2019. 3–28 σ. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816699-4.00001-3>
7. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases.* 2007, 2(4):MR17-R71.
8. Salata O V. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J Nanobiotechnology [Διαδίκτυο]*. 2004, 2(1):3. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-3>
9. Su SS, Chang I. Review of Production Routes of Nanomaterials. Στο 2018.
10. Bleeker EAJ, Cassee F, Re G, Jong WH, Heugens E, Koers-Jacquemijns M, Van de meent D, Oomen A, Popma J, Rietveld A, Wijnhoven S. Interpretation and implications of the European Commission Recommendation on the definition of nanomaterial. 2012. 43 σ.

11. Bashir S, Liu JL. Nanomaterials and Their Application [Διαδίκτυο]. Advanced Nanomaterials and Their Applications in Renewable Energy. Elsevier Inc., 2015. 1–50 σ. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801528-5.00001-4>
12. Schodek DL, Ferreira PJ, Ashby M. Nanomaterials, Nanotechnologies and Design : An Introduction for Engineers and Architects. Στο 2009.
13. Trotta F, Mele A. Nanomaterials: Classification and Properties [Διαδίκτυο]. Nanosponges. 2019. σ 1–26. (Wiley Online Books). Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1002/9783527341009.ch1>
14. Saleh TA. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. Environ Technol Innov [Διαδίκτυο]. 2020, 20:101067. Διαθέσιμο στο: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352186420313675>
15. Dolez P. Nanoengineering: Global Approaches to Health and Safety Issues. 2015. 1–706 σ.
16. Partha R, Conyers J. Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials. Int J Nanomedicine. 23 Νοέμβριος 2009, 4:261–75.
17. Wang J, Hu Z, Xu J, Zhao Y. Therapeutic applications of low-toxicity spherical nanocarbon materials. NPG Asia Mater. 7 Φεβρουάριος 2014, 6.
18. Grillo R, Rosa AH, Fraceto LF. Engineered nanoparticles and organic matter: A review of the state-of-the-art. Chemosphere [Διαδίκτυο]. 2015, 119:608–19. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.049>
19. Xiao L, Sun H. Novel properties and applications of carbon nanodots. Nanoscale Horizons. 2018, 3(6):565–97.
20. Yang ST, Wang X, Wang HF, Lu FS, Luo PJG, Cao L, Meziani MJ, Liu JH, Liu YF, Chen M, Huang YP, Sun YP. Carbon Dots as Nontoxic and High-Performance Fluorescence Imaging Agents. J Phys Chem C. 2009, 113(42):18110–4.
21. Crevillen AG, Escarpa A, García CD. Chapter 1: Carbon-based Nanomaterials in Analytical Chemistry. τ. 2019-Janua, RSC Detection Science. 2019. 1–36 σ.
22. Wicinski PN. Toxicity of intact and weathered nanomaterials to zebrafish. 2012,

23. Fard JK, Jafari S, Eghbal MA. A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. *Tabriz Univ Med Sci* [Διαδίκτυο]. 2015, 5(4):447–54. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.15171/apb.2015.061>
24. Lim SY, Shen W, Gao Z. Carbon quantum dots and their applications. *Chem Soc Rev* [Διαδίκτυο]. 2014, 44(1):362–81. Διαθέσιμο στο: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/cs/c4cs00269e>
25. Cayuela A, Soriano ML, Carrillo-Carrión C, Valcárcel M. Semiconductor and carbon-based fluorescent nanodots: The need for consistency. *Chem Commun*. 2016, 52(7):1311–26.
26. Wang Y, Hu A. Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications. *J Mater Chem C* [Διαδίκτυο]. 2014, 2(34):6921. Διαθέσιμο στο: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4TC00988F>
27. Ramanan V, Thiyagarajan SK, Raji K, Suresh R, Sekar R, Ramamurthy P. Outright green synthesis of fluorescent carbon dots from eutrophic algal blooms for in vitro imaging. *ACS Sustain Chem Eng*. 2016, 4(9):4724–31.
28. Yu M, Zhang X, Guo L, Tian H, Wang W, Ru S. Anti-estrogenic effect of semicarbazide in female zebrafish (*Danio rerio*) and its potential mechanisms. 2016, 170:262–70.
29. Plácido J, Bustamante-López S, Meissner KE, Kelly DE, Kelly SL. Microalgae biochar-derived carbon dots and their application in heavy metal sensing in aqueous systems. *Sci Total Environ* [Διαδίκτυο]. 2019, 656:531–9. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.393>
30. Zhang J, Liu X, Zhou J, Huang X, Xie D, Ni J, Ni C. Carbon dots derived from algae as H₂O₂ sensors: The importance of nutrients in biomass. *Nanoscale Adv*. 2019, 1(6):2151–6.
31. Shi X, Wei W, Fu Z, Gao W, Zhang C, Zhao Q, Deng F, Lu X. Review on carbon dots in food safety applications. *Talanta* [Διαδίκτυο]. 2019, 194:809–21. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.005>
32. Wang Y, Hu A. Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications. *J Mater*

- Chem C [Διαδίκτυο]. 2014, 2(34):6921–39. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1039/C4TC00988F>
33. Ghosal K, Ghosh A. Carbon dots: The next generation platform for biomedical applications. *Mater Sci Eng C* [Διαδίκτυο]. 2019, 96:887–903. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.060>
 34. Sun YP, Zhou B, Lin Y, Wang W, Fernando KAS, Pathak P, Meziani MJ, Harruff BA, Wang X, Wang H, Luo PG, Yang H, Kose ME, Chen B, Veca LM, Xie SY. Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *J Am Chem Soc*. 2006, 128(24):7756–7.
 35. Ding C, Zhu A, Tian Y. 20.Functional Surface Engineering of C-Dots.pdf. 2014, 47(1).
 36. Choi Y, Kim S, Choi MH, Ryoo SR, Park J, Min DH, Kim BS. Highly biocompatible carbon nanodots for simultaneous bioimaging and targeted photodynamic therapy in vitro and in vivo. *Adv Funct Mater*. 2014, 24(37):5781–9.
 37. Bhunia SK, Saha A, Maity AR, Ray SC, Jana NR. Carbon nanoparticle-based fluorescent bioimaging probes. *Sci Rep*. 2013, 3.
 38. Shang W, Zhang X, Zhang M, Fan Z, Sun Y, Han M, Fan L. The uptake mechanism and biocompatibility of graphene quantum dots with human neural stem cells. *Nanoscale*. 2014, 6(11):5799–806.
 39. Wang L, Wang Y, Xu T, Liao H, Yao C, Liu Y, Li Z, Chen Z, Pan D, Sun L, Wu M. Gram-scale synthesis of single-crystalline graphene quantum dots with superior optical properties. *Nat Commun* [Διαδίκτυο]. 2014, 5:1–9. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6357>
 40. Zhang X, Wang S, Xu L, Feng L, Ji Y, Tao L, Li S, Wei Y. Biocompatible polydopamine fluorescent organic nanoparticles: Facile preparation and cell imaging. *Nanoscale*. 2012, 4(18):5581–4.
 41. Vedamalai M, Periasamy AP, Wang CW, Tseng YT, Ho LC, Shih CC, Chang HT. Carbon nanodots prepared from o-phenylenediamine for sensing of Cu²⁺ ions in cells. *Nanoscale*. 2014, 6(21):13119–25.

42. Xu Y, Wu M, Liu Y, Feng XZ, Yin XB, He XW, Zhang YK. Nitrogen-doped carbon dots: A facile and general preparation method, photoluminescence investigation, and imaging applications. *Chem - A Eur J*. 2013, 19(7):2276–83.
43. Tuerhong M, XU Y, YIN XB. Review on Carbon Dots and Their Applications. *Chinese J Anal Chem* [Διαδίκτυο]. 2017, 45(1):139–50. Διαθέσιμο στο: [http://dx.doi.org/10.1016/S1872-2040\(16\)60990-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1872-2040(16)60990-8)
44. Gerhard GS, Kauffman EJ, Wang X, Stewart R, Moore JL, Kasales CJ, Demidenko E, Cheng KC. Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Exp Gerontol*. 2002, 37(8–9):1055–68.
45. Kang YF, Li YH, Fang YW, Xu Y, Wei XM, Yin XB. Carbon Quantum Dots for Zebrafish Fluorescence Imaging. *Sci Rep* [Διαδίκτυο]. 2015, 5(April):11835. Διαθέσιμο στο: <http://www.nature.com/srep/2015/150702/srep11835/full/srep11835.html>
46. Xu M, Wang L V. Photoacoustic imaging in biomedicine. *Rev Sci Instrum*. 2006, 77(4).
47. Farshbaf M, Davaran S, Rahimi F, Annabi N, Salehi R, Akbarzadeh A. Carbon quantum dots: recent progresses on synthesis, surface modification and applications. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol* [Διαδίκτυο]. 2018, 46(7):1331–48. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1377725>
48. Tang J, Kong B, Wu H, Xu M, Wang Y, Wang Y, Zhao D, Zheng G. Carbon nanodots featuring efficient FRET for real-time monitoring of drug delivery and two-photon imaging. *Adv Mater*. 2013, 25(45):6569–74.
49. Wang H, Liu C, Liu Z, Ren J, Qu X. Specific Oxygenated Groups Enriched Graphene Quantum Dots as Highly Efficient Enzyme Mimics. *Small*. 2018, 14(13):1–8.
50. Jian HJ, Wu RS, Lin TY, Li YJ, Lin HJ, Harroun SG, Lai JY, Huang CC. Super-Cationic Carbon Quantum Dots Synthesized from Spermidine as an Eye Drop Formulation for Topical Treatment of Bacterial Keratitis. *ACS Nano*. 2017, 11(7):6703–16.
51. Li X, Robinson SM, Gupta A, Saha K, Jiang Z, Moyano DF, Sahar A, Riley MA, Rotello VM. Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria. *ACS Nano*. 2014, 8(10):10682–6.

52. Liu C, Zhang P, Zhai X, Tian F, Li W, Yang J, Liu Y, Wang H, Wang W, Liu W. Nano-carrier for gene delivery and bioimaging based on carbon dots with PEI-passivation enhanced fluorescence. *Biomaterials* [Διαδίκτυο]. 2012, 33(13):3604–13. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.052>
53. Rosenholm JM, Sahlgren C, Lindén M. Towards multifunctional, targeted drug delivery systems using mesoporous silica nanoparticles - Opportunities & challenges. *Nanoscale*. 2010, 2(10):1870–83.
54. Zhou L, Chen Z, Dong K, Yin M, Ren J, Qu X. DNA-mediated biomineralization of rare-earth nanoparticles for simultaneous imaging and stimuli-responsive drug delivery. *Biomaterials* [Διαδίκτυο]. 2014, 35(30):8694–702. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.034>
55. Devi P, Saini S, Kim KH. The advanced role of carbon quantum dots in nanomedical applications. *Biosens Bioelectron* [Διαδίκτυο]. 2019, 141(December 2018):111158. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.02.059>
56. Zheng M, Liu S, Li J, Qu D, Zhao H, Guan X, Hu X, Xie Z, Jing X, Sun Z. Integrating oxaliplatin with highly luminescent carbon dots: An unprecedented theranostic agent for personalized medicine. *Adv Mater*. 2014, 26(21):3554–60.
57. Boakye-Yiadom KO, Kesse S, Opoku-Damoah Y, Filli MS, Aquib M, Joelle MMB, Farooq MA, Mavlyanova R, Raza F, Bavi R, Wang B. Carbon dots: Applications in bioimaging and theranostics. *Int J Pharm*. 2019, 564(March):308–17.
58. Yang C, Thomsen RP, Ogaki R, Kjems J, Teo BM. Ultrastable green fluorescence carbon dots with a high quantum yield for bioimaging and use as theranostic carriers. *J Mater Chem B*. 2015, 3(22):4577–84.
59. Zhang M, Zhao X, Fang Z, Niu Y, Lou J, Wu Y, Zou S, Xia S, Sun M, Du F. Fabrication of HA/PEI-functionalized carbon dots for tumor targeting, intracellular imaging and gene delivery. *RSC Adv*. 2017, 7(6):3369–75.
60. Kabir E, Kumar V, Kim KH, Yip ACK, Sohn JR. Environmental impacts of nanomaterials. *J Environ Manage* [Διαδίκτυο]. 2018, 225(May):261–71. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.087>

61. Joris F, Manshian BB, Peynshaert K, De Smedt SC, Braeckmans K, Soenen SJ. Assessing nanoparticle toxicity in cell-based assays: Influence of cell culture parameters and optimized models for bridging the in vitro-in vivo gap. *Chem Soc Rev*. 2013, 42(21):8339–59.
62. Madannejad R, Shoaie N, Jahanpeyma F, Darvishi MH, Azimzadeh M, Javadi H. Toxicity of carbon-based nanomaterials: Reviewing recent reports in medical and biological systems. *Chem Biol Interact* [Διαδίκτυο]. 2019, 307(January):206–22. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.04.036>
63. Zhu Y, Liu X, Hu Y, Wang R, Chen M, Wu J, Wang Y, Kang S, Sun Y, Zhu M. Behavior, remediation effect and toxicity of nanomaterials in water environments. *Environ Res* [Διαδίκτυο]. 2019, 174(November 2018):54–60. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.04.014>
64. Schirizzi GF, Pérez-Pomeda I, Sanchís J, Rossini C, Farré M, Barceló D. Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environ Res* [Διαδίκτυο]. 2017, 159(August):579–87. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.043>
65. Hill RL. A Bibliography of the Anglo-Egyptian Sudan: From the Earliest Times to 1937 [Διαδίκτυο]. Oxford University Press, H. Milford, 1939. Διαθέσιμο στο: <https://books.google.gr/books?id=OXAZAAAAMAAJ>
66. John AC, Küpper M, Manders-Groot AMM, Debray B, Lacombe JM, Kuhlbusch TAJ. Emissions and possible environmental Implication of engineered nanomaterials (ENMs) in the atmosphere. *Atmosphere (Basel)*. 2017, 8(5):1–29.
67. Sidhu JS, Singh A, Garg N, Kaur N, Singh N. Carbon dots as analytical tools for sensing of thioredoxin reductase and screening of cancer cells. *Analyst*. 2018, 143(8):1853–61.
68. Mitrano DM, Motellier S, Clavaguera S, Nowack B. Review of nanomaterial aging and transformations through the life cycle of nano-enhanced products. *Environ Int* [Διαδίκτυο]. 2015, 77:132–47. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.01.013>

69. Ge Y, Schimel JP, Holden PA. Evidence for negative effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities. *Environ Sci Technol*. 2011, 45(4):1659–64.
70. Vale G, Mehennaoui K, Cambier S, Libralato G, Jomini S, Domingos RF. Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview. *Aquat Toxicol*. 2016, 170:162–74.
71. Rocha TL, Gomes T, Sousa VS, Mestre NC, Bebianno MJ. Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs: An overview. *Mar Environ Res* [Διαδίκτυο]. 2015, 111:74–88. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.013>
72. Baker TJ, Tyler CR, Galloway TS. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environ Pollut* [Διαδίκτυο]. 2014, 186:257–71. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.014>
73. Gao M, Zhang Z, Lv M, Song W, Lv Y. Toxic effects of nanomaterial-adsorbed cadmium on *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf* [Διαδίκτυο]. 2018, 148(399):261–8. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.038>
74. Kwok KW, Leung KM, Flahaut E, Cheng J, Cheng SH. Chronic toxicity of double-walled carbon nanotubes to three marine organisms: Influence of different dispersion methods. *Nanomedicine*. 2010, 5(6):951–61.
75. Binderup ML, Bredsdorff L, Beltoft VM, Mortensen A, Löschner K, Larsen EH, Erikse FD. Systemic Absorption of Nanomaterials by Oral Exposure. 2013. σ 98.
76. Mallapragada G, Chandukala SR, Liu Q. Exploring the effects of ‘what’ (product) and ‘where’ (website) characteristics on online shopping behavior. *J Mark*. 2016, 80(2):21–38.
77. Mackevica A, Foss Hansen S. Release of nanomaterials from solid nanocomposites and consumer exposure assessment – A forward-looking review. *Nanotoxicology*. 2016, 10(6):641–53.
78. Sly PD, Schüepp K. Nanoparticles and Children’s Lungs: Is there a need for caution?

- Paediatr Respir Rev. 2012, 13(2):71–2.
79. Meldrum K, Guo C, Marczylo EL, Gant TW, Smith R, Leonard MO. Mechanistic insight into the impact of nanomaterials on asthma and allergic airway disease. Part Fibre Toxicol. 2017, 14(1):1–35.
 80. Becker H, Herzberg F, Schulte A, Kolossa-Gehring M. The carcinogenic potential of nanomaterials, their release from products and options for regulating them. Int J Hyg Environ Health [Διαδίκτυο]. 2011, 214(3):231–8. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.11.004>
 81. Centers for Disease Control and Prevention. Disinfection By-Products and the Safe Water System. 2002, 1900. Διαθέσιμο στο: <http://www.cdc.gov/safewater/chlorination-byproducts.html>
 82. Pasteur L. The History of Drinking Water Treatment. Public Health [Διαδίκτυο]. 2000, 40(4606):1–4. Διαθέσιμο στο: <http://www.epa.gov/ogwdw000/consumer/pdf/hist.pdf>
 83. WHO. Disinfectants and Disinfection By-Products. WHO Semin Pack Drink - Water Qual [Διαδίκτυο]. 1978, 27. Διαθέσιμο στο: https://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKewjDnbHn7avJAhVHOxoKHQBADZ8QFgggMAA&url=http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/S04.pdf&usq=AFQjCNHpRHqpraJ28SurxytFA9kEaxhz-w
 84. WHO. Guidelines for drinking-water quality, Fourth Edition incorporating the first and second addenda, World Health Organization (WHO) 2022, Geneva, Switzerland. τ. 33. 2022. 1–614 σ.
 85. Prochazka E, Escher BI, Plewa MJ, Leusch FDL. In Vitro Cytotoxicity and Adaptive Stress Responses to Selected Haloacetic Acid and Halobenzoquinone Water Disinfection Byproducts. Chem Res Toxicol. 2015, 28(10):2059–68.
 86. Li J, Moe B, Vemula S, Wang W, Li XF. Emerging Disinfection Byproducts, Halobenzoquinones: Effects of Isomeric Structure and Halogen Substitution on Cytotoxicity, Formation of Reactive Oxygen Species, and Genotoxicity. Environ Sci Technol [Διαδίκτυο]. 2016, acs.est.5b05585. Διαθέσιμο στο:

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.5b05585>

87. Hung S. Evaluating the Toxicity and Formation of Halobenzoquinones in Point-of-Use Chlorinated Drinking Water. 2018, (October).
88. Wu H, Long K, Sha Y, Lu D, Xia Y, Mo Y, Yang Q, Zheng W, Yang M, Wei X. Occurrence and toxicity of halobenzoquinones as drinking water disinfection byproducts. *Sci Total Environ*. 21 Ιανουάριος 2021, 770:145277.
89. Qin F, Zhao YY, Zhao Y, Boyd JM, Zhou W, Li XF. A Toxic Disinfection By-product, 2,6-Dichloro-1,4-benzoquinone, Identified in Drinking Water. *Angew Chemie Int Ed [Διαδίκτυο]*. 18 Ιανουάριος 2010, 49(4):790–2. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1002/anie.200904934>
90. Zhao Y, Qin F, Boyd JM, Anichina J, Li XF. Characterization and determination of chloro- and bromo-benzoquinones as new chlorination disinfection byproducts in drinking water. *Anal Chem*. Ιούνιος 2010, 82(11):4599–605.
91. Wang W, Qian Y, Boyd JM, Wu M, Hrudey SE, Li XF. Halobenzoquinones in swimming pool waters and their formation from personal care products. *Environ Sci Technol*. 2013, 47(7):3275–82.
92. Li J, Wang W, Moe B, Wang H, Li XF. Chemical and toxicological characterization of halobenzoquinones, an emerging class of disinfection byproducts. *Chem Res Toxicol*. 2015, 28(3):306–18.
93. Du H, Li J, Moe B, McGuigan CF, Shen S, Li XF. Cytotoxicity and oxidative damage induced by halobenzoquinones to T24 bladder cancer cells. *Environ Sci Technol*. Μάρτιος 2013, 47(6):2823–30.
94. Hung S, Mohan A, Reckhow DA, Godri Pollitt KJ. Assessment of the in vitro toxicity of the disinfection byproduct 2,6-dichloro-1,4-benzoquinone and its transformed derivatives. *Chemosphere [Διαδίκτυο]*. 2019, 234:902–8. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.086>
95. Zhao Y, Anichina J, Lu X, Bull RJ, Krasner SW, Hrudey SE, Li XF. Occurrence and formation of chloro- and bromo-benzoquinones during drinking water disinfection.

- Water Res [Διαδίκτυο]. 2012, 46(14):4351–60. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.05.032>
96. Teo TLL, Coleman HM, Khan SJ. Chemical contaminants in swimming pools: Occurrence, implications and control. *Environ Int* [Διαδίκτυο]. 2015, 76:16–31. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.11.012>
 97. Talwar P., Jhingran AG. *Inland Fishes of India and Adjacent Countries* [Διαδίκτυο]. τ. 1, *Reviews in Fish Biology and Fisheries* volume. 1992. 135–136 σ. Διαθέσιμο στο: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24324122>
 98. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev* [Διαδίκτυο]. 2008, 83(1):13–34. Διαθέσιμο στο: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18093234 <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x/asset/j.1469-185X.2007.00030.x.pdf?v=1&t=gzie1u8h&s=0a780dc45692a9a4e938b3d2c6621c>
 99. Lawrence C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*. 2007, 269(1–4):1–20.
 100. Spence R, Fatema MK, Reichard M, Huq KA, Wahab MA, Ahmed ZF, Smith C. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *J Fish Biol*. 2006, 69(5):1435–48.
 101. Parichy DM. Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. *Elife*. 2015, 4:1–11.
 102. McClure MM, McIntyre PB, McCune AR. Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *J Fish Biol*. 2006, 69(2):553–70.
 103. Breder CM, Rosen DE. *Modes of reproduction in fishes*. Neptune City, N.J.: Distributed by T.F.H. Publications, 1966.
 104. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* [Διαδίκτυο]. 1995, 203(3):253–310.

Διαθέσιμο στο: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8589427>

105. Laale HW. The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. *J Fish Biol* [Διαδίκτυο]. 1 Φεβρουάριος 1977, 10(2):121–73. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1977.tb04049.x>
106. Haffter P, Odenthal J, Mullins MC, Lin S, Farrell MJ, Vogelsang E, Haas F, Brand M, van Eeden FJM, Furutani-Seiki M, Granato M, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Kelsh RN, Hopkins N, Nüsslein-Volhard C. Mutations affecting pigmentation and shape of the adult zebrafish. *Dev Genes Evol* [Διαδίκτυο]. 1996, 206(4):260–76. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1007/s004270050051>
107. D’Costa A, Shepherd IT. Zebrafish Development and Genetics: Introducing Undergraduates to Developmental Biology and Genetics in a Large Introductory Laboratory Class. *Zebrafish* [Διαδίκτυο]. 1 Ιούνιος 2009, 6(2):169–77. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1089/zeb.2008.0562>
108. Hollert H, Keiter SH. *Danio rerio* as a model in aquatic toxicology and sediment research. *Environ Sci Pollut Res*. 2015, 22(21):16243–6.
109. Aleström P, D’Angelo L, Midtlyng PJ, Schorderet DF, Schulte-Merker S, Sohm F, Warner S. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. *Lab Anim* [Διαδίκτυο]. 11 Σεπτέμβριος 2019, 54(3):213–24. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1177/0023677219869037>
110. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*. 2007, 8(5):353–67.
111. Nüsslein-Volhard C, Dahm R. Zebrafish: A Practical Approach. *B D Hames, Pract Approach Ser*. 1 Ιανουάριος 2001, xviii.
112. Langheinrich U. Zebrafish: A new model on the pharmaceutical catwalk. *BioEssays* [Διαδίκτυο]. 1 Σεπτέμβριος 2003, 25(9):904–12. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1002/bies.10326>
113. Scholz S, Fischer S, Gündel U, Küster E, Luckenbach T, Voelker D. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - Applications beyond acute toxicity

- testing. *Environ Sci Pollut Res*. 2008, 15(5):394–404.
114. Santoriello C, Zon LI. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *J Clin Invest* [Διαδίκτυο]. 2 Ιούλιος 2012, 122(7):2337–43. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1172/JCI60434>
 115. Lam SH, Hlaing MM, Zhang X, Yan C, Duan Z, Zhu L, Ung CY, Mathavan S, Ong CN, Gong Z. Toxicogenomic and Phenotypic Analyses of Bisphenol-A Early-Life Exposure Toxicity in Zebrafish. *PLoS One* [Διαδίκτυο]. 14 Δεκέμβριος 2011, 6(12):e28273. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028273>
 116. Calow P. Ecotoxicology: What are we trying to protect? *Environ Toxicol Chem* [Διαδίκτυο]. 1 Οκτώβριος 1994, 13(10):1549. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1002/etc.5620131001>
 117. Costa BPD, Moura LA, Pinto SAG, Lima-Maximino M, Maximino C. Zebrafish models in neural and behavioral toxicology across the life stages. *Fishes*. 2020, 5(3):1–14.
 118. Örn S. The Zebrafish as a Model Organism for Evaluation of Endocrine Disrupters. 2006. 1–39 σ.
 119. Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicol Sci* [Διαδίκτυο]. 1 Ιούλιος 2005, 86(1):6–19. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>
 120. Lin CY, Chiang CY, Tsai HJ. Zebrafish and Medaka: new model organisms for modern biomedical research. *J Biomed Sci* [Διαδίκτυο]. 2016, 1–11. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1186/s12929-016-0236-5>
 121. OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. *OECD Guidel Test Chem Sect 2, OECD Publ* [Διαδίκτυο]. 2013, (July):1–22. Διαθέσιμο στο: <http://www.oecd-ilibrary.org>
 122. Harisson SJ, Bradshaw RA, Stahl P. *Metabolomics in Cell Biology*. Στο: *Cell Biology*. Waltham, 2016. σ 199–210.
 123. Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol*.

Μάιος 2004, 22(5):245–52.

124. Xu YJ, Wang C, Ho WE, Ong CN. Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2014, 56(Complete):37–48.
125. Nagana Gowda GA, Raftery D. Recent advances in NMR-based metabolomics. *Anal Chem.* 2017, 89(1):490–510.
126. Sotelo J, Slupsky CM. Metabolomics using nuclear magnetic resonance (NMR). *Metabolomics Food Nutr.* 2013, 29–43.
127. Djukovic D, Nagana Gowda GA, Raftery D. Mass Spectrometry and NMR Spectroscopy-Based Quantitative Metabolomics. *Proteomic Metabolomic Approaches to Biomark Discov.* 2013, 279–97.
128. Ye YF, Zhang LM, An YP, Hao FH, Tang HR. Nuclear magnetic resonance for analysis of metabolite composition of *Escherichia coli*. *Fenxi Huaxue/ Chinese J Anal Chem.* 2011, 39(8):1186–94.
129. Guo AC, Jewison T, Wilson M, Liu Y, Knox C, Djoumbou Y, Lo P, Mandal R, Krishnamurthy R, Wishart DS. ECMDB: The *E. coli* Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* 2013, 41(D1).
130. Xia J, Sinelnikov I V., Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res.* 2015, 43(W1):W251–7.
131. Daviss B. Growing Pains for Metabolomics. *Scientist.* 25 Απρίλιος 2005, 19:25–8.
132. Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic Phenotyping in Health and Disease. *Cell* [Διαδίκτυο]. 2008, 134(5):714–7. Διαθέσιμο στο: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867408010714>
133. Robertson DG. Metabonomics in Toxicology: A Review. *Toxicol Sci* [Διαδίκτυο]. 1 Ιούλιος 2005, 85(2):809–22. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi102>
134. Jordan KW, Nordenstam J, Lauwers GY, Rothenberger DA, Alavi K, Garwood M, Cheng LL. Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy. *Dis Colon Rectum* [Διαδίκτυο].

- Μάρτιος 2009, 52(3):520–5. Διαθέσιμο στο:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19333056>
135. Trivedi DK, Hollywood KA, Goodacre R. Metabolomics for the masses: The future of metabolomics in a personalized world. *New horizons Transl Med* [Διαδίκτυο]. Μάρτιος 2017, 3(6):294–305. Διαθέσιμο στο:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29094062>
136. Laíns I, Gantner M, Murinello S, Lasky-Su JA, Miller JW, Friedlander M, Husain D. Metabolomics in the study of retinal health and disease. *Prog Retin Eye Res* [Διαδίκτυο]. 2019, 69:57–79. Διαθέσιμο στο:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350946218300211>
137. Morello J, Derks RJE, Lopes SS, Steenvoorden E, Monteiro EC, Mayboroda OA, Pereira SA. Zebrafish Larvae Are a Suitable Model to Investigate the Metabolic Phenotype of Drug-Induced Renal Tubular Injury. *Front Pharmacol*. 2018, 9:1193.
138. Bouhifd M, Hartung T, Hogberg HT, Kleensang A, Zhao L. Review: toxicometabolomics. *J Appl Toxicol*. Δεκέμβριος 2013, 33(12):1365–83.
139. van der Werf MJ, Overkamp KM, Muilwijk B, Coulier L, Hankemeier T. Microbial metabolomics: toward a platform with full metabolome coverage. *Anal Biochem*. Νοέμβριος 2007, 370(1):17–25.
140. Xu YJ, Wang C, Ho WE, Ong CN. Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations. *TrAC - Trends Anal Chem* [Διαδίκτυο]. 2014, 56:37–48. Διαθέσιμο στο:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.009>
141. E3 medium (for zebrafish embryos). *Cold Spring Harb Protoc* [Διαδίκτυο]. 1 Οκτώβριος 2011, 2011(10):pdb.rec66449. Διαθέσιμο στο:
<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2011/10/pdb.rec66449.short>
142. Bonsignorio D, Perego L, Giacco L Del, Cotelli F. Structure and macromolecular composition of the zebrafish egg chorion. *Zygote* [Διαδίκτυο]. 2008/09/26. 1996, 4(2):101–8. Διαθέσιμο στο: <https://www.cambridge.org/core/article/structure-and-macromolecular-composition-of-the-zebrafish-egg->

chorion/24CCC099B984C4259C6BA74310ABFC4A

143. Henn K, Braunbeck T. Dechoriation as a tool to improve the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 31 Ιανουάριος 2011, 153:91–8.
144. Creton R. The calcium pump of the endoplasmic reticulum plays a role in midline signaling during early zebrafish development. *Dev Brain Res* [Διαδίκτυο]. 2004, 151(1):33–41. Διαθέσιμο στο: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165380604001063>
145. Commission E. OECD, 2013a. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. τ. 1–34, EUR – Scientific and Technical Research series. 2014.
146. Wang W, Qian Y, Li J, Moe B, Huang R, Zhang H, Hrudehy SE, Li XF. Analytical and toxicity characterization of halo-hydroxyl-benzoquinones as stable halobenzoquinone disinfection byproducts in treated water. *Anal Chem*. 2014, 86(10):4982–8.
147. BLIGH EG, DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959, 37(8):911–7.
148. Nezhad-Mokhtari P, Aرسالani N, Ghorbani M, Hamishehkar H. Development of biocompatible fluorescent gelatin nanocarriers for cell imaging and anticancer drug targeting. *J Mater Sci* [Διαδίκτυο]. 2018, 53(15):10679–91. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1007/s10853-018-2371-8>
149. Mukherjee S, Prasad E, Chadha A. H-Bonding controls the emission properties of functionalized carbon nano-dots. *Phys Chem Chem Phys*. 2017, 19(10):7288–96.
150. Dong Y, Pang H, Yang H Bin, Guo C, Shao J, Chi Y, Li CM, Yu T. Carbon-based dots co-doped with nitrogen and sulfur for high quantum yield and excitation-independent emission. *Angew Chemie - Int Ed*. 2013, 52(30):7800–4.
151. Lu YC, Chen J, Wang AJ, Bao N, Feng JJ, Wang W, Shao L. Facile synthesis of oxygen and sulfur co-doped graphitic carbon nitride fluorescent quantum dots and their

- application for mercury(ii) detection and bioimaging. *J Mater Chem C*. 2015, 3(1):73–8.
152. Pitt JA, Kozal JS, Jayasundara N, Massarsky A, Trevisan R, Geitner N, Wiesner M, Levin ED, Di Giulio RT. Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol*. 2018, 194(November):185–94.
 153. Ahmad F, Noldus LPJJ, Tegelenbosch RAJ, Richardson MK. Zebrafish embryos and larvae in behavioural assays. *Behaviour*. 2012, 149(10–12):1241–81.
 154. Crosby EB, Bailey JM, Oliveri AN, Levin ED. Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol*. 2015, 49:81–90.
 155. Tzima E, Serifi I, Tsikari I, Alzualde A, Leonardos I, Papamarcaki T. Transcriptional and behavioral responses of zebrafish larvae to microcystin-LR exposure. *Int J Mol Sci*. 2017, 18(2).
 156. Duan J, Yu Y, Shi H, Tian L, Guo C, Huang P, Zhou X, Peng S, Sun Z. Toxic Effects of Silica Nanoparticles on Zebrafish Embryos and Larvae. *PLoS One*. 2013, 8(9):4–12.
 157. Zhang W, Lin K, Miao Y, Dong Q, Huang C, Wang H, Guo M, Cui X. Toxicity assessment of zebrafish following exposure to CdTe QDs. *J Hazard Mater [Διαδίκτυο]*. 2012, 213–214:413–20. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.02.014>
 158. Singleman C, Holtzman NG. Growth and maturation in the zebrafish, *Danio Rerio*: A staging tool for teaching and research. *Zebrafish*. 2014, 11(4):396–406.
 159. Wang ZG, Zhou R, Jiang D, Song JE, Xu Q, Si J, Chen YP, Zhou X, Gan L, Li JZ, Zhang H, Liu B. Toxicity of graphene quantum dots in zebrafish embryo. *Biomed Environ Sci*. 2015, 28(5):341–51.
 160. Ji Z, Yin Z, Jia Z, Wei J. Carbon Nanodots Derived from Urea and Citric Acid in Living Cells: Cellular Uptake and Antioxidation Effect. *Langmuir*. 2020, 36(29):8632–40.
 161. Bailey J, Oliveri A, Levin ED. Zebrafish model systems for developmental neurobehavioral toxicology. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev*. 2013, 99(1):14–23.

162. Noyes PD, Haggard DE, Gonnerman GD, Tanguay RL. Advanced morphological - behavioral test platform reveals neurodevelopmental defects in embryonic zebrafish exposed to comprehensive suite of halogenated and organophosphate flame retardants. *Toxicol Sci.* 2015, 145(1):177–95.
163. Maximino C, de Brito TM, da Silva Batista AW, Herculano AM, Morato S, Gouveia A. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. τ. 214, *Behavioural Brain Research.* 2010. σ 157–71.
164. Maximino C, da Silva AWB, Gouveia A, Herculano AM. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* [Διαδίκτυο]. 2011, 35(2):624–31. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.01.006>
165. Kane AS, Salierno JD, Gipson GT, Molteno TCA, Hunter C. A video-based movement analysis system to quantify behavioral stress responses of fish. *Water Res.* 2004, 38(18):3993–4001.
166. Sun HJ, Zhang Y, Zhang JY, Lin H, Chen J, Hong H. The toxicity of 2,6-dichlorobenzoquinone on the early life stage of zebrafish: A survey on the endpoints at developmental toxicity, oxidative stress, genotoxicity and cytotoxicity. *Environ Pollut* [Διαδίκτυο]. 2019, 245(March):719–24. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.051>
167. Wang C, Yang X, Zheng Q, Moe B, Li XF. Halobenzoquinone-Induced Developmental Toxicity, Oxidative Stress, and Apoptosis in Zebrafish Embryos. *Environ Sci Technol.* 2018, 52(18):10590–8.
168. Sun HJ, Xiang P, Tang MH, Sun L, Ma LQ. Arsenic impacted the development, thyroid hormone and gene transcription of thyroid hormone receptors in bighead carp larvae (*Hypophthalmichthys nobilis*). *J Hazard Mater.* Φεβρουάριος 2016, 303:76–82.
169. Lou J, Wang W, Zhu L. Occurrence, Formation, and Oxidative Stress of Emerging Disinfection Byproducts, Halobenzoquinones, in Tea. *Environ Sci Technol.* 2019, 53(20):11860–8.

170. Bakkers J. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc Res*. 2011, 91(2):279–88.
171. Salman HE, Yalcin HC. Advanced blood flow assessment in Zebrafish via experimental digital particle image velocimetry and computational fluid dynamics modeling. *Micron*. 2020, 130(September 2019).
172. Yalcin HC, Amindari A, Butcher JT, Althani A, Yacoub M. Heart function and hemodynamic analysis for zebrafish embryos. *Dev Dyn*. 2017, 246(11):868–80.
173. Chen JN, Haffter P, Odenthal J, Vogelsang E, Brand M, van Eeden FJ, Furutani-Seiki M, Granato M, Hammerschmidt M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Nüsslein-Volhard C. Mutations affecting the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish. *Development*. Δεκέμβριος 1996, 123:293–302.
174. Chousidis I, Chatzimitakos T, Leonardos D, Filiou MD, Stalikas CD, Leonardos ID. Cannabinol in the spotlight: Toxicometabolomic study and behavioral analysis of zebrafish embryos exposed to the unknown cannabinoid. *Chemosphere*. 2020, 252.
175. Chousidis I, Stalikas CD, Leonardos ID. Induced toxicity in early-life stage zebrafish (*Danio rerio*) and its behavioral analysis after exposure to non-doped, nitrogen-doped and nitrogen, sulfur-co doped carbon quantum dots. *Environ Toxicol Pharmacol* [Διαδίκτυο]. 2020, 79:103426. Διαθέσιμο στο: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668920301022>
176. Chatzimitakos TG, Pliatsika C, Chousidis I, Leonardos ID, Stalikas CD. Metabolomic profiling unveils the impact of non-doped and heteroatom-doped carbon nanodots on zebrafish (*Danio Rerio*) embryos. *Nanomaterials*. 2021, 11(2).
177. Zhang L, Liu C, Jiang Q, Yin Y. Butyrate in Energy Metabolism: There Is Still More to Learn. *Trends Endocrinol Metab* [Διαδίκτυο]. 2021, 32(3):159–69. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.12.003>
178. Costa B, Ferreira S, Póvoa V, Cardoso MJ, Vieira S, Stroom J, Fidalgo P, Rio-Tinto R, Figueiredo N, Parés O, Greco C, Ferreira MG, Fior R. Developments in zebrafish avatars as radiotherapy sensitivity reporters — towards personalized medicine. *EBioMedicine* [Διαδίκτυο]. 2020, 51:102578. Διαθέσιμο στο:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352396419307881>

179. Kimmel CB, Patterson J, Kimmel RO. The development and behavioral characteristics of the startle response in the zebra fish. *Dev Psychobiol* [Διαδίκτυο]. 1 Ιανουάριος 1974, 7(1):47–60. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1002/dev.420070109>
180. Kim SH, Kowalski ML, Carson RP, Bridges LR, Ess KC. Heterozygous inactivation of *tsc2* enhances tumorigenesis in p53 mutant zebrafish. *Dis Model Mech* [Διαδίκτυο]. 1 Ιούλιος 2013, 6(4):925–33. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1242/dmm.011494>
181. Kataba A, Botha TL, Nakayama SMM, Yohannes YB, Ikenaka Y, Wepener V, Ishizuka M. Acute exposure to environmentally relevant lead levels induces oxidative stress and neurobehavioral alterations in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol*. Οκτώβριος 2020, 227:105607.
182. Matthews JJ, Artioli GG, Turner MD, Sale C. The Physiological Roles of Carnosine and β-Alanine in Exercising Human Skeletal Muscle. *Med Sci Sports Exerc*. Οκτώβριος 2019, 51(10):2098–108.
183. Quesnele JJ, Laframboise MA, Wong JJ, Kim P, Wells GD. The effects of beta-alanine supplementation on performance: a systematic review of the literature. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. Φεβρουάριος 2014, 24(1):14–27.
184. Tocher DR. Chapter 6 Glycerophospholipid metabolism. *Biochem Mol Biol Fishes*. 1995, 4(C):119–57.
185. Henderson F, Johnston HR, Badrock AP, Jones EA, Forster D, Nagaraju RT, Evangelou C, Kamarashev J, Green M, Fairclough M, Ramirez IBR, He S, Snaar-Jagalska BE, Hollywood K, Dunn WB, Spaink HP, Smith MP, Lorigan P, Claude E, Williams KJ, McMahon AW, Hurlstone A. Enhanced fatty acid scavenging and glycerophospholipid metabolism accompany melanocyte neoplasia progression in Zebrafish. *Cancer Res*. 2019, 79(9):2136–51.
186. Watkins PA. Fatty Acyl-CoA Synthetases. Στο: Lennarz WJ, Lane MD, επιμελητές. *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)* [Διαδίκτυο]. Second Edi. Waltham: Academic Press, 2013. σ 290–5. Διαθέσιμο στο: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123786302001006>

187. Pirro V, Guffey SC, Sepúlveda MS, Mahapatra CT, Ferreira CR, Jarmusch AK, Cooks RG. Lipid dynamics in zebrafish embryonic development observed by DESI-MS imaging and nanoelectrospray-MS. *Mol Biosyst* [Διαδίκτυο]. 2016, 12(7):2069–79. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1039/C6MB00168H>
188. Gonsioroski A, Mourikes VE, Flaws JA. Endocrine disruptors in water and their effects on the reproductive system. *Int J Mol Sci*. Μάρτιος 2020, 21(6).
189. Sui S, Liu H, Yang X. Research Progress of the Endocrine-Disrupting Effects of Disinfection Byproducts. *J xenobiotics* [Διαδίκτυο]. Ιούνιος 2022, 12(3):145–57. Διαθέσιμο στο: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35893263><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC9326600>
190. Agaba M, Tocher DR, Dickson CA, Dick JR, Teale AJ. Zebrafish cDNA encoding multifunctional fatty acid elongase involved in production of eicosapentaenoic (20:5n-3) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids. *Mar Biotechnol*. 2004, 6(3):251–61.
191. Massarsky A, Kozal JS, Di Giulio RT. Glutathione and zebrafish: Old assays to address a current issue. *Chemosphere* [Διαδίκτυο]. 2017, 168:707–15. Διαθέσιμο στο: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.004>
192. Sprecher H. The roles of anabolic and catabolic reactions in the synthesis and recycling of polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2002, 67(2–3):79–83.
193. Şahan U, Ipek A, Sozcu A. Yolk sac fatty acid composition, yolk absorption, embryo development, and chick quality during incubation in eggs from young and old broiler breeders. *Poult Sci*. 2014, 93(8):2069–77.
194. Lee HK, Kim K, Lee J, Lee J, Lee J, Kim S, Lee SE, Kim JH. Targeted toxicometabolomics of endosulfan sulfate in adult zebrafish (*Danio rerio*) using GC-MS/MS in multiple reaction monitoring mode [Διαδίκτυο]. τ. 389, *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier B.V., 2020. 122056 σ. Διαθέσιμο στο: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122056>
195. Bai X, Jia J, Kang Q, Fu Y, Zhou Y, Zhong Y, Zhang C, Li M. Integrated Metabolomics

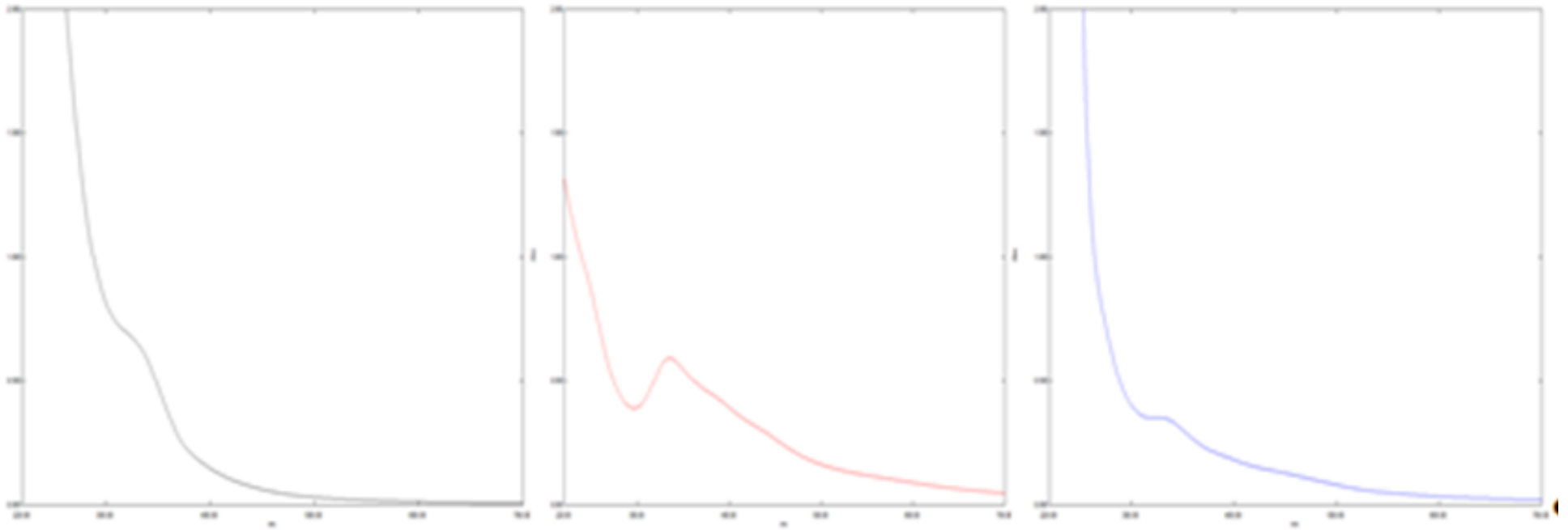
and Lipidomics Analysis Reveal Remodeling of Lipid Metabolism and Amino Acid Metabolism in Glucagon Receptor–Deficient Zebrafish. *Front Cell Dev Biol.* 2021, 8(January):1–15.

196. Artioli GG, Gualano B, Smith A, Stout J, Lancha AHJ. Role of beta-alanine supplementation on muscle carnosine and exercise performance. *Med Sci Sports Exerc.* Ιούλιος 2010, 42(6):1162–73.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Σταθερότητα των CNDS

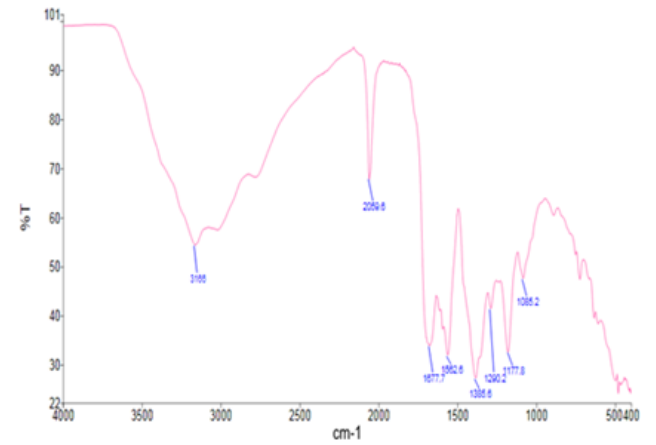
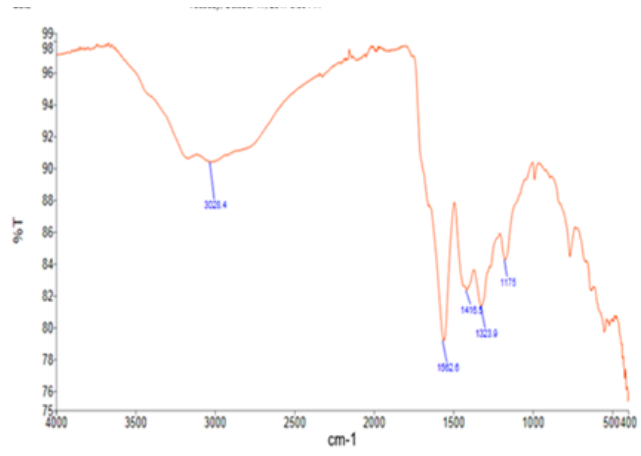
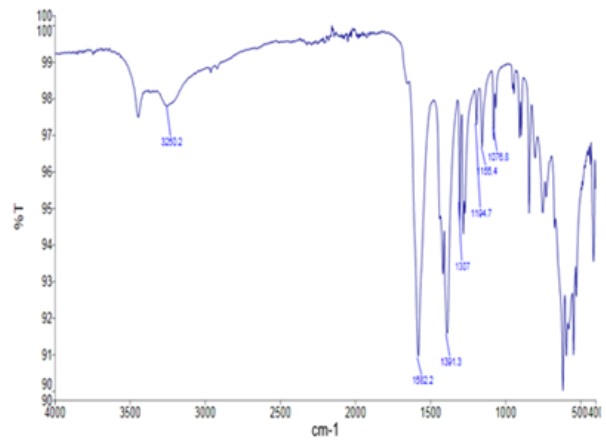
Για την λήψη φασμάτων παρασκευάστηκαν διαλύματα CNDS σε νερό, με κατάλληλη αραιώση. Τα διαλύματα μετρήθηκαν με χρήση κυψελίδας quartz οπτικής διαδρομής 1 cm χωρητικότητας 1 mL. Έγιναν λήψεις των φασμάτων στην περιοχή UV-Vis με φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-2100 σε θερμοκρασία δωματίου. Τα φάσματα UV-Vis που απεικονίζονται στην **Εικόνα Π1**, απεικονίζουν μια ευρεία κορυφή απορρόφησης περίπου στα 340 nm που μπορεί να αποδοθεί στη μετάβαση $n-\pi^*$ στο οξυγόνο του δεσμού C=O ή στις μεταβάσεις του O. Οι δεσμοί C=C και C-N λόγω του σχηματισμού διεγερμένων επιφανειακών καταστάσεων ελαττώματος που προκαλούνται από το N. Τα υδατικά διαλύματα των CNDS εμφανίζουν ένα αχνό κίτρινο χρώμα στο φως της ημέρας και ένα έντονο μπλε PL, κάτω από το υπεριώδες φως (**Εικόνα Π4**).



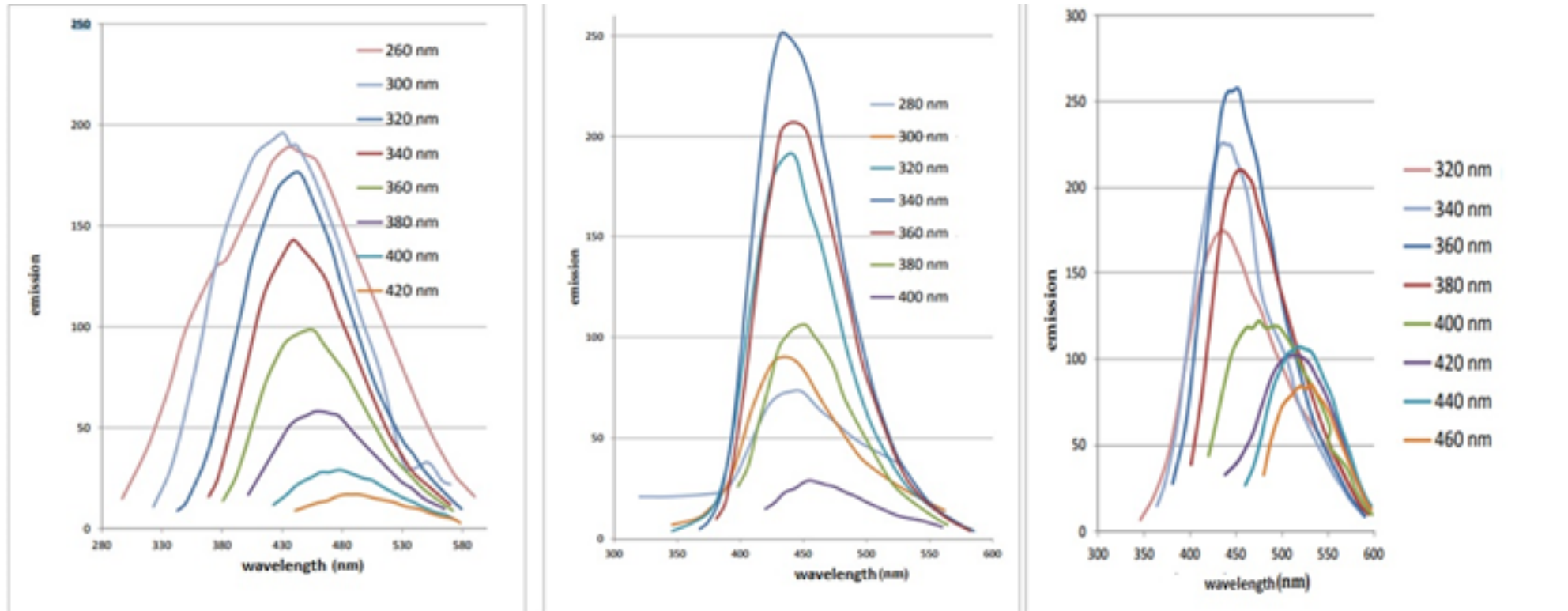
Εικόνα Π1. Φάσματα UV-Vis των Non doped CNDs, N-doped CQDs, N,S-doped CQDs.

Φασματοσκοπία FT-IR

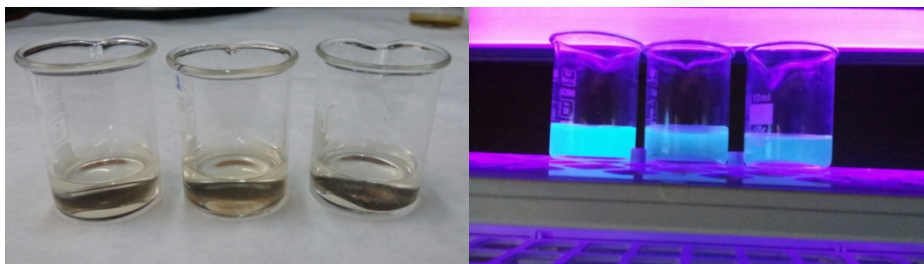
Η ανάλυση FT-IR διεξήχθη με σκοπό των χαρακτηρισμό των επιφανειακών ομάδων των Non-doped, N-doped και N,S-doped CNDs (**Εικόνα Π2**). Οι κορυφές που εμφανίζονται περίπου στα 3400 και 3165 cm^{-1} αντιστοιχούν στις έλκουσες δυνάμεις μεταξύ N-H/O-H, και τον συντονισμό των αρωματικών δακτυλίων των CNDs υποδεικνύοντας υψηλή υδροφιλία. Η απορρόφηση στα 2925 cm^{-1} , αντιστοιχεί στο δεσμό η(C-H). Αναλυτικά, η κορυφή στα 2770 cm^{-1} , αποδίδεται στον συντονισμό των ομάδων S-H, η κορυφή στα 2060 cm^{-1} , στον συντονισμό των ομάδων C-N, η κορυφή στα 1670 cm^{-1} , στο συντονισμό του δεσμού C=O στο COOH, η κορυφή στα 1398 cm^{-1} , αφορά τον συντονισμό του δεσμού C-N, η κορυφή στα 1410 cm^{-1} αφορά την ομάδα COO- και η κορυφή μεταξύ 1180~1080 cm^{-1} αποδίδεται στον συντονισμό του δεσμού C-S. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν πως οι συντεθειμένες CNDs έχουν τροποποιηθεί με υδρόφιλες ομάδες όπως οι υδρόξυλομάδες, καρβοξυλομάδες και αμινομάδες οι οποίες τους προσδίδουν με μεγάλη υδατοδιαλυτότητα



Εικόνα Π2. Φάσματα FT-IR των Non doped, N-doped και N,S- doped CNDs.



Εικόνα Π3. Φάσματα φθορισμού των Non doped, N-doped και N,S- doped CNDs.



Εικόνα Π4. Ενδεικτικές εικόνες κάτω από το φως της ημέρας (αριστερά) και UV (δεξιά) των Non doped CNDs, N-doped CNDs και N,S-doped CNDs.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

ΛΙΣΤΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

A1. Δημοσιεύσεις από την παρούσα διδακτορική διατριβή

1. Chousidis I, Stalikas CD, Leonardos ID. Induced toxicity in early-life stage zebrafish (*Danio rerio*) and its behavioral analysis after exposure to non-doped, nitrogen-doped and nitrogen, sulfur-co doped carbon quantum dots. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2020, 79.
2. Chousidis I, Stalikas C, Leonardos I. Untargeted metabolomics associated with behavioral and toxicological studies yield insights into the impact of 2,6-dichloro-3-hydroxy-1,4-benzoquinone disinfection by-product on zebrafish larvae. Under review.

A2. Δημοσιεύσεις κατά την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής

1. Lazari D, Alexiou GA, Markopoulos GS, Vartholomatos E, Hodaj E, Chousidis I, Leonardos I, Galani V, Kyritsis AP. N-(p-coumaroyl) serotonin inhibits glioblastoma cells growth through triggering S-phase arrest and apoptosis. *J Neurooncol.* 2017, 132(3).
2. Vartholomatos E, Alexiou GA, Markopoulos GS, Lazari D, Tsiftoglou O, Chousidis I, Leonardos I, Kyritsis AP. Deglucohelebrin: A potent agent for glioblastoma treatment. *Anticancer Agents Med Chem.* 2020, 20(1).
3. Chousidis I, Chatzimitakos T, Leonardos D, Filiou MD, Stalikas CD, Leonardos ID. Cannabinol in the spotlight: Toxicometabolomic study and behavioral analysis of zebrafish embryos exposed to the unknown cannabinoid. *Chemosphere* [Internet]. 2020, 252:126417. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126417>
4. Bounas A, Keroglidou M, Toli EA, Chousidis I, Tsaparis D, Leonardos I, Sotiropoulos K. Constrained by aliens, shifting landscape, or poor water quality? Factors affecting the persistence of amphibians in an urban pond network. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst.* 2020, 30(5).

5. Zoi V, Galani V, Vartholomatos E, Zacharopoulou N, Tsoumeleka E, Gkizas G, Bozios G, Tsekeris P, Chousidis I, Leonardos I, Tzakos AG, Kyritsis AP, Alexiou GA. Curcumin and radiotherapy exert synergistic anti-glioma effect in vitro. *Biomedicines*. 2021 Oct, 9(11).
6. Chatzimitakos TG, Pliatsika C, Chousidis I, Leonardos ID, Stalikas CD. Metabolomic profiling unveils the impact of non-doped and heteroatom-doped carbon nanodots on zebrafish (*Danio Rerio*) embryos. *Nanomaterials*. 2021, 11(2).
7. Chatzimitakos T, Chousidis I, Leonardos D, Stalikas C, Leonardos I. In the Swim of Cannabis: Developmental Toxicity and Metabolomic Pathway Alterations of Zebrafish Larvae Exposed to THC for the Assessment of Its Potential Environmental and Human Health Impact. Vol. 27, *Molecules*. 2022. p. 5506.

B. Δημοσιεύσεις σε πρακτικά Ελληνικών Συνεδρίων με κριτική επιτροπή κατά την διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής

1. Ι. Χουσίδης, Α. Οικονόμου, Α. Ντάκης, Μ. Τσουμάνη, Ι. Λεονάρδος (2016) Εκτίμηση παραμέτρων αλιευτικής εκμετάλλευσης του είδους *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) στη Λίμνη Παμβώτιδα. Πρακτικά 16ου Πανελληνίου Συνεδρίου Ιχθυολόγων Δημοσίου, 6-9 Οκτωβρίου 2016, Καβάλα.
2. Ι. Χουσίδης, Α. Οικονόμου, Α. Ντάκης, Μ. Τσουμάνη, Γ. Κουτούπας, Μ. Γκανιάτσα, Π. Παπαδοπούλου, Ι. Λεονάρδος (2016) Σύθεση μηκών και εκτίμηση της αύξησης του είδους *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) στη Λίμνη Παμβώτιδα. Πρακτικά 16ου Πανελληνίου Συνεδρίου Ιχθυολόγων Δημοσίου, 6-9 Οκτωβρίου 2016, Καβάλα.
3. Αικατερίνη Θεμελή, Ιερεμίας Χουσίδης, Δημήτριος Αλίβερτης, Ιωάννης Δ. Λεονάρδος, Αξιολόγηση τοξικότητας σε έμβρυα και ανάλυση συμπεριφοράς σε λάρβες zebrafish (*Danio rerio*) μετά από έκθεση σε Δισφαινόλη Α (Bisphenol A-BPA), 41ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών, Κατερίνη 2019.
4. Βασιλική Σφαιροπούλου, Ιερεμίας Χουσίδης, Δημήτριος Αλίβερτης, Ιωάννης Δ. Λεονάρδος, Επίδραση της παρακεταμόλης στη μορφολογία και τη συμπεριφορά

εμβρύων και λαβρών zebrafish (*Danio rerio*), 41ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών, Κατερίνη 2019.