

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ZEBRAFISH ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΤΟΥ ΣΕ ΝΑΝΟΚΟΥΚΚΙΔΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΕΣ (DOPED) ΜΕ ΑΖΩΤΟ ΚΑΙ ΘΕΙΟ



ΠΛΙΑΤΣΙΚΑ ΚΛΑΙΡΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

2019

© 2019 Πλιάτσικα Κλαίρη

Η έγκριση της διπλωματικής εργασίας από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Φασματοσκοπική μελέτη του μεταβολώματος του zebrafish μετά την έκθεση του σε νανοκουκκίδες άνθρακα ενισχυμένες (doped) με άζωτο και θείο.

ΠΛΙΑΤΣΙΚΑ ΚΛΑΙΡΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

A.M.: 1209

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Σταλίκας Κωνσταντίνος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου

Ιωαννίνων

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 1009/21-11-2019

Σταλίκας Κωνσταντίνος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων **Λεονάρδος Ιωάννης,** Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σακκάς Βασίλειος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Η Γραμματέας του Τμήματος

Καθηγήτρια, Μαρία Λουλούδη

Ξανθή Τουτουνζόγλου

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

2019

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1° – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ			ΑΙΟ 1° – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
	1.1	Ναν	νοϋλικά και νανοκουκκίδες	15
	1.1	.1	Ορισμός νανοϋλικών	15
	1.1	.2	Σύνθεση των CNDs	18
	1.1	.3	Τροποποίηση των CNDs	18
	1.1	.4	Κατάταξη νανοκουκκίδων	19
	1.1	.5	Ομοιότητες και διαφορές μεταξύ των τύπων νανοκουκκίδων	21
	1.1	.6	Εφαρμογές των νανοκουκκίδων	24
	1.2	Επυ	πτώσεις της νανοτεχνολογίας στο περιβάλλον και στον άνθρωπο	32
	1.2	.1	Περιβάλλον	33
	1.2	.2	Ο άνθρωπος και άλλα θηλαστικά σε σχέση με τα νανοϋλικά	36
	1.3	Zeb	rafish (Danio rerio)	37
	1.3	.1	Το zebrafish ως εναλλακτικό πειραματικό μοντέλο	38
	1.4	- oµ	ιικές προσεγγίσεις	40
	1.5	Mε	ταβολομική	41
	1.5	.1	Εργαλεία στη μεταβολομική μελέτη	43
	1.5	.2	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear	
	ma	gneti	c resonance -NMR)	43
	1.5	.3	Φασματομετρία μάζα (mass spectrometry-MS)	44
	1.5	.4	Βάσεις δεδομένων	45
2 КЕФ,		ΦΑΛΑ	ΑΙΟ 2° – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	49
	2.1	Ηθι	κή	49
	2.2	Αντ	ιδραστήρια - διαλύτες - υλικά:	49
	2.3	Όργ	γανα και συσκευές	50
	2.4	Πει	ραματικές πορείες	54
	2.4	.1	Συνθέσεις νανοκουκκίδων άνθρακα (CNDs)	54

2.4.2	Φασματοσκοπία UV-VIS	55			
2.4.3	Φασματοσκοπία IR (FTIR)	55			
2.4.4	Φθορισμομετρία	56			
2.4.5	Διατήρηση-εκτροφή zebrafish	56			
2.4.6	Αναπαραγωγή και συλλογή αυγών	56			
2.4.7	Έκθεση του zebrafish σε νανοκουκκίδες	57			
2.4.8	Εκχύλιση των μεταβολιτών	58			
2.4.9	Λήψη φασμάτων ¹ Η-ΝΜR και MS/MS	59			
2.5 Avó	κλυση δεδομένων	60			
3 ΚΕΦΑΛΑ	ΑΙΟ 3 ⁰ - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	63			
3.1 Χαρ	οακτηρισμός CNDs	63			
3.1.1	Φασματοσκοπία UV-Vis	63			
3.1.2	Φασματοσκοπία FT-IR	65			
3.1.3	Φθορισμομετρική μελέτη	69			
3.1.4	Μέγεθος νανοκουκκίδων άνθρακα	71			
3.2 Τοξ	ικότητα	72			
3.2.1	Προσδιορισμός θνησιγόνου δόσης (Lethal dose)	73			
3.3 Me	λέτη του μεταβολώματος του zebrafish	74			
3.3.1	Αλλαγές του μεταβολώματος με βάση τις φασματοσκοπίες Ν	MR και			
MS		74			
3.3.2	Μεταβολικά μονοπάτια	79			
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜ	1ATA	95			
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΕΣ97					
ПАРАРТНМА І					
ПАРАРТНМА II					
ПАРАРТНМА III					
ΠΕΡΙΛΗΨΗ					
ABSTRACT127					

<u>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ</u>

Εικόνα 1: Κλίμακα μεγεθών διαφόρων σωματιδίων και νανοϋλικών	15
Εικόνα 2: Κατηγορίες νανοϋλικών με βάση το μεγεθός τους	17
Εικόνα 3: Ταξινόμηση φθοριζουσών νανοκουκκίδων: SQDs (Semiconducto	r
Quantum Dots), GQDs (Graphene Quantum Dots), CQDs (Carbon Quantum	Dots) and
CNDs (Carbon Nanodots)	21
Εικόνα 4: Αρσενικό (Α) και θηλυκό (Β) zebrafish	38
Εικόνα 5: Cell culture multiwell plates 24 wells	50
Εικόνα 6: Αυτόκλειστο	50
Εικόνα 7: Shimadzu UV-2100	51
Εικόνα 8: Perkin Elmer FT-IR spectrometer SPECTRUM TWO	51
Εικόνα 9: Cary Eclipse, Fluorescence Spectrophotometer	51
Εικόνα 10: Στερεομικροσκόπιο Olympus SZ61 (Πηγή: www.olympus-lifesci	ence.com)
	52
Εικόνα 11: ZebTEC, Aquatics Zebrafish Housing System (Πηγή: www.tecnip	last.it)53
Εικόνα 12: Σύστημα αναπαραγωγής (Πηγή: www.tecniplast.it)	54
Εικόνα 13: Διαδικασία αποχορίωσης	57
Εικόνα 14: Φάσμα UV-Vis των non-doped CNDs	63
Εικόνα 15: Φάσμα UV-Vis των N-doped CNDs	64
Εικόνα 16: Φάσμα UV-Vis των N,S-doped CNDs	64
Εικόνα 17: Φάσμα FT-IR των non-doped CNDs	67
Εικόνα 18: Φάσμα FT-IR των N-doped CNDs	67
Εικόνα 19: Φάσμα FT-IR των N,S-doped CNDs	68
Εικόνα 20: Φάσματα εκπομπής του φθορισμού των non-doped CNDs σε δι	ιάφορα
μήκη κύματος διέγερσης	69
Εικόνα 21: Φάσματα εκπομπής του φθορισμού των N-doped CNDs σε διάα	φορα μήκη
κύματος διέγερσης	70
Εικόνα 22: Φάσματα εκπομπής του φθορισμού των N,S-doped CNDs σε δυ	άφορα
μήκη κύματος διέγερσης	70

Εικόνα 23: Α: Εμφάνιση των N-doped CNDs, non-doped CNDs και N,S-doped CNDs σε				
μορφή διαλύματος Β: εμφάνιση των N-doped CNDs, non-doped CNDs και N,S-doped				
CNDs κάτω από λάμπα UV71				
Εικόνα 24: Εικόνες ΤΕΜ και κατανομές μεγέθους των (A) non-doped, (B) N-doped				
and (C) N,S-doped CNDs71				
Εικόνα 25: Ενδεικτικές εικόνες λαρβών zebrafish. (Α) Δείγμα ελέγχου, λάρβες που				
εκτέθηκαν σε (B) non-doped CNDs, (C) N-doped CNDs και (D) N,S-doped CNDs72				
Εικόνα 26:Νεκρές λάρβες zebrafish μετά από έκθεση στις νανοκουκκίδες72				
Εικόνα 27: Καμπύλες θνησιμότητας των λαρβών zebrafish μετά από έκθεση στις				
non-doped CNDs, N-doped CNDs και N,S-doped CNDs73				

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ιδιότητες των νανοκουκκίδων24
Πίνακας 2: Συγκεντρώσεις διαλυμάτων νανοκουκκίδων58
Πίνακας 3: Μεταβολίτες του δείγματος ελέγχου ατόμων zebrafish74
Πίνακας 4: Μεταβολίτες ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε non-doped CNDs75
Πίνακας 5: Μεταβολίτες ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε N-doped CNDs76
Πίνακας 6: Μεταβολίτες ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε N,S-doped CNDs76
Πίνακας 7: Μεταβολικά μονοπάτια δείγματος ελέγχου ατόμων zebrafish79
Πίνακας 8: Μεταβολικά μονοπάτια ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε non-
doped CNDs79
Πίνακας 9: Μεταβολικά μονοπάτια ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε N-doped
CNDs
Πίνακας 10: Μεταβολικά μονοπάτια ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε N,S-
doped CNDs81

<u>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</u>

CA: Citric acid

CDs: Carbon dots

CNDs: Carbon nanodots

CQDs: Carbon Quantum Dots

D₂O: Deuterium oxide

dpf: Days post fertilization

ENMs: Engineered nanomaterials

GQDs: Graphene Quantum Dots

HMDB: Human Metabolome Database

hpf: Hours post fertilization

IR: Infrared radiation

LD₅₀: Lethal dose 50%

MMCD: Madison-Qingdao Metabolomics Consortium Database

MS: Mass spectrometry

NMR: Nuclear magnetic resonance

NMs: Nanomaterials

PL: Photoluminescence

SQDs: Semiconductor Quantum Dots

UV: Ultraviolet

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του Τμήματος Χημείας, με κατεύθυνση: «Σύγχρονες Τεχνολογίες Αναλυτικής και Περιβαλλοντικής Χημείας», υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κωνσταντίνου Σταλίκα, κατά την περίοδο 2017-2019.

Σε αυτό το σημείο αισθάνομαι την ανάγκη ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους που έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην υλοποίησή της. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Κωνσταντίνο Σταλίκα, τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, όσο και για τη συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξή του. Με την επιμονή, το αμείωτο ενδιαφέρον του και τις επιστημονικές του παρατηρήσεις, αποτέλεσε για μένα πρότυπο αλλά και κινητήριο δύναμη. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Θοδωρή Χατζημητάκος για τη συνεχή πρακτική αλλά και ηθική υποστήριξη. Η βοήθεια που μου παρείχε αυτά τα δύο χρόνια ήταν καταλυτική για την εκπόνηση αυτής της έρευνας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστήριο Ζωολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών και ιδιαίτερα τον καθηγητή Ιωάννη Λεονάρδο και τον υποψήφιο διδάκτορα Ιερεμία Χουσίδη για την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφεραν όλο αυτό το διάστημα, αλλά και για το ότι με έκαναν να νιώσω μέλος του εργαστηρίου τους. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Εργαστήριο φυσικοχημείας βιολογικών συστημάτων του κ. Τρογκάνη και ιδιαίτερα την Αθανασία για την πολύτιμη βοήθεια τους.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Τσιαφούλη, υπεύθυνο του κέντρου πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού καθώς και τον κ. Αθανάσιο Καρκαμπούνα υπεύθυνο του κέντρου ORBITRAP-LC-MS για τη βοήθεια που μου προσέφεραν και τη φιλική συνεργασία. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη τον Καθηγητή του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών κ. Α. Αυγερόπουλο για την μελέτη των δειγμάτων με τη χρήση Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διέλευσης.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Προδρομίδη και όλα τα μέλη ΔΕΠ του τομέα αναλυτικής χημείας, καθώς και όλα μέλη του εργαστηρίου και φίλους πια, και ιδιαίτερα την Κατερίνα, τον Ροδόλφο και τον Άλκη. Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου, την οικογένειά μου για την αδιάκοπη υποστήριξή τους και την πίστη τους σε εμένα όλα αυτά τα χρόνια. Και φυσικά τους φίλους μου που στάθηκαν δίπλα μου με υπομονή σε όλη αυτή την προσπάθεια.

Η παρούσα εργασία αφιερώνεται στους γονείς μου και στην αδερφή μου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1° – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Νανοϋλικά και νανοκουκκίδες

1.1.1 Ορισμός νανοϋλικών

Τα νανοϋλικά, σήμερα, θεωρούνται ακρογωνιαίοι λίθοι της νανοεπιστήμης και της vavoτεχνολογίας. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή Περιβάλλοντος [1] (European Commissioner for the Environment), 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». Σε ειδικές περιπτώσεις και εφόσον αυτό δικαιολογείται από τις ανησυχίες για το περιβάλλον, την υγεία, την ασφάλεια ή την ανταγωνιστικότητα, το κατώτατο όριο κατανομής μεγέθους (50%) μπορεί να αντικατασταθεί από ένα όριο μεταξύ 1 και 50%. Κατά παρέκκλιση από τα ανωτέρω, τα φουλερένια, οι νιφάδες γραφενίου (graphene flakes) οι νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος, με μία ή περισσότερες εξωτερικές διαστάσεις κάτω του 1 nm πρέπει να θεωρούνται ως νανοϋλικά.



Εικόνα 1: Κλίμακα μεγεθών διαφόρων σωματιδίων και νανοϋλικών.

Τα νανοϋλικά μπορούν να διακριθούν με βάση τη δομή και το μέγεθος τους (διαστάσεις)[2,3].

Ως προς τη δομή τους, η διάκριση γίνεται σε:

- Υλικά με βάση τον άνθρακα. Τα νανοϋλικά αυτά αποτελούνται κυρίως από άνθρακα και έχουν συνήθως ελλειψοειδή μορφή ή μορφή κοίλης σφαίρας ή ενός σωλήνα. Τα σφαιροειδή και τα ελλειψοειδή νανοϋλικά αναφέρονται συνήθως και ως φουλερένια, ενώ τα κυλινδρικά ως νανοσωλήνες.
- Υλικά με βάση τα μέταλλα. Το κύριο συστατικό των υλικών της κατηγορίας αυτής είναι κάποιο μέταλλο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι τα νανοσωματίδια χρυσού, αργύρου, σιδήρου και οξειδίων, όπως το διοξείδιο του τιτανίου.
- Δενδριμερή. Τα νανοϋλικά αυτά είναι πολυμερή, πολύ μικρού μεγέθους, τα οποία αποτελούνται από διακλαδισμένες μονάδες. Στην επιφάνεια του δενδριμερούς καταλήγουν πολλές αλυσίδες, οι οποίες μπορούν να προσαρμοστούν για να εκτελούν συγκεκριμένες χημικές λειτουργίες. Επιπλέον, τα τρισδιάστατα δενδριμερή, περιέχουν εσωτερικές κοιλότητες, στις οποίες μπορούν να τοποθετηθούν άλλα μόρια.
- Σύνθετα νανοϋλικά. Τα υλικά αυτά συνδυάζουν νανοσωματίδια μεταξύ τους
 ή με ογκωδέστερα υλικά, για βελτίωση κυρίως των ιδιοτήτων τους.
 Ορίζονται ως πολυφασικά υλικά, όπου, η μια τουλάχιστον από τις φάσεις
 έχει μία, δύο ή τρεις διαστάσεις που εμπίπτει στη νανοκλίμακα.
 Παραδείγματα τέτοιων υλικών είναι τα κολλοειδή, τα gel κ.α.

Ως προς το μέγεθος τους, 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* [4,5].

 Υλικά μηδενικής διάστασης θεωρούνται αυτά που έχουν και τις τρεις διαστάσεις τους στην νανοκλίμακα. Τα περισσότερα από τα υλικά αυτά έχουν σφαιρικό σχήμα, με διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ 1 και 50 nm. Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί και υλικά με κυβικό ή πολυγωνικό σχήμα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα υλικών της κατηγορίας αυτής, είναι τα μεταλλικά νανοϋλικά και οι φθορίζουσες νανοκουκκίδες (ή νανοτελείες).

- Στα μονοδιάστατα υλικά, η μια από τις τρεις διαστάσεις ξεπερνάει την νανοκλίμακα. Στην κατηγορία αυτή εμπίπτουν οι νανοΐνες, οι νανοράβδοι και οι νανοσωλήνες μετάλλων, οξειδίων και άλλων υλικών. Τα υλικά αυτά έχουν μήκος αρκετών μικρομέτρων, αλλά η διάμετρός τους είναι λίγα μόνο νανόμετρα.
- Δισδιάστατα θεωρούνται τα νανοϋλικά εκείνα των οποίων, δυο από τις τρεις διαστάσεις είναι εκτός νανοκλίμακας. Εδώ συγκαταλέγονται: τα νανοφίλμ, τα λεπτά φύλλα και οι πλάκες. Το εμβαδό των νανοδομών αυτών μπορεί να είναι αρκετά τετραγωνικά μικρόμετρα, αλλά το πάχος τους έχει πάντα διαστάσεις μέσα στα όρια της νανοκλίμακας.
- Στα τρισδιάστατα υλικά ανήκουν όλα τα ογκωδέστερα υλικά εκ των οποίων και οι τρεις διαστάσεις ξεπερνούν τα 100 nm. Ωστόσο, συγκαταλέγονται στα νανοϋλικά, στην περίπτωση που τα μεμονωμένα δομικά τους στοιχεία έχουν διαστάσεις έως και 100 nm.



Εικόνα 2: Κατηγορίες νανοϋλικών με βάση το μεγεθός τους.

Εντός της κλίμακας των νανομέτρων, τα νανοσωματίδια εμφανίζουν διακριτές φυσικοχημικές ιδιότητες και βιολογικές συμπεριφορές, όπως, χημική αδράνεια και ηλεκτροθερμική αγωγιμότητα, καθιστώντας τα κατάλληλα ως φορείς φαρμάκου/γονιδίου ή φωτοθερμικά μέσα [6,7]. Οι εφαρμογές στις οποίες έχουν αξιοποιηθεί τα νανοϋλικά είναι αναρίθμητες και συνεχώς αυξάνονται. Η αξιοποίηση αυτή έχει πολλαπλά πλεονεκτήματα και οφέλη για την κοινωνία μέσω της βελτίωσης διαφόρων τομέων, όπως, της ενέργειας, του περιβάλλοντος, της ηλεκτρονικής, της πληροφορικής, των τροφίμων, της γεωργίας αλλά και των τομέων της υγείας και της βιοϊατρικής.

Οι νανοκουκκίδες άνθρακα (carbon nanodots, CNDs) είναι επιφανειακά παθητικοποιημένα νανοσωματίδια μηδενικής διάστασης με βάση τον άνθρακα, τα οποία, τυπικά, έχουν διάμετρο μικρότερη από 10 nm [8].

1.1.2 Σύνθεση των CNDs

Η σύνθεση των 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 [9]. Οι επιφανειακές τροποποιήσεις των CNDs είναι ιδιαίτερα σημαντικές καθώς μπορούν να προσδώσουν διαφορετικές ιδιότητες στο τελικό προϊόν, με αποτέλεσμα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διαφορετικές εφαρμογές [10,11]. Οι συνθετικές μέθοδοι για τις CNDs διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τις "top-down" και "bottom-up". Η "Top-down" συνθετική πορεία αναφέρεται στο σπάσιμο μεγαλύτερων δομών άνθρακα, όπως ο γραφίτης, οι νανοσωλήνες άνθρακα και τα νανοδιαμάντια, σε CNDs, χρησιμοποιώντας εκτομή με laser, εκκένωση τόξου άνθρακα ή ηλεκτροχημικές τεχνικές. Η "Bottom-up" συνθετική πορεία περιλαμβάνει τη σύνθεση των CNDs από μικρές πρόδρομες ενώσεις όπως οι υδατάνθρακες, τα κιτρικά άλατα και νανοϋλικά από πολυμερέςσίλικα μέσω υδροθερμικής κατεργασίας και συνθετικών πορειών με χρήση μικροκυμάτων [9].

1.1.3 Τροποποίηση των CNDs

Βασική ιδιότητα των CNDs είναι ο φθορισμός, που επιτρέπει την αξιοποίησή τους στους τομείς της βιοαπεικόνισης και των βιοαισθητήρων. Η αξιοποίηση των CNDs σε τέτοιες εφαρμογές ενισχύεται από την φιλικότητά τους σε βιολογικά συστήματα και την εξαιρετική βιοσυμβατότητα που παρουσιάζουν [11]. Προκειμένου να καταστεί βιώσιμη και ανταγωνιστική η χρήση αυτού του νέου τύπου νανοσωματιδίων πρέπει αυτά να εμφανίζουν υψηλή κβαντική απόδοση. Η επιφανειακή παθητικοποίηση (passivation) και οι μέθοδοι εμβολιασμού (doping) για τη τροποποίηση, συνήθως, εφαρμόζονται για βελτίωση της κβαντικής απόδοσης. Για να αποτραπούν μεταβολές των οπτικών ιδιοτήτων των CNDs ή οι μη επιθυμητές αλληλεπιδράσεις της επιφάνειας των CNDs με το περιβάλλον (π.χ. οξείδωση), χρησιμοποιείται κάποια επιφανειακή παθητικοποίηση. Συγκεκριμένα, σχηματίζεται ένα ελαφρύ μονωτικό στρώμα, συνήθως με χρήση πολυμερικών υλικών στην επιφάνεια των CNDs και για να επιτευχθεί η επιφανειακή παθητικοποίηση γίνεται κατεργασία με οξύ. Ο εμβολιασμός (doping) είναι μια συνηθισμένη μέθοδος για την ανάδειξη των ιδιοτήτων των CNDs. Έχουν αναφερθεί ποικίλες μέθοδοι εμβολιασμού (με στοιχεία όπως, άζωτο [12–14], θείο [15,16] και φωσφόρο [17]) για να αναβαθμίσουν τις ιδιότητες των CNDs, μεταξύ των οποίων, ο εμβολιασμός με άζωτο είναι πιο κοινός τρόπος, λόγω της εξαιρετικής ικανότητάς του να ενισχύει την εκπομπή φωταύγειας [18].

1.1.4 Κατάταξη νανοκουκκίδων

Τα τελευταία χρόνια, διάφοροι τύποι φθοριζουσών νανοκουκκίδων έχουν λάβει μεγάλο ενδιαφέρον. Συνεπώς, υπάρχει ανάγκη να υιοθετηθεί μια γενική ονοματολογία για να διακριθούν και να προσδιοριστούν αδιαμφισβήτητα οι διάφοροι υπάρχοντες τύποι, με επίκεντρο την περίπτωση των φθορίζουσων νανοκουκκίδων ημιαγωγών άνθρακα. Αν και ορισμένες από αυτές τις νανοκουκκίδες παρουσιάζουν κοινά οπτικά χαρακτηριστικά, ο μηχανισμός των εκπομπών τους φαίνεται να είναι αρκετά διαφορετικός.

Ο Mark Reed επινόησε τον όρο «κβαντική κουκίδα» (QD) [19] που αναφερόταν αρχικά σε νανοσωματίδια ημιαγωγών μεγέθους λίγων νανομέτρων της κβαντικής περιοχής (δηλαδή, μικρότερα από την ακτίνα εξιτονίων του Bohr), το οποίο σημαίνει ότι σε αυτά τα σωματίδια τα εξιτόνια, περιορίζονται σε χωρικές διαστάσεις με κβαντισμένες ενεργειακές καταστάσεις. Στη συνέχεια, ο όρος «κβαντικές κουκκίδες άνθρακα» αναφέρθηκε σε αρκετές δημοσιεύσεις με φθορίζουσες νανοκουκκίδες, ο οποίος αποδόθηκε σε όλους τους αναδυόμενους τύπους φθοριζόντων νανοσωματιδίων άνθρακα χωρίς όμως τα χαρακτηριστικά τους να πληρούν τις απαραίτητες προϋποθέσεις ώστε να ονομάζονται «κβαντικές κουκκίδες».

Προκειμένου να επεκταθεί η ονοματολογία και σε άλλα, νέα σωματίδια με τον πιο κατάλληλο τρόπο, θα αναφερθούν ορισμένοι σημαντικοί όροι. Στη νανοεπιστήμη, ο όρος «κουκκίδα» αναφέρεται γενικά σε αντικείμενα ή σωματίδια μεγέθους νανομέτρου, παρόλο που μπορεί να βρεθεί και ως «νανοκουκκίδα». Το κύριο ενδιαφέρον αυτών των νανοκουκκίδων έγκειται στις λειτουργικές και δομικές τους ιδιότητες, οι οποίες δεν είναι διαθέσιμες ούτε σε ογκώδη υλικά, ούτε σε διακριτά μόρια. Από την άλλη πλευρά, ο όρος «κβαντικό» αναφέρεται στην περιορισμένη μεταφορά φορτίου λόγω των μειωμένων διαστάσεων. Ως εκ τούτου, η χρήση του όρου «κβαντικές κουκκίδες» πρέπει να διατηρηθεί σε όλους τους τύπους νανοσωματιδίων με κβαντικό περιορισμό, που περιλαμβάνουν τις κβαντικές κουκκίδες ημιαγωγών (Semiconductor Quantum Dots-SQDs) αλλά και τις ανθρακογενείς κβαντικές κουκκίδες.

Για τις «κβαντικές κουκκίδες άνθρακα» ή «κουκκίδες άνθρακα», πρέπει να αξιολογηθούν πτυχές όπως, η διάταξη των ατόμων άνθρακα, η κρυσταλλική δομή, οι διαστάσεις κ.ο.κ., ώστε να καθιερωθεί μια συνεκτική ταξινόμηση. Οι νανοκουκκίδες με βάση τον άνθρακα κατατάσσονται σε τρεις κύριες κατηγορίες, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 3. Οι άμορφες περίπου σφαιρικές νανοκουκκίδες οι οποίες δεν διαθέτουν κβαντικό περιορισμό αναφέρονται ως νανοσυμπλέγματα/νανοσυστάδες άνθρακα, πολυμερικές κουκκίδες, κουκκίδες άνθρακα ή κουκκίδες C. "Carbon NanoDots" (CNDs) είναι ο καταλληλότερος όρος που προτάθηκε και θα χρησιμοποιείται από εδώ και στο εξής. Όταν οι νανοκουκκίδες παρουσιάζουν κβαντικό περιορισμό και κρυσταλλική δομή, τότε αναφερόμαστε στις σφαιρικές κβαντικές κουκκίδες άνθρακα («Carbon Quantum Dots» CQDs)) και στις μονοστρωματικές π-συζευγμένες («Graphene Quantum Dots» GQDs),. Είναι ενδιαφέρον ότι τα στοιχεία που διακρίνουν και τα δύο είδη βρίσκονται στις πρόδρομες ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεσή τους. Έτσι, τα CQDs μπορούν να παρασκευαστούν από άλλα νανοϋλικά άνθρακα με κρυσταλλική δομή, όπως νανοσωλήνες άνθρακα ή με πυρόλυση οργανικών μορίων που υποβάλλονται σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ στην περίπτωση των GQDs (π.χ.

20

ένας δίσκος γραφενίου στην περιοχή μεγέθους 2-20 nm), οι πρόδρομες ενώσεις είναι κυρίως υλικά με βάση το γραφένιο[20].



Εικόνα 3: Ταξινόμηση φθοριζουσών νανοκουκκίδων: SQDs (Semiconductor Quantum Dots), GQDs (Graphene Quantum Dots), CQDs (Carbon Quantum Dots) and CNDs (Carbon Nanodots).

1.1.5 Ομοιότητες και διαφορές μεταξύ των τύπων νανοκουκκίδων

Η ανακάλυψη των φθοριζουσών νανοκουκκίδων ήρθε το 1981 με τις SQDs και πολύ αργότερα, το 2004, εμφανίστηκαν οι κουκκίδες άνθρακα (CQDs και CNDs), ακολουθούμενες το 2006 από τις κβαντικές κουκκίδες γραφενίου (GQDs). Ενώ οι SQDs και οι GQDs έχουν καθορισμένες δομές (τέλειοι σφαιρικοί νανοκρύσταλλοι μεταλλικών ατόμων και νανοσωματιδίων των sp² ανθράκων, αντίστοιχα), οι άλλοι τύποι κουκκίδων με βάση τον άνθρακα παρουσιάζουν μια συγκεχυμένη δομή ως προς τον πυρήνα, που σε ορισμένες περιπτώσεις είναι ένα μίγμα κρυσταλλικών δομών που μοιάζουν με νανοστοιβάδες γραφενίου σε συνδυασμό με άμορφο άνθρακα. Έτσι, μπορούμε να διακρίνουμε δύο τύπους σφαιρικών δομών, ο ένας είναι ένας κρυσταλλικός πυρήνας που βασίζεται σε ένα μίγμα sp² και sp³ ανθράκων (οι CQDs) και ο άλλος ένα μίγμα κυρίως sp³ ανθράκων σε ένα διαταραγμένο δομικό πυρήνα (οι CNDs). Με βάση τις δομικές διαφορές που έχουν οι πυρήνες, τα νανοσωματίδια εμφανίζουν κάποιες διαφορετικές ιδιότητες, αλλά και κοινά στοιχεία. Τα χαρακτηριστικά αυτά δεν αποτελούν κριτήριο μόνο για τη διάκριση μεταξύ των διάφορων τύπων αλλά και για την εκάστοτε εφαρμογή τους.

Όλα τα νανοσωματίδια άνθρακα, ως κοινή ιδιότητα, εμφανίζουν ένα ποσοστό ατόμων οξυγόνου στην επιφάνεια τους που τα καθιστά υδατοδιαλυτά, γεγονός που

συνδέεται στενά με την υψηλή βιοσυμβατότητα τους και τη χαμηλή τους τοξικότητα. Αυτό το περιεχόμενο οξυγόνου είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση των σφαιρικών νανοκουκκίδων άνθρακα. Αντίθετα, οι SQDs θεωρούνται γενικά ως υδρόφοβες νανοδομές και η υψηλή τους τοξικότητα έχει αποδοθεί στην απελευθέρωση ιόντων βαρέων μετάλλων από τον πυρήνα προς το εξωτερικό μέσο.

Ωστόσο, σήμερα δεν περιγράφονται μόνο νέες συνθετικές μέθοδοι για να ληφθούν υδατοδιαλυτά SQDs [21] αλλά και διαφορετικές μέθοδοι επιφανειακής τροποποίησης των υδρόφοβων νανοσωματιδίων ώστε να γίνουν υδατοδιαλυτές και περισσότερο βιοσυμβατές [22]. Έτσι, αναφέρεται για παράδειγμα, η επικάλυψη με αμφίφιλο πολυμερές όπου οι υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες του πολυμερούς αλληλεπιδρούν με τα υδρόφοβα επιφανειοδραστικά μόρια που υπάρχουν στην επιφάνεια του νανοσωματιδίου. Η τελευταία μέθοδος έχει το πλεονέκτημα ότι δεν εξαρτάται από τον ανόργανο πυρήνα (και πιθανόν ούτε και από τον ακριβή τύπο του οργανικού μορίου), δεδομένου ότι η επικάλυψη βασίζεται κυρίως στην υδρόφοβη αλληλεπίδραση αλυσίδων υδρογονανθράκων και δυνάμεων van der Waals μεταξύ των μορίων. Επιπλέον, κελύφη υψηλής πυκνότητας πολυμερούς γύρω από τους πυρήνες των SQDs επιτρέπουν πολύ σταθερά και ασφαλή SQDs, χάρη στη σημαντική μείωση των μεταλλικών ιόντων που απελευθερώνεται από τους πυρήνες τους.

Αν και στις περισσότερες περιπτώσεις οι συνθετικές οδοί για τις SQDs τυπικά οδηγούν σε μεγέθη νανοσωματιδίων μέχρι 6 nm, στην περίπτωση των σφαιρικών νανοκουκκίδων άνθρακα (CQDs και CNDs). Για τις νανοκουκκίδες γραφενίου (GQDs), οι περισσότερες από τις αναφερόμενες μεθόδους οδηγούν σε μεγαλύτερα σωματίδια με διάμετρο των 10 και 20 nm, αντίστοιχα. Αυτή η παράμετρος εξαρτάται σημαντικά από τον τρόπο σύνθεσης και τις πρόδρομες ουσίες που χρησιμοποιούνται, όπως έχει αναφερθεί και στα περισσότερα άρθρα ανασκόπησης.

Στην πραγματικότητα, παρόλο που οι SQDs, γενικά, λαμβάνονται με τη μέθοδο σύνθεσης bottom-up, για όλες τις ανθρακογενείς κουκκίδες, έχουν εφαρμοστεί τόσο μεθοδολογίες top-down όσο και bottom-up με προσθήκη λειτουργικών ομάδων κατά το στάδιο της σύνθεσης ή αμέσως μετά, είτε είναι σε αντίδραση ενός σταδίου (κατά τη διάρκεια της παρασκευής των νανοκουκκίδων με τη μέθοδο bottom-up) είτε ως ένα επιπλέον βήμα (μέσω ομοιοπολικών και μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων με τις επιφανειακές ομάδες και με τις δύο μεθοδολογίες) [8,23,24]. Συγκεκριμένα, οι σφαιρικές νανοκουκκίδες με βάση τον άνθρακα που λαμβάνονται από την μέθοδο top-down απαιτούν ένα ενδιάμεσο βήμα, που ονομάζεται παθητικοποίηση, για την ενίσχυση της φωταύγεια τους, [25,26] ενώ οι μέθοδοι σύνθεσης bottom-up δημιουργούν φωτεινές κουκκίδες που οφείλονται στην παρουσία των ενεργών επιφανειακών ομάδων ως πηγές εκπομπής. Ακόμη, οι νανοκουκκίδες με βάση τον άνθρακα μπορούν να παραχθούν σε μεγάλη κλίμακα με σχετικά χαμηλό κόστος, ακολουθώντας ποικίλες προσεγγίσεις.

Οι κουκκίδες με βάση τον άνθρακα παρουσιάζουν φασματικά ευρεία εκπομπή φωταύγειας (photoluminescence – PL) με ισχυρή εξάρτηση από το μήκος κύματος διέγερσης και ευρείες ζώνες/ταινίες απορρόφησης. Στην περίπτωση γραφιτικών νανοκουκκίδων, οι μεταβάσεις μεταξύ ενεργειακών χασμάτων ζωνών (bandgap) προκύπτουν από συζευγμένες περιοχές π, οι οποίες μοιάζουν με μεγάλα αρωματικά συστήματα με εκτεταμένη π-συζυγία συγκεκριμένων ηλεκτρονιακών ενεργειακών bandgap για εκπομπές φωταύγειας Αυτές οι ηλεκτρονικές μεταβάσεις εμφανίζουν μια ισχυρή ζώνη απορρόφησης στην υπεριώδη περιοχή, εξαιτίας της απορρόφησης φωτός από μια μεγάλη ποσότητα π ηλεκτρονίων. Αντίθετα, οι SQDs παρουσιάζουν μια πολύ στενή ζώνη εκπομπής, μη εξαρτώμενη από τη διέγερση. Στην πραγματικότητα, οι SQDs, με την εξαιρετική τους απόδοση και τις προβλέψιμες μεταβολές του φθορισμού εξαιτίας του μεγέθους τους, σε συνδυασμό με τη φωταύγεια μεγάλου χρόνου ζωής και την υψηλή κβαντική απόδοση, είναι εξαιρετικά υλικά για εφαρμογές στη βιοϊατρική και ανίχνευση, αν και κύριος περιορισμός τους είναι η χρήση βαρέων μετάλλων Οι άλλοι τύποι νανοκουκκίδων χρησιμοποιούνται, επίσης, σε αναλυτικές και βιοϊατρικές εφαρμογές, αλλά σε πολύ μικρότερο βαθμό καθώς παρουσιάζουν χαμηλότερες κβαντικές αποδόσεις, χαμηλή ομοιογένεια μεγέθους και γενικά σύντομη διάρκεια ζωής φωταύγειας, αλλά και γιατί ανακαλύφθηκαν αργότερα [20].

Πίνακας 1: Ιδιότητες των νανοκουκκίδων

CNDs						
Έτος α	νακάλυψης	2004				
	Φύση	Οργανικό υλικό/οξυγόνο (5-50%)				
	Δομή	Άμορφος πυρήνας C				
Φυσικοχημικές	Σχήμα	Ψευδοσφαιρικό				
ισιστητές	Μέγεθος	Συνήθως < 10 nm				
	Κβαντικός περιορισμός	Όχι				
	Διαλυτότητα	Υδρόφιλες				
Οπτικές ιδιότητες	Απορρόφηση του φωτός	Στην περιοχή UV (260-350 nm) Μετατόπιση μετά από παθητικοποίηση Πολύ ευρεία ζώνη απορρόφησης				
	Τύποι εκπομπής ακτινοβολίας	Down-conversion				
	Σύνθεση	Τοp-down και bottom-up προσεγγίσεις				
Παρασκευη	Λειτουργικοποίηση	Κατά τη διάρκεια της σύνθεσης. Δεν χρειάζεται περαιτέρω βήματα				
	Κοινές ιδιότητες	Οπτικοηλεκτρονικές ιδιότητες Μεγάλη επιφάνεια Καλή φωτοσταθερότητα				
Χαρακτηριστικά	Διαφορετικές ιδιότητες	PL εξαρτώμενη από διέγερση (ένταση/μήκος κύματος) PL εξαρτώμενη από τη λειτουργικοποίηση Εξαιρετική χημική αδράνεια Καλή κινητικότητα ηλεκτρονίων				

1.1.6 Εφαρμογές των νανοκουκκίδων

Ως μια νέα κατηγορία φθοριζουσών νανοϋλικών άνθρακα, οι νανοκουκκίδες άνθρακα 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 [9]. 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 νανοκουκκίδες μπορούν, επίσης, να βρουν εφαρμογές στην κατάλυση, στους αισθητήρες και στον τομέα της οπτοηλεκτρονικής. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι νανοκουκκίδες χρησιμοποιούνται ως μέσο απεικόνισης φθορισμού, ωστόσο, ένας περιορισμένος αριθμός μελετών επικεντρώθηκε, επίσης, στη φωτοακουστική απεικόνιση[27]. Παρακάτω, παραθέτονται κάποια παραδείγματα βασικών εφαρμογών.

1.1.6.1 Βιοαπεικόνιση

Οι νανοκουκκίδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιοαπεικόνιση λόγω της εκπομπής φθορισμού και της βιοσυμβατότητας τους. Με την έγχυση νανοκουκκίδων 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 [28]. Όταν οι κουκκίδες άνθρακα, σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα, επωάστηκαν με καρκινική κυτταρική σειρά (καρκίνος του μαστού) και διεγέρθηκαν με λέιζερ στα 800 nm, ήταν ικανά να επισημάνουν τόσο την κυτταρική μεμβράνη όσο και το κυτταρόπλασμα χωρίς να φτάσουν στον πυρήνα [27,29]. 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 χρόνου, έτσι ώστε οι ενέσιμοι παράγοντες δεν μπορούν να συσσωρευθούν στο σώμα και ο χρόνος κυκλοφορίας τους πρέπει να βελτιστοποιηθεί [10]. Οι CDs χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία σε μια ποικιλία απεικονίσεων μεταμόσχευσης κυττάρων, όπως HeLa [30-32], ανθρώπινα νευρικά βλαστοκύτταρα [33], 4 T1 [34], NIH-3T3 [35], A549 [36], HepG-2 [13], κτλ. Οι κουκκίδες εισήχθησαν κυρίως στα κύτταρα μέσω ενδοκυττάρωσης και συγκεντρώθηκαν στο κυτταρόπλασμα. Υπάρχουν λίγες αναφορές ότι οι CNDs εισέρχονται στον πυρήνα των κυττάρων [37]. Ο Wu και οι συνεργάτες του ανέφεραν ένα νέο σύστημα βασισμένο στις CNDs για απεικόνιση εξωγενούς και ενδογενούς ΝΟ σε ζωντανά κύτταρα. [27,38]

Οι εκπεμπόμενη ακτινοβολία των κουκκίδων άνθρακα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην *in vivo* βιοαπεικόνιση, επιτρέποντας έτσι τη δυνατότητα διερεύνησης της βιοκατανομής και της αποβολή τους στα ζώα [10]. Τα Zebrafish χρησιμοποιούνται ευρέως για την επιστήμη της ιατρικής[101]. Ο Kang YF και οι συνεργάτες του επέλεξαν το zebrafish ως πειραματικό μοντέλο για τη φθορισμομετρική απεικόνιση και βρήκαν ότι οι CDs συσσωρεύτηκαν επιλεκτικά στα μάτια και στον λεκιθικό σάκο [37,39].

1.1.6.2 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 δημιουργίας όγκου, της χαρτογράφησης οξυγόνωσης του αίματος, της μέτρησης της μεθαιμοσφαιρίνης, της λειτουργικής απεικόνισης του εγκεφάλου, της ανίχνευσης του μελανώματος του δέρματος κλπ. [40]. 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 [27].

1.1.6.3 (Βιο) ανίχνευση

Οι νανοκουκκίδες 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 [11]. 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 [41].

Έχουν αναφερθεί διάφοροι αισθητήρες που βασίζονται στο φθορισμό νανοκουκκίδων άνθρακα και μπορούν γενικά να κατηγοριοποιηθούν στις ακόλουθες ομάδες: ανίχνευση ιόντων, [42,43] όπως Eu³⁺, Fe³⁺, Fe²⁺, F⁻, Tl⁺ (θάλλιο), ανίχνευση της τιμής του ρΗ, [44,45] ανίχνευση βιολογικού υλικού [45–47], όπως ενδοκυτταρική λυσίνη, ασκορβικό οξύ, 3'-διφωσφορική-5'-διφωσφορική γουανοσίνη (ppGpp), ένζυμο (π.χ., αναγωγάση θειορεδοξίνης (TrxR)), DNA και ανίχνευση θερμοκρασίας. Ακόμα είναι δυνατή η ανίχνευση των ιόντων Hg²⁺ και των βιολογικών θειολών [48]. Τα ιόντα Hg²⁺ θα μπορούσαν να ανασχηματίσουν τα ηλεκτρόνια και τις οπές των CDs και να σβήσουν τον φθορισμό των Cdots.

Ο Dong et al [49] συνέθεσε διακλαδισμένες νανοκουκκίδες άνθρακα Carbon dots τροποποιημένα με πολυαιθυλενιμίνη για την ανίχνευση Cu²⁺ σε δείγματα νερών, με όριο ανίχνευσης 6 nM, χρησιμοποιώντας την απόσβεση φθορισμού από τον συντονισμό μεταξύ Cu²⁺ και αμινομάδων από τις CDs [50].

Οι κουκκίδες άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, για την κατασκευή αναλυτικών συστημάτων χημειοφωταύγειας (chemiluminescence-CL) και ηλεκτροφωταύγειας (ectrochemiluminescence-ECL). Τα συστήματα αυτά που βασίζονται στις κουκκίδες άνθρακα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για οπτική παρακολούθηση του κυτταρικού χαλκού [51], της γλυκόζης [52], του pH [53] και των νουκλεϊκών οξέων [54]. Ο Lin και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι οι CDs εμφάνιζαν φωταύγεια παρουσία οξέος κατασκεύασαν υπεροξυνιτρώδους (ONOOH) και ένα σύστημα χημειοφωταύγειας με βάση CDs για ανίχνευση νιτρωδών [55]. Ο Shao et al [92] χρησιμοποίησε την ηλεκτροχημική απόκριση του Cdot-TPEA για τον εντοπισμό του Cu²⁺ στον εγκέφαλο ποντικών [37,56].

1.1.6.4 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, τη μεσοπορώδη σίλικα και τα AuNPs ως οχήματα παροχής φαρμάκων [57]. 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 [27]. Η εξαιρετική βιοσυμβατότητα

και η αποκόλληση τους από τις νανοκουκκίδες άνθρακα 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 [58–60]. Η εκπομπή ακτινοβολίας των κουκκίδων άνθρακα παρέχει την ευκαιρία παρακολούθησης της κατανομής και της αντίδρασης του φαρμάκου σε πραγματικό χρόνο [10].

Αν και ο καρκίνος και άλλες εντοπισμένες ασθένειες έχουν αντιμετωπιστεί συμβατικά με χημειοθεραπεία, μια τέτοια προσέγγιση, γενικά, στερείται εξειδίκευσης και μπορεί να προκαλεί προβλήματα τοξικότητας και αντοχής σε πολλαπλά φάρμακα [61]. 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 [62,63]. Ωστόσο, σε τέτοιες εναλλακτικές μεθόδους, οι παράγοντες στόχευσης επηρεάζονται, επίσης, από την πρόωρη διαρροή του φαρμάκου προτού φθάσει στο στόχο [64,65].

Οι κουκκίδες άνθρακα που συντέθηκαν με τη θερμική πυρόλυση του κιτρικού οξέος και της πολυενοπολυαμίνης χρησιμοποιήθηκαν από την 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% χημειοθεραπευτικών για κλινικούς ασθενείς με καρκίνο [10]. Ο Tang και οι συνάδελφοί του περιέγραψαν για πρώτη φορά την παροχή φαρμάκων με βάση τη Μεταφορά Ενέργειας Συντονισμού (FRET) για κυτταρική απεικόνιση και παρακολούθηση απελευθέρωσης φαρμάκου [60,66]. Για να χορηγηθεί η δοξορουβικίνη (doxorubicin-DOX), ένα αντικαρκινικό φάρμακο, ανεπτύξαν ένα σύστημα CDs με βάση το FRET το οποίο μπορεί να μεταφέρει αποτελεσματικά το DOX στην περιοχή ενδιαφέροντος. [Carbon dots: The next generation platform for biomedical applications]. Αυτό το σύστημα 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 κουκίδων άνθρακα. Ο φθορισμός των

κουκίδων άνθρακα ανακτάται [27,66]. Σε μια παρόμοια μελέτη, ο Τeo και συνεργάτες του συνέθεσαν 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 [27,67].

1.1.6.5 CNDs στην παράδοση γονιδίων/πρωτεϊνών

Οι νανοκουκκίδες άνθρακα 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 νανο-φορέας για την παροχή θεραπευτικών ωφέλιμων φορτίων. Ο Zhang και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν μια εύκολη στη χρήση, bottom-up μέθοδο για τη σύνθεση πολυλειτουργικών κουκίδων 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) [66,68].

1.1.6.6 Άλλες εφαρμογές

<u>Οπτοηλεκτρονική</u>

Οι CQDs έχουν την δυνατότητα να χρησιμεύουν ως υλικά για την ιχνηθέτηση μέσω χρωστικής ηλιακών κυττάρων [69], οργανικών ηλιακών κυττάρων, υπερπυκνωτών [70], συσκευών εκπομπής φωτός [71] και ως φωτοανιχνευτές σε ηλιακά κύτταρα.

<u>Φωτοκατάλυση</u>

Ένα από τα σημαντικά και αναπτυσσόμενα πεδία στη νανοχημεία είναι η νανοφωτοκατάλυση, όπου ο σχεδιασμός ενός ισχυρού νανοκαταλύτη με ρυθμιζόμενη χημική δραστικότητα θεωρείται ως το κύριο αντικείμενο. Η εύκολη τροποποίηση της λειτουργικότητας με διάφορες ομάδες κάνουν τις κουκκίδες άνθρακα ικανές να απορροφούν φως διαφορετικών μηκών κύματος, το οποίο προσφέρει καλές προοπτικές για εφαρμογές στη φωτοκατάλυση. Συγκεκριμένα, τα CQDs με ελεγχόμενα μεγέθη είναι σε θέση να επιδεικνύουν συντονισμένες εκπομπές από το μπλε μήκος κύματος έως την περιοχή εγγύς υπερύθρου. Πρόσφατα, με μία ηλεκτροχημική μέθοδο υποβοηθούμενη από αλκαλικό περιβάλλον, ο Kang και οι συνεργάτες του συνέθεσαν CQDs από 1,2 έως 3,8 nm και σχεδίασαν ένα σύστημα φωτοκατάλυσης με βάση τα SiO₂/CQDs και TiO₂/CQDs για να αξιοποιήσουν το πλήρες φάσμα του ηλιακού φωτός [72]. Λόγω των ιδιοτήτων ανοδικής μετατροπής αυτού του πολύπλοκου συστήματος, μόλις οι CQDs απορροφήσουν το φως του ήλιου (ορατό φως), εκπέμπουν το φως σε μικρότερο μήκος κύματος, το οποίο διεγείρει το SiO₂ ή το TiO₂ για τη δημιουργία ζευγών ηλεκτρονίων/οπών [57].

<u>Δίοδοι εκπομπής φωτός (LEDs)</u>

Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις εφαρμογές των CNDs ως συσκευές φωτισμού στερεάς κατάστασης (light emitting devices-LEDs). Ο έλεγχος της φωταύγεια τους, η εκπομπή φωταύγειας σε στερεά κατάσταση και η σταθερότητα των εκπομπών φωταύγειας, είναι ιδιότητες σχεδιασμένες για εφαρμογές LED. Το 2010, ο Wang et al πέτυχαν άμεση εκπομπή λευκού φωτός από κουκκίδες άνθρακα, οι οποίες προσέφεραν τη δυνατότητα κατασκευής συσκευών εκπομπής λευκού φωτός με βάση τις νανοκουκκίδες άνθρακα [73]. Αργότερα, πραγματοποίησαν δοκιμές σε συσκευές εκπομπής λευκού φωτός χρησιμοποιώντας κουκκίδες άνθρακα που εκπέμπουν λευκό φως. Οι νανοκουκκίδες άνθρακα συντέθηκαν με μέθοδο θερμικής πυρόλυσης χρησιμοποιώντας κιτρικό οξύ ως πηγή άνθρακα και 1εξαδεκυλαμίνη ως παράγοντα παθητικοποίησης της επιφάνειας, η οποία έδειξε σχετικά υψηλή κβαντική απόδοση 60% με μέση διάμετρο των 5 nm [10].

<u>Βιοϊατρικες εφαρμογές</u>

<u>Κουκκίδες άνθρακα στη φωτοθερμική θεραπεία (PTT).</u>

Η φωτοθερμική θεραπεία (photothermal therapy-PTT) χρησιμοποιεί φωτοθερμικούς παράγοντες για την παραγωγή θερμότητας μέσω της μετατροπής ενέργειας που απορροφάται από τα φωτόνια που οδηγεί σε θερμική αφαίρεση των κυττάρων στόχων και επακόλουθο κυτταρικό θάνατο [66].

<u>Κουκκίδες άνθρακα στη φωτοδυναμική θεραπεία (PDT).</u>

Η φωτοδυναμική θεραπεία (photodynamic therapy-PDT) προσφέρει χαμηλή τοξικότητα, ελάχιστη διεισδυτικότητα και στοχευμένη θεραπεία έναντι του καρκίνου. Περιλαμβάνει τρεις κύριους παράγοντες, μια φωτεινή πηγή, έναν φωτοευαισθητοποιητή και μια ρίζα. Εδώ, ένα λέιζερ διεγείρει τον φωτοευαισθητοποιητή για να παράγει δραστικές μορφές οξυγόνου που τελικά καταστρέφει τα καρκινικά κύτταρα [66].

Κουκκίδες άνθρακα στη διάγνωση.

Μια άλλη σημαντική εφαρμογή των CQDs στον τομέα της βιοϊατρικής είναι η διάγνωση. Οι νανοανιχνευτές που βασίζονται σε κουκκίδες άνθρακα είναι γρήγορες και οικονομικά αποδοτικές μέθοδοι σε σύγκριση με τις άλλες διαθέσιμες μεθόδους [64].

Κουκκίδες άνθρακα σε διπλή φωτοθεραπεία και ακτινοθεραπεία.

Οι CQDs έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη φωτοθεραπεία και την κλινική θεραπεία για επιφανειακούς όγκους όπως ο καρκίνος του δέρματος. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει τη συγκέντρωση φωτοευαισθητοποιητών στον ιστό του όγκου και ακολουθεί ακτινοβολία για την ενεργοποίηση του σχηματισμού ROS (Reactive oxygen species), η οποία προκαλεί απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος). Οι CQDs που λειτουργούν με θετικά φορτισμένα μόρια μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ROS σε κυτταρικές σειρές [64,74].

1.2 Επιπτώσεις της νανοτεχνολογίας στο περιβάλλον και στον άνθρωπο

Η νανοτεχνολογία περιλαμβάνει την έρευνα, την ανάπτυξη, την παραγωγή και την επεξεργασία δομών και υλικών σε νανομετρική κλίμακα σε διάφορους τομείς της επιστήμης, της τεχνολογίας, της υγείας, των βιομηχανιών και της γεωργίας και αποτελεί επί του παρόντος έναν από τους τομείς έρευνας με την υψηλότερη προτεραιότητα σε πολλές χώρες, λόγω της τεράστιας οικονομικής της επίδρασης [75]. Με την πρόοδο της νανοτεχνολογίας, λοιπόν, τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες, υπάρχει ένας αυξανόμενος ρυθμός για την εφαρμογή των νανοϋλικών σε διάφορες πτυχές της ζωής μας [76]. Σύμφωνα με τις πληροφορίες που συλλέχθηκαν από την Εθνική Πρωτοβουλία Νανοτεχνολογίας (National Nanotechnology Initiative), η παραγωγή και οι εφαρμογές υλικών νανοκλίμακας αυξάνονται αξιοσημείωτα κάθε χρόνο [77].

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. [78,79]. Μεταξύ των διαφόρων τύπων νανοϋλικών, τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα είναι από τις κύριες ομάδες νανοϋλικών και έχουν δυνητικά εκτεταμένες εφαρμογές. Η αύξηση της χρήσης των νανοϋλικών αυξάνει και την πιθανότητα έκθεσής τους στον άνθρωπο τόσο με άμεσο όσο και έμμεσο τρόπο, γεγονός που αναμφισβήτητα θα έχει τόσο θετικές όσο και αρνητικές επιπτώσεις στους ανθρώπους, τα ζώα και το περιβάλλον [75,80]. Έχουν εκφραστεί λοιπόν ανησυχίες σχετικά με την τύχη, τη μεταφορά και τον μετασχηματισμό των νανοϋλικών που απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Η αναγνώριση των δυνητικών πλεονεκτημάτων και των ακούσιων 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 κυτταρικά διαμερίσματα καθώς η τοξικότητα και οι παρενέργειες αυτών των υλικών έχουν λάβει πρόσφατα σημαντική προσοχή [77].

1.2.1 Περιβάλλον

Τα νανοϋλικά που βρίσκονται στο περιβάλλον προέρχονται είτε από διάφορες φυσικές δραστηριότητες (π.χ. ηφαιστειακές δραστηριότητες, δασικές πυρκαγιές, διάβρωση εδάφους, καταιγίδες, ορυκτά αργίλου και καταιγίδες σκόνης) είτε από ανθρωπογενείς δραστηριότητες (π.χ. καύση ορυκτών καυσίμων, εξόρυξη/κατεδάφιση, κυκλοφορία αυτοκινήτων και παραγωγή νανοϋλικών). Τα νανοϋλικά, συσσωρεύονται στον αέρα, το νερό, το χώμα και τα ιζήματα [75,81].

<u>Αέρας</u>

Εξακολουθούν να υπάρχουν μεγάλα κενά γνώσης όσον αφορά την περιβαλλοντική τύχη των νανοϋλικών, ιδίως μετά την απελευθέρωση στον αέρα. Κάθε βήμα ενός κύκλου ζωής των νανοϋλικών από την παραγωγή, την επεξεργασία, τη μεταφορά, το χειρισμό και την εφαρμογή μέχρι το τέλος του κύκλου ζωής του μπορεί να προκαλέσει απελευθέρωση στον ατμοσφαιρικό αέρα. Τα νανοϋλικά στην ατμόσφαιρα εκλύονται από τις εξατμίσεις των μέσων μεταφοράς, της καύσης, της έκρηξης και της οξείδωσης των ατμοσφαιρικών αερίων [46][82].

Τα κατασκευασμένα νανοϋλικά (Engineered nanomaterials-ENMs) που εισέρχονται στο ατμοσφαιρικό περιβάλλον τείνουν να εκτίθενται σε ηλιακό φως και μήκη κύματος υπεριώδους ακτινοβολίας σε σημαντικά υψηλότερους βαθμούς από αυτά που απελευθερώνονται σε άλλα τμήματα του περιβάλλοντος (Mitrano et al., 2015). Η έκθεση αυτή είναι πιθανό να προκαλέσει φυσικοχημικές αλλαγές στα νανοϋλικά.

Η εκπομπή ENMs από εγκαταστάσεις αποτέφρωσης αποβλήτων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις διεργασίες σύνθεσης των νανοϋλικών. Τα ανθρακογενή και οργανικά ENMs τείνουν να καταστρέφονται εντελώς, ενώ η νανοάργιλος φαίνεται να παραμένει σε κατάλοιπα καύσης [83]. Επιπλέον, μεγάλες ποσότητες και συγκεντρώσεις νανοϋλικών απελευθερώνονται στον αέρα κατά λάθος (π.χ. έκρηξη και πυρκαγιά). Τα NMs μετά την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό νεφών σκόνης (και υποβαθμίζουν την ποιότητα του αέρα.

<u>Έδαφος</u>

Τα κατασκευασμένα νανοϋλικά μπορούν να εισέλθουν στο έδαφος διαμέσου διαφορετικών πηγών και μονοπατιών, όπως για παράδειγμα με χρήση λιπασμάτων και φυτοπροστατευτικών προϊόντων [82]. Το έδαφος είναι μια μήτρα πολυστρωματικής και πολύπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ της ύλης (π.χ. αέριαστερεά-ύδατα-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 et al. (2011) και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν δυσμενείς επιπτώσεις των TiO₂ και ZnO στη βιοποικιλότητα των κοινοτήτων των μικροοργανισμών του εδάφους [75,84]. Τα νανοϋλικά, σε ορισμένες συγκεντρώσεις μπορούν να μειώσουν την ανάπτυξη και την αναπαραγωγική ικανότητα των φυτών και μεταβάλλουν την περιεκτικότητα των φυτικών κυττάρων και μεταβάλλουν την περιεκτικότητα των φυτικών χρωστικών ουσιών [78].

<u> Υδάτινο περιβάλλον</u>

Τα νανοσωματίδια 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 συσσώρευση, διάσπαση, διάχυση, αλληλεπίδραση με άλλα συστατικά (και υδρόβιους οργανισμούς), βιολογική αποδόμηση (αερόβια και αναερόβια) και αβιοτική αποδόμηση (συμπεριλαμβανομένης της φωτόλυσης και της υδρόλυσης) [75,85].

Τα νανοϋλικά μπορούν να αλληλεπιδράσουν με άλλα αιωρούμενα σωματίδια, οργανική ύλη και κολλοειδή, οδηγώντας σε συσσωμάτωση και πιθανώς καθίζηση [86]. Η συσσωμάτωση των νανοϋλικών με άλλες ουσίες στο νερό τους επιτρέπει συχνά να αλληλεπιδρούν με διαφορετικά στερεά αντί να διασπείρονται σε βαθμός συσσωμάτωσης εξαρτάται από εναιωρήματα. Επιπλέον, ο 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) [87]. Επιπλέον, η συσσωμάτωση μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της συγκεκριμένης ειδικής επιφάνειας των σωματιδίων και της ελεύθερης ενέργειας διεπιφάνειας, μειώνοντας την δραστικότητα των σωματιδίων. Μερικές μελέτες έχουν αναφέρει τις ανεπιθύμητες ενέργειες της έκθεσης των νανοϋλικών σε υδρόβιους οργανισμούς (όπως, βλάβες DNA, θνησιμότητα, οξειδωτικό στρες και μείωση της ανάπτυξης [87,88]. 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. ψάρια και δάφνια) [89]. Η επίδραση του νανο-Cd στον πλαγκτονικό οργανισμό *Daphnia magna* ερευνήθηκε για να εκτιμηθεί το επίπεδο τοξικότητάς του. Το νανο-Cd έδειξε την εξαρτώμενη από τη δόση τοξικότητα στο *D. magna*. Για παράδειγμα, σε χαμηλή/μέση συγκέντρωση νανο-Cd, αυξήθηκε η δραστικότητα της υπεροξειδάσης, της καταλάσης και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου. Αντίθετα, παρατηρήθηκε οξειδωτική βλάβη στο *D. magna* σε υψηλότερα επίπεδα νανο-Cd.

Οι νανοσωλήνες άνθρακα και τα προϊόντα τους έχουν, επίσης, αναφερθεί ότι παρουσιάζουν τοξικές επιδράσεις σε θαλάσσιους οργανισμούς, π.χ. Thalassiosira pseudonana, Tigriopus japonicas και Oryzias melastigma [90].

Διαφορετικοί τύποι νανοϋλικών ή ακόμη και το ίδιο είδος νανοϋλικών σε διαφορετικά μεγέθη διαπιστώθηκε ότι έχουν διαφορετική τοξική επίδραση σε ορισμένους οργανισμούς [78]. Ως εκ τούτου, η επιβάρυνση των υδάτων που προκαλείται από τα υλικά αυτά μπορεί να είναι επιβλαβής για την υδρόβια ζωή.

1.2.2 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 και να απορροφηθούν από αυτές. Ο ρυθμός απορρόφησης των νανοϋλικών από κύτταρα εξαρτάται από το μέγεθός τους, το βαθμό συσσωμάτωσης και καθίζησης τους [91]. Η απορρόφηση των νανοϋλικών συμβαίνει με ενδοκυττάρωση ή φαγοκυττάρωση (Mallapragada et al., 2015). 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 [92]. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις, τα ENMs εγχέονται σκόπιμα στο ανθρώπινο σώμα για ιατρικές εφαρμογές. Με την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και οξειδωτικής βλάβης, τα νανοϋλικά προκαλούν 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 [75,93].

Οι επιστήμονες έχουν βρει συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης του νεογνού (1^{ος} μήνας μετά τη γέννηση) και της αυξημένης έξαρσης του άσθματος, της μειωμένης πνευμονικής λειτουργίας και του βήχα χωρίς λοίμωξη [94]. 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, οι Becker et al. κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι νανοσωλήνες άνθρακα και τα νανοσωματίδια
TiO₂ μπορούν να προκαλέσουν όγκους σε ζώα [95]. Τα κατασκευασμένα νανοϋλικά έχουν τοξικές επιδράσεις στους ινοβλάστες και στα επιδερμικά κερατινοκύτταρα και, επιπλέον, μπορούν να μεταβάλλουν την έκφραση γονιδίων ή πρωτεϊνών. Μερικά NMs και ENMs 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. Επομένως, η κατανόηση των επιπτώσεων των νανοϋλικών αποτελεί μία πρόκληση του σήμερα όχι μόνο στην περιβαλλοντική αλλά και στην ανθρώπινη τοξικολογία. Επιπλέον, υπάρχει μεγάλη ανάγκη να αναπτυχθούν νέα συστήματα βιολογικών δοκιμών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση κινδύνων περιβαλλοντικών δειγμάτων. Το Zebrafish αντιπροσωπεύει ένα εξαιρετικό μοντέλοοργανισμό για τη διερεύνηση των κινδύνων για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον που σχετίζονται με επιβαρυντικούς παράγοντες [96].

1.3 Zebrafish (Danio rerio)

To zebrafish (*Danio rerio*) είναι ένα ψάρι γλυκού νερού που ανήκει στην οικογένεια των Cyprinidae, της τάξης Cypriniformes. Προέρχεται από το Μπαγκλαντές, την Ινδία, το Νεπάλ, το Πακιστάν, το Μπουτάν και τη Σρι Λάνκα [97,98]. Συνήθως, επιλέγει στάσιμα ή μέτριας ροής ενδιαιτήματα πολύ μικρού βάθους, όπως ρέματα, κανάλια, μικρές λίμνες και ορυζώνες [99] σε σχεδόν ουδέτερο μέχρι ελαφρώς βασικό pH και σε θερμοκρασία από 16,5 έως 34 °C [100].

Το zebrafish πήρε το όνομα του εξαιτίας των πέντε ομοιόμορφων, οριζόντιων, μπλε λωρίδων στο πλάι του σώματος του, οι οποίες θυμίζουν τις ρίγες της ζέβρας και οι οποίες εκτείνονται μέχρι το άκρο του ουραίου πτερυγίου. Το σχήμα του είναι συμπαγές και πλευρικά συμπιεσμένο, με το στόμα του στραμμένο προς τα πάνω. Το αρσενικό έχει τορπιλοειδές σχήμα, με χρυσές ρίγες ανάμεσα στις μπλε λωρίδες. Το θηλυκό έχει μεγαλύτερη, υπόλευκη κοιλιά και ασημί ρίγες αντί χρυσών. Το zebrafish μπορεί να φτάσει σε μήκος έως και 4-5 cm, αν και τυπικά είναι 1,8-3,7 cm στο φυσικό περιβάλλον με κάποιες παραλλαγές ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται [99].



Εικόνα 4: Αρσενικό (Α) και θηλυκό (Β) zebrafish

Η διάρκεια ζωής του σε αιχμαλωσία είναι περίπου δύο με τρία χρόνια, αν και σε ιδανικές συνθήκες μπορεί να επεκταθεί σε πάνω από πέντε χρόνια. Στην άγρια φύση είναι τυπικά ένα ετήσιο είδος [97,101].

1.3.1 Το zebrafish ως εναλλακτικό πειραματικό μοντέλο

To zebrafish έχει πολλά χαρακτηριστικά που το καθιστούν καλό πρότυπο μοντέλο σε διάφορους τομείς έρευνας και κάποια πλεονεκτήματα έναντι των άλλων μοντέλων όπως π.χ. των τρωκτικών. Τα άτομα είναι εύκολα διαθέσιμα, διατηρήσιμα και έχουν χαμηλό κόστος συντήρησης [96]. Επιπρόσθετα, είναι πολύ εύκολο να διατηρηθεί μεγάλος αριθμός απ' αυτά σε ένα μικρό χώρο [102].

Τα θηλυκά γεννούν αυγά κάθε 2-3 ημέρες και κάθε γέννα μπορεί να δώσει εκατοντάδες αυγά. Τα έμβρυα Zebrafish που διατηρούνται στους 28.5°C εκκολάπτονται μεταξύ 48-72 ωρών μετά τη γονιμοποίηση (hpf), όταν γίνονται προνύμφες [103]. Πριν από την εκκόλαψη, το έμβρυο περιορίζεται στο χόριο, μια ημι-διαφανή και σχετικά αδιαπέραστη μεμβράνη που δρα ως φραγμός στην είσοδο ορισμένων ενώσεων. Τα έμβρυα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλά ερευνητικά πλαίσια επειδή αναπτύσσονται εξαιρετικά γρήγορα και μπορούν να ληφθούν όλο το χρόνο σε μεγάλους αριθμούς [97, 104]. Η εξωτερική γονιμοποίηση, η ανάπτυξη των αυγών εκτός της μητέρας (η οποία μειώνει τις επιρροές συμπεριφοράς της μητέρας) και η διαφάνεια του εμβρύου zebrafish (που επιτρέπει στους ερευνητές να εξετάζουν εύκολα την ανάπτυξη των εσωτερικών δομών)

και το καθιστούν πολύ κατάλληλο οργανισμό σε βιολογικές μελέτες, καθώς η ανάπτυξή τους μπορεί να παρατηρηθεί εύκολα [105]. Αφού στα πρώιμα στάδια της ζωής του τα έμβρυα zebrafish είναι οπτικά διάφανα, μπορούν να παρακολουθούνται εύκολα με τη βοήθεια ενός μικροσκοπίου. Κάθε αιμοφόρο αγγείο σε ένα ζωντανό έμβρυο zebrafish είναι ορατό χρησιμοποιώντας και μόνο ένα μικροσκόπιο χαμηλής ισχύος.

Η ανάπτυξη των εμβρύων zebrafish είναι γρήγορη και η οργανογένεση ολοκληρώνεται εντός 3 ημερών μετά τη γονιμοποίηση (dpf) [106,107]. Το σωματικό πρότυπο λαρβών zebrafish είναι ομόλογο με αυτό άλλων σπονδυλωτών, για παράδειγμα τον ρόλο της μεταβολικής ενεργοποίησης τον επιτελεί το συκώτι, διαθέτει λειτουργικό θυροειδή αδένα και έχει πλήρως σχηματισμένο αιματοεγκεφαλικό φραγμό [108–110]. Στη βιοϊατρική εκμεταλλεύονται τον υψηλό βαθμό γονιδιωματικής ομοιότητας μεταξύ του zebrafish και των θηλαστικών, το μικρό μέγεθος του zebrafish, και το γεγονός ότι ο φαινότυπός τους μπορεί να εκτιμηθεί τόσο γρήγορα με υψηλή απόδοση ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί το είδος σε πολλές ερευνητικές μελέτες [105,111].

Το γονιδίωμα του zebrafish έχει αναλυθεί πλήρως (είναι διαθέσιμο online στο ensembl.org) και η αναπτυξιακή του συμπεριφορά είναι κατανοητή. Το Zebrafish έχει παρόμοια γενετική δομή με τον άνθρωπο. Μοιράζεται με τον άνθρωπο το 70% των γονιδίων ενώ το 84% των γονιδίων που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες έχουν αντίστοιχο ομόλογο με το zebrafish [112]. Ως σπονδυλωτό, το zebrafish έχει τα ίδια κύρια όργανα και ιστούς με τον άνθρωπο. Ο μυς, το αίμα, τα νεφρά και τα μάτια του έχουν πολλά χαρακτηριστικά με τα ανθρώπινα συστήματα.

Το zebrafish χρησιμοποιείται σε πολλούς τομείς της βιολογικής έρευνας, ως αναπτυξιακό και γενετικό εργαλείο για τη μελέτη της τοξικολογίας, της συμπεριφοράς, της φυσιολογίας, της οργανογένεσης, της ανακάλυψης φαρμάκων και της μοντελοποίησης των νόσων. Δεδομένων των προαναφερθέντων πλεονεκτημάτων του zebrafish, οι επιδράσεις τόσο της βραχυπρόθεσμης όσο και

της μακροπρόθεσμης έκθεσης σε ένα ευρύ φάσμα ουσιών μπορούν να μελετηθούν με σχετική ευκολία.

Ακόμα το μοντέλο zebrafish αποτελεί εναλλακτική επιλογή για βιοϊατρικές και γενετικές μελέτες, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που σχετίζονται με το μεταβολισμό. Το zebrafish μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πραγματοποίηση μεταβολικών αναλύσεων *in vivo* (είτε σε απλούς ιστούς είτε σε ολόκληρους οργανισμούς) [112].

1.4 - ομικές προσεγγίσεις

Οι –ομικές (-omics) προσεγγίσεις παρέχουν τα απαραίτητα εργαλεία για να εξεταστούν και να κατανοηθούν καλύτερα από τους ερευνητές οι διαφορές στο DNA, το RNA, τις πρωτεΐνες και άλλα κυτταρικά μόρια μεταξύ των ειδών και μεταξύ των ατόμων ενός είδους. Το πεδίο της έρευνας «-ομικής» είναι σχετικά νέο, ξεκινώντας από τη δεκαετία του 1980 με τη γονιδιωματική [113]. Οι 4 κύριες τεχνολογίες είναι οι εξής:

- Γονιδιωματική (Genomics), μελέτη των γονιδίων και της λειτουργία τους
- Πρωτεομική (Proteomics), μελέτη πρωτεϊνών
- Τρανσκριπτομική/Μεταγραφική μελέτη, μελέτη του mRNA
- Μεταβολομική (Metabolomics), μελέτη μορίων (μεταβολιτών) που εμπλέκονται στον κυτταρικό μεταβολισμό

Υπάρχουν και άλλες όπως η γλυκιδομική (Glycomics), η μελέτη των κυτταρικών υδατανθράκων, λιπιδομική (Lipomics), η μελέτη των κυτταρικών λιπιδίων ενός οργανισμού ή ενός βιολογικού συστήματος, καταλομική (Catalomics), η μελέτη ενζύμων (καταλυτών) ή άλλων βιοκαταλυτών ενός οργανισμού ή ενός συστήματος. Ακόμα Foodomics είναι μια σχετικά νέα προσέγγιση στη μελέτη των τροφίμων και των θρεπτικών συστατικών με την εφαρμογή της γονιδιωματικής, της πρωτεομικής, της πεπτιδομικής και της μεταβολομικής για να διερευνήσει την ασφάλεια των τροφίμων, την ποιότητα, την ανιχνευσιμότητα, την αποθήκευση, τη θρεπτική αξία και τη βιοδραστικότητα [114].

επεκτάθηκε στους τομείς της γεωλογίας, ειδικότερα της πετρολογίας και της παλαιολιμνολογίας.

1.5 Μεταβολομική

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», η μελέτη των προφίλ των μεταβολιτών τους [115]. 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 [116]. Ωστόσο, υπάρχουν εξαιρέσεις σε αυτό, ανάλογα με το δείγμα και τη μέθοδο ανίχνευσης. Για παράδειγμα, τα μακρομόρια όπως οι λιποπρωτεΐνες και η λευκωματίνη ανιχνεύονται αξιόπιστα στο πλάσμα του αίματος, σε μελέτες μεταβολισμού με βάση την τεχνική NMR. 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 [117]. Αντίθετα, στη μεταβολομική (που βασίζεται) 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 ενζυματικής χημικής αντίδρασης είναι αντιδρώντα σε άλλες χημικές αντιδράσεις.

Το μεταβόλωμα αντιπροσωπεύει το πλήρες σύνολο μεταβολιτών, σε ένα βιολογικό κύτταρο, ιστό, όργανο ή οργανισμό, οι οποίοι είναι τα τελικά προϊόντα των κυτταρικών διεργασιών [118]. 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 [119]. 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 να δημιουργηθούν νέες υποθέσεις για τους μηχανισμούς της νόσου, (ii) προσδιορισμού βιολογικών δεικτών, πρόβλεψης και διάγνωσης του κινδύνου ασθενείας, (iii) αξιολόγησης της εξέλιξης της νόσου, (iv) ερμηνείας της επίδρασης της έκθεσης του περιβάλλοντος και του τρόπου ζωής σε ασθένειες, ν) 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 αντιπροσωπεύει ένα επιπλέον πλεονέκτημα. Η συσχέτιση με τα αποτελέσματα των ασθενειών είναι ισχυρότερη στη μεταβολομική από ό, τι στη γονιδιωματική. Έτσι, οι μεταβολικές μελέτες απαιτούν μικρότερα μεγέθη δειγμάτων από τις γενετικές μελέτες [120]. Αυτή η μέθοδος ελέγχου χρησιμοποιεί συνδυασμούς μη στοχοθετημένων, ημι-στοχευμένων και στοχοθετημένων αναλύσεων.

1.5.1 Εργαλεία στη μεταβολομική μελέτη

Δύο είναι τα κύρια εργαλεία ανάλυσης που είναι διαθέσιμα για τη διαμόρφωση του μεταβολικού προφίλ: η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και η φασματομετρία μάζας (MS). Ανάλογα με το μέσο ή το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται, συνήθως, κάποιος μπορεί να ταυτοποιήσει από 50 έως και 5000 διαφορετικούς μεταβολίτες κάθε φορά. Ωστόσο, κανένα εργαλείο ή πλατφόρμα δεν είναι σε θέση να εντοπίσει όλους τους υπάρχοντες μεταβολίτες με μία και μόνο ανάλυση ή χρησιμοποιώντας μια μόνο τεχνολογική πλατφόρμα. Η πλειονότητα των μεταβολικών μελετών χρησιμοποιεί μία μόνο αναλυτική πηγή. Ωστόσο, υπάρχει μια αυξανόμενη αναγνώριση της αξίας του συνδυασμού NMR και MS. Είναι συμπληρωματικές τεχνικές, οπότε ο συνδυασμός τους είναι πιθανό να βελτιώσει τη συνολική ποιότητα μιας μελέτης και να καλύψει το μεταβόλωμα στο μεγαλύτερο δυνατό βαθμό [120].

1.5.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear magnetic resonance -NMR)

Η φασματοσκοπία NMR μπορεί να εφαρμοστεί σε δείγματα υγρών, αλλά και σε στερεά, αέρια και δείγματα ιστών. Η τεχνική NMR είναι μια τεχνική ανίχνευσης η οποία δεν βασίζεται στον διαχωρισμό των αναλυόμενων συστατικών [121]. Ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα της είναι η ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος που απαιτείται και ο μη καταστρεπτικός χαρακτήρας της (ακόμη και μετά την ανάλυση, τα δείγματα μπορούν ακόμα να χρησιμοποιηθούν για άλλες μελέτες). Η τεχνική αναγνωρίζεται, επίσης, ως ιδιαίτερα επαναλήψιμη και λιγότερο ευαίσθητη στη μεταβλητότητα του οργάνου. Επιπλέον, έχει το πλεονέκτημα ότι είναι μια τεχνική ποσοτικοποίησης, μετρώντας την ποσότητα των πρωτονίων, υπό δεδομένες συνθήκες και επιτρέποντας έτσι τη σύγκριση των άμεσων φασματικών δεδομένων. Το σημαντικό μειονέκτημά της σχετίζεται με την ευαισθησία της, η οποία είναι χαμηλότερη από αυτή της MS. Επίσης, η ερμηνεία των φασμάτων NMR θεωρείται σύνθετη και απαιτεί σημαντική εκπαίδευση, καθώς τα σήματα από διαφορετικούς μεταβολίτες μπορούν να επικαλύπτονται [120].

1.5.3 Φασματομετρία μάζα (mass spectrometry-MS)

Η φασματομετρία μάζας (MS) χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολιτών μετά τον διαχωρισμό με αέρια χρωματογραφία, υγρή χρωματογραφία ή ηλεκτροφόρηση [121]. Η MS αναγνωρίζει μεταβολίτες κυρίως με βάση τη σχέση μάζας τους προς φορτίο (m/z) (Crutchfield et al., 2016). Τα άτομα και τα μόρια πρέπει να μετατραπούν σε ιόντα (ιονισμός), και κατόπιν αυτά επιταχύνονται έτσι ώστε να έχουν την ίδια κινητική ενέργεια. Τα ιόντα στη συνέχεια εκτρέπονται από ένα μαγνητικό πεδίο σύμφωνα με τη μάζα τους και τον αριθμό των θετικών φορτίων τους [122]. Διάφορες τεχνικές είναι διαθέσιμες για ιονισμό, με τον ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (Electrospray ionization-ESI) να είναι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος. Ένα φάσμα μάζας ενός δείγματος μπορεί να ληφθεί με άμεση έγχυση, αλλά συνήθως εκτελείται σε συνδυασμό με τεχνικές διαχωρισμού. Είναι σημαντικό ότι καμία μέθοδος διαχωρισμού δεν επιτρέπει τον ταυτόχρονο διαχωρισμό όλων των μεταβολιτών. Επιπλέον, δεν υπάρχει ένας αναλυτής μάζας που να μπορεί να μετρήσει όλους τους μεταβολίτες, καθώς ορισμένοι μεταβολίτες δεν μπορούν να ιονίζονται με συγκεκριμένες μεθόδους ή επειδή η συγκέντρωσή τους είναι πολύ χαμηλή [120].

Στις βιολογικές επιστήμες, η υγρή χρωματογραφία, ιδιαίτερα η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (Ultra Performance Liquid Chromatography-UPLC), γίνεται ολοένα και πιο δημοφιλής και είναι πιθανώς η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ικανότητα της υγρής χρωματογραφίας να διαχωρίζει και να ανιχνεύει ένα ευρύ φάσμα μεταβολιτών. Ένα μειονέκτημα της LC-MS (Liquid chromatography–mass spectrometry) είναι η καταστολή των ιόντων, καθώς ο ιονισμός μεταβολιτών μπορεί να εξαρτάται από την παρουσία συστατικών της μήτρας, ιδιαίτερα με ESI. Η αέρια χρωματογραφία έχει υψηλή απόδοση διαχωρισμού και επαναλήψιμους χρόνους κατακράτησης. Ωστόσο, παρουσιάζει τρία κύρια μειονεκτήματα: πιθανή απώλεια θερμοευαίσθητων αναλυτών, σύνθετη προετοιμασία δείγματος, και υψηλότερη μεταβλητότητα στα αποτελέσματα σε σύγκριση με τη μεταβολομική με βάση την LC. Υπάρχουν, επίσης, ορισμένες μελέτες που χρησιμοποιούν την MS ως ανεξάρτητη τεχνική: το δείγμα εγχέεται απευθείας στο φασματογραφο μάζας χωρίς

προηγούμενο διαχωρισμό και ο ανιχνευτής χρησιμεύει τόσο για τον διαχωρισμό όσο και για την ανίχνευση μεταβολιτών [121].

Γενικά, η τεχνική MS έχει πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία από την αντίστοιχη NMR (επίπεδο ανίχνευσης από picomoles έως femtomoles), επιτρέποντας, έτσι, τη μέτρηση ενός μεγαλύτερου φάσματος μεταβολιτών. Επιπλέον, οι διαφορετικές τεχνολογίες MS παρέχουν λειτουργίες που μπορούν να εφαρμοστούν, αυξάνοντας έτσι τον αριθμό των μεταβολιτών που μπορούν ενδεχομένως να ανιχνευθούν. Πράγματι, η ανώτερη βελτιωμένη χρωματογραφική ανάλυση και ο ταχύς διαχωρισμός που προσφέρει η UPLC, σε συνδυασμό με την υψηλή ευαισθησία της MS, επιτρέπουν τόσο την ανίχνευση όσο και την ποσοτικοποίηση πολλών μεταβολιτών σε λίγα λεπτά. Παρά το γεγονός αυτό, πρέπει να γνωρίζουμε ότι η μη στοχοθετημένη μεταβολική γενικώς δεν είναι ποσοτική. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τα βιολογικά δείγματα. Η φασματομετρία μάζας απαιτεί τη χρήση δειγμάτων ελέγχου ποιότητας καθώς και πολλαπλών ταυτόχρονων εσωτερικών προτύπων αναφοράς (τυπικά τουλάχιστον τριών) [120].

1.5.4 Βάσεις δεδομένων

Βάση δεδομένων είναι ένα συστηματικά οργανωμένο ή δομημένο αποθετήριο πληροφοριών (συνήθως ως ομάδα συνδεδεμένων αρχείων δεδομένων) που επιτρέπει την εύκολη ανάκτηση, ενημέρωση, ανάλυση και παραγωγή δεδομένων.

1.5.4.1 MMCD

Ο στόχος της Βάσης Δεδομένων Madison-Qingdao Metabolomics Consortium Database (MMCD), η οποία συντηρείται από την National Magnetic Resonance Facility στο Madison, είναι να υποστηρίξει υψηλού επιπέδου μετρήσεις NMR και MS κατά την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολιτών που υπάρχουν σε βιολογικά δείγματα. Η MMCD λειτουργεί, επί του παρόντος, ως κόμβος για πληροφορίες σχετικά με μικρά μόρια βιολογικού ενδιαφέροντος, που συγκεντρώνονται από ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων και την επιστημονική βιβλιογραφία. Κάθε καταχώρηση μεταβολίτη στο MMCD υποστηρίζεται από

πληροφορίες 50 ξεχωριστών πεδίων δεδομένων, κατά μέσο όρο, που παρέχουν τον χημικό τύπο, τα ονόματα και τα συνώνυμα, τη δομή, τις φυσικές και χημικές ιδιότητες, τα δεδομένα του NMR και της MS σε καθαρές ενώσεις υπό καθορισμένες συνθήκες, οι χημικές μετατοπίσεις που καθορίζονται από εμπειρικές ή/και θεωρητικές προσεγγίσεις, υπολογισμένες μάζες ισοτομερών, πληροφορίες σχετικά με την παρουσία του μεταβολίτη σε διαφορετικά βιολογικά είδη και εκτεταμένους συνδέσμους σε εικόνες, αναφορές και άλλες δημόσιες βάσεις δεδομένων, όπως η Εγκυκλοπαίδεια των Γονιδίων και Γονιδίων του Κιότο KEGG) και PubChem. Η μηχανή αναζήτησης MMCD επιτρέπει στους χρήστες να κάνουν απευθύνουν ερωτήματα βάσει πειραματικών δεδομένων NMR ή/και MS μαζί με άλλα κριτήρια. Η βάση περιέχει συνολικά 20.306 ενώσεις, 745 ενώσεις με πρότυπα πειραματικά δεδομένα NMR, 300 ενώσεις με θεωρητικά δεδομένα NMR και 1156 ενώσεις με δεδομένα

1.5.4.2 HMDB

Η βάση Human Metabolome Database-HMDB είναι μια ελεύθερης πρόσβασης ηλεκτρονική βάση δεδομένων που περιέχει λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τους μεταβολίτες /μικρά μόρια που βρίσκονται στο ανθρώπινο σώμα. Προορίζεται για χρήση στη μεταβολική, την κλινική χημεία, την ανακάλυψη βιολογικών δεικτών και για εκπαίδευση. Η βάση δεδομένων έχει σχεδιαστεί για να περιέχει ή να συνδέει τρία είδη δεδομένων: 1) χημικά δεδομένα, 2) κλινικά δεδομένα και 3) δεδομένα μοριακής βιολογίας/βιοχημείας. Η βάση δεδομένων περιέχει 114.100 καταχωρίσεις μεταβολιτών που περιλαμβάνουν τόσο υδατοδιαλυτούς όσο και λιποδιαλυτούς μεταβολίτες καθώς και μεταβολίτες σε συγκεντρώσεις > 1 μM ή <1 nM. Επιπλέον, 5.702 πρωτεϊνικές αλληλουχίες συνδέονται με τις παραπάνω καταχωρίσεις μεταβολιτών. Κάθε καταχώριση MetaboCard περιέχει 130 πεδία δεδομένων με τα 2/3 των πληροφοριών να είναι αφιερωμένα σε χημικά/κλινικά δεδομένα και το άλλο 1/3 να προορίζονται για ενζυμικά ή βιοχημικά δεδομένα. Πολλά πεδία δεδομένων είναι υπερσυνδεδεμένα με άλλες βάσεις δεδομένων (KEGG, PubChem, MetaCyc, ChEBI, PDB, UniProt και GenBank) και μια ποικιλία δομών και διαδρομών παρακολούθησης μικροεφαρμογών. Η βάση δεδομένων

HMDB υποστηρίζει εκτεταμένες αναζητήσεις κειμένων, αλληλουχίας, χημικής δομής και σχεσιακών ερωτημάτων. Τέσσερις επιπλέον βάσεις δεδομένων, το DrugBank, το T3DB, το SMPDB και το FooDB είναι, επίσης, μέρος της σουίτας βάσεων δεδομένων HMDB. Το φάρμακο DrugBank περιέχει ισοδύναμες πληροφορίες για ~ 2280 μεταβολίτες φαρμάκων και φαρμάκων, το T3DB περιέχει πληροφορίες για ~ 3670 κοινές τοξίνες και περιβαλλοντικούς ρύπους, το SMPDB περιέχει διαγράμματα για ~ 25.000 μεταβολικές οδούς και ασθενειών του ανθρώπου, ενώ το FooDB περιέχει ισοδύναμες πληροφορίες για ~ 28.000 συστατικά τροφίμων και πρόσθετα τροφίμων [124–127].

1.5.4.3 MetaboAnalyst

Αυτή η βάση δεδομένων υποστηρίζει την ανάλυση μονοπατιών και την απεικόνιση 21 μοντέλων οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπου, ποντικιού, αρουραίου, αγελάδας, κοτόπουλου, Zebrafish, Arabidopsis thaliana, ρυζιού, Drosophila, Malaria, Budding ζύμη, E.coli, κλπ., με ένα σύνολο 1600 μονοπατιών. Η βάση δεδομένων MetaboAnalyst (Έκδοση 4.0) περιέχει συνολικά 12 ενότητες οργανωμένες σε τέσσερις γενικές κατηγορίες:

- Διερευνητική στατιστική ανάλυση: γενικές στατιστικές μεθόδους, ανάλυση
 βιοδεικτών, ανάλυση δύο φάσεων και ανάλυση ισχύος
- Ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού: ανάλυση εμπλουτισμού σε σύνολο μεταβολιτών, ανάλυση μεταβολικής οδού και πρόβλεψη δραστηριότητας οδού από κορυφές MS
- Ενσωμάτωση δεδομένων & βιολογία συστημάτων: μετα-ανάλυση
 βιοδεικτών, ανάλυση κοινής οδού και εξερευνητής δικτύου
- Λειτουργίες επεξεργασίας και χρησιμότητας δεδομένων: μετατροπή ταυτότητας χημικής ένωσης, λιπιδομική και συνδέσεις με διάφορα εργαλεία ανάλυσης φασμάτων

Αποδέχεται την εισαγωγή διαφόρων τύπων δεδομένων μεταβολομικής, καθώς και γονίδια ή ορθόλογα KEGG (KOs) για την υποστήριξη μιας ολοκληρωμένης ανάλυσης με χρήση τρανσκριπτομικής ή (μετα)γονιδιωματικής [128–130].

ΣΚΟΠΟΣ

Με βάση προηγούμενες μελέτες που έχουν διεξαχθεί έχει προκύψει ότι οι CNDs προκαλούν θνησιμότητα των λαρβών zebrafish μετά από έκθεση τους σε αυτές. Δεδομένης της τεράστιας αύξησης που εμφανίζεται στην έρευνα γύρω από τις CNDs είναι αναπόφευκτο ότι σε βάθος χρόνου οι CNDs θα καταλήξουν στα υδάτινα οικοσυστήματα. Πέραν της οξείας τοξικότητας που μπορούν να προκαλέσουν είναι πιθανό οι CNDs να προκαλούν και ποικίλες μεταβολικές αλλαγές στους υδρόβιους οργανισμούς με άγνωστα ακόμα αποτελέσματα. Προκειμένου να γίνει καλύτερη αξιολόγηση της επικινδυνότητας των CNDs στους υδρόβιους οργανισμούς θα πρέπει οι τοξικολογικές μελέτες να συνδυάζονται και με μεταβολομικές μελέτες που θα συμπληρώνουν τα αποτελέσματα αυτά (τοξικομεταβολομική μελέτη).

Για την απόκτηση μιας πιο ολοκληρωμένης άποψης της επίδρασης των ετεροατόμων στην τοξικότητα των CNDs, συντέθηκαν νανοκουκκίδες με το κιτρικό οξύ ως κοινή πηγή άνθρακα, οι οποίες διαφοροποιήθηκαν με βάση το άζωτο (ως πηγή αζώτου η ουρία) και τα άζωτο-θείο (ως πηγή αζώτου και θείου η θειουρία). Έπειτα, μελετήθηκε σύντομα η τοξικότητα και οι μορφολογικές ανωμαλίες των λαρβών zebrafish. Τέλος, διεξήχθη, μια μη-στοχευμένη μεταβολομική μελέτη της επίδρασης των νανοκουκκίδων στο μεταβόλωμα του zebrafish. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία ¹H-NMR (1D) και με τη βοήθεια δύο μεταβολομικών βάσεων δεδομένων, ελεύθερης πρόσβασης, έγινε μερική ταυτοποίηση των μεταβολιτών και συμπληρωματικά, χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία μάζας ώστε να ταυτοποιηθούν με μεγαλύτερη βεβαιότητα οι μεταβολίτες. Για την διερεύνηση των μεταβολικών οδών που εμπλέκονται στις αλλαγές του μεταβολικού αποτυπώματος, έγινε ανάλυση των μεταβολικών οδών με κατάλληλο μεταβολομικό πρόγραμμα ελεύθερης πρόσβασης. Τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν μεταξύ τους καθώς και με το δείγμα ελέγχου ούτως ώστε να προκύψουν συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση των CNDs στο μεταβολικό δίκτυο του zebrafish.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2° – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Ηθική

Όλες οι πειραματικές διαδικασίες στα ψάρια διεξήχθησαν σύμφωνα με τους εθνικούς κανονισμούς και εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Ερευνών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τα πειράματα και η έρευνα έγιναν σύμφωνα με την Οδηγία 86/609 / ΕΟΚ και Ευρωπαϊκή Οδηγία 2010/63 / ΕΕ. Σύμφωνα με τις οδηγίες αυτές, τα έμβρυα επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται σε πειράματα μέχρι τη στιγμή της ελεύθερης διαβίωσης (περίπου 5-7 dpf) [131].

2.2 Αντιδραστήρια - διαλύτες - υλικά:

Όλα τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τουλάχιστον αναλυτικής καθαρότητας. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο ύδωρ (DDW). Ακολουθεί κατάλογος των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν.

- Μεθανόλη, (HPLC-grade) (Fisher Scientific, Leicester, UK)
- Κιτρικό οξύ, Aldrich (Sigma–Aldrich-Hellas, Greece)
- Ουρία, Aldrich (Sigma–Aldrich-Hellas, Greece)
- Υδροξείδιο του νατρίου, NaOH, (Merck, Darmstadt, Germany)
- Θειουρία, Aldrich (Sigma–Aldrich-Hellas, Greece)
- Χλωροφόμιο, (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain)
- D₂O
- Νερό συστήματος
- Διάλυμα εμβρύων E3 (περιλαμβάνει 1-5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂ και 0,33 mM MgSO₄ διαλυμένα σε νερό συστήματος)
- Cell culture multiwell plates (Εικόνα 5)



Εικόνα 5: Cell culture multiwell plates 24 wells

2.3 Όργανα και συσκευές

- ο Πεχάμετρο PHM83 Autocal pH meter
- o Vortex
- ο Φυγόκεντρος
- ο Λουτρό υπερήχων Elma S40 (Elmasonic)
- ο Φούρνος
- ο Υδατόλουτρο
- ο Συσκευή λυοφιλίωσης με αντλία κενού
- ο Αυτόκλειστο (Autoclave) Parr με Teflon (Εικόνα 6)



Εικόνα 6: Αυτόκλειστο

Φασματοφωτόμετρο UV-VIS Shimadzu UV-2100 με κυψελίδα από quartz
 οπτικής διαδρομής 10 mm (Εικόνα 7)







ο Φασματοφωτόμετρο ATR-FTIR της Perkin Elmer, SPECTRUM TWO (Εικόνα 8)

Εικόνα 8: Perkin Elmer FT-IR spectrometer SPECTRUM TWO

Φθορισμόμετρο Cary Eclipse, Fluorescence Spectrophotometer, Varian.
 (Εικόνα 9)



Εικόνα 9: Cary Eclipse, Fluorescence Spectrophotometer

- Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) ελήφθησαν σε φασματόμετρο Brüker AV-500 εξοπλισμένο με κρυοκαθετήρα TXI (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany).
- O UHPLC Accela LC (Thermo Fisher Scientific, Inc. GmbH, Bremen, Germany) με φασματόμετρο μάζας (LTQ) Orbitrap (LTQ-Orbitrap XL 2.5.5 SP1, Thermo Fisher Scientific, Inc. GmbH, Bremen, Γερμανία). Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το X calibur 2.5.0.
- Στερεομικροσκόπιο (διοφθάλμιο) Olympus SZ61, με ψυχρό φωτισμό LED KL
 300 L



Εικόνα 10: Στερεομικροσκόπιο Olympus SZ61 (Πηγή: www.olympus-lifescience.com)

Ο Αυτοματοποιημένο σύστημα εκτροφής zebrafish ZebTEC Tecniplast, Aquatics
 Zebrafish Housing System





Εικόνα 11: ZebTEC, Aquatics Zebrafish Housing System (Πηγή: www.tecniplast.it)

ο Σύστημα αναπαραγωγής ISPAWN-S χωρητικότητας 20L



Εικόνα 12: Σύστημα αναπαραγωγής ISPAWN-S (Πηγή: www.tecniplast.it)

2.4 Πειραματικές πορείες

2.4.1 Συνθέσεις νανοκουκκίδων άνθρακα (CNDs)

<u>Σύνθεση 1^η (CNDs)</u>: Ζυγίστηκαν 0,20 g κιτρικού οξέος (CA) και μεταφέρθηκαν σε αυτόκλειστο Teflon. Στη συνέχεια το αυτόκλειστο τοποθετήθηκε σε φούρνο η θερμοκρασία του οποίου αυξήθηκε με ρυθμό 10 °C/min, μέχρι τους 200 °C. Μετά από 3 ώρες, η οβίδα τοποθετήθηκε στον απαγωγό και αφέθηκε να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου. Το παχύρευστο υγρό που προέκυψε συλλέχθηκε με μικρή ποσότητα δις απεσταγμένου νερού. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε σε τιμή περίπου 7 με διάλυμα NaOH. Τέλος, έγινε απομάκρυνση του διαλύτη με λυοφιλίωση και το εναπομείναν στερεό αποθηκεύτηκε σε σκοτεινό μέρος, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μέχρι την χρήση του.

Σύνθεση 2^η (N-doped CNDs): Ζυγίστηκαν 0,13 g CA και 0,11 g ουρίας σε ποτήρι ζέσεως και διαλύθηκαν σε 3 mL 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 στον απαγωγό και αφέθηκε να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου. Το παχύρρευστο υγρό που προέκυψε συλλέχθηκε με μικρή ποσότητα δις απεσταγμένου νερού. Τέλος, έγινε απομάκρυνση του διαλύτη με λυοφιλίωση και το εναπομείναν στερεό αποθηκεύτηκε σε σκοτεινό μέρος, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μέχρι την χρήση του.

<u>Σύνθεση 3ⁿ (N,S-doped CNDs)</u>: Ζυγίστηκαν 0,10 g CA και 0,11 g θειουρίας. Οι ποσότητες μεταφέρθηκαν σε γουδί για ομογενοποίηση. Έπειτα, το μίγμα μεταφέρθηκε σε αυτόκλειστο Teflon και στη συνέχεια σε αυτόκλειστο, το οποίο τοποθετήθηκε σε προθερμασμένο φούρνο σε θερμοκρασία 200 °C. Μετά από 2 ώρες, η οβίδα τοποθετήθηκε στον απαγωγό και αφέθηκε να κρυώσει έως θερμοκρασία δωματίου. Το παχύρρευστο υγρό που προέκυψε συλλέχθηκε με μικρή ποσότητα δις απεσταγμένου νερού. Τέλος, έγινε απομάκρυνση του διαλύτη με λυοφιλίωση και το εναπομείναν στερεό αποθηκεύτηκε σε σκοτεινό μέρος, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μέχρι τη χρήση του.

2.4.2 Φασματοσκοπία UV-VIS

Για την λήψη φασμάτων παρασκευάστηκαν διαλύματα νανοκουκκίδων σε νερό, με κατάλληλη αραίωση. 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.

2.4.3 Φασματοσκοπία IR (FTIR)

Λήφθηκαν FTIR φάσματα από τα στερεά δείγματα των CNDs. Οι μετρήσεις έγιναν στο φασματοφωτόμετρο ATR-FTIR SPECTRUM TWO, Perkin Elmer, σε θερμοκρασία δωματίου. Τα φάσματα λήφθησαν στην περιοχή από 4000 cm⁻¹ έως 400 cm⁻¹.

2.4.4 Φθορισμομετρία

Χρησιμοποιήθηκαν υδατικά διαλύματα των CNDs και καταγράφηκαν τα φάσματα εκπομπής (emission) φθορισμού στο φθορισμόμετρο σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης (excitation). Οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm.

2.4.5 Διατήρηση-εκτροφή zebrafish

Τα ενήλικα ψάρια διατηρήθηκαν και αναπτύχθηκαν στο αυτοματοποιημένο σύστημα εκτροφής με κλειστό κύκλωμα ανανέωσης νερού ZebTEC, Tecniplast (*Εικόνα 11*) στους 28 ± 1 °C σε μια φωτοπερίοδο 10 ώρες σκοτάδι : 14 ώρες φώς. Η μονάδα εκτροφής λειτουργεί μέσω συστήματος αντίστροφης ώσμωσης και αυτόματης προσθήκης άλατος και ρύθμισης pH. Στο σύστημα όλες οι συνθήκες φυσικοχημικών παραμέτρων είναι σταθερές και αυτόματα ρυθμιζόμενες με αγωγιμότητα νερού μεταξύ 450 και 1500 ms cm⁻¹ και pH 7.0 ± 1. Στα ψάρια παρέχεται τροφή δύο φορές ημερησίως με εμπορική ξηρή τροφή.

2.4.6 Αναπαραγωγή και συλλογή αυγών

Η πλειοψηφία των εγκαταστάσεων αναπαραγωγής zebrafish χρησιμοποιεί μια ειδική τεχνική δεξαμενής αναπαραγωγής που τηρεί τις ακόλουθες γενικές αρχές: ένας μικρός πλαστικός συνδυασμός κλουβί ή κιβώτιο με πλέγμα ή πλέγμα σχάρας τοποθετείται μέσα σε ένα ελαφρώς μεγαλύτερο δοχείο που γεμίζει με νερό. Στην παρούσα εργασία, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, χρησιμοποιήθηκε σύστημα αναπαραγωγής ISPAWN-S χωρητικότητας 20 L με πλαστικό διαχωριστικό και βρύση συλλογής των αυγών στο κάτω μέρος (*Εικόνα 12*) [132].

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε πληθυσμός ψαριών wild type. Την ημέρα πριν από την ωοτοκία, αρσενικά και θηλυκά ψάρια σε αναλογία 2 : 1 τοποθετήθηκαν στο σύστημα αναπαραγωγής για μια νύχτα, τα θηλυκά ψάρια στο κάτω μέρος ενώ τα αρσενικά στο πάνω μέρος της γεννήστρας. Η αναπαραγωγή στο zebrafish εξαρτάται έντονα από τη φωτοπερίοδο. Τα άτομα zebrafish συνήθως γεννάνε κατά την αυγή, μέσα στις πρώτες ώρες του φωτός, τόσο στο εργαστήριο όσο και στην άγρια φύση. Την επόμενη μέρα τα γονιμοποιημένα αυγά έπεσαν στο πυθμένα του εσωτερικού δοχείου και έτσι προστατεύτηκαν από κανιβαλισμό από τους ενήλικες. Τα γονιμοποιημένα έμβρυα συλλέχθηκαν, πλύθηκαν με το απαραίτητο μέσο (Ε3) και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri στους 28 ± 1 °C με Ε3, ενώ οι γεννήτορες μεταφέρθηκαν πίσω στις δεξαμενές τους και ακολούθησε το τάισμα τους [132].

2.4.7 Έκθεση του zebrafish σε νανοκουκκίδες

Την επόμενη μέρα (μετά τη συλλογή των εμβρύων) έγινε η διαδικασία της αποχορίωσης, μια μηχανική μέθοδος, με τη βοήθεια στερεσκοπίου χειρουργικής λαβίδας και χειρουργικής βελόνας (*Εικόνα* 13).





Μετά τη διαδικασία αποχορίωσης ακολούθησε η τοποθέτηση των λαρβών σε well plates των 24 θέσεων. Αρχικά, σε κάθε πηγάδι (well) προστέθηκε 1,5 mL διαλύματος έκθεσης. Πιο συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν οι παρακάτω ουσίες, σε E3, σε διάφορες συγκεντρώσεις (*Πίνακας 2*). Κάθε πείραμα συνοδευόταν από πειράματα ελέγχου (E3).

Πίνακας 2: Συγκεντρώσεις	διαλυμάτων	νανοκουκκίδων
--------------------------	------------	---------------

Ουσία	Συγκέντρωση			
Non-doped CNDs	140 µg mL ⁻¹	275 μg mL ⁻¹	400 µg mL⁻¹	585 μg mL ⁻¹
N-doped CNDs	50 µg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹	200 µg mL ⁻¹	400 µg mL ⁻¹
N,S-doped CNDs	75 μg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹	150 μg mL ⁻¹	200 μg mL ⁻¹

Στη συνέχεια σε κάθε πηγάδι τοποθετήθηκαν (τυχαία) 2 αποχοριομένα έμβρυα. Χρησιμοποιήθηκαν 144 ψάρια για κάθε συγκέντρωση και πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις. Τα διαλύματα δοκιμής δεν ανανεώθηκαν κατά τη διάρκεια της έκθεσης. Όλα τα πειράματα διήρκησαν 96 ώρες (4 ημέρες). Τα well plates τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 28±1 °C με φωτοπερίοδο σκοταδιού/φωτός 10 : 14 h. Κατά τη διάρκεια των 96 ωρών παρατηρήθηκε με στερεσκόπιο η ανάπτυξη, οι μορφολογικές ανωμαλίες και η θνησιμότητα των λαρβών και έγινε λήψη φωτογραφιών. Μετά τις 96 ώρες ακολούθησε η συλλογή των λαρβών και η έκπλυση με νερό συστήματος, η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 3 φορές προκειμένου να απομακρυνθούν τα άλατα που περιέχει το διάλυμα Ε3 και τυχόν ακαθαρσίες εξαιτίας των ψαριών. Τα άτομα τοποθετήκαν σε falcon με μικρή ποσότητα νερού συστήματος και στη συνέχεια θανατώθηκαν σε υγρό άζωτο. Τέλος, ακολούθησε η διαδικασία της λυοφιλίωσης.

2.4.8 Εκχύλιση των μεταβολιτών

Για την εκχύλιση των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκε μία παραλλαγή της μεθόδου εκχύλισης Bligh και Dyer (με μεθανόλη, απεσταγμένο νερό και χλωροφόρμιο σε αναλογία 2:1:2) [133]. Στις λυοφιλιωμένες λάρβες 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 λεπτά 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 φυλάχτηκε στους -80 °C μέχρι τη χρήση του.

2.4.9 Λήψη φασμάτων ¹Η-NMR και MS/MS

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

- Καταγραφή φασμάτων στους 298 Κ.
- Χρόνος μέτρησης: 4,1 sec
- Χρόνος ηρεμίας: 5000 sec
- Σημεία δεδομένων: 64 Κ
- Μήκος παλμού: 90°
- Ο Αριθμός σαρώσεων: 256

Για τη λήψη φασμάτων μάζας έγινε επαναιώρηση του δείγματος σε 100 μL ακετονιτρίλιο και το δείγμα εισήχθηκε σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας για διαχωρισμό και τη 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 × 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 μL 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 ένα 2 λεπτά επαν-εξισορρόπησης της στήλη.

Χρησιμοποιήθηκε ένα φασματόμετρο 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 μL, τάση πηγής: 3,70 kV, φακοί του σωλήνα: 120 V, θερμαινόμενη τριχοειδής τάση: 3,70 kV, φακοί του σωλήνα: 120 V, θερμαινόμενη τριχοειδής τάση: 3,70 kV, φακοί του σωλήνα: 120 V, θερμαινόμενη τριχοειδής τάση: 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 πλήρη σάρωση με ανάλυση 60.000 και εύρος μαζών (m/z) 50 – 1500 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

2.5 Ανάλυση δεδομένων

Ο έλεγχος και η επεξεργασία των φασμάτων ΝΜR 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) και του "NMR based Search" της Madison Metabolomics Consortium Database (MMCD) 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 ± 0.01. Στη βάση δεδομένων MMCD ρυθμίστηκαν οι εξής παράμετροι: Data Set: Experimental_Data, Sample Condition: ANY, Threshold: 1%, H_tol: 0.02 ppm, Show: 999 Results. Στη συνέχεια λήφθηκαν οι μεταβολίτες και από τις δύο βάσεις δεδομένων και με σύγκριση των αποτελεσμάτων καταγράφηκαν οι μεταβολίτες που ήταν κοινοί και στις δύο σειρές αποτελεσμάτων.

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 σαρώθηκαν για τις ακριβείς μάζες των πιθανών μεταβολιτών. 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 4.0 και με χρήση της βιβλιοθήκης: zebrafish (Danio rerio) λήφθηκαν τα μεταβολικά μονοπάτια στα οποία ενέχονται οι μεταβολίτες του zebrafish.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3⁰- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Χαρακτηρισμός CNDs

3.1.1 Φασματοσκοπία UV-Vis

Τα φάσματα UV-Vis που λήφθησαν για τις non-doped CNDs, N-doped CNDs, και N,Sdoped CNDs παρουσιάζονται στις *Εικόνες 14, 15* και *16* αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις εμφανίζεται μια κορυφή περίπου στα 230 nm που είναι χαρακτηριστική για τις π-π* μεταπτώσεις των δεσμών -C-C- στις νανοκουκκίδες. Η μετάπτωση ηλεκτρονίων που είναι γνωστή ως π-π* (από το HOMO π στο LUMO π*) είναι μια επιτρεπτή μετάπτωση και η διέγερση αυτή αντιπροσωπεύεται από υψηλές τιμές συντελεστή μοριακής απορρόφησης ε, ο οποίος είναι ανάλογος της έντασης. Ακόμα, παρατηρείται μια κορυφή περίπου στα 340 nm. Σύμφωνα με τον Reckmeier et al., η κορυφή αυτή αντιστοιχεί στις n-π* μεταπτώσεις που προκύπτουν από τις άκρες που σχηματίζονται στα όρια των sp² και sp³ υβριδισμένων ανθράκων. Η συγκεκριμένη μετάπτωση είναι μη επιτρεπτή, συνεπώς πιο ασθενής και έτσι η διέγερση χαρακτηρίζεται από μικρότερες τιμές του συντελεστή μοριακής απορρόφησης ε, σε σχέση με την μετάπτωση π-π*.



Εικόνα 14: Φάσμα UV-Vis των non-doped CNDs



Εικόνα 15: Φάσμα UV-Vis των N-doped CNDs



Εικόνα 16: Φάσμα UV-Vis των N,S-doped CNDs

3.1.2 Φασματοσκοπία FT-IR

Προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα για τις λειτουργικές ομάδες καθώς και για την ποιοτική σύσταση του εκάστοτε υλικού, λήφθησαν τα φάσματα FTIR για κάθε υλικό. Τα στοιχεία που συλλέχθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

Φάσμα των non-doped CNDs (παρουσιάζεται στην Εικόνα 17):

Το φάσμα περιλαμβάνει μια κορυφή στα 3500 cm⁻¹ που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού -O-H, καθώς και μια κορυφή στα 3282 cm⁻¹ που επίσης οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού –O-H ή σε δόνηση τάσης δεσμού –C-H. Επιπλέον, εμφανίζονται οι εξής κορυφές απορρόφησης:

- \circ στα 1689 cm⁻¹ που οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού -C=O
- στα 1418 cm⁻¹ και 1391 cm⁻¹ που οφείλονται σε δόνηση κάμψης του δεσμού O-H
- στα 1171 cm⁻¹, 1140 cm⁻¹, 1079 cm⁻¹ και 1052 cm⁻¹ που αντιστοιχούν σε δόνηση τάσης του δεσμού -C-O
- στα 934 cm⁻¹ και 903 cm⁻¹ που οφείλονται σε δόνηση κάμψης του δεσμού -C=C-
- στα 881 cm⁻¹ που αντιστοιχεί επίσης σε δόνηση τάσης του δεσμού -C=C- ή σε δόνηση κάμψης του δεσμού -C-H
- ο στα 771 cm⁻¹ που αντιστοιχεί επίσης σε δόνηση κάμψης του δεσμού -C-H.

Φάσμα των N-doped CNDs (παρουσιάζεται στην Εικόνα 18):

Ομοίως με το φάσμα του προηγούμενου υλικού, εμφανίζεται μια κορυφή στα 3189 cm⁻¹ που υποδηλώνει δόνηση τάσης του δεσμού -Ο-Η. Ακόμα παρατηρούμε μια κορυφή στα 3050 cm⁻¹ που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού –C–H, Επίσης, εμφανίζονται κορυφές όπως:

 \circ στα 1567 cm⁻¹ που οφείλεται σε δόνηση τάσης του διπλού δεσμού -C=C- στα

- στα 1333 cm⁻¹ που οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού -C-N (aromatic amine) ή σε δόνηση τάσης του δεσμού -N-O (nitro compound) ή σε δόνηση κάμψης του δεσμού -O-H
- στα 1185 cm⁻¹ που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού –C-N ή σε δόνηση τάσης του δεσμού -C-O
- ο στα 991 cm⁻¹ που οφείλεται σε δόνηση κάμψης του δεσμού -C=C-
- ο στα 771 cm⁻¹ που οφείλεται σε δόνηση κάμψης του δεσμού -C-H.

Φάσμα των N,S-doped CNDs (παρουσιάζεται στην Εικόνα 19):

Στο φάσμα εμφανίζονται δυο κορυφές στα 3300 cm⁻¹ και 3400 cm⁻¹ που αντιστοιχούν σε δόνηση τάσης του δεσμού N-H. Ακόμα, το φάσμα περιλαμβάνει μια κορυφή στα 3157 cm⁻¹ που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού -O-H. Εμφανίζονται επιπλέον οι κορυφές απορρόφησης:

- \circ στα 2063 cm⁻¹ που οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού N=C=S
- \circ στα 1699 cm⁻¹ που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού –C=O
- στα 1657 cm⁻¹ που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού –C=N ή σε δόνηση τάσης του δεσμού –C=C–
- ο στα 1594 cm⁻¹ που οφείλεται σε δόνηση κάμψης του δεσμού N-H
- στα 1386 cm⁻¹ που οφείλεται σε δόνηση κάμψης του δεσμού C-H ή σε δόνηση τάσης του δεσμού S=O
- στα 1188 cm⁻¹ που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού S=O ή σε δόνηση τάσης του δεσμού -C-N
- \circ στα 1088 cm⁻¹ που οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού -C-N
- στα 727 cm⁻¹ που αντιστοιχεί σε δόνηση κάμψης του δεσμού −C-H

Συμπερασματικά, στο φάσμα των N-doped CNDs εμφανίζονται κορυφές που είναι ενδεικτικές των δεσμών ατόμων με άζωτο, γεγονός που αποδεικνύει την παρουσία αζώτου στο δείγμα. Με αυτόν τον τρόπο επιβεβαιώνεται η επιτυχής σύνθεση των N-doped CNDs, με την προσθήκη ουρίας στο κιτρικό οξύ. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από την απουσία των αντίστοιχων κορυφών στο φάσμα των απλών CNDs. Αντίστοιχα, στο φάσμα των N,S-doped CNDs εμφανίζονται κορυφές που είναι ενδεικτικές των δεσμών ατόμων με άζωτο και θείο, γεγονός που αποδεικνύει και την παρουσία των ατόμων αυτών στο δείγμα. Έτσι, επιβεβαιώνεται η σύνθεση των τελειών αυτών με την προσθήκη θειουρίας στο κιτρικό οξύ.



Εικόνα 17: Φάσμα FT-IR των non-doped CNDs



Εικόνα 18: Φάσμα FT-IR των N-doped CNDs



Εικόνα 19: Φάσμα FT-IR των N,S-doped CNDs

3.1.3 Φθορισμομετρική μελέτη

Στις Εικόνες 20, 21 και 22 απεικονίζονται 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. Παρατηρείται ότι, σε όλες τις περιπτώσεις ο εκπεμπόμενος φθορισμός είναι εξαρτώμενος από το μήκος κύματος διέγερσης. Η μέγιστη εκπομπή φθορισμού των non-doped CNDs παρατηρείται στα 450 nm και επιτυγχάνεται για διέγερση στα 330 nm. Στην περίπτωση των N-doped CNDs, η μέγιστη εκπομπή φθορισμού παρατηρείται στα 458 nm και επιτυγχάνεται για διέγερση στα 350 nm, ενώ οι N,S-doped CNDs εμφανίζουν μέγιστη εκπομπή φθορισμού στα 480 nm σε μήκος κύματος διέγερσης 380 nm. Είναι εμφανές πως η προσθήκη αζώτου και θείου μετατοπίζει το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής φθορισμού των νανοκουκκίδων. Μεγαλύτερη τιμή έντασης εκπομπής εμφανίζεται κατά σειρά για τις non-doped CNDs, N-doped CNDs και τις N,S-doped CNDs σε διέγερση 330, 350 και 380 nm αντίστοιχα.



Εικόνα 20: Φάσματα εκπομπής του φθορισμού των non-doped CNDs σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης.



Εικόνα 21: Φάσματα εκπομπής του φθορισμού των N-doped CNDs σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης.



Εικόνα 22: Φάσματα εκπομπής του φθορισμού των N,S-doped CNDs σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης.

Στις *Εικόνες 23Α* και 23B και φαίνονται κατά σειρά τα αραιωμένα σε DDW διαλύματα των N-doped CNDs, non-doped CNDs και N,S-doped CNDs, όπως εμφανίζονται σε φυσικό φως (*Εικόνα 23Α*) και κάτω από λάμπα UV, στα 254 nm (*Εικόνα 23B*).



Εικόνα 23: Α: Εμφάνιση των N-doped CNDs, non-doped CNDs και N,S-doped CNDs σε μορφή διαλύματος Β: εμφάνιση των N-doped CNDs, non-doped CNDs και N,S-doped CNDs κάτω από λάμπα UV.

3.1.4 Μέγεθος νανοκουκκίδων άνθρακα



Εικόνα 24: Εικόνες ΤΕΜ και κατανομές μεγέθους των (**A**) non-doped, (**B**) N-doped and (**C**) N,Sdoped CNDs

Εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Transition Electron Microscopy TEM) δίνονται στην *Εικόνα 24*. Από τις κατανομές μεγέθους των σωματιδίων φαίνεται ότι οι non-doped CNDs έχουν πολύ μικρή διακύμανση, από 4 έως 6 nm με μέγιστο τα 5 nm. Ομοίως, για τις N-doped και N,S doped CNDs έχουμε πάλι πολύ μικρή διακύμανση, από 4 έως 6 nm με μέγιστο τα 5 nm.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα από τις φασματοσκοπίες UV-Vis και FTIR, τη φθορισμομετρική μελέτη και το μέγεθος των σωματιδίων συμφωνούν με τη βιβλιογραφία των συγκεκριμένων νανοκουκκίδων [134–136].

3.2 Τοξικότητα

Κατά τη διάρκεια της έκθεσης στα τρία είδη νανοκουκκίδων και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις τους παρατηρήθηκαν οι λάρβες με την χρήση στερεοσκοπίου.



Εικόνα 25: Ενδεικτικές εικόνες λαρβών zebrafish. (Α) Δείγμα ελέγχου, λάρβες που εκτέθηκαν σε (Β) non-doped CNDs, (C) N-doped CNDs και (D) N,S-doped CNDs.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 25, στα άτομα zebrafish που εκτέθηκαν στις νανοκουκκίδες παρατηρήθηκαν, μορφολογικές ανωμαλίες, όπως περικαρδιακό οίδημα και κύρτωση ουράς. Κατά τη διάρκεια του πειράματος γινόταν καθημερινά καταμέτρηση των νεκρών ατόμων σε κάθε πηγάδι και γινόταν λήψη φωτογραφιών. Ενδεικτικές φωτογραφίες των νεκρών ατόμων παρουσιάζονται στην Εικόνα 26.



Εικόνα 26: Νεκρές λάρβες zebrafish μετά από έκθεση στις νανοκουκκίδες.
3.2.1 Προσδιορισμός θνησιγόνου δόσης (Lethal dose)

Όπως φαίνεται από τις καμπύλες θνησιμότητας που παρουσιάζονται στην Εικόνα 27, σε όλες τις περιπτώσεις η τοξικότητα είναι δοσοεξαρτώμενη και αυξάνεται με τη πάροδο του χρόνου. Επιπλέον, η τοξικότητα αυξάνεται όσο αυξάνεται το doping. Οι non-doped CNDs ήταν οι λιγότερο τοξικές από τα δοκιμασμένα νανοϋλικά, ακολουθούμενες από τις N-doped CNDs, ενώ οι N,S-doped CNDs ήταν οι πιο τοξικές.

Στην τοξικολογία, η μέση θνησιγόνος δόση (median lethal dose), LD₅₀ (συντόμευση για lethal dose, 50%), LC₅₀ (θνησιγόνος συγκέντρωση (lethal concentration), 50%) ή LCt₅₀ (θνησιγόνος συγκέντρωση και χρόνος (lethal concentration and time)) μιας τοξίνης, ακτινοβολίας, ή παθογόνου ουσίας είναι η απαιτούμενη δόση για να σκοτώσει τα μισά μέλη του ελεγχόμενου πληθυσμού μετά από έναν συγκεκριμένο χρόνο δοκιμής. Οι αριθμοί LD₅₀ χρησιμοποιούνται συχνά ως ένας γενικός δείκτης οξείας τοξικότητας μιας ουσίας. Μια χαμηλή τιμή LD₅₀ είναι ένδειξη αυξημένης τοξικότητας [137].

Συγκεκριμένα, οι θνησιγόνες δόσεις για τις non-doped CNDs, N-doped CNDs και N,Sdoped CNDs ήταν LD₅₀ = 584 μg ml⁻¹, LD₅₀= 399 μg ml⁻¹ και LD₅₀= 150 μg ml⁻¹ αντίστοιχα.



Εικόνα 27: Καμπύλες θνησιμότητας των λαρβών zebrafish μετά από έκθεση στις non-doped CNDs, Ndoped CNDs και N,S-doped CNDs.

3.3 Μελέτη του μεταβολώματος του zebrafish

3.3.1 Αλλαγές του μεταβολώματος με βάση τις φασματοσκοπίες NMR και MS

Αρχικά ελήφθησαν τα φάσματα ¹Η-ΝΜR (1D) για όλα τα δείγματα (*Εικόνες Π1-Π13*). Όπως ήταν αναμενόμενο, τα φάσματα είναι αρκετά πολύπλοκα εξαιτίας του μεγάλου αριθμού μεταβολιτών. Με μία πρώτη ματιά εντοπίζονται διαφορές στα φάσματα που αντιπροσωπεύουν τα μεταβολώματα των ατόμων zebrafish πριν και μετά την έκθεση τους σε νανοκουκκίδες καθώς και διαφορές στα μεταβολώματα των ατόμων zebrafish που εκτέθηκαν τόσο στις διαφορετικές νανοκουκκίδες, όσο και στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ίδιου υλικού.

Στη συνέχεια, τα δεδομένα (φασματικές κορυφές, ppm) αναλύθηκαν με τη χρήση του εργαλείου "1D NMR Search" της Human Metabolome Database (HMDB) και του "NMR based Search" της Madison Metabolomics Consortium Database (MMCD). Οι μεταβολίτες που προέκυψαν από τις παραπάνω βάσεις δεδομένων ταυτοποιήθηκαν περαιτέρω με χρήση UHPLC-LTQ-OrbitrapMS. Ακολουθώντας αυτή τη πειραματική πορεία για το σύνολο των δειγμάτων, ταυτοποιήθηκαν 35 διαφορετικοί μεταβολίτες. Στους πίνακες 3-6 φαίνονται οι ταυτοποιημένοι μεταβολίτες του zebrafish μετά την έκθεση του σε non-doped CNDs, N-doped CNDs, N,S-doped CNDs καθώς και για το control. Αναλυτικός κατάλογος με όλους τους μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν, παραθέτεται στο παράρτημα ΙΙ.

Μεταβολίτες του δείγματος ελέγχου ατόμων zebrafish				
α-D-γλυκόζη	D-Μαννόζη	Σταχυόζη		
α-Λακτόζη	6-φωσφορική φρουκτόζη	Σακχαρόζη		
Βιοτίνη	6-φωσφορική γλυκοζαμίνη	Διφωσφορικό γλυκουρονικό οξύ ουριδίνης		
D-Φρουκτόζη	L-Κυσταθειόνη	Διφωσφορική Ν - ακετυλογλυκοζαμίνη ουριδίνης		
D-Μαλτόζη	Ραφινόζη			

Πίνακας 3: Μεταβολίτες του	δείγματος ελέγχου	ατόμων zebrafish
----------------------------	-------------------	------------------

Μεταβολίτες ατόμ	ιων zebrafish μετ	ά από έκθεση σε	non-doped CNDs
145 μg mL ⁻¹ (LD ₅₀ /4)	290 μg mL ⁻¹ (LD ₅₀ /2)	400 μg mL ⁻¹	585 μg mL ⁻¹ (LD ₅₀)
α-Λακτόζη	-	-	-
-	α- κετοϊσοβαλερικό οξύ	α- κετοϊσοβαλερικό οξύ	-
Βιοτίνη	-	-	-
Κιτρουλλίνη	-	-	-
D-Μαλτόζη	-	D-Μαλτόζη	D-Μαλτόζη
γ-αμινο-βουτυρικό οξύ	-	-	-
-	-	6-φωσφορική γλυκοζαμίνης	-
Γλουταθειόνη	-	-	-
-	-	3-φωσφορική γλυκερόλη	-
-	Ινοσίνη	-	-
-	L-Αραβιτόλη	-	-
L-Κυσταθειόνη	-	L-Κυσταθειόνη	L-Κυσταθειόνη
-	L-Κυστίνη	L-Κυστίνη	-
L-Φουκόζη	-	-	-
L-Ιστιδίνη	-	L-Ιστιδίνη	-
-	-	L-Μεθειονίνη	-
L-Τυροσίνη	-	-	-
Μελιβιόζη	-	-	-
-	Πιπεκολικό οξύ	-	-
S- Αδενοσυλομοκυστεΐν η	-	-	S- Αδενοσυλομοκυστ εΐνη
Σεληνομεθειονίνη	-	Σεληνομεθειονίν η	-
Σταχυόζη	-	-	_
-	Σακχαρόζη	-	_
-	Τρεχαλόζη	-	-

Μεταβολίτες ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε N-doped CNDs				
50 μg mL ⁻¹ (LD ₅₀ /8)	100 μg mL ⁻¹ (LD ₅₀ /4)	200 μg mL ⁻¹ (LD ₅₀ /2)	400 μg mL ⁻¹ (LD ₅₀)	
-	-	α-D-γλυκόζη	α-D-γλυκόζη	
α-Λακτόζη	α-Λακτόζη	α-Λακτόζη	α-Λακτόζη	
-	-	Κιτρουλλίνη	-	
-	-	D-Φρουκτόζη	-	
D-Μαλτόζη	D-Μαλτόζη	D-Μαλτόζη	D-Μαλτόζη	
D-Μαννόζη	-	-	-	
-	-	D-Ξυλόζη	-	
-	-	L-Ισολευκίνη	-	
Ραφινόζη	Ραφινόζη	Ραφινόζη	Ραφινόζη	
S-	S-	S-	S-	
Αδενοσυλομοκυστ	Αδενοσυλομοκυστ	Αδενοσυλομοκυστ	Αδενοσυλομοκυστ	
εΐνη	εΐνη	εΐνη	εΐνη	
-	Σταχυόζη	Σταχυόζη	Σταχυόζη	

Πίνακας 5: Μεταβολίτες ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε N-doped CNDs

Πίνακας 6: Μεταβολίτες ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε N,S-doped CNDs

Μεταβολίτες ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε N,S-doped CNDs					
75 μg mL ⁻¹ (LD ₅₀ /2)	100 µg mL ⁻¹	150 μg mL ⁻¹ (LD ₅₀)	200 μg mL ⁻¹		
α-D-γλυκόζη	α-D-γλυκόζη	α-D-γλυκόζη	-		
α-Λακτόζη	α-Λακτόζη	-	α-Λακτόζη		
-	Βιοτίνη	-	-		
D-Φρουκτόζη	-	-	-		
D-Μαλτόζη	D-Μαλτόζη	D-Μαλτόζη	D-Μαλτόζη		
D-Μαννόζη	-	D-Μαννόζη	-		
D-Ξυλόζη	-	D-Ξυλόζη	-		
6-φωσφορική φρουκτόζη	-	6-φωσφορική φρουκτόζη	_		
-	6-φωσφορική γλυκοζαμίνη	6-φωσφορική γλυκοζαμίνη	6-φωσφορική γλυκοζαμίνη		
-	-	L-Αραβιτόλη	-		
L-Κυσταθειόνη	L-Κυσταθειόνη	L-Κυσταθειόνη	-		
L-Ισολευκίνη	-	-	-		

L-Προλίνη	-	-	-
Μελιβιόζη	-	Μελιβιόζη	-
Ραφινόζη	Ραφινόζη	Ραφινόζη	-
-	-	-	S- Αδενοσυλομοκυστεΐνη
Σταχυόζη	Σταχυόζη	Σταχυόζη	-
Σακχαρόζη	-	Σακχαρόζη	-

Σε όλα τα δείγματα εξαφανίζονται οι μεταβολίτες Διφωσφορικό γλυκουρονικό οξύ ουριδίνης και Διφωσφορική Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη ουριδίνης, οι οποίοι υπάρχουν στο δείγμα ελέγχου.

Στην περίπτωση των non-doped CNDs, ανιχνεύτηκαν 24 διαφορετικοί μεταβολίτες. Από αυτούς οι 7 ήταν κοινοί με το δείγμα ελέγχου: α-Λακτόζη, Βιοτίνη, D-Μαλτόζη, L-Κυσταθειόνη, Σταχυόζη, Σακχαρόζη, 6-φωσφορική γλυκοζαμίνη, ενώ εμφανίστηκαν 17 νέοι μεταβολίτες, οι ακόλουθοι: Κιτρουλλίνη, γ-αμινοβουτυρικό οξύ, Γλουταθειόνη, L-Ιστιδίνη, L-Φουκόζη, L-Τυροσίνη, Μελιβιόζη, S-Αδενοσυλομοκυστεΐνη, Σεληνομεθειονίνη, α-κετοϊσοβαλερικό οξύ, Ινοσίνη, L-Αραβιτόλη, L-Κυστίνη, Πιπεκολικό οξύ, Τρεχαλόζη, L-Μεθειονίνη, 3-φωσφορική γλυκερόλη. Επιπλέον, 7 μεταβολίτες εξαφανίστηκαν από τις λάρβες μετά από έκθεση στις non-doped CNDs: α-D-γλυκόζη, D-φρουκτόζη, D-Μαννόζη, 6φωσφορική φρουκτόζη, Ραφινόζη, Διφωσφορικό γλυκουρονικό οξύ ουριδίνης, Διφωσφορική Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη ουριδίνης. Δεν ταυτοποιήθηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις κοινός μεταβολίτης. Οι μεταβολίτες D-Μαλτόζη και L-Κυσταθειόνη ταυτοποιήθηκαν στις συγκεντρώσεις 145 μ g mL⁻¹, 400 μ g mL⁻¹ και 585 μ g mL⁻¹ αλλά όχι στην 290 μg mL⁻¹. Περισσότεροι μεταβολίτες ανιχνεύτηκαν μετά από έκθεση σε συγκέντρωση 145 μg mL⁻¹. Ακόμα, οι μεταβολίτες: α-κετοϊσοβαλερικό οξύ, γαμινοβουτυρικό οξύ, Γλουταθειόνη L-Φουκόζη, 3-φωσφορική γλυκερόλη, Ινοσίνη, L-Κυστίνη, L-Ιστιδίνη, L-Μεθειονίνη, L-Τυροσίνη, Πιπεκολικό οξύ, Σεληνομεθειονίνη και Τρεχαλόζη εμφανίστηκαν μόνο μετά από έκθεση του zebrafish σε non-doped CNDs και δεν εμφανίστηκαν στις υπόλοιπες συνθήκες.

Όταν τα άτομα zebrafish εκτέθηκαν στις CNDs τροποποιημένες με άζωτο, εντοπίστηκαν 11 διαφορετικοί μεταβολίτες εκ των οποίων, οι 7 (Σταχυόζη, Ραφινόζη, D-Μαννόζη, α-D-γλυκόζη, D-Μαλτόζη, α-Λακτόζη, D-φρουκτόζη) ήταν κοινοί με το δείγμα ελέγχου. Οι μεταβολίτες D-Ξυλόζη, Κιτρουλλίνη, S-Αδενοσυλομοκυστεΐνη, L-Ισολευκίνη εμφανίστηκαν μετά από έκθεση στις nondoped CNDs και δεν υπήρχαν στο δείγμα ελέγχου. Ακόμα 7 μεταβολίτες εξαφανίστηκαν από το δείγμα ελέγχου, δηλ: Βιοτίνη, 6-φωσφορική γλυκοζαμίνη, L-Κυσταθειόνη, Σακχαρόζη, 6-φωσφορική φρουκτόζη, Διφωσφορικό γλυκουρονικό οξύ ουριδίνης, Διφωσφορική Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη ουριδίνης. Σε όλες τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες α-Λακτόζη, D-Μαλτόζη και Ραφινόζη, οι οποίοι ταυτοποιήθηκαν και στο δείγμα ελέγχου. Ακόμα, ο μεταβολίτης Σταχυόζη εμφανίστηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις εκτός από τη mL^{-1} . μg Τέλος, ταυτοποιήθηκε ο συγκέντρωση 50 μεταβολίτης S-Αδενοσυλομοκυστεΐνη ο οποίος δεν υπάρχει στο δείγμα ελέγχου. Περισσότεροι μεταβολίτες ανιχνεύτηκαν μετά από έκθεση στη συγκέντρωση 200 μg mL⁻¹.

Η έκθεση του zebrafish σε CNDs τροποποιημένες με άζωτο και θείο απέφεραν την παρουσία 18 διαφορετικών μεταβολιτών, από τους οποίους οι 12 εμφανίστηκαν και στο δείγμα ελέγχου α-D-γλυκόζη, D-Μαλτόζη, D-Μαννόζη, 6-φωσφορική φρουκτόζη, 6-φωσφορική γλυκοζαμίνη, L-Κυσταθειόνη, Ραφινόζη, Σταχυόζη, Σακχαρόζη, α-Λακτόζη, Βιοτίνη, D-φρουκτόζη. Επίσης, εμφανίστηκαν οι εξής 6 μεταβολίτες, οι οποίοι δεν υπήρχαν στο δείγμα ελέγχου: D-Ξυλόζη, L-Αραβιτόλη, Μελιβιόζη, S- Αδενοσυλομοκυστεΐνη , L-Ισολευκίνη, L-Προλίνη. Ακόμα εξαφανίστηκαν οι μεταβολίτες Διφωσφορικό γλυκουρονικό οξύ ουριδίνης και Διφωσφορική Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη ουριδίνης οι οποίοι ανιχνεύτηκαν στο δείγμα ελέγχου. Στη συγκέντρωση 75 μ g mL⁻¹ ανιχνεύτηκαν οι περισσότεροι μεταβολίτες. Ο μεταβολίτης D-Μαλτόζη ταυτοποιήθηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν. Ενώ οι α-Λακτόζη και Ραφινόζη ταυτοποιήθηκαν μόνο σε τρεις συγκεντρώσεις όπως και οι: Σταχυόζη, 6-φωσφορική γλυκοζαμίνη, L-Κυσταθειόνη και α-D-γλυκόζη. Τέλος, ο μεταβολίτης L-Προλίνη ταυτοποιήθηκε μόνο στην περίπτωση που οι λάρβες εκτέθηκαν σε 75 μ g mL⁻¹ N,S-doped CNDs και δεν

ταυτοποιήθηκε ούτε στο δείγμα ελέγχου ούτε μετά από έκθεση στα άλλα δύο νανοϋλικά.

3.3.2 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 στους πίνακες 7-10.

Μεταβολικά μονοπάτια δείγματος ελέγχου ατόμων zebrafish				
Μεταβολισμός αμινοσακχάρων και σακχάρων των νουκλεοτιδίων	Μεταβολισμός αζώτου			
Μεταβολισμός βιοτίνης	Μεταβολισμός ριβοφλαβίνης			
Μεταβολισμός φρουκτόζης και μαννόζης	Μεταβολισμός αμύλου και σακχαρόζης			
Μεταβολισμός γαλακτόζης				

Μεταβολικά μονοπάτια ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε non-doped CNDs				
145 μg mL ⁻¹ (LD50/4)	290 μg mL ⁻¹ (LD ₅₀ /2)	400 µg mL ⁻¹	585 μg mL⁻¹ (LD₅₀)	
Μεταβολισμός		Μεταβολισμός		
αμινοσακχάρων και		αμινοσακχάρων και		
σακχάρων των	-	σακχάρων των	-	
νουκλεοτιδίων		νουκλεοτιδίων		
Βιοσύνθεση του		Βιοσύνθεση του		
αμινοακυλο-tRNA	-	αμινοακυλο-tRNA	-	
Μεταβολισμός				
αργινίνης και	-	-	-	
προλίνης				
Μεταβολισμός				
βιοτίνης	-	-	-	

Πίνακας 8: Μεταβολικά μονοπάτια ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε non-doped CNDs

Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός
κυστεΐνης και	κυστεΐνης και	κυστεΐνης και	κυστεΐνης και
μεθειονίνης	μεθειονίνης	μεθειονίνης	μεθειονίνης
Μεταβολισμός			
φρουκτόζης και	-	-	-
μαννόζης			
Μεταβολισμός	Μεταβολισμός		
γαλακτόζης	γαλακτόζης	-	-
Μεταβολισμός			
γλουταθειόνης	-	-	-
		Μεταβολισμός	
-	-	γλυκερολιπιδίων	-
		Μεταβολισμός	
-	-	γλυκεροφωσφολιπιδ	-
		ίων	
			Μεταβολισμός
-	-	-	γλυκίνης, σερίνης
			και θρεονίνης
Μεταβολισμός		Μεταβολισμός	· · · ·
ιστιδίνης	-	ιστιδίνης	-
Μεταβολισμός		Μεταβολισμός	Μεταβολισμός
αζώτου	-	αζώτου	αζώτου
	Βιοσύνθεση	Βιοσύνθεση	
	παντοθενικού και	παντοθενικού και	
-	ακέτυλου	ακέτυλου	-
	συνενζύμου Α	συνενζύμου Α	
	Αλληλομετατροπές		
	πεντόζης και		
-	γλυκουρονικού	-	-
	οξέος		
	Μεταβολισμός		
-	πουρινών	-	-
Μεταβολισμού		Μεταβολισμού	
αμινοσεληνιώδους	-	αμινοσεληνιώδους	-
οξέος		οξέος	
Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός
αμύλου και	αμύλου και	αμύλου και	αμύλου και
σακχαρόζης	σακχαρόζης	σακχαρόζης	σακχαρόζης
	Βιοσύνθεση βαλίνης,	Βιοσύνθεση βαλίνης,	
-	λευκίνης και	λευκίνης και	-
	ισολευκίνης	ισολευκίνης	
	Αποδόμηση βαλίνης,	Αποδόμηση βαλίνης,	
-	λευκίνης και	λευκίνης και	-
	ισολευκίνης	ισολευκίνης	

Πίνακας 9:	Μεταβολικά	μονοπάτια	ατόμων	zebrafish	μετά από	έκθεση	σε N-doped	CNDs
		<i>p</i> :0107107100	are proor	20.010.0	pie : 0: 00, 10	0	001100000	0

Μεταβολικά μονοπάτια ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε N-						
	doped CNDs					
50 μg mL ⁻¹ (LD ₅₀ /8)	100 μg mL ⁻¹ (LD ₅₀ /4)	200 μg mL ⁻¹ (LD ₅₀ /2)	400 μg mL ⁻¹ (LD ₅₀)			
Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός			
αμινοσακχάρων και	αμινοσακχάρων και	αμινοσακχάρων και	αμινοσακχάρων και			
σακχάρων των	σακχάρων των	σακχάρων των	σακχάρων των			
νουκλεοτιδίων	νουκλεοτιδίων	νουκλεοτιδίων	νουκλεοτιδίων			
		Μεταβολισμός				
-	-	αργινίνης και	-			
		προλίνης				
Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός			
κυστεΐνης και	κυστεΐνης και	κυστεΐνης και	κυστεΐνης και			
μεθειονίνης	μεθειονίνης	μεθειονίνης	μεθειονίνης			
Μεταβολισμός φρουκτόζης και	-	-	-			
μαννόζης						
Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός			
γαλακτόζης	γαλακτόζης	γαλακτόζης	γαλακτόζης			
		Αλληλομετατροπές				
		πεντόζης και				
-	-	γλυκουρονικού	-			
		οξέος				
Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός			
αμύλου και	αμύλου και	αμύλου και	αμύλου και			
σακχαρόζης	σακχαρόζης	σακχαρόζης	σακχαρόζης			
		Βιοσύνθεση βαλίνης,				
-	-	λευκίνης και	-			
		ισολευκίνης				

Πίνακας 10: Μεταβολικά μονοπάτια ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε N,S-doped CNDs

Μεταβολικά μονοπάτια ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε N,S- doped CNDs				
75 μg mL ⁻¹ (LD ₅₀ /2)	100 μg mL ⁻¹	150 μg mL ⁻¹ (LD ₅₀)	200 μg mL ⁻¹	
-	-	-	Μεταβολισμός αλανίνης, ασπαρτικού και γλουταμινικού οξέος	
Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	
αμινοσακχάρων και	αμινοσακχάρων και	αμινοσακχάρων και	αμινοσακχάρων και	
σακχάρων των	σακχάρων των	σακχάρων των	σακχάρων των	
νουκλεοτιδίων	νουκλεοτιδίων	νουκλεοτιδίων	νουκλεοτιδίων	
Βιοσύνθεση του αμινοακυλο-tRNA	-	-	-	
-	Μεταβολισμός βιοτίνης	-	-	

			Μεταβολισμός
-	-	-	κυστεΐνης και
			μεθειονίνης
Μεταβολισμός		Μεταβολισμός	
φρουκτόζης και	-	φρουκτόζης και	-
μαννόζης		μαννόζης	
Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός
γαλακτόζης	γαλακτόζης	γαλακτόζης	γαλακτόζης
Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	
αζώτου	αζώτου	αζώτου	-
Αλληλομετατροπές		Αλληλομετατροπές	
πεντόζης και		πεντόζης και	
γλυκουρονικού	-	γλυκουρονικού	-
οξέος		οξέος	
Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός	Μεταβολισμός
αμύλου και	αμύλου και	αμύλου και	αμύλου και
σακχαρόζης	σακχαρόζης	σακχαρόζης	σακχαρόζης
Βιοσύνθεση βαλίνης,			
λευκίνης και	-	-	-
ισολευκίνης			

Αναλυτικότερα, μόνο ένα μονοπάτι δεν επηρεάστηκε από την παρουσία των νανοκουκκίδων και εμφανίζεται σε όλες τις υπό μελέτη συνθήκες και στο δείγμα ελέγχου: ο μεταβολισμός του αμύλου και της σακχαρόζης. Εν αντιθέσει, ο μεταβολισμός της ριβοφλαβίνης που εμφανίζεται στο control αποσιωποιήθηκε (down regulation) σε όλα τα δείγματα.

Non-doped CNDs

Σε όλες τις περιπτώσεις που οι λάρβες εκτέθηκαν σε non-doped CNDs το μονοπάτι του μεταβολισμού του αμύλου και της σακχαρόζης έμεινε ανεπηρέαστο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω και ενεργοποιήθηκε ένα νέο μονοπάτι, ο μεταβολισμός της κυστεΐνης και της μεθειονίνης το οποίο δεν εμφανίστηκε στο δείγμα ελέγχου.

Μεταβολικά μονοπάτια που ανιχνεύτηκαν στο δείγμα ελέγχου

Ο μεταβολισμός της βιοτίνης καθώς και της φρουκτόζης και της μαννόζης έμειναν ανεπηρέαστοι μόνο στη συγκέντρωση των 145 μg mL⁻¹. Ο μεταβολισμός του αζώτου, αποσιωποιήθηκε μόνο μετά από έκθεση στη συγκέντρωση 290 μg mL⁻¹. Η έκθεση στις συγκεντρώσεις 400 μg mL⁻¹ και 585 μg mL⁻¹ είχε ως αποτέλεσμα την

αποσιωποίηση του μεταβολισμού της γαλακτόζης μόνο σε αυτές τις δύο συγκεντρώσεις των non-doped CNDs ενώ το μονοπάτι αυτό υπάρχει στο δείγμα ελέγχου και δεν επηρεάστηκε σε καμία από τι υπόλοιπες δοκιμαζόμενες συνθήκες. Ο μεταβολισμός των αμινοσακχάρων και των σακχάρων των νουκλεοτιδίων αποσιωποιήθηκε στις συγκεντρώσεις 585 μg mL⁻¹ και 290 μg mL⁻¹ ενώ δεν επηρεάστηκε στις υπόλοιπες (145 μg mL⁻¹ και 400 μg mL⁻¹).

Μεταβολικά μονοπάτια που δεν ανιχνεύτηκαν στο δείγμα ελέγχου

Ο μεταβολισμός της αργινίνης και της προλίνης καθώς και της γλουταθειόνης ενεργοποιήθηκαν μόνο μετά από έκθεση σε συγκέντρωση 145 μg mL⁻¹ ενώ στις υπόλοιπες τρεις συγκεντρώσεις και στο δείγμα ελέγχου δεν ενεργοποιήθηκε. Ο μεταβολισμός της ιστιδίνης και του μεταβολισμού του αμινοσεληνιώδους οξέος ενεργοποιήθηκε μόνο μετά από έκθεση των zebrafish στις συγκεντρώσεις 145 μg mL^{-1} και 400 μg mL^{-1} . Η βιοσύνθεση του παντοθενικού και του ακέτυλου συνενζύμου Α καθώς και η βιοσύνθεση και η αποδόμηση της βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης ενεργοποιήθηκαν στις συγκεντρώσεις 290 μ g mL⁻¹ και 400 μ g mL⁻¹ ενώ δεν εμφανίστηκαν στο δείγμα ελέγχου. Οι αλληλομετατροπές πεντόζης και γλυκουρονικού οξέος και ο μεταβολισμός των πουρίνων ενεργοποιήθηκαν μόνο μετά από έκθεση στη συγκέντρωση 290 μg mL-1. Ο μεταβολισμός των γλυκερολιπιδίων και των γλυκεροφωσφολιπιδίων εμφανίστηκαν μόνο στη συγκέντρωση 400 μg mL-1, ενώ ο μεταβολισμός γλυκίνης, σερίνης και θρεονίνης εμφανίστηκε μόνο στη συγκέντρωση LD₅₀. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα μεταβολικά μονοπάτια του μεταβολισμού της γλουταθειόνης, των πουρίνων, των γλυκερολιπιδίων, των γλυκεροφωσφολιπιδίων της γλυκίνης, της σερίνης και της θρεονίνης που αναφέρθηκαν παραπάνω, ενεργοποιήθηκαν μόνο στη περίπτωση των non-doped CNDs.

N-doped CNDs

Όταν το zebrafish εκτέθηκε σε N-doped CNDs εκτός από τον μεταβολισμό του αμύλου και της σακχαρόζης σε όλες τις περιπτώσεις έμειναν ανεπηρέαστα και άλλα

δύο μονοπάτια που εμφανίστηκαν και στο control: ο μεταβολισμός της γαλακτόζης και ο μεταβολισμός των αμινοσακχάρων και των σακχάρων των νουκλεοτιδίων. Ενεργοποιήθηκε και εδώ ο μεταβολισμός της κυστεΐνης και της μεθειονίνης. Ακόμα, ο μεταβολισμός της φρουκτόζης και της μαννόζης αποσιωποιήθηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις εκτός από αυτή των 50 μg mL⁻¹. Μετά την έκθεση σε N-doped CNDs συγκέντρωσης 200 μg mL⁻¹ ενεργοποιήθηκαν τρία μεταβολικά μονοπάτια που δεν εμφανίστηκαν στο δείγμα ελέγχου: ο μεταβολισμός της αργινίνης και της προλίνης, αλληλομετατροπές πεντόζης και γλυκουρονικού οξέος και η βιοσύνθεση της βαλίνης της λευκίνης και της ισολευκίνης. Ακόμα παρατηρούμε ότι ο μεταβολισμός του αζώτου αποσιωποιήθηκε σε όλες της περιπτώσεις έκθεσης σε N-doped CNDs.

N, S-doped CNDs

Τέλος, όταν τα άτομα zebrafish εκτέθηκαν σε N,S-doped CNDs σε όλες τις περιπτώσεις δεν επηρεάστηκαν τα εξής τρία μονοπάτια: ο μεταβολισμός του αμύλου και της σακχαρόζης, ο μεταβολισμός της γαλακτόζης και ο μεταβολισμός των αμινοσακχάρων και των σακχάρων των νουκλεοτιδίων. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι στην περίπτωση των N,S-doped CNDs δεν εμφανίστηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις το μονοπάτι του μεταβολισμού της κυστεΐνης και της μεθειονίνης, όπως έγινε στις άλλες δύο νανοκουκκίδες. Ενεργοποιήθηκε μόνο στη συγκέντρωση 200 μg mL⁻¹ ενώ στις 75 μg mL⁻¹, 100 μg mL⁻¹ mL^{-1} και 150 μg αποσιωποιήθηκε. Ο μεταβολισμός του αζώτου αποσιωποιήθηκε μόνο μετά από έκθεση στη συγκέντρωση 200 μg mL⁻¹. Ακόμα ο μεταβολισμός της βιοτίνης έμεινε ανεπηρέαστος μόνο μετά από έκθεση στη συγκέντρωση 100 μg mL⁻¹, ενώ ο μεταβολισμός της φρουκτόζης και της μαννόζης έμεινε ανεπηρέαστος μόνο μετά από έκθεση στις συγκεντρώσεις 75 μ g mL⁻¹ και 150 μ g mL⁻¹. Στις ίδιες συγκεντρώσεις ενεργοποιήθηκαν και οι αλληλομετατροπές πεντόζης και γλυκουρονικού οξέος, ενώ τα μεταβολικά μονοπάτια: βιοσύνθεση του αμινοακυλο-tRNA και η βιοσύνθεση της βαλίνης, της λευκίνης και της ισολευκίνης ενεργοποιήθηκαν μόνο στη περίπτωση που τα άτομα zebrafish εκτέθηκαν στη συγκέντρωση 75 μg mL⁻¹. Τέλος, ο μεταβολισμός της αλανίνης, του ασπαρτικού και του γλουταμινικού οξέος

ενεργοποιήθηκε μόνο μετά από έκθεση του zebrafish σε 200 μg mL⁻¹ N,S-doped CNDs και δεν εμφανίστηκε ούτε στο δείγμα ελέγχου, ούτε στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν non-doped CNDs και N-doped CNDs.

Μεταβολισμός γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη, έχει σημαντική αντιοξειδωτική δράση στους ζωντανούς οργανισμούς. 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 σουφυδρυλική ομάδα (–SH) της κυστεΐνης χρησιμεύει ως δότης πρωτονίων και είναι υπεύθυνη για τη βιολογική της δράση. 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. Η γλουταθειόνη είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για την αποτοξίνωση του οργανισμού και είναι ζωτικής σημασίας για την υγεία του ήπατος. Η γλουταθειόνη παρέχει προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες, συμμετέχοντας απευθείας στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και των ενεργών μορφών του οξυγόνου ενώ συντηρεί και εισαγόμενα αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες C και E στις ανηγμένες (ενεργές) μορφές τους, προστατεύοντας το ήπαρ, τους πνεύμονες και τα νεφρά.

Στην περίπτωση μας ο μεταβολισμός της γλουταθειόνης παρατηρήθηκε μόνο στα μεταβολώματα των λαρβών zebrafish που εκτέθηκαν στις non-doped CNDs. Η ενεργοποίηση αυτού του μεταβολικού μονοπατιού πιθανόν συμβαίνει επειδή η έκθεση των λαρβών zebrafish στις non-doped CNDs οδηγεί σε αύξηση του οξειδωτικού στρές. Κατά συνέπεια ο οργανισμός του zebrafish πιθανόν ενεργοποιεί το συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι προκειμένου να παράγει γλουταθειόνη σε μεγαλύτερη συγκέντρωση προκειμένου να ανιτμετωπίσει το οξειδωτικό στρες.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι από τα υπό μελέτη δείγματα μόνο σε αυτά που προήλθαν από έκθεση σε non-doped CNDs παρατηρήθηκε αυτό το μεταβολικό μονοπάτι, παρόλο που τα άλλα δύο νανοϋλικά είναι πιο επιβλαβή για τον

οργανισμό, σύμφωνα με τις τιμές LD₅₀. Προκειμένου να διερευνηθεί περεταίρω το φαινόμενο αυτό, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των τριών νανοϋλικών, μέσω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες του DPPH. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Παράρτημα ΙΙΙ. Από τα αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό ότι οι CNDs δεν έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες του DPPH σε ικανοποιητικό βαθμό, ενώ οι N,S doped CNDs έχουν εμφανώς μεγαλύτερη ικανότητα να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες σε σχέση με τις CNDs και N-doped CNDs, έχουν αυξημένη ικανότητα δέσμευσης σε σχέση με τις N,S-doped CNDs. Συσχετίζοντας τα αποτελέσματα αυτά με τα πειράματα που διεξήθχησαν στο zebrafish, στις συγκεντρώσεις LD₅₀, οι non-doped CNDs επιτυγχάνουν 3,8 % δέσμευση των ελευθέρων ριζών, οι N,S-doped CNDs 30 % και οι N-doped CNDs 100 %. Κατά συνέπεια, οι N-doped και N,S-doped CNDs πιθανώς, δρουν προστατευτικά για τις λάρβες δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες, κάτι το οποίο δεν ισχύει για τις non-doped CNDs. Το γεγονός αυτό ενισχύει την άποψη ότι οι λάρβες υπόκεινται σε μεγαλύτερο οξειδωτικό στρές παρουσία των non-doped CNDs και ενεργοποιούν το μεταβολισμό της γλουταθειόνης για να την παράγουν προκειμένου να δεσμεύσουν τις ελεύθερες ρίζες.

Εφόσον λοιπόν, στις άλλες συνθήκες δεν ενεργοποιείται ο μεταβολισμός της γλουταθειόνης, πιθανόν, οι βλάβες οι οποίες παρατηρούνται στα άτομα zebrafish στις συνθήκες αυτές οφείλονται, κατά κύριο λόγο, σε άλλες μεταβολικές διεργασίες και λιγότερο στο οξειδωτικό στρες, καθώς οι N-doped CNDs και οι N,S-doped CNDs έχουν αρκετά καλή αντιοξειδωτική δράση, ενώ οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στις λάρβες που εκτέθηκαν στις non-doped CNDs οφείλονται και στο οξειδωτικό στρες.

Ο μεταβολισμός γλυκερολιπιδίων και γλυκεροφωσφολιπιδίων

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. Τα γλυκερολιπίδια είναι μια δομικά ετερογενής ομάδα λιπιδίων που παίζουν βασικούς δομικούς και λειτουργικούς ρόλους σε βακτηριακές, φυτικές και ζωικές μεμβράνες. Τα γλυκεροφωσφολιπίδια 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.

Μετά την έκθεση του zebrafish στις non-doped CNDs ενεργοποιήθηκε ο μεταβολισμός των γλυκερολιπιδίων και των γλυκεροφωσφολιπιδίων, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάτι αντίστοιχο στις περιπτώσεις των δύο άλλων νανοϋλικών. Αυτή η ενεργοποίηση συνδέεται πιθανότατα με το γεγονός ότι οι λάρβες υπόκεινται σε μεγαλύτερο οξειδωτικό στρες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Συνήθης στόχος των ελευθέρων ριζών, πέρα από τα ελεύθερα μόρια, είναι και τα λιπίδια που υπάρχουν στις μεμβράνες των κυττάρων. Αυτό ονομάζεται υπεροξείδωση των λιπιδίων και μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στις κυτταρικές μεμβράνες, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή των κυττάρων. Συντάρων. Συνταρικές μεμβράνες, είναι πιθανό στις λάρβες που εκτέθηκαν στις non-doped CNDs τα λιπίδια στις μεμβράνες των κυττάρων να οξειδώθηκαν οδηγώντας σε βλάβες στις κυτταρικές μεμβράνες. Συνεπώς, ενεργοποιείται ο μεταβολισμός των γλυκερολιπιδίων και των γλυκεροφωσφολιπιδίων προκειμένου να επιδιορθωθούν οι βλάβες στις κυτταρικές μεμβράνες, μεμβράνες τως μεμβράνες τως κυτταρικές των κυττάρωθούν οι βλάβες στις κυτταρικές μεμβράνες των κυτταρικές μεμβράνες των κυτταρικές των οδηγώντας τα λιπίδιο στις κυτταρικές μεμβράνες των κυτταρικές μεμβράνες των κυτταρικές μεμβράνες των οληγίοει ο μεταβολισμός των γλυκερολιπιδίων και των

Μεταβολισμός της ριβοφλαβίνης

Η ριβοφλαβίνη, επίσης γνωστή ως βιταμίνη B2, είναι ένα σημαντικό συστατικό των συμπαραγόντων FAD (Flavin adenine dinucleotide-φλαβινο αδενινο δινουκλεοτίδιο) και FMN (Flavin mononucleotide-φλαβινο μονονουκλεοτίδιο) και ένα βασικό μικροθρεπτικό συστατικό για την φυσιολογική κυτταρική λειτουργία και επιβίωση. Αυτοί οι συμπαράγοντες αποτελούν μέρος των φλαβοπρωτεϊνών και είναι ουσιώδεις για πολλές μεταβολικές οδούς, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων, του κύκλου του κιτρικού οξέος και της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το FAD και το FMN είναι βασικοί φορείς υδρογόνου και συμμετέχουν σε πάνω από 100 οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που συμμετέχουν στον ενεργειακό μεταβολισμό. Το FAD είναι ένας βασικός δέκτης ηλεκτρονίων πέραν των NAD⁺ και NADP⁺ σε αυτές τις οδούς.

Στην περίπτωση μας, ο μεταβολισμός της ριβοφλαβίνης εμφανίζεται μόνο στο δείγμα ελέγχου, ενώ αποσιωποιήθηκε σε όλες τις δοκιμαζόμενες συνθήκες. Αυτό είναι μια πρώτη ένδειξη ότι οι νανοκουκκίδες επηρεάζουν τη φυσιολογική πορεία πολλών μεταβολικών διεργασιών, στις οποίες η ριβοφλαβίνη-βιταμίνη B2 υπεισέρχεται. Επομένως η διατάραξη αυτού του μεταβολικού μονοπατιού μπορεί να οδηγήσει εν δυνάμει σε ποικίλες μεταβολικές διαταραχές.

Μεταβολισμός της βιοτίνης

Η βιοτίνη είναι υδατοδιαλυτός συμπαράγοντας ενζύμου που ανήκει στο σύμπλεγμα βιταμίνης Β. Εμπλέκεται σε σημαντικές μεταβολικές οδούς, όπως η γλυκονεογένεση, η σύνθεση λιπαρών οξέων και ο καταβολισμός των αμινοξέων και σχετίζεται με τις μετατροπές της πυροσταφυλικής καρβοξυλάσης, β-μεθυλκροτινυλ-CoA καρβοξυλάσης και ακετυλ-CoA καρβοξυλάσης. Ακόμα, η βιοτίνη ρυθμίζει το καταβολικό ένζυμο προπιονυλ-CoA καρβοξυλάση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο ενώ η συνθετάση της ολο-καρβοξυλάσης ρυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο από τη βιοτίνη. Πέραν του ρόλου της στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των καρβοξυλασών, η βιοτίνη εμπλέκεται στην επαγωγή του υποδοχέα για τα γλυκολυτικά ένζυμα και των πρωτεΐνών δέσμευσης βιοτίνης από τον λεκιθικό σάκο. Ο λεκιθικός σάκος εξασφαλίζει τα θρεπτικά συστατικά για την επιβίωση του zebrafish τις πρώτες μέρες που η τροφοληψία είναι αδύνατη. Επομένως, στα πρώτα στάδια ζωής του zebrafish (στα οποία διεξήχθησαν και τα πειράματα μας) ο λεκιθικός σάκος είναι απαραίτητος για την ομαλή ανάπτυξη των λαρβών και την επιβίωση τους, καλύπτοντας τις ενεργειακές και όχι μόνο ανάγκες τους. Παρατηρήθηκε ότι ο μεταβολισμός της βιοτίνης αποσιωποιήθηκε σε μεγάλο βαθμό μετά από έκθεση του zebrafish στις non-doped CNDs, N-doped CNDs και N,S-doped CNDs. Η απενεργοποίηση αυτού του μεταβολικού μονοπατιού οδηγεί σε μείωση των επιπέδων βιοτίνης γεγονός που μπορεί να οδηγήσει πέραν των άλλων, και σε διαταραχές στην επαγωγή των υποδοχέων στις κυτταρικές μεμβράνες. Οι διαταραχές αυτές μπορούν να οδηγήσουν πιθανώς σε μείωση της απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών από τον λεκιθικό σάκο, παρεμποδίζοντας την ομαλή ανάπτυξη των λαρβών, δεδομένου ότι η μείωση απορρόφησης θρεπτικών συστατικών μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές των επιπέδων ενέργειας στον οργανισμό.

Μεταβολισμός αζώτου

Τα άτομα zebrafish εκκρίνουν κυρίως τα αζωτούχα τους απόβλητα με τη μορφή αμμωνίας. Τα έμβρυα και οι προνύμφες του zebrafish εκκρίνουν περίπου το 80% των αζωτούχων αποβλήτων ως ουρία, χρησιμοποιώντας τους μεταφορείς ουρίας ως εργαλείο για την αποτελεσματική διέλευση των μεμβρανών πλάσματος. Η παραγωγή ουρίας παρέχει μια εικόνα για την ισορροπία του αζώτου στο zebrafish και έχει αναφερθεί ότι αποτελεί χρήσιμο δείκτη για το περιβαλλοντικό στρες στα ψάρια. Η αυξημένη ουρία μπορεί να οδηγήσει σε υπερτροφία και υπερπλασία των πλούσιων σε μιτοχόνδρια κυττάρων στα βράγχια, διότι τα βράγχια είναι τα κύρια εκκρινόμενα όργανα για την ουρία. Έτσι, η συσσώρευση ουρίας σε έμβρυα zebrafish μπορεί να συσχετιστεί με καταστροφές στα βράγχια που έχουν περιορισμένη λειτουργία στην απέκκριση ουρίας. Παρατηρούμε ότι όταν τα άτομα zebrafish εκτέθηκαν στις N-doped CNDs, σε όλες τις δοκιμαζόμενες συγκεντρώσεις, αποσιωποιήθηκε ο μεταβολισμός του αζώτου. Το γεγονός αυτό, υποδηλώνει την πιθανότητα δυσλειτουργίας ή βλάβης των κυττάρων, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία του μεταβολισμού του αζώτου. Τέλος, υπάρχει πιθανότητα στις περιπτώσεις αυτές τα άτομα zebrafish να μη μπορούν να μεταβολίσουν ενώσεις όπως η ουρία, με αποτέλεσμα αυτές να παραμένουν στον οργανισμό και να συγκεντρώνονται, δημιουργώντας τοξικότητα εκ των έσω.

Αλλαγές στα επίπεδα γλυκόζης

Η γλυκόζη αποτελεί τον σημαντικότερο υδατάνθρακα στη βιολογία, αφού τα κύτταρα την χρησιμοποιούν ως την κύρια πηγή ενέργειας. Επιπλέον, οι

οργανισμοί χρησιμοποιούν τη γλυκόζη ως πρόδρομη ένωση για την σύνθεση πολλών σημαντικών ουσιών. Οι ολιγοσακχαρίτες της γλυκόζης σε συνδυασμό με άλλα σάκχαρα χρησιμεύουν ως σημαντικά αποθέματα ενέργειας. Αυτά περιλαμβάνουν τη λακτόζη (ένα δισακχαρίτη γλυκόζης-γαλακτόζης) και τη σακχαρόζη (ένα δισακχαρίτη γλυκόζης και φρουκτόζης). Στα ζώα, η γλυκόζη συντίθεται στο ήπαρ και τα νεφρά από ενώσεις εκτός των υδατανθράκων όπως πυροσταφυλικό, γαλακτικό οξύ και γλυκερόλη, με μία μέθοδο γνωστή ως γλυκονεογένεση.

Όπως φαίνεται στους πίνακες 7-10 ο μεταβολίτης α-D-γλυκόζη ο οποίος εμφανίζεται στο δείγμα ελέγχου εξαφανίζεται από το μεταβόλωμα των λαρβών zebrafish μετά από έκθεση σε 50 μg mL⁻¹ και 100 μg mL⁻¹ N-doped CNDs και σε 200 μ g mL⁻¹ N,S-doped CNDs και μετά από έκθεση στις non-doped CNDs σε όλες τις δοκιμαζόμενες συγκεντρώσεις. Το γεγονός αυτό πιθανότατα υποδηλώνει διαταραχές στην φυσιολογική πορεία της γλυκόλυσης/γλυκονεογένεσης. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένα επίπεδα ενέργειας στον οργανισμό των λαρβών, δυσχεραίνοντας την επιβίωση των λαρβών. Η γλυκόλυση/γλυκονεογένεση συμβαίνει κατά κύριο λόγο στο ήπαρ. Η διαταραχή των επιπέδων της γλυκόζης αντικατοπτρίζει διαταραχές στη γλυκόλυση/γλυκονεογένεση, οι οποίες "σκιαγραφούν" πιθανές ηπατικές βλάβες του zebrafish μετά από έκθεση τους στις CNDs. Οι πιθανές αυτές ηπατικές βλάβες, πέρα από τη μείωση των επιπέδων ενέργειας που προκαλούν, είναι πιθανόν και υπαίτιες για την παρατηρούμενη θνησιμότητα των λαρβών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μετά από έκθεση του zebrafish σε 200 μ g mL⁻¹ N,S-doped CNDs παρατηρήθηκε, επιπλέον, η ενεργοποίηση του μεταβολισμού της αλανίνης, του ασπαρτικού και του γλουταμινικού οξέος, χωρίς ωστόσο να ανιχνεύεται το γλουταμινικό οξύ. Είναι γνωστό ότι η L-γλουταμίνη έχει την ιδιότητα να διαπερνά τη γενική κυκλοφορία και να φθάνει στον εγκέφαλο και να μετατρέπεται σε L-γλουταμινικό οξύ, το οποίο αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας. Το γεγονός ότι δεν εντοπίστηκε το Lγλουταμινικό οξύ, παρόλο που ο μεταβολισμός του ενεργοποιήθηκε πιθανώς υποδηλώνει ότι το L-γλουταμινικό οξύ παράγεται και "καταναλώνεται" προκειμένου να καλύψει τις ενεργειακές ανάγκες που δεν καλύπτονται από τη γλυκόζη.

Μεταβολισμός πουρινών

Οι πουρίνες είναι ετεροκυκλικές αρωματικές οργανικές ενώσεις, που αποτελούνται από δακτύλιο πυριμιδίνης συνδεδεμένο με δακτύλιο ιμιδαζολίου. Τα νουκλεοτίδια πουρίνης και πυριμιδίνης είναι κύριοι φορείς ενέργειας, υπομονάδες νουκλεϊνικών οξέων και πρόδρομοι για τη σύνθεση νουκλεοτιδίων συμπαραγόντων όπως NAD και SAM. Η ενεργοποίηση του εν λόγο μεταβολικού μονοπατιού υποδηλώνει την πιθανώς αυξημένη ανάγκη των λαρβών τόσο για ενέργεια όσο και για πουρίνες. Δεδομένου ότι οι πουρίνες είναι συστατικά των νουκλεϊνικών οξέων, σημαίνει ότι σε κυτταρικό επίπεδο αυξάνεται η ανάγκη για μεταγραφή γονιδίων, προκειμένου να παραχθούν οι κατάλληλες πρωτεΐνες για να αλλάξει ο μεταβολισμός του κυττάρου. Άρα υπάρχουν αυξημένες ανάγκες για πουρίνες για τη σύνθεση του RNA, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να είναι εξίσου απαραίτητες και για την επιδιόρθωση του DNA, κατά τα στάδια ελέγχου της αντιγραφής. Ο μεταβολισμός των πουρινών ενεργοποιήθηκε μόνο στη περίπτωση των non-doped CNDs που όπως αναφέρθηκε παραπάνω δεν ανιχνεύθηκε η γλυκόζη.

Μεταβολισμός αμινοξέων

Ως βασικά αμινοξέα (ή αλλιώς απαραίτητα αμινοξέα) χαρακτηρίζονται τα αμινοξέα που θα πρέπει να λάβει ένας οργανισμός με τη διατροφή του (καθώς δεν μπορεί να τα συνθέσει), σε αντίθεση με τα μη βασικά αμινοξέα (ή αλλιώς μη απαραίτητα αμινοξέα) που μπορούν να συντεθούν από τον ίδιο τον οργανισμό με τη διαδικασία της διαμίνωσης. Τα απαραίτητα αμινοξέα είναι : η λευκίνη, η ισολευκίνη, η βαλίνη, η λυσίνη, η μεθειονίνη, η φαινυλαλανίνη, η θρεονίνη και η τρυπτοφάνη. Τα μηαπαραίτητα αμινοξέα μπορούν να συντεθούν από το σώμα και περιλαμβάνουν : την αλανίνη, το ασπαραγινικό οξύ, τη γλουταμίνη, το γλουταμινικό οξύ, την τυροσίνη, τη σερίνη, την κυστεΐνη και την προλίνη. Τα αμινοξέα ιστιδίνη, γλυκίνη και αργινίνη ονομάζονται και ημιαπαραίτητα αμινοξέα, καθώς μπορούν να συντεθούν στους οργανισμούς αλλά με μικρό ρυθμό βιοσύνθεσης. Συνεπώς, κατά τη νεαρή ηλικία όπου η οργανογένεση και η ανάπτυξη είναι πρωταρχική ανάγκη του οργανισμού τα αμινοξέα αυτά θεωρούνται απαραίτητα. Το γεγονός ότι αυξάνεται ο μεταβολισμός των απαραίτητων αμινοξέων, οφείλεται πιθανότατα στην αυξημένη ανάγκη καταβολισμού τους (καθώς δεν μπορούν να συντεθούν από τον οργανισμό). Πέραν της διατροφής, πηγή απαραίτητων αμινοξέων είναι οι πρωτεΐνες και οι μύες, τα οποία όταν διασπώνται απελευθερώνουν τα αμινοξέα τους.

Σε όλες τις περιπτώσεις βλέπουμε ότι ενεργοποιούνται μεταβολικά μονοπάτια, τα οποία, σχετίζονται κυρίως με το μεταβολισμό των απαραίτητων αμινοξέων. Η αύξηση λοιπόν των εν λόγω μεταβολικών μονοπατιών υποδηλώνει πιθανότατα την βλάβη των μυών στις λάρβες μετά την έκθεση τους στις νανοκουκκίδες. Η διάσπαση των μυών μπορεί να συνδέεται με τις αλλαγές στα επίπεδα βιοτίνης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, καθώς δεν μπορούν να απορροφηθούν θρεπτικά συστατικά από τον λεκιθικό σάκο.

Αμινοξέα Διακλαδισμένης Αλυσίδας

Τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας, περιλαμβάνουν τα απαραίτητα αμινοξέα λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη, τα οποία διαφέρουν από τα υπόλοιπα αμινοξέα στο ότι μεταβολίζονται κυρίως στους σκελετικούς μύες παρά σε άλλους ιστούς του σώματος ή στο ήπαρ ενώ παράλληλα εξυπηρετούν πολλές λειτουργίες για τους σκελετικούς μύες, όπως την ενίσχυση της μυϊκής ενεργειακής παραγωγής κυττάρων. Τα αμινοξέα αυτά αυξάνουν τον ρυθμό πρωτεΐνοσύνθεσης. Δεδομένου ότι στα δείγματα μας ανιχνεύθηκαν, αυτό μπορεί να εξηγείται από την αυξημένη πρωτεΐνοσύνθεση που λαμβάνει χώρα προκειμένου να καλυφθούν οι ανάγκες σε πρωτεΐνες οι οποίες υπέστησαν βλάβες ή διασπάστηκαν, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι για να λάβει χώρα η πρωτεΐνοσύνθεση, χρειάζεται να γίνει μεταγραφή του DNA σε μεγαλύτερο βαθμό, που, όπως αναφέρθηκε και πριν, εξηγείται με την αύξηση του μεταβολισμού των πουρινών.

Μεταβολισμός κυστεΐνης και μεθειονίνης

Πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεση της κυστεΐνης στους ζωικούς οργανισμούς είναι τα αμινοξέα σερίνη και μεθειονίνη. Η μεθειονίνη, από την οποία προέρχεται το άτομο θείου, μετατρέπεται διαδοχικά σε S-αδενοσυλμεθειονίνη και ομοκυστεΐνη. Η κυστεΐνη είναι πρόδρομη ένωση της αντιοξειδωτικής ουσίας γλουταθειόνη. Ως ένα από τα δύο θειούχα αμινοξέα (το άλλο είναι η μεθειονίνη), η κυστεΐνη είναι σημαντική πηγή θείου στον ανθρώπινο μεταβολισμό. Τα αμινοξέα αυτά, είναι απαραίτητα για όλα τα βιολογικά συστήματα λόγω του σημαντικού τους ρόλου στον πρωτογενή και δευτερογενή μεταβολισμό. Στις πρωτεΐνες, τα μόρια κυστεΐνης είναι σημαντικά για τη σταθεροποίηση της τριτοταγούς και τεταρτοταγούς πρωτεϊνικής διαμόρφωσης μέσω δισουλφιδικών γεφυρών. Εκτός από το ρόλο της στις πρωτεΐνες, η κυστεΐνη συμμετέχει στη σύνθεση βασικών βιομορίων όπως τα αντιοξειδωτικά, οι βιταμίνες και οι συν-παράγοντες. Είναι πιθανό να ενεργοποιείται το συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι προκειμένου να παραχθεί κυστεΐνη ώστε να σταθεροποιηθούν οι πρωτεΐνες (οι υπάρχουσες ή οι νεοσυντιθέμενες). Ο μεταβολισμός της κυστεΐνης και της μεθειονίνης ενεργοποιείται μετά από την έκθεση του zebrafish στις νανοκουκκίδες ενώ δεν εμφανίζεται στο δείγμα ελέγχου [138–145].

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση προηγούμενες μελέτες προκύπτει ότι οι νανοκουκκίδες άνθρακα είναι τοξικές για τους υδρόβιους οργανισμούς. Ωστόσο, δεν έχει μελετηθεί η επίδραση τους στον μεταβολισμό τον οργανισμών. Στο πλαίσιο του παρόντος μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική μελέτη του μεταβολώματος του zebrafish μετά την έκθεση του σε νανοκουκκίδες άνθρακα ενισχυμένες με άζωτο και θείο, προκειμένου να προκύψουν συμπεράσματα για την επίδραση τους στον μεταβολισμό του zebrafish.

Για τη μελέτη αυτή, χρησιμοποιήθηκαν νανοκουκκίδες άνθρακα που παρασκευάστηκαν μέσω μιας απλής και γρήγορης συνθετικής πορείας, χρησιμοποιώντας κιτρικό οξύ (non-doped CNDs), ενώ παρουσία ουρίας και θειουρίας συντέθηκαν οι N-doped και N,S-doped νανοκουκκίδες, αντίστοιχα. Για τα συντιθέμενα νανοϋλικά έγινε χαρακτηρισμός με φασματοσκοπία FT-IR, Uv-Vis και φθορισμού ενώ λήφθηκαν και εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης από όπου υπολογίσθηκε το μέγεθος τους.

Από τη μελέτη των μεταβολωμάτων του zebrafish μετά την έκθεσή του στα τρία νανοϋλικά προκύπτει ότι τα μεταβολώματα εμφανίζουν ποικίλες διαφορές τόσο σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, όσο και μεταξύ τους. Οι διαφορές εντοπίζονται όχι μόνο μεταξύ των τριών νανοϋλικών, αλλά και μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων που δοκιμάστηκαν για κάθε υλικό. Σε όλες τις περιπτώσεις προέκυψε ότι ο μεταβολισμός του αμύλου και της σακχαρόζης έμεινε ανεπηρέαστος. Εν αντιθέσει, ο μεταβολισμός της ριβοφλαβίνης αποσιωποιήθηκε (down regulation) σε όλες τις περιπτώσεις έκθεσης του zebrafish σε νανοκουκκίδες. Στις περισσότερες δοκιμαζόμενες συνθήκες, παρατηρήθηκε ενεργοποίηση μεταβολικών μονοπατιών που σχετίζονται με μεταβολισμό αμινοξέων και ειδικότερα με τον μεταβολισμό των απαραίτητων αμινοξέων. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μεταξύ άλλων, ότι ο μεταβολισμός της βιοτίνης αποσιωποιήθηκε σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις ενώ ο μεταβολισμός της κυστεΐνης και της μεθειονίνης ενεργοποιείται μετά από την έκθεση του zebrafish στις νανοκουκκίδες ενώ δεν εμφανίζεται στο δείγμα ελέγχου. Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτουν, επίσης, τα εξής σε σχέση με την έκθεση του zebrafish στις νανοκουκκίδες: Ι. Η διατάραξη του φυσιολογικού μεταβολισμού του, μπορεί να οδηγήσει σε πολλές φαινοτυπικές αλλαγές, όπως κύρτωση ουράς και περικαρδιακό οίδημα, οι οποίες παρατηρήθηκαν κατά τη μελέτη. ΙΙ. Οι αλλαγές στα μεταβολικά μονοπάτια μπορεί να εξηγούν τις παρατηρούμενες αλλαγές στον φαινότυπο του zebrafish, ενώ είναι πολύ πιθανόν να συνδέονται και με την αποδεδειγμένη τοξικότητα, καθώς επηρεάζονται ζωτικές μεταβολικές λειτουργίες.

Με βάση τα παραπάνω, στοιχειοθετείται η επίδραση των νανοκουκκίδων στο zebrafish σε μεταβολικό επίπεδο και προκύπτουν χρήσιμα συμπεράσματα για την πιθανή επίδραση τους, τόσο στους υδρόβιους οργανισμούς όσο και στον άνθρωπο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΕΣ

- RIVM, E.A.J. Bleeker, F.R. Cassee, R.E. Geertsma, W.H. De Jong, E.H.W.
 Heugens, M. Koers-Jacquemijns, D. van De Meent, A.G. Oomen, J. Popma, A.G.
 Rietveld, S.W.P. Wijnhoven, D.N.I. for P.H. and the Environment,
 Interpretation and implications of the European Commission
 Recommendation on the definition of nanomaterial, 2012.
- S. Bashir, J.L. Liu, Nanomaterials and Their Application, in: Adv. Nanomater.
 Their Appl. Renew. Energy, 2015. doi:10.1016/B978-0-12-801528-5.00001-4.
- [3] Nanomaterials, nanotechnologies and design: an introduction for engineers and architects, Choice Rev. Online. (2009). doi:10.5860/choice.47-2023.
- [4] P.I. Dolez, Nanoengineering: Global Approaches to Health and Safety Issues, 2015. doi:10.1016/C2011-0-09095-6.
- [5] D. Schodek, P. Ferreira, M. Ashby, Nanomaterials, Nanotechnologies and Design, 2009. doi:10.1016/B978-0-7506-8149-0.X0001-3.
- [6] R. Partha, J.L. Conyers, Biomedical applications of functionalized fullerenebased nanomaterials., Int. J. Nanomedicine. (2009).
- [7] J. Wang, Z. Hu, J. Xu, Y. Zhao, Therapeutic applications of low-toxicity spherical nanocarbon materials, NPG Asia Mater. (2014). doi:10.1038/am.2013.79.
- [8] S.N. Baker, G.A. Baker, Luminescent carbon nanodots: Emergent nanolights, Angew. Chemie - Int. Ed. (2010). doi:10.1002/anie.200906623.
- [9] S.Y. Lim, W. Shen, Z. Gao, Carbon quantum dots and their applications, Chem.Soc. Rev. 44 (2015) 362–381. doi:10.1039/c4cs00269e.
- [10] L. Xiao, H. Sun, Novel properties and applications of carbon nanodots, Nanoscale Horizons. 3 (2018) 565–597. doi:10.1039/c8nh00106e.
- Y. Wang, A. Hu, Copyright (C) by Foxit Software Company, 2005-2008 Carbon quantum dots : synthesis, properties and applications, J. Mater. Chem. C
 Mater. Opt. Electron. Devices. 2 (2014) 6921–6939. doi:10.1039/C4TC00988F.
- J. Zhou, Y. Yang, C.Y. Zhang, A low-temperature solid-phase method to synthesize highly fluorescent carbon nitride dots with tunable emission, Chem. Commun. (2013). doi:10.1039/c3cc42266f.
- [13] Y. Xu, M. Wu, Y. Liu, X.Z. Feng, X.B. Yin, X.W. He, Y.K. Zhang, Nitrogen-doped

carbon dots: A facile and general preparation method, photoluminescence investigation, and imaging applications, Chem. - A Eur. J. (2013). doi:10.1002/chem.201203641.

- [14] M.J. Krysmann, A. Kelarakis, P. Dallas, E.P. Giannelis, Formation mechanism of carbogenic nanoparticles with dual photoluminescence emission, J. Am.
 Chem. Soc. (2012). doi:10.1021/ja204661r.
- [15] D. Sun, R. Ban, P.H. Zhang, G.H. Wu, J.R. Zhang, J.J. Zhu, Hair fiber as a precursor for synthesizing of sulfur- and nitrogen-co-doped carbon dots with tunable luminescence properties, Carbon N. Y. (2013). doi:10.1016/j.carbon.2013.07.095.
- [16] S. Chandra, P. Patra, S.H. Pathan, S. Roy, S. Mitra, A. Layek, R. Bhar, P. Pramanik, A. Goswami, Luminescent S-doped carbon dots: An emergent architecture for multimodal applications, J. Mater. Chem. B. (2013). doi:10.1039/c3tb00583f.
- [17] K.S. Prasad, R. Pallela, D.M. Kim, Y.B. Shim, Microwave-assisted one-pot synthesis of metal-free nitrogen and phosphorus dual-doped nanocarbon for electrocatalysis and cell imaging, Part. Part. Syst. Charact. (2013). doi:10.1002/ppsc.201300020.
- P. Ayala, R. Arenal, A. Loiseau, A. Rubio, T. Pichler, The physical and chemical properties of heteronanotubes, Rev. Mod. Phys. (2010).
 doi:10.1103/RevModPhys.82.1843.
- [19] M.A. Reed, J.N. Randall, R.J. Aggarwal, R.J. Matyi, T.M. Moore, A.E. Wetsel, Observation of discrete electronic states in a zero-dimensional semiconductor nanostructure, Phys. Rev. Lett. (1988). doi:10.1103/PhysRevLett.60.535.
- [20] A. Cayuela, M.L. Soriano, C. Carrillo-Carrión, M. Valcárcel, Semiconductor and carbon-based fluorescent nanodots: The need for consistency, Chem. Commun. 52 (2016) 1311–1326. doi:10.1039/c5cc07754k.
- [21] Y. Shi, Z. Ma, N. Cui, Y. Liu, X. Hou, W. Du, L. Liu, T. Gangsheng, In situ preparation of fluorescent CdTe quantum dots with small thiols and hyperbranched polymers as co-stabilizers, Nanoscale Res. Lett. (2014). doi:10.1186/1556-276X-9-121.
- [22] R.A. Sperling, W.J. Parak, Surface modification, functionalization and

bioconjugation of colloidal Inorganic nanoparticles, Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci. (2010). doi:10.1098/rsta.2009.0273.

- [23] S. Benítez-Martínez, Á.I. López-Lorente, M. Valcárcel, Graphene quantum dots sensor for the determination of graphene oxide in environmental water samples, Anal. Chem. (2014). doi:10.1021/ac5035083.
- [24] L. Li, G. Wu, G. Yang, J. Peng, J. Zhao, J.J. Zhu, Focusing on luminescent graphene quantum dots: Current status and future perspectives, Nanoscale.
 (2013). doi:10.1039/c3nr33849e.
- [25] A. Cayuela, M. Laura Soriano, M. Valcárcel, Strong luminescence of Carbon Dots induced by acetone passivation: Efficient sensor for a rapid analysis of two different pollutants, Anal. Chim. Acta. (2013). doi:10.1016/j.aca.2013.10.031.
- [26] Z. Yang, Z. Li, M. Xu, Y. Ma, J. Zhang, Y. Su, F. Gao, H. Wei, L. Zhang, Controllable synthesis of fluorescent carbon dots and their detection application as nanoprobes, Nano-Micro Lett. (2013). doi:10.5101/nml.v5i4.p247-259.
- [27] K. Ghosal, A. Ghosh, Carbon dots: The next generation platform for biomedical applications, Mater. Sci. Eng. C. 96 (2019) 887–903.
 doi:10.1016/j.msec.2018.11.060.
- Y.P. Sun, B. Zhou, Y. Lin, W. Wang, K.A.S. Fernando, P. Pathak, M.J. Meziani,
 B.A. Harruff, X. Wang, H. Wang, P.G. Luo, H. Yang, M.E. Kose, B. Chen, L.M.
 Veca, S.Y. Xie, Quantum-sized carbon dots for bright and colorful
 photoluminescence, J. Am. Chem. Soc. (2006). doi:10.1021/ja062677d.
- [29] L. Cao, X. Wang, M.J. Meziani, F. Lu, H. Wang, P.G. Luo, Y. Lin, B.A. Harruff, L.M. Veca, D. Murray, S.Y. Xie, Y.P. Sun, Carbon dots for multiphoton bioimaging, J. Am. Chem. Soc. (2007). doi:10.1021/ja073527l.
- [30] Y. Choi, S. Kim, M.H. Choi, S.R. Ryoo, J. Park, D.H. Min, B.S. Kim, Highly biocompatible carbon nanodots for simultaneous bioimaging and targeted photodynamic therapy in vitro and in vivo, Adv. Funct. Mater. (2014). doi:10.1002/adfm.201400961.
- [31] C. Ding, A. Zhu, Y. Tian, Functional surface engineering of C-dots for fluorescent biosensing and in vivo bioimaging, Acc. Chem. Res. (2014).

doi:10.1021/ar400023s.

- [32] S.K. Bhunia, A. Saha, A.R. Maity, S.C. Ray, N.R. Jana, Carbon nanoparticlebased fluorescent bioimaging probes, Sci. Rep. (2013). doi:10.1038/srep01473.
- [33] W. Shang, X. Zhang, M. Zhang, Z. Fan, Y. Sun, M. Han, L. Fan, The uptake mechanism and biocompatibility of graphene quantum dots with human neural stem cells, Nanoscale. (2014). doi:10.1039/c3nr06433f.
- [34] L. Wang, Y. Wang, T. Xu, H. Liao, C. Yao, Y. Liu, Z. Li, Z. Chen, D. Pan, L. Sun, M. Wu, Gram-scale synthesis of single-crystalline graphene quantum dots with superior optical properties, Nat. Commun. (2014). doi:10.1038/ncomms6357.
- [35] X. Zhang, S. Wang, L. Xu, L. Feng, Y. Ji, L. Tao, S. Li, Y. Wei, Biocompatible polydopamine fluorescent organic nanoparticles: Facile preparation and cell imaging, Nanoscale. (2012). doi:10.1039/c2nr31281f.
- [36] M. Vedamalai, A.P. Periasamy, C.W. Wang, Y.T. Tseng, L.C. Ho, C.C. Shih, H.T. Chang, Carbon nanodots prepared from o-phenylenediamine for sensing of Cu2+ ions in cells, Nanoscale. (2014). doi:10.1039/c4nr03213f.
- [37] M. Tuerhong, Y. XU, X.B. YIN, Review on Carbon Dots and Their Applications, Chinese J. Anal. Chem. (2017). doi:10.1016/S1872-2040(16)60990-8.
- [38] C. Yu, Y. Wu, F. Zeng, S. Wu, A fluorescent ratiometric nanosensor for detecting NO in aqueous media and imaging exogenous and endogenous NO in live cells, J. Mater. Chem. B. (2013). doi:10.1039/c3tb20686f.
- [39] Y.F. Kang, Y.H. Li, Y.W. Fang, Y. Xu, X.M. Wei, X.B. Yin, Carbon Quantum Dots for Zebrafish Fluorescence Imaging, Sci. Rep. (2015). doi:10.1038/srep11835.
- [40] M. Xu, L. V Wang, Photoacoustic imaging in biomedicine Photoacoustic imaging in biomedicine, Rev. Sci. Instrum. 041101 (2006) 41101–41122. doi:10.1063/1.2195024.
- [41] M. Tuerhong, Y. XU, X.B. YIN, Review on Carbon Dots and Their Applications, Chinese J. Anal. Chem. 45 (2017) 139–150. doi:10.1016/S1872-2040(16)60990-8.
- [42] X. Lu, J. Zhang, Y.N. Xie, X. Zhang, X. Jiang, X. Hou, P. Wu, Ratiometric Phosphorescent Probe for Thallium in Serum, Water, and Soil Samples Based on Long-Lived, Spectrally Resolved, Mn-Doped ZnSe Quantum Dots and

Carbon Dots, Anal. Chem. (2018). doi:10.1021/acs.analchem.7b05365.

- [43] J. Shangguan, J. Huang, D. He, X. He, K. Wang, R. Ye, X. Yang, T. Qing, J. Tang, Highly Fe3+-Selective Fluorescent Nanoprobe Based on Ultrabright N/P Codoped Carbon Dots and Its Application in Biological Samples, Anal. Chem. 89 (2017) 7477–7484. doi:10.1021/acs.analchem.7b01053.
- [44] H. Nie, M. Li, Q. Li, S. Liang, Y. Tan, L. Sheng, W. Shi, S.X.A. Zhang, Carbon dots with continuously tunable full-color emission and their application in ratiometric pH sensing, Chem. Mater. (2014). doi:10.1021/cm5003669.
- [45] W. Song, W. Duan, Y. Liu, Z. Ye, Y. Chen, H. Chen, S. Qi, J. Wu, D. Liu, L. Xiao, C. Ren, X. Chen, Ratiometric Detection of Intracellular Lysine and pH with One-Pot Synthesized Dual Emissive Carbon Dots, Anal. Chem. (2017).
 doi:10.1021/acs.analchem.7b04211.
- [46] J.S. Sidhu, A. Singh, N. Garg, N. Kaur, N. Singh, Carbon dots as analytical tools for sensing of thioredoxin reductase and screening of cancer cells, Analyst.
 (2018). doi:10.1039/c7an02040f.
- [47] B. Bin Chen, M.L. Liu, L. Zhan, C.M. Li, C.Z. Huang, Terbium(III) Modified Fluorescent Carbon Dots for Highly Selective and Sensitive Ratiometry of Stringent, Anal. Chem. (2018). doi:10.1021/acs.analchem.7b05149.
- [48] W. Lu, X. Qin, S. Liu, G. Chang, Y. Zhang, Y. Luo, A.M. Asiri, A.O. Al-Youbi, X. Sun, Economical, green synthesis of fluorescent carbon nanoparticles and their use as probes for sensitive and selective detection of mercury(II) ions, Anal. Chem. (2012). doi:10.1021/ac3007939.
- [49] Y. Dong, R. Wang, G. Li, C. Chen, Y. Chi, G. Chen, Polyamine-functionalized carbon quantum dots as fluorescent probes for selective and sensitive detection of copper ions, Anal. Chem. (2012). doi:10.1021/ac3012126.
- [50] X. Wu, F. Tian, W. Wang, J. Chen, M. Wu, J.X. Zhao, Fabrication of highly fluorescent graphene quantum dots using L-glutamic acid for in vitro/in vivo imaging and sensing, J. Mater. Chem. C. 1 (2013) 4676–4684. doi:10.1039/c3tc30820k.
- [51] A. Zhu, Q. Qu, X. Shao, B. Kong, Y. Tian, Carbon-dot-based dual-emission nanohybrid produces a ratiometric fluorescent sensor for in vivo imaging of cellular copper ions, Angew. Chemie - Int. Ed. (2012).

doi:10.1002/anie.201109089.

- [52] W. Shi, Q. Wang, Y. Long, Z. Cheng, S. Chen, H. Zheng, Y. Huang, Carbon nanodots as peroxidase mimetics and their applications to glucose detection, Chem. Commun. (2011). doi:10.1039/c1cc11943e.
- [53] W. Shi, X. Li, H. Ma, A tunable ratiometric ph sensor based on carbon nanodots for the quantitative measurement of the intracellular pH of whole cells, Angew. Chemie - Int. Ed. (2012). doi:10.1002/anie.201202533.
- [54] H. Li, Y. Zhang, L. Wang, J. Tian, X. Sun, Nucleic acid detection using carbon nanoparticles as a fluorescent sensing platform, Chem. Commun. (2011). doi:10.1039/c0cc04326e.
- [55] Z. Lin, W. Xue, H. Chen, J.M. Lin, Peroxynitrous-acid-induced chemiluminescence of fluorescent carbon dots for nitrite sensing, Anal. Chem. (2011). doi:10.1021/ac202039h.
- [56] X. Shao, H. Gu, Z. Wang, X. Chai, Y. Tian, G. Shi, Highly selective electrochemical strategy for monitoring of cerebral Cu2+ based on a carbon dot-TPEA hybridized surface, Anal. Chem. (2013). doi:10.1021/ac303113n.
- [57] M. Farshbaf, S. Davaran, F. Rahimi, N. Annabi, R. Salehi, A. Akbarzadeh,
 Carbon quantum dots: recent progresses on synthesis, surface modification and applications, Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol. 46 (2018) 1331–1348. doi:10.1080/21691401.2017.1377725.
- [58] H.J. Jian, R.S. Wu, T.Y. Lin, Y.J. Li, H.J. Lin, S.G. Harroun, J.Y. Lai, C.C. Huang, Super-Cationic Carbon Quantum Dots Synthesized from Spermidine as an Eye Drop Formulation for Topical Treatment of Bacterial Keratitis, ACS Nano. (2017). doi:10.1021/acsnano.7b01023.
- [59] H. Wang, C. Liu, Z. Liu, J. Ren, X. Qu, Specific Oxygenated Groups Enriched Graphene Quantum Dots as Highly Efficient Enzyme Mimics, Small. (2018). doi:10.1002/smll.201703710.
- [60] J. Tang, B. Kong, H. Wu, M. Xu, Y. Wang, Y. Wang, D. Zhao, G. Zheng, Carbon nanodots featuring efficient FRET for real-time monitoring of drug delivery and two-photon imaging, Adv. Mater. (2013). doi:10.1002/adma.201303124.
- [61] X. Li, S.M. Robinson, A. Gupta, K. Saha, Z. Jiang, D.F. Moyano, A. Sahar, M.A.Riley, V.M. Rotello, Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial

agents against multi-drug-resistant bacteria, ACS Nano. (2014). doi:10.1021/nn5042625.

- [62] C. Liu, P. Zhang, X. Zhai, F. Tian, W. Li, J. Yang, Y. Liu, H. Wang, W. Wang, W. Liu, Nano-carrier for gene delivery and bioimaging based on carbon dots with PEI-passivation enhanced fluorescence, Biomaterials. (2012).
 doi:10.1016/j.biomaterials.2012.01.052.
- [63] J.M. Rosenholm, C. Sahlgren, M. Lindén, Towards multifunctional, targeted drug delivery systems using mesoporous silica nanoparticles - Opportunities & challenges, Nanoscale. (2010). doi:10.1039/c0nr00156b.
- [64] P. Devi, S. Saini, K.-H. Kim, The advanced role of carbon quantum dots in nanomedical applications, Biosens. Bioelectron. 141 (2019) 111158.
 doi:10.1016/j.bios.2019.02.059.
- [65] L. Zhou, Z. Chen, K. Dong, M. Yin, J. Ren, X. Qu, DNA-mediated biomineralization of rare-earth nanoparticles for simultaneous imaging and stimuli-responsive drug delivery, Biomaterials. (2014). doi:10.1016/j.biomaterials.2014.06.034.
- [66] K.O. Boakye-Yiadom, S. Kesse, Y. Opoku-Damoah, M.S. Filli, M. Aquib, M.M.B. Joelle, M.A. Farooq, R. Mavlyanova, F. Raza, R. Bavi, B. Wang, Carbon dots: Applications in bioimaging and theranostics, Int. J. Pharm. 564 (2019) 308–317. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.04.055.
- [67] C. Yang, R.P. Thomsen, R. Ogaki, J. Kjems, B.M. Teo, Ultrastable green fluorescence carbon dots with a high quantum yield for bioimaging and use as theranostic carriers, J. Mater. Chem. B. (2015). doi:10.1039/c5tb00467e.
- [68] M. Zhang, X. Zhao, Z. Fang, Y. Niu, J. Lou, Y. Wu, S. Zou, S. Xia, M. Sun, F. Du, Fabrication of HA/PEI-functionalized carbon dots for tumor targeting, intracellular imaging and gene delivery, RSC Adv. 7 (2017) 3369–3375. doi:10.1039/C6RA26048A.
- [69] S. Xie, H. Su, W. Wei, M. Li, Y. Tong, Z. Mao, Remarkable photoelectrochemical performance of carbon dots sensitized TiO2 under visible light irradiation, J. Mater. Chem. A. (2014). doi:10.1039/c4ta03203a.
- [70] Y. Zhu, X. Ji, C. Pan, Q. Sun, W. Song, L. Fang, Q. Chen, C.E. Banks, A carbon quantum dot decorated RuO 2 network: Outstanding supercapacitances under

ultrafast charge and discharge, Energy Environ. Sci. (2013). doi:10.1039/c3ee41776j.

- [71] X. Zhang, Y. Zhang, Y. Wang, S. Kalytchuk, S. V. Kershaw, Y. Wang, P. Wang, T. Zhang, Y. Zhao, H. Zhang, T. Cui, Y. Wang, J. Zhao, W.W. Yu, A.L. Rogach, Color-switchable electroluminescence of carbon dot light-emitting diodes, ACS Nano. (2013). doi:10.1021/nn405017q.
- [72] H. Li, X. He, Z. Kang, H. Huang, Y. Liu, J. Liu, S. Lian, C.H.A. Tsang, X. Yang, S.T. Lee, Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalyst design, Angew. Chemie Int. Ed. (2010). doi:10.1002/anie.200906154.
- [73] F. Wang, M. Kreiter, B. He, S. Pang, C.Y. Liu, Synthesis of direct white-light emitting carbogenic quantum dots, Chem. Commun. (2010). doi:10.1039/c002206c.
- [74] M. Havrdova, K. Hola, J. Skopalik, K. Tomankova, M. Petr, K. Cepe, K. Polakova, J. Tucek, A.B. Bourlinos, R. Zboril, Toxicity of carbon dots-Effect of surface functionalization on the cell viability, reactive oxygen species generation and cell cycle, Carbon N. Y. (2016). doi:10.1016/j.carbon.2015.12.027.
- [75] E. Kabir, V. Kumar, K.H. Kim, A.C.K. Yip, J.R. Sohn, Environmental impacts of nanomaterials, J. Environ. Manage. 225 (2018) 261–271.
 doi:10.1016/j.jenvman.2018.07.087.
- [76] F. Joris, B.B. Manshian, K. Peynshaert, S.C. De Smedt, K. Braeckmans, S.J. Soenen, 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). doi:10.1039/c3cs60145e.
- [77] R. Madannejad, N. Shoaie, F. Jahanpeyma, M.H. Darvishi, M. Azimzadeh, H. Javadi, Toxicity of carbon-based nanomaterials: Reviewing recent reports in medical and biological systems, Chem. Biol. Interact. 307 (2019) 206–222. doi:10.1016/j.cbi.2019.04.036.
- Y. Zhu, X. Liu, Y. Hu, R. Wang, M. Chen, J. Wu, Y. Wang, S. Kang, Y. Sun, M. Zhu, Behavior, remediation effect and toxicity of nanomaterials in water environments, Environ. Res. 174 (2019) 54–60. doi:10.1016/j.envres.2019.04.014.
- [79] G.F. Schirinzi, I. Pérez-Pomeda, J. Sanchís, C. Rossini, M. Farré, D. Barceló,

Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells, Environ. Res. (2017). doi:10.1016/j.envres.2017.08.043.

- [80] G. Pattan, G. Kaul, Health hazards associated with nanomaterials, Toxicol. Ind. Health. (2014). doi:10.1177/0748233712459900.
- [81] R.L. Hill, A bibliography of the Anglo-Egyptian Sudan, from the earliest times to 1937, Ann. Biol. 4 (1939) xi+213.
- [82] A.C. John, M. Küpper, A.M.M. Manders-Groot, B. Debray, J.M. Lacome, T.A.J. Kuhlbusch, Emissions and possible environmental Implication of engineered nanomaterials (ENMs) in the atmosphere, Atmosphere (Basel). (2017). doi:10.3390/atmos8050084.
- [83] G. Ounoughene, O. Le Bihan, C. Chivas-Joly, C. Motzkus, C. Longuet, B. Debray,
 A. Joubert, L. Le Coq, J.M. Lopez-Cuesta, Behavior and fate of halloysite
 nanotubes (HNTs) when incinerating pa6/HNTs nanocomposite, Environ. Sci.
 Technol. 49 (2015) 5450–5457. doi:10.1021/es505674j.
- [84] Y. Ge, J.P. Schimel, P.A. Holden, Evidence for negative effects of TiO2 and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities, Environ. Sci. Technol. (2011). doi:10.1021/es103040t.
- [85] G. Vale, K. Mehennaoui, S. Cambier, G. Libralato, S. Jomini, R.F. Domingos, Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview, Aquat. Toxicol. (2016). doi:10.1016/j.aquatox.2015.11.019.
- [86] T.L. Rocha, T. Gomes, V.S. Sousa, N.C. Mestre, M.J. Bebianno, Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs: An overview, Mar. Environ. Res. (2015). doi:10.1016/j.marenvres.2015.06.013.
- [87] T.J. Baker, C.R. Tyler, T.S. Galloway, Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms, Environ. Pollut. (2014).
 doi:10.1016/j.envpol.2013.11.014.
- [88] R. Grillo, A.H. Rosa, L.F. Fraceto, Engineered nanoparticles and organic matter: A review of the state-of-the-art, Chemosphere. (2015). doi:10.1016/j.chemosphere.2014.07.049.
- [89] M. Gao, Z. Zhang, M. Lv, W. Song, Y. Lv, Toxic effects of nanomaterial-

adsorbed cadmium on Daphnia magna, Ecotoxicol. Environ. Saf. 148 (2018) 261–268. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.10.038.

- [90] K.W. Kwok, K.M. Leung, E. Flahaut, J. Cheng, S.H. Cheng, Chronic toxicity of double-walled carbon nanotubes to three marine organisms: Influence of different dispersion methods, Nanomedicine. (2010). doi:10.2217/nnm.10.59.
- [91] M.L. Binderup, L. Bredsdorff, V.M. Beltoft, A. Mortensen, K. Löschner, E.H.
 Larsen, F.D. Erikse, Systemic Absorption of Nanomaterials by Oral Exposure, 2013.
- [92] A. Mackevica, S. Foss Hansen, Release of nanomaterials from solid nanocomposites and consumer exposure assessment – A forward-looking review, Nanotoxicology. (2016). doi:10.3109/17435390.2015.1132346.
- [93] P.D. Sly, K. Schüepp, Nanoparticles and Children's Lungs: Is there a need for caution?, Paediatr. Respir. Rev. 13 (2012) 71–72.
 doi:10.1016/j.prrv.2011.07.005.
- [94] K. Meldrum, C. Guo, E.L. Marczylo, T.W. Gant, R. Smith, M.O. Leonard, Mechanistic insight into the impact of nanomaterials on asthma and allergic airway disease, Part. Fibre Toxicol. (2017). doi:10.1186/s12989-017-0228-y.
- [95] H. Becker, F. Herzberg, A. Schulte, M. Kolossa-Gehring, The carcinogenic potential of nanomaterials, their release from products and options for regulating them, Int. J. Hyg. Environ. Health. (2011). doi:10.1016/j.ijheh.2010.11.004.
- [96] H. Hollert, S.H. Keiter, Danio rerio as a model in aquatic toxicology and sediment research, Environ. Sci. Pollut. Res. 22 (2015) 16243–16246. doi:10.1007/s11356-015-5362-1.
- [97] R. Spence, G. Gerlach, C. Lawrence, C. Smith, The behaviour and ecology of the zebrafish, Danio rerio, Biol. Rev. (2008). doi:10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x.
- [98] R.E. Engeszer, L.B. Patterson, A.A. Rao, D.M. Parichy, Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field, Zebrafish. (2007). doi:10.1089/zeb.2006.9997.
- [99] M. Arunachalam, M. Raja, C. Vijayakumar, P. Malaiammal, R.L. Mayden, Natural history of zebrafish (Danio rerio) in India, Zebrafish. (2013).

doi:10.1089/zeb.2012.0803.

- [100] R. Spence, M.K. Fatema, M. Reichard, K.A. Huq, M.A. Wahab, Z.F. Ahmed, C. Smith, The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh, J. Fish Biol. (2006). doi:10.1111/j.1095-8649.2006.01206.x.
- [101] G.S. Gerhard, E.J. Kauffman, X. Wang, R. Stewart, J.L. Moore, C.J. Kasales, E. Demidenko, K.C. Cheng, Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (Danio rerio), Exp. Gerontol. (2002). doi:10.1016/S0531-5565(02)00088-8.
- [102] G.J. Lieschke, P.D. Currie, Animal models of human disease: Zebrafish swim into view, Nat. Rev. Genet. (2007). doi:10.1038/nrg2091.
- [103] R.M. Colwill, R. Creton, Locomotor behaviors in zebrafish (Danio rerio) larvae, Behav. Processes. (2011). doi:10.1016/j.beproc.2010.12.003.
- [104] R. Dahm, R. Geisler, Learning from small fry: The zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species, Mar. Biotechnol. (2006). doi:10.1007/s10126-006-5139-0.
- [105] S. Ali, D.L. Champagne, H.P. Spaink, M.K. Richardson, Zebrafish embryos and larvae: A new generation of disease models and drug screens, Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev. (2011). doi:10.1002/bdrc.20206.
- [106] C.B. Kimmel, W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann, T.F. Schilling, Stages of embryonic development of the zebrafish, Dev. Dyn. (1995). doi:10.1002/aja.1002030302.
- [107] D.M. Parichy, M.R. Elizondo, M.G. Mills, T.N. Gordon, R.E. Engeszer, Normal table of postembryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish, Dev. Dyn. (2009). doi:10.1002/dvdy.22113.
- [108] T. Tao, J. Peng, Liver development in zebrafish (Danio rerio), J. Genet. Genomics. (2009). doi:10.1016/S1673-8527(08)60121-6.
- [109] P. Porazzi, D. Calebiro, F. Benato, N. Tiso, L. Persani, Thyroid gland development and function in the zebrafish model, Mol. Cell. Endocrinol.
 (2009). doi:10.1016/j.mce.2009.05.011.
- [110] J.Y. Jeong, H.B. Kwon, J.C. Ahn, D. Kang, S.H. Kwon, J.A. Park, K.W. Kim,
 Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish,
 Brain Res. Bull. (2008). doi:10.1016/j.brainresbull.2007.10.043.

- [111] K. Howe, M.D. Clark, C.F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Muffato, J.E. Collins, S. Humphray, K. McLaren, L. Matthews, S. McLaren, I. Sealy, M. Caccamo, C. Churcher, C. Scott, J.C. Barrett, R. Koch, G.J. Rauch, S. White, W. Chow, B. Kilian, L.T. Quintais, J.A. Guerra-Assunção, Y. Zhou, Y. Gu, J. Yen, J.H. Vogel, T. Eyre, S. Redmond, R. Banerjee, J. Chi, B. Fu, E. Langley, S.F. Maguire, G.K. Laird, D. Lloyd, E. Kenyon, S. Donaldson, H. Sehra, J. Almeida-King, J. Loveland, S. Trevanion, M. Jones, M. Quail, D. Willey, A. Hunt, J. Burton, S. Sims, K. McLay, B. Plumb, J. Davis, C. Clee, K. Oliver, R. Clark, C. Riddle, D. Eliott, G. Threadgold, G. Harden, D. Ware, B. Mortimer, G. Kerry, P. Heath, B. Phillimore, A. Tracey, N. Corby, M. Dunn, C. Johnson, J. Wood, S. Clark, S. Pelan, G. Griffiths, M. Smith, R. Glithero, P. Howden, N. Barker, C. Stevens, J. Harley, K. Holt, G. Panagiotidis, J. Lovell, H. Beasley, C. Henderson, D. Gordon, K. Auger, D. Wright, J. Collins, C. Raisen, L. Dyer, K. Leung, L. Robertson, K. Ambridge, D. Leongamornlert, S. McGuire, R. Gilderthorp, C. Griffiths, D. Manthravadi, S. Nichol, G. Barker, S. Whitehead, M. Kay, J. Brown, C. Murnane, E. Gray, M. Humphries, N. Sycamore, D. Barker, D. Saunders, J. Wallis, A. Babbage, S. Hammond, M. Mashreghi-Mohammadi, L. Barr, S. Martin, P. Wray, A. Ellington, N. Matthews, M. Ellwood, R. Woodmansey, G. Clark, J. Cooper, A. Tromans, D. Grafham, C. Skuce, R. Pandian, R. Andrews, E. Harrison, A. Kimberley, J. Garnett, N. Fosker, R. Hall, P. Garner, D. Kelly, C. Bird, S. Palmer, I. Gehring, A. Berger, C.M. Dooley, Z. Ersan-Ürün, C. Eser, H. Geiger, M. Geisler, L. Karotki, A. Kirn, J. Konantz, M. Konantz, M. Oberländer, S. Rudolph-Geiger, M. Teucke, K. Osoegawa, B. Zhu, A. Rapp, S. Widaa, C. Langford, F. Yang, N.P. Carter, J. Harrow, Z. Ning, J. Herrero, S.M.J. Searle, A. Enright, R. Geisler, R.H.A. Plasterk, C. Lee, M. Westerfield, P.J. De Jong, L.I. Zon, J.H. Postlethwait, C. Nüsslein-Volhard, T.J.P. Hubbard, H.R. Crollius, J. Rogers, D.L. Stemple, The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome, Nature. (2013). doi:10.1038/nature12111.
- [112] M.M. Santoro, Zebrafish as a model to explore cell metabolism, Trends Endocrinol. Metab. 25 (2014) 546–554. doi:10.1016/j.tem.2014.06.003.
- [113] M. Bell, J.M. Blais, "-Omics" workflow for paleolimnological and geological archives: A review, Sci. Total Environ. 672 (2019) 438–455.
doi:10.1016/j.scitotenv.2019.03.477.

- [114] A. Papetti, R. Colombo, High-performance capillary electrophoresis for food quality evaluation, Elsevier Inc., 2019. doi:10.1016/b978-0-12-814217-2.00014-7.
- [115] B. Daviss, Growing pains for metabolomics, Scientist. (2005).
- [116] E. Holmes, I.D. Wilson, J.K. Nicholson, Metabolic Phenotyping in Health and Disease, Cell. (2008). doi:10.1016/j.cell.2008.08.026.
- [117] D.G. Robertson, Metabonomics in toxicology: A review, Toxicol. Sci. (2005). doi:10.1093/toxsci/kfi102.
- [118] K.W. Jordan, J. Nordenstam, G.Y. Lauwers, D.A. Rothenberger, K. Alavi, M. Garwood, L.L. Cheng, Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy, Dis. Colon Rectum. (2009). doi:10.1007/DCR.0b013e31819c9a2c.
- [119] D.K. Trivedi, K.A. Hollywood, R. Goodacre, Metabolomics for the masses: The future of metabolomics in a personalized world, New Horizons Transl. Med.
 (2017). doi:10.1016/j.nhtm.2017.06.001.
- [120] I. Laíns, M. Gantner, S. Murinello, J.A. Lasky-Su, J.W. Miller, M. Friedlander, D. Husain, Metabolomics in the study of retinal health and disease, Prog. Retin.
 Eye Res. 69 (2019) 57–79. doi:10.1016/j.preteyeres.2018.11.002.
- [121] S. Tyagi, Raghvendra, U. Singh, T. Kalra, K. Munjal, Applications of metabolomics - A systematic study of the unique chemical fingerprints: An overview, Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 3 (2010) 83–86.
- [122] M. V. Lind, O.I. Savolainen, A.B. Ross, The use of mass spectrometry for analysing metabolite biomarkers in epidemiology: methodological and statistical considerations for application to large numbers of biological samples, Eur. J. Epidemiol. (2016). doi:10.1007/s10654-016-0166-2.
- [123] Q. Cui, I.A. Lewis, A.D. Hegeman, M.E. Anderson, J. Li, C.F. Schulte, W.M.
 Westler, H.R. Eghbalnia, M.R. Sussman, J.L. Markley, Metabolite identification
 via the Madison Metabolomics Consortium Database [3], Nat. Biotechnol.
 (2008). doi:10.1038/nbt0208-162.
- [124] D.S. Wishart, D. Tzur, C. Knox, R. Eisner, A.C. Guo, N. Young, D. Cheng, K. Jewell, D. Arndt, S. Sawhney, C. Fung, L. Nikolai, M. Lewis, M.A. Coutouly, I.

Forsythe, P. Tang, S. Shrivastava, K. Jeroncic, P. Stothard, G. Amegbey, D.
Block, D.D. Hau, J. Wagner, J. Miniaci, M. Clements, M. Gebremedhin, N. Guo,
Y. Zhang, G.E. Duggan, G.D. MacInnis, A.M. Weljie, R. Dowlatabadi, F.
Bamforth, D. Clive, R. Greiner, L. Li, T. Marrie, B.D. Sykes, H.J. Vogel, L.
Querengesser, HMDB: The human metabolome database, Nucleic Acids Res.
(2007). doi:10.1093/nar/gkl923.

- [125] D.S. Wishart, C. Knox, A.C. Guo, R. Eisner, N. Young, B. Gautam, D.D. Hau, N. Psychogios, E. Dong, S. Bouatra, R. Mandal, I. Sinelnikov, J. Xia, L. Jia, J.A. Cruz, E. Lim, C.A. Sobsey, S. Shrivastava, P. Huang, P. Liu, L. Fang, J. Peng, R. Fradette, D. Cheng, D. Tzur, M. Clements, A. Lewis, A. de souza, A. Zuniga, M. Dawe, Y. Xiong, D. Clive, R. Greiner, A. Nazyrova, R. Shaykhutdinov, L. Li, H.J. Vogel, I. Forsythei, HMDB: A knowledgebase for the human metabolome, Nucleic Acids Res. (2009). doi:10.1093/nar/gkn810.
- [126] D.S. Wishart, T. Jewison, A.C. Guo, M. Wilson, C. Knox, Y. Liu, Y. Djoumbou, R. Mandal, F. Aziat, E. Dong, S. Bouatra, I. Sinelnikov, D. Arndt, J. Xia, P. Liu, F. Yallou, T. Bjorndahl, R. Perez-Pineiro, R. Eisner, F. Allen, V. Neveu, R. Greiner, A. Scalbert, HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013, Nucleic Acids Res. (2013). doi:10.1093/nar/gks1065.
- [127] D.S. Wishart, Y.D. Feunang, A. Marcu, A.C. Guo, K. Liang, R. Vázquez-Fresno, T. Sajed, D. Johnson, C. Li, N. Karu, Z. Sayeeda, E. Lo, N. Assempour, M. Berjanskii, S. Singhal, D. Arndt, Y. Liang, H. Badran, J. Grant, A. Serra-Cayuela, Y. Liu, R. Mandal, V. Neveu, A. Pon, C. Knox, M. Wilson, C. Manach, A. Scalbert, HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018, Nucleic Acids Res. (2018). doi:10.1093/nar/gkx1089.
- [128] J. Chong, O. Soufan, C. Li, I. Caraus, S. Li, G. Bourque, D.S. Wishart, J. Xia, MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis, Nucleic Acids Res. (2018). doi:10.1093/nar/gky310.
- [129] J. Chong, M. Yamamoto, J. Xia, MetaboAnalystR 2.0: From raw spectra to biological insights, Metabolites. (2019). doi:10.3390/metabo9030057.
- [130] J. Xia, D.S. Wishart, Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis, Curr. Protoc. Bioinforma. (2016). doi:10.1002/cpbi.11.
- [131] T.O.F. Testing, L.O.F. Assessment, P.O.F. Testing, DB-ALM Protocol n ° 140 :

Fish Embryo Acute Toxicity Test with Zebrafish (ZFET) Objective & Application Résumé Data Analysis / Prediction Model, (2012) 1–14.

- [132] C. Lawrence, The husbandry of zebrafish (Danio rerio): A review, Aquaculture.269 (2007) 1–20. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.077.
- [133] E.G. BLIGH, W.J. DYER, A rapid method of total lipid extraction and purification., Can. J. Biochem. Physiol. (1959). doi:10.1139/o59-099.
- [134] S. Mukherjee, E. Prasad, A. Chadha, H-Bonding controls the emission properties of functionalized carbon nano-dots, Phys. Chem. Chem. Phys. (2017). doi:10.1039/c6cp08889a.
- [135] Y. Dong, H. Pang, H. Bin Yang, C. Guo, J. Shao, Y. Chi, C.M. Li, T. Yu, Carbonbased dots co-doped with nitrogen and sulfur for high quantum yield and excitation-independent emission, Angew. Chemie - Int. Ed. (2013). doi:10.1002/anie.201301114.
- [136] Y.C. Lu, J. Chen, A.J. Wang, N. Bao, J.J. Feng, W. Wang, L. Shao, 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). doi:10.1039/c4tc02111h.
- [137] P. Wexler, Encyclopedia of Toxicology: Third Edition, 2014.
- [138] J. Fu, Z. Gong, B.C. Kelly, Metabolomic profiling of zebrafish (Danio rerio) embryos exposed to the antibacterial agent triclosan, Environ. Toxicol. Chem.
 (2019). doi:10.1002/etc.4292.
- [139] Z. Zuberi, M.N.H. Eeza, J. Matysik, J.P. Berry, A. Alia, NMR-based metabolic profiles of intact zebrafish embryos exposed to aflatoxin b1 recapitulates hepatotoxicity and supports possible neurotoxicity, Toxins (Basel). (2019). doi:10.3390/toxins11050258.
- [140] N. Ørtenblad, H. Westerblad, J. Nielsen, Muscle glycogen stores and fatigue, J. Physiol. (2013). doi:10.1113/jphysiol.2013.251629.
- [141] X. Zhang, Q. Zhou, W. Zou, X. Hu, Molecular Mechanisms of Developmental Toxicity Induced by Graphene Oxide at Predicted Environmental Concentrations, Environ. Sci. Technol. (2017). doi:10.1021/acs.est.7b01922.
- [142] A. Santos-Fandila, E. Vázquez, A. Barranco, A. Zafra-Gómez, A. Navalón, R.Rueda, M. Ramírez, Analysis of 17 neurotransmitters, metabolites and

precursors in zebrafish through the life cycle using ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. (2015). doi:10.1016/j.jchromb.2015.07.040.

- S. Kim, D. Yoon, M. Lee, C. Yoon, S. Kim, Metabolic responses in zebrafish
 (Danio rerio) exposed to zinc and cadmium by nuclear magnetic resonance based metabolomics, Chem. Ecol. 32 (2016) 136–148.
 doi:10.1080/02757540.2015.1125891.
- [144] W. Wang, Z. Wu, Z. Dai, Y. Yang, J. Wang, G. Wu, Glycine metabolism in animals and humans: Implications for nutrition and health, Amino Acids.
 (2013). doi:10.1007/s00726-013-1493-1.
- [145] R. Riché, M. Liao, I.A. Pena, K.Y. Leung, N. Lepage, N. DE Greene, K. Sarafoglou, L.A. Schimmenti, P. Drapeau, É. Samarut, Glycine decarboxylase deficiencyinduced motor dysfunction in zebrafish is rescued by counterbalancing glycine synaptic level, JCI Insight. (2018). doi:10.1172/jci.insight.124642.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι





Εικόνα Π1- 2: Φάσμα ¹H-NMR ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε 145 μg mL⁻¹ non-doped CNDs.



Εικόνα Π1- 3: Φάσμα ¹H-NMR ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε 290 μg mL⁻¹ non-doped CNDs.



Εικόνα Π1- 4: Φάσμα ¹H-NMR ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε 400 μg mL⁻¹ non-doped CNDs.



Εικόνα Π1- 5: Φάσμα ¹H-NMR ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε 585 μg mL⁻¹ non-doped CNDs.



Εικόνα Π1- 6: Φάσμα ¹H-NMR ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε 50 μ g mL⁻¹ N-doped CNDs.



Εικόνα Π1- 7: Φάσμα ¹H-NMR ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε 100 μg mL⁻¹ N-doped CNDs.



Εικόνα Π1- 8: Φάσμα ¹H-NMR ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε 200 μg mL⁻¹ N-doped CNDs.



Εικόνα Π1- 9: Φάσμα ¹H-NMR ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε 400 μg mL⁻¹ N-doped CNDs.



Εικόνα Π1- 10: Φάσμα ¹H-NMR ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε 75 μg mL⁻¹ N,S-doped CNDs.



Εικόνα Π1- 11: Φάσμα ¹H-NMR ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε 100 μ g mL⁻¹ N,S-doped CNDs.



Εικόνα Π1- 12: Φάσμα ¹H-NMR ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε 150 μg mL⁻¹ N,S-doped CNDs.



Εικόνα Π1- 13: Φάσμα ¹H-NMR ατόμων zebrafish μετά από έκθεση σε 200 μ g mL⁻¹ N,S-doped CNDs.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Πίνακας Π2- 1: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν στο zebrafish και προέκυψαν από την παρούσα μελέτη, με cas number και χημικό τύπο.

Μεταβολίτης	cas number	Χημικός τύπος	
α-D-γλυκόζη	492-62-6	C ₆ H ₁₂ O ₆	
α-κετοϊσοβαλερικό οξύ	759-05-7	C ₅ H ₈ O ₃	
α-Λακτόζη	63-42-3	$C_{12}H_{22}O_{11}$	
Βιοτίνη	58-85-5	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	
Κιτρουλλίνη	372-75-8	$C_6H_{13}N_3O_3$	
D-φρουκτόζη	53188-23-1	$C_6H_{12}O_6$	
D-Μαλτόζη	69-79-4	$C_{12}H_{22}O_{11}$	
D-Mαννόζη	3458-28-4	$C_6H_{12}O_6$	
D-Ξυλόζη	58-86-6	$C_5H_{10}O_5$	
6-φωσφορική φρουκτόζη	643-13-0	$C_6H_{13}O_9P$	
γ-αμινοβουτυρικό οξύ	56-12-2	$C_4H_9NO_2$	
6-φωσφορική γλυκοζαμίνη	3616-42-0	C ₆ H ₁₄ NO ₈ P	
Γλουταθειόνη	70-18-8	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	
3-φωσφορική γλυκερόλη	57-03-4	C ₃ H ₉ O ₆ P	
Ινοσίνη	58-63-9	$C_{10}H_{12}N_4O_5$	
L-Αραβιτόλη	7643-75-6	$C_5H_{12}O_5$	
L-Κυσταθειόνη	56-88-2	$C_7H_{14}N_2O_4S$	
L-Κυστίνη	56-89-3	$C_6H_{12}N_2O_4S_2$	
L-Φουκόζη	2438-80-4	C ₆ H ₁₂ O ₅	
L-Ιστιδίνη	71-00-1	$C_6H_9N_3O_2$	
L-Ισολευκίνη	73-32-5	$C_6H_{13}NO_2$	
L-Μεθειονίνη	63-68-3	$C_5H_{11}NO_2S$	
L-Προλίνη	147-85-3	$C_5H_9NO_2$	

		l	
L-Τυροσίνη	60-18-4	$C_9H_{11}NO_3$	
Μελιβιόζη	585-99-9	$C_{12}H_{22}O_{11}$	
Πιπεκολικό οξύ	535-75-1	$C_6H_{11}NO_2$	
Ραφινόζη	512-69-6	$C_{18}H_{32}O_{16}$	
S- Αδενοσυλομοκυστεΐνη	979-92-0	$C_{14}H_{20}N_6O_5S$	
Σεληνομεθειονίνη	3211-76-5	$C_5H_{11}NO_2Se$	
Σταχυόζη	470-55-3	$C_{24}H_{42}O_{21}$	
Σακχαρόζη	57-50-1	$C_{12}H_{22}O_{11}$	
Τρεχαλόζη	99-20-7	$C_{12}H_{22}O_{11}$	
Διφωσφορικό γλυκουρονικό οξύ ουριδίνης	2616-64-0	$C_{15}H_{22}N_2O_{18}P_2$	
Διφωσφορική Ν- ακετυλογλυκοζαμίνη ουριδίνης	528-04-1	$C_{17}H_{27}N_3O_{17}P_2$	

Πίνακας Π2- 2: Μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν στο zebrafish και προέκυψαν από την παρούσα μελέτη, με θεωρητικές και πειραματικές μάζες, θραυσματοποίηση και χαρακτηριστικά ¹Η-ΝΜR.

Μεταβολίτης	Θεωρητική μάζα	Πειραματική μάζα	Διαφορά σε ppm	MS/MS θραυσματο- ποίηση	¹ Η NMR χαρακτηριστι- κά σήματα
α-D-γλυκόζη	181,1632	181,163	-1,1	163.0600/145 .0495/103.03 89 /91.0389	3.52 (dd, J=9.82, 3.77 Hz)
α- κετοϊσοβαλερι κό οξύ	117,1225	117,1226	0,85	99.044/71.04 91	1.11(d, J=7.14 Hz)
α-Λακτόζη	343,3038	343,3036	-0,58	181.0706/163 .0600/147.06 51/119.0338	3.59 (d, J=3.68 Hz)
Βιοτίνη	245,3183	245,3184	0,41	210.058/199. 0899/157.043 0	2.20 (t, J=7.43 Hz)
Κιτρουλλίνη	176,193	176,1929	-0,57	116.0706/85. 0760/70.0651	3.74 (dd, <i>J</i> =6.42, 5.84 Hz)
D-φρουκτόζη	180.1559	180.1559	2.22	243.0264/171 .0053/147.06 51	4.01 (dd, J = 4.5, 3.4 Hz), 4.46 (d, J = 4.5 Hz)
D-Μαλτόζη	343,3038	343,3037	-0,29	281.0867/181 .0706/163.06 00 /145.0495	3.64-3.68 (m), 5.40 (d, J=3.89 Hz)

D-Μαννόζη	181,1632	181,1634	1,1	145.0495/103 .0389/91.038 9	5.17 (d, J=1.31 Hz)
D-Ξυλόζη	151,1372	151,1374	1,32	115.0389/91. 0389	4.41 (d, J=10.26 Hz)
6-φωσφορική φρουκτόζη	261,1431	261,1431	0	147.0651/110 .9841/96.968 5	3.60-3.70 (m)
γ- αμινοβουτυρικ ό οξύ	104,1271	104,1272	0,96	87.044/77.05 97	2.28 (t, J=7.36 Hz)
6-φωσφορική γλυκοζαμίνη	260,1583	260,1584	0,38	171.0053/146 .0811/103.03 89	5.45 (d, J=3.57 Hz)
Γλουταθειόνη	308,3303	308,3304	0,32	228.0978/187 .0535/159.05 86/102.0549	4.20 (q, J=7.14, 7.14, 7.14 Hz)
3-φωσφορική γλυκερόλη	173,081	173,0809	-0,58	136.9998/96. 9685/75.0440	3.61 (dd, J=11.80, 5.90 Hz)
Ινοσίνη	269,2334	269,2333	-0,37	199.0713/137 .0457/120.01 92	8.18 (s), 8.30 (s)
L-Αραβιτόλη	153,1531	153,1532	0,65	135.0651/117 .0546/75.044 0	3.63-3.69 (m)
L-Κυσταθειόνη	223,2693	223,2693	0	177.0692/160 .0426/148.04 26	3.85 (dt, J=6.85, 5.56 Hz)
L-Κυστίνη	241,3073	241,3074	0,41	177.9990/149 .0201/119.99 36	3.18 (dd, J=14.94, 8.12 Hz)
L-Φουκόζη	165,1638	165,1638	0	129.0546/105 .0546/87.044 0	5.21 (d, J=3.90 Hz)
L-Ιστιδίνη	156,1619	156,162	0,64	139.0502/110 .0712/93.044 7	7.09 (d, J=0.58 Hz)
L-Ισολευκίνη	132,1802	132,1804	1,51	114.0913/86. 0964	1.240-1.254 (m)
L-Μεθειονίνη	150,2183	150,2184	0,67	104.0528/88. 0215	2.05-2.24 (m)
L-Προλίνη	116,1378	116,1379	0,86	98.0600/72.0 807	1.99-2.06 (m), 4.12 (dd, J=8.63, 6.42 Hz)
L-Τυροσίνη	182,1958	182,1959	0,55	164.0706/136 .0756/109.06 47	6.86-6.90 (m)
Μελιβιόζη	343,3038	343,3038	0	307.1023/281 .0867/253.09 17	3.68-3.78 (m)

Πιπεκολικό οξύ	130,1643	130,1644	0,77	112.0756/94. 0651/84.0807	1.49-1.75 (m) <i>,</i> 2.17-2.30 (m)
Ραφινόζη	505,4444	505,4447	0,59	325.1129/181 .0706/163.06 00 /93.0546	4.12 (d, J=6.30 Hz)
S- Αδενοσυλομο κυστεΐνη	385,4183	385,4181	-0,52	220.0638/136 .0617/119.03 52	1.78-1.84 (m), 8.37 (s)
Σεληνομεθειον ίνη	197,1173	197,1176	1,52	151.9972/122 .9707/120.95 50	1.72 (q, J=7.5, 7.3, 7.5 Hz)
Σταχυόζη	667,585	667,5848	-0,3	649.2185/487 .1657/325.11 29 /181.0706/16 3.0600	4.60 (d, J=2.64 Hz)
Σακχαρόζη	343,3038	343,3038	0	181.0706/163 .0600/121.04 95/105.0546	4.21 (d, J=8.75 Hz), 5.40 (d, J=3.89 Hz)
Τρεχαλόζη	343,3038	343,3036	-0,58	325.1129/281 .0867/181.07 0 /163.0600/11 9.0338	3.64 (dd, J=9.93, 3.84 Hz), 3.85 (s)
Διφωσφορικό γλυκουρονικό οξύ ουριδίνης	580.2853	580.2859	1.03	377.0145/227 .0.662/113.03 45	6.21 (d, J = 9.3 Hz), 7.61 (d, J = 10.8 Hz)
Διφωσφορική Ν- ακετυλογλυκοζ αμίνη ουριδίνης	608,361	608,3608	-0,33	539.0673/364 .0193/284.05 29 /113.0345/83 .0239	2.07 (s), 5.50 (dd, <i>J</i> =7.14, 3.29 Hz)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ



Εικόνα Π3-1 1: Μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών με τη μέθοδο του DPPH[.]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο πλαίσιο του παρόντος μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης, πραγματοποιήθηκε μελέτη του μεταβολώματος του zebrafish μετά την έκθεση του σε νανοκουκκίδες άνθρακα ενισχυμένες με άζωτο και θείο, με χρήση φασματοσκοπιών ¹H-NMR (1D) και μάζας καθώς και μεταβολομικών βάσεων δεδομένων ελεύθερης πρόσβασης, προκειμένου να γίνει αξιολόγηση των επιπτώσεων των CNDs στους υδρόβιους οργανισμούς.

Αρχικά, συντέθηκαν, μέσω μιας απλής και γρήγορης συνθετικής πορείας, nondoped CNDs με βάση το κιτρικό οξύ, ενώ με μικρές τροποποιήσεις συντέθηκαν οι αντίστοιχες N-doped και N,S-doped νανοκουκκίδες. Ακολούθησε ο χαρακτηρισμός τους και λήφθηκαν φάσματα FT-IR, Uv-Vis, φθορισμού και εικόνες των υλικών από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM). Επιπλέον, έγινε μια σύντομη μελέτη της τοξικότητας των τριών νανοκουκκίδων σε λάρβες zebrafish και παρατηρήθηκαν οι μορφολογικές ανωμαλίες των ατόμων.

Στη συνέχεια, διεξήχθη, μια μη-στοχευμένη μεταβολομική μελέτη της επίδρασης των νανοκουκκίδων στο μεταβόλωμα του zebrafish. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία ¹H-NMR (1D) και με τη χρήση των Human Metabolome Database και Madison-Qingdao Metabolomics Consortium Database μεταβολομικών βάσεων δεδομένων, έγινε μερική ταυτοποίηση των μεταβολιτών. Συμπληρωματικά, χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία μάζας ώστε να ταυτοποιηθούν με μεγαλύτερη βεβαιότητα οι μεταβολίτες. Για τη διερεύνηση των μεταβολικών οδών που εμπλέκονται στις αλλαγές του μεταβολικού δικτύου έγινε ανάλυσή τους με τη βάση δεδομένων MetaboAnalyst. Τέλος, τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν μεταξύ τους καθώς και με το δείγμα ελέγχου ούτως ώστε να προκύψουν συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση των CNDs στο μεταβολικό δίκτυο του zebrafish. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η έκθεση του zebrafish στις νανοκουκκίδες συνοδεύεται από ποικίλες μεταβολικές αλλαγές. Η διατάραξη του φυσιολογικού μεταβολισμού του, μπορεί να οδηγήσει σε πολλές φαινοτυπικές αλλαγές, όπως κύρτωση ουράς και περικαρδιακό οίδημα, οι οποίες παρατηρήθηκαν στα πλαίσια της μελέτης αυτής. Οι αλλαγές στα μεταβολικά μονοπάτια που παρατηρήθηκαν εξηγούν τις παρατηρούμενες αλλαγές στον φαινότυπο του zebrafish, ενώ μπορεί να συνδέονται και με την παρατηρούμενη τοξικότητα, καθώς επηρεάζονται ζωτικές μεταβολικές λειτουργίες. Συνολικά, προέκυψαν αποτελέσματα που αφορούν την επίδραση των νανοκουκκίδων στον μεταβολισμό του zebrafish τα οποία μπορούν να αξιοποιηθούν μελλοντικά για πρόβλεψη της επίδρασης των νανοκουκκίδων στους υδρόβιους οργανισμούς και τον άνθρωπο.

ABSTRACT

In this MSc thesis, an NMR and mass spectrometric study of zebrafish metabolome after exposure to carbon nanodots doped with nitrogen and sulfur was carried out, in order to evaluate the effect of CNDs on the aquatic organism metabolism.

Citric acid-based non-doped CNDs were synthesized, through a simple and rapid synthetic process, while N-doped and N, S-doped CNDs were synthesized with minor modifications. The synthesized nanodots were characterized by FT-IR, Uv-Vis and fluorescence spectroscopy. Images of the materials were taken with a transition electron microscope (TEM), whereof the size of CNDs was calculated. In addition, the toxicity of the three CNDs to zebrafish larvae was studied in brief and morphological abnormalities of the larvae were observed.

To gain insight into the metabolic alterations that occur in zebrafish upon exposure to CNDs, a metabolomic workflow was employed. Tentative identification of metabolites was carried out using ¹H-NMR (1D) spectroscopy combined with Human Metabolome Database and Madison-Qingdao Metabolomics Consortium Database, two free-access metabolomic databases. Furthermore, mass spectroscopy was used to identify metabolites with greater certainty. To appraise the alterations of metabolic fingerprint, a metabolic pathway analysis was carried out using MetaboAnalyst, a comprehensive tool suite for metabolomic data analysis. From the obtained results useful conclusions were drawn about the effect of CNDs on the zebrafish metabolic network. It is apparent that the exposure of zebrafish to CNDs is accompanied by multiple metabolic alterations. These can induce various phenotypic changes such as tail bending and pericardial edema, which were also observed in our study. Changes in the metabolic pathways recorded in our study account for the observed phenotypic alterations of zebrafish, while they may also be related to the toxicity, because vital metabolic processes are affected. Overall, results on the effect of CNDs on zebrafish metabolism can be utilized to draw conclusions on the effect of CNDs on marine organisms and human.