



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ, ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΩΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ
HaCaT και HEK-293 ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΘΕΣΗ ΤΟΥΣ ΣΕ
ΝΑΝΟΚΟΥΚΚΙΔΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΑΖΩΤΟ-
ΦΩΣΦΟΡΟ ΚΑΙ ΑΖΩΤΟ-ΒΟΡΙΟ**

**ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΥ ΦΟΙΒΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

2023

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΥ ΦΟΙΒΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ

Μελέτη του μεταβολώματος των κυτταρικών σειρών HaCaT και HEK-293 μετά από έκθεσή τους σε νανοκουκκίδες άνθρακα που περιέχουν άζωτο-φώσφορο και άζωτο-βόριο.

A.M.:1359

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Σταλίκας Κωνσταντίνος
Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σταλίκας Κωνσταντίνος
Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Λεονάρδος Ιωάννης
Καθηγητής Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών,
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σακκάς Βασίλειος
Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ιωάννινα
2023

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	13
1.1 Νανοϋλικά.....	13
1.2 Νανοϋλικά άνθρακα.....	16
1.3 Νανοκουκίδες άνθρακα.....	17
1.3.1 Σύνθεση νανοκουκκίδων άνθρακα.....	18
1.3.2 Τροποποιήσεις νανοκουκκίδων άνθρακα.....	19
1.3.3 Ιδιότητες νανοκουκκίδων άνθρακα.....	20
1.3.4 Εφαρμογές νανοκουκκίδων άνθρακα.....	23
1.2 Επιπτώσεις νανοτεχνολογίας στο περιβάλλον και στον άνθρωπο.....	26
1.2.1 Κοινές οδοί και μηχανισμοί έκθεσης των νανοςωματιδίων στο ανθρώπινο σώμα...29	
1.2.3 Περιβαλλοντικοί παράγοντες που διέπουν την τοξικότητα των νανοςωματιδίων...30	
1.3 Κυτταρικές καλλιέργειες ως βιολογικά μοντέλα.....	31
1.3.1 Κύτταρα HaCaT.....	34
1.3.2 Κύτταρα HEK.....	36
1.4 -ομικές επιστήμες.....	39
1.5 Μεταβολομική.....	39
1.5.1 Γενικό πρωτόκολλο μεταβολομικής μελέτης.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΜΕΡΟΣ.....	50
2.1 Αντιδραστήρια-διαλύτες-υλικά-κύτταρα.....	50
2.2 Διαλύματα.....	51
2.3 Όργανα και συσκευές.....	52
2.4 Πειραματικές πορείες.....	53
2.4.1 Συνθέσεις νανοκουκκίδων άνθρακα.....	53
2.4.2 Χαρακτηρισμός της δομής.....	53
2.4.2.1 Φασματοσκοπία UV – Vis.....	53
2.4.2.2 Φασματοσκοπία IR (FTIR).....	53
2.4.2.3 Φασματοφθορισμομετρία.....	53
2.4.2.4 Μέτρηση ζ-δυναμικού.....	54
2.4.3 Εκτίμηση αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων.....	54
2.4.3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH'.....	54
2.4.3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με το H ₂ O ₂ . 54	
2.4.4 Κυτταρικές καλλιέργειες.....	55
2.4.5 Μέτρηση βιωσιμότητας κυττάρων.....	55
2.4.6 Μεταβολομική μελέτη.....	56
2.4.7 Εκχύλιση των μεταβολιτών.....	57
2.4.8 Λήψη φασμάτων ¹ H-NMR.....	57
2.4.9 Ανάλυση δεδομένων.....	57

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	59
3.1 Χαρακτηρισμός CNDs.....	59
3.1.1 Φασματοσκοπία UV-Vis.....	59
3.1.2 Φασματοσκοπία FT-IR.....	61
3.1.3 Φθορισμομετρική μελέτη.....	66
3.1.4 ζ-δυναμικό.....	68
3.2 Τοξικότητα.....	70
3.3 Μελέτη του μεταβολώματος των κυτταρικών σειρών.....	72
3.3.1 Αλλαγές του μεταβολώματος με βάση τη φασματοσκοπία NMR.....	72
3.4 Μεταβολικά μονομάτια.....	80
3.5 Εκτίμηση αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων.....	86
3.5.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH [•]	86
3.5.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με το H ₂ O ₂	87
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	89
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	98
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	100
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	111

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Κλίμακα μεγεθών διαφόρων σωματιδίων και νανοϋλικών.....	13
Εικόνα 2: Ταξινόμηση νανουλικών με βάση τις διαστάσεις , την προέλευση και τη σύσταση τους.....	15
Εικόνα 3: Κατηγορίες νανουλικών με βάση τον άνθρακα.....	17
Εικόνα 4: Κατηγορίες σύνθεσης νανουλικών.....	19
Εικόνα 5: Φάσμα μοριακής απορρόφησης, διέγερσης, εκπομπής νανοκουκκίδων άνθρακα.....	22
Εικόνα 6: Κυτταρική σειρά HaCaT.....	36
Εικόνα 7: Κυτταρική σειρά HEK-293.....	38
Εικόνα 8: Γενικό πρωτόκολλο μεταβολομικής μελέτης.....	42
Εικόνα 9: Φάσμα UV-Vis υδατικού διαλύματος των non-doped CNDs.....	59
Εικόνα 10: Φάσμα UV-Vis υδατικού διαλύματος των N-doped CNDs.....	60
Εικόνα 11: Φάσμα UV-Vis υδατικού διαλύματος των N,S-doped CNDs.....	60
Εικόνα 12: Φάσμα UV-Vis υδατικού διαλύματος των N,P-doped CNDs.....	60
Εικόνα 13: Φάσμα UV-Vis υδατικού διαλύματος των N,B-doped CNDs.....	61
Εικόνα 14: Φάσμα FT-IR των non-doped CNDs.....	64
Εικόνα 15: Φάσμα FT-IR των N-doped CNDs.....	64
Εικόνα 16: Φάσμα FT-IR των N,S-doped CNDs.....	65
Εικόνα 17: Φάσμα FT-IR των N,P-doped CNDs.....	65
Εικόνα 18: Φάσμα FT-IR των N,B-doped CNDs.....	66
Εικόνα 19: Φάσματα εκπομπής φθορισμού των non-doped CNDs σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης.....	67
Εικόνα 20: Φάσματα εκπομπής φθορισμού των N-doped CNDs σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης.....	67

Εικόνα 21: Φάσματα εκπομπής φθορισμού των N,S-doped CNDS σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης.....	67
Εικόνα 22: Φάσματα εκπομπής φθορισμού των N,P-doped CNDS σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης.....	68
Εικόνα 23: Φάσματα εκπομπής φθορισμού των N,B-doped CNDS σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης.....	68
Εικόνα 24: Κατάνομη ζ-δυναμικού non-doped CNDS.....	69
Εικόνα 25: Κατάνομη ζ-δυναμικού N-doped CNDS.....	69
Εικόνα 26: Κατάνομη ζ-δυναμικού N,S-doped CNDS.....	69
Εικόνα 27: Κατάνομη ζ-δυναμικού N,P-doped CNDS.....	70
Εικόνα 28: Κατάνομη ζ-δυναμικού N,B-doped CNDS.....	70
Εικόνα 29: Διάγραμμα τοξικότητας κυτταρικών σειρών HaCaT και HEK-293 μετά την έκθεση σε N,P-doped CNDS και N,B-doped CNDS σε συγκεντρώσεις 50-600μg/mL.....	71
Εικόνα 30: Φάσματα ¹ H-NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HaCaT (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-doped CNDS (κόκκινο) N,B-doped CNDS (πράσινο)..	72
Εικόνα 31: Φάσματα ¹ H-NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HEK-293 (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-doped CNDS (κόκκινο) N,B-doped CNDS (πράσινο)..	73
Εικόνα 32: Μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών με τη μέθοδο DPPH• των N,P-CNDS και N,B-CNDS.....	87
Εικόνα 33: Μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης H ₂ O ₂ των N,P-CNDS και N,B-CNDS.....	88
Εικόνα 34: Επισκόπηση καταβολισμού αμινοξέων.....	90
Εικόνα 35: Κύκλος της ουρίας.....	91
Εικόνα 36: Σύνδεση κύκλου ουρίας με κύκλο κιτρικού οξέος.....	92
Εικόνα 37: Μεταβολισμός ανθρακικών σκελετών μέσω του κύκλου κιτρικού οξέος.....	93
Εικόνα 38: Φάσμα ¹ H-NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HEK-293 (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDS (κόκκινο) N,B-CNDS (πράσινο) 1-1,5ppm.....	111
Εικόνα 39: Φάσμα ¹ H-NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HEK-293 (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDS (κόκκινο) N,B-CNDS (πράσινο) 1,5-2,5 ppm..	111
Εικόνα 40: Φάσμα ¹ H-NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HEK-293 (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDS (κόκκινο) N,B-CNDS (πράσινο) 2,5-3,5 ppm..	111
Εικόνα 41: Φάσμα ¹ H-NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HEK-293 (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDS (κόκκινο) N,B-CNDS (πράσινο) 3,5-4,5 ppm..	112
Εικόνα 42: Φάσμα ¹ H-NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HEK-293 (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDS (κόκκινο) N,B-CNDS (πράσινο) 4,5-5,5 ppm..	112
Εικόνα 43: Φάσμα ¹ H-NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HEK-293 (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDS (κόκκινο) N,B-CNDS (πράσινο) 5,5-6,5 ppm..	112
Εικόνα 44: Φάσμα ¹ H-NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HEK-293 (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDS (κόκκινο) N,B-CNDS (πράσινο) 7,5-8,5 ppm..	113
Εικόνα 45: Φάσμα ¹ H-NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HaCaT (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDS (κόκκινο) N,B-CNDS (πράσινο) 1-2,5 ppm.....	113
Εικόνα 46: Φάσμα ¹ H-NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HaCaT (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDS (κόκκινο) N,B-CNDS (πράσινο) 2,5- 4,5 ppm.....	113
Εικόνα 47: Φάσμα ¹ H-NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HaCaT (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDS (κόκκινο) N,B-CNDS (πράσινο) 4,5-8,5 ppm.....	114

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Μερικά κοινά χρησιμοποιούμενα παράγωγα κυττάρων HEK293.....	38
Πίνακας 2: Σύγκριση NMR-MS.....	45
Πίνακας 3: Μεταβολίτες παρόντες στα δείγματα ελέγχου και στα δείγματα μετά από έκθεση στις εκάστοτε νανοκουκκίδες (+ παρουσία μεταβολίτη, - απουσία μεταβολίτη).....	73
Πίνακας 4: Μεταβολισμοί κυττάρων και ομαδοποίησή τους (+ παρουσία μεταβολισμού, - απουσία μεταβολισμού).....	80

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CNDs: Carbon Nano Dots
SQDs: Semiconductor Quantum Dots
CQDs: Carbon Quantum Dots
GQDs: Graphene Quantum Dots
CPDs: Carbon Polymer Dots
ROS: Reactive Oxygen Species
MEM: Minimum Essential Medium
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
MS: Mass Spectrometry
NMR: Nuclear Magnetic Resonance
ESI: Electrospray Ionization
MRS: In vivo Magnetic Resonance Spectroscopy
HMDB: Human Metabolome Database
PBS: Phosphate Buffer Saline
TSP: Trimethylsilylpropanoic acid
D₂O: Deuterium Oxide
LD₅₀: Lethal Dose 50%
TCA: The Citric Acid cycle

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών (ΠΜΣ) του Τμήματος Χημείας, με κατεύθυνση: «Αναλυτική Χημεία, Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος και Τροφίμων, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κωνσταντίνου Σταλικά κατά την περίοδο 2020-2023.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους που με την πολύτιμη βοήθεια και συμβολή τους έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στη διεκπεραίωση αυτής της προσπάθειας. Πρωτίστως, βαθύτατες ευχαριστίες οφείλω στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Κωνσταντίνο Σταλικά, τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, δεχόμενος να συμμετάσχω στην ερευνητική του ομάδα όσο και για την ουσιαστική υποστήριξη και βοήθειά του. Με την επιμονή και υπομονή του, κατέβαλε κάθε δυνατή προσπάθεια για την ολοκλήρωση της παρούσας έρευνας.

Στη συνέχεια, νιώθω την ανάγκη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους διδάκτορες Θεόδωρο Χατζημητάκο και Αθανασία Κασούννη, καθώς η συστηματική επιστημονική και συμβουλευτική καθοδήγησή που μου προσέφεραν αυτά τα τρία χρόνια ήταν καταλυτική για την ολοκλήρωσή της έρευνας.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να εκφράσω στον κ. Τρογκάνη Αναστάσιο καθώς και στον κ. Θυφρονίτη Γεώργιο για την πρόσβαση στους χώρους των εργαστηρίων τους όπου διεξήχθη μεγάλο μέρος των πειραμάτων. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Τσιαφούλη Κωνσταντίνο, υπεύθυνο του κέντρου πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού για τη βοήθεια που μου προσέφερε.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, κ. Λεονάρδο Ιωάννη και κ. Σακκά Βασίλειο, για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην εξεταστική επιτροπή, καθώς και για τον χρόνο που διέθεσαν για να μελετήσουν την παρούσα εργασία.

Ξεχωριστές ευχαριστίες, οφείλω σε όλα τα μέλη ΔΕΠ και ΕΔΙΠ του τομέα Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και ιδιαίτερα στον καθηγητή κ. Μάμαντο Προδρομίδα και όλα τα μέλη της ερευνητικής του ομάδας για το ευχάριστο κλίμα και την αρμονική συνύπαρξη στο εργαστήριο.

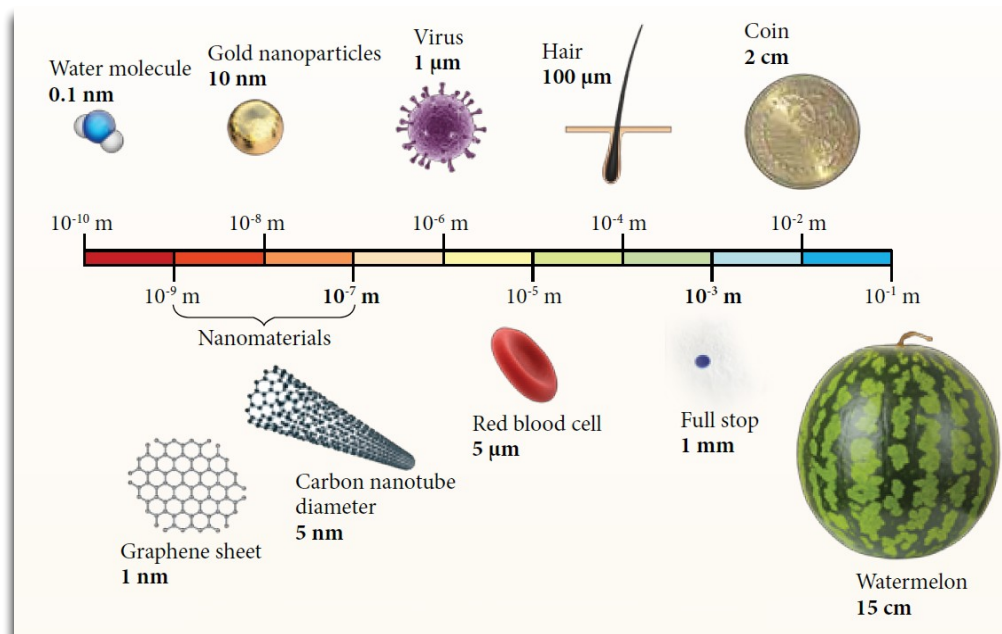
Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω στους συμφοιτητές μου, που είχα την τύχη να γνωρίσω και να συνεργαστώ, Θώμη, Γεωργία, Δήμητρα, Καλλιρόη, Ελευθερία, Ιωάννα, Άλκη, Ιωάννη και Άννυ καθώς μοιραστήκαμε μαζί πολλές ευχάριστες στιγμές και εμπειρίες. Με τη συμπαράσταση και τη στήριξή τους συνέβαλλαν ώστε να ξεπεραστούν προβληματισμοί και ανησυχίες, δημιουργώντας ένα όμορφο περιβάλλον.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου, την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου για την αδιάκοπη υποστήριξη, ηθική συμπαράσταση και κυρίως πίστη τους προς εμένα όλα αυτά τα χρόνια. Φυσικά ευχαριστώ τους φίλους μου, που στάθηκαν δίπλα μου σε όλη αυτή τη προσπάθεια με συνεχή κατανόηση, υπομονή και αγάπη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Νανοϋλικά

Ο κλάδος της νανοτεχνολογίας και της νανοεπιστήμης ανθίζει σε μεγάλο βαθμό και ιδιαιτέρως τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει αποτελέσει αντικείμενο πολυάριθμων εργασιών και ερευνών. Στην πραγματικότητα, το πρόθεμα «nano» προέρχεται από την ελληνική ή τη λατινική λέξη που σημαίνει «νάνος» και απεικονίζει το χίλιο εκατομμυριοστό του μέτρου [1-3]. Με τους όρους νανοεπιστήμη και νανοτεχνολογία, περιγράφονται η σύγκλιση επιστημών όπως η φυσική, η χημεία και η βιολογία με στόχο τη μελέτη δομών σε ατομική, μοριακή και μακρομοριακή κλίμακα και αντίστοιχα η ανάπτυξη, η σύνθεση, η εφαρμογή και ο χαρακτηρισμός υλικών ελέγχοντας το σχήμα και το μέγεθος στη νανοκλίμακα [4,5]. Θεμελιώδη στοιχεία του πεδίου αυτού αποτελούν τα νανοϋλικά. Σύμφωνα με τον επίσημο ορισμό της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Περιβάλλοντος (European Commissioner for the Environment), ως νανοϋλικά ορίζονται 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, έχουν μία ή περισσότερες εξωτερικές διαστάσεις που να ανήκει στην νανοκλίμακα, δηλαδή μεταξύ 1 nm και 100 nm [6]. Στην **Εικόνα 1** φαίνεται η σχέση μεγέθους συγκρινόμενη με άλλα υλικά και δομές.



Εικόνα 1: Κλίμακα μεγέθων διαφόρων σωματιδίων και νανοϋλικών.

Τα νανοϋλικά έχουν διαφορετικές ιδιότητες σε σύγκριση με τα υλικά μεγαλύτερης κλίμακας λόγω της υψηλής αναλογίας επιφάνειας προς όγκο. Τόσο η χημική τους σύνθεση όσο και τα μορφολογικά τους γνωρίσματα (μέγεθος, σχήμα, ιδιότητες επιφάνειας) καθορίζουν τα χαρακτηριστικά τους. Οι ιδιότητες αυτές δεν διαφέρουν μόνο από εκείνες των αντίστοιχων υλικών μεγαλύτερης κλίμακας, αλλά και μεταξύ διαφορετικών νανομορφών της ίδιας χημικής ουσίας. Τα νανοϋλικά μπορούν να διακριθούν με βάση τη δομή, το μέγεθος και τη προέλευσή τους όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2** [7-11].

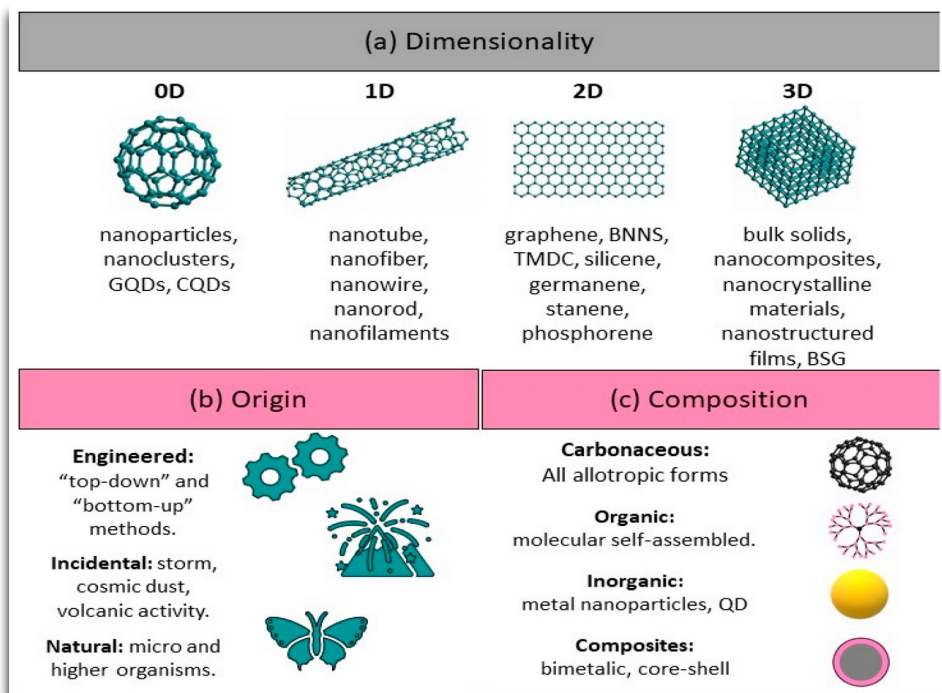
Ταξινόμηση με βάση τη σύσταση:

- Νανοϋλικά άνθρακα. Το κύριο συστατικό αυτού του τύπου είναι ο άνθρακας και τα νανουλικά αυτά παρουσιάζουν διάφορες μορφολογίες όπως κοίλων σφαιρών, ελλειψοειδών ή σωλήνων. Τα σφαιρικά και ελλειψοειδή νανοϋλικά άνθρακα αναφέρονται ως φουλερένια, ενώ τα κυλινδρικά ονομάζονται νανοςωλήνες.
- Οργανικά νανοϋλικά. Αποτελούνται κατά κύριο λόγο από οργανική ύλη όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες ή πολυμερή. Τα πιο σημαντικά παραδείγματα αυτής της κατηγορίας είναι τα δενδριμερή, τα λιποσώματα, τα μικκύλια και τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Θεωρούνται μη τοξικά και βιοδιασπώμενα, με επικρατούσα εφαρμογή στον βιοϊατρικό τομέα.
- Ανόργανα νανοϋλικά. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τύπους νανοϋλικών που δεν είναι κατασκευασμένα από άνθρακα ή οργανική ύλη με κυρίαρχα παραδείγματα τα μεταλλικά νανοϋλικά και τα νανοϋλικά ημιαγωγών. Η πρώτη κατηγορία περιέχει μέταλλα, οξειδία μετάλλων και μεταλλικά άλατα. Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα είναι τα νανოსωματίδια χρυσού, αργύρου, σιδήρου και διοξειδίου του τιτανίου. Η δεύτερη κατηγορία συνδυάζει μεταλλικές με μη μεταλλικές ιδιότητες με βασικό χαρακτηριστικό των νανοϋλικών αυτών το ευρύ ενεργειακό χάσμα μεταξύ των ζωνών. Χρησιμοποιούνται ευρέως στη φωτοκατάλυση.
- Σύνθετα νανοϋλικά. Πρόκειται για πολυφασικά υλικά, όπου η μία τουλάχιστον από τις φάσεις έχει μία, δύο ή τρεις διαστάσεις μικρότερες από 100nm. Αφορά συνδυασμό νανოსωματιδίων μεταξύ τους ή με ογκωδέστερα υλικά, με στόχο την επίτευξη επιθυμητών ιδιοτήτων.

Ταξινόμηση με βάση το μέγεθος:

- Νανοϋλικά μηδενικών διαστάσεων (0-D). Βρίσκονται και οι τρεις διαστάσεις τους στη νανοκλίμακα (1-100 nm). Έχουν σφαιρικό σχήμα με διάμετρο μεταξύ 1-50 nm. Τυπικό παράδειγμα είναι οι νανοκουκκίδες άνθρακα.

- Μονοδιάστατα νανοϋλικά (1-D). Μία από τις τρεις διαστάσεις ξεπερνάει τη νανοκλίμακα. Έχουν μήκος αρκετών μικρομέτρων, αλλά διάμετρο στη κλίμακα των νανομέτρων. Ενδεικτικά παραδείγματα είναι οι νανοϊνες, οι νανοράβδοι και οι νανοσωλήνες.
- Δισδιάστατα νανοϋλικά (2-D). Δύο από τις τρεις διαστάσεις δεν ανήκουν στη νανοκλίμακα. Έχουν εμβαδόν μερικών τετραγωνικών μέτρων, αλλά το πάχος τους δε ξεπερνά τις διαστάσεις νανοκλίμακας. Σε αυτά συγκαταλέγονται τα νανοφίλμ, οι πλάκες και οι στρώσεις.
- Τρισδιάστατα νανοϋλικά (3-D). Καμία από τις τρεις διαστάσεις δεν περιορίζεται στη νανοκλίμακα. Αφορά ογκωδέστερα υλικά των οποίων τα μεμονωμένα δομικά στοιχεία έχουν διαστάσεις έως και 100 nm, όπως για παράδειγμα συστοιχίες νανοσωλήνων ή διασπορές νανοσωματιδίων.



Εικόνα 2: Ταξινόμηση νανοϋλικών με βάση τις διαστάσεις, την προέλευση και τη σύστασή τους.

Ταξινόμηση με βάση την προέλευση:

- Τα φυσικά νανοϋλικά παράγονται από φυσικά αίτια και φαινόμενα στο περιβάλλον μέσω φυσικών (βιο)γεωχημικών διεργασιών. Τέτοια παραδείγματα είναι οι δασικές πυρκαγιές, η ηφαιστειακή τέφρα, τα θραύσματα πετρωμάτων από θαλάσσια κύματα, καθώς και υλικά όπως νύχια, δέρμα, τρίχες αλλά και φυτά, μικροφύκη και μύκητες.

- Τα τεχνητά νανοϋλικά παρασκευάζονται σκόπιμα μέσω καλά καθορισμένων μηχανικών διαδικασιών. Οι νανοσωλήνες άνθρακα, τα φουλερένια και τα νανოსωματίδια ημιαγωγών αποτελούν ενδεικτικά παραδείγματα.
- Τα τυχαία νανοϋλικά παράγονται ακούσια μέσω άμεσων ή έμμεσων ανθρώπινων επιρροών ή ανθρωπογενών διεργασιών όπως τα καυσαέρια οχημάτων, τα αέρια συγκόλλησης, οι χρωστικές ουσίες και το τσιμέντο. Τα νανοϋλικά αυτά έχουν υψηλές περιβαλλοντικές επιπτώσεις.

1.2 Νανοϋλικά άνθρακα

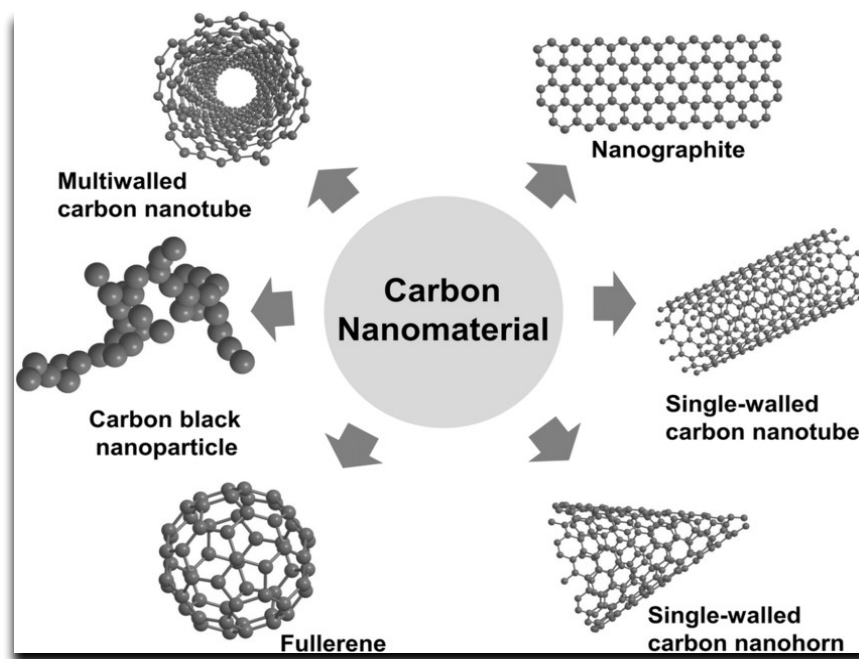
Πρόκειται για ένα από τα πιο άφθονα στοιχεία στη Γη και αποτελεί αναγκαίο συστατικό ενός μεγάλου αριθμού μακρομορίων που είναι απαραίτητα για τη ζωή, συμπεριλαμβανομένων των σακχάρων, των πρωτεϊνών και του DNA. Ο άνθρακας, καθώς και ορισμένα άλλα στοιχεία, είναι σε θέση να συνθέσουν μια σειρά από διαφορετικές μοριακές δομές από τον ίδιο τύπο ατόμων, γνωστά και ως αλλότροπα, με τα πιο διαδεδομένα να είναι τα διαμάντια και ο γραφίτης. Ο αριθμός των γνωστών αλλότροπων του έχει επεκταθεί κατά τις τελευταίες δεκαετίες του 20ού αιώνα μετά την ανακάλυψη αρκετών νέων μορφών άνθρακα χαμηλών διαστάσεων. Οι εξαιρετικές ιδιότητες του αποτυπώνονται αξιοσημείωτα στα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα.

Τα πιο σημαντικά νανοϋλικά άνθρακα συμπεριλαμβάνονται στην **Εικόνα 3** και είναι τα εξής:

- Γραφένιο: Είναι μια δισδιάστατη αλλοτροπική μορφή, που σχηματίζεται από μεμονωμένα στρώματα ατόμων άνθρακα. Εμφανίζουν υβριδισμό sp^2 που συνδέονται με δεσμούς σ- και π- σε ένα δισδιάστατο εξαγωνικό κρυσταλλικό πλέγμα. Έχει μοναδικές φυσικές ιδιότητες, όπως εξαιρετικά υψηλή μηχανική ακαμψία και υψηλή θερμική σταθερότητα. Αποτελεί βασικό δομικό στοιχείο άλλων αλλοτροπών, όπως τα φουλερένια και τους νανοσωλήνες άνθρακα.
- Φουλερένια: Είναι ένα μόριο με 60 άτομα άνθρακα και συμμετρική δομή κλειστού κλωβού. Σχηματίζεται από 20 εξάγωνα και 12 πεντάγωνα στα οποία κάθε άτομο άνθρακα συνδέεται με άλλα 3 άτομα με sp^2 υβριδισμό. Χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να αντιστέκονται σε υψηλές πιέσεις και επιστρέφουν στο αρχικό τους σχήμα ακόμα και μετά την υποβολή τους σε πιέσεις υψηλότερες των 3000 atm.
- Νανοσωλήνες: Είναι κυλινδρικά μόρια που αποτελούνται από τυλιγμένα φύλλα ατόμων άνθρακα μονής στιβάδας (γραφένιο). Ενδέχεται να είναι απλού τοιχώματος με διάμετρο μικρότερη από 1 νανόμετρο ή πολλαπλών τοιχωμάτων, που

αποτελούνται από αρκετούς ομόκεντρα διασυνδεδεμένους νανοσωλήνες, με διαμέτρους που φτάνουν πάνω από 100 nm. Το μήκος τους μπορεί να φτάσει αρκετά μικρόμετρα ή και χιλιοστά.

- **Νανοκουκκίδες:** Ορίζονται τα νανოსωματίδια μηδενικής διάστασης με βάση τον άνθρακα, των οποίων η διάμετρος δε ξεπερνά τα 10 nm. Εμφανίζουν κάποια μορφή επιφανειακής παθητικοποίησης και ο φθορισμός είναι η εγγενής τους ιδιότητα.



Εικόνα 3: Κατηγορίες νανουλικών με βάση τον άνθρακα.

Εντός του σχετικά σύντομου χρόνου από τη ανακάλυψη του φουλερενίου το 1985, των νανοσωλήνων άνθρακα το 1991 και του γραφενίου το 2004, οι αξιοσημείωτες ιδιότητες των νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα έχουν προσεγγίσει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον και μια συνεχώς αυξανόμενη χρήση σε πολλαπλά πεδία. [12-15].

1.3 Νανοκουκκίδες άνθρακα

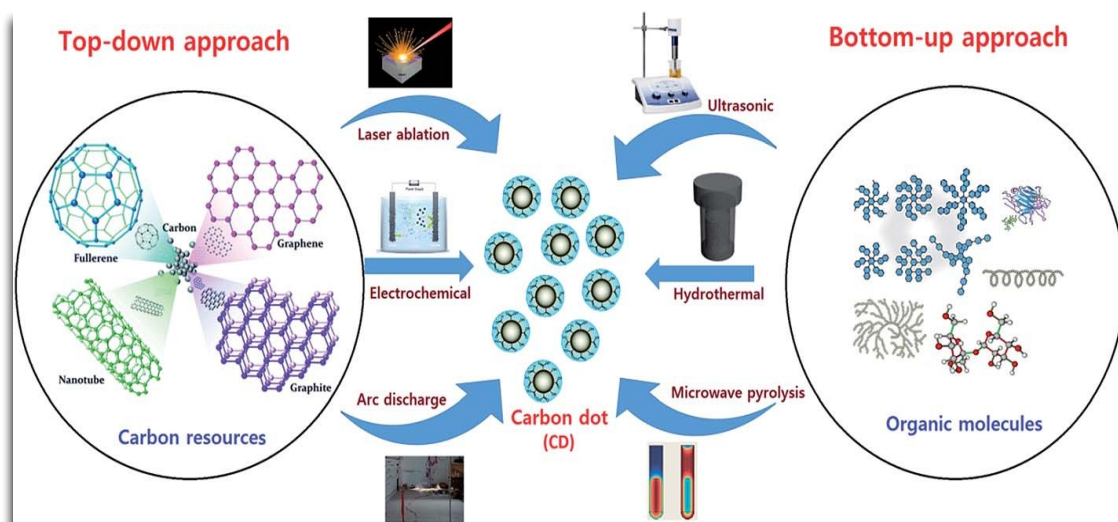
Οι πολυσυζητημένες νανοκουκκίδες άνθρακα (Carbon Nano Dots-CNDs) θεωρούνται σήμερα πρωταγωνιστές της οικογένειας των νανοϋλικών άνθρακα. Αναφέρθηκαν πρώτη φορά το 2004, ως υποπροϊόν στο καθαρισμό νανοσωλήνων άνθρακα μονού τοιχώματος και έκτοτε έχουν προσελκύσει τη προσοχή λόγω των εξαιρετών φυσικοχημικών και ηλεκτροχημικών ιδιοτήτων τους. Αποτέλεσμα αυτής της αναγνωρισιμότητας είναι η αναγκαιότητα για τη διάκρισή των διαφόρων τύπων νανοκουκκίδων [16]. Για την περαιτέρω

κατηγοριοποίηση είναι απαραίτητη η αποσαφήνιση του σημαντικού όρου «κβαντικό». Αφορά το φαινόμενο του κβαντικού περιορισμού, που υπαγορεύει πως το μέγεθος πρέπει να είναι τόσο μικρό ώστε να μπορεί να συγκριθεί με το μήκος κύματος του ηλεκτρονίου. Ως εκ τούτου, η χρήση του όρου «κβαντικές κουκκίδες» πρέπει να διατηρηθεί σε όλους τους τύπους νανοσωματιδίων με κβαντικό περιορισμό, και περιλαμβάνει τις κβαντικές κουκκίδες ημιαγωγών (Semiconductor Quantum Dots-SQDs) αλλά και τις ανθρακογενείς κβαντικές κουκκίδες στις οποίες εμπεριέχονται οι κβαντικές κουκκίδες άνθρακα (Carbon Quantum Dots-CQDs) και οι κβαντικές κουκκίδες γραφενίου (Graphene Quantum Dots-GQDs). Η ουσιαστικότερη διαφορά μεταξύ των δύο τελευταίων, εντοπίζεται στις πρόδρομες ενώσεις που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεσή τους. Τη πρώτη περίπτωση, απαρτίζουν νανοϋλικά άνθρακα με κρυσταλλική μορφή, ενώ τη δεύτερη κυρίως υλικά με βάση το γραφένιο. Δεν παρουσιάζουν κβαντικό περιορισμό οι νανοκουκκίδες άνθρακα (Carbon Nano Dots-CNDs) που είναι σφαιρικές κουκκίδες με άμορφη δομή και οι πολυμερικές κουκκίδες άνθρακα (Carbon Polymer Dots-CPDs) δηλαδή υβριδικές νανοδομές, που αποτελούνται από συσσωματωμένους/ διασταυρούμενους πυρήνες άνθρακα συνδεδεμένους με αλυσίδες οργανικού πολυμερούς [17-20].

1.3.1 Σύνθεση νανοκουκκίδων άνθρακα

Τόσο οι ιδιότητες όσο και οι πιθανές εφαρμογές των νανοκουκκίδων άνθρακα εξαρτώνται σε μέγιστο βαθμό από την συνθετική διαδικασία. Οι συνθετικοί μέθοδοι διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες τις «top-down» και «bottom-up» όπως απεικονίζεται στην **Εικόνα 4** [21-24].

- Top-down. Βασίζεται στον κατακερματισμό και την κονιοποίηση μεγαλύτερων δομών άνθρακα όπως ο γραφίτης και τα νανοδιαμάντια, σε μικρότερες μονάδες, που στην συνέχεια μετατρέπονται στην τελική και επιθυμητή τους δομή (νανοκουκκίδες). Παραδείγματα αποτελούν η χρήση laser, η εκκένωση τόξου άνθρακα, και οι υπερηχητικές τεχνικές.
- Bottom-up. Περιλαμβάνει τη σύνθεση νανοκουκκίδων άνθρακα από μικρές πρόδρομες ενώσεις όπως τα κιτρικά άλατα και οι υδατάνθρακες. Επί του παρόντος οι τεχνικές αυτές ακμάζουν λόγω των πλεονεκτημάτων τους, όπως η εύκολη και βολική μεθοδολογία, η εμπλοκή μη τοξικών πρόδρομων μορίων, η οικονομική αποδοτικότητα, ο εύκολος εξοπλισμός και ο ακριβής έλεγχός τους. Οι υδροθερμικές τεχνικές καθώς και η πυρόλυση και η χρήση μικροκυμάτων είναι κάποια χαρακτηριστικά παραδείγματα.



Εικόνα 4: Κατηγορίες σύνθεσης νανοϋλικών.

1.3.2 Τροποποιήσεις νανοκουκκίδων άνθρακα

Η τροποποίηση είναι μια διαδικασία που ενσωματώνεται στον συνολικό μηχανισμό σχηματισμού νανοκουκκίδων άνθρακα. Προκειμένου να καταστεί ανταγωνιστική η χρήση τους, απαιτείται η επίτευξη υψηλής κβαντικής απόδοσης και ο έλεγχος των ιδιοτήτων τους. Οι διεργασίες επεξεργασίας που υπερισχύουν είναι η παθητικοποίηση, η λειτουργικοποίηση και το doping [25-28].

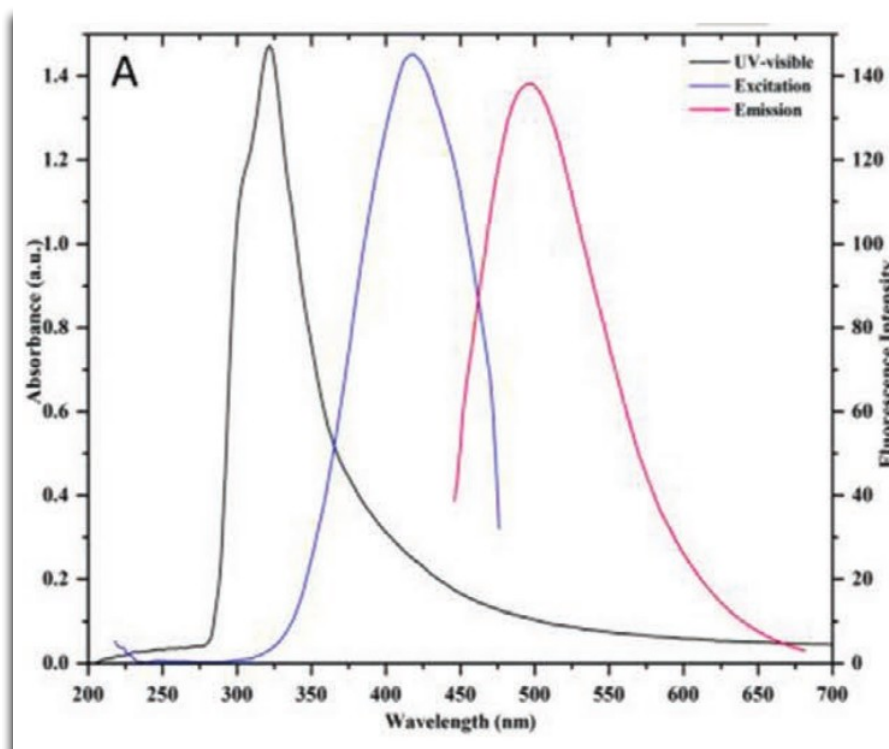
- **Παθητικοποίηση.** Οι επιφάνειες των CNDs έχουν υψηλή ευαισθησία στις μολυσματικές ουσίες καθώς ακόμη και ελάχιστα επίπεδα ρύπων μπορούν να επηρεάσουν τις ιδιότητές τους. Για να μετριαστεί η επιβλαβής επίδραση της επιφανειακής μόλυνσης, διεξάγεται επιφανειακή παθητικοποίηση των CNDs. Η επεξεργασία της επιφάνειας με οξύ, την καθιστά ικανή να συνδεθεί με λειτουργικούς συνδέτες όπως η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), το DNA, οι πρωτεΐνες και άλλα οργανικά μόρια, με στόχο το σχηματισμό ενός λεπτού μονωτικού στρώματος.
- **Λειτουργικοποίηση.** Ο όρος αυτός αναφέρεται στη χημική τροποποίηση της επιφάνειας από διαδικασίες προσθήκης, αφαίρεσης ή μετατροπής χημικών ομάδων. Λειτουργικές ομάδες όπως οι αμίνες και τα καρβοξύλια, εισάγουν ελαττώματα (defects) στην επιφάνεια, που λειτουργούν ως παγίδες ενέργειας διέγερσης και οδηγούν σε πιθανές διακυμάνσεις στις εκπομπές φθορισμού. Η οξείδωση με ισχυρά οξέα είναι ο πιο απλός και αποτελεσματικός τρόπος εισαγωγής καρβονυλικών και καρβοξυλικών ομάδων, προσδίδοντας τους μεγαλύτερη διαλυτότητα στο νερό.

- Doping (εμφύτευση προσμίξεων). Ο άνθρακας, το υδρογόνο και το οξυγόνο είναι τα κύρια συστατικά στοιχεία των νανοκουκκίδων με την περιεκτικότητά τους να ποικίλλει ανάλογα με τις συνθήκες σύνθεσης και τις πρόδρομες ενώσεις. Οι εγγενείς ιδιότητες τους μπορούν να διαφοροποιηθούν μέσω doping με ετεροάτομα όπως το άζωτο (N), ο φώσφορος (P), το θείο (S), το βόριο (B), μεμονωμένα ή σε διάφορους συνδυασμούς κατά τη διάρκεια της σύνθεσης. Η εισαγωγή των ετεροατόμων προσθέτει περαιτέρω νέες ηλεκτρονικές, χημικές και οπτικές λειτουργίες, διευρύνοντας έτσι την εφαρμογή τους. Ανάλογα με τον τύπο του στοιχείου, το doping κατηγοριοποιείται σε μη μεταλλικό και μεταλλικό με τα επικρατέστερα να είναι το άζωτο, ο φωσφόρος, το βόριο και το θείο. Το doping αζώτου είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος doping, λόγω των πέντε ηλεκτρονίων σθένους του και του συγκρίσιμου ατομικού μεγέθους με αυτό του άνθρακα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η εκπομπή φθορισμού μπορεί να αυξηθεί μόνο όταν το άζωτο συνδέεται με τον άνθρακα. Μέχρι στιγμής, έχουν αναφερθεί πολλές μέθοδοι παρασκευής με πρόσμειξη αζώτου. Σε αντίθεση, το άτομο του φωσφόρου είναι μεγαλύτερο από αυτό του άνθρακα. Έτσι, μπορεί να σχηματίσει ελαττώματα (defects) υποκατάστασης στο σύμπλεγμα άνθρακα και να συμπεριφέρεται ως δότης τύπου n, τροποποιώντας τις ηλεκτρονικές και οπτικές ιδιότητες. Διάφορες πρόδρομες ενώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν όπως ο τριβρωμιούχος φωσφόρος, η τριφαινυλοφωσφίνη, το φωσφορικό μονονάτριο, και το φωσφορικό οξύ. Πρόσφατα, ιδιαίτερη προσοχή έχουν λάβει οι προσμίξεις βορίου. Έχοντας μόνο τρία ηλεκτρόνια σθένους, δηλαδή ένα λιγότερο από τον άνθρακα, η εισαγωγή ενός ατόμου βορίου σε ένα σύμπλεγμα άνθρακα, δημιουργεί φορείς τύπου p στις κουκκίδες, αλλάζοντας και εδώ τις ηλεκτρονικές δομές και τις οπτικές τους ιδιότητες. Τέλος, τα άτομα θείου μπορούν να παρέχουν ενέργεια για τη σύλληψη ηλεκτρονίων που διεγείρονται από την ενέργεια, αλλάζοντας την ηλεκτρονιακή δομή των νανοκουκκίδων. Πηγές θείου έχουν βρεθεί να είναι το θειικό οξύ, το θειικό νάτριο και η δωδεκανόλη.

1.3.3 Ιδιότητες νανοκουκκίδων άνθρακα

Όπως τακτικά αναφέρεται, τα νανοϋλικά άνθρακα και συγκεκριμένα οι νανοκουκκίδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μια μεγάλη πληθώρα εφαρμογών λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους που δεν υπάρχουν στα αντίστοιχα, μεγαλύτερης διάστασης, υλικά. Ενδεικτικά αναφέρονται οι πιο σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοκουκκίδων άνθρακα [29-31,18].

- **Οπτικές.** Μία από τις πιο ελκυστικές ιδιότητες των CNDs, είναι ο έντονος φθορισμός τους. Ως επί το πλείστον, εκπέμπουν κυανό ή πράσινο φως κατά την υπεριώδη ακτινοβολία. Πιο ειδικά, παρουσιάζουν ισχυρή απορρόφηση στην περιοχή του υπεριώδους φάσματος (200–400 nm), με μια “ουρά” που εκτείνεται στο ορατό εύρος. Η απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας μικρότερου μήκους κύματος, η οποία είναι περίπου μεταξύ 200 και 350 nm, αποδίδεται στις ηλεκτρονικές μεταβάσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ των δεσμών C=C και C=N, ενώ η απορρόφηση μεγαλύτερου μήκους κύματος, η οποία συνήθως εμφανίζεται με τη μορφή ασθενέστερης κορυφής μεταξύ 300 και 400 nm, αποδίδεται σε $n \rightarrow \pi^*$ μεταβάσεις του δεσμού C=O. Ένα τυπικό φάσμα απορρόφησης των CNDs φαίνεται στην **Εικόνα 5**. Γενικότερα, η εκπομπή φθορισμού των νανοκουκκίδων μπορεί να μετατοπιστεί στη περιοχή του ορατού φάσματος μεταβάλλοντας τις λειτουργικές ομάδες στην επιφάνειά τους, τη σύνθεση και το περιβάλλον τους. Ο μηχανισμός εκπομπής φωταύγειας, ο οποίος έχει συζητηθεί εκτενώς στη διεθνή βιβλιογραφία, εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενος με αρκετούς διαφορετικούς μηχανισμούς να έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την προέλευση. Στις περισσότερες αναφορές, υποδεικνύεται ο καθοριστικός ρόλος των λειτουργικών επιφανειακών ομάδων και ειδικότερα αυτών που περιέχουν άζωτο και οξυγόνο. Εν αντιθέσει, σε άλλες εκδοχές, η εκπομπή αποδίδεται στις ηλεκτρονικές μεταπτώσεις μεταξύ των ζωνών κρυσταλλικού άνθρακα ή στις επιδράσεις μεγέθους σωματιδίων. Τα τελευταία χρόνια έχουν προκύψει CNDs με εξαιρετικά υψηλή κβαντική απόδοση, η οποία έχει αποδοθεί είτε στην κρυσταλλικότητα και το μέγεθος των νανოსωματιδίων, είτε στην παρουσία φθοριζόντων μορίων στην επιφάνεια. Εν ολίγοις, υπάρχουν πολλές ερμηνείες της εκπομπής φωταύγειας από τις CNDs, αλλά ο ακριβής μηχανισμός του φθορισμού δεν είναι ακόμα σαφής.



Εικόνα 5: Φάσμα μοριακής απορρόφησης, διέγερσης, εκπομπής νανοκουκκίδων άνθρακα.

- Βιολογικές. Παρά την εντυπωσιακή πρόοδο που έχει σημειωθεί στην σύνθεση νανοκουκκίδων άνθρακα για βιολογικές εφαρμογές, η βιοσυμβατότητα τους εξακολουθεί να είναι ένα κρίσιμο ζήτημα για περαιτέρω χρήση σε ζωντανά κύτταρα, ιστούς και ζώα. Οι τροποποιήσεις της επιφάνειάς τους μπορούν να καθορίσουν την οδό της κυτταρικής πρόσληψης, την ενδοκυτταρική διακίνηση και την κυτταροτοξικότητα. Πολλές μελέτες κυτταροτοξικότητας έχουν δείξει ότι οι CNDs (με ή χωρίς τροποποιήσεις) παρουσιάζουν πολύ χαμηλή τοξικότητα και μπορούν εύκολα να εσωτερικευθούν από τα κύτταρα για απεικόνισή τους. Οι επιδράσεις των νανοκουκκίδων στη βιωσιμότητα, τη θνησιμότητα, και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων έχουν δοκιμαστεί σε διάφορους τύπους κυτταρικών σειρών, σε διάφορες συγκεντρώσεις και με διαφορετικές επιφανειακές ομάδες. Μεταξύ των βασικών χαρακτηριστικών που επιτρέπουν στις CNDs μια ποικιλία βιοϊατρικών εφαρμογών, οι αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (για την προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες) είναι ιδιαίτερα αξιοσημείωτες. Παρόλο που τα νανοϋλικά μπορούν να είναι πηγές παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), ορισμένες φορές έχουν δείξει αντιοξειδωτική δράση στα βιολογικά συστήματα. Πρόσφατες μελέτες έχουν χαρακτηρίσει την ικανότητα τους να δεσμεύουν/εξουδετερώνουν μια ποικιλία ελευθέρων ριζών και ROS,

συμπεριλαμβανομένων των ανιόντων υπεροξειδίου και υδροξυλίου. Το συζυγιακό π-σύστημα, τους επιτρέπει να συμπεριφέρονται ως δότες ηλεκτρονίων, παρέχοντάς τους τη δυνατότητα για δέσμευση/εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών και συνεπώς επιδεικνύουν αντιοξειδωτική δράση. Οι αντιοξειδωτικές αυτές ιδιότητες τους, εξαρτώνται από τη συμπεριφορά τους ως δότες ή δέκτες ηλεκτρονίων. Πάραυτα, χρειάζονται αρκετές ακόμα μελέτες στο αντικείμενο, για να καταστεί γνωστός ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους, ο οποίος θα προάγει τη χρήση τους στη βιοϊατρική.

1.3.4 Εφαρμογές νανοκουκκίδων άνθρακα

Οι φθορίζουσες CNDs έχουν εμφανιστεί ως νανοδομές που μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν χημικά και με τον τρόπο αυτό να αξιοποιηθούν σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Οι αξιοσημείωτες ιδιότητές τους, όπως ο φθορισμός, οι οπτικές και βιολογικές ιδιότητές τους, καθώς και η δυνατότητα χημικής τροποποίησής τους, τις καθιστούν επωφελή υλικά σε διάφορους τομείς, όπως στην οπτοηλεκτρονική, την ιατρική, την ενέργεια και την περιβαλλοντική τεχνολογία. Επιπλέον, η συνεισφορά τους στον τομέα της επιστήμης των τροφίμων είναι σημαντική, όσον αφορά την ασφάλεια και την τοξικότητα των τροφίμων καθώς χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση θρεπτικών ουσιών, απαγορευμένων ή περιορισμένων προσθέτων, παθογόνων μικροοργανισμών και τοξινών και βαρεών μετάλλων. Συνεπώς, οι φθορίζουσες CNDs αναδεικνύονται ως ένα υποσχόμενο υλικό για πολλές εφαρμογές στην επιστήμη και τη βιομηχανία [32,33,23,18,16].

Με βάση τις προαναφερθείσες οπτικές ιδιότητες, οι χρήσεις των CNDs στις οπτικές εφαρμογές λαμβάνουν αυξανόμενη προσοχή. Ανάμεσα τους, συμπεριλαμβάνονται οι αισθητήρες και η κρυπτογράφηση πληροφοριών, που αποτελεί πλέον επίκαιρο ζήτημα.

- **Αισθητήρες:** Οι CNDs έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανίχνευση διαφόρων αναλυτών στο περιβάλλον και στα βιολογικά συστήματα λόγω των εγγενών ιδιοτήτων φθορισμού, της υψηλής ευαισθησίας και της γρήγορης απόκρισης. Το μικρό μέγεθος, η μεγάλη ειδική επιφάνεια και οι ποικίλες λειτουργικές επιφανειακές ομάδες, τις καθιστούν πολύ δραστικές και ευαίσθητες σε διάφορους παράγοντες, όπως είναι η θερμοκρασία, η ιοντική ισχύς και ο διαλύτης. Αποτέλεσμα αυτών, είναι οι αλλαγές στις ιδιότητές τους, ιδιαίτερα στις οπτικές, όπως για παράδειγμα η απόσβεση ή ενίσχυση του φθορισμού. Χρησιμοποιούνται συνήθως για την ανίχνευση κατιόντων και ανιόντων όπως Pt^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , ONOO^- και

ClO^- , τα οποία μπορούν να δεσμεύσουν τις επιφανειακές ομάδες, μέσω συντονισμού/ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης ή αντίδρασης ελεύθερων ριζών.

- Κρυπτογράφηση πληροφοριών. Η ασφάλεια των πληροφοριών έχει γίνει ένα σημαντικό ζήτημα στη σύγχρονη ζωή. Με την ταχεία ανάπτυξη της επιστήμης και της τεχνολογίας, η απαίτηση αυτή γίνεται όλο και περισσότερο επείγουσα. Ως ένα είδος υλικού κρυπτογράφησης πληροφοριών, τα φθορίζοντα μελάνια, έχουν λάβει ευρεία προσοχή. Οι συμβατικές κρυπτογραφήσεις εξακολουθούν να εμφανίζουν μειονεκτήματα, όπως χαμηλή ασφάλεια και περίπλοκη - χρονοβόρα διαδικασία λειτουργίας. Αντιθέτως, η διαδικασία κρυπτογράφησης μέσω CNDs, είναι εύκολη στη λειτουργία και η διαδικασία αποκρυπτογράφησης μπορεί να ολοκληρωθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα (<8 s) με τη σωστή μέθοδο.

Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι μία από τις πιο υποσχόμενες και συχνά αναφερόμενες εφαρμογές των CNDs είναι στη βιοϊατρική. Όπως επισημάνθηκε προηγουμένως, μελέτες κυτταροτοξικότητας *in vitro* σε μια σειρά κυτταρικών σειρών, αποδεικνύουν τη χαμηλή τοξικότητα και την εξαιρετική βιοσυμβατότητα των CNDs, ακόμα και σε υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης. Πειράματα *in vivo* έχουν δείξει επίσης, ότι οι CNDs δεν προκαλούν ιδιαίτερα συμπτώματα σε ζωτικά όργανα αρουραίων, ούτε και στα συστατικά του αίματος και απεκκρίνονται ταχέως μέσω του νεφρού. Επιβεβαιώνεται έτσι, ότι είναι ασφαλή για βιοϊατρικές εφαρμογές. Τα χαρακτηριστικά που κατέχουν, καθιστούν τις CNDs πολλά υποσχόμενα εναλλακτικά υλικά φθορισμού στη διάγνωση ασθενειών, τη θεραπεία και τα συμπληρώματα υγειονομικής περίθαλψης.

- Βιοαπεικόνιση. Είναι μια τεχνική που μπορεί να απεικονίσει άμεσα βιολογικούς οργανισμούς σε πραγματικό χρόνο, με μη επεμβατικούς τρόπους μέσω ανιχνευτών. Η απεικόνιση φθορισμού, έχει γίνει μια ισχυρή προσέγγιση για την κλινική διάγνωση ασθενειών καθώς, μεταξύ άλλων, προσφέρει μακροχρόνια απεικόνιση. Σε σύγκριση με τις φθορίζουσες οργανικές ενώσεις και τις γενετικά τροποποιημένες φθορίζουσες πρωτεΐνες, οι CNDs υπερέχουν με σημαντικά πλεονεκτήματα όπως την υψηλή κβαντική απόδοση φωταύγειας και τη φωτοσταθερότητα, προσδίδοντας ένα τεράστιο δυναμικό στις βιο-εφαρμογές που βασίζονται στις CNDs.
- Φωτοθεραπεία. Η φωτοθεραπεία, συμπεριλαμβανομένης της φωτοδυναμικής θεραπείας και της φωτοθερμικής θεραπείας, είναι μια μορφή μη επεμβατικής θεραπευτικής αγωγής που μετατρέπει το ακτινοβολούμενο φως σε ROS (π.χ. $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$ και O_2^2-) και σε θερμότητα με τη βοήθεια φωτοευαισθητοποιητών, προκαλώντας την τοπική απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Οι CNDs, έχουν κερδίσει μεγάλη

προσοχή ως ελπιδοφόροι φωτοθεραπευτικοί παράγοντες λόγω της υψηλής υδατοδιαλυτότητας και της υψηλής φωτοσταθερότητάς τους.

- Παράδοση φαρμάκων (drug delivery). Εκτός από τις αντικαρκινικές φωτοθεραπείες, η εξαιρετική βιοσυμβατότητα των CNDs ικανοποιεί επιθυμητά την προϋπόθεση των *in vivo* εφαρμογών. Συνδυάζοντας εργαλεία απεικόνισης με φάρμακα ή γονίδια, πετυχαίνεται ο σχηματισμός καθοδηγούμενων νανοϋβριδίων για τη βελτίωση της αποδοτικότητας χορήγησης. Η χορήγηση φαρμάκου και η ασφαλής και αποτελεσματική θεραπεία, αφορά τη μεταφορά του φαρμάκου σε μια συγκεκριμένη θέση στο σώμα και την ελεγχόμενη απελευθέρωσή του σε ελεγχόμενο χρόνο. Έτσι, επιτυγχάνεται η αύξηση των τοπικών θεραπευτικών επιδράσεων και η ελαχιστοποίηση των παρενεργειών των μη μολυσματικών και/ή μη καρκινικών ιστών. Η φωτεινή εκπομπή κουκκίδων άνθρακα παρέχει την ευκαιρία παρακολούθησης της διανομής και της ανταπόκρισης του φαρμάκου, σε πραγματικό χρόνο.

Η επιταχυνόμενη βιομηχανική ανάπτυξη και η οικονομική ανάπτυξη προκάλεσαν ταχεία κατανάλωση ορυκτών καυσίμων, έλλειψη ενέργειας, υποβάθμιση του περιβάλλοντος και κλιματική αλλαγή. Επομένως η εξερεύνηση ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, φιλικών προς το περιβάλλον, σταθερών και αποδοτικών τεχνολογιών μετατροπής και αποθήκευσης ενέργειας είναι απαραίτητη και επείγουσα για την παγκόσμια κοινωνική ανάπτυξη. Ως νέο υλικό άνθρακα, οι νανοκουκκίδες υπόσχονται ευρείες εφαρμογές στον τομέα της ενέργειας, όπως φωτο- /ηλεκτροκαταλύτες, LED, υπερπυκνωτές, επαναφορτιζόμενες μπαταρίες, και κυψέλες καυσίμου.

- Κατάλυση. Οι CNDs έχουν προταθεί ως φωτοκαταλύτες, ηλεκτροκαταλύτες και φωτοηλεκτροκαταλύτες με βάση τις διαφορετικές δομές και ιδιότητες τους. Πολλές τεχνικές επεξεργασίας νερού, όπως η προσρόφηση, ο διαχωρισμός μεμβράνης, η ανταλλαγή ιόντων και η βιολογική (ενζυμική) αποδόμηση έχουν αναπτυχθεί για την εξάλειψη των ρύπων όπως οι βαφές, τα αντιβιοτικά και τα φυτοφάρμακα. Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει την ιδέα της αντικατάστασης των συμβατικών καταλυτών με CNDs, δημιουργώντας υβρίδια με συμβατικούς ημιαγωγούς οξειδίου μετάλλου ή ακόμα χρησιμοποιώντας τα εμποτισμένα με άζωτο, βόριο ή θείο για την αποδόμηση. Επιπρόσθετα, έρευνες φανερώνουν τη δυνατότητα των CNDs στη μείωση του CO₂, στη παραγωγή H₂, ακόμη και στη Ηλιακή Διεπιφανειακή Εξάτμιση Νερού (Solar Interfacial Water Evaporation- SIWE).
- Επαναφορτιζόμενες μπαταρίες. Θεωρούνται ως μία από τις πιο αποτελεσματικές τεχνολογίες αποθήκευσης ενέργειας για τη γεφύρωση της παραγωγής και της

κατανάλωσης ανανεώσιμης ενέργειας. Στις μπαταρίες ιόντων Li, Na ή K, οι CNDs μπορούν να δημιουργήσουν μια εξαιρετική διεπαφή για παρεμβολές μεταξύ ηλεκτροδίων και ηλεκτρολυτών, παρέχοντας πιο ενεργές θέσεις για την εισαγωγή και εξαγωγή ιόντων, ενισχύοντας τη σταθερότητα, βοηθώντας τη μεταφορά και τη διάχυση ηλεκτρονίων/ιόντων και βελτιώνοντας τις ηλεκτροχημικές ιδιότητες.

Στο σημείο αυτό, αξίζει να σημειωθεί και η συνεισφορά των διαφόρων νανοϋλικών άνθρακα στην έρευνα του εξαιρετικά παθογόνου οξέος αναπνευστικού συνδρόμου SARS-CoV-2, που προκαλεί την τρέχουσα πανδημική νόσο COVID-19. Τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα, όπως το φουλερένιο, οι κουκκίδες άνθρακα, το γραφένιο, και τα παράγωγά τους, έχουν αποτελέσει μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση, λόγω της αντιμικροβιακής τους δράσης, της βιοσυμβατότητας, της βιοδιασπασιμότητας και της ικανότητας πρόκλησης αναγέννησης ιστών. Σύμφωνα με μελέτες, τα νανοϋλικά αυτά, και ιδιαίτερα οι κουκκίδες άνθρακα, μπορούν να θεωρηθούν ιατρικά αντίμετρα, εμφανίζοντας αντική δράση έναντι 13 ιών μονόκλωνου RNA, συμπεριλαμβανομένου του SARS-CoV-2. Νανοϋλικά άνθρακα με χαμηλή ή/και μηδαμινή τοξικότητα για τον άνθρωπο, είναι πολλά υποσχόμενα εργαλεία, που μπορούν να σχεδιαστούν με στόχο την αποτελεσματική ανίχνευση και θεραπεία του COVID-19 αλλά και άλλων ιών, ακόμη και σε αυτούς με ιδιαίτερη ανθεκτικότητα στα φάρμακα [34-36].

1.2 Επιπτώσεις νανοτεχνολογίας στο περιβάλλον και στον άνθρωπο

Η νανοτεχνολογία είναι ένα από τα πιο ενδιαφέροντα και ταχύτερα αναπτυσσόμενα ερευνητικά πεδία στην περιβαλλοντική έρευνα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καθημερινή ζωή λόγω των τεράστιων δυνατοτήτων της. Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα νανοϋλικά, και ιδιαίτερα αυτά με βάση τον άνθρακα χρησιμοποιούνται εκτενώς σε διάφορες εφαρμογές. Εκτός όμως από τις εξαιρετικά ωφέλιμες εφαρμογές τους, υπάρχει ανησυχία για πιθανές ανεπιθύμητες ή απροσδόκητες αλληλεπιδράσεις με τα βιολογικά συστήματα και τις σχετικές επιπτώσεις στο περιβάλλον αλλά και στην ανθρώπινη υγεία. Παρόλο που σχεδόν οτιδήποτε μπορεί να γίνει τοξικό σε αρκετά υψηλή δόση, το πιο σωστό ερώτημα είναι: πόσο τοξικά είναι τα νανοϋλικά στις πιθανές συγκεντρώσεις στις οποίες θα μπορούσαν να συναντηθούν; Ωστόσο, για τη πρόβλεψη της τοξικότητας των νανοσωματιδίων είναι αναγκαία η απόκτηση γνώσης σχετικά με τους παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στη προώθηση της. Ο τρόπος με τον οποίο αυτά τα σωματίδια αλληλεπιδρούν με το ανθρώπινο σώμα και το περιβάλλον καθορίζει και τις επιπτώσεις τους [37].

Εν συντομία τα χαρακτηριστικά που καθιστούν τα νανοσωματίδια τοξικά είναι τα εξής:

- **Μέγεθος.** Καθώς το μέγεθος τους γίνεται μικρό, η αναλογία επιφάνειας προς όγκο αυξάνεται εκθετικά, γεγονός που τα καθιστά πιο δραστικά και τοξικά. Επιπρόσθετα, με τη μείωση του μεγέθους αυξάνεται η ικανότητά τους να διεισδύουν στους φυτικούς και ζωικούς ιστούς. Η διείσδυση των σωματιδίων μέσω διαφορετικών φραγμών των κυττάρων έχει μεγάλη εξάρτηση από το μέγεθος. Σημειώνεται ότι τα σωματίδια με μέγεθος μικρότερο από 35 nm μπορούν να διεισδύσουν στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, αυτά με μέγεθος μικρότερο από 40 nm μπορούν να εισέλθουν σε πυρήνες κυττάρων ενώ εκείνα με μέγεθος μικρότερο από 100 nm μπορούν να εισέλθουν σε κύτταρα διασχίζοντας την κυτταρική μεμβράνη [38]. Σε γενικότερο πλαίσιο, οι περισσότερες από τις αναφορές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τις πτυχές τοξικότητας που μελετήθηκαν. Ένα κοινό χαρακτηριστικό όμως που αποκαλύπτεται από όλες ευνοεί το αξίωμα ότι τα μικρού μεγέθους νανοσωματίδια είναι πιο τοξικά σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μεγάλου μεγέθους. Ως εκ τούτου, το μέγεθος έχει σημασία για τον προσδιορισμό της τοξικότητάς τους σε ζωντανούς οργανισμούς. Η κυτταρική πρόσληψη, ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης και η μεσοκυτταρική σταθερότητα είναι συνάρτηση του μεγέθους, αλλά εξακολουθεί να μην μπορεί να αναπτυχθεί μια σαφής συσχέτιση με βάση τις διαθέσιμες μελέτες.
- **Σχήμα.** Μεταξύ άλλων, το σχήμα των νανοσωματιδίων συμβάλλει στις τοξικές τους επιδράσεις. Έρευνες έχουν δείξει ότι το σχήμα και το φορτίο, μπορούν να επιταχύνουν τη διαδικασία μετατόπισής τους μέσω κυτταρικών μεμβρανών έως και 6 τάξεων μεγέθους [39]. Όταν το μέγεθος και η επιφάνεια διατηρούνται ίδια, τότε το σχήμα τους γίνεται πιο εμφανές στην αξιολόγηση της τοξικότητας. Για παράδειγμα, τα νανοσωματίδια ψευδαργύρου ZnO σε σχήμα νανοράβδων προκαλούν μεγαλύτερη τοξικότητα στα κύτταρα του ανθρώπινου πνευμονικού επιθηλίου (A549) από ότι τα αντίστοιχα σφαιρικά [40].
- **Φύση-Χημική σύσταση.** Η φύση των νανοσωματιδίων, είναι επίσης ένας από τους βασικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην τοξικότητα με πολλές μελέτες να το επικυρώνουν. Σε μία από αυτές, διαπιστώθηκε ότι τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) είναι πιο τοξικά από τα νανοσωματίδια διοξειδίου του δημητρίου (CeO₂ NPs) σε έμβρυα zebrafish, στο ίδιο εύρος μεγέθους και συγκεντρώσεων [41].
- **Δραστικότητα.** Ένα βασικό χαρακτηριστικό των νανοσωματιδίων είναι η εξαιρετικά υψηλή δραστηριότητά τους σε σύγκριση με άλλα υλικά. Για το λόγο αυτό, ξεκινούν καταλυτικές αντιδράσεις μέσα στα κύτταρα και καταλήγουν στην παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου. Καθώς τα σωματίδια δεν υπόκεινται σε αποδόμηση στις

καταλυτικές διεργασίες, αναμενόμενη μπορεί να είναι μια αλυσίδα αντιδράσεων εντός των βιολογικών συστημάτων. Αυτή η ασυνήθιστη δραστηριότητα τα χαρακτηρίζει εξαιρετικά τοξικά. Η παρουσία φορτίου, τα κάνει ακόμη πιο δραστικά προς τα κύτταρα και τις πρωτεΐνες σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ουδέτερα.

- **Κινητικότητα.** Πρόκειται για στερεά σωματίδια που έχουν την ικανότητα να κινούνται με τρόπο όπως τα αέρια και τα υγρά. Η υψηλή αυτή κινητικότητα σε συνδυασμό με το μικρό τους μέγεθος, καθιστά εύκολη τη διάχυση τους στα φυτικά και ζωικά κύτταρα. Η διάχυση αυτή, αυξάνεται καθώς μειώνεται το μέγεθός τους. Η κινητικότητα είναι επίσης ένας παράγοντας που βοηθά στη συσσωμάτωσή τους, φέρνοντάς τα κοντά το ένα στο άλλο.
- **Σταθερότητα.** Η σταθερότητα των νανοσωματιδίων εντός ενός βιολογικού συστήματος εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τη φύση, το μέγεθος και τη συγκέντρωσή που συζητήθηκαν προηγουμένως. Το pH είναι εξίσου σημαντικό για τη σταθερότητα τους. Στις τιμές των βιολογικών συστημάτων, τα περισσότερα από τα ανόργανα και οργανικά νανοσωματίδια γίνονται διαλυτά. Η διαλυτότητά τους είναι μια βασική παράμετρος που σχετίζεται με τη σταθερότητα και την τοξικότητά τους. Ελαφρώς διαλυτά σωματίδια (όπως ZnO) μπορούν να προκαλέσουν θάνατο συγκεκριμένων κυττάρων, σε αντίθεση με αδιάλυτα νανοσωματίδια (όπως τα ζirkονία) όπου η κυτταρική δραστηριότητα και η ποσότητα DNA μειώνονται αλλά σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις [42].
- **Επιφανειακή χημεία και φορτίο.** Τα νανοσωματίδια μπορούν να λειτουργικοποιηθούν με οργανικά τμήματα προκαλώντας διαφορετικά φορτία στις επιφάνειες τους. Ομάδες όπως οι καρβοξυλομάδες ($-COOH$) δημιουργούν θετικά φορτισμένα νανοσωματίδια ενώ οι αμινομάδες ($-NH_2$) δημιουργούν αρνητικά φορτισμένα. Τα φορτία είναι αλληλένδετα με τον τρόπο δράσης στα βιολογικά συστήματα. Τα λειτουργικοποιημένα νανοσωματίδια χρυσού με κατιονικές ή ανιονικές αλυσίδες εμφανίζουν αντίστοιχα μέτρια ή καθόλου τοξικότητα [43].
- **Συσσωμάτωση.** Τέλος τα νανοσωματίδια έχουν την ικανότητα να συσσωματώνονται στα διαλύματα. Η έκταση της συσσωμάτωσης εξαρτάται από τους παραπάνω παράγοντες, καθώς και από τη θερμοκρασία του εκάστοτε διαλύματος. Τα συσσωματωμένα νανοσωματίδια συμπεριφέρονται με διαφορετικό τρόπο από τα μεμονωμένα διεσπαρμένα σωματίδια, κυρίως λόγω αλλαγών στις ιδιότητες της επιφάνειάς τους. Άρα, ο τρόπος αλληλεπίδρασής και συνεπώς η τοξικότητά τους επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό [44].

1.2.1 Κοινές οδοί και μηχανισμοί έκθεσης των νανοσωματιδίων στο ανθρώπινο σώμα

Η έκθεση των νανοσωματιδίων στο περιβάλλον και τον άνθρωπο μπορεί να περιγραφεί μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Κάτα κύριο λόγο, άμεσες εκθέσεις συμβαίνουν σε εργαζόμενους (συμπεριλαμβανομένων μηχανικών, επιστημόνων και τεχνικών) κατά τη διάρκεια της εμπορικής παραγωγής προϊόντων που βασίζονται σε νανοϋλικά. Αυτή η έκθεση προκύπτει κυρίως είτε από το χειρισμό πρώτων υλών κατά τη διεξαγωγή αντιδράσεων είτε κατά τη διάρκεια μεταφοράς τους. Σε δεύτερη φάση, εκτίθενται οι καταναλωτές κατά τη χρήση και την εφαρμογή τους, που μπορεί να οδηγήσει σε επιβλαβείς και τοξικές επιδράσεις.

Η αλληλεπίδραση με το ανθρώπινο σώμα μπορεί να συμβεί μέσω των παρακάτω οδών:

- Διείσδυση μέσω των δερματικών κόμβων. Με την ανάπτυξη του πεδίου νανοϋλικών, ιδιαίτερα των εφαρμογών στην ιατρική, ο κίνδυνος έκθεσης σε νανοσωματίδια μέσω του δέρματος και η είσοδός τους στην κυκλοφορία του αίματος αυξάνεται, με αποτέλεσμα τις αυξημένες ανησυχίες για την ασφάλεια. Η έκθεση μπορεί να συμβεί με σκόπιμα ή ακούσια μέσα. Η σκόπιμη έκθεση θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα εφαρμογών καλλυντικών προϊόντων ή υγιεινής όπως κρέμες και αντηλιακά. Η ακούσια έκθεση λαμβάνει χώρα μέσω των απευθείας παραγόμενων νανοσωματιδίων κατά την κατασκευή, την καύση και την απόρριψη χρησιμοποιημένων προϊόντων που βασίζονται σε νανοϋλικά. Ακόμη και η διείσδυση πολύ μικρής συγκέντρωσης μπορεί να επηρεάσει με διάφορους τρόπους [45].
- Πρόσληψη από το αναπνευστικό σύστημα μέσω εισπνοής. Κατά την εισπνοή, τα νανοσωματίδια μπορούν να διεισδύσουν βαθύτερα στους πνεύμονες και να αλληλεπιδράσουν με το επιθήλιο. Αυτό μπορεί να προκαλέσει φλεγμονή και χρόνιες επιδράσεις, με περαιτέρω διείσδυση στους λεμφαδένες. Η εναπόθεση σωματιδίων εξαρτάται από διάφορες παράγοντες όπως την αεροδυναμική των σωματιδίων, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, την ανατομία της αναπνευστικής οδού και την κατάσταση της υγείας του οργάνου του ξενιστή.
- Πρόσληψη από το πεπτικό σύστημα μέσω κατάποσης. Η κατάποση νανοσωματιδίων είναι μια σημαντική οδός έκθεσης στο ανθρώπινο σώμα. Η γαστρεντερική έκθεση μπορεί να συμβεί μέσω άμεσης κατάποσης συχνά με τη χρήση τροφής, νερού και φαρμάκων ή με μεταφορά σωματιδίων όπως ο βήχας. Αποτέλεσμα είναι η αλλαγή του μεταβολισμού και της απορρόφησης των τροφών και των φαρμάκων καθώς και της σύνθεσης της χλωρίδας των οργάνων. Τα νανοσωματίδια μπορεί να συμπεριφέρονται διαφορετικά όταν εισέρχονται στην ηπατική κυκλοφορία. Σε

μερικές περιπτώσεις μπορεί να είναι ηπατο-τοξικά και να προκαλέσουν απόφραξη ή σταδιακή ίνωση [46-48].

1.2.3 Περιβαλλοντικοί παράγοντες που διέπουν την τοξικότητα των νανοσωματιδίων.

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να συμβάλουν στην τοξικότητα των νανοσωματιδίων. Οι καιρικές συνθήκες όπως η υγρασία, η θερμοκρασία, ο ρυθμός ροής του ανέμου και η φύση του φωτός μπορεί να επηρεάσουν ορισμένες ιδιότητες τους που οδηγούν στην τοξικότητά τους. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες, τα νανοσωματίδια μπορούν να διασκορπιστούν με αυξημένο ρυθμό σε σύγκριση με χαμηλότερες ή κανονικές θερμοκρασίες. Είναι επίσης γνωστό ότι συμπεριφέρονται ποικιλοτρόπως κάτω από διαφορετικά είδη φωτός όπως το ορατό και το υπεριώδες. Τέλος, όταν βρεθούν στον αέρα, επιταχύνεται η γρήγορη διείσδυση στους φυτικούς και ζωικούς ιστούς.

Κατά κύριο λόγο, οι επιπτώσεις αφορούν το υδάτινο και εδαφικό περιβάλλον [49,50].

- Επιπτώσεις στο υδάτινο περιβάλλον. Το υδάτινο περιβάλλον είναι πιο επιρρεπές να μολυνθεί με τα νανοσωματίδια, κυρίως λόγω της αύξησης των καταναλωτικών προϊόντων όπως τα αντηλιακά και τα καλλυντικά. Μπορούν να εισέλθουν μέσω βιομηχανικής αποδέσμευσης, απόρριψης αποβλήτων επεξεργασίας λυμάτων και μέσω επιφανειακών απορροών από εδάφη. Ο προσδιορισμός της ακριβούς συγκέντρωσής τους στα ύδατα εξακολουθεί να αποτελεί συνεχή πρόκληση, με τα νανοσωματίδια να εισέρχονται στα υδρόβια ζώα μέσω των βραγχίων ή της κατάποσης. Σύμφωνα με τοξικολογικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι είναι τοξικά για την υδρόβια ζωή -ψάρια, δάφνια και μονοκύτταρους οργανισμούς- αν και ο βαθμός ποικίλει από είδος σε είδος [51].
- Επιπτώσεις στο εδαφικό περιβάλλον. Στη πρόσφατη βιβλιογραφία που ασχολείται με την τύχη και τις επιπτώσεις των νανοϋλικών στο έδαφος υπογραμμίζεται η εισροή μέσω διαφορετικών πηγών και μονοπατιών, όπως η χρήση λιπασμάτων και φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα, τα νανοϋλικά, σε ορισμένες συγκεντρώσεις μπορούν να μειώσουν την ανάπτυξη και την αναπαραγωγική ικανότητα των φυτών, την φωτοσυνθετική αποτελεσματικότητα των φυτικών κυττάρων και να μεταβάλλουν την περιεκτικότητα των φυτικών χρωστικών ουσιών. Η έκθεση, δυνητικά οδηγεί σε τοξικές παρενέργειες όπως ενισχυμένη παραγωγή των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου, διαταραχή της ομοιόστασης οξειδοαναγωγής, υπεροξειδωση λιπιδίων, μειωμένη μιτοχονδριακή λειτουργία και βλάβη της μεμβράνης.

Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο να διερευνηθεί περαιτέρω η ασφάλεια των νανοϋλικών, καθώς εκτός από αναρίθμητα πλεονεκτήματά και εφαρμογές, μπορούν επίσης να έχουν και καταστροφικά αποτελέσματα. Επομένως, αποδοτικά και ισχυρά τοξικολογικά μοντέλα είναι κρίσιμα για την αξιολόγηση της τοξικότητας των νανοϋλικών. Παρότι έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες σε ζώα για την εκτίμηση των δυσμενών επιπτώσεων στον άνθρωπο, πρόσφατα λαμβάνουν χώρα ελεγχόμενα για βιοηθικούς λόγους με συνέπεια, να καθιερωθούν μοντέλα ανθρώπινων κυττάρων [52].

1.3 Κυτταρικές καλλιέργειες ως βιολογικά μοντέλα

Για να κατανοήσουμε τις επιπτώσεις των χημικών ουσιών στους ζωντανούς οργανισμούς, χρειάζεται να μελετήσουμε ζωντανά μοντέλα. Παραδοσιακά, η τοξικολογική έρευνα βασίζεται σε εθελοντές ή πειραματόζωα, αλλά δεδομένων των ζητημάτων βιοηθικής που προκύπτουν, υπάρχει μια αυξανόμενη στροφή προς *in vitro* μοντέλα. Με τους όρους *in vitro* και *in vivo* εννοούνται οι δύο βασικοί τύποι πειραματικών μοντέλων, με την κύρια διαφορά μεταξύ τους να είναι ότι η πρώτη αναφέρεται στις πειραματικές διαδικασίες που εκτελούνται έξω από έναν ζωντανό οργανισμό, ενώ η δεύτερη αναφέρεται σε αυτές που εκτελούνται σε έναν ζωντανό οργανισμό. Παρόλο που και οι δύο έχουν πολλά οφέλη και εφαρμογές, η *in vitro* έρευνα προσφέρει υψηλότερη απόδοση, μειωμένο κόστος, έλεγχο του χημικού και φυσικού περιβάλλοντος, εξοικονόμηση χρόνου και αυτοματοποίηση. Οι κυτταρικές σειρές είναι δημοφιλείς στα ερευνητικά εργαστήρια επειδή είναι ευρέως διαθέσιμες και εύκολες στον χειρισμό τους, με την προϋπόθεση ότι ο χρήστης έχει πρόσβαση σε κατάλληλες εγκαταστάσεις και γνώσεις. Για δεκαετίες, ήταν η κινητήρια δύναμη μελετών για τον εντοπισμό μηχανισμών δράσης, την ανακάλυψη ή/και τη δοκιμή φαρμάκων και ενώσεων και την επίδειξη συνάφειας των ευρημάτων με την ανθρώπινη ασθένεια [53,54].

Η ανάπτυξη της κυτταρικής καλλιέργειας άλλαξε σημαντικά τον τομέα των βιοεπιστημών και συνέβαλε σε μεγάλες προόδους στην ιατρική. Η έρευνα με τη χρήση κυτταρικών σειρών είναι μια ουσιαστική διαδικασία για τη μοντελοποίηση ασθενειών, τη διερεύνηση των βλαστοκυττάρων και του καρκίνου και την καθιέρωση θεραπειών [55]. Το 1885 ο Wilhelm Roux αφαίρεσε ένα τμήμα της μυελικής πλάκας ενός εμβρυϊκού κοτόπουλου και το διατήρησε σε ζεστό αλατούχο διάλυμα για 13 ημέρες, καθιερώνοντας την αρχή της καλλιέργειας ιστών [56,57]. Ωστόσο, η ακριβής πρωτογενής κυτταρική καλλιέργεια έχει την αρχή της, στην πρώτη δεκαετία του 20ου αιώνα, όταν ο Ross Granville Harrison

καλλιέργησε με επιτυχία νευρικά κύτταρα βατράχου. Μετά από αυτά τα επιτεύγματα, παρουσιάστηκε μεγάλη βελτίωση με την εκπόνηση εργασιών, που οδήγησαν σε άλλες ανακαλύψεις, όπως η δημιουργία της πρώτης καλλιέργειας ινοβλαστών ποντικού, ακολουθούμενη από την ανάπτυξη της πρώτης κυτταρικής σειράς ανθρώπινου όγκου. Λίγα χρόνια αργότερα, παρασκευάστηκαν μέσα όπως το Minimum Essential Medium (MEM) και το Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), καθώς και μέσα συμπληρωμένα με αυξητικούς παράγοντες. Το τελευταίο κρίσιμο γεγονός για την ανάπτυξη της κυτταρικής καλλιέργειας έλαβε χώρα το 1998 όταν απομονώθηκαν ανθρώπινα εμβρυικά βλαστοκύτταρα [58]. Αυτά τα *in vitro* μοντέλα ανθρώπινης βιολογίας χρησιμοποιούνται στη βιοϊατρική έρευνα, στις τοξικολογικές μελέτες, στη βιομηχανία βιολογικών διεργασιών (*bio industry*), στην ανακάλυψη φαρμάκων, στην ανάπτυξη εμβολίων και σε μια σειρά από άλλες εφαρμογές. Για να εκπληρωθεί αυτή την τεράστια ανάγκη έχουν δημιουργηθεί ερευνητικοί οργανισμοί, όπως είναι η Αμερικανική Συλλογή Ιστών και Κυττάρων (American Tissue and Cell Collection, ATCC) η οποία προσφέρει τη μεγαλύτερη συλλογή κυττάρων στον κόσμο [59-61].

Αποτελείται τόσο από νοσούντα όσο και φυσιολογικά κύτταρα, από κάθε τύπο ιστού που βρίσκονται στο ανθρώπινο σώμα και κατηγοριοποιούνται ως εξής:

- Πρωτογενή κύτταρα. Κύτταρα που απομονώνονται απευθείας από ανθρώπινο ή ζωικό ιστό χρησιμοποιώντας ενζυμικές ή μηχανικές μεθόδους. Αφού απομονωθούν, τοποθετούνται σε τεχνητό περιβάλλον σε πλαστικά ή γυάλινα δοχεία που υποστηρίζονται με εξειδικευμένο μέσο που περιέχει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και τους αυξητικούς παράγοντες για την υποστήριξη του πολλαπλασιασμού. Τα πρωτογενή κύτταρα είναι δύο τύπων: προσκολλημένα ή αιωρούμενα. Τα προσκολλημένα κύτταρα απαιτούν προσκόλληση για ανάπτυξη και συνήθως προέρχονται από ιστούς οργάνων. Τα κύτταρα αιωρήματος δεν απαιτούν προσκόλληση και τα περισσότερα απομονώνονται από το σύστημα αίματος. Μερικά κύτταρα αιωρήματος που προέρχονται από ιστό είναι διαθέσιμα όπως τα ηπατοκύτταρα ή τα εντερικά κύτταρα. Μέσω της πρωτογενούς κυτταρικής καλλιέργειας, οι ερευνητές αποκτούν την ευκαιρία να μελετήσουν δότες και όχι μόνο κύτταρα. Κατά την κατασκευή ενός πειραματικού μοντέλου μπορούν να ληφθούν υπόψη αρκετοί παράγοντες όπως η ηλικία, το ιατρικό ιστορικό, η φυλή και το φύλο. Με μια αυξανόμενη τάση προς την εξατομικευμένη ιατρική, αυτή η μεταβλητότητα του δότη και η πολυπλοκότητα των ιστών μπορούν να επιτευχθούν μόνο με τη χρήση πρωτογενών κυττάρων και είναι δύσκολο να αντιγραφούν με κυτταρικές σειρές που είναι πολύ συστηματικές και ομοιόμορφης φύσης.

- Κυτταρικές Σειρές. Πρόκειται για κύτταρα που διαβιβάζονται συνεχώς και έχουν αποκτήσει ομοιογενή γονοτυπικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Οι κυτταρικές σειρές μπορεί να είναι πεπερασμένες ή συνεχείς. Μια πεπερασμένη κυτταρική σειρά διαιρείται μόνο περιορισμένο αριθμό φορές πριν χάσει την ικανότητά της για πολλαπλασιασμό, το οποίο είναι ένα γενετικά καθορισμένο γεγονός γνωστό ως γήρανση. Ωστόσο, ορισμένες κυτταρικές σειρές γίνονται αθάνατες μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται μετασχηματισμός, ο οποίος μπορεί να συμβεί είτε μέσω γενετικών μεταλλάξεων είτε μέσω τεχνητών τροποποιήσεων. Όταν μια πεπερασμένη κυτταρική γραμμή υφίσταται μετασχηματισμό και αποκτά την ικανότητα να διαιρείται επ' αόριστον, γίνεται αθανатоποιημένη η συνεχής. Οι κυτταρικές σειρές χρησιμοποιούνται κατά προτίμηση για ευκολία, καθώς προσφέρουν πιο εύκολο χειρισμό [49,63,64].

Οι αθανатоποιημένες κυτταρικές σειρές χρησιμοποιούνται συχνά στην έρευνα, στη θέση των πρωτογενών κυττάρων. Προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα, αφού είναι οικονομικά, αποδοτικά και εύχρηστα κύτταρα, παρέχοντας απεριόριστη παροχή υλικού και παρακάμπτοντας τις ηθικές ανησυχίες που σχετίζονται με τη χρήση ζωικού και ανθρώπινου ιστού. Παρέχουν επίσης έναν πληθυσμό κυττάρων, ο οποίος είναι πολύτιμος καθώς παρέχει σταθερό δείγμα και συνεπή αποτελέσματα. Έχουν φέρει επανάσταση στην επιστημονική έρευνα και χρησιμοποιούνται στην παραγωγή εμβολίων, στον έλεγχο του μεταβολισμού και της κυτταροτοξικότητας των φαρμάκων, στην παραγωγή αντισωμάτων, στη μελέτη της γονιδιακής λειτουργίας, στη δημιουργία τεχνητών ιστών (τεχνητό δέρμα) και στη σύνθεση βιολογικών ενώσεων (θεραπευτικών πρωτεϊνών). Οι κυτταρικές αυτές σειρές θα πρέπει να εμφανίζουν και να διατηρούν λειτουργικά χαρακτηριστικά όσο το δυνατόν πιο κοντά στα πρωταρχικά κύτταρα, πράγμα ιδιαίτερα δύσκολο να επιτευχθεί. Δεδομένου ότι υποβάλλονται σε γενετική επεξεργασία, είναι πιθανό να αλλάξει ο φαινότυπος, οι εγγενείς λειτουργίες και η ανταπόκρισή τους στα ερεθίσματα. Ένα δεύτερο σημαντικό πρόβλημα που σχετίζεται με τις κυτταρικές σειρές είναι η μόλυνση από άλλες κυτταρικές σειρές και από μυκόπλασμα. Όταν συμβαίνει μόλυνση, εισάγεται ταχέως μια πολλαπλασιαζόμενη κυτταρική σειρά και χρειάζονται μόνο μερικές διελεύσεις έως ότου η καλλιέργεια καταληφθεί πλήρως από τη μολυσματική κυτταρική σειρά. Επιπλέον, η μόλυνση από μυκόπλασμα μπορεί να παραμείνει απαρατήρητη σε κυτταρικές καλλιέργειες για μεγάλο χρονικό διάστημα και να προκαλέσει εκτεταμένες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση και τη συμπεριφορά των κυττάρων. Με βάση τις υποβολές στις τράπεζες κυττάρων, το 15-35% των κυτταρικών σειρών έχει εκτιμηθεί ότι ήταν μολυσμένες με μυκόπλασμα. Ως εκ τούτου, θα πρέπει να δίνεται μεγάλη προσοχή κατά τη χρήση τους [65,66].

1.3.1 Κύτταρα HaCaT

Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο όργανο του σώματος, καλύπτει ολόκληρη την εξωτερική επιφάνεια και είναι συνεχώς αυτό-ανανεώσιμο. Η λεία αυτή επιφάνεια του, υποδηλώνει απλότητα, αλλά ενσωματώνει ένα από τα πιο πολύπλοκα και μεταβολικά ενεργά όργανα. Αναλυτικότερα, πρόκειται για έναν ολοκληρωμένο ιστό, που εκτελεί τις λειτουργίες του μέσω ενός εξαιρετικά εξελιγμένου δικτύου.

Αποτελείται από τα εξής στρώματα, όπου και τα τρία ποικίλλουν σημαντικά ως προς την ανατομία και τη λειτουργία τους:

- **Επιθηλιακό στρώμα.** Η επιδερμίδα είναι το πιο εξωτερικό στρώμα του δέρματος. Αυτό το αδιάβροχο φράγμα προστατεύει τα υποκείμενα στρώματα και άλλες εσωτερικές δομές, από τραυματισμούς, βλάβες και μολύνσεις. Το πάχος της επιδερμίδας ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών σημείων του σώματος.
- **Στρώμα συνδετικού ιστού.** Το χόριο βρίσκεται ακριβώς κάτω από την επιδερμίδα και είναι το παχύτερο από τα τρία στρώματα του δέρματος. Περιέχει ένα δίκτυο εξειδικευμένων δομών, συμπεριλαμβανομένων των αιμοφόρων αγγείων, των λεμφαγγείων, των ιδρωτοποιών αδένων, των τριχοθυλακίων, των σμηγματογόνων αδένων και των νευρικών απολήξεων. Περιέχει επίσης κολλαγόνο και ελαστίνη - δομικές πρωτεΐνες- που κάνουν το δέρμα δυνατό και εύκαμπτο. Οι κύριες λειτουργίες είναι να παρέχει οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά στην επιδερμίδα.
- **Λιπώδη στρώμα.** Το υπόδερμα είναι το εσώτερο στρώμα του δέρματος. Αποτελείται κυρίως από λιποκύτταρα και λειτουργεί ως μονωτικό στρώμα που βοηθά στη ρύθμιση της εσωτερικής θερμοκρασίας του σώματος. Προστατεύει επίσης τα εσωτερικά όργανα από τραυματισμούς.

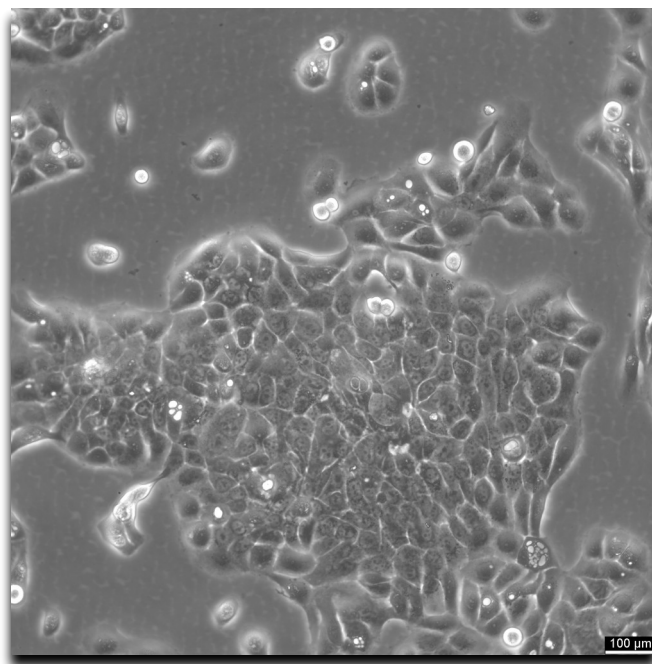
Στο σύνολο του, ως φυσικό εμπόδιο, το δέρμα αποτρέπει την απώλεια νερού και αντέχει σε μηχανικές, χημικές και μικροβιακές επιθέσεις. Ρυθμίζει επίσης τη θερμοκρασία, την παραγωγή ορμονών και βιταμινών και ανταποκρίνεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένης της υπεριώδους ακτινοβολίας. Τα κύτταρα του δέρματος είναι τα βασικά δομικά στοιχεία και κατηγοριοποιούνται σε κερατινοκύτταρα, μελανοκύτταρα, τα κύτταρα Langerhans και τα κύτταρα Merkel.

Κάθε τύπος κυττάρου δέρματος έχει έναν μοναδικό ρόλο που συμβάλλει στη συνολική δομή και λειτουργία του δέρματος. Αναλυτικότερα:

- **Μελανοκύτταρα.** Αποτελούν το 5-10% των κυττάρων του δέρματος και βρίσκονται στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας. Η κύρια λειτουργία τους είναι να παράγουν μελανίνη, η οποία είναι η χρωστική ουσία που δίνει το χρώμα στο δέρμα και στα

μαλλιά. Η μελανίνη προστατεύει τα κύτταρα του δέρματος από την επιβλαβή υπεριώδη ακτινοβολία και παράγεται ως απόκριση στην έκθεση στον ήλιο.

- Κύτταρα Langerhans. Είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος της επιδερμίδας και διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην προστασία του δέρματος από παθογόνα.
- Κύτταρα Merkel. Βρίσκονται και αυτά στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας και είναι ιδιαίτερα συγκεντρωμένα στις παλάμες και στα δάκτυλα. Τοποθετούνται πολύ κοντά στις αισθητήριες νευρικές απολήξεις και πιστεύεται ότι λειτουργούν ως κύτταρα ευαίσθητα στην αφή. Επιτρέπουν να αντιλαμβανόμαστε αισθητηριακές πληροφορίες (όπως το άγγιγμα, η πίεση και η υφή) από το εξωτερικό μας περιβάλλον.
- Κερατινοκύτταρα. Είναι ο πιο άφθονος τύπος κυττάρων του δέρματος αντιπροσωπεύοντας περίπου το 90-95% των επιδερμικών κυττάρων. Προέρχονται από το βαθύτερο στρώμα της επιδερμίδας, τη βασική στιβάδα και ανεβαίνουν στο τελικό στρώμα φραγμού του δέρματος, την κεράτινη στιβάδα. Εκεί, τα κερατινοκύτταρα βρίσκονται ως χωρίς-πυρήνα, επίπεδα και εξαιρετικά κερατινοποιημένα πλακώδη κύτταρα. Τα κερατινοκύτταρα πολλαπλασιάζονται στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας και αρχίζουν να διαφοροποιούνται στην πορεία τους προς την επιφάνεια, καθώς υφίστανται σταδιακή διαφοροποίηση. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, αλλάζουν βαθιά τη μορφολογία τους και αρχίζουν να παράγουν κερατίνη, κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες, ιντερλευκίνες και παράγοντες συμπληρώματος. Η διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες καθώς και από επιγενετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς. Όσον αφορά τη λειτουργία τους πρόκειται για εξαιρετικά εξειδικευμένα κύτταρα. Παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην προστασία, καθώς σχηματίζουν ένα σφιχτό φράγμα που εμποδίζει την είσοδο ξένων ουσιών στο σώμα, ενώ ελαχιστοποιεί την απώλεια υγρασίας, θερμότητας και άλλων συστατικών. Αυτά τα κύτταρα έχουν επίσης δομικό ρόλο, σχηματίζοντας στενούς δεσμούς με τα άλλα κύτταρα της επιδερμίδας και διατηρώντας τα στις θέσεις τους. Επιπλέον, τα κερατινοκύτταρα λειτουργούν ως ανοσορυθμιστές μετά από τραυματισμούς του δέρματος [67].



Εικόνα 6: Κυτταρική σειρά HaCaT.

Τα καλλιεργημένα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα αν και χρησιμοποιούνται συχνά για μελέτες, παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα. Συνοπτικά, όπως έχει ήδη αναφερθεί, απαιτούν συμπληρωματικούς αυξητικούς παράγοντες για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους *in vitro*. Επιπρόσθετα, μετά τη διαφοροποίησή τους, πεθαίνουν γρήγορα και δεν επιτρέπουν τη μακροχρόνια διερεύνηση. Τέλος, η μεταβλητότητα από δότη σε δότη στα χαρακτηριστικά ανάπτυξης και οι αλλαγές στα χαρακτηριστικά πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης με αυξανόμενο αριθμό διελεύσεων, περιπλέκουν την ερμηνεία των πειραματικών δεδομένων. Για να ελαχιστοποιηθούν αυτά τα προβλήματα, η αυθόρμητα αθανатоποιημένη ανθρώπινη κυτταρική σειρά κερατινοκυττάρων- HaCaT- από ενήλικο δέρμα, έχει προταθεί ως μοντέλο για τη μελέτη των λειτουργιών των κερατινοκυττάρων. Τα HaCaT είναι μια μη ογκογονική μονοκλωνική κυτταρική σειρά, προσαρμοσμένη σε μακροχρόνια ανάπτυξη, χωρίς συμπληρωμένους αυξητικούς παράγοντες που επιδεικνύει φυσιολογική μορφογένεση και εκφράζει όλες τις κύριες λειτουργίες των κυττάρων αυτών [68-71].

1.3.2 Κύτταρα HEK

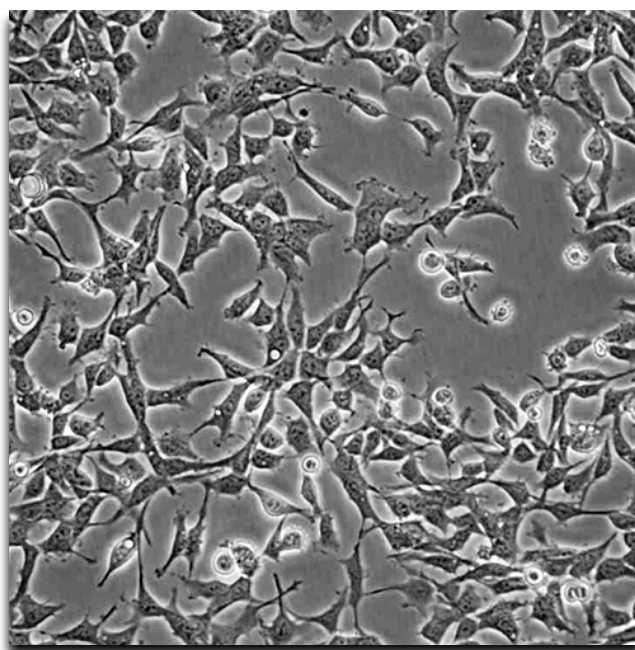
Τα νεφρά είναι ζωτικά όργανα υπεύθυνα για την απομάκρυνση των άχρηστων ή/και τοξικών προϊόντων, των αλάτων και του νερού από το σώμα. Ο νεφρός είναι από τα πιο πολύπλοκα όργανα όσον αφορά την ποικιλία των τύπων κυττάρων. Η κυτταρική αυτή πολυπλοκότητα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και η πρόκληση περιπλέκεται περαιτέρω από την ύπαρξη

πολλαπλών δεξαμενών προγόνων και οδών διαφοροποίησης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα όχι μόνο την αδυναμία προσδιορισμού του αριθμού των τύπων νεφρικών κυττάρων αλλά και την αναπαραγωγή τους *in vitro*. Η ετερογένεια είναι ένας όρος που εμφανίζεται συχνά σε όλες τις δημοσιεύσεις, αποτελώντας σαφή ένδειξη μιας από τις σημαντικότερες δυσκολίες στην έρευνα των νεφρών. Μέχρι στιγμής, έχουν αναφερθεί ορισμένες ετερογένειες, όπως ο χρόνος ανάπτυξης των νεφρών, ο αριθμός των νεφρώνων, οι αριθμοί κυττάρων ανά τμήμα και οι ανατομικές διαφορές. Σαφώς, ένα στενό δίκτυο επιθηλιακών, ενδοθηλιακών και διάμεσων κυττάρων καθώς και ανοσοκυττάρων είναι κρίσιμο για την επίτευξη της βέλτιστης λειτουργίας και τη διατήρηση του εσωτερικού περιβάλλοντος. Συχνή επιλογή αποτελούν τα κύτταρα ανθρώπινου εμβρυϊκού νεφρού 293 (HEK293, HEK-293 ή HEK) αφού είναι μία από τις πιο κοινές κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται για ερευνητικούς σκοπούς, δεύτερη μετά τα κύτταρα HeLa, την πρώτη ανθρώπινη κυτταρική σειρά. Η κυτταρική αυτή σειρά, αρχικά παρήχθη το 1973 από τον Frank Graham, από φυσιολογικά ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα. Δημιουργήθηκαν μετά από επιμόλυνση (transfection) με διατμημένο DNA αδενοϊού 5, που οδήγησε στην ενσωμάτωση μέρους του γονιδιώματος του αδενοϊού στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 19 του γονιδιώματος του εμβρυϊκού κυττάρου. Το όνομα 293 προέρχεται από το γεγονός ότι ήταν το 293ο πείραμα του. Ο τύπος του νεφρικού κυττάρου από τον οποίο προήλθε είναι άγνωστος και είναι δύσκολο να χαρακτηριστούν με βεβαιότητα τα κύτταρα μετά τον μετασχηματισμό, καθώς ο αδενοϊός 5 θα μπορούσε να έχει διαταράξει σημαντικά τη μορφολογία και την έκφραση των κυττάρων. Επίσης, οι εμβρυϊκοί νεφροί, όπως επισημάνθηκε, είναι ένα ετερογενές μείγμα σχεδόν όλων των τύπων κυττάρων που υπάρχουν στο σώμα. Έχει εικαστεί, ότι τα κύτταρα μπορεί να είναι νευρωνικής προέλευσης. Αν και θεωρητικά είναι δυνατό, τα περισσότερα κύτταρα που προέρχονται από έναν εμβρυϊκό νεφρό είναι ενδοθηλιακά, επιθηλιακά ή ινοβλαστικά κύτταρα. Η νευρωνική προέλευση υποπτεύεται λόγω της παρουσίας mRNA και γονιδιακών προϊόντων που συνήθως βρίσκονται στους νευρώνες. Τα κύτταρα αυτά, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία διαφόρων παραγώγων κυτταρικών σειρών που έχουν τις ιδιαίτερες χρήσεις τους [72]. Ο **Πίνακας 1** συνοψίζει μερικά από τα κοινά παράγωγα HEK293 [73-76].

Πίνακας 1: Μερικά κοινά χρησιμοποιούμενα παράγωγα κυττάρων HEK293.

Παράγωγο	Χαρακτηριστικό
293-F	Γρήγορη ανάπτυξη, ανάπτυξη σε μέσο χωρίς πρόσθετα.
293-H	Γρήγορη ανάπτυξη, ανάπτυξη σε μέσο χωρίς πρόσθετα, έντονη προσκόλληση.
293T	Υψηλή επιμόλυνση, περιέχει το T-αντιγόνο SV 40.
293E	Εκφράζει την πρωτεΐνη EBNA-1.

Υπάρχουν πολλοί λόγοι για τους οποίους η κυτταρική σειρά HEK-293 είναι τόσο δημοφιλής, εκτός από τον γρήγορο χρόνο διπλασιασμού και την ευκολία καλλιέργειας. Ένα βασικό πλεονέκτημα είναι ότι προσφέρει επαναλαμβανόμενα και συνεπή αποτελέσματα. Δεύτερον, είναι εξαιρετικά αποτελεσματική στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών, καθιστώντας τα ιδανικά για την παραγωγή θεραπευτικών παραγόντων σε εμπορικές ποσότητες. Τρίτον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για παροδική όσο και για σταθερή έκφραση των επιθυμητών γονιδίων. Τέλος, είναι ευαίσθητα στη διαμόλυνση και μπορούν να επιμολυνθούν χρησιμοποιώντας μια ποικιλία χημικών και φυσικών μεθόδων [72].



Εικόνα 7: Κυτταρική σειρά HEK-293.

Ένα κοινό χαρακτηριστικό των δύο αυτών κυτταρικών σειρών είναι οι ιδανικές συνθήκες ανάπτυξής τους: έναν υγροποιημένο επωαστήρα που διατηρείται στους 37°C με 5% CO₂ και ένα μέσο υψηλής γλυκόζης (όπως το DMEM), συμπληρωμένο με ορό εμβρύου βοοειδών (FBS). Τα μέσα καλλιέργειας μπορούν επίσης να περιέχουν αντιβιοτικά ευρέος φάσματος, όπως πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη, προκειμένου να αποτραπούν κοινές βακτηριακές λοιμώξεις.

1.4 -ομικές επιστήμες

Από τότε που ξεκίνησε η διαδικασία χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος, οι νέες τεχνολογίες κατέστησαν δυνατή τη λήψη ενός τεράστιου αριθμού μοριακών μετρήσεων μέσα σε έναν ιστό ή ένα κύτταρο. Αυτές οι τεχνολογίες μπορούν να εφαρμοστούν σε ένα βιολογικό σύστημα για να ληφθεί ένα στιγμιότυπο της υποκείμενης βιολογίας σε μια ανάλυση που ποτέ πριν δεν ήταν δυνατή. Σε γενικές γραμμές, τα επιστημονικά πεδία που σχετίζονται με αυτές τις μετρήσεις ονομάζονται «ομικά». Ο όρος “omics” είναι παράγωγο του επιθέματος “ome” και προέρχεται από ελληνική λέξη που σημαίνει “ολόκληρο” ή “πλήρη”. Η προσθήκη αυτού σε κυτταρικά μόρια, όπως το γονίδιο, το μεταγράφημα, η πρωτεΐνη και ο μεταβολίτης, οδηγεί στις αντίστοιχες τεχνολογίες με τις 4 βασικές κατηγορίες να είναι οι εξής:

- Γονιδιωματική (Genomics), μελέτη του γονιδιώματος
- Πρωτεωμική (Proteomics), μελέτη του πρωτεώματος
- Τρανσκριπτομική/Μεταγραφική (Transcriptomics), μελέτη του μεταγραφώματος
- Μεταβολομική (Metabolomics), μελέτη του μεταβολισμού

Υπάρχουν και αρκετές άλλες όπως η γλυκιδομική (Glycomics), η μελέτη των κυτταρικών υδατανθράκων, η λιποδιμική (Lipomics), η μελέτη των κυτταρικών λιπιδίων και η καταλομική (Catalomics), η μελέτη των ενζύμων ή άλλων βιοκαταλυτών. Πολλοί τομείς έρευνας μπορούν να ταξινομηθούν πλέον ως omics, με μια ολοκληρωμένη λίστα να είναι αδύνατη επειδή οι νέες αυτές τεχνολογίες αναπτύσσονται γρήγορα [77-81].

1.5 Μεταβολομική

Η μεταβολομική είναι πλέον ένα ταχέως εξελισσόμενο πεδίο των βιολογικών επιστημών και περιγράφεται ως η «συστηματική μελέτη των μοναδικών χημικών αποτυπωμάτων που αφήνουν πίσω τους συγκεκριμένες κυτταρικές διεργασίες» [82]. Περιλαμβάνει την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών, με στόχο τη συσχέτιση των

αλλαγών τους με παθολογικές καταστάσεις ή με την επίδραση εξωτερικών παραγόντων επιρροής. Μαζί με τους άλλους κύριους τομείς «ομικής» που αναφέρθηκαν προηγουμένως, αποτελεί ένα από τα δομικά στοιχεία της βιολογίας των συστημάτων [83].

Αναλυτικότερα, οι μεταβολίτες είναι τα ενδιάμεσα προϊόντα του μεταβολισμού. Στο πλαίσιο της μεταβολομικής, ένας μεταβολίτης ορίζεται συνήθως ως οποιοδήποτε μόριο μεγέθους μικρότερου από 1 kDa [84]. Ωστόσο, υπάρχουν εξαιρέσεις σε αυτό ανάλογα με το δείγμα και τη μέθοδο ανίχνευσης. Για παράδειγμα, μακρομόρια όπως οι λιποπρωτεΐνες και η αλβουμίνη ανιχνεύονται αξιόπιστα σε μεταβολομικές μελέτες πλάσματος αίματος που βασίζονται σε NMR. Στη μεταβολομική με βάση τα φυτά, είναι σύνηθες να αναφερόμαστε 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 λειτουργία όπως είναι τα αντιβιοτικά και οι χρωστικές ουσίες. Αντίθετα, στη μεταβολομική που βασίζεται στον άνθρωπο, είναι πιο κοινό να περιγράφονται οι μεταβολίτες είτε ως ενδογενείς (που παράγονται από τον οργανισμό ξενιστή) είτε ως εξωγενείς. Οι μεταβολίτες ξένων ουσιών όπως τα φάρμακα ονομάζονται ξενομεταβολίτες. Το μεταβόλωμα σχηματίζει ένα μεγάλο δίκτυο μεταβολικών αντιδράσεων, όπου τα προϊόντα από μια ενζυματική χημική αντίδραση είναι αντιδρώντα σε άλλη. Τέτοια συστήματα έχουν περιγραφεί ως υπερκύκλοι. Ως μεταβόλωμα ορίζεται το πλήρες σύνολο των μικρών μορίων των μεταβολιτών που βρίσκονται σε ένα βιολογικό δείγμα, όπως ένας μεμονωμένος οργανισμός. Ο όρος επινοήθηκε το 1998, κατ' αναλογία με το γονιδίωμα, το μεταγράφημα και το πρωτέωμα. Αν και ορίζεται με ευκολία, δεν είναι επί του παρόντος δυνατό να αναλυθεί ολόκληρο το φάσμα των μεταβολιτών με μία μόνο αναλυτική μέθοδο. Οι πληροφορίες από την τρέχουσα επιστημονική βιβλιογραφία δεν είναι ολοκληρωμένες και αποτελεί πρόκληση η παροχή μιας λεπτομερούς περιγραφής των μεταβολικών οδών και λειτουργιών τους.

Η μεταβολομική ανάλυση μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο προσεγγίσεις, τη στοχευμένη και τη μη στοχευμένη μεταβολομική [85].

- Στοχευμένη. Αναφέρεται στην ανίχνευση και τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό (σε nM, ή mg/mL) ενός μικρού συνόλου γνωστών ενώσεων. Καθοδηγείται από μια συγκεκριμένη βιοχημική υπόθεση στην οποία το σύνολο των μεταβολιτών που σχετίζονται με ένα ή περισσότερα μονοπάτια είναι ήδη καθορισμένο. Ένας περιορισμός της στοχευμένης προσέγγισης είναι ότι απαιτεί οι ενώσεις που ενδιαφέρουν να είναι γνωστές εκ των προτέρων και να είναι διαθέσιμες στην καθαρή τους μορφή. Λόγω της μεγάλης ποικιλίας μεταβολιτών και της πολύπλοκης

δυναμικής τους μέσα σε ένα κύτταρο, η στοχευμένη προσέγγιση δεν μπορεί ακόμη να χρησιμοποιηθεί μόνη της για μια ολοκληρωμένη ανάλυση του μεταβολισμού [86].

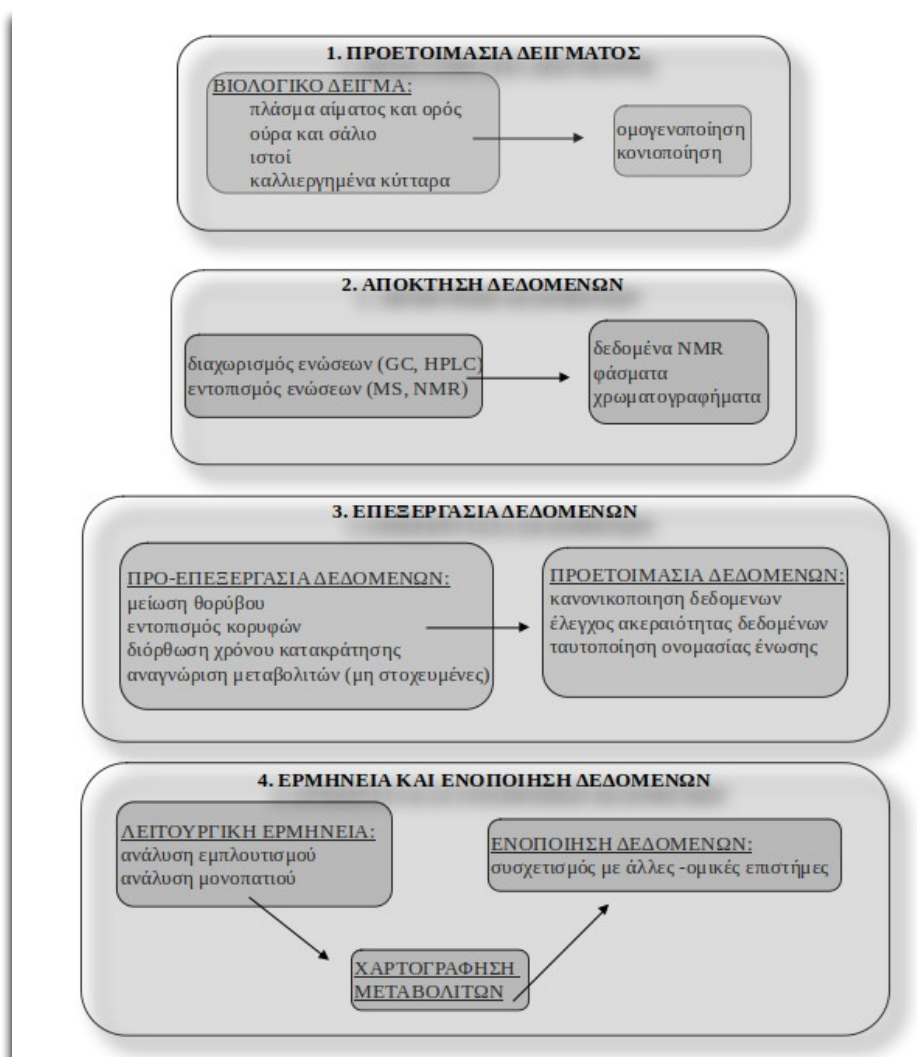
- Μη στοχευμένη. Ονομάζεται επίσης και «δακτυλικό αποτύπωμα μεταβολίτη». Δε βασίζεται σε μια εκ των προτέρων υπόθεση και χρησιμοποιείται για πλήρη σύγκριση μεταβολιτών (δηλαδή όσο το δυνατόν περισσότεροι μεταβολίτες μετρώνται και συγκρίνονται μεταξύ των δειγμάτων). Οι παραλλαγές του μεταβολίτη παρατηρούνται κυρίως ως ολικές αλλαγές των χρωματογραφικών μοτίβων χωρίς να απαιτείται προηγούμενη γνώση των υπό διερεύνηση ενώσεων. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι, παρά την παρουσία εκτεταμένων αποθετηρίων φασμάτων μεταβολισμού, η ταυτοποίηση μεταβολιτών εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση σε μη στοχευμένη μεταβολομική [87].

Αν και παραμένει ένα σχετικά νέο πεδίο έρευνας σε σύγκριση με την γονιδιωματική ή/και την πρωτεωμική, προσφέρει τη δυνατότητα ευρέων εφαρμογών, με πολλές από αυτές να εκτυλίσσονται σταδιακά. Ιδιαίτερες εφαρμογές είναι η εκτίμηση τοξικότητας καθώς το μεταβολικό προφίλ (ειδικά δειγμάτων ούρων ή πλάσματος αίματος) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των φυσιολογικών αλλαγών που προκαλούνται από την τοξική προσβολή μιας χημικής ουσίας (ή ενός μείγματος χημικών ουσιών). Επιπλέον, μπορεί να είναι ένα εξαιρετικό εργαλείο στη λειτουργική γονιδιωματική για τον προσδιορισμό του φαινοτύπου που προκαλείται από έναν γενετικό χειρισμό, όπως η διαγραφή ή η εισαγωγή γονιδίου. Μια εξίσου βασική εφαρμογή είναι η διατροφογονιδιωματική, όπου πρόκειται για ένα γενικευμένο όρο που συνδέει τη γονιδιωματική, τη μεταγραφική, την πρωτεωμική και τη μεταβολομική με τη διατροφή του ανθρώπου [88].

1.5.1 Γενικό πρωτόκολλο μεταβολομικής μελέτης

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των δεδομένων της μεταβολομικής απαιτούν την εφαρμογή διαφορετικών εργαλείων βιοπληροφορικής μετά από μια συγκεκριμένη ροή εργασίας. [89-92]. Τα βασικά στάδια που περιλαμβάνει η ροή εργασιών της μεταβολομικής περιγράφονται σχηματικά στην **Εικόνα 8** και είναι τα εξής:

- Προετοιμασία δειγμάτων
- Απόκτηση δεδομένων
- Επεξεργασία δεδομένων
- Ερμηνεία και ενοποίηση δεδομένων



Εικόνα 8: Γενικό πρωτόκολλο μεταβολομικής μελέτης

Προετοιμασία δειγμάτων

Το πρώτο βήμα στη ροή του μεταβολισμού είναι η προετοιμασία του βιολογικού δείγματος (πλάσμα αίματος και ορός, ούρα, σάλιο, φυτικά εκχυλίσματα, ιστοί ζώων ή ανθρώπων ή/και καλλιεργημένα κύτταρα). Οι ενώσεις σε ένα δεδομένο δείγμα είναι συνήθως πολύπλοκης φύσης και ανάλογα με το είδος του προς ανάλυση δείγματος, χρησιμοποιούνται και διάφορες προσεγγίσεις. Επιπλέον, η προετοιμασία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από τον τρόπο ανίχνευσης της τεχνικής που θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια (φασματομετρία μάζα-MS ή φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού-NMR). Τέλος, το είδος της μελέτης- στοχευμένη ή μη στοχευμένη- παίζει καθοριστικό ρόλο. Για μη στοχευμένες μελέτες, είναι επιθυμητή η ελάχιστη προεπεξεργασία ώστε να μην χάνονται μεταβολίτες. Ως επί το πλείστον, τα δείγματα συνήθως ομογενοποιούνται ή κονιοποιούνται σε μικρότερα σωματίδια για να αυξηθεί η επιφάνειά τους για την μετέπειτα έκθεση στο ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης, το οποίο επιλέγεται σύμφωνα με τα χημικά χαρακτηριστικά τους [93-96].

Λήψη δεδομένων

Μόλις το δείγμα είναι έτοιμο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες τεχνικές για τον διαχωρισμό και τον χαρακτηρισμό διαφορετικών χημικών ομάδων μεταβολιτών. Για το σκοπό αυτό, οι τεχνικές διαχωρισμού ενώσεων (αέρια χρωματογραφία, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, υγρή χρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής απόδοσης και τριχοειδική ηλεκτροφόρηση) συνδυάζονται με τεχνικές φασματοσκοπίας (MS, NMR). Κάθε μέθοδος ανίχνευσης ή διαχωρισμού έχει διαφορετική ανάλυση, ευαισθησία και τεχνολογικούς περιορισμούς και επιλέγεται σύμφωνα με τα χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά κάθε δείγματος και το είδος της ανάλυσης που θα πραγματοποιηθεί [97-99]. Η φασματομετρία MS και η φασματοσκοπία NMR έχουν εξελιχθεί ως οι πιο κοινές τεχνικές σε μελέτες μεταβολομικής, και η καθεμία έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και περιορισμούς που αναφέρονται στον **Πίνακα 2**.

- Η φασματοσκοπία NMR είναι ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο που έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως στη χημεία για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των συστατικών ενός δεδομένου δείγματος. Πρόκειται για μια φασματοσκοπική τεχνική που βασίζεται στην αρχή της απορρόφησης ενέργειας και της επανεκπομπής από τους ατομικούς πυρήνες λόγω διακυμάνσεων σε ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, και όχι στο διαχωρισμό των αναλυόμενων συστατικών. Η εφαρμογή της δεν περιορίζεται μόνο σε υγρά δείγματα, αλλά επεκτείνεται και σε στερεά ή/και αέρια, καθώς και σε δείγματα ιστών. Επιπλέον, αν και οι κύριες εφαρμογές έγκειται στη μοριακή ταυτοποίηση και τη δομική διασαφήνιση, η φασματοσκοπία NMR μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των μορίων, όπως η πυκνότητα ηλεκτρονίων και η μοριακή δυναμική. Κατά συνέπεια, έχει γίνει το κύριο εργαλείο για μελέτες δομικής βιολογίας. Επιπλέον, έχει χρησιμοποιηθεί σε ένα ευρύ φάσμα ερευνητικών τομέων, συμπεριλαμβανομένης της οργανικής και ανόργανης χημείας, της βιοχημείας, της φυσικής, της βιολογίας, των πολυμερών και της ανακάλυψης φαρμάκων. Η φασματοσκοπία NMR έχει προταθεί ως μία από τις πιο αποτελεσματικές τεχνικές σε εφαρμογές μεταβολομικής λόγω των πολλαπλών πλεονεκτημάτων της όπως η ελάχιστη προετοιμασία δείγματος και ο μη καταστρεπτικός χαρακτήρας (ακόμη και μετά την ανάλυση, τα δείγματα μπορούν ακόμα να χρησιμοποιηθούν για άλλες μελέτες). Ως τεχνική, αναγνωρίζεται επίσης, ως ιδιαίτερα επαναλήψιμη, και λιγότερο ευαίσθητη στη μεταβλητότητα του οργάνου. Η χαμηλή ευαισθησία είναι το εγγενές μειονέκτημα και η κύρια πρόκληση για την εφαρμογή στη βιοϊατρική έρευνα. Οι συνεχείς εξελίξεις στον σχετικό μηχανισμό, όπως η υψηλότερη ένταση μαγνητικού πεδίου, οι κρυογονικά ψυχόμενοι

ανιχνευτές και οι μικροανιχνευτές έχουν ενισχύσει σημαντικά την ευαισθησία. Επίσης, η ερμηνεία των φασμάτων θεωρείται σύνθετη και απαιτεί σημαντική εκπαίδευση, αφού τα σήματα από διαφορετικούς μεταβολίτες μπορούν να επικαλύπτονται [100,101].

- Η φασματομετρία μάζας είναι μια πιο ευρέως εφαρμοσμένη τεχνική. Χρησιμοποιείται κυρίως για την ταυτοποίηση άγνωστων ενώσεων και για τον ποσοτικό προσδιορισμό γνωστών μορίων μέσα σε ένα δείγμα, μετά το διαχωρισμό με αέρια ή υγρή χρωματογραφία ή ηλεκτροφόρηση. Λόγω της υψηλής ευαισθησίας και επιλεκτικότητάς της, παρέχει μια σημαντική αναλυτική πλατφόρμα για τη δημιουργία προφίλ μεταβολιτών σε μικτά δείγματα (π.χ. βιολογικά). Αναγνωρίζει μεταβολίτες κυρίως με βάση τη σχέση της μάζας τους προς το φορτίο (m/z). Τα άτομα και μόρια πρέπει να μετατραπούν σε ιόντα (ιονισμός), και κατόπιν 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. Διάφορες τεχνικές είναι διαθέσιμες για ιονισμό, με τον ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (Electrospray ionization-ESI) να είναι ο πιο δημοφιλής. Καμία μέθοδος ιονισμού δεν μπορεί να καλύψει όλες τις κατηγορίες μεταβολιτών, όπως πολικούς, μη πολικούς, ουδέτερους και ιοντικούς. Συνεπώς, διαφορετικές μέθοδοι θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ανεξάρτητα για να μεγιστοποιηθεί ο αριθμός των μεταβολιτών που ανιχνεύονται. Ένα φάσμα μάζας ενός δείγματος μπορεί να ληφθεί με άμεση έγχυση, αλλά γενικώς εκτελείται σε συνδυασμό με τεχνικές διαχωρισμού. Είναι σημαντικό να αναφερθεί, πώς καμία μέθοδος διαχωρισμού δεν επιτρέπει τον ταυτόχρονο διαχωρισμό όλων των μεταβολιτών. Επιπλέον, δεν υπάρχει ένας αναλυτής μάζας που μπορεί να μετρήσει όλους τους μεταβολίτες, για το λόγο ότι ορισμένοι δεν μπορούν να ιονίζονται με συγκεκριμένες μεθόδους ή επειδή η συγκέντρωσή τους είναι πολύ χαμηλή [102,103].

Εν τέλει, επισημαίνεται στην επιστημονική βιβλιογραφία, πως η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται συνήθως σε μη στοχευμένες μεταβολομικές μελέτες, σε αντίθεση με τη φασματοσκοπία MS που είναι συνήθως η βέλτιστη τεχνική για τις στοχευμένες αναλύσεις. Σε σύγκριση με τη φασματοσκοπία NMR, η MS είναι ανώτερη στο να επιτρέπει την ανάλυση δευτερογενών μεταβολιτών όπου το επίπεδο ανίχνευσης είναι από picomole έως femtomole. Επιπλέον, οι διαφορετικές τεχνολογίες MS παρέχουν μια σειρά από λειτουργικές αρχές που μπορούν να εφαρμοστούν, όπως διαφορετικές τεχνικές ιονισμού, αυξάνοντας έτσι τον αριθμό μεταβολιτών που μπορούν ενδεχομένως να ανιχνευθούν. Η υψηλή αναπαραγωγικότητα μαζί με τα μη καταστροφικά και μη επεμβατικά χαρακτηριστικά

της φασματοσκοπίας NMR αντιπροσωπεύουν τα σημαντικά πλεονεκτήματα για τη χρήση της στη μεταβολομική έρευνα. Περαιτέρω, η φασματοσκοπία NMR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για *in vivo* μελέτες, και αναφέρεται ως φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (MRS). Οποιαδήποτε *in vitro* οδός μεταβολίτη που διερευνάται με φασματοσκοπία NMR μπορεί να επιδιωχθεί με *in vivo* μελέτες χρησιμοποιώντας MRS. Ο υψηλός αριθμός μεταβολιτών που μπορούν να ανιχνευθούν ταυτόχρονα σε σύντομο χρονικό διάστημα λίγων μόνο λεπτών αντιπροσωπεύει περαιτέρω πλεονέκτημα της χρήσης φασματοσκοπίας NMR στη μεταβολομική έρευνα [104].

Πίνακας 2: Σύγκριση NMR-MS.

	NMR	MS
Ευαισθησία	Χαμηλή	Υψηλή
Επαναληψιμότητα	Πολύ υψηλή	Μέσης τιμής
Αριθμός ανιχνεύσιμων μεταβολιτών	30-100	300-1000+
Κόστος	Πιο ακριβό και καταλαμβάνει περισσότερο χώρο	Φθηνότερο και καταλαμβάνει λιγότερο χώρο
Κόστος δείγματος	Χαμηλό κόστος ανά δείγμα	Υψηλό κόστος ανά δείγμα
Προετοιμασία δειγμάτων	Ελάχιστη προετοιμασία	Σύνθετη προετοιμασία
Προτεινόμενη ανάλυση	Μη στοχευμένη	Στοχευμένη

Επεξεργασία δεδομένων

Μόλις ληφθούν τα πρωτογενή δεδομένα (χρωματογραφήματα, φάσματα ή δεδομένα NMR) υποβάλλονται σε μία προεπεξεργασία. Γενικά, αυτή περιλαμβάνει μείωση θορύβου,

διόρθωση χρόνου κατακράτησης, ανίχνευση και ολοκλήρωση κορυφών και ευθυγράμμιση χρωματογραφήματος. Στη συνέχεια, για τις μη στοχευμένες μεταβολομικές μελέτες, χρησιμοποιούνται διαφορετικές βάσεις δεδομένων, όπως η Βάση Δεδομένων Ανθρώπινου Μεταβολισμού (HMDB) για την αναγνώριση των μεταβολιτών από τα φάσματα.

Η Βάση Δεδομένων Ανθρώπινου Μεταβολισμού (HMDB) είναι αυτή τη στιγμή η πιο ολοκληρωμένη και περιεκτική διαδικτυακή βάση δεδομένων μικρών μορίων μεταβολιτών που βρίσκονται στο ανθρώπινο σώμα. Εκτός από τα περιεκτικά δεδομένα που προέρχονται από τη βιβλιογραφία, το HMDB περιέχει επίσης μια εκτενή συλλογή πειραματικών δεδομένων συγκέντρωσης μεταβολιτών που συγκεντρώθηκαν από εκατοντάδες φάσματα μάζας (MS) και μεταβολομικές αναλύσεις πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα ούρων, αίματος και εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Αυτό συμπληρώνεται περαιτέρω με χιλιάδες φάσματα NMR και MS που συλλέγονται σε μεταβολίτες αναφοράς. Πρόκειται για μια υψηλής ποιότητας, ελεύθερα προσβάσιμη συλλογή που περιέχει τρία είδη δεδομένων: χημικά, κλινικά και μοριακής βιολογίας/βιοχημείας. Τα χημικά δεδομένα περιλαμβάνουν 41514 δομές μεταβολιτών με λεπτομερείς περιγραφές μαζί με σχεδόν 10000 φάσματα NMR, GC-MS και LC/MS. Τα κλινικά δεδομένα περιλαμβάνουν πληροφορίες για >10.000 συγκεντρώσεις μεταβολίτη-βιορευστού και πληροφορίες συγκέντρωσης μεταβολιτών σε περισσότερες από 600 διαφορετικές ανθρώπινες ασθένειες. Τα βιοχημικά δεδομένα περιλαμβάνουν 5.688 αλληλουχίες πρωτεϊνών και DNA και περισσότερες από 5000 βιοχημικές αντιδράσεις που συνδέονται με αυτές τις καταχωρήσεις μεταβολιτών. Κάθε καταχώρηση μεταβολίτη στη HMDB περιέχει περισσότερα από 110 πεδία δεδομένων, με τα 2/3 των πληροφοριών να είναι αφιερωμένα σε χημικά/κλινικά δεδομένα και το άλλο 1/3 να αφιερώνονται σε ενζυματικά ή βιοχημικά δεδομένα. Συμπεριλαμβάνονται περιεκτική περιγραφή της ένωσης, ονόματα και συνώνυμα, δομικές και φυσικοχημικές πληροφορίες, φάσματα αναφοράς NMR και MS, συγκεντρώσεις βιορευστού, συσχετίσεις ασθενειών, δεδομένα ενζύμων και αλληλουχίας γονιδίων. Πολλά πεδία δεδομένων είναι υπερσυνδεδεμένα με άλλες βάσεις δεδομένων (KEGG, MetaCyc, PubChem, Protein Data Bank, ChEBI, Swiss-Prot και GenBank) και μια ποικιλία από μικροεφαρμογές προβολής δομής. Τέσσερις πρόσθετες βάσεις δεδομένων, η DrugBank, T3DB, SMPDB και FooDB αποτελούν επίσης μέρος της σειράς βάσεων δεδομένων HMDB. Το DrugBank περιέχει ισοδύναμες πληροφορίες για ~1600 μεταβολίτες φαρμάκων, το T3DB περιέχει πληροφορίες για 3100 κοινές τοξίνες και περιβαλλοντικούς ρύπους, το SMPDB περιέχει διαγράμματα μονοπατιών για 700 ανθρώπινες μεταβολικές οδούς και οδούς ασθενειών, ενώ το FooDB περιέχει ισοδύναμες πληροφορίες για ~28.000 συστατικά πρόσθετων τροφίμων και τροφίμων [105-108].

Ερμηνεία και ενοποίηση δεδομένων

Σε αυτό το τελευταίο βήμα, οι επιλεγμένοι μεταβολίτες συνδέονται με το υπό μελέτη βιολογικό πλαίσιο, μέσω αναλύσεων εμπλουτισμού και μονοπατιών. Πιο συγκεκριμένα, η ανάλυση εμπλουτισμού στοχεύει στη διερεύνηση του εμπλουτισμού (δηλαδή υπερ- ή/και υπο-έκφρασης) σε προκαθορισμένες ομάδες λειτουργικά συγγενών μεταβολιτών, για τον εντοπισμό σημαντικών και συντονισμένων αλλαγών έκφρασης μεταξύ τους. Αυτό επιτρέπει την αξιοποίηση της λίστας των αλλαγμένων μεταβολιτών για να προταθεί μια βιολογική οδός ή μια κατάσταση ασθένειας, η οποία μπορεί να διερευνηθεί περαιτέρω. Αντίθετα, η ανάλυση μονοπατιού περιλαμβάνει την περιγραφή και την απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ γονιδίων, πρωτεϊνών ή μεταβολιτών εντός κυττάρων, ιστών ή οργάνων. Στόχος είναι ο εντοπισμός των οδών που επηρεάζουν σημαντικά μια δεδομένη βιολογική διαδικασία. Οι αναλύσεις εμπλουτισμού και μονοπατιών πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας εργαλεία, τα οποία χαρτογραφούν σημαντικούς μεταβολίτες σε γνωστές βιοχημικές οδούς με βάση τις πληροφορίες που περιέχονται σε βάσεις δεδομένων. Μόλις εντοπιστούν τα μεταβολικά μονοπάτια, αυτές οι πληροφορίες μπορούν να ενσωματωθούν περαιτέρω με μεταγραφικά και πρωτεωμικά δεδομένα για να ληφθεί μια ολοκληρωμένη εικόνα όλων των εμπλεκόμενων βιολογικών διεργασιών [109].

Το MetaboAnalyst είναι μια ελεύθερα προσβάσιμη πλατφόρμα που κυκλοφόρησε για πρώτη φορά το 2009. Υποστηρίζει την ανάλυση μονοπατιών και της απεικόνισης 21 μοντέλων οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων, ποντικίου, 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 12 ενότητες οργανωμένες σε τέσσερις γενικές κατηγορίες:

- Διερευνητική στατιστική ανάλυση: γενικές στατιστικές μεθόδους, ανάλυση βιοδεικτών, ανάλυση δύο φάσεων και ανάλυση δικτύων.
- Λειτουργική ανάλυση: ανάλυση εμπλουτισμού σε σύνολο μεταβολιτών, ανάλυση μεταβολικής οδού.
- Ενσωμάτωση δεδομένων και βιολογία συστημάτων: μετά-ανάλυση βιοδεικτών, ανάλυση κοινής οδού και εξερεύνηση δικτύου.
- Λειτουργίες επεξεργασίας και χρησιμότητας δεδομένων: μετατροπή ταυτότητας χημικής ένωσης, λιποδιμική και συνδέσεις με διάφορα εργαλεία [110-112].

Τα ισχυρά αυτά εργαλεία λογισμικού, είναι απαραίτητα για την αντιμετώπιση του τεράστιου όγκου και της ποικιλίας δεδομένων που παράγονται από τις μεταβολομικές αναλύσεις. Οι απαιτούμενες δυνατότητες λογισμικού, περιλαμβάνουν επιγραμματικά:

- επεξεργασία ακατέργαστων φασματικών δεδομένων.

- στατιστική ανάλυση για την εύρεση μεταβολιτών που εκφράζονται σημαντικά.
 - σύνδεση με βάσεις δεδομένων μεταβολιτών για ταυτοποίηση μεταβολιτών.
 - ολοκλήρωση και ανάλυση πολλαπλών ετερογενών «ομικών» δεδομένων.
 - ανάλυση βιοπληροφορικής και οπτικοποίηση δικτύων μοριακής αλληλεπίδρασης.
-

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για τη μελέτη της πιθανής τοξικότητας των νανοκουκκίδων άνθρακα τόσο σε *in vitro* όσο και *in vivo* πειράματα. Λόγω των προαναφερθέντων χαρακτηριστικών τους (μέγεθος, αντοχή, κινητικότητα, φορτίο κ.λπ) είναι πιθανό να εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό και να προκαλέσουν δυσμενείς επιπτώσεις. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η μεταβολομική μελέτη των κυτταρικών σειρών HaCaT (κερατινοκύτταρα) και HEK-293 (εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα) έπειτα από την έκθεσή τους σε επιλεγμένες νανοκουκκίδες που έχουν ως βάση τον άνθρακα και ετεροάτομα αζώτου-βορίου και αζώτου-φωσφόρου. Τα κύτταρα αυτά επιλέχθηκαν ως ιδανικά μοντέλα καθώς καλύπτουν δύο βασικές οδούς: την είσοδο των νανοκουκκίδων άνθρακα στον οργανισμό και τη μετέπειτα έξοδο τους. Αναλυτικότερα, τα κύτταρα HaCaT προσφέρουν τη βασικότερη κοινή οδό αλληλεπίδρασης των σωματιδίων με τον άνθρωπο, που είναι η άμεση επαφή με την επιδερμίδα, ενώ τα κύτταρα HEK-293 αφορούν τα όργανα που είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση των τοξικών και μη ουσιών. Τέλος, διεξήχθη μια μη-στοχευμένη μεταβολομική μελέτη της επίδρασης των δύο ειδών νανοκουκκίδων στο μεταβόλωμα των δύο αυτών κυττάρων. Για τη μεταβολομική μελέτη χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ (1D) και με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων Human Metabolome Database έγινε ταυτοποίηση των μεταβολιτών. Στόχο, επίσης, αποτέλεσε η διερεύνηση των μεταβολικών οδών που εμπλέκονται στις αλλαγές του μεταβολικού αποτυπώματος και η σύγκριση μεταξύ των νανοϋλικών έκθεσης καθώς και με τα δείγματα ελέγχου έτσι ώστε να προκύψουν συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση των CNDs στο κάθε μεταβόλωμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΜΕΡΟΣ

2.1 Αντιδραστήρια-διαλύτες-υλικά-κύτταρα

Όλα τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τουλάχιστον αναλυτικής καθαρότητας. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν δις απεσταγμένο (DDW). Ακολουθεί ο κατάλογος των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν:

- Μεθανόλη, (HPLC-grade) (Fisher Scientific, Leicester, UK)
- Ακετονιτρίλιο, (HPLC-grade) (Fisher Scientific, Leicester, UK)
- Κιτρικό οξύ, (Sigma–Aldrich–Steinheim, Germany)
- Ουρία, (Sigma–Aldrich–Steinheim, Germany)
- Θειουρία, (Sigma–Aldrich–Steinheim, Germany)
- Δισόξινο φωσφορικό αμμώνιο, (Sigma–Aldrich–Hellas, Greece)
- Βορικό οξύ, (Sigma–Aldrich–Hellas, Greece)
- Υγρό άζωτο
- D₂O
- 3-(τριμεθυλο-σιλυλο)-1-προπιονικό-2,2,3,3-d₄ οξύ άλατος νατρίου (TSP) (Deutero GmbH, Kastellaun, Germany)
- 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλο-υδραζυλική ελεύθερη ρίζα, (DPPH• 95%, Sigma–Aldrich–Steinheim, Germany)
- Θεικό εναμμόνιο σιδήρου (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ , (Sigma–Aldrich–Steinheim, Germany)
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), (Sigma–Aldrich–Steinheim, Germany)
- 1,10-φαινανθρολίνη, (Sigma–Aldrich–Steinheim, Germany)
- Χλωριούχο νάτριο, NaCl, (Sigma–Aldrich–Steinheim, Germany)
- Χλωριούχο κάλιο, KCl, (Sigma–Aldrich–Steinheim, Germany)
- Όξινο φωσφορικό νάτριο, Na₂HPO₄, (Sigma–Aldrich–Steinheim, Germany)
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο, KH₂PO₄, (Sigma–Aldrich–Steinheim, Germany)
- Αθανατοποιημένα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (HaCaT)
- Αθανατοποιημένα ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα (HEK-293)
- Θρεπτικό υλικό DMEM, (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Australia)
- Ορός εμβρύου βοοειδούς (FBS), (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Australia)
- L-Γλουταμίνη, (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Australia)
- Αντιβιοτικά (πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη) 10.000 U/mL, (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Australia)

- Θρυψίνη (Trypsin-EDTA 0,5%), (Gibco, Thermo Fischer Scientific, America)
- Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)
- Χρωστική κρυσταλλικού ιώδους, crystal violet, (Merck, Darmstadt, Germany)
- Χρωστική Trypan Blue Solution, 0,4%, (Merck, Darmstadt, Germany)
- Φορμαλδεΰδη 37%, (Merck, Darmstadt, Germany)
- Τρυβλία Petri για τις ανακαλλιέργειες κυττάρων, (Gibco, Thermo Fischer Scientific, America)
- Τρυβλία καλλιέργειας κυττάρων έξι θέσεων, (Gibco, Thermo Fischer Scientific, America)
- Ορολογική πιπέτα, (Gibco, Thermo Fischer Scientific, America)
- Σωλήνες Falcon, (SARSTEDT AG & Co., Germany)

2.2 Διαλύματα

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μεταπτυχιακή εργασία, παρασκευάστηκαν ως εξής:

- Διάλυμα DPPH[•] σε μεθανόλη συγκέντρωσης 6×10^{-5} M. Το διάλυμα παρασκευάστηκε με διαλυτοποίηση 2,4 mg DPPH[•] σε 100 mL μεθανόλης.
- Διάλυμα (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ συγκέντρωσης 3 mM. Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 42,6 mg της ένωσης και διαλυτοποιήθηκαν σε 50 mL DDW.
- Διάλυμα 1,10-φαινανοθρολίνης 3 mM. Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 27 mg της ένωσης και διαλυτοποιήθηκαν σε 50 mL μεθανόλης.
- Παρασκευή αλατούχου ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS). Ζυγίστηκαν με ακρίβεια 1,6 g NaCl, 0,04 g KCl, 0,288 g Na₂HPO₄, 0,048 g KH₂PO₄. Διαλυτοποιήθηκαν με 200 mL DDW σε μάτι ανάδευσης και ρυθμίστηκε το pH=7,4.
- Το θρεπτικό υλικό για τις καλλιέργειες κυττάρων DMEM υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης, παρασκευάστηκε με την προσθήκη 1% αντιβιοτικών (πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης), 10% FBS και 1% γλουταμίνης.
- Διάλυμα χρωστικής κρυσταλλικού ιώδους 0,2% w/v, παρασκευάστηκε με την προσθήκη 0,2 g crystal violet, 10 mL διαλύματος φορμαλδεΰδης 37% w/v, 0,25 g χλωριούχου νατρίου, 50 mL μεθανόλης και 40 mL DDW και αποθηκεύτηκε στους 4 °C, μέχρι τη χρήση του.

2.3 Όργανα και συσκευές

- Πεχάμετρο PHM83 Autocal (Radiometer, Copenhagen, Denmark)
- Συσκευή περιδίνησης, Vortex TK3S (Technokartell, Italy)
- Αναλυτικός ζυγός (Shimadzu, Tokyo, Japan)
- Συσκευή διπλής απόσταξης ύδατος (Aquatron, A4D, BIBBY Scientific Ltd., UK)
- Φυγόκεντρος PrO-Research (Centurion, Sci., West Sussex, UK)
- Λουτρό υπερήχων Emmi-D30 (Emag, Germany)
- Θερμαινόμενη πλάκα-αναδευτήρας
- Γεννήτρια αζώτου Micro Nitrogen Generator (Claind S.r.l., Lenno, Italy)
- Αυτόκλειστο (Autoclave) Parr με Teflon
- Φούρνος
- Συσκευή λυοφιλίωσης με αντλία κενού Alpha 1-4 LD (Christ, Germany)
- Υδατόλουτρο (Brookfield TC-200 Constant Temperature Bath water recirculator circulating) (AMETEK Brookfield, America)
- Κλίβανος με παροχή διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) (Forma direct heat CO₂ incubator) (Thermo Electron Corporation, America)
- Πλάκα Neubauer
- Απαγωγός με ομαλή, αδιάκοπη, βελτιωμένη ροή, αποστειρωμένου αέρα, που έχει φιλτραριστεί (Distributor of EUROCLONE Fume Hood) (EUROCLONE, Italy)
- Μικροσκόπιο (Olympus BX43) (Lumenera, Canada)
- Φασματοφωτόμετρο UV-VIS Shimadzu UV-2100 με κυψελίδα από quartz οπτικής διαδρομής 10 mm
- Φασματοφωτόμετρο ATR-FTIR Perkin Elmer (MA, USA)
- Φθορισμόμετρο FS5 Edinburgh (Livingston, UK)
- Nano Zetasizer (Nano ZS, Malvern, Herrenberg) με τεχνολογία δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) για τον προσδιορισμό της υδροδυναμικής διαμέτρου και τη μέτρηση του ζ-δυναμικού.
- Φασματομέτρο NMR Brüker AV-500 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) εξοπλισμένο με κρυοκαθετήρα TXI

2.4 Πειραματικές πορείες

2.4.1 Συνθέσεις νανοκουκκίδων άνθρακα

- Σύνθεση N,P-doped CNDs: Ζυγίστηκαν 0,3 g κιτρικού οξέος και 0,754 g δισόξινου φωσφορικού αμμωνίου σε ποτήρι ζέσεως και διαλυτοποιήθηκαν σε λουτρό υπερήχων σε 20 mL DDW. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε αυτόκλειστο Teflon και παράμεινε στο φούρνο για 8 h, σε θερμοκρασία 180 °C.
- Σύνθεση N,B-doped CNDs: Ζυγίστηκαν 0,2 g κιτρικού οξέος, 0,2 g ουρίας και 0,2 g βορικού οξέος σε ποτήρι ζέσεως. Έγινε διαλυτοποίηση σε 10 mL DDW σε λουτρό υπερήχων και μεταφορά του διαλύματος σε αυτοκλειστο Teflon. Η οβίδα τοποθετήθηκε στο φούρνο για 8 h σε θερμοκρασία 180 °C.
- Σύνθεση non-doped CNDs, N-doped CNDs και N,S-doped CNDs: Για τη σύνθεση των νανοκουκκίδων ακολουθήθηκε πειραματική πορεία με βάση προηγούμενη μελέτη [113].

Σε κάθε μία από τις συνθέσεις, η οβίδα αφέθηκε να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου με φυσικό τρόπο. Στη συνέχεια, το παχύρευστο υγρό που προέκυψε, συλλέχθηκε με διαλυτοποίηση σε μικρή ποσότητα DDW. Ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη μέσω λυοφιλίωσης. Τα εναπομείναντα στερεά αποθηκευτήκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, απουσία φωτός.

2.4.2 Χαρακτηρισμός της δομής

2.4.2.1 Φασματοσκοπία UV – Vis

Έπειτα από κατάλληλη αραιώση των διαλυμάτων CNDs έγινε λήψη των φασμάτων σε κυψελίδα quartz οπτικής διαδρομής 1 cm χωρητικότητας 1 mL. Τα φάσματα ελήφθησαν στην περιοχή UV - Vis, σε θερμοκρασία δωματίου με φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV – 2100.

2.4.2.2 Φασματοσκοπία IR (FTIR)

Ελήφθησαν φάσματα από το στερεό δείγμα των CNDs. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο ATR-FTIR SPECTRUM TWO, Perkin Elmer, σε θερμοκρασία δωματίου, στην περιοχή από 4000 cm⁻¹ έως 400 cm⁻¹.

2.4.2.3 Φασματοφθορισμομετρία

Χρησιμοποιήθηκαν υδατικά διαλύματα νανοκουκκίδων και καταγράφηκαν τα φάσματα εκπομπής φθορισμού στο φθορισμόμετρο σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης. Οι μετρήσεις έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση στο φασματοφθορισμόμετρο FS5 Edinburgh, με κυψελίδα quartz, οπτικής διαδρομής 1 cm.

2.4.2.4 Μέτρηση ζ-δυναμικού

Η μέτρηση του ζ-δυναμικού των νανοκουκκίδων έγινε με χρήση κατάλληλης κυψελίδας, στους 25 °C από το όργανο μέτρησης του υδροδυναμικού μεγέθους (τεχνική Δυναμικής Σκέδασης του Φωτός-DLS).

2.4.3 Εκτίμηση αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων

2.4.3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH[•]

Διάλυμα DPPH[•] παρασκευαζόταν καθημερινά και αποθηκευόταν απουσία φωτός. Ακολούθησε η παρασκευή των διαλυμάτων των εξεταζόμενων CNDs σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 3 mL. Αναλυτικότερα, σε υάλινο φιαλίδιο αναμίχθηκαν 2,34 mL διαλύματος DPPH[•] με 0,66 mL μεθανολικού διαλύματος των εκάστοτε νανοκουκκίδων. Το μίγμα αναδεύτηκε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και η απορρόφηση του μετρήθηκε στα 515 nm. Διάλυμα που παρασκευάστηκε υπό τις ίδιες συνθήκες, με DPPH[•] και μεθανόλη χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα ελέγχου. Τυφλά δείγματα, παρασκευάστηκαν αντίστοιχα με ανάμιξη μεθανόλης και διαλύματος νανοκουκκίδων [114]. Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης DPPH[•] (%) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

$$\% DPPH \cdot = \frac{A_{\text{ελέγχου}} - A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{ελέγχου}}} \times 100$$

όπου A η απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος.

2.4.3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με το H₂O₂

Διάλυμα H₂O₂ παρασκευαζόταν καθημερινά και αποθηκευόταν απουσία φωτός. Ομοίως με τη προηγούμενη δοκιμασία, παρασκευάστηκαν διαλύματα CNDs διαφορετικών συγκεντρώσεων. Εδώ, ο συνολικός όγκος της αντίδρασης ήταν 4 mL. Πιο συγκεκριμένα, σε υάλινο φιαλίδιο αναμίχθηκαν 0,30 mL διαλύματος εναμμώνιου θεικού σιδήρου με 1,5 mL μεθανολικού διαλύματος των υπό εξέταση νανοκουκκίδων. Ακολούθησε περιδίνηση σε vortex, προσθήκη 70 μL υπεροξειδίου του υδρογόνου και ξανά περιδίνηση. Το μίγμα αφέθηκε στο σκοτάδι για 5 min και στη συνέχεια προστέθηκαν 1,5 mL 1,10 φαινανθρολίνης. Πραγματοποιήθηκε περιοδική ανακίνηση (με vortex) για 10 min και η απορρόφηση του διαλύματος μετρήθηκε στα 510 nm. Το δείγμα ελέγχου περιείχε εναμμώνιο θεικού σιδήρου και 1,10-φαινανθρολίνη σε μεθανόλη και τα τυφλά δείγματα διάλυμα CNDs σε μεθανόλη. Ο υπολογισμός της ικανότητας δέσμευσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο τύπο:

$$\% H_2O_2 = \frac{A_{\text{δείγματος}}}{A_{\text{ελέγχου}}} \times 100$$

όπου A η απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος.

2.4.4 Κυτταρικές καλλιέργειες

Και οι δύο κυτταρικές σειρές (HaCaT και HEK-293) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη, που περιείχε 1% αντιβιοτικά (πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη), 1% L-γλουταμίνη και 10% βόειο ορό για 24 h. Διατηρήθηκαν μέσα σε ειδικό επωαστήρα σε θερμοκρασία 37 °C και με παροχή 5% CO₂. Οι ανακαλλιέργειες πραγματοποιούνταν κάθε 2-3 μέρες σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία:

- Ανακαλλιέργεια: Απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο Petri και έγινε διπλή έκπλυση με 3 mL PBS (μονή για τα κύτταρα HEK-293). Έπειτα προστέθηκε 1 mL θρυψίνης (και 1 mL PBS για τα κύτταρα HEK-293), ακολούθησε επώαση και ανακίνηση μέχρις ότου γίνει πλήρης αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα. Προστέθηκαν 2 mL θρεπτικού υλικού και το συνολικό διάλυμα (θρεπτικό υλικό-κύτταρα-θρυψίνη) μεταφέρθηκε σε σωλήνα Falcon για φυγοκέντριση (2 min 1400 rpm). Αποχύθηκε το υπερκείμενο και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν (σε μορφή δισκίου) με 5 mL θρεπτικό υλικό. Για την ανακαλλιέργεια, 1 mL μεταφέρθηκε σε νέο τρυβλίο και προστέθηκαν 15 mL θρεπτικού υλικού.
- Μέτρηση κυττάρων: Αντίστοιχα, από το διάλυμα κυττάρων σε 5 mL θρεπτικού υλικού που προέκυψε προηγουμένως, 60 μL μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο Eppendorf που περιείχε ήδη 60 μL χρωστική trypan blue. Έπειτα από επαναιώρηση και έντονη ανάδευση, 10 μL μεταφέρθηκαν σε πλάκα Neubauer και μετρήθηκαν μέσω αυτής. Για τα μετέπειτα πειράματα λήφθηκε κατάλληλη ποσότητα του διαλύματος ώστε να στρωθούν στα τρυβλία, παρέχοντας σε τελικό όγκο κάθε θέσης 300.000 κύτταρα.

2.4.5 Μέτρηση βιωσιμότητας κυττάρων

Σε τρυβλίο έξι θέσεων στρώθηκαν κύτταρα και αφέθηκαν να αναπτυχθούν στις συνθήκες που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα εκπλύθηκαν με PBS ώστε να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα και οι ακαθαρσίες. Προκειμένου να γίνει η μελέτη της βιωσιμότητας, προστέθηκε θρεπτικό υλικό και διάλυμα CNDs. Οι τελικές συγκεντρώσεις κυμαίνονταν μεταξύ 50-600 μg/mL, για τελικό όγκο

διαλύματος 2 mL σε κάθε θέση. Έπειτα από εικοσιτετράωρη έκθεση των κυττάρων στις CNDs, ακολούθησε πειραματική πορεία σύμφωνα με προηγούμενη εργασία [115]. Αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα εκπλύθηκαν με PBS. Προστέθηκε διάλυμα χρωστικής crystal violet και επώαστηκαν για 30 min. Μέσω βύθισης του τρυβλίου σε απεσταγμένο ύδωρ, τα κύτταρα εκπλύθηκαν, αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και προστέθηκε διαλύτης διαλυτοποίησης (μεθανόλη) σε τέτοια ποσότητα ώστε να παραληφθεί όλη η χρωστική. Τέλος η μέτρηση της απορρόφησης έγινε στα 295 nm σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis.

Η μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων υπολογίστηκε μέσω της σχέσης:

$$\% \text{Βιωσιμότητα} = \frac{A_{M, \text{Οδειγμάτων}}}{A_{M, \text{Οcontrol}}} \times 100$$

όπου A = απορρόφηση.

2.4.6 Μεταβολομική μελέτη

Στην έκθεση των κυττάρων σε CNDs για τη μεταβολομική μελέτη, ακολουθήθηκαν ίδια βήματα με τελικές συγκεντρώσεις 200 μg/mL σε κάθε θέση του τρυβλίου. Έπειτα από την εικοσιτετράωρη έκθεση στον παράγοντα, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο από κάθε πηγάδι και τα κύτταρα εκπλύθηκαν με PBS. Προστέθηκαν 200 μL θρυψίνης, 1 mL PBS και αφού τα κύτταρα αφέθηκαν να επωαστούν για 2 έως 5 min προστέθηκε 1 mL θρεπτικού υλικού σε κάθε πηγάδι. Φυγοκεντρήθηκαν σε 14000 rpm για 5 min και το υπερκείμενο αποχύθηκε. Προστέθηκαν 1-2 mL PBS, επαναιωρήθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν ξανά στις ίδιες συνθήκες. Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε δύο επιπλέον φορές. Τέλος, το δισκίο κυττάρων αποθηκεύτηκε σε υγρό άζωτο και μετέπειτα στους -80°C έως την εκχύλιση των μεταβολιτών.

Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε στείρες συνθήκες μέσα σε απαγωγό με ομαλή, αδιάκοπη ροή αποστειρωμένου αέρα που φιλτράρεται. Το PBS που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αποστειρώθηκε για 20 min στους 121 °C και σε πίεση 2 bar. Σε κάθε περίπτωση (μέτρηση βιωσιμότητας και μεταβολομική μελέτη) παρασκευάστηκαν τρία ίδια δείγματα ώστε να διασφαλιστεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

2.4.7 Εκχύλιση των μεταβολιτών

Για την εκχύλιση των μεταβολιτών αρχικά το δισκίο κυττάρων φυγοκεντρήθηκε για 5 min στις 5000 rpm και στη συνέχεια απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Προστέθηκαν 0,5 mL ψυχρής μεθανόλης και ακολούθησε ακαριαία ψύξη σε υγρό άζωτο και απόψυξη σε θερμοκρασία δωματίου (flash freeze thaw). Το βήμα επαναλήφθηκε άλλες 2 φορές και έπειτα έγινε περιδίνηση και επαναιώρηση σε συσκευή vortex. Ακολούθησε φυγοκέντρωση υπό τις ίδιες συνθήκες και το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε φιαλίδιο Eppendorf. Στο εναπομείναν δισκίο προστέθηκαν 0,5 mL ψυχρής μεθανόλης, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν μέσω vortex και φυγοκεντρήθηκαν ξανά. Το υπερκείμενο που προέκυψε συλλέχθηκε και ενώθηκε με το προηγούμενο. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλη μια φορά με στόχο τη συλλογή του τρίτου υπερκειμένου, την μετέπειτα ανάμιξη των τριών και την εξάτμιση του τελικού συνόλου μέχρι ξηρού σε ομαλή ροή ρεύματος αζώτου.

2.4.8 Λήψη φασμάτων ¹H-NMR

Για τη λήψη φασμάτων NMR, τα δείγματα αποψύχτηκαν και στο καθένα προστέθηκε 600 μl δευτεριωμένου ύδατος (D₂O). Το διάλυμα αναδεύτηκε σε vortex και μεταφέρθηκε σε υάλινο σωλήνα NMR 5 mm όπου προστέθηκαν και 3 μL TSP ως ένωση αναφοράς. Το σύστημα ελεγχόταν από λογισμικό TopSpin 4.0.7. Όλα τα φάσματα λήφθηκαν με τις εξής πειραματικές συνθήκες:

- Καταγραφή φασμάτων στους 298 K.
- Χρόνος ανάκτησης: 2,339 sec.
- Χρόνος ηρεμίας: 6,50 msec.
- Σημεία δεδομένων: 32 K.
- Μήκος παλμού: 90°.
- Αριθμός σαρώσεων: 512.

2.4.9 Ανάλυση δεδομένων

Ο έλεγχος και η επεξεργασία των φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό TopSpin 4.0.7. της εταιρίας Bruker. Η φάση και η γραμμή της βάσης διορθώθηκαν χειροκίνητα μετά από το μετασχηματισμό Fourier των αποτελεσμάτων. Τα δεδομένα αναλύθηκαν στη βάση δεδομένων της Human Metabolome Database (HMDB), όπου οι κορυφές «μεταφράστηκαν» στους αντίστοιχους μεταβολίτες. Πιο συγκεκριμένα στη βάση δεδομένων τοποθετήθηκαν οι κορυφές (ppm) των φασμάτων NMR και ρυθμίστηκε το εύρος ανοχής (Peak Tolerance) στο $\pm 0,01$. Στη συνέχεια, οι ταυτοποιημένοι μεταβολίτες

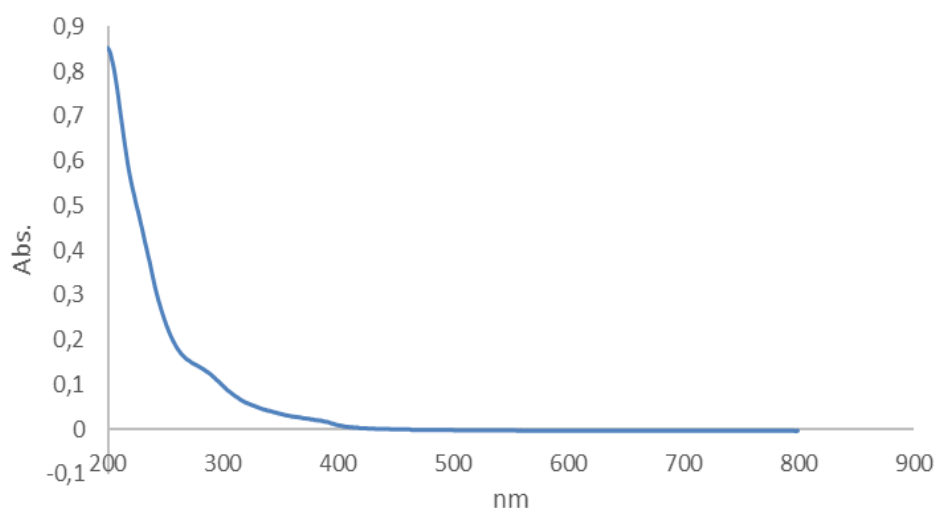
εισήχθησαν στο εργαλείο «pathway analysis» της βάσης δεδομένων MetaboAnalyst 5.0 και με χρήση της βιβλιοθήκης: Homo Sapiens (KEGG) λήφθηκαν τα μεταβολομικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν οι μεταβολίτες των κυττάρων HaCaT και HEK-293.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

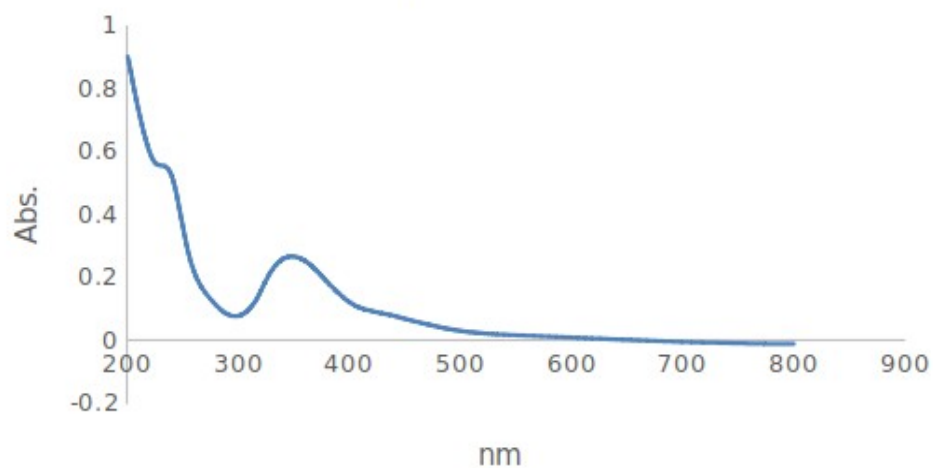
3.1 Χαρακτηρισμός CNDS

3.1.1 Φασματοσκοπία UV-Vis

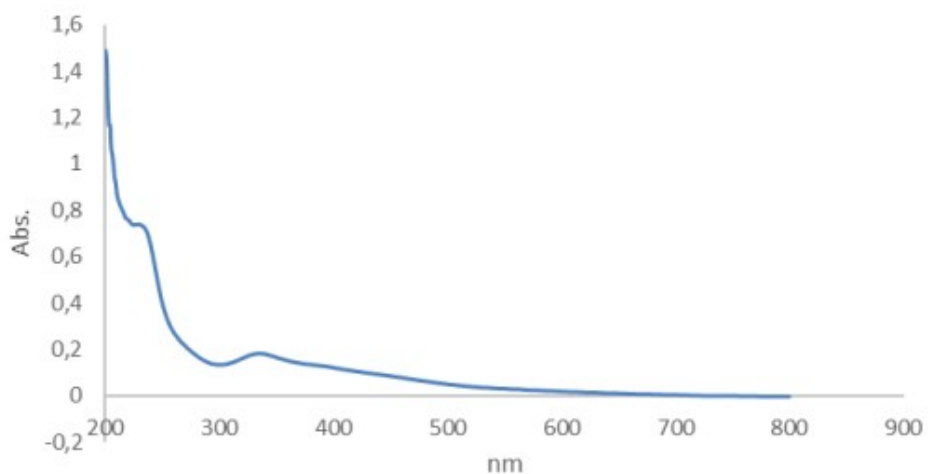
Τα φάσματα UV-Vis που ελήφθησαν για τις non-doped, N-doped, N,S-doped, N,P-doped και N,B-doped CNDS παρουσιάζονται στις **Εικόνες 9 -13** αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις εμφανίζεται μία κορυφή περίπου στα 240 nm που είναι χαρακτηριστική για τις π - π^* μεταπτώσεις των δεσμών C=C στις νανοκουκκίδες. Η μετάπτωση ηλεκτρονίων που είναι γνωστή ως π - π^* (από 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 μία κορυφή στα 340 nm περίπου. Σύμφωνα με τον Reckmeier et. al., η κορυφή αυτή αντιστοιχεί στις n - π^* μεταπτώσεις που προκύπτουν από τις άκρες που σχηματίζονται στα όρια των sp^2 και sp^3 υβριδισμένων ανθράκων. Πρόκειται για μεταπτώσεις δεσμού C=O, αποδεικνύοντας την ύπαρξη καρβοξυλομάδων. 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^* .



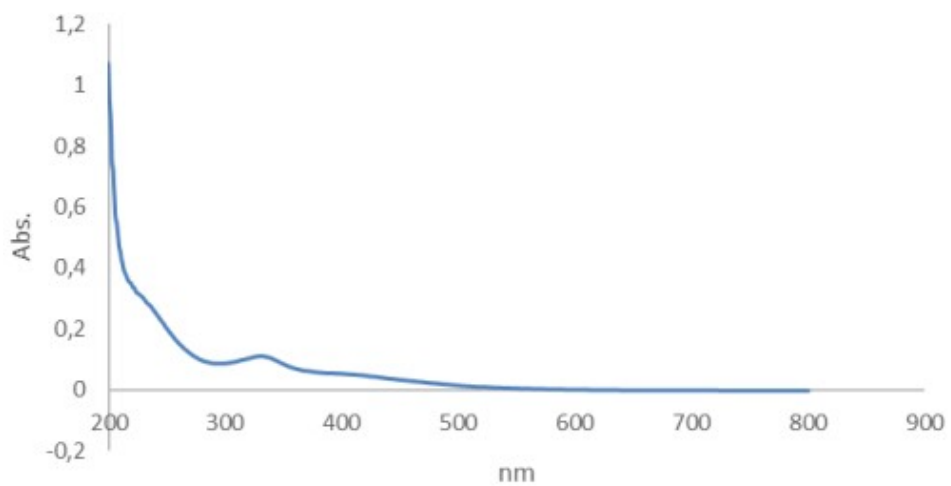
Εικόνα 9: Φάσμα UV-Vis υδατικού διαλύματος των non-doped CNDS.



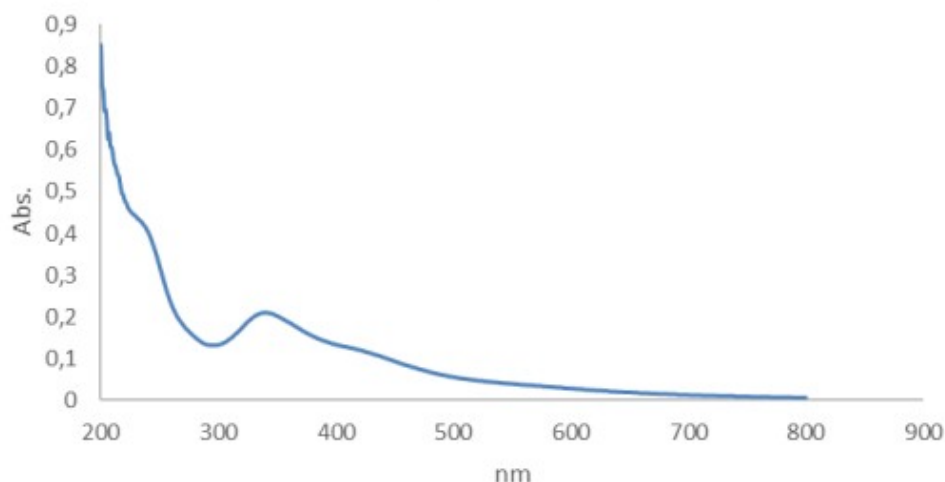
Εικόνα 10: Φάσμα UV-Vis υδατικού διαλύματος των *N-doped CNDs*.



Εικόνα 11: Φάσμα UV-Vis υδατικού διαλύματος των *N,S-doped CNDs*.



Εικόνα 12: Φάσμα UV-Vis υδατικού διαλύματος των *N,P-doped CNDs*.



Εικόνα 13: Φάσμα UV-Vis υδατικού διαλύματος των *N,B-doped CNDs*.

3.1.2 Φασματοσκοπία FT-IR

Φάσματα FTIR ελήφθησαν για κάθε υλικό με στόχο τη εξαγωγή περαιτέρω συμπερασμάτων για τις λειτουργικές ομάδες καθώς και για την ποιοτική σύσταση των συντιθέμενων νανοκουκκίδων. Στις **Εικόνα 14 -18** παρουσιάζονται τα δεδομένα.

Non-doped CNDs

Το φάσμα περιλαμβάνει μία κορυφή στα 3180 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού O-H ή δόνηση τάσης δεσμού C-H , καθώς και μία κορυφή στα 2987 cm^{-1} που επίσης αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού C-H . Επιπλέον εμφανίζονται οι εξής κορυφές ή ταινίες στα:

- 1701 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού C=O
- 1400 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση κάμψης του δεσμού O-H
- 1177 cm^{-1} που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού C-O
- 892 cm^{-1} που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού C=C- ή σε δόνηση κάμψης του δεσμού C-H
- 784 cm^{-1} και 730 cm^{-1} που αντιστοιχούν επίσης σε δόνηση κάμψης του δεσμού C-H

N-doped CNDs

Η πρώτη κορυφή επισημαίνεται 3053 cm^{-1} που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού C-H . Στη συνέχεια εμφανίζονται οι ακόλουθες κορυφές ή ταινίες στα:

- 1585 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση τάσης του διπλού δεσμού C=C-
- 1455 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση κάμψης του δεσμού C-H
- 1347 cm^{-1} που αντιστοιχεί σε δόνηση κάμψης του δεσμού O-H

- 1267 cm^{-1} που οφείλεται είτε σε δόνηση τάσης του δεσμού C-O , είτε σε δόνηση τάσης του δεσμού C-N
- 1190 cm^{-1} που οφείλεται επίσης είτε σε δόνηση τάσης του δεσμού C-O , είτε σε δόνηση τάσης του δεσμού C-N
- 988 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση κάμψης του δεσμού C=C-
- 769 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση κάμψης του δεσμού C-H
- 727 cm^{-1} που αντιστοιχεί επίσης σε δόνηση κάμψης του δεσμού C-H

N,S-doped CNDs

Στο φάσμα εμφανίζεται μια κορυφή στα 3376 cm^{-1} που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού N-H , καθώς και στα 3156 cm^{-1} που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού O-H . Επιπλέον η κορυφή στα 3022 cm^{-1} οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού C-H . Στη συνέχεια υπάρχουν οι εξής κορυφές ή ταινίες στα:

- 2061 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού N=C=S
- 1656 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού C=N ή σε δόνηση τάσης του δεσμού C=C-
- 1594 cm^{-1} οφείλεται σε δόνηση κάμψης του δεσμού N-H
- 1563 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του διπλού δεσμού C=C
- 1382 cm^{-1} οφείλεται σε δόνηση σε δόνηση κάμψης του δεσμού C-H ή σε δόνηση τάσης του δεσμού S=O
- 1183 cm^{-1} οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού S=O ή σε δόνηση τάσης του δεσμού C-N
- 1089 cm^{-1} εμφανίζεται η κορυφή που οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού C-N
- 724 cm^{-1} η κορυφή που αντιστοιχεί σε δόνηση κάμψης του δεσμού C-H

N,B-doped CNDs

Παρουσιάζεται μια κορυφή στα 3202 cm^{-1} που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού O-H . Επιπλέον εμφανίζονται οι εξής κορυφές ή ταινίες

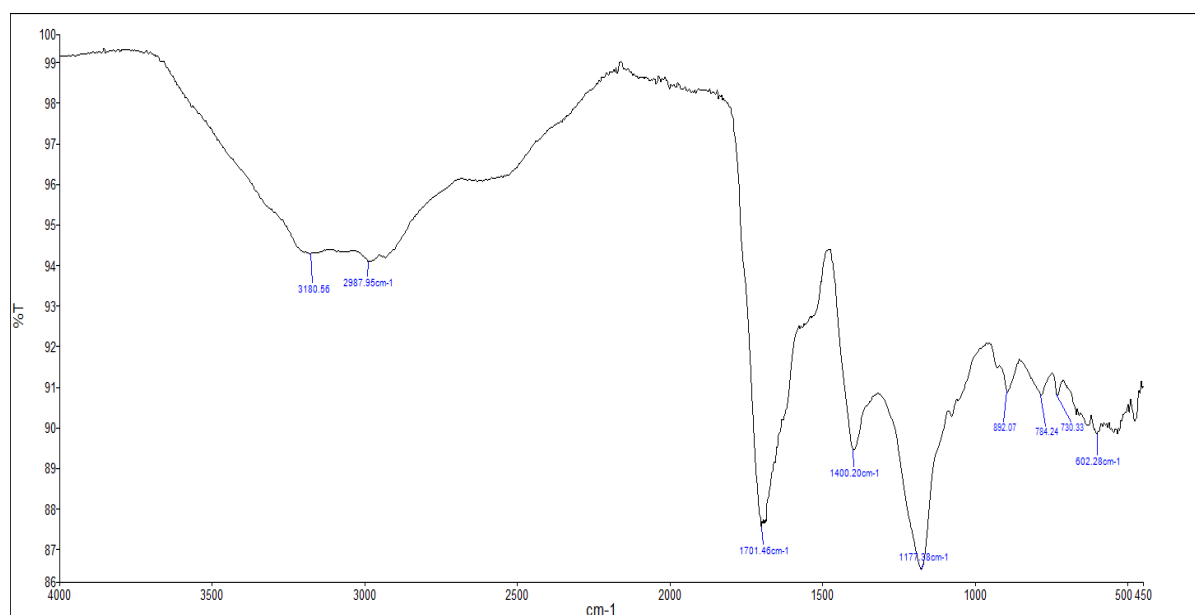
- 2261 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού N=C=O
- 1597 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση κάμψης του δεσμού N-H
- 1435 cm^{-1} που αντιστοιχεί είτε σε δόνηση κάμψης του δεσμού O-H
- 1410 cm^{-1} που αντιστοιχεί ασύμμετρη δόνηση κάμψης του δεσμού B-O
- 1195 cm^{-1} που αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του δεσμού C-O και στη δόνηση κάμψης του δεσμού B-O-H
- 1101 cm^{-1} που οφείλεται στη δόνηση τάσης του δεσμού B-C

- 1025 cm^{-1} που οφείλεται είτε στη δόνηση τάσης του δεσμού C-N , είτε σε δόνηση παραμόρφωσης του δεσμού B-O-H
- 924 cm^{-1} που οφείλεται στη δόνηση κάμψης του δεσμού C=C-
- 883 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση κάμψης του δεσμού C=C- είτε σε δόνηση κάμψης του δεσμού C-H
- 730 cm^{-1} που αντιστοιχεί σε δόνηση κάμψης του δεσμού C-H

N,P-doped CNDs

Σε αυτό το φάσμα εμφανίζεται μια κορυφή στα 3218 cm^{-1} που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού O-H , καθώς επίσης και μια κορυφή στα 3008 cm^{-1} που οφείλεται στη δόνηση τάσης του δεσμού C-H . Επιπλέον εμφανίζονται κορυφές ή ταινίες στα:

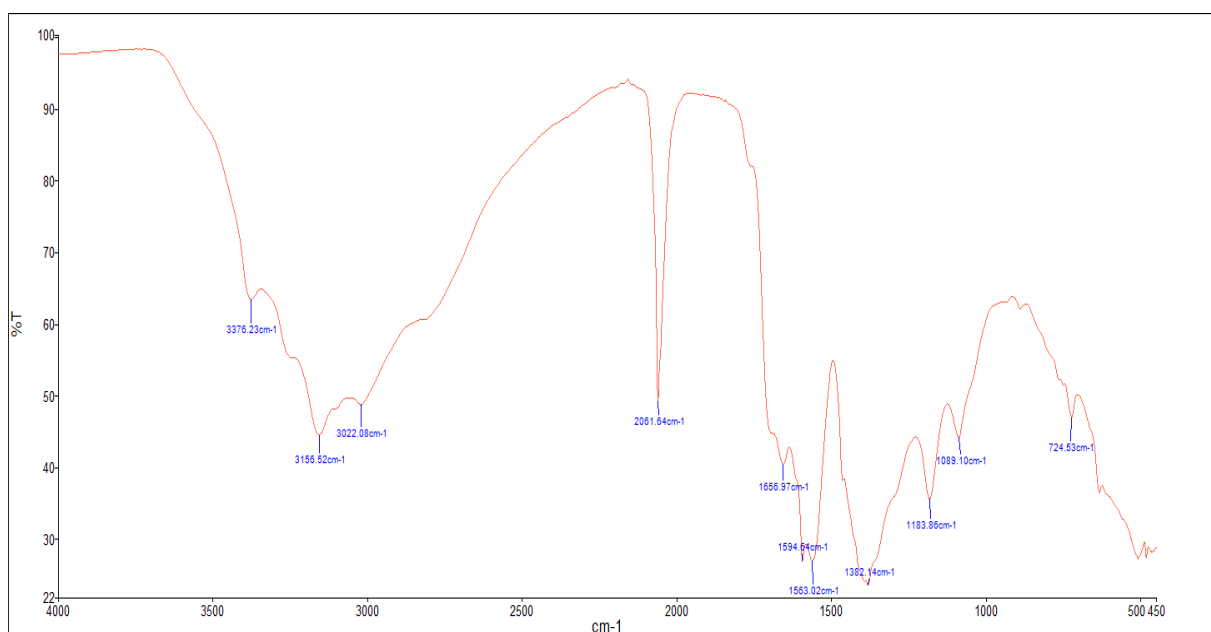
- 2325 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση τάσης
- 1693 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού C=O
- 1435 cm^{-1} και 1403 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση κάμψης του δεσμού O-H
- 1264 cm^{-1} που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού C-O
- 1180 cm^{-1} που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης του δεσμού P-O
- 1078 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση τάσης του δεσμού C-N και σε δόνηση τάσης του δεσμού P-O
- 848 cm^{-1} που οφείλεται σε δόνηση κάμψης του δεσμού C=C- είτε σε δόνηση κάμψης του δεσμού C-H



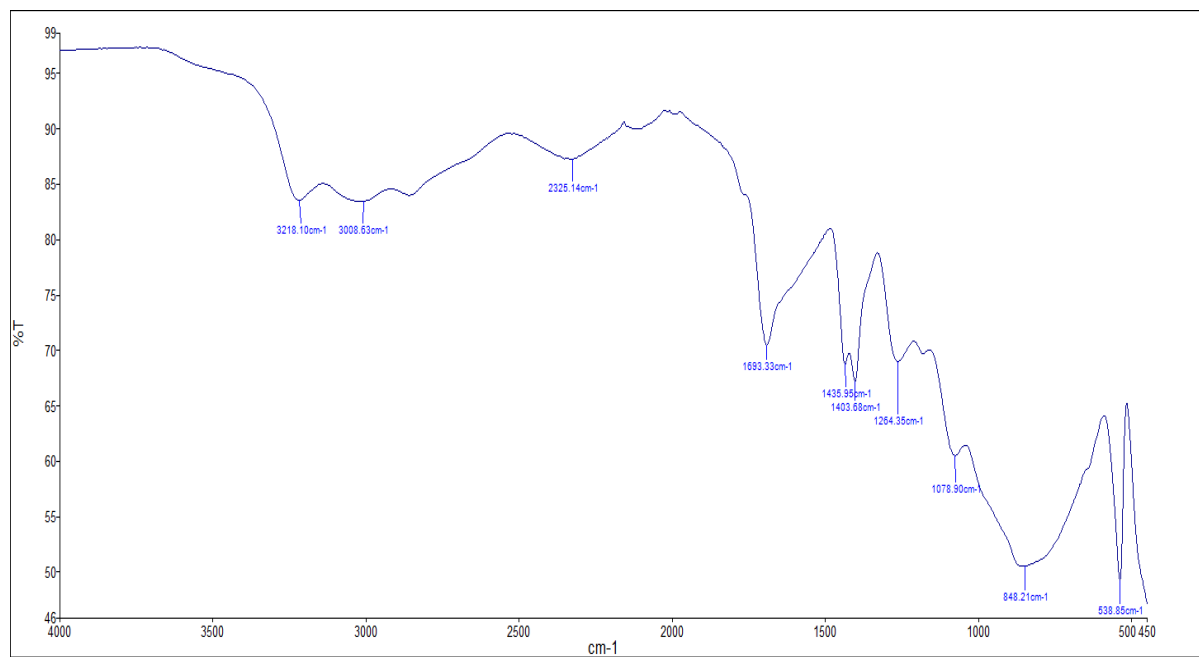
Εικόνα 14: Φάσμα FT-IR των non-doped CNDs.



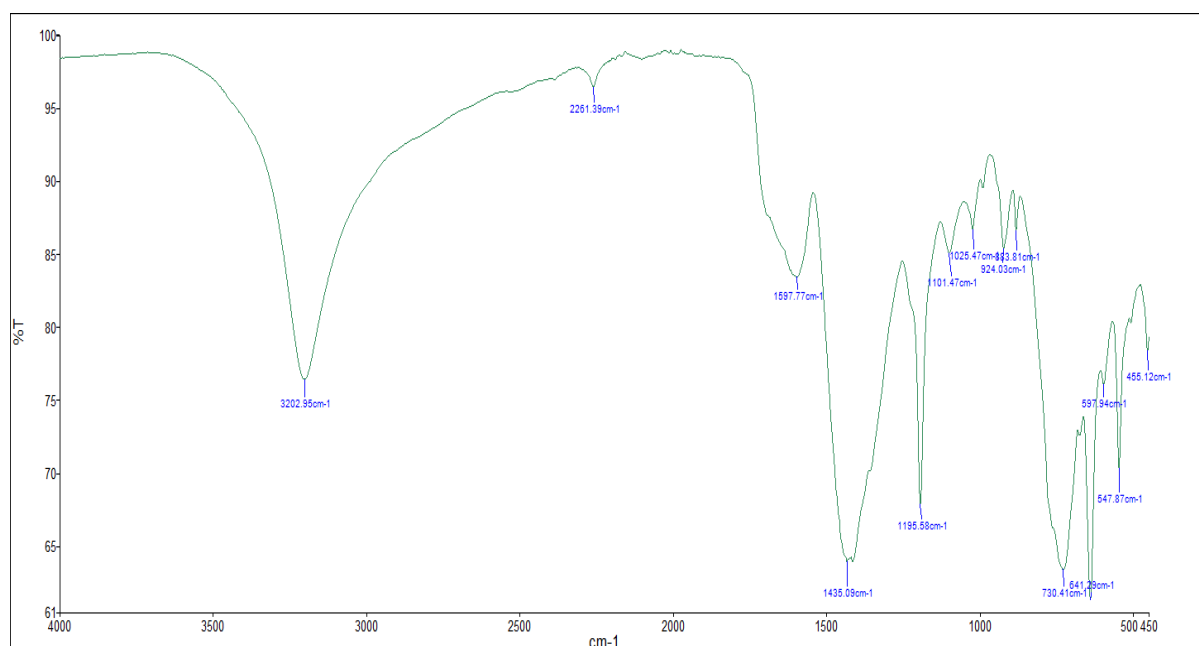
Εικόνα 15: Φάσμα FT-IR των N-doped CNDs.



Εικόνα 16: Φάσμα FT-IR των N,S-doped CNDs.



Εικόνα 17: Φάσμα FT-IR των N,P-doped CNDs.

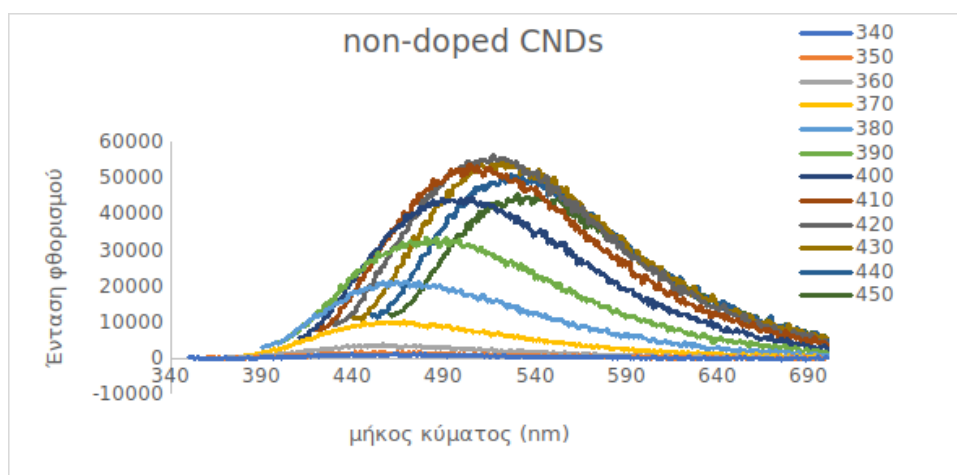


Εικόνα 18: Φάσμα FT-IR των N,B-doped CNDs.

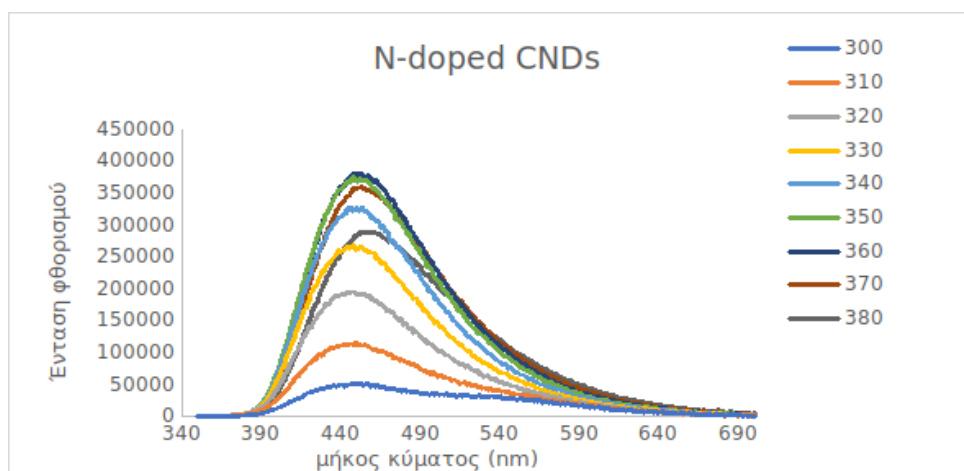
3.1.3 Φθορισμομετρική μελέτη

Στις **Εικόνες 19-23** απεικονίζονται τα φάσματα εκπομπής του φθορισμού των non-doped, N-doped, N,S- doped, N,P-doped και N,B-doped CNDs, για διάφορα μήκη κύματος διέγερσης στην περιοχή 310-800 nm. Παρατηρείται ότι σε όλες τις περιπτώσεις ο εκπεμπόμενος φθορισμός είναι εξαρτώμενος από το μήκος κύματος διέγερσης. Συγκεκριμένα για τις non-doped CNDs η μέγιστη εκπομπή φθορισμού παρατηρείται στα

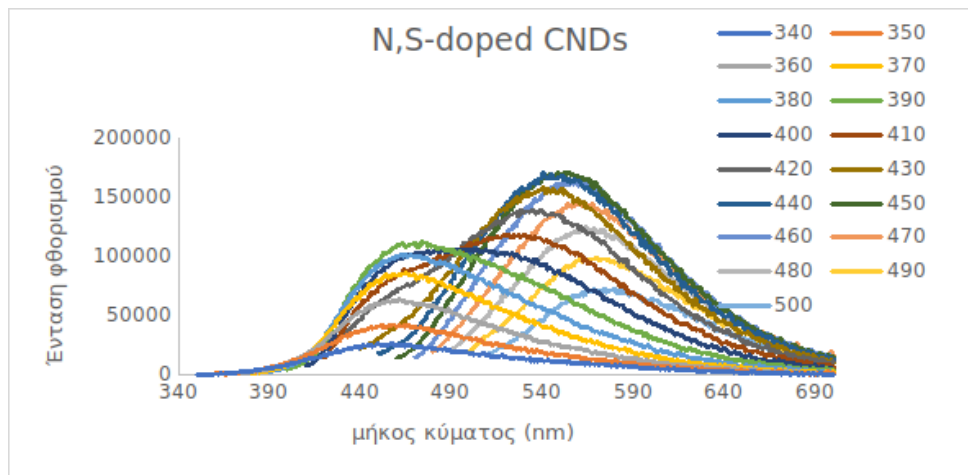
450 nm και επιτυγχάνεται με διέγερση στα 360 nm. Οι N-doped CNDs, εμφανίζουν μέγιστη εκπομπή φθορισμού στα 517 nm όταν η διέγερση είναι στα 420 nm. Στην περίπτωση των N,S-doped CNDs παρατηρείται η εμφάνιση δύο κορυφών. Ουσιαστικά, συμβαίνει μετατόπιση της πρώτης κορυφής σε μεγαλύτερα μήκη κύματος καθώς αυξάνεται το μήκος κύματος διέγερσης. Στην πρώτη κορυφή η μέγιστη εκπομπή φθορισμού παρατηρείται στα 470 nm με μήκος κύματος διέγερσης 390 nm, ενώ η δεύτερη κορυφή εμφανίζει μέγιστη εκπομπή φθορισμού στα 553 nm και επιτυγχάνεται με μήκος κύματος διέγερσης 450 nm. Οι N,B-doped CNDs εμφανίζουν μέγιστη κορυφή στα 440 nm σε μήκος κύματος διέγερσης 350 nm, ενώ στις N,P-doped επιτυγχάνεται στα 485 nm, με μήκος κύματος διέγερσης 390 nm.



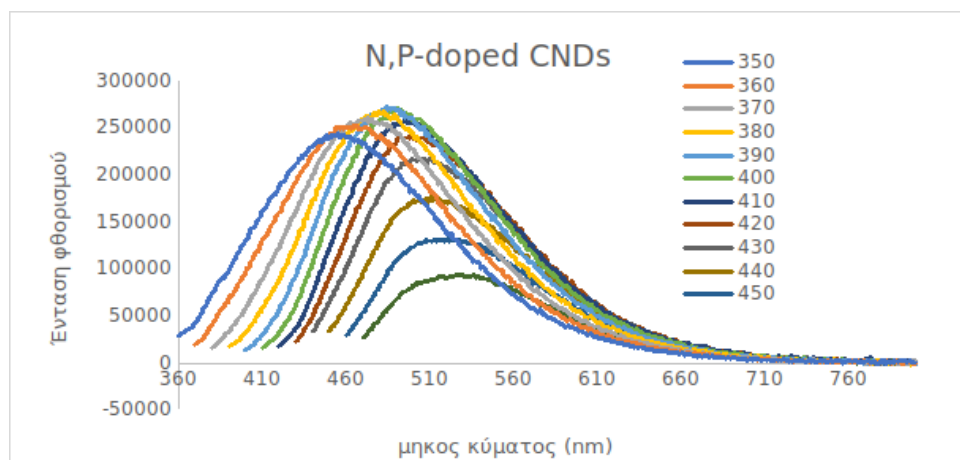
Εικόνα 19: Φάσματα εκπομπής φθορισμού των non-doped CNDs σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης.



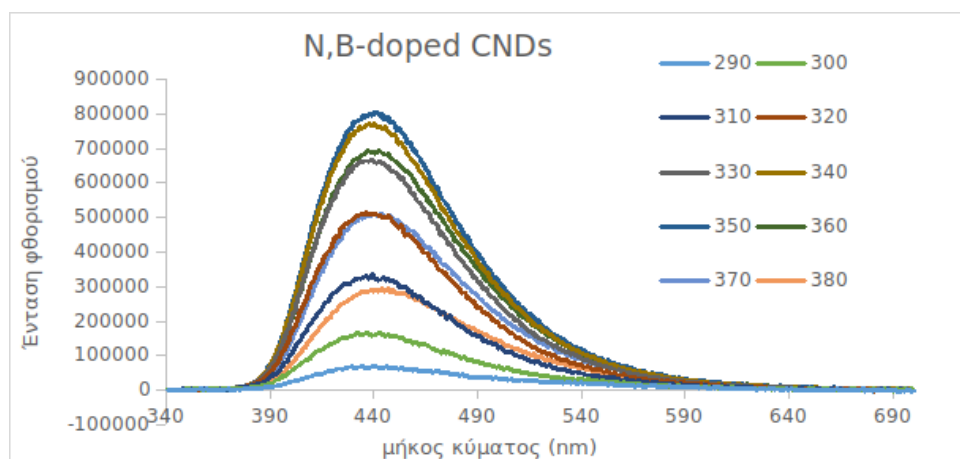
Εικόνα 20: Φάσματα εκπομπής φθορισμού των N-doped CNDs σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης.



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



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

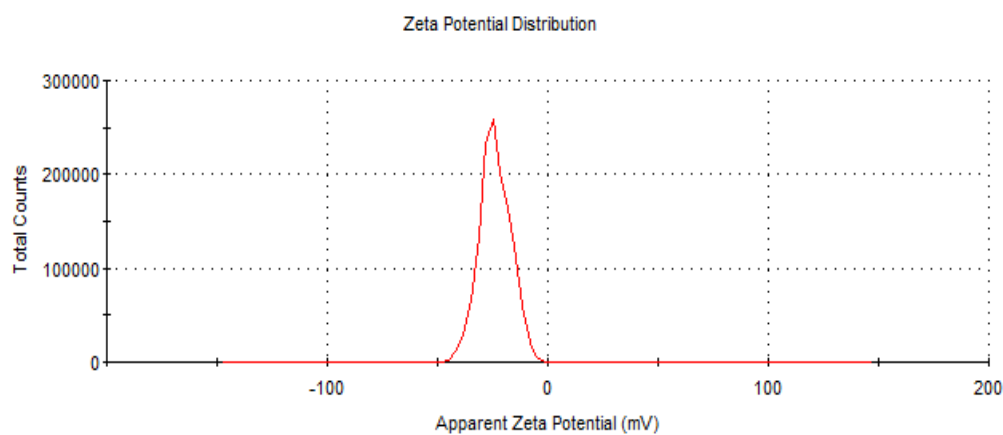


Εικόνα 23: Φάσματα εκπομπής φθορισμού των *N,B-doped CNDs* σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης.

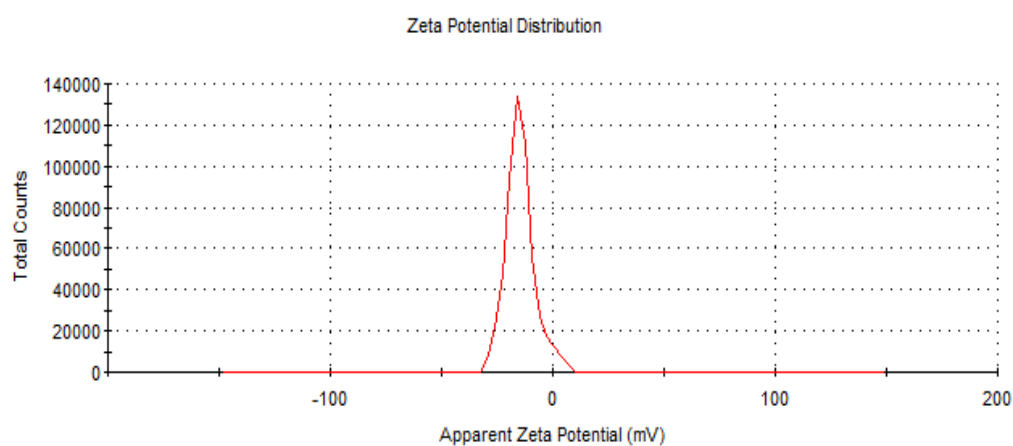
3.1.4 ζ-δυναμικό

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση του ζ δυναμικού (σε mV). Η τιμή αυτή, αποτελεί ένδειξη για την εκτίμηση της σταθερότητας των κολλοειδών διασπορών (υψηλότερη απόλυτη τιμή είναι

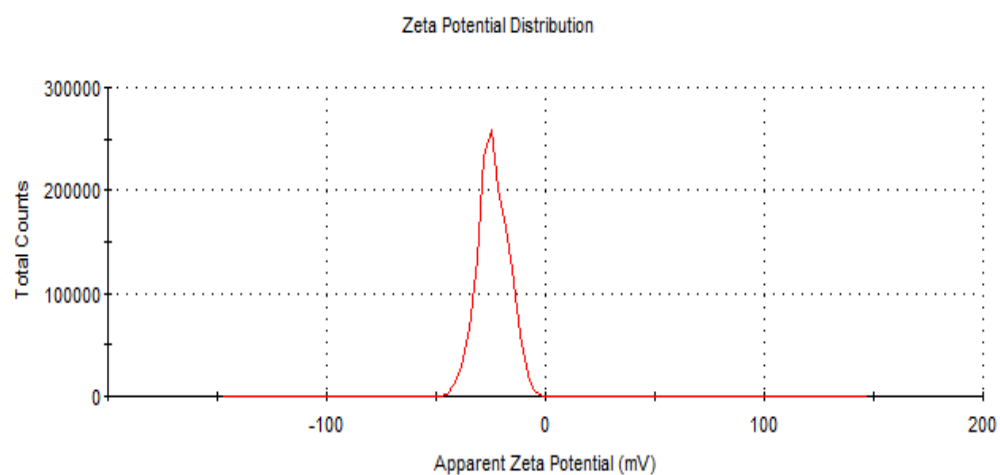
ένδειξη σταθερότητας) και βρέθηκε να είναι -15,6 mV, -24,8 mV, -23,9 mV, -14,5 mV και -23,0 mV για τις non-doped, N-doped, N,S-doped, N,P-doped, N,B-doped CNDs. Όπως φαίνεται στις **Εικόνες 24-28** όλα τα υλικά είναι αρνητικά φορτισμένα.



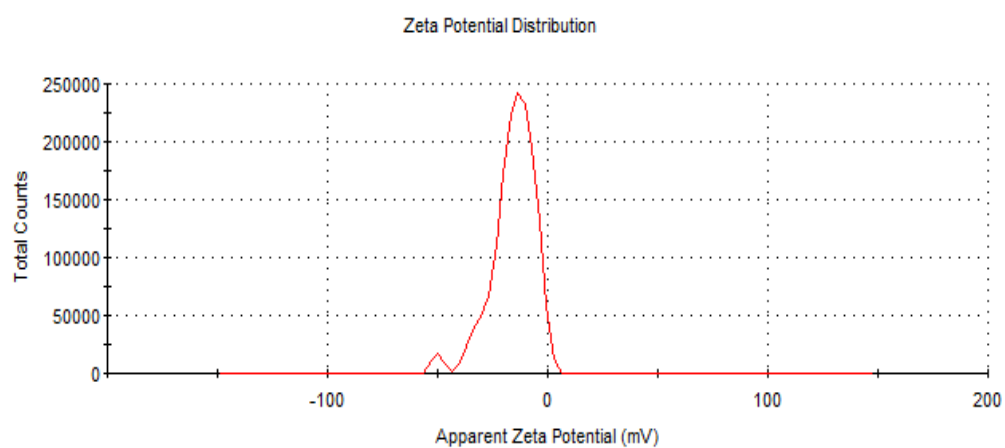
Εικόνα 24: Κατάνομη ζ-δυναμικού non-doped CNDs.



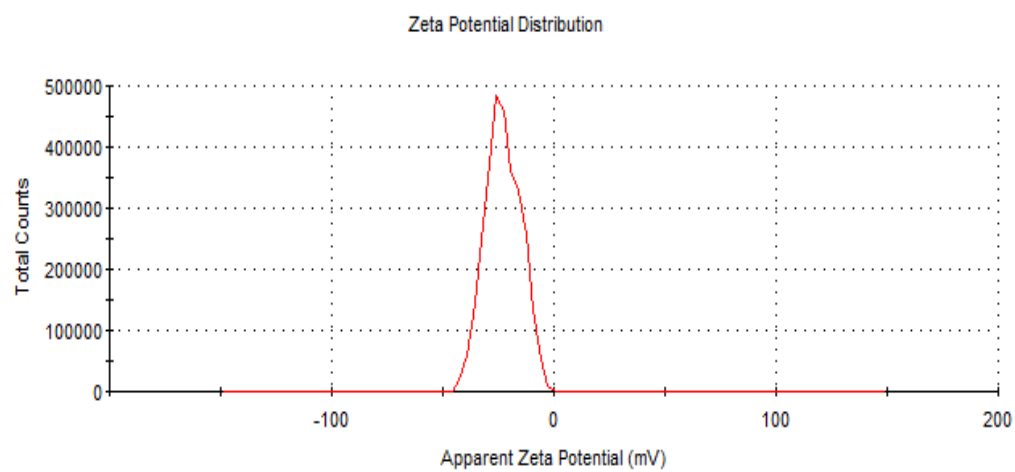
Εικόνα 25: Κατάνομη ζ-δυναμικού N-doped CNDs.



Εικόνα 26: Κατάνομη ζ-δυναμικού *N,S-doped CNDs*.



Εικόνα 27: Κατάνομη ζ-δυναμικού *N,P-doped CNDs*.

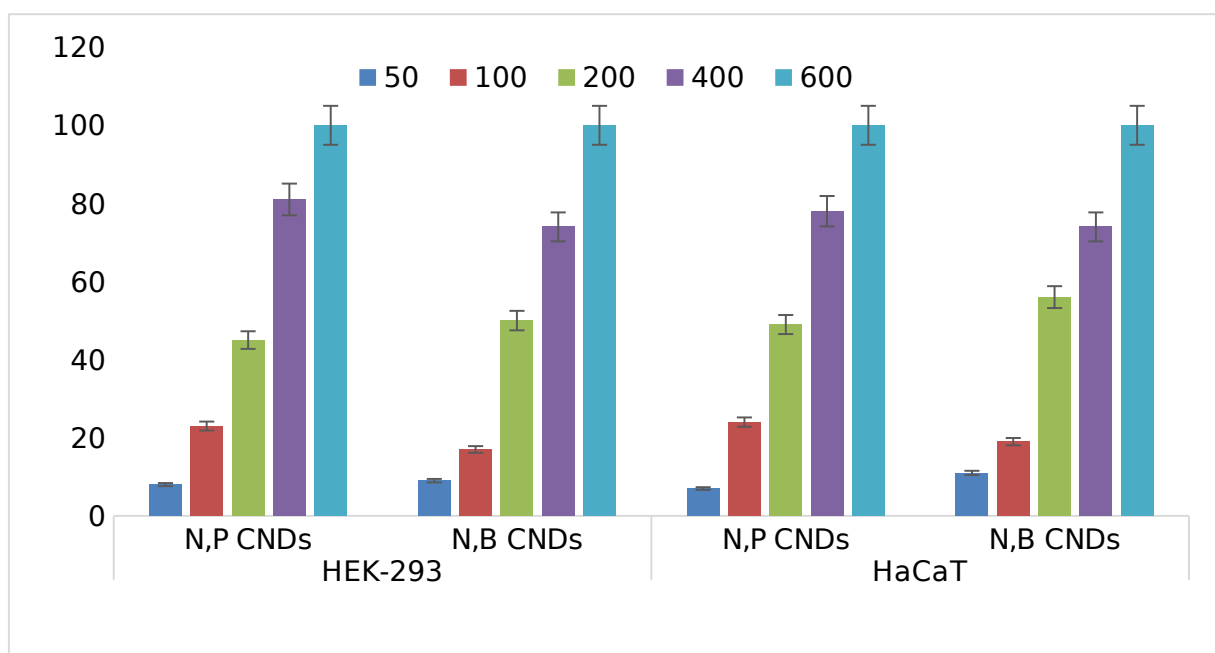


Εικόνα 28: Κατάνομη ζ-δυναμικού *N,B-doped CNDs*.

3.2 Τοξικότητα

Σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν, παρατηρήθηκε πως η τοξικότητα είναι δοσοεξαρτώμενη καθώς επίσης σημειώθηκε και επίδραση της τροποποίησης των νανοκουκκίδων από τα ετεροάτομα (doping). Συγκεκριμένα, παρουσιάστηκε αύξηση της τοξικότητας, με τις non-doped CNDs να είναι οι λιγότερο τοξικές, ακολουθούμενες από τις N-doped CNDs, τις N,S-doped CNDs και τέλος οι περισσότερο τοξικές από τα δοκιμασμένα υλικά που εν τέλει επιλέχθηκαν για την μελέτη, οι N,P- doped CNDs και N,B- doped CNDs. Στην τοξικολογία, η μέση θνησιγόνος δόση LD₅₀ (Median Lethal Dose 50%), LC₅₀ (Lethal Concentration 50%) ή LCt₅₀ (Lethal Concentration and Time) μιας τοξίνης, ακτινοβολίας ή παθογόνου ουσίας είναι η απαιτούμενη δόση για σκοτώσει τα μισά μέλη του ελεγχόμενου πληθυσμού. Αντιστοίχως, οι αριθμοί LD₂₀ και LD₈₀ αντιπροσωπεύουν την απαιτούμενη δόση για να θανατωθεί το 20% και το 80% του πληθυσμού. Ο αριθμός LD₅₀ χρησιμοποιείται, συχνά, ως ένας γενικός δείκτης οξείας τοξικότητας μιας ουσίας. Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή LD₅₀ τόσο πιο αυξημένη είναι η τοξικότητα.

Στην παρούσα εργασία, βρέθηκε πως οι τιμές LD₂₀, LD₅₀ και LD₈₀ για τις N,P-doped και N,B-doped CNDs που μελετήθηκαν ήταν 100 μg/mL, 200μg/mL και 400μg/mL. Αντίστοιχα, οι τιμές LD₅₀ για τις non-doped CNDs, N-doped CNDs, και N,S-doped CNDs ήταν 1300 μg/mL, 1100 μg/mL και 800 μg/mL, αντίστοιχα. Συνεπώς, από τις παραπάνω τιμές κρίθηκε ότι λόγω αυξημένης τοξικότητας, οι N,P-doped και N,B-doped CNDs παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον για να μελετηθούν μεταβολομικά. Τα δείγματα ελέγχου διατήρησαν τη βιωσιμότητά τους σε όλη τη διάρκεια των 24 ωρών. Για κάθε είδος νανοκουκκίδων πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις πειραμάτων με τα αποτελέσματα να εμφανίζονται ποιοτικά κάθε φορά ίδια.



Εικόνα 29: Διάγραμμα τοξικότητας κυτταρικών σειρών HaCaT και HEK-293 μετά την έκθεση σε N,P-doped CNDs και N,B-doped CNDs σε συγκεντρώσεις 50-600µg/mL.

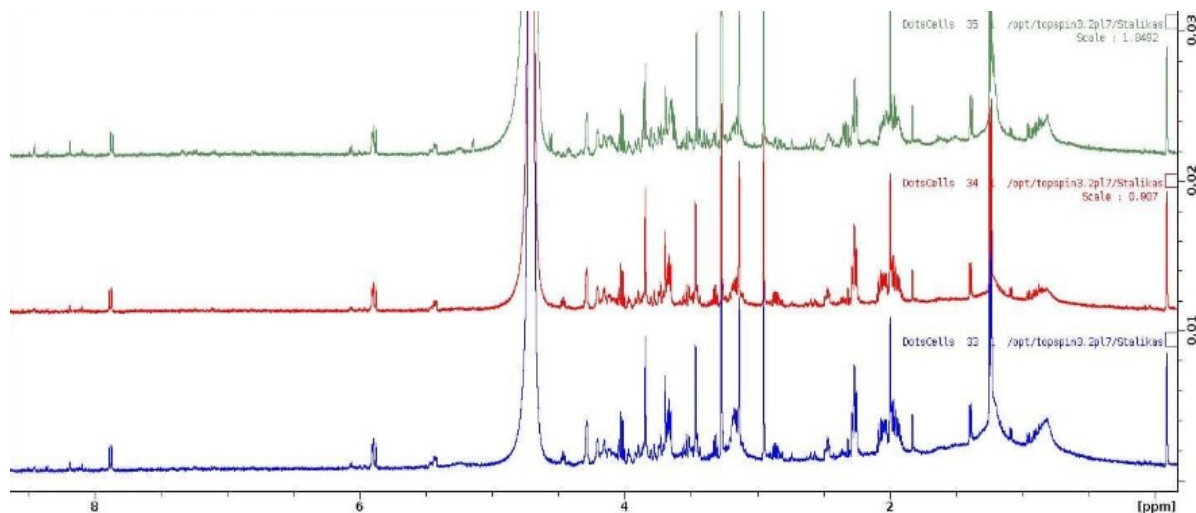
Έχοντας υπόψη πως οι μεταβολικές διεργασίες συνδέονται άμεσα με τη βιωσιμότητα των κυττάρων, είναι σημαντικό να μελετηθεί το μεταβόλωμα των μελετούμενων κυττάρων, τα οποία εκτίθενται σε N,P-doped CNDs και N,B-doped CNDs, σε σύγκριση με το μεταβόλωμα των κυττάρων που δεν έχουν εκτεθεί. Έτσι, οι πληροφορίες που θα ληφθούν από τις μεταβολικές διεργασίες, μπορούν να εξηγήσουν την απόκριση των κυττάρων υπό την επίδραση των χημικών αυτών παραγόντων.

3.3 Μελέτη του μεταβολώματος των κυτταρικών σειρών

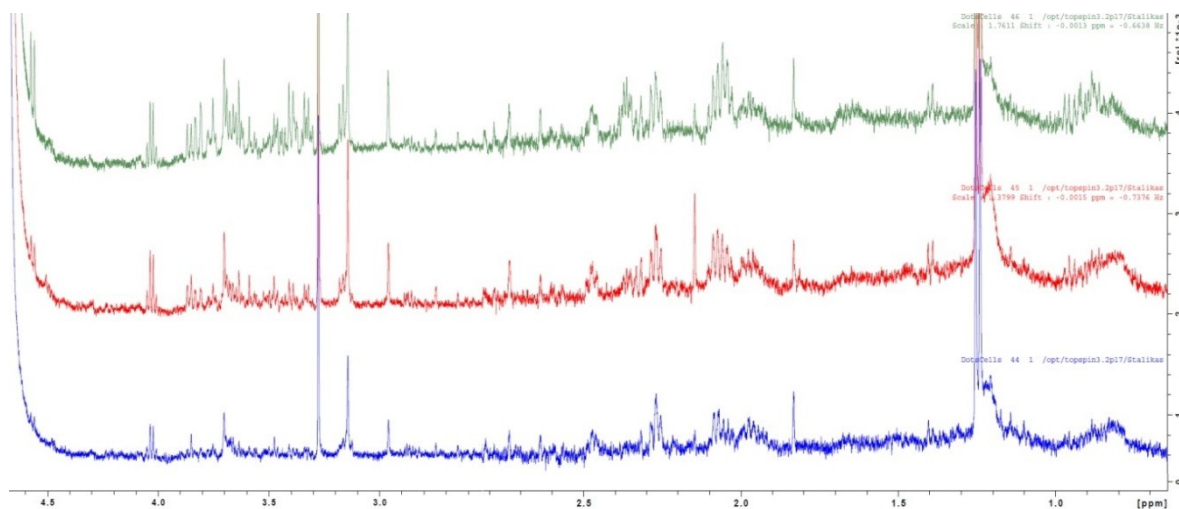
3.3.1 Αλλαγές του μεταβολώματος με βάση τη φασματοσκοπία NMR

Φάσματα ^1H -NMR (1D) ελήφθησαν για το σύνολο των δειγμάτων και αφορούν την έκθεση των κυττάρων στα δύο είδη νανοκουκκίδων, αποτελούμενα από ένα δείγμα ελέγχου και ένα δείγμα σε συγκέντρωση έκθεσης 200 µg/mL. Μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν ακατάλληλες για μεταβολομική μελέτη, καθώς εμφάνιζαν υψηλή θνησιμότητα, που σημαίνει πως αρκετά μεταβολικά μονοπάτια θα απενεργοποιούνταν λόγω του κυτταρικού θανάτου. Η πληθώρα των κορυφών που παρουσιάζονται στα φάσματα NMR (**Εικόνες 30 και 31**) οφείλεται στο μεγάλο αριθμό μεταβολιτών που υπήρχαν στα δείγματα. Εκ πρώτης όψεως, υπάρχουν αρκετές διαφορές που είναι εμφανείς τόσο μεταξύ των φασμάτων που αντιπροσωπεύουν τα μεταβολώματα της ίδιας κυτταρικής σειράς πριν και μετά την έκθεσή στα δύο είδη νανοκουκκίδων, όσο και μεταξύ των δύο ειδών κυττάρων αφού έχουν εκτεθεί

στο ίδιο υλικό. Για κάθε νανοϋλικό πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις πειραμάτων με τα φάσματα NMR να εμφανίζουν κάθε φορά το ίδιο προφίλ



Εικόνα 30: Φάσματα ^1H -NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HaCaT (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-doped CNDs (κόκκινο) N,B-doped CNDs (πράσινο).



Εικόνα 31: Φάσματα ^1H -NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HEK-293 (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-doped CNDs (κόκκινο) N,B-doped CNDs (πράσινο).

Στη συνέχεια, τα δεδομένα (φασματικές κορυφές, ppm) αναλύθηκαν με τη χρήση του εργαλείου “1D NMR Search” της Human Metabolome Database (HMDB). Με την πειραματική αυτή πορεία, προέκυψαν συνολικά 152 διαφορετικοί μεταβολίτες. Στον **Πίνακα 3** φαίνονται οι ταυτοποιημένοι μεταβολίτες των δύο διαφορετικών κυτταρικών σειρών με την έκθεσή τους σε N,P-doped CNDs και N,B-doped CNDs καθώς και για τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου.

Πίνακας 3: Μεταβολίτες παρόντες στα δείγματα ελέγχου και στα δείγματα μετά από έκθεση στις εκάστοτε νανοκουκκίδες (+ παρουσία μεταβολίτη, - απουσία μεταβολίτη).

Μεταβολίτες	Control HEK	N,P- CNDs	N,B- CNDs	Control HaCaT	N,P- CNDs	N,B- CNDs
<i>L</i> -ασπαράγίνη	+	+	+	+	+	+
17α-υδροξυπρογεστερόνη	+	+	+	+	+	+
1,6-διφωσφορική-α-D-γλυκόζη	+	+	+	+	+	+
Τετραδεκανοϊκό οξύ	+	+	+	+	+	+
6-φωσφορική D-γλυκοζαμίνη	+	+	+	+	+	+
Δεοξαδενοσίνη	+	+	+	+	+	+
Φαιναιθυλαμίνη	+	+	+	+	+	+
5-φωσφορική D-ριβόζη	+	+	+	+	+	+
21-υδροξυπρεγνενολόνη	+	+	+	+	+	+
Χενοδοξυχολικό οξύ	+	+	+	+	+	+
Λινολεϊκό οξύ	+	+	+	+	+	+
Δωδεκανοϊκό οξύ	+	+	+	+	+	+
11-δεοξυκορτιζόλη	+	+	+	+	+	+
Θειική χοληστερόλη	+	+	+	+	+	+
<i>L</i> -ισολευκίνη	+	+	+	+	+	+
Χολερυθρίνη	+	+	+	+	+	+
β-σιτοστερόλη	+	+	+	+	+	+
Γλυκοχολικό οξύ	+	+	+	+	+	+
Παντοθενικό οξύ	+	+	+	+	+	+
17-β-εστραδιόλη	+	+	+	+	+	+
Κινολινικό οξύ	+	+	+	+	-	+
Ισταμίνη	+	+	+	+	+	+
Μονοφωσφορική ουριδίνη (UMP)	+	+	+	+	+	+
α-κετογλουταρικό οξύ	+	+	+	+	+	+
4-αμινοβουτανοϊκό οξύ	+	+	+	+	+	+
Βιοτίνη	+	+	+	+	+	+

<i>L</i> -σεληνομεθειονίνη	+	+	+	+	+	+
β -D-φρουκτόζη	+	+	+	+	+	+
Τριφωσφορική κυτιδίνη (CTP)	+	+	+	+	+	+
α -κετοϊσοβαλερικό οξύ	+	+	+	+	+	+
Δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης (NAD ⁺)	+	+	+	+	+	+
<i>N</i> -ακετυλ- <i>L</i> -ασπαρτικό οξύ	+	+	+	+	+	+
<i>L</i> -ασπαρτικό οξύ	+	-	-	+	-	-
<i>D</i> -ασπαρτικό οξύ	+	-	-	+	-	-
<i>N</i> -(<i>L</i> -αργινινο)ηλεκτρικό οξύ	+	-	-	-	-	-
<i>L</i> -αλανίνη	+	-	+	-	-	+
<i>L</i> -γλουταμίνη	+	-	-	-	-	-
<i>L</i> -θρεονίνη	+	+	+	-	-	-
<i>L</i> -λευκίνη	+	+	+	-	+	+
α -κετοϊσοκαπροϊκό οξύ	+	+	-	-	-	-
Διφωσφορική ουριδίνη (UDP)	+	+	-	+	-	+
CMP	+	+	+	+	+	+
Κυτιδίνη	+	+	+	+	-	-
Δεοξυκυτιδίνη	+	+	+	-	-	-
Ουριδίνη	+	+	-	+	+	-
Δεοξουριδίνη	+	-	-	-	-	-
5,6-διϋδροουρακίλη	+	-	-	-	-	+
(<i>S</i>)-διϋδροοροτικό οξύ	+	+	+	-	-	-
<i>L</i> -αργινίνη	+	-	-	-	-	-
<i>L</i> -ορνιθίνη	+	-	+	-	-	-
<i>L</i> -φαινυλαλανίνη	+	-	-	-	-	-
Γλυκίνη	+	+	+	-	-	-
<i>L</i> -λυσίνη	+	-	-	-	-	-
<i>L</i> -Κυστεϊκό οξύ	+	+	+	-	-	-

Ταυρίνη	+	-	-	-	-	+
Ταυροχολικό οξύ	+	-	-	+	-	-
Φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης (NADP+)	+	+	-	-	-	-
Φαινυλοξικό οξύ	+	+	-	+	+	-
Δινουκλεοτίδιο αδενίνης φλαβίνης (FAD)	+	+	-	-	-	-
L-βαλίνη	-	+	+	-	-	-
α-D-γαλακτόζη	+	+	+	+	-	-
6-δεοξυ-L-γαλακτόζη	+	+	+	+	-	-
6-φωσφορική N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη	-	+	-	+	+	+
Διφωσφορική ουριδίνη-γλυκουρονικού οξέος	-	+	-	-	-	-
Αγματίνη	+	+	-	-	-	-
S-αδενοσυλο-L-μεθειονίνη	+	+	-	+	+	-
L-προλίνη	+	-	-	+	-	+
N-ακετυλοπουτρεσκίνη	+	-	+	-	+	+
Διφωσφορική γουανοσίνη (GDP)	+	+	-	-	-	-
Δεοξυγουανοσίνη	+	-	-	-	-	-
Διφωσφορική αδενοσίνη (ADP)	+	+	-	-	-	-
Αδενίνη	+	+	+	+	-	+
Τριφωσφορική ινοσίνη (ITP)	+	+	-	-	-	-
Μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP)	+	+	-	-	-	-
Μονοφωσφορική δεοξυαδενοσίνη (d -amp)	+	+	-	-	-	-
Υποξανθίνη	+	+	+	+	-	+
Βουτανοϊκό οξύ	+	-	-	-	-	-
Σταχυόζη	+	+	+	+	-	-
Ραφινόζη	+	+	+	+	-	-
Σακχαρόζη	+	+	+	+	-	-
2-αμινοαιθυλοφωσφονικό οξύ	+	-	-	-	-	-
Γλυκολικό οξύ	+	-	-	+	-	+

Γλυκίνη	+	+	+	-	+	-
Οξικό άλας	+	+	+	-	-	-
Μηλονικός μεθυλεστέρας	+	+	+	-	-	-
Πυριδοξαμίνη	+	+	+	-	-	-
1-φωσφορική D-φρουκτόζη	+	-	-	-	-	+
S-αδενοσυλο-L-ομοκυστεΐνη	+	+	+	-	-	-
Ταυρίνη	+	-	-	-	-	+
Βεταΐνη αλδεϋδη	+	-	-	-	-	-
Εξαδεκανοϊκό οξύ	+	+	+	-	-	-
Οκταδεκανοϊκό οξύ	+	+	+	-	-	-
Δεκανοϊκό οξύ	+	+	+	-	+	+
β-καροτίνη	+	+	-	+	+	+
Προγεστερόνη	+	-	-	-	-	+
Ανδροστερόνη	+	+	+	-	+	+
Οιστρόνη	+	+	+	+	-	-
D-ξυλόζη	+	+	+	+	-	-
Προπανοϊκό οξύ	+	+	-	-	-	-
Αιθανολαμίνη	+	+	+	-	-	-
Ακετυλοχολίνη	+	-	+	+	+	+
Σκουαλένιο	+	+	+	-	+	+
Υδροξυταμοξιφαίνη	+	+	-	-	-	-
Γλυκερόλη	-	+	+	-	-	-
N-ακετυλο-D-μαννοζαμίνη	-	+	+	-	-	-
Δεοξυγουανασίνη	-	+	-	-	-	-
5-υδροξυ-L-τρυπτοφάνη	-	+	-	-	-	-
Βεταΐνη	-	+	+	-	+	-
L-σερίνη	-	+	+	-	-	-
D-σερίνη	-	+	+	-	-	-
L-τρυπτοφάνη	-	+	+	+	+	-

Σφιγγομυελίνη	-	+	+	+	+	+
<i>N</i> -ακετυλο- <i>L</i> -γλουταμινικό οξύ	-	+	+	+	+	-
Φωσφορική αιθανολαμίνη	-	+	+	-	-	-
Θειαμίνη	-	+	+	+	+	-
β -αλανυλο- <i>N</i> (<i>pi</i>)-μεθυλο- <i>L</i> -ιστιδίνη	-	+	+	-	+	-
<i>cis</i> -ακονικό οξύ	-	+	-	-	-	+
11-δεοξυκορτικοστερόνη	-	+	+	-	-	-
Κορτιζόνη	-	+	-	+	+	+
Βιταμίνη D3	-	+	-	+	-	+
3,5-διωδο- <i>L</i> -τυροσίνη	-	+	+	-	-	-
<i>L</i> -γλουταμινικό οξύ	-	-	+	+	+	-
<i>L</i> -κιτρουλίνη	-	-	+	-	+	+
Κυστεαμίνη	-	-	+	+	+	-
<i>N</i> (<i>pi</i>)-μεθυλο- <i>L</i> -ιστιδίνη	-	-	+	+	+	-
5-τριφωσφορική ουριδίνη	-	-	+	-	-	-
<i>D</i> -ορνιθίνη	-	-	+	-	-	-
Καδαβερίνη	-	-	+	-	+	+
4-ακεταμιδοβουτανόϊκο οξύ	-	-	+	-	+	+
Υποταυρίνη	-	-	+	+	+	-
Καφεΐνη	-	-	+	+	+	-
Γουανοσίνη	-	-	+	-	-	-
Αδενοσίνη	-	-	+	-	-	-
Ινοσίνη	-	-	+	-	-	-
Ρετινοϊκό οξύ	-	-	-	+	+	+
6-φωσφορική <i>D</i> -φρουκτόζη	-	-	-	+	+	-
Αδρενοστερόνη	-	-	-	+	+	-
2,6-διφωσφορικό οξύ	-	-	-	+	+	-
Πρωτοπορφυρίνη	-	-	-	+	-	+
Δεοξυκυτιδίνη	-	-	-	+	-	-

Χολικό οξύ	-	-	-	+	-	-
<i>trans</i> -Dodec-2-enoyl-[<i>acp</i>]	-	-	-	+	-	-
Τετραϋδροβιοπερίνη	-	-	-	+	-	-
Κιτρικό άλας	-	-	-	-	+	+
Ταυροχολικό οξύ	-	-	-	-	+	+
6-φωσφορική D-γλυκόζη	-	-	-	-	+	+
3-ουρεΐδοπροπιονικό οξύ	-	-	-	-	+	+
5-φωσφορική D-Ριβουλόζη	-	-	-	-	+	+
Ντοπαμίνη	-	-	-	-	+	+
Κορτικοστερόνη	-	-	-	-	+	-
Μεταβολισμός φαρμάκων - κυτόχρωμα P450	-	-	-	-	-	+

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει πως κατά την έκθεση των κυττάρων στις νανοκουκκίδες, 32 από τους συνολικά 152 μεταβολίτες παρέμειναν σταθεροί σε όλα τα δείγματα, δηλαδή οι L-ασπαραγίνη, φαιλαιθυλαμίνη, 17α-υδροξυπρογεστερόνη, 1,6-διφωσφορική-α-D-γλυκόζη, τετραδεκανοϊκό οξύ, 6-φωσφορική D-γλυκοζαμίνη, δεοξαδενοσίνη, 5-φωσφορική D-ριβόζη, 21-υδροξυπρεγνενολόνη, χενοδοξυχολικό οξύ, λινολεϊκό οξύ, δωδεκανοϊκό οξύ, 11-δεοξυκορτιζόλη, θεική χοληστερόλη, L-ισολευκίνη, χολερυθρίνη, β-σιτοστερόλη, γλυκοχολικό οξύ, παντοθενικό οξύ, 17-β-εστραδιόλη, ισταμίνη, μονοφωσφορική ουριδίνη (UMP), α-κετογλουταρικό οξύ, 4-αμινοβουτανοϊκό οξύ, βιοτίνη, L-σεληνομεθειονίνη, β-D-φρουκτόζη, τριφωσφορική κυτιδίνη (CTP), α-κετοϊσοβαλερικό οξύ, δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης (NAD⁺), N-ακετυλ-L-ασπαρτικό οξύ).

Μελέτη μεταβολώματος κυττάρων HaCaT μετά την έκθεσή τους σε N,P-CNDs

Κατά τη μελέτη του μεταβολώματος των κυττάρων HaCaT στην έκθεση με τροποποιημένες με φωσφόρο CNDs, ανιχνεύτηκαν συνολικά 93 μεταβολίτες. Από το σύνολο, προέκυψε πως οι 52 ήταν κοινοί με το δείγμα ελέγχου. Κατά την έκθεση παρατηρήθηκε τόσο η αποσιωποποίηση 23 μεταβολιτών όσο και η εμφάνιση 18 νέων.

Μελέτη μεταβολώματος κυττάρων HaCaT μετά την έκθεσή τους σε N,B-CNDs

Αντίστοιχα, στην ίδια κυτταρική σειρά η έκθεση στις τροποποιημένες με βόριο CNDs επέφερε διαφορετικές αλλαγές στους μεταβολίτες. Εδώ, εντοπίστηκαν συνολικά 98 μεταβολίτες, εκ των οποίων οι 46 ήταν κοινοί με το δείγμα ελέγχου. Από τον μεταβολισμό των κυττάρων εξαφανίστηκαν 29 μεταβολίτες ενώ 22 νέοι προέκυψαν μόνο μετά από την έκθεση των κυττάρων στο υλικό.

Μελέτη μεταβολώματος κυττάρων HEK-293 μετά την έκθεσή τους σε N,P-CNDs

Στην περίπτωση της έκθεσης των κυττάρων HEK-293 σε τροποποιημένες με φωσφόρο CNDs, από τους συνολικά 123 μεταβολίτες, οι 76 παρέμειναν σταθεροί. Μετά από την έκθεση τους στο υλικό, 25 μεταβολίτες εντοπίζονται μόνο στο δείγμα ελέγχου. Επιπρόσθετα, 22 καινούργιοι μεταβολίτες εμφανίστηκαν έπειτα από την έκθεση στις συγκεκριμένες νανοκουκκίδες.

Μελέτη μεταβολώματος κυττάρων HEK-293 μετά την έκθεσή τους σε N,B-CNDs

Η έκθεση των κυττάρων στις τροποποιημένες με βόριο CNDs, απέφεραν την υψηλότερη συνολική παρουσία των 129 μεταβολιτών. Από αυτούς, οι 63 είναι κοινοί και στο δείγμα ελέγχου ενώ με την χρήση των CNDs, ταυτοποιούνται 38 μεταβολίτες που υπάρχουν μόνο στα δείγματα ελέγχου. Ακόμη, 28 νέοι μεταβολίτες παρουσιάζονται στα δείγματα μετά την έκθεση.

Στις περιπτώσεις έκθεσης της κυτταρικής σειράς HaCaT, εμφανίστηκαν μεταβολίτες όπως η 6-φωσφορική D-γλυκόζη, η 5-φωσφορική D-ριβουλόζη και η 1-φωσφορική D-φρουκτόζη που συμμετέχουν στο μεταβολικό μονοπάτι της οδού φωσφορικής πεντόζης. Επίσης, ο μεταβολίτης καδαβερίνη που εμπλέκεται στο μεταβολισμό γλουταθειόνης καθώς και το κιτρικό άλας και το cis-ακονικό οξύ που λαμβάνουν μέρος στον κύκλο κιτρικού οξέος. Αντίστοιχα, μετά την έκθεση της κυτταρικής σειράς HEK-293 στα υλικά, εμφανίστηκαν μεταβολίτες σαν τη σφιγγομυελίνη, τη φωσφορική αιθανολαμίνη και την L-σερίνη που αφορούν το μεταβολισμό λιπιδίων. Στην τελευταία περίπτωση, παρατηρείται και εμφάνιση της κιτρουλίνης και ορνιθίνης που οδηγεί στον αντίστοιχο μεταβολισμό αργινίνης και ορνιθίνης.

Είναι φανερό πως τις περισσότερες αλλαγές επιφέρουν οι τροποποιημένες με βόριο νανοκουκκίδες άνθρακα έναντι των τροποποιημένων με φωσφόρο. Επιπλέον φαίνεται πως η κυτταρική σειρά HEK-293 είναι περισσότερο ευαίσθητη στις CNDs από την HaCaT, καθώς παρατηρούνται περισσότερες αλλαγές στο μεταβόλωμα.

3.4 Μεταβολικά μονοπάτια

Με την ολοκλήρωση της ταυτοποίησης των μεταβολιτών, ακολούθησε η συσχέτισή τους με τις μεταβολικές οδούς στις οποίες συμμετέχουν. Για τον σκοπό αυτό, έγινε χρήση του εργαλείου “pathway analysis” της ηλεκτρονικής πλατφόρμας MetaboAnalyst 4.0. Αφού εισήχθησαν οι μεταβολίτες στη μηχανή αναζήτησης, επιλέχθηκε η κατάλληλη βιβλιοθήκη για τα κύτταρα (*Homo Sapiens*), και προέκυψαν τα μεταβολικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν οι μεταβολίτες. Ο συνολικός αριθμός των μονοπατιών που προέκυψαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 4: Μεταβολισμοί κυττάρων και ομαδοποίησή τους (+ παρουσία μεταβολισμού, - απουσία μεταβολισμού).

Μεταβολισμός		<i>Control HEK</i>	<i>N,P- CNDs</i>	<i>N,B- CNDs</i>	<i>Control HaCaT</i>	<i>N,P- CNDs</i>	<i>N,B- CNDs</i>
Νουκλεοτιδίων	Μεταβολισμός πυριμιδίνης	+	+	+	+	+	+
	Μεταβολισμός πουρίνης	+	+	+	+	+	+
Λιπιδίων	Μεταβολισμός λινολεϊκού οξέος	+	+	+	+	+	+
	Πρωτογενής βιοσύνθεση χολικών οξέων	+	+	+	+	+	+
	Βιοσύνθεση ακόρεστων λιπαρών οξέων	+	+	+	-	-	-
	Βιοσύνθεση λιπαρών οξέων	+	+	+	+	+	+
	Βιοσύνθεση στεροειδών ορμονών	+	+	+	+	+	+
	Μεταβολισμός γλυκεροφωσfolιπιδίων	+	+	+	+	+	+
	Βιοσύνθεση στεροειδών	+	+	+	+	+	+
	Μεταβολισμός σφιγγολιπιδίων	-	+	+	+	+	+
	Αποδόμηση βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης	+	+	+	+	+	+

Αμινοξέων	Μεταβολισμός τρυπτοφάνης	-	+	-	-	-	-
	Μεταβολισμός τυροσίνης	-	+	+	-	+	+
	Μεταβολισμός γλυκίνης, σερίνης και θρεονίνης	+	+	+	-	+	-
	Μεταβολισμός κυστεΐνης και μεθειονίνης	+	+	+	-	-	-
	Μεταβολισμός αλανίνης, ασπαρτικού και γλουταμικού οξέος	+	+	+	+	+	+
	Βιοσύνθεση φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και τρυπτοφάνης	+	-	-	-	-	-
	Βιοσύνθεση βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης	+	+	+	+	+	+
	Βιοσύνθεση αργινίνης	+	+	+	+	+	+
	Μεταβολισμός φαινυλαλανίνης	+	+	+	+	+	+
	Μεταβολισμός αργινίνης και προλίνης	+	+	+	+	+	+
	Μεταβολισμός ιστιδίνης	+	+	+	+	+	+
Ενέργειας	Μεταβολισμός αζώτου	-	+	+	-	+	-
Συμπαράγοντων και βιταμινών	Βιοσύνθεση φυλλικού οξέος	-	-	-	+	-	-
	Μεταβολισμός νικοτινικών και νικοτιναμιδίων	+	+	+	+	+	+
	Βιοσύνθεση παντοθενικού και ακέτυλου συνενζύμου Α	+	+	+	+	+	+
	Μεταβολισμός βιοτίνης	+	+	+	+	+	+
	Μεταβολισμός ριβοφλαβίνης	+	+	-	-	-	-

	Μεταβολισμός βιταμίνης B6	+	+	+	-	-	-
	Μεταβολισμός ρετινόλης	+	+	-	+	+	+
	Μεταβολισμός πορφυρίνης και χλωροφύλλης	+	+	+	+	+	+
	Μεταβολισμός θειαμίνης	-	+	+	+	+	-
Βιοσύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών	Μεταβολισμός καφεΐνης	-	-	+	+	+	-
Άλλων αμινοξέων	Μεταβολισμός ταυρίνης και υποταυρίνης	+	-	+	+	+	+
	Μεταβολισμός γλουταθειόνης	+	+	+	-	+	+
	Μεταβολισμός αμινοσακχάρων και σακχάρων των νουκλεοτιδίων	+	+	+	+	+	+
	Μεταβολισμός φωσφονικών και φωσφινικών	+	-	-	-	-	-
	Μεταβολισμός σεληνικών ενώσεων	+	+	+	+	+	+
	Μεταβολισμός β-αλανίνης	-	-	-	-	+	+
Υδατανθράκων	Κύκλος κιτρικού οξέος (κύκλος TCA)	-	+	-	-	+	+
	Γλυκόλυση/Γλυκονεογένεση	+	+	+	-	-	-
	Μεταβολισμός πυροσταφυλικού οξέος	+	-	+	-	-	-
	Μεταβολισμός προπανοϊκού οξέος	+	+	-	-	-	-
	Μεταβολισμός φρουκτόζης και μαnnόζης	+	-	-	+	+	+

	Οδός φωσφορικής πεντόζης	-	-	-	-	+	+
	Μεταβολισμός αμύλου και σακχαρόζης	+	+	+	+	+	+
	Μεταβολισμός γλυοξυλικών και δικαρβοξυλικών οξέων	+	+	+	+	-	+
	Αλληλομετατροπές πεντόζης και γλυκουρονικού οξέος	+	+	+	+	-	-
	Μεταβολισμός βουτανοϊκού οξέος	+	+	+	+	+	-
	Μεταβολισμός γαλακτόζης	+	+	+	+	-	-
Βιοσύνθεσης και μεταβολισμός γλυκάνη	Βιοσύνθεση Ο-γλυκάνης τύπου μαννόζης	+	-	-	-	-	-
Βιοαποδόμηση και μεταβολισμός ξενοβιοτικών	Μεταβολισμός φαρμάκων - κυτόχρωμα P450	+	+	-	-	-	+
	Μεταβολισμός D-Αργινίνης και D-ορνιθίνης	-	-	+	-	-	-
	Βιοσύνθεση αμινοακυλο-tRNA	+	+	+	+	+	+
	Μεταβολισμός D-γλουταμίνης και D-γλουταμινικού οξέος	+	+	+	+	+	-

Αναλυτικότερα, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4**, 25 από τους συνολικά 55 μεταβολισμούς δεν επηρεάζονται από τις νανοκουκκίδες άνθρακα και εμφανίζονται σε όλες τις υπό μελέτη συνθήκες ανεξαρτήτως κυτταρικής σειράς. Τα μεταβολικά μονοπάτια αυτά, αφορούν κυρίως το μεταβολισμό των νουκλεοτιδίων (μεταβολισμός πυριμιδίνης, μεταβολισμός πουρίνης), των λιπιδίων (μεταβολισμός λινολεϊκού οξέος, πρωτογενής βιοσύνθεση χολικών οξέων, βιοσύνθεση λιπαρών οξέων, βιοσύνθεση στεροειδών ορμονών, μεταβολισμός γλυκεροφωσfolιπιδίων, βιοσύνθεση στεροειδών), των αμινοξέων (αποδόμηση βαλίνης,

λευκίνης και ισολευκίνης, μεταβολισμός αλανίνης, ασπαρτικού και γλουταμικού οξέος, βιοσύνθεση βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης, μεταβολισμός φαινυλαλανίνης, βιοσύνθεση αργινίνης, μεταβολισμός αργινίνης και προλίνης και μεταβολισμός ιστιδίνης), των συμπαραγόντων και βιταμινών (μεταβολισμός νικοτινικών και νικοτιναμιδίων, βιοσύνθεση παντοθενικού και ακέτυλου συνενζύμου A, μεταβολισμός βιοτίνης, μεταβολισμός ρετινόλης, μεταβολισμός πορφυρίνης και χλωροφύλλης) και το μεταβολισμό βιοσύνθεσης του αμινοακυλο-tRNA. Εν συνεχεία πρόκειται επίσης για το μεταβολισμό άλλων αμινοξέων (μεταβολισμός αμινοσακχάρων και σακχάρων των νουκλεοτιδίων, μεταβολισμός γλουταθειόνης, μεταβολισμός σεληνικών ενώσεων) και σε μικρότερο βαθμό τον μεταβολισμό των υδατανθράκων (μεταβολισμός αμύλου και σακχαρόζης).

Μελέτη μεταβολισμού κυττάρων HaCaT κατά την έκθεσή τους σε N,P-CNDs

Κατά την μελέτη του μεταβολώματος των κυττάρων HaCaT με τις N,P-CNDs, παρουσιάστηκαν συνολικά 43 μεταβολισμοί, εκ των οποίων οι 31 παρέμειναν ανεπηρέαστοι. Σημειώνεται πως τόσο ο μεταβολισμός της βιοσύνθεσης του φυλλικού οξέος, όσο και 3 μεταβολισμοί υδατανθράκων συμπεριλαμβανομένων του μεταβολισμού γλυοξυλικών και δικαρβοξυλικών οξέων, των αλληλομετατροπών πεντόζης και γλυκουρονικού οξέος και του μεταβολισμού γαλακτόζης, υπήρχαν μόνο στα δείγματα ελέγχου. Μεταβολισμοί αμινοξέων, με αυτούς της τυροσίνης, γλυκίνης, σερίνης και θρεονίνης, της γλουταθειόνης και της β-αλανίνης, μεταβολισμοί υδατανθράκων όπως ο κύκλος κιτρικού οξέος και η οδός φωσφορικής πεντόζης, αλλά και ο μεταβολισμός ενέργειας που αφορά το μεταβολισμό αζώτου, ενεργοποιήθηκαν μετά την έκθεση.

Μελέτη μεταβολισμού κυττάρων HaCaT κατά την έκθεσή τους σε N,B-CNDs

Στην ίδια κυτταρική σειρά, η έκθεση στις N,B-doped CNDs, δημιούργησε συνολικά 42 μεταβολικά μονοπάτια. Τα περισσότερα από αυτά, 28, παρέμειναν κοινά με τα δείγματα ελέγχου, με 7 να αποσιωποούνται και άλλα 6 να ενεργοποιούνται από την έκθεση στις νανοκουκίδες αυτές. Αναλυτικότερα, ο μεταβολισμός των υδατανθράκων που περιλαμβάνει τις αλληλομετατροπές πεντόζης και γλυκουρονικού οξέος και το μεταβολισμό βουτανοϊκού οξέος και γαλακτόζης, ο μεταβολισμός συμπαραγόντων και βιταμινών όπως η βιοσύνθεση φυλλικού οξέος και ο μεταβολισμός θειαμίνης, ο μεταβολισμός βιοσύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών με το μεταβολομικό μονοπάτι του μεταβολισμού καφεΐνης αλλά και ο μεταβολισμός D-γλουταμίνης και D-γλουταμινικού οξέος, εξαφανίζονται παρουσία των νανοκουκίδων. Αντιθέτως, μεταβολισμοί αμινοξέων με αυτούς της τυροσίνης, της

γλουταθειόνης και της β-αλανίνης, ο μεταβολισμός υδατανθράκων στον οποίο συγκαταλέγεται ο κύκλος κιτρικού οξέος και η οδός φωσφορικής πεντόζης αλλά και ο μεταβολισμός βιοαποδόμησης ξενοβιοτικών που περιέχει το μεταβολισμό φαρμάκων – κυτοχρώματος P450, ενεργοποιήθηκαν με την έκθεση στις νανοκουκκίδες.

Μελέτη μεταβολισμού κυττάρων HEK-293 κατά την έκθεσή τους σε N,P-CNDs

Τα μεταβολικά μονοπάτια που παρουσιάστηκαν στην προκειμένη περίπτωση ήταν συνολικά 50, με 38 από αυτά να μην επηρεάζονται. Ο μεταβολισμός των αμινοξέων που αφορά τη βιοσύνθεση φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και τρυπτοφάνης, ταυρίνης και υποταυρίνης και φωσφονικών και φωσφινικών, καθώς επίσης και ο μεταβολισμός υδατανθράκων που περιλαμβάνει το μεταβολισμό πυροσταφυλικού οξέος και το μεταβολισμό φρουκτόζης και μαννόζης και τέλος ο μεταβολισμός βιοσύνθεσης Ο-γλυκάνης τύπου μαννόζης, αποσιωποήθηκαν. Ταυτόχρονα, ενεργοποιήθηκε ο μεταβολισμός άλλων αμινοξέων όπως αυτός της τρυπτοφάνης και τυροσίνης, ο μεταβολισμός υδατανθράκων όπως ο κύκλος κιτρικού οξέος, ο μεταβολισμός ενέργειας με το μεταβολικό μονοπάτι του αζώτου, ο μεταβολισμός συμπαραγόντων και βιταμινών που περιέχει το μεταβολισμό θειαμίνης αλλά και ο μεταβολισμός λιπιδίων με αυτόν των σφιγγολιπιδίων.

Μελέτη μεταβολισμού κυττάρων HEK-293 κατά την έκθεσή τους σε N,B-CNDs

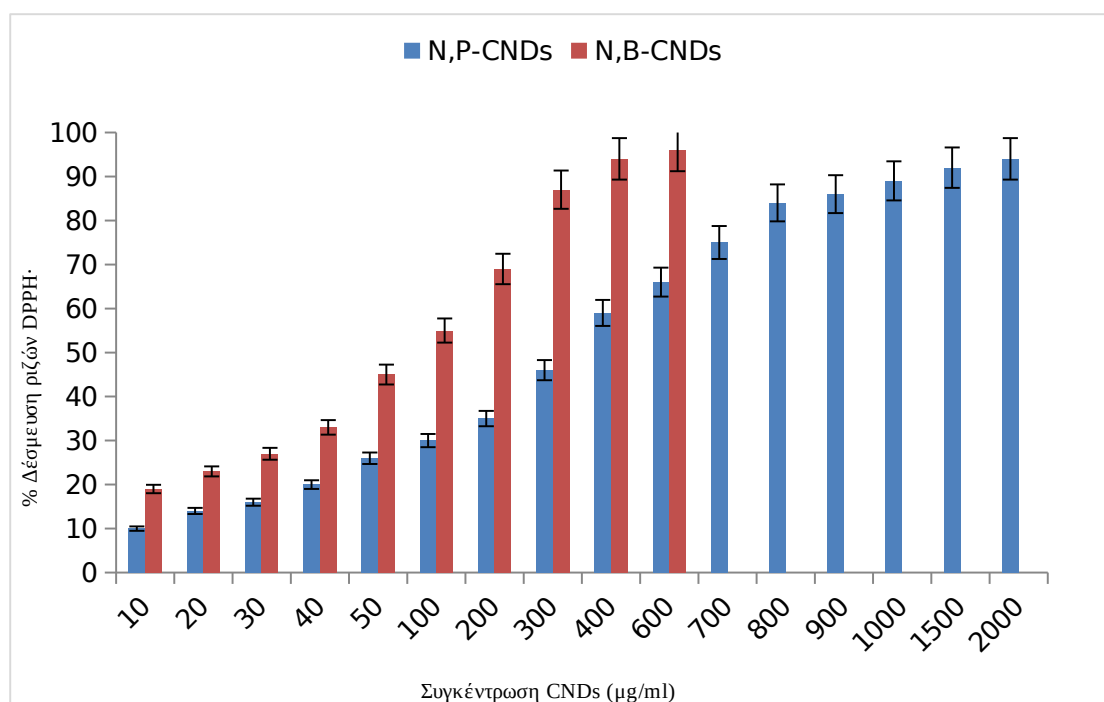
Τέλος, όταν η κυτταρική σειρά εκτέθηκε σε N,B-doped CNDs προέκυψαν συνολικά 50 μεταβολικά μονοπάτια ενώ από το σύνολο αυτών, οι 36 παρέμειναν σταθεροί. Ο μεταβολισμός της βιοσύνθεσης φαινυλαλανίνης, τυροσίνης και τρυπτοφάνης καθώς και αυτός φωσφονικών και φωσφινικών από το μεταβολισμό των αμινοξέων, ο μεταβολισμός ριβοφλαβίνης και ρετινόλης από το μεταβολισμό συμπαραγόντων και βιταμινών, ο μεταβολισμός προπανοϊκού οξέος, φρουκτόζης και μαννόζης από το μεταβολικό μονοπάτι των υδατανθράκων και τέλος ο μεταβολισμός που αφορά τη βιοσύνθεση και το μεταβολισμό γλυκάνης με τη βιοσύνθεση Ο-γλυκάνης τύπου μαννόζης και ο μεταβολισμός που αφορά τη βιοαποδόμηση και το μεταβολισμό ξενοβιοτικών με το μεταβολισμό φαρμάκων - κυτοχρώματος P450 αποσιωπήθηκαν. Σε αντίθεση ενεργοποιήθηκαν μεταβολισμοί όπως αυτός της D-Αργινίνης και D-ορνιθίνης, των σφιγγολιπιδίων, της τυροσίνης, του αζώτου, της θειαμίνης και της καφεΐνης.

3.5 Εκτίμηση αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων

Με βάση τα προαναφερθέντα μεταβολικά μονοπάτια, εντοπίζεται η πρόκληση οξειδωτικού στρες. Για το λόγο αυτό, η περαιτέρω διερεύνηση των οξειδωτικών ιδιοτήτων των νανοκουκκίδων άνθρακα κρίθηκε απαραίτητη καθώς οδηγεί στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους ως αντιοξειδωτικά ή προ-οξειδωτικά.

3.5.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH[•]

Μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των N,P-doped CNDs και N,B-doped CNDs πραγματοποιήθηκε σε πρώτο στάδιο μέσω της μέτρησης ικανότητας δέσμευσης των ελεύθερων ριζών DPPH[•]. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με τη σταθερή ρίζα DPPH[•], η οποία φέρει μωβ χρώμα και μπορεί να αναχθεί σε DPPH:H. Η αναγωγή προκαλείται από την προσθήκη ουσίας με αντιοξειδωτική δράση, και μεταβάλλει το χρώμα σε κίτρινο, μεταβολή ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας. Συγκεκριμένα, προέκυψε πως η ικανότητα δέσμευσης των ριζών αυξάνεται εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση και στους δύο τύπους CNDs. Οι τιμές φαίνονται στο διάγραμμα που εμφανίζεται στην **Εικόνα 32** και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή μέγιστης δέσμευσης τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα των νανοκουκκίδων. Από τη μελέτη φάνηκε πως οι N,B-doped CNDs έχουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τις N,P-doped CNDs. Το μέγιστο δέσμευσης βρέθηκε να είναι σε συγκεντρώσεις 600 $\mu\text{g/mL}$ και 2000 $\mu\text{g/mL}$.

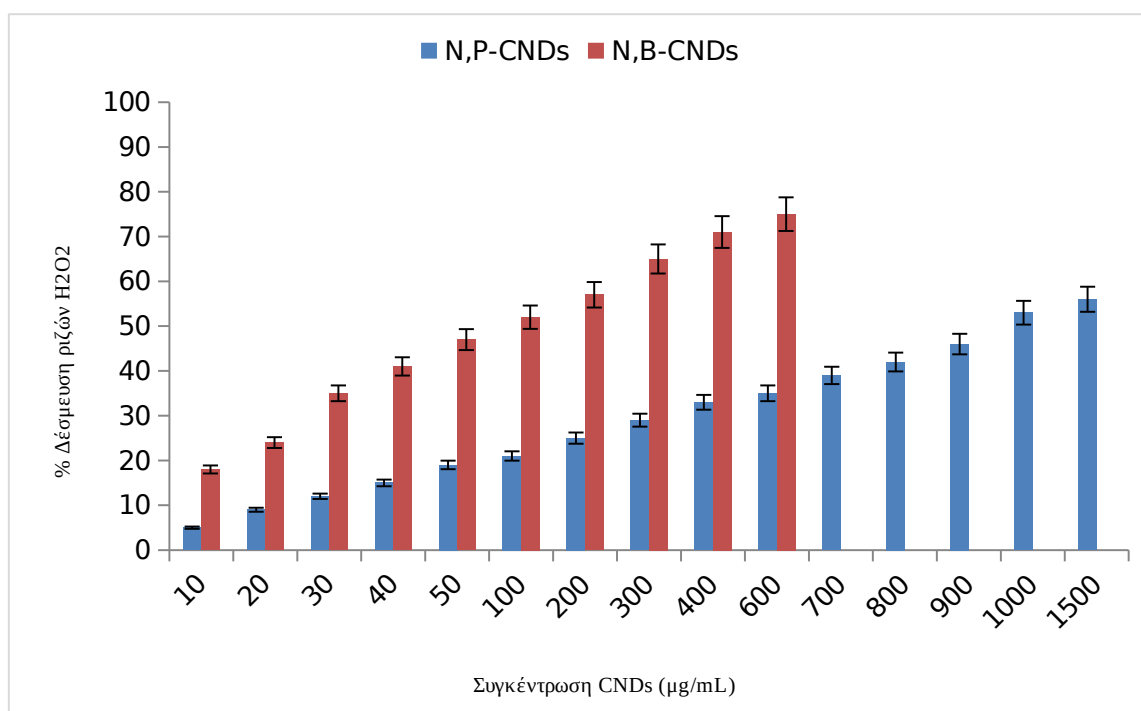


Εικόνα 32: Μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών με τη μέθοδο DPPH• των N,P-CNDs και N,B-CNDs.

3.5.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με το H_2O_2

Σε δεύτερο στάδιο εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των CNDs μέσω αλληλεπίδρασης με το H_2O_2 . Και σε αυτή τη δοκιμή, παρατηρήθηκε εξαρτώμενη σχέση συγκέντρωσης-ικανότητας δέσμευσης. Οι τιμές παρουσιάζονται στο διάγραμμα που εμφανίζεται στην

Εικόνα 33 με τα αποτελέσματα να φανερώνουν επανειλημμένα ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση των N,B-doped CNDs έναντι των N,P-doped CNDs. Το μέγιστο δέσμευσης βρέθηκε να είναι σε συγκεντρώσεις 600 $\mu\text{g/mL}$ και 1500 $\mu\text{g/mL}$, με τα ποσοστά δέσμευσης των ριζών να μειώνονται σε σχέση με την προηγούμενη μέτρηση.



Εικόνα 33: Μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης H₂O₂ των N,P-CNDs και N,B-CNDs.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το αποτέλεσμα που προέκυψε από την κυτταροτοξική μελέτη είναι αξιοσημείωτο, καθώς αμφότερες οι νανοκουκκίδες άνθρακα εμφάνισαν τιμή LD₅₀ 200 µg/mL και στις δύο κυτταρικές σειρές HaCaT και HEK-293. Σε πρωταρχικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εξετάστηκαν οι non-doped, οι N-doped και οι N,S-doped CNDs με την τοξικότητά τους να αυξάνει κατά αυτή τη σειρά, η οποία ωστόσο, φάνηκε να είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με τα άλλα δύο είδη CNDs, όπως επιβεβαιώθηκε και από τις τιμές LD₅₀.

Τα αποτελέσματα της μεταβολομικής μελέτης, έδειξαν πως οι CNDs επηρεάζουν διαφορετικά κάθε κυτταρική σειρά, αλλά και πως τα δύο διαφορετικά είδη έχουν διαφορετική επίδραση στην ίδια κυτταρική σειρά. Αναλυτικότερα, από την έκθεση των κυττάρων HaCaT στις δύο CNDs, παρατηρήθηκε πως παρέμειναν ανεπηρέαστοι οι μεταβολισμοί των λιπιδίων και των νουκλεοτιδίων. Ένα δεύτερο επιπλέον κοινό στοιχείο ήταν η ενεργοποίηση των μεταβολισμών αμινοξέων και υδατανθράκων. Σε αντίθεση, στην περίπτωση των N,P-doped CNDs ενεργοποιήθηκε επιπλέον ο μεταβολισμός ενέργειας, ενώ σε αυτή των N,B-doped CNDs η βιοαποδόμηση και ο μεταβολισμός ξενοβιοτικών.

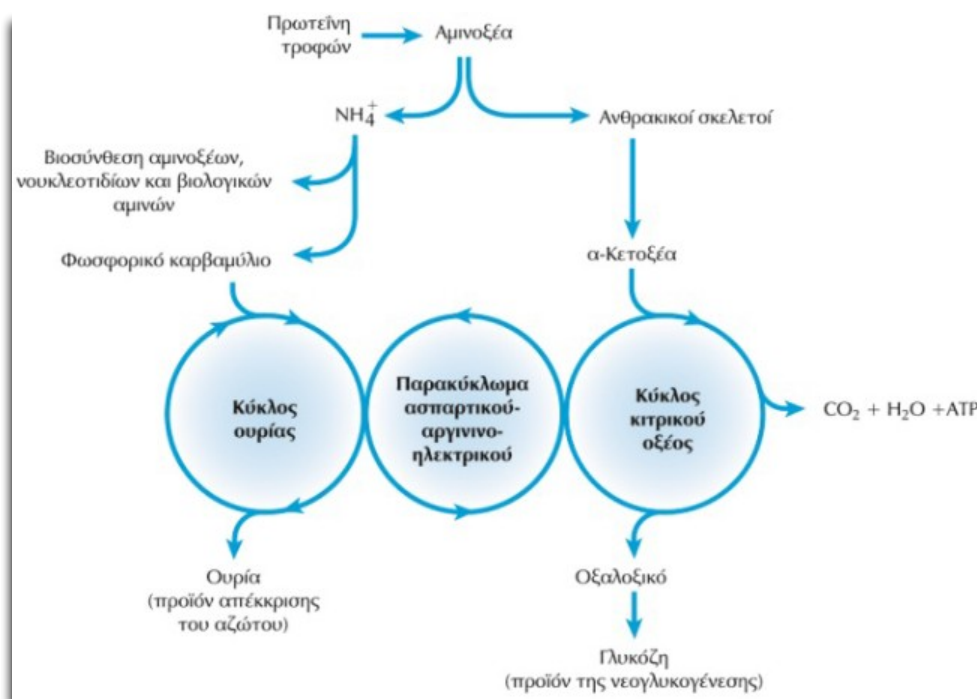
Η έκθεση των CNDs στα κύτταρα HEK-293 επέφερε αλλαγή στο μεταβολισμό των λιπιδίων, με την ενεργοποίηση του μεταβολομικού μονοπατιού των σφιγγολιπιδίων. Αντίστοιχες μεταβολές παρατηρήθηκαν στους μεταβολισμούς αμινοξέων, ενέργειας και συμπαραγόντων και βιταμινών. Η χρήση των N,P-doped CNDs, εμφάνισε αλλαγή και στο μεταβολισμό υδατανθράκων, ενώ των N,B-doped CNDs στο μεταβολισμό βιοσύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών και σε αυτόν της D-αργινίνης και D-ορνιθίνης.

Γίνεται αντιληπτό ότι σε όλες τις περιπτώσεις, ενεργοποιήθηκαν συγκεκριμένες κατηγορίες μεταβολισμών- αμινοξέων, υδατανθράκων, λιπιδίων, ενέργειας, συμπαραγόντων και βιταμινών, βιοσύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών και αποδόμησης και μεταβολισμού ξενοβιοτικών-, με τα μεταβολομικά μονοπάτια που παρέμειναν ανεπηρέαστα, να αφορούν το μεγαλύτερο ποσοστό των συνολικών μονοπατιών.

Μεταβολισμός των αμινοξέων

Υπάρχουν 20 αμινοξέα τα οποία κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες: τα απαραίτητα ή βασικά αμινοξέα (essential amino acids), τα μη απαραίτητα αμινοξέα (nonessential amino acids) και τα ημι-απαραίτητα ή υπό όρους αμινοξέα (conditional amino acids). Τα απαραίτητα αμινοξέα δεν μπορούν να συντεθούν *de novo* (από την αρχή) από τον οργανισμό σε ρυθμό ανάλογο με τη ζήτηση του, και επομένως πρέπει να παρέχονται στη

διατροφή του. Αυτά είναι η φαινυλαλανίνη, η βαλίνη, η θρεονίνη, η τρυπτοφάνη, η μεθειονίνη, η λευκίνη, η ισολευκίνη, η λυσίνη και η ιστιδίνη. Τα μη απαραίτητα αμινοξέα μπορούν να παραχθούν από το σώμα και στην κατηγορία αυτή ανήκουν η αλανίνη, η ασπαράγινη, το ασπαρτικό και το γλουταμικό οξύ. Τα ημι-απαραίτητα περιλαμβάνουν την αργινίνη, την κυστεΐνη, τη γλουταμίνη, την γλυκίνη, την προλίνη, την τυροσίνη και τη σερίνη. Βασική λειτουργία των αμινοξέων είναι η σύνθεση πρωτεϊνών, αν και μπορούν επίσης να δημιουργήσουν γλυκόζη, ATP και λιπαρά οξέα καθώς επίσης είναι μεταβολικοί πρόδρομοι για πολλά βιομόρια, συμπεριλαμβανομένων των ομάδων αίμης, των βάσεων νουκλεοτιδίων και των μορίων σηματοδότησης (κατεχολαμίνες, νευροδιαβιβαστές). Επιπλέον, είναι απαραίτητα και για επιγενετικές τροποποιήσεις. Παρουσία βλάβης, οι πρωτεΐνες αποικοδομούνται σε αμινοξέα, τα οποία παράγουν ενέργεια η οποία απαιτείται για τη προφύλαξη και τις επιδιορθώσεις ζημιών στα κύτταρα καθώς και για την σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Αναλυτικότερα, ο μεταβολισμός των αμινοξέων αφορά τον καταβολισμό και τον αναβολισμό. Μέσω της διαδικασίας αποδόμησης των αμινοξέων, αφαιρείται η αμινομάδα NH_4^+ , η οποία είτε συντελεί στη βιοσύνθεση νέων αμινοξέων και νουκλεοτιδίων, είτε αποκρίνεται από τον κύκλο της ουρίας, και ένας σκελετός άνθρακα που μπορεί να εισέλθει στις μεταβολικές οδούς για να δημιουργήσει ATP, γλυκόζη και λιπαρά οξέα όπως απεικονίζεται συνοπτικά στην **Εικόνα 34**.

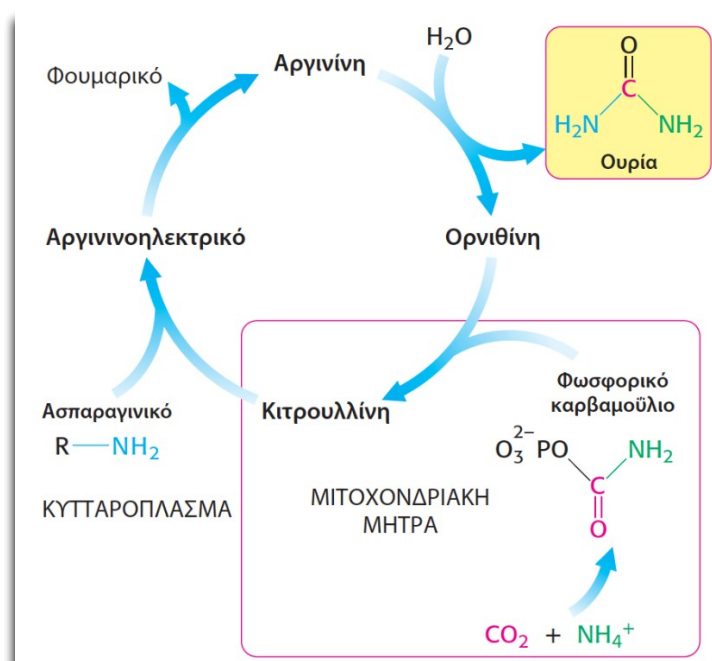


Εικόνα 34: Επισκόπηση καταβολισμού αμινοξέων

Τα μεταβολικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται έπειτα από την έκθεση των κυτταρικών σειρών στις νανοκουκκίδες, αφορούν τους μεταβολισμούς β-αλανίνης, τυροσίνης, τρυπτοφάνης, γλυκίνης, σερίνης και θρεονίνης, αμινοξέων που σχετίζονται με το οξειδωτικό

στρες. Πιο συγκεκριμένα, η β-αλανίνη παρόλο που έχει αποδειχθεί ως αναποτελεσματικό αντιοξειδωτικό, η ικανότητά της να αυξάνει την περιεκτικότητα σε καρνοσίνη στους ιστούς, έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένιση απόκρισης οξειδωτικού στρες, φλεγμονών και μυϊκών βλαβών. Αντίστοιχα, η σερίνη, μπορεί να βελτιώσει το αντιοξειδωτικό σύστημα γλουταθειόνης, μειώνοντας την παραγωγή ROS, καθώς και η γλυκίνη με τη σειρά της, κατέχει σημαντικό ρόλο στη μεταβολική ρύθμιση αλλά και στις αντιοξειδωτικές αντιδράσεις. Τα αμινοξέα τυροσίνη και τρυπτοφάνη, αποτελούν πρόδρομες ενώσεις κατεχολαμινών (νορεπινεφρίνη, επινεφρίνη και ντοπαμίνη) και νευροδιαβιβαστών (σεροτονίνη). Σε συνθήκες υψηλού στρες, παρατηρείται αυξημένη παραγωγή επινεφριδίων με στόχο την κινητοποίηση του κυττάρου για αντίδραση. Η σεροτονίνη είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, ιδίως κατά της υπεροξείδωσης των λιπιδίων.

Ένα ακόμη μεταβολικό μονοπάτι που ενεργοποιείται μόνο στα νεφρικά κύτταρα HEK-293 μετά από την έκθεση στις νανοκουκκίδες (N,P-doped) αφορά τον μεταβολισμό D-αργινίνης και D-ορνιθίνης. Ο μεταβολισμός αυτός, σχετίζεται με την μετατροπή της περίσσειας NH_4^+ σε ουρία μέσω του κύκλου της ουρίας.

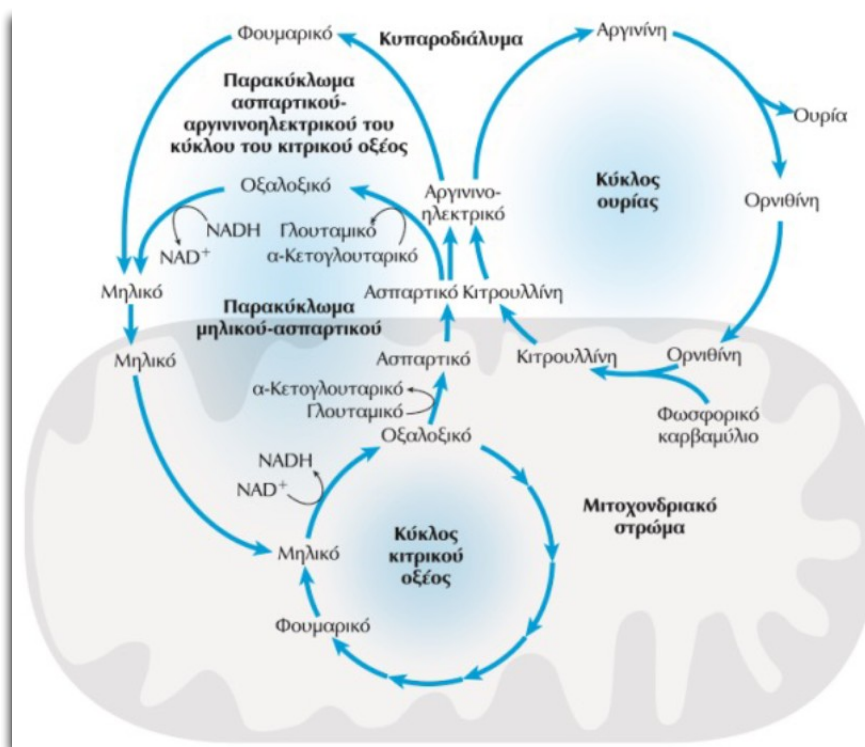


Εικόνα 35: Κύκλος της ουρίας.

Κύκλος του κιτρικού οξέος (TCA)

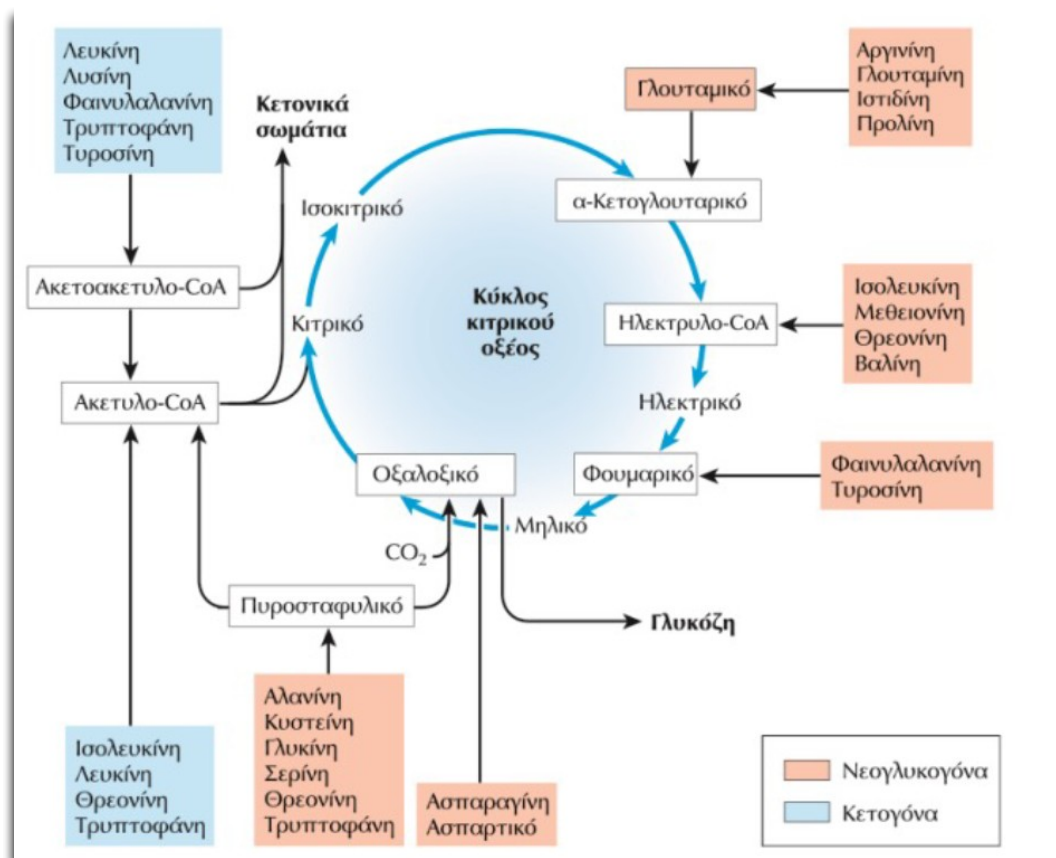
Ο κύκλος κιτρικού οξέος συνδέεται με τον κύκλο της ουρίας όπως φαίνεται στην **Εικόνα 36**. Πρόκειται για την τελευταία κοινή οδό για την οξείδωση των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων. Το TCA παίζει σημαντικό ρόλο στη γλυκονεογένεση, την

τρανσαμίνωση, την απαμίνωση και τη λιπογένεση. Η οξείδωση του ακετυλο-CoA με τον κύκλο TCA αντιπροσωπεύει το 2/3 της συνολικής κατανάλωσης οξυγόνου και της παραγωγής ATP. Το ακέτυλο-CoA λαμβάνεται από αμινοξέα όπως λευκίνη, τυροσίνη, ισολευκίνη, λυσίνη, φαινυλαλανίνη και τρυπτοφάνη, τριακυλογλυκερόλη, υδατάνθρακες και κετονοσώματα. Μέσω του ρόλου του στον οξειδωτικό καταβολισμό υδατανθράκων, λιπαρών οξέων και αμινοξέων, ο κύκλος παρέχει πρόδρομες ουσίες για πολλές βιοσυνθετικές οδούς [121-123].



Εικόνα 36: Σύνδεση κύκλου ουρίας με κύκλο κιτρικού οξέος.

Στην παρούσα έρευνα παρατηρήθηκε πως στα δείγματα ελέγχου απουσίαζε ο μεταβολισμός του κύκλου κιτρικού οξέος, ενώ μετά την προσθήκη των νανοκουκκίδων ενεργοποιήθηκε παράλληλα με την ενεργοποίηση των μεταβολισμών αμινοξέων. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως και αποτυπώνεται στην **Εικόνα 37**, οι ανθρακικοί σκελετοί των αμινοξέων, τροποποιούνται σε ενδιάμεσα μεταβολικών μονοπατιών μέσω του κύκλου κιτρικού οξέος. Σκοπός του μονοπατιού αυτού είναι η παραγωγή ενέργειας. Συνεπώς ενεργοποιείται από τα κύτταρα ώστε να καλυφθεί η ανάγκη για ενέργεια, καθιστώντας εφικτό να ανταπεξέλθουν στο οξειδωτικό στρες που προκλήθηκε από τις νανοκουκκίδες.



Εικόνα 37: Μεταβολισμός ανθρακικών σκελετών μέσω του κύκλου κιτρικού οξέος.

Μεταβολισμός του αζώτου

Με βάση τα προαναφερθέντα, το άζωτο μπορεί να δημιουργηθεί από αμινοξέα και να χρησιμοποιηθεί για βιοσυνθετικές διεργασίες μέσω αντιδράσεων τρανσαμίνωσης και απαμίνωσης. Οι περιορισμοί της διαθεσιμότητας αζώτου στα κύτταρα μπορούν να διαταράξουν τη σύνθεση πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και άλλων σημαντικών ενώσεων που περιέχουν άζωτο. Η πλειοψηφία του μεταβολισμού του αζώτου επικεντρώνεται στην απομάκρυνση της περίσσειας αζώτου από το σώμα ώστε τα αμινοξέα να μετατραπούν στην απαιτούμενη ενέργεια. Η απομάκρυνση του αζώτου γίνεται με διάφορες μορφές. Είτε η αλανίνη είτε η γλουταμίνη θα μεταφέρει μια ομάδα αμίνης στο ήπαρ, όπου η αμίνη συνδυάζεται με το CO_2 για να σχηματίσει φωσφορικό καρβαμυλίο, το οποίο με τη σειρά του εισέρχεται στον κύκλο της ουρίας για να μετατρέψει την ορνιθίνη σε κιτρουλίνη. Το ασπαρτικό δωρίζει μια άλλη ομάδα αμίνης μετατρέποντάς το σε φουμαρικό και αυτό δημιουργεί αργινίνη. Η μετατροπή της αργινίνης σε ορνιθίνη δημιουργεί την ουρία που πρέπει να απεκκριθεί από τα νεφρά ή η μετατροπή της αργινίνης σε κιτρουλίνη παρουσία οξυγόνου παράγει μονοξείδιο του αζώτου το οποίο αποικοδομείται ως νιτρικά για απέκκριση μέσω των νεφρών. Εναλλακτικά, οι άλλες μορφές απομάκρυνσης αζώτου μπορεί

να συμβούν στο νεφρό, οπότε μπορεί να απελευθερωθούν ελεύθερα ιόντα αμμωνίας ή αμμωνίου με τη μετατροπή της γλουταμίνης σε γλουταμικό. Η απελευθέρωση ιόντων αμμωνίου βοηθά στη ρύθμιση του pH μέσα στο σώμα αποβάλλοντας επιπλέον υδρογόνο [132,116].

Μεταβολισμός της γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη είναι η πιο άφθονη θειόλη χαμηλού μοριακού βάρους και η δισουλφιδική GSH/γλουταθειόνη είναι το κύριο ζεύγος οξειδοαναγωγής. Παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα, στον μεταβολισμό των θρεπτικών συστατικών και στη ρύθμιση των κυτταρικών συμβάντων (συμπεριλαμβανομένης της γονιδιακής έκφρασης, της σύνθεσης DNA και πρωτεϊνών, του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των κυττάρων, της μεταγωγής σήματος, της παραγωγής και της ανοσολογικής απόκρισης κυτοκίνης και της γλουταθειονυλίωσης πρωτεΐνης). Η ανεπάρκεια γλουταθειόνης συμβάλλει στο οξειδωτικό στρες, που παίζει βασικό ρόλο στη γήρανση και την παθογένεση πολλών ασθενειών. Συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές αντιδράσεις αλλά η βασικότερη λειτουργία της είναι να "σκανάρει" αποτελεσματικά τις ελεύθερες ρίζες και άλλα δραστικά είδη οξυγόνου. Σε τέτοιες αντιδράσεις, η GSH οξειδώνεται για να σχηματίσει GSSG (δισουλφίδιο γλουταθειόνης), η οποία στη συνέχεια ανάγεται σε GSH από την εξαρτώμενη από NADPH αναγωγή γλουταθειόνης. Επιπλέον, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (ένα ένζυμο που περιέχει σελήνιο) καταλύει την εξαρτώμενη από την GSH μείωση του H_2O_2 και άλλων υπεροξειδίων [124-127]. Η ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού παρατηρείται στα κύτταρα HaCaT μετά τον επωασμό τους με τις νανοκουκκίδες. Είναι μία ισχυρή ένδειξη οξειδωτικού στρες και επισημαίνει τη μεγαλύτερη ανάγκη των κυττάρων για την παραγωγή μεγαλύτερης συγκέντρωσης του εξαιρετικού αυτού αντιοξειδωτικού.

Οδός της φωσφορικής πεντόζης

Η οδός φωσφορικής πεντόζης (PPP), επίσης γνωστή ως διαφυγή φωσφορικής πεντόζης, είναι ένα σημαντικό μέρος του μεταβολισμού της γλυκόζης. Είναι ένα από τα κύρια αντιοξειδωτικά συστήματα κυτταρικής άμυνας, ελέγχοντας το οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής NADPH, το οποίο δρα ως δότης ηλεκτρονίων στα αντιοξειδωτικά αμυντικά συστήματα. Αναλυτικότερα, η PPP διακλαδίζεται μετά το πρώτο στάδιο της γλυκόλυσης και καταναλώνει την ενδιάμεση 6-φωσφορική γλυκόζη (G6P) για να δημιουργήσει 6-φωσφορική φρουκτόζη (F6P) και 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη (G3P) μέσω των οξειδωτικών και μη οξειδωτικών κλάδων. Σε αντίθεση με τη γλυκόλυση και την αερόβια οξείδωση της γλυκόζης, η PPP δεν παρέχει 5'-τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) για να

καλύπτει τις ενεργειακές απαιτήσεις των κυττάρων. Αντίθετα, παρέχει NADPH και 5-φωσφορική ριβόζη (R5P). Αυτοί οι δύο μεταβολίτες είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Το R5P είναι ένα δομικό στοιχείο για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Το NADPH είναι η αναγωγική ισχύς που απαιτείται για τη σύνθεση λιπαρών οξέων, στερολών, νουκλεοτιδίων και μη βασικών αμινοξέων. Επιπλέον, η προερχόμενη από NADPH μετατροπή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) σε ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης είναι σημαντική για την κυτταρική αντιοξειδωτική άμυνα. Είναι ενδιαφέρον ότι το NADPH χρησιμεύει επίσης ως υπόστρωμα των οξειδασών NADPH (NOXs) που παράγουν αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS). Είναι αποδεδειγμένο ότι είναι ένας κύριος ρυθμιστής για την ομοιόσταση και τη βιοσύνθεση της κυτταρικής αναγωγής-οξείδωσης (οξειδοαναγωγής). Τα ένζυμα στη PPP αναφέρεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές ανθρώπινες ασθένειες [128-130]. Και σε αυτή την περίπτωση, όπως και προγουμένως, το μονοπάτι ενεργοποιείται στην κυτταρική σειρά HaCaT ύστερα από την προσθήκη των νανοκουκκίδων. Σε συνδυασμό με την παραγωγή γλουταθειόνης, τονίζεται η ιδιαίτερη ανάγκη των κυττάρων για την καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες που έχει προκληθεί.

Μεταβολισμός της θειαμίνης

Η θειαμίνη ή αλλιώς βιταμίνη B1, είναι ένα απαραίτητο μόριο για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και κατέχει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση του μεταβολισμού των υδατανθράκων και συγκεκριμένα στην οδό φωσφορικής πεντόζης. Οι τρεις πιο σημαντικοί εστέρες θειαμίνης είναι η μονοφωσφορική θειαμίνη, η πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP) και η τριφωσφορική θειαμίνη. Η TPP, είναι απαραίτητη για την οξειδωτική φωσφορυλίωση και την οδό φωσφορικής πεντόζης δρώντας ως συμπράγοντας για αφυδρογονάσες α-κετοξέος όπως η πυροσταφυλική αφυδρογονάση (PDH), η α-κετογλουταρική αφυδρογονάση (GDH), η αφυδρογονάση α-κετοξέος διακλαδισμένης αλυσίδας και η τρανσκετολάση. Επιπλέον, είναι ένα σημαντικό συνένζυμο για βασικά βήματα στον κύκλο του Krebs, συμπεριλαμβανομένης της αποκαρβοξυλίωσης του πυροσταφυλικού και της οξείδωσης του άλφα-κετογλουταμικού οξέος. Επομένως, παρέχει μια σημαντική σύνδεση μεταξύ του κύκλου του γλυκολυτικού και του κιτρικού οξέος. Κατέχοντας ρόλο αντιοξειδωτικού, είναι απαραίτητη για την παραγωγή ενέργειας και όπως και άλλες βιταμίνες του συμπλέγματος B, συγκαταλέγεται στις "αντι-στρες" βιταμίνες, επειδή μπορεί να ενισχύσει το ανοσοποιητικό σύστημα και να βελτιώσει την ικανότητα αντοχής σε στρεσογόνες συνθήκες. Ανεπάρκεια θειαμίνης οδηγεί στην εξασθένηση του οξειδωτικού μηχανισμού και σε περαιτέρω διαταραχές.

Μεταβολισμός των σφιγγολιπιδίων

Τα σφιγγολιπίδια, ένα σύνολο δομικά διαφορετικών λιπιδίων, διαθέτουν τόσο υδρόφοβες όσο και υδρόφιλες ιδιότητες, και είναι σημαντικοί παράγοντες της πλασματικής μεμβράνης όλων σχεδόν των κυττάρων συμβάλλοντας σε μια σειρά από διαφορετικές κυτταρικές λειτουργίες. Συγκεκριμένα, διαδικασίες όπως η αλληλεπίδραση κυττάρου-κυττάρου, η κυτταρική προσκόλληση, ο πολλαπλασιασμός κυττάρων και ο κυτταρικός θάνατος ρυθμίζονται εν μέρει από σφιγγολιπίδια. Αυτά τα βιοενεργά μόρια συμμετέχουν σε εξαιρετικά πολύπλοκα και διασυνδεδεμένα μονοπάτια που αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της κυτταρικής ζωής. Τα σφιγγολιπίδια είναι μια κατηγορία αμφιπαθών λιπιδίων που μοιράζονται μια σφιγγοειδή βάση που είναι N-ακυλιωμένη με διάφορες αλυσίδες λιπαρών οξέων. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει λιπίδια όπως σφιγγοσίνη, κεραμίδιο, S1P, κεραμίδιο-1-φωσφορικό (C1P) και σφιγγομυελίνη (SM). Τα σφιγγολιπίδια μπορούν να χωριστούν σε τρεις δομικές κατηγορίες: σφιγγοειδείς βάσεις και παράγωγα, κεραμίδια και σύνθετα σφιγγολιπίδια [133]. Η εμφάνιση του μονοπατιού αυτού μόνο στα κύτταρα HEK-293 έπειτα από την προσθήκη των δύο ειδών νανοκουκκίδων, σε αντίθεση με την απουσία του στα κύτταρα HaCaT, υπογραμμίζει την επιπλέον ευαισθησία της κυτταρικής αυτής σειράς στα υπό μελέτη υλικά. Συχνό φαινόμενο αποτελεί η υπεροξείδωση των λιπιδίων που μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στις κυτταρικές μεμβράνες, αποφέρωντας έως και καταστροφή των κυττάρων. Συνεπώς, ένας πιθανός λόγος ενεργοποίησης του μονοπατιού είναι η επιδιόρθωση βλαβών στις κυτταρικές μεμβράνες, μέσω ενίσχυσης των λιπιδίων.

Μεταβολισμός του κυτοχρώματος P-450

Αμυντικά συστήματα που περιέχουν ως κεντρικό τους στοιχείο τη μοναδική αιμοπρωτεΐνη κυτόχρωμα P450 (CYP) έχουν εξελιχθεί για να προστατεύουν τους οργανισμούς από τοξικές ενώσεις. Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYP) είναι αιμοπρωτεΐνες που συνδέονται με τη μεμβράνη και παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών, στον κυτταρικό μεταβολισμό και στην ομοιόσταση.

Μεταβολισμός της καφεΐνης

Η καφεΐνη μεταβολίζεται σχεδόν αποκλειστικά από το ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450 με 3% ή λιγότερο να αποβάλλεται αμετάβλητη από τα νεφρά στα ούρα. Το ένζυμο CYP1A2 είναι υπεύθυνο για το μεταβολισμό πολλών αντιοξειδωτικών, συμπεριλαμβανομένης της καφεΐνης. Το κύριο προϊόν μεταβολισμού της είναι η παραξανθίνη με δευτερεύοντες μεταβολίτες τη θεοβρωμίνη και τη θεοφυλλίνη. Και τα δύο μόρια (καφεΐνη, παραξανθίνη) είναι γνωστά για τα αντιοξειδωτικά και προ-

οξειδωτικά τους χαρακτηριστικά, με την μοριακή αναλογία παραξανθίνης προς καφεΐνη να είναι μια ευρέως αποδεκτή μέτρηση για τον φαινότυπο του του κυτοχρώματος P450 1A2 (CYP1A2).

Οξειδωτική ικανότητα

Οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν για την εξακρίβωση της οξειδωτικής ικανότητας των νανοκουκκίδων, έδειξε πως διαθέτουν αντιοξειδωτικό χαρακτήρα, με τις νανοκουκκίδες αζώτου βορίου να κατέχουν υψηλότερη δράση. Στη συγκέντρωση LD₅₀ (200 µg/mL), η ικανότητα αλληλεπίδρασης με το DPPH και το H₂O₂ βρέθηκε σε ποσοστά 96% και 75%, για τις N,B-doped CNDs, ενώ για τις N,P-doped CNDs σε ποσοστά 94% και 56% αντίστοιχα. Παρόλο που προκύπτει πως οι νανοκουκκίδες έχουν αντιοξειδωτική δράση, τα μεταβολικά μονοπάτια που ενεργοποιήθηκαν όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν σε αυτές, υποδηλώνουν την πρόκληση οξειδωτικού στρες. Και στα δύο είδη νανοκουκκίδων, ο ρόλος τους ως προ-οξειδωτικά σε in vitro πειράματα είναι κυρίαρχος.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο πλαίσιο του παρόντος μεταπτυχιακού διπλώματος, πραγματοποιήθηκε μελέτη του μεταβολώματος δύο διαφορετικών ανθρώπινων αθανатоποιημένων κυτταρικών σειρών-κερατινοκύτταρα HaCaT και εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα HEK 293- μετά την έκθεσή τους σε νανοκουκκίδες άνθρακα, προκειμένου να προκύψουν συμπεράσματα για την επίδρασή τους. Μέσω της φασματοσκοπίας NMR και των βάσεων δεδομένων, τα αποτελέσματα της μεταβολομικής μελέτης μετά την έκθεση στα δύο νανοϋλικά, έδειξαν αλλαγές στο μεταβολισμό των αμινοξέων, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη βλάβης των πρωτεϊνών. Σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση του κύκλου κιτρικού οξέος και του μεταβολισμού αζώτου, καθώς και την εμφάνιση του μεταβολισμού της D-αργινίνης και της D-ορνιθίνης που συνδράμουν στον κύκλο της ουρίας, φαίνεται η ανάγκη των κυττάρων για τον καταβολισμό των αμινοξέων με στόχο την παραγωγή ενέργειας και την σύνθεση νέων πρωτεϊνών για την επίλυση των δυσλειτουργιών που προκλήθηκαν από τις νανοκουκκίδες. Μεταβολισμοί όπως αυτοί της γλουταθειόνης και της οδού φωσφορικής πεντόζης, επισημαίνουν την ανάγκη παραγωγής αντιοξειδωτικών και συνεπώς την ύπαρξη υψηλού οξειδωτικού στρες. Και τα δύο μεταβολικά μονοπάτια, ενεργοποιήθηκαν αποκλειστικά στην κυτταρική σειρά HaCaT, υποδηλώνοντας την εντονότερη επιρροή του οξειδωτικού στρες σε αυτά τα κύτταρα έναντι των HEK-293. Παρά την απουσία των δύο προηγούμενων ισχυρών μεταβολισμών αντιοξειδωτικής φύσης από την κυτταρική σειρά HEK-293, παρουσία των νανοκουκκίδων αζώτου βορίου, ενεργοποιείται ο μεταβολισμός της θειαμίνης, ο οποίος συνδράμει στην καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το υλικό. Επιπλέον, ένας ακόμη μεταβολισμός που παρουσιάστηκε μόνο στη κυτταρική σειρά HEK-293, είναι των σφιγγολιπιδίων. Έχοντας κρίσιμο ρόλο στη δομή της κυτταρικής μεμβράνης, τα προϊόντα μεταβολισμού τους, όπως το κεραμίδιο και η σφιγγοσίνη, ρυθμίζουν την επιβίωση των κυττάρων και την απόκριση στο οξειδωτικό στρες. Η εμφάνιση του μεταβολισμού, υποδηλώνει και πιθανό μονοπάτι απόπτωσης, καθιστώντας τη κυτταρική σειρά HEK-293 περισσότερο ευαίσθητη συγκριτικά με την HaCaT. Στα κύτταρα HaCaT παρουσία νανοκουκκίδων αζώτου βορίου εμφανίστηκε ο μεταβολισμός φαρμάκων-κυτοχρώματος 450, ενώ στα αντίστοιχα νανοϋλικά με τη κυτταρική σειρά HEK-293 εμφανίστηκε ο μεταβολισμός καφεΐνης. Οι περισσότερες οξειδώσεις χημικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένης και της καφεΐνης, καταλύονται από ένζυμα του κυτοχρώματος P450. Τα παράγωγα των ενζύμων αυτών, συνεισφέρουν στην αποτοξίνωση των νανοκουκκίδων από τα κύτταρα. Διαθέτουν αντιοξειδωτικό και προ-οξειδωτικό χαρακτήρα.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψε πως και από τα δύο αυτά είδη ναοκουκκίδων είναι κυτταροτοξικά και επιφέρουν πολλαπλές μεταβολές στο μεταβολισμό των κυττάρων. Τα μεταβολικά μονοπάτια που ενεργοποιήθηκαν, ως επί το πλείστον, παραπέμπουν στην πρόκληση οξειδωτικού στρες, προκαλώντας κυρίως διαταραχές στις πρωτεΐνες αλλά και στην κυτταρική μεμβράνη. Με βάση τα προαναφερθέντα, στοιχειοθετείται η επίδραση των δύο ειδών ναοκουκκίδων άνθρακα στις προς μελέτη ανθρώπινες κυτταρικές σειρές σε μεταβολικό επίπεδο και προκύπτουν χρήσιμα συμπεράσματα για την πιθανή επίδρασή τους στον άνθρωπο. Η μελέτη αυτή μπορεί να συνεισφέρει στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που αφορούν την παραγωγή μεταβολιτών και αποτελεί βάση για περαιτέρω έρευνα και ερμηνεία των επιπτώσεων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] L. A. Kolahalam, I. V. Kasi Viswanath, B. S. Diwakar, B. Govindh, V. Reddy, and Y. L. N. Murthy, “Review on nanomaterials: Synthesis and applications,” in *Materials Today: Proceedings*, Elsevier Ltd, 2019, pp. 2182–2190. doi: 10.1016/j.matpr.2019.07.371.
- [2] S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani, and F. Rizzolio, “The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine,” *Molecules*, vol. 25, no. 1. MDPI AG, 2020. doi: 10.3390/molecules25010112.
- [3] N. Joudeh and D. Linke, “Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists,” *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 20, no. 1. BioMed Central Ltd, Dec. 01, 2022. doi: 10.1186/s12951-022-01477-8.
- [4] G. A. Mansoori and T. A. F. Soelaiman, “Nanotechnology - An introduction for the standards community,” *Journal of ASTM International*, vol. 2, no. 6, pp. 17–38, 2005, doi: 10.1520/JAI13110.
- [5] D. T. Dan, “Nanotechnology, Nanoparticles and Nanoscience: A New Approach in Chemistry and Life Sciences,” *Soft Nanoscience Letters*, vol. 10, no. 02, pp. 17–26, 2020, doi: 10.4236/snl.2020.102002.
- [6] J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y. S. Chan, A. Dufresne, and M. K. Danquah, “Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations,” *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 9, no. 1. Beilstein-Institut Zur Forderung der Chemischen Wissenschaften, pp. 1050–1074, Apr. 03, 2018. doi: 10.3762/bjnano.9.98.
- [7] R. Kjr, R. K. Mohapatra, and M. Phil, “Chemistry_Nanomaterials.”
- [8] M. M. El-Kady *et al.*, “Nanomaterials: A comprehensive review of applications, toxicity, impact, and fate to environment,” *Journal of Molecular Liquids*, vol. 370. Elsevier B.V., Jan. 15, 2023. doi: 10.1016/j.molliq.2022.121046.
- [9] T. A. Saleh, “Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities,” *Environmental Technology and Innovation*, vol. 20. Elsevier B.V., Nov. 01, 2020. doi: 10.1016/j.eti.2020.101067.
- [10] A. Cayuela, M. L. Soriano, C. Carrillo-Carrión, and M. Valcárcel, “Semiconductor and carbon-based fluorescent nanodots: The need for consistency,” *Chemical Communications*, vol. 52, no. 7, pp. 1311–1326, 2016, doi: 10.1039/c5cc07754k.
- [11] A. Barhoum *et al.*, “Review on Natural, Incidental, Bioinspired, and Engineered Nanomaterials: History, Definitions, Classifications, Synthesis, Properties, Market, Toxicities, Risks, and Regulations,” *Nanomaterials*, vol. 12, no. 2, Jan. 2022, doi: 10.3390/nano12020177.

- [12] D. Holmannova, P. Borsky, T. Svadlakova, L. Borska, and Z. Fiala, "Carbon Nanoparticles and Their Biomedical Applications," *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 12, no. 15, pp. 1–21, 2022, doi: 10.3390/app12157865.
- [13] R. B. Onyancha, K. E. Ukhurebor, U. O. Aigbe, O. A. Osibote, H. S. Kusuma, and H. Darmokoesoemo, "A Methodical Review on Carbon-Based Nanomaterials in Energy-Related Applications," *Adsorption Science and Technology*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/4438286.
- [14] O. Zaytseva and G. Neumann, "Carbon nanomaterials: Production, impact on plant development, agricultural and environmental applications," *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, vol. 3, no. 1, pp. 1–26, 2016, doi: 10.1186/s40538-016-0070-8.
- [15] A. Mar, "Carbon-Based Nanomaterials," 2021.
- [16] J. Singh, M. Kumar, A. Sharma, G. Pandey, K. Chae, and S. Lee, "We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %," *Intech*, vol. 11, no. tourism, p. 13, 2016, [Online]. Available: <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
- [17] P. I. Fogel, "Kletochnye faktory immuniteta pri fiziologicheskom techenii beremennosti i nevynashivani.,," *Akusherstvo i ginekologiya*, vol. 60, no. 12, pp. 28–30, 1982.
- [18] J. Liu, R. Li, and B. Yang, "Carbon Dots: A New Type of Carbon-Based Nanomaterial with Wide Applications," *ACS Central Science*, vol. 6, no. 12, pp. 2179–2195, 2020, doi: 10.1021/acscentsci.0c01306.
- [19] S. M. Sharker and M. Do, "Nanoscale Carbon-Polymer Dots for Theranostics and Biomedical Exploration," *Journal of Nanotheranostics*, vol. 2, no. 3, pp. 118–130, 2021, doi: 10.3390/jnt2030008.
- [20] S. Tao, T. Feng, C. Zheng, S. Zhu, and B. Yang, "Carbonized Polymer Dots: A Brand New Perspective to Recognize Luminescent Carbon-Based Nanomaterials," *Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 10, pp. 5182–5188, 2019, doi: 10.1021/acs.jpclett.9b01384.
- [21] L. Cui, X. Ren, M. Sun, H. Liu, and L. Xia, "Carbon dots: Synthesis, properties and applications," *Nanomaterials*, vol. 11, no. 12, 2021, doi: 10.3390/nano11123419.
- [22] L. Xiao and H. Sun, "Novel properties and applications of carbon nanodots," *Nanoscale Horizons*, vol. 3, no. 6, pp. 565–597, 2018, doi: 10.1039/c8nh00106e.
- [23] Y. Wang and A. Hu, "Carbon quantum dots: Synthesis, properties and applications," *Journal of Materials Chemistry C*, vol. 2, no. 34, pp. 6921–6939, 2014, doi: 10.1039/c4tc00988f.
- [24] A. Sciortino, A. Cannizzo, and F. Messina, "Carbon Nanodots: A Review—From the Current Understanding of the Fundamental Photophysics to the Full Control of the

- Optical Response,” *C*, vol. 4, no. 4, p. 67, 2018, doi: 10.3390/c4040067.
- [25] V. L. John, Y. Nair, and T. P. Vinod, “Doping and Surface Modification of Carbon Quantum Dots for Enhanced Functionalities and Related Applications,” *Particle and Particle Systems Characterization*, vol. 38, no. 11, pp. 1–28, 2021, doi: 10.1002/ppsc.202100170.
- [26] Y. Park, J. Yoo, B. Lim, W. Kwon, and S. W. Rhee, “Improving the functionality of carbon nanodots: Doping and surface functionalization,” *Journal of Materials Chemistry A*, vol. 4, no. 30, pp. 11582–11603, 2016, doi: 10.1039/c6ta04813g.
- [27] Y. Sun, M. Zhang, B. Bhandari, and C. Yang, “Recent Development of Carbon Quantum Dots: Biological Toxicity, Antibacterial Properties and Application in Foods,” *Food Reviews International*, vol. 38, no. 7, pp. 1513–1532, 2022, doi: 10.1080/87559129.2020.1818255.
- [28] Z. Zaidi *et al.*, “Fabrication, Characteristics, and Therapeutic Applications of Carbon-Based Nanodots,” *Journal of Nanomaterials*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/8031495.
- [29] M. Havrdova *et al.*, “Toxicity of carbon dots-Effect of surface functionalization on the cell viability, reactive oxygen species generation and cell cycle,” *Carbon*, vol. 99, pp. 238–248, 2016, doi: 10.1016/j.carbon.2015.12.027.
- [30] S. Khan *et al.*, “Recent advances in carbon nanodots: A promising nanomaterial for biomedical applications,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 13, 2021, doi: 10.3390/ijms22136786.
- [31] N. Javed and D. M. O’Carroll, “Carbon Dots and Stability of Their Optical Properties,” *Particle and Particle Systems Characterization*, vol. 38, no. 4, pp. 1–12, 2021, doi: 10.1002/ppsc.202000271.
- [32] N. Azam, M. Najabat Ali, and T. Javaid Khan, “Carbon Quantum Dots for Biomedical Applications: Review and Analysis,” *Frontiers in Materials*, vol. 8, no. August, pp. 1–21, 2021, doi: 10.3389/fmats.2021.700403.
- [33] C. Yang *et al.*, “Dual information encryption of carbon dots endowed with recoverable functions after interception,” *New Journal of Chemistry*, vol. 45, no. 18, pp. 8203–8209, 2021, doi: 10.1039/d0nj06251k.
- [34] S. Kotta *et al.*, “Exploring the Potential of Carbon Dots to Combat COVID-19,” *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 7, no. December, pp. 1–11, 2020, doi: 10.3389/fmolb.2020.616575.
- [35] T. Guerrero-Esteban, C. Gutiérrez-Sánchez, A. M. Villa-Manso, M. Revenga-Parra, F. Pariente, and E. Lorenzo, “Sensitive SARS-CoV-2 detection in wastewaters using a carbon nanodot-amplified electrochemiluminescence immunosensor,” *Talanta*, vol. 247, no. February, 2022, doi: 10.1016/j.talanta.2022.123543.
- [36] J. Belza, A. Opletalová, and K. Poláková, “Carbon dots for virus detection and therapy,” *Microchimica Acta*, vol. 188, no. 12, 2021, doi: 10.1007/s00604-021-05076-

6.

- [37] Y. Xiao *et al.*, “Effect of Surface Modifications on Cellular Uptake of Gold Nanorods in Human Primary Cells and Established Cell Lines,” *ACS Omega*, vol. 5, no. 50, pp. 32744–32752, 2020, doi: 10.1021/acsomega.0c05162.
- [38] P. B. Jingkun Jiang, Günter Oberdörster, Alison Elder, Robert Gelein, Pamela Mercer, “Does Nanoparticle Activity Depend upon Size and Crystal Phase?,” *Nanotoxicology*, 2008, doi: 10.1080/17435390701882478.
- [39] R. S. Shikha Nangia, “Effects of nanoparticle charge and shape anisotropy on translocation through cell membranes,” *Langmuir*, vol. 28, no. 51, pp. 17666–17671, 2012.
- [40] Y.-J. H. I-Lun Hsiao, “Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO nanoparticles toward human lung epithelial cells,” *Sci Total Environ*, 2011, doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.12.033.
- [41] D. Y. F. Ofek Bar-Ilan, Ralph M Albrecht, Valerie E Fako, “Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos,” *Small*, no. 16, pp. 1897–910, 2009, doi: 10.1002/smll.200801716.
- [42] P. N. P. Indrajit Roy, Tymish Y Ohulchanskyy, Haridas E Pudavar, Earl J Bergey, Allan R Oseroff, Janet Morgan, Thomas J Dougherty, “Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy,” *J Am Chem Soc*, vol. 125, no. 26, pp. 7860–5, 2003, doi: 10.1021/ja0343095.
- [43] V. M. R. Catherine M Goodman, Catherine D McCusker, Tuna Yilmaz, “Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains,” *Bioconjug Chem*, vol. 15, no. 4, pp. 897–900, 2004, doi: 10.1021/bc049951i.
- [44] S. M. H. Jeanne E Skebo, Christin M Grabinski, Amanda M Schrand, John J Schlager, “Assessment of metal nanoparticle agglomeration, uptake, and interaction using high-illuminating system,” *Int J Toxicol*, vol. 26, no. 2, pp. 135–41, 2007, doi: 10.1080/10915810701226248.
- [45] J. O. Günter Oberdörster, Eva Oberdörster, “Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles,” *Environ Health Perspect*, vol. 113, no. 7, pp. 832–39, 2005, doi: 10.1289/ehp.7339.
- [46] P. C. Ray, H. Yu, and P. P. Fu, *Toxicity and environmental risks of nanomaterials: Challenges and future needs*, vol. 27, no. 1. 2009. doi: 10.1080/10590500802708267.
- [47] X. Yuan, X. Zhang, L. Sun, Y. Wei, and X. Wei, “Cellular Toxicity and Immunological Effects of Carbon-based Nanomaterials,” *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 16, no. 1, 2019, doi: 10.1186/s12989-019-0299-z.
- [48] M. Sajid *et al.*, “Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects,” *Environmental*

- Science and Pollution Research*, vol. 22, no. 6, pp. 4122–4143, 2015, doi: 10.1007/s11356-014-3994-1.
- [49] Z. Hossain, G. Mustafa, and S. Komatsu, “Plant responses to nanoparticle stress,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, no. 11, pp. 26644–26653, 2015, doi: 10.3390/ijms161125980.
- [50] M. Chen *et al.*, “Toxicity of carbon nanomaterials to plants, animals and microbes: Recent progress from 2015-present,” *Chemosphere*, vol. 206, pp. 255–264, 2018, doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.05.020.
- [51] J. L. and R. M. A P Popov, A V Priezzhev, “Applied Physics TiO₂ nanoparticles as an effective UV-B radiation skin-protective compound in sunscreens,” *Journal of Physics D*, vol. 38, no. 15, 2005, doi: 10.1088/0022-3727/38/15/006.
- [52] P. Wipt and K. M. George, “基因的改变 NIH Public Access,” *Bone*, vol. 23, no. 1, pp. 1–7, 2008, doi: 10.1002/wnan.54.Assessing.
- [53] G. P. Risbridger, “Human cell lines as tools of our trade: ‘Laying it on the (cell) line,’” *Molecular Endocrinology*, vol. 29, no. 1, pp. 1–2, 2015, doi: 10.1210/me.2014-1376.
- [54] and J. L.-S. Jon R. Lorsch , Francis S. Collins, “Fixing problems with cell lines,” *Science*, vol. 346, no. 6216, pp. 1452–1453, 2014, doi: 10.1126/science.1259110.
- [55] S. I. Jedrzejczak M, “Bovine mammary epithelial cell cultures for the study of mammary gland functions.,” *Vitro Cellular & Developmental Biology—Animal*, vol. 50, pp. 389–98, 2014, doi: 10.1007/s11626-013-9711-4.
- [56] W. Roux, “Wilhelm Roux (1850?1924),” *Roux’s Archives of Developmental Biology*, vol. 204, no. 1, pp. i–i, 1994, doi: 10.1007/bf00744866.
- [57] and Z. S. Shuaibu Abdullahi Hudu, Ahmed Subeh Alshrari, Ahmad Syahida, “Cell Culture, Technology: Enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases,” *J Clin Diagn Res.*, vol. 10, no. 3, pp. DE01–DE05., 2016, doi: 10.7860/JCDR/2016/15837.7460.
- [58] G. L. Pítia Flores Ledur , Giovana Ravizzoni Onzi, Hui Zong, “Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries?,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 40, 2017, doi: 10.18632/oncotarget.20193.
- [59] Zhou, Yang, and Wang, “No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析 Title,” *file:///C:/Users/VERA/Downloads/ASKEP_AGREGAT_ANAK_and_REMAJA_PRINT.docx*, vol. 21, no. 1, pp. 1–9, 2020.
- [60] Y.-L. Cheng *et al.*, “We are IntechOpen , the world ’ s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %,” *Intech*, vol. 11, no. tourism, p. 13, 2016, [Online]. Available:

<https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>

- [61] T. Yao and Y. Asayama, “Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues,” *Reproductive Medicine and Biology*, vol. 16, no. 2, pp. 99–117, 2017, doi: 10.1002/rmb2.12024.
- [62] M. M. Pan C, Kumar C, Bohl S, Klingmueller U, ““Comparative Proteomic Phenotyping of Cell Lines and Primary Cells to Assess Preservation of Cell Type-specific Functions.,”” *Cell Proteomics.*, pp. 443-450., 2009.
- [63] D. M. Pastor *et al.*, “Primary cell lines: False representation or model system? A comparison of four human colorectal tumors and their coordinately established cell lines,” *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, vol. 3, no. 1, pp. 69–83, 2010.
- [64] M. D. David Pamies, Anna Bal-Price, Christophe Chesné, Sandra Coecke, Andras Dinnyes, Chantra Eskes, Regina Grillari, Gerhard Gstraunthaler, Thomas Hartung, Paul Jennings, Marcel Leist, Ulrich Martin, Robert Passier, Jens C Schwamborn, Glyn N Stacey, Heidrun El, “Advanced Good Cell Culture Practice for human primary, stem cell-derived and organoid models as well as microphysiological systems,” pp. 353–378, 2018, doi: 10.14573/altex.1710081.
- [65] G. Kaur and J. M. Dufour, “Cell lines,” *Spermatogenesis*, vol. 2, no. 1, pp. 1–5, 2012, doi: 10.4161/spmg.19885.
- [66] M. I. Maqsood, M. M. Matin, A. R. Bahrami, and M. M. Ghasroldasht, “Immortality of cell lines: Challenges and advantages of establishment,” *Cell Biology International*, vol. 37, no. 10, pp. 1038–1045, 2013, doi: 10.1002/cbin.10137.
- [67] Hani Yousef; Mandy Alhajj; Sandeep Sharma., “Anatomy, Skin (Integument), Epidermis,” 2022.
- [68] I. Colombo *et al.*, “HaCaT Cells as a Reliable in Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes,” *Mediators of Inflammation*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/7435621.
- [69] E. Pavez Lorie *et al.*, “Characterisation of the novel spontaneously immortalized and invasively growing human skin keratinocyte line HaSKpw,” *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, pp. 1–20, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-71315-0.
- [70] P. Boukamp, R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N. E. Fusenig, “Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line,” *Journal of Cell Biology*, vol. 106, no. 3, pp. 761–771, 1988, doi: 10.1083/jcb.106.3.761.
- [71] M. T. Rekus, “Dissertation: Characterization of growth and differentiation of a spontaneously immortalized keratinocyte cell line (HaCaT) in a defined, serum-free culture system.,” p. 96, 2000.

- [72] E. Tan, C. S. H. Chin, Z. F. S. Lim, and S. K. Ng, "HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9, no. December, pp. 1–9, 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.796991.
- [73] J. Yuan, W. W. Xu, S. Jiang, H. Yu, and H. F. Poon, "The scattered twelve tribes of HEK293," *Biomedical and Pharmacology Journal*, vol. 11, no. 2, pp. 621–623, 2018, doi: 10.13005/bpj/1414.
- [74] Y. C. Lin *et al.*, "Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations," *Nature Communications*, vol. 5, no. 11, 2014, doi: 10.1038/ncomms5767.
- [75] T. G. S. Thomas Philip, "HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 51, no. 3, pp. 187–200, 2005, doi: <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>.
- [76] J. Dumont, D. Euwart, B. Mei, S. Estes, and & R. Kshirsagar, "Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives," *Critical reviews in Biotechnology*, vol. 36, no. 6, pp. 1110–1122, 2016, doi: <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266>.
- [77] M. Bell and J. M. Blais, "'-Omics' workflow for paleolimnological and geological archives: A review," *Science of the Total Environment*, vol. 672, pp. 438–455, 2019, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.477.
- [78] R. C. A. Papetti, "High-performance capillary electrophoresis for food quality evaluation," *Elsevier Inc.*, 2019, doi: doi:10.1016/b978-0-12-814217-2.00014-7.
- [79] J. J. L. Mario Vailati-Riboni, Valentino Palombo, "What are omics sciences?," *Springer*, pp. 1–7, 2017, doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-43033-1_1.
- [80] C. M. Micheel, S. J. Nass, G. S. Omenn, and H. S. Policy, *Evolution of Translational Omics : Lessons Learned and the Path Forward IOM Committee on Omics-based Predictive Tests On Behalf of the IOM Committee* : 2012.
- [81] X. Dai and L. Shen, "Advances and Trends in Omics Technology Development," *Frontiers in Medicine*, vol. 9, no. July, 2022, doi: 10.3389/fmed.2022.911861.
- [82] B. Daviss, "Growing pains for metabolomics," *Scientist.*, 2005.
- [83] C. B. Clish, "Metabolomics: an emerging but powerful tool for precision medicine," *Molecular Case Studies*, vol. 1, no. 1, p. a000588, 2015, doi: 10.1101/mcs.a000588.
- [84] J. K. N. E. Holmes, I.D. Wilson, "Metabolic Phenotyping in Health and Disease," *Cell*, 2008, doi: doi:10.1016/j.cell.2008.08.026.
- [85] J. A. Camila Pereira Braga, "Metabolome Analysis," *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, vol. 3, pp. 463–475, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20134-9>.
- [86] and C. B. C. Lee D. Roberts, Amanda L. Souza, Robert E. Gerszten, "Targeted Metabolomics," *PuBMeD Central*, 2013, doi: 10.1002/0471142727.mb3002s98.

- [87] and J. A. M. Alexandra C. Schrimpe-Rutledge, Simona G. Codreanu, Stacy D. Sherrod, “Untargeted metabolomics strategies – Challenges and Emerging Directions,” *PuBMeD Central*, 2016, doi: 10.1007/s13361-016-1469-y.
- [88] S. Alseekh and A. R. Fernie, “Metabolomics 20 years on: what have we learned and what hurdles remain?,” *Plant Journal*, vol. 94, no. 6, pp. 933–942, 2018, doi: 10.1111/tpj.13950.
- [89] A. Cambiaghi, M. Ferrario, and M. Masseroli, “Analysis of metabolomic data: Tools, current strategies and future challenges for omics data integration,” *Briefings in Bioinformatics*, vol. 18, no. 3, pp. 498–510, 2017, doi: 10.1093/bib/bbw031.
- [90] S. V., “Metabolomics technology and bioinformatics.,” *Brief Bioinform*, vol. 7, pp. 128–39, 2006.
- [91] et al . Castle AL, Fiehn O, Kaddurah-Daouk R, “Metabolomics Standards Workshop and the development of international standards for reporting metabolomics experimental results.,” *Brief. Bioinform*, vol. 7, pp. 159–65., 2006.
- [92] et al. Sugimoto M, Kawakami M, Robert M, “Bioinformatics tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis,” *Curr Bioinform*, vol. 7, pp. 96–108, 2012.
- [93] K. A., “Metabolomics: The state of art.,” *Biotechnol Biotechnol Equip*, vol. 24, pp. 1537–43, 2010.
- [94] P. GJ., “Separation strategies for untargeted metabolomics.,” *J Sep Sci*, vol. 34, pp. 3460–9., 2011.
- [95] V. D., “Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 6, pp. 1523–48., 2012.
- [96] et al. Villas-Boas SG, Hojer-Pedersen J, Akesson M, “Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods.,” *Yeast*, vol. 22, pp. 1155–69., 2005.
- [97] Z. P., “Comparing and combining NMR spectroscopy and mass spectrometry in metabolomics.,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 387, pp. 525–7, 2007.
- [98] et al Zhang A, Sun H, Wang P, “Modern analytical techniques in metabolomics analysis,” *Analyst*, vol. 137, p. 293, 2012.
- [99] E. DI Dunn WD, “Metabolomics: current analytical platforms and methodologies.,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 387, pp. 525–7, 2007.
- [100] A. H. Emwas *et al.*, “Nmr spectroscopy for metabolomics research,” *Metabolites*, vol. 9, no. 7, 2019, doi: 10.3390/metabo9070123.
- [101] S. Moco, “Studying Metabolism by NMR-Based Metabolomics,” *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 9, no. April, pp. 1–12, 2022, doi: 10.3389/fmolb.2022.882487.

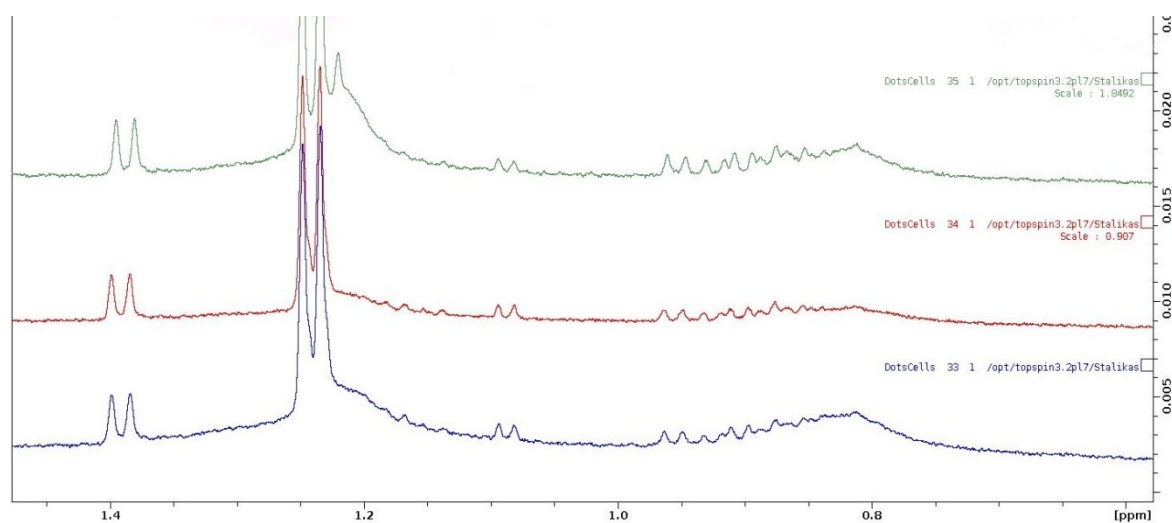
- [102] G. A. Nagana Gowda and D. Djukovic, "Overview of mass spectrometry-based metabolomics: Opportunities and challenges," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1198, pp. 3–12, 2014, doi: 10.1007/978-1-4939-1258-2_1.
- [103] A. B. R. M. V. Lind, O.I. Savolainen, "The use of mass spectrometry for analysing metabolite biomarkers in epidemiology: methodological and statistical considerations for application to large numbers of biological samples," *Eur. J. Epidemiol.*, 2016, doi: doi:10.1007/s10654-016-0166-2.
- [104] A.-H. M. Emwas, "The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research," *Methods Mol Biol*, pp. 161–93, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-2377-9_13.
- [105] K. D.S. Wishart, D. Tzur, C. Knox, R. Eisner, A.C. Guo, N. Young, D. Cheng, D. 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, N. G. Block, D.D. Hau, J. Wagner, J. Miniaci, M. Clements, M. Gebremedhin, F. Y. Zhang, G.E. Duggan, G.D. MacInnis, A.M. Weljie, R. Dowlatabadi, L. Bamforth, D. Clive, R. Greiner, L. Li, T. Marrie, B.D. Sykes, H.J. Vogel, and Querengesser, "HMDB: The human metabolome database," *Nucleic Acids Res.*, 2007, doi: oi:10.1093/nar/gkl923.
- [106] N. D.S. Wishart, C. Knox, A.C. Guo, R. Eisner, N. Young, B. Gautam, D.D. Hau, J. A. C. Psychogios, E. Dong, S. Bouatra, R. Mandal, I. Sinelnikov, J. Xia, L. Jia, R. E. Lim, C.A. Sobsey, S. Shrivastava, P. Huang, P. Liu, L. Fang, J. Peng, M. Fradette, D. Cheng, D. Tzur, M. Clements, A. Lewis, A. de souza, A. Zuniga, H. J. Dawe, Y. Xiong, D. Clive, R. Greiner, A. Nazyrova, R. Shaykhutdinov, L. Li, and I. F. Vogel, "HMDB: A knowledgebase for the human metabolome," *Nucleic Acids Res*, 2009, doi: doi:10.1093/nar/gkn810.
- [107] T. D.S. Wishart, Y.D. Feunang, A. Marcu, A.C. Guo, K. Liang, R. Vázquez-Fresno, M. Sajed, D. Johnson, C. Li, N. Karu, Z. Sayeeda, E. Lo, N. Assempour, A. S.-C. Berjanskii, S. Singhal, D. Arndt, Y. Liang, H. Badran, J. Grant, and A. S. Y. Liu, R. Mandal, V. Neveu, A. Pon, C. Knox, M. Wilson, C. Manach, "HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018," *Nucleic Acids Res*, 2018, doi: doi:10.1093/nar/gkx1089.
- [108] R. D.S. Wishart, T. Jewison, A.C. Guo, M. Wilson, C. Knox, Y. Liu, Y. Djoumbou, F. Mandal, F. Aziat, E. Dong, S. Bouatra, I. Sinelnikov, D. Arndt, J. Xia, P. Liu, R. G. Yallou, T. Bjorndahl, R. Perez-Pineiro, R. Eisner, F. Allen, V. Neveu, and A. Scalbert, "HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013," *Nucleic Acids Res*, 2013, doi: doi:10.1093/nar/gks1065.
- [109] W. D. Xia J, "MSEA: a web-based tool to identify biologically meaningful patterns in quantitative metabolomic data.," *Nucleic Acids Res*, vol. 38, pp. W71–7., 2010.
- [110] J. X. J. Chong, O. Soufan, C. Li, I. Caraus, S. Li, G. Bourque, D.S. Wishart, "MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis," *Nucleic Acids Res*, 2018, doi: doi:10.1093/nar/gky310.

- [111] J. X. J. Chong, M. Yamamoto, “MetaboAnalystR 2.0: From raw spectra to biological insights, *Metabolites*,” *Nucleic Acids Res*, 2019, doi: doi:10.3390/metabo9030057.
- [112] D. S. W. J. Xia, “Using metaboanalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis,” *Curr. Protoc. Bioinforma.*, 2016, doi: doi:10.1002/cpbi.11.
- [113] C. D. Chatzimitakos, T.G.; Kasouni, A.I.; Troganis, A.N.; Stalikas, “Exploring the antibacterial potential and unraveling the mechanism of action of non-doped and heteroatom-doped carbon nanodots,” *J. Nanoparticle Res*, vol. 22, no. 36, 2020.
- [114] C. D. S. T. Chatzimitakos, A. Kallimanis, A. Avgeropoulos, “No Antibacterial, Anti-Biofouling, and Antioxidant Prospects of Metal-Based Nanomaterials,” *Clean - Soil, Air, Water.*, vol. 44, pp. 794–802, 2016, doi: 10.1002/clen.201500366.
- [115] C. D. Chatzimitakos, T.G.; Kasouni, A.I.; Troganis, A.N.; Stalikas, “Carbonization of Human Fingernails: Toward the Sustainable Production of Multifunctional Nitrogen and Sulfur Codoped Carbon Nanodots with Highly Luminescent Probing and Cell Proliferative/Migration Properties,” *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, vol. 10, pp. 16024–16032, 2018, doi: 10.1021/acsami.8b03263.
- [116] N. S. Chandel, “Amino acid metabolism,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 13, no. 4, pp. 1–17, 2021, doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A040584.
- [117] Q. Wu, X. Chen, J. Li, and S. Sun, “Serine and metabolism regulation: A novel mechanism in antitumor immunity and senescence,” *Aging and Disease*, vol. 11, no. 6, pp. 1640–1653, 2020, doi: 10.14336/AD.2020.0314.
- [118] G. W. Weiwei Wang , Zhenlong Wu, Zhaolai Dai, Ying Yang, Junjun Wang, “Glycine metabolism in animals and humans: implications for nutrition and health,” *Amino Acids*, vol. 45, no. 3, pp. 463–77, 2013, doi: 10.1007/s00726-013-1493-1.
- [119] D. M. Richard, M. A. Dawes, C. W. Mathias, A. Acheson, N. Hill-Kapturczak, and D. M. Dougherty, “L-tryptophan: Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications,” *International Journal of Tryptophan Research*, vol. 2, no. 1, pp. 45–60, 2009, doi: 10.4137/ijtr.s2129.
- [120] L. Aquili, “The Role of Tryptophan and Tyrosine in Executive Function and Reward Processing,” *International Journal of Tryptophan Research*, vol. 13, 2020, doi: 10.1177/1178646920964825.
- [121] M. Akram, “Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism,” *Cell Biochemistry and Biophysics*, vol. 68, p. pages 475–478, 2013, doi: 10.1007/s12013-013-9750-1.
- [122] N. C. Williams and L. A. J. O'Neill, “A role for the krebs cycle intermediate citrate in metabolic reprogramming in innate immunity and inflammation,” *Frontiers in Immunology*, vol. 9, no. FEB, pp. 1–11, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.00141.
- [123] M. Akram, “Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism,” *Cell Biochemistry and Biophysics*, vol. 68, no. 3, pp. 475–478, 2014, doi: 10.1007/s12013-013-9750-1.

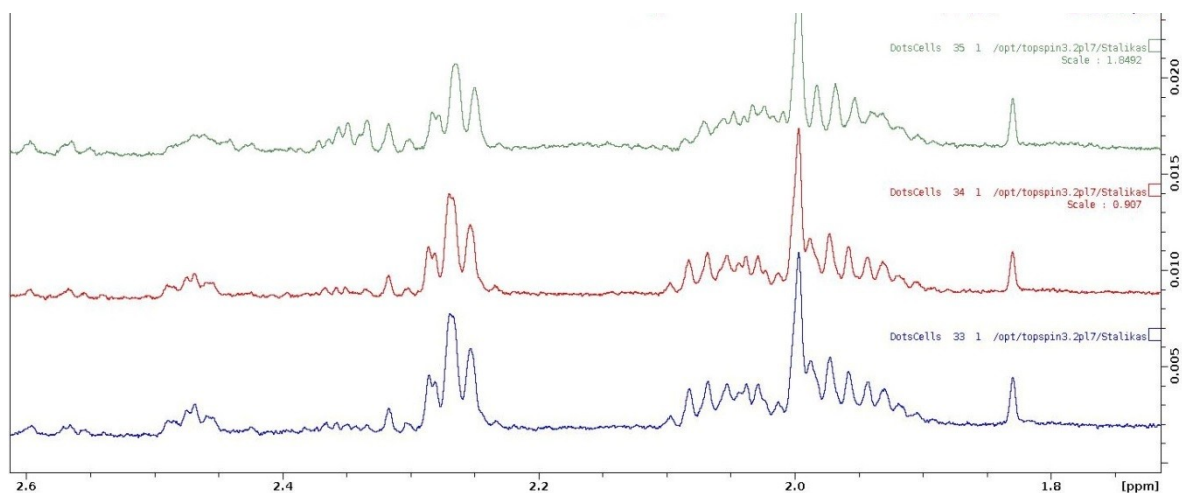
- [124] D. Öztekin Long, Nicole, M and Badre *et al.*, “基因的改变 NIH Public Access,” *Aquatic Toxicology*, vol. 9, no. 1, pp. 1–7, 2016, doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006.Glutathione.
- [125] F. Silvagno, A. Vernone, and G. P. Pescarmona, “The role of glutathione in protecting against the severe inflammatory response triggered by covid-19,” *Antioxidants*, vol. 9, no. 7, pp. 1–16, 2020, doi: 10.3390/antiox9070624.
- [126] R. Franco and J. A. Cidlowski, “Apoptosis and glutathione: Beyond an antioxidant,” *Cell Death and Differentiation*, vol. 16, no. 10, pp. 1303–1314, 2009, doi: 10.1038/cdd.2009.107.
- [127] G. Wu, Y.-Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, and N. D. Turner, “Glutathione Metabolism and Its,” *The Journal of Nutrition*, vol. 134, no. 3, pp. 489–492, 2004.
- [128] S. J. Moon, W. Dong, G. N. Stephanopoulos, and H. D. Sikes, “Oxidative pentose phosphate pathway and glucose anaplerosis support maintenance of mitochondrial NADPH pool under mitochondrial oxidative stress,” *Bioengineering and Translational Medicine*, vol. 5, no. 3, pp. 1–18, 2020, doi: 10.1002/btm2.10184.
- [129] E. Cheung, V. Olin-sandoval, and N. Grüning, “pentoseHHS Public Access,” *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, vol. 90, no. 3, pp. 927–963, 2015, doi: 10.1111/brv.12140.The.
- [130] T. Ge, J. Yang, S. Zhou, Y. Wang, Y. Li, and X. Tong, “The Role of the Pentose Phosphate Pathway in Diabetes and Cancer,” *Frontiers in Endocrinology*, vol. 11, no. June, pp. 1–11, 2020, doi: 10.3389/fendo.2020.00365.
- [131] L. De Jong, Y. Meng, J. Dent, and S. Hekimi, “Thiamine pyrophosphate biosynthesis and transport in the nematode *Caenorhabditis elegans*,” *Genetics*, vol. 168, no. 2, pp. 845–854, 2004, doi: 10.1534/genetics.104.028605.
- [132] K. Kurmi and M. C. Haigis, “Nitrogen Metabolism in Cancer and Immunity,” *Trends in Cell Biology*, vol. 30, no. 5, pp. 408–424, 2020, doi: 10.1016/j.tcb.2020.02.005.
- [133] B. M. Quinville, N. M. Deschenes, A. E. Ryckman, and J. S. Walia, “A comprehensive review: Sphingolipid metabolism and implications of disruption in sphingolipid homeostasis,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 11, 2021, doi: 10.3390/ijms22115793.
- [134] Anne M McDonnell, PharmD, BCOP and Cathy H. Dang, “Basic Review of the Cytochrome P450 System,” *J Adv Pract Oncol*, vol. 4, no. 4, pp. 263–268, 2013, doi: 10.6004/jadpro.2013.4.4.7.
- [135] Palrasu Manikandan and Siddavaram Nagini, “Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review,” *BENTHAM SCIENCE*, vol. 19, pp. 38–54, 2018, doi: 10.2174/1389450118666170125144557.
- [136] J. Zhang *et al.*, “Influence of a combination of triptolide and ferulic acid on the activities of CYP450 enzymes and oxidative stress in HaCaT cells,” *Experimental*

[137] J. Grzegorzewski, F. Bartsch, A. Köller, and M. König, “Pharmacokinetics of Caffeine: A Systematic Analysis of Reported Data for Application in Metabolic Phenotyping and Liver Function Testing,” *Frontiers in Pharmacology*, vol. 12, no. February, 2022, doi: 10.3389/fphar.2021.752826.

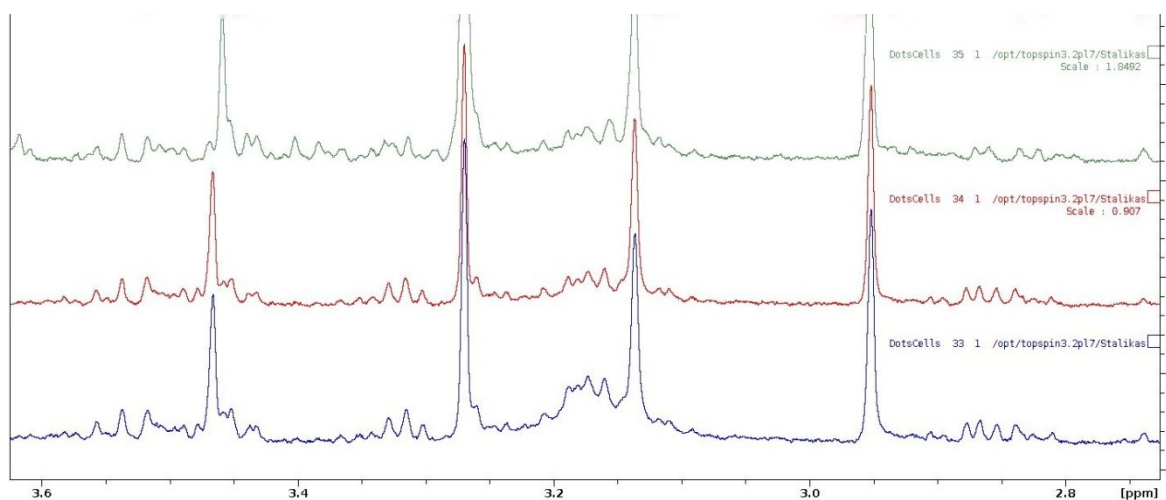
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



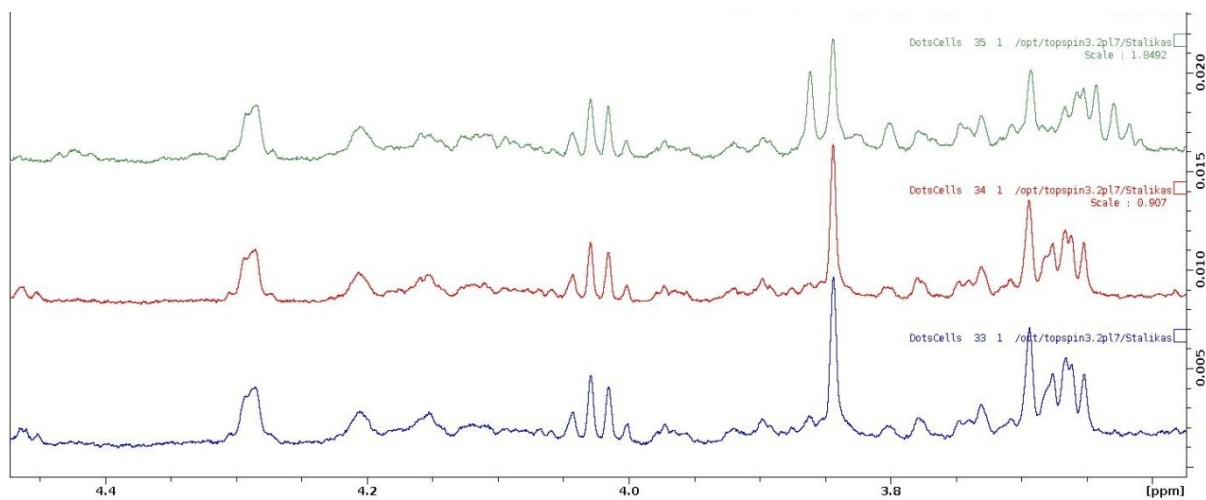
Εικόνα 38: Φάσμα ¹H-NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HEK-293 (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDs (κόκκινο) N,B-CNDs (πράσινο) 1-1,5ppm.



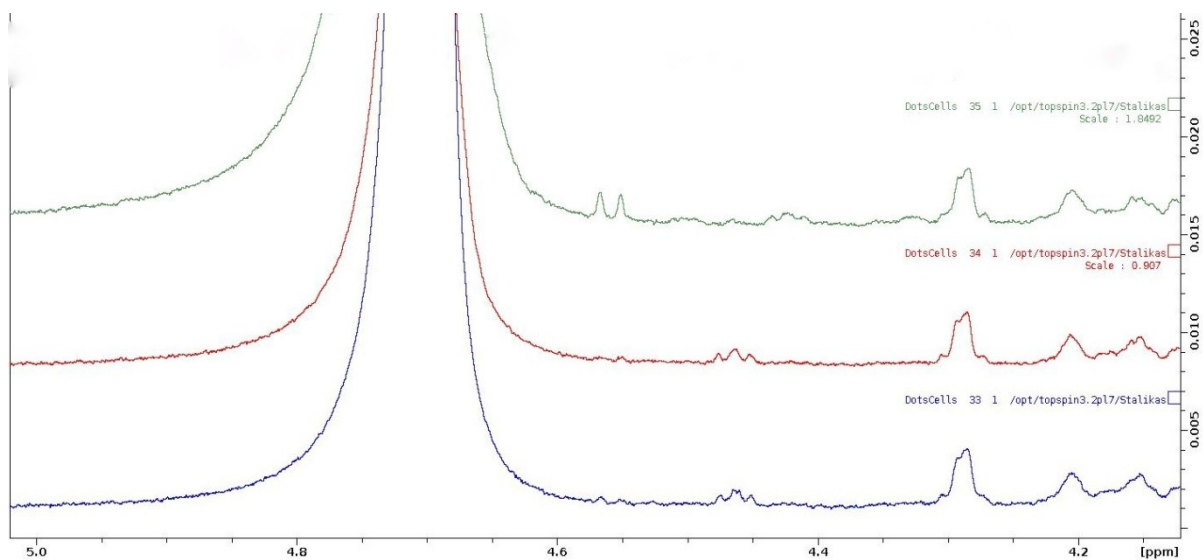
Εικόνα 39: Φάσμα ^1H -NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HEK-293 (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDs (κόκκινο) N,B-CNDs (πράσινο) 1,5-2,5 ppm.



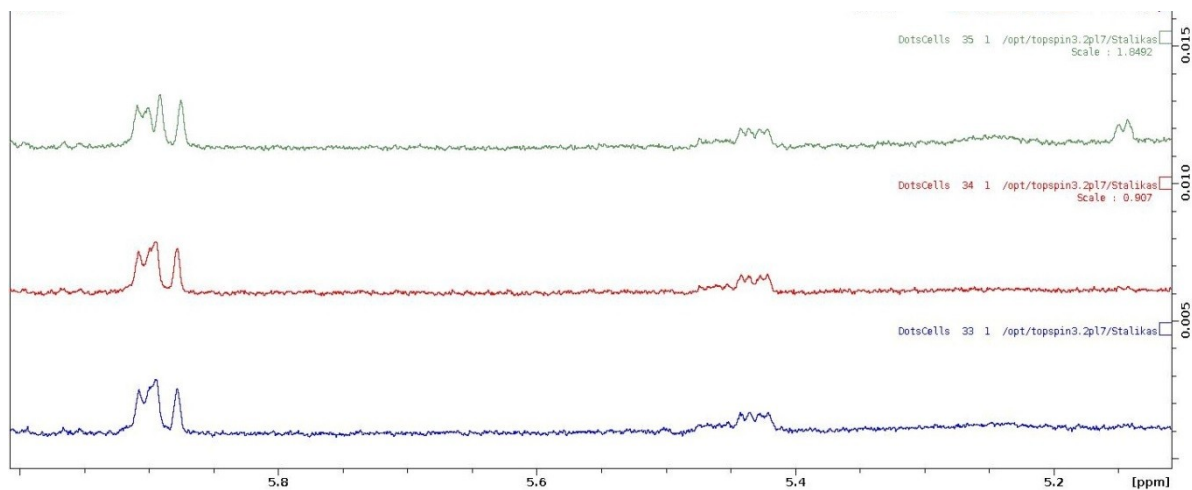
Εικόνα 40: Φάσμα ^1H -NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HEK-293 (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDs (κόκκινο) N,B-CNDs (πράσινο) 2,5-3,5 ppm.



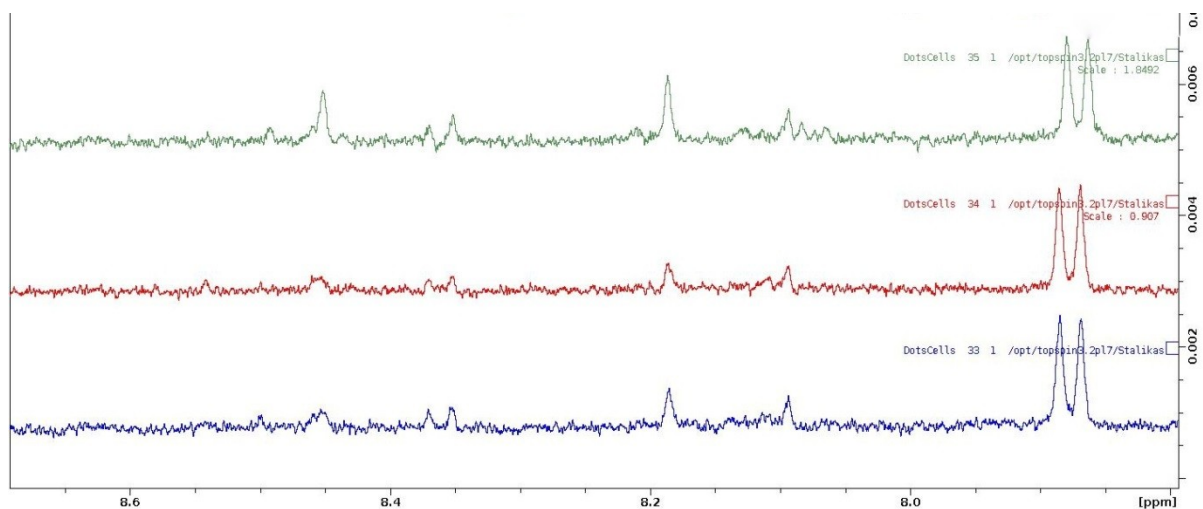
Εικόνα 41: Φάσμα ^1H -NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HEK-293 (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDs (κόκκινο) N,B-CNDs (πράσινο) 3,5-4,5 ppm.



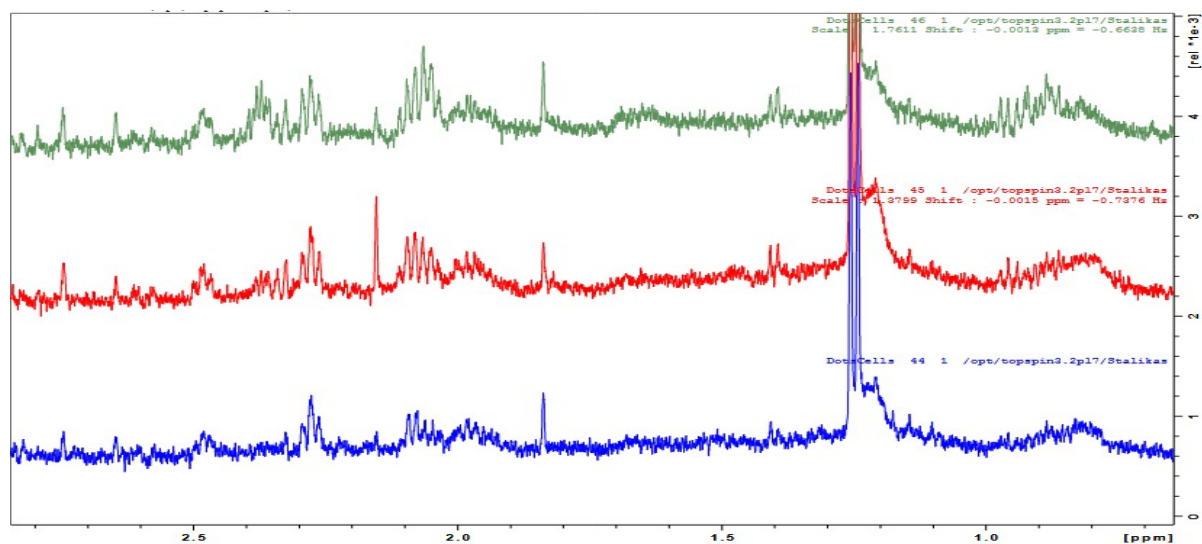
Εικόνα 42: Φάσμα ^1H -NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HEK-293 (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDs (κόκκινο) N,B-CNDs (πράσινο) 4,5-5,5 ppm.



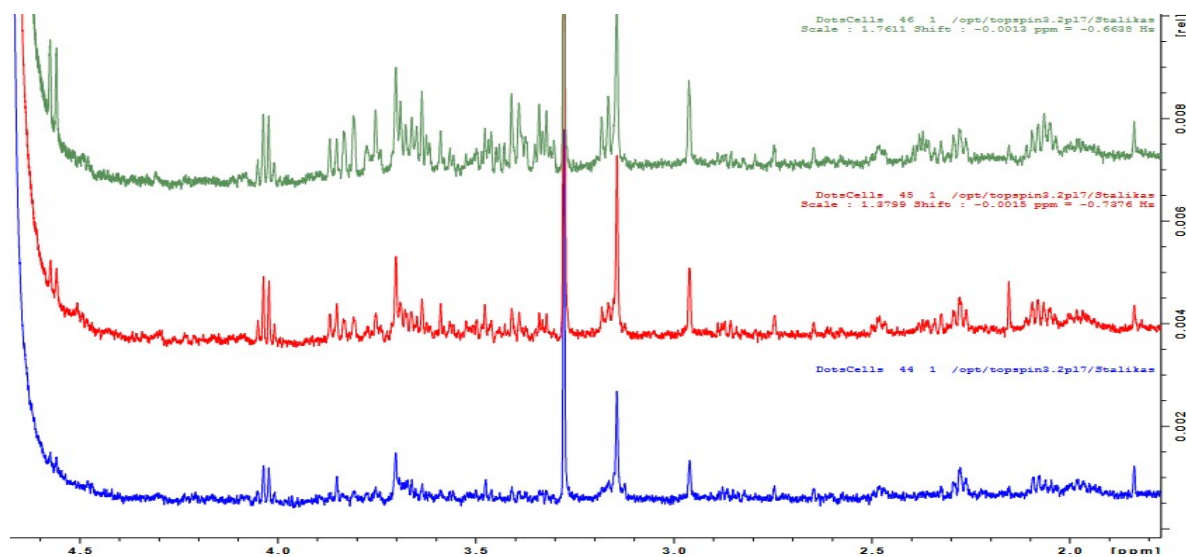
Εικόνα 43: Φάσμα ^1H -NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HEK-293 (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDs (κόκκινο) N,B-CNDs (πράσινο) 5,5-6,5 ppm.



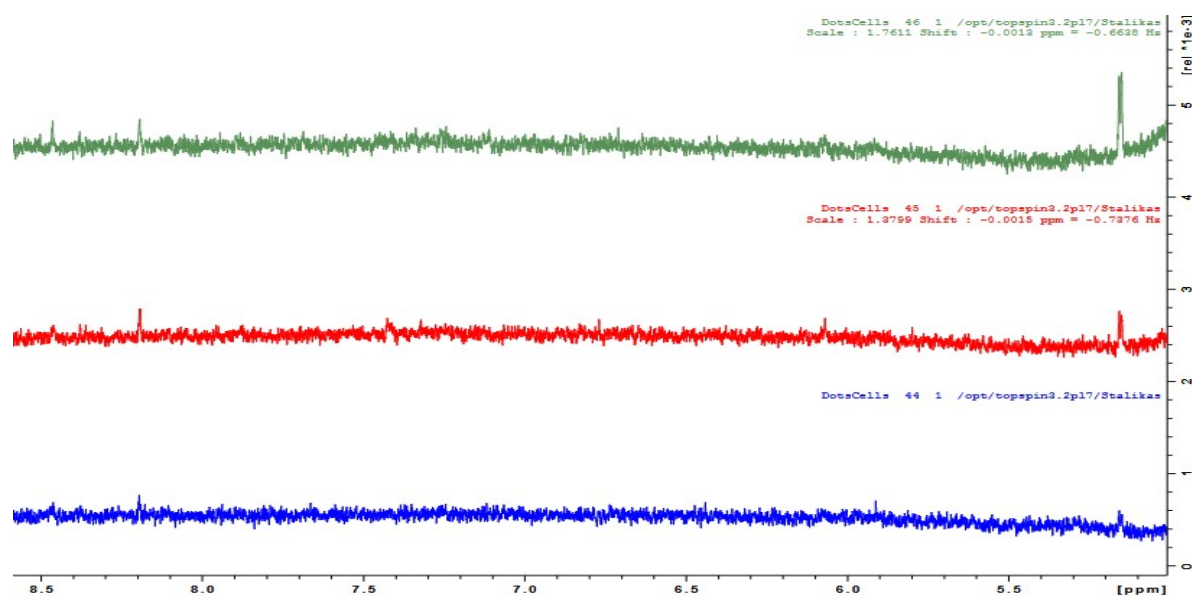
Εικόνα 44: Φάσμα ^1H -NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HEK-293 (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDs (κόκκινο) N,B-CNDs (πράσινο) 7,5-8,5 ppm.



Εικόνα 45: Φάσμα ¹H-NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HaCaT (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDs (κόκκινο) N,B-CNDs (πράσινο) 1-2,5 ppm.



Εικόνα 46: Φάσμα ¹H-NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HaCaT (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDs (κόκκινο) N,B-CNDs (πράσινο) 2,5- 4,5 ppm.



Εικόνα 47: Φάσμα ^1H -NMR δείγματος ελέγχου κυττάρων HaCaT (μπλε), μετά από έκθεση σε συγκέντρωση LD50 N,P-CNDs (κόκκινο) N,B-CNDs (πράσινο) 4,5-8,5 ppm.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο πλαίσιο του παρόντος μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης, πραγματοποιήθηκε μελέτη του μεταβολώματος των κυτταρικών σειρών HaCaT και HEK-293 κατά την έκθεσή τους σε νανοκουκκίδες άνθρακα ενισχυμένες με άζωτο-φωσφόρο και άζωτο-θείο, με χρήση φασματοσκοπίας ^1H -NMR καθώς και μεταβολικών βάσεων δεδομένων ελεύθερης πρόσβασης, προκειμένου να γίνει αξιολόγηση των επιπτώσεων των CNDs στο μεταβολισμό των κυττάρων.

Αρχικά, συντέθηκαν, μέσω της διαλυτοθερμικής επεξεργασίας οι non-doped, N-doped, N,S-doped, N,P-doped και N,B-doped CNDs, με κοινή πηγή άνθρακα το κιτρικό οξύ. Ακολούθησε ο χαρακτηρισμός τους και λήφθηκαν φάσματα FT-IR, UV-Vis, φθορισμού και μετρήσεις ζ-δυναμικού. Επιπλέον, έγινε μία σύντομη μελέτη της τοξικότητας των πέντε νανοκουκκίδων στις δύο κυτταρικές σειρές και μέσω των τιμών LD_{50} που προέκυψαν, επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη οι N,P-doped και N,B-doped CNDs λόγω της υψηλότερης τοξικότητάς τους. Στα δύο αυτά είδη νανοκουκκίδων μετρήθηκε συμπληρωματικά η αντιοξειδωτική τους δράση.

Στη συνέχεια, διεξήχθη, μια μη-στοχευμένη μεταβολομική μελέτη των δύο κυτταρικών σειρών, στη συγκέντρωση που ανέστειλε τον πληθυσμό κατά 50% και για τα δύο είδη νανοκουκκίδων άνθρακα. Για τα σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία ^1H -NMR και με τη χρήση της Human Metabolome Database, έγινε ταυτοποίηση των μεταβολιτών. 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 τα δείγματα ελέγχου ούτως ώστε να προκύψουν συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση των CNDs στο μεταβόλωμα των κυτταρικών σειρών. Από τα αποτελέσματα, προέκυψε ότι η έκθεση τους στις νανοκουκκίδες συνοδεύεται από ποικίλες μεταβολικές αλλαγές. Οι αλλαγές στα μεταβολικά μονοπάτια που παρατηρήθηκαν υπογραμμίζουν την έντονη πρόκληση οξειδωτικού στρες. Τα δεδομένα αυτά, μπορούν να αξιοποιηθούν μελλοντικά για τη μελέτη του μηχανισμού επίδρασης των νανοκουκκίδων στον άνθρωπο και την πρόβλεψη των επιπτώσεών τους στον ανθρώπινο μεταβολισμό.

ABSTRACT

In this MSc thesis, an NMR study of two immortalized human cell lines metabolome - keratinocytes HaCaT and embryonic kidney HEK-293 cells was carried out after exposure to carbon nanodots doped with nitrogen, phosphorus and borium, in order to evaluate the effect of CNDs on human metabolism.

Citric acid-based non-doped, N-doped, N,S-doped, N,P-doped and N,B-doped CNDs were synthesized through hydrothermal treatment. The synthesized nanodots were characterized by FT-IR, UV-Vis and fluorescence spectroscopy while the ζ -potential was additionally measured. Furthermore, the toxicity of the five CNDs in the two cell lines was studied. After evaluating the LD₅₀ values, the N,P-doped and N,B-doped CNDs were chosen for further study due to their higher toxicity. In these two types of CNDs, a complementary antioxidant activity study was performed.

To gain insight into the metabolic alterations that occurs in the cell lines upon exposure to CNDs, a metabolomics workflow was employed. Tentative identification of metabolites was carried out using ¹H-NMR (1D) spectroscopy combined with Human Metabolome Database, a free-access metabolomics database. To appraise the alterations of metabolic fingerprint, a metabolic pathway analysis was carried out using MetaboAnalyst, a comprehensive tool suite for metabolomics data analysis. From the obtained results useful conclusions were drawn about the effect of CNDs on the cell lines metabolic network. It is apparent that the exposure is accompanied by multiple metabolic alterations. Changes in the metabolic pathways highlight the intense induction of oxidative stress. Overall, results on the effect of CNDs on HaCaT and HEK-293 cells metabolism can be utilized to draw conclusions on the mechanism of the effect of CNDs on humans.