



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**«ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΝΑΝΟΥΪΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ  
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΗΣ  
ΓΛΥΚΟΖΗΣ»**

**ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΕΙΡΗΝΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2024**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**«ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΝΑΝΟΎΛΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ  
ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΔΙΑΤΑΡΑΧΩΝ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΗΣ  
ΓΛΥΚΟΖΗΣ»**

**ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΕΙΡΗΝΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2024**



**Creative Commons Αναφορά Μη Εμπορική Χρήση Παρόμοια Διανομή (CC BY-NC-SA):** Η άδεια αυτή επιτρέπει στον χρήστη να χρησιμοποιεί, μοιράζεται και δημιουργεί παράγωγα έργα επί του αδειοδοτούμενου περιεχομένου και να το διαμοιράζεται με την προϋπόθεση να κάνει αναφορά στο δημιουργό (π.χ. το συγγραφέα), το δικαιούχο (π.χ. τον εκδότη) και τον φορέα που κάνει το περιεχόμενο διαθέσιμο (π.χ. το ΕΚΤ). Του επιτρέπει επίσης να μοιράζεται οποιοδήποτε νέο περιεχόμενο δημιουργεί με βάση το αδειοδοτημένο περιεχόμενο (π.χ. μια διασκευή ή μια μετάφραση) με την ίδια άδεια που έλαβε το αρχικό περιεχόμενο (δηλαδή την Creative Commons Αναφορά Μη Εμπορική Χρήση Παρόμοια Διανομή. Τελευταία προϋπόθεση είναι να μη χρησιμοποιεί ή μοιράζεται το πρωτότυπο περιεχόμενο ή τα δικά του παράγωγα δημιουργήματα για εμπορικούς σκοπούς

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»



Ημερομηνία αίτησης της κας Παπανικολάου Ειρήνης: 3-11-2020

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 956<sup>α</sup>/24-3-2021

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπουσα:

Ντουνούση Ευαγγελία, Επίκουρη Καθηγήτρια Νεφρολογίας με έμφαση στις Μεταμοσχεύσεις

Μέλη:

Πέσχος Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κυτταρική Φυσιολογία

Τίγκας Στυλιανός, Αναπληρωτής Καθηγητής Ενδοκρινολογίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 14-4-2021

«Βιολογικές εφαρμογές νανοϋλικών για τη διάγνωση και αντιμετώπιση διαταραχών του μεταβολισμού της γλυκόζης»

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 1095<sup>α</sup>/23-4-2024**

1. Ντουνούση Ευαγγελία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Νεφρολογίας με έμφαση στις Μεταμοσχεύσεις του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Πέσχος Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στην Κυτταρική Φυσιολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Τίγκας Στυλιανός, Αναπληρωτής Καθηγητής Ενδοκρινολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Γουρνής Δημήτριος, Καθηγητής Νανοϋλικών και Νανοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης
5. Σταμάτης Χαράλαμπος, Καθηγητής Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Τσάμης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Σίμος Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στη Φυσιολογία του Ανθρώπου του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 30-4-2024

Ιωάννινα 22-5-2024

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Σπυρίδων Κονιτσιώτης**

**Καθηγητής Νευρολογίας**







# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο εικοστός πρώτος αιώνας είναι συνδεδεμένος με πολύ μεγάλες κατακτήσεις του ανθρώπινου πνεύματος, αλλά και με σωρεία προβλημάτων. Στην Ιατρική καθώς επίσης και σε όλους τους τομείς έρευνας κληροδοτήθηκαν από τον προηγούμενο αιώνα πολλές γνώσεις αλλά και άλυτα προβλήματα στην αντιμετώπιση ασθενειών, για τα οποία τόσο η Βιολογία όσο και η Ιατρική οφείλουν να δώσουν λύσεις. Συγκεκριμένα, ο Σακχαρώδης Διαβήτης είναι μία από τις ασθένειες που στις μέρες μας τείνει να εξελιχθεί σε επιδημία- μάστιγα για την ανθρωπότητα. Ο τρόπος ζωής του σημερινού ανθρώπου, η κακή διατροφή, η ελλιπής άσκηση και προπαντός το στρες συμβάλλουν στην εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου από την οποία πάσχουν όλο και περισσότεροι άνθρωποι.

Εάν η ως τώρα πορεία της έρευνας δεν κατόρθωσε να προτείνει καίριες και οριστικές παρεμβάσεις και λύσεις για την εν λόγω ασθένεια, φαίνεται πως η Νανοεπιστήμη και η Νανοτεχνολογία, επιτεύγματα της τέταρτης Τεχνολογικής Επανάστασης, που πλέον καταλαμβάνουν όλο και περισσότερο χώρο στην επιστημονική έρευνα, θα μπορέσουν να δώσουν τις απαραίτητες διεξόδους. Η χρήση των νανοϋλικών έχει ήδη συμβάλει σημαντικά στη διαχείριση του διαβήτη, ενώ η περαιτέρω έρευνα αναμένεται να εξελίξει τις ήδη υπάρχουσες κατακτήσεις βελτιώνοντας ουσιαστικά την ποιότητα ζωής των πασχόντων από την ασθένεια.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ως στόχο να αξιολογήσει την τοξικότητα νανοϋλικών γραφενίου και να διερευνήσει τη δραστικότητα καινοτόμων νανογαλακτωμάτων υπογλυκαιμικών ουσιών. Η συνδυαστική αξιοποίηση των δύο αυτών καινοτομιών της Νανοτεχνολογίας δύναται να οδηγήσει στην ανάπτυξη ενός ολοκληρωμένου μη επεμβατικού «κλειστού» συστήματος για τη διαχείριση του Σακχαρώδους Διαβήτη.

Το ερευνητικό κομμάτι της διατριβής εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε συνεργασία με τη Νεφρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Έχοντας την τύχη η ίδια να φοιτήσω στη Σχολή Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στο οποίο ολοκλήρωσα τόσο τις προπτυχιακές μου σπουδές, στο Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, όσο και τον κύκλο των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο Τμήμα Ιατρικής, βρίσκομαι σήμερα στην ευχάριστη θέση να ολοκληρώνω τη διδακτορική μου διατριβή στην ίδια Σχολή.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην επιβλέπουσα καθηγήτρια της διατριβής μου, κ. Ευαγγελία Ντουνούση, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Νεφρολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και Διευθύντρια της Νεφρολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, που με ενέπνευσε να ξεκινήσω την ωραία και κοπιαστική αυτή διαδρομή. Την ευχαριστώ

θερμά τόσο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την εκπόνηση αυτής της διατριβής, όσο και για τη διαρκή ενθάρρυνση και υποστήριξη που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της εργασίας μου. Η κ. Ντουνούση αποτελεί για εμένα πρότυπο τόσο για την επιστημονική της αρτιότητα όσο και για την επαγγελματική της αξία και συνεισφορά.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τα δύο άλλα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής. Αφενός μεν ευχαριστώ τον Καθηγητή Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας κ. Δημήτριο Πέσχο για την καθοδήγησή του και τη συνεχή παρακολούθηση της έρευνάς μου στο χώρο του Εργαστηρίου Φυσιολογίας, αφετέρου δε τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ενδοκρινολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και Διευθυντή της Ενδοκρινολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, κ. Στυλιανό Τίγκα για τη στήριξη και τις επισημάνσεις του.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Καθηγητή Νανοϋλικών και Νανοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης κ. Δημήτριο Γουρνή, τον Καθηγητή Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Χαράλαμπο Σταμάτη και τον Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κωνσταντίνο Τσάμη για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Εντελώς ιδιαίτερη ήταν η συμβολή του Επίκουρου Καθηγητή Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και μέλους της Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής κ. Ιωάννη Σίμου. Με τον κ. Σίμο, είχα κοινή πορεία τόσο στη διαδρομή μου ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια όσο και μετέπειτα ως υποψήφια διδάκτορας. Τον ευχαριστώ θερμά για την καθημερινή του συμπαράσταση, την καθοδήγησή μου καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, την εμπιστοσύνη του και την απλόχερη βοήθεια που μου παρείχε κάθε φορά που είχα ανάγκη.

Ευγνωμοσύνη χρωστάω στις ερευνήτριες Μιχαέλα Πατήλα και Χριστίνα Αλατζόγλου, συνεργάτριές μου από το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, καθώς επίσης και στον Κωνσταντίνο Σπύρου, τη Νίκη Καρούτα και την Παναγιώτα Ζυγούρη από το Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τους ευχαριστώ θερμά για τη σύνθεση και την παροχή των νανοϋλικών και την καθοδήγησή τους σε επιστημονικά αντικείμενα με τα οποία δεν είχα μεγάλη εξοικείωση. Η άρτια συνεργασία μας εξασφάλισε και τη διεπιστημονικότητα στην εργασία μου πράγμα απαραίτητο στην επιστημονική έρευνα και αίτημα των καιρών.

Τα *in vivo* πειράματα δεν θα είχαν πραγματοποιηθεί χωρίς την πολύτιμη συμβολή του κ. Παναγιώτη Λέκκα. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα γιατί μοιράστηκε μαζί μου τις γνώσεις και την εμπειρία του στο χειρισμό των πειραματοζώων και ήταν παρών και με στήριζε καθ' όλη τη διάρκεια των *in vivo* μελετών.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη ΕΔΙΠ και ΕΤΕΠ του Εργαστηρίου Φυσιολογίας και όλους τους υποψήφιους διδάκτορες, μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές που πέρασαν από το Εργαστήριο Φυσιολογίας όλα αυτά τα χρόνια και με τον τρόπο τους και το όμορφο κλίμα συνεργασίας συνέβαλαν στην εξέλιξη της έρευνάς μου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους συνεργάτες μου που ήταν δίπλα μου όλα τα χρόνια εκπόνησης της διατριβής. Τους υποψήφιους διδάκτορες του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ευτέρπη Κορακάκη, Αντρέα Κάτσενο, Άντρεα- Μαρία Αθηνόδωρου, Φοίβο Κανέλλο και Νικόλαο Τζαβέλλα και τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Αγνή Κλωνάρη και Αθηνά Δαύρη, για την άψογη συνεργασία μας και τη βοήθειά τους στην επίλυση οποιουδήποτε πρακτικού ζητήματος.

Μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στη συνάδελφο, συνοδοιπόρο και φίλη μου, Μαρία Σπηλιά για τη στήριξη και τη βοήθειά της εντός και εκτός εργαστηρίου.

Ευχαριστώ επίσης τους ερευνητές του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Χαράλαμπο Μπρακατσέλο, Αλεξάνδρα Πολύζου και Κυριακή Πρεμέτη, για τις παρατηρήσεις και τις συμβουλές τους στη διεξαγωγή των *in vitro* πειραμάτων. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Ομότιμο Καθηγητή Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Χαράλαμπο Αγγελίδη για τις πολύτιμες συμβουλές του οι οποίες ήταν καθοριστικές για την εξέλιξη της έρευνάς μου.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω την κ. Πατρώνα Βεζυράκη, Ομότιμη Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων η οποία διετέλεσε και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Φυσιολογίας τα πρώτα χρόνια εκπόνησης της διατριβής μου. Την ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη της, την καθοδήγησή της και τη στήριξή μου ήδη από τις μεταπτυχιακές μου σπουδές.

Τέλος, μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στην οικογένεια μου, στους φίλους μου και στον σύντροφό μου για τη σταθερή στήριξή τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου. Η διατριβή αυτή δεν θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς την αγάπη και τη συμπαράστασή τους.

**Ειρήνη Παπανικολάου.**



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....	i
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	v
ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	viii
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	xvii
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ- ΕΠΕΞΗΓΗΣΕΙΣ .....	xix
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	3
1.1. Ο σακχαρώδης διαβήτης .....	3
1.1.1. Γενικά στοιχεία και επιδημιολογία .....	3
1.1.2. Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1.....	3
1.1.3. Σακχαρώδης διαβήτης Τύπου 2.....	7
1.1.4. Σακχαρώδης διαβήτης της κήσης.....	11
1.1.5. Σπάνιες μορφές σακχαρώδους διαβήτη .....	15
1.1.5.1. Μονογονικός διαβήτης.....	15
1.1.5.2. Ασταθής διαβήτης.....	17
1.1.5.3. Διαβήτης προκαλούμενος από φάρμακα/ χημικά .....	18
1.2. Συστήματα ανίχνευσης γλυκόζης.....	20
1.2.1. Ιστορική αναδρομή και εξέλιξη των συστημάτων ανίχνευσης γλυκόζης 20	
1.2.2. Ενζυμική ανίχνευση της γλυκόζης .....	24
1.2.3. Ανίχνευση της γλυκόζης μη ενζυμικά.....	25
1.2.4. Μη επεμβατικοί αισθητήρες ανίχνευσης της γλυκόζης .....	27
1.3. Νανοεπιστήμη και νανοτεχνολογία.....	29
1.3.1. Γενικά στοιχεία.....	29
1.3.2. Κατηγορίες νανοϋλικών .....	30
1.3.3. Σύνθεση των νανοϋλικών .....	32
1.3.4. Εφαρμογές της νανοτεχνολογίας στην Ιατρική- Νανοϊατρική.....	34
1.3.4.1. Διάγνωση ασθενειών .....	34
1.3.4.2. Θεραπεία ασθενειών .....	35
<i>Νανοϋλικά ως φορείς φαρμάκων</i> .....	35
<i>Νανοϋλικά σε εμφυτεύματα</i> .....	36
1.3.4.3. Ταυτόχρονη διάγνωση και θεραπεία ασθενειών .....	37
1.3.5. Συμβολή της νανοτεχνολογίας στη διαχείριση του ΣΔ.....	38

1.4.	Γραφένιο.....	40
1.4.1.	Γενικά στοιχεία.....	40
1.4.2.	Δομή και ιδιότητες του γραφενίου.....	41
1.4.3.	Το γραφένιο σε βιοϊατρικές εφαρμογές.....	44
1.4.3.1.	Βιοανίχνευση.....	44
1.4.3.2.	Μεταφορά φαρμάκων.....	44
1.4.3.3.	Αντιβακτηριακή δράση.....	45
1.4.4.	Το γραφένιο στη διαχείριση του ΣΔ.....	46
1.4.4.1.	Βιοαισθητήρες ανίχνευσης γλυκόζης από γραφένιο.....	47
	<i>Ενζυμικοί αισθητήρες γραφενίου.....</i>	<i>47</i>
	<i>Μη ενζυμικοί αισθητήρες γραφενίου.....</i>	<i>48</i>
1.4.4.2.	Νανοφορείς γραφενίου για τη χορήγηση αντιδιαβητικών φαρμάκων.....	50
1.5.	Συστήματα εγκλωβισμού υπογλυκαιμικών ουσιών.....	51
1.5.1.	Πολυμερικά νανοσωματίδια.....	52
1.5.2.	Νανολιποσώματα.....	53
1.5.3.	Νανοϋδρογέλες.....	54
1.5.4.	SLNs.....	55
1.5.5.	NLCs.....	55
1.5.6.	Νανογαλακτώματα.....	56
1.5.7.	Νιοσώματα.....	56
1.5.8.	Τρανσεθοσώματα και τρανσφεροσώματα.....	57
2.	ΣΚΟΠΟΣ.....	59
	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	61
3.	ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ.....	63
3.1.	Μελέτες <i>in vitro</i> .....	63
3.1.1.	Χημικά και αντιδραστήρια.....	63
3.1.2.	Νανοϋλικά γραφενίου.....	65
3.1.3.	Κυτταρικές σειρές.....	66
3.1.4.	Μέθοδος MTT (MTT assay).....	68
3.1.5.	Έλεγχος της ικανότητας σχηματισμού αποικιών (Colony forming efficiency assay).....	70
3.1.6.	Κυτταρομετρία Ροής.....	70
3.1.6.1.	Έλεγχος της δημιουργίας Δραστικών Μορφών Οξυγόνου.....	71
3.1.6.2.	Έλεγχος κυτταρικού κύκλου (Cell cycle arrest).....	72

3.1.6.3. Έλεγχος απόπτωσης/ νέκρωσης.....	75
3.1.7. Ανοσοαποτύπωμα πρωτεϊνών κατά Western (Western blotting)....	77
3.1.7.1. Κυτταρική λύση και απομόνωση των πρωτεϊνών .....	77
3.1.7.2. Προετοιμασία πηκτώματος πολυακρυλαμίδης .....	78
3.1.7.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών .....	79
3.1.7.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών.....	79
3.1.7.5. Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη (Tranfer)....	80
3.1.7.6. Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών .....	80
3.2. Μελέτες <i>in vivo</i> .....	81
3.2.1. Εξοπλισμός .....	81
3.2.2. Νανογαλακτώματα .....	81
3.2.3. Πειραματόζωα- Μύες 129SV.....	82
3.2.4. Πειραματικό πρωτόκολλο .....	83
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	85
4.1. Μελέτες <i>in vitro</i> .....	85
4.1.1. Αξιολόγηση της τοξικότητας του διαλύτη DMF .....	85
4.1.2. Δοκιμασίες MTT .....	88
4.1.2.1. Βιογραφένιο & χημικό γραφένιο.....	89
4.1.2.2. Bio N- Doped graphene και Chem N- Doped graphene.....	93
4.1.2.3. Bio_ Nitrate graphene και Chem_ Nitrate graphene .....	97
4.1.3. Έλεγχος της ικανότητας σχηματισμού αποικιών .....	101
4.1.3.1. Biographene & Chemical graphene .....	102
4.1.3.2. Bio_ N- Doped & Chem_ N- Doped.....	104
4.1.3.3. Bio_ Nitrate & Chem_ Nitrate.....	107
4.1.4. Έλεγχος σχηματισμού ΔΜΟ (ROS).....	109
4.1.4.1. Biographene & Chemical graphene .....	110
4.1.4.2. Bio_ N-Doped & Chem_ N- Doped.....	113
4.1.4.3. Bio_ Nitrate & Chem_ Nitrate .....	116
4.1.5. Έλεγχος απόπτωσης- νέκρωσης .....	119
4.1.5.1. Biographene & graphene.....	119
4.1.5.2. Bio_ N- Doped & Chem_ N- Doped.....	122
4.1.5.3. Bio_ Nitrate & Chem_ Nitrate.....	127
4.1.6. Ανάλυση κυτταρικού κύκλου.....	131
4.1.6.1. Biographene & Chemical graphene .....	131

4.1.6.2. Bio_ Doped & Chem_ Doped.....	134
4.1.6.3. Bio_ Nitrate & Chem_ Nitrate.....	139
4.1.7. Μελέτη σηματοδοτικών μονοπατιών μέσω Western Blotting.....	144
4.1.7.1. Biographene & Chemical graphene.....	144
4.1.7.2. Bio_ N-Doped & Chem_ N- Doped.....	148
4.1.7.3. Bio_ Nitrate & Chem_ Nitrate.....	153
4.2. Μελέτες <i>in vivo</i> .....	157
4.2.1. Τεστ ανοχής στην γλυκόζη.....	157
4.2.2. Έλεγχος της υγείας του δέρματος και της συμπεριφοράς των ζώων 160	
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	161
5.1. Ξεπερνώντας τους περιορισμούς στη χρήση των νανοϋλικών γραφενίου.....	161
<i>Τοξικότητα των συμβατικών νανοϋλικών γραφενίου</i> .....	162
<i>Πως μπορεί να μειωθεί η τοξικότητα;</i> .....	169
<i>Τοξικότητα «πράσινων» νανοϋλικών γραφενίου</i> .....	170
<i>Επίδραση των νανοϋλικών γραφενίου στην κυτταρική σηματοδότηση</i> .....	175
5.2. Η διαδερμική χορήγηση μέσω νανοσυστημάτων είναι το μέλλον στη διαχείριση του ΣΔ;.....	179
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	183
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	185
ABSTRACT.....	189
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	191
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	211

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1. 1.</b> Η ανάπτυξη του ΣΔΤ1 βασίζεται στην αλληλεπίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος (αριστερά) και των β- κυττάρων του παγκρέατος (δεξιά). Στις περισσότερες περιπτώσεις είναι πιθανό να εμπλέκονται ήπιες αλλαγές στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος π.χ. μεταβολές σε γονίδια που βρίσκονται σε περιοχές που ρυθμίζουν τη λειτουργία των T- λεμφοκυττάρων (HLA, CTLA4, PTPN2, RPTN22 και IL2RA) μαζί με αλλαγές στην βιολογία των β – κυττάρων (γενετικές ή περιβαλλοντικές) <sup>5</sup> . .....	5
<b>Εικόνα 1. 2.</b> Τύποι υπεργλυκαιμίας κατά την εγκυμοσύνη <sup>21</sup> . .....	12



<b>Εικόνα 1. 3.</b> Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης ΣΔ κατά την κύηση και βραχυπρόθεσμες/ μακροπρόθεσμες επιπλοκές <sup>21</sup> .	14
<b>Εικόνα 1. 4.</b> Μηχανισμοί μέσω των οποίων κοινές κατηγορίες φαρμάκων μπορεί να επάγουν την ανάπτυξη ΣΔ <sup>36</sup> .	19
<b>Εικόνα 1. 5.</b> Αρχή λειτουργίας των ενζυμικών βιοαισθητήρων ανίχνευσης γλυκόζης μέσω του ενζύμου GOx. Η ακινητοποιημένη GOx καταλύει την οξείδωση της γλυκόζης (S) από το μοριακό οξυγόνο (O <sub>2</sub> ) παράγοντας γλυκονικό οξύ (P) και υπεροξειδίο του υδρογόνου (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ). Το δινοουκλεοτίδιο αδερίνης της φλαβίνης (Flavin adenine dinucleotide, FAD) λειτουργεί ως συμπάραγοντας οξειδοαναγωγής στη δράση της GOx ως καταλύτης. Οι βιοαισθητήρες δεύτερης γενιάς χρησιμοποιούν οξειδοαναγωγικούς μεσολαβητές για να αλληλεπιδράσουν απευθείας με το ένζυμο σε χαμηλότερα δυναμικά. Οι τρίτης γενιάς βιοαισθητήρες διαθέτουν νανοϋλικά υψηλής εκλεκτικότητας μέσω των οποίων διευκολύνεται η άμεση ηλεκτρο-οξείδωση της γλυκόζης <sup>44,45</sup> .	22
<b>Εικόνα 1. 6.</b> Εξέλιξη των συστημάτων ανίχνευσης γλυκόζης <sup>45</sup> .	23
<b>Εικόνα 1. 7.</b> Ανακαλύψεις- ορόσημα στην ανίχνευση της γλυκόζης <sup>47</sup> .	24
<b>Εικόνα 1. 8.</b> Οι μηχανισμοί ανίχνευσης της γλυκόζης από υλικά που διαθέτουν ενεργό μεταβατικό μεταλλικό κέντρο. A: Η γλυκόζη απορροφάται (χημειοαπορόφηση) πάνω στη μεταλλική επιφάνεια του ηλεκτροδίου προτού οξειδωθεί. B: Το μοντέλο IHOAM. Η γρήγορη ηλεκτρο-οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονο-δ- λακτόνη διευκολύνεται από την παρουσία αντιδραστικών υδροξυλίων [OH] <sub>ads</sub> στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων <sup>48</sup> .	26
<b>Εικόνα 1. 9.</b> Σχηματική αναπαράσταση μεθόδων ανίχνευσης της γλυκόζης σε διαφορετικά βιολογικά υγρά <sup>55</sup> . α) εμπορικός γλυκομετρητής με ταινίες για την ανίχνευση της γλυκόζης με τη λήψη μίας σταγόνας αίματος <sup>62</sup> , β) εμπορικός ελάχιστα επεμβατικός CGM για την ανίχνευση της γλυκόζης στο ISF <sup>62</sup> , μη επεμβατικός CGM για την ανίχνευση της γλυκόζης στο σάλιο <sup>61</sup> , δ) συσκευή για τη μη επεμβατική ανίχνευση της γλυκόζης στον ιδρώτα <sup>63</sup> , ε) ελάχιστα επεμβατικός CGM για την ανίχνευση της γλυκόζης στα δάκρυα <sup>64</sup> και στ) ανίχνευση της γλυκόζης στα ούρα <sup>65</sup> .	28
<b>Εικόνα 1. 10.</b> Σύγκριση του μεγέθους των νανοϋλικών με άλλες βιολογικές δομές, κύτταρα και οργανισμούς <sup>66</sup> .	29
<b>Εικόνα 1. 11.</b> Γενική ταξινόμηση των νανοϋλικών <sup>72</sup> .	31
<b>Εικόνα 1. 12.</b> Διάκριση των νανοϋλικών με βάση τις διαστάσεις τους <sup>73</sup> .	32
<b>Εικόνα 1. 13.</b> Οι δύο προσεγγίσεις για τη σύνθεση των νανοϋλικών <sup>67</sup> .	33
<b>Εικόνα 1. 14.</b> Η νανοτεχνολογία βελτιώνει σημαντικά τη θεραπεία του ΣΔ <sup>83</sup> .	39
<b>Εικόνα 1. 15.</b> Αναπαράσταση ενός πιθανού ολοκληρωμένου «κλειστού» συστήματος για τη διαχείριση του ΣΔ <sup>45</sup> .	40
<b>Εικόνα 1. 16.</b> Η τεχνική σύνθεσης του γραφενίου με χρήση της ταινίας «Scotch tape» αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Novoselov και Geim το 2004 <sup>87,88</sup> .	41
<b>Εικόνα 1. 17.</b> Γραφική απεικόνιση της δομής μίας στρώσης γραφενίου <sup>85</sup> .	42
<b>Εικόνα 1. 18.</b> Το εξαγωνικό πλέγμα του γραφενίου <sup>89</sup> .	42
<b>Εικόνα 1. 19.</b> Αλλότροπα νανοϋλικά άνθρακα που προέρχονται από το γραφένιο <sup>90</sup> .	43
<b>Εικόνα 1. 20.</b> Μηχανισμοί μέσω των οποίων οι δομές γραφενίου καταστέλλουν την ανάπτυξη Gram + και Gram – βακτηρίων <sup>112</sup> .	46
<b>Εικόνα 1. 21.</b> Απεικόνιση της λειτουργίας της φορέσιμης συσκευής των Lee et al., για την παρακολούθηση και θεραπεία του ΣΔ σε <i>in vivo</i> μοντέλο <sup>122</sup> .	48
<b>Εικόνα 1. 22.</b> Σχηματική αναπαράσταση μίας νανογέλης για τον εγκλωβισμό της ινσουλίνης. Η GOx καταλύει τη μετατροπή της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ. Αυτό οδηγεί σε	

πρωτονίωση των πολυμερικών αλυσίδων, διόγκωση της νανογέλης και απελευθέρωση της ινσουλίνης <sup>139</sup>.....55

<b>Εικόνα 3. 1.</b> Γραφική απεικόνιση της δομής του δέρματος.....	67
<b>Εικόνα 3. 2.</b> Σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας της μεθόδου MTT.....	69
<b>Εικόνα 3. 3.</b> Σχηματική αναπαράσταση της ανίχνευσης των ΔΜΟ στο εσωτερικό του κυττάρου με τη χρήση του DCFH-DA.....	72
<b>Εικόνα 3. 4.</b> Σχηματική αναπαράσταση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου <sup>164</sup> .....	73
<b>Εικόνα 3. 5.</b> Παράδειγμα του ιστογράμματος που προκύπτει κατά τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου με τη χρήση PI <sup>164</sup> .....	74
<b>Εικόνα 3. 6.</b> Εκτίμηση του κυτταρικού θανάτου με τη χρήση των χρωστικών Annexin V και PI <sup>165</sup> .....	76
<b>Εικόνα 3. 7.</b> Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων που ακολουθούνται για την ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών μέσω της τεχνικής Western Blot.....	77
<b>Εικόνα 3. 8.</b> Σχηματική αναπαράσταση του πρωτοκόλλου της <i>in vivo</i> αξιολόγησης της δραστηριότητας των καινοτόμων νανογαλακτωμάτων υπογλυκαιμικών ουσιών.....	84

<b>Εικόνα 4. 1.</b> Βιωσιμότητα των κυττάρων NIH/3T3, HaCaT και THP-1 έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις του διαλύτη DMF για 24 ( <b>α</b> ) και 48 ( <b>β</b> ) ώρες.....	86
<b>Εικόνα 4. 2.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης και νέκρωσης του πληθυσμού των κυττάρων NIH/3T3 ( <b>α, β</b> ), HaCaT ( <b>γ, δ</b> ) και THP-1 ( <b>ε, στ</b> ) έπειτα από επώαση για 24 ώρες με 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ του διαλύτη DMF. ( <b>α</b> ): NIH/3T3 control, ( <b>β</b> ): NIH/3T3 + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DMF, ( <b>γ</b> ): HaCaT control, ( <b>δ</b> ): HaCaT + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DMF, ( <b>ε</b> ): THP-1 control, ( <b>στ</b> ): THP-1 + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DMF.....	87
<b>Εικόνα 4. 3.</b> Ποσοστά του αποπτωτικού πληθυσμού των NIH/3T3 ( <b>α</b> ), HaCaT ( <b>β</b> ) και THP-1 ( <b>γ</b> ) κυττάρων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις του διαλύτη DMF. Ο DMF δοκιμάστηκε σε δόσεις από 0.15% v/v έως 0.75% v/v που ισοδυναμεί σε δόσεις 10 έως 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ του cG. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). .88	88
<b>Εικόνα 4. 4.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα των NIH/3T3 κυττάρων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG για 24 ώρες.....	89
<b>Εικόνα 4. 5.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα των NIH/3T3 κυττάρων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG για 48 ώρες.....	90
<b>Εικόνα 4. 6.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG για 24 ώρες.....	90
<b>Εικόνα 4. 7.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG για 48 ώρες.....	91
<b>Εικόνα 4. 8.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG για 24 ώρες.....	92
<b>Εικόνα 4. 9.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG για 48 ώρες.....	92
<b>Εικόνα 4. 10.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα των NIH/3T3 κυττάρων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD για 24 ώρες.....	93
<b>Εικόνα 4. 11.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα των NIH/3T3 κυττάρων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD για 48 ώρες.....	94
<b>Εικόνα 4. 12.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα HaCaT κυττάρων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD για 24 ώρες.....	95

<b>Εικόνα 4. 13.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD για 48 ώρες.....	95
<b>Εικόνα 4. 14.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD για 24 ώρες. ....	96
<b>Εικόνα 4. 15.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD για 48 ώρες. ....	97
<b>Εικόνα 4. 16.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα των NIH/3T3 κυττάρων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN για 24 ώρες. ....	98
<b>Εικόνα 4. 17.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα των NIH/3T3 κυττάρων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN για 48 ώρες. ....	98
<b>Εικόνα 4. 18.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN για 24 ώρες. ....	99
<b>Εικόνα 4. 19.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN για 48 ώρες. ....	100
<b>Εικόνα 4. 20.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN για 24 ώρες. ....	100
<b>Εικόνα 4. 21.</b> Κυτταρική βιωσιμότητα των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN για 48 ώρες. ....	101
<b>Εικόνα 4. 22.</b> Ενδεικτικές εικόνες της κλωνογόνου δοκιμασίας στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG (α) και cG (β) για 48 ώρες.....	102
<b>Εικόνα 4. 23.</b> Κλωνογόνος δοκιμασία στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG για 48 ώρες. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).....	103
<b>Εικόνα 4. 24.</b> Ενδεικτικές εικόνες της κλωνογόνου δοκιμασίας στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG (α) και cG (β) για 48 ώρες.....	103
<b>Εικόνα 4. 25.</b> Κλωνογόνος δοκιμασία στα κύτταρα HaCaT μετά από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG για 48 ώρες. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).....	104
<b>Εικόνα 4. 26.</b> Ενδεικτικές εικόνες της κλωνογόνου δοκιμασίας στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD (α) και cD (β) για 48 ώρες.....	105
<b>Εικόνα 4. 27.</b> Κλωνογόνος δοκιμασία στα κύτταρα NIH/3T3 μετά από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD για 48 ώρες. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).....	105
<b>Εικόνα 4. 28.</b> Ενδεικτικές εικόνες της κλωνογόνου δοκιμασίας στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD (α) και cD (β) για 48 ώρες.....	106
<b>Εικόνα 4. 29.</b> Κλωνογόνος δοκιμασία στα κύτταρα HaCaT μετά από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD για 48 ώρες.....	106
<b>Εικόνα 4. 30.</b> Ενδεικτικές εικόνες της κλωνογόνου δοκιμασίας στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN (α) και cN (β) για 48 ώρες. ....	107
<b>Εικόνα 4. 31.</b> Κλωνογόνος δοκιμασία στα κύτταρα NIH/3T3 μετά από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN για 48 ώρες. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).....	108
<b>Εικόνα 4. 32.</b> Ενδεικτικές εικόνες της κλωνογόνου δοκιμασίας στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN (α) και cN (β) για 48 ώρες. ....	109
<b>Εικόνα 4. 33.</b> Κλωνογόνος δοκιμασία στα κύτταρα HaCaT μετά από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN για 48 ώρες. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).....	109

<b>Εικόνα 4. 34.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα NIH/3T3 κύτταρα. (α): κύτταρα ελέγχου, (β): κύτταρα που επωάστηκαν με 20 µg/mL του bG και (γ): κύτταρα που επωάστηκαν με 20 µg/mL του cG	110
<b>Εικόνα 4. 35.</b> Σχηματισμός ΔΜΟ στα NIH/3T3 κύτταρα έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις bG (20, 50 και 100 µg/mL) και δύο δόσεις cG (20 και 50 µg/mL) για 24 ώρες. MFI: Μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units)	110
<b>Εικόνα 4. 36.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα HaCaT κύτταρα. (α): κύτταρα ελέγχου, (β): κύτταρα που επωάστηκαν με 20 µg/mL του bG και (γ): κύτταρα που επωάστηκαν με 20 µg/mL του cG.	111
<b>Εικόνα 4. 37.</b> Σχηματισμός ΔΜΟ στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις bG (20, 50 και 100 µg/mL) και δύο δόσεις cG (20 και 50 µg/mL) για 24 ώρες. MFI: Μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units)	111
<b>Εικόνα 4. 38.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα κύτταρα. (α): κύτταρα ελέγχου, (β): κύτταρα που επωάστηκαν με 20 µg/mL του bG και (γ): κύτταρα που επωάστηκαν με 20 µg/mL του cG.	112
<b>Εικόνα 4. 39.</b> Σχηματισμός ΔΜΟ στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις bG (20, 50 και 100 µg/mL) και δύο δόσεις cG (20 και 50 µg/mL) για 24 ώρες. MFI: Μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units)	112
<b>Εικόνα 4. 40.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα NIH/3T3 κύτταρα. (α): κύτταρα ελέγχου, (β): κύτταρα που επωάστηκαν με 50 µg/mL του bD και (γ): κύτταρα που επωάστηκαν με 50 µg/mL του cD.	113
<b>Εικόνα 4. 41.</b> Σχηματισμός ΔΜΟ στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις (20, 50 και 100 µg/mL) του bD και του cD για 24 ώρες. MFI: Μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units)	113
<b>Εικόνα 4. 42.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα κύτταρα HaCaT. (α): κύτταρα ελέγχου, (β): κύτταρα που επωάστηκαν με 50 µg/mL του bD και (γ): κύτταρα που επωάστηκαν με 50 µg/mL του cD.	114
<b>Εικόνα 4. 43.</b> Σχηματισμός ΔΜΟ στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις (20, 50 και 100 µg/mL) του bD και του cD για 24 ώρες. MFI: Μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units). *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ )	114
<b>Εικόνα 4. 44.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα κύτταρα. (α): κύτταρα ελέγχου, (β): κύτταρα που επωάστηκαν με 50 µg/mL του bD και (γ): κύτταρα που επωάστηκαν με 50 µg/mL του cD.	115
<b>Εικόνα 4. 45.</b> Σχηματισμός ΔΜΟ στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις (20, 50 και 100 µg/mL) του bD και του cD για 24 ώρες. MFI: Μέση	

ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units).....	115
<b>Εικόνα 4. 46.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα NIH/3T3 κύτταρα. (α): κύτταρα ελέγχου, (β): κύτταρα που επωάστηκαν με 20 µg/mL του bN και (γ): κύτταρα που επωάστηκαν με 20 µg/mL του cN. ....	116
<b>Εικόνα 4. 47.</b> Σχηματισμός ΔΜΟ στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις (20, 50 και 100 µg/mL) του bN και μία δόση (20 µg/mL) του cN για 24 ώρες. MFI: Μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units). *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control (p< 0.05).....	116
<b>Εικόνα 4. 48.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα NIH/3T3 κύτταρα. (α): κύτταρα ελέγχου, (β): κύτταρα που επωάστηκαν με 50 µg/mL του bN και (γ): κύτταρα που επωάστηκαν με 50 µg/mL του cN .....	117
<b>Εικόνα 4. 49.</b> Σχηματισμός ΔΜΟ στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις (20, 50 και 100 µg/mL) του bN και του cN για 24 ώρες. MFI: Μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units). *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control (p< 0.05). .....	118
<b>Εικόνα 4. 50.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα NIH/3T3 κύτταρα. (α): κύτταρα ελέγχου, (β): κύτταρα που επωάστηκαν με 50 µg/mL του bN και (γ): κύτταρα που επωάστηκαν με 50 µg/mL του cN .....	118
<b>Εικόνα 4. 51.</b> Σχηματισμός ΔΜΟ στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις (20, 50 και 100 µg/mL) του bN και του cN για 24 ώρες. MFI: Μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units).....	119
<b>Εικόνα 4. 52.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των NIH/3T3 κυττάρων. (α): Κύτταρα ελέγχου- Control. (β): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20 µg/mL του bG. (γ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20 µg/mL του cG.....	120
<b>Εικόνα 4. 53.</b> Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με 20 µg/mL του bG και cG για 24 ώρες. ....	120
<b>Εικόνα 4. 54.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των κυττάρων HaCaT. (α): Κύτταρα ελέγχου- Control. (β): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20 µg/mL του bG. (γ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20 µg/mL του cG.....	121
<b>Εικόνα 4. 55.</b> Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με 20 µg/mL του bG και cG για 24 ώρες.....	121
<b>Εικόνα 4. 56.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων. (α): Κύτταρα ελέγχου- Control. (β): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20 µg/mL του bG. (γ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20 µg/mL του cG. ....	122

<b>Εικόνα 4. 57.</b> Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα, έπειτα από επώαση με 20 µg/mL του bG και του cG για 24 ώρες.....	122
<b>Εικόνα 4. 58.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των κυττάρων NIH/3T3. (α): Κύτταρα ελέγχου-Control. (β): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του bD. (γ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του cD.....	123
<b>Εικόνα 4. 59.</b> Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα κύτταρα NIH/3T3, έπειτα από επώαση με 20 µg/mL ( <b>α</b> ), 50 ( <b>β</b> ) και 100 µg/mL ( <b>γ</b> ) του bD και cD για 24 ώρες.....	124
<b>Εικόνα 4. 60.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των κυττάρων HaCaT. (α): Κύτταρα ελέγχου-Control. (β): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του bD. (γ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του cD.....	124
<b>Εικόνα 4. 61.</b> Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα κύτταρα HaCaT, έπειτα από επώαση με 20 µg/mL ( <b>α</b> ), 50 µg/mL ( <b>β</b> ) και 100 µg/mL ( <b>γ</b> ) του bD και του cD για 24 ώρες. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου- control ( $p < 0.05$ ).....	125
<b>Εικόνα 4. 62.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των κυττάρων THP-1. (α): Κύτταρα ελέγχου-Control. (β): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του bD. (γ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του cD.....	126
<b>Εικόνα 4. 63.</b> Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα, έπειτα από επώαση με 20 µg/mL ( <b>α</b> ), 50 µg/mL ( <b>β</b> ) και 100 µg/mL ( <b>γ</b> ) του bD και του cD για 24 ώρες. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου- control ( $p < 0.05$ ).....	126
<b>Εικόνα 4. 64.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των κυττάρων NIH/3T3. (α): Κύτταρα ελέγχου-Control. (β): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του bN. (γ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του cN.....	127
<b>Εικόνα 4. 65.</b> Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα NIH/3T3 κύτταρα, έπειτα από επώαση με 20 µg/mL ( <b>α</b> ), 50 µg/mL ( <b>β</b> ) και 100 µg/mL ( <b>γ</b> ) του bN και του cN για 24 ώρες.....	128
<b>Εικόνα 4. 66.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των κυττάρων HaCaT. (α): Κύτταρα ελέγχου-Control. (β): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του bN. (γ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του cN.....	128
<b>Εικόνα 4. 67.</b> Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα κύτταρα HaCaT, έπειτα από επώαση με 20 µg/mL ( <b>α</b> ), 50 µg/mL ( <b>β</b> ) και 100 µg/mL ( <b>γ</b> ) του bN και του cN για 24 ώρες. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου- control ( $p < 0.05$ ).....	129
<b>Εικόνα 4. 68.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων. (α): Κύτταρα ελέγχου- control. (β): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του bN. (γ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του cN.....	130
<b>Εικόνα 4. 69.</b> Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα, έπειτα από επώαση	

με 20 µg/mL (α), 50 µg/mL (β) και 100 µg/mL (γ) του bN και του cN για 24 ώρες. *: στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου- control (p< 0.05).	130
<b>Εικόνα 4. 70.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των NIH/3T3 κυττάρων. (α): Κύτταρα ελέγχου- Control. (β): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20 µg/mL του bG. (γ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20 µg/mL του cG.	132
<b>Εικόνα 4. 71.</b> Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των NIH/3T3 κυττάρων έπειτα από επώαση με 20 µg/mL του bG και του cG για 24 ώρες.	132
<b>Εικόνα 4. 72.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των κερατινοκυττάρων HaCaT. (α): Κύτταρα ελέγχου- Control. (β): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20 µg/mL του bG. (γ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20 µg/mL του cG.	133
<b>Εικόνα 4. 73.</b> Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων HaCaT έπειτα από επώαση με 20 µg/mL του bG και του cG για 24 ώρες.	133
<b>Εικόνα 4. 74.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων. (α): Κύτταρα ελέγχου- Control. (β): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20 µg/mL του bG. (γ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20 µg/mL του cG.	134
<b>Εικόνα 4. 75.</b> Διακοπή κυτταρικού κύκλου των κυττάρων THP-1 έπειτα από επώαση με 20 µg/mL του bG και του cG.	134
<b>Εικόνα 4. 76.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των NIH/ 3T3 κυττάρων. (α): Κύτταρα ελέγχου- Control. (β): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του bD. (γ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του cD.	135
<b>Εικόνα 4. 77.</b> Διακοπή κυτταρικού κύκλου των κυττάρων NIH/3T3 έπειτα από επώαση με 20 (α), 50 (β) και 100 µg/mL (γ) του bD και του cD. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control.	136
<b>Εικόνα 4. 78.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των κερατινοκυττάρων HaCaT. (α): Κύτταρα ελέγχου- Control. (β): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του bD. (γ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του cD.	137
<b>Εικόνα 4. 79.</b> Διακοπή κυτταρικού κύκλου των κυττάρων HaCaT έπειτα από επώαση με 20 (α), 50 (β) και 100 µg/mL (γ) από το bD και το cD.	137
<b>Εικόνα 4. 80.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων. (α): Κύτταρα ελέγχου- Control. (β): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20 µg/mL του bD. (γ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20 µg/mL του cD.	138
<b>Εικόνα 4. 81.</b> Διακοπή κυτταρικού κύκλου των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων έπειτα από επώαση με 20 µg/mL του bD και του cD (α), 50 µg/mL του bD (β) και 100 µg/mL του bD (γ). *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control (p < 0.05).	139
<b>Εικόνα 4. 82.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των HaCaT κυττάρων. (α): Κύτταρα ελέγχου- Control. (β): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του bD. (γ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του cD.	140

<b>Εικόνα 4. 83.</b> Διακοπή κυτταρικού κύκλου των κυττάρων NIH/3T3 έπειτα από επώαση με 20 ( <b>α</b> ), 50 ( <b>β</b> ) και 100 µg/mL ( <b>γ</b> ) από το bN και το cN. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).....	141
<b>Εικόνα 4. 84.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των HaCaT κυττάρων. ( <b>α</b> ): Κύτταρα ελέγχου- Control. ( <b>β</b> ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του bD. ( <b>γ</b> ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του cD.....	142
<b>Εικόνα 4. 85.</b> Διακοπή κυτταρικού κύκλου των κυττάρων HaCaT έπειτα από επώαση με 20 ( <b>α</b> ), 50 ( <b>β</b> ) και 100 µg/mL ( <b>γ</b> ) από το bN και το cN. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).....	142
<b>Εικόνα 4. 86.</b> Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων. ( <b>α</b> ): Κύτταρα ελέγχου- Control. ( <b>β</b> ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20 µg/mL του bN. ( <b>γ</b> ): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20 µg/mL του cN.....	143
<b>Εικόνα 4. 87.</b> Διακοπή κυτταρικού κύκλου των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων έπειτα από επώαση με 20 ( <b>α</b> ), 50 ( <b>β</b> ) και 100 µg/mL ( <b>γ</b> ) από το bN και το cN. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). .....	144
<b>Εικόνα 4. 88.</b> Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 ( <b>α</b> ), p65 ( <b>β</b> ) και HO-1 ( <b>γ</b> ) στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). .....	145
<b>Εικόνα 4. 89.</b> Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 ( <b>α</b> ), p65 ( <b>β</b> ) και HO-1 ( <b>γ</b> ) στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). .....	147
<b>Εικόνα 4. 90.</b> Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 ( <b>α</b> ), p65 ( <b>β</b> ) και HO-1 ( <b>γ</b> ) στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). .....	148
<b>Εικόνα 4. 91.</b> Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 ( <b>α</b> ), p65 ( <b>β</b> ) και HO-1 ( <b>γ</b> ) στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). .....	150
<b>Εικόνα 4. 92.</b> Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 ( <b>α</b> ), p65 ( <b>β</b> ) και HO-1 ( <b>γ</b> ) στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). .....	151
<b>Εικόνα 4. 93.</b> Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 ( <b>α</b> ), p65 ( <b>β</b> ) και HO-1 ( <b>γ</b> ) στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). .....	152
<b>Εικόνα 4. 94.</b> Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 ( <b>α</b> ), p65 ( <b>β</b> ) και HO-1 ( <b>γ</b> ) στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN. ....	154
<b>Εικόνα 4. 95.</b> Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 ( <b>α</b> ), p65 ( <b>β</b> ) και HO-1 ( <b>γ</b> ) στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). .....	155
<b>Εικόνα 4. 96.</b> Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 ( <b>α</b> ), p65 ( <b>β</b> ) και HO-1 ( <b>γ</b> ) στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ). .....	156
<b>Εικόνα 4. 97.</b> Ενδεικτικές φωτογραφίες από το τεστ OGTT στους μύες SV129. ( <b>α</b> ) χορήγηση διαλύματος γλυκόζης ( <b>β</b> ) τοποθέτηση των ζώων σε χωριστούς κλωβούς και σε restrainer κατά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου ( <b>γ</b> ) λήψη σταγόνας αίματος από το	



πέλμα των ζώων και μέτρηση της γλυκόζης του αίματος με τη χρήση του συστήματος Solus V2 με ταινίες.....	158
<b>Εικόνα 4. 98.</b> Επίπεδα γλυκόζης αίματος κατά το τεστ OGTT στις τρεις ομάδες πειραματοζώων.....	159
<b>Εικόνα 4. 99.</b> Εμβαδό κάτω από την καμπύλη (AUC) των επιπέδων γλυκόζης αίματος του τεστ OGTT για τις τρεις ομάδες. RU: relative units, τυχαίες μονάδες. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).....	159

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 3. 1.</b> Τα τρία ζεύγη ναουλικών που προέκυψαν από τους δύο τρόπους αποφυλλοποίησης του γραφενίου από γραφίτη. ....	66
<b>Πίνακας 3. 2.</b> Περιγραφή των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στις in vitro δοκιμασίες.....	68
<b>Πίνακας 3. 3.</b> Σύσταση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.....	79
<b>Πίνακας 3. 4.</b> Οι 3 ομάδες στις οποίες χωρίστηκαν οι μύες 129SV για την αξιολόγηση της δράσης των νανογαλακτωμάτων υπογλυκαιμικών ουσιών.....	84
<b>Πίνακας 4. 1.</b> Αντιστοίχιση των συγκεντρώσεων (% v/v) του διαλύτη DMF με τις δόσεις του cG.....	85



# ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ- ΕΠΕΞΗΓΗΣΕΙΣ

<b>ADA</b>	American Diabetes Association, Αμερικάνικη Ένωση Διαβήτη
<b>ART</b>	Antiretroviral therapy, αντιρετροϊκή θεραπεία
<b>cAMP</b>	Cyclic adenosine monophosphate, κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
<b>ATP</b>	Adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη
<b>AUC</b>	Area under curve, εμβαδό κάτω από την καμπύλη
<b>BAFF</b>	B- cell activating factor, παράγοντας ενεργοποίησης των B-κυττάρων
<b>bD</b>	Biologically exfoliated N- Doped graphene
<b>bG</b>	Biographene
<b>bN</b>	Biologically- exfoliated nitrate graphene
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin, αλβουμίνη βόειου ορού
<b>CA</b>	Caprylic acid, καπρυλικό οξύ
<b>cD</b>	Chemically exfoliated N- Doped graphene
<b>CD40L</b>	CD40 ligand, λιγάση CD40
<b>CDKs</b>	Cyclin- dependent kinases, κυκλινο- εξαρτώμενες κινάσες
<b>CF</b>	Carbon fiber, ίνες άνθρακα
<b>CFE</b>	Colony forming efficiency, ικανότητα σχηματισμού αποικιών
<b>cG</b>	Graphene, γραφένιο από χημική αποφυλλοποίηση
<b>CGM</b>	Continuous glucose monitoring, συστήματα συνεχούς καταγραφής της γλυκόζης
<b>CN</b>	Cellulose nanofiber, νανοΐνες κυτταρίνης

<b>cN</b>	Chemically exfoliated nitrate graphene
<b>CNTs</b>	Carbon nanotubes, νανοσωλήνες άνθρακα
<b>CSII</b>	Continuous subcutaneous insulin infusion, συστήματα συνεχούς υποδόριας έγχυσης ινσουλίνης
<b>CT</b>	Computed tomography, αξονική τομογραφία
<b>DCFDA</b>	2', 7' -Dichlorofluorescein diacetate
<b>DDS</b>	Drug- delivery systems, συστήματα μεταφοράς φαρμάκων
<b>DIP</b>	Diabetes mellitus in pregnancy, ΣΔ που εμφανίζεται κατά την κύηση
<b>DKA</b>	Diabetic Ketoacidosis, διαβητική κετοξέωση
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMF</b>	Dimethylformamide, διμεθυλοφορμαμίδιο
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide, διμεθυλοσουλφοξείδιο
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid, Δεσοξυριβοζονουκλεϊνικό οξύ
<b>DPP4</b>	Dipeptidyl peptidase 4, διπεπτιδυλική πεπτιδάση 4
<b>EMA</b>	European Medicines Agency, Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων
<b>EU, EE</b>	European Union, Ευρωπαϊκή Ένωση
<b>FAD</b>	Flavin adenine dinucleotide, δινουκλεοτίδιο αδένινης της φλαβίνης
<b>FBS</b>	Fetal bovine serum
<b>FC</b>	Flow Cytometry, Κυτταρομετρία Ροής
<b>FDA</b>	U.S. Food and Drug Administration, Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ
<b>FPLD2</b>	Familial partial lipodystrophy of the Dunnigan type
<b>FSC</b>	Forward scatter

<b>GDF15</b>	Growth differentiation factor 15
<b>GDH</b>	Glucose dehydrogenase, αφυδρογονάση της γλυκόζης
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein, πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη
<b>GLP-1</b>	Glucagon-like peptide-1, γλυκαγονόμορφο πεπτίδιο-1
<b>GO</b>	Graphene oxide, οξείδιο του γραφενίου
<b>GOQD</b>	Graphene oxide quantum dots, κβαντικές κουκίδες οξειδίου του γραφενίου
<b>GOx</b>	Glucose Oxidase, οξειδάση της γλυκόζης
<b>GPx</b>	Glutathione peroxidase, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
<b>GS</b>	Graphene sheets, φύλλα γραφενίου
<b>HbA1c</b>	Glycated hemoglobin, γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη
<b>HBSS</b>	Hanks's Balanced Salt Solution
<b>HLA</b>	Human leukocyte antigen, Ανθρώπινο λευκοκυτταρικό αντιγόνο
<b>HO-1</b>	Heme oxygenase- 1, αιμοξυγενάση- 1
<b>IADPSG</b>	International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups
<b>ICIs</b>	Immune checkpoint inhibitors, αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος
<b>IDF</b>	International Diabetes Federation, Διεθνής Ομοσπονδία Διαβήτη
<b>IFG</b>	Impaired fasting glucose, διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας
<b>IPEX</b>	Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome
<b>LA</b>	Lauric acid, λαυρικό οξύ
<b>LT</b>	Lymphotoxin, λεμφοτοξίνη

<b>MCF</b>	Mesocellular silicate foam, μεσοκυτταρικός αφρός από πυρίτιο
<b>MELAS</b>	Mitochondrial encephalopathy with stroke-like episodes syndrome
<b>MFI</b>	Mean fluorescence intensity, μέση ένταση φθορισμού
<b>MIDD</b>	Maternally inherited diabetes and deafness syndrome
<b>MODY</b>	Maturity- onset diabetes of the young, διαβήτης των νέων με όψιμη έναρξη
<b>MONO</b>	Monogenic diabetes, μονογονικός διαβήτης
<b>MRI</b>	Magnetic resonance imaging, μαγνητική τομογραφία
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
<b>NAD</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide, δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδης αδενίνης
<b>NDM, ΝΣΔ</b>	Neonatal diabetes mellitus, νεογνικός ΣΔ
<b>NF- κB</b>	Nuclear factor- κB, πυρηνικός παράγοντας- κB
<b>NK</b>	Natural killers, φυσικοί φονείς
<b>NLCs</b>	Nanostructured lipid carriers, νανοδομημένοι φορείς λιπιδίων
<b>NNI</b>	National Nanotechnology Initiative, Εθνική Πρωτοβουλία Νανοτεχνολογίας
<b>NPs</b>	Nanoparticles, νανοσωματίδια
<b>Nrf2</b>	Nuclear factor (erythroid-derived 2)- like 2, Πυρηνικός παράγοντας 2 προερχόμενος από το ερυθροειδές 2
<b>OD</b>	Optical density, οπτική πυκνότητα
<b>OGTT, GTT</b>	Oral glucose tolerance test, δοκιμασία ανοχής στην γλυκόζη
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>PcCLs</b>	Protein corona liposomes

<b>PCL</b>	Polycaprolactone, πολυκαπρολακτόνη
<b>PCL</b>	Polycaprolactone, πολυκαπρολακτόνη
<b>PDA</b>	Polydopamine
<b>PDL1</b>	Programmed death-ligand 1
<b>PEG</b>	Polyethene glycol, πολυαιθυλενογλυκόλη
<b>PERK</b>	Protein kinase-like ER kinase
<b>PET</b>	Positron emission tomography, τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων
<b>PI</b>	Propidium iodide, Ιωδιούχο προπίδιο
<b>PLGA</b>	Poly (lactic- co- glycolic acid, πολυγαλακτικό -συν-γλυκολικό οξύ
<b>PMA</b>	Phorbol 12- myristate 13- acetate
<b>PNDM</b>	Permanent Neonatal Diabetes Mellitus, μόνιμος ΝΣΔ
<b>PQQ</b>	Pyrroloquinoline quinone
<b>PS</b>	Phosphatidylserine, φωσφατιδυλοσερίνη
<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidone, πολυβινυλοπυρρολιδόνη
<b>RCAD</b>	Renal Cysts and Diabetes
<b>RFU</b>	Relative fluorescence units, σχετικές μονάδες φθορισμού
<b>rGO</b>	Reduced graphene oxide
<b>RNasea</b>	Ribonuclease, ριβονουκλεάση
<b>RPM</b>	Revolutions per minutes, στροφές ανά λεπτό
<b>RU</b>	Relative units, σχετικές μονάδες
<b>SDH</b>	Succinate dehydrogenase, σουκινική αφυδρογονάση
<b>SF</b>	Surviving fraction, κλάσμα επιβίωσης

<b>SGLT1</b>	Sodium-glucose transport protein 1, συµµεταφορέας γλυκόζης-νατρίου 1
<b>SGLT2</b>	Sodium-glucose transport protein 2, συµµεταφορέας γλυκόζης-νατρίου 2
<b>SLNs</b>	Solid- lipid nanoparticles, νανοσωµατίδια στερεών λιπιδίων
<b>SOD</b>	Superoxide dismutase, υπεροξειδίο της δισµουτάσης
<b>SPECT</b>	Single photon emission computed tomography, αξονική τοµογραφία εκποµπής ενός φωτονίου
<b>SPS</b>	Stiff- Person syndrome
<b>SSC</b>	Side scatter, πλάγιος σκεδασµός
<b>TNDM</b>	Transient Neonatal Diabetes Mellitus, παροδικός ΝΣΔ
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor, παράγοντας νέκρωσης όγκων
<b>WHO</b>	World health organization, Παγκόσµιος οργανισµός Υγείας
<b>ISF</b>	Interstitial fluid, διάµεσο υγρό
<b>ΔΑΜΟ, ROS</b>	Δραστικές µορφές οξυγόνου, reactive oxygen species
<b>ΟΗΕ</b>	Οργανισµός Ηνωµένων Εθνών
<b>ΣΔ</b>	Σακχαρώδης διαβήτης
<b>ΣΔΚ</b>	Σακχαρώδης διαβήτης κήσεως
<b>Τ1ΣΔ</b>	ΣΔ Τύπου 1
<b>Τ2ΣΔ</b>	ΣΔ Τύπου 2



# **ΜΕΡΟΣ Ι. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Ο σακχαρώδης διαβήτης

### 1.1.1. Γενικά στοιχεία και επιδημιολογία

Ο όρος Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) αναφέρεται σε μια ομάδα ετερογενών μεταβολικών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα λόγω ανεπαρκούς παραγωγής ινσουλίνης ή μη αποτελεσματικής χρήσης της παραγόμενης ινσουλίνης από τον οργανισμό. Υπάρχουν διάφορες μορφές του ΣΔ, με πιο κοινές: τον Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 1 (Τ1ΣΔ), τον Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 (Τ2ΣΔ) και τον Σακχαρώδη Διαβήτη της κήσης (ΣΔΚ).

Η κλινική εικόνα του ΣΔ παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια. Ωστόσο το τρίπτυχο των συμπτωμάτων: πολυδιψία, πολυουρία και πολυφαγία, σε συνδυασμό με την απώλεια βάρους εμφανίζεται σχεδόν σε όλους τους τύπους διαβήτη.

Σήμερα ο ΣΔ αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα της δημόσιας υγείας παγκοσμίως επιδρώντας σημαντικά στην κοινωνικο-οικονομική ανάπτυξη κάθε χώρας. Τις τελευταίες δεκαετίες ο επιπολασμός της νόσου έχει αυξηθεί δραματικά στις περισσότερες ανεπτυγμένες και αναπτυσσόμενες χώρες <sup>1</sup>. Η Διεθνής Ομοσπονδία Διαβήτη (International Diabetes Federation, IDF) κάνει λόγο για επιδημία του σύγχρονου κόσμου καθώς σήμερα εκτιμάται ότι 538.000.000 άνθρωποι παγκοσμίως πάσχουν από κάποια μορφή διαβήτη, ενώ ο αριθμός αυτός αναμένεται να φτάσει τα 783.000.000 έως το 2045 <sup>2</sup>.

Επιπλέον, με βάση τα τελευταία δεδομένα, ένας στους δύο ενήλικες (20-79 ετών) πάσχει από κάποια μορφή διαβήτη και δεν το γνωρίζει. Το 2021 τα περιστατικά αδιάγνωστου διαβήτη εκτιμήθηκαν στα 240.000.000 <sup>3</sup>. Η έγκαιρη ανίχνευση του ΣΔ είναι αναγκαία για την επιλογή κατάλληλης θεραπείας και επηρεάζει σημαντικά την εξέλιξη της νόσου.

### 1.1.2. Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1

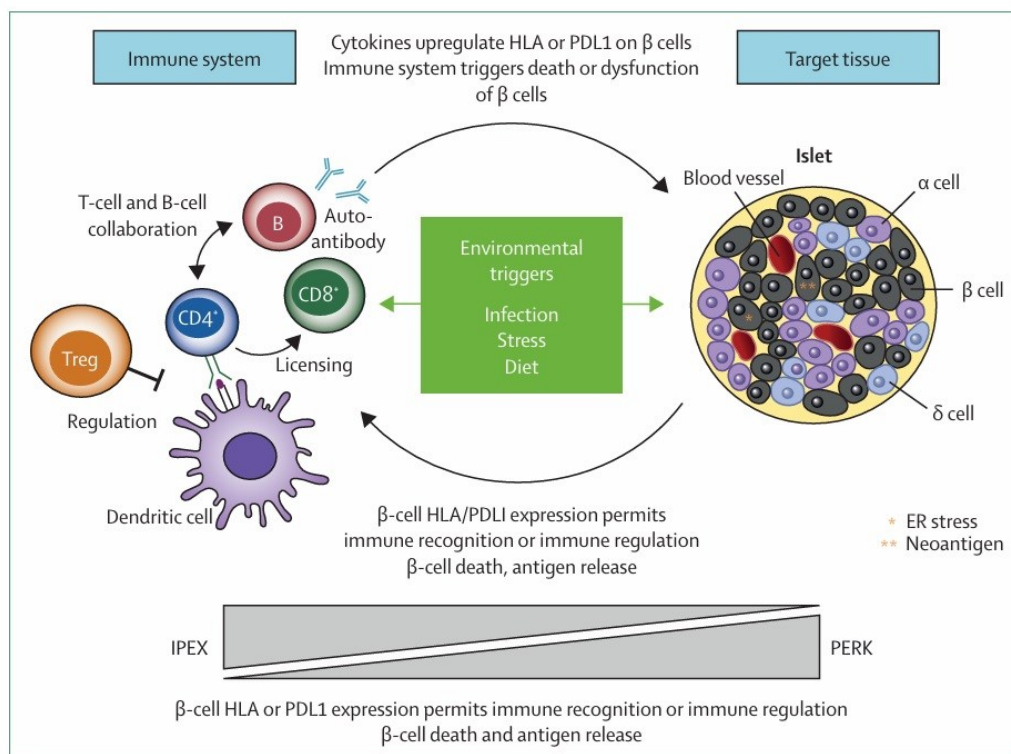
Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 1 (Τ1ΣΔ) είναι μία χρόνια διαταραχή που προκαλείται από την αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος. Το 2021 εκτιμήθηκε ότι 8.420.000 άνθρωποι ηλικίας 0-99 ετών ζούσαν με ΣΔΤ1 παγκοσμίως. Ο αριθμός αυτός αντιστοιχεί στο 1.6% των συνολικών περιστατικών ΣΔ. Μέσα στα επόμενα έτη ο επιπολασμός της νόσου αναμένεται να αυξηθεί δραματικά και εκτιμάται ότι το 2040 τα περιστατικά θα αγγίζουν τα 13.5-17.4 εκατομμύρια (περίπου 60-107% αύξηση από το 2021). Στην Ελλάδα το 2021 τα περιστατικά Τ1ΣΔ υπολογίστηκαν στις 26731 <sup>4</sup>. Ο Τ1ΣΔ παλαιότερα ονομαζόταν

και «παιδικός διαβήτης» καθώς αποτελεί την τρίτη πιο κοινή χρόνια ασθένεια της παιδικής ηλικίας. Μάλιστα εκτιμάται ότι 1 στα 300 παιδιά πάσχουν από αυτήν τη μορφή διαβήτη και ο αριθμός αυτός τείνει να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου.

Η παθοφυσιολογία του Τ1ΣΔ είναι περίπλοκη. Όπως και άλλες αυτοάνοσες διαταραχές η εκδήλωσή της εξαρτάται από ανοσολογικούς, γενετικούς αλλά και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η νόσος εμφανίζεται όταν το ίδιο το ανοσοποιητικό σύστημα καταστρέφει τα β- κύτταρα του παγκρέατος. Πρόκειται δηλαδή για μία αλληλεπίδραση μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος και του ιστού- στόχου που είναι τα νησίδια του παγκρέατος. Όπως κάθε απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος, έτσι και αυτή η επίθεση εναντίον των β- κυττάρων προκαλείται από τη συντονισμένη δράση διαφορετικών ειδών κυττάρων. Τον σημαντικότερο ρόλο σε αυτό το παιχνίδι φαίνεται ότι παίζουν τα Τ- λεμφοκύτταρα τα οποία δρουν ειδικά έναντι συγκεκριμένων αυτο-αντιγόνων των νησιδίων του παγκρέατος. Τα αυτο- αντιδραστικά αυτά Τ- κύτταρα υπάρχουν στον οργανισμό και υπό φυσιολογικές συνθήκες, ωστόσο αδυναμία στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος τα ωθεί στην καταστροφή των β- κυττάρων. Ρόλο παίζουν επίσης και τα Β- λεμφοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, οι φυσικοί φονείς (Natural killers, NK), τα μακροφάγα αλλά και τα δενδριτικά κύτταρα. Οι κυτοκίνες που απελευθερώνονται από τα κύτταρα αυτά ενισχύουν την καταστροφή των β- κυττάρων. Όσον αφορά τους γενετικούς παράγοντες, στην παθογένεση της νόσου συμμετέχει κυρίως το σύμπλεγμα HLA (human leukocyte antigen) και ιδίως τα HLA- DR και HLA- DQ. Επίσης, πολυμορφισμοί που συμβαίνουν στο γονίδιο της ινσουλίνης και σε γονίδια που συμμετέχουν στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και είναι υπεύθυνα για την παθογένεση άλλων αυτοάνοσων διαταραχών όπως τα PTPN22, CTLA4, IL2RA, και PTPN2, συμβάλλουν στην εμφάνιση της νόσου. Τέλος, η διατροφή, τα επίπεδα της βιταμίνης D καθώς και λοιμώξεις από μικρόβια, όπως ο *Enterovirus B*, μπορεί να ενισχύσουν την εμφάνιση της αυτοάνοσης διαταραχής. Οι περιβαλλοντικοί αυτοί παράγοντες προκαλούν στρες στα β- κύτταρα το οποίο οδηγεί στη γένεση νέο- αντιγόνων. Συν τοις άλλοις, οι μικροβιακές λοιμώξεις επηρεάζουν τα β- κύτταρα οδηγώντας τα σε αυτοανοσία και τα μικροβιακά αντιγόνα ενεργοποιούν τα Τ- κύτταρα τα οποία δυνητικά δρουν ως αυτό- αντιγόνα (**Εικόνα 1. 1**)<sup>5</sup>.

Απόδειξη της ανοσολογικής βάσης της νόσου αποτελεί το γεγονός ότι ο Τ1ΣΔ μπορεί να εμφανιστεί σε μη διαβητικά άτομα που δέχτηκαν μεταμόσχευση μυελού των οστών από συγγενή δότη με Τ1ΣΔ<sup>6</sup>. Επιπλέον, η επανεμφάνιση της νόσου σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς που έλαβαν παράλληλη μεταμόσχευση παγκρέατος και νεφρού επιβεβαιώνει τον ρόλο των αυτό-αντιγόνων και των αυτοαντιδραστικών κυττάρων<sup>7</sup>. Εξάλλου, μελέτες δείχνουν ότι στις περισσότερες περιπτώσεις πριν την κλινική εμφάνιση του Τ1ΣΔ προϋπήρχαν αυτοαντισώματα έναντι των αντιγόνων των β- κυττάρων για πολλά χρόνια. Η γενετική βάση της

νόσου επιβεβαιώνεται από την πιθανότητα εμφάνισης Τ1ΣΔ σε μονοζυγωτικά δίδυμα, η οποία αγγίζει το 65% έως την ηλικία των 60 ετών<sup>8</sup>. Το γεγονός ότι αυτή η συσχέτιση δεν είναι απόλυτη, υπογραμμίζει και τον ρόλο των περιβαλλοντικών παραγόντων<sup>5</sup>.



**Εικόνα 1. 1.** Η ανάπτυξη του Τ1ΣΔ βασίζεται στην αλληλεπίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος (αριστερά) και των β-κυττάρων του παγκρέατος (δεξιά). Στις περισσότερες περιπτώσεις είναι πιθανό να εμπλέκονται ήπιες αλλαγές στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος π.χ. μεταβολές σε γονίδια που βρίσκονται σε περιοχές που ρυθμίζουν τη λειτουργία των Τ-λεμφοκυττάρων (HLA, CTLA4, PTPN2, PTPN22 και IL2RA) μαζί με αλλαγές στη βιολογία των β-κυττάρων (γενετικές ή περιβαλλοντικές)<sup>5</sup>.

Οι ανεξέλεγκτες διακυμάνσεις της γλυκόζης του αίματος, ως αποτέλεσμα του Τ1ΣΔ, επηρεάζουν σημαντικά τα μικρά και τα μεγάλα αγγεία. Οι μικροαγγειακές επιπλοκές περιλαμβάνουν την αμφιβληστροειδοπάθεια, τη νευροπάθεια και τη νεφροπάθεια και μπορεί να επηρεάσουν επιπλέον την καρδιά και άλλα όργανα. Στις μακροαγγειακές επιπλοκές του Τ1ΣΔ ανήκει η αθηροσκλήρωση και η ισχαιμική αγγειακή νόσος στην καρδιά, στον εγκέφαλο και στα περιφερικά αγγεία των άκρων. Η διαβητική νεφροπάθεια αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης των μακροαγγειακών επιπλοκών και οι καρδιαγγειακές ασθένειες είναι ο κύριος παράγοντας νοσηρότητας και πρόωρου θανάτου στους ασθενείς με Τ1ΣΔ. Οι ασθενείς αυτοί διατρέχουν επίσης υψηλό κίνδυνο εμφάνισης τόσο χρόνιας όσο και οξείας διαταραχής στη γνωστική λειτουργία με επιβλαβείς επιπτώσεις στην

ψυχοκινητική ταχύτητα, τη γνωστική ευελιξία, την προσοχή και την οπτική αντίληψη. Επιπλέον υπάρχει υψηλή πιθανότητα να εμφανίσουν άλλες αυτοάνοσες διαταραχές όπως είναι ο θυρεοειδισμός (Hashimoto ή Grave's), η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, η αυτοάνοση γαστρίτιδα, η λεύκη και η νόσος του Addison's <sup>9</sup>.

Ευτυχώς τα τελευταία χρόνια οι κίνδυνοι εμφάνισης των παραπάνω επιπλοκών μεταξύ των ασθενών με Τ1ΣΔ έχουν μειωθεί σημαντικά. Αυτό οφείλεται κυρίως στον καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο και την ορθή διαχείριση των παραγόντων κινδύνου όπως είναι η αρτηριακή υπέρταση και η υπεργλυκαιμία. Οι μικροαγγειακές επιπλοκές προκαλούνται κυρίως από την υπεργλυκαιμία και έτσι μείωση της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) ειδικά κατά την έναρξη της νόσου, μειώνει σημαντικά την εμφάνιση ή/και την εξέλιξη αυτών των επιπλοκών. Δυστυχώς όμως, ο κίνδυνος εμφάνισης των μακροαγγειακών επιπλοκών φαίνεται ότι παραμένει ακόμα και όταν οι ασθενείς επιτυγχάνουν ορθή γλυκαιμική ρύθμιση <sup>9</sup>.

Η αντιμετώπιση του Τ1ΣΔ απαιτεί την χορήγηση εξωγενούς ινσουλίνης εφ' όρου ζωής και για τον λόγο αυτό καλείται και «ινσουλινο- εξαρτώμενος» διαβήτης. Η ινσουλίνη απομονώθηκε αρχικά από ζωικά προϊόντα, αλλά με την πάροδο των ετών και την εξέλιξη της βιοτεχνολογίας έγινε δυνατή η σύνθεση ανθρώπινης ανασυνδυασμένης ινσουλίνης η οποία χορηγούνται μέχρι πρόσφατα, παράλληλα με παράγοντες που βελτιώναν τις γλυκοδυναμικές της ιδιότητες. Σήμερα, υπάρχουν ανάλογα ανασυνδυασμένης ινσουλίνης από διάφορες φαρμακευτικές εταιρείες, τα οποία συμπεριφέρονται είτε ως ινσουλίνη ταχείας δράσης (rapid-acting insulin) είτε ως ινσουλίνη μακράς δράσης (βασική ινσουλίνη, basal insulin). Οι περισσότεροι διαβητικοί ασθενείς χορηγούν στον εαυτό τους ένα ανάλογο βασικής ινσουλίνης μία φορά την ημέρα και πολλαπλά ανάλογα ινσουλίνης ταχείας δράσης, όποτε κρίνεται απαραίτητο (π.χ. σε περιπτώσεις υπεργλυκαιμίας, παράλληλα με τη λήψη υδατανθράκων κλπ.) <sup>5</sup>.

Τα δεδομένα στη διαχείριση του Τ1ΣΔ άλλαξαν οι συσκευές συνεχούς υποδόριας έγχυσης ινσουλίνης (continuous subcutaneous insulin infusion- CSII) ή αλλιώς αντλίες ινσουλίνης. Πρόκειται για μικρές ψηφιακές συσκευές οι οποίες μιμούνται με τον καλύτερο δυνατό τρόπο την έκκριση της ινσουλίνης από τον οργανισμό. Οι αντλίες διαθέτουν έναν μικρό καθετήρα ο οποίος εισέρχεται υποδόρια και εγχέει συνεχόμενα ινσουλίνη. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται πιο ακριβής και ευέλικτος γλυκαιμικός έλεγχος. Επιπλέον, βελτιώνεται σημαντικά η ποιότητα ζωής των διαβητικών ασθενών αφού αποφεύγεται η επώδυνη υποδόρια χορήγηση της αγωγής μέσω σύριγγας ή πένας και μειώνονται σημαντικά τα επεισόδια υπο- και υπερ- γλυκαιμίας <sup>10</sup>. Σε συνδυασμό με ένα σύστημα συνεχούς παρακολούθησης της γλυκόζης (Continuous Glucose Monitoring- CGM) επιτυγχάνεται ένα υβριδικό «κλειστό» σύστημα χορήγησης της θεραπείας. Τα

συστήματα CGM προσφέρουν διαρκή έλεγχο των επιπέδων γλυκόζης και συνεχή ενημέρωση του ασθενούς.

### **1.1.3. Σακχαρώδης διαβήτης Τύπου 2**

Σε αντίθεση με τον Τ1ΣΔ, ο Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου 2 (Τ2ΣΔ) δεν έχει αυτοάνοση βάση αλλά κληρονομική. Πρόκειται για μία ετερογενή, πολύ-παραγοντική και προοδευτική νόσο η οποία χαρακτηρίζεται από κληρονομική και επίκτητη αντίσταση στην ινσουλίνη και ποιοτικές ή ποσοτικές διαταραχές στην έκκριση της ινσουλίνης <sup>11</sup>.

Η θεραπευτική αντιμετώπιση του Τ2ΣΔ είναι διαφορετική σε κάθε ασθενή και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον βαθμό εξέλιξης της νόσου. Άλλοι παράγοντες που συντελούν στην επιλογή κατάλληλης θεραπείας είναι η ηλικία, οι προτιμήσεις και συνήθειες, η ψυχοκοινωνική κατάσταση και το προσδόκιμο ζωής του ασθενούς. Ρόλο παίζει επίσης η συνύπαρξη άλλων παθολογικών καταστάσεων καθώς και οι πολιτισμικές και οικονομικές συνθήκες που επικρατούν στη χώρα διαβίωσης του ασθενούς <sup>9</sup>.

Στις περισσότερες περιπτώσεις Τ2ΣΔ συνιστάται αρχικά αλλαγή του τρόπου ζωής. Αυτό περιλαμβάνει σωστή διατροφή, απώλεια βάρους σε περίπτωση που ο ασθενής είναι παχύσαρκος, αποφυγή του καπνίσματος και συστηματική άσκηση. Οι αλλαγές αυτές προτείνεται να ακολουθούνται και προληπτικά από υγιή άτομα τα οποία διατρέχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης Τ2ΣΔ. Εάν ο ΣΔ βρίσκεται σε προχωρημένη κατάσταση ή εάν ο ασθενής δεν συμμορφώνεται με τις αλλαγές του τρόπου ζωής, χορηγείται παράλληλα φαρμακευτική αγωγή. Η θεραπεία πολλές φορές απαιτεί τον συνδυασμό της κατάλληλης υπογλυκαιμικής αγωγής με φάρμακα ειδικά για την πρόληψη και την αντιμετώπιση άλλων, σχετικών με τον ΣΔ, επιπλοκών. Υπάρχουν πλέον πάρα πολλά σκευάσματα για την αντιμετώπιση του Τ2ΣΔ τα οποία διακρίνονται σε κατηγορίες ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους. Σε περίπτωση που η νόσος έχει εξελιχθεί και δεν είναι εφικτή η καλή μεταβολική ρύθμιση του ασθενούς με στόχο HbA1c < 7%, τότε απαιτείται χορήγηση ινσουλίνης εφ' όρου ζωής ακριβώς όπως και στη διαχείριση του Τ1ΣΔ <sup>12</sup>. Οι φαρμακευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση του Τ2ΣΔ είναι οι εξής:

#### ***Μετφορμίνη***

Η μετφορμίνη (1,1-dimethylbiguanide hydrochloride) είναι ένα συνθετικό υδρόφιλο διγουανίδιο (biguanide) που απορροφάται κυρίως από το ανώτερο λεπτό έντερο. Χορηγείται εκ του στόματος και έχει χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα. Τα τελευταία 60 χρόνια και μέχρι σήμερα, η μετφορμίνη αποτελεί φάρμακο εκλογής

για τη θεραπεία του Τ2ΣΔ και συνιστάται στις περισσότερες κλινικές κατευθυντήριες οδηγίες. Η μετφορμίνη συντέθηκε το 1922 και ήδη από τις πρώτες αναφορές προκλινικών μελετών σε κουνέλια έδειξε να μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Έκτοτε χρησιμοποιήθηκε για διάφορους σκοπούς από την διαχείριση της επιδημίας της ινφλουέντσα στις Φιλιππίνες το 1949 έως και την αντιμετώπιση της νόσου Covid-19 σε παχύσαρκους ασθενείς με ΣΔ, το 2021. Εκτιμάται ότι σήμερα η μετφορμίνη χρησιμοποιείται καθημερινά από περισσότερους από 200.000.000 ασθενείς με Τ2ΣΔ είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με σουλφονουλουρίες ή αναστολείς του DPP4. Αυτό έγκειται στο γεγονός ότι έχει χαμηλό κόστος παρασκευής, υψηλή αποτελεσματικότητα και ασφάλεια, μικρό κίνδυνο εμφάνισης υπογλυκαιμικών επεισοδίων, ενώ παράλληλα προσφέρει και καρδιαγγειακή προστασία. Επιπλέον, συντελεί στη μείωση του βάρους σε παχύσαρκους ασθενείς πιθανότατα μέσω αύξησης της έκφρασης της GDF15 (growth differentiation factor 15). Η μετφορμίνη διατίθεται και χορηγείται εκ του στόματος με τη μορφή χαπιού (0.5–2.5 g καθημερινά) και βελτιώνει αποτελεσματικά και μακροχρόνια τον γλυκαιμικό έλεγχο μειώνοντας σημαντικά την HbA1c. Η χορήγησή της ενδείκνυται και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης για την αντιμετώπιση του ΣΔ της κύησης ή σε εγκύους με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών ή Τ2ΣΔ <sup>13</sup>.

Είναι εντυπωσιακό ότι παρά τη σχεδόν καθολική χρήση του φαρμάκου, μέχρι στιγμής δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως ο μηχανισμός της θεραπευτικής του δράσης. Έχει αποδειχθεί ότι οι υπογλυκαιμικές ιδιότητες της μετφορμίνης προέρχονται κυρίως από τη δράση της στο ήπαρ όπου ρυθμίζει την ηπατική παραγωγή της γλυκόζης μέσω AMPK- εξαρτώμενων και AMPK- ανεξάρτητων μηχανισμών <sup>14</sup>. Ωστόσο πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι δρα και σε άλλους ιστούς όπως ο γαστρεντερικός σωλήνας, ο φαιός λιπώδης ιστός και τα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, φαίνεται ότι συμμετέχει στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος κάτι που την καθιστά πολλά υποσχόμενο παράγοντα και για άλλες παθολογίες όπως ο καρκίνος, οι φλεγμονώδεις νόσοι και διάφορες μολύνσεις <sup>13</sup>.

### ***Αναστολείς του SGLT2***

Οι αναστολείς του συμμεταφορέα γλυκόζης- νατρίου 2 (sodium-glucose transport protein 2, SGLT2) ονομάζονται και γλιφλοζίνες ή φλοζίνες. Είναι μία κατηγορία φαρμάκων που δρα κυρίως στους νεφρούς αναστέλλοντας την επαναπρόσληψη της γλυκόζης, προκαλώντας έτσι σημαντική γλυκοζουρία. Οι ενώσεις αυτές είναι 200-2500 φορές πιο εκλεκτικές έναντι του SGLT2 ο οποίος βρίσκεται στα εγγύς νεφρικά σωληνάκια, απ' ότι του SGLT1 ο οποίος βρίσκεται στους νεφρούς και το έντερο. Όταν χορηγούνται στο θεραπευτικό τους εύρος συμβάλουν στην αποβολή περίπου 60-100 g γλυκόζης στα ούρα, προκαλώντας έτσι άμεση αποβολή της γλυκόζης από τη συστηματική κυκλοφορία και σημαντική μείωση των επιπέδων της



γλυκόζης στο αίμα. Φάρμακα κλειδιά σε αυτή την κατηγορία είναι η καναγλιφλοζίνη (canagliflozin), η νταπαγλιφλοζίνη (dapagliflozin), η εμπραγλιφλοζίνη (empagliflozin) και η ερτουγλιφλοζίνη (ertugliflozin) που έχουν εγκριθεί από τον EMA και τον FDA και χορηγούνται εκ του στόματος. Στην κατηγορία αυτή ανήκει και η σοταγλιφλοζίνη (sotagliflozin) η οποία έχει πάρει έγκριση μόνο από τον EMA και μόνο για τη θεραπεία του Τ1ΣΔ. Οι αναστολείς του SGLT2 εμφανίζουν μικρές φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές διαφορές μεταξύ τους ωστόσο όλοι έχουν υψηλή βιοδιαθεσιμότητα όταν χορηγούνται από το στόμα. Χάρη στον εξαιρετικό χρόνο ημίσειας ζωής τους είναι αρκετή η χορήγηση τους μόνο μία φορά την ημέρα. Λήψη των παραγόντων αυτών για ένα έτος μειώνει σημαντικά την HbA1c και προκαλεί δευτερογενώς μείωση του βάρους και της αρτηριακής πίεσης. Συν τοις άλλοις, οι αναστολείς του SGLT2 φαίνεται να έχουν μακροπρόθεσμα και καρδιαγγειακά οφέλη μειώνοντας τις επιπλοκές από τον Τ2ΣΔ. Τα οφέλη τους αυτά δοκιμάζονται πλέον σε κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία νεφρικών παθήσεων που δεν σχετίζονται με τον ΣΔ και έχουν λάβει έγκριση τόσο διεθνώς όσο και στη χώρα μας για τη θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας και της χρόνιας νεφρικής νόσου που δεν οφείλεται σε ΣΔ.<sup>15</sup>

### ***Αγωνιστές των υποδοχέων του GLP-1***

Το γλυκαγονόμορφο πεπτίδιο-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) είναι μία ινκρετίνη που απελευθερώνεται φυσιολογικά από τα επιθηλιακά L- κύτταρα του εντέρου μετά την λήψη των θρεπτικών συστατικών και κυρίως της γλυκόζης και του λίπους. Αμέσως μετά από ένα γεύμα και με την αύξηση της γλυκόζης, το πεπτίδιο αυτό διεγείρει την απελευθέρωση της ινσουλίνης από τα β- κύτταρα του παγκρέατος μέσω του ινκρετινικού φαινομένου. Συνήθως στον Τ2ΣΔ η διαδικασία αυτή είναι διαταραγμένη και η λήψη φαρμακολογικών αγωνιστών των υποδοχέων του GLP-1 αποκαθιστά την απελευθέρωση της ινσουλίνης. Επιπλέον, οι παράγοντες αυτοί, αναστέλλουν την παραγωγή γλυκαγόνου από τα α- κύτταρα του παγκρέατος και καταστέλλουν την απόπτωση των β -κυττάρων. Συν τοις άλλοις, τα φάρμακα αυτά συμβάλλουν στη μείωση του βάρους, καθώς ο GLP-1 δρα στον υποθάλαμο προκαλώντας το αίσθημα του κορεσμού και στο στομάχι επιβραδύνοντας τη γαστρική κένωση. Κλινικές μελέτες δείχνουν ότι οι αγωνιστές του GLP-1 μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων, ρυθμίζοντας την αρτηριακή πίεση και τη χοληστερόλη και παρέχοντας νευροπροστασία <sup>16</sup>.

Οι αγωνιστές των υποδοχέων του GLP-1 διακρίνονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους: τους αγωνιστές σύντομης δράσης (short-acting GLP-1 receptor agonists) και τους αγωνιστές μακράς δράσης (long-term-acting GLP-1 receptors) <sup>15</sup>.

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν παράγοντες οι οποίοι δομικά έχουν 90-97% ομολογία αλληλουχίας με την εξεντίνη- 4 (exendin-4) και επομένως διαφέρουν σημαντικά από το ενδογενές GLP-1. Ωστόσο, μπορούν να συνδεθούν στους υποδοχείς του στα διάφορα όργανα του οργανισμού, εκλύοντας τις δράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η εξενατίδη (exenatide) και η λιξιसेνατίδη (lixisenatide). Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν αγωνιστές του GLP-1 που δομικά έχουν τον ίδιο σκελετό με το ενδογενές ανθρώπινο GLP-1. Για τον λόγο αυτό καλούνται και ανάλογα του GLP-1. Έπειτα από κατάλληλες μετατροπές οι αγωνιστές αυτοί καθίστανται ανθεκτικοί στην διάσπαση από την DPP-4 και αυτό τους προσδίδει μακροχρόνια δράση. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η λιραγλουτίδη (liraglutide), η ντουλαγλουτίδη (dulaglutide), η αλβιγλουτίδη (albiglutide) και η σεμαγλουτίδη (semaglutide).

Όλοι οι παραπάνω αγωνιστές των υποδοχέων του GLP-1 χορηγούνται υποδορίως με τη χρήση ειδικής πέννας. Ωστόσο η σεμαγλουτίδη υπάρχει και σε μορφή χαπιού για την εκ του στόματος χορήγηση. Η συχνότητα χορήγησής τους διαφέρει ανάλογα με το σκεύασμα και ποικίλει από μία με δύο φορές την ημέρα έως μία φορά την εβδομάδα.

### *Σουλφονουλουρίες*

Οι σουλφονουλουρίες είναι από τα παλαιότερα φάρμακα για την αντιμετώπιση του Τ2ΣΔ. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τις σουλφονουλουρίες πρώτης γενιάς και τις σουλφονουλουρίες δεύτερης γενιάς. Τα φάρμακα της δεύτερης γενιάς αντικατέστησαν σχεδόν εξ ολοκλήρου αυτά της πρώτης, καθώς επέλυσαν τις ανεπιθύμητες ενέργειες όπως την αύξηση του βάρους, τη χαμηλή συγγένεια του υποδοχέα και τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης υπογλυκαιμίας και καρδιαγγειακών επιπλοκών. Στην πρώτη γενιά ανήκουν οι ενώσεις τολβουταμίδη (tolbutamide), καρβουταμίδη (carbutamide), χλωπροπαμίδη (chlorpropamide) και τολαζαμίδη (tolazamide). Η δεύτερη γενιά περιλαμβάνει την γλιβενκλαμίδη (glibenclamide), την γλιβορνουρίδη (glibornuride), την γλικλαζίδη (gliclazide), την γλιπιζίδη (glipizide) και την γλικιδόνη (gliquidone). Οι σουλφονουλουρίες διεγείρουν την απελευθέρωση της ινσουλίνης από τα β- κύτταρα του παγκρέατος κυρίως μέσω αναστολής του μονοπατιού των ευαίσθητων στο ATP καναλιών καλίου ( $K_{ATP}$ ) και ενεργοποίησης της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cyclic adenosine monophosphate, cAMP). Επιπλέον οι σουλφονουλουρίες αυξάνουν την ευαισθησία των περιφερικών ιστών στην ινσουλίνη και την αξιοποίηση της περιφερικής γλυκόζης<sup>17</sup>.

## *Γλινίδες*

Οι γλινίδες ή μεγλιτινίδες είναι μία άλλη κατηγορία φαρμάκων που διεγείρουν την απελευθέρωση της ινσουλίνης μέσω αναστολής καναλιών  $K_{ATP}$  που βρίσκονται στη μεμβράνη των  $\beta$ -κυττάρων του παγκρέατος. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η νατεγλινίδα (nateglinide), η ρεπαγλινίδα (repaglinide) και η μιγλινίδα (miglinide)<sup>17</sup>.

## *Αναστολείς του DPP-4*

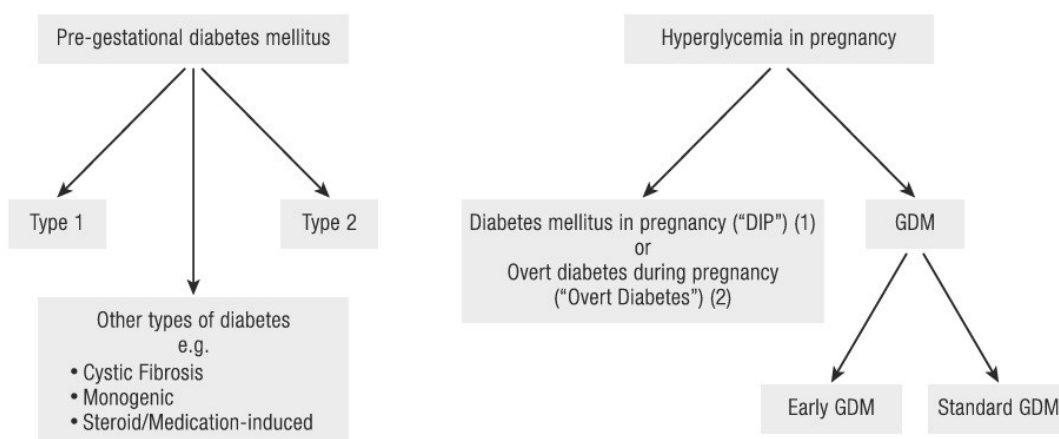
Οι αναστολείς του DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4 inhibitors) ή γλιπτίνες είναι αντιδιαβητικά φάρμακα τα οποία δρουν αναστέλλοντας το ένζυμο DPP-4. Παρουσιάστηκαν ως φάρμακα για την αντιμετώπιση του Τ2ΣΔ το 2006. Η θεραπευτική τους ικανότητα έγκειται στο ότι διεγείρουν την απελευθέρωση της ινσουλίνης και αναστέλλουν την απελευθέρωση του γλυκογόνου μέσω αύξησης της συγκέντρωσης του ενδογενούς GLP-1. Το σημαντικότερο πλεονέκτημά τους είναι ότι δεν προκαλούν υπογλυκαιμικά επεισόδια. Τα τελευταία χρόνια οι αναστολείς του DPP-4 αντικατέστησαν σημαντικά τις σουλφονουλουρίες και έγιναν δεύτερης εκλογής φάρμακα στην αντιμετώπιση του Τ2ΣΔ μετά την μετφορμίνη. Πολλές φορές χρησιμοποιούνται και συνδυαστικά με την μετφορμίνη σε διάφορα θεραπευτικά σχήματα, ωστόσο απαγορεύεται να χορηγηθούν παράλληλα με τους αγωνιστές του GLP-1. Οι αναστολείς του DPP-4 καταφέρνουν να αναστέλλουν το DPP-4 σε ποσοστά μεγαλύτερα του 80-90%. Γνωστοί εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι η σιταγλιπτίνη (sitagliptin), η λιναγλιπτίνη (linagliptin), η βιδαγλιπτίνη (vidagliptin), η σαξαγλιπτίνη (saxagliptin), η γεμιγλιπτίνη (gemigliptin) και η αλογλιπτίνη (alogliptin) οι οποίες έχουν εγκριθεί από τον FDA για την εκ του στόματος χορήγηση<sup>18</sup>.

### **1.1.4. Σακχαρώδης διαβήτης της κύησης**

Ο σακχαρώδης διαβήτης της κύησης (ΣΔΚ) καταγράφηκε για πρώτη φορά ως κλινικό σενάριο το 1824 στην Γερμανία, στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής του H.G. Bennewitz<sup>19</sup>. Τα χρόνια που ακολούθησαν υπήρξαν πολλές αναφορές στις ΗΠΑ και στην Αγγλία σχετικά με υψηλά ποσοστά περιγεννητικής θνησιμότητας σε γυναίκες με διαβήτη και το 1909 έγινε η πρώτη προσπάθεια καθορισμού διαγνωστικών κριτηρίων για τον διαβήτη κύησης από τον Williams ο οποίος μελέτησε την «παροδική γλυκοζουρία» στην εγκυμοσύνη. Πιο ορθά διαγνωστικά κριτήρια καθορίστηκαν στις ΗΠΑ το 1964 από τους O'Sullivan και Mahan οι οποίοι συνέστησαν πραγματοποίηση του τεστ ανοχής στην γλυκόζη (OGTT) κατά το δεύτερο και το τρίτο τρίμηνο<sup>20</sup>. Ο Παγκόσμιος οργανισμός Υγείας (WHO) από το 1965 εξέδωσε κατευθυντήριες οδηγίες και κριτήρια για την

διάγνωση του ΣΔΚ τα οποία όμως έκτοτε αμφισβητήθηκαν και τροποποιήθηκαν πολλές φορές. Το 2013 ο WHO μαζί με τον IADPSG (International Association of the Diabetes and Pregnancy Study Groups) εξέδωσαν νέα διαγνωστικά κριτήρια τα οποία περιλαμβάνουν το τεστ OGTT και χρησιμοποιούνται μέχρι και σήμερα από πολλούς κλινικούς ιατρούς .

Πέρα από τη δυσκολία καθορισμού ευρέως αποδεκτών διαγνωστικών κριτηρίων, η ορολογία του ΣΔΚ ήταν επίσης αμφισβητήσιμη και έως σήμερα δεν έχει αποσαφηνιστεί. Μέχρι πρόσφατα ο όρος ΣΔΚ χρησιμοποιούνταν για να περιγράψει όλο το φάσμα των διαταραχών ρύθμισης της γλυκόζης που παρατηρείται κατά την εγκυμοσύνη. Πλέον, η υπεργλυκαιμία στην εγκυμοσύνη ταξινομείται από το IADPSG και τον WHO σε δύο ξεχωριστές κατηγορίες. Διακρίνεται στον «φανερό» διαβήτη κατά την εγκυμοσύνη ή ΣΔ κατά την εγκυμοσύνη (DIP) και στον διαβήτη κύησης (GDM). Ο ΣΔ κατά την εγκυμοσύνη δεν πρέπει να συγχέεται με ΣΔ που προϋπήρχε της εγκυμοσύνης (**Εικόνα 1. 2**). Αξίζει να τονιστεί ωστόσο ότι ο ADA δεν έχει δεχτεί ακόμη αυτή την ονοματολογία και ορίζει τον ΣΔΚ με βάση το χρόνο της διάγνωσης. Έτσι, οι γυναίκες που διαγιγνώσκονται με διαβήτη στο πρώτο τρίμηνο της κύησης θεωρείται ότι πάσχουν από Τ2ΣΔ ο οποίος προϋπήρχε της εγκυμοσύνης, ενώ εάν διαγνωστούν μεταγενέστερα και δεν πληρούνται τα διαγνωστικά κριτήρια του Τ2ΣΔ, θεωρείται ότι πάσχουν από τον ΣΔΚ<sup>21</sup>. Τυπικά, ως διαβήτης κύησης ορίζεται μία διαταραχή στην ανοχή στη γλυκόζη η οποία συμβαίνει ή παρατηρείται για πρώτη φορά κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης.



**Εικόνα 1. 2.** Τύποι υπεργλυκαιμίας κατά την εγκυμοσύνη<sup>21</sup>.

Η μεγάλη ποικιλία στα διαγνωστικά κριτήρια και τις στρατηγικές προσυμπτωματικού ελέγχου (screening strategies) καθιστά δύσκολη την εκτίμηση του επιπολασμού του ΣΔΚ παγκοσμίως. Ωστόσο, χρησιμοποιώντας τα

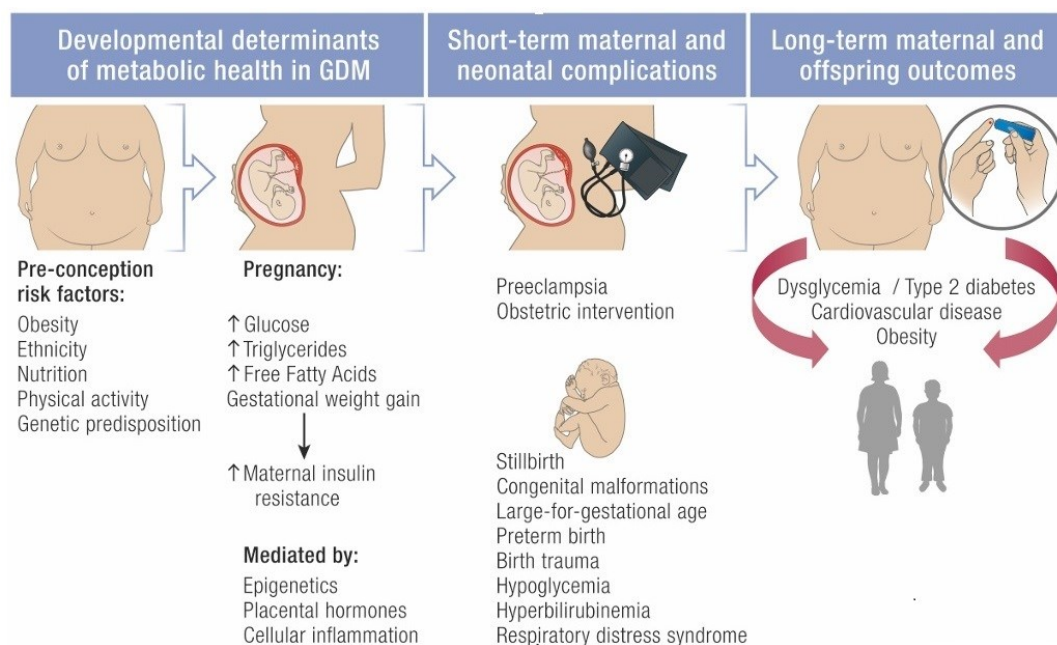
διαγνωστικά κριτήρια του IADPSG και τη διεθνή στρατηγική OGTT, ο IDF κατάφερε να εκτιμήσει ότι ο επιπολασμός της νόσου ήταν 14.2 % παγκοσμίως το 2019, με τα περισσότερα περιστατικά να απαντώνται στις χώρες της Μέσης Ανατολής, της Βόρειας Αφρικής και της Νοτιοανατολικής Ασίας, και τα χαμηλότερα στις Ευρωπαϊκές χώρες <sup>22</sup>. Ανεξάρτητα από τα συγκεκριμένα διαγνωστικά κριτήρια ή τον πληθυσμό, τα περιστατικά ΣΔΚ παγκοσμίως φαίνεται ότι αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου και μάλιστα σε ανησυχητικά επίπεδα. Η αύξηση αυτή σχετίζεται με την αύξηση των ποσοστών Τ2ΣΔ και της παχυσαρκίας σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, καθώς επίσης και με την αύξηση της μέσης ηλικίας τεκνοποίησης των γυναικών <sup>21</sup>.

Εκτός από το υπερβολικό βάρος και την προχωρημένη ηλικία της εγκύου, παράγοντες κινδύνου στην εμφάνιση του ΣΔΚ αποτελούν επίσης η εθνικότητα, το προηγούμενο ιστορικό ΣΔΚ, το οικογενειακό ιστορικό Τ2ΣΔ και ο τρόπος ζωής. Περιβαλλοντικοί και ψυχοκοινωνικοί παράγοντες φαίνεται πως παίζουν επίσης κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη υπεργλυκαιμίας κατά την κύηση. Για παράδειγμα, η έκθεση σε οργανικούς ρύπους και ενδοκρινικούς διαταράκτες όπως είναι ο πολυβρωμιωμένος διφαινυλαιθέρας, έχουν συσχετιστεί με εμφάνιση ΣΔΚ. Το ίδιο και η εμφάνιση κατάθλιψης κατά το πρώτο και το δεύτερο τρίμηνο της κύησης. Υπάρχουν επίσης αναφορές που συσχετίζουν την εμφάνιση του ΣΔΚ με συγκεκριμένους γενετικούς παράγοντες, ωστόσο μέχρι στιγμής τα ευρήματα αυτά είναι περιορισμένα και μη τεκμηριωμένα <sup>23</sup>.

Ο ΣΔΚ χαρακτηρίζεται από την αδυναμία των παγκρεατικών β-κυττάρων να ανταποκριθούν επαρκώς στις αυξημένες απαιτήσεις σε ινσουλίνη που παρατηρούνται κατά την εγκυμοσύνη, με αποτέλεσμα να προκύπτουν διάφοροι βαθμοί υπεργλυκαιμίας. Τα παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά της αντίστασης στην ινσουλίνη και στην ελαττωματική έκκριση ινσουλίνης μοιάζουν αρκετά με αυτά του Τ2ΣΔ <sup>24</sup>. Ο ΣΔΚ είναι κυρίως ασυμπτωματικός και διαγιγνώσκεται συνήθως χάρη στην καθιερωμένη πλέον εξέταση ελέγχου των επιπέδων γλυκόζης κατά την κύηση.

Ο ΣΔΚ αποτελεί μία από τις πιο κοινές ιατρικές επιπλοκές που μπορεί να εμφανιστούν κατά την εγκυμοσύνη. Η αρρύθμιστη γλυκόζη κατά την κύηση μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές που απειλούν τη ζωή της εγκύου και του εμβρύου. Οι γυναίκες με ΣΔΚ έχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης προεκλαμψίας, υπέρτασης στην κύηση, πολυϋδραμνίου, τοκετού με καισαρική τομή ή πρόωρου τοκετού, μολύνσεων της ουροδόχου κύστης, θρομβοεμβολισμού και αιμορραγίας. Επιπλέον, ακόμα και μετά τον τοκετό έχουν μεγάλη πιθανότητα να εμφανίσουν ΣΔΚ σε επόμενη εγκυμοσύνη ή να αναπτύξουν Τ2ΣΔ. Κίνδυνο διατρέχει και το έμβρυο καθώς κατά τη γέννησή του υπάρχει πιθανότητα εμφάνισης πολλαπλών επιπλοκών όπως ο τραυματισμός κατά τον τοκετό, η μακροσωμία, η δυστοκία του ώμου, η νεογνική υπογλυκαιμία, η υπερχολερυθριναιμία, η πολυκυτταραιμία και η αναπνευστική δυσχέρεια <sup>24,25</sup>. Επιπλέον, μελέτες δείχνουν ότι τα νεογνά που

γεννιούνται από γυναίκες με ΣΔΚ έχουν υψηλό κίνδυνο να εμφανίσουν παχυσαρκία, διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας (Impaired Fasting Glucose, IFG), ΣΔ και καρδιαγγειακά νοσήματα κατά την παιδική ηλικία ή την ενήλικη ζωή τους <sup>26</sup> (Εικόνα 1. 3).



**Εικόνα 1. 3.** Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης ΣΔ κατά την κύηση και βραχυπρόθεσμες/ μακροπρόθεσμες επιπλοκές <sup>21</sup>.

Η σωστή ρύθμιση της γλυκόζης κατά την εγκυμοσύνη σε γυναίκες με ΣΔΚ μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης των παραπάνω επιπλοκών. Πρώτη γραμμή στην αντιμετώπιση του ΣΔΚ αποτελεί η επιβολή αυστηρής διαίτας και σωματικής άσκησης σε συνδυασμό με τη συνεχή παρακολούθηση της γλυκόζης. Μάλιστα οι αλλαγές αυτές στον τρόπο ζωής συνιστάται να ακολουθούνται και προληπτικά πριν την εγκυμοσύνη, σε γυναίκες με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης ΣΔΚ. Εάν με τις παραπάνω στρατηγικές η γλυκόζη εξακολουθεί να είναι αρρυθμιστη, συνιστάται χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής. Η μετφορμίνη προτείνεται ως θεραπεία πρώτης γραμμής για τον ΣΔΚ με εναλλακτική επιλογή την ινσουλίνη όταν η μετφορμίνη αντενδείκνυται ή δεν είναι αποτελεσματική <sup>26</sup>. Πέρα από αυτές τις επιλογές τελευταία δοκιμάζεται και η μυο- ινοσιτόλη ως καινοτόμος θεραπευτικός παράγοντας για τον ΣΔΚ <sup>27</sup> αλλά περαιτέρω κλινικές δοκιμές απαιτούνται για την εξακρίβωση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειάς της <sup>26</sup>.

## 1.1.5. Σπάνιες μορφές σακχαρώδους διαβήτη

### 1.1.5.1. Μονογονικός διαβήτης

Ο μονογονικός διαβήτης (Monogenic diabetes, MONO) προκαλείται από μετάλλαξη ενός γονιδίου το οποίο έχει ως αποτέλεσμα σοβαρές ανωμαλίες στην ανάπτυξη και τη λειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος και διαταραχές στην έκκριση της ινσουλίνης. Σε αντίθεση με τις άλλες μορφές διαβήτη η εμφάνιση του MONO είναι καθαρά γενετική και δεν εξαρτάται από άλλους παράγοντες κινδύνου και γι' αυτό εμφανίζεται συνήθως σε νεαρή ηλικία. Η διάγνωση του μονογονικού διαβήτη είναι αρκετά δύσκολη καθώς συχνά η κλινική του εικόνα ομοιάζει τον Τ1ΣΔ (π.χ. εκδήλωση σε νεαρή ηλικία και απώλεια βάρους) και τον Τ2ΣΔ (διατηρημένη λειτουργία των β-κυττάρων και οικογενειακό ιστορικό)<sup>28</sup>. Διακρίνεται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τον διαβήτη των νέων με όψιμη έναρξη (Maturity-onset diabetes of the young, MODY), τον νεογενικό ΣΔ (neonatal diabetes mellitus, NDM) και τον διαβήτη που εμφανίζεται στα πλαίσια συνδρόμων (syndromic diabetes).

#### *Διαβήτης των νέων με όψιμη έναρξη (MODY)*

Ο διαβήτης των νέων με όψιμη έναρξη αποτελεί τη συχνότερη περίπτωση μονογονικού διαβήτη και αποτελεί το 1-2% των ολικών περιπτώσεων ΣΔ στην Ευρώπη. Ωστόσο θεωρείται ότι η πλειονότητα των ασθενών με MODY είναι αδιάγνωστοι<sup>29</sup>. Περίπου 14 γονίδια έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση MODY και θεωρείται ότι ο MODY έχει 14 υποτύπους με πιο κοινούς τους MODY 1, 2, 3 και MODY 5 και πιο σπάνιους τους MODY 4 και MODY 6-14. Το 80% των περιπτώσεων MODY προκαλείται από μεταλλάξεις στα γονίδια HNF1A (MODY3), HNF4A (MODY3), GCK (MODY2) και HNF1B (MODY5). Η νόσος έχει μεγάλη ετερογένεια ως προς την κλινική της εικόνα που εξαρτάται από τη γενετική μετάλλαξη που την προκαλεί. Για παράδειγμα, ο υπότυπος MODY 2 εμφανίζει μακροχρόνια μη προοδευτική υπεργλυκαιμία νηστείας. Οι MODY 3 και MODY 1 έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά και εμφανίζονται κυρίως κατά την εφηβεία ή την πρώιμη ενήλικη ζωή. Τα άτομα με τους δύο αυτούς υποτύπους διατρέχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης μικρο- και μακρο-αγγειακών διαταραχών όμοιους με αυτούς που προκαλούνται από τον Τ1ΣΔ και τον Τ2ΣΔ. Ο MODY 5 προκαλεί εξω-παγκρεατικές ανωμαλίες που επηρεάζουν το νεφρικό σύστημα και καταλήγουν στην εκδήλωση του κλινικού συνδρόμου RCAD (Renal Cysts and Diabetes)<sup>30</sup>.

Η θεραπευτική προσέγγιση που ακολουθείται για την αντιμετώπιση του MODY ποικίλει ανάλογα με τον υπότυπο. Στις περισσότερες περιπτώσεις, συμπεριλαμβανομένων και των σπάνιων υποτύπων, χορηγείται ινσουλίνη. Σε ασθενείς με τη σπάνια μορφή MODY 12 μπορεί να προτιμηθεί αγωγή με

σουλφονυλουρίες ή αναστολείς του SGLT2. Αναστολείς του DPP-4 σε συνδυαστικά σχήματα με άλλα φάρμακα μπορεί να χορηγηθούν στους MODY 3 και MODY 4 <sup>30</sup>.

### **Νεογνικός ΣΔ**

Ως νεογνικός ΣΔ (ΝΣΔ) ορίζεται ο διαβήτης που διαγιγνώσκεται τους πρώτους έξι μήνες της ζωής και μπορεί να είναι είτε μόνιμος (Permanent Neonatal Diabetes Mellitus, PNDM) είτε μεταβατικός (Transient Neonatal Diabetes Mellitus, TNDM). Η κλινική εκδήλωση της νόσου περιλαμβάνει καθυστερημένη ενδομήτρια ανάπτυξη, πολουρία, σοβαρή αφυδάτωση και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές κατά τη γέννηση ή νευρολογική δυσλειτουργία. Εκτιμάται ότι επηρεάζει μία στις 90.000 γέννες, με το 50% των περιπτώσεων να είναι μεταβατικές και το 50% μόνιμες.

Ο μεταβατικός ΝΣΔ, προκαλείται από ανεπαρκή παραγωγή ινσουλίνης που εμφανίζεται την πρώτη εβδομάδα μετά τη γέννηση και συνήθως επιλύεται μέσα στους πρώτους δεκαοχτώ μήνες ζωής. Ωστόσο, στο 50% των περιπτώσεων εμφανίζεται ξανά κατά την πρώιμη ενήλικη ζωή. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων μεταβατικού ΝΣΔ προκύπτουν από ανωμαλίες σε γονίδια του χρωμοσώματος 6q24 οι οποίες έχουν πατρική προέλευση ή από μεταλλάξεις στα γονίδια KCNJ11 και ABCC8 που συμμετέχουν στην δημιουργία των καναλιών  $K_{ATP}$ . Οι μεταλλάξεις των  $K_{ATP}$  εμπλέκονται και στην παθογένεση του μόνιμου ΝΣΔ. Ο μόνιμος ΝΣΔ μπορεί να αποτελεί μέρος της κλινικής εκδήλωσης συνδρόμων όπως το IPEX και το Wolcott- Rallison <sup>28</sup>.

Η πλειονότητα των βρεφών με ΝΣΔ γεννιέται με βάρος μικρότερο του φυσιολογικού. Μπορεί επίσης να υπάρχουν μορφολογικές ανωμαλίες στο πάγκρεας. Στην περίπτωση αυτή συνήθως συνυπάρχει καταστροφή των β-παγκρεατικών κυττάρων και άλλες ανωμαλίες που εξαρτώνται από τη γενετική μετάλλαξη. Εάν το πάγκρεας έχει φυσιολογική μορφολογία, υπάρχει πιθανότητα τα βρέφη να αναπτύξουν νευρολογικές και αναπτυξιακές διαταραχές <sup>31</sup>. Συνιστάται η διενέργεια γενετικού ελέγχου στα βρέφη που διαγιγνώσκονται με ΣΔ στους έξι πρώτους μήνες ζωής προκειμένου να διευκρινιστεί ο υπότυπος ΝΣΔ καθώς η θεραπευτική αντιμετώπιση διαφέρει ανάλογα με την αιτιολογία της νόσου <sup>28</sup>. Στον μεταβατικό ΝΣΔ η θεραπεία συνήθως διακόπτεται κάποια στιγμή μεταξύ των πρώτων εβδομάδων της ζωής και των πέντε ετών. Αντίθετα στον μόνιμο ΝΣΔ η φαρμακευτική αγωγή είναι απαραίτητη εφ' όρου ζωής. Οι περισσότερες περιπτώσεις ΝΣΔ αντιμετωπίζονται με τη χορήγηση σουλφονυλουριών <sup>31</sup>. Σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να απαιτείται χορήγηση ινσουλίνης σε συνδυασμό με σωστή άσκηση και διατροφή.



### *Μονογονικός διαβήτης που εμφανίζεται στα πλαίσια συνδρόμων*

Στην περίπτωση αυτή ο διαβήτης αποτελεί μέρος ενός ολόκληρου κλινικού συνδρόμου και όχι μοναδική εκδήλωση της γενετικής ανωμαλίας. Στην κατηγορία αυτή κατατάσσονται σύνδρομα που έχουν μητρική κληρονομικότητα καθώς οφείλονται σε μεταλλάξεις στα μιτοχόνδρια, όπως το σύνδρομο MELAS (mitochondrial encephalopathy with stroke-like episodes) και το σύνδρομο MIDD (maternally inherited diabetes and deafness). Επίσης το σύνδρομο Wolfram που σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο WFS1 έχει ως εκδήλωση τον ΣΔ. Επιπλέον, μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα της ινσουλίνης, INSR μπορεί να οδηγήσουν σε σύνδρομο αντοχής στην ινσουλίνη. Πιο συγκεκριμένα, ετερόζυγες μεταλλάξεις οδηγούν σε Τύπου Α αντοχή στην ινσουλίνη, ενώ η ομόζυγη μορφή οδηγεί στα σύνδρομα Donohue και Rabson- Mendenhall. Μεταλλάξεις στο γονίδιο LMNA έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση οικογενούς μερικής λιποδυστροφίας Dunningan (familial partial lipodystrophy of the Dunningan type, FPLD2) ή με μορφές συγγενούς γενικευμένης λιποδυστροφίας (σύνδρομο Seip-Berardinelli)<sup>32</sup>.

#### **1.1.5.2. Ασταθής διαβήτης**

Ο όρος ασταθής διαβήτης (brittle diabetes) χρησιμοποιούνταν μέχρι πρόσφατα για να περιγράψει ασθενείς η ποιότητα ζωής των οποίων διαταρασσόταν συνεχώς από επεισόδια υπο- και υπερ- γλυκαιμίας (Schade, 1985). Ο ορισμός αυτός θεωρείται πλέον ξεπερασμένος και ο ασταθής διαβήτης αναφέρεται σε καταστάσεις σοβαρής διαταραχής της γλυκαιμίας, οι οποίες έχουν ξεχωριστά χαρακτηριστικά, διαφορετική αιτιολογία και κακή έκβαση. Επιπλέον, θεωρήθηκε χρήσιμο για την κλινική πρακτική οι ασθενείς με ασταθή διαβήτη να διακρίνονται σε τέσσερις ομάδες<sup>33</sup>.

Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει συνήθως νεαρές γυναίκες οι οποίες παρουσιάζουν έντονες διακυμάνσεις της γλυκόζης του αίματος λόγω σοβαρών ψυχιατρικών διαταραχών, ψυχο-κοινωνικών στρεσογόνων παραγόντων στο περιβάλλον τους ή/και κάποιας μορφής αδιάγνωστης διατροφικής διαταραχής. Τα άτομα αυτά είναι επιρρεπή στην ανάπτυξη σοβαρής υπογλυκαιμίας και καταστάσεων διαβητικής κετοξέωσης (Diabetic Ketoacidosis, DKA). Η θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών αυτών είναι περίπλοκη και διαφέρει σε κάθε άτομο. Σε κάθε περίπτωση όμως απαιτείται παράλληλα με την χορήγηση θεραπείας, συστηματική ψυχιατρική παρακολούθηση.

Η δεύτερη κατηγορία ασταθούς διαβήτη περιλαμβάνει άτομα τα οποία πάσχουν από άλλη ιατρική νόσο ή διατροφική διαταραχή η οποία οδηγεί σε σημαντική ανωμαλία στην ευαισθησία ή στην αξιοποίηση της ινσουλίνης από τον οργανισμό.

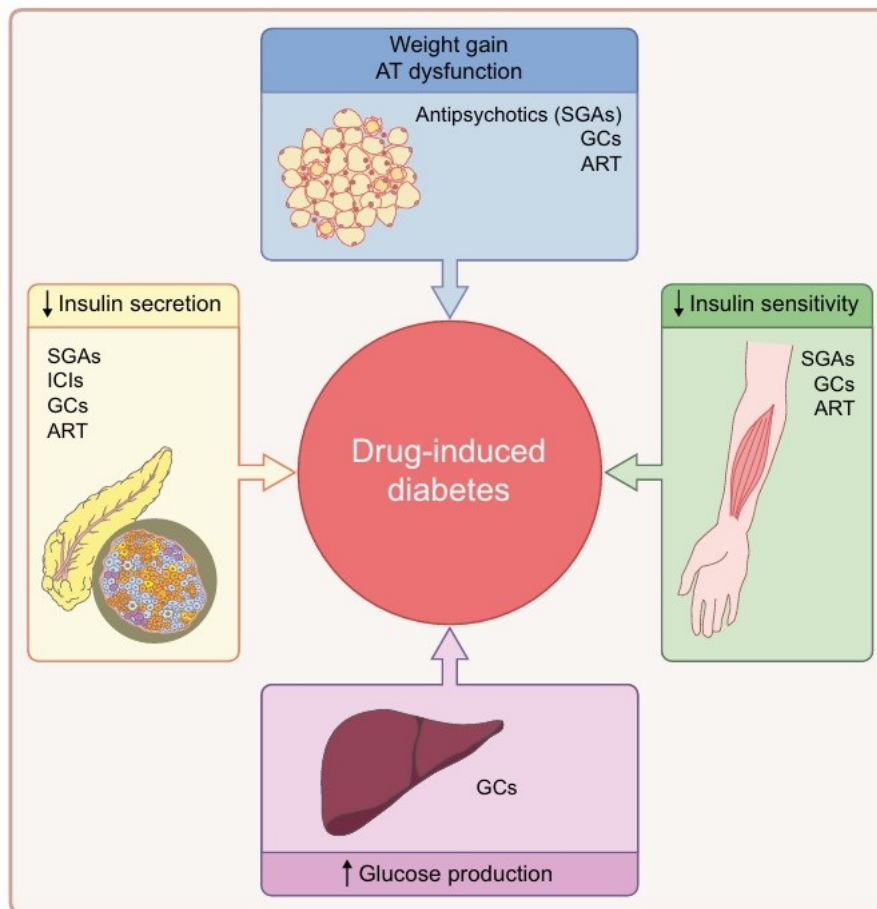
Ο εντοπισμός και η αντιμετώπιση της προϋπάρχουσας συννοσηρότητας, συνήθως θεραπεύει πλήρως και την αρρυθμιστη γλυκαιμία. Αν και είναι σπάνιο φαινόμενο, παθήσεις όπως οι ενδοκρινοπάθειες (θυρεοτοξίκωση, ακρομεγαλία, σύνδρομο Cushing's, γλυκαγόνωμα και φαιοχρωμοκύττωμα), συστηματικές λοιμώξεις και το σύνδρομο Stiff- Person (SPS) μπορεί να οδηγήσουν σε υπεργλυκαιμία με κετοξέωση. Άλλα νοσήματα που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση ασταθούς διαβήτη είναι η διαβητική γαστροπάρεση, σύνδρομο λιποδυστροφίας, αθεράπευτη ασθένεια Addison's σε συνδυασμό με T1ΣΔ, κοιλιοκάκη, νοσήματα που προκαλούν αλλαγές στην εκκαθάριση της ινσουλίνης (νεφρική ανεπάρκεια, υποθυρεοειδισμός), σύνδρομο Munchausen's, διατροφικές διαταραχές, λιποϋπερτροφία και εθισμός σε φάρμακα ή αλκοόλ.

Ηλικιωμένα άτομα που ζουν χρόνια με T1ΣΔ (γηριατρικός T1ΣΔ) αποτελούν την τρίτη ομάδα ασταθούς διαβήτη. Τα άτομα αυτά εμφανίζουν σοβαρές διακυμάνσεις στη γλυκόζη τους καθώς δεν μπορούν να διαχειριστούν σωστά τον διαβήτη τους, είτε λόγω διαταραχών στην γνωστική λειτουργία ή εξαιτίας της σωματικής ανικανότητας λόγω της γήρανσης <sup>34</sup>.

Στην τέταρτη και τελευταία κατηγορία κατατάσσονται άτομα που διαβιούν συνήθως σε υποανάπτυκτες χώρες όπου επικρατεί επισιτιστική ανασφάλεια και η πρόσβαση στην ινσουλίνη είναι περιορισμένη. Ωστόσο, θάνατοι από μη σωστό καταμερισμό της ινσουλίνης παρατηρούνται συχνά και σε ανεπτυγμένες χώρες καθώς η αδυναμία πρόσβασης σε φάρμακα λόγω του υψηλού τους κόστους αφορά όλο και περισσότερα άτομα και εξελίσσεται σε παγκόσμιο κοινωνικό πρόβλημα <sup>35</sup>.

### **1.1.5.3. Διαβήτης προκαλούμενος από φάρμακα/ χημικά**

Συχνό φαινόμενο στην κλινική πρακτική τα τελευταία χρόνια αποτελεί η εμφάνιση ΣΔ ως αποτέλεσμα της χορήγησης κοινών φαρμάκων. Εγκεκριμένα φαρμακευτικά σκευάσματα μεταβάλλουν την ομοιοστασία της γλυκόζης μέσω διαφορετικών μηχανισμών, οι οποίοι περιλαμβάνουν τη μείωση της ευαισθησίας των ιστών στην ινσουλίνη, την αύξηση του σωματικού βάρους και την πρόκληση λειτουργικών ανωμαλιών στην έκκριση της ινσουλίνης. Επιπλέον, ορισμένες ουσίες μπορεί να αυξήσουν την παραγωγή της γλυκόζης στο ήπαρ, να προκαλέσουν οξεία παγκρεατίτιδα ή να έχουν άμεσες κυτταροτοξικές επιδράσεις στα β- κύτταρα του παγκρέατος (**Εικόνα 1. 4**). Οι τέσσερις σημαντικότερες κατηγορίες φαρμάκων που μπορεί να οδηγήσουν σε ΣΔ είναι τα γλυκοκορτικοειδή, τα αντιψυχωτικά, η αντιρετροϊκή θεραπεία (antiretroviral therapy, ART) και οι αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (immune checkpoint inhibitors, ICIs).



**Εικόνα 1. 4.** Μηχανισμοί μέσω των οποίων κοινές κατηγορίες φαρμάκων μπορεί να επάγουν την ανάπτυξη ΣΔ <sup>36</sup>.

Ο ΣΔ που προκαλείται από γλυκοκορτικοειδή είναι η πιο κοινή περίπτωση ΣΔ που προκαλείται από φάρμακα και εμφανίζεται συνήθως στα αρχικά στάδια χορήγησης της αγωγής. Καταγράφηκε ως φαινόμενο πριν από περίπου 60 χρόνια τόσο σε άτομα με προηγούμενο ιστορικό ΣΔ αλλά και σε άτομα χωρίς ιστορικό. Η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών επιδρά αρνητικά στο ήπαρ, τους σκελετικούς μυς, τον λιπώδη ιστό και τα β- κύτταρα του παγκρέατος και επηρεάζει τόσο την αντοχή στην ινσουλίνη όσο και την παραγωγή και απελευθέρωσή της από τα β- κύτταρα. Επιπλέον τα γλυκοκορτικοειδή διεγείρουν την γλυκονεογένεση στο ήπαρ.

Μεταξύ των ανεπιθύμητων ενεργειών πολλών αντιψυχωσικών φαρμάκων και κυρίως των αντιψυχωτικών δεύτερης γενιάς, είναι η αύξηση του βάρους των ασθενών. Η αλλαγή αυτή σχετίζεται με την εμφάνιση παχυσαρκίας και ΣΔ, ωστόσο η εμφάνιση του διαβήτη από τη λήψη αντιψυχωσικών δεν σχετίζεται πάντα με την αύξηση του βάρους. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα αντιψυχωτικά οδηγούν στην εμφάνιση του ΣΔ δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως

αλλά φαίνεται να περιλαμβάνουν αλλαγές στην κυτταρική σηματοδότηση της ινσουλίνης, την ενδογενή παραγωγή της γλυκόζης, την επαναπρόσληψη της γλυκόζης και την απελευθέρωση της ινσουλίνης. Το μοτίβο υπεργλυκαιμίας που εμφανίζεται μετά τη λήψη αντιψυχωσικών μοιάζει πολύ με αυτό του Τ2ΣΔ ωστόσο έχει πολύ πιο ραγδαία εξέλιξη.

Η αντιρετροϊκή θεραπεία που χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων από HIV περιλαμβάνει τέσσερις διαφορετικές τάξεις φαρμάκων και δυστυχώς όλες έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση ΣΔ. Ο διαβήτης που προκαλείται από τη λήψη των φαρμάκων αυτών είναι συνήθως ασυμπτωματικός και οφείλεται κατά κύριο λόγο στη λιποατροφία και σε διακυμάνσεις στην κατανομή του λίπους οι οποίες οδηγούν σε αντοχή στην ινσουλίνη.

Μονοκλωνικά αντισώματα όπως η ιπιλιμουμάμπη (ipilimumab), η πεβρολιζουμάβη (pembrolizumab) και η νιβολουμάμπη (nivolumab) ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα με σκοπό να αποκαταστήσουν την επαγόμενη από τον καρκίνο ανοσοκαταστολή. Παρότι δρουν πολύ αποτελεσματικά έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου, διαταράσσουν την φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και προκαλούν διάφορες διαταραχές όπως οι ενδοκρινοπάθειες. Σε αυτές ανήκει και η εμφάνιση ΣΔ η οποία μερικώς ομοιάζει με τον αυτοάνοσο Τ1ΣΔ.

Η διαχείριση του ΣΔ που προκαλείται από φάρμακα ποικίλει ανάλογα με την κατηγορία φαρμάκου που τον προκαλεί, την ηλικία του ασθενούς, την ψυχολογική του κατάσταση και τη συννοσηρότητα <sup>36</sup>.

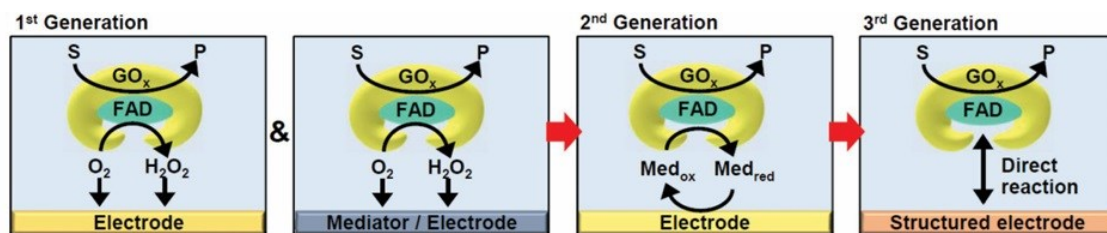
## **1.2. Συστήματα ανίχνευσης γλυκόζης**

### **1.2.1. Ιστορική αναδρομή και εξέλιξη των συστημάτων ανίχνευσης γλυκόζης**

Η παρακολούθηση των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος είναι ζωτικής σημασίας για τη διαχείριση του ΣΔ, καθώς πέρα από τη διάγνωση, καθορίζει και την εξέλιξη της νόσου. Επιπλέον, αποτελεί δείκτη της αποτελεσματικότητας της θεραπευτικής αγωγής. Ήδη από τα τέλη της δεκαετίας του 1980 και τις αρχές της δεκαετίας του 1990 δημοσιεύτηκαν μελέτες που υποστήριζαν ότι ο μόνος τρόπος για την ορθή χορήγηση της ινσουλίνης σε ασθενείς όλων των μορφών διαβήτη είναι η συνεχής παρακολούθηση της γλυκόζης του αίματος με φορητούς αισθητήρες γλυκόζης <sup>37</sup>.

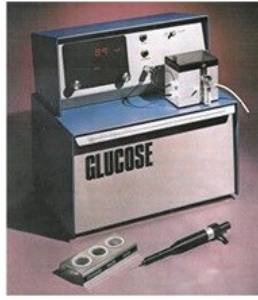
Η ιστορία της ανίχνευσης της γλυκόζης αρχίζει το 1962 όταν οι Clark και Lyons παρουσίασαν το πρώτο ενζυμικό σύστημα ηλεκτροδίων για τη μέτρηση βιοδεικτών στο αίμα, κατά τη διάρκεια καρδιαγγειακών χειρουργείων. Επρόκειτο για μία συσκευή η οποία αποτελούνταν από δύο αδιαπέραστες μεμβράνες μεταξύ των οποίων ήταν εγκλωβισμένη μία ενζυμική επιφάνεια. Το σύστημα ολοκλήρωνε ένα ηλεκτρόδιο οξυγόνου<sup>38</sup>. Λίγα χρόνια αργότερα, το 1967 οι Urdhike και Hicks κατάφεραν να ακινητοποιήσουν το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης (Glucose Oxidase, GOx) πάνω σε ένα ηλεκτρόδιο οξυγόνου<sup>39</sup>. Αυτές οι επιστημονικές καινοτομίες οδήγησαν τελικά το 1975 στην κυκλοφορία της πρώτης συσκευής καταγραφής γλυκόζης, του μοντέλου 23A YSI που αποτέλεσε τον πρώτο αισθητήρα ανίχνευσης γλυκόζης πρώτης γενιάς. Ο 23A YSI ήταν ένας αναλυτής ολικού αίματος ο οποίος μπορούσε να μετράει τα επίπεδα της γλυκόζης με ένα ηλεκτρόδιο πλατίνας μέσω της ανίχνευσης του παραγόμενου υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>40</sup>. Η ανάπτυξη των αισθητήρων ανίχνευσης γλυκόζης πρώτης γενιάς αποτέλεσε ορόσημο στον τομέα της Υγείας, ωστόσο οι αισθητήρες αυτοί εμφάνιζαν αρκετά μειονεκτήματα. Για παράδειγμα, η οξείδωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> απαιτούσε δυναμικά υψηλής τάσης που προκαλούσε παρεμβολές στην μέτρηση. Επιπλέον, οι αισθητήρες πρώτης γενιάς είχαν τεράστιο μέγεθος και εξαιτίας του ηλεκτροδίου πλατίνας, πολύ υψηλό κόστος παραγωγής.

Προκειμένου να ξεπεραστούν αυτές οι αδυναμίες, οι επιστήμονες αντικατέστησαν τα ηλεκτρόδια οξυγόνου με τροποποιημένους οργανικούς ή ανόργανους δέκτες ηλεκτρονίων οι οποίοι δρούσαν ως μεσολαβητές της οξειδοαναγωγής διευκολύνοντας έτσι τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του οξειδοαναγωγικού κέντρου του ενζύμου και του ηλεκτροδίου. Αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη του πρώτου αμπερομετρικού βιοαισθητήρα ο οποίος αποτέλεσε αισθητήρα ανίχνευσης γλυκόζης δεύτερης γενιάς<sup>41</sup>. Η τεχνολογία αυτού του αισθητήρα, οδήγησε το 1987 στην παραγωγή και κυκλοφορία των πρώτων ηλεκτροχημικών ταινιών ανίχνευσης γλυκόζης. Οι ταινίες αυτές επέτρεψαν στους διαβητικούς ασθενείς να ανιχνεύουν για πρώτη φορά μόνοι τους τα επίπεδα της γλυκόζης τους, στο σπίτι (in house use)<sup>42</sup>. Οι βιοαισθητήρες δεύτερης γενιάς αν και είχαν τρομερή επιτυχία, εμφάνιζαν κι αυτοί ατέλειες καθώς το σύστημα είχε αρκετά χαμηλή σταθερότητα. Έτσι γύρω στο 1992 άρχισε η μετάβαση από τους αισθητήρες δεύτερης γενιάς στους αισθητήρες τρίτης γενιάς οι οποίοι χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα. Σε αυτό συνέβαλε η δουλειά μίας επιστημονικής ομάδας που κατάφερε να ενσωματώσει την GOx μέσα στους πόρους μίας τροποποιημένης μεμβράνης<sup>43</sup>. Οι αισθητήρες τρίτης γενιάς δεν χρειάζονται μεσολαβητές οξειδοαναγωγής καθώς χάρη στη δομική τροποποίηση των ενζύμων, επιτρέπουν την άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του οξειδοαναγωγικού κέντρου του ενζύμου και του ηλεκτροδίου. Για παράδειγμα, τροποποιώντας ηλεκτρόδια με CNTs και ενσωματώνοντας την GOx σε αυτά, καθίσταται δυνατή η απευθείας μεταφορά των ηλεκτρονίων στο ηλεκτρόδιο<sup>44</sup>. Οι διαφορές στην αρχή λειτουργίας των τριών γενεών βιοαισθητήρων απεικονίζονται στην **Εικόνα 1. 5**<sup>45</sup>.



**Εικόνα 1. 5.** Αρχή λειτουργίας των ενζυμικών βιοαισθητήρων ανίχνευσης γλυκόζης μέσω του ενζύμου GOx. Η ακινητοποιημένη GOx καταλύει την οξείδωση της γλυκόζης (S) από το μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ) παράγοντας γλυκονικό οξύ (P) και υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Το δινουκλεοτίδιο αδενίνης της φλαβίνης (Flavin adenine dinucleotide, FAD) λειτουργεί ως συμπαραγοντας οξειδοαναγωγής στη δράση της GOx ως καταλύτης. Οι βιοαισθητήρες δεύτερης γενιάς χρησιμοποιούν οξειδοαναγωγικούς μεσολαβητές για να αλληλεπιδράσουν απευθείας με το ένζυμο σε χαμηλότερα δυναμικά. Οι τρίτης γενιάς βιοαισθητήρες διαθέτουν νανοϋλικά υψηλής εκλεκτικότητας μέσω των οποίων διευκολύνεται η άμεση ηλεκτρο-οξείδωση της γλυκόζης <sup>44,45</sup>.

Με το πέρασμα των χρόνων οι αισθητήρες τρίτης γενιάς εξελίχθηκαν σημαντικά ώστε να ξεπεραστούν οι αδυναμίες που προέκυπταν κατά τη λειτουργία τους. Τελικά, η ανακάλυψη των CGMs, άλλαξε το σκηνικό στη διαχείριση του ΣΔ (**Εικόνα 1. 6**). Σε αντίθεση με τους συμβατικούς αισθητήρες της τρίτης γενιάς που αναλύουν μία σταγόνα αίματος και καταγράφουν την τιμή της γλυκόζης τη στιγμή της μέτρησης, οι CGMs προσφέρουν ημισυνεχή πληροφόρηση των διακυμάνσεων της γλυκόζης. Αυτό γίνεται έμμεσα μέσω της γλυκόζης του διάμεσου υγρού (ISF) και με τη χρήση ειδικού αλγορίθμου. Επιπλέον, τα συστήματα CGM βελτιώνουν σημαντικά τη διαχείριση του ΣΔ καθώς παρέχουν πληροφορίες για την τάση αύξησης ή μείωσης της γλυκόζης κάθε στιγμή και επιτρέπουν έτσι καλύτερο έλεγχο στη χορήγηση του φαρμάκου. Με τα CGMs αποφεύγονται τα επεισόδια υπο- και υπερ- γλυκαιμίας καθώς κάθε φορά που η γλυκόζη ξεπερνάει τα επιθυμητά όρια, ο ασθενής ειδοποιείται <sup>46</sup>. Σήμερα, ο συνδυασμός ενός CGM με μία αντλία ινσουλίνης αποτελεί την καλύτερη δυνατή προσέγγιση για τη διαχείριση του ΣΔ καθώς προσφέρει ένα ημι- αυτοματοποιημένο σύστημα θεραπείας.



1975



1993



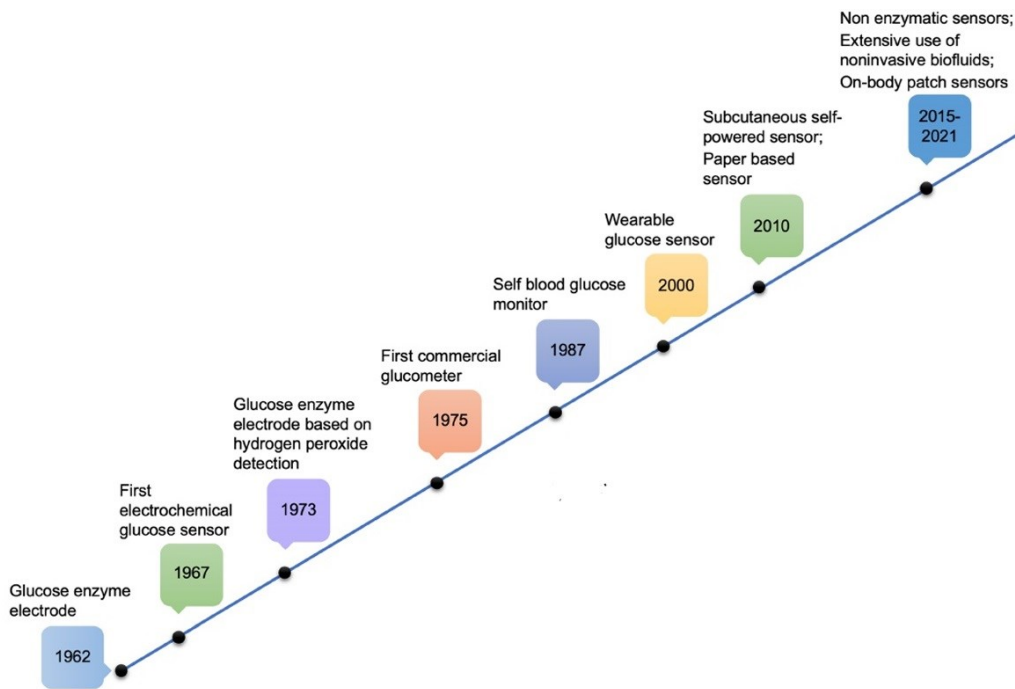
2013



2020

**Εικόνα 1. 6.** Εξέλιξη των συστημάτων ανίχνευσης γλυκόζης <sup>45</sup>.

Συσκευές οι οποίες επιτρέπουν την άμεση ηλεκτρο-οξειδωση της γλυκόζης χωρίς την παρουσία ενζύμου, προτείνονται ως πιθανοί αισθητήρες τέταρτης γενιάς. Οι αισθητήρες αυτοί βρίσκονται ακόμα σε αρχικά στάδια δοκιμών αλλά είναι πολλά υποσχόμενοι καθώς αξιοποιώντας νανοϋλικά (κυρίως νανομέταλλα) ως καταλύτες, επιτρέπουν την ανίχνευση της γλυκόζης μη ενζυμικά <sup>47</sup>. Επίσης προσπάθειες γίνονται για την κατασκευή αισθητήρων που θα επιτρέπουν την ανίχνευση της γλυκόζης μη επεμβατικά, σε υγρά εκτός του αίματος όπως τα δάκρυα, το σάλιο, ο ιδρώτας και τα ούρα (**Εικόνα 1. 7**).



**Εικόνα 1. 7.** Ανακαλύψεις- ορόσημα στην ανίχνευση της γλυκόζης <sup>47</sup>.

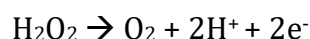
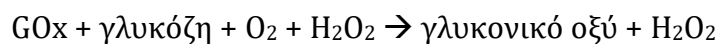
### 1.2.2. Ενζυμική ανίχνευση της γλυκόζης

Οι ηλεκτροχημικοί ενζυμικοί αισθητήρες γλυκόζης διακρίνονται σε ποτενσιομετρικούς, αμπερομετρικούς ή αγωγομετρικούς. Οι ποτενσιομετρικοί αισθητήρες αναγνωρίζουν μεταβολές στο φορτίο της επιφάνειας πάνω σε ένα ηλεκτρόδιο μέτρησης. Οι αμπερομετρικοί αισθητήρες μετράνε αλλαγές φορτίου μεταξύ του ηλεκτροδίου και του βιοσυστήματος. Οι αγωγομετρικοί αισθητήρες ανιχνεύουν μεταβολές στην αγωγιμότητα των ιόντων μεταξύ των ηλεκτροδίων.

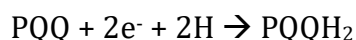
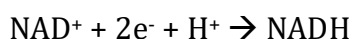
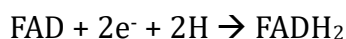
Οι αμπερομετρικοί αισθητήρες ανίχνευσης της γλυκόζης με τη βοήθεια ενζύμου, ήταν οι πρώτοι αισθητήρες που αναπτύχθηκαν για τη μέτρηση της γλυκόζης και με την πάροδο των χρόνων εξελίχθηκαν σημαντικά. Στη σύνθεσή τους χρησιμοποιούν δύο διαφορετικές οικογένειες ενζύμων, την οξειδάση της γλυκόζης (Glucose oxidase, GOx) και την αφυδρογονάση της γλυκόζης (Glucose dehydrogenase, GDH).

Σε πολλά διαφορετικά είδη δειγμάτων, όπως και στο αίμα, η γλυκόζη ισομερίζεται μεταξύ των ανωμερών α- D- γλυκόζη και β- D- γλυκόζη και μπορεί να βρεθεί ακόμα και στη μορφή της αλδεΐδης. Τόσο η GOx όσο και η GDH είναι εξαιρετικά εκλεκτικές ως προς την β- D- γλυκόζη. Η λειτουργία των ενζυμικών αισθητήρων γλυκόζης στηρίζεται στο γεγονός ότι η ακινητοποιημένη GOx καταλύει την οξείδωση της D- γλυκόζης από ένα μοριακό οξυγόνο, παράγοντας γλυκονικό οξύ και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:





Ωστόσο, προκειμένου να δράσει ως καταλύτης, η GOx απαιτεί τον οξειδοαναγωγικό παράγοντα FAD. Αντίστοιχα η GDH απαιτεί τον συμπαράγοντα NAD<sup>+</sup> ή τον PQQ (pyrroloquinoline quinone). Οι παράγοντες αυτοί αφαιρούν H<sup>+</sup> και e<sup>-</sup> από το μόριο της D- γλυκόζης ως εξής:



Οι ενζυματικοί ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες αξιολογούν τα επίπεδα γλυκόζης μέσω της αμπερομετρικής ανίχνευσης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> που απελευθερώνεται από την αντίδραση αυτή της γλυκόζης και του ενζύμου <sup>47</sup>.

### 1.2.3. Ανίχνευση της γλυκόζης μη ενζυμικά

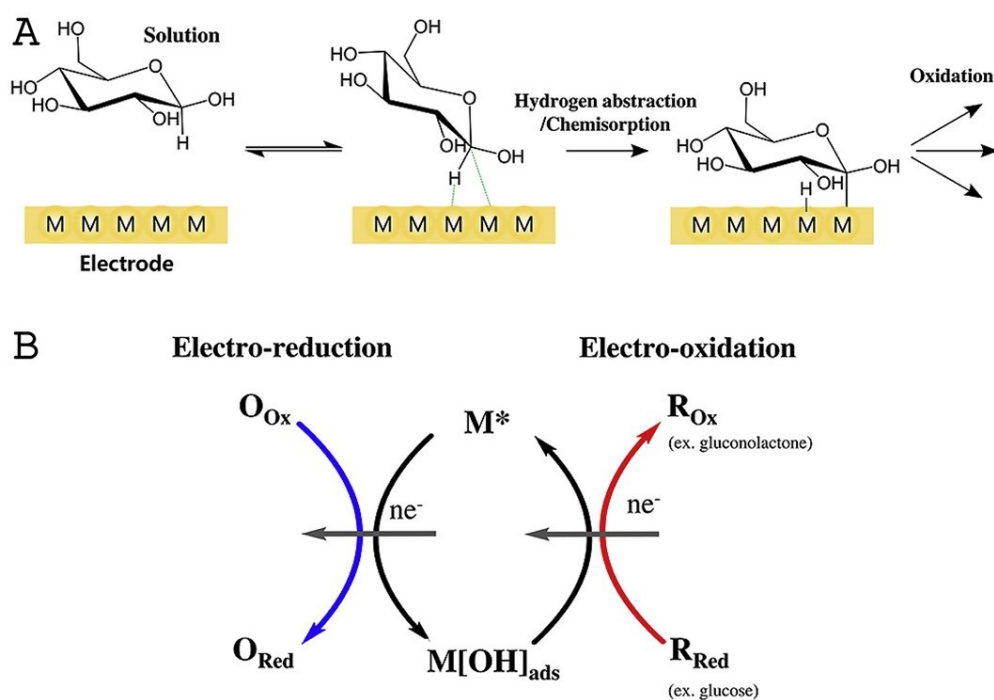
Η λειτουργία των ενζυμικών αισθητήρων γλυκόζης ακριβώς επειδή βασίζεται στη δραστηριότητα και τα ενδογενή χαρακτηριστικά των ενζύμων, εμφανίζει σημαντικά μειονεκτήματα. Αρχικά, η σταθερότητα των αισθητήρων είναι σημαντικά μειωμένη. Χημικές και θερμικές τροποποιήσεις που είναι πιθανό να συμβούν κατά την παραγωγή, την αποθήκευση και τη χρήση των ενζυμικών αισθητήρων, διαταράσσουν ολοκληρωτικά τη λειτουργία τους. Για παράδειγμα, θερμοκρασία υψηλότερη των 40 °C ή pH μικρότερο του 2 και μεγαλύτερο του 8, προκαλούν σημαντικές βλάβες στους αισθητήρες. Πολύ υψηλή ή πολύ χαμηλή υγρασία κατά την αποθήκευση ή τη λειτουργία των αισθητήρων είναι επίσης επιζήμια. Επιπρόσθετα, η ευαισθησία τους βασίζεται κατά κύριο λόγο στη δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου, οπότε μπορούν να προκύψουν σημαντικά θέματα αναπαραγωγιμότητας κατά τον έλεγχο της ποιότητάς τους. Σημαντικό περιορισμό θέτει επίσης η ανάγκη ύπαρξης οξυγόνου για τη λειτουργία τους <sup>48</sup>.

Για αυτούς τους λόγους και με τη συμβολή της νανοτεχνολογίας η έρευνα στράφηκε στη δημιουργία αισθητήρων για την ανίχνευση της γλυκόζης χωρίς την παρουσία ενζύμου.

Στους μη ενζυμικούς βιοαισθητήρες, η οξειδωση της γλυκόζης καταλύεται άμεσα από υλικά που έχουν ηλεκτροκαταλυτικές ιδιότητες. Στα υλικά αυτά περιλαμβάνονται καταλύτες οι οποίοι διαθέτουν ένα μεταβατικό μεταλλικό

κέντρο, όπως τα μέταλλα, τα οξείδια των μετάλλων και τα κράματα μετάλλων, καθώς επίσης και νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα <sup>49</sup>. Τα πιο δοκιμασμένα νανοϋλικά για την κατασκευή μη ενζυμικών αισθητήρων γλυκόζης είναι τα οξείδια των μετάλλων, τα νανοϋλικά άνθρακα ή συνδυασμοί αυτών των δύο <sup>45</sup>.

Υπάρχουν δύο θεωρίες για τη μη ενζυμική ηλεκτρο-οξείδωση της γλυκόζης από υλικά που διαθέτουν μεταβατικό μεταλλικό κέντρο (**Εικόνα 1. 8**). Η πρώτη είναι το “Activated Chemisorption Model” που προτάθηκε από τον Pletcher το 1984. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό η οξείδωση της γλυκόζης πραγματοποιείται στην επιφάνεια του υλικού όπου η γλυκόζη σχηματίζει δεσμούς με τα άτομα <sup>50</sup>. Δέκα χρόνια αργότερα, το 1994 ο Burke πρότεινε ένα δεύτερο μοντέλο, το “Incipient Hydrous Oxide Adatom Mediator (IHOAM)”. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, στην οξείδωση της γλυκόζης συμμετέχουν ενεργά οι ρίζες υδροξυλίου και τα ενεργά άτομα του μετάλλου που βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, αυξάνουν τη δραστηριότητα και διευκολύνουν την οξείδωση της γλυκόζης <sup>51</sup>.



**Εικόνα 1. 8.** Οι μηχανισμοί ανίχνευσης της γλυκόζης από υλικά που διαθέτουν ενεργό μεταβατικό μεταλλικό κέντρο. A: Η γλυκόζη απορροφάται (χημειοαπορόφηση) πάνω στη μεταλλική επιφάνεια του ηλεκτροδίου προτού οξειδωθεί. B: Το μοντέλο IHOAM. Η γρήγορη ηλεκτρο-οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονο-δ- λακτόνη διευκολύνεται από την παρουσία αντιδραστικών υδροξυλίων  $[OH]_{ads}$  στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων <sup>48</sup>.

Αν και τα αποτελέσματα για τη μη ενζυμική ανίχνευση της γλυκόζης είναι πολλά υποσχόμενα στο εργαστήριο, οι αισθητήρες αυτοί ακόμη απέχουν πολύ από την

κλινική πραγματικότητα. Κι αυτό γιατί, παρότι έχουν κατασκευαστεί πλήθος διαφορετικών νανοϋλικών, ελάχιστα από αυτά έχουν ελεγχθεί ως προς τη μέτρηση της γλυκόζης σε ακέραια, μη νοθευμένα ανθρώπινα δείγματα. Η μέτρηση της γλυκόζης περιορίζεται σε αραιωμένα δείγματα αίματος ή δείγματα νοθευμένα με περίσσεια γλυκόζης κι αυτό δεν δίνει πληροφορίες για την αξία τους στην κλινική πρακτική. Επίσης τα περισσότερα μη ενζυμικά ηλεκτρόδια που έχουν κατασκευαστεί μέχρι στιγμής απαιτούν αλκαλικό περιβάλλον (π.χ. διάλυμα NaOH) για να λειτουργήσουν σωστά, οπότε η εξέλιξή τους σε CGMs φαίνεται ότι είναι προδικασμένη να αποτύχει. Προκειμένου να ξεπεραστούν αυτές οι αδυναμίες, έχουν προταθεί κάποιες καινοτόμες λύσεις όπως η ηλεκτροχημική προεργασία προκειμένου να αυξηθεί το pH του δείγματος μέσω αναγωγικής αντίδρασης πρωτονίων <sup>45,52</sup>.

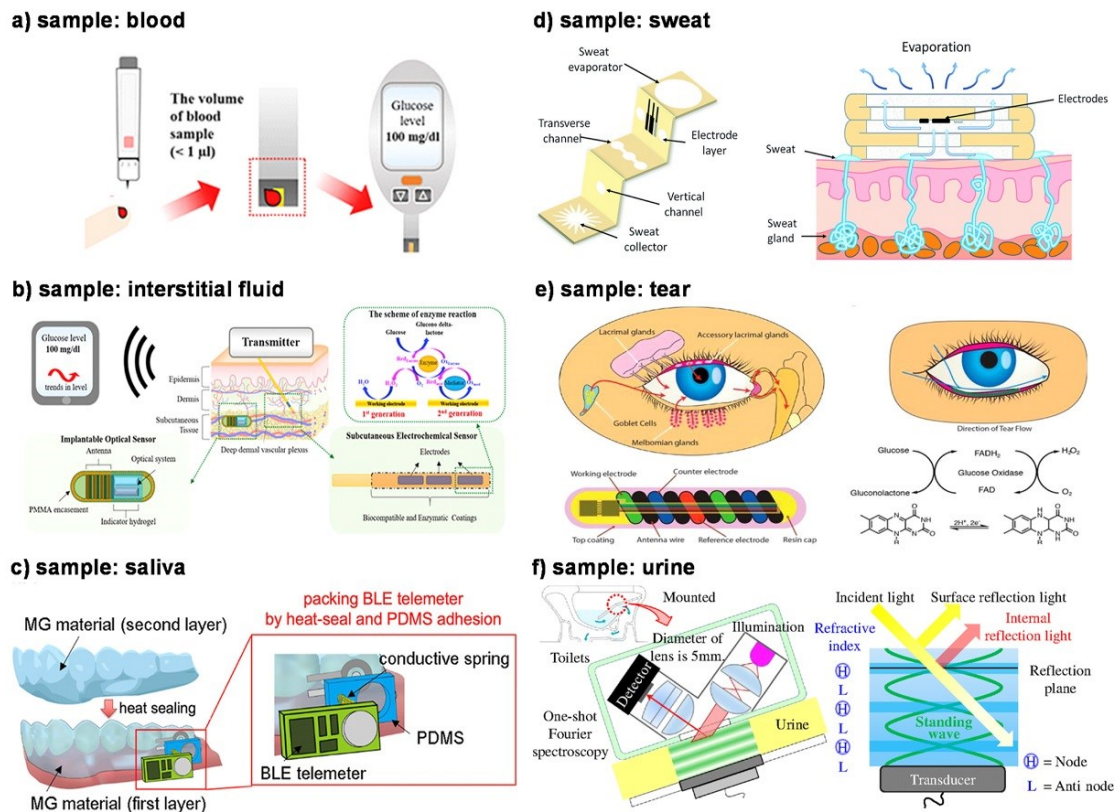
#### **1.2.4. Μη επεμβατικοί αισθητήρες ανίχνευσης της γλυκόζης**

Οι εμπορικοί CGMs ανιχνεύουν τα επίπεδα της γλυκόζης στο ISF μέσω της υποδόριας εμφύτευσης εύκαμπτων αισθητήρων που έχουν μήκος από 5 έως 13 mm <sup>53</sup>. Παρότι θεωρούνται ελάχιστα επεμβατικοί, η εμφύτευσή τους στο σώμα προκαλεί πόνο και στρες και συχνά περιορίζει τις δραστηριότητες του ασθενούς καθώς ορισμένες κινήσεις μπορεί να αποδεσμεύσουν τον αισθητήρα και να επηρεάσουν τη μέτρηση. Επίσης, η μακροχρόνια χρήση τους ελλοχεύει κινδύνους εμφάνισης λύσης της συνέχειας του ιστού και μόλυνσης στο σημείο της εμφύτευσης, το οποίο εκτός από δυσάρεστο για τον ασθενή, μπορεί να μειώσει την ευαισθησία και τη σταθερότητα του αισθητήρα.

Προκειμένου να μειωθεί ο πόνος και ο κίνδυνος των μολύνσεων, οι CGMs που έχουν ως βάση τις μικροβελόνες, έχουν προταθεί ως εναλλακτική των συμβατικών CGMs <sup>54</sup> και δοκιμάζονται σε διάφορες μελέτες *in vitro* και *in vivo*. Οι μικροβελόνες έχουν μήκος μόλις 0.05-1 mm και μπορούν να εμφυτευθούν ανώδυνα κάτω από το δέρμα χωρίς να έρθουν σε επαφή με τους νευρώνες και τα αιμοφόρα αγγεία. Έτσι, μειώνεται ο πόνος, η δυσφορία και ο κίνδυνος αιμορραγίας του διαβητικού ασθενούς <sup>55</sup>. Ωστόσο, με τη χρήση των μικροβελόνων εξακολουθεί να υπάρχει πολύ μικρός κίνδυνος ανάπτυξης φλεγμονής λόγω μολύνσεων μετά από την επαναλαμβανόμενη χρήση τους <sup>45</sup>.

Η ανάπτυξη μη επεμβατικών CGMs φαίνεται να αποτελεί το μέλλον στην παρακολούθηση της γλυκόζης καθώς θα ξεπεράσει τις αδυναμίες των ελάχιστα επεμβατικών CGMs. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν γίνει σημαντικές ερευνητικές προσπάθειες για την ανάπτυξη συστημάτων καταγραφής της γλυκόζης σε βιολογικά υγρά όπως τα δάκρυα <sup>56-58</sup>, ο ιδρώτας <sup>59</sup>, τα ούρα <sup>60</sup> ή το σάλιο <sup>61</sup> (**Εικόνα 1. 9**). Δυστυχώς όμως τα επίπεδα της γλυκόζης στα υγρά αυτά είναι σημαντικά μειωμένα σε σχέση με τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα. Έτσι το

αποτέλεσμα της μέτρησης που προκύπτει από τις μεθόδους αυτές συχνά έχει μεγάλη απόκλιση από την πραγματική τιμή της γλυκόζης στο αίμα. Επιπλέον, οι μη επεμβατικές τεχνολογίες αμφισβητούνται ως προς τις παρεμβολές στη μέτρηση, την ευαισθησία της ανίχνευσης και τη σταθερότητά τους <sup>55</sup>. Συν τοις άλλοις, πρόκληση ειδικά για την ανίχνευση της γλυκόζης στα δάκρυα, αποτελεί και η συλλογή κατάλληλης ποσότητας δείγματος ώστε να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η μέτρηση με ακρίβεια.



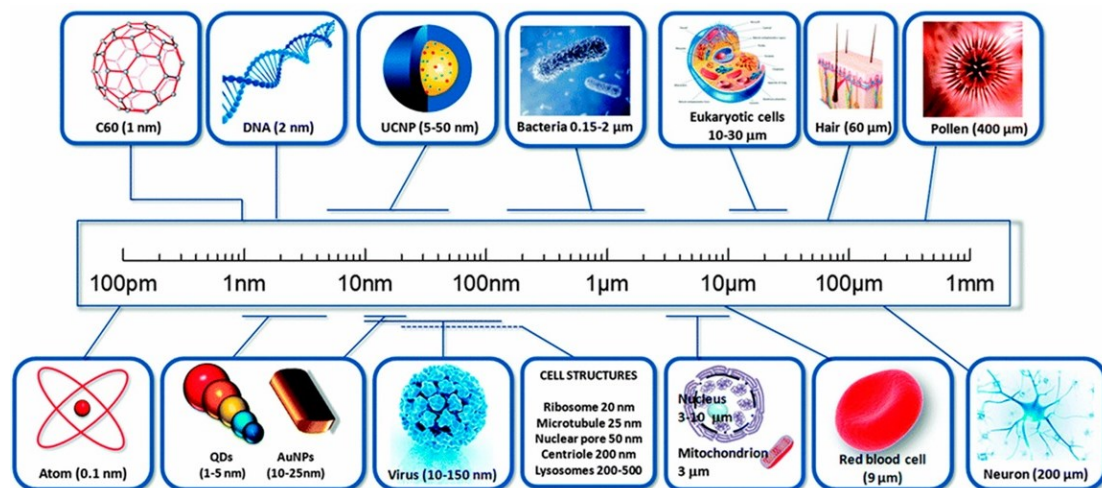
**Εικόνα 1. 9.** Σχηματική αναπαράσταση μεθόδων ανίχνευσης της γλυκόζης σε διαφορετικά βιολογικά υγρά <sup>55</sup>. α) εμπορικός γλυκομετρητής με ταινίες για την ανίχνευση της γλυκόζης με τη λήψη μίας σταγόνας αίματος <sup>62</sup>, β) εμπορικός ελάχιστα επεμβατικός CGM για την ανίχνευση της γλυκόζης στο ISF <sup>62</sup>, μη επεμβατικός CGM για την ανίχνευση της γλυκόζης στο σάλιο <sup>61</sup>, δ) συσκευή για τη μη επεμβατική ανίχνευση της γλυκόζης στον ιδρώτα <sup>63</sup>, ε) ελάχιστα επεμβατικός CGM για την ανίχνευση της γλυκόζης στα δάκρυα <sup>64</sup> και στ) ανίχνευση της γλυκόζης στα ούρα <sup>65</sup>.

Από τα παραπάνω βιολογικά υγρά, ο ιδρώτας φαίνεται να αποτελεί την πιο εύχρηστη και υποσχόμενη λύση για τη μη επεμβατική ανίχνευση της γλυκόζης. Τα επόμενα χρόνια αναμένεται να αναπτυχθούν καινοτόμες φορέσιμες συσκευές οι οποίες μέσω της συλλογής μικρής ποσότητας ιδρώτα θα ανιχνεύουν ταυτόχρονα τόσο τις διακυμάνσεις της γλυκόζης όσο και τις διακυμάνσεις άλλων αναλυτών, συμβάλλοντας συνολικά στην καλύτερη διαχείριση του ΣΔ <sup>45</sup>.

## 1.3. Νανοεπιστήμη και νανοτεχνολογία

### 1.3.1. Γενικά στοιχεία

Η Νανοεπιστήμη είναι η μελέτη δομών και μορίων που κυμαίνονται στην κλίμακα των νανομέτρων και συγκεκριμένα μεταξύ 1 και 100nm (**Εικόνα 1. 10**)<sup>66</sup>. Οι δομές αυτές ονομάζονται νανοϋλικά. Η ιδέα της Νανοεπιστήμης μπορεί να αποδοθεί στους Έλληνες και τον Δημόκριτο ο οποίος ήδη από τον 5<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ. υποστήριζε ότι η ύλη είναι ασυνεχής και αποτελείται από άπειρα μικρά, αδιαίρετα και άφθαρτα σωματίδια. Η ύπαρξη των σωματιδίων αυτών είναι πλέον αποδεδειγμένη και αποκαλούνται από την επιστημονική κοινότητα ως «άτομα»<sup>67</sup>.



**Εικόνα 1. 10.** Σύγκριση του μεγέθους των νανοϋλικών με άλλες βιολογικές δομές, κύτταρα και οργανισμούς<sup>66</sup>.

Νανοτεχνολογία καλείται η αξιοποίηση της νανοεπιστήμης σε πρακτικές εφαρμογές και θεωρείται μία από τις πιο υποσχόμενες τεχνολογίες του 21<sup>ου</sup> αιώνα. Η Εθνική Πρωτοβουλία Νανοτεχνολογίας (NNI, National Nanotechnology Initiative) ορίζει την νανοτεχνολογία ως επιστήμη, μηχανική και τεχνολογία η οποία συμβαίνει στη νανοκλίμακα και μέσω της αξιοποίησης μοναδικών φαινομένων οδηγεί στην ανάπτυξη καινοτόμων εφαρμογών σε πολλά επιστημονικά πεδία, συμπεριλαμβανομένης της χημείας, της φυσικής, της βιολογίας, της ιατρικής, της μηχανικής και της ηλεκτρονικής. Ο ορισμός αυτός θέτει δύο συνθήκες στην νανοτεχνολογία: τη νανοκλίμακα και την καινοτομία. Εξαιτίας της νανοκλίμακας προσδίδονται μοναδικές ιδιότητες στα υλικά οι οποίες οδηγούν στην ανάπτυξη καινοτόμων εφαρμογών<sup>67</sup>.

Η ιδέα της νανοτεχνολογίας εισήχθη για πρώτη φορά από τον Αμερικανό φυσικό και νομπελίστα Richard Feynman το 1959 κατά τη διάρκεια της ετήσιας συνάντησης της Αμερικανικής Εταιρείας Φυσικής, στην ομιλία του με τίτλο: “There’s Plenty of Room at the Bottom”<sup>1</sup> στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας της Καλιφόρνια. Κατά τη διάρκεια της ομιλίας του ο Feynman περιέγραψε το όραμά του για την κατασκευή μηχανών στο μοριακό επίπεδο <sup>68,69</sup>. Το 1974, ο Ιάπωνας επιστήμονας Norio Taniguchi χρησιμοποίησε για πρώτη φορά τον όρο «νανοτεχνολογία» για να ορίσει τη «διαδικασία του διαχωρισμού, της ενοποίησης και της μεταμόρφωσης των υλικών κατά ένα άτομο ή μόριο» <sup>67</sup>.

### 1.3.2. Κατηγορίες νανοϋλικών

Τα νανοϋλικά αποτελούν τη βάση της νανοτεχνολογίας. Πολύ πρόσφατα, στις 10 Ιουνίου του 2022, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή τροποποίησε την Οδηγία 2011/696/EU <sup>70</sup> για τον ορισμό των νανοϋλικών που ήταν σε ισχύ από το 2011, με τη νέα Ευρωπαϊκή Οδηγία 2022/C 229/01/ EU <sup>71</sup>. Σύμφωνα με αυτή, ως «νανοϋλικό ορίζεται το φυσικό, περιστασιακό ή μεταποιημένο υλικό που αποτελείται από στερεά σωματίδια τα οποία υπάρχουν είτε μεμονωμένα είτε ως αναγνωρίσιμα συστατικά σωματίδια σε συσσωματώματα ή συμπύγματα, και στο οποίο τουλάχιστον το 50% των σωματιδίων αυτών στην κατανομή των αριθμητικών μεγεθών πληροί τουλάχιστον μία από τις ακόλουθες προϋποθέσεις:

α) μία ή περισσότερες εξωτερικές διαστάσεις του σωματιδίου εμπίπτουν στην κλίμακα από 1 nm έως 100 nm,

β) το σωματίδιο έχει επίμηκες σχήμα, όπως ράβδος, ίνα ή σωλήνας, όπου οι δύο εξωτερικές διαστάσεις είναι μικρότερες από 1 nm και η άλλη διάσταση είναι μεγαλύτερη από 100 nm και

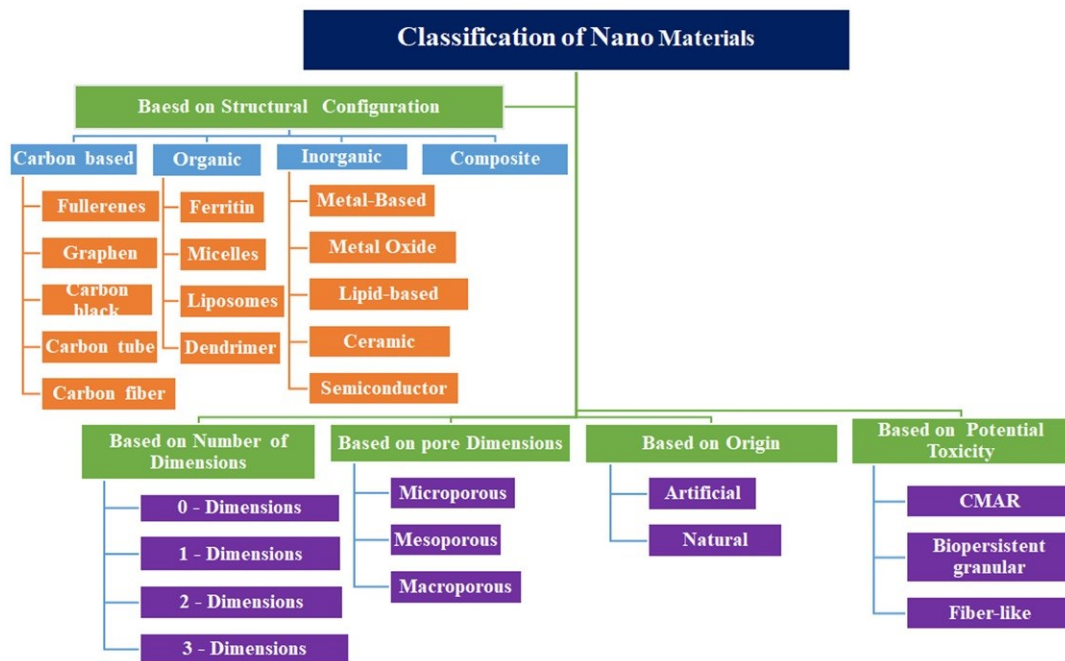
γ) το σωματίδιο έχει σχήμα πλάκας, όπου η μία εξωτερική διάσταση είναι μικρότερη από 1 nm και οι άλλες διαστάσεις είναι μεγαλύτερες από 100 nm».

Στην ίδια Οδηγία υπογραμμίστηκε ότι «ένα υλικό με ειδικό εμβαδόν κατ’ όγκο μικρότερο του  $6 \text{ m}^2/\text{cm}^3$  δεν θεωρείται νανοϋλικό».

Τα νανοϋλικά μπορούν να διακριθούν σε πολλές κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθος, την προέλευση, τη δομή, τη διάμετρο των πόρων αλλά και τη δυνητική τοξικότητά τους (**Εικόνα 1. 11**) <sup>72</sup>.

---

<sup>1</sup> Μτφ: «Υπάρχει άφθονος χώρος στον πάτο»



Εικόνα 1. 11. Γενική ταξινόμηση των νανοϋλικών <sup>72</sup>.

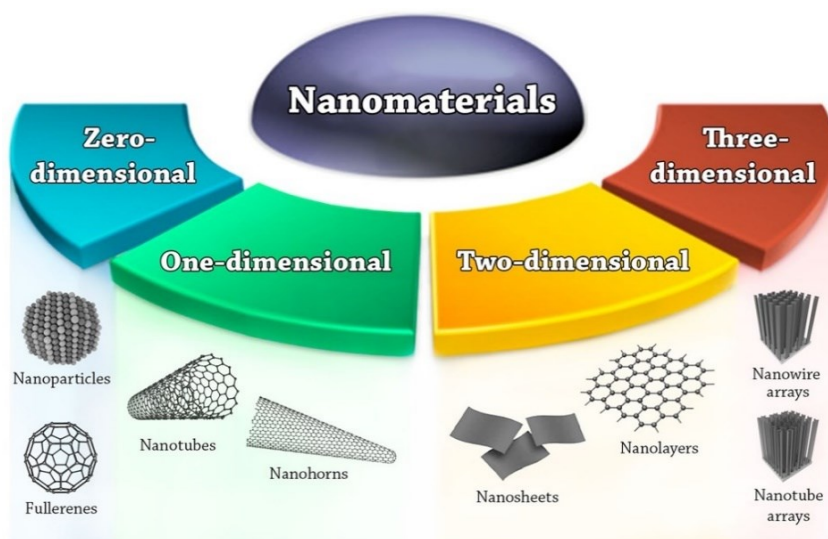
Ωστόσο, πιο εύχρηστη ταξινόμηση των νανοϋλικών αποτελεί αυτή που τα διακρίνει με βάση τις διαστάσεις τους. Τα νανοϋλικά διακρίνονται με αυτό τον τρόπο σε τέσσερις τάξεις:

1) Νανοϋλικά μηδενικών διαστάσεων (0-D): Στην κατηγορία αυτή ανήκουν νανοϋλικά τα οποία έχουν και τις τρεις διαστάσεις τους στη νανοκλίμακα, όπως οι κβαντικές κηλίδες (quantum dots), τα φουρελένια και τα νανοσωματίδια.

2) Νανοϋλικά μίας διάστασης (1-D): Τα νανοϋλικά αυτής της τάξης έχουν μία διάσταση εκτός της νανοκλίμακας. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι οι νανοσωλήνες (nanotubes), οι νανοϊνες (nanofibers), οι νανοράβδοι (nanorods), τα νανωσύρματα (nanowires) και τα νανοκέρατα (nanohorns).

3) Νανοϋλικά δύο διαστάσεων (2-D): Εδώ ανήκουν νανοϋλικά που διαθέτουν δύο διαστάσεις εκτός της νανοκλίμακας, παραδείγματος χάριν τα νανοφύλλα (nanosheets), τα νανοφίλμ (nanofilm) και οι νανοστρώσεις (nanolayers).

4) Νανοϋλικά τριων διαστάσεων (3-D) ή bulk νανοϋλικά: Τα υλικά αυτής της τάξης δεν έχουν καμία διάστασή τους στη νανοκλίμακα, ωστόσο αποτελούνται από σωματίδια που βρίσκονται στην κλίμακα των νανοϋλικών (1-100 nm). Για παράδειγμα, στην κατηγορία αυτή ανήκουν δέσμες νανοσυρμάτων και νανοσωλήνων, διασπορές νανοσωματιδίων και πολυ- νανοστρώσεις στις οποίες βασικά στοιχεία 0D, 1D και 2D βρίσκονται σε στενή επαφή (Εικόνα 1. 12) <sup>72,73</sup>.



**Εικόνα 1. 12.** Διάκριση των νανοϋλικών με βάση τις διαστάσεις τους <sup>73</sup>.

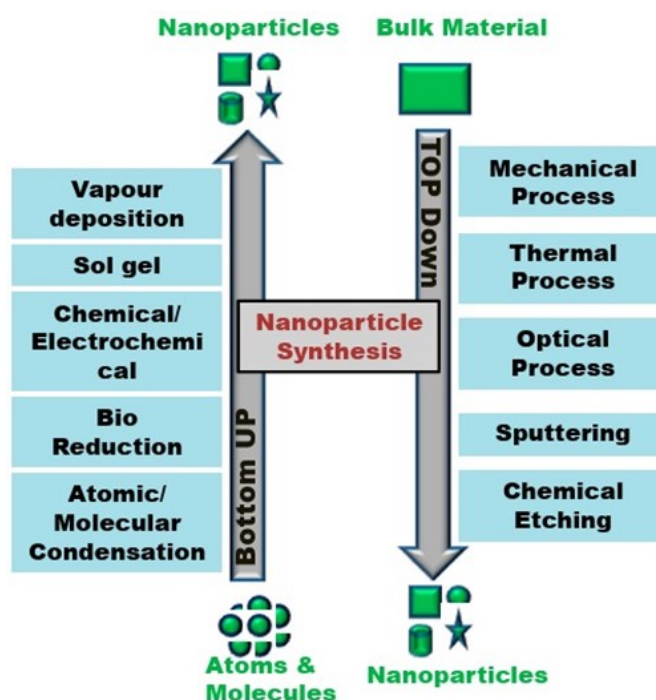
Στη νανοκλίμακα, επιδράσεις που είναι ανάλογες του μεγέθους γίνονται πιο ισχυρές και έτσι τα νανοϋλικά αποκτούν μοναδικές χημικές, φυσικές και βιολογικές ικανότητες που δεν διαθέτουν ως υλικά σε μεγαλύτερες κλίμακες. Για παράδειγμα, μη-μαγνητικά υλικά όπως ο χρυσός και η πλατίνα, μετατρέπονται σε ισχυρούς μαγνήτες στη νανοκλίμακα <sup>72</sup>. Εντυπωσιακό είναι επίσης το γεγονός ότι το χαρακτηριστικά κίτρινο διάλυμα του χρυσού εμφανίζεται ως μωβ ή κόκκινο στο επίπεδο της νανοκλίμακας. Αλλαγές παρατηρούνται και στις μηχανικές και ηλεκτρικές ιδιότητες, καθώς τα νανοϋλικά έχουν πολύ μεγαλύτερη περιοχή επιφάνειας (surface area) και καλύτερη κρυσταλλικότητα σε σχέση με τις αντίστοιχες ογκώδεις δομές. Επιπλέον, οι ηλεκτρικές και ορατές ιδιότητες αλλά και η μηχανική και θερμική αγωγιμότητα αυξάνονται σημαντικά όσο μειώνεται η κλίμακα <sup>74</sup>.

### 1.3.3. Σύνθεση των νανοϋλικών

Η ανακάλυψη των αξιοθαύμαστων ιδιοτήτων των νανοϋλικών τράβηξε το ενδιαφέρον πλήθους ερευνητών από διάφορα επιστημονικά πεδία. Αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη διαφορετικών τεχνικών για τη σύνθεση των νανοϋλικών. Υπάρχουν δύο προσεγγίσεις: η top-down (από πάνω προς τα κάτω) προσέγγιση και η bottom-up (από κάτω προς τα πάνω) <sup>75</sup> οι οποίες διαφέρουν ως προς την ποιότητα του παραγόμενου προϊόντος, την ταχύτητα και το κόστος της σύνθεσης (Εικόνα 1. 13) <sup>67</sup>.



Η προσέγγιση top- down αφορά τη σύνθεση υλικών της νανοκλίμακας από ένα αρχικό υλικό μεγάλης κλίμακας μέσω διαδικασιών προσθήκης ή αφαίρεσης. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται μέθοδοι όπως η φωτολιθογραφία (photolithography), η λιθογραφία σάρωσης (scanning lithography), η λιθογραφία νανοσφαιρίων (nanosphere lithography), η λιθογραφία κολλοειδών (colloidal lithography), η κοπή με λέιζερ (laser machining), η εκτύπωση νανοεπαφών (nanocontact printing), η εμφύτευση ιόντων (ion implantation), η διάχυση (diffusion) και η απόθεση (deposition). Παρόλο που η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για την σύνθεση διαφορετικών νανοϋλικών, εμφανίζει αρκετά μειονεκτήματα όπως είναι η εμφάνιση ατελειών στα υλικά, το υψηλό κόστος της (ειδικά για τις διαδικασίες λιθογραφίας), και η απαίτηση υλικών υψηλής επιφάνειας. Η προσέγγιση bottom- up, περιλαμβάνει τη σύνθεση νανοδομών από τη συγκρότηση ατόμων ή μορίων. Η προσέγγιση αυτή περιλαμβάνει δύο βασικές τεχνικές, τη σύνθεση αέριας φάσης (gas- phase synthesis) και τον σχηματισμό υγρής φάσης (liquid- phase formation). Μερικές μέθοδοι που ακολουθούν την προσέγγιση αυτή είναι η διαδικασία εναπόθεσης χημικών ατμών (chemical vapor deposition process), η οργανική αποσύνθεση μετάλλων (metal organic decomposition), η πυρόλυση με λέιζερ (laser pyrolysis) και η υγρή σύνθεση (wet synthesis) <sup>76</sup>.



Εικόνα 1. 13. Οι δύο προσεγγίσεις για τη σύνθεση των νανοϋλικών <sup>67</sup>.

## *Νανοσωματίδια*

Τα νανοσωματίδια αποτελούν μία κατηγορία νανοϋλικών. Σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης (ISO, International Organization for Standardization) ως νανοσωματίδιο ορίζεται μία νανοδομή που έχει όλες τις διαστάσεις της στη νανοκλίμακα (0-D) και το μήκος του μακρύτερου και του κοντύτερου άξονα του υλικού δεν διαφέρει πολύ. Τα νανοσωματίδια έχουν διάφορα σχήματα, μεγέθη και δομές, μπορεί να είναι κρυσταλλικά ή άμορφα, να είναι ομοιογενή ή να αποτελούνται από διαφορετικές στρώσεις κ.α. Ανάλογα με την σύνθεσή τους διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τα οργανικά, τα ανόργανα και τα νανοϋλικά που έχουν ως βάση τον άνθρακα (carbon-based).

Τα οργανικά νανοσωματίδια συντίθενται από οργανικά συστατικά όπως είναι οι πρωτεΐνες, οι υδρογονάνθρακες, τα λιπίδια και τα πολυμερή. Γνωστοί εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι τα δενδριμερή, τα λιποσώματα και τα μικκύλια. Στα νανοσωματίδια που έχουν ως βάση τον άνθρακα ανήκουν τα φουρελένια, οι κβαντικές κουκίδες άνθρακα (carbon quantum dots) και τα νανοσωματίδια μαύρου άνθρακα. Τα υλικά αυτά αποτελούνται εξ ολοκλήρου από άτομα άνθρακα. Στα ανόργανα νανοσωματίδια εντάσσονται τα νανοσωματίδια που δεν είναι οργανικά και δεν έχουν ως βάση τον άνθρακα. Παραδείγματα αποτελούν τα νανοσωματίδια από μέταλλα, τα κεραμικά νανοσωματίδια και τα ημιαγωγά νανοσωματίδια <sup>73</sup>.

### **1.3.4. Εφαρμογές της νανοτεχνολογίας στην Ιατρική- Νανοϊατρική**

Η Νανοϊατρική αποτελεί ανερχόμενο και πολλά υποσχόμενο πεδίο της Ιατρικής. Αναφέρεται στην αξιοποίηση των ιδιοτήτων και των φυσικών χαρακτηριστικών των νανοϋλικών με σκοπό την ανάπτυξη καινοτόμων λύσεων για την κλινική πρακτική. Η Νανοϊατρική έχει αλλάξει τα δεδομένα στην πρόληψη, τη διάγνωση, τη θεραπεία και την παρακολούθηση των ασθενειών <sup>77</sup>.

#### **1.3.4.1. Διάγνωση ασθενειών**

Μία από τις πρώτες χρήσεις των νανοϋλικών στην Ιατρική αφορά την ανάπτυξη τεχνικών για τη διάγνωση των ασθενειών. Τα νανοϋλικά μπορούν να τροποποιηθούν με ειδικό τρόπο ώστε να αποκτήσουν ιδιότητες αντίθεσης και αφού κατευθυνθούν σε συγκεκριμένους ιστούς, να επιτρέψουν την απεικόνιση δομών μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Με τον τρόπο αυτό αναπτύχθηκαν τεχνικές όπως η αξονική τομογραφία (computed tomography, CT), η μαγνητική τομογραφία (magnetic resonance imaging, MRI), η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (positron emission tomography, PET), η αξονική τομογραφία

εκπομπής ενός φωτονίου (single photon emission computed tomography, SPECT), η φωτοακουστική απεικόνιση (photoacoustic imaging) και η απεικόνιση μέσω φθορισμού (fluorescence imaging) <sup>78</sup>.

#### **1.3.4.2.Θεραπεία ασθενειών**

##### *Νανοϋλικά ως φορείς φαρμάκων*

Η ανάπτυξη συστημάτων για τη μεταφορά των φαρμάκων (DDS, drug- delivery systems) αποτέλεσε καινοτομία στην κλινική πρακτική και συνέβαλε στην αποτελεσματικότερη θεραπεία πλήθους ασθενειών όπως μολύνσεων, διαφόρων τύπων καρκίνου, διαβήτη αλλά και νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως είναι η νόσος Alzheimer's.

Η ενσωμάτωση των φαρμάκων σε φορείς επιτρέπει πιο στοχευμένη μεταφορά του φαρμάκου στον ιστό- στόχο μειώνοντας έτσι τις ανεπιθύμητες ενέργειες που προκύπτουν από τη βλάβη των υγιών γειτονικών ιστών. Επίσης, οι φορείς καθιστούν δυνατή την χορήγηση του φαρμάκου μέσω άλλων οδών ενισχύοντας έτσι τις φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητές του. Αυτό συνήθως μειώνει την απαιτούμενη δόση του φαρμάκου. Ως φορείς φαρμάκων έχουν δοκιμαστεί πολλά συστήματα, όπως νανοσωματίδια, υδατοδιαλυτά συμπλέγματα πολυμερών, πολυμερικά μικκύλια κ.α. Από αυτά, τα νανοσωματίδια έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας χάρη στην ευκολία παρασκευής τους και την υψηλή βιοσυμβατότητά τους με το ανθρώπινο σώμα <sup>79</sup>. Πολλές κατηγορίες νανοσωματιδίων έχουν ήδη εγκριθεί για την χρήση τους ως νανοφορείς φαρμάκων στη θεραπεία ασθενειών.

Η κλινική αξία των νανοφορέων φαρμάκων επιβεβαιώνεται κυρίως στην αντικαρκινική θεραπεία. Η παραδοσιακή χημειοθεραπεία για την αντιμετώπιση του καρκίνου περιλαμβάνει τη χορήγηση φαρμακολογικά ενεργών μορίων μικρού μοριακού βάρους. Η χημειοθεραπεία αν και συχνά είναι πολύ αποτελεσματική, έχει σοβαρές επιπλοκές όπως η τοξικότητα των φυσιολογικών κυττάρων και η πρόκληση σημαντικών ανεπιθύμητων ενεργειών που περιλαμβάνουν νευροτοξικότητα, πεπτικές διαταραχές, καταστολή του μυελού των οστών, στοματική βλενογοννίτιδα και αλωπεκία. Η χρήση των νανοϋλικών ως DDS για την στοχευμένη μεταφορά αντικαρκινικών παραγόντων ξεπερνά αυτούς τους περιορισμούς. Μέσω των DDS, τα φάρμακα στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα πιο άμεσα, πιο αποτελεσματικά προκαλώντας λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες <sup>80</sup>.

Πλήθος νανοσωματιδίων έχουν δοκιμαστεί ως νανοφορείς φαρμάκων, προσφέροντας διαφορετικά πλεονεκτήματα. Τα νανοσωματίδια από λιπίδια όπως τα λιποσώματα και τα νανοσωματίδια στερεών λιπιδίων (Solid- lipid nanoparticles, SLNs) χάρη στη διττή τους φύση μπορούν να ενσωματώνουν τόσο

υδρόφιλα όσο και υδρόφοβα φάρμακα. Τα λιποσώματα αποτελούν έναν από τους πιο δοκιμασμένους και κοινούς νανοφορείς καθώς έχουν πολύ μικρή τοξικότητα, είναι βιοσυμβατά και βιοδιασπώμενα. Παράδειγμα εγκεκριμένου φαρμάκου εγκλωβισμένου σε λιποσώματα αποτελεί η υδροχλωρική δοξορουβισίνη σε πεγκυλιωμένη λιποσωματική μορφή με την εμπορική ονομασία Caelyx, που κυκλοφορεί στην Ευρώπη για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού και των ωοθηκών αλλά και των σαρκωμάτων Kaposi σε ασθενείς με AIDS. Καινοτόμοι νανοφορείς από λιπίδια είναι οι νανοδομημένοι φορείς λιπιδίων (nanostuctured lipid carriers, NLCs) οι οποίοι διατηρούνται σταθεροί σε θερμοκρασία δωματίου και έχουν πλήθος πλεονεκτημάτων σε σχέση με τους συμβατικούς νανοφορείς λιπιδίων. Οι NLCs μάλιστα φαίνεται ότι είναι πολύ χρήσιμοι στην κοσμετολογία. Νανοσωματίδια που έχουν συντεθεί από βιοδιασπώμενα πολυμερή όπως το πολυγαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ (PLGA, poly (lactic- co- glycolic acid), η πολυαιθυλενογλυκόλη (polyethene glycol, PEG), η χιτοζάνη ή η πολυκαπρολακτόνη (polycaprolactone, PCL) μπορούν να εγκλωβίσουν στο εσωτερικό τους πολλά είδη φαρμάκων. Τα δενδριμερή αποτελούν επίσης αποτελεσματικά συστήματα DDS χάρη στην ευκολία τους να εγκλωβίζουν αντικαρκινικούς παράγοντες ενισχύοντας τις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες και μειώνοντας την τοξικότητά τους. Ανόργανα νανοσωματίδια όπως τα νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs), τα νανοσωματίδια μαγνησίου (MNPs) και τα νανοσωματίδια πυριτίου (silica NPs) αποτελούν επίσης καλά μελετημένα συστήματα DDS. Υποσχόμενοι φορείς φαρμάκων είναι και τα νανοσωματίδια από άνθρακα όπως τα GO που μπορούν να μεταφέρουν μικρά μόρια στην επιφάνειά τους και οι νανοσωλήνες άνθρακα (carbon nanotubes, CNTs) που έχουν μελετηθεί για τον εγκλωβισμό πολλών διαφορετικών αντικαρκινικών φαρμάκων. Όμως, όσον αφορά τα CNTs υπάρχουν ενστάσεις ως προς την τοξικότητά τους. Τέλος υβριδικά νανοσωματίδια όπως τα νανοσωματίδια με δομή πυρήνα- κελύφους (core- shell) που έχουν ανόργανο πυρήνα και κέλυφος από άλλο υλικό (πολυμερές ή λιπίδιο) καταφέρνουν να συνδυάσουν τα πλεονεκτήματα των δύο διαφορετικών υλικών και να ενθυλακώσουν διαφορετικές φαρμακευτικές ουσίες. Χρήσιμα είναι και τα υβρίδια ανόργανων και οργανικών νανοσωματιδίων τα οποία είναι πολύ σταθερά, ρυθμίζουν την απελευθέρωση του φαρμάκου και συνδυάζουν τις λειτουργίες των ανόργανων και των οργανικών νανοσωματιδίων

81.

### *Νανοϋλικά σε εμφυτεύματα*

Τα ιατρικά εμφυτεύματα είναι μικρές συσκευές ή προσθέσεις οι οποίες εμφυτεύονται χειρουργικά μέσα στο ανθρώπινο σώμα με σκοπό να αντικαταστήσουν, να ενισχύσουν ή να υποστηρίξουν τις βιολογικές δομές. Η ανακάλυψη και χρήση των εμφυτευμάτων άλλαξε τα δεδομένα στον χώρο της Υγείας καθώς συνέβαλε στη θεραπεία πολλών χρόνιων ασθενειών, στην

αποκατάσταση τραυμάτων και φυσιολογικών αναπηριών και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής πλήθους ασθενών παγκοσμίως. Υπάρχουν πολλοί τύποι εμφυτευμάτων όπως τα ορθοπεδικά τα οποία αντικαθιστούν ή επισκευάζουν τραυματισμένα οστά και χόνδρους, τα καρδιαγγειακά για τη θεραπεία των αρρυθμιών, της στεφανιαίας νόσου ή της καρδιακής ανεπάρκειας, τα οδοντικά για την αντικατάσταση χαμένων δοντιών και τα νευρολογικά για τη θεραπεία της νόσου Parkinson's, καταστάσεων χρόνιου πόνου αλλά και της επιληψίας.

Παρά την αποτελεσματική συμβολή τους στην αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων τα εμφυτεύματα έχουν περιθώρια βελτίωσης. Με την πάροδο του χρόνου, προκύπτουν αδυναμίες στη λειτουργία τους λόγω μηχανικής βλάβης ή σκουριάς. Επίσης συχνή είναι και η απόρριψή τους από τον ιστό στον οποίο τοποθετούνται ή η πρόκληση μόλυνσεων<sup>82</sup>. Σπάνια μπορεί να προκαλέσουν και σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες όπως αλλεργικές αντιδράσεις και φλεγμονώδεις απαντήσεις του ανοσοποιητικού.

Η ενίσχυση των εμφυτευμάτων με νανοϋλικά βελτιώνει σημαντικά την απόδοσή τους. Αν και η χρήση τους στα εμφυτεύματα είναι ακόμα σε αρχικά στάδια, φαίνεται ότι χάρη στις μοναδικές τους ιδιότητες βελτιώνουν κάποια χαρακτηριστικά των εμφυτευμάτων όπως τη δύναμη, την ευελιξία και τη βιοσυμβατότητά τους. Από τα πιο δοκιμασμένα νανοϋλικά σε εμφυτεύματα είναι τα νανოსύνθετα που έχουν ως βάση πολυμερή, τα νανοϋλικά με βάση τα μέταλλα και τα κεραμικά νανοϋλικά.

Θέματα που μπορεί να προκύψουν από τη χρήση των νανοϋλικών στα εμφυτεύματα αφορούν την ασφάλεια και τη βιοσυμβατότητά τους μακροπρόθεσμα καθώς έχουν μικρό μέγεθος και μεγάλη περιοχή επιφάνειας και έτσι μπορούν να αλληλεπιδράσουν εύκολα με το ανοσοποιητικό σύστημα. Επίσης προκειμένου να είναι χρήσιμα στην κλινική πρακτική πρέπει να αναπτυχθούν πιο αξιόπιστες και οικονομικά προσιτές μέθοδοι σύνθεσής τους.

#### **1.3.4.3. Ταυτόχρονη διάγνωση και θεραπεία ασθενειών**

Τα νανοϋλικά έχουν εφαρμογή και στη Θερανοστική (Theranostics), δηλαδή στην παράλληλη διάγνωση και θεραπεία ασθενειών. Ένα τέτοιο παράδειγμα αφορά την καθοδηγούμενη αφαίρεση όγκων με τη χρήση νανοσωματιδίων. Τα νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται για τη σήμανση καρκινικών κυττάρων αλλά και μεταστάσεων των όγκων και βοηθούν τον χειρουργό στην αφαίρεσή τους. Επιπλέον τα ίδια νανοσωματίδια μπορεί να περιέχουν θεραπευτικούς παράγοντες που συμβάλλουν στην αποκατάσταση του ασθενούς μετά το χειρουργείο. Άλλη εφαρμογή αφορά την παράδοση αντικαρκινικών παραγόντων μέσω νανοφορέων στους καρκινικούς όγκους και τη μετέπειτα παρακολούθηση της δράσης του

φαρμάκου στον στόχο. Αυτό επιτρέπει την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας στα αρχικά της στάδια <sup>78</sup>.

### **1.3.5. Συμβολή της νανοτεχνολογίας στη διαχείριση του ΣΔ**

Στην περίπτωση του ΣΔ, η πιο σημαντική συμβολή της επιστήμης μέχρι σήμερα αφορά την ανάπτυξη καινοτόμων νανοαισθητήρων για την ανίχνευση της γλυκόζης του αίματος <sup>83</sup>. Μέσω προηγμένων συστημάτων καθίσταται δυνατή η γρήγορη, αξιόπιστη και συνεχή καταγραφή των διακυμάνσεων της γλυκόζης στον οργανισμό με ελάχιστα επεμβατικό τρόπο. Πρόκειται για τα «έξυπνα» συστήματα συνεχόμενης παρακολούθησης της γλυκόζης (CGMs) τα οποία εκτός από τη συνεχή καταγραφή των διακυμάνσεων της γλυκόζης, ενημερώνουν τον ασθενή για την τάση αύξησης ή μείωσης της γλυκόζης του, ώστε να έχει καλύτερο έλεγχο της θεραπείας του.

Τα δεδομένα στη διαχείριση του ΣΔ άλλαξε επίσης η ανάπτυξη των αντλιών ινσουλίνης, που επιτρέπουν πιο αποτελεσματική χορήγηση του φαρμάκου. Οι αντλίες ινσουλίνης αποτελούν μία εύχρηστη εναλλακτική μέθοδο στην καθημερινή υποδότηση ένεση καθώς διευκολύνουν τη μεταφορά του φαρμάκου στην κυκλοφορία του αίματος, παρακάμπτοντας το όξινο γαστρικό περιβάλλον. Με τον τρόπο αυτό ελαχιστοποιούνται οι δοσολογικές ανισορροπίες και μειώνεται ο κίνδυνος εμφάνισης επεισοδίων υπο- και υπερ- γλυκαιμίας.

Αυτές οι δύο καινοτομίες άλλαξαν τα δεδομένα στην αντιμετώπιση του ΣΔ και συνδυασμένες μαζί, προσφέρουν στον διαβητικό ασθενή ένα υβριδικό «κλειστό» σύστημα θεραπείας. Στην ελληνική αγορά σήμερα κυκλοφορούν και χρησιμοποιούνται ευρέως δύο τέτοια υβριδικά συστήματα. Πρόκειται για το κλειστό σύστημα παρακολούθησης της γλυκόζης το οποίο συνδέεται με μία αντλία ινσουλίνης και το κλειστό σύστημα παρακολούθησης με φορητό pod. Και στις δύο περιπτώσεις, μέσω της επικοινωνίας των CGM με την αντλία της ινσουλίνης ή τα pods, αποφεύγονται επεισόδια υπο- και υπερ- γλυκαιμίας καθώς το εκάστοτε σύστημα χορήγησης του φαρμάκου χορηγεί δόση ινσουλίνης ή διακόπτει την χορήγηση του φαρμάκου όταν κρίνεται απαραίτητο.

Αν και τα συστήματα αυτά προσφέρουν καλύτερο γλυκαιμικό έλεγχο και απαλλάσσουν μερικώς τον ασθενή από το άγχος, ακόμη δεν είναι πλήρως αυτοματοποιημένα ούτε μη επεμβατικά.

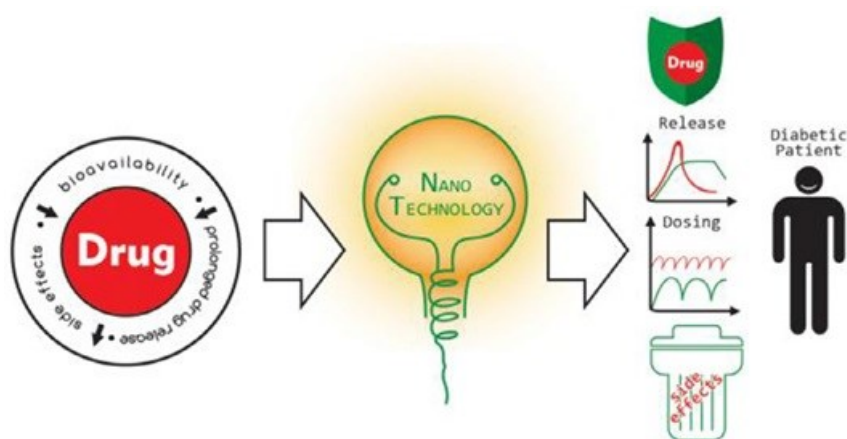
Προσπάθειες γίνονται για την κατασκευή πλήρως αυτοματοποιημένων μη επεμβατικών κλειστών συστημάτων για την διαχείριση του ΣΔ. Τα κλειστά συστήματα θα αναγνωρίζουν σε πραγματικό χρόνο τις απαιτήσεις ινσουλίνης του οργανισμού και θα χορηγούν την κατάλληλη δόση της ινσουλίνης ή των

υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Έτσι, θα αποδεσμεύουν τελείως τον ασθενή από την χορήγηση της θεραπευτικής αγωγής.

Προκειμένου να αναπτυχθούν τέτοια συστήματα, απαιτείται εύρεση καλύτερων στρατηγικών τόσο για την ανίχνευση της γλυκόζης του αίματος όσο και για τη χορήγηση της φαρμακευτικής αγωγής. Σε αυτό φαίνεται ότι μπορεί να συμβάλει η ανάπτυξη ακόμη πιο αποτελεσματικών νανοϋλικών.

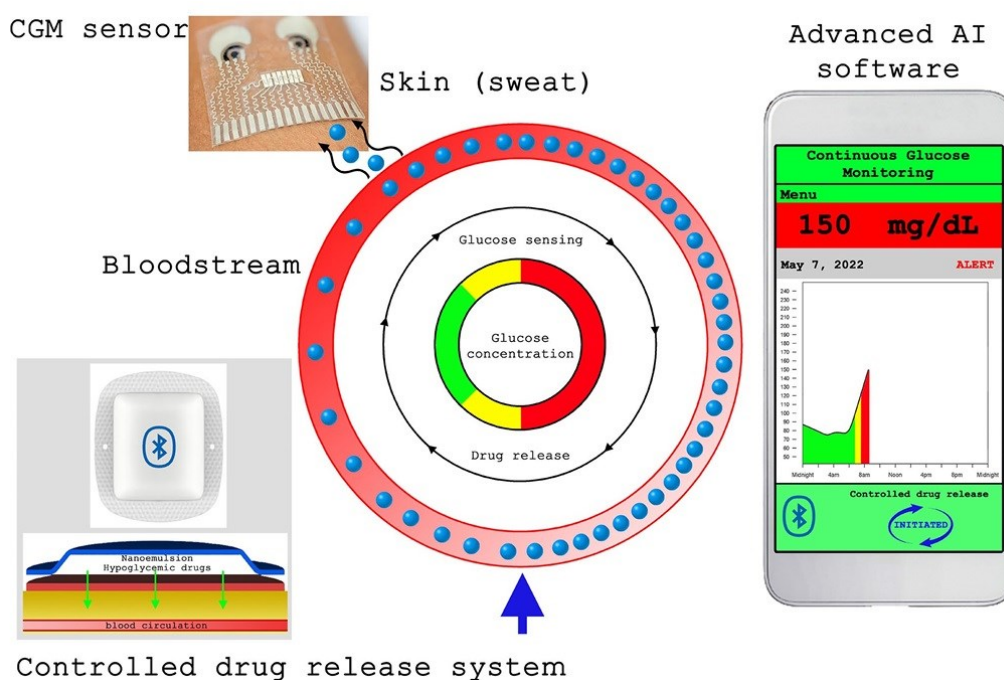
Αρχικά, όσον αφορά τη διάγνωση της γλυκόζης, προσπάθειες γίνονται για την ανάπτυξη μη επεμβατικών CGMs που θα αναγνωρίζουν τη γλυκόζη σε υγρά εκτός του αίματος. Αν και βρίσκονται ακόμη σε αρχικά στάδια πολλές μελέτες αναφέρονται στη χρήση καινοτόμων νανοϋλικών για την ανάπτυξη προηγμένων βιοαισθητήρων για την ανίχνευση της γλυκόζης στον ιδρώτα, στο σάλιο ή στα δάκρυα. Προσπάθειες γίνονται επίσης για την δημιουργία φορέσιμων συσκευών οι οποίες εκτός από την ανίχνευση της γλυκόζης του αίματος, θα επιτρέπουν παράλληλα την ανάλυση άλλων βιοδεικτών, προσφέροντας πιο ολοκληρωμένη θεραπευτική στρατηγική <sup>84</sup>.

Όσον αφορά την ελεγχόμενη απελευθέρωση της φαρμακευτικής αγωγής, όποτε κρίνεται απαραίτητο, η έρευνα επικεντρώνεται στην ανάπτυξη «έξυπνων» νανοφορέων υπογλυκαιμικών ουσιών για τη στοχευμένη και ελεγχόμενη χορήγησή τους. Ο εγκλωβισμός της ινσουλίνης ή άλλων υπογλυκαιμικών παραγόντων σε νανοφορείς δοκιμάζεται εντατικά καθώς επιτρέπει πιο στοχευμένη μεταφορά του φαρμάκου, μειώνει τη χορηγούμενη δόση και τις ανεπιθύμητες ενέργειες και προσφέρει καλύτερη συμμόρφωση του ασθενούς και ορθότερο γλυκαιμικό έλεγχο (**Εικόνα 1. 14**) <sup>83</sup>.



**Εικόνα 1. 14.** Η νανοτεχνολογία βελτιώνει σημαντικά τη θεραπεία του ΣΔ <sup>83</sup>.

Αυτές οι εφαρμογές της νανοτεχνολογίας σε συνδυασμό με την ανάπτυξη ακόμη πιο «έξυπνων» αλγορίθμων «machine-learning» που θα λαμβάνουν υπόψιν καθημερινούς παράγοντες που επηρεάζουν τις διακυμάνσεις της γλυκόζης στο αίμα όπως είναι η διατροφή, η άσκηση, η συναισθηματική κατάσταση, ο ύπνος και οι αυξομειώσεις του βάρους <sup>55</sup>, μπορούν να προσφέρουν ένα ολοκληρωμένο «κλειστό» σύστημα θεραπείας. Αυτό αναμένεται να φέρει την επανάσταση στη διαχείριση του ΣΔ και να βελτιώσει την ποιότητα ζωής των ασθενών που ταλαιπωρούνται καθημερινά από αυτή τη νόσο (Εικόνα 1. 15).



**Εικόνα 1. 15.** Αναπαράσταση ενός πιθανού ολοκληρωμένου «κλειστού» συστήματος για τη διαχείριση του ΣΔ <sup>45</sup>.

## 1.4. Γραφένιο

### 1.4.1. Γενικά στοιχεία

Το γραφένιο είναι ένα δισδιάστατο (2D) νανοϋλικό άνθρακα με εξαιρετικές ιδιότητες. Ο όρος «graphene» προέρχεται από το συνθετικό «graph» του γραφίτη και την κατάληξη «ene» που χαρακτηρίζει τους διπλούς δεσμούς μεταξύ των ατόμων άνθρακα που διαθέτει (C=C) <sup>85</sup>.



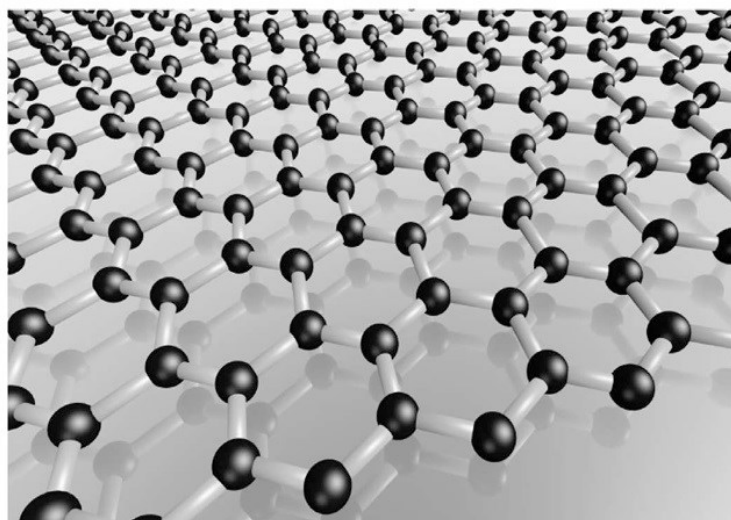
Η ανακάλυψη του γραφενίου αποδίδεται στους ερευνητές Konstantin Novoselov και Andre Geim οι οποίοι το 2004 στο Πανεπιστήμιο του Μάντσεστερ κατάφεραν να εξάγουν επιτυχώς μονο-ατομικό στρώμα γραφενίου από ένα κομμάτι γραφίτη όμοιο με αυτό που υπάρχει στα κοινά μολύβια, με κολλητική ταινία (η διάσημη πλέον Scotch Tape technique) (**Εικόνα 1. 16**)<sup>86</sup>. Μάλιστα το 2010 οι δύο ερευνητές έλαβαν από κοινού βραβείο Nobel στη Φυσική για τα πειράματά τους με το δισδιάστατο γραφένιο καθώς η ανακάλυψη του νανοϋλικού θεωρήθηκε ότι συνέβαλε στην εξέλιξη πολλών επιστημονικών πεδίων.



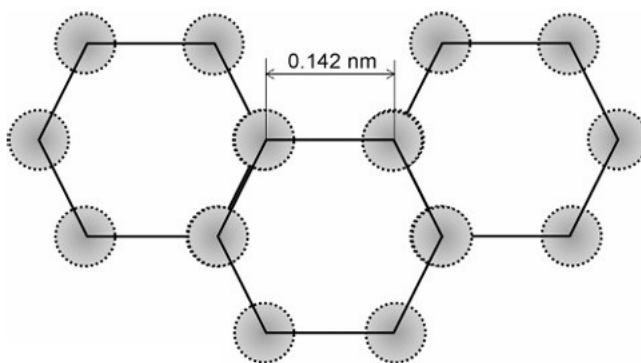
**Εικόνα 1. 16.** Η τεχνική σύνθεσης του γραφενίου με χρήση της ταινίας «Scotch tape» αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Novoselov και Geim το 2004<sup>87,88</sup>.

#### 1.4.2. Δομή και ιδιότητες του γραφενίου

Το γραφένιο είναι ένα αλλότροπο δισδιάστατο νανοϋλικό άνθρακα με μορφή εξαγωνικού πλέγματος (**Εικόνα 1. 17**). Σε μία στρώση γραφενίου ένα άτομο άνθρακα σχηματίζει κάθε κορυφή του εξαγωνικού πλέγματος και κάθε άτομο άνθρακα δένεται με το γειτονικό του με  $sp^2$  υβριδισμό. Το μήκος κάθε δεσμού άνθρακα- άνθρακα είναι 0.142 nm. Σε κάθε πλέγμα υπάρχουν τρεις σ δεσμοί με δυνατές συνδέσεις που σχηματίζουν μία πολύ σταθερή δομή εξάγωνου (**Εικόνα 1. 18**)<sup>89</sup>.

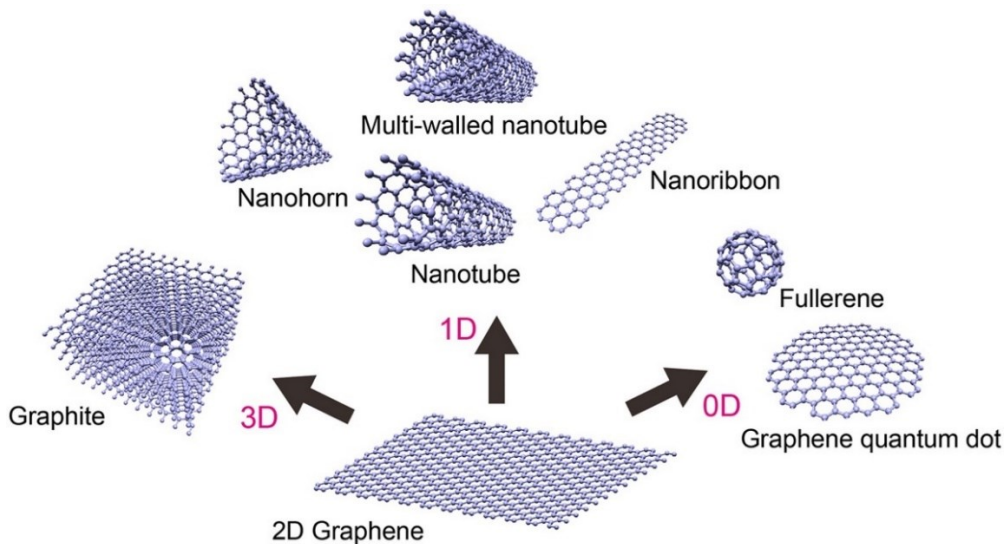


**Εικόνα 1. 17.** Γραφική απεικόνιση της δομής μίας στρώσης γραφενίου <sup>85</sup>.



**Εικόνα 1. 18.** Το εξαγωνικό πλέγμα του γραφενίου <sup>89</sup>.

Το γραφένιο αποτελεί το βασικό δομικό στοιχείο άλλων αλλότροπων υλικών άνθρακα συμπεριλαμβανομένου του γραφίτη, των φουρελενίων, των νανοσωλήνων άνθρακα (CNT) και άλλων σχετικών υλικών όπως οι ίνες άνθρακα (Carbon fiber, CF) (**Εικόνα 1. 19**). Θεωρείται επίσης βάση μερικών αρωματικών μορίων με άπειρο μέγεθος όπως είναι οι εξαιρετικά επίπεδοι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες <sup>89</sup>.



**Εικόνα 1. 19.** Αλλότροπα νανοϋλικά άνθρακα που προέρχονται από το γραφένιο <sup>90</sup>.

Τα παραπάνω νανοϋλικά άνθρακα θεωρούνται μέλη της ίδιας οικογένειας καθώς κατά βάση αποτελούνται από  $sp^2$  άτομα άνθρακα που διαμορφώνονται σε εξαγωνικό δίκτυο. Λόγω της κοινής τους δομής εμφανίζουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά όπως οι άριστες ηλεκτροχημικές τους ιδιότητες <sup>91</sup>. Ωστόσο, έχουν και σημαντικές διαφορές που οφείλονται κυρίως στο διαφορετικό μέγεθος και σχήμα τους. Από τα νανοϋλικά άνθρακα, το γραφένιο είναι το καλύτερα μελετημένο ειδικά ως προς την αξιοποίησή του σε βιοϊατρικές εφαρμογές, χάρη στην ιδιαίτερη δομή του, που του προσδίδει μοναδικές ιδιότητες.

Από μηχανική άποψη, το γραφένιο αποτελεί την πιο σκληρή κρυσταλλική δομή που είναι γνωστή μέχρι σήμερα. Η σφιχτή σύνδεση των ατόμων άνθρακα και ο  $sp^2$  υβριδισμός τους, προσδίδουν στο γραφένιο εξαιρετική σταθερότητα. Επιπλέον, τα φύλλα γραφενίου αν και είναι εξαιρετικά λεπτά και ελαφριά διαθέτουν πολύ υψηλή δύναμη. Με πάχος μόλις 0.35 nm, το οποίο αποτελεί το 1/2000000στό της διαμέτρου μίας ανθρώπινης τρίχας και επίπεδη πυκνότητα 0.77 mg/m<sup>2</sup>, το γραφένιο είναι 100 φορές πιο ισχυρό από το ατσάλι. Μάλιστα υπολογίζεται ότι 1 m<sup>2</sup> γραφενίου μπορεί να αντέξει έως 4 κιλά βάρους <sup>89</sup>. Συν τοις άλλοις, διαθέτει πολύ μεγάλο εμβαδόν επιφάνειας προς μάζα <sup>92</sup>.

Άριστες είναι και οι ηλεκτροχημικές του ιδιότητες οι οποίες οφείλονται κυρίως στους υβριδισμένους π-δεσμούς του. Το γραφένιο έχει εξαιρετικά υψηλή ηλεκτρική <sup>93</sup> και θερμική αγωγιμότητα <sup>94</sup>. Η θερμική του αγωγιμότητα είναι 10 φορές υψηλότερη από αυτή του χαλκού και μέχρι στιγμής, σε θερμοκρασία δωματίου θεωρείται το πιο αγώγιμο υλικό, με αγωγιμότητα 10<sup>6</sup> S/m <sup>89</sup>.

Τέλος, χάρη στη μονοατομικότητά του, το γραφένιο έχει πολύ μεγάλη διαφάνεια της τάξης του 97.7% καθώς απορροφά μόνο το 2.3% του ορατού φωτός <sup>89</sup>.

### **1.4.3. Το γραφένιο σε βιοϊατρικές εφαρμογές**

#### **1.4.3.1. Βιοανίχνευση**

Το γραφένιο και τα νανοϋλικά που έχουν ως βάση το γραφένιο αποτελούν ιδανικούς υποψήφιους για την κατασκευή προηγμένων ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων. Αυτό οφείλεται όχι μόνο στις άριστες ηλεκτροχημικές τους ιδιότητες αλλά και στην ευκολία της λειτουργικής τροποποίησης της επιφάνειάς τους με άλλα στοιχεία <sup>95</sup>. Τα νανοϋλικά γραφενίου ενισχύουν τις ηλεκτροχημικές απαντήσεις των ηλεκτροδίων και επιπλέον αυξάνουν την επιφάνειά τους διευκολύνοντας έτσι την προσαρμογή βιο- υποδοχέων και την ακινητοποίηση βιομορίων όπως ενζύμων, αντισωμάτων και DNA για τη δημιουργία βιοαισθητήρων υψηλής ευαισθησίας και εκλεκτικότητας <sup>96</sup>.

Πλήθος ερευνών αναφέρεται στην κατασκευή βιοαισθητήρων γραφενίου για την ανάλυση βιοδεικτών κρίσιμων για την κλινική διάγνωση. Για παράδειγμα, έχουν κατασκευαστεί ευαίσθητοι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες με βάση το γραφένιο για την ανίχνευση της γλυκόζης <sup>45</sup>, της ντοπαμίνης <sup>97-99</sup>, της σεροτονίνης <sup>98</sup>, της ουρίας <sup>100</sup>, του ασκορβικού οξέος <sup>99</sup> αλλά και ψυχοτρόπων ουσιών <sup>101</sup>.

Επίσης, στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές σχετικά με τη συνεργιστική δράση ειδικών αντισωμάτων και ηλεκτροδίων γραφενίου για την παραγωγή αισθητήρων υψηλής ευαισθησίας και απόκρισης στην ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών <sup>95</sup>. Για παράδειγμα, έχουν σχεδιαστεί τροποποιημένα ηλεκτρόδια γραφενίου που αναγνωρίζουν ειδικά την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 <sup>102,103</sup>, την α-φετοπρωτεΐνη (AFP) <sup>104,105</sup> και το εμβρυικό καρκινικό αντιγόνο CEA <sup>106,107</sup>.

Ηλεκτρόδια που έχουν ως βάση το γραφένιο έχουν κατασκευαστεί και για την ανίχνευση ελεύθερων βάσεων DNA ή μικρών πολυνουκλεοτιδίων DNA <sup>108-110</sup>.

#### **1.4.3.2. Μεταφορά φαρμάκων**

Τα νανοϋλικά αποτελούν αξιόλογους νανοφορείς για τη στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων στη θεραπεία του καρκίνου και άλλων ασθενειών. Το γραφένιο και τα παράγωγά του είναι από τα πιο μελετημένα νανοϋλικά για την κατασκευή νανοφορέων, ειδικά για τη θεραπεία του καρκίνου. Η μεγάλη επιφάνεια, η χημική σταθερότητα, η εξαιρετική βιοσυμβατότητα και η υψηλή ικανότητα δέσμευσης φαρμάκου που επιδεικνύουν οι δομές γραφενίου αποτελούν ιδανικά στοιχεία για τη σύνθεση νανοφορέων. Επιπλέον, το GO και το rGO που διαθέτουν πολλές λειτουργικές ομάδες οξυγόνου και έχουν υδρόφιλη φύση, καθίστανται ιδανικές πλατφόρμες για την αγκίστρωση αντικαρκινικών μορίων <sup>80</sup>.

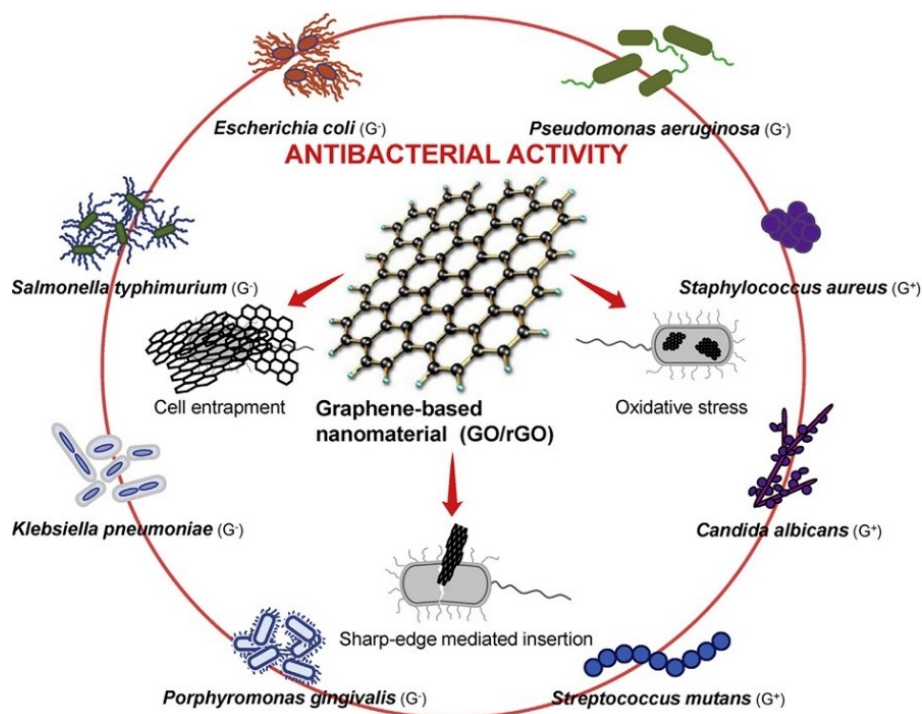
### 1.4.3.3. Αντιβακτηριακή δράση

Η δράση των νανοϋλικών γραφενίου στην ανάπτυξη των βακτηρίων είναι διαφορούμενη. Από τη μία πλευρά, στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές σχετικά με τη δράση του γραφενίου ενισχυτικά στην ανάπτυξη των βακτηρίων και από την άλλη, πλήθος μελετών υπογραμμίζει την αντιβακτηριακή του δράση. Προτείνεται λοιπόν ότι κάθε νανοϋλικό που έχει ως βάση το γραφένιο δρα διαφορετικά αναλόγως των συνθηκών και των φυσικοχημικών του χαρακτηριστικών. Οι παράγοντες που ρυθμίζουν τη θετική ή αρνητική επίδραση των νανοϋλικών γραφενίου στην ανάπτυξη των βακτηρίων περιλαμβάνουν το μέγεθος, το σχήμα, την υδροφιλικότητα/ υδροφοβικότητα, τη δόση, τον τρόπο σύνθεσης, το είδος του βακτηρίου, το στάδιο ανάπτυξης του βακτηρίου και τις περιβαλλοντικές συνθήκες <sup>111</sup>.

Ως προς την αντιβακτηριακή τους δράση, τα τελευταία χρόνια οι δομές γραφενίου θεωρούνται πολύτιμοι θεραπευτικοί παράγοντες καθώς φαίνεται να καταστέλλουν την ανάπτυξη πλήθους Gram+ και Gram- βακτηρίων, μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Τα καλύτερα μελετημένα νανοϋλικά γραφενίου ως προς τις ιδιότητές τους αυτές είναι το γραφένιο, το GO και το rGO, με το GO να είναι το πιο αποτελεσματικό από τα τρία. Επιπλέον, σε πολλές μελέτες δοκιμάζεται ο συνδυασμός των νανοϋλικών αυτών με άλλα νανοσωματίδια ή βιοδραστικούς παράγοντες, όπως μέταλλα ή οξειδία μετάλλων προκειμένου να αυξηθεί η δραστηριότητά τους <sup>112</sup>.

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα νανοσωματίδια γραφενίου καταστέλλουν την βακτηριακή ανάπτυξη ποικίλουν (**Εικόνα 1. 20**). Αρχικά νανοσωματίδια όπως το GO και το rGO χάρη στις αιχμηρές τους άκρες μπορούν να προκαλέσουν μηχανική βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων. Για παράδειγμα, οι Hu et al., παρατήρησαν ότι τα νανοφύλλα GO καταστρέφουν επιτυχώς τη μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων *E. Coli* <sup>113</sup>. Η ικανότητα αυτή των βακτηρίων εξαρτάται από την πυκνότητα της άκρης των νανοδομών και τη γωνία κατά την οποία το νανοσωματίδιο «συναντάει» το βακτηριακό κύτταρο. Παραδόξως όσο πιο μαλακή είναι η άκρη της δομής, τόσο πιο μεγάλη είναι η πυκνότητά της και έτσι τόσο πιο ισχυρή η αντιβακτηριακή δράση <sup>112</sup>. Άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου τα νανοσωματίδια γραφενίου δρουν έναντι των βακτηρίων, σχετίζεται με την επαγωγή οξειδωτικού στρες. Τα νανοσωματίδια μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή ΔΜΟ στα βακτηριακά κύτταρα το οποίο διαταράσσει τη δομή της κυτταρικής τους μεμβράνης και τελικά τα οδηγεί σε θάνατο. Τα GO και τα rGO φαίνεται να δρουν μέσω αυτού του μηχανισμού καταστέλλοντας την ανάπτυξη του *P. aeruginosa* <sup>114</sup> και του *E. coli* <sup>115</sup>. Άλλος σημαντικός και γνωστός αντιβακτηριακός μηχανισμός είναι η «παγίδευση» των βακτηριακών κυττάρων. Τα βακτήρια εγκλωβίζονται μεταξύ των δομών γραφενίου, απομονώνονται από το εξωτερικό περιβάλλον, στερούνται τροφής και τελικά πεθαίνουν. Η δράση αυτή φαίνεται να πραγματοποιείται κυρίως από

νανοδομές που βρίσκονται σε μορφή φύλλων και κυρίως από τα νανοφύλλα GO, και είναι ανάλογη του μεγέθους των νανοσωματιδίων <sup>116</sup>.



**Εικόνα 1. 20.** Μηχανισμοί μέσω των οποίων οι δομές γραφενίου καταστέλλουν την ανάπτυξη Gram + και Gram - βακτηρίων <sup>112</sup>.

Σπάνιες αντιβακτηριακές δράσεις των νανοϋλικών γραφενίου που έχουν συζητηθεί περιλαμβάνουν την αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια των βακτηριακών κυττάρων <sup>117</sup>. Επίσης φύλλα GO και γραφενίου φαίνεται ότι μπορούν να εισχωρήσουν στο εσωτερικό της βακτηριακής μεμβράνης και να προκαλέσουν εξαγωγή λιπιδίων <sup>118</sup>. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει ένας μηχανισμός που καλείται «επίδραση αυτοκτονίας» (“suicide effect”) σύμφωνα με τον οποίο τα βακτήρια αφαιρούν λειτουργικές ομάδες O<sub>2</sub> από τα GO και αδρανοποιούνται τα ίδια <sup>112,113</sup>.

#### 1.4.4. Το γραφένιο στη διαχείριση του ΣΔ

Οι παραπάνω εφαρμογές επιβεβαιώνουν την αξία του γραφενίου στην κλινική πρακτική. Ειδικά για τη διαχείριση του ΣΔ, οι ιδιότητες του γραφενίου έχουν αξιολογηθεί εκτενώς και δοκιμάζονται σε πλήθος ερευνών, ωστόσο οι περισσότερες από αυτές βρίσκονται ακόμη σε αρχικά στάδια. Το γραφένιο χάρη στις ιδιότητές του φαίνεται να είναι ιδανικό υλικό τόσο για την κατασκευή

καινοτόμων βιοαισθητήρων γλυκόζης όσο και για τη στοχευμένη μεταφορά των υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

#### **1.4.4.1. Βιοαισθητήρες ανίχνευσης γλυκόζης από γραφένιο**

Η οικογένεια των νανοϋλικών από γραφένιο και ιδιαίτερα το γραφένιο, το GO και το rGO, αποτελούν εξαιρετικούς υποψήφιους για την κατασκευή καινοτόμων ενζυμικών και μη ενζυμικών CGMs.

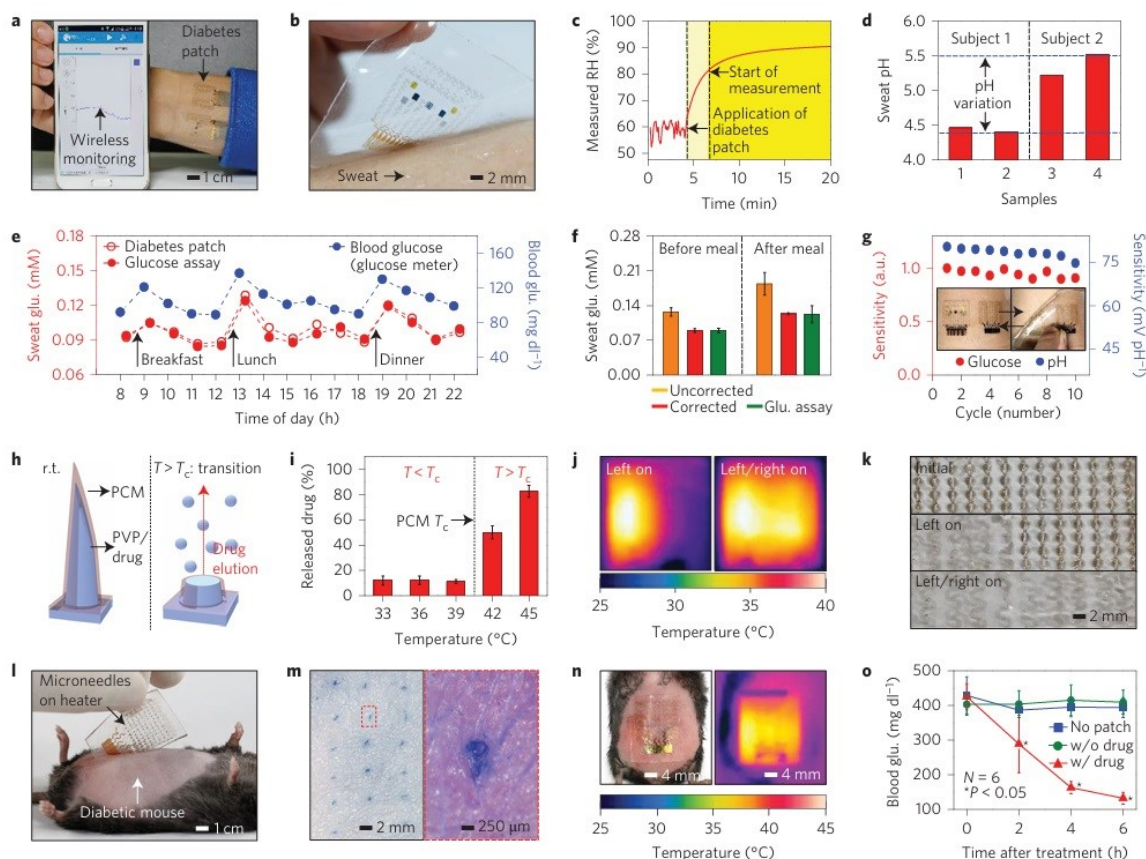
##### *Ενζυμικοί αισθητήρες γραφενίου*

Στη συνεχή έρευνα για την ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών επεμβατικών αισθητήρων αλλά και αισθητήρων που θα ανιχνεύουν τη γλυκόζη μη επεμβατικά, δοκιμάζονται και τα νανοϋλικά που έχουν ως βάση το γραφένιο. Οι δομές αυτές αποτελούν εξαιρετικό υπόστρωμα για την ακινητοποίηση της GOx και της GOD. Μάλιστα τα τελευταία χρόνια δοκιμάζεται ο συνδυασμός των νανοϋλικών γραφενίου με βιοσυμβατά υλικά όπως η κυτταρίνη για τη σύνθεση λιγότερο τοξικών και πιο αξιόπιστων αισθητήρων γλυκόζης <sup>45</sup>.

Για παράδειγμα, οι Wang et al., συνδύασαν μεσοκυτταρικό αφρό από πυρίτιο (MCF, mesocellular silicate foam) με rGO και συνέθεσαν έναν πειραματικό αισθητήρα ανίχνευσης της γλυκόζης μέσω της GOD, με υψηλή βιοσυμβατότητα (χάρη στο MCF) και εξαιρετική αγωγιμότητα (χάρη στον rGO σκελετό) <sup>119</sup>. Άλλη προσέγγιση αφορούσε τη δημιουργία αισθητήρα γλυκόζης με τρισδιάστατη αερογέλη πορώδους γραφενίου (3D porous graphene aerogel). Το σύστημα ανίχνευσης ήταν πολύ σταθερό και εμφάνισε υψηλή εκλεκτικότητα ως προς την γλυκόζη σε ανθρώπινα δείγματα ορού <sup>120</sup>. Ερευνητές δημιούργησαν επίσης μία πρωτοπόρα αναλυτική συσκευή από χαρτί (ePAD) χρησιμοποιώντας νανοϊνες κυτταρίνης (CN, cellulose nanofibers) και rGO. Ο αισθητήρας ανίχνευσε την γλυκόζη μέσω της GOx σε δείγματα αίματος με μεγάλη ευαισθησία <sup>121</sup>.

Όσον αφορά τη μη επεμβατική ανίχνευση της γλυκόζης, από τις καλύτερες ερευνητικές προσπάθειες για τη δημιουργία μη επεμβατικού ενζυμικού CGM γραφενίου μέχρι στιγμής φαίνεται να είναι η εργασία των Lee, et al. <sup>122</sup>. Η ερευνητική ομάδα κατάφερε να συνθέσει ένα καινοτόμο πειραματικό σύστημα για την ανίχνευση της γλυκόζης στον ιδρώτα και την ταυτόχρονη χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής. Επρόκειτο για ένα επίθεμα το οποίο ανίχνευε αποτελεσματικά τη γλυκόζη στον ιδρώτα μέσω της ακινητοποίησης της GOx σε ένα πλέγμα από χρυσό και «ντοπαρισμένο» με χρυσό γραφένιο και ηλεκτρόδιο μέτρησης από Ag/AgCl. Το σύστημα ολοκλήρωνε ένα λεπτό φιλμ συλλογής ιδρώτα, μικροβελόνες από πολυμερή για την χορήγηση του φαρμάκου, φιλμ αδιαβροχοποίησης και συστατικά για την ανίχνευση εξωτερικών παραμέτρων

όπως η υγρασία, το pH και το τρέμουλο. Όταν δοκιμάστηκε *in vivo* το σύστημα ήταν πολύ σταθερό, μέτρησε ορθά τη γλυκόζη στον ιδρώτα και οδήγησε σε αποτελεσματική υποδόρια χορήγηση της μετφορμίνης (Εικόνα 1. 21). Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας επιβεβαίωσαν την αξία του γραφενίου στις βιοϊατρικές εφαρμογές και ήταν πολύ ενθαρρυντικά καθώς θέτουν τα θεμέλια για την ανάπτυξη ενός «κλειστού» συστήματος διαχείρισης του ΣΔ<sup>45</sup>.



**Εικόνα 1. 21.** Απεικόνιση της λειτουργίας της φορέσιμης συσκευής των Lee et al., για την παρακολούθηση και θεραπεία του ΣΔ σε *in vivo* μοντέλο<sup>122</sup>.

### Μη ενζυμικοί αισθητήρες γραφενίου

Όπως αναφέρθηκε, οι μη ενζυμικοί αισθητήρες απαιτούν τη χρήση υλικών με άριστες ηλεκτροκαταλυτικές ιδιότητες που καταφέρνουν να οξειδώνουν την γλυκόζη χωρίς την χρήση διαμεσολαβητών. Τα νανοϋλικά γραφενίου και κυρίως το GO, το rGO και το γραφένιο αποτελούν πολύ καλά δοκιμασμένα υλικά για την κατασκευή μη ενζυμικών αισθητήρων ανίχνευσης της γλυκόζης, είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό με μέταλλα και οξείδια μετάλλων<sup>45</sup>.



Συχνά, πριν τη χρήση των νανοϋλικών γραφενίου σε τέτοιες εφαρμογές, προηγείται το «ντοπάρισμά» τους (Doping) με στοιχεία όπως το άζωτο (N), το θείο (S), το φθόριο (F) και το βόριο (B). Η τεχνική αυτή ενισχύει τις ηλεκτροκαταλυτικές ιδιότητες των νανοϋλικών. Από τα παραπάνω στοιχεία, το «ντοπάρισμα» με άζωτο (N- Doping) φαίνεται να είναι το ιδανικότερο καθώς ενισχύει την ηλεκτρική αγωγιμότητα του γραφενίου και την ικανότητα πρόσδεσής του και δημιουργεί περισσότερες ενεργές θέσεις. Οι Rahsepar et al., δοκίμασαν το «ντοπάρισμα» του γραφενίου με διαφορετικές ποσότητες πυριδινικού αζώτου (pyridinic N), πυρρολικού αζώτου (pyrrolic N) και τετρατικού αζώτου (quaternary N) και είδαν ότι αν και όλες οι δομές είχαν πολύ καλή απάντηση στη γλυκόζη, πιο αποτελεσματικός συνδυασμός ήταν αυτός του γραφενίου με πυριδινικό άζωτο. Ωστόσο το όριο ανίχνευσης όλων των δομών ήταν αρκετά περιορισμένο σε φυσιολογικό pH (7.4) <sup>123</sup>.

Αν και οι ηλεκτροκαταλυτικές ιδιότητες του γραφενίου είναι πολύ υψηλές, ο συνδυασμός του με μέταλλα, μεταλλικά κράματα ή/ και οξειδία μετάλλων φαίνεται να είναι μέχρι στιγμής η καλύτερη στρατηγική για την ανάπτυξη μη ενζυμικών αισθητήρων. Ο συνδυασμός αυτός προκαλεί συνεργιστικό αποτέλεσμα ("synergistic effect") που αυξάνει την ηλεκτροκαταλυτική δραστηριότητα του νανοϋλικού, την ευαισθησία αλλά και την εκλεκτικότητα ως προς τη γλυκόζη <sup>45</sup>

Στην κατεύθυνση αυτή έχουν δοκιμαστεί πολλοί διαφορετικοί συνδυασμοί. Τα πολύτιμα μέταλλα όπως η πλατίνα (Pt), ο χρυσός (Au), και το παλλάδιο (Pd), συνήθως αποφεύγονται καθώς το κόστος κατασκευής αυξάνεται σημαντικά. Ωστόσο φθηνότερα μεταβατικά μέταλλα όπως ο σίδηρος (Fe), το κοβάλτιο (Co), ο χαλκός (Cu) και το νικέλιο (Ni) δρουν εξίσου αποτελεσματικά.

Όσον αφορά τον σίδηρο, αν και το οξείδιό του,  $Fe_3O_4$ , είναι πολύ οικονομικό με καλές ηλεκτροχημικές ιδιότητες και οξειδώνει αποτελεσματικά τη γλυκόζη, έχει δοκιμαστεί σε ελάχιστες μελέτες ως προς τη μη ενζυμική ανίχνευση της γλυκόζης. Πρόσφατα οι Suyanta et al., κατασκεύασαν μη ενζυμικό αισθητήρα που είχε ως βάση νανοδομές  $Fe_3O_4$  και γραφενίου πάνω σε ηλεκτρόδιο GCE. Ο αισθητήρας τους ήταν εξαιρετικά εκλεκτικός ως προς την γλυκόζη και είχε μακροπρόθεσμη σταθερότητα καθώς η αμπερομετρική του απάντηση διατηρήθηκε σταθερή ακόμα και μετά από 14 ημέρες. Σε δείγματα αίματος νοθευμένα με  $KNO_3$  μέτρησε την γλυκόζη με υψηλή ακρίβεια συγκριτικά με έναν εμπορικό αισθητήρα <sup>124</sup>.

Με κοβάλτιο και γραφένιο δούλεψαν οι Chaiyo et al., οι οποίοι βασιζόμενοι στο γεγονός ότι οι φθαλοκυανίνες μετάλλων έχουν πολύ καλές ηλεκτροκαταλυτικές ιδιότητες και χρησιμοποιούνται ήδη ως μεσολαβητές στους ενζυμικούς αισθητήρες, κατασκεύασαν μία νανοδομή αποτελούμενη από φθαλοκυανίνη κοβαλτίου (CoPc) και γραφένιο. Με τη νανοδομή αυτή τροποποίησαν ένα ηλεκτρόδιο το οποίο τύπωσαν πάνω σε χάρτινο υπόστρωμα (PAD). Ο αισθητήρας

τους μέτρησε αποτελεσματικά τη γλυκόζη σε νοθευμένα με ηλεκτρολύτη δείγματα ορού αίματος υγιών ασθενών <sup>125</sup>.

Τα νανοϋλικά νικελίου είναι επίσης άριστοι καταλύτες στην οξείδωση της γλυκόζης χάρη στο σχηματισμό ενός ζεύγους οξειδοαναγωγής Ni (II)/ Ni (III) πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου σε ένα αλκαλικό διάλυμα. Ο συνδυασμός των νανοδομών αυτών με γραφένιο παρέχει ένα υβριδικό νανοσύστημα που διαθέτει εξαιρετική ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων <sup>45</sup>. Στην κατεύθυνση αυτή, οι Darvishi et al., κατασκεύασαν αισθητήρα από πορώδη τρισδιάστατη αερογέλη τροποποιημένη με μεθακρυλοϊκό οξύ ζελατίνης (gelatin methacryloyl, GelMA) συνδυασμένης με νανοσωματίδια νικελίου και rGO. Οι Xue et al., συνέθεσαν ένα υβριδικό υλικό από πολυμερείς αλυσίδες κυστεΐνης (poly(cysteine)) και υδροξείδιο του νικελίου (poly(cysteine)-Ni(OH)<sub>2</sub>) και το ενσωμάτωσαν σε τροποποιημένο από γραφένιο ηλεκτρόδιο GCE. Οι δύο αυτοί αισθητήρες είχαν καλή απόκριση στη γλυκόζη σε νοθευμένα δείγματα ανθρώπινου αίματος. Επίσης έχει δοκιμαστεί και ο συνδυασμός νανοσωματιδίων γραφενίου και Ni/NiO σε διαφορετικό βαθμό οξείδωσης (mixed- valence states). Οι διαφορετικές οξειδωτικές καταστάσεις αυξάνουν την αγωγιμότητα και την κινητική και δυναμική της κατάλυσης.

Καινοτόμος είναι και ο συνδυασμός δύο διαφορετικών μεταβατικών μετάλλων ή οξειδίων μεταβατικών μετάλλων σε μία νανοδομή γραφενίου. Μαζί, τα τρία αυτά στοιχεία δρουν συνεργιστικά βελτιώνοντας την αγωγιμότητα, την ευαισθησία και τη σταθερότητα του συστήματος. Δύο διαφορετικές ερευνητικές ομάδες χρησιμοποίησαν νανοφύλλα νικελίου και κοβαλτίου τα οποία συνδύασαν με νανοδομές γραφενίου. Η πρώτη ομάδα ενσωμάτωσε τα NiCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub> νανοφύλλα σε N-Doped rGO <sup>126</sup> ενώ η δεύτερη σε GO <sup>127</sup>. Οι δύο αισθητήρες μέτρησαν με υψηλή ακρίβεια τη γλυκόζη ωστόσο ο πρώτος δοκιμάστηκε σε καθαρά ανθρώπινα δείγματα, ενώ ο δεύτερος σε νοθευμένα με γλυκόζη δείγματα.

Ο συνδυασμός νικελίου και χαλκού σε τροποποιημένο ηλεκτρόδιο γραφενίου δοκιμάστηκε επίσης από τους Cui et al., και οδήγησε στην ανάπτυξη ενός αισθητήρα με καλή απόκριση στη γλυκόζη σε αραιωμένα δείγματα ορού αίματος <sup>128</sup>.

#### **1.4.4.2. Νανοφορείς γραφενίου για τη χορήγηση αντιδιαβητικών φαρμάκων**

Μέχρι στιγμής η μετφορμίνη, το φάρμακο εκλογής για τον Τ2ΣΔ, χορηγείται εκ του στόματος με τη μορφή χαπιού. Ωστόσο έχει χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα (50-60%) και μικρό χρόνο ημίσειας ζωής το οποίο απαιτεί συχνότερη χορήγηση και λήψη αρκετά υψηλών δόσεων από τους διαβητικούς ασθενείς. Συν τοις άλλοις, πολλοί ασθενείς μετά τη λήψη του φαρμάκου βιώνουν ανεπιθύμητες ενέργειες από το

πεπτικό σύστημα όπως ναυτία, κοιλιακό άλγος και δυσπεψία <sup>129</sup>. Προκειμένου να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί, ερευνάται τα τελευταία χρόνια η διαδερμική χορήγηση της μετφορμίνης. Κυρίως δοκιμάζεται η χορήγηση της μέσω ειδικών μικροβελόνων και υδρογελών που απελευθερώνουν το φάρμακο μέσω απόκρισης στη θερμότητα. Οι δομές γραφενίου αποτελούν αποτελεσματικά δομικά στοιχεία τέτοιων νανοφορέων για τη διαδερμική χορήγηση του φαρμάκου.

Οι Chegnan et al., συνέθεσαν δύο διαφορετικές καινοτόμες υδρογέλες για την απελευθέρωση του αντιδιαβητικού φαρμάκου υδροχλωρική μετφορμίνη χρησιμοποιώντας ως cross- linker GO ή rGO-COOCH. Σε *in vitro*, *in vivo* και *ex vivo* μοντέλα, διαπίστωσαν ότι μέσω του συστήματος, η μετφορμίνη μεταφέρεται επιτυχώς δια μέσου του δέρματος, διατηρώντας τη δραστηριότητά της. Η απελευθέρωση του φαρμάκου πραγματοποιήθηκε μέσω φωτοθερμικής θέρμανσης <sup>129</sup>.

Οι Sarkar et al., είχαν άλλη προσέγγιση και έφτιαξαν νανοφορείς από GOQD (graphene oxide quantum dots) και υαλουρονικό οξύ για τη στοχευμένη μεταφορά της μετφορμίνης στον υποδοχέα CD44 των μακροφάγων. Ο υποδοχέας αυτός υπερεκφράζεται σε καταστάσεις αντίστασης στην ινσουλίνη και φλεγμονής. Τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, οι νανοφορείς μείωσαν την έκφραση προφλεγμονωδών κυτοκινών και αποκατέστησαν την οξειδωτική ισορροπία σε μικρότερες δόσεις από ότι η σκέτη μετφορμίνη. Οι νανοφορείς αύξησαν την αποτελεσματικότητα της μετφορμίνης όχι μόνο χάρη στη στοχευμένη μεταφορά της αλλά και από μόνοι τους καθώς τόσο το υαλουρονικό οξύ όσο και τα GOQD έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες <sup>130</sup>.

## 1.5. Συστήματα εγκλωβισμού υπογλυκαιμικών ουσιών

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η τρέχουσα φαρμακευτική προσέγγιση για την αντιμετώπιση του ΣΔ περιλαμβάνει κυρίως την υποδόρια χορήγηση ινσουλίνης και αναλόγων ινσουλίνης ή τη χορήγηση υπογλυκαιμικών φαρμάκων από το στόμα ή υποδορίως. Παρότι πλέον στην αγορά υπάρχει μεγάλη ποικιλία αντιδιαβητικών ουσιών, δεν έχει σχεδιαστεί ακόμη μία ολοκληρωμένη και αποτελεσματική θεραπευτική στρατηγική για τη διαχείριση του ΣΔ. Αυτό οφείλεται στις ενδογενείς ελλείψεις των φαρμάκων, στις ανεπιθύμητες ενέργειες που προκαλούν αλλά και στα μειονεκτήματα που εμφανίζουν οι συμβατικές οδοί χορήγησης.

Αρχικά, η μακροχρόνια χορήγηση ενέσιμης ινσουλίνης είναι δυσάρεστη, επίπονη, επιφέρει ανεπιθύμητες ενέργειες όπως ο ερεθισμός στο σημείο της ένεσης και η

λιποδυστροφία και συνολικά μειώνει την ποιότητα ζωής του διαβητικού ασθενούς. Από την άλλη πλευρά, η εκ του στόματος χορήγηση υπογλυκαιμικών ουσιών επιφέρει ανεπιθύμητες ενέργειες από το γαστρεντερικό σύστημα και αδυνατεί να πετύχει τη βέλτιστη συγκέντρωση του φαρμάκου που απαιτείται στις περιοχές- στόχους, λόγω του χαμηλού pH και της ενζυμικής αποικοδόμησης των φαρμάκων από το πεπτικό σύστημα. Άλλα προβλήματα περιλαμβάνουν τον μικρό χρόνο ημιζωής των υπογλυκαιμικών παραγόντων στο πλάσμα, το στενό θεραπευτικό παράθυρο, τη μικρή βιοδιαθεσιμότητα και τη μη συμμόρφωση του ασθενούς. Επιπλέον, οι συμβατικές μορφές χορήγησης και δοσολογίας δεν μπορούν να προσαρμοστούν «έξυπνα» και άμεσα στις διακυμάνσεις της γλυκόζης και αυτό οδηγεί σε υψηλό κίνδυνο εμφάνισης επεισοδίων υπο- και υπερ-γλυκαιμίας· εξάλλου δεν μπορούν εύκολα να ενσωματωθούν σε ένα μη επεμβατικό πλήρως αυτοματοποιημένο «κλειστό» σύστημα για τη διαχείριση του ΣΔ.

Επομένως, πέρα από τον σχεδιασμό καλύτερων αισθητήρων γλυκόζης, καθίσταται αναγκαία και η εύρεση νέων, πιο αποτελεσματικών και εύχρηστων συστημάτων χορήγησης των αντιδιαβητικών φαρμάκων. Οι ιδιότητες των νανοϋλικών και η ικανότητά τους να δρουν αποτελεσματικά στη μεταφορά φαρμάκων, έστρεψε το ενδιαφέρον των ερευνητών στη χρήση τους ως νανοφορείς για τη θεραπεία του ΣΔ. Οι νανοφορείς αυτοί έχουν δοκιμαστεί μέχρι στιγμής μόνο *in vitro* και *in vivo*, αλλά φαίνεται ότι προστατεύουν τα υπογλυκαιμικά φάρμακα από την ενζυμική αποικοδόμηση στο στομάχι, βελτιώνουν τη σταθερότητά τους και αυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητά τους, ενώ παράλληλα μειώνουν τον κίνδυνο υπο-γλυκαιμίας. Επίσης προσφέρουν πιο στοχευμένη μεταφορά του φαρμάκου στις επιθυμητές περιοχές και μειώνουν έτσι τις μακροπρόθεσμες ανεπιθύμητες ενέργειες <sup>131</sup>. Νανοδομές όπως τα νανογαλακτώματα μπορούν να προσφέρουν εναλλακτικές οδούς χορήγησης των υπογλυκαιμικών φαρμάκων όπως είναι η διαδερμική. Οι νέες πλατφόρμες χορήγησης των φαρμάκων μπορούν να συμμετέχουν σε έξυπνα αυτοματοποιημένα κλειστά συστήματα που μιμούνται την ενδογενή χορήγηση της ινσουλίνης και προσφέρουν αποτελεσματικότερο γλυκαιμικό έλεγχο και καλύτερη συμμόρφωση του ασθενούς. Οι σημαντικότερες κατηγορίες νανοϋλικών που έχουν δοκιμαστεί για τον εγκλωβισμό υπογλυκαιμικών ουσιών και κάποια αξιολογικά παραδείγματα από κάθε κατηγορία αναπτύσσονται παρακάτω.

### **1.5.1. Πολυμερικά νανοσωματίδια**

Τα πολυμερικά νανοσωματίδια που δρουν ως φορείς φαρμάκων περιλαμβάνουν τις νανοκάψουλες (nanocapsules) και τις νανοσφαίρες (nanospheres). Οι νανοκάψουλες είναι κυστοειδείς δομές στις οποίες οι φαρμακευτικές ουσίες

εγκλωβίζονται εντός του πολυμερικού κελύφους. Οι νανοσφαίρες είναι στερεές μάζες με πολυμερική μήτρα και τα φάρμακα εγκλωβίζονται στο κέντρο τους ή απορροφώνται στην επιφάνεια της σφαίρας<sup>132</sup>. Οι δύο αυτές δομές είναι χρήσιμες τόσο για την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των φαρμάκων κατά τη χορήγηση από το στόμα όσο και για τη διαδερμική χορήγηση των υπογλυκαιμικών ουσιών. Όσον αφορά την πρώτη περίπτωση, οι Wu et al., κατασκεύασαν PEG-νανοσωματίδια στα οποία ενσωμάτωσαν τον μεταβολίτη της μικροχλωρίδας, βουτυρικό οξύ, για τη χορήγηση της ινσουλίνης εκ του στόματος. Χάρη στον μεταβολίτη αυτό, βελτιώθηκε η ενδοεπιθηλιακή μεταφορά και η εντερική απορρόφηση της ινσουλίνης. Μάλιστα σε *in vivo* μοντέλο διαβητικών επιμυών το σύστημα χορήγησης μείωσε αποτελεσματικά τη γλυκόζη του αίματος και η βιοδιαθεσιμότητα της ινσουλίνης ήταν σημαντικά αυξημένη<sup>133</sup>.

Όσον αφορά τη διαδερμική χορήγηση υπογλυκαιμικών φαρμάκων με νανοπολυμερή, έχουν δοκιμαστεί διαφορετικές τεχνικές. Για παράδειγμα, οι Zhang et al., κατασκεύασαν πολυμερικές μικροβελόνες τις οποίες επένδυσαν με PDA/ LA (polydopamine/ lauric acid) για την απελευθέρωση της μετφορμίνης έπειτα από κάποιο φωτοθερμικό ερέθισμα. Σε *in vitro* μοντέλο με διαβητικούς επίμυες, οι μικροβελόνες εισχώρησαν στο δέρμα χωρίς να προκαλέσουν τοξικότητα στους ιστούς και προκάλεσαν σημαντική αντιδιαβητική δράση<sup>134</sup>.

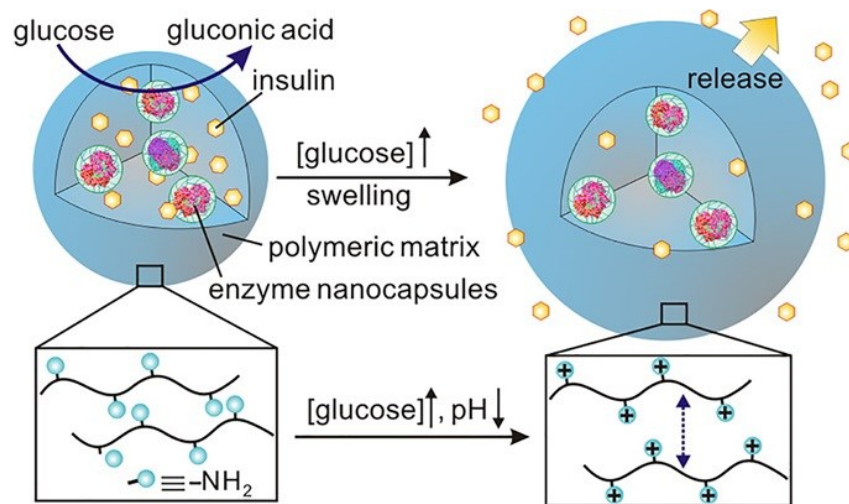
### 1.5.2. Νανολιποσώματα

Τα λιποσώματα αποτελούνται από φωσφολιπίδια και αποτελούν καλά μελετημένους νανοφορείς φαρμάκων καθώς χάρη στη διττή τους φύση μπορούν να εγκλωβίζουν τόσο υδρόφιλα όσο και υδρόφοβα μόρια. Τα φάρμακα μπορούν να ενσωματωθούν στον υδρόφιλο πυρήνα στο εσωτερικό των λιποσωμάτων ή στις υδρόφοβες διπλές στιβάδες λιπιδίων ή ακόμη να δεσμευτούν στην επιφάνεια του κυστιδίου. Οι λιπιδικοί νανοφορείς έχουν υψηλή βιοσυμβατότητα, είναι βιοαποικοδομήσιμοι και παράλληλα προστατεύουν τις φαρμακευτικές ουσίες από την ενζυμική αποικοδόμηση αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητά τους στον οργανισμό. Οι Wang et al., σχεδίασαν πρωτεϊνικά λιποσώματα κορόνας (protein corona liposomes, PcCLs) στα οποία εγκλώβισαν ινσουλίνη και παρατήρησαν σε *in vitro* και *in vivo* δοκιμές ότι οι νανοδομές αυτές κατάφεραν να διαπεράσουν επιτυχώς τους φραγμούς της βλέννας και του επιθηλίου και έτσι να βελτιώσουν σημαντικά την εκ του στόματος βιοδιαθεσιμότητα της ινσουλίνης. Σε αρουραίους με T1ΣΔ η χορήγηση των PcCLs είχε σημαντική υπογλυκαιμική δράση και αύξησε τη βιοδιαθεσιμότητα της ινσουλίνης κατά 12%<sup>135</sup>. Οι Joshi et al., αξιοποιώντας τη μικρορευστονική τεχνολογία (microfluidics) κατασκεύασαν λιποσώματα στα οποία εγκλώβισαν ταυτόχρονα την υδρόφιλη μετφορμίνη και τη λιπόφιλη γλιπιζίδη. Η παράλληλη απελευθέρωση των δύο φαρμάκων ήταν πιο γρήγορη συγκριτικά με την απελευθέρωση κάθε φαρμάκου χωριστά, κάτι που υποδηλώνει

συνέργεια των δύο ουσιών στα λιποσώματα <sup>136</sup>. Πρόσφατα, οι Mohamed et al., κατασκεύασαν σταθερά φιλμ λιποσωμάτων επικαλυμμένα με χιτοζάνη για τη διαδερμική χορήγηση της γλιπιζίδης. Σε *in vivo* πειράματα παρατήρησαν ότι η φαρμακοκινητική του φαρμάκου μετά από διαδερμική χορήγηση ήταν υποσχόμενη και *ex vivo* φάνηκε ότι η γλιπιζίδα διαπέρασε με μεγάλη ευκολία το δέρμα των αρουραίων <sup>137</sup>.

### 1.5.3. Νανοϋδρογέλες

Οι νανοϋδρογέλες είναι τρισδιάστατες πολυλειτουργικές δομές που αποτελούνται από διασταυρωμένα συστήματα πολυμερών. Συνδυάζουν τις ιδιότητες της υδρογέλης και των νανοσωματιδίων και έχουν την ικανότητα να απορροφούν μεγάλες ποσότητες υγρού. Το υγρό που απορροφούν λειτουργεί ως μέσο για τη διάλυση άλλων διαλυτών. Οι νανοϋδρογέλες είναι ιδανικοί φορείς φαρμάκων καθώς είναι βιοσυμβατές και έχουν την ικανότητα να εγκλωβίζουν τόσο υδρόφιλες όσο και υδρόφοβες ουσίες, ανεξαρτήτως του μοριακού τους βάρους. Εντυπωσιακό τους χαρακτηριστικό είναι ότι έχουν την ικανότητα να «απαντούν» σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα με αλλαγές στη δομή τους. Λειτουργούν έτσι σαν διακόπτες «on»/ «off» και αναλόγως με το ερέθισμα συρρικνώνονται ή μεγενθύνονται. Τέτοια ερεθίσματα περιλαμβάνουν αλλαγές στο pH, τη θερμοκρασία, την ιονική δύναμη ή το μαγνητικό πεδίο <sup>138</sup>. Οι ιδιότητές τους αυτές τις καθιστούν ιδανικά συστατικά ενός «έξυπνου» συστήματος διαχείρισης του ΣΔ καθώς μπορούν να χορηγήσουν ελεγχόμενα προ-φορτωμένα αντιδιαβητικά φάρμακα ως απάντηση σε κάποιο ερέθισμα. Επιπλέον, προστατεύουν τα φάρμακα από την ενζυμική αποικοδόμηση και τα οδηγούν σε συγκεκριμένα σημεία- στόχους <sup>131</sup>. Οι Gu et al., σχεδίασαν μία ενέσιμη νανογέλη για την ελεγχόμενη απελευθέρωση της ινσουλίνης ως απάντηση σε αύξηση της γλυκόζης. Το σύστημα περιλάμβανε μεμβράνη χιτοζάνης που απαντάει σε αλλαγές του pH και νανοκάψουλες με GOx. Η μετατροπή της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ από την GOx, οδήγησε σε πρωτονίωση των αλυσίδων χιτοζάνης και τελικά απελευθέρωση της ινσουλίνης (**Εικόνα 1. 22**). Λειτουργώντας ως αυτορρυθμιζόμενη βαλβίδα, η νανογέλη προσαρμόστηκε κατάλληλα ώστε να απελευθερώνει την ινσουλίνη σε βασικούς ρυθμούς κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και σε ταχύτερους ρυθμούς υπό υπεργλυκαιμικές συνθήκες. Σε *in vivo* μοντέλο μυών με ΣΔΤ1 το μοντέλο αυτό φάνηκε να δρα πολύ αποτελεσματικά <sup>139</sup>.



**Εικόνα 1. 22.** Σχηματική αναπαράσταση μίας νανογέλης για τον εγκλωβισμό της ινσουλίνης. Η GOx καταλύει τη μετατροπή της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ. Αυτό οδηγεί σε πρωτονίωση των πολυμερικών αλυσίδων, διόγκωση της νανογέλης και απελευθέρωση της ινσουλίνης <sup>139</sup>.

#### 1.5.4. SLNs

Τα νανοσωματίδια σταθερών λιπιδίων (SLNs) έχουν συνήθως στρογγυλό σχήμα και αποτελούνται από σταθερά λιπίδια. Είναι αποτελεσματικοί νανοφορείς και μπορούν είτε να ενσωματώσουν τα φάρμακα στον συμπαγή πυρήνα τους είτε να τα προσαρτήσουν στην επιφάνεια της μήτρας <sup>140</sup>. Οι Vijayan *et al.*, εγκλώβισαν τη ρεπαγλινίδη σε SLNs και ενσωμάτωσαν τα SLNs σε επιθέματα για τη διαδερμική χορήγηση του φαρμάκου. Οι *in vitro*, *in vivo* και *ex vivo* μελέτες τους έδειξαν καλή απελευθέρωση του φαρμάκου από τα SLNs και μείωση της γλυκόζης του αίματος σε διαβητικούς επίμυες η οποία διατηρήθηκε σε χαμηλά επίπεδα για περισσότερες από 48 ώρες <sup>141</sup>. Δοκιμάστηκε επίσης ο εγκλωβισμός της γλιβενκλαμίδης σε SLNs, από την ερευνητική ομάδα των Elbahwy *et al.* Η εκ του στόματος χορήγηση των SLNs με γλιβενκλαμίδη σε επίμυες, μείωσε άμεσα και σημαντικά τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος και μάλιστα η δράση αυτή διατηρήθηκε για μεγάλο χρονικό διάστημα <sup>142</sup>. Με τη χρήση των νανοφορέων SLNs βελτιώθηκε και η διαλυτότητα και βιοδιαθεσιμότητα από το στόμα του φαρμάκου γλιβουρίδη. Τα SLNs με τη γλιβουρίδη είχαν καλύτερη αντιδιαβητική δράση σε διαβητικούς επίμυες απ' ό,τι η φαρμακευτική ουσία από μόνη της. Επιπλέον, ιστοπαθολογική ανάλυση αποκάλυψε την υψηλή βιοσυμβατότητα των νανοφορέων <sup>143</sup>.

#### 1.5.5. NLCs

Οι νανοδομημένοι φορείς λιπιδίων (NLCs) αποτελούν λιπιδικούς νανοφορείς 2<sup>ης</sup> γενιάς μετά τα SLNs, και προσφέρουν μία καινοτόμα τεχνολογία για τη μεταφορά φαρμάκων <sup>140</sup>. Αποτελούνται από βιοσυμβατά στερεά και υγρά λιπίδια,

επιφανειοδραστικές ουσίες και συμπαράγοντες και όπως τα λιποσώματα έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν τόσο υδρόφιλα όσο και λιπόφιλα φάρμακα. Μέσω των NLCs καθίσταται δυνατή η χορήγηση των φαρμάκων από εναλλακτικές οδούς όπως η διαδερμική <sup>144</sup>. Οι Sohrab Alam et al., υποστήριξαν ότι η αξιοποίηση των NLCs για τη διαδερμική χορήγηση του υπογλυκαιμικού φαρμάκου πιογλιταζόνη είναι πολλά υποσχόμενη καθώς σε *in vivo* μελέτες παρατηρήθηκε αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας του φαρμάκου. Επιπλέον τα επίπεδα του σακχάρου στο αίμα μειώθηκαν με σταθερό μοτίβο για παρατεταμένη χρονική περίοδο συγκριτικά με την εμπορική μορφή του φαρμάκου που χορηγείται εκ του στόματος <sup>145</sup>. Πιογλιταζόνη εγκλώβισαν σε NLCs και οι Ilyas et al. και παρατήρησαν σταθερή απελευθέρωση του φαρμάκου, ωστόσο δεν προχώρησαν σε *in vivo* αξιολόγηση του συστήματος <sup>146</sup>.

### 1.5.6. Νανογαλακτώματα

Τα νανογαλακτώματα είναι κολλοειδή συστήματα που μπορούν να ενσωματώνουν ποικίλες δραστικές ουσίες. Στη διαχείριση του ΣΔ φαίνεται να είναι αποτελεσματικά ενισχύοντας τη βιοδιαθεσιμότητα των υπογλυκαιμικών ουσιών στην εκ του στόματος χορήγηση αλλά και προσφέροντας την εναλλακτική διαδερμική οδό χορήγησης των υπογλυκαιμικών φαρμάκων <sup>132,147</sup>. Οι Akhtar et al., σχεδίασαν με έναν εύκολο τρόπο νανογαλακτώματα με ρεπαγλινίδη και τα χορήγησαν σε διαβητικούς αρουραίους σε τρία διαφορετικά θεραπευτικά σχήματα. Η απελευθέρωση της ρεπαγλινίδης από τα νανογαλακτώματα ήταν σημαντικά υψηλή (98.22%) εντός 24 ωρών και τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα μειώθηκαν σημαντικά *in vivo* και αναλογικά με τη δόση του κάθε θεραπευτικού σχήματος <sup>148</sup>. Οι Razzaq et al., εγκλώβισαν τη γλιμεπιριδίνη σε νανογαλακτώματα που συνέθεσαν από Tween-80, PEG-400, κόμμι ξανθάνης και γαρυφαλέλαιο. Σε διαβητικό μοντέλο επιμυών Wistar, παρατήρησαν ότι μέσω των νανογαλακτωμάτων το φάρμακο απορροφήθηκε ικανοποιητικά από το δέρμα παρέχοντας την υπογλυκαιμική του δράση. Η αντιδιαβητική δράση του φαρμάκου μάλιστα φαίνεται να ενισχύθηκε από την παρουσία του γαρυφαλελαίου <sup>149</sup>. Οι Ali et al., παρασκεύασαν σταθερό νανογαλακτώμα από ελαϊκό οξύ, ισοπροπυλική αλκοόλη, Tween80 και νερό για τη διαδερμική απελευθέρωση της ινσουλίνης και παρατήρησαν πολύ καλή βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου σε αρουραίους Albino Wister <sup>150</sup>.

### 1.5.7. Νιοσώματα

Τα νιοσώματα (niosomes) αποτελούν κυστοειδείς νανοφορείς φαρμάκων που έχουν ως βάση μη- ιονικούς επιφανειοδραστικούς παράγοντες. Έχουν διττή φύση



με υδρόφιλες κεφαλές και υδρόφοβες άκρες και έτσι μπορούν να εγκλωβίζουν τόσο υδρόφοβα όσο και υδρόφιλα φάρμακα <sup>151</sup>. Οι Mohsen et al., χρησιμοποίησαν νιοσώματα για τον εγκλωβισμό της γλιμεπιρίδης και αύξησαν την βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου. Μάλιστα σε διαβητικό μοντέλο επιμύων, το εγκλωβισμένο σε νιοσώματα φάρμακο είχε καλύτερη και πιο παρατεταμένη υπογλυκαιμική δράση σε σχέση με το εμπορικό προϊόν <sup>152</sup>. Οι Prasad et al., εγκλώβισαν την πιογλιταζόνη σε νιοσώματα για τη διαδερμική χορήγηση του φαρμάκου και είδα σημαντική αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς της. Επίσης, σε *in vivo* μοντέλο τα νιοσώματα πιογλιταζόνης είχαν ισχυρότερη αντιδιαβητική δράση από το αντίστοιχο εμπορικό προϊόν <sup>153</sup>.

### **1.5.8. Τρανσεθοσώματα και τρανσφεροσώματα**

Τα τρανσεθοσώματα (transethosomes) είναι τροποποιημένα και βελτιωμένα εθοσώματα που καθιστούν πιο εύκολη τη διαδερμική χορήγηση φαρμάκων. Τα τρανσφεροσώματα (transfersomes) αποτελούν τροποποιημένες μορφές των λιποσωμάτων και χαρακτηρίζονται από μία διπλοστιβάδα λιπιδίων που εσωκλείει τουλάχιστον ένα εσωτερικό υδατικό διαμέρισμα <sup>132</sup>. Υπάρχουν λίγες αναφορές για τον εγκλωβισμό υπογλυκαιμικών φαρμάκων σε αυτές τις νανοδομές και δεν έχουν προχωρήσει σε *in vivo* δοκιμές για τον ΣΔ. Τα τρανσεθοσώματα δοκιμάστηκαν από τους Mishra et al., για την διαδερμική χορήγηση του φυσικού υπογλυκαιμικού παράγοντα υδροχλωρική βερβερίνη (berberine hydrochloride) <sup>154</sup>. Οι Chauhan et al., εγκλώβισαν τη γλιμεπιρίδίνη σε τρανσφεροσώματα και πέτυχαν υψηλή απελευθέρωση του φαρμάκου <sup>155</sup>.



## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο ΣΔ είναι μία χρόνια μεταβολική διαταραχή που επηρεάζει την ομοιοστασία της γλυκόζης στον οργανισμό. Τα τελευταία χρόνια τα περιστατικά ΣΔ, ειδικά σε νεαρές ηλικίες, αυξήθηκαν δραματικά και η νόσος τείνει να εξελιχθεί σε επιδημία του σύγχρονου κόσμου. Ο ΣΔ αποτελεί πλέον ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα της δημόσιας υγείας παγκοσμίως.

Η εξέλιξη της Νανοεπιστήμης και της Νανοτεχνολογίας έδωσε ελπίδα στην αντιμετώπιση της νόσου και συνέβαλε σημαντικά στη διαχείρισή της. Ωστόσο, μέχρι στιγμής δεν έχει καταφέρει να προτείνει ριζικές παρεμβάσεις που βελτιώνουν οριστικά την ποιότητα ζωής των πασχόντων από την ασθένεια. Συν τοις άλλοις, παρά τα πλεονεκτήματα της Νανοτεχνολογίας στην Ιατρική, υπάρχουν ορισμένες αρνητικές πτυχές που αφορούν την πιθανή τοξικότητα κατά τη σύνθεση ή τη χρήση των νανοϋλικών στις βιοϊατρικές εφαρμογές.

Από τα νανοϋλικά, το γραφένιο ξεχώρισε νωρίς χάρη στις αξιοθαύμαστες ιδιότητές του οι οποίες είναι εξαιρετικά χρήσιμες στην Ιατρική. Ωστόσο, η τεχνική που ακολουθείται για την αποφυλλοποίηση του γραφενίου από γραφίτη απαιτεί τη χρήση τοξικών διαλυτών που έχουν αρνητική επίδραση στα ζωντανά οικοσυστήματα.

Η ανάγκη για την εύρεση πιο φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων για τη σύνθεση των νανοϋλικών οδήγησε στην ανάπτυξη «πράσινων» τεχνικών για την αποφυλλοποίηση του γραφίτη. Όμως ακόμη δεν έχει διευκρινιστεί η βιοσυμβατότητα των «πράσινων» αυτών νανοϋλικών.

Η παρούσα διατριβή εστίασε στην εξέταση της τοξικότητας διαφορετικών νανοϋλικών γραφενίου τα οποία συντέθηκαν είτε μέσω συμβατικών μεθόδων με τη χρήση χημικών διαλυτών, είτε με αξιοποίηση των τεχνικών της «πράσινης» χημείας. Στόχος της διατριβής ήταν να διερευνήσει εάν η βιολογική αποφυλλοποίηση παράγει πιο βιοσυμβατά υλικά και κατά συνέπεια πιο κατάλληλα για βιοϊατρικές εφαρμογές, όπως για την κατασκευή ευαίσθητων αισθητήρων ανίχνευσης της γλυκόζης.

Πέραν αυτού, στη διατριβή εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια καινοτόμων νανογαλακτωμάτων υπογλυκαιμικών ουσιών για τη διαδερμική χορήγηση των υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Η ασφαλής χρήση των προϊόντων της Νανοτεχνολογίας στην Ιατρική δύναται να δώσει οριστικές λύσεις στη διαχείριση χρόνιων ασθενειών όπως ο ΣΔ.



# **ΜΕΡΟΣ ΙΙ. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## 3. ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1. Μελέτες *in vitro*

#### 3.1.1. Χημικά και αντιδραστήρια

- 2', 7' -Dichlorofluorescein diacetate, ≥97% (DCFDA), D6885, Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- a Tubulin (B-7) HRP mouse monoclonal IgG, sc- 5286, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
- Acrylamide/ Bis-acrylamide, 30% solution, A3699, Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Ammonium persulfate, A3678, Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Annexin V binding buffer, 422201, BioLegend Inc. (San Diego, CA, USA)
- Anti- rabbit IgG, HRP-linked Antibody, 7074, Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)
- Bovine serum albumin (BSA, 98% Fraction V), Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Clarity Western ECL Substrate, 1705061, Bio- Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
- Crystal Violet, C3886, Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Dimethyl Sulfoxide, Certified AR for Analysis, D/4121/PB15, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
- Deoxycholic acid, D- 6750, Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium High glucose, D6429, Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Ethanol Absolute, 107017, Supelco- Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Fetal bovine serum (FBS), P4737500, PAN BIOTECH (Aidenbach, Germany)
- FITC Annexin V, 640906, BioLegend Inc. (San Diego, CA, USA)

- Glutaraldehyde, 25% aq. Soln., A17876, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
- Glycine, 33226 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Hanks' Balanced Salts Solution (HBSS), LM-S2034, Biosera (Nuaille, France)
- HO-1 (E3F4S) Rabbit mAb, 43966, Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)
- L- Glutamine, X0550, Biowest (Riverside, CA, USA)
- Laemmli-Lysis buffer, 38733, Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- m- IgGk BP-HRP, HRP conjugated, sc- 516102, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
- Methanol Puriss p.a., 32213, Honeywell (Charlotte, NC, USA)
- N, N, N', N'- Tetramethyl- ethylenediamine (TEMED), T9281, Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- N, N-Dimethylformamide (DMF), L091000, Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- NF- kB p65 (D14E12) XP Rabbit mAb, 8242, Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)
- NRF2 (D1Z9C) XP Rabbit mAb, 12721, Cell Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)
- PageRuler plus Prestained Protein Ladder, 16619, Thermofisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
- Penicillin–Streptomycin, L0022, Biowest (Riverside, CA, USA)
- Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), >99%, P7626, Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Phorbol 12- myristate 13- acetate (PMA), 500582, Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Phosphate Buffer Saline (PBS), P4417, Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)



- Pierce BCA Protein Assay Kit, 23227, ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
- Ponceau S staining solution, P7170, Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Propidium Iodide (PI), 421301, BioLegend Inc. (San Diego, CA, USA)
- Protease & phosphatase inhibitor cocktail, PPC1010, Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Ribonuclease A from bovine pancreas (RNaseA), R4642, Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- RPMI-1640 Medium, R1780, Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Sodium dodecyl sulfate, approx. 95% based on total alkyl sulfate content, L5750, Sigma- Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)
- Sodium dodecyl sulfate, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), P7626, Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), M5655, Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Triton X, BP151, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
- Trizma base, T1503, Sigma- Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
- Trypsin- EDTA, L0940, Biowest (Riverside, CA, USA)
- Tween 20, BP337, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)

### 3.1.2. Νανοϋλικά γραφενίου

Στις *in vitro* μελέτες αξιολογήθηκαν ως προς την τοξικότητά τους έξι διαφορετικά νανοϋλικά που έχουν ως βάση το γραφένιο. Πρόκειται για το γραφένιο, το «ντοπαρισμένο με άζωτο» γραφένιο (N- Doped graphene) και το νιτρικό γραφένιο (Nitrate graphene). Κάθε νανοϋλικό συντέθηκε με δύο διαφορετικούς τρόπους. Ο πρώτος τρόπος αφορά την κλασσική αποφυλλοποίηση του γραφενίου από γραφίτη με τη χρήση χημικών διαλυτών όπως το DMF και το DMSO. Κατά τον δεύτερο τρόπο, η αποφυλλοποίηση πραγματοποιήθηκε μόνο με τη χρήση βιολογικών διαλυτών όπως είναι το ddH<sub>2</sub>O και οι πρωτεΐνες (π.χ. BSA) <sup>156</sup>. Έτσι προέκυψαν έξι διαφορετικά νανοϋλικά τα οποία αξιολογήθηκαν ως προς την

τοξικότητά τους σε ζεύγη, προκειμένου να συγκριθεί η βιοσυμβατότητα της βιολογικής με αυτή της χημικής δομής (Πίνακας 3. 1). Οι δομές γραφενίου που προέκυψαν από την αποφυλλοποίηση του γραφίτη με τη χρήση χημικών διαλυτών παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Κεραμικών & Σύνθετων Υλικών του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Οι αντίστοιχες «πράσινες» δομές συντέθηκαν με βιολογικούς διαλύτες στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

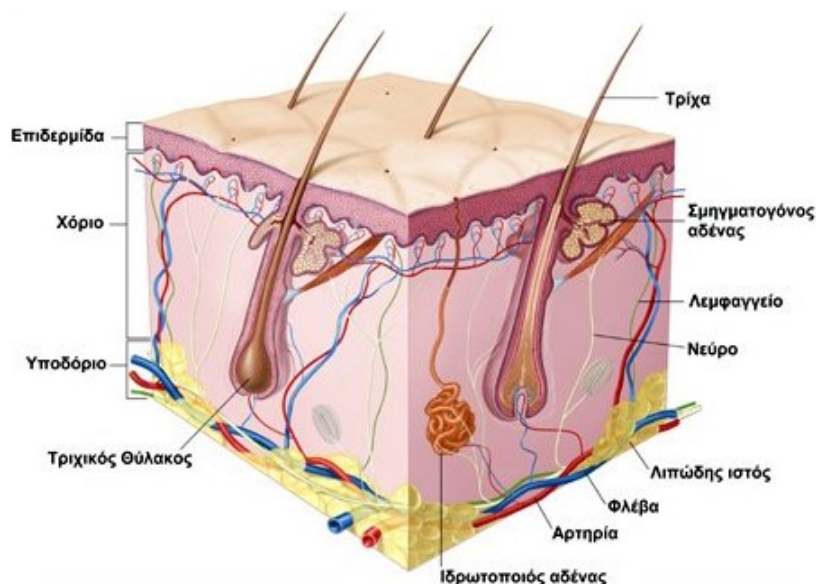
**Πίνακας 3. 1.** Τα τρία ζεύγη νανοϋλικών που προέκυψαν από τους δύο τρόπους αποφυλλοποίησης του γραφενίου από γραφίτη.

Χημική αποφυλλοποίηση	Βιολογική αποφυλλοποίηση
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Γραφένιο- Chemical graphene (cG)</li> <li>• Ντοπαρισμένο με άζωτο γραφένιο- N- Doped chemical graphene (cD)</li> <li>• Γραφένιο συνδεδεμένο με νιτρικά- Nitrate chemical graphene (cN)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Βιογραφένιο- Biographene (bG)</li> <li>• Ντοπαρισμένο με άζωτο βιογραφένιο- N- Doped biographene (bD)</li> <li>• Βιογραφένιο συνδεδεμένο με νιτρικά- Nitrate biographene (bN)</li> </ul>

### 3.1.3. Κυτταρικές σειρές

Η *in vitro* αξιολόγηση της τοξικότητας των νανοϋλικών γραφενίου πραγματοποιήθηκε σε τρεις κυτταρικές σειρές. Πιθανή αξιοποίηση των νανοδομών αυτών αφορά την ανάπτυξη ενός ευαίσθητου βιοαισθητήρα ανίχνευσης της γλυκόζης στον ιδρώτα, ο οποίος εξ' ορισμού θα βρίσκεται σε συνεχή επαφή με το όργανο του δέρματος. Προκειμένου να εκτιμηθεί η κλινική αξία των νανοϋλικών γραφενίου σε αντίστοιχες βιοϊατρικές εφαρμογές τα νανοϋλικά ελέγχθηκαν ως προς την τοξικότητά τους σε τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές οι οποίες μαζί προσομοιάζουν ένα μοντέλο του δέρματος (Εικόνα 3. 1). Χρησιμοποιήθηκαν λοιπόν ανθρώπινα κερατινοκύτταρα της εξωτερικής στιβάδας του δέρματος (κύτταρα HaCaT), ινοβλάστες από έμβρυο

ποντικού (κύτταρα NIH/3T3) και ανθρώπινα μονοκύτταρα από ασθενή με οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία (κύτταρα THP-1) (Πίνακας 3. 2).



**Εικόνα 3. 1.** Γραφική απεικόνιση της δομής του δέρματος.

Οι κυτταρικές σειρές HaCaT και NIH/3T3 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High glucose εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοοειδών (FBS), 1% διαλύματος L- γλουταμίνης και 1% διαλύματος στρεπτομυκίνης- πενικιλίνης. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε ειδικό επωαστικό θάλαμο με 37 °C και 5% CO<sub>2</sub>.

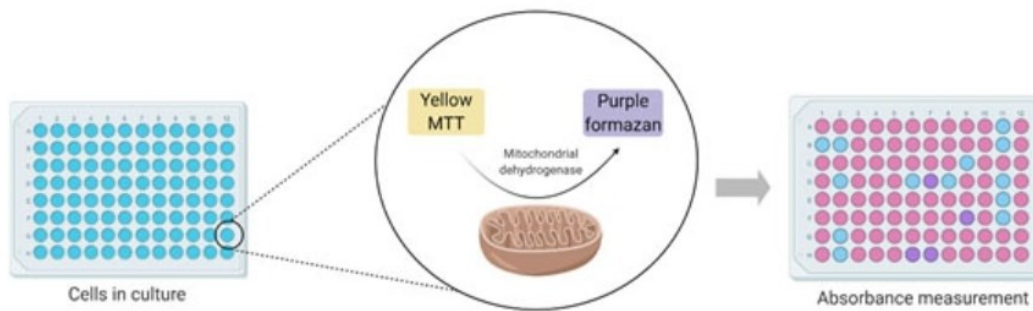
Η κυτταρική σειρά THP-1 καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο RPMI- 1640 Medium εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοοειδών (FBS), 1% διαλύματος L- γλουταμίνης και 1% διαλύματος στρεπτομυκίνης- πενικιλίνης σε επωαστικό θάλαμο με 37 °C και 5% CO<sub>2</sub>. Πριν τη χρήση τους στις *in vitro* δοκιμασίες, τα THP-1 μονοκύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε ώριμα μακροφάγα με την προσθήκη 100ng/ mL Phorbol 12- myristate 13- acetate (PMA) για 24 ώρες <sup>157</sup>. Μετά τη διαφοροποίησή τους τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στο ταπήδιο του τριβλύου και δεν αναπτύχθηκαν περαιτέρω.

**Πίνακας 3. 2.** Περιγραφή των κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν στις *in vitro* δοκιμασίες.

Κυτταρική σειρά	Περιγραφή
<b>HaCaT</b>	Ανθρώπινα κερατινοκύτταρα της εξωτερικής στιβάδας του δέρματος. Αναπτύσσονται προσκολλημένα στο ταπήδιο του τριβλύου (HaCaT cell line, <i>CLS GmbH, 300493</i> )
<b>NIH/3T3</b>	Ινοβλάστες απομονωμένοι από έμβρυο ποντικού NIH/Swiss. Είναι προσκολλόμενα κύτταρα. (NIH/3T3 cell line, <i>ATCC, CLR- 1658</i> )
<b>THP-1</b>	Ανθρώπινα μονοκύτταρα απομονωμένα από το περιφερικό αίμα ασθενούς με οξεία μονοκυτταρική λευχαιμία. Τα κύτταρα είναι αιωρούμενα ( <i>suspension</i> ) και αναπτύσσονται στο θρεπτικό διάλυμα. (THP-1 cell line, <i>DSMZ, ACC16</i> )

### 3.1.4. Μέθοδος MTT (MTT assay)

Η μέθοδος MTT (MTT assay) είναι μία χρωματογραφική τεχνική που εκτιμά τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Η μέθοδος αναπτύχθηκε το 1983 από τον Tim Mosmann <sup>158</sup> και βασίζεται στην αναγωγή της κίτρινης υδατοδιαλυτής μονο-τετραζόλης 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) σε αδιάλυτους στο νερό κυανούς κρυστάλλους φορμαζάνης. Το MTT χάρη στη λιπόφιλη φύση του διαπερνά τις κυτταρικές και τις μιτοχονδριακές μεμβράνες και ανάγεται ενδοκυττάρια από τις οξειδοοδουκτάσες και τις αφυδρογονάσες (π.χ. σουκινική αφυδρογονάση (SDH)) των μεταβολικά ενεργών κυττάρων. Μετά τον σχηματισμό τους, οι κρύσταλλοι φορμαζάνης διαλύονται με τη βοήθεια διαλυτών όπως το DMSO και εκτιμάται η τιμή απορρόφησης του διαλύματος, η οποία αντιστοιχεί στην πυκνότητα της φορμαζάνης σε κάθε δείγμα και επομένως αντανακλά το ποσοστό των ενεργών- ζωντανών κυττάρων <sup>159</sup> (**Εικόνα 3. 2**).



**Εικόνα 3. 2.** Σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας της μεθόδου MTT

Ο έλεγχος της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη μέθοδο του MTT πραγματοποιείται ως εξής:

$5 \times 10^3$  κύτταρα/ φρεάτιο σε τελικό όγκο 100  $\mu\text{L}$  από τα NIH/3T3 και τα HaCaT κύτταρα επιστρώνονται σε πολυτριβλύο 96 φρεατίων (96-well plate) και αναπτύσσονται σε ειδικό επωαστήριο (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) για 24 ώρες. Για τα διαφοροποιημένα THP-1 μακροφάγα, ο αριθμός επίστρωσης είναι  $4 \times 10^4$  κύτταρα/ 100  $\mu\text{L}$ / φρεάτιο. Την επόμενη ημέρα προστίθενται στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων αυξανόμενες συγκεντρώσεις από τα προς μελέτη νανοϋλικά γραφενίου σε τελικό όγκο φρεατίου 200  $\mu\text{L}$ . Τα κύτταρα επάζονται με τα νανοϋλικά για 24 και 48 ώρες. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, προστίθενται στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων 40  $\mu\text{L}$  διαλύματος MTT (συγκέντρωσης 3 mg/mL) για 3 ώρες. Το χρονικό διάστημα αυτό είναι αρκετό για την αναγωγή του αντιδραστηρίου MTT σε κρυστάλλους φορμαζάνης από τα μεταβολικώς ενεργά κύτταρα. Μετά τον σχηματισμό των κρυστάλλων, το θρεπτικό μέσο από κάθε φρεάτιο αφαιρείται προσεχτικά με αναρρόφηση υπό κενό. Οι κρύσταλλοι που παραμένουν στον πυθμένα κάθε φρεατίου διαλύονται ήπια με τη χρήση οκτακάναλης πιπέτας σε 100  $\mu\text{L}$  DMSO. Η οπτική πυκνότητα (optical density- OD) κάθε φρεατίου εκτιμάται στα 540 nm (με μία επιπλέον μέτρηση αναφοράς στα 690 nm) σε φασματοφωτόμετρο (Infinite 200 Pro, Tecan, Switzerland). Το ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας σε κάθε φρεάτιο εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό (%) σε σχέση με το ποσοστό της βιωσιμότητας στα φρεάτια ελέγχου (κύτταρα χωρίς δραστική ουσία- control).

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για κάθε συνθήκη. Ποσοστά κυτταρικής βιωσιμότητας άνω του 80% χαρακτηρίζονται ως φυσιολογικά (μη τοξική δόση).

### 3.1.5. Έλεγχος της ικανότητας σχηματισμού αποικιών (Colony forming efficiency assay)

Η βιωσιμότητα των κυττάρων μπορεί επίσης να εκτιμηθεί μέσω του ελέγχου της ικανότητας σχηματισμού αποικιών των κυττάρων (colony forming efficiency assay, CFE). Η CFE είναι μη χρωματογραφική, μη φθορίζουσα τεχνική κι έτσι καθίσταται ιδανική για την αξιολόγηση της τοξικότητας των νανοϋλικών καθώς αποφεύγονται πιθανές παρεμβολές στη μέτρηση από την αντίδραση των νανοϋλικών με τις φθορίζουσες ουσίες <sup>160</sup>. Μέσω της ανάλυσης αυτής ποσοτικοποιείται η κυτταρική επιβίωση και εκτιμώνται πιθανές μακροπρόθεσμες βλάβες ή κυτταροστατικές επιδράσεις των νανοϋλικών στα κύτταρα. Τα κύτταρα που επιβιώνουν από την έκθεση στα νανοϋλικά διαιρούνται και σχηματίζουν αποικίες. Επομένως η μείωση του σχηματισμού των αποικιών ή/και η μείωση του μεγέθους των αποικιών, αντανακλά καθυστερημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη.

Η τεχνική CFE μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο σε κύτταρα που αναπτύσσονται προσκολλημένα στο ταπήδιο (adherent) και διαιρούνται. Για το λόγο αυτό τα μακροφάγα THP-1 αποκλείστηκαν από τη συγκεκριμένη μελέτη.

Για τον έλεγχο της ικανότητας σχηματισμού αποικιών των κυττάρων ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο:

$5 \times 10^2$  κύτταρα/ mL από τους ινοβλάστες NIH/3T3 και  $1 \times 10^3$  κύτταρα/ mL από τα κερατινοκύτταρα HaCaT επιστρώνονται σε τρυβλίο 6 φρεατίων σε τελικό όγκο 2 mL και αναπτύσσονται σε επωαστικό κλίβανο (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Την επόμενη ημέρα προστίθενται τα υπό μελέτη νανοϋλικά γραφενίου σε δόσεις από 1 έως 100 μg/mL για 48 ώρες. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, το θρεπτικό μέσο αντικαθίσταται με φρέσκο και τα κύτταρα αφήνονται να αναπτυχθούν για άλλες 7 ημέρες. Την 8<sup>η</sup> ημέρα το θρεπτικό μέσο απορρίπτεται προσεχτικά, τα φρεάτια ξεπλένονται δύο φορές με διάλυμα PBS και πραγματοποιείται χρώση των κυττάρων με διάλυμα που περιέχει 0.5% w/v crystal violet, 6% v/v glutaraldehyde και ddH<sub>2</sub>O. Ο αριθμός των ορατών αποικιών σε κάθε φρεάτιο εκτιμάται με το πρόγραμμα OpenCFU open-source software (version 3.9.0) και υπολογίζεται το κλάσμα επιβίωσης (Surviving fraction (SF)) των κυττάρων <sup>161</sup>.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για κάθε συνθήκη.

### 3.1.6. Κυτταρομετρία Ροής

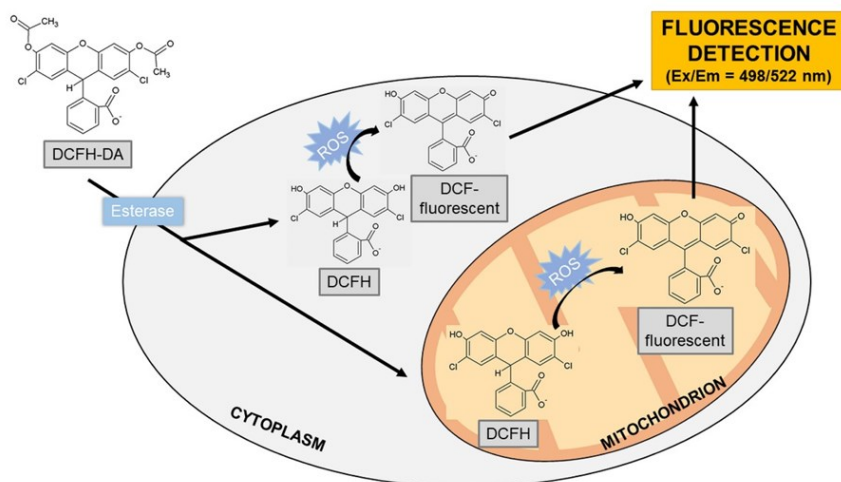
Η Κυτταρομετρία Ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μία τεχνολογία που προσφέρει γρήγορη ανάλυση πολλών παραμέτρων, μεμονωμένων κυττάρων σε ένα διάλυμα. Είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη και αξιόπιστη τεχνική και για τον λόγο αυτό

χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλά επιστημονικά πεδία. Κάθε σωματίδιο- κύτταρο αναλύεται ως προς τον ορατό σκεδασμό του φωτός και ως προς μία ή πολλαπλές παραμέτρους φθορισμού. Ο σκεδασμός του ορατού φωτός μετράται σε δύο διαφορετικές κατευθύνσεις, τη μπροστινή κατεύθυνση (Forward scatter, FSC) και την κατεύθυνση των 90 μοιρών (Side scatter, SSC). Η κατεύθυνση FSC προσδιορίζει το σχετικό μέγεθος του κυττάρου ενώ η κατεύθυνση SSC δίνει πληροφορίες σχετικά με την εσωτερική πολυπλοκότητα ή/και την κοκκίωση του κυττάρου. Οι παράμετροι φθορισμού εκτιμώνται ανεξάρτητα από τον σκεδασμό του ορατού φωτός. Μέσω κατάλληλης προετοιμασίας των δειγμάτων που μπορεί να περιλαμβάνει το transfection των κυττάρων για την έκφραση φθορίζουσών πρωτεϊνών (π.χ. GFP) ή τη χρώση τους με φθορίζουσες χρωστικές (π.χ. PI), καθίσταται δυνατή η ανάλυση διαφορετικών πληροφοριών των κυττάρων <sup>162</sup>. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή με τη χρήση του Κυτταρόμετρου Ροής εκτιμήθηκε ο σχηματισμός δραστικών μορφών οξυγόνου, ελέγχθηκε η απόπτωση και νέκρωση του πληθυσμού και αναλύθηκε ο κυτταρικός κύκλος των κυττάρων έπειτα από την επώαση με τα νανοϋλικά γραφενίου.

### 3.1.6.1. Έλεγχος της δημιουργίας Δραστικών Μορφών Οξυγόνου

Ο σχηματισμός Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ΔΜΟ, ROS) εμπλέκεται φυσιολογικά στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιοστασίας στο εσωτερικό των κυττάρων. Ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις, η ανεξέλεγκτη παραγωγή ΔΜΟ μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες και καταστροφή των κυττάρων και των ιστών. Η πρόκληση οξειδωτικού στρες στα κύτταρα ως αποτέλεσμα του σχηματισμού ΔΜΟ είναι ένας κοινός μηχανισμός μέσω του οποίου τα νανοϋλικά προκαλούν τοξικότητα στα ζωντανά κύτταρα. Υπάρχουν διαφορετικές κατηγορίες ΔΜΟ και διαφορετικοί τρόποι ανίχνευσής τους *in vitro* <sup>163</sup>.

Στα πειράματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής ο έλεγχος του σχηματισμού ΔΜΟ στα κύτταρα μετά την επώαση των νανοϋλικών, πραγματοποιήθηκε στο Κυτταρόμετρο Ροής με τη χρήση του παράγοντα 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). Ο παράγοντας αυτός μπορεί να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και να ανιχνεύει ειδικά την παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Μόλις εισέλθει στο κυτταρικό περιβάλλον, το DCFH-DA υδρολύεται από ενδογενείς εστεράσες σε 2',7'-δικλωρο-δι-υδρο-διφαινο-φαινόξετο (DCFH). Το DCFH αντιδρά με τις ΔΜΟ που σχηματίζονται εντός του κυττάρου και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωσή του σε ένα ενεργό προϊόν που εκπέμπει φθορισμό (στα 522 nm). Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη του ποσοστού των ΔΜΟ που έχουν σχηματιστεί κι έτσι μπορεί να εκτιμηθεί η οξειδωτική δραστηριότητα στο εσωτερικό περιβάλλον του κυττάρου (**Εικόνα 3. 3**).



**Εικόνα 3.3.** Σχηματική αναπαράσταση της ανίχνευσης των ΔΜΟ στο εσωτερικό του κυττάρου με τη χρήση του DCFH-DA.

Ο έλεγχος του σχηματισμού ΔΜΟ στα κύτταρα με χρήση του DCFH-DA πραγματοποιείται ως εξής:

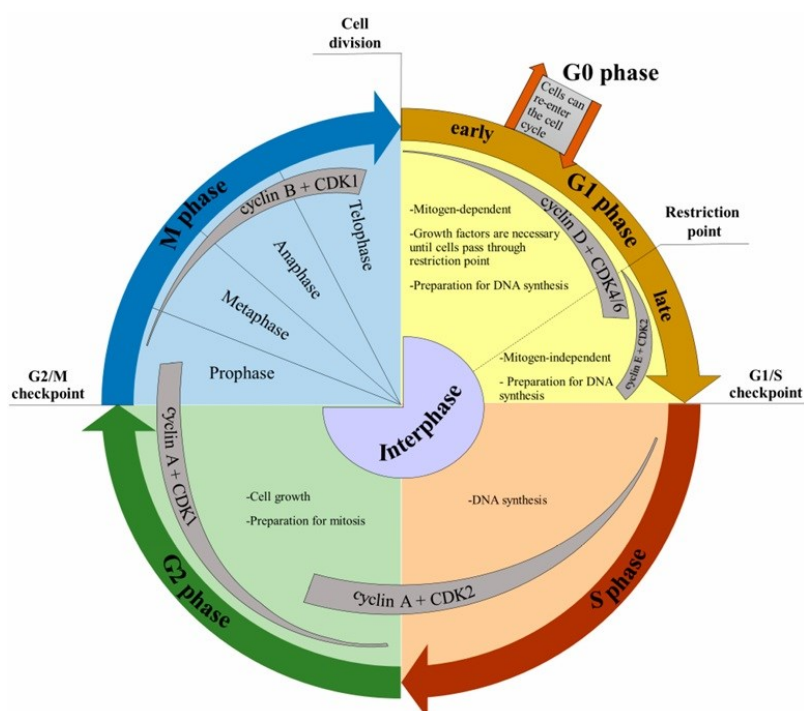
15 × 10<sup>4</sup> κύτταρα/φρεάτιο από τα HaCaT και τα NIH/3T3 κύτταρα και 3 × 10<sup>5</sup> κύτταρα/φρεάτιο από διαφοροποιημένα THP-1 μακροφάγα επιστρώνονται σε πολυτριβλύα 6 θέσεων. Μετά το πέρας 5-6 ωρών και εφόσον τα κύτταρα έχουν προσκολληθεί επιτυχώς στα ταπήδια, προστίθενται αυξανόμενες συγκεντρώσεις από τα νανοϋλικά γραφενίου (20, 50 και 100 μg/mL) για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα πραγματοποιείται αποκόλληση των κυττάρων από τα ταπήδια με τη βοήθεια θρυψίνης, συλλογή των κυττάρων σε διάλυμα PBS και φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 3000 RPM για 5 λεπτά. Ακολουθεί αναδιασπορά της κυτταρικής πελέτας σε 2 mL κρύου διαλύματος Hanks's Balanced Salt Solution (HBSS) το οποίο περιέχει DCFH-DA σε συγκέντρωση 2.5 μM και επώαση των δειγμάτων στους 37 °C στο σκοτάδι, για 30 λεπτά. Έπειτα, τα δείγματα βάφονται με PI, τοποθετούνται στον πάγο και αναλύονται απευθείας σε Κυτταρόμετρο Ροής (Partec ML, Partec GmbH, Leipzig, Germany). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για κάθε συνθήκη.

### 3.1.6.2. Έλεγχος κυτταρικού κύκλου (Cell cycle arrest)

Ο κυτταρικός κύκλος αναφέρεται σε μία σειρά γεγονότων που συμβαίνουν στο κύτταρο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της διαφοροποίησής του. Αποτελείται από τέσσερις διακριτές φάσεις: Τη φάση G1 (gar 1), τη φάση S, τη φάση G2 (gar 2) και τη φάση M. Στη φάση S πραγματοποιείται η σύνθεση του DNA ενώ στη φάση M η μίτωση. Οι φάσεις G1 και G2 είναι φάσεις ανάπτυξης όπου γίνεται η προετοιμασία για τη σύνθεση του DNA (φάση G1) και η προετοιμασία



για τη μίτωση (φάση G2) (**Εικόνα 3. 4**). Η μετάβαση του κυττάρου σε κάθε φάση είναι αυστηρά καθορισμένη και ρυθμίζεται από ενδοκυττάριους μηχανισμούς. Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου υπάρχουν αρκετά σημεία ελέγχου (checkpoints) που καθορίζουν την είσοδο του κυττάρου σε κάθε φάση. Σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου παίζουν οι εξαρτώμενες από την κυκλίνη κινάσες (cyclin-dependent kinases, CDKs) η ρύθμιση των οποίων επιτυγχάνεται από την αλληλεπίδρασή τους με τις κυκλίνες και τους αναστολείς των CDK. Η ενεργοποίηση των κυκλινών/ CDKs επάγεται από μιτογόνα σήματα και αναστέλλεται από τα σημεία ελέγχου σε περίπτωση βλάβης του DNA <sup>164</sup>.

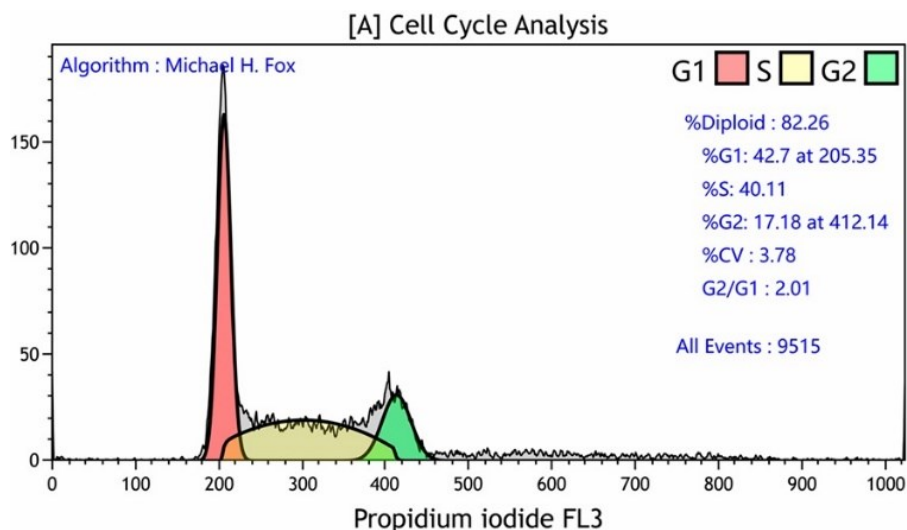


**Εικόνα 3. 4.** Σχηματική αναπαράσταση των φάσεων του κυτταρικού κύκλου <sup>164</sup>.

Τα νανοϋλικά μπορούν να προκαλέσουν τοξικότητα και να βλάψουν το DNA και να σταματήσουν έτσι τον κυτταρικό κύκλο σε κάποια φάση (cell cycle arrest). Για τον λόγο αυτό, ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου αποτελεί απαραίτητο στοιχείο στην *in vitro* αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας των νανοϋλικών.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των διαφόρων φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Η πιο συχνή προσέγγιση αφορά την ανάλυση του περιεχομένου των κυττάρων σε DNA. Τα κύτταρα της φάσης G1 και G0 έχουν τη μισή ποσότητα DNA από αυτά που βρίσκονται στις φάσεις G2 και M. Η ανίχνευση του DNA καθίσταται εφικτή έπειτα από χρώση του με φθορίζουσες χρωστικές (όπως το PI) και ανάλυση του σήματος φθορισμού. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να

σχηματιστεί το ιστογράμμο του περιεχομένου σε DNA και να εκτιμηθεί ο αριθμός των κυττάρων που βρίσκονται στις φάσεις G1/G0, S και G2/M (**Εικόνα 3. 5**). Το PI βάφει και το RNA και έτσι, προκειμένου να μην υπάρχουν παρεμβολές στη μέτρηση, παράλληλα με τη χρήση του στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου απαιτείται η επώαση των κυττάρων με RNAase.



**Εικόνα 3. 5.** Παράδειγμα του ιστογράμματος που προκύπτει κατά τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου με χρήση της χρωστικής PI <sup>164</sup>.

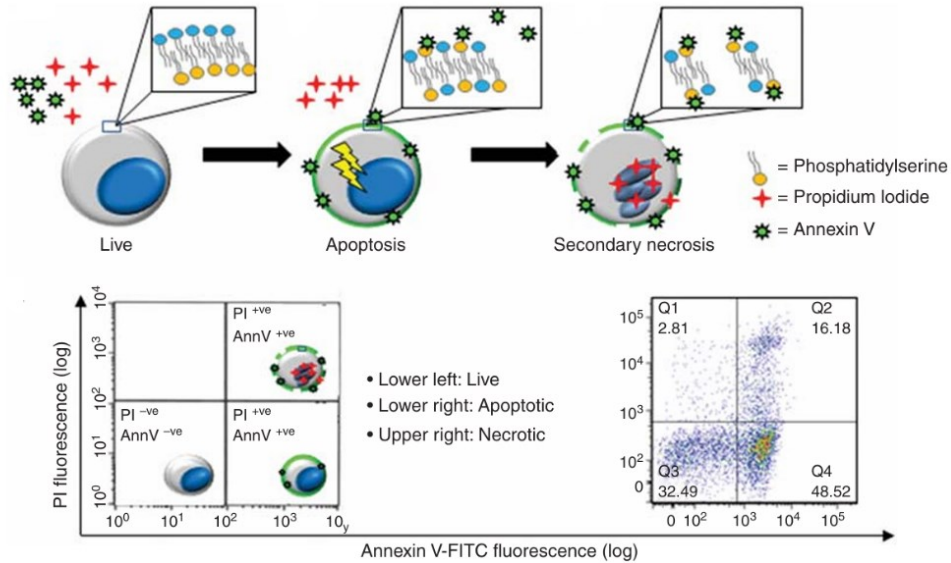
Για τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου με τη χρήση PI και RNAase,  $1 \times 10^5$  κύτταρα/ φρεάτιο από τα NIH/3T3 και τα HaCaT κύτταρα και  $5 \times 10^5$  κύτταρα/φρεάτιο από τα διαφοροποιημένα THP-1 μακροφάγα επιστρώνονται σε πολυτρυβλία 6 θέσεων και τοποθετούνται σε επωαστήρα (37 °C, 8% CO<sub>2</sub>). Την επόμενη ημέρα προστίθενται στα κύτταρα συγκεκριμένες δόσεις από τα νανοϋλικά για 24 ώρες. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, πραγματοποιείται αποκόλληση των κυττάρων από τα ταπήδια με τη χρήση θρυψίνης, συλλογή των κυττάρων σε διάλυμα PBS και φυγοκέντρηση στις 3000 RPM για 5 λεπτά. Ακολουθεί επαναιώρηση της κυτταρικής πελέτας σε 1 mL παγωμένου διαλύματος PBS και φυγοκέντρηση ξανά στις 3000 RPM για 5 λεπτά. Πραγματοποιείται ήπια επαναιώρηση της πελέτας σε 0.5 mL PBS και προσθήκη 0.5 mL παγωμένης απόλυτης αιθανόλης (98%) στάγδην, υπό συνεχή ανάδευση του δείγματος σε vortex. Στο στάδιο αυτό, τα δείγματα φυλάσσονται στους -20 °C για 7 ημέρες. Την 8<sup>η</sup> ημέρα, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 λεπτά στις 3000 RPM, απόρριψη του υπερκειμένου και επαναιώρηση του ιζήματος σε 1 mL παγωμένου PBS ώστε να απορριφθεί η αιθανόλη. Έπειτα προστίθενται RNAase και PI σε τελική συγκέντρωση 25 µg/mL σε κάθε δείγμα και ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας του χρόνου

επάσης, τα δείγματα αναλύονται άμεσα σε Κυτταρόμετρο Ροής. Όλα τα πειράματα πραγματοποιούνται εις τριπλούν για κάθε συνθήκη.

### 3.1.6.3. Έλεγχος απόπτωσης/ νέκρωσης

Ο κυτταρικός θάνατος είναι μία διαδικασία που λαμβάνει χώρα στους ιστούς με σκοπό την απομάκρυνση των κυττάρων από τον οργανισμό. Ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να επέλθει με δύο τρόπους: την απόπτωση (apoptosis) και τη νέκρωση (necrosis). Ο θάνατος των κυττάρων μέσω απόπτωσης προκαλείται από ενδογενείς μηχανισμούς και είναι απόλυτα ελεγχόμενος. Η απόπτωση είναι σημαντική για τη ρύθμιση του αριθμού των κυττάρων σε έναν οργανισμό και για την απομάκρυνση των κυττάρων που έχουν παρακμάσει ή έχουν υποστεί βλάβη. Αντιθέτως, η νέκρωση είναι συνήθως αποτέλεσμα ακούσιων μηχανισμών και δεν ελέγχεται. Η νέκρωση μπορεί να προκληθεί από εξωτερικά ερεθίσματα και έκτακτες συνθήκες, όπως ο τραυματισμός ή η έκθεση σε βλαβερές ουσίες. Τα νανοϋλικά μπορούν να επάγουν τοξικότητα στον οργανισμό και να αυξήσουν μη φυσιολογικά τον κυτταρικό θάνατο του πληθυσμού, είτε ενεργοποιώντας τα σηματοδοτικά μονοπάτια της απόπτωσης είτε προκαλώντας νέκρωση των κυττάρων.

Τα ποσοστά της απόπτωσης και της νέκρωσης σε έναν κυτταρικό πληθυσμό, μπορούν να εκτιμηθούν στο Κυτταρόμετρο Ροής με τη χρήση των χρωστικών Annexin V και PI (**Εικόνα 3. 6**). Στα υγιή κύτταρα, πλήθος λιπιδίων διανέμονται ασύμμετρα στην εσωτερική και την εξωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης. Ένα από αυτά τα λιπίδια είναι η φωσφατιδιλοσερίνη (phosphatidylserine, PS) η οποία βρίσκεται στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης και συνεπώς εκτίθεται μόνο στο κυτταρόπλασμα. Κατά τη διαδικασία της απόπτωσης του κυττάρου η λιπιδική ασυμμετρία χάνεται και η PS εκτίθεται στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης. Η φθορίζουσα χρωστική Annexin V έχει την ικανότητα να δένεται στην PS και να εκπέμπει φθορισμό. Έτσι μπορεί να εκτιμήσει τον πληθυσμό των αποπτωτικών κυττάρων καθώς μόνο τα κύτταρα που έχουν PS στην εξωτερική τους μεμβράνη θα δεθούν από τη χρωστική. Η Annexin V μπορεί επίσης να σημάνει και τα νεκρά κύτταρα (necrotic) καθώς οι μεμβράνες τους έχουν διαταραχθεί. Η ταυτόχρονη σήμανση του πληθυσμού με PI επιτρέπει τον διαχωρισμό των κυττάρων που έχουν θανατωθεί μέσω νέκρωσης καθώς το PI εισέρχεται μόνο στο εσωτερικό των κυττάρων <sup>165</sup>. Μέσω του Κυτταρομέτρου Ροής μπορεί να αναλυθεί το σήμα των δύο φθορίζουσών χρωστικών και να εκτιμηθούν τα ποσοστά απόπτωσης και νέκρωσης στον κυτταρικό πληθυσμό.

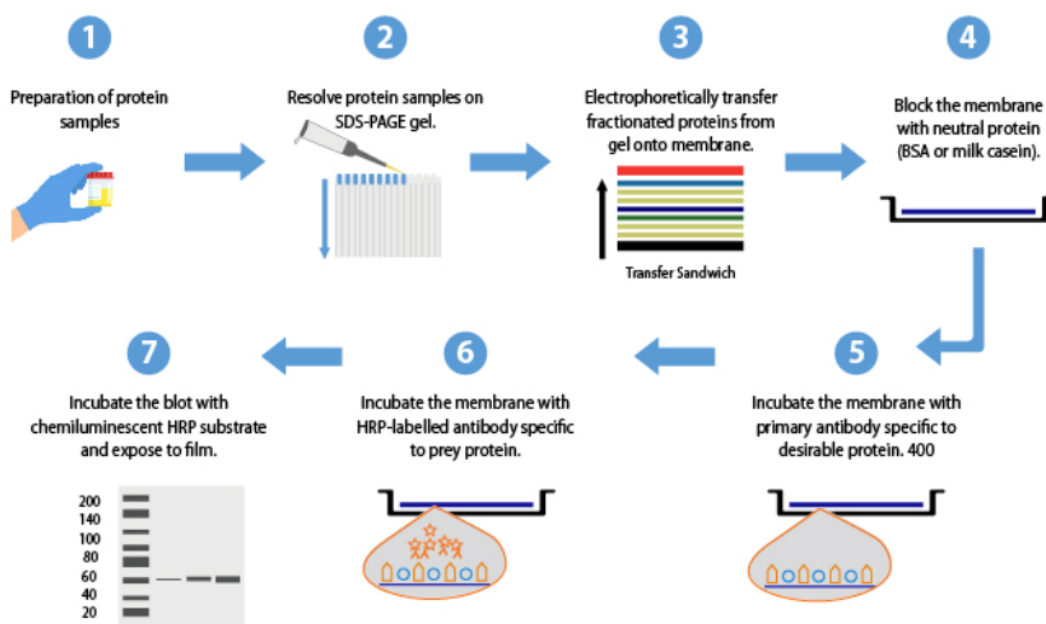


**Εικόνα 3. 6.** Εκτίμηση του κυτταρικού θανάτου στο Κυτταρόμετρο Ροής με χρήση των χρωστικών Annexin V και PI <sup>165</sup>

Για την εκτίμηση της απόπτωσης/ νέκρωσης του κυτταρικού πληθυσμού  $5 \times 10^4$  κύτταρα/ φρεάτιο από τα NIH/3T3 και τα HaCaT κύτταρα επιστρώνονται σε πολυτριβλύα 24 θέσεων. Για τα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα η πυκνότητα σποράς είναι  $24 \times 10^4$  κύτταρα/ φρεάτιο. Την επόμενη ημέρα προστίθενται οι επιθυμητές δόσεις από τα προς μελέτη ναυούλικά για 24 ώρες. Μόλις ολοκληρωθεί ο χρόνος επώασης, το θρεπτικό υλικό των κυττάρων συλλέγεται σε καθαρά falcons, γίνεται πλύση του ταπηδίου με PBS το οποίο επίσης συλλέγεται στα ίδια falcons και τα κύτταρα αποκολλώνται από τα ταπήδια με τη βοήθεια θρυψίνης. Τα κύτταρα συλλέγονται με 1 mL διαλύματος PBS στα ίδια falcons και ακολουθεί καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων κάθε δείγματος με τη βοήθεια πλακιδίου Neubauer.  $1 \times 10^5$  κύτταρα από κάθε δείγμα τοποθετούνται σε καθαρά σωληνάρια τύπου Eppendorfs και φυγοκεντρώνονται στις 3000 RPM για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα αναδιασπείρεται ήπια σε 0.1 mL ρυθμιστικού διαλύματος Annexin V Binding buffer. Στο διάλυμα προστίθενται οι χρωστικές FITC Annexin V και PI σε τελική συγκέντρωση 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Ακολουθεί ήπιο vortex των δειγμάτων και επώαση για 15 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Με την πάροδο του χρόνου επώασης τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο και αναλύονται άμεσα σε Κυτταρόμετρο Ροής. Όλα τα πειράματα πραγματοποιούνται εις τριπλούν για κάθε συνθήκη.

### 3.1.7. Ανοσοαποτύπωμα πρωτεϊνών κατά Western (Western blotting)

Το Western blotting είναι μία αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως στην Κυτταρική και τη Μοριακή Βιολογία. Μέσω της τεχνικής αυτής καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε ένα μείγμα ολικών πρωτεϊνών κυττάρων ή ιστών. Η ολοκλήρωση της μεθόδου απαιτεί την επίτευξη τριών ξεχωριστών στόχων: του σωστού διαχωρισμού των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους, της μεταφοράς των πρωτεϊνών σε μία στερεή βάση και την ταυτοποίηση και απεικόνιση της πρωτεΐνης- στόχου με τη χρήση ειδικών πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων. Για την επίτευξη των στόχων απαιτείται η διενέργεια πολλών βημάτων (Εικόνα 3. 7).



Εικόνα 3. 7. Σχηματική αναπαράσταση των βημάτων που ακολουθούνται για την ανάλυση της έκφρασης των πρωτεϊνών μέσω της τεχνικής Western Blotting.

#### 3.1.7.1. Κυτταρική λύση και απομόνωση των πρωτεϊνών

Για τη συλλογή των ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των κυττάρων,  $1 \times 10^6$  από τα NIH/3T3 κύτταρα,  $2 \times 10^6$  από τα HaCaT κύτταρα και  $4 \times 10^6$  από τα THP-1 μονοκύτταρα επιστρώνονται σε τριβλύα Petri των 10 cm και τοποθετούνται σε ειδικό επωαστήριο ( $37^\circ\text{C}$ , 8%  $\text{CO}_2$ ). Την επόμενη ημέρα προστίθενται στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων επιλεγμένες δόσεις (20, 50 ή/και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) από τα ναουϊλικά γραφενίου για 24 ώρες. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, τα τριβλύα τοποθετούνται σε πάγο και ξεπλένονται 2 φορές με παγωμένο διάλυμα

PBS. Ακολούθως, προστίθενται 7 mL παγωμένου διαλύματος PBS σε κάθε τρυβλίο και τα κύτταρα αποκολλώνται μηχανικά από το ταπήδιο με ξύστρα σιλικόνης και συλλέγονται σε καθαρά σωληνάρια τύπου Falcon των 15 mL. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 3000 RPM για 3 λεπτά, απόρριψη του υπερκείμενου και αναδιασπορά του ιζήματος σε 1 mL παγωμένου PBS. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ακόμη μία φυγοκέντρηση στις 11000 RPM για 8 δευτερόλεπτα στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται με προσοχή με αναρρόφηση υπό κενό και το ίζημα επαναιωρείται ήπια σε 0.3 mL διαλύματος λύσης RIPA (RIPA buffer: 10 mM Tris pH= 7.5, 158 mM NaCl, 2mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton- X-100) στο οποίο προστίθενται αμέσως πριν τη χρήση αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών. Μετά την επαναιώρηση του ιζήματος, τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 20 λεπτά. Κατά τη διάρκεια των 20 λεπτών, πραγματοποιείται ήπια μηχανική λύση των δειγμάτων με σύριγγα 21 G × 1 ½ και vortex. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης τα δείγματα υποβάλλονται δύο φορές σε διάσπαση με υπερήχους (sonication) σε πάγο για 20 δευτερόλεπτα (ανάμεσα στις δύο επαναλήψεις του sonication τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 1 λεπτό). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14.800 RPM για 20 λεπτά στους 4 °C. Τα υπερκείμενα δηλαδή το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα κάθε δείγματος, συλλέγονται προσεκτικά σε καθαρά σωληνάρια Eppendorf και διατηρούνται στους -20 °C.

### **3.1.7.2. Προετοιμασία πηκτώματος πολυακρυλαμίδης**

Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης έχουν μεγάλη διακριτική ικανότητα και χρησιμοποιούνται για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ή μικρών μορίων DNA. Το πήκτωμα αποτελείται από δύο επιμέρους τμήματα: το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) και το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel). Το πήκτωμα διαχωρισμού είναι υπεύθυνο για το διαχωρισμό των δειγμάτων ανάλογα με το μοριακό τους βάρος και για τον λόγο αυτό το ποσοστό πολυακρυλαμίδης που περιέχει διαφέρει κάθε φορά (8, 10, 12 και 15%) και εξαρτάται από το μέγεθος των προς ανάλυση πρωτεϊνών. Τα πηκτώματα με υψηλή ποσότητα ακρυλαμίδης, έχουν μικρούς πόρους και είναι κατάλληλα για την ανίχνευση πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους. Αντίστοιχα, πηκτώματα με μικρή ποσότητα ακρυλαμίδης χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση μεγάλων πρωτεϊνών. Στο πήκτωμα επιστοίβαξης σχηματίζονται με τη βοήθεια ειδικής χτένας, οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων. Ο ρόλος του πηκτώματος αυτού είναι να «συμπυκνώνει» τις πρωτεΐνες σε μικρή ζώνη εξασφαλίζοντας ότι θα φτάσουν όλες μαζί στο πήκτωμα διαχωρισμού. Για τον λόγο αυτό, σε αντίθεση με το πήκτωμα διαχωρισμού, το πήκτωμα επιστοίβαξης περιέχει σταθερό ποσοστό ακρυλαμίδης κάθε φορά, ανεξάρτητο από το μέγεθος των πρωτεϊνών που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν. Το πήκτωμα παρασκευάζεται σε ειδική κάθετη διάταξη και μόλις πολυμεριστεί τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Στα πειράματα της παρούσας διατριβής, το μοριακό βάρος των υπό μελέτη πρωτεϊνών κυμαινόταν στο εύρος των 21- 120 kDa και έτσι προτιμήθηκε η σύνθεση πηκτώματος διαχωρισμού σύστασης 10% σε πολυακρυλαμίδη. Οι αναλογίες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των δύο τμημάτων του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης αναγράφονται στον **Πίνακας 3. 3**.

**Πίνακας 3. 3.** Σύσταση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 10%.

<i>Πηκτή διαχωρισμού (10 mL)</i>		<i>Πηκτή επιστοιβάξης (3 mL)</i>	
<b>10%</b>			
ddH <sub>2</sub> O	4	ddH <sub>2</sub> O	2.1
30% acrylamide mix	3.3	30% acrylamide mix	0.5
1.5 M Tris pH= 8.8	2.5	1 M Tris pH= 6.8	0.38
10% SDS	0.1	10% SDS	0.03
10% APS	0.1	10% APS	0.03
TEMED	0.004	TEMED	0.003

### 3.1.7.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Η περιεκτικότητα κάθε δείγματος σε πρωτεΐνη προσδιορίζεται με τη βοήθεια εμπορικού κιτ που περιλαμβάνει τον σχηματισμό καμπύλης γνωστών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης BSA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA). Μέσω της εξίσωσης:

$$\text{συγκέντρωση} = \frac{\text{μάζα}}{\text{όγκος}}$$

καθορίζεται ο όγκος του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που απαιτείται ώστε να φορτωθεί ίση ποσότητα πρωτεΐνης (20- 30 μg) σε κάθε δείγμα.

### 3.1.7.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Μόλις ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός της πηκτής, η κάθετη συσκευή στήριξης αφαιρείται προσεχτικά και τοποθετείται στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, USA). Κατόπιν, αφαιρείται η ειδική χτένα σχηματισμού των θέσεων υποδοχής των δειγμάτων και προστίθεται στη συσκευή ειδικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running buffer: 125 mM Tris, 1M Glycine, 0.5% w/v SDS).

Σε 20- 30 μg πρωτεΐνης των προς ηλεκτροφόρηση δειγμάτων προστίθεται διάλυμα Laemmli (Laemmli sample buffer: 10% SDS, 50% GluceroI, 1% Bromophenol blue διαλυμένο σε 10% EtOH, 1M Tris pH= 6.8) σε τελική συγκέντρωση 1x που περιέχει 5% v/v β- μερκαπτοαιθανόλη. Μετά την ομογενοποίηση με το Laemmli buffer, τα δείγματα θερμαίνονται για 5 λεπτά στους 95 °C προκειμένου να αποδιαταχθούν πλήρως οι πρωτεΐνες και φορτώνονται στις θέσεις υποδοχής της πηκτής επιστοίβαξης. Στην πρώτη θέση της πηκτής φορτώνεται ο δείκτης μοριακών βαρών (molecular weight marker). Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται υπό σταθερή τάση 180V για περίπου 2- 3 ώρες.

### **3.1.7.5. Ηλεκτροφορητική μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη (Transfer)**

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή επιστοίβαξης απορρίπτεται και η πηκτή διαχωρισμού εξισορροπείται σε διάλυμα μεταφοράς (Transfer buffer: 50 mM Tris, 380 mM Glycine, 20% Methanol και 0.4% w/v SDS). Στο ίδιο διάλυμα εξισορροπούνται τέσσερα φύλλα χαρτιού Whatman 3MM και μία μεμβράνη polyvinylidene fluoride (PDVF). Έπειτα, δύο φύλλα χαρτιού Whatman, η μεμβράνη PVDF, η πηκτή διαχωρισμού και τα άλλα δύο φύλλα Whatman τοποθετούνται κατ' αυτή τη σειρά προς τον θετικό πόλο σε ειδική συσκευή υγρής ηλεκτρομεταφοράς (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA, USA). Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα Transfer buffer, στους 4 °C, με ρεύμα σταθερής τάσης, 250 V για 90 λεπτά.

### **3.1.7.6. Ανοσοεντόπιση πρωτεϊνών**

Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, η πηκτή διαχωρισμού απορρίπτεται και η μεμβράνη PVDF ξεπλένεται με ddH<sub>2</sub>O και χρωματίζεται με τη χρωστική Ponceau S για 5 λεπτά προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών ήταν επιτυχής. Η χρωστική αφαιρείται με διάλυμα TBST (TBST 1x: 50 mM Tris pH= 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) και η μεμβράνη επώαζεται με διάλυμα 5% μη λιπαρού γάλακτος σε TBST (Blocking) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το γάλα μπλοκάρει τις μη ειδικές θέσεις δέσμευσης των αντισωμάτων στη μεμβράνη. Στη συνέχεια η μεμβράνη επώαζεται με το επιθυμητό πρωτογενές αντίσωμα, το οποίο δεσμεύεται ειδικά στην προς εξέταση πρωτεΐνη. Το αντίσωμα είναι διαλυμένο σε 5% μη λιπαρό γάλα σε TBST και η επώαση της μεμβράνης πραγματοποιείται στους 4 °C υπό συνεχή ανάδευση για ένα βράδυ (≈11- 15 ώρες). Την επόμενη ημέρα πραγματοποιούνται τρεις γρήγορες πλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα TBST (3 × 5 λεπτά) και η μεμβράνη επώαζεται με κατάλληλο δευτερογενές αντίσωμα διαλυμένο σε 5% μη λιπαρό γάλα σε TBST, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Το δευτερογενές αντίσωμα αναγνωρίζει ειδική



θέση του πρωτογενούς αντισώματος και φέρει μόριο- ιχνηθέτη που καθιστά δυνατή την ανίχνευση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL). Έτσι, μετά το πέρας του χρόνου επώασης του δευτερογενούς αντισώματος, η μεμβράνη ξεπλένεται τρεις φορές με διάλυμα TBST (3 x 5 λεπτά) και προστίθεται σε αυτή διάλυμα ECL (Clarity Western ECL Substrate, #1705061, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) για 5 λεπτά. Οι μπάντες των πρωτεϊνών απεικονίζονται μέσω του συστήματος ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) και αναλύονται με το ImageLab (Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

Στην παρούσα μελέτη, τα πρωτογενή αντισώματα έναντι της NF- κB, της HO-1, της  $\alpha$ -tubulin και τα δευτερογενή αντισώματα anti- Rabbit και anti- Mouse, χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:1000. Το πρωτογενές αντίσωμα έναντι του Nrf2 χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:750.

## **3.2. Μελέτες *in vivo***

### **3.2.1. Εξοπλισμός**

- Glucose concentrated drink “Top Star 100”, orange flavoured (Dietetic product for specific medical purposes)
- Solus V2 Μετρητής Σακχάρου Αίματος, Biosense Medical Devices (Duluth, GA, USA)
- Solus V2 Test strips, 633050, Biosense Medical Devices (Duluth, GA, USA)
- Βελόνες 23G x 1<sup>1/4</sup>, Pentaferte (Campli, Italy)

### **3.2.2. Νανογαλακτώματα**

Για τις *in vivo* μελέτες παρασκευάστηκαν από το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων νανογαλακτώματα με ή χωρίς δραστική υπογλυκαιμική ουσία. Τα νανογαλακτώματα συντέθηκαν σε νερό χρησιμοποιώντας καπρυλικό οξύ (caprylic acid, CA) ως τη φάση ελαίου, Tween-80 ως επιφανειοδραστική ένωση και προπυλενική γλυκόλη (propylene glycol, PG) ως συν-επιφανειοδραστική ένωση.

Με τον τρόπο αυτό παρασκευάστηκαν τρία διαφορετικά νανογαλακτώματα: νανογαλάκτωμα χωρίς δραστική ουσία (Placebo), νανογαλάκτωμα με εγκλωβισμένη την υπογλυκαιμική ουσία Σιταγλιπτίνη (Sitagliptin) και νανογαλάκτωμα με εγκλωβισμένη την υπογλυκαιμική ουσία Δαπαγλιφλοζίνη (Dapagliflozin). Στα νανογαλακτώματα με φαρμακευτική ουσία, η συγκέντρωση του φαρμάκου ήταν 10 mg/mL.

### 3.2.3. Πειραματόζωα- Μύες 129SV

Για την *in vivo* αξιολόγηση της δραστηριότητας των νανογαλακτωμάτων υπογλυκαιμικών ουσιών επιλέχθηκαν οι μύες 129 SV. Οι μύες αποτελούν από τα συνηθέστερα μοντέλα για προκλινικές μελέτες διαταραχών που επηρεάζουν την ομοιοστασία της γλυκόζης. Ένας από τους λόγους που τα καθιστά αποτελεσματικά μοντέλα για τον σκοπό αυτό, είναι το γεγονός ότι οι τιμές γλυκόζης στο αίμα τους προσεγγίζουν αρκετά αυτές του ανθρώπινου οργανισμού και επομένως ο έλεγχός τους μπορεί να γίνει με αντίστοιχες διαδικασίες, όπως π.χ. με τη χρήση ενός ανθρώπινου γλυκομετρητή με ταινίες <sup>166</sup>. Ο γλυκομετρητής απαιτεί τη λήψη μόνο μιας μικρής σταγόνας αίματος από την ουρά ή το πέλμα του ζώου και έτσι αποφεύγεται η επώδυνη συλλογή μεγάλης ποσότητας αίματος. Εκτός από τον έλεγχο της γλυκόζης με ταινίες, στους μύες καθίσταται εύκολη και η πραγματοποίηση του test ανοχής στη γλυκόζη (OGTT) <sup>167</sup>.

Στην εν λόγω μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 30 υγιείς, αρσενικοί, ενήλικες (3- 4 εβδομάδων) μύες SV129 οι οποίοι χωρίστηκαν σε 3 ομάδες των 10 ζώων. Πριν την εφαρμογή του πρωτοκόλλου τα πειραματόζωα διαβίωναν σε κλωβούς ανοιχτού τύπου διαφόρων μεγεθών ανάλογα με τον αριθμό τους και η χορήγηση τροφής (pellets GLP προδιαγραφών) και νερού γινόταν κατά βούληση. Για στρωμνή χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο ροκανίδι καλής ποιότητας και το περιβάλλον εμπλουτίστηκε με ειδικό υλικό για κατασκευή φωλιάς. Κάθε κλωβός έφερε υποχρεωτικά καρτέλα όπου αναγραφόταν, το όνομα του ερευνητή, το είδος, η σειρά, το στέλεχος των ζώων, το φύλο των ζώων, ο κωδικός του πειράματος, ο πραγματικός αριθμός των ζώων ανά κλωβό, η ημερομηνία λήξης του πειράματος και πιθανές παρατηρήσεις του χειριστή του πρωτοκόλλου (σύμφωνα με το κανονιστικό εγχειρίδιο του Εκτροφείου Πειραματόζωων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων).

### 3.2.4. Πειραματικό πρωτόκολλο

Για την αξιολόγηση της δραστηριότητας των νανογαλακτωμάτων υπογλυκαιμικών ουσιών οι μύες χωρίστηκαν σε 3 ομάδες (group) των 10 ζώων/ ομάδα. Σε κάθε ομάδα χορηγήθηκε διαφορετικό νανογαλάκτωμα (**Πίνακας 3. 4**).

Η ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου της αξιολόγησης της δραστηριότητας των νανογαλακτωμάτων υπογλυκαιμικών ουσιών απαιτεί συνολικά τρεις ημέρες. Το πρωτόκολλο εφαρμόζεται ταυτόχρονα σε ένα ζώο από κάθε ομάδα δηλαδή συνολικά σε τρία ζώα κάθε φορά. Την πρώτη ημέρα τα ζώα χωρίζονται σε κλωβούς (ένα ζώο/ κλωβό). Στις 20.00 μ.μ. αφαιρείται η τροφή και το νερό από τους κλωβούς ώστε τα ζώα να παραμείνουν νηστικά όλο το βράδυ. Την επόμενη ημέρα, στις 7.50 π.μ., τα ζώα ζυγίζονται, τοποθετούνται σε restrainer για 10 λεπτά και πραγματοποιείται η πρώτη μέτρηση της γλυκόζης του αίματος η οποία αποτελεί τη γλυκόζη νηστείας (στις 8.00 π.μ. - μετά από 12 ώρες νηστείας). Η μέτρηση γίνεται με το σύστημα ανίχνευσης γλυκόζης με ταινίες, Solus V2. Το σύστημα απαιτεί μία μικρή σταγόνα αίματος η οποία λαμβάνεται από την πατούσα των ζώων με βελόνα 23G x 1 ¼. Μετά την καταγραφή της τιμής της γλυκόζης του αίματος, πραγματοποιείται προσεκτικό ξύρισμα στον αυχένα των ζώων και γίνεται επάλειψη στο σημείο με 30 μL από το αντίστοιχο νανογαλάκτωμα το οποίο αντιστοιχεί σε δόση 10 mg/kg της εκάστοτε φαρμακευτικής ουσίας (κάθε νανογαλάκτωμα περιέχει συγκέντρωση φαρμάκου 10 mg/mL). Στις 8.30 π.μ. χορηγείται διάλυμα γλυκόζης στα ζώα με τη βοήθεια αυτοσχέδιου καθετήρα. Έπειτα από 30 λεπτά (9.00 π.μ.) πραγματοποιείται η δεύτερη μέτρηση της γλυκόζης του αίματος. Ακολουθούν άλλες δύο μετρήσεις της γλυκόζης, στις 2 ώρες μετά τη χορήγηση της γλυκόζης (10.30 π.μ.) και στις 3 ώρες μετά τη χορήγηση της γλυκόζης (11.30 π.μ.). Με την ολοκλήρωση των μετρήσεων και τη δημιουργία της καμπύλης γλυκόζης, τα ζώα τοποθετούνται σε μεταβολικούς κλωβούς με τροφή και νερό. Την επόμενη ημέρα στις 8.00 π.μ. (24 ώρες μετά την επάλειψη των νανογαλακτωμάτων) συλλέγονται τα ούρα των ζώων και ακολουθεί ευθανασία με αποκεφαλισμό για συλλογή του ολικού αίματος (**Εικόνα 3. 8**). Το αίμα συλλέγεται σε σωληνάρια με ηπαρίνη και φυγοκεντρείται άμεσα για την απομόνωση του ορού. Ο ορός του αίματος και τα ούρα κάθε ζώου φυλάσσονται στους -80 °C.



**Εικόνα 3. 8.** Σχηματική αναπαράσταση του πρωτοκόλλου της *in vivo* αξιολόγησης της δραστηριότητας των καινοτόμων νανογαλακτωμάτων υπογλυκαιμικών ουσιών.

Το *in vivo* πρωτόκολλο πήρε έγκριση από την Περιφέρεια Ηπείρου στις 06/06/2023 με αριθμό πρωτοκόλλου: 8099. Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό EEC Directive 2010/63/EU και του Προεδρικού Διατάγματος 56 της 30<sup>ης</sup> Απριλίου 2013.

**Πίνακας 3. 4.** Οι 3 ομάδες στις οποίες χωρίστηκαν οι μύες 129SV για την αξιολόγηση της δραστηριότητας των νανογαλακτωμάτων υπογλυκαιμικών ουσιών.

Ομάδα ζώων	Δραστική ουσία
Group A- <b>Control</b> (Ομάδα ελέγχου)	Χορήγηση νανογαλακτώματος χωρίς δραστική ουσία
Group B- <b>Dapagliflozin</b>	Χορήγηση νανογαλακτώματος με εγκλωβισμένη τη δραστική ουσία νταπαγλιφλοζίνη (10 mg/mL)
Group C- <b>Sitagliptin</b>	Χορήγηση νανογαλακτώματος με εγκλωβισμένη τη δραστική ουσία σιταγλιπτίνη (10 mg/mL)

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1. Μελέτες *in vitro*

#### 4.1.1. Αξιολόγηση της τοξικότητας του διαλύτη DMF

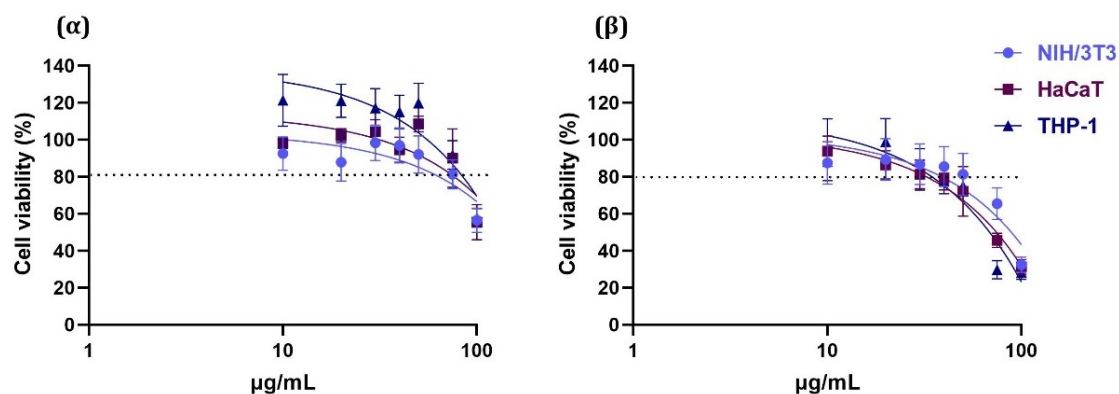
Ο διαλύτης DMF που χρησιμοποιήθηκε για την αποφυλλοποίηση του τυπικού γραφενίου (cG), εμφανίζει δόσο- και χρονο- εξαρτώμενη τοξικότητα σε ζωντανούς οργανισμούς<sup>168</sup>. Για τον λόγο αυτό, πριν τις *in vitro* δοκιμασίες, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της τοξικότητας του DMF μέσω MTT assay και ελέγχου απόπτωσης/ νέκρωσης στις τρεις κυτταρικές σειρές. Στις δοκιμασίες αυτές, ο διαλύτης DMF ελέγχθηκε σε δόσεις από 0.15% v/v (επί τοις εκατό όγκο κατ' όγκο) έως 1.5% v/v οι οποίες αντιστοιχούν σε δόσεις 10 µg/mL έως 100 µg/mL του cG (Πίνακας 4. 1.).

Πίνακας 4. 1. Αντιστοίχιση των συγκεντρώσεων (% v/v) του διαλύτη DMF με τις δόσεις του cG.

cG (µg/mL)	DMF (% v/v)
10	0.15
20	0.30
30	0.45
40	0.60
50	0.75
75	1.05
100	1.50

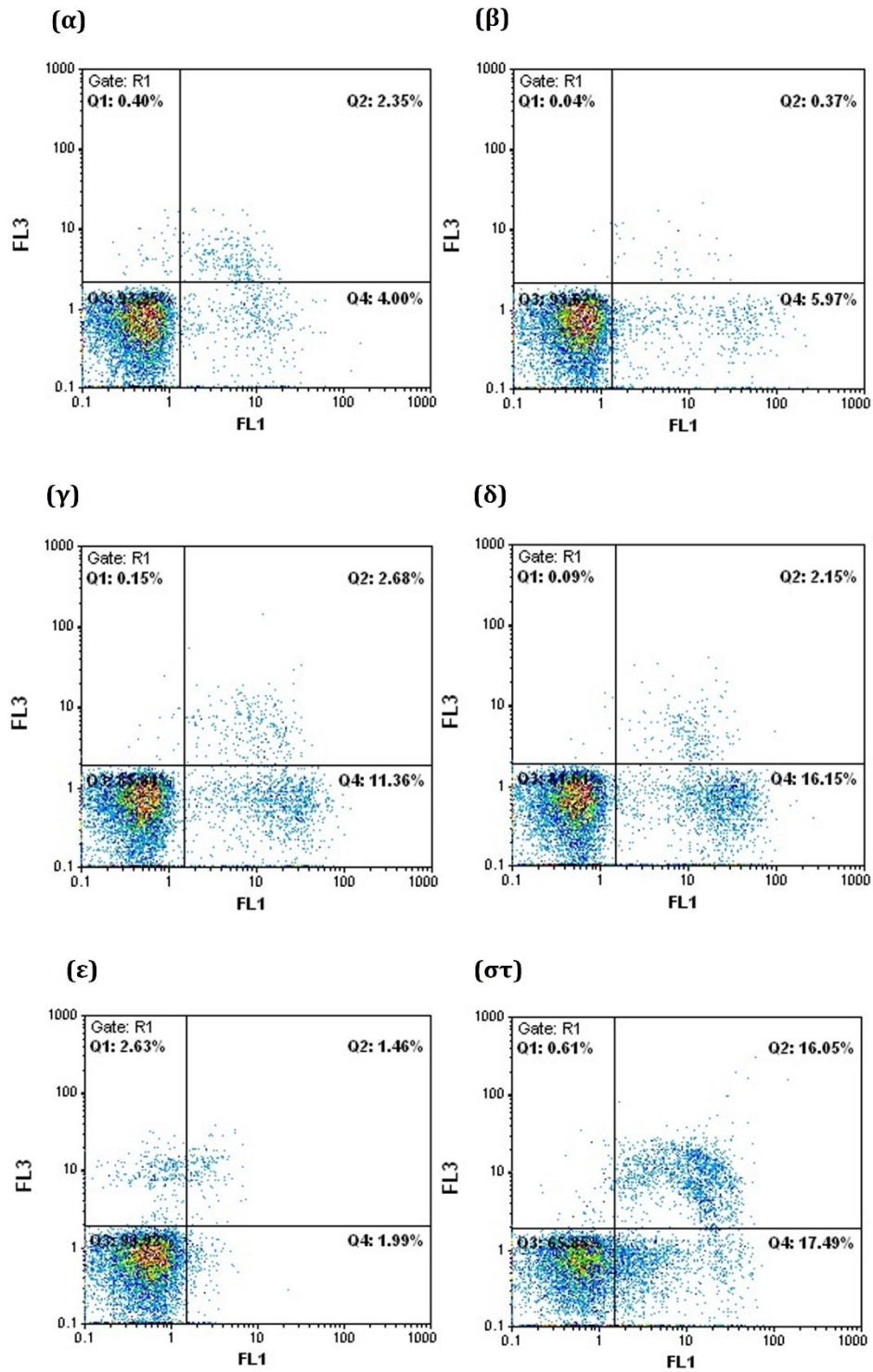
Στη δοκιμασία MTT, επώαση με όλες τις δόσεις του DMF έως και το 1.05% v/v (ισοδύναμο με δόσεις έως τα 75 µg/mL του cG) για 24 ώρες δεν είχε σημαντική επίδραση στη βιωσιμότητα των τριών κυτταρικών σειρών. Ωστόσο, στη μέγιστη δόση του 1.50% v/v (ισοδύναμο με 100 µg/mL του cG), η κυτταρική βιωσιμότητα μειώθηκε κατά 50% σε όλες τις κυτταρικές σειρές (Εικόνα 4. 1α). Στις 48 ώρες η θνησιμότητα αυξήθηκε, γεγονός που υπογραμμίζει τη χρονο- εξαρτώμενη τοξικότητα του διαλύτη. Πιο συγκεκριμένα, έως τη δόση του 0.60% v/v (ισοδύναμο με 40 µg/mL του cG), το DMF φάνηκε να είναι καλά ανεκτό από τα

κύτταρα (τιμές κυτταρικής βιωσιμότητας μεγαλύτερες του 80%). Στις μεγαλύτερες δόσεις όμως παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας η οποία έφτασε σε ποσοστά έως το 20% στη μέγιστη δόση, στις τρεις κυτταρικές σειρές (**Εικόνα 4. 1β**).

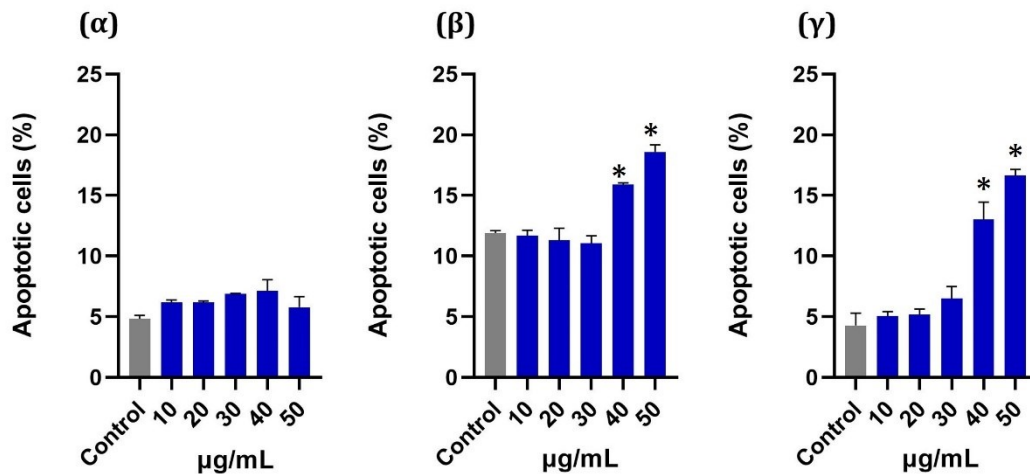


**Εικόνα 4. 1.** Βιωσιμότητα των κυττάρων NIH/3T3, HaCaT και THP-1 έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις του διαλύτη DMF για 24 (**α**) και 48 (**β**) ώρες.

Όσον αφορά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης των κυττάρων, επώαση με δόσεις 0.15% v/v έως 0.75% v/v του DMF (ισοδύναμο με δόσεις από 10 έως 50 µg/mL του cG) για 24 ώρες δεν επηρέασε την απόπτωση των NIH/3T3 κυττάρων (**Εικόνα 4. 2 α, β, Εικόνα 4. 3 α**). Ωστόσο, στα κύτταρα HaCaT ο αποπτωτικός πληθυσμός αυξήθηκε από το  $11.91 \pm 0.18\%$  στο  $15.88 \pm 0.16\%$  μετά από επώαση με 0.6% v/v DMF και στο  $18.59 \pm 0.59\%$  μετά από επώαση με 0.75% v/v DMF (**Εικόνα 4. 2 γ, δ, Εικόνα 4. 3 β**). Στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα, ο αποπτωτικός πληθυσμός αυξήθηκε από  $4.28 \pm 1.02\%$  (control) στο  $13.02 \pm 1.44\%$  στη δόση των 0.60% v/v και στο  $16.65 \pm 0.50\%$  στη δόση των 0.75% v/v (**Εικόνα 4. 2 ε, στ, Εικόνα 4. 3 γ**).



**Εικόνα 4. 2.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης και νέκρωσης του πληθυσμού των κυττάρων NIH/3T3 (**α**, **β**), HaCaT (**γ**, **δ**) και THP-1 (**ε**, **στυ**) έπειτα από επώαση για 24 ώρες με 50 μg/mL του διαλύτη DMF. (**α**): NIH/3T3 control, (**β**): NIH/3T3 + 50 μg/mL DMF, (**γ**): HaCaT control, (**δ**): HaCaT + 50 μg/mL DMF, (**ε**): THP-1 control, (**στυ**): THP-1 + 50 μg/mL DMF.



**Εικόνα 4. 3.** Ποσοστά του αποπτωτικού πληθυσμού των NIH/3T3 (α), HaCaT (β) και THP-1 (γ) κυττάρων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις του διαλύτη DMF. Ο DMF δοκιμάστηκε σε δόσεις από 0.15% v/v έως 0.75% v/v που ισοδυναμεί σε δόσεις 10 έως 50 µg/mL του cG. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

Συνολικά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δόσεις του διαλύτη DMF μεγαλύτερες από το 0.30% v/v το οποίο αντιστοιχεί σε 20 µg/mL του cG, προκαλεί κυτταρικό θάνατο πιθανότατα μέσω επαγωγής αποπτωτικών σηματοδοτικών μονοπατιών, τουλάχιστον στις κυτταρικές σειρές HaCaT και THP-1. Στα κύτταρα NIH/3T3 υψηλές δόσεις του DMF οδηγούν πάλι σε κυτταρικό θάνατο αλλά πιθανότατα μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Καθώς οι τρεις κυτταρικές σειρές μαζί απεικονίζουν ένα μοντέλο μελέτης του δέρματος, η *in vitro* αξιολόγηση της τοξικότητας του cG περιορίστηκε έως τη δόση των 20 µg/mL.

#### 4.1.2. Δοκιμασίες MTT

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τον έλεγχο της τοξικότητας του διαλύτη DMF, οδήγησαν στον περιορισμό της μελέτης τοξικότητας του χημικού cG έως τη δόση των 20 µg/mL. Έτσι, στη δοκιμασία MTT, το cG ελέγχθηκε στις δόσεις: 0.01, 0.10, 0.25, 0.50, 1, 10 και 20 µg/mL, για 24 και 48 ώρες.

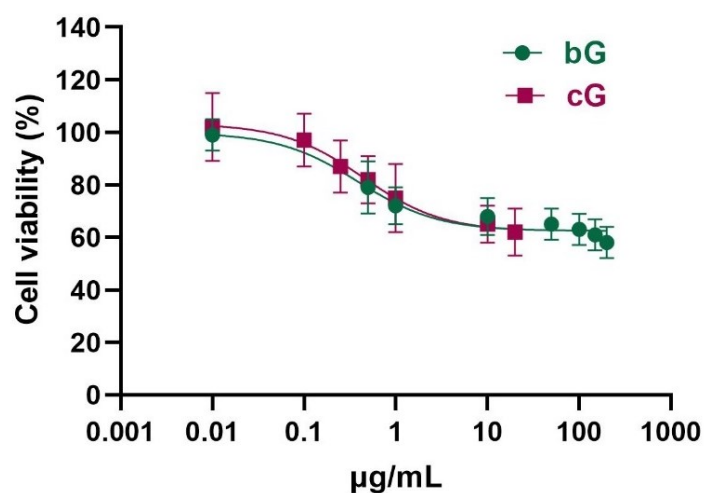
Στις *in vitro* δοκιμασίες των δύο άλλων χημικών δομών, cD και cN, η μέγιστη δόση καθορίστηκε ώστε το ποσό του διαλύτη DMSO να μην ξεπερνάει το 1%. Έτσι, οι δομές αυτές καθώς επίσης και όλες οι βιολογικά αποφυλλοποιημένες δομές γραφενίου, δοκιμάστηκαν έως και δεκαπλάσια δόση από το cG και συγκεκριμένα στις δόσεις: 0.5, 1, 10, 50, 100, 150 και 200 µg/mL για 24 και 48 ώρες.



#### 4.1.2.1. Βιογραφένιο & χημικό γραφένιο

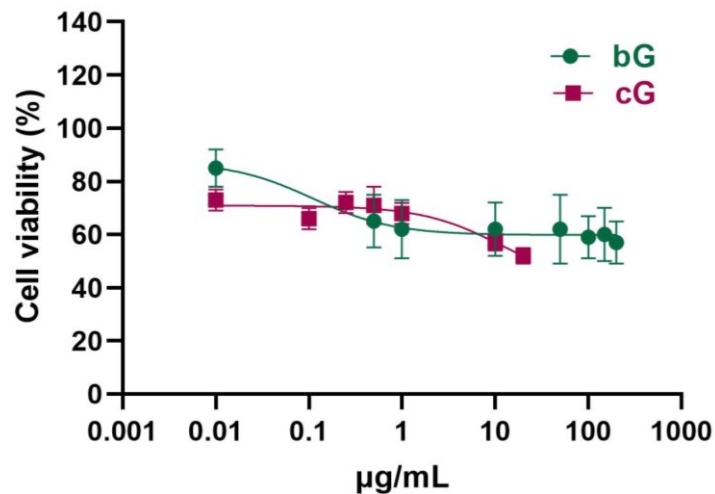
##### Κυτταρική σειρά NIH/3T3

Στην κυτταρική σειρά NIH/3T3 επώαση με το bG και το cG για 24 ώρες δεν προκάλεσε τοξικότητα έως τη δόση των 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , καθώς τα ποσοστά κυτταρικής βιωσιμότητας παρέμειναν υψηλά (άνω του 80%). Από τη δόση του 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  έως τα 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , το cG προκάλεσε ήπια δόσο- εξαρτώμενη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, από το 75% στο 65%. Το bG από το 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  προκάλεσε μείωση της βιωσιμότητας των ινοβλαστών στο 70% και σε όλες τις επόμενες δόσεις, δηλαδή από τα 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  έως τα 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  η βιωσιμότητα διατηρήθηκε μεταξύ 60- 65% (Εικόνα 4. 4).



**Εικόνα 4. 4.** Κυτταρική βιωσιμότητα των NIH/3T3 κυττάρων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG για 24 ώρες.

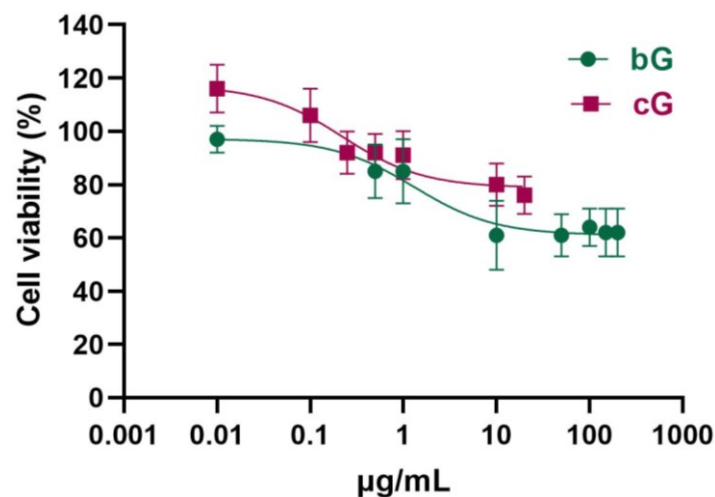
Το cG φάνηκε να έχει χρονο- εξαρτώμενη τοξικότητα στην κυτταρική σειρά NIH/3T3 καθώς στις 48 ώρες επώασης η βιωσιμότητα των κυττάρων σε κάθε δόση ήταν κατά 10-20% μικρότερη από αυτή στις 24 ώρες. Πιο συγκεκριμένα, στις δόσεις από 0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  έως 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  το cG παρουσίασε ήπια τοξικότητα με τα ποσοστά της κυτταρικής βιωσιμότητας να βρίσκονται στο 70%. Στις δύο υψηλότερες δόσεις, στα 10 και στα 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώθηκε στο 55%. Το bG δεν φάνηκε να έχει χρονο- εξαρτώμενη τοξικότητα παρά μόνο στις υψηλές δόσεις. Από 0.5 έως 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  η κυτταρική βιωσιμότητα ήταν σταθερή στα 60-65% και μειώθηκε στο 55% στις δόσεις από 100 έως 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Εικόνα 4. 5).



**Εικόνα 4. 5.** Κυτταρική βιωσιμότητα των NIH/3T3 κυττάρων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG για 48 ώρες.

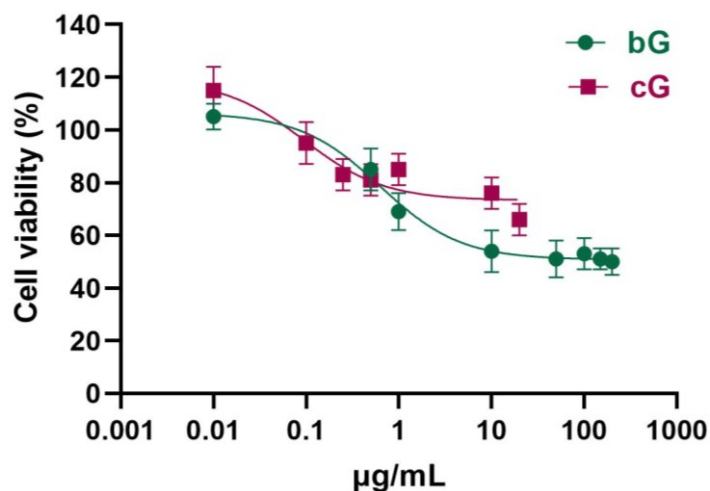
#### *Κυτταρική σειρά HaCaT*

Στην κυτταρική σειρά HaCaT, στις 24 ώρες το cG δεν προκάλεσε τοξικότητα έως και τη δόση των 10 µg/mL. Στη μέγιστη δόση των 20 µg/mL η κυτταρική βιωσιμότητα μειώθηκε ελαφρώς στο 75%. Σε αυτή την κυτταρική σειρά, το bG στις 24 ώρες είχε την ίδια επίδραση με αυτή που είχε στα κύτταρα NIH/3T3. Έως τη δόση του 1µg/mL ήταν μη τοξικό ενώ από τα 10 έως τα 200 µg/mL η βιωσιμότητα μειώθηκε και παρέμεινε σταθερή, στο 60-65% (**Εικόνα 4. 6**).



**Εικόνα 4. 6.** Κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG για 24 ώρες.

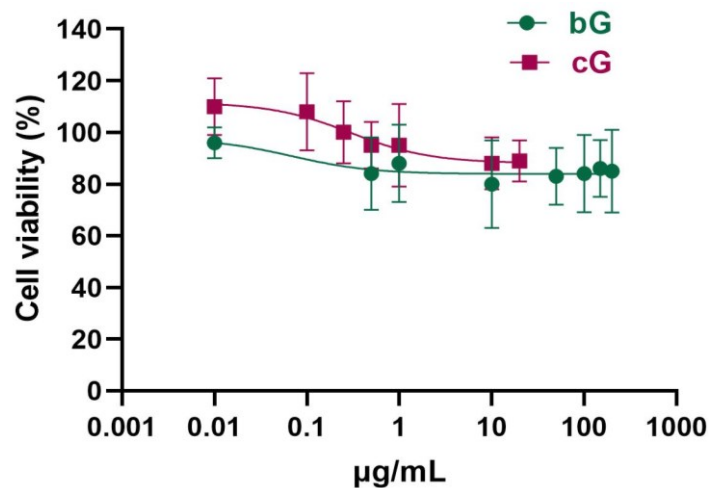
Στα κύτταρα HaCaT το bG και το cG δεν παρουσίασαν χρονο- εξαρτώμενη τοξικότητα. Στις 48 ώρες επώασης, το cG δεν ήταν τοξικό έως τη δόση του 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ενώ μικρή μείωση της βιωσιμότητας στο 75% και στο 65% σημειώθηκε στις μέγιστες δόσεις των 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  και 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , αντίστοιχα. Το bG ήταν ασφαλές έως τα 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Στη δόση του 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  παρατηρήθηκε μικρή πτώση της βιωσιμότητας των κυττάρων στο 70% και από τα 10 έως τα 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  η βιωσιμότητα μειώθηκε και παρέμεινε χαμηλή στο 50% (Εικόνα 4. 7).



**Εικόνα 4. 7.** Κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG για 48 ώρες.

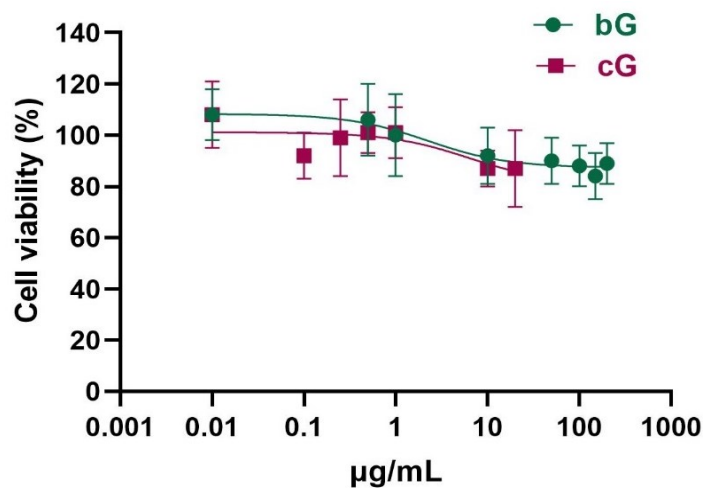
#### **Κυτταρική σειρά THP-1**

Τα δύο νανοϋλικά ήταν καλά ανεκτά από τα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα σε όλες τις δόσεις, στις 24 ώρες επώασης. Τα ποσοστά κυτταρικής βιωσιμότητας ήταν μεγαλύτερα του 85% ακόμα και στη μέγιστη δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cG και των 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bG (Εικόνα 4. 8).



**Εικόνα 4. 8.** Κυτταρική βιωσιμότητα των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG για 24 ώρες.

Όπως στις 24 ώρες, έτσι και στις 48 ώρες επώασης, το bG και το cG δεν επηρέασαν την βιωσιμότητα των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων. Το χαμηλότερο ποσοστό κυτταρικής βιωσιμότητας που σημειώθηκε ήταν 85% στις μέγιστες δόσεις (**Εικόνα 4. 9**).

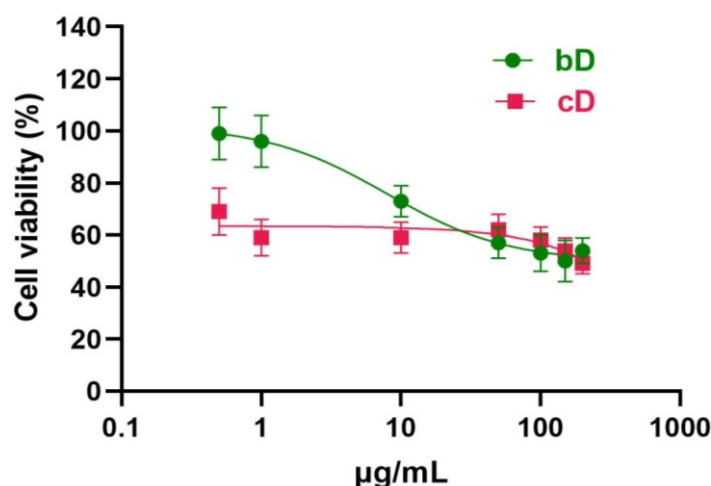


**Εικόνα 4. 9.** Κυτταρική βιωσιμότητα των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG για 48 ώρες.

#### 4.1.2.2. Bio N- Dopped graphene και Chem N- Doped graphene

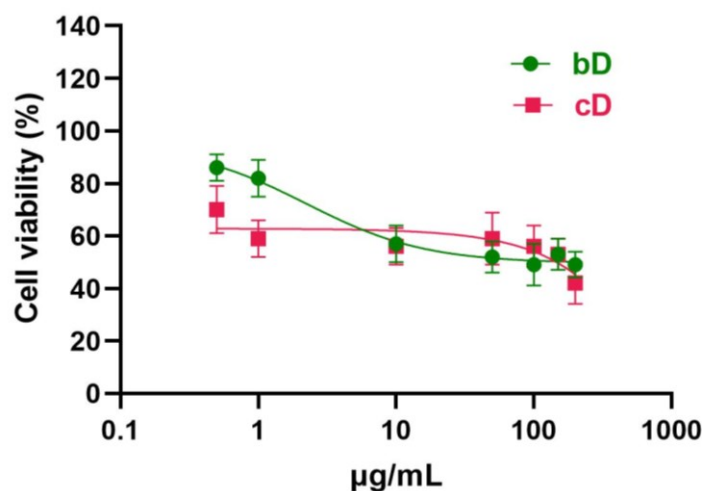
##### Κυτταρική σειρά NIH/3T3

Στα κύτταρα NIH/3T3, στις 24 ώρες το cD ήταν τοξικό από τη μικρότερη δόση των 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  καθώς η βιωσιμότητα των κυττάρων ήταν στο 70%. Το ποσοστό αυτό μειώθηκε στο 60% στις δόσεις από 1- 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  και έφτασε έως το 50% στη μέγιστη δόση των 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Στις μικρές δόσεις, δηλαδή έως τα 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , το bD ήταν λιγότερο τοξικό από το cD. Μέχρι τη δόση του 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ήταν μη τοξικό καθώς τα ποσοστά της κυτταρικής βιωσιμότητας παρέμειναν υψηλά, στο 95%. Στις μεγαλύτερες δόσεις παρατηρήθηκε δόσο- εξαρτώμενη τοξικότητα και η κυτταρική βιωσιμότητα μειώθηκε στο 50- 55% στις μέγιστες δόσεις (**Εικόνα 4. 10**).



**Εικόνα 4. 10.** Κυτταρική βιωσιμότητα των NIH/3T3 κυττάρων έπειτα επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD για 24 ώρες.

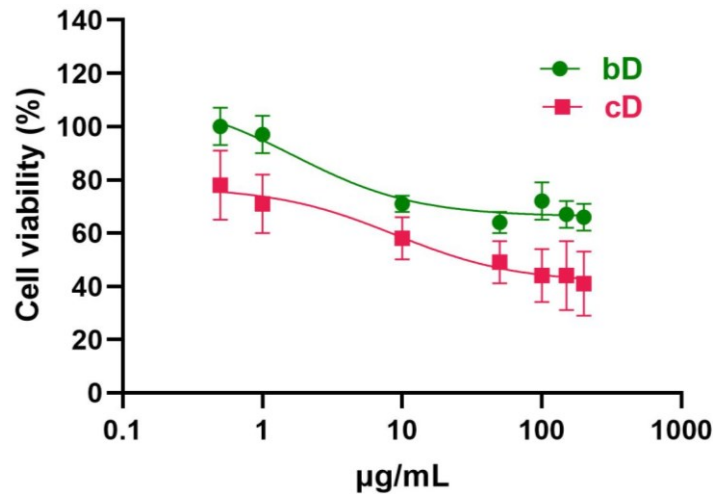
Στις 48 ώρες επώασης, το cD είχε την ίδια επίδραση στα NIH/3T3 κύτταρα με αυτή που σημείωσε στις 24 ώρες. Η κυτταρική βιωσιμότητα ήταν στο 70% στη μικρότερη δόση (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) και μειώθηκε έως το 45% στη μέγιστη δόση. Το bD είχε επίσης αντίστοιχη εικόνα στις 48 ώρες με αυτή των 24 ωρών, με τη διαφορά ότι η κυτταρική βιωσιμότητα μειώθηκε κάτω από 50% στις υψηλές δόσεις (**Εικόνα 4. 11**).



**Εικόνα 4. 11.** Κυτταρική βιωσιμότητα των NIH/3T3 κυττάρων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD για 48 ώρες.

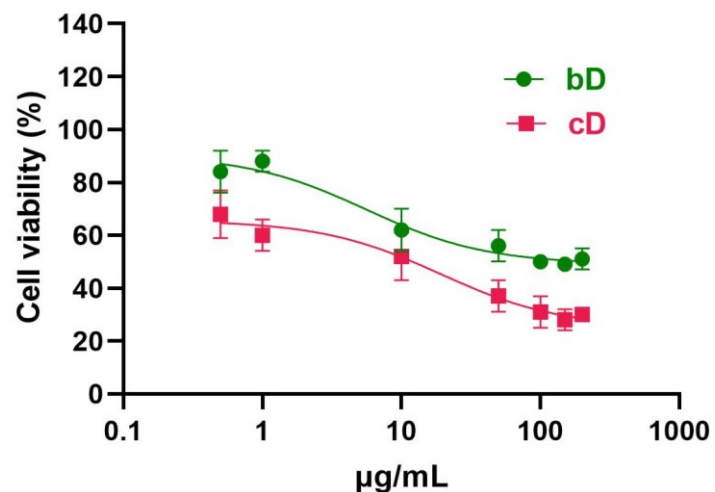
#### *Κυτταρική σειρά HaCaT*

Στην κυτταρική σειρά HaCaT, τόσο το bD όσο και το cD εμφάνισαν δόσο-εξαρτώμενη τοξικότητα στις 24 ώρες επώασης. Ωστόσο το cD ήταν σημαντικά πιο τοξικό από το bD σε όλες τις δόσεις. Το bD έως τη δόση του 1 µg/mL ήταν μη τοξικό, καθώς η κυτταρική βιωσιμότητα ήταν στο 97-100%. Η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώθηκε στο 70% στη δόση των 10 µg/mL και έφτασε σε πλατό στο 65% στις επόμενες δόσεις. Το cD ήδη από τη μικρότερη δόση των 0.5 µg/mL ήταν τοξικό, καθώς η βιωσιμότητα των κυττάρων στη δόση αυτή ήταν στο 75%. Με την αύξηση της δόσης, η κυτταρική βιωσιμότητα μειώθηκε σημαντικά και έφτασε στα 40-45% στις δόσεις από 50 έως 200 µg/mL) (**Εικόνα 4. 12**).



**Εικόνα 4. 12.** Κυτταρική βιωσιμότητα HaCaT κυττάρων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD για 24 ώρες.

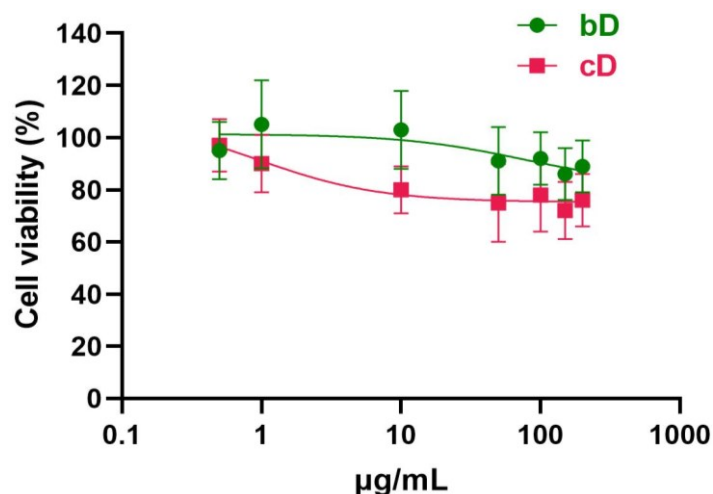
Αντίστοιχη εικόνα δοσο- εξαρτώμενης τοξικότητας εμφάνισαν τα δύο νανοϋλικά και στις 48 ώρες επώασης αλλά με χαμηλότερα ποσοστά κυτταρικής επιβίωσης από αυτά που σημειώθηκαν στις 24 ώρες. Το cD φάνηκε να είναι εξαιρετικά τοξικό καθώς από τη δόση των 50 µg/mL και έπειτα η βιωσιμότητα των κυττάρων ήταν στο 30-35%. Όπως και στις 24 ώρες, έτσι και στις 48 ώρες επώασης, το bD ήταν μη τοξικό έως τη δόση του 1 µg/mL και έπειτα μείωσε δοσο- εξαρτώμενα τη βιωσιμότητα των κυττάρων, μέχρι το 50% στις μέγιστες δόσεις (100- 200 µg/mL) (Εικόνα 4. 13).



**Εικόνα 4. 13.** Κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD για 48 ώρες.

### Κυτταρική σειρά THP-1

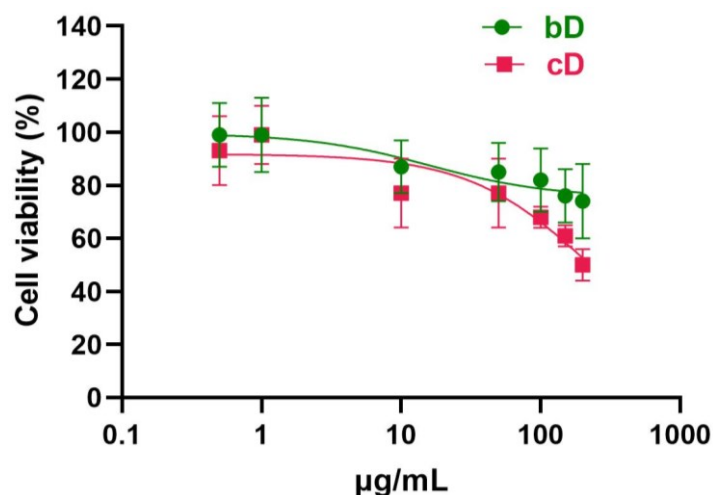
Στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα, το bD στις 24 ώρες δεν ήταν τοξικό καθώς σε όλες τις δόσεις τα ποσοστά της κυτταρικής βιωσιμότητας ήταν μεγαλύτερα του 90%. Το cD ήταν σχετικά καλά ανεκτό. Δεν προκάλεσε τοξικότητα έως και τη δόση των 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Στις δόσεις από 50 έως 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  η κυτταρική βιωσιμότητα μειώθηκε ελαφρώς στο 70-75% (Εικόνα 4. 14).



**Εικόνα 4. 14.** Κυτταρική βιωσιμότητα των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD για 24 ώρες.

Στις 48 ώρες επώασης, το bD ήταν μη τοξικό έως και τη δόση των 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (κυτταρική βιωσιμότητα >80%). Η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώθηκε ελαφρώς (75%) μόνο στις δύο μέγιστες δόσεις δηλαδή στα 150 και τα 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Αντίθετα, στις 48 ώρες το cD σημείωσε σημαντική δόσο- εξαρτώμενη τοξικότητα. Μέχρι τη δόση του 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  δεν ήταν τοξικό, ωστόσο από τα 10 έως τα 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώθηκε σημαντικά και έφτασε έως το 50% στη μέγιστη δόση (Εικόνα 4. 15).



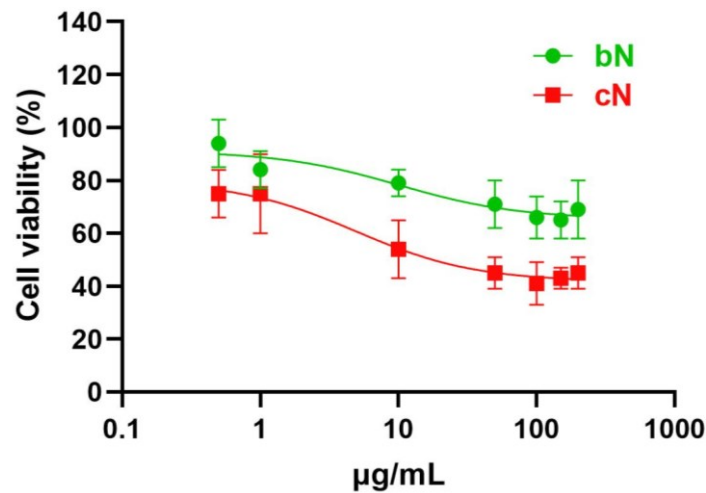


**Εικόνα 4. 15.** Κυτταρική βιωσιμότητα των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD για 48 ώρες.

#### 4.1.2.3. Bio\_ Nitrate graphene και Chem\_ Nitrate graphene

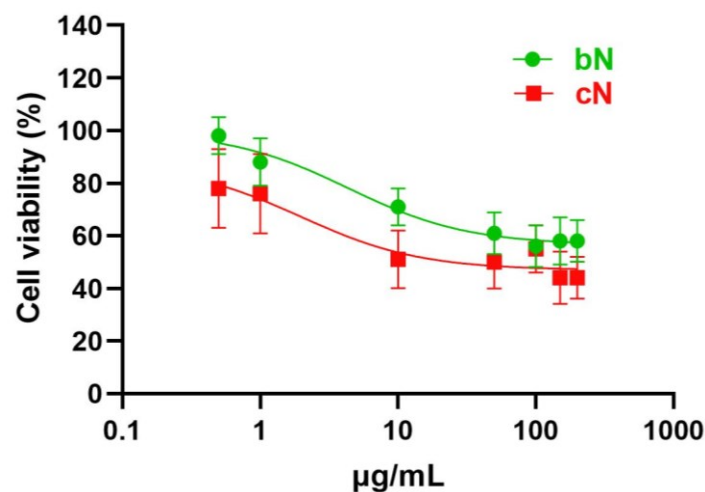
##### *Κυτταρική σειρά NIH/3T3*

Τόσο το bN όσο και το cN στις 24 ώρες επώασης προκάλεσαν δόσο- εξαρτώμενη τοξικότητα στα κύτταρα NIH/3T3. Σε όλες τις δόσεις το cN ήταν πιο τοξικό από το bN. Το bN ήταν μη τοξικό έως τη δόση των 10 µg/mL. Στις μεγαλύτερες δόσεις, δηλαδή από τα 50 έως τα 200 µg/mL, η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώθηκε και παρέμεινε σταθερή στο 65- 70%. Αντιθέτως, το cN ήταν τοξικό σε όλες τις δόσεις. Ήδη από τις μικρότερες δόσεις των 0.5 και 1 µg/mL η κυτταρική βιωσιμότητα ήταν στο 75% και στην επόμενη δόση των 10 µg/mL έπεσε στο 55%. Από τη δόση των 50 µg/mL έως και τη δόση των 200 µg/mL, η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώθηκε στο 40-45% (**Εικόνα 4. 16****Εικόνα 4. 30**).



**Εικόνα 4. 16.** Κυτταρική βιωσιμότητα των NIH/3T3 κυττάρων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN για 24 ώρες.

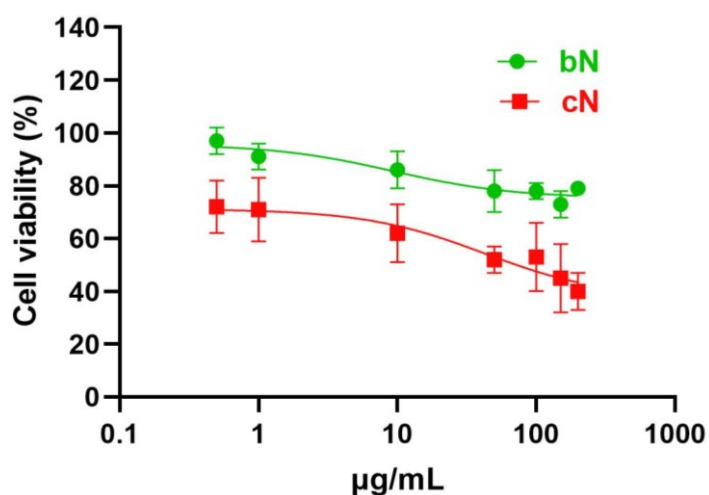
Το cN δεν φάνηκε να έχει χρονο- εξαρτώμενη τοξικότητα στα NIH/3T3 κύτταρα. Στις 48 ώρες επώασης, η επίδραση του ήταν ίδια με αυτή των 24 ωρών, μειώνοντας εξίσου σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Το bN σημείωσε ήπια χρονο- εξαρτώμενη τοξικότητα. Στις 48 ώρες επώασης, ήταν μη τοξικό έως τη δόση του 1 µg/mL (κυτταρική βιωσιμότητα > 80%). Στη δόση των 10 µg/mL η βιωσιμότητα των NIH/3T3 μειώθηκε στο 70% και από τη δόση των 50 έως τη δόση των 200 µg/mL μειώθηκε στο 55-60% (**Εικόνα 4. 17**).



**Εικόνα 4. 17.** Κυτταρική βιωσιμότητα των NIH/3T3 κυττάρων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN για 48 ώρες.

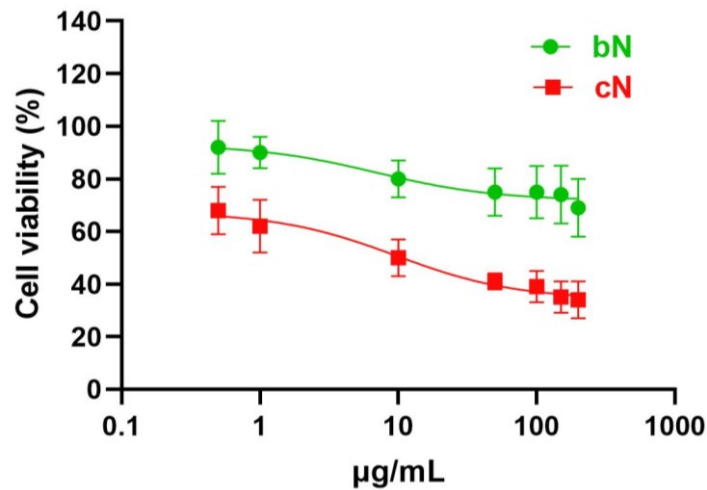
### Κυτταρική σειρά HaCaT

Στην κυτταρική σειρά HaCaT το bN και το cN είχαν πολύ διαφορετική επίδραση μεταξύ τους. Στις 24 ώρες επώασης, το bN ήταν καλά ανεκτό από τα κύτταρα σε όλες τις δόσεις που δοκιμάστηκαν. Έως τα 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ήταν μη τοξικό (κυτταρική βιωσιμότητα > 80%) και στις μεγαλύτερες δόσεις, δηλαδή από τα 50 έως τα 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  παρατηρήθηκε μία πολύ μικρή πτώση της κυτταρικής βιωσιμότητας στα 75-78%. Αντιθέτως, το cN ήταν τοξικό σε όλες τις δόσεις. Έως τη δόση του 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  η βιωσιμότητα των κυττάρων ήταν στο 70% αλλά στις μεγαλύτερες δόσεις παρατηρήθηκε σημαντική δόσο- εξαρτώμενη μείωση. Μάλιστα στις μέγιστες δόσεις των 150 και 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  η βιωσιμότητα των κυττάρων έφτασε στο 40- 45% (Εικόνα 4. 18).



**Εικόνα 4. 18.** Κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN για 24 ώρες.

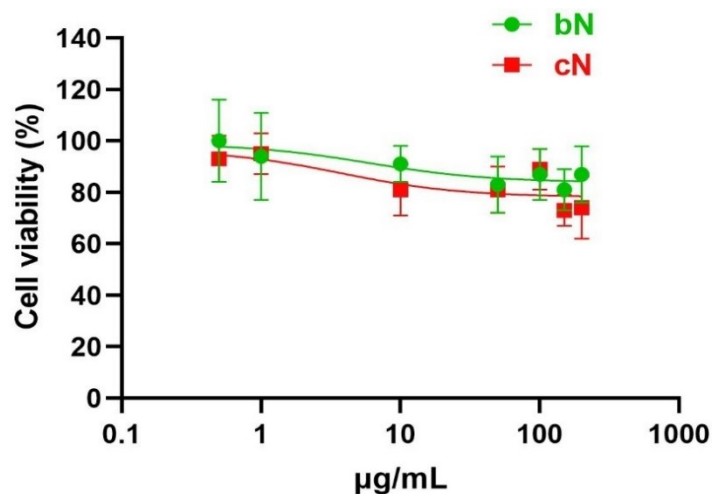
Στις 48 ώρες επώασης, το bN ήταν πάλι καλά ανεκτό από τα κύτταρα HaCaT. Έως τα 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  δεν παρατηρήθηκε τοξικότητα ενώ η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώθηκε ελαφρώς στο 70- 75% στις δόσεις από 50 έως 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Το cN στις 48 ώρες επώασης φάνηκε να είναι ακόμη πιο τοξικό από ότι στις 24 ώρες. Ήδη από τις μικρές δόσεις, 0.5 και 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , τα ποσοστά της κυτταρικής επιβίωσης ήταν στο 65% και μειώθηκαν ακόμη περισσότερο στις επόμενες δόσεις, με δόσο- εξαρτώμενο τρόπο. Μάλιστα, στις δύο μέγιστες δόσεις των 150 και 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , η βιωσιμότητα των κυττάρων ήταν μόλις 35% (Εικόνα 4. 19).



**Εικόνα 4. 19.** Κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN για 48 ώρες.

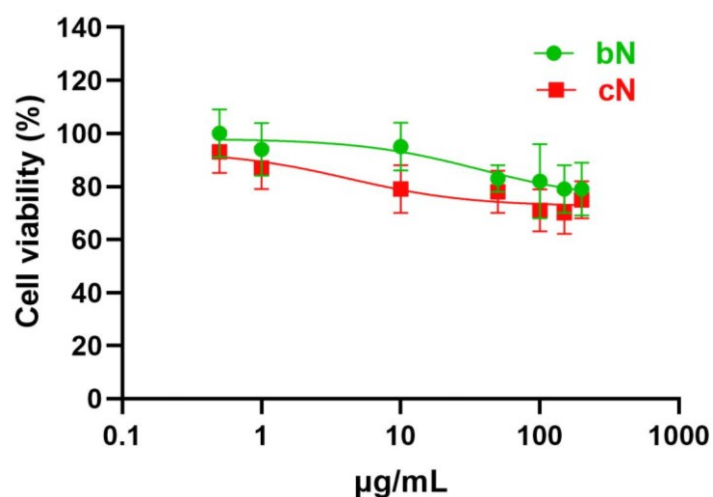
#### Κυτταρική σειρά THP-1

Το bN στις 24 ώρες δεν προκάλεσε τοξικότητα στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα. Σε όλες τις δόσεις τα ποσοστά κυτταρικής επιβίωσης ήταν μεγαλύτερα του 80%. Το cN ήταν μη τοξικό έως τα 100 µg/mL. Στις δύο μέγιστες δόσεις των 150 και 200 µg/mL, η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώθηκε ελαφρώς στο 75% (**Εικόνα 4. 20**).



**Εικόνα 4. 20.** Κυτταρική βιωσιμότητα των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN για 24 ώρες.

Στις 48 ώρες, το bN ήταν πάλι μη τοξικό σε όλες τις δόσεις. Το cN ήταν ασφαλές έως τη δόση των 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Στις μεγαλύτερες δόσεις, δηλαδή από 100 έως 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  η κυτταρική βιωσιμότητα μειώθηκε στο 70-75% (Εικόνα 4. 21).



**Εικόνα 4. 21.** Κυτταρική βιωσιμότητα των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN για 48 ώρες.

#### 4.1.3. Έλεγχος της ικανότητας σχηματισμού αποικιών

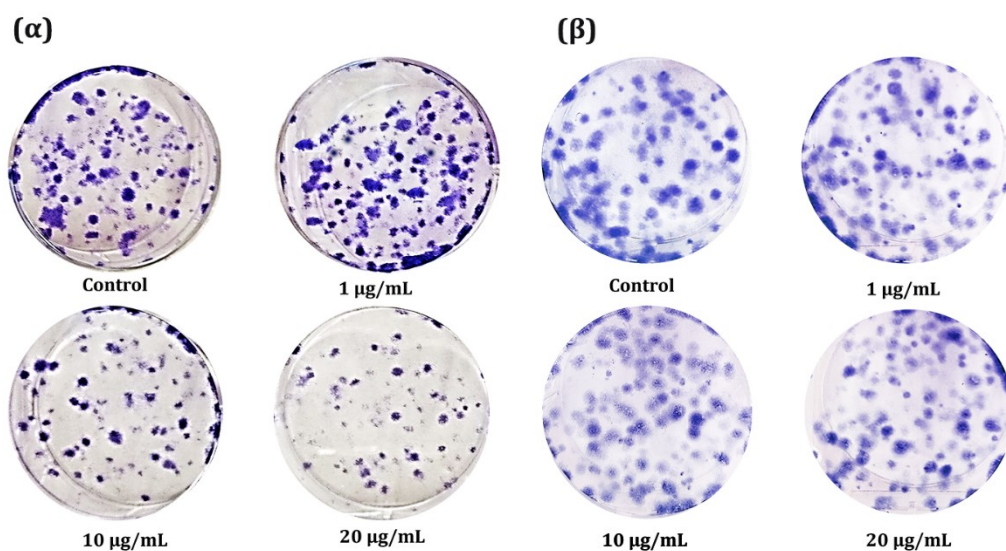
Με την κλωνογόνο δοκιμασία μπορεί να εκτιμηθεί η πιθανή μακροπρόθεσμη τοξικότητα των νανοϋλικών στα ζωντανά κύτταρα <sup>160</sup>. Η τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε κύτταρα που αναπτύσσονται προσκολλημένα στο ταπήδιο και πολλαπλασιάζονται <sup>169</sup>. Για τον λόγο αυτό, τα THP-1 κύτταρα αποκλείστηκαν από αυτή τη μελέτη.

Όλα τα νανοϋλικά εκτός από το cG, δοκιμάστηκαν στις κυτταρικές σειρές HaCaT και NIH/3T3 στις δόσεις: 1, 10, 20, 50 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Η τοξικότητα του cG αξιολογήθηκε στις δόσεις 1, 10, 20 και 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Η επίδραση των νανοϋλικών στην ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων εκτιμήθηκε στις 48 ώρες επώασης.

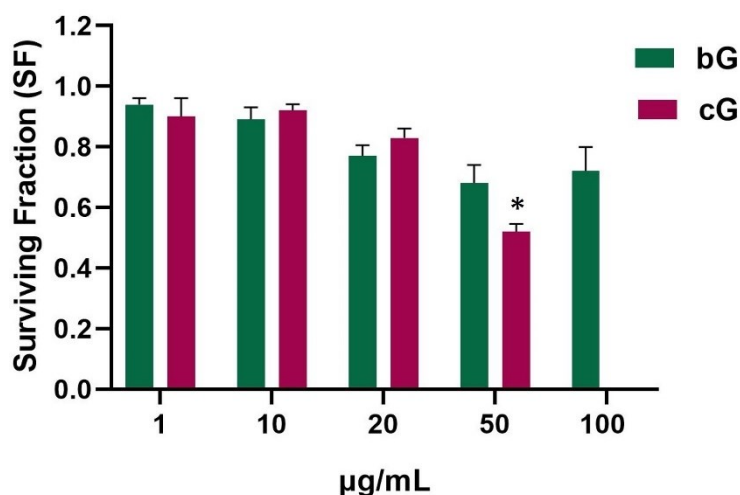
#### 4.1.3.1. Biographene & Chemical graphene

##### Κυτταρική σειρά NIH/3T3

Στα κύτταρα NIH/3T3, οι δύο χαμηλότερες δόσεις του bG (1 και 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) δεν επηρέασαν την ικανότητα των κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες. Οι μεγαλύτερες δόσεις, μείωσαν το σχηματισμό αποικιών κατά περίπου 20%. Η μείωση αυτή δεν ήταν δοσο- εξαρτώμενη (**Εικόνα 4. 22α, Εικόνα 4. 23**). Το cG, έως τα 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  δεν επηρέασε το σχηματισμό των αποικιών. Ωστόσο στη μέγιστη δόση των 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  παρατηρήθηκε σημαντική μείωση κατά 50% στις αποικίες των NIH/3T3 κυττάρων (**Εικόνα 4. 22 β, Εικόνα 4. 23**).



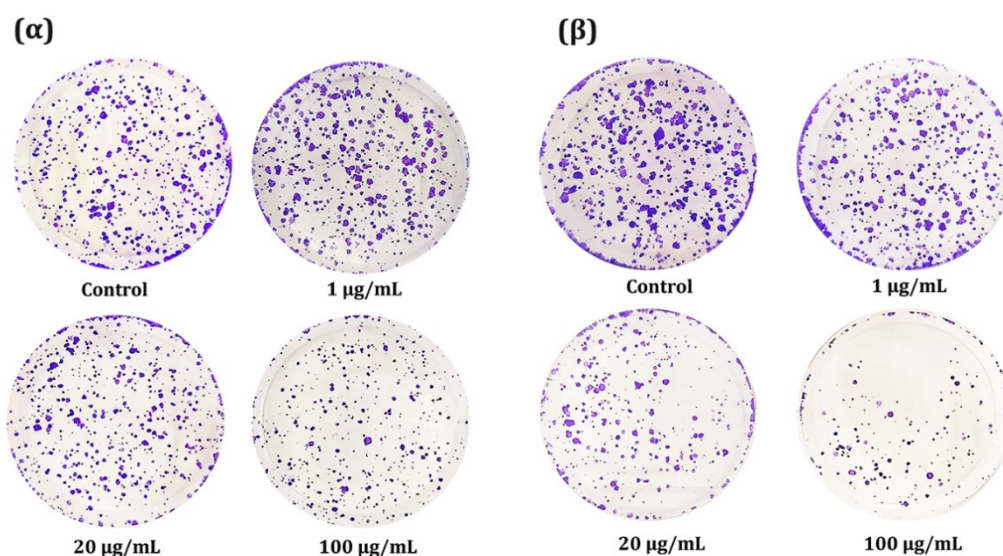
**Εικόνα 4. 22.** Ενδεικτικές εικόνες της κλωνογόνου δοκιμασίας στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG (**α**) και cG (**β**) για 48 ώρες.



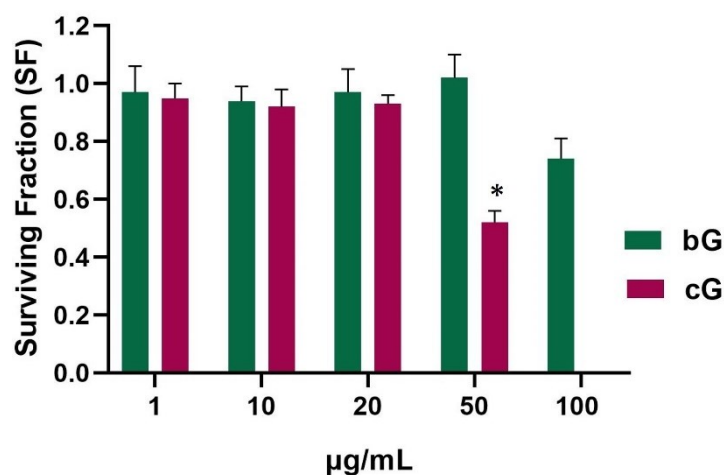
**Εικόνα 4. 23.** Κλωνογόνος δοκιμασία στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG για 48 ώρες. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

#### Κυτταρική σειρά HaCaT

Στα κύτταρα HaCaT, μόνο η μέγιστη δόση των 100 µg/mL του bG επηρέασε την ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων. Το κλάσμα επιβίωσης (SF) παρέμεινε σταθερό στο 0.9-1 για όλες τις δόσεις από 1 έως 50 µg/mL και μειώθηκε στο 0.7 στη μέγιστη δόση των 100 µg/mL. Δόσεις από 1 έως 20 µg/mL του cG επίσης δεν επηρέασαν τον σχηματισμό αποικιών των κυττάρων HaCaT ( $SF \approx 0.9$ ). Ωστόσο, στη μέγιστη δόση των 50 µg/mL παρατηρήθηκε σημαντική μείωση 50% στο σχηματισμό αποικιών των κερατινοκυττάρων (**Εικόνα 4. 24 β**, **Εικόνα 4. 25**).



**Εικόνα 4. 24.** Ενδεικτικές εικόνες της κλωνογόνου δοκιμασίας στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG (**α**) και cG (**β**) για 48 ώρες.



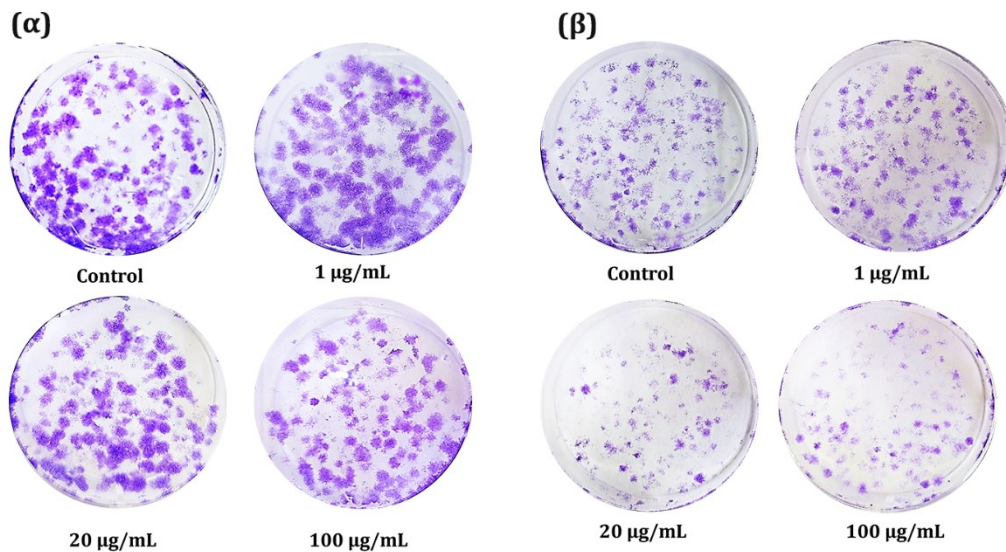
**Εικόνα 4. 25.** Κλωνογόνος δοκιμασία στα κύτταρα HaCaT μετά από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG για 48 ώρες. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

#### 4.1.3.2. Bio\_ N- Doped & Chem\_ N- Doped

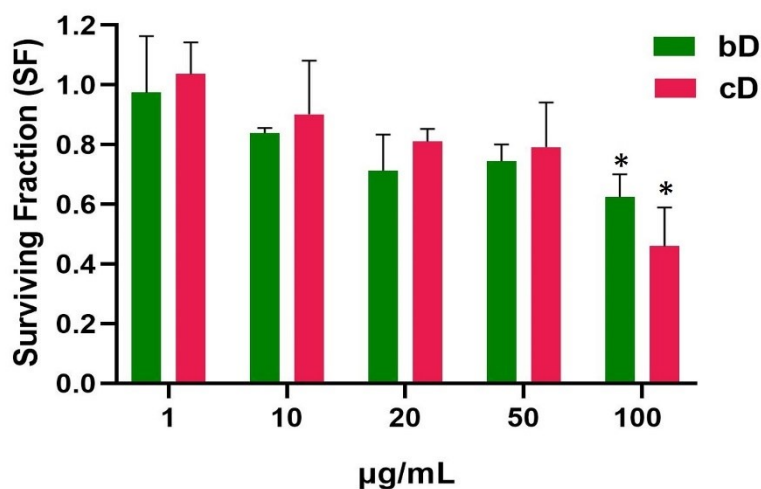
##### *Κυτταρική σειρά NIH/3T3*

Επώαση με bD στα κύτταρα NIH/3T3 για 48 ώρες είχε ως αποτέλεσμα δόσο-εξαρτώμενη μείωση στο σχηματισμό αποικιών των κυττάρων. Το SF ήταν 0.9 στη μικρότερη δόση (1 µg/mL) και έπειτα μειώθηκε στο 0.8 στη δόση των 10 µg/mL, στο 0.7 στις δόσεις 20 και 50 µg/mL και στο 0.65 στη μέγιστη δόση των 100 µg/mL (**Εικόνα 4. 26 α, Εικόνα 4. 27**). Το cD στις δόσεις 1 και 10 µg/mL δεν επηρέασε την ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων. Ωστόσο στις μεγαλύτερες δόσεις των 20 και των 50 µg/mL το SF μειώθηκε στο 0.8. Στη μέγιστη δόση των 100 µg/mL του cD σημειώθηκε σημαντική μείωση στις αποικίες των κυττάρων με το SF να είναι 0.45 (**Εικόνα 4. 26 β, Εικόνα 4. 27**)





**Εικόνα 4. 26.** Ενδεικτικές εικόνες της κλωνογόνου δοκιμασίας στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD (**α**) και cD (**β**) για 48 ώρες.

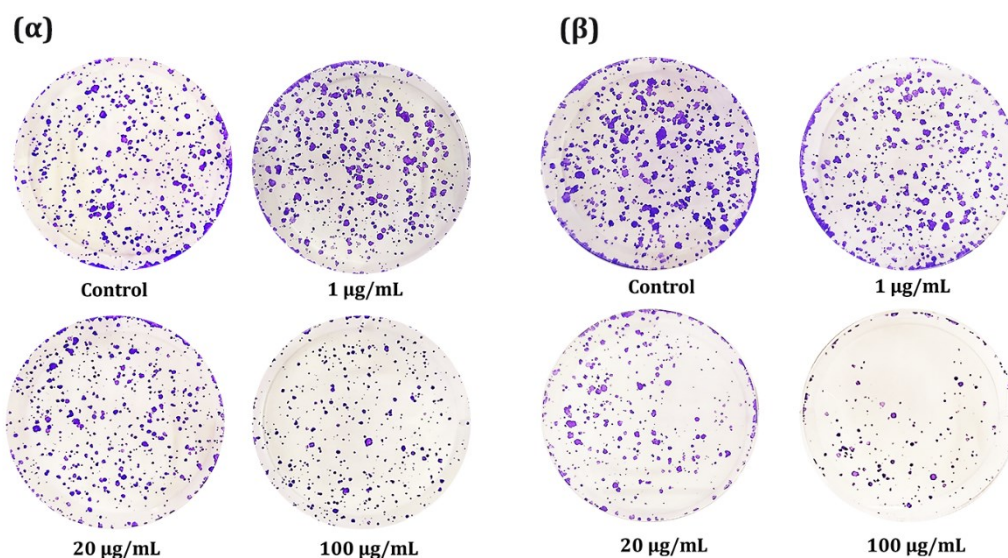


**Εικόνα 4. 27.** Κλωνογόνος δοκιμασία στα κύτταρα NIH/3T3 μετά από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD για 48 ώρες. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

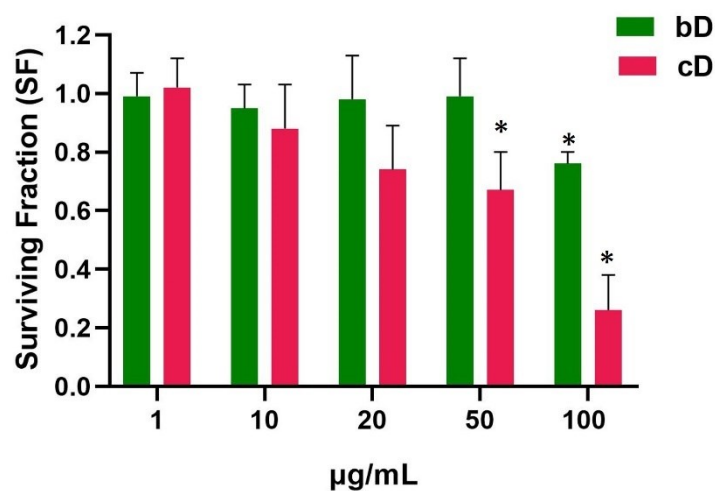
### *Κυτταρική σειρά HaCaT*

Το bD έως τη δόση των 50  $\mu\text{g/mL}$  δεν επηρέασε την ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων HaCaT καθώς το κλάσμα επιβίωσης διατηρήθηκε υψηλό στο 0.99 (Εικόνα 4. 28 α, Εικόνα 4. 29). Μείωση των αποικιών παρατηρήθηκε μόνο στη μέγιστη δόση των 100  $\mu\text{g/mL}$  όπου το SF μειώθηκε στο 0.75. Αντιθέτως το cD προκάλεσε δοδο- εξαρτώμενη μείωση στις αποικίες. Το κλάσμα επιβίωσης

μειώθηκε από το 0.9 στη δόση των 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  στο 0.7 στη δόση των 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Στη μέγιστη δόση των 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  σημειώθηκε πολύ σημαντική μείωση των αποικιών σε σχέση με το control με το SF να είναι αγγίζει το 0.25 (Εικόνα 4. 28 β, Εικόνα 4. 29).



**Εικόνα 4. 28.** Ενδεικτικές εικόνες της κλωνογόνου δοκιμασίας στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD (α) και cD (β) για 48 ώρες.

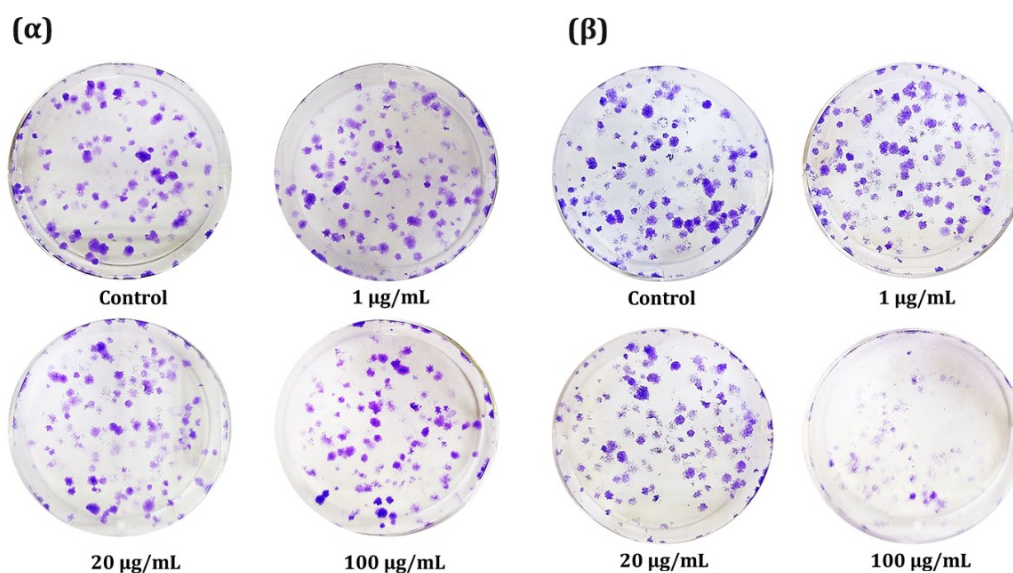


**Εικόνα 4. 29.** Κλωνογόνος δοκιμασία στα κύτταρα HaCaT μετά από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD για 48 ώρες.

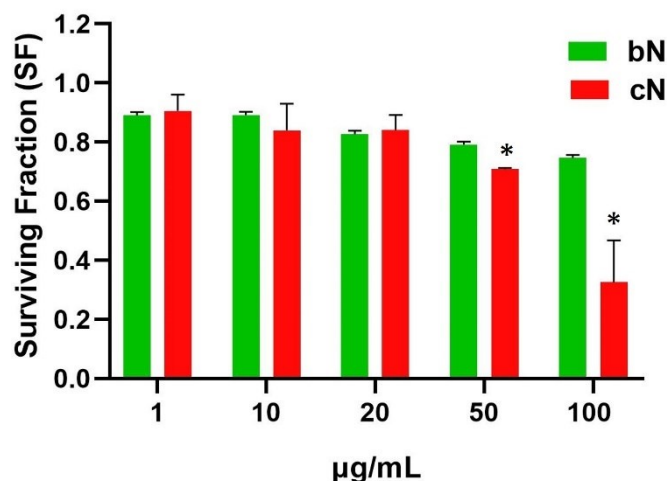
#### 4.1.3.3. Bio\_Nitrate & Chem\_Nitrate

##### Κυτταρική σειρά NIH/3T3

Επώαση με μικρές δόσεις (1 και 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) του bN για 48 ώρες δεν επηρέασε τον σχηματισμό αποικιών των NIH/3T3 κυττάρων. Στις μεγαλύτερες δόσεις φάνηκε να έχει μικρή δοσο-εξαρτώμενη επίδραση. Στις δόσεις των 20 και 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  το SF μειώθηκε στο 0.8 και στη μέγιστη δόση των 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  μειώθηκε κι άλλο, στο 0.7 (**Εικόνα 4. 30 α, Εικόνα 4. 31**). Το cN έως τη δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  δεν επηρέασε τις αποικίες των κυττάρων (SF= 0.85-0.90). Ωστόσο, στις δύο μέγιστες δόσεις το cN μείωσε σημαντικά τον σχηματισμό αποικιών των ινοβλαστών. Στη δόση των 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  το SF μειώθηκε στο 0.7 και στη δόση των 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , στο 0.35 (**Εικόνα 4. 30 β, Εικόνα 4. 31**).



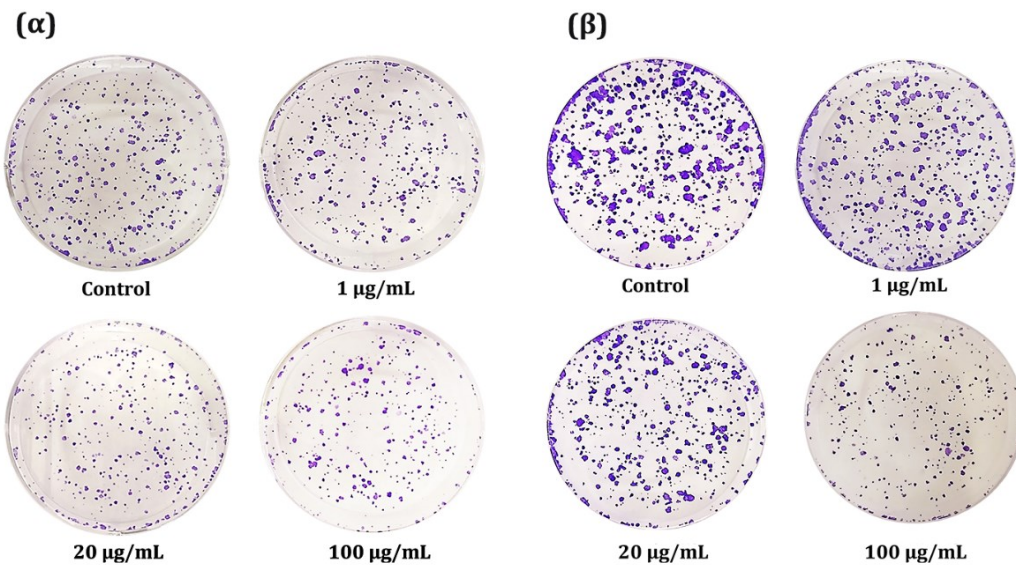
**Εικόνα 4. 30.** Ενδεικτικές εικόνες της κλωνογόνου δοκιμασίας στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN (**α**) και cN (**β**) για 48 ώρες.



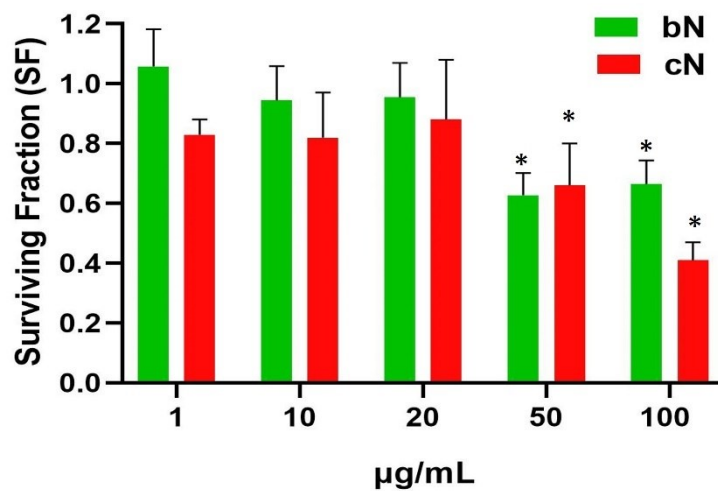
**Εικόνα 4. 31.** Κλωνογόνος δοκιμασία στα κύτταρα NIH/3T3 μετά από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN για 48 ώρες. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

#### *Κυτταρική σειρά HaCaT*

Στα κύτταρα HaCaT μόνο οι δύο μέγιστες δόσεις του bN (50 και 100 µg/mL) επηρέασαν την ικανότητα σχηματισμού αποικιών των κυττάρων. Συγκεκριμένα έως τα 20 µg/mL το SF διατηρήθηκε υψηλό στο 0.90-1. Στις δύο υψηλές δόσεις των 50 και 100 µg/mL σημειώθηκε σημαντική μείωση του SF στο 0.65 (**Εικόνα 4. 32 α, Εικόνα 4. 33**). Επώαση με το cN από τη δόση του 1 µg/mL έως τα 20 µg/mL είχε μικρή επίδραση στο σχηματισμό των αποικιών (SF = 0.85). Οι δύο μεγαλύτερες δόσεις προκάλεσαν σημαντική μείωση στο σχηματισμό των αποικιών καθώς το SF μειώθηκε στο 0.65 και στο 0.40 στις δόσεις των 50 µg/mL και των 100 µg/mL, αντίστοιχα (**Εικόνα 4. 32 β, Εικόνα 4. 33**).



**Εικόνα 4. 32.** Ενδεικτικές εικόνες της κλωνογόνου δοκιμασίας στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN **(α)** και cN **(β)** για 48 ώρες.



**Εικόνα 4. 33.** Κλωνογόνος δοκιμασία στα κύτταρα HaCaT μετά από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN για 48 ώρες. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

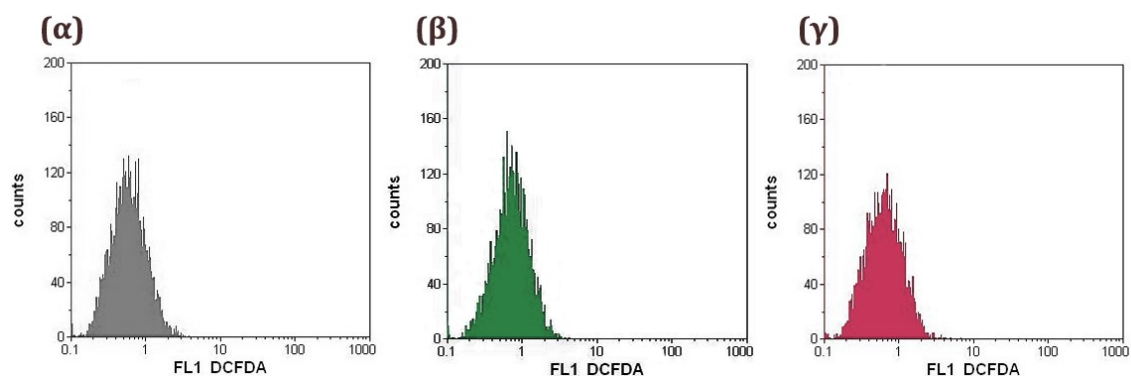
#### 4.1.4. Έλεγχος σχηματισμού ΔΜΟ (ROS)

Ο σχηματισμός ΔΜΟ στις τρεις κυτταρικές σειρές εκτιμήθηκε στις δόσεις των 20 και 50 µg/mL για το cG και στα υπόλοιπα ναουβλικά γραφενίου στις δόσεις 20, 50 και 100 µg/mL.

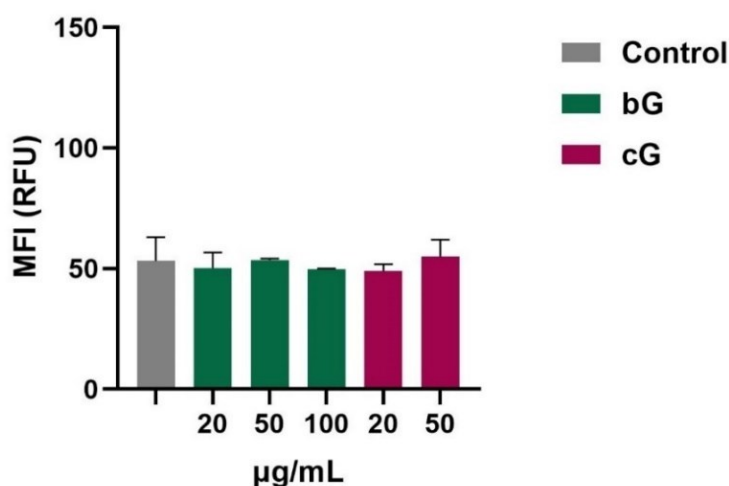
#### 4.1.4.1. Biographene & Chemical graphene

##### Κυτταρική σειρά NIH/3T3

Στα κύτταρα NIH/3T3 τόσο το bG όσο και το cG σε όλες τις δόσεις, δεν προκάλεσαν σχηματισμό ΔΜΟ. Το MFI παρέμεινε αμετάβλητο σε σχέση με το αυτό στα κύτταρα ελέγχου (control) (Εικόνα 4. 34, Εικόνα 4. 35).



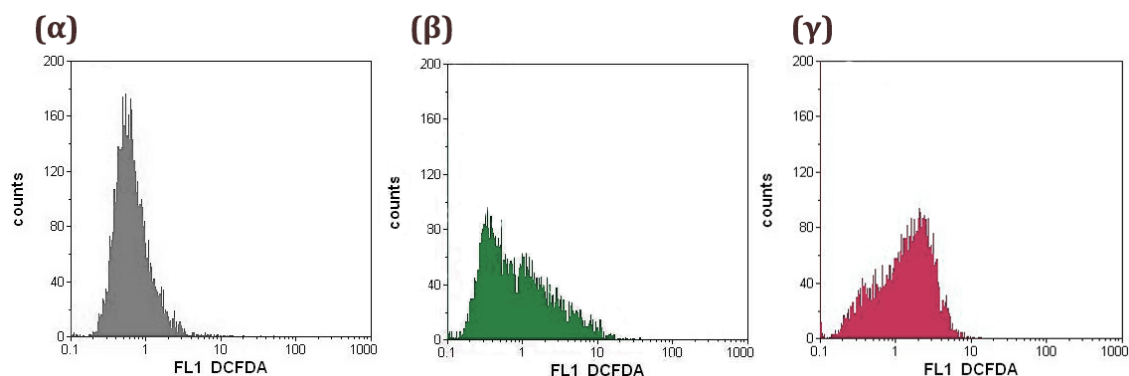
**Εικόνα 4. 34.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα NIH/3T3 κύτταρα. **(α)**: κύτταρα ελέγχου, **(β)**: κύτταρα που επώαστηκαν με 20 μg/mL του bG και **(γ)**: κύτταρα που επώαστηκαν με 20 μg/mL του cG



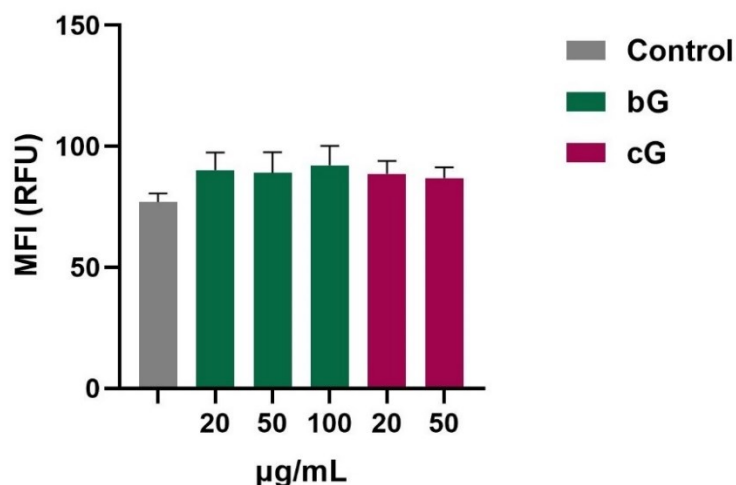
**Εικόνα 4. 35.** Σχηματισμός ΔΜΟ στα NIH/3T3 κύτταρα έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις bG (20, 50 και 100 μg/mL) και δύο δόσεις cG (20 και 50 μg/mL) για 24 ώρες. MFI: Μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units).

### Κυτταρική σειρά HaCaT

Στα κύτταρα HaCaT, το bG προκάλεσε μικρή αύξηση κατά 14% στο σχηματισμό ΔΜΟ. Η αύξηση αυτή δεν σχετιζόταν με τη δόση χορήγησης καθώς ήταν η ίδια σε όλες τις δόσεις. Το cG αύξησε επίσης τον σχηματισμό ΔΜΟ στα κύτταρα HaCaT κατά 10% και 12% στις δόσεις των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  και 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , αντίστοιχα (**Εικόνα 4. 36, Εικόνα 4. 37**).



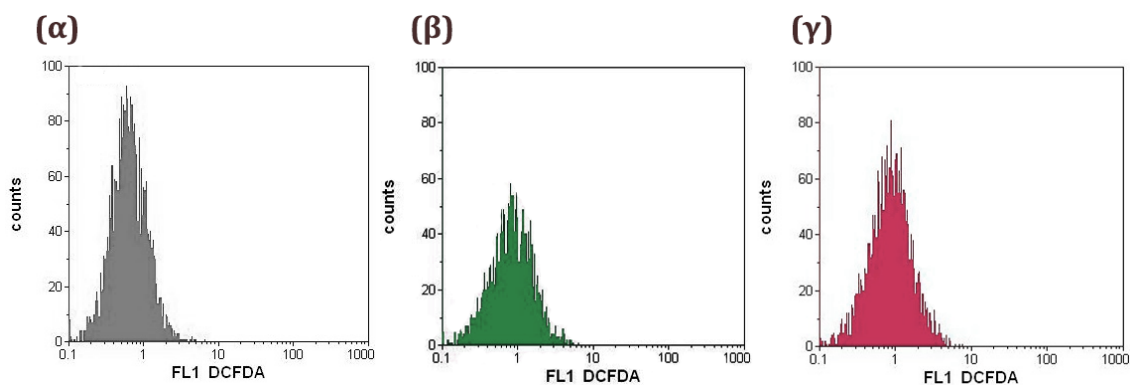
**Εικόνα 4. 36.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα HaCaT κύτταρα. **(α)**: κύτταρα ελέγχου, **(β)**: κύτταρα που επώαστηκαν με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bG και **(γ)**: κύτταρα που επώαστηκαν με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cG.



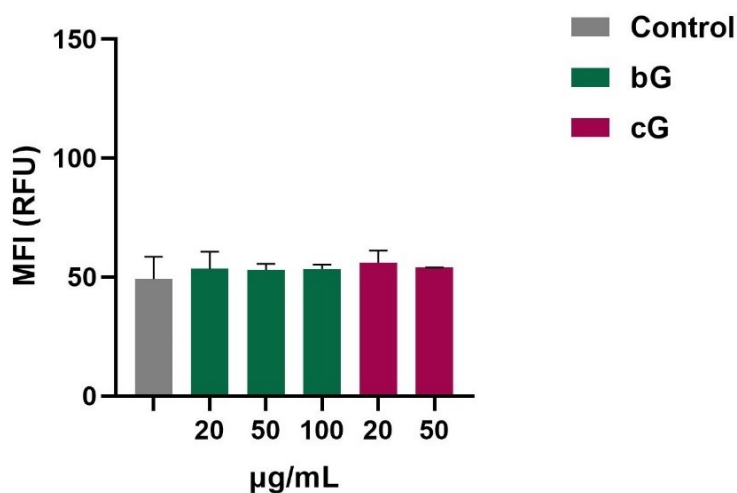
**Εικόνα 4. 37.** Σχηματισμός ΔΜΟ στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις bG (20, 50 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) και δύο δόσεις cG (20 και 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) για 24 ώρες. MFI: Μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units).

### Κυτταρική σειρά THP-1

Στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα, το bG και το cG είχαν την ίδια δράση με αυτή που είχαν στα κύτταρα NIH/3T3. Δεν προκάλεσαν σχηματισμό ΔΜΟ, σε καμία δόση (**Εικόνα 4. 38**, **Εικόνα 4. 39**)



**Εικόνα 4. 38.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα κύτταρα. **(α)**: κύτταρα ελέγχου, **(β)**: κύτταρα που επώαστηκαν με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bG και **(γ)**: κύτταρα που επώαστηκαν με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cG.



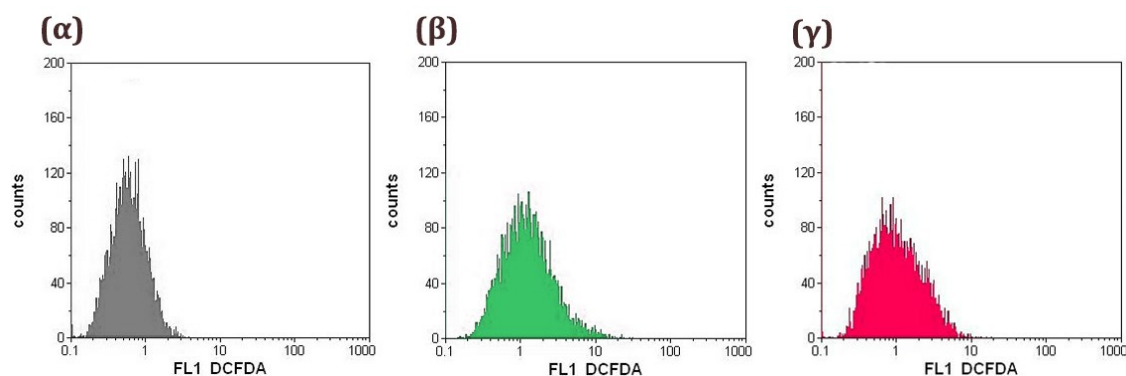
**Εικόνα 4. 39.** Σχηματισμός ΔΜΟ στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις bG (20, 50 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) και δύο δόσεις cG (20 και 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) για 24 ώρες. MFI: Μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units).



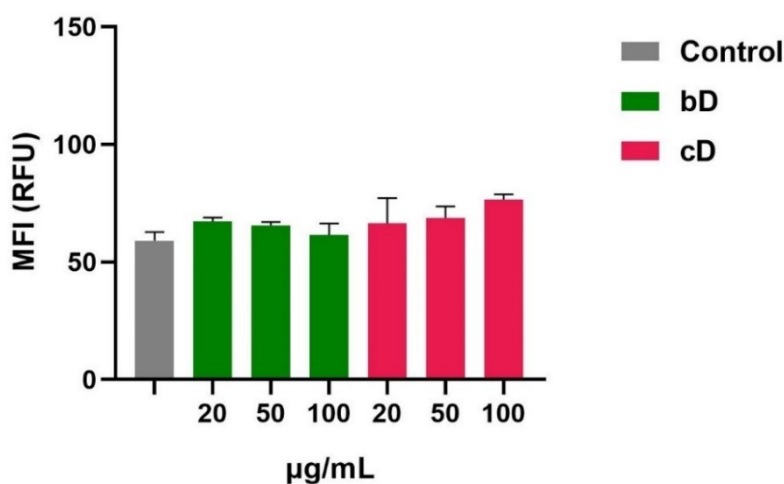
#### 4.1.4.2. Bio\_N-Doped & Chem\_N- Doped

##### Κυτταρική σειρά NIH/3T3

Επώαση των κυττάρων NIH/3T3 με αυξανόμενες δόσεις του bD για 24 ώρες προκάλεσε μικρή, μη σημαντική αύξηση στο σχηματισμό ΔΜΟ κατά περίπου 10%. Το cD είχε το ίδιο αποτέλεσμα με το bD και στις τρεις δόσεις (Εικόνα 4. 40, Εικόνα 4. 41).



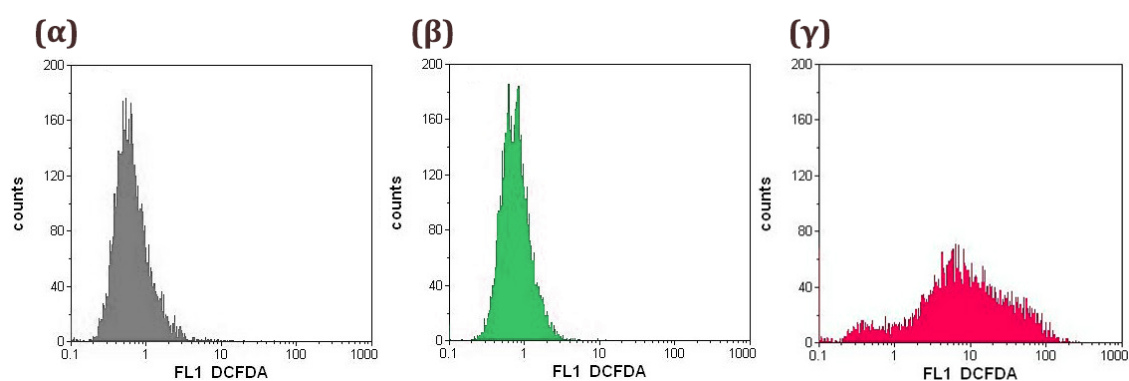
**Εικόνα 4. 40.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα NIH/3T3 κύτταρα. (α): κύτταρα ελέγχου, (β): κύτταρα που επώαστηκαν με 50 μg/mL του bD και (γ): κύτταρα που επώαστηκαν με 50 μg/mL του cD.



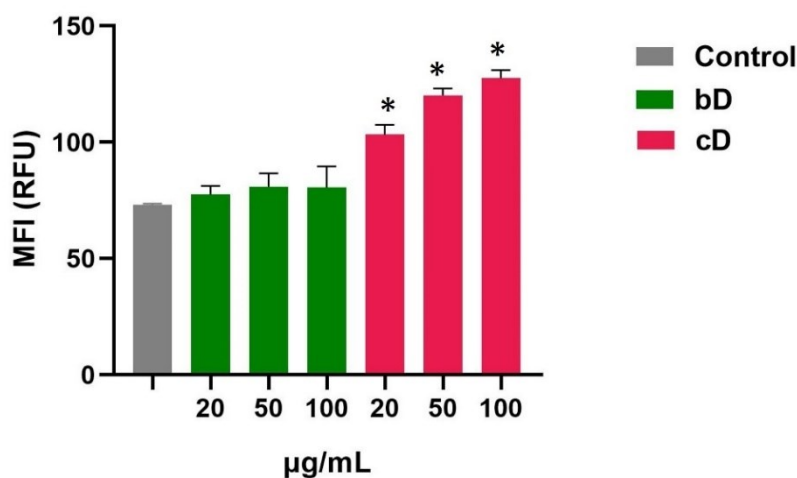
**Εικόνα 4. 41.** Σχηματισμός ΔΜΟ στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις (20, 50 και 100 μg/mL) του bD και του cD για 24 ώρες. MFI: Μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units).

### Κυτταρική σειρά HaCaT

Το bD είχε το ίδιο αποτέλεσμα στα κύτταρα HaCaT με αυτό που προκάλεσε στα κύτταρα NIH/3T3. Σε όλες τις δόσεις (20, 50 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) παρατηρήθηκε πολύ μικρή αύξηση του σχηματισμού ΔΜΟ, της τάξεως του 10%. Αντιθέτως, η επίδραση του cD στα κύτταρα HaCaT ήταν πολύ έντονη. Παρατηρήθηκε σημαντική δόσο-εξαρτώμενη αύξηση των ΔΜΟ. Στη μικρότερη δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , το cD προκάλεσε αύξηση κατά 41% στον σχηματισμό ΔΜΟ, ενώ στις μεγαλύτερες δόσεις των 50 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  η αύξηση ήταν 64% και 74% αντίστοιχα (**Εικόνα 4. 42 γ**, **Εικόνα 4. 43**).



**Εικόνα 4. 42.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα κύτταρα HaCaT. **(α)**: κύτταρα ελέγχου, **(β)**: κύτταρα που επώαστηκαν με 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bD και **(γ)**: κύτταρα που επώαστηκαν με 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cD.

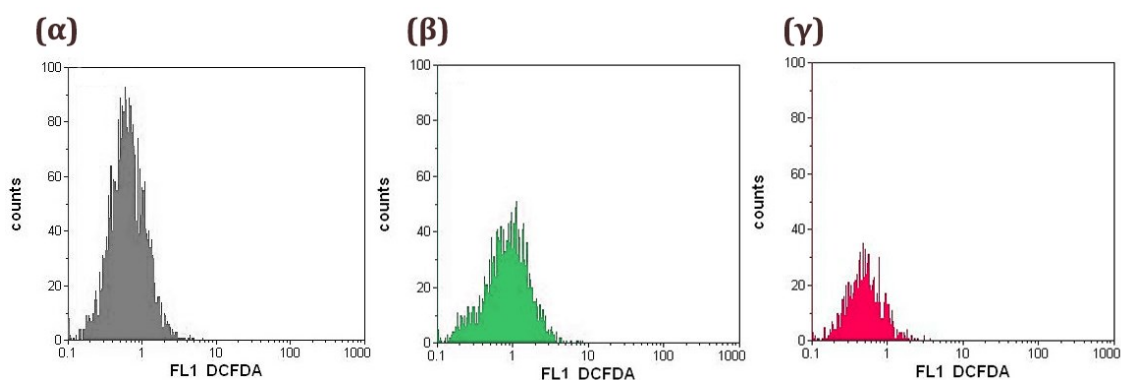


**Εικόνα 4. 43.** Σχηματισμός ΔΜΟ στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις (20, 50 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) του bD και του cD για 24 ώρες. MFI: Μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence

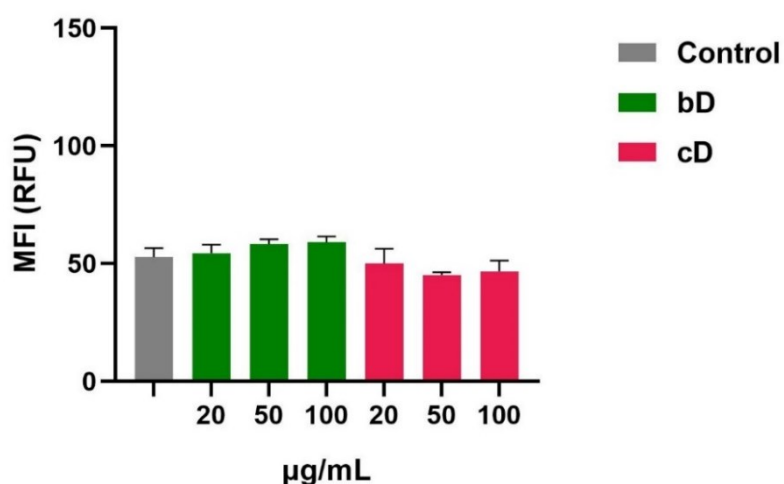
intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units). \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

### Κυτταρική σειρά THP-1

Το bD και το cD δεν προκάλεσαν σχηματισμό ΔΜΟ στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα σε καμία από τις δόσεις (20, 50 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Η τιμή της MFI παρέμεινε αμετάβλητη (Εικόνα 4. 44, Εικόνα 4. 45).



**Εικόνα 4. 44.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα κύτταρα. **(α)**: κύτταρα ελέγχου, **(β)**: κύτταρα που επώαστηκαν με 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bD και **(γ)**: κύτταρα που επώαστηκαν με 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cD.

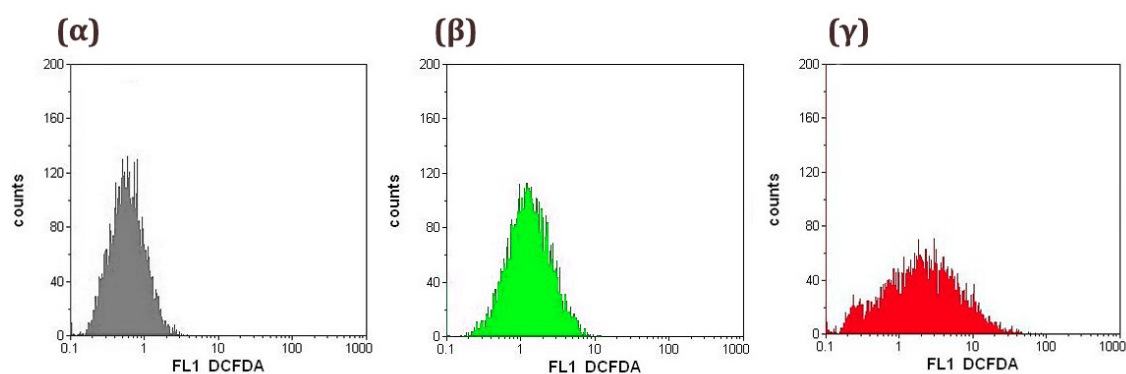


**Εικόνα 4. 45.** Σχηματισμός ΔΜΟ στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις (20, 50 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) του bD και του cD για 24 ώρες. MFI: Μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units).

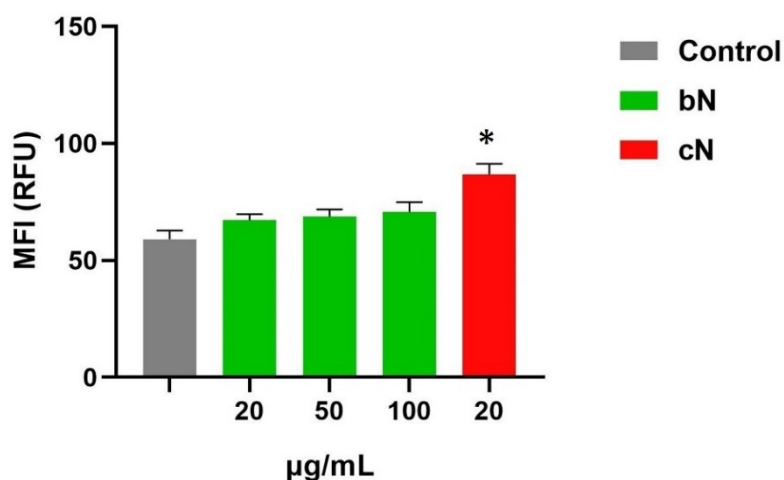
#### 4.1.4.3. Bio\_Nitrate & Chem\_Nitrate

##### Κυτταρική σειρά NIH/3T3

Επώαση με τις τρεις αυξανόμενες δόσεις του bN (20, 50 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) στα κύτταρα NIH/3T3 για 24 ώρες, είχε ως αποτέλεσμα μικρή αύξηση, κατά 11-15% στον σχηματισμό ΔΜΟ (Εικόνα 4. 46 β, Εικόνα 4. 47). Ωστόσο το cN είχε πολύ σημαντικότερη επίδραση. Στη δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  παρατηρήθηκε 45% αύξηση των ΔΜΟ. Επιπλέον, η ανίχνευση της επαγωγής ΔΜΟ στις δύο μεγαλύτερες δόσεις, των 50 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cN ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί λόγω σημαντικής μείωσης του πληθυσμού (Εικόνα 4. 46 γ, Εικόνα 4. 47).



**Εικόνα 4. 46.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα NIH/3T3 κύτταρα. (α): κύτταρα ελέγχου, (β): κύτταρα που επώαστηκαν με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bN και (γ): κύτταρα που επώαστηκαν με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cN.

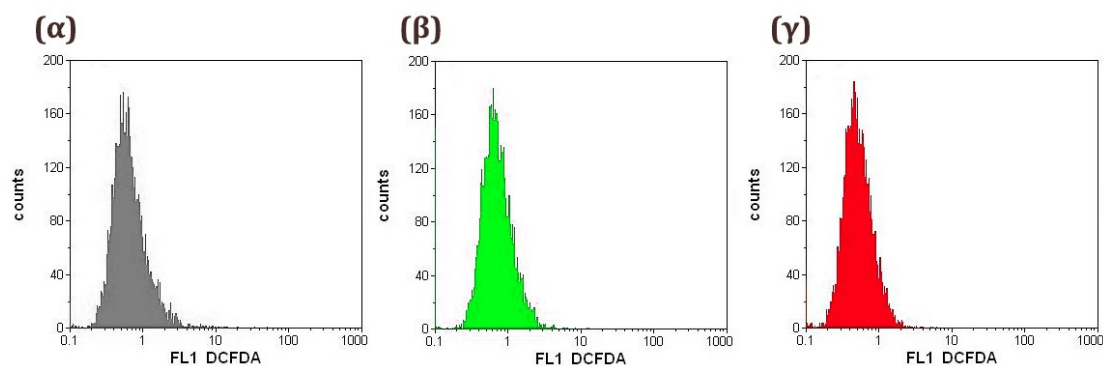


**Εικόνα 4. 47.** Σχηματισμός ΔΜΟ στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις (20, 50 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) του bN και μία δόση (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) του cN για 24 ώρες. MFI: Μέση ένταση

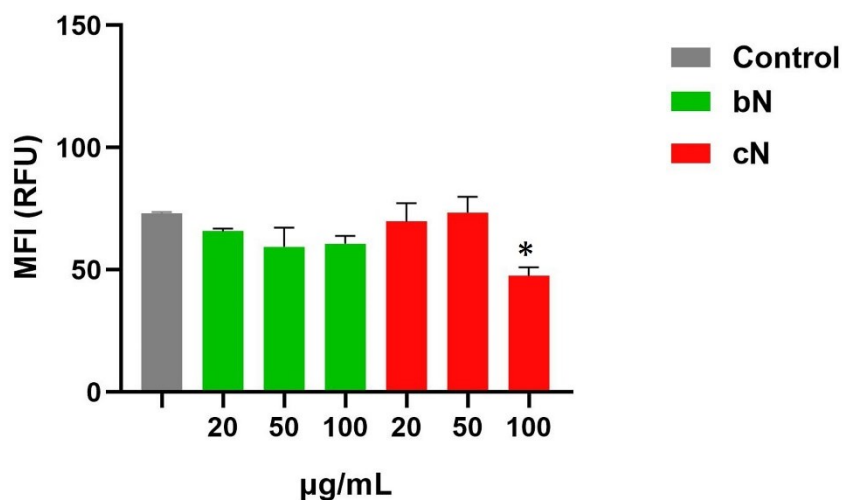
φθορισμού (mean fluorescence intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units). \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

### Κυτταρική σειρά HaCaT

Στα κύτταρα HaCaT το bN δεν επηρέασε το σχηματισμό ΔΜΟ καθώς και στις τρεις δόσεις οι τιμές της MFI παρέμειναν αμετάβλητες σε σχέση με το control (**Εικόνα 4. 48 β, Εικόνα 4. 49**). Το cN στις δόσεις των 20 και 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  επίσης φάνηκε να μην επηρεάζει τον σχηματισμό ΔΜΟ. Ωστόσο, στη μέγιστη δόση των 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cN σημειώθηκε σημαντική μείωση κατά 35% στις ΔΜΟ. Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι το αποτέλεσμα αυτό συνδυάστηκε με πολύ υψηλά επίπεδα κυτταρικού θανάτου στον πληθυσμό (**Εικόνα 4. 48 γ, Εικόνα 4. 49**).



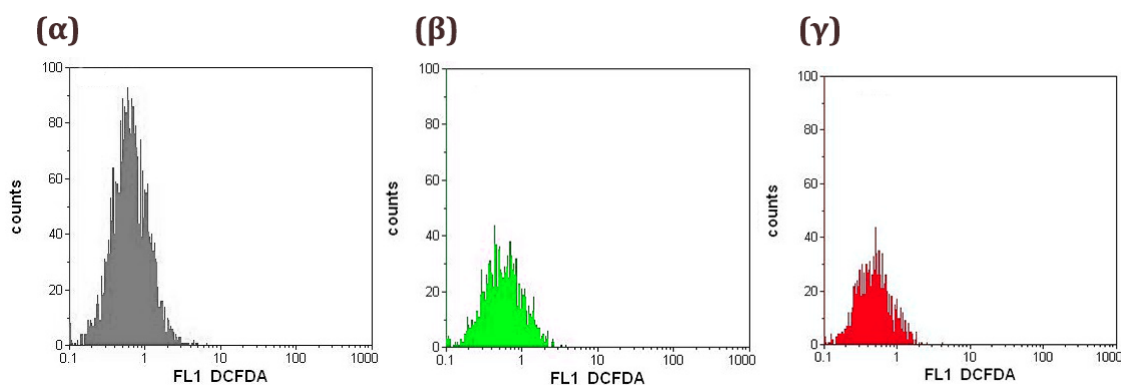
**Εικόνα 4. 48.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα NIH/3T3 κύτταρα. **(α)**: κύτταρα ελέγχου, **(β)**: κύτταρα που επώαστηκαν με 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bN και **(γ)**: κύτταρα που επώαστηκαν με 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cN



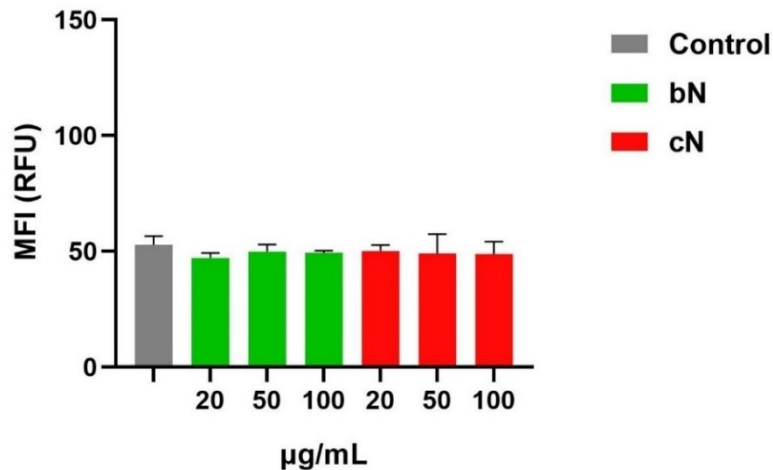
**Εικόνα 4. 49.** Σχηματισμός ΔΜΟ στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις (20, 50 και 100 µg/mL) του bN και του cN για 24 ώρες. MFI: Μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units). \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

### Κύτταρα THP-1

Τα δύο νανοϋλικά δεν προκάλεσαν σχηματισμό ΔΜΟ στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα. Οι τιμές της MFI δεν μεταβλήθηκαν σε σχέση με το κοντρόλ στις τρεις δόσεις των bN και cN. Ωστόσο κατά την ανάλυση στο Κυτταρόμετρο Ροής παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στον πληθυσμό των κυττάρων μετά την επώαση με τα δύο νανοϋλικά στις δόσεις των 50 και 100 µg/mL (**Εικόνα 4. 50**, **Εικόνα 4. 51**).



**Εικόνα 4. 50.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του σχηματισμού ΔΜΟ στα NIH/3T3 κύτταρα. **(α)**: κύτταρα ελέγχου, **(β)**: κύτταρα που επώαστηκαν με 50 µg/mL του bN και **(γ)**: κύτταρα που επώαστηκαν με 50 µg/mL του cN



**Εικόνα 4. 51.** Σχηματισμός ΔΜΟ στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα έπειτα από επώαση με τρεις δόσεις (20, 50 και 100 µg/mL) του bN και του cN για 24 ώρες. MFI: Μέση ένταση φθορισμού (mean fluorescence intensity), RFU: σχετικές μονάδες φθορισμού (relative fluorescence units).

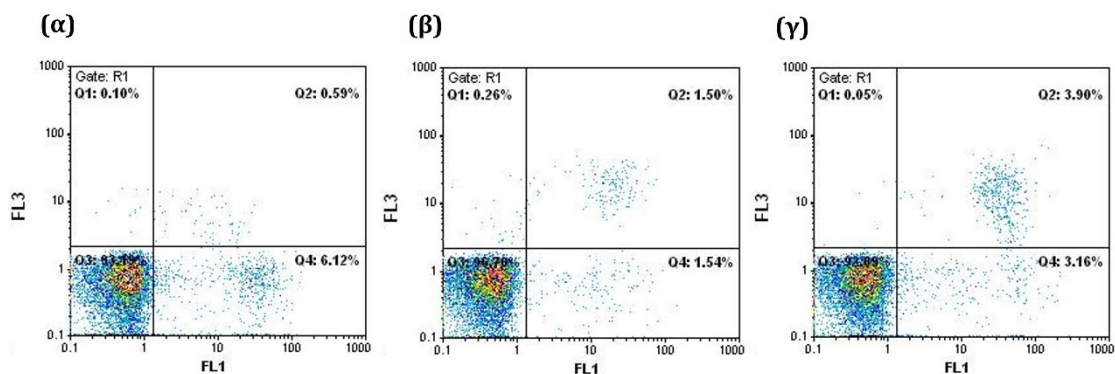
#### 4.1.5. Έλεγχος απόπτωσης- νέκρωσης

Τα τρία ζεύγη νανοϋλικών ελέγχθηκαν ως προς την πιθανή πρόκληση απόπτωσης και νέκρωσης στον πληθυσμό των τριών κυτταρικών σειρών. Στον αρχικό έλεγχο φάνηκε ότι ο διαλύτης DMF που περιέχει το cG αυξάνει σημαντικά την απόπτωση του πληθυσμού, ειδικά στις κυτταρικές σειρές HaCaT και THP-1. Για τον λόγο αυτό, η δράση των bG και cG εκτιμήθηκε μόνο στη δόση των 20 µg/mL. Τα άλλα νανοϋλικά γραφενίου δοκιμάστηκαν στις τρεις κυτταρικές σειρές σε τρεις διαφορετικές δόσεις: 20, 50 και 100 µg/mL.

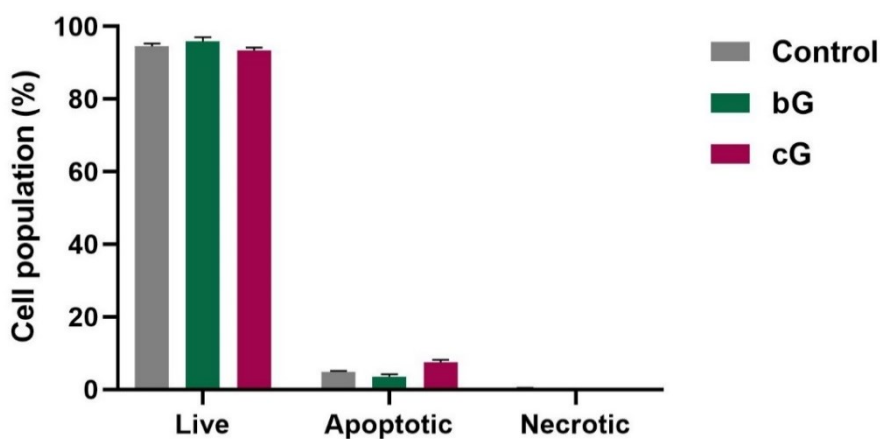
##### 4.1.5.1. Biographene & graphene

###### *Κυτταρική σειρά NIH/3T3*

Τα νανοϋλικά bG και cG δεν φάνηκε να προκαλούν θνησιμότητα στα NIH/3T3 κύτταρα, καθώς τα ποσοστά της απόπτωσης και της νέκρωσης στον κυτταρικό πληθυσμό δεν μεταβλήθηκαν (**Εικόνα 4. 52**, **Εικόνα 4. 53**).



**Εικόνα 4. 52.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των NIH/3T3 κυττάρων. **(α):** Κύτταρα ελέγχου- Control. **(β):** Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bG. **(γ):** Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cG.

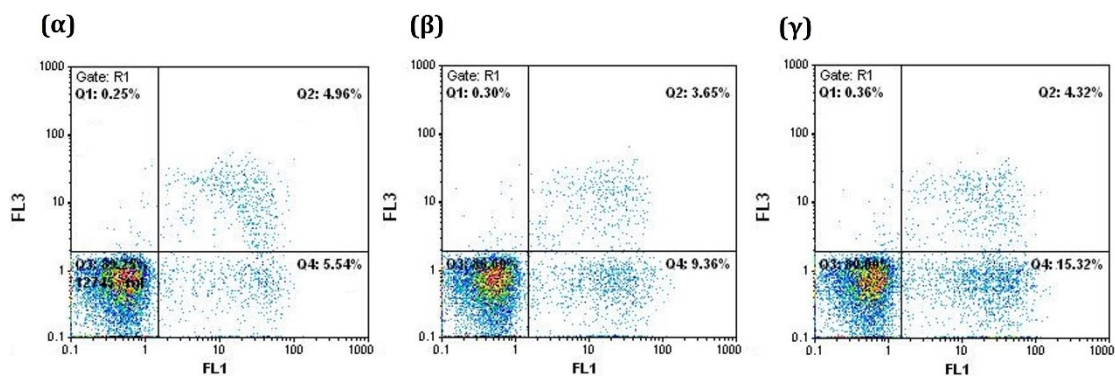


**Εικόνα 4. 53.** Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bG και cG για 24 ώρες.

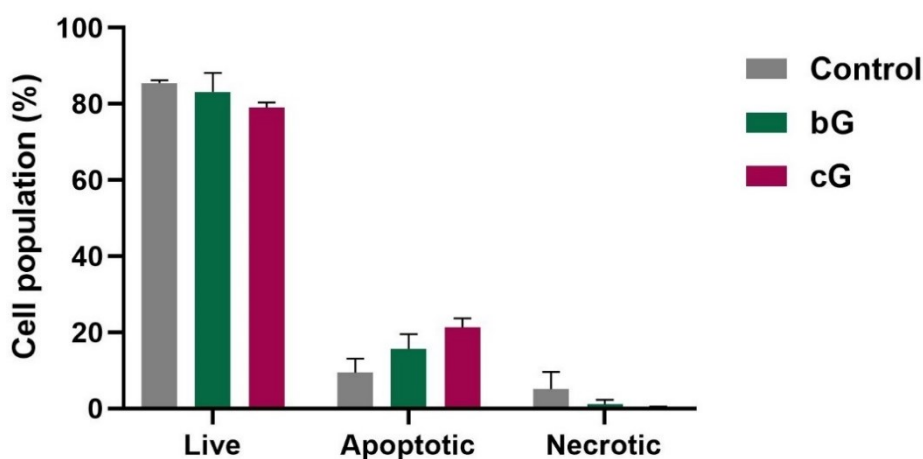
### *Κυτταρική σειρά HaCaT*

Το bG στη δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  προκάλεσε μικρή αύξηση, κατά 7% στον αποπτωτικό πληθυσμό των κυττάρων HaCaT. Το cG είχε αντίστοιχο αποτέλεσμα, αυξάνοντας την απόπτωση κατά 12%. Κανένα νανοϋλικό δεν προκάλεσε κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης (**Εικόνα 4. 54, Εικόνα 4. 55**).





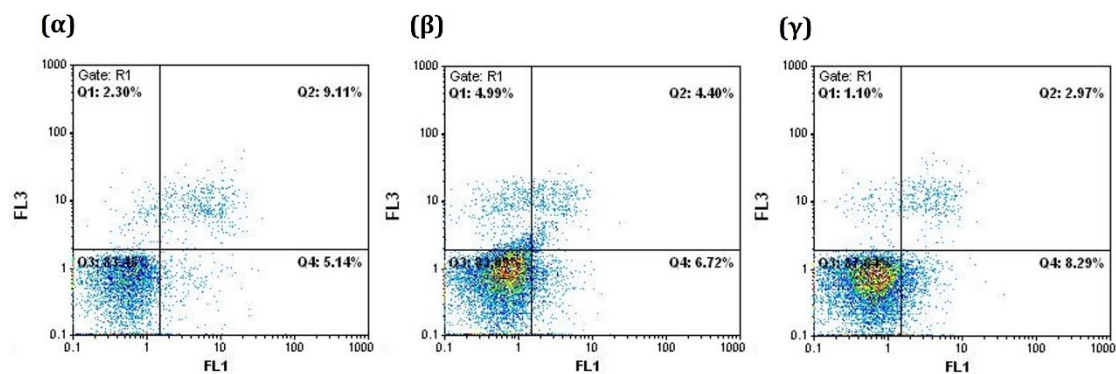
**Εικόνα 4. 54.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των κυττάρων HaCaT. **(α):** Κύτταρα ελέγχου- Control. **(β):** Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bG. **(γ):** Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cG.



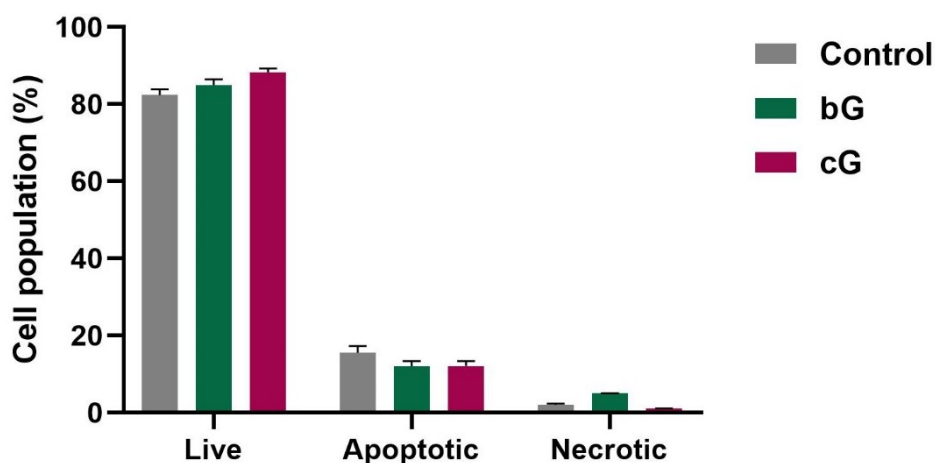
**Εικόνα 4. 55.** Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bG και cG για 24 ώρες.

### Κυτταρική σειρά THP-1

Το bG και το cG στη δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  δεν φάνηκε να προκαλούν θάνατο στον πληθυσμό των THP-1 διαφοροποιημένων κυττάρων. Τα ποσοστά της απόπτωσης και της νέκρωσης στα κύτταρα που επώαστηκαν με bG και cG δεν μεταβλήθηκαν σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (**Εικόνα 4. 56, Εικόνα 4. 57**).



**Εικόνα 4. 56.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων. **(α):** Κύτταρα ελέγχου-Control. **(β):** Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bG. **(γ):** Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cG.



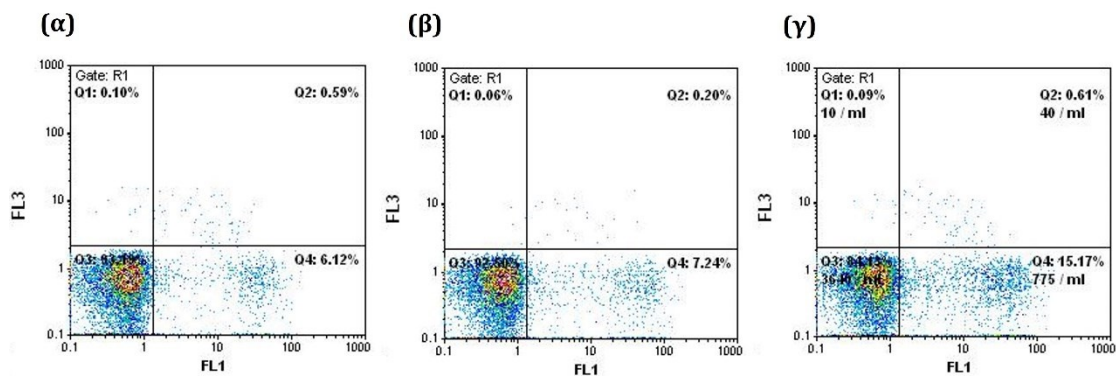
**Εικόνα 4. 57.** Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα, έπειτα από επώαση με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bG και του cG για 24 ώρες.

#### 4.1.5.2. Bio\_N-Doped & Chem\_N-Doped

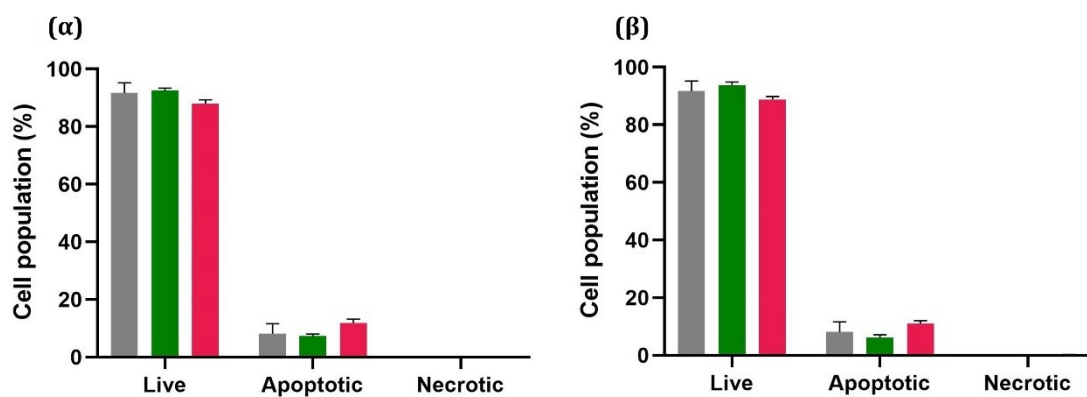
##### *Κυτταρική σειρά NIH/3T3*

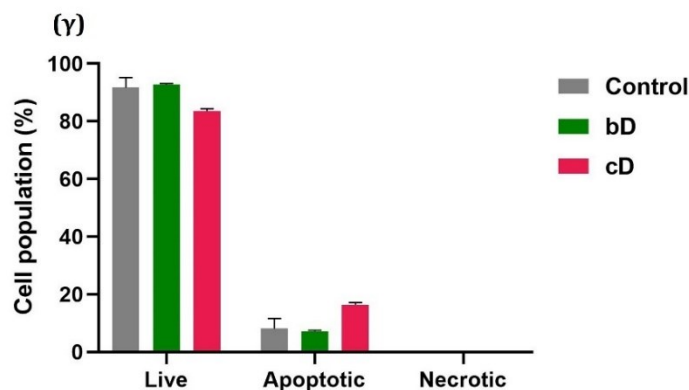
Καμία δόση του bD δεν φάνηκε να επηρεάζει τον πληθυσμό των NIH/3T3 κυττάρων, στις 24 ώρες επώασης (**Εικόνα 4. 58 β, Εικόνα 4. 59 α-γ**). Επώαση με το cD στις δόσεις των 20 και 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  είχε ως αποτέλεσμα μικρή αύξηση του αποπτωτικού πληθυσμού, κατά 4% (**Εικόνα 4. 59 α,β**). Στη μέγιστη δόση των 100

μg/mL ο αποπτωτικός πληθυσμός των κυττάρων αυξήθηκε κατά 8% σε σχέση με το Control (Εικόνα 4. 58 γ, Εικόνα 4. 59 γ).



**Εικόνα 4. 58.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των κυττάρων NIH/3T3. **(α):** Κύτταρα ελέγχου- Control. **(β):** Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 μg/mL του bD. **(γ):** Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 μg/mL του cD.

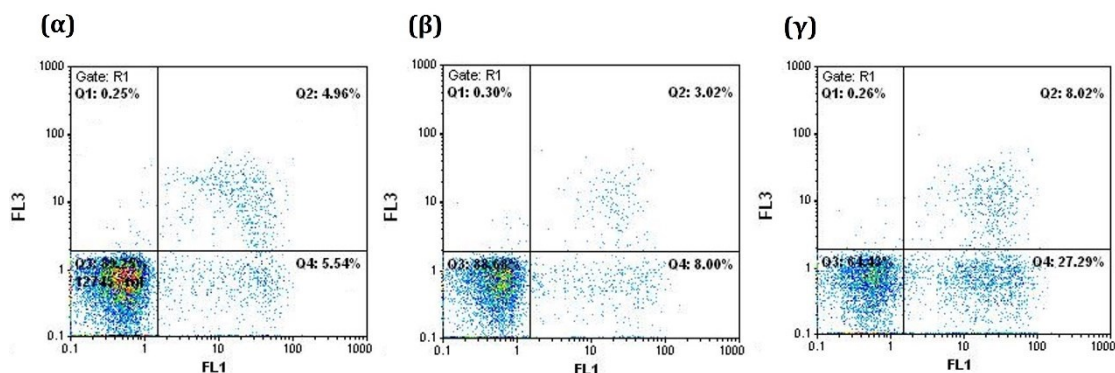




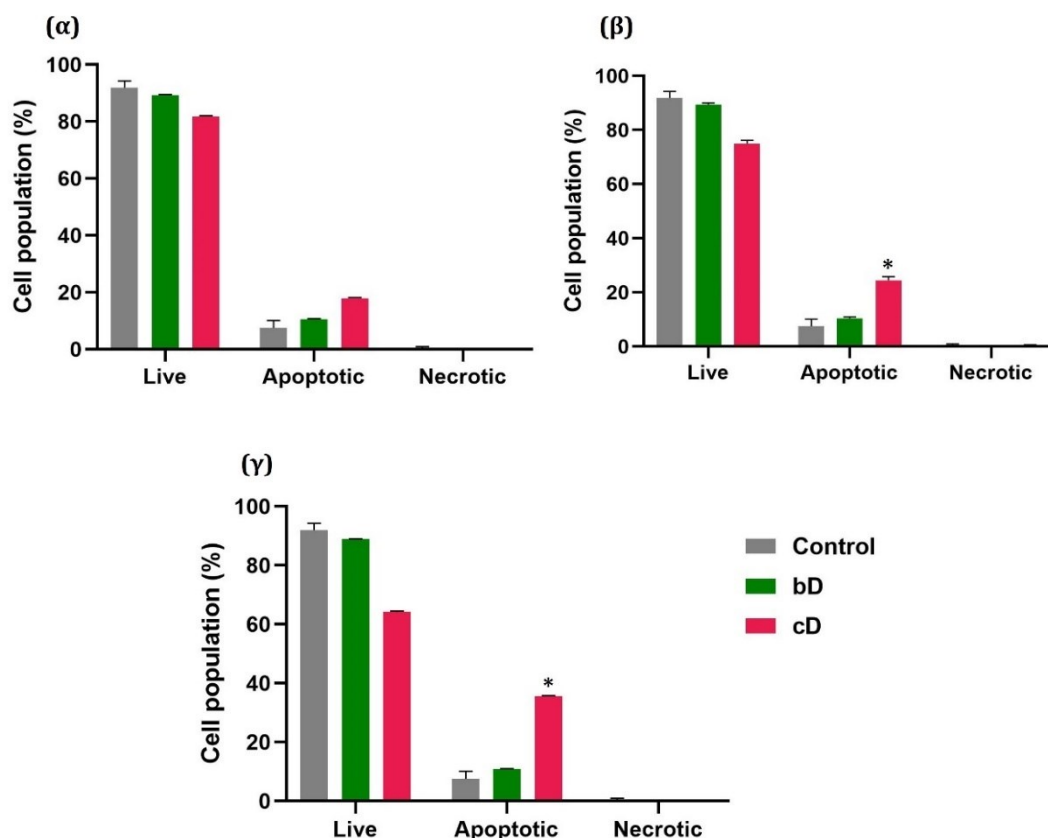
**Εικόνα 4. 59.** Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα κύτταρα NIH/3T3, έπειτα από επώαση με 20 µg/mL (**α**), 50 (**β**) και 100 µg/mL (**γ**) του bD και cD για 24 ώρες.

### Κυτταρική σειρά HaCaT

Επώαση των κυττάρων HaCaT με τις τρεις δόσεις του bD (20, 50 και 100 µg/mL), δεν επηρέασε τον κυτταρικό πληθυσμό, καθώς δεν παρατηρήθηκε ούτε αύξηση της απόπτωσης αλλά ούτε και νέκρωση των κυττάρων (**Εικόνα 4. 60**, **Εικόνα 4. 61α-γ**). Ωστόσο, επώαση με το cD προκάλεσε αλλαγές στον κυτταρικό πληθυσμό οι οποίες ήταν μάλιστα δόσο- εξαρτώμενες. Στη δόση των 20 µg/mL παρατηρήθηκε αύξηση του αποπτωτικού πληθυσμού κατά 10% (**Εικόνα 4. 61 α**) ενώ στη δόση των 50 µg/mL κατά 17% (**Εικόνα 4. 61β**) σε σχέση με το control. Στη μέγιστη δόση των 100 µg/mL το ποσοστό των κυττάρων που βρισκόταν σε απόπτωση αυξήθηκε σημαντικά, κατά 28% (**Εικόνα 4. 60 γ**, **Εικόνα 4. 61γ**). Όπως και το bD έτσι και το cD δεν φάνηκε να προκαλεί θάνατο του πληθυσμού μέσω νέκρωσης σε καμία από τις τρεις δόσεις.



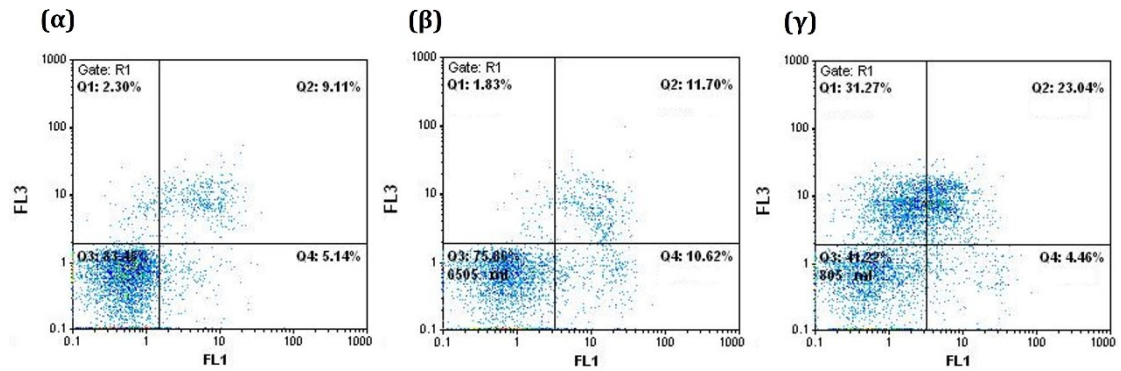
**Εικόνα 4. 60.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των κυττάρων HaCaT. (**α**): Κύτταρα ελέγχου- Control. (**β**): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του bD. (**γ**): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του cD.



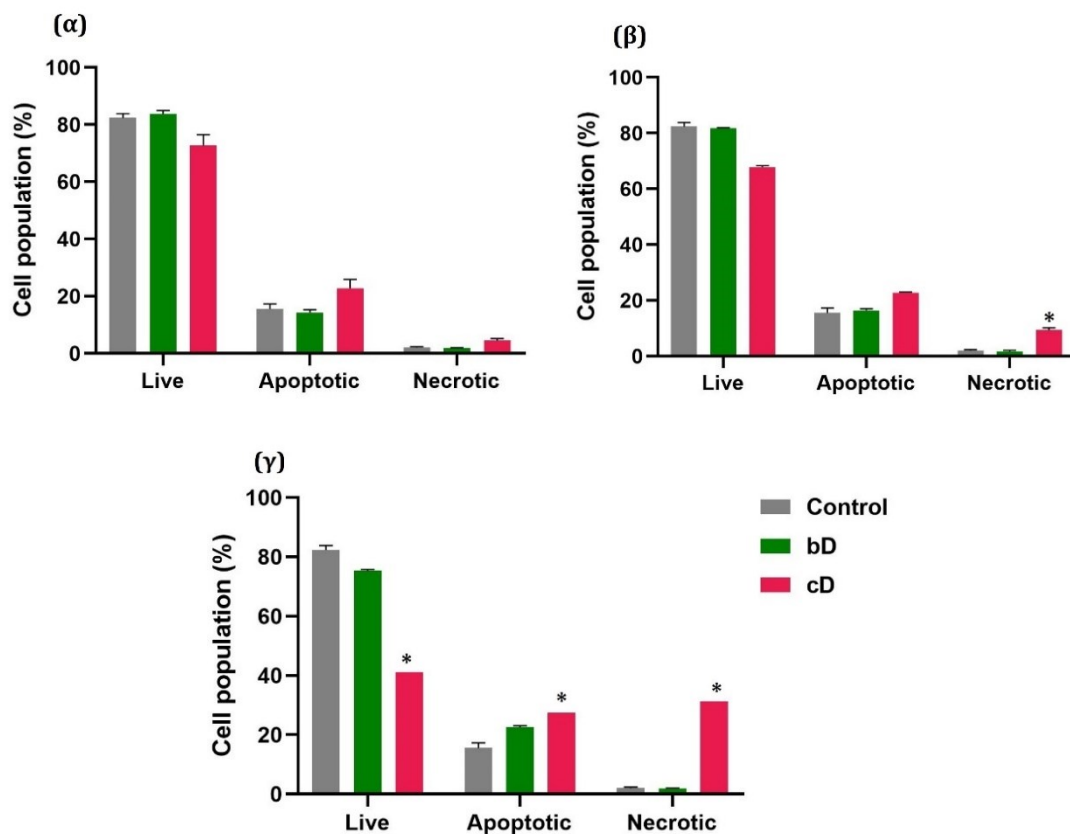
**Εικόνα 4. 61.** Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα κύτταρα HaCaT, έπειτα από επώαση με 20 μg/mL (**α**), 50 μg/mL (**β**) και 100 μg/mL (**γ**) του bD και του cD για 24 ώρες. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου- control ( $p < 0.05$ ).

### Κυτταρική σειρά THP-1

Το bD στις δόσεις 20 και 50 μg/mL δεν επηρέασε τον πληθυσμό των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων (**Εικόνα 4. 63 α, β**). Μικρή επίπτωση είχε μόνο στη μέγιστη δόση των 100 μg/mL όπου σημειώθηκε αύξηση κατά 7% στον αποπτωτικό πληθυσμό (**Εικόνα 4. 62, Εικόνα 4. 63 γ**). Το cD είχε σημαντική επίπτωση στον πληθυσμό των THP-1 μακροφάγων, η οποία ήταν δόσο-εξαρτώμενη. Στα 20 μg/mL του cD, σημειώθηκε μικρή αύξηση κατά 8% στον αποπτωτικό πληθυσμό και ελάχιστη νέκρωση, κατά 5% σε σχέση με το control (**Εικόνα 4. 63 α**). Στα 50 μg/mL σημειώθηκε πάλι αύξηση 8% στην απόπτωση αλλά η νέκρωση αυξήθηκε κατά 9% (**Εικόνα 4. 63 β**). Στη μέγιστη δόση των 100 μg/mL ο αποπτωτικός πληθυσμός αυξήθηκε κατά 13%. Η νέκρωση στη δόση αυτή ήταν σημαντικά υψηλή καθώς έφτασε το 28% (**Εικόνα 4. 62, Εικόνα 4. 63 γ**).



**Εικόνα 4. 62.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των κυττάρων THP-1. **(α)**: Κύτταρα ελέγχου- Control. **(β)**: Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 μg/mL του bD. **(γ)**: Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 μg/mL του cD.

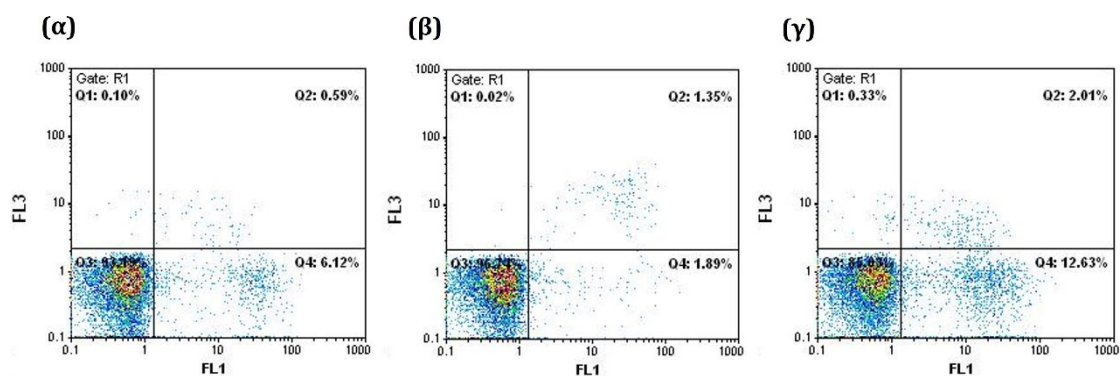


**Εικόνα 4. 63.** Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα, έπειτα από επώαση με 20 μg/mL **(α)**, 50 μg/mL **(β)** και 100 μg/mL **(γ)** του bD και του cD για 24 ώρες. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου- control ( $p < 0.05$ ).

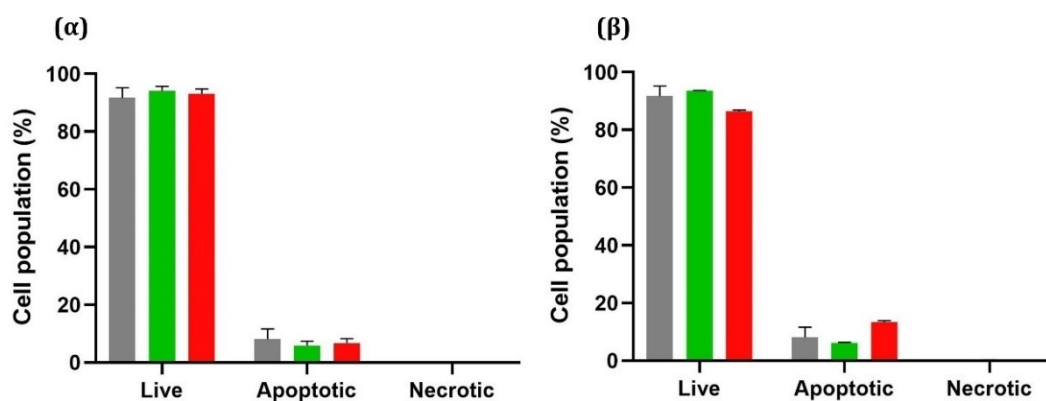
### 4.1.5.3. Bio\_Nitrate & Chem\_Nitrate

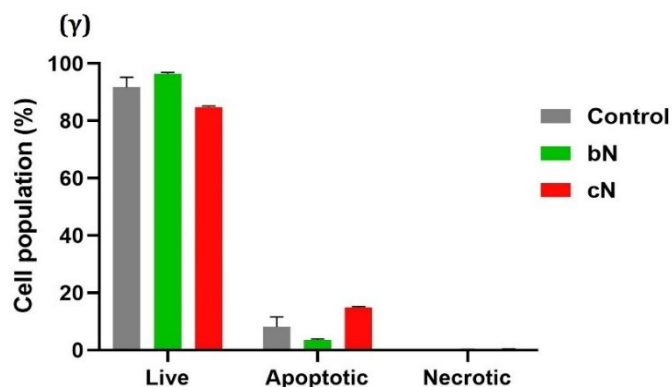
#### Κυτταρική σειρά NIH/3T3

Καμία από τις τρεις δόσεις του bN δεν προκάλεσε θνησιμότητα στον πληθυσμό των κυττάρων NIH/3T3 (**Εικόνα 4. 64 β, Εικόνα 4. 65**). Το ίδιο αποτέλεσμα είχε και το cN στη δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Στις μεγαλύτερες δόσεις των 50 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cN, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της απόπτωσης σε σχέση με το control κατά 5% και 8%, αντίστοιχα (**Εικόνα 4. 64 γ, Εικόνα 4. 65**).



**Εικόνα 4. 64.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των κυττάρων NIH/3T3. **(α)**: Κύτταρα ελέγχου- Control. **(β)**: Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bN. **(γ)**: Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cN.



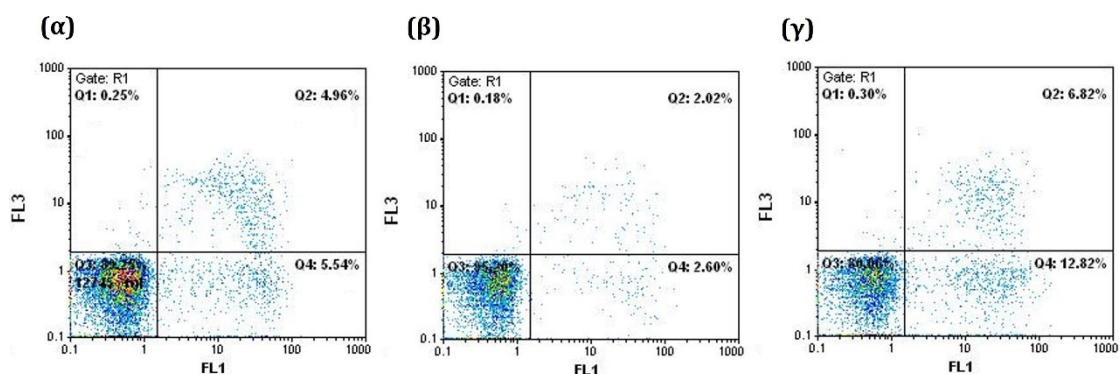


**Εικόνα 4. 65.** Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα NIH/3T3 κύτταρα, έπειτα από επώαση με 20 µg/mL (**α**), 50 µg/mL (**β**) και 100 µg/mL (**γ**) του bN και του cN για 24 ώρες.

### Κυτταρική σειρά HaCaT

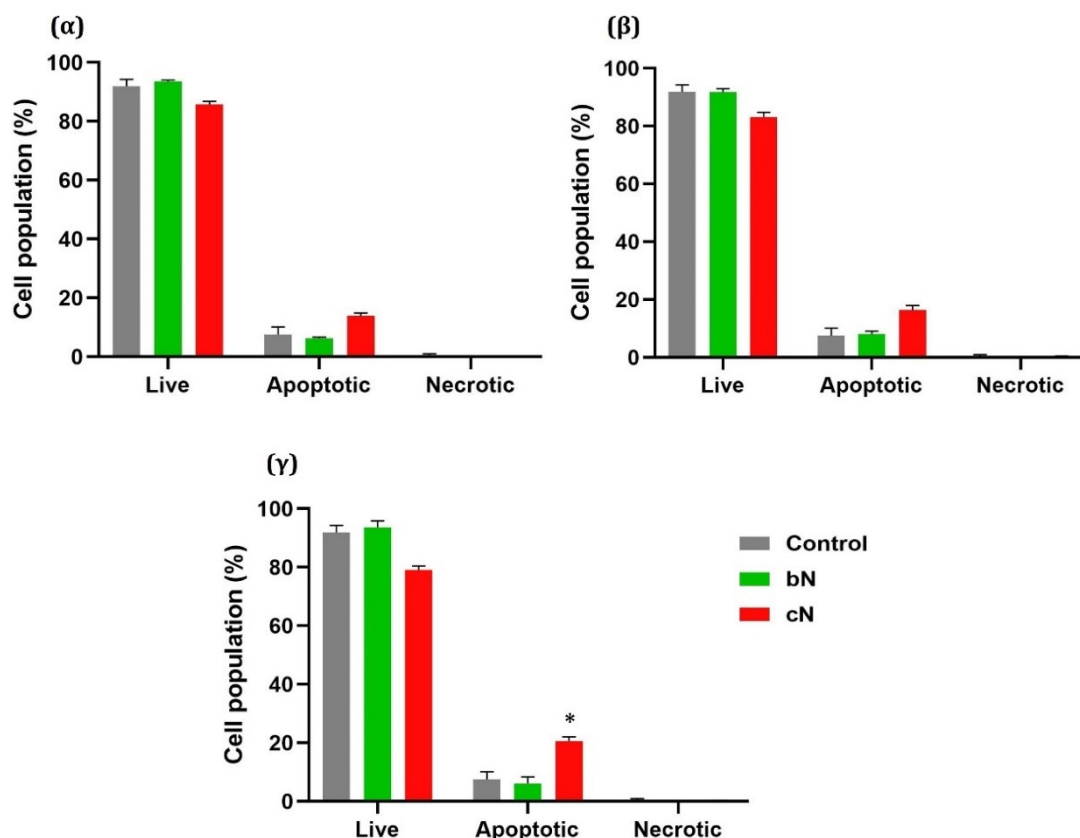
Όπως ακριβώς και στα κύτταρα NIH/3T3, καμία δόση του bN δεν προκάλεσε θνησιμότητα στον πληθυσμό των κερατινοκυττάρων HaCaT (**Εικόνα 4. 66 β**, **Εικόνα 4. 67**).

Αντιθέτως, το cN προκάλεσε δοδο- εξαρτώμενη αύξηση στην απόπτωση του πληθυσμού. Στα 20 µg/mL ο αποπτωτικός πληθυσμός αυξήθηκε κατά 5% (**Εικόνα 4. 67 α**) ενώ στα 50 µg/mL κατά 8% (**Εικόνα 4. 67 β**). Στη μέγιστη δόση των 100 µg/mL σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση κατά 13% στον πληθυσμό των αποπτωτικών κυττάρων σε σχέση με το control (**Εικόνα 4. 66 γ**, **Εικόνα 4. 67 γ**).



**Εικόνα 4. 66.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των κυττάρων HaCaT. (**α**): Κύτταρα ελέγχου- Control. (**β**): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του bN. (**γ**): Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του cN.

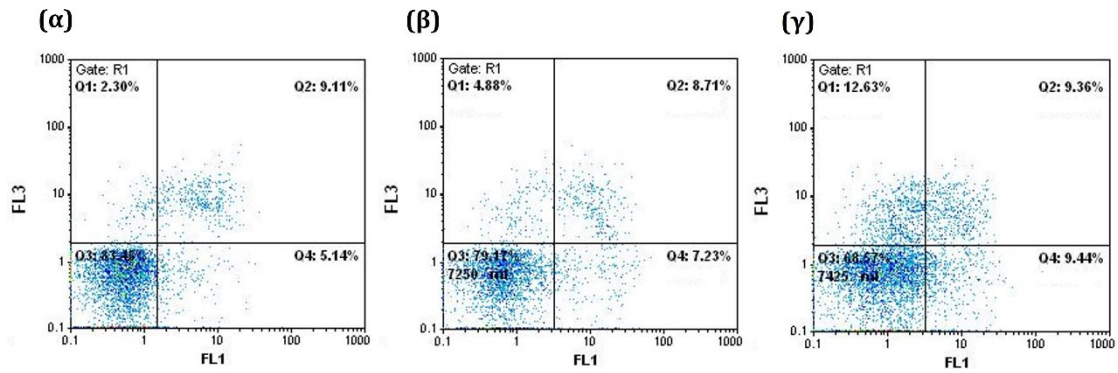




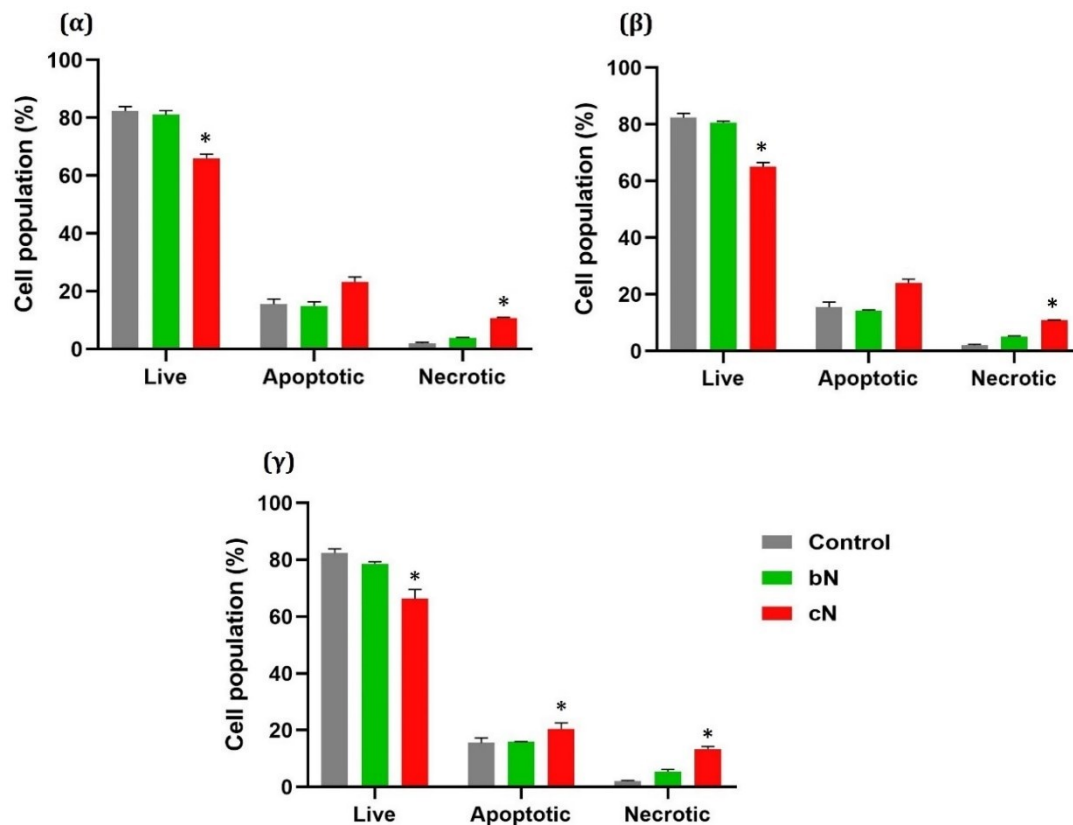
**Εικόνα 4. 67.** Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα κύτταρα HaCaT, έπειτα από επώαση με 20 µg/mL (**α**), 50 µg/mL (**β**) και 100 µg/mL (**γ**) του bN και του cN για 24 ώρες. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου- control ( $p < 0.05$ ).

### Κυτταρική σειρά THP-1

Ακριβώς όπως και στις άλλες δύο κυτταρικές σειρές, καμία δόση του bN δεν προκάλεσε θνησιμότητα στον πληθυσμό των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων (**Εικόνα 4. 68 β, Εικόνα 4. 69**). Το cN σε όλες τις δόσεις προκάλεσε μικρή αύξηση του αποπτωτικού πληθυσμού, κατά περίπου 5-10% σε σχέση με το control (**Εικόνα 4. 69**). Ωστόσο σε αντίθεση με τη δράση του στις άλλες δύο κυτταρικές σειρές, στα THP-1 μακροφάγα το cN προκάλεσε σημαντική θνησιμότητα μέσω νέκρωσης. Η δράση του αυτή ήταν μάλιστα δόσο- εξαρτώμενη. Στις δόσεις των 20 και 50 µg/mL το ποσοστό της νέκρωσης του πληθυσμού αυξήθηκε κατά 8% (**Εικόνα 4. 69 α, β**) και στη μέγιστη δόση κατά 11% σε σχέση με το control (**Εικόνα 4. 68 γ, Εικόνα 4. 69 γ**).



**Εικόνα 4. 68.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά τον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης στον πληθυσμό των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων. **(α):** Κύτταρα ελέγχου-control. **(β):** Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του bN. **(γ):** Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100 µg/mL του cN.



**Εικόνα 4. 69.** Απεικόνιση των ζωντανών, αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων (% κυτταρικού πληθυσμού) στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα, έπειτα από επώαση με 20 µg/mL (α), 50 µg/mL (β) και 100 µg/mL (γ) του bN και του cN για 24 ώρες. \*: στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου-control ( $p < 0.05$ ).

#### 4.1.6. Ανάλυση κυτταρικού κύκλου

Με Κυτταρόμετρο Ροής αναλύθηκε ο κυτταρικός κύκλος των τριών ειδών κυττάρων ώστε να εντοπιστούν βλάβες στα κύτταρα που πιθανόν προκλήθηκαν από τη δράση των νανοϋλικών γραφενίου και είχαν ως αποτέλεσμα διακοπή του κύκλου των κυττάρων (cell cycle arrest) σε κάποια από τις Φάσεις: G0/G1, S και G2/M.

Η δράση των bG και cG ελέγχθηκε μόνο στη δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Τα δύο άλλα ζεύγη νανοϋλικών δοκιμάστηκαν στις δόσεις 20, 50 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Ωστόσο, στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα, οι χημικές δομές cD και cN προκάλεσαν σημαντική μείωση του πληθυσμού των κυττάρων στη δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  και κατέστησαν αδύνατη την αξιολόγησή τους σε μεγαλύτερες δόσεις στην εν λόγω κυτταρική σειρά.

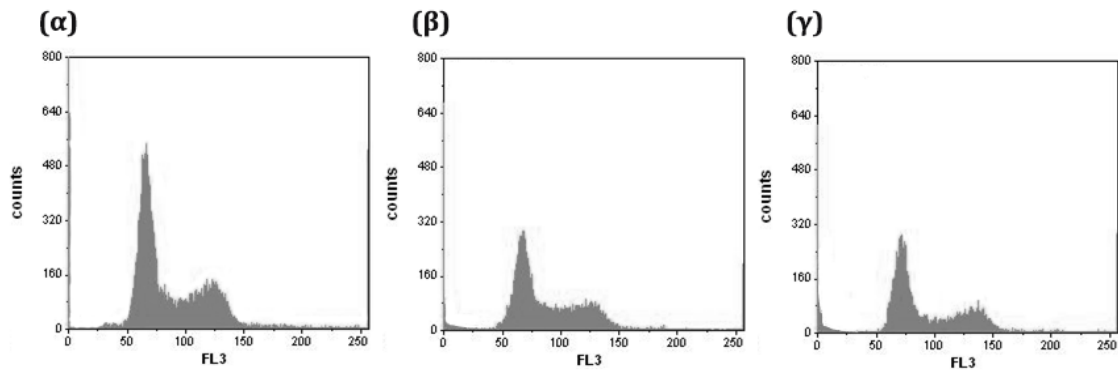
##### 4.1.6.1. Biographene & Chemical graphene

###### *Κυτταρική σειρά NIH/3T3*

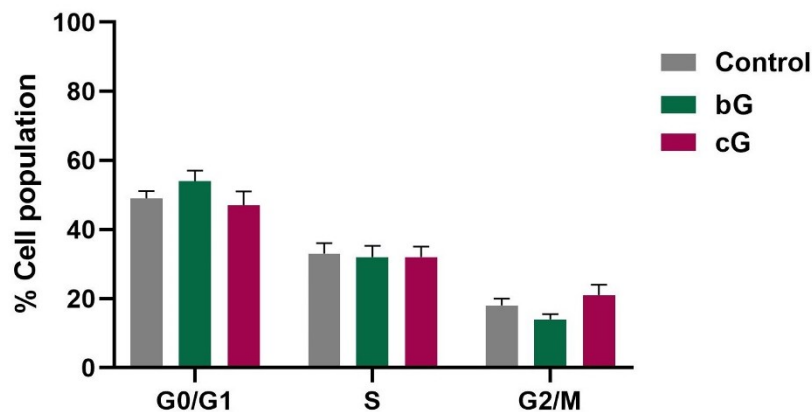
Τόσο το bG όσο και το cG, στη δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  δεν προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές στον κυτταρικό κύκλο των NIH/3T3 κυττάρων.

Στα κύτταρα που επώαστηκαν με bG παρατηρήθηκε πολύ μικρή αύξηση του πληθυσμού στη Φάση G0/G1 και ταυτόχρονη μείωση του ποσοστού των κυττάρων στη Φάση G2/M. Συγκεκριμένα, στη Φάση G0/G1 τα ποσοστά του πληθυσμού αυξήθηκαν από το  $49 \pm 2\%$  στο κοντρόλ στο  $54 \pm 3\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με bG (**Εικόνα 4. 70β, Εικόνα 4. 71**).

Η δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cG είχε ως αποτέλεσμα μικρή αύξηση κατά 3% στο ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονταν στη φάση G2/M (**Εικόνα 4. 71γ, Εικόνα 4. 72**). Οι μεταβολές αυτές δεν θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.



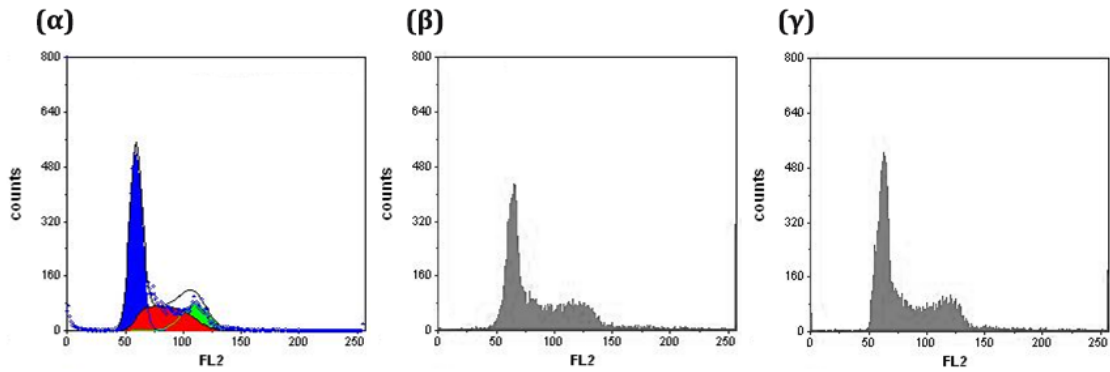
**Εικόνα 4. 70.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των NIH/3T3 κυττάρων. **(α)**: Κύτταρα ελέγχου- Control. **(β)**: Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bG. **(γ)**: Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cG.



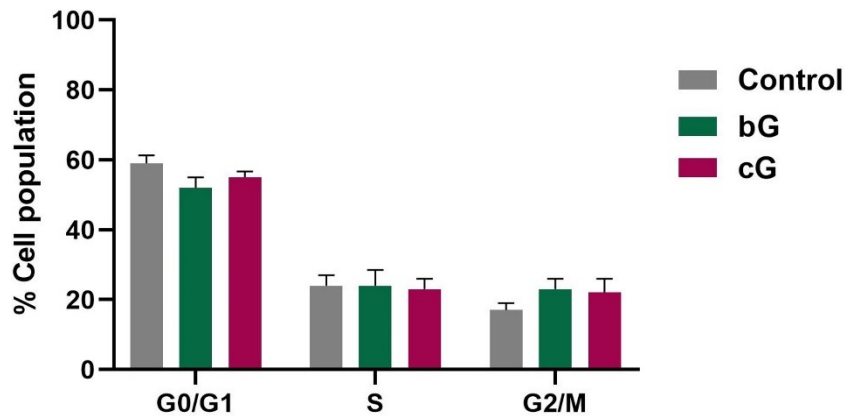
**Εικόνα 4. 71.** Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των NIH/3T3 κυττάρων έπειτα από επώαση με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bG και του cG για 24 ώρες.

### **Κυτταρική σειρά HaCaT**

Τα δύο νανοϋλικά είχαν την ίδια επίδραση στον πληθυσμό των HaCaT κυττάρων, προκαλώντας μικρή διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M. Το ποσοστό του κυτταρικού πληθυσμού στη φάση αυτή αυξήθηκε από  $17 \pm 2\%$  στο control σε  $23 \pm 3\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με bG και σε  $22 \pm 4\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με cG (**Εικόνα 4. 72 & Εικόνα 4. 73**).



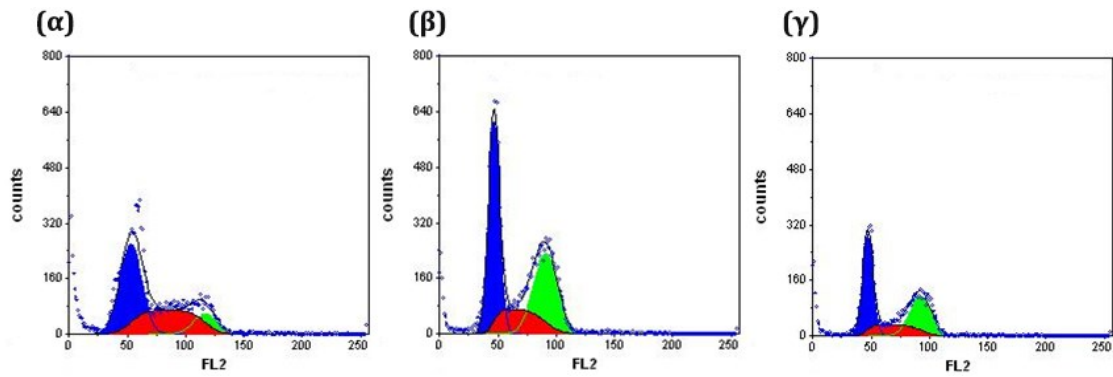
**Εικόνα 4. 72.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των κερατινοκυττάρων HaCaT. **(α)**: Κύτταρα ελέγχου- Control. **(β)**: Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bG. **(γ)**: Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cG.



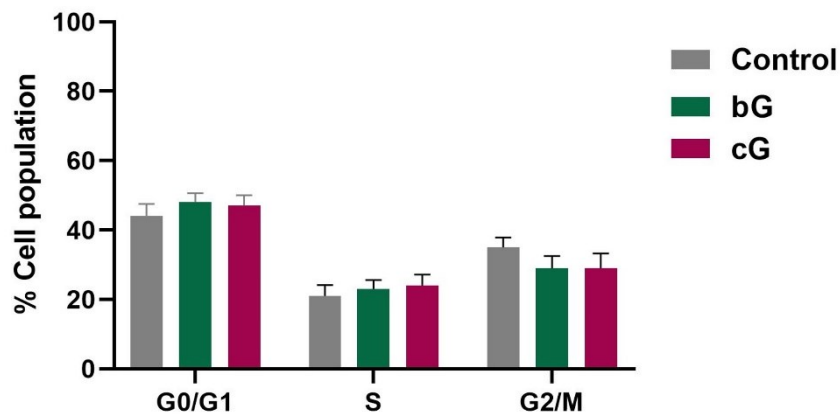
**Εικόνα 4. 73.** Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων HaCaT έπειτα από επώαση με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bG και του cG για 24 ώρες.

### **Κυτταρική σειρά THP-1**

Στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα, επώαση με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bG είχε ως αποτέλεσμα μικρή μείωση του πληθυσμού στη φάση G2/M καθώς τα ποσοστά μεταβλήθηκαν από το  $35 \pm 3\%$  στα κύτταρα κοντρόλ, στο  $29 \pm 3.5\%$  στα κύτταρα που δέχτηκαν bG. Το cG στη δόση αυτή είχε το ίδιο αποτέλεσμα. Ο πληθυσμός των κυττάρων στη φάση G2/M μειώθηκε στο  $29 \pm 4\%$  μετά από χορήγηση cG. Παράλληλα παρατηρήθηκε μικρή αύξηση στον πληθυσμό των κυττάρων στη φάση S. Ωστόσο οι μεταβολές αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (**Εικόνα 4. 74**, **Εικόνα 4. 75**).



**Εικόνα 4. 74.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων. **(α)**: Κύτταρα ελέγχου- Control. **(β)**: Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bG. **(γ)**: Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cG.



**Εικόνα 4. 75.** Διακοπή κυτταρικού κύκλου των κυττάρων THP-1 έπειτα από επώαση με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bG και του cG.

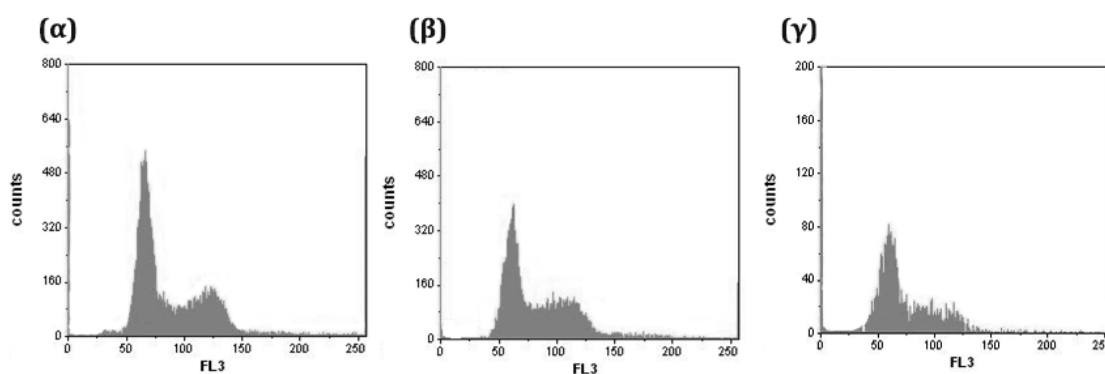
#### 4.1.6.2. Bio\_Doped & Chem\_Doped

##### *Κυτταρική σειρά NIH/3T3*

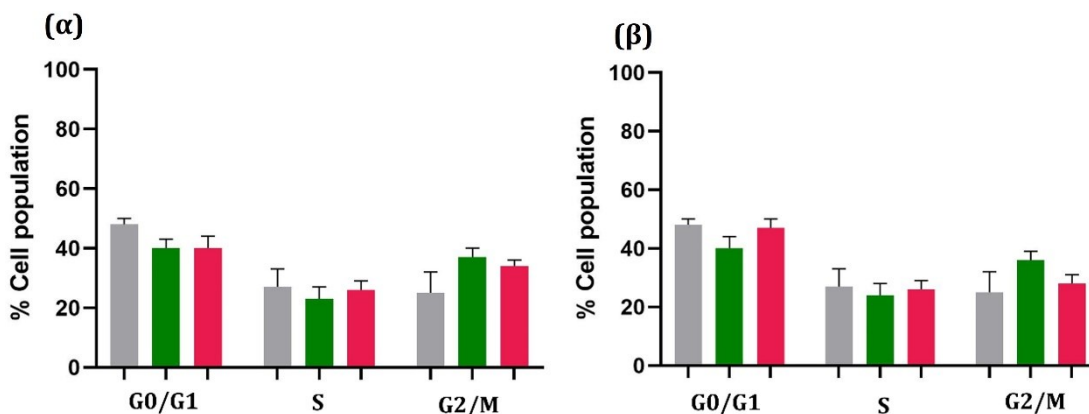
Στα κύτταρα NIH/3T3 τα νανοϋλικά bD και cD στη δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  είχαν την ίδια επίδραση στον κυτταρικό κύκλο, προκαλώντας μικρή διακοπή στη φάση G2/M με ταυτόχρονη μείωση του πληθυσμού των κυττάρων που βρίσκονται στη φάση G0. Στη φάση G0/G1 ο πληθυσμός μειώθηκε από το  $48 \pm 2\%$  στο κοντρόλ, στο  $40 \pm 3\%$  στο bD και στο  $40 \pm 4\%$  στο cD. Αντίστοιχα, ο πληθυσμός στη φάση G2/M αυξήθηκε από τα  $25 \pm 7\%$ , στα  $37 \pm 3\%$ , στο bD και στα  $34 \pm 2\%$  στο cD (**Εικόνα 4. 77 α**).

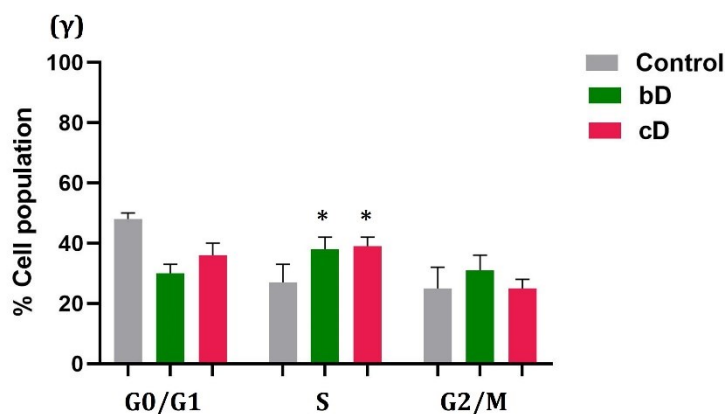
Η δόση των 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bD είχε ακριβώς την ίδια επίδραση στον κυτταρικό κύκλο με αυτή που είχε στη μικρότερη δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Ωστόσο το cD στη δόση αυτή δεν φάνηκε να μεταβάλλει τον κυτταρικό κύκλο καθώς τα ποσοστά του πληθυσμού σε κάθε φάση ήταν όμοια με αυτά των κυττάρων- control (**Εικόνα 4. 77 β**).

Στη δόση των 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  τα δύο ναουϊλικά προκάλεσαν σημαντικές μεταβολές στον κυτταρικό κύκλο των NIH/3T3 κυττάρων. Τόσο το bD όσο και το cD διέκοψαν τον κυτταρικό κύκλο στη φάση S καθώς ο πληθυσμός των κυττάρων αυξήθηκε από το  $27 \pm 6\%$  στο control, στο  $38 \pm 4\%$  και στο  $39 \pm 3\%$ , στα 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bD και του cD, αντίστοιχα. Παράλληλα μειώθηκε ο πληθυσμός των κυττάρων που βρίσκονταν στη φάση G2/M (**Εικόνα 4. 76, Εικόνα 4. 77 γ**).



**Εικόνα 4. 76.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμτρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των NIH/ 3T3 κυττάρων. **(α)**: Κύτταρα ελέγχου- Control. **(β)**: Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bD. **(γ)**: Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cD.





**Εικόνα 4. 77.** Διακοπή κυτταρικού κύκλου των κυττάρων NIH/3T3 έπειτα από επώαση με 20 (**α**), 50 (**β**) και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**γ**) του bD και του cD. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control.

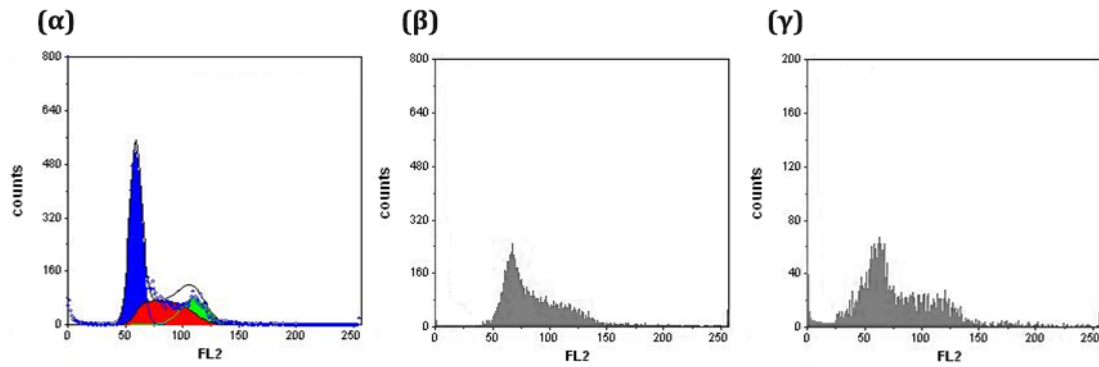
### *Κυτταρική σειρά HaCaT*

Επώαση των κυττάρων HaCaT με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  από το bD και το cD είχε ως αποτέλεσμα μικρή μείωση του πληθυσμού των κυττάρων που βρίσκονταν στη φάση G0/G1 και παράλληλη αύξηση αυτών στη φάση S. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός των κυττάρων στη φάση G0/G1 μεταβλήθηκε από το  $50 \pm 13\%$  (κοντρόλ), στο  $41 \pm 5\%$  και στο  $40 \pm 3\%$ , στα bD και cD αντίστοιχα (**Εικόνα 4. 79 α**).

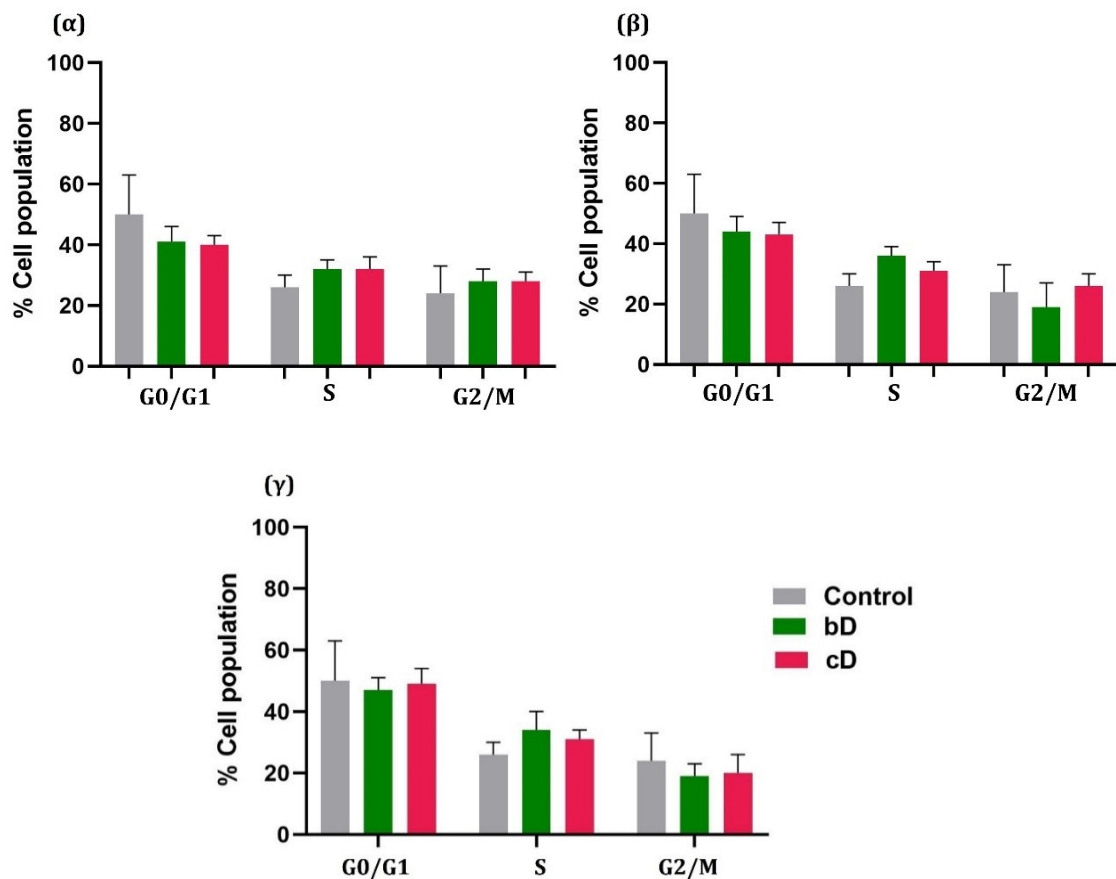
Επώαση με τα 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  των bD και cD οδήγησε σε αντίστοιχο αποτέλεσμα με αυτό που προκάλεσαν στα 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού της φάσης G0/G1 και αύξηση αυτών στη φάση S. Στη φάση S, ο πληθυσμός από  $26 \pm 4\%$ , αυξήθηκε στο  $36 \pm 3\%$  για το bD και στο  $31 \pm 3\%$  για το cD (**Εικόνα 4. 79 β**).

Στα 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  τα δύο ναουβλικά προκάλεσαν πάλι παρόμοια μεταβολή στον κυτταρικό κύκλο σε σχέση με τις δύο μικρότερες δόσεις. Επομένως η επίδρασή τους στα κύτταρα HaCaT δεν ήταν δόσο- εξαρτώμενη. Ο πληθυσμός των κυττάρων στη φάση G0/G1 μειώθηκε από τα  $50 \pm 13\%$  (κοντρόλ), στα  $47 \pm 4\%$  στο bD και στα  $49 \pm 5\%$  στο cD. Αντίστοιχα ο πληθυσμός στη φάση S αυξήθηκε από το  $26 \pm 4\%$  στα κύτταρα- κοντρόλ, στο  $34 \pm 6\%$  στα κύτταρα που δέχτηκαν bD και στο  $31 \pm 3\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με cD (**Εικόνα 4. 78**, **Εικόνα 4. 79 γ**). Κατά την ανάλυση στο Κυτταρόμετρο Ροής παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του πληθυσμού στα κύτταρα που επώαστηκαν με τη μέγιστη δόση του cD.





**Εικόνα 4. 78.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των κερατινοκυττάρων HaCaT. **(α)**: Κύτταρα ελέγχου- Control. **(β)**: Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bD. **(γ)**: Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cD.



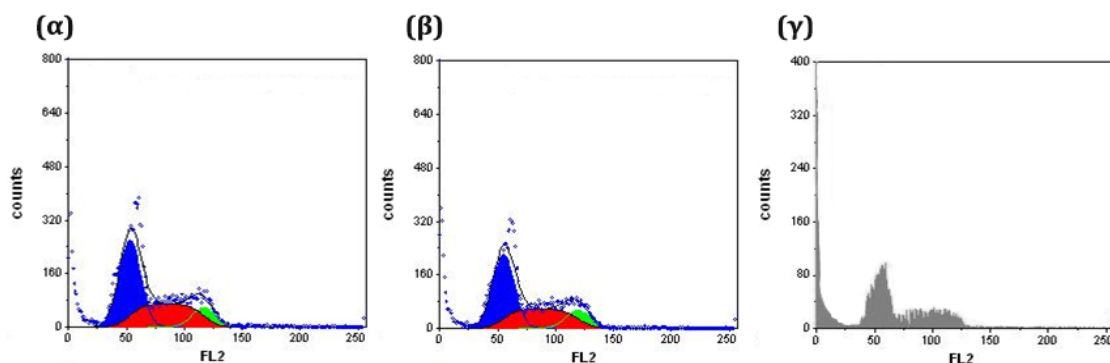
**Εικόνα 4. 79.** Διακοπή κυτταρικού κύκλου των κυττάρων HaCaT έπειτα από επώαση με 20 **(α)**, 50 **(β)** και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  **(γ)** από το bD και το cD.

### Κυτταρική σειρά THP-1

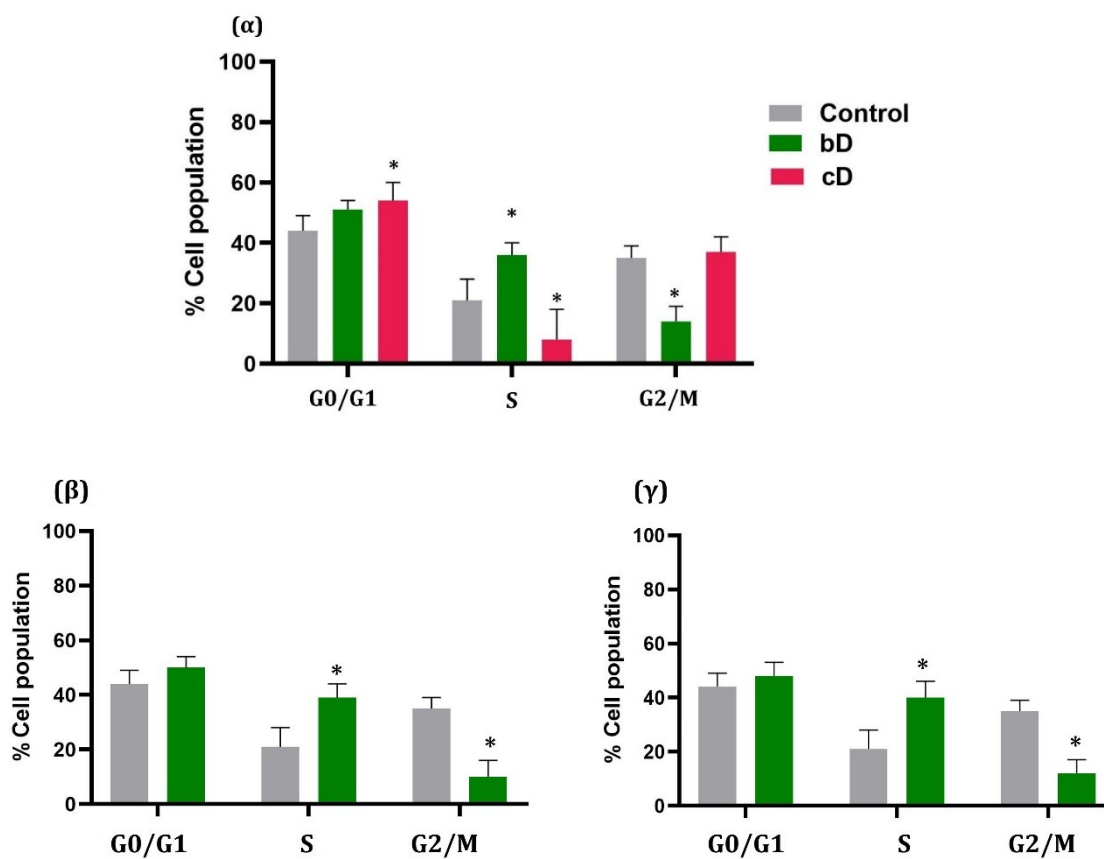
Τα δύο ντοπαρισμένα με άζωτο νανοϋλικά προκάλεσαν πολύ σημαντικές μεταβολές στον κυτταρικό κύκλο των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων. Στα 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  είχαν πολύ διαφορετική δράση μεταξύ τους. Το bD στη δόση αυτή προκάλεσε διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση S. Τα ποσοστά στη φάση αυτή μεταβλήθηκαν από  $21 \pm 7\%$  στο control σε  $36 \pm 4\%$  στα κύτταρα που επώαστηκαν με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bD. Παράλληλα μειώθηκε σημαντικά ο πληθυσμός των κυττάρων που βρίσκονταν στη φάση G2/M και τα ποσοστά μεταβλήθηκαν από  $35 \pm 4\%$  (control) στο  $14 \pm 5\%$  (bD). Το cD στην ίδια δόση είχε αντίθετο αποτέλεσμα. Ο πληθυσμός των κυττάρων που βρίσκονταν στην φάση S μειώθηκε σημαντικά και παρατηρήθηκε αύξηση των κυττάρων στην φάση G0/G1. Τα ποσοστά του κυτταρικού πληθυσμού στην φάση αυτή μεταβλήθηκαν από  $44 \pm 5\%$  (control) στο  $54 \pm 6\%$  (cD). Ο πληθυσμός των κυττάρων που βρίσκονταν στην φάση S σχεδόν υποδιπλασιάστηκε καθώς τα ποσοστά μειώθηκαν από το  $21 \pm 7\%$  (control) στο  $8 \pm 10\%$  (cD) (**Εικόνα 4. 80, Εικόνα 4. 81 α**).

Κατά τη διεξαγωγή της ανάλυσης μέσω του Κυτταρομέτρου Ροής παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του πληθυσμού στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cD. Για τον λόγο αυτό, οι μετρήσεις στις δύο υψηλότερες δόσεις (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) του cD ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθούν. Έτσι, στις δόσεις αυτές ελέγχθηκε μόνο η δράση του bD.

Στις δύο μεγαλύτερες δόσεις η δράση του bD στον κυτταρικό κύκλο ήταν ίδια με αυτή που είχε στα 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , δηλαδή σημαντική διακοπή του κύκλου στη φάση S. Ο πληθυσμός στη φάση αυτή αυξήθηκε από  $21 \pm 7\%$  στο control σε  $39 \pm 5\%$  και σε  $40 \pm 6\%$  στα 50 και στα 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , αντίστοιχα (**Εικόνα 4. 81 β, γ**).



**Εικόνα 4. 80.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρομέτρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων. **(α)**: Κύτταρα ελέγχου- Control. **(β)**: Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bD. **(γ)**: Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cD.



**Εικόνα 4. 81.** Διακοπή κυτταρικού κύκλου των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων έπειτα από επώαση με 20 µg/mL του bD και του cD **(α)**, 50 µg/mL του bD **(β)** και 100 µg/mL του bD **(γ)**. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

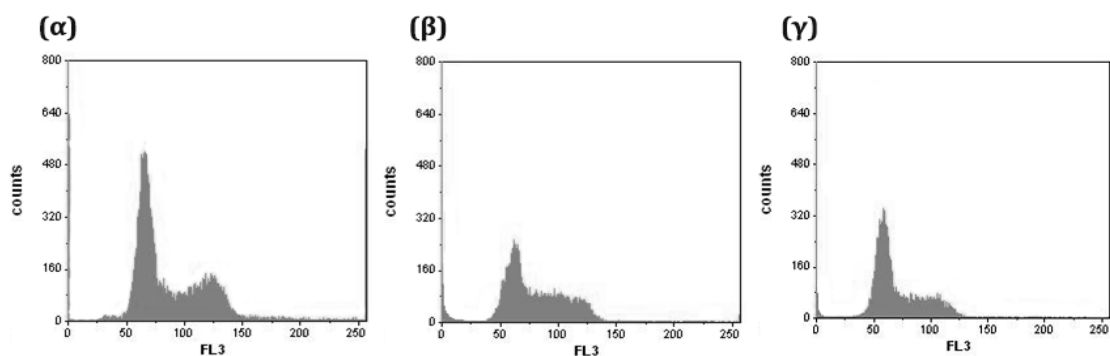
#### 4.1.6.3. Bio\_Nitrate & Chem\_Nitrate

##### *Κυτταρική σειρά NIH/3T3*

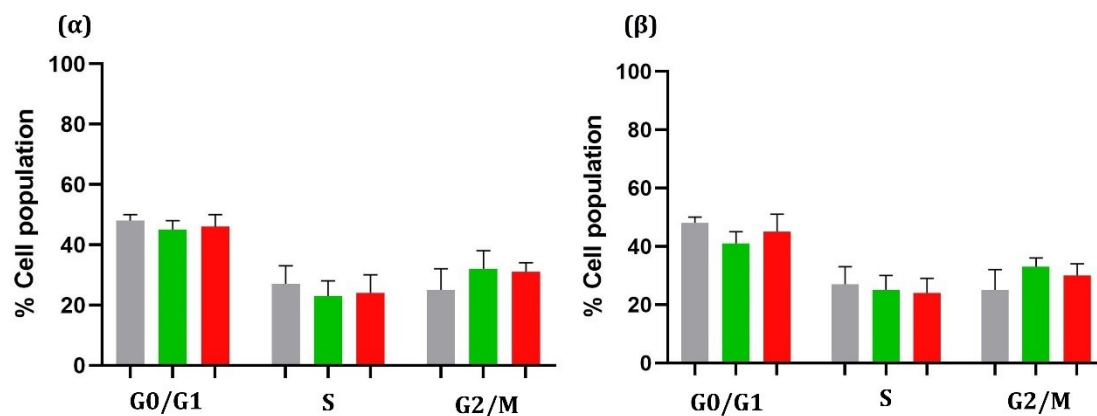
Στα κύτταρα NIH/3T3, επώαση με 20 µg/mL από τα νανοϋλικά bN και cN είχε ως αποτέλεσμα μία μικρή διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G2/M με ταυτόχρονη μείωση του πληθυσμού στη φάση S. Στη φάση G2/M, ο πληθυσμός από  $25 \pm 7\%$  (control), αυξήθηκε στο  $32 \pm 6\%$  στο bN και στο  $31 \pm 3\%$  στο cN (**Εικόνα 4. 83 α**).

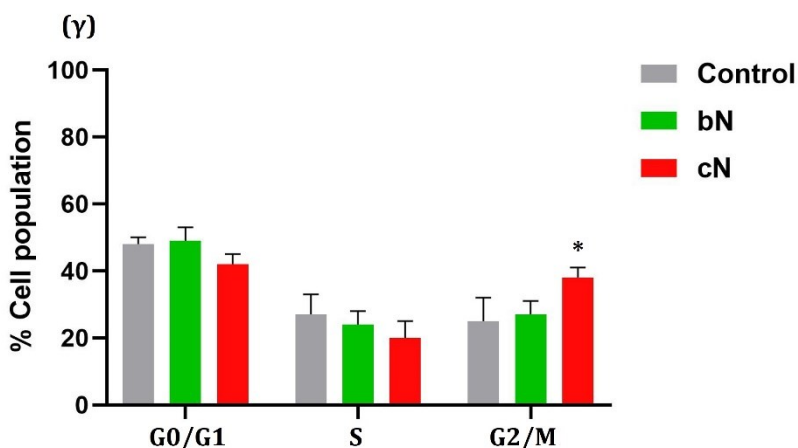
Στα 50 µg/mL τα δύο νανοϋλικά είχαν την ίδια επίδραση με αυτή των 20 µg/mL. Στην φάση G2/M ο πληθυσμός αυξήθηκε στο  $33 \pm 3\%$  και στο  $30 \pm 4\%$  για το bN και το cN, αντίστοιχα (**Εικόνα 4. 83 β**).

Τα δύο ναουϊλικά είχαν αντίστοιχη δράση και στη δόση των 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  διακόπτοντας τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G2/M. Ωστόσο η επίδραση του cN στη δόση αυτή ήταν πολύ πιο ισχυρή από αυτή του bN. Στη φάση G2/M ο πληθυσμός των κυττάρων αυξήθηκε από  $25 \pm 7\%$  στο  $38 \pm 3\%$  (Εικόνα 4. 82, Εικόνα 4. 83 γ).



**Εικόνα 4. 82.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των HaCaT κυττάρων. **(α):** Κύτταρα ελέγχου- Control. **(β):** Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bD. **(γ):** Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cD.





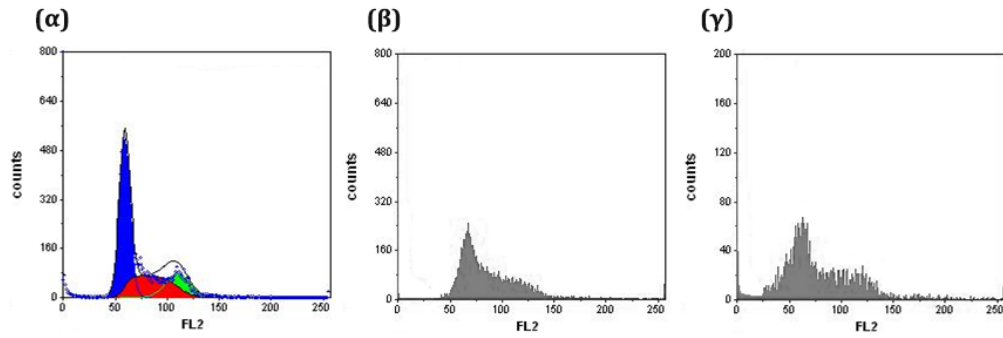
**Εικόνα 4. 83.** Διακοπή κυτταρικού κύκλου των κυττάρων NIH/3T3 έπειτα από επώαση με 20 (**α**), 50 (**β**) και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**γ**) από το bN και το cN. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

### *Κυτταρική σειρά HaCaT*

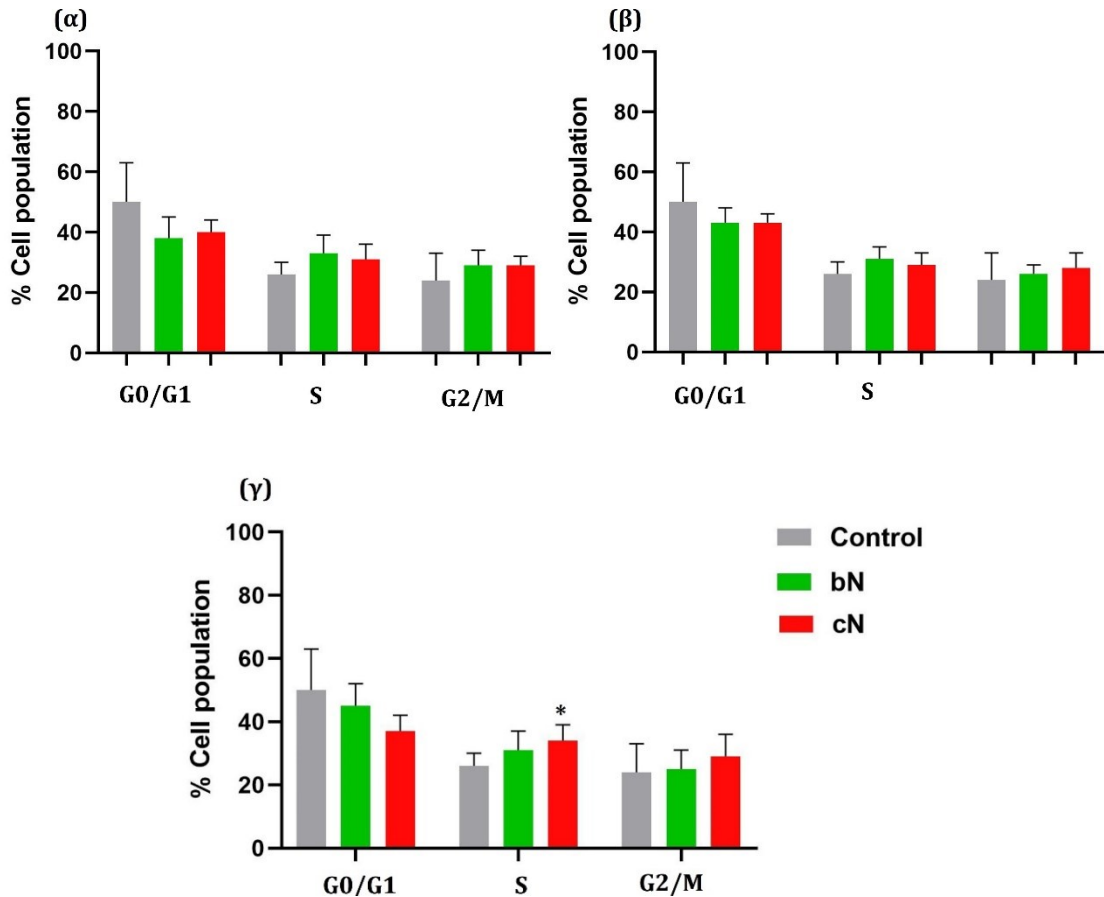
Επώαση των κυττάρων HaCaT με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  των ναουϊλικών bN και cN προκάλεσε μικρή διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη φάση S. Ο πληθυσμός στη φάση αυτή αυξήθηκε από το  $26 \pm 4\%$  στα κύτταρα control στο  $33 \pm 6\%$  και στο  $31 \pm 5\%$  για το bN και το cN αντίστοιχα (**Εικόνα 4. 85 α**). Παράλληλα μειώθηκε ο πληθυσμός στη φάση G0/G1.

Στα 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  σημειώθηκε πάλι αύξηση του πληθυσμού στη φάση S και μείωση αυτού στη φάση G0/G1 με ποσοστά αντίστοιχα με αυτά που σημειώθηκαν στη δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**Εικόνα 4. 85 β**).

Στη μέγιστη δόση των 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  το bN είχε το ίδιο αποτέλεσμα και αντίστοιχα ποσοστά κυτταρικού πληθυσμού με αυτά που καταγράφηκαν στις δόσεις 20 και 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Ωστόσο, το cN στη δόση αυτή είχε πολύ εντονότερη δράση. Ο πληθυσμός στη φάση S αυξήθηκε από  $26 \pm 4\%$  (control) στα  $34 \pm 5\%$ . Παράλληλα το ποσοστό των κυττάρων που βρίσκονταν στη φάση G0/G1 μειώθηκε από  $50 \pm 13\%$  (control) στο  $37 \pm 5\%$  (**Εικόνα 4. 84, Εικόνα 4. 85 γ**).



**Εικόνα 4. 84.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρόμετρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των HaCaT κυττάρων. **(α)**: Κύτταρα ελέγχου- Control. **(β)**: Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bD. **(γ)**: Κύτταρα που επώαστηκαν για 24 ώρες με 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cD.



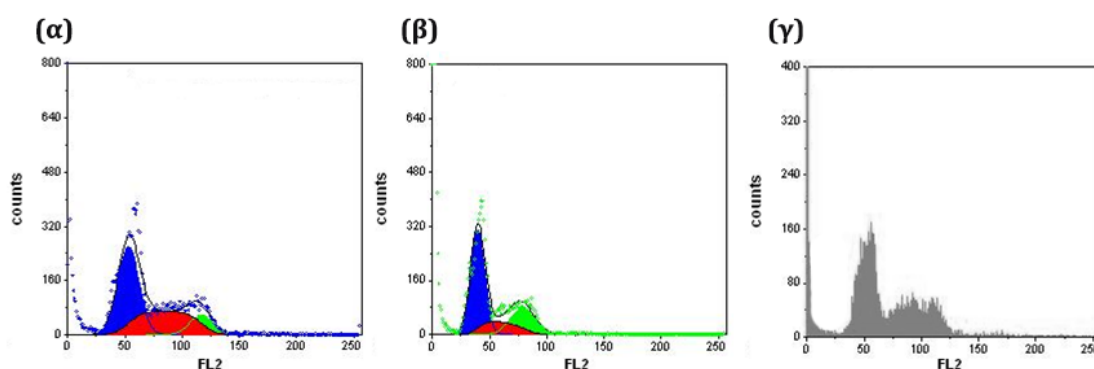
**Εικόνα 4. 85.** Διακοπή κυτταρικού κύκλου των κυττάρων HaCaT έπειτα από επώαση με 20 **(α)**, 50 **(β)** και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  **(γ)** από το bN και το cN. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

### Κυτταρική σειρά THP-1

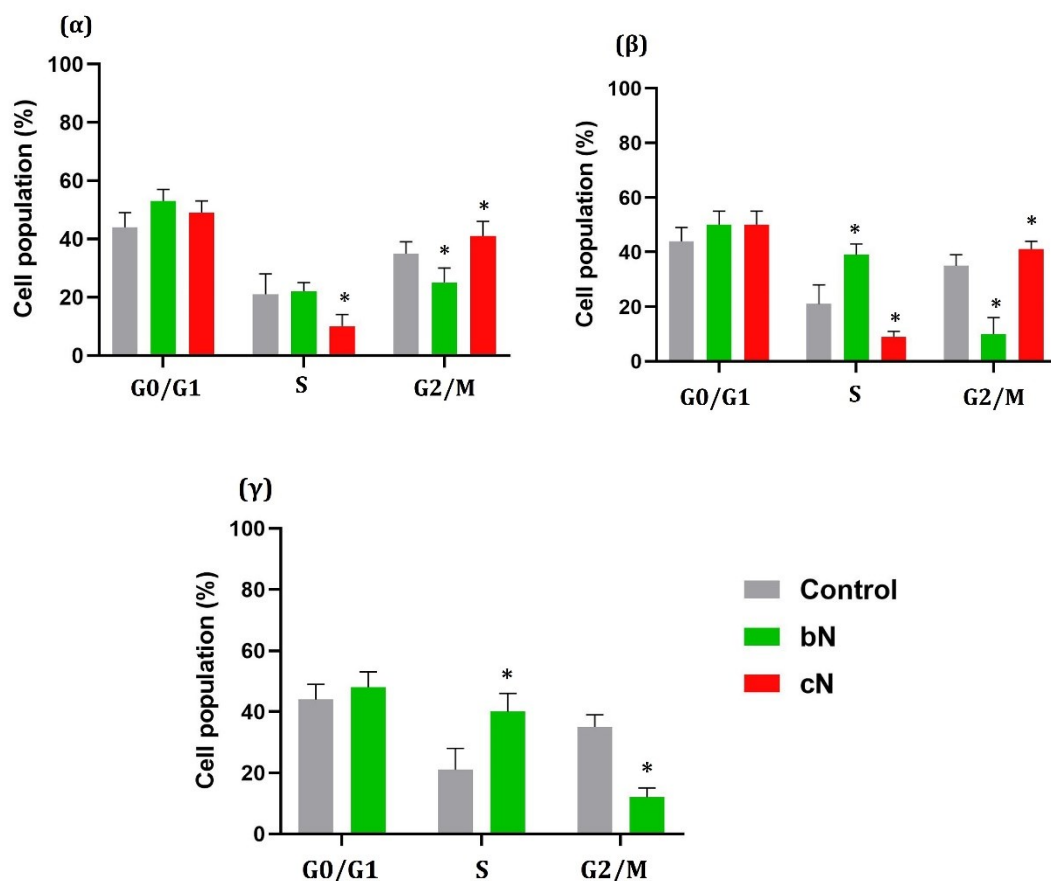
Στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα, τα bN και cN μετέβαλλαν σημαντικά τον κυτταρικό κύκλο δρώντας με διαφορετικό τρόπο. Στη δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  το bN προκάλεσε μικρή αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού στη φάση G0/G1 και μείωση του πληθυσμού στην φάση G2/M. Αντιθέτως το cN σε αυτή τη δόση διέκοψε τον κύκλο στην φάση G2/M. Ο πληθυσμός στην φάση αυτή αυξήθηκε από το  $35 \pm 4\%$  (control) στο  $41 \pm 5\%$  (cN). Παράλληλα μειώθηκε σχεδόν στο μισό ο πληθυσμός στη φάση S, από το  $21 \pm 7\%$  (control) στο  $10 \pm 4\%$  (cN) (**Εικόνα 4. 86, Εικόνα 4. 87 α**).

Στα 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  το bN διέκοψε τα κύτταρα στην φάση S καθώς τα ποσοστά του πληθυσμού αυξήθηκαν από  $21 \pm 7\%$  (control) στο  $39 \pm 4\%$  (bN). Η επίδραση του cN δεν επηρεάστηκε με την αύξηση της δόσης. Συνέχισε να διακόπτει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G2/M και το ποσοστό των κυττάρων στη φάση αυτή αυξήθηκε στο  $41 \pm 3\%$  (**Εικόνα 4. 87 β**)

Η ανάλυση της επίδρασης του cN στη δόση των 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί μέσω του Κυτταρομέτρου Ροής λόγω σημαντικής μείωσης του πληθυσμού. Το bN στην δόση αυτή είχε την ίδια επίδραση στον κυτταρικό κύκλο των μακροφάγων με αυτή που είχε στην δόση των 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Διέκοψε τον κυτταρικό κύκλο στη φάση S καθώς το ποσοστό του κυτταρικού πληθυσμού στη φάση αυτή διπλασιάστηκε σε σχέση με το control, με τιμή  $40 \pm 6\%$  (**Εικόνα 4. 87 γ**).



**Εικόνα 4. 86.** Ενδεικτικές εικόνες από το Κυτταρομέτρο Ροής κατά την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων. **(α)**: Κύτταρα ελέγχου- Control. **(β)**: Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bN. **(γ)**: Κύτταρα που επωάστηκαν για 24 ώρες με 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cN.



**Εικόνα 4. 87.** Διακοπή κυτταρικού κύκλου των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων έπειτα από επώαση με 20 **(α)**, 50 **(β)** και 100 μg/mL **(γ)** από το bN και το cN. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

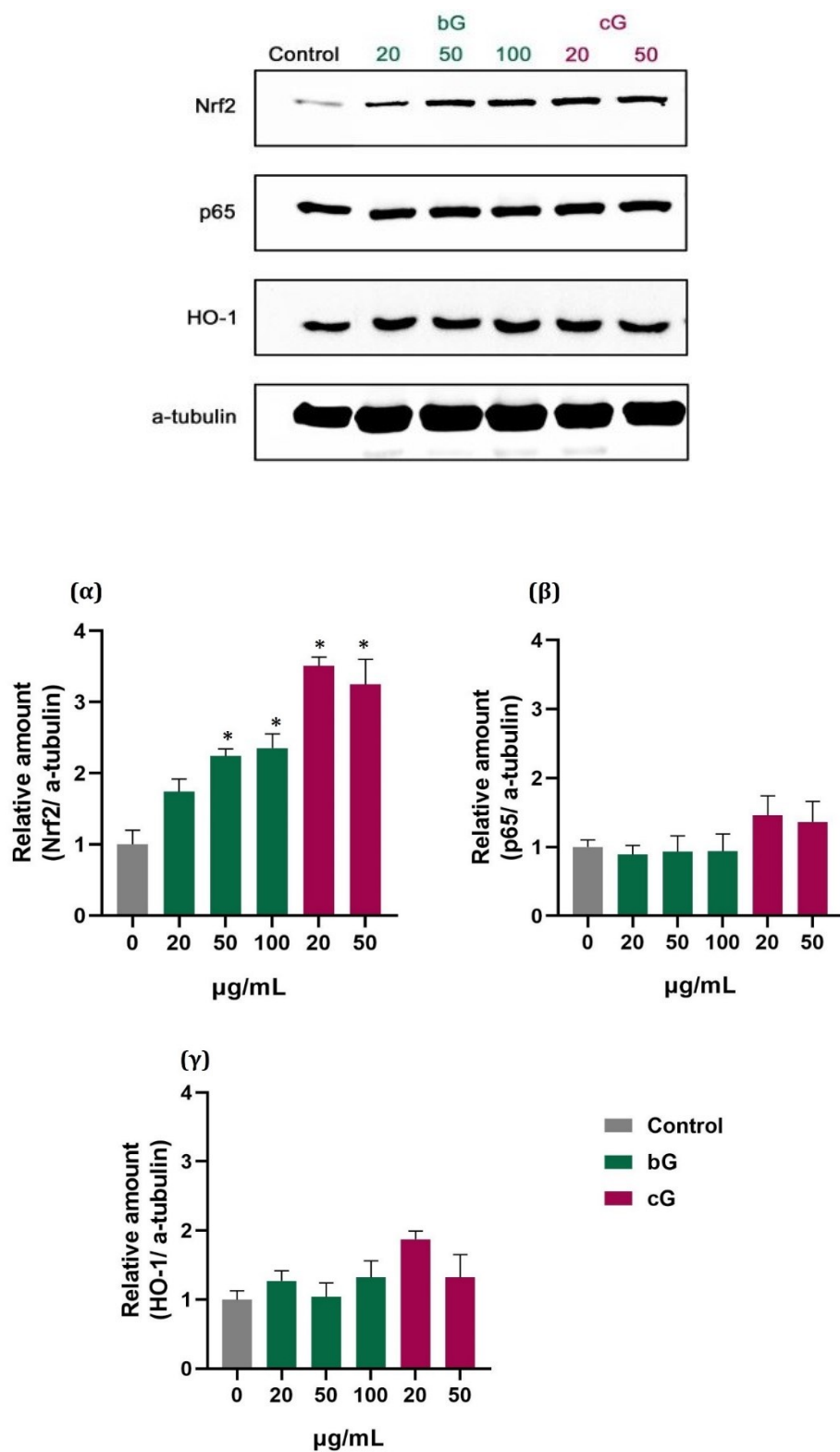
#### 4.1.7. Μελέτη σηματοδοτικών μονοπατιών μέσω Western Blotting

##### 4.1.7.1. Biographene & Chemical graphene

###### Κυτταρική σειρά NIH/3T3

Στα κύτταρα NIH/3T3 αύξηση στην έκφραση του Nrf2 παρατηρήθηκε μετά από επώαση με το bG και το cG με τη σχετική ποσότητα της πρωτεΐνης να είναι σημαντικά υψηλότερη στα κύτταρα που δέχτηκαν το cG. Συγκεκριμένα στα κύτταρα που επώαστηκαν με το cG παρατηρήθηκε αύξηση κατά 2.5 folds (fold-change) στη σχετική ποσότητα του Nrf2 ενώ σε αυτά που δέχτηκαν bG η πρωτεΐνη αυξήθηκε κατά 1- fold, σε σχέση με το control (**Εικόνα 4. 88 α**). Μικρή αύξηση της έκφρασης της HO-1 παρατηρήθηκε επίσης στα κύτταρα που επώαστηκαν με 20 μg/mL του cG (**Εικόνα 4. 88 γ**). Η έκφραση της p65 δεν επηρεάστηκε από τα δύο νανοϋλικά (**Εικόνα 4. 88 β**).

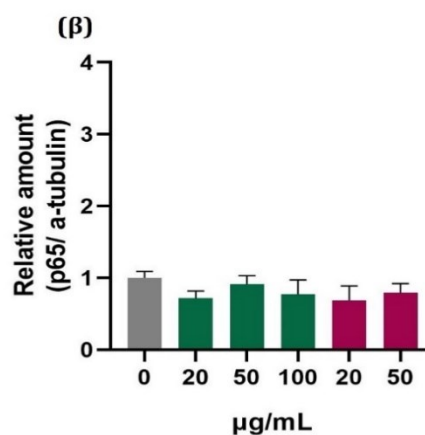
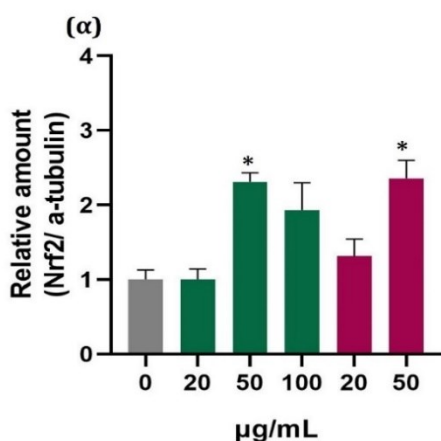
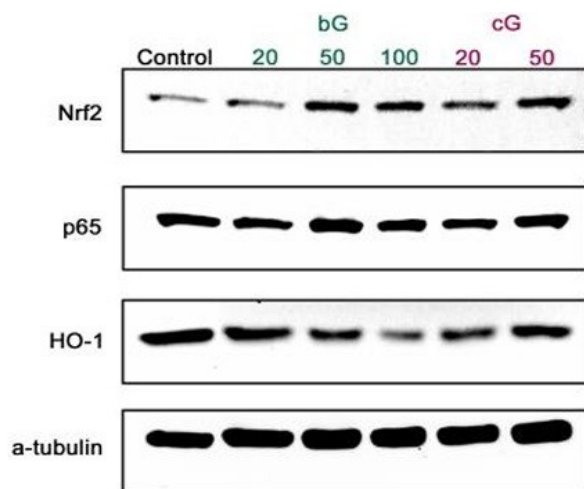


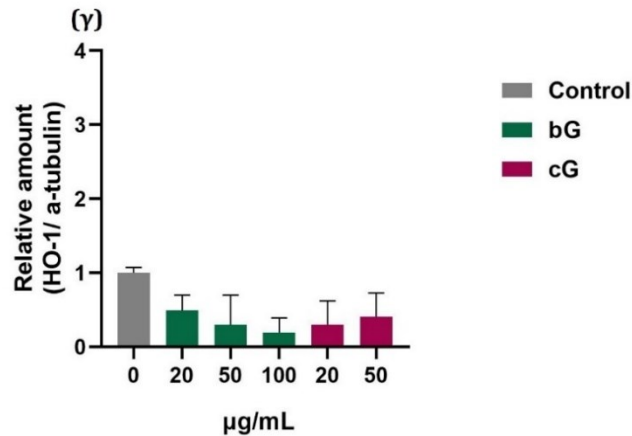


**Εικόνα 4. 88.** Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 (α), p65 (β) και HO-1 (γ) στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

### Κυτταρική σειρά HaCaT

Στα κύτταρα HaCaT, επώαση με τις μέγιστες δόσεις των 50 και 100  $\mu\text{g/mL}$  του bG διπλασίασε την έκφραση της πρωτεΐνης Nrf2 (αύξηση κατά περίπου 1- fold). Την ίδια επίδραση είχε και το cG στην δόση των 50  $\mu\text{g/mL}$  (Εικόνα 4. 89 α). Η αύξηση αυτή δεν συνδυάστηκε με μεταβολές στην έκφραση της HO-1 (Εικόνα 4. 89 γ). Όπως στα κύτταρα NIH/3T3, έτσι και στα κύτταρα HaCaT η έκφραση της p65 παρέμεινε αμετάβλητη έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις του bG και του cG (Εικόνα 4. 89 β)

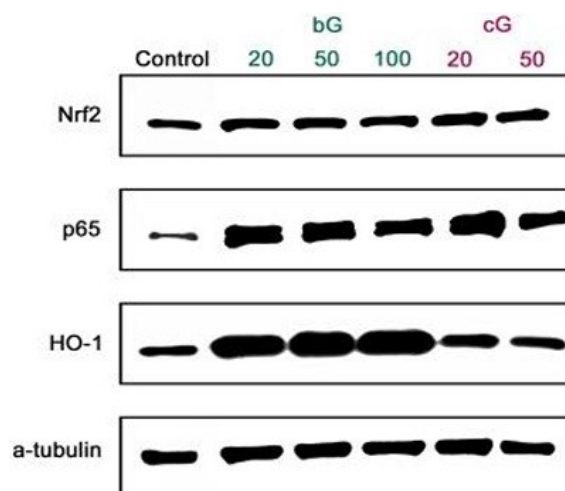


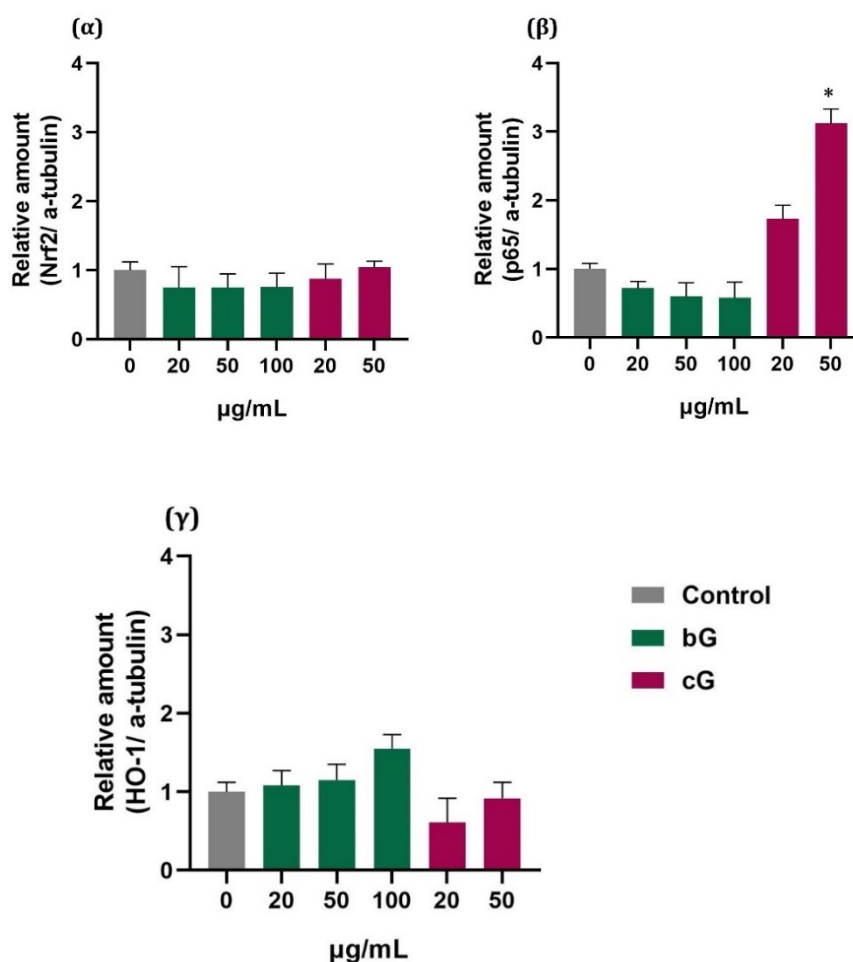


**Εικόνα 4. 89.** Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 (**α**), p65 (**β**) και HO-1 (**γ**) στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

#### Κυτταρική σειρά THP-1

Το bG και το cG είχαν διαφορετική επίδραση στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα από ότι στις άλλες δύο κυτταρικές σειρές. Τόσο το bG όσο και το cG δεν φάνηκε να ενεργοποιούν τον Nrf2 σε καμία από τις υπό μελέτη δόσεις (**Εικόνα 4. 90 α**), ωστόσο σημειώθηκε μία ήπια δόσο- εξαρτώμενη ενεργοποίηση της HO-1 στα κύτταρα που επώαστηκαν με το bG (**Εικόνα 4. 90 γ**). Επίσης επώαση με το cG προκάλεσε σημαντική αύξηση στην έκφραση της p65 η οποία μάλιστα ήταν δόσο- εξαρτώμενη. Παρατηρήθηκε μεταβολή κατά 1-fold στη δόση των 20 µg/mL και κατά 2-folds στη μέγιστη δόση των 50 µg/mL του cG (**Εικόνα 4. 90 β**).





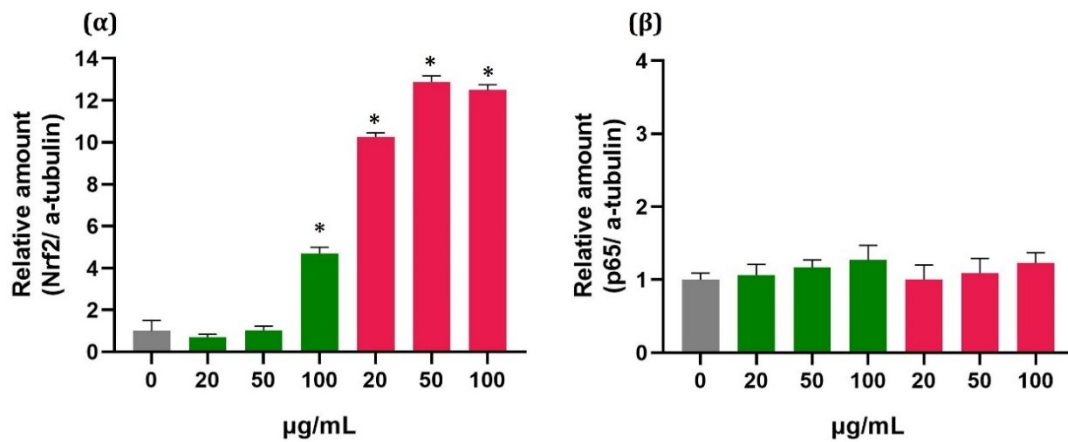
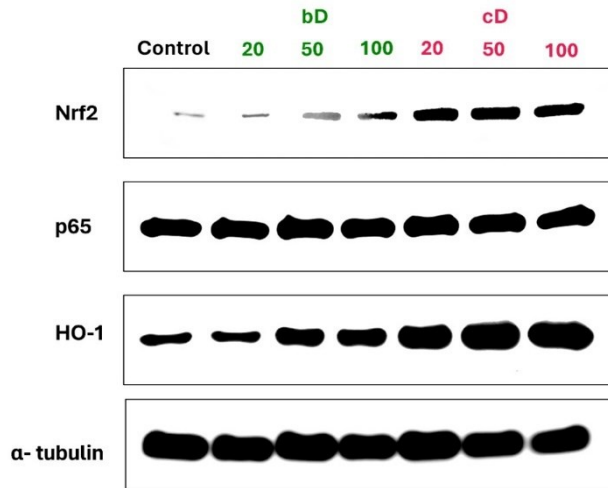
**Εικόνα 4. 90.** Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 (**α**), p65 (**β**) και HO-1 (**γ**) στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bG και cG. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

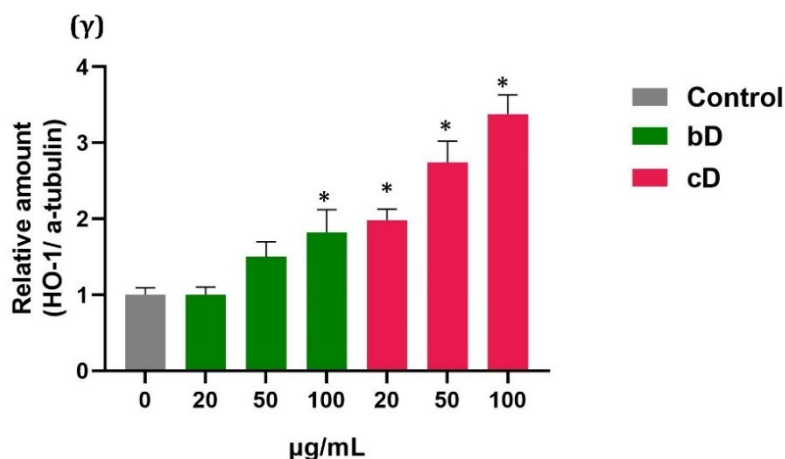
#### 4.1.7.2. Bio\_ N-Doped & Chem\_ N- Doped

##### *Κυτταρική σειρά NIH/3T3*

Στα NIH/3T3 κύτταρα το cD σημείωσε τη μεγαλύτερη ενεργοποίηση του Nrf2 από όλες τις δομές γραφενίου η οποία φάνηκε να είναι και δοσο- εξαρτώμενη. Συγκεκριμένα, στη δόση των 20  $\mu\text{g/mL}$  του cD παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης του Nrf2 κατά 9- folds σε σχέση με το control, ενώ στις δόσεις 50 και 100  $\mu\text{g/mL}$  κατά 11 φορές. Το bD προκάλεσε επίσης σημαντική αύξηση του Nrf2 κατά 4- folds σε σχέση με το control αλλά μόνο στη μέγιστη δόση των 100  $\mu\text{g/mL}$  (**Εικόνα 4. 91 α**). Παράλληλα με την αύξηση του Nrf2, τα δύο νανοϋλικά αύξησαν δοσο- εξαρτώμενα τη σχετική ποσότητα της HO-1. Η μεταβολή ήταν κατά

περίπου 1 και 2- folds στις δόσεις 50 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bD και από 2 έως 4 folds στις δόσεις 20 έως 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cD (Εικόνα 4. 91 γ). Η έκφραση της p65 δεν επηρεάστηκε από τα δύο ναουϊλικά (Εικόνα 4. 91 β).

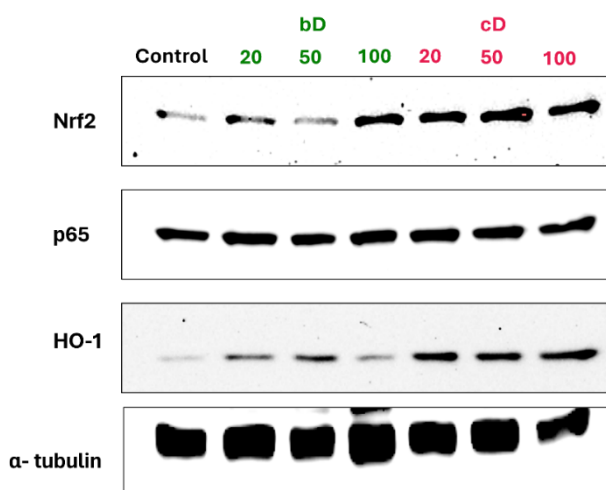


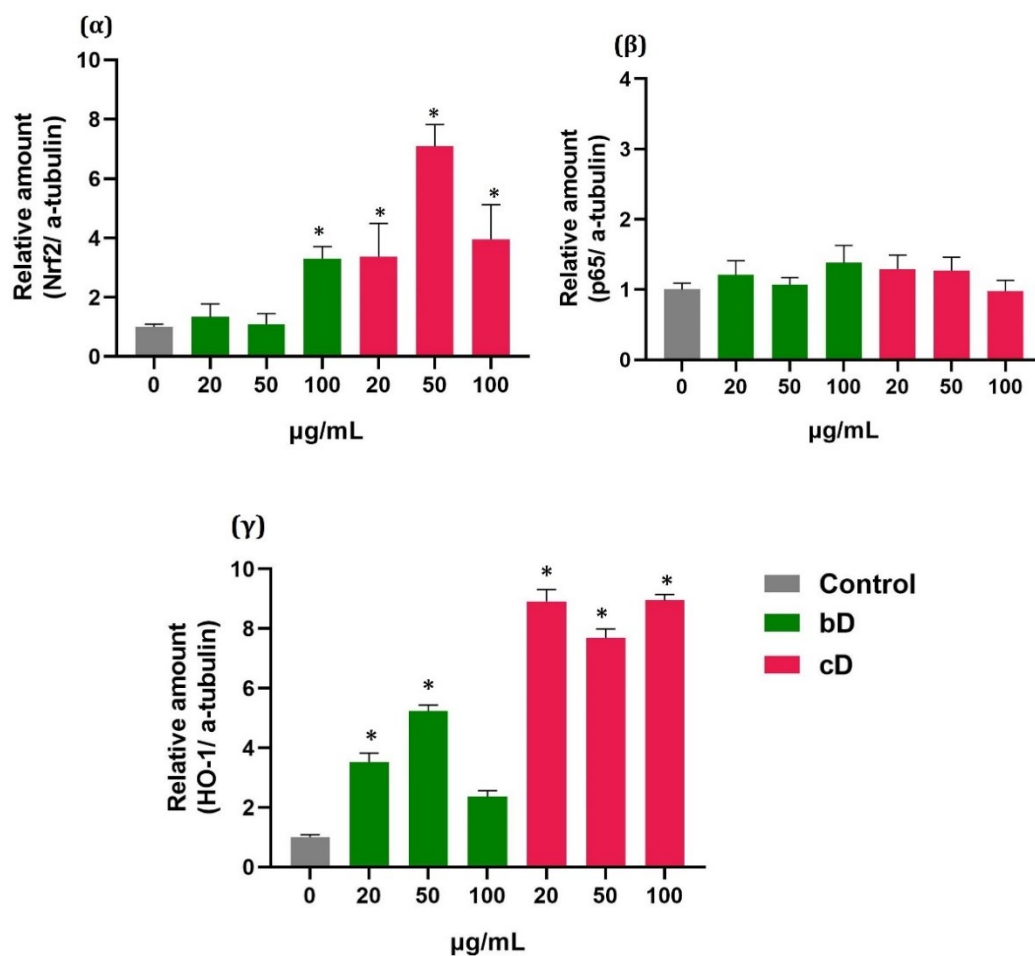


**Εικόνα 4. 91.** Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 (**α**), p65 (**β**) και HO-1 (**γ**) στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

### Κυτταρική σειρά HaCaT

Στην κυτταρική σειρά HaCaT, το cD φάνηκε να ενεργοποιεί τον Nrf2 καθώς παρατηρήθηκε αύξηση στην έκφρασή του έπειτα από επώαση με όλες τις δόσεις. Ειδικά στη δόση των 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  σημειώθηκε η μεγαλύτερη αύξηση, καθώς η σχετική ποσότητα της πρωτεΐνης εξαπλασιάστηκε. Η μέγιστη δόση των 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bD είχε επίσης επίδραση στον Nrf2, καθώς η σχετική του ποσότητα τριπλασιάστηκε (**Εικόνα 4. 92 α**). Παράλληλα με την αύξηση της Nrf2, το cD σε όλες τις δόσεις προκάλεσε επίσης ενεργοποίηση της HO-1. Η HO-1 αυξήθηκε κατά 8- folds σε όλες τις δόσεις του cD. Το bD επίσης αύξησε την έκφραση της HO-1, ειδικά στις μικρότερες δόσεις των 20 και 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**Εικόνα 4. 92 γ**). Η έκφραση της p65 δεν επηρεάστηκε από τα δύο ναουϊλικά (**Εικόνα 4. 92 β**).

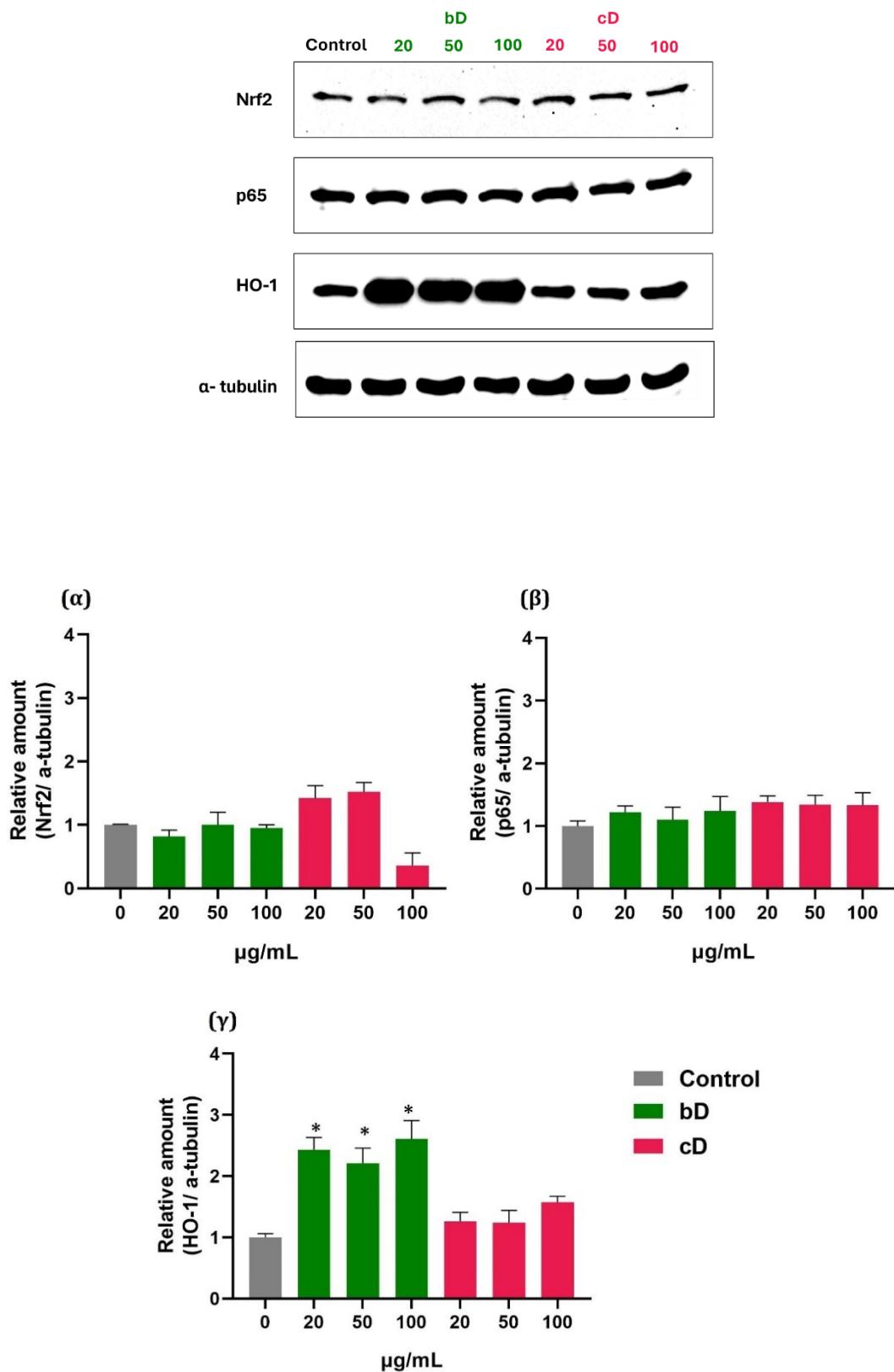




**Εικόνα 4. 92.** Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 (**α**), p65 (**β**) και HO-1 (**γ**) στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

### Κυτταρική σειρά THP-1

Στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα, επώαση με όλες τις δόσεις του bD δεν επηρέασαν την έκφραση του Nrf2. Ωστόσο, επώαση με το cD προκάλεσε ήπια, στατιστικά μη σημαντική μεταβολή στην έκφραση της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, στις δόσεις 20 και 50 µg/mL του cD, σημειώθηκε αύξηση της σχετικής ποσότητας του Nrf2 κατά 0,5- folds ενώ στη μέγιστη δόση των 100 µg/mL η έκφραση μειώθηκε κατά 0,5- folds σε σχέση με το control (**Εικόνα 4. 93 α**). Η έκφραση της p65 παρέμεινε αμετάβλητη (**Εικόνα 4. 93 β**). Οι τρεις δόσεις του bD προκάλεσαν σημαντική αύξηση της HO-1, κατά 1,5- folds. Όλες οι δόσεις του cD οδήγησαν επίσης σε αύξηση της σχετικής ποσότητας της HO-1 αλλά σε πολύ μικρότερα επίπεδα από ότι το bD (**Εικόνα 4. 93 γ**).



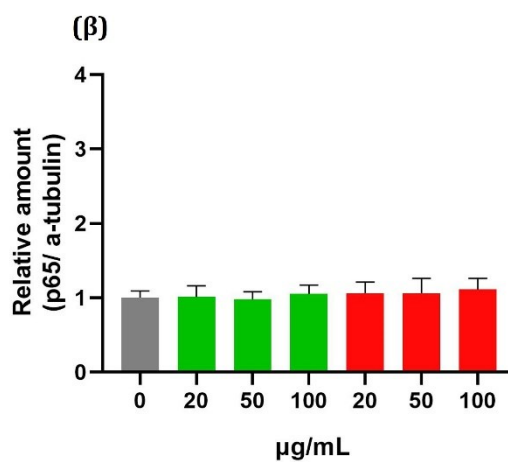
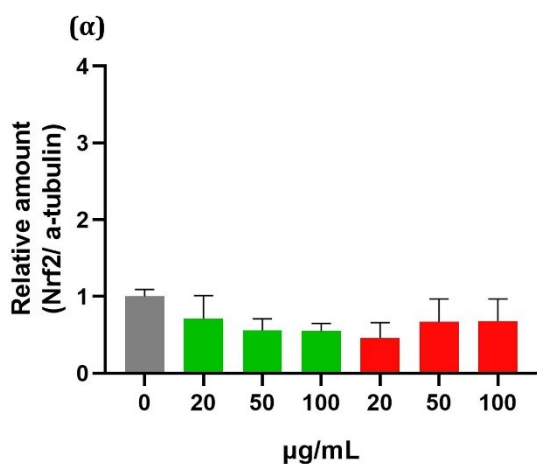
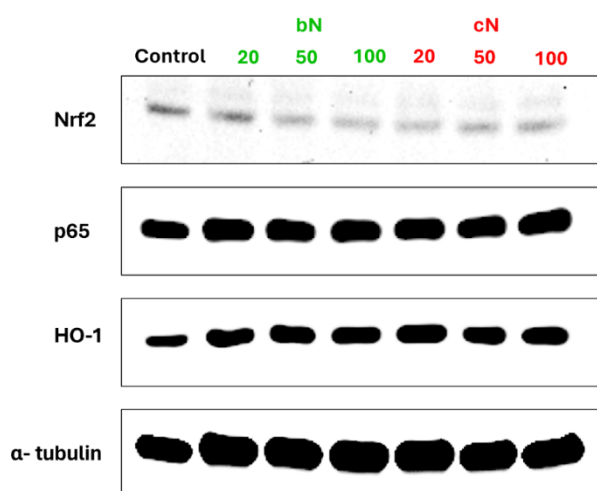
**Εικόνα 4. 93.** Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 ( $\alpha$ ), p65 ( $\beta$ ) και HO-1 ( $\gamma$ ) στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bD και cD. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

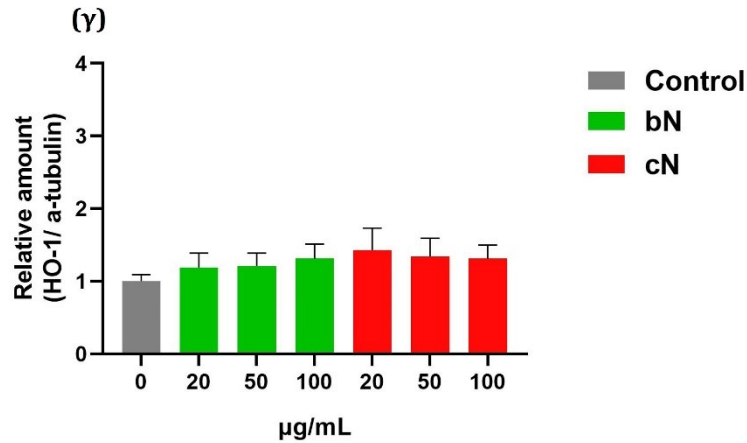


### 4.1.7.3. Bio\_Nitrate & Chem\_Nitrate

#### Κυτταρική σειρά NIH/3T3

Στα κύτταρα NIH/3T3 επώαση με τις δόσεις 50 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του bN και τη δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  του cN μείωσε περίπου στο μισό την έκφραση του Nrf2 σε σχέση με το control. Στις υπόλοιπες δόσεις η έκφραση της εν λόγω πρωτεΐνης δεν φάνηκε να μεταβάλλεται (Εικόνα 4. 94 α). Τα δύο ναουλικά δεν επηρέασαν την έκφραση της p65 (Εικόνα 4. 94 β). Μικρή αύξηση σημειώθηκε και στην έκφραση της HO σε όλες τις δόσεις του bN και του cN. Ωστόσο η αύξηση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Εικόνα 4. 94 γ).

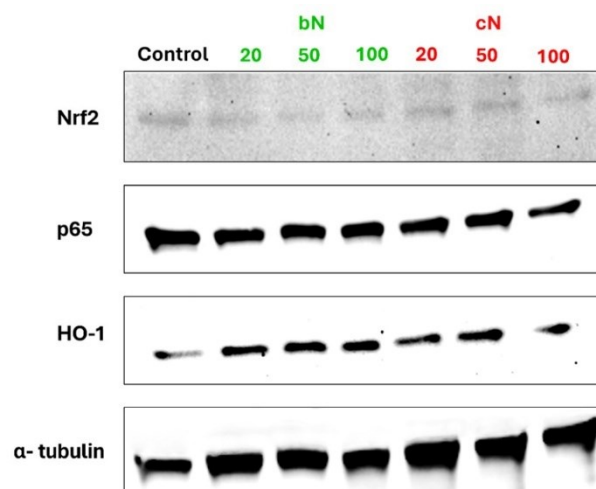


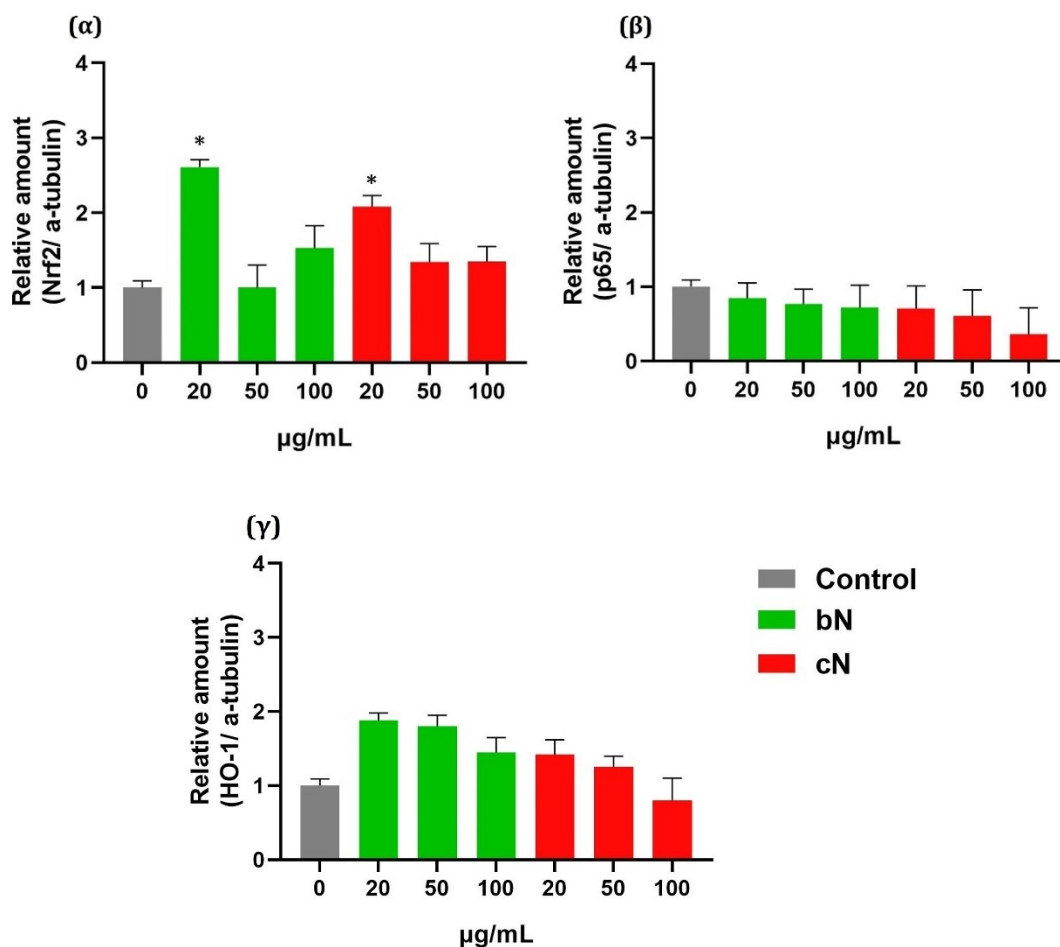


**Εικόνα 4. 94.** Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 (**α**), p65 (**β**) και HO-1 (**γ**) στα κύτταρα NIH/3T3 έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN.

#### *Κυτταρική σειρά HaCaT*

Στα κύτταρα HaCaT, επώαση με τα 20 μg/mL του bN και του cN είχε ως αποτέλεσμα μικρή αύξηση της έκφρασης του Nrf2 κατά 2- folds και 1- fold, αντίστοιχα. Στις δύο άλλες δόσεις, στα 50 και τα 100 μg/mL, σημειώθηκε μικρή αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης η οποία όμως δεν ήταν σημαντική (**Εικόνα 4. 95 α**). Η έκφραση της HO-1 αυξήθηκε επίσης, σε όλες τις δόσεις του bN και στις δύο δόσεις των 20 και 50 μg/mL του cN (**Εικόνα 4. 95 γ**). Η αύξηση ήταν κατά περίπου 1- fold. Η έκφραση της p65 παρέμεινε αμετάβλητη από τα δύο νανούλικά (**Εικόνα 4. 95 β**).

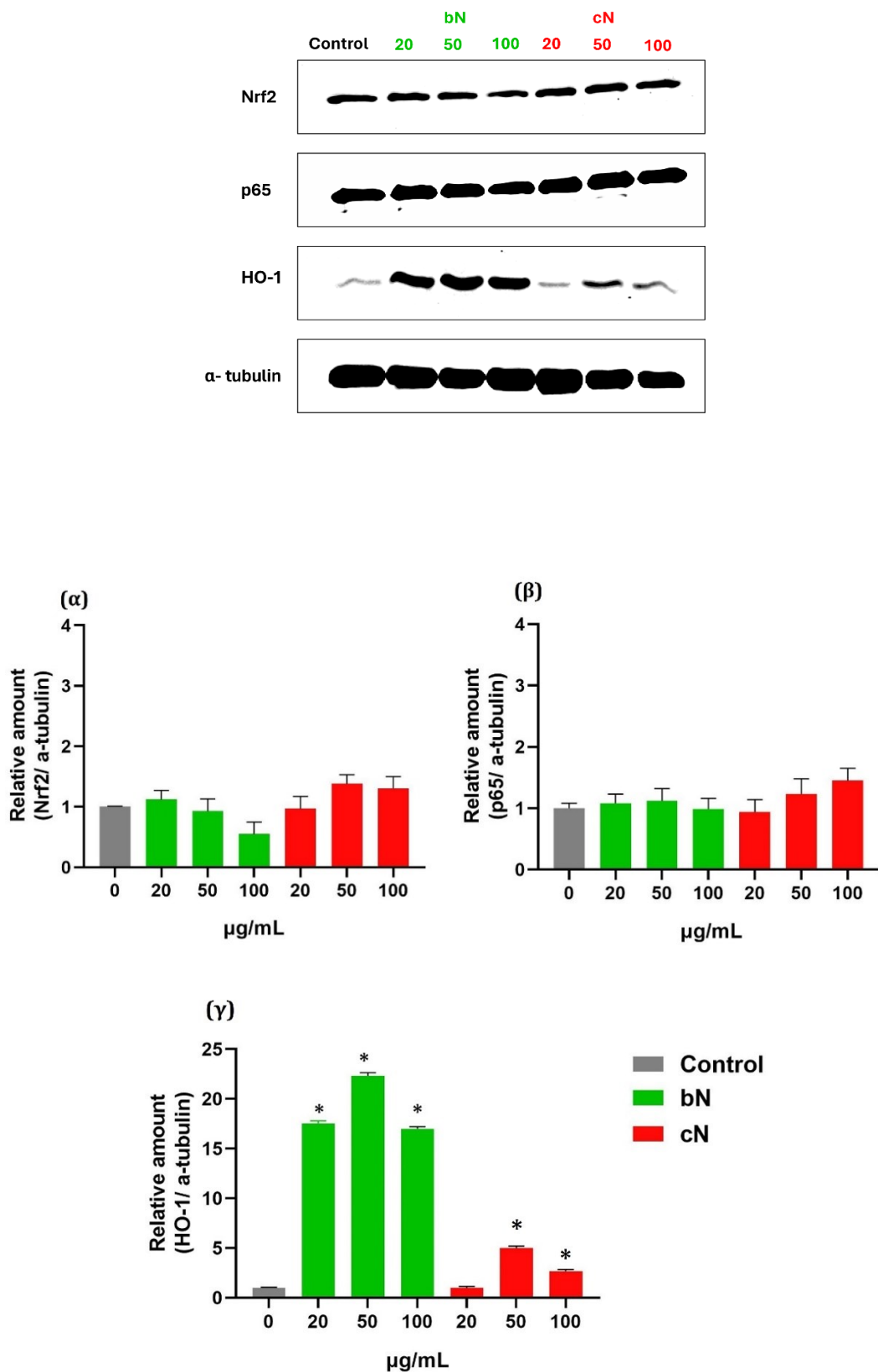




**Εικόνα 4. 95.** Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 (**α**), p65 (**β**) και HO-1 (**γ**) στα κύτταρα HaCaT έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

### *Κυτταρική σειρά THP-1*

Τα δύο νανοϋλικά δεν φάνηκε να επηρεάζουν την έκφραση του Nrf2 στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα. Μόνο στη μέγιστη δόση των 100 µg/mL του bN υπήρχε μικρή πτώση (0.5- folds) στην έκφραση του Nrf2 (**Εικόνα 4. 96 α**). Η έκφραση της p65 επίσης παρέμεινε αμετάβλητη σε όλες τις δόσεις που δοκιμάστηκαν (**Εικόνα 4. 96 β**). Ωστόσο, η έκφραση της HO-1 επηρεάστηκε σημαντικά από τα δύο νανοϋλικά και κυρίως από το bN. Όσον αφορά το cN, οι δύο μέγιστες δόσεις αύξησαν την έκφραση της HO-1, κατά 4- folds στη δόση των 50 µg/mL και κατά 3- folds στη δόση των 100 µg/mL, σε σχέση με το control. Το bN προκάλεσε πολύ πιο σημαντικές αλλαγές στην έκφραση της HO-1. Στη δόση των 20 και των 100 µg/mL η έκφραση της HO-1 αυξήθηκε κατά 17- folds ενώ στην ενδιάμεση δόση των 50 µg/mL κατά 20- folds, σε σχέση με το control (**Εικόνα 4. 96 γ**).

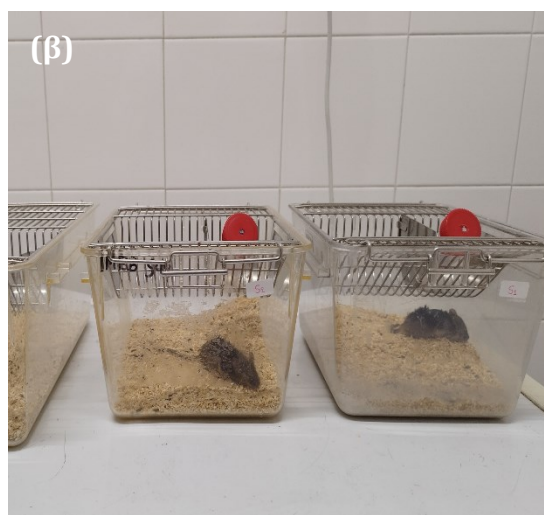
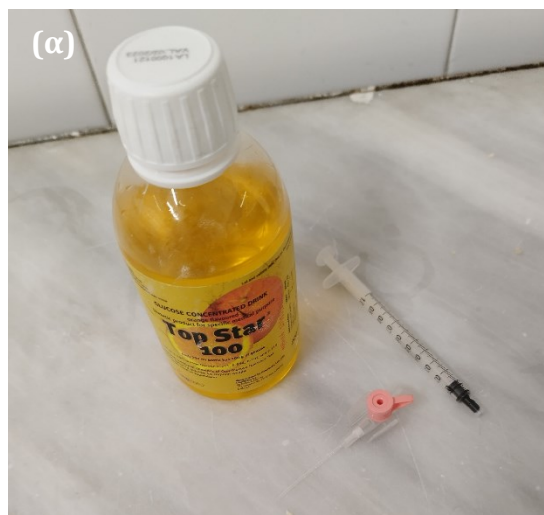


**Εικόνα 4. 96.** Σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών Nrf2 (α), p65 (β) και HO-1 (γ) στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα έπειτα από επώαση με αυξανόμενες δόσεις bN και cN. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control (p < 0.05).

## 4.2. Μελέτες *in vivo*

### 4.2.1. Τεστ ανοχής στην γλυκόζη

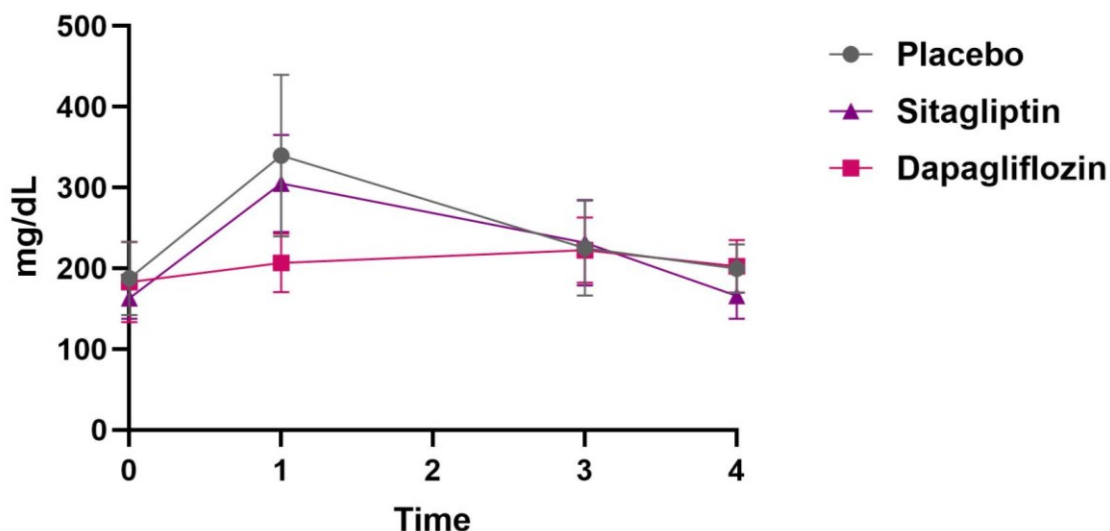
Το τεστ ανοχής στην γλυκόζη (OGTT) χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί η ταχύτητα εκκαθάρισης της εξωγενούς γλυκόζης από το αίμα (Εικόνα 4. 97). Τα ζώα παρέμειναν νηστικά καθ' όλη τη διάρκεια του πρωτοκόλλου ώστε η λήψη εξωγενούς γλυκόζης να είναι η μόνη πηγή αύξησης της γλυκόζης του αίματος και τα αποτελέσματα να μείνουν ανεπηρέαστα από εξωγενείς παράγοντες. Επιπλέον, σε μία από τις ομάδες ζώων χορηγήθηκε νανογαλάκτωμα χωρίς δραστική ουσία (placebo group) ώστε να ληφθεί υπόψιν η πιθανή πρόκληση υπεργλυκαιμίας λόγω στρες σε όλες τις ομάδες των ζώων. Προκειμένου να μειωθούν οι παρεμβολές στη μέτρηση από το στρες, πριν από τη λήψη της απαιτούμενης για τη μέτρηση σταγόνας αίματος, τα ζώα τοποθετούνταν σε restrainer για 15 λεπτά ώστε να ηρεμήσουν. Η λήψη αίματος πραγματοποιήθηκε από το πέλμα των ζώων ενώ αυτά ήταν εντός του restrainer.





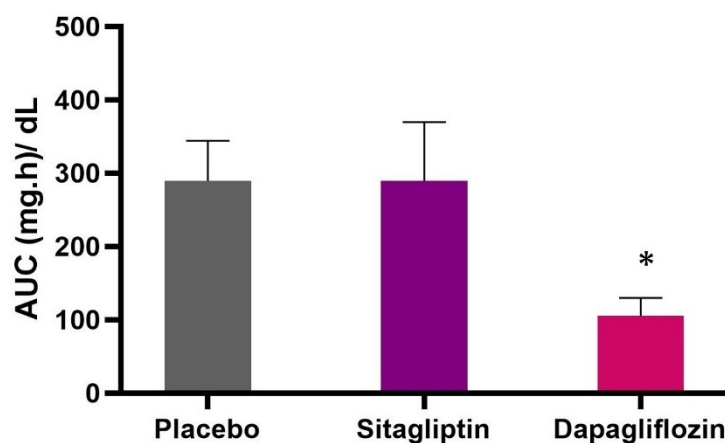
**Εικόνα 4. 97.** Ενδεικτικές φωτογραφίες από το τεστ OGTT στους μύες SV129. **(α)** χορήγηση διαλύματος γλυκόζης **(β)** τοποθέτηση των ζώων σε χωριστούς κλωβούς και σε restrainer κατά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου **(γ)** λήψη σταγόνας αίματος από το πέλμα των ζώων και μέτρηση της γλυκόζης του αίματος με τη χρήση του συστήματος Solus V2 με ταινίες.

Ο πρώτος έλεγχος των επιπέδων γλυκόζης αίματος (χρονική στιγμή  $t = 0$ ), πραγματοποιήθηκε πριν την επάλειψη των νανογαλακτωμάτων ώστε να υπάρχει κοινή βάση αναφοράς σε όλες τις ομάδες. Η μέτρηση αυτή αφορούσε τη γλυκόζη νηστείας, έπειτα από 12 ώρες χωρίς φαγητό. Οι τιμές της γλυκόζης νηστείας των ζώων σε όλες τις ομάδες ήταν μεταξύ 160-180 mg/dL. Μισή ώρα μετά την επάλειψη των νανογαλακτωμάτων και τη χορήγηση του διαλύματος γλυκόζης σε κάθε ζώο, πραγματοποιήθηκε ο δεύτερος έλεγχος της γλυκόζης ( $t = 1$  h από την έναρξη του πρωτοκόλλου). Η τιμή της γλυκόζης ήταν σημαντικά αυξημένη στις ομάδες placebo και σιταγλιπτίνης. Στην ομάδα placebo ο μέσος όρος των μετρήσεων ήταν στα 340 mg/dL και στην ομάδα σιταγλιπτίνης στα 300 mg/dL. Ωστόσο, στην ομάδα νταπαγλιφλοζίνης, μετά τη λήψη της εξωγενούς γλυκόζης τα επίπεδα της γλυκόζης αίματος παρέμειναν πολύ χαμηλά συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες, με μέσο όρο στα 200 mg/dL. Έπειτα από 2 ώρες μετά την λήψη εξωγενούς γλυκόζης, τα επίπεδα της γλυκόζης αίματος στις ομάδες placebo και σιταγλιπτίνης μειώθηκαν στα 220 mg/dL. Αντίστοιχη μέτρηση είχε και η ομάδα νταπαγλιφλοζίνης, διατηρώντας ίδια τιμή με την προηγούμενη μέτρηση. Στην τέταρτη και τελευταία μέτρηση, 3 ώρες μετά τη λήψη της γλυκόζης, τα επίπεδα της γλυκόζης αίματος επανήλθαν σχεδόν στα φυσιολογικά επίπεδα. Στις ομάδες placebo και σιταγλιπτίνης, ο μέσος όρος των μετρήσεων ήταν στα 200 mg/dL και στην ομάδα της σιταγλιπτίνης στα 165 mg/dL (**Εικόνα 4. 98**).



**Εικόνα 4. 98.** Επίπεδα γλυκόζης αίματος κατά το τεστ OGTT στις τρεις ομάδες πειραματοζώων.

Με βάση τα αποτελέσματα του OGTT, υπολογίστηκε η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) για κάθε ομάδα ζώων. Το AUC στην ομάδα της σιταγλιπτίνης ήταν ίσο με αυτό της ομάδας placebo, με μέσο όρο και στις δύο ομάδες στα 289 mg.h/dL. Ωστόσο, στην ομάδα που χορηγήθηκε νανογαλάκτωμα με νταπαγλιφλοζίνη, το AUC ήταν σημαντικά μειωμένο σε σχέση με αυτό των άλλων ομάδων, με μέσο όρο τα 105 mg.h/dL (**Εικόνα 4. 99**).



**Εικόνα 4. 99.** Εμβαδό κάτω από την καμπύλη (AUC) των επιπέδων γλυκόζης αίματος του τεστ OGTT για τις τρεις ομάδες. RU: relative units, τυχαίες μονάδες. \*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ( $p < 0.05$ ).

#### **4.2.2. Έλεγχος της υγείας του δέρματος και της συμπεριφοράς των ζώων**

Η επιδερμίδα των ζώων παρατηρήθηκε έως και 24 ώρες έπειτα από τη χορήγηση των τριών διαφορετικών νανογαλακτωμάτων. Τα τρία νανογαλακτώματα δεν προκάλεσαν ερεθισμό, ερύθημα ή οίδημα στο δέρμα των ζώων. Ήδη από την στιγμή της επάλειψής τους στη ράχη των ζώων δεν φάνηκε να προκαλούν δυσφορία, κνησμό ή κάποια άλλη ένδειξη τοξικότητας ή αλλεργίας.

Επιπλέον, με την ολοκλήρωση του τεστ OGTT και την τοποθέτηση των ζώων στους μεταβολικούς κλωβούς, η λήψη τροφής και νερού γινόταν κατά βούληση και ήταν φυσιολογική από όλα τα ζώα των τριών διαφορετικών ομάδων.



## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5.1. Ξεπερνώντας τους περιορισμούς στη χρήση των νανοϋλικών γραφενίου

Τα νανοϋλικά έφεραν επαναστατικές αλλαγές στην Ιατρική. Πέρα από τη βελτίωση της προϋπάρχουσας κλινικής πραγματικότητας, συνέβαλαν στην επίλυση ιατρικών προκλήσεων που για χρόνια ήταν αδύνατο να αντιμετωπιστούν. Επιπλέον, άνοιξαν νέους ορίζοντες στην έρευνα και τις βιοϊατρικές εφαρμογές.

Καθοριστικό παράγοντα για τη χρήση ενός νανοϋλικού στη βιοϊατρική αποτελεί η ικανότητά του να προσφέρει ακρίβεια και αποτελεσματικότητα στην παροχή διάγνωσης ή/και θεραπείας. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει τη δυνατότητα να παραδίδει φάρμακα σε συγκεκριμένα σημεία στο σώμα, την ικανότητα να ανιχνεύει και να αναλύει βιολογικούς παράγοντες ή ακόμη και να παρέχει εικονικές πληροφορίες για ασθένειες ή συνθήκες του ανθρώπινου σώματος. Ρόλο παίζει επίσης το κόστος της σύνθεσης και της χρήσης του. Ωστόσο ο σημαντικότερος ίσως παράγοντας που καθορίζει εάν και κατά πόσο θα χρησιμοποιηθεί ένα νανοϋλικό σε ιατρικές εφαρμογές, είναι η ασφάλειά του. Το ισοζύγιο κινδύνου/ οφέλους πρέπει να είναι απολύτως καθορισμένο.

Από τα νανοϋλικά, το γραφένιο ξεχώρισε νωρίς χάρη στις μοναδικές του ιδιότητες. Πρόκειται για ένα ευέλικτο, αδιαφανές, εξαιρετικά αγωγίμο υλικό με άριστες μηχανικές ιδιότητες. Θεωρείται ότι είναι η πιο λεπτή και πιο ισχυρή κρυσταλλική δομή μέχρι σήμερα και οι δεσμοί άνθρακα- άνθρακα που διαθέτει είναι οι ισχυρότεροι στη φύση. Ένα πολύ λεπτό φύλλο γραφενίου είναι διακόσιες φορές πιο δυνατό από το ατσάλι και πιο σκληρό από το διαμάντι <sup>170</sup>. Η ανακάλυψή του άλλαξε τα δεδομένα στην έρευνα σε πολλά επιστημονικά πεδία και ιδιαίτερα στην Ιατρική. Οι ιδιότητές του συνέβαλαν σημαντικά στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων υψηλής ακρίβειας για την ανίχνευση βιολογικών παραγόντων. Ωστόσο σε αντίθεση με άλλα νανοϋλικά άνθρακα, η αποφυλλοποίησή του από τον γραφίτη απαιτεί τοξικούς χημικούς διαλύτες, γεγονός που περιορίζει τη χρήση του σε άλλες βιοϊατρικές εφαρμογές όπως για παράδειγμα στη μεταφορά φαρμάκων στο ανθρώπινο σώμα. Επιπλέον, σε αντίθεση με άλλα νανοϋλικά που έχουν ως βάση το γραφένιο όπως το GO, το καθαρό γραφένιο (pristine graphene) είναι υδρόφοβο <sup>171</sup>. Η υδροφοβικότητά του μειώνει τη βιοσυμβατότητά του με τα ανθρώπινα κύτταρα και τους ιστούς καθιστώντας το δύσχρηστο σε ιατρικές εφαρμογές <sup>172</sup>.

Πλέον, παρότι έχουν κατασκευαστεί πολλά διαφορετικά νανοϋλικά γραφενίου τα οποία φαίνεται να είναι ιδανικά για βιοϊατρικές εφαρμογές, η βιοσυμβατότητα και

η ασφάλειά τους δεν έχουν λάβει τη δέουσα προσοχή σε προκλινικές μελέτες. Στη βιβλιογραφία υπάρχει σημαντική έλλειψη ολοκληρωμένων μελετών που συνδυάζουν την αξιολόγηση των μηχανικών και λειτουργικών ικανοτήτων των νανοϋλικών γραφενίου με μία παράλληλη εκτίμηση της βιοσυμβατότητάς τους <sup>173</sup>.

Η τοξικότητα των νανοϋλικών γραφενίου εξαρτάται από πολλούς φυσικοχημικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του μεγέθους, του σχήματος, της αιχμηρότητας των άκρων τους, των νανοπόρων, των δεσμών π-π, του φορτίου της επιφάνειας, της αγωγιμότητας, της υδροφιλικότητας/ υδροφοβικότητας και της λειτουργικής τροποποίησης της επιφάνειάς τους <sup>174</sup>. Καθώς έχουν αναπτυχθεί διαφορετικές στρατηγικές σύνθεσης και αξιοποιούνται κάθε φορά διαφορετικά μόρια για τη λειτουργική τροποποίηση της επιφάνειας των νανοϋλικών γραφενίου, η τοξικότητα των νανοδομών αυτών ποικίλλει. Επιπλέον, η βιολογική απάντηση των νανοϋλικών γραφενίου σε ζωντανά κύτταρα και οργανισμούς φαίνεται ότι εξαρτάται και από το είδος των κυττάρων και των ιστών με τους οποίους αλληλεπιδρά.

Καθίσταται λοιπόν αναγκαίο πριν από την αξιοποίηση κάθε νανοδομής που έχει ως βάση το γραφένιο σε βιοϊατρικές εφαρμογές, να διερευνάται προσεχτικά η βιοσυμβατότητά της τόσο *in vitro* σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές όσο και *in vivo* σε διάφορα ζωικά μοντέλα <sup>175</sup>.

### ***Τοξικότητα των συμβατικών νανοϋλικών γραφενίου***

Η βιοσυμβατότητα του γραφενίου και των παραγώγων του *in vitro* είναι συχνά αντικρουόμενη. Όπως αναφέρθηκε, η επίδραση των νανοϋλικών αυτών στα ζωντανά κύτταρα δεν εξαρτάται μόνο από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους αλλά και από τις πειραματικές συνθήκες. Ειδικά για τις κυτταρικές σειρές, όταν πρόκειται για βιοϊατρικές εφαρμογές προτεραιότητα πρέπει να δοθεί στην αξιολόγηση της τοξικότητας σε κυτταρικούς τύπους που είναι άφθονοι στο ανθρώπινο σώμα και πιο πιθανό να αλληλεπιδράσουν με ξένα υλικά, όπως είναι οι ινοβλάστες, τα κύτταρα του δέρματος και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος <sup>176</sup>.

Με ινοβλάστες δούλεψε η ερευνητική ομάδα των Liao et al., η οποία διερεύνησε τις αλληλεπιδράσεις των φύλλων γραφενίου (graphene sheets, GS) και του GO με ανθρώπινους ινοβλάστες δέρματος (κυτταρική σειρά BJ). Στη δοκιμασία WST-8, επώαση με τα GS για 24 ώρες προκάλεσε δόσο- εξαρτώμενη μείωση στην κυτταρική βιωσιμότητα των ινοβλαστών. Έως τα 12.5 μg/mL η βιωσιμότητα ήταν υψηλή (>80%) αλλά στη διπλάσια δόση των 25 μg/mL παρατηρήθηκε σημαντική μείωση κατά 50% στην κυτταρική επιβίωση. Σε υψηλότερες δόσεις του GS, σημειώθηκε ακόμη πιο έντονη μείωση της βιωσιμότητας των ινοβλαστών και στη

μέγιστη δόση των 200 µg/mL το ποσοστό της επιβίωσης ήταν μόλις 20%. Επιπλέον, τα GS στη δόση των 25 µg/mL προκάλεσαν αύξηση στη δημιουργία των ΔΜΟ κατά 9 φορές (9- folds) σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου <sup>176</sup>. Τα αποτελέσματα αυτά είναι συναφή με τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης του χημικά αποφυλλοποιημένου γραφενίου (cG) σε ινοβλάστες ποντικίου που εξέτασε η παρούσα διατριβή. Ωστόσο, σε αντίθεση με τους Liao et al., η αξιολόγηση του cG περιορίστηκε μέχρι τη δόση των 20 µg/mL καθώς σε μεγαλύτερες δόσεις τοξικότητα στα κύτταρα προκαλεί και ο χημικός διαλύτης του cG και θα επηρεαζόταν η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Επώαση λοιπόν του cG για 24 ώρες μείωσε τη βιωσιμότητα των NIH/3T3 κυττάρων δόσο- εξαρτώμενα. Στη μέγιστη δόση των 20 µg/mL η βιωσιμότητα των κυττάρων ήταν μικρότερη από το 65%. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η τοξικότητα του γραφενίου και στις 48 ώρες επώασης. Παρατηρήθηκε ότι το cG είχε μικρή χρονο- εξαρτώμενη τοξικότητα καθώς χαμηλότερες τιμές βιωσιμότητας σημειώθηκαν στις 48 ώρες επώασης από ότι στις 24 ώρες. Σε αντίθεση με το GS, το cG δεν φάνηκε να επάγει σχηματισμό ΔΜΟ στους ινοβλάστες, τουλάχιστον στις δόσεις των 20 και των 50 µg/mL. Επίσης στις δόσεις αυτές δεν προκάλεσε νέκρωση ή απόπτωση του πληθυσμού, ούτε σημαντικές μεταβολές στον κυτταρικό κύκλο των ινοβλαστών.

Τα δύο άλλα νανοϋλικά γραφενίου που προήλθαν από τη χημική αποφυλλοποίηση του γραφίτη, με τη χρήση διαφορετικού χημικού διαλύτη από ότι το cG, δηλαδή το cD και το cN, είχαν περίπου την ίδια επίδραση στους ινοβλάστες NIH/3T3. Σε όλες τις δόσεις που δοκιμάστηκαν (0.5- 200 µg/mL) ήταν τοξικά προς τα κύτταρα καθώς η κυτταρική επιβίωση ήδη από τη μικρότερη χορηγούμενη δόση ήταν στο 70%. Η επιβίωση των κυττάρων μειώθηκε με την αύξηση της δόσης και στα 200 µg/mL τα ποσοστά της κυτταρικής βιωσιμότητας ήταν πολύ χαμηλά, στο 50% για το cD και στο 45% για το cN. Παρότι η τοξικότητα των νανοϋλικών αυτών δεν ήταν χρονο- εξαρτώμενη, μακροπρόθεσμα και οι δύο δομές προκάλεσαν σημαντικές βλάβες στα κύτταρα που εμπόδισαν τον πολλαπλασιασμό τους. Συγκεκριμένα, στη δοκιμασία CFE, στη δόση των 100 µg/mL τα δύο νανοϋλικά μείωσαν κατά το ήμισυ τον σχηματισμό αποικιών των κυττάρων. Στην ίδια δόση, προκάλεσαν επίσης 8% αύξηση της απόπτωσης του κυτταρικού πληθυσμού. Παρότι στις αρχικές μελέτες τοξικότητας το cD και το cN είχαν παρόμοια επίδραση στους ινοβλάστες, η συμπεριφορά τους διαφοροποιήθηκε αρκετά ως προς την πρόκληση οξειδωτικού στρες. Το cD σε όλες τις δόσεις προκάλεσε μικρή αύξηση κατά 10% στον σχηματισμό ΔΜΟ. Ωστόσο, το cN είχε αρκετά πιο ισχυρή δράση. Στη δόση των 20 µg/mL ο σχηματισμός ΔΜΟ στα κύτταρα διπλασιάστηκε. Συν τοις άλλοις, ο έλεγχος του οξειδωτικού στρες ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί σε μεγαλύτερες δόσεις του νανοϋλικού λόγω σημαντικής μείωσης του πληθυσμού.

Διαφορετική επίδραση είχαν τα δύο νανοϋλικά και στον κυτταρικό κύκλο των ινοβλαστών. Και οι δύο δομές διέκοψαν τον κύκλο των κυττάρων αλλά σε διαφορετική φάση. Το cD στη μέγιστη δόση των 100 µg/mL διέκοψε τον κύκλο

των ινοβλαστών στη φάση S. Το cN αντίθετα, διέκοψε τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G2/M. Η διακοπή του κυτταρικού κύκλου (cell cycle arrest) είναι ένας σημαντικός και κοινός μηχανισμός μέσω του οποίου τα νανοϋλικά επάγουν τοξικότητα σε ζωντανά κύτταρα <sup>177</sup>. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Διακοπή του κύκλου των κυττάρων σε κάποια φάση συνεπάγεται διακοπή των διαδικασιών του διπλασιασμού και της διαίρεσής τους και επομένως, μείωση του πολλαπλασιασμού τους. Η μετάβαση των κυττάρων σε κάθε φάση ρυθμίζεται αυστηρά από πολλά σημεία ελέγχου (checkpoints) της αντιγραφής, της μεταγραφής και της σύνθεσης του DNA. Σε περίπτωση βλάβης στο ενδοκυττάριο DNA που είναι δύσκολο να επιδιορθωθεί, οι ρυθμιστές αποτρέπουν τη μετάβαση στην επόμενη φάση του κυτταρικού κύκλου <sup>178</sup>. Τα νανοϋλικά όπως και κάθε ξένο σωματίδιο, μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες στο DNA των κυττάρων και να επηρεάσουν τη λειτουργία των ρυθμιστών στα διάφορα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Ανάλογα με τη βλάβη και το σημείο ελέγχου που θα επηρεαστεί, ο κύκλος μπορεί να διακοπεί σε κάποια από τις φάσεις. Έτσι, η διακοπή στη Φάση G2/M που προκάλεσε το cN στους ινοβλάστες είναι πιθανό να προκλήθηκε από επίδραση του νανοϋλικού στην έκφραση και τη λειτουργία του συμπλέγματος CDK/cyclin B που είναι ο κύριος ρυθμιστής του σημείου ελέγχου της G2/M Φάσης <sup>179</sup>.

Ίδια επίδραση με το cD στον κυτταρικό κύκλο των ινοβλαστών φαίνεται ότι έχει και το GO. Στη μελέτη των Hashemi et al., το GO στη δόση των 100 µg/mL διέκοψε τον κυτταρικό κύκλο εμβρυϊκών ινοβλαστών στη φάση S <sup>180</sup>. Στη φάση αυτή γίνεται η σύνθεση του DNA που αποτελεί κρίσιμο βήμα για την κυτταρική διαίρεση. Παρεμβολές στη διαδικασία αυτή έχουν συνήθως πολύ κακή έκβαση. Η οικογένεια των GO νανοϋλικών έχει βρεθεί και σε άλλες έρευνες ότι διακόπτει τους ινοβλάστες στη φάση S μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν τον σχηματισμό ΔΜΟ, την καταστροφή του DNA ή/και την πρόκληση θραυσμάτων στον διπλό κλώνο του DNA <sup>181</sup>.

Παρά την επίδρασή του στον κυτταρικό κύκλο, το GO συνολικά φαίνεται να είναι καλύτερα ανεκτό από τους ινοβλάστες από ότι τα νανοϋλικά γραφενίου GS, cG, cD και cN. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην υδρόφιλη φύση του. Το GO σε ένα μεγάλο εύρος δόσεων δεν επηρέασε αρνητικά ούτε τη βιωσιμότητα ινοβλαστών του δέρματος. Πολύ μικρή επίπτωση στη βιωσιμότητα των κυττάρων είχε μόνο στη μέγιστη δόση των 200 µg/mL <sup>176</sup>. Αντίστοιχο αποτέλεσμα είχαν σε άλλη μελέτη νανόφυλλα GO σε ινοβλάστες από έμβρυο ποντικού. Στις δόσεις των 100 και 200 µg/mL η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώθηκε στο 75% και 60%, αντίστοιχα. Ωστόσο στις δόσεις αυτές σημειώθηκε σημαντική νέκρωση του πληθυσμού και δοσο- εξαρτώμενη αύξηση στον σχηματισμό ΔΜΟ <sup>180</sup>.

Την επίδραση των νανοϋλικών γραφενίου στο δέρμα, το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος, ερεύνησε διεξοδικά η ερευνητική ομάδα των Pelin et al., σε

διάφορες μελέτες. Σε μία αρχική μελέτη η ερευνητική ομάδα έλεγξε την τοξικότητα τεσσάρων διαφορετικών νανοϋλικών γραφενίου. Επρόκειτο για ένα γραφένιο λίγων στρώσεων (few layers graphene, FLG) και για τρεις μορφές GO που διέφεραν ως προς το μέγεθος, τη σύσταση, το σχήμα και το αρχικό υλικό προέλευσης (νανοΐνες άνθρακα ή γραφίτης). Μέσω της ανάλυσης WST-8 ελέγχθηκαν οι επιδράσεις των τεσσάρων νανοϋλικών στη βιωσιμότητα των κερατινοκυττάρων HaCaT, στις 24, στις 48 και στις 72 ώρες επώασης. Σε ένα μεγάλο εύρος δόσεων (0.005–100 µg/mL) το FLG στις 24 ώρες επώασης δεν επηρέασε τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Ωστόσο, στις 48 ώρες, από τη δόση των 30 µg/mL έως τη δόση των 100 µg/mL, η βιωσιμότητα των κερατινοκυττάρων μειώθηκε σημαντικά με δοσο- εξαρτώμενο τρόπο. Στις 72 ώρες επώασης, η μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας ήταν ίδια με αυτή που σημειώθηκε στις 48 ώρες. Σε αντίθεση με το FLG, το GO και στις τρεις μορφές του είχε αρνητική επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων από τις 24 ώρες και μάλιστα από τη χαμηλή δόση των 3 µg/mL. Η βιωσιμότητα των κυττάρων HaCaT μειώθηκε ακόμη πιο πολύ στις 48 ώρες. Όπως και το FLG, η δράση του GO δεν ενισχύθηκε στις 72 ώρες επώασης. Συνολικά σε όλες τις δόσεις, οι τρεις μορφές του GO ήταν πιο τοξικές από τα νανοφύλλα γραφενίου. Μάλιστα, συγκρίνοντας την τοξικότητα των τριών νανοδομών GO, οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο βαθμός οξειδωσης επηρεάζει τις βιολογικές δράσεις του νανοϋλικού. Όσο μεγαλώνει ο βαθμός οξειδωσης τόσο μειώνεται η βιοσυμβατότητα της δομής<sup>182</sup>. Η τοξικότητα του GO φαίνεται επίσης ότι αυξάνεται με την αύξηση του αριθμού των φύλλων του. Σε κερατινοκύτταρα HaCaT οι Salesa et al., δοκίμασαν GO με περισσότερα φύλλα (multi- layers GO) από αυτά που περιείχαν οι τρεις δομές των Pelin et al. Το GO με τα περισσότερα φύλλα προκάλεσε την ισχυρότερη δοσο- και χρονο- εξαρτώμενη τοξικότητα στα κερατινοκύτταρα<sup>183</sup>.

Τα αποτελέσματα των Pelin et al., έρχονται σε αντιπαράθεση με την έρευνα των Liao et al., στους ινοβλάστες καθώς το GO στη δική τους μελέτη βρέθηκε λιγότερο τοξικό από το γραφένιο. Η διαφορά αυτή στη βιολογική απάντηση του GO αποδόθηκε από τους ερευνητές στη διαφορετική τεχνική που αξιοποιήθηκε για τη σύνθεση των νανοϋλικών και στο διαφορετικό μέγεθος των GO νανοϋλικών. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Pelin et al., όλα τα χημικής προέλευσης νανοϋλικά γραφενίου που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή προκάλεσαν σημαντική τοξικότητα στα κερατινοκύτταρα HaCaT ήδη από τις 24 ώρες επώασης. Μάλιστα, στην εν λόγω κυτταρική σειρά, στη διαδικασία MTT όλες οι χημικές δομές ήταν τοξικές σε όλες τις δόσεις (0.5-200 µg/mL) και η τοξικότητά τους ήταν τόσο δοσο- όσο και χρονο- εξαρτώμενη. Το cG ήταν το πιο βιοσυμβατό από τα τρία νανοϋλικά καθώς στη μέγιστη δόση των 20 µg/mL η βιωσιμότητα των κερατινοκυττάρων μειώθηκε στο 70% στις 24 ώρες και στο 65% στις 48 ώρες επώασης. Τα cD και cN που μελετήθηκαν σε δεκαπλάσιες δόσεις από ότι το cG, είχαν μεταξύ τους ακριβώς την ίδια επίδραση στα κύτταρα HaCaT, μειώνοντας τη βιωσιμότητα δραματικά μέχρι το 30% στη μέγιστη δόση, στις 48 ώρες επώασης.

Μεγάλες δόσεις των τριών νανοϋλικών επηρέασαν και μακροπρόθεσμα τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επώαση για 48 ώρες με τη μέγιστη δόση των 50 µg/mL για το cG και των 100 µg/mL για τα cD και cN είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση (μεγαλύτερη από 50%) στον σχηματισμό αποικιών των κερατινοκυττάρων. Οι Pelin et al., στην έρευνά τους έλεγξαν επίσης τις επιδράσεις των νανοϋλικών γραφενίου στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων HaCaT. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, καμία δόση του FLG και των τριών GO δεν επηρέασε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες επώασης. Μόνο στις 72 ώρες επώασης στη μέγιστη δόση των 100 µg/mL παρατηρήθηκε μικρή μείωση στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, από το FLG και το GO με τη μέγιστη οξειδωση <sup>182</sup>.

Σε άλλη τους μελέτη, οι Pelin et al. κατέγραψαν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία των κερατινοκυττάρων HaCaT έπειτα από επώαση με το FLG και το GO η οποία προκλήθηκε από αυξημένη παραγωγή ΔΜΟ. Επώαση με τα δύο αυτά νανοϋλικά για 24 ώρες προκάλεσε σημαντική δοσο- και χρονο- εξαρτώμενη αύξηση στη δημιουργία ΔΜΟ. Στη μέγιστη δόση των 100 µg/mL το FLG αύξησε τη δημιουργία ΔΜΟ κατά 25% ενώ το GO κατά 39% <sup>184</sup>. Σημαντική δοσο- εξαρτώμενη αύξηση στον σχηματισμό ΔΜΟ στα κύτταρα HaCaT προκάλεσε και το cD. Στα 20 µg/mL η παραγωγή ΔΜΟ αυξήθηκε κατά 40%. Μάλιστα, στη μέγιστη δόση των 100 µg/mL, το cD ξεπέρασε κατά πολύ την οξειδωτική δράση των άλλων νανοϋλικών γραφενίου καθώς η παραγωγή ΔΜΟ αυξήθηκε κατά 73%. Αυτή ήταν η υψηλότερη αύξηση στον σχηματισμό ΔΜΟ που καταγράφηκε από όλα τα νανοϋλικά γραφενίου (χημικής ή βιολογικής αποφυλλοποίησης) και σε όλα τα είδη κυττάρων που εξέτασε η παρούσα διατριβή. Σε αντίθεση με το cD, το cG προκάλεσε μικρή αύξηση κατά 10- 12% στο σχηματισμό ΔΜΟ στις δόσεις των 20 και 50 µg/mL η οποία δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Το cN στις ίδιες δόσεις δεν επηρέασε καθόλου τις ΔΜΟ. Ωστόσο, στη μέγιστη δόση των 100 µg/mL σημειώθηκε σημαντική μείωση στις ΔΜΟ κατά 35% σε σχέση με το κοντρόλ. Το αποτέλεσμα αυτό δεν συνάδει με τις αναλύσεις κυτταροτοξικότητας και είναι πιθανό να πρόκειται για λανθασμένη εκτίμηση. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές σχετικά με παρεμβολές που προκαλούν τα νανοϋλικά γραφενίου σε *in vitro* οπτικές τεχνικές εκτίμησης της κυτταροτοξικότητας. Μία από αυτές αφορά την ικανότητα των νανοϋλικών να μειώνουν το σήμα των φθορίζουσων χρωστικών <sup>185</sup>. Αντίστοιχο παράδοξο αποτέλεσμα κατά τον έλεγχο του σχηματισμού ΔΜΟ από το FLG έλαβαν και οι Pelin et al., στη μελέτη τους. Προκειμένου να διαλευκάνουν αυτή την αδυναμία στις μετρήσεις τους οι ερευνητές δοκίμασαν το FLG σκέτο, απουσία κυτταρικών συνθηκών και παρατήρησαν ότι πράγματι από τη δόση των 33 µg/mL μειώνει σημαντικά το σήμα του DCFH- DA. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι στις μεγάλες δόσεις γραφενίου η εκτίμηση της κυτταρικής παραγωγής ROS πιθανό να επιδέχεται παρεμβολές και να μην είναι αξιόπιστη. Επιπλέον, στις υψηλές αυτές δόσεις επιρροές στη μέτρηση μπορεί να προκαλούνται και από την υπερφόρτωση σωματιδίων <sup>184</sup>, γεγονός το οποίο παρατηρήθηκε και στην

παρούσα διατριβή κατά την ανάλυση των κυττάρων μέσω του Κυτταρομέτρου Ροής.

Πέρα από τον σχηματισμό ΔΜΟ, τα τρία χημικά νανοϋλικά γραφενίου αύξησαν και την απόπτωση του πληθυσμού των κερατινοκυττάρων. Το cG στη δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  και το cN στην δόση των 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  προκάλεσαν μικρή αύξηση της απόπτωσης κατά 12- 14%. Ωστόσο το cD σημείωσε για άλλη μια φορά πολύ ισχυρότερη επίδραση η οποία ήταν μάλιστα δοσο- εξαρτώμενη. Στη μέγιστη δόση των 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  η απόπτωση των κυττάρων αυξήθηκε κατά 30% σε σχέση με το κοντρόλ.

Μέχρι στιγμής δεν φαίνεται να υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία σχετικά με τη δράση του γραφενίου στον κυτταρικό κύκλο των κυττάρων του δέρματος. Στην παρούσα διατριβή στα κερατινοκύτταρα HaCaT το cG προκάλεσε μικρή διακοπή των κυττάρων στη φάση G2/M. Αντιθέτως, τα cD και cN διέκοψαν τον κυτταρικό κύκλο στη φάση S. Ειδικά για το cN, η δράση αυτή φάνηκε να είναι δοσο- εξαρτώμενη και ισχυρότερη από τη δράση των άλλων νανοϋλικών. Εντυπωσιακό είναι επίσης το γεγονός ότι στους ινοβλάστες το cN διέκοψε τον κύκλο σε διαφορετική φάση (G2/M) από ότι στα κύτταρα HaCaT. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει τις διαφορετικές βιολογικές απαντήσεις των νανοϋλικών σε κάθε είδος κυττάρων.

Συγκριτικά με τις άλλες δύο κυτταρικές σειρές, οι αλληλεπιδράσεις των νανοϋλικών γραφενίου με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος φαίνεται να είναι καλύτερα μελετημένες στη βιβλιογραφία. Οι Duan et al., έλεγξαν *in vitro* την τοξικότητα νανοφύλλων GO στα μακροφάγα κύτταρα Raw264.7. Τα νανοφύλλα GO μείωσαν σημαντικά τη βιωσιμότητα των μακροφάγων με χρονο- και δοσο- εξαρτώμενο τρόπο. Στις 24 ώρες επώασης, η κυτταρική βιωσιμότητα μειώθηκε στο 45% στη μικρή δόση των 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  και στο 35% στη μέγιστη δόση των 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  <sup>186</sup>. Σε αντίθεση με το GO, οι χημικές δομές cG και cN που μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή δεν φάνηκε να επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των μακροφάγων κυττάρων σε καμία δόση ακόμη και έπειτα από 48 ώρες επώασης. Αντιθέτως, το cD είχε σημαντική χρονο- εξαρτώμενη επίδραση στη βιωσιμότητα των THP-1 κυττάρων. Στις 48 ώρες επώασης, οι μέγιστες δόσεις του cD μείωσαν τη βιωσιμότητα των μακροφάγων σε ποσοστά μικρότερα του 50%. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και στις μελέτες απόπτωσης/ νέκρωσης. Το cD προκάλεσε σημαντική θνησιμότητα στα μακροφάγα κύτταρα αυξάνοντας τα ποσοστά της απόπτωσης και της νέκρωσης με δοσο- εξαρτώμενο τρόπο. Στη μέγιστη δόση των 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  σημειώθηκε 13% αύξηση της απόπτωσης και 28% αύξηση της νέκρωσης. Το ποσοστό αυτό θνησιμότητας ήταν το υψηλότερο που καταγράφηκε από όλα τα νανοϋλικά γραφενίου στις τρεις κυτταρικές σειρές. Το cN, παρότι δεν φάνηκε να είναι τοξικό στις αναλύσεις του MTT, προκάλεσε μικρή δοσο- εξαρτώμενη αύξηση στα ποσοστά απόπτωσης και νέκρωσης του πληθυσμού των μακροφάγων κυττάρων. Στη μέγιστη δόση επώασης (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

σημειώθηκε 10% αύξηση στην απόπτωση και 11% αύξηση στη νέκρωση στον κυτταρικό πληθυσμό. Αρκετά σημαντικές αλλαγές προκάλεσαν το cD και το cN και στις φάσεις του κυτταρικού κύκλου των μακροφάγων. Τα δύο νανοϋλικά μείωσαν σημαντικά τον πληθυσμό των κυττάρων που βρίσκονταν στη φάση S. Το cD διέκοψε τον κύκλο στη φάση G0/G1 ενώ το cN προκάλεσε αύξηση του πληθυσμού τόσο στη φάση G0/G1 όσο και στη Φάση G2/M. Φαίνεται ότι και τα δύο νανοϋλικά προκάλεσαν βλάβες στο DNA που απέτρεψαν την είσοδο στη φάση S και επομένως ανέστειλαν τη σύνθεση του DNA. Το cG δεν φάνηκε να προκαλεί αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο ούτε σημαντική απόπτωση στον πληθυσμό των μακροφάγων κυττάρων. Βέβαια εξαιτίας του τοξικού διαλύτη που περιείχε δοκιμάστηκε σε πολύ μικρότερες δόσεις.

Σε αντίθεση με τις άλλες δύο κυτταρικές σειρές, η τοξικότητα των cD και cN στα μακροφάγα κύτταρα δε φάνηκε να σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες. Σε όλες τις δόσεις τα cD και cN δεν αύξησαν τον σχηματισμό ΔΜΟ στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα κύτταρα. Καθώς είχαν έντονη τοξικότητα σε αυτή την κυτταρική σειρά (ειδικά το cD) πιθανόν έδρασαν μέσω μηχανισμών που δεν σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες π.χ. ενεργοποιώντας ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης ή προκαλώντας σημαντικές βλάβες στο DNA που ήταν αδύνατο να επιδιορθωθούν.

Με THP-1 μακροφάγα κύτταρα και νανοϋλικά γραφενίου ασχολήθηκε και η ερευνητική ομάδα των Li et al., η οποία διερεύνησε την επίδραση της χημικής τροποποίησης της επιφάνειας του GO στη τοξικότητά του νανοϋλικού<sup>187</sup>. Οι ερευνητές σύγκριναν την τοξικότητα τριών διαφορετικών νανοϋλικών: του GO, του rGO και του hGO (hydrated GO). Το hGO προέκυψε από την αντίδραση του GO με διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου στους 50 °C ή τους 100 °C. Τα τρία νανοϋλικά παρουσίασαν χρονο- και δοσο- εξαρτώμενη τοξικότητα στα THP-1 μακροφάγα κύτταρα. Στις 24 ώρες μόνο το hGO είχε αρνητική επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Στις 48 ώρες επώασης όμως, τα τρία νανοϋλικά μείωσαν τη βιωσιμότητα των THP-1 μακροφάγων με δοσο- εξαρτώμενο τρόπο. Το GO είχε υψηλότερη τοξικότητα από το rGO, γεγονός το οποίο συμφωνεί με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών. Αν και ακόμη δεν έχει αποδειχθεί, οι περισσότεροι ερευνητές θεωρούν ότι η αναγωγή του GO σε rGO πέρα από την ενίσχυση των ηλεκτροχημικών χαρακτηριστικών, δημιουργεί και πιο βιοσυμβατές δομές<sup>188,189</sup>.

Ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης των Li et al., ήταν επίσης οι διαφορετικές θέσεις στις οποίες εντοπίστηκαν τα νανοϋλικά στο εσωτερικό των κυττάρων. Τα πιο τοξικά νανοϋλικά GO και hGO, βρέθηκαν στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης ενώ το rGO εντοπίστηκε κυρίως στο εσωτερικό των μακροφάγων κυττάρων, πιθανότατα εξαιτίας της υδροφοβικότητάς του. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν διφορούμενες αναφορές σχετικά με την ενδοκυττάρια θέση (localization) των νανοϋλικών γραφενίου<sup>188-192</sup>. Η ομάδα των Li et al., υποστηρίζει ότι η θέση των νανοϋλικών στο εσωτερικό των κυττάρων σχετίζεται



με την τοξικότητά τους και εξαρτάται τόσο από το είδος των κυττάρων όσο και από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των νανοϋλικών.

Σε αντίθεση με την έρευνα των Li et al., έρχεται η εργασία των Ma et al. Στη μελέτη τους αυτή, οι ερευνητές διερεύνησαν την επίδραση του πλευρικού μεγέθους των νανοϋλικών γραφενίου στην επαγωγή τοξικότητας και παρατήρησαν ότι το GO είχε σημαντική επίδραση στη βιωσιμότητα των J774.A1 μακροφάγων από τις 24 ώρες επώασης <sup>193</sup>. Μάλιστα το νανοϋλικό μείωσε δραματικά την κυτταρική βιωσιμότητα στη σχετικά χαμηλή δόση των 20 μg/mL. Επιπλέον, το GO προκάλεσε οξειδωτικό στρες στα μακροφάγα κύτταρα αυξάνοντας σημαντικά τον σχηματισμό των ΔΜΟ.

Συνολικά όλα τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν αυτό που αναφέρθηκε στην αρχή. Η λειτουργική τροποποίηση και τα φυσικά χαρακτηριστικά ενός νανοϋλικού παίζουν σημαντικό ρόλο στην τοξικότητά του αλλά η βιολογική του απάντηση επηρεάζεται εξίσου και από το είδος των κυττάρων με τα οποία αλληλεπιδρά. Στους ινοβλάστες το συνδεδεμένο με νιτρικά γραφένιο (cN) προκάλεσε οξειδωτικό στρες στα κύτταρα σε υψηλότερα επίπεδα από ότι το «ντοπαρισμένο» με άζωτο γραφένιο (cD). Αντιθέτως, στα κύτταρα HaCaT ο σχηματισμός ΔΜΟ αυξήθηκε δραματικά από το cD αλλά όχι από το cN. Στα μακροφάγα κύτταρα κανένα υλικό δεν φάνηκε να προκαλεί οξειδωτικό στρες. Όμως, το cD είχε πολύ ισχυρότερη επίδραση από το cN προκαλώντας σημαντική απόπτωση και νέκρωση του πληθυσμού και επιφέροντας σημαντικές μεταβολές στον κυτταρικό κύκλο. Το cG φάνηκε να είναι πιο βιοσυμβατό στις τρεις κυτταρικές σειρές από ότι το cD και το cN. Ωστόσο, ο τοξικός διαλύτης που περιέχει αποτρέπει εξ' αρχής τη χρήση του σε μεγάλες δόσεις και επομένως μειώνει την κλινική του αξία στις βιοϊατρικές εφαρμογές.

### ***Πως μπορεί να μειωθεί η τοξικότητα;***

Μελέτες έχουν δείξει ότι η τροποποίηση της επιφάνειας του γραφενίου με βιοσυμβατά υλικά μειώνει την τοξικότητά του <sup>174</sup>. Για παράδειγμα η επικάλυψη του GO με PEG, αυξάνει την υδροφιλικότητα και μειώνει την τοξικότητα του νανοϋλικού σε πολλές κυτταρικές σειρές <sup>194,195</sup>. Επίσης η επικάλυψη της επιφάνειας του GO με πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP) αυξάνει την βιοσυμβατότητα του GO με τα κύτταρα του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος όπως είναι οι δενδρίτες, τα T- λεμφοκύτταρα και τα μακροφάγα κύτταρα <sup>196</sup>.

Τα φυσικά χαρακτηριστικά των νανοϋλικών σχετίζονται με την τοξικότητά τους επομένως τροποποιήσεις στο μέγεθος ή το σχήμα του γραφενίου μπορεί να οδηγήσουν σε πιο βιοσυμβατά υλικά <sup>174</sup>. Για παράδειγμα, το rGO όταν έχει την

μορφή πολύ λεπτών νανοφίλμ, δεν επηρεάζει την ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα πολλών ειδών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου των ανθρώπινων ολιγοδενδροκυττάρων και των φαιοχρωμοκυττάρων αρουραίου <sup>197</sup>. Επίσης, λεπτά φιλμ GO επάγουν την προσκόλληση και την ανάπτυξη των HT-29 κυττάρων <sup>198</sup>. Ακόμη και το γραφένιο, στη μορφή λεπτών φιλμ έχει πολύ υψηλή βιοσυμβατότητα με πρωτογενή νευρικά κύτταρα του ιππόκαμπου ποντικών, προωθώντας μάλιστα και την ανάπτυξή τους <sup>199</sup>.

Άλλη στρατηγική ενίσχυσης της βιοσυμβατότητας του γραφενίου αποτελεί η σύνθεση των νανοδομών με πιο πράσινες μεθόδους, αποφεύγοντας τη χρήση χημικών και τοξικών διαλυτών. Η αξιολόγηση της βιοσυμβατότητας των πράσινων νανοϋλικών γραφενίου αποτέλεσε έναν από τους στόχους της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η έρευνα της παρούσας διατριβής είναι καινοτόμα καθώς ήταν η πρώτη φορά που ελέγχθηκε η τοξικότητα των εν λόγω νανοϋλικών γραφενίου σε τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Εξάλλου, μέχρι στιγμής στη βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστες έρευνες που να διερευνούν την βιοσυμβατότητα των βιολογικά κατασκευασμένων νανοϋλικών γραφενίου.

### *Τοξικότητα «πράσινων» νανοϋλικών γραφενίου*

Παρά τη σημαντική συνεισφορά των νανοϋλικών γραφενίου σε πολλούς τομείς, οι διαδικασίες παραγωγής και χρήσης τους σε μεγάλη κλίμακα έχουν συχνά αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία. Οι επιδράσεις αυτές σχετίζονται με την υπερβολική χρήση χημικών ουσιών κατά τη σύνθεση των νανοϋλικών, τη διάχυση τοξικών νανοσωματιδίων στο περιβάλλον και την πιθανότητα πρόκλησης ανεπιθύμητων ενεργειών στον άνθρωπο και τους ζωντανούς οργανισμούς.

Συγκεκριμένα, η χημική αναγωγή του GO σε rGO απαιτεί τη χρήση ισχυρών αναγωγικών μορίων όπως η υδραζίνη, το βοροϋδρίδιο του νατρίου και η υδροκινόνη, που αφαιρούν λειτουργικές ομάδες οξυγόνου από το GO <sup>175,200-202</sup>. Η αναγωγή του GO σε rGO αυξάνει σημαντικά την αγωγιμότητα του νανοϋλικού και γι' αυτό χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία και την έρευνα. Όμως, οι αναγωγικοί αυτοί παράγοντες είναι επικίνδυνοι, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των νανοϋλικών σε μεγάλη κλίμακα καθώς προκαλούν τοξικότητα στο περιβάλλον και τα προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά συστήματα <sup>203</sup>.

Επικίνδυνη είναι και η χημική αποφυλλοποίηση του γραφενίου από γραφίτη καθώς χρησιμοποιούνται ισχυροί διαλύτες όπως το DMF το οποίο είναι εύφλεκτο και τοξικό και έχει σοβαρές αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον και την υγεία του ανθρώπου <sup>204-206</sup>. Επιπλέον το γραφένιο που προκύπτει μέσω της χημικής

αποφυλλοποίησης είναι υδρόφοβο πράγμα που το καθιστά δύσχρηστο σε αρκετές βιοϊατρικές εφαρμογές <sup>207</sup>.

Η ανάγκη για την ανάπτυξη πιο βιοσυμβατών και περιβαλλοντικά φιλικών νανοϋλικών οδήγησε την έρευνα στη σύνθεση του αποκαλούμενου «πράσινου γραφενίου». Ο όρος αυτός περιλαμβάνει φιλικές προς το περιβάλλον τεχνικές που αξιοποιούν βιολογικά μόρια για την αποφυλλοποίηση του γραφενίου από γραφίτη καθώς επίσης και οικολογικές μεθόδους για την αναγωγή του GO με τη χρήση μη τοξικών αναγωγικών παραγόντων. Τα τελευταία χρόνια το «πράσινο» γραφένιο έχει μονοπωλήσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας καθώς η σύνθεσή του εκτός από οικολογική, είναι πιο οικονομική και συνήθως απαιτεί λιγότερη ενέργεια.

Σήμερα μάλιστα, η Ναυαρχίδα του Γραφενίου (Graphene Flagship) σε συνεργασία με ερευνητικά Ινστιτούτα, κυβερνήσεις και εταιρείες από όλο τον κόσμο, δουλεύει στο πρότζεκ με τίτλο "Going green with graphene"<sup>2</sup> που στοχεύει στην κατάθεση ολοκληρωμένης πρότασης σχετικά με την αξιοποίηση του «πράσινου» γραφενίου στην Ατζέντα 2030 για τη Βιώσιμη Ανάπτυξη του ΟΗΕ <sup>208</sup>.

Η παγκόσμια αυτή διάχυση της καινοτόμας «πράσινης» σύνθεσης του γραφενίου έστρεψε πολλές ερευνητικές ομάδες στην εύρεση βιολογικών, φυσικών και ανακυκλώσιμων μορίων για την αποφυλλοποίηση του γραφίτη. Έτσι πλέον έχει συντεθεί οικολογικό γραφένιο με τη χρήση αμινοξέων, πεπτιδίων, βακτηρίων, μυκήτων και συστατικών των φυτών <sup>203</sup>.

Η αναγωγή του GO με τη χρήση μη τοξικών, υδατικών παραγόντων είναι καλύτερα μελετημένη από ότι η «πράσινη» αποφυλλοποίηση του γραφίτη και έχουν δοκιμαστεί μόρια όπως το ασκορβικό οξύ, η γλυκόζη, το υδροξείδιο του καλίου, η μαγιά αρτοποιείου, η μελατονίνη, η σόδα και η γλυκόζη <sup>209</sup>. Ακόμα καλύτερη στρατηγική φαίνεται να αποτελεί η χρήση της «πράσινης χημείας» που αξιοποιεί βιομάζα και εκχυλίσματα φρούτων και φυτών ως σταθεροποιητικούς και αναγωγικούς παράγοντες για τη σύνθεση υδατοδιαλυτών νανοϋλικών γραφενίου <sup>210</sup>.

Τα νανοϋλικά που συντίθενται με τις οικολογικές αυτές τεχνικές είναι εξίσου αποτελεσματικά με τις αντίστοιχες χημικές δομές σε πληθώρα βιοϊατρικών εφαρμογών. Ωστόσο μέχρι στιγμής ελάχιστες μελέτες έχουν αξιολογήσει την τοξικότητα όλων αυτών των νανοϋλικών. Επομένως η αξία τους στην κλινική πραγματικότητα παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστη. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η τοξικότητα πράσινων νανοϋλικών γραφενίου τα οποία προέκυψαν από την αποφυλλοποίηση του γραφίτη με τη χρήση βιολογικών διαλυτών ως σταθεροποιητικούς και τροποποιητικούς παράγοντες <sup>156</sup>. Τα πράσινα νανοϋλικά

---

<sup>2</sup> Μτφ: «Οδεύοντας προς το πράσινο γραφένιο».

γραφενίου είχαν υψηλότερη βιοσυμβατότητα από τα συμβατικά νανοϋλικά στις τρεις κυτταρικές σειρές.

Συγκεκριμένα, στους ινοβλάστες από έμβρυο ποντικού (NIH/3T3 κύτταρα), το βιολογικά κατασκευασμένο bN ήταν λιγότερο τοξικό από το χημικά κατασκευασμένο cN στη δοκιμασία MTT, σε όλες τις δόσεις στις 24 ώρες επώασης. Σε υψηλές δόσεις, από 50 έως 200 µg/mL, το bN προκάλεσε πολύ μικρή μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας ( $\approx 70\%$ ). Αντιθέτως, το cN μείωσε σημαντικά τη βιωσιμότητα των ινοβλαστών και η επιβίωση ήταν μικρότερη του 40% στις υψηλές δόσεις. Επιπλέον, στον έλεγχο απόπτωσης/ νέκρωσης παρότι κανένα από τα δύο νανοϋλικά δεν προκάλεσε κυτταρικό θάνατο μέσω νέκρωσης, το cN αύξησε σημαντικά την απόπτωση του πληθυσμού με δοσο- εξαρτώμενο τρόπο. Στις μικρές δόσεις και το bD ήταν λιγότερο τοξικό από το cD στους ινοβλάστες NIH/3T3. Ωστόσο, σε αντίθεση με το bN, στις υψηλές δόσεις, από 20 έως 200 µg/mL, το bD και το cD ήταν εξίσου τοξικά μειώνοντας την κυτταρική βιωσιμότητα των ινοβλαστών στο 50-55%. Όσον αφορά το απλό γραφένιο (cG) και το βιογραφένιο (bG), μέχρι τα 20 µg/mL προκάλεσαν την ίδια τοξικότητα στους ινοβλάστες. Ωστόσο το bG δοκιμάστηκε σε δεκαπλάσια δόση και διατήρησε την κυτταρική βιωσιμότητα στο 60-65%.

Επιπλέον, όλες οι χημικά αποφυλλοποιημένες μορφές του γραφενίου που εξέτασε η παρούσα διατριβή (cG, cD και cN) μείωσαν σημαντικά την ικανότητα των ινοβλαστών να σχηματίζουν αποικίες, τουλάχιστον στις δόσεις των 50 και των 100 µg/mL. Οι αντίστοιχες «πράσινες» δομές δεν προκάλεσαν τόσο σημαντική μείωση. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι σε αντίθεση με τις βιολογικές δομές, οι χημικές δομές μπορούν να προκαλέσουν μακροπρόθεσμα βλάβη στους ινοβλάστες επηρεάζοντας την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους. Πιο ισχυρή επίδραση είχε το cN και στον κυτταρικό κύκλο των ινοβλαστών συγκριτικά με το bN. Τα δύο νανοϋλικά διέκοψαν τον κύκλο στη φάση G2/M αλλά το ποσοστό των κυττάρων στη φάση αυτή ήταν σημαντικά υψηλότερο έπειτα από την επώαση με το cN. Τα νανοϋλικά bD και cD επηρέασαν διαφορετικά σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου από τα bN και cN καθώς διέκοψαν τον κύκλο των ινοβλαστών στη φάση S. Όπως και στον έλεγχο κυτταροτοξικότητας, η επίδραση των νανοϋλικών αυτών είχε την ίδια ισχύ στον κυτταρικό κύκλο των NIH/3T3 κυττάρων. Το cG και το bG δεν φάνηκε να επιδρούν στον κυτταρικό κύκλο των ινοβλαστών ωστόσο ο έλεγχος τους περιορίστηκε στη μικρή δόση των 20 µg/mL.

Συναφή με τα ευρήματα της παρούσας διατριβής, τουλάχιστον για το ζεύγος των νανοϋλικών bN και cN, ήταν τα αποτελέσματα της έρευνας των Gurunathan et al. Η ερευνητική ομάδα συνέθεσε rGO με μία πράσινη, απλή, μη τοξική μέθοδο χρησιμοποιώντας βιομάζα από την ψευδομονάδα *P. Aeruginosa* ως αναγωγικό παράγοντα. Το μικροβιακής προέλευσης M-rGO ελέγχθηκε ως προς τη βιοσυμβατότητά του σε πρωτογενείς εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικού (κύτταρα PMEF). Στον έλεγχο WSK-8, το M-rGO βρέθηκε ότι είναι καλά ανεκτό από τα PMEF

κύτταρα καθώς σε ένα μεγάλο εύρος δόσεων (20- 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) η κυτταρική βιωσιμότητα παρέμεινε υψηλή ( $\approx 90\%$ ). Αντιθέτως, το χημικά ανηγμένο GO μέσω υδραζίνης (h-rGO) ήταν αρκετά τοξικό προς τα PMEF και μείωσε με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο την κυτταρική βιωσιμότητα. Από τη χαμηλότερη δόση των 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  η βιωσιμότητα των κυττάρων ήταν στο 80% και στις επόμενες δόσεις μειώθηκε δραματικά, φτάνοντας σε ποσοστά μικρότερα του 20% στις μέγιστες δόσεις των 80 και 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Αντίστοιχα και το GO μείωσε σημαντικά τη βιωσιμότητα με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο ωστόσο ήταν λιγότερο τοξικό από ότι το h-rGO. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και μέσω της δοκιμασίας trypan blue. Το «πράσινο» M-rGO δεν προκάλεσε κυτταρικό θάνατο ενώ το h-rGO και το GO προκάλεσαν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας στους ινοβλάστες. Το h-rGO ήταν πολύ πιο τοξικό από τα τρία νανοϋλικά <sup>211</sup>.

Η διαφορά στις απαντήσεις των βιολογικών και των χημικών νανοϋλικών έγινε πιο εμφανής στα κύτταρα του δέρματος. Στον έλεγχο του MTT το bG και το cG σημείωσαν αντίστοιχη δοσο-εξαρτώμενη τοξικότητα. Ωστόσο τα χημικά νανοϋλικά cD και cN, προκάλεσαν πολύ πιο σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων HaCaT από ότι οι πράσινες μορφές τους, bD και bN, τόσο στις 24 όσο και στις 48 ώρες επώασης. Με την «πράσινη» αποφυλλοποίηση μειώθηκαν επίσης οι μακροπρόθεσμες επιδράσεις των νανοϋλικών στα κύτταρα HaCaT. Υψηλές δόσεις του cD και του cN είχαν σημαντική επίπτωση στο σχηματισμό αποικιών των κυττάρων. Αντιθέτως, οι αντίστοιχες πράσινες δομές δεν επηρέασαν σε τέτοιο βαθμό την ικανότητα των κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες. Επιπλέον, όλες οι χημικές δομές προκάλεσαν σημαντική αύξηση στην απόπτωση του πληθυσμού των κερατινοκυττάρων HaCaT, πράγμα που δεν φάνηκε να συμβαίνει από τα πράσινα νανοϋλικά. Εντονότερη επίδραση από τη βιολογική μορφή του φάνηκε να έχει το cN και στον κυτταρικό κύκλο των κερατινοκυττάρων. Παρότι και τα δύο νανοϋλικά, bN και cN, διέκοψαν τον κύκλο στη Φάση S, η επίδραση του cN ήταν πολύ πιο ισχυρή.

Ο διαφορετικός τρόπος σύνθεση των bG και cG δεν φάνηκε να επηρεάζει την επιβίωση και ανάπτυξη των THP-1 μακροφάγων κυττάρων. Τα δύο νανοϋλικά ήταν καλά ανεκτά από τα μακροφάγα κύτταρα σε όλες τις δόσεις και δεν προκάλεσαν αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο. Παρατηρήθηκε μόνο μικρή αύξηση στην απόπτωση των κυττάρων έπειτα από επώαση με τα δύο νανοϋλικά η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Ήπια επίδραση στη βιωσιμότητα των THP-1 μακροφάγων είχαν και τα νιτρικά νανοϋλικά, bN και cN. Ωστόσο πολύ διαφορετική δράση μεταξύ τους είχαν το cD και το bD. Στις 48 ώρες επώασης το cD μείωσε σημαντικά και με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο την βιωσιμότητα των THP-1 διαφοροποιημένων μακροφάγων. Στις ίδιες δόσεις και στον ίδιο χρόνο επώασης, η βιολογική δομή bD δεν προκάλεσε σημαντική τοξικότητα. Επιπλέον, στον έλεγχο της απόπτωσης/ νέκρωσης, το cD αύξησε σημαντικά με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο τη θνησιμότητα του πληθυσμού κάτι το οποίο δεν συνέβη στην «πράσινη» μορφή

του. Το cN παρόλο που δεν φάνηκε να μειώνει την επιβίωση των κυττάρων στη διαδικασία MTT, προκάλεσε σημαντική αύξηση στα ποσοστά νέκρωσης και απόπτωσης του πληθυσμού επίδραση η οποία αναιρέθηκε με την πράσινη σύνθεση του υλικού. Διαφορετική δράση είχαν τα νανοϋλικά και στον κυτταρικό κύκλο των μακροφάγων. Τα βιολογικά υλικά bN και bD αύξησαν τον πληθυσμό των κυττάρων που βρίσκονταν στη φάση S ενώ οι αντίστοιχες χημικές δομές cN και cD μείωσαν σημαντικά τα κύτταρα στη Φάση αυτή, διακόπτοντας τον κύκλο στη φάση G0/G1.

Όσον αφορά την απόπτωση των THP-1 μακροφάγων, σημαντικές διαφορές στη δράση των βιολογικών και των χημικών νανοϋλικών γραφενίου παρατήρησε και η ερευνητική ομάδα των Yan et al. Οι ερευνητές κατασκεύασαν κβαντικές κουκίδες γραφενίου (graphene quantum dots, GQDs) χρησιμοποιώντας μόνο γλυκόζη σε υδατικό διάλυμα (HGQDs). Συγκριτικά με τις GQDs που συντέθηκαν με συμβατικές χημικές μεθόδους (CGQDs), οι HGQDs ήταν πολύ πιο βιοσυμβατές προς τα THP-1 μακροφάγα κύτταρα. Κατά τον έλεγχο απόπτωσης/ νέκρωσης, τα HGQDs δεν προκάλεσαν μεταβολές στον πληθυσμό των THP-1 κυττάρων τόσο στις 6 όσο και στις 12 ώρες επώασης. Αντιθέτως, τα CGQDs αύξησαν σημαντικά και χρονο-εξαρτώμενα την απόπτωση του κυτταρικού πληθυσμού. Μάλιστα, στις 12 ώρες επώασης σημειώθηκε αύξηση της απόπτωσης κατά 59.4%. Διαφορετική επίδραση είχαν οι δύο τύποι GQDs και στη βιωσιμότητα ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων της ομφαλικής φλέβας ( κύτταρα HUVEC). Σε όλες τις δόσεις επώασης, οι οποίες ήταν μάλιστα πολύ υψηλές (100- 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), τα HGQDs δεν προκάλεσαν τοξικότητα στα HUVEC κύτταρα καθώς η κυτταρική βιωσιμότητα διατηρήθηκε υψηλή (>80%). Στις ίδιες δόσεις τα χημικά CGQDs μείωσαν σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε ποσοστά μικρότερα του 40% <sup>212</sup>.

Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι καμία από τις βιολογικά αποφυλλοποιημένες δομές γραφενίου που εξέτασε η παρούσα διδακτορική διατριβή δεν προκάλεσε οξειδωτικό στρες, στις τρεις κυτταρικές σειρές. Αντιθέτως, το χημικό νανοϋλικό cD αύξησε σημαντικά με δοσο- εξαρτώμενο τρόπο τον σχηματισμό ΔΜΟ στα κύτταρα HaCaT. Αντίστοιχη επίδραση είχε η χημική μορφή cN στους ινοβλάστες NIH/3T3. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, άλλα «πράσινα» νανοϋλικά γραφενίου φαίνεται ότι επάγουν οξειδωτικό στρες σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Για παράδειγμα, το βιολογικά ανηγμένο rGO προκάλεσε σημαντική αύξηση στο σχηματισμό ΔΜΟ σε ανθρώπινα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs). Το rGO αυτής της μελέτης κατασκευάστηκε από την ερευνητική ομάδα των Dasgupta et al., με οικολογικές μεθόδους αξιοποιώντας έναν πολυσακχαρίτη από το άγριο μανιτάρι *Pleurotus flabellatus Sacc* ως αναγωγικό παράγοντα. Παρότι το παραγόμενο PR-GO δεν μείωσε την κυτταρική βιωσιμότητα των PBMCs ακόμα και στη μέγιστη δόση των 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (ποσοστά κυτταρικής επιβίωσης υψηλότερα του 80%), προκάλεσε σημαντική δοσο- εξαρτώμενη αύξηση στον σχηματισμό ΔΜΟ. Μάλιστα

στη δόση των 250 µg/mL, οι ΔΜΟ σχεδόν διπλασιάστηκαν σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (control) <sup>213</sup>. Ακόμη μεγαλύτερη πρόκληση οξειδωτικού στρες παρατηρήθηκε στα κύτταρα MCF-7, από rGO βακτηριακής προέλευσης. Το εν λόγω rGO συντέθηκε με τη χρήση βιομάζας από το βακτήριο *Bacillus marisflavi* ως αναγωγικό και σταθεροποιητικό παράγοντα. Συγκρινόμενο με το χημικό GO, το B-rGO επηρέασε πολύ πιο έντονα τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων MCF-7 και προκάλεσε σημαντικότερη δοσο- εξαρτώμενη αύξηση των ΔΜΟ <sup>214</sup>. Αντίστοιχα, «πράσινο» rGO το οποίο συντέθηκε με τη χρήση του ασκορβικού οξέος ως αναγωγικό παράγοντα και του πλουρονικού P123 ως σταθεροποιητικό παράγοντα, φάνηκε να επάγει οξειδωτικό στρες σε κύτταρα φαιοχρωμοκυτώματος αρουραίου (PC-12). Στις 24 ώρες επώασης το παραγόμενο rGO- P αύξησε σημαντικά τη δημιουργία ΔΜΟ στα PC-12 κύτταρα με δοσο- εξαρτώμενο τρόπο. Στα ίδια κύτταρα και στις ίδιες δόσεις το χημικά ανηγμένο rGO δεν προκάλεσε σχηματισμό ΔΜΟ <sup>215</sup>.

Παραδόξως, η παραγωγή ΔΜΟ που προκάλεσαν τα «πράσινα» νανοϋλικά B- rGO και rGO- P των δύο τελευταίων μελετών θεωρήθηκε ενθαρρυντικό αποτέλεσμα καθώς οι κυτταρικές σειρές στις οποίες προκλήθηκε το οξειδωτικό στρες ήταν καρκινικές. Ωστόσο, διεγείρονται αμφιβολίες σχετικά με την τοξικότητα των νανοϋλικών αυτών και σε υγιή κύτταρα και απαιτείται επιπλέον έλεγχος της δράσης τους σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές.

Στις περισσότερες μελέτες όπως και στην παρούσα διδακτορική διατριβή, μέσω των οικολογικών μεθόδων σύνθεσης προέκυψαν πιο βιοσυμβατά υλικά. Ωστόσο, παρά την υδροφιλικότητα των νανοϋλικών αυτών και την απουσία τοξικών διαλυτών, μερικά από τα «πράσινα» νανοϋλικά γραφενίου είχαν ισχυρή αρνητική επίδραση στη βιωσιμότητα και την ανάπτυξη διαφορετικών κυτταρικών σειρών. Το γεγονός αυτό τονίζει την ανάγκη πραγματοποίησης κυτταροτοξικού ελέγχου σε κάθε νανοϋλικό που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές του ιατρικού πεδίου ακόμη κι αν αυτό έχει συντεθεί με βιολογικές μεθόδους.

### ***Επίδραση των νανοϋλικών γραφενίου στην κυτταρική σηματοδότηση***

Η ποικιλία στις βιολογικές απαντήσεις των νανοϋλικών γραφενίου στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές επιβεβαιώθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή μέσω του ελέγχου της έκφρασης πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε γνωστά ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης. Καθώς πρωταρχικός στόχος της διατριβής ήταν η αξιολόγηση της τοξικότητας των νανοϋλικών γραφενίου, επιλέχθηκε να μελετηθούν κύριοι εκπρόσωποι των σηματοδοτικών μονοπατιών του Nrf2 και της NF-kB (p65). Τα μονοπάτια αυτά ενεργοποιούνται σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες και φλεγμονής των κυττάρων.

Το σηματοδοτικό μονοπάτι keap1/Nrf2/ARE θεωρείται ότι είναι ο κύριος προστατευτικός μηχανισμός των κυττάρων και ενεργοποιείται ως απάντηση σε οξειδωτικούς και ηλεκτροφιλικούς στρεσογόνους παράγοντες. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (ομοιόσταση), το keap1 αποτελεί τμήμα της E3 λιγάσης ουβικουιτίνης (E3 ubiquitin- ligase) η οποία δένει ισχυρά τον Nrf2 και επάγει τη μεταφορά και την αποικοδόμησή του μέσω του πρωτεασώματος. Ωστόσο σε καταστάσεις στρες ένας ενδογενής μοριακός μηχανισμός εντός του keap1 επιτρέπει την απελευθέρωση του Nrf2, τη συσσώρευσή του εντός του κυττάρου και τη μεταφορά του στον πυρήνα όπου επάγει τη μεταγραφή αντιοξειδωτικών παραγόντων (γονίδια ARE) <sup>216</sup>. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα παραγόμενα προϊόντα του μονοπατιού keap1/Nrf2/ARE, συμπεριλαμβανομένου του NADPH, της NQO1, της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase, GPx), της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (superoxide dismutase, SOD) και της αιμοξυγενάσης -1 (heme oxygenase-1, HO-1), προστατεύουν τα κύτταρα από πολλές βλάβες και ενισχύουν την αντίσταση των ιστών <sup>217,218</sup>. Εξάλλου, οι παράγοντες αυτοί είναι ζωτικής σημασίας στην διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας (redox balance) και της κυτταρικής ομοιόστασης <sup>219</sup>.

Όντας ο κύριος ρυθμιστής του αντιοξειδωτικού συστήματος, ο Nrf2 ελέγχει την κυτταρική μοίρα, επηρεάζοντας τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων. Μπορεί επίσης να καθορίσει την αντίσταση στη θεραπεία, τις διεργασίες της γήρανσης και την εξέλιξη των λοιμώξεων. Ο Nrf2 είναι ο βασικός συντονιστής της άμυνας των κυττάρων και η απορρύθμιση της σηματοδότησής του έχει συσχετιστεί με την παθογένεση πολλών ασθενειών συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου και του ΣΔ. Η απορρύθμισή του φαίνεται ότι επηρεάζει επίσης την απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος <sup>219</sup>. Για αυτούς του λόγους η ενεργοποίηση του Nrf2 θεωρείται ότι αποτελεί ισχυρή κυτταροπροστατευτική στρατηγική και η επαγωγή του μπορεί να συμβάλει στη θεραπεία διαφορετικών παθολογιών. Ο κύριος ρυθμιστής της δραστηριότητας του Nrf2 είναι προφανώς η πρωτεΐνη keap 1 <sup>220</sup>. Ωστόσο επειδή ο Nrf2 είναι αρκετά ασταθής επιδέχεται ρύθμιση και από πλήθος διαφορετικών πρωτεϊνών, πολλές από τις οποίες συμμετέχουν σε άλλα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια (π.χ. το μονοπάτι της PI3K/AKT) <sup>216,219</sup>.

Ένα από αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζει τη μοίρα του Nrf2 είναι αυτό της NF- κB (p65). Η NF-κB μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω δύο διαφορετικών οδών: της κανονικής πορείας (canonical) και της μη- κανονικής πορείας (non-canonical). Η ενεργοποίηση της p65 μέσω της κανονικής πορείας επάγεται κυρίως από προ φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ο TNF-α και η IL-1 ενώ στη μη- κανονική πορεία ρόλο παίζουν κυτταροκίνες όπως η λεμφοτοξίνη (LT), η CD40L και η BAFF <sup>217</sup>. Ανεξάρτητα από τον τρόπο ενεργοποίησης της, το αποτέλεσμα της σηματοδότησης είναι το ίδιο, δηλαδή μεταφορά της NF- κB στον πυρήνα του κυττάρου όπου δεσμεύεται με το DNA.



Τα μονοπάτια του Nrf2 και της NF-κB φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες και φλεγμονής. Η αλληλεπίδραση αυτή μέχρι στιγμής δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Η υπομονάδα p65 της NF-κB μπορεί να αναστείλει άμεσα τον Nrf2 στο μεταγραφικό επίπεδο. Επίσης πλήθος αντιφλεγμονωδών παραγόντων μπορούν να αναστείλουν την p65 και να ενεργοποιήσουν έτσι έμμεσα τον Nrf2. Από την άλλη πλευρά φαίνεται ότι μείωση των επιπέδων του Nrf2 έχει ως αποτέλεσμα επαγωγή εντονότερης φλεγμονής μέσω ενεργοποίησης της p65 και των καθοδικών της στόχων που είναι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες. Ένας από τους καθοδικούς στόχους της σηματοδότησης του Nrf2, η αιμοξυγενάση 1 (HO-1), φαίνεται ότι συμμετέχει ενεργά στην αλληλεπίδραση του Nrf2 και της p65. Η HO-1 μπορεί να αναστείλει τη μεταφορά της p65 στον πυρήνα ρυθμίζοντας έτσι την φλεγμονή<sup>217</sup>.

Τα νανοϋλικά μπορούν να εκκινήσουν φλεγμονώδεις διαδικασίες μέσω επαγωγής οξειδωτικού στρες ή να έχουν αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις. Λίγες αναφορές υπάρχουν στη βιβλιογραφία σχετικά με τις επιδράσεις των νανοϋλικών γραφενίου στα σηματοδοτικά μονοπάτια της φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση των έξι διαφορετικών νανοϋλικών γραφενίου στην έκφραση τριών πρωτεϊνών που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των δύο μονοπατιών: του Nrf2, της p65 και της HO-1. Τα νανοϋλικά γραφενίου φάνηκε ότι ενεργοποιούν με διαφορετικό τρόπο τα δύο σηματοδοτικά μονοπάτια. Μάλιστα οι απαντήσεις των νανοϋλικών συχνά διέφεραν σε κάθε είδος κυττάρου.

Αύξηση της έκφρασης της p65 φάνηκε να συμβαίνει μόνο από το cG και μόνο στα THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα κύτταρα. Η αύξηση αυτή πιθανόν υποδηλώνει εκκίνηση φλεγμονωδών αντιδράσεων στα κύτταρα αυτά από το cG. Η πράσινη μορφή του, το bG δεν φάνηκε να επηρεάζει την p65. Σε άλλη μελέτη, έχει βρεθεί ότι το GO ενεργοποιεί επίσης την p65 σε μακροφάγα κύτταρα και επάγει φλεγμονή. Αν και ο μηχανισμός της ενεργοποίησης της p65 από το GO δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, φαίνεται ότι η ισχυρή συσχέτισή του με την πλασματική μεμβράνη έχει ως αποτέλεσμα ενισχυμένη αλληλεπίδρασή του με τους TLRs υποδοχείς (π.χ. τον TLR4) το οποίο επάγει την πόλωση του M1 και τελικά την ενεργοποίηση της NF-κB. Η ενεργοποίηση αυτή είχε ως αποτέλεσμα παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών *in vitro* στα μακροφάγα κύτταρα και εκκίνηση φλεγμονωδών απαντήσεων *in vivo* σε πειραματόζωα. Το GO στην *in vivo* μελέτη χορηγήθηκε ενδοφλεβίως στην κυκλοφορία του αίματος των ζώων μέσω της φλέβας της ουράς<sup>193</sup>.

Στα δύο άλλα ζεύγη νανοϋλικών, στα μακροφάγα κύτταρα, παρατηρήθηκε μία πολύ έντονη αύξηση στην έκφραση της HO-1 μόνο από τις βιολογικά κατασκευασμένες δομές, δηλαδή το bD και το bN. Η αύξηση αυτή δεν φάνηκε να συνδυάζεται με αύξηση της ολικής έκφρασης του Nrf2. Αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί από τον χρόνο επώασης. Τα νανοϋλικά χορηγήθηκαν στα κύτταρα

για 24 ώρες. Είναι πιθανό στο χρονικό αυτό διάστημα τα bD και bN να ενεργοποίησαν το μονοπάτι του Nrf2 οδηγώντας τον στον πυρήνα όπου συνέβαλε στην αύξηση της έκφρασης της HO-1. Καθώς ελέγχθηκε μόνο η ολική ποσότητα του Nrf2, έλεγχος της έκφρασης του ξεχωριστά στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα των κυττάρων απαιτείται ώστε να εκτιμηθεί καλύτερα το αποτέλεσμα. Πάντως μιας και οι «πράσινες» αυτές νανοδομές στους ελέγχους κυτταροτοξικότητας δεν φάνηκε να επάγουν οξειδωτικό στρες στα THP-1 κύτταρα, ούτε σημαντική θνησιμότητα στον πληθυσμό, η αυξημένη έκφραση της HO-1 θα μπορούσε να αποτελεί ένδειξη αντιοξειδωτικής ικανότητας των νανοϋλικών μέσω διαφορετικών μονοπατιών και αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω. Ενδιαφέρον είναι επίσης το γεγονός ότι στα μακροφάγα κύτταρα παρότι το cD σημείωσε τα υψηλότερα ποσοστά κυτταρικού θανάτου και σημαντικές μεταβολές στον κυτταρικό κύκλο αποτρέποντας τα κύτταρα να προχωρήσουν στη Φάση S, δεν ενεργοποίησε κανένα σηματοδοτικό μονοπάτι φλεγμονής. Το cD πιθανότατα έδρασε στα μακροφάγα κύτταρα μέσω διαφορετικών μηχανισμών (π.χ. ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια απόπτωσης).

Στους ινοβλάστες, το γραφένιο με νιτρικά δεν είχε καμία επίδραση στην σηματοδότηση, τόσο στη χημική (cN) όσο και στη βιολογική (bN) του μορφή. Τα άλλα τέσσερα νανοϋλικά γραφενίου στα NIH/3T3 κύτταρα ενεργοποίησαν όλα τον Nrf2 αλλά σε διαφορετικό βαθμό. Οι χημικές δομές (cG, cD) προκάλεσαν πολύ πιο έντονη ενεργοποίηση του Nrf2 από ότι οι αντίστοιχες «πράσινες» δομές (bG, bD). Ειδικότερα, επώαση των κυττάρων με το cD είχε ως αποτέλεσμα έντονη ενεργοποίηση του μονοπατιού Nrf2/ARE καθώς αυξήθηκαν σημαντικά τόσο τα επίπεδα έκφρασης του Nrf2 όσο και όσο και του καθοδικού του στόχου, της HO-1. Μάλιστα τόσο η αύξηση του Nrf2 όσο και η αύξηση της HO-1 ήταν δόσο-εξαρτώμενες. Η «πράσινη» μορφή του νανοϋλικού, το bD, αύξησε επίσης με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο την έκφραση των πρωτεϊνών Nrf2 και HO-1 αλλά σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα από ότι το cD. Παρότι δεν φάνηκε να επάγει τον σχηματισμό ΔΜΟ, το cD στους ινοβλάστες βρέθηκε τοξικό σε όλες τις δόσεις μειώνοντας σημαντικά την κυτταρική βιωσιμότητα και αυξάνοντας την απόπτωση του πληθυσμού με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. Επίσης στις υψηλές δόσεις προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στον κυτταρικό κύκλο, διακόπτοντας τα κύτταρα στη φάση S. Η ισχυρή τοξικότητά του πιθανόν να εκκίνησε διαδικασίες φλεγμονής στους ινοβλάστες και να προώθησε την ενεργοποίηση του Nrf2 ως προστατευτικό μηχανισμό.

Στα κύτταρα του δέρματος το cD είχε την ίδια επίδραση στη σηματοδότηση του Nrf2 με αυτή που σημείωσε στους ινοβλάστες. Προκάλεσε δηλαδή σημαντική δόσο-εξαρτώμενη αύξηση της έκφρασης του Nrf2 και της HO-1. Στα κύτταρα αυτά αύξησε σημαντικά τον σχηματισμό ΔΜΟ και την απόπτωση του πληθυσμού. Φαίνεται ότι η περίσσεια παραγωγή ΔΜΟ, οδήγησε σε οξειδωτικό στρες στα

κύτταρα HaCaT το οποίο ενεργοποίησε το μονοπάτι του Nrf2. Όπως και στους ινοβλάστες, μικρή ενεργοποίηση του μονοπατιού παρατηρήθηκε στα κύτταρα HaCaT και από την βιολογική μορφή, το bD, αλλά σε πολύ πιο χαμηλά επίπεδα. Πολύ μικρή αύξηση στην έκφραση του Nrf2 και της HO-1 προκάλεσε και το ζεύγος των νανοϋλικών bN και cN.

Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με τον αρχικό έλεγχο της κυτταροτοξικότητας επιβεβαιώνουν τις διαφορετικές βιολογικές δράσεις κάθε νανοϋλικού γραφενίου σε κάθε κυτταρική σειρά. Συνολικά από τα αποτελέσματα μπορεί να εκτιμηθεί ότι το «πράσινο» γραφένιο είναι πιο βιοσυμβατό σε όλες τις κυτταρικές σειρές από ότι η αντίστοιχη χημική μορφή του.

## **5.2. Η διαδερμική χορήγηση μέσω νανοσυστημάτων είναι το μέλλον στη διαχείριση του ΣΔ;**

Σήμερα, είναι διαθέσιμα πολλά διαφορετικά εμπορικά σκευάσματα για τη θεραπεία του ΣΔ. Σε αυτά περιλαμβάνονται φάρμακα που λαμβάνονται από το στόμα, όπως τα δισκία ή οι ταμπλέτες υπογλυκαιμικών ουσιών που ρυθμίζουν τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα, καθώς επίσης και ινσουλίνη και ανάλογά της που χορηγούνται σε ενέσιμη μορφή. Επιπλέον, ο σχεδιασμός ειδικών πενών και αντλιών συνεχούς έγχυσης ινσουλίνης βελτίωσαν σημαντικά την ποιότητα ζωής των διαβητικών ασθενών. Ωστόσο, η σημερινή αντιδιαβητική θεραπεία έχει πολλά μειονεκτήματα όπως η κακή συμμόρφωση του ασθενούς και η εμφάνιση περιστατικών υπογλυκαιμίας και άλλων ανεπιθύμητων ενεργειών. Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός αντιδιαβητικών φαρμάκων υφίσταται εκτεταμένο μεταβολισμό από τα πεπτικά ένζυμα του στομάχου, το οποίο μειώνει την βιοδιαθεσιμότητα και την αποτελεσματικότητά τους. Επίσης, η χορήγηση από το στόμα καθιστά σχεδόν αδύνατη την ελεγχόμενη απελευθέρωση συγκεκριμένης δόσης φαρμάκου σε ένα «κλειστό» σύστημα θεραπείας <sup>221</sup>.

Την επίλυση των περιορισμών των συμβατικών αυτών οδών χορήγησης έφερε η ανάπτυξη τεχνικών για τη χορήγηση των φαρμάκων από άλλες οδούς. Η χορήγηση των φαρμάκων δια μέσου του δέρματος, φαίνεται ότι αποτελεί ιδανική στρατηγική καθώς παρακάμπτεται η αποικοδόμηση των ουσιών από το πεπτικό σύστημα, ελαχιστοποιούνται οι ανεπιθύμητες ενέργειες της παρεντερικής οδού και μειώνεται ο πόνος και το στρες που προκαλεί στον ασθενή η υποδόρια χορήγηση. Η διαδερμική χορήγηση είναι ιδιαίτερα ευνοϊκή στη θεραπεία χρόνιων ασθενειών όπως ο ΣΔ, ο οποίος συνήθως απαιτεί τη χορήγηση των φαρμάκων εφ' όρου ζωής ή/και πολλές φορές την ημέρα ώστε να επιτευχθεί η απαραίτητη θεραπευτική δόσολογία <sup>221</sup>.

Ως εκ τούτου, πολλοί αντιδιαβητικοί παράγοντες για την αντιμετώπιση του ΣΔ δοκιμάστηκαν τα τελευταία χρόνια σε προκλινικές μελέτες ως προς τη χορήγησή τους μέσω του δέρματος. Η διαδερμική χορήγηση στις περισσότερες μελέτες απαιτεί τη χρήση μικροβελόνων η οποία χαρακτηρίζεται ως ελάχιστα επεμβατική. Σε κάποιες περιπτώσεις μάλιστα οι έρευνες προχώρησαν και σε κλινικές δοκιμές. Από τα πρώτα και ολοκληρωμένα προϊόντα για τη διαδερμική, ελάχιστα επεμβατική, χορήγηση της ινσουλίνης είναι το σύστημα «Pass Port™ System» από την Altea Therapeutics. Το σύστημα αποτελείται από ένα επίθεμα που ανοίγει μικροπόρους και χορηγεί την ινσουλίνη εντός του δέρματος. Η αποτελεσματικότητα του συστήματος ελέγχθηκε σε ασθενείς με ΣΔ, σε κλινική δοκιμή Φάσης I/II (NCT00519623). Η κλινική δοκιμή ολοκληρώθηκε με επιτυχία καθορίζοντας τις φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες του συστήματος. Ωστόσο, στον έλεγχο τοξικότητας του επιθέματος διαπιστώθηκε η πρόκληση ερυθήματος στο σημείο της εφαρμογής το οποίο βέβαια ήταν παροδικό.

Προκειμένου να μειωθούν οι τοξικές αλληλεπιδράσεις του δέρματος και να βελτιωθεί ριζικά η ποιότητα ζωής των διαβητικών ασθενών, προσπάθειες γίνονται για την ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών συστημάτων χορήγησης της υπογλυκαιμικής αγωγής, με πλήρως μη επεμβατικά συστήματα. Με την εξέλιξη της Νανοτεχνολογίας, αναπτύχθηκαν καινοτόμοι νανοφορείς οι οποίοι προστατεύουν τις φαρμακευτικές ουσίες από την αποικοδόμηση και προσφέρουν στοχευμένη μεταφορά τους στον ιστό-στόχο. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου, μειώνεται η δόση χορήγησης και ελαχιστοποιούνται οι ανεπιθύμητες ενέργειες από την παράπλευρη στόχευση των υγιών ιστών. Ορισμένοι νανοφορείς όπως τα νανογαλακτώματα και οι νανογέλες, φαίνεται ότι μπορούν να προσφέρουν διαδερμική χορήγηση των φαρμακευτικών ουσιών χωρίς τη χρήση μικροβελόνων <sup>222</sup>. Τα δύο αυτά νανოსυστήματα κέρδισαν την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας χάρη στα πλεονεκτήματά τους. Η σύνθεσή τους είναι συνήθως εύκολη και οικονομική, έχουν υψηλή θερμοδυναμική σταθερότητα, μεγάλη περιοχή επιφάνειας και καθιστούν δυνατή τη χορήγηση σταθερής δόσης φαρμάκου μέσω μικρών πανομοιότυπων σταγονιδίων <sup>223</sup>. Σημαντικό είναι επίσης ότι τα νανογαλακτώματα και οι νανογέλες μπορούν να προσφέρουν την ελεγχόμενη απελευθέρωση του φαρμάκου (controlled release technology, CRT) μια τεχνολογία που επιτρέπει τη χορήγηση καθορισμένης δόσης φαρμάκου όποτε κρίνεται απαραίτητο <sup>224</sup>. Ειδικά για την αντιμετώπιση του ΣΔ, αυτή η τεχνολογία είναι τρομερά χρήσιμη για τη λειτουργία ενός αυτοματοποιημένου «κλειστού» συστήματος που θα αναγνωρίζει κάθε στιγμή τις απαιτήσεις του οργανισμού σε ινσουλίνη και θα αποδεσμεύει υπογλυκαιμικές ουσίες όποτε απαιτείται.

Στη βιβλιογραφία, υπάρχουν αναφορές σχετικά με νανογαλακτώματα για τη μη επεμβατική, διαδερμική χορήγηση θεραπευτικών εκχυλισμάτων φυτών και ελαίων που δρουν ευεργετικά στην αντιμετώπιση του ΣΔ. Για παράδειγμα έχει

δοκιμαστεί η σύνθεση νανογαλακτωμάτων για τον εγκλωβισμό ελαίου της τριγωνέλλας <sup>225</sup>, φύλλων δάφνης <sup>226</sup>, καρβακρόλης <sup>227</sup> και ελαίου από σπόρους πικρής κολοκύθας <sup>228</sup>. Τα παραπάνω συστήματα μέσω διαδερμικής απελευθέρωσης των θεραπευτικών παραγόντων, συμβάλλουν στην επίτευξη ευγλυκαιμίας σε ασθενείς με ΣΔ.

Ωστόσο, πιο αξιόλογες και πιο χρήσιμες είναι οι μελέτες που διερευνούν τη χρήση νανογαλακτωμάτων και νανογελών ως εναλλακτική στρατηγική για τη διαδερμική χορήγηση της ινσουλίνης ή γνωστών εμπορικών υπογλυκαιμικών φαρμάκων.

Στην κατεύθυνση αυτή, στην παρούσα διδακτορική διατριβή εξετάστηκε *in vivo* η διαδερμική χορήγηση των εμπορικών φαρμάκων νταπαγλιφλοζίνη και σιταγλιπτίνη, με τη χρήση νανογαλακτωμάτων. Τα υπογλυκαιμικά φάρμακα ενσωματώθηκαν στο εσωτερικό των νανογαλακτωμάτων και τα νανογαλακτώματα χορηγήθηκαν μέσω επάλειψης στον αυχένα μυών SV129. Μέσω του τεστ OGTT ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα των νανογαλακτωμάτων να δράσουν ως φορείς για τη διαδερμική απελευθέρωση των ουσιών. Το νανογαλάκτωμα με εγκλωβισμένη τη σιταγλιπτίνη δεν φάνηκε να δρα αποτελεσματικά στους μύες SV129. Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (AUC) της σιταγλιπτίνης ήταν παρόμοιο με αυτό του νανογαλακτώματος- placebo (χωρίς δραστική ουσία). Ωστόσο το νανογαλάκτωμα με εγκλωβισμένη τη νταπαγλιφλοζίνη είχε ισχυρή υπογλυκαιμική δράση, μειώνοντας σημαντικά το AUC σε σχέση με το νανογαλάκτωμα ελέγχου. Η διαφορά αυτή στη δραστηριότητα των δύο νανογαλακτωμάτων μπορεί να δικαιολογηθεί από το διαφορετικό μηχανισμό υπογλυκαιμικής δράσης που προσφέρουν τα δύο φάρμακα. Η νταπαγλιφλοζίνη δρα αναστέλλοντας τον SGLT2 ενώ η σιταγλιπτίνη είναι γνωστός αναστολέας του DPP-4. Η διαδερμική χορήγηση των DPP-4 αναστολέων δεν έχει μελετηθεί μέχρι στιγμής σε άλλες έρευνες.

Με αναστολέα του SGLT2 δούλεψε η ερευνητική ομάδα των Lotfy et al. Οι ερευνητές κατασκεύασαν νανοδομές με υγρή κρυσταλλική μήτρα γέλης (nanostructured liquid crystal gel matrix, NLCG) τις οποίες γέμισαν με την καναγλιφλοζίνη. Χρησιμοποιώντας το τεστ OGTT σε νορμογλυκαιμικούς και διαβητικούς επίμυες, διαπίστωσαν ότι η διαδερμική χορήγηση της καναγλιφλοζίνης μέσω των νανοφορέων NLCG, είναι πολύ αποτελεσματική και μάλιστα η υπογλυκαιμική της δράση αυξήθηκε. Το AUC ήταν μικρότερο στη διαδερμική χορήγηση της καναγλιφλοζίνης από ότι το AUC που προέκυψε όταν το εμπορικό προϊόν χορηγήθηκε από το στόμα <sup>229</sup>.

Με διαφορετικό φαρμακευτικό σκεύασμα ασχολήθηκε η ερευνητική ομάδα των Razzaq et al., η οποία συνέθεσε νανογέλη γαλακτώματος (nanoemulgel) από γαρυφαλέλαιο, Tween-80, PEG και κόμμι ξανθάνης στην οποία εγκλωβίστηκε το αντιδιαβητικό φάρμακο γλιμεπιρίδη. Το γαρυφαλέλαιο αύξησε σημαντικά την

διαλυτότητα της νανογέλης και έτσι τόσο η απελευθέρωση, όσο και η απορρόφηση της γλιμεπιρίδης από το δέρμα ήταν εξαιρετική. Σε *in vivo* μελέτες με διαβητικό μοντέλο αρσενικών αρουραίων Wistar, η νανογέλη γλιμεπιρίδης είχε ισχυρότερη αντιδιαβητική δράση από ότι το εμπορικό προϊόν <sup>149</sup>.

Οι Akhtar et al., συνέθεσαν νανογαλακτώματα με εγκλωβισμένη την υπογλυκαιμική ουσία ρεπαγλινίδη. Τα νανογαλακτώματα κατασκευάστηκαν μέσω της μεθόδου (tritiation method) χρησιμοποιώντας το έλαιο efsol-218 (5% v/v) και Tween- 80 (30% v/v) και transcutol ως επιφανειοδραστικούς παράγοντες. Η φαρμακευτική ουσία εγκλωβίστηκε στη φάση του ελαίου. *In vitro* αναλύσεις έδειξαν ότι η απελευθέρωση του φαρμάκου από τα νανογαλακτώματα ήταν πολύ υψηλή (98.22%), με χαμηλό ιξώδες. Το νανογαλάκτωμα είχε καλύτερη υπογλυκαιμική δράση από την εμπορική ταμπλέτα ρεπαγλινίδης που χορηγείται από το στόμα, σε *in vivo* μοντέλο διαβητικών αρουραίων. Συν τοις άλλοις, το νανογαλάκτωμα διατηρήθηκε σταθερό σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και σχετικής υγρασίας για μία περίοδο τριών μηνών <sup>148</sup>.

Οι Prasad et al., εγκλώβισαν πιογλιταζόνη σε σύστημα νανογέλης από προνιοσώματα και νιοσώματα. Η νανογέλη αύξησε σημαντικά την βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου (κατά 2.26 φορές) σε σχέση με την εμπορική ταμπλέτα. Επίσης σε *in vivo* μελέτη με διαβητικούς αρουραίους Wistar, η νανογέλη πιογλιταζόνης είχε ισχυρότερη αντιδιαβητική δράση από ότι το εμπορικό προϊόν και οι υπογλυκαιμικές της ιδιότητες διατηρήθηκαν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Το δέρμα των ζώων εξετάστηκε και δεν παρατηρήθηκαν ενδείξεις ερυθήματος, οιδήματος ή φλεγμονής <sup>153</sup>. Στην *in vivo* μελέτη της παρούσας διατριβής, ελέγχθηκε επίσης προσεχτικά το δέρμα των 30 πειραματόζωων τόσο κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου όσο μετά την ολοκλήρωση της μελέτης. Σε κανένα ζώο δεν εντοπίστηκαν ενδείξεις αλλεργικής αντίδρασης έπειτα από την επάλειψη των τριών νανογαλακτωμάτων. Επιπλέον, όλα τα πειραματόζωα μετά την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου συμπεριφέρθηκαν φυσιολογικά και η λήψη τροφής και νερού γινόταν κατά βούληση.

Παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα των παραπάνω μελετών σχετικά με τη δραστηριότητα των υπογλυκαιμικών φαρμάκων, είναι ελάχιστες οι ερευνητικές ομάδες που δουλεύουν σε αυτή την κατεύθυνση. Επιπλέον, σε κλινική δοκιμή μέχρι στιγμής έχει προχωρήσει μόνο η μη επεμβατική διαδερμική χορήγηση της ινσουλίνης. Πρόκειται για ένα σύστημα που επιτρέπει την απελευθέρωση καθορισμένης δόσης του φαρμάκου διαδερμικά, μέσω αντλίας. Η αντλία έχει τη μορφή σπρέι και ενεργοποιείται με το πάτημα του δαχτύλου. Το σύστημα αυτό βρίσκεται αυτή τη στιγμή σε ανοιχτή τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή Φάσης II/III, με 30 ενήλικες ασθενείς με ΣΔΤ2 (NCT05159453). Τα αποτελέσματα της κλινικής δοκιμής αναμένονται με προσμονή καθώς μπορεί να αλλάξουν τα δεδομένα στη διαχείριση του ΣΔ.

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αξιολογήθηκαν *in vitro* οι βιολογικές απαντήσεις διαφορετικών νανοϋλικών γραφενίου σε τρεις κυτταρικές σειρές. Πρωταρχικός στόχος της διατριβής ήταν να διερευνηθεί εάν η αξιοποίηση της «πράσινης» χημείας μπορεί να αυξήσει τη βιοσυμβατότητα των νανοϋλικών γραφενίου και επομένως την κλινική τους αξία στις βιοϊατρικές εφαρμογές.

Στις *in vitro* δοκιμασίες φάνηκε ότι κάθε νανοϋλικό επάγει τοξικότητα με διαφορετικό τρόπο σε κάθε κυτταρική σειρά. Στις τρεις κυτταρικές σειρές, μεγαλύτερη τοξικότητα προκλήθηκε από το ντοπαρισμένο με άζωτο γραφένιο (cD) και το γραφένιο συνδεδεμένο με νιτρικά (cN), που συντέθηκαν μέσω της χημικής αποφυλλοποίησης του γραφενίου με τη χρήση ισχυρών διαλυτών. Τα δύο αυτά νανοϋλικά επηρέασαν σημαντικά και με διαφορετικό τρόπο τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Στους ινοβλάστες NIH/3T3, το cN είχε ισχυρότερη δράση από το cD, αυξάνοντας σημαντικά την απόπτωση του πληθυσμού και επάγοντας οξειδωτικό στρες. Στις άλλες δύο κυτταρικές σειρές, δηλαδή στα κερατινοκύτταρα HaCaT και στα μακροφάγα κύτταρα THP-1, το cD παρουσίασε υψηλότερη τοξικότητα από το cN. Στα κύτταρα HaCaT αύξησε σημαντικά την απόπτωση του πληθυσμού, διέκοψε τον κυτταρικό κύκλο στη φάση S και προκάλεσε οξειδωτικό στρες στα κύτταρα αυξάνοντας σημαντικά τον σχηματισμό ΔΜΟ. Στα THP-1 μακροφάγα κύτταρα δεν προκάλεσε οξειδωτικό στρες αλλά αύξησε σημαντικά τη θνησιμότητα του πληθυσμού. Επιπλέον και στις δύο κυτταρικές σειρές φαίνεται ότι εκκίνησε ισχυρές φλεγμονώδεις αντιδράσεις από το ανοσοποιητικό σύστημα που είχαν ως αποτέλεσμα ενεργοποίηση του κυτταροπροστατευτικού σηματοδοτικού μονοπατιού Nrf2/Kear 1/ HO-1. Το μονοπάτι ενεργοποιήθηκε και από το cN στα κύτταρα αυτά αλλά σε μικρότερο βαθμό.

Οι αρνητικές επιδράσεις αυτές των cN και cD ελαχιστοποιήθηκαν σημαντικά όταν τα νανοϋλικά συντέθηκαν μέσω περιβαλλοντικά φιλικών μεθόδων. Μάλιστα, σε αντίθεση με τις χημικές δομές γραφενίου, όλες οι «πράσινες» δομές ήταν καλά ανεκτές από τα κύτταρα σε ένα μεγάλο εύρος δόσεων. Μόνο πολύ υψηλές δόσεις των «πράσινων» νανοϋλικών προκάλεσαν μείωση στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Επίσης, μακροπρόθεσμα προκάλεσαν πολύ λιγότερες βλάβες στα κύτταρα από ότι οι χημικές δομές. Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι κανένα «πράσινο» νανοϋλικό γραφενίου δεν προκάλεσε οξειδωτικό στρες στα κύτταρα ούτε σημαντική θνησιμότητα μέσω απόπτωσης ή νέκρωσης. Εξάλλου, δεν φάνηκε να ενεργοποιούν τους κυτταροπροστατευτικούς μηχανισμούς σηματοδότησης των κυττάρων, στο βαθμό που τους ενεργοποίησαν οι χημικές μορφές.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα είναι η σημαντική αύξηση της έκφρασης της HO-1 στα μακροφάγα κύτταρα THP-1 που σημειώθηκε μόνο από τις βιολογικές μορφές bD και bN και δεν συνοδεύτηκε από αύξηση των επιπέδων του Nrf2. Το αποτέλεσμα

αυτό, σε συνδυασμό με την ήπια τοξικότητα των νανοϋλικών στα εν λόγω κύτταρα διεγείρει ερωτήματα σχετικά με την πιθανή αντιοξειδωτική ικανότητα του «πράσινου» γραφενίου και αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω.

Οι αλληλεπιδράσεις του γραφενίου με άλλα κρίσιμα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν σε άλλες διεργασίες (π.χ. απόπτωσης) πρέπει επίσης να διερευνηθούν μελλοντικά καθώς μπορεί να δώσουν νέες πληροφορίες ως προς τις βιολογικές δράσεις των νανοϋλικών. Σημαντικό είναι επίσης να διερευνηθεί η θέση των νανοϋλικών στο εσωτερικό των κυττάρων (localization), καθώς σε πολλές μελέτες φαίνεται ότι σχετίζεται με την τοξικότητά τους. Τέλος, *in vivo* αξιολόγηση της τοξικότητας των εν λόγω νανοϋλικών, τόσο των χημικών όσο και των βιολογικών, απαιτείται πριν τη χρήση τους σε ιατρικές εφαρμογές.

Συνολικά φάνηκε ότι η σύνθεση του γραφενίου με οικολογικές τεχνικές διατηρεί τη μοναδικότητα και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του και ταυτόχρονα μειώνει τις αρνητικές του επιδράσεις στα κύτταρα. Επομένως, το «πράσινο» γραφένιο καθίσταται ιδανικός υποψήφιος για βιοϊατρικές εφαρμογές όπως για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων υψηλής ακρίβειας για την ανίχνευση της γλυκόζης.

Στην παρούσα διατριβή διερευνήθηκε επίσης *in vivo* η αποτελεσματικότητα καινοτόμων νανογαλακτωμάτων να λειτουργήσουν ως φορείς για τη διαδερμική απελευθέρωση υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Παρότι η διαδερμική χορήγηση της σιταγλιπτίνης δεν φάνηκε να είναι αποτελεσματική, η νταπαγλιφλοζίνη χάρη στα νανογαλακτώματα διαπέρασε επιτυχώς το δέρμα των ζώων και άσκησε ισχυρή υπογλυκαιμική δράση. Επιπλέον τα νανογαλακτώματα νταπαγλιφλοζίνης δεν προκάλεσαν τοξικές αντιδράσεις στο δέρμα των ζώων ούτε επηρέασαν τη συμπεριφορά τους.

Συνδυαστικά, η ανάπτυξη καινοτόμων, ασφαλών, μη επεμβατικών αισθητήρων γλυκόζης από «πράσινο» γραφένιο και η χρήση των νανογαλακτωμάτων ως νανοφορείς για τη διαδερμική απελευθέρωση των αντιδιαβητικών φαρμάκων, δύναται να οδηγήσουν στη δημιουργία ενός πλήρως αυτοματοποιημένου «κλειστού» συστήματος για τη διαχείριση του ΣΔ. Το σύστημα αυτό θα βελτιώσει σημαντικά την ποιότητα ζωής των πασχόντων από την ασθένεια, ο αριθμός των οποίων αυξάνεται με ραγδαίους ρυθμούς.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) είναι μια χρόνια μεταβολική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από την απώλεια ελέγχου της ομοιόστασης της γλυκόζης από τον οργανισμό. Τις τελευταίες δεκαετίες η εξάπλωση του ΣΔ έχει λάβει επιδημικές διαστάσεις σε παγκόσμιο επίπεδο. Σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία Διαβήτη εκτιμάται ότι σήμερα 538 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως πάσχουν από κάποια μορφή διαβήτη, ενώ ο αριθμός αυτός αναμένεται να φτάσει τα 783 εκατομμύρια έως το 2045. Ο ΣΔ αποτελεί πλέον ένα από τα μεγαλύτερα ζητήματα της δημόσιας υγείας επιδρώντας σημαντικά στην κοινωνικο-οικονομική ανάπτυξη κάθε χώρας.

Η εξέλιξη της Νανοτεχνολογίας έδωσε ελπίδα στη διαχείριση του ΣΔ. Με την ανάπτυξη των συστημάτων συνεχούς καταγραφής της γλυκόζης και τις αντλίες ινσουλίνης μειώθηκαν σημαντικά τα επεισόδια υπο- και υπερ- γλυκαιμίας και βελτιώθηκε η ποιότητα των διαβητικών ασθενών.

Ωστόσο υπάρχουν περιθώρια βελτίωσης και πλέον γίνονται προσπάθειες για την ανάπτυξη νέων συστημάτων ανίχνευσης των επιπέδων γλυκόζης και χορήγησης της θεραπευτικής αγωγής. Πιο συγκεκριμένα, η έρευνα στοχεύει στην ανάπτυξη μη επεμβατικών «κλειστών» συστημάτων (closed-loop) για τη διαχείριση του ΣΔ τα οποία θα προσφέρουν όχι μόνο συνεχή καταγραφή της συγκέντρωσης της γλυκόζης αλλά και αποδέσμευση της ενδεδειγμένης θεραπευτικής ουσίας όποτε κρίνεται απαραίτητο. Τα συστήματα αυτά θα βελτιώσουν σημαντικά την ποιότητα ζωής των πασχόντων από την ασθένεια καθώς θα προσφέρουν πιο αποτελεσματικό έλεγχο της γλυκόζης, μειωμένη χορηγούμενη δόση φαρμάκου, καλύτερη συμμόρφωση του ασθενούς και καλύτερο έλεγχο της θεραπείας.

Η δημιουργία των «κλειστών» συστημάτων απαιτεί την ανάπτυξη καινοτόμων μη επεμβατικών αισθητήρων ανίχνευσης της γλυκόζης σε υγρά εκτός του αίματος (π.χ. στον ιδρώτα) αλλά και νανοφορέων για την αυτοματοποιημένη χορήγηση της θεραπευτικής αγωγής, από εναλλακτικές οδούς, όποτε απαιτείται. Για τον λόγο αυτό, καθίσταται αναγκαία η σύνθεση πιο αποτελεσματικών και πιο βιοσυμβατών νανοϋλικών.

Το γραφένιο είναι ένα νανοϋλικό το οποίο χάρη στις άριστες ηλεκτροχημικές του ιδιότητες ξεχώρισε νωρίς στις βιοϊατρικές εφαρμογές. Τα μοναδικά χαρακτηριστικά του το καθιστούν ιδανικό υποψήφιο για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων υψηλής ακρίβειας. Μάλιστα, οι αισθητήρες γραφενίου αποτελούν τεχνολογία αιχμής σε σχέση με τους συμβατικούς αισθητήρες όσον αφορά την ανάλυση και την ευαισθησία. Ο λόγος για τον οποίο το γραφένιο δεν έχει πάρει ολοκληρωτικά τα ηνία σε ιατρικές εφαρμογές, είναι η δυσκολία παραγωγής σε μεγάλη κλίμακα και υψηλής ποιότητας γραφενίου με χαμηλό κόστος και

περιβαλλοντολογικά φιλικό τρόπο. Τα τελευταία χρόνια, με τη χρήση των τεχνικών της «πράσινης» χημείας κατέστη δυνατή η αποφυλλοποίηση του γραφένιου από γραφίτη χωρίς τη χρήση τοξικών διαλυτών. Ωστόσο ακόμη δεν έχει διερευνηθεί η βιοσυμβατότητα των δομών αυτών με ανθρώπινα κύτταρα και ιστούς.

Πρωταρχικός στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να διερευνηθεί κατά πόσο η «πράσινη» αποφυλλοποίηση του γραφίτη οδηγεί στη σύνθεση πιο βιοσυμβατών νανοϋλικών σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους. Καθώς η λειτουργική τροποποίηση των νανοϋλικών επηρεάζει τόσο τα χαρακτηριστικά όσο και την τοξικότητά τους, ελέγχθηκαν *in vitro* τρεις διαφορετικές δομές που έχουν ως βάση το γραφένιο: γραφένιο, «ντοπαρισμένο» με άζωτο (N-Doped) γραφένιο και γραφένιο συνδεδεμένο με νιτρικά, οι οποίες συντέθηκαν με δύο διαφορετικές μεθόδους που περιλάμβαναν τη χρήση χημικών ή βιολογικών διαλυτών. Είναι γνωστό ότι οι επιδράσεις των νανοϋλικών διαφέρουν σε κάθε είδος κυττάρου και έτσι η τοξικότητα των νανοϋλικών γραφένιου ελέγχθηκε σε τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές (ινοβλάστες NIH/3T3, κερατινοκύτταρα HaCaT και THP-1 διαφοροποιημένα μακροφάγα), οι οποίες μαζί αποτελούν ένα μοντέλο του δέρματος. Με σύγχρονες μεθόδους εξετάστηκε η άμεση ή μακροπρόθεσμη τοξικότητα των νανοϋλικών στα κύτταρα, η πιθανή πρόκληση κυτταρικού θανάτου ή οξειδωτικού στρες, η επίδρασή τους στον κυτταρικό κύκλο αλλά και η αλληλεπίδρασή τους με μόρια που παίζουν σημαντικό ρόλο σε κρίσιμα σηματοδοτικά μονοπάτια της φλεγμονής.

Ο ενδεδειγμένος έλεγχος κυτταροτοξικότητας απέδειξε ότι η «πράσινη» σύνθεση του γραφένιου διατηρεί τη μοναδικότητά του περιορίζοντας παράλληλα τις αρνητικές του επιδράσεις στα κύτταρα. Επομένως, το «πράσινο» γραφένιο καθίσταται ιδανικός υποψήφιος για βιοϊατρικές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένου της ανάπτυξης βιοαισθητήρων υψηλής ακρίβειας για την ανίχνευση της γλυκόζης μη επεμβατικά.

Δεύτερος στόχος της διατριβής ήταν η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας καινοτόμων νανογαλακτωμάτων να δράσουν ως νανοφορείς για τη διαδερμική απελευθέρωση εμπορικών υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Σε *in vivo* μοντέλο αποδείχθηκε ότι η νταπαγλιφλοζίνη, ένα κοινό φάρμακο για τη διαχείριση του ΣΔ, μέσω των νανογαλακτωμάτων διαπερνά επιτυχώς το δέρμα των ζώων και ασκεί την ισχυρή υπογλυκαιμική της δράση χωρίς να προκαλεί τοξικές αντιδράσεις στον οργανισμό.

Συνδυαστικά, η ανάπτυξη καινοτόμων, ασφαλών, μη επεμβατικών αισθητήρων γλυκόζης από «πράσινο» γραφένιο και η χρήση των νανογαλακτωμάτων ως νανοφορείς για τη διαδερμική απελευθέρωση των αντιδιαβητικών φαρμάκων, δύναται να οδηγήσουν στη δημιουργία ενός πλήρως αυτοματοποιημένου «κλειστού» συστήματος για τη διαχείριση του ΣΔ. Το σύστημα αυτό θα βελτιώσει

σημαντικά την ποιότητα ζωής των πασχόντων από την ασθένεια, ο αριθμός των οποίων αυξάνεται με ραγδαίους ρυθμούς.



# ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is a chronic metabolic disorder characterized by impaired glucose homeostatic regulation in the body. Over the last decades, DM has reached epidemic levels worldwide. According to the International Diabetes Federation it is estimated that approximately 538 million adults are living with diabetes and this number is projected to rise to 783 million by 2045. DM has become one of the major public health issues, significantly impacting the socio-economic development of each country.

The evolution of Nanotechnology brought hope for achieving effective management of DM. The development of continuous glucose monitoring systems as well as insulin pumps, significantly reduced the episodes of hypo- and hyperglycemia and improved the quality of life of diabetics.

However, there is still room for improvement, and efforts are now being made to develop new systems for detecting glucose levels and administering therapeutic treatment. Specifically, research aims at developing non-invasive “closed-loop” systems for diabetes management, which will not only provide continuous glucose monitoring but also release the appropriate therapeutic agent when it is necessary. These systems will significantly improve the quality of life for those suffering from the disease, as they will offer more effective glucose control, reduced drug dosage, better patient compliance, and improved treatment control.

The development of “closed-loop” systems require the creation of innovative non-invasive biosensors for the detection of glucose in biological fluids other than blood (e.g. in sweat) and nanocarriers for the automated administration of therapeutic treatment, by alternative routes, when needed. For this reason, the synthesis of more efficient and more biocompatible nanomaterials is necessary.

Of all nanomaterials, graphene stood out early in biomedical applications, due to its excellent electrochemical properties. Its unique characteristics make it an ideal candidate for the development of high precision biosensors. In fact, graphene biosensors are state-of-the-art compared to conventional sensors in terms of resolution and sensitivity. The only reason why graphene has not completely taken over the world of medical applications, is the difficulty in producing high-quality graphene in large-scale, at a low cost and in an environmentally friendly way. In recent years, “green” chemistry techniques made possible the biological exfoliation of graphene from graphite without the use of toxic solvents. However, the biocompatibility of these structures with human cells and tissues has not been explored yet.

The primary objective of this PhD thesis was to investigate whether the "green" exfoliation of graphite leads to the synthesis of more biocompatible nanomaterials compared to conventional methods. As the functional modification of nanomaterials affects both their characteristics and their toxicity, three different graphene- based structures were tested *in vitro*: graphene, nitrogen-doped (N-Doped) graphene and nitrate- bonded graphene. The three nanomaterials were synthesized by two different methods involving the use of chemical or biological solvents. It is known that the effects of nanomaterials differ in each cell type, so the toxicity of graphene nanomaterials was tested in three different cell lines (NIH/3T3 fibroblasts, HaCaT keratinocytes and THP-1 differentiated macrophages), which together constitute a skin model. Using modern methods, the immediate or long-term toxicity of nanomaterials to cells, the possible induction of cell death or oxidative stress, their effect on the cell cycle and their interaction with molecules that play an important role in critical signaling pathways of inflammation, were examined.

Thorough cytotoxicity assessment proved that "green" synthesis of graphene maintains its uniqueness while limiting its negative effects on cells. Therefore, "green" graphene becomes an ideal candidate for biomedical applications, including the development of high- precision biosensors for non- invasive glucose detection.

A second aim of this thesis was to investigate the effectiveness of innovative nanoemulsions to act as nanocarriers for transdermal release of commercial hypoglycemic drugs. In an *in vivo* model, it was shown that dapagliflozin, a common drug for DM, through nanoemulsions successfully penetrates the skin of laboratory animals and exerts its strong hypoglycemic effect without causing toxic reactions in the body.

Combined, the development of innovative, non- toxic, non- invasive glucose sensors with "green" graphene and the use of nanoemulsions as nanocarriers for the transdermal delivery of antidiabetic drugs, may lead to the design of a fully automated "closed" system for the management of DM. This system will significantly improve the quality of life of the ever- increasing patients.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lin X, Xu Y, Pan X, et al. Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025. *Sci Rep* [Internet] 2020;10(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71908-9>
2. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet] 2022;183:109119. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119>
3. Ogurtsova K, Guariguata L, Barengo NC, et al. IDF diabetes Atlas: Global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2021. *Diabetes Res Clin Pract* 2022;183.
4. Gregory GA, Robinson TIG, Linklater SE, et al. Global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021 with projection to 2040: a modelling study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2022;10(10):741–60.
5. Quattrin T, Mastrandrea LD, Walker LSK. Type 1 diabetes. *Lancet* [Internet] 2023;401(10394):2149–62. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)00223-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00223-4)
6. Lampeter EF, Homberg M, Gries FA, et al. Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation. *Lancet* 1993;341(8855):1243–4.
7. Transplantation P, Vendrame F, Pileggi A, et al. Recurrence of Type 1 Diabetes After Simultaneous. *Diabetes* 2010;59(April):947–57.
8. Redondo MJ, Jeffrey J, Fain PR, Eisenbarth GS, Orban T. Concordance for Islet Autoimmunity among Monozygotic Twins. *N Engl J Med* 2008;359(26):2849–50.
9. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet* [Internet] 2018;391(10138):2449–62. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5)
10. Berget C, Messer LH, Forlenza GP. A clinical overview of insulin pump therapy for the management of diabetes: Past, present, and future of intensive therapy. *Diabetes Spectr* 2019;32(3):194–204.
11. Landgraf R, Aberle J, Birkenfeld AL, et al. Therapy of Type 2 Diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2019;127:S73–92.
12. Marín-Peñalver JJ, Martín-Timón I, Sevillano-Collantes C, Cañizo-Gómez FJ del. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* 2016;7(17):354.

13. Foretz M, Guigas B, Viollet B. Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential. *Nat Rev Endocrinol* 2023;19(8):460–76.
14. Foretz M, Guigas B, Viollet B. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* [Internet] 2019;15(10):569–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41574-019-0242-2>
15. Brown E, Heerspink HJL, Cuthbertson DJ, Wilding JPH. SGLT2 inhibitors and GLP-1 receptor agonists: established and emerging indications. *Lancet* [Internet] 2021;398(10296):262–76. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00536-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00536-5)
16. Collins L, Costello R. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists [Internet]. StatPearls [Internet]. Treasure Isl. StatPearls Publ. 2023; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551568/>
17. Lv W, Wang X, Xu Q, Lu W. Mechanisms and Characteristics of Sulfonylureas and Glinides. *Curr Top Med Chem* 2019;20(1):37–56.
18. Gallwitz B. Clinical use of DPP-4 inhibitors. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10(JUN):1–10.
19. Hadden DR, Hillebrand B. The first recorded case of diabetic pregnancy (Bennewitz HG, 1824, University of Berlin). *Diabetologia*. 1989;32(8):625.
20. O’SULLIVAN JB, MAHAN CM. CRITERIA FOR THE ORAL GLUCOSE TOLERANCE TEST IN PREGNANCY. *Diabetes* 1964;13:278–85.
21. Sweeting A, Wong J, Murphy HR, Ross GP. A Clinical Update on Gestational Diabetes Mellitus. *Endocr Rev* 2022;43(5):763–93.
22. Wang H, Li N, Chivese T, et al. IDF Diabetes Atlas: Estimation of Global and Regional Gestational Diabetes Mellitus Prevalence for 2021 by International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group’s Criteria. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet] 2022;183:109050. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109050>
23. McIntyre HD, Catalano P, Zhang C, Desoye G, Mathiesen ER, Damm P. Gestational diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Prim* [Internet] 2019;5(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-019-0098-8>
24. Johns EC, Denison FC, Norman JE, Reynolds RM. Gestational Diabetes Mellitus: Mechanisms, Treatment, and Complications. *Trends Endocrinol Metab* [Internet] 2018;29(11):743–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.09.004>
25. Moon JH, Jang HC. Gestational Diabetes Mellitus: Diagnostic Approaches and Maternal-Offspring Complications. *Diabetes Metab J* 2022;46(1):3–14.
26. Zito G, Della Corte L, Giampaolino P, et al. Gestational diabetes mellitus:



- Prevention, diagnosis and treatment. A fresh look to a busy corner. *J Neonatal Perinatal Med* 2020;13(4):529–41.
27. Fraticelli F, Celentano C, Zecca I AI, et al. Effect of inositol stereoisomers at different dosages in gestational diabetes: an open-label, parallel, randomized controlled trial. *Acta Diabetol* [Internet] 2018;55(8):805–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00592-018-1157-4>
  28. Zhang H, Colclough K, Gloyn AL, Pollin TI. Monogenic diabetes: A gateway to precision medicine in diabetes. *J Clin Invest* 2021;131(3):1–14.
  29. Fajans SS, Bell GI. MODY: History, genetics, pathophysiology, and clinical decision making. *Diabetes Care* 2011;34(8):1878–84.
  30. Aarthy R, Aston-Mourney K, Mikocka-Walus A, et al. Clinical features, complications and treatment of rarer forms of maturity-onset diabetes of the young (MODY) - A review. *J Diabetes Complications* [Internet] 2021;35(1):107640. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2020.107640>
  31. Beltrand J, Busiah K, Vaivre-Douret L, et al. Neonatal Diabetes Mellitus. *Front Pediatr* 2020;8(September):1–9.
  32. Carmody D, Støy J, Greeley SAW, Bell GI, Philipson LH. *A Clinical Guide to Monogenic Diabetes* [Internet]. Second Edi. Isevier Inc.; 2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800892-8/00002-6>
  33. Hirsch IB, Gaudiani LM. A new look at brittle diabetes. *J Diabetes Complications* [Internet] 2021;35(1):107646. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2020.107646>
  34. Benbow SJ, Walsh A, Gill G V. Brittle Diabetes in the Elderly. *J R Soc Med* [Internet] 2001;94(11):578–80. Available from: <http://jrsm.rsmjournals.com/cgi/doi/10.1258/jrsm.95.1.58>
  35. Beran D, Ewen M, Lipska K, Hirsch IB, Yudkin JS. Availability and Affordability of Essential Medicines: Implications for Global Diabetes Treatment. *Curr Diab Rep* 2018;18(8):5–9.
  36. Fève B, Scheen AJ. When therapeutic drugs lead to diabetes. *Diabetologia* 2022;65(5):751–62.
  37. Pfeiffer EF. The glucose sensor: the missing link in diabetes therapy. *Horm Metab Res Suppl* [Internet] 1990;24:154—164. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/2272621>
  38. Clark LC, Lyons C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann N Y Acad Sci* 1962;102(1):29–45.
  39. Updike SJ, Hicks GP. The enzyme electrode. *Nature* [Internet] 1967;214(5092):986–8. Available from:

<https://doi.org/10.1038/214986a0>

40. Juska VB, Pemble ME. A critical review of electrochemical glucose sensing: Evolution of biosensor platforms based on advanced nanosystems. *Sensors (Switzerland)* 2020;20(21):1–28.
41. Cass AEG, Davis G, Francis GD, et al. Ferrocene-Mediated Enzyme Electrode for Amperometric Determination of Glucose. *Anal Chem* 1984;56(4):667–71.
42. Kyvik KO, Traulsen J, Reinholdt B, Frøland A. The ExacTech blood glucose testing system. *Diabetes Res Clin Pract* 1990;10(1):85–90.
43. Koopal CGJ, Feiters MC, Nolte RJM, de Ruyter B, Schasfoort RBM. Third-generation amperometric biosensor for glucose. Polypyrrole deposited within a matrix of uniform latex particles as mediator. *Bioelectrochemistry Bioenerg* 1992;29(2):159–75.
44. Lee H, Hong YJ, Baik S, Hyeon T, Kim DH. Enzyme-Based Glucose Sensor: From Invasive to Wearable Device. *Adv Healthc Mater* 2018;7(8):1–14.
45. Papanikolaou E, Simos Y V., Spyrou K, et al. Is graphene the rock upon which new era continuous glucose monitors could be built? *Exp Biol Med* 2023;248(1):14–25.
46. Mariani HS, Layden BT, Aleppo G. Continuous glucose monitoring: A perspective on its past, present, and future applications for diabetes management. *Clin Diabetes* 2017;35(1):60–5.
47. Pullano SA, Greco M, Bianco MG, Foti D, Brunetti A, Fiorillo AS. Glucose biosensors in clinical practice: Principles, limits and perspectives of currently used devices. *Theranostics* 2022;12(2):493–511.
48. Hwang DW, Lee S, Seo M, Chung TD. Recent advances in electrochemical non-enzymatic glucose sensors – A review. *Anal Chim Acta* [Internet] 2018;1033:1–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.051>
49. Si P, Huang Y, Wang T, Ma J. Nanomaterials for electrochemical non-enzymatic glucose biosensors. *RSC Adv* 2013;3(11):3487–502.
50. Pletcher D. Electrocatalysis: present and future. *J Appl Electrochem* 1984;14(4):403–15.
51. Burke LD. Premonolayer oxidation and its role in electrocatalysis. *Electrochim Acta* 1994;39(11–12):1841–8.
52. Zhu X, Ju Y, Chen J, Liu D, Liu H. Nonenzymatic wearable sensor for electrochemical analysis of perspiration glucose. *ACS Sensors* 2018;3(6):1135–41.

53. Chien MN, Chen YJ, Bai CH, Huang JT. Continuous Glucose Monitoring System Based on Percutaneous Microneedle Array. *Micromachines* 2022;13(3).
54. Ahmad NFN, Ghazali NNN, Wong YH. Concept Design of Transdermal Microneedles for Diagnosis and Drug Delivery: A Review. *Adv Eng Mater* 2021;23(12):1–22.
55. Zou Y, Chu Z, Guo J, Liu S, Ma X, Guo J. Minimally invasive electrochemical continuous glucose monitoring sensors: Recent progress and perspective. *Biosens Bioelectron* [Internet] 2023;225(October 2022):115103. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115103>
56. Bamgboje D, Christoulakis I, Smanis I, et al. Continuous non-invasive glucose monitoring via contact lenses: Current approaches and future perspectives. *Biosensors* 2021;11(6).
57. Duong HD, Sohn OJ, Rhee J Il. Development of a ratiometric fluorescent glucose sensor using an oxygen-sensing membrane immobilized with glucose oxidase for the detection of glucose in tears. *Biosensors* 2020;10(8).
58. Ma X, Ahadian S, Liu S, et al. Smart Contact Lenses for Biosensing Applications. *Adv Intell Syst* 2021;3(5).
59. Wiorek A, Parrilla M, Cuartero M, Crespo GA. Epidermal Patch with Glucose Biosensor: PH and Temperature Correction toward More Accurate Sweat Analysis during Sport Practice. *Anal Chem* 2020;92(14):10153–61.
60. Zhang J, Liu J, Su H, Sun F, Lu Z, Su A. A wearable self-powered biosensor system integrated with diaper for detecting the urine glucose of diabetic patients. *Sensors Actuators, B Chem* [Internet] 2021;341(April):130046. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130046>
61. Arakawa T, Tomoto K, Nitta H, et al. A Wearable Cellulose Acetate-Coated Mouthguard Biosensor for in Vivo Salivary Glucose Measurement. *Anal Chem* 2020;92(18):12201–7.
62. Lee I, Probst D, Klonoff D, Sode K. Continuous glucose monitoring systems - Current status and future perspectives of the flagship technologies in biosensor research -. *Biosens Bioelectron* 2021;181(June 2020).
63. Cao Q, Liang B, Tu T, Wei J, Fang L, Ye X. Three-dimensional paper-based microfluidic electrochemical integrated devices (3D-PMED) for wearable electrochemical glucose detection. *RSC Adv* 2019;9(10):5674–81.
64. Kownacka AE, Vegelyte D, Joosse M, et al. Clinical Evidence for Use of a Noninvasive Biosensor for Tear Glucose as an Alternative to Painful Finger-Prick for Diabetes Management Utilizing a Biopolymer Coating. *Biomacromolecules* 2018;19(11):4504–11.
65. Yamamoto N, Kawashima N, Kitazaki T. Ultrasonic standing wave

- preparation of a liquid cell for glucose measurements in urine by midinfrared spectroscopy and potential application to smart toilets. *J Biomed Opt* 2018;23(05):1.
66. Gnach A, Lipinski T, Bednarkiewicz A, Rybka J, Capobianco JA. Upconverting nanoparticles: Assessing the toxicity. *Chem Soc Rev* 2015;44(6):1561–84.
  67. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules* 2020;25(1):1–15.
  68. Feynman RP. Plenty of room at the bottom? *Eng Sci* 1960;23(5):22–36.
  69. “Plenty of room” revisited. *Nat Nanotechnol* [Internet] 2009;4(12):781–781. Available from: <https://www.nature.com/articles/nnano.2009.356>
  70. European Commission. European Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial, 2011/696/EU. *Off J Eur Union* 2011;54:275: 38-40.
  71. European Commission. Commission Recommendation of 10 June 2022 on the definition of nanomaterial. *Off J Eur Union* 2022;65(2022/C 229/01):1–5.
  72. Mekuye B, Abera B. Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications. *Nano Sel* 2023;4(8):486–501.
  73. Joudeh N, Linke D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *J Nanobiotechnology* [Internet] 2022;20(1):1–29. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>
  74. Baig N, Kammakakam I, Falath W, Kammakakam I. Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Mater Adv* 2021;2(6):1821–71.
  75. Bellah MM, Christensen SM, Iqbal SM. Nanostructures for medical diagnostics. *J Nanomater* 2012;2012.
  76. Kumar S, Bhushan P, Bhattacharya S. *Fabrication of Nanostructures with Bottom-up Approach and Their Utility in Diagnostics, Therapeutics, and Others*. 2018.
  77. Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanomedicine. *N Engl J Med* [Internet] 2010;363(25):2434–43. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1461444810365020>
  78. Pelaz B, Alexiou C, Alvarez-Puebla RA, et al. Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano* 2017;11(3):2313–81.
  79. Hsu CY, Rheima AM, Kadhim MM, et al. An overview of nanoparticles in drug

- delivery: Properties and applications. South African J Chem Eng [Internet] 2023;46(August):233–70. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2023.08.009>
80. Sachdeva H, Khandelwal AR, Meena R, Sharma K, Khatik N. Graphene-based nanomaterials for cancer therapy. Mater Today Proc [Internet] 2021;43:2954–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.314>
  81. Prakash S. Nano-based drug delivery system for therapeutics: a comprehensive review. Biomed Phys Eng Express 2023;9(5).
  82. Ramezani M, Ripin ZM. An Overview of Enhancing the Performance of Medical Implants with Nanocomposites. J Compos Sci 2023;7(5).
  83. Simos Y V., Spyrou K, Patila M, et al. Trends of nanotechnology in type 2 diabetes mellitus treatment. Asian J Pharm Sci [Internet] 2021;16(1):62–76. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.05.001>
  84. Leung HMC, Forlenza GP, Prioleau TO, Zhou X. Noninvasive Glucose Sensing In Vivo. Sensors 2023;23(16):1–34.
  85. Ghany NAA, Elsherif SA, Handal HT. Revolution of Graphene for different applications: State-of-the-art. Surfaces and Interfaces 2017;9(June):93–106.
  86. Novoselov K, Geim A, Morozov S, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. Science (80- ) 2004;306(5696):666–9.
  87. Noorden R. Beyond sticky tape: Graphene. Nat 2012;483(7389):5–6.
  88. Mbayachi VB, Ndayiragije E, Sammani T, Taj S, Mbuta ER, Khan A Ullah. Graphene synthesis, characterization and its applications: A review. Results Chem [Internet] 2021;3:100163. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2021.100163>
  89. Zhen Z, Zhu H. Structure and properties of graphene [Internet]. Elsevier Inc.; 2017. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812651-6.00001-X>
  90. Nakano H, Tetsuka H, Spencer MJS, Morishita T. Chemical modification of group IV graphene analogs. Sci Technol Adv Mater [Internet] 2018;19(1):76–100. Available from: <http://doi.org/10.1080/14686996.2017.1422224>
  91. Inagaki M, Konno H, Tanaike O. Carbon materials for electrochemical capacitors. J Power Sources [Internet] 2010;195(24):7880–903. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpowsour.2010.06.036>
  92. Stoller MD, Park S, Zhu Y, An J, Ruoff RS. Graphene-Based Ultracapacitors. 2008;6–10.

93. Castro Neto AH, Guinea F, Peres NMR, Novoselov KS, Geim AK. The electronic properties of graphene. *Rev Mod Phys* 2009;81(1):109–62.
94. Ghosh S, Calizo I, Teweldebrhan D, et al. Extremely high thermal conductivity of graphene: Prospects for thermal management applications in nanoelectronic circuits. *Appl Phys Lett* 2008;92(15):15–7.
95. Ambrosi A, Chua CK, Bonanni A, Pumera M. Electrochemistry of graphene and related materials. *Chem Rev* 2014;114(14):7150–88.
96. Peña-Bahamonde J, Nguyen HN, Fanourakis SK, Rodrigues DF. Recent advances in graphene-based biosensor technology with applications in life sciences. *J Nanobiotechnology* [Internet] 2018;16(1):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0400-z>
97. Gong QJ, Han HX, Wang YD, Yao CZ, Yang HY, Qiao JL. An electrochemical sensor for dopamine detection using poly-tryptophan composited graphene on glassy carbon as the electrode. *Xinxing Tan Cailiao/New Carbon Mater* [Internet] 2020;35(1):34–41. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1872-5805\(20\)60473-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1872-5805(20)60473-5)
98. Cernat A, Ștefan G, Tertis M, Cristea C, Simon I. An overview of the detection of serotonin and dopamine with graphene-based sensors. *Bioelectrochemistry* 2020;136.
99. Meng S, Liu Y, Wang L, et al. Graphene-Based Flexible Sensors for Simultaneous Detection of Ascorbic Acid, Dopamine, and Uric Acid. *Front Bioeng Biotechnol* 2021;9(September):1–12.
100. Magar HS, Hassan RYA, Abbas MN. Non-enzymatic disposable electrochemical sensors based on CuO/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MWCNTs nanocomposite modified screen-printed electrode for the direct determination of urea. *Sci Rep* [Internet] 2023;13(1):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28930-4>
101. Boroujerdi R, Paul R. Graphene-Based Electrochemical Sensors for Psychoactive Drugs. *Nanomaterials* 2022;12(13).
102. Yu CX, Xiong F, Liu LL. Electrochemical biosensors for the detection of p53 proteins and anti-p53 autoantibody. *Int J Electrochem Sci* [Internet] 2020;15(7):6695–705. Available from: <https://doi.org/10.20964/2020.07.52>
103. Du D, Wang L, Shao Y, Wang J, Engelhard MH, Lin Y. Functionalized graphene oxide as a nanocarrier in a multienzyme labeling amplification strategy for ultrasensitive electrochemical immunoassay of phosphorylated p53 (s392). *Anal Chem* 2011;83(3):746–52.
104. Liu C, Liu T. A graphene-assisted electrochemical sensor for detection of alpha-fetoprotein in serum. *Int J Electrochem Sci* [Internet] 2023;18(4):100081. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.ijoes.2023.100081>

105. Upan J, Youngvises N, Tuantranont A, et al. A simple label-free electrochemical sensor for sensitive detection of alpha-fetoprotein based on specific aptamer immobilized platinum nanoparticles/carboxylated-graphene oxide. *Sci Rep* [Internet] 2021;11(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93399-y>
106. Manasa G, Mascarenhas RJ, Malode SJ, Shetti NP. Graphene-based electrochemical immunosensors for early detection of oncomarker carcinoembryonic antigen. *Biosens Bioelectron X* [Internet] 2022;11(June):100189. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2022.100189>
107. Guo Y, Feng L. Highly Sensitive Detection of Carcinoembryonic Antigen via an Electrochemical Platform Fabricated by AuNPs/Streptavidin/Reduced Graphene Oxide. *Front Chem* 2022;10(May):1–10.
108. Wu X, Mu F, Wang Y, Zhao H. Graphene and graphene-based nanomaterials for DNA detection: A review. *Molecules* 2018;23(8).
109. Hwang MT, Heiranian M, Kim Y, et al. Ultrasensitive detection of nucleic acids using deformed graphene channel field effect biosensors. *Nat Commun* [Internet] 2020;11(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-15330-9>
110. Heerema SJ, Dekker C. Graphene nanodevices for DNA sequencing. *Nat Nanotechnol* [Internet] 2016;11(2):127–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2015.307>
111. Zhang T, Tremblay PL. Graphene: An Antibacterial Agent or a Promoter of Bacterial Proliferation? *iScience* [Internet] 2020;23(12):101787. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101787>
112. Xia MY, Xie Y, Yu CH, et al. Graphene-based nanomaterials: the promising active agents for antibiotics-independent antibacterial applications. *J Control Release* [Internet] 2019;307(May):16–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.06.011>
113. Hu W, Peng C, Luo W, et al. Graphene-based antibacterial paper. *ACS Nano* 2010;4(7):4317–23.
114. Gurunathan S, Han JW, Abdal Dayem A, Eppakayala V, Kim JH. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Nanomedicine* 2012;7:5901–14.
115. Liu S, Zeng TH, Hofmann M, et al. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: Membrane and oxidative stress. *ACS Nano* 2011;5(9):6971–80.

116. Liu S, Hu M, Zeng TH, et al. Lateral dimension-dependent antibacterial activity of graphene oxide sheets. *Langmuir* 2012;28(33):12364–72.
117. Luan B, Huynh T, Zhao L, Zhou R. Potential toxicity of graphene to cell functions via disrupting protein-protein interactions. *ACS Nano* 2015;9(1):663–9.
118. Tu Y, Lv M, Xiu P, et al. Destructive extraction of phospholipids from *Escherichia coli* membranes by graphene nanosheets. *Nat Nanotechnol* 2013;8(8):594–601.
119. Wang H, Teng F, Zhang L, et al. Meso-Cellular Silicate Foam-Modified Reduced Graphene Oxide with a Sandwich Structure for Enzymatic Immobilization and Bioelectrocatalysis. *ACS Appl Mater Interfaces* 2019;11(33):29522–35.
120. Xu J, Xu K, Han Y, et al. A 3D porous graphene aerogel@GOx based microfluidic biosensor for electrochemical glucose detection. *Analyst* 2020;145(15):5141–7.
121. Ahmadi A, Khoshfetrat SM, Kabiri S, Fotouhi L, Dorraji PS, Omidfar K. Impedimetric Paper-Based Enzymatic Biosensor Using Electrospun Cellulose Acetate Nanofiber and Reduced Graphene Oxide for Detection of Glucose from Whole Blood. *IEEE Sens J* 2021;21(7):9210–7.
122. Lee H, Choi TK, Lee YB, et al. A graphene-based electrochemical device with thermoresponsive microneedles for diabetes monitoring and therapy. *Nat Nanotechnol* 2016;11(6):566–72.
123. Rahsepar M, Foroughi F, Kim H. A new enzyme-free biosensor based on nitrogen-doped graphene with high sensing performance for electrochemical detection of glucose at biological pH value. *Sensors Actuators, B Chem* [Internet] 2019;282(September 2018):322–30. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.11.078>
124. Suyanta, Yazid SNAM, Isa IM, Hashim N, Ahmad MS. Novel one pot synthesis of alkaline-reduced iron oxide/graphene nanocomposites for amperometric non-enzymatic glucose sensor. *Int J Electrochem Sci* 2018;13(9):9200–13.
125. Chaiyo S, Mehmeti E, Siangproh W, et al. Non-enzymatic electrochemical detection of glucose with a disposable paper-based sensor using a cobalt phthalocyanine–ionic liquid–graphene composite. *Biosens Bioelectron* [Internet] 2018;102(October 2017):113–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.015>
126. Wang C, Hu H, Ding S, Dong M, Li L. Highly sensitive electrochemical non-enzymatic glucose biosensor based on squamous NiCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanosheets decorated nitrogen-doped reduced graphene oxide. *Mater Technol* 2022;37(9):906–14.



127. Babulal SM, Chen SM, Palani R, et al. Graphene oxide template based synthesis of NiCo<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanosheets for high performance non-enzymatic glucose sensor. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet] 2021;621(April):126600. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126600>
128. Cui D, Su L, Li H, et al. Non-enzymatic glucose sensor based on micro-/nanostructured Cu/Ni deposited on graphene sheets. *J Electroanal Chem* [Internet] 2019;838(March):154–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.03.005>
129. Chengnan L, Pagneux Q, Voronova A, et al. Near-infrared light activatable hydrogels for metformin delivery. *Nanoscale* 2019;11(34):15810–20.
130. Sarkar K, Bank S, Chatterjee A, et al. Hyaluronic acid-graphene oxide quantum dots nanoconjugate as dual purpose drug delivery and therapeutic agent in meta-inflammation. *J Nanobiotechnology* [Internet] 2023;21(1):1–25. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02015-w>
131. Zhao R, Lu Z, Yang J, Zhang L, Li Y, Zhang X. Drug Delivery System in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8(July):1–16.
132. Hussain M, Hafeez A, Kushwaha SP. Nanoformulation mediated transdermal delivery of anti-diabetic drugs: an updated review. *Intell Pharm* [Internet] 2023;1(4):192–200. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ipha.2023.08.009>
133. Wu L, Liu M, Shan W, et al. Bioinspired butyrate-functionalized nanovehicles for targeted oral delivery of biomacromolecular drugs. *J Control Release* [Internet] 2017;262:273–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.045>
134. Zhang Y, Jiang G, Hong W, et al. Polymeric Microneedles Integrated with Metformin-Loaded and PDA/LA-Coated Hollow Mesoporous SiO<sub>2</sub> for NIR-Triggered Transdermal Delivery on Diabetic Rats. *ACS Appl Bio Mater* 2018;1(6):1906–17.
135. Wang A, Yang T, Fan W, et al. Protein Corona Liposomes Achieve Efficient Oral Insulin Delivery by Overcoming Mucus and Epithelial Barriers. *Adv Healthc Mater* 2019;8(12):1–11.
136. Joshi S, Hussain MT, Roces CB, et al. Microfluidics based manufacture of liposomes simultaneously entrapping hydrophilic and lipophilic drugs. *Int J Pharm* [Internet] 2016;514(1):160–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.027>
137. Badran MM, Alouny NN, Aldosari BN, Alhusaini AM, Abou El Ela AES. Transdermal Glipizide Delivery System Based on Chitosan-Coated Deformable Liposomes: Development, Ex Vivo, and In Vivo Studies. *Pharmaceutics* 2022;14(4).

138. Suhail M, Rosenholm JM, Minhas MU, et al. Nanogels as drug-delivery systems: A comprehensive overview. *Ther Deliv* 2019;10(11):697–717.
139. Gu Z, Dang TT, Ma M, et al. Glucose-responsive microgels integrated with enzyme nanocapsules for closed-loop insulin delivery. *ACS Nano* 2013;7(8):6758–66.
140. Scioli Montoto S, Muraca G, Ruiz ME. Solid Lipid Nanoparticles for Drug Delivery: Pharmacological and Biopharmaceutical Aspects. *Front Mol Biosci* 2020;7(October):1–24.
141. Vijayan V, Jayachandran E, Anburaj J, Rao DS, Jayaraj Kumar K. Transdermal delivery of repaglinide from solid lipid nanoparticles in diabetic rats: In vitro and in vivo studies. *J Pharm Sci Res* 2011;3(3):1077–81.
142. Elbahwy IA, Ibrahim HM, Ismael HR, Kasem AA. Enhancing bioavailability and controlling the release of glibenclamide from optimized solid lipid nanoparticles. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet] 2017;38:78–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2017.02.001>
143. Mukherjee S, Maity S, Ghosh B, Chakraborty T, Mondal A, Bishayee A. Assessment of the antidiabetic potentiality of glyburide loaded glyceryl monostearate solid lipid nanoparticles. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet] 2020;55:101451. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101451>
144. Chauhan I, Yasir M, Verma M, Singh AP. Nanostructured lipid carriers: A groundbreaking approach for transdermal drug delivery. *Adv Pharm Bull* [Internet] 2020;10(2):150–65. Available from: <https://doi.org/10.34172/apb.2020.021>
145. Alam S, Aslam M, Khan A, et al. Nanostructured lipid carriers of pioglitazone for transdermal application: From experimental design to bioactivity detail. *Drug Deliv* 2016;23(2):601–9.
146. Ilyas U, Asif M, Wang M, et al. Nanostructured Lipid Carrier-Based Delivery of Pioglitazone for Treatment of Type 2 Diabetes. *Front Pharmacol* 2022;13(July):1–10.
147. Souto EB, Souto SB, Campos JR, et al. Nanoparticle delivery systems in the treatment of diabetes complications. *Molecules* 2019;24(23):1–29.
148. Akhtar J, Siddiqui HH, Fareed S, Badruddeen, Khalid M, Aqil M. Nanoemulsion: for improved oral delivery of repaglinide. *Drug Deliv* 2016;23(6):2026–34.
149. Razaq FA, Asif M, Asghar S, et al. Glimepiride-Loaded Nanoemulgel; Development, In Vitro Characterization, Ex Vivo Permeation and In Vivo Antidiabetic Evaluation. *Cells* [Internet] 2021;10(9):2404. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/10/9/2404>

150. Ali FR, Shoaib MH, Ali SA, et al. A nanoemulsion based transdermal delivery of insulin: Formulation development, optimization, in-vitro permeation across Strat-M® membrane and its pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet] 2022;71(January):103338. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103338>
151. Karim K, Mandal A, Biswas N, et al. Niosome: A future of targeted drug delivery systems. *J Adv Pharm Technol Res* 2010;1(4):374–80.
152. Mohsen AM, AbouSamra MM, ElShebiney SA. Enhanced oral bioavailability and sustained delivery of glimepiride via niosomal encapsulation: in-vitro characterization and in-vivo evaluation. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet] 2017;43(8):1254–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/03639045.2017.1310224>
153. Prasad PS, Imam SS, Aqil M, Sultana Y, Ali A. QbD-based carbopol transgel formulation: Characterization, pharmacokinetic assessment and therapeutic efficacy in diabetes. *Drug Deliv* 2016;23(3):1057–66.
154. Mishra KK, Kaur CD. Screening of process variables using Box– Behnken design in the fabrication of berberine hydrochloride-loaded transthesomes for enhanced transdermal delivery. *Thai J Pharm Sci* 2022;46(2):191–202.
155. Chauhan MK, Gulati A. Aggrandized Transdermal Delivery of Glimepiride Via Transfersomes: Formulation, Evaluation and Statistical Optimisation. *J Drug Deliv Ther* 2016;6(4):48–54.
156. Alatzoglou C, Patila M, Giannakopoulou A, et al. Development of a Multi-Enzymatic Biocatalytic System through Immobilization on High Quality Few-Layer bio-Graphene. *Nanomaterials* 2023;13(1).
157. Loeffler H, Jonitz-Heincke A, Peters K, et al. Comparison of Inflammatory Effects in THP-1 Monocytes and Macrophages after Exposure to Metal Ions. *Materials (Basel)* [Internet] 2020;13(5):1150. Available from: <https://www.mdpi.com/1996-1944/13/5/1150>
158. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* [Internet] 1983;65(1–2):55–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175983903034>
159. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int J Mol Sci* 2021;22(23).
160. Rundén-Pran E, Mariussen E, El Yamani N, Elje E, Longhin EM, Dusinska M. The colony forming efficiency assay for toxicity testing of nanomaterials— Modifications for higher-throughput. *Front Toxicol* 2022;4(September):1–8.

161. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 2006;1(5):2315–9.
162. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* [Internet] 2018;120(1):56–61. Available from: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpim.40>
163. Čapek J, Roušar T. Detection of oxidative stress induced by nanomaterials in cells—the roles of reactive oxygen species and glutathione. *Molecules* 2021;26(16).
164. Ligasová A, Frydrych I, Koberna K. Basic Methods of Cell Cycle Analysis. *Int J Mol Sci* 2023;24(4).
165. Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* 2016;2016(11):953–7.
166. Kennard MR, Daniels Gatward LF, Roberts AG, White ERP, Nandi M, King AJF. The use of mice in diabetes research: The impact of experimental protocols. *Diabet Med* 2021;38(12):1–12.
167. Pedro PF, Tsakmaki A, Bewick GA. The Glucose Tolerance Test in Mice [Internet]. In: *Methods in Molecular Biology*. 2020. p. 207–16. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-0385-7\\_14](http://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-0385-7_14)
168. Kleiner DE. *Drugs and Toxins* [Internet]. Seventh Ed. Elsevier Ltd; 2018. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-7020-6697-9.00012-1>
169. Won H, Kim SH, Yang JY, et al. Colony-Forming Efficiency Assay to Assess Nanotoxicity of Graphene Nanomaterials. *Toxics* 2022;10(5).
170. Skoda M, Dudek I, Jarosz A, Szukiewicz D. Graphene: One material, many possibilities - Application difficulties in biological systems. *J Nanomater* 2014;2014.
171. Munz M, Giusca CE, Myers-Ward RL, Gaskill DK, Kazakova O. Thickness-Dependent Hydrophobicity of Epitaxial Graphene. *ACS Nano* 2015;9(8):8401–11.
172. Catania F, Marras E, Giorcelli M, et al. A Review on Recent Advancements of Graphene and Graphene-Related Materials in Biological Applications. *Appl Sci* [Internet] 2021;11(2):614. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3417/11/2/614>
173. Papanikolaou E, Simos Y V., Spyrou K, et al. Does Green Exfoliation of Graphene Produce More Biocompatible Structures? *Pharmaceutics* 2023;15(3).
174. Devasena T, Francis AP, Ramaprabhu S. Toxicity of Graphene: An Update [Internet]. In: de Voogt P, editor. *Reviews of Environmental Contamination*

- and Toxicology Volume 259. Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 51–76. Available from: [https://doi.org/10.1007/398\\_2021\\_78](https://doi.org/10.1007/398_2021_78)
175. Liao C, Li Y, Tjong SC. Graphene nanomaterials: Synthesis, biocompatibility, and cytotoxicity. *Int J Mol Sci* 2018;19(11).
  176. Liao KH, Lin YS, MacOsco CW, Haynes CL. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *ACS Appl Mater Interfaces* 2011;3(7):2607–15.
  177. Mahmoudi M, Azadmanesh K, Shokrgozar MA, Journeay WS, Laurent S. Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle. *Chem Rev* [Internet] 2011;111(5):3407–32. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr1003166>
  178. Moghaddam AB, Moniri M, Azizi S, et al. Eco-friendly formulated zinc oxide nanoparticles: Induction of cell cycle arrest and apoptosis in the MCF-7 cancer cell line. *Genes (Basel)* 2017;8(10).
  179. Pan Z, Zhang X, Yu P, et al. Cinobufagin Induces Cell Cycle Arrest at the G2/M Phase and Promotes Apoptosis in Malignant Melanoma Cells. *Front Oncol* 2019;9(September):1–11.
  180. Hashemi E, Akhavan O, Shamsara M, et al. Graphene oxide negatively regulates cell cycle in embryonic fibroblast cells. *Int J Nanomedicine* 2020;15:6201–9.
  181. Wang Y, Xu J, Xu L, et al. Functionalized graphene oxide triggers cell cycle checkpoint control through both the ATM and the ATR signaling pathways. *Carbon N Y* [Internet] 2018;129:495–503. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.12.012>
  182. Pelin M, Fusco L, León V, et al. Differential cytotoxic effects of graphene and graphene oxide on skin keratinocytes. *Sci Rep* [Internet] 2017;7:1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep40572>
  183. Salesa B, Serrano-Aroca Á. Multi-layer graphene oxide in human keratinocytes: Time-dependent cytotoxicity, proliferation, and gene expression. *Coatings* 2021;11(4).
  184. Pelin M, Fusco L, Martín C, et al. Graphene and graphene oxide induce ROS production in human HaCaT skin keratinocytes: The role of xanthine oxidase and NADH dehydrogenase. *Nanoscale* 2018;10(25):11820–30.
  185. Creighton MA, Rangel-Mendez JR, Huang J, Kane AB, Hurt RH. Graphene-Induced Adsorptive and Optical Artifacts During In Vitro Toxicology Assays. *Small* [Internet] 2013;9(11):1921–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/sml.201202625>
  186. Duan G, Zhang Y, Luan B, et al. Graphene-Induced Pore Formation on Cell Membranes. *Sci Rep* 2017;7(February):1–12.

187. Li R, Guiney LM, Chang CH, et al. Surface Oxidation of Graphene Oxide Determines Membrane Damage, Lipid Peroxidation, and Cytotoxicity in Macrophages in a Pulmonary Toxicity Model. *ACS Nano* [Internet] 2018;12(2):1390–402. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.7b07737>
188. Cebadero-Domínguez O, Ferrández-Gómez B, Sánchez-Ballester S, Moreno J, Jos A, Cameán AM. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide and reduced graphene oxide on Caco-2 cells. *Toxicol Reports* 2022;9(May):1130–8.
189. Siqueira PR, Souza JP, Estevão BM, et al. Concentration- and time-dependence toxicity of graphene oxide (GO) and reduced graphene oxide (rGO) nanosheets upon zebrafish liver cell line. *Aquat Toxicol* [Internet] 2022;248:106199. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X22001254>
190. Chatterjee N, Eom H-J, Choi J. A systems toxicology approach to the surface functionality control of graphene–cell interactions. *Biomaterials* [Internet] 2014;35(4):1109–27. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961213012088>
191. Horváth L, Magrez A, Burghard M, Kern K, Forró L, Schwaller B. Evaluation of the toxicity of graphene derivatives on cells of the lung luminal surface. *Carbon N Y* [Internet] 2013;64:45–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000862231300626X>
192. Kucki M, Diener L, Bohmer N, et al. Uptake of label-free graphene oxide by Caco-2 cells is dependent on the cell differentiation status. *J Nanobiotechnology* [Internet] 2017;15(1):46. Available from: <http://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-017-0280-7>
193. Ma J, Liu R, Wang X, et al. Crucial Role of Lateral Size for Graphene Oxide in Activating Macrophages and Stimulating Pro-inflammatory Responses in Cells and Animals. *ACS Nano* [Internet] 2015;9(10):10498–515. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.5b04751>
194. Sun X, Liu Z, Welsher K, et al. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano Res* 2008;1(3):203–12.
195. Liu Z, Robinson JT, Sun X, Dai H. PEGylated Nanographene Oxide for Delivery of Water-Insoluble Cancer Drugs. *J Am Chem Soc* [Internet] 2008;130(33):10876–7. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja803688x>
196. Zhi X, Fang H, Bao C, et al. The immunotoxicity of graphene oxides and the effect of PVP-coating. *Biomaterials* [Internet] 2013;34(21):5254–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.03.024>
197. Agarwal S, Zhou X, Ye F, et al. Interfacing live cells with nanocarbon

- substrates. *Langmuir* 2010;26(4):2244–7.
198. Ruiz ON, Fernando KAS, Wang B, et al. Graphene oxide: a nonspecific enhancer of cellular growth. *ACS Nano* 2011;5(10):8100–7.
  199. Li N, Zhang X, Song Q, et al. The promotion of neurite sprouting and outgrowth of mouse hippocampal cells in culture by graphene substrates. *Biomaterials* [Internet] 2011;32(35):9374–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.065>
  200. Bansal K, Singh J, Dhaliwal AS. Synthesis and characterization of Graphene Oxide and its reduction with different reducing agents. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* [Internet] 2022;1225(1):012050. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/1225/1/012050>
  201. Liu W, Speranza G. Chemical Reduction of GO: Comparing Hydroiodic Acid and Sodium Borohydride Chemical Approaches by X-ray Photoelectron Spectroscopy. *C* [Internet] 2022;8(2):20. Available from: <https://www.mdpi.com/2311-5629/8/2/20>
  202. Park S, An J, Potts JR, Velamakanni A, Murali S, Ruoff RS. Hydrazine-reduction of graphite- and graphene oxide. *Carbon N Y* [Internet] 2011;49(9):3019–23. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008622311001965>
  203. Gurunathan S, Kim J. Synthesis, toxicity, biocompatibility, and biomedical applications of graphene and graphene-related materials. *Int J Nanomedicine* [Internet] 2016;11:1927–45. Available from: <https://www.dovepress.com/synthesis-toxicity-biocompatibility-and-biomedical-applications-of-gra-peer-reviewed-article-IJN>
  204. Zheng Y, Chen D, Li N, et al. Efficient simultaneous adsorption-biodegradation of high-concentrated N,N-dimethylformamide from water by *Paracoccus denitrificans*-graphene oxide microcomposites. *Sci Rep* 2016;6(February):1–11.
  205. Kim TH, Kim YW, Shin SM, Kim CW, Yu IJ, Kim SG. Synergistic hepatotoxicity of N,N-dimethylformamide with carbon tetrachloride in association with endoplasmic reticulum stress. *Chem Biol Interact* [Internet] 2010;184(3):492–501. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.029>
  206. Shieh D Bin, Chen CC, Shih TS, Tai HM, Wei YH, Chang HY. Mitochondrial DNA alterations in blood of the humans exposed to N,N-dimethylformamide. *Chem Biol Interact* 2007;165(3):211–9.
  207. Ban G, Hou Y, Shen Z, Jia J, Chai L, Ma C. Potential Biomedical Limitations of Graphene Nanomaterials. *Int J Nanomedicine* 2023;18(March):1695–708.
  208. Mishra S, Jindal T, Choudhary R. Going green and sustainable with graphene: A wider prospect. *Mater Today Proc* [Internet] 2023;73:372–5. Available

from: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.11.343>

209. Xu C, Shi X, Ji A, Shi L, Zhou C, Cui Y. Fabrication and characteristics of reduced graphene oxide produced with different green reductants. *PLoS One* 2015;10(12).
210. Singh J, Jindal N, Kumar V, Singh K. Role of green chemistry in synthesis and modification of graphene oxide and its application: A review study. *Chem Phys Impact [Internet]* 2023;6(October 2022):100185. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chphi.2023.100185>
211. Gurunathan S, Han JW, Eppakayala V, Kim JH. Biocompatibility of microbially reduced graphene oxide in primary mouse embryonic fibroblast cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces [Internet]* 2013;105:58–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.036>
212. Yan C, Hu X, Guan P, et al. Highly biocompatible graphene quantum dots: green synthesis, toxicity comparison and fluorescence imaging. *J Mater Sci [Internet]* 2020;55(3):1198–215. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10853-019-04079-2>
213. Dasgupta A, Sarkar J, Ghosh M, et al. Green conversion of graphene oxide to graphene nanosheets and its biosafety study. *PLoS One* 2017;12(2):1–20.
214. Gurunathan S, Han JW, Eppakayala V, Kim JH. Green synthesis of graphene and its cytotoxic effects in human breast cancer cells. *Int J Nanomedicine* 2013;8:1015–27.
215. Cherian RS, Sandeman S, Ray S, Savina IN, Ashtami J, Mohanan P V. Green synthesis of Pluronic stabilized reduced graphene oxide: Chemical and biological characterization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2019;179(March):94–106.
216. Baird L, Yamamoto M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Mol Cell Biol [Internet]* 2020;40(13):1–23. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1128/MCB.00099-20>
217. Gao W, Guo L, Yang Y, et al. Dissecting the Crosstalk Between Nrf2 and NF- $\kappa$ B Response Pathways in Drug-Induced Toxicity. *Front Cell Dev Biol* 2022;9(February):1–21.
218. Ahmed SMU, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis [Internet]* 2017;1863(2):585–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.005>
219. Hammad M, Raftari M, Cesário R, et al. Roles of Oxidative Stress and Nrf2 Signaling in Pathogenic and Non-Pathogenic Cells: A Possible General Mechanism of Resistance to Therapy. *Antioxidants* 2023;12(7).
220. Ulasov A V., Rosenkranz AA, Georgiev GP, Sobolev AS. Nrf2/Keap1/ARE



- signaling: Towards specific regulation. *Life Sci* [Internet] 2022;291(August 2021):120111. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.120111>
221. Ahad A, Al-Saleh AA, Akhtar N, Al-Mohizea AM, Al-Jenoobi FI. Transdermal delivery of antidiabetic drugs: formulation and delivery strategies. *Drug Discov Today* [Internet] 2015;20(10):1217–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2015.06.002>
  222. Hassan S, Prakash G, Bal Ozturk A, et al. Evolution and clinical translation of drug delivery nanomaterials. *Nano Today* [Internet] 2017;15(5):91–106. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748013217302062>
  223. Lovelyn C, Attama AA. Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. *J Biomater Nanobiotechnol* 2011;02(05):626–39.
  224. Devaraj A, Mahalingam G. Nanoemulsion Formulation as an Effective Therapeutic Drug Delivery System in Diabetes Mellitus [Internet]. In: *Green Nanoparticles Synthesis and Biomedical Application*. 2020. p. 317–29. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-39246-8\\_16](http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-39246-8_16)
  225. Agab Mohammed Hassan K, M Hassan KA, Ali Mujtaba M. Oral Nano-Emulsion of Fenugreek Oil for Treatment of Diabetes. *Artic Int J Pharm Sci Res* [Internet] 2017;8(7):3151. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/318402597>
  226. Prihapsara F, Harini M, Widiyani T, Artanti AN, Ani IL. Antidiabetic Activity of Self Nanoemulsifying Drug Delivery System from Bay Leaves ( *Eugenia polyantha* Wight) Ethyl Acetate Fraction. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* [Internet] 2017;176(1):012004. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/176/1/012004>
  227. Hussein J, El-Bana M, Refaat E, El-Naggar ME. Synthesis of carvacrol-based nanoemulsion for treating neurodegenerative disorders in experimental diabetes. *J Funct Foods* [Internet] 2017;37:441–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.011>
  228. Paul D, Dey TK, Mukherjee S, Ghosh M, Dhar P. Comparative prophylactic effects of  $\alpha$ -eleostearic acid rich nano and conventional emulsions in induced diabetic rats. *J Food Sci Technol* 2014;51(9):1724–36.
  229. Lotfy NM, Ahmed MA, El Hoffy NM, Bendas ER, Morsi NM. Development and optimization of amphiphilic self-assembly into nanostructured liquid crystals for transdermal delivery of an antidiabetic SGLT2 inhibitor. *Drug Deliv* [Internet] 2022;29(1):3340–57. Available from: <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2144546>



## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής δημοσιεύτηκαν σε δύο επιστημονικές δημοσιεύσεις σε Διεθνή περιοδικά. Οι δημοσιεύσεις είναι οι εξής:

- **Papanikolaou E**, Simos YV, Spyrou K, Tzianni EI, Vezyraki P, Tsamis K, Patila M, Tigas S, Prodromidis MI, Gournis DP, Stamatis H, Peschos D, Dounousi E. Is graphene the rock upon which new era continuous glucose monitors could be built? *Exp Biol Med* (Maywood). 2023 Jan;248(1):14-25. doi: 10.1177/15353702221134105. Epub 2022 Nov 19. PMID: 36408556; PMCID: PMC9989146.
- **Papanikolaou E**, Simos YV, Spyrou K, Patila M, Alatzoglou C, Tsamis K, Vezyraki P, Stamatis H, Gournis DP, Peschos D, Dounousi E. Does Green Exfoliation of Graphene Produce More Biocompatible Structures? *Pharmaceutics*. 2023 Mar 20;15(3):993. doi: 10.3390/pharmaceutics15030993. PMID: 36986854; PMCID: PMC10051938.

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής ανακοινώθηκαν με τη μορφή poster στα εξής συνέδρια:

- 8<sup>th</sup> International electronic conference on medicinal chemistry. 1-30 Νοεμβρίου 2022 (virtual).
- 48<sup>ο</sup> Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο. 12- 14 Μαΐου 2022, Αθήνα
- 20<sup>th</sup> International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN23). 4- 7 Ιουλίου 2023, Θεσσαλονίκη.

Μέρος των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής παρουσιάστηκε σε ομιλίες στα εξής συνέδρια:

- Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσιολογίας. 15- 16 Απριλίου 2022, Αθήνα
- 42<sup>ο</sup> Επιστημονικό Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιολογικών Επιστημών. 18- 20 Μαΐου 2023, Θεσσαλονίκη.
- Joint meeting of the Hellenic Society of Physiology, the Academy of Athens, the American Physiological Society & Physiological Reviews. 5- 6 Οκτωβρίου 2023, Αθήνα.

