



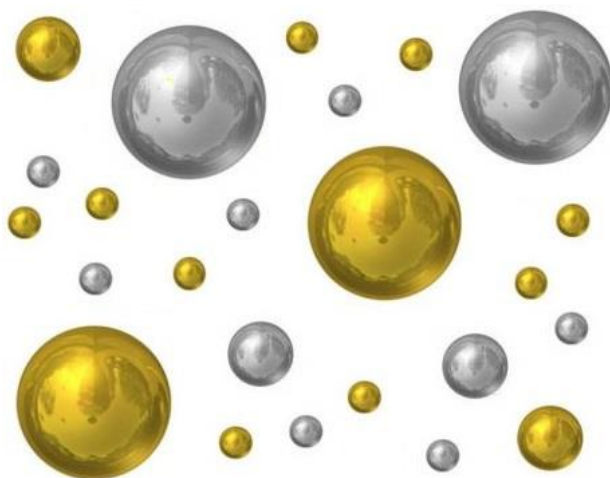
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ – ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

**«Μελέτη επίδρασης και εφαρμογές σφαιρικών
νανοσωματιδίων χρυσού και αργύρου σε ανθρώπινα
καρκινικά κύτταρα μέσω ανάλυσης μικροσυστοιχιών DNA.»**



Ιωάννης Καταγάς

Διπλωματούχος της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών
Επιστημών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

ΑΘΗΝΑ 2019



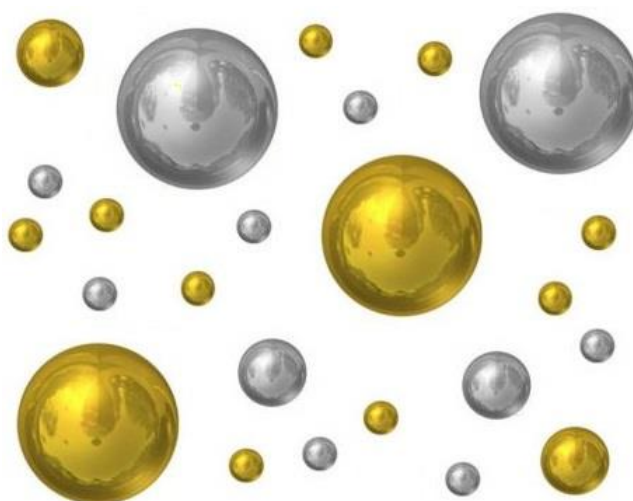
HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens

SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY

MASTER IN "BIOINFORMATICS"

Master Diploma Thesis

«Impact study and applications of spherical gold and silver nanoparticles on human cancer cells through DNA microarray analysis.»



IOANNIS KATAGAS

Diploma in Applied Mathematical and Physical Sciences
National Technical University of Athens

ATHENS 2019



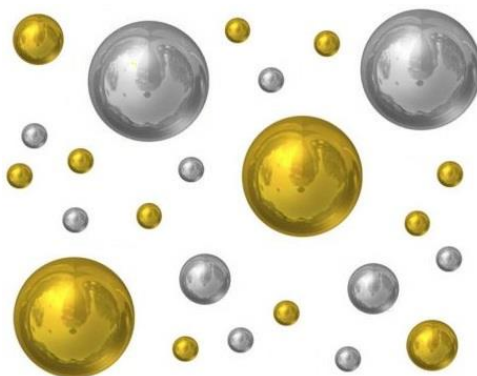
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

**«Μελέτη επίδρασης και εφαρμογές σφαιρικών
νανοσωματιδίων χρυσού και αργύρου σε ανθρώπινα
καρκινικά κύτταρα μέσω ανάλυσης μικροσυστοιχιών DNA.»**



Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Αναπληρωτής Καθηγητής Αλέξανδρος Γεωργακίλας,
*Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών
Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο*

Καθηγητής Κωνσταντίνος Βοργιάς
*Τμήμα Βιολογίας
Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

Καθηγητής Παντελής Μπάγκος
*Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Σαν ένα ελάχιστο δείγμα ευγνωμοσύνης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με στήριξαν σε ηθικό και πρακτικό επίπεδο για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ένα θερμό ευχαριστώ στον κύριο Γεωργακίλα Αλέξανδρο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την εκπόνηση αυτής της εργασίας καθώς και για την άρτια συνεργασία μας.

Επιπλέον, στον κύριο Θεοφιλάτο Κωνσταντίνο , που μου επέτρεψε την χρήση της πλατφόρμα InSyBio και για την καθοδήγησή του σε βιοπληροφορικά θέματα, όπως επίσης και την κυρία Κορφιάτη Αίγλη για τον χρόνο της και την βοήθεια της σε λειτουργικά θέματα της πλατφόρμας.

Στις ευχαριστίες δεν θα μπορούσα να παραλείψω όλους τους παράγοντες που βοήθησαν να γίνει αυτό το Π.Μ.Σ. πραγματικότητα και να συνεχίζει την εύρυθμη λειτουργία του, και ιδιαιτέρως τον κύριο Βοργιά Κωνσταντίνο, ο οποίος ήταν πάντα στο πλευρό των φοιτητών διατελώντας διευθυντής του Π.Μ.Σ., που αποδέχτηκε να συμμετέχει στην τριμελή επιτροπή εξέτασης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Για την αποδοχή της πρόσκλησης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον κύριο Μπάγκο Παντελή , καθώς και όλη την επιτροπή για τον χρόνο που διέθεσαν στην ανάγνωση και παρουσίαση της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ τους ανθρώπους που είναι στην ζωή μου, οικογένεια και φίλους, που για ακόμα μια φορά ήταν παρόντες έμπρακτα σε αυτό μου το εγχείρημα.

Ιωάννης Καταγάς

Στο αρκουδάκι

The saddest aspect of life right now is that
science gathers knowledge faster than society gathers wisdom.

Isaac Asimov

Περιεχόμενα

Περίληψη	3
Abstract.....	4
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	5
1.1: Νανοτεχνολογία.....	5
1.1.1: Γενικά	5
1.1.2: Νανοϋλικά.....	6
1.1.3: Ταξινόμηση Νανοϋλικών	7
1.1.4: Τεχνικές παραγωγής νανοϋλικών.....	9
1.2: Μικροσυτοιχίες (Microarrays).....	12
1.2.1: Γενικά	12
1.2.2: Αποθετήρια δεδομένων	14
1.3: Περί βιοπληροφορικής	16
Κεφάλαιο 2: Υλικά - Δεδομένα	17
2.1: Νανοςωματίδια Χρυσού (AuNPs).....	17
2.1.1: Ιστορική αναδρομή.....	17
2.1.2: Φυσικές και χημικές ιδιότητες AuNPs.....	18
2.1.3: Σύνθεση AuNPs	21
2.1.4: Βιοενεργοποίηση επιφανειών AuNPs	23
2.1.5: Βιολογικές εφαρμογές AuNPs	25
2.1.6: Κυτταροτοξικότητα AuNPs.....	30
2.2: Νανοςωματίδια Αργύρου (AgNPs)	32
2.2.1: Σύνθεση AgNPs	33
2.2.2: Βιολογικές εφαρμογές AgNPs.....	34
2.2.3: Κυτταροτοξικότητα AgNPs.....	38
2.3: Κυτταρική Σειρά Caco-2.....	40
2.4: Δεδομένα Μικροσυτοιχιών	41
2.4.1: Αναζήτηση δεδομένων	41
2.4.2: GSE55349	43
2.4.3: GSE62253	45
2.4.4: GSE84982	47
Κεφάλαιο 3: Εργαλεία – Μέθοδος	50
3.1: Στατιστικοί έλεγχοι	50
3.1.1: Kruskal–Wallis H-test (one-way ANOVA on ranks)	50
3.1.2: Mann-Whitney U-test (Wilcoxon Rank Sum test).....	52

3.1.3: Student T-test	54
3.1.4: Fold Change.....	55
3.2: Ιστότοποι.....	56
3.2.1: Gene Expression Omnibus (GEO).....	56
3.2.2: InSyBio Suite	58
3.2.3: DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery).....	65
3.2.4: STRING	68
3.3: Μέθοδος	71
Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα - Συζήτηση	73
4.1: Αποτελέσματα	73
4.2.1: GSE55349	77
4.2.2: GSE62253	81
4.2.3: GSE84982	85
4.2: Συζήτηση	91
4.2.1: AuNPs.....	91
4.2.2: AgNPs	93
Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα.....	97
Ευρετήριο Εικόνων	99
Ευρετήριο Διαγραμμάτων	101
Ευρετήριο Πινάκων.....	102
Βιβλιογραφία.....	103

Περίληψη

Η νανοτεχνολογία είναι μια επιστήμη η οποία μετρά λιγότερο από πενήντα χρόνια. Η επιστήμη αυτή έχει επιτρέψει στον άνθρωπο να κατασκευάσει και να μελετήσει υλικά σε μικροσκοπικές διαστάσεις. Όταν οι διαστάσεις γίνουν μικρότερες των 100nm τότε η ύλη αλλάζει ιδιότητες και συμπεριφορά καθώς οι κβαντικοί νόμοι υπερισχύουν. Στην παρούσα μελέτη αρχικά γίνεται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση των πρόσφατων επιτευγμάτων του ανθρώπου, με τη βοήθεια της νανοτεχνολογίας σε βιολογικό και κλινικό επίπεδο, που έγιναν αξιοποιώντας τις ιδιότητες νανοσωματιδίων χρυσού και αργύρου. Στη συνέχεια γίνεται συνδυαστική μελέτη δεδομένων μικροσυστοιχιών DNA με σκοπό την ανεύρεση πιθανών νανοσωματιδιακά επαγόμενων μηχανισμών ή βιολογικών φαινομένων σχετιζόμενων με έκθεση κυττάρων σε νανοσωματίδια.

Αρχικό βήμα της μεθόδου εργασίας ήταν η εύρεση πρωτογενών ερευνητικών δεδομένων. Για τη συλλογή των δεδομένων αξιοποιήθηκε το αποθετήριο GEO και επιλέχθηκαν οι σειρές δεδομένων GSE55349, GSE62253 και GSE84982, κυρίως λόγω ίδιου κυτταρικού τύπου (Caco-2) και ακατέργαστων νανοσωματιδίων. Για την ανάλυση των δεδομένων αξιοποιήθηκε ένας αλγόριθμος που πραγματοποίησε έλεγχο Kruskal-Wallis για εύρεση πιθανά στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων, ανά δύο συγκρίσεις Paired-Wilcoxon, καθώς και διορθώσεις Benjamini. Έπειτα, με τη χρήση της σουίτας InSyBio έγινε ανάλυση διαφορικής έκφρασης με τη χρήση μη παραμετρικών (Wilcoxon Rank Sum test) και παραμετρικών μεθόδων (Student T-test). Η τελική επιλογή των γονιδίων έγινε με περιορισμό στο fold change. Στη συνέχεια έγινε λειτουργικός εμπλουτισμός με το εργαλείο DAVID, έλεγχος για σημεία πρόσδεσης miRNAs στα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια και κατασκευή δικτύων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων των περισσότερο διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων με το εργαλείο STRING.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης για την επίδραση των νανοσωματιδίων σε κύτταρα Caco-2 φάνηκε ότι επηρεάζονται από τον τύπο υλικού, το μέγεθος και το χρόνο δειγματοληψίας. Επιπρόσθετα, η κύρια επίδραση των νανοσωματιδίων φαίνεται να είναι η υπερέκφραση γονιδίων που συνδέονται με την αρνητική ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης, την ενεργοποίηση μηχανισμών απόκρισης στο οξειδωτικό στρες και την απόκριση των κυττάρων σε μέταλλα. Συν τοις άλλοις, φαίνεται πολλά από τα υπερεκφρασμένα γονίδια να ανήκουν σε καταρράκτες αντιδράσεων που διαμεσολαβούνται από το μεταγραφικό παράγοντα Nrf2.

Ακόμα, δεν βρέθηκαν μηχανισμοί που να σχετίζονται αυστηρά με νανοσωματίδια, επειδή ο άργυρος φαίνεται να επιδρά στα κύτταρα το ίδιο, είτε σε σωματιδιακή είτε σε ιοντική μορφή. Συγκρίνοντας την βιοδραστικότητα των δύο μετάλλων (χρυσός, άργυρος), τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ενώ ο χρυσός όταν είναι σε μορφή μεγαλύτερων νανοσωματιδίων φαίνεται να είναι βιολογικά αδρανής ακόμα και μέσα στο κύτταρο, ο άργυρος δε φαίνεται να αλλάζει βιοδραστικότητα ανάλογα με το μέγεθος των νανοσωματιδίων, ενώ φαίνεται να επηρεάζει τα κύτταρα βρισκόμενος κυρίως εξωτερικά, καθώς δεν εμφανίζει μεγάλο ποσοστό πρόσληψης.

Σαν συμπέρασμα, οι πολλές μεταβλητές που αλλάζουν μεταξύ των τριών σειρών δεδομένων, όπως η πλατφόρμα, η διαφοροποίηση των κυττάρων και ο χρόνος δειγματοληψίας, καθιστούν τέτοιου είδους αναλύσεις ένα έργο δύσκολο και πολλές φορές ανακριβές. Με βάση το παραπάνω, ο σχεδιασμός νέων μελετών κρίνεται αναγκαίος και απαραίτητος καθώς και η διενέργεια περαιτέρω αναλύσεων για την ακρίβη αποσαφήνιση των επιδράσεων των νανοσωματιδίων στα κύτταρα, σε σχέση με το υλικό, το μέγεθός τους και τις αιτίες πίσω από την κάθε επίδραση.

Abstract

Nanotechnology is a science counting less than fifty years. This science has allowed humans to manufacture and study materials in the smallest of dimensions. When dimensions become smaller than 100nm, matter behaves differently, and its properties and behavior change as quantum laws prevail. In the current study, firstly there is a review of the most recent achievements on a biological and clinical level using nanotechnology, which were accomplished by making use of gold and silver nanoparticles' properties. Following is a combined study of DNA microarrays data, with the aim of finding possible nanoparticle activated mechanisms or biological phenomena correlated to nanoparticle exposure.

The method followed was firstly to find and pick the raw data. For that reason, GEO repository was used and the data from the series GSE55349, GSE62253 and GSE84982 was selected, mainly because of their matching cell type matching (Caco-2) and crude nanoparticles. As far as data analysis in concerned, a Kruskal-Wallis algorithm was used to find possible statistically important differentially expressed genes, as well as Paired-Wilcoxon comparisons and Benjamini corrections. Then, by using the InSyBio platform, a differential expression analysis was carried out by using non-parametrical (Wilcoxon Rank Sum test) and parametrical methods (Student T-test). The final gene selection was made by fold change limitation. Up next was the functional annotation of DEGs by using DAVID, miRNA binding sites checking and construction of protein-protein interaction networks of the most differentially expressed genes by using STRING.

The analysis results for the effects of nanoparticles on Caco-2 cells seem to be affected by the material type, the size and the sampling time. In addition, the main effect of nanoparticles seems to be the upregulation of genes correlated to negative cell growth regulation, activation of response mechanisms to oxidative stress and cell response to metals. Moreover, many of the upregulated genes seem to belong to Nrf2 transcription factor mediated signaling cascades.

Furthermore, no strictly nanoparticle correlated mechanisms were discovered, because silver seems to affect cells the same, whether in nanoparticle or ionic form. When comparing the bioreactivity of the two metals (gold, silver), the results suggest that while gold seems to be biologically inert even when inside the cell if it is in the form of bigger nanoparticles, silver does not seem to change its bioreactivity according to particle size, while on the same time seems to affect the cells by being mostly outside, as its cellular uptake is very low.

To conclude, the many variables that are different between the three selected data series, such as the platform, the cell differentiation and the sampling time, render such kind of analysis difficult and more often than not inaccurate. On this basis, the design of new studies is deemed indispensable and necessary, as well as the carrying out of further analysis for the accurate clarification of nanoparticles' effects on cells, due to their material, size and underlying mechanisms behind each effect.

Λέξεις-κλειδιά – Key words:

νανοσωματίδια χρυσού, νανοσωματίδια αργύρου, κύτταρα caco-2, διαφορική έκφραση γονιδίων, βιοπληροφορική, ανάλυση μικροσυστοιχιών, βιολογικές εφαρμογές, κλινικές εφαρμογές,

gold nanoparticles, silver nanoparticles, caco-2 cells, differential expression of genes, bioinformatics, microarray analysis, biological applications, clinical applications, AuNPs, GNPs, AgNPs

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1: Νανοτεχνολογία

1.1.1: Γενικά

Ο όρος *νανοτεχνολογία* αναφέρεται σε κάθε τεχνολογία στο επίπεδο της νανοκλίμακας, πιο συγκεκριμένα, περιλαμβάνει την έρευνα και την ανάπτυξη τεχνολογιών σε ατομικό, μοριακό ή μακρομοριακό επίπεδο σε κλίμακα από 1 – 100 nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). [1]

Το πεδίο της νανοτεχνολογίας παρουσιάστηκε για πρώτη φορά στα μέσα του προηγούμενου αιώνα από τον Richard P. Feynman κατά την διάσημη διάλεξη του “There’s Plenty of Room at the Bottom”: *“Θα ήθελα να σας μιλήσω για ένα επιστημονικό και τεχνολογικό πεδίο, στο οποίο λίγα έχουν γίνει μέχρι σήμερα, πολλά μπορούν όμως να επιτευχθούν. Αυτό το πεδίο δεν μοιάζει με τα ήδη ανεπτυγμένα επιστημονικά πεδία που θεμελίωσαν της βασικές θεωρίες που γνωρίζουμε σήμερα στην επιστημονική κοινότητα. Προσφέρει όμως σημαντικές πληροφορίες σχετικά με φαινόμενα που παρατηρούνται σε ιδιαίτερες περιπτώσεις και καταστάσεις και θα αποτελέσει βάση για την ανάπτυξη των εφαρμογών του μέλλοντος. Θα σας μιλήσω για τον χειρισμό, τον έλεγχο και την σταθεροποίηση της ύλης σε μικρότερη κλίμακα.”*[2]

Ο όρος Νανοτεχνολογία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Norio Taniguchi το 1974 στο Διεθνές Συνέδριο Μηχανικής Ακρίβειας (ICPE) [3] αναφερόμενος στις αλλαγές που παρατηρούνται στα υλικά στο επίπεδο της νανοκλίμακας. Πράγματι, καθώς οι διαστάσεις κάποιου υλικού μειώνονται σταδιακά, αρχικά οι ιδιότητες του παραμένουν οι ίδιες, όταν όμως μία από τις διαστάσεις του υλικού γίνει μικρότερη από 100 nm τότε συνήθως παρατηρούνται μεγάλες αλλαγές στις ιδιότητες του υλικού [4]. Οι ιδιότητες της ύλης στο επίπεδο της νανοκλίμακας είναι κβαντικής φύσεως, συνεπώς διαφέρουν από τις ιδιότητες των μεγεθών που συναντώνται στο μακρόκοσμο [5].

1.1.2: Νανοϋλικά

Ως **νανοϋλικό** χαρακτηρίζεται ένα αντικείμενο που έχει τουλάχιστον μία από τις διαστάσεις του στην νανοκλίμακα (περίπου 1-100nm) [6]. Πιο συγκεκριμένα, ο όρος **νανοϋλικό** αναφέρεται σε ένα φυσικό, προκύπτον ή κατασκευασμένο (natural, incidental or manufactured) υλικό στο οποίο περιέχονται σωματίδια είτε σε μη δεσμευμένη μορφή είτε ως σύμπτυγμα ή συσσωμάτωμα (aggregate or agglomerate) και στο οποίο τουλάχιστον το 50% των σωματιδίων έχουν μία ή περισσότερες διαστάσεις σε κλίμακα μεγέθους 1 nm – 100 nm. [7]

Συνήθως, για την ταξινόμηση των νανοϋλικών χρησιμοποιούνται γνωρίσματα, όπως οι διαστάσεις τους, η χημική σύνθεσή τους, η διαδικασία παραγωγής τους, τα πεδία εφαρμογής τους, κ.τ.λ.

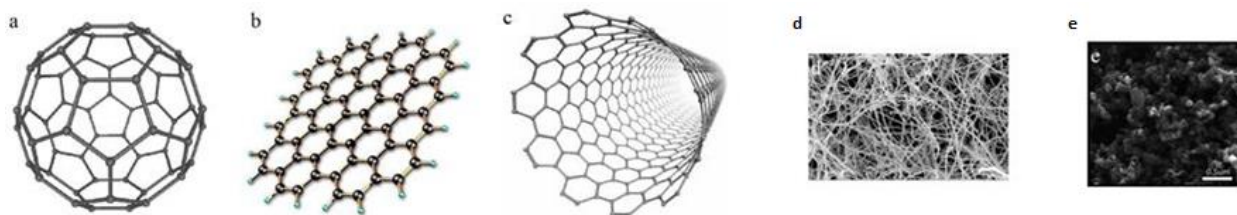
Τα νανοϋλικά κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τις διαστάσεις τους, σύμφωνα με την ταξινόμηση των Pokropivny and Skorokhod σε 0D, 1D, 2D και 3D. Η ταξινόμηση αυτή εξαρτάται άμεσα από τις κινήσεις των ηλεκτρονίων εντός των διαστάσεων του νανοϋλικού. Για παράδειγμα, τα ηλεκτρόνια στα 0 D νανοϋλικά είναι παγιδευμένα σε έναν χώρο χωρίς διαστάσεις, ενώ στα 1 D μπορούν να κινηθούν στον x-άξονα. Ομοίως στα 2 D και 3 D νανοϋλικά τα ηλεκτρόνια επιτρέπεται να κινούνται στους x-y άξονες και στους x, y, z αντιστοίχως. [8]

Ως **νανοσωματίδιο** ορίζεται το νανοαντικείμενο με τρεις εξωτερικές διαστάσεις στην νανοκλίμακα. Ο όρος **νανοραβδίο** ή **νανοπλάκα** υιοθετούνται, αντί του **νανοσωματιδίου** όταν τα μήκη του μεγαλύτερου και του μικρότερου άξονα του νανοαντικειμένου διαφέρουν. Τα νανοσωματίδια μπορεί να λάβουν οποιαδήποτε ταξινόμηση ανάλογα με τις διαστάσεις τους (0D, 1D, 2D και 3D) [9].

1.1.3: Ταξινόμηση Νανοϋλικών

Τα περισσότερα νανοσωματίδια και νανοϋλικά μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με την χημική τους σύνθεση σε νανοϋλικά που έχουν ως βάση τον άνθρακα (Carbon-based nanomaterials), ανόργανα νανοϋλικά (Inorganic-based nanomaterials), οργανικά νανοϋλικά (Organic-based nanomaterials) και σύνθετα νανοϋλικά (Composite-based nanomaterials)

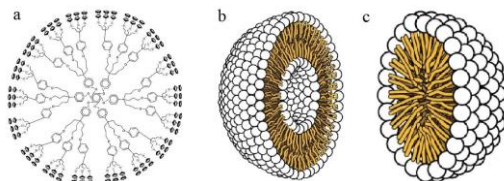
- i. Νανοϋλικά που έχουν ως βάση τον άνθρακα (Carbon-based nanomaterials): Γενικά αυτά τα νανοϋλικά ανευρίσκονται σε μορφολογίες όπως κενοί σωλήνες, ελλειψοειδή και σφαίρες. Τα φουλερένια, οι νανοσωλήνες άνθρακα, τα γραφένια, τα κρεμμύδια άνθρακα (carbon onions) και ο μαύρος άνθρακας (carbon black) συμπεριλαμβάνονται σε αυτή την κατηγορία.



Εικόνα 1: Νανοσωματίδια που έχουν ως βάση τον άνθρακα: a – φουλερένιο, b – γραφένιο, c – νανοσωλήνας άνθρακα, d – νανοϊνες άνθρακα και e - μαύρος άνθρακας [10].

- ii. Ανόργανα νανοϋλικά (Inorganic-based nanomaterials): Περιλαμβάνουν μεταλλικά νανοσωματίδια και νανοϋλικά καθώς και νανοσωματίδια και νανοϋλικά οξειδίων μετάλλων. Μπορούν να συντεθούν από μέταλλα όπως χρυσό (Au) και άργυρο (Ag), οξείδια μετάλλων όπως TiO_2 και ZnO καθώς ημιαγωγούς όπως πυρίτιο και κεραμικά. Τα μεταλλικά νανοσωματίδια έχουν ιδιαίτερες ιδιότητες όπως εξαιρετικά μικρό μέγεθος (10-100 nm) και επιφανειακά χαρακτηριστικά, όπως υψηλό λόγο επιφάνειας προς όγκο, μέγεθος πόρων, φορτίο επιφάνειας και πυκνότητα φορτίου επιφάνειας. Λαμβάνουν ιδιαίτερες κρυσταλλικές ή άμορφες δομές και σχήματα τα οποία μπορεί να είναι σφαιρικά ή κυλινδρικά, ενώ έχουν ιδιαίτερο χρώμα καθώς και ευαισθησία σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως ο αέρας η υγρασία η ζέστη και το ηλιακό φως. Τα νανοϋλικά που έχουν ως βάση οξείδια μετάλλων συνήθως συντίθενται εξαιτίας της αύξημένης αντιδραστικότητας (reactivity) και αποτελεσματικότητας (efficiency) τους.
- iii. Οργανικά νανοϋλικά (Organic-based nanomaterials): Τα νανοϋλικά αυτά κατασκευάζονται κατά κύριο λόγο από οργανική ύλη. Η επιστράτευση μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων για την αυτό-διάταξη των μορίων, βοηθά ώστε να μεταμορφωθούν τα οργανικά νανοϋλικά στις επιθυμητές δομές, όπως δενδριμερή, μικκύλια, λιποσώματα και πολυμερή. Αυτά τα βιοϋλικά είναι βιοδιασπώμενα, μη-τοξικά ενώ ορισμένες δομές όπως τα μικκύλια και τα λιποσώματα έχουν κενό πυρήνα και είναι ευαίσθητα στη θερμότητα και την ηλεκτρομαγνητική

ακτινοβολία. Αυτά τα μοναδικά χαρακτηριστικά τα κάνουν ιδανική επιλογή για φορείς φαρμάκων.

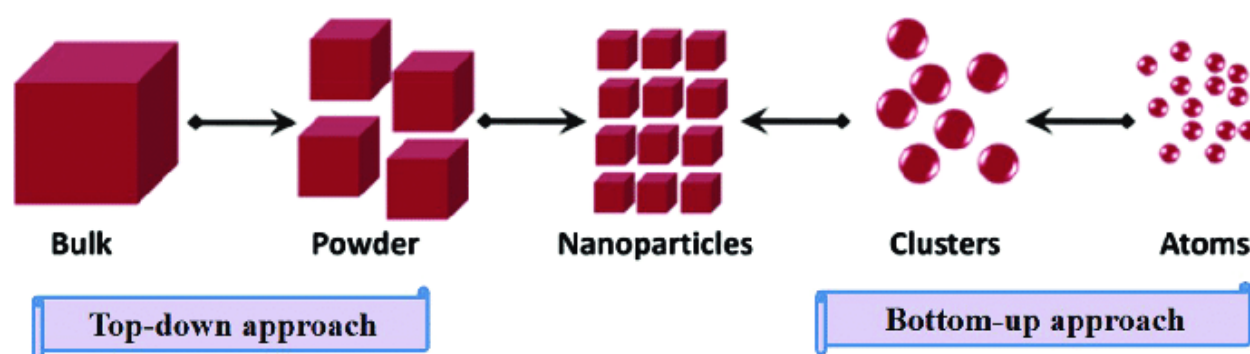


Εικόνα 2: Οργανικά νανοσωματίδια: *a* – Δενδριμερές, *b* – Λιπόσωμα and *c* – μικύλλιο [10].

- iv. **Σύνθετα νανοϋλικά (Composite-based nanomaterials):** Τα σύνθετα νανοϋλικά αποτελούν ένα κράμα στο οποίο μπορεί να συνδυάζεται τουλάχιστον ένα στοιχείο στην νανοκλίμακα είτε με άλλο νανοϋλικό είτε με κάποιο μεγαλύτερης κλίμακας υλικό. Στην κατηγορία αυτή μπορεί να μετέχει οποιοδήποτε από τα ανωτέρω νανοϋλικά με οποιοδήποτε μέταλλο, πολυμερές ή κεραμικό. Τα νανοϋλικά κατασκευάζονται σε διάφορες μορφολογίες ώστε να έχουν τις απαιτούμενες ιδιότητες για τις επιθυμητές χρήσεις [10, 11].

1.1.4: Τεχνικές παραγωγής νανοϋλικών

Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες τεχνικών παραγωγής νανοϋλικών. Η πρώτη από αυτές αναφέρεται ως «από κάτω προς τα κάτω» προσέγγιση (bottom-up approach) ή επαγωγικές μέθοδος. Ο τρόπος παραγωγής της τεχνικής αυτής είναι να γίνει ο κατάλληλος συνδυασμός μικρότερων δομών, ώστε να δημιουργηθεί μία μεγάλη πολύπλοκη δομή. Η δεύτερη από αυτές αναφέρεται ως «από πάνω προς τα κάτω» προσέγγιση (top-down approach) ή παραγωγική μέθοδος. Η τεχνική top-down είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα υλικό μεγάλων διαστάσεων χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη με στόχο να κατακερματιστεί σε μικρότερες δομές με τη βοήθεια κατάλληλων διεργασιών. Οι τεχνικές περιγράφονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα:



Εικόνα 3: Top-down και bottom-up προσεγγίσεις για τη σύνθεση νανοσωματιδίων [12].

Τεχνικές Bottom-Up

Ορισμένες από τις διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των νανοϋλικών είναι η επεξεργασία της κολλοειδούς γέλης (sol – gel processing), η χημική εναπόθεση ατμών (chemical vapour deposition, CVD), η ατομική ή μοριακή συμπύκνωση, κ.τ.λ.

Η **τεχνική της κολλοειδούς γέλης (sol-gel)** είναι μία βιομηχανική διαδικασία η οποία περιλαμβάνει την παραγωγή πηκτωμάτων από ένα υγρό κολλοειδές διάλυμα. Τα κύρια πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η τεχνική αυτή για την παραγωγή των υλικών είναι οι χαμηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται κατά τη διαδικασία αυτή, η ικανότητα προσαρμογής της σε πολλές διαφορετικές εφαρμογές καθώς και η απλότητα της. Επίσης, η διαδικασία αυτή επιτρέπει στους επιστήμονες να ελέγχουν με ευκολία το σχήμα του παραγόμενου νανοϋλικού και τους δίνει τη δυνατότητα ενσωμάτωσης και άλλων υλικών εάν αυτό κριθεί απαραίτητο .

Η **τεχνική χημικής εναπόθεσης ατμών** είναι μία χημική διαδικασία που κύριο σκοπό έχει τη σύνθεση υλικών υψηλής καθαρότητας και επιδόσεων. Η χημική αυτή διαδικασία χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον στη σύνθεση λεπτών υμενίων για την κατασκευή ημιαγωγών. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής ένα υπόστρωμα, που είναι και το αρχικό υλικό από το οποίο θα παραχθεί η ζητούμενη δομή, τοποθετείται σε ένα θάλαμο κενού. Η χημική διαδικασία πραγματοποιείται μεταξύ του υποστρώματος και κάποιου καταλύτη σε αέρια μορφή. Η διαδικασία αυτή μπορεί να ενεργοποιηθεί με την αύξηση της θερμοκρασίας του υποστρώματος ή με την εναπόθεση πλάσματος (σύνολο θετικών ιόντων και ηλεκτρονίων μέσα σε πλήθος ουδέτερων ατόμων) πάνω στο υπόστρωμα. Από αυτήν τη διαδικασία μπορεί να παραχθούν και άλλα υποπροϊόντα τα οποία και αφαιρούνται από το θάλαμο μέσω ροής αέρα.

Η **επιταξία μοριακών δεσμών** (Molecular Beam Epitaxy, MBE), είναι και αυτή μία διαδικασία για τη σύνθεσης μίας νανοδομής, κατά την οποία το κύριο σώμα από το οποίο θα κατασκευαστεί η νανοδομή τοποθετείται μέσα σε ένα θάλαμο κενού. Στο θάλαμο κενού υπάρχουν και κάποιοι σωλήνες οι οποίοι περιέχουν χημικά στοιχεία που θα πρέπει να περιέχει η συγκεκριμένη νανοδομή. Οι σωλήνες αυτοί, στη συνέχεια, θερμαίνονται με αποτέλεσμα τα χημικά στοιχεία να κατευθύνονται προς το κύριο σώμα της νανοδομής όπου και αλληλεπιδρούν με αυτή. Για να επιτευχθεί η ομοιόμορφη εναπόθεση των χημικών στοιχείων πάνω στο κύριο σώμα της δομής, αυτό τοποθετείται σε ένα δίσκο ο οποίος περιστρέφεται καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

Μία διαδικασία σύνθεσης νανοϋλικών η οποία απαντάται και στη φύση είναι η κατασκευή νανοδομών με **αυτοδιάταξη** (self-assembly). Η αυτοδιάταξη είναι η διαδικασία κατά την οποία ορισμένα μόρια ενώνονται μεταξύ τους χωρίς την καθοδήγηση ή τον έλεγχο από κάποιον εξωτερικό παράγοντα. Κατά τη διαδικασία της αυτοδιάταξης ένα μεμονωμένο δομικό στοιχείο, άτομο ή μόριο, περιέχει τις απαραίτητες πληροφορίες ώστε να σχηματίσει μία δομή υπό τις σωστές συνθήκες (συγκέντρωση, θερμοκρασία κλπ.) η οποία θα αποτελείται από πολλά όμοια στοιχεία. Η τελική δομή που σχηματίζεται περιλαμβάνει τόσο τη δομή όσο και τις ιδιότητες των επιμέρους στοιχείων από τα οποία κατασκευάστηκε. Με τη διαδικασία της αυτοδιάταξης φαίνεται να σχηματίζονται υλικά τα οποία παρουσιάζουν λιγότερες κατασκευαστικές ατέλειες σε σχέση με τις υπόλοιπες κατασκευαστικές μεθόδους [12, 13].

Η **βιοσύνθεση** αποτελεί μια οικολογική και περιβαλλοντικά φιλική προσέγγιση για την σύνθεση μη-τοξικών και βιοδιασπώμενων νανοσωματιδίων. Η βιοσύνθεση χρησιμοποιεί βακτήρια, εκχυλίσματα φυτών μύκητες κτλ. μαζί με πρόδρομα υλικά για την παραγωγή νανοσωματιδίων. Τα νανοσωματίδια που παράγονται με αυτή την τεχνική παρουσιάζουν μοναδικές και ενισχυμένες ιδιότητες με ευρεία εφαρμογή στην βιοϊατρική [10].

Τεχνικές Top-Down

Η τεχνική Top-Down στον αντίποδα της τεχνικής Bottom-Up επιδιώκει τη σύνθεση νανοδομών από μεγαλύτερα σε μέγεθος υλικά τα οποία με τη βοήθεια εξωτερικών μηχανισμών κατακερματίζονται ώστε να αποκτήσουν τις επιθυμητές ιδιότητες και μέγεθος μίας νανοδομής. Ορισμένες από τις διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή νανοϋλικών είναι η ιοντική λείανση, η λιθογραφία, κ.τ.λ. Οι διαδικασίες αυτές λαμβάνουν χώρα σε ένα περιβάλλον αδρανούς ατμόσφαιρας ή στο κενό. Αμέσως μετά το τέλος των διαδικασιών αυτών οι δομές που κατασκευάζονται είναι ακόμη ενεργές με αποτέλεσμα να υπάρχει η δυνατότητα να σχηματίσουν συσσωματώματα. Για να τερματιστεί η διαδικασία αλληλεπίδρασης του κατασκευασμένου υλικού με το περιβάλλον ή με κάποιες χημικές ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν κατά την παραγωγή του, η νανοδομή καλύπτεται με ένα αδρανές αέριο.

Η **λιθογραφία** (lithography) είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην κατασκευή νανοδομών. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας στο υπόστρωμα τοποθετείται ένα υμένιο το οποίο περιλαμβάνει τη χημική ένωση από την οποία θα προέλθει τελικά η νανοδομή. Πάνω από το υμένιο τοποθετείται ένα φωτοευαίσθητο πολυμερές και μία μάσκα στο σχήμα της επιθυμητής νανοδομής, η οποία περιέχει διαφανείς και αδιαφανείς περιοχές. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια φωτός χαράσσεται το υμένιο, μόνο στις διαφανείς περιοχές της μάσκας ώστε να προκύψει το

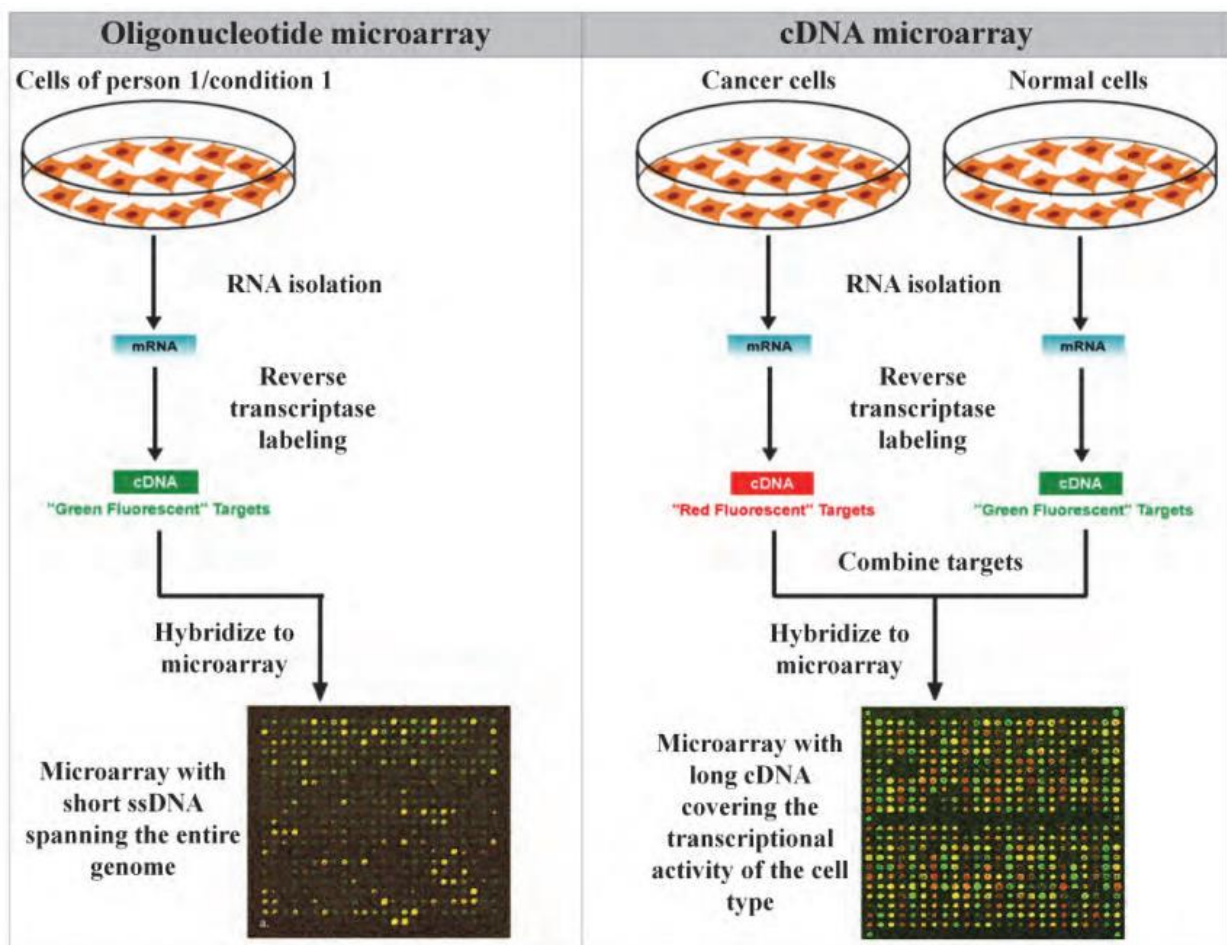
σχήμα της νανοδομής. Το πολυμερές χρησιμοποιείται για την προστασία του υμενίου. Για να απομακρυνθούν τα περιττά κομμάτια της διάταξης που δεν προστατεύονται από το πολυμερές χρησιμοποιείται οξύ. Η τελική νανοδομή προκύπτει αφού προστεθεί ακετόνη ώστε να διασπάσει και το φωτοευαίσθητο πολυμέρες που έχει απομείνει στη δομή. Υπάρχουν διάφορα είδη λιθογραφίας, όπως η λιθογραφία με ακτίνες Χ, η λιθογραφία με δέσμη ηλεκτρονίων, κ.τ.λ.

Μία ακόμη Top-Down τεχνική είναι η **ιοντική λείανση** (Ion milling). Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας χρησιμοποιείται πλάσμα το οποίο αφαιρεί την κατάλληλη ποσότητα ενός υλικού, το οποίο διαθέτει τις επιθυμητές ιδιότητες για τη ζητούμενη νανοδομή, και την τοποθετεί πάνω σε ένα υπόστρωμα. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα σε ένα θάλαμο κενού με το υπόστρωμα να είναι τοποθετημένο μέσα στο θάλαμο αλλά ηλεκτρικά απομονωμένο από αυτόν. Το πλάσμα σε αυτήν την περίπτωση δημιουργείται εξαιτίας του ιονισμού των ατόμων του αερίου που βρίσκονται μέσα στο θάλαμο. Ο ιονισμός επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ενός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου. Με την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου τα θετικά ιόντα του πλάσματος συγκρούονται με την επιφάνεια του υποστρώματος ώστε να επιτευχθεί η εγχάραξη της [12, 13].

1.2: Μικροσυστοιχίες (Microarrays)

1.2.1: Γενικά

Οι μικροσυστοιχίες (microarrays) είναι γυάλινα πλακίδια μικροσκοπίου με αύλακες (probes), τα οποία φέρουν ακινητοποιημένα μόρια που δρουν ως ανιχνευτές (π.χ. ανάλογα με το είδος της μικροσυστοιχίας κλάσματα DNA που αντιστοιχούν σε ολόκληρα γονίδια ή σε μικρά ολιγονουκλεοτίδια, πρωτεΐνες, αντισώματα κ.α. βλ. Εικόνα 4). Σε κάθε περίπτωση, είναι γνωστή η ακριβής αλληλουχία και εντόπιση κάθε ανιχνευτή πάνω στη μικροσυστοιχία. Οι μικροσυστοιχίες αυτές χρησιμοποιούνται για να καθοριστεί αν ένα δείγμα περιέχει ορισμένα χαρακτηριστικά μόρια ή να μελετηθεί μια κυτταρική λειτουργία σε συνάρτηση με το χρόνο.



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση μιας μικροσυστοιχίας ολιγονουκλεοτιδίων (αριστερά) και μιας μικροσυστοιχίας cDNA (δεξιά) [14].

Οι πιο διαδεδομένες είναι οι μικροσυστοιχίες cDNA (Εικόνα 4b) με τις οποίες δύναται να αναγνωριστούν και να μελετηθούν περίπλοκα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης. Ένα δείγμα RNA αντιγράφεται στο συμπληρωματικό του cDNA, το οποίο σημαίνεται με μια φθορίζουσα ουσία και εγχύεται στη μικροσυστοιχία. Η μικροσυστοιχία επωάζεται με το δείγμα για ορισμένο χρονικό διάστημα (λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις υβριδισμού) και στη συνέχεια εκπλύνεται ώστε να απομακρυνθούν τα μη συνδεδεμένα μόρια. Ακολούθως η μικροσυστοιχία περνά από ένα μικροσκόπιο σάρωσης laser και οι θέσεις όπου έχουν υβριδιστεί σημασμένα κλάσματα DNA αναγνωρίζονται ως φθορίζουσες κηλίδες και αντιστοιχίζονται στα συγκεκριμένα γονίδια των οποίων η αλληλουχία DNA είχε τοποθετηθεί στις θέσεις αυτές.

Με τη γνώση που προσφέρουν οι μικροσυστοιχίες πάνω στα προφίλ της γονιδιακής έκφρασης, καθίσταται δυνατή η μελέτη και η σύγκριση των προτύπων έκφρασης γονιδίων των διάφορων μορφών καρκινικών κυττάρων και κατ' επέκταση η πρόβλεψη απόκρισης ενός ασθενούς σε μια θεραπεία. Παρόλα αυτά οι μικροσυστοιχίες DNA έχουν περιορισμούς όσον αφορά στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων στις πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκαν οι μικροσυστοιχίες ή τσιπ πρωτεϊνών με τα οποία ανιχνεύονται οι λειτουργίες και οι αλληλεπιδράσεις τους.

Οι μικροσυστοιχίες έχουν το πλεονέκτημα ότι περιέχουν έναν πολύ μεγάλο αριθμό γονιδίων σε πολύ μικρό μέγεθος. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να γίνει ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης με ένα μόνο δείγμα ή προκειμένου να συγκριθεί η γονιδιακή έκφραση σε δυο διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους ή σε διαφορετικά είδη ιστών, όπως σε έναν υγιή και έναν παθολογικό ιστό. Η μικροσυστοιχία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εξετάσει την έκφραση σε εκατοντάδες ή και σε χιλιάδες γονίδια με ένα μόνο πείραμα. Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών, όπως και οι άλλες μέθοδοι υψηλής απόδοσης, κρίνονται πλέον απαραίτητες για την κατανόηση των βιολογικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στα βιολογικά συστήματα και συμπληρώνουν τις κοινές μεθόδους μελέτης [15]. Τα τελευταία χρόνια, παρά την ανακάλυψη της πειραματικής τεχνολογίας αλληλούχισης ακολουθιών RNA (RNA-sequencing) οι μικροσυστοιχίες έχουν διατηρήσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω του χαμηλότερου συγκριτικά κόστους τους, αλλά και της μεγαλύτερης ακρίβειας ποσοτικοποίηση που παρέχουν για γνωστές ακολουθίες RNA.

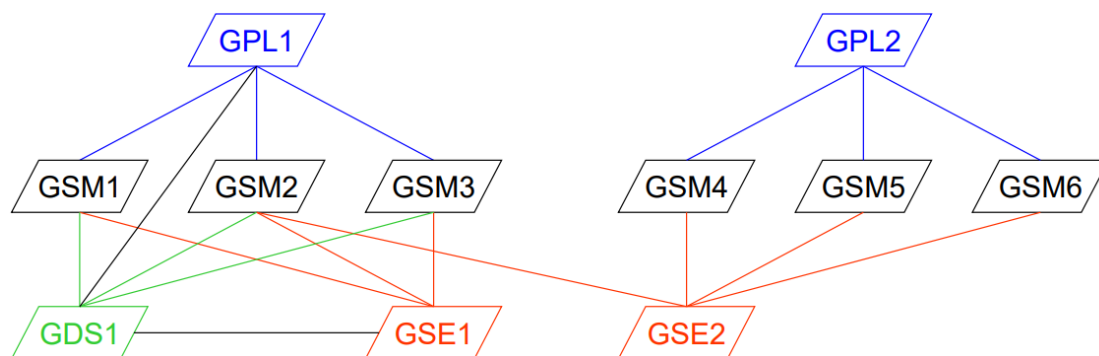
1.2.2: Αποθετήρια δεδομένων

Υπάρχουν δύο βασικά, ελεύθερα στο κοινό αποθετήρια δεδομένων γονιδιακής έκφρασης, το Gene Expression Omnibus (GEO) [16] και το Array Express [17].

Κατά την αναζήτηση δεδομένων προς επεξεργασία για την παρούσα εργασία έγινε αναζήτηση σε αυτά τα δύο αποθετήρια και βρέθηκε ταύτιση των αποτελεσμάτων οπότε επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν τα δεδομένα από τη βάση δεδομένων GEO.

Gene Expression Omnibus (GEO)

Η βάση δεδομένων Gene Expression Omnibus (GEO) [18] του NCBI χρησιμεύει ως δημόσιο καταθετήριο για ένα ευρύ φάσμα πειραματικών δεδομένων υψηλής απόδοσης. Αυτά τα δεδομένα περιλαμβάνουν πειράματα μονοκάναλων και δικάναλων (cDNA) μικροσυστοιχιών mRNA, γονιδιωματοκτικού DNA, πρωτεϊνών, και άλλων τεχνικών, όπως η σειριακή ανάλυση έκφρασης γονιδίων (SAGE) ή φασματομετρία μάζας πρωτεϊνικών δεδομένων και η μέθοδος εύρεσης αλληλουχιών επόμενης γενιάς. Επιπλέον, σχεδόν πάντα, μαζί με τα επεξεργασμένα δεδομένα υψηλής απόδοσης, κατατίθενται και τα μη επεξεργασμένα (πρωτογενή) αντίστοιχα δεδομένα τους. Στο βασικό επίπεδο οργάνωσης του GEO, υπάρχουν τέσσερις βασικοί τύποι οντότητας: Οι πρώτοι τρεις (Δείγμα, Πλατφόρμα, και Σειρά) συμπληρώνονται και παρέχονται στο GEO από τους χρήστες. Το προσωπικό του GEO καταρτίζει και επιμελείται τον τέταρτο τύπο, το Σύνολο Δεδομένων, χρησιμοποιώντας τα δεδομένα που έχουν υποβληθεί από τους χρήστες.



Εικόνα 5: Δομή αρχειοθέτησης δεδομένων στη GEO [19].

Πλατφόρμες (Platforms)

Μια εγγραφή Πλατφόρμας περιγράφει τα χαρακτηριστικά της μικροσυστοιχίας (π.χ. cDNA, probe sets ολιγονουκλεοτιδίων, ORFs, αντισώματα), τον κατάλογο των στοιχείων που μπορούν να ανιχνευθούν και ποσοτικοποιηθούν σε αυτό το πείραμα (π.χ., υπογραφές SAGE, πεπτίδια), κλπ. Κάθε εγγραφή Πλατφόρμας έχει έναν μοναδικό και σταθερό αριθμό καταχώρησης GEO που ξεκινάει πάντα με τα γράμματα “GPL” και ακολουθείται από αριθμούς. Η Πλατφόρμα μπορεί να παραπέμπει σε πολλά δείγματα που έχουν υποβληθεί από διάφορους χρήστες.

Δείγματα (Samples)

Μια εγγραφή Δείγματος περιγράφει την προέλευση κάθε ξεχωριστού δείγματος, τα πειραματικά πρωτόκολλα συλλογής, εκχύλισης, σήμανσης, υβριδισμού και σάρωσης, την υπολογιστική

επεξεργασία των ληφθέντων πρωτογενών δεδομένων καθώς και τη μέτρηση της αφθονίας κάθε στοιχείου που προκύπτει από το δείγμα. Κάθε εγγραφή Δείγματος έχει έναν μοναδικό και σταθερό αριθμό καταχώρησης GEO που ξεκινάει πάντα με τα γράμματα “GSM” και ακολουθείται από αριθμούς. Κάθε Δείγμα πρέπει να παραπέμπει σε μια μόνο Πλατφόρμα και μπορεί να συμπεριληφθεί σε μία ή περισσότερες Σειρές.

Σειρές (Series)

Μια εγγραφή Σειράς καθορίζει μια συλλογή Δειγμάτων που ανήκουν σε μια ομάδα, εξηγεί πώς σχετίζονται τα δείγματα και πώς διευθετούνται. Η Σειρά είναι το κομβικό σημείο της περιγραφής του πειράματος συνολικά. Οι εγγραφές των Σειρών μπορεί επίσης να περιέχουν πίνακες που περιγράφουν εξαγόμενα δεδομένα, συνοπτικά συμπεράσματα, ή αναλύσεις. Κάθε εγγραφή Σειράς έχει έναν μοναδικό και σταθερό αριθμό GEO που ξεκινάει πάντα με τα γράμματα “GSE” και ακολουθείται από αριθμούς και επίσης, μπορεί να περιλαμβάνει Δείγματα από διαφορετικές Πλατφόρμες.

Σύνολα Δεδομένων (Datasets)

Τα Σύνολα Δεδομένων GEO είναι επιμελημένες ομάδες Δειγμάτων GEO. Μια εγγραφή Συνόλου Δεδομένων είναι μια συλλογή από βιολογικά και στατιστικά συγκρίσιμα Δείγματα GEO και αποτελεί τη βάση της σουίτας διαδικτυακών εφαρμογών του GEO των εργαλείων ανάλυσης και προβολής δεδομένων. Τα Δείγματα κάθε Συνόλου Δεδομένων ανήκουν αποκλειστικά σε μια Πλατφόρμα. Οι τιμές των μετρήσεων για κάθε Δείγμα που ανήκει σε ένα Σύνολο Δεδομένων υπολογίζονται με ταυτόσημο τρόπο, δηλαδή, παράγοντες όπως η επεξεργασία υποβάθρου και η κανονικοποίηση είναι κοινές σε ολόκληρη την ομάδα δεδομένων. Επιπλέον πληροφορίες που αντανακλούν τον πειραματικό σχεδιασμό, παρέχονται μέσω υποσυνόλων Δειγμάτων. Η κάθε εγγραφή Συνόλου Δεδομένων έχει έναν μοναδικό και σταθερό αριθμό GEO που ξεκινάει πάντα με τα γράμματα “GDS” και ακολουθείται από αριθμούς.

1.3: Περί βιοπληροφορικής

Η γονιδιωματική (genomics) είναι ένας κλάδος της γενετικής που μελετά μεγάλης κλίμακας αλλαγές στα γονιδιώματα των οργανισμών. Η γονιδιωματική και η μεταγραφωματική (transcriptomics), η οποία μελετά ευρείες γονιδιακές αλλαγές στο RNA που μεταγράφεται από το DNA, μελετούν πολλά γονίδια τη φορά. Η γονιδιωματική μπορεί επίσης να περιλαμβάνει την ανάγνωση και την ευθυγράμμιση πολύ μακριών ακολουθιών του DNA ή του RNA. Η ανάλυση και ερμηνεία αυτών των μεγάλης κλίμακας σύνθετων δεδομένων απαιτεί τη βοήθεια των υπολογιστών. Το ανθρώπινο μυαλό δεν είναι σε θέση να χειριστεί τόσες πολλές πληροφορίες.

Η Βιοπληροφορική είναι ένα υβριδικό πεδίο που συνδυάζει τη γνώση της βιολογίας και της επιστήμης της πληροφορικής και αποτελεί ένα υποπεδίο της επιστήμης των υπολογιστών. Τα γονιδιώματα των οργανισμών είναι πολύ μεγάλα. Το ανθρώπινο γονιδίωμα εκτιμάται ότι έχει τρία δισεκατομμύρια ζεύγη βάσεων που περιέχουν περίπου 25.000 γονίδια. Επιπλέον, η μεταγραφωματική (Transcriptomics) μελετά το ποια γονίδια, μεταξύ των δεκάδων χιλιάδων σε έναν οργανισμό, έχουν ενεργοποιηθεί ή απενεργοποιηθεί σε μια δεδομένη στιγμή, σε πολλαπλές χρονικές στιγμές αλλά και σε πολλαπλές πειραματικές συνθήκες σε κάθε χρονικό σημείο. Με άλλα λόγια, τα δεδομένα «-ωμικής» περιέχουν τεράστιες ποσότητες πληροφοριών που ο άνθρωπος νους δεν μπορεί να συλλάβει χωρίς τη βοήθεια των υπολογιστικών μεθόδων της Βιοπληροφορικής. Η Βιοπληροφορική είναι σημαντική για τη γενετική έρευνα, επειδή τα γενετικά δεδομένα έχει ένα πλαίσιο, αυτό της βιολογίας. Όλες οι μορφές ζωής έχουν ορισμένους κανόνες συμπεριφοράς. Το ίδιο ισχύει και για τους ιστούς και τα κύτταρα, τα γονίδια και τις πρωτεΐνες. Αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένους τρόπους και ρυθμίζουν το ένα το άλλο με συγκεκριμένους τρόπους. Η μεγάλη κλίμακα, σύνθετων δεδομένων που δημιουργούνται στον τομέα της γονιδιωματικής, δεν θα είχε νόημα χωρίς τη γνώση του πώς λειτουργούν οι μορφές ζωής. Τα δεδομένα που προκύπτουν από τη γονιδιωματική μπορούν να αναλυθούν με τις ίδιες μεθόδους που χρησιμοποιούνται από τους μηχανικούς και τους φυσικούς που μελετούν τις αγορές των χρηματοοικονομικών και των οπτικών ινών, αλλά αναλύοντας δεδομένα με τρόπο που να απαιτεί γνώση της βιολογίας. Έτσι, η Βιοπληροφορική έγινε ένα πολύτιμο υβριδικό πεδίο της γνώσης. Η Βιοπληροφορική είναι σε θέση να υπολογίσει δεκάδες χιλιάδες αριθμών σε λίγα λεπτά, ανάλογα με το πόσο γρήγορα ο υπολογιστής μπορεί να επεξεργαστεί τις πληροφορίες. Ο τομέας των «-omics» χρησιμοποιεί υπολογιστές για να τρέξουν οι αλγόριθμοι σε μεγάλη κλίμακα ώστε να βρει μοτίβα σε μεγάλα σύνολα δεδομένων. Κοινοί αλγόριθμοι περιλαμβάνουν λειτουργίες όπως η ιεραρχική ομαδοποίηση και ανάλυση σε κύριες συνιστώσες. Και οι δύο είναι οι τεχνικές για να βρεθούν οι σχέσεις μεταξύ των δειγμάτων που έχουν πολλούς παράγοντες σε αυτές [20].

Η Βιοπληροφορική κατάφερε να μελετήσει τον τρόπο με τον οποίο ένα σύστημα που έχει χιλιάδες κινούμενα μέρη καταφέρνει να προσαρμοστεί στο επίπεδο που όλα τα μέρη κινούνται ταυτόχρονα. Παλιότερα, οι γενετιστές μελετούσαν μόνο ένα γονίδιο τη φορά. Αν και η προσέγγιση αυτή εξακολουθεί να έχει ιδιαίτερη αξία και θα συνεχίσει να έχει, η Βιοπληροφορική άνοιξε το δρόμο για νέες ανακαλύψεις και μέσω της θεωρίας συστημάτων, η βιολογία συστημάτων ερμηνεύει πλέον τα διάφορα βιολογικά συμβάντα ως σύνολο αλληλεπιδράσεων σε δυναμική ισορροπία [21].

Κεφάλαιο 2: Υλικά - Δεδομένα

2.1: Νανοσωματίδια Χρυσού (AuNPs)

2.1.1: Ιστορική αναδρομή

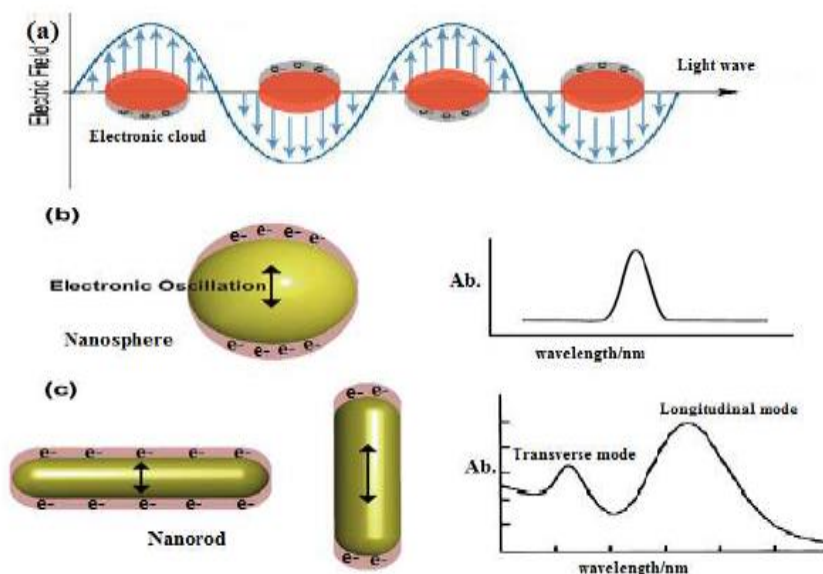
Ο χρυσός αποτελεί ένα από τα πρώτα μέταλλα που ανακαλύφθηκαν και τόσο η μελέτη όσο και οι εφαρμογές του εκτείνονται σε βάθος χιλιετιών. Οι πρώτες πληροφορίες για τον κολλοειδή χρυσό ανευρίσκονται σε πραγματείες Αράβων, Κινέζων και Ινδών επιστημόνων τον 5^ο αιώνα πΧ, όπου αναφέρονται στοιχεία για την χρήση του «υγρού χρυσού» και του «χρυσού διαλύματος». Κατά τον Μεσαίωνα, στην Ευρώπη ο κολλοειδής χρυσός μελετήθηκε και χρησιμοποιήθηκε στα εργαστήρια των αλχημιστών. Ο Παράκελσος έγραψε για τις θεραπευτικές ιδιότητες του αποστάγματος χρυσού “*quinta essentia auri*” το οποίο λάμβανε από την αναγωγή του χλωριούχου χρυσού με εκχυλίσματα λαχανικών σε αλκοόλες ή έλαια. Χρησιμοποίησε τον «πόσιμο χρυσό» για τη θεραπεία πολλών ψυχικών ασθενειών και της σύφιλης. Ο σύγχρονός του, Giovanni Andrea, χρησιμοποίησε τον “*aurum potabile*” ως θεραπεία για ασθενείς με λέπρα, πανώλη, επιληψία και διάρροια. Το 1583, ο αλχημιστής David de Planis-Campy που υπηρετούσε ως ιατρός του Louis XIII της Γαλλίας σύστηνε το «ελιξίριο μακροζωίας», ένα κολλοειδές διάλυμα χρυσού σε νερό. Το πρώτο διασωθέν σύγγραμμα για τον κολλοειδή χρυσό εκδόθηκε το 1618 από τον φιλόσοφο και ιατρό Francisco Antonii και περιλαμβάνει στοιχεία για την παρασκευή κολλοειδούς χρυσού, τις χρήσεις του στην ιατρική, καθώς και πρακτικές συμβουλές.

Παρά την μακρά αυτή ιστορία, η επανάσταση στην ανοσοϊστοχημία σχετιζόμενη με την χρήση νανοσωματιδίων χρυσού σε βιολογικές μελέτες επήλθε το 1971, όταν οι Βρετανοί ερευνητές Faulk και Taylor περιέγραψαν μια μέθοδο σύζευξης αντισώματος με κολλοειδή χρυσό για άμεση απεικόνιση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο των επιφανειακών αντιγόνων της σαλμονέλας. Αυτή ήταν η απαρχή των βιοϊατρικών εφαρμογών του συζευγμένου με άλλες ουσίες κολλοειδούς χρυσού ώστε σήμερα τα νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs) να χρησιμοποιούνται ευρέως μεταξύ άλλων στη διαγνωστική, στην φωτοθερμική και φωτοδυναμική θεραπεία, καθώς και στη μεταφορά φαρμάκων και γενετικού υλικού. Όλες αυτές οι εφαρμογές καθίστανται δυνατές λόγω των μοναδικών φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των AuNPs [22, 23].

2.1.2: Φυσικές και χημικές ιδιότητες AuNPs

Φυσικές ιδιότητες

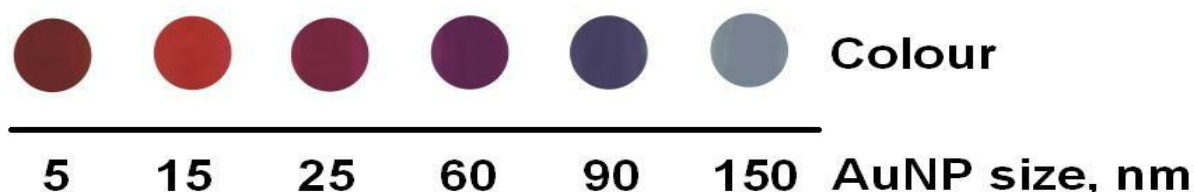
Τα νανοσωματίδια χρυσού παρουσιάζουν μοναδικές οπτικές ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές οφείλονται στην αλληλεπίδραση του φωτός με ηλεκτρόνια στην επιφάνεια του νανοσωματιδίου. Σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος (και κατ' επέκταση συχνότητα) φωτός παρατηρείται μια αθροιστική ταλάντωση των ηλεκτρονίων στην επιφάνεια του AuNP που ονομάζεται **επιφανειακός συντονισμός πλάσμονιου**, με αποτέλεσμα την έντονη απόσβεση φωτός (μέσω σκέδασης και απορρόφησης). Το ακριβές μήκος κύματος στο οποίο συμβαίνει αυτό εξαρτάται ισχυρά από το μέγεθος, το σχήμα και την επιφάνεια του AuNP. Το πλάσμONIO ορίζεται ως ένα κβάντο ταλάντωσης πλάσματος. Φυσιολογικά τα πλάσμονια αποτελούν αθροιστικές ταλαντώσεις του ελεύθερου ηλεκτρονιακού νέφους σε συγκεκριμένες συχνότητες. Οι περισσότερες από τις ιδιότητες του πλάσμονιου μπορούν να εξαχθούν άμεσα από τις εξισώσεις του Maxwell καθώς προκύπτουν από κβάντωση των κλασσικών ταλαντώσεων πλάσματος. Μικρότερα AuNPs κυρίως απορροφούν φως ενώ μεγαλύτερα νανοσωματίδια τείνουν να το σκεδάσουν. Για παράδειγμα, σε AuNPs με $d < 30\text{nm}$ ο επιφανειακός συντονισμός πλάσμονιου προκαλεί απορρόφηση του φωτός στο μπλε-πράσινο φάσμα ($\approx 450\text{nm}$) ενώ το κόκκινο φως ($> 680\text{nm}$) ανακλάται, με αποτέλεσμα μακροσκοπικά να φαίνεται το κόκκινο ως χρώμα. Σωματίδια με μεγαλύτερο μέγεθος ($> 50\text{nm}$) τείνουν να απορροφούν το κόκκινο ενώ ανακλούν το μπλε φως, οδηγώντας σε μπλε ή μωβ απόχρωση. Χρησιμοποιώντας ακτινοβολία απορροφώμενου μήκους κύματος στα νανοσωματίδια, είναι εφικτή η πρόκληση υπερθερμίας στον ιστό ο οποίος θα τα έχει προσλάβει [24, 25].



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση α) τοπικού Επιφανειακού Συντονισμού Πλάσμονιου, β) ηλεκτρικής ταλάντωσης νανοσφαιριδίων και γ) ηλεκτρικής ταλάντωσης νανοραβδίων, καθώς και φάσματα απορρόφησης LSPR and TSPR [26].

Εκτός του μεγέθους, μεγάλη σημασία για τις οπτικές ιδιότητες των AuNPs διαδραματίζει το σχήμα τους, συνεπώς συνθέτοντας AuNPs σε διαφορετικά σχήματα, δίνεται η δυνατότητα μετατόπισης του επιφανειακού συντονισμού πλάσμονιου από τα 500 nm κοντά στο φάσμα του υπέρυθρου. Τέλος, η

συσσώρευση νανοσωματιδίων προκαλεί σημαντική μετατόπιση του συντονισμού προς το κόκκινο, μετατρέποντας το χρώμα του διαλύματος από κόκκινο σε μπλέ εξαιτίας της σύζευξης πλασμονίων μεταξύ των σωματιδίων. Ένα πρόσφατα ανακαλυφθέν φαινόμενο δείχνει ότι AuNPs μικρότερα από 10nm εμφανίζουν μοναδικό πλεονέκτημα σε σχέση με τα NPs μεγαλύτερα από 10nm στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με ζώντα κύτταρα, καθώς οι επιφανειακές ιδιότητες των μικρότερων AuNPs διαφέρουν από αυτές των μεγαλύτερων νανοϋλικών, αντανakλώντας μεταβολές στη συχνότητα και το πλάτος των αντίστοιχων κορυφών ταλάντωσης του επιφανειακού συντονισμού πλασμονίου [26, 27].



Εικόνα 7: Μεταβολή του χρώματος (μακροσκοπικά) των AuNPs ανάλογα το μέγεθος τους [27].

Εκτός του επιφανειακού συντονισμού πλασμονίου πολύ σημαντική ιδιότητα των AuNPs είναι η ικανότητα απόσβεσης του φθορισμού των εγγύς φθοριοφόρων. Η ικανότητα αυτή προκύπτει από ένα μονοπάτι απενεργοποίησης που στηρίζεται στην επαρκώς καλή αλληλεπικάλυψη του φάσματος εκπομπής των διεγερμένων φθοριοφόρων με την μπάντα επιφανειακού πλασμονίου των AuNP. Αυτό το φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας συντονισμού φθορισμού (*fluorescence resonance energy transfer (FRET)*) παρατηρείται ακόμα και παρουσία AuNPs διαμέτρου 1nm καθώς τόσο οι ραδιενεργοί όσο και οι μη-ραδιενεργοί ρυθμοί αποδόμησης των μορίων φθορισμού επηρεάζονται από τα νανοσωματίδια. Τα AuNPs μπορούν να λειτουργήσουν επίσης ως δέκτες ηλεκτρονίων ώστε να αποσβεστούν τα φθοριοφόρα μέσω φωτοεπαγώμενης μεταφοράς ηλεκτρονίων (*photoinduced electron transfer (PET)*) [28-35].

Χημικές ιδιότητες

Οι χημικές και βιολογικές ιδιότητες των AuNPs δεν καθορίζονται μόνο από το μέγεθος και τις οπτικές τους ιδιότητες αλλά και από την επιφανειακή τους χημεία. Τα AuNPs καλύπτονται με κιτρικό, ταννικό οξύ ή πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP). Το κιτρικό ως παράγοντας επικάλυψης, σχετίζεται ασθενώς με την επιφάνεια του νανοσωματιδίου και χρησιμοποιείται ευρέως καθώς προσφέρει μακροπρόθεσμη σταθερότητα και μπορεί εύκολα να αντικατασταθεί από άλλα μόρια όπως αμίνες, θειολικά πολυμερή, πρωτεΐνες και αντισώματα. Το ταννικό οξύ μπορεί να αντικατασταθεί εύκολα από μόρια που περιέχουν θειόλες και χρησιμοποιείται σε εφαρμογές που απαιτούν υψηλή συγκέντρωση νανοσωματιδίων. Το PVP είναι ένα πολυμερές που συνδέεται ισχυρά στην επιφάνεια του AuNP, προσφέρει μεγαλύτερη σταθερότητα αλλά είναι δυσκολότερο να αντικατασταθεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι η επιφάνεια των νανοσωματιδίων είναι δυναμική και επηρεάζεται από το τοπικό περιβάλλον. Η επιφάνεια του χρυσού εμφανίζει υψηλή συγγένεια με ομάδες θιολών και δισουλφίδια. Το θείο των θειολικών ομάδων οι των δισουλφιδίων σχηματίζει ημι-ομοιοπολικούς δεσμούς με το χρυσό με ισχύ περίπου 45kcal/mol. Αυτή η ιδιότητα των AuNPs χρησιμοποιείται για την κάλυψη τους με διάφορα μόρια. Για παράδειγμα, η PEGυλίωση (σύζευξη με πολυεθυλενική γλυκόλη) πραγματοποιείται μέσω ομάδων SH με διυδρολιποϊκό οξύ. Επίσης το θείο που περιέχεται στα αμινοξέα κυστεΐνη και μεθειονίνη φαίνεται να αλληλεπιδρά με την επιφάνεια του χρυσού. Τέλος

οι επιφάνειες των AuNPs μπορούν να σχηματίσουν ασθενέστερους υδροφοβικούς δεσμούς με ενώσεις όπως οι λιποπολυσακχαρίτες [36].

Τα AuNPs που χρησιμοποιούνται σε βιολογικές εφαρμογές συνήθως καλύπτονται με PEG, βόειο αλβουμίνη (BSA), πρωτεΐνες, πεπτίδια, ολιγονουκλεοτίδια ή διάφορα άλλα πολυμερή. Η σύζευξη των μορίων αυτών στην επιφάνεια του χρυσού γίνεται μέσω προσρόφησης (physisorption) ή αξιοποιώντας τους πολύ ισχυρούς θειολικούς (thiol-gold) δεσμούς. Τα σωματίδια χρυσού μπορούν να συζευχθούν με μόρια που μετατρέπουν το αρνητικό φορτίο του νανοσωματιδίου σε θετικό. Επίσης μπορούν να τροποποιηθούν ώστε να παρέχουν αντιδρώσες ομάδες για μετέπειτα σύζευξη από τον ερευνητή [26].

2.1.3: Σύνθεση AuNPs

Σήμερα, υπάρχει μια πληθώρα τεχνικών για τη σύνθεση AuNPs, που περιλαμβάνει Top-Down και Bottom-Up μεθόδους. Γενικά, οι τεχνικές αυτές ταξινομούνται σε χημικές φυσικές και βιολογικές.

Χημικές μέθοδοι

Στις χημικές μεθόδους τα AuNPs γενικά παράγονται με αναγωγή του HAuCl_4 με την χρήση κάποιου σταθεροποιητικού παράγοντα. Μετά την διάλυση του HAuCl_4 , το διάλυμα αναδεύεται έντονα, ενώ προστίθεται το αναγωγικό μέσο. Η ανάμιξη αυτή έχει ως αποτέλεσμα την αναγωγή των τρισθενών ιόντων χρυσού σε ουδέτερα άτομα.

Η μέθοδος Turkevich είναι η απλούστερη διαθέσιμη. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή ομοιόμορφων σφαιρικών AuNPs διαλυμένα σε νερό με διάμετρο 10-20 nm. Μεγαλύτερα σωματίδια μπορούν επίσης να παραχθούν, ωστόσο, με μικρότερη ομοιομορφία. Περιλαμβάνει την αντίδραση μικρών ποσοτήτων θερμού HAuCl_4 παρουσία αναγωγικών παραγόντων όπως κιτρικό, αμινοξέα, ασκορβικό οξύ ή υπεριώδες φως. Ο κολλοειδής χρυσός σχηματίζεται καθώς το κιτρικό λειτουργεί τόσο ως αναγωγικός παράγοντας όσο και ως παράγοντας επικάλυψης. Για την παραγωγή μεγαλύτερων σωματιδίων χρησιμοποιείται κιτρικό με μικρότερη συγκέντρωση, ως και 0.05%, πέραν της οποίας απλά δεν υπάρχει αρκετό για την αναγωγή του χρυσού. Η αναγωγή παρουσία της συγκεκριμένης ποσότητας κιτρικού νατρίου, θα μειώσει την ποσότητα των ιόντων κιτρικού που είναι διαθέσιμα για την σταθεροποίηση των σωματιδίων, οπότε τα μικρά σωματίδια θα συσσωματωθούν σε μεγαλύτερα ώστε η συνολική επιφάνεια όλων των σωματιδίων να είναι αρκετά μικρή ώστε να καλυφθεί από τα διαθέσιμα ιόντα κιτρικού.

Η μέθοδος Brust μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή AuNPs σε οργανικά υγρά που δεν είναι δυνατόν να αναμειχθούν με νερό (όπως το τολουόλιο). Περιλαμβάνει την αναγωγή του HAuCl_4 με TOAB σε τολουόλιο και NaBH_4 ως αντιπηκτικό και αναγωγικό παράγοντα αντίστοιχα. Σε αυτή την περίπτωση τα AuNPs θα έχουν μέγεθος 2-6 nm. Το NaBH_4 λειτουργεί ως αναγωγικός παράγοντας, ενώ το TOAB ως καταλύτης και παράγοντας σταθεροποίησης. Η μέθοδος Brust πλεονεκτεί καθώς προσφέρει έλεγχο στη διάμετρο των σωματιδίων και τροποποίηση της επιφάνειας των AuNPs με αλκαλοθειόλες.

Ενώ οι μέθοδοι Turkevich και Brust μπορούν να παράγουν μόνο σφαιρικά AuNPs, στην μέθοδο κρυστάλλωσης με σπορά (Seeded growth method), μπορούν να υπάρξει ποικιλία νανοδομών όπως ραβδία, κύβοι και σωλήνες. Η βασική αρχή της τεχνικής αυτής είναι η παραγωγή αρχικά σωματιδίων σποράς από την αναγωγή αλάτων χρυσού με ένα ισχυρό αναγωγικό μέσο όπως το NaBH_4 . Τα σωματίδια σποράς προστίθενται στη συνέχεια σε ένα διάλυμα μεταλλικού άλατος παρουσία ενός ασθενούς αναγωγικού μέσου (ασκορβικό οξύ) και ενός παράγοντα που εμποδίζει την περαιτέρω πυρήνωση και επιταχύνει την ανισοτροπική ανάπτυξη των AuNPs. Η γεωμετρία των AuNPs μπορεί να τροποποιηθεί από αλλαγές στους αναγωγικούς παράγοντες, στους παράγοντες που κατευθύνουν την δομή και τη συγκέντρωση των σωματιδίων σποράς.

Φυσικές μέθοδοι

Μέθοδοι όπως η γ-ακτινοβόληση, η ακτινοβόληση με μικροκύματα, η ηχοχημική μέθοδος, η ακτινοβόληση με υπεριώδες φως η εξάχνωση με laser, η θερμολυτική μέθοδος και η φωτοχημική μέθοδος ταξινομούνται ως φυσικές μέθοδοι

Η γ-ακτινοβόληση έχει αποδειχθεί η καλύτερη μέθοδος για την παραγωγή AuNPs με ελεγχόμενο μέγεθος και υψηλή καθαρότητα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την παραγωγή νανοσωματιδίων με μέγεθος 2-40 nm με την χρήση σταθεροποιητών όπως η βόειος αλβουμίνη (BSA). Η ηχοχημική μέθοδος (Sonochemical method) μπορεί να αποδώσει Au/Pd διμεταλλικά σωματίδια AuNPs εντός πόρων πυριτίου. Η υψηλή θερμοκρασία και η υπεριώδης ακτινοβολία είναι οι κύριοι αναγωγικοί παράγοντες στην θερμολυτική μεθοδο και την μέθοδο υπεριώδους ακτινοβολίας αντίστοιχα. Ρυθμίζοντας την συνθήκες σύνθεσης μπου να επιτευχθούν ποικίλα σχήματα. Οι φωτοχημικές μέθοδοι συνήθως αποδίδουν νανοραβδία με ιδιαίτερα περίπλοκες φυσικές ιδιότητες σε σχέση με τα σφαιρικά νανοσωματίδια. Τέλος, η μέθοδος εξάχνωσης με laser παράγει νανοσωματίδια με σωληνώδη χαρακτηριστικά.

Βιολογικές μέθοδοι

Η ανάπτυξη οικολογικών τεχνολογιών για την σύνθεση AuNPs έχει μεγάλη σημασία ώστε να επεκταθούν οι βιολογικές εφαρμογές τους. Η βιοσύνθεση νανοσωματιδίων χρυσού από μικρόβια θεωρείται ασφαλής, καθαρή, μη-τοξική και περιβαλλοντικά φιλική μεθοδος. Η χρήση μικροβίων συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, μυκήτων και ακτινομυκήτων μπορεί να χωριστεί σε ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια αναλόγως με το σημείο στο οποίο σχηματίζονται τα AuNPs. Πολλαπλές προσπάθειες πραγματοποιούνται για την βιοσύνθεση νανοσωματιδίων με ομοιόμορφο σχήμα και μέγεθος. Συνηθέστερα αναφέρεται η χρήση του βακτηρίου *Bacillus subtilis* καθώς και των μυκήτων *Fusariumoxysporum* και *Candida albicans* [26].

2.1.4: Βιοενεργοποίηση επιφανειών AuNPs

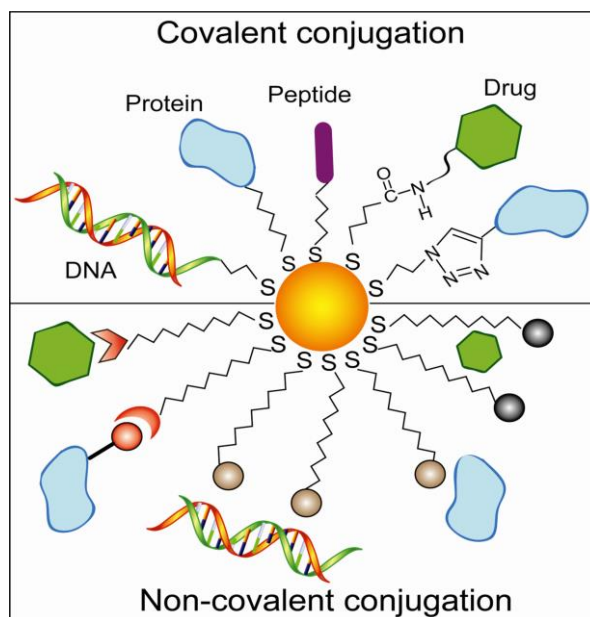
Η επιφάνεια των νανοσωματιδίων Au τροποποιείται με μια πληθώρα προστατευτικών και λειτουργικών ενώσεων. Η βιοενεργοποίηση των επιφανειών των AuNPs, δηλαδή η σύζευξη λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων γίνεται με διάφορους τρόπους. Κομβικό ρόλο για το είδος της τροποποίησης διαδραματίζει ο τρόπος παρασκευής, καθώς οι διάφοροι σταθεροποιητές προσδίδουν διαφορετικές δυνατότητες τροποποίησης. Οι δυο βασικοί μηχανισμοί είναι η προσρόφηση και η ισχυρή αλληλεπίδραση Au-S.

Η προσρόφηση προκύπτει από αλληλεπιδράσεις μεταξύ της στερεάς επιφάνειας του προσροφητή και των μορίων που απαιτούν προσρόφηση, οι οποίες έχουν είτε φυσική είτε χημική προέλευση. Η φυσική προσρόφηση λαμβάνει χώρα μέσω δυνάμεων Van der Waals και ηλεκτροστατικών δυνάμεων και είναι ασθενής και αναστρέψιμη. Αντιθέτως, η χημική προσρόφηση λαμβάνει χώρα μέσω ομοιοπολικών δεσμών και ως εκ τούτου είναι ισχυρή και μη αναστρέψιμη. Η ομοιόμορφη επιφάνειά τους καθώς και το επιφανειακό τους φορτίο, καθιστά τα AuNPs ιδανικούς προσροφητές [37].

Συχνές μέθοδοι βιοενεργοποίησης των AuNPs και η χρήση τους αναφέρονται στον Πίνακα 1 καθώς και στην Εικόνα 8 [26, 38].

Προσροφητής/συνδέτης	Κύριο χαρακτηριστικό	Εφαρμογή
Πολυβινυλοπυρολιδόνη (PVP)	Ισχυρή πρόσδεση στην επιφάνεια των AuNPs	Αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας των λιποφιλικών φαρμάκων
Πολυεθυλενική γλυκόλη (PEG) προσδεδεμένη μέσω θειολικών ομάδων	Πρόσδεση σε κυτταρικές μεμβράνες	Κυτταρική και ενδοκυτταρική στόχευση, μελέτες βιοκατανομής.
Αμινομάδες PEG	Μεταφορά siRNA	Τεχνολογία siRNA
Πρωτεΐνες, Καρβοξυλομάδες ως λειτουργικές ομάδες	Γλουταμικό οξύ ως αναγωγικός παράγοντας	Εξαρτάται από την πρωτεΐνη
Πεπτίδιο Επιφανειακοί υποδοχείς	Κυτταρική και πυρηνική μεταφορά	Κυτταρική και ενδοκυτταρική στόχευση, βιοαπεικόνιση καρκινικών κυττάρων
Αντισώματα	Μικρό μέγεθος	Ανοσοχημικές μελέτες και διάγνωση
DNA	Antisense DNA ολιγονουκλεοτίδια	Βιοαπεικόνιση, μεταφορά γονιδίων

Πίνακας 1: Μέθοδοι βιοενεργοποίησης AuNPs, κύριο χαρακτηριστικό έκαστης, καθώς και βασικές εφαρμογές τους.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση σύνδεσης AuNP με DNA, πρωτεΐνες, πεπτίδια και φάρμακα, πάνω με ομοιοπολικό δεσμό και κάτω με μη-ομοιοπολικό δεσμό [38]..

2.1.5: Βιολογικές εφαρμογές AuNPs

Πρόσφατες εξελίξεις στη νανοτεχνολογία έχουν δημιουργήσει καινούριες γενιές διαφόρων τύπων νανοσωματιδίων, όπως τα νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs), τα οποία είναι σχεδιασμένα να δρουν ως ευαίσθητοποιητές τόσο στα ραδιοκύματα όσο και σε φωτοθερμικά φαινόμενα, εξαιτίας των μοναδικών οπτικών και ηλεκτρικών τους ιδιοτήτων. Βιοενεργοποιημένα AuNPs μπορούν να εφαρμοστούν σε συνδυασμό με μη-ιονίζουσα και ιονίζουσα ακτινοβολία ώστε να βελτιωθεί αισθητά η αποτελεσματικότητα της καταστροφής του καρκινικού ιστού ενώ παράλληλα οι υγιείς περιβάλλοντες ιστοί μένουν σχετικά ανεπηρέαστοι [39].

Ραδιοθεραπεία

Η ραδιοθεραπεία (RT) είναι μια θεραπεία που χρησιμοποιεί ιονίζουσα ακτινοβολία, κυρίως για καταστροφή καρκινικών όγκων, η οποία συνήθως προέρχεται από έναν γραμμικό επιταχυντή. Η ιονίζουσα ακτινοβολία λειτουργεί καταστρέφοντας το DNA των κυτταρικών ιστών οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο. Τα κύρια φυσικά φαινόμενα που εκμεταλλεύεται αυτή η θεραπεία όταν συνδυάζεται με νανοσωματίδια είναι το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο και η σκέδαση Compton (καθώς πρόκειται για τάξη ενέργειας σωματιδίων keV). Αναμένεται μεγαλύτεροι ατομικοί αριθμοί (Z) να παρουσιάσουν σε μεγαλύτερο βαθμό τα φαινόμενα αυτά. Κατά συνέπεια, εισάγοντας AuNPs με $Z=79$ είναι ένας εξαιρετικός τρόπος ραδιοευαίσθητοποίησης λόγω του υψηλού ατομικού αριθμού και συντελεστή μάζας ενέργειας του χρυσού σε σχέση με τους βιολογικούς ιστούς (οι οποίοι αποτελούνται κυρίως από υδρογόνο, οξυγόνο και άνθρακα) [40-42].

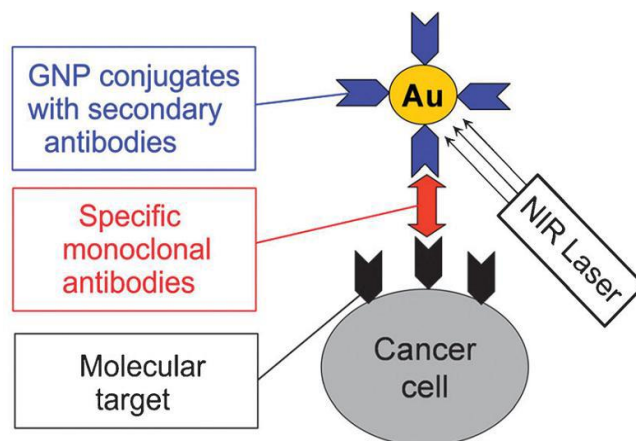
Φωτοδυναμική θεραπεία

Η φωτοδυναμική θεραπεία (PDT) θεωρείται σημαντική ως θεραπεία για ογκολογικές ασθένειες, και ορισμένες ασθένειες του δέρματος ή λοιμώδεις ασθένειες. Πρόκειται για μια μη-επεμβατική ή ελάχιστα επεμβατική βιοφωτονική μέθοδο, η οποία βασίζεται στην ταυτόχρονη δράση των εξής τριών μηχανισμών: (i) τη χρήση φωτοευαίσθητοποιητικών παραγόντων, οι οποίοι φωτοχημικά σκοτώνουν τα κακοήγη κύτταρα, (ii) τη δημιουργία ελευθέρων ριζών οξυγόνου οι οποίες είναι ιδιαίτερα δραστικές, και (iii) τη μη-θερμική μονοχρωματική ακτινοβολία. Τα καρκινικά κύτταρα υπόκεινται σε απόπτωση ή νέκρωση επαγόμενη από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου παραγόμενες από την ενέργεια των φωτοευαίσθητοποιητικών παραγόντων. Η απόσβεση φθορισμού και ο επιφανειακός συντονισμός πλάσμονίων αποτελούν ιδιότητες που χρησιμεύουν στην φωτοδυναμική θεραπεία. Επιπλέον η διασύνδεση του χρυσού διευκολύνει την είσοδό του στα κύτταρα, λόγω της τάσης του να συνδέεται με θειόλες, δισουλφίδια και αμίνες [39].

Φωτοθερμική θεραπεία

Η φωτοθερμική θεραπεία (PTT) γνωστή και ως θερμική εξάχνωση ή οπτική υπερθερμία είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη ελάχιστα παρεμβατική μέθοδος η οποία έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Πρακτικά είναι η εξέλιξη της φωτοδυναμικής θεραπείας ώστε να μη χρειάζεται οξυγόνο [39]. AuNPs με μέγιστη απορρόφηση στο ορατό φως η κοντά στην περιοχή των υπέρυθρων, προσλαμβάνουν φως αποδίδοντας θερμότητα όταν ακτινοβολούνται με τα αντίστοιχα μήκη κύματος. Αν βρίσκονται κοντά ή μέσα στα κύτταρα στόχους, προκαλούν τον θάνατό τους. Τα σφαιρικά συμπαγή AuNPs με διάμετρο μεγαλύτερη των 50 nm, εξαιτίας της απορρόφησης τους κοντά στο φάσμα του υπέρυθρου χρησιμοποιούνται συχνότερα στην PTT. Η Εικόνα Χ δείχνει μια σχηματική αναπαράσταση της εφαρμογής των AuNPs στην PTT η οποία έχει προταθεί να ονομάζεται

πλασμονική φωτοθεραπεία (PPT). Η αποτελεσματικότητα της PPT εξαρτάται: (i) από την επιλογή κατάλληλων AuNPs σύμφωνα με το μέγεθος, το σχήμα, τη δομή και το ποσοστό δημιουργίας συσσωματωμάτων, καθώς αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν την απορρόφηση της ακτινοβολίας, (ii) την σύνδεση των AuNPs με αντισώματα ώστε να βελτιωθεί η εκλεκτικότητά τους για τα κύτταρα στόχους, (iii) την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου εφαρμογής της ακτινοβολίας στα όργανα στόχους ώστε να ελαχιστοποιηθεί η παρέμβαση στους περίξ ιστούς [24, 25].



Εικόνα 9 Σχηματική απεικόνιση μιας PTT που εκμεταλλεύεται AuNPs προσδεσμένα σε καρκινικά κύτταρα [43].

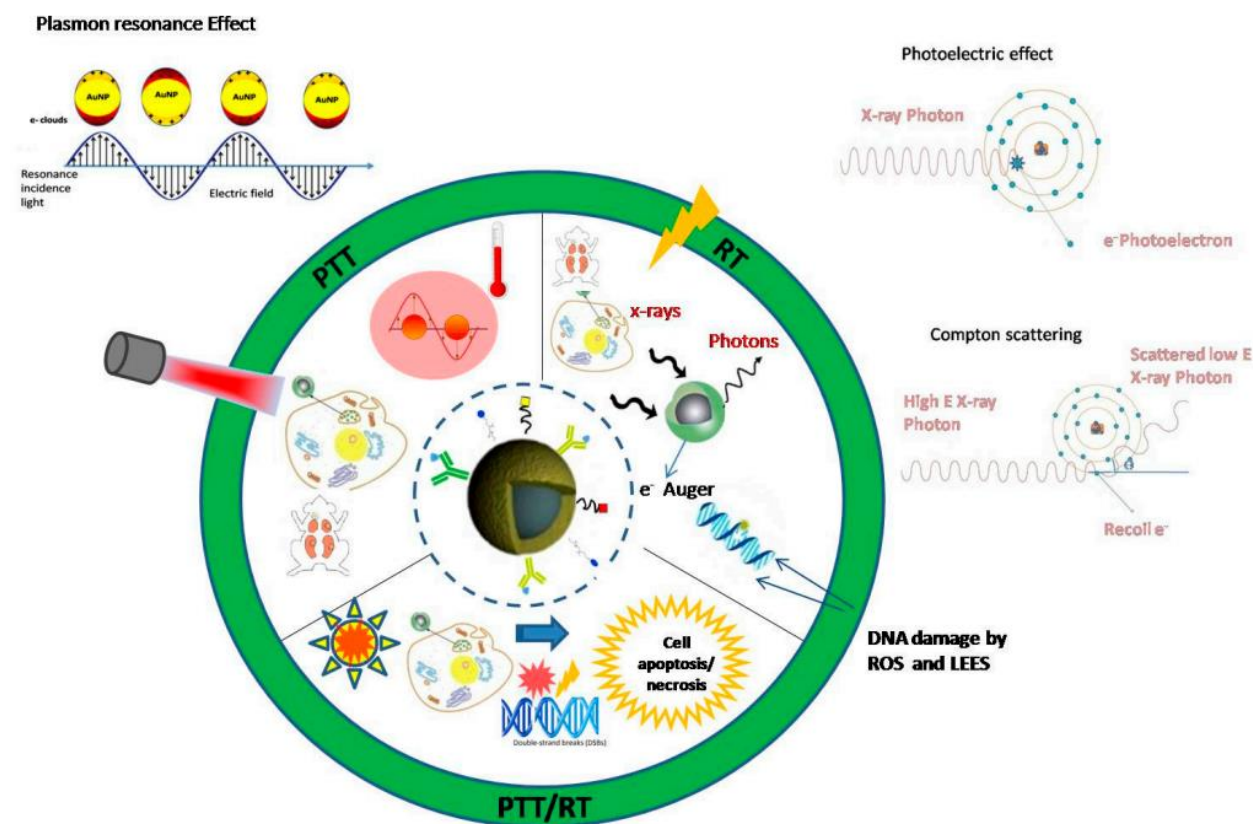
Συνδυασμός RT/PPT

Μία πολλά υποσχόμενη θεραπεία είναι ο συνδυασμός RT και PPT, καθώς δύναται να έχει συνεργικά θεραπευτικά αποτελέσματα και έτσι να ξεπεράσει περιορισμούς που προκύπτουν από την εφαρμογή έκαστης θεραπείας αν εφαρμοζόταν ξεχωριστά. Έκθεση κυττάρων σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 41°C προκαλεί τόσο αποδιάταξη των πρωτεϊνών, όσο και προσωρινή απενεργοποίηση του κυττάρου που μπορεί να διαρκέσει αρκετές ώρες. Τα κύτταρα που επιβιώνουν μετά από την εν λόγω απενεργοποίηση αναπτύσσουν θερμοανθεκτικότητα. Αυτή η θερμοανθεκτικότητα η οποία δυσχεραίνει πολλαπλές ακτινοβολήσεις από PPT, μπορεί να αξιοποιηθεί από την RT, καθώς ενεργοποίηση των μηχανισμών θερμοανθεκτικότητας συχνά συνοδεύονται από αλλαγές που αυξάνουν την ευαισθησία σε ακτίνες-X. Δε, η ίδια η PPT μετριάξει τους μηχανισμούς επισκευής των θραύσεων της διπλής έλικας του DNA (DSBs) που προκαλεί η RT, και επίσης, προκαλώντας αυξημένη ροή αίματος μέσω υπερθερμίας σε ιστούς οι οποίοι είναι υποξικοί ή/και σε περιοχές με χαμηλό pH ή/και κύτταρα στη φάση-S (και οι τρεις αυτές υποπεριπτώσεις παρουσιάζουν ραδιοανθεκτικότητα) αυξάνει προσωρινά την οξυγόνωση και κατά συνέπεια τη ραδιοευαισθησία.

Απαιτείται βαθιά γνώση των υποκείμενων βιοχημικών μηχανισμών και ο υπολογισμός των ποσοτικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών κάθε ακτινοβολίας πρώτου περάσει η μέθοδος αυτή σε κλινικές δοκιμές. Παράλληλα συγκεντρώνονται στοιχεία που δείχνουν αλληλεπίδραση των AuNPs με το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς και δεδομένα ότι η υπερθερμία της PPT δύναται να ενεργοποιήσει συστημικούς ανοσοποιητικούς μηχανισμούς έναντι καρκινικών όγκων που μπορούν να καθυστερήσουν την ανάπτυξη όγκων ακόμη και αν δεν ήταν στόχοι της θεραπείας (και άρα της ακτινοβολίας).

Εν, κατακλείδι, οι παράμετροι ακτινοβολήσης σε συνδυασμό με τις ιδιότητες των AuNPs (όπως μέγεθος, μορφολογία, βιοενεργοποίηση και συγκέντρωση) δημιουργούν περίπλοκα συστήματα που χρήζουν βελτιστοποίησης και οργανωμένων πρωτοκόλλων προκειμένου να περάσουν σε κλινική εφαρμογή.

Στην Εικόνα 10 παρουσιάζεται διαγραμματικά ο συνδυασμός των δύο μεθόδων, καθώς και οι συνιστώσες του, συνοδευμένες από τα φυσικά φαινόμενα τα οποία αξιοποιούν.



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση των βασικών μηχανισμών της φωτοθερμικής θεραπείας (PTT), της ιονίζουσας ραδιοθεραπείας (RT) και του συνδυασμού PTT/RT στη θεραπεία καρκίνου βασισμένη σε βιοενεργοποιημένα AuNPs.

Απεικόνιση με ακτίνες Χ

Τα AuNPs έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον ως σκιαγραφικοί παράγοντες για απεικόνιση με ακτίνες Χ καθώς παρουσιάζουν έντονη απορρόφηση στο φάσμα των ακτίνων Χ, είναι μη τοξικά, τουλάχιστον εν συγκρίσει με τα κλασικά σκιαγραφικά, και μπορούν να υποβληθούν σε επιφανειακή βιοενεργοποίηση για μεγαλύτερη σταθερότητα και στοχευμένη χορήγηση.

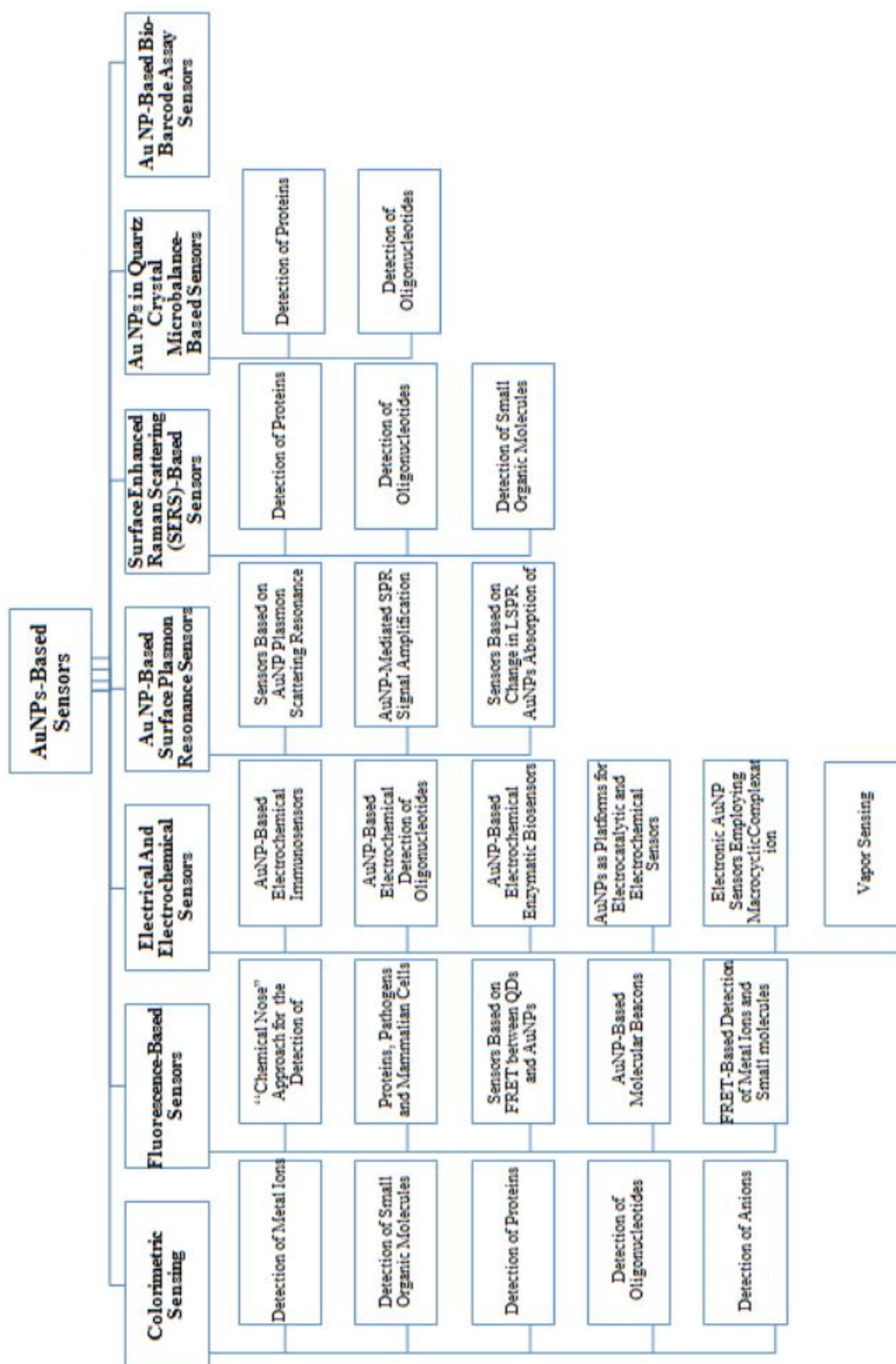
Μεταφορά φαρμάκων

Χαρακτηριστικά των AuNPs όπως οι μοναδικές οπτικές και φυσικοχημικές ιδιότητές τους, η βιοσυμβατότητα, η ελεγχόμενη αποδέσμευση, η μεγάλη επιφάνεια, η σταθερότητα και η μη τοξικότητά τους, τα καθιστούν ιδανικούς νανοφορείς φαρμάκων, οι οποίοι μπορούν να μεταφέρουν μια ποικιλία ουσιών όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες, πλασμιδιακό DNA, siRNAs και χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Εκτός από τα σφαιρικά νανοσωματίδια, τα PEGυλιωμένα νανοραβδία χρύσου φαίνεται να αποτελούν ένα επαρκές και αποδοτικό σύστημα μεταφοράς φαρμάκων, αποφεύγοντας την κάθαρση από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα.

Ανίχνευση- Βιοαισθητήρες

Μια από τις κύριες εφαρμογές των AuNPs είναι η βιολογική και χημική ανίχνευση. Επιστρατεύοντας ενδογενή χαρακτηριστικά τους, τα AuNPs έχουν χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για την ανίχνευση αναλυτών (analytes) όπως μεταλλικών ιόντων, ανιόντων, και βιομορίων, όπως σάκχαρα, νουκλεοτίδια, πρωτεΐνες και τοξίνες. Στο Σχήμα Χ παρουσιάζονται ποικίλοι νανοβιοανιχνευτές βασιζόμενοι στα χαρακτηριστικά των AuNPs. Σύμφωνα με την στρατηγική ανίχνευσης οι ανιχνευτές AuNPs μπορεί να είναι χρωματομετρικοί, βασιζόμενοι στον φθορισμό, ηλεκτρικοί και ηλεκτροχημικοί, επιφανειακού συντονισμού πλάσμονιου, βασιζόμενοι στην επιφανειακή ενίσχυση σκέδασης Raman, βασιζόμενοι στην μικροισορροπία κρυστάλλων quartz και βασιζόμενοι στην τεχνική Bio-Barcode.

Διαφορετικοί τύποι βιοανιχνευτών επιστρατεύουν διαφορετικά ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των AuNPs. Ειδικότερα, οι χρωματομετρικοί ανιχνευτές βασίζονται στις χρωματικές αλλαγές λόγω της συσσώρευσης νανοσωματιδίων, οι βασιζόμενοι στον φθορίσμο, στην ικανότητα απόσβεσης φθορισμού των AuNPs και οι χημικοί και οι ηλεκτροχημικοί στην αγωγιμότητα την μεγάλη επιφάνεια και τις καταλυτικές ιδιότητες των AuNPs, Οι βασιζόμενοι στον επιφανειακό συντονισμό πλάσμονιου επιστρατεύουν τις οπτικές ιδιότητες των AuNPs. Οι ανιχνευτές βασιζόμενοι στην επιφανειακή ενίσχυση σκέδασης Raman εκμεταλλεύονται την ανελαστική σκέδαση φωτονίων από τα AuNPs εξαιτίας του κβαντοποιημένου επίπεδου ταλάντωσής τους, ενώ οι ανιχνευτές βασιζόμενοι στην μικροισορροπία κρυστάλλων quartz, χρησιμοποιούν την μεγάλη επιφάνεια των AuNPs για αυξημένη ευαισθησία ανίχνευσης. Τέλος, οι ανιχνευτές βασιζόμενοι στην τεχνική Bio-Barcode Assay, χρησιμοποιούν την ισχυρή ικανότητα των AuNPs για σύνδεση με θιόλες και τις χρωματικές αλλαγές λόγω της συσσώρευσης των AuNPs [43].



Εικόνα 11: Διαγραμματική απεικόνιση διαφορετικών τύπων βιοαισθητήρων νανοσωματιδίων χρυσού· αξιοποιώντας της ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων, μπορούν να σχεδιαστούν διάφοροι αισθητήρες [43].

2.1.6: Κυτταροτοξικότητα AuNPs

Η επίδραση των νανοσωματιδίων χρυσού στα κύτταρα φαίνεται ότι εξαρτάται άμεσα από παράγοντες όπως το μέγεθος, το σχήμα, το φορτίο και η παρουσία μορίων στην επιφάνεια τους [24].

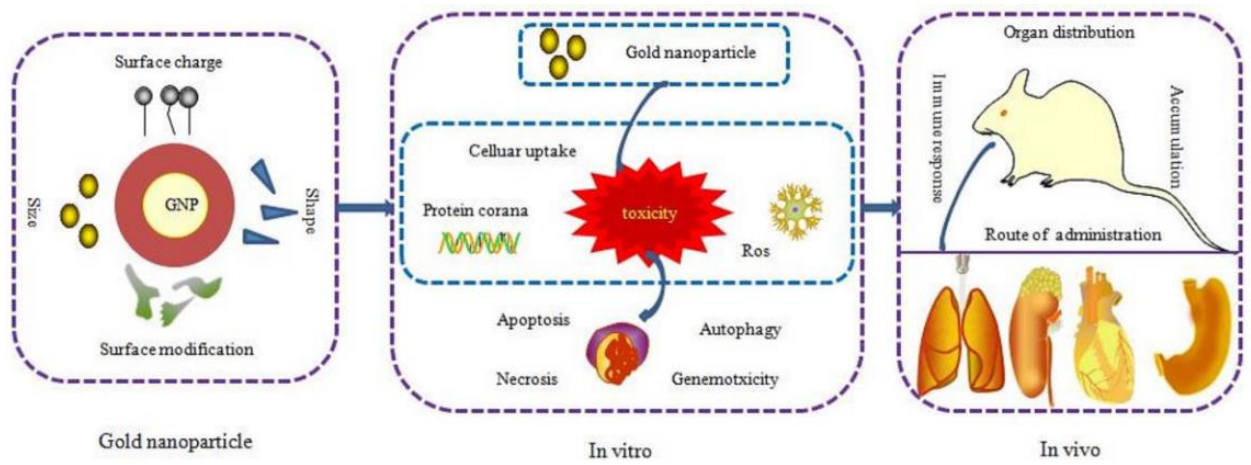
Τα μικρότερα νανοσωματίδια προκαλούν πιο σοβαρή τοξικότητα καθώς προσλαμβάνονται ευκολότερα από τα κύτταρα και προκαλούν βλάβη σε αυτά. Τα AuNPs μπορούν να καταλύσουν την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) από ενδογενείς ενεργές ρίζες NO στο ορό του αίματος. Η επίδραση του NO μπορεί να προκαλέσει κυτταρική νέκρωση ή απόπτωση. Έτσι τα σωματίδια αυτά μπορούν να προκαλέσουν τοξικότητα μέσω μιας δοσοεξαρτώμενης αύξησης των ενεργών ριζών αζώτου. Το οξειδωτικό στρες από την συσσώρευση ενεργών ριζών μπορεί να ενεργοποιήσει την διαδικασία της αυτοφαγίας. AuNPs που παράγουν περισσότερες ενεργές ρίζες οξυγόνου μπορούν πιθανώς να αποδομηθούν μέσω αυτοφαγίας, προκαλώντας μικρότερη βλάβη στο DNA. Πολλαπλές μελέτες έχουν δείξει τον σχηματισμό αυτοφαγωσμάτων και την επαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν τις σχετικές πρωτεΐνες μετά την είσοδο των AuNPs στα κύτταρα [44].

Τα αποτελέσματα άλλων μελετών δείχνουν ότι η έκθεση κυττάρων σε AuNPs μπορεί να προκαλέσει απόπτωση, μέσω της παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου, της ευαισθητοποίησης της μιτοχονδριακής μεμβράνης και της διακοπής του κυτταρικού κύκλου. Πράγματι, τα σωματίδια αυτά φαίνεται να σταματούν τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G0 ή G2 [45].

Τα αποτελέσματα μιας άλλης μελέτης σε καρκινικά κύτταρα (A549 cells), φυσιολογικά βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα (16HBE cells), και αρχέγονα κύτταρα (MSC cells), απέδειξε όμοιο μονοπάτι πρόσληψης των AuNPs από τα διαφορετικά ήδη κυττάρων. Ωστόσο, η ενδοκυττάρια τύχη των νανοσωματιδίων διαφέρει ανάλογα με την ανθεκτικότητα της ενδοσωματικής/λυσosomalικής μεμβράνης. Για τα κύτταρα A549, τα AuNPs μεταφέρθηκαν από το ενδόσωμα/λυσόσωμα στα μιτοχόνδρια, προκαλώντας μείωση του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης, αυξημένο οξειδωτικό στρες και τελικά κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σχεδόν καθόλου τοξικότητα στα 16HBE και MSC κύτταρα, καθώς η λυσοσωματική μεμβράνη παρέμεινε πιο ανθεκτική και τα νανοσωματίδια δεν μπορούσαν να διαφύγουν από το λυσόσωμα [46].

Αναφορικά με τα επικαλυμμένα νανοσωματίδια, φαίνεται ότι τα AuNPs επικαλυμμένα με τρανφερίνη, προσλαμβάνονται από τα κύτταρα μέσω ενός μονοπατιού ενδοκυττάρωσης επαγόμενο από συγκεκριμένο υποδοχέα και στηριζόμενο στην κλαθρίνη. Τόσο η πρόσληψη όσο και η αποβολή των νανοσωματιδίων φαίνεται στην περίπτωση αυτή να εξαρτάται άμεσα από το μέγεθος των νανοσωματιδίων [47]. Σε άλλη μελέτη αναδεικνύεται ότι τα AuNPs επικαλυμμένα με sodium (3-diphenylphosphino)benzenesulfonic acid (TPPMS) επάγουν οξειδωτικό στρες, αυξημένη μιτοχονδριακή διαπερατότητα και κυτταρικό θάνατο. Αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης στην περίπτωση αυτή δείχνουν επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με φλεγμονή και αποσιώπηση γονιδίων που σχετίζονται με την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου [48].

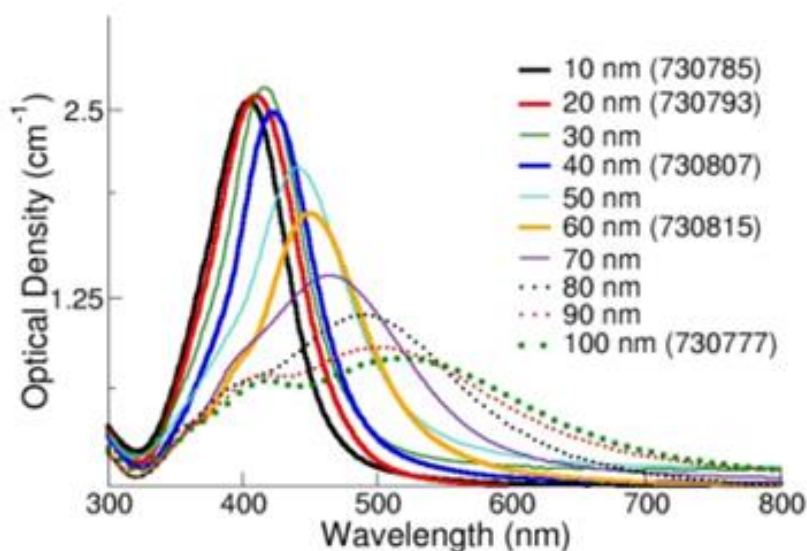
Μελέτες δείχνουν ότι τα AuNPs ρυθμίζουν σημαντικά την γονιδιακή έκφραση και την πρωτεϊνική λειτουργία προκαλώντας απόπτωση και οι λειτουργίες τους αυτές εξαρτώνται από τον τύπο του κυττάρου, το κυτταρικό περιβάλλον και το μέγεθος του νανοσωματιδίου [49].



Εικόνα 12: Γραφική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων των AuNPs με βιοσυστήματα, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [44].

2.2: Νανοσωματίδια Αργύρου (AgNPs)

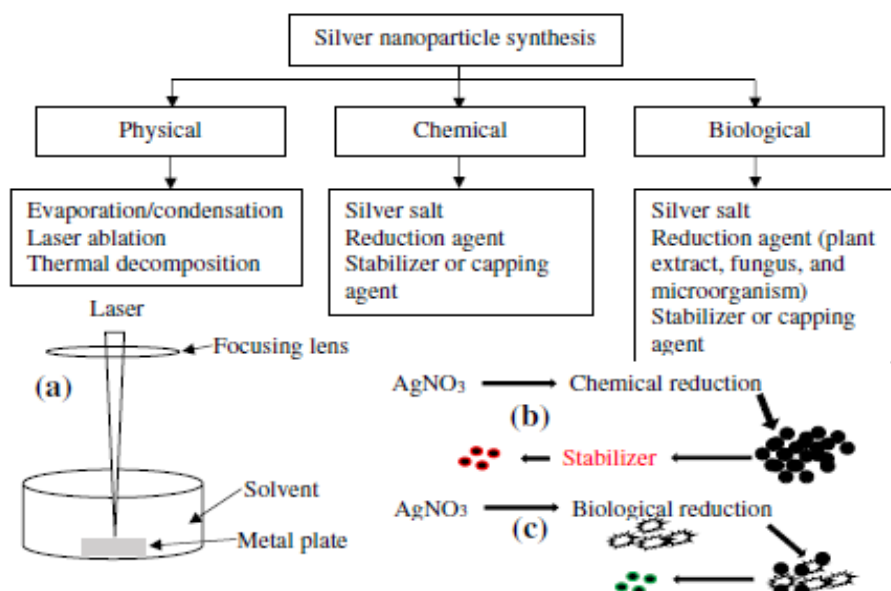
Τα νανοσωματίδια αργύρου, παρουσιάζουν εξίσου ενδιαφέρουσες οπτικές ιδιότητες με αυτά του χρυσού και βρίσκουν επίσης εφαρμογή και σε βιολογικά συστήματα σαν βιολογικοί αισθητήρες ανίχνευσής ουσιών, και επίσης λόγω των αντιβακτηριδιακών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν χρησιμοποιούνται σε πληθώρα εφαρμογών όπως σε ρούχα και χρώματα. Τα νανοσωματίδια Ag έχουν έντονο κίτρινο χρώμα και εμφανίζουν επιφανειακό συντονισμό πλασμονίου μεταξύ 400 nm και 450 nm ανάλογα με το μέγεθός τους [50].



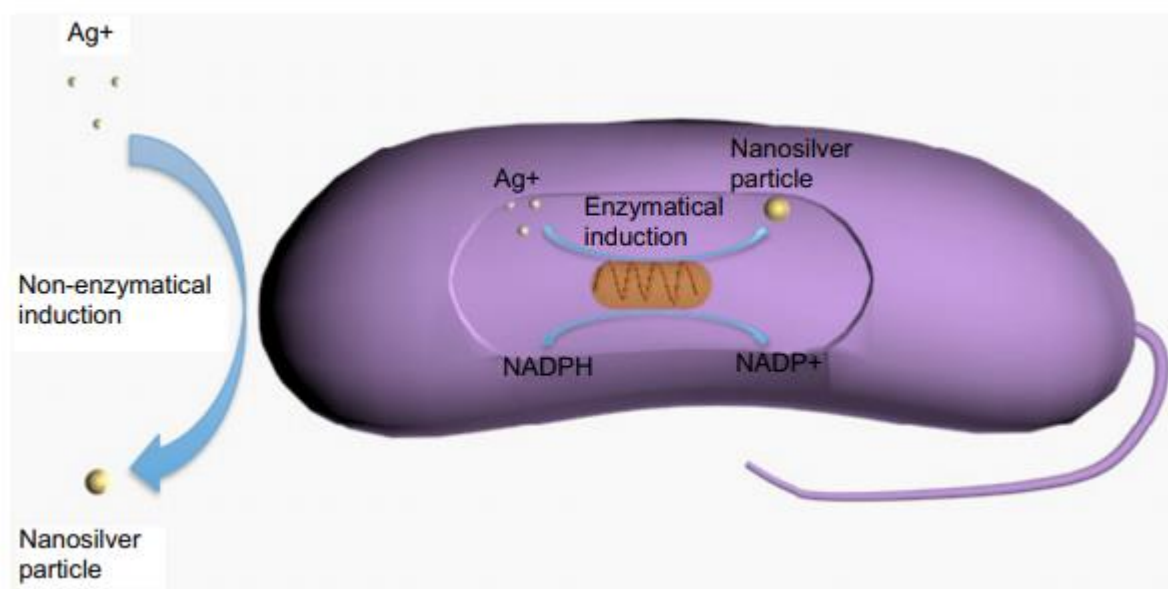
Διάγραμμα 1: Επιφανειακός συντονισμός πλασμονίου AgNPs συναρτήσει του μεγέθους τους σε συγκέντρωση 0.02 mg/mL [51].

2.2.1: Σύνθεση AgNPs

Όπως φαίνεται στο Σχήμα Χ, παρομοίως με τα AuNPs, τα AgNPs μπορούν να συντεθούν με μια πληθώρα τεχνικών, που συμπεριλαμβάνουν φυσικές, χημικές και βιολογικές μεθόδους. Η μέθοδος σύνθεσης οδηγεί σε νανοσωματίδια με διαφορετικό σχήμα, μέγεθος, μορφολογία και σταθερότητα [52].



Εικόνα 13: Διαγραμματική σύνοψη διαδικασιών σύνθεσης AgNPs, α) φυσικών, β) χημικών και γ) βιολογικών [52].



Εικόνα 14: Βιολογική σύνθεση AgNPs [50].

2.2.2: Βιολογικές εφαρμογές AgNPs

Διαγνωστικές εφαρμογές

Τα AgNPs, όπως και τα AuNPs, χρησιμοποιούνται σε βιοανιχνευτές και πολλαπλές αναλύσεις όπου τα νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται ως βιολογικοί δείκτες για τον ποσοτικό προσδιορισμό μακρομορίων και βιολογικών ενώσεων.

Αντιβακτηριακές εφαρμογές

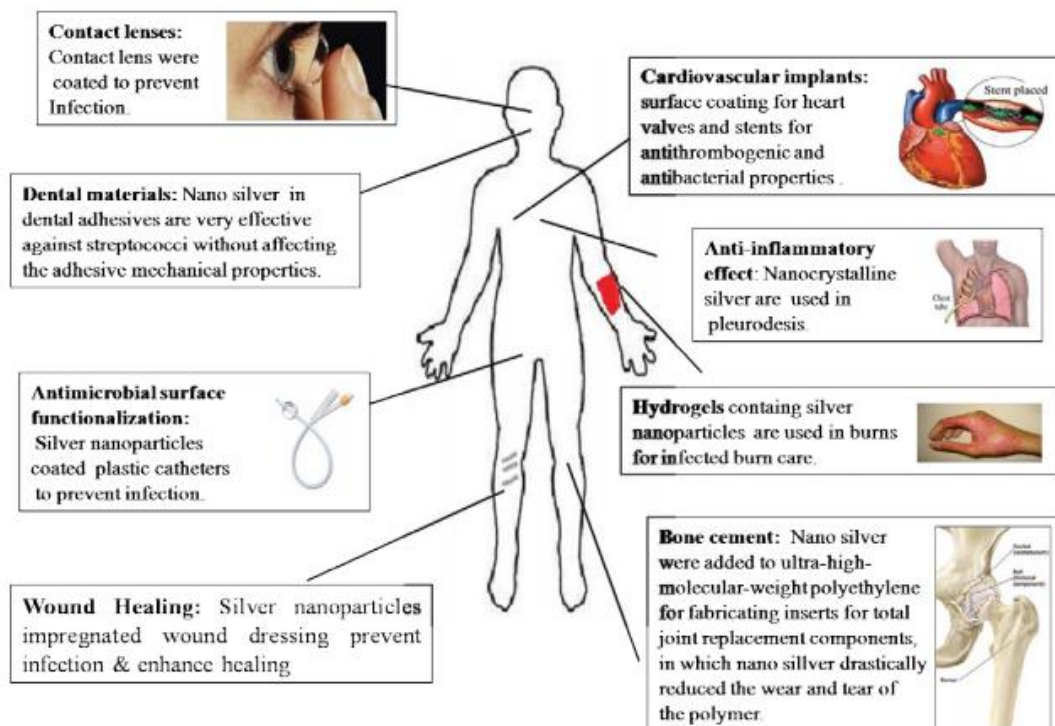
Σε ιατρικούς χώρους όπου απαιτείται υψηλή καθαριότητα και αποστειρωμένοι χώροι, νανοσωματίδια αργύρου βρίσκονται ενσωματωμένα από τα υλικά των τζαμιών μέχρι και στα χρώματα που χρησιμοποιούνται για να βαφούν οι τοίχοι. Η βακτηριοκτόνος δράση του αργύρου χρησιμοποιείται και για τον καθαρισμό του νερού, σκοτώνοντας βακτήρια που αλλιώς θα συσσωρεύονταν στα φίλτρα αποστείρωσης του νερού. Ένας ακόμη κλάδος χρήσης του αργύρου όπως αναφέρθηκε είναι αυτός της συσκευασίας τροφίμων. Στις περιπτώσεις αυτές συχνά νανοσωματίδια αργύρου βρίσκονται ενσωματωμένα σε πολυμερικές μήτρες από υλικά που χρησιμοποιούνται για την συσκευασία τροφίμων. Με αυτό το τρόπο διασφαλίζεται η ποιότητα των τροφίμων αυξάνοντας τη διάρκεια ζωής τους και προστατεύεται η δημόσια υγεία.

Εφαρμογές αγωγιμότητας

Τα AgNPs χρησιμοποιούνται σε αγώγιμα μελάνια και ενσωματώνονται σε σύνθετα υλικά για να αυξήσουν την θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητά τους. Τα αγώγιμα μελάνια είναι πρακτικά κανονικά μελάνια που περιέχουν συνήθως γραφίτη ή κάποιο άλλο αγώγιμο υλικό.

Οπτικές εφαρμογές

Τα AgNPs χρησιμοποιούνται για την αποτελεσματική συλλογή φωτός και για την ενισχυμένη οπτική φασματογραφία (Enhanced optical spectroscopy) [53-55].



Εικόνα 15: Βιοϊατρικές εφαρμογές AgNPs [55].

Μηχανισμός Αντιβακτηριακής Δράσης των AgNPs

Σήμερα η αντιβακτηριακή δράση των νανοσωματιδίων αργύρου πιστεύεται πως οφείλεται σε έναν πολύπλευρο μηχανισμό αλληλεπίδρασης των νανοσωματιδίων με τόσο τα Gram θετικά όσο και τα Gram αρνητικά βακτηριακά στελέχη.

Ο μηχανισμός δράσης του αργύρου βασίζεται στη συσσώρευση των νανοσωματιδίων στην επιφάνεια των βακτηριακών κυττάρων. Η συσσώρευση αυτή ενισχύεται εξαιτίας της ηλεκτροστατικής έλξης μεταξύ του θετικού z- δυναμικού των νανοσωματιδίων και της αρνητικά φορτισμένης κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων. Ειδικότερα, στα θετικά κατά Gram βακτήρια που λόγω του παχέως στρώματος πεπτιδογλυκάνων και τειχοϊκών οξέων εμφανίζουν μεγαλύτερη πυκνότητα αρνητικού επιφανειακού φορτίου, η συσσώρευση των νανοσωματιδίων είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια [56]. Η συσσώρευση των νανοσωματιδίων έχει παρατηρηθεί πως σταδιακά προκαλεί δομικές αλλαγές στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων, οδηγώντας στη μεταβολή της διαπερατότητάς της. Η αλλαγή στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί στην ανεξέλεγκτη μεταφορά ουσιών από το εσωτερικό του κυττάρου στο εξωτερικό, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο [57]. Η καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να οφείλεται στην αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με το στρώμα φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν ομάδες θείου και δισουλφιδικούς δεσμούς. Ο άργυρος συμπεριφέρεται σαν οξύ και έχει την δυνατότητα να αντιδρά με ομάδες θείου και φωσφόρου που συμπεριφέρονται ως βάσεις. Με αυτό το τρόπο μπορεί να επηρεάσει την λειτουργία των πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης και συνεπώς τη δομή της [57].

Τα νανοσωματίδια αργύρου εκτός από τη συσσώρευση τους στη κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων βρίσκονται και στο εσωτερικό τους. Ο μηχανισμός με τον οποίο διαπερνούν την υδροφοβική λιπιδική

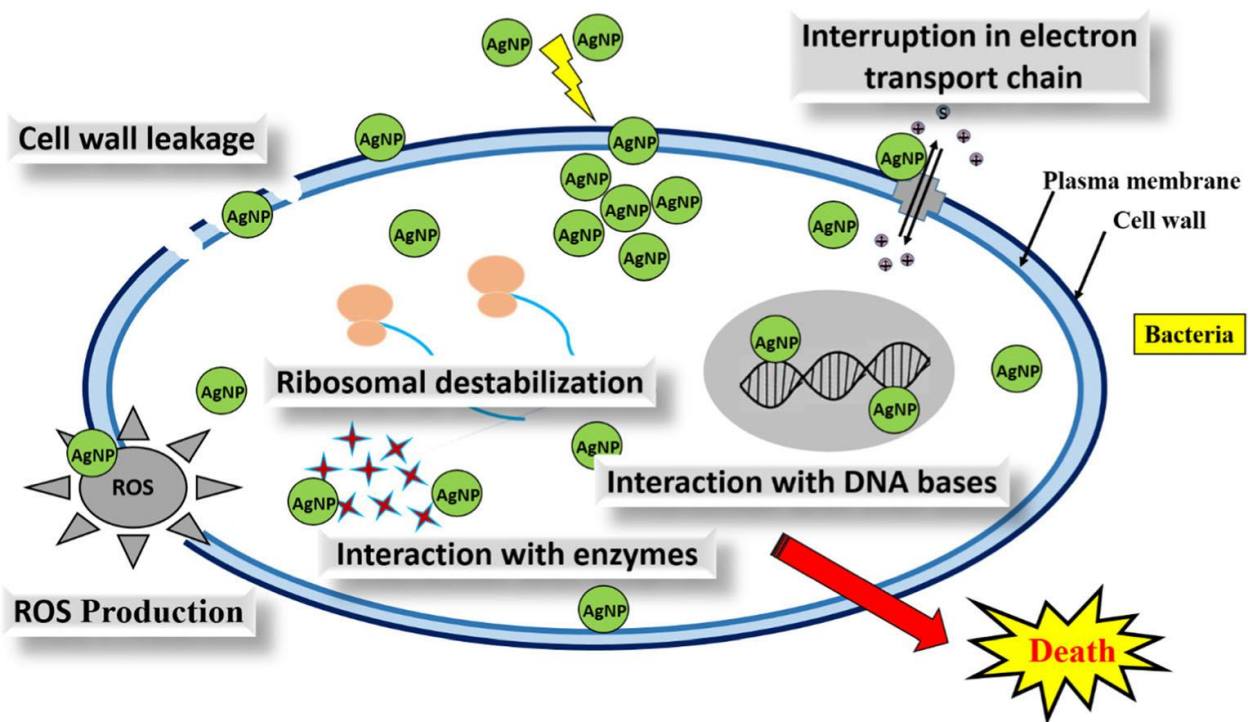
διπλοστοιβάδα δεν είναι γνωστός. Στο εσωτερικό των κυττάρων τα νανοσωματίδια αλληλεπιδρούν με ένζυμα και πρωτεΐνες που φέρουν ομάδες φωσφόρου και θείου σχηματίζοντας ισχυρούς δεσμούς Ag-S, οδηγώντας σε απώλεια της λειτουργικότητας πρωτεϊνών που καλύπτουν λειτουργικές ανάγκες του κυττάρου [58].

Εκτός από τα νανοσωματίδια αργύρου, πιστεύεται πως στην αντιβακτηριδιακή δράση του αργύρου συνεισφέρουν και ιόντα αργύρου τα οποία εκλύονται από την επιφάνεια των νανοσωματιδίων, όταν αυτά βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον ή στο εσωτερικό των κυττάρων [58]. Τα ιόντα αργύρου μπορούν να εισέλθουν στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω διαμεμβρανικών πρωτεϊνών που λειτουργούν ως κανάλια ιόντων. Τα ιόντα αργύρου αντιδρούν με ομάδες θείου και φωσφόρου που βρίσκονται στα ένζυμα, αλλά και με τα ριβοσώματα του κυττάρου, επηρεάζοντας τις κυτταρικές λειτουργίες. Για παράδειγμα έχει προταθεί η επίδραση των ιόντων αργύρου στη ριβοσωμική πρωτεϊνική υπομονάδα 30S, εμποδίζοντας την μετάφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη φωσφορυλίωση του ADP σε ATP [59].

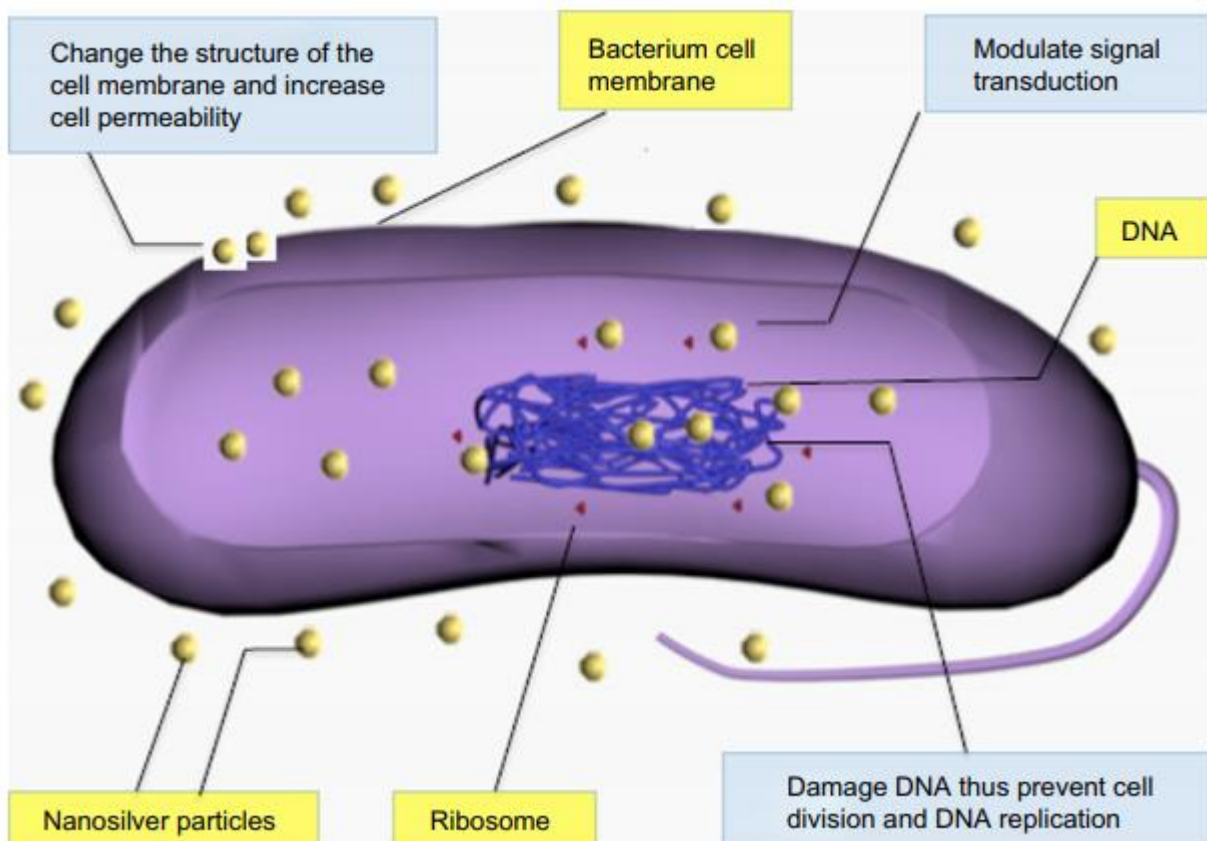
Τα ιόντα αργύρου, όπως και τα νανοσωματίδια αργύρου, έχει προταθεί πως συνδέονται με λειτουργικές ομάδες στο γενετικό υλικό των κυττάρων, καθώς και πως οδηγούν στην διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ελίκων του DNA. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παρεμπόδιση διαδικασιών του γενετικού υλικού, όπως η αντιγραφή, αλλά και η έκφραση γονιδίων, οδηγώντας έτσι στον κυτταρικό θάνατο [60].

Ένας ακόμη μηχανισμός που συνεισφέρει στην αντιβακτηριδιακή δράση του αργύρου είναι η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου όπως ανιόν οξυγόνου (O_2^-), ρίζες υδροξυλίου ($OH\cdot$), H_2O_2 . Αυτά τα στοιχεία δημιουργούνται κατά την αντίδραση του αργύρου αλλά και των ιόντων αργύρου με πρωτεΐνες των κυτταρικής μεμβράνης, αλλά και με ένζυμα στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου μπορούν να καταστρέψουν και να επιδράσουν στην λειτουργία των μιτοχονδρίων αλλά και του DNA του κυττάρου [61].

Συνοπτικά, όπως βλέπουμε και στο Σχήμα X τα νανοσωματίδια αργύρου και τα ιόντα αργύρου αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη προκαλώντας δομικές αλλαγές. Επιπλέον διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη προκαλώντας βλάβες στις ενδοκυτταρικές δομές των βακτηρίων. Εμπλέκονται στην πρωτεϊνοσύνθεση προκαλώντας την αναστολή της, ενώ μπορούν να εμπλακούν και στις διαδικασίες αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης γονιδίων του DNA, με την πρόσδεση των νανοσωματιδίων στο γενετικό υλικό του κυττάρου αλλά και μέσω της δημιουργίας ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Πράγματι η πρωτεϊνοσύνθεση έχει βρεθεί πως επηρεάζεται από την ύπαρξη των νανοσωματιδίων αργύρου [62] οδηγώντας στην αποσταθεροποίηση της σύνθεσης της εξωτερικής μεμβράνης των βακτηρίων [63].



Εικόνα 16: Αντιμικροβιακοί μηχανισμοί AgNPs [63].

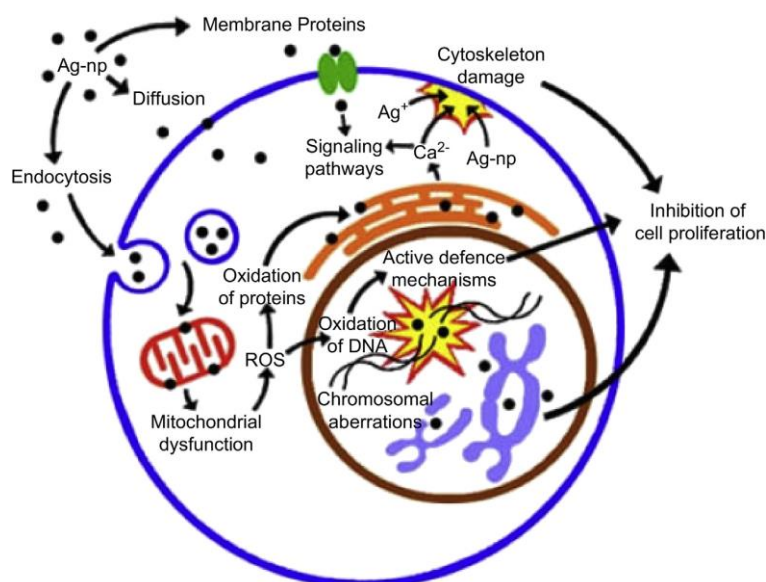


Εικόνα 17: Αντιβακτηριακοί μηχανισμοί των AgNPs [50].

2.2.3: Κυτταροτοξικότητα AgNPs

In vitro τοξικότητα

Τα AgNPs έχει βρεθεί να είναι κυτταροτοξικά σε διάφορα είδη κυττάρων, όπως ανθρώπινα μονοκύρηννα περιφερικού αίματος [64], ανθρώπινα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα (A549) [65], ανθρώπινα κυψελιδικά μακροφάγα [66], νευροενδοκρινικά κύτταρα [67] ηπατικά κύτταρα αρουραίου [68] και γοναδικά κύτταρα ποντικού [69]. Ωστόσο, οι Alt και συν. έδειξαν ότι οστικό τσιμέντο με περιεκτικότητα 1.0% σε AgNPs δεν προκάλεσε σημαντική κυτταροτοξικότητα σε ινοβλάστες ποντικού (L929) και ανθρώπινους οστεοβλάστες [70]. Αν και οι λεπτομέρειες του μηχανισμού τοξικότητας παραμένουν ασαφείς, πιστεύεται ότι τα νανοσωματίδια ιονίζονται στο κύτταρο, οδηγώντας σε ενεργοποίηση διαύλων ιόντων και μεταβολές στην διαπερατότητα των μεμβρανών τόσο σε νάτριο όσο και κάλιο [71]. Επιπλέον φαίνεται να αλληλοεπιδρούν με τα μιτοχόνδρια [72], και να οδηγούν σε ενεργοποίηση των αποπτωτικών μηχανισμών του κυττάρου μέσω της παραγωγής ενεργών ριζών οξυγόνου [73], οδηγώντας έτσι στον κυτταρικό θάνατο (Εικόνα 18) [74].



Εικόνα 18: Προτεινόμενος μηχανισμός τοξικότητας των AgNPs [74].

In vivo τοξικότητα

Οι Chen και Schluesener έχουν ανασκοπήσει την βιοκατανομή, τη συσσώρευση σε όργανα, την αποδόμηση, τις πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες και την τοξικότητα από τις ιατρικές χρήσεις των AgNPs [75].

Το αναπνευστικό, το γαστρεντερικό, το δέρμα και το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα είναι οι κύριες πύλες εισόδου για την είσοδο των περιβαλλοντικών AgNPs στον οργανισμό. Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι μετά την εισπνοή AgNPs, μικρές αλλά ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων μεγέθους 14.6 ± 1.0 nm παρέμειναν στον πνεύμονα και εν συνεχεία στην συστηματική κυκλοφορία και άλλα όργανα όπως η καρδιά, το ήπαρ, οι νεφροί, ακόμα και ο εγκέφαλος [76]. Σε μια πρόσφατη έρευνα στοματικής τοξικότητας σε ποντίκια, οι Kim και συν βρήκαν ότι AgNPs συσσωρεύτηκαν στο αίμα, στο ήπαρ, στους πνεύμονες, στο στομάχι, τους όρχεις και στον εγκέφαλο, ωστόσο, δεν αναδείχθηκε σημαντική γενετοξικότητα (τοξικότητα σε γονάδες) από την στοματική χορήγηση νανοσωματιδίων 60nm σε διάφορες δόσεις για 28 ημέρες [77]. Οι Lee και συν.

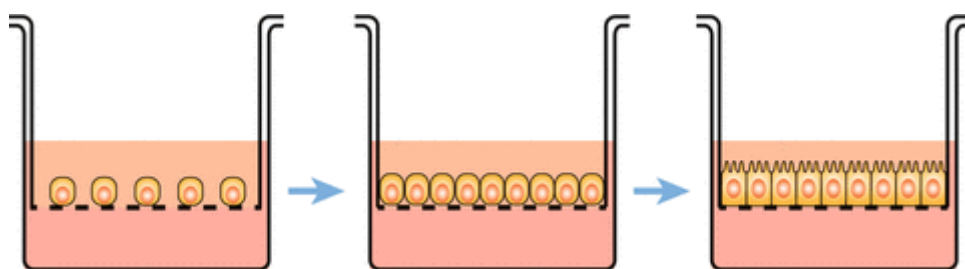
έδειξαν ότι AgNPs μικρότερα από 12nm σε μέγεθος επηρέασαν την ανάπτυξη εμβρύων ψαριών, προκάλεσαν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, βλάβες DNA και αναστολή κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε κυτταρικές σειρές από zebrafish [78]. Ωστόσο, ο Lansdown έδειξε ότι ο άργυρος δεν είναι νευροτοξικός παρά τις εναποθέσεις AgNPs σε νευρικά κύτταρα του δέρματος [79] και οι Ji και συν. έδειξαν ότι τα AgNPs δεν είχαν επίδραση στο αναπνευστικό σύστημα σε μια 28ήμερη in vivo μελέτη [80].

Οι μελέτες σε ζώα και ανθρώπους δείχνουν ότι είναι δύσκολη η πλήρης αποβολή του αργύρου από το σώμα., ωστόσο νανοσωματίδια αργύρου φαίνεται να αποβάλλονται στις τρίχες, τα ούρα και τα κόπρανα [81]. Δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με την τοξικότητα των νανοσωματιδίων αργύρου στον άνθρωπο καθώς οι περισσότερες μελέτες βασίζονται σε κυτταρικές σειρές και βραχυπρόθεσμα πειράματα σε ζώα.

2.3: Κυτταρική Σειρά Caco-2

Η κυτταρική σειρά με την οποία ασχολείται η παρούσα διατριβή είναι η Caco-2. Αποτελεί μια συνεχή σειρά από ετερογενή ανθρώπινα κύτταρα ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος, που αναπτύχθηκε από το Sloan-Kettering Institute for Cancer Research με τις μελέτες του Dr. Jorgen Fogh.

Αν και προέρχονται από καρκίνωμα του παχέος εντέρου, όταν καλλιεργηθούν σε κατάλληλες συνθήκες μπορούν να διαφοροποιηθούν και να πολωθούν ώστε ο φαινότυπος τους να προσομοιάζει, μορφολογικά και λειτουργικά, αυτόν των εντεροκυττάρων που επικαλύπτουν το εσωτερικό του λεπτού εντέρου. Τα Caco-2 κύτταρα εκφράζουν στεγανές συνάψεις, μικρολάχνες και μια πληθώρα ενζύμων και μεταφορέων που χαρακτηρίζουν τα εντεροκύτταρα όπως πεπτιδάσες, εστεράσες, Ρ-γλυκοπρωτεΐνη, μεταφορείς για αμινοξέα, χολικά οξέα, καρβοξυλικά οξέα κ.α [82-84].



Εικόνα 19: Σχηματική αναπαράσταση της επαγόμενης διαφοροποίησης των κυττάρων Caco-2, η οποία επέρχεται όταν γεμίσει το τρυβλίο καλλιέργειας [85].

2.4: Δεδομένα Μικροσυστοιχιών

2.4.1: Αναζήτηση δεδομένων

Αρχικά εκπονήθηκε ενδεδειγμένη αναζήτηση στα ελεύθερα πρόσβασης αποθετήρια δεδομένων (GEO, ArrayExpress) με βασικό άξονα αναζήτησης τα νανοσωματίδια χρυσού και αργύρου σε ανθρώπινα κύτταρα με τους όρους (βλ. Πίνακας 2: Όροι αναζήτησης δεδομένων στη βάση GEO. Πίνακας 2):

Νανοσωματίδια Χρυσού	Νανοσωματίδια Αργύρου
gold nanoparticle	silver nanoparticle
gold nanoparticles	silver nanoparticles
gnp	-
gnps	-
aunp	agnp
aunps	agnps
au-np	ag-np
au-nps	ag-nps

Πίνακας 2: Όροι αναζήτησης δεδομένων στη βάση GEO.

Βρέθηκαν τελικά έξι σύνολα δεδομένων για νανοσωματίδια χρυσού και τέσσερα για νανοσωματίδια αργύρου σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές.

Οι τελικές προς επεξεργασία μελέτες είναι οι

- “Understanding toxicity pathways of gold nanoparticles: RNA expression study on Caco-2 human colon carcinoma cells.” [86]
- “Molecular mechanism of silver nanoparticles in human intestinal cell line Caco-2.” [87]
- “Different responses of Caco-2 and MCF-7 cells to silver nanoparticles are based on highly similar mechanisms of action.” [88]

Οι υπόλοιπες αφαιρέθηκαν είτε λόγω ελλιπών δεδομένων (π.χ. μη-ύπαρξη δείγματος ελέγχου), είτε λόγω μη-δημοσίευσης της μελέτης μετά το πέρας ετών. Λοιπά κριτήρια ήταν ο περιορισμός σε νανοσφαιρίδια (κατά προτίμηση χωρίς να είναι σύνθετα με άλλες ουσίες) και ο κυτταρικός τύπος πάνω στον οποίο έγινε η κάθε μελέτη. Οι σειρές που μελετώνται τελικά αντιστοιχούν στα chip Agilent, Affymetrix και Illumina αντίστοιχα και οι προς μελέτη επιλογές αντιστοιχούν ένα σύνολο δεδομένων χρυσού και δύο αργύρου, τα οποία παρουσιάζονται στους Πίνακες 3 και 4:

Νανοσωματίδια Χρυσού	Νανοσωματίδια Αργύρου
GSE55349	GSE62253
	GSE84982

Πίνακας 3: Κωδικοί καταχώρησης σειρών δειγμάτων που επιλέχθηκαν από τη GEO.

Κωδικός GEO	Τίτλος Δημοσίευσης	Πλατφόρμα	Κύτταρα	Είδος NPs	Μέγεθος NPs	Συγκέντρωση NPs	Χρονική Στιγμή
GSE55349	Understanding toxicity pathways of gold nanoparticles: RNA expression study on Caco-2 human colon carcinoma cells.	GPL14550 Agilent Microarray	Caco-2	Au	5nm 30nm	100μM 300μM	24h 72h
GSE62253	Molecular mechanism of silver nanoparticles in human intestinal cell line Caco-2.	GPL570 [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Array	Caco-2	Ag AgNO3	15nm	0.5μg/ml 5μg/ml 25μg/ml	24h
GSE84982	Different responses of Caco-2 and MCF-7 cells to silver nanoparticles are based on highly similar mechanisms of action.	GPL10558 Illumina beadchip	Caco-2 MCF7	Ag AgNO3	20nm 30nm 60nm 110nm	1 mg/ml	6h 24h

Πίνακας 4: Συνοπτική παρουσίαση συνόλων δεδομένων που επιλέχθηκαν από τη GEO προς επεξεργασία.

Τα πρωτογενή δεδομένα από τις προαναφερθείσες έρευνες αντλήθηκαν τοπικά προς επεξεργασία από τη δημόσια βάση δεδομένων μικροσυστοιχιών GEO.

Αναλυτικότερα, οι σειρές δεδομένων και οι δημοσιεύσεις με τις οποίες σχετίζονται είναι οι εξής:

2.4.2: GSE55349

Με τη σειρά δεδομένων GSE55349 σχετίζεται η δημοσίευση “Understanding toxicity pathways of gold nanoparticles: RNA expression study on Caco-2 human colon carcinoma cells.” [86], η οποία πραγματοποιήθηκε συνεργατικά από τα «European Commission, Joint Research Centre (JRC)» και του «University of Insubria» στο Varese της Ιταλίας και δημοσιεύθηκε στις 4 Μαρτίου 2015 στο περιοδικό Toxicology Letters.

Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που αντλήθηκαν μέσω της πλατφόρμας με κωδικό GPL14550, η οποία αντιστοιχεί στο chip Agilent-028004 SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray (Probe Name Version).

Σε αυτή τη μελέτη συγκρίνεται η κυτταρική πρόσληψη, η κυτταροτοξικότητα και τα μοτίβα στην έκφραση RNA που παρατηρήθηκαν σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος (Caco-2) τα οποία εκτέθηκαν σε AuNPs (5 και 30nm). Σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο κατασκευάστηκαν τρία technical replicates για κάθε φαινότυπο. Οι πιο έκδηλες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση ανιχνεύθηκαν στις 72h (300mM συγκέντρωση) έκθεσης σε AuNPs (5nm).

Οι βιολογικές διαδικασίες που επηρεάστηκαν από αυτά τα μικρότερα AuNPs ήταν σύμφωνα με τους συγγραφείς της αρχικής δημοσίευσης των δεδομένων:

- Πρόσδεση ιόντων RNA/ιόντων ψευδάργυρου/μεταβατικών μετάλλων (μειώθηκε)
- Πρόσδεση ιόντων καδμίου/χαλκού (αυξήθηκε)
- Μεταβολισμός γλουταθειόνης (αυξήθηκε)
- Μερικά γονίδια ευαίσθητα στον NRF2 (μερικές μεταλλοθειονίνες, HMOX, G6PD, OSGIN1 και GPX2) (ιδιαίτερη αύξηση)
- Μερικές σεληνοπρωτεΐνες εκφράστηκαν διαφορεικά
- Τα ευρήματα δείχνουν ότι έκθεση σε υψηλή συγκέντρωση AuNPs (5nm) επάγει το μονοπάτι έκθεσης σε μέταλλα, σηματοδοτικά μονοπάτια οξειδωτικού στρες, και μπορεί να επηρεάζουν την ομοιόσταση του σεληνίου.

Κάποιες από της ανιχνευόμενες κυτταρικές αποκρίσεις μπορούν να διερευνηθούν περαιτέρω ως πιθανοί επαγωγείς των αντικαρκινικών ιδιοτήτων των νανοφαρμάκων που βασίζονται σε AuNPs.

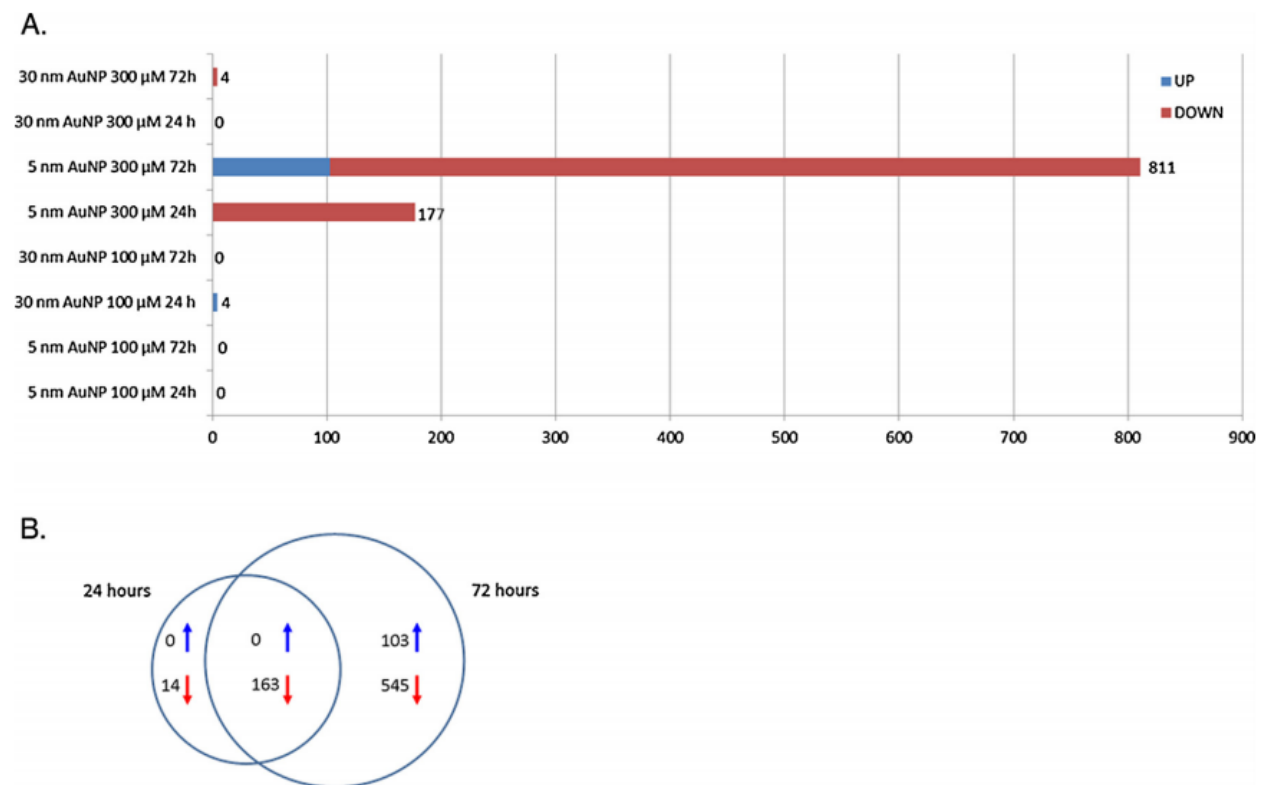
Η προεπεξεργασία των δεδομένων έγινε με το στατιστικό περιβάλλον της R χρησιμοποιώντας το πακέτο Agi4x44PreProcess (v 1.18.0). Η κανονικοποίηση και το φιλτράρισμα έγιναν με mean signal και BG median signal ως foreground και background σήματα αντίστοιχα. Τα δεδομένα κανονικοποιήθηκαν μεταξύ των μικροσυστοιχιών με τη μέθοδο quantile. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το πακέτο Limma και έγινε moderated t test. Τέλος η επίλογη γονιδίων έγινε με log2 fold change μεγαλύτερο του 1.5 με false discovery rate (μέθοδος Benjamini και Hochberg's method) διορθωμένα p-value μικρότερα από 0.05.

Για ανάλυση λειτουργικού εμπλουτισμού χρησιμοποιήθηκαν τα:

- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>)
- DAVID bioinformatics resources server (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)
- Phylogenetic tree creation (rVISTA)
- Co-expression network visualization (FunCoup)

- In silico miRNA binding sites prediction (DIANA-mirExTra)

Διαγραμματικά τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 20.



Εικόνα 20: Απεικόνιση των βιβλιογραφικών αποτελεσμάτων διαφορικής ανάλυσης γονιδίων της σειράς δεδομένων GSE55349 σε (A) αθροιστικό ραβδόγραμμα και (B) διάγραμμα Venn για την υποπερίπτωση έκθεσης σε AuNPs 5nm (300mM).

Έγινε επίσης και επαλήθευση με qPCR ενδεικτικά σε 12 mRNAs που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα διαδικασιών και φάνηκε να υπάρχει αρκετά καλή συμφωνία με τις μικροσυστοιχίες.

2.4.3: GSE62253

Με τη σειρά δεδομένων GSE62253 σχετίζεται η δημοσίευση “Molecular mechanism of silver nanoparticles in human intestinal cell line Caco-2.” [87], η οποία πραγματοποιήθηκε στο Department of Food Safety του Federal Institute for Risk Assessment στο Βερολίνο της Γερμανίας. και δημοσιεύθηκε στις 21 Μαΐου 2015 στο περιοδικό Nanotoxicology.

Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που αντλήθηκαν μέσω της πλατφόρμας με κωδικό GPL570, η οποία αντιστοιχεί στο chip [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array.

Σε αυτή τη μελέτη γίνεται ανάλυση των μοριακών μηχανισμών των νανοσωματιδίων αργύρου 15nm (AgNPs) σε συγκεντρώσεις 0.5μg/ml (ιόντα), 5μg/ml και 25μg/ml σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα ορθοκολικού αδενοκαρκινώματος (Caco-2). Μελετώνται τα συγκεκριμένα νανοσωματίδια επειδή χρησιμοποιούνται σε συσκευασίες προϊόντων προς κατανάλωση και άρα έρχονται σε επαφή με φαγητό, νερό και διατροφικά συμπληρώματα και κατά συνέπεια οδηγούνται σε πρόσληψη από του στόματος και άρα έκθεση του γαστρεντερικού σωλήνα σε αυτά. Αν και σε προηγούμενη μελέτη δε βρέθηκε ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών, ενεργοποιήθηκαν μηχανισμοί οξειδωτικού στρες, μορφολογικές αλλαγές και κυτταρικός θάνατος. Σε αυτή λοιπόν τη μελέτη χρησιμοποιείται η διαφορική γονιδιακή έκφραση ολόκληρου του γονιδιώματος με επαλήθευση με ποσοτική real-time RT-PCR και μικροσκοπική ανάλυση. Σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο κατασκευάστηκαν τρία technical replicates για κάθε φαινότυπο.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα surfactant-coated AgNPs πιθανώς επηρεάζουν τα κύτταρα με σηματοδότηση από έξω προς τα μέσα. Επίσης:

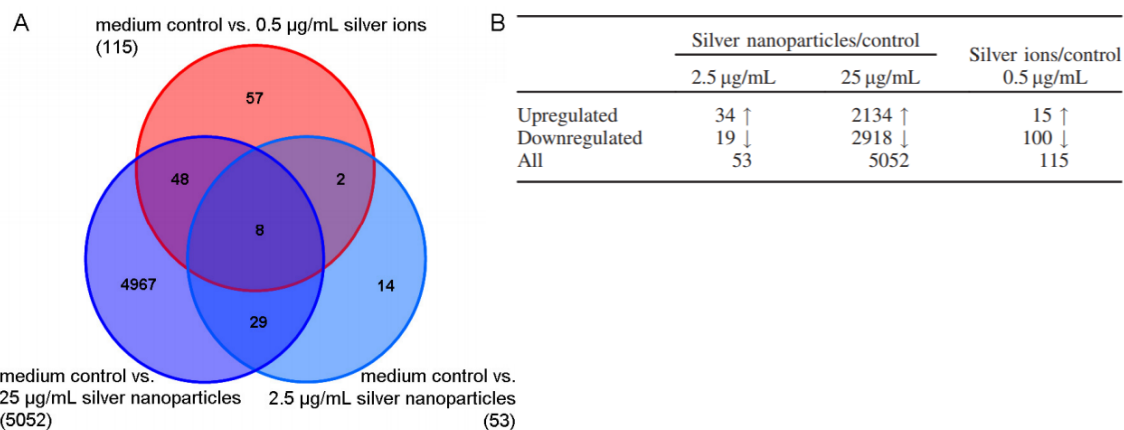
- Επάγουν οξειδωτικό στρες και επηρεάζουν τα μονοπάτια που σχετίζονται με τα FAK, ILK, ERK, MAPK, τις ιντεγκρίνες, τις συνδέσεις πρόσφυσης και τις στεγανές συνδέσεις, άρα:
- Επάγουν μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι AP1, NFκB και NRF2, οι οποίοι συμμετέχουν στην ενεργοποίηση κυτταρικών μηχανισμών που λειτουργούν ως απάντηση σε οξειδωτικό στρες και μεταλλικά ιόντα.
- Επάγουν αλλαγές στον κυτταροσκελετό και τις επαφές κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-έξωκυτταρικού δικτύου.
- Επιβεβαιώνεται η απουσία αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου.
- Μη-αποπτωτικός, νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος, ειδικά στο έντερο, μπορεί να προκαλέσει φλεγμονή και να επηρεάσει τη ανοσολογική απόκριση στους βλεννογόνους.

Συμπερασματικά, η συνολική εικόνα δείχνει μικρό ποσοστό κυτταρικής πρόσληψης. Τα δεδομένα υποστηρίζουν αντιδράσεις με αγκιστρωμένες στη μεμβράνη πρωτεΐνες και/ή εξωκυττάρια.

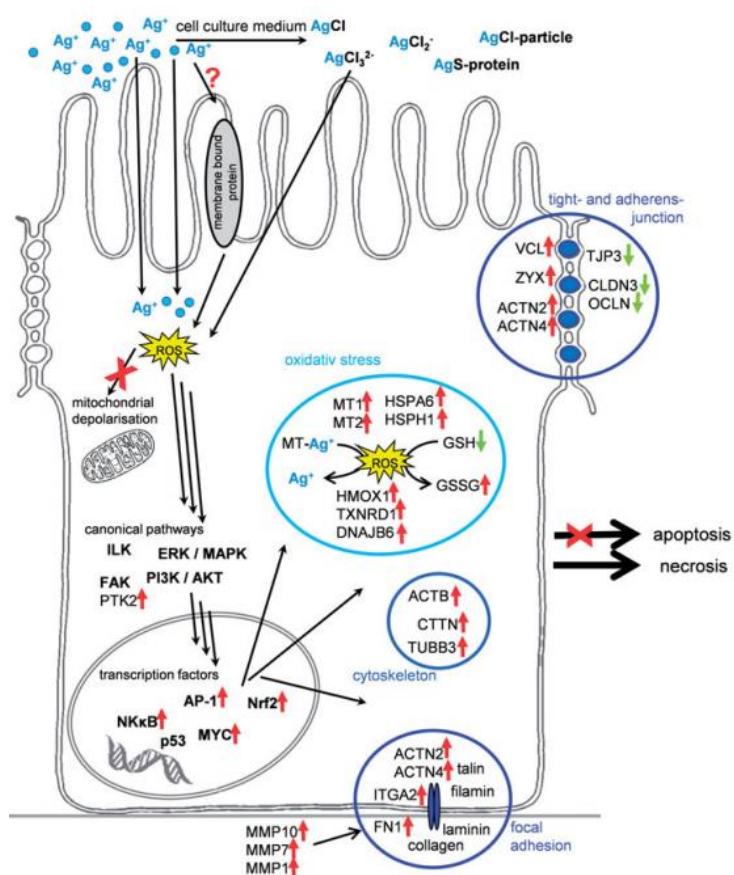
Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του Ingenuity Pathway Analysis software (IPA, Ingenuity Systems, www.ingenuity.com). Το κατώφλι του fold change τέθηκε $-1.4 < fc < 1.4$ και το p-value < 0.05 . Ο εμπλουτισμός έγινε με το ίδιο λογισμικό.

Έγινε επιλογή 89 γονιδίων για επαλήθευση με RT-PCR και τα αποτελέσματα φάνηκαν αξιόπιστα.

Στις Εικόνα 21 και Εικόνα 22 φαίνονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της μελέτης.



Εικόνα 21: (A) Διάγραμμα Venn διαφορικών κφρασμένων γονιδίων και (B) συνοπτικός πίνακας της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στη σειρά δεδομένων GSE62253.



Εικόνα 22: Συνολική εικόνα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στη σειρά δεδομένων GSE62253

2.4.4: GSE84982

Με τη σειρά δεδομένων GSE84982 σχετίζεται η δημοσίευση “Different responses of Caco-2 and MCF-7 cells to silver nanoparticles are based on highly similar mechanisms of action.” [88], η οποία πραγματοποιήθηκε συνεργατικά από το RIKILT - Wageningen University & Research Centre, στο Wageningen της Ολλανδίας και το University College Dublin στο Δουβλίνο της Ιρλανδίας και δημοσιεύθηκε στις 6 Σεπτεμβρίου 2016 στο περιοδικό Nanotoxicology.

Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που αντλήθηκαν μέσω της πλατφόρμας με κωδικό GPL10558, η οποία αντιστοιχεί στο chip Illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip.

Σε αυτή τη μελέτη γίνεται προσπάθεια βαθύτερης κατανόησης των επαγόμενων μοριακών μηχανισμών που ενεργοποιούνται σε κυτταρικές σειρές Caco-2 και MCF-7 μετά από έκθεση σε AgNPs προκειμένου να γίνει συγκριτική μελέτη για το αν επιθηλιακά κύτταρα διαφορετικών ιστών έχουν παρόμοια αντίδραση. Τα νανοσωματίδια είναι 20, 30, 60, και 110nm, ενώ γίνεται και χρήση AgNO₃, ενώ όλα τα νανοσωματίδια μελετώνται σε 6h και 24h μετά την έκθεση. Σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο κατασκευάστηκαν τρία technical replicates για κάθε φαινότυπο. Τα AgNPs φάνηκε να προσλαμβάνονται από τα κύτταρα και να διαλύονται ενδοκυτταρικά. Συγκριτικά, τα κύτταρα Caco-2 φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε AgNPs, πιο αργούς κινητικούς μηχανισμούς γονιδιακής έκφρασης, και δεν παρατηρήθηκαν διαφορές εξαρτώμενες από το μέγεθος των νανοσωματιδίων. Μολαταύτα, σε μοριακό επίπεδο, δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δυο κυτταρικές σειρές. Ανάλυση του μεταγραφώματος των σειρών μετά από έκθεση σε νανοσωματίδια αργύρου δείχνει ότι:

- Προκαλείται απόκριση οξειδωτικού στρες (που πιθανώς οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο και στις δυο κυτταρικές σειρές)
- Δεν υπάρχουν ενδείξεις επιδράσεων που να επάγονται συγκεκριμένα από AgNPs.
- Αποκρίσεις σε AgNPs φαίνεται να επάγονται από ιόντα αργύρου που απελευθερώνονται από τα AgNPs.

Εν κατακλείδι, οι διαφορές στις αποκρίσεις των κυττάρων μεταξύ των κυττάρων Caco-2 και MCF-7 είναι κυρίως χρονικές και διαφορετικές σε μέγεθος, αλλά όχι σε διαφορετικό υποκείμενο μηχανισμό.

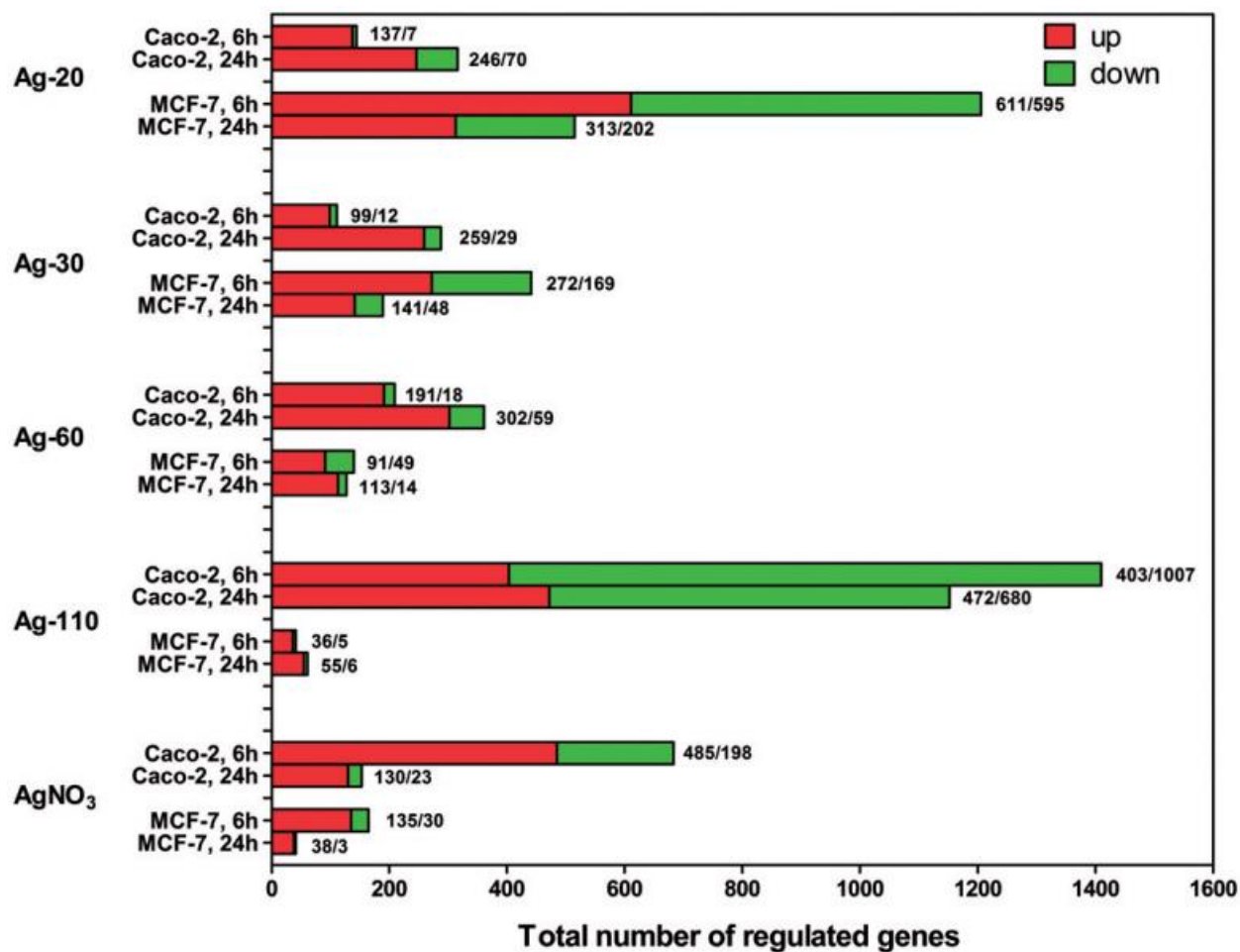
Ειδικότερα, τα περισσότερα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια και στους δύο κυτταρικούς τύπους ήταν υπερεκφρασμένα, με εξαίρεση το συνδυασμό κυττάρων Caco-2 με AgNPs 100nm, ο οποίος έδωσε περισσότερα υποεκφρασμένα γονίδια. Ανάλυση σηματοδοτικών μονοπατιών αυτής της υποπερίπτωσης έδειξε ότι τα γονίδια αυτά σχετίζονται με αρνητική ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, των μεταβολικών και βιοσυνθετικών μηχανισμών, υποδεικνύοντας έτσι μια ισχυρή κυτταροτοξική επίδραση. Αυτό συνάδει μακροσκοπικά με τα πολύ μικρότερα ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων αυτού του συνδυασμού.

Η κανονικοποίηση και η ανάλυση των δεδομένων έγινε χρησιμοποιώντας το MadMax, ένα on-line σύστημα φτιαγμένο ιδιωτικά (Lin et al. 2011). Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Variance Stabilization and Normalization (VSN) για να εξαχθούν οι τιμές έκφρασης. Μετά την αφαίρεση του υποβάθρου έγινε λογαρίθμηση και υπολογισμός fold change. Στη συνέχεια ο στατιστικός έλεγχος σημαντικότητας έγινε με το πακέτο limma χρησιμοποιώντας ένα εμπειρικό Bayes moderated t-test και έγινε και διόρθωση false discovery rate (FDR). Κρατήθηκαν τα γονίδια με ελάχιστο fold change 1.5x, και p-value ≤ 0.05,

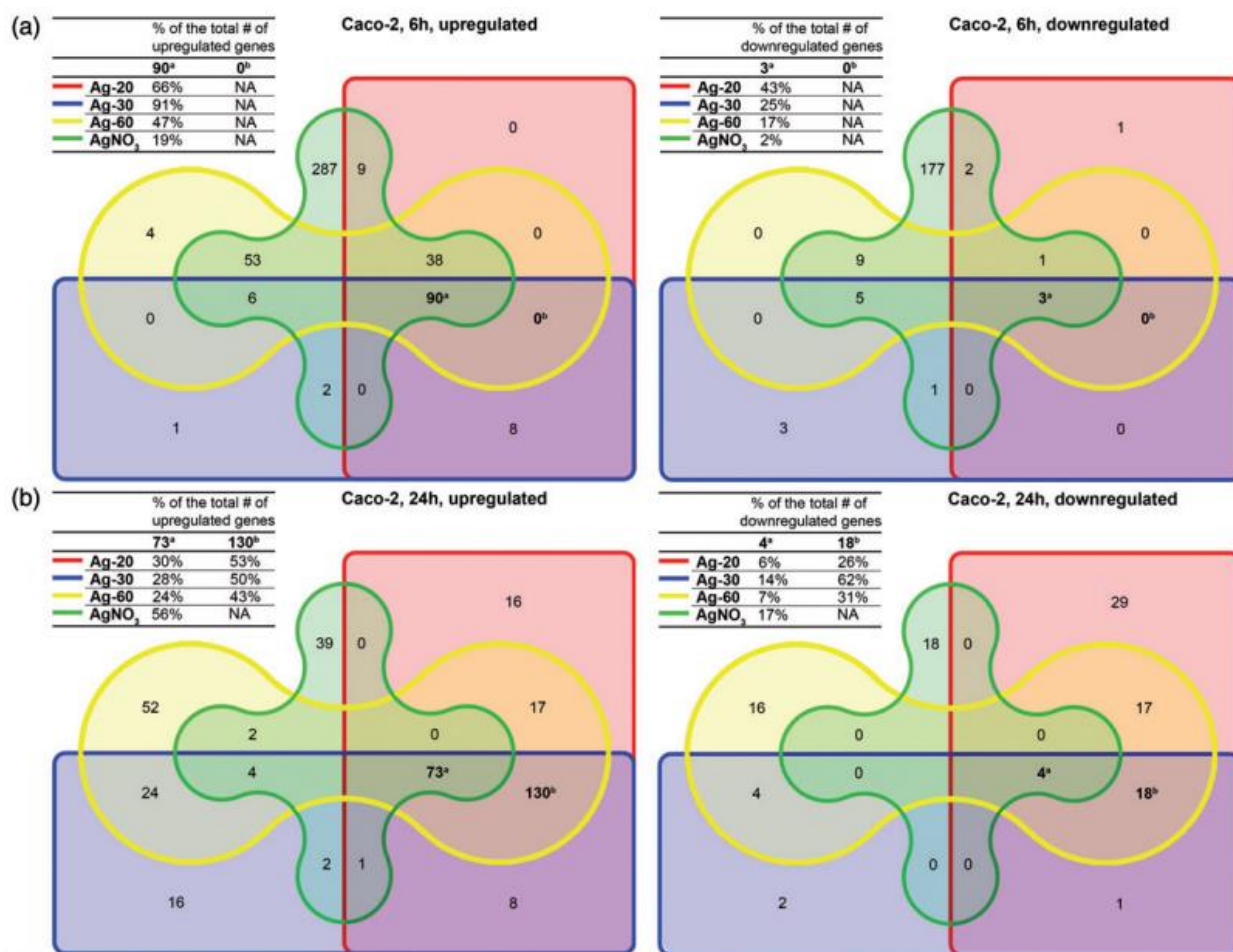
και
FDR ≤ 0.25 .

με

Στις Εικόνα 23 και Εικόνα 24 φαίνονται συνοπτικά τα αποτελέσματα της μελέτης.



Εικόνα 23: Αθροιστικά ραβδογράμματα διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων σε κύτταρα Caco-2 και MCF-7 μετά από έκθεση σε AgNPs ή AgNO₃ σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, στις χρονικές στιγμές 6h και 24h.



Εικόνα 24: Διαγράμματα Venn υπερ- και υπόεκφρασμένων γονιδίων σε κύτταρα Caco-2 μετά από (Α) 6h και (Β) 24h έκθεσης.

Κεφάλαιο 3: Εργαλεία – Μέθοδος

Σε αυτό το κεφάλαιο γίνεται συνοπτική παρουσίαση όλων των εργαλείων και μεθόδων, τόσο μαθηματικών όσο και προγραμματιστικών που αξιοποιήθηκαν ώστε να αναλυθούν τα δεδομένα. Επισυνάπτονται επίσης σύνδεσμοι και screenshot των ιστοτόπων των εργαλείων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

3.1: Στατιστικοί έλεγχοι

Για να γίνει έλεγχος ποιες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση είναι στατιστικά σημαντικές, χρησιμοποιήθηκαν τρεις στατιστικοί έλεγχοι, το Kruskal–Wallis H-test, το Mann-Whitney U-test και το Student's T-test (two tailed).

Επίσης χρησιμοποιήθηκε ο λόγος fold change για να γίνει επιλογή των δεδομένων στις περιπτώσεις όπου ο αριθμός των δειγμάτων ήταν περιορισμένος ή το σύνολο δεδομένων αποτελούταν από 1 μόνο δείγμα ανά φαινότυπο και από πολλαπλές τεχνητές μετρήσεις του (technical replicates). Σε αυτές τις περιπτώσεις η διακύμανση των τιμών ανάμεσα στις τεχνητές επαναλήψεις του πειράματος είναι πολύ μικρές καθιστώντας την εφαρμογή περαιτέρω στατιστικής ανάλυσης μη αξιόπιστη.

3.1.1: Kruskal–Wallis H-test (one-way ANOVA on ranks)

Το Kruskal-Wallis H-test είναι μια μη παραμετρική μέθοδος για να ελέγχεται αν ένας αριθμός δειγμάτων προέρχεται από την ίδια κατανομή. Χρησιμεύει για έλεγχο δυο ή περισσότερων ανεξάρτητων δειγμάτων, ίδιου ή διαφορετικού μεγέθους. Πρακτικά είναι η επέκταση του ελέγχου Mann–Whitney U-test σε περισσότερα των δύο δείγματα, και είναι ο αντίστοιχος μη-παραμετρικός έλεγχος του one-way analysis of variance (ANOVA). Δεδομένου του ότι είναι μη-παραμετρική μέθοδος, προφανώς δεν προϋποθέτει κανονική κατανομή των δειγμάτων.

Ένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα Kruskal–Wallis υποδεικνύει ότι τουλάχιστον ένα δείγμα υπερσχύει στοχαστικά κάποιου άλλου. Ο έλεγχος δεν εντοπίζει ούτε μεταξύ ποιων δύο δειγμάτων συμβαίνει αυτό, ούτε πόσα πιθανά ζεύγη υπάρχουν. Για να εντοπιστεί αυτό χρησιμοποιούνται έλεγχοι ζευγών όπως το Dunn's test, το Mann-Whitney U-test, ή ακόμα και το Conover–Iman test.

Η διαδικασία του ελέγχου έχει ως εξής:

1. Οι παρατηρήσεις διατάσσονται κατά αύξουσα σειρά και σε κάθε παρατήρηση προσδιορίζεται η σχετική της θέση (rank).
2. Στη συνέχεια υπολογίζονται οι ποσότητες:

$$SS_k = \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j}$$

Όπου:

$$R_j = \sum_{i=1}^{n_j} r_{ij}$$

3. Το άθροισμα των θέσεων της κάθε j-ομάδας, το οποίο είναι το αντίστοιχο «άθροισμα τετραγώνων των θέσεων μεταξύ των ομάδων»:

$$SS_r = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} r_{ij}^2$$

Το «συνολικό άθροισμα τετραγώνων των θέσεων των παρατηρήσεων όλων των ομάδων».

4. Η συνάρτηση ελέγχου προκύπτει από τη σχέση:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1) \sim X_{k-1}^2$$

Και η υπόθεση απορρίπτεται όταν:

$$H > X_{k-1;\alpha}^2$$

3.1.2: Mann-Whitney U-test (Wilcoxon Rank Sum test)

Στην στατιστική το Mann–Whitney U test (Mann–Whitney–Wilcoxon (MWW), Wilcoxon rank-sum test ή Wilcoxon–Mann–Whitney test) είναι μια μη παραμετρική δοκιμασία ελέγχου της μηδενικής υπόθεσης ότι μία τυχαία επιλεγμένη τιμή από ένα δείγμα είναι εξίσου πιθανό να είναι μεγαλύτερη ή μικρότερη από μια τυχαία επιλεγμένη τιμή από ένα δεύτερο δείγμα. Αντίθετα με το t-test δεν απαιτείται να ακολουθούν τα δείγματα κανονική κατανομή. Η δοκιμασία χρησιμοποιείται για να διαπιστωθεί αν δυο ανεξάρτητα δείγματα επιλέχθηκαν από πληθυσμούς που ακολουθούν την ίδια κατανομή.

Μια πολύ γενική διατύπωση είναι να υποθέσουμε ότι:

1. Όλες οι παρατηρήσεις από τις δύο ομάδες είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους.
2. Τα δεδομένα είναι διατεταγμένα (ordinal)
3. Κατά την μηδενική υπόθεση H_0 , η κατανομή των δύο πληθυσμών είναι ίδια
4. Η εναλλακτική υπόθεση H_1 , είναι ότι οι κατανομές δεν είναι ίδιες.

Κάτω από αυτή τη γενική διατύπωση, η δοκιμασία είναι συνεπής μόνο όταν το μέγεθος του δείγματος τείνει στο άπειρο, οπότε για την H_1 ισχύει ότι:

Η πιθανότητα μια παρατήρηση από τον πληθυσμό X να υπερβαίνει μια παρατήρηση από τον πληθυσμό Y είναι διαφορετική από την πιθανότητα η παρατήρηση από τον Y να υπερβαίνει την παρατήρηση από τον X , πχ. $(X > Y) \neq P(Y > X)$ or $P(X > Y) + 0.5 \cdot P(X = Y) \neq 0.5$.

Η δοκιμασία περιλαμβάνει τον υπολογισμό ενός μέτρου που ονομάζεται U , του οποίου η κατανομή κάτω από την μηδενική υπόθεση είναι γνωστή. Στην περίπτωση μικρών δειγμάτων, η κατανομή πινακοποιείται, ωστόσο για δείγματα μεγέθους άνω του 20, η προσέγγιση με την χρήση της κανονικής κατανομής είναι αρκετά καλή.

Για μεγάλα δείγματα η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Ορίζουμε αριθμητικές τάξεις σε όλες τις παρατηρήσεις (τοποθετούμε τις παρατηρήσεις από όλες τις ομάδες σε ένα σύνολο). Όταν υπάρχουν ομάδες με ίδιες τιμές, ορίζουμε ως τάξη το μέσο της μη διορθωμένης βαθμονόμησης. Πχ. για το σύνολο (3, 5, 5, 5, 5, 8) η βαθμονόμηση θα είναι (1, 3.5, 3.5, 3.5, 3.5, 6), καθώς η μη διορθωμένη θα ήταν (1, 2, 3, 4, 5, 6)).
2. Στη συνέχεια προσθέτουμε τις τάξεις από όλες τις παρατηρήσεις που προήλθαν από το δείγμα 1 και στη συνέχεια υπολογίζουμε το άθροισμα των τάξεων τους δείγματος 2. Σημειώνεται ότι το άθροισμα όλων των τάξεων ισούται με $N(N + 1)/2$ όπου N είναι ο συνολικός αριθμός των παρατηρήσεων.
3. Το U υπολογίζεται ως:

$$U_1 = R_1 - \frac{n_1(n_1 + 1)}{2}$$

Όπου n_1 είναι το μέγεθος του δείγματος 1 και R_1 το άθροισμα των τάξεων του δείγματος

Αντίστοιχα για το δείγμα 2:

$$U_2 = R_2 - \frac{n_2(n_2 + 1)}{2}$$

Η μικρότερη τιμή από τα U_1 και U_2 χρησιμοποιείται για τους πίνακες στατιστικής σημαντικότητας. Το άθροισμα των δύο τιμών U δίνεται ως εξής:

$$U_1 + U_2 = n_1 n_2,$$

καθώς

$$R_1 + R_2 = N(N + 1)/2$$

και

$$N = n_1 + n_2,$$

3.1.3: Student T-test

Το t-test είναι μια στατιστική μέθοδος η οποία αξιολογεί αν οι μέσες τιμές δύο ομάδων έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Το t-test δύο δειγμάτων χρησιμοποιείται για την σύγκριση των μέσων τιμών δύο ανεξάρτητων πληθυσμών. Ελέγχεται έτσι εάν η διαφορά μέσων τιμών σε δύο ανεξάρτητους πληθυσμούς προέκυψε τυχαία ή όχι. Γίνεται χρήση της μηδενικής υπόθεσης η οποία θεωρεί ότι οι δύο μέσες τιμές είναι ίσες. Το στατιστικό t μπορεί να υπολογιστεί, υποθέτοντας ίσες διακυμάνσεις, ως εξής:

$$t = \frac{(\overline{X}_1 - \overline{X}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

όπου $\mu_1 - \mu_2$ η διαφορά μέσων τιμών του πληθυσμού και $\overline{X}_1 - \overline{X}_2$ η διαφορά μέσων τιμών του δείγματος και n_1, n_2 ο πληθυσμός του δείγματος 1 και 2 αντίστοιχα.

Η τιμή της ομαδοποιημένης διακύμανσης S_p δίνεται από τον τύπο:

$$S_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

και το τυπικό σφάλμα SE (Standard error) δίνεται από τον τύπο:

$$SE = \sqrt{\frac{S_p^2}{n_1} + \frac{S_p^2}{n_2}}$$

Στους στατιστικούς ελέγχους υποθέσεων ορίζεται μια υπόθεση H_0 , μηδενική υπόθεση (null hypothesis), η οποία συνήθως θεωρεί ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων που μελετώνται, ενώ η H_1 , εναλλακτική υπόθεση (alternative hypothesis), θεωρεί ότι υπάρχει διαφορά. Η τιμή p (p-value) είναι το μικρότερο επίπεδο σημαντικότητας (α) στο οποίο η μηδενική υπόθεση μπορεί να απορριφθεί. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται από τον ερευνητή αλλά συνήθως είναι είτε 5% ($\alpha=0.05$) είτε 1% ($\alpha=0.01$). Όσο πιο μικρή η p-value, τόσο μεγαλύτερη είναι η βεβαιότητα ότι απορρίπτεται η H_0 . Η p-value κυμαίνεται ανάμεσα στο 0 και στο 1, κάθε γονίδιο εμφανίζει μια p-value που προσδιορίζει το κατά πόσο εμφανίστηκε τυχαία ως διαφορικά εκφρασμένο, το οποίο στη συνέχεια χρησιμοποιείται για να γίνει έλεγχος σημαντικότητας του γονιδίου.

3.1.4: Fold Change

Η τιμή **Fold Change** χρησιμοποιείται για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε πειράματα όπως οι μικροσυστοιχίες, qPCR, RNA-seq και άλλα. Η τιμή Fold Change είναι ένας αριθμός που περιγράφει το μέτρο της διαφοράς αλλαγής από μια αρχική σε μια τελική τιμή. Για παράδειγμα, εάν έχουμε μια αρχική τιμή 30 και μία τελική τιμή 60, η τελική τιμή αντιστοιχεί στον διπλασιασμό της αρχικής τιμής, δηλαδή σε μια αύξηση της τάξης του 2x, ή τιμή Fold Change ίση με 2. Στα πειράματα όπου πραγματοποιείται η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, αρχική είναι η τιμή της έκφρασης ενός γονιδίου όπως αυτή υπολογίζεται στο βιολογικό δείγμα ελέγχου, ενώ τελική είναι η τιμή που λαμβάνουμε στο πειραματικό δείγμα. Η τιμή fold change είναι ξεχωριστή για κάθε γονίδιο και εκφράζει το κατά πόσες φορές η έκφραση του γονιδίου αυτού στο πειραματικό δείγμα έχει μεταβληθεί σε σύγκριση με την τιμή της έκφρασης του ίδιου γονιδίου όπως αυτή εμφανίζεται στο βιολογικό δείγμα ελέγχου. Δηλαδή, το fold change είναι ο πολλαπλασιαστής με τον οποίο όταν θα πολλαπλασιάσουμε την τιμή της έκφρασης ενός γονιδίου στο δείγμα ελέγχου, θα έχουμε ως αποτέλεσμα την τιμή της γονιδιακής έκφρασης του ίδιου γονιδίου στο πειραματικό δείγμα.

Η τιμή Fold Change υπολογίζεται ως ο λόγος της τελικής τιμής προς την αρχική τιμή, δηλαδή εάν η αρχική τιμή είναι A και η τελική τιμή είναι B, η τιμή Fold Change είναι B / A . Μια μεταβολή από 20 σε 80 θα έχει τιμή Fold Change ίση με 4, αφού $20 \times 4 = 80$. Σε ένα άλλο παράδειγμα, μια μεταβολή τιμής από 80 σε 20 θα έχει τιμή Fold Change ίση με 0.25, ή $-4 = 1/4$ αφού το 20 είναι το $\frac{1}{4}$ του 80. Προκειμένου να υπάρχει ρεαλιστική αντιπροσώπευση του επιπέδου αλλαγής σε όλο το φάσμα των θετικών αριθμών, όταν ο λόγος τελικής προς αρχικής τιμής είναι μικρότερος του 1 αντικαθιστούμε τον δεκαδικό αριθμό με την αρνητική τιμή του αντίστροφου του, π.χ. μια αλλαγή 80 έως 20 αντιστοιχεί σε τιμή Fold Change ίση με -4, δηλαδή σε μια τετραπλάσια μείωση.

Ένα σοβαρό μειονέκτημα της χρήσης του Fold Change είναι ότι μπορεί να προκαλέσει εσφαλμένη ταξινόμηση γονιδίων με μεγάλη διαφορά (B-A) αλλά μικρούς λόγους (B/A), οδηγώντας σε φτωχή ταυτοποίηση αλλαγών σε υψηλά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης.

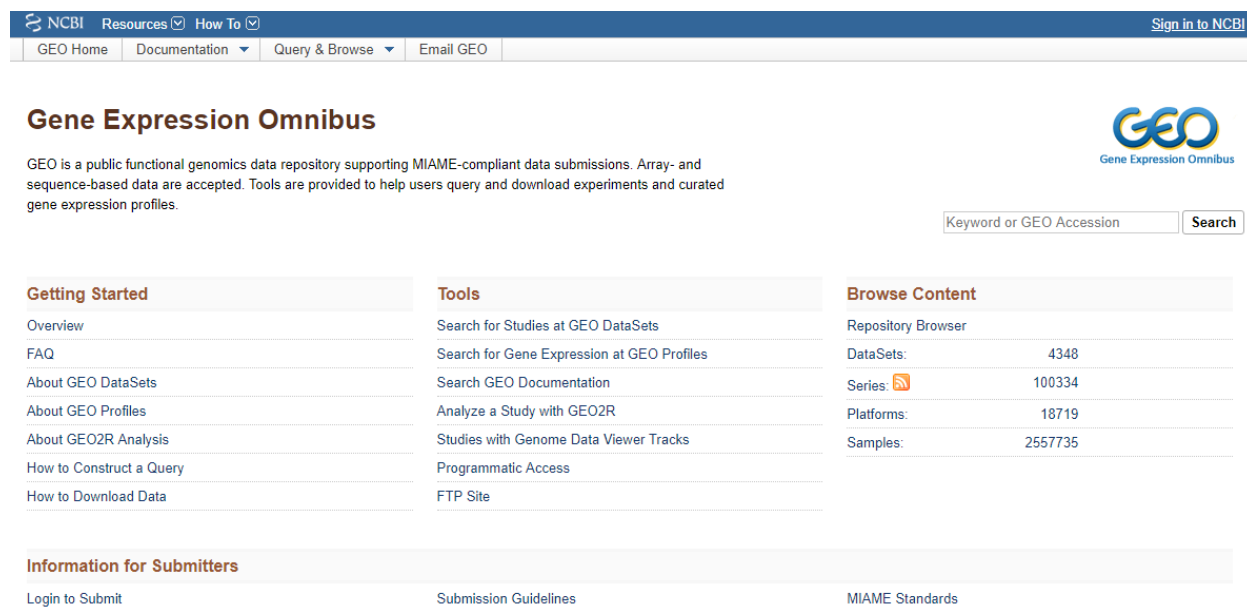
Ωστόσο, ο λογαριθμικός μετασχηματισμός χρησιμοποιείται συχνά στην ανάλυση και την οπτικοποίηση των fold change. Ο λογάριθμος με βάση το 2 χρησιμοποιείται συννηθέστερα καθώς παρουσιάζει μεγαλύτερη ευχέρεια στην ερμηνεία. Για παράδειγμα, ο διπλασιασμός ενός μεγέθους στην αρχική κλίμακα ισούται με $\log_2$ Fold Change 1, ο τετραπλασιασμός με 2 και ούτω καθεξής. Αντιστρόφως, το μέγεθος είναι συμμετρικό όταν η μεταβολή μειώνεται κατά ένα ισοδύναμο ποσό. Για παράδειγμα, υποδιπλασιασμός ισοδυναμεί με $\log_2$ Fold Change -1 και υποτετραπλασιασμός με -2. Αυτό οδηγεί σε πιο καλαίσθητη απεικόνιση των δεδομένων καθώς εκθετικές μεταβολές παρουσιάζονται με γραμμικό τρόπο.

3.2: Ιστότοποι

Για την άντληση, επεξεργασία και εμπλουτισμό της προς επεξεργασία πληροφορίας χρησιμοποιήθηκαν κάποια εργαλεία τα οποία βρίσκονται σε ιστότοπους του διαδικτύου. Αυτοί οι ιστότοποι παρουσιάζονται παρακάτω μαζί με συνοπτική παρουσίαση του τρόπου αξιοποίησής τους.

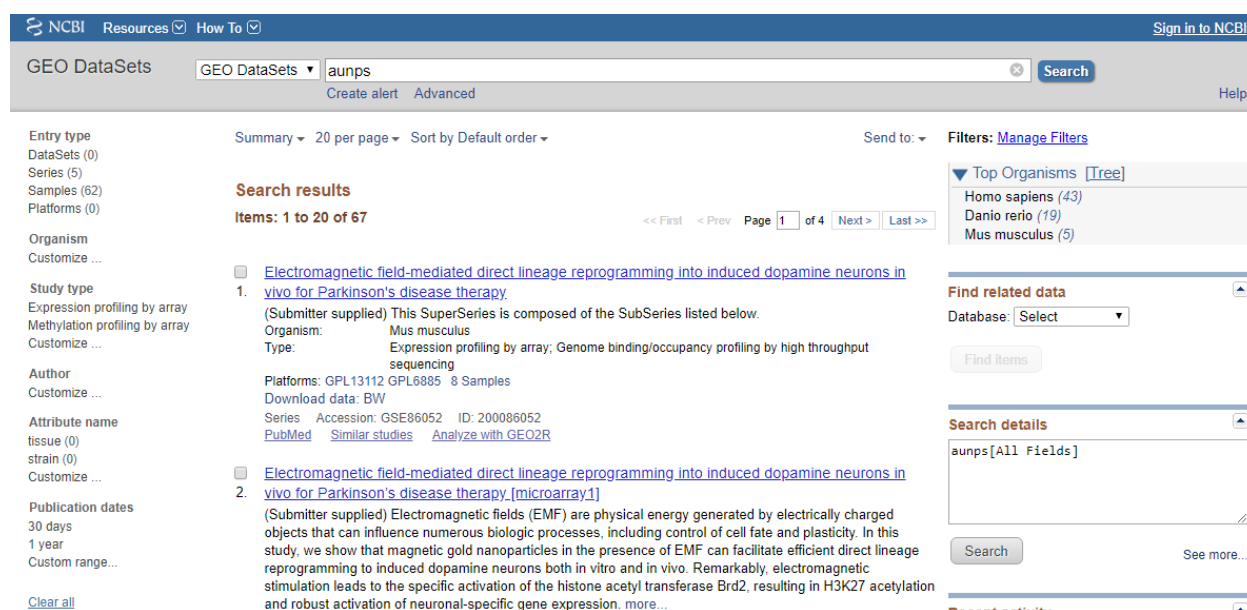
3.2.1: Gene Expression Omnibus (GEO)

Η GEO είναι η βάση αποθετήριο στην οποία κατατίθενται δεδομένα μικροσυστοιχιών και από την οποία αντλήθηκαν τα δεδομένα προς επεξεργασία. Υπάγεται στο NCBI. Η κεντρική σελίδα είναι η εξής (Εικόνα 25) στην οποία διακρίνονται διάφορα εργαλεία και αναζητήσεις που μπορούν να γίνουν.



Εικόνα 25: GEO: Αρχική σελίδα.

Στην επόμενη εικόνα (Εικόνα 26) φαίνονται τα αποτελέσματα μιας αναζήτησης ενδεικτικά με τη λέξη-κλειδί “aunps”. Οι αναζητήσεις δεν έχουν πεζοκεφαλαία διάκριση και μπορούν να είναι σύνθετες αξιοποιώντας ειδικό συντακτικό και λογικούς τελεστές.



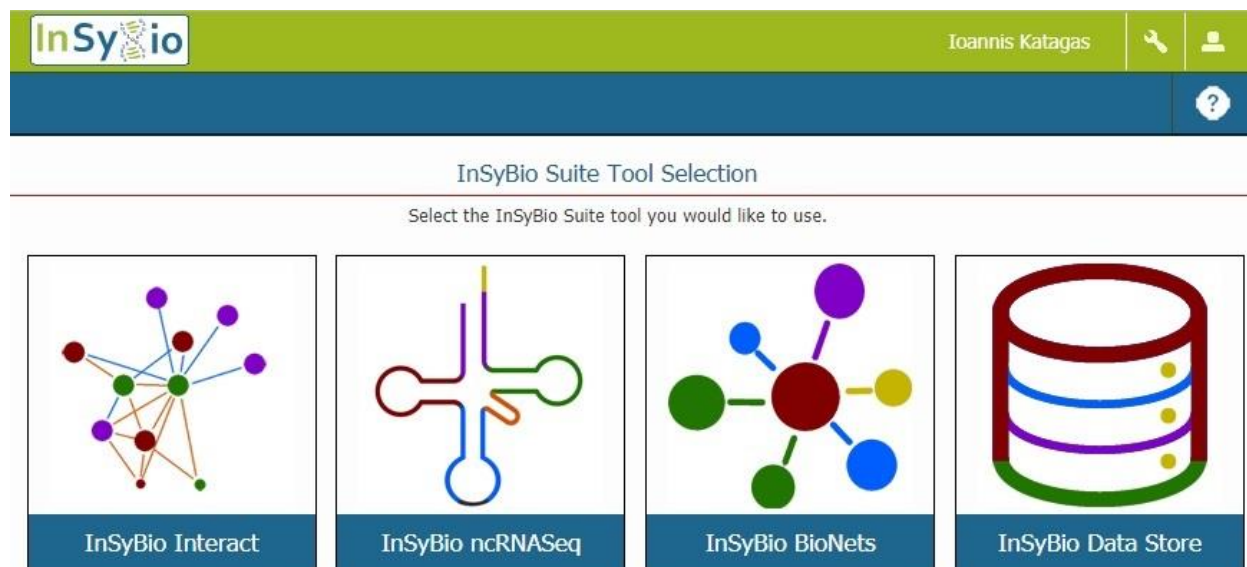
Εικόνα 26: GEO: Σελίδα αναζήτησης.

Στις πλαϊνές μπάρες φαίνονται επιλογές για εύκολη πρόσβαση σε επιπλέον κριτήρια που πιθανώς χρειάζεται ο ερευνητής π.χ. οργανισμός.

3.2.2: InSyBio Suite

Για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση χρησιμοποιείται αρχικά η σουίτα InSyBio (χρησιμοποιώντας ένα evaluation version).

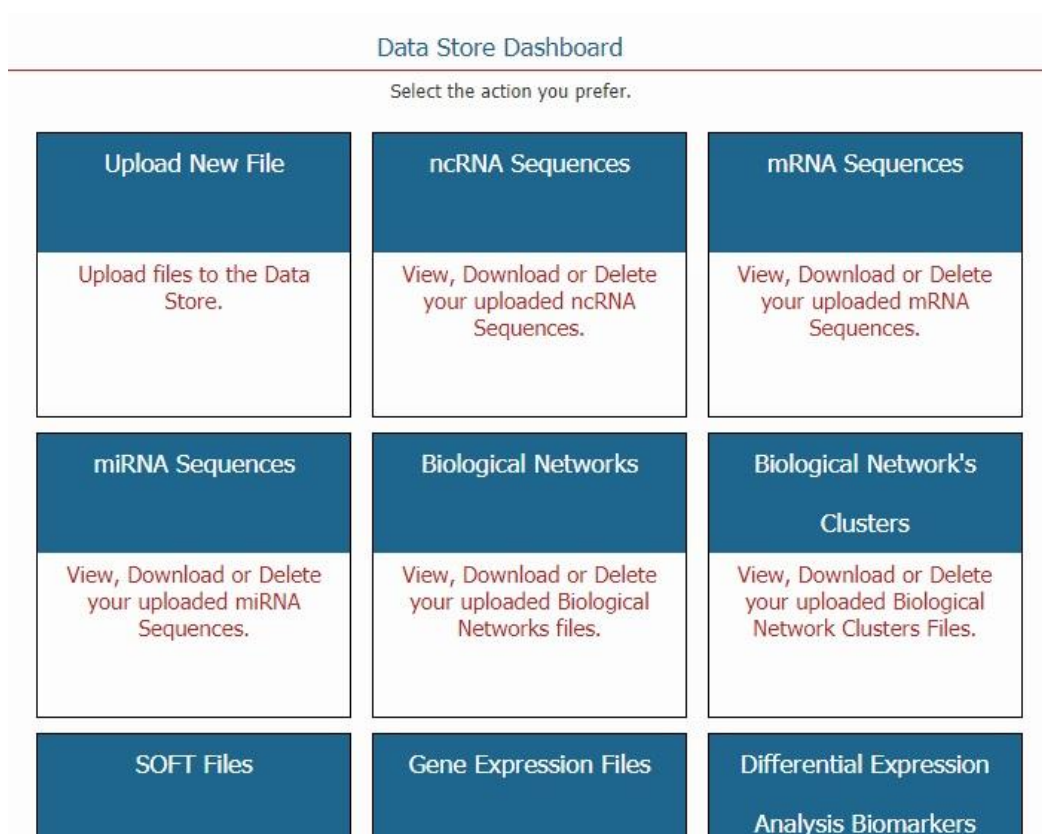
Κατόπιν εγγραφής νέου χρήστη και εισόδου στη σουίτα η αρχική σελίδα είναι η παρακάτω:



Εικόνα 27: InSyBio Suite: Αρχική σελίδα.

Οι επιλογές Interact, ncRNASeq και BioNets είναι τα τρία βασικά υποπρογράμματα της σουίτας, και το Data Store είναι η βοηθητική διεπαφή για να εισάγονται δεδομένα στο σύννεφο προκειμένου να γίνει η επεξεργασία στους server.

Αρχικά χρησιμοποιείται το Data Store λοιπόν, το οποίο φαίνεται ως εξής:



Εικόνα 28: InSyBio Suite: Data Store Dashboard.

Προκειμένου να γίνει η ανάλυση επιλέγεται το Upload New File και εμφανίζεται η παρακάτω φόρμα για να ανέβουν τα απαραίτητα αρχεία.

Εικόνα 29: InSyBio Suite: Upload file to Data Store.

Προκειμένου να τρέξουν οι αναλύσεις ο τύπος αρχείων που χρησιμοποιούνται είναι ο gene expression file. Όταν επιλεγεί ο τύπος και το αρχείο, υπάρχει και η δυνατότητα να δοθεί ένα όνομα το οποίο στη συνέχεια είναι αυτό που χρησιμοποιεί η σουίτα.

Όταν έχουν ανέβει όλα τα αρχεία, φαίνονται επιλέγοντας το “Gene Expression Files” στην αρχική σελίδα του Data Store.

InSyBio									
Ioannis Katagas									
InSyBio Data Store									
Gene Expression Files									
You have covered the 4.24 % (391.36 MiB of 9.02 GiB) of your storage limit.									
My Gene Expression Files									
Gene Expression Files are tab delimited files. i.e.:									
gene_name_1 expr1 ... exprn									
gene_name_2 expr1 ... exprn									
Upload new file									
File Name	Description	File Type	Format	Size	Date Created	Date Last Modified	Operations	InSyBio Tools Actions	
softparse_239_Parkinsons_disease.txt	Parkinson's disease	Gene Expressions	TSV (Tab Separated Value)	3.79 MiB	Jul 20, 2017 3:53:23 AM	Jul 20, 2017 3:53:23 AM	 	Select Action	
softparse_239_healthy_control.txt	healthy control	Gene Expressions	TSV (Tab Separated Value)	1.69 MiB	Jul 20, 2017 3:53:23 AM	Jul 20, 2017 3:53:23 AM	 	Select Action	
softparse_239_neurodegenerative_disease_control.txt	neurodegenerative disease control	Gene Expressions	TSV (Tab Separated Value)	2.51 MiB	Jul 20, 2017 3:53:23 AM	Jul 20, 2017 3:53:23 AM	 	Select Action	
GSE55349_CACO2_AUSNM_100UM_24H.txt	GSE55349_CACO2_AUSNM_100UM_24H	Gene Expressions	TSV (Tab Separated Value)	651.33 KiB	Aug 20, 2017 11:21:31 PM	Aug 20, 2017 11:21:31 PM	 	Select Action	

Εικόνα 30: InSyBio Suite: Gene Expression Files.

Κατόπιν, για να εκτελεστεί η ανάλυση διαφορικής έκφρασης χρησιμοποιείται το εργαλείο BioNets [89] του οποίου παρατίθεται η αρχική σελίδα

BioNets Dashboard

Select the action you prefer.

Bionets Jobs Dashboard

Here you can view all your submitted jobs along with their results

SOFT Files Parsing

Preprocess SOFT files.

Create Gene Co-Expression Networks

Create gene co-expression networks from Gene Expressions.

Network Analysis

Analyze your biological networks to validate them, to visualize them and to uncover significant nodes and edges on them.

Predict Network-based Biomarkers

Extract Biomarkers from comparing network metrics.

Differential Expression Biomarkers

Extract Differential Expression Biomarkers from Gene Expressions pairs.

Merge Biomarkers

Biological Network

Visualize Biological Network

Εικόνα 31: InSyBio Suite: BioNets Dashboard.

Η επιλογή “Differential Expression Biomarkers” είναι αυτή που κάνει τη διαφορική ανάλυση έκφρασης γονιδίων από δεδομένα έκφρασης γονιδίων. Η φόρμα εισόδου δεδομένων που δίνει αυτή η επιλογή είναι η παρακάτω:

InSyBio Ioannis Katagas

InSyBio BioNets

Differential expression biomarkers from analysing gene expressions

You can upload files containing gene expressions or you can select them from your Data Store.

Select form Hide Form

Title 1: GSE55349_CACO2_CONTROL_24H

Filename 1: dsfile1503271581_6667.txt

Select 1st file (control condition) from Data Store

Title 2: GSE55349_CACO2_AU5NM_100UM_24H

Filename 2: dsfile1503271291_5137.txt

Select 2nd file from Data Store Go to Data Store to Upload File

Hide Advanced Options

Sign Threshold: 0.05

Method: Wilcoxon rank sum

Submit Job

Εικόνα 32: InSyBio Suite: Differential expression biomarkers from analysing gene expression.

Σε αυτή τη φόρμα επιλέγονται ανά δύο τα αρχεία στα οποία θα εκτελεστεί η διαφορική έκφραση και πατώντας στο κουμπί “Show Advanced Options” μπορεί να επιλεγεί μία από τις δυο διαθέσιμες μεθόδους (student t-test / Wilcoxon rank sum), καθώς και ένα κατώφλι σημαντικότητας.

Στην παρούσα εργασία οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τις προκαθορισμένες ρυθμίσεις (Wilcoxon rank sum, Sign threshold=0.05).

Όταν είναι όλα ρυθμισμένα και πατηθεί το πλήκτρο “Submit Job”, η εργασία που έχει επιλεγεί να γίνει παίρνει αριθμό προτεραιότητας στο server ώστε να εκτελεστεί. Πατώντας την επιλογή Job Dashboard του BioNets εμφανίζεται η εξής οθόνη:

BioNets Jobs Dashboard

Total jobs submitted: 49
 Running Jobs: 1, Pending Jobs: 0, Error Jobs: 18, Completed Jobs: 30

Running Jobs

Show 10 entries

Job ID	Job Type	Input File(s)	Submission Date	Start Execution Date	Completion Date	Status	Actions
1010	Extract differential expression biomarkers	GSE55349_CAC02_CONTROL_24H (GSE55349_CAC02_CONTROL_24H.txt) GSE55349_CAC02_AU5NM_100UM_24H (GSE55349_CAC02_AU5NM_100UM_24H.txt)	5/11/18 10:42 AM	5/11/18 10:42 AM	-	Running	View Details

Previous 1 Next

Pending Jobs

Show 10 entries

Job ID	Job Type	Input File(s)	Submission Date	Start Execution Date	Completion Date	Status	Actions
No data available in table							

Previous Next

Completed Jobs

Show 10 entries

Job ID	Job Type	Input File(s)	Submission Date	Start Execution Date	Completion Date	Status	Actions
958	Create Gene Co-expression Network	NEW_GSE55349_CAC02_CONTROL_24H (GSE55349_CAC02_CONTROL_24H.txt)	12/19/17 12:52 PM	12/21/17 12:07 PM	12/21/17 12:36 PM	Completed	View Results
957	Extract differential expression biomarkers	NEW_GSE55349_CAC02_CONTROL_72H (GSE55349_CAC02_CONTROL_72H.txt) GSE55349_CAC02_AU40NM_300UM_72H (GSE55349_CAC02_AU40NM_300UM_72H.txt)	12/19/17 12:16 PM	12/19/17 12:17 PM	12/19/17 12:17 PM	Completed	View Results
956	Extract differential expression biomarkers	NEW_GSE55349_CAC02_CONTROL_72H (GSE55349_CAC02_CONTROL_72H.txt) GSE55349_CAC02_AU40NM_100UM_72H (GSE55349_CAC02_AU40NM_100UM_72H.txt)	12/19/17 12:16 PM	12/19/17 12:17 PM	12/19/17 12:17 PM	Completed	View Results
955	Extract differential expression biomarkers	NEW_GSE55349_CAC02_CONTROL_72H (GSE55349_CAC02_CONTROL_72H.txt) GSE55349_CAC02_AU5NM_300UM_72H (GSE55349_CAC02_AU5NM_300UM_72H.txt)	12/19/17 12:16 PM	12/19/17 12:16 PM	12/19/17 12:17 PM	Completed	View Results
954	Extract differential expression biomarkers	NEW_GSE55349_CAC02_CONTROL_72H (GSE55349_CAC02_CONTROL_72H.txt) GSE55349_CAC02_AU5NM_100UM_72H (GSE55349_CAC02_AU5NM_100UM_72H.txt)	12/19/17 12:16 PM	12/19/17 12:16 PM	12/19/17 12:17 PM	Completed	View Results
953	Extract differential expression biomarkers	NEW_GSE55349_CAC02_CONTROL_72H (GSE55349_CAC02_CONTROL_72H.txt) GSE55349_CAC02_SOLVENT40NM_72H (GSE55349_CAC02_SOLVENT40NM_72H.txt)	12/19/17 12:15 PM	12/19/17 12:15 PM	12/19/17 12:16 PM	Completed	View Results
952	Extract differential expression biomarkers	NEW_GSE55349_CAC02_CONTROL_72H (GSE55349_CAC02_CONTROL_72H.txt) GSE55349_CAC02_SOLVENT5NM_72H (GSE55349_CAC02_SOLVENT5NM_72H.txt)	12/19/17 12:15 PM	12/19/17 12:15 PM	12/19/17 12:16 PM	Completed	View Results

Εικόνα 33: InSyBio Suite: BioNets Jobs Dashboard.

Σε αυτή την οθόνη εμφανίζονται οι τρέχουσες εργασίες (μέχρι τρεις ταυτόχρονα), οι εν αναμονή εργασίες (όσες έχουν ζητηθεί πέραν των τριών που τρέχουν), οι ολοκληρωμένες, και στο τέλος της σελίδας όσες δεν κατάφεραν να εκτελεστούν.

Στη συνέχεια, επιλέγοντας το “View Results” σε μία ολοκληρωμένη εργασία, εμφανίζεται η παρακάτω οθόνη η οποία περιέχει μια σύνοψη της ανάλυσης που έγινε και των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και των αποτελεσμάτων της ανάλυσης. Από αυτή την οθόνη μπορούν να κατέβουν τα αποτελέσματα τοπικά σε TSV μορφοποίηση, καθώς και σε μορφή μικρού report.

InSyBio Ioannis Katagas

InSyBio BioNets

Extract differential expression biomarkers

Input Data and Parameters

Input File 1: NEW_GSE55349_CACO2_CONTROL_72H (GSE55349_CACO2_CONTROL_72H.txt)
 Input File 2: GSE55349_CACO2_AU40NM_300UM_72H (GSE55349_CACO2_AU40NM_300UM_72H.txt)
 Sign Threshold: 0.05
 Method: Wilcoxon rank sum

Job Information

Submission Date: Dec 19, 2017 12:16:43 PM
 Start Execution Date: Dec 19, 2017 12:17:24 PM
 Completion Date: Dec 19, 2017 12:17:52 PM
 Execution Time: 00 hours, 00 minutes, 28 seconds
 Status: Completed

Differential expression biomarkers

Download Biomarkers
 Export Results Merge it with Network Comparison Biomarkers
 Browse among biomarkers
 Show 25 entries

Gene Expression (Click to view associated diseases)	P-value	Database	Related Uniprot ID	Link to External Databases
MLN	0.0495346134356	Gene Symbols	Q9BYT8	- Genecards - OMIM

Εικόνα 34: InSyBio Suite: Extracted biomarkers through differential expression analysis.

Η τελευταία λειτουργία της πλατφόρμας που αξιοποιείται στην παρούσα εργασία είναι ο εντοπισμός miRNAs από τα τελικά δεδομένα που έχουν επιλεγεί ως σημαντικά διαφοροποιημένα. Αυτό γίνεται μέσω της επιλογής ncRNASeq. Επιλέγοντας αυτό το εργαλείο η οθόνη που εμφανίζεται είναι η εξής:

InSyBio Intelligent Systems Biology Ioannis Katagas

InSyBio ncRNASeq

ncRNASeq Dashboard
 Select the action you prefer.

ncRNA Feature Calculation

Feature calculation module for 58 miRNA genes-related features.

miRNA Prediction

Prediction module for pre-miRNAs.

miRNA Target site Feature Calculation

Feature calculation module for 124 miRNA target features.

miRNA Target site Prediction

Prediction module for miRNA targets.

miRNA Search

Search module for stem-loop and mature miRNAs.

Transcript Search

Search module for transcripts and genes.

miRNA Target Prediction

Prediction module for miRNA targets.

Εικόνα 35: InSyBio Suite: ncRNASeq Dashboard

Και από εδώ επιλέγεται το «miRNA Target Prediction», εμφανίζεται στην οθόνη η πλατφόρμα ελέγχου και επιλέγεται το «Create new miRNA prediction process» όπως φαίνεται παρακάτω.

The screenshot shows the 'miRNA Target Prediction' interface of the InSyBio Suite. The header is green with the InSyBio logo and 'Intelligent Systems Biology'. The navigation bar is blue with 'InSyBio ncRNASeq'. The main content area is titled 'miRNA Target Prediction' and contains two sections: 'Select miRNAs' and 'Select Genes'. Each section has a search input, an 'Add to list' button, a tip, and a list box. At the bottom left is a 'Queue new Process' button.

Select miRNAs

Search miRNA: [Add to list](#)

Tip: Search a Mature's miRNA name (i.e hsa-miR-6126) and add it to miRNAs list.

miRNAs List:

Select Genes

Search Genes: [Add to list](#)

Tip: Search a specific gene of your interest (i.e ZIK1) and add it to Targets list.

Genes List:

[Queue new Process](#)

Εικόνα 36: InSyBio Suite: miRNA Target Prediction

Από εδώ εισάγονται δύο λίστες από το χρήστη, μία που περιέχει τα miRNAs που θέλει να ψάξει και μία με τα γονίδια έναντι των οποίων γίνεται η ανίχνευση. Όταν εισαχθούν τα δεδομένα επιλέγεται το «Queue new process» και τα αποτελέσματα αυτής της διαδικασίας εμφανίζονται ως εξής:

3.2.3: DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)

Για να πραγματοποιηθεί ο εμπλουτισμός χρησιμοποιείται το εργαλείο DAVID [90, 91]

Το DAVID (έκδοση 6.8 κατά τη συγγραφή) είναι ένα δωρεάν εργαλείο βιοπληροφορικής το οποίο αναπτύσσεται από το Laboratory of Immunopathogenesis and Bioinformatics. Αποτελεί μια βάση δεδομένων συνοδευμένη με εργαλεία επεξεργασίας των πληροφοριών της, με στόχο τη λειτουργική ερμηνεία αποτελεσμάτων μεγάλων λιστών γονιδίων που προκύπτουν από γενομικές έρευνες π.χ. μέσω μικροσυστοιχιών.

Ουσιαστικά αποτελείται από πέντε εργαλεία:

1. DAVID Gene Functional Classification Tool
2. DAVID Functional Annotation Tool
3. DAVID Gene ID Conversion Tool
4. DAVID Gene Name Viewer
5. DAVID NIAID Pathogen Genome Browser

Και παρέχει πάρα πολλές δυνατότητες, μερικές εκ των οποίων είναι ο εντοπισμός και χαρακτηρισμός λειτουργικότητας των γονιδίων, και ομαδοποίηση τους, κυρίως μέσω όρων GO. Επίσης είναι δυνατή η οπτικοποίηση των δεδομένων σε χάρτες μονοπατιών BioCarta & KEGG, εύρεση περισσότερων συναφών γονιδίων που δεν περιέχονται στην αρχική λίστα, εύρεση αντίστοιχων πρωτεϊνών, ασθενειών που σχετίζονται με τα γονίδια, σύνδεση με βιβλιογραφικές παραπομπές καθώς και μετατροπή των δεικτών των γονιδίων από μία τυποποίηση σε άλλη.

Η αρχική σελίδα του ιστοτόπου είναι η εξής:

DAVID Bioinformatics Resources 6.8
Laboratory of Human Retrovirology and Immunoinformatics (LHRI)

Home | Start Analysis | Shortcut to DAVID Tools | Technical Center | Downloads & APIs | Term of Service | Why DAVID? | About Us

*** Welcome to DAVID 6.8 ***
*** If you are looking for DAVID 6.7, please visit our [development site](#). ***

Recommending: A paper published in *Nature Protocols* describes step-by-step procedure to use DAVID!

Welcome to DAVID 6.8

2003 - 2018

The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8 comprises a full Knowledgebase update to the sixth version of our original web-accessible programs. DAVID now provides a comprehensive set of functional annotation tools for investigators to understand biological meaning behind large list of genes. For any given gene list, DAVID tools are able to:

- Identify enriched biological themes, particularly GO terms
- Discover enriched functional-related gene groups
- Cluster redundant annotation terms
- Visualize genes on BioCarta & KEGG pathway maps
- Display related many-genes-to-many-terms on 2-D view.
- Search for other functionally related genes not in the list
- List interacting proteins
- Explore gene names in batch
- Link gene-disease associations
- Highlight protein functional domains and motifs

What's Important in DAVID?

- Cite DAVID
- IDs of Affy Exon and Gene arrays supported
- Novel Classification Algorithms
- Pre-built Affymetrix and Illumina backgrounds
- User's customized gene background
- Enhanced calculating speed

Statistics of DAVID

DAVID Citations (2003-2017)

Year	Citations
03	10
04	15
05	20
06	25
07	30
08	35
09	40
10	45
11	50
12	55
13	60
14	65
15	70
16	75
17	80

Εικόνα 37: DAVID: Homepage

Και από την αριστερή λίστα επιλέγουμε “Functional Annotation”. Στην ακόλουθη σελίδα εισάγεται η λίστα με τα γονίδια προς εμπλουτισμό, επιλέγεται η τυποποίηση των ονομασιών των γονιδίων, το είδος του οργανισμού και τι είδους πληροφορία θέλουμε να αντλήσουμε.

*** Welcome to DAVID 6.8 ***
*** If you are looking for DAVID 6.7, please visit our development site. ***

Functional Annotation Tool

Submit your gene list to start the tool!

[Tell us how you like the tool](#)
[Read technical notes of the tool](#)
[Contact us for questions](#)

Key Concepts:

Term/Gene Co-Occurrence Probability
Ranking functional categories based on co-occurrence with sets of genes in a gene list can rapidly aid in unraveling new biological processes associated with cellular functions and pathways. DAVID 6.8 allows investigators to sort gene categories from dozens of annotation systems. Sorting can be based either the number of genes within each category or by the EASE-score. [More](#)

Gene Similarity Search
Any given gene is associating with a set of annotation terms. If genes share similar set of those terms, they are most likely involved in similar biological mechanisms. The algorithm tries to group those related genes based on the agreement of sharing similar annotation terms by Kappa statistics. [More](#)

Term Similarity Search
Typically, a biological process/term is done by a corporation of a set of genes. If two or more biological processes are done by similar set of genes, the processes might be related in the biological network somehow. This search function is to identify the related biological processes/terms by quantitatively measuring the degree of the agreement how terms share the similar participating genes. [More](#)

Εικόνα 38: DAVID: Functional Annotation

Υπάρχουν πολλά πεδία και επιλογές περεταίρω επεξεργασίας στη σελίδα αποτελεσμάτων. Ενδεικτικά παρακάτω παρουσιάζεται ένα στιγμιότυπο με ανεπτυγμένη μόνο τη λίστα των μονοπατιών.

Οι επιλογές Clustering, Chart και Table στο κάτω μέρος είναι τρεις συνοπτική τρόποι παρουσίασης της πληροφορίας μετά τον εμπλουτισμό. Επίσης για τους λιγότερο έμπειρους χρήστες υπάρχει πάντα η default επιλογή στα κριτήρια της πληροφορίας.

Annotation Summary Results

[Help and Tool Manual](#)

Current Gene List: List_1

5 DAVID IDs

Current Background: Homo sapiens

Check Defaults ☒

Clear All

- ☒ Disease (1 selected)
- ☒ Functional_Categories (2 selected)
- ☒ Gene_Ontology (3 selected)
- ☒ General_Annotations (0 selected)
- ☒ Literature (0 selected)
- ☒ Main_Accessions (0 selected)
- ☒ Pathways (3 selected)

☒ BBID	40.0%	2	Chart	
☒ BIOCARTA	60.0%	3	Chart	
☒ KEGG_PATHWAY	60.0%	3	Chart	
☐ REACTOME_PATHWAY	80.0%	4	Chart	

- ☒ Protein_Domains (3 selected)
- ☒ Protein_Interactions (0 selected)
- ☒ Tissue_Expression (0 selected)

Red annotation categories denote DAVID defined defaults

Combined View for Selected Annotation

Functional Annotation Clustering

Functional Annotation Chart

Functional Annotation Table

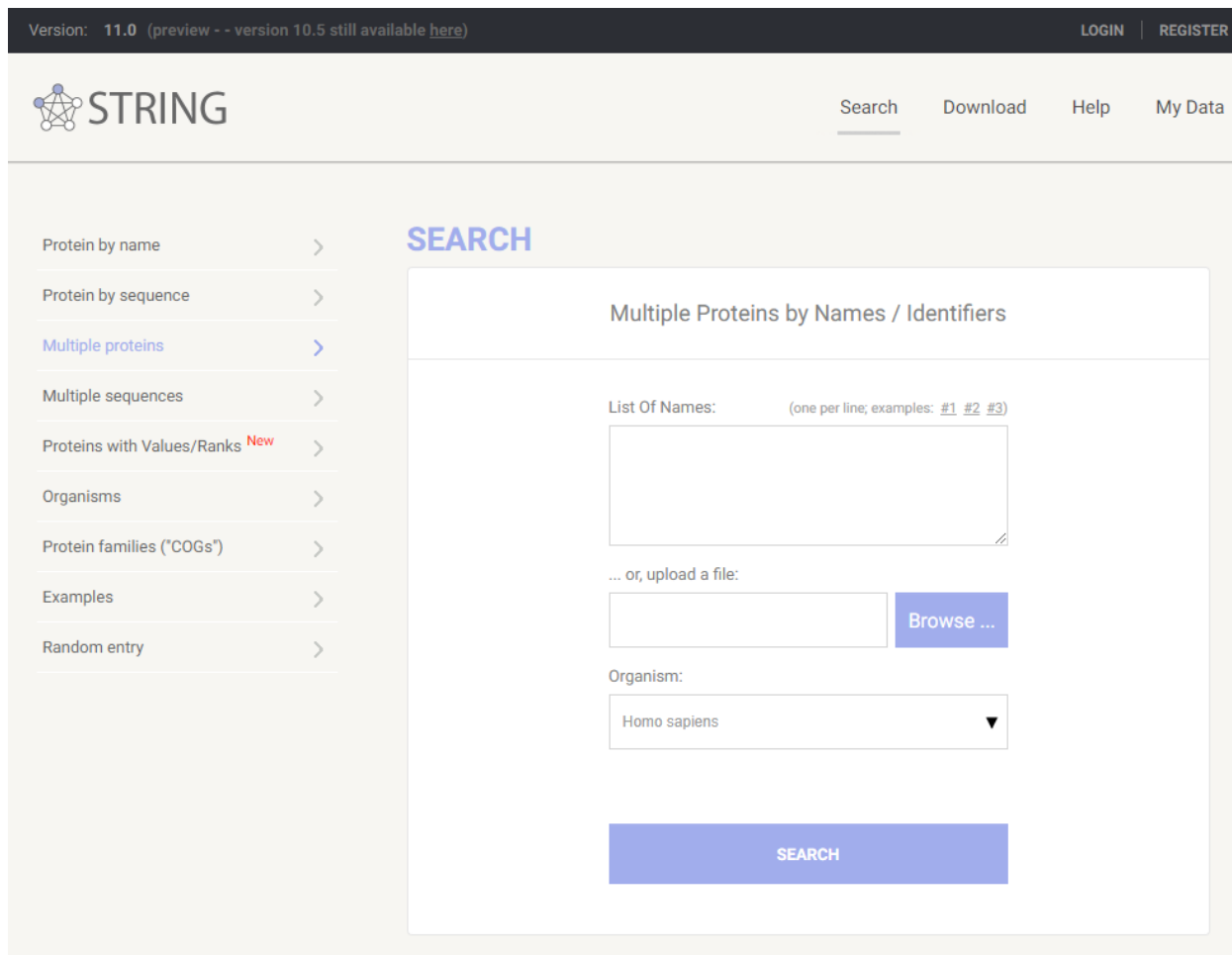
Εικόνα 39: DAVID: Ενδεικτική εικόνα επιλογών εμπλουτισμού.

3.2.4: STRING

Για την κατασκευή δικτύων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων αξιοποιήθηκε ο ιστότοπος string-db.org [92], ο οποίος είναι μια βάση δεδομένων γνωστών και προβλεπόμενων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Οι αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν τόσο άμεσες (φυσικές) όσο και έμμεσες (λειτουργικές) συσχετίσεις. Το σύνολο των δεδομένων προέρχεται από υπολογιστικές προβλέψεις, μεταφορά γνώσης μεταξύ οργανισμών και από αλληλεπιδράσεις που συγκεντρώνονται από άλλες (πρωτογενείς) βάσεις, μεταξύ των οποίων οι BIND, DIP, GRIP, HPRD, IntAct, MINT και PID.

Στις 14/02/2019 περιλάμβανε 9.643.763 πρωτεΐνες από 2.031 οργανισμούς.

Η αρχική σελίδα του ιστοτόπου είναι όπως φαίνεται παρακάτω.



The screenshot shows the STRING database search interface. At the top, there is a header bar with the version '11.0 (preview - - version 10.5 still available [here](#))' and links for 'LOGIN' and 'REGISTER'. Below the header, the STRING logo is on the left, and navigation links for 'Search', 'Download', 'Help', and 'My Data' are on the right. A left sidebar contains a list of search options: 'Protein by name', 'Protein by sequence', 'Multiple proteins' (highlighted in blue), 'Multiple sequences', 'Proteins with Values/Ranks' (marked as 'New'), 'Organisms', 'Protein families ("COGs")', 'Examples', and 'Random entry'. The main content area is titled 'SEARCH' and 'Multiple Proteins by Names / Identifiers'. It features a 'List Of Names:' input field with a placeholder '(one per line; examples: #1 #2 #3)'. Below this is a text area for uploading a file, with a 'Browse ...' button. There is also an 'Organism:' dropdown menu currently set to 'Homo sapiens'. At the bottom of the search area is a large blue 'SEARCH' button.

Εικόνα 40: STRING: Αρχική σελίδα.

Σε αυτήν επιλέχθηκε “Multiple Proteins” καθώς ο στόχος ήταν να διαφωτιστούν οι συσχετίσεις των υπέρ και υπό διαφορεικά εκφρασμένων πρωτεϊνών. Εισήχθησαν οι επιθυμητές πρωτεΐνες για τις οποίες κατασκευάστηκε το εκάστοτε δίκτυο αλληλεπιδράσεων και επιλέχθηκε ως οργανισμός ο Homo Sapiens.

Η επόμενη η οθόνη είναι μια οθόνη αντιστοίχισης γονιδίου-πρωτεΐνης, αυτοματοποιημένη, στην οποία δίνεται η δυνατότητα επιλογής επιμέρους πρωτεϊνών για κάθε γονίδιο.

Version: 11.0 (preview - - version 10.5 still available [here](#))
LOGIN
REGISTER



Search
Download
Help
My Data

The following proteins in *Homo sapiens* appear to match your input. Please review the list, then click 'Continue' to proceed.

<- BACK
CONTINUE ->

MT1H:

☒ **MT1H** - Metallothionein-1H; Metallothioneins have a high content of cysteine residues that bind various heavy metals; these proteins are transcriptionally regulated by both heavy metals and glucocorticoids; Belongs to the metallothionein superfamily. Type 1 family

MT1F:

☒ **MT1F** - Metallothionein-1F; Metallothioneins have a high content of cysteine residues that bind various heavy metals; these proteins are transcriptionally regulated by both heavy metals and glucocorticoids; Belongs to the metallothionein superfamily. Type 1 family

MTE:

☒ **PRDM2** - PR domain zinc finger protein 2; S-adenosyl-L-methionine-dependent histone methyltransferase that specifically methylates 'Lys-9' of histone H3. May function as a DNA-binding transcription factor. Binds to the macrophage-specific TPA-responsive element (**MTE**) of the HMOX1 (heme oxygenase 1) gene and may act as a transcriptional activator of this gene; Belongs to the class V-like SAM-binding methyltransferase superfamily [a.k.a. *RIZ*, *KMT8*, *2QPW*]

MT1X:

☒ **MT1X** - Metallothionein-1X; Metallothioneins have a high content of cysteine residues that bind various heavy metals; these proteins are transcriptionally regulated by both heavy metals and glucocorticoids. May be involved in FAM168A anti-apoptotic signaling

Εικόνα 41: STRING: Σελίδα αντιστοίχισης γονιδίου-πρωτεΐνης.

Όταν γίνουν αυτές οι επιλογές η επόμενη οθόνη είναι η απεικόνιση του δικτύου και από κάτω έχει διάφορες επιλογές εμφάνισης του δικτύου, ανάλυσής του με στατιστικά εργαλεία της θεωρίας γράφων, ρυθμίσεις, καθώς και ένα υπόμνημα για την κατανόηση του δικτύου το οποίο φαίνεται παρακάτω.

Nodes:

Network nodes represent proteins
splice isoforms or post-translational modifications are collapsed, i.e. each node represents all the proteins produced by a single, protein-coding gene locus.

Node Color

 *colored nodes:*
query proteins and first shell of interactors

 *white nodes:*
second shell of interactors

Node Content

 *empty nodes:*
proteins of unknown 3D structure

 *filled nodes:*
some 3D structure is known or predicted

Edges:

Edges represent protein-protein associations
associations are meant to be specific and meaningful, i.e. proteins jointly contribute to a shared function; this does not necessarily mean they are physically binding each other.

Edge Confidence

 *low (0.150)*

 *medium (0.400)*

 *high (0.700)*

 *highest (0.900)*

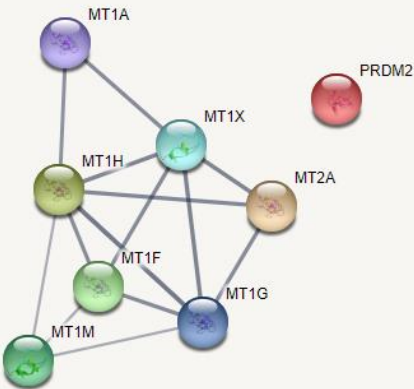
Εικόνα 42: STRING: Υπόμνημα δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

Ένα ενδεικτικό δίκτυο παρουσιάζεται παρακάτω, με μια ενδεικτική επιλογή οχτώ γονιδίων και των αντιστοιχων πρωτεϊνών τους.

Version: 11.0 (preview - version 10.5 still available [here](#))
LOGIN | REGISTER



Search
Download
Help
My Data



Viewers >
Legend >
Settings >
Analysis >
Exports v
Clusters >
More
Less

Export your current network:

- ... as a bitmap image: [download](#) *file format is 'PNG'; portable network graphic*
- ... as a high-resolution bitmap: [download](#) *same PNG format, but resolution at 400 dpi*
- ... as a vector graphic: [download](#) *SVG: scalable vector graphic - can be opened and edited in Illustrator, CorelDraw, Dia, etc*
- ... as simple tabular text output: [download](#) *TSV: tab separated values - can be opened in Excel*
- ... as an XML summary: [download](#) *structured XML interaction data, according to the 'PSI-MI' data standard*
- ... network coordinates: [download](#) *a flat-file format describing the coordinates and colors of nodes in the network*
- ... protein sequences: [download](#) *MFA: multi-fasta format - containing the aminoacid sequences in the network*
- ... protein annotations: [download](#) *a tab-delimited file describing the names, domains and annotated functions of the network proteins*

Εικόνα 43: STRING: Σελίδα απεικόνισης δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.

3.3: Μέθοδος

Στην παρούσα εργασία τα δεδομένα από τις σειρές GSE55349, GSE62253 και GSE84982 κατέβηκαν τοπικά και επεξεργάστηκαν.

Η μορφή στην οποία συνέβη αυτό είναι τα αρχεία SOFT, στα οποία έχει γίνει προεπεξεργασία και διόρθωση υποβάθρου, και αποτελούνται από λίστες ID αναφοράς συνοδευμένες από κανονικοποιημένες (κανονικοποίηση ποσοστημορίου) τιμές έκφρασης, καθώς και πληροφορίες για το πείραμα και τη διάταξη. Με χρήση αρχείων αντιστοίχισης ID με γονίδια του έκαστοτε μοντέλου πλατφόρμας (τα οποία διατίθενται από τους κατασκευαστές στο διαδύκτιο), οι λίστες των αρχείων SOFT μετατράπηκαν σε λίστες γονιδίων και τιμών έκφρασης.

Αρχικά αξιοποιήθηκε τοπικά ένας αλγόριθμος ο οποίος εφαρμόζει τον μη παραμετρικό έλεγχο Kruskal-Wallis H-test για εντοπισμό γονιδίων ενδιαφέροντος, Paired-Wilcoxon test συγκρίσεις για κάθε ζεύγος διαφορετικών φαινοτύπων και διορθώσεις Benjamini στις εκάστοτε συγκρίσεις. Αυτό έγινε για να έχουμε μια αρχική εικόνα για τις σειρές δεδομένων. Τα συνολικά αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης βρίσκονται στο Παράρτημα Α.

Έπειτα η ανάλυση συνεχίστηκε με τη σουίτα InSyBio ώστε να γίνει ανάλυση διαφορικής έκφρασης γονιδίων. Για την πραγματοποίηση αυτού του βήματος τα αρχεία δεδομένων ανέβηκαν στο σύννεφο μέσω του εργαλείου Data Store της InSyBio ώστε να γίνει η περαιτέρω επεξεργασία.

Έγινε ανάλυση διαφορικής έκφρασης χρησιμοποιώντας σαν κατώφλι στατιστικής σημαντικότητας το $p\text{-value} = 0.05$, και οι έλεγχοι έγιναν με χρήση μη παραμετρικών (Wilcoxon Rank Sum test) και παραμετρικών μεθόδων (Student T-test).

Σημειώνεται πως στην ανάλυση διαφορικής έκφρασης που διεκπεραιώθηκε με τη σουίτα χρησιμοποιείται το μη παραμετρικό τεστ Wilcoxon Rank Sum test, καθώς το πλήθος των δειγμάτων δεν επαρκούσε για να αποδειχθεί η κανονικότητα των δεδομένων. Σε αυτό το τεστ οι τιμές των $p\text{-values}$ δεν είναι συνεχείς και άρα είναι λογικό να υπάρχει πλήθος γονιδίων με ίδιο $p\text{-value}$. Το Student T-test χρησιμοποιείται επικουρικά ώστε να υπάρχει διάκριση στις τιμές αυτές χωρίς να χρησιμοποιείται ο συγκεκριμένος έλεγχος για την απόδειξη της στατιστικής σημαντικότητας.

Η τελική επιλογή των γονιδίων έγινε με περιορισμό στο fold change να είναι μεγαλύτερο από 1.5 στα μη-λογαριθμημένα δεδομένα, έτσι ώστε να φιλτραριστούν γονίδια με μικρές διαφοροποιήσεις που όμως προέκυπταν σαν στατιστικά σημαντικές λόγω μικρής διασποράς. Οι τελικές λίστες των γονιδίων βρίσκονται στο Παράρτημα Β.

Κατόπιν γίνεται λειτουργικός εμπλουτισμός σε αυτές τις λίστες γονιδίων αξιοποιώντας το εργαλείο DAVID 6.8 Functional Annotation Tool (<https://david.ncifcrf.gov/>), με τα συνολικά αποτελέσματα αυτού του εμπλουτισμού να βρίσκονται αναλυτικά στο Παράρτημα Γ.

Επίσης έγινε έλεγχος για σημεία πρόσδεσης miRNAs στα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια. Για την πραγματοποίησή του αξιοποιήθηκε η σουίτα InSyBio μέσω του εργαλείου ncRNASeq. Έγινε επιλογή αριθμού γονιδίων (των έως και πέντε πιο διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων σε κάθε μια από τις έως και τρεις περισσότερο επηρεασμένες φαινοτυπικά συγκρίσεις) καθώς το πλήθος των στατιστικά σημαντικών διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων ήταν πολύ μεγάλο και οι αναλύσεις είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες. Στη συνέχεια κατασκευάστηκαν διαγράμματα επιλέγοντας το 10% των σημαντικότερων αλληλεπιδράσεων miRNA-γονιδίων στόχων βάσει του σκορ της αλληλεπίδρασης. Το σύνολο των διαγραμμάτων παρατίθεται στο Παράρτημα Δ ως υλικό για περαιτέρω έρευνα.

Στη συνέχεια έγινε δοκιμή να δημιουργηθούν δίκτυα συσχέτισης ανά φαινότυπο μέσω της σουίτας InSyBio, αλλά κάτι τέτοιο φαίνεται να μην είναι εφικτό καθώς υπάρχουν πολύ λίγα δείγματα ανά φαινότυπο (μόλις 3), και μάλιστα επειδή πρόκειται για technical replicates με πολύ καλά ελεγχόμενες συνθήκες έχουν πολύ μικρή διακύμανση στις τιμές. Κατά συνέπεια οι αλγόριθμοι καταλήγουν να μην βρίσκουν σημαντικές συνδέσεις.

Εναλλακτικά, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων STRING (<https://string-db.org/>) για κατασκευή δικτύων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων των περισσότερο διαφορεικά εκφρασμένων γονιδίων κάθε περίπτωσης ώστε να γίνει πιο εύκολα η ερμηνεία των αποτελεσμάτων, καθώς εκτός του δικτύου που βοηθά σημαντικά, παρέχει και σύνοψη για τις σημαντικότερες βιολογικές διεργασίες και μοριακές λειτουργίες, τα εκάστοτε μεταβολικά μονοπάτια και υποκυτταρικές περιοχές, καθώς και επιπλέον βιβλιογραφία.

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα - Συζήτηση

4.1: Αποτελέσματα

Για την εξαγωγή των πρώτων αποτελεσμάτων διαφορικής έκφρασης γονιδίων σε ανά δύο συγκρίσεις, τα αρχεία δεδομένων ανέβηκαν στο σύννεφο της InSyBio.

Εκεί πραγματοποιήθηκε ανάλυση διαφορικής έκφρασης χρησιμοποιώντας σαν κατώφλι στατιστικής σημαντικότητας το $p\text{-value} = 0.05$, και οι έλεγχοι έγιναν με χρήση μη παραμετρικών (Wilcoxon Rank Sum test) και παραμετρικών μεθόδων (Student T-test). Αν και το πλήθος των δειγμάτων δεν επαρκούσε για να αποδειχθεί η κανονικότητα των δεδομένων, ιδιότητα του δείγματος η οποία υποδεικνύει την απαίτηση μη-παραμετρικού ελέγχου, με αυτό το τεστ οι τιμές των $p\text{-values}$ δεν είναι συνεχείς και άρα υπάρχει πλήθος γονιδίων με ίδιο $p\text{-value}$. Ο παραμετρικός έλεγχος χρησιμοποιείται επικουρικά ώστε να υπάρχει διάκριση στις τιμές αυτές χωρίς να χρησιμοποιείται ο συγκεκριμένος έλεγχος για την απόδειξη της στατιστικής σημαντικότητας.

Οι ανά δύο συγκρίσεις έγιναν για όλους τους φαινοτύπους κάθε σειράς, με σύγκριση κάθε φαινοτύπου έκθεσης σε νανοσωματίδια ή ιόντα έναντι του συνόλου των δεδομένων ελέγχου της κάθε σειράς.

Η τελική επιλογή των γονιδίων έγινε με περιορισμό στο fold change να είναι μεγαλύτερο από 1.5 στα μη-λογαριθμημένα δεδομένα, έτσι ώστε να φιλτραριστούν γονίδια με μικρές διαφοροποιήσεις που όμως προέκυπταν σαν στατιστικά σημαντικές λόγω μικρής διασποράς. Οι τελικές λίστες των γονιδίων μαζί με τα $p\text{-values}$ από τους στατιστικούς ελέγχους και τα fold changes που προκύπτουν από τις συγκρίσεις με τις ομάδες ελέγχου βρίσκονται στο Παράρτημα Β.

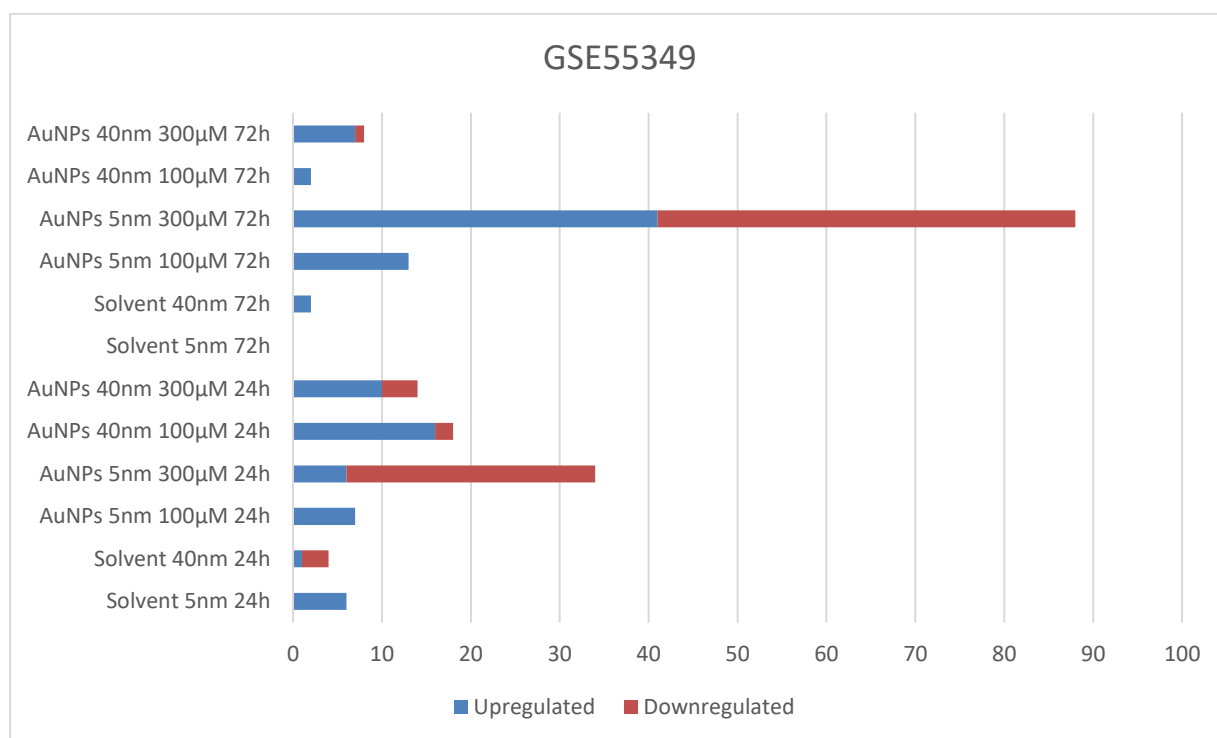
Έπειτα από αυτά τα βήματα ανάλυσης, τα περισσότερα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια κάθε σειράς συνοψίζονται παρακάτω:

Για τη σειρά δεδομένων GSE55349 τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

GSE55349	Upregulated	Downregulated
Solvent 5nm 24h	6	0
Solvent 40nm 24h	1	3
AuNPs 5nm 100μM 24h	7	0
AuNPs 5nm 300μM 24h	6	28
AuNPs 40nm 100μM 24h	16	2
AuNPs 40nm 300μM 24h	10	4
Solvent 5nm 72h	0	0
Solvent 40nm 72h	2	0
AuNPs 5nm 100μM 72h	13	0
AuNPs 5nm 300μM 72h	41	47
AuNPs 40nm 100μM 72h	2	0
AuNPs 40nm 300μM 72h	7	1

Πίνακας 5: Αριθμός στατιστικά σημαντικών διαφορικά υπερεκφρασμένων και υποεκφρασμένων γονιδίων της σειράς δεδομένων GSE55349 μετά την διαλογή με $F.C. > 0.5$.

Και ομοίως διαγραμματικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:



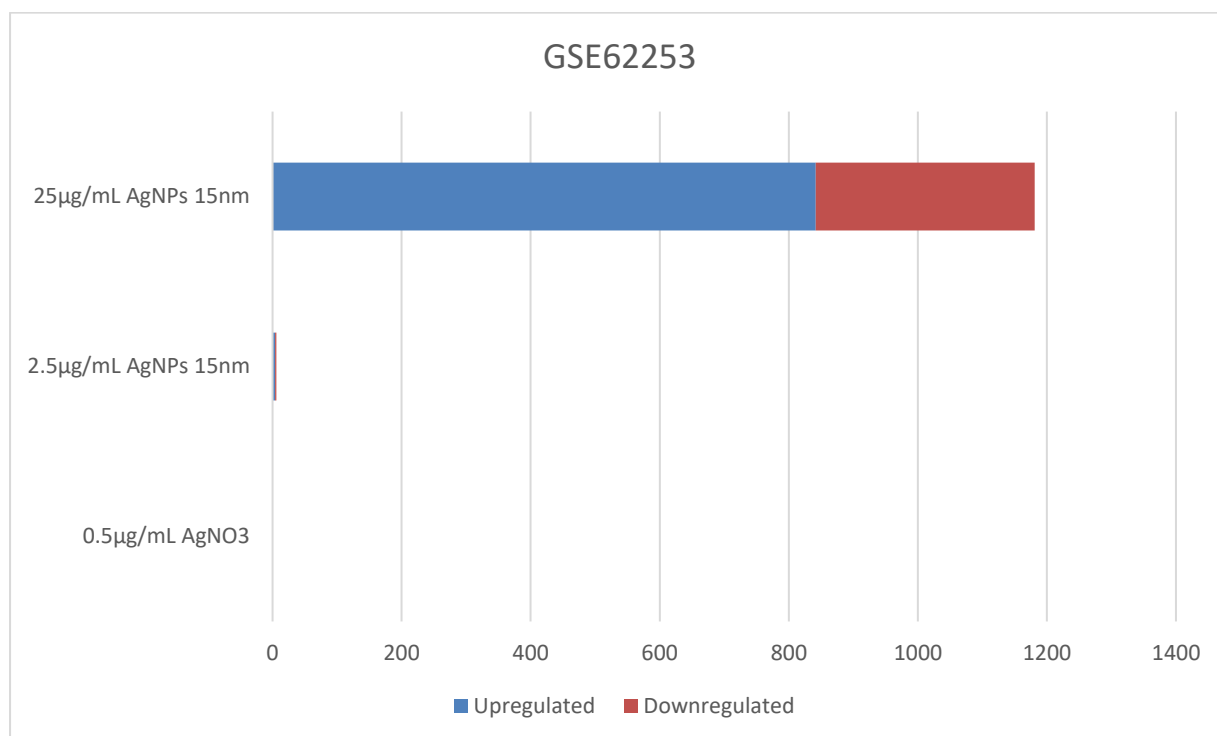
Διάγραμμα 2: Σωρευμένο ραβδόγραμμα στατιστικά σημαντικών διαφορικά υπερεκφρασμένων και υποεκφρασμένων γονιδίων της σειράς δεδομένων GSE55349 μετά την διαλογή με $F.C. > 0.5$.

Για τη σειρά δεδομένων GSE62253 τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

GSE62253	Upregulated	Downregulated
0.5μg/mL AgNO3	0	0
2.5μg/mL AgNPs 15nm	4	2
25μg/mL AgNPs 15nm	842	339

Πίνακας 6: Αριθμός στατιστικά σημαντικών διαφορικά υπερεκφρασμένων και υποεκφρασμένων γονιδίων της σειράς δεδομένων GSE62253 μετά την διαλογή με F.C. > 0.5.

Και ομοίως διαγραμματικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:



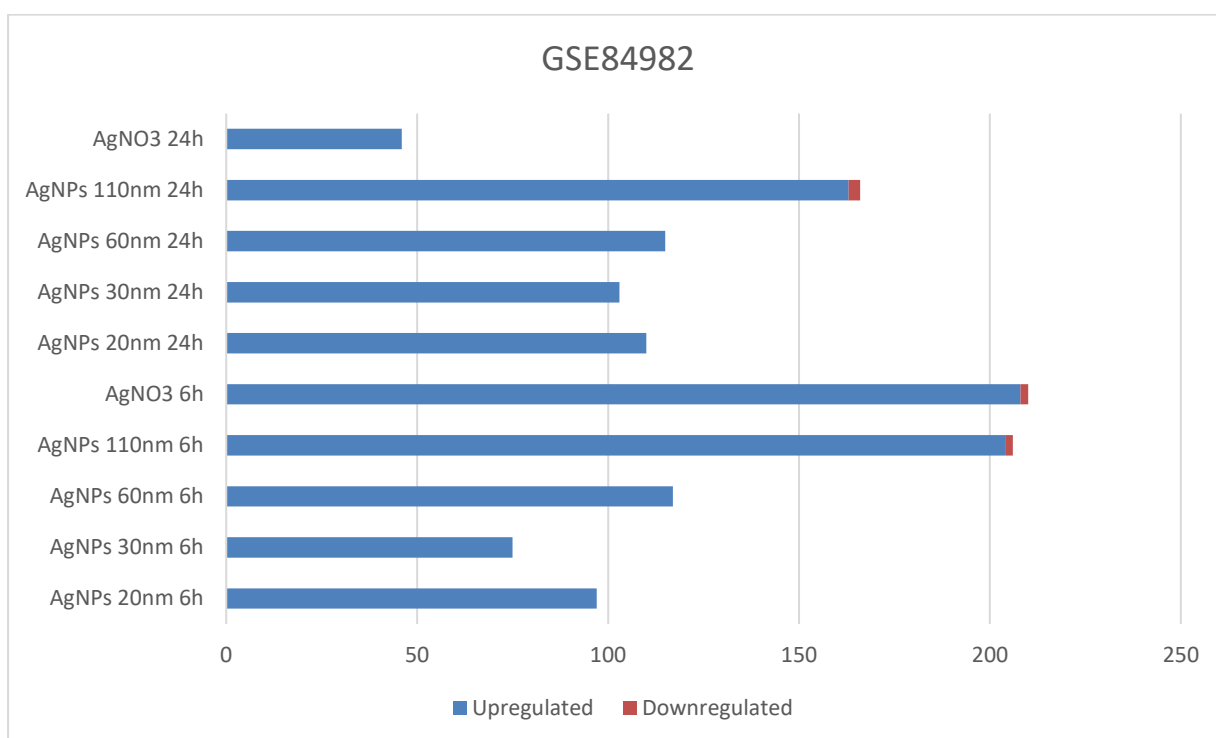
Διάγραμμα 3: Σωρευμένο ραβδόγραμμα στατιστικά σημαντικών διαφορικά υπερεκφρασμένων και υποεκφρασμένων γονιδίων της σειράς δεδομένων GSE62253 μετά την διαλογή με F.C. > 0.5.

Για τη σειρά δεδομένων GSE84982 τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

GSE84982	Upregulated	Downregulated
AgNPs 20nm 6h	97	0
AgNPs 30nm 6h	75	0
AgNPs 60nm 6h	117	0
AgNPs 110nm 6h	204	2
AgNO3 6h	208	2
AgNPs 20nm 24h	110	0
AgNPs 30nm 24h	103	0
AgNPs 60nm 24h	115	0
AgNPs 110nm 24h	163	3
AgNO3 24h	46	0

Πίνακας 7: Αριθμός στατιστικά σημαντικών διαφορικά υπερεκφρασμένων και υποεκφρασμένων γονιδίων της σειράς δεδομένων GSE84982 μετά την διαλογή με F.C. > 0.5.

Και ομοίως διαγραμματικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:



Διάγραμμα 4: Σωρευμένο ραβδόγραμμα στατιστικά σημαντικών διαφορικά υπερεκφρασμένων και υποεκφρασμένων γονιδίων της σειράς δεδομένων GSE84982 μετά την διαλογή με F.C. > 0.5.

Από το σύνολο των αποτελεσμάτων του λειτουργικού εμπλουτισμού έγινε επιλογή των δέκα στατιστικά σημαντικότερων λειτουργικών όρων των βάσεων GO και KEGG pathways, για τις τρεις πιο σημαντικές σε ποσότητα διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων περιπτώσεις. Αυτό διότι ο πολύ μεγάλος όγκος της πληροφορίας καθιστά ανούσια τη μελέτη κάθε υποπερίπτωσης χωρίς τη χρήση ομαδοποιήσεων. Οι συνολικοί πίνακες (των οποίων παρακάτω βρίσκεται μόνο ένα πολύ μικρό μέρος) μπορούν να βρεθούν στο παράρτημα Β.

Για κάθε μία από τις συγκρίσεις που παρουσιάζονται γίνεται ανάλυση, κατασκευή του δικτύου πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων των διαφορικότερα εκφρασμένων γονιδίων και σχολιασμός. Παραθέτονται και σχολιάζονται επίσης οι εκάστοτε miRNA αναλύσεις όπου αυτό κρίνεται σκόπιμο.

4.2.1: GSE55349

Για τη σειρά GSE55349 επιλέχθηκαν οι συγκρίσεις:

- AuNPs 5nm 300μM 24h (Downregulated)
- AuNPs 5nm 300μM 72h (Downregulated)
- AuNPs 5nm 300μM 72h (Upregulated)

καθώς οι συγκρίσεις τους με τις συνθήκες ελέγχου ήταν αυτές που έδωσαν τα περισσότερα και στατιστικά σημαντικότερα αποτελέσματα. Αναλυτικά οι πλήρεις λίστες των γονιδίων μπορούν να βρεθούν στους πίνακες του παραρτήματος Β, ενώ στο παράρτημα Γ ο πλήρης λειτουργικός εμπλουτισμός τους.

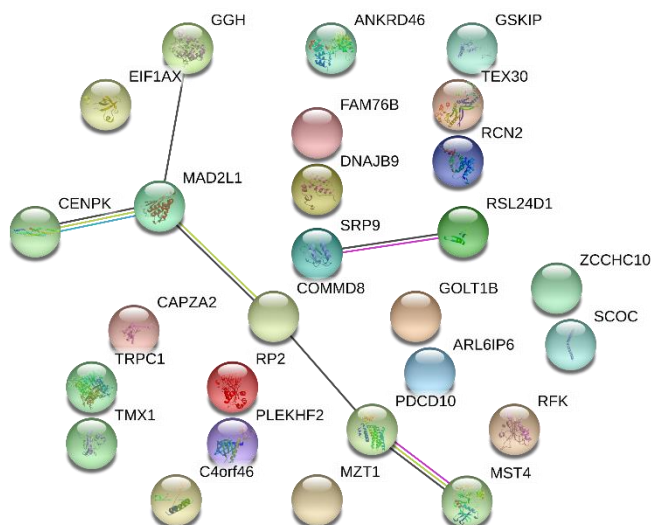
AuNPs 5nm 300μM 24h (Downregulated)

Στις 24 ώρες, με τα νανοσωματίδια 5nm σε συγκέντρωση 300μM επηρεάζεται αρνητικά η πρόσδεση των πρωτεϊνών και παράγοντες εκκίνησης της μετάφρασης, καθώς και η μεταφορά πρωτεϊνών.

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
☐	GOTERM_MF_DIRECT	protein binding	RT		18	72.0	1.4E-2	4.1E-1
☐	GOTERM_CC_DIRECT	endoplasmic reticulum	RT		5	20.0	1.6E-2	5.9E-1
☐	GOTERM_CC_DIRECT	cytosol	RT		9	36.0	3.4E-2	6.1E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	protein transport	RT		3	12.0	7.3E-2	1.0E0
☐	GOTERM_MF_DIRECT	translation initiation factor activity	RT		2	8.0	7.7E-2	7.8E-1
☐	GOTERM_CC_DIRECT	nucleolus	RT		4	16.0	8.2E-2	7.9E-1
☐	GOTERM_CC_DIRECT	condensed chromosome kinetochore	RT		2	8.0	1.0E-1	7.7E-1

Πίνακας 8: Οι έξι σημαντικότεροι λειτουργικοί όροι της σύγκρισης του φαινοτύπου AuNPs 5nm 300μM 24h (Downregulated) με το δείγμα ελέγχου.

Σημαντικότερη εκπροσώπηση έχει η πρόσδεση πρωτεϊνών και σημαντικότερα γονίδια τα ZCCHC10, CENPK, MZT1, SRP9 και TRPC1. Ακολουθεί πλήρης δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 44: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών για τα αρνητικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια της σύγκρισης του φαινοτύπου AuNPs 5nm 300μM 24h με το δείγμα ελέγχου.

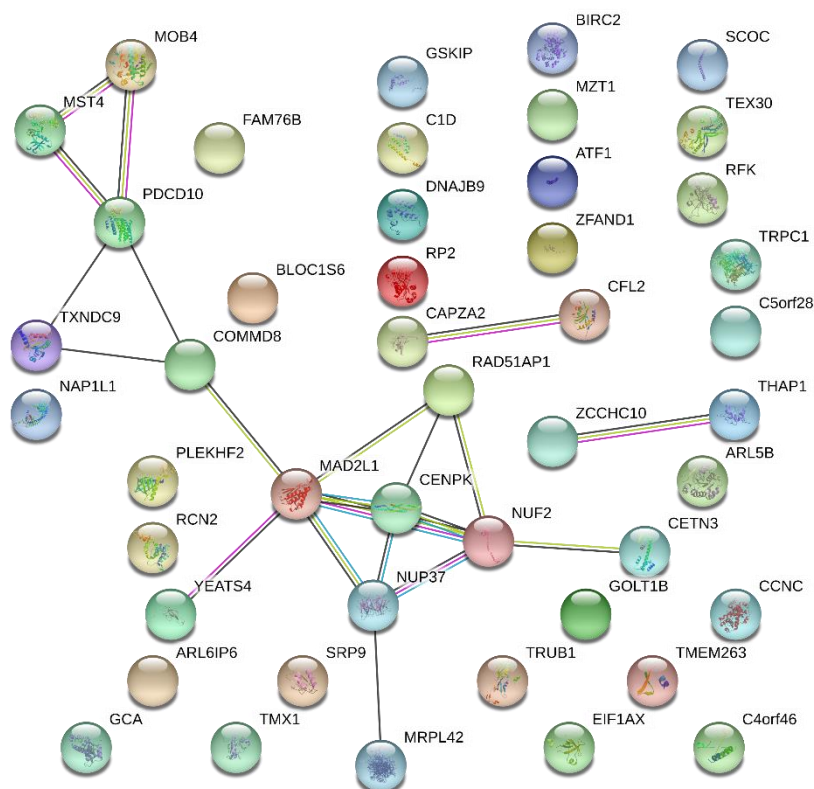
AuNPs 5nm 300μM 72h (Downregulated)

Στις 72 ώρες, τα ίδια νανοσωματίδια στην ίδια συγκέντρωση, έχουν ισχυρότερες (και πάλι) αρνητικές επιδράσεις σε παρόμοιες λειτουργίες, και πάλι με κυριότερη την πρωτεϊνική πρόσδεση. Φανερή είναι η επίδραση σε μιτωτικές διαδικασίες, καθώς και η μεταφορά του RNA.

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
☐	GOTERM_MF_DIRECT	protein binding	RT		32	78.0	3.7E-4	2.3E-2
☐	GOTERM_CC_DIRECT	condensed chromosome kinetochore	RT		4	9.8	6.7E-4	5.5E-2
☐	GOTERM_BP_DIRECT	sister chromatid cohesion	RT		4	9.8	1.3E-3	2.0E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	mitotic nuclear division	RT		4	9.8	1.5E-2	7.3E-1
☐	GOTERM_CC_DIRECT	nucleolus	RT		6	14.6	2.6E-2	6.7E-1
☐	KEGG_PATHWAY	RNA transport	RT		3	7.3	2.9E-2	5.6E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cell division	RT		4	9.8	3.6E-2	8.9E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	protein transport	RT		4	9.8	4.9E-2	8.9E-1
☐	GOTERM_CC_DIRECT	cytosol	RT		12	29.3	5.0E-2	7.7E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	mitotic spindle assembly	RT		2	4.9	7.2E-2	9.3E-1

Πίνακας 9: Οι δέκα σημαντικότεροι λειτουργικοί όροι της σύγκρισης του φαινοτύπου AuNPs 5nm 300μM 72h (Downregulated) με το δείγμα ελέγχου.

Περισσότερο διαφορικά εκφρασμένα γονίδια είναι τα ZCCHC10, CENPK, COMM8, SCOC και MAD2L1. Ακολουθεί πλήρες δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 45: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών για τα αρνητικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια της σύγκρισης του φαινοτύπου AuNPs 5nm 300μM 72h με το δείγμα ελέγχου.

AuNPs 5nm 300μM 72h (Upregulated)

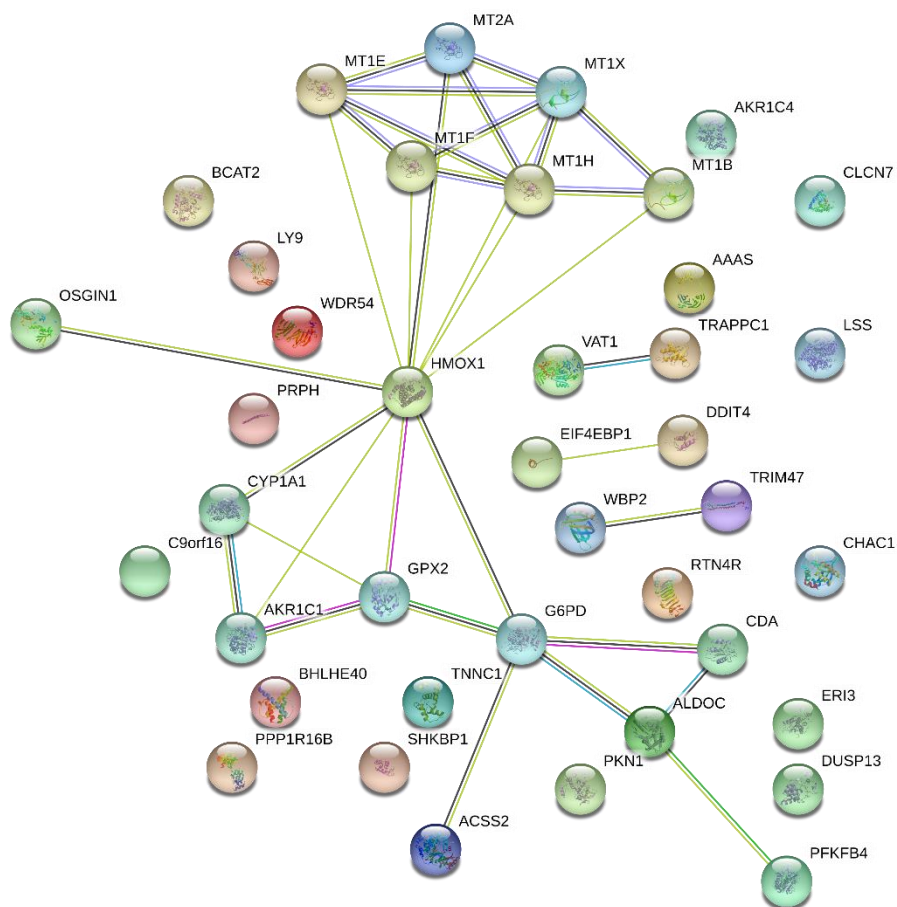
Εξετάζοντας τα γονίδια που υπερεκφράζονται στις 72 ώρες μετά την έκθεση σε AuNPs 5nm είναι εμφανής η αναγνώριση των νανοσωματιδίων ως μεταλλικά ιόντα, επηρεάζοντας αντίστοιχες διεργασίες και ρυθμίζοντας αρνητικά την κυτταρική ανάπτυξη. Ενεργοποιείται επίσης ο μηχανισμός μείωσης του οξειδωτικού στρες.

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
☐	GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of growth	RT		7	17.1	1.7E-12	4.9E-10
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to zinc ion	RT		7	17.1	1.7E-12	4.9E-10
☐	KEGG_PATHWAY	Mineral absorption	RT		7	17.1	7.6E-9	3.6E-7
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to cadmium ion	RT		5	12.2	4.2E-8	6.1E-6
☐	GOTERM_CC_DIRECT	perinuclear region of cytoplasm	RT		9	22.0	1.8E-5	9.6E-4
☐	GOTERM_BP_DIRECT	response to metal ion	RT		3	7.3	2.0E-4	1.9E-2
☐	GOTERM_CC_DIRECT	cytosol	RT		16	39.0	6.2E-4	1.6E-2
☐	GOTERM_MF_DIRECT	zinc ion binding	RT		10	24.4	7.5E-4	8.4E-2
☐	GOTERM_BP_DIRECT	oxidation-reduction process	RT		7	17.1	1.5E-3	1.0E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to erythropoietin	RT		2	4.9	4.3E-3	2.2E-1

Πίνακας 10: Οι δέκα σημαντικότεροι λειτουργικοί όροι της σύγκρισης του φαινοτύπου AuNPs 5nm 300μM 72h (Upregulated) με το δείγμα ελέγχου.

Τα περισσότερο διαφορικά εκφρασμένα γονίδια είναι τα DDIT4, DUSP13, ALDOC, GPX2, G6PD, HMOX1, καθώς και στις μεταλλοθειονείνες (MTs) MT1F, MT1H, MT1B, MT1X, MT1E, MT1L και MT2A.

Ακολουθεί πλήρες δίκτυο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 46: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών για τα θετικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια της σύγκρισης του φαινοτύπου AuNPs 5nm 300μM 72h με το δείγμα ελέγχου.

4.2.2: GSE62253

Για τη σειρά GS62253 επιλέχθηκαν οι συγκρίσεις:

- 25μg/mL AgNPs 15nm (Upregulated)
- 25μg/mL AgNPs 15nm (Downregulated)

καθώς οι συγκρίσεις τους με τις συνθήκες ελέγχου ήταν αυτές που έδωσαν τα περισσότερα και στατιστικά σημαντικότερα αποτελέσματα. Αναλυτικά οι πλήρεις λίστες των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων μπορούν να βρεθούν στους πίνακες του παραρτήματος Β, ενώ στο παράρτημα Γ ο πλήρης λειτουργικός εμπλουτισμός τους.

25μg/mL AgNPs 15nm 24h (Upregulated)

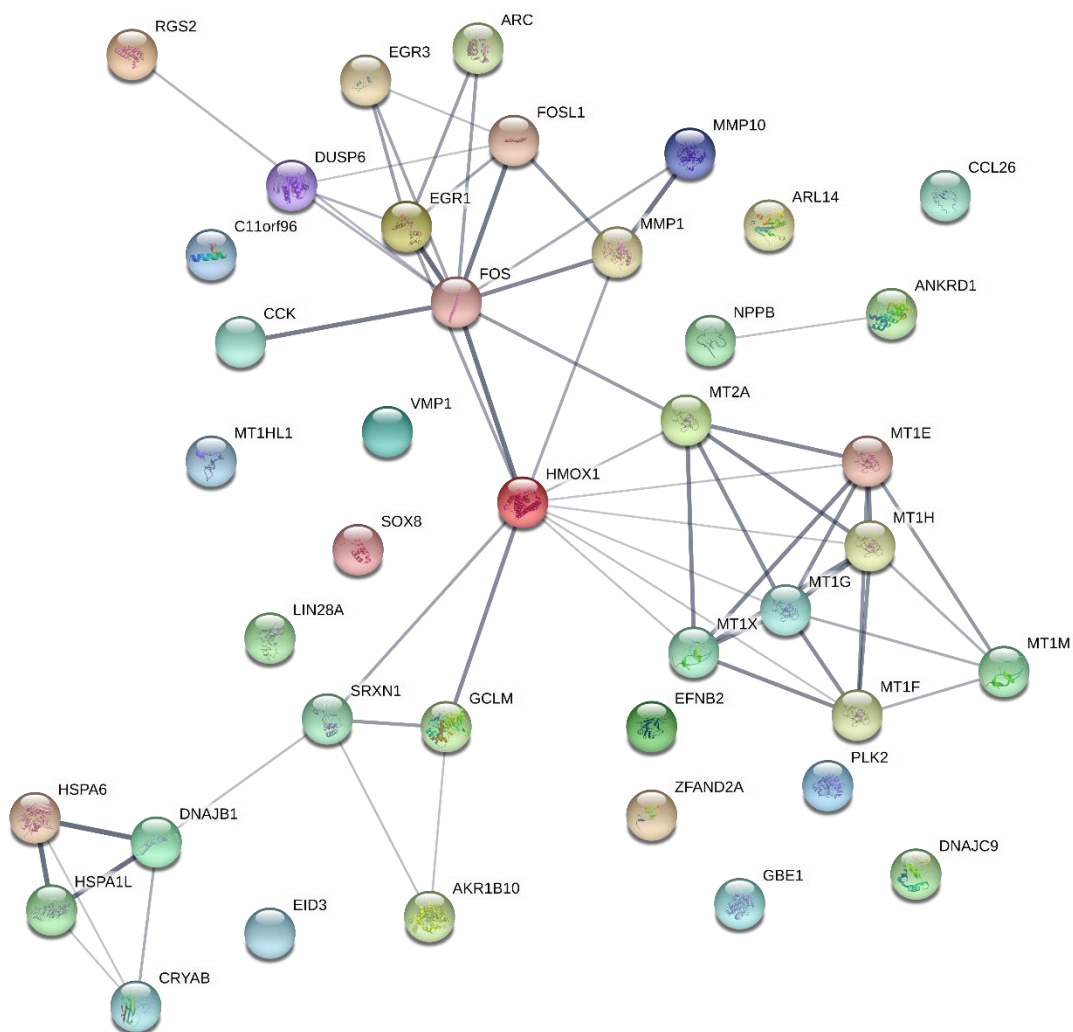
Το δείγμα με τα AgNPs 15nm σε συγκέντρωση 25μg/mL στις 24 ώρες φαίνεται να επηρεάζεται λειτουργικά στην πρόσδεση πρωτεϊνών, και να ενεργοποιούνται διεργασίες που σχετίζονται με μεταλλικά ιόντα, στρες και αρνητική ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης.

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to zinc ion	RT 		9	5.1	3.9E-12	5.4E-9
☐	GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of growth	RT 		9	5.1	3.9E-12	5.4E-9
☐	GOTERM_BP_DIRECT	response to unfolded protein	RT 		11	6.3	5.3E-12	3.6E-9
☐	KEGG_PATHWAY	Mineral absorption	RT 		12	6.9	1.0E-11	1.6E-9
☐	GOTERM_BP_DIRECT	regulation of cellular response to heat	RT 		12	6.9	1.2E-10	5.5E-8
☐	GOTERM_MF_DIRECT	protein binding	RT 		120	68.6	6.7E-10	2.2E-7
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to cadmium ion	RT 		7	4.0	7.7E-9	2.7E-6
☐	GOTERM_MF_DIRECT	unfolded protein binding	RT 		11	6.3	7.7E-8	1.3E-5
☐	GOTERM_CC_DIRECT	perinuclear region of cytoplasm	RT 		22	12.6	1.4E-7	3.0E-5
☐	GOTERM_CC_DIRECT	cytosol	RT 		58	33.1	1.4E-7	1.5E-5

Πίνακας 11: Οι δέκα σημαντικότεροι λειτουργικοί όροι της σύγκρισης του φαινοτύπου 25μg/mL AgNPs 15nm 24h (Upregulated) με το δείγμα ελέγχου.

Τα περισσότερα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια είναι το NPPB, μεταλλοθειονείνες όπως οι MT1H, MT1E και η MT1M, η οξυγενάση της αίμης 1 (HMOX1), και περισσότερο υπερεκφρασμένο γονίδιο το HSPA6.

Ακολουθεί δίκτυο των περισσότερο θετικά ρυθμισμένων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 47: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών για τα >4FC διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια της σύγκρισης του φαινοτύπου 25μg/mL AgNPs 15nm 24h με το δείγμα ελέγχου.

25μg/mL AgNPs 15nm 24h (Downregulated)

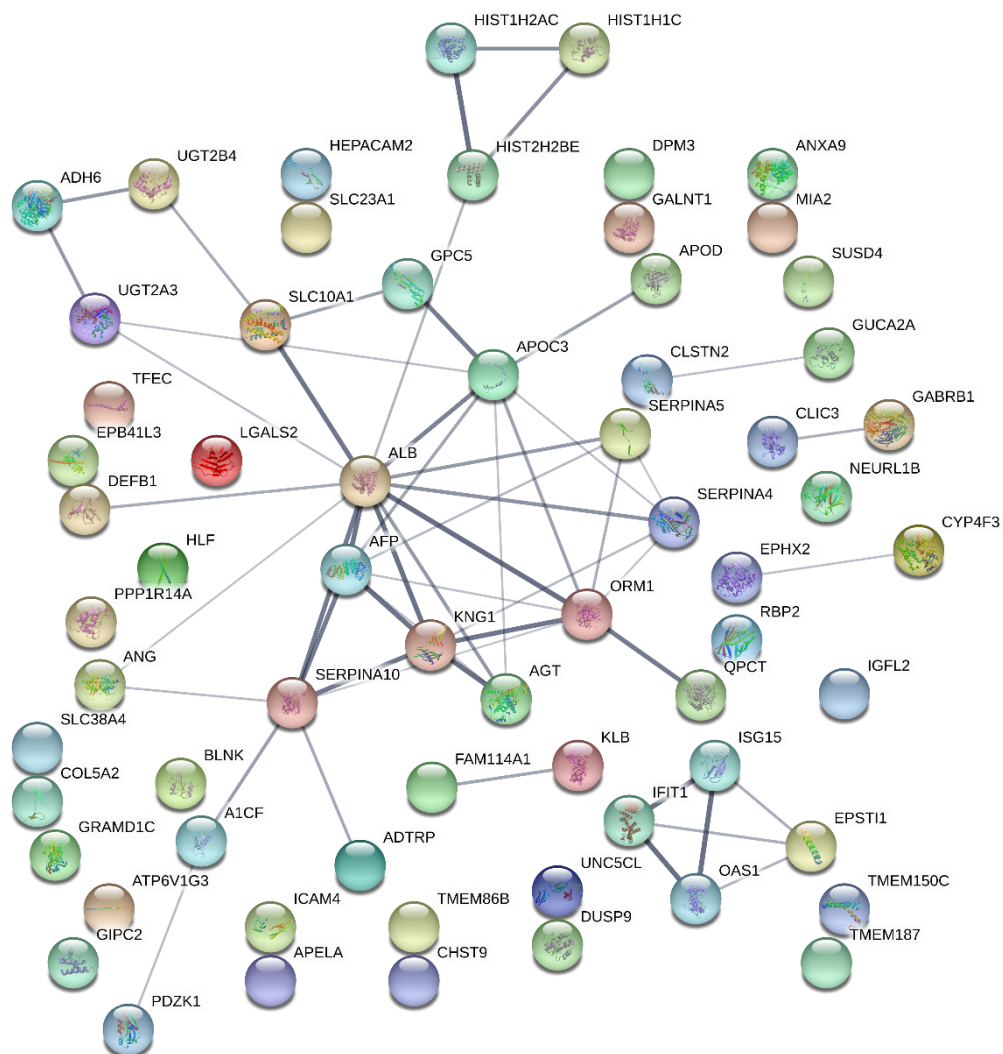
Ο ίδιος φαινότυπος εμφανίζει αρνητική ρύθμιση σε πρωτεΐνες μεταβολικών διαδικασιών, σε πρωτεΐνες εμπλεκόμενες στο σηματοδοτικό μονοπάτι των τύπου I ιντερφερονών, καθώς και σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον ομοιοστατικό μηχανισμό της χοληστερόλης.

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
☐	GOTERM_CC_DIRECT	extracellular exosome	RT		82	24.4	1.1E-8	2.7E-6
☐	KEGG_PATHWAY	Metabolic pathways	RT		44	13.1	1.6E-7	2.8E-5
☐	GOTERM_BP_DIRECT	type I interferon signaling pathway	RT		9	2.7	5.5E-6	6.5E-3
☐	GOTERM_CC_DIRECT	extracellular region	RT		49	14.6	9.1E-6	1.1E-3
☐	GOTERM_CC_DIRECT	platelet alpha granule lumen	RT		7	2.1	2.1E-4	1.6E-2
☐	GOTERM_CC_DIRECT	integral component of membrane	RT		109	32.4	2.3E-4	1.4E-2
☐	GOTERM_BP_DIRECT	metabolic process	RT		11	3.3	2.6E-4	1.4E-1
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cholesterol homeostasis	RT		7	2.1	4.2E-4	1.5E-1

Πίνακας 12: Οι δέκα σημαντικότεροι λειτουργικοί όροι της σύγκρισης του φαινοτύπου 25μg/mL AgNPs 15nm 24h (Downregulated) με το δείγμα ελέγχου.

Τα περισσότερα αρνητικά διαφορικά εκφρασμένα γονίδια είναι τα ANG, KLB, GPC5, AGT, APELA, ORM1, EPB41L3 και το IFIT1.

Ακολουθεί δίκτυο των περισσότερα αρνητικά ρυθμισμένων πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.



Εικόνα 48: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών για τα <0.35FC διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια της σύγκρισης του φαινοτύπου 25μg/mL AgNPs 15nm 24h με το δείγμα ελέγχου.

4.2.3: GSE84982

Για τη σειρά GSE84982 επιλέχθηκαν οι συγκρίσεις:

- AgNPs 110nm 6h (Upregulated)
- AgNO₃ 6h (Upregulated)
- AgNPs 110nm 24h (Upregulated)

καθώς οι συγκρίσεις τους με τις συνθήκες ελέγχου ήταν αυτές που έδωσαν τα περισσότερα και στατιστικά σημαντικότερα αποτελέσματα. Αναλυτικά οι πλήρεις λίστες των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων μπορούν να βρεθούν στους πίνακες του παραρτήματος Β, ενώ στο παράρτημα Γ ο πλήρης λειτουργικός εμπλουτισμός τους.

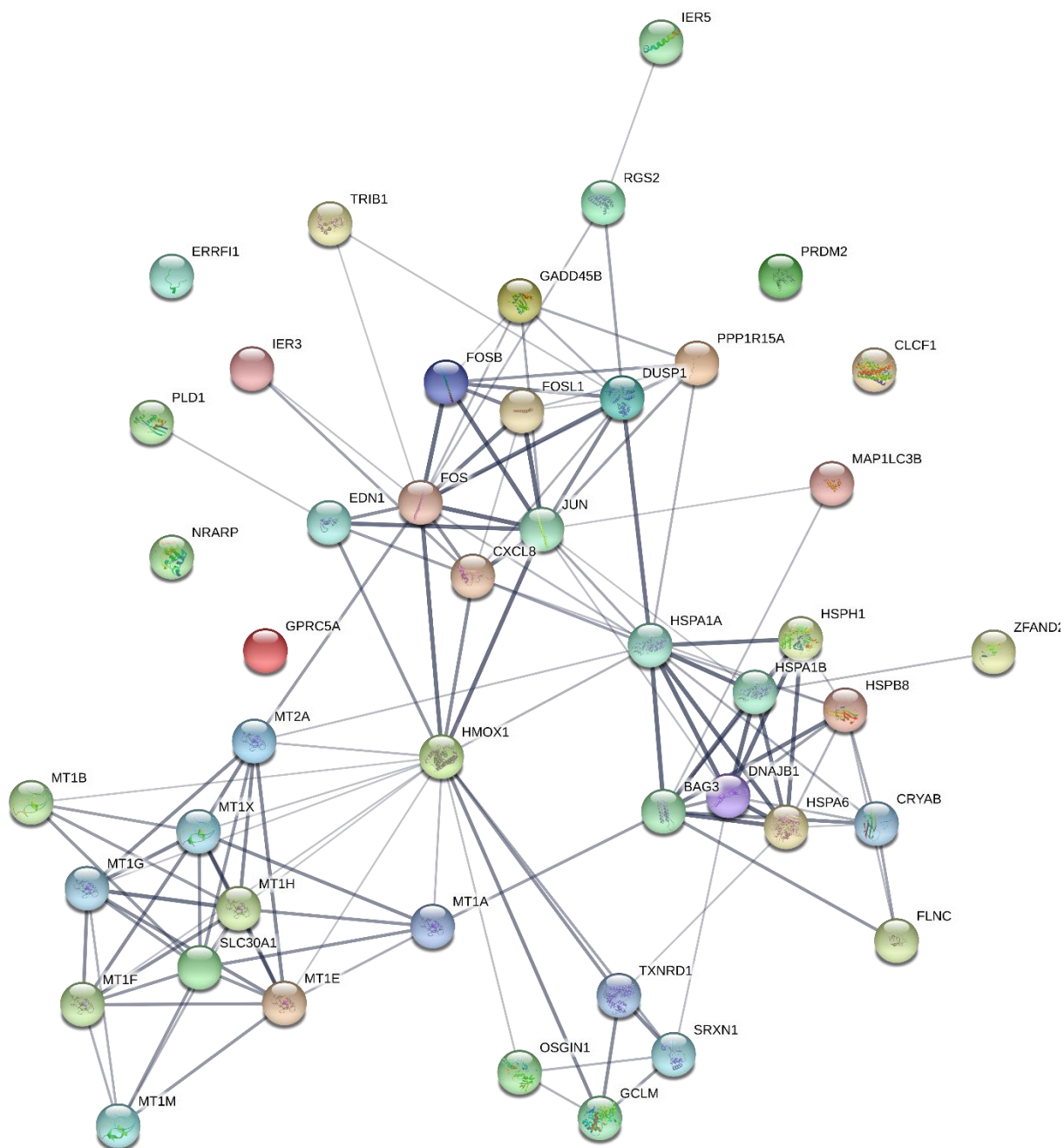
AgNPs 110nm 6h (Upregulated)

Το δείγμα το οποίο εκτέθηκε σε AgNPs 110nm για 6 ώρες, σύμφωνα με τα αποτελέσματα φαίνεται να εκφράζει μεγάλες αλλαγές σε γονίδια υπεύθυνα για την πρόσδεση πρωτεϊνών, αντίδραση σε μεταλλικά στοιχεία και απορρόφηση αυτών, αρνητική ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, καθώς και μηχανισμούς (θερμικού-οξειδωτικού) στρες.

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to zinc ion	RT 		9	5.1	3.9E-12	5.4E-9
☐	GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of growth	RT 		9	5.1	3.9E-12	5.4E-9
☐	GOTERM_BP_DIRECT	response to unfolded protein	RT 		11	6.3	5.3E-12	3.6E-9
☐	KEGG_PATHWAY	Mineral absorption	RT 		12	6.9	1.6E-11	2.6E-9
☐	GOTERM_BP_DIRECT	regulation of cellular response to heat	RT 		12	6.9	1.2E-10	5.5E-8
☐	GOTERM_MF_DIRECT	protein binding	RT 		120	68.6	6.7E-10	2.2E-7
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to cadmium ion	RT 		7	4.0	7.7E-9	2.7E-6
☐	GOTERM_MF_DIRECT	unfolded protein binding	RT 		11	6.3	7.7E-8	1.3E-5
☐	GOTERM_CC_DIRECT	perinuclear region of cytoplasm	RT 		22	12.6	1.4E-7	3.0E-5
☐	GOTERM_CC_DIRECT	cytosol	RT 		58	33.1	1.4E-7	1.5E-5

Κύρια γονίδια τα οποία υπερεκφράζονται είναι το DNAJB1, πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPA6, HSPA7 και HSPA1A, πολλές μεταλλοθειονίνες, η FOS μαζί με την JUN και την PPP1R15A, και -όπως ήταν αναμενόμενο βάση των προηγούμενων- η οξυγενάση της αίμης HMOX1.

Το δίκτυο αλληλεπιδράσεων των περισσότερο υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών έχει ως εξής.



Εικόνα 49: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών για τα >2.5FC διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια της σύγκρισης του φαινοτύπου AgNPs 110nm 6h με το δείγμα ελέγχου.

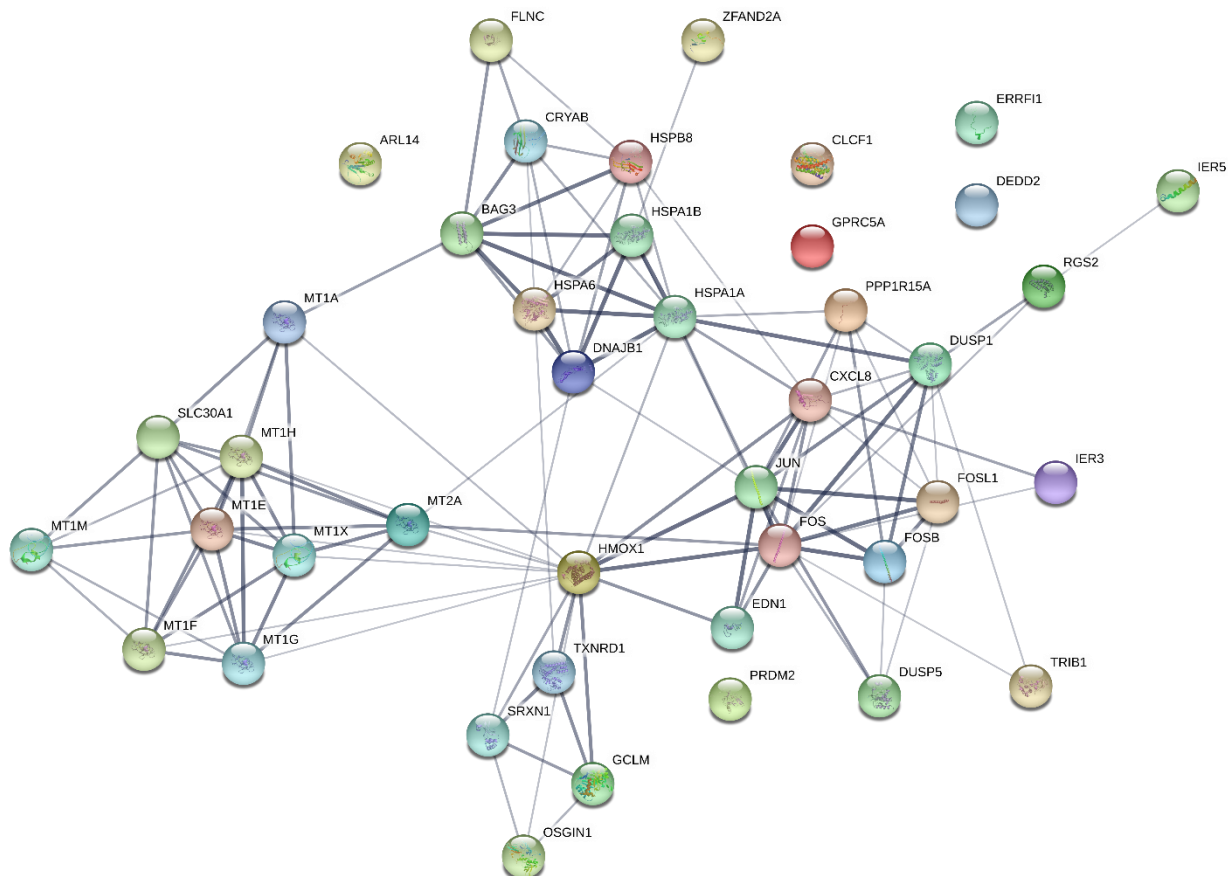
AgNO3 6h (Upregulated)

Αν και το δείγμα το οποίο είχε AgNO3 για 6 ώρες δεν είχε καθόλου νανοσωματίδια αλλά αντίθετα εκτέθηκε κατευθείαν ιόντα αργύρου, φαινοτυπικά ακολουθεί το ίδιο μοτίβο με το δείγμα που είχε νανοσωματίδια. Σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα φαίνεται να εκφράζονται μεγαλύτερη ποσότητα σε γονίδια υπεύθυνα για την πρόσδεση πρωτεϊνών, αντίδραση σε μεταλλικά στοιχεία και απορρόφηση αυτών, αρνητική ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, καθώς και μηχανισμούς (θερμικού-οξειδωτικού) στρες.

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
☐	GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of growth	RT		9	5.0	5.3E-12	8.0E-9
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to zinc ion	RT		9	5.0	5.3E-12	8.0E-9
☐	GOTERM_MF_DIRECT	protein binding	RT		128	70.7	1.2E-10	4.2E-8
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to cadmium ion	RT		8	4.4	1.5E-10	1.1E-7
☐	GOTERM_BP_DIRECT	response to unfolded protein	RT		10	5.5	2.4E-10	1.2E-7
☐	KEGG_PATHWAY	Mineral absorption	RT		11	6.1	7.5E-10	1.2E-7
☐	GOTERM_BP_DIRECT	regulation of cellular response to heat	RT		11	6.1	3.2E-9	1.2E-6
☐	GOTERM_BP_DIRECT	response to oxidative stress	RT		12	6.6	1.2E-8	3.5E-6
☐	GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of apoptotic process	RT		21	11.6	2.5E-8	6.2E-6
☐	GOTERM_CC_DIRECT	perinuclear region of cytoplasm	RT		23	12.7	1.1E-7	2.3E-5

Τα περισσότερο υπερεκφρασμένα γονίδια είναι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ HSPA1A και HSPA6, η οξυγενάση της αίμης HMOX1, πολλές μεταλλοθειονίνες, καθώς και πρωτεΐνες της οικογενειας FOS μαζί με την JUN και την PPP1R15A.

Το δίκτυο των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων για τις οποίες κωδικοποιούν τα ισχυρότερα υπερεκφρασμένα γονίδια αυτού του φαινοτύπου ακολουθεί παρακάτω.



Εικόνα 50: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών για τα >2.5FC διαφορικά εκφρασμένα γονίδια της σύγκρισης του φαινοτύπου AgNO₃ 6h με το δείγμα ελέγχου.

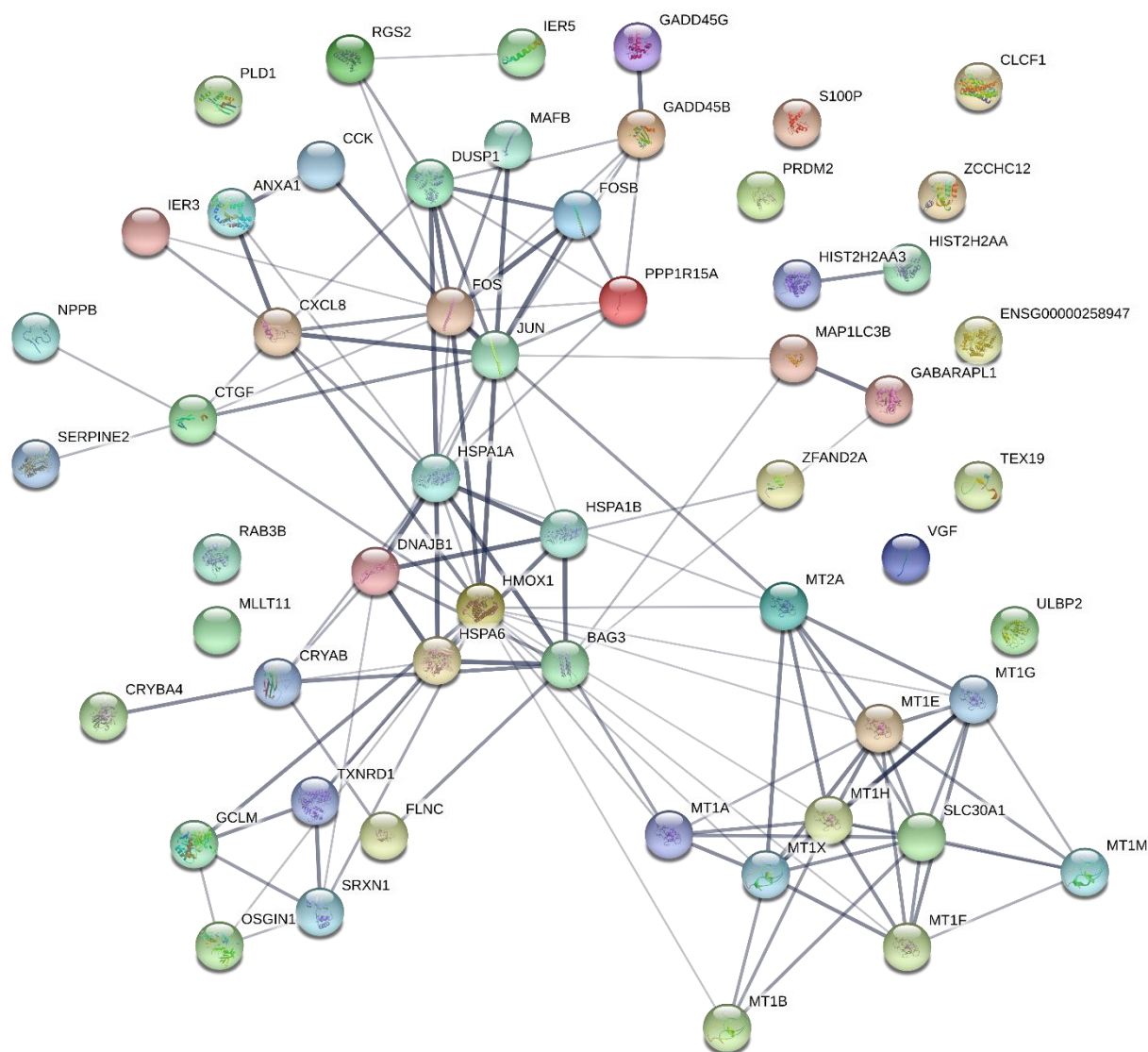
AgNPs 110nm 24h (Upregulated)

Το δείγμα το οποίο είχε AgNPs 110nm για 24 ώρες -ομοίως με τις 6 ώρες- φαίνεται να εκφράζει μεγάλες αλλαγές σε γονίδια υπεύθυνα για την πρόσδεση πρωτεϊνών, αντίδραση σε μεταλλικά στοιχεία και απορρόφηση αυτών, αρνητική ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, καθώς και μηχανισμούς (θερμικού-οξειδωτικού) στρες.

Sublist	Category	Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
☐	GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of growth	RT		9	6.7	4.1E-13	4.4E-10
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to zinc ion	RT		9	6.7	4.1E-13	4.4E-10
☐	KEGG_PATHWAY	Mineral absorption	RT		12	8.9	1.8E-12	2.4E-10
☐	GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to cadmium ion	RT		8	5.9	1.6E-11	8.5E-9
☐	GOTERM_CC_DIRECT	cytosol	RT		50	37.0	1.5E-8	2.7E-6
☐	GOTERM_MF_DIRECT	protein binding	RT		93	68.9	8.8E-8	2.3E-5
☐	GOTERM_CC_DIRECT	perinuclear region of cytoplasm	RT		19	14.1	1.9E-7	1.7E-5
☐	GOTERM_CC_DIRECT	cytoplasm	RT		62	45.9	7.2E-7	4.3E-5
☐	GOTERM_BP_DIRECT	regulation of cellular response to heat	RT		8	5.9	1.1E-6	4.1E-4
☐	GOTERM_BP_DIRECT	response to cAMP	RT		6	4.4	1.9E-5	5.3E-3

Τα πλείστα υπερεκφρασμένα γονίδια είναι οι κυρίως πολλές μεταλλοθειονίνες, η οξυγενάση της αίμης HMOX1, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ HSAPA1A, HSPA1B, HSPA6, καθώς και η κρυσταλλίνη AB η οποία ανήκει στην οικογένεια των μικρών πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSP20). Η υπερέκφραση των FOS, JUN και PPP1R15A δείχνουν οξειδωτικό στρες και πιθανή αποπτωτική τάση.

Το δίκτυο των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων των περισσότερο διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων του φαινοτύπου είναι όπως φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 51: Δίκτυο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών για τα >2FC διαφορεικά εκφρασμένα γονίδια της σύγκρισης του φαινοτύπου AgNPs 110nm 24h με το δείγμα ελέγχου.

Έχοντας μεγάλη ετερογένεια στα δείγματα, έγινε προσπάθεια μέσω διαγραμμάτων Venn να εντοπιστούν γονίδια τα οποία να εκφράζονται εκλεκτικά διαφορεικά μόνο για νανοσωματίδια (στις 24 ώρες αρχικά). Όσοσο η μεγάλη αλληλοεπικάλυψη των ιόντων και των νανοσωματιδίων αργύρου δείχνει ότι τα νανοσωματίδια αργύρου μάλλον επιδρούν στο κύτταρο μέσω διάστασης σε ιόντα, γεγονός το οποίο μας αποτρέπει από το να βρούμε γονίδια τα οποία να εκφράζονται διαφορεικά συγκεκριμένα λόγω έκθεσης σε νανοσωματίδια. Περεταίρω ανάλυση για τις 6h έκθεσης οδηγεί στα ίδια αποτελέσματα.

4.2: Συζήτηση

Τα αδιαφοροποίητα γονίδια Caco-2 είναι ένα από τα *in vitro* μοντέλα για την εντερική οδό και χρησιμοποιείται για τη μελέτη νανοσωματιδίων. Όταν τα κύτταρα αυτά επωαστούν σε γεμάτα τρυβλία για 21 μέρες, υφίστανται αυθόρμητη αναστολή του κυτταρικού κύκλου και διαφοροποίηση. Μέσω αυτής της διαδικασίας σχηματίζεται το εντεροκυτταρικό μονοστρώμα, το οποίο χρησιμεύει ως μοντέλο για τον εντερικό φραγμό [93, 94]. Τα αδιαφοροποίητα κύτταρα έχουν ευρύτερη πλαστικότητα στην κυτταρική φυσιολογία, στην ευαισθησία και την απόκριση στο στρες σε σύγκριση με τα ώριμα εντεροκύτταρα [95]. Επίσης, εξαιτίας της ενδογενούς ετερογένειας της (αδιαφοροποίητης) προγονικής κυτταρικής σειράς και των διαφορετικών συνθηκών καλλιέργειας κατά τη διαφοροποίηση, η έκφραση των μορφολογικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών των ώριμων εντεροκυττάρων διαφέρει πολύ ανά εργαστήριο και πείραμα. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι αυτή η διαφορετική συμπεριφορά των κυττάρων τόσο στην πρόσληψη όσο και στην αντίδραση στα νανοσωματίδια είναι πιθανό να ευθύνεται εν μέρη στις διαφορές έκφρασης ανάμεσα στους δυο κυτταρικούς τύπους [96, 97].

4.2.1: AuNPs

Τα αδιαφοροποίητα κύτταρα κρίθηκαν πιο ταιριαστό μοντέλο από τους ερευνητές για τον εντοπισμό διαφορικής γονιδιακής έκφρασης κατά την έκθεση σε νανοσωματίδια στη σειρά GSE55349.

Όταν τα κύτταρα Caco-2 εκτεθούν σε AuNPs, εξετάζοντας την πρόσληψη τους δε φάνηκε να υπάρχει διαφορά μεταξύ των 24 και των 72 ωρών, πιθανώς επειδή είχε φτάσει σε ένα σταθερό σημείο η διαδικασία της πρόσληψης ήδη από τις 24h, εύρημα το οποίο συνάδει με παλιότερες μελέτες σε άλλα είδη κυττάρων (HUVEC, C17.2 νευρικά προγονικά κύτταρα και PC12 κύτταρα αρουραίων) [98], ενώ αντίκειται σε άλλες (με Balb/3T3 κύτταρα ποντικών) [99]. Σύγκριση μεταξύ των δύο μεγεθών AuNPs έδειξε μεγαλύτερη πρόσληψη των μικρότερων, πιθανώς επειδή αν χρησιμοποιηθεί ίδια συγκέντρωση νανοσωματιδίων, τα κύτταρα εκτίθενται σε περίπου 100 φορές περισσότερα νανοσωματίδια μικρού μεγέθους σε σχέση με τα μεγαλύτερα. Επιπροσθέτως, μέσω ανάλυσης TEM διαπιστώθηκε ότι και τα δύο μεγέθη εισέρχονται στο κύτταρο μέσω ενδοκυτταρικών μονοπατιών.

Όσον αφορά την κυτταροτοξικότητα, τα μικρά νανοσωματίδια (5 nm) σταματούν την κυτταρική ανάπτυξη και μειώνουν την ικανότητα σχηματισμού αποικιών, κυρίως σε μεγάλες συγκεντρώσεις (300mM) και σε αρκετό χρόνο (72h).

Εξετάζοντας τις κυτταρικές λειτουργίες, κυρίως επηρεάζονται μονοπάτια που καταστέλλουν την κυτταρική ανάπτυξη, και αυτό είναι εμφανές ήδη από τις 24h για τα AuNPs 5nm, ενώ εντείνεται στις 72h. Αντίθετα, τα νανοσωματίδια 40nm πρακτικά φαίνεται να είναι κατά κύριο λόγο αδρανή.

Για την έκθεση σε AuNPs 5nm για 24h λοιπόν, η αρχική εικόνα της ανάλυσης δείχνει μικρή υπερέκφραση της APO3 (η οποία ίσως είναι ενδεικτική ενεργοποίησης νεκρωτικού μηχανισμού) και υποέκφραση διαφόρων γονιδίων, κυρίως εκ των οποίων τα CENPK, ANKRD46 και MZT1 τα οποία επηρεάζουν την κυτταρική ανάπτυξη και μοιράζονται κοινά μεταβολικά μονοπάτια που κυρίως σχετίζονται με τη μίτωση.

Στις 72h, ομοίως με τις 24h, παρατηρείται υποέκφραση σε γονίδια σχετιζόμενα με τον κινητοχώρο και τις μιτωτικές διαδικασίες, όπως ο διαχωρισμός των αδελφών χρωματίδων (κύρια γονίδια τα MAD2L1, CENPK, NUF2 και NUP37). Αντίθετα, όσον αφορά την υπερέκφραση γονιδίων, η εικόνα αλλάζει και πλέον είναι ξεκάθαρη η αντίδραση του κυττάρου σε μεταλλικά ιόντα μέσω μεγάλης υπερέκφρασης μεταλλοθειονών, οι οποίες ευθύνονται και για την αρνητική ρύθμιση της ανάπτυξης του κυττάρου, συνοδευμένες από τα OSGIN1, G6PD και HMOX1 με τα οποία συνδέονται λειτουργικά.

Αύξηση παρατηρείται και στο GPX2 το οποίο έχει καταγραφεί πως ενεργοποιείται πιθανώς στα θηλαστικά για την προστασία τους σε περίπτωση κατάποσης οργανικών υπεροξειδίων του υδρογόνου (στην προκειμένη φαίνεται λοιπόν να υπερεκφράζεται για προστασία ενάντια στην οξειδωση). Η ρύθμιση όλων αυτών των γονιδίων ανήκει σε σηματοδοτικούς καταρράκτες αντιδράσεων που διαμεσολαβούνται από το μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 [100, 101]. Αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων αυτών μπορεί να ενεργοποιούνται από διάφορους παράγοντες: έκθεση σε μέταλλα, οξειδωτικό στρες, διαταραγμένη οξειδωαναγωγική ισορροπία, ή και συνδυασμό όλων αυτών. Προηγούμενες έρευνες έδειξαν ραδιοευαίσθητοποίηση διάφορων κυτταρικών τύπων λόγω του οξειδωτικού στρες μετά την έκθεση σε νανοσωματίδια χρυσού μέσω μηχανισμών σχετιζόμενων με την αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR), ωστόσο στην παρούσα μελέτη δεν επιβεβαιώνεται ο μηχανισμός αυτός για τα κύτταρα Caco-2 καθώς λείπουν αυτού του είδους τα δεδομένα [102]. Αλλαγή στο μεταγράψωμα για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν υπάρχει, ωστόσο υπάρχει μικρή υπερέκφραση στο γονίδιο TXNIP, υπεύθυνο για κωδικοποίηση πρωτεΐνης η οποία αντιδρά με τη θειορεδοξίνη.

Αξίζει να σημειωθεί πως η πρωτεΐνη Nrf2 ενεργοποιείται όταν τα κύτταρα Caco-2 εκτεθούν σε μεγάλη συγκέντρωση νανοσωματιδίων αργύρου [103], γεγονός το οποίο υποστηρίζει τη λογική ότι η υπερέκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων ενεργοποιείται -τουλάχιστον εν μέρη- από σηματοδοτικούς καταρράκτες αντιδράσεων που διαμεσολαβούνται από το μεταγραφικό παράγοντα Nrf2.

Όσον αφορά τις μεταλλοθειονίνες, στους ανθρώπους υπάρχουν τουλάχιστον 18 γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τέσσερις διακριτές ισομορφές τους, τις MT1, MT2, MT3 και MT4 [104]. Η έκθεση των κυττάρων Caco-2 σε AuNPs 5nm (300mM, 72 h) οδήγησε σε υπερέκφραση mRNA εφτά εκ των MTs, οι οποίες ανήκουν στις ομάδες MT1 και MT2. Είναι τα πλείστα υπερεκφρασμένα γονίδια σε αυτό το φαινότυπο, και μάλιστα κορυφαίο εξ αυτών είναι το MT2A, του οποίου το υψηλό επίπεδο έκφρασης επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο qPCR. Δεν είναι τυχαία η υπερέκφραση μόνο μεταλλοθειονών των ισομορφών MT1 και MT2, καθώς η ισομορφή MT3 εκφράζεται κυρίως σε νευρώνες [105] και η MT4 αποκλειστικά σε στρωματοποιημένο πλακώδες επιθήλιο [106].

Η εξήγηση της πολύ ασθενούς απόκρισης των κυττάρων Caco-2 στο επίπεδο της μεταγραφής μετά την έκθεση σε μεγαλύτερα AuNPs (30nm), παραμένει ασαφής. Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, η κυτταρική πρόσληψη των νανοσωματιδίων εξαρτάται από το μέγεθος των νανοσωματιδίων [107-109]. Στο συγκεκριμένο πείραμα λοιπόν, ο αριθμός των AuNP που προσλαμβάνεται από τα κύτταρα είναι πολύ μεγαλύτερος στην περίπτωση των μικρότερων NPs (5nm), και αυτό από μόνο του μπορεί να είναι βιολογικά σημαντικότερο ερέθισμα για την απόκριση του κυττάρου. Αντίστοιχα, η μεγαλύτερη συχνότητα διαταραχής της κυτταρικής μεμβράνης, μέσω της μεγαλύτερης συχνότητας πρόσληψης και εξωκύτωσης των AuNPs 5nm, μπορεί να προκαλεί πολύ ισχυρότερη επίδραση στα σηματοδοτικά γεγονότα, σε σύγκριση με τα AuNPs 30nm, που ενώ υπάρχουν στην ίδια μοριακή συγκέντρωση, αυτό συνεπάγεται ότι υπάρχουν σε μικρότερο αριθμό [110, 111].

Επιπλέον, η υψηλότερη αναλογία επιφάνειας προς όγκο των μικρότερων AuNPs είναι ίσως πιθανή για την υψηλότερη αντιδραστικότητα τους με βιολογικά μόρια [112], καθιστώντας τα έτσι πιο "αποδιοργανωτικά" στην ομοίωση των κυττάρων σε σύγκριση με τα μεγαλύτερα AuNPs. Βιβλιογραφικά υποστηρίζεται πως ισοτροπικά AuNPs μεγαλύτερα από 5nm φαίνεται να είναι βιολογικά αδρανή [113].

Ωστόσο, πρέπει να υπογραμμίσουμε ότι αν και τα μεγαλύτερα AuNPs επηρέασαν πολύ λίγο την έκφραση σε μεταγραφικό επίπεδο, η εικόνα των κυτταρικών αποκρίσεων μπορεί να είναι διαφορετική όταν εξετάζεται διαφορετικός χρόνος έκθεσης (π.χ., νωρίτερη δειγματοληψία) ή

διαφορετικά επίπεδα έκφρασης (πρωτεϊνική έκφραση, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, κυτταρικός μεταβολισμός, ενδοκυτταρική διακίνηση/έκκριση βιομορίων, κλπ.). Επίσης, το γεγονός ότι τα κύτταρα Caco-2 εκτέθηκαν σε πολύ μεγαλύτερο αριθμό μικρών AuNPs σε σύγκριση με μεγαλύτερα AuNPs σημαίνει ότι κάποιες κυτταροτοξικές επιδράσεις μπορεί να παρατηρηθούν ακόμη και για τα AuNPs 30nm, αν τα κύτταρα εκτεθούν σε επαρκώς υψηλό αριθμό.

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα κύτταρα Caco-2 στις 24h ανταποκρίθηκαν περισσότερο στα AuNPs 30nm ήδη από τα 100mM συγκέντρωσης, ενώ στα AuNPs 5nm σχεδόν καθόλου. Μια πιθανή εξήγηση είναι πως η μαζικότερη μεταφορά των μεγαλύτερων AuNPs στην κυτταρική επιφάνεια (και η αλληλεπίδραση τους με την κυτταρική μεμβράνη) ως αποτέλεσμα της ταχύτερης καθίζησης λόγω βαρύτητας [109, 114] σε σύγκριση με τα μικρότερα AuNP, προκαλεί διάφορα συμβάντα σηματοδότησης με πιθανώς διαφορετικές επιδράσεις στην έκφραση των γονιδίων.

Τέλος, είναι γνωστό ότι η γονιδιακή έκφραση μπορεί να ρυθμιστεί τόσο σε επίπεδο χρωματίνης όσο και επίπεδο RNA (μεταγραφή, μάτισμα, μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις RNA, σταθερότητα, κυτταρικός εντοπισμός μορίων RNA, μετάφραση κ.λπ.). Αυτές οι διεργασίες συχνά εμπλέκονται και ρυθμίζονται από μη-κωδικοποιά RNAs (ncRNAs), συμπεριλαμβανομένων των μικρών (20-22nt) μη-κωδικοποιών microRNAs [115, 116]. Για το λόγο αυτό, εξετάστηκαν *in silico* τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών για την παρουσία σημείων πρόσδεσης miRNAs στα περισσότερα διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια. Πράγματι, η ανάλυση πρόβλεψης επεσήμανε ότι ορισμένα miRNAs (miR 4929, miR 2861, miR 4456, miR 7977) θα μπορούσαν να διαδραματίζουν σε κάποιο βαθμό ρόλο στη ρύθμιση αυτών των mRNA. Ωστόσο η ανάλυση αυτή έγινε και από τους συγγραφείς της πρωτότυπης έρευνας και τα αποτελέσματα τους δείχνουν πως τα περισσότερα υποεκφρασμένα γονίδια ZCCHC10, MAD2L1, C13orf27, CNPK, COMMD8 δεν ήταν από τα σημαντικότερα σε σκορ για την μετα-μεταγραφική ρύθμιση μέσω miRNAs. Επειδή λοιπόν η παρούσα ανάλυση είχε πολύ περιορισμένο γονιδιακό εύρος, και τα δεδομένα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης συμφωνούν με την πρωτότυπη, ο περιορισμός αυτός του εύρους κρίθηκε πως καθιστά την παρούσα ανάλυση miRNA αναξιόπιστη.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ λοιπόν, δείχνουν σαφώς ότι τα καρκινικά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη ήταν σε θέση να αναγνωρίσουν τα AuNPs όχι μόνο ως μεταλλικές οντότητες αλλά και ως πιθανά σήματα κινδύνου και επαγωγείς στρες. Αν και τα κύτταρα Caco-2 έδειξαν την ικανότητα να ενεργοποιούν μηχανισμούς άμυνας (πιθανώς με τη μεσολάβηση του Nrf2), αυτές οι αποκρίσεις δεν ήταν επαρκείς για την αποφυγή της τοξικότητας των AuNPs 5nm.

4.2.2: AgNPs

Όσον αφορά τα νανοσωματίδια αργύρου, μελετήθηκαν δυο προγενέστερες έρευνες. Και στις δύο αυτές κρίθηκε χρησιμότερο να μελετηθούν διαφοροποιημένα κύτταρα επειδή προσομοιάζουν καλύτερα το γαστρεντερικό σωλήνα. Καθότι τα νανοσωματίδια αυτά χρησιμοποιούνται κατά κόρον σε συσκευασίες τροφίμων και άρα περνούν από το έντερο μέσω κατάποσης, ήταν σημαντικό το μοντέλο να ανταποκρίνεται κατά το δυνατό στον υπό μελέτη ιστό.

Αρχικά αναλύεται η σειρά GSE62253 η οποία μελέτησε τα κύτταρα Caco-2 σε τρεις διαφορετικές εκθέσεις, AgNPs 15nm σε συγκεντρώσεις 2,5μg/mL και 25μg/mL καθώς και ιόντα αργύρου σε συγκέντρωση 0,5μg/mL. Διαφορικά εκφρασμένα γονίδια πρακτικά υπάρχουν μόνο για την έκθεση

AgNPs 15nm σε συγκέντρωση 25μg/mL. Η πολύ μικρή συγκέντρωση στις άλλες δύο εκθέσεις φαίνεται να μην είναι ικανή να προκαλέσει διαφορετική έκφραση στα γονίδια των κυττάρων.

Η υπερέκφραση της οξυγενάσης της αίμης 1 (HMOX1), των πρωτεϊνών θερμικού σοκ HSPA1A, HSPA1L, HSPA1B and HSPA6 (>140FC), των πρωτεϊνών συνοδών BAG3, DNAJB6 και DNAJB1 και των μεταλλοθειονών είναι ένδειξη οξειδωτικού στρες και φλεγμονής. Σε αυτούς τους μηχανισμούς συμμετέχουν επίσης ο μεταγραφικός παράγοντας ATF3 και ο αυξητικός παράγοντας BDNF, η θειορεδοξίνη 1 (SRXN1) και η αναγωγάση της θειορεδοξίνης 1 (TXNRD1), ενώ η αρνητική ρύθμιση της αλβουμίνης (ALB) συνάδει με την ενεργοποίηση του μηχανισμού απόκρισης στο στρες.

Η έκδηλη υπερέκφραση των μεταλλοθειονών είναι σημαντική: οι μεταλλοθειονίνες είναι μικρές, πλούσιες σε κυστεΐνη πρωτεΐνες, οι οποίες προσδένονται σε μέταλλα και προστατεύουν τα κύτταρα όταν βρίσκονται σε πολυάριθμες δυσμενείς καταστάσεις [117]. Επίσης έχουν αναγνωριστεί ως σήμα κινδύνου στην ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, όπου προσελκύουν μακροφάγα και άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος πυροδοτώντας φλεγμονή [118].

Το οξειδωτικό στρες συνήθως προκαλεί απόπτωση σε κύτταρα των περισσότερων ανθρώπινων ιστών, και πράγματι είναι η συχνότερη επίδραση που καταγράφεται βιβλιογραφικά να έχουν τα νανοσωματίδια αργύρου στα κύτταρα [119-121]. Ωστόσο, ενώ σε κάποια είδη εντερικών κυττάρων παρατηρείται απόπτωση (HT29, LoVo, και HCT116) [73, 121, 122], σε άλλα δεν παρατηρείται (HTC116) [123, 124], ενώ σε κάποιες μελέτες η ρύθμιση της απόπτωσης δεν είναι ξεκάθαρη [125]. Ενώ οι συγγραφείς ισχυρίζονται πιθανή νέκρωση λόγω κυκλοποιημένων και αποκολλημένων κυττάρων που παρατηρήθηκαν οπτικά ως πρώτες ενδείξεις τοξικότητας, η ενεργοποίηση νεκρωτικών μηχανισμών δεν επιβεβαιώνεται από την ανάλυση γονιδιακής έκφρασης. Στον αντίποδα, όσον αφορά τον αποπτωτικό μηχανισμό, φαίνεται να καταστέλλεται μέσω της αυξημένης παραγωγής μεταγράφων των γονιδίων DNAJB6, MCL1 και BAG3, ενώ η καταστολή αυτή γίνεται ισχυρότερη μέσω αρνητικής ρύθμισης σε γονίδια που τον ενεργοποιούν, όπως το BCL2L11 και το PAK1.

Σε συμφωνία και με άλλες μελέτες, δε μετράται να γίνεται μεγάλη πρόσληψη νανοσωματιδίων από τα κύτταρα (κατά περιπτώσεις η πρόσληψη είναι μικρότερη από 1% μετά από 4 ώρες) [125], ωστόσο η επιρροή που έχουν στο κύτταρο ακόμα και βρισκόμενα εξωτερικά του είναι μεγάλη. Πολλές επιφανειακές και εξωκυτταρίες πρωτεΐνες περιέχουν κυστεϊνικά και μεθειονινικά κατάλοιπα, τα οποία μπορούν να οξειδωθούν σε οξειδωαναγωγικό περιβάλλον λόγω της μεγάλης χημικής συγγένειας του άργυρου με το θείο [126]. Αυτή η αντίδραση με τη σειρά της, επηρεάζει την κυτταρική σηματοδότηση [127] και μέσω ιντεγκρινών και υποδοχέων G-πρωτεϊνών μπορούν να δωθούν σήματα ικανά να αλλάξουν τη μορφολογία του κυττάρου [128]. Η διάδοση των σημάτων αυτών από το εξωτερικό του κυττάρου προς τον πυρήνα συνήθως γίνεται μέσω γρήγορων ενζυμικών πρωτεϊνικών τροποποιήσεων όπως η φωσφορυλίωση [129, 130], ωστόσο οι διαδικασίες αυτές δεν είναι άμεσα ανιχνεύσιμες μέσω μικροσυστοιχιών.

Πράγματι, η ανάλυση των μικροσυστοιχιών δείχνει μεγάλη αρνητική ρύθμιση σε γονίδια σχετιζόμενα με μεταβολικά μονοπάτια υπεύθυνα για το μεταβολισμό των λιπιδίων και την ομοιόστασή τους, και ομοίως ένα ισχυρά συνδεδεμένο δίκτυο υποεκφρασμένων γονιδίων του σηματοδοτικού μονοπατιού ιντερφερονών τύπου 1. Τα υπερεκφρασμένα γονίδια σχετίζονται κατά πολύ μεγάλο μέρος με αντιδράσεις του κυττάρου σε μέταλλα, με τις μεταλλοθειονίνες κύριες εκπροσώπους, ενώ μαζί με τα MMP1, MMP3, MMP7 και MMP10, τα FOS, FOSB, FOSL1, την κίνηση PAK1 και την ASAP1 φανερώνουν αλλαγές και στη διακυτταρική και ενδοκυτταρική σηματοδότηση. Τα κύρια μεταβολικά

μονοπάτια που σχετίζονται με τα υπερεκφρασμένα γονίδια είναι η απορρόφηση ιόντων, το μονοπάτι IL-17 το οποίο σχετίζεται με φλεγμονή, καθώς και το μονοπάτι MAPK.

Αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα σε γονίδια όπως η τουμπουλίνη b3 (TUBB3), η ιντεγκρίνη ITGA2, και διακυτταρικές πρωτεΐνες όπως οι ZYX και η ACTN2 υποδεικνύουν μορφολογικές αλλαγές δεδομένου ότι κωδικοποιούν για επαφές κυττάρου-κυττάρου, κυττάρου με την κυτταρική μήτρα καθώς και για τον κυτταροσκελετό. Οι εν λόγω ρυθμίσεις της γονιδιακής έκφρασης έχουν καταγραφεί και από άλλους ερευνητές, και φαίνεται να οφείλονται στην έκθεση σε νανοσωματίδια και ιόντα αργύρου, επηρεάζοντας κυρίως γονίδια σχετιζόμενα με στενοσυνδέσμους και συνδέσμους προσκόλλησης, ενώ ορισμένες φορές επηρεάζονται και οι χασμοσύνδεσμοι [131-134].

Το οξειδωτικό στρες ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες όπως τον NFκB, την πρωτεΐνη ενεργοποιητή 1 (AP-1), τον παράγοντα HIF-1α και τον Nrf2 [135]. Ο Nrf2 ρυθμίζεται επίσης από αλλαγές στην εξωκυτταρική οξειδοαναγωγική ισορροπία [136]. Συγκεκριμένα οι NFκB και Nrf2 προβλέπεται ότι θα ρυθμιστούν θετικά από έκθεση κυττάρων Caco-2 σε νανοσωματίδια αργύρου. Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 ρυθμίζει τη βασική και την επαγόμενη έκφραση των πρωτεϊνών φάσης 2, για παράδειγμα, της αιμοξυγενάση 1 (HMOX1), της NAD(P)H οξειδοοξειδοκτάσης 1 της κινιδίνης (NQO1), ή της S-τρανσφοράσης της γλουταθειόνης (GSTA2), οι οποίες προστατεύουν το κύτταρο ενάντια στους ηλεκτρονιόφιλους και τους οξειδωτικούς παράγοντες [137-139]. Εκτός από το οξειδωτικό στρες, το NRF2 επάγεται από την διάρκεια του κυτταροσκελετού ακτίνης [137].

Αντίστοιχα, στη σειρά GSE84982 βλέπουμε κυρίως θετική ρύθμιση στα γονίδια, η οποία συμφωνεί με παλαιότερο πείραμα της ίδιας ομάδας, αν και τότε η διαφορά μεταξύ θετικά και αρνητικά ρυθμισμένων γονιδίων δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Στο παλαιότερο πείραμα είχαν χρησιμοποιηθεί ίδια κύτταρα και παρόμοιου μεγέθους νανοσωματίδια σε παρόμοιες συγκεντρώσεις, ενώ η μέτρηση έγινε στις 4h [125]. Μεγαλύτερη θετική από αρνητική ρύθμιση έχει παρατηρηθεί και σε άλλα πειράματα με διαφορετικού τύπου κύτταρα τα οποία εκτέθηκαν σε νανοσωματίδια και ιόντα αργύρου π.χ. κύτταρα HepG2 σε AgNPs 20nm και 50nm (2.5 mg/ml, 4h και 24h) [140] ή κύτταρα A549 σε AgNPs 16nm (12mg/ml, 24h) ή Ag⁺ (1.3 mg/ml, 24 h) [141]. Στον αντίποδα, υπάρχουν μελέτες στις οποίες κυριαρχεί η αρνητική ρύθμιση όπως π.χ. η μελέτη της σειράς GSE62253 η οποία αναλύεται και παραπάνω, ωστόσο η παρούσα εκ νέου ανάλυση των δεδομένων δε συνάδει με τη δημοσίευση που συνοδεύει την πρωτότυπη μελέτη [87].

Λειτουργικά λοιπόν, τα κύρια μονοπάτια που επηρεάζονται είναι συνδεδεμένα είτε με απόκριση σε (οξειδωτικό) στρες, είτε με μεταλλικά ιόντα, είτε με την κυτταρική διαίρεση. Παρόμοιες αντιδράσεις έχουν καταγραφεί και σε επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα μετά από έκθεση σε AgNPs για 24h (16 nm, 12.1mg/ml) [141]. Μικρή ενεργοποίηση παρατηρείται και σε αποπτωτικούς μηχανισμούς, οι οποίο βιβλιογραφικά υποστηρίζεται να επάγονται από τα AgNPs μέσω του οξειδωτικού στρες [120, 121]. Καταγράφεται μεγάλη θετική ρύθμιση στις ισομορφές MT1 και MT2 των μεταλλοθειονών, το οποίο είναι μια συχνή βιβλιογραφικά αντίδραση διαφόρων τύπων κυττάρων όταν εκτεθούν σε μεταλλικά νανοσωματίδια [86, 87, 125, 140-143]. Υπερέκφραση παρατηρείται και σε πολλά γονίδια σχετιζόμενα με το οξειδωτικό στρες όπως πολλές πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs), η οξυγενάση της αίμης 1 (HMOX1), η θειική οξειδοαναγωγή 1 (SRXN1) και ο αναπτυξιακός αναστολέας OKL38. Η υψηλή έκφραση της HMOX1 και των HSPs έχει καταγραφεί σε διάφορες μελέτες Caco-2 κυττάρων τα οποία έχουν εκτεθεί σε διάφορων ειδών μεταλλικά νανοσωματίδια [86, 87, 125, 138, 141].

Έχει παρατηρηθεί βιβλιογραφικά ότι τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια που επάγονται από ιόντα αργύρου είναι κατά πολύ λιγότερα σε σχέση με αυτά που επάγονται από νανοσωματίδια αργύρου

στις 24 ώρες, και μάλιστα είναι ακόμα λιγότερα αν η δειγματοληψία γίνει στις 48 ώρες [141], γεγονός το οποίο συμφωνεί και με την παρούσα μελέτη η οποία δείχνει μείωση ήδη μεταξύ 6 και 24 ωρών έκθεσης. Αν και εκ πρώτης όψεως φαίνεται τα AgNPs να επηρεάζουν με πιο πολύπλοκο τρόπο τα κύτταρα σε σχέση με τα απλά ιόντα αργύρου (κυρίως λόγω του πολύ μεγαλύτερου αριθμού διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων στις 24 ώρες έκθεσης) ωστόσο αυτή η κυτταρική απόκριση μπορεί να αιτιολογηθεί ως απόρροια του μεγάλου χρόνου έκθεσης σε ιόντα αργύρου λόγω της ενδοκυτταρικής διάλυσης των AgNPs. Προς υποστήριξη αυτής της υπόθεσης, ενδεικτικά το γονίδιο GADD45A παρατηρείται θετικά ρυθμισμένο για όλες τις διαφορετικές εκθέσεις στις 6h, ωστόσο στις 24h επιστρέφει σε κανονικά επίπεδα για όλες τις υπόλοιπες εκθέσεις εκτός των μεγαλύτερων -και κατά συνέπεια δυσκολότερα διαλυόμενων- AgNPs (110nm). Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη αναστολής της ανάπτυξης η οποία επάγεται από βλάβες του DNA και έχει φανεί πως είναι από τα βασικά γονίδια που σχετίζονται με την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στο όριο G2/M. Παρόμοια αποτελέσματα υπάρχουν και στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα [141], υποδεικνύοντας πως μετά από 24h τα κύτταρα ήδη έχουν ξεπεράσει το σοκ που προκαλούν τα ιόντα αργύρου.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η υπερέκφραση του LOC441019, και μάλιστα σε μεγάλο βαθμό ($10 < FC < 30$) σε όλες τις ανά δύο συγκρίσεις, ωστόσο το NCBI το αναφέρει ως ένα υποθετικό γονίδιο το οποίο έχει αποσυρθεί επειδή το μοντέλο πάνω στο οποίο είχε βασιστεί δεν προβλεπόταν σε μεταγενέστερο σχολιασμό.

Στην πρωτότυπη δημοσίευση υπάρχουν δεδομένα και για κύτταρα MCF-7, τα οποία διαφέρουν σε σχέση με τα κύτταρα Caco-2, όπως ήταν και το αναμενόμενο δεδομένου πως υπάρχουν μελέτες που υποδεικνύουν διαφορετικές αντιδράσεις αν αλλάξει ο κυτταρικός τύπος ή το υλικό του σωματιδίου, ακόμα και αν τα κύτταρα είναι συγγενικών τύπων (π.χ. κύτταρα του ανοσοποιητικού) [143]. Παρατηρείται πως ανάλογα τον κυτταρικό τύπο αλλάζει το ποσοστό πρόσληψης των ιόντων, και όσο μεγαλύτερη είναι η πρόσληψη, τόσο πιο έντονα αντιδρά το κύτταρο. Ωστόσο, μια λεπτομερής εξέταση των διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων δείχνει μεγάλη επικάλυψη των διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων στους διάφορους κυτταρικούς τύπους, τόσο σε έκθεση νανοσωματιδίων όσο και ιόντων, γεγονός το οποίο υποδεικνύει μεγάλη ομοιότητα της κυτταρικής απόκρισης στον άργυρο, όσο αφορά τη σύγκριση μεταξύ σωματιδιακής και ιοντικής μορφής.

Τα συνολικά ευρήματα λοιπόν για τα νανοσωματίδια αργύρου δεν αποτελούν ένδειξη για αποκλειστικά νανοσωματιδιακά ενεργοποιούμενους μηχανισμούς, καθώς όλες οι αντιδράσεις φαίνεται να επάγονται κυρίως από τα ιόντα, συμφωνώντας με παλαιότερη έρευνα στην οποία η βιολογική δραστηριότητα των AgNPs σε κύτταρα Caco-2 φαινόταν να είναι εξαιτίας της παρουσίας ιόντων αργύρου [125]. Μελέτες οι οποίες εξετάζουν διάφορα είδη μεταλλικών νανοσωματιδίων επίσης δεν εντόπισαν κάποια αποκλειστικά νανοσωματιδιακή απόκριση [142, 143].

Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα

Η γενική εικόνα για τα χρυσά νανοσωματίδια είναι πως τα AuNPs 30nm είναι κυρίως αδρανή και φαίνεται να επηρεάζουν το κύτταρο κυρίως λόγω μάζας και ταχύτερης καθίζησης. Η επίδραση τους αυτή είναι εμφανής ήδη από τη συγκέντρωση 100μM. Τα μικρότερα AuNPs (5nm) προκαλούν οξειδωτικό στρες και αναγνωρίζονται από το κύτταρο ως μεταλλικές οντότητες, με ισχυρότερη επίδραση σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (300μM), ωστόσο οι αντιδράσεις αυτές των κυττάρων γίνονται σε δεύτερο χρόνο (72h).

Οι παρατηρούμενες κυτταροτοξικές ιδιότητες των μικρότερων AuNPs μπορεί να είναι πρακτικά χρήσιμες για την ενίσχυση των ήδη υφιστάμενων θερμικών θεραπειών που βασίζονται σε AuNPs, καθώς και σε πρωτόκολλα θεραπείας καρκίνου. Παρόλα αυτά, δεν πρέπει να αγνοηθεί το γεγονός ότι οι αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που προκαλούνται από την έκθεση σε AuNPs 5nm μπορεί να οδηγήσουν σε δυνητικά επικίνδυνα αποτελέσματα για υγιή κύτταρα ή/και ιστούς, τα οποία πρέπει να εκτιμηθούν και να χαρακτηριστούν, παρά την απουσία οξείας τοξικότητας.

Αντίστοιχα, για τα αργυρά νανοσωματίδια φαίνεται ότι η πλειονότητα τους δεν προσλαμβάνεται από τα κύτταρα αλλά αντίθετα τα επηρεάζουν αντιδρώντας με μεμβρανικές ή εξωκυττάρειες πρωτεΐνες, προκαλώντας μορφολογικές αλλαγές και έντονο οξειδωτικό στρες. Διαφορά στο μέγεθος των AgNPs δε φαίνεται να επηρεάζει την αντίδραση των κυττάρων, ενώ αντίθετα η ποσότητα τους είναι σημαντική, καθώς σε επαρκώς υψηλά επίπεδα είναι ικανά να επάγουν μεγάλες αλλαγές στο μεταγράφημα.

Τέλος, υπάρχει μεγάλη ομοιότητα στην αντίδραση των κυττάρων, τόσο όταν εκτεθούν σε νανοσωματίδια όσο και αν αντί σωματιδίων χρησιμοποιηθούν ιόντα αργύρου, γεγονός που υποδεικνύει πως τα AgNPs αντιδρούν κυρίως ως ιόντα, διαλυόμενα ενδο- και εξωκυτταρικά. Η γρήγορη αποκατάσταση της ομοιόστασης των κυττάρων όταν εκτίθενται σε ιόντα συνάδει με την ερμηνεία αυτή.

Επίσης ενώ φαίνεται πως δεν επάγονται αποπτωτικοί μηχανισμοί, κύτταρα φαίνονται να πεθαίνουν όταν μελετώνται στο οπτικό μικροσκόπιο, και κυρίως τα αδιαφοροποίητα. Αν πεθαίνουν νεκρωτικά, αυτός ο τρόπος κυτταρικού θανάτου μπορεί να προκαλέσει φλεγμονή και να επιδεινώσει παθολογικές καταστάσεις σε ανθρώπους με προδιάθεση για ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, ωστόσο κάτι τέτοιο δεν αποδεικνύεται μέσω αυτής της ανάλυσης. Ενδιαφέρον θα είχε μελέτη για μηχανισμούς νεκρόπτωσης ή μιτωτικής καταστροφής σε παρόμοιες συνθήκες έκθεσης.

Το κοινό εύρημα μεταξύ των τριών σειρών δεδομένων είναι πως η έκθεση σε νανοσωματίδια χρυσού ή αργύρου επάγει κυρίως θετική ρύθμιση στα γονίδια των κυττάρων, και κυρίως σε γονίδια υπεύθυνα για την αρνητική ρύθμιση της ανάπτυξης του κυττάρου, γονίδια απόκρισης σε μέταλλα και γονίδια απόκρισης στο οξειδωτικό στρες. Ωστόσο είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι αλλαγές στη μεταγραφική δραστηριότητα δεν σημαίνει αυτόματα τις αντίστοιχες μία προς μία αλλαγές και στις τελικές πρωτεΐνες, οπότε είναι σημαντικό να γίνει περαιτέρω δουλειά για να εκτιμηθεί αν αυτές οι αλλαγές αντιστοιχούν σε ανάλογη αλλαγή της έκφρασης των αντίστοιχων πρωτεϊνών, τη δραστηριότητά τους, το μέρος του κυττάρου στο οποίο εντοπίζονται, καθώς και το αν εκκρίνονται έξω από το κύτταρο [144]. Ομοίως χρειάζονται περισσότερα δεδομένα και αναλύσεις για να διευκρινιστεί ο ρόλος των εκάστοτε miRNA ή/και άλλων ncRNAs.

Η ανομοιογένεια μεταξύ των τριών μελετών σε επίπεδο κυττάρων (αδιαφοροποίητα στην πρώτη και διαφοροποιημένα σε διαφορετικές συνθήκες στη δεύτερη και την τρίτη) και νανοσωματιδίων, τόσο σε υλικό όσο και σε μέγεθος, προσθέτει πολλές μεταβλητές δυσχεραίνοντας τη σύγκριση μεταξύ των μελετών. Επίσης, οι διαφορετικές πλατφόρμες, τόσο σε τύπο όσο και σε μάρκα, κάνουν τη σύγκριση

ακόμα πιο δύσκολη. Σκόπιμο θα ήταν λοιπόν να γίνουν έρευνες μεγάλης κλίμακας με προσπάθεια εξασφάλισης όσο το δυνατόν πιο ομοιογενών πειραματικών συνθηκών ώστε να είναι ευκρινέστεροι οι διάφοροι επαγόμενοι μηχανισμοί που οφείλονται στην επίδραση νανοσωματιδίων στα κύτταρα.

Μολαταύτα, τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην παρούσα εργασία μπορούν να λειτουργήσουν ως εφελτήριο για περεταίρω έρευνα σχετικά με την κυτταροτοξικότητα που παρατηρείται σε κύτταρα που εκτίθενται σε νανοσωματίδια χρυσού και αργύρου, και να χρησιμοποιηθούν ώστε να καταφέρουμε να σχεδιάζουμε πιο αποτελεσματικά και ασφαλή νανοσωματίδια.

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1: Νανοσωματίδια που έχουν ως βάση τον άνθρακα: a – φουλερένιο, b – γραφένιο, c – νανοσωλήνας άνθρακα, d – νανοϊνες άνθρακα και e – μαύρος άνθρακας [10].	7
Εικόνα 2: Οργανικά νανοσωματίδια: a – Δενδριμερές, b – Λιπόσωμα and c – μικύλλιο [10].	8
Εικόνα 3: Top-down και bottom-up προσεγγίσεις για τη σύνθεση νανοσωματιδίων [12].	9
Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση μιας μικροσυστοιχίας ολιγονουκλεοτιδίων (αριστερά) και μιας μικροσυστοιχίας cDNA (δεξιά) [14].	12
Εικόνα 5: Δομή αρχειοθέτησης δεδομένων στη GEO [19].	14
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση a) τοπικού Επιφανειακού Συντονισμού Πλασμονίου, b) ηλεκτρικής ταλάντωσης νανοσφαιριδίων και c) ηλεκτρικής ταλάντωσης νανοραβδίων, καθώς και φάσματα απορρόφησης LSPR and TSPR [26].	18
Εικόνα 7: Μεταβολή του χρώματος (μαρκοσκοπικά) των AuNPs ανάλογα το μέγεθος τους [27].	19
Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση σύνδεσης AuNP με DNA, πρωτεΐνες, πεπτίδια και φάρμακα, πάνω με ομοιοπολικό δεσμό και κάτω με μη-ομοιοπολικό δεσμό [38].	24
Εικόνα 9 Σχηματική απεικόνιση μιας PTT που εκμεταλλεύεται AuNPs προσδεσμένα σε καρκινικά κύτταρα [43].	26
Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση των βασικών μηχανισμών της φωτοθερμικής θεραπείας (PTT), της ιονίζουσας ραδιοθεραπείας (RT) και του συνδυασμού PTT/RT στη θεραπεία καρκίνου βασιζόμενη σε βιοενεργοποιημένα AuNPs.	27
Εικόνα 11: Διαγραμματική απεικόνιση διαφορετικών τύπων βιοαισθητήρων νανοσωματιδίων χρυσού· αξιοποιώντας της ποικίλες φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων, μπορούν να σχεδιαστούν διάφοροι αισθητήρες [43].	29
Εικόνα 12: Γραφική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων των AuNPs με βιοσυστήματα, τόσο in vitro όσο και in vivo [44].	31
Εικόνα 13: Διαγραμματική σύνοψη διαδικασιών σύνθεσης AgNPs, a) φυσικών, b) χημικών και c) βιολογικών [52].	33
Εικόνα 14: Βιολογική σύνθεση AgNPs [50].	33
Εικόνα 15: Βιοϊατρικές εφαρμογές AgNPs [55].	35
Εικόνα 16: Αντιμικροβιακοί μηχανισμοί AgNPs [63].	37
Εικόνα 17: Αντιβακτηριακοί μηχανισμοί των AgNPs [50].	37
Εικόνα 18: Προτεινόμενος μηχανισμός τοξικότητας των AgNPs [74].	38
Εικόνα 19: Απεικόνιση των βιβλιογραφικών αποτελεσμάτων διαφορικής ανάλυσης γονιδίων της σειράς δεδομένων GSE55349 σε (A) αθροιστικό ραβδόγραμμα και (B) διάγραμμα Venn για την υποπερίπτωση έκθεσης σε AuNPs 5nm (300mM).	44
Εικόνα 20: (A) Διάγραμμα Venn διαφορικών κφρασμένων γονιδίων και (B) συνοπτικός πίνακας της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στη σειρά δεδομένων GSE62253.	46
Εικόνα 21: Συνολική εικόνα ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στη σειρά δεδομένων GSE62253	46
Εικόνα 22: Αθροιστικά ραβδογράμματα διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων σε κύτταρα Caco-2 και MCF-7 μετά από έκθεση σε AgNPs ή AgNO ₃ σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, στις χρονικές στιγμές 6h και 24h.	48
Εικόνα 23: Διαγράμματα Venn υπερ- και υπόεκφρασμένων γονιδίων σε κύτταρα Caco-2 μετά από (A) 6h και (B) 24h έκθεσης.	49
Εικόνα 24: GEO: Αρχική σελίδα.	56
Εικόνα 25: GEO: Σελίδα αναζήτησης.	56
Εικόνα 26: InSyBio Suite: Αρχική σελίδα.	58
Εικόνα 27: InSyBio Suite: Data Store Dashboard.	59
Εικόνα 28: InSyBio Suite: Upload file to Data Store.	59

Εικόνα 29: InSyBio Suite: Gene Expression Files.....	60
Εικόνα 30: InSyBio Suite: BioNets Dashboard.	60
Εικόνα 31: InSyBio Suite: Differential expression biomarkes from analysing gene expression.	61
Εικόνα 32: InSyBio Suite: BioNets Jobs Dashboard.	62
Εικόνα 33: InSyBio Suite: Extracted biomarkers through differential expression analysis.	63

Ευρετήριο Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Επιφανειακός συντονισμός πλασμονίου AgNPs συναρτήσει του μεγέθους τους σε συγκέντρωση 0.02 mg/mL [51].....	32
Διάγραμμα 2: Σωρευμένο ραβδόγραμμα στατιστικά σημαντικών διαφορικά υπερεκφρασμένων και υποεκφρασμένων γονιδίων της σειράς δεδομένων GSE55349 μετά την διαλογή με F.C. > 0.5.	74
Διάγραμμα 3: Σωρευμένο ραβδόγραμμα στατιστικά σημαντικών διαφορικά υπερεκφρασμένων και υποεκφρασμένων γονιδίων της σειράς δεδομένων GSE62253 μετά την διαλογή με F.C. > 0.5.	75
Διάγραμμα 4: Σωρευμένο ραβδόγραμμα στατιστικά σημαντικών διαφορικά υπερεκφρασμένων και υποεκφρασμένων γονιδίων της σειράς δεδομένων GSE84982 μετά την διαλογή με F.C. > 0.5.	76

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Μέθοδοι βιοενεργοποίησης AuNPs, κύριο χαρακτηριστικό έκαστης, καθώς και βασικές εφαρμογές τους.....	23
Πίνακας 2: Όροι αναζήτησης δεδομένων στη βάση GEO.....	41
Πίνακας 3: Κωδικοί καταχώρησης σειρών δειγμάτων που επιλέχθηκαν απο τη GEO.	41
Πίνακας 4: Συνοπτική παρουσίαση συνόλων δεδομένων που επιλέχθηκαν απο τη GEO προς επεξεργασία.....	42
Πίνακας 5: Αριθμός στατιστικά σημαντικών διαφορικά υπερεκφρασμένων και υποεκφρασμένων γονιδίων της σειράς δεδομένων GSE55349 μετά την διαλογή με F.C. > 0.5.	74
Πίνακας 6: Αριθμός στατιστικά σημαντικών διαφορικά υπερεκφρασμένων και υποεκφρασμένων γονιδίων της σειράς δεδομένων GSE62253 μετά την διαλογή με F.C. > 0.5.	75
Πίνακας 7: Αριθμός στατιστικά σημαντικών διαφορικά υπερεκφρασμένων και υποεκφρασμένων γονιδίων της σειράς δεδομένων GSE84982 μετά την διαλογή με F.C. > 0.5.	76

Βιβλιογραφία

1. Hasan, S., *A review on nanoparticles: their synthesis and types*. Research Journal of Recent Sciences _____ ISSN, 2015. **2277**: p. 2502.
2. Feynman, R.P., *There's plenty of room at the bottom: An invitation to enter a new field of physics*, in *Handbook of Nanoscience, Engineering, and Technology, Third Edition*. 2012, CRC Press. p. 26-35.
3. Peercy, P.S., *The drive to miniaturization*. Nature, 2000. **406**(6799): p. 1023.
4. Smita, S., et al., *Nanoparticles in the environment: assessment using the causal diagram approach*. Environ Health, 2012. **11 Suppl 1**: p. S13.
5. Filippini, L., D. Sutherland, and I.N. Center, *Introduction to Nanoscience and Nanotechnologies*. NANOYOU Teachers Training Kit in Nanoscience and Nanotechnologies, 2010: p. 1-29.
6. Khan, Z.H., et al., *Introduction to Nanomaterials*, in *Advances in Nanomaterials*, M. Husain and Z.H. Khan, Editors. 2016, Springer India: New Delhi. p. 1-23.
7. Commission, E. *Recommendation*. 2011 [cited 2018 06/07/2018]; Available from: https://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/pdf/policy/commission-recommendation-on-the-definition-of-nanomater-18102011_en.pdf.
8. Pokropivny, V.V. and V.V. Skorokhod, *Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science*. Materials Science and Engineering: C, 2007. **27**(5): p. 990-993.
9. BSI, *Nanoparticles - Vocabulary*. Second ed. 2011: BSI Standards Publication.
10. Anu Mary, E. and M.P. Saravanakumar, *A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application*. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 2017. **263**(3): p. 032019.
11. Jeevanandam, J., et al., *Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations*. Beilstein J Nanotechnol, 2018. **9**: p. 1050-1074.
12. Pareek, V., et al., *Synthesis and Applications of Noble Metal Nanoparticles: A Review*. Vol. 9. 2017. 527-544.
13. Konofaos, N., *Nanotechnology & Bioelectronics I*. 2011, Samos, Greece: Aegean University. 38.
14. Veronique Vermeeren, L.M., *Evolution Towards the Implementation of Point-Of-Care Biosensors*. 2011. p. 129.
15. Lou, X.J., et al., *Expression monitoring using cDNA microarrays*, in *Genomics Protocols*. 2001, Springer. p. 323-340.
16. Barrett, T., et al., *NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update*. Nucleic Acids Research, 2013. **41**(D1): p. D991-D995.
17. Kolesnikov, N., et al., *ArrayExpress update--simplifying data submissions*. Nucleic acids research, 2015. **43**(Database issue): p. D1113-6.
18. Barrett, T., et al., *NCBI GEO: mining millions of expression profiles—database and tools*. Nucleic acids research, 2005. **33**(suppl_1): p. D562-D566.
19. Michalopoulos, I., *Microarrays*. 2016. p. 134.
20. Kitano, H., *Systems biology: a brief overview*. Science, 2002. **295**(5560): p. 1662-4.
21. Salazar, C., J. Schutze, and O. Ebenhoh, *Bioinformatics meets systems biology*. Genome Biol, 2006. **7**(1): p. 303.
22. Dykman, L. and N. Khlebtsov, *Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives*. Chemical Society Reviews, 2012. **41**(6): p. 2256-2282.
23. Faulk, W.P. and G.M. Taylor, *An immunocolloid method for the electron microscope*. Immunochemistry, 1971. **8**(11): p. 1081-3.

24. Dimitriou, N.M., et al., *Gold nanoparticles, radiations and the immune system: Current insights into the physical mechanisms and the biological interactions of this new alliance towards cancer therapy*. Pharmacology & therapeutics, 2017. **178**: p. 1-17.
25. Dimitriou, N.M., Mavragani, I.V., Kouloulas, V.E. and Georgakilas, A.G. . *Conference proceedings of the 31st annual meeting of the European Society for Hyperthermic Oncology (ESHO 2017)*. in *31st annual meeting of the European Society for Hyperthermic Oncology (ESHO 2017)*. 2017. Athens, Greece.
26. Sharma, N., G. Bhatt, and P. Kothiyal, *Gold Nanoparticles synthesis, properties, and forthcoming applications-A review*. Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research, 2015. **3**(2): p. 13.
27. Sumbayev, V.V., I.M. Yasinska, and B.F. Gibbs, *Biomedical applications of gold nanoparticles*. Recent advances in circuits, communications and signal processing, WSEAS Press, Athens, 2013: p. 342-348.
28. Thomas, K.G. and P.V. Kamat, *Chromophore-functionalized gold nanoparticles*. Acc Chem Res, 2003. **36**(12): p. 888-98.
29. Dulkeith, E., et al., *Gold nanoparticles quench fluorescence by phase induced radiative rate suppression*. Nano Lett, 2005. **5**(4): p. 585-9.
30. Mohamed, M.B., et al., *The 'lightning' gold nanorods: fluorescence enhancement of over a million compared to the gold metal*. Chemical Physics Letters, 2000. **317**(6): p. 517-523.
31. Bigioni, T.P., R.L. Whetten, and Ö. Dag, *Near-Infrared Luminescence from Small Gold Nanocrystals*. The Journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**(30): p. 6983-6986.
32. Oh, E., et al., *Inhibition assay of biomolecules based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) between quantum dots and gold nanoparticles*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(10): p. 3270-1.
33. Pons, T., et al., *On the quenching of semiconductor quantum dot photoluminescence by proximal gold nanoparticles*. Nano Lett, 2007. **7**(10): p. 3157-64.
34. Sapsford, K.E., L. Berti, and I.L. Medintz, *Materials for fluorescence resonance energy transfer analysis: beyond traditional donor-acceptor combinations*. Angew Chem Int Ed Engl, 2006. **45**(28): p. 4562-89.
35. Gersten, J. and A. Nitzan, *Spectroscopic properties of molecules interacting with small dielectric particles*. The Journal of Chemical Physics, 1981. **75**(3): p. 1139-1152.
36. Grönbeck, H., A. Curioni, and W. Andreoni, *Thiols and disulfides on the Au (111) surface: the headgroup- gold interaction*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(16): p. 3839-3842.
37. Kong, F.-Y., et al., *Unique roles of gold nanoparticles in drug delivery, targeting and imaging applications*. Molecules, 2017. **22**(9): p. 1445.
38. Yeh, Y.-C., B. Creran, and V.M. Rotello, *Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology*. Nanoscale, 2012. **4**(6): p. 1871-1880.
39. Spyratou, E., et al., *Recent advances in cancer therapy based on dual mode gold nanoparticles*. Cancers, 2017. **9**(12): p. 173.
40. Haume, K., et al., *Gold nanoparticles for cancer radiotherapy: a review*. Cancer Nanotechnol, 2016. **7**(1): p. 8.
41. Retif, P., et al., *Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: the Key Parameters*. Theranostics, 2015. **5**(9): p. 1030-44.
42. Butterworth, K.T., et al., *Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization*. Nanoscale, 2012. **4**(16): p. 4830-8.
43. Elahi, N., M. Kamali, and M.H. Baghersad, *Recent biomedical applications of gold nanoparticles: a review*. Talanta, 2018.
44. Jia, Y.-P., et al., *The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles*. Chinese Chemical Letters, 2017. **28**(4): p. 691-702.

45. Ramalingam, V., et al., *Biogenic gold nanoparticles induce cell cycle arrest through oxidative stress and sensitize mitochondrial membranes in A549 lung cancer cells*. RSC Advances, 2016. **6**(25): p. 20598-20608.
46. Wang, L., et al., *Selective targeting of gold nanorods at the mitochondria of cancer cells: implications for cancer therapy*. Nano letters, 2010. **11**(2): p. 772-780.
47. Chithrani, B.D. and W.C. Chan, *Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes*. Nano letters, 2007. **7**(6): p. 1542-1550.
48. Pan, Y., et al., *Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage*. Small, 2009. **5**(18): p. 2067-2076.
49. Chuang, S.-M., et al., *Extensive evaluations of the cytotoxic effects of gold nanoparticles*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2013. **1830**(10): p. 4960-4973.
50. Ge, L., et al., *Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity*. International journal of nanomedicine, 2014. **9**: p. 2399.
51. Oldenburg, S.J. *Silver Nanoparticles: Properties and Applications*. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html>.
52. Syafiuddin, A., et al., *A review of silver nanoparticles: Research trends, global consumption, synthesis, properties, and future challenges*. Journal of the Chinese Chemical Society, 2017. **64**(7): p. 732-756.
53. Li, W.-R., et al., *Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli*. Applied microbiology and biotechnology, 2010. **85**(4): p. 1115-1122.
54. Lubick, N., *Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both?* 2008, ACS Publications.
55. Khatoon, N., J. Mazumder, and M. Sardar, *Biotechnological applications of green synthesized silver nanoparticles*. J Nanosci Curr Res, 2017. **2**(107): p. 2.
56. Kawahara, K., et al., *Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions*. Dental materials, 2000. **16**(6): p. 452-455.
57. Pal, S., Y.K. Tak, and J.M. Song, *Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli*. Applied and environmental microbiology, 2007. **73**(6): p. 1712-1720.
58. Slonczewski, J.L. *Silver as an Antimicrobial Agent*. 2013 10/10/2013 [cited 2018 06/07/2018]; Available from: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php?title=Silver as an Antimicrobial Agent&oldid=92065>.
59. Yamanaka, M., K. Hara, and J. Kudo, *Bactericidal actions of a silver ion solution on Escherichia coli, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis*. Applied and environmental microbiology, 2005. **71**(11): p. 7589-7593.
60. Franci, G., et al., *Silver nanoparticles as potential antibacterial agents*. Molecules, 2015. **20**(5): p. 8856-8874.
61. Chudobova, D., et al., *The effect of silver ions and silver nanoparticles on Staphylococcus aureus*. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, 2013: p. 728-735.
62. Tran, Q.H. and A.-T. Le, *Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives*. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, 2013. **4**(3): p. 033001.
63. Patil, M.P. and G.-D. Kim, *Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles*. Applied microbiology and biotechnology, 2017. **101**(1): p. 79-92.
64. Shin, S.-H., et al., *The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells*. International immunopharmacology, 2007. **7**(13): p. 1813-1818.

65. Park, S., et al., *Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells*. Inhalation toxicology, 2007. **19**(sup1): p. 59-65.
66. Soto, K., K. Garza, and L. Murr, *Cytotoxic effects of aggregated nanomaterials*. Acta Biomaterialia, 2007. **3**(3): p. 351-358.
67. Hussain, S.M., et al., *The interaction of manganese nanoparticles with PC-12 cells induces dopamine depletion*. Toxicological sciences, 2006. **92**(2): p. 456-463.
68. Hussain, S., et al., *In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells*. Toxicology in vitro, 2005. **19**(7): p. 975-983.
69. McAuliffe, M.E. and M.J. Perry, *Are nanoparticles potential male reproductive toxicants? A literature review*. Nanotoxicology, 2007. **1**(3): p. 204-210.
70. Alt, V., et al., *An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement*. Biomaterials, 2004. **25**(18): p. 4383-4391.
71. Kone, B.C., M. Kaleta, and S.R. Gullans, *Silver ion (Ag⁺)-induced increases in cell membrane K⁺ and Na⁺ permeability in the renal proximal tubule: reversal by thiol reagents*. The Journal of membrane biology, 1988. **102**(1): p. 11-19.
72. Carlson, C., et al., *Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species*. The journal of physical chemistry B, 2008. **112**(43): p. 13608-13619.
73. Hsin, Y.-H., et al., *The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS-and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells*. Toxicology letters, 2008. **179**(3): p. 130-139.
74. McShan, D., P.C. Ray, and H. Yu, *Molecular toxicity mechanism of nanosilver*. Journal of food and drug analysis, 2014. **22**(1): p. 116-127.
75. Chen, X. and H.J. Schluesener, *Nanosilver: a nanoproduct in medical application*. Toxicology letters, 2008. **176**(1): p. 1-12.
76. Takenaka, S., et al., *Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats*. Environmental health perspectives, 2001. **109**(Suppl 4): p. 547.
77. Kim, Y.S., et al., *Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats*. Inhalation toxicology, 2008. **20**(6): p. 575-583.
78. Lee, K.J., et al., *In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos*. ACS nano, 2007. **1**(2): p. 133-143.
79. Lansdown, A., *Critical observations on the neurotoxicity of silver*. Critical reviews in toxicology, 2007. **37**(3): p. 237-250.
80. Ji, J.H., et al., *Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats*. Inhalation toxicology, 2007. **19**(10): p. 857-871.
81. DiVincenzo, G., C. Giordano, and L. Schriever, *Biologic monitoring of workers exposed to silver*. International archives of occupational and environmental health, 1985. **56**(3): p. 207-215.
82. Pinto, M., *Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture*. Biol. cell, 1983. **47**: p. 323-330.
83. Fogh, J. and G. Trempe, *New human tumor cell lines*, in *Human tumor cells in vitro*. 1975, Springer. p. 115-159.
84. Hidalgo, I.J., T.J. Raub, and R.T. Borchardt, *Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability*. Gastroenterology, 1989. **96**(3): p. 736-749.
85. Lea, T., *Caco-2 Cell Line*, in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, et al., Editors. 2015, Springer International Publishing: Cham. p. 103-111.
86. Bajak, E., et al., *Changes in Caco-2 cells transcriptome profiles upon exposure to gold nanoparticles*. Toxicol Lett, 2015. **233**(2): p. 187-99.
87. Böhmert, L., et al., *Molecular mechanism of silver nanoparticles in human intestinal cells*. Nanotoxicology, 2015. **9**(7): p. 852-860.

88. van der Zande, M., et al., *Different responses of Caco-2 and MCF-7 cells to silver nanoparticles are based on highly similar mechanisms of action*. *Nanotoxicology*, 2016. **10**(10): p. 1431-1441.
89. Theofilatos, K., et al., *InSyBio BioNets: an efficient tool for network-based biomarker discovery*. 2016, 2016. **22**.
90. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(1): p. 1-13.
91. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. *Nat Protoc*, 2009. **4**(1): p. 44-57.
92. Szklarczyk, D., et al., *STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(Database issue): p. D447-52.
93. Sambuy, Y., et al., *The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics*. *Cell Biol Toxicol*, 2005. **21**(1): p. 1-26.
94. Natoli, M., et al., *Good Caco-2 cell culture practices*. *Toxicol In Vitro*, 2012. **26**(8): p. 1243-6.
95. Tadjali, M., et al., *Transcriptome changes during intestinal cell differentiation*. *Biochim Biophys Acta*, 2002. **1589**(2): p. 160-7.
96. Tremblay, E., et al., *Gene expression profiles of normal proliferating and differentiating human intestinal epithelial cells: a comparison with the Caco-2 cell model*. *J Cell Biochem*, 2006. **99**(4): p. 1175-86.
97. Natoli, M., et al., *Cell growing density affects the structural and functional properties of Caco-2 differentiated monolayer*. *J Cell Physiol*, 2011. **226**(6): p. 1531-43.
98. Soenen, S.J., et al., *Cytotoxic effects of gold nanoparticles: a multiparametric study*. *ACS Nano*, 2012. **6**(7): p. 5767-83.
99. Coradeghini, R., et al., *Size-dependent toxicity and cell interaction mechanisms of gold nanoparticles on mouse fibroblasts*. *Toxicol Lett*, 2013. **217**(3): p. 205-16.
100. Kensler, T.W., N. Wakabayashi, and S. Biswal, *Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007. **47**: p. 89-116.
101. Miles, A.T., et al., *Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2000. **35**(1): p. 35-70.
102. Penninckx, S., et al., *Thioredoxin Reductase Activity Predicts Gold Nanoparticle Radiosensitization Effect*. *Nanomaterials*, 2019. **9**(2): p. 295.
103. Aueviriyavit, S., D. Phummiratch, and R. Maniratanachote, *Mechanistic study on the biological effects of silver and gold nanoparticles in Caco-2 cells--induction of the Nrf2/HO-1 pathway by high concentrations of silver nanoparticles*. *Toxicol Lett*, 2014. **224**(1): p. 73-83.
104. Laukens, D., et al., *Human metallothionein expression under normal and pathological conditions: mechanisms of gene regulation based on in silico promoter analysis*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2009. **19**(4): p. 301-17.
105. Masters, B.A., et al., *Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles*. *J Neurosci*, 1994. **14**(10): p. 5844-57.
106. Quaife, C.J., et al., *Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia*. *Biochemistry*, 1994. **33**(23): p. 7250-9.
107. Wang, S.H., et al., *Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images*. *J Nanobiotechnology*, 2010. **8**: p. 33.
108. Labens, R., et al., *Ex vivo effect of gold nanoparticles on porcine synovial membrane*. *Tissue Barriers*, 2013. **1**(2): p. e24314.
109. Li, K. and M. Schneider, *Quantitative evaluation and visualization of size effect on cellular uptake of gold nanoparticles by multiphoton imaging-UV/Vis spectroscopic analysis*. *J Biomed Opt*, 2014. **19**(10): p. 101505.
110. Bahrami, A.H., et al., *Wrapping of nanoparticles by membranes*. *Adv Colloid Interface Sci*, 2014. **208**: p. 214-24.

111. Oh, N. and J.H. Park, *Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells*. Int J Nanomedicine, 2014. **9 Suppl 1**: p. 51-63.
112. Nel, A.E., et al., *Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface*. Nat Mater, 2009. **8**(7): p. 543-57.
113. Li, N., P. Zhao, and D. Astruc, *Anisotropic gold nanoparticles: synthesis, properties, applications, and toxicity*. Angew Chem Int Ed Engl, 2014. **53**(7): p. 1756-89.
114. Wittmaack, K., *Excessive delivery of nanostructured matter to submersed cells caused by rapid gravitational settling*. ACS Nano, 2011. **5**(5): p. 3766-78.
115. Venkatesh, S., J.L. Workman, and M. Smolle, *UpSETing chromatin during non-coding RNA production*. Epigenetics Chromatin, 2013. **6**(1): p. 16.
116. Ullah, S., P. John, and A. Bhatti, *MicroRNAs with a role in gene regulation and in human diseases*. Mol Biol Rep, 2014. **41**(1): p. 225-32.
117. Lindeque, J.Z., et al., *The involvement of metallothioneins in mitochondrial function and disease*. Curr Protein Pept Sci, 2010. **11**(4): p. 292-309.
118. Devisscher, L., et al., *Role of metallothioneins as danger signals in the pathogenesis of colitis*. J Pathol, 2014. **233**(1): p. 89-100.
119. Ahamed, M., et al., *DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 2008. **233**(3): p. 404-10.
120. Lee, Y.S., et al., *Silver nanoparticles induce apoptosis and G2/M arrest via PKCzeta-dependent signaling in A549 lung cells*. Arch Toxicol, 2011. **85**(12): p. 1529-40.
121. Gopinath, P., et al., *Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2010. **77**(2): p. 240-5.
122. Satapathy, S.R., et al., *Silver-based nanoparticles induce apoptosis in human colon cancer cells mediated through p53*. Nanomedicine (Lond), 2013. **8**(8): p. 1307-22.
123. Bohmert, L., et al., *Cytotoxicity of peptide-coated silver nanoparticles on the human intestinal cell line Caco-2*. Arch Toxicol, 2012. **86**(7): p. 1107-15.
124. Miethling-Graff, R., et al., *Exposure to silver nanoparticles induces size- and dose-dependent oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells*. Toxicol In Vitro, 2014. **28**(7): p. 1280-9.
125. Bouwmeester, H., et al., *Characterization of translocation of silver nanoparticles and effects on whole-genome gene expression using an in vitro intestinal epithelium coculture model*. ACS Nano, 2011. **5**(5): p. 4091-103.
126. Moriarty-Craige, S.E. and D.P. Jones, *Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism*. Annu Rev Nutr, 2004. **24**: p. 481-509.
127. Honore, S., et al., *Outside-in regulation of integrin clustering processes by ECM components per se and their involvement in actin cytoskeleton organization in a colon adenocarcinoma cell line*. Histochem Cell Biol, 2000. **114**(4): p. 323-35.
128. Shen, B., M.K. Delaney, and X. Du, *Inside-out, outside-in, and inside-outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction*. Curr Opin Cell Biol, 2012. **24**(5): p. 600-6.
129. Clark, E.A. and J.S. Brugge, *Integrins and signal transduction pathways: the road taken*. Science, 1995. **268**(5208): p. 233-9.
130. Whitmarsh, A.J. and R.J. Davis, *Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways*. J Mol Med (Berl), 1996. **74**(10): p. 589-607.
131. Deng, F., et al., *Silver nanoparticles up-regulate Connexin43 expression and increase gap junctional intercellular communication in human lung adenocarcinoma cell line A549*. Nanotoxicology, 2010. **4**(2): p. 186-95.
132. Kawata, K., M. Osawa, and S. Okabe, *In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells*. Environ Sci Technol, 2009. **43**(15): p. 6046-51.
133. Liu, W., et al., *Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size*. Nanotoxicology, 2010. **4**(3): p. 319-30.

134. Nowrouzi, A., et al., *Cytotoxicity of subtoxic AgNP in human hepatoma cell line (HepG2) after long-term exposure*. Iran Biomed J, 2010. **14**(1-2): p. 23-32.
135. Reuter, S., et al., *Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?* Free Radic Biol Med, 2010. **49**(11): p. 1603-16.
136. Imhoff, B.R. and J.M. Hansen, *Extracellular redox status regulates Nrf2 activation through mitochondrial reactive oxygen species*. Biochem J, 2009. **424**(3): p. 491-500.
137. Kang, M.I., et al., *Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 2046-51.
138. Kang, S.J., et al., *Role of the Nrf2-heme oxygenase-1 pathway in silver nanoparticle-mediated cytotoxicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 2012. **258**(1): p. 89-98.
139. Simmons, S.O., et al., *NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent*. Curr Chem Genomics, 2011. **5**: p. 1-12.
140. Sahu, S.C., et al., *Toxicogenomic responses of human liver HepG2 cells to silver nanoparticles*. J Appl Toxicol, 2015. **35**(10): p. 1160-8.
141. Foldbjerg, R., et al., *Global gene expression profiling of human lung epithelial cells after exposure to nanosilver*. Toxicol Sci, 2012. **130**(1): p. 145-57.
142. Moos, P.J., et al., *Responses of human cells to ZnO nanoparticles: a gene transcription study*. Metallomics, 2011. **3**(11): p. 1199-211.
143. Tuomela, S., et al., *Gene expression profiling of immune-competent human cells exposed to engineered zinc oxide or titanium dioxide nanoparticles*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68415.
144. Walker, M.S. and T.A. Hughes, *Messenger RNA expression profiling using DNA microarray technology: diagnostic tool, scientific analysis or un-interpretable data?* Int J Mol Med, 2008. **21**(1): p. 13-7.