



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μελέτη της επίδρασης νανοσωλήνων άνθρακα στην έκφραση
κρίσιμων αντιοξειδωτικών γονιδίων σε μακροφάγα κύτταρα
ποντικού»**

Μιχαήλ Χατζηλοΐζου, του Χριστάκη

Λάρισα, 2023



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND
BIOTECHNOLOGY

DIPLOMA THESIS

**“Evaluation of the effects of carbon nanotubes on the expression of
crucial antioxidant genes in mouse macrophages”**

Michail Chatziloizou

Larissa, 2023

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Δημήτριος Κουρέτας, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων Καθηγητής)

Κωνσταντίνος Χαριτίδης, Καθηγητής Νανομηχανικής και Νανοτεχνολογίας, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (Μέλος)

Αριστείδης Βεσκούκης, Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Μέλος)

Περιεχόμενα	
Ευχαριστίες	1
Περίληψη	2
1. Εισαγωγή	4
1.1 Ελεύθερες ρίζες	4
1.2 Δραστικές μορφές	4
1.3 Παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	5
1.3.1 Εξωγενής παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	6
1.3.2 Ενδογενής παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	6
1.4 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών.....	9
1.4.1 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών στα βιομόρια	9
1.4.2 Επιδράσεις στη φυσιολογία.....	10
1.4.3 Επιδράσεις στην παθολογία	12
1.5 Αντιοξειδωτικά.....	13
1.5.1 Ενδογενή αντιοξειδωτικά	14
1.5.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά	18
1.6 Κυτταρικές καταπονήσεις.....	21
1.6.1 Οξειδωτικό στρες	21
1.6.2 Αναγωγικό στρες	21
1.7 Μοριακή ρύθμιση στις επιδράσεις των ελευθέρων ριζών.....	22
1.7.1 Δομή Nrf2	23
1.7.2 Ρύθμιση του Nrf2	24
1.7.3 Δράση και γονίδια-στόχοι του Nrf2.....	29
1.8 Νανοϋλικά.....	30
1.8.1 Νανοσωλήνες άνθρακα.....	32
1.8.2 Μηχανισμοί παραγωγής ROS	33
2. Σκοπός	35
3. Υλικά και μέθοδοι	36
3.1 Νανοσωλήνες άνθρακα.....	36
3.2 Διασπορά νανοσωλήνων άνθρακα και προετοιμασία διαλυμάτων	37
3.3 Κυτταρική σειρά.....	37
3.4 Κυτταροκαλλιέργειες.....	37
3.5 Αξιολόγηση κυτταροτοξικότητας μέσω της δοκιμασίας XTT.....	38
3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR).....	39
3.6.1 Διαχείριση κυτταρικής σειράς και προετοιμασία για την RT-PCR	39

3.6.2 Απομόνωση ολικού RNA	40
3.6.3 Ποσοτικοποίηση RNA και πέψη με DNάση	41
3.6.4 Σύνθεση cDNA	41
3.6.5 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR).....	42
3.7 Διαχείριση κυτταρικής σειράς και απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού κλάσματος.....	44
3.8 Ποσοτικοποίηση της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω της μεθόδου Bradford.....	45
3.9 Ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	45
3.9.1 Αρχή μεθόδου.....	46
3.9.3 Προετοιμασία δειγμάτων.....	47
3.9.4 Παρασκευή πηκτής ηλεκτροφόρησης	48
3.9.5 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE	48
3.9.6 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF	49
3.9.7 Ανοσοανίχνευση στη μεμβράνη.....	49
3.9.8 Εμφάνιση πρωτεϊνικού σήματος	50
3.10 Στατιστική ανάλυση.....	50
4. Αποτελέσματα	51
4.1 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης των νανοσωλήνων άνθρακα στη κυτταρική σειρά RAW264.7	51
4.2 Επιδράσεις στην έκφραση κρίσιμων αντιοξειδωτικών γονιδίων	54
4.3 Επιδράσεις στα πρωτεϊνικά επίπεδα της καταλυτικής υπομονάδας της λιγάσης της γλουταμικής κυστεΐνης.....	57
5. Συζήτηση.....	58
6. Βιβλιογραφία	62

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δημήτριου Κουρέτα.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Κουρέτα, για την ανάθεση ενός τόσο αξιόλογου και ενδιαφέροντος θέματος, για τη δυνατότητα συμμετοχής στην ερευνητική του ομάδα, αλλά και για το σύνολο των θεωρητικών γνώσεων που μου μετέδωσε, οι οποίες αποτέλεσαν καθοριστικό παράγοντα για την ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ταυτόχρονα, οφείλω ένα θερμό ευχαριστώ στον καθηγητή μου κ. Αριστείδη Βεσκούκη, για το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας και την προθυμία του να λύσει τις απορίες μου και να προσφέρει την βοήθεια του, καθώς και στην κ. Κωνσταντίνο Χαριτίδη για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή και τη συνεργασία στο κομμάτι των νανοϋλικών.

Στο σύνολο της διαδρομής της παρούσας μελέτης αποκόμισα μια πληθώρα νέων γνώσεων και πολύτιμη εργαστηριακή εμπειρία μέσω της καθοδήγησης του υποψήφιου διδακτορικού ερευνητή του εργαστηρίου Περικλή Βαρδάκα, ο οποίος εξαρχής στάθηκε δίπλα μου σε κάθε βήμα της διαδικασίας. Αδιαμφισβήτητα, του οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη του και συνεπώς για την διαμόρφωση της αυτοπεποίθησης μου εντός του εργαστηριακού χώρου, αλλά και για τις συμβουλές του σε κάθε βήμα της μελέτης και την συμβολή του στη επιμέλεια της παρούσας διατριβής.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες, στην υποψήφια διδάκτορα Μαρία-Παρασκευή Νεχαλιώτη και την μεταδιδακτορικό ερευνήτρια Μαρία Κούρτη για τη αμέριστη βοήθεια τους καθ' όλη τη διεκπεραίωση της πειραματικής διαδικασίας. Στο ίδιο πλαίσιο ευγνωμοσύνης, έχω την ανάγκη να ευχαριστήσω τους μεταδιδακτορικούς ερευνητές Σωτηρία Μακρή, Ζωή-Βασιλική Σκαπέρδα, Φώτιο Τέκο, τις υποψήφιες διδάκτορες Αναστασία Πατούνα, Μαρία Γκασδρόγκα και τον Θωμά Καραμπατζάκη, για το εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας και την άμεση προσφορά βοήθειας σε οποιοδήποτε προκύπτει ζήτημα.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, με τη διαρκή εξέλιξη των τεχνολογικών επιστημών, ο κλάδος της Νανοτεχνολογίας έχει συντελέσει στην προώθηση και την ενσωμάτωση μιας πληθώρας τεχνητών νανοϋλικών σε ποικίλες πτυχές της ανθρώπινης ζωής. Ωστόσο, παρουσιάζονται έντονες ανησυχίες αναφορικά με την ασφάλεια και τους κινδύνους που ελλοχεύουν από την αυξημένη έκθεση σε τέτοιου τύπου υλικά, πρωτίστως κατά την πολύωρη εργασιακή απασχόληση. Λαμβάνοντας τα παραπάνω υπόψιν, ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η εκτίμηση των επιδράσεων μη τροποποιημένων (CNTs-Ref), καρβοξυλιωμένων (CNTs-COOH) και υβριδικών με νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (CNTs@Fe₃O₄, CNTs@ZnFe₂O₄) πολυφλοιϊκών νανοσωλήνων άνθρακα στην κυτταρική βιωσιμότητα και στην έκφραση κρίσιμων αντιοξειδωτικών γονιδίων σε μακροφάγα κύτταρα μυών RAW264.7. Η παραπάνω κυτταρική σειρά εκτέθηκε σε ένα εύρος αυξανόμενων συγκεντρώσεων (12.5, 25, 50, 100 και 200 μg/ml) των νανοσωλήνων άνθρακα της μελέτης για 8 ώρες και μέσω της δοκιμασίας XTT προσδιορίστηκε η κυτταροτοξικότητά τους, ενώ με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR) και ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών ελέγχθηκε η επίδραση μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων στην έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων που συμμετέχουν στη ρύθμιση της γλουταθειόνης. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τρεις κατηγορίες νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs-COOH, CNTs@Fe₃O₄, CNTs@ZnFe₂O₄) προκάλεσαν μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στη συγκέντρωση των 200 μg/ml, ενώ στη περίπτωση των CNTs-Ref το κατώφλι κυτταροτοξικότητας ήταν τα 50 μg/ml. Στο κομμάτι της έκφρασης των κρίσιμων αντιοξειδωτικών γονιδίων, επιλέχθηκαν για την παρούσα μελέτη τα γονίδια NFE2L2, GCLc, GSR και GPx1. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την RT-PCR φανέρωσαν σημαντική ενίσχυση στην έκφραση του γονιδίου της GPx1 στους CNTs-Ref και της GCLc στους CNTs-COOH και CNTs@Fe₃O₄. Τέλος, σε πρωτεϊνικό επίπεδο μελετήθηκε η έκφραση της GCLc, όπου δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική επίδραση.

Abstract

In recent years, with the continuous development of technological sciences, the field of Nanotechnology has contributed to the promotion and integration of a multitude of engineered nanomaterials in various aspects of human life. However, there are severe concerns regarding the safety and the health risks arising from increased exposure to such nanoscale materials, primarily in the occupational environment. Taking these into account, the purpose of this study was to evaluate the effects of pristine (CNTs-Ref), carboxylated (CNTs-COOH), and hybrid with iron oxide nanoparticles (CNTs@Fe₃O₄, CNTs@ZnFe₂O₄) multi-walled carbon nanotubes on cell viability and on expression of crucial antioxidant genes in RAW264.7 mouse macrophages. The above mentioned cell line was exposed to a range of increasing concentrations (12.5, 25, 50, 100 and 200 µg/ml) of carbon nanotubes for 8 hours and their acute toxic effects on cell viability were determined by XTT assay, while the expression levels of antioxidant genes involved in GSH homeostasis were determined by RT-PCR and Western Blot. The results of the study showed that CNTs-COOH, CNTs@Fe₃O₄, and CNTs@ZnFe₂O₄ caused a significant decrease in cell viability at the concentration of 200 µg/ml, whereas the cytotoxic threshold of CNTs-Ref was 50 µg/ml. Regarding gene expression, the genes selected for the present study were NFE2L2, GCLc, GSR, and GPx1. The results obtained by RT-PCR revealed a significant enhancement in gene expression of GPx1 in CNTs-Ref and of GCLc in CNTs-COOH and CNTs@Fe₃O₄. Finally, at protein level the expression of GCLc was studied, however, no significant effects were observed.

1. Εισαγωγή

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ο όρος ελεύθερη ριζά αποδίδεται σε ένα άτομο, μόριο ή ιόν το οποίο φέρει την ιδιότητα της αυτουσίας ύπαρξης και διαθέτει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στο εξωτερικό του τροχιακό, παρουσιάζοντας υψηλή δραστηριότητα. Η πρώτη αναφορά στις ελεύθερες ρίζες γίνεται από τον Guyton de Morveau το 1786, ωστόσο για αρκετές δεκαετίες δεν παρουσιάστηκαν στοιχεία, ικανά να επιβεβαιώσουν την ύπαρξή τους (Di Meo & Venditti, 2020). Η αδυναμία για την απομόνωση και το χαρακτηρισμό των ελευθέρων ριζών αποδόθηκε στο χαρακτηριστικά γρήγορο συνδυασμό τους και στην έλλειψη μεθόδου απομόνωσης εκείνη την εποχή (Ovalle & Ovalle, 2022). Η πρώτη αντίδραση στην οποία συμμετείχαν ελεύθερες ρίζες πραγματοποιήθηκε το 1894 από τον H. J. H. Fenton και περιελάμβανε την παραγωγή ανιόντος υδροξυλίου (OH^-) και ρίζας υδροξυλίου (OH^\bullet) από υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) με τρισθενή σίδηρο ως καταλύτη. Ταυτόχρονα η παρουσία ελευθέρων ριζών σε βιολογικά συστήματα αποδείχθηκε το 1954, με την βοήθεια φασματοσκοπίας ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR), μέσω της οποίας επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη μιας παραμαγνητικής ενδιάμεσης ένωσης σε συστήματα ενζύμου-υποστρώματος (Di Meo & Venditti, 2020). Η υψηλή δραστηριότητα που παρουσιάζουν οι ελεύθερες ρίζες τις καθιστά εξαιρετικά ασταθείς με σύντομο χρόνο ζωής, παρέχοντάς τους τη δυνατότητα να αποσπών ηλεκτρόνια από άλλες ενώσεις για την αποκατάσταση της σταθερότητάς τους (Patel et al., 2018). Συνεπώς, η ένωση που χάνει το ηλεκτρόνιό της μετατρέπεται η ίδια σε ελεύθερη ριζά, εκκινώντας έτσι έναν αλυσιδωτό καταρράκτη αντιδράσεων ο οποίος, εν τέλει, προκαλεί κυτταρικές βλάβες.

1.2 Δραστικές μορφές

Η κατηγοριοποίηση των δραστικών μορφών γίνεται με βάση το κεντρικό μόριο που τις απαρτίζει. Έτσι, οι τρεις κυρίες ομάδες δραστικών μορφών είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), οι δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS) και οι δραστικές μορφές θείου (Reactive Sulfur Species, RSS) (Lushchak, 2014). Ταυτόχρονα, οι ROS και οι RNS διακρίνονται σε δραστικές και μη δραστικές ενώσεις (Martemucci et al., 2022).

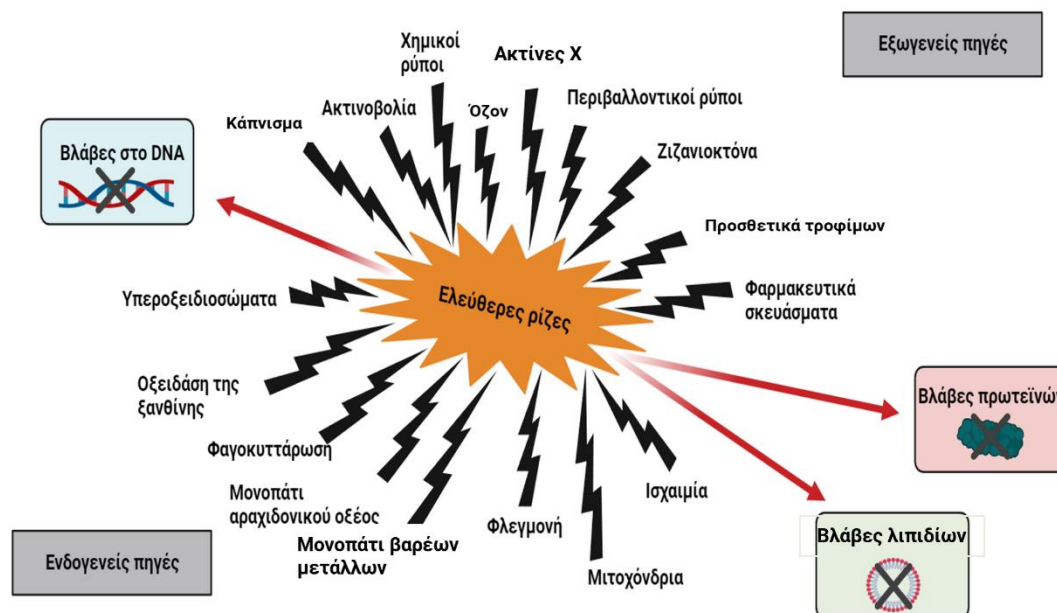
Πιο αναλυτικά, στο επίπεδο των ROS διακρίνονται, μεταξύ άλλων, η ριζά υπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet-}$) και η ριζά υδροξυλίου (HO^\bullet), οι οποίες αποτελούν δραστικές ενώσεις, ενώ στις μη δραστικές ενώσεις περιλαμβάνονται το υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), το όζον (O_3) και το μονατομικό οξυγόνο ($^1\text{O}_2$) (Lushchak, 2014). Αναφορικά με τις RNS, στις δραστικές ενώσεις περιλαμβάνονται το μονοξειδίου του αζώτου (NO^\bullet) και το διοξειδίου του αζώτου (NO_2^\bullet), ενώ από την άλλη, στις μη δραστικές ενώσεις συναντώνται το νιτρώδες οξύ (HNO_2), το τριοξειδίου του διαζώτου (N_2O_3), το τετροξειδίου του διαζώτου (N_2O_4), το ανιόν (NO^-) και το κατιόν (NO^+) νιτροξυλίου (Halliwell, 2006). Οι μη

δραστικές ενώσεις δεν χαρακτηρίζονται ως δραστικές μορφές, ωστόσο, έχουν την δυνατότητα να «πυροδοτήσουν» ταχύτατα αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών στους ζωντανούς οργανισμούς (Phaniendra et al., 2015). Αξιοσημείωτο είναι ότι οι διαφορετικοί τύποι ελευθέρων ριζών ποικίλουν ως προς τη δραστηριότητά τους, κάτι που σχετίζεται και με το βαθμό της βλάβης που προκαλούν στα βιολογικά μόρια (Martemucci et al., 2022).

Παράλληλα, οι δραστικές μορφές θείου RSS, στις οποίες περιλαμβάνονται το υδρόθειο (H_2S), τα υπεροσουλφίδια και τα πολυσουλφίδια συντίθενται από κυστεΐνη και αναδεικνύονται ως σημαντικά μόρια της οξειδοαναγωγικής ρύθμισης τα τελευταία χρόνια (Iciek et al., 2022). Οι δραστικές μορφές περιελάμβαναν και την κατηγορία των δραστικών μορφών χλωρίου (Reactive Chlorine Species, RCS), ωστόσο, φαίνεται πως οι ενώσεις αυτές, όπως το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$) και οι χλωραμίνες, κατηγοριοποιούνται πλέον με βάση τα μόρια του οξυγόνου και του αζώτου και άρα αποτελούν μέλη των ROS και RNS, αντίστοιχα (Martemucci et al., 2022) (Lennon et al., 2021).

1.3 Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι πηγές παραγωγής των ελευθέρων ριζών μπορεί να διακριθούν ως εξωγενείς (εξωτερικός παράγοντας των βιολογικών συστημάτων) ή ενδογενείς (παράγωγα των οργανισμών).



Εικόνα 1. Κύριες εξωγενείς και ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών και οι προκαλούμενες βλάβες στα βιολογικά μακρομόρια. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το εργαλείο Biorender (<https://www.biorender.com/>).

1.3.1 Εξωγενής παραγωγή ελευθέρων ριζών

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών μπορεί να είναι αποτέλεσμα της επίδρασης συγκεκριμένων εξωτερικών παραγόντων, όπως διάφοροι τύποι ακτινοβολιών (ακτίνες X, ακτίνες-γ, ορατό φως), βαρέα μέταλλα (κάδμιο, υδράργυρος, μόλυβδος) και χημικές ουσίες (Martemucci et al., 2022). Επίσης, το κάπνισμα, η διατροφή πλούσια σε καμμένα ελαία και λίπη και η έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους αυξάνουν τις πιθανότητες σχηματισμού ελευθέρων ριζών (J. Liu et al., 2021).

1.3.2 Ενδογενής παραγωγή ελεύθερων ριζών

Η δημιουργία ελευθέρων ριζών ενδογενώς αποδίδεται σε συγκεκριμένες κυτταρικές διεργασίες, όπως η δράση της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, η ενεργοποίηση ενζυμικών συστημάτων, η λειτουργία των λυσοσωμάτων, του ενδοπλασματικού δικτύου και των υπεροξειδιοσωμάτων, το σύμπλοκο του κυτοχρώματος P450, καθώς και διαταραχές στη φυσιολογία των ιστών που οδηγούν σε ασθένειες (Martemucci et al., 2022).

1.3.2.1 Μιτοχόνδρια

Στον ανθρώπινο οργανισμό το μοριακό οξυγόνο χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενέργειας μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, η οποία λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Το μεγαλύτερο ποσοστό οξυγόνου σχηματίζει μόρια νερού, ενώ σε ένα μικρό ποσοστό δημιουργεί ελεύθερες ρίζες (Zaric et al., 2023). Η οξειδωτική μονάδα των μιτοχονδρίων αποτελείται από πρωτεϊνικά σύμπλοκα, τα οποία διατάσσονται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη και συνιστούν την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Electron Transfer Chain, ETC) (Rich & Maréchal, 2010). Το υδρογόνο χαρακτηρίζεται ως αναγωγικό μόριο, το οποίο διέρχεται από τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα (σύμπλοκα I-IV) της ETC, όπου το μοριακό οξυγόνο ανάγεται σε νερό. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση οδηγεί στην παραγωγή μορίων ATP, κατά την οποία προκύπτει απώλεια ηλεκτρονίων, καθοριστική για το σχηματισμό ελευθέρων ριζών (Lüthje et al., 2013). Συνεπώς, οι ROS προκύπτουν ως παραπροϊόντα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα την παραγωγή κυρίως $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 (Zaric et al., 2023). Η σύνθεση των ROS, μέσω της λειτουργίας της ETC, αποδίδεται στην διαρροή έως και του 2% των ηλεκτρονίων, τα οποία αντιδρούν με το μοριακό οξυγόνο προς σχηματισμό δραστικών μορφών (Di Meo et al., 2016).

1.3.2.2 Λυσοσώματα

Τα λυσοσώματα ευθύνονται για την αποσύνθεση ποικίλων οργανικών ενώσεων, συμμετέχοντας ενεργά στον κυτταρικό μεταβολισμό (Perera & Zoncu, 2016). Ως

οργανίδια, περιέχουν τον περισσότερο οξειδοαναγωγικά ενεργό σίδηρο, κάτι που τα καθιστά ευάλωτα στην επαγόμενη από οξειδωτικούς παράγοντες βλάβη (Kim & Kim Bai, 2022). Ειδικότερα, μόρια H_2O_2 , που σχηματίζονται εξωτερικά των κυτταρικών οργανιδίων, δύνανται να εισέλθουν στα λυσοσώματα και να οδηγήσουν στο σχηματισμό ριζών OH^\bullet και OH^- , μέσω της αντίδρασης Fenton (Di Meo et al., 2016).

1.3.2.3 Υπεροξεισώματα

Στα συγκεκριμένα οργανίδια έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 50 ένζυμα, τα οποία συμμετέχουν σε ποικίλλες βιοχημικές διεργασίες, διαδραματίζοντας κεντρικό ρόλο στην παραγωγή ROS και τη σύνθεση και διάσπαση των λιπιδίων (Waterham et al., 2016). Εξαιτίας του οξειδωτικού μεταβολισμού τους, τα υπεροξεισώματα αποτελούν πηγές παραγωγής ROS και RNS και συνεπώς προκύπτουν ελεύθερες ρίζες όπως H_2O_2 , 1O_2 , O_2^\bullet και NO (Kim & Bai, 2022). Επίσης, συναντώνται μεταλλικά ιόντα, όπως χαλκού και σιδηρού, τα οποία συμμετέχουν στην αντίδραση Fenton, οδηγώντας τελικά στην παραγωγή H_2O_2 , O_2^\bullet και ROO^\bullet (Repetto et al., 2010).

1.3.2.4 Ενδοπλασματικό δίκτυο

Στο ενδοπλασματικό δίκτυο διενεργείται η σύνθεση, η αναδίπλωση, αλλά και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών (Phaniendra et al., 2015). Οι μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες συσσωρεύονται δημιουργώντας συσσωματώματα, εντός του αυλού του ενδοπλασματικού δικτύου, με αποτέλεσμα το οργανίδιο να οδηγείται σε συνθήκες στρες και να επηρεάζεται η κυτταρική ομοιόσταση (Zaric et al., 2023). Στο ενδοπλασματικό δίκτυο συναντάται η ισομεράση PDI (protein disulfide isomerase). Η παραπάνω πρωτεΐνη είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών, εξασφαλίζοντας την επιθυμητή αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Zeeshan et al., 2016). Κατά τη δράση της PDI στο αντίστοιχο υπόστρωμα, γίνεται μεταφορά δυο ηλεκτρονίων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, με συνέπεια η πρωτεΐνη-υπόστρωμα να οξειδώνεται (Madkour, 2020). Ο μηχανισμός αυτός έχει συσχετιστεί άμεσα με τη σύνθεση H_2O_2 και κατ' επέκταση με την πρόκληση οξειδωτικού στρες (Zaric et al., 2023).

1.3.2.5 Πυρήνας

Ο πυρήνας υπό φυσιολογικές συνθήκες χαρακτηρίζεται από υψηλότερα επίπεδα ROS από ότι το κυτταρόπλασμα, ωστόσο, δεν έχει προσδιοριστεί αν αυτό οφείλεται σε ενδογενή παραγωγή ROS ή εάν είναι αποτέλεσμα μεταφοράς από το κυτταρόπλασμα. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν δυο κύρια ένζυμα της οικογένειας των κυκλοοξυγενασών (COX-1, COX-2) που συνεισφέρουν στον πυρηνικό σχηματισμό ROS, μέσω της

παραγωγής ριζών $O_2^{\cdot-}$ (Snezhkina et al., 2019). Η σημασία των πυρηνικών ROS οφείλεται στη χρήση τους ως «αισθητήρες», οι οποίοι συλλέγουν πληροφορίες για την κυτταρική ακεραιότητα και την πιθανή πρόκληση μεταβολικού στρες στα άλλα οργανίδια, επάγοντας αποκρίσεις που θα οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση (Chittiboyina et al., 2018).

1.3.2.6 Ενζυμικά συστήματα

Η ενζυμική δραστηριότητα του κυττάρου σχετίζεται άμεσα με την παραγωγή ελευθέρων ριζών, κυρίως ROS. Η βασική ομάδα ενζύμων που συμμετέχει στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών είναι οι οξειδοαναγωγάσες. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν τέσσερα κύρια ένζυμα με υψηλή δραστηριότητα και βιολογική σημασία με χαρακτηριστικό αποτέλεσμα της δράσης τους την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Η οξειδάση της διαμίνης (Diamine oxidase, DAO) φέρει ιόντα χαλκού (Cu^{2+}) και χρειάζεται ως συμπαραγόνα για τη δράση της ένα φλάβινο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο (FAD) (Pegg, 2013). Το συγκεκριμένο ένζυμο καταλύει την οξείδωση των πολυαμινών και μέσα από αυτές τις αντιδράσεις παράγεται τελικά H_2O_2 (Snezhkina et al., 2019). Παράλληλα, η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης (Xanthine oxidoreductase, XOR) αποτελεί μια φλαβινο-υδροξυλάση που φέρει κατάλοιπα μολυβδαινίου, θείου και σιδηρού, η οποία συναντάται σε δυο μορφές, της αφυδρογονάσης (XDH) και της οξειδάσης (XOD) (Di Meo et al., 2016). Το ένζυμο έχει την ιδιότητα να μεταβαίνει από τη μια μορφή στην άλλη μέσω τροποποίησης καταλοίπων κυστεϊνών και είναι υπεύθυνο για την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ κατά το μεταβολισμό των πουρινών (Maiuolo et al., 2016). Η δράση και των δυο μορφών οδηγεί στην παραγωγή H_2O_2 και $O_2^{\cdot-}$ (Snezhkina et al., 2019).

Ένα χαρακτηριστικό ενζυμικό σύμπλοκο με δράση οξειδάσης αποτελεί το κυτόχρωμα P450 (CYP), μέλος της υπεροικογένειας των μεμβρανικών πρωτεϊνών και του μικροσωμικού συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων, ενώ όσον αφορά τη λειτουργία του, καταλύει την οξείδωση πολυάριθμων οργανικών υποστρωμάτων, καθώς και την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου (Snezhkina et al., 2019). Τα ένζυμα της οικογένειας CYP φέρουν δραστηριότητα υπεροξυγενάσης και υπεροξειδάσης, χρησιμοποιώντας H_2O_2 ως δοτή ηλεκτρονίων. Συνεπώς, το H_2O_2 αποσυντίθεται σε OH^{\cdot} υπό την παρουσία ιόντων σιδηρού μέσω της αντίδρασης Fenton (Hrycay & Bandiera, 2015).

Η οικογένεια των NADPH οξειδασών (NOX) αποτελείται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το NADPH στο FAD, μέσω των βιολογικών μεμβρανών, για την αναγωγή του οξυγόνου σε $O_2^{\cdot-}$ (Bedard & Krause, 2007). Η απορρύθμιση της δραστηριότητας των NOX οδηγεί στην αυξανόμενη παραγωγή ROS, οδηγώντας σε κυτταρικές βλάβες (Zeeshan et al., 2016). Συμπληρωματικά, οι NOX μπορούν να ενεργοποιηθούν από ποικίλους ξενοβιοτικούς παράγοντες, με αποτέλεσμα την παραγωγή ROS ως απόκριση στη φλεγμονή (Tang et al., 2018).

1.4 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Οι επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά συστήματα διακρίνονται σε φυσιολογικές και παθολογικές (Bardaweel et al., 2018; Di Meo et al., 2016; Milkovic et al., 2019). Πιο συγκεκριμένα, η ύπαρξη των δυο κυρίων δραστικών μορφών που συναντώνται στους οργανισμούς (ROS, RNS) μπορεί να χαρακτηριστεί ως ευεργετική για συγκεκριμένους κυτταρικούς μηχανισμούς, αλλά και ως αρνητική για την κυτταρική ομοιόσταση.

1.4.1 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών στα βιομόρια

Η δραστηριότητα που χαρακτηρίζει τις ελεύθερες ρίζες, τους επιτρέπει να προκαλούν βλάβες σε όλες τις θεμελιώδεις κατηγορίες βιομορίων, δηλαδή στα νουκλεϊκά οξέα, στα λιπίδια και στις πρωτεΐνες (Phaniendra et al., 2015). Η διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής των ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών καταλήγει στην πρόκληση βλαβών, με τελικές συνέπειες την αλλοίωση τόσο των κυττάρων όσο και γενικότερα των ιστών, οδηγώντας σε παθολογικές επιπτώσεις (Martemucci et al., 2022).

Οι δυο κύριες κατηγορίες ελευθέρων ριζών, ROS και RNS, τροποποιούν και καταστρέφουν το DNA, μέσω αλλαγής βάσεων, ελλείψεων, ρήξης των κλώνων, χρωμοσωμικών αναδιατάξεων, υπερ- και υπο-μεθυλώσεων και διαφοροποίησης της γονιδιακής έκφρασης (Patel et al., 2018). Ένα κύτταρο παράγει περίπου 50 OH[•] το δευτερόλεπτο. Η OH[•] αντιδρά απευθείας με στοιχεία του DNA, όπως τις πουρίνες και πυριμιδίνες και το σκελετό της δεοξυριβόζης, προκαλώντας μονόκλωνες ή δίκλωνες ρήξεις, ενώ έχει την ιδιότητα να αφαιρεί μόρια υδρογόνου μεταβάλλοντας τις πουρίνες, συνθέτοντας πυριμιδίνες και ενισχύοντας τη σύνδεση DNA-πρωτεϊνών (Dizdaroglu & Jaruga, 2012). Οι παραγόμενες ρίζες οξειδώνουν τη γουανοσίνη και τη θυμιδίνη, μετατρέποντάς τις σε 8-υδροξύλο-2-δεοξυγουανοσίνη και 5,6-διυδροξύ-5,6-διυδροξυθυμίνη, αντίστοιχα. Η τροποποιημένη βάση του DNA 8-υδροξύ-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG) θεωρείται κατάλληλος βιοδείκτης για την εξακρίβωση οξειδωτικών βλαβών στο DNA, ενώ η ύπαρξή της σχετίζεται με τη μεταλλαξιγένεση και την εμφάνιση καρκίνου. Παράλληλα, οι ελεύθερες ρίζες στοχεύουν και τα μόρια του RNA. Το RNA είναι ευάλωτο στην οξειδωτική βλάβη, εξαιτίας της μονόκλωνης διαμόρφωσης του, της έλλειψης επιδιορθωτικού μηχανισμού και της μειωμένης προστασίας από πρωτεΐνες (Martemucci et al., 2022).

Η λιπιδική υπεροξείδωση είναι μια φυσιολογική διαδικασία που λαμβάνει χώρα σε όλα τα αερόβια κύτταρα. Οι κύριοι στόχοι της οξείδωσης είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) και τα φωσφολιπίδια (Schiliro & Firestein, 2021). Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα περιέχουν μια καρβονυλική ομάδα, που υπολείπεται σε ηλεκτρόνια, όπως τα PUFAs, αλλά στον ακόρεστο διπλό δεσμό τους. Ακριβώς αυτή η απώλεια ηλεκτρονίων καθιστά τα λιπαρά οξέα ευπαθή στην προσβολή από ποικίλους οξειδωτικούς

παράγοντες (Teoh & Lunt, 2018). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν δομικό στοιχείο των κυτταρικών μεμβρανών, συνεπώς η λιπιδική υπεροξείδωση προβάλλεται ως βασικό στοιχείο που διαταράσσει τη μεμβρανική ακεραιότητα (Martemucci et al., 2022). Η λιπιδική υπεροξείδωση δύναται να διαιρεθεί σε τρία διακριτά βήματα: έναρξη, αναπαραγωγή και τερματισμός. Κατά την έναρξη, προ-οξειδωτικά μόρια, όπως η OH^\cdot αφαιρεί το αλλυλικό ηλεκτρόνιο, σχηματίζοντας μια ελεύθερη ριζά με κεντρικό μόριο τον άνθρακα (L $^\cdot$). Στη φάση της αναπαραγωγής, αυτή η ελεύθερη ριζά (L $^\cdot$) αντιδρά με το υδρογόνο για να συνδεθεί μια λιπιδική ριζά περοξυλίου (LOO $^\cdot$), η οποία αποσπά ένα μόριο οξυγόνου από ένα άλλο λιπίδιο, παράγοντας μια νέα ριζά (L $^\cdot$) και ένα λιπιδικό υδροξυπεροξείδιο (LOOH). Η διαδικασία ολοκληρώνεται με τον τερματισμό των αλυσιδωτών αντιδράσεων που προκύπτουν, όταν μια αντιοξειδωτική ένωση προσφέρει ένα άτομο υδρογόνου στην ριζά LOO $^\cdot$ δίνοντας την δυνατότητα το προκύπτον μόριο να αλληλεπιδράσει με μια άλλη λιπιδική ριζά για το σχηματισμό μη ριζικών προϊόντων (Ayala et al., 2014).

Οι πρωτεΐνες γίνονται συχνά στόχοι των ROS με αποτέλεσμα την παραγωγή καρβονυλίων και άλλων αμινοξικών παραγώγων. Η αλληλεπίδραση των ριζών με τις πρωτεΐνες στοχεύει αμινοξικά κατάλοιπα, όπως λυσίνες, προλίνες και θρεονίνες και οδηγεί σε μετουσίωση των πρωτεϊνών, που καταλήγει σε απώλεια λειτουργίας (Pizzino et al., 2017). Οι ομάδες καρβονυλίων σε πρωτεΐνες θεωρούνται σημαντικοί δείκτες της οξείδωσης των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες (Martemucci et al., 2022). Τα αμινοξέα που διαθέτουν άτομα θείου, όπως η κυστεΐνη και η μεθειονίνη, είναι πιο ευάλωτα στη οξείδωση από τις ROS, δίνοντας ως τελικά προϊόντα δισουλφίδια (Zeeshan et al., 2016). Παρόλα αυτά, στα βιολογικά συστήματα, οι δυο παραπάνω οξειδωμένες μορφές αμινοξέων είναι οι μονές που δύνανται να αποκτήσουν τη φυσιολογική διαμόρφωση τους μετά από την επίδραση ενζύμων, όπως οι δισουλφιδικές αναγωγάσες (Phaniendra et al., 2015). Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες έχει δειχθεί ότι αποικοδομούνται μέσω του 20s πρωτεοσώματος, λόγω της ιδιότητας του τελευταίου να αναγνωρίζει υδροφοβικές περιοχές στην επιφάνεια των προς καταστροφή πρωτεϊνών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί η εξακρίβωση ότι κατά την οξειδωτική βλάβη σε κύτταρα παρατηρείται πρωτεόλυση των οξειδωμένων πρωτεϊνών, ανεξάρτητη της σηματοδότηση της ουβικουΐτινης. Σε ακραίες συνθήκες οξειδωτικής καταπόνησης, το σύστημα του πρωτεοσώματος μπορεί να αποσυναρμολογηθεί και να καταστεί ανενεργό, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης συσσωματωμάτων οξειδωμένων πρωτεϊνών υψηλού μοριακού βάρους (Ayala & Grune, 2014).

1.4.2 Επίδρασεις στη φυσιολογία

Οι δραστικές μορφές όταν βρίσκονται σε ορισμένα κρίσιμα επίπεδα συμμετέχουν στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης του οργανισμού και στην αποφυγή του οξειδωτικού στρες (Patel et al., 2018). Ο όρος Οξειδοαναγωγική Βιολογία χρησιμοποιείται ευρέως για να περιγράψει τους μηχανισμούς με τους οποίους οι ROS και RNS συμμετέχουν ως σηματοδοτικά μόρια στη ρύθμιση και διατήρηση των

φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών (Mittler, 2017). Η δράση αυτή επιτυγχάνεται κυρίως μέσω αλληλεπίδρασης με κυστεΐνες πρωτεϊνών. Οι διαφοροποιήσεις που συμβαίνουν στις πρωτεΐνες επηρεάζουν τη μεταγραφή τους, αλλά και τις μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως την φωσφορυλίωση (Reczek & Chandel, 2015). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ενίσχυσης κυτταρικής διεργασίας μέσω της συμμετοχής των ROS είναι η προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που παρατηρείται σε τύπους βλαστικών κυττάρων. Οι δραστικές μορφές επάγουν την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση με στόχους-μονοπάτια, όπως της κινάσης της 3-φωσφορικής φωσφατίδυλο-ινοσιτόλης (PI3K) και των επαγόμενων από υποξία μεταγραφικών παραγόντων (HIFs) (Truong & Carroll, 2013).

Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ο καθοριστικός ρόλος των ROS για την σηματοδότηση των κυττάρων της έμφυτης ανοσίας (Reczek & Chandel, 2015). Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα όπως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά, φαγοκυτταρώνουν ξένα στοιχεία που εισβάλλουν στον οργανισμό. Η φαγοκυττάρωση στηρίζεται στην παρουσία ROS, οι οποίες συντίθενται στα ενδοσώματα των φαγοκυττάρων, μέσω της οξειδάσης του NADPH (Moghadam et al., 2021). Όταν μια ξένη ουσία αναγνωρίζεται από το ανοσοποιητικό μέσω συγκεκριμένων υποδοχέων, ενεργοποιείται η οξειδάση με σκοπό την εκτεταμένη παραγωγή ROS για την καταστροφή του ξενοβιοτικού παράγοντα (Takeuchi & Akira, 2010). Από την άλλη πλευρά, τα μειωμένα επίπεδα ROS διατηρούν το ανοσοποιητικό σύστημα σε κατάσταση ανοσοεπαγωγής (Mittal et al., 2014). Ως εκ τούτου, γίνεται εμφανές ότι η οξειδοαναγωγική ισορροπία αποτελεί βασικό ρυθμιστή του ανοσοποιητικού συστήματος.

Στο επίπεδο του νευρικού συστήματος, οι ROS σχετίζονται άμεσα με τη διανοητική λειτουργία. Συνολικά, έχει δημιουργηθεί η λανθασμένη εντύπωση ότι οι δραστικές μορφές καθολικά φθείρουν τους μηχανισμούς του κεντρικού νευρικού συστήματος (Bardaweel et al., 2018). Ωστόσο, σήμερα είναι γνωστό ότι η νευρική επικοινωνία απαιτεί μια συνεχή διατήρηση της ιοντικής βαθμίδωσης, βαρυσήμαντη για την πυροδότηση των δυναμικών δράσης και συνολικά για τη συναπτική σηματοδότηση (Bardaweel et al., 2018). Το ενδιαφέρον στράφηκε στην ανασταλτική σηματοδότηση στον εγκέφαλο, με μελέτες που στοχεύουν στη διερεύνηση της λειτουργίας των υποδοχέων του γάμμα-αμινοβουτυρικού οξέος (gamma-aminobutyric acid-GABA receptors). Ο Accardi και οι συνεργάτες του εξέτασαν την επίδραση των μιτοχονδριακά παραγόμενων ROS στη δραστηριότητα των GABAεργικών υποδοχέων. Η επιστημονική ομάδα κατέληξε ότι η παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια διευκολύνει την ανασταλτική σηματοδότηση, συσχετίζοντας έτσι τις ελεύθερες ρίζες με την ανασταλτική μετάδοση σήματος στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Accardi et al., 2014).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η συσχέτιση των ROS με τη γονιμότητα (Bardaweel et al., 2018). Τα σπερματικά κύτταρα είναι οι βασικοί παραγωγοί ROS στο σπέρμα. Αποδεδειγμένα, απαιτείται αυστηρή ρύθμιση των επιπέδων των ROS κατά τα διαφορετικά στάδια της σπερματογένεσης, καθώς οι παραπάνω δραστικές μορφές σχετίζονται άμεσα με τη συμπίκνωση της χρωματίνης στα σπερματικά κύτταρα, αλλά και διατήρηση του αριθμού αυτών μέσω επαγωγής πολλαπλασιασμού ή απόπτωσης (S.

J. Chen et al., 2013). Μάλιστα, τα υψηλά επίπεδα ROS επηρεάζουν τη μορφολογία και την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων, αποδεικνύοντας για ακόμα μια φορά, τη σημασία της διατήρησης του ισοζυγίου των ROS, αφού η εκτεταμένη παραγωγή ROS οδηγεί σε επιβλαβείς συνέπειες στις ιδιότητες του σπέρματος (Aziz et al., 2004).

Παράλληλα, έχει χαρακτηριστεί η σημαντική επίδραση συγκεκριμένων RNS, όπως το NO σε διάφορες φυσιολογικές κυτταρικές διεργασίες. Η σύνθεση NO στα κυτταρικά συστήματα γίνεται από τρεις ισόμορφες της συνθάσης του νιτρικού οξέος, τη νευρική συνθάση (nNOS), την επιθηλιακή συνθάση (eNOS) και την επαγωγίμη συνθάση (iNOS). Το NO που συντίθενται από την nNOS συμμετέχει στην επικοινωνία των νευρικών κυττάρων (Lundberg & Weitzberg, 2022). Ταυτόχρονα, η παραγωγή από την iNOS χρησιμεύει στους αμυντικούς μηχανισμούς στα μακροφάγα και λεία μυϊκά κύτταρα, ενώ η συνθάση eNOS μεριμνά για την διατήρηση της φυσιολογικής πίεσης του αίματος σε κύτταρα του ενδοθηλίου, της καρδιάς και του εγκεφάλου (Di Meo et al., 2016).

1.4.3 Επίδρασεις στην παθολογία

Η εκτεταμένη παραγωγή ROS μπορεί να αποτελεί αιτία εμφάνισης για ένα ευρύ φάσμα ασθενειών, από νευροεκφυλιστικές ασθένειες μέχρι καρδιομυοπάθειες (Patel et al., 2018). Σε κυτταρικό επίπεδο, η υψηλή συγκέντρωση ROS οδηγεί σε ανεπιθύμητη επαγωγή απόπτωσης, μέσω της ενεργοποίησης του αποπτοσώματος από την αλληλεπίδραση του παράγοντα ενεργοποίησης της απόπτωσης (APAF-1) με το μιτοχονδριακό κυτόχρωμα c (X. Li et al., 2016). Το κύτταρο επιλέγει μεταξύ φλεγμονής και απόπτωσης, ανάλογα με τα επίπεδα των μιτοχονδριακά παραγόμενων ROS (Patel et al., 2018).

Η πρόκληση βλαβών στο DNA και οι επακόλουθες μεταλλάξεις που προκύπτουν από αυτές σχετίζονται με ποικίλες παθολογικές καταστάσεις. Η επαγόμενη από δραστικές μορφές νευροτοξικότητα, οι καρδιοπάθειες, αλλά και ο καρκίνος αποτελούν αξιοσημείωτα παραδείγματα ασθενειών που σχετίζονται άμεσα με την οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού.

Η νόσος του Αλτσχάιμερ οφείλεται στη συσσώρευση β-αμυλοειδών πρωτεϊνών, που προκύπτει μέσω φωσφορυλίωσης και οδηγεί σε απώλεια της συναπτικής επικοινωνίας αλλά και σε εγκεφαλική ατροφία (Phaniendra et al., 2015). Η διατάραξη των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, ειδικότερα η μείωση στις δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων αλλά και των αντιοξειδωτικών ουσιών, οδηγεί στην αύξηση των ROS, με αποτέλεσμα την εναπόθεση Αβ αμυλοειδών και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία (Murakami et al., 2011). Ο ρόλος των ROS περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης 5 (Cdk5), την απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, αλλά και την αναστολή του μονοπατιού σηματοδότησης wnt, διεργασίες που καταλήγουν στην αυξημένη φωσφορυλίωση των αμυλοειδών πλακών και το σχηματισμό νευροϊνδικών συσσωματωμάτων (Hajam et al., 2022).

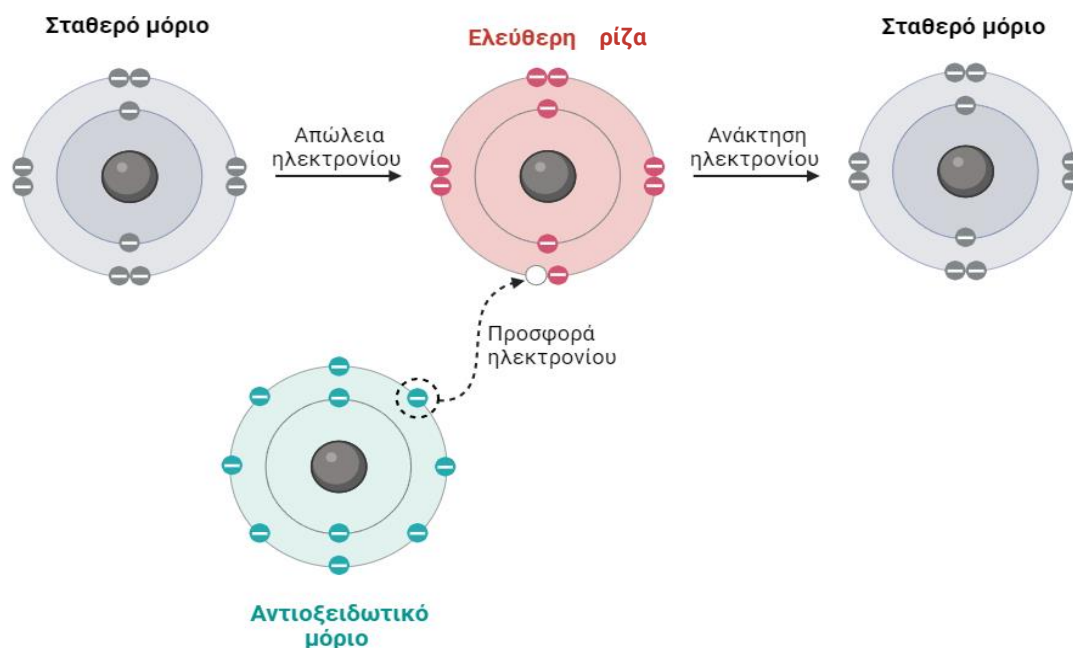
Επιπρόσθετα, ο αυξημένος σχηματισμός ROS αναδεικνύεται ως βασικός παράγοντας κίνδυνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων (Ma et al., 2020). Έχει βρεθεί ότι τα κύτταρα των τοιχωμάτων των αγγείων παράγουν υψηλά επίπεδα ROS, μέσω της οξείδωσης του NADPH, υπό παθολογικές συνθήκες (Zaric et al., 2023). Αυτό οδηγεί στη μείωση της διαθεσιμότητας του NO και κατά συνέπεια στην αδυναμία χάλασης του ενδοθηλίου των αγγείων, οδηγώντας σε αυξημένη αγγειακή πίεση (Q. Chen et al., 2018). Τα καρδιακά μυϊκά κύτταρα χρειάζονται σημαντικά ποσά οξυγόνου λόγω των υψηλών απαιτήσεων για παραγωγή ATP και εύλογα διαθέτουν αυξημένο αριθμό μιτοχονδρίων. Αυτή η υψηλή δραστηριότητα των μιτοχονδρίων στα μυϊκά κύτταρα έχει ως αποτελέσματα την οξείδωση πρωτεϊνών που απαιτούνται για την κυτταρική διέγερση και σύσπαση, μειώνοντας τα επίπεδα του NO. Η ανισορροπία αυτή οδηγεί σε αποπόλωση του μιτοχονδρίου, συσσώρευση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και τελικώς σε απόπτωση. Το ενδοπλασματικό δίκτυο υποβάλλεται και αυτό, όπως και το μιτοχόνδριο, σε καταπόνηση που στα καρδιακά μυϊκά κύτταρα μεταφράζεται σε αρρυθμίες (Zaric et al., 2023).

Η μεταγωγή σήματος που προωθείται από την ύπαρξη των ROS συμπεριλαμβάνει οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, οι οποίες συνήθως καταλήγουν στην τροποποίηση της διαμόρφωσης και λειτουργίας πρωτεϊνών και συνεπώς σε μια αποκλίνουσα απόκριση. Ο παραπάνω μηχανισμός των ROS είναι χαρακτηριστικός στον καρκίνο. Τα καρκινικά κύτταρα χρειάζονται ενεργά μιτοχόνδρια και έχουν διαρκώς αυξανόμενες μεταβολικές απαιτήσεις, με αποτέλεσμα να οδηγούνται σε υψηλές συγκεντρώσεις ROS (Sajadimajd & Khazaei, 2017). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενδυνάμωση της καρκινογόνου συμπεριφοράς και τη συσσώρευση νέων μεταλλάξεων (Bardaweel et al., 2018). Ταυτόχρονα, οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ιδιότητα να τροποποιούν χημικά το DNA, μεταβάλλοντας τόσο την ισορροπία έκφρασης ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Phaniendra et al., 2015) όσο και τη ρύθμιση του μηχανισμού καταπολέμησης του οξειδωτικού στρες μέσω του συστήματος Nrf2-Keap1 (Sajadimajd & Khazaei, 2017).

1.5 Αντιοξειδωτικά

Τα αντιοξειδωτικά αναφέρονται ως «οποιαδήποτε ουσία που εξουδετερώνει άμεσα ελεύθερες ρίζες ή δρα έμμεσα ώστε να αυξορρυθμίσει τις αντιοξειδωτικές άμυνες και να αναστείλλει την παραγωγή ελευθέρων ριζών» (Khlebnikov et al., 2007). Η εκτεταμένη ποσότητα ελευθέρων ριζών έχει συνδεθεί άμεσα με τον κυτταρικό θάνατο (Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016). Το ανθρώπινο σώμα αποκρίνεται στη συσσώρευση αυτή μέσω εγγενών μηχανισμών που βασίζονται στη δράση αντιοξειδωτικών ουσιών (Kumari & Jat, 2021). Τα αντιοξειδωτικά παρακωλύουν αποτελεσματικά την οξειδωτική διαδικασία, διαφυλάττοντας έτσι την φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και αποτρέποντας την οξείδωση μακρομορίων, όπως πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων (Kehrer & Klotz, 2015). Τα αντιοξειδωτικά φέρουν την ιδιότητα να παρέχουν ηλεκτρόνια, διακόπτοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις, μέσω της αντίδρασής τους με τις ελεύθερες ρίζες. Αυτό έχει ως

αποτέλεσμα οι αντιοξειδωτικές ενώσεις να υφίστανται οξείδωση και να χρειάζεται να αναγεννηθούν ή να υποκατασταθούν (Martemucci et al., 2022).



Εικόνα 2. Γενικό μοντέλο δράσης αντιοξειδωτικών παραγόντων. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το εργαλείο Biorender (<https://www.biorender.com/>).

Καθ' όλη την ανθρώπινη εξέλιξη, η επίκτητοι αμυντικοί μηχανισμοί του σώματος έχουν προοδευτικά ενισχυθεί για να διατηρούν μια ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ ελευθέρων ριζών και οξειδωτικού στρες. Η αποτροπή των οξειδωτικών συνεπειών των ελευθέρων ριζών μπορεί να επέλθει μέσα από ποικίλους μηχανισμούς των αντιοξειδωτικών. Αρχικά, δύνανται να αναστέλλουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών λιπαρών οξέων, αλλά και να εμποδίζουν τη διάδοση των αλυσιδωτών αντιδράσεων της αυτο-οξείδωσης. Ακόμα, λειτουργούν ως χηλικοί παράγοντες που μετατρέπουν μεταλλικά προ-οξειδωτικά ιόντα σε σταθερά προϊόντα και εξυπηρετούν ως αναστολείς των προ-οξειδωτικών ενζύμων (Carocho & Ferreira, 2013).

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να διακριθούν σε ενδογενή και εξωγενή. Τα ενδογενή περιλαμβάνουν ένζυμα, όπως η υπεροξειδική διμυσουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), και η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), αλλά και μη ενζυμικές ενώσεις, όπως η γλουταθειόνη (GSH), το λιποϊκό και ουρικό οξύ (Aguilar et al., 2016). Από την άλλη, τα εξωγενή αντιοξειδωτικά λαμβάνονται κυρίως από διατροφικές πηγές. Σε αυτά συναντώνται οι βιταμίνες E και C και ουσίες όπως οι ισοφλαβίνες, οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή (Brigelius-Flohé, 2021).

1.5.1 Ενδογενή αντιοξειδωτικά

1.5.1.1 Ενδογενή ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η υπεροξειδική δισμουτάση είναι μια μεταλλοπρωτεΐνη, η οποία αποτελεί τον πρώτο μηχανισμό άμυνας έναντι των επιβλαβών επιδράσεων των ελευθέρων ριζών. Βασική λειτουργία του ενζύμου είναι η εξάλειψη του $O_2^{\cdot-}$, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός μορίου οξυγόνου και ενός μορίου H_2O_2 (Eddaikra et al., 2021). Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί τρεις ισομορφές του ενζύμου. Η κυτταροπλασματική μορφή SOD1 (Cu/Zn-SOD), η μιτοχονδριακή μορφή SOD2 (Mn-SOD) και η εξωκυτταρική μορφή SOD3 (Cu/Zn-SOD) (L. He et al., 2017). Η λειτουργία τους δεν διαφοροποιείται σημαντικά, ωστόσο, οι ισομορφές διαφέρουν ως προς την τεταρτοταγή δομή τους, τη χρωμοσωμική περιοχή των γονιδίων τους, τους μεταλλικούς συμπράγοντες που χρειάζονται και την κυτταρική τους θέση (Eddaikra et al., 2021). Πρόσφατα, βρέθηκε μια τέταρτη ισομορφή του ενζύμου, η SOD4, η οποία σχετίζεται με το νικέλιο και εντοπίζεται σε συγκεκριμένα βακτήρια του εδάφους του γένους *Streptomyces* (Aguilar et al., 2016)

Η SOD1 απαιτεί ως συνένζυμα την παρουσία χαλκού και ψευδαργύρου. Έχει αποδειχθεί μάλιστα πως η μεταβολή της ομοιόστασης του χαλκού μπορεί να οδηγήσει σε ασθένειες στους ανωτέρους ευκαρυώτες, όπως αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) (Tokuda et al., 2013). Τα επίπεδα της ισομορφής SOD2 ρυθμίζονται μέσω της δραστηριότητας της κινάσης MAPK και η επαγωγή της έκφρασης του mRNA της SOD2 γίνεται από ουσίες όπως οι πολυφαινόλες και τα αλκαλοειδή, αλλά και από φλεγμονώδεις κυτοκίνες. Η τρίτη ισομορφή SOD3 σχετίζεται άμεσα με φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, όπως η καρδιαγγειακή και αναπνευστική ακεραιότητα (Aguilar et al., 2016).

Καταλάση (CAT)

Η καταλάση είναι ένα τετραμερές ένζυμο που περιέχει πορφυρίνη και βρίσκεται κυρίως στα υπεροξεισώματα, ενώ είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή του H_2O_2 σε μοριακό οξυγόνο και νερό (L. He et al., 2017). Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Αρχικά η καταλάση οξειδώνεται σε ένα υπερσθενές μόριο που αποδίδεται ως ένωση 1 (compound I). Αυτή η ενδιάμεση ένωση ανάγεται οδηγώντας το ένζυμο σε κατάσταση ηρεμίας με τη συμμετοχή ενός δευτέρου μορίου H_2O_2 (Mahomoodally et al., 2022). Το ήπαρ και τα ερυθροκύτταρα έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν μεγάλη δραστηριότητα του παραπάνω ενζύμου. Το ένζυμο μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε τρεις τάξεις με βάση τη δομή και την αμινοξική του αλληλουχία (Aguilar et al., 2016). Έτσι διακρίνονται η μονολειτουργική καταλάση, η καταλάση με ενεργότητα υπεροξειδάσης, που συναντάται αποκλειστικά σε βακτηριακούς οργανισμούς και η εξαρτωμένη από το μαγγάνιο καταλάση (Carocho & Ferreira, 2013). Η δραστηριότητα της καταλάσης είναι ένας σημαντικός βιοδείκτης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης και οι διαταραχές της σχετίζονται με ποικίλες ασθένειες και μολύνσεις. Χαρακτηριστικά, φέρει έναν προστατευτικό ρόλο, αφού αποτρέπει την έναρξη νευρολογικών και φλεγμονωδών

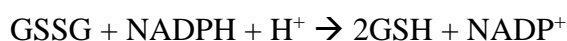
ασθενειών. Συνεπώς, σήμερα μελετάται η πιθανή θεραπευτική συνδρομή της σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος και τα καρδιαγγειακά νοσήματα (Mahomoodally et al., 2022).

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης αποτελούν μια μεγάλη ομάδα ενζύμων που εντοπίζονται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Στα σπονδυλωτά συναρμολογούνται από τέσσερις υπομονάδες και το ενεργό τους κέντρο φέρει μια σεληνοκυστεΐνη. Λειτουργικά, καταλύουν τη μετατροπή των οργανικών καρβοξυλίων σε αλκοόλη και νερό με τη βοήθεια της GSH. Ταυτόχρονα, ανάγουν το H₂O₂ σε νερό και οξυγόνο μέσω της οξείδωσης της GSH, μετατρέποντας την σε δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG) (Aguilar et al., 2016). Το ένζυμο αυτό έχει καταλυτική επίδραση στην αναστολή της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, ως εκ τούτου διασφαλίζει την κυτταρική ακεραιότητα μέσω μείωσης των ROS. Εύλογα, στις περιπτώσεις που το ένζυμο καθίσταται μη λειτουργικό παρουσιάζονται βλάβες στις μεμβράνες των κυττάρων (Santos-Sánchez et al., 2019).

Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγή της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH. Γενικά, η συσσώρευση δισουλφιδίων θεωρείται επιβλαβής για τα κύτταρα λόγω της αποδοχής της ιδέας πως η S-θειολοίωση των θειολών είναι καθοριστική για τον επαγόμενο από οξειδωτικούς παράγοντες κυτταρικό θάνατο (Kehrer et al., 2010). Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης που καταλύει η GR απαιτείται η παρουσία του συμπαραγόντα NADPH, ο οποίος υφίσταται οξείδωση. Η αντίδραση πραγματοποιείται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:



1.5.1.2 Ενδογενή μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Γλουταθειόνη (GSH)

Η γλουταθειόνη υπάρχει σε διαφορετικές οξειδοαναγωγικές μορφές στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι δύο πιο σημαντικές είναι η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) και η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Σε φυσιολογικές συνθήκες η κυρίαρχη μορφή είναι η ανηγμένη και αποτελεί το 98% της συνολικής διαθέσιμης γλουταθειόνης των κυττάρων. Η GSH χρησιμοποιείται ως συμπαραγόντας σε ενζυμικές αντιδράσεις αντιοξειδωτικών ενζύμων (Mironczuk-Chodakowska et al., 2018).

Εξωκυττάρια, η συγκέντρωση της GSH είναι μικρότερη από ότι ενδοκυτταρικά. Το τριπεπτίδιο εντοπίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια. Παρά το χαρακτηρισμό της GSH ως ένα δραστικό αντιοξειδωτικό, εμφανίζει επίσης ιδιότητες που δεν εμπλέκονται στην άμυνα έναντι

των ελευθέρων ριζών. Πιο συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί η συμμετοχή της στο μεταβολισμό των προσταγλαδινών και των λευκοτριενίων, στη μεταφορά αμινοξέων, αλλά και στην απορρόφηση θρεπτικών ιόντων, όπως το σελήνιο και ο σίδηρος (Mironczuk-Chodakowska et al., 2018).

Αδιαμφισβήτητα, η GSH μετέχει ενεργά στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της GSH εξαρτώνται από δυο βασικά χαρακτηριστικά της, την ύπαρξη ενός ψευδο-πεπτιδίου μεταξύ της κυστεΐνης και της άλφα-καρβοξυλικής ομάδας, το οποίο παρέχει προστασία έναντι αμινοπεπτιδασών, καθώς και λόγω της θειολικής ομάδας (-SH) του καταλοίπου κυστεΐνης. Η ομάδαθειόλης προσφέρει στη GSH την ιδιότητα να προστατεύει αντίστοιχες θειολικές ομάδες πρωτεϊνών από την οξειδωτική βλάβη (Mironczuk-Chodakowska et al., 2018).

Μελατονίνη

Η μελατονίνη είναι μια ένωση μικρού μοριακού βάρους που κατηγοριοποιείται ως ινδόλη. Μέχρι πρόσφατα θεωρείτο ότι βρίσκεται μόνο στα σπονδυλωτά, ωστόσο, σήμερα έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί στοιχείο των ασπόνδυλων, των ανωτέρων φυτών, αλλά και των βακτηρίων (Laudon & Frydman-Marom, 2014). Ποικίλες λειτουργίες του οργανισμού στηρίζονται στη δράση της μελατονίνης, όπως η ρύθμιση του κιρκάδιου ρυθμού, η ωρίμανση του γεννητικού συστήματος και η αναπαραγωγή στα θηλαστικά. Η αντιοξειδωτική δράση της στηρίζεται στην άμεση εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών και στην αποτροπή του σχηματισμού τους μέσω της ρύθμισης της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Η έκκριση της μελατονίνης διαφοροποιείται με τη γήρανση και τα μειωμένα επίπεδά της συσχετίζονται με υψηλή νοσηρότητα σε σχετιζόμενες με την ηλικία ασθένειες. Η στεροειδής της φύση διευκολύνει τη μεταφορά της δια μέσω μεμβρανών και την καθιστά ενεργή τόσο σε λιπόφιλες όσο και σε υδρόφιλες συνθήκες (Mironczuk-Chodakowska et al., 2018).

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ είναι μια οργανική ένωση μικρού μοριακού βάρους που παράγεται κατά το μεταβολισμό των πουρινών (Mironczuk-Chodakowska et al., 2018). Το ουρικό οξύ και η αλβουμίνη είναι τα δυο κύρια αντιοξειδωτικά που περιέχονται στο πλάσμα του αίματος, συνεισφέροντας στο 24% και 33%, αντίστοιχα, της ολικής αντιοξειδωτικής δραστηριότητας. Χαρακτηριστικά, παρατηρείται αύξηση στα επίπεδα του ουρικού οξέος στον άνθρωπο σε περιπτώσεις καρδιακής, νευρικής και οξειδωτικής βλάβης, αναδεικνύοντας τις προστατευτικές του ιδιότητες (Aguilar et al., 2016).

Το ουρικό οξύ αποικοδομείται περαιτέρω μέσω του ενζύμου ουρικάση, ωστόσο αποδείχθηκε πως το συγκεκριμένο ένζυμο είναι απενεργοποιημένο στον άνθρωπο (Aguilar et al., 2016), λόγω εξελικτικής προσαρμογής των ανθρωπίδων, που δικαιολογεί και τα υψηλότερα επίπεδα ουρικού οξέος στο αίμα (3.5–7.5 mg/dL) σε σχέση με τα υπόλοιπα θηλαστικά (0.5–1.5 mg/dL) (Maiuolo et al., 2016).

Η μεγαλύτερη συγκέντρωση ουρικού οξέος στον άνθρωπο συνδέεται άμεσα με τη σημασία της οργανικής ένωσης στην αντιοξειδωτική προστασία του οργανισμού. Το ουρικό οξύ αντιδρά και καταστέλλει ROS, όπως υπεροξυνιτρικές ρίζες, ρίζες υδροξυλίου, αλλά και λιπιδικά υπεροξειδία. Το αποτέλεσμα της δράσης του είναι ο σχηματισμός σταθερών συμπλόκων με ιόντα σιδηρού και χαλκού, οδηγώντας στην αναστολή των αντιδράσεων των ελευθέρων ριζών. Παράλληλα, το ουρικό οξύ διαπιστώθηκε πως προστατεύει αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως τις ισόμορφες τις SOD, ενώ μπορεί να ρυθμίζει τη λειτουργία των δισμουτασών μέσω ελέγχου της ενεργοποίησής τους (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018). Επίσης, δύναται να αντιδράσει το ίδιο με το H₂O₂ σχηματίζοντας ρίζες ουρικού, οι οποίες εμφανίζουν πολύ μικρότερο οξειδωτικό δυναμικό σε σχέση με ρίζες οξυγόνου. Συνεπώς, μπορούν να αντιδρούν απευθείας με το ασκορβικό οξύ για την αναγέννηση του ουρικού οξέος (Maiuolo et al., 2016).

1.5.2 Εξωγενή αντιοξειδωτικά

Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C αναφέρεται ως ένα μέλος των αναλόγων του ασκορβικού οξέος. Το ασκορβικό οξύ είναι μια υδατοδιαλυτή κετολακτόνη, με δυο ιονίζοντες ομάδες υδροξυλίου (Aguilar et al., 2016). Το ασκορβικό οξύ είναι ένας αναγωγικός παράγοντας, που υπόκειται σε δυο αλληπάλληλες αφαιρέσεις ενός ηλεκτρονίου για να σχηματιστεί η ριζά του ασκορβικού οξέος και ένα δεϋδροασκορβικό οξύ (Santos-Sánchez et al., 2019). Έχει αναφερθεί πως η βιταμίνη C είναι αποτελεσματικός παράγοντας εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών, όπως O₂⁻, H₂O₂, OH·, ¹O₂, καθώς και NO₂· σε υδατικά διαλύματα. Ταυτόχρονα, εμφανίζει και προ-οξειδωτική δράση όταν συνδυάζεται με σίδηρο και χαλκό, ανάγοντας Fe³⁺ σε Fe²⁺ και Cu³⁺ σε Cu²⁺, ενώ χρησιμοποιείται και ως συμπαράγοντας πολλών ενζύμων, όπως των υδροξυλασών (Gulcin, 2020).

Βιταμίνη E

Οι τοκοφερόλες είναι στοιχειώδεις ενώσεις των βιολογικών μεμβρανών που εμφανίζουν αντιοξειδωτικές αλλά και μη αντιοξειδωτικές λειτουργίες. Σήμερα, είναι γνωστά τέσσερα ισομερή (α-, β-, γ-, δ-), τα οποία δομικά αποτελούνται από μια κεφαλή χρωμανίου και μια πλευρική αλυσίδα φυτανίου. Τα παραπάνω στοιχεία διαμορφώνουν τον αμφιπαθή χαρακτήρα των τοκοφερολών, στις οποίες περιλαμβάνεται η βιταμίνη E. Η αντιοξειδωτική της δραστηριότητα αποδίδεται στο μοτίβο μεθυλίωσης των ισομερών αλλά και τον αριθμό των μεθυλομάδων που φέρουν. Έτσι, η κατά φθίνουσα σειρά δραστηριότητας των ισομέρων που προκύπτει, είναι α > β > γ > δ (Blokhuin et al., 2003). Οι τοκοφερόλες συντίθενται από τα φυτά και τα φύκη. Ο άνθρωπος λαμβάνει τη βιταμίνη E μέσω της διατροφής, κυρίως από λαχανικά και ξηρούς καρπούς. Από τις παραπάνω ισομορφές, η α χαρακτηρίζεται ως η πιο άφθονη στα βιολογικά συστήματα

(L. He et al., 2017). Ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός των τοκοφερολών στηρίζεται στην ικανότητά τους να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση, δίνοντας το φαινολικό υδρογόνο τους στις ρίζες υπεροξειδίου προς σχηματισμό τοκοφεροξειδικών ριζών, οι οποίες είναι μη δραστικές και δεν δύνανται να συνεχίσουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις οξειδωσης (Brigelius-Flohé, 2021).

Συνένζυμο Q10 (CoQ10)

Το συνένζυμο Q10 ονομάζεται ουβικινόνη ή ουβικινόλη, ανάλογα με την οξειδωτική κατάσταση στην οποία βρίσκεται (Raizner, 2019). Η ονομασία της ένωσης προκύπτει από τη λατινική λέξη *ubiquitarius* που σημαίνει «πανταχού παρών» (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018). Δομικά, το CoQ10 αποτελείται από δυο βασικά στοιχεία, ένα δακτύλιο βενζοκινόνης που προσδίδει ικανότητα να υφίσταται η ένωση οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και μια πολυπρενοειδή ουρά που διαμορφώνει τη λιποφιλικότητά της (Cirilli et al., 2021). Το CoQ10 συναντάται σε τρεις (3) οξειδοαναγωγικές καταστάσεις: πλήρως οξειδωμένη διαμόρφωση (σχηματισμός ουβικινόνης), ριζά ημικινόνης και πλήρως ανηγμένη διαμόρφωση (σχηματισμός ουβικινόλης) (Hidalgo-Gutiérrez et al., 2021).

Το συνένζυμο Q10 είναι παρόν σε όλους τους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού σε ποικίλες συγκεντρώσεις, με τις υψηλότερες να παρουσιάζονται σε ιστούς με αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις ή μεταβολική δραστηριότητα, όπως η καρδιά, οι νεφροί και το ήπαρ (Carocho & Ferreira, 2013). Στους παραπάνω ιστούς το συνένζυμο βρίσκεται κυρίως ως ουβικινόλη που συγκεντρώνεται στα μιτοχόνδρια, κάτι που αναδεικνύει τη σημασία του στη μιτοχονδριακή λειτουργία. Πράγματι, το CoQ10 αποτελεί συμπράγοντα των ενζυμικών μιτοχονδριακών συμπλοκών που συμμετέχουν στην OXPHOS για την παραγωγή ATP (Raizner, 2019). Ταυτόχρονα διασφαλίζει τη μεταφορά ηλεκτρονίων εκτός του μιτοχονδριακού διαμεμβρανικού χώρου, ενώ λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα του παίζει κεντρικό ρολό στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις των αφυδρογονασών και των κυτοχρωμάτων (Mirończuk-Chodakowska et al., 2018). Η συνεισφορά του στην αντιοξειδωτική άμυνα αποδίδεται στη διασφάλιση του μειωμένου σχηματισμού λιπιδικών ριζών υπεροξειδίου (LOO[•]), αλλά και την εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών μετά το σχηματισμό τους. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ιδιότητα του συνενζύμου να αναγεννάει τη βιταμίνη E, μέσω του ασκορβικού οξέος (Carocho & Ferreira, 2013). Συγκεκριμένα, η παραπάνω συμμετοχή στην αναγέννηση αντιοξειδωτικών αποδίδεται κυρίως στη μορφή της ουβικινόλης (Raizner, 2019).

Φλαβονοειδή

Η λέξη «flavo» προέρχεται από την λατινική λέξη «flavus», μια ενδιάμεση απόχρωση μεταξύ κίτρινου και κόκκινου χρώματος, χαρακτηριστική των φλαβονοειδών ενώσεων (Romero et al., 2013). Τα φλαβονοειδή είναι μια τάξη πολυφαινολικών ενώσεων που περιέχουν μια δομή γ-βένζο-πυρενίου και απαντώνται ευρέως στους φυτικούς οργανισμούς (Pizzino et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα, σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον τέσσερις χιλιάδες πολυφαινολικές ενώσεις σε όλα τα μέρη ενός φυτικού

οργανισμού από τη ριζά μέχρι τον καρπό (Gulcin, 2020). Τα φλαβονοειδή τιτλοφορούνται ως ενώσεις μικρού μοριακού βάρους και διακρίνονται σε τέσσερις επιμέρους ομάδες, το ελλαγικό οξύ, τις ανθοκυανιδίνες, τις κατεχίνες και τα κιτροφλαβονοειδή (Romero et al., 2013). Συνολικά, οι τέσσερις παραπάνω κατηγορίες αποτελούν παράγωγα της 2-φαίνυλο-χρωμόνης, η οποία δομείται από τρεις φαινολικούς δακτυλίους με χαρακτηριστικά υψηλά επίπεδα μεθυλιώσεων και υδροξυλιώσεων (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

Τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται ως αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά και έχει προταθεί ότι επιτελούν τον προστατευτικό τους ρόλο, μέσω της μείωσης της οξειδωσης των λιποπρωτεϊνών (Gulcin, 2020). Η αντιοξειδωτική τους δραστηριότητα βασίζεται στη διαμορφωτική τάση των λειτουργικών ομάδων τους: στη διάταξη, υποκατάσταση και στον αριθμό των υδροξυλομάδων τους, που αποτελούν ρυθμιστικούς παράγοντες του μηχανισμού δράσης των φλαβονοειδών (S. Kumar et al., 2013). Τα φλαβονοειδή συγκαταλέγονται στις φυτοχημικές ενώσεις, με εμφανή ικανότητα προαγωγής του ρυθμιστικού οπλοστασίου άμυνας των κυττάρων, μέσω ενεργοποίησης μονοπατιών που καταλήγουν στη διαμόρφωση μιας βέλτιστης απόκρισης στο στρες (Bjørklund & Chirumbolo, 2017). Μείζων ρόλο φαίνεται πως διαδραματίζει η χορήγηση φλαβονοειδών στη ρύθμιση της μιτοχονδριακής λειτουργίας, όπως προτάθηκε από τον Μυλωνή και τους συνεργάτες του, οι οποίοι κατέληξαν πως τα φλαβονοειδή διεγείρουν τον επαγόμενο από την υποξία παράγονται άλφα (HIF-1α) στα φυσιολογικά κύτταρα, ενώ τον αναστέλλουν στα καρκινικά, εκκινώντας έτσι μια σειρά υποθέσεων για τη διττή φύση των φλαβονοειδών ως αντιοξειδωτικά (φυσιολογικά κύτταρα) και ως προ-οξειδωτικά (καρκινικά κύτταρα) (Mylonis et al., 2010).

Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι φυσικές χρωστικές ουσίες, λιποδιαλυτής φύσης, με στοιχειώδη αντιοξειδωτική ικανότητα (Romero et al., 2013). Κατά βάση, η σύνθεσή τους πραγματοποιείται από φυτά και μικροοργανισμούς, όπου στα φυτά εντοπίζονται εστεροποιημένα με λιπαρά οξέα αλλά και σε μη εστεροποιημένη μορφή (Gulcin, 2020). Όσον αφορά τη συμμετοχή τους στην ανθρώπινη διατροφή και τη χρησιμότητά τους στην ανθρώπινη υγεία, τα καροτενοειδή εκτείνουν το φάσμα των δράσεων τους από τη ρύθμιση των χασμοσυνδέσμων μέχρι τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος (Bjørklund & Chirumbolo, 2017).

Αναντίρρητα, σήμερα, διαπιστώνεται πως μια δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε καροτενοειδή συνδέεται με το μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης ποικίλων ασθενειών που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες, όπως ο καρκίνος, οι οφθαλμολογικές και καρδιοαγγειακές παθήσεις (Monego et al., 2017). Τα καροτενοειδή μπορούν να διακριθούν σε δυο πολυπληθείς ομάδες, βάσει της χημικής τους δομής, στα καροτένια και στα οξυγονωμένα καροτενοειδή, τις ξανθοφύλλες (Carocho & Ferreira, 2013). Η κυρίαρχη αντιοξειδωτική δυναμική των καροτενοειδών στηρίζεται στην εξάλειψη του 1O_2 , κατά την οποία τα διεγερμένα καροτενοειδή διασκορπίζουν την προσλαμβάνουσα ενέργεια μέσω μιας σειράς από περιστροφικές και δονούμενες αλληλεπιδράσεις και

έτσι επιστρέφουν στη μη διεγερμένη κατάσταση, επιτρέποντας έτσι την εξάλειψη και άλλων δραστικών μορφών (Gulcin, 2020). Η παραπάνω δράση των καροτενοειδών επιτυγχάνεται υπό την προϋπόθεση ύπαρξης συζευγμένων διπλών δεσμών εντός της δομής τους (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

1.6 Κυτταρικές καταπονήσεις

1.6.1 Οξειδωτικό στρες

Το 1985, ο Sies εισήγαγε τον όρο «οξειδωτικό στρες» για να περιγράψει την ανισορροπία μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων (Di Meo et al., 2016). Ουσιαστικά, η ανισορροπία αυτή προκύπτει από την εκτενή παραγωγή ROS συνδυαστικά με την αδυναμία περιορισμού τους από τους αμυντικούς μηχανισμούς των κυττάρων, δηλαδή την επαγωγή αντιοξειδωτικής απόκρισης (Ngo & Duennwald, 2022). Το χρόνιο οξειδωτικό στρες και η επακόλουθη οξειδωτική βλάβη σχετίζονται με την πρόκληση διαφόρων ασθενειών στον άνθρωπο, όπως καρδιοαγγειακές παθήσεις και νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Alfadda & Sallam, 2012).

Οι επιπτώσεις των ROS και ο βαθμός της οξειδωτικής βλάβης καθορίζεται από την αντοχή του κυττάρου, το χρόνο και το πλαίσιο της έκθεσης (DI Meo & Venditti, 2020). Ως απόκριση στο οξειδωτικό στρες, τα κύτταρα υποβάλλονται σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου και εισέρχονται στην αδρανή φάση G₀ λόγω ενεργοποίησης του παράγοντα p21, ενός αναστολέα των κύκλο-εξαρτώμενων κινασών που ρυθμίζεται από τον παράγοντα p53 (Kumari & Jat, 2021). Οι ROS μπορούν να πυροδοτήσουν την αποφωσφορλίωση της όγκο-κατασταλτικής πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb) μέσω των παραγόντων p21 και p53, κάτι που έχει σαν αποτέλεσμα τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου (R. Kumar et al., 2021). Αξίζει να σημειωθεί πως ο παράγοντας p21 συναντάται και στη ρύθμιση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού αφού συνδέεται και σταθεροποιεί τη μεταγραφική δραστηριότητα του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 (Ngo & Duennwald, 2022). Συνολικά, τα κύτταρα ενεργοποιούν προσαρμοστικά μονοπάτια κυτταρικής επιβίωσης ως απόκριση στην έκθεση σε ROS, ενώ όταν εκτεθούν σε χρόνια ή υψηλά επίπεδα αυτών επιλέγουν αυτοφαγικά ή αποπτωτικά μονοπάτια για τον περιορισμό της βλάβης (Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016b) διατηρώντας την οξειδοαναγωγική ομοιότητα του οργανισμού (Ngo & Duennwald, 2022).

1.6.2 Αναγωγικό στρες

Το αναγωγικό στρες, προκύπτει λόγω έλλειψης ROS στα κύτταρα σε συνδυασμό με την υψηλή παρουσία αναγωγικών ισοδύναμων μορίων, τα οποία βρίσκονται σε μορφή οξειδοαναγωγικών ζευγών NAD/NADH⁺, NADPH/NADP⁺ και GSH/GSSG (Bjørklund & Chirumbolo, 2017). Μάλιστα, οι ιδίες οι ROS μπορούν να αποκρίνονται

στην αύξηση της αναλογίας NADH/NAD⁺ στη μιτοχondριακή μήτρα, οδηγώντας σε απελευθέρωση H₂O₂ από τα μιτοχόνδρια, ενώ ταυτόχρονα όταν οι αναλογίες NADH/NAD⁺, NADPH/NADP⁺ μετατοπίζονται στην ανηγμένη κατάσταση ενεργοποιείται η αντιοξειδωτική δραστηριότητα στη μιτοχondριακή μήτρα για την εξουδετέρωση των ROS (Xiao & Loscalzo, 2020). Προκύπτει λοιπόν πως το αναγωγικό στρες μπορεί να επάγει οξειδωτικό στρες, το οποίο εκ νέου οδηγεί σε αναγωγικό στρες μέσω ρύθμισης ενός κόμβου ανατροφοδότησης (Pérez-Torres et al., 2017). Χαρακτηριστικά κατά το αναγωγικό στρες, όπου οι αποδέκτες ηλεκτρονίων αναμένονται μειωμένοι, κάποιες αναγωγικές πρωτεΐνες μπορούν να προσφέρουν ηλεκτρόνια στο οξυγόνο με αποτέλεσμα να αυξάνουν το περιεχόμενο των ROS (Korge et al., 2015).

Παράλληλα, αυτή η δυναμική ισορροπία μεταξύ του οξειδωτικού και του αναγωγικού στρες επιτυγχάνεται μέσω της μιτοχondριακής ομοιόστασης, σύμφωνα με την οποία η παραγωγή ROS αλλά και αναγωγικών ζευγών κατά τη δράση της μιτοχondριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων μπορούν να ενεργοποιήσουν τόσο την μιτοχondριακή βιογένεση όσο και την αντιοξειδωτική δραστηριότητα, ώστε να αποκατασταθεί η ισορροπία και να εδραιωθεί επιτυχώς η ομοιόσταση (Singh et al., 2015). Κυτταρικά, οι μιτοχondριακά παραγόμενες ROS και η ελάττωση τους από το αναγωγικό στρες διαδραματίζουν ένα ζωτικό και απαραίτητο ρολό στη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών και το σχηματισμό των δισουλφιδικών δεσμών (Pérez-Torres et al., 2017). Όταν η μιτοχondριακή παραγωγή οξειδωτικών παραγόντων αναστέλλεται, παρατηρείται μια μείωση στα επίπεδα των δισουλφιδικών δεσμών που σχηματίζονται στα κύτταρα (Xiao & Loscalzo, 2020). Το αναγωγικό στρες οδηγεί σε απώλεια των δισουλφιδικών δεσμών και επάγει την απόκριση των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο (Maity et al., 2016).

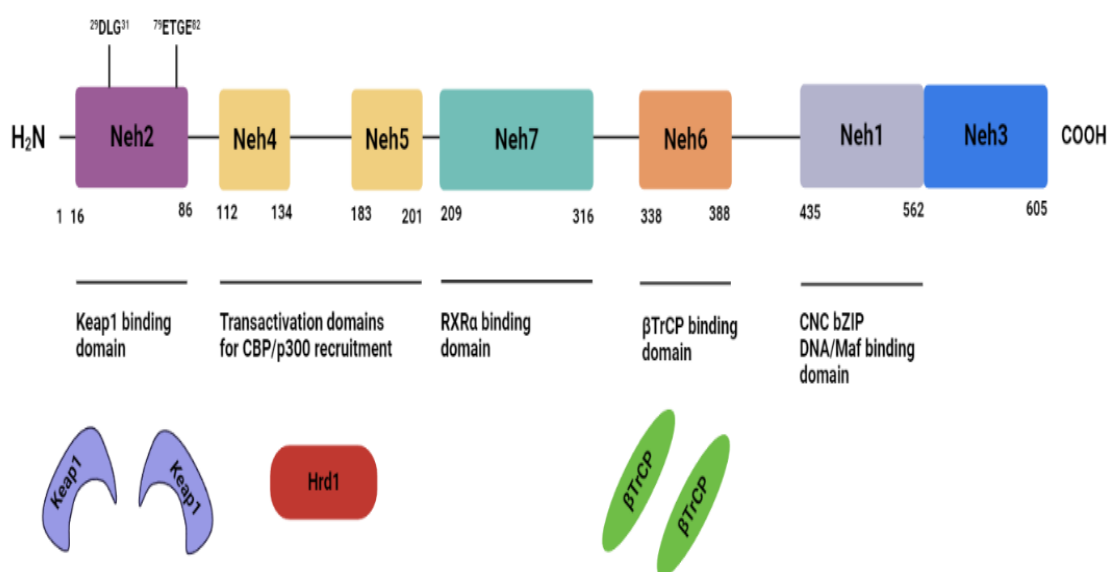
1.7 Μοριακή ρύθμιση στις επιδράσεις των ελευθέρων ριζών

Τα κύτταρα αναδιαμορφώνουν το μεταβολισμό, καθώς και τη γονιδιακή έκφρασή τους με στόχο τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης, ενόσω βρίσκονται υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες (Kasai et al., 2020). Η προσπάθεια για αντιμετώπιση της προκύψασας καταπόνησης γίνεται με την ενεργοποίηση του συσχετιζόμενου με τον πυρηνικό παράγοντα 2 των ερυθροκυττάρων παράγοντα 2, εν συντομία Nrf2 (Nuclear factor-erythroid 2 related factor 2) (Ahmed et al., 2017). Ο Nrf2 αποτελεί τον κύριο μεταγραφικό ρυθμιστή των κυτταρικών αποκρίσεων στο οξειδωτικό στρες (Ngo & Duennwald, 2022) και ο αμυντικός μηχανισμός που ενεργοποιεί φαίνεται πως είναι ευρέως διατηρημένος σε ποικίλους οργανισμούς, με τα πρώτα ορθόλογα γονίδια να εμφανίζονται στους μύκητες πριν από πενήντα εκατομμύρια χρόνια (Ulasov et al., 2022). Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, όλοι οι οργανισμοί κλήθηκαν να αντιμετωπίσουν πολυάριθμους στρεσογόνους παράγοντες και μόνο οι οργανισμοί που ήταν εξοπλισμένοι με αποτελεσματικά αμυντικά συστήματα, όπως του Nrf2, επιβίωσαν και εξελίχθηκαν (Bellezza et al., 2018).

1.7.1 Δομή Nrf2

Ο πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 είναι μέλος της υποοικογένειας των cap'n'collar πρωτεϊνών (CNC) (Sajadimajd & Khazaei, 2017) και της ευρύτερης ομάδας μεταγραφικών παραγόντων που περιέχουν φερμουάρ λεύκινης (bZip), η οποία απαρτίζεται από τους NFE2, NRF1, NRF2 και NRF3 (F. He, Antonucci, et al., 2020). Συνολικά, όλα τα μέλη της οικογένειας διατηρούν ομοιότητες με τον πυρηνικό παράγοντα 2 των ερυθροκυττάρων (NF-E2), ο οποίος συναντάται μόνο στα αιμοποιητικά κύτταρα και είναι απαραίτητος για την παραγωγή αιμοπεταλίων και την ερυθροποίηση (T. Liu et al., 2021). Ο Nrf2 αποτελεί μια πρωτεΐνη 66 kDa που απαρτίζεται από επτά καλά διατηρημένες ρυθμιστικές περιοχές, οι οποίες ονομάζονται Nrf2-ECH ομόλογες επικράτειες ή πιο συνοπτικά Neh (Ulasov et al., 2022) και έχουν τη χαρακτηριστική ιδιότητα να ετεροδιμερίζονται με το DNA αλλά και με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και ρυθμιστικά στοιχεία (Sajadimajd & Khazaei, 2017). Η περιοχή Neh1 περιέχει ένα μοτίβο φερμουάρ λεύκινης (bZip) και είναι υπεύθυνη για τον ετεροδιμερισμό του Nrf2 με το συνεργό μεταγραφικό παράγοντα του μυοαπονευρωτικού ινοσαρκώματος (Maf), καθώς και για την πρόσδεση στο DNA (Ulasov et al., 2022). Η επικράτεια Neh2 περιέχει τα χαρακτηριστικά μοτίβα αμινικών καταλοιπών ETGE και DLG που αλληλεπιδρούν ειδικώς με τη μονάδα Kelch της σχετιζόμενης με την ECH πρωτεΐνη 1 (Kelch-like-ECH-associated protein 1- KEAP1) με στόχο τη ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα (F. He, Ru, et al., 2020). Ταυτόχρονα, η επικράτεια Neh2 συνιστά μια οξειδοαναγωγικά ευαίσθητη περιοχή, απαραίτητη για τον έλεγχο της αποικοδόμησης της πρωτεΐνης (degron domain), αφού περιέχει επτά κατάλοιπα λυσίνης, τα οποία συγκροτούν μια ρυθμιστική περιοχή ως στόχο ουβικουτινίωσης από την Cul3 E3 λιγάση της ουβικουτίνης (Ngo & Duennwald, 2022). Η επικράτεια Neh3 εντοπίζεται κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης και δρα ως μια επικράτεια μετενεργοποίησης, αφού προσφέρει τη δυνατότητα στον Nrf2 να αλληλεπιδρά με την ελικάση CHD6 (Ahmed et al., 2017), η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης στο σημείο πρόσδεσης του Nrf2 (Ngo & Duennwald, 2022). Οι επικράτειες Neh4 και Neh5 αντιστοιχούν σε περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης, αφού μέσω αυτών, ο Nrf2 συνδέεται στην εξαρτώμενη από το cAMP δεσμευτική πρωτεΐνη απόκρισης (co-activator cyclic adenosine monophosphate-responsive element-binding protein-CREBP), ενώ ταυτόχρονα διακρίνονται για την αλληλεπίδρασή τους με συμπαραγόντες που εντείνουν την μεταγραφή των στόχων του μεταγραφικού παράγοντα, όπως τους RAC3, AIB1, SRC-3 (Bellezza et al., 2018). Ομοίως με την επικράτεια Neh2, η πλούσια σε σερίνη Neh6 εδραιώνεται ως σημαντική ρυθμιστική περιοχή για την αποικοδόμηση του Nrf2, μέσω της ύπαρξης ειδικών αλληλουχιών αμινοξέων, DSGIS και DSAPGS (degrons), οι οποίες συνδέονται με την β-τρανδοουκίνη (β-TrCP) (Ulasov et al., 2022). Η β-TrCP αποτελεί υποδοχέα- υπόστρωμα για τη λιγάση της ουβικιτίνης Skp1- Cul1-Rbx1/Roc1, η οποία με τη σειρά της στοχεύει τον Nrf2 για πρωτεοσωμική αποικοδόμηση (Ahmed et al., 2017). Τέλος, η επικράτεια Neh7 χαρακτηρίζεται ως η περιοχή σύνδεσης του Nrf2 με τον παράγοντα ρετινοειδούς X α ((RXRα). Η κατάληξη της παραπάνω αλληλεπίδρασης είναι η

αδυναμία στρατολόγησης συμπαράγοντων στις επικράτειες Neh4 και Neh5 και κατά συνέπεια επέρχεται η μεταγραφική καταστολή του Nrf2 (Ngo & Duennwald, 2022).



Εικόνα 3. Αναπαράσταση των επικρατειών του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 και οι βασικοί του προσδέτες. Η εικόνα δημιουργήθηκε μέσω του εργαλείου Biorender (<https://www.biorender.com/>).

1.7.2 Ρύθμιση του Nrf2

1.7.2.1 Ρύθμιση εξαρτωμένη από την Keap1

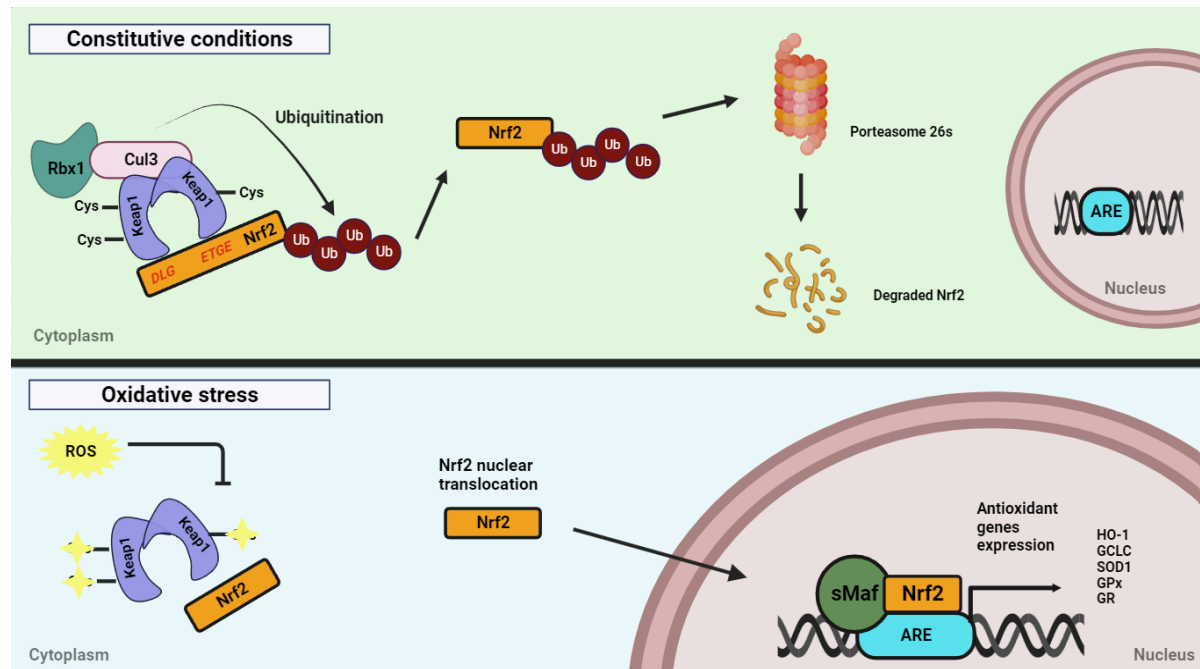
Η πρωτεΐνη Keap1 ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών BTB-Kelch, η οποία περιλαμβάνει πενήντα μέλη, τα οποία αλληλεπιδρούν με την Cul3 E3 λιγάση της ουβικουτίνης και την πρωτεΐνη RING-box 1 (Rbx1) για το σχηματισμό ενός ειδικού τύπου λιγάσης ουβικιτίνης, τις Cullin-RING E3 λιγάσες, εξειδικευμένες στην ουβικιτίνωση των BTB-Kelch πρωτεϊνών (Ngo & Duennwald, 2022). Η Keap1 αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά μέσω ελέγχου δυο υβριδίων (yeast two-hybrid) χρησιμοποιώντας ως «δόλωμα» την επικράτεια Neh2 του Nrf2 και ταυτόχρονα επαληθεύτηκε η ανασταλτική επίδρασή της στον Nrf2 μέσω χρήσης εμβρυικών ινοβλαστών επίμυων που έφεραν αναστολή έκφρασης της Keap1, τα οποία έδειξαν καθολικά υψηλά επίπεδα τόσο του Nrf2 όσο και των στόχων του (Tonelli et al., 2018a). Η ανθρώπινη Keap1 είναι μια πρωτεΐνη 69 kDa που περιέχει είκοσι επτά κατάλοιπα κυστεΐνης, τα περισσότερα από τα οποία αποτελούν προστασία από οξείδωση αλλά και σύζευξη ηλεκτρονιόφιλων (F. He, Ru, et al., 2020). Η Keap1 διακρίνεται σε τρεις λειτουργικές μονάδες (Cleasby et al., 2014). Η μονάδα BTB εξειδικεύεται στον ομοδιμερισμό της Keap1, η μονάδα IVR φέρει περίσσεια κατάλοιπων κυστεΐνης, ενώ η μονάδα Kelch είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του Nrf2 (Ulasov et al., 2022).

Η άμεση αλληλεπίδραση που εμφανίζεται μεταξύ του Nrf2 και της Keap1 αποτελεί τη βάση για την αυστηρή ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα και εμφανίζεται άμεσα εξαρτημένη από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου. Ο Nrf2 εκφράζεται σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και τα φυσιολογικά επίπεδά του είναι χαμηλά στα φυσιολογικά κύτταρα, εξαιτίας της διαμεσολαβούμενης από την Keap1 πρωτεοσωμική αποικοδόμηση (F. He, Antonucci, et al., 2020). Υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, ηλεκτρονιόφιλες ενώσεις και ROS αντιδρούν με τις κυστεΐνες-αισθητήρες, όπως οι κυστεΐνες 151 (C151), C273 και C288, οι οποίες επιτρέπουν στον Nrf2 να «αποδράσει» από τη στενή εποπτεία και την αποικοδόμηση (Canning et al., 2015). Αποτελεσματικά, ο Nrf2 οδηγείται και συσσωρεύεται στον πυρήνα, ενεργοποιώντας την έκφραση κυτταροπροστατευτικών γονιδίων (Bord et al., 2013).

Πιο συγκεκριμένα, για την επίτευξη του ελέγχου της έκφρασης του Nrf2, απαιτείται ο ομοδιμερισμός της Keap1 (Ngo & Duennwald, 2022). Η Keap1 στρατολογεί το μεταγραφικό παράγοντα, αρχικά, μέσω σύνδεσης ενός μορίου Keap1 πρωτεΐνης στο υψηλής συγγένειας αμινοξικό μοτίβο ETGE της επικράτειας Neh2, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί η σύνδεση του δευτέρου μορίου της Keap1 στο χαμηλής συγγένειας DLG μοτίβο. Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί στο «κλείδωμα» του Nrf2 από τη ρυθμιστική του πρωτεΐνη, με τέτοιο τρόπο ώστε συγκεκριμένα κατάλοιπα λυσίνης της Neh2 να προσανατολίζονται στην επιθυμητή διάταξη για τη διευκόλυνση της ουβικιτίνωσης του Nrf2 από την Cul3 E3 λιγάση και της αποικοδόμησης από το πρωτεάσωμα 26S (Ahmed et al., 2017). Το ομοδιμερές της Keap1 πραγματοποιεί την πρόσδεση αυτή στον Nrf2 μέσω των επικρατειών KELCH, με το μοτίβο ETGE να παρομοιάζεται με «μεντεσέ» (hinge), ενώ το μοτίβο DLG με «μάνταλο» (latch), με αποτέλεσμα αυτή η αλληλεπίδραση να είναι ευρέως γνωστή σήμερα ως hinge & latch αλληλεπίδραση (Bellezza et al., 2018). Όπως προκύπτει η αλληλεπίδραση Nrf2-Keap1 εμφανίζει μια στοιχειομετρία 1:2 και αποτελεί ένα μοντέλο αναγνώρισης υποστρώματος δυο σημείων (Ulasov et al., 2022). Η συναρμολόγηση του ομοδιμερούς της Keap1 επιτρέπει τη στρατολόγηση της Cul3 πρωτεΐνης και της Rbx1 πρωτεΐνης, ώστε να σχηματιστεί επιτυχώς το σύμπλοκο της E3 λιγάσης (Canning et al., 2015). Το σύμπλοκο αυτό, που συνοπτικά αναφέρεται ως CRLKEAP1 διαμεσολαβεί την πολυουβικουτινιλίωση του Nrf2 (F. He, Ru, et al., 2020). Αξιοσημείωτα, η πολυουβικουτινιλίωση αυτή πραγματοποιείται μόνο όταν Keap1 είναι σε θέση να συνδεθεί επιτυχώς και στα δυο απαιτούμενα αμινοξικά μοτίβα ETGE και DLG της Neh2 (Bellezza et al., 2018).

Στο πρόσφατο παρελθόν, η προσοχή της επιστημονικής κοινότητας στράφηκε στον ακριβή προσδιορισμό των ποσοτήτων των Keap1-Nrf2 στα κύτταρα (S. Liu et al., 2022). Παραδόξως, φαίνεται πως γίνεται λόγος για δυο άφθονες κυτταρικές πρωτεΐνες, με τα συνολικά επίπεδα τους υπό φυσιολογικές συνθήκες να κυμαίνονται από πενήντα χιλιάδες ως τριακόσιες χιλιάδες μόρια Keap1 ανά κύτταρο, ενώ τα επίπεδα του Nrf2 από σαράντα εννιά χιλιάδες έως εκατό ενενήντα χιλιάδες μόρια ανά κύτταρο (Iso et al., 2023). Εκτός από τα ποσοτικά επίπεδα του Nrf2, η ρύθμιση στοχεύει στη διαμόρφωση του χρόνου ημιζωής των δυο πρωτεϊνών, με τον Nrf2 υπό φυσιολογικές κυτταρικές

συνθήκες να σημειώνει χρόνο ημιζωής επτά με δεκαοκτώ λεπτά, ενώ η Keap1 εμφανίζει περίπου δεκατρείς ώρες, διάστημα που δύναται να μειωθεί μετά από την αντίδρασή της με στοιχεία που επάγουν την κυτταρική καταπόνηση (Ulasov et al., 2022).



Εικόνα 4. Ρύθμιση των επιπέδων του Nrf2 μέσω της ανασταλτικής πρωτεΐνης Keap1 υπό φυσιολογικές και οξειδωτικές συνθήκες. Η εικόνα δημιουργήθηκε με την εφαρμογή Biorender (<https://www.biorender.com/>).

1.7.2.2 Ρύθμιση μέσω φωσφορύλιωσης

Η φωσφορύλιωση θεωρείται μια καλά διατηρημένη ρυθμιστική μετα-μεταφραστική τροποποίηση του Nrf2 (T. Liu et al., 2021). Η αφθονία του Nrf2 σε κατάλοιπα αμινοξέων, όπως σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης, παρέχει έναν ευρύ αριθμό σημείων φωσφορύλιωσης για ποικίλες πρωτεϊνικές κινάσες (Kryszczuk & Kowalczyk, 2022). Οι φωσφορύλιώσεις αυτές στο σύνολό τους ασκούν ένα μεγάλο εύρος επιδράσεων στο μεταγραφικό παράγοντα, με πιο χαρακτηριστικές την πρωτεοσωμική αποικοδόμηση, την πυρηνική μεταφορά, την πρόσδεση στο DNA και την έξοδο από τον πηρήνα (S. Liu et al., 2022).

Η πιο συνήθης και συνάμα καθοριστική φωσφορύλιωση του Nrf2 πραγματοποιείται στην Neh2 επικράτεια, διαταρράσσοντας τη σύνδεση του μεταγραφικού παράγοντα με τη ρυθμιστική πρωτεΐνη Keap1 (Taguchi et al., 2011). Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) έχει βρεθεί πως φωσφορυλιώνει την επικράτεια Neh2 με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του Nrf2 από την Keap1 (T. Liu et al., 2021). Η οικογένεια των PKC κινασών αποτελείται από κινάσες σερίνης/θρεονίνης με πολλαπλές ισομορφές, οι οποίες περιέχουν μια καθορισμένη αμινοτελική ρυθμιστική περιοχή με μια

χαρακτηριστική αμινοξική αλληλουχία ψευδοϋποστρώματος, μια ιδιότητα που προσφέρει την αναστολή της δραστηριότητας των κινασών αυτών (Marrocco et al., 2019). Η χρήση συγκεκριμένων μορίων-ενεργοποιητών των PKC κινασών, όπως της οξικής τετραδεκανοϋλοφορβόλης (TPA), αποδείχθηκε πως μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση της έκφρασης κρίσιμων αντιοξειδωτικών γονιδίων, όπως η τρανσφεράση της γλουταθειόνης A1 (GSTA1) και η οξειδοαναγωγή της κίνησης 1 (NQO1), υποδηλώνοντας έμμεσα τη διέγερση του Nrf2 (T. Liu et al., 2021). Συμπληρωματικά, διαπιστώθηκε η ενίσχυση στην πυρηνική μεταφορά που δύναται να επάγει η PKC στον Nrf2, καθώς και επτά πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης στην επικράτεια Neh2 (Torrente & DeNicola, 2022). Η επιβεβαίωση των επίδρασεων της PKC στο μεταγραφικό παράγοντα προέκυψε από πειράματα μεταλλαξιγένεσης που ανέδειξαν την Ser40 της επικράτειας Neh2 ως το σημείο φωσφορυλίωσης από την κινάση (Kryszczuk & Kowalczyk, 2022). Παρά τα πολυσήμαντα αποτελέσματα που κατοχύρωσαν την αλληλεπίδραση PKC-Nrf2, παραμένει άγνωστο το πιο από τα ισοένζυμα της οικογένειας PKC συμμετέχει σε αυτή την τροποποίηση (Marrocco et al., 2019).

Επιπρόσθετα, η φωσφορυλίωση φαίνεται πως συντονίζει ακόμα μια θεμελιώδη για την αποικοδόμηση του Nrf2 επικράτεια, την Neh6, η οποία προσελκύει, όπως έχει προαναφερθεί, την πρωτεΐνη β-TrCP, ένα μόριο προσαρμογέα της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης ανεξάρτητο από την E3 λιγάση της ουβικουτίνης (T. Liu et al., 2021). Η παραπάνω διαδικασία αποικοδόμησης σχετίζεται άμεσα με την κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου 3 (GSK-3), μια καθολικά εκφραζόμενη κινάση με δύο κυρίες ισομορφές, την GSK-3α και την GSK-3β (Ruvolo, 2017). Το 2006, ο Salazar και οι συνεργάτες του υπέδειξαν πως η GSK-3β μπορεί απευθείας να φωσφορυλιώνει τον Nrf2 με αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης των γονιδίων-στόχων του και την καταστολή της κυτταρικής επιβίωσης υπό οξειδωτικές βλάβες, ενώ χρησιμοποίησαν και αναστολείς της GSK-3, όπως το χλωριούχο λίθιο, και διαπίστωσαν αντίθετη επίδραση, δηλαδή αύξηση στην έκφραση των γονιδίων-στόχων (Salazar et al., 2006). Η διαμεσολαβούμενη από την GSK-3 αποικοδόμηση του Nrf2 συσχετίστηκε με τα διατηρημένα αμινοξικά μοτίβα, DSGIS και DSAPGS, δηλαδή τα υποστρώματα αναγνώρισης της β-TrCP (Rada et al., 2011). Η GSK-3 φωσφορυλιώνει τα κατάλοιπα Ser335 και Ser338 εντός του μοτίβου DSGIS, παρέχοντας έτσι μια πλατφόρμα για την αλληλεπίδραση της Neh2 με την β-TrCP (Rada et al., 2012). Η πρωτεΐνη β-TrCP αναγνωρίζει το φωσφορυλιωμένο μοτίβο DSGIS και αλληλεπιδρά άμεσα με την κινάση SKP1, μέσω της επικράτειας F-box, η οποία στρατολογεί περαιτέρω τις πρωτεΐνες Cul1 και Rbx1 για τη δημιουργία του συμπλόκου αποικοδόμησης (Hayes et al., 2015). Αντίθετως, επιβεβαιώθηκε πρόσφατα ότι το μοτίβο DSAPGS ενώ προάγει την αποικοδόμηση του Nrf2 δεν ρυθμίζεται άμεσα από την κινάση GSK-3 (Chowdhry et al., 2012). Αξιοσημείωτα, το σύστημα αποικοδόμησης που βασίζεται στη δράση των GSK-3/β-TrC μπορεί να καθορίζει τα επίπεδα του Nrf2 μόνο ως απόκριση σε συγκεκριμένα ανοδικά κυτταρικά σήματα, ενώ η ρύθμιση μέσω της πρωτεΐνης Keap1 πραγματοποιείται κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (Cuadrado, 2015).

1.7.2.3 Ρύθμιση μέσω *microRNAs*

Τα τελευταία δεκαπέντε χρόνια έχει διαμορφωθεί ένα αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον για τα μικρού μήκους ρυθμιστικά μόρια RNA (*microRNAs*), τα οποία φαίνεται πως κατέχουν έναν εξέχοντα ρόλο στη ρύθμιση πολλών διαφορετικών πλευρών της κυτταρικής βιολογίας (Cheng et al., 2013). Μια από αυτές τις πλευρές φαίνεται πως είναι η οξειδοαναγωγική ομοιόσταση, στην οποία η συμμετοχή των *microRNAs* έχει πυροδοτήσει μια σημαντική προσπάθεια διερεύνησης της μετα-μεταφραστικής ρύθμισης του συστήματος Nrf2-Keap1 (Ashrafizadeh et al., 2020). Στο παρελθόν, ένα πλήθος *in silico* αναλύσεων υπέδειξαν πιθανά *microRNAs* που επιδρούν στα πυρηνικά αλλά και κυτταροπλασματικά επίπεδα του Nrf2 και μάλιστα με έναν ανεξάρτητο από την Keap1 τρόπο (Kurinna & Werner, 2015). Συνολικά, έχουν ταυτοποιηθεί ογδόντα πέντε πιθανά *microRNAs* που αλληλεπιδρούν με τον Nrf2, με τα εξήντα τρία από αυτά να διακρίνονται για τις ρυθμιστικές τους ιδιότητες στο μεταγραφικό παράγοντα (Cheng et al., 2013). Τέσσερα μόρια RNAs (miR-27a, miR-142-5p, miR-144, miR-153) από τα παραπάνω πρωταγωνιστούν ως καθοριστές της μοίρας της αντιοξειδωτικής άμυνας, με όλο και περισσότερα *in vivo* πειράματα να επιβεβαιώνουν τη σημασία τους (Zhang et al., 2015). Πιο συγκεκριμένα, αποδείχθηκε πρόσφατα πως το μόριο miR-144 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε δικτυοερυθροκύτταρα ασθενών με δρεπανοκυτταρική αναιμία, κάτι που συνοδεύτηκε από μειωμένη αντιοξειδωτική δραστηριότητα στους ασθενείς, λόγω εξασθένισης της σηματοδότησης του Nrf2 (Ashrafizadeh et al., 2020). Ένα από τα πιο διεξοδικά μελετημένα *microRNAs*, μέχρι σήμερα, είναι το miR-153. Η μελέτη της δράσης του σε καρδιοπάθειες, απέδειξε πως το miR-153 μπορεί να επάγει την αύξηση των ROS στα καρδιομυοκύτταρα και ταυτόχρονα η στόχευση και η μειορύθμιση του συγκεκριμένου ρυθμιστικού μορίου οδήγησε σε ενεργοποίηση του συστήματος του Nrf2 στα κύτταρα αυτά, μειώνοντας τα επίπεδα απόπτωσής τους (F. He, Ru, et al., 2020). Η προσοχή των επιστημόνων στράφηκε στη συμμετοχή του miR-153 στον καρκίνο, μια πάθηση με εμφανώς διαταραγμένη αντιοξειδωτική άμυνα, και διαπιστώθηκε πως σε κυτταρική σειρά του καρκίνου του μαστού επέρχεται αναστολή της δράσης του Nrf2 και συνεπώς μείωση της απόπτωσης και ενίσχυση του αποικισμού των καρκινικών κυττάρων (Kurinna & Werner, 2015). Η δράση των *microRNAs* στη διαμόρφωση κυτταρικών σηματοδοτικών γεγονότων, στη ρύθμιση του επιγενετικού προγράμματος, σε σχετιζόμενες με την ηλικία ασθένειες, αλλά και στο προσδόκιμο ζωής φαίνεται πως θα κυριαρχήσει στο άμεσο μέλλον, αποκαλύπτοντας έτσι μια πληθώρα νέων δεδομένων για την πολυπολοκότητα της ρύθμισης του Nrf2 (Kryszczuk & Kowalczyk, 2022).

1.7.2.4 Μεταγραφική ρύθμιση Nrf2

Δεδομένου του μεγάλου εύρους σημάτων που δύνανται να ενεργοποιήσουν τον Nrf2, αλλά και των ποικίλων κυτταρικών διεργασιών που συντονίζει, η ρύθμιση της δραστηριότητάς του είναι πολύπλοκη και πολυεπίπεδη. Ως εκ τούτου, είναι αναγκαία

η ρύθμισή του στο επίπεδο της μεταγραφής (Tonelli et al., 2018a). Το γονίδιο του Nrf2 ονομάζεται NFE2L2 και κατευθύνει τη μεταγραφή του μέσω ενός πλήθους σημάτων, με κυριότερο από όλα να αποτελεί ο υποδοχέας υδρογονανθράκων αρυλίου (aryl hydrocarbon receptor, AhR) ο οποίος αρχικά βρέθηκε ότι δρα ως απόκριση στην έκθεση σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (F. He, Ru, et al., 2020). Ο υποδοχέας αυτός συνδέεται ως ετεροδιμερές με έναν πυρηνικό μεταφορέα, τον Arnt, σε στοιχεία απόκρισης σε ξενοβιοτικά (xenobiotic response elements, XREs), τα οποία είναι αλληλουχίες ενεργοποίησης της μεταγραφής του γονιδίου Nfe212 και συναντώνται εντός του υποκινητή του (Tonelli et al., 2018a). Επιπρόσθετα, ο υποκινητής του γονιδίου του Nrf2 φέρει καθορισμένο σημείο πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα (NF)-κB και έχει προσδιοριστεί ότι η υψηλή έκθεση λιποπολυσακχαριτών (LPS) είναι αυτή που διεγείρει την δρομολόγηση του (NF)-κB για τη μεταγραφή του Nfe212 (Rushworth et al., 2012). Μάλιστα σε μοντέλα ιδιοσύστατης έκφρασης του NF-κB σημειώθηκαν εμφανώς υψηλότερα των φυσιολογικών επίπεδα Nrf2 (Tonelli et al., 2018a). Ομοίως, έχει δειχθεί πως όγκο-προωθητικά σήματα, όπως οι κινάσες Kras, B-Raf, ο μεταγραφικός παράγοντας Myc, αλλά και μονοπάτια όπως το PI3K-Akt και το Notch μπορούν να πυροδοτήσουν αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου Nfe212, αποτελώντας έτσι έναν πιθανό μηχανισμό αυξημένης έκφρασης του Nrf2 στα καρκινικά κύτταρα (Wakabayashi et al., 2023). Ωστόσο, έχουν ταυτοποιηθεί αντιοξειδωτικές αλληλουχίες απόκρισης (AREs) εντός του ίδιου του υποκινητή του Nfe212, δίνοντας το πλεονέκτημα στον Nrf2 να ενεργοποιεί τη μεταγραφή του γονιδίου του και παρέχοντας ένα μηχανισμό θετικής ανατροφοδότησης που ενισχύει τη δράση του Nrf2 (F. He, Ru, et al., 2020).

1.7.3 Δράση και γονίδια-στόχοι του Nrf2

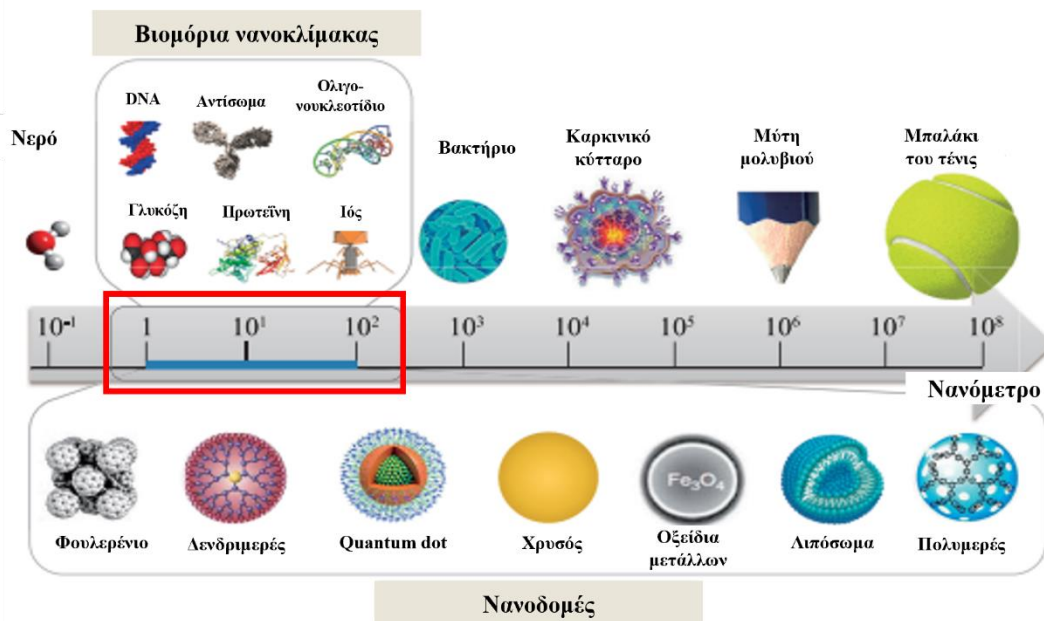
Η δραστηριότητα του Nrf2 δεν καθορίζεται μόνο από τους παραπάνω τρόπους ρύθμισης, αλλά σχετίζεται άμεσα και με τη διαμόρφωση των απαραίτητων συνθηκών για την ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων του, δηλαδή των αντιοξειδωτικών γονιδίων (Ahmed et al., 2017). Οι συνθήκες αυτές αφορούν κυρίως τη διαθεσιμότητα των απαραίτητων συμπαραγόντων του μεταγραφικού παράγοντα, αλλά και την παρουσία ειδικών αλληλουχιών στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων του, που ονομάζονται στοιχεία απόκρισης στα αντιοξειδωτικά (AREs), ενώ παραθέτονται και ως στοιχεία απόκρισης ηλεκτρονιόφιλων (EpREs) (S. Liu et al., 2022). Τα AREs είναι *cis*-αλληλουχίες ενίσχυσης, οι οποίες φέρουν μια κεντρική αλληλουχία 5'-TGACnnnGC-3' και βρίσκονται στην περιοχή του υποκινητή όλων των κυτταροπροστατευτικών γονιδίων αλλά και γονιδίων ένζυμων φάσης II (Ngo & Duennwald, 2022). Επιπρόσθετα, ο μεταγραφικός παράγοντας προκειμένου να επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του θα πρέπει να δημιουργήσει ετεροδιμερή με τις πρωτεΐνες sMafs για την αναγνώριση των AREs των γονιδίων (Tonelli et al., 2018a). Οι πρωτεΐνες sMafs είναι μέλη της οικογενείας των bZip μεταγραφικών παραγόντων και φέρουν μια ζώνη πρόσδεσης στο DNA, καθώς και ένα φερμουάρ λευκίνης που επιτελεί τον ετεροδιμερισμό τους με CNC πρωτεΐνες, όπως ο Nrf2 (Bellezza et al., 2018).

Από την ανακάλυψη του Nrf2 το 1994, όταν και προσδιορίστηκε ως μεταγραφικός παράγοντας για τα γονίδια των βήτα-αιμοσφαιρινών, έχει πραγματοποιηθεί ένα πλήθος μελετών που αποκάλυψαν έναν ευρύτατο άξονα γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα, κυρίως γονίδια που σχετίζονται με την απόκριση στο οξειδωτικό στρες και την αποτοξίνωση φαρμάκων (F. He, Ru, et al., 2020). Η στόχευση από τον Nrf2 δημιουργεί ένα δίκτυο συνεργαζόμενων ενζύμων που συμμετέχουν στις φάσεις I, II, και III του μεταβολισμού αλλά και στη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014). Τα ένζυμα τις φάσης I μεριμνούν για την οξείδωση και αναγωγή των ξενοβιοτικών ουσιών και συμπεριλαμβάνονται σε αυτή την κατηγορία ένζυμα όπως, η αφυδρογονάση 1 της κινόνης (NQO1), οι αναγωγάσες των καρβονυλίων (CBRs), οι αναγωγάσες των αλδοκετονών (AKRs), η αλδεϋδική αφυδρογονάση 1 (ALDH1), και συγκεκριμένα μέλη οξειδοαναγωγασών του κυτοχρώματος P450 (CYPs) (Wu et al., 2012). Στα ένζυμα της φάσης II συναντώνται ενώσεις που καταλύουν αντιδράσεις σύζευξης, όπως η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), η UDP-γλυκοζυλοτρανσφεράση (UGT) και η οξυγενάση της αίμης 1 (HO-1) (F. He, Ru, et al., 2020). Ταυτόχρονα, στη φάση III συμμετέχουν ένζυμα μεταφοράς των συζευγμένων μεταβολιτών που προκύπτουν από τη φάση I, κυρίως μεταφορείς εκροής φαρμάκων, όπως οι πρωτεΐνες σχετιζόμενες με αντίσταση φαρμάκων (MDR) και η πρωτεΐνη ανθεκτικότητας του καρκίνου του μαστού (BCRP) (Wu et al., 2012).

Ένα βασικό αντιοξειδωτικό μονοπάτι που ρυθμίζεται εξ ολοκλήρου από τη δράση του Nrf2 είναι αυτό της γλουταθειόνης (GSH), σε επίπεδο σύνθεσης, αξιοποίησης και αναγέννησης (F. He, Ru, et al., 2020). Πιο συγκεκριμένα, ένζυμα όπως η καταλυτική (GCLC) και η ρυθμιστική (GCLM) υπομονάδα της λιγάσης της γλουταμικής κυστεΐνης, καθώς και η συνθετάση της γλουταθειόνης (GSS) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) αποτελούν στόχους μεταγραφής του Nrf2 (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014). Ταυτόχρονα, ως μεταγραφικός παράγοντας εκκινεί τη μεταγραφή ενζύμων που καταλύουν την εξουδετέρωση ROS, όπως τα γονίδια της θειορεδοξίνης, της GPx, της SOD1 και της CAT (Tonelli et al., 2018a). Το σύνολο των παραπάνω κυτταροπροστατευτικών πρωτεϊνών κωδικοποιούνται από στοχεύομενα από τον Nrf2 γονίδια και είναι στοιχειώδη για την προστασία έναντι ενός πλήθους τοξικών και οξειδωτικών προσβολών (F. He, Ru, et al., 2020).

1.8 Νανοϋλικά

Τα τεχνητά νανοϋλικά είναι υλικά ανθρωπογενούς προέλευσης, κατασκευασμένα με επιθυμητά τεχνικά χαρακτηριστικά, των οποίων τουλάχιστον μία εξωτερική διάσταση βρίσκεται εντός της νανοκλίμακας, δηλαδή από 1-100 nm (Auffan et al., 2009). Τα τεχνητά νανοϋλικά χαρακτηρίζονται από το εξαιρετικά μικρό μέγεθος και τον υψηλό λόγο επιφάνειας προς μάζα, δυο ιδιότητες που τους προσδίδουν μοναδικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και τα διαφοροποιούν σημαντικά από υλικά μεγαλύτερης κλίμακας (Jeevanandam et al., 2018).



Εικόνα 5. Κατηγορίες σωματιδίων της νανοκλίμακας (Saallah & Lenggoro, 2018).

Παρά την πληθώρα πλεονεκτημάτων που παρέχουν τα τεχνητά νανοϋλικά, η ραγδαία ανάπτυξη και ενσωμάτωση σε διάφορους τομείς της καθημερινότητας εγείρει έντονες ανησυχίες για την ανθρώπινη υγεία και ασφάλεια (Vardakas et al., 2022). Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των τεχνητών νανοϋλικών σχετίζονται άμεσα με τις επιδράσεις τους στα βιολογικά συστήματα (Pietrojusti, 2012). Ως εκ τούτου, είναι κρίσιμης σημασίας όχι μόνο η μελέτη του βιολογικού τους αποτυπώματος, αλλά και ο προσδιορισμός των μηχανισμών μέσω των οποίων προκαλούν επιβλαβείς φαινοτύπους (Vardakas et al., 2022).

Η νέα εποχή της Νανομηχανικής φέρνει δυο σημαντικές παραμέτρους στο προσκήνιο, τις πιθανές επιπτώσεις της ανθρώπινης έκθεσης και το περιβαλλοντικό αποτύπωμα (Vardakas et al., 2022). Η πιο συχνή και έντονη έκθεση στα τεχνητά νανοϋλικά εντοπίζεται στο εργασιακό περιβάλλον, μέσω της εισπνοής αέριων νανοσωματιδίων (Boyes & Van Thriel, 2020). Η διεξαγωγή πολλαπλών τοξικολογικών μελετών έχει υποδείξει τις ισχυρές αλληλεπιδράσεις των τεχνητών νανοϋλικών με το ενδογενές οξειδοαναγωγικό σύστημα, με αποτέλεσμα το οξειδωτικό στρες να αποτελεί μηχανισμό-κλειδί για την αποδοτικότερη κατανόηση των πιθανών βιολογικών τους επιδράσεων (Horie & Tabei, 2021).

Ειδικότερα, στο σύνολο των διαφορετικών τεχνητών νανοϋλικών εντοπίζεται ένας κοινός τοξικολογικός μηχανισμός, ο οποίος περιλαμβάνει τη διατάραξη της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας μέσω της παραγωγής ROS (Kodali & Thrall, 2015). Η διατάραξη της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης μπορεί να οφείλεται είτε στην εκτενή συσσώρευση ελευθέρων ριζών και δραστικών μορφών είτε στην αδυναμία της κυτταρικής αντιοξειδωτικής άμυνας να αποκαταστήσει την επικείμενη βλάβη (Zhang, Wu, et al., 2021). Οι προ-οξειδωτικές ιδιότητες των νανοϋλικών αποτελούν σημαντικό ζήτημα στο πεδίο της Νανοτεχνολογίας, καθότι τίθενται υπό διερεύνηση ολοένα και

περισσότερες πιθανές κλινικές χρήσεις των τεχνητών νανοϋλικών (Vardakas et al., 2022).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, διαπιστώνεται η διττή φύση των τεχνητών νανοϋλικών, η οποία από τη μια παρέχει σημαντικά τεχνικά πλεονεκτήματα, ενώ από την άλλη επάγει τοξικές επιδράσεις στα βιολογικά συστήματα. Αυτή η ασαφής κατάληξη των επιδράσεων των νανοϋλικών πηγάζει από το πλήθων των τεχνικών χαρακτηριστικών τους, με τα τέσσερα πιο καθοριστικά να είναι το μέγεθος, το διάκενο ζώνης, οι ιδιότητες της επιφάνειας και η χημική σύσταση (Vardakas et al., 2021). Ειδικότερα, το εξαιρετικά μικρό μέγεθος προσδίδει τη δυνατότητα στα τεχνητά νανοϋλικά να διαπερνούν τους βιολογικούς φραγμούς των οργανισμών, καταλήγοντας στη συστηματική κυκλοφορία (Pietrojusti et al., 2013). Αναπόφευκτα, το μέγεθος των τεχνητών νανοϋλικών συνδέεται άμεσα με την δραστικότητα που εμφανίζει η επιφάνειά τους, καθώς όσο αυξάνεται η αναλογία επιφάνειας ανά μονάδα μάζας τόσο ενισχύεται η δραστικότητα αυτής (Manke et al., 2013). Αυτή η υψηλή δραστικότητα έχει ως αποτέλεσμα την προσκόλληση οξειδωτικών παραγόντων και ελευθέρων ριζών στην επιφάνεια των τεχνητών νανοϋλικών, όπως οι ρίζες $O_2^{\cdot-}$ και OH^{\cdot} (Dayem et al., 2017).

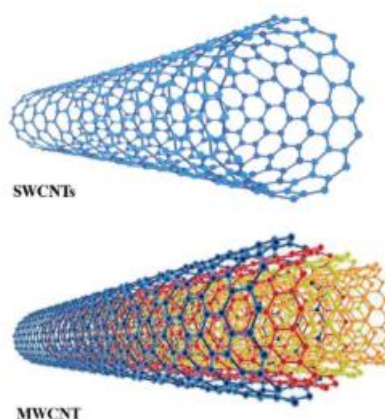
1.8.1 Νανოსωλήνες άνθρακα

Οι νανοςωλήνες άνθρακα (carbon nanotubes, CNTs) είναι κυλινδρικά αλλότροπα άνθρακα με διαστάσεις εντός της νανοκλίμακας με εκτεθειμένα ή επενδυμένα άκρα (Vardakas et al., 2023). Δομικά, άτομα άνθρακα με υβριδισμό sp^2 διατάσσονται σε εξαγωνικές συστυχίες, διασυνδεδεμένες για το σχηματισμό ενός φύλλου γραφενίου, το οποίο περιτυλίγεται σε κυλινδρική διαμόρφωση, προκειμένου να προσδώσει στους CNTs το χαρακτηριστικό τους σχήμα (Eatemadi et al., 2014). Ο αριθμός των στρωμάτων γραφενίου που δομούν τους CNTs τους διακρίνουν σε μονοφλοιϊκούς νανοςωλήνες άνθρακα (single-walled carbon nanotubes, SWCNTs) και πολυφλοιϊκούς (multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs) (De Volder et al., 2013).

Από την ανακάλυψη τους το 1991 από τον Iijima (Iijima, 2002), οι CNTs έχουν ενσωματωθεί σε ένα αξιόλογο αριθμό ερευνητικών και βιομηχανικών πεδίων, λόγω των εξεχόντων χαρακτηριστικών τους, όπως η θερμική αγωγιμότητα, η χημική δραστικότητα και η βιοδιαθεσιμότητα (Norizan et al., 2020). Αξιοσημείωτα, στον τομέα των βιοϊατρικών εφαρμογών, οι CNTs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοαισθητήρες για την ανίχνευση βιοδεικτών (Sireesha et al., 2018), ως ικρίωματα στη μηχανική ιστών και στην αναγεννητική ιατρική (Tanaka et al., 2020) και ως φωτοχημικοί μετατροπείς στη θεραπεία του καρκίνου (Sobhani et al., 2017).

Επίσης, οι CNTs λόγω της χαρακτηριστικής δομής τους χαρακτηρίζονται από υψηλή ηλεκτρονιακή συγγένεια, που τους επιτρέπει να λειτουργούν ως «παγίδες» ελευθέρων ριζών σε αλυσιδωτές αντιδράσεις *in vitro* (Zhang, Wang, et al., 2021). Η ενισχυμένη δυνατότητα των CNTs να προσφέρουν αλλά και να δέχονται ηλεκτρόνια αποδίδεται στη δομή τους, αφού συγκροτούνται από πολυάριθμες σειρές από διπλούς δεσμούς,

που τους καθιστούν ικανούς να αντιμετωπίζουν την έλλειψη ή περίσσεια ηλεκτρονίων (Wen et al., 2020).



Εικόνα 6. Δομή των μονοφλοιϊκών και πολυφλοιϊκών νανοσωλήνων άνθρακα (Norizan et al., 2020).

1.8.2 Μηχανισμοί παραγωγής ROS

Οι μηχανισμοί παραγωγής ROS από τα τεχνητά νανοϋλικά μπορεί να είναι άμεσοι αλλά και έμμεσοι (Zhang, Wang, et al., 2021). Οι άμεσες οδοί παραγωγής ROS εξαρτώνται κυρίως από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, ενώ οι έμμεσες σχετίζονται κυρίως με βλάβη της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Πιο συγκεκριμένα, τα τεχνητά νανοϋλικά μπορούν να διεισδύσουν στο μιτοχονδριακό χώρο, προξενώντας δομικές και λειτουργικές αλλαγές που τροποποιούν τη δυναμική των μιτοχονδρίων (Vardakas et al., 2022). Επίσης, τα τεχνητά νανοϋλικά μπορούν να ενεργοποιήσουν το φαγοκυτταρικό σύστημα της οξειδάσης του NADPH, ως έναν μηχανισμό απόκρισης στην είσοδο των τεχνητών νανοϋλικών στο κύτταρο, οδηγώντας σε παραγωγή ROS και RNS (Mendoza & Brown, 2019).

Σε ότι αφορά τους άμεσους μηχανισμούς παραγωγής ROS, το μέγεθος των τεχνητών νανοϋλικών καθορίζει την κυτταρική απόκριση, καθώς επηρεάζει μια σειρά από παραμέτρους, όπως το μηχανισμό εσωτερίκευσης, το ρυθμό πρόσληψης, την κινητική των αντιδράσεων που συμβαίνουν ενδοκυτταρικά και την κυτταρική κατανομή που (Shang et al., 2014). Έχει αποδειχθεί ότι τα τεχνητά νανοϋλικά εισέρχονται στο κύτταρο μέσω ενεργητικής ενδοκύτωσης, αλλά και παθητικών μηχανισμών, με την ενδοκύτωση ωστόσο να συνιστά το πιο κοινό μονοπάτι (Sabourian et al., 2020). Καθοριστικός παράγοντας για τον τρόπο εισόδου στα κύτταρα είναι η κλίμακα μεγέθους των υλικών, καθώς αυτά που κινούνται εντός μερικών εκατοντάδων nm εισρέουν μέσω πινοκύτωσης, ενώ αυτά που ξεπερνούν τα 200 nm εισέρχονται στο κύτταρο μέσω ενδοκύτωσης, καθοδηγούμενης από μόρια κλαθρίνης (Foroozandeh & Aziz, 2018). Σχετικά με την επίδραση του μεγέθους στη συχνότητα της κυτταρικής πρόσληψης, έχει διαπιστωθεί ότι τα 50 nm είναι το ιδανικό μέγεθος για εσωτερίκευση

(Vardakas et al., 2022). Παράλληλα, σε επίπεδο ιστών, τα εξαιρετικά μικρού μεγέθους τεχνητά νανοϋλικά μπορούν να διαπεράσουν τους επιθηλιακούς και ενδοθηλιακούς φραγμούς, καταλήγοντας στην λεμφική και αιματική κυκλοφορία και ακολούθως στα εσωτερικά όργανα, όπου και δύνανται να προκαλέσουν τοξικότητα (Sukhanova et al., 2018).

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης πολυφλοϊικών νανοσωλήνων άνθρακα μη τροποποιημένων (CNTs-Ref), καρβοξυλιωμένων (CNTs-COOH) και υβριδικών με μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (CNTs@Fe₃O₄ και CNTs@ZnFe₂O₄) στη βιωσιμότητα και στην έκφραση κρίσιμων αντιοξειδωτικών γονιδίων των μακροφάγων κυττάρων μύων RAW264.7. Ειδικότερα, τα κύτταρα εκτέθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων (12.5, 25, 50, 100 και 200 μg/ml) των πολυφλοϊικών νανοσωλήνων άνθρακα για 8 ώρες, χρονικό διάστημα που αντιστοιχεί σε μία τυπική εργασιακή συνθήκη. Σε αυτό το πλαίσιο, προσδιορίστηκαν οι επιδράσεις των νανοσωλήνων άνθρακα στην κυτταρική βιωσιμότητα με τη χρήση της χρωματομετρικής μεθόδου XTT. Ακολούθως, εκτιμήθηκαν οι επιδράσεις μη κυτταροτοξικών συγκεντρώσεων των νανοσωλήνων άνθρακα στην έκφραση γονιδίων-στόχων του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, τα οποία σχετίζονται με τη ρύθμιση της γλουταθειόνης, σε μεταγραφικό και πρωτεϊνικό επίπεδο.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Νανοσωλήνες άνθρακα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν οι επιδράσεις τεσσάρων τεχνητών νανοϋλικών, τα οποία υπάγονται στην κατηγορία των πολυφλοϊϊκών νανοσωλήνων άνθρακα. Η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός τους διενεργήθηκαν στο εργαστήριο Προηγμένων και Συνθέτων Υλικών, Νανοϋλικών, Νανοδιεργασιών και Νανοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Στη συνέχεια, απεστάλησαν στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την εκτίμηση των βιολογικών τους επιδράσεων.

Τα υλικά της παρούσας μελέτης συγκαταλέγονται στους πολυφλοϊϊκούς νανοσωλήνες άνθρακα και επιγραμματικά θα αναφέρονται από εδώ και στο εξής ως CNTs-Ref, CNTs-COOH, CNTs@Fe₃O₄ και CNTs@ZnFe₂O₄. Οι CNTs-Ref είναι μη τροποποιημένοι πολυφλοϊϊκοί νανοσωλήνες άνθρακα, οι οποίοι συντέθηκαν μέσω της μεθόδου χημικής εναπόθεσης ατμών (Chemical Vapor Deposition, CVD) με καταλύτη κατιόντα δισθενούς (Fe²⁺) και τρισθενούς (Fe³⁺) σιδήρου, προσροφημένα σε σωματίδια ζεολίθου. Οι CNTs-COOH είναι καρβοξυλιωμένοι πολυφλοϊϊκοί νανοσωλήνες άνθρακα, οι οποίοι αναπτύχθηκαν μέσω καθαρισμού των CNTs-Ref, μετά την έξοδο από το σύστημα CVD, με τη χρήση διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH), συγκέντρωσης 1 M για την απομάκρυνση του ζεολίθου και με τη διαδοχική υποβολή στο σύστημα απομόνωσης Soxhlet για την απομάκρυνση των σωματιδίων σιδήρου. Ακολούθησε η τροποποίηση της επιφάνειάς τους με τη χρήση νιτρικού καιθειϊκού οξέος και την έκπλυση με απιονισμένο νερό μέχρι τη διαμόρφωση ουδέτερου pH.

Τουναντίον, για τη σύνθεση των υβριδικών νανοσωλήνων άνθρακα με νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (CNTs@Fe₃O₄) είναι απαραίτητη η προκαταρκτική σύνθεση των μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (Fe₃O₄). Η διαδικασία σύνθεσης εμπεριέχει την ελεγχόμενη υδρόλυση υδατικού διαλύματος δισθενούς και τρισθενούς χλωριούχου σιδήρου υπό την παρουσία κιτρικού νατρίου για την αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων. Το προκύπτον διάλυμα διασποράς φυγοκεντρήθηκε στα 7000 rpm για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα σωματίδια επαναδιαλύθηκαν σε δις απιονισμένο νερό, μέσω συσκευής υπερήχων, μια διαδικασία που επαναλήφθηκε τρεις φορές. Οι καθαρισμένες σκόνες αφυδατώθηκαν πλήρως μέσω ξηραντήρα. Στην συνέχεια, τα δείγματα απασβεστώθηκαν περαιτέρω για 3 ώρες σε φούρνο στους 500 °C, με συχνότητα θέρμανσης στους 5 °C min⁻¹. Έτσι, παρήχθησαν σωματίδια αιματίτη (Fe₂O₃), τα οποία θερμάνθηκαν για 4 ώρες στους 350 °C σε φούρνο υδρογόνου και το αποτέλεσμα ήταν ο σχηματισμός σωματιδίων μαγνητίτη (Fe₃O₄). Τα παραχθέντα μαγνητικά σωματίδια χρησιμοποιήθηκαν ως καταλύτης για την ανάπτυξη των νανοσωματιδίων άνθρακα και την τελική παραγωγή των CNTs@Fe₃O₄. Με αντίστοιχο τρόπο προέκυψαν τα σωματίδια ZnFe₂O₄ για την παραγωγή των CNTs@ZnFe₂O₄.

3.2 Διασπορά νανοσωλήνων άνθρακα και προετοιμασία διαλυμάτων

Η ξηρά σκόνη που παραλήφθηκε ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας και προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα μείγματος 5% διμεθυλοσουλφοξειδίου (dimethylsulfoxide, DMSO) σε απιονισμένο ύδωρ (dH₂O), ώστε να προκύψει αρχικό stock συγκέντρωσης 2 mg/ml. Έπειτα, το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε σε συσκευή υπερήχων (UP400S, Hielscher), μέσω της οποίας το διάλυμα υπεβλήθη σε υπερήχους με 70% πλάτος κύματος και 0,7 δευτερόλεπτα χρόνο παλμού για ένα διάστημα 10 λεπτών, με σκοπό τη μέγιστη δυνατή διασπορά των υλικών εντός του διαλύτη. Το αρχικό stock χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή αραιωμένων διαλυμάτων, μετά από διαδοχικές αραιώσεις σε θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), απουσία εμβρυϊκού βόειου ορού (fetal bovine serum, FBS). Τελικώς, διαμορφώθηκε το εύρος συγκεντρώσεων 12.5, 25, 50, 100 και 200 μg/ml.

3.3 Κυτταρική σειρά

Η κυτταρική σειρά που επιλέχθηκε για την παρούσα τοξικολογική μελέτη ήταν τα RAW264.7. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται λόγος για μακρόφαγα κύτταρα μυ, τα οποία απομονώθηκαν για πρώτη φορά το 1978 από τον WC Raschke, από όγκο προκαλούμενο από τον ιό της λευχαιμίας Abelson. Τα μακροφάγα κύτταρα αποτελούν μια κυτταρική σειρά του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος. Ως εκ τούτου, καθίστανται ιδανικά για την προσομοίωση της απόκρισης του οργανισμού στην έκθεση σε ξενοβιοτικούς παράγοντες, όπως τα τεχνητά νανοϋλικά, αφού εμπλέκονται στα στάδια αναγνώρισης, εσωτερίκευσης και εκκαθάρισης (Taciak et al., 2018). Η χρησιμότητά τους στην άμυνα του οργανισμού, καθώς και η χρήση τους σε ένα πλήθος ερευνητικών εργασιών για την εκτίμηση των τοξικολογικών αποκρίσεων στα τεχνητά νανοϋλικά, καθιστούν τα RAW264.7 ως κατάλληλη κυτταρική σειρά για μία τέτοιου τύπου μελέτη (Drasler et al., 2017).

3.4 Κυτταροκαλλιέργειες

Οι καλλιέργειες και οι χειρισμοί των κύτταρων πραγματοποιήθηκαν βάσει των οδηγιών της Καλής Πρακτικής Καλλιέργειας Κυττάρων (Guidance on Good Cell Culture Practice, GCCP). Τα κύτταρα ελέγχθηκαν για την παρουσία μυκοπλάσματος μέσω της τεχνικής RT-PCR και από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε η απουσία οποιασδήποτε μόλυνσης. Ακολούθησε μορφολογικός έλεγχος και χαρακτηρισμός με τη χρήση μικροσκοπίου, για να πιστοποιηθεί η κατάστασή τους μέσω της διατήρησης των φαινοτυπικών τους χαρακτηριστικών, ένα βήμα που πραγματοποιούταν πριν από κάθε ανακαλλιέργεια και πειραματική διαδικασία.

Οι συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων RAW264.7 περιελάμβαναν αρχικά την επιστροφή τους σε φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων 75 cm² και τη διατήρησή τους σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C σε συνθήκες 5% CO₂ και 80-95% υγρασίας, με σκοπο

την κάλυψη της επιφάνειας της φλάσκας στο 70%-80%. Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε με τη χρήση καλλιεργητικού θρεπτικού μέσου Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) της Gibco με 4.5 g/L D-γλυκόζη και 4 mM L-γλουταμίνη, ενώ περιείχε 10% v/v FBS και 100 μονάδες/ml πενικιλίνη και 100 μονάδες/ml στρεπτομυκίνη.

Το πρωτόκολλο ανακαλλιέργειας που ακολουθήθηκε στηρίχθηκε στη χρήση ξέστρου της BIOLOGIX™ για την επιτυχή αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας. Έπειτα, έγινε επαναιώρηση των κυττάρων σε πλήρες θρεπτικό μέσο με 10% FBS και μετά από μέτρηση στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, μεταφέρθηκε σε νέα φλάσκα ποσότητα εναιωρήματος που περιείχε περίπου 1.200.000 κύτταρα.

3.5 Αξιολόγηση κυτταροτοξικότητας μέσω της δοκιμασίας XTT

Η ένωση XTT είναι ένα άλας τετραζολίου, το οποίο κατά την αναγωγή του, από τις κυτταρικές αφυδρογονάσες των μεταβολικά ενεργών κυττάρων, σχηματίζει ένα υδατοδιαλυτό προϊόν φορμαζάνης με έντονη πορτοκαλί απόχρωση, του οποίου η ποσότητα εκτιμάται ποσοτικά μέσω φωτομέτρησης σε συσκευή αναγνώρισης μικροπλακών στα 450 nm.

Η εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός εμπορικά διαθέσιμου kit από την R&D systems. Κατ' αρχάς, τα κύτταρα RAW264.7 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε πλήρες καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο σε τρυβλίο 96 κυψελίδων (96-well plate), με τη κάθε κυψελίδα να περιέχει 10.000 κύτταρα. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα επωάστηκαν για 8 ώρες με ένα εύρος συγκεντρώσεων (12.5, 25, 50, 100 και 200 µg/ml) των νανοσωλήνων άνθρακα σε νέο θρεπτικό μέσο απουσία FBS. Μετά το πέρας των 8 ωρών, έγινε προσθήκη σε κάθε κυψελίδα 50 µl διαλύματος XTT, που περιείχε 49 µl αντιδραστηρίου XTT και 1 µl ενεργοποιητή XTT (PMS). Σύμφωνα με τις οδηγίες χειρισμού του kit ακολούθησαν 4 επώασης και μετρήθηκαν οι τιμές της οπτικής απορρόφησης σε δύο μήκη κύματος, στα 630 nm (μήκος κύματος αναφοράς) και στα 450 nm σε συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών Bio-Tek ELx800 (Winooski, VT, USA).

Στη παρούσα πειραματική διαδικασία ήταν απαραίτητη η χρήση ομάδας ελέγχου, έτσι αξιοποιήθηκαν κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία FBS με 5% DMSO σε dH₂O. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης έγινε για κάθε εξεταζόμενη συκέντρωση των νανοσωλήνων άνθρακα με θρεπτικό μέσο χωρίς FBS, απουσία κυττάρων και οι τιμές αυτές αφαιρέθηκαν από αυτές των κυττάρων που επωάστηκαν με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Στο σύνολο τους, οι τιμές οπτικής απορρόφησης που πάρθηκαν για τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου και για τα κύτταρα που επωάστηκαν με τις διάφορες συγκεντρώσεις των νανοϋλικών αξιοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της μεταβολής της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη βοήθεια της ακόλουθης σχέσης:

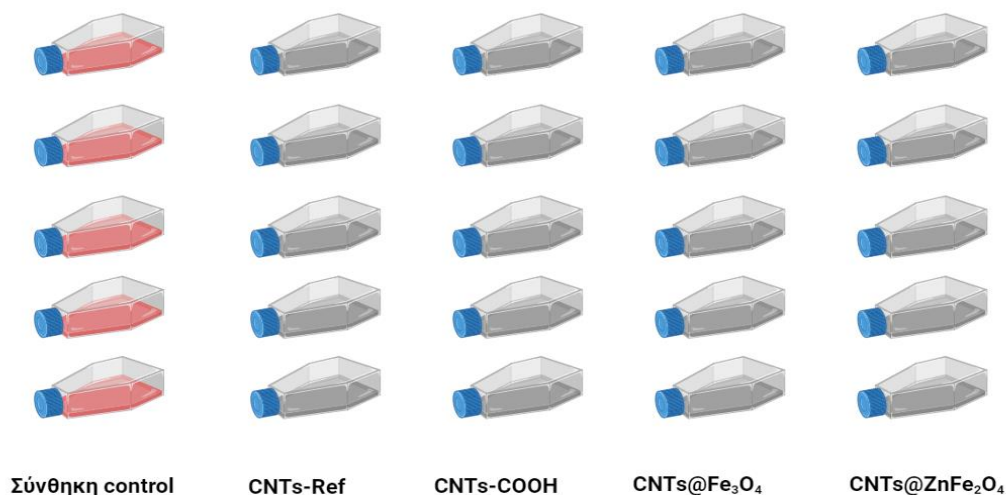
Κυτταρική βιωσιμότητα (% μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου) =
 $(\text{Οπτική απορρόφηση}_{\text{Δείγματος}} / \text{Οπτική απορρόφηση}_{\text{Ομάδα ελέγχου}}) \times 100$

Οι παραπάνω διαδικασία διεξήχθη εις τριπλούν και σε δύο ανεξάρτητες μεταξύ τους περιπτώσεις.

3.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR)

3.6.1 Διαχείριση κυτταρικής σειράς και προετοιμασία για την RT-PCR

Η προσέγγιση που επιλέχθηκε για τη διαχείριση της κυτταρικής σειράς περιελάμβανε τη δημιουργία πέντε ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων σε φλάσκες 75 cm² για τους CNTs-Ref, CNTs-COOH, CNTs@Fe₃O₄ και CNTs@ZnFe₂O₄, καθώς και πέντε ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων για την ομάδα ελέγχου (control). Κάθε βιολογική επανάληψη περιείχε περίπου 1.200.000 κύτταρα. Τα κύτταρα της ομάδας ελέγχου επώαστηκαν για 8 ώρες με την αντίστοιχη ποσότητα 5% DMSO σε dH₂O με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για τη διασπορά των υλικών της μελέτης. Αντίθετα, στην περίπτωση των νανοσωλήνων άνθρακα τα κύτταρα επώαστηκαν για 8 ώρες με την πρώτη υποτοξική συγκέντρωση του κάθε υλικού, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο XTT (25 µg/ml για τους CNTs-Ref και 100 µg/ml για τους CNTs-COOH, CNTs@Fe₃O₄ και CNTs@ZnFe₂O₄). Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολούθησε λύση και απομόνωση του ολικού RNA, όπως αναφέρεται ακολούθως.



Αριθμός κυττάρων ανά φλάσκα: ≈ 1.200.00

Εικόνα 7. Πρότυπο καλλιιεργειών ανά συνθήκη επώασης με τους νανοσωλήνες άνθρακα. Η εικόνα δημιουργήθηκε μέσω του εργαλείου Biorender (<https://www.biorender.com/>).

3.6.2 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση του ολικού RNA αποτελεί προϋπόθεση για την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των επιλεγμένων αντιοξειδωτικών γονιδίων σε μεταγραφικό επίπεδο μέσω της τεχνικής RT-PCR. Για την απομόνωση έγινε χρήση ειδικού kit (PureLink™ RNA Mini Kit 12183018A; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Για τη λύση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν 600 μl από το διάλυμα λύσης (lysis buffer) εμπλουτισμένο με 1% β-μερκαπτοαιθανόλη σύμφωνα με τις οδηγίες του kit.

Πειραματική διαδικασία

1. Λύση
 - I. Τα κύτταρα προστέθηκαν σε κατάλληλα σωληνάκια (tubes) και φυγοκεντρήθηκαν στα 2.000 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε.
 - II. Προστέθηκαν 600 μl διαλύματος λύσης.
 - III. Πραγματοποιήθηκε ανάδευση με συσκευή vortex για τη λύση των κυττάρων.
2. Ομογενοποίηση
 - I. Φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στα 12.000 g σε κατάλληλο σωληνάκι ομογενοποίησης
3. Έκλυση και καθαρισμός
 - I. Προσθήκη αιθανόλης 70% v/v σε αναλογία 1:1 με την ποσότητα του ομογενοποιημένου από κάθε δείγμα.
 - II. Ανάδευση με συσκευή vortex για τη διαλυτοποίηση πιθανού ιζήματος από τη προσθήκη της αιθανόλης.
 - III. Μεταφορά 700 μl από το παραπάνω διάλυμα σε ειδικά σωληνάκια περιστροφής (spin cartridge).
 - IV. Φυγοκέντρωση στα 12.000 g για 15 δευτερόλεπτα στους 25 °C. απόρριψη του υγρού και επανατοποθέτηση του σωληνακίου περιστροφής στο σωληνάκι συλλογής (collection tube).
 - V. Επανάληψη των βημάτων II και IV.
 - VI. Προσθήκη 700 μl από το διάλυμα καθαρισμού 1 (wash buffer 1).
 - VII. Φυγοκέντρωση στα 12.000 g για 15 δευτερόλεπτα στους 25°C, απόρριψη του υγρού και τοποθέτηση του σωληνακίου περιστροφής σε νέο σωληνάκι συλλογής.
 - VIII. Προσθήκη 500 μl από το διάλυμα καθαρισμού 2 (wash buffer 2) με αιθανόλη.
 - IX. Φυγοκέντρωση για 15 δευτερόλεπτα και απόρριψη υγρού.
 - X. Επανάληψη των βημάτων VIII και IX.
 - XI. Φυγοκέντρωση για 1-2 λεπτά στα 12.000 g ώστε να στεγνώσει η μεμβράνη του σωληνακίου περιστροφής και να παραμείνει μόνο το RNA, αλλαγή του σωληνακίου συλλογής.
 - XII. Προσθήκη νερού ελεύθερου από RNάση (RNase-free water) στο σωληνάκι περιστροφής.

- XIII. Επώαση για 1 λεπτό στους 25 °C.
XIV. Φυγοκέντρωση στα 12.000 g στους 25 °C.

4. Αποθήκευση

Το καθαρό RNA διατηρείται στους -80 °C.

3.6.3 Ποσοτικοποίηση RNA και πέψη με DNάση

Η μέτρηση των συγκεντρώσεων των δειγμάτων που περιείχαν το ολικό RNA έγινε με την χρήση του φασματοφωτόμετρου UV q5000 της Quawell. Η συσκευή, μέσω του αντίστοιχου προγράμματος παρέχει τη δυνατότητα υπολογισμού της καθαρότητας των δειγμάτων RNA, βάσει της αναλογίας της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm και 280 nm (OD260/280). Η συγκέντρωση αποδόθηκε σε ng/μl και ακολούθησε ο υπολογισμός του όγκου που απαιτείται από κάθε δείγμα, ώστε η τελική ποσότητα του RNA να είναι 1 μg για την κατασκευή του cDNA.

Επόμενο καθοριστικό βήμα ήταν η απομάκρυνση των υπολειμμάτων DNA που πιθανώς βρίσκονταν στα δείγματα, η οποία πραγματοποιήθηκε μέσω πέψης με ενδονουκλεάση (DNase I). Πιο συγκεκριμένα, έγινε χρήση του kit RQ1 RNase-Free DNase (M6101; Promega Corporation, Madison, WI, USA). Μόλις προστέθηκαν οι κατάλληλες ποσότητες των δειγμάτων για την απαιτούμενη ποσότητα RNA, έγινε προσθήκη κατάλληλου όγκου απιονισμένου νερού ώστε τα δείγματα να αποκτήσουν τελικό όγκο 8 μl. Ακολούθως, παρασκευάστηκε το μίγμα της αντίδρασης πέψης (Mastermix I) με την ισόποση ανάμειξη του ενζύμου DNAase (RQ1 RNase-Free DNase 1 x 1000U) και του διαλύματος της αντίδρασης (RQ1 DNase 10X Reaction Buffer 1 x 1mL). Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 2 μl από το Mastermix I και στη συνέχεια όλα τα δείγματα επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 37°C, ενώ μετά το πέρας της επώασης προστέθηκε 1 μl από το διάλυμα απενεργοποίησης της DNase (RQ1 DNase Stop Solution 1 x 1mL), ώστε να τερματιστεί επιτυχώς η αντίδραση πέψης. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε πάγο.

3.6.4 Σύνθεση cDNA

Το απομονωμένο ολικό RNA χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του αντίστοιχου cDNA των δειγμάτων με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την παρασκευή του cDNA αγοράστηκαν από την εταιρία Invitrogen της Thermo Fisher Scientific. Ειδικότερα, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα (Mastermix II) για το σύνολο των αντιδράσεων που περιείχε τυχαία εξαμερή εκκινητών (Random Primers, #48190-011) και μείγμα dNTP, το οποίο περιείχε σε αναλογία 1:1:1:1 τα 4 νουκλεοτίδια από το σετ αντιδραστηρίων (dNTP Set 100 mM Solutions). Το συγκεκριμένο διάλυμα προστέθηκε στα δείγματα RNA και αυτά τοποθετήθηκαν για επώαση στους 65 °C για 5 λεπτά. Επιπλέον, παρασκευάστηκε και προστέθηκε στα δείγματα, μείγμα (Mastermix III) (με περιεχόμενο 5x First Strand Buffer [250 mM

Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂] και διθειοθρεϊτόλη (DTT), για την προστασία του cDNA, και ακολούθησε επώαση για 2 λεπτά στους 42 °C. Ακολούθως, στα δείγματα προστέθηκε το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (SuperScript™ II Reverse Transcriptase) και αφέθηκαν στους 42 °C για 50 λεπτά ώστε να ενεργοποιηθεί και να δράσει το ένζυμο για το σχηματισμό ολικού cDNA. Μετά το πέρας της σύνθεσης, τα δείγματα υποβλήθηκαν για 15 λεπτά στους 70 °C για την απενεργοποίηση του ενζύμου. Τα αντιδραστήρια 5x First Strand Buffer, SuperScript™ II Reverse Transcriptase και DDT που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνονται στο SuperScript™ II Reverse Transcriptase kit (#18064-014) της Invitrogen. Για την ολοκλήρωση της διαδικασίας, προστέθηκαν 20 μl απιονισμένου νερού. Η παραπάνω διαδικασία διεξήχθη στον παγό και τα δείγματα με το νεοσυντιθέμενο cDNA φυλάχθηκαν και διατηρήθηκαν στους -20°C. Στον [Πίνακα 1](#) παρουσιάζονται οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση μίας αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής.

*Πίνακας 1. Τελικοί όγκοι ανά αντίδραση (δείγμα) αντίστροφης μεταγραφής και συνολικές ποσότητες. *Διαφορετική ποσότητα μl RNA χρησιμοποιήθηκε, μάζας 1 μg, ** Ποσότητα RNase Free dH₂O προσαρμοσμένη για κάθε αντίδραση και υπολογισμένη για κάθε δείγμα με βάση τον τύπο VdH₂O=8μl-VRNA, *** Οι ποσότητες που αναγράφονται αφορούν το σύνολο των δειγμάτων.*

Αντιδραστήρια	Ποσότητα (μl) / αντίδραση	Συνολική ποσότητα (μl) ***
Random Primers	1	25
dNTP mix (25 mM to καθένα)	1	25
5x First Strand Buffer	4	100
0.1 M DTT	2	50
SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200 units)	1	25
Total RNA	*	*
RNase Free dH ₂ O	**	**

3.6.5 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR)

Με την ολοκλήρωση της σύνθεσης του cDNA, το επόμενο βήμα για τη μεταγραφική ανάλυση των επιλεγμένων γονιδίων ήταν η χρήση της ποσοτικής μεθόδου RT-PCR. Αρχικά, έγινε προετοιμασία μίγματος (Mastermix PCR) για κάθε γονίδιο ξεχωριστά το οποίο περιείχε τους forward και reverse εκκινητές του υπό μελέτη γονιδίου, ddH₂O και το προπαρασκευασμένο διάλυμα που περιέχει τη φθορίζουσα χρωστική SYBR® Green I (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix; A25742; Applied Biosystems™). Οι εκκινητές για όλα τα γονίδια (NFE2L2, GCLC, GSR, GPx1 και GAPDH) χρησιμοποιήθηκαν σε τελική συγκέντρωση 0.25 μM και αποτελούν προϊόντα της εταιρίας Invitrogen. Οι αλληλουχίες των εκκινητών κάθε γονιδίου παρατίθενται στον [Πίνακα 2](#). Στη συνέχεια, έγινε χρήση πλακέτας με 96 κυψελίδες (96-well PCR Plate; AB0600, Thermo Scientific™) και διαμοιραστήκε ποσότητα 9 μl από το Mastermix PCR στις απαραίτητες θέσεις που αντιστοιχούσαν στον αριθμό των δειγμάτων. Έπειτα, προστέθηκε 1 μl cDNA από το κάθε δείγμα στις αντίστοιχες κυψελίδες. Οι ακριβείς

συγκεντρώσεις των συστατικών που συμμετέχουν στην αντίδραση παρουσιάζονται στον [Πίνακα 3](#) και [Πίνακα 4](#). Η πλακέτα 96 θέσεων σφραγίστηκε με κολλητική διαφάνεια και μεταφέρθηκε σε εξειδικευμένη συσκευή (FastGene Plate Centrifuge; NG040, NIPPON™) για την καταβύθιση της συνολικής ποσότητας των αντιδράσεων στον πάτο των κυψελίδων, αλλά και την απομάκρυνση φυσαλίδων από αυτές. Η πλακέτα τοποθετήθηκε εντός της συσκευής CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System της Bio-rad, προκειμένου να λάβει χώρα η αντίδραση της πολυμεράσης.

Η διαδικασία του προγράμματος που εκτελείται από τη συσκευή περιλαμβάνει έναν κύκλο αποδιάταξης του δίκλωνου cDNA και ενεργοποίησης της DNA πολυμεράσης στους 95 °C για 5 λεπτά, ενώ συγχρόνως στο ίδιο στάδιο πραγματοποιούνται σαράντα κύκλοι ενίσχυσης του γονιδίου ενδιαφέροντος στους 95 °C για 15 λεπτά. Ακολούθως, γίνεται υβριδοποίηση των εκκινητών στα γονίδια (60 °C για 30 λεπτά) και επέκταση των εκκινητών από τη DNA πολυμεράση για τη σύνθεση των θυγατρικών κλώνων (72 °C για 30 λεπτά). Για την ολοκλήρωση της διαδικασίας συντελείται επώαση στους 95 °C για 1 λεπτό, στους 55 °C για 1 λεπτό και ξανά στους 95 °C για 30 λεπτά για τη διαμόρφωση της καμπύλης τήξης. Ο προσδιορισμός των διαφορών στην έκφραση κάθε γονιδίου μεταξύ των κυττάρων που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου και αυτών που εκτέθηκαν στους ναοσωλήνες άνθρακα έγινε με τη συγκριτική μέθοδο Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), βάσει του γονιδίου αναφοράς GAPDH.

Πίνακας 2. Forward/reverse εκκινητές για τα γονίδια NFE2L2, GCLC, GSR, GPx1 και GAPDH.

Γονίδια	Εκκινητές Forward/Reverse (5'-3')
NFE2L2	CGAGATATACGCAGGAGAGGTAAGA GCTCGACAATGTTCTCCAGCTT
GCLC	ATCTGCCAAGGCGGCAAC ACTCCTCTGCAGCTGGCTC
GSR	GCTATGCAACATTCGCAGATG AGCGTAAACTTTTTCCCATTTG
GPx1	GAAGAACTTGGGCCATTTGG TCTCGCCTGGCTCCTGTTT
GAPDH	AACGACCCCTTCATTGAC TCCACGACATACTCAGCAC

Συστατικά για κάθε αντίδραση	Όγκος (μl)	Τελική συγκέντρωση
------------------------------	------------	--------------------

Πίνακας

2x PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	5	1x
Forward Primer 25 μM	0.1	0.25 μM
Reverse Primer 25 μM	0.1	0.25 Μμ
dH ₂ O	3.8	
cDNA μήτρα (17 ng/μl)	1	17 ng

3.

Ποσότητες και συγκεντρώσεις για μία αντίδραση RT-PCR τελικού όγκου 10 μl και συνολική ποσότητα αντιδραστηρίων που απαιτούνται για κάθε γονίδιο (NFE2L2, GCLC, GR, GPx1).

3.7 Διαχείριση κυτταρικής σειράς και απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού κλάσματος

Όπως και στη περίπτωση της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για το μεταγραφικό έλεγχο των γονιδίων, ο τρόπος μεταχείρισης των κυττάρων για την απομόνωση του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου περιελάμβανε τη χρήση 25 καλλιεργητικών φλασκών 75 cm² (αναλυτικότερα στην υποενότητα [3.6.1](#)).

Η διαδικασία απομόνωσης του συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος απαιτούσε αρχικά την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από τις καλλιεργητικές φλάσκες και μια σύντομη πλύση με PBS. Μετά την απόχυση του PBS, έγινε προσθήκη κατάλληλου διαλύματος για τη λύση των κυττάρων, συγκεκριμένα ενός διαλύματος δοκιμασίας ράδιοανοσοαποτύπωσης (Radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA buffer) με σύσταση: 0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, 0.1% w/v SDS, 1% Nonidet P-40, 0.5% w/v sodium deoxycholate. Ως αποτέλεσμα, το σύνολο των κυττάρων αποκολλήθηκε από την επιφάνεια της φλάσκας και ακολούθησε κυτταρόλυση. Αξίζει να επισημανθεί πως έγινε χρήση ξέστρου για την επιτυχή αποκόλληση των κυττάρων. Η ποσότητα του διαλύματος RIPA που χρησιμοποιήθηκε ανά φλάσκα ήταν 300 μl και ο χρόνος που έδρασε το διάλυμα ήταν 20 λεπτά. Η ποσότητα κυτταρολύματος που προέκυψε από

κάθε φλάσκα μεταφέρθηκε σε αντίστοιχους δοκιμαστικούς σωλήνες 1.5 ml και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 13.000 g για πέντε 5 λεπτά για την καθίζηση των κυτταρικών θραυσμάτων ως ίζημα. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα για τη διατήρηση του στους -80 °C ως τη μέρα του πειράματος. Η διαδικασία, στο σύνολο της, διεξήχθη στον πάγο προκειμένου να διατηρηθεί η ακεραιότητα του συνόλου των πρωτεϊνών.

3.8 Ποσοτικοποίηση της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω της μεθόδου Bradford

Η παρούσα μέθοδος είναι μία ταχεία φασματοσκοπική τεχνική, η οποία βασίζεται στη χρήση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, επιτρέποντας την εκτίμηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης δειγμάτων. Η χρωστική αυτή σε ελεύθερη μορφή αποδίδει μια σκούρα φαιά απόχρωση, η οποία όταν έρθει σε επαφή με τις πρωτεΐνες ενός διαλύματος, υπό όξινες συνθήκες, σχηματίζει σύμπλοκα με τις καρβοξυλικές ομάδες των αμινοξέων, παίρνοντας τελικά ένα έντονο κυανό χρώμα. Η χρωστική δανείζει ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο στις ιονίζουσες ομάδες των πρωτεϊνών, κάτι που προκαλεί διαταραχή της φυσιολογικής διαμόρφωσης των πρωτεϊνών και εκθέτει εξωτερικά της υδρόφοβες περιοχές τους. Έτσι, οι περιοχές αυτές συνδέονται με τις μη πολικές περιοχές της χρωστικής, μέσω δυνάμεων van der Waals, οι οποίες τελικά φέρνουν σε επαφή τα θετικά φορτία των αμινοξέων με τις αρνητικά φορτισμένες περιοχές της χρωστικής. Η απορρόφηση μετράται φασματοφωτομετρικά στα 595 nm. Για τη μέτρηση των δειγμάτων απαιτείται η δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης από μια πρωτεΐνη γνωστής συγκέντρωσης, έτσι ώστε να προκύψει εξίσωση απαραίτητη για τον υπολογισμό του πρωτεϊνικού περιεχομένου. Ειδικότερα, ζυγίστηκε ποσότητα αλβουμίνης (4 mg), η οποία αραιώθηκε σε διάλυμα RIPA, για να προκύψει ένα εύρος συγκεντρώσεων (0.4 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml και 0.025 mg/ml). Στη συνέχεια 20 μl από τα δείγματα αραιωμένης αλβουμίνης αναμιχθηκαν με 1 ml διαλύματος Bradford και έγινε μέτρηση των τιμών της οπτικής απορρόφησης, αφού προηγήθηκε επώαση για 20 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα των γνωστών συγκεντρώσεων και οι αντίστοιχες τιμές οπτικής απορρόφησης τοποθετήθηκαν σε άξονες xy, όπου στον άξονα y αντιστοιχούσαν οι οπτικές απορροφήσεις και στον x οι πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις. Η παραπάνω γραφική παράσταση έδωσε μια εξίσωση της μορφής $y = ax + \beta$, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων. Το σύνολο των δειγμάτων επώαστηκε με τον ίδιο τρόπο με τα δείγματα της αλβουμίνης και έγινε η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης όλων. Κάθε πρωτεϊνικό δείγμα έφερε δύο επαναλήψεις για την αύξηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων.

3.9 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

3.9.1 Αρχή μεθόδου

Η εκτίμηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των επιλεγμένων γονιδίων, στα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου και σε αυτά που εκτέθηκαν στους ναοσωλήνες άνθρακα, πραγματοποιήθηκε μέσω της τεχνικής ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται ως μία ημιποσοτική μέθοδος, η οποία εκτός από τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος απαιτεί τη χρήση γονιδίων αναφοράς (housekeeping genes) που εκφράζουν πρωτεΐνες σε παρόμοια επίπεδα στα κύτταρα ανεξάρτητα από τις προκαλούμενες σε αυτά παρεμβάσεις. Αυτός ο τύπος ανοσοαποτύπωσης εμφανίζει μία σύνθετη αρχιτεκτονική, αφού περιλαμβάνει το διαχωρισμό του συνόλου των πρωτεϊνών βάσει μοριακού βάρους μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή ακρυλαμίδιου, τη μεταφορά αυτών σε στερεό υπόστρωμα, την υβριδοποίησή τους με κατάλληλα αντισώματα και την εμφάνιση του σήματος της υβριδοποίησης αυτής υπό τη μορφή μπαντών, δηλαδή την οπτικοποίηση της σύνδεσης των πρωτεϊνών. Ο τελικός σκοπός της παραπάνω διαδικασίας είναι η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος και η σύγκριση των επιπέδων έκφρασης μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των πειραματικών συνθήκων.

3.9.2 Συστατικά παρασκευής διαλυμάτων

Πίνακας 4. Γενικά διαλύματα.

Γενικά διαλύματα			
10% SDS	0.5 M Tris (pH 6.8)	1.5 M Tris (pH 8.8)	10% APS
Αποθήκευση στους 25 °C	Αποθήκευση στους 25 °C	Αποθήκευση στους 25 °C	Αποθήκευση στους -20 °C

Πίνακας 5. Διαλύματα παρασκευής πηκτής ακρυλαμίδιου.

Διαλύματα παρασκευής πηκτής	
Resolving gel	Stacking gel
40% v/v ddH ₂ O	50% v/v ddH ₂ O
25% v/v 1.5 M Tris (pH 8.8)	25% v/v 0.5 M Tris (pH 6.8)
33% v/v ακρυλαμίδιο	13% v/v ακρυλαμίδιο
0.01 v/v 10% SDS	0.01 v/v 10% SDS
0.005 10% APS	0.01 10% APS
0.0015 v/v TEMED	0.001 v/v TEMED

Πίνακας 6. Συστατικά διαλυμάτων ηλεκτροφόρησης.

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης	
10x Running buffer	10x Transfer buffer
Tris (0.25 M)	Tris (0.25 M)
Γλυκίνη (1.92 M)	Γλυκίνη (1.92 M)
SDS (0.035 M)	-
ddH ₂ O	ddH ₂ O
Αποθήκευση στους 25 °C	Αποθήκευση στους 25 °C
Αραίωση 1x πραγματοποιείται με κατάλληλη ποσότητα ddH ₂ O (αποθήκευση στους 4 °C)	Αραίωση 1x πραγματοποιείται με 20% v/v μεθανόλη και συμπλήρωση με κατάλληλη ποσότητα ddH ₂ O (αποθήκευση στους 4 °C)

Πίνακας 7. Διαλύματα εμφάνισης ανοσοαποτύπωσης.

Αντιδραστήρια εμφάνισης ανοσοαποτύπωσης	
Developer	Fixer
50% v/v ddH ₂ O	50% v/v ddH ₂ O
27.63% v/v διάλυμα A	26.32% v/v διάλυμα A'
2.8% v/v διάλυμα B	4.21% v/v διάλυμα B'
2.5% v/v διάλυμα C	-
16.97% v/v ddH ₂ O	19.48% v/v ddH ₂ O

Πίνακας 8. Συστατικά διαλυμάτων μεταχείρισης μεμβρανών.

Διαλύματα μεταχείρισης μεμβρανών	
TBST 10x (pH 7.6)	Διάλυμα Ponceau
Tris (0.13 M)	0.5% σκόνη Ponceau διαλυμένη σε 1% ακετικό οξύ
NaCl (1.49 M)	-
Tween 20 διαλυμένο σε ddH ₂ O (2% v/v)	-

3.9.3 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα ολικής πρωτεΐνης που συλλέχθηκαν από το σύνολο των βιολογικών επαναλήψεων έλαβαν την κατάλληλη μεταχείριση για να ηλεκτροφορηθούν. Συνεπώς, προσδιορίστηκε η ακριβής ποσότητα που απαιτούνταν από κάθε δείγμα προκειμένου η τελική ποσότητα του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος να είναι 30 μg. Η ποσότητα αυτή αναμείχθηκε με κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) που περιέχει τους αποδιατακτικούς παράγοντες β-μερκαπτοαιθανόλη και SDS, γλυκίνη ως ρυθμιστή του ιξώδους των πρωτεϊνών, τη χρωστική παρατήρησης των πρωτεϊνών μπλε της βρωμοφαίνολης και το ρυθμιστικό διάλυμα Tris. Η χρήση SDS

είναι καίρια, καθώς εξασφαλίζει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών μέσω της προσθήκης αρνητικού φορτίου, έτσι ώστε ο διαχωρισμός να πραγματοποιηθεί αποκλειστικά βάσει μεγέθους. Η ανάμειξη των δειγμάτων με το loading buffer έγινε σε αναλογία 4:1 και τα προκύψαντα δείγματα θερμάνθηκαν στους 95 °C για την ολοκλήρωση της αποδιάταξης των πρωτεϊνών.

3.9.4 Παρασκευή πηκτής ηλεκτροφόρησης

Η πηκτή πολυακρυλαμίδιου συνίσταται ως ένα πολυμερές που σχηματίζει ένα πυκνό τρισδιάστατο δίκτυο πόρων συγκεκριμένης διαμέτρου και που συντίθενται από ακρυλαμίδιο και bis-ακρυλαμίδιο. Η γέλη σταθεροποιείται και λαμβάνει τη μονιμοποιημένη της μορφή μετά τη προσθήκη των δύο απαραίτητων πηκτικών παραγόντων, του υπερθειϊκού αμμωνίου (Ammonium persulfate, APS) και της τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνης (Tetramethylethylenediamine, TEMED). Ωστόσο, για την απόκτηση αυτής της τελικής διαμόρφωσης της πηκτής χρησιμοποιούνται δύο ξεχωριστά αρχικά διαλύματα, τα οποία τροποποιούνται μεταξύ τους στη συγκέντρωση του πολυμερούς που περιέχουν και στην τιμή του pH έτσι ώστε να επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών. Το πρώτο πήκτωμα που θα διασχίσουν οι πρωτεΐνες είναι αυτό της επιστοιβάξεως (stacking gel) και περιέχει μεγαλύτερους πόρους, για τη μετακίνηση όλων των πρωτεϊνών ανεξαρτήτως μεγέθους μέχρι το σημείο επαφής με το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) που αποτελείται από πόρους μικρότερου μεγέθους για τον επιτυχή διαχωρισμό των πρωτεϊνών, οι οποίες κινούνται πλέον με διαφορετική ταχύτητα. Τα υλικά και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τη παρασκευή της πηκτής παρουσιάζονται στον [Πίνακα 5](#).

Κατά τη παρασκευή των παραπάνω πηκτωμάτων το APS και το TEMED προστίθενται στο τέλος και στα δύο τζελ, καθώς αντιδρούν με μεγάλη συγγένεια μεταξύ τους και πολυμερίζεται ταχύτατα το ακρυλαμίδιο. Τα δύο τζελ τοποθετούνται εντός δύο γυάλινων λεπτών πλακών (short plate και glass plate) τα οποία σχηματίζουν μεταξύ τους ένα κενό πάχους ενός χιλιοστού (1 mm). Η κατασκευή των δύο τζαμιών στηρίζεται στη συσκευή Casting Apparatus και αρχικά προστίθεται η ποσότητα του separating gel που απαιτείται (≈ 5 ml). Αφού μεσολαβεί ο χρόνος που χρειάζεται για να πήξει η γέλη (40 λεπτά) προστίθεται και η ποσότητα του stacking gel (≈ 4 ml) και με γρήγορες κινήσεις τοποθετείται εντός του stacking gel το χτενάκι για το σχηματισμό των θέσεων προσθήκης των πρωτεϊνικών δειγμάτων. Μετά το πέρας 40 λεπτών για πήξη και αυτής της γέλης ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων, καθώς και ειδικού μάρτυρα μοριακού βάρους για αντιστοιχία με τις πρωτεϊνικές μπάντες.

3.9.5 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE

Η ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης υπό την παρουσία του δωδεκυλο-θειικού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) διεξάγεται για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των πρωτεϊνών. Για την παρούσα μέθοδο απαιτείται ένα κλειστό κύκλωμα στο οποίο οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες,

εξαιτίας του loading buffer, δύνανται να μετακινούνται εντός της πηκτής με βάση το μοριακό τους βάρος υπό συγκεκριμένες συνθήκες ηλεκτρικής ισχύος, θερμοκρασίας και pH.

Αφού γίνει η προσθήκη των δειγμάτων στην πηκτή, η κατασκευή των τζαμίων εισάγεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1X Running Buffer) (Πίνακας 6) μέχρι τη καθορισμένη ένδειξη της συσκευής και στη συνέχεια ρυθμίζονται οι παράμετροι ώστε να εφαρμοστεί τάση 120 V και ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση για 1 ώρα.

3.9.6 Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη PVDF

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, τα τζαμάκια αφαιρέθηκαν από τη συσκευή και με προσεκτικούς χειρισμούς αποσπάστηκε η γέλη ακρυλαμιδίου από το εσωτερικό τους. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκε σε μεμβράνη φθοριούχου πολυβινυλιδενίου (polyvinylidene chloride, PVDF) και εισήχθη σε κασέτα μεταφοράς, η οποία μεταφέρθηκε εκ νέου σε συσκευή για την εφαρμογή διαφοράς δυναμικού 100 V στην οποία περιέχεται ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (1x Transfer buffer) (Πίνακας 6). Για τη διευκόλυνση της μεταφοράς του πρωτεϊνικού σήματος στη μεμβράνη PVDF εντός της κασέτας μεταφοράς, εκατέρωθεν της μεμβράνης και του τζελ τοποθετήθηκαν διηθητικά χαρτιά τύπου Wattman και πορώδη επιθέματα. Η διαδικασία της κατασκευής της κασετίνας πραγματοποιήθηκε εντός ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς και για την ενεργοποίηση της μεμβράνης PVDF έγινε εμβάπτιση για 1 λεπτό σε καθαρή αιθανόλη. Συμπληρωματικά, διασφαλίστηκε ότι η κασετίνα και κατά συνεπεία η μεμβράνη δεν είχε φυσαλίδες, ικανές να διαταράξουν την ομοιόμορφη μεταφορά του σήματος. Η κασετίνα σφραγίστηκε και εφαρμόστηκε η καθορισμένη τιμή τάσης για 90 λεπτά.

3.9.7 Ανοσοανίχνευση στη μεμβράνη

Ακολούθησε το στάδιο της ανοσοανίχνευσης των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Μετά τη μεταφορά του πρωτεϊνικού σήματος, η μεμβράνη αφαιρέθηκε από την κασετίνα και επώαστηκε για 1 ώρα σε διάλυμα μη λιπαρού ξηρού γάλατος (5% σκόνη γάλατος σε 1x TBST), για τη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων της μεμβράνης από το πρωτεϊνικό περιεχόμενο του διαλύματος. Ακολούθως, η μεμβράνη ξεπλύθηκε με περίσσεια διαλύματος 1x TBST και υποβλήθηκε σε ολονύκτια επώαση με το κατάλληλο πρωτογενές αντίσωμα για την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, στους 4 °C. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το αντίσωμα για τη πρωτεΐνη αναφοράς (GAPDH) (Mouse monoclonal HRP conjugate, #G9295, Thermo Scientific, 1:2000) και το αντίσωμα για τη γGCLc (Rabbit polyclonal IgG, #H2905, Santa Cruz Biotechnology, 1:1000). Η δέσμευση του πρωτογενούς αντισώματος χαρακτηρίζεται ως αντιγόνο-ειδική, καθώς πραγματοποιείται σε επίτοπους της πρωτεΐνης-στόχου.

Την επόμενη μέρα, συλλέχθηκε το πρωτογενές αντίσωμα και ακολούθησαν τρεις πλύσεις των 10 λεπτών με διάλυμα 1x TBST. Συνεπακόλουθα, έγινε προσθήκη του δευτερογενούς αντισώματος, έτσι ώστε η μεμβράνη να επωαστεί για ακόμα 1 ώρα με αυτό. Το δευτερογενές αντίσωμα δύναται να συνδέεται με μη ειδικό τρόπο με το Fc τμήμα του πρωτογενούς αντισώματος, ενώ ταυτόχρονα είναι συζευγμένο με το ένζυμο σήμανσης HRP (Horseradish Peroxidase), το οποίο όταν αντιδράσει με κατάλληλο υπόστρωμα εκπέμπει χημειοφωταύγεια, καθιστώντας δυνατή την ανίχνευση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Το δευτερογενές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Goat anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate (#31462, Thermo Scientific, 1:2000). Το δευτερογενές αντίσωμα διαλυτοποιήθηκε σε 1x TBST.

3.9.8 Εμφάνιση πρωτεϊνικού σήματος

Τελικό βήμα της διαδικασίας ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών ήταν η εμφάνιση του σήματος της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος πάνω σε ειδικά φιλμ ακτίνων X (Fuji Medical Film, X-ray Film, Jurus RX-N, Fujifilm Corporation, Minato-Ku, Tokyo, Japan). Συνεπώς στο σημείο αυτό, απορρίφθηκε το δευτερογενές αντίσωμα και οι μεμβράνες υποβλήθηκαν σε τρεις διαδοχικές πλύσεις με περίσσεια διαλύματος 1x TBST. Έπειτα, προστέθηκε σε αυτές το μίγμα ανίχνευσης ECL (Enhanced ChemiLuminescence) για 5 λεπτά, επιτρέποντας στο ένζυμο της HRP να αντιδράσει με το υπόστρωμά του. Το παραπάνω μίγμα ανίχνευσης του ECL (ECL 170-5060; BIO-RAD, United States) παρασκευάστηκε με τη χρήση δύο 2 αντιδραστηρίων του kit σε ίση αναλογία, του υποστρώματος του HRP (Clarity Western Peroxide Reagent) και του ενισχυτή σήματος της αντίδρασης (Clarity Western Luminol/Enhancer Reagent).

Αφού ολοκληρώθηκε η επώαση αυτή, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε κατάλληλη κασετίνα εμφάνισης σε επαφή με το ειδικό φιλμ και μετά το σφράγισμά της, η κασετίνα διατηρήθηκε ερμητικώς κλειστή για τον προβλεπόμενο χρόνο έκθεσης. Η διαδικασία της εμφάνισης πραγματοποιήθηκε σε σκοτεινό θάλαμο για την προστασία του φιλμ από την έκθεση σε φως, Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος της εμφάνισης έγινε με την ήπια ανάδευση του φιλμ σε τρία διαλύματα, για χρονική διάρκεια 10 δευτερολέπτων. Τα διαλύματα κατά σειρά ήταν το διάλυμα εμφάνισης (Developer solution), dH₂O, μονιμοποιητής (Fixer solution), dH₂O. Τα απαραίτητα αντιδραστήρια για τη παρασκευή των διαλυμάτων Developer και Fixer αγοράστηκαν από την εταιρεία Fujifilm Corporation και οι ποσότητες των συστατικών τους παρουσιάζονται στον [Πίνακα 7](#). Τέλος, χρειάστηκε η λήψη φωτογραφιών των φιλμς ώστε να γίνει οπτικοποίηση και ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων με τη συμβολή του προγράμματος Fiji.

3.10 Στατιστική ανάλυση

Όλα τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του στατιστικού μοντέλου ανάλυσης διακύμανσης ANOVA (Analysis of variance), ώστε να γίνει σύγκριση των μέσων όρων των υλικών της μελέτης με το μέσο όρο της ομάδας ελέγχου. Τα αποτελέσματα

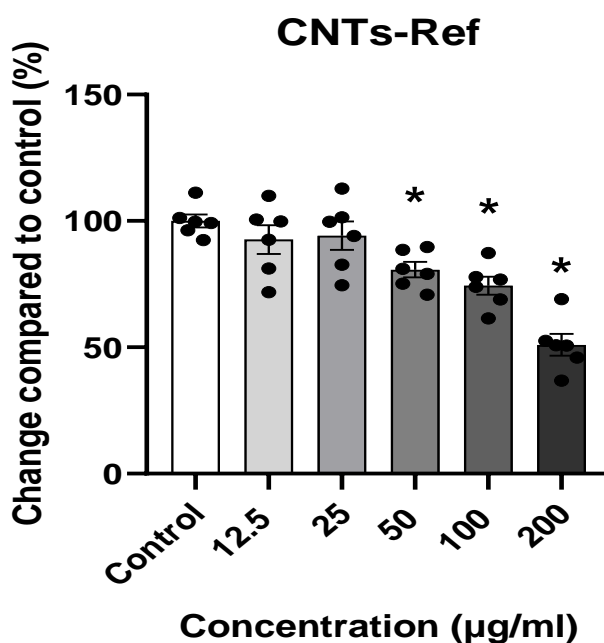
εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM), που έχει προκύψει από 2 ή 3 ανεξάρτητα πειράματα. Στην περίπτωση των πειραμάτων με χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR), τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM), που έχει προκύψει από το σύνολο των 5 βιολογικών επαναλήψεων. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για $p < 0.05$. Το σύνολο των στατιστικών αναλύσεων πραγματοποιήθηκε με χρήση της έκδοσης 8.0.1 GraphPad Prism για Windows, GraphPad Software, San Diego, California US.

4. Αποτελέσματα

4.1 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης των νανοσωλήνων άνθρακα στη κυτταρική σειρά RAW264.7

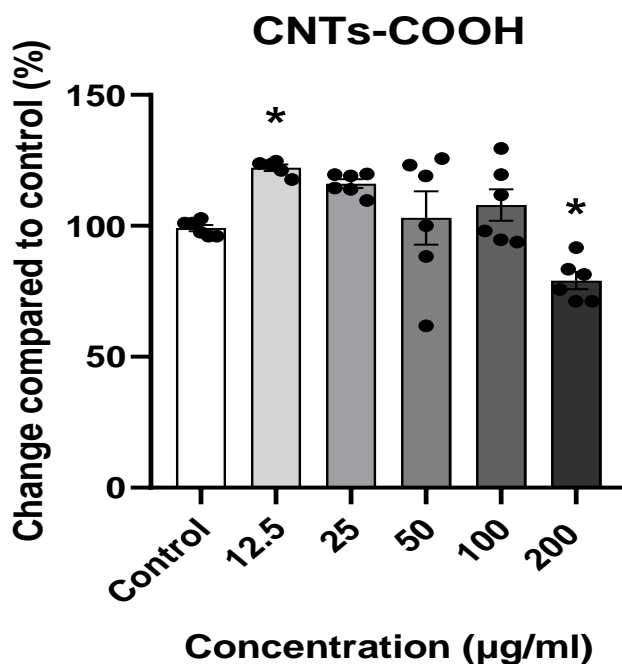
Ο έλεγχος της κυτταροτοξικότητας πραγματοποιήθηκε μέσω της χρωματομετρικής μεθόδου XTT. Η δοκιμασία διεξήχθη μετά από επώαση 8 ωρών των κυττάρων με τα διαφορετικού τύπου νανοϋλικά και προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα.

Εμφανώς, η χορήγηση των CNTs-Ref στη κυτταρική σειρά RAW264.7 προκάλεσε κυτταροτοξικά αποτελέσματα. Ειδικότερα, στις συγκεντρώσεις των 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ και 200 $\mu\text{g/ml}$ προκλήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας, όπως φαίνεται στο [Διάγραμμα 1](#).



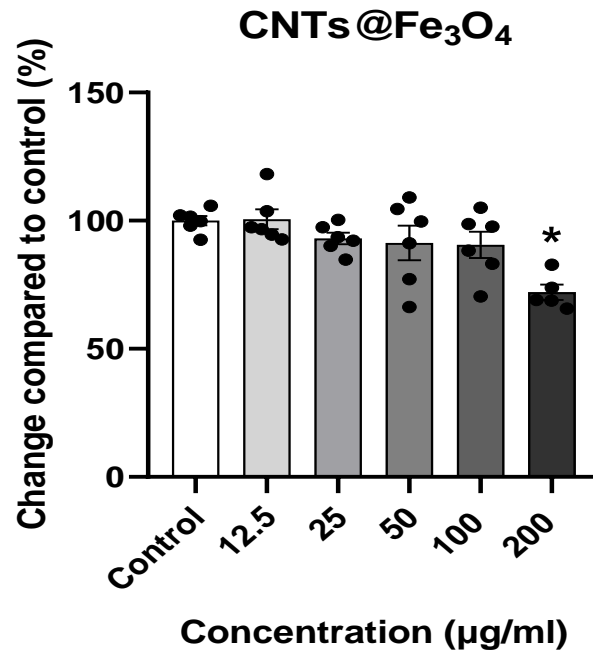
Διάγραμμα 1. Η μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας των RAW264.7 υπό την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων (12.5 – 200 $\mu\text{g/ml}$) των CNTs-Ref μετά από 8 ώρες επώασης. *: Στατιστικά σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$).

Στη περίπτωση των CNTs-COOH (Διάγραμμα 2), διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας στη χαμηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (12.5 $\mu\text{g/ml}$). Παράλληλα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (200 $\mu\text{g/ml}$).



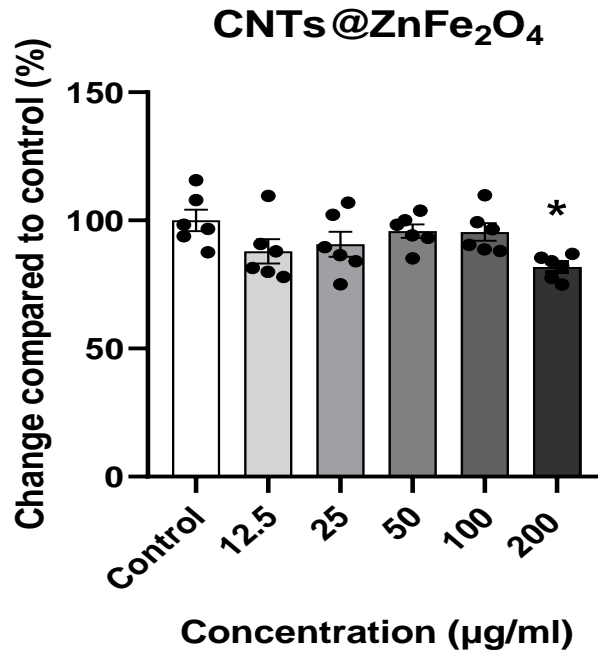
Διάγραμμα 2. Η μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας των RAW264.7 υπό την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων (12.5 – 200 $\mu\text{g/ml}$) των CNTs-COOH μετά από 8 ώρες επώασης. *: Στατιστικά σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$).

Στην περίπτωση των CNTs@Fe₃O₄, (Διάγραμμα 3), παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση (200 $\mu\text{g/ml}$).



Διάγραμμα 3. Η μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας των RAW264.7 υπό την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων (12.5 – 200 µg/ml) των CNTs@Fe₃O₄ μετά από 8 ώρες επώασης. *: Στατιστικά σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$).

Τέλος, τα αποτελέσματα της δοκιμασίας XTT για τους CNTs@ZnFe₂O₄ παρουσιάζονται στο [Διάγραμμα 4](#). Ειδικότερα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου στη συγκέντρωση των 200 µg/ml.



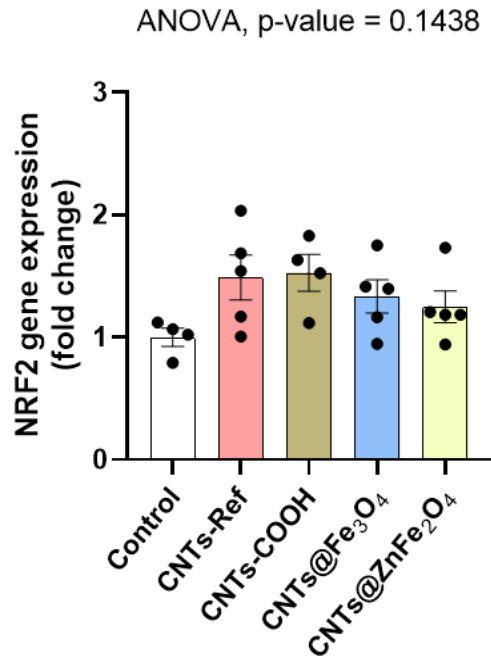
Διάγραμμα 4. Η μεταβολή της κυτταρικής βιωσιμότητας των RAW264.7 υπό την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων (12.5 – 200 µg/ml) των CNTs@ZnFe₂O₄ μετά από 8 ώρες επώασης. *: Στατιστικά σημαντική μεταβολή συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$).

4.2 Επίδρασεις στην έκφραση κρίσιμων αντιοξειδωτικών γονιδίων

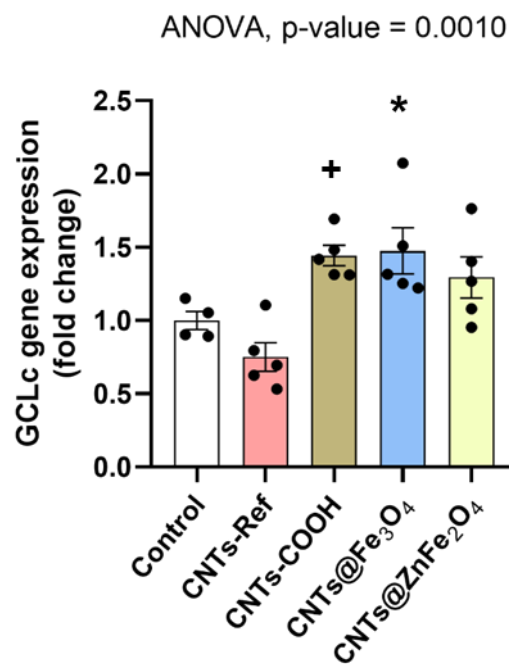
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μέσω της μεθόδου RT-PCR, αφορούσαν τη μεταγραφική ανάλυση των αντιοξειδωτικών γονιδίων NFE2L2, GCLC, GPx1 και GSR. Η μελέτη όπως προαναφέρθηκε, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της κυτταρικής σειράς RAW264.7, στην οποία ελέγχθηκαν οι επιδράσεις των CNTs-Ref, CNTs-COOH, CNTs@Fe₃O₄ και CNTs@ZnFe₂O₄ στην αντιοξειδωτική απόκριση. Βάσει της δοκιμασίας XTT, η συγκέντρωση των νανοσωλήνων άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα 100 µg/ml, εκτός των CNT-Ref, στους οποίους χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση των 25 µg/ml ως η πρώτη υποδοξική.

Η έκφραση του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 (NFE2L2) φαίνεται πως δεν επηρεάστηκε από τη χορήγηση κανενός από τα υλικά της μελέτης (Διάγραμμα 5). Αντιθέτως, στη περίπτωση του γονιδίου της καταλυτικής υπομονάδας της λιγάσης της γλουταμικής κυστεΐνης (GCLC), στους CNTs-COOH παρατηρήθηκε ισχυρή τάση αύξησης, ενώ στους CNTs@Fe₃O₄ παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 6). Επόμενο γονίδιο του οποίου ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης ήταν αυτό της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GSR), όπου δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στην έκφραση του γονιδίου σε οποιαδήποτε περίπτωση (Διάγραμμα 7). Τέλος, κατά τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης 1 (GPx1), στους CNTs-

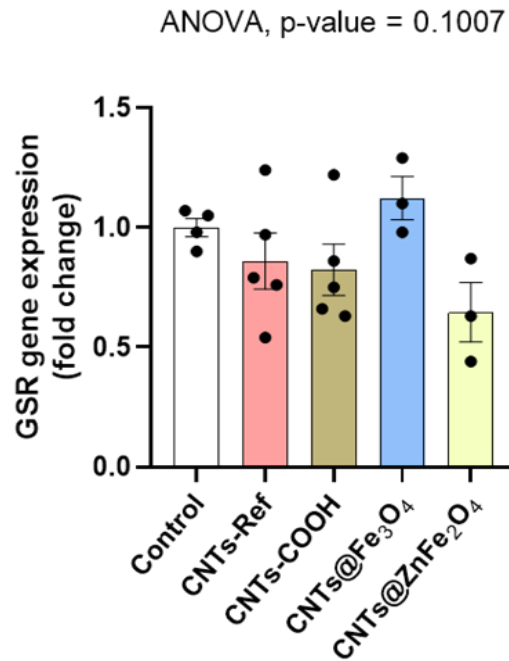
Ref παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 8).



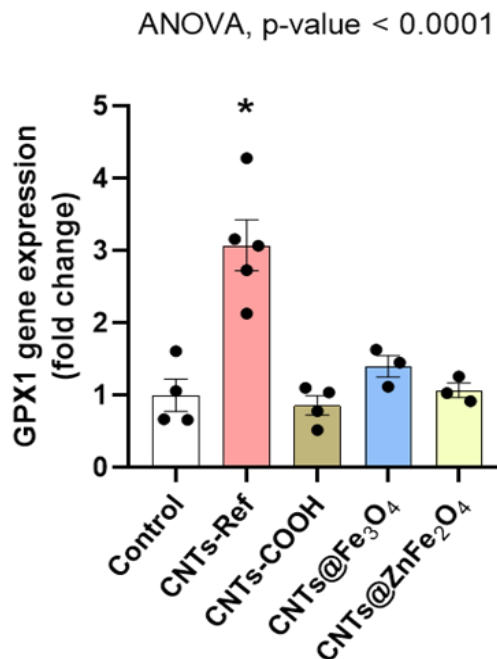
Διάγραμμα 5. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου NFE2L2 στα RAW264.67 μετά από 8 ώρες επώασης με τους νανοσωλήνες άνθρακα.



Διάγραμμα 6. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *GCLC* στα RAW264.7 μετά από 8 ώρες επώασης με τους νανοσωλήνες άνθρακα. +: Ισχυρή τάση μεταβολής σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.056$).*: Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$).



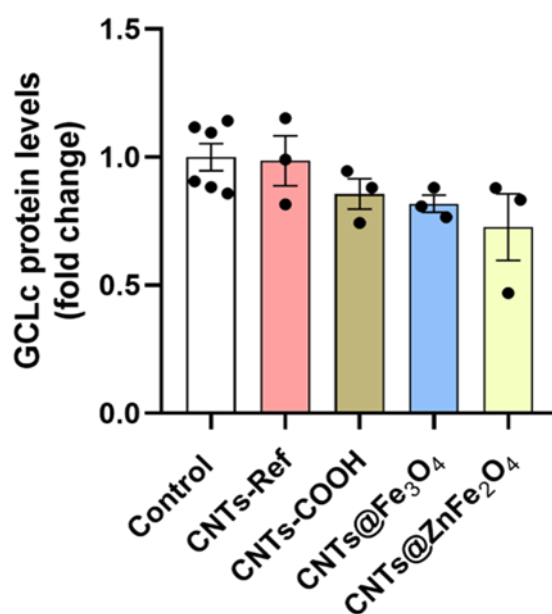
Διάγραμμα 7. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *GPR* στα RAW264.67 μετά από 8 ώρες επώασης με τους νανοσωλήνες άνθρακα.



Διάγραμμα 8. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου GPX1 στα RAW264.7 μετά από 8 ώρες επώασης με τους νανοσωλήνες άνθρακα. Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$).

4.3 Επιδράσεις στα πρωτεϊνικά επίπεδα της καταλυτικής υπομονάδας της λιγάσης της γλουταμικής κυστεΐνης

Μέσω της διαδικασίας ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών έγινε εκτίμηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της καταλυτικής υπομονάδας της λιγάσης της γλουταμικής κυστεΐνης (GCLc). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, που παρουσιάζονται στο [Διάγραμμα 9](#), δεν προέκυψε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στα πρωτεϊνικά επίπεδα της GCLc σε οποιαδήποτε περίπτωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.



Διάγραμμα 9. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της GCLc στα RAW264.7 μετά από 8 ώρες επώασης με τους νανοσωλήνες άνθρακα.

5. Συζήτηση

Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώθηκε στη διερεύνηση των επιδράσεων τεσσάρων κατηγοριών πολυφλοϊκών νανοσωλήνων άνθρακα, στην κυτταρική βιωσιμότητα αλλά και στην έκφραση κρίσιμων αντιοξειδωτικών γονιδίων στα μακροφάγα κύτταρα μυών RAW264.7. Η αξιολόγηση των παραπάνω επιδράσεων θα μπορούσε να παρέχει κάποιες πρώιμες ενδείξεις σχετικά με τους κινδύνους για την υγεία που προκύπτουν από την έκθεση σε υλικά νανοκλίμακας στον εργασιακό χώρο (Vardakas et al., 2021).

Στο πρώτο σκέλος, που αφορούσε την εκτίμηση των επιδράσεων στην κυτταρική βιωσιμότητα, ο πειραματικός σχεδιασμός περιελάμβανε την επώαση της κυτταρικής σειράς με ένα εύρος συγκεντρώσεων (12.5, 25, 50, 100 και 200 $\mu\text{g/ml}$) των πολυφλοϊκών νανοσωλήνων άνθρακα για 8 ώρες. Αντίστοιχη προηγούμενη μελέτη, η οποία διερεύνησε τις επιδράσεις της έκθεσης σε μη τροποποιημένους και καρβοξυλιωμένους πολυφλοϊκούς νανοσωλήνες άνθρακα για σύντομα χρονικά διαστήματα στη βιωσιμότητα και την απόπτωση στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα A549 έδειξε πως τα νανοϋλικά επάγουν μια δόσοεξαρτώμενη και χρονοεξαρτώμενη κυτταροτοξικότητα (Kyriakidou et al., 2020).

Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης, αποδείχθηκε η επαγωγή κυτταροτοξικότητας στα RAW264.7 μετά από την έκθεση 8 ωρών σε όλα τα υλικά της μελέτης. Ειδικότερα, οι CNTs-Ref, CNTs@Fe₃O₄ και CNTs@ZnFe₂O₄ προκάλεσαν μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στα 200 $\mu\text{g/ml}$, ενώ το κατώφλι κυτταροτοξικότητας ήταν αισθητά χαμηλότερο στους CNTs-COOH, στα 50 $\mu\text{g/ml}$.

Εντός των δύο τελευταίων δεκαετιών, η έρευνα στον χώρο των νανοϋλικών έχει καταδείξει τις συνέπειες των πολυφλοϊκών νανοσωλήνων άνθρακα στη λειτουργία των μακροφάγων κυττάρων, οι οποίες χαρακτηρίζονται πρωτίστως από λειτουργικές και δομικές βλάβες οι οποίες επάγουν κυτταρικό θάνατο (Y. Li & Cao, 2018). Μια από τις πρώτες ολοκληρωμένες απόπειρες για τη μελέτη της έκθεσης σε νανοσωλήνες άνθρακα πραγματοποιήθηκε από τον Liu και τους συνεργάτες του, κατά την οποία εκτιμήθηκαν οι επιδράσεις ενός εύρους αυξανόμενων συγκεντρώσεων (2.5, 10, 25 και 100 $\mu\text{g/ml}$) για 24 ώρες, όπου και παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας στα 25 $\mu\text{g/ml}$ και 100 $\mu\text{g/ml}$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου με βάση τη χρωματομετρική μέθοδο MTT (Y. Liu et al., 2008). Στο ίδιο μήκος κύματος, κινήθηκε και η ερευνητική ομάδα του Chen και των συνεργατών του, οι οποίοι με τη χρήση του ίδιου εύρους συγκεντρώσεων νανοσωλήνων άνθρακα επιβεβαίωσαν την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των μακροφάγων RAW264.7 μέσω της μεθόδου MTT (B. Chen et al., 2011). Επίσης, οι επιδράσεις του ίδιου εύρους συγκεντρώσεων νανοσωλήνων άνθρακα εξετάστηκαν μέσω της χρωματομετρικής μεθόδου WST-1 και έπειτα από 48 ώρες επώασης παρατηρήθηκε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στα 100 $\mu\text{g/ml}$ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Ye et al., 2012). Επιπροσθέτως, σε μια πιο πρόσφατη συγκριτική μελέτη μεταξύ των επιδράσεων μη τροποποιημένων και

καρβοξυλιωμένων πολυφλοϊϊκών νανοσωλήνων άνθρακα στα RAW264.7 διαπιστώθηκε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας και στις δύο περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα, η επώαση των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις (1, 10, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) των πολυφλοϊϊκών νανοσωλήνων άνθρακα για διαστήματα 24, 48 και 72 ωρών προκάλεσαν μια δοσοεξαρτώμενη απόκριση, χωρίς ωστόσο διακριτές μεταβολές μεταξύ των δύο κατηγοριών υλικών (Dong et al., 2015).

Επόμενος στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η εκτίμηση της απόκρισης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών στη χορήγηση των νανοσωλήνων άνθρακα της μελέτης. Η συγκεκριμένη διερεύνηση βασίστηκε στην επιλογή κατάλληλων αντιοξειδωτικών γονιδίων (NFE2L2, GCLC, GSR, GPx1), των οποίων ελέγχθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα μέσω RT-PCR.

Ειδικότερα, τα επίπεδα έκφρασης του κύριου ρυθμιστή της αντιοξειδωτικής απόκρισης, του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, δεν παρουσίασαν καμία σημαντική μεταβολή μετά από οποιαδήποτε χορήγηση. Από την άλλη η έκφραση του γονιδίου της GCLC εμφάνισε ισχυρή τάση μείωσης στην περίπτωση των CNTs-Ref και στατιστικά σημαντική αύξηση στην περίπτωση των CNTs-COOH. Σε ότι αφορά το γονίδιο της GSR, δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή σε μεταγραφικό επίπεδο μετά από οποιαδήποτε χορήγηση. Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης των μεταγράφων της GPx1 παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση στην περίπτωση των CNTs-Ref σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Οι διαφοροποιήσεις και τα μοτίβα έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν μπορεί να οφείλονται σε μία πληθώρα μοριακών μηχανισμών, στη φύση των υλικών, αλλά και στα χαρακτηριστικά της κυτταρικής σειράς η οποία χρησιμοποιήθηκε. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η απόδοση των αιτιών για τα παραπάνω πρότυπα έκφρασης των γονιδίων εστιάστηκε στο ρόλο που διαμορφώνουν οι μοριακοί μηχανισμοί του κυτταρικού συστήματος, οι οποίοι βρίσκονται σε άμεση σύνδεση με την αντιοξειδωτική άμυνα.

Ο Nrf2 ως μεταγραφικός παράγοντας μερίμνα για τον συντονισμό της ενεργοποίησης ενός μεγάλου εύρους κυτταροπροστατευτικών γονιδίων τόσο υπό φυσιολογικές συνθήκες όσο και υπό συνθήκες στρες (Tonelli et al., 2018b). Η σημασία του Nrf2 για την ακεραιότητα των κυττάρων και για την καταπολέμηση παθολογικών επιπτώσεων απαιτεί τη διαμόρφωση ενός δικτύου ρύθμισης που απαρτίζεται από πολυάριθμα συμμετέχοντα μόρια. Συνεπώς, τα πρότυπα έκφρασης που διακρίνονται στα αποτελέσματα των μεταγραφικών επιπέδων του ίδιου του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα, αλλά και των γονιδίων-στόχων του, μπορούν να αποδοθούν στην έμμεση ρύθμιση του παρόντος αντιοξειδωτικού μηχανισμού των κυττάρων.

Συνολικά, επιβεβαιώνεται πως η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα (Nrf2) δεν σημειώνει κάποια σημαντική μεταβολή. Το παραπάνω φαινόμενο μπορεί πιθανόν να αποδοθεί στην αρνητική ανατροφοδότηση που υφίσταται ο μεταγραφικός παράγοντας λόγω της ενεργοποίησης των αντιοξειδωτικών ενζύμων και την πιθανή επακόλουθη μείωση των επιπέδων των ελευθέρων ριζών. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα

μεταγραφής του Nrf2 έχει αποδειχθεί πως ρυθμίζονται από τη στόχευση μίας σειράς μεταγραφικών παραγόντων όπως ο NF-κB, AP-1 και p53, οι οποίοι με τη σειρά τους πυροδοτούν τη δράση του βάσει μιας πληθώρας κυτταρικών ερεθισμάτων (F. He, Ru, et al., 2020). Ταυτόχρονα, η περιοχή του υποκινητή του γονιδίου του Nrf2 διαπιστώνεται πως βρίσκεται συχνά σε κατάσταση υπερμεθυλίωσης και συνεπώς η έκφραση του γονιδίου παραμένει σε χαμηλά επίπεδα (Khor et al., 2014). Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στη ρύθμιση που υπόκειται μετα-μεταγραφικά ο Nrf2, κυρίως μέσω μορίων microRNAs, αφού όλο ένα και αυξάνονται τα ευρήματα για νέα ρυθμιστικά μόρια miRNAs που στοχεύουν το μετάγραφο του Nrf2, οδηγώντας τελικά σε μειωμένα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου (Zhang et al., 2015). Μια ακόμα διαπίστωση που μπορεί να γίνει για τα χαμηλά επίπεδα μεταγραφής του Nrf2 σχετίζεται με την επίδραση που ασκεί στο γονιδίο του ο μεταγραφικός παράγοντας των φλεγμονωδών αποκρίσεων NF-κB, ο οποίος έχει προσδιοριστεί ότι μπορεί να συνδεθεί επιτυχώς σε καθορισμένα σημεία πρόσδεσης εντός του υποκινητή του NFE2L2 και να ρυθμίσει την έκφρασή του (F. He, Ru, et al., 2020), προσφέροντας έτσι ένα πιθανό σενάριο για τα μειωμένα επίπεδα μεταγραφής. Ο NF-κB πιθανώς δεν εκφράζεται σημαντικά, καθώς η συγκέντρωση των υλικών της μελέτης που χρησιμοποιήθηκε είναι υποτοξική και δεν έχει εκκινήσει κάποιο φλεγμονώδες μονοπάτι (Bellezza et al., 2018).

Επόμενο γονίδιο, του οποίου μελετήθηκε η έκφραση, ήταν αυτό της καταλυτικής μονάδας της λιγάσης της γλουταμικής κυστεΐνης (GCLC). Η παραπάνω υπομονάδα μαζί με τη GCLM συνιστούν το ενζύμο της λιγάσης της γλουταμικής κυστεΐνης (GCL), το οποίο μεσολαβεί για τη *de novo* σύνθεση της γ-γλουτάμιλοκυστεΐνης, ένα ενδιάμεσο μόριο για τη παραγωγή της GSH. Εμφανώς, η εκτίμηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου GCLC αντικατοπτρίζει επαρκώς τα επίπεδα της παραγόμενης γ-γλουτάμιλοκυστεΐνης και έμμεσα προδιαθέτει για την αποτελεσματική σύνθεση της GSH. Τα αποτελέσματα της RT-PCR έδειξαν μια ισχυρή τάση αύξησης της έκφρασης στην περίπτωση των CNTs-COOH αλλά και στατιστικά σημαντική αύξηση στη περίπτωση των CNTs@Fe₃O₄. Συνεπώς, εξάγεται το συμπέρασμα ότι κατά την χορήγηση των δύο παραπάνω τύπων υλικών έχει εκκινήσει η *de novo* σύνθεση της GSH. Η μεταγραφή της GCLC δεν εξαρτάται εξ' ολοκλήρου από την ρύθμιση του Nrf2, καθώς η μεταγραφή του γονιδίου της συντελείται και από άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο Nrf1 και ο AP-1 (Yang et al., 2005).

Σχετικά με την έκφραση του γονιδίου της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GSR), διαπιστώθηκε η έλλειψη κάποιας στατιστικά σημαντικής μεταβολής συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Τελευταίο γονίδιο του οποίου ελεγχθήκαν τα μεταγραφικά επίπεδα ήταν αυτό της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης 1 (GPx1). Η GPx1 χρησιμοποιεί τη GSH ως συμπάραγοντα για την μετατροπή του H₂O₂ σε νερό και μοριακό οξυγόνο αποτρέποντας τις τοξικές επιδράσεις της συσσώρευσης H₂O₂. Η σημαντική αύξηση που παρατηρήθηκε στα μεταγραφικά επίπεδα στην περίπτωση των CNTs-Ref μπορεί να μεταφραστεί ως αυξημένη επαγωγή της αντιοξειδωτικής απόκρισης, λόγω της μεγαλύτερης οξειδωτικής βλάβης που πιθανώς προκαλούν οι CNTs-Ref.

Η σύγκριση των παραπάνω αποτελεσμάτων με πορίσματα αντίστοιχων μελετών δεν καθίσταται εφικτή, καθότι στη διεθνή βιβλιογραφία δεν είναι διαθέσιμες μελέτες με το συγκεκριμένο χρονικό εύρος έκθεσης σε νανοσωλήνες άνθρακα, ενώ θα πρέπει να επισημανθεί ότι για τους καινοτόμους CNTs@Fe₃O₄ και CNTs@ZnFe₂O₄ δεν έχουν διεξαχθεί μελέτες εκτίμησης τοξικότητας. Τουναντίον, οι κατηγορίες των CNTs-Ref και CNTs-COOH έχουν απασχολήσει σε μεγάλο βαθμό την επιστημονική κοινότητα για τις τοξικές τους συνέπειες στα βιολογικά συστήματα την τελευταία δεκαετία. Πρόσφατο παράδειγμα μελέτης της τοξικότητας των CNTs-COOH αποτελεί η εργασία του Lu και των συνεργατών του (Lu et al., 2022), κατά την οποία προσδιορίστηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα κρίσιμων αντιοξειδωτικών γονιδίων (SOD1, SOD2, CAT, GPX1, GPX2, CYP-35A2) στο ζωικό μοντέλο, *Caenorhabditis elegans*. Τα αποτελέσματα της μελέτης φανέρωσαν μία αξιολογη αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων και συνεπώς επαγωγή της αντιοξειδωτικής απόκρισης. Ακόμα μία περίπτωση στην οποία η μελέτη επικεντρώθηκε στην έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων και μάλιστα με τη χρήση μακροφάγων κυττάρων, είναι η έρευνα της Nahle και των συνεργατών της (Nahle et al., 2020), βάσει της οποίας οι πολυφλοιϊκοί νανοσωλήνες άνθρακα επήγαγαν αποτελεσματικά τη μεταγραφή αντιοξειδωτικών γονιδίων, όπως της GCLc.

Σε ότι αφορά τα αποτελέσματα που σχετίζονται με τα πρωτεϊνικά επίπεδα της GCLc, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική μεταβολή σε οποιαδήποτε περίπτωση. Επίσης, κατά τη συσχέτιση των επιπέδων του mRNA και των αντίστοιχων της πρωτεΐνης της GCLc δεν διακρίνεται κάποιο κοινό μοτίβο μεταβολής. Φυσικά, οι μοριακοί μηχανισμοί που μεσολαβούν από την σύνθεση του ενός μορίου (mRNA) μέχρι του άλλου (πρωτεΐνη) κρύβουν μια πληθώρα παραγόντων που καθιστά αδύνατη την άμεση συσχέτισή τους. Οι παράγοντες αυτοί συνήθως είναι η αποτελεσματικότητα της μετάφρασης, ο ρυθμός αποικοδόμησης της πρωτεΐνης, η ευαισθησία των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των επιπέδων, οι τροποποιήσεις στα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν και φυσικά οι άγνωστες επιδράσεις που πιθανώς προκύπτουν από τη χορήγηση εξωγενών παραγόντων, όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

6. Βιβλιογραφία

- Accardi, M. V., Daniels, B. A., Brown, P. M. G. E., Fritschy, J. M., Tyagarajan, S. K., & Bowie, D. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species regulate the strength of inhibitory GABA-mediated synaptic transmission. *Nature Communications*, *5*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms4168>
- Aguilar, T. A. F., Hernández, Navarro, B. C., Pérez, J. A. M., Aguilar, T. A. F., Hernández, Navarro, B. C., & Pérez, J. A. M. (2016a). Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress. *A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2*. <https://doi.org/10.5772/65715>
- Ahmed, S. M. U., Luo, L., Namani, A., Wang, X. J., & Tang, X. (2017). Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1863*(2), 585–597. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2016.11.005>
- Alfadda, A. A., & Sallam, R. M. (2012). Reactive oxygen species in health and disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/936486>
- Ashrafizadeh, M., Ahmadi, Z., Samarghandian, S., Mohammadinejad, R., Yaribeygi, H., Sathyapalan, T., & Sahebkar, A. (2020). MicroRNA-mediated regulation of Nrf2 signaling pathway: Implications in disease therapy and protection against oxidative stress. *Life Sciences*, *244*(October 2019). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117329>
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J. Y., Lowry, G. V., Jolivet, J. P., & Wiesner, M. R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology* *2009 4:10*, *4*(10), 634–641. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.242>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Aziz, N., Saleh, R. A., Sharma, R. K., Lewis-Jones, I., Esfandiari, N., Thomas, A. J., & Agarwal, A. (2004). Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertility and Sterility*, *81*(2), 349–354. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2003.06.026>

- Baird, L., Llères, D., Swift, S., & Dinkova-Kostova, A. T. (2013). Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(38), 15259–15264. https://doi.org/10.1073/PNAS.1305687110/SUPPL_FILE/PNAS.201305687SI.PDF
- Bardaweel, S. K., Gul, M., Alzweiri, M., Ishaqat, A., Alsalamat, H. A., & Bashatwah, R. M. (2018). Reactive oxygen species: The dual role in physiological and pathological conditions of the human body. *Eurasian Journal of Medicine*, *50*(3), 193–201. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2018.17397>
- Baschieri, A., & Amorati, R. (2021). Methods to Determine Chain-Breaking Antioxidant Activity of Nanomaterials beyond DPPH•. A Review. *Antioxidants* *2021*, Vol. 10, Page 1551, *10*(10), 1551. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10101551>
- Bedard, K., & Krause, K.-H. (2007). *The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>.-For
- Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A., & Donato, R. (2018). Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1865*(5), 721–733. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2018.02.010>
- Bjørklund, G., & Chirumbolo, S. (2017). Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, *33*, 311–321. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2016.07.018>
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany*, *91*(2), 179. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCF118>
- Boyes, W. K., & Van Thriel, C. (2020). Neurotoxicology of Nanomaterials. *Chemical Research in Toxicology*, *33*(5), 1121. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRESTOX.0C00050>
- Brigelius-Flohé, R. (2021). Vitamin E research: Past, now and future. *Free Radical Biology and Medicine*, *177*, 381–390. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2021.10.029>
- Canning, P., Sorrell, F. J., & Bullock, A. N. (2015). Structural basis of Keap1 interactions with Nrf2. *Free Radical Biology and Medicine*, *88*(Part B), 101–107. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2015.05.034>

- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, *51*(1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2012.09.021>
- Chen, B., Liu, Y., Song, W. M., Hayashi, Y., Ding, X. C., & Li, W. H. (2011). In vitro evaluation of cytotoxicity and oxidative stress induced by multiwalled carbon nanotubes in murine RAW 264.7 macrophages and human A549 lung cells. *Biomedical and Environmental Sciences : BES*, *24*(6), 593–601. <https://doi.org/10.3967/0895-3988.2011.06.002>
- Chen, Q., Wang, Q., Zhu, J., Xiao, Q., & Zhang, L. (2018). Reactive oxygen species: key regulators in vascular health and diseases. *British Journal of Pharmacology*, *175*(8), 1279–1292. <https://doi.org/10.1111/bph.13828>
- Chen, S. J., Allam, J. P., Duan, Y. G., & Haidl, G. (2013). Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *288*(1), 191–199. <https://doi.org/10.1007/s00404-013-2801-4>
- Cheng, X., Ku, C. H., & Siow, R. C. M. (2013). Regulation of the Nrf2 antioxidant pathway by microRNAs: New players in micromanaging redox homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*, *64*, 4–11. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2013.07.025>
- Chittiboyina, S., Bai, Y., & Lelièvre, S. A. (2018). Microenvironment-Cell Nucleus Relationship in the Context of Oxidative Stress. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *6*(MAR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00023>
- Chowdhry, S., Zhang, Y., McMahon, M., Sutherland, C., Cuadrado, A., & Hayes, J. D. (2012). Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. *Oncogene* *2013* *32*:32, *32*(32), 3765–3781. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.388>
- Cirilli, I., Damiani, E., Dłudla, P. V., Hargreaves, I., Marcheggiani, F., Millichap, L. E., Orlando, P., Silvestri, S., & Tiano, L. (2021). Role of coenzyme q10 in health and disease: An update on the last 10 years (2010–2020). *Antioxidants*, *10*(8), 1–24. <https://doi.org/10.3390/antiox10081325>
- Cleasby, A., Yon, J., Day, P. J., Richardson, C., Tickle, I. J., Williams, P. A., Callahan, J. F., Carr, R., Concha, N., Kerns, J. K., Qi, H., Sweitzer, T., Ward, P., & Davies, T. G. (2014). Structure of the BTB Domain of Keap1 and Its Interaction with the Triterpenoid Antagonist CDDO. *PLOS ONE*, *9*(6), e98896. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0098896>

- Cuadrado, A. (2015). Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3/β-TrCP. *Free Radical Biology and Medicine*, 88(Part B), 147–157. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2015.04.029>
- Dayem, A. A., Hossain, M. K., Lee, S. Bin, Kim, K., Saha, S. K., Yang, G. M., Choi, H. Y., & Cho, S. G. (2017). The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1). <https://doi.org/10.3390/IJMS18010120>
- De Volder, M. F. L., Tawfick, S. H., Baughman, R. H., & Hart, A. J. (2013). Carbon nanotubes: present and future commercial applications. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6119), 535–539. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1222453>
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>
- Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>
- Dizdaroglu, M., & Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*, 46(4), 382–419. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.653969>
- Dong, X., Liu, L., Zhu, D., Zhang, H., Li, Y., & Leng, X. (2015). Effects of carboxylated multiwalled carbon nanotubes on the function of macrophages. *Journal of Nanomaterials*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/638760>
- Drasler, B., Vanhecke, D., Rodriguez-Lorenzo, L., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2017). Quantifying nanoparticle cellular uptake: which method is best? *Nanomedicine (London, England)*, 12(10), 1095–1099. <https://doi.org/10.2217/NNM-2017-0071>
- Eatemadi, A., Daraee, H., Karimkhanloo, H., Kouhi, M., Zarghami, N., Akbarzadeh, A., Abasi, M., Hanifehpour, Y., & Joo, S. W. (2014). Carbon nanotubes: Properties, synthesis, purification, and medical applications. *Nanoscale Research Letters*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-393/TABLES/6>
- Eddaikra, A., Eddaikra, N., Eddaikra, A., & Eddaikra, N. (2021). Endogenous Enzymatic Antioxidant Defense and Pathologies. *Antioxidants - Benefits, Sources, Mechanisms of Action*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.95504>

- Foroozandeh, P., & Aziz, A. A. (2018). Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters* 2018 13:1, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S11671-018-2728-6>
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology* 2020 94:3, 94(3), 651–715. <https://doi.org/10.1007/S00204-020-02689-3>
- Hajam, Y. A., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheikh, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., Pramodh, S., Alsulimani, A., Alkhanani, M. F., Harakeh, S., Hussain, A., Haque, S., & Reshi, M. S. (2022). Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives. *Cells*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/cells11030552>
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141(2), 312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Hayes, J. D., Chowdhry, S., Dinkova-Kostova, A. T., & Sutherland, C. (2015). Dual regulation of transcription factor Nrf2 by Keap1 and by the combined actions of β -TrCP and GSK-3. *Biochemical Society Transactions*, 43, 611–620. <https://doi.org/10.1042/BST20150011>
- Hayes, J. D., & Dinkova-Kostova, A. T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(4), 199–218. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2014.02.002>
- He, F., Antonucci, L., & Karin, M. (2020). NRF2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer. *Carcinogenesis*, 41(4), 405–416. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa039>
- He, F., Ru, X., & Wen, T. (2020). NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 1–23. <https://doi.org/10.3390/IJMS21134777>
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., & Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(2), 532–553. <https://doi.org/10.1159/000485089>
- Hidalgo-Gutiérrez, A., González-García, P., Díaz-Casado, M. E., Barriocanal-Casado, E., López-Herrador, S., Quinzii, C. M., & López, L. C. (2021). Metabolic Targets of Coenzyme Q10 in Mitochondria. *Antioxidants* 2021, Vol. 10, Page 520, 10(4), 520. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10040520>

- Horie, M., & Tabei, Y. (2021). Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity. *Free Radical Research*, 55(4), 331–342.
<https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1859108>
- Hrycay, E. G., & Bandiera, S. M. (2015). *Monoxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Reaction Mechanisms of Cytochrome P450 Enzymes*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16009-2>
- Iciek, M., Bilska-Wilkosz, A., Kozdrowicki, M., & Górny, M. (2022). Reactive sulfur species and their significance in health and disease. *Bioscience Reports*, 42(9), 1–35. <https://doi.org/10.1042/BSR20221006>
- Iijima, S. (2002). Carbon nanotubes: past, present, and future. *Physica B: Condensed Matter*, 323(1–4), 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0921-4526\(02\)00869-4](https://doi.org/10.1016/S0921-4526(02)00869-4)
- Iso, T., Suzuki, T., Baird, L., & Yamamoto, M. (2023). Absolute Amounts and Status of the Nrf2-Keap1-Cul3 Complex within Cells. <https://doi.org/10.1128/MCB.00389-16>, 36(24), 3100–3112.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00389-16>
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9(1), 1050–1074.
<https://doi.org/10.3762/BJNANO.9.98>
- Kasai, S., Shimizu, S., Tataru, Y., Mimura, J., & Itoh, K. (2020). Regulation of Nrf2 by mitochondrial reactive oxygen species in physiology and pathology. *Biomolecules*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/biom10020320>
- Kehrer, J. P., & Klotz, L. O. (2015). Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. <http://dx.doi.org/10.3109/10408444.2015.1074159>, 45(9), 765–798.
<https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1074159>
- Kehrer, J. P., Robertson, J. D., & Smith, C. V. (2010). Free Radicals and Reactive Oxygen Species. *Comprehensive Toxicology: Second Edition*, 1–14, 277–307.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7>
- Khlebnikov, A. I., Schepetkin, I. A., Domina, N. G., Kirpotina, L. N., & Quinn, M. T. (2007). Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(4), 1749–1770.
<https://doi.org/10.1016/J.BMC.2006.11.037>

- Khor, T. O., Fuentes, F., Shu, L., Paredes-Gonzalez, X., Yang, A. Y., Liu, Y., Smiraglia, D. J., Yegnasubramanian, S., Nelson, W. G., & Kong, A. N. T. (2014). Epigenetic DNA Methylation of Anti-oxidative Stress Regulator NRF2 in Human Prostate Cancer. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 7(12), 1186. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0127>
- Kim, J., & Bai, H. (2022). Peroxisomal Stress Response and Inter-Organelle Communication in Cellular Homeostasis and Aging. *Antioxidants*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/antiox11020192>
- Kodali, V., & Thrall, B. D. (2015). Oxidative Stress and Nanomaterial-Cellular Interactions. *Studies on Experimental Toxicology and Pharmacology*, 347–367. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19096-9_18
- Korge, P., Calmettes, G., & Weiss, J. N. (2015). Increased reactive oxygen species production during reductive stress: The roles of mitochondrial glutathione and thioredoxin reductases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1847(6–7), 514–525. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2015.02.012>
- Kryszczuk, M., & Kowalczyk, O. (2022a). Significance of NRF2 in physiological and pathological conditions an comprehensive review. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 730, 109417. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2022.109417>
- Kumar, R., Prasad, H. K., & Kumar, M. (2021). The Double-Edged Sword Role of ROS in Cancer. *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Mechanistic Aspects*, 1–17. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4501-6_71-1
- Kumar, S., Mishra, A., & Pandey, A. K. (2013). Antioxidant mediated protective effect of Parthenium hysterophorus against oxidative damage using in vitro models. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-120/TABLES/6>
- Kumari, R., & Jat, P. (2021). Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 485. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.645593/BIBTEX>
- Kurinna, S., & Werner, S. (2015). NRF2 and microRNAs: New but awaited relations. *Biochemical Society Transactions*, 43, 595–601. <https://doi.org/10.1042/BST20140317>
- Kyriakidou, K., Brasinika, D., Trompeta, A. F. A., Bergamaschi, E., Karoussis, I. K., & Charitidis, C. A. (2020). In vitro cytotoxicity assessment of pristine and carboxyl-functionalized MWCNTs. *Food and Chemical Toxicology*, 141, 111374. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2020.111374>

- Laudon, M., & Frydman-Marom, A. (2014). Therapeutic Effects of Melatonin Receptor Agonists on Sleep and Comorbid Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* 2014, Vol. 15, Pages 15924-15950, 15(9), 15924–15950. <https://doi.org/10.3390/IJMS150915924>
- Lennon, C. W., Wahl, D., Goetz, J. R., & Weinberger, J. (2021). Reactive Chlorine Species Reversibly Inhibit DnaB Protein Splicing in Mycobacteria. *Microbiology Spectrum*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00301-21>
- Li, X., Fang, P., Li, Y., Kuo, Y. M., Andrews, A. J., Nanayakkara, G., Johnson, C., Fu, H., Shan, H., Du, F., Hoffman, N. E., Yu, D., Eguchi, S., Madesh, M., Koch, W. J., Sun, J., Jiang, X., Wang, H., & Yang, X. (2016). Mitochondrial Reactive Oxygen Species Mediate Lysophosphatidylcholine-induced Endothelial Cell Activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(6), 1090. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306964>
- Li, Y., & Cao, J. (2018). The impact of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) on macrophages: contribution of MWCNT characteristics. *Science China. Life Sciences*, 61(11), 1333–1351. <https://doi.org/10.1007/S11427-017-9242-3>
- Liu, J., Wu, M., Zhang, R., & Xu, Z. P. (2021). Oxygen-derived free radicals: Production, biological importance, bioimaging, and analytical detection with responsive luminescent nanoprobe. *View*, 2(5), 20200139. <https://doi.org/10.1002/VIW.20200139>
- Liu, S., Pi, J., & Zhang, Q. (2022). Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway. *Redox Biology*, 54, 102389. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2022.102389>
- Liu, T., Lv, Y. F., Zhao, J. L., You, Q. D., & Jiang, Z. Y. (2021). Regulation of Nrf2 by phosphorylation: Consequences for biological function and therapeutic implications. *Free Radical Biology and Medicine*, 168(January), 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.034>
- Liu, Y., Song, W., Li, W., & Gaku, I. (2008). [In vitro cytotoxicity and oxidative damage effects of multi-wall carbon nanotube on RAW264.7 macrophages]. *Wei Sheng Yan Jiu = Journal of Hygiene Research*, 37(3), 281–284.
- Lundberg, J. O., & Weitzberg, E. (2022). Nitric oxide signaling in health and disease. *Cell*, 185(16), 2853–2878. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2022.06.010>
- Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 224, 164–175. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2014.10.016>

- Lüthje, S., Möller, B., Perrineau, F. C., & Wöltje, K. (2013). Plasma Membrane Electron Pathways and Oxidative Stress. *Https://Home.Liebertpub.Com/Ars*, 18(16), 2163–2183. <https://doi.org/10.1089/ARS.2012.5130>
- Ma, W.-X., Li, C.-Y., Tao, R., Wang, X.-P., & Yan, L.-J. (2020). *Reductive Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction and Cardiomyopathy*. <https://doi.org/10.1155/2020/5136957>
- Madkour, L. H. (2020). Endoplasmic reticulum stress and associated ROS in disease pathophysiology applications. *Reactive Oxygen Species (ROS), Nanoparticles, and Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-Induced Cell Death Mechanisms*, 265–297. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822481-6.00011-6>
- Mahomoodally, M. F., Désiré A.-L., D., & Rosette M. A.-L., E. (2022). Catalase. *Antioxidants Effects in Health: The Bright and the Dark Side*, 81–90. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819096-8.00022-7>
- Maity, S., Rajkumar, A., Matai, L., Bhat, A., Ghosh, A., Agam, G., Kaur, S., Bhatt, N. R., Mukhopadhyay, A., Sengupta, S., & Chakraborty, K. (2016). Oxidative Homeostasis Regulates the Response to Reductive Endoplasmic Reticulum Stress through Translation Control. *Cell Reports*, 16(3), 851–865. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.06.025>
- Maiuolo, J., Oppedisano, F., Gratteri, S., Muscoli, C., & Mollace, V. (2016). Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology*, 213, 8–14. <https://doi.org/10.1016/J.IJCARD.2015.08.109>
- Manke, A., Wang, L., & Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/942916>
- Marrocco, V., Bogomolovas, J., Ehler, E., dos Remedios, C. G., Yu, J., Gao, C., & Lange, S. (2019). PKC and PKN in heart disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 128, 212–226. <https://doi.org/10.1016/J.YJMCC.2019.01.029>
- Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., & D'Alessandro, A. G. (2022). Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *Oxygen*, 2(2), 48–78. <https://doi.org/10.3390/oxygen2020006>
- Mendoza, R. P., & Brown, J. M. (2019). Engineered nanomaterials and oxidative stress: Current understanding and future challenges. *Current Opinion in Toxicology*, 13, 74–80. <https://doi.org/10.1016/J.COTOX.2018.09.001>

- Milkovic, L., Gasparovic, A. C., Cindric, M., Mouthuy, P. A., & Zarkovic, N. (2019). Short overview of ROS as cell function regulators and their implications in therapy concepts. *Cells*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/cells8080793>
- Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*, 63(1), 68–78. <https://doi.org/10.1016/J.ADVMS.2017.05.005>
- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(7), 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Moghadam, Z. M., Henneke, P., & Kolter, J. (2021). From Flies to Men: ROS and the NADPH Oxidase in Phagocytes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 628991. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.628991/BIBTEX>
- Monego, D. L., da Rosa, M. B., & do Nascimento, P. C. (2017). Applications of computational chemistry to the study of the antiradical activity of carotenoids: A review. *Food Chemistry*, 217, 37–44. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.08.073>
- Murakami, K., Murata, N., Noda, Y., Tahara, S., Kaneko, T., Kinoshita, N., Hatsuta, H., Murayama, S., Barnham, K. J., Irie, K., Shirasawa, T., & Shimizu, T. (2011). SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid β protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(52), 44557–44568. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.279208>
- Mylonis, I., Lakka, A., Tsakalof, A., & Simos, G. (2010). The dietary flavonoid kaempferol effectively inhibits HIF-1 activity and hepatoma cancer cell viability under hypoxic conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398(1), 74–78. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2010.06.038>
- Nahle, S., Cassidy, H., Leroux, M. M., Mercier, R., Ghanbaja, J., Doumandji, Z., Matallanas, D., Rihn, B. H., Joubert, O., & Ferrari, L. (2020). Genes expression profiling of alveolar macrophages exposed to non-functionalized, anionic and cationic multi-walled carbon nanotubes shows three different mechanisms of toxicity. *Journal of Nanobiotechnology*, 18(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S12951-020-0587-7/FIGURES/9>

- Ngo, V., & Duennwald, M. L. (2022). Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. *Antioxidants*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/antiox11122345>
- Norizan, M. N., Moklis, M. H., Ngah Demon, S. Z., Halim, N. A., Samsuri, A., Mohamad, I. S., Knight, V. F., & Abdullah, N. (2020). Carbon nanotubes: functionalisation and their application in chemical sensors. *RSC Advances*, 10(71), 43704–43732. <https://doi.org/10.1039/D0RA09438B>
- Ovalle, R., & Ovalle, R. (2022). *A History of the Fenton Reactions (Fenton Chemistry for Beginners)*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.99846>
- Patel, R., Rinker, L., Peng, J., & Chilian, W. M. (2018). Reactive Oxygen Species: The Good and the Bad. *Reactive Oxygen Species (ROS) in Living Cells*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71547>
- Pegg, A. E. (2013). *Toxicity of Polyamines and Their Metabolic Products*.
- Perera, R. M., & Zoncu, R. (2016). The Lysosome as a Regulatory Hub. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32, 223–253. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125125>
- Pérez-Torres, I., Guarner-Lans, V., & Rubio-Ruiz, M. E. (2017). Reductive Stress in Inflammation-Associated Diseases and the Pro-Oxidant Effect of Antioxidant Agents. *International Journal of Molecular Sciences 2017*, Vol. 18, Page 2098, 18(10), 2098. <https://doi.org/10.3390/IJMS18102098>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pietroiusti, A. (2012). Health implications of engineered nanomaterials. *Nanoscale*, 4(4), 1231–1247. <https://doi.org/10.1039/C2NR11688J>
- Pietroiusti, A., Campagnolo, L., & Fadeel, B. (2013). Interactions of engineered nanoparticles with organs protected by internal biological barriers. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 9(9–10), 1557–1572. <https://doi.org/10.1002/SMLL.201201463>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>

- Rada, P., Rojo, A. I., Chowdhry, S., McMahon, M., Hayes, J. D., & Cuadrado, A. (2011). SCF/ β -TrCP Promotes Glycogen Synthase Kinase 3-Dependent Degradation of the Nrf2 Transcription Factor in a Keap1-Independent Manner. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(6), 1121–1133. <https://doi.org/10.1128/MCB.01204-10>
- Rada, P., Rojo, A. I., Evrard-Todeschi, N., Innamorato, N. G., Cotte, A., Jaworski, T., Tobón-Velasco, J. C., Devijver, H., García-Mayoral, M. F., Van Leuven, F., Hayes, J. D., Bertho, G., & Cuadrado, A. (2012). Structural and Functional Characterization of Nrf2 Degradation by the Glycogen Synthase Kinase 3/ β -TrCP Axis. *Molecular and Cellular Biology*, *32*(17), 3486–3499. <https://doi.org/10.1128/MCB.00180-12>
- Raizner, A. E. (2019). Coenzyme Q10. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*, *15*(3), 185. <https://doi.org/10.14797/MDCJ-15-3-185>
- Reczek, C. R., & Chandel, N. S. (2015). ROS-dependent signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*, *33*, 8–13. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2014.09.010>
- Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1863*(12), 2977–2992. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2016.09.012>
- Repetto, M. G., Ferrarotti, N. F., & Boveris, A. (2010). The involvement of transition metal ions on iron-dependent lipid peroxidation. *Archives of Toxicology*, *84*(4), 255–262. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0487-y>
- Rich, P. R., & Maréchal, A. (2010). The mitochondrial respiratory chain. *Essays in Biochemistry*, *47*, 1–23. <https://doi.org/10.1042/BSE0470001>
- Romero, A. C., Hernández, E. G. O., Cerón, T. F., Chávez, A. Á., Romero, A. C., Hernández, E. G. O., Cerón, T. F., & Chávez, A. Á. (2013). The Exogenous Antioxidants. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. <https://doi.org/10.5772/52490>
- Rushworth, S. A., Zaitseva, L., Murray, M. Y., Shah, N. M., Bowles, K. M., & MacEwan, D. J. (2012). The high Nrf2 expression in human acute myeloid leukemia is driven by NF- κ B and underlies its chemo-resistance. *Blood*, *120*(26), 5188–5198. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2012-04-422121>
- Ruvolo, P. P. (2017). GSK-3 as a novel prognostic indicator in leukemia. *Advances in Biological Regulation*, *65*, 26–35. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOR.2017.05.001>

- Saallah, S., & Lenggoro, I. W. (2018). Nanoparticles Carrying Biological Molecules: Recent Advances and Applications †. *KONA Powder and Particle Journal No.*, 35, 89–111. <https://doi.org/10.14356/kona.2018015>
- Sabourian, P., Yazdani, G., Ashraf, S. S., Frounchi, M., Mashayekhan, S., Kiani, S., & Kakkar, A. (2020). Effect of Physico-Chemical Properties of Nanoparticles on Their Intracellular Uptake. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 1–20. <https://doi.org/10.3390/IJMS21218019>
- Sajadimajd, S., & Khazaei, M. (2017). Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2. *Current Cancer Drug Targets*, 18(6), 538–557. <https://doi.org/10.2174/1568009617666171002144228>
- Salazar, M., Rojo, A. I., Velasco, D., De Sagarra, R. M., & Cuadrado, A. (2006). Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibits the Xenobiotic and Antioxidant Cell Response by Direct Phosphorylation and Nuclear Exclusion of the Transcription Factor Nrf2. *Journal of Biological Chemistry*, 281(21), 14841–14851. <https://doi.org/10.1074/JBC.M513737200>
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., Hernández-Carlos, B., Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. *Antioxidants*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.85270>
- Schiliro, C., & Firestein, B. L. (2021). Mechanisms of metabolic reprogramming in cancer cells supporting enhanced growth and proliferation. *Cells*, 10(5), 1–41. <https://doi.org/10.3390/cells10051056>
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.06.018>
- Shang, L., Nienhaus, K., & Nienhaus, G. U. (2014). Engineered nanoparticles interacting with cells: Size matters. *Journal of Nanobiotechnology*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-12-5/FIGURES/1>
- Singh, F., Charles, A. L., Schlagowski, A. I., Bouitbir, J., Bonifacio, A., Piquard, F., Krähenbühl, S., Geny, B., & Zoll, J. (2015). Reductive stress impairs myoblasts mitochondrial function and triggers mitochondrial hormesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1853(7), 1574–1585. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2015.03.006>
- Sireesha, M., Jagadeesh Babu, V., Kranthi Kiran, A. S., & Ramakrishna, S. (2018). A review on carbon nanotubes in biosensor devices and their applications in

medicine. <https://doi.org/10.1080/20550324.2018.1478765>, 4(2), 36–57.
<https://doi.org/10.1080/20550324.2018.1478765>

- Snezhkina, A. V, Kudryavtseva, A. V, Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V, Melnikova, N. V, Krasnov, G. S., & Dmitriev, A. A. (2019). *Review Article ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. 2019.* <https://doi.org/10.1155/2019/6175804>
- Sobhani, Z., Behnam, M. A., Emami, F., Dehghanian, A., & Jamhiri, I. (2017). Photothermal therapy of melanoma tumor using multiwalled carbon nanotubes. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 4509–4517.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S134661>
- Sukhanova, A., Bozrova, S., Sokolov, P., Berestovoy, M., Karaulov, A., & Nabiev, I. (2018). Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Research Letters* 2018 13:1, 13(1), 1–21.
<https://doi.org/10.1186/S11671-018-2457-X>
- Taciak, B., Białasek, M., Braniewska, A., Sas, Z., Sawicka, P., Kiraga, L., Rygiel, T., & Król, M. (2018). Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLoS ONE*, 13(6).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0198943>
- Taguchi, K., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2011). Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to Cells*, 16(2), 123–140. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2443.2010.01473.X>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, 140(6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.01.022>
- Tanaka, M., Aoki, K., Haniu, H., Kamanaka, T., Takizawa, T., Sobajima, A., Yoshida, K., Okamoto, M., Kato, H., & Saito, N. (2020). Applications of Carbon Nanotubes in Bone Regenerative Medicine. *Nanomaterials* 2020, Vol. 10, Page 659, 10(4), 659. <https://doi.org/10.3390/NANO10040659>
- Tang, C. T., Lin, X. L., Wu, S., Liang, Q., Yang, L., Gao, Y. J., & Ge, Z. Z. (2018). NOX4-driven ROS formation regulates proliferation and apoptosis of gastric cancer cells through the GLI1 pathway. *Cellular Signalling*, 46, 52–63.
<https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2018.02.007>
- Teoh, S. T., & Lunt, S. Y. (2018). Metabolism in cancer metastasis: bioenergetics, biosynthesis, and beyond. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 10(2). <https://doi.org/10.1002/wsbm.1406>

- Tokuda, E., Okawa, E., Watanabe, S., Ono, S. I., & Marklund, S. L. (2013). Dysregulation of intracellular copper homeostasis is common to transgenic mice expressing human mutant superoxide dismutase-1s regardless of their copper-binding abilities. *Neurobiology of Disease*, *54*, 308–319. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2013.01.001>
- Tonelli, C., Chio, I. I. C., & Tuveson, D. A. (2018a). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants and Redox Signaling*, *29*(17), 1727–1745. <https://doi.org/10.1089/ARS.2017.7342/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE6.JPG>
- Torrente, L., & DeNicola, G. M. (2022). Targeting NRF2 and Its Downstream Processes: Opportunities and Challenges. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Pharmtox-052220-104025>, *62*, 279–300. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-052220-104025>
- Ulasov, A. V., Rosenkranz, A. A., Georgiev, G. P., & Sobolev, A. S. (2022). Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation. *Life Sciences*, *291*, 120111. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2021.120111>
- Vardakas, P., Kartsonakis, I. A., Kyriazis, I. D., Kainourgiou, P., Trompeta, A. F. A., Charitidis, C. A., & Kouretas, D. (2023). Pristine, carboxylated, and hybrid multi-walled carbon nanotubes exert potent antioxidant activities in in vitro-cell free systems. *Environmental Research*, *220*, 115156. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.115156>
- Vardakas, P., Kyriazis, I. D., Kourti, M., Skaperda, Z., Tekos, F., & Kouretas, D. (2022). Oxidative stress-mediated nanotoxicity: mechanisms, adverse effects, and oxidative potential of engineered nanomaterials. *Advanced Nanomaterials and Their Applications in Renewable Energy*, 179–218. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99877-2.00012-6>
- Vardakas, P., Skaperda, Z., Tekos, F., Trompeta, A. F., Tsatsakis, A., Charitidis, C. A., & Kouretas, D. (2021). An integrated approach for assessing the in vitro and in vivo redox-related effects of nanomaterials. *Environmental Research*, *197*, 111083. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2021.111083>
- Wakabayashi, N., Skoko, J. J., Chartoumpakis, D. V., Kimura, S., Slocum, S. L., Noda, K., Palliyaguru, D. L., Fujimuro, M., Boley, P. A., Tanaka, Y., Shigemura, N., Biswal, S., Yamamoto, M., & Kensler, T. W. (2023). Notch-Nrf2 Axis: Regulation of Nrf2 Gene Expression and Cytoprotection by Notch Signaling. <https://doi.org/10.1128/MCB.01408-13>, *34*(4), 653–663. <https://doi.org/10.1128/MCB.01408-13>

- Wang, F., Yuan, Q., Chen, F., Pang, J., Pan, C., Xu, F., & Chen, Y. (2021). Fundamental Mechanisms of the Cell Death Caused by Nitrosative Stress. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 2506. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.742483/BIBTEX>
- Waterham, H. R., Ferdinandusse, S., & Wanders, R. J. A. (2016). Human disorders of peroxisome metabolism and biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(5), 922–933. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2015.11.015>
- Wen, T., Liu, J., He, W., Yang, A., Wen, T., Yang, A., & Liu, J. (2020). Nanomaterials and Reactive Oxygen Species (ROS). *Nanotechnology in Regenerative Medicine and Drug Delivery Therapy*, 361–387. https://doi.org/10.1007/978-981-15-5386-8_8
- Wu, K. C., Cui, J. Y., & Klaassen, C. D. (2012). Effect of Graded Nrf2 Activation on Phase-I and -II Drug Metabolizing Enzymes and Transporters in Mouse Liver. *PLOS ONE*, 7(7), e39006. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0039006>
- Xiao, W., & Loscalzo, J. (2020). Metabolic Responses to Reductive Stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, 32(18), 1330–1347. https://doi.org/10.1089/ARS.2019.7803/ASSET/IMAGES/LARGE/ARS.2019.7803_FIGURE8.JPEG
- Zaric, B. L., Macvanin, M. T., & Isenovic, E. R. (2023). Free radicals: Relationship to Human Diseases and Potential Therapeutic applications. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 154(July 2022), 106346. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2022.106346>
- Zeeshan, H. M. A., Lee, G. H., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2016). Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS17030327>
- Zhang, C., Shu, L., & Kong, A. N. T. (2015). MicroRNAs: new Players in Cancer Prevention Targeting Nrf2, Oxidative Stress and Inflammatory Pathways. *Current Pharmacology Reports*, 1(1), 21–30. <https://doi.org/10.1007/S40495-014-0013-7/TABLES/1>
- Zhang, C., Wang, X., Du, J., Gu, Z., & Zhao, Y. (2021). Reactive Oxygen Species-Regulating Strategies Based on Nanomaterials for Disease Treatment. *Advanced Science*, 8(3), 1–34. <https://doi.org/10.1002/advs.202002797>