

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΣΕ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΔΕΙΓΜΑ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΠΟΥ ΥΠΟΚΕΙΝΤΑΙ ΣΕ
ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΨΥΧΡΟΥ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΙΚΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ (COLD
ATMOSPHERIC PLASMA - CAP)**

**ASSESSMENT OF REDOX STATUS MARKERS IN SAMPLES OF
HUMAN PATIENTS SUBJECTED TO COLD ATMOSPHERIC
PLASMA (CAP) THERAPY**

Χωματά Παρασκευή του Ιωάννη

Λάρισα, 2025

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κουρέτας Δημήτριος (Επιβλέπων)

*Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και Τοξικολογίας, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

Γιαννούλη Περσεφόνη

*Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

Βεσκούκης Αριστείδης

*Επίκουρος Καθηγητής στην Οξειδοαναγωγική
Βιολογία της Διατροφής και της Άσκησης, Τμήμα Διαιτολογίας και
Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, κατά το Εαρινό εξάμηνο του 2025. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά, ένα προς ένα, τα άτομα που συνέβαλαν στη προσπάθειά μου.

Αρχικά, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Κουρέτα Δημήτριο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο, αλλά και να συνδράμω στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Βεσκούκη Αριστείδη και την κυρία Γιαννούλη Περσεφόνη, που δέχτηκαν να συμπληρώσουν την τριμελή εξεταστική επιτροπή μου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην υπεύθυνη μου στο εργαστήριο, κυρία Μακρή Σωτηρία, για την πολύτιμη καθοδήγησή της. Μου έμαθε πώς να κινούμαι με αυτοπεποίθηση και υπευθυνότητα στον εργαστηριακό χώρο, απαντώντας με σαφήνεια και υπομονή σε κάθε μου απορία. Η στάση της και ο τρόπος με τον οποίο εργάζεται, αποτελούν για μένα ένα ουσιαστικό πρότυπο επιστημονικής συνέπειας, ήθους και συνεργατικότητας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου, για τη βοήθεια τους το χρονικό διάστημα που εκπόνησα την εργασία μου, αλλά και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που δημιούργησαν.

Τέλος, αποδίδω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, που είναι πάντα δίπλα μου, με στηρίζουν και με ενθαρρύνουν σε κάθε μου βήμα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	2
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT.....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Ελεύθερες Ρίζες.....	9
1.1.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου – Reactive Oxygen Species (ROS).....	10
1.1.2 Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS)	11
1.1.3 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	12
1.1.3.1 Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια	13
1.1.3.2 Παραγωγή ROS στα υπεροξειδιοσώματα	13
1.1.3.3 Παραγωγή ROS στο ενδοπλασματικό δίκτυο	14
1.1.3.4 Παραγωγή ROS κατά τη Φαγοκυττάρωση.....	15
1.1.3.5 Εξωγενείς παραγοντες	15
1.1.4 Ελεύθερες ρίζες- Φυσιολογικές επιδράσεις στον οργανισμό	16
1.1.4.1 Κυτταρική Σηματοδότηση	17
1.1.4.2 Κυτταρική Ανάπτυξη, Διαφοροποίηση και Απόπτωση	18
1.1.5 Ελεύθερες ρίζες- Παθολογικές επιπτώσεις	18
1.2 Οξειδωτικό στρες	18
1.2.1 Οξειδωτικό στρες και ασθένειες.....	19
1.3 Αντιοξειδωτικά	20
1.3.1 Ενδογενή Αντιοξειδωτικά	20
1.3.2 Εξωγενή Αντιοξειδωτικά	22
1.4 Ψυχρό Ατμοσφαιρικό Πλάσμα - Cold Atmospheric Plasma (CAP)	22
1.4.1 Τεχνολογία Ψυχρού Ατμοσφαιρικού Πλάσματος (CAP)	24
1.4.2 Εφαρμογές του Ψυχρού Ατμοσφαιρικού Πλάσματος (CAP).....	25
1.4.2.1 Ιατρικές Εφαρμογές.....	25
1.4.2.2 Εφαρμογές στη Βιομηχανία και στα Τρόφιμα.....	28
1.4.2.3 Περιβαλλοντικές Εφαρμογές.....	29
1.4.3 Ψυχρό Ατμοσφαιρικό Πλάσμα και Οξειδωτικό Στρες	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΚΟΠΟΣ.....	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33

3.1 Γενικά.....	33
3.2 Πειραματικός σχεδιασμός και τύποι δειγμάτων.....	33
3.3.1 Επεξεργασία αίματος.....	34
3.4 Μέθοδος μέτρησης Αιμοσφαιρίνης.....	35
3.5 Μέθοδος μέτρησης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)	36
3.6 Μέθοδος μέτρησης Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (Total Antioxidant Capacity)	39
3.7 Ρυθμός αποικοδόμησης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H ₂ O ₂)– Μέθοδος μέτρησης δραστηριότητας καταλάσης (CAT).....	41
3.8 Μέθοδος εκτίμησης ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	43
3.10 Στατιστική ανάλυση	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
4.1 Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH).....	46
4.2 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).....	47
4.3 Προσδιορισμός του ρυθμού αποικοδόμησης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H ₂ O ₂).....	48
4.4 Προσδιορισμός ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).....	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	50
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	56

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα (Cold Atmospheric Plasma – CAP) αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη καινοτόμα τεχνολογία με αυξανόμενο ενδιαφέρον στον ιατρικό και βιοτεχνολογικό τομέα, κυρίως λόγω της ικανότητάς του να επιδρά σε βιολογικούς ιστούς χωρίς να προκαλεί θερμική καταπόνηση. Το CAP περιλαμβάνει δραστικά μόρια όπως δραστικές ρίζες, ιόντα και φωτόνια, τα οποία φαίνεται να επηρεάζουν την οξειδοαναγωγική ισορροπία των κυττάρων και να συμμετέχουν σε διαδικασίες όπως η επούλωση ιστών, η αντιμικροβιακή δράση και η ρύθμιση φλεγμονωδών αποκρίσεων. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε δείγμα αίματος ασθενών που υποβάλλονται σε θεραπεία με CAP. Οι δείκτες που προσδιορίστηκαν ήταν: τα ενδογενή επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), ο ρυθμός αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου, μέσω της μέτρησης της δραστικότητας του ενζύμου της καταλάσης (CAT) και οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε δείγμα αίματος 23 ασθενών που υποβλήθηκαν στη θεραπεία με CAP, στους οποίους ακολουθήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο: σχηματίστηκαν δυο γκρουπ ασθενών, όπου το πρώτο γκρουπ (Group A, n=13) για διάστημα 1 μήνα, υποβλήθηκε σε θεραπεία CAP. Στη συνέχεια έγινε διακοπή της θεραπείας για ένα μήνα και συνεχίστηκε για διάστημα ενός επιπλέον μήνα, όπου το CAP αντικαταστάθηκε με placebo, δηλαδή οι ασθενείς υπόκεινταν μόνο σε θεραπεία αέρα. Το δεύτερο γκρουπ (Group B, n=10) ακολούθησε ακριβώς το ανάποδο πρωτόκολλο. Από τη σύγκριση που πραγματοποιήθηκε ανάμεσα στα δυο γκρουπ, κατά την ίδια χρονική στιγμή δειγματοληψίας, προέκυψε ότι και οι τρεις δείκτες που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, η GSH, ο ρυθμός αποικοδόμησης του H_2O_2 και η TAC, αυξήθηκαν στατιστικώς σημαντικά στο γκρουπ Α σε σχέση με το γκρουπ Β. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της GSH και της CAT αυξήθηκαν σημαντικά κατά την 3^η αιμοληψία στο πρώτο γκρουπ, ενώ τα επίπεδα της TAC αυξήθηκαν σημαντικά τόσο κατά τη 2^η, όσο και στο τέλος του πειραματικού πρωτοκόλλου (4^η αιμοληψία). Τέλος τα επίπεδα της λιπιδικής υπεροξειδωσίας ήταν μειωμένα στο γκρουπ Α στην 4^η αιμοληψία. Από αυτή την πρώτη ανάλυση φάνηκε ότι η οξειδοαναγωγική κατάσταση των ασθενών του γκρούπ που πρώτα ακολούθησε την θεραπεία με ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα και στην συνέχεια θεραπεία με placebo, επηρεάστηκε περισσότερο σε σχέση με το άλλο γκρουπ. Περαιτέρω μελέτες και αναλύσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του

CAP, τόσο μέσα στο ίδιο άτομο καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας και στα δυο γκρουπ, όσο και ανάμεσα στο ίδιο γκρουπ συνολικά μεταξύ των διαφορετικών στιγμών αιμοληψίας. Επίσης θα μπορούσαν να μελετηθούν επιπλέον δείκτες που σχετίζονται με το οξειδοαναγωγικό προφίλ των ασθενών, όπως για παράδειγμα δραστικότητα σημαντικών αντιοξειδωτικών ενζύμων (πχ. αναγωγή, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης) ώστε να σχηματιστεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τον κάθε συμμετέχοντα στη μελέτη.

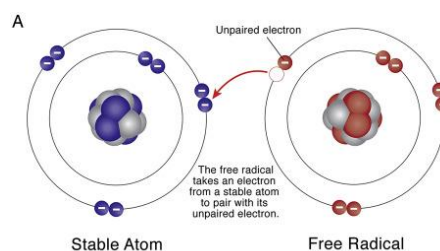
ABSTRACT

Cold Atmospheric Plasma (CAP) is a highly promising and innovative technology that is gaining increasing attention in medical and biotechnological fields, primarily due to its ability to affect biological tissues without causing thermal damage. CAP consists of reactive molecules such as reactive species, ions, and photons, which appear to influence the redox balance of cells and participate in processes such as tissue healing, antimicrobial activity, and regulation of inflammatory responses. The aim of this study was to evaluate crucial redox biomarkers in blood samples from patients undergoing CAP treatment. The markers assessed were: endogenous levels of reduced glutathione (GSH), total antioxidant capacity (TAC), hydrogen peroxide degradation rate (via measurement of catalase enzyme activity – CAT), protein carbonyls, and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Assessment was conducted on blood samples from 23 patients receiving CAP therapy, who followed the protocol described below: two groups of patients were formed. The first group (group A, n=13) underwent CAP treatment for one month, followed by a one-month cessation period, and then continued for another month with placebo treatment – meaning patients received only air therapy. The second group (group B, n=10) followed the reverse protocol. A comparison between the two groups, at the same sampling time points, showed that all three markers related to the body's antioxidant defense—GSH, hydrogen peroxide degradation rate, and TAC—were significantly increased in Group A compared to Group B. Specifically, GSH and CAT levels increased significantly at the 3rd blood sampling in Group A, while TAC levels increased significantly both at the 2nd and at the final (4th) blood sampling. Finally, lipid peroxidation levels were reduced in Group A at the 4th blood sampling. From this initial analysis, it appears that the redox status of patients in the group that first received CAP treatment and then placebo therapy was more affected compared to the other group. Further studies and analyses could be conducted to investigate the effect of CAP both within the same individual throughout the experimental process and between different sampling timepoints within each group. Additionally, further redox-related markers could be examined, such as the activity of key antioxidant enzymes (e.g., glutathione reductase, glutathione oxidase), in order to build a more comprehensive profile for each participant in the study.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες Ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα δραστικά μόρια, άτομα ή ιόντα, που φέρουν ένα ή περισσότερα μονήρη (ασύζευκτα) ηλεκτρόνια στη δομή τους, τα οποία τις καθιστούν ασταθείς, και μπορούν να υπάρχουν ως ανεξάρτητα στοιχεία μέσα στο κύτταρο. Για να αυξήσει τη σταθερότητά της, μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να προσλάβει ένα ηλεκτρόνιο από ένα άλλο άτομο (**Εικόνα 1**), με σκοπό να δημιουργηθεί ζεύγος ηλεκτρονίων, μετατρέποντας έτσι το δευτερεύον άτομο σε μια νέα ελεύθερη ρίζα (Khammash et al., 2023).



Εικόνα 1: Η δομή της ελεύθερης ρίζας – Πρόσληψη ηλεκτρονίου από άλλο άτομο (Khammash et al., 2023)

Τα στοιχεία της ύπαρξης των ελεύθερων ριζών αποκτήθηκαν μόλις στις αρχές του 20ου αιώνα. Οι χημικοί διαπίστωσαν σταδιακά τη συμμετοχή των ελεύθερων ριζών σε οργανικές αντιδράσεις και, στα μέσα του 20ου αιώνα, την παραγωγή τους σε βιολογικά συστήματα. Για αρκετές δεκαετίες, οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνταν ότι προκαλούν αποκλειστικά καταστροφικές συνέπειες, καθώς μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στα κύτταρα μέσω οξειδωτικών αντιδράσεων. Αυτή η ιδέα υποστηρίχθηκε κυρίως από το εύρημα ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS) αντιδρούν εύκολα με όλα τα βιολογικά μακρομόρια προκαλώντας την οξειδωτική τους τροποποίηση και διαταραχή της δομής και της λειτουργίας τους. Επιπλέον, ελήφθησαν στοιχεία ότι όταν, στον ζωντανό οργανισμό, οι ελεύθερες ρίζες δεν εξουδετερώνονται από συστήματα βιοχημικής άμυνας, αναπτύσσονται πολλές παθολογικές καταστάσεις. Ωστόσο, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, έγινε σαφές ότι οι ζωντανοί οργανισμοί όχι μόνο είχαν προσαρμοστεί στη συνύπαρξη με τις ελεύθερες ρίζες, αλλά και ανέπτυξαν μεθόδους για να μετατρέψουν αυτές τις τοξικές ουσίες προς όφελός τους, χρησιμοποιώντας τις σε κρίσιμες φυσιολογικές διεργασίες. Επομένως, οι ελεύθερες ρίζες έχουν διττό ρόλο στα ζωντανά συστήματα: είναι τοξικά παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού, προκαλώντας οξειδωτική βλάβη και δυσλειτουργία των ιστών και χρησιμεύουν ως μοριακά σήματα που ενεργοποιούν ευεργετικές αντιδράσεις στο στρες (Di Meo & Venditti, 2020).

Οι ελεύθερες ρίζες κατατάσσονται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες, ανάλογα με το κεντρικό τους άτομο, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 1**. Οι πιο διαδεδομένες είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS), με κεντρικό άτομο το οξυγόνο και το άζωτο, αντίστοιχα. Στις δραστικές μορφές περιλαμβάνονται δύο κατηγορίες, οι ρίζες (radicals) και οι μη ρίζες (non-radicals), ο διαχωρισμός των οποίων γίνεται με βάση την παρουσία ή την απουσία ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου στο άτομο (**Πίνακας 1**). Οι μη-ρίζες δεν φέρουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια, αλλά παραμένουν τόσο δραστικές, όσο και οι ρίζες της αντίστοιχης κατηγορίας τους, όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). (Phaniendra et al., 2014).

Πίνακας 1: Κατηγοριοποίηση των ελεύθερων ριζών (Phaniendra et al., 2014)

ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ	Δραστικές Μορφές Οξυγόνου	Δραστικές Μορφές Αζώτου	Δραστικές Μορφές Θείου	Δραστικές Μορφές Χλωρίου
Ρίζες (Radicals)	Ανιόν Σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) Ρίζα Υδροξυλίου ($OH^{\bullet}$)	Μονοξειδίο του αζώτου ($\bullet NO$), Διοξειδίο του αζώτου($\bullet NO_2$)	Thyl radical ($\bullet RS$)	Ρίζα χλωρίου ($Cl^{\bullet}$) Υποχλωριώδης ρίζα ($ClO^{\bullet}$)
Μη-ρίζες (Non- radicals)	Υπεροξειδίο Υδρογόνου (H_2O_2) Μονήρες Οξυγόνο (1O_2)	Ανιόν υπεροξυνιτρίτη ($ONOO^-$)		Υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$)

1.1.1 Δραστικές Μορφές Οξυγόνου – Reactive Oxygen Species (ROS)

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου μπορούν να παραχθούν είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς πηγές. Ενδογενείς πηγές παραγωγής ROS αποτελούν διάφορα κυτταρικά όργανα όπως τα υπεροξειδισώματα, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα μιτοχόνδρια - κατά τον μεταβολισμό, όπου η κατανάλωση οξυγόνου είναι υψηλή. Η παραγωγή τους μπορεί να προκληθεί και από εξωγενείς παράγοντες, όπως τα ξενοβιοτικά, οι κυτοκίνες

και η βακτηριακή μόλυνση, με αποτέλεσμα να έχουν ισχυρή οξειδωτική δράση (Phaniendra et al., 2014). Τα κυριότερα είδη δραστικών μορφών οξυγόνου συνοψίζονται στον **Πίνακα 2**.

Πίνακας 2: Ονομασία και χημικοί τύποι των Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (Ray et al., 2012)

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)			
<i>Ρίζες (Radicals)</i>		<i>Μη ρίζες (Non radicals)</i>	
$O_2^{\bullet-}$	Ανιόν Σουπεροξειδίου	H_2O_2	Υπεροξειδίο Υδρογόνου
$OH^{\bullet}$	Ρίζα Υδροξυλίου	1O_2	Μονήρες Οξυγόνο
$RO^{\bullet}$	Αλκοξειδική ρίζα	O_3	Όζον

1.1.2 Δραστικές Μορφές Αζώτου (RNS)

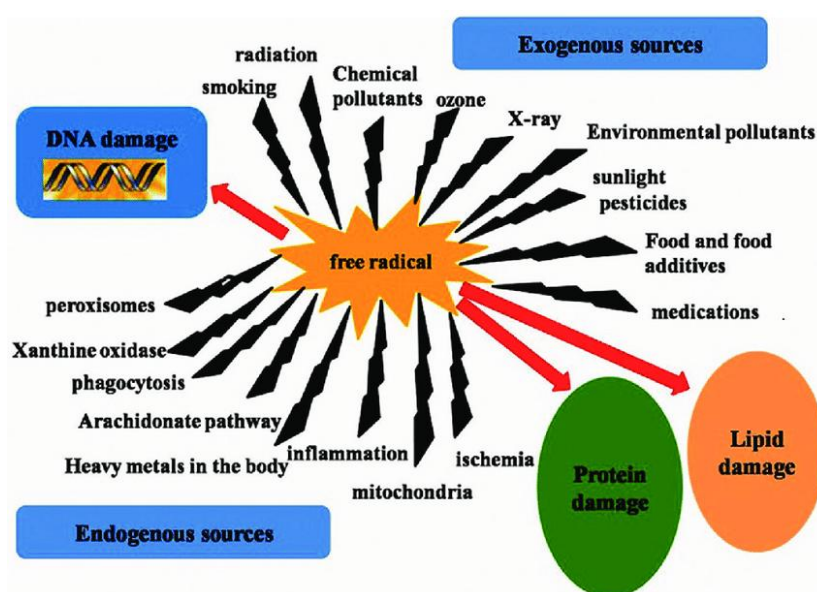
Οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS), μόρια με κεντρικό άτομο το άζωτο, παράγονται σε βιολογικά συστήματα κυρίως ως παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού. Κύριος εκπρόσωπός τους είναι το μονοξειδίο του αζώτου ($NO^{\bullet}$), το οποίο προκύπτει κατά την οξείδωση της L-αργινίνης προς L-κιτρουλίνη (Dutta et al., 2022). Αυτό, αν και λειτουργεί ως σημαντικός κυτταρικός σηματοδότης, μπορεί να αντιδράσει με άλλες ελεύθερες ρίζες, σχηματίζοντας πιο τοξικές μορφές όπως το υπεροξυνιτρώδες ($ONOO^-$). Άλλες δραστικές μορφές αζώτου παράγονται μετά την αρχική αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου ($NO^{\bullet}$) με το ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) για την παραγωγή ενός ανιόντος υπεροξυνιτρίτη ($ONOO^-$), το οποίο είναι ένα ιδιαίτερα δραστικό μόριο που μπορεί να αντιδράσει άμεσα με συστατικά του κυττάρου, όπως τα λιπίδια και το DNA. Το ανιόν υπεροξυνιτρίτη ($ONOO^-$) αντιδρώντας στη συνέχεια και με άλλα μόρια, σχηματίζει επιπλέον τύπους RNS (Phaniendra et al., 2014). Τα κυριότερα είδη δραστικών μορφών αζώτου συνοψίζονται στον **Πίνακα 3**. Οι RNS συμμετέχουν σε ποικίλες φυσιολογικές διεργασίες, όπως η αγγειοδιαστολή και η ανοσολογική απόκριση, όμως όταν υπερπαράγονται ή δεν εξουδετερώνονται επαρκώς, μπορεί να προκαλέσουν νιτρωτικές και νιτρωζυλιωτικές βλάβες σε πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη φλεγμονών και παθολογικών καταστάσεων (Di Meo et al., 2016).

Πίνακας 3: Ονομασία και χημικοί τύποι των Δραστικών Μορφών Αζώτου (Phaniendra et al., 2014)

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ (RNS)			
Ρίζες (Radicals)		Μη ρίζες (Non radicals)	
NO•	Μονοξειδίο του αζώτου	ONOO•	Ανιόν υπεροξυνιτρίτη
NO ₂	Διοξειδίο του αζώτου	N ₂ O ₃	Τριοξειδίο του αζώτου
		NO-	Ανιόν νιτροζυλίου

1.1.3 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

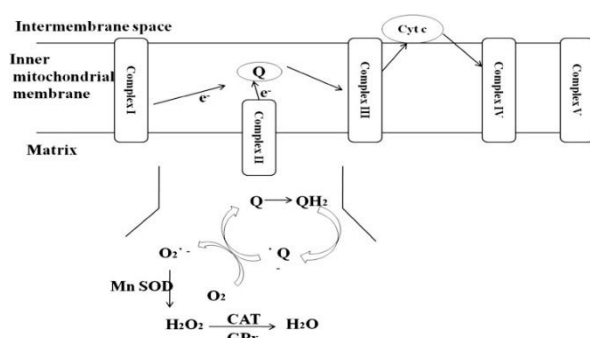
Οι ελεύθερες ρίζες προέρχονται τόσο από ενδογενείς (οργανίδια όπως μιτοχόνδρια, υπεροξειδισώματα, ενδοπλασματικό δίκτυο, και διαδικασίες όπως η φαγοκυττάρωση και η φλεγμονή), όσο και από εξωγενείς πηγές (περιβαλλοντικοί ρύποι, αλκοόλ, καπνός τσιγάρου, βαρέα μέταλλα, μέταλλα μεταπτώσεως, βιομηχανικοί διαλύτες, φυτοφάρμακα, ορισμένα φάρμακα όπως η παρακεταμόλη και ακτινοβολία), όπως παρουσιάζονται στην **Εικόνα 2** (Phaniendra et al., 2014).



Εικόνα 2: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες (Ahmad, 2017)

1.1.3.1 Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια

Οι περισσότερες από τις ενδοκυτταρικές ROS προέρχονται από μιτοχόνδρια (**Εικόνα 3**), τα οποία είναι οργανίδια του κυττάρου, που το τροφοδοτούν με την απαραίτητη ενέργεια για να επιτελέσει όλες τις βασικές του λειτουργίες. Τα ανιόντα σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) παράγονται σε δύο κύρια σημεία στην αλυσίδα



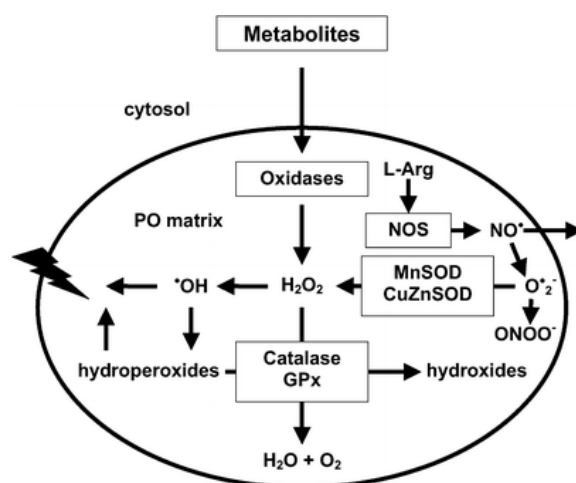
Εικόνα 3: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια (Phaniendra et al., 2014)

μεταφοράς ηλεκτρονίων, συγκεκριμένα στο σύμπλοκο I (αφυδρογονάση NADH) και στο σύμπλοκο III (αναγωγάση του κυτοχρώματος c της ουβικινόνης). Η μεταφορά ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο I ή II στο συνένζυμο Q ή την ουβικινόνη (Q), έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ανηγμένης μορφής του συνενζύμου Q (QH_2). Η ανηγμένη μορφή QH_2 αναγεννά το συνένζυμο Q μέσω ενός ασταθούς ενδιάμεσου ανιόντος ημικινόνης ($\cdot Q-$) στον κύκλο Q. Το σχηματιζόμενο $\cdot Q-$ μεταφέρει αμέσως ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο οδηγώντας στον μη ενζυμικό σχηματισμό ρίζας υπεροξειδίου και επομένως όσο υψηλότερος ο μεταβολικός ρυθμός, τόσο μεγαλύτερη είναι η παραγωγή ROS. Το ανιόν υπεροξειδίου, στη συνέχεια μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω της δράσης της μιτοχονδριακής υπεροξειδικής δισμουτάσης (MnSOD). Το H_2O_2 μπορεί να διασπαστεί σε νερό και οξυγόνο, μέσω της δράσης του ενζύμου της καταλάσης (CAT) και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx). (Phaniendra et al., 2014).

1.1.3.2 Παραγωγή ROS στα υπεροξειδιοσώματα

Στα υπεροξειδιοσώματα, η μεταφορά ηλεκτρονίων από διάφορους μεταβολίτες προς το οξυγόνο που οδηγεί στο σχηματισμό H_2O_2 περιλαμβάνεται στην αναπνευστική οδό. Η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων είναι η κύρια μεταβολική διαδικασία που παράγει H_2O_2 στα υπεροξειδιοσώματα. Τα ένζυμα (**Εικόνα 4**), όπως οι οξειδάσες άκυλοCoA, η οξειδάση D-αμινοξέων, η L-α-υδρόξυ-οξειδάση, η ουρική οξειδάση, η

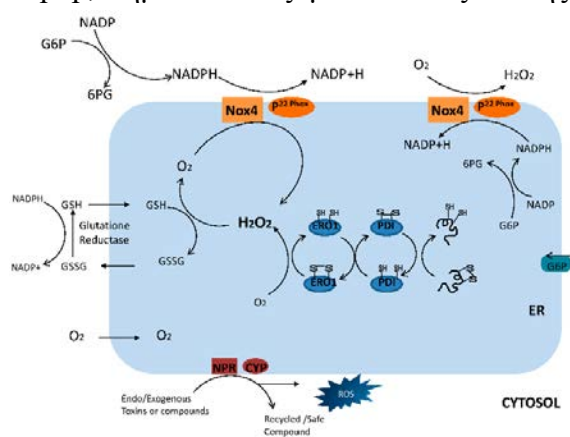
οξειδάση της ξανθίνης, η οξειδάση D-ασπαρτικού, έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλουν στην παραγωγή διαφορετικών ειδών ROS (Phaniendra et al., 2014).



Εικόνα 4: Υπεροξεισωμικά ένζυμα που παράγουν ή αποσυνθέτουν ROS (Schrader & Fahimi, 2004)

1.1.3.3 Παραγωγή ROS στο ενδοπλασματικό δίκτυο

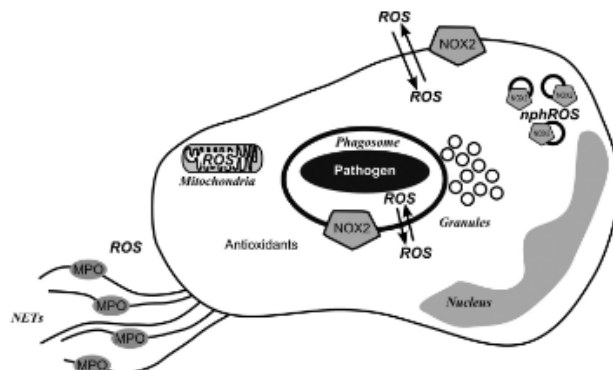
Τα ένζυμα του ενδοπλασματικού δικτύου P450, b5 και η οξειδάση της διαμίνης, συμβάλλουν στον σχηματισμό ROS. Το Ero1p, σημαντικό ένζυμο θειολοοξειδάσης, συμμετέχει καταλύοντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων από τις διθειόλες στο μοριακό οξυγόνο οδηγώντας στο σχηματισμό H₂O₂ (Εικόνα 5). Κατά τη διαδικασία αναδίπλωσης πρωτεϊνών, παρατηρείται παραγωγή ROS από πηγές, όπως η οξειδάση NADPH 4 (Nox4), η αναγωγή NADPH-P450 (NPR) και η GSH (ανηγμένη γλουταθειόνη), οι οποίες επιτέλουν λειτουργίες στο εξωτερικό περιβάλλον του ενδοπλασματικού δικτύου (Phaniendra et al., 2014; Zeeshan et al., 2016).



Εικόνα 5: Παραγωγή ROS στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Zeeshan et al., 2016)

1.1.3.4 Παραγωγή ROS κατά τη Φαγοκυττάρωση

Κατά τη φαγοκυττάρωση, τα φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα και μακροφάγα) ενεργοποιούνται για να καταστρέψουν παθογόνους μικροοργανισμούς. Στο πλαίσιο αυτής της διαδικασίας, ενεργοποιείται το ενζυμικό σύμπλεγμα NADPH – οξειδάση (υπάρχει φυσιολογικά στα μακροφάγα). Αυτό μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADPH (υπόστρωμα) στο O_2 , σχηματίζοντας υπεροξειδικό ανιόν (O_2^-). Το μόριο αυτό αποτελεί την πρώτη και κύρια δραστική μορφή οξυγόνου (ROS) που σχηματίζεται, και στη συνέχεια μετατρέπεται – ανάγεται σε άλλες πιο δραστικές ενώσεις, όπως το H_2O_2 και η υδροξυλική ρίζα ($\bullet OH$). Αυτή η «αναπνευστική έκρηξη» (respiratory burst) αποτελεί κρίσιμο αμυντικό μηχανισμό του οργανισμού, καθώς οι ROS καταστρέφουν τα παθογόνα μέσα στο φαγόσωμα (**Εικόνα 6**). Ωστόσο, η υπερβολική παραγωγή τους μπορεί να προκαλέσει και βλάβη στους ίδιους τους ιστούς του οργανισμού. Τα υπεροξειδία, όταν αντιδράσουν με τη ρίζα μονοξειδίου του αζώτου, που επίσης υπάρχει άφθονη στα κύτταρα, συνθέτουν ρίζες υπεροξεινιτρίτη, οι οποίες είτε δρουν αυτούσιες, λόγω της υψηλής τους δραστηριότητας, είτε αντιδρούν με άλλα μόρια παράγοντας εξίσου δραστικές ενώσεις. (Piacenza et al., 2019).

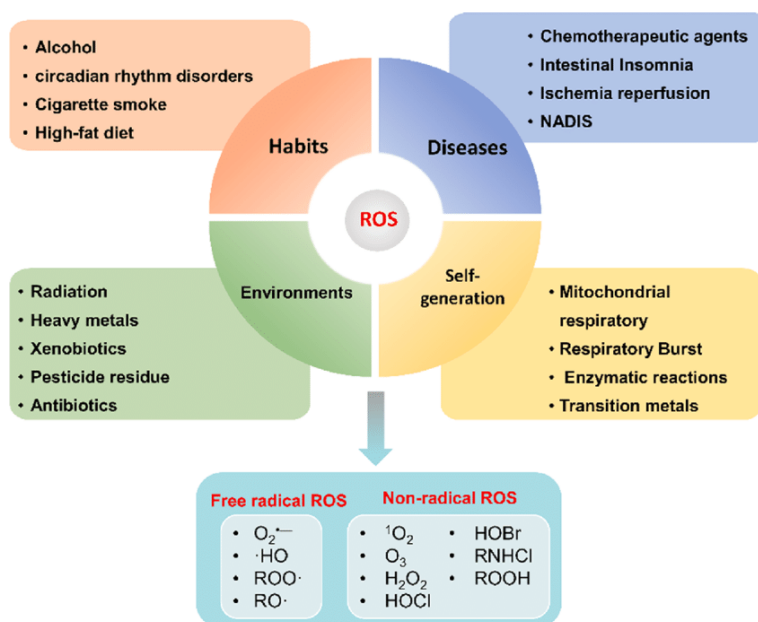


Εικόνα 6: Φαγοκύτταρο που παράγει ROS (Dupré-Crochet et al., 2013)

1.1.3.5 Εξωγενείς παραγοντες

Οι εξωγενείς παράγοντες που προκαλούν αυξημένη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) περιλαμβάνουν διάφορα περιβαλλοντικά και χημικά ερεθίσματα που διαταράσσουν την οξειδοαναγωγική ισορροπία του οργανισμού. Τέτοιοι παράγοντες είναι η έκθεση σε υπεριώδη (UV) και ιοντίζουσα ακτινοβολία, η ατμοσφαιρική ρύπανση (όπως το όζον και τα βαρέα μέταλλα), το κάπνισμα, η

κατανάλωση αλκοόλ, η χρήση φαρμάκων ή ναρκωτικών, καθώς και η επαφή με φυτοφάρμακα και βιομηχανικές χημικές ουσίες. Επιπλέον, το χρόνιο ψυχολογικό στρες, η κακή διατροφή και η έντονη ή παρατεταμένη σωματική άσκηση μπορούν επίσης να συμβάλουν στην εξωγενή παραγωγή ROS (Wang *et al.*, 2020).



Εικόνα 7: Εξωγενείς παράγοντες που προκαλούν τη δημιουργία ROS (Wang *et al.*, 2020)

1.1.4 Ελεύθερες ρίζες- Φυσιολογικές επιδράσεις στον οργανισμό

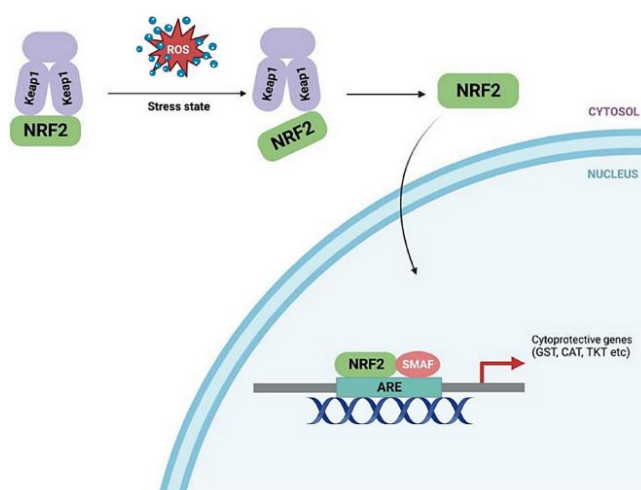
Παρότι οι ελεύθερες ρίζες είναι συχνά συνδεδεμένες με κυτταρική βλάβη και παθολογικές καταστάσεις, σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις έχουν σημαντικές θετικές επιδράσεις στον οργανισμό.

Λειτουργούν ως μόρια-σήματα σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως η ρύθμιση της αγγειοδιαστολής, η απόκριση σε φλεγμονή και η ενεργοποίηση της κυτταρικής άμυνας. Οι ρίζες οξυγόνου και αζώτου εμπλέκονται στη φαγοκυττάρωση και στην εξουδετέρωση παθογόνων μικροοργανισμών από το ανοσοποιητικό σύστημα. Επίσης, συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) και σε διαδικασίες επιδιόρθωσης ιστών. Συνεπώς, οι ελεύθερες ρίζες δεν είναι αποκλειστικά βλαβερές. Όταν βρίσκονται σε ισορροπία με τα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού, συμβάλλουν στην ομαλή λειτουργία και επιβίωση των κυττάρων (Lobo *et al.*, 2010).

1.1.4.1 Κυτταρική Σηματοδότηση

Οι ελεύθερες ρίζες, ιδιαίτερα το NO• και το H₂O₂, παίζουν σημαντικό ρόλο όχι μόνο ως παράγοντες που προκαλούν κυτταρικές βλάβες, αλλά και ως σημαντικά μόρια σηματοδότησης μέσα στα κύτταρα και μεταξύ τους.

Ήδη από τη δεκαετία του 1970, η ρίζα υδροξυλίου αναγνωρίστηκε ότι ενεργοποιεί το ένζυμο γουανυλική κυκλάση, οδηγώντας στην παραγωγή του κυκλικού GMP (cGMP), ενός χημικού διαβιβαστή. Με την πάροδο του χρόνου, περισσότερες ελεύθερες ρίζες βρέθηκαν ότι εμπλέκονται σε βασικές βιολογικές διεργασίες, όπως η κυτταρική ανάπτυξη και η αναπαραγωγή. Παράλληλα, οι ελεύθερες ρίζες συμβάλλουν στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων του DNA. Μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση γονιδίων που ελέγχονται από μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο Nf-κB. Επιπλέον, συμμετέχουν στη ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με την παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων. Πιο συγκεκριμένα, η ρύθμιση αυτών των γονιδίων γίνεται μέσω της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο Nrf2 σχηματίζει ένα σύμπλοκο με την πρωτεΐνη Keap1 στο κυτταρόπλασμα και υφίσταται αποικοδόμηση μέσω ουβικιτινυλίωσης. Ωστόσο, όταν υπάρχει αυξημένο οξειδωτικό στρες, ο Nrf2 απελευθερώνεται, εισέρχεται στον πυρήνα και συνδέεται σε συγκεκριμένες περιοχές του DNA, γνωστές ως ARE (antioxidant response elements), μαζί με τις πρωτεΐνες SMAD. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα (Εικόνα 8) (Muhammad Javed Iqbal et al., 2024).



Εικόνα 8: Μονοπάτι Keap1 – Nrf2 σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Muhammad Javed Iqbal et al., 2024)

1.1.4.2 Κυτταρική Ανάπτυξη, Διαφοροποίηση και Απόπτωση

Οι ROS εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο, προάγοντας ή αναστέλλοντας την κυτταρική διαίρεση, ανάλογα με το είδος και την ένταση του σήματος. Επιπλέον, χαμηλά επίπεδα ROS είναι απαραίτητα για την κυτταρική διαφοροποίηση, ενώ αυξημένα επίπεδα μπορούν να ενεργοποιήσουν σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε απόπτωση – μια απαραίτητη διαδικασία για την απομάκρυνση κατεστραμμένων ή ανεπιθύμητων κυττάρων (*Di Meo et al., 2016*).

1.1.5 Ελεύθερες ρίζες- Παθολογικές επιπτώσεις

Η διπλή φύση των ελεύθερων ριζών παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανθρώπινη παθοφυσιολογία. Από τη μία πλευρά, είναι ζωτικής σημασίας για τις φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες. Αντίθετα, μια δυσαναλογία μεταξύ της παραγωγής ελεύθερων ριζών και της ικανότητας του σώματος να τις εξουδετερώσει ή να επιδιορθώσει την προκύπτουσα βλάβη, μπορεί να οδηγήσει τον οργανισμό σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

Οι ROS και RNS μπορούν να τροποποιήσουν βιολογικά μακρομόρια, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA, προκαλώντας λιπιδική υπεροξείδωση, πρωτεϊνικές αλλοιώσεις και γονιδιακές μεταλλάξεις. Αυτές οι βλάβες σχετίζονται με την εμφάνιση και εξέλιξη χρόνιων φλεγμονών, νευροεκφυλιστικών νοσημάτων (όπως οι νόσοι Alzheimer και Parkinson), καρδιαγγειακών παθήσεων, διαβήτη τύπου 2, αθηροσκλήρωσης, καθώς και διάφορων τύπων καρκίνου. Επίσης, το οξειδωτικό στρες επιταχύνει τη διαδικασία της γήρανσης και επηρεάζει αρνητικά τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, επιδεινώνοντας τη μεταβολική ισορροπία των κυττάρων. Ιδιαίτερα σε καταστάσεις χρόνιου στρες, περιβαλλοντικών τοξικών επιδράσεων ή φλεγμονωδών νοσημάτων, η ανεξέλεγκτη δράση των ελευθέρων ριζών οδηγεί σε κυτταρική δυσλειτουργία, νέκρωση ή απόπτωση και γενικευμένη διαταραχή της ομοιόστασης. Συνεπώς, η κατανόηση της παθολογικής τους δράσης είναι κρίσιμη για την πρόληψη και αντιμετώπιση πολλών κοινών, αλλά και σοβαρών παθήσεων (*Chandimali et al., 2025*).

1.2 Οξειδωτικό στρες

Αν και ο όρος «οξειδωτικό στρες» είχε οριστεί από τον Helmut Sies το 1985, ως μια «σοβαρή δυσανάλογη υπεροχή του προοξειδωτικού σε σχέση με το αντιοξειδωτικό

φορτίο του οργανισμού», μία πιο σύγχρονη και ολοκληρωμένη ερμηνεία του όρου διατυπώθηκε από τον ίδιο το 2015. Σύμφωνα με αυτήν, οξειδωτικό στρες ορίζεται «η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μορίων, υπέρ των πρώτων, που οδηγεί στη διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου, και σε μοριακές βλάβες» (Sies, 2015). Αυτή η νέα προσέγγιση δεν αντιμετωπίζει πλέον τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) αποκλειστικά ως επιβλαβείς παράγοντες, αλλά αναγνωρίζει τη φυσιολογική και απαραίτητη συμμετοχή τους στη ρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών. Πρόκειται για μια μετατόπιση προς μια πιο εξελιγμένη αντίληψη του ρόλου των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό. (Veskoukis *et al.*, 2019)

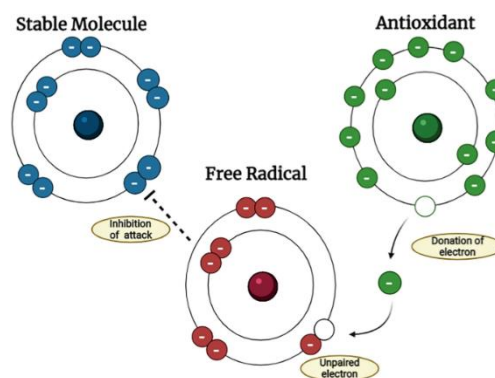
Το οξειδωτικό στρες, ωστόσο, εξακολουθεί να αποτελεί αποτέλεσμα της υπερβολικής συσσώρευσης ROS ή RNS, η οποία υπερβαίνει τις δυνατότητες της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού. Όταν αυτό συμβαίνει, προκύπτουν μη αναστρέψιμες κυτταρικές βλάβες, που μπορεί να είναι καθοριστικές για την επιβίωση των κυττάρων (Ansari *et al.*, 2020).

1.2.1 Οξειδωτικό στρες και ασθένειες

Το οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί με πολλές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης, της φλεγμονώδους απόκρισης, ορισμένων μορφών καρκίνου και της διαδικασίας γήρανσης. Θεωρείται πλέον ότι συμβάλλει σημαντικά σε όλες τις φλεγμονώδεις ασθένειες που οφείλονται σε φλεγμονές διαφόρων οργάνων του σώματος (αρθρίτιδα, αγγειίτιδα, σπειραματονεφρίτιδα, ερυθρελάτης, σύνδρομο αναπνευστικών παθήσεων ενηλίκων), ισχαιμικές παθήσεις (καρδιακές παθήσεις, εγκεφαλικό, ισχαιμικό εντέρου), αιμοχρωμάτωση, σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας, μεταμοσχεύσεις οργάνων, εμφύσημα, νευρολογικές διαταραχές (νόσος Alzheimer, νόσος Parkinson, μυϊκή δυστροφία), αλκοολισμός, ασθένειες που σχετίζονται με το κάπνισμα και πολλές άλλες. (Lobo *et al.*, 2010).

1.3 Αντιοξειδωτικά

Τα αντιοξειδωτικά είναι μόρια που προστατεύουν τα κύτταρα του οργανισμού από την επιβλαβή δράση των ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων. Λειτουργούν είτε προλαμβάνοντας το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών, είτε εξουδετερώνοντάς τες μέσω χημικών αντιδράσεων (μόρια αρκετά



σταθερά, ώστε να δώσουν ένα ηλεκτρόνιο σε *Εικόνα 9: Η συνεισφορά του αντιοξειδωτικού στην* μια ελεύθερη ρίζα και να την *ελεύθερη ρίζα (Mehla et al., 2021)* εξουδετερώσουν), είτε επιδιορθώνοντας τις βλάβες που έχουν ήδη προκληθεί στα βιομόρια. Τα αντιοξειδωτικά ασκούν τη δράση τους μέσω ποικίλων μηχανισμών, με βασικό στόχο την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών και την προστασία των κυττάρων από οξειδωτικές βλάβες.

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος δράσης τους είναι η άμεση δέσμευση ή η μεταφορά ηλεκτρονίων προς τις ελεύθερες ρίζες, καθιστώντας τες μη ενεργές (*Εικόνα 9*). Έτσι, αποτρέπεται η αλυσιδωτή αντίδραση οξείδωσης που θα μπορούσε να καταστρέψει ζωτικά μόρια όπως τα μεμβρανικά λιπίδια των κυττάρων, τις πρωτεΐνες ή το DNA.

Η σωστή λειτουργία του αντιοξειδωτικού συστήματος είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης, την πρόληψη εκφυλιστικών και χρόνιων ασθενειών και την καθυστέρηση της γήρανσης. Η διαταραχή αυτής της ισορροπίας υπέρ των οξειδωτικών παραγόντων οδηγεί, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στο φαινόμενο του οξειδωτικού στρες, με σημαντικές παθολογικές συνέπειες (*Gulcin, 2020; Mehla et al., 2021*).

1.3.1 Ενδογενή Αντιοξειδωτικά

Ενδογενή αντιοξειδωτικά είναι τα αντιοξειδωτικά που παράγονται φυσιολογικά από τον ίδιο τον οργανισμό και διακρίνονται σε ενζυμικά, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), καθώς και μη ενζυμικά μόρια όπως η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), το ουρικό οξύ και η μελατονίνη (*Πίνακας 4*).

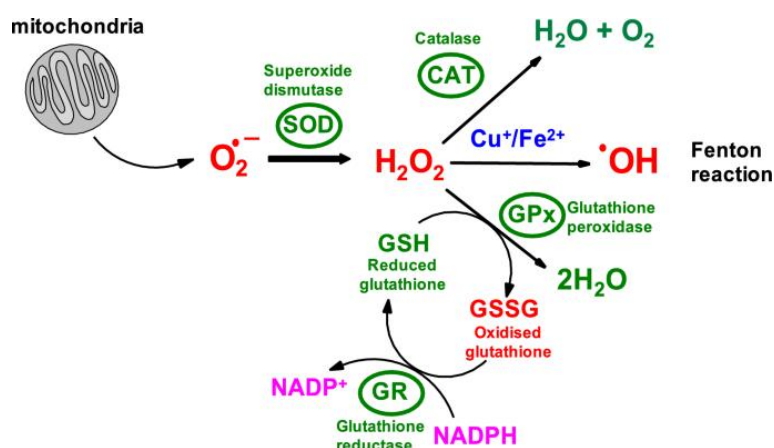
Πίνακας 4: Ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά του οργανισμού (Klaudia Jomona et al., 2024)

Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά	Μη ενζυμικά Αντιοξειδωτικά
Καταλάση (CAT)	Ανηγγμένη γλουταθειόνη (GSH)
Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	Ουρικό οξύ
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GRx)	Μελατονίνη
Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)	

Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), ανάγει το $O_2^{\bullet-}$ σε H_2O_2 , το οποίο στη συνέχεια αποδομείται σε νερό και οξυγόνο από το ένζυμο της καταλάσης (CAT) ή χρησιμοποιείται από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) για την οξείδωση της γλουταθειόνης. Η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) ανάγεται από την αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), η οποία χρησιμοποιεί το NADPH (ως αναγωγικό μέσο). Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), δρα τόσο άμεσα ως δότης ηλεκτρονίων όσο και έμμεσα,

Εικόνα 10: Συντονισμένη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (Klaudia Jomona et al., 2024)

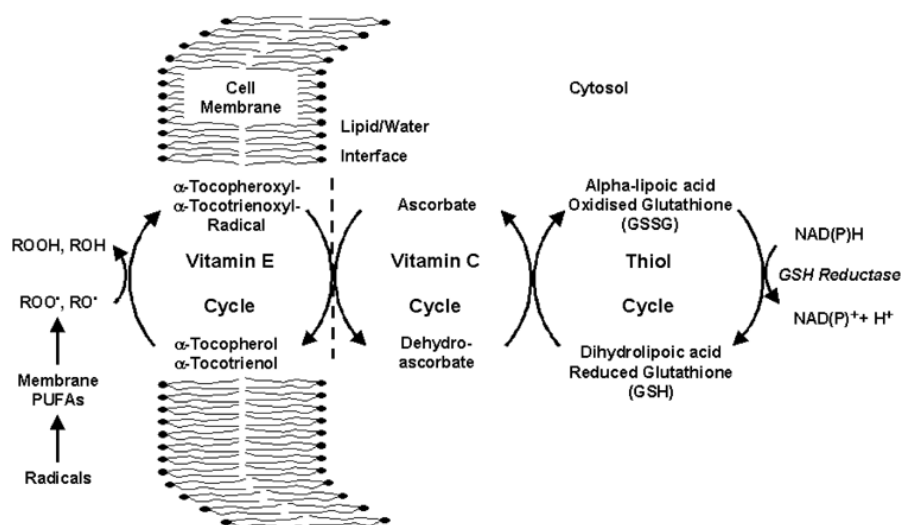
συμμετέχοντας στην ανακύκλωση άλλων αντιοξειδωτικών (*Εικόνα 10*) (Klaudia Jomona et al., 2024).



1.3.2 Εξωγενή Αντιοξειδωτικά

Τα εξωγενή αντιοξειδωτικά είναι εκείνες οι ουσίες που ένας οργανισμός μπορεί να λαμβάνει κυρίως μέσω της διατροφής.

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν φυσικές ενώσεις όπως οι βιταμίνες C (ασκορβικό οξύ) και E (α -τοκοφερόλη), τα καροτενοειδή (π.χ. β -καροτένιο, λυκοπένιο), τα φλαβονοειδή, καθώς και ιχνοστοιχεία, όπως το σελήνιο και ο ψευδάργυρος, τα οποία λειτουργούν ως συμπράγοντες ενζυμικών συστημάτων. Οι βιταμίνες C και E, προσφέρουν ηλεκτρόνια στις ελεύθερες ρίζες και σταθεροποιούνται χωρίς να γίνονται οι ίδιες τοξικές. Η βιταμίνη E, ειδικά, προστατεύει τις μεμβράνες των κυττάρων από την υπεροξείδωση των λιπιδίων, ενώ η βιταμίνη C αναγεννά τη βιταμίνη E στην ενεργή της μορφή (*Εικόνα 11*). Η πρόσληψη αυτών των αντιοξειδωτικών μέσω τροφών φυτικής προέλευσης (π.χ. φρούτα, λαχανικά, ξηροί καρποί), είναι καθοριστική για την ενίσχυση της άμυνας του οργανισμού έναντι του οξειδωτικού στρες, ιδιαίτερα όταν οι ενδογενείς μηχανισμοί δεν επαρκούν (*Van Meeteren et al., 2005*).



Εικόνα 11: Το αντιοξειδωτικό δίκτυο που παρουσιάζει την αλληλεπίδραση μεταξύ της βιταμίνης E, της βιταμίνης C και γλουταθειόνης (*Van Meeteren et al., 2005*)

1.4 Ψυχρό Ατμοσφαιρικό Πλάσμα - Cold Atmospheric Plasma (CAP)

Η επιστημονική μελέτη του πλάσματος ξεκίνησε από τον William Crookes το 1879, ο οποίος καθιέρωσε τις βασικές αρχές της επιστήμης του πλάσματος, όταν παρατήρησε την ιονισμένη κατάσταση αερίου σε σωλήνες ηλεκτρικής εκκένωσης, με την

εφαρμογή υψηλής τάσης μέσω ενός πηνίου τάσης. Το ιονισμένο αέριο ονομάστηκε από τον Crookes «ακτινοβολούμενη ύλη» και πίστευε πως αποτελούσε την τέταρτη κατάσταση της ύλης (τις τρεις αποτελούν το στερεό, το υγρό και το αέριο). Ο σημερινός όρος «πλάσμα» εισήχθη σχεδόν πενήντα χρόνια αργότερα, το 1927, από τον Irvin Langmuir (*Braný et al., 2020*).

Το πλάσμα μπορεί να διαχωριστεί σε θερμικό και μη θερμικό (ψυχρό). Στο θερμικό πλάσμα, όλα τα σωματίδια βρίσκονται σε θερμική ισορροπία και οι θερμοκρασίες είναι εξαιρετικά υψηλές. Αντίθετα, στο ψυχρό πλάσμα, μόνο τα ηλεκτρόνια έχουν υψηλή ενέργεια, ενώ τα βαριά σωματίδια (ιόντα, ουδέτερα σωματίδια) παραμένουν σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.

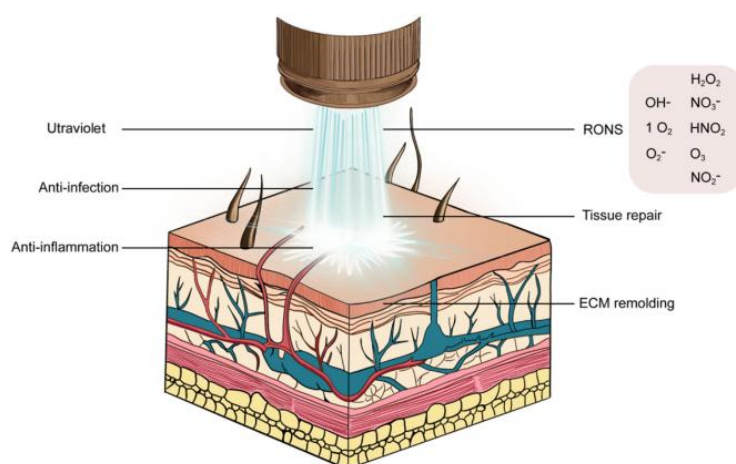
Το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα (Cold Atmospheric Plasma - CAP) είναι μια μορφή ιονισμένου αερίου που παράγεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Το πλάσμα είναι ενεργειακά πλούσιο, καθώς περιέχει ένα μείγμα ιονισμένων σωματιδίων, ελευθέρων ριζών, ηλεκτρονίων, φωτονίων και άλλων ενεργών μορίων. Ο χαρακτηρισμός «ψυχρό» προκύπτει από το γεγονός ότι, σε αντίθεση με άλλα είδη πλάσματος, δεν αναπτύσσει υψηλές θερμοκρασίες, και επομένως δεν καταστρέφει τους ιστούς ή τα υλικά με τα οποία έρχεται σε επαφή. Η τεχνολογία του ψυχρού πλάσματος έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, καθώς μπορεί να παραχθεί με απλό εξοπλισμό και να εφαρμοστεί χωρίς να προκαλέσει θερμική καταπόνηση στους ιστούς (*Min et al., 2022*).

Το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα παρουσιάζει ισχυρή αντιμικροβιακή, αντική και αντιμυκητιακή δράση. Η αποτελεσματικότητά του έγκειται στην ικανότητά του να παράγει ROS και RNS σε ελεγχόμενα επίπεδα, τα οποία δεν είναι τοξικά για τον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά επαρκούν για την καταστροφή παθογόνων μικροοργανισμών. Οι δραστικές αυτές μορφές προκαλούν οξειδωτικό στρες στους στόχους τους, οδηγώντας σε δομικές και λειτουργικές βλάβες, όπως η διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών, η απενεργοποίηση ενζύμων και η καταστροφή του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών. Αυτοί οι μηχανισμοί καθιστούν το CAP ιδιαίτερα αποτελεσματικό έναντι ανθεκτικών στελεχών μικροβίων, ενώ παράλληλα περιορίζεται ο κίνδυνος εμφάνισης αντοχής, όπως συμβαίνει με τα παραδοσιακά αντιμικροβιακά. Χάρη στις πολυδιάστατες βιοδραστικές του ιδιότητες, το CAP έχει βρει εφαρμογές σε πολλούς τομείς, συμπεριλαμβανομένου της Ιατρικής, της Βιοτεχνολογίας, της Φαρμακευτικής και της Τεχνολογίας τροφίμων (*Khalaf et al., 2024*).

1.4.1 Τεχνολογία Ψυχρού Ατμοσφαιρικού Πλάσματος (CAP)

Η παραγωγή του CAP, το οποίο όπως προαναφέρθηκε, είναι μια μη θερμική, ιονισμένη μορφή αερίου που παράγεται υπό συνθήκες θερμοκρασίας περιβάλλοντος και ατμοσφαιρικής πίεσης, επιτυγχάνεται μέσω ηλεκτρικής εκκένωσης σε αέρια όπως το ήλιο, το αργό, το οξυγόνο ή ο ατμοσφαιρικός αέρας, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πολύπλοκου ενεργειακού μείγματος που περιλαμβάνει ελεύθερα ηλεκτρόνια, ιόντα, φωτόνια (UV), και κυρίως δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου (ROS και RNS αντίστοιχα). Αυτά τα μόρια είναι τα κύρια υπεύθυνα για τις βιολογικές επιδράσεις του CAP (Min *et al.*, 2022).

Το CAP παράγει διάφορες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), όπως το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-), το όζον (O_3), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και την εξαιρετικά δραστική ρίζα υδροξυλίου ($\bullet OH$), καθώς και δραστικές μορφές αζώτου (RNS), όπως το μονοξείδιο του αζώτου ($NO\bullet$), το διοξείδιο του αζώτου ($NO_2\bullet$) και ο υπεροξυνιτρίτης ($ONOO^-$) (εικόνα 12). Η σύνθεση και συγκέντρωση αυτών των μορφών καθορίζεται από παραμέτρους όπως το είδος του αερίου, τη διάρκεια εφαρμογής και την απόσταση από τον στόχο.



Εικόνα 12: Μηχανισμός δράσης ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος (Khalaf *et al.*, 2024)

Το CAP μεταβάλλει τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, επιτρέποντας ευκολότερη διείσδυση των δραστικών μορφών, ενώ παράλληλα παράγει υπεριώδη ακτινοβολία και ηλεκτρικά πεδία, τα οποία ενισχύουν τη μικροβιοκτόνο και κυτταροτοξική του δράση (Khalaf *et al.*, 2024).

Η συνδυασμένη αυτή επίδραση μπορεί να οδηγήσει σε επιλεκτική καταστροφή μικροβίων ή ακόμα και καρκινικών κυττάρων, αφήνοντας τους υγιείς ιστούς σε μεγάλο βαθμό ανεπηρέαστους. Χάρη σε αυτόν τον μηχανισμό, το CAP αναδεικνύεται ως μία υποσχόμενη και καινοτόμο θεραπευτική προσέγγιση στον τομέα της ιατρικής, με εφαρμογές που κυμαίνονται από την αποστείρωση τραυμάτων έως την στοχευμένη αντιμετώπιση διαφόρων κακοηθειών (Khalaf et al., 2024).

1.4.2 Εφαρμογές του Ψυχρού Ατμοσφαιρικού Πλάσματος (CAP)

Το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα βρίσκει ολοένα και περισσότερες εφαρμογές σε διάφορους τομείς της επιστήμης και της τεχνολογίας, με ιδιαίτερα δυναμική παρουσία στον χώρο της ιατρικής. Χρησιμοποιείται για την αποστείρωση τραυμάτων, την επούλωση εγκαυμάτων, την απολύμανση ιατρικών εργαλείων και την εξουδετέρωση ανθεκτικών μικροβίων. Επιπλέον, διερευνάται για την αντικαρκινική του δράση, καθώς μπορεί να προκαλέσει, επιλεκτικά, απόπτωση καρκινικών κυττάρων χωρίς να επηρεάζει σημαντικά τους υγιείς ιστούς. Εκτός της ιατρικής, αξιοποιείται και στη βιομηχανία τροφίμων για την απολύμανση επιφανειών και τροφίμων, τη μείωση παθογόνων χωρίς θερμική επεξεργασία, καθώς και για την μεγαλύτερη διάρκεια ζωής των προϊόντων.

1.4.2.1 Ιατρικές Εφαρμογές

Στον τομέα της ιατρικής, το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα αναδεικνύεται ως μία ελπιδοφόρα θεραπευτική προσέγγιση. Σε ανθρώπινα κύτταρα, το CAP ασκεί διττή δράση, ανάλογα με τη δόση και το οξειδωτικό φορτίο.

Σε χαμηλές δόσεις, διεγείρει αντιοξειδωτικούς και επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως το μονοπάτι Nrf2, προάγοντας την έκφραση ενζύμων όπως η SOD, CAT και η GPx. Ταυτόχρονα, ενισχύεται η σύνθεση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), βασικό μόριο κυτταροπροστασίας και το πιο σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό του οργανισμού. Αντίθετα, σε υψηλότερες δόσεις ή σε κύτταρα με εξασθενημένη αντιοξειδωτική ικανότητα (όπως τα καρκινικά), η παρουσία ROS/RNS οδηγεί σε βλάβη των μιτοχονδρίων, απελευθέρωση κυτοχρώματος C, ενεργοποίηση κασπασών και τελικά σε απόπτωση.

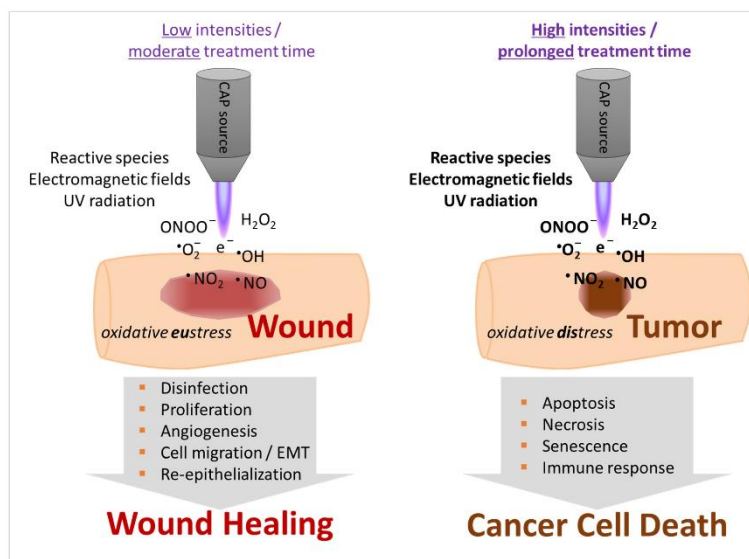
Υπάρχουν ερευνητικά δεδομένα που υποστηρίζουν την εφαρμογή του σε αντικαρκινικές θεραπείες, καθώς έχει αποδειχθεί ότι το CAP προκαλεί επαγόμενη απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο) σε νεοπλασματικά κύτταρα, αφήνοντας σε μεγάλο βαθμό ανεπηρέαστους τους υγιείς ιστούς. Η δράση αυτή έχει αξιοποιηθεί πειραματικά και κλινικά σε μορφές καρκίνου όπως το μελάνωμα, το γλοιοβλάστωμα, το οστεοσάρκωμα (Mateu-Sanz *et al.*, 2021) ο καρκίνος παχέος εντέρου, παγκρέατος, πνεύμονα, μαστού και τραχήλου της μήτρας. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την πρόκληση βλάβης στο DNA και τα μιτοχόνδρια, με επακόλουθη ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών απόπτωσης (Kazemi *et al.*, 2024).

Η εφαρμογή του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος (CAP) στη δερματολογία έχει προσελκύσει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, λόγω των πολλαπλών θεραπευτικών του δυνατοτήτων. Το CAP, σε χαμηλές δόσεις, έχει αποδειχθεί ότι ασκεί αντιμικροβιακή δράση, προάγει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων και την αναγέννηση ιστών, ενώ σε υψηλότερες δόσεις προκαλεί απόπτωση (προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο), ιδιαίτερα σε καρκινικά κύτταρα. Μια σειρά μελετών που αξιοποιούν το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα (CAP) έχουν αναδείξει την αποτελεσματικότητά του σε πάθησεις όπως το ατοπικό έκζεμα, η ψωρίαση και η λευκή, ενώ εξετάζουν και κοσμητολογικές εφαρμογές όπως η αντιγήρανση. Συγκεκριμένα, μια πιλοτική κλινική μελέτη από τους Kim *et al.* (2021) σε 22 ασθενείς με ήπιας έως μέτριας σοβαρότητας ατοπική δερματίτιδα (ατοπικό έκζεμα), έδειξε σημαντική μείωση του δείκτη EASI (Eczema Area and Severity Index) που αξιολογεί την εμφάνιση ερυθρήματος, οιδήματος, εκδορών και ξηρότητας στο δέρμα. Από τη μελέτη των Zhai *et al.* (2021), προκύπτει ότι η εφαρμογή ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος (CAP), μέσω ειδικού gel, έδειξε σημαντική επαναμελάγχρωση σε μοντέλο ποντικού και σε τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή σε ασθενείς με εστιακή λεύκη. Συγκεκριμένα, το 80 % των δερματικών βλαβών παρουσίασε μερική και το 20 % πλήρη αποκατάσταση της δερματικής μελάγχρωσης, χωρίς ανεπιθύμητες ενέργειες, ενώ παρατηρήθηκε μείωση φλεγμονής. Επιπλέον, στην ψωρίαση, η χρήση CAP στο χέρι νεαρής γυναίκας που είχε το συγκεκριμένο νόσημα (Gareri *et al.*, 2020) παρουσίασε πλήρη υποχώρηση της βλάβης εντός 14 ημερών, καταδεικνύοντας την ταχεία και αποτελεσματική δράση του CAP σε ανθεκτικές ψωριασικές βλάβες. Η εκλεκτική επίδρασή του στα παθολογικά κύτταρα σε σχέση με τα υγιή, ενισχύει τις δυνατότητες στοχευμένης θεραπείας σε δερματικές παθήσεις. Η συνεχής εξέλιξη της έρευνας στον τομέα αυτό καθιστά το CAP μια πολλά υποσχόμενη

τεχνολογία για τη σύγχρονη και μελλοντική δερματολογική πρακτική (Khalaf et al., 2024).

Η εφαρμογή του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος (CAP) έχει αναδειχθεί ως μια ιδιαίτερα υποσχόμενη τεχνολογία στην αντιμετώπιση λοιμωδών δερματικών παθήσεων, χάρη στις ισχυρές αντιμικροβιακές του ιδιότητες που οφείλονται κυρίως στην παραγωγή ROS και RNS. Σε αντίθεση με τα συμβατικά αντιβιοτικά, το CAP εμφανίζει μειωμένο κίνδυνο πρόκλησης αντοχής των μικροοργανισμών και παράλληλα εμφανίζει ελάχιστη τοξικότητα. Έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό κατά ευρέως φάσματος παθογόνων, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων (όπως *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus*), μυκήτων (όπως *Candida* και *Trichophyton*), ιών (π.χ. HPV και HSV-1), καθώς και παρασίτων (όπως τα ακάρεα *Demodex mites* και οι ψείρες). Το CAP μπορεί να καταστρέψει βιομεμβράνες, να αποδομήσει τις κυτταρικές μεμβράνες δημιουργώντας συνθήκες οξειδωτικού στρες στα μικρόβια, οδηγώντας έτσι στον θάνατό τους. Μελέτη που διεξήχθη από τους Brun et al. (2018), διερεύνησε τη δράση του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος (CAP) ενάντια σε δύο κρίσιμους παθογόνους μικροοργανισμούς, τους *Pseudomonas aeruginosa* και MRSA (ανθεκτικό *Staphylococcus aureus*). Συγκεκριμένα, επιβεβαίωσε ότι το CAP παράγει δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου μέσα στα βακτήρια, προκαλώντας διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης και οξειδωτικό στρες, οδηγώντας στον θάνατο τους παθογόνους μικροοργανισμούς, αλλά και σημαντική μείωση του μικροβιακού φορτίου, συγκρίσιμη με αυτή των αντιβιοτικών. Ιδιαίτερα αξιοσημείωτη είναι η δράση του σε περιπτώσεις όπως οι χρόνιες μολύνσεις διαβητικού ποδιού και οι ονυχομυκητιάσεις, με αποτελέσματα που περιλαμβάνουν σημαντική μείωση του μικροβιακού φορτίου και βελτιωμένη επούλωση των πληγών (Khalaf et al., 2024).

Σε περιβάλλον τραύματος ή χρόνιας φλεγμονής, το CAP συμβάλλει στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης, στην ενεργοποίηση ινοβλαστών και στην αγγειογένεση, ενισχύοντας σημαντικά την επούλωση (**Εικόνα 13**). Ταυτόχρονα, η δράση του στο ανοσοποιητικό σύστημα είναι σημαντική. Ενισχύει τη δράση των T-λεμφοκυττάρων και την παρουσίαση αντιγόνων, ιδίως σε καρκινικούς στόχους. Σημαντικό είναι ότι οι υγιείς ιστοί διαθέτουν μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να αντιμετωπίσουν συνθήκες ήπιου οξειδωτικού στρες, σε αντίθεση με τα καρκινικά ή μολυσμένα κύτταρα που είναι πιο ευάλωτα (Boeckmann et al., 2020).



Εικόνα 13: Το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα σε θεραπεία τραύματος και καρκίνου

(Boeckmann et al., 2020)

Σε σύγκριση με τη χρήση του CAP για την επούλωση τραυμάτων, οι κλινικές μελέτες στην ογκολογία εξακολουθούν να είναι πολύ περιορισμένες. Παρ' όλα αυτά, οι μελέτες *in vitro* και *in vivo*, καθώς και οι πρώτες κλινικές δοκιμές, είναι ενθαρρυντικές και δικαιολογούν περαιτέρω προσπάθειες για να αποδειχθεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα του CAP ως καινοτόμο θεραπεία για τον καρκίνο (Boeckmann et al., 2020). Αν και βρίσκεται ακόμη σε στάδιο ερευνητικής ανάπτυξης, το ψυχρό πλάσμα δείχνει να αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για τη σύγχρονη ιατρική, με σημαντικές προοπτικές για στοχευμένες, μη επεμβατικές και φιλικές προς τον οργανισμό, παρεμβάσεις.

1.4.2.2 Εφαρμογές στη Βιομηχανία και στα Τρόφιμα

Το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα (CAP) έχει αναδειχθεί σε μια ιδιαίτερα υποσχόμενη τεχνολογία για εφαρμογές στη βιομηχανία και ειδικότερα στον τομέα των τροφίμων. Στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιείται κυρίως για την μικροβιακή απολύμανση επιφανειών, την αποστείρωση τροφίμων, τη μείωση μικροβιακού φορτίου σε νωπά προϊόντα και την παράταση της διάρκειας ζωής των τροφίμων, χωρίς την ανάγκη θερμικής επεξεργασίας που μπορεί να αλλοιώσει τα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους.

Το CAP ασκεί επίδραση σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των δημητριακών, του γάλακτος, των φρούτων, των λαχανικών και του κρέατος. Η επεξεργασία με ψυχρό πλάσμα προσφέρει σαφή πλεονεκτήματα σε σχέση με τις

παραδοσιακές μεθόδους, όπως η θερμική επεξεργασία, η χημική επεξεργασία και η ακτινοβολία (Sadhula et al., 2023). Εξαλείφει αποτελεσματικά τα παθογόνα μικρόβια από τις επιφάνειες τροφίμων, διατηρώντας παράλληλα την ποιότητα, τη γεύση και το θρεπτικό περιεχόμενο του τροφίμου. Αποστειρώνοντας τις επιφάνειες τροφίμων και τα υλικά συσκευασίας, το ψυχρό πλάσμα μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο μόλυνσης από επιβλαβείς μικροοργανισμούς. Επιπλέον, παρατείνει τη διάρκεια ζωής των τροφίμων εξαλείφοντας μικρόβια, ιούς και άλλα επικίνδυνα μικρόβια. Συγκεκριμένα, επιδρά αποτελεσματικά ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς όπως οι *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli*, χωρίς να αφήνει χημικά υπολείμματα. Η μελέτη των Kilonzo-Nthenge et al. (2018), εξέτασε την αποτελεσματικότητα του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος (CAP) για την αποστείρωση των επιφανειών μήλων μολυσμένων με *Salmonella Typhimurium/Choleraesuis* και *Escherichia coli*. Συνολικά, η έρευνα υποστηρίζει ότι το CAP αποτελεί μια γρήγορη, μη-θερμική και χημικά ουδέτερη τεχνολογία για την αποτελεσματική εξάλειψη παθογόνων σε φρούτα, χωρίς να επηρεάζεται η βιολογική και αισθητική ακεραιότητα των τροφίμων. Στη βιομηχανία γενικότερα, θεωρείται μια ενεργειακά αποδοτική και περιβαλλοντικά φιλική τεχνολογία, γεγονός που την καθιστά ελκυστική επιλογή για βιώσιμες βιομηχανικές διεργασίες (Sadhula et al., 2023).

1.4.2.3 Περιβαλλοντικές Εφαρμογές

Η τεχνολογία του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος (CAP) αναδεικνύεται ως μια βιώσιμη και φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση για την απολύμανση και την αποδόμηση οργανικών ρύπων στο νερό. Σύμφωνα με μελέτες, το CAP έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό στην απομάκρυνση βακτηρίων, μικροπλαστικών και οργανικών ρύπων από διάφορα υδάτινα περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων του νερού των ποταμών και του νερού που προέρχεται από τα αστικά λύματα. Οι ROS και RNS που παράγονται με την τεχνολογία CAP, έχουν την ικανότητα να διασπούν τους ρύπους και να εξουδετερώνουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς χωρίς την ανάγκη χρήσης άλλων χημικών ουσιών (Velasquez et al., 2024). Αφού η εφαρμογή του CAP δεν απαιτεί υψηλές θερμοκρασίες ή μεγάλες ποσότητες ενέργειας, η μέθοδος προσφέρει ένα ενεργειακά αποδοτικό και οικολογικά ασφαλές εργαλείο για την επεξεργασία του νερού, συμβάλλοντας στη μείωση της περιβαλλοντικής επιβάρυνσης και προάγοντας τη

βιώσιμη διαχείριση των υδάτινων πόρων και την προστασία του περιβάλλοντος (Velasquez et al., 2024; Ibrahim Ahmed Hamza et al., 2023).

1.4.3 Ψυχρό Ατμοσφαιρικό Πλάσμα και Οξειδωτικό Στρες

Το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα (CAP) σχετίζεται άμεσα με το οξειδωτικό στρες, καθώς η βιολογική του αποτελεσματικότητα βασίζεται κυρίως στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου (ROS και RNS - RONS). Τα RONS, όπως το H_2O_2 , οι υδροξυλικές ρίζες ($\bullet OH$), το $NO\bullet$, ο υπεροξυνιτρίτης ($ONOO^-$), είναι μόρια-ελεύθερες ρίζες που προκαλούν ή ρυθμίζουν το οξειδωτικό στρες σε κύτταρα και ιστούς. Αυτές οι δραστικές μορφές, οι οποίες παράγονται φυσιολογικά κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού, αποκτούν ιδιαίτερη σημασία όταν παράγονται εξωγενώς με τη χρήση CAP (Braný et al., 2020).

Η εφαρμογή του CAP προκαλεί προσωρινή αύξηση των επιπέδων RONS στα κύτταρα, οδηγώντας σε ένα φαινόμενο γνωστό ως «oxidative eustress» – δηλαδή, ένα ήπιο, ρυθμισμένο επίπεδο οξειδωτικού στρες που ενεργοποιεί κυτταρικά μονοπάτια αναγέννησης ιστών, επούλωσης τραυμάτων και αντιοξειδωτικής άμυνας. Αυτό το είδος αντίδρασης είναι ευεργετικό για διεργασίες όπως η επούλωση τραυμάτων, μέσω της ενεργοποίησης μορίων όπως VEGF, TGF- β , και ιντερλευκινών (π.χ. IL-6, IL-8), που εμπλέκονται στην αγγειογένεση, στην κυτταρική μετανάστευση και στην αναδιαμόρφωση του εξωκυττάριου χώρου.

Ωστόσο, σε υψηλότερες δόσεις ή παρατεταμένες εφαρμογές, η συγκέντρωση των RONS που παράγονται, μπορεί να υπερβεί την ικανότητα του κυττάρου να τις εξουδετερώσει με τα ενδογενή του αντιοξειδωτικά, και να προκαλέσει «oxidative distress». Σε αυτή την περίπτωση, παρατηρείται κυτταρική βλάβη, που περιλαμβάνει οξείδωση λιπιδίων, πρωτεϊνών και DNA, οδηγώντας σε απόπτωση ή νέκρωση. Η ιδιότητα αυτή του CAP αξιοποιείται στην ιατρική, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε εκλεκτική καταστροφή παθογόνων μικροοργανισμών και καρκινικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα, λόγω του ήδη αυξημένου ενδογενούς οξειδωτικού φορτίου τους, είναι πιο ευαίσθητα στην περαιτέρω αύξηση RONS από το CAP, γεγονός που επιτρέπει επιλεκτική καταστροφή τους, χωρίς να προκαλούνται σημαντικές βλάβες στους υγιείς ιστούς (Boeckmann et al., 2020).

Η μεταγωγή του σήματος από το οξειδωτικό στρες ελέγχεται εν μέρει μέσω του μονοπατιού Nrf2, το οποίο ενεργοποιείται σε απάντηση στην αυξημένη συγκέντρωση ελεύθερων ριζών.

Το γεγονός ότι το CAP μπορεί να επηρεάσει τέτοια βασικά μονοπάτια κυτταρικής άμυνας και αναγέννησης, το καθιστά ένα ισχυρό εργαλείο στην ιατρική, είτε για την ενίσχυση της επούλωσης, είτε για την καταπολέμηση κακοήθων κυττάρων, ανάλογα με τη δόση και τη διάρκεια της θεραπείας.

Δεδομένου ότι η εφαρμογή του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος μπορεί να οδηγήσει τον οργανισμό σε συνθήκες ήπιου οξειδωτικού στρες, οι επιστήμονες συχνά μετρούν ειδικούς δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης, όπως για παράδειγμα, η γλουταθειόνη, το υπεροξείδιο του υδρογόνου ή άλλα μόρια, για να μελετήσουν πώς το σώμα αντιδρά ή αν έχει προκληθεί οξειδωτική βλάβη (Boeckmann *et al.*, 2020).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία είχε σαν στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης της θεραπείας με Ψυχρό Ατμοσφαιρικό Πλάσμα (Cold Atmospheric Plasma - CAP) στην οξειδοαναγωγική ισορροπία του ανθρώπινου οργανισμού. Το CAP αποτελεί μία αναδυόμενη τεχνολογία με εφαρμογές στην ιατρική και τη βιοτεχνολογία, κυρίως λόγω της ικανότητάς του να αλληλεπιδρά με τους ιστούς χωρίς να προκαλεί θερμική καταπόνηση. Οι βιολογικές του επιδράσεις αποδίδονται κυρίως στην παρουσία δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου (ROS/RNS), ιόντων και φωτονίων, που μπορούν να τροποποιήσουν την κυτταρική οξειδοαναγωγική ισορροπία.

Η εργασία αυτή επικεντρώθηκε στη μελέτη 4 βασικών δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε συνολικό δείγμα αίματος 23 ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με CAP. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δυο γκρουπ: στο πρώτο γκρουπ (n=13) για ένα μήνα οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε θεραπεία με CAP, η θεραπεία διακόπηκε για διάστημα ενός μήνα και συνεχίστηκε για ακόμη ένα μήνα με χορήγηση placebo (αέρας αντί για CAP). Το δεύτερο γκρουπ (n=10), ακολούθησε το ακριβώς ανάποδο πρωτόκολλο. Και στα δυο γκρουπ πραγματοποιήθηκαν 4 αιμοληψίες, σε διάστημα περίπου τεσσάρων μηνών, με κάθε αιμοληψία να απέχει περίπου έναν μήνα από την προηγούμενη, δηλαδή στην αρχή και στο τέλος κάθε παρέμβασης. Οι δείκτες που μελετήθηκαν είναι η αιμοσφαιρίνη (Hb), η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) του πλάσματος, η δραστηριότητα της καταλάσης, ενός ενζύμου αποτοξικοποίησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου και οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), κυρίως ως δείκτης υπεροξειδωσής των λιπιδίων.

Μέσα από την αξιολόγηση των παραπάνω δεικτών σε 4 χρονικές στιγμές και με διαφορετική εφαρμογή της θεραπείας με CAP, στόχος είναι να αξιολογηθεί κατά πόσο και με ποιον τρόπο το CAP επηρεάζει την αντιοξειδωτική άμυνα και τις οξειδωτικές βλάβες του οργανισμού. Τα αποτελέσματα μπορούν να συμβάλουν στην κατανόηση των μηχανισμών δράσης του CAP και στην ενδεχόμενη καθιέρωσή του ως συμπληρωματική θεραπευτική προσέγγιση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Γενικά

Σε αυτό το κεφάλαιο ακολουθεί αναλυτική περιγραφή του πειραματικού σχεδιασμού της μελέτης και των πειραματικών πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής εργασίας.

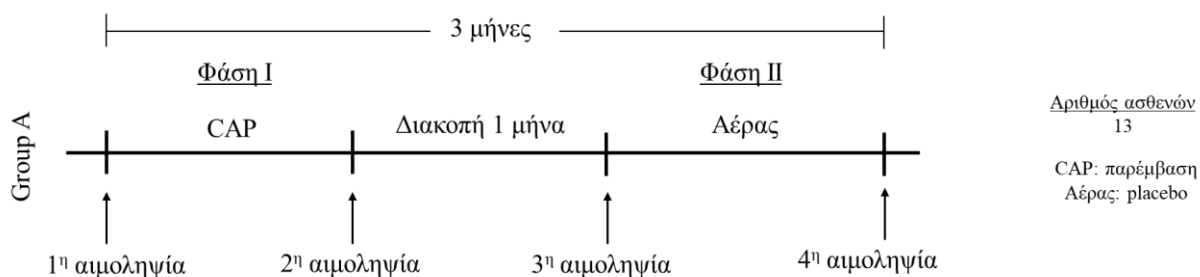
Οι δείκτες οξειδοαναγωγής που εκτιμήθηκαν είναι:

1. Ανηγμένη Γλουταθειόνη (GSH)
2. Ρυθμός αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)
/Δραστικότητα ενζύμου Καταλάσης (CAT)
3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)
4. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

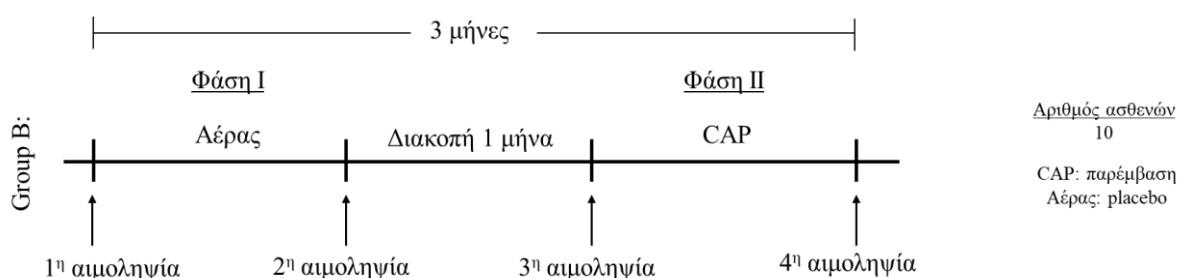
3.2 Πειραματικός σχεδιασμός και τύποι δειγμάτων

Για τη σειρά πειραμάτων, μελετήθηκαν βιολογικά δείγματα αίματος ανθρώπων, τα οποία προήλθαν από το Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Οι συγκεκριμένοι ασθενείς, υποβλήθηκαν σε θεραπεία Ψυχρού Ατμοσφαιρικού Πλάσματος (CAP). Οι ασθενείς υποβλήθηκαν συνολικά σε τέσσερις αιμοληψίες που πραγματοποιήθηκαν σε διάστημα περίπου τριών μηνών, με κάθε αιμοληψία να απέχει περίπου έναν μήνα από την προηγούμενη. Σε αυτά τα δείγματα αίματος, έγινε η μελέτη των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Για το κάθε δείγμα, έγινε επανάληψη της μέτρησης του κάθε δείκτη 3 φορές.

Ο πειραματικός σχεδιασμός για κάθε γκρουπ είχε ως εξής:



Εικόνα 14: Πειραματικό πλάνο για το Group A



Εικόνα 15: Πειραματικό πλάνο για το Group B

3.3 Συνθήκες αποθήκευσης δειγμάτων

Στα δείγματα αίματος αμέσως μετά τη λήψη τους πραγματοποιήθηκε η διαδικασία διαχωρισμού τους σε πλάσμα και ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (Red Blood Cell Lysate-RBCL), το κάθε δείγμα χωρίστηκε σε διαφορετικά aliquots τα οποία αποθηκεύτηκαν κατευθείαν στους -80°C , σε βαθιά κατάψυξη, ώστε να ανασταλεί κάθε βιολογική μεταβολή τους, η οποία θα επηρέαζε τα αποτελέσματα των πειραμάτων.

3.3.1 Επεξεργασία αίματος

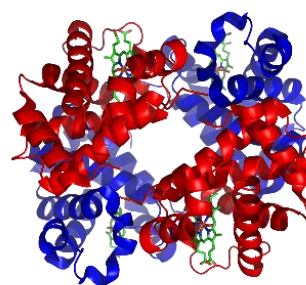
Αμέσως μετά τη λήψη του ολικού αίματος, έγινε ο διαχωρισμός του σε πλάσμα και ερυθροκύτταρα (Red Blood Cell Lysate – RBCL), αφού το πρώτο χρησιμοποιείται για την μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (total antioxidant capacity, TAC) και της υπεροξειδωσής λιπιδίων – TBARS, ενώ το RBCL στη μέτρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης – GSH, και της ικανότητας διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2).

Ο διαχωρισμός πλάσματος και ερυθροκυττάρων έγινε με φυγοκέντρηση (1380 g, 10 min, 4°C) και στη συνέχεια, το υπερκείμενο (πλάσμα) συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε σωληνάκια erpendorf τα οποία τοποθετήθηκαν στους -80°C για τις επόμενες μετρήσεις. Στο ίζημα (ερυθροκύτταρα) προστέθηκε απιονισμένο νερό (dH₂O) σε αναλογία 1:1 v/v, ακολούθησε έντονο vortex και δεύτερη φυγοκέντρηση στα 4000 g, για 15 min, στους 4°C). Τέλος, σε νέα σωληνάκια erpendorf συλλέχθηκε το υπερκείμενο (RBCL), το οποίο φυλάχθηκε ομοίως στους -80°C για τις επόμενες μετρήσεις, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως.

3.4 Μέθοδος μέτρησης Αιμοσφαιρίνης

Αρχή της μεθόδου

Η αιμοσφαιρίνη είναι μια ζωτική πρωτεΐνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων που παίζει καθοριστικό ρόλο στη μεταφορά οξυγόνου από τους πνεύμονες προς τους ιστούς και διοξειδίου του άνθρακα πίσω στους πνεύμονες. Αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες, καθεμία με μία ομάδα αίμης που περιέχει σίδηρο, γεγονός που της επιτρέπει να δεσμεύει και να μεταφέρει μόρια οξυγόνου. Η μέτρηση της συγκέντρωσής της έχει σημαντική διαγνωστική αξία, καθώς παρέχει πληροφορίες για την οξυγόνωση του οργανισμού και μπορεί να συμβάλλει στη διάγνωση παθολογικών καταστάσεων όπως η αναιμία. Στην παρούσα μελέτη, η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης χρησιμοποιήθηκε για την έκφραση των αποτελεσμάτων στους δείκτες που μετρήθηκαν στο RBCL των ασθενών και προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της hemiglobincyanide (HiCN), κάνοντας χρήση εμπορικού κιτ της εταιρείας Dutch Diagnostics (Zutphen, Ολλανδία).



Εικόνα 16: Η κρυσταλλική δομή της αιμοσφαιρίνης

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Σε σωληνάκια erpendorf των 1,5 ml, προστίθενται οι εξής ποσότητες, κατά σειρά:

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια που προστίθενται, στη μέθοδο προσδιορισμού της αιμοσφαιρίνης

	Δείγμα	Blank
Αραιωμένο R1 (1:10)	1000 μ L	1000 μ L
Δείγμα (RBCL)	5 μ L	-

Το αντιδραστήριο R1 αραιώνεται 1: 10 σε νερό. Ακολουθεί ανάδευση με vortex και τα φιαλίδια επωάζονται στο σκοτάδι για 10 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 540nm με πλαστική κυψελίδα. Σαν τυφλό, χρησιμοποιήθηκε ένα erpendorf tube το οποίο περιείχε μόνο 1ml αραιωμένο R1.

Υπολογισμοί

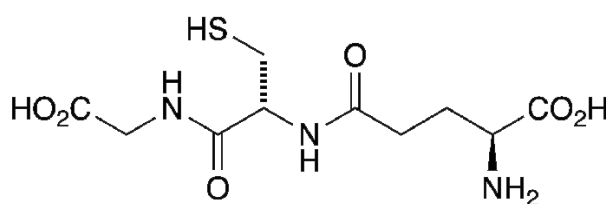
Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$Hb \left(\frac{g}{dl} \right) = (Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}) \times 29.4$$

3.5 Μέθοδος μέτρησης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

Αρχή της μεθόδου

Η γλουταθειόνη είναι ένα μικρό πεπτιδίο που αποτελείται από τρία αμινοξέα, τη γλυκίνη, την κυστεΐνη και το γλουταμινικό οξύ.



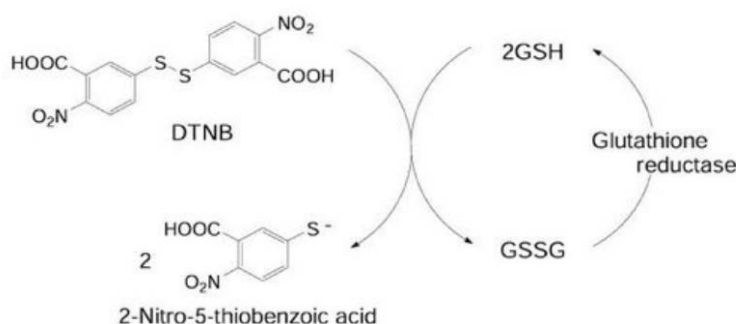
Πρόκειται για την πιο άφθονη *Εικόνα 17: Ο συντακτικός τύπος του τριπεπτιδίου της γλουταθειόνης* θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων

και του ανθρώπου. Απαντάται σε μεγάλη ποσότητα στους ζωικούς ιστούς και είναι το πιο βασικό ενδογενές αντιοξειδωτικό του οργανισμού, χάρη στις ικανότητές της να εξουδετερώνει επιβλαβείς ουσίες. Η γλουταθειόνη λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση.

Ο ρόλος της είναι κυρίως προστατευτικός, καθώς βοηθά στην απομάκρυνση ελεύθερων ριζών και άλλων επιβλαβών ενώσεων από τα κύτταρα, διατηρώντας τη

σωστή λειτουργία τους. Επίσης, συμβάλλει σημαντικά στον μεταβολισμό φαρμάκων και ασβεστίου, καθώς και στη ρύθμιση της λειτουργίας των αιμοπεταλίων και της σταθερότητας των κυτταρικών μεμβρανών. Στον οργανισμό εμφανίζεται σε δύο μορφές: την ανηγμένη (GSH), που είναι η ενεργή μορφή, και την οξειδωμένη (GSSG), που προκύπτει όταν η GSH αντιδρά για να εξουδετερώσει οξειδωτικούς παράγοντες. Η GSSG, συνήθως, αποτελεί το 10% της GSH.

Η μέθοδος μέτρησης της γλουταθειόνης βασίζεται στο γεγονός ότι η GSH μπορεί να οξειδωθεί από ένα αντιδραστήριο, το διθειοδυνιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB). Κατά τη χημική αυτή αντίδραση, η GSH αντιδρά με το DTNB και μετατρέπεται στην οξειδωμένη της μορφή-GSSG, ενώ ταυτόχρονα παράγεται μια έγχρωμη ένωση, το 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ (**Εικόνα 18**). Αυτή η ένωση απορροφά φως σε μήκος κύματος 412 nm, οπότε η ποσότητά της μπορεί να μετρηθεί με τη βοήθεια φασματοφωτομέτρου. Έτσι, υπολογίζεται έμμεσα η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (Reddy *et al.*, 2004).



Εικόνα 18: Η μετατροπή της GSH σε GSSG με παραγωγή έγχρωμου προϊόντος 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ (블로그, 2017)

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Η πειραματική διαδικασία βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Reddy *et al.* (2004) με κάποιες τροποποιήσεις. Αρχικά, απαιτείται ο καθαρισμός των δειγμάτων, πριν ξεκινήσει η διαδικασία. Πιο συγκεκριμένα, προστίθενται 110 μL δείγματος αίματος (RBCL) και 110 μL TCA 5% σε σωληνάριο eppendorf των 1,5 ml, και μετά από ανάδευση, ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4°C. Το TCA 5% χρησιμοποιείται για να κατακρημνιστούν τα βιομόρια. Μετά την φυγοκέντρηση, αντλούνται 100 μL υπερκειμένου, τα οποία προστίθενται σε νέο eppendorf, και το ίζημα

απορρίπτεται. Στο νέο erpendorf, προστίθενται 30 μL TCA 5%, γίνεται ανάδευση με vortex, και έπειτα ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρωση. Μετά το πέρας αυτής, τα δείγματα διατηρούνται στον πάγο έως ότου να ξεκινήσει η μέθοδος. Στη συνέχεια, προστίθενται οι εξής ποσότητες διαλυμάτων, όπως παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6**.

Πίνακας 6: Αντιδραστήρια που προστίθενται, κατά σειρά, στη μέθοδο προσδιορισμού ανηγμένης γλουταθειόνης

	Blank	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα 67mM (pH 7,95)	660 μL	660 μL
Απεσταγμένο νερό (dH_2O)	20 μL	-
Δείγμα αίματος μετά από καθαρισμό	-	20 μL
Αντιδραστήριο DTNB	330 μL	330 μL

Έπειτα, γίνεται ανάδευση, και ακολουθεί επώαση στο σκοτάδι για 15 λεπτά. Η διατήρηση των δειγμάτων στο σκοτάδι γίνεται με σκοπό να πραγματοποιηθεί η αντίδραση μεταξύ του DTNB και της GSH. Μετά το πέρας της επώασης, μετράται η απορρόφηση στα 412 nm με πλαστική κυψελίδα.

Υπολογισμοί

Για τον υπολογισμό των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στα δείγματα αίματος, έγιναν οι εξής υπολογισμοί:

$$GSH \left(\frac{\mu\text{mol}}{g \text{ Hb}} \right) = \frac{\left[\left(\frac{Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}}{13,6} \right) \times 262,6 \right] \times 1000}{Hb \left(\frac{g}{L} \right)}$$

Όπου:

- το 262.6 είναι ο συντελεστής αραίωσης. Αυτός προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (20 μL) ($1010 / 20 = 50.5$), πολλαπλασιάζοντας με 2, για να συνυπολογιστεί η 1:1 αραίωση που έγινε για τη

λύση των ερυθροκυττάρων και με 2×1.3 , για να συνυπολογιστεί η πρώτη (110 μL αιμολύματος / 110 μL 5% TCA) και η δεύτερη αραιώση (100 μL υπερκειμένου / 30 μL 5% TCA) που έγιναν από το TCA 5%.

- το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.
- Πολλαπλασιάζοντας με 1000 για να γίνει η μετατροπή mmol/l σε $\mu\text{mol/l}$.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη (Hb). Συγκέντρωση GSH ανά g αιμοσφαιρίνης - GSH ($\mu\text{mol/g Hb}$)

3.6 Μέθοδος μέτρησης Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (Total Antioxidant Capacity)

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) ενός δείγματος λειτουργεί ως ένδειξη της γενικής αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού. Εκφράζει, συγκεκριμένα, τη συνολική ικανότητα των συστατικών του πλάσματος και των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, συμβάλλοντας έτσι στην προστασία του οργανισμού από οξειδωτικό στρες (Janaszewska & Bartosz, 2002).

Αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως το ουρικό οξύ στο αίμα ή η βιταμίνη C, συμβάλλουν με διαφορετικούς τρόπους στην προστασία του οργανισμού από το οξειδωτικό στρες. Στο πλάσμα, το ουρικό οξύ έχει τη μεγαλύτερη συμβολή στην TAC, επηρεάζοντας καθοριστικά την τιμή της (55–60%) λόγω της υψηλής του συγκέντρωσης. Σημαντική είναι επίσης η συνεισφορά της βιταμίνης C, ενώ ακολουθούν οι βιταμίνες E και A. Η βιταμίνη C και η E, μαζί, ενδέχεται να ευθύνονται για το 25% της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος. Επειδή είναι δύσκολο να μετρηθεί ξεχωριστά η δράση κάθε αντιοξειδωτικού συστατικού ξεχωριστά, συνήθως αξιολογείται η συνολική τους επίδραση με έναν ενιαίο δείκτη, την TAC.

Η μέθοδος βασίζεται σε μια τεχνητή ελεύθερη ρίζα που ονομάζεται DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Αυτή η ρίζα (DPPH•) έχει έντονο μωβ χρώμα και, όταν έρθει σε επαφή με αντιοξειδωτικές ενώσεις του δείγματος, δέχεται υδρογόνο, ανάγεται και μετατρέπεται σε μια άχρωμη ή λιγότερο έγχρωμη μορφή, την υδραζίνη (1,1-

diphenyl-2-picrylhydrazine). Αυτή η αλλαγή στο χρώμα μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά στα 520 nm, επιτρέποντας την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του δείγματος (Munteanu & Apetrei, 2021).

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Η πειραματική διαδικασία βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Janaszewska & Bartosz (2002) με κάποιες τροποποιήσεις. Σε φιαλίδια eppendorf των 1,5 ml, προσθέτουμε με σειρά, τις ποσότητες που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**:

Πίνακας 7: Αντιδραστήρια που προστίθενται, κατά σειρά, στη μέθοδο προσδιορισμού ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

	Blank	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα 10mM (pH 7,4)	500 μL	480 μL
Πλάσμα	-	20 μL
DPPH 0,1 mM	500 μL	500μL

Έπειτα, ακολουθεί ανάδευση των φιαλιδίων με vortex και επώάζονται στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης, οι αντιοξειδωτικές ουσίες του ορού εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH και τη μετατρέπουν στην, πιο σταθερή ένωση, υδραζίνη. Μετά την επώαση, τοποθετούνται στη φυγόκεντρο στα 12.000 g, στους 25°C, για 3 λεπτά, με σκοπό την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση, και στη συνέχεια φωτομετρούνται με πλαστική κυψελίδα στα 520 nm.

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας μπορούν να εκφραστούν ως εξής:

$$\frac{\text{mmol DPPH που εξουδετερώθηκαν}}{L \text{ πλάσματος}} = \frac{\left(\frac{\% \text{ μείωση Abs}}{100} \right) \times 50 \times 50}{1000}$$

Όπου:

$$\% \text{ μείωση Abs} = \frac{(Abs_{\text{τυφλού}} - Abs_{\text{δείγματος}})}{Abs_{\text{μάρτυρα}}} \times 100$$

Διαίρεση με το 100 για να μετατραπεί το ποσοστό μείωσης της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης

Πολλαπλασιασμός με το 50 επειδή το DPPH έχει συγκέντρωση 50 μmol/L στην κυψελίδα

Πολλαπλασιασμός με το 50 επειδή η αραίωση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50 φορές μεγαλύτερη (1000 μL στην κυψελίδα / 20 μL πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 50)

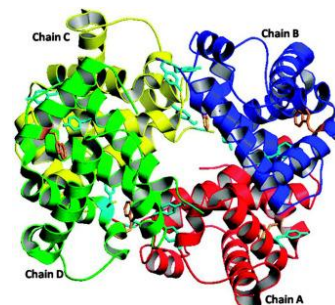
1000 = η μετατροπή των μmol σε mmol

Εκφράζεται σε mmol DPPH/L πλάσματος.

3.7 Ρυθμός αποικοδόμησης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂)– Μέθοδος μέτρησης δραστηριότητας καταλάσης (CAT)

Αρχή της μεθόδου

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), ένα τοξικό υποπροϊόν του κυτταρικού μεταβολισμού, μετατρέποντάς το σε νερό και οξυγόνο. Είναι εξαιρετικά αποτελεσματική, κάθε μόριο της μπορεί να διασπάσει δεκάδες χιλιάδες μόρια H₂O₂, κάθε δευτερόλεπτο. Απαντάται κυρίως στα υπεροξειδισώματα, αλλά βρίσκεται επίσης στα μιτοχόνδρια και στο κυτταρόπλασμα. Η καταλάση αποτελείται από τέσσερις μεγάλες πολυπεπτιδικές αλυσίδες (τετραμερές – **Εικόνα 19**), καθεμία από τις οποίες περιέχει μία ομάδα αίμης. Οι ομάδες αυτές, που περιέχουν σίδηρο, είναι υπεύθυνες για τη δράση της απέναντι στο H₂O₂.



Εικόνα 19: Η κρυσταλλική δομή της καταλάσης (Singh & Kumar, 2019)



Εικόνα 20: Η αντίδραση διάσπασης του H₂O₂ από την καταλάση

Η διάσπαση του υπεροξειδίου γίνεται σε δύο στάδια, στα οποία εμπλέκεται το σίδηρο του ενζύμου. Το ένζυμο μπορεί επίσης να χρησιμοποιήσει το H_2O_2 για να οξειδώσει και να απομακρύνει άλλες τοξικές ουσίες, όπως η αιθανόλη. Η βέλτιστη δραστηριότητα της καταλάσης παρατηρείται σε ουδέτερο pH.

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Η πειραματική διαδικασία βασίστηκε στο πρωτόκολλο του Aebi (1984), με κάποιες τροποποιήσεις. Σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες, προστίθενται, κατά σειρά, οι παρακάτω ποσότητες, που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8**:

Πίνακας 8: Αντιδραστήρια που προστίθενται, κατά σειρά, στη μέθοδο προσδιορισμού δραστηριότητας καταλάσης (CAT)

	Δείγματα
Ρυθμιστικό διάλυμα 67 mM (pH 7,4)	2991 μ L
Αραιωμένο δείγμα RBCL (1:10)	4 μ L

Στη συνέχεια, γίνεται ανάδευση και ακολουθεί επώαση στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά. Κάθε φορά, επωάζονται 2 δείγματα, προκειμένου να φωτομετρούνται απευθείας μετά την επώαση. Μετά το πέρας της επώασης, το περιεχόμενο του δοκιμαστικού σωλήνα μεταφέρεται σε κυψελίδα χαλαζία (Quartz). Σε αυτή προστίθενται 5 μ L 30% H_2O_2 , ανακινείται χρησιμοποιώντας παραφίλμ και έπειτα τοποθετείται αμέσως στο φωτόμετρο, για μέτρηση της απορρόφησης στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα (2.05 λεπτά).

Υπολογισμοί

Η δραστηριότητα της καταλάσης ορίζεται ως εξής:

$$\text{Ρυθμός διάσπασης του } H_2O_2 \left(\frac{U}{mg \text{ Hb}} \right) = \frac{\left(\frac{\Delta Abs_{\text{δείγματος}}}{min} \right)}{40} \times 750 \times 10 \times 2 \times 1000$$

$$Hb \left(\frac{mg}{mL} \right)$$

Όπου:

- ΔAbs δείγματος/min είναι ο μέσος όρος των τιμών της δραστηριότητας του ενζύμου, αφού έχει προηγηθεί αναγωγή της τιμής στο 1 λεπτό
- 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H_2O_2
- 750 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του σωλήνα (3000 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (4 μL) ($3000 / 4 = 750$)
- το 10 προκύπτει από την 1:10 αραίωση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων
- πολλαπλασιασμός με 1000 για τη μετατροπή των mol/l σε $\mu\text{mol/ml}$

Hb (mg/mL) είναι η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης

3.8 Μέθοδος εκτίμησης ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Αρχή της μεθόδου

Όταν τα κύτταρα βρίσκονται υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες υφίστανται υπεροξείδωση, οδηγώντας στη δημιουργία πολύ δραστικών και ασταθών παραγώγων. Κατά τη διάσπασή τους, ένα από τα βασικά προϊόντα που σχηματίζονται είναι η μαλονδιαλδεΐδη (MDA).

Η ανίχνευση της μαλονδιαλδεΐδης γίνεται μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), με αναλογία 1:2 μεταξύ MDA και TBA, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται μια σταθερή ένωση. Τα TBARS αποτελούν έναν δείκτη των επιπέδων της μαλονδιαλδεΐδης (εκφράζονται σαν ισοδύναμά της). Η ποσότητα της μαλονδιαλδεΐδης που σχηματίζεται, μετριέται με φασματοφωτομετρική μέθοδο, και παρέχει μια εκτίμηση του βαθμού λιπιδικής υπεροξείδωσης στον οργανισμό (Mylonas & Kouretas, 1999).

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Η πειραματική διαδικασία βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Keles et al. (2001), με κάποιες τροποποιήσεις. Πριν αρχίσει η πειραματική διαδικασία, ρυθμίζεται το υδατόλουτρο στους 95 °C και παρασκευάζεται το διάλυμα Na₂SO₄ (2M) – TBA (55mM), το οποίο χρειάζεται θέρμανση και ανάδευση για κάποια λεπτά προτού χρησιμοποιηθεί στο πείραμα.

Αρχικά, σε σωλήνες Falcon των 15 ml, προστίθενται με σειρά τα αντιδραστήρια και το δείγμα, όπως εμφανίζονται στον **Πίνακα 10**.

Πίνακας 10: Αντιδραστήρια που προστίθενται στη μέθοδο προσδιορισμού των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

	Δείγματα	Τυφλό δείγμα
Δείγμα αίματος (Πλάσμα)	100 μL	-
35% TCA	500 μL	500 μL
Tris-HCl	500 μL	500 μL

Μετά από τις παραπάνω προσθήκες γίνεται ανάδευση και οι σωλήνες επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Έπειτα, προστίθεται 1 mL Na₂SO₄ – TBA και τα δείγματα επωάζονται στους 95°C για 45 min μέσα σε αυτό. Αφού ολοκληρωθεί η επώαση, οι σωλήνες Falcon μεταφέρονται στον πάγο με σκοπό να κρυώσουν, για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθεται 1 mL TCA 70% και αναδεύονται. Σε αυτό το σημείο, γίνεται μεταφορά 1 mL από το περιεχόμενο του κάθε Falcon, σε eppendorfs και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11200g στους 25 °C για 3 λεπτά. Τέλος, η οπτική απορρόφηση μετράται στα 530 nm με χρήση πλαστικής κυψελίδας.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS υπολογίζεται ως εξής:

$$TBARS \left(\frac{\mu\text{mol}}{L} \right) = \left(\frac{Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}}{0,156} \right) \times 31$$

Όπου:

- το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου της αντίδρασης (3100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) ($3100 / 100 = 31$)
- το 0,156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10^{-6} για να μετατραπούν τα mol/L σε $\mu\text{mol/L}$

3.10 Στατιστική ανάλυση

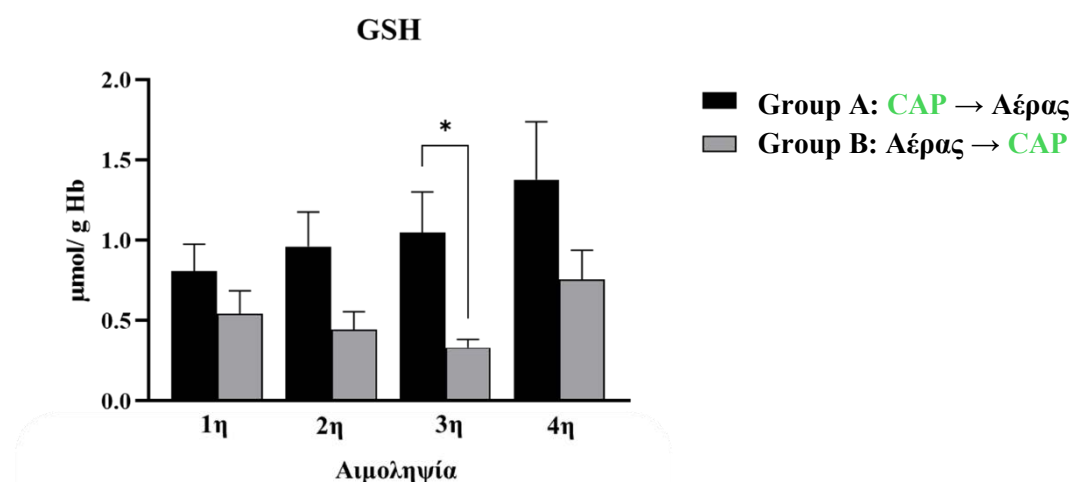
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού GraphPad Prism, έκδοση 8.0.1 (GraphPad Software, Inc., Boston, MA, USA). Ορίστηκε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$ και έγινε έλεγχος κανονικότητας των αποτελεσμάτων με τη χρήση του Shapiro-Wilk. Για τις μετρήσεις που ακολουθούσαν κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση t-test, ενώ για αυτές που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney, για τη σύγκριση των δύο γκρουπ μέσα στην ίδια χρονική στιγμή αιμοληψίας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SEM (τυπικό σφάλμα του μέσου όρου).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι βιοδείκτες που εκτιμήθηκαν ήταν τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), ο ρυθμός αποικοδόμησης του H_2O_2 μέσω της δραστηρότητας του ενζύμου της καταλάσης, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC) και τα επίπεδα των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS). Οι οξειδοαναγωγικοί αυτοί δείκτες, μετρήθηκαν σε σύνολο δειγμάτων 23 ασθενών, που υποβλήθηκαν σε θεραπεία Ψυχρού Ατμοσφαιρικού Πλάσματος (CAP), όπως περιγράφηκε προηγουμένως στον πειραματικό σχεδιασμό.

4.1 Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

Στο **Διάγραμμα 1** παρατηρείται η μεταβολή των επιπέδων της Ανηγμένης Γλουταθειόνης (GSH) στα δείγματα που προήλθαν από τους ασθενείς που υποβλήθηκαν στη θεραπεία με ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα.

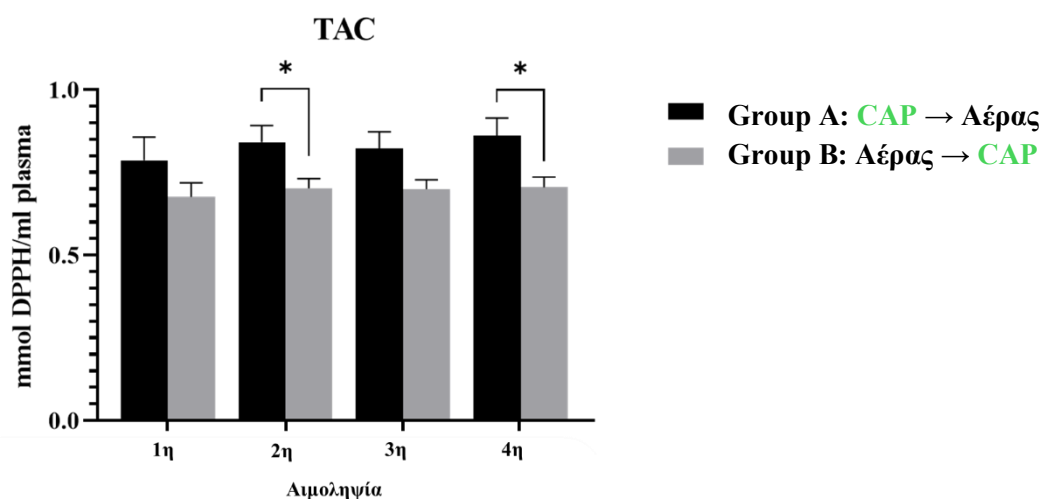


*Διάγραμμα 1: Η μεταβολή των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH). * Στατιστικώς σημαντική μεταβολή ανάμεσα στα δύο γκρουπ κατά την ίδια χρονική στιγμή αιμοληψίας $p < 0.05$*

Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) ($p < 0.05$) κατά την τρίτη χρονική στιγμή αιμοληψίας στο γκρουπ των ασθενών που αρχικά υποβλήθηκαν σε θεραπεία CAP (group A), σε σχέση με τους ασθενείς που υποβλήθηκαν πρώτα σε placebo θεραπεία (group B).

4.2 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Στο Διάγραμμα 2 σημειώνεται η μεταβολή της Ολικής Αντιοξειδωτικής Ικανότητας (TAC), στα δείγματα που προήλθαν από τους ασθενείς που υποβλήθηκαν στη θεραπεία με ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα.



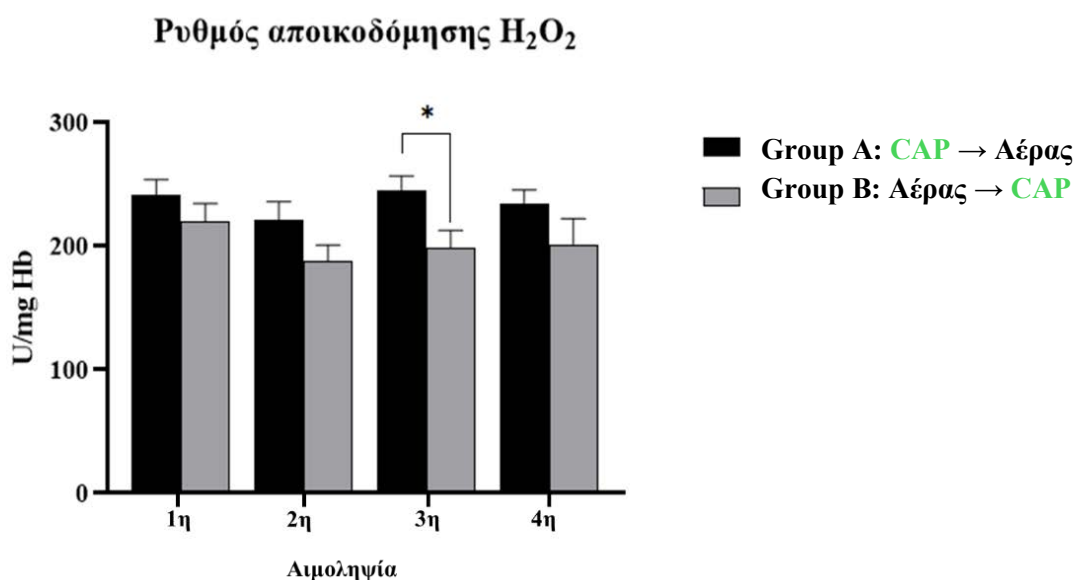
Διάγραμμα 2: Η μεταβολή των επιπέδων ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

* Στατιστικώς σημαντική μεταβολή ανάμεσα στα δύο γκρουπ κατά την ίδια χρονική στιγμή αιμοληψίας, $p < 0.05$

Συγκεκριμένα, σημειώθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) ($p < 0.05$) κατά τη δεύτερη και τέταρτη χρονική στιγμή αιμοληψίας στο γκρουπ των ασθενών που πρώτα υποβλήθηκαν σε θεραπεία CAP (group A), σε σχέση με τους ασθενείς που υποβλήθηκαν στην αρχή σε θεραπεία αέρα (group B).

4.3 Προσδιορισμός του ρυθμού αποικοδόμησης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂)

Στο **Διάγραμμα 3** σημειώνεται ο προσδιορισμός του ρυθμού αποικοδόμησης υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), στα δείγματα που προήλθαν από τους ασθενείς που υποβλήθηκαν στη θεραπεία με ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα.

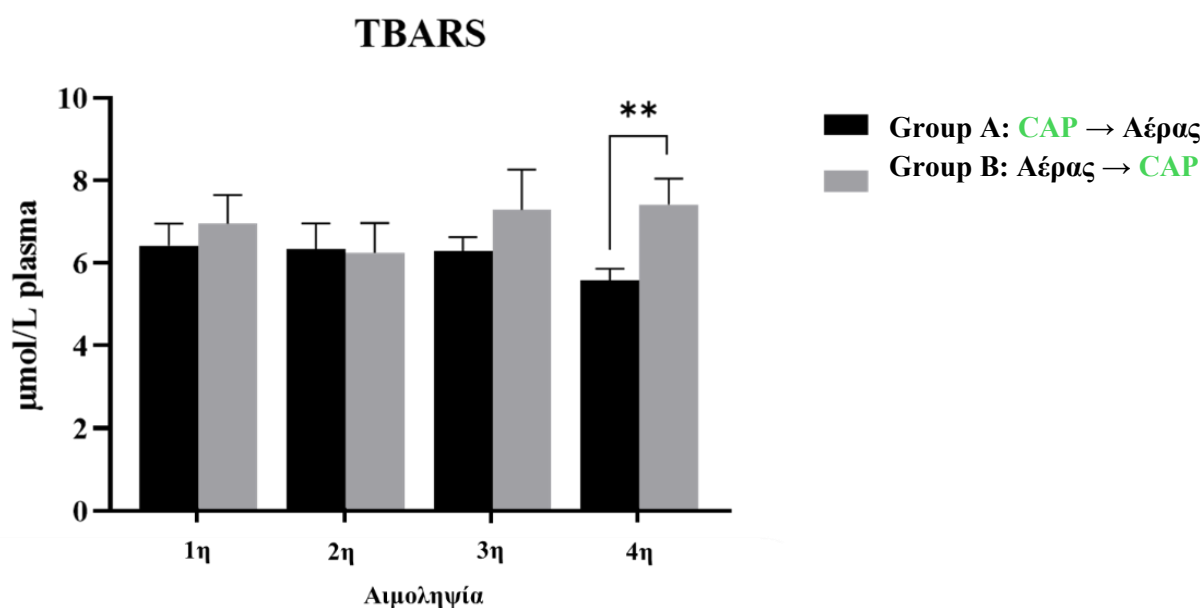


*Διάγραμμα 3: Η μεταβολή των επιπέδων του ρυθμού αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂), * Στατιστικώς σημαντική μεταβολή ανάμεσα στα δύο γκρουπ κατά την ίδια χρονική στιγμή αιμοληψίας, $p < 0.05$*

Όπως φαίνεται και στο **Διάγραμμα 3**, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση του ρυθμού αποικοδόμησης του H₂O₂ ($p < 0.05$), κατά την τρίτη χρονική στιγμή αιμοληψίας στο γκρουπ των ασθενών που πρώτα υποβλήθηκαν σε θεραπεία ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος (group A), σε σχέση με τους ασθενείς που υποβλήθηκαν πρώτα σε placebo θεραπεία (group B).

4.4 Προσδιορισμός ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Στο **Διάγραμμα 4** σημειώνεται ο προσδιορισμός ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), στα δείγματα που προήλθαν από τους ασθενείς που υποβλήθηκαν στη θεραπεία με ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα.



*Διάγραμμα 4: Η μεταβολή των επιπέδων ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), ** Στατιστικώς σημαντική μεταβολή ανάμεσα στα δύο γκρουπ κατά την ίδια χρονική στιγμή αιμοληψίας, $p < 0.01$*

Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων της λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS) ($p < 0.01$), κατά τη τέταρτη χρονική στιγμή αιμοληψίας στο γκρουπ των ασθενών που πρώτα υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα (CAP) (group A), σε σχέση με τους ασθενείς που υποβλήθηκαν πρώτα σε θεραπεία με αέρα (placebo) (group B).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εφαρμογή του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος (Cold Atmospheric Plasma – CAP) ως θεραπευτική παρέμβαση έχει συγκεντρώσει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, καθώς αποτελεί μια καινοτόμο βιοτεχνολογική τεχνολογία με πολυδιάστατες εφαρμογές, τόσο στον ιατρικό τομέα όσο και στη βιομηχανία τροφίμων και σε περιβαλλοντικούς τομείς. Το CAP αποτελεί μια μορφή ιονισμένου αερίου που παράγεται σε θερμοκρασία δωματίου και είναι ενεργειακά πλούσιο καθώς περιέχει ένα πολύπλοκο μείγμα δραστικών συστατικών όπως ελεύθερες ρίζες (δραστικές μορφές οξυγόνου και δραστικές μορφές αζώτου – ROS και RNS), υπεριώδη ακτινοβολία, ηλεκτρόνια, ιόντα και φωτόνια. Τα συστατικά αυτά αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα και τους ιστούς επιδρώντας τόσο σε μοριακό όσο και σε κυτταρικό επίπεδο. (Min *et al.*, 2022).

Η μοναδικότητα του CAP έγκειται στο γεγονός ότι μπορεί να εφαρμοστεί τοπικά χωρίς να προκαλεί θερμική καταπόνηση στους ιστούς, κάτι το οποίο το διαφοροποιεί από άλλες μορφές ενέργειας (π.χ. θερμικό πλάσμα) που σχετίζονται με κυτταρική καταστροφή λόγω υψηλής θερμοκρασίας. Αντιθέτως, το CAP αξιοποιεί την παρουσία των ROS και RNS ώστε να τροποποιήσει το οξειδοαναγωγικό ισοζύγιο και να ενεργοποιήσει ελεγχόμενους μοριακούς μηχανισμούς σηματοδότησης, οι οποίοι εμπλέκονται σε κρίσιμες διεργασίες όπως η επούλωση τραυμάτων, η αντιμικροβιακή δράση, η ρύθμιση φλεγμονής, η προαγωγή της αγγειογένεσης, καθώς και η αναστολή ανάπτυξης όγκων (Khalaf *et al.*, 2024).

Σημαντικό ρόλο στη δράση του CAP διαδραματίζει η ικανότητά του να αλληλεπιδρά με βιολογικά μόρια και να επηρεάζει τη φυσιολογική οξειδοαναγωγική ισορροπία των κυττάρων. Η επίδρασή του πραγματοποιείται μέσω της παραγωγής και διάχυσης δραστικών μορίων – κυρίως δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS), όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το μονοξείδιο του αζώτου και η ρίζα υδροξυλίου – τα οποία ενισχύουν ή αναστέλλουν βιολογικά μονοπάτια, ρυθμίζοντας την κυτταρική ομοιόσταση. Το CAP, προκαλώντας ήπιο και παροδικό οξειδωτικό ερέθισμα, ενεργοποιεί την ενδογενή αντιοξειδωτική απόκριση των κυττάρων, χωρίς να επιφέρει μακροχρόνιες κυτταρικές βλάβες. Η αντίδραση αυτή εντάσσεται στο φαινόμενο που είναι γνωστό ως «oxidative hormesis», όπου ήπια επίπεδα οξειδωτικού στρες κινητοποιούν προστατευτικούς μηχανισμούς και μεταγραφικούς παράγοντες, όπως υποδεικνύεται από την αυξημένη δραστικότητα ενζύμων όπως η καταλάση (CAT), καθώς και την αυξημένη

παρουσία μορίων όπως η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) (Boeckmann et al., 2020; Nitti et al., 2022).

Σε επίπεδο εφαρμογών, η αξιοποίηση του CAP σε βιολογικά και ιατρικά περιβάλλοντα σχετίζεται άμεσα με τη μοναδική του δυνατότητα να επιδρά επιλεκτικά και μη θερμικά σε ιστούς. Στον τομέα της ιατρικής, το CAP έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε περιπτώσεις επιτάχυνσης της επούλωσης ιστών, όπως σε δερματικά έλκη ή μικροτραυματισμούς, καθώς και για την ενίσχυση της αναγέννησης επιθηλιακών επιφανειών. Επίσης, έχει τεκμηριωθεί η έντονη αντιμικροβιακή του δράση έναντι ευρέος φάσματος παθογόνων μικροοργανισμών – βακτηρίων, ιών και μυκήτων – κυρίως μέσω της καταστροφής των μικροβιακών μεμβρανών και της αποδιάταξης των γενετικών τους υλικών. Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμβολή του στην τροποποίηση της φλεγμονώδους απόκρισης, αφού επηρεάζει τοπικά την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών και ενεργοποιεί ρυθμιστικά οξειδοαναγωγικά μονοπάτια, χωρίς να προκαλεί υπερβολική καταπόνηση στα υγιά κύτταρα (Khalaf et al., 2024 ; Boeckmann et al., 2020).

Οι παραπάνω ιδιότητες καθιστούν το CAP μια εξαιρετικά ενδιαφέρουσα θεραπευτική πλατφόρμα, ιδιαίτερα σε περιβάλλοντα όπου επιζητείται η ελεγχόμενη ανοσολογική ενεργοποίηση, η αποστείρωση ιστών και επιφανειών, και η αποκατάσταση της βιολογικής ισορροπίας μέσω της ρύθμισης του οξειδοαναγωγικού δυναμικού.

Η παρούσα μελέτη έρχεται να προσθέσει μια πρωτότυπη και ουσιαστική συμβολή στο επιστημονικό αυτό πεδίο, εστιάζοντας στη σχέση του CAP με δείκτες του οξειδοαναγωγικού προφίλ στον ανθρώπινο οργανισμό. Με χρήση ενός προσεκτικά σχεδιασμένου πρωτοκόλλου και τη συμμετοχή 23 ασθενών σε δύο διακριτές πειραματικές ομάδες, η εργασία αυτή είχε ως στόχο να διερευνήσει κατά πόσο και με ποιον τρόπο το CAP επηρεάζει την αντιοξειδωτική άμυνα και τις οξειδωτικές βλάβες του οργανισμού. Για το σκοπό αυτό, οι βιοδείκτες που μελετήθηκαν ήταν ο προσδιορισμός των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η δραστηριότητα της καταλάσης (CAT) και οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS). Η κατανόηση των αλλαγών αυτών σε σχέση με τη χρονική εφαρμογή του CAP αποτελεί καθοριστικής σημασίας βήμα για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του ως θεραπευτικού εργαλείου.

Ξεκινώντας από τους δείκτες που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού – δηλαδή η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστικότητα της καταλάσης (CAT) και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) – παρουσίασαν ιδιαίτερα σημαντικές μεταβολές, οι οποίες ήταν πιο εμφανείς στο Group A, το οποίο αρχικά υποβλήθηκε στη θεραπεία με CAP και στη συνέχεια με placebo. Η ανάλυση αυτών των μεταβολών παρέχει ενδείξεις για το πώς το χρονικό σημείο εφαρμογής του CAP και η προϋπάρχουσα κατάσταση του οργανισμού επηρεάζουν την απόκρισή του.

Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), ως το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό μόριο ενδοκυτταρικά, παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση κατά την 3η αιμοληψία στο Group A όπως παρουσιάζεται στο **Διάγραμμα 1**, σε σχέση με το Group B όπου οι ασθενείς υποβλήθηκαν πρώτα σε θεραπεία με placebo και στη συνέχεια με CAP. Αυτή η χρονική στιγμή είναι ιδιαίτερα κρίσιμη, καθώς αντιστοιχεί στη λήξη της φάσης placebo και στην έναρξη της θεραπείας με CAP. Η μείωση της GSH στο δεύτερο γκρουπ μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι το προηγούμενο χρονικό διάστημα, κατά το οποίο οι ασθενείς δεν έλαβαν καμία δραστική παρέμβαση, συνέβαλε στη συσσώρευση ROS. Η παρατεταμένη έκθεση σε οξειδωτικό φορτίο οδηγεί σε εξάντληση των αποθεμάτων της GSH, τα οποία κινητοποιούνται για την απενεργοποίηση των ROS. Επίσης, δεδομένου ότι η GSH αναγεννάται μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR), είναι πιθανό ότι η παρατεταμένη υπερκατανάλωση ξεπέρασε την ικανότητα ανακύκλωσής της, οδηγώντας έτσι σε μειωμένα επίπεδα στο γκρουπ που έλαβε πρώτα το placebo, σε σχέση με το γκρουπ στο οποίο χορηγήθηκε πρώτα το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα, όπου φάνηκε να επιδρά θετικά στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των ασθενών (γκρουπ Α) (Kwon *et al.*, 2019).

Παράλληλη τάση καταγράφηκε και στη δραστικότητα της καταλάσης (CAT), η οποία αυξήθηκε επίσης σημαντικά κατά την ίδια χρονική στιγμή (3η αιμοληψία) στο Group A, όπως φανερώνει το **Διάγραμμα 3**. Η καταλάση πραγματοποιεί την αποικοδόμηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό και οξυγόνο, και συνεπώς, η μείωσή της στο γκρουπ B αντανάκλασε πιθανή εξάντληση ή αναστολή λόγω παρατεταμένης έκθεσης σε αυξημένες συγκεντρώσεις H_2O_2 . Τα χαμηλά επίπεδα της CAT πιθανόν να ευθύνονται για την «αδυναμία» άμεσης διάσπασης του H_2O_2 σε H_2 και O_2 , επιδεινώνοντας τη συνολική οξειδωτική επιβάρυνση στο πλάσμα των ασθενών του συγκεκριμένου γκρουπ, αφού δεν είχε ξεκινήσει η χορήγηση CAP, όπως είχε γίνει με το γκρουπ Α. Μπορεί επίσης να υποτεθεί ότι η έκθεση σε placebo, χωρίς δραστική

αντιοξειδωτική παρέμβαση, δημιούργησε συνθήκες υπολειτουργίας της ενζυμικής άμυνας ή αλλοίωσης της δομής του ενζύμου λόγω οξειδωτικής τροποποίησης (Kwon *et al.*, 2019).

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η οποία αποτυπώνει τη συνολική ικανότητα όλων των αντιοξειδωτικών παραγόντων του πλάσματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση ήδη από τη 2η αιμοληψία (**Διάγραμμα 2**), και αυτή η τάση συνεχίστηκε και εντάθηκε στη 4η αιμοληψία, στο Group A σε σχέση με το Group B. Από αυτό φαίνεται ότι συνεχίζεται η θετική επίδραση του CAP στο γκρουπ Α που ξεκίνησε από την αρχή. Αντίθετα, η μείωση που παρατηρήθηκε στο γκρουπ Β, είναι ενδεικτική συστηματικής εξάντλησης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, πιθανότατα τόσο των ενζυμικών (CAT, GPx, SOD) όσο και των μη-ενζυμικών (GSH, ουρικό οξύ, βιταμίνη C). Η TAC επηρεάζεται από τη συνεργιστική δράση των αντιοξειδωτικών μορίων και η μείωσή της αντανακλά γενικευμένη απορρύθμιση της αντιοξειδωτικής ισορροπίας, όπως συνέβη στο Group B (Buico *et al.*, 2009).

Αντίθετα, στο Group A, όπου η θεραπεία με CAP εφαρμόστηκε από την αρχή, παρατηρήθηκε σταθεροποίηση των τιμών των GSH, CAT και TAC. Αυτό υποδηλώνει ότι η πρόωπη εφαρμογή του CAP ενδεχομένως ενεργοποίησε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, μειώνοντας την πιθανότητα οξειδωτικών βλαβών σε σημαντικά βιομόρια. Εδώ μπορεί να υποστηριχθεί η υπόθεση ότι το CAP δρα ως ήπιο οξειδωτικό ερέθισμα, ικανό να προκαλέσει προσαρμοστική αντίδραση κυτταρικής άμυνας (oxidative hormesis) (Nitti *et al.*, 2022), ενισχύοντας την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων. Αξιοσημείωτο είναι ότι στο Group B, η εισαγωγή του CAP μετά από την περίοδο placebo δεν κατάφερε να επαναφέρει πλήρως την αντιοξειδωτική άμυνα, τουλάχιστον εντός του χρονικού πλαισίου της μελέτης. Αυτό εγείρει το ερώτημα κατά πόσο οι βιολογικές βλάβες που προκλήθηκαν κατά την περίοδο απουσίας παρέμβασης είναι αναστρέψιμες ή αν το CAP έχει κυρίως προληπτικό ρόλο και όχι πλήρως θεραπευτικό, τουλάχιστον σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Όσον αφορά την αξιολόγηση της οξειδωτικής βλάβης στον οργανισμό των ασθενών, αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω της μέτρησης των TBARS, που αντικατοπτρίζουν τη λιπιδική υπεροξείδωση. Στο **Διάγραμμα 4**, παρατηρείται μείωση των TBARS στο Group A κατά την 4η αιμοληψία, η οποία συμπίπτει χρονικά με την ολοκλήρωση της φάσης placebo, υποδηλώνοντας ότι στο γκρουπ Β, όπου τα TBARS αυξήθηκαν, το οξειδωτικό φορτίο συσσωρεύτηκε κατά τη διάρκεια της προηγούμενης φάσης placebo και

ότι η μεταγενέστερη εφαρμογή του CAP δεν ήταν επαρκής για να αναστείλει τη λιπιδική υπεροξειδωση που είχε ήδη ξεκινήσει. (Leon & Borges, 2020).

Εν κατακλείδι, η συσχέτιση αυτών των δεικτών με την εφαρμογή CAP δείχνει ότι η χρονική αλληλουχία θεραπείας και placebo επηρεάζει όχι μόνο την αντιοξειδωτική ικανότητα, αλλά και την πραγματική βλάβη στα βιομόρια, με το CAP να δρα περισσότερο προστατευτικά όταν εφαρμόζεται στην αρχή και λιγότερο όταν εφαρμόζεται εκ των υστέρων.

Η παράλληλη σύγκριση των δύο πειραματικών γκρουπ αναδεικνύει με σαφήνεια τη σημασία της χρονικής αλληλουχίας εφαρμογής του CAP στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Ενώ και οι δύο ομάδες εκτέθηκαν στην ίδια συνολική διάρκεια CAP και placebo (ένα μήνα η καθεμία), η σειρά εφαρμογής είχε καθοριστική επίδραση στους δείκτες που μελετήθηκαν.

Το Group A, που ξεκίνησε με ενεργή θεραπεία, εμφάνισε συγκριτικά υψηλότερες τιμές GSH, CAT και TAC και ταυτόχρονα χαμηλότερα επίπεδα TBARS. Αυτό υποδεικνύει ότι η πρώιμη έκθεση στο CAP πιθανότατα ενεργοποίησε έγκαιρα προσαρμοστικές αντιοξειδωτικές αποκρίσεις, ενεργοποιώντας ενδογενή συστήματα αποτοξίνωσης και διατήρησης της κυτταρικής ομοιόστασης. Αυτή η επίδραση μπορεί να εξηγηθεί μέσω του φαινομένου oxidative hormesis, κατά το οποίο μία ήπια πρόκληση οξειδωτικού στρες οδηγεί σε ενίσχυση της άμυνας του κυττάρου, βελτιώνοντας μακροπρόθεσμα τη λειτουργικότητά του.

Αντιθέτως, στο Group B, η αρχική φάση placebo άφησε τον οργανισμό χωρίς εξωτερική παρέμβαση, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ROS και την πρόκληση μη αναστρέψιμων ή βραδέως αναστρέψιμων οξειδωτικών βλαβών. Η μεταγενέστερη εφαρμογή του CAP, δεν είχε τον χαρακτήρα προσαρμοστικής πρόληψης, αλλά πιθανότατα λειτουργούσε ως ερέθισμα σε έναν ήδη επιβαρυνμένο μεταβολικά οργανισμό. Η αδυναμία ανάκαμψης της TAC και η επίμονη αύξηση των TBARS στο τέλος του πρωτοκόλλου υποδεικνύουν ότι η θεραπευτική δυναμική του CAP εξαρτάται από την προηγούμενη οξειδωτική κατάσταση του οργανισμού, και ίσως είναι περισσότερο αποτελεσματική σε προληπτικό παρά σε επίπεδο αποκατάστασης.

Η διεθνής βιβλιογραφία μέχρι σήμερα έχει επικεντρωθεί κυρίως στη διερεύνηση των βιοχημικών και κυτταρικών επιδράσεων του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος (CAP), με έμφαση στη βελτίωση της αντιοξειδωτικής άμυνας, τη μείωση των δεικτών

οξειδωτικού στρες και, σε ορισμένες περιπτώσεις, στη ρυθμιστική του δράση στη φλεγμονώδη απόκριση. Οι περισσότερες μελέτες (Martirosyan et al., 2021 ; Rezaeinezhad et al. 2019) αφορούν in vitro ή ex vivo πειραματικά μοντέλα, ή in vivo εφαρμογές σε πειραματόζωα, με σκοπό την κατανόηση των μηχανισμών δράσης του CAP σε κυτταρικό ή μοριακό επίπεδο. Αν και τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά και δείχνουν τη θετική επίδραση του CAP στη ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού ισοζυγίου, η κλινική εφαρμογή σε ανθρώπους παραμένει περιορισμένη, ενώ απουσιάζει σχεδόν πλήρως η μελέτη της χρονοεξαρτώμενης ανταπόκρισης ή η σύγκριση με placebo σε οργανωμένα θεραπευτικά πρωτόκολλα.

Ωστόσο, παρά τα κοινά ευρήματα ως προς την κατεύθυνση της δράσης του CAP, η παρούσα μελέτη διαφέρει ουσιαστικά ως προς τη δομή, τη στόχευση και τη μεθοδολογία. Πιο συγκεκριμένα, παρέχει πολύτιμα δεδομένα για την ασφάλεια και τη βιολογική επίδραση του CAP στον ανθρώπινο οργανισμό. Επίσης, ένα πολύ σημαντικό διαφοροποιητικό στοιχείο της μελέτης είναι ο πειραματικός σχεδιασμός με χρήση placebo, καθώς και η εστίαση στη χρονική αλληλουχία εφαρμογής της θεραπείας. Επιπλέον, εισάγει στην κλινική πράξη μια συνδυαστική ανάλυση κρίσιμων δεικτών οξειδωτικής βλάβης και αντιοξειδωτικής ικανότητας. Αυτό προσφέρει ένα σημαντικό βήμα για την κατανόηση των μηχανισμών δράσης του CAP σε κλινικές συνθήκες και θέτει τις βάσεις για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων βασισμένων σε αυτή την τεχνολογία.

Για τη μελλοντική έρευνα, θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον να πραγματοποιηθεί ενδοομαδική σύγκριση των αποτελεσμάτων, δηλαδή να εξεταστούν οι μεταβολές των δεικτών μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών αιμοληψίας μέσα στο ίδιο γκρουπ (π.χ. μεταξύ 1ης και 2ης ή μεταξύ 2ης και 4ης αιμοληψίας). Με αυτόν τον τρόπο θα μπορούσε να αναδειχθεί με μεγαλύτερη σαφήνεια η δυναμική της απόκρισης του οργανισμού κατά τη διάρκεια της θεραπείας, αλλά και η πιθανή καθυστέρηση ή συσσώρευση της επίδρασης του CAP. Επιπλέον, είναι σκόπιμο να εξεταστεί η ποιοτική διάσταση της ανταπόκρισης, όχι μόνο μέσω βιοχημικών δεικτών, αλλά και μέσω υποκειμενικών παραμέτρων, όπως η διάθεση, η ευεξία ή η ανακούφιση από συμπτώματα. Δεδομένου ότι η παρούσα μελέτη προσφέρει μια πρώτη εικόνα για το τι συμβαίνει με βάση το θεραπευτικό πρωτόκολλο, η εμβάθυνση στην εσωτερική χρονική εξέλιξη της κάθε ομάδας θα μπορούσε να αποκαλύψει σημαντικά στοιχεία σχετικά με τη συσχέτιση της φυσιολογικής απόκρισης με τη χρονική στιγμή παρέμβασης, και να ενισχύσει τη χρήση του CAP σε πιο εξατομικευμένα θεραπευτικά σχήματα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3)
- Ahmad, S. (2017). Protein oxidation an overview of metabolism of sulphur containing amino acid cysteine. *Frontiers in Bioscience*, 9(1), 71–87. <https://doi.org/10.2741/s474>
- Ansari, M. Y., Ahmad, N., & Haqqi, T. M. (2020). Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110452. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110452>
- Averill-Bates, D. (2024). Reactive oxygen species and cell signaling. Review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1871(2), 119573. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2023.119573>
- 블로그바이오맥스. (2017). *Oxidative stress(4)-Antioxidant assays (Glutathione assays)*. 네이버 블로그 | 바이오맥스 : From Experience to Science. <https://m.blog.naver.com/biomaxinc/221013234365>
- Boeckmann, L., Schäfer, M., Bernhardt, T., Semmler, M. L., Jung, O., Ojak, G., Fischer, T., Peters, K., Nebe, B., Müller-Hilke, B., Seebauer, C., Bekeschus, S., & Emmert, S. (2020). Cold Atmospheric Pressure Plasma in Wound Healing and Cancer Treatment. *Applied Sciences*, 10(19), 6898. <https://doi.org/10.3390/app10196898>
- Braný, D., Dvorská, D., Halašová, E., & Škovierová, H. (2020). Cold Atmospheric Plasma: A Powerful Tool for Modern Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082932>
- Brun, P., Bernabè, G., Marchiori, C., Scarpa, M., Zuin, M., Cavazzana, R., Zaniol, B., & Martines, E. (2018). Antibacterial efficacy and mechanisms of action of low power atmospheric pressure cold plasma: membrane permeability, biofilm penetration and antimicrobial sensitization. *Journal of Applied Microbiology*, 125(2), 398–408. <https://doi.org/10.1111/jam.13780>
- Buico, A., Cassino, C., Ravera, M., Betta, P.-G., & Osella, D. (2009). Oxidative stress and total antioxidant capacity in human plasma. *Redox Report*, 14(3), 125–131. <https://doi.org/10.1179/135100009x392557>
- Chandimali, N., Bak, S. G., Park, E. H., Lim, H.-J., Won, Y.-S., Kim, E.-K., Park, S.-I., & Lee, S. J. (2025). Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: a review. *Cell Death Discovery*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41420-024-02278-8>

- Ciechanover, A., & Schwartz, A. L. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: The complexity and myriad functions of proteins death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 2727–2730. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2727>
- 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, 1–44. <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, 1–32. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>
- Dupré-Crochet, S., Erard, M., & Nüße, O. (2013). ROS production in phagocytes: why, when, and where? *Journal of Leukocyte Biology*, 94(4), 657–670. <https://doi.org/10.1189/jlb.1012544>
- Dutta, S., Sengupta, P., Das, S., Slama, P., & Roychoudhury, S. (2022). Reactive Nitrogen Species and Male Reproduction: Physiological and Pathological Aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10574. <https://doi.org/10.3390/ijms231810574>
- Forman, H. J., & Zhang, H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(9), 689–709. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>
- Gareri, C., Bennardo, L., & De Masi, G. (2020). Use of a new cold plasma tool for psoriasis treatment: A case report. *SAGE Open Medical Case Reports*, 8. <https://doi.org/10.1177/2050313x20922709>
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Ibrahim Ahmed Hamza, El-Kalliny, A. S., Sherif Abd-Elmaksoud, Marouf, M. A., Abdel-Wahed, M. S., Mohamed Azab El-Liethy, & Mohamed Mokhtar Hefny. (2023). Cold atmospheric plasma: a sustainable approach to inactivating viruses, bacteria, and protozoa with remediation of organic pollutants in river water and wastewater. *Environmental Science and Pollution Research International*, 30(54), 116214–116226. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-30298-x>
- Janaszewska, A., & Bartosz, G. (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 62(3), 231–236. <https://doi.org/10.1080/003655102317475498>
- Kazemi, A., Nicol, M. J., Bilén, S. G., Kirimanjeswara, G. S., & Knecht, S. D. (2024). Cold Atmospheric Plasma Medicine: Applications, Challenges, and Opportunities for Predictive Control. *Plasma*, 7(1), 233–257. <https://doi.org/10.3390/plasma7010014>

- Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akçay, F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 28(2), 141–143. <https://doi.org/10.1017/s0317167100052823>
- Khalaf, A. T., Abdalla, A. N., Ren, K., & Liu, X. (2024). Cold atmospheric plasma (CAP): a revolutionary approach in dermatology and skincare. *European Journal of Medical Research*, 29(1). <https://doi.org/10.1186/s40001-024-02088-9>
- Khammash, D., Rajagopal, S. K., & Polk, T. A. (2023). The neurobiology of aging. *Elsevier EBooks*, 977–993. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85654-6.00057-5>
- Kilonzo-Nthenge, A., Liu, S., Yannam, S., & Patras, A. (2018). Atmospheric Cold Plasma Inactivation of Salmonella and Escherichia coli on the Surface of Golden Delicious Apples. *Frontiers in Nutrition*, 5, 120. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00120>
- Kim, Y. J., Lim, D. J., Lee, M. Y., Lee, W. J., & Won, C. H. (2021). Prospective, comparative clinical pilot study of cold atmospheric plasma device in the treatment of atopic dermatitis. *Scientific Reports*, 11(1), 14461. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93941-y>
- Klaudia Jomova, Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. (2024). Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Archives of Toxicology*, 98(5), 1323–1367. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03696-4>
- Kwon, D., Cha, H.-J., Lee, H., Hong, S.-H., Park, C., Park, S.-H., Kim, G.-Y., Kim, S., Kim, H.-S., Hwang, H.-J., & Choi, Y. (2019). Protective Effect of Glutathione against Oxidative Stress-induced Cytotoxicity in RAW 264.7 Macrophages through Activating the Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor-2/Heme Oxygenase-1 Pathway. *Antioxidants*, 8(4), 82. <https://doi.org/10.3390/antiox8040082>
- Leon, J. A. D. D., & Borges, C. R. (2020). Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *Journal of Visualized Experiments*, 159. <https://doi.org/10.3791/61122>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, Antioxidants and Functional foods: Impact on Human Health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Martirosyan, D., Hossein Mirmiranpour, Hamid Ghomi, Ashoori, M. R., & Alireza Rezaeinezhad. (2021). The effect of cold plasma on antioxidant enzymes, minerals, and some of the levels of the biochemical parameters in the subjects

- with type 2 diabetes mellitus samples. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 4(2), 14. <https://doi.org/10.31989/bchd.v4i2.783>
- Mateu-Sanz, M., Tornín, J., Ginebra, M.-P., & Canal, C. (2021). Cold Atmospheric Plasma: A New Strategy Based Primarily on Oxidative Stress for Osteosarcoma Therapy. *Journal of Clinical Medicine*, 10(4), 893. <https://doi.org/10.3390/jcm10040893>
- Mehla, N., Kothari Chhajer, A., Kumar, K., Dahiya, S., & Mohindroo, V. (2021). Applications of Antioxidants: A Review. *Plant Antioxidants and Health*, 1–29. https://doi.org/10.1007/978-3-030-45299-5_28-1
- Min, T., Xie, X., Ren, K., Sun, T., Wang, H., Dang, C., & Zhang, H. (2022). Therapeutic Effects of Cold Atmospheric Plasma on Solid Tumor. *Frontiers in Medicine*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.884887>
- Mitsuishi, Y., Motohashi, H., & Yamamoto, M. (2012). The Keap1–Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. *Frontiers in Oncology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00200>
- Muhammad Javed Iqbal, Kabeer, A., Abbas, Z., Hamid Anees Siddiqui, Calina, D., Javad Sharifi-Rad, & Cho, W. C. (2024). Interplay of oxidative stress, cellular communication and signaling pathways in cancer. *Cell Communication and Signaling*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01398-5>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Mylonas, C., & Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo (Athens, Greece)*, 13(3), 295–309. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10459507/>
- Nitti, M., Marengo, B., Furfaro, A. L., Pronzato, M. A., Marinari, U. M., Domenicotti, C., & Traverso, N. (2022). Hormesis and Oxidative Distress: Pathophysiology of Reactive Oxygen Species and the Open Question of Antioxidant Modulation and Supplementation. *Antioxidants*, 11(8), 1613. <https://doi.org/10.3390/antiox11081613>
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N. T., Georgiou, C. D., Angelatou, F., & Matsokis, N. A. (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience Letters*, 357(2), 83–86. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.10.080>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2014). 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>

- Piacenza, L., Trujillo, M., & Radi, R. (2019). Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. *Journal of Experimental Medicine*, 216(3), 501–516. <https://doi.org/10.1084/jem.20181886>
- Ray, P. D., Huang, B.-W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- Reddy, Y. N., Murthy, S. V., Krishna, D. R., & Prabhakar, M. C. (2004). Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian Journal of Tuberculosis*, 51(4), 213–218. https://www.researchgate.net/publication/285022100_Role_of_free_radicals_and_antioxidants_in_tuberculosis_patients
- Rezaeinezhad, A., Eslami, P., Mirmiranpour, H., & Ghomi, H. (2019). The effect of cold atmospheric plasma on diabetes-induced enzyme glycation, oxidative stress, and inflammation; in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56459-y>
- S. Harikrishna, Pawase Prashant Anil, Shams, R., & Kshirod Kumar Dash. (2023). Cold plasma as an emerging nonthermal technology for food processing: A comprehensive review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 100747–100747. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100747>
- Schrader, M., & Fahimi, H. D. (2004). Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(4), 383–393. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0673-1>
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Singh, P., & Kumar, S. (2019). *Catalase - an Overview* | ScienceDirect Topics. [Www.sciencedirect.com. https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/catalase](https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/catalase)
- van Meeteren, M. E., Teunissen, C. E., Dijkstra, C. D., & van Tol, E. A. F. (2005). Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59(12), 1347–1361. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602255>
- Velasquez, J. A., Bao, Y., & Huang, J.-Y. (2024). Atmospheric cold plasma as a novel approach to remediating microplastics pollution in water. *Environmental Pollution*, 356, 124390. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.124390>
- Veskoukis, A. S., Efthalia Kerasioti, Alexandros Priftis, Paraskevi Kouka, Ypatios Spanidis, Sotiria Makri, & Demetrios Kouretas. (2019). *A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue*. 13, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.10.001>

- Wang, Y., Chen, Y., Zhang, X., Lu, Y., & Chen, H. (2020). New insights in intestinal oxidative stress damage and the health intervention effects of nutrients: A review. *Journal of Functional Foods*, 75, 104248. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104248>
- Wojtunik-Kulesza, K. A., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., & Waksmundzka-Hajnos, M. (2016). The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 78, 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.12.024>
- 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), 327. <https://doi.org/10.3390/ijms17030327>
- Zhai, S., Xu, M., Li, Q., Guo, K., Chen, H., Kong, M. G., & Xia, Y. (2021). Successful Treatment of Vitiligo with Cold Atmospheric Plasma-Activated Hydrogel. *Journal of Investigative Dermatology*, 141(11), 2710-2719.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.04.019>