



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Εξέταση του υδροϋπεροξειδίου του βουτυλίου (tBHP) ως  
οξειδωτικού παράγοντα για την πρόκληση οξειδωτικού  
στρες σε ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα»**

**“The examination of tert-butyl-hydroperoxide (tBHP) as an  
oxidative agent that induces oxidative stress in human  
mesenchymal stem cells”**

Ζησοπούλου Παντελία του Γεωργίου

Επιβλέπων: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΣΤΑΓΚΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής  
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Λάρισα, 2025**

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Στάγκος Δημήτριος (Επιβλέπων):** Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Τραχανά Βαρβάρα:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας-Κυτταρικής Βιολογίας, του τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Μόσιαλος Δημήτριος:** Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία επικεντρώνεται στη μελέτη του tert-butyl hydroperoxide (tBHP) ως οξειδωτικού παράγοντα για την πρόκληση οξειδωτικού στρες σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs). Η επιλογή του συγκεκριμένου μοντέλου βασίστηκε στη διπλή σημασία του: αφενός το tBHP αποτελεί έναν καθιερωμένο επαγωγέα παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), ενώ αφετέρου, τα WJ-MSCs αποτελούν πολυδύναμα κύτταρα με σημαντικό ερευνητικό και θεραπευτικό ενδιαφέρον, λόγω της ικανότητάς τους να διαφοροποιούνται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και να συμβάλλουν σε αναγεννητικές θεραπείες.

Το θεωρητικό υπόβαθρο της μελέτης θεμελιώνεται στη σημασία των ελεύθερων ριζών και των ROS, που αν και αποτελούν φυσιολογικά παραπροϊόντα του μεταβολισμού, όταν συσσωρεύονται σε υπερβολικά επίπεδα, προκαλούν οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες αποτελεί μία κατάσταση ανισορροπίας μεταξύ της παραγωγής οξειδωτικών μορίων και της ικανότητας των κυττάρων να τα εξουδετερώσουν μέσω αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Η ανισορροπία αυτή έχει συνδεθεί με πλήθος παθολογικών καταστάσεων, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (νόσος Parkinson), διάφορες μορφές καρκίνου, μεταβολικές διαταραχές, αλλά και με τη φυσιολογική διαδικασία της γήρανσης. Κατά συνέπεια, η ανάπτυξη και η μελέτη αξιόπιστων μοντέλων οξειδωτικού στρες σε κυτταρικό επίπεδο έχει ιδιαίτερη σημασία για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στις παραπάνω παθολογίες.

Στο πλαίσιο της παρούσας έρευνας, αρχικά, η μέθοδος ΧΤΤ χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της κυτταρικής βιωσιμότητας και της επίδρασης του tBHP στην ανάπτυξη των κυττάρων. Η παραγωγή πρωτεϊνικών καρβονυλίων και ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) μετρήθηκε ως δείκτης πρωτεϊνικής και λιπιδικής υπεροξειδωσης αντίστοιχα. Επιπλέον, η συγκέντρωση της γλουταθειόνης (GSH), που αποτελεί το κύριο ενδογενές αντιοξειδωτικό, καθώς και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αξιολογήθηκαν προκειμένου να εκτιμηθεί η ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών άμυνας των κυττάρων.

Για την εξέταση του tBHP ως οξειδωτικού παράγοντα χρησιμοποιήθηκε μία μη κυτταροτοξική (100μM) και δύο κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (200μM και 300μM). Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS), αποδεικνύοντας την εκτεταμένη οξειδωτική βλάβη σε βασικά βιομόρια. Την ίδια στιγμή, τα επίπεδα της γλουταθειόνης και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας μειώθηκαν κυρίως στη συγκέντρωση των 100μM, δείχνοντας την εξασθένιση των ενδογενών μηχανισμών άμυνας των κυττάρων στην προσπάθεια αποκατάστασης της οξειδωτικής ισορροπίας.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν για πρώτη φορά ότι το tBHP, και ιδιαίτερα η συγκέντρωση των 100μM, μπορεί να αποτελέσει ένα

αξιόπιστο εργαλείο για την πρόκληση ελεγχόμενου οξειδωτικού στρες σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα WJ-MSCs. Η ιδιότητα αυτή καθιστά το συγκεκριμένο πειραματικό μοντέλο ιδιαίτερα χρήσιμο τόσο για τη βασική έρευνα, προκειμένου να διευκρινιστούν οι μοριακοί μηχανισμοί της οξειδωτικής βλάβης, όσο και για εφαρμογές σε προκλινικές μελέτες, με στόχο την αξιολόγηση νέων αντιοξειδωτικών ουσιών ή θεραπευτικών στρατηγικών στα WJ-MSCs κύτταρα.

Λέξεις-κλειδιά: Ελεύθερες ρίζες, Οξειδωτικό στρες, Οξειδωτικοί παράγοντες, tert-butyl hydroperoxide (tBHP), μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs)

## ABSTRACT

The present undergraduate thesis focuses on the investigation of tert-butyl hydroperoxide (tBHP) as an oxidative agent for the induction of oxidative stress in mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly (WJ-MSCs). The choice of this model was based on a dual rationale: on the one hand, tBHP is a well-established inducer of reactive oxygen species (ROS) production, and on the other hand, WJ-MSCs are multipotent cells with considerable research and therapeutic interest, due to their ability to differentiate into multiple lineages and their potential use in regenerative medicine.

The theoretical background of this study is based on the role of free radicals and ROS, which, although they represent natural by-products of cellular metabolism, can cause oxidative stress when produced in excess. Oxidative stress is defined as an imbalance between the generation of ROS and the antioxidant defense mechanisms of the cell. This imbalance has been associated with a wide spectrum of pathological conditions, including cardiovascular diseases, neurodegenerative disorders (such as Parkinson's disease), cancer, metabolic syndromes and the natural aging process. Therefore, the development of reliable cellular models of oxidative stress is crucial for unraveling the

Initially, cell viability and proliferation under oxidative challenge were assessed using the XTT assay. Oxidative damage to proteins and lipids was evaluated by quantifying protein carbonyls and thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), respectively. Furthermore, intracellular glutathione (GSH) levels and the total antioxidant capacity (TAC) of the cells were measured to assess the activation of endogenous antioxidant defenses in response to tBHP exposure.

Based on the results from XTT assay, one non-cytotoxic concentration (100 $\mu$ M) and two cytotoxic concentrations (200 $\mu$ M and 300 $\mu$ M) of tBHP were used. The results showed tBHP induced a significant increase in protein carbonyls and lipid peroxidation products (TBARS), indicating extensive oxidative damage to fundamental biomolecules. Moreover, tBHP treatment, especially at 100 $\mu$ M, reduced GSH concentration and TAC, indicating the attenuation of the cellular antioxidant mechanisms, due to the cell response to counteract the oxidative insult and restore redox balance.

In conclusion, the present results suggest that tBHP, especially the 100 $\mu$ M concentration, constitutes a reliable and reproducible tool for inducing controlled oxidative stress in WJ-MSCs mesenchymal stem cells. This finding renders the suggested model particularly valuable both for basic research, aimed at elucidating the molecular basis of oxidative damage, and for preclinical applications, such as testing novel antioxidants or therapeutic interventions targeting redox homeostasis in WJ-MSCs cells.

Key Words: Free radicals, Oxidative stress, Oxidative factors, tert-butyl hydroperoxide tBHP, mesenchymal stem cells from Wharton's jelly (WJ-MSCs)

## Περιεχόμενα

|                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>                                                       | <b>3</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>                                                       | <b>5</b>  |
| <b>1. Εισαγωγή</b>                                                    | <b>9</b>  |
| 1.1 Ελεύθερες ρίζες                                                   | 9         |
| 1.1.1 Γενικά                                                          | 9         |
| 1.1.2 Πηγές ελεύθερων ριζών                                           | 11        |
| 1.1.3 Συνέπειες παραγωγής ελεύθερων ριζών                             | 16        |
| 1.1.4 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια                       | 16        |
| 1.2 Αντιοξειδωτική άμυνα                                              | 20        |
| 1.2.1. Αντιοξειδωτική ουσία                                           | 20        |
| 1.2.2. Μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών                              | 21        |
| 1.2.3. Κατηγορίες αντιοξειδωτικών ουσιών                              | 22        |
| 1.3 Οξειδωτικοί παράγοντες                                            | 25        |
| 1.4 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα Wharton's Jelly                       | 25        |
| <b>2. Σκοπός</b>                                                      | <b>27</b> |
| <b>3. Υλικά και Μέθοδοι</b>                                           | <b>28</b> |
| 3.1 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford | 29        |
| 3.1.1 Αρχή μεθόδου                                                    | 29        |
| 3.1.2. Πειραματική διαδικασία                                         | 30        |
| 3.1.3. Υπολογισμοί                                                    | 30        |
| 3.2 Μέθοδος ΧΤΤ                                                       | 30        |
| 3.2.1 Αρχή μεθόδου                                                    | 30        |
| 3.2.2 Πειραματική διαδικασία                                          | 30        |
| 3.2.3 Υπολογισμοί                                                     | 31        |
| 3.3 Πρωτεϊνικά καρβονύλια                                             | 32        |
| 3.3.1 Αρχή μεθόδου                                                    | 32        |
| 3.3.2 Πειραματική διαδικασία                                          | 32        |
| 3.3.3 Υπολογισμοί                                                     | 34        |
| 3.4 Ουσίες που αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)           | 34        |
| 3.4.1. Αρχή μεθόδου                                                   | 34        |
| 3.4.2 Πειραματική διαδικασία                                          | 35        |
| 3.4.3. Υπολογισμοί                                                    | 36        |
| 3.5 Γλουταθειόνη                                                      | 37        |
| 3.5.1. Αρχή μεθόδου                                                   | 37        |
| 3.5.2. Πειραματική διαδικασία                                         | 37        |

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5.3. Υπολογισμοί .....                                                | 38 |
| 3.6 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC).....                           | 39 |
| 3.6.1. Αρχή μεθόδου .....                                               | 39 |
| 3.6.2. Πειραματική διαδικασία .....                                     | 40 |
| 3.6.3 Υπολογισμοί .....                                                 | 41 |
| 3.7 Στατιστική Ανάλυση.....                                             | 42 |
| 4. Αποτελέσματα-Συζήτηση.....                                           | 43 |
| 4.1 Προσδιορισμός κυτταρικής αύξησης-Μέθοδος ΧΤΤ .....                  | 43 |
| 4.2 Πρωτεϊνικά καρβονύλια-Προσδιορισμός πρωτεϊνικής υπεροξειδωσης ..... | 43 |
| 4.3 Προσδιορισμός επιπέδων θειοβαρβιτορικού οξέος-TBARS .....           | 44 |
| 4.4 Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης-GSH .....                      | 45 |
| 5. Συζήτηση.....                                                        | 47 |
| 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....                                                   | 52 |

### Πίνακας περιεχομένων εικόνων

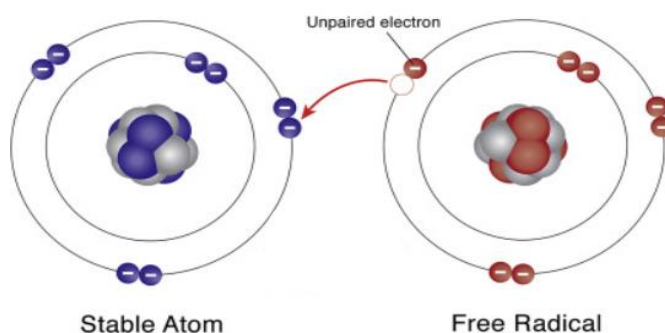
|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| Εικόνα 1: Αντίδραση ατόμου με ελεύθερη ρίζα .....                              | 9  |
| Εικόνα 2: Δημιουργία ROS από την Αναπνευστική αλυσίδα.....                     | 12 |
| Εικόνα 3: Ένζυμα που συμμετέχουν στη παραγωγή ή διάσπαση των ROS.....          | 13 |
| Εικόνα 4: Μηχανισμοί συμβολής CYPs σε ασθένειες που προκαλούνται από ROS ..... | 14 |
| Εικόνα 5: Πηγή ROS στα μακροφάγα .....                                         | 15 |
| Εικόνα 6: Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών .....                      | 16 |
| Εικόνα 7: Διαδικασία υπεροξειδωσης των λιπιδίων.....                           | 19 |
| Εικόνα 8: Μηχανισμός δράσης Υπεροξειδικής Δισμουτάσης.....                     | 22 |
| Εικόνα 9: Συντονισμένη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων .....                 | 23 |
| Εικόνα 10: Δομή του tBHP .....                                                 | 25 |
| Εικόνα 11: Ικανότητα διαφοροποίησης μεσεγχυματικών κυττάρων.....               | 27 |
| Εικόνα 12: Μετατροπή του αντιδραστηρίου ΧΤΤ σε φορμαζάνη.....                  | 30 |
| Εικόνα 13: Αντίδραση DNPΗ με τα πρωτεϊνικά καρβονύλια.....                     | 32 |
| Εικόνα 14: Αντίδραση Μαλονδιαλδεΰδης με 2 μόρια Θειοβαρβιτορικού οξέος.....    | 35 |

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Ελεύθερες ρίζες

### 1.1.1 Γενικά

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια ή άτομα, τα οποία διαθέτουν ένα ασύζευκτο (μονήρες) ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα, γεγονός που τις καθιστά πολύ ασταθείς και χημικά δραστικές. Όταν η ελεύθερη ρίζα αντιδρά με ένα άλλο μόριο, μπορεί να δεχτεί ένα από τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στιβάδας του μορίου αυτού, το οποίο (ηλεκτρόνιο) θα δημιουργήσει ζεύγος με το μονήρες ηλεκτρόνιο της ελεύθερης ρίζας και έτσι αυτή θα σταθεροποιηθεί. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το μόριο να χάνει ένα ηλεκτρόνιο και να μετατρέπεται σε ελεύθερη ρίζα. Ξεκινάει, έτσι, ένας καταρράκτης αντιδράσεων, οι οποίες τελικά καταστρέφουν το κύτταρο.



Εικόνα 1: Αντίδραση ατόμου με ελεύθερη ρίζα

Η κατηγοριοποίηση των ελεύθερων ριζών εξαρτάται από την χημική τους σύσταση, αλλά και τα άτομα που συμμετέχουν. Οι δύο κύριες κατηγορίες είναι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) και οι ελεύθερες ρίζες αζώτου (RNS), υπάρχουν όμως και δραστικές μορφές με κέντρο τον άνθρακα, καθώς και το υδρογόνο, που αποτελεί την απλούστερη ελεύθερη ρίζα (Mason et al., 1994). Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου μπορούν να διαχωριστούν σε ριζικά είδη (radical species) και μη ριζικά είδη (non radical species). Τα ριζικά είδη είναι οι μορφές που διαθέτουν τουλάχιστον ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα και υπάρχουν ως ελεύθερα μόρια, όπως για παράδειγμα η ρίζα υπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet}$ ), η ρίζα οξυγόνου ( $O_2^{\bullet\bullet}$ ), η ρίζα υδροξυλίου ( $OH^{\bullet}$ ), η ρίζα αλκοξειδίου ( $RO^{\bullet}$ ), η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου ( $NO^{\bullet}$ ) και η ρίζα διοξειδίου του αζώτου ( $NO_2^{\bullet}$ ). Τα μη ριζικά είδη, παρόλο που δεν είναι ελεύθερες ρίζες, μπορούν να οδηγήσουν εύκολα σε αντιδράσεις ελεύθερων ριζών σε ζώντες οργανισμούς. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ), το υποβρωμιώδες οξύ ( $HOBr$ ), το όζον ( $O_3$ ), το μονήρες οξυγόνο ( $^1O_2$ ), το νιτρώδες οξύ ( $HNO_2$ ), το νιτροσυλκατιόν ( $NO^+$ ), το νιτροσυλανιόν ( $NO^-$ ), το τριοξείδιο του δινιτρογόνου ( $N_2O_3$ ), το τετραοξείδιο του δινιτρογόνου ( $N_2O_4$ ), το νιτριλοκατιόν ( $NO_2^+$ ), τα οργανικά υπεροξείδια ( $ROOH$ ), οι αλδεΐδες ( $HCO^{\bullet}$ ) και ο υπερονιτρίτης ( $ONOOH$ ) (Phaniendra et al., 2015).

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται αφενός από ενδογενείς πηγές, κυρίως στα υποκυτταρικά οργανίδια (μιτοχόνδρια, υπεροξειδιοσώματα, ενδοπλασματικό δίκτυο) ως υποπροϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού, και αφετέρου από εξωγενείς πηγές και πιο συγκεκριμένα περιβαλλοντικούς παράγοντες, παθολογικές καταστάσεις και χημικές ουσίες, παραδείγματος χάριν τα ναρκωτικά (Phaniendra et al., 2015). Υπάρχουν δύο κύριοι τρόποι με τους οποίους δημιουργούνται οι ελεύθερες ρίζες, είτε από μόρια με ζεύγη ηλεκτρονίων (μέσω ομοιολυτικής διάσπασης, ή μεταφοράς ηλεκτρονίων, αλλιώς οξειδοαναγωγή), ή από άλλες ρίζες (μέσω αντιδράσεων υποκατάστασης, προσθήκης και απομάκρυνσης). Στις αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων οι ελεύθερες ρίζες παράγονται μέσω αντιδράσεων οξειδοαναγωγής όπου τα μόρια χάνουν ή αποκτούν ηλεκτρόνια, δημιουργώντας ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Κατά την ομοιόλυση διασπάται ομοιόμορφα ο ομοιοπολικός δεσμός και κάθε θραύσμα διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο από τον δεσμό. Αυτή η διαδικασία μπορεί να προκληθεί από θερμότητα, φως (φωτόνια), ή άλλες εισροές υψηλής ενέργειας, όπως ιονίζουσα ακτινοβολία, ή ηλεκτρικές εκκενώσεις (Clayden et al., 2012). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκύψουν και από άλλες ελεύθερες ρίζες, όπως προαναφέρθηκε, και πιο συγκεκριμένα, μέσω αντιδράσεων υποκατάστασης, όπου μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να αφαιρέσει ένα άτομο, συχνά υδρογόνο, από ένα άλλο μόριο, δημιουργώντας μια νέα ελεύθερη ρίζα (Snyder et al., 2016), μέσω αντιδράσεων προσθήκης, όπου μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να προστεθεί σε ένα μόριο με ζεύγος spin, όπως ένα αλκένιο, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μιας νέας ρίζας (Gridnev et al., 2001), ή μέσω αντιδράσεων απομάκρυνσης, όπου μια ρίζα διασπάται αποβάλλοντας μία ομάδα και παράγοντας μια νέα ρίζα και ένα ουδέτερο μόριο, όπως για παράδειγμα, μια βενζοϋλοξυ ρίζα μπορεί να αποβάλει το διοξείδιο του άνθρακα για να σχηματίσει μια φαινυλική ρίζα (Su et al., 2013).

Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών είναι διπλός και εξαρτάται άμεσα από την συγκέντρωσή τους. Πιο συγκεκριμένα, σε φυσιολογικά επίπεδα συμμετέχουν σε αρκετές διεργασίες, όπως η κυτταρική σηματοδότηση, η ανοσολογική απόκριση, η οξειδοαναγωγική ρύθμιση, αλλά και στις αντιδράσεις που προκαλούν κυτταρική διαίρεση (Chaudhary et al., 2023). Στη κυτταρική σηματοδότηση, οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν ως δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως είναι για παράδειγμα το μονοξείδιο του αζώτου, το οποίο ρυθμίζει την αγγειοδιαστολή και κατά συνέπεια την αρτηριακή πίεση και τον αγγειακό τόνο (Pacher et al., 2007). Κατά την αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών, παρατηρείται παροδική αύξηση της παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως είναι τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα (Ponath et al., 2017).

Ωστόσο, η υπερβολική παραγωγή ελεύθερων ριζών υπερνικά τα αντιοξειδωτικά συστήματα, προάγοντας με αυτόν τον τρόπο το οξειδωτικό στρες, το οποίο οδηγεί σε βλάβη βιομορίων, όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα, αλλά και σε διατάραξη των κυτταρικών λειτουργιών. Η ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής ελεύθερων ριζών και της αντιοξειδωτικής άμυνας έχει μακροπρόθεσμα ως αποτέλεσμα την εμφάνιση πολλών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των

καρδιαγγειακών διαταραχών, των νευροεκφυλιστικών παθήσεων (Yang et al., 2020), των μεταβολικών ηπατικών παθήσεων και της ανδρικής υπογονιμότητας (Ribas-Maynou et al., 2020).

### 1.1.2 Πηγές ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες, όπως προαναφέρθηκε, προέρχονται τόσο από ενδογενείς πηγές, και πιο συγκεκριμένα, τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξειδισώματα, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τα φαγοκύτταρα, όσο και από εξωγενείς πηγές, δηλαδή συνήθειες όπως το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ και η λήψη ορισμένων φαρμάκων (π.χ. παρακεταμόλη), ή ρύπους του περιβάλλοντος, βαρέα μέταλλα, εντομοκτόνα.

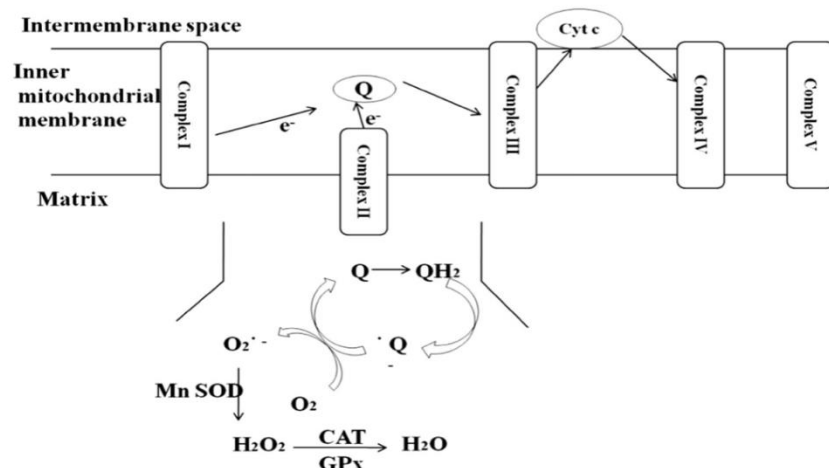
#### A. Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών

##### 1. Μιτοχόνδρια

Οι αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας, που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια, αποτελείται από 4 μεγάλα συμπλέγματα πρωτεϊνών, τα οποία είναι «βυθισμένα» μέσα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και πραγματοποιείται σε αυτά η ροή των ηλεκτρονίων. Πιο συγκεκριμένα, τα 4 σύμπλοκα αυτά χωρίζονται σε 3 αντλίες πρωτονίων (Σύμπλοκα I, III και IV) και 1 φυσική σύνδεση με τον κύκλο του κιτρικού οξέος (Σύμπλοκο II). Τα τέσσερα σύμπλοκα έχουν τις εξής ονομασίες:

- Σύμπλοκο I: Οξειδοαναγωγή του NADH-Q, εισάγει στην αλυσίδα τα ηλεκτρόνια του NADH.
- Σύμπλοκο II: Αναγωγή του ηλεκτρικού-Q, περιέχει την ηλεκτρική αφυδρογονάση που παράγει FADH<sub>2</sub> στον κύκλο του κιτρικού οξέος. Στην συνέχεια, τα ηλεκτρόνια αυτά εισέρχονται στο σύμπλοκο III.
- Σύμπλοκο III: Οξειδοαναγωγή συνενζύμου Q-Cyt C, μεταφέρει ηλεκτρόνια από το QH<sub>2</sub> στο κυτόχρωμα C.
- Σύμπλοκο IV: Οξειδάση του κυτοχρώματος C, καταλύει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το ανηγμένο κυτόχρωμα C στο O<sub>2</sub>, που ανάγεται σε H<sub>2</sub>O.

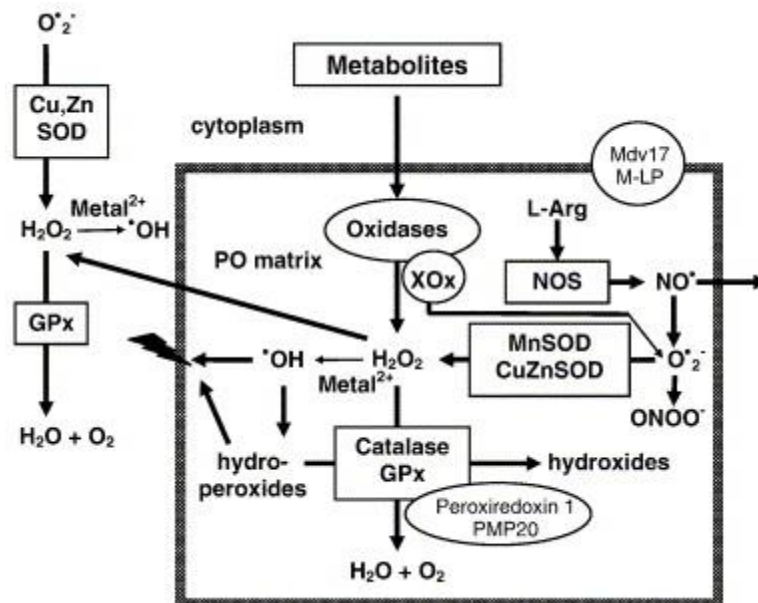
Το μοριακό οξυγόνο είναι ένας ιδανικός αποδέκτης ηλεκτρονίων. Η μερική αναγωγή του παράγει επικίνδυνες ενώσεις (π.χ. σουπεροξείδιο), δηλαδή δραστικές μορφές οξυγόνου. Προκειμένου η αναγωγή του οξυγόνου να είναι ασφαλής, η οξειδάση του κυτοχρώματος c δεσμεύει στερεά το O<sub>2</sub> ανάμεσα σε ιόντα Fe και Cu.



Εικόνα 2: Δημιουργία ROS από την Αναπνευστική αλυσίδα

## 2. Υπεροξειδιοσώματα

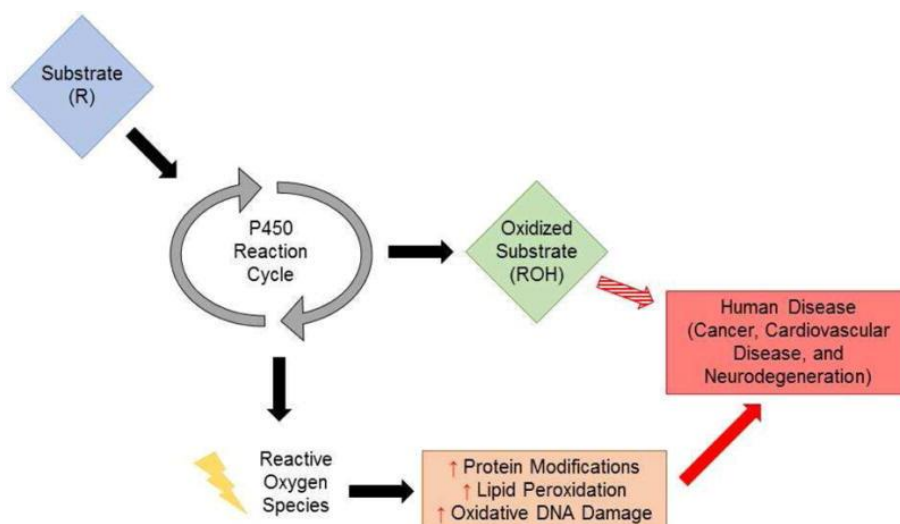
Τα υπεροξειδιοσώματα διαδραματίζουν κύριο ρόλο στη δημιουργία και τη δέσμευση των δραστικών ριζών οξυγόνου και κυρίως του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Κατά το αναπνευστικό μονοπάτι στα υπεροξειδιοσώματα, αφαιρούνται ηλεκτρόνια από διάφορους μεταβολίτες, με συνέπεια το O<sub>2</sub> να ανάγεται σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και στη συνέχεια σε H<sub>2</sub>O. Η αναπνευστική αλυσίδα στα οργανίδια αυτά δεν είναι συνδεδεμένη με την οξειδωτική φωσφορυλίωση, ούτε οδηγεί στην δημιουργία ATP. Η παραγωγή ROS γίνεται κυρίως μέσω ενζυμικών αντιδράσεων, οι οποίες καταλύονται από συγκεκριμένα ένζυμα, τις οξειδάσες. Τα ένζυμα αυτά μεταφέρουν ηλεκτρόνια από διάφορα μεταβολικά υποστρώματα απευθείας στο μοριακό οξυγόνο (O<sub>2</sub>). Αυτή είναι η διαδικασία που οδηγεί στη μερική αναγωγή του οξυγόνου και στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), που αποτελεί το βασικό ROS στα υπεροξειδιοσώματα. Κύρια πηγή παραγωγής H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> είναι η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων, όπου τα ένζυμα ακυλ-CoA οξειδάσες καταλύουν την πρώτη αντίδραση, παράγοντας H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ως παραπροϊόν. Επιπλέον, άλλα ένζυμα όπως η οξειδάση του ουρικού οξέος, η οξειδάση της ξανθίνης, η οξειδάση D-αμινοξέων και η οξειδάση L-α-υδροξυ-οξέων συμβάλλουν επίσης στην παραγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ενώ η οξειδάση ξανθίνης μπορεί να παράγει και ρίζες υπεροξειδίου (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>). Υπό ορισμένες συνθήκες, η παρουσία μεταλλικών ιόντων (όπως Fe<sup>2+</sup> ή Cu<sup>+</sup>) μπορεί να οδηγήσει στη μετατροπή του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε ρίζες υδροξυλίου (•OH) μέσω της αντίδρασης Fenton, οι οποίες είναι ιδιαίτερα τοξικές για τα κυτταρικά συστατικά. Τα υπεροξειδιοσώματα διαθέτουν επίσης ένζυμα όπως η καταλάση και άλλες αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες, που εξουδετερώνουν τα παραγόμενα ROS και προστατεύουν το κύτταρο από οξειδωτική βλάβη (Schrader et al., 2006).



Εικόνα 3: Ένζυμα που συμμετέχουν στη παραγωγή ή διάσπαση των ROS

### 3. Ενδοπλασματικό δίκτυο

Στο ενδοπλασματικό δίκτυο υπάρχουν τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYP), τα οποία αποτελούν μία μεγάλη οικογένεια αιμικών μονοοξυγενασών και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στον μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών, φαρμάκων, τοξινών, αλλά και ενδογενών μορίων όπως στερόλες, λιπαρά οξέα και βιταμίνες. Η βασική λειτουργία των ενζύμων είναι η οξείδωση αυτών των μορίων μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων και της ενεργοποίησης του μοριακού οξυγόνου. Τα CYP ένζυμα, κατά τη διάρκεια του καταλυτικού τους κύκλου, μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το NADPH στον αιμικό τους πυρήνα, μέσω αναγωγικών πρωτεϊνών, γεγονός που έχει ως συνέπεια την ενεργοποίηση του οξυγόνου και την ένωσή του με το υπόστρωμα. Παρ' ολ' αυτά, αν το ενεργοποιημένο οξυγόνο δεν ενωθεί με το υπόστρωμα σωστά, παράγονται ελεύθερες ρίζες όπως η ρίζα υπεροξειδίου και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε ρίζα υδροξυλίου, παρουσία μεταλλικών ιόντων, μέσω της αντίδρασης Fenton. Η παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου από τα CYP εξαρτάται από το ισοένζυμο, το υπόστρωμα και τις συνθήκες του κυττάρου. Το ισοένζυμο CYP2E1, για παράδειγμα, που φυσιολογικά μεταβολίζει την αιθανόλη, μπορεί να παράγει σημαντικές ποσότητες ROS, συμβάλλοντας στην ηπατική βλάβη που σχετίζεται με την υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις, τα ROS συμμετέχουν σε κυτταρικές λειτουργίες όπως η σηματοδότηση, η ρύθμιση της φλεγμονής, η απόπτωση και η αποτοξικοποίηση ξενοβιοτικών ουσιών. Ωστόσο, η αυξημένη δραστηριότητα ή η επαγωγή των CYP μπορεί να οδηγήσει σε υπερπαραγωγή των ROS. Το γεγονός αυτό, έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες, εξαιτίας του οποίου προκαλούνται βλάβες στα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA και μακροπρόθεσμα παθολογικές καταστάσεις, όπως η ηπατική ίνωση, η πνευμονική βλάβη, η ανάπτυξη καρκίνου και η γήρανση (Veith et al., 2018).



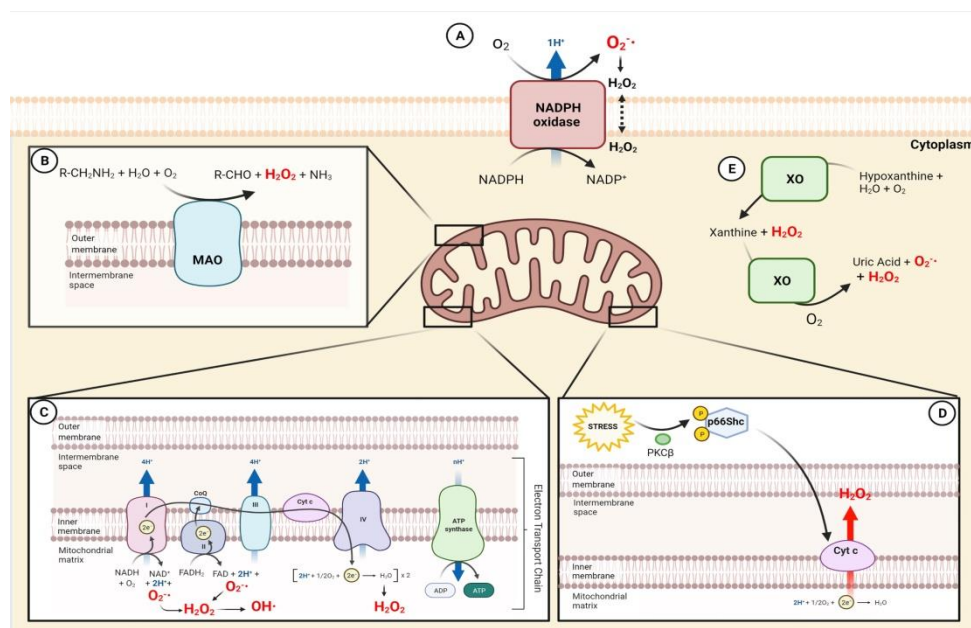
Εικόνα 4: Μηχανισμοί συμβολής CYPs σε ασθένειες που προκαλούνται από ROS

#### 4. Φαγοκύτταρα

Τα φαγοκύτταρα είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, και πιο συγκεκριμένα αποτελούν ένα είδος λευκών αιμοσφαιρίων. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν, να προσλαμβάνουν και να καταστρέφουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα κυριότερα φαγοκύτταρα στον άνθρωπο είναι τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα, ενώ φαγοκυτταρική δράση εμφανίζουν και τα δενδριτικά κύτταρα, τα ηοσινόφιλα και τα μονοκύτταρα (Canton et al., 2021). Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που παράγονται στα φαγοκύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία τους, και πιο συγκεκριμένα στη λειτουργία των μακροφάγων, καθώς συμμετέχουν στην άμυνα έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών και στην κυτταρική σηματοδότηση. Στα φαγοκύτταρα τα ROS παράγονται από δύο κύριες πηγές, με τη δράση της οξειδάσης NADPH (NOX2) και μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια, όπως περιγράφηκε και προηγουμένως.

Η οξειδάση NADPH είναι το κυριότερο ενζυμικό σύστημα για την παραγωγή ROS. Το σύστημα αυτό αποτελεί μία οικογένεια διαμεμβρανικών ενζύμων NOX, με το NOX2 να είναι το καλύτερα μελετημένο. Κατά την φαγοκυττάρωση, το ένζυμο αυτό μεταφέρει ηλεκτρόνια από το NADPH στο οξυγόνο, δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου. Το υπεροξείδιο, με την σειρά του, μετατρέπεται είτε αυθόρμητα, είτε με τη βοήθεια της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, από το οποίο είναι δυνατόν να προκύψουν άλλα ROS, όπως οι ρίζες υδροξυλίου. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για την εξόντωση των μικροβίων που φαγοκυτταρώνονται. Ωστόσο, εκτός από την αντιμικροβιακή δράση, τα ROS που παράγονται από την οξειδάση NADPH συμμετέχουν και σε σηματοδοτικά μονοπάτια, ρυθμίζοντας διάφορες μεταβολικές διεργασίες, τη διαφοροποίηση των μακροφάγων, την πολικότητα (M1/M2) και την παραγωγή κυτταροκινών. Τα ROS ενεργοποιούν επίσης φλεγμονώδη συστήματα, αλλά η υπερβολική ή ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση της

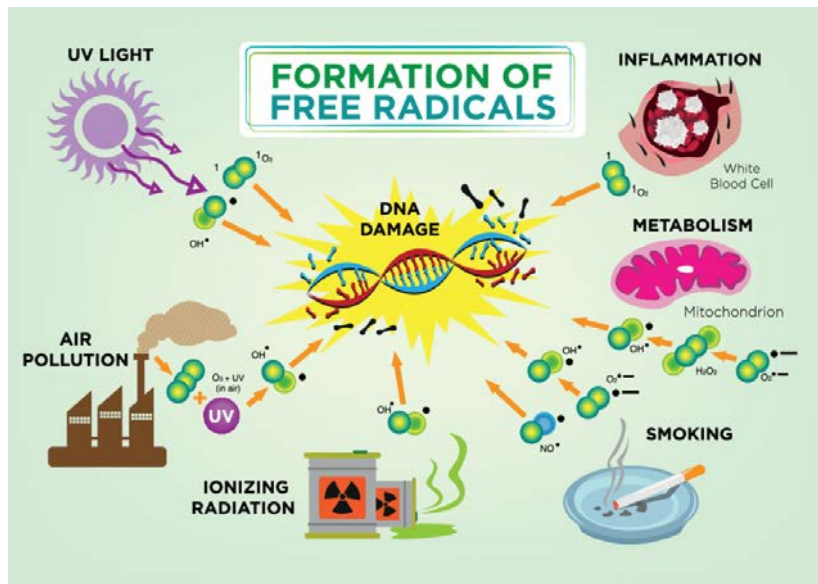
οξειδάσης NADPH, μπορεί να οδηγήσει σε φλεγμονώδεις και εκφυλιστικές παθήσεις (Canton et al., 2021).



Εικόνα 5: Πηγή ROS στα μακροφάγα

## B. Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται και από εξωγενείς πηγές, οι οποίες περιλαμβάνουν μία ποικιλία περιβαλλοντικών και εξωτερικών παραγόντων. Η δράση τους μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες και βλάβες σε βιολογικά μόρια, επηρεάζοντας αρνητικά την υγεία. Μερικές από τις σημαντικότερες εξωγενείς πηγές είναι, αρχικά, η ρύπανση του περιβάλλοντος που περιλαμβάνει την έκθεση σε αιωρούμενα σωματίδια, καυσαέρια και βιομηχανικούς ρύπους. Η έκθεση σε ακτινοβολία, είτε υπεριώδη από τον ήλιο, είτε ιονίζουσα (όπως ακτίνες X ή γ) που προκαλεί διάσπαση χημικών δεσμών και δημιουργία ελεύθερων ριζών, αποτελεί μία ακόμη εξωγενή πηγή παραγωγής ελεύθερων ριζών. Επιπλέον, από την επαφή με βαρέα μέταλλα, όπως ο χαλκός, ο μόλυβδος και το κάδμιο, προάγεται η δημιουργία ελεύθερων ριζών μέσω καταλυτικών διαδικασιών, όπως η αντίδραση Fenton. Εκτός από τα προηγούμενα, η κατανάλωση αλκοόλ και το κάπνισμα, καθώς και η έκθεση σε βιομηχανικά χημικά, φυτοφάρμακα και ορισμένες φαρμακευτικές ουσίες, μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή τοξικών ριζών (Martemucci et al., 2022).



Εικόνα 6: Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών

### 1.1.3 Συνέπειες παραγωγής ελεύθερων ριζών

Η διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών παραγόντων και αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κυττάρου, είτε λόγω αύξησης της παραγωγής ελεύθερων ριζών, ή λόγω μείωσης των αντιοξειδωτικών αμυνών του, προκαλεί οξειδωτικό στρες, το οποίο επιδρά αρνητικά σε βιομόρια, όπως το DNA, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες. Οι βλάβες αυτές είναι πιθανόν να οδηγήσουν σε δυσλειτουργία των κυττάρων, ακόμα και προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (Sies, 2015). Το οξειδωτικό στρες διαταράσσει τις σηματοδοτικές οδούς και την κυτταρική ομοιόσταση, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη φλεγμονής χρόνιων ασθενειών (Sadiq, 2023). Οι σημαντικότερες νόσοι που προκαλούνται ή επιδεινώνονται από το οξειδωτικό στρες αφορούν καρδιαγγειακά νοσήματα, όπως είναι η αθηροσκλήρωση, τα εμφράγματα και η υπέρταση, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, για παράδειγμα η νόσος του Parkinson και η νόσος Alzheimer, μεταβολικές ασθένειες, και συγκεκριμένα η παχυσαρκία και ο διαβήτης τύπου 2 και τέλος καρκίνο και γήρανση (Hajam et al., 2022).

### 1.1.4 Επιπτώσεις οξειδωτικού στρες στα βιομόρια

Το οξειδωτικό στρες προκύπτει, όπως προαναφέρθηκε, όταν η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) υπερβαίνει την ικανότητα των κυττάρων να τις εξουδετερώσουν με αντιοξειδωτικά συστήματα. Αυτό οδηγεί σε βλάβες στα βιομόρια του οργανισμού, όπως το DNA, το RNA, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, οι βλάβες στο DNA μπορεί να προκαλέσουν μεταλλάξεις και κυτταρικό θάνατο, η οξείδωση των λιπιδίων διαταραχές στη δομή και στην λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ η τροποποίηση των πρωτεϊνών οδηγεί σε αλλαγές στη δομή και στην αποδόμησή τους. Παράλληλα, μικρές ποσότητες ROS συμμετέχουν σε φυσιολογικά σήματα και ρυθμίζουν ζωτικές διαδικασίες. Ωστόσο, η υπερβολική έκθεση σε οξειδωτικό στρες σχετίζεται με γήρανση, χρόνιες παθήσεις και φλεγμονώδεις διαταραχές, καθιστώντας σημαντική την ισορροπία μεταξύ παραγωγής και εξουδετέρωσης των ROS για την υγεία των κυττάρων.

## I. DNA

Το οξειδωτικό στρες αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο γενετικό υλικό, με μακροπρόθεσμες συνέπειες στη γονιδιακή σταθερότητα και κυτταρική λειτουργία. Η έκθεση του DNA σε δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) μπορεί να οδηγήσει σε αποσταθεροποίησή του, καθώς οι ενώσεις αυτές προκαλούν μεταλλάξεις, όπως λανθασμένο ζευγάρι βάσεων, απώλειες και εισαγωγές βάσεων που συμβάλλουν στην καρκινογένεση, τον νευροεκφυλισμό και την γήρανση. Σε περιπτώσεις εκτεταμένης ζημιάς, ενεργοποιούνται σηματοδοτικά μονοπάτια όπως αυτό του p53, οδηγώντας είτε σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου είτε σε απόπτωση, προκειμένου να αποφευχθεί η μεταβίβαση των βλαβών σε νέα κύτταρα (Shadfar et al., 2023). Επιπλέον η δυσλειτουργία των επιδιορθωτικών μηχανισμών είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία μονόκλωνων και δίκλωνων θραύσματος, για αναδιατάξεις χρωμοσωμάτων και αυξημένο κίνδυνο καρκίνου (Roetsch, 2020). Ένα παράδειγμα βλάβης του DNA από το οξειδωτικό στρες αποτελεί η υδροξυλική ρίζα ( $\text{OH}^\bullet$ ), η οποία προσβάλλει τη νουκλεοτιδική βάση γουανίνη, οδηγώντας σε σχηματισμό της 8-υδροξυγουανίνης (8-OHdG). Το συγκεκριμένο παράγωγο χρησιμοποιείται συχνά ως βιοδείκτης για την εκτίμηση της οξειδωτικής βλάβης στο DNA. Η παρουσία του έχει συσχετιστεί με την πρόκληση μεταλλάξεων, την ανάπτυξη καρκινικών αλλοιώσεων και την επιτάχυνση της γήρανσης. Το μιτοχονδριακό DNA είναι ιδιαίτερα επιρρεπές σε τέτοιες βλάβες, εξαιτίας της γειννιάσής του με τα σημεία παραγωγής ROS, αλλά και της περιορισμένης ικανότητας επιδιόρθωσης που διαθέτει. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα επίπεδα της 8-OHdG στο μιτοχονδριακό DNA να είναι αυξημένα σε σχέση με το πυρηνικό (Phaniendra et al., 2015). Παράλληλα, οι δραστικές μορφές αζώτου, όπως το υπεροξυνιτρώδες ανιόν ( $\text{ONOO}^-$ ), μπορούν να τροποποιήσουν τη γουανίνη, οδηγώντας στη δημιουργία της 8-νιτρογουανίνης. Το μόριο αυτό μπορεί να ζευγαρώσει λανθασμένα με την αδενίνη κατά την αντιγραφή του DNA, προκαλώντας αντικαταστάσεις γουανίνης με θυμίνη. Τέτοιου είδους μεταλλάξεις θεωρούνται ιδιαίτερα επικίνδυνες, καθώς συμβάλλουν στη γενετική αστάθεια και στην εμφάνιση νεοπλασιών (Martemucci et al., 2022). Για την αποκατάσταση οξειδωτικών βλαβών, το κύτταρο επιστρατεύει μηχανισμούς, όπως την επιδιόρθωση βάσης (Base Excision Repair-BER), που στοχεύει κυρίως μικρές τροποποιήσεις βάσεων. Ωστόσο, η παρατεταμένη έκθεση σε οξειδωτικό στρες μπορεί να υπερβεί τις δυνατότητες αυτών των επιδιορθωτικών συστημάτων, οδηγώντας σε συσσωρευτική γενετική αστάθεια (Van Houten et al., 2018).

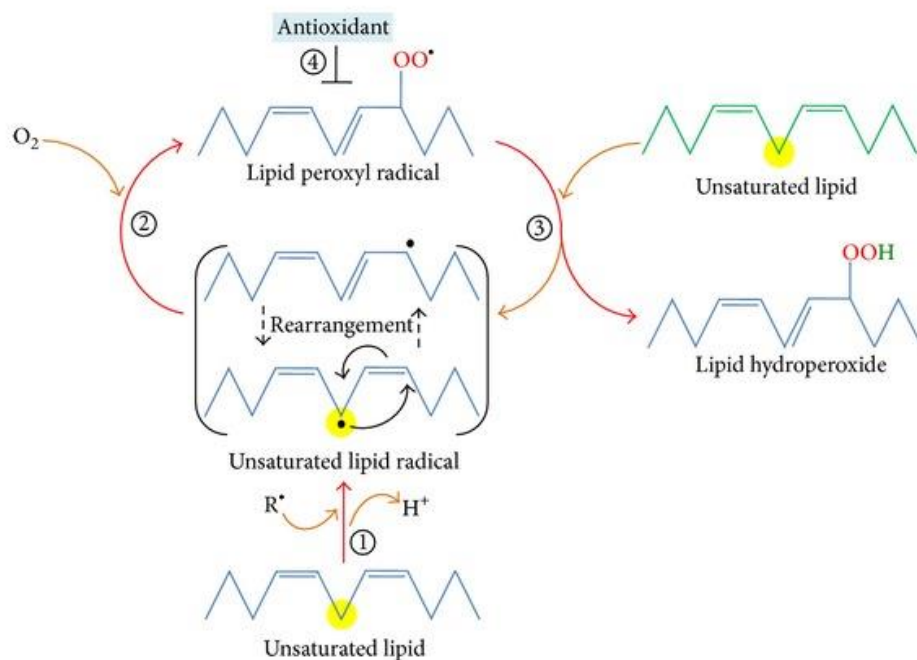
## II. RNA

Το οξειδωτικό στρες προκαλεί σοβαρές επιπτώσεις στο RNA, επηρεάζοντας τη δομή, τη σταθερότητα και τη λειτουργικότητά του. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) οδηγούν σε οξειδωτικές τροποποιήσεις βάσεων, όπως η 8-οξο-γουανοσίνη (8-oxoGuo), η οποία αποτελεί δείκτη οξειδωτικής βλάβης και σχετίζεται με διαταραχές στη λειτουργία του RNA. Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση και την επεξεργασία του RNA. Σε μελέτες σε υδρόβιους οργανισμούς που

εκτέθηκαν σε νανοσωματίδια, καταγράφηκαν αλλαγές στην έκφραση χιλιάδων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που σχετίζονται με τα ριβοσώματα, το πρωτεάσωμα και μονοπάτια σηματοδότησης, όπως το MAPK, που συνδέονται με την κυτταρική απόκριση στο οξειδωτικό στρες (Liu et al., 2023). Σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και τα κυκλικά RNA (circRNAs). Χαρακτηριστικά, στην περίπτωση της διαβητικής νεφροπάθειας, το circCOL1A2 βρέθηκε υπερεκφρασμένο και φάνηκε να ενισχύει το οξειδωτικό στρες και την πυρόπτωση (pyroptosis) μέσω της ρύθμισης του μονοπατιού miR-424-5p/SGK1. Η καταστολή του circCOL1A2 μείωσε τη φλεγμονή και τη βλάβη, επιβεβαιώνοντας τον ρυθμιστικό ρόλο τέτοιων RNA ειδών (Zhuang et al., 2023). Παράλληλα, σε πειραματικά μοντέλα που υπέστηκαν οξειδωτικό στρες, παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις στην έκφραση RNA που σχετίζονταν με πρωτεΐνες σύσφιξης, αυτοφαγία και απόπτωση, δείχνοντας την επίδραση στην κυτταρική ακεραιότητα (Zhong et al., 2023). Τέλος, στοχεύοντας RNA μονοπάτια, για παράδειγμα με RNA interference, ενάντια σε ένζυμα του κυτοχρώματος P450 τη νόσο του ήπατος από αλκοόλ, μειώθηκε το οξειδωτικό στρες και η φλεγμονή (Zhang et al., 2024).

### III. Λιπίδια

Το οξειδωτικό στρες επηρεάζει τα λιπίδια, προάγοντας την υπεροξειδωσή τους, μία διαδικασία κατά την οποία οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) επιτίθενται σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες. Η διαδικασία περιλαμβάνει τρία βασικά στάδια, πρώτο από τα οποία είναι η έναρξη, όπου οξειδωτικοί παράγοντες, όπως η ρίζα υδροξυλίου ( $\text{OH}^\bullet$ ), αφαιρούν ένα άτομο υδρογόνου από ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ. Έτσι παράγεται μία λιπιδική ρίζα, που έχει ως κέντρο τον άνθρακα, η οποία σταθεροποιείται τροποποιώντας τη μοριακή της δομή και σχηματίζοντας τελικά ένα συζυγές διένιο. Ακολουθεί το επόμενο βήμα, η προώθηση (Propagation), όπου η λιπιδική ρίζα αντιδρά γρήγορα με το οξυγόνο, σχηματίζοντας μία υπεροξυλ-ρίζα ( $\text{LOO}^\bullet$ ), η οποία με τη σειρά της αφαιρεί ένα άτομο υδρογόνου από ένα άλλο μόριο λιπιδίου, παράγοντας με αυτόν τον τρόπο μία νέα ρίζα ( $\text{L}^\bullet$ ) και ένα υδροϋπεροξείδιο λιπιδίου ( $\text{LOOH}$ ). Η αλυσιδωτή αυτή αντίδραση συνεχίζεται ενισχύοντας τη βλάβη. Κατά το στάδιο του τερματισμού, σταματά η αλυσιδωτή αντίδραση όταν δύο ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους ή όταν αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως η βιταμίνη E, δίνουν άτομα υδρογόνου στις υπεροξυλ-ρίζες, σχηματίζοντας σταθερά μη ριζικά προϊόντα και αναστέλλοντας την περαιτέρω υπεροξειδωση. Η υπεροξειδωση επηρεάζει κυρίως τα λιπίδια των μεμβρανών, όπως τα γλυκολιπίδια, τα φωσφολιπίδια και τη χοληστερόλη. Από την διαδικασία αυτή παράγονται πρωτογενή υδροϋπεροξείδια λιπιδίων ( $\text{LOOH}$ ) και δευτερογενή αντιδραστικά αλδεϋδικά προϊόντα, όπως η μαλονική διαλδεϋδη (MDA) και η 4-υδροξυ-2-νονεναλ (4-HNE), που μπορεί να είναι κυτταροτοξικά, αλλά και να δρουν ως σηματοδοτικά μόρια. Η ισορροπία μεταξύ υπεροξειδωσης λιπιδίων και αντιοξειδωτικής άμυνας καθορίζει αν τα κύτταρα θα επιβιώσουν ή θα οδηγηθούν σε θάνατο, συμβάλλοντας είτε σε φυσιολογικές προσαρμογές είτε σε παθολογικές καταστάσεις, ανάλογα με την ένταση του οξειδωτικού στρες (Ayala et al., 2014).



Εικόνα 7: Διαδικασία υπεροξειδωσης των λιπιδίων

#### IV. Πρωτεΐνες

Το οξειδωτικό στρες επηρεάζει σημαντικά τη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών, μέσω ποικίλων μηχανισμών, που μπορεί να είναι αναστρέψιμοι ή μη αναστρέψιμοι, προκαλώντας διαταραχή στην ομοιόσταση και συμβάλλοντας στην εμφάνιση ασθενειών. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), όπως οι ρίζες υδροξυλίου και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, οξειδώνουν άμεσα τις πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων, ειδικά την κυστεΐνη και τη μεθειονίνη, οδηγώντας στο σχηματισμό σουλφενικού, σουλφινικού και σουλφονικού οξέος, με το τελευταίο να είναι μη αναστρέψιμο (Kehm et al., 2021). Είναι πιθανόν να προκληθούν και έμμεσες βλάβες από δευτερογενή προϊόντα όπως οι αλδεΐδες, που προέρχονται από υπεροξειδωση λιπιδίων ή από προϊόντα γλυκοξειδωσης (AGEs), οδηγώντας σε καρβονυλίωση πρωτεϊνών (Kehm et al., 2021). Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες προκαλεί μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως δισουλφιδικούς δεσμούς, S-νιτροσυλίωση και S-γλουταθειονυλίωση, που μπορεί να είναι αναστρέψιμες και να ρυθμίζουν την κυτταρική σηματοδότηση (Turell et al., 2020). Οι βλάβες αυτές οδηγούν σε απώλεια ενζυμικής δραστηριότητας, αποδιάταξη, διακοπή αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών (όπως του συμπλέγματος KRAS/c-RAF) (Rudan Dimlić et al., 2024), συσσωμάτωση και τελικά αποικοδόμηση ή κυτταρικό θάνατο. Οι πρωτεΐνες αυτές αναγνωρίζονται από το πρωτεοσωμάτιο ή απομακρύνονται μέσω αυτοφαγίας, αν και οι υπερβολικές ποσότητες βλαβών μπορεί να ξεπεράσουν τη δυνατότητα του κυττάρου να τις απομακρύνει (Mesika et al., 2019). Αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως οι θειορεδοξίνες και οι μεθειονινο-σουλφοξειδικές ρεδουκτάσες επισκευάζουν οξειδωμένα κατάλοιπα, αποκαθιστώντας μερικώς την λειτουργία (Martemucci et al., 2022). Μακροπρόθεσμα, η ανισορροπία μεταξύ πρωτεϊνικών βλαβών και

επισκευαστικών μηχανισμών σχετίζεται με τη γήρανση και νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Kehm et al., 2021). Ωστόσο ορισμένες αναστρέψιμες τροποποιήσεις έχουν ρυθμιστικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση και την προσαρμογή στο στρες (Turell et al., 2020).

## 1.2 Αντιοξειδωτική άμυνα

Η αντιοξειδωτική άμυνα αποτελεί ένα πολύπλοκο βιολογικό σύστημα που έχει εξελιχθεί στους ζωντανούς οργανισμούς ως απάντηση στις επιβλαβείς συνέπειες του οξειδωτικού στρες. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει ένζυμα, όπως οι υπεροξειδικές δισμουτάσες (SODs), η καταλάση και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPx), τα οποία μετατρέπουν τα ROS σε λιγότερο επιβλαβή μόρια. Παράλληλα, υπάρχουν και μη ενζυματικοί παράγοντες, όπως οι βιταμίνες C και E, τα καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή και η γλουταθειόνη, που δρουν ως συλλέκτες ελεύθερων ριζών, διατηρώντας την οξειδωαναγωγική ισορροπία (Jomona et al., 2024). Συνολικά, η αντιοξειδωτική άμυνα είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της κυτταρικής ακεραιότητας και της φυσιολογικής λειτουργίας, ενώ η αποτυχία της σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη ασθενειών και την γήρανση.

### 1.2.1. Αντιοξειδωτική ουσία

Το αντιοξειδωτικό είναι ένα μόριο που προστατεύει τα κύτταρα εμποδίζοντας ή επιβραδύνοντας την οξείδωση άλλων μορίων. Η οξείδωση είναι μία χημική αντίδραση που μπορεί να παράγει ελεύθερες ρίζες, δηλαδή ασταθή και ιδιαίτερα δραστικά μόρια που μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε κύτταρα, DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια. Τα αντιοξειδωτικά εξουδετερώνουν αυτές τις ελεύθερες ρίζες είτε άμεσα, μέσω της «συλλογής» τους (πρωτογενή αντιοξειδωτικά), είτε έμμεσα, αποτρέποντας τον σχηματισμό τους, προστατεύοντας έτσι τα κυτταρικά συστατικά από την οξειδωτική φθορά (δευτερογενή αντιοξειδωτικά) (Pisoschi et al., 2021). Η ταξινόμησή τους μπορεί να γίνει με βάση:

- **Τη φύση τους**, όπου διακρίνονται σε ενζυμικά (υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση και υπεροξειδάση γλουταθειόνης) και μη ενζυμικά (βιταμίνες C και E, καροτενοειδή και φλαβονοειδή).
- **Το μηχανισμό δράσης τους**, όπου χωρίζονται σε προληπτικά αντιοξειδωτικά (εμποδίζουν τον σχηματισμό των ελεύθερων ριζών), σε συλλέκτες ριζών (εξουδετερώνουν υπάρχουσες ρίζες), σε αντιοξειδωτικά αποκατάστασης (επιδιορθώνουν ήδη οξειδωμένα μόρια) και αντιοξειδωτικά προσαρμογής (ενεργοποιούν προσαρμοστικούς μηχανισμούς στον οργανισμό).
- **Τη προέλευσή τους**, σε ενδογενή, δηλαδή ένζυμα ή μόρια που παράγονται μέσω μεταβολικών διεργασιών του οργανισμού, και εξωγενή, όπως συνθετικές ενώσεις ή φυτικά παράγωγα που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής ή των συμπληρωμάτων.

Τα αντιοξειδωτικά, ανάλογα με τον ρόλο τους στην άμυνα κατά του οξειδωτικού στρες, διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες. Η πρώτη γραμμή άμυνας περιλαμβάνει προληπτικά αντιοξειδωτικά που εμποδίζουν τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών και

δρουν άμεσα, εξουδετερώνοντας αντιδραστικά είδη όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Επίσης πρωτεΐνες όπως η φερριτίνη και η λακτοφερρίνη δεσμεύουν μέταλλα (σίδηρο και χαλκό), εμποδίζοντας τον σχηματισμό ριζών, μέσω αντιδράσεων Fenton. Η δεύτερη γραμμή άμυνας αφορά αντιοξειδωτικά που εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες, μέσω της δωρεάς ηλεκτρονίων, διακόπτοντας την αλυσιδωτή οξείδωση. Περιλαμβάνει υδρόφιλα μόρια, όπως η βιταμίνη C και η γλουταθειόνη και λιπόφιλα, όπως η βιταμίνη E και η ουβικινόλη. Η Τρίτη γραμμή άμυνας αποτελείται από ένζυμα επιδιόρθωσης, που απομακρύνουν ή επιδιορθώνουν οξειδωμένες πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA. Σε αυτά περιλαμβάνονται πολυμεράσες, νουκλεάσες και πρωτεάσες που λειτουργούν σε μιτοχόνδρια και κυτταρόπλασμα. Η τέταρτη γραμμή άμυνας βασίζεται σε μηχανισμούς προσαρμογής. Τα κύτταρα ανιχνεύουν την παρουσία ελεύθερων ριζών και ενεργοποιούν τη σύνθεση αντιοξειδωτικών ενζύμων στο κατάλληλο σημείο, περιορίζοντας έτσι μελλοντική οξειδωτική βλάβη (Pisoschi et al., 2021).

### 1.2.2. Μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί δράσης αποτελούν μία πολύπλοκη και συνεργατική άμυνα του οργανισμού ενάντια στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Τα αντιοξειδωτικά δρουν μέσω δύο βασικών μηχανισμών, δηλαδή με την πρόληψη του σχηματισμού των ROS, αλλά και την διακοπή των αλυσιδωτών αντιδράσεων που προκαλούνται από αυτά.

Στην πρώτη περίπτωση, ορισμένα μόρια ή ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση και η καταλάση, μετατρέπουν τα ROS σε λιγότερο τοξικά παράγωγα, για παράδειγμα η μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό. Άλλα αντιοξειδωτικά μόρια, όπως η γλουταθειόνη και η βιταμίνη C, δεσμεύουν μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός, εμποδίζοντας την παραγωγή ελεύθερων ριζών, μέσω αντιδράσεων τύπου Fenton.

Ο δεύτερος μηχανισμός δράσης περιλαμβάνει τα αντιοξειδωτικά που σπάνε την αλυσίδα της οξείδωσης, όπως η βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη), που διακόπτει την αλυσιδωτή οξείδωση των λιπιδίων με δωρεά ή αποδοχή ηλεκτρονίων. Αυτά τα αντιοξειδωτικά προστατεύουν κυτταρικά συστατικά, όπως τα λιπίδια των μεμβρανών, οι πρωτεΐνες και το DNA.

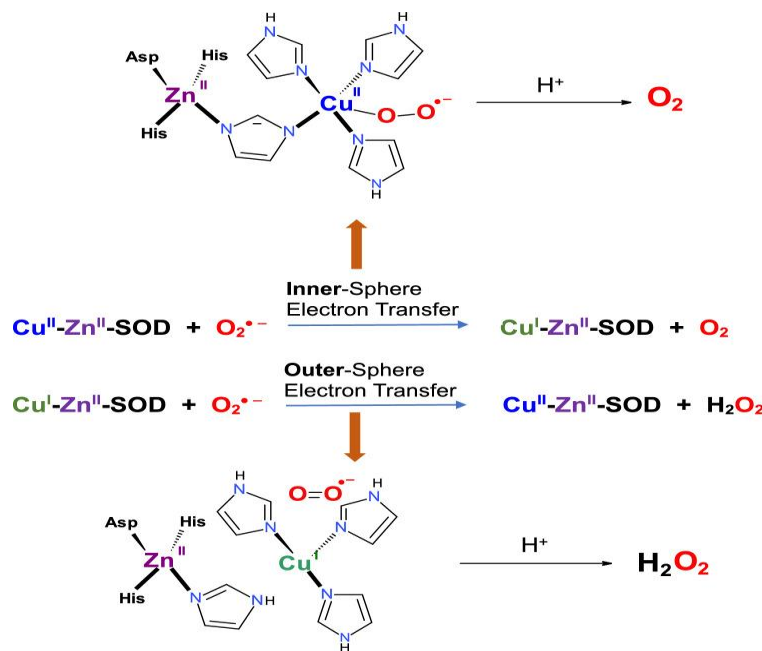
Σε περιπτώσεις που οι δύο αυτοί μηχανισμοί δεν επαρκούν, ενεργοποιούνται συστήματα επιδιόρθωσης. Αυτά περιλαμβάνουν ένζυμα που αποκαθιστούν οξειδωμένες βάσεις DNA, απομακρύνουν οξειδωμένες πρωτεΐνες και ανακυκλώνουν λιπίδια. Τα αντιοξειδωτικά, είτε ενδογενή, είτε εξωγενή, λειτουργούν συντονισμένα και συνεργατικά, σχηματίζοντας ένα προστατευτικό δίκτυο που διατηρεί την κυτταρική ακεραιότητα και προστατεύει από χρόνια νοσήματα που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Meulmeester et al., 2022).

### 1.2.3. Κατηγορίες αντιοξειδωτικών ουσιών

Ο κύριος τρόπος κατηγοριοποίησης των αντιοξειδωτικών είναι ανάλογα με τη φύση τους, σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά χωρίζονται ως εξής:

#### I. Υπεροξειδική Δισμουτάση

Το ένζυμο αυτό θεωρείται η πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού ενάντια στα οξειδωτικά μόρια, ειδικά στις ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ). Η βασική λειτουργία της SOD είναι να μετατρέπει δύο μόρια υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ), μειώνοντας έτσι την επιβλαβή δράση του υπεροξειδίου στα κύτταρα. Υπάρχουν τρεις τύποι SOD στα κύτταρα: το SOD1, στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και τις μεμβράνες των μιτοχονδρίων, που περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο, το SOD2, στη μιτοχονδριακή μήτρα, που περιέχει μαγγάνιο και το SOD3, που βρίσκεται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον και περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο. Η SOD δρα μέσω δύο βημάτων ηλεκτρονιακής μεταφοράς, στα οποία το υπεροξείδιο είτε οξειδώνεται σε οξυγόνο, είτε ανάγεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, ανάλογα με την κατάσταση οξείδωσης του χαλκού. Η παρουσία του ψευδαργύρου είναι κρίσιμη, καθώς χωρίς αυτόν η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται σημαντικά (Jomona et al., 2024).

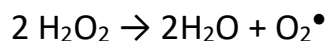


Εικόνα 8: Μηχανισμός δράσης Υπεροξειδικής Δισμουτάσης

#### II. Καταλάση (CAT)

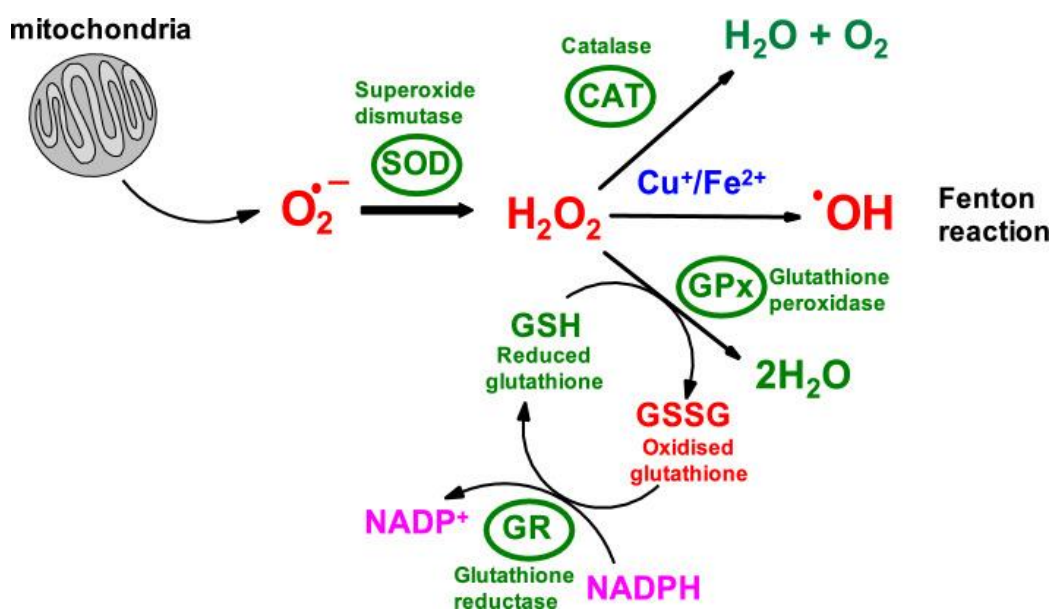
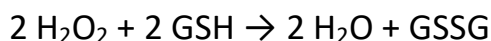
Η καταλάση είναι ένα βασικό αντιοξειδωτικό ένζυμο που συναντάται σχεδόν σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς και παίζει κρίσιμο ρόλο στην προστασία από το οξειδωτικό στρες. Ανήκει στην κατηγορία των οξειδοαναγωγικών ενζύμων (οξειδορεδουκτάσες) και καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) σε νερό ( $H_2O$ ) και οξυγόνο ( $O_2$ ), αποτρέποντας έτσι τη συσσώρευση του  $H_2O_2$  που είναι πρόδρομο των δραστικών μορφών οξυγόνου. Η καταλάση έχει υπερβολική

υψηλή καταλυτική ικανότητα, αφού μπορεί να αποδομεί εκατομμύρια μόρια  $\text{H}_2\text{O}_2$  ανά δευτερόλεπτο. Εντοπίζεται κυρίως στα υπεροξειδισώματα των κυττάρων, αλλά και σε μικρότερο βαθμό στο κυτταρόπλασμα (Jomona et al., 2024). Το ένζυμο αυτό καταλύει την εξής αντίδραση:



### III. Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης (GPx)

Είναι μία οικογένεια αντιοξειδωτικών ενζύμων που παίζουν κρίσιμο ρόλο στην προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες. Στον άνθρωπο έχουν εντοπιστεί 8 ισομορφές με διαφορετικό ρόλο και κατανομή στους ιστούς. Η πιο κοινή μορφή είναι η GPx1, ένα τετραμερές ένζυμο που περιέχει την αμινοξική ομάδα σεληνοκυστεΐνη στη δραστική του θέση, γνωστή ως το 21<sup>ο</sup> αμινοξύ. Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ή άλλων υδροϋπεροξειδίων σε νερό ή αλκοόλες, με τη χρήση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) ως δότη ηλεκτρονίων (Jomona et al., 2024).



Εικόνα 9: Συντονισμένη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων

Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε:

#### I. Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C είναι υδατοδιαλυτή και δρα ως αντιοξειδωτικό προσφέροντας ηλεκτρόνια για την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση κολλαγόνου, την ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης και την απορρόφηση σιδήρου. Επίσης, αναγεννά άλλους αντιοξειδωτικούς παράγοντες, όπως η βιταμίνη E. Η έλλειψή της προκαλεί σκορβούτο, ωστόσο σε υψηλές δόσεις μπορεί να έχει προ-οξειδωτική δράση (Traber et al., 2011).

## II. Βιταμίνη Ε

Η βιταμίνη Ε είναι λιποδιαλυτή και ενσωματώνεται σε κυτταρικές και οργανιδιακές μεμβράνες, όπου διακόπτει την αλυσιδωτή αντίδραση της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Προστατεύει τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των μεμβρανών, ιδιαίτερα σε ιστούς όπως το νευρικό σύστημα. Συνεργάζεται με την βιταμίνη C, η οποία μπορεί να την επαναφέρει στην ενεργή της μορφή (Traber et al., 2011).

## III. Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι λιποδιαλυτές χρωστικές που απαντώνται κυρίως στα φυτά και λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά εξουδετερώνοντας το μονήρες οξυγόνο και τις ρίζες υπεροξειδίου. Το β-καροτένιο μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη Α, αλλά και να δράσει ανεξάρτητα ως αντιοξειδωτικό. Τα καροτενοειδή παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του δέρματος και των οφθαλμών από το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από το φως (Traber et al., 2011).

## IV. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις που συναντώνται ευρέως σε φρούτα, λαχανικά και ροφήματα, όπως το τσάι και το κρασί. Δρουν προσφέροντας ηλεκτρόνια για την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και ρυθμίζουν μονοπάτια σηματοδότησης που σχετίζονται με τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες. Η αντιοξειδωτική τους δράση εξαρτάται από τη μοριακή τους δομή, ενώ μπορούν επίσης να ενεργοποιούν ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα (Traber et al., 2011).

## V. Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο που απαντάται ευρέως στους ιστούς των θηλαστικών και αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Πρόκειται για τη βασική ενδοκυτταρική θειόλη (SH), και η παρουσία της είναι καθοριστική για τη διατήρηση της κυτταρικής ισορροπίας έναντι των οξειδωτικών παραγόντων. Η βιολογική της σημασία οφείλεται κυρίως στις αναγωγικές της ιδιότητες, που είναι πολύ σημαντικές αφενός για την προστασία των κυττάρων από οξειδωτικές βλάβες και αφετέρου για την καλή λειτουργία πολλών μεταβολικών μονοπατιών. Η γλουταθειόνη εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στην ανηγμένη μορφή της (GSH), ενώ σε μικρότερο ποσοστό απαντά στην οξειδωμένη μορφή της (GSSG). Σε φυσιολογικές συνθήκες, η GSSG αποτελεί περίπου το 10% της συνολικής γλουταθειόνης. Ο λόγος GSH/GSSG χρησιμοποιείται ως δείκτης οξειδωτικού στρες, καθώς αντανακλά το ισοζύγιο μεταξύ αναγωγικών και οξειδωτικών δυνάμεων στο κύτταρο. Η γλουταθειόνη συμμετέχει ενεργά σε πλήθος βιολογικών διεργασιών. Λειτουργεί ως συμπαραγοντας σε ένζυμα με αντιοξειδωτική και αποτοξινωτική δράση όπως:

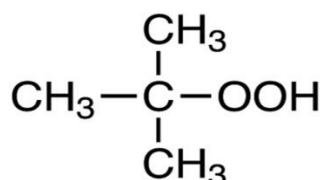
1. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
2. Η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης

### 3. Η θειολτρανσφεράσης

Επιπλέον, εμπλέκεται στον μεταβολισμό φαρμακευτικών ουσιών και ανόργανων στοιχείων (όπως το ασβέστιο), στην απομάκρυνση ξενοβιοτικών και αντιδραστικών ειδών οξυγόνου, καθώς και στη μεταφορά αμινοξέων διαμέσου κυτταρικών μεμβρανών.

#### 1.3 Οξειδωτικοί παράγοντες

Το tert- υδροϋπεροξειδίο του βουτυλίου (tBHP) είναι ένα οργανικό υπεροξείδιο με χημικό τύπο  $C_4H_{10}O_2$  και μοριακή δομή  $(CH_3)_3COOH$ . Πρόκειται για ένα άχρωμο, υδατοδιαλυτό υγρό με έντονη οσμή, που ανήκει στην κατηγορία των αλκυλικών υπεροξειδίων. Το tBHP χρησιμοποιείται εκτενώς στη βιομηχανία ως εκκινητής ελεύθερων ριζών, ιδιαίτερα για αντιδράσεις πολυμερισμού. Μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές του είναι στην παραγωγή οξειδίου του προπυλενίου μέσω της μεθόδου Halcon, όπου σε συνδιασμό με καταλύτες μολυβδαινίου, παράγει ως παραπροϊόν τη βουτανόλη, η οποία αξιοποιείται περαιτέρω (Siegemund et al., 2005). Το tBHP υπερέχει σε σχέση με άλλα υπεροξείδια ή το υπεροξείδιο του υδρογόνου, λόγω της σταθερότητάς του, της καλής διαλυτότητας σε οργανικούς διαλύτες και της ευκολίας χειρισμού (Millipore Sigma, 2020). Συνήθως διατίθεται ως διάλυμα 69-70% σε νερό και παρουσιάζει σημαντική σταθερότητα. Ωστόσο, αποτελεί ισχυρό οξειδωτικό μέσο και είναι δυνητικά επικίνδυνο, καθώς μπορεί να αποσυντεθεί εκρηκτικά υπό ορισμένες συνθήκες (NIOSH, 2007).



Εικόνα 10: Δομή του tBHP

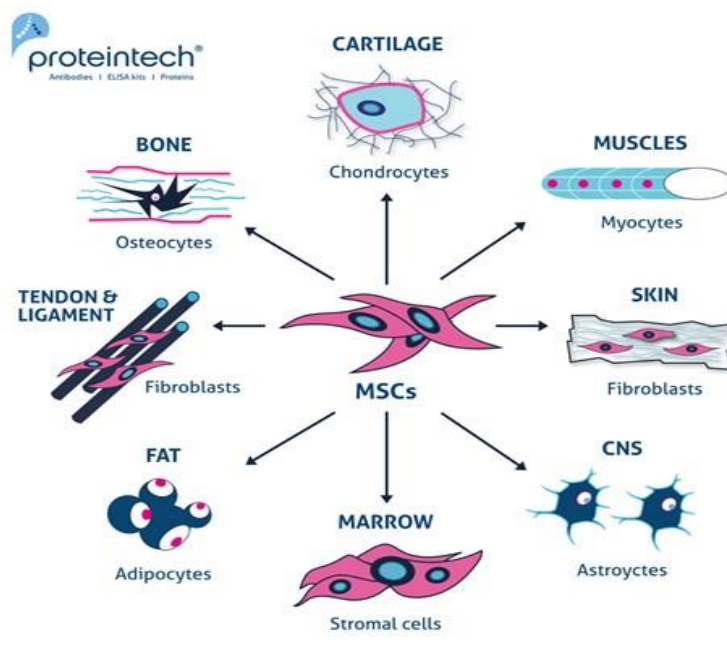
Συνολικά το tert-υδροϋπεροξειδίο του βουτυλίου (tBHP) είναι προτιμότερο για πειράματα σε κύτταρα, καθώς αποτελεί καθιερωμένο επαγωγέα οξειδωτικού στρες, με καλή διαλυτότητα σε υδατικά μέσα και προβλέψιμα, δοσο-εξαρτώμενα κυτταρικά αποτελέσματα, όπως η παραγωγή ROS, η απόπτωση και οι μεταβολικές αλλαγές. Σε αντίθεση με το di-tert-υπεροξειδίο του βουτυλίου, που χρησιμοποιείται κυρίως σε χημικές αντιδράσεις λόγω χαμηλής διαλυτότητας και της απρόβλεπτης τοξικότητας σε κύτταρα, το tBHP έχει ευρεία χρήση σε κυτταρικά μοντέλα (Loch-Carusio et al., 2020).

#### 1.4 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα Wharton's Jelly

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs) είναι πολυδύναμα, μη αιμοποιητικά κύτταρα με ικανότητα διαφοροποίησης σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, όπως οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα (Ullah et al., 2015). Μορφολογικά, τα

κύτταρα αυτά έχουν ινοβλαστοειδή εμφάνιση, είναι επιμήκη, προσκολλώνται σε πλαστικές επιφάνειες και σχηματίζουν αποικίες CFU-F (Dominici et al., 2006). Φαινοτυπικά εκφράζουν τους δείκτες CD73, CD90, CD105, ενώ στερούνται αιμοποιητικών δεικτών, όπως CD34 και CD45 (Samsonraj et al., 2017). Ταυτόχρονα δεν εκφράζουν υψηλά MHCII, γεγονός που τα καθιστά ανοσοπρονομιούχα (Ullah et al., 2015). Τα μεσεγχυματικά κύτταρα, ανάλογα με την προέλευσή τους, διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες: ενήλικα και εμβρυικά ή περιγεννητικά. Τα ενήλικα MSCs απομονώνονται από ώριμους ιστούς, όπως ο μυελός των οστών (BM-MSCs) και ο λιπώδης ιστός (AD-MSCs). Από την άλλη, τα εμβρυικά MSCs προέρχονται από ιστούς που σχετίζονται με το έμβρυο ή το περιβάλλον του, όπως ο ομφάλιος λώρος (WJ-MSCs) και η αμνιακή μεμβράνη (Pavon et al., 2023). Μία ιδιαίτερη περίπτωση αποτελούν τα MSCs που απομονώνονται από τη γέλη του Wharton, δηλαδή τον βλεννώδη συνδετικό ιστό που περιβάλλει τα αγγεία στον ομφάλιο λώρο. Αυτά τα κύτταρα εμφανίζουν αυξημένη πλαστικότητα και είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, όπως λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα, οστεοκύτταρα, ινοβλάστες και λεία μυϊκά κύτταρα (Carvalho et al., 2011). Τα MSCs επιτελούν παρακρινή λειτουργία, εκκρίνοντας κυτταροκίνες, αυξητικούς παράγοντες και εξωκυτταρικά κυστίδια, συμβάλλοντας έτσι στην ιστική αναγέννηση, την αντιφλεγμονώδη δράση και τη νεοαγγείωση (Ragni et al., 2021). Χρησιμοποιούνται σε πειραματικά και κλινικά πρωτόκολλα για καρδιοπάθειες, αυτοάνοσα νοσήματα, εκφυλιστικές παθήσεις και μεταμοσχεύσεις.

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα της γέλης του Wharton (WJ-MSCs) προτιμώνται έναντι άλλων τύπων MSCs, λόγω των εξαιρετικών βιολογικών και κλινικών τους χαρακτηριστικών. Διαθέτουν υψηλότερη ικανότητα πολλαπλασιασμού και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής σε καλλιέργεια σε σύγκριση με τα ενήλικα MSCs, γεγονός που διευκολύνει την ταχεία επέκτασή τους για θεραπευτικούς σκοπούς. Παρουσιάζουν, επίσης, ενισχυμένη πολυδυναμικότητα, με ικανότητα διαφοροποίησης σε κύτταρα οστών, χόνδρου και άλλους ιστούς (Pampanella et al., 2023). Επιπλέον, τα WJ-MSCs είναι λιγότερο ανοσογόνα και διαθέτουν καλύτερη ανοσορρυθμιστική δράση, κάτι που τα καθιστά κατάλληλα για αλλογενείς μεταμοσχεύσεις χωρίς υψηλό κίνδυνο απόρριψης (Millan-Rivero et al., 2018). Η συλλογή των κυττάρων αυτών είναι μη επεμβατική και ηθικά αποδεκτή, καθώς προέρχονται από τον ομφάλιο λώρο, ο οποίος απορρίπτεται μετά τη γέννηση (Pampanella et al., 2023). Τέλος εκκρίνουν βιοδραστικούς παράγοντες με αντιφλεγμονώδη και αναπλαστική δράση, συμβάλλοντας στην επούλωση και νευροπροστασία (Marino et al., 2019).



Εικόνα 11: Ικανότητα διαφοροποίησης μεσεγχυματικών κυττάρων

## 2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να εξεταστεί η καταλληλότητα του tert-BOOH ως οξειδωτικού παράγοντα για την πρόκληση οξειδωτικού στρες σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα της γέλης του Wharton (WJ-MSCs). Για τον προσδιορισμό του οξειδωτικού στρες χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες: i) πρωτεϊνικά καρβονύλια για τον βαθμό οξείδωσης των πρωτεϊνών, ii) ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) για τον προσδιορισμό της λιπιδικής υπεροξείδωσης, iii) προσδιορισμός των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), iv) προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των κυττάρων (TAC). Η ανάπτυξη ενός μοντέλου πρόκλησης οξειδωτικού στρες στα WJ-MSCs είναι ιδιαίτερα σημαντική για μελέτες που εξετάζουν τη δράση αντιοξειδωτικών σε αυτά τα κύτταρα.

### 3. Υλικά και Μέθοδοι

#### Μέθοδοι σε Μεσεγχυματικά Κύτταρα

##### Υλικά

- Θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium): με 4,5g/γλυκόζη, 1mM πυροσταφυλικό νάτριο και Gibco BRL 41996. Απαραίτητα για την ανάπτυξη κυτταρικών σειρών θηλαστικών.
- FBS (Fetal Bovine Serum 1x): Ορός που απομονώνεται από έμβρυα βοοειδών. Παρέχει αυξητικούς παράγοντες και πρωτεΐνες για την ανάπτυξη για διατήρηση των κυττάρων invitro και προστίθενται στο θρεπτικό μέσο DMEM.
- Αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (antibiotic-antimitotic solution Gibco): Προστίθενται στο θρεπτικό DMEM με σκοπό την αποφυγή βακτηριακών μολύνσεων.
- PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 7,4): Ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για την έκπλυση της φλάσκας και την απομάκρυνση υπολειμμάτων.
- Τρυψίνη 1x (Gibco): Αποτελεί πρωτεολυτικό ένζυμο και χρησιμοποιείται για τη διάσπαση των πρωτεϊνών που συνδέουν τα κύτταρα στην επιφάνεια της φλάσκας, με σκοπό την επανακαλλιέργεια των κυττάρων.
- XTT Cell Proliferation Kit II (Sigma).

#### Συνθήκες Καλλιέργειας

Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής τάξης II, ο οποίος εξασφαλίζει αποστειρωμένο περιβάλλον μέσω υπεριώδους ακτινοβολίας και καθαρού φιλτραρισμένου αέρα. Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε φλάσκες από πολυστυρένιο με ειδικό φίλτρο, που επιτρέπει την ανταλλαγή αερίων, χωρίς να θέτει σε κίνδυνο τη στειρότητα του περιβάλλοντος. Η επώαση πραγματοποιείται σε κλίβανο, σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (37°C), υγρασίας και ατμοσφαιρικής σύνθεσης (5% CO<sub>2</sub>). Η μορφολογία και η κατάσταση των κυττάρων παρακολουθήθηκαν με χρήση οπτικού μικροσκοπίου αντίθετης φάσης.

#### Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα

Σε όλες τις πειραματικές εφαρμογές χρησιμοποιήθηκαν μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα που προέρχονταν από τη γέλη του Wharton (WJ-MSCs) και χαρακτηρίζονται από υψηλότερο ρυθμό αναδιπλασιασμού του πληθυσμού, συγκριτικά με άλλους τύπους κυττάρων. Αναπτύσσονται μέσω προσκόλλησης στην επιφάνεια του μέσου καλλιέργειας, ενώ η αλληλεπίδραση με γειτονικά κύτταρα ευνοεί περαιτέρω την ανάπτυξή τους. Ωστόσο, όταν η επιφάνεια αυτή καλυφθεί σε ποσοστό άνω του 80%, τα κύτταρα εκκρίνουν παράγοντες που αναστέλλουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους. Κατά συνέπεια, στο στάδιο αυτό είναι αναγκαία η ανακαλλιέργεια, προκειμένου να διασφαλιστεί επαρκής χώρος και συνθήκες ανάπτυξης για τα κύτταρα.

#### Καλλιέργεια Κυττάρων

Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biowest). Προκειμένου να εξασφαλιστεί η παροχή όλων των απαραίτητων αυξητικών παραγόντων για την ανάπτυξη των κυττάρων, το θρεπτικό μέσο ενισχύθηκε με ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco), σε τελική συγκέντρωση 10%v/v.

### **Ανακαλλιέργεια κυττάρων**

Όταν καλυφθεί περίπου το 80% της επιφάνειας της φλάσκας από τα κύτταρα, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια (passage), προκειμένου να διατηρηθεί η βιωσιμότητα και η φυσιολογική λειτουργία τους. Αρχικά, είναι απαραίτητη η αποκόλληση των κυττάρων, για την οποία χρησιμοποιείται θρυψίνη, ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που υδρολύει τους πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών και του υποστρώματος. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας περιλαμβάνει τα εξής διαδοχικά στάδια:

1. Αφαιρείται το αρχικό θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα.
2. Έκπλυση της φλάσκας με ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1% (Phosphate-Buffered Saline), για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων.
3. Απομάκρυνση του PBS με τη χρήση πιπέτας, καθώς αν παραμείνει στη φλάσκα, αναστέλλει τη δράση της θρυψίνης.
4. Προσθήκη θρυψίνης 1x και επώαση στον κλίβανο για 3 λεπτά, στους 37°C
5. Έλεγχος με τη βοήθεια μικροσκοπίου, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί πλήρως.
6. Προσθήκη θρεπτικού υλικού DMEM (με FBS) στη φλάσκα για να αδρανοποιηθεί η θρυψίνη, η οποία μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα καθίσταται τοξική για τα κύτταρα.
7. Πλύση της φλάσκας, αφενός για την απομάκρυνση των κυττάρων που εξακολουθούν να είναι προσκολλημένα και αφετέρου για τον διαχωρισμό των κυτταρικών συσσωματωμάτων.
8. Μεταφορά του διαλύματος των κυττάρων σε κάθε νέα φλάσκα, στην οποία έχει προστεθεί ήδη θρεπτικό υλικό.

## **3.1 Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford**

### **3.1.1 Αρχή μεθόδου**

Η μέθοδος Bradford αξιοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης μίας πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα. Βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία έχει αρνητικό φορτίο και κόκκινο χρώμα στην ελεύθερη μορφή της (απορρόφηση στα 465nm), με τα θετικά φορτία της πρωτεΐνης και κυρίως αμινοξέα όπως είναι η αργινίνη, η λυσίνη και η ιστιδίνη, υπό όξινες συνθήκες. Από την αλληλεπίδραση αυτή παράγεται ένα σύμπλοκο μπλε χρώματος, το οποίο απορροφά στα 595nm. Για να εφαρμοστεί η μέθοδος αυτή, είναι απαραίτητος ο

σχεδιασμός μίας πρότυπης καμπύλης, με διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης μίας πρωτεΐνης, της αλβουμίνης.

### 3.1.2. Πειραματική διαδικασία

1. Προσθήκη 1mL αντιδραστηρίου Bradford σε 5μL δείγματος. Το αντιδραστήριο Bradford είναι φωτοευαίσθητο και διατηρείται στο ψυγείο. Πριν την χρήση του, αραιώνονται 6mL αντιδραστηρίου σε 24mL PBS. Στο Blank, αντί για 5μL δείγματος, προστίθενται 5μL buffer ομογενοποίησης PBS.
2. Πραγματοποιείται vortex
3. Επώση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 15min
4. Μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 595nm με γυάλινη κυψελίδα

### 3.1.3. Υπολογισμοί

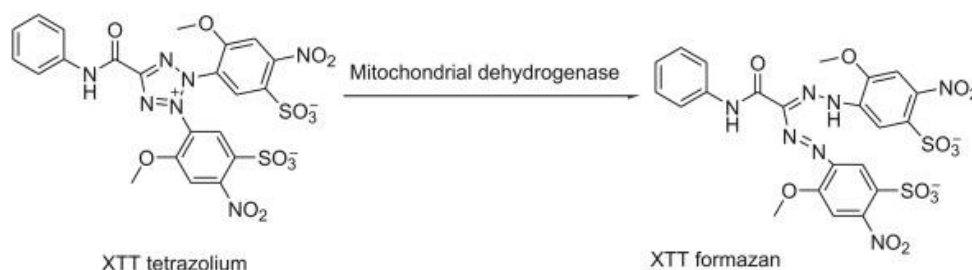
Η ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης προσδιορίζεται με βάση τους συντελεστές που προκύπτουν κάθε φορά από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης, εκφρασμένης σε mg/mL.

## 3.2 Μέθοδος ΧΤΤ

### 3.2.1 Αρχή μεθόδου

Η δοκιμή κυτταρικής ζωτικότητας ΧΤΤ είναι μία φασματοφωτομετρική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας, του πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικότητας των κυττάρων. Είναι μία μέθοδος ιδιαίτερα χρήσιμη σε βιολογικές έρευνες και δοκιμές φαρμάκων.

Το ΧΤΤ είναι μία κίτρινη ένωση, η οποία ανάγεται σε ένα πορτοκαλί προϊόν από μιτοχονδριακά ένζυμα μεταβολικά ενεργών κυττάρων, όπως είναι για παράδειγμα οι δεϋδρογονάσες. Αυτή η αλλαγή χρώματος οφείλεται στη διάσπαση του θετικά φορτισμένου τετραζολικού δακτυλίου, οδηγώντας στη δημιουργία του προϊόντος φορμαζάνη, η οποία είναι διαλυτή. Η ένταση του χρώματος του προϊόντος αυτού είναι ανάλογη με τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων και μπορεί να μετρηθεί με τη χρήση φωτόμετρου στα 450nm.



Εικόνα 12: Μετατροπή του αντιδραστηρίου ΧΤΤ σε φορμαζάνη

### 3.2.2 Πειραματική διαδικασία

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM, που περιείχε 10% FBS και 1% διάλυμα πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης, με συγκέντρωση

100 units/mL και 100 µg/mL, αντίστοιχα. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την αξιολόγηση της ανάπτυξης κυττάρων με τη μέθοδο ΧΤΤ είχε διάρκεια 2 ημέρες. Την πρώτη ημέρα πραγματοποιείται το στρώσιμο των κυττάρων σε 96-Well Cell Culture Plates. Η διαδικασία ξεκινάει με την προσθήκη 100µL θρεπτικού σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας. Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται προέρχονται από φλάσκες T-75, στις οποίες έχουν καλύψει περίπου το 75-80% της επιφάνειας και διαχωρίζονται από αυτές με τη χρήση θρυψίνης 1x. Ακολουθεί η προσθήκη θρεπτικού DMEM, περίπου 5mL, και η μεταφορά του συνολικού όγκου σε falcon 50 mL, από όπου θα ληφθούν 10µL, προκειμένου να γίνει η μέτρηση των κυττάρων σε πλάκα Neubauer. Με αυτόν τον τρόπο, θα υπολογιστεί ο όγκος που θα ληφθεί από το falcon, έτσι ώστε σε κάθε πηγαδάκι της πλάκας να υπάρχουν 10.000 κύτταρα. Τέλος, η πλάκα επωάζεται στον κλίβανο (37°C και 5% CO<sub>2</sub>) για 24 ώρες, με σκοπό τα κύτταρα να προσκολληθούν στην ειδική επιφάνεια της πλάκας που είναι φτιαγμένη από πολυστυρένιο.

Τη δεύτερη μέρα, προστίθεται αρχικά το αντιδραστήριο tert-Butylhydroperoxide σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, κάθε μία από τις οποίες τοποθετήθηκε σε 3 διαφορετικά πηγαδάκια, για να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα. Η ουσία αυτή τοποθετήθηκε και σε πηγαδάκια, τα οποία δεν περιείχαν κύτταρα, προκειμένου να διαπιστωθεί αν η ουσία απορροφά στα 450 nm. Τέλος, προστέθηκαν δείγματα control, που περιείχαν μόνο θρεπτικό DMEM με FBS. Ακολούθησε επώαση στον κλίβανο στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub> για 1h. Μετά το πέρας του χρόνου αυτού, προστίθεται το αντιδραστήριο ΧΤΤ, από το Cell Proliferation Kit II, της εταιρείας Roche, που περιείχε δύο αντιδραστήρια: το ΧΤΤ labeling reagent και το Electron coupling reagent. Τα αντιδραστήρια αυτά είναι φωτοευαίσθητα, οπότε η διαδικασία πρέπει να γίνεται στο σκοτάδι. Δημιουργείται ένα μείγμα των αντιδραστηρίων αυτών, το οποίο μοιράζεται στα πηγαδάκια της πλάκας. Κατόπιν, η πλάκα επωάζεται στον κλίβανο, στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub>, για 4h. Μετά την επώαση, γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης στα 450nm σε φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader.

### 3.2.3 Υπολογισμοί

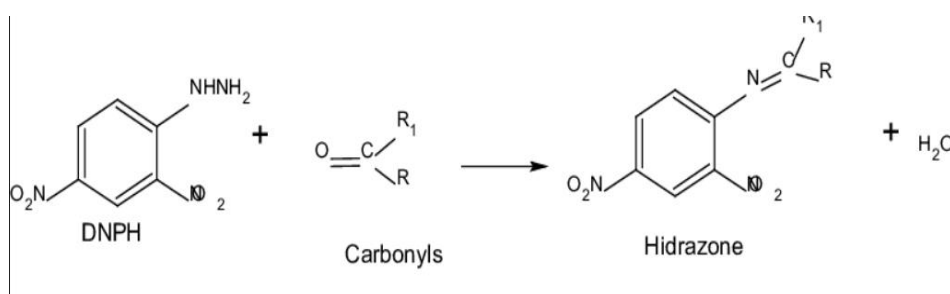
Η κάθε συγκέντρωση της ουσίας εξετάστηκε σε τριπλά δείγματα. Προκειμένου να υπολογιστεί η % αναστολή των εκχυλισμάτων στην κυτταρική αύξηση, αξιοποιήθηκε ο τύπος:

% αναστολή = [(O.D. αρνητικού μάρτυρα – O.D. δείγματος) / O.D. αρνητικού μάρτυρα] x 100

### 3.3 Πρωτεϊνικά καρβονύλια

#### 3.3.1 Αρχή μεθόδου

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι άμεσα σχετιζόμενα με το οξειδωτικό στρες, καθώς αποτελούν έναν από τους πιο αξιόπιστους δείκτες της οξείδωσης των πρωτεϊνών, η οποία προκαλείται από ελεύθερες ρίζες (ROS). Οι ROS “επιτίθενται” στα αμινοξέα των πρωτεϊνών και προκαλούν τροποποιήσεις, όπως η δημιουργία καρβονυλικών ομάδων, δηλαδή χημικών ομάδων (κυρίως αλδεΐδες και κετόνες) που σχηματίζονται στις πρωτεΐνες και συγκεκριμένα στις προσθετικές ομάδες αμινοξέων όπως η προλίνη, η αργινίνη, η λυσίνη και η θρεονίνη. Οι πρωτεΐνες που καρβονυλώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της φυσιολογικής τους λειτουργίας, αλλά και της φυσιολογικής λειτουργίας άλλων μακρομορίων. Η κύρια μέθοδος προσδιορισμού των πρωτεϊνικών καρβονυλίων βασίζεται στην 2,4-δινιτροφαινυλϋδραζίνη (DNPH), ένα μόριο που αντιδρά με ομάδες καρβονυλίων οδηγώντας στο σχηματισμό του σταθερού 2,4-δινιτροφαινυλϋδραζονίου (DNP), το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί και να ποσοτικοποιηθεί φασματοφωτομετρικά στα 375 nm. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε αρχικά από τους Levine et al. (1990).



Εικόνα 13: Αντίδραση DNPH με τα πρωτεϊνικά καρβονύλια

#### 3.3.2 Πειραματική διαδικασία

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μέσω της αντίδρασης με DNPH, είχε διάρκεια 3 μέρες. Την πρώτη ημέρα χρησιμοποιούνται κύτταρα από 2 φλάσκες T-75, τα οποία μεταφέρονται σε 8 τρυβλία, τα 2 θα αποτελούν control και στα υπόλοιπα 6 θα προστεθούν οι διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος. Σε κάθε τρυβλίο μεταφέρονται 2mL κυττάρων σε θρεπτικό υλικό DMEM, που περιέχει FBS και προστίθενται επιπλέον 8mL θρεπτικό υλικό. Τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub>, για 48h.

Την τρίτη ημέρα, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα και προστίθενται εκ νέου 10mL θρεπτικού μαζί με συγκεκριμένη ποσότητα του εκχυλίσματος, εκτός από τα control στα οποία προστίθεται μόνο το θρεπτικό DMEM. Τα κύτταρα επωάζονται

στον κλίβανο για 1h και στη συνέχεια μεταφέρονται σε falcon 15mL, που αντιστοιχούν με το κάθε τρυβλίο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 1.500 g, για 5 λεπτά στους 20°C. Μετά την φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα (κύτταρα) διαλύεται σε 4mL PBS, για να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του θρεπτικού, το οποίο εξαιτίας της περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνη παρεμβάλλεται στις μετέπειτα φασματοφωτομετρικές μετρήσεις. Μετά από φυγοκέντρηση σε 1.500 g, για 5 λεπτά στους 20°C, απορρίπτεται ξανά το υπερκείμενο και το ίζημα διαλύεται σε 200μL PBS, αναδεύοντας με την πιπέτα και το vortex. Τα κύτταρα διατηρούνται σε πάγο.

Για την ολοκλήρωση της μεθόδου την τρίτη ημέρα, είναι απαραίτητη η χρήση τεσσάρων buffer:

1. *Διάλυμα DNPH 14mM*: Για την παραγωγή 100 mL 14mM DNPH, διαλύουμε 0,2833gr DNPH σε 100 mL HCl 2,5N. Το DNPH είναι φωτοευαίσθητο. Για τον λόγο αυτό, καλύπτουμε το διάλυμα με αλουμινόχαρτο
2. *Διάλυμα HCl 2,5N*: Για την παραγωγή 100mL διαλύματος, αραιώνουμε 24,6mL HCl με συγκέντρωση 10,1N σε απιονισμένο νερό, έτσι ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται στα 100mL.
3. *Μείγμα Αιθανόλης-Οξικού αιθυλεστέρα (αναλογία 1:1)*: Για την παραγωγή 100mL διαλύματος, αναμειγνύουμε 50mL αιθανόλης και 50mL οξικού αιθυλεστέρα.
4. *Ουρία (pH=2.3)*: Για τη παραγωγή 100 mL 5 M ουρίας (pH 2.3, το οποίο ρυθμίζεται με 2.5 N HCl), διαλύουμε 30g ουρίας σε ~70 mL απιονισμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απιονισμένο νερό.

Σε φιαλίδια erpendorf προστίθενται 50μL κυτταρικού εναιωρήματος με 350μL PBS, γίνεται ανάδευση με vortex, επώαση για 15 λεπτά στον πάγο και μετά φυγοκέντρηση στα 15.000g, για 5 λεπτά στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρηση, απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται στο ίζημα 0,5mL DNPH (για τα δείγματα) και 0,5 mL HCl (για τα τυφλά). Το ίζημα διαλύεται με την πιπέτα και με ανάδευση με vortex και τα διαλύματα επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση γίνεται απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 1 mL TCA 20% στο ίζημα όλων των φιαλιδίων erpendorf. Γίνεται ανάδευση και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και κατόπιν απομακρύνεται το υπερκείμενο. Στο ίζημα προστίθεται 1mL μείγματος αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα (σε αναλογία 1:1) και γίνεται ανάδευση με την πιπέτα και vortex. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται μία φορά. Οι διαδοχικές πλύσεις με TCA 20% και μείγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα (σε αναλογία 1:1) γίνονται

προκειμένου να απομακρυνθεί το DNPΗ που δεν έχει αντιδράσει. Τέλος, προσθέτουμε 1mL ουρία (pH= 2.3), η οποία οδηγεί σε μετουσίωση των πρωτεϊνών και κατά συνέπεια αύξηση της διαλυτότητάς τους, καθώς διασπά τους ομοιοπολικούς δεσμούς. Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στους 37°C, για 15 λεπτά στο υδατόλουτρο και ύστερα φυγοκεντρούνται για 3 λεπτά στα 15.000 g, στους 4°C. Τέλος, μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων στα 375nm.

### 3.3.3 Υπολογισμοί

*Για το κυτταρικό αιώρημα:*

$$\text{Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/mL)} = [ (A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}}) / 0.022 ] \times 1000/X$$

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPΗ είναι  $22 \text{ Mm} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Η τιμή 0,022 υπολογίζεται ως εξής:

$$22 \text{ mmol/L, ισούται με } 22 \text{ } \mu\text{mol/mL, ισούται } 0,022 \text{ nmol/mL}$$

1000/X είναι ο συντελεστής αραίωσης, όπου 1000μL ο όγκος στην κυψελίδα και ΧμL ο όγκος του δείγματος. Η κανονικοποίηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης μπορεί να γίνει με τον τύπο:

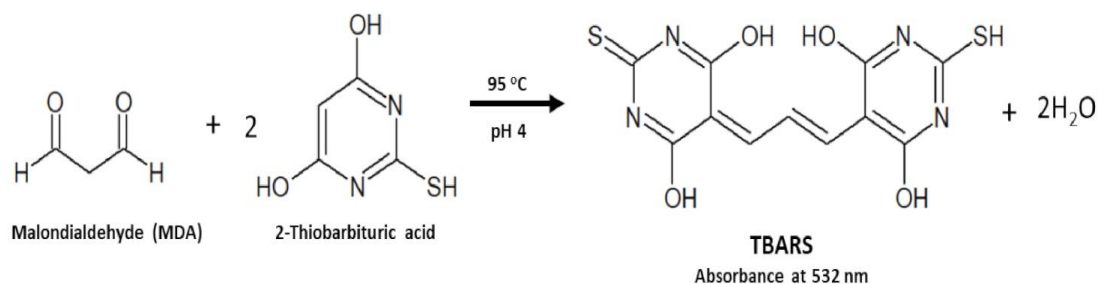
$$\text{Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/mg)} = \frac{\text{Συγκέντρωση καρβονυλίων (nmol/mL)}}{\text{Συγκέντρωση πρωτεΐνης (mg/mL)}}$$

$$\text{Συγκέντρωση πρωτεϊνών} = Y \text{ mg/mL}$$

## 3.4 Ουσίες που αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

### 3.4.1. Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος TBARS αποτελεί μία διαδεδομένη τεχνική, κατά την οποία μετράται η υπεροξείδωση των λιπιδίων σε βιολογικά δείγματα, που αποτελεί σημαντικό δείκτη οξειδωτικού στρες. Πιο συγκεκριμένα, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) που συσσωρεύονται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, επιτίθενται στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των κυτταρικών μεμβρανών, αλλάζοντας την δομή τους και δημιουργώντας υπεροξειδία λιπιδίων. Τα λιπίδια αυτά μπορούν να διασπαστούν σε διάφορα προϊόντα, όπως η μαλονδιαλδεΐδη (MDA), η οποία είναι μία αρκετά δραστική ένωση που μπορεί να αντιδρά με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), σε αναλογία MDA/TBA=1/2, σε όξινο περιβάλλον και υψηλή θερμοκρασία (~100°C). Τα TBARS εκφράζονται ως ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΐδης. Είναι απαραίτητη η όξινη επεξεργασία των πρωτεϊνών και η διάσπαση των υπεροξειδίων με θερμότητα, προκειμένου να αυξηθεί η συγκέντρωση του MDA, το οποίο φυσιολογικά είναι σε χαμηλά επίπεδα. Κατά την αντίδραση της μαλονδιαλδεΐδης με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, παράγεται ένα έγχρωμο σύμπλοκο, το οποίο μπορεί να μετρηθεί με φασματοφωτομετρία στα 530nm.



Εικόνα 14: Αντίδραση Μαλονδιαλδεύδης με 2 μόρια Θειοβαρβιτορικού οξέος

### 3.4.2 Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία προσδιορισμού της υπεροξειδωσής των λιπιδίων με τη μέθοδο TBARS πραγματοποιήθηκε στη διάρκεια τριών ημερών. Την πρώτη μέρα, συλλέχθηκαν κύτταρα από δύο φλάσκες καλλιέργειας T-75 και κατανεμήθηκαν σε οκτώ τρυβλία. Τα τρία από αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, ενώ στα υπόλοιπα πέντε προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος. Σε κάθε τρυβλίο προστέθηκαν 2mL κυτταρικού εναιωρήματος σε θρεπτικό DMEM, που περιείχε ορό FBS, και επιπλέον 8mL φρέσκου μέσου. Τα κύτταρα επώαστηκαν στον κλίβανο, υπό συνθήκες 37°C και 5% CO<sub>2</sub> για 48h.

Την τρίτη μέρα και αφού τα κύτταρα έχουν καλύψει το 80-90% της επιφάνειας του τρυβλίου, απορρίπτεται το θρεπτικό υλικό DMEM. Στα τρυβλία μελέτης προστέθηκε το εκχύλισμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μαζί με 10mL θρεπτικού, ενώ στα control δείγματα προστέθηκε μόνο το καλλιεργητικό μέσο. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στις ίδιες συνθήκες. Μετά την επώαση, το περιεχόμενο κάθε τρυβλίου μεταφέρεται σε falcon των 15mL και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 1.500 g, για 5 λεπτά, στους 20°C. Μετά τη φυγοκέντρηση, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 4 mL PBS, ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα του θρεπτικού. Το βήμα αυτό είναι απαραίτητο, καθώς η παρουσία πρωτεϊνών και άλλων παραγόντων από το μέσο καλλιέργειας μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα της μεθόδου, τα οποία προσδιορίζονται με φασματοφωτομετρική ανάλυση.

#### Αντιδραστήρια

##### *Tris-HCl 200 mM (pH 7.4)*

Για την παρασκευή ~ 100 mL του Tris-HCl buffer χρησιμοποιούνται 25 mL Tris (200 mL) και 42 mL HCl (0.1N). Για το Tris ζυγίζονται 0.61 g και διαλύονται σε 25 mL απιονισμένου νερού. Για το HCl διαλύονται 0.42 mL του stock 37% HCl (10.1N) σε 42 mL απιονισμένου νερού. Στην συνέχεια αναμινγούνται τα δύο διαλύματα σε ένα

ποτήρι ζέσεως και προστίθενται απιονισμένο νερό ως τα 100 mL. Τέλος, ρυθμίζεται το pH στο 7.4

#### *Διάλυμα Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2M) – TBA (55Mm)*

Για την παρασκευή 20mL διαλύματος, ζυγίζονται 5,68g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και 0,16g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Μεταφέρονται σε ένα ποτήρι ζέσεως και προστίθεται 20 mL απιονισμένου νερού. Η ανάδευση γίνεται με μαγνητάκι και θέρμανση, μέχρι την πλήρη διάλυση των συστατικών. Παράγεται πάντα την ημέρα του πειράματος.

#### *TCA 35%*

Για 100 mL TCA 35%, μεταφέρονται από αρχικό stock TCA 100% 35 mL σε 65 mL απιονισμένου νερού, προκειμένου ο τελικός όγκος να είναι 100 mL dH<sub>2</sub>O (σε θερμοκρασία δωματίου).

#### *TCA 70%*

Για 100 mL TCA 70%, μεταφέρονται από αρχικό stock TCA 100% 70 mL σε 30 mL απιονισμένου νερού, προκειμένου ο τελικός όγκος να είναι 100 mL dH<sub>2</sub>O (σε θερμοκρασία δωματίου).

Πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία, πρέπει να ρυθμιστεί το υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95°C.

Μετά και την δεύτερη φυγοκέντρηση, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα διαλύεται σε 300 μL PBS, κάνοντας ανάδευση με πιπέτα και vortex. Στην συνέχεια, προστίθενται 100 μL κυτταρικού αιωρήματος σε δοκιμαστικούς σωλήνες falcon (15 mL) και 300 μL (400-X, όπου X= η ποσότητα του κυτταρικού αιωρήματος) και 400 μL PBS στο τυφλό. Προστίθενται στη συνέχεια 500 μL Tris-HCl και 500 μL 35% TCA, γίνεται ανάδευση και επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, γίνεται προσθήκη 1 mL Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – TBA και επωάζουμε στους 95°C για 45 min στο υδατόλουτρο. Μετά την επώαση μεταφέρουμε τα falcon στον πάγο και τα αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min. Γίνεται προσθήκη 1 mL TCA 70%, ανάδευση των falcon και μεταφορά 1 mL σε eppendorfs και φυγοκέντρηση στα 11.200 g (10.000 rpm) στους 25°C για 3 min. Τέλος, μετράται η οπτική απορρόφηση στα 530 nm με γυάλινη κυψελίδα.

### **3.4.3. Υπολογισμοί**

*Για το κυτταρικό αιώρημα:*

Η συγκέντρωση των TBARS (μmol/L) =  $[(Abs_{\text{δείγματος}} - Abs_{\text{τυφλού}}) / 0.156] * (3400/X)$ , όπου X= η ποσότητα του κυτταρικού αιωρήματος που απαιτείται ώστε να έχουμε >30μg ολικής πρωτεΐνης, με βάση τη μέθοδο Bradford. Το 0.156 προέρχεται από το

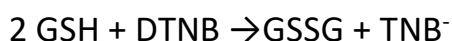
συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10<sup>-6</sup> με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε μmol/L.

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

### 3.5 Γλουταθειόνη

#### 3.5.1. Αρχή μεθόδου

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης ενός δείγματος μπορεί να πραγματοποιηθεί έμμεσα μέσω της ποσοτικοποίησης της GSH, με μία από τις πλέον διαδεδομένες μεθόδους να είναι αυτή του Ellman. Η μέθοδος αυτή πρωτοπαρουσιάστηκε το 1959 και βασίζεται στην αντίδραση της GSH με το αντιδραστήριο DNTB (διθειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ). Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, η GSH οξειδώνεται σε GSSG, ενώ παράγεται το 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό ανιόν (TNB<sup>-</sup>), το οποίο εμφανίζει έντονο κίτρινο χρώμα και απορροφά φως στα 412 nm, σύμφωνα και με την παρακάτω αντίδραση:



Η μέτρηση της απορρόφησης του TNB<sup>-</sup> με φασματοφωτόμετρο επιτρέπει την ποσοτική εκτίμηση της GSH, και συνεπώς την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του υπό μελέτη δείγματος.

#### 3.5.2. Πειραματική διαδικασία

Η αξιολόγηση των επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε σε διάστημα τριών ημερών. Κατά την πρώτη ημέρα, συλλέγονται κύτταρα από δύο φλάσκες τύπου T-75 και κατανεμήθηκαν ισόποσα σε 8 τρυβλία καλλιέργειας (2 mL σε κάθε τρυβλίο). Τρία από τα τρυβλία χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες (control), ενώ στα υπόλοιπα πέντε εφαρμόστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος προς μελέτη. Έπειτα τοποθετήθηκαν σε κλίβανο επώασης υπό συνθήκες 37°C και 5% CO<sub>2</sub> για 48 ώρες, προκειμένου να επιτραπεί η προσκόλληση και ανάπτυξη των κυττάρων. Κατά την τρίτη ημέρα, απορρίπτεται το θρεπτικό μέσο και προστίθεται ο οξειδωτικός παράγοντας (TERT), μαζί με 10 mL νέου θρεπτικού, εκτός από τα control, όπου προστίθενται μόνο τα 10 mL θρεπτικού. Η επώαση συνεχίστηκε για 1 ώρα υπό τις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και CO<sub>2</sub>.

Μετά το τέλος της επώασης, το περιεχόμενο των τρυβλίων μεταφέρθηκε σε σωληνάρια τύπου falcon (15 mL) και υποβλήθηκε σε φυγοκέντρηση στα 1.500g, για 5 λεπτά στους 20°C. Κατόπιν, το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε και το κυτταρικό

ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 4 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS, με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων του μέσου καλλιέργειας.

#### Αντιδραστήρια

*Phosphate buffer 67 mM (pH=7,95) (διατηρείται στο ψυγείο)*

Για την παραγωγή 500 mL phosphate buffer, φτιάχνουμε 25 mL  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (67 mM) και 500 mL  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (67 mM). Για το  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ζυγίζουμε 0.227g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ζυγίζουμε 5.94g και τα διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε το pH με NaOH ή HCl 1N, μέχρι να φτάσει στην τιμή 7.95.

*DTNB (1 mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) διαλυμένα σε ddH<sub>2</sub>O (φωτοευαίσθητο- φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος)*

Διάλυση 39.6 mg DTNB σε 100 mL του 1% διαλύματος του κιτρικού νατρίου, για να δώσει μία συγκέντρωση του 1 mM.

#### *Κιτρικό Νάτριο*

Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο, το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

Το ίζημα που προκύπτει από την δεύτερη φυγοκέντρωση επαναδιαλύεται σε 300  $\mu\text{L}$  PBS. Στη συνέχεια, προστίθενται οι παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια eppendorf:

|                                    | Blank             | Sample            |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|
| Phosphate buffer 67 mM,<br>pH=7.95 | 620 $\mu\text{L}$ | 620 $\mu\text{L}$ |
| Απεσταγμένο νερό                   | 100 $\mu\text{L}$ | -                 |
| Κυτταρικό αιώρημα                  | -                 | 100 $\mu\text{L}$ |
| DTNB 1mM                           | 330 $\mu\text{L}$ | 330 $\mu\text{L}$ |

Γίνεται vortex στα eppendorf και στη συνέχεια επωάζονται στο σκοτάδι για 15 λεπτά, για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση μεταξύ DTNB και GSH. Μετά το τέλος της επώασης, μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm με πλαστική κυψελίδα.

### 3.5.3. Υπολογισμοί

*Για το κυτταρικό αιώρημα:*

Ποσότητα της GSH (mmol/L) =  $(\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \Delta \text{abs}_{\text{blank}} / 13.6) * 20$ , όπου το 20 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1000  $\mu\text{L}$ ) με τον

όγκο του κυτταρικού αιωρήματος (50  $\mu\text{L}$ , > 30 $\mu\text{g}$  απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης) (1000/50=20). Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB. Μετά τον υπολογισμό των nmol/LGSH στα δείγματα, τα αποτελέσματα ανάγονται σε nmol GSH/mg πρωτεΐνης στα αντίστοιχα δείγματα.

### 3.6 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC)

#### 3.6.1. Αρχή μεθόδου

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity-TAC) περιγράφει τη δυνατότητα των συστατικών του πλάσματος και των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, οι οποίες σχετίζονται με οξειδωτικό στρες και κυτταρικές βλάβες. Κάθε αντιοξειδωτικό μόριο διαθέτει διαφορετική ισχύ και συμμετοχή στη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, με αποτέλεσμα η μέτρηση της TAC να αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της αντιοξειδωτικής κατάστασης του οργανισμού. Η αξιολόγηση της TAC μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Αξιοποιώντας την πρώτη προσέγγιση, μπορεί να υπολογιστεί η αντιοξειδωτική ικανότητα κάθε επιμέρους αντιοξειδωτικού, όπως οι βιταμίνες, τα φλαβονοειδή και τα ένζυμα. Παρόλο που αυτή η μέθοδος προσφέρει λεπτομερή δεδομένα, είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και απαιτητική λόγω του πλήθους των ενώσεων που εμπλέκονται. Η δεύτερη προσέγγιση προϋποθέτει την μέτρηση της συνολικής TAC, χωρίς να διαχωρίζεται ανά συστατικό, γεγονός που την καθιστά πιο πρακτική και έτσι χρησιμοποιείται πιο συχνά σε εργαστηριακές εφαρμογές.

Ανάμεσα στα διάφορα συστατικά του πλάσματος, το ουρικό οξύ φαίνεται να έχει τον σημαντικότερο ρόλο στη διαμόρφωση της τιμής της TAC, συμβάλλοντας σε ποσοστό περίπου 55-60%. Η υψηλή συγκέντρωσή του στο πλάσμα, σε σύγκριση με άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες (εκτός των θειολών), το καθιστά κυρίαρχο ρυθμιστή της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας. Η βιταμίνη C ακολουθεί σε σημασία, ενώ σημαντική είναι και η συμβολή των βιταμινών E και A. Συνολικά, οι βιταμίνες C και E, μπορεί να ευθύνονται για περίπου το 25% της συνολικής TAC του πλάσματος.

Η παρούσα μελέτη χρησιμοποιεί τη μέθοδο του DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) για την εκτίμηση της TAC. Το DPPH αποτελεί σταθερή ελεύθερη ρίζα, η οποία κατά την παρουσία δότη υδρογόνου από τον ορό, ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Η μείωση της ρίζας παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά σε μήκος κύματος 520nm και η μεταβολή στην απορρόφηση σχετίζεται με την αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος.

### 3.6.2. Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία για την εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε τρεις διαδοχικές ημέρες. Την πρώτη ημέρα, τα κύτταρα που είχαν αναπτυχθεί σε δύο φλάσκες T-75 συγκομίστηκαν και κατανεμήθηκαν ισομερώς σε οκτώ τρυβλία καλλιέργειας, δηλαδή 2 mL κυτταρικού εναιωρήματος ανά τρυβλίο. Τρία από τα τρυβλία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (control), ενώ στα υπόλοιπα πέντε προστέθηκαν διαφορετικές του προς μελέτη οξειδωτικού παράγοντα. Στην συνέχεια, τα τρυβλία επώαστηκαν σε κλίβανο στους 37°C, με 5% CO<sub>2</sub> για 48 ώρες. Την τρίτη ημέρα, το θρεπτικό απορρίφθηκε και στα δείγματα προστέθηκε φρέσκο θρεπτικό διάλυμα (10 mL), μαζί με ορισμένη συγκέντρωση του οξειδωτικού παράγοντα. Η επώαση συνεχίστηκε για ακόμη 1 ώρα στις ίδιες συνθήκες. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, τα περιεχόμενα των τρυβλίων συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια φυγοκέντρωσης falcon (15 mL). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 1.500g για 5 λεπτά στους 20°C, με σκοπό των διαχωρισμό των κυττάρων από το υπερκείμενο υγρό. Έπειτα, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 4 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS, για να απομακρυνθούν ουσίες που παρεμβάλλονται στις μετέπειτα φωτομετρήσεις.

#### Αντιδραστήρια

*Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4):*

Για την παραγωγή 500 mL του buffer φτιάχνουμε 100 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mM) και 400 mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10 mM). Για το KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ζυγίζουμε 0.136g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ζυγίζουμε 0.712g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1N μέχρι το pH να φτάσει τη τιμή 7.4. Το διάλυμα διατηρείται στο ψυγείο.

*DPPH 0.1 mM (Το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο και παράγεται την ημέρα του πειράματος):*

Διαλύουμε 0.02g DPPH σε 5 mL μεθανόλης και τα αναδεύουμε με μαγνητάκι (10mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναδεύουμε ξανά, για παράδειγμα αραιώνουμε 200 μL του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19.8 mL μεθανόλης (ποσό αρκετό για 10 δείγματα συν το τυφλό και τον θετικό έλεγχο). Εξαιτίας της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5 mL είναι πάντα αρκετός για πολλούς προσδιορισμούς, οπότε μπορούμε να διατηρήσουμε το πυκνό διάλυμα DPPH στο ψυγείο (κρατά περίπου για μία βδομάδα). Στη συνέχεια, το ποτήρι ζέσεως όπου παράγεται το DPPH, καλύπτεται με αλουμινόχαρτο, για να αποφευχθεί η φωτόλυση.

Μετά την παραγωγή των αντιδραστηρίων που προαναφέρθηκαν, προστίθενται σε erppendorf, οι παρακάτω ποσότητες:

|                                  | control | Δείγμα | Blank    |
|----------------------------------|---------|--------|----------|
| Phosphate buffer<br>10mM, Ph 7.4 | 500μL   | 450μL  | 500μL    |
| DPPH 0,1mM                       | 500μL   | 500μL  |          |
| Ιστός (Αραίωση 1/5)              | -       | 50μL   | 50μL PBS |

Ακολουθεί vortex και επώαση στο σκοτάδι για 60 λεπτά, κατά τη διάρκεια της οποίας οι αντιοξειδωτικές ουσίες του ορού εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση, την υδραζίνη. Κατόπιν, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στα 20.000 g στους 25°C, προκειμένου να καταβυθιστούν τα σωματίδια που θα αυξήσουν την απορρόφηση. Τέλος, μετράται η οπτική απορρόφηση στα 520nm με πλαστική κυψελίδα και είναι επιθυμητή η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 δείγματα περίπου, καθώς είναι πιθανόν η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου.

### 3.6.3 Υπολογισμοί

Για το κυτταρικό εναιώρημα, τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

- I. Ποσοστιαία (%) μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, για παράδειγμα:

$$\% \text{ Abs μείωση} = (\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού} * 100$$

- II.  $\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν/mL αιωρήματος} = [(\% \text{ Abs μείωση}/100) * 50 * 20] / 1000$

Στην δεύτερη περίπτωση:

- Διαιρούμε με το 100 με σκοπό να μετατρέψουμε την ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης.
- Πολλαπλασιάζουμε με το 50, διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50  $\mu\text{mol/L}$  της κυψελίδας.
- Πολλαπλασιάζουμε με το 20, γιατί η αραίωση του αιωρήματος στην κυψελίδα είναι εικοσαπλάσια (1000μL στην κυψελίδα/50  $\mu\text{L}$  κυτταρικού αιωρήματος του δείγματος στην κυψελίδα=20).
- Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του αιωρήματος σε mL ορού, για παράδειγμα, αν η % μείωση της απορρόφησης είναι 20, τα  $\mu\text{mol}$  του DPPH που απομακρύνθηκαν/ mL αιωρήματος είναι:

$$20/100 * 50 * 20 /1000=0.2 \mu\text{mol του DPPH},$$

που απομακρύνθηκαν/ mL αιωρήματος ή 0.2 mmol DPPH που απομακρύνθηκαν/  
L πλάσματος ή 0.2 mmol DPPH/L.

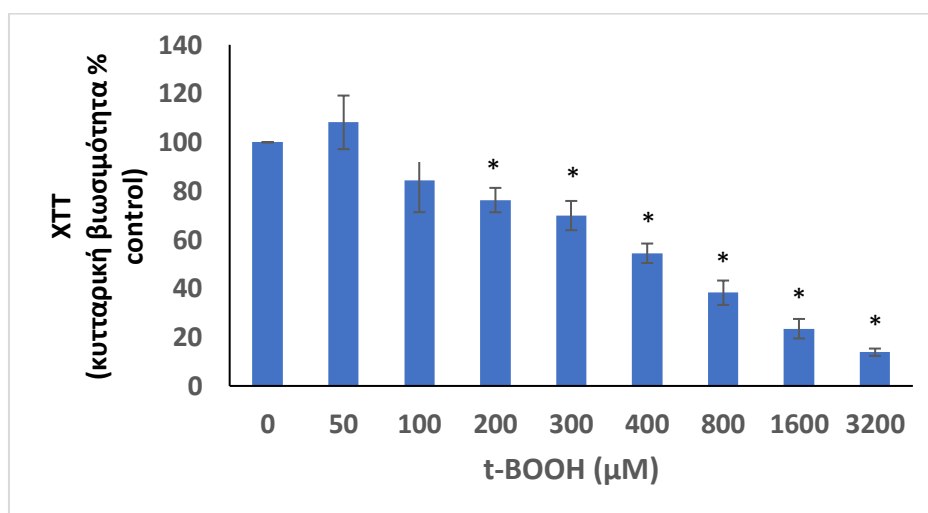
### 3.7 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη μέθοδο 'onewayANOVA' σε συνδυασμό με πολλαπλές συγκρίσεις (post hoc tests) με τη χρήση του προγράμματος SPSSv.20.

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Προσδιορισμός κυτταρικής αύξησης-Μέθοδος ΧΤΤ

Η μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη μέθοδο ΧΤΤ έδειξε ότι η έκθεση των ανθρώπινων μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων ομφάλιου λώρου σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις tert-BOOH προκαλεί δόσοεξαρτώμενη αύξηση της % αναστολής της κυτταρικής αύξησης, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 1.

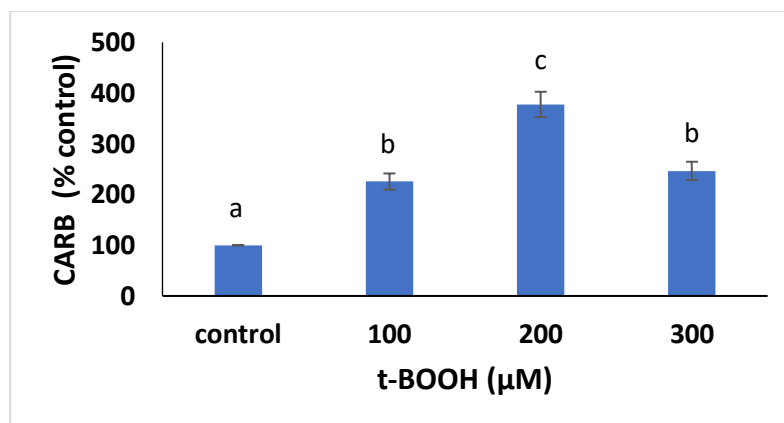


Διάγραμμα 1: Η % αναστολή της κυτταρικής αύξησης στα κύτταρα WJ-MSCs από το tert-BOOH όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο ΧΤΤ. (\*) στατιστικά σημαντική ( $p < 0,05$ ) διαφορά σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.

Το ΧΤΤ, ανιχνεύει την μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων, η οποία μειώνεται όταν η τοξικότητα του οξειδωτικού παράγοντα προκαλεί κυτταρικό στρες ή θάνατο. Τα κύτταρα επώαστηκαν στις ακόλουθες συγκεντρώσεις tert-BOOH, 50μM, 100μM, 200μM, 300μM, 400μM, 800μM, 1600μM και 3200μM. Παρατηρείται ότι σε συγκεντρώσεις tert-BOOH υψηλότερες από 200μM υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας ( $p < 0,05$ ) σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες. Αυτό υποδεικνύει ότι το tert-BOOH σε αυτές τις συγκεντρώσεις έχει και ισχυρή κυτταροτοξική δράση που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο.

### 4.2 Πρωτεϊνικά καρβονύλια-Προσδιορισμός πρωτεϊνικής υπεροξειδωσης

Το διάγραμμα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων παρουσιάζει τα επίπεδα οξείδωσης των πρωτεϊνών στα WJ-MSCs, μετά από έκθεση σε tert-BOOH. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες επώαστηκαν τα κύτταρα είναι 100μM, 200μM και 300μM. Δηλαδή, χρησιμοποιήθηκε μία μη κυτταροτοξική (100μM) και δύο κυτταροτοξικές (200μM και 300μM) συγκεντρώσεις (Διάγραμμα 2).

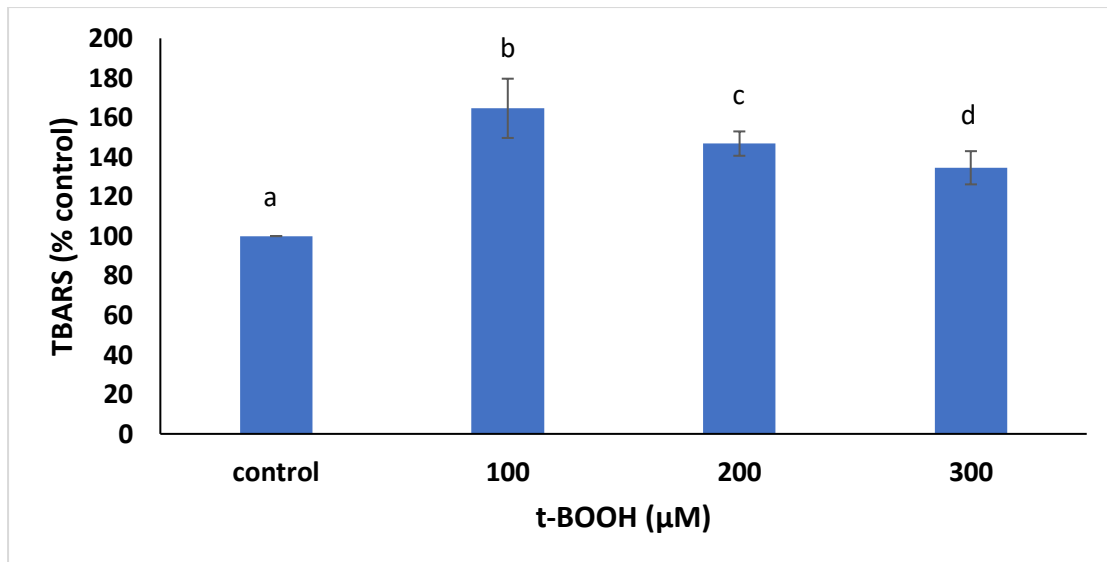


Διάγραμμα 2: Επίπεδα οξείδωσης πρωτεϊνών όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARB) στα κύτταρα WJ-MSCs. Τιμές που συμβολίζονται με διαφορετικά γράμματα είναι μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,05$ ) διαφορετικές.

Σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις παρατηρείται σημαντική αύξηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, που υποδηλώνει ότι πραγματοποιείται οξείδωση των πρωτεϊνών λόγω του οξειδωτικού στρες από την παρουσία του tert-BOOH. Πιο συγκεκριμένα, η μικρότερη συγκέντρωση του tert-BOOH (100μM) προκαλεί αύξηση των καρβονυλίων κατά 125% σε σύγκριση με το control, η μεσαία συγκέντρωση (200μM) προκαλεί αύξηση κατά 250% (δηλαδή 2,5 φορές πάνω από το control), ενώ η μεγαλύτερη συγκέντρωση των 300μM κατά 146% (1,5 φορά μεγαλύτερη από το control), παρόμοια με την αύξηση που προκαλεί η συγκέντρωση 100μM.

#### 4.3 Προσδιορισμός επιπέδων θειοβαρβιτουρικού οξέος-TBARS

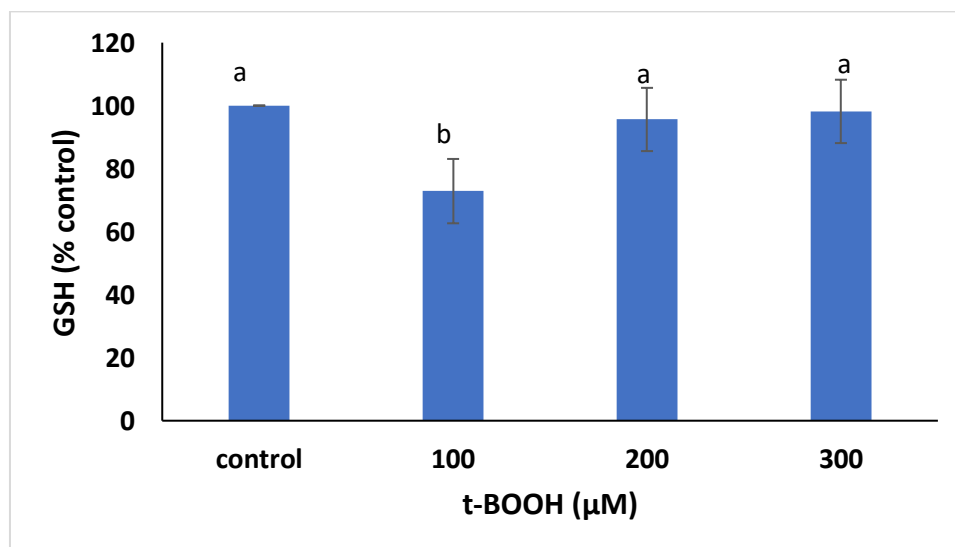
Το Διάγραμμα 3 δείχνει τα επίπεδα λιπιδικής υπεροξείδωσης, όπως μετρήθηκαν με τη μέθοδο TBARS. Μελετήθηκαν τρεις συγκεντρώσεις του tert-BOOH: 100μM, 200μM και 300μM. Σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις παρατηρείται σημαντική αύξηση της λιπιδικής υπεροξείδωσης σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες, λόγω του οξειδωτικού στρες από την παρουσία του tert-BOOH. Με την προσθήκη 100μM tert-BOOH, η λιπιδική υπεροξείδωση αυξήθηκε κατά 64% σε σύγκριση με το control, ενώ η προσθήκη 200μM tert-BOOH, οδήγησε σε 46% αύξηση σε σχέση με τον μάρτυρα. Τέλος, η συγκέντρωση tert-BOOH των 300μM, αύξησε την υπεροξείδωση των λιπιδίων κατά 34%.



Διάγραμμα 3: Επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης στα κύτταρα WJ-MSCs όπως προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο TBARS. Τιμές που συμβολίζονται με διαφορετικά γράμματα είναι μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,05$ ) διαφορετικές.

#### 4.4 Προσδιορισμός επιπέδων γλουταθειόνης-GSH

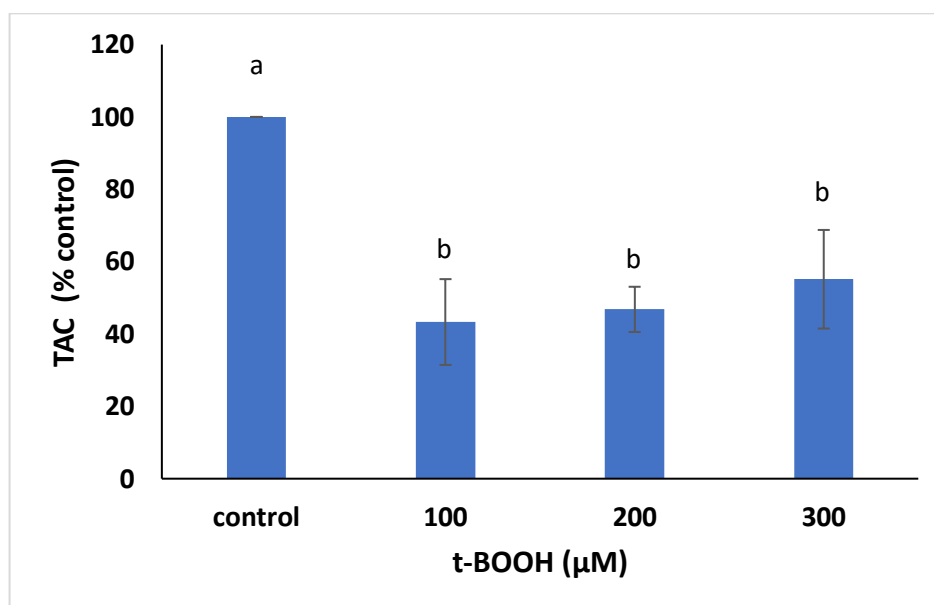
Το διάγραμμα της γλουταθειόνης παρουσιάζει τα επίπεδα GSH στα κύτταρα WJ-MSCs μετά την έκθεση σε tert-BOOH. Οι τρεις συγκεντρώσεις του οξειδωτικού παράγοντα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα 100μM, 200μM και 300μM. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 4, παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της ανηγμένης μορφής γλουταθειόνης σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες στη συγκέντρωση των 100μM, η οποία είναι περίπου 30%. Στις συγκεντρώσεις των 200μM και 300μM, τα επίπεδα της γλουταθειόνης δεν μεταβλήθηκαν στατιστικά σημαντικά σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.



Διάγραμμα 4: Επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στα κύτταρα WJ-MSCs. Τιμές που συμβολίζονται με διαφορετικά γράμματα είναι μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,05$ ) διαφορετικές.

#### 4.5 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας-TAC

Στο Διάγραμμα 5 απεικονίζονται τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στα WJ-MSCs. Σε όλες τις συγκεντρώσεις του tert-BOOH, παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση της TAC, παρόμοιας έκτασης, καθώς η συγκέντρωση των 100μM προκαλεί μείωση ~55%, των 200μM προκαλεί μείωση ~53% και η συγκέντρωση των 300μM μειώνει την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα κατά 45%.



Διάγραμμα 5: Επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στα κύτταρα WJ-MSCs. Τιμές που συμβολίζονται με διαφορετικά γράμματα είναι μεταξύ τους στατιστικώς σημαντικά ( $p < 0,05$ ) διαφορετικές.

## 5. Συζήτηση

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνήσει αν το *tert*-butyl hydroperoxide (tBHP) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας πρόκλησης οξειδωτικού στρες σε μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα προερχόμενα από τον ιστό Wharton's Jelly (WJ-MSCs). Η ανάπτυξη ενός αξιόπιστου μοντέλου πρόκλησης οξειδωτικού στρες στα κύτταρα WJ-MSCs είναι καθοριστικής σημασίας για την κατανόηση της βιολογίας και των μηχανισμών προστασίας τους. Το οξειδωτικό στρες αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες που συμβάλλουν στη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης, μέσω πρόκλησης βλαβών στο DNA, στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια (Phaniendra et al., 2015). Δεδομένου ότι τα WJ-MSCs αποτελούν καθιερωμένο μοντέλο για τη μελέτη της κυτταρικής γήρανσης, η πρόκληση ελεγχόμενου οξειδωτικού στρες προσφέρει τη δυνατότητα διερεύνησης των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν σε απώλεια της λειτουργικότητάς τους με την πάροδο του χρόνου και συμβάλλει στην ανάπτυξη στρατηγικών για τη διατήρηση ή αποκατάσταση της βιολογικής τους δραστηριότητας (Hajam et al., 2022). Παράλληλα, τα WJ-MSCs έχουν αναδειχθεί ως σημαντικό βιολογικό υλικό στην αναγεννητική ιατρική, με εφαρμογές στη δημιουργία ιστών και οργάνων για μεταμοσχεύσεις. Σε αυτό το πλαίσιο, η ανθεκτικότητα των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες είναι καθοριστική, καθώς οι οξειδωτικές βλάβες μπορούν να μειώσουν τη βιωσιμότητα και τη θεραπευτική τους απόδοση είτε κατά την καλλιέργεια *in vitro* είτε μετά την μεταμόσχευση. Ένα πειραματικό μοντέλο που μιμείται τις συνθήκες οξειδωτικού στρες επιτρέπει την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής άμυνας των WJ-MSCs, την ανίχνευση μοριακών μονοπατιών που ενεργοποιούνται και την ανάπτυξη παρεμβάσεων που βελτιώνουν την ανθεκτικότητά τους.

Τα αποτελέσματα της μελέτης επιβεβαίωσαν τον ισχυρό ρόλο του tBHP ως οξειδωτικού παράγοντα, καταδεικνύοντας αύξηση δεικτών οξειδωτικής βλάβης και εξάντληση των ενδοκυττάρων αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Η έκθεση των WJ-MSCs στο tBHP οδήγησε σε σημαντική αύξηση του οξειδωτικού στρες, εύρημα που συνάδει με προηγούμενες μελέτες σε διαφορετικούς τύπους MSCs, όπου το tBHP έχει τεκμηριωθεί ως ένας από τους πλέον ισχυρούς επαγωγείς παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) (Phaniendra et al., 2015, Halcon et al., 2020). Το tBHP, ως οργανικό υπεροξείδιο, προκαλεί παραγωγή ελεύθερων ριζών και ενεργοποιεί οξειδωτικές διεργασίες, οδηγώντας σε λιπιδική υπεροξείδωση, πρωτεϊνικές τροποποιήσεις και βλάβες στο DNA.

Στις δύο από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις του tBHP, δηλαδή στα 200μM και 300μM, υπήρξε και στατιστικά σημαντική μείωση της βιωσιμότητας, ενώ στα 100μM δεν επηρεάστηκε η βιωσιμότητα. Στη βιβλιογραφία όταν οξειδωτικοί παράγοντες χρησιμοποιούνται σε μελέτες οξειδωτικού στρες χρησιμοποιούνται τόσο μη κυτταροτοξικές όσο και κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Οι κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις χρησιμοποιούνται συνήθως όταν σκοπός της μελέτης είναι να διερευνήσει και κατά πόσο ένας προστατευτικός αντιοξειδωτικός παράγοντας μπορεί να αναστείλει τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες.

Η ανάλυση των δεικτών οξειδωτικής βλάβης με τη μέθοδο TBARS ανέδειξε σημαντική αύξηση στα προϊόντα λιπιδικής υπεροξειδωσης, γεγονός που καταδεικνύει σοβαρές βλάβες κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη και σε μεμβράνες κυτταρικών οργανιδίων που είναι πλούσιες σε λιπίδια. Η λιπιδική υπεροξειδωση είναι ένας από τους πλέον καθιερωμένους μηχανισμούς κυτταρικής βλάβης που συνδέεται με το οξειδωτικό στρες και οδηγεί σε αυξημένη διαπερατότητα της μεμβράνης, κυτταρική δυσλειτουργία και, εν τέλει, κυτταρικό θάνατο (Ayala et al., 2014). Τα επίπεδα TBARS αυξήθηκαν σημαντικά σε όλες τις συγκεντρώσεις tert-BOOH σε σχέση με τα control. Συγκεκριμένα, στα 100μM παρατηρήθηκε αύξηση 64,6%, στα 200μM 46,8%, ενώ στα 300μM 34,6% σε σχέση με τα control. Το μέγιστο της λιπιδικής υπεροξειδωσης καταγράφηκε στη χαμηλότερη δόση, με σταδιακή μείωση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Αυτό το μη-γραμμικό μοτίβο έχει αποδοθεί είτε σε κυτταρικό θάνατο που μειώνει την ανιχνεύσιμη MDA, είτε σε ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών μηχανισμών που μετριαζουν την υπεροξειδωση. Σε μελέτες σε άλλα κύτταρα, όπως ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, η έκθεση σε tert-BOOH αύξησε επίσης τα TBARS, επιβεβαιώνοντας ότι η λιπιδική υπεροξειδωση είναι καθολικό επακόλουθο της οξειδωτικής πρόκλησης (Kerasioti et al., 2015). Συνεπώς, το αποτέλεσμα δείχνει ότι οι μεμβράνες των WJ-MSCs είναι ιδιαίτερα ευάλωτες στο tert-BOOH.

Η οξείδωση των πρωτεϊνών αποτελεί έναν σημαντικό δείκτη οξειδωτικής βλάβης και συνδέεται στενά με το οξειδωτικό στρες, που προκαλεί διαταραχές στη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών. Η μέθοδος μέτρησης της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων αποτελεί την καθιερωμένη τεχνική ανίχνευσης της οξείδωσης πρωτεϊνών, καθώς τα καρβονύλια σχηματίζονται κατά την οξειδωτική τροποποίηση αμινοξέων μέσω της εισαγωγής καρβονυλομάδων (αλδεϋδες και κετόνες) στα πρωτεϊνικά μόρια. Η πρωτεϊνική οξείδωση, όπως μετρήθηκε μέσω των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, αυξήθηκε θεαματικά σε σχέση με τα control. Παρατηρήθηκε αύξηση 125% στα 100μM, 250% στα 200μM και 146% στα 300μM. Η κορύφωση στη μεσαία συγκέντρωση υποδηλώνει ότι η οξειδωτική τροποποίηση πρωτεϊνών είναι έντονη, αλλά σε πολύ υψηλές δόσεις μπορεί να εμφανιστούν αμυντικοί μηχανισμοί ως προσαρμογή στο οξειδωτικό στρες, όπως η απομάκρυνση κατεστραμμένων πρωτεϊνών ή η απώλεια βιώσιμων κυττάρων. Η πρωτεϊνική οξείδωση αποτελεί σημαντικό δείκτη βιολογικής φθοράς, καθώς επηρεάζει ενζυμικές λειτουργίες και σηματοδοτικά μονοπάτια. Παρόμοιες αυξήσεις καρβονυλίων έχουν αναφερθεί και σε άλλους κυτταρικούς τύπους μετά από έκθεση σε tBHP (Jomona et al., 2024), επιβεβαιώνοντας ότι το μόριο προκαλεί σοβαρή πρωτεϊνική βλάβη.

Παράλληλα, η μείωση των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας TAC επιβεβαιώνει την εξάντληση των ενδοκυττάρων αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Η GSH αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό άμυνας των κυττάρων έναντι των ROS και η μείωση των επιπέδων της αντικατοπτρίζει τόσο την αυξημένη κατανάλωσή της για την αποτοξίνωση των οξειδωτικών παραγόντων, όσο και την πιθανή αδρανοποίησή της σε μη λειτουργικές μορφές (Jomona et al., 2024, Pisoschi et al., 2021). Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)

μειώθηκε σημαντικά μόνο στη χαμηλότερη συγκέντρωση: στα 100μM σημειώθηκε μείωση 27,1%, ενώ στα 200μM και στα 300μM δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές σε σχέση με τα επίπεδα control. Αυτό το μοτίβο υποδηλώνει ότι στη χαμηλή συγκέντρωση έχουμε άμεση κατανάλωση GSH για την εξουδετέρωση ROS, ενώ σε υψηλότερες δόσεις πιθανόν ενεργοποιούνται αντισταθμιστικοί μηχανισμοί σύνθεσης/ανακύκλωσης ή παρατηρείται απώλεια κυττάρων, που οδηγεί σε πλασματικά σταθερά επίπεδα GSH. Αντίστοιχες μη γραμμικές αποκρίσεις έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες, όπου το tBHP μείωσε την GSH ~28% σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Kerasioti et al., 2015), επιβεβαιώνοντας τον ρόλο του ως ισχυρού παράγοντα πρόκλησης οξειδωτικού στρες.

Το γεγονός ότι παρατηρήθηκε παράλληλη μείωση και της TAC υπογραμμίζει ότι το σύνολο των αντιοξειδωτικών αποθεμάτων των κυττάρων επηρεάστηκε σημαντικά, οδηγώντας σε ανισορροπία μεταξύ παραγωγής και απομάκρυνσης ROS (Sies 2015). Η TAC μειώθηκε σημαντικά σε όλες τις συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, στα 100μM παρατηρήθηκε μείωση 56,7%, στα 200μM 53,2% και στα 300μM 44,9%. Η παρόμοια μείωση ανεξαρτήτως δόσης δείχνει ότι η αντιοξειδωτική άμυνα των WJ-MSCs εξαντλείται δραστικά ήδη από τη χαμηλή συγκέντρωση (100μM). Στις μεγαλύτερες δόσεις, που ήταν κυτταροτοξικές σε αντίθεση με τη μικρότερη, δεν προκλήθηκε περαιτέρω μείωση της TAC, ίσως λόγω πιο έντονης ενεργοποίησης προσαρμοστικών αμυντικών μηχανισμών λόγω του ισχυρότερου οξειδωτικού στρες να μην μπορούν να προκαλέσουν περαιτέρω σημαντική μείωση. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το tert-BOOH επιφέρει γενικευμένη και άμεση καταστολή της αντιοξειδωτικής ικανότητας, γεγονός που έχει ιδιαίτερη σημασία για την κατανόηση της ευαισθησίας των WJ-MSCs στο οξειδωτικό στρες. Συναφείς μελέτες σε MSCs άλλης προέλευσης έχουν δείξει επίσης σημαντική μείωση της TAC μετά από οξειδωτική πρόκληση (Pisoschi et al., 2021), επιβεβαιώνοντας την αξία του μοντέλου.

Η διεθνής βιβλιογραφία έχει ήδη αναδείξει ότι τα MSCs είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στο οξειδωτικό στρες, γεγονός που επηρεάζει τις θεραπευτικές τους ιδιότητες (Phaniendra et al., 2015). Παρά ταύτα, η προέλευση των MSCs φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση της ανθεκτικότητάς τους. Τα WJ-MSCs έχουν αναφερθεί ως πιο ανθεκτικά σε συνθήκες στρες σε σύγκριση με MSCs από άλλες πηγές, όπως ο μυελός των οστών ή ο λιπώδης ιστός, εξαιτίας της νεανικής τους προέλευσης και των ιδιαιτέρων βιολογικών τους χαρακτηριστικών (Carvalho et al., 2011, Marino et al., 2019. Pampanella et al., 2023). Ωστόσο οι αποκλίσεις που παρατηρούνται μεταξύ διαφορετικών μελετών πιθανόν να σχετίζονται με την προέλευση των MSCs, τη μέθοδο απομόνωσης, τις συνθήκες καλλιέργειας, αλλά και τα πειραματικά πρωτόκολλα (π.χ. συγκέντρωση και διάρκεια έκθεσης στο tBHP). Οι παράγοντες αυτοί συνιστούν σημαντικές πηγές μεταβλητότητας που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων.

Η σημασία της εύρεσης κατάλληλων οξειδωτικών παραγόντων όπως του tBHP στα WJ-MSCs έγκειται στο ότι θα αποτελέσουν πειραματικά μοντέλα για τη διερεύνηση της προστατευτικής δράσης αντιοξειδωτικών ουσιών έναντι του οξειδωτικού στρες.

Για παράδειγμα η χρήση αντιοξειδωτικών παραγόντων όπως η Ν-ακετυλοκυστεΐνη (NAC), η βιταμίνη C και οι φυτικές πολυφαινόλες μπορεί να αποκαλύψει κατά πόσο η ενίσχυση των ενδογενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών συμβάλλει στην επιβίωση και λειτουργικότητα των MSCs.

Η αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες από το tBHP μπορεί να ενισχυθεί με τη συμπερίληψη περισσότερων δεικτών που αποτυπώνουν τη βλάβη σε διαφορετικά βιολογικά μόρια. Ιδιαίτερη σημασία έχει η καταγραφή οξειδωτικών τροποποιήσεων στο DNA. Παράλληλα, η μελέτη παραμέτρων που σχετίζονται με τη μιτοχονδριακή λειτουργία, όπως η παραγωγή ATP, το μιτοχονδριακό δυναμικό μεμβράνης και η παραγωγή μιτοχονδριακών ROS, θα συνεισφέρει στην διερεύνηση του ρόλου των μιτοχονδρίων στη διαδικασία.

Θα μπορούσε επίσης να εξεταστεί και σε *in vivo* μελέτες κατά πόσο το tBHP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόκληση οξειδωτικού στρες σε MSCs. Αυτό θα ήταν ιδιαίτερα σημαντικό γιατί οι *in vivo* μελέτες έχουν σκοπό να αξιολογήσουν, αρχικά, το πώς επιβιώνουν και λειτουργούν τα MSCs όταν εισαχθούν σε έναν ζωντανό οργανισμό που βρίσκεται σε κατάσταση οξειδωτικού στρες (π.χ. ισχαιμία, φλεγμονή, εκφυλιστική νόσος). Μπορεί επίσης να εξεταστεί αν τα κύτταρα διατηρούν την αναγεννητική τους ικανότητα, αν παράγουν τροφικούς παράγοντες και συνεισφέρουν στην αποκατάσταση των ιστών. Τέλος, μπορούν να μετρηθούν κλινικά αποτελέσματα, όπως η βελτίωση ιστικής λειτουργίας, η μείωση της φλεγμονής και η αύξηση της επιβίωσης σε ισχαιμικά μοντέλα.

Η κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ οξειδωτικού στρες και MSCs έχει κομβική σημασία για την αναγεννητική ιατρική. Σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως οι νευροεκφυλιστικές νόσοι, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και ο σακχαρώδης διαβήτης, το οξειδωτικό στρες αποτελεί βασικό παθοφυσιολογικό μηχανισμό. Επομένως, η αποτελεσματικότητα των MSCs ως θεραπευτικών εργαλείων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητά τους να αντέχουν σε τέτοιες συνθήκες. Τα WJ-MSCs διαθέτουν ορισμένα συγκριτικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων MSCs, αλλά παραμένουν ευάλωτα σε υψηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες. Αυτό δημιουργεί την ανάγκη ανάπτυξης στρατηγικών προστασίας τους, είτε μέσω ενδογενούς ενίσχυσης των αντιοξειδωτικών τους μηχανισμών είτε μέσω εξωγενών παρεμβάσεων. Γενικότερα, σε πρακτικό επίπεδο, υπάρχει η ανάγκη καθιέρωσης πρωτοκόλλων αξιολόγησης του οξειδωτικού στρες κατά την προετοιμασία MSCs για κλινική χρήση. Η παρακολούθηση δεικτών οξειδωτικής βλάβης και αντιοξειδωτικής ικανότητας θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό κριτήριο ποιοτικού ελέγχου, βελτιώνοντας την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των θεραπειών. Επομένως, η ανάπτυξη ενός πειραματικού μοντέλου όπως με τη χρήση tBHP για την πρόκληση οξειδωτικού στρες στα MSCs έχει ιδιαίτερη σημασία και σε αυτόν τον τομέα.

Συνολικά, η εργασία αυτή έδειξε για πρώτη φορά ότι το tBHP αποτελεί έναν ισχυρό επαγωγέα οξειδωτικού στρες στα WJ-MSCs, προκαλώντας σημαντική λιπιδική υπεροξείδωση, οξείδωση πρωτεϊνών, μείωση της GSH, ενός από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά μόρια στα κύτταρα, αλλά και της συνολικής αντιοξειδωτικής

ικανότητας. Τα αποτελέσματα συνάδουν με τη διεθνή βιβλιογραφία, όσον αφορά τη χρήση του tBHP ως οξειδωτικού παράγοντα σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Η σημασία των αποτελεσμάτων είναι ιδιαίτερα σημαντική γιατί η ανάπτυξη κατάλληλων πειραματικών μοντέλων πρόκλησης οξειδωτικού στρες στα WJ-MSCs αφενός συμβάλλει στην κατανόηση της βιολογικής συμπεριφοράς των MSCs σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, αλλά και στο πως μπορούν να προστατευτούν από το οξειδωτικό στρες με τη χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών. Η προστασία από το οξειδωτικό στρες των WJ-MSCs έχει αξία σε μελέτες κυτταρικής γήρανσης όπου χρησιμοποιούνται αλλά και για τη βελτίωση της κλινικής τους αξιοποίησης στην αναγεννητική ιατρική.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>

Carvalho, M. M., Teixeira, F. G., Reis, R. L., & Sousa, N. (2011). Mesenchymal stem cells from the umbilical cord matrix: characteristics and potential clinical applications. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 6(2), 122–129. <https://doi.org/10.2174/157488811794372697>

Chaudhary, P., Janmeda, P., Docea, A. O., Yeskaliyeva, B., Abdull Razis, A. F., Modu, B., Calina, D., & Sharifi-Rad, J. (2023). Oxidative stress, free radicals and antioxidants: Potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Frontiers in Chemistry*, 11, 1158198. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1158198>

Clayden, J., Greeves, N., & Warren, S. G. (2012). *Organic chemistry* (2nd ed.). Oxford University Press.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R.J., Keating, A., Procop, D.J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>

Gridnev, A. A., & Ittel, S. D. (2001). Catalytic chain transfer in free-radical polymerizations. *Chemical Reviews*, 101(12), 3611–3660. <https://doi.org/10.1021/cr9901236>

Hajam, Y. A., Rani, R., Ganie, S. Y., Sheikh, T. A., Javaid, D., Qadri, S. S., Pramodh, S., Alsulimani, A., Alkhanani, M. F., Harakeh, S., Hussain, A., Haque, S., & Reshi, M. S. (2022). Oxidative stress in human pathology and aging: Molecular mechanisms and perspectives. *Cells*, 11(3), 552. <https://doi.org/10.3390/cells11030552>

Jomova, K., 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>

Kehm, R., Baldensperger, T., Raupbach, J., & Höhn, A. (2021). Protein oxidation – Formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases. *Redox Biology*, 42, 101901. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101901>

Kerasioti, E., Stagos, D., Georgatzi, V., Bregou, E., Priftis, A., Kafantaris, I., & Kouretas, D. (2016). Antioxidant effects of sheep whey protein on endothelial cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, Article 6585737. <https://doi.org/10.1155/2016/6585737>

Khammash, D., Rajagopal, S. K., & Polk, T. A. (2023). The neurobiology of aging\*. In M. J. Zigmond, C. A. Wiley, & M.-F. Chesselet (Eds.), *Neurobiology of brain disorders* (2nd ed., pp. 977–993). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85654-6.00057-5>

Liu, X., Yang, J., & Li, Z. (2023). Transcriptomic analysis of oxidative stress mechanisms induced by acute nanoplastic exposure in *Sepia esculenta* larvae. *Frontiers in Physiology*, 14, 1250513. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1250513>

Loch-Caruso, R., Korte, C. S., Hogan, K. A., Liao, S., & Harris, C. (2020). Tert-Butyl Hydroperoxide Stimulated Apoptosis Independent of Prostaglandin E<sub>2</sub> and IL-6 in the HTR-8/SVneo Human Placental Cell Line. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 27(11), 2104–2114. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00231-5>

Marino, L., Castaldi, M. A., Rosamilio, R., Ragni, E., Vitolo, R., Fulgione, C., Castaldi, S. G., Serio, B., Bianco, R., Guida, M., & Selleri, C. (2019). Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord: Biological Properties and Therapeutic Potential. *International journal of stem cells*, 12(2), 218–226. <https://doi.org/10.15283/ijsc18034>

Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'Andrea, L., Napolitano, P., & D'Alessandro, A. G. (2022). Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*, 2(2), 48–78. <https://doi.org/10.3390/oxygen2020006>

Mason, R. P., & Chignell, C. F. (1994). Free radicals in toxicology with an emphasis on electron spin resonance investigations. In C. A. Rice-Evans & R. H. Burdon (Eds.), *New Comprehensive Biochemistry* (Vol. 28, pp. 319–332). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(08\)60449-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60449-4)

Mesika, R., & Reichmann, D. (2019). When safeguarding goes wrong: Impact of oxidative stress on protein homeostasis in health and neurodegenerative disorders. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 114, 221–264. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2018.11.001>

Meulmeester, F. L., Luo, J., Martens, L. G., Mills, K., van Heemst, D., & Noordam, R. (2022). Antioxidant supplementation in oxidative stress-related diseases: What have we learned from studies on alpha-tocopherol?. *Antioxidants*, 11(12), 2322. <https://doi.org/10.3390/antiox11122322>

Millán-Rivero, J. E., Nadal-Nicolás, F. M., García-Bernal, D., Sobrado-Calvo, P., Blanquer, M., Moraleda, J. M., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2018). Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells protect axotomized rat retinal ganglion cells

via secretion of anti-inflammatory and neurotrophic factors. *Scientific Reports*, 8, Article 16299. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34527-z>

MilliporeSigma. (2020). *tert-Butyl hydroperoxide, ~70% solution in water*. Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com>

NIOSH. (2007). *NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards: tert-Butyl hydroperoxide*. U.S. Department of Health and Human Services, CDC. <https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0624.html>

Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315–424. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>

Pampanella, L., Abruzzo, P. M., Tassinari, R., Alessandrini, A., Petrocelli, G., Ragazzini, G., Cavallini, C., Pizzuti, V., Collura, N., Canaider, S., Facchin, F., & Ventura, C. (2023). Cytochalasin B influences cytoskeletal organization and osteogenic potential of human Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Pharmaceuticals*, 16(2), 289. <https://doi.org/10.3390/ph16020289>

Pavon, D. M., Caballero, A. L., Espinoza, A., & Rojas, M. (2023). Placental-derived mesenchymal stromal cells: phenotypic and functional heterogeneity and clinical applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1180531. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1180531>

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>

Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., & Serban, A. I. (2021). Oxidative stress mitigation by antioxidants: An overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209, 112891. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>

Poetsch, A. R. (2020). The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.12.013>

Ponath, V., & Kaina, B. (2017). Death of monocytes through oxidative burst of macrophages and neutrophils: Killing in trans. *PLOS ONE*, 12(1), e0170347. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170347>

Pritchard, H. O., & Clothier, P. Q. E. (1986). Anaerobic operation of an internal combustion engine. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (20), 1529–1530. <https://doi.org/10.1039/C39860001529>

- Ragni, E., Viganò, M., Boselli, L., et al. (2021). Extracellular vesicle-shuttled mRNA in mesenchymal stem cell communication. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 653228. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.653228>
- RajanBabu, T. V., & Simpkins, N. S. (2005). 1,1-Di-tert-butyl peroxide. In L. A. Paquette (Ed.), *e-EROS Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/047084289X.rd066.pub2>
- Ribas-Maynou, J., & Yeste, M. (2020). Oxidative stress in male infertility: Causes, effects in assisted reproductive techniques, and protective support of antioxidants. *Biology*, 9(4), 77. <https://doi.org/10.3390/biology9040077>
- Rudan Dimlić, M., Raić, S., Močibob, M., Sanader Maršić, Ž., Yao, Z., Radman, M., & Stagljarić, I. (2024). Oxidative protein damage negatively affects protein-protein interaction: The case of KRAS-cRAF. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 734, 150792. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.150792>
- Sadiq, I. Z. (2023). Free radicals and oxidative stress: Signaling mechanisms, redox basis for human diseases, and cell cycle regulation. *Current Molecular Medicine*, 23(1), 13–35. <https://doi.org/10.2174/1566524022666211222161637>
- Samsonraj, R. M., Raghunath, M., Nurcombe, V., Hui, J. H. P., van Wijnen, A. J., & Cool, S. M. (2017). Concise review: Multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(12), 2173–2185. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0129>
- Schrader, M., & Fahimi, H. D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(12), 1755–1766. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.09.006>
- Shadfar, S., Parakh, S., Jamali, M. S., & Atkin, J. D. (2023). Redox dysregulation as a driver for DNA damage and its relationship to neurodegenerative diseases. *Translational Neurodegeneration*, 12(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s40035-023-00350-4>
- Siegemund, G., Schwertfeger, H., Feiring, A. E., Pfeifer, H., Gail, E., Gygax, R., & Maurer, G. (2005). *Peroxo Compounds, Organic*. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH. [https://doi.org/10.1002/14356007.a19\\_449.pub2](https://doi.org/10.1002/14356007.a19_449.pub2)
- 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>
- Snyder, B. E. R., Vanelderen, P., Bols, M. L., Hallaert, S. D., Böttger, L. H., Ungur, L., Pierloot, K., Schoonheydt, R. A., & Sels, B. F. (2016). The active site of low-temperature methane hydroxylation in iron-containing zeolites. *Nature*, 536(7616), 317–321. <https://doi.org/10.1038/nature19059>

Su, W.-F. (2013). Radical chain polymerization. In W.-F. Su (Ed.), *Principles of polymer design and synthesis* (Vol. 82, pp. 137–183). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-38730-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38730-2_7)

Traber, M. G., & Stevens, J. F. (2011). Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 1000–1013. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.017>

Turell, L., Zeida, A., & Trujillo, M. (2020). Mechanisms and consequences of protein cysteine oxidation: The role of the initial short-lived intermediates. *Essays in Biochemistry*, 64(1), 55–66. <https://doi.org/10.1042/EBC20190053>

Ullah, M., Liu, D. D., & Thakor, A. S. (2015). Mesenchymal stromal cell homing: Mechanisms and strategies for improvement. *iScience*, 10, 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.11.008>

Van Houten, B., Santa-Gonzalez, G. A., & Camargo, M. (2018). DNA repair after oxidative stress: Current challenges. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.009>

Veith, A., & Moorthy, B. (2018). Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.003>

Yang, J., Fu, X., Liao, X., & Li, Y. (2020). Nrf2 activators as dietary phytochemicals against oxidative stress, inflammation, and mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: A systematic review. *Frontiers in Psychiatry*, 11, 561998. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2020.561998>

Zhang, Q., Wu, S., Chen, Q., Zhang, Y., Zhang, C., Yin, R., Ouyang, Z., & Wei, Y. (2024). Reducing oxidative stress-mediated alcoholic liver injury by multiplexed RNAi of *Cyp2e1*, *Cyp4a10*, and *Cyp4a14*. *Biomedicines*, 12(7), 1505. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12071505>

Zhong, Y., Ma, T., Fu, Z., Chen, A., Yu, J., Huang, Y., & Fu, J. (2023). Effects of hydrogen peroxide-induced oxidative stress on intestinal morphology, redox status, and related molecules in squabs. *Animals*, 13(4), 749. <https://doi.org/10.3390/ani13040749>

Zhuang, L., Jin, G., Qiong, W., Ge, X., & Pei, X. (2023). Circular RNA *COL1A2* mediates high glucose-induced oxidative stress and pyroptosis by regulating miR-424-5p/SGK1 in diabetic nephropathy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195, 7652–7667. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04587-2>

## Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευλικρινείς μου ευχαριστίες προς τον κ. Δημήτριο Στάγκο, Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας – Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ανάθεση της παρούσας πτυχιακής εργασίας και την καθοδήγηση που μου προσέφερε. Οι πολύτιμες γνώσεις και οι συμβουλές του συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της μελέτης αυτής

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Βαρβάρα Τραχανά, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας – Κυτταρικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ευκαιρία που μου παρείχε να πραγματοποιήσω την εργασία μου στο εργαστήριό της. Παράλληλα, είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων για τη συμμετοχή της στη τριμελή επιτροπή αξιολόγησης, όπως και του κ. Δημήτριου Μόσιαλου, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Ιδιαίτερη μνεία αξίζει στη Ζωζώ Ουτσούνη, για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράστασή της κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Η διάθεσή της να προσφέρει στήριξη και να μοιραστεί την εμπειρία της έκαναν την πορεία μου πιο ομαλή και παραγωγική.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου, που βρίσκονται πάντα στο πλευρό μου, προσφέροντάς μου δύναμη, κατανόηση και στήριξη σε κάθε μου βήμα.