

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ –
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**«Ανάπτυξη λειτουργικών πολυμερικών μεμβρανών με
ενθυλάκωση σιλυβίνης και κερκετίνης: Μορφολογία και βιοχημικές
ιδιότητες»**

Βαρέλα-Αθανασάτου Μαρία

ΛΑΡΙΣΑ 2025

«Ανάπτυξη λειτουργικών πολυμερικών μεμβρανών με
ενθυλάκωση σιλυβίνης και κερκετίνης: Μορφολογία και
βιοχημικές ιδιότητες»

"Development of functional polymeric membranes with
encapsulation of silybin and quercetin: Morphology and
biochemical properties"

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Μαρράς Σωτήριος, εργαστηριακό διδακτικό προσωπικό, εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (επιβλέπων καθηγητής).

Ψαρρά Άννα-Μαρία, καθηγήτρια Βιοχημείας, εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Τσιβιντζέλης Ιωάννης, αναπληρωτής καθηγητής, εργαστήριο Φυσικοχημείας, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ηλεκτροστατική ινοποίηση είναι μια μέθοδος απλή, αποδοτική και χαμηλού κόστους, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί σε βιομηχανικό επίπεδο. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή πολύ λεπτών ινών, από διάφορα πολυμερή, εφαρμόζοντας ένα ηλεκτρικό πεδίο υψηλής τάσης. Οι μοναδικές ιδιότητες των μεμβρανών που προκύπτουν παρουσιάζουν μεγάλο τεχνολογικό και ερευνητικό ενδιαφέρον καθιστώντας δυνατή την αξιοποίησή τους σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, που περιλαμβάνει την καθαρότερη ενέργεια, την προστασία του περιβάλλοντος, την προηγμένη κλωστοϋφαντουργία, καθώς και βιοϊατρικούς τομείς όπως η αναγέννηση ιστών, η αντιμετώπιση φλεγμονών του δέρματος και η ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμακευτικών ουσιών. Στην παρούσα εργασία διερευνώνται η μορφολογία και οι βιοχημικές ιδιότητες ινωδών μεμβρανών πολυκαπρολακτώνης (PCL), στις οποίες ενθυλακώθηκαν δύο βιοδραστικές ουσίες, η σιλυβίνη και η κερκετίνη. Η σιλυβίνη (silybin ή silibinin) είναι ένα φυσικό φλαβονολιγνάνιο και αποτελεί το κύριο και πιο βιολογικά ενεργό συστατικό της σιλυμαρίνης, που προέρχεται από τους σπόρους του γαϊδουράγκαθου. Εμφανίζει εξαιρετική ηπατοπροστατευτική, νευροπροστατευτική, αντικαρκινική, αντιοξειδωτική, ανοσορυθμιστική και αντιφλεγμονώδη δράση. Η κερκετίνη (Quercetin) αποτελεί μια φυσική φαρμακευτική ένωση που ανήκει στην κατηγορία των φλαβονοειδών και βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση σε λαχανικά, φρούτα, σπόρους και ξηρούς καρπούς, ενώ περιέχεται επίσης στο τσάι, το ελαιόλαδο και το κόκκινο κρασί. Είναι γνωστή για τις ισχυρές αντιοξειδωτικές της ιδιότητες, ενώ έχει μελετηθεί εκτενώς για την πιθανή αντικαρκινική της δράση. Στόχος ήταν η δημιουργία ενός ινώδους επιθέματος, το οποίο θα συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των ινών πολύ μικρής διαμέτρου που παράγονται με την τεχνική της ηλεκτροστατικής ινοποίησης με τη συνεργιστική δράση των δυο βιοδραστικών ουσιών. Με την ενθυλάκωση διατηρείται η σταθερότητα των ουσιών αυτών ενώ η λεπτή δομή των ινών και η μεγάλη ειδική τους επιφάνεια διευκολύνει την ελεγχόμενη και στοχευμένη αποδέσμευσή τους περιορίζοντας την άμεση έκθεση του δέρματος σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Οι σύνθετες ίνες που παράχθηκαν ελέγχθηκαν ως προς την μορφολογία τους με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM), ενώ διερευνήθηκε η επίδραση της ενθυλάκωσης στη διάμετρο των ινών. Προέκυψε ότι στην καθαρή PCL οι ίνες είναι λείες και ομοιόμορφες χωρίς σφαιρίδια, όμως στα δείγματα που προστέθηκαν οι δραστικές ουσίες, ενώ δεν επηρεάστηκε σημαντικά η διάμετρος των ινών, αυτές ήταν λιγότερο ομοιόμορφες, με κάποιες διογκώσεις και σφαιρίδια. Παράλληλα, μέσω της δοκιμασίας MTT, διερευνήθηκε η κυτταροτοξικότητα των ινών, χρησιμοποιώντας ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα (HEK 293) και η αντικαρκινική τους δράση σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος (Hep G2). Διαπιστώθηκε ότι οι ινώδεις μεμβράνες είχαν πολύ καλή βιοσυμβατότητα σε όλα τα δείγματα αφού η βιωσιμότητα των HEK 293 κυττάρων ήταν παρόμοια με αυτή του δείγματος ελέγχου. Επίσης, στα δείγματα PCL-Silybin και PCL-Quercetin υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση των καρκινικών κυττάρων, με μείωση έως και 36%. Τέλος, σημαντική ήταν η αντιοξειδωτική δράση ινωδών μεμβρανών έναντι του οξειδωτικού στρες που προκλήθηκε από H_2O_2 , αυξάνοντας το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων που εκτέθηκαν σε 0,4mM H_2O_2 έως και 27 ποσοστιαίες μονάδες και των κυττάρων που εκτέθηκαν σε 0,6mM H_2O_2 έως και 37 ποσοστιαίες μονάδες.

Ηλεκτροστατική ινοποίηση, Σιλυβίνη, Κερκετίνη, Ενθυλάκωση, Ινώδεις Μεμβράνες, Αντιοξειδωτικές ιδιότητες, Αντικαρκινικές ιδιότητες

ABSTRACT

Electrospinning is a simple, efficient, and low-cost technique that can be applied at an industrial scale. It is used to produce ultrafine fibers from various polymeric materials by applying a high-voltage electric field. The unique properties of the resulting membranes present significant technological and scientific interest, enabling their utilization in a wide range of applications, including clean energy, environmental protection, advanced textiles, as well as biomedical fields such as tissue regeneration, wound healing, and controlled drug delivery. In this study, the morphology and biochemical properties of polycaprolactone (PCL) fibrous membranes encapsulating two bioactive compounds, silybin and quercetin, were investigated. Silybin (or silibinin) is a natural flavonolignan and the main biologically active component of silymarin, derived from milk thistle seeds. It exhibits hepatoprotective, neuroprotective, anticancer, antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory properties. Quercetin is a natural flavonoid found in high concentrations in vegetables, fruits, seeds, and nuts, as well as in tea, olive oil, and red wine. It is well known for its strong antioxidant activity and has been extensively studied for its potential anticancer effects. The aim of this study was to develop a fibrous patch that combines the advantages of electrospun nanofibers with the synergistic action of these two bioactive substances. Encapsulation preserves their stability, while the nanofibrous structure and large surface area facilitate their controlled and targeted release, minimizing direct exposure of the skin to high concentrations.

The composite fibers were characterized morphologically using Scanning Electron Microscopy (SEM), and the effect of encapsulation on fiber diameter was examined. Pure PCL fibers were smooth and uniform without beads, while samples containing the bioactive compounds displayed less uniformity, showing some localized swellings and bead formation, although the overall fiber diameter was not significantly affected. In addition, the cytotoxicity of the fibers was evaluated via the MTT assay using human embryonic kidney cells (HEK 293), and their anticancer activity was assessed against human hepatocellular carcinoma cells (Hep G2). The fibrous membranes exhibited excellent biocompatibility, as HEK 293 cell viability was comparable to that of the control. Moreover, PCL-Silybin and PCL-Quercetin samples showed a statistically significant reduction in cancer cell viability, with decreases of up to 36%. Finally, the antioxidant activity of the fibrous membranes against oxidative stress induced by H₂O₂ was notable, increasing the survival rate of cells exposed to 0.4 mM H₂O₂ by up to 27 percentage points and those exposed to 0.6 mM H₂O₂ by up to 37 percentage points.

Keywords

Electrospinning, Silybin, Quercetin, Encapsulation, Fibrous Membranes, Antioxidant Properties, Anticancer Properties

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία υλοποιήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στην Λάρισα στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Βιοτεχνολογία- Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος». Επιβλέποντας καθηγητής ήταν ο κ. Μαρράς Σωτήριος τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την υποστήριξή του, τη συνεχή ενασχόλησή του, τις συμβουλές και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ψαρρά για τη βοήθεια της, ιδιαίτερα για τα πειράματα στον χώρο των κυτταροκαλλιεργειών. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Τσιβιντζέλη και την Τσιώτα Σοφία για την βοήθεια και καθοδήγησή στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Φυσικοχημείας του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Σουΐλεμέζη Σταυρούλα για την πολύτιμη βοήθεια της στο εργαστήριο, καθώς ήταν πάντα πρόθυμη να με συμβουλέψει και να μοιραστεί τις γνώσεις της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για τη βοήθεια που μου προσέφεραν στον ομαλό εγκλιματισμό μου στο χώρο, καθώς και για τις χρήσιμες συμβουλές και την υποστήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους γονείς μου, Ασημίνα και Δημήτρη, που με την αμέριστη αγάπη και στήριξή τους αποτελούν τη σταθερή δύναμη πίσω από κάθε μου προσπάθεια.

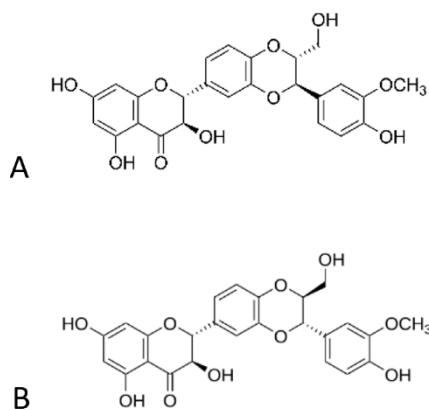
Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
ABSTRACT	iv
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	v
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Σιλυβίνη (Silybin) και Κερκετίνη (Quercetin)	1
1.2 Αντιοξειδωτική & Αντικαρκινική δράση Σιλυβίνης και Κερκετίνης	2
1.3 Σκοπός και Εφαρμογές Ενθυλάκωσης	3
1.4 Πολυ(ε-καπρολακτόνη) (PCL)	5
1.5 Σκοπός της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας	6
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	7
2.1 ΥΛΙΚΑ	7
2.1.1 Αναλώσιμα	7
2.1.2 Αντιδραστήρια-Διαλύτες	7
2.1.3 Οργανολογία	7
2.2 Μέθοδοι	8
2.2.1 Ηλεκτροστατική ινοποίηση (Electrospinning)	8
2.2.2 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)	11
2.2.3 Τεχνικές κυτταροκαλλιέργειών	12
2.2.3.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών HEK 293 & Hep G2:	13
2.2.3.2 Δημιουργία θρεπτικού μέσου	14
2.2.3.3 Απόψυξη κυττάρων	15
2.2.3.4 Θρυψινοποίηση κυττάρων	15
2.2.3.5 Ανακαλλιέργεια κυττάρων	16
2.2.3.6 Ψύξη κυττάρων	16
2.2.3.7 Μέτρηση και Στρώσιμο κυττάρων	17
2.2.3.8 Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας με δοκιμασία MTT (MTT assay)	18
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	20
3.1 Παραγωγή σύνθετων πολυμερικών μεμβρανών	20
3.2 Αποτελέσματα Μορφολογικής ανάλυσης με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)	20
3.3 Προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας HEK 293 και Hep G2	25
3.4 Αντιοξειδωτική δράση ινωδών μεμβρανών έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από H ₂ O ₂	27
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	30
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	31

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σιλυβίνη (Silybin) και Κερκετίνη (Quercetin)

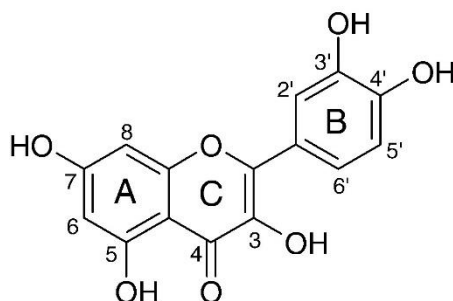
Η σιλυβίνη (silybin ή silibinin) είναι ένα φυσικό флаβονολιγνάνιο (μια ειδική κατηγορία флаβονοειδών που περιέχουν ένα μόριο λιγνάνης) που απομονώνεται από το γαϊδουράγκαθο (*Silybum marianum*), ένα φαρμακευτικό φυτό με ιστορική χρήση από την αρχαιότητα για τη θεραπεία ποικίλων παθήσεων. Αποτελεί το κύριο και πιο βιολογικά ενεργό συστατικό της σιλυμαρίνης, ενός φυτικού εκχυλίσματος που προέρχεται από τους σπόρους του γαϊδουράγκαθου (Surai, 2015). Η χημική της σύνθεση έχει μοριακό τύπο $C_{12}H_{22}O_{10}$ και εμφανίζεται ως ισομοριακό μίγμα δύο διαστερεομερών, τη σιλυβίνη Α και σιλυβίνη Β, τα οποία βρίσκονται σε σχεδόν ίση αναλογία. Έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζει εξαιρετική ηπατοπροστατευτική, νευροπροστατευτική, αντικαρκινική, αντιοξειδωτική, ανοσορρυθμιστική και αντιφλεγμονώδη δράση, και τα οφέλη της έχουν συγκριθεί και με άλλα флаβονοειδή (Spartali et al., 2024).



Εικόνα 1. Χημικές δομές των δύο διαστερεοϊσομερών της σιλυβίνης, Α και Β (Spartali et al., 2024).

Η δεύτερη ουσία που μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι η κερκετίνη (quercetin). Είναι γνωστή και ως κερσετίνη ή κουερσετίνη και αποτελεί μια φυσική φαρμακευτική ένωση που ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των πολυφαινόλων και ειδικότερα των флаβονοειδών. Πρόκειται για ένα από τα πιο σημαντικά флаβονοειδή, το οποίο έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει ισχυρή αντικαρκινική δράση, αναστέλλοντας την ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκινικών κυττάρων (Nathiya S, et. al., 2014). Η κερκετίνη βρίσκεται σε σημαντικές ποσότητες σε πολλά φυτά, με υψηλή συγκέντρωση σε λαχανικά, φρούτα, σπόρους και ξηρούς καρπούς, ενώ περιέχεται επίσης σε ροφήματα και προϊόντα όπως το τσάι, το

ελαιόλαδο και το κόκκινο κρασί. Λόγω της ευρείας παρουσίας της σε κοινές τροφές, αποτελεί συστατικό που είναι εύκολα προσβάσιμο μέσω της καθημερινής διατροφής του ανθρώπου (Sak, 2013).



Εικόνα 2. Μοριακή δομή της κερκετίνης (Boots et al., 2008).

1.2 Αντιοξειδωτική & Αντικαρκινική δράση Σιλυβίνης και Κερκετίνης

Σιλυβίνη

Το ήπαρ είναι ένα κύριο όργανο που εμπλέκεται στη βιομετατροπή τοξικών ουσιών που λαμβάνονται από τρόφιμα και φάρμακα. Οι τοξίνες που απορροφώνται από τον εντερικό σωλήνα εισέρχονται πρώτα στο ήπαρ, με αποτέλεσμα την πρόκληση διαφόρων ηπατικών διαταραχών (Surai, 2015). Η σιλυβίνη έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ευρέως φάσματος ηπατικών νόσων, όπως χρόνιες ηπατοπάθειες, κίρρωση και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, λόγω των αντιφλεγμονωδών, αντιοξειδωτικών και αντι-ινωτικών ιδιοτήτων της. Οι Vecchione et al. (2016) σε έρευνα που πραγματοποίησαν έδειξαν ότι η σιλυβίνη μειώνει τις ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) και την υπεροξειδωση των λιπιδίων (με μείωση έως και 57%), ενώ παράλληλα διατηρεί τη μιτοχονδριακή λειτουργία και τα επίπεδα ATP.

Επιπλέον, η σιλυβίνη έχει επιδείξει σημαντική ανασταλτική δράση σε διάφορους τύπους όγκων, όπως σε μαστού, νεφρού, ουροδόχου κύστης, πνεύμονα και παχέος εντέρου, σε αρκετά μοντέλα *in vitro* και *in vivo* (Boojar et al., 2020). Σε μια μελέτη οι Dobiasová et al. (2020) πραγματοποίησαν πειράματα που σχετίζονταν με τον καρκίνο και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα παράγωγα της σιλυβίνης μπορούν να ρυθμίζουν τον κυτταρικό θάνατο και την αντοχή στα φάρμακα. Για παράδειγμα, η 2,3-δεϋδροσιλυβίνη A και η σιλυβίνη B αναστέλλουν τη P-γλυκοπρωτεΐνη και καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων πολυφαρμακευτικής αντοχής σε κύτταρα καρκινώματος ωοθηκών ανθεκτικά στη δοξορουβικίνη. Επίσης, η 2,3-δεϋδροσιλυβίνη προκαλεί απόπτωση και αναστολή MMPs (μεταλλοπρωτεϊνών) σε κύτταρα ηπατικού καρκίνου σε συγκεντρώσεις μόλις 30 μΜ.

Επιπρόσθετα, η σιλυβίνη εμφανίζει νευροπροστατευτικές ιδιότητες έναντι νευρολογικών νοσημάτων, όπως νόσος Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον και εγκεφαλική ισχαιμία, πιθανώς μέσω της αναστολής του οξειδωτικού στρες στον εγκέφαλο (Wang et al., 2015; Borah et al., 2013). Ωστόσο, η χαμηλή διαλυτότητά της στο νερό, η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα και ο σύντομος χρόνος ημιζωής της, περιορίζουν ουσιαστικά τη θεραπευτική της αποτελεσματικότητα (Seo et al., 2024).

Κερκετίνη

Η κερκετίνη δρα ως αντιοξειδωτικό σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, εξουδετερώνοντας τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και προστατεύοντας τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη (Neuwirthová et al., 2018). Οι επιδράσεις της κερκετίνης είναι δόσοεξαρτώμενες, κάποιες *in vitro* μελέτες αναφέρουν αποτελεσματικές συγκεντρώσεις από 1 nanomolar έως 150 micromolar, ενώ σε μελέτες σε ζώα χρησιμοποιούνται δόσεις 50–200 mg/kg (Almatroodi et al., 2021; Neuwirthová et al., 2018; Sundaram et al., 2019). Επίσης, μπορεί να ενισχύσει την αποτελεσματικότητα της αντικαρκινικής θεραπείας και να προστατεύσει τα μη καρκινικά κύτταρα από τις παρενέργειες των σύγχρονων θεραπειών (Neuwirthová et al., 2018).

Μελετώντας την κυτταροτοξικότητα της κερκετίνης, παρατηρήθηκε ότι η δράση της μεταβάλλεται ανάλογα με τον τύπο καρκίνου και την κυτταρική σειρά. Μελέτες και ανασκοπήσεις δείχνουν ότι οι πιο επιθετικοί τύποι καρκίνου, όπως αυτοί του αίματος, του εγκεφάλου, των πνευμόνων και το μελάνωμα, παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στην κερκετίνη. Οι αποκρίσεις διαφέρουν ανάλογα με την περιοχή του όγκου, με μεταβλητές τιμές της συγκέντρωσης IC₅₀ και των ποσοστών ανταπόκρισης. Οι Hashemzaei et al. (2017) μελέτησαν καρκινικές κυτταρικές σειρές από το παχύ έντερο και τον μαστό κάνοντας *in vivo* και *in vitro* πειράματα και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ομάδα που έλαβε κερκετίνη παρουσίασε σημαντική μείωση του καρκινικού όγκου σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

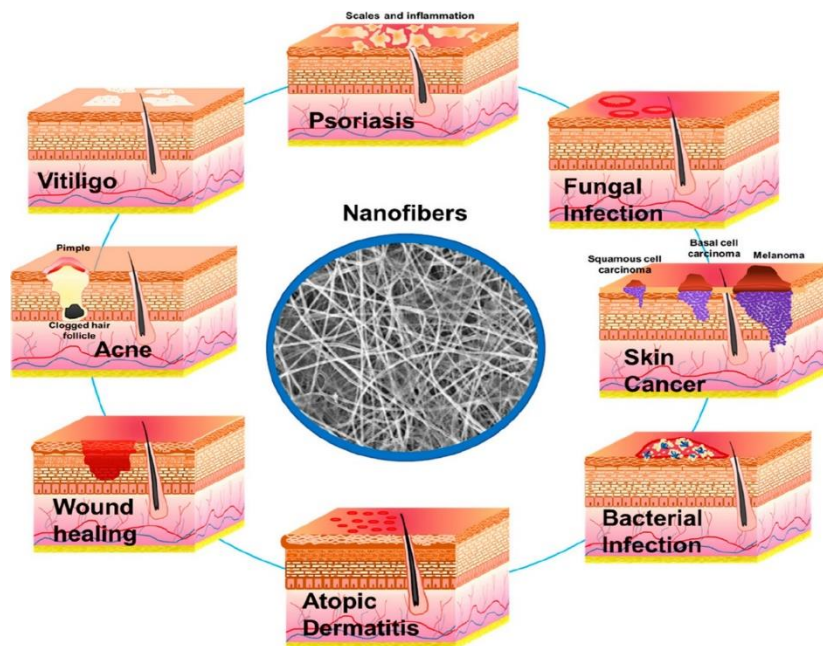
Η κερκετίνη, λοιπόν, αποτελεί μια φυσική ουσία με αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, όμως οι θεραπευτικές της εφαρμογές είναι περιορισμένες λόγω του σύντομου χρόνου ημιζωής της στα βιολογικά υγρά. Επιπλέον, η ελλιπής διαλυτότητα και η περιορισμένη φυσικοχημική της σταθερότητα επηρεάζουν αρνητικά την αποτελεσματικότητά της, γεγονός που έχει οδηγήσει στην αναζήτηση εναλλακτικών μεθόδων χρήσης για την υπέρβαση αυτών των περιορισμών. Μία από αυτές τις μεθόδους είναι η ενσωμάτωση της κερκετίνης σε νανοδομές από βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή, με στόχο την ελεγχόμενη μεταφορά και σταδιακή απελευθέρωσή της, η οποία καθορίζεται από τον ρυθμό αποδόμησης του κάθε πολυμερούς (D'Archivio et al., 2010).

1.3 Σκοπός και Εφαρμογές Ενθυλάκωσης

Η τεχνική του εγκλεισμού ουσιών έχει μελετηθεί εκτενώς, την τελευταία δεκαετία, σε διάφορους κλάδους, όπως η φαρμακευτική, η γεωπονία, η κοσμετολογία, η βιομηχανία τροφίμων και υφασμάτων (Ghosh, 2006). Στη φαρμακευτική ειδικότερα,

η εφαρμογή του εγκλεισμού έχει ξεπεράσει τις παραδοσιακές μεθόδους χορήγησης φαρμάκων, οι οποίες παρουσίαζαν περιορισμούς και έλλειψη ευελιξίας. Αναλυτικότερα, η μέθοδος του εγκλεισμού φαρμακευτικών ουσιών βρίσκει εφαρμογή σε ένα ευρύ φάσμα χρήσεων, καθώς συμβάλλει στην ελεγχόμενη απελευθέρωση της δραστικής ουσίας και στη στοχευμένη μεταφορά της σε συγκεκριμένους ιστούς ή όργανα. Παράλληλα, επιτρέπει την απόκρυψη ή εξουδετέρωση δυσάρεστων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, όπως η έντονη γεύση ή οσμή, ενώ προσφέρει σημαντική προστασία σε ευαίσθητα συστατικά. Επιπλέον, ενισχύει τη σταθερότητα των μορίων απέναντι σε εξωτερικούς παράγοντες, όπως το οξυγόνο, τη θερμοκρασία, την υγρασία και το φως, μειώνει την εξάτμιση πτητικών ενώσεων και συμβάλλει στον έλεγχο ή τη μείωση της τοξικότητας. Τέλος, διευκολύνει τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων μορφών δοσολογίας, ενισχύοντας τη συνολική αποτελεσματικότητα των φαρμακευτικών προϊόντων (Armendáriz-Barragán et al., 2016; Singh & Pai, 2014; S. Singh, 2010).

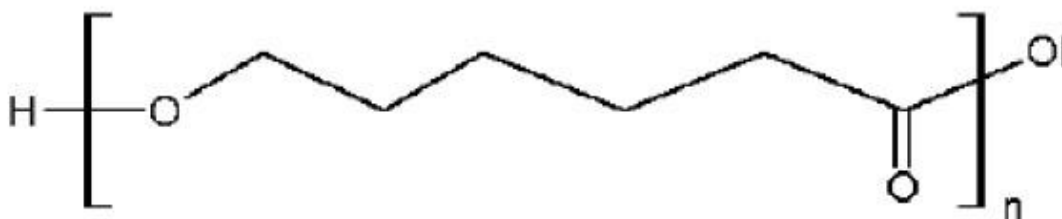
Ο εγκλεισμός φαρμακευτικών ουσιών σε νανοϊνές με την τεχνική της ηλεκτροστατικής ινοποίησης έχει προσελκύσει σημαντικό ενδιαφέρον, όχι μόνο λόγω της απλότητας της διαδικασίας, αλλά και εξαιτίας της χαρακτηριστικής μορφολογίας και της μεγάλης ειδικής επιφάνειας των παραγόμενων ινών. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά προσδίδουν στις ίνες μοναδικές ιδιότητες, καθιστώντας τις κατάλληλες για εφαρμογές στην αναγέννηση ιστών και ευρύτερα στην αναγεννητική ιατρική. Ενδεικτικά, η σύσταση των ινών που προκύπτουν μέσω αυτής της μεθόδου τους επιτρέπει να μιμούνται τη φυσική εξωκυττάρια μήτρα, επιταχύνοντας την κυτταρική ανάπτυξη και την ανάπλαση των τραυματισμένων ιστών (S. Singh, 2010). Επίσης, η ενθυλάκωση συμβάλλει στην ενισχυμένη σταθερότητα και διατήρηση της βιοδραστικότητας των συστατικών, προστατεύοντας τις πολυφαινόλες και τις ταννίνες του εκχυλίσματος από την αποικοδόμηση που προκαλείται από οξείδωση, φως ή αυξημένη θερμοκρασία. Με τον τρόπο αυτό, διασφαλίζεται η αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων τους στο τελικό προϊόν (Lameirão et al., 2020). Επιπλέον, η ενθυλάκωση μειώνει την άμεση επαφή του δέρματος με υψηλές συγκεντρώσεις ταννινών ή φυτικών αποσταγμάτων, τα οποία ενδέχεται να προκαλέσουν ερεθισμό. Έτσι, επιτυγχάνεται η ελεγχόμενη και ήπια απελευθέρωση των δραστικών ουσιών, γεγονός που καθιστά τη χρήση τους πιο ασφαλή, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ευαίσθητου ή φλεγμονώδους δέρματος. Πρόκειται για μια βασική αρχή που διέπει τη χρήση νανοφορέων και τεχνολογιών ενθυλάκωσης (Pant et al., 2019). Γενικότερα, τα επιθέματα που έχουν παρασκευαστεί με την τεχνική της ηλεκτροστατικής ινοποίησης παρουσιάζονται ως ιδιαιτέρως αποτελεσματικά συστήματα δερματικής/διαδερμικής χορήγησης δραστικών ουσιών σε διάφορες θεραπείες για δερματικές παθήσεις, επούλωση τραυμάτων, προβλήματα ακμής και φλεγμονών (Εικόνα 3) (Tomar et al., 2023).



Εικόνα 3. Νανοΐνες ως φορείς για στοχευμένη τοπική θεραπεία δερματικών παθήσεων (Tomar et al., 2023).

1.4 Πολυ(ε-καπρολακτόνη) (PCL)

Η πολυ(ε-καπρολακτόνη) (PCL) (Εικόνα 4) ανήκει στους αλειφατικούς πολυεστέρες και χαρακτηρίζεται από ημικρυσταλλική δομή. Πρόκειται για ένα υλικό που έχει προσελκύσει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον στον τομέα των βιοϋλικών, κυρίως λόγω της κατεργασιμότητάς του και της ευρείας διαλυτότητάς του σε ποικιλία οργανικών διαλυτών. Ένα από τα πιο καθοριστικά χαρακτηριστικά της είναι η δυνατότητα βιοαποικοδόμησής της, η οποία αρχικά εντοπίστηκε μέσω μικροβιακής δράσης και στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί και εντός του θηλαστικού οργανισμού, μέσω μηχανισμών υδρόλυσης υπό φυσιολογικές συνθήκες (C. G. Pitt et al., 1981; G. Pitt et al., 1981; C. G. Pitt et al., 1984). Σε σύγκριση με άλλα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή όπως το γαλακτικό οξύ και το γλυκολικό οξύ, η PCL παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερο ρυθμό αποικοδόμησης. Η μηχανική της αντοχή διατηρείται για διάστημα που υπερβαίνει τους 24 μήνες, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη για τη σχεδίαση εμφυτεύσιμων συστημάτων παρατεταμένης διάρκειας (Generali et al., 2017). Η PCL παρουσιάζει επίσης ορισμένες ιδιότητες που δεν είναι κοινές σε άλλους αλειφατικούς πολυεστέρες, με πιο αξιοσημείωτες το πολύ χαμηλό σημείο υαλώδους μετάβασης στους -60°C , τη σχετικά χαμηλή θερμοκρασία τήξης στους 57°C , καθώς και την αυξημένη θερμική της σταθερότητα (Agarwal et al., 2013; Ma, 2004).



Εικόνα 4. Η χημική δομή της Πολύ(ε-καπρολακτόνης) (PCL) (Mahapatro & Singh, 2011).

Μία από τις θεμελιώδεις ιδιότητες της πολυ(ε-καπρολακτόνης) (PCL), που την καθιστά ιδιαίτερα σημαντική, είναι η ικανότητά της να σχηματίζει συμβατά μείγματα με πληθώρα άλλων πολυμερών (Koleske, 1978). Παράλληλα, η ε-καπρολακτόνη μπορεί να συμμετάσχει σε συμπολυμερισμό με διάφορα μονομερή. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα συμπολυμερή που προκύπτουν από τον συνδυασμό της ε-καπρολακτόνης με το γαλακτικό οξύ, τα οποία έχουν μελετηθεί εις βάθος (C. G. Pitt et al., 1981; Feng et al., 1983). Ορισμένα από αυτά τα υλικά έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ινών μέσω ηλεκτροϊνοποίησης, με στόχο τη δημιουργία ικριωμάτων για εφαρμογές στην ιστομηχανική, και ειδικότερα για την αναγέννηση αγγειακών ιστών, παρουσιάζοντας ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Xu et al., 2004). Τέλος, αναφορικά με την ασφάλεια της PCL, έχει διεξαχθεί εκτεταμένη τοξικολογική αξιολόγηση, σύμφωνα με την οποία τόσο το μονομερές ε-καπρολακτόνη όσο και το πολυμερές πολυ(ε-καπρολακτόνη) κρίνονται ως μη τοξικά και συμβατά με τους βιολογικούς ιστούς (Sun et al., 2017).

1.5 Σκοπός της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η ενσωμάτωση της σιλυβίνης, της κερκετίνης καθώς και ισόποσων μερών και των δύο ουσιών σε ίνες του πολυμερούς πολυ(ε-καπρολακτόνη) (PCL), μέσω της τεχνικής της ηλεκτροστατικής ινοποίησης. Ο συνδυασμός των δύο ουσιών αποσκοπεί στη διερεύνηση της πιθανότητας άσκησης συνεργιστικής δράσης στοχεύοντας διαφορετικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στις αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες τους. Παράλληλα, εξετάστηκαν η μορφολογία και οι βιοχημικές ιδιότητες των παραγόμενων ινωδών δομών. Μακροπρόθεσμος στόχος της έρευνας είναι η ανάπτυξη βιοδραστικών μεμβρανών με δυνατότητες εφαρμογής στους τομείς της βιοϊατρικής, της φαρμακευτικής και της κοσμητολογίας, οι οποίες θα συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των ινών πολύ μικρής διαμέτρου που παράγονται και τη βιοδραστικότητα των δύο ουσιών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Αναλώσιμα

- Μικροπλακίδιο 96 θέσεων, Thermo Fisher Scientific
- Πιπέτες των 2, 5, 10 και 25 mL, Thermoscientific
- Φιαλίδια (Falcon) & Tips πιπέτας 10-1000μL
- Φιαλίδια του 1,5 mL, Eppendorf
- Φιαλίδια κατάψυξης (cryovials- κρυοφιαλίδια)
- Φλάσκες T25 & T75 (25 cm² & 75 cm² επιφάνεια), Orange scientific

2.1.2 Αντιδραστήρια-Διαλύτες

- Silybin (CAS 22888-70-6), Chem Cruz, sc-202812A
- Quercetin
- Poly-ε-caprolactone (PCL), Aldrich Chemical Co
- Dichloromethane (DCM), Fluka
- Dimethylformamide (DMF), Fluka
- Dimethylacetamide (DMA), Fluka
- Phosphate buffered saline tablet, P4417-50TAB, Sigma
- MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), VWR
- Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) High Glucose with Sodium Pyruvate, Biowest (θρεπτικό υλικό)
- Fetal Bovine Serum (FBS), Biowest
- Trypsin-EDTA 1X in PBS, Biowest
- Penicillin- Streptomycin Solution 100x, Biowest
- L-Glutamine 100x 200mM, Biowest
- Dimethyl sulfonyl Chloride (DMSO), Panreac Applichem
- PBS, Gipro
- H₂O₂ , Th. geyer
- Isopropanol, Aldrich Chemical Co
- Ethanol, Bionlov

2.1.3 Οργανολογία

- Electrospinning:
 - Τροφοδοσία διαλύματος: YUMPU, 975/2274 Harvard Apparatus
 - Παροχή υψηλής τάσης: SpellmanHigh Voltage DC SUPPLY, RHR30P30
 - High Volume Power, Spellman-CZE1000R

- Θάλαμος κενού αέρος, Shanghai Laboratory Instrument Work Co. Ltd, 320 Pa,
- Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης SEM, JEOL JSM-6510
- Carbon Coater (μοντέλο Q150R), Quorum
- Φασματοφωτόμετρο UV-Vis (μοντέλο Lambda Bio+), PerkinElmer
- Αυτόματοι πιπιεταδόροι τύπου Gilson
- Σετ φλατζοκόφτη (μοντέλο 0800320), M. Paffrath oHG
- Θερμενόμενος μαγνητικός αναδευτήρας, Thermolyne
- Υδατόλουτρο, Selecta WiseBath
- Φυγόκεντρος (μοντέλο BR 4i), Jouan
- Επωαστικός κλίβανος CO₂ (μοντέλο Galaxy 170S), New Brunswick
- Πλάκα Neubauer (αιμοκυτταρόμετρο), Heinz Herenz
- Ανάστροφο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης, Krüss Optronic Germany
- Θάλαμος καθέτου νηματικής ροής (Laminar flow hood) μικροβιολογικής ασφάλειας επιπέδου II (μοντέλο AV-30/70), Telstar
- Θερμαντική πλάκα heat-block, Thermoleader
- Κυκλομείκτες (vortex), Kisker
- Φασματοφωτόμετρο ανάγνωσης πλακιδίων 96 μικροϋποδοχών (μοντέλο Enspire 2300), PerkinElmer

2.2 Μέθοδοι

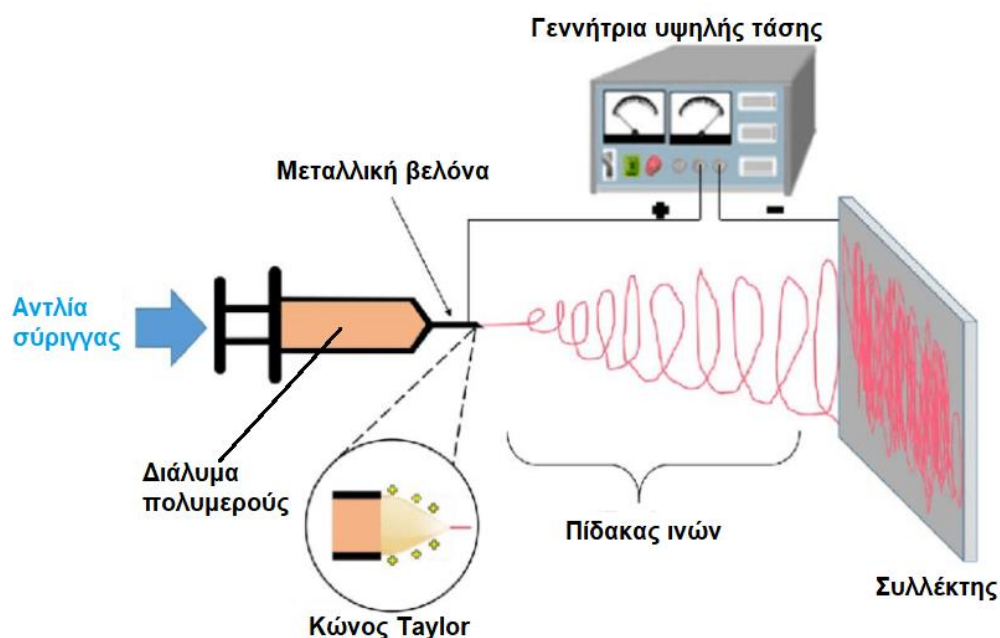
2.2.1 Ηλεκτροστατική ινοποίηση (Electrospinning)

Η ηλεκτροστατική ινοποίηση είναι μια μέθοδος απλή, αποδοτική και χαμηλού κόστους η οποία μπορεί να εφαρμοστεί σε βιομηχανικό επίπεδο. Χρησιμοποιείται για την παραγωγή πολύ λεπτών ινών στη κλίμακα των νανομέτρων (από 3nm έως και πάνω από 5μm) από διάφορα πολυμερή υλικά, εφαρμόζοντας ένα ηλεκτρικό πεδίο υψηλής τάσης (Marras et al., 2008; C. Zhang et al., 2020). Παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό και τεχνολογικό ενδιαφέρον για εφαρμογές που σχετίζονται με συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης (Arampatzis et al., 2021; Kontogiannopoulos et al., 2011). Οι μοναδικές ιδιότητες των μεμβρανών που προκύπτουν καθιστούν δυνατή την αξιοποίησή τους σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, που περιλαμβάνει την καθαρότερη ενέργεια, την προστασία του περιβάλλοντος, την προηγμένη κλωστοϋφαντουργία, καθώς και κρίσιμους βιοϊατρικούς τομείς όπως η αναγέννηση ιστών, η αντιμετώπιση δερματικών φλεγμονών (Tomar et al., 2023).

Μία τυπική οριζόντια διάταξη ηλεκτροστατικής ινοποίησης με βελόνα παροχής παρουσιάζεται στην Εικόνα 5. Τα βασικά εξαρτήματα από τα οποία αποτελείται είναι (Leão & Araújo, 2019):

- μία βελόνα από ανοξείδωτο χάλυβα με αμβλύ άκρο ή ένας τριχοειδής σωλήνας,
- μία αντλία, που ο ρόλος της είναι να μετακινεί τη σύριγγα τροφοδοσίας, που περιέχει το προς ινοποίηση διάλυμα πολυμερούς,
- ένα τροφοδοτικό – πηγή παροχής υψηλής τάσης και
- ένα συλλέκτη των ινών που παράγονται.

Αρχικά, τοποθετείται στη σύριγγα το πολυμερικό διάλυμα. Κατά την διάρκεια της διεργασίας, εφαρμόζεται υψηλή τάση μεταξύ της βελόνας και του συλλέκτη. Η σταγόνα του διαλύματος στο ακροφύσιο της σύριγγας φορτίζεται ηλεκτρικά και τα προκαλούμενα φορτία κατανέμονται ομοιόμορφα στην επιφάνειά της. Στη συνέχεια, η σταγόνα λόγω δύο τύπων ηλεκτροστατικών δυνάμεων που δέχεται (την ηλεκτροστατική απώθηση μεταξύ των όμοιων επιφανειακών φορτίων και τη δύναμη Coulomb από το εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο), μετατρέπεται από σφαιρικό σχήμα σε κωνικό, γνωστό και ως «κώνο του Taylor». Μόλις η ένταση του πεδίου ξεπεράσει μια οριακή τιμή, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις υπερσχύουν της επιφανειακής τάσης του διαλύματος, γεγονός που οδηγεί στον σχηματισμό και την εκτίναξη πίδακα από το άκρο της βελόνας. Εξαιτίας της αλληλεπίδρασης του πίδακα, του εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου και των δυνάμεων εξώθησης στο εσωτερικό του θαλάμου, ο πίδακας υφίσταται τανυσμό και μετασχηματίζεται, σε μία μακριά και λεπτή ίνα. Καθώς ο πίδακας κατευθύνεται προς τον συλλέκτη, ο διαλύτης εξατμίζεται και η ταχύτητα που αναπτύσσεται οδηγεί στην εναπόθεση ενός στρώματος πολύ λεπτών πολυμερικών ινών στον συλλέκτη (Raghavan et al., 2012).



Εικόνα 5. Διάταξη ηλεκτροστατικής ινοποίησης (Leão & Araújo, 2019).

Η μέθοδος της ηλεκτροστατικής ινοποίησης, η δημιουργία καθώς και η τελική μορφολογία των παραγόμενων νανοϊνών εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες. Οι σημαντικότεροι είναι οι εξής (Kai et al., 2014; Kayaci et al., 2014; Mohammadi et al., 2020; Angammana & Jayaram, 2011):

α. Τις ιδιότητες του διαλύματος και του πολυμερούς, όπως

- Την συγκέντρωση του πολυμερούς στο διάλυμα: Η μείωση της συγκέντρωσης τείνει να οδηγεί στον σχηματισμό ινών μικρότερης διαμέτρου. Ωστόσο, όταν η συγκέντρωση είναι υπερβολικά χαμηλή, περιορίζονται οι αλληλεπιδράσεις

μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων, γεγονός που καθιστά δύσκολο τον σχηματισμό σταθερών ινών. Αντιθέτως, η αύξηση της συγκέντρωσης συνοδεύεται από άνοδο του ιξώδους και της επιφανειακής τάσης, με αποτέλεσμα να απαιτείται υψηλότερη εφαρμοζόμενη τάση για την επίτευξη ινώδους εκβολής.

- *Το ιξώδες του διαλύματος:* Η μείωση του ιξώδους συνήθως οδηγεί στον σχηματισμό ινών μικρότερης διαμέτρου, καθώς το διάλυμα ρέει πιο εύκολα και επιμηκύνεται ευκολότερα. Ωστόσο, πολύ χαμηλές τιμές ιξώδους μπορεί να μην εξασφαλίζουν την απαιτούμενη συνοχή για τον σχηματισμό συνεχών ινών. Αντίθετα, υψηλό ιξώδες δυσχεραίνει τη ροή του διαλύματος μέσω της βελόνας, επηρεάζοντας αρνητικά τη διαδικασία εκτόξευσης.
- *Το μοριακό του βάρος του πολυμερούς,* το οποίο πρέπει να είναι επαρκώς υψηλό, ώστε να εξασφαλίζεται ο σχηματισμός συνεχών και λείων νανοϊνών, χωρίς εμφάνιση συσσωματωμάτων ή ασυνεχειών στη μορφολογία.
- *Την επιφανειακή τάση του διαλύματος:* Η μείωση της επιφανειακής τάσης του διαλύματος ευνοεί τον σχηματισμό ινών χωρίς σφαιρίδια, ενώ η αύξησή της προκαλεί αστάθεια του πίδακα και την εμφάνιση σφαιριδίων, τα οποία την καταστρέφουν.
- *Την ηλεκτρική αγωγιμότητα:* Η αύξηση της αγωγιμότητας του διαλύματος συμβάλλει συνήθως στον σχηματισμό ινών μικρότερης διαμέτρου, λόγω της ενίσχυσης των ηλεκτροστατικών δυνάμεων που επιμηκύνουν τον πίδακα. Ωστόσο, τόσο πολύ υψηλές όσο και πολύ χαμηλές τιμές αγωγιμότητας μπορεί να αποτρέψουν τον σταθερό σχηματισμό του κώνου Taylor, καθιστώντας τη διαδικασία μη αποτελεσματική.
- *Αποτελεσματικότητα διαλύτη:* Ο διαλύτης πρέπει να έχει επαρκή διαλυτότητα ώστε να δημιουργείται ένα ομογενές πολυμερικό διάλυμα χωρίς αδιάλυτα σωματίδια.
- *Την πτητικότητα διαλύτη:* Θα πρέπει να είναι επαρκής ώστε να επιτρέπει την εξάτμισή του πριν η ίνα φτάσει στον συλλέκτη, αποτρέποντας τη δημιουργία υγρών ινών. Ωστόσο, υπερβολικά υψηλή πτητικότητα μπορεί να προκαλέσει πρόωρη εξάτμιση του διαλύτη στο άκρο της βελόνας, οδηγώντας σε απόφραξή της και διακοπή της διαδικασίας.

β. Περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως

- *Η θερμοκρασία:* Η διάμετρος των παραγόμενων ινών εξαρτάται από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Συγκεκριμένα, με την αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνεται η εξάτμιση του διαλύτη και μειώνεται το ιξώδες του πολυμερικού διαλύματος, γεγονός που οδηγεί σε μείωση της διαμέτρου των ινών.
- *Η υγρασία:* Επηρεάζει σημαντικά τη μορφολογία των ινών. Όταν ξεπερνά το 25%, οι ίνες χάνουν την ομαλότητά τους και αρχίζουν να εμφανίζουν πόρους στην επιφάνειά τους. Με περαιτέρω αύξηση της υγρασίας, αυξάνονται τόσο το μέγεθος όσο και ο αριθμός των πόρων. Επιπλέον, η υγρασία φαίνεται να επηρεάζει και τη διάμετρο των ινών, καθώς υψηλότερα επίπεδα σχετίζονται με μείωσή της.

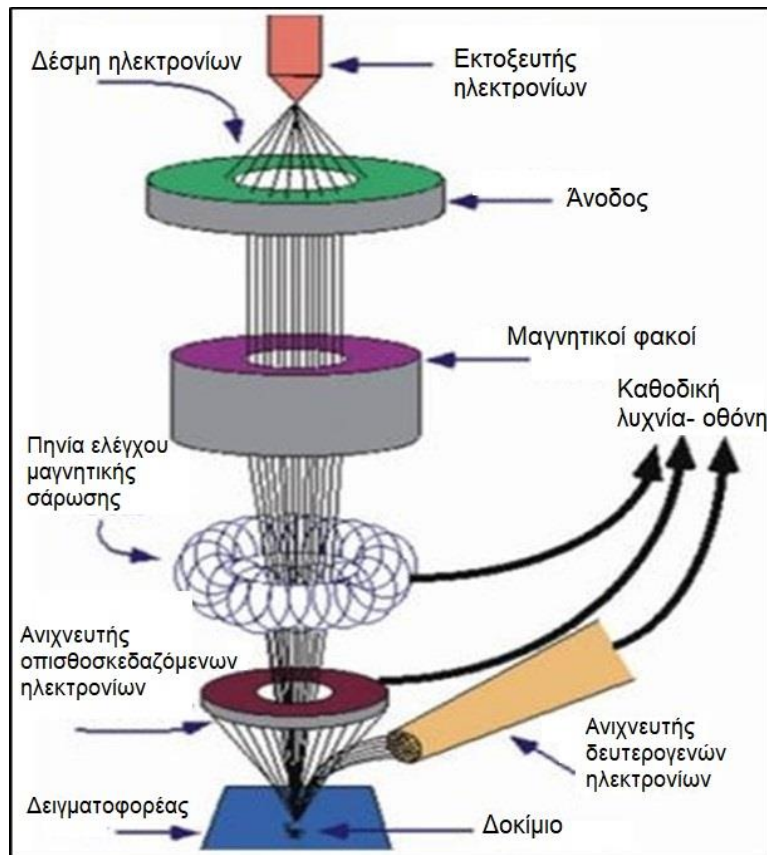
γ. Τις συνθήκες διεργασίας, όπως

- *Η τάση:* Όταν η εφαρμοζόμενη τάση είναι πολύ χαμηλή, δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός ινών. Με την αύξησή της και τη διατήρησή της σε βέλτιστα επίπεδα, επιτυγχάνεται η παραγωγή ομοιόμορφων ινών μικρότερης διαμέτρου. Ωστόσο, εάν η τάση αυξηθεί υπερβολικά, οι ίνες παύουν να είναι ομοιόμορφες και αρχίζουν να σχηματίζονται σφαιρίδια.
- *Η απόσταση βελόνας-χώρου συλλογής:* Η απόσταση βελόνας-συλλέκτη επηρεάζει την εξάτμιση του διαλύτη και τη μορφολογία των ινών. Μικρές αποστάσεις μπορεί να δώσουν υγρές ή ατελείς ίνες, ενώ μεγαλύτερες απαιτούν αυξημένη τάση. Συνήθως επιλέγεται απόσταση 10–15 cm.
- *Ο ρυθμός ροής του διαλύματος:* Για την παραγωγή ομοιόμορφων ινών, απαιτείται βέλτιστος ρυθμός ροής, ώστε να διατηρείται σταθερός ο «κώνος του Taylor». Η κατάλληλη τιμή εξαρτάται από το πολυμερές που χρησιμοποιείται. Χαμηλοί ρυθμοί ροής οδηγούν σε ίνες μικρότερης διαμέτρου, ενώ υψηλοί ρυθμοί δημιουργούν παχύτερες ίνες ή ίνες με σφαιρίδια, λόγω ανεπαρκούς χρόνου στεγνώματος.

2.2.2 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

Η μορφολογική ανάλυση και ο προσδιορισμός της διαμέτρου των παραγόμενων ινών πραγματοποιήθηκαν μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM), η οποία αποτελεί μία τεχνική υψηλής ανάλυσης που επιτρέπει την λεπτομερή απεικόνιση της επιφανειακής δομής των υλικών. Η λειτουργία του σαρωτικού ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (SEM) βασίζεται στην αλληλεπίδραση της προσπίπτουσας δέσμης ηλεκτρονίων με το υπό εξέταση δείγμα. Το μικροσκόπιο αποτελείται από τέσσερα βασικά υποσυστήματα: το σύστημα δημιουργίας της δέσμης ηλεκτρονίων, το σύστημα καθοδήγησης της δέσμης, το σύστημα συλλογής πληροφοριών και το σύστημα κενό (Geremew, 2022; Inkson, 2016). Κατά τη λειτουργία του μικροσκοπίου δεν χρησιμοποιείται φως, όπως συμβαίνει στο οπτικό μικροσκόπιο, με αποτέλεσμα οι παραγόμενες εικόνες να είναι ασπρόμαυρες (Geremew, 2022).

Η λειτουργία του σαρωτικού ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (SEM) βασίζεται σε μια σειρά σταδίων που επιτρέπουν την παραγωγή εικόνων υψηλής ανάλυσης (Εικόνα 6). Αρχικά, η δέσμη ηλεκτρονίων παράγεται από την ηλεκτρονική πηγή και επιταχύνεται προς το δείγμα μέσω εφαρμογής θετικού ηλεκτρικού δυναμικού. Στη συνέχεια, η δέσμη διέρχεται από μεταλλικά διαφράγματα, ηλεκτρομαγνητικούς φακούς και πηνία σάρωσης, τα οποία επιτρέπουν τη διαμόρφωση μιας λεπτά εστιασμένης και μονοχρωματικής δέσμης, η οποία σαρώνει συστηματικά την επιφάνεια του δείγματος. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της δέσμης και του δείγματος παράγουν διάφορα σήματα, τα οποία ανιχνεύονται από κατάλληλους ανιχνευτές και μετατρέπονται σε εικόνες, αποκαλύπτοντας λεπτομερείς πληροφορίες για τη μορφολογία και τη σύσταση της επιφάνειας (Geremew, 2022).



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (SEM) (Geremew, 2022).

2.2.3 Τεχνικές κυτταροκαλλιεργειών

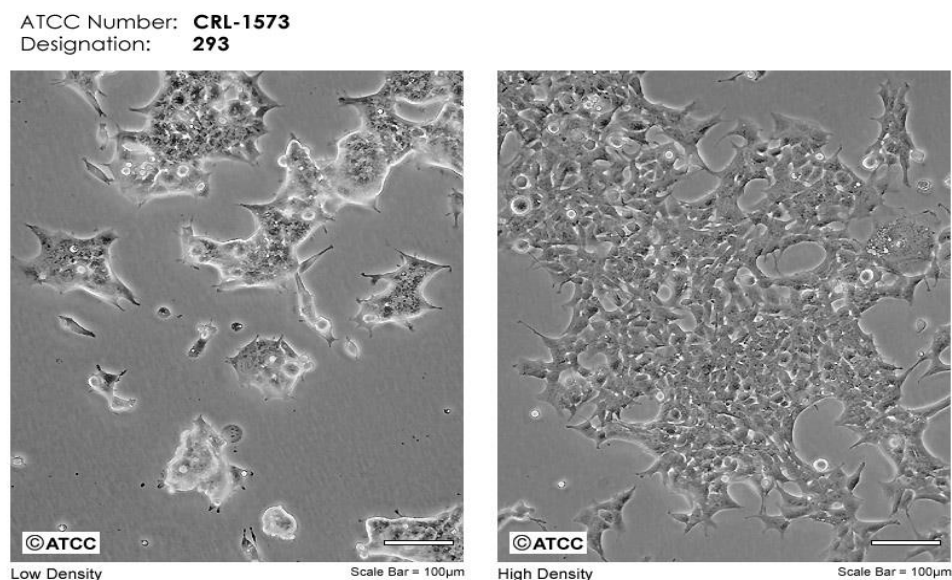
Η κυτταροκαλλιέργεια σε εργαστηριακό περιβάλλον επιτρέπει τη μελέτη της επίδρασης διαφόρων ουσιών σε ευκαρυωτικά κύτταρα, συμβάλλοντας έτσι στη μείωση της χρήσης πειραματόζων. Οι διαδικασίες πραγματοποιούνται σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο, υπό ασηπτικές συνθήκες και μέσα σε κλίβανο καθέτου νηματικής ροής, ώστε να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος επιμολύνσεων. Για τον σκοπό αυτό, εφαρμόζονται συγκεκριμένα μέτρα, όπως η χρήση κατάλληλης εργαστηριακής ένδυσης, η αποστείρωση υλικών και καλλιεργητικών μέσων, η απολύμανση αντικειμένων με αιθανόλη 70% πριν την είσοδό τους στον θάλαμο, καθώς και η αποστείρωση του εσωτερικού του με υπεριώδη ακτινοβολία για 30 λεπτά πριν και μετά τη χρήση. Η παρακολούθηση της κατάστασης των κυττάρων γίνεται τακτικά με μικροσκόπιο, προκειμένου να διασφαλίζεται η ομαλή ανάπτυξή τους.

2.2.3.1 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών HEK 293 & Hep G2:

HEK 293

Η εμβρυϊκή κυτταρική σειρά HEK-293 (Human Embryonic Kidney 293) αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες κυτταρικές σειρές στη βιοϊατρική έρευνα και τη βιοτεχνολογία (Stepanenko & Dmitrenko, 2015) (Εικόνα 7). Δημιουργήθηκε το 1973 από τον επιστήμονα Frank Graham στο Πανεπιστήμιο του Leiden (Ολλανδία), με τη μεταφορά DNA του ανθρώπινου αδενοϊού τύπου 5 σε εμβρυϊκά ανθρώπινα νεφρικά κύτταρα. Το “293” προέρχεται από τον αριθμό του πειράματος κατά τη διάρκεια της δημιουργίας της σειράς.

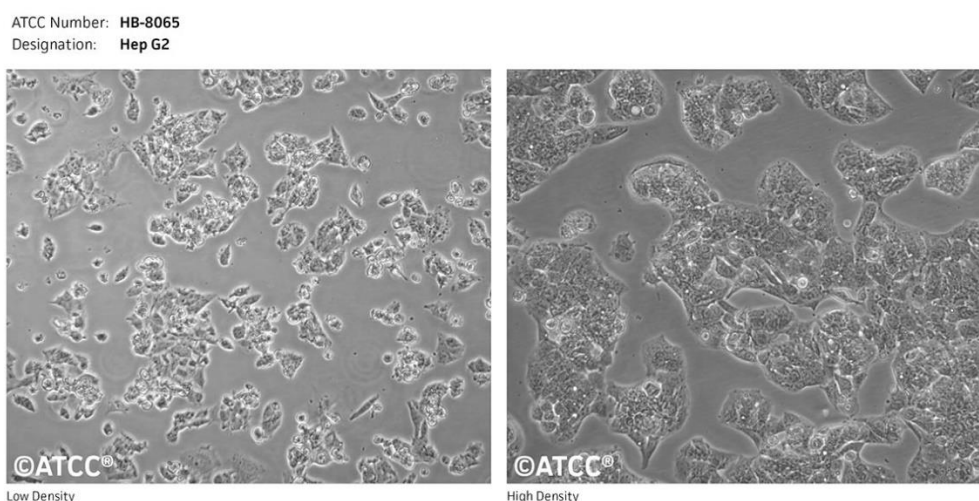
Η κυτταρική αυτή σειρά διαθέτει ορισμένα χαρακτηριστικά που την καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμη. Αρχικά, καλλιεργείται εύκολα στο εργαστήριο και επιτρέπει την αποδοτική εισαγωγή γενετικού υλικού, γεγονός που την καθιστά κατάλληλη για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και ιικών φορέων, όπως αυτοί που χρησιμοποιούνται στη γονιδιακή θεραπεία και τα εμβόλια. Επίσης, παρότι προέρχεται από εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα, παρουσιάζει χαρακτηριστικά πρόδρομων κυττάρων με στοιχεία τόσο νεφρικής όσο και νευρωνικής ή επινεφριδιακής διαφοροποίησης. Ωστόσο, εμφανίζει αστάθεια στον καρυότυπο και είναι ογκογόνα (tumorigenic), λόγω της ενσωμάτωσης γενετικού υλικού του αδενοϊού, κάτι που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη σε ευαίσθητες εφαρμογές (Malm et al., 2021; Stepanenko & Dmitrenko, 2015).



Εικόνα 7. Εμβρυϊκή κυτταρική σειρά HEK 293 (πηγή: ATCC).

Hep G2

Η Hep G2 είναι μια ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά (Εικόνα 8) που προέρχεται από ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (hepatocellular carcinoma) ενός 15χρονου αγοριού. Χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοϊατρική έρευνα για τη μελέτη της ηπατικής λειτουργίας, του μεταβολισμού, της αποτοξίνωσης και της φαρμακοκινητικής, καθώς και για τον έλεγχο ηπατοτοξικότητας φαρμάκων και ουσιών (Arzumanyan et al., 2021). Παρότι δεν αποτελεί πλήρως διαφοροποιημένο τύπο ηπατοκυττάρου, διατηρεί πολλές βασικές ηπατικές λειτουργίες, όπως η παραγωγή πρωτεϊνών του πλάσματος (π.χ. αλβουμίνη, τρανσφερίνη και ινωδογόνο) και η παρουσία ενζύμων φάσης I και II, που συμμετέχουν στη μεταβολική αποτοξίνωση. Ωστόσο, η έκφραση ορισμένων κυτοχρωμάτων P450 είναι περιορισμένη, γεγονός που μειώνει την καταλληλότητα της σειράς για ορισμένες φαρμακολογικές μελέτες. Τα κύτταρα HepG2 αναπτύσσονται σχετικά αργά, δεν είναι ιδιαίτερα μεταστατικά και γι' αυτό χρησιμοποιούνται κυρίως σε εφαρμογές που σχετίζονται με τον μεταβολισμό, την ηπατοτοξικότητα και την έκφραση ηπατικών γονιδίων (Costantini et al., 2013).



Εικόνα 8. Καρκινική κυτταρική σειρά Hep G2 (πηγή: ATCC).

2.2.3.2 Δημιουργία θρεπτικού μέσου

Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο, με βάση το DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), στο οποίο προστέθηκε 10% FBS, 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και 1% L-γλουταμίνη (γλυκόζη, red δείκτης για την οξείδωση, πυροσταφιλικό και γλουταμινικό). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στις κυτταροκαλλιέργειες, όπως το θρεπτικό μέσο, η θρυψίνη, το FBS και το διάλυμα MTT, διατηρούνται σε συνθήκες ψύξης για λόγους σταθερότητας. Πριν έρθουν σε επαφή με τα κύτταρα, θερμαίνονται σε υδατόλουτρο στους 37 °C ώστε να προσαρμοστούν στη θερμοκρασία καλλιέργειας. Η προσθήκη αντιβιοτικών,

όπως η πενικιλίνη και η στρεπτομυκίνη, στο θρεπτικό μέσο αποσκοπεί στην πρόληψη επιμολύνσεων από βακτήρια και μύκητες. Παράλληλα, η L-γλουταμίνη προστίθεται ως βασικό αμινοξύ, καθώς αποτελεί συμπληρωματική πηγή ενέργειας, υποστηρίζοντας κρίσιμες μεταβολικές διεργασίες των κυττάρων.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι πρέπει να ανανεώνεται τακτικά το θρεπτικό υλικό των κυττάρων, προκειμένου να αποφευχθεί η εξάντληση των θρεπτικών συστατικών και να απομακρυνθούν τα ανεπιθύμητα προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού. Έτσι, διασφαλίζονται σταθερές και κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη των κυττάρων.

2.2.3.3 Απόψυξη κυττάρων

Για την έναρξη οποιουδήποτε πειράματος που βασίζεται σε κυτταροκαλλιέργεια, απαιτείται πρώτα η απόψυξη των κυττάρων. Κατά τη διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη η απομάκρυνση του DMSO, το οποίο, παρόλο που λειτουργεί ως κρυοπροστατευτικό κατά την κατάψυξη, είναι κυτταροτοξικό σε θερμοκρασία 37 °C. Αξίζει να τονιστεί ότι οι κυτταρικές σειρές μπορούν να διατηρηθούν για εκτεταμένα χρονικά διαστήματα σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (-80 °C ή -120 °C), αποθηκευμένες σε ειδικά φιαλίδια κρυοσυντήρησης (cryovials).

Η διαδικασία απόψυξης των κυττάρων περιλαμβάνει συγκεκριμένα στάδια, τα οποία πρέπει να ακολουθούνται με ακρίβεια ώστε να διασφαλιστεί η βιωσιμότητά τους. Αρχικά, το cryovial μεταφέρεται από τον χώρο κατάψυξης (-80 °C ή -120 °C) σε υδατόλουτρο στους 37 °C, μέχρι να ξεπαγώσει σχεδόν πλήρως. Στη συνέχεια, προστίθεται σε falcon ποσότητα θρεπτικού μέσου ίση με 4–5 φορές τον όγκο του περιεχομένου του cryovial, στο οποίο και μεταφέρεται προσεκτικά το περιεχόμενό του. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στους 1000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C), με σκοπό την απομάκρυνση του υπερκείμενου που περιέχει το DMSO. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε φρέσκο θρεπτικό υλικό, ανάλογα με τον επιθυμητό τελικό όγκο (π.χ. 5 mL για φλάσκα 25 cm²), και το εναιώρημα μεταφέρεται στη φλάσκα καλλιέργειας. Τέλος, τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο στους 37 °C με επίπεδα CO₂ 5%, ώστε να αρχίσει η διαδικασία ανάπτυξής τους.

2.2.3.4 Θρυψινοποίηση κυττάρων

Η θρυψινοποίηση αποτελεί βασική διαδικασία στις κυτταροκαλλιέργειες και εφαρμόζεται κυρίως όταν τα κύτταρα έχουν φτάσει σε υψηλό ποσοστό κάλυψης της επιφάνειας της φλάσκας (περίπου 80-90%). Επιπλέον, χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις εμφάνισης μεγάλων ή πολλών συσσωματωμάτων, τα οποία θεωρούνται ανεπιθύμητα, καθώς και πριν από διαδικασίες που περιλαμβάνουν αξιοποίηση ή μεταφορά κυττάρων. Κάθε διαδικασία θρυψινοποίησης αντιστοιχεί σε ένα πέρασμα (passage), δηλαδή σε μια ανανέωση της κυτταρικής καλλιέργειας. Η μέθοδος βασίζεται στη δράση της θρυψίνης, ενός πρωτεολυτικού ενζύμου, η οποία διασπά πεπτιδικούς δεσμούς κυρίως στο καρβοξυλικό άκρο των αμινοξέων λυσίνη και αργινίνη. Με αυτόν τον τρόπο αποικοδομούνται οι προσκολλητικές πρωτεΐνες που συγκρατούν τα κύτταρα μεταξύ τους αλλά και στην επιφάνεια της φλάσκας,

επιτρέποντας έτσι την αποκόλλησή τους και τη συνέχιση της καλλιέργειας ή τη χρήση τους σε περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες (Kaur & Singh, 2020).

Για την αποτελεσματική θρυψινοποίηση των κυττάρων, ακολουθείται μια συγκεκριμένη σειρά από βασικά στάδια με σκοπό την αποκόλλησή τους από τη φλάσκα. Αρχικά, το υπάρχον θρεπτικό μέσο απομακρύνεται και ακολουθεί η προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας θρυψίνης. Στη συνέχεια, η φλάσκα τοποθετείται για σύντομο χρονικό διάστημα στον επωαστήρα και παρακολουθείται τακτικά στο μικροσκόπιο μέχρι να διαπιστωθεί η πλήρης αποκόλληση των κυττάρων και η απουσία συσσωματωμάτων. Όταν ολοκληρωθεί αυτό το στάδιο, προστίθεται ποσότητα θρεπτικού μέσου τετραπλάσια από τον όγκο της θρυψίνης, με σκοπό την αναστολή της ενζυμικής της δράσης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1000 rpm για 5 λεπτά στους 25 °C και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού. Τέλος, το κυτταρικό ίζημα συλλέγεται και επαναδιαλύεται προσεκτικά σε φρέσκο θρεπτικό μέσο, ανάλογα με τον επιθυμητό τελικό όγκο, ώστε τα κύτταρα να είναι έτοιμα για επανακαλλιέργεια ή περαιτέρω πειραματική χρήση.

2.2.3.5 Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Η διαδικασία ανακαλλιέργειας ξεκινά όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει περίπου το 80% της επιφάνειας της φλάσκας, καθώς η υπερβολική κυτταρική πυκνότητα μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ανάπτυξή τους. Σε αυτό το στάδιο, περιορίζεται ο διαθέσιμος χώρος, μειώνεται η πρόσβαση σε θρεπτικά συστατικά και αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης κυτταρικών συσσωματωμάτων και ανεπιθύμητης διαφοροποίησης. Η ανακαλλιέργεια στοχεύει στον διαχωρισμό των κυττάρων μεταξύ τους, με την βοήθεια της θρυψινοποίησης, και την μεταφορά ποσότητας κυττάρων πίσω στη φλάσκα (πχ για HEK293 και HepG2 περίπου 10% τελικού επιθυμητού όγκου). Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την προσθήκη θρεπτικού μέσου σύμφωνα με τον επιθυμητό τελικό όγκο στη φλάσκα, υπό συνθήκες που ευνοούν τη συνεχή και ομοιόμορφη ανάπτυξη των κυττάρων.

2.2.3.6 Ψύξη κυττάρων

Κατά τη διαδικασία της θρυψινοποίησης τα κύτταρα που απομακρύνονται από τη φλάσκα καλλιέργειας μπορούν να καταψυχθούν στους -80°C ώστε να χρησιμοποιηθούν σε μελλοντικά πειράματα. Για να εξασφαλιστεί όμως η επιτυχής κρυοσυντήρηση, είναι σημαντικό τα κύτταρα να βρίσκονται σε υγιή κατάσταση και με ενεργό μεταβολισμό πριν από τη διαδικασία ψύξης. Γι' αυτόν τον λόγο, οι καλλιέργειες που προορίζονται για αποθήκευση δεν πρέπει να έχουν υπερβεί το 70-80% κάλυψης της επιφάνειας της φλάσκας. Η διαδικασία ψύξης ξεκινά με τη θρυψινοποίηση του δείγματος έως και το βήμα όπου γίνεται φυγοκέντρηση στα 1000 rpm για 5 λεπτά στους 25 °C και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.3.4. Στη συνέχεια, το ίζημα επαναδιαλύεται σε θρεπτικό μέσο και μεταφέρεται σε cγονial σε όγκο που αντιστοιχεί στο 90% της τελικής επιθυμητής ποσότητας. Αμέσως μετά, προστίθεται DMSO σε αναλογία 10% του συνολικού όγκου (δηλαδή, για ένα κρυοφιαλίδιο του 1mL απαιτούνται 900μL FBS

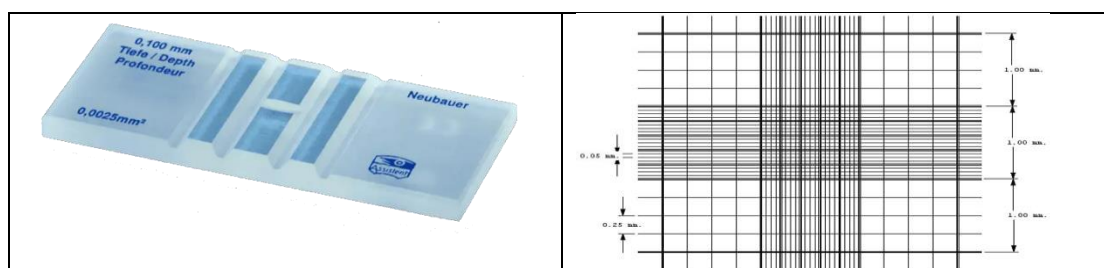
και 100μL DMSO). Λόγω της κυτταροτοξικής δράσης του DMSO, η κατάψυξη των δειγμάτων πρέπει να γίνει χωρίς καθυστέρηση, είτε στους -80°C είτε στους -120°C.

2.2.3.7 Μέτρηση και Στρώσιμο κυττάρων

Η καταμέτρηση των κυττάρων και η ομοιόμορφη κατανομή τους αποτελεί βασική προϋπόθεση για την εκτέλεση πειραμάτων. Για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιείται μία εξειδικευμένη αντικειμενοφόρος πλάκα, γνωστή ως πλάκα Neubauer ή αιμοκυτταρόμετρο (Εικόνα 9). Το αιμοκυτταρόμετρο αποτελείται από δύο διαμερίσματα, καθένα με 9 χαραγμένα τετράγωνα. Από αυτά, χρησιμοποιούνται μόνο τα 4 γωνιακά τετράγωνα, τα οποία διακρίνονται από τις πιο αραιές χαράξεις. Τα υπόλοιπα 5 τετράγωνα, που σχηματίζουν έναν σταυρό στο κέντρο, δεν συμμετέχουν στην καταμέτρηση και χρησιμεύουν στην οπτική καθοδήγηση κατά την τοποθέτηση και παρακολούθηση των κυττάρων. Η μέτρηση των κυττάρων διεξάγεται με το οπτικό μικροσκόπιο για κάθε γωνιακό τετράγωνο ξεχωριστά, και ο αριθμός τους καταγράφεται. Στη συνέχεια, ο μέσος όρος κυττάρων υπολογίζεται με βάση τον όγκο του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε (π.χ. 10 μL) και έπειτα το αποτέλεσμα εκφράζεται σε κύτταρα ανά mL για ευκολότερους υπολογισμούς με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Αριθμός κυττάρων ανά mL} = \frac{\alpha + \beta + \gamma + \delta}{4} * 10.000$$

Όπου α,β,γ,δ ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν σε κάθε τεταρτημόριο.



Εικόνα 9. Αιμοκυτταρόμετρο – Πεδίο μέτρησης (πηγή: Editorial Team, 2022).

Αφού ολοκληρωθεί η μέτρηση των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο, συνεχίζουμε με το στρώσιμο των κυττάρων σε μικροπλακίδια 96 θέσεων (96-well plate) με τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων σε κάθε θέση.

Αναλυτικά, η διαδικασία που ακολουθείται για το στρώσιμο περιλαμβάνει τα εξής στάδια: Αρχικά, πραγματοποιείται θρυψινοποίηση του δείγματος μέχρι και το βήμα όπου προστίθεται ποσότητα θρεπτικού μέσου τετραπλάσια από τον όγκο της θρυψίνης, με σκοπό την αναστολή της ενζυμικής της δράσης, σύμφωνα με την περιγραφή της υποενότητας 2.2.3.4. Στη συνέχεια, λαμβάνονται 10 μL από το ελαιώρημα και τοποθετούνται σε αιμοκυτταρόμετρο για καταμέτρηση των κυττάρων μέσω μικροσκοπικής παρατήρησης. Με βάση τα δεδομένα αυτά, υπολογίζεται η συγκέντρωση των κυττάρων ανά mL. Ακολουθεί ο προσδιορισμός του συνολικού

αριθμού κυττάρων που απαιτούνται για το πείραμα, καθώς και ο αντίστοιχος όγκος που τα περιέχει, ο οποίος μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο Falcon. Το δείγμα υφίσταται φυγοκέντρηση στα 1000 rpm για 5 λεπτά στους 25 °C και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Έπειτα, το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται στον τελικό επιθυμητό όγκο, και το εναιώρημα κατανέμεται ισόποσα στο μικροπλακίδιο 96 θέσεων.

2.2.3.8 Προσδιορισμός κυτταροτοξικότητας με δοκιμασία MTT (MTT assay)

Η δοκιμασία MTT (MTT assay) αποτελεί μία από τις συνηθέστερες μεθόδους αξιολόγησης της κυτταρικής βιωσιμότητας, καθώς επιτρέπει τη μέτρηση της μεταβολικής δραστηριότητας και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Η εκτίμηση της μεταβολικής δραστηριότητας βασίζεται σε μία αντίδραση αλλαγής χρώματος, η οποία καταλύεται από μιτοχονδριακά ένζυμα. Συγκεκριμένα, τα μιτοχονδριακά NAD(P)H-εξαρτώμενα ένζυμα οξειδοοδουκτάσης μετατρέπουν τη χρωστική MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) σε αδιάλυτους κρυστάλλους φορμαζάνης με χαρακτηριστικό μωβ/μπλε χρώμα. Η χρωματική αυτή μεταβολή αντικατοπτρίζει τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων που παραμένουν. Η διάλυση των κρυστάλλων φορμαζάνης επιτυγχάνεται με την προσθήκη DMSO ή ισοπροπανόλης, επιτρέποντας την ποσοτική τους ανάλυση με φασματοφωτομετρική μέτρηση στα 570 nm.

Η δοκιμασία MTT ολοκληρώνεται στις 4 ημέρες. Αναλυτικότερα τα στάδια της δοκιμασίας είναι:

Ημέρα 1^η

Πραγματοποιείται θρυψινοποίηση και μέτρηση των κυττάρων σε πλάκα Neubauer. Έπειτα, γίνεται κατανομή της κατάλληλης ποσότητας με τον επιθυμητό αριθμό κυττάρων σε μικροπλακίδιο 96 θέσεων. Μόλις ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία το μικροπλακίδιο τοποθετείται στον κλίβανο για επώαση, σε θερμοκρασία 37 °C και επίπεδα CO₂ 5% για 24 ώρες.

Ημέρα 2^η

Σε αυτό το στάδιο, γίνεται η προσθήκη των ελεγχόμενων ουσιών σε κάθε θέση στο μικροπλακίδιο. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε φλατζοκόφτης για να δημιουργηθούν δείγματα του ινώδους υλικού με διάμετρο 4mm. Αυτά, μετά από αποστείρωση μέσω έκθεσης σε ακτινοβολία UV (30 λεπτά ανά πλευρά), τοποθετήθηκαν στις μικροκυψελίδες με το κυτταρικό εναιώρημα. Στη συνέχεια, το μικροπλακίδιο τοποθετείται σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C και επίπεδα CO₂ 5% για 48 ώρες.

Ημέρα 4^η

Την τελευταία ημέρα του πειράματος πραγματοποιείται η προετοιμασία του διαλύματος MTT 5mg/mL PBS 10X. Πιο συγκεκριμένα, σε θάλαμο νηματικής ροής και αποστειρωμένες συνθήκες, διαλύθηκαν 200mg MTT σε 40 mL διαλύτη (36 mL αποστειρωμένου ύδατος και 4 mL PBS 1X). Έπειτα, γίνεται προσθήκη του αντιδραστηρίου MTT στις μικροκυψελίδες, ώστε η τελική συγκέντρωση κάθε μικροκυψελίδας να ισούται με 0,5 mg/mL. Ακολουθεί επώαση της πλάκας

καλλιέργειας σε κλίβανο με θερμοκρασία 37 °C και επίπεδα CO₂ 5% για 3-4 ώρες. Στη συνέχεια, απομακρύνεται προσεκτικά το διάλυμα θρεπτικού με MTT κάθε μικροκυψελίδας, αποφεύγοντας την απομάκρυνση κρυστάλλων φορμαζάνης που έχουν σχηματιστεί. Μόλις ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία, προστίθενται 150 μL DMSO και πραγματοποιείται ανακίνηση σε αναδευτήρα απουσία φωτός σε θερμοκρασία δωματίου ωσότου διαλυτοποιηθούν πλήρως οι κρύσταλλοι. Σε αυτό το στάδιο της διαδικασίας, και λαμβάνοντας υπόψη ότι η πειραματική μελέτη περιλαμβάνει τη χρήση ινωδών μεμβρανών, πραγματοποιείται η μεταφορά 100 μL του κυτταρικού εναιωρήματος σε νέα πλάκα καλλιέργειας. Αυτό γίνεται προκειμένου να αποφευχθεί οποιαδήποτε παρεμβολή των ινωδών μεμβρανών κατά τη διαδικασία φωτομέτρησης, η οποία μπορεί να επηρεάσει την ακρίβεια των μετρήσεων. Ακολούθως, διενεργείται φωτομέτρηση στα 570 nm, τιμή που αντιστοιχεί στη μωβ χρωστική φορμαζάνης, καθώς και στα 690 nm, που χρησιμοποιείται ως δείγμα αναφοράς.

Οι μετρήσεις απορρόφησης από την τέταρτη ημέρα αναλύονται και αποδίδονται ως ποσοστά βιωσιμότητας (%) μέσω της εξίσωσης που ακολουθεί.

$$\text{Βιωσιμότητα κυττάρων (\%)} = \frac{(\text{Απορρόφηση δείγματος})}{(\text{Απορρόφηση μάρτυρα})} * 100$$

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα για τη βιωσιμότητα των κυττάρων (%). Η στατιστική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την παραπάνω εξίσωση πραγματοποιείται μέσω της δοκιμής Student t-test. Τιμές με $p \leq 0,05$ θεωρούνται ενδεικτικές στατιστικά σημαντικής διαφοράς.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

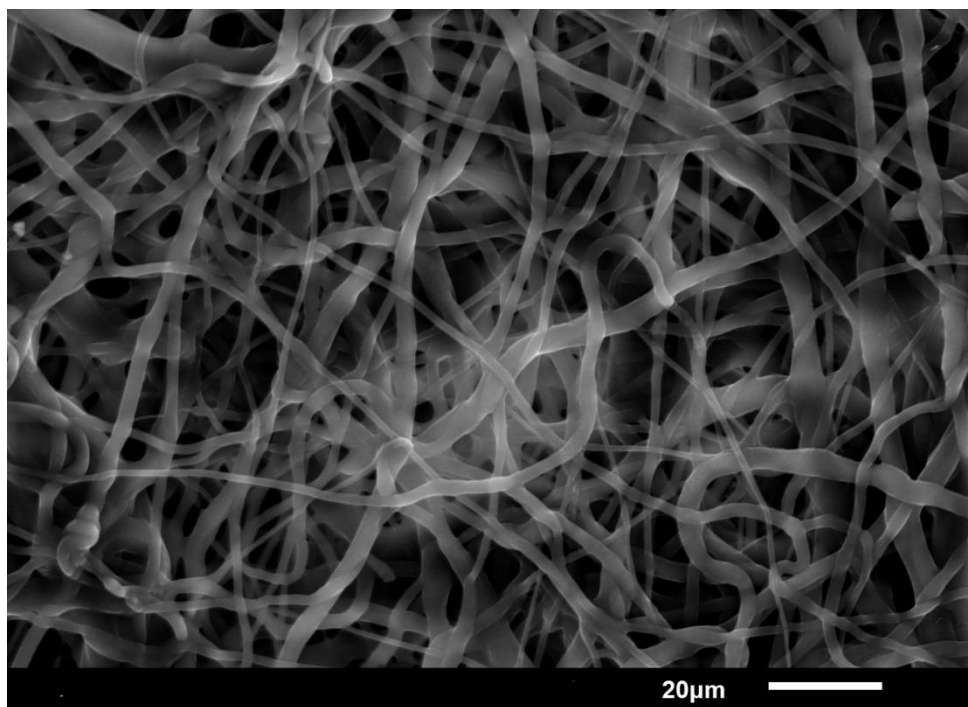
3.1 Παραγωγή σύνθετων πολυμερικών μεμβρανών

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Ηλεκτροστατικής Ινοποίησης για την ενσωμάτωση της σιλυβίνης και κερκετίνης σε ίνες του πολυμερούς πολυκαπρολακτόνη (PCL). Δημιουργήθηκαν τα εξής δείγματα:

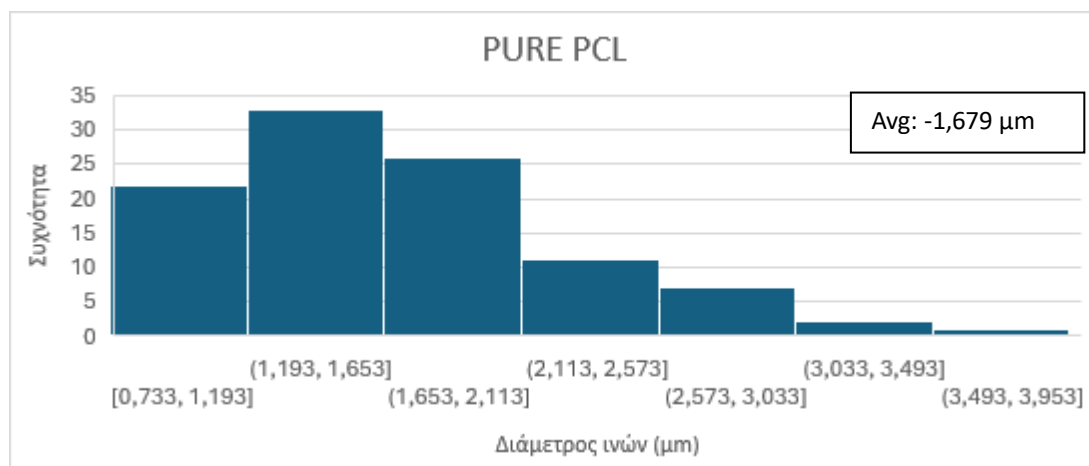
- Pure PCL
- PCL-Silybin (4% wt silybin)
- PCL-Quercetin (4% wt quercetin)
- PCL-Silybin-Quercetin (2% wt silybin & 2% wt quercetin)

3.2 Αποτελέσματα Μορφολογικής ανάλυσης με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

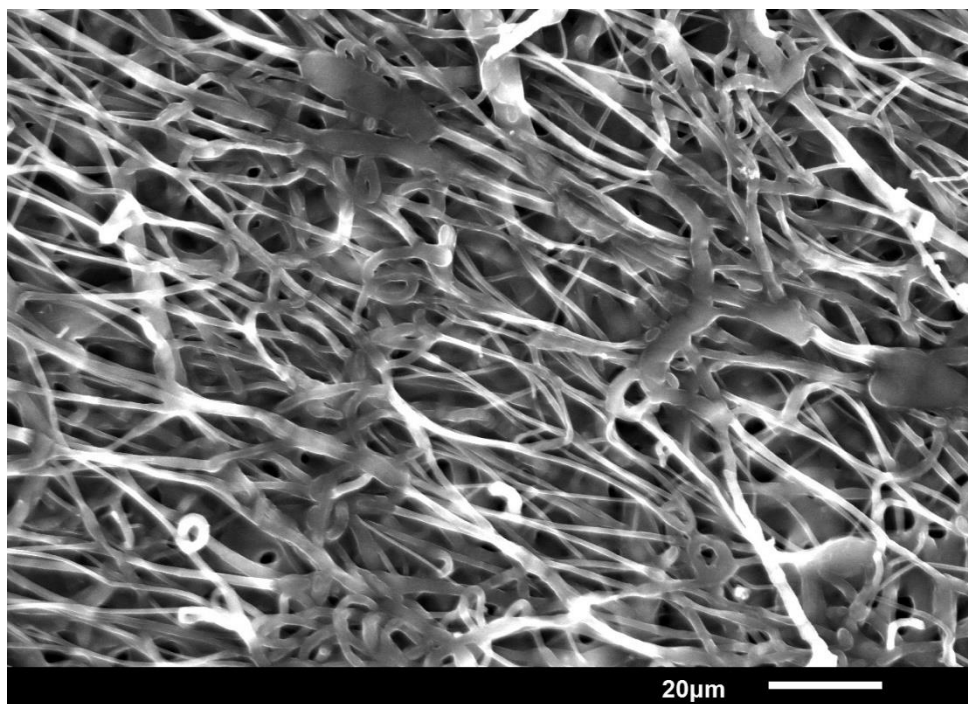
Η μορφολογική ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM). Στις αντίστοιχες εικόνες (Εικόνες 10-13) παρουσιάζονται χαρακτηριστικά στιγμιότυπα του καθαρού πολυμερούς, καθώς και των ινών με ενθυλακωμένη σιλυβίνη, κερκετίνη και σιλυβίνη μαζί με κερκετίνη. Επιπλέον, στα Διαγράμματα 1-4 παρατηρείται η κατανομή διαμέτρου των νανοϊνών, ενώ στο Διάγραμμα 5 παρουσιάζεται η μέση διάμετρος των ινών του κάθε δείγματος.



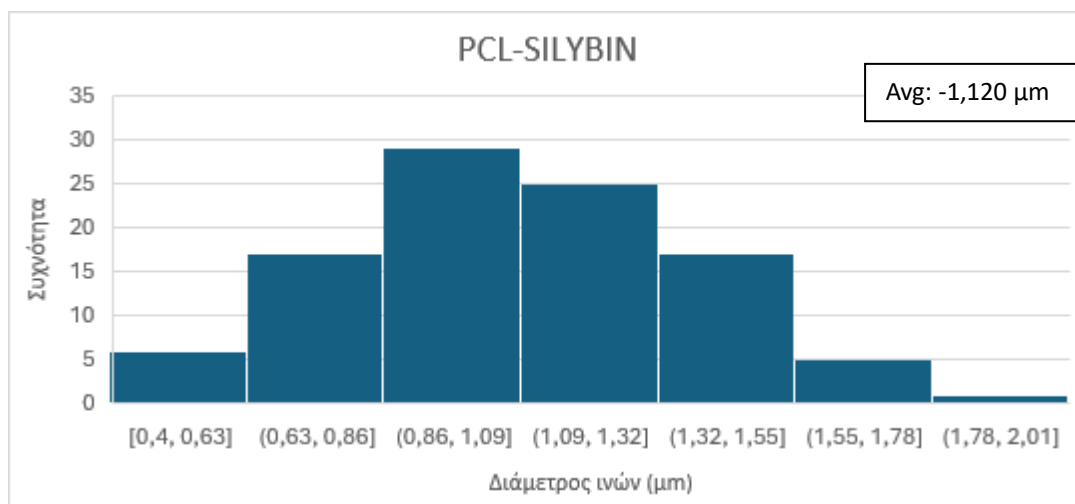
Εικόνα 10. Μορφολογία ινών καθαρής PCL.



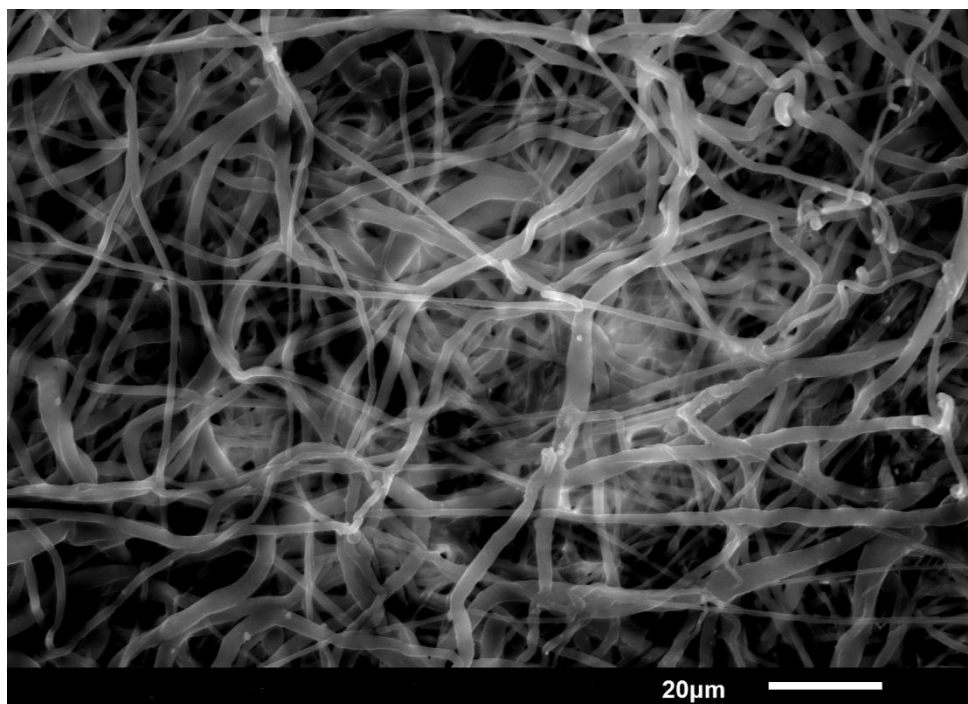
Διάγραμμα 1. Κατανομή διαμέτρου των νανοϊνών καθαρής PCL.



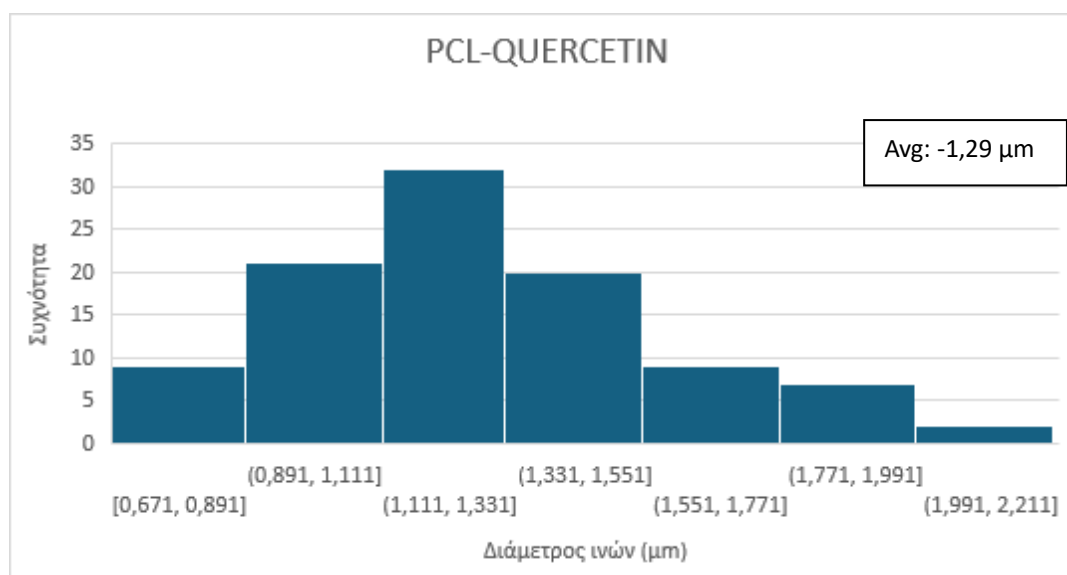
Εικόνα 11. Μορφολογία ινών δείγματος PCL-Silybin.



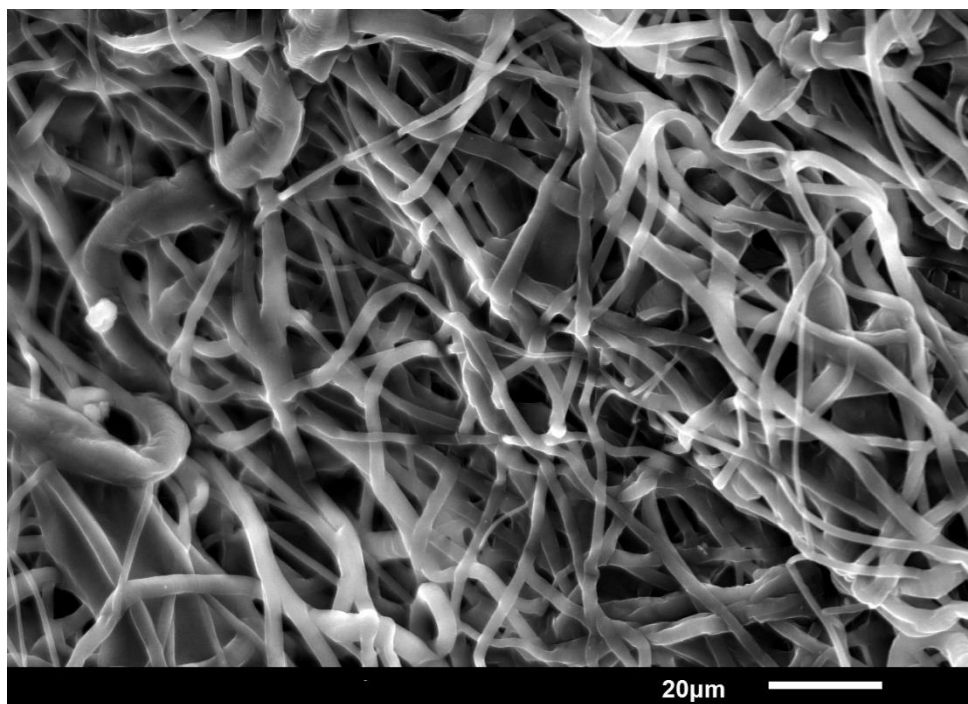
Διάγραμμα 2. Κατανομή διαμέτρου των νανοϊνών PCL-Silybin.



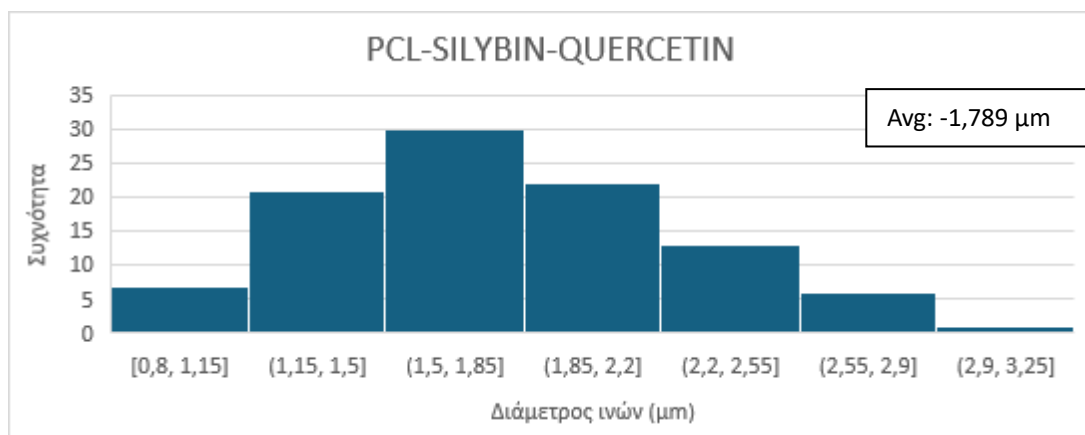
Εικόνα 12. Μορφολογία ινών δείγματος PCL-Quercetin.



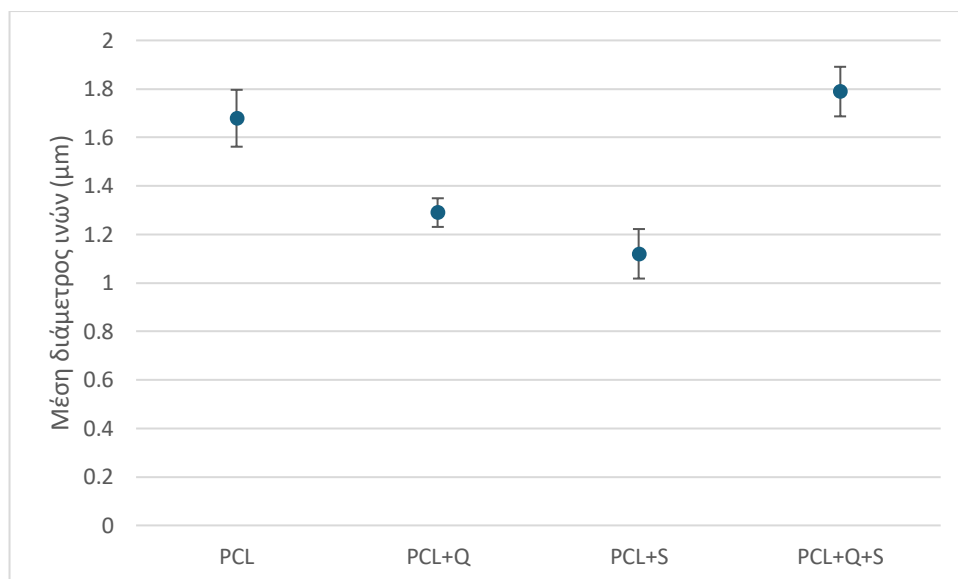
Διάγραμμα 3. Κατανομή διαμέτρου των νανοϊνών PCL- Quercetin.



Εικόνα 13. Μορφολογία ινών δείγματος PCL-Silybin-Quercetin.



Διάγραμμα 4. Κατανομή διαμέτρου των νανοϊνών PCL- Silybin- Quercetin.



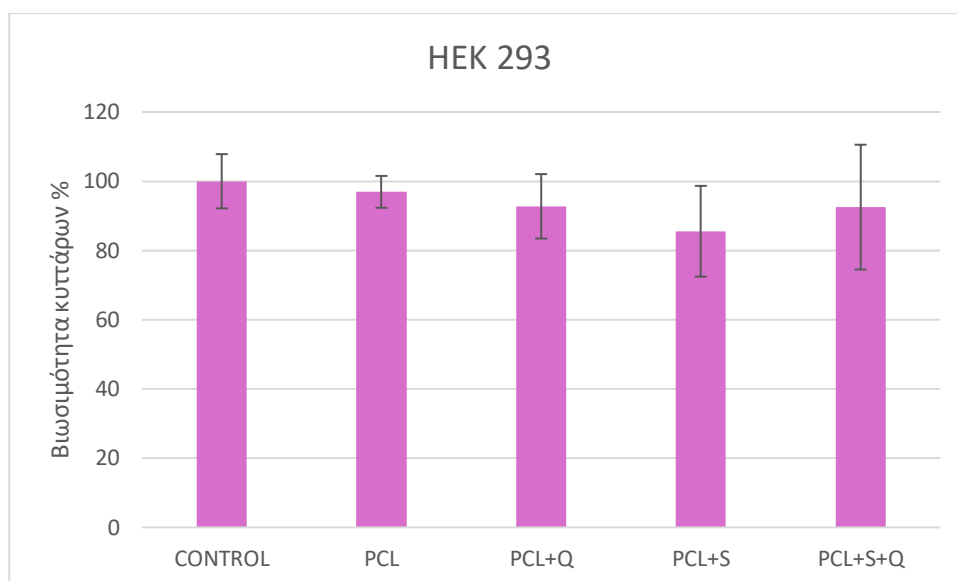
Διάγραμμα 5. Επίδραση των βιοδραστικών ουσιών, σιλυβίνη και κερκετίνη, στη διάμετρο των ινών. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ S.D.

Από τις παραπάνω φωτογραφίες παρατηρήθηκε ότι στη καθαρή PCL οι ίνες είναι λείες και ομοιόμορφες χωρίς σφαιρίδια. Με την προσθήκη σιλυβίνης ή/και κερσετίνης οι ίνες γίνονται λιγότερο ομοιόμορφες σε σχέση με την καθαρή PCL, εμφανίζονται κάποιες διογκώσεις ενώ συναντώνται και κάποια σφαιρίδια. Το φαινόμενο αυτό ενδέχεται να σχετίζεται με τη μεταβολή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του διαλύματος, ιδιαίτερα του ιξώδους και της αγωγιμότητας, τα οποία διαφοροποιούνται μετά την εισαγωγή των φυτικών ουσιών.

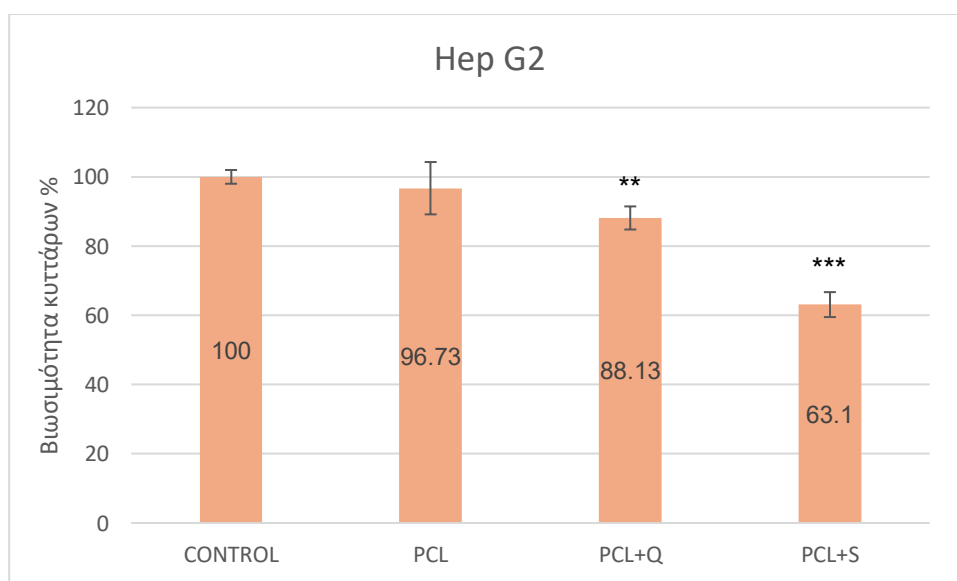
Η διάμετρος των ινών προσδιορίστηκε με τη χρήση του λογισμικού ImageJ. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε περισσότερες από 100 ίνες, ώστε να υπολογιστεί η μέση τιμή. Από τα παραπάνω διαγράμματα διαπιστώθηκε ότι η ενθυλάκωση των ουσιών δεν επηρέασε σημαντικά τη μέση διάμετρο των ινών. Παρόμοια αποτελέσματα βρήκαν σε έρευνα τους οι Spartali et al. (2024) όπου διάφορες συγκεντρώσεις σιλυβίνης ενθυλακώθηκαν σε ίνες πολυκαπρολακτόνης (PCL) και διαπιστώθηκε ότι η ενθυλάκωση της δραστικής ουσίας δεν είχε σημαντική επίδραση στη διάμετρο των ινών.

3.3 Προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας HEK 293 και Hep G2

Η κυτταροτοξικότητα των σύνθετων μεμβρανών μελετήθηκε και στις δυο κυτταρικές σειρές (HEK 293, Hep G2) μέσω της δοκιμασίας MTT. Αρχικά, δημιουργήθηκαν κυκλικά δείγματα (διάμετρος 4 mm) με χρήση φλατζοκόφτη και αποστειρώθηκαν με ακτινοβολία UV για τουλάχιστον 30 λεπτά σε κάθε πλευρά. Έπειτα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε καλλιέργειες κυττάρων και ακολούθησε επώαση διάρκειας 2 ημερών. Η βιωσιμότητα των κυττάρων υπολογίστηκε μετά το πέρας της επώασης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 6 και 7.



Διάγραμμα 6. Κυτταροτοξικότητα ινωδών μεμβρανών σε κυτταρική σειρά HEK-293. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις ινώδεις μεμβράνες για 48 ώρες και η βιωσιμότητά τους εκτιμήθηκε μέσω της δοκιμασίας MTT. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ S.D. ($n=4-8$) και συγκρίνονται με τον μάρτυρα ελέγχου.



Διάγραμμα 7. Κυτταροτοξικότητα ινωδών μεμβρανών σε καρκινική κυτταρική σειρά Hep G2. Τα κύτταρα επώαστηκαν με τις ινώδεις μεμβράνες για 48 ώρες και η βιωσιμότητά τους αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία MTT. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ S.D. ($n=3-8$), ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ σε σύγκριση με τον μάρτυρα ελέγχου.

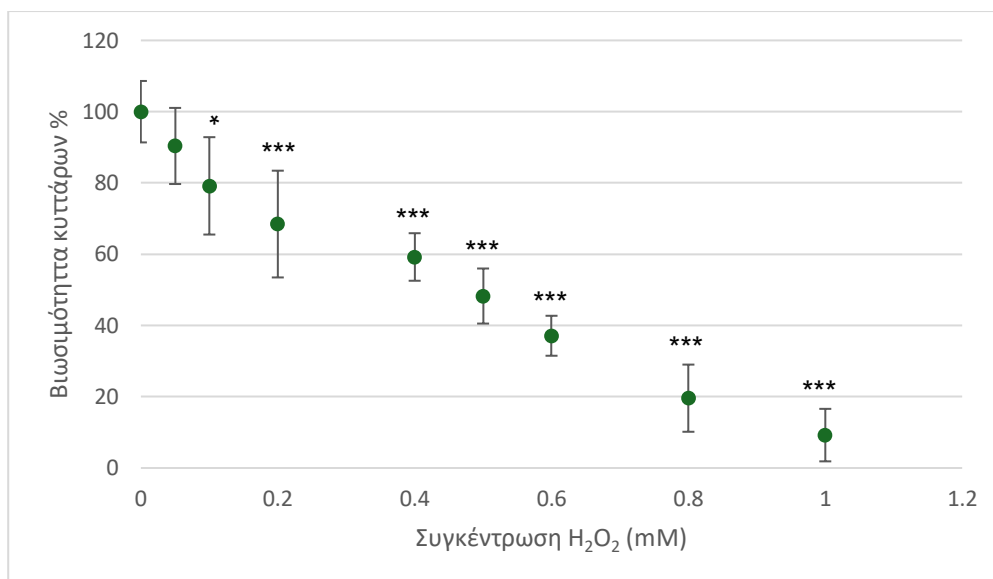
Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι οι ινώδεις μεμβράνες στην κυτταρική σειρά HEK 293 είχαν πολύ καλή βιοσυμβατότητα σε όλα τα δείγματα, καθώς η βιωσιμότητα των κυττάρων ήταν παρόμοια με αυτή του δείγματος ελέγχου. Το δείγμα ελέγχου ήταν χωρίς την παρουσία μεμβρανών και τα κύτταρα είχαν επωαστεί για 48 ώρες στις ίδιες συνθήκες με τα υπόλοιπα δείγματα. Παρόμοια αποτελέσματα κυτταροτοξικότητας σε κυτταρική σειρά HEK 293 παρατηρήθηκαν σε

έρευνα των Spartali et al. (2024) όπου μελετήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις σιλυβίνης ενθυλακωμένες σε ινώδεις μεμβράνες PCL.

Όσον αφορά στην ηπατοκαρκινική σειρά Hep G2 παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση των κυττάρων στα δείγματα PCL-Quercetin και PCL-Silybin σε σχέση με τον μάρτυρα ελέγχου. Υπάρχει αισθητή μείωση των καρκινικών κυττάρων, με ποσοστό μείωσης έως και 37%. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται στην έρευνα των Spartali et al. (2024) όπου μελετήθηκε η αντικαρκινική δράση της σιλυβίνης στην κυτταρική σειρά Hep G2. Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η σιλυβίνη προκαλεί δραστική μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων χωρίς να έχει τοξική επίδραση στα φυσιολογικά κύτταρα. Επίσης, στην έρευνα των Zhou et al. (2017), οι *in vitro* μελέτες που πραγματοποίησαν έδειξαν ότι η κερκετίνη μπορούσε να αναστείλει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό, να επάγει την απόπτωση και να τροποποιήσει τον κυτταρικό κύκλο σε κύτταρα Hep G2.

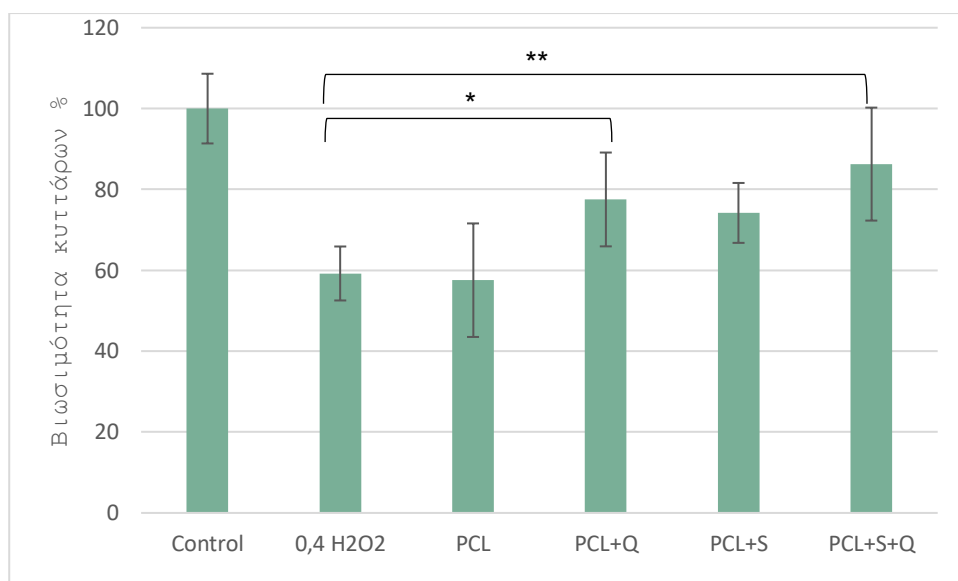
3.4 Αντιοξειδωτική δράση ινωδών μεμβρανών έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από H₂O₂

Το οξειδωτικό στρες προκύπτει όταν διαταράσσεται η ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή ή τη συσσώρευση δραστικών μορφών οξυγόνου στους ιστούς και στα κύτταρα και στην ικανότητα του βιολογικού συστήματος να κινητοποιεί επαρκείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Υποστηρίζεται ότι αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες που συνεισφέρουν στην ανάπτυξη νευροεκφυλιστικών, νεφρικών, πνευμονικών, οφθαλμικών, καρδιακών, ηπατικών, δερματικών και αναπαραγωγικών νοσημάτων (Spartali et al., 2024). Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η ικανότητα των σύνθετων μεμβρανών να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες που προκαλούνται από H₂O₂ σε κυτταρικές καλλιέργειες της κυτταρικής σειράς HEK 293 με την δοκιμασία MTT. Στο Διάγραμμα 8 παρουσιάζεται η κυτταροτοξική επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων H₂O₂ (0,05–1 mM) στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Όπως παρατηρείται, η κυτταρική βιωσιμότητα εμφανίζει δόσοεξαρτώμενη μείωση. Γι' αυτό το λόγο, μειώθηκε στο 90,38% για συγκέντρωση H₂O₂ ίση με 0,05 mM, η οποία αποτελεί την ελάχιστη δόση, ενώ μειώθηκε στο 9,23% όταν εφαρμόστηκε η μέγιστη δόση. Παρόμοια επίδραση του H₂O₂ στη βιωσιμότητα των ανθρώπινων εμβρυϊκών νεφρικών κυττάρων HEK 293 έχει επίσης αναφερθεί από άλλους ερευνητές (Spartali et al., 2024; Tsialtas et al., 2021).

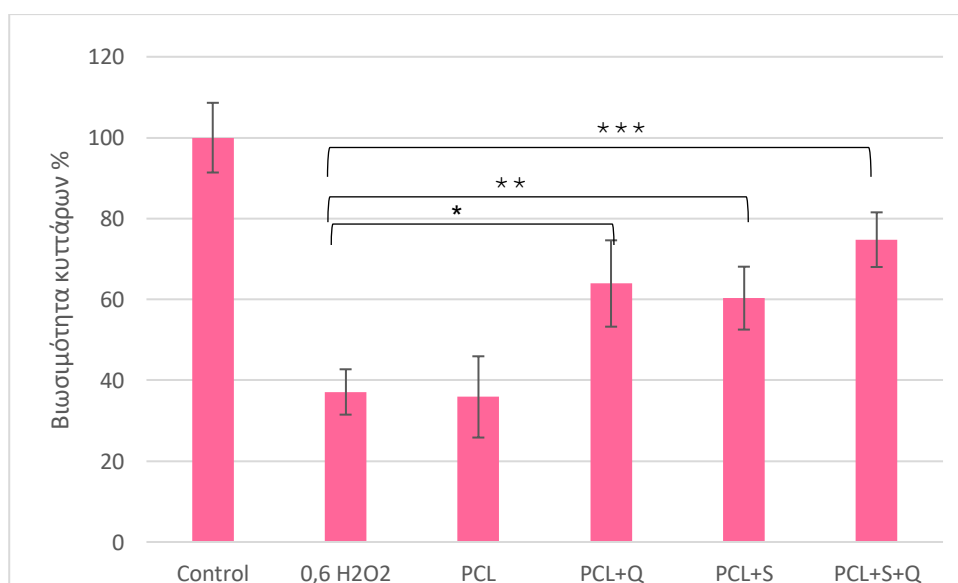


Διάγραμμα 8. Επίδραση της συγκέντρωσης H₂O₂ (0,05–1 mM) στη βιωσιμότητα των κυττάρων HEK 293 μετά από 12 ώρες επώασης. Η βιωσιμότητα εκτιμήθηκε με δοκιμασία MTT. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ S.D. (n=5–8), *p<0,05, ***p<0,001 σε σύγκριση με τον μάρτυρα ελέγχου (0 mM H₂O₂).

Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν δύο ενδιάμεσες συγκεντρώσεις H₂O₂, 0,4 και 0,6 mM, ως βέλτιστες συγκεντρώσεις πρόκλησης βλάβης, προκειμένου να αξιολογηθεί η προστατευτική δράση των δειγμάτων των ινωδών μεμβρανών PCL. Στα Διαγράμματα 9 και 10 φαίνεται ότι όταν τα κύτταρα HEK 293 εκτέθηκαν στις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις H₂O₂ χωρίς την παρουσία σύνθετων ινωδών μεμβρανών, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου. Αντίθετα, όταν προστέθηκαν στα κύτταρα οι μεμβράνες που περιείχαν τις ουσίες, καταγράφηκε αύξηση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Η παρουσία της σιλυβίνης και της κερκετίνης φάνηκε να μειώνει τη βλάβη που προκαλείται από το H₂O₂ παρουσιάζοντας σημαντικά προστατευτικά αποτελέσματα ιδιαίτερα στο δείγμα με τον συνδυασμό των δύο ουσιών. Τα αποτελέσματα αυτά είναι παρόμοια με αυτά των Zuo et al. (2011) όπου στην έρευνά τους μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση διαφόρων ουσιών ανάμεσα τους της σιλυβίνης και της κερκετίνης, οι οποίες φαίνεται να παρουσιάζουν εξαιρετική αντιοξειδωτική δράση στη κατάλληλη συγκέντρωση.



Διάγραμμα 9. Κυτταροπροστατευτική δράση σιλυβίνης και κερκετίνης σε κύτταρα HEK 293 έναντι H₂O₂ (0,4 mM). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ο μέσος όρος ± S.D. (n=3-6), *p<0,05, **p<0,01 σε σύγκριση με τα κύτταρα που επωάσθηκαν για 12h σε H₂O₂ (0,4 mM) χωρίς δείγματα.



Διάγραμμα 10. Κυτταροπροστατευτική δράση σιλυβίνης και κερκετίνης σε κύτταρα HEK 293 έναντι H₂O₂ (0,6 mM). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ο μέσος όρος ± S.D. (n=3-6), *p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001 σε σύγκριση με τα κύτταρα που επωάσθηκαν για 12h σε H₂O₂ (0,6 mM) χωρίς δείγματα.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε η ενθυλάκωση δύο ουσιών, της σιλυβίνης (silybin) και της κερκετίνης (quercetin) καθώς και ο συνδυασμός αυτών των ουσιών, σε ίνες βιοαποικοδομήσιμου και βιοσυμβατού πολυμερούς πολυκαπρολακτόνης (PCL). Η σιλυβίνη και η κερκετίνη είναι δύο φυσικές ουσίες με ιδιαίτερα ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες και ο συνδυασμός τους αποσκοπούσε σε μια πιθανή συνεργιστική δράση στοχεύοντας διαφορετικούς μηχανισμούς που εμπλέκονται με τις παραπάνω ιδιότητες. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για την παρασκευή των ινών ήταν η ηλεκτροστατική ινοποίηση. Για τη διερεύνηση της μορφολογίας των παραγόμενων ινών χρησιμοποιήθηκε Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) και προέκυψε ότι στην καθαρή PCL οι ίνες είναι λείες και ομοιόμορφες χωρίς σφαιρίδια ενώ στα δείγματα που έχουν προστεθεί οι ουσίες οι ίνες είναι λιγότερο ομοιόμορφες, με κάποιες διογκώσεις και σφαιρίδια. Η μέση διάμετρος των ινών ήταν περίπου 1,5 μm , ενώ η ενσωμάτωση των δραστικών ουσιών δεν επηρέασε σημαντικά την μέση διάμετρό τους. Επιπλέον, ελέγχθηκε η κυτταροτοξικότητα των δειγμάτων στην κυτταρική σειρά HEK 293 με την δοκιμασία MTT και τα αποτελέσματα έδειξαν πως η παρουσία των δύο βιοδραστικών ουσιών στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις δεν περιορίζει την ανάπτυξη των κυττάρων. Έλεγχος της αντικαρκινικής δράσης των δειγμάτων στην ηπατοκαρκινική σειρά Hep G2 με τη διαδικασία MTT έδειξε ότι η προσθήκη των βιοδραστικών ουσιών έχει αρνητική επίδραση στην βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων. Ιδιαίτερα στην περίπτωση της σιλυβίνης παρατηρήθηκε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε ποσοστό 36%. Τέλος, σημαντική ήταν η αντιοξειδωτική δράση ινωδών μεμβρανών έναντι του οξειδωτικού στρες που προκλήθηκε από H_2O_2 , αυξάνοντας το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων που εκτέθηκαν σε 0,4mM H_2O_2 έως και 27 ποσοστιαίες μονάδες και των κυττάρων που εκτέθηκαν σε 0,6mM H_2O_2 έως και 37 ποσοστιαίες μονάδες.

Ως προοπτική για τη συνέχιση της παρούσας εργασίας, θα μπορούσε να εξεταστεί σε μεγαλύτερο βάθος η λειτουργία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, ώστε να αποσαφηνιστούν περαιτέρω οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του σύνθετου υλικού. Επιπλέον, σημαντική θα ήταν η διερεύνηση της θερμικής συμπεριφοράς του υλικού, ενώ παράλληλα, η μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης του θα μπορούσε να προσφέρει πρόσθετες χρήσιμες πληροφορίες. Τέλος, καθοριστικό ρόλο στις ιδιότητες των σύνθετων μεμβρανών διαδραματίζει ο ρυθμός αποδέσμευσης της βιοδραστικής ουσίας, ο οποίος θα πρέπει επίσης να προσδιοριστεί.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agarwal, S., Greiner, A. and Wendorff, J.H. (2013) 'Functional materials by electrospinning of polymers,' *Progress in Polymer Science*, 38(6), pp. 963–991. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.02.001>.
- Almatroodi, S.A. *et al.* (2021) 'Potential Therapeutic Targets of Quercetin, a Plant Flavonol, and Its Role in the Therapy of Various Types of Cancer through the Modulation of Various Cell Signaling Pathways,' *Molecules*, 26(5), p. 1315. <https://doi.org/10.3390/molecules26051315>.
- Angamma, C.J. and Jayaram, S.H. (2011) 'Analysis of the effects of solution conductivity on electrospinning process and fiber morphology,' *IEEE Transactions on Industry Applications*, 47(3), pp. 1109–1117. <https://doi.org/10.1109/tia.2011.2127431>.
- Arampatzis, A.S. *et al.* (2021) 'Novel electrospun poly-hydroxybutyrate scaffolds as carriers for the wound healing agents alkanins and shikonins,' *Regenerative Biomaterials*, 8(3). <https://doi.org/10.1093/rb/rbab011>.
- Armendáriz-Barragán, B. *et al.* (2016) 'Plant extracts: from encapsulation to application,' *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(8), pp. 1165–1175. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1182487>.
- Arzumanian, V.A., Kiseleva, O.I. and Poverennaya, E.V. (2021) 'The curious case of the HEPG2 cell line: 40 years of expertise,' *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), p. 13135. <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>.
- Boojar, Mahdi Mashhadi Akbar, Boojar, Massoud Mashhadi Akbar and Golmohammad, S. (2020) 'Overview of Silibinin anti-tumor effects,' *Journal of Herbal Medicine*, 23, p. 100375. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100375>.
- Boots, A.W., Haenen, G.R.M.M. and Bast, A. (2008) 'Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical,' *European Journal of Pharmacology*, 585(2–3), pp. 325–337. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.008>.
- Borah, A. *et al.* (2013) 'Neuroprotective Potential of Silymarin against CNS Disorders: Insight into the Pathways and Molecular Mechanisms of Action,' *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 19(11), pp. 847–853. <https://doi.org/10.1111/cns.12175>.
- Costantini, S. *et al.* (2013) 'Gene expression signature of human HepG2 cell line,' *Gene*, 518(2), pp. 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.106>.
- D'Archivio, M. *et al.* (2010) 'Bioavailability of the polyphenols: status and controversies,' *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), pp. 1321–1342. <https://doi.org/10.3390/ijms11041321>.
- Dobiasová, S. *et al.* (2020) 'Multidrug resistance modulation activity of silybin derivatives and their Anti-Inflammatory potential,' *Antioxidants*, 9(5), p. 455. <https://doi.org/10.3390/antiox9050455>.

Feng, XD, Voong, ST, Song, CX & Chen, WY (1983) 'Synthesis and evaluation of biodegradable block copolymers of ϵ -caprolactone and DL-lactide', *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition*, vol. 21, no. 8, pp. 593–600, <https://doi.org/10.1002/pol.1983.130210802>.

Generali, M. *et al.* (2017) 'Comparative analysis of poly-glycolic acid-based hybrid polymer starter matrices for in vitro tissue engineering,' *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 158, pp. 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.046>.

Geremew, T. (2022) 'Thin film deposition and characterization techniques,' *Journal of 3D Printing and Applications*, 1(2), pp. 1–24. <https://doi.org/10.14302/issn.2831-8846.j3dpa-22-4066>.

Ghosh, S.K. (2006) *Functional coatings*, Wiley eBooks. <https://doi.org/10.1002/3527608478>.

Hashemzaei, M. *et al.* (2017) 'Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo,' *Oncology Reports*, 38(2), pp. 819–828. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5766>.

Inkson, B.J. (2016) 'Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization,' in *Elsevier eBooks*, pp. 17–43. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100040-3.00002-x>.

Kai, D., Liow, S.S. and Loh, X.J. (2014) 'Biodegradable polymers for electrospinning: Towards biomedical applications,' *Materials Science and Engineering C*, 45, pp. 659–670. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.051>.

Kaur, J. and Singh, P.K. (2020) 'Trypsin Detection Strategies: a review,' *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 52(5), pp. 949–967. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1846490>.

Kayaci, F. *et al.* (2014) 'Functional electrospun polymeric nanofibers incorporating geraniol–cyclodextrin inclusion complexes: High thermal stability and enhanced durability of geraniol,' *Food Research International*, 62, pp. 424–431. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.033>.

Koleske, J.V. (1978) 'Blends Containing Poly(ϵ -caprolactone) and Related Polymers,' in *Elsevier eBooks*, pp. 369–389. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-546802-2.50018-x>.

Kontogiannopoulos, K.N. *et al.* (2011) 'Electrospun fiber mats containing shikonin and derivatives with potential biomedical applications,' *International Journal of Pharmaceutics*, 409(1–2), pp. 216–228. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.004>.

Lameirão, F. *et al.* (2020) 'Green-Sustainable Recovery of Phenolic and Antioxidant Compounds from Industrial Chestnut Shells Using Ultrasound-Assisted Extraction: Optimization and Evaluation of Biological Activities In Vitro,' *Antioxidants*, 9(3), p. 267. <https://doi.org/10.3390/antiox9030267>.

- Leão, V.N.S. and Araújo, E.S. (2019) 'Metal oxide heteronanostructures prepared by electrospinning for the humidity detection: Fundamentals and Perspectives,' *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, 07(07), pp. 43–54. <https://doi.org/10.4236/msce.2019.77006>.
- Ma, PX (2004) 'Scaffolds for tissue fabrication', *Materials Today*, vol. 7, no. 5, pp. 30–40, [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00233-0](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00233-0).
- Mahapatro, A. and Singh, D.K. (2011) 'Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines,' *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), p. 55. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-55>.
- Malm, M. *et al.* (2021) 'Author Correction: Evolution from adherent to suspension: systems biology of HEK293 cell line development,' *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85105-9>.
- Marras, S.I. *et al.* (2008) 'Biodegradable polymer nanocomposites: The role of nanoclays on the thermomechanical characteristics and the electrospun fibrous structure,' *Acta Biomaterialia*, 4(3), pp. 756–765. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.12.005>.
- Mohammadi, M.A., Hosseini, S.M. and Yousefi, M. (2020) 'Application of electrospinning technique in development of intelligent food packaging: A short review of recent trends,' *Food Science & Nutrition*, 8(9), pp. 4656–4665. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1781>.
- Nathiya, S, Durga, M & Devasena, T *et al.* (2014) 'Quercetin, encapsulated quercetin and its applications – a review', *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 6, pp. 20–26.
- Neuwirthová, J. *et al.* (2018) 'Potential of the flavonoid quercetin to prevent and treat cancer – Current status of research,' *Klinicka Onkologie*, 31(3). <https://doi.org/10.14735/amko2018184>.
- Pant, B., Park, M. and Park, S.-J. (2019) 'Drug delivery applications of Core-Sheath nanofibers prepared by coaxial electrospinning: a review,' *Pharmaceutics*, 11(7), p. 305. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070305>.
- Pitt, C.G. *et al.* (1981) 'Aliphatic polyesters. I. The degradation of poly(ε-caprolactone) in vivo,' *Journal of Applied Polymer Science*, 26(11), pp. 3779–3787. <https://doi.org/10.1002/app.1981.070261124>.
- Pitt, C.G. *et al.* (1984) 'The enzymatic surface erosion of aliphatic polyesters,' *Journal of Controlled Release*, 1(1), pp. 3–14. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(84\)90016-6](https://doi.org/10.1016/0168-3659(84)90016-6).
- Pitt, G. *et al.* (1981) 'Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (ε-caprolactone), and their copolymers in vivo,' *Biomaterials*, 2(4), pp. 215–220. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(81\)90060-0](https://doi.org/10.1016/0142-9612(81)90060-0).

- Raghavan, P. *et al.* (2012) 'Electrospun polymer nanofibers: The booming cutting edge technology,' *Reactive and Functional Polymers*, 72(12), pp. 915–930. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2012.08.018>.
- Sak, K. (2013) 'Site-Specific anticancer effects of dietary flavonoid quercetin,' *Nutrition and Cancer*, 66(2), pp. 177–193. <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.864418>.
- Seo, S. *et al.* (2024) 'Nanocrystal formulation to enhance oral absorption of silybin: preparation, in vitro evaluations, and pharmacokinetic evaluations in rats and healthy human subjects,' *Pharmaceutics*, 16(8), p. 1033. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16081033>.
- Singh, G. and Pai, R.S. (2014) 'In-vitro/in-vivo characterization of trans-resveratrol-loaded nanoparticulate drug delivery system for oral administration,' *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(8), pp. 1062–1076. <https://doi.org/10.1111/jphp.12232>.
- Singh, S. (2010) 'Nanomedicine–Nanoscale drugs and delivery systems,' *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10(12), pp. 7906–7918. <https://doi.org/10.1166/jnn.2010.3617>.
- Spartali, C. *et al.* (2024) 'Silybin-Functionalized PCL electrospun fibrous membranes for potential pharmaceutical and biomedical applications,' *Polymers*, 16(16), p. 2346. <https://doi.org/10.3390/polym16162346>.
- Stepanenko, A.A. and Dmitrenko, V.V. (2015) 'HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution,' *Gene*, 569(2), pp. 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.065>.
- Sun, Z. *et al.* (2017) 'Recent Advances in Application of Poly-Epsilon-Caprolactone and its Derivative Copolymers for Controlled Release of Anti-Tumor Drugs,' *Current Cancer Drug Targets*, 17(5), pp. 445–455. <https://doi.org/10.2174/1568009617666170109150430>.
- Sundaram, M.K. *et al.* (2019) 'Quercetin modulates signaling pathways and induces apoptosis in cervical cancer cells,' *Bioscience Reports*, 39(8). <https://doi.org/10.1042/bsr20190720>.
- Surai, P. (2015) 'Silymarin as a natural antioxidant: An overview of the current evidence and perspectives,' *Antioxidants*, 4(1), pp. 204–247. <https://doi.org/10.3390/antiox4010204>.
- Tomar, Y. *et al.* (2023) 'Evolving trends in nanofibers for topical delivery of therapeutics in skin disorders,' *ACS Omega*, 8(21), pp. 18340–18357. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00924>.

Tsialtas, I. *et al.* (2021) 'Anti-Apoptotic and antioxidant activities of the mitochondrial estrogen receptor beta in N2A neuroblastoma cells,' *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), p. 7620. <https://doi.org/10.3390/ijms22147620>.

Vecchione, G. *et al.* (2016) 'Silybin counteracts lipid excess and oxidative stress in cultured steatotic hepatic cells,' *World Journal of Gastroenterology*, 22(26), p. 6016. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i26.6016>.

Wang, M. *et al.* (2015) 'Silibinin Prevents Autophagic Cell Death upon Oxidative Stress in Cortical Neurons and Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury,' *Molecular Neurobiology*, 53(2), pp. 932–943. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9062-5>.

Xu, C.Y. *et al.* (2003) 'Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering,' *Biomaterials*, 25(5), pp. 877–886. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00593-3](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00593-3).

Zhang, C. *et al.* (2020) 'Electrospinning of nanofibers: Potentials and perspectives for active food packaging,' *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), pp. 479–502. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12536>.

Zhang, M. *et al.* (2011) 'Antioxidant properties of quercetin,' *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 283–289. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7756-4_38.

Zhou, J. *et al.* (2017) 'Investigation of the anti-cancer effect of quercetin on HepG2 cells in vivo,' *PLoS ONE*, 12(3), p. e0172838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172838>.

Zuo, A. *et al.* (2011) 'Study on the relation of structure and antioxidant activity of isorhamnetin, quercetin, phloretin, silybin and phloretin isonicotinyl hydrazone,' *Free Radicals and Antioxidants*, 1(4), pp. 39–47. <https://doi.org/10.5530/ax.2011.4.7>.

Διαδικτυακές πηγές

ATCC. CRL-1573 (293 cell line) micrograph. Αντλήθηκε από <https://www.atcc.org/-/media/product-assets/images/micrographs/cell-biology/crl-1573.jpg?rev=e0b3a6bc95d24132ae0b84996e72bbfb> (πρόσβαση: 15 Αυγούστου 2025)

ATCC. HepG2 (HB-8065) micrograph. Αντλήθηκε από: <https://www.atcc.org/-/media/product-assets/images/micrographs/cell-biology/hb-8065-low-high.jpg?rev=15d0f54a6b79468d8c3f57c9c200f420> (πρόσβαση: 15 Αυγούστου 2025)

Editorial Team. (2022, March 7). *Manual cell counting with Neubauer chamber*. Laboratoryinfo. <https://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/>