

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΜΣ «ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΥΓΡΩΝ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΥ
ΤΣΙΓΑΡΟΥ ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ
ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΖΑΧΑΡΙΑΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **Κουρέτας Δημήτριος (Επιβλέπων):** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών – Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- **Στάγκος Δημήτριος:** Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- **Πουλός Κωνσταντίνος:** Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Ευχαριστίες

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου και διευθυντή του ΠΜΣ «ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ», κ. Δημήτριο Κουρέτα για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας και για την ευκαιρία που μου έδωσε να διεξάγω τα απαιτούμενα πειράματα σε ένα πλήρως εξοπλισμένο εργαστήριο και σε ένα ευχάριστο περιβάλλον όπου υπήρχε η δυνατότητα αξιοποίησης των ήδη υπαρχουσών γνώσεων μου καθώς και απόκτησης νέων βαρυσήμαντων δεξιοτήτων μέσα από τη χρήση προηγμένων τεχνικών και μεθόδων.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στην κ. Κερασιώτη Ευθαλία για την άψογη συνεργασία και τη συμβολή της στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας και γενικότερα για την πολύτιμη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια της εργαστηριακής μου πορείας.

Ευχαριστώ πολύ όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το φιλικό κλίμα και το πνεύμα αλληλεγγύης που επικρατούσε καθώς και για τον επαγγελματισμό που φρόντιζαν να επιδεικνύουν σε κάθε περίπτωση.

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω αυτή την εργασία στην οικογένεια μου και να τους ευχαριστήσω ολόψυχα για την αμέριστη στήριξή τους σε κάθε μου βήμα μέχρι σήμερα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα εικόνων.....	6
Περιεχόμενα πινάκων.....	9
Περιεχόμενα γραφημάτων.....	10
Συντομογραφίες.....	14
Περίληψη.....	17

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες.....	20
1.1.1 Εισαγωγή.....	20
1.1.1.1 Ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$).....	21
1.1.1.2 Ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot}).....	22
1.1.1.3 Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)	22
1.1.2 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	22
1.1.2.1 Ενδογενείς πηγές	23
1.1.2.1.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση	23
1.1.2.1.2 Ουδετερόφιλα και αναπνευστική «έκρηξη».....	24
1.1.2.1.3 Οξειδάση της ξανθίνης (XO).....	24
1.1.2.1.4 Κυτόχρωμα P450.....	25
1.1.2.1.5 Αυτοοξείδωση μορίων.....	25
1.1.2.2 Εξωγενείς πηγές.....	25
1.1.3 Βιολογική δράση των ROS.....	26
1.1.3.1 Θετικές επιδράσεις	26
1.1.3.2 Αρνητικές επιδράσεις.....	26
1.1.4 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	28
1.1.4.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	28
1.1.4.1.1 Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	29
1.1.4.1.2 Καταλάση (CAT)	29
1.1.4.1.3 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)	29
1.1.4.1.4 Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)	30
1.1.4.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	30
1.1.4.2.1 Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)	30
1.1.5 Οξειδωτικό στρες.....	31

1.1.5.1 Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες.....	31
1.2 Ηλεκτρονικό τσιγάρο	32
1.2.1 Κάπνισμα vs άτμισμα	32
1.2.2 Τι είναι το ηλεκτρονικό τσιγάρο;.....	33
1.2.3 Συσκευές ηλεκτρονικού τσιγάρου.....	34
1.2.4 Υγρά αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου.....	35
1.2.4.1 Προπυλενογλυκόλη (PG)	36
1.2.4.2 Φυτική γλυκερόλη (VG).....	37
1.2.4.3 Αρωματικές ύλες (flavorings).....	38
1.2.4.4 Νικοτίνη	39
1.2.5 Ηλεκτρονικό τσιγάρο και οξειδωτικό στρες.....	41
1.3 Ενδοθήλιο.....	42
1.3.1 Εισαγωγή.....	42
1.3.2 Λειτουργίες του ενδοθηλίου.....	44
1.3.3 Ενδοθήλιο και ROS.....	44
1.3.4 Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και οξειδωτικό στρες.....	45
Σκοπός της μελέτης.....	47

2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά και οργανολογία.....	49
2.1.1 Αντιδραστήρια – διαλύματα – υλικά.....	49
2.1.2 Όργανα – σκεύη – συσκευές.....	50
2.2 Μέθοδοι και πειραματικές πορείες.....	51
2.2.1 Καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς EA.hy926.....	51
2.2.2 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου με τη μέθοδο XTT.....	51
2.2.2.1 Αρχή μεθόδου.....	52
2.2.2.2 Πειραματική διαδικασία.....	52
2.2.3 Προσδιορισμός των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) και των ελευθέρων ριζών (δραστικών μορφών οξυγόνου, ROS) με κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC).....	53
2.2.3.1 Αρχή μεθόδου.....	53
2.2.3.2 Πειραματική διαδικασία.....	54

2.2.4	Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS.....	55
2.2.4.1	Αρχή μεθόδου.....	55
2.2.4.2	Πειραματική διαδικασία.....	56
2.2.5	Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford	56
2.2.6	Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας TAC (Total Antioxidant Capacity)	57
2.2.6.1	Αρχή μεθόδου.....	57
2.2.6.2	Πειραματική διαδικασία.....	57
2.2.7	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.....	58
2.2.7.1	Αρχή μεθόδου.....	58
2.2.7.2	Πειραματική διαδικασία.....	59
2.3	Στατιστική ανάλυση	59

3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1	Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου με τη μέθοδο XTT.....	62
3.2	Προσδιορισμός των επιπέδων GSH και ROS με κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC).....	68
3.3	Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).....	78
3.4	Προσδιορισμός των επιπέδων των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).....	79
3.5	Προσδιορισμός των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.....	80

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1	Συζήτηση.....	83
4.2	Συμπεράσματα.....	87
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	89

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Κυτταρικές πηγές παραγωγής ROS. Τα υποκυτταρικά οργανίδια καθώς και διάφορα δομικά και διαλυτά κυτταρικά συστατικά συνεισφέρουν στην παραγωγή μιας μεγάλης ποικιλίας δραστικών ειδών.

Εικόνα 2: Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων. Το ζεύγος e^- από το NADH εισέρχεται στο σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας. Έπειτα γίνεται μεταφορά των e^- στο συνένζυμο Q όπου μεταφέρονται μέσω της μεμβράνης στο σύμπλοκο III. Στη συνέχεια, τα e^- μεταφέρονται στο κυτόχρωμα c το οποίο με τη σειρά του τα μεταφέρει στο σύμπλοκο IV. Το σύμπλοκο IV μεταφέρει τα e^- στο μοριακό οξυγόνο.

Εικόνα 3: Μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ μέσω της δράσης του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης (XO) και παράλληλη παραγωγή ROS (H_2O_2 και $O_2^{\cdot-}$).

Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση ορισμένων πηγών παραγωγής ελευθέρων ριζών.

Εικόνα 5: Ο μηχανισμός της λιπιδικής υπεροξειδωσης.

Εικόνα 6: Δράση ενός αντιοξειδωτικού παράγοντα έναντι μιας ελεύθερης ρίζας.

Εικόνα 7: Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.

Εικόνα 8: Η δομή της γλουταθειόνης. Είναι ένα τριπεπτίδιο το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα Glu, Cys, Gly.

Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες.

Εικόνα 10: Διαφορετικοί τύποι συσκευών ηλεκτρονικού τσιγάρου.

Εικόνα 11: Συστατικά υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου.

Εικόνα 12: Οι διαφορετικές αναλογίες PG/VG που χρησιμοποιούνται στα υγρά ηλεκτρονικού τσιγάρου και η συσχέτισή τους με την παραγωγή καπνού και την αίσθηση του «χτυπήματος» που δίνει ο ατμός στο λαιμό.

Εικόνα 13: Μεταβολισμός της προπυλενογλυκόλης σε κύτταρα θηλαστικών.

Εικόνα 14: Οι τρεις διαφορετικοί τύποι ενδοθηλίου: το συνεχές ενδοθήλιο (continuous), το ενδοθήλιο με διάκενα (fenestrated) και το ασυνεχές ενδοθήλιο (discontinuous).

Εικόνα 15: Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει την προέλευση των ενδοθηλιακών και αιμοποιητικών κυττάρων από έναν κοινό πρόγονο αιμαγαιοβλαστών.

Εικόνα 16: Οι διάφορες λειτουργίες του ενδοθηλίου.

Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της συσχέτισης του οξειδωτικού στρες με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και κατ' επέκταση με την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και άλλων καρδιαγγειακών νόσων.

Εικόνα 18: Διαγραμματική απεικόνιση της καλλιέργειας των ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926).

Εικόνα 19: Μεταβολισμός του XTT προς την υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων.

Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του κυτταρομέτρου ροής.

Εικόνα 21: Αντίδραση μεταξύ της MDA με το TBA προς σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος με $\lambda_{max}=531$ nm.

Εικόνα 22: Εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από αντιοξειδωτικούς παράγοντες που δρουν άμεσα ως δότες H^+ με παράλληλη μετατροπή του χρώματος από μωβ σε κίτρινο.

Εικόνα 23: Αντίδραση μεταξύ των καρβονυλικών ομάδων (αλδεΐδες/κετόνες) των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί οξειδωτική βλάβη με τη 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH) προς σχηματισμό του DNPH παραγώγου 2,4-δινιτροφαινυλδραζόνη με $\lambda_{\max}=370$ nm. Η αντίδραση πραγματοποιείται υπό όξινες συνθήκες και συνοδεύεται με αποβολή ενός μορίου H_2O .

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Οι κυριότερες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS).

Πίνακας 2: Η ταξινόμηση της νικοτίνης ως προς τους κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία σύμφωνα με τον ευρωπαϊκό κανονισμό CLP [(ΕΚ) αριθ. 1272/2008]

Πίνακας 3: Οι συνηθέστερες συγκεντρώσεις νικοτίνης στα υγρά ηλεκτρονικών τσιγάρων.

Πίνακας 4: Επιλογή συγκεντρώσεων των υγρών ηλεκτρονικού τσιγάρου με βάση τα αποτελέσματα του XTT assay για χρήση στα πειράματα προσδιορισμού αντιοξειδωτικών δεικτών.

Πίνακας 5: Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων από τα πειράματα προσδιορισμού των επιπέδων GSH, ROS, TAC, TBARS και πρωτεϊνικών καρβονυλίων των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 έπειτα από επώαση τους με τα υγρά αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου. Με ↑ ή ↓ δηλώνεται η στατιστικά σημαντική αύξηση ή μείωση, αντίστοιχα, ενώ με ↗ ή ↘ δηλώνεται η τάση για αύξηση ή μείωση, αντίστοιχα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1: Επίδραση του υγρού αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου Dragon Tail συγκέντρωσης νικοτίνης 0 mg/ml στη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.

Γράφημα 2: Επίδραση του υγρού αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου Dragon Tail συγκέντρωσης νικοτίνης 12 mg/ml στη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.

Γράφημα 3: Επίδραση του υγρού αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου Dragon Tail συγκέντρωσης νικοτίνης 18 mg/ml στη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.

Γράφημα 4: Επίδραση του υγρού αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου White Orchid συγκέντρωσης νικοτίνης 6 mg/ml στη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.

Γράφημα 5: Επίδραση του υγρού αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου White Orchid συγκέντρωσης νικοτίνης 12 mg/ml στη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.

Γράφημα 6: Επίδραση του υγρού αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου Temptation συγκέντρωσης νικοτίνης 12 mg/ml στη βιωσιμότητα των

ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.

Γράφημα 7: Επίδραση του υγρού αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου Temptation συγκέντρωσης νικοτίνης 18 mg/ml στη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.

Γράφημα 8: Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926, έπειτα από επώασή τους με τα υγρά ηλεκτρονικού τσιγάρου στην υψηλή συγκέντρωση, με κυτταρομετρία ροής. Α) Με κόκκινο χρώμα φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των ενδοθηλιακών κυττάρων. Β) Με μπλε χρώμα φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που δείχνουν τον αριθμό των κυττάρων συναρτήσει του φθορισμού τους (10,000 κύτταρα). DOH: Dragon Tail (0 mg/ml) High concentration, D12H: Dragon Tail (12 mg/ml) High concentration, D18H: Dragon Tail (18 mg/ml) High concentration, T12H: Temptation (12 mg/ml) High concentration, T18H: Temptation (18 mg/ml) High concentration, W6H: White Orchid (6 mg/ml) High concentration, W12H: White Orchid (12 mg/ml) High concentration.

Γράφημα 9: Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926, έπειτα από επώασή τους με τα υγρά ηλεκτρονικού τσιγάρου στη χαμηλή συγκέντρωση, με κυτταρομετρία ροής. Α) Με κόκκινο χρώμα φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των ενδοθηλιακών κυττάρων. Β) Με μπλε χρώμα φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που δείχνουν τον αριθμό των κυττάρων συναρτήσει του φθορισμού τους (10,000 κύτταρα). DOL: Dragon Tail (0 mg/ml) Low concentration, D12L: Dragon Tail (12 mg/ml) Low concentration, D18L: Dragon Tail (18 mg/ml) Low concentration, T12L: Temptation (12 mg/ml) Low concentration, T18L: Temptation (18 mg/ml) Low concentration, W6L: White

Orchid (6 mg/ml) Low concentration, W12L: White Orchid (12 mg/ml) Low concentration.

Γράφημα 10: Επίδραση των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου στα επίπεδα της ενδογενούς ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ($p < 0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $\text{mean} \pm \text{SEM}$.

Γράφημα 11: Προσδιορισμός των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926, έπειτα από επώασή τους με τα υγρά ηλεκτρονικού τσιγάρου στην υψηλή συγκέντρωση, με κυτταρομετρία ροής. Α) Με κόκκινο χρώμα φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των ενδοθηλιακών κυττάρων. Β) Με μπλε χρώμα φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που δείχνουν τον αριθμό των κυττάρων συναρτήσει του φθορισμού τους (10,000 κύτταρα).

Γράφημα 12: Προσδιορισμός των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926, έπειτα από επώασή τους με τα υγρά ηλεκτρονικού τσιγάρου στη χαμηλή συγκέντρωση, με κυτταρομετρία ροής. Α) Με κόκκινο χρώμα φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των ενδοθηλιακών κυττάρων. Β) Με μπλε χρώμα φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που δείχνουν τον αριθμό των κυττάρων συναρτήσει του φθορισμού τους (10,000 κύτταρα).

Γράφημα 13: Επίδραση των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου στα επίπεδα των ελευθέρων ριζών (ROS) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ($p < 0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $\text{mean} \pm \text{SEM}$.

Γράφημα 14: Επίδραση των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου στα επίπεδα της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

Γράφημα 15: Επίδραση των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου στα επίπεδα των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ($p < 0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

Γράφημα 16: Επίδραση των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ($p < 0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

¹O₂ : Μονήρες οξυγόνο

8-OHdG : 8-οξο-2'-δεοξυγουανοσίνη

AcOEt : οξικός αιθυλεστέρας

CAT (Catalase): Καταλάση

CLP (Classification Labelling Packaging): Ευρωπαϊκός Κανονισμός για την Ταξινόμηση, Επισήμανση και Συσκευασία των επικίνδυνων χημικών προϊόντων

CoQ-10 (Co-enzyme Q-10) : Συνένζυμο Q-10

Cys (Cysteine): Κυστεΐνη

DCF-DA (2,7-dichlorofluorescein diacetate): 2,7-διχλωροφθορεσκεΐνη διοξικού

DIY (e-liquids) (Do it yourself): αυτοσχέδια (υγρά ηλεκτρονικού τσιγάρου)

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium): Θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των κυττάρων το οποίο περιέχει άλατα Earle's

DNPH : 2,4 – δινιτροφαινυλδραζίνη

DPPH• : 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο

DPPH-H : 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη

EPR (Electron Paramagnetic Resonance): Ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός

ESR (Electron Spin Resonance): Συντονισμός περιστροφής ηλεκτρονίων

EtOH : αιθανόλη

FAD (Flavin Adenine Dinucleotide): Φλαβινο-αδενο-δινουκλεοτίδιο

FBS (Fetal Bovine Serum): Ορός εμβρύου μόσχου

FC (Flow Cytometry): Κυτταρομετρία ροής

FDA (Food and Drug Administration): Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ

FSC (Forward Scattering): Εμπρόσθιος σκεδασμός

GC-MS (Gas Chromatography – Mass Spectrometry): Αέρια χρωματογραφία – Φασματομετρία μάζας

Glu (Glutamic Acid): Γλουταμινικό οξύ

Gly (Glycine): Γλυκίνη

GPx (Glutathione Peroxidase): Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

GR (Glutathione Reductase): Αναγωγάση της γλουταθειόνης

GSH : Ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης

GSSG : Οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης
HCl : υδροχλωρικό οξύ
HNO₂ : Νιτρώδες οξύ
HOBr : Υποβρωμιώδες οξύ
HOCl : Υποχλωριώδες οξύ
HOO• : Ρίζα υδροπεροξυλίου
H₂O₂ : Υπεροξειδίο του υδρογόνου
HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells): Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής φλέβας
KH₂PO₄ : Δισόξινο φωσφορικό κάλιο
MDA (Malondialdehyde): Μηλονική διαλδεύδη
MeOH : Μεθανόλη
Na₂HPO₄ : Όξινο φωσφορικό νάτριο
Na₂SO₄ : θειικό νάτριο
NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide): Νικοτιναμιδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο
NH₂CONH₂ : ουρία
NO• : Ρίζα μονοξειδίου του αζώτου
NO₂• : Ρίζα διοξειδίου του αζώτου
O₂•⁻ : Ανιονική ρίζα σουπεροξειδίου
O₃ : Όζον
OH• : Ρίζα υδροξυλίου
ONOO⁻ : Υπεροξυνιτρώδες ανιόν
PBS (Phosphate Buffered Saline): Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
PMN (Polymorphonuclear neutrophil): Ουδετερόφιλο πολυμορφοπύρρηνο κύτταρο
Prxs (Peroxiredoxins): Περοξυρεδοξίνες
PUFAs (Polyunsaturated fatty acids): Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
PG (Propylene glycole): Προπυλενογλυκόλη
RCS (Reactive Chlorine Species): Δραστικές μορφές χλωρίου
RNS (Reactive Nitrogen Species): Δραστικές μορφές αζώτου
RO• : Ρίζα αλκοξυλίου
ROO• : Ρίζα περοξυλίου
ROS (Reactive Oxygen Species): Δραστικές μορφές οξυγόνου
RSS (Reactive Sulfur Species): Δραστικές μορφές θείου
SOD (Superoxide Dismutase): Υπεροξειδική δισμουτάση

SSC (Side Scattering): Πλάγιος σκεδασμός

TAC (Total Antioxidant Capacity): Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα

TBA (Thiobarbituric Acid) : Θειοβαρβιτουρικό οξύ

TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances): Ουσίες οι οποίες αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ.

TCA (Trichloroacetic Acid) : τριχλωροξικό οξύ

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor): Ενδοθηλιακός αγγειακός αυξητικός παράγοντας

VG (Vegetable Glycerin): Φυτική γλυκερίνη

WHO (World Health Organisation): Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

XO (Xanthine Oxidase): Οξειδάση της ξανθίνης

ΠΑΥ : Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες

Περίληψη

Το κάπνισμα αποτελεί έναν από τους κορυφαίους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακές και άλλες ασθένειες παγκοσμίως και έχει ενοχοποιηθεί για πρόκληση πρώιμου θανάτου. Στα πλαίσια της μείωσης της βλάβης του καπνίσματος, τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μια ραγδαία αύξηση της χρήσης εναλλακτικών τρόπων καπνίσματος μέσω ηλεκτρονικών συστημάτων πρόσληψης νικοτίνης. Ειδικότερα, το ηλεκτρονικό τσιγάρο κερδίζει συνεχώς έδαφος καθώς θεωρείται ασφαλέστερο από το συμβατικό τσιγάρο και επικρατεί η αντίληψη ότι αποτελεί πιθανό εργαλείο για τη διακοπή του καπνίσματος. Οι οξείες επιπτώσεις από τη χρήση ηλεκτρονικού τσιγάρου έχουν μελετηθεί εκτενώς, ωστόσο οι μακροχρόνιες πιθανές δυσμενείς επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστες. Το οξειδωτικό στρες είναι γνωστό πως εμπλέκεται στην ανάπτυξη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων. Μέχρι στιγμής οι περισσότερες έρευνες αφορούν τις επιπτώσεις στο αναπνευστικό σύστημα ενώ λιγότερες έχουν εστιάσει στο αγγειακό σύστημα (Pisinger & Døssing, 2014). Στην παρούσα έρευνα, επιχειρήθηκε να σκιαγραφηθεί η επίδραση των υγρών αναπλήρωσης του ηλεκτρονικού τσιγάρου στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων (κυτταρική σειρά EA.hy926). Για το σκοπό αυτό αρχικά προσδιορίστηκε η κυτταροτοξική δράση των υγρών αναπλήρωσης με μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων χρησιμοποιώντας το XTT cell proliferation assay. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρίας ροής τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH) και των ελευθέρων ριζών (ROS). Ακολούθησε φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), του βαθμού λιπιδικής υπεροξειδωσης (TBARS) και του βαθμού πρωτεϊνικής οξείδωσης με προσδιορισμό των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας υπέρ των ελευθέρων ριζών στα υγρά αναπλήρωσης που είχαν γεύση καπνικού ενώ τα υγρά με γεύση βανίλιας επέδειξαν ένα πιο πολύπλοκο προφίλ ανάλογα με την περιεκτικότητα σε νικοτίνη. Ίσως το πιο ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης αφορά τα υγρά με γεύση μήλο/μέντα που φάνηκε να ενεργοποιούν την αντιοξειδωτική άμυνα για να προστατεύσουν τα κύτταρα από τις δυσμενείς επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών. Έγινε φανερό πως οι αρωματικές ύλες που περιέχονται στα υγρά αναπλήρωσης παίζουν καίριο ρόλο στη μεσολαβούμενη από το οξειδωτικό στρες επαγόμενη τοξικότητα των υγρών αναπλήρωσης. Η μεγάλη ποικιλία των εμπορικά

διαθέσιμων υγρών αναπλήρωσης και της πληθώρας των διαφορετικών γεύσεων που κυκλοφορούν καθιστά επιτακτική την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη και αποσαφήνιση του ρόλου των συστατικών των υγρών στην τοξικότητά τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες

1.1.1 Εισαγωγή

Ως ελεύθερη ρίζα μπορεί να οριστεί κάθε αυθύπαρκτο χημικό είδος (μόριο, άτομο, ιόν) το οποίο διαθέτει περιττό αριθμό e^- σθένους (συνήθως επτά) και συνεπώς έχει ένα ασύζευκτο e^- σε κάποιο τροχιακό. Ως εκ τούτου, οι ελεύθερες ρίζες είναι ηλεκτρονιόφιλες καθώς έχουν αυξημένη τάση να αποσπών e^- από άλλες ενώσεις προκειμένου να συμπληρώσουν την οκτάδα των e^- στη στοιβάδα σθένους τους (IUPAC, 1997). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το άτομο του υδρογόνου (H) το οποίο αποτελείται από $1p^+$ και $1e^-$ και είναι η απλούστερη ελεύθερη ρίζα. Οι ελεύθερες ρίζες έχουν γενικά μεγάλη χημική αστάθεια και εμφανίζουν υψηλή δραστηριότητα και πολύ χαμηλό χρόνο ημιζωής. Ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκύψουν με διάφορους τρόπους. Ένας από αυτούς είναι μέσω ομολυτικής διάσπασης ομοιοπολικού δεσμού ($A:B \rightarrow A\cdot + B\cdot$) όπου προκύπτουν δύο ρίζες. Επίσης, μπορούν να σχηματιστούν μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων ή ακόμα και μέσω απόσπασης ενός ατόμου από κάποιο άλλο μόριο καθιστώντας το μια νέα ρίζα. Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν και μεταξύ τους προς σχηματισμό μιας ενεργειακά σταθερής ένωσης η οποία είναι μη ρίζα. Στον οργανισμό, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με πολλά βιομόρια όπως πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA προκαλώντας οξειδωτικές βλάβες και εκκινώντας αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών οι οποίες μπορούν δυνητικά να έχουν βλαβερές συνέπειες για την υγεία (Siraki et al., 2017).

Μια βασική κατηγοριοποίηση των ελευθέρων ριζών μπορεί να γίνει βάσει του κεντρικού τους ατόμου. Έτσι, διακρίνονται, μεταξύ άλλων, οι: δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), αζώτου (RNS), θείου (RSS) και χλωρίου (RCS). Από αυτές, εκείνες που συναντώνται συχνότερα στον οργανισμό είναι οι ROS και σε μικρότερο βαθμό οι RNS οι οποίες μαζί με τις υπόλοιπες μπορούν να προκύψουν έπειτα από αντίδραση με τις ROS. Παρόλο που αναφερόμαστε σε ρίζες, πολλές ουσίες μη ρίζες συγκαταλέγονται σε αυτές τις δραστικές μορφές, καθώς είτε αποτελούν οξειδωτικούς παράγοντες είτε μπορούν εύκολα να μετατραπούν στις αντίστοιχες ρίζες τους. Έτσι, οι ROS ορίζονται ευρύτερα από ότι οι ελεύθερες ρίζες, ως εκείνα τα είδη που περιέχουν ένα ή περισσότερα άτομα οξυγόνου που πληρούν τα

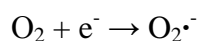
απαραίτητα κριτήρια ώστε να είναι χημικά πολύ δραστικές (Halliwell & Gutteridge, 2015). Οι κυριότερες ROS και RNS παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Οι κυριότερες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS).

Ρίζες		Μη ρίζες	
Όνομασία ROS	Συμβολισμός	Όνομασία ROS	Συμβολισμός
Ανιόντος σουπεροξειδίου	$O_2^{\cdot-}$	Υπεροξειδίο του υδρογόνου	H_2O_2
Υδροξυλίου	OH^{\cdot}	Υποχλωριώδες οξύ	$HOCl$
Περοξυλίου	ROO^{\cdot}	Υποβρωμιώδες οξύ	$HOBr$
Αλκοξυλίου	RO^{\cdot}	Όζον	O_3
Υδροπεροξυλίου	HOO^{\cdot}	Μονήρες οξυγόνο	1O_2
Όνομασία RNS	Συμβολισμός	Όνομασία RNS	Συμβολισμός
Μονοξειδίου του αζώτου	NO^{\cdot}	Νιτρώδες οξύ	HNO_2
Διοξειδίου του αζώτου	NO_2^{\cdot}	Υπεροξυνιτρώδες ανιόν	$ONOO^{\cdot-}$

1.1.1.1 Ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)

Το σουπεροξειδίο είναι η ανιονική μορφή του οξυγόνου και όταν διαθέτει ένα ασύζευκτο e^- , αποτελεί ελεύθερη ρίζα. Παράγεται από την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου από $1e^-$ σε συστήματα μεταφοράς e^- (π.χ. αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων). Μπορεί να προκύψει και μέσω ενζυμικών αντιδράσεων με τη βοήθεια οξειδασών (XO, NAD(P)H oxidase) (Halliwell & Gutteridge, 1984). Η αντίδραση σχηματισμού του είναι η εξής:

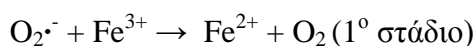


Παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τα φλεγμονώδη κύτταρα. Επειδή είναι αρνητικά φορτισμένο, το $O_2^{\cdot-}$ διαχέεται δύσκολα μέσα από τις βιολογικές μεμβράνες. Το $O_2^{\cdot-}$ είναι επίσης παραμαγνητικό. Σε σύγκριση με άλλες ROS, έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής ($t_{1/2}=10^{-5}$ sec). Στα βιολογικά συστήματα, μπορεί να δημιουργηθεί κατά τη φυσιολογική καταλυτική λειτουργία μιας ποικιλίας ενζύμων καθώς επίσης κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της αιμοσφαιρίνης (Hb) σε μεθαιμοσφαιρίνη (HbM). Στους ζωντανούς οργανισμούς, το ένζυμο SOD προστατεύει το κύτταρο από τις επιβλαβείς επιδράσεις του $O_2^{\cdot-}$. Η βιολογική τοξικότητα του $O_2^{\cdot-}$ οφείλεται στην ικανότητά του να αδρανοποιεί ένζυμα που περιέχουν σύμπλεγμα σιδήρου-θείου (τα οποία παίζουν κρίσιμο ρόλο σε μια ευρεία γκάμα μεταβολικών οδών),

απελευθερώνοντας με αυτόν τον τρόπο ελεύθερο σίδηρο στο κύτταρο ο οποίος μπορεί μέσω της αντίδρασης Fenton να παράγει την εξαιρετικά δραστική ρίζα υδροξυλίου (OH·). Στη μορφή του HO₂· μπορεί επίσης να προκαλέσει λιπιδική υπεροξειδωση και ειδικότερα οξειδωση των PUFAs. Αντιδρά επίσης και με καρβονυλικές ενώσεις και αλογονωμένους άνθρακες δημιουργώντας τοξικές υπεροξυ- ρίζες. Ως εκ τούτου, το υπεροξειδίο είναι μια κύρια αιτία οξειδωτικού στρες (Hayyan et al., 2016).

1.1.1.2 Ρίζα υδροξυλίου (OH·)

Με πολύ μικρό χρόνο ημιζωής (~10⁻⁹ sec) και πάρα πολύ υψηλή δραστικότητα, η ρίζα OH· αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους οξειδωτικούς παράγοντες στα βιολογικά συστήματα, ο οποίος μάλιστα παρουσιάζει χαμηλή εκλεκτικότητα αναφορικά με το προς οξειδωση υπόστρωμα. Παράγεται μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss (Haber & Weiss, 1932; Koppenol, 2001) και Fenton (Fenton, 1894) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης ως καταλύτη το οποίο συνήθως είναι Cu ή Fe:



1.1.1.3 Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂)

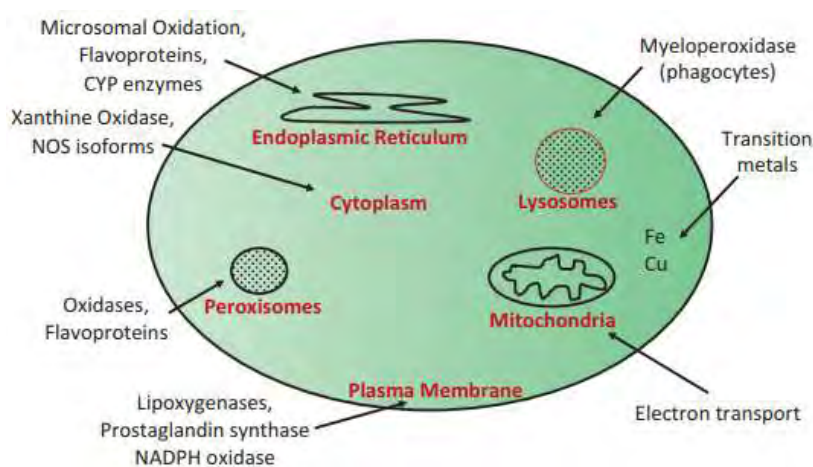
Παρόλο που ανήκει στις ROS, το H₂O₂ δεν είναι ρίζα, αλλά ένα σταθερό μόριο με υψηλό χρόνο ημιζωής που έχει την ικανότητα να διαπερνά τις μεμβράνες και δρα ως προ-οξειδωτικός παράγοντας επάγοντας την παραγωγή άλλων δραστικών ελευθέρων ριζών. Είναι ένα ήπιο οξειδωτικό και ως εκ τούτου σχετικά αδρανές στα περισσότερα βιομόρια, παρόλα αυτά είναι ικανό να επάγει αναστρέψιμες, ομοιοπολικές τροποποιήσεις υπολειμμάτων θειολικής κυστεΐνης που εντοπίζονται σε ενεργές και αλλοστερικές θέσεις ειδικών πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα μεταβολές στη δραστικότητα και τη λειτουργία τους. Οποιαδήποτε πρωτεΐνη περιέχει ένα υπόλειμμα αποπρωτονιωμένης κυστεΐνης μπορεί να οξειδωθεί από το H₂O₂ (Veal, Day & Morgan, 2007). Μπορεί να σχηματιστεί με διάφορους τρόπους, όπως μέσω της αντίδρασης Fenton ή με τη δράση διαφόρων οξειδασών. Παράγεται σε σημαντικές ποσότητες στα υπεροξειδισώματα (μικρά μεμβρανικά οργανίδια) καθώς επίσης στα

μιτοχόνδρια. Αποικοδομείται ενζυμικά κυρίως μέσω της CAT, της GPx και των περοξυρεδοξινών (Prxs) (Sies, 2017).

1.1.2 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

1.1.2.1 Ενδογενείς πηγές

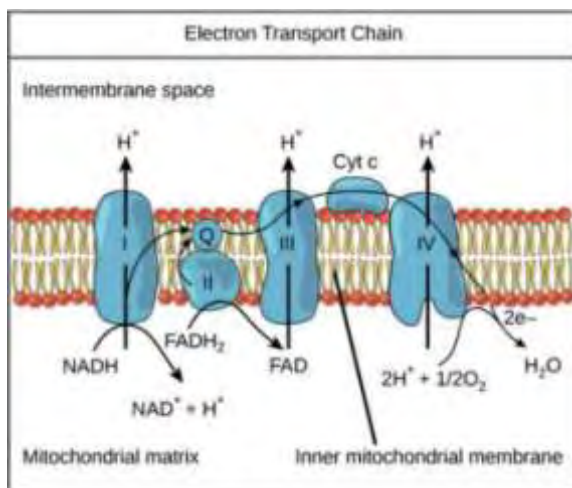
Στους ζωντανούς οργανισμούς, οι ROS παράγονται σε διάφορα κυτταρικά συστήματα που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη, στο κυτοσόλιο, στα υπεροξυσώματα, στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. (Εικόνα 1) (Di Meo et al., 2016; Holmström & Finkel, 2014).



Εικόνα 1: Κυτταρικές πηγές παραγωγής ROS. Τα υποκυτταρικά οργανίδια καθώς και διάφορα δομικά και διαλυτά κυτταρικά συστατικά συνεισφέρουν στην παραγωγή μιας μεγάλης ποικιλίας δραστικών ειδών.

1.1.2.1.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων αποτελεί την κύρια ενδοκυτταρική πηγή παραγωγής ROS στους περισσότερους ιστούς. Τα κατεξοχήν σημεία όπου παράγεται $O_2^{\cdot-}$ είναι τα συμπλέγματα I και III της αλυσίδας μεταφοράς e^- . Κατά τη διαδικασία παραγωγής του ATP ορισμένα e^- δύνανται να ξεφύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα έχοντας ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ελευθέρων ριζών (κυρίως ROS, καθώς το O_2 καταναλώνεται κατά κόρον στην οξειδωτική φωσφορυλίωση) ως παραπροϊόντα (Ježek & Hlavatá, 2005; Turrens, 2003).



Εικόνα 2: Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων. Το ζεύγος e^- από το NADH εισέρχεται στο σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας. Έπειτα γίνεται μεταφορά των e^- στο συνένζυμο Q όπου μεταφέρονται μέσω της μεμβράνης στο σύμπλοκο III. Στη συνέχεια, τα e^- μεταφέρονται στο κυτόχρωμα c το οποίο με τη σειρά του τα μεταφέρει στο

σύμπλοκο IV. Το σύμπλοκο IV μεταφέρει τα e^- στο μοριακό οξυγόνο.

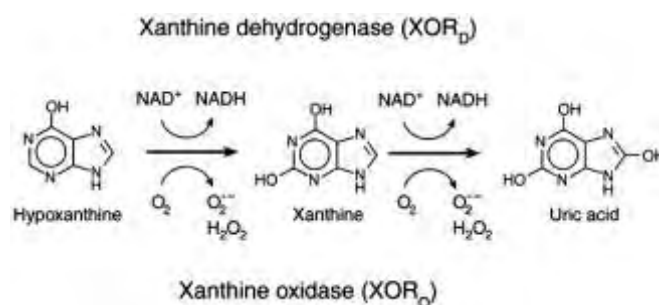
1.1.2.1.2 Ουδετερόφιλα και αναπνευστική «έκρηξη»

Τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρνα κύτταρα (PMNs) αποτελούν την πλειονότητα των κυκλοφορούντων λευκοκυττάρων στον οργανισμό και δύνανται να παράγουν γρήγορα μεγάλες ποσότητες ROS κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης μέσω ενός φαινομένου που ονομάζεται αναπνευστική (ή οξειδωτική) «έκρηξη». Τα PMNs παίζουν κρίσιμο ρόλο στην πρόιμη άμυνα του οργανισμού έναντι των παθογόνων. Κατά τη φλεγμονή, τα κύτταρα επιτρέπουν τη μετανάστευση και προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο σημείο του τραύματος μέσω έκκρισης διαφόρων χημειοτακτικών παραγόντων. Η αναπνευστική «έκρηξη» λοιπόν χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και υπερβολική παραγωγή ROS (κυρίως παράγεται $O_2^{\cdot-}$ από την NADPH οξειδάση) η οποία έχει αντιβακτηριακά αποτελέσματα (El-Benna et al., 2016; Mittal et al., 2014; Nguyen et al., 2017).

1.1.2.1.3 Οξειδάση της ξανθίνης (XO)

Διάφορα ένζυμα μπορούν να οξειδώσουν ενδογενή και εξωγενή υποστρώματα και να οδηγήσουν στην παραγωγή ROS. Από αυτά, η οξειδάση της ξανθίνης (XO) είναι από τα πιο μελετημένα. Η XO είναι μια φλαβινοπρωτεΐνη που περιέχει μολυβδαίνιο (Mo) και σίδηρο (Fe) στο ενεργό της κέντρο και παίζει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό των πουρινών καθώς καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Μέσω αυτής της διαδικασίας το μοριακό οξυγόνο ανάγεται οδηγώντας στο σχηματισμό $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 . Η XO υπάρχει σε δύο

μορφές: μια μορφή δεϋδρογονάσης που χρησιμοποιεί το NAD^+ ως δέκτη e^- και μια μορφή οξειδάσης που μπορεί και ανάγει το O_2 απευθείας σε H_2O_2 και $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Djordjević, 2004).



Εικόνα 3: Μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ μέσω της δράσης του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης (XO) και παράλληλη παραγωγή ROS (H_2O_2 και $\text{O}_2^{\cdot-}$).

1.1.2.1.4 Κυτόχρωμα P450

Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 εμπλέκονται στο σχηματισμό ROS στα βιολογικά συστήματα. Τα ένζυμα CYP καταλύουν την οξυγόνωση ενός οργανικού υποστρώματος με ταυτόχρονη αναγωγή του μοριακού οξυγόνου. Εάν η μεταφορά οξυγόνου σε ένα υπόστρωμα δεν είναι καλά ελεγχόμενη, εμφανίζεται φαινόμενο αποσύζευξης, γεγονός που οδηγεί στο σχηματισμό ROS (Hrgucay & Bandiera, 2015; Zangar et al., 2004).

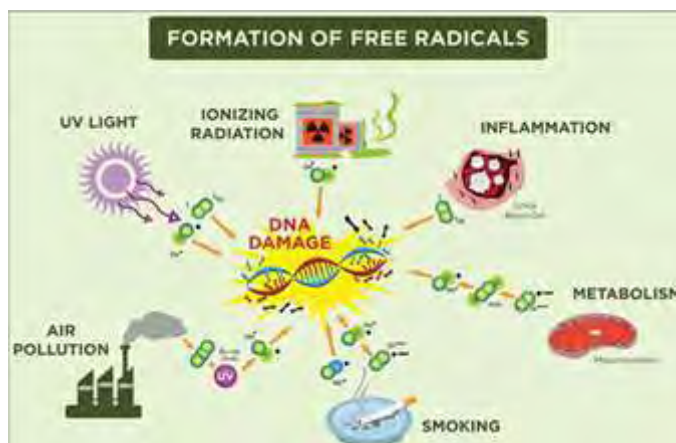
1.1.2.1.5 Αυτοοξειδωση μορίων

Κάποιες ενώσεις όπως η αιμοσφαιρίνη, η μυοσφαιρίνη, διάφορες φλαβόνες, κατεχολαμίνες και θειόλες δύνανται να αυτό-οξειδωθούν προς σχηματισμό ROS (κυρίως $\text{O}_2^{\cdot-}$).

1.1.2.2 Εξωγενείς πηγές

Ποικίλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες που λειτουργούν ως οξειδωτικά ευθύνονται για το σχηματισμό ελευθέρων ριζών στους οργανισμούς. Ειδικότερα, η έκθεση σε Η/Μ ιονίζουσα ακτινοβολία (UV, ακτίνες X και γ), σε ατμοσφαιρικούς ρύπους και βιομηχανικά απόβλητα καθώς επίσης το όζον (O_3) αποτελούν μερικές μόνο από τις εξωγενείς πηγές σχηματισμού ROS. Επίσης, αξίζει να τονιστεί ότι η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου όπως και η κατανάλωση αλκοόλ συνεισφέρουν σημαντικά στη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Επιπλέον, διάφορες άλλες ξеноβιοτικές

ουσίες όπως ορισμένα φάρμακα, εντομοκτόνα, τοξίνες κ.ά. μπορεί να δρουν προ-οξειδωτικά. Τέλος, κυρίαρχη θέση κατέχει και η διατροφή, μέσω της οποίας δύνανται να παραχθούν ROS (Schröder & Krutmann, 2005).



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση ορισμένων πηγών παραγωγής ελευθέρων ριζών.

1.1.3 Βιολογική δράση των ROS

1.1.3.1 Θετικές επιδράσεις

Παρά το γεγονός ότι οι ROS έχουν ταυτιστεί με ανεπιθύμητες επιδράσεις για την ανθρώπινη υγεία, έχει φανεί πως διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού. Πολλές ROS εμπλέκονται στο ανοσοποιητικό σύστημα με τη δράση τους έναντι των αντιγόνων κατά τη φαγοκύτωση, καθώς και στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις του οργανισμού. Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμα σηματοδοτικά μόρια, συμβάλλοντας στη διακυτταρική επικοινωνία μέσω της μεταγωγής σήματος. Παίζουν κρίσιμο ρόλο στη ενεργοποίηση γονιδίων, την κυτταρική ανάπτυξη και τη διαμόρφωση των χημικών αντιδράσεων μέσα στα κύτταρα. Συμμετέχουν επίσης στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και μπορούν να χρησιμεύσουν ως μεσολαβητές στη βιοσύνθεση των προσταγλανδινών (Reczek & Chandel, 2015; Shadel & Horvath, 2015; Zhang et al., 2016).

1.1.3.2 Αρνητικές επιδράσεις

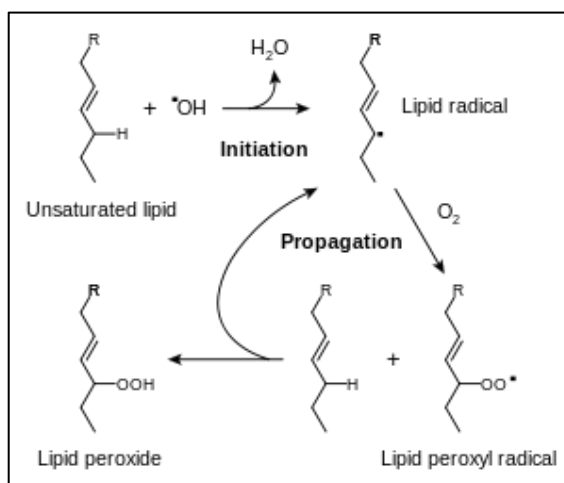
Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με διάφορα βιομόρια όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα οξειδώνοντάς τα, οδηγώντας σε σημαντικές τοξικές επιδράσεις για τον οργανισμό που συσχετίζονται με διάφορες παθολογίες. Χαρακτηριστικό

παράδειγμα αποτελεί η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL) η οποία οξειδώνεται από τις ελεύθερες ρίζες. Η οξειδωμένη μορφή της προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα και σχηματίζονται τα λεγόμενα «foam cells» που θα οδηγήσουν αργότερα στη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας (αθηρογένεση). Στη συνέχεια περιγράφονται οι κυριότερες οξειδώσεις αυτών των βιομορίων και οι συνέπειές τους.

I. Λιπιδική υπεροξείδωση:

Η έναρξη της λιπιδικής υπεροξείδωσης συμβαίνει όταν μία ρίζα (συνήθως το $\text{OH}\cdot$ λόγω της υψηλής δραστηριότητάς του) προσβάλλει τα φωσφολιπίδια (και ιδιαίτερα τα PUFAs) των λιπιδικών μεμβρανικών διπλοστοιβάδων των κυττάρων. Αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι μια αλυσιδωτή αντίδραση ριζών που οδηγεί σε σχηματισμό όλο και λιγότερων δραστικών ριζών έχοντας εν τέλει ως συνέπεια την απώλεια της μεμβρανικής ακεραιότητας. Κατά την οξείδωση των PUFAs παράγονται λιπιδικά υπεροξείδια καθώς και άλλοι μεταβολίτες ως παραπροϊόντα όπως η μηλονική διαλδεϋδη (MDA) η οποία βρίσκει συχνά εφαρμογή ως δείκτης οξειδωτικού στρες.

Ο μηχανισμός της λιπιδικής υπεροξείδωσης έχει ως εξής: μία ελεύθερη ρίζα (π.χ. $\text{OH}\cdot$) αρχικά αντιδρά με ένα PUFA αποσπώντας ένα υδρογόνο και σχηματίζοντας μια λιπιδική ρίζα ($\text{L}\cdot$) η οποία μέσω ανασχηματισμού των δεσμών μετατρέπεται σε ένα διένιο το οποίο στη συνέχεια σχηματίζει μια περοξυ-



ριζα ($\text{LOO}\cdot$) με προσθήκη οξυγόνου. Η **Εικόνα 5:** Ο μηχανισμός της λιπιδικής $\text{LOO}\cdot$ με τη σειρά της μπορεί να υπεροξειδώσης.

αποσπάσει Η από γειτονικά λιπαρά οξέα προς σχηματισμό LOOH και μιας νέας λιπιδικής ρίζας. Με αυτόν τον τρόπο διαδίδεται αλυσιδωτά η λιπιδική υπεροξείδωση (Mylonas & Kouretas, 1999).

II. Πρωτεϊνική οξείδωση:

Οι πρωτεΐνες είναι από τα βιομόρια που βρίσκονται στο στόχαστρο των ελευθέρων ριζών, αφού προσβάλλονται από τις ROS με συνέπεια την τροποποίηση της δομής τους. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες χάνουν τη λειτουργικότητά τους, γεγονός που έχει σημαντικό αντίκτυπο για τα ίδια τα κύτταρα καθώς αυτό μπορεί να

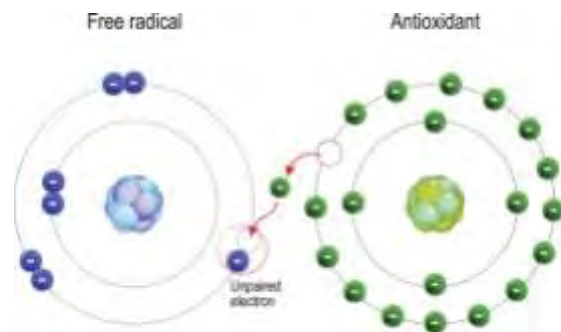
συνεπάγεται απώλεια κάποιας ενζυμικής λειτουργίας. Όταν μια πρωτεΐνη οξειδώνεται ουσιαστικά παράγονται καρβονυλικές ενώσεις (αλδεΐδες/κετόνες) οι οποίες συχνά χρησιμοποιούνται ως δείκτες οξειδωτικού στρες. (Nyström, 2005; Suzuki et al., 2010)

III. Οξείδωση νουκλεϊκών οξέων:

Παρά το γεγονός ότι πρόκειται για ένα γενικά σταθερό μόριο, το DNA μπορεί να υποστεί οξειδωτικές βλάβες έπειτα από αλληλεπίδρασή του με τις ROS. Αυτές οι βλάβες αφορούν κυρίως τροποποίηση των βάσεων (π.χ. οξείδωση από το $\text{OH}\cdot$) με χαρακτηριστικό παράδειγμα το σχηματισμό 8-οξο-2'-δεοξυγουανοσίνης (8-OHdG) λόγω οξείδωσης της γουανίνης, αποικοδόμηση των πουρινών, θραύση είτε της διπλής έλικας είτε μίας εκ των δύο, και βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσης (Cooke, 2003; Evans et al., 2009). Αποτέλεσμα των παραπάνω αλλοιώσεων είναι η δημιουργία μεταλλάξεων που ενδεχομένως να οδηγήσουν σε καρκινογένεση (Marnett, 2000).

1.1.4 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικό θεωρείται μια ουσία η οποία αναστέλλει ή καθυστερεί την οξείδωση διαφόρων βιομορίων. Τα κύτταρα διαθέτουν διάφορους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς οι οποίοι μπορούν να διακριθούν σε ενζυμικούς και μη ενζυμικούς και ο βιολογικός τους ρόλος είναι να προστατέψουν το κύτταρο από την οξειδωτική καταστροφή. Αυτή η προστασία μπορεί να επιτευχθεί είτε με άμεση αντίδραση με τις ελεύθερες ρίζες και εξουδετέρωσή τους με μετατροπή τους σε λιγότερο δραστικά μόρια είτε με επιδιόρθωση των βλαβών που έχουν ήδη προκληθεί στα βιομόρια (Sies, 1993).

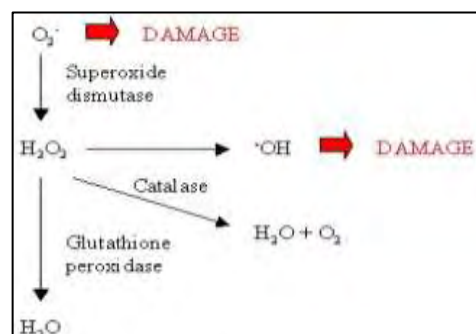


Εικόνα 6: Δράση ενός αντιοξειδωτικού παράγοντα έναντι μιας ελεύθερης ρίζας.

1.1.4.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ορισμένοι από τους κυριότερους ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς περιλαμβάνουν τα ένζυμα δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD), καταλάση (CAT),

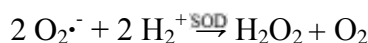
Εικόνα 7: Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.



υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) τα οποία συμβάλλουν στην αποτοξικοποίηση των ROS μέσω μετατροπής τους σε λιγότερο δραστικά μόρια.

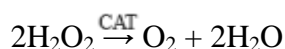
1.1.4.1.1 Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Επειδή το υπεροξειδίο είναι τοξικό, σχεδόν όλοι οι οργανισμοί που ζουν παρουσία οξυγόνου περιέχουν ισομορφές του ενζύμου δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), ενός εξαιρετικά αποτελεσματικού ενζύμου που καταλύει την εξουδετέρωση του $O_2^{\cdot-}$ προς H_2O_2 και O_2 . Στα θηλαστικά διακρίνονται τρεις ισομορφές, η κυτταροπλασματική Cu/ZnSOD (SOD1), η μιτοχονδριακή MnSOD (SOD2) και η εξωκυτταρική Cu/ZnSOD (SOD3) και όλες απαιτούν ένα μέταλλο ως καταλύτη (Cu, Zn ή Mn) προκειμένου να επιτελέσουν τη λειτουργία τους (Fukai & Ushio-Fukai, 2011). Η αντίδραση που καταλύουν είναι η εξής:



1.1.4.1.2 Καταλάση (CAT)

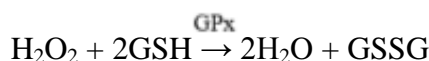
Η CAT είναι ένα σταθερό αντιοξειδωτικό ένζυμο που συναντάται κυρίως στα υπεροξυσώματα όπου γίνεται αποτοξικοποίηση ουσιών με τη βοήθεια O_2 η οποία συνοδεύεται από παραγωγή H_2O_2 . Δομικά, αποτελείται από τέσσερις όμοιες υπομονάδες με καθεμία να περιέχει από μια ομάδα αίμης στο ενεργό κέντρο. Ο ρόλος της είναι να διασπά το H_2O_2 σε O_2 και H_2O , προστατεύοντας έτσι το κύτταρο από την τοξική επίδραση του H_2O_2 (Chelikani et al., 2004). Καταλύει την εξής αντίδραση:



1.1.4.1.3 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο που περιέχει σελήνιο (Se) στο ενεργό κέντρο και επιτελεί την ίδια προστατευτική λειτουργία με την CAT είναι η GPx. Βρίσκεται τόσο στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια όσο και στον εξωκυττάριο χώρο. Υπάρχουν οκτώ γνωστές ισομορφές του ενζύμου στον άνθρωπο με πιο άφθονη την GPx1 η οποία συναντάται στο κυττασόλιο και έχει ως προτιμώμενο υπόστρωμα το H_2O_2 (Conrad & Friedmann Angeli, 2017). Η GPx1 χρησιμοποιεί την ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH) για να διασπάσει το H_2O_2 σε H_2O με παράλληλη

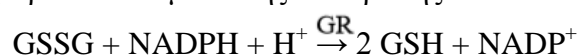
μετατροπή της GSH στην οξειδωμένη μορφή της (GSSG), σύμφωνα με την αντίδραση:



Όταν τα επίπεδα H_2O_2 είναι χαμηλά δρα κυρίως η GPx, ενώ σε περιπτώσεις αυξημένων επιπέδων H_2O_2 ο οργανισμός χρησιμοποιεί την CAT για τη διάσπασή του.

1.1.4.1.4 Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG προς GSH και χάρη σε αυτό το ένζυμο επιτυγχάνεται αναγέννηση της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης και το κύτταρο διατηρεί σε μια ισορροπία το λόγο ανηγμένης/οξειδωμένης μορφής. Ως συνένζυμο χρησιμοποιείται το FAD το οποίο ανάγεται από το NADPH και γίνεται μεταφορά e^- στη δισουλφιδική γέφυρα του διμερούς GSSG που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό δύο μορίων GSH μέσω της αντίδρασης:



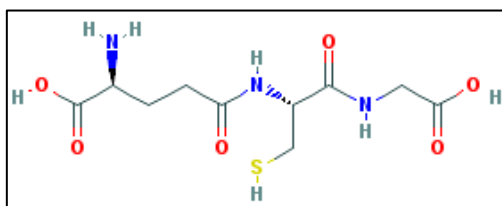
1.1.4.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Μεταξύ των σπουδαιότερων μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών συγκαταλέγονται: η ρετινόλη (Vit A), η α -τοκοφερόλη (Vit E), το ασκορβικό οξύ (Vit C), το Β-καροτένιο, το ουρικό οξύ, η γλουταθειόνη (GSH), το συνένζυμο Q-10 (CoQ-10) και το σελήνιο (Se) (Mirończuk-Chodakowska, Witkowska, & Zujko, 2018).

1.1.4.2.1 Γλουταθειόνη (GSH)

Πρόκειται για ένα τριπεπτίδιο αποτελούμενο από Glu, Cys και Gly το οποίο συναντάται σε όλους τους ιστούς (στο κυτόπλασμα, τα μιτοχόνδρια και το ενδοπλασματικό δίκτυο) και έχει πολλαπλούς ρόλους μέσα στα κύτταρα λειτουργώντας ως συνένζυμο σε διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις με σημαντικότερες τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις όπου δρα ως ενδογενές αντιοξειδωτικό μόριο και τις αντιδράσεις σύζευξης όπου δρα ως παράγοντας αποτοξικοποίησης ουσιών (κυρίως στο ήπαρ). Συμμετέχει επίσης στο σχηματισμό και τη διατήρηση των δισουλφιδικών δεσμών στις πρωτεΐνες και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών. Η αντιοξειδωτική της ικανότητα αποδίδεται στη σουλφυδρυλομάδα (-SH) που διαθέτει η ανηγμένη μορφή της (GSH). Επίσης, χάρη στα ένζυμα GPx και GR καθίσταται δυνατή η διαρκής ανακύκλωσή της και μετατροπή της από την οξειδωμένη μορφή στην ανηγμένη και αντιστρόφως [National Center for

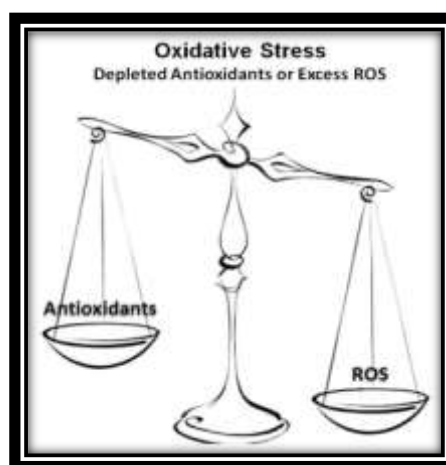
Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=124886, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/124886> (accessed Dec 2, 2018)].



Εικόνα 8: Η δομή της γλουταθειόνης. Είναι ένα τριπεπτίδιο το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα Glu, Cys, Gly.

1.1.5 Οξειδωτικό στρες

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ROS διατηρούνται σε ισορροπία με τα ενδοκυτταρικά βιοχημικά αντιοξειδωτικά ώστε να προλαμβάνεται η κυτταρική καταστροφή. Ως οξειδωτικό στρες θεωρείται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων η οποία δύναται να προκαλέσει βλάβη (Εικόνα 9) (Sies, 1985). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκύψει είτε από υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών είτε από μείωση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών ή συνδυασμό αυτών των δύο καταστάσεων.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες.

1.1.5.1 Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι ένα φαινόμενο το οποίο αφορά τη διαταραχή της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης και σχετίζεται με την ανάπτυξη πολλών παθολογικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων καρδιαγγειακών παθήσεων, πνευμονικών νοσημάτων, νευροεκφυλιστικών ασθενειών (Parkinson's, Alzheimer's) αλλά και του διαβήτη, της γήρανσης και ορισμένων τύπων καρκίνου (Cheignon et al., 2018; Dasgupta & Klein, 2014; Emerit et al., 2004; Mantovani & Madeddu, 2006; Reuter et al., 2010; Valko et al., 2007). Αναλυτικότερα, το οξειδωτικό στρες μπορεί να είναι υπεύθυνο για την οξειδωτική καταστροφή βιολογικών μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, DNA. Ειδικότερα, οι βλάβες στις πρωτεΐνες περιλαμβάνουν

μεταξύ άλλων τροποποίηση της τριτοταγούς δομής και αλλαγή στη λειτουργικότητά τους, ενώ όσον αφορά τη λιπιδική υπεροξειδωση μπορεί να έχει ως συνέπεια την απώλεια της μεμβρανικής ακεραιότητας των κυττάρων. Σχετικά με το DNA, οι θραύσεις στις αλυσίδες αλλά και οι τροποποιήσεις των βάσεων όπως και η ανεπάρκεια λειτουργίας του συστήματος επιδιόρθωσης λόγω οξειδωτικού στρες μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις και πιθανόν σε καρκινογένεση. Μια εκ των συνεπειών του οξειδωτικού στρες μπορεί να είναι ο κυτταρικός θάνατος, ο οποίος μπορεί να επέλθει με δύο τρόπους: είτε μέσω απόπτωσης είτε μέσω νέκρωσης των κυττάρων. Στην πρώτη περίπτωση (απόπτωση) το ίδιο το κύτταρο ενεργοποιώντας ειδικούς μηχανισμούς οδηγείται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο δίχως πρόκληση βλάβης στα γειτονικά κύτταρα. Αντίθετα, όταν υπάρχει νέκρωση, το κύτταρο αρχικά διαστέλλεται και προκαλείται ρήξη με αποτέλεσμα το περιεχόμενό του να διαρρεύσει στον περιβάλλοντα χώρο επηρεάζοντας τα γειτονικά κύτταρα.

1.2 Ηλεκτρονικό τσιγάρο

1.2.1 Κάπνισμα vs άτμισμα

Το κάπνισμα αποτελεί έναν από τους κορυφαίους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ποικίλων νόσων αλλά και πρόωμου θανάτου στην ΕΕ καθώς θεωρείται υπεύθυνο για περίπου 700,000 θανάτους ετησίως. Κατά μέσο όρο, το 50% των καπνιστών πεθαίνουν πρόωρα (σχεδόν 14 χρόνια νωρίτερα). Παρά τις συνεχείς προσπάθειες των τελευταίων ετών για ευαισθητοποίηση του κοινού, ο αριθμός των καπνιστών στην Ευρώπη παραμένει υψηλός και είναι της τάξης του 26% του συνολικού πληθυσμού εκ των οποίων το 25% είναι νέοι ηλικίας 15-24 ετών (European Parliament. *700,000 deaths a year: tackling smoking in the EU*; <<http://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/society/20160518STO27901/700-000-deaths-a-year-tackling-smoking-in-the-eu>>; accessed: December 22, 2018). Μάλιστα, σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα της Commission το 2017, η Ελλάδα βρίσκεται στην κορυφή των χωρών όσον αφορά το κάπνισμα με ποσοστό 37% γεγονός που σημαίνει ότι περίπου τέσσερις στους δέκα πολίτες είναι καπνιστές (European Commission. *Special Eurobarometer 458 "Attitudes of Europeans towards tobacco and electronic cigarettes"*. Brussels, 2017). Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει πάνω από 4.000 χημικές ενώσεις όπως CO, HCN, ακεταλδεΐδη, διάφορα οξειδία του αζώτου, βαρέα μέταλλα και πλήθος πτητικών ενώσεων (αλκοόλες, κινόνες, αμίνες,

αλδεύδες). Επίσης, περιέχει πολλές από τις πιο καρκινογόνες και μεταλλαξιγόνες γνωστές ενώσεις όπως το Βενζο[α]πυρένιο και άλλους ΠΑΥ, νιτροζαμίνες, Ν-ετεροκυκλικές αμίνες και βενζόλιο μεταξύ άλλων (Talhout et al., 2011). Είναι γνωστό πως ο καπνός του τσιγάρου μπορεί να επάγει κυτταροτοξικότητα μέσω διαφόρων μηχανισμών, ένας εκ των οποίων είναι και το οξειδωτικό στρες. Από την άλλη πλευρά τα υγρά του ηλεκτρονικού τσιγάρου περιέχουν περίπου 4 βασικά συστατικά, δηλαδή σχεδόν χίλιες φορές λιγότερες ουσίες από τον καπνό ενός συμβατικού τσιγάρου. Ωστόσο, κατά την ατμοποίηση τους μπορούν να παραχθούν τοξικές ενώσεις όπως ακεταλδεύδη, ακετόνη, ακρολεΐνη, φορμαλδεύδη λόγω θερμικής αποικοδόμησης (Jensen et al., 2017; Klager et al., 2017; Sleiman et al., 2016). Βέβαια, τα επίπεδα των εκπεμπόμενων αλδευδών είναι πολύ χαμηλότερα από ότι στο συμβατικό τσιγάρο (Farsalinos & Voudris, 2018). Στους ατμούς των ηλεκτρονικών τσιγάρων έχουν βρεθεί επίσης τοξικά βαρέα μέταλλα όπως Cd, Cr, Pb, Mn και Ni (Hess et al., 2017).

Την τελευταία δεκαετία έχει παρατηρηθεί μια όλο και αυξανόμενη τάση για χρήση εναλλακτικών μορφών καπνίσματος μέσω διαφόρων ηλεκτρονικών συστημάτων πρόσληψης νικοτίνης. Ειδικότερα, όλο και περισσότερος κόσμος έχει στραφεί στη χρήση του ηλεκτρονικού τσιγάρου επιλέγοντας το άτμισμα ως ένα υποκατάστατο του καπνίσματος (Stimson et al., 2014). Σύμφωνα με έρευνες, ο ατμός που παράγει το ηλεκτρονικό τσιγάρο θεωρείται ασφαλέστερος (Farsalinos & Polosa, 2014) και υποστηρίζεται πως περιέχει 9-450 φορές λιγότερες τοξικές ουσίες σε σχέση με τον καπνό του συμβατικού τσιγάρου (Goniewicz et al., 2014). Επίσης, επικρατεί η άποψη από το ευρύ κοινό πως αποτελεί εργαλείο για τη διακοπή του καπνίσματος, κάτι το οποίο δεν είναι ακόμα πλήρως επιβεβαιωμένο (Kalkhoran & Glantz, 2016; Pepper & Brewer, 2014). Παρόλο που έχουν μελετηθεί οι οξείες επιπτώσεις του ηλεκτρονικού τσιγάρου στην υγεία του ανθρώπου, οι πιθανές μακροχρόνιες επιδράσεις παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστες (Farsalinos, 2018; Kaisar et al., 2016; Kaur et al., 2018).

1.2.2 Τι είναι το ηλεκτρονικό τσιγάρο;

Το ηλεκτρονικό τσιγάρο αποτελεί μια πατέντα του Κινέζου φαρμακοποιού Hon Lik η οποία κατοχυρώθηκε το 2004 (Lik, 2006). Στις αγορές της Ευρώπης και της Αμερικής έκανε την εμφάνισή του το 2006 και 2007, αντίστοιχα. Πρόκειται για

μια επαναστατική καινοτομία που αφορά ένα ηλεκτρονικό σύστημα πρόσληψης νικοτίνης το οποίο χρησιμοποιεί ως πηγή ενέργειας μια επαναφορτιζόμενη μπαταρία ιόντων λιθίου η οποία μπορεί να είναι είτε αποσπώμενη είτε ενσωματωμένη στη συσκευή. Σε αντίθεση με το συμβατικό τσιγάρο όπου γίνεται καύση του καπνού, το ηλεκτρονικό τσιγάρο παράγει έναν εισπνεόμενο ατμό μέσω ηλεκτρονικής θέρμανσης ενός υγρού αναπλήρωσης (Schaller et al., 2013). Οι συσκευές που χρησιμοποιούνται αποτελούνται κατά κύριο λόγο από τη μπαταρία, την αντίσταση, τον περιέκτη αναπλήρωσης, τον ατμοποιητή και το ακροστόμιο. Οι σύγχρονοι τύποι συσκευών διαθέτουν επιλογές ρύθμισης παραμέτρων όπως της ισχύος (watt) και της τάσης (volt), συστήματα ελέγχου ροής αέρα (Air Flow Control Systems) που επιτρέπουν τη ρύθμιση της επιθυμητής ποσότητας αέρα κατά την εισπνοή, όπως επίσης και οθόνη LED με ένδειξη στάθμης μπαταρίας (Brown & Cheng, 2014). Τα υγρά αναπλήρωσης περιέχουν περίπου 4 βασικά συστατικά και διατίθενται σε πλήθος γεύσεων και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις νικοτίνης. Επιπλέον, υπάρχει η δυνατότητα για τους χρήστες να φτιάξουν το υγρό αναπλήρωσης της επιλογής τους (DIY) αγοράζοντας τις πρώτες ύλες και συνδυάζοντας τις γεύσεις που επιθυμούν (Cox et al., 2018).

1.2.3 Συσκευές ηλεκτρονικού τσιγάρου

Μεταξύ των διαφόρων τύπων συσκευών ηλεκτρονικού τσιγάρου που έχουν κυκλοφορήσει μέχρι σήμερα, διακρίνονται τέσσερις γενιές συσκευών. Αρχικά, η πρώτη γενιά αφορούσε ηλεκτρονικά τσιγάρα μίας χρήσεως τα οποία προσομοίαζαν στην όψη τα συμβατικά τσιγάρα και αποτελούνταν από μία μπαταρία και ένα φυσίγγιο το οποίο περιείχε τον ατμοποιητή ο οποίος θέρμαινε ένα διάλυμα. Αυτός ο τύπος συσκευής δεν επιδέχονταν επαναφόρτιση ή αναπλήρωση του υγρού και γι' αυτό στην πορεία αναπτύχθηκαν τα ηλεκτρονικά τσιγάρα τα οποία διατηρώντας το σχήμα του συμβατικού τσιγάρου είχαν επιπλέον τη δυνατότητα επαναφόρτισης της μπαταρίας τους καθώς και ρύθμισης του



Εικόνα 10: Διαφορετικοί τύποι συσκευών ηλεκτρονικού τσιγάρου.

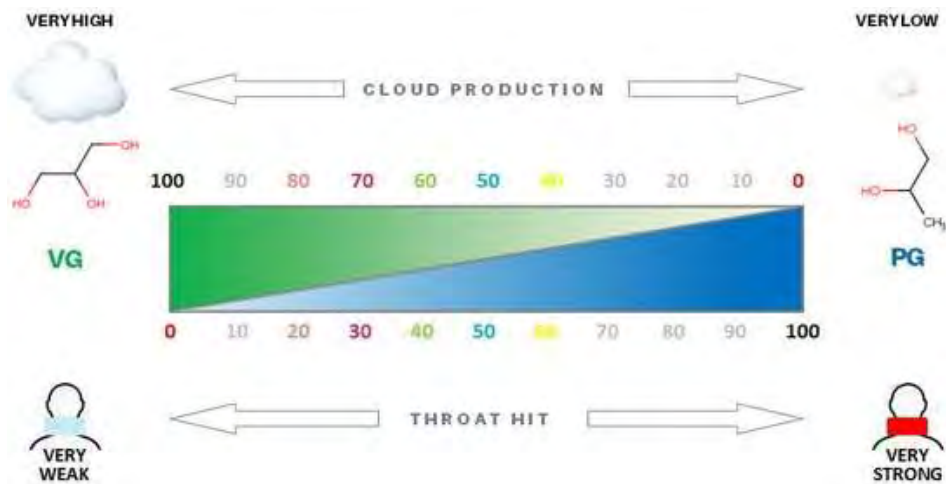
αριθμού και της διάρκειας των εισπνοών (“puffs”) και επομένως ήταν επαναχρησιμοποιούμενα. Στη συνέχεια κυκλοφόρησε η δεύτερη γενιά συσκευών με πιο κομψό σχεδιασμό, μέγεθος μεγαλύτερο από ένα κλασικό τσιγάρο και κυλινδρικό σχήμα που παρέπεμπε σε στυλό. Η επαναφορτιζόμενη μπαταρία είχε μεγαλύτερη χωρητικότητα (mAh) και ήταν δυνατή η αναπλήρωση του υγρού. Τέλος, οι συσκευές τρίτης γενιάς χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερο μέγεθος, το δοχείο που περιέχει το υγρό αναπλήρωσης έχει μεγαλύτερη χωρητικότητα και είναι σε στυλ δεξαμενής και έχουν αυξημένη χωρητικότητα μπαταρίας. Συνήθως περιέχουν χειροκίνητους διακόπτες με τους οποίους ο χρήστης μπορεί να ρυθμίσει διάφορες παραμέτρους όπως την ισχύ (watt) και την τάση (volt) (Gillman, 2016; Grana et al., 2014).

1.2.4 Υγρά αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου

Όλα τα υγρά αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου (refill liquids ή e-liquids) αποτελούνται από μια βάση η οποία μπορεί να είναι είτε VG είτε PG (συνήθως χρησιμοποιείται μείγμα αυτών), από τις αρωματικές/γλυκαντικές ύλες (flavorings), τη νικοτίνη (προαιρετικά) και νερό. Στην Εικόνα 11 φαίνονται τα βασικά συστατικά ενός υγρού



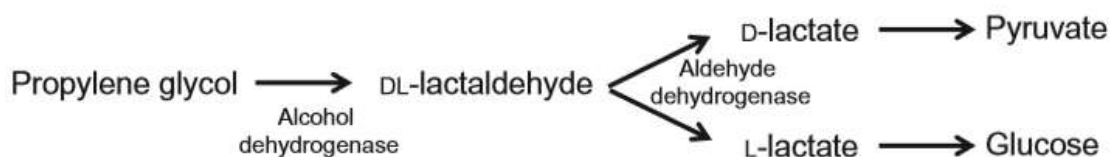
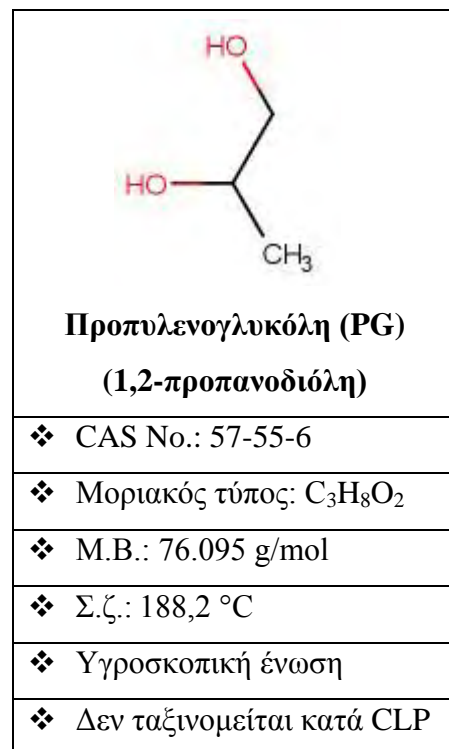
αναπλήρωσης (Kanvalakis et al., 2015; Schaller et al., 2013). Τα μείγματα PG/VG είναι χημικά ηλεκτρονικού τσιγάρου. σταθερά και διατίθενται στο εμπόριο σε διάφορες αναλογίες αυτών των συστατικών, με συνηθέστερη την αναλογία 50% PG/50% VG. Ωστόσο, κυκλοφορούν υγρά αναπλήρωσης με αναλογία 70% VG/30% PG ή ακόμη και 100% VG ή 100% PG. Οι διαφορές στη χρήση μεταξύ VG και PG, έχουν να κάνουν με την πυκνότητα του υγρού, στην παραγωγή ατμού και την αίσθηση "χτυπήματος" που δίνει ο ατμός στον λαιμό. Πιο συγκεκριμένα, η PG διακρίνεται για το «χτύπημα» στο λαιμό που αισθάνεται ο χρήστης, αναδεικνύει τις γεύσεις στα υγρά αναπλήρωσης, ενώ έχει μειωμένη παραγωγή ατμού σε σχέση με τη VG. Από την άλλη πλευρά, η VG χαρακτηρίζεται από μια βελούδινη υφή και αυξημένη παραγωγή ατμού, σε σύγκριση με την PG, ωστόσο έχει μειωμένη απόδοση γεύσης (Harvanko et al., 2019).



Εικόνα 12: Οι διαφορετικές αναλογίες PG/VG που χρησιμοποιούνται στα υγρά ηλεκτρονικού τσιγάρου και η συσχέτισή τους με την παραγωγή καπνού και την αίσθηση του «χτυπήματος» που δίνει ο ατμός στο λαιμό.

1.2.4.1 Προπυλενογλυκόλη (PG)

Η προπυλενογλυκόλη ή αλλιώς 1,2-προπανοδιόλη είναι μια οργανική ένωση (μια διόλη). Πρόκειται για ένα άγευστο, άοσμο και άχρωμο ελαιώδες υγρό το οποίο είναι αναμειξιμο με νερό, ακετόνη και χλωροφόρμιο. Παρασκευάζεται με υδρόλυση του προπυλενοξειδίου. Χρησιμοποιείται ως διαλύτης φαρμακευτικών σκευασμάτων, σε καλλυντικά, ως πρόσθετο τροφίμων και ως βιομηχανικό αντιψυκτικό, είναι εγκεκριμένο από τον FDA και γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές. Έχει πολύ χαμηλή συστηματική τοξικότητα, όπως έχει φανεί σε πειραματόζωα, λόγω του μεταβολισμού της σε γαλακτικό και πυροσταφυλικό τα οποία είναι φυσιολογικά συστατικά του κύκλου του κιτρικού οξέος.

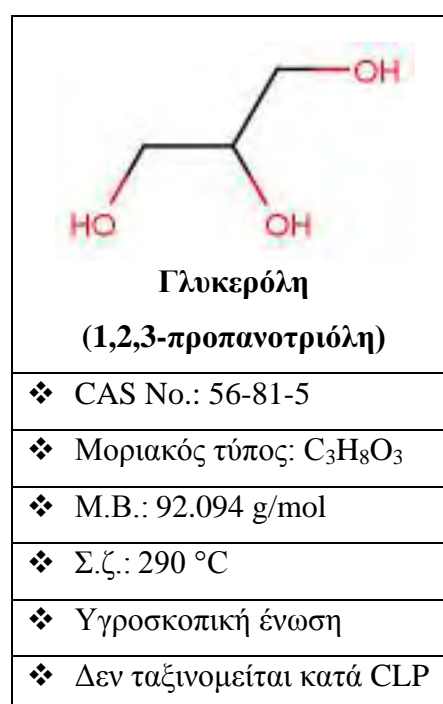


Εικόνα 13: Μεταβολισμός της προπυλενογλυκόλης σε κύτταρα θηλαστικών.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) συνιστά ως μέγιστη κατανάλωση προπυλενογλυκόλης τα 25 mg/Kg/ημέρα όταν αυτή χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων, αλλά το όριο αυτό διαφέρει όταν χρησιμοποιείται ως διαλύτης φαρμάκων. Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως συστατικό στα υγρά αναπλήρωσης, θα πρέπει να είναι φαρμακευτικής καθαρότητας 99,5% και άνω [Farsalinos, 2016; National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=1030, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1030> (accessed Nov. 10, 2018)].

1.2.4.2 Φυτική γλυκερίνη (VG)

Η γλυκερίνη (ή γλυκερόλη) είναι ένα άχρωμο, άοσμο, υγρό με υψηλό ιξώδες, έχει γλυκιά γεύση και είναι ως επί το πλείστον μη τοξικό. Χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ως γλυκαντικό και ενυδατικό και σε καλλυντικά και φαρμακευτικά σκευάσματα. Χρησιμοποιείται ο όρος «φυτική» καθώς παράγεται κυρίως ως παραπροϊόν κατά τη διαδικασία παραγωγής βιοκαυσίμων. Η γλυκερόλη αποτελεί σημαντικό συστατικό των τριγλυκεριδίων (TG) και των φωσφολιπιδίων. Ουσιαστικά, είναι αυτή που σχηματίζει τον σκελετό των λιπαρών οξέων στα λίπη. Όταν το σώμα χρησιμοποιεί το αποθηκευμένο λίπος ως πηγή ενέργειας, η γλυκερόλη και τα λιπαρά οξέα απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος. Το συστατικό γλυκερόλης μπορεί να μετατραπεί σε γλυκόζη από το ήπαρ και να παρέχει ενέργεια για τον κυτταρικό μεταβολισμό. Κανονικά η γλυκερόλη παρουσιάζει πολύ μικρή οξεία τοξικότητα και μπορούν να γίνουν ανεκτές πολύ υψηλές από του στόματος δόσεις ή οξείες εκθέσεις. Από την άλλη πλευρά, τα χρόνια υψηλά επίπεδα γλυκερόλης στο αίμα σχετίζονται με ανεπάρκεια της κίνησης της γλυκερίνης (GKD), η οποία προκαλεί μια κατάσταση γνωστή ως υπεργλυκερολαιμία δηλαδή μια συσσώρευση γλυκερόλης στο αίμα και στα ούρα. Προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως συστατικό στα υγρά αναπλήρωσης, θα πρέπει να είναι φαρμακευτικής καθαρότητας



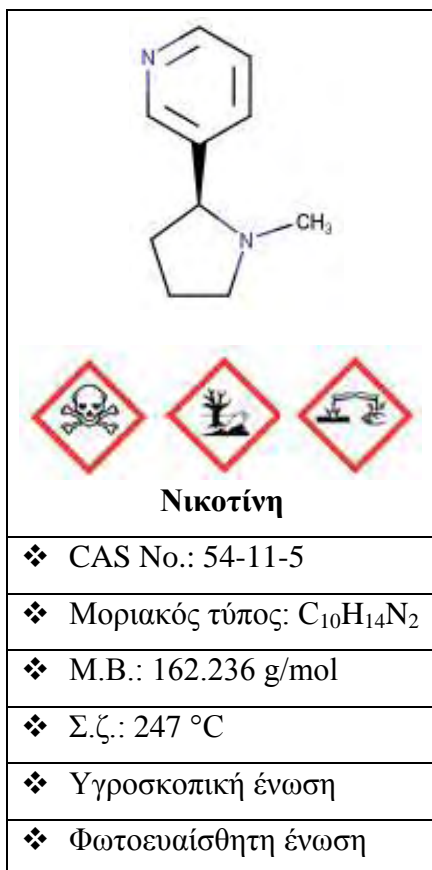
99,5% και άνω. [(Farsalinos, 2016; National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=753, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/753> (accessed Nov. 10, 2018)]. Η καθαρή γλυκερίνη δεν είναι επιρρεπής στην οξείδωση από την ατμόσφαιρα υπό συνθήκες συνθήκες, ωστόσο αποσυντίθεται κατά τη θέρμανση με παραγωγή της τοξικής αλδεϋδης ακρολεΐνη. Η έκθεση στην ακρολεΐνη μπορεί να έχει ποικίλα τοξικά αποτελέσματα σε κυτταρικό επίπεδο συμπεριλαμβανομένου του οξειδωτικού στρες (Moghe et al., 2015).

1.2.4.3 Αρωματικές ύλες (flavorings)

Οι αρωματικές ύλες αποτελούν αναπόσπαστο μέρος των υγρών αναπλήρωσης των ηλεκτρονικών τσιγάρων και μπορεί να είναι είτε φυσικές είτε τεχνητές. Χρησιμοποιούνται για να προσδώσουν την διαφορετική γεύση σε κάθε υγρό αναπλήρωσης, είναι κατά κύριο λόγο βρώσιμες αρωματικές ύλες που χρησιμοποιούνται στη ζαχαροπλαστική και είναι γενικά αναγνωρισμένες ως ασφαλείς. Το γεγονός ότι αυτές οι ουσίες είναι εγκεκριμένες για χρήση ως πρόσθετα τροφίμων υποδηλώνει πως οι πιθανοί κίνδυνοι για την υγεία έχουν αξιολογηθεί κυρίως μόνο για κατάποση και όχι για έκθεση διά της εισπνοής, επομένως δε συνεπάγεται ότι η εισπνοή αυτών είναι ασφαλής. Ο αεραγωγός και ο γαστρεντερικός σωλήνας είναι αρκετά διακριτοί και αντιπροσωπεύουν σημαντικά διαφορετικές ευαισθησίες όσον αφορά την τοξικότητα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η τοξικότητα του διακετυλίου το οποίο χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων για να προσομοιάσει τη γεύση και το άρωμα του βουτύρου. Παρόλο που έχει εγκριθεί για κατάποση, η υπερβολική έκθεση σε διακετύλιο δια της εισπνοής στον ιστό του πνεύμονα έχει ως αποτέλεσμα εμφάνιση βρογχολίτιδας, μιας σπάνιας και μη αναστρέψιμης πνευμονικής νόσου (Kreiss et al., 2002; Van Rooy et al., 2007). Επιπροσθέτως, οι αρωματικές ενώσεις θερμαίνονται στη συσκευή ηλεκτρονικού τσιγάρου πριν εισπνευστούν, οπότε ενδέχεται να υφίστανται δομικές μεταβολές κατά τη θέρμανσή τους. Τα αρώματα είναι διαλυμένα είτε σε PG ή VG και συχνά δεν αναγράφονται στην ετικέτα του υγρού οι ουσίες οι οποίες περιέχονται και ευθύνονται για το άρωμα. Με επιλογή του κατάλληλου συνδυασμού, οι αρωματικές αυτές ουσίες μπορούν να προσομοιάσουν είτε τη γεύση του συμβατικού τσιγάρου, είτε γεύσεις

φρούτων, γλυκών, ποτών, καθώς και συνδυασμό αυτών. Μάλιστα, έως το 2014 υπήρχαν τουλάχιστον 7,700 διαφορετικές γεύσεις στην αγορά (Zhu et al., 2014).

1.2.4.4 Νικοτίνη



Πρόκειται για ένα ελαιώδες υγρό με χαρακτηριστική οσμή. Είναι άχρωμο έως ελαφρώς κίτρινο και αποκτά σταδιακά καφέ χρώμα όταν εκτεθεί στον αέρα ή το φως. Η γεύση του είναι πικρή και καυστική. Είναι διαλυτή στο νερό και στους συνήθεις οργανικούς διαλύτες (EtOH, CHCl₃, διαιθυλαιθέρα κ.ά.). Η νικοτίνη είναι ένα φυσικό αλκαλοειδές που βρίσκεται στα φύλλα του καπνού και αποτελεί βασικό συστατικό των τσιγάρων. Επίσης, χρησιμοποιείται θεραπευτικά για να βοηθήσει στην διακοπή του καπνίσματος. Η νικοτίνη έχει ταξινομηθεί κατά CLP όσον αφορά τους κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία ως οξείας τοξικότητας (οδοί έκθεσης: στόμα, δέρμα, εισπνοή) κατηγορίας 2, ως ερεθιστικό του δέρματος και ως ικανή να προκαλέσει σοβαρή οφθαλμική βλάβη.

Κατά τη θερμική αποσύνθεσή της εκπέμπονται τοξικά αέρια μονοξειδίου του άνθρακα και οξειδίων του αζώτου. [National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=89594, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/89594> (accessed Dec 22, 2018); European Chemicals Agency (ECHA). Nicotine, <https://echa.europa.eu/el/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/48724> (accessed: December 22, 2018)]

Πίνακας 2: Η ταξινόμηση της νικοτίνης ως προς τους κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία σύμφωνα με τον ευρωπαϊκό κανονισμό CLP [(ΕΚ) αριθ. 1272/2008]

Ταξινόμηση νικοτίνης κατά CLP		
Τάξη κινδύνου	Κατηγορία κινδύνου	Δήλωση επικινδυνότητας
Οξεία τοξικότητα από	2	H300: θανατηφόρο σε

στόμα		περίπτωση κατάποσης
Οξεία τοξικότητα δια δέρματος	2	H310 : θανατηφόρο σε επαφή με το δέρμα
Οξεία τοξικότητα δια εισπνοής	2	H330 : θανατηφόρο σε περίπτωση εισπνοής
Διάβρωση/ερεθισμός δέρματος	2	H315 : προκαλεί ερεθισμό του δέρματος
Σοβαρή οφθαλμική βλάβη/ ερεθισμός του οφθαλμού	1	H318 : προκαλεί σοβαρή οφθαλμική βλάβη

Ως γνωστόν, η νικοτίνη είναι μια ιδιαίτερα εθιστική ουσία και ένα εξαιρετικά τοξικό αλκαλοειδές που έχει την ικανότητα να διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Μάλιστα, αρκούν κατά μέσο όρο 7 sec για να φτάσει η νικοτίνη στον εγκέφαλο - έπειτα από έκθεση δια εισπνοής - στους πνεύμονες όπου υπάρχει αυξημένη απορρόφηση από το αίμα. Επηρεάζει λοιπόν το νευρικό σύστημα έχοντας ποικίλα νευροφυσιολογικά και συμπεριφορικά αποτελέσματα μέσω διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου και νευροχημικών οδών. Συγκεκριμένα, δρα ως αγωνιστής στους νικοτινικούς υποδοχείς ακετυλοχολίνης (ιονοτροπικοί υποδοχείς οι οποίοι κατανέμονται ευρέως σε όλο τον εγκέφαλο) όπου προσδένεται και διεγείρει δραματικά τους ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ντοπαμίνης μέσω ενεργοποίησης των μονοπατιών ανταμοιβής και κατά συνέπεια τη δημιουργία του αισθήματος της ευφορίας (Laviolette & Van Der Kooy, 2004; Wonnacott & Barik, 2009). Όσον αφορά το μεταβολισμό της, συμβαίνει κυρίως στο ήπαρ από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 και ειδικότερα από τα CYP2A6 και CYP2B6 και σε ένα μικρότερο ποσοστό στους πνεύμονες. Η κοτινίνη είναι ο κύριος μεταβολίτης της νικοτίνης με χρόνο ημιζωής 15-20 ώρες, ενώ η νικοτίνη έχει χρόνο ημιζωής 1-3 ώρες (Benowitz et al., 2009).

Πίνακας 3: Οι συνηθέστερες συγκεντρώσεις νικοτίνης στα υγρά ηλεκτρονικών τσιγάρων.

None	0 mg/ml (0 %)
Extra low	3 mg/ml (0.3 %)
Low	6 mg/ml (0.6 %)
Extra medium	9 mg/ml (0.9 %)
Medium	12 mg/ml (1.2 %)
High	18 mg/ml (1.8 %)
Extra high	20 mg/ml (2.0 %)

Οι πιο κοινές συγκεντρώσεις νικοτίνης που περιέχονται στα υγρά αναπλήρωσης που κυκλοφορούν στο εμπόριο παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Αξίζει να σημειωθεί πως σύμφωνα με το άρθρο 20 της ευρωπαϊκής οδηγίας για τα προϊόντα καπνού (2014/40 / ΕΚ) έχει οριστεί ως ανώτατο επιτρεπτό όριο, όσον αφορά τη συγκέντρωση νικοτίνης στα υγρά ηλεκτρονικού τσιγάρου, τα 20 mg/ml. Επίσης η χωρητικότητα του περιέκτη υγρού

ορίζεται στα 2 ml ως μέγιστο όριο και ο μέγιστος όγκος που μπορεί να περιέχει ένα μπουκάλι υγρού αναπλήρωσης είναι πλέον τα 10 ml. [Directive 2014/40/EU of the European Parliament and of the Council of 3 April 2014 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States concerning the manufacture, presentation and sale of tobacco and related products and repealing Directive 2001/37/EC (Text with EEA relevance) Available at: <http://data.europa.eu/eli/dir/2014/40/2015-01-06> (Accessed on November 25, 2018)].

1.2.5 Ηλεκτρονικό τσιγάρο και οξειδωτικό στρες

Τα επίπεδα των ROS στον ατμό των υγρών αναπλήρωσης παίζουν σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα του ηλεκτρονικού τσιγάρου. Η παραγωγή ROS εξαρτάται από πολλούς παράγοντες μεταξύ των οποίων είναι η μάρκα του ηλεκτρονικού τσιγάρου, οι αρωματικές ύλες, η χρησιμοποιούμενη τάση (volt), η περιεκτικότητα του υγρού σε νικοτίνη κ.ά (Leigh et al., 2016; Zhao et al., 2018). Η χρήση του ηλεκτρονικού τσιγάρου έχει γενικά συσχετιστεί με αυξημένο οξειδωτικό στρες. Σύμφωνα με μελέτες φασματοσκοπίας ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη δραστικών, χαμηλού χρόνου ημιζωής ελευθέρων ριζών στον ατμό των υγρών ηλεκτρονικού τσιγάρου (Goel et al., 2015). Ένα σύνθηρες μοντέλο στο οποίο εστιάζονται οι μελέτες των τοξικολογικών επιδράσεων των ηλεκτρονικών τσιγάρων είναι τα κύτταρα και οι ιστοί από τον πνεύμονα. Ερευνητές έδειξαν πως τα αερολύματα επάγουν κυτταροτοξικότητα και αυξάνουν τα επίπεδα οξειδωτικού στρες και δεικτών φλεγμονής τόσο σε ανθρώπινα πνευμονικά κύτταρα όσο και σε πνεύμονες ποντικών (Lerner et al., 2015). Η διαπερατότητα των ενδοθηλιακών

κυττάρων του πνεύμονα, όπως μετρήθηκε με τη μέθοδο ανίχνευση της σύνθετης αντίστασης κυττάρου-υποστρώματος, επίσης αυξάνεται έπειτα από έκθεση στα αερολύματα ηλεκτρονικού τσιγάρου, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση νικοτίνης. Μάλιστα, αυτά τα ελλείματα στη ενδοθηλιακή μονοστοιβάδα ενισχύουν το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή που προκαλείται από την έκθεση στα αερολύματα (Schweitzer et al., 2015). Ακόμη, μελέτη σε ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα (Beas2B) και ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες (HFL-1) έδειξε ότι η έκθεσή τους σε συνήθη χημικά που χρησιμοποιούνται ως γλυκαντικές ύλες στα υγρά αναπλήρωσης ηλεκτρονικών τσιγάρων είχε παρόμοια επιζήμια αποτελέσματα προκαλώντας φλεγμονή και απώλεια της λειτουργίας του επιθηλιακού φραγμού (Gerloff et al., 2017). Οι αρωματικές ύλες επομένως που χρησιμοποιούνται στα υγρά των ηλεκτρονικών τσιγάρων μπορούν γενικά να πυροδοτήσουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις στις οποίες μεσολαβεί παραγωγή ROS, όπως διαπιστώθηκε και σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε μονοκύτταρα (κυτταρικές σειρές MM6 και U937) (Muthumalage et al., 2018).

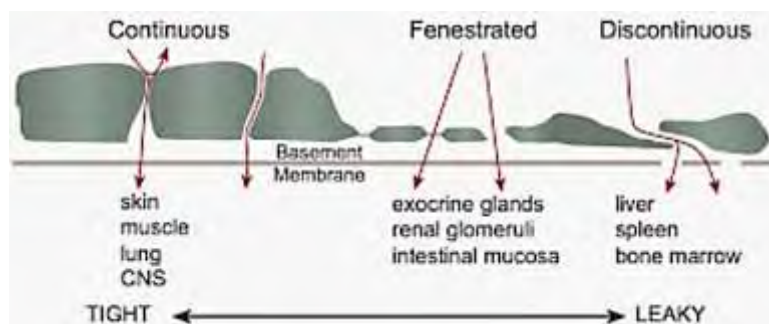
1.3 Ενδοθήλιο

1.3.1 Εισαγωγή

Το ενδοθήλιο, μια μονοστοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων, αποτελεί την εσωτερική κυτταρική επένδυση των αιμοφόρων αγγείων (αρτηρίες, φλέβες και τριχοειδή αγγεία) και του λεμφικού συστήματος. Επομένως βρίσκεται σε άμεση επαφή με το αίμα, τη λέμφο και τα κυκλοφορούντα κύτταρα. Τα τριχοειδή αγγεία αποτελούνται αποκλειστικά από ενδοθήλιο, ενώ όλα τα άλλα αγγεία φέρουν επιπρόσθετα, στοιβάδες από συνδετικό ιστό και λείο μυ. Το σχήμα των ενδοθηλιακών κυττάρων ποικίλει σε όλο το αγγειακό δέντρο, αλλά είναι γενικά λεπτά και ελαφρώς επιμήκη, με διαστάσεις περίπου 50-70 μm σε μήκος, 10-30 μm σε πλάτος και 0,1-10 μm σε πάχος. Στο τοίχωμα του αιμοφόρου αγγείου, τα ενδοθηλιακά κύτταρα προσανατολίζονται κατά μήκος του άξονα του αγγείου, ελαχιστοποιώντας τις δυνάμεις διατμητικής τάσης που ασκούνται από το ρέον αίμα. Σε έναν ενήλικα, το ενδοθήλιο αποτελείται από περίπου 1×10^{13} κύτταρα σχηματίζοντας σχεδόν 1 κιλό «όργανο» (Féléτου, 2011, p. 1-2;) (Sumpio et al., 2002).

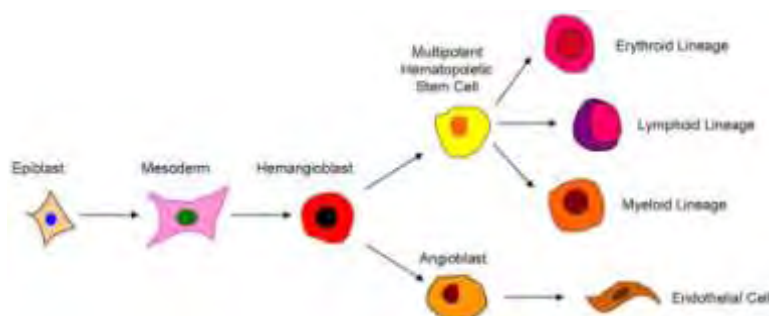
Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν μια αξιοσημείωτη ετερογένεια όσον αφορά τη μορφολογία, τη μοριακή τους σύνθεση και τις λειτουργίες τους. Αυτή η ετερογένεια έχει τεκμηριωθεί με μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας που

καθιέρωσαν μορφολογικά αναγνωρίσιμους ενδοθηλιακούς φαινοτύπους τόσο σε αγγεία διαφορετικών οργάνων, όσο και εντός των διαφόρων αγγειακών τμημάτων κάθε οργάνου. Μπορούν να διακριθούν τρεις κύριοι δομικοί τύποι ενδοθηλίου: το συνεχές, το ασυνεχές και το ενδοθήλιο με διάκενα (Tse & Stan, 2010). Το ενδοθήλιο των αρτηριών και των φλεβών είναι συνεχές σχηματίζοντας μια αδιάκοπη μονοστοιβάδα η οποία συγκρατείται με σφιχτούς συνδέσμους. Το ενδοθήλιο των τριχοειδών αγγείων μπορεί να είναι συνεχές, ασυνεχές ή με διάκενα, ανάλογα με τις ανάγκες του υποκείμενου ιστού. Το ενδοθήλιο με διάκενα είναι χαρακτηριστικό των οργάνων που εμπλέκονται στη διήθηση ή την έκκριση, συμπεριλαμβανομένων των ενδοκρινών και εξωκρινών αδένων, του γαστρικού και εντερικού βλενογόννου καθώς και των νεφρικών σπειραμάτων. Το ασυνεχές ενδοθήλιο μοιάζει με το ενδοθήλιο με διάκενα, με τη διαφορά ότι η διάμετρος των πόρων είναι μεγαλύτερη και μπορεί να εκδηλωθούν ως κενά στο κύτταρο. Ασυνεχές ενδοθήλιο συναντάται στο ήπαρ, το σπλήνα και το μυελό των οστών (Aird, 2012).



Εικόνα 14: Οι τρεις διαφορετικοί τύποι ενδοθηλίου: το συνεχές ενδοθήλιο (continuous), το ενδοθήλιο με διάκενα (fenestrated) και το ασυνεχές ενδοθήλιο (discontinuous).

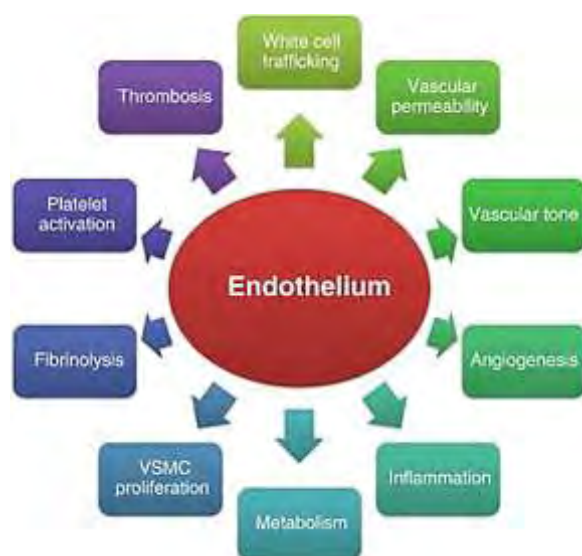
Τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος προκύπτουν από διαφοροποίηση του ίδιου πρόδρομου κυττάρου, του αιμαγγειοβλάστη. Οι αιμαγγειοβλάστες δημιουργούν αγγειοβλάστες οι οποίοι με τη σειρά τους διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα αρτηριών, φλεβών και τριχοειδών (Féléτου, 2011, p. 4).



Εικόνα 15: Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει την προέλευση των ενδοθηλιακών και αιμοποιητικών κυττάρων από έναν κοινό πρόγονο αιμαγγειοβλαστών.

1.3.2 Λειτουργίες του ενδοθηλίου

Το ενδοθήλιο παίζει κυρίαρχο ρόλο στον έλεγχο της ρευστότητας του αίματος, της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων και γενικότερα στη διαδικασία της αιμόστασης (Criswell, 2017; Yau et al., 2015). Επιπλέον, εμπλέκεται στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου (δηλαδή της κατάστασης της συσταλτικής τάσης στα τοιχώματα του αγγείου) μέσω της έκκρισης αγγειοδραστικών ουσιών (είτε αγγειοδιασταλτικών όπως το NO και η προστακυκλίνη είτε αγγειοσυσταλτικών όπως η ενδοθηλίνη-1). Σχηματίζοντας ένα ημιπερατό φράγμα μεταξύ του αίματος και των περιβαλλόντων ιστών, μπορεί και ελέγχει τη δια-ενδοθηλιακή μεταφορά διαφόρων διαλυμένων ουσιών και μακρομορίων όπως λιπαρά οξέα, λιποπρωτεΐνες, λιποπρωτεϊνικές λιπάσες, γλυκόζη και ινσουλίνη, μέσα και έξω από το αίμα, διαμέσου του τοιχώματος του αιμοφόρου αγγείου (Pi, Xie, & Patterson, 2018). Εκτός αυτού, αποτελεί σημαντικό παράγοντα στη ρύθμιση της ανοσολογίας, της φλεγμονής και της



αγγειογένεσης (μέσω παραγωγής του αγγειογόνου παράγοντα VEGF) και έχει αναγνωριστεί ως ένα μεταβολικό και ενδοκρινικό όργανο. Με άλλα λόγια, συμβάλλει στη διατήρηση της αγγειακής ομοιόστασης (Galley & Webster, 2004; Moreira et al., 2018). Μερικές εκ των πολλών και βαρυσήμαντων λειτουργιών που επιτελούνται από τα ενδοθηλιακά

κύτταρα παρουσιάζονται στην Εικόνα 16.

Εικόνα 16: Οι διάφορες λειτουργίες του ενδοθηλίου.

1.3.3 Ενδοθήλιο και ROS

Οι ROS σχετίζονται στενά με τη φυσιολογική λειτουργία του ενδοθηλίου καθώς παίζουν κρίσιμο ρόλο στην επουλωτική διαδικασία και τον έλεγχο της λοίμωξης στην περιοχή του τραύματος. Χαμηλά επίπεδα ROS (ιδίως υπό τη μορφή

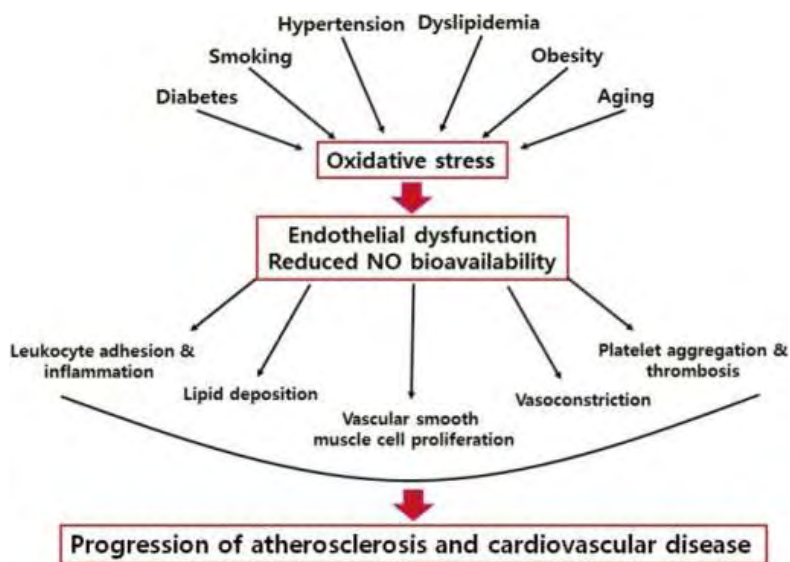
H₂O₂) μπορούν να έχουν ευεργετικές επιδράσεις στη διαδικασία επούλωσης των πληγών καθώς οι ROS δρουν ως δευτερογενείς αγγειοφόροι σε πολλά ανοσοκύτταρα και μη-λεμφοειδή κύτταρα τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία επιδιόρθωσης. Οι ROS έχουν επίσης την ικανότητα να ρυθμίζουν το σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση) στο σημείο του τραύματος και τη βέλτιστη αιμάτωση στην περιοχή επούλωσης των πληγών. Δρουν στην πρόιμη άμυνα του ξενιστή έναντι της μόλυνσης μέσω των φαγοκυττάρων επάγοντας την αναπνευστική «έκρηξη» έχοντας ως αποτέλεσμα την καταστροφή των παθογόνων στην περιοχή του τραύματος και επιπλέον η υπερβολική διαρροή ROS στον περιβάλλοντα χώρο έχει περαιτέρω βακτηριοστατικά αποτελέσματα (Dunnill et al., 2017).

Οι ROS παίζουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση μιας μεγάλης ποικιλίας διαφορετικών διαδικασιών κυτταρικής σηματοδότησης. Αν και ο όρος ROS περιλαμβάνει όλα τα χημικά είδη που προέρχονται από την ατελή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου, τα διάφορα οξειδοαναγωγικά δραστικά είδη έχουν εντελώς διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες συμπεριλαμβανομένων της δραστηριότητας, του χρόνου ημιζωής ή της λιποδιαλυτότητας, γεγονός που έχει σημαντικές συνέπειες στη δράση τους. Το H₂O₂ πληροί τις προϋποθέσεις για να χρησιμεύσει ως ενδοκυτταρικός αγγειοφόρος και να ενεργήσει ως ένα μόριο κυτταρικής σηματοδότησης καθώς πρόκειται για ένα μικρό και μη πολικό μόριο ικανό να διαχέεται σε βιολογικές μεμβράνες. Παράγεται σε αφθονία και ο μεγάλος χρόνος ημιζωής του το καθιστά ικανό να δρα ως ένας δεύτερος αγγειοφόρος ασκώντας παρατεταμένες επιδράσεις σε διαφορετικές οδούς σηματοδότησης. Το H₂O₂ ρυθμίζει διαφορετικές πτυχές της ενδοθηλιακής κυτταρικής λειτουργίας, συμπεριλαμβανομένων της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, της απόπτωσης, της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού και της δυσλειτουργίας του ρόλου του ως φραγμός, των φλεγμονωδών αποκρίσεων, και της ρύθμισης του αγγειακού τόνου (Bretón-Romero & Lamas, 2014; Chen & Keaney, 2004; Féléτου, 2011, p.62).

1.3.4 Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και οξειδωτικό στρες

Δεδομένου των πολλαπλών δράσεων που έχει το ενδοθήλιο και των ποικίλων συστημάτων που εμπλέκονται, μεταβολές στη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων μπορούν να επηρεάσουν ένα ή περισσότερα από αυτά τα συστήματα. Ορισμένα παραδείγματα ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας περιλαμβάνουν: αυξημένη

διαπερατότητα μακρομορίων, αυξημένη/μειωμένη παραγωγή αγγειοδραστικών παραγόντων που οδηγεί σε μη φυσιολογική αγγειοσυστολή/αγγειοδιαστολή, και αυξημένη προ-θρομβωτική δραστηριότητα (Grover-Páez & Zavalza-Gómez, 2009). Υψηλά επίπεδα ROS δύνανται να έχουν επιβλαβείς συνέπειες για τη λειτουργία του ενδοθηλίου και μπορούν να οδηγήσουν σε παθολογικές καταστάσεις (Lund, 2010). Το αυξημένο οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί με πολλούς παράγοντες κινδύνου που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης και γενικότερα διαφόρων αγγειακών παθολογιών, συμπεριλαμβανομένων του διαβήτη, της υπερχοληστερολαιμίας, της νεφρικής ανεπάρκειας, της γήρανσης, της υπέρτασης και του καπνίσματος (Εικόνα 17) (Higashi et al., 2009; Singh et al., 2015; Victor et al., 2009).



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της συσχέτισης του οξειδωτικού στρες με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και κατ' επέκταση με την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης και άλλων καρδιαγγειακών νόσων.

Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης τριών διαφορετικών υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου διαβαθμισμένης συγκέντρωσης νικοτίνης στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ανθρώπινων αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, καλλιεργήθηκε η κυτταρική σειρά EA.hy926, μια υβριδική κυτταρική σειρά προερχόμενη από τη σύντηξη ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας ανθρώπου (Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) και επιθηλιακών κυττάρων από καρκίνωμα του πνεύμονα του ανθρώπου (A549). Αρχικά, προσδιορίστηκε η κυτταροτοξικότητα του κάθε δείγματος έπειτα από επώαση των ενδοθηλιακών κυττάρων με τα υγρά αναπλήρωσης, χρησιμοποιώντας το XTT Cell Proliferation Assay Kit. Με βάση τα αποτελέσματα του XTT assay αναφορικά με τη βιωσιμότητα των κυττάρων, επιλέχθηκαν από δύο συγκεντρώσεις (μία κυτταροτοξική και μία μη κυτταροτοξική) για κάθε δείγμα υγρού αναπλήρωσης για να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα προσδιορισμού δεικτών οξειδωτικού στρες. Αρχικά, εξετάστηκε η επίδραση των δειγμάτων στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) των ενδοθηλιακών κυττάρων με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (Flow Cytometry, FC). Έπειτα, προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) των ενδοθηλιακών κυττάρων έπειτα από επώασή τους με τα υγρά αναπλήρωσης. Επιπλέον, εξετάστηκε ο βαθμός λιπιδικής υπεροξειδωσης με τη μέθοδο των TBARS καθώς και η υπεροξειδωση των πρωτεϊνών με μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Με βάση τα παραπάνω, επιχειρήθηκε να σκιαγραφηθεί η επίπτωση των υγρών αναπλήρωσης στο οξειδωτικό προφίλ των ενδοθηλιακών κυττάρων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά & Οργανολογία

2.1.1 Αντιδραστήρια – διαλύματα – υλικά

Όλα τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας, τουλάχιστον.

- Υγρά αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου της σειράς NOBACCO Premium της εταιρείας NOBACCO:
 - ◆ Black Line Dragon Tail (συγκέντρωσης νικοτίνης: 0 mg/mL, 12 mg/mL, 18 mg/mL) με γεύση καπνικού
 - ◆ Blue Line White Orchid (συγκέντρωσης νικοτίνης: 6 mg/mL, 12 mg/mL) με γεύση βανίλια
 - ◆ Blue Line Temptation (συγκέντρωσης νικοτίνης: 12 mg/mL, 18 mg/mL) με γεύση μήλο/μέντα
- Θρεπτικό υλικό DMEM (Gibco, Grand Island, NY)
- PBS (pH 7,4) (Gibco, Grand Island, NY)
- FBS (Gibco, Grand Island, NY)
- Διάλυμα αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών (100x): περιέχει 10,000 units/mL Πενικιλίνης, 10,000 µg/mL Στρεπτομυκίνης και 25 µg/mL Gibco Αμοτερικίνης B (Gibco, Grand Island, NY)
- Διάλυμα L-γλουταμίνης (L-Glutamine) (Gibco, Grand Island, NY)
- Θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% (v/v) FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών: Για την παρασκευή του, σε 500 mL DMEM προστέθηκαν 50 mL FBS, 5 mL L-γλουταμίνης και 5 mL διαλύματος αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών.
- Διάλυμα θρυψίνης [Trypsin (0.25%), phenol red] (Gibco, Grand Island, NY)
- Χρωστική mercury orange (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)
- Χρωστική DCF-DA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)
- FACS Sheath fluid, Clean, Rinse (Becton-Dickinson)
- XTT Cell Proliferation Assay Kit (Trevigen)
- Phosphate buffer 10 Mm (pH 7,4): για την παρασκευή ενός stock διαλύματος 500 ml διαλύθηκαν 0,136 g KH_2PO_4 σε 100 ml H_2O , 0,712 g Na_2HPO_4 σε 400 ml H_2O , ακολούθησε ανάμειξη των δύο διαλυμάτων και ρύθμιση του pH.

- DPPH 0,1 mM : Παρασκευάζεται με αραίωση 100 φορές με MeOH του πυκνού διαλύματος DPPH (10 mM). Το πυκνό διάλυμα παρασκευάζεται με διάλυση 0,02 g DPPH σε 5 ml MeOH.
- Tris-HCl 200 mM (pH 7,4): για την παρασκευή ενός stock διαλύματος 100 ml διαλύθηκαν 0,61 g Tris σε 25 ml H₂O, 0,42 ml HCl 37% σε 42 ml H₂O, ακολούθησε ανάμειξη αυτών των δύο, συμπλήρωση με H₂O έως τελικό όγκο 100 ml και ρύθμιση του pH.
- Διάλυμα Na₂SO₄ (2M) – TBA (55 mM): για την παρασκευή 10 ml διαλύματος διαλύθηκαν 2,84 g Na₂SO₄ και 0,08 g TBA σε 10 ml H₂O εν θερμώ.
- TCA 35%, 70%, 100%
- HCl 2,5 N
- DNPH 10 mM: για την παρασκευή 100 ml διαλύματος διαλύθηκαν 0,2 g DNPH σε 100 ml HCl 2,5 N.
- NH₂CONH₂ 5 M (pH 2,3): για την παρασκευή 100 ml διαλύματος διαλύθηκαν 30 g ουρίας σε 100 ml H₂O και ακολούθησε ρύθμιση του pH.
- Μείγμα EtOH/AcOEt 1:1 v/v

2.1.2 Όργανα, σκεύη και συσκευές

- Φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων διαστάσεων 25cm² (Sarstedt TC Flask T25, Standard) και 75cm² (Sarstedt TC Flask T75, Standard)
- 96-well plates
- Αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer 0,100mm depth, 0,0025 mm² (Heinz Herenz Hamburg)
- Πιπέτες, με tips αποστειρωμένα μιας χρήσεως: Sarstedt serological pipettes 2ml/5ml/10ml, with cotton plug, colour code: green/blue/orange, polystyrene, sterile, non-pyrogenic/endotoxin-free, non-cytotoxic
- Θάλαμος ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (MRC Fume Hood BSC-C1-5 LAMINAR AIRFLOW)
- Επωαστικός κλίβανος (SCO6WE SHEL LAB Water-Jacketed CO₂ Incubator)
- Φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5804 R Refrigerated Centrifuge)
- Μικροσκόπιο (KERN Inverse microscope OCL-2 Transmitted light microscope)

- Φασματοφωτόμετρο ELISA (ELx808 Absorbance Microplate Reader) (Biotek) με λογισμικό Gen5 (Biotek)
- Κυτταρόμετρο ροής FACScan (Becton Dickinson, NJ, USA) με λογισμικό BD Cell Quest (Becton Dickinson)
- Φασματοφωτόμετρο Hitachi ορατού-υπεριώδους (UV/Vis)

2.2 Μέθοδοι & Πειραματικές πορείες

2.2.1 Καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς EA.hy926

Στο συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η κυτταρική σειρά EA.hy926. Πρόκειται για ανθρώπινα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία αποτελούν υβριδική κυτταρική σειρά προερχόμενη από τη σύντηξη ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας ανθρώπου (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs) και επιθηλιακών κυττάρων από καρκίνωμα του πνεύμονα του ανθρώπου (A549). Η καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς EA.hy926 πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων διαστάσεων 25cm² και 75cm² σε θρεπτικό υλικό DMEM (5 mL και 10 mL αντίστοιχα) το οποίο είχε εμπλουτιστεί με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών σε επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασιακές συνθήκες 37°C και ποσοστό CO₂ 5%. Η ανάπτυξη των κυττάρων έλαβε χώρα σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS έως ότου η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί πλήρως από κύτταρα. Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων ήταν απαραίτητη αρχικά η αποκόλλησή τους με 0,5 mL (και 1 mL αντίστοιχα) τρυψίνης (0.25%) και έπειτα η επώασή τους με την τρυψίνη για 5 min σε θερμοκρασία 37°C. Στη συνέχεια γινόταν επαναιώρηση των κυττάρων που είχαν αποκολληθεί σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS. Οι διαδικασίες που απαιτούσαν χειρισμό των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες εντός ειδικού θαλάμου με συνεχή διαβίβαση ροής ρεύματος αέρα (Laminar air flow).

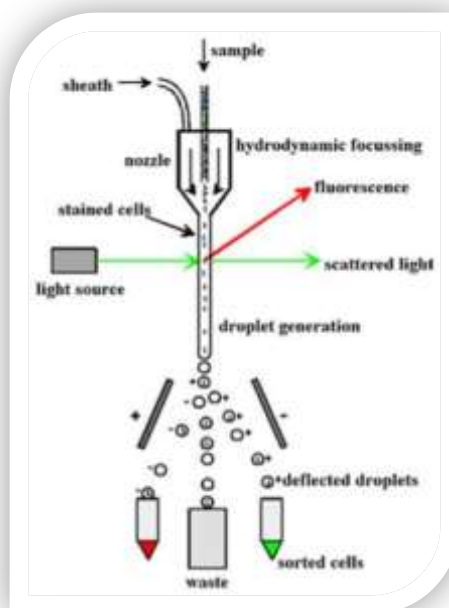
FBS και έγινε μέτρησή τους στο μικροσκόπιο χρησιμοποιώντας την αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer. Στη συνέχεια, επιστρώθηκαν 15.000 cells/well σε 96-well plate και προστέθηκαν 150 μ L θρεπτικό μέσο με 10% FBS σε κάθε θέση του 96-well plate. Ακολούθησε επώαση overnight για 24 h σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂ με σκοπό την προσκόλληση των κυττάρων στον πυθμένα της κάθε θέσης του 96-well plate. Ύστερα, απομακρύνθηκε το θρεπτικό μέσο και προστέθηκαν οι διάφορες συγκεντρώσεις των υγρών αναπλήρωσης σε θρεπτικό μέσο χωρίς FBS τελικού όγκου 100 μ L. Για κάθε ένα δείγμα υγρού αναπλήρωσης χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις: 0,3%, 1%, 2,5%, 5%, 10% και 20%. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν απαλλαγμένο από FBS για την αποφυγή της αλληλεπίδρασης των συστατικών του FBS με τα υγρά αναπλήρωσης. Μετά από 24 h επώασης των κυττάρων με τα υγρά αναπλήρωσης, έγινε προσθήκη 50 μ L από το μείγμα XTT/reagent σε κάθε θέση του 96-well plate και ακολούθησε επώαση για 4 h. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν ως controls δείγματα που περιείχαν μόνο κύτταρα. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες και δείγματα που περιείχαν μόνο το υγρό αναπλήρωσης και XTT για να διαπιστωθεί εάν η συγκέντρωση του υγρού αναπλήρωσης επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης. Ύστερα από 4 h επώασης, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση στα 450 nm και στα 630 nm σε φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader χρησιμοποιώντας το λογισμικό Gen5. Η εξέταση του κάθε υγρού αναπλήρωσης έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα.

2.2.3 Προσδιορισμός των επιπέδων της γλουταθειόνης (GSH) και των ελευθέρων ριζών (δραστικών μορφών οξυγόνου, ROS) με κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC)

2.2.3.1 Αρχή μεθόδου

Στην Εικόνα 20 παριστάνεται η λειτουργία ενός κυτταρομέτρου ροής. Τα κύτταρα βρίσκονται σε μορφή εναιωρήματος (κεντρικό διάλυμα) και καθώς εισέρχονται στο μηχάνημα, ρέουν εν σειρά το ένα πίσω από το άλλο. Μέσα στο σωλήνα ροής το κεντρικό διάλυμα περιβάλλεται από το διάλυμα κάλυψης (sheath fluid) και τα δύο δ/τα κινούνται μαζί παράλληλα δίχως όμως να αναμειγνύονται χάρη σε ένα χαρακτηριστικό της κυτταρομετρίας ροής που λέγεται υδροδυναμική εστίαση. Ουσιαστικά η πίεση που ασκεί το κεντρικό διάλυμα στο διάλυμα κάλυψης είναι πάντα μεγαλύτερη και έτσι επιτυγχάνεται η μη ανάμειξη των δύο υγρών. Η πίεση του

κεντρικού διαλύματος δύναται να μεταβληθεί (low/medium/high) από το χειριστή. Στη συνέχεια τα κύτταρα ακτινοβολούνται από μια ακτίνα laser συγκεκριμένου μήκους κύματος η οποία καθώς χτυπάει πάνω στα κύτταρα, σκεδάζεται προς δύο κατευθύνσεις. Ο σκεδασμός που γίνεται σε κατεύθυνση παράλληλη προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία ονομάζεται εμπρόσθιος σκεδασμός “FSC” και σχετίζεται με το μέγεθος του κυττάρου, ενώ ο σκεδασμός που γίνεται σε κατεύθυνση κάθετη ως προς την προσπίπτουσα ονομάζεται πλευρικός σκεδασμός “SSC” και σχετίζεται με την εσωτερική πολυπλοκότητα του κυττάρου. Επίσης οι φθορίζουσες ουσίες που μπορεί να είναι συνδεδεμένες στα κύτταρα μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φθορισμό. Οι ανακλώμενες ακτίνες κατευθύνονται διαμέσου μιας σειράς πρισμάτων και οπτικών ινών σε συγκεκριμένους οπτικούς ανιχνευτές (φίλτρα). Το κάθε φίλτρο ανιχνεύει μια ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος. Έπειτα το ηλεκτρονικό σύστημα μετατρέπει την οπτική ακτινοβολία που ανιχνεύτηκε από τα φίλτρα σε ηλεκτρικό ρεύμα και στη συνέχεια αυτό μετατρέπεται σε ψηφιακό σήμα το οποίο εμφανίζεται στην οθόνη του H/Y.



Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του κυτταρομέτρου ροής.

2.2.3.2 Πειραματική διαδικασία

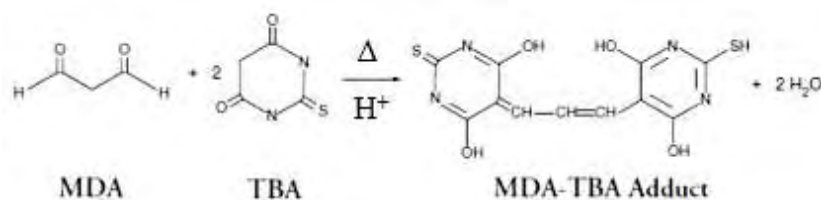
Για τον προσδιορισμό των ενδοκυτταρικών επιπέδων GSH και ROS με κυτταρομετρία ροής, χρησιμοποιήθηκαν οι χρωστικές: mercury orange [1-(4-Chloromercuriophenylazo)-2-naphthol] και DCF-DA (2',7'-Dichlorohydrofluorescein diacetate) αντίστοιχα. Η χρωστική mercury orange φθορίζει από μόνη της και συνδέεται στην GSH μέσω των -SH ομάδων. Η DCF-DA αρχικά δε φθορίζει, όμως έπειτα από την είσοδό της στα κύτταρα και την απακετυλίωσή της από κυτταρικές εστεράσες μετατρέπεται σε μη φθορίζον προϊόν το οποίο οξειδώνεται από τις ROS προς τη φθορίζουσα ένωση 2',7'-dichlorofluorescein. Ετοιμάστηκε stock διάλυμα της mercury orange (400 μM) με διάλυση 1,94 mg της χρωστικής σε 10 mL ακετόνη, το οποίο φυλασσόταν στο ψυγείο στους 4°C. Όσον αφορά το διάλυμα της DCF-DA (400

μM), παρασκευαζόταν με διάλυση 1,94 mg χρωστικής σε 10 mL MeOH, κάθε φορά φρέσκο την ημέρα του πειράματος. Μετά από αποκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων με 0,5 mL θρυψίνης (0,25%) και προσθήκη 2 mL DMEM με FBS, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (160g/ 10 min/ 4°C) και απόρριψη του υπερκειμένου. Ακολούθησε προσθήκη 2 mL PBS, επαναιώρηση και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Μετά έγινε απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων σε 300 μL PBS. Από αυτό το κυτταρικό εναιώρημα, τοποθετήθηκαν από 150 μL σε κάθε ένα ειδικό σωληνάκι κυτταρομέτρου και από 15 μL από το διάλυμα της αντίστοιχης χρωστικής για τον προσδιορισμό της GSH και των ROS. Ακολούθησε επώαση με την κάθε χρωστική στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 37°C για 30 min. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 250 μL PBS σε κάθε σωληνάκι και φυγοκέντρηση (400 rcf/ 5°C/ 5 min). Μετά από την απομάκρυνση του υπερκειμένου, έγινε επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων σε 250 μL PBS και στη συνέχεια ακολούθησε η μέτρηση στο κυτταρόμετρο ροής. Η διέγερση μέσω της δέσμης ακτινοβολίας laser έγινε στα 488 nm τόσο για την GSH όσο και για τις ROS, ενώ όσον αφορά το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής, για την GSH είναι τα 580 nm και για τις ROS τα 530 nm. Επιπλέον, μετρήθηκαν η εμπρόσθια και δεξιά οπτική γωνία σκέδασης του φωτός που δείχνουν το μέγεθος και την εσωτερική πολυπλοκότητα των κυττάρων. Η ανάλυση των κυττάρων έγινε με ρυθμό 1000 γεγονότων/sec. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε 10.000 κύτταρα ανά δείγμα και η ένταση φθορισμού μετρήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα. Η ανάλυση των δεδομένων έγιναν με χρήση του λογισμικού BD Cell Quest. Το κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν τουλάχιστον.

2.2.4 Προσδιορισμός του δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης TBARS

2.2.4.1 Αρχή μεθόδου

Το αυξημένο οξειδωτικό στρες μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες στα κύτταρα αποτελώντας το έναυσμα για το σχηματισμό ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων προερχόμενα από τα PUFAs. Χαρακτηριστικό προϊόν της αποδόμησης τέτοιων ασταθών μορίων αποτελεί η μηλονική διαλδεΰδη (MDA), η οποία μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Κατά συνέπεια, οι ουσίες που αντιδρούν με το TBA, τα γνωστά TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) μπορούν να εκφραστούν ως ισοδύναμα MDA, η οποία αντιδρώντας με το TBA σχηματίζει προϊόν με αναλογία 1:2.



Εικόνα 21: Αντίδραση μεταξύ της MDA με το TBA προς σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος με $\lambda_{\max}=531$ nm.

2.2.4.2 Πειραματική διαδικασία

Σε falcons προστίθενται χ μ l κυτταρικού αιωρήματος (όπως προέκυψε έπειτα από τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford) ώστε να επιτευχθεί ποσότητα πρωτεΐνης ίση με 200 μ g. Στο τυφλό προστίθεται αντίστοιχη ποσότητα PBS. Ακολουθεί προσθήκη 500 μ l διαλύματος Tri-HCl και 500 μ l TCA 35%. Πραγματοποιείται ανάδευση στο vortex και επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 1 ml διαλύματος Na_2SO_4 -TBA και τα δείγματα επωάζονται στους 95°C για 45 min σε υδατόλουτρο. Έπειτα, τα falcons μεταφέρονται στον πάγο για 5 min και ακολουθεί προσθήκη 1 ml TCA 70%. Γίνεται ανάδευση σε vortex και μεταφορά 1 ml από τα falcons σε eppendorfs. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε συνθήκες 11.200 g / 25°C για 3 min και το υπερκείμενο των δειγμάτων φωτομετρείται στα 530 nm σε γυάλινη κυψελίδα. Οι υπολογισμοί έγιναν με βάση τον κάτωθι τύπο:

$$\text{TBARS (nmol / mg πρωτεΐνης)} = [(A_{\delta} - A_0) / 0,156] \times (V_{\text{τελ. αντ.}} / \mu\text{L}_{\text{αιωρ.}}) / C_{\delta}, \text{ όπου:}$$

A_{δ} , A_0 : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος και του τυφλού αντίστοιχα.

$\epsilon_{(530\text{nm,MDA})}$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 0,156 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της MDA.

$\{V_{\text{τελ. αντίδρασης}}/\mu\text{L αιωρήματος} [(3000+\chi) \mu\text{L}/\chi \mu\text{L}]\}$: Ο συντελεστής αραίωσης.

C_{δ} : Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

2.2.5. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

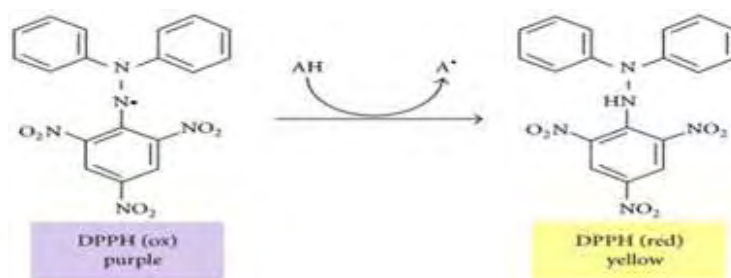
Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας της πρωτεΐνης που περιείχαν τα δείγματα, χρησιμοποιήθηκε η πρότυπη καμπύλη της αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της

χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου Bradford με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών προς σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος (μπλε) με $\lambda_{\max}=595$ nm. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης της αλβουμίνης, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400 $\mu\text{g/ml}$. Ύστερα, 20 μL από κάθε πρότυπο διάλυμα (20 μL PBS για το τυφλό, αντίστοιχα) προστέθηκαν σε 1 ml διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Ακολούθησε ανακίνηση των δειγμάτων και επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 595 nm. Αντιστοίχως, για κάθε δείγμα 20 μL προστίθενται κάθε φορά σε 1 mL διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Γίνεται φωτομέτρηση και η τιμή της οπτικής απορρόφησης αντιστοιχίζεται με την συγκέντρωση της αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

2.2.6 Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

2.2.6.1 Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της TAC χρησιμοποιείται η σταθερή συνθετική ρίζα DPPH• (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο). Το DPPH• έχει μωβ χρώμα και $\lambda_{\max}=520$ nm. Παρουσία αντιοξειδωτικών παραγόντων στο δείγμα οι οποίοι δρουν ως δότες H^+ , το DPPH• μπορεί να αναχθεί σε (DPPH-H) (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη) το οποίο έχει κίτρινο χρώμα. Για την ανίχνευση του DPPH-H γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 520 nm. Μείωση της οπτικής απορρόφησης συνεπάγεται αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας.



Εικόνα 22: Εξουδετέρωση της ρίζας DPPH• από αντιοξειδωτικούς παράγοντες που δρουν άμεσα ως δότες H^+ με παράλληλη μετατροπή του χρώματος από μωβ σε κίτρινο.

2.2.6.2 Πειραματική διαδικασία

Σε erpendorfs προστίθενται χ μl κυτταρικού αιωρήματος (όπως προέκυψε έπειτα από τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford) και (500- χ) μL Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4). Στο τυφλό προστίθεται

μόνο 500 μL Phosphate buffer. Ακολουθεί προσθήκη 500 μL διαλύματος DPPH 0.1 mM, ανάδευση σε vortex και επώαση για 1 h στο σκοτάδι. Έπειτα πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε συνθήκες 20.000 g / 25°C / 3 min και το υπερκείμενο φωτομετρείται στα 520 nm. Ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου γίνεται με αέρα. Η εξέταση κάθε δείγματος γίνεται εις τριπλούν. Η TAC εκφράζεται ως τα μmol DPPH• τα οποία έχουν αναχθεί σε DPPH-H από τα αντιοξειδωτικά συστατικά των κυττάρων ανά mg πρωτεΐνης του δείγματος. Οι υπολογισμοί έγιναν με βάση τον κάτωθι τύπο:

$$\text{TAC } (\mu\text{mol DPPH}\cdot/\text{mg prot.}) = [(A_0 - A_\delta)/A_0] \times 0,05 \times (V_{\text{τελ.}}/\mu\text{L}_{\text{αιωρ.}})/C_\delta, \text{ όπου:}$$

A_0 , A_δ : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του τυφλού και του δείγματος αντίστοιχα.

0,05: Η συγκέντρωση $\mu\text{mol}/\text{ml}$ ρίζας DPPH• στην αντίδραση.

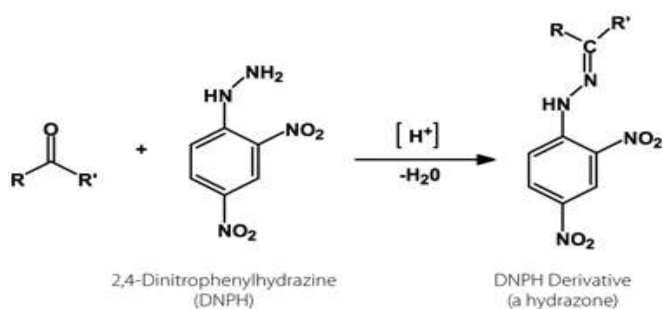
($V_{\text{τελ.}}$ αντίδρασης / μl αιωρήματος [1000 μl / χ μl]): Ο συντελεστής αραίωσης.

C_δ : Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστήριου Bradford.

2.2.7 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

2.2.7.1 Αρχή μεθόδου

Τόσο οι πρωτεΐνες όσο και τα αμινοξέα μπορούν να υποστούν οξειδωτική καταστροφή εξαιτίας των ελευθέρων ριζών. Έναν αντιπροσωπευτικό δείκτη της πρωτεϊνικής οξείδωσης αποτελούν τα πρωτεϊνικά καρβονύλια κυρίως λόγω της χημικής τους σταθερότητας. Η παρουσία καρβονυλομάδων (C=O) παρατηρείται στις προσθετικές ομάδες των αμινοξέων Pro, Arg, Lys και Thr. Οι πρωτεΐνες έπειτα από καρβονυλίωση παύουν να είναι λειτουργικές και η διαδικασία αυτή είναι μη αναστρέψιμη. Ο σχηματισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4 – δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4 – δινιτροφαινυλδραζόνης).



Εικόνα 23: Αντίδραση μεταξύ των καρβονυλικών ομάδων (αλδεΐδες/κετόνες) των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί οξειδωτική βλάβη με τη 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH)

προς σχηματισμό του DNPH παραγώγου 2,4-δινιτροφαινυλδραζόνη με $\lambda_{\max}=370$ nm. Η αντίδραση πραγματοποιείται υπό όξινες συνθήκες και συνοδεύεται με αποβολή ενός μορίου H_2O .

2.2.7.2 Πειραματική διαδικασία

Σε φιαλίδια Eppendorf προστίθενται χ μ l κυτταρικού αιωρήματος (όπως προέκυψε έπειτα από τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστήριου Bradford). Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 0,5 mL DNPH 10 mM στα δείγματα και 0,5 mL HCl 2,5 N στα τυφλά. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. για 1 h (με ενδιάμεση ανάδευση) και φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 5 min στους 4°C. Έπειτα, απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται από 100 μ l TCA 100% σε κάθε Eppendorf. Πραγματοποιείται ανάδευση και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και μετά το υπερκείμενο απομακρύνεται. Στη συνέχεια προστίθεται 1 mL από το μείγμα EtOH/AcOEt (1:1 v/v) και ακολουθεί ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Επαναλαμβάνεται το τελευταίο βήμα μία φορά ακόμα. Τέλος προστίθεται σε κάθε Eppendorf 1 mL ουρίας 5 M (pH 2,3) και τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται στους 37°C για 15 min. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις παραπάνω συνθήκες και το υπερκείμενο φωτομετρείται σε κυψελίδα χαλαζία (Quartz) στα 370 nm. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιείται και το αντίστοιχο τυφλό. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν τουλάχιστον. Τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων υπολογίζονται με βάση τον κάτωθι τύπο:

$$\text{Protein carbonyls (nmol/mg protein)} = [(A_{\delta} - A_0) / 0.022 \times (1000/\chi)] / C\delta, \text{ όπου:}$$

A_{δ} , A_0 : Μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος και του τυφλού αντίστοιχα.

ϵ_{375} DNPH (nmol/mL): 0.022 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH.

(1000/ χ): Ο συντελεστής αραιώσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ.αντίδρασης}}/\mu\text{L}$ αιωρήματος).

C δ : Η συγκέντρωση mg/mL της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστήριου Bradford.

2.4 Στατιστική επεξεργασία

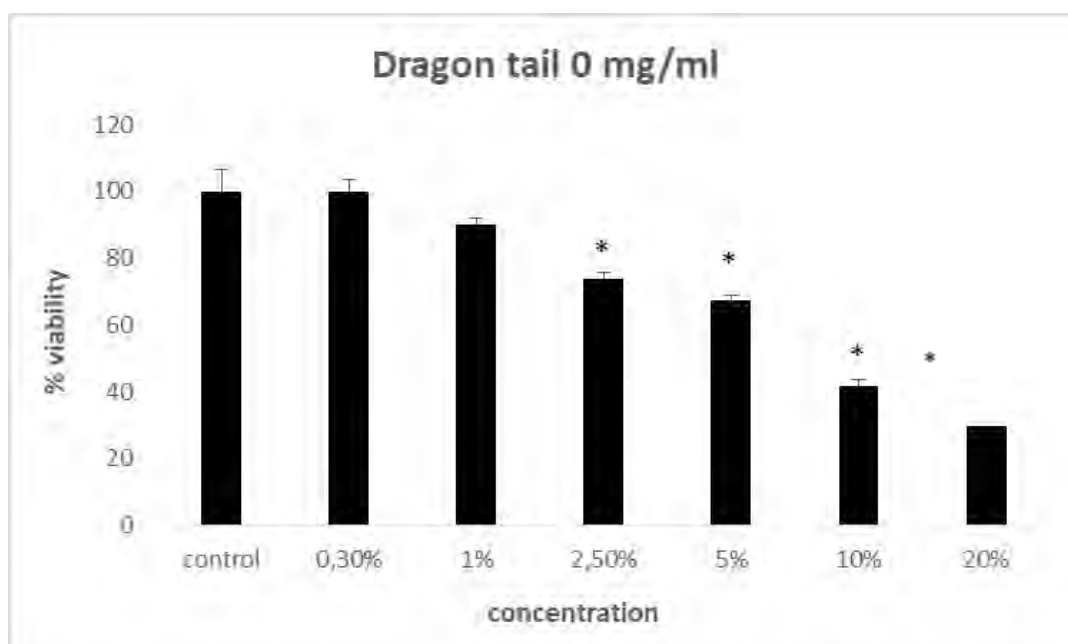
Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS (έκδοση 13.0). Αρχικά υπολογίστηκαν για κάθε δείγμα η μέση τιμή

(mean) και η τυπική απόκλιση (standard deviation) καθώς και το τυπικό σφάλμα (standard error). Έπειτα, προκειμένου να διαπιστωθεί ποια αποτελέσματα είχαν στατιστική σημαντική διαφορά από το control, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα (1-way ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του Tukey's test. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το $P < 0,05$ (στάθμη εμπιστοσύνης 95%). Η παρουσίαση των δεδομένων έγινε υπό τη μορφή $\text{mean} \pm \text{SEM}$.

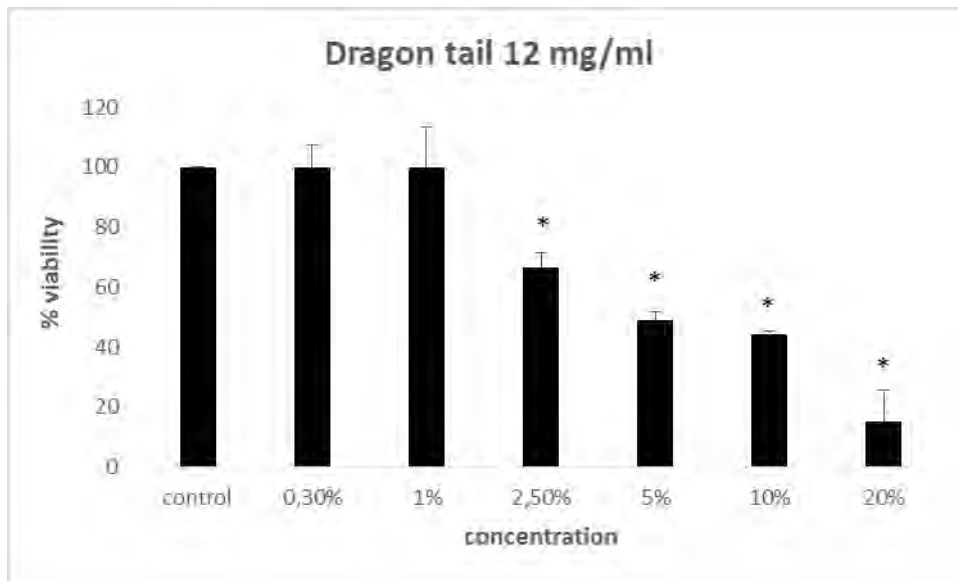
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου με τη μέθοδο XTT

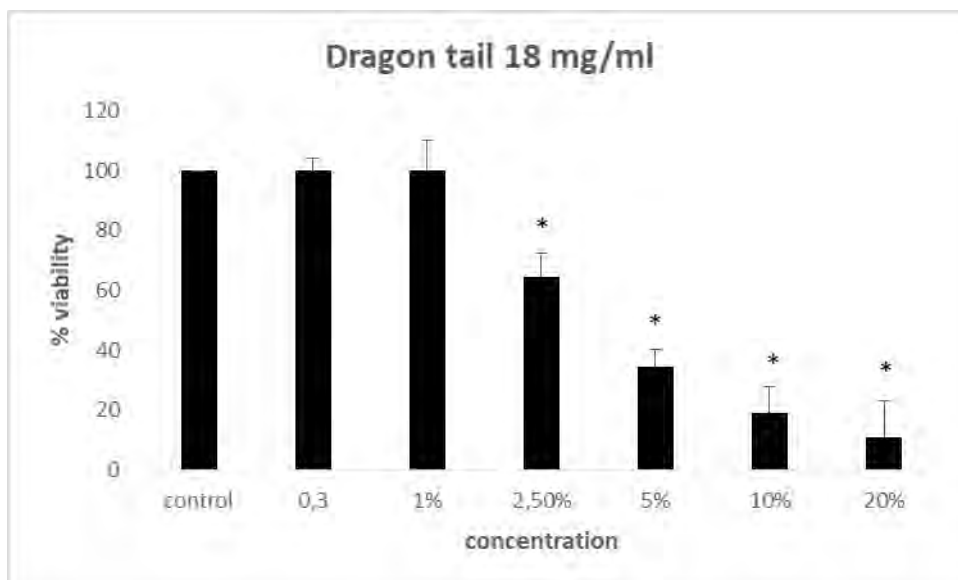
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του XTT assay αναφορικά με την επίδραση των υγρών αναπλήρωσης στη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων.



Γράφημα 1: Επίδραση του υγρού αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου Dragon Tail συγκέντρωσης νικοτίνης 0 mg/ml στη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.

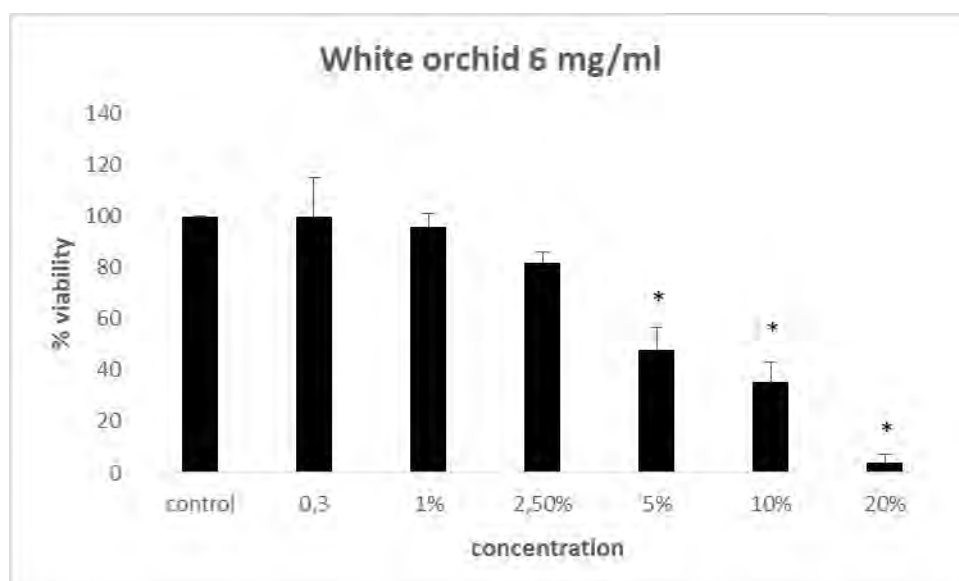


Γράφημα 2: Επίδραση του υγρού αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου Dragon Tail συγκέντρωσης νικοτίνης 12 mg/ml στη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.

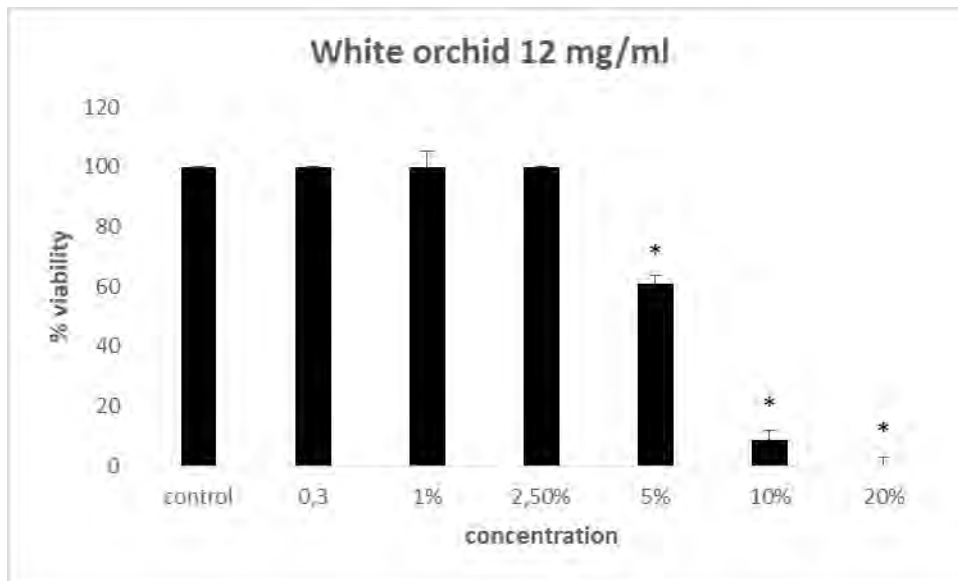


Γράφημα 3: Επίδραση του υγρού αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου Dragon Tail συγκέντρωσης νικοτίνης 18 mg/ml στη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM. Με *

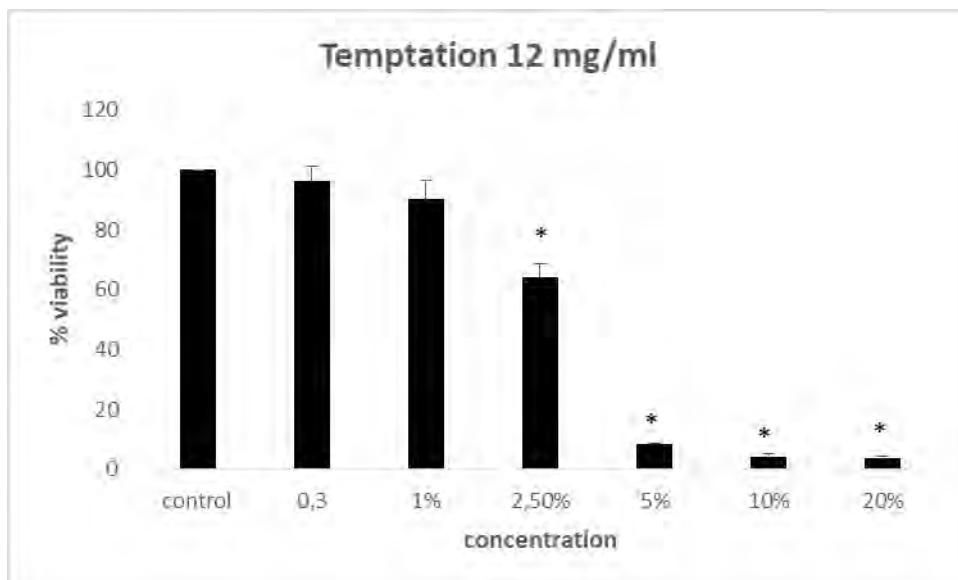
επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.



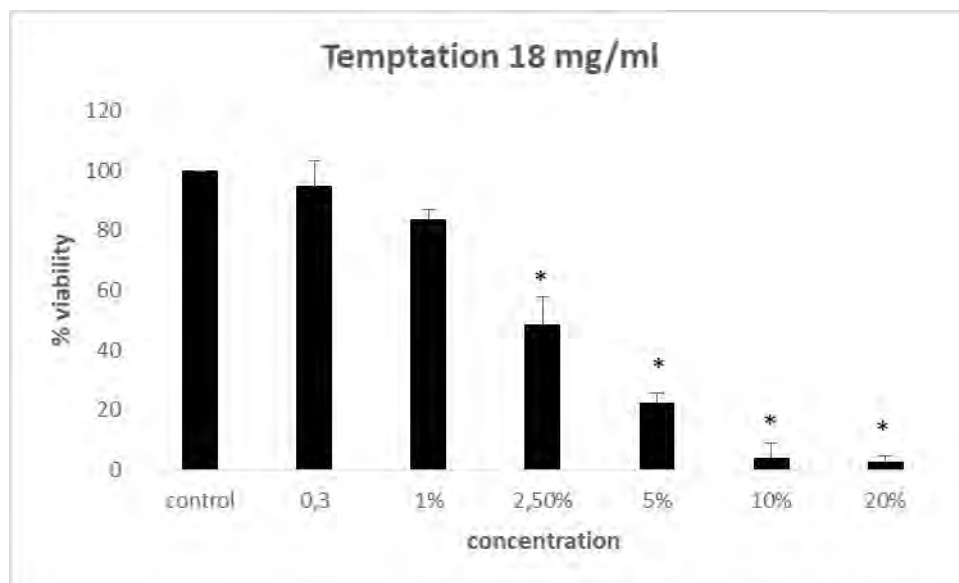
Γράφημα 4: Επίδραση του υγρού αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου White Orchid συγκέντρωσης νικοτίνης 6 mg/ml στη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.



Γράφημα 5: Επίδραση του υγρού αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου White Orchid συγκέντρωσης νικοτίνης 12 mg/ml στη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.



Γράφημα 6: Επίδραση του υγρού αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου Temptation συγκέντρωσης νικοτίνης 12 mg/ml στη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.



Γράφημα 7: Επίδραση του υγρού αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου Temptation συγκέντρωσης νικοτίνης 18 mg/ml στη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (EA.hy926). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά με το control.

Από τα υγρά αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου που χρησιμοποιήθηκαν, όλα τα Dragon Tail και Temptation εμφάνισαν κυτταροτοξική δράση από τη συγκέντρωση υγρού 2,5% και άνω (Γραφήματα 1-3 και 6-7) ενώ τα White Orchid φάνηκε πως επάγουν κυτταροτοξικότητα από τη συγκέντρωση υγρού 5% και άνω (Γραφήματα 4, 5). Οι επιλεγθείσες συγκεντρώσεις εύρους 0,3% έως 20% προέκυψαν έπειτα από εκτενή βιβλιογραφική έρευνα. Με βάση τα αποτελέσματα του XTT assay αναφορικά με την κυτταροτοξικότητα των υγρών αναπλήρωσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, επιλέχθηκαν από δύο συγκεντρώσεις για κάθε υγρό: μία κυτταροτοξική που προκαλεί αναστολή της βιωσιμότητας των κυττάρων \sim 30% και μία μη κυτταροτοξική η οποία δεν έχει επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα κυτταρομετρίας ροής για τον προσδιορισμό των επιπέδων GSH και ROS καθώς και σε φασματοφωτομετρικά πειράματα για τον προσδιορισμό των δεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης TAC,

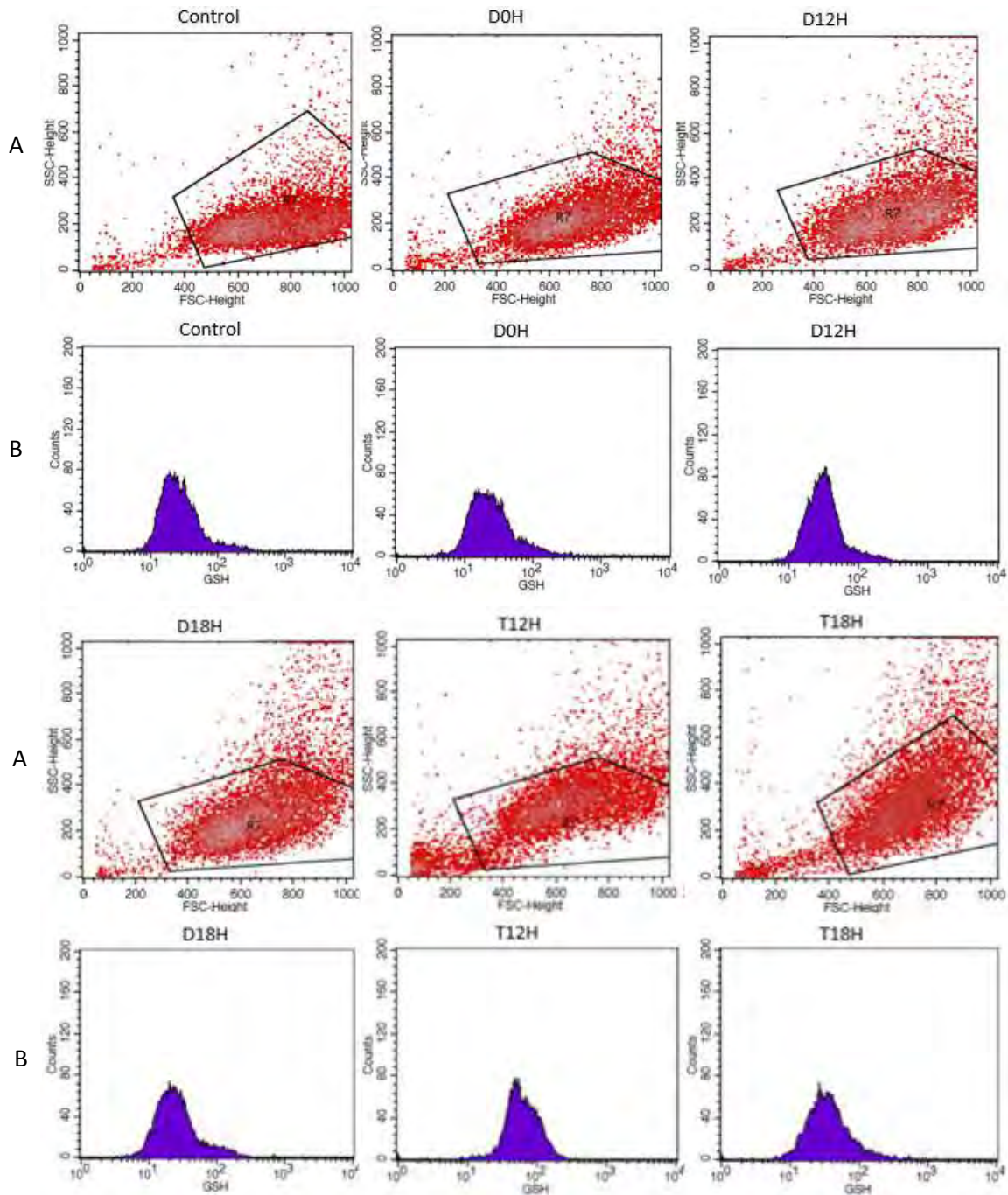
TBARS και πρωτεϊνικά καρβονύλια. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των υγρών που επιλέχθηκαν.

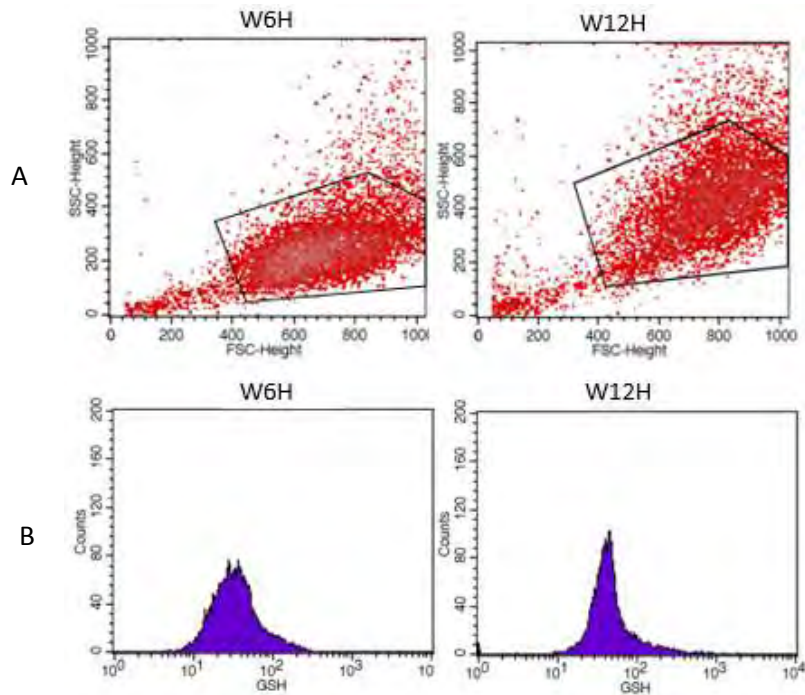
Πίνακας 4: Επιλογή συγκεντρώσεων των υγρών ηλεκτρονικού τσιγάρου με βάση τα αποτελέσματα του XTT assay για χρήση στα πειράματα προσδιορισμού αντιοξειδωτικών δεικτών.

High concentration (% inhibition of viability ~ 30%)	Low concentration (no effect on viability)
Dragon Tail 0 mg/ml (5%)	Dragon Tail 0 mg/ml (1%)
Dragon Tail 12 mg/ml (2,5%)	Dragon Tail 12 mg/ml (1%)
Dragon Tail 18 mg/ml (2,5%)	Dragon Tail 18 mg/ml (1%)
White Orchid 6 mg/ml (3,5%)	White Orchid 6 mg/ml (1%)
White Orchid 12 mg/ml (4,5%)	White Orchid 12 mg/ml (2,5%)
Temptation 12 mg/ml (2,5%)	Temptation 12 mg/ml (1%)
Temptation 18 mg/ml (1,5%)	Temptation 18 mg/ml (0,3%)

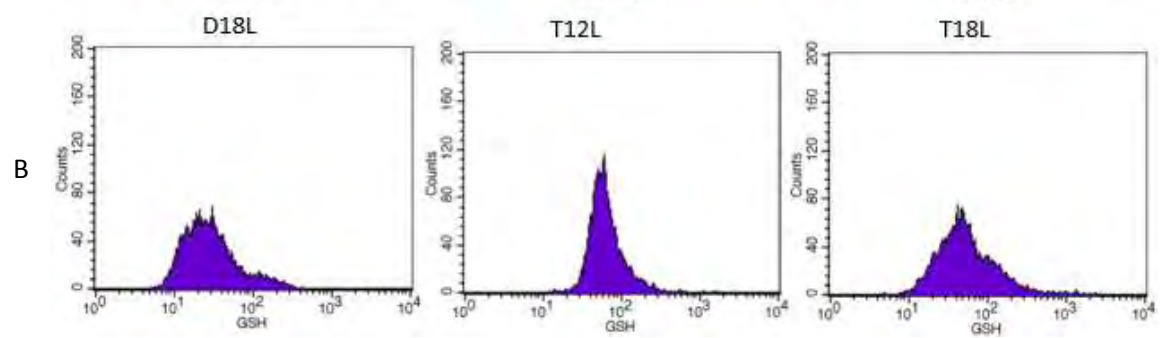
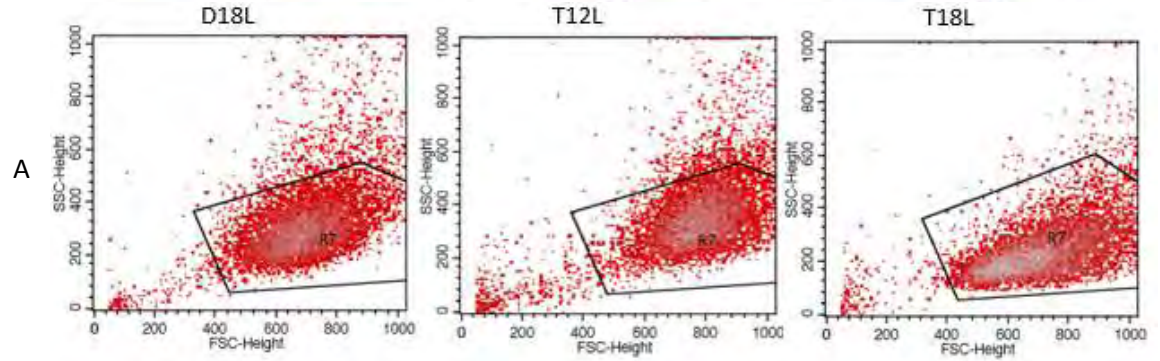
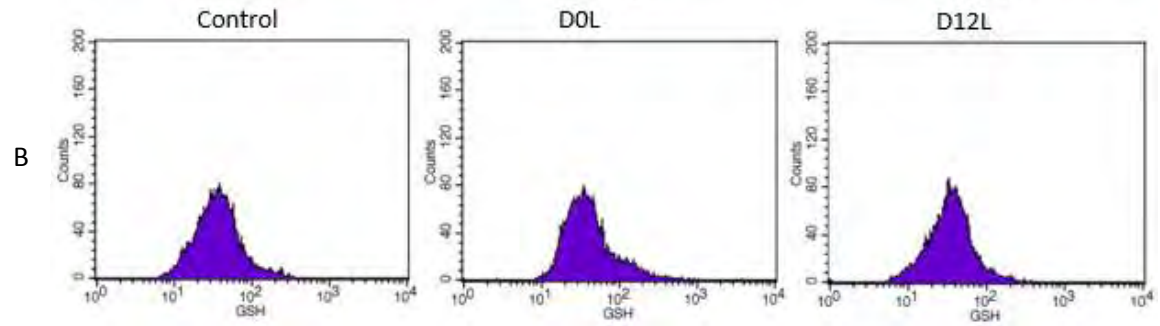
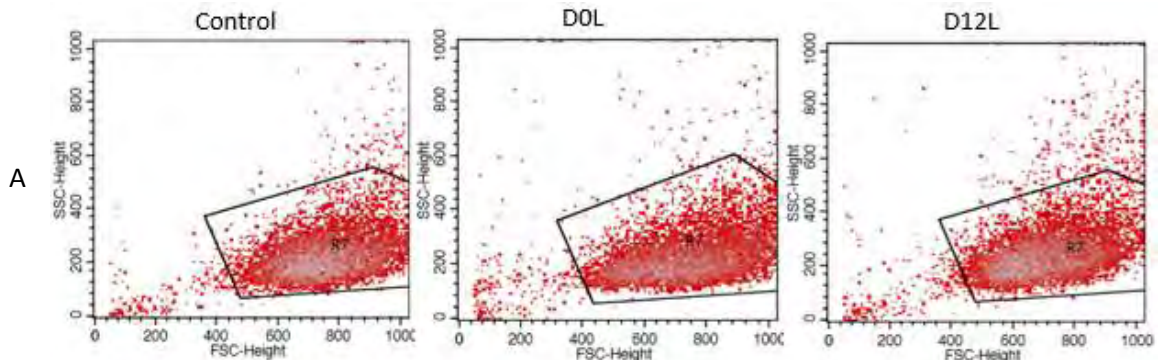
3.2 Προσδιορισμός των επιπέδων GSH και ROS με κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC)

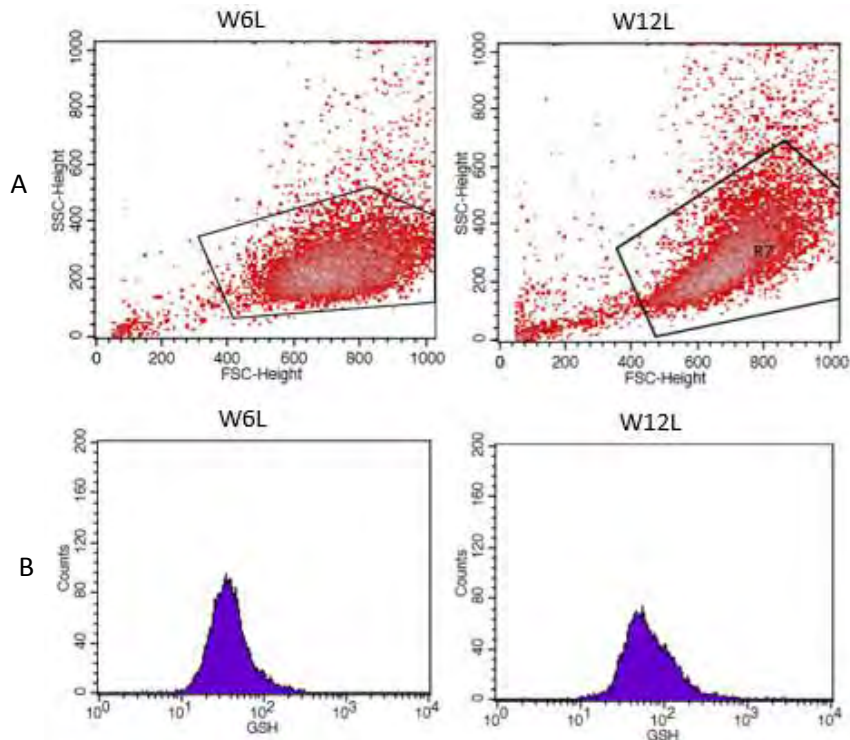
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου στα επίπεδα της GSH και των ROS όπως προέκυψαν έπειτα από πειράματα κυτταρομετρίας ροής.



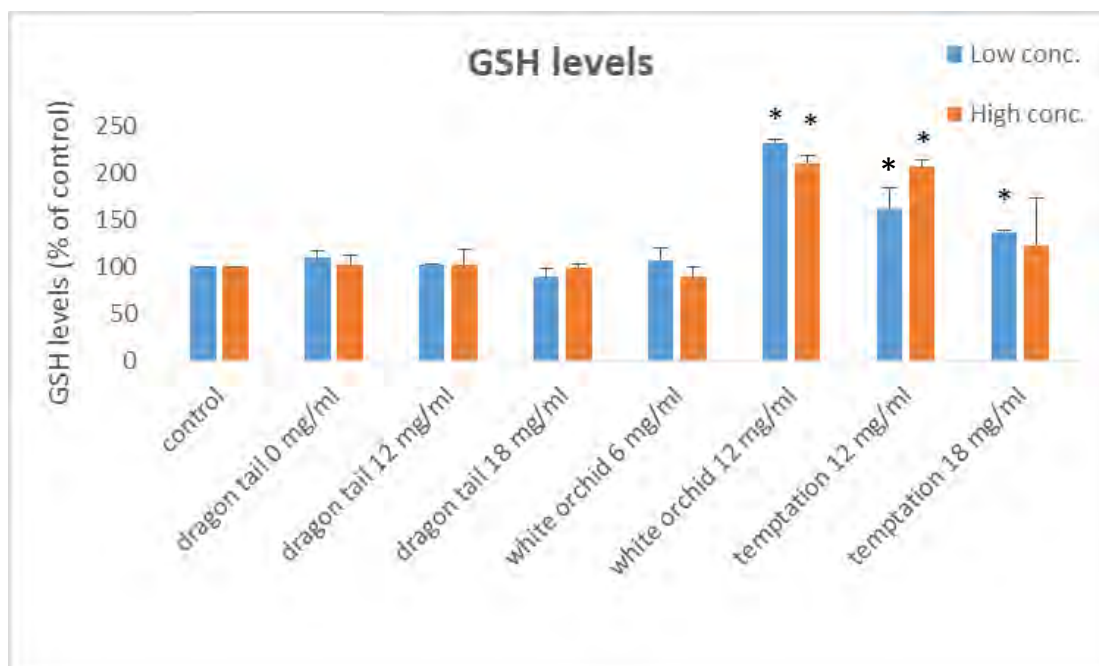


Γράφημα 8: Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926, έπειτα από επώασή τους με τα υγρά ηλεκτρονικού τσιγάρου στην υψηλή συγκέντρωση, με κυτταρομετρία ροής. A) Με κόκκινο χρώμα φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των ενδοθηλιακών κυττάρων. B) Με μπλε χρώμα φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που δείχνουν τον αριθμό των κυττάρων συναρτήσει του φθορισμού τους (10,000 κύτταρα). DOH: Dragon Tail (0 mg/ml) High concentration, D12H: Dragon Tail (12 mg/ml) High concentration, D18H: Dragon Tail (18 mg/ml) High concentration, T12H: Temptation (12 mg/ml) High concentration, T18H: Temptation (18 mg/ml) High concentration, W6H: White Orchid (6 mg/ml) High concentration, W12H: White Orchid (12 mg/ml) High concentration.



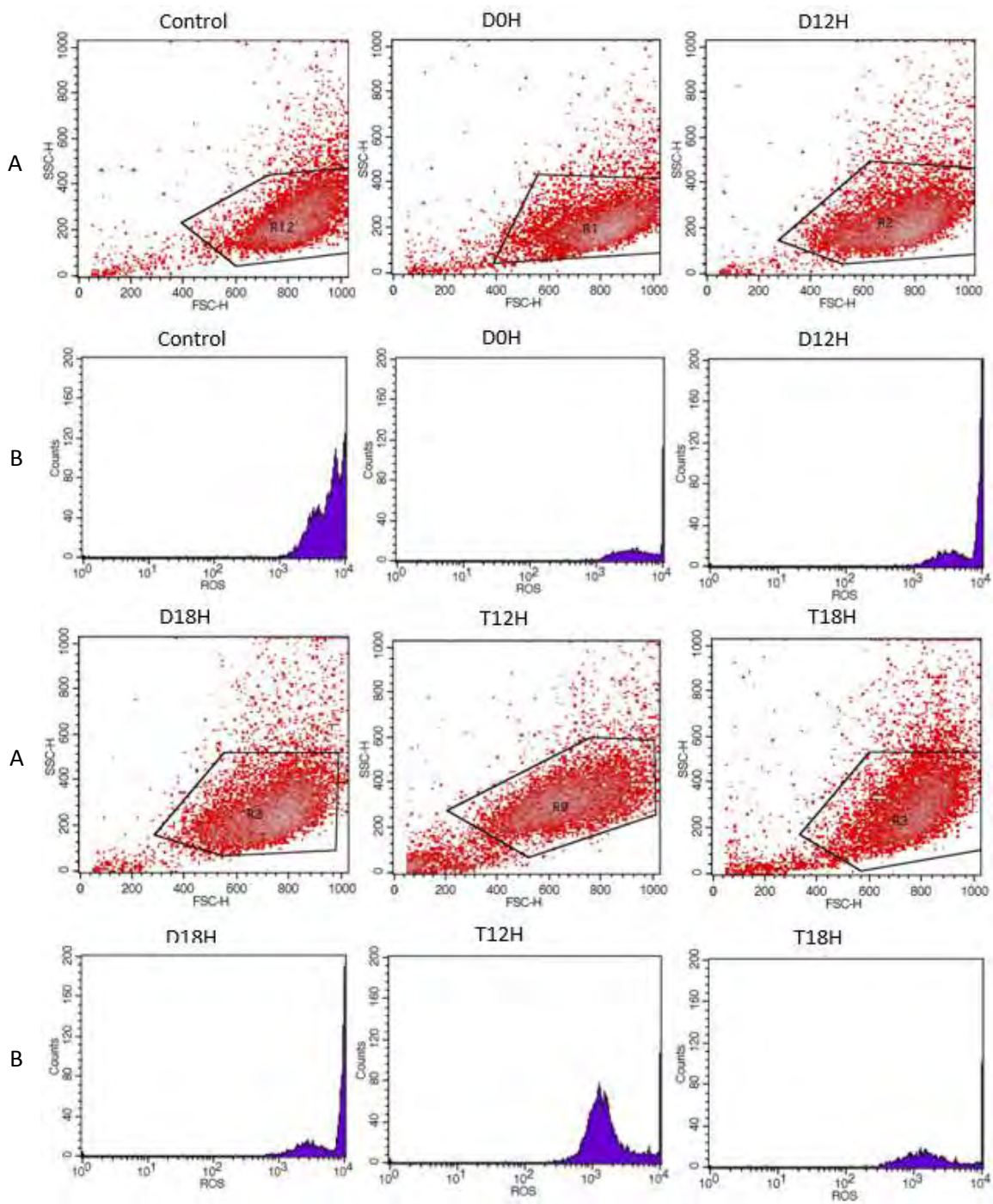


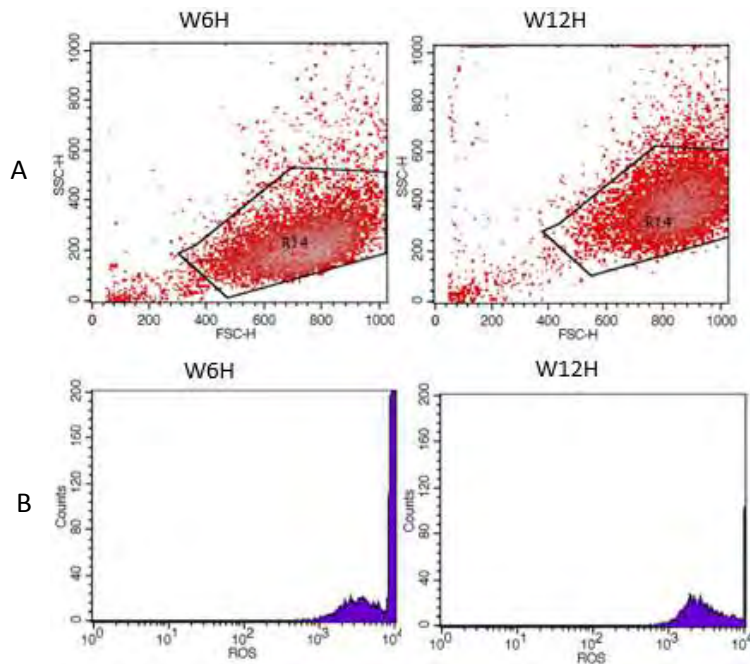
Γράφημα 9: Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926, έπειτα από επώασή τους με τα υγρά ηλεκτρονικού τσιγάρου στη χαμηλή συγκέντρωση, με κυτταρομετρία ροής. A) Με κόκκινο χρώμα φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των ενδοθηλιακών κυττάρων. B) Με μπλε χρώμα φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που δείχνουν τον αριθμό των κυττάρων συναρτήσει του φθορισμού τους (10,000 κύτταρα). DOL: Dragon Tail (0 mg/ml) Low concentration, D12L: Dragon Tail (12 mg/ml) Low concentration, D18L: Dragon Tail (18 mg/ml) Low concentration, T12L: Temptation (12 mg/ml) Low concentration, T18L: Temptation (18 mg/ml) Low concentration, W6L: White Orchid (6 mg/ml) Low concentration, W12L: White Orchid (12 mg/ml) Low concentration.



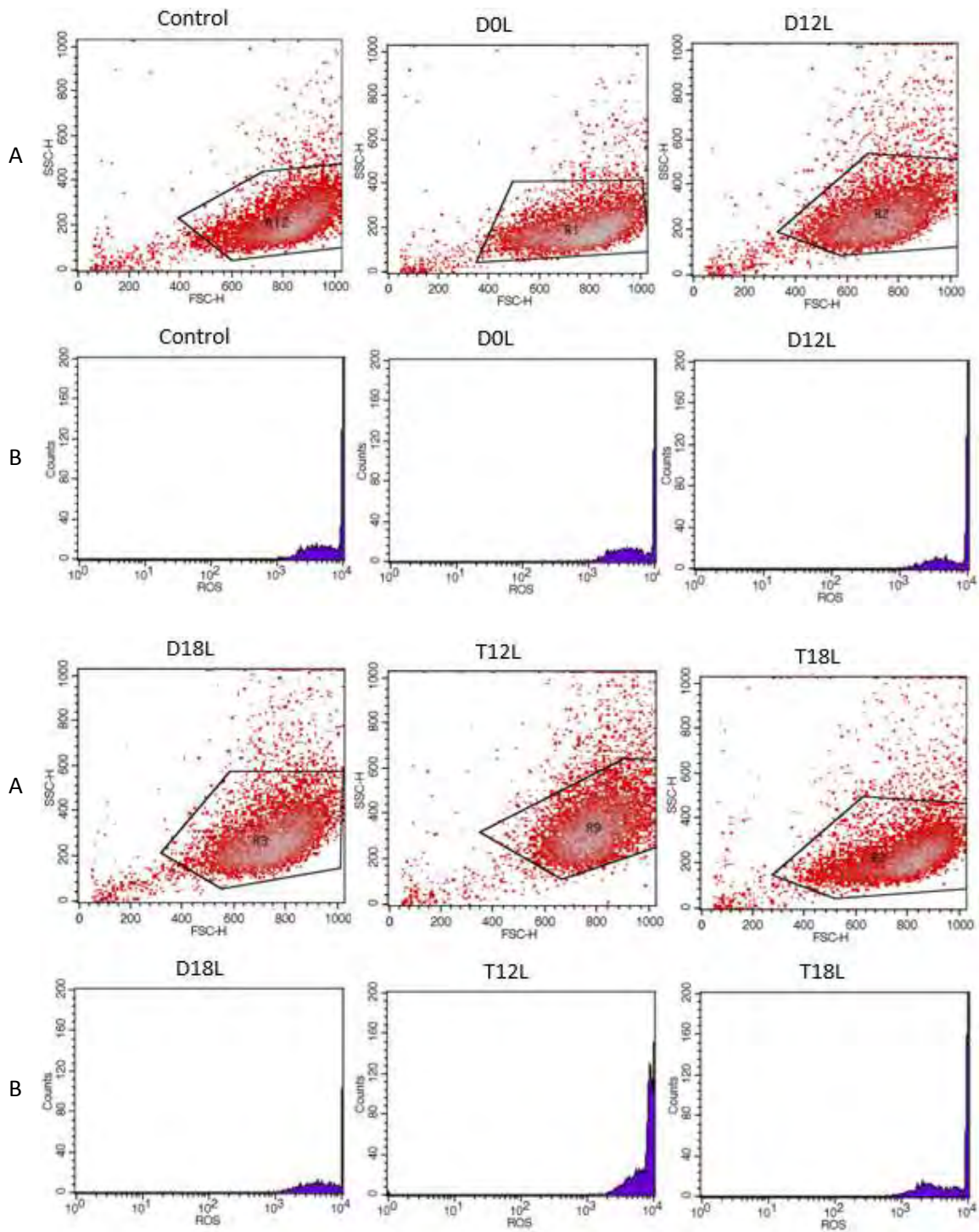
Γράφημα 10: Επίδραση των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου στα επίπεδα της ενδογενούς ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ($p < 0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

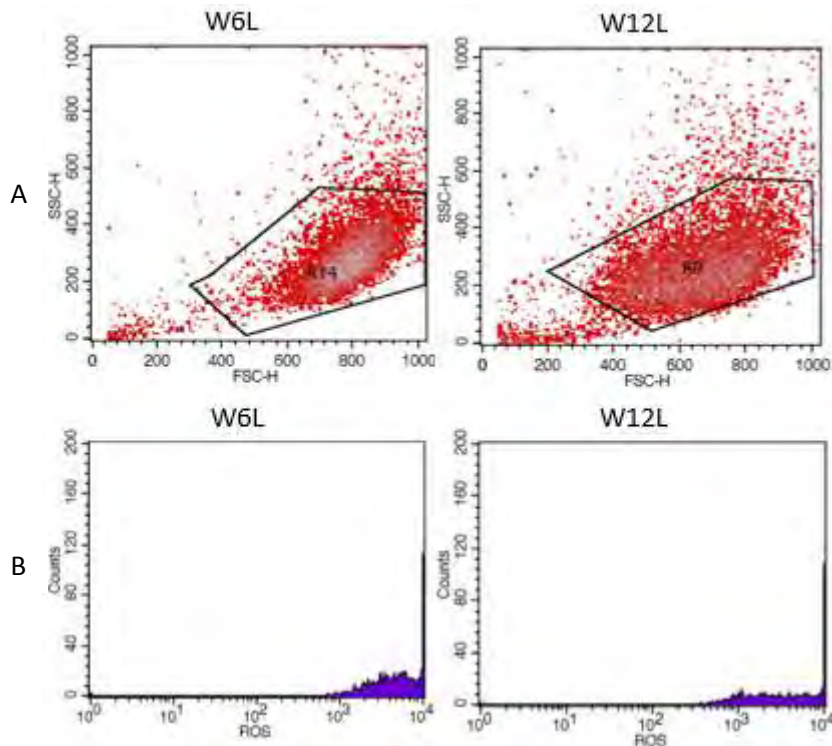
Όπως φαίνεται και από το Γράφημα 10, τα υγρά αναπλήρωσης Dragon Tail καθώς και το White Orchid (6 mg/ml) δεν είχαν κάποια επίδραση στα επίπεδα της GSH των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στα υγρά White Orchid (12 mg/ml) και Temptation (12 mg/ml) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της ενδογενούς GSH των κυττάρων τόσο στην κυτταροτοξική όσο και στη μη κυτταροτοξική συγκέντρωση ενώ στο Temptation (18 mg/ml) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση μόνο στη μη κυτταροτοξική συγκέντρωση ενώ στην κυτταροτοξική υπήρχε απλώς μια τάση για αύξηση της GSH. Ειδικότερα, για το White Orchid (6 mg/ml) υπήρχε αύξηση κατά 132% στη χαμηλή συγκέντρωση και 110% στην υψηλή συγκέντρωση ενώ για το Temptation (12 mg/ml) υπήρχε αύξηση κατά 62% και 107% στη χαμηλή και στην υψηλή συγκέντρωση, αντίστοιχα. Για το Temptation (18 mg/ml) στη χαμηλή συγκέντρωση η αύξηση της GSH ήταν της τάξης του 37% ενώ υπήρχε μια τάση για αύξηση στην κυτταροτοξική συγκέντρωση.



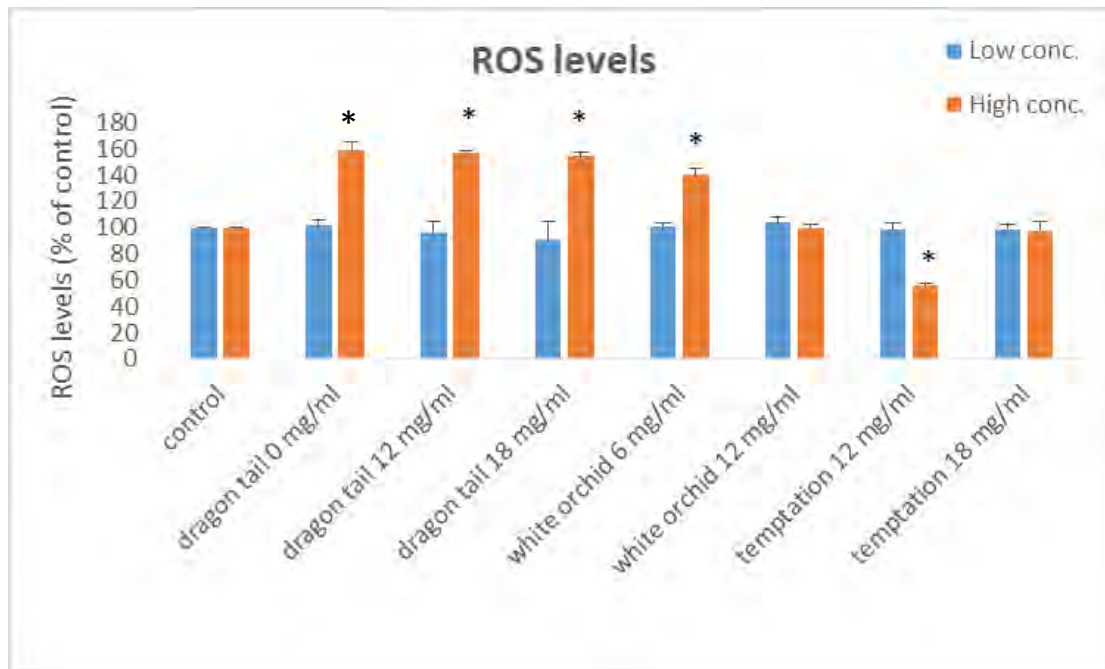


Γράφημα 11: Προσδιορισμός των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926, έπειτα από επώασή τους με τα υγρά ηλεκτρονικού τσιγάρου στην υψηλή συγκέντρωση, με κυτταρομετρία ροής. A) Με κόκκινο χρώμα φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των ενδοθηλιακών κυττάρων. B) Με μπλε χρώμα φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που δείχνουν τον αριθμό των κυττάρων συναρτήσει του φθορισμού τους (10,000 κύτταρα). DOL: Dragon Tail (0 mg/ml) Low concentration, D12L: Dragon Tail (12 mg/ml) Low concentration, D18L: Dragon Tail (18 mg/ml) Low concentration, T12L: Temptation (12 mg/ml) Low concentration, T18L: Temptation (18 mg/ml) Low concentration, W6L: White Orchid (6 mg/ml) Low concentration, W12L: White Orchid (12 mg/ml) Low concentration.





Γράφημα 12: Προσδιορισμός των επιπέδων των ελευθέρων ριζών (ROS) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926, έπειτα από επώασή τους με τα υγρά ηλεκτρονικού τσιγάρου στη χαμηλή συγκέντρωση, με κυτταρομετρία ροής. A) Με κόκκινο χρώμα φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που παρουσιάζουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των ενδοθηλιακών κυττάρων. B) Με μπλε χρώμα φαίνονται τα αντιπροσωπευτικά ιστογράμματα που δείχνουν τον αριθμό των κυττάρων συναρτήσει του φθορισμού τους (10,000 κύτταρα). DOL: Dragon Tail (0 mg/ml) Low concentration, D12L: Dragon Tail (12 mg/ml) Low concentration, D18L: Dragon Tail (18 mg/ml) Low concentration, T12L: Temptation (12 mg/ml) Low concentration, T18L: Temptation (18 mg/ml) Low concentration, W6L: White Orchid (6 mg/ml) Low concentration, W12L: White Orchid (12 mg/ml) Low concentration.

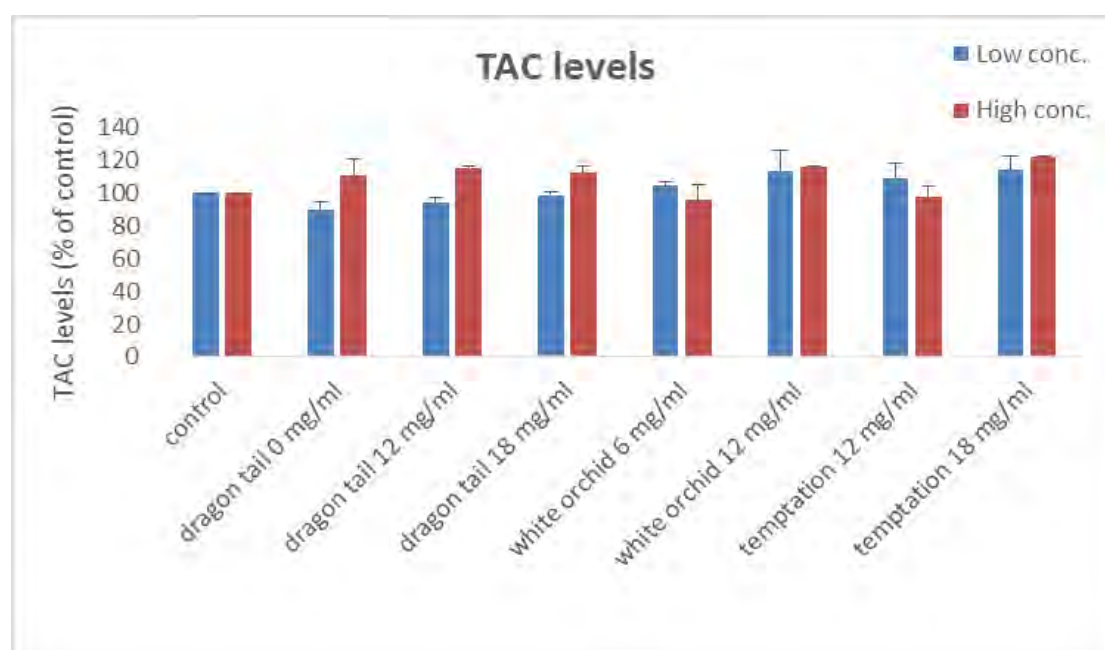


Γράφημα 13: Επίδραση των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου στα επίπεδα των ελευθέρων ριζών (ROS) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ($p < 0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

Όπως φαίνεται και από το Γράφημα 13, στις χαμηλές συγκεντρώσεις όλων των υγρών καθώς και στις υψηλές συγκεντρώσεις των White Orchid (12 mg/ml) και Temptation (18 mg/ml) δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των ελευθέρων ριζών σε σχέση με το control. Αντίθετα, στις υψηλές συγκεντρώσεις, υπήρχε στατιστικά σημαντική αύξηση των ROS σε όλα τα Dragon Tail καθώς και στο White Orchid (6 mg/ml). Πιο συγκεκριμένα οι ROS αυξήθηκαν κατά 59%, 57% και 54% μετά από επώαση των κυττάρων με τα Dragon Tail (0 mg/ml), Dragon Tail (12 mg/ml) και Dragon Tail (18 mg/ml), αντίστοιχα. Όσον αφορά το White Orchid (6 mg/ml) υπήρχε αύξηση των επιπέδων των ROS κατά 40%. Στο Temptation (12 mg/ml) παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική μείωση των ROS στην υψηλή συγκέντρωση η οποία άγγιξε το 44%.

3.3 Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Στο Γράφημα 14 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Η TAC αναφέρεται στους αντιοξειδωτικούς παράγοντες που δρουν άμεσα ως δότες πρωτονίων και δεν αντιπροσωπεύει το σύνολο όλων των αντιοξειδωτικών μηχανισμών ενός κυττάρου (π.χ. ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί), ωστόσο δίνει μια καλή εικόνα για τη δράση των άμεσων αντιοξειδωτικών.

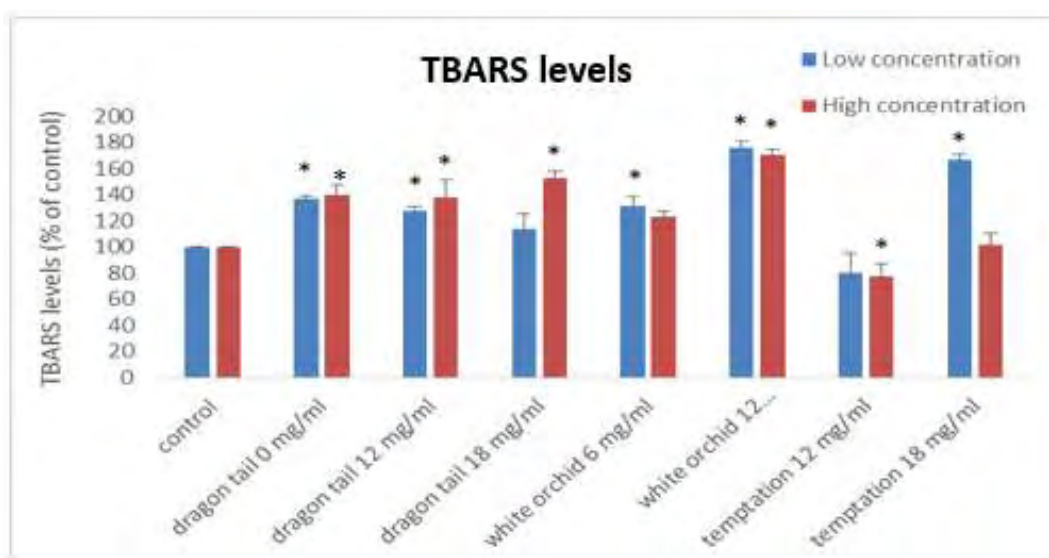


Γράφημα 14: Επίδραση των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου στα επίπεδα της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

Όπως φαίνεται και από το Γράφημα 14, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές σε σχέση με το control σε κανένα από τα υγρά αναπλήρωσης ούτε στη χαμηλή ούτε στην υψηλή συγκέντρωση.

3.4 Προσδιορισμός των επιπέδων των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

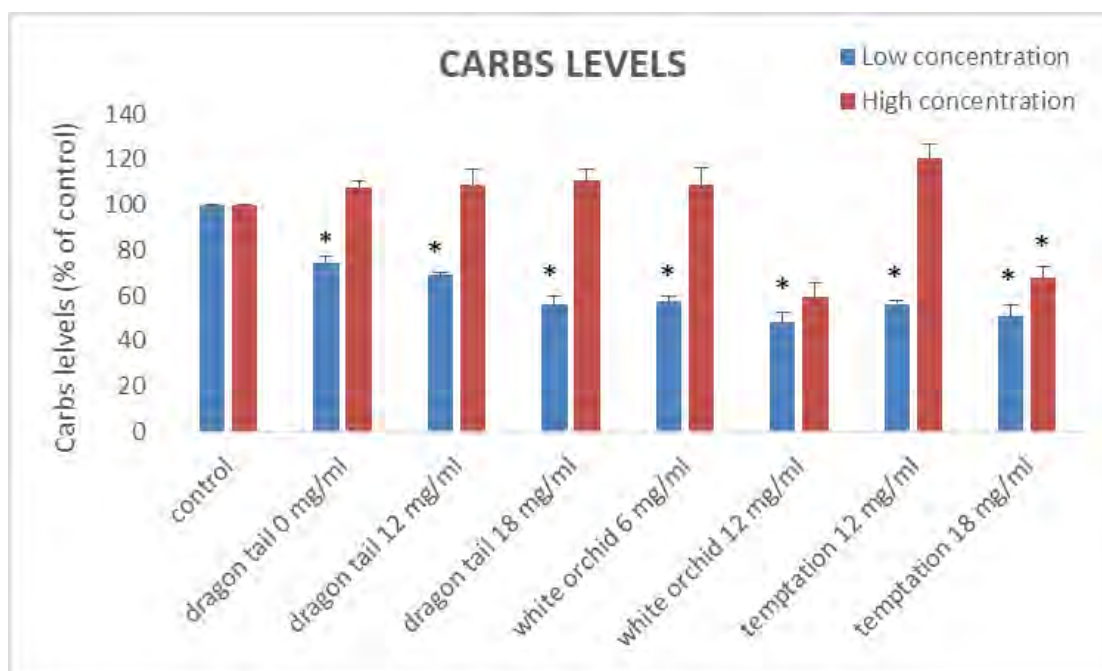
Όπως φαίνεται και στο Γράφημα 15, όσον αφορά τα υγρά Dragon Tail παρατηρήθηκε μια αύξηση των TBARS τόσο στη χαμηλή όσο και στην υψηλή συγκέντρωση. Πιο αναλυτικά, υπήρχε αύξηση των TBARS κατά 37% και 40% στο Dragon Tail (0 mg/ml) στη χαμηλή και στην υψηλή συγκέντρωση, αντίστοιχα. Για το Dragon Tail (12 mg/ml) η αύξηση ήταν 28% και 38% στη χαμηλή και στην υψηλή συγκέντρωση, αντίστοιχα. Για το Dragon Tail (18 mg/ml) υπήρχε μια τάση για αύξηση στη χαμηλή συγκέντρωση ενώ σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ύψους 53% στην υψηλή συγκέντρωση. Τα υγρά White Orchid προκάλεσαν επίσης στατιστική σημαντική αύξηση των TBARS. Ειδικότερα, το White Orchid (6 mg/ml) στη χαμηλή συγκέντρωση αύξησε τα TBARS κατά 31% ενώ στην υψηλή είχε μια τάση για αύξηση κατά 23% και το White Orchid (12 mg/ml) προκάλεσε αύξηση κατά 76% και 71% στη χαμηλή και στην υψηλή συγκέντρωση, αντίστοιχα. Όσον αφορά το Temptation (12 mg/ml), παρατηρήθηκε μια σημαντικά στατιστική μείωση στην υψηλή συγκέντρωση κατά 22% καθώς και μια τάση για μείωση στη χαμηλή συγκέντρωση του υγρού. Για το Temptation (18 mg/ml) στη χαμηλή συγκέντρωση υπήρχε αύξηση των TBARS κατά 67%.



Γράφημα 15: Επίδραση των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου στα επίπεδα των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ($p < 0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

3.5 Προσδιορισμός των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Όπως φαίνεται και από το Γράφημα 16, υπήρχε μια στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνικών των ενδοθηλιακών κυττάρων στις χαμηλές συγκεντρώσεις όλων των υγρών αναπλήρωσης καθώς και στην υψηλή συγκέντρωση του Temptation (18 mg/ml). Πιο αναλυτικά, για τα Dragon Tail (0 mg/ml), Dragon Tail (12 mg/ml) και Dragon Tail (18 mg/ml) παρατηρήθηκαν μειώσεις κατά 26%, 31% και 44%, αντίστοιχα, στις χαμηλές συγκεντρώσεις των υγρών. Στα White Orchid (6 mg/ml) και White Orchid (12 mg/ml) η μείωση ήταν της τάξης του 43% και 41%, αντίστοιχα, στις χαμηλές συγκεντρώσεις. Για το Temptation (12 mg/ml) υπήρχε μείωση κατά 44% στη χαμηλή συγκέντρωση ενώ όσον αφορά το Temptation (18 mg/ml), σημειώθηκε μείωση ύψους 49% στη χαμηλή συγκέντρωση και 32% στην υψηλή συγκέντρωση του υγρού.



Γράφημα 16: Επίδραση των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926. Με * επισημαίνονται τα αποτελέσματα που παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ($p < 0.05$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως $\text{mean} \pm \text{SEM}$.

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα αναφορικά με τους αντιοξειδωτικούς δείκτες.

Πίνακας 5: Συγκεντρωτικός πίνακας των αποτελεσμάτων από τα πειράματα προσδιορισμού των επιπέδων GSH, ROS, TAC, TBARS και πρωτεϊνικών καρβονυλίων των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926 έπειτα από επώαση τους με τα υγρά αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου. Με ↑ ή ↓ δηλώνεται η στατιστικά σημαντική αύξηση ή μείωση, αντίστοιχα, ενώ με ↗ ή ↘ δηλώνεται η τάση για αύξηση ή μείωση, αντίστοιχα.

E-liquid sample	GSH	ROS	TAC	TBARS	CARBS
Dragon Tail (0 mg/ml) High conc.	-	↑ (59%)	-	↑ (40%)	-
Dragon Tail (0 mg/ml) Low conc.	-	-	-	↑ (37%)	↓ (26%)
Dragon Tail (12 mg/ml) High conc.	-	↑ (57%)	-	↑ (38%)	-
Dragon Tail (12 mg/ml) Low conc.	-	-	-	↑ (28%)	↓ (31%)
Dragon Tail (18 mg/ml) High conc.	-	↑ (54%)	-	↑ (53%)	-
Dragon Tail (18 mg/ml) Low conc.	-	-	-	↗	↓ (44%)
White Orchid (6 mg/ml) High conc.	-	↑ (40%)	-	↗	-
White Orchid (6 mg/ml) Low conc.	-	-	-	↑ (31%)	↓ (43%)
White Orchid (12 mg/ml) High conc.	↑ (110%)	-	-	↑ (71%)	↓ (41%)
White Orchid (12 mg/ml) Low conc.	↑ (132%)	-	-	↑ (76%)	↓ (52%)
Temptation (12 mg/ml) High conc.	↑ (107%)	↓ (44%)	-	↓ (22%)	-
Temptation (12 mg/ml) Low conc.	↑ (62%)	-	-	↘	↓ (44%)
Temptation (18 mg/ml) High conc.	↗	-	-	-	↓ (32%)
Temptation (18 mg/ml) Low conc.	↑ (37%)	-	-	↑ (67%)	↓ (49%)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Συζήτηση

Έχει φανεί πως τα αερολύματα από τα υγρά αναπλήρωσης ηλεκτρονικών τσιγάρων επιδεικνύουν παρόμοια προφίλ τοξικότητας με τα μη ατμοποιημένα υγρά αναπλήρωσης, γεγονός που καθιστά την απευθείας έκθεση των κυττάρων στα υγρά αναπλήρωσης αξιόπιστη για τον καθορισμό της σχετικής τοξικότητας (Rowell et al., 2017). Μάλιστα, έχει προταθεί συγκεκριμένο πλαίσιο για την τοξικολογική εκτίμηση της επίδρασης των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου σε *in vitro* συστήματα (Iskandar et al., 2016).

Σχετικά με την επίδραση των υγρών ηλεκτρονικού τσιγάρου στη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων, το XTT assay έδειξε ότι: η συγκέντρωση 2,5% των υγρών Dragon Tail και Temptation και η συγκέντρωση 5% του υγρού White Orchid ήταν τοξικές στην κυτταρική σειρά EA.hy926 μειώνοντας σημαντικά τη βιωσιμότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτή η τοξικολογική επίδραση στη βιωσιμότητα συμβαίνει με δόσοεξαρτώμενο τρόπο καθώς αυξανόμενη της συγκέντρωσης του υγρού υπάρχει κλιμακούμενη μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Η κυτταροτοξική δράση του White Orchid αρχίζει να εμφανίζεται σε υψηλότερη συγκέντρωση του υγρού σε σχέση με τα Dragon Tail και Temptation, υποδηλώνοντας πως η άμεση επαφή των κυττάρων με αυτό το υγρό είναι λιγότερο επιβλαβής όσον αφορά τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Οι διαφορές στις συγκεντρώσεις της νικοτίνης μεταξύ των ίδιων υγρών φάνηκε πως δεν επηρεάζουν την κυτταροτοξική δράση του κάθε υγρού. Παρόλα αυτά, στην περίπτωση όπου η νικοτίνη δεν περιλαμβάνεται στα συστατικά του υγρού η κυτταροτοξικότητα εμφανίζεται σε υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με την περίπτωση όπου το ίδιο υγρό περιέχει νικοτίνη. Δηλαδή, το επίπεδο (συγκέντρωση) πάνω από το οποίο αρχίζει και παρατηρείται κυτταροτοξική δράση είναι υψηλότερο στο White Orchid απ' ότι στα άλλα δύο υγρά, ενώ είναι ακόμη υψηλότερο στο Dragon Tail που δεν περιείχε καθόλου νικοτίνη. Επίσης συγκρίνοντας το Temptation (12 mg/ml) και το White Orchid (12 mg/ml) τα οποία έχουν ίδια συγκέντρωση νικοτίνης (12 mg/ml) και ίδια αναλογία διαλυτών (50%VG/50%PG), γίνεται αντιληπτό πως η παρατηρούμενη διαφορά στη συγκέντρωση όπου το υγρό αρχίζει να έχει κυτταροτοξική δράση αποδίδεται στις διαφορετικές αρωματικές ύλες του κάθε προϊόντος.

Με βάση όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, έγινε προσπάθεια να αποκτηθεί μια ολοκληρωμένη εικόνα της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ενδοθηλιακών κυττάρων έπειτα από έκθεσή τους με τα υγρά ηλεκτρονικού τσιγάρου. Όσον αφορά

λοιπόν τα υγρά αναπλήρωσης Dragon Tail, φάνηκε πως ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης νικοτίνης, υπήρχε μια αύξηση των επιπέδων των ελευθέρων ριζών στην κυτταροτοξική συγκέντρωση του υγρού που χρησιμοποιήθηκε η οποία μάλιστα συνοδεύεται από παράλληλη αύξηση των επιπέδων των TBARS. Το γεγονός αυτό δείχνει πως η αύξηση των ROS συνδέεται με την αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσής δρώντας καταστροφικά για τις μεμβράνες των κυττάρων. Στη χαμηλή συγκέντρωση των υγρών Dragon Tail διαπιστώθηκε αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσής με ταυτόχρονη προστασία των πρωτεϊνών, γεγονός που φαίνεται να δείχνει ότι τα υγρά αναπλήρωσης επιδρούν στη δράση των ROS ευνοώντας την οξειδωση συγκεκριμένων βιομορίων και ειδικότερα των λιπιδίων έναντι των πρωτεϊνών χωρίς να επηρεάζονται τα συνολικά επίπεδα των ROS. Παρόμοιο μοτίβο παρατηρήθηκε και για το υγρό White Orchid συγκέντρωσης νικοτίνης 6 mg/ml. Με βάση αυτά τα στοιχεία γίνεται αντιληπτό πως τα Dragon Tail και το White Orchid (6 mg/ml) έχουν ένα προ-οξειδωτικό προφίλ καθώς επιδρούν επιζήμια στη φυσιολογική λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων επάγοντας την παραγωγή ROS και την οξειδωτική καταστροφή των λιπιδίων.

Από την άλλη πλευρά, το White Orchid (12 mg/ml) παρουσίασε υψηλή αύξηση της GSH και των TBARS με ταυτόχρονη μείωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Ενδεχομένως λόγω πρόκλησης λιπιδικής υπεροξειδωσής από την αλληλεπίδραση με το υγρό τα κύτταρα να οδηγήθηκαν σε υπερπαραγωγή ενδογενούς γλουταθειόνης ως απόκριση στη βλάβη των λιπιδίων με σκοπό την αποκατάσταση της ισορροπίας μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών. Η αυξημένη λοιπόν παραγωγή GSH φαίνεται πως ευθύνεται για την παρατηρούμενη προστασία των πρωτεϊνών από την οξειδωση. Το φαινόμενο αυτό ήταν ελαφρώς πιο έντονο στη χαμηλή συγκέντρωση του υγρού σε σχέση με την υψηλή.

Ένα ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης αφορά την επίδραση του υγρού Temptation (12 mg/ml) το οποίο φαίνεται να ενεργοποιεί αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άμυνας για να παρέχει προστασία έναντι των δυσμενών επιδράσεων των ελευθέρων ριζών τόσο στην υψηλή συγκέντρωση του υγρού όσο και στη χαμηλή. Πιο αναλυτικά, στην υψηλή συγκέντρωση, το υγρό κατάφερε να μειώσει σημαντικά τα επίπεδα των ROS και των TBARS ενώ παράλληλα αύξησε σε μεγάλο βαθμό τα επίπεδα της GSH. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για τη μη κυτταροτοξική συγκέντρωση του υγρού, όπου πάλι υπήρχε αύξηση της GSH των κυττάρων συνοδευόμενη από σημαντική μείωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και

μια τάση για μείωση των TBARS. Η προστασία των πρωτεϊνών και των λιπιδίων που φαίνεται ότι παρέχει το Temptation (12 mg/ml) στα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και η ενίσχυση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού μέσω αύξησης της GSH καθιστούν το συγκεκριμένο υγρό ένα ενδιαφέρον αντικείμενο μελέτης όσον αφορά τη μελέτη του μηχανισμού δράσης του που οδηγεί στην ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Όσο για το Temptation (18 mg/ml), αυτό έδειξε μια τάση για αύξηση της GSH και μια προστασία των πρωτεϊνών στην υψηλή συγκέντρωση η οποία στη χαμηλή συγκέντρωση ήταν εντονότερη και συνοδευόταν από αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Η διαφορά στη συγκέντρωση νικοτίνης των υγρών Temptation πιθανόν να ευθύνεται για την ισχυρότερη προστατευτική δράση του Temptation (12 mg/ml) σε σχέση με το Temptation (18 mg/ml).

Συμπερασματικά, όλα τα υγρά στη χαμηλή τους (μη κυτταροτοξική) συγκέντρωση παρουσίασαν προστατευτική δράση έναντι της πρωτεϊνικής οξείδωσης. Σε κανένα υγρό δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας. Σχεδόν όλα τα υγρά τόσο στη χαμηλή όσο και στην υψηλή συγκέντρωση προάγουν τη λιπιδική υπεροξειδωση με το Temptation (12 mg/ml) να αποτελεί εξαίρεση καθώς προστατεύει τα λιπίδια από το οξειδωτικό στρες. Γενικότερα, διαπιστώθηκε μια κατεύθυνση της δράσης των ελευθέρων ριζών προς τη λιπιδική υπεροξειδωση ενώ οι πρωτεΐνες παρέμειναν προστατευμένες. Όσα δείγματα είχαν γεύση καπνικού ανεξάρτητα της συγκέντρωσης νικοτίνης που περιείχαν, έδρασαν ως προ-οξειδωτικά επάγοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών και το οξειδωτικό στρες το οποίο εστιαζόταν στην καταστροφή των λιπιδίων. Το ίδιο συμβαίνει και για το υγρό με γεύση βανίλια σε συγκέντρωση νικοτίνης 6 mg/ml ενώ το ίδιο υγρό όταν έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε νικοτίνη (12 mg/ml) προάγει την αύξηση της GSH λόγω οξειδωτικής βλάβης των λιπιδίων η οποία ταυτόχρονα ευνοεί την προστασία των πρωτεϊνών. Ανάμεσα στα υγρά που εξετάστηκαν, το πιο ενδιαφέρον αποδείχθηκε εκείνο που είχε γεύση μήλο-μέντα και ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται σε μέτρια συγκέντρωση νικοτίνης (12 mg/ml). Η ικανότητά του υγρού αυτού να μειώνει τις ROS και να αυξάνει τη GSH όπως επίσης να προστατεύει τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη σημαντικών βιομορίων (πρωτεΐνες, λιπίδια) το αναδεικνύουν ως ένα ενδιαφέρον αντικείμενο μελέτης. Είναι φανερό από τα παραπάνω πως οι αρωματικές/γλυκαντικές ύλες παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, καθώς μερικές φαίνεται να επάγουν την παραγωγή ROS και άλλες να την αναστέλλουν, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από τη διεθνή βιβλιογραφία. Πιο

συγκεκριμένα, ερευνητές εξέτασαν την επίδραση της προσθήκης 49 διαφορετικών αρωματικών υλών στο σύστημα διαλυτών PG/VG των υγρών αναπλήρωσης όσον αφορά την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η ανίχνευση των ελευθέρων ριζών έγινε με χρήση EPR ενώ η σύσταση των αρωμάτων των υγρών αναλύθηκε με GC-MS και διαπίστωσαν πως συνολικά η δημιουργία ελευθέρων ριζών ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό στα διαφορετικά υγρά που δοκιμάστηκαν. Σχεδόν το 43% των αρωμάτων οδήγησαν σε σημαντική αύξηση της παραγωγής ROS σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (60% PG/ 40% VG). Στα αρώματα με ισχυρούς συσχετισμούς συμπεριλαμβάνονταν οι ενώσεις: β-δαμασκόνη, δ-τετραδεκαλακτόνη, γ-δεκαλακτόνη, κιτράλη, διπεντένιο, αιθυλ μαλτόλη, αιθυλ βανιλίνη, ακετάλη PG αιθυλ βανιλίνης, λιναλοόλη και πιπερονάλη. Το διπεντένιο, η αιθυλ-μαλτόλη, η κιτράλη, η λιναλοόλη και η πιπερονάλη προάγουν τον σχηματισμό ριζών με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο ενώ η αιθυλική βανιλίνη και σε μικρότερο βαθμό η β-δαμασκόνη αναστέλλει τον σχηματισμό ριζών με τρόπο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών ήταν στενά συνδεδεμένη με την ικανότητα οξειδωσης βιολογικά σχετικών λιπιδίων, όπως εξετάστηκε με τη μέθοδο των TBARS. (Bitzer et al., 2018).

Από τη βιβλιογραφία έχει φανεί πως τα αερολύματα που παράγονται από την ατμοποίηση των υγρών ηλεκτρονικού τσιγάρου επάγουν την παραγωγή ROS, την καταστροφή του DNA και τον κυτταρικό θάνατο σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (Anderson et al., 2016). Σε διασταυρούμενη τυχαιοποιημένη και μονά τυφλή κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε και στην οποία έλαβαν μέρος 40 υγιείς ενήλικες καπνιστές και μη καπνιστές, μελετήθηκε και συγκρίθηκε η επίδραση των συμβατικών τσιγάρων και των ηλεκτρονικών τσιγάρων στο οξειδωτικό στρες και την ενδοθηλιακή λειτουργία. Διαπιστώθηκε, έπειτα από μέτρηση των κατάλληλων βιοδεικτών, πως τόσο τα κλασσικά όσο και τα ηλεκτρονικά τσιγάρα έχουν δυσμενείς επιδράσεις αναφορικά με το οξειδωτικό στρες και την αγγειακή λειτουργία με το ηλεκτρονικό τσιγάρο να προκαλεί βλάβη σε μικρότερο βαθμό (Carnevale et al., 2016). Επιπλέον, ευρήματα από τον προσδιορισμό ελευθέρων ριζών σε αερολύματα με χρήση EPR/ESR έδειξαν αυξημένη απελευθέρωση ROS από τα ατμοποιημένα υγρά αναπλήρωσης τόσο σε κυτταρικά όσο και μη κυτταρικά συστήματα, η οποία συσχετίζεται με αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης όπως προσδιορίστηκε με μέτρηση των επιπέδων των TBARS σε μελέτη ομογενοποιημένων ιστών του πνεύμονα ποντικών που εκτέθηκαν σε ατμούς ηλεκτρονικού τσιγάρου (Sussan et al., 2015).

Η παρούσα μελέτη φιλοδοξεί να ρίξει φως στον τρόπο με τον οποίο τα υγρά αναπλήρωσης μπορεί να αλληλεπιδρούν με τα κύτταρα του ενδοθηλίου επηρεάζοντας την οξειδοαναγωγική κατάσταση αυτών. Προς το παρόν δεν υπάρχει πλούσια βιβλιογραφία σχετικά με το επαγόμενο από τα υγρά αναπλήρωσης οξειδωτικό στρες σε ενδοθηλιακά κύτταρα και δεδομένης της πληθώρας των διαφορετικών γεύσεων που κυκλοφορούν στο εμπόριο παγκοσμίως (Zhu et al., 2014) κρίνεται επιτακτική η ανάγκη για εξέταση τουλάχιστον των δημοφιλέστερων εξ αυτών προκειμένου να εξακριβωθεί η σχετική ασφάλειά τους για την υγεία του ανθρώπου.

4.2 Συμπεράσματα

Από την παρούσα μελέτη προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα αναφορικά με την τοξικότητα των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου μέσω του μηχανισμού του οξειδωτικού στρες:

- 1) Υπάρχει ετερογένεια μεταξύ των υγρών αναπλήρωσης ηλεκτρονικού τσιγάρου όσον αφορά το οξειδοαναγωγικό προφίλ που παρουσιάζουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα έπειτα από έκθεσή τους σε αυτά που μπορεί να αποδοθεί στις διαφορετικές αρωματικές ύλες που περιέχει κάθε υγρό.
- 2) Μεταξύ των τριών διαφορετικών γεύσεων που εξετάστηκαν τα υγρά με γεύση καπνικού φάνηκε να δρουν προ-οξειδωτικά, ανεξαρτήτως της περιεκτικότητάς τους σε νικοτίνη, υποδεικνύοντας ότι τέτοιου είδους υγρά ίσως να μην είναι τόσο ασφαλή όσο θεωρούνται.
- 3) Τα υγρά με γεύση βανίλια είχαν διαφορετική επίδραση ανάλογα με τη συγκέντρωση νικοτίνης που περιείχαν, με τη χαμηλότερη συγκέντρωση νικοτίνης να φαίνεται να δρα προ-οξειδωτικά και τη μεσαία συγκέντρωση νικοτίνης να επάγει τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, γεγονός που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης της πιθανής συσχέτισης του επιπέδου νικοτίνης με τις αρωματικές ύλες.
- 4) Το πιο εντυπωσιακό εύρημα της μελέτης αφορά τα υγρά με γεύση μήλο/μέντα (και ιδιαίτερα εκείνο της μέτριας περιεκτικότητας σε νικοτίνη) τα οποία φάνηκε να περιορίζουν την καταστροφή σημαντικών βιομορίων (λιπίδια, πρωτεΐνες) με ταυτόχρονη αύξηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού των κυττάρων.
- 5) Γενικά, στις μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των υγρών αναπλήρωσης παρατηρήθηκε ένα φαινόμενο στοχευμένης δράσης των ελευθέρων ριζών

υπέρ της οξειδωσης των λιπιδίων και παράλληλης προστασίας των πρωτεϊνών, γεγονός που δημιουργεί ερωτήματα για το πώς μπορούν τα υγρά αναπλήρωσης να κατευθύνουν τη δράση των ROS.

- 6) Αναδεικνύεται η σπουδαιότητα της εξέτασης πολλαπλών αντιοξειδωτικών δεικτών με σκοπό την απόκτηση μιας πιο ολοκληρωμένης και ξεκάθαρης εικόνας, καθώς η μελέτη ενός μόνο βιοδείκτη μπορεί να οδηγήσει σε παραπλανητικά και μη αληθή συμπεράσματα.
- 7) Η συνολική τοξικότητα που προκύπτει από τη χρήση των υγρών αναπλήρωσης στα ηλεκτρονικά τσιγάρα είναι ένα φαινόμενο πολυπαραγοντικό στο οποίο εμπλέκονται πολλές μεταβλητές και συνεπώς η συγκεκριμένη μελέτη μπορεί προς το παρόν να δώσει απλώς ενδείξεις σχετικά με την επίδραση των υγρών στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων. Κρίνεται λοιπόν απαραίτητη η περαιτέρω έρευνα επί του συγκεκριμένου θέματος προς διαλεύκανση των μηχανισμών που διέπουν τις τοξικολογικές επιδράσεις των υγρών αναπλήρωσης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aird, W. C. (2012). Endothelial Cell Heterogeneity, 1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006429>
- Anderson, C., Majeste, A., Hanus, J., & Wang, S. (2016). E-cigarette aerosol exposure induces reactive oxygen species, DNA damage, and cell death in vascular endothelial cells. *Toxicological Sciences*. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFW166>
- Benowitz, N. L., Hukkanen, J., & Jacob, P. (2009). Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. In *Handbook of Experimental Pharmacology*. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69248-5_2
- Bitzer, Z. T., Goel, R., Reilly, S. M., Elias, R. J., Silakov, A., Foulds, J., ... Richie, J. P. (2018). Effect of flavoring chemicals on free radical formation in electronic cigarette aerosols. *Free Radical Biology and Medicine*, 120(November 2017), 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.020>
- Bretón-Romero, R., & Lamas, S. (2014). Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biology*, 2(1), 529–534. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.02.005>
- Brown, C. J., & Cheng, J. M. (2014). Electronic cigarettes: Product characterization and design considerations. *Tobacco Control*, 23(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2013-051476>
- Carnevale, R., Sciarretta, S., Violi, F., Nocella, C., Loffredo, L., Perri, L., ... Frati, G. (2016). Acute Impact of Tobacco vs Electronic Cigarette Smoking on Oxidative Stress and Vascular Function. *Chest*, 150(3), 606–612. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.04.012>
- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., & Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, 14, 450–464. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(2), 192–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
- Chen, K., & Keaney, J. F. (2004). Reactive oxygen species-mediated signal transduction in the endothelium. *Endothelium: Journal of Endothelial Cell Research*, 11(2), 109–121. <https://doi.org/10.1080/10623320490482655>

- Conrad, M., & Friedmann Angeli, J. P. (2017). *Glutathione Peroxidases. Comprehensive Toxicology: Third Edition* (Third Edit, Vol. 10–15). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.95621-6>
- COOKE, M. S. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195–1214. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>
- Cox, S., Leigh, N. J., Vanderbush, T. S., Choo, E., Goniewicz, M. L., & Dawkins, L. (2018). An exploration into “do-it-yourself” (DIY) e-liquid mixing: Users’ motivations, practices and product laboratory analysis. *Addictive Behaviors Reports*, (December), 100151. <https://doi.org/10.1016/j.abrep.2018.100151>
- Criswell, K. A. (2017). *Evaluation of Hemostasis. Comprehensive Toxicology: Third Edition* (Third Edit, Vol. 12–15). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64256-3>
- Dasgupta, A., & Klein, K. (2014). *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements. Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405872-9.00016-1>
- Di Meo, S., Reed, T. T., Venditti, P., & Victor, V. M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>
- Directive 2014/40/EU of the European Parliament and of the Council of 3 April 2014 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States concerning the manufacture, presentation and sale of tobacco and related products and repealing Directive 2001/37/EC (Text with EEA relevance) Available at: <http://data.europa.eu/eli/dir/2014/40/2015-01-06> (Accessed on November 25, 2018)
- Djordjević, V. B. (2004). Free radicals in cell biology. *International Review of Cytology*, 237, 57–89. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)37002-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)37002-6)
- Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J., ... Georgopoulos, N. T. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International Wound Journal*, 14(1), 89–96. <https://doi.org/10.1111/iwj.12557>
- El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J. C., Gougerot-Pocidal, M. A., & Dang, P. M. C. (2016). Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunological Reviews*, 273(1), 180–193.

<https://doi.org/10.1111/imr.12447>

Emerit, J., Edeas, M., & Bricaire, F. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine and Pharmacotherapy*.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2003.11.004>

European Chemicals Agency (ECHA). Nicotine,
<https://echa.europa.eu/el/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/48724> (accessed: December 22, 2018)

European Commission. *Special Eurobarometer 458 “Attitudes of Europeans towards tobacco and electronic cigarettes”*. Brussels, 2017.

European Parliament. *700,000 deaths a year: tackling smoking in the EU*,
<http://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/society/20160518STO27901/700-000-deaths-a-year-tackling-smoking-in-the-eu>; accessed: December 22, 2018

Evans, M. D., Sc, B., Ph, D., Infirmiry, L. R., Cooke, M. S., & Sc, M. (2009).
INTELLIGENCE Oxidative Damage to Nucleic Acids.
<https://doi.org/10.1007/978-0-387-72974-9>

Farsalinos, K. (2018). E-cigarettes: An aid in smoking cessation, or a new health hazard? *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 12, 1–20.
<https://doi.org/10.1177/1753465817744960>

Farsalinos, K. E. (2016). *Review of Compounds of Regulatory Concern. Analytical Assessment of e-Cigarettes: From Contents to Chemical and Particle Exposure Profiles*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811241-0.00005-X>

Farsalinos, K. E., & Polosa, R. (2014). Safety evaluation and risk assessment of electronic cigarettes as tobacco cigarette substitutes: A systematic review. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 5(2), 67–86.
<https://doi.org/10.1177/2042098614524430>

Farsalinos, K. E., & Voudris, V. (2018). Do flavouring compounds contribute to aldehyde emissions in e-cigarettes? *Food and Chemical Toxicology*, 115, 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.059>

Félétou, M. (2011). The Endothelium, Part I: Multiple Functions of the Endothelial Cells -- Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. *Colloquium Series On Integrated Systems Physiology: From Molecule To Function*, 3(4), 1-306

Fenton, H. J. H. (1894). Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 65, 899–910.

<https://doi.org/10.1039/CT8946500899>

- Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(6), 1583–1606. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>
- Galley, H. F., & Webster, N. R. (2004). Physiology of the endothelium. *British Journal of Anaesthesia*, 93(1), 105–113. <https://doi.org/10.1093/bja/ae163>
- Gerloff, J., Sundar, I. K., Freter, R., Sekera, E. R., Friedman, A. E., Robinson, R., ... Rahman, I. (2017). Inflammatory Response and Barrier Dysfunction by Different e-Cigarette Flavoring Chemicals Identified by Gas Chromatography–Mass Spectrometry in e-Liquids and e-Vapors on Human Lung Epithelial Cells and Fibroblasts. *Applied In Vitro Toxicology*, 3(1), 28–40. <https://doi.org/10.1089/aivt.2016.0030>
- Gillman, I. G. (2016). *Analytical Testing of e-Cigarette Aerosol. Analytical Assessment of e-Cigarettes: From Contents to Chemical and Particle Exposure Profiles*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811241-0.00002-4>
- Goel, R., Durand, E., Trushin, N., Prokopczyk, B., Foulds, J., Elias, R. J., & Richie, J. P. (2015). Highly Reactive Free Radicals in Electronic Cigarette Aerosols. *Chemical Research in Toxicology*, 28(9), 1675–1677. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00220>
- Goniewicz, M. L., Knysak, J., Gawron, M., Kosmider, L., Sobczak, A., Kurek, J., ... Benowitz, N. (2014). Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. *Tobacco Control*, 23(2), 133–139. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2012-050859>
- Grana, R., Benowitz, N., & Glantz, S. A. (2014). E-cigarettes: A scientific review. *Circulation*, 129(19), 1972–1986. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.007667>
- Grover-Páez, F., & Zavalza-Gómez, A. B. (2009). Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 84(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2008.12.013>
- Haber, F., & Weiss, J. (1932). Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Die Naturwissenschaften*, 20(51), 948–950. <https://doi.org/10.1007/BF01504715>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology & Medicine*. Oxford University Press (Vol. 5 ed). <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>

- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1984). Oxygen toxicity. *Biochemistry Journal*, *219*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2010.04.003>
- Harvanko, A., Kryscio, R., Martin, C., & Kelly, T. (2019). Stimulus effects of propylene glycol and vegetable glycerin in electronic cigarette liquids. *Drug and Alcohol Dependence*. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2018.08.039>
- Hayyan, M., Hashim, M. A., & Alnashef, I. M. (2016). Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical Reviews*, *116*(5), 3029–3085. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00407>
- Hess, C. A., Olmedo, P., Navas-Acien, A., Goessler, W., Cohen, J. E., & Rule, A. M. (2017). E-cigarettes as a source of toxic and potentially carcinogenic metals. *Environmental Research*, *152*(June 2016), 221–225. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.09.026>
- Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M., & Kihara, Y. (2009). Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Circulation Journal*. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-08-1102>
- Holmström, K. M., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(6), 411–421. <https://doi.org/10.1038/nrm3801>
- Hrycay, E. G., & Bandiera, S. M. (2015). *Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer*. *Advances in Pharmacology* (1st ed., Vol. 74). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2015.03.003>
- Iskandar, A. R., Gonzalez-Suarez, I., Majeed, S., Marescotti, D., Sewer, A., Xiang, Y., ... Hoeng, J. (2016). A framework for *in vitro* systems toxicology assessment of e-liquids. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *26*(6), 389–413. <https://doi.org/10.3109/15376516.2016.1170251>
- IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
- Jensen, R. P., Strongin, R. M., & Peyton, D. H. (2017). Solvent Chemistry in the Electronic Cigarette Reaction Vessel. *Scientific Reports*, *7*(November 2016), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep42549>
- Ježek, P., & Hlavatá, L. (2005). Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen

- species in cell, tissues, and organism. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37(12), 2478–2503. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.05.013>
- Kaisar, M. A., Prasad, S., Liles, T., & Cucullo, L. (2016). A decade of e-cigarettes: Limited research & unresolved safety concerns. *Toxicology*, 365, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.07.020>
- Kalkhoran, S., & Glantz, S. A. (2016). E-cigarettes and smoking cessation in real-world and clinical settings: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Respiratory Medicine*, 4(2), 116–128. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00521-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00521-4)
- Kaur, G., Pinkston, R., McLemore, B., Dorsey, W. C., & Batra, S. (2018). Immunological and toxicological risk assessment of e-cigarettes. *European Respiratory Review*, 27(147). <https://doi.org/10.1183/16000617.0119-2017>
- Kavvalakis, M. P., Stivaktakis, P. D., Tzatzarakis, M. N., Kouretas, D., Liesivuori, J., Alegakis, A. K., ... Tsatsakis, A. M. (2015). Multicomponent analysis of replacement liquids of electronic cigarettes using chromatographic techniques. *Journal of Analytical Toxicology*, 39(4), 262–269. <https://doi.org/10.1093/jat/bkv002>
- Klager, S., Vallarino, J., MacNaughton, P., Christiani, D. C., Lu, Q., & Allen, J. G. (2017). Flavoring Chemicals and Aldehydes in E-Cigarette Emissions. *Environmental Science & Technology*. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02205>
- Koppenol, W. H. (2001). The Haber-Weiss cycle – 70 years later. *Redox Report*, 6(4), 229–234. <https://doi.org/10.1179/135100001101536373>
- Kreiss, K., Gomaa, A., Kullman, G., Fedan, K., Simoes, E. J., & Enright, P. L. (2002). Clinical Bronchiolitis Obliterans in Workers at a Microwave-Popcorn Plant. *New England Journal of Medicine*, 347(5), 330–338. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020300>
- Laviolette, S. R., & Van Der Kooy, D. (2004). The neurobiology of nicotine addiction: Bridging the gap from molecules to behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(1), 55–65. <https://doi.org/10.1038/nrn1298>
- Leigh, N. J., Lawton, R. I., Hershberger, P. A., & Goniewicz, M. L. (2016). Flavours significantly affect inhalation toxicity of aerosol generated from electronic nicotine delivery systems (ENDS). *Tobacco Control*, 25, ii81–ii87. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2016-053205>
- Lerner, C. A., Sundar, I. K., Yao, H., Gerloff, J., Ossip, D. J., McIntosh, S., ...

- Rahman, I. (2015). Vapors produced by electronic cigarettes and E-juices with flavorings induce toxicity, oxidative stress, and inflammatory response in lung epithelial cells and in mouse lung. *PLoS ONE*, *10*(2), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116732>
- Lik, H. (2006). Flameless electronic atomizing cigarette. *US20060196518 A1*.
- Lund, A. K. (2010). 6.14 - Oxidants and Endothelial Dysfunction A2 - McQueen, Charlene A. *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*, 243–274. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00712-0>
- Mantovani, G., & Madeddu, C. (2006). Oxidative Stress and Cancer Cachexia. In *Oxidative Stress, Disease and Cancer* (pp. 733–759). https://doi.org/10.1142/9781860948046_0025
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, *21*(3), 361–370. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.361>
- Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>
- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P., & Malik, A. B. (2014). Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling*. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>
- Moghe, A., Ghare, S., Lamoreau, B., Mohammad, M., Barve, S., McClain, C., & Joshi-Barve, S. (2015). Molecular mechanisms of acrolein toxicity: Relevance to human disease. *Toxicological Sciences*, *143*(2), 242–255. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu233>
- Moreira, M. B., Garcia-Cardena, G., Saffi, M. A. L., & Libby, P. (2018). Endothelium: A Coordinator of Acute and Chronic Inflammation. *Endothelium and Cardiovascular Diseases: Vascular Biology and Clinical Syndromes*, 485–491. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812348-5.00032-5>
- Muthumalage, T., Prinz, M., Ansah, K. O., Gerloff, J., Sundar, I. K., & Rahman, I. (2018). Inflammatory and oxidative responses induced by exposure to commonly used e-cigarette flavoring chemicals and flavored e-liquids without nicotine. *Frontiers in Physiology*, *8*(JAN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01130>
- Mylonas C, Kouretas D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*, *13*, 295-309

- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=89594, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/89594> (accessed Dec 22, 2018).
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=124886, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/124886> (accessed Dec 2, 2018)
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=1030, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1030> (accessed Nov. 10, 2018)
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=753, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/753> (accessed Nov. 10, 2018)
- Nguyen, G. T., Green, E. R., & Meccas, J. (2017). Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(August). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00373>
- Nyström, T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600599>
- Pepper, J. K., & Brewer, N. T. (2014). Electronic nicotine delivery system (electronic cigarette) awareness, use, reactions and beliefs: A systematic review. *Tobacco Control*. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2013-051122>
- Pi, X., Xie, L., & Patterson, C. (2018). Review Emerging Roles of Vascular Endothelium in Metabolic Homeostasis. *Circulation Research*, 477–494. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313237>
- Pisinger, C., & Døssing, M. (2014). A systematic review of health effects of electronic cigarettes. *Preventive Medicine*, 69, 248–260. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2014.10.009>
- Reczek, C. R., & Chandel, N. S. (2015). ROS-dependent signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.09.010>
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>
- Rowell, T. R., Reeber, S. L., Lee, S. L., Harris, R. A., Nethery, R. C., Herring, A. H., ... Tarran, R. (2017). Flavored e-cigarette liquids reduce proliferation and

- viability in the CALU3 airway epithelial cell line. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 313(1), L52–L66. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00392.2016>
- Schaller, K., Ruppert, L., Kahnet, S., Bethke, C., Nair, U., & Pötscheke-Langer, M. (2013). Electronic Cigarettes- An Overview. *Red Series Tobacco Prevention and Tobacco Control*.
- Schröder, P., & Krutmann, J. (2005). Environmental Oxidative Stress – Environmental Sources of ROS. In *The Handbook of Environmental Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/b101144>
- Schweitzer, K. S., Chen, S. X., Law, S., Van Demark, M., Poirier, C., Justice, M. J., ... Petrache, I. (2015). Endothelial disruptive proinflammatory effects of nicotine and e-cigarette vapor exposures. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 309(2), L175–L187. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00411.2014>
- Shadel, G. S., & Horvath, T. L. (2015). Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell*, 163(3), 560–569. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.001>
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, 11(November 2016), 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
- SIES, H. (1985). *Oxidative Stress: Introductory Remarks*. *Oxidative Stress*. PERGAMON PRESS INC. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-642760-8.50005-3>
- SIES, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215(2), 213–219. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x>
- Singh, R., Devi, S., & Gollen, R. (2015). Role of free radical in atherosclerosis, diabetes and dyslipidaemia: Larger-than-life. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 31(2), 113–126. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2558>
- Siraki, A. G., Klotz, L.-O., & Kehrer, J. P. (2017). *Free Radicals and Reactive Oxygen Species. Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.01895-X>
- Sleiman, M., Logue, J. M., Montesinos, V. N., Russell, M. L., Litter, M. I., Gundel, L. A., & Destailats, H. (2016). Emissions from electronic cigarettes: Key parameters affecting the release of harmful chemicals. *Environmental Science*

- and Technology*, 50(17), 9644–9651. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01741>
- Stimson, G. V., Thom, B., & Costall, P. (2014). Disruptive innovations: The rise of the electronic cigarette. *International Journal of Drug Policy*, 25(4), 653–655. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2014.05.003>
- Sumpio, B. E., Riley, J. T., & Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. - PubMed - NCBI, 34, 1508–1512. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12379270>
- Sussan, T. E., Gajghate, S., Thimmulappa, R. K., Ma, J., Kim, J. H., Sudini, K., ... Biswal, S. (2015). Exposure to electronic cigarettes impairs pulmonary anti-bacterial and anti-viral defenses in a mouse model. *PLoS ONE*, 10(2), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116861>
- Suzuki, Y. J., Carini, M., & Butterfield, D. A. (2010). Protein Carbonylation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(3), 323–325. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2887>
- Talhout, R., Schulz, T., Florek, E., van Benthem, J., Wester, P., & Opperhuizen, A. (2011). Hazardous compounds in tobacco smoke. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(2), 613–628. <https://doi.org/10.3390/ijerph8020613>
- Tse, D., & Stan, R. V. (2010). Morphological heterogeneity of endothelium. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 36(3), 236–245. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1253447>
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552(2), 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Van Rooy, F. G. B. G. J., Rooyackers, J. M., Prokop, M., Houba, R., Smit, L. A. M., & Heederik, D. J. J. (2007). Bronchiolitis obliterans syndrome in chemical workers producing diacetyl for food flavorings. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 176(5), 498–504. <https://doi.org/10.1164/rccm.200611-16200C>
- Veal, E., Day, A., & Morgan, B. (2007). Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Molecular Cell*, 26(1), 1–14. doi: 10.1016/j.molcel.2007.03.016

- Victor, V., Rocha, M., Sola, E., Banuls, C., Garcia-Malpartida, K., & Hernandez-Mijares, A. (2009). Oxidative Stress, Endothelial Dysfunction and Atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*, *15*(26), 2988–3002. <https://doi.org/10.2174/138161209789058093>
- Wonnacott, S., & Barik, J. (2009). Molecular and cellular mechanisms of action of nicotine in the CNS. *Handbook of Experimental Pharmacology*. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69248-5_7
- Yau, J. W., Teoh, H., & Verma, S. (2015). Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovascular Disorders*, *15*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12872-015-0124-z>
- Zangar, R. C., Davydov, D. R., & Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *199*(3), 316–331. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.01.018>
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
- Zhao, J., Zhang, Y., Sisler, J. D., Shaffer, J., Leonard, S. S., Morris, A. M., ... Demokritou, P. (2018). Assessment of reactive oxygen species generated by electronic cigarettes using acellular and cellular approaches. *Journal of Hazardous Materials*, *344*, 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.057>
- Zhu, S. H., Sun, J. Y., Bonnevie, E., Cummins, S. E., Gamst, A., Yin, L., & Lee, M. (2014). Four hundred and sixty brands of e-cigarettes and counting: Implications for product regulation. *Tobacco Control*, *23*(January), iii3-iii9. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2014-051670>