



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

Μελέτη επίδρασης του εκχυλίσματος
μικροσωματιδίων του αέρα από την
περιοχή της Λάρισας σε ανθρώπινα
κύτταρα και DNA. Αξιολόγηση της
προστατευτικής δράσης εκχυλισμάτων
καφέ

Study of air particulate extract influence originated from the area
of Larissa in human cells and DNA. Evaluation of the protective
effects of coffee extracts

Παπικινός Κωνσταντίνος

Λάρισα 2017

Μελέτη επίδρασης του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων του αέρα από την περιοχή της Λάρισας σε ανθρώπινα κύτταρα και DNA. Αξιολόγηση της προστατευτικής δράσης εκχυλισμάτων καφέ

Τριμελής επιτροπή

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημοσθένης Σαρηγιάννης : Αναπληρωτής Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μηχανικής του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Δημήτριος Στάγκος: Επίκουρος καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά τον καθηγητή κύριο Δημήτρη Κουρέτα για την ανάθεση της πτυχιακής μου. Μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ με ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον θέμα και με βοήθησε να αναπτύξω τις γνώσεις μου.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την βοήθεια τους και την συμπαράστασή τους κατά την διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στην Θάλεια Κερασιώτη για την υπομονή που επέδειξε και για τις γνώσεις που μου πρόσφερε.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την υποστήριξή τους. Για ακόμα μία φορά στάθηκαν αρωγοί στην προσπάθειά μου και χωρίς αυτούς τίποτα από όλα αυτά δεν θα ήταν δυνατό. Και βέβαια την σύντροφό μου που με στήριξε και με στηρίζει σε κάθε βήμα ενώ παράλληλα μου δίνει την απαραίτητη ώθηση για να κυνηγήσω τα όνειρά μου κάθε φορά.

Περίληψη

Η ατμοσφαιρική ρύπανση αποτελεί ένα πολύ σημαντικό και διεθνές πρόβλημα. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) κάθε χρόνο περίπου 2 εκατομμύρια άνθρωποι πεθαίνουν λόγω αυτής¹.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων μικροσωματιδίων από την περιοχή της Λάρισας σε κύτταρα και DNA. Επιπλέον διερευνήθηκε η προστατευτική δράση εκχυλισμάτων καφέ στην πρόκληση βλαβών στο γενετικό υλικό. Για αυτόν τον σκοπό πραγματοποιήθηκε μια εκστρατεία συλλογής δειγμάτων αέρα στην περιοχή της Λάρισας με την συνεργασία του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Από τα δείγματα εκχυλίστηκαν τα ιδιαίτερα επιβαρυντικά για την ανθρώπινη υγεία μικροσωματίδια με αεροδυναμική διάμετρο 2.5 μm (PM2.5). Τα εν λόγω μικροσωματίδια προκαλούν ιδιαίτερα σοβαρά προβλήματα στο καρδιαγγειακό κι αναπνευστικό σύστημα. Το μικρό τους μέγεθος τους επιτρέπει να εισχωρούν μέχρι την περιοχή ανταλλαγής αερίων του πνεύμονα.

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν τα κύτταρα EA.hay926 (αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου). Η επιλογή της εν λόγω σειράς έγινε καθώς σε μεγάλο αριθμό μελετών τα μικροσωματίδια επηρεάζουν το ενδοθήλιο και προκαλούν καρδιοαγγειακές νόσους.

Αναλυτικότερα, κατά την μελέτη με την μέθοδο ΧΤΤ εντοπίστηκε πως το εκχύλισμα των μικροσωματιδίων ήταν ιδιαίτερα τοξικό ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις (0,1μg/μl). Στη συνέχεια με την χρήση χρωστικών και της κυτταρομετρίας ροής μπορέσαμε να διακρίνουμε, στα κύτταρα που επιζούν της επιρροής των μικροσωματιδίων, την κατακόρυφη αύξηση των επιπέδων GSH (141%) και τον περιορισμό της αύξησης των ROS.

Τέλος με την χρήση πλασμιδιακού DNA παρατηρήσαμε την δυνατότητα πρόκλησης ρήξεων από τα συστατικά των μικροσωματιδίων. Επιπλέον μελετήσαμε την προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων καφέ και πως αυτή φαίνεται να αλλάζει από κατεργασίες το καβούρδισμα των κόκκων και η αφαίρεση της καφεΐνης.

Έτσι, φάνηκε η σημαντική επίδραση των PM2.5 στην υγεία του ανθρώπου και τονίστηκε η σημασία της μελέτης τους. Ωστόσο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να αποσαφηνιστεί τελείως ο τρόπος δράσης τους καθώς και η προστατευτική δράση άλλων τροφών στο DNA.

Abstract

Air pollution is a very important international problem. According to the World Health Organization (WHO) every year about two million people die because of this.

The purpose of this study was to study the effect of microparticles extracts from the region of Larissa in cells and DNA. Furthermore, the protective effect of coffee extracts in damaging the genetic material was investigated. For this purpose, a campaign was set to collect air samples in the region of Larissa with the cooperation of University of Thessaly and the Aristotle University of Thessaloniki. From these samples, the particularly penalizing for human health micro particles of aerodynamic diameter of 2.5 microns (PM_{2.5}) were extracted. These microparticles cause very serious problems in the cardiovascular and respiratory system. Their small size allows it to penetrate to the lung.

The cell line used in this study was EA.hy926 cells (human vascular endothelial cells). The choice of this series was made because in a large number of studies the microparticles influence the endothelium causing cardiovascular diseases.

Specifically, during the study the XTT method detected that the microparticles of the extract was very toxic even in small concentrations (0,1µg/µl). Then with the use of special pigments and flow cytometry to discern, from the cells that survive the influence of the microparticles, a sharp increase in GSH levels (141%) that limited the increase in ROS.

Finally, using the plasmid DNA we documented the capability of the PM_{2.5} to cause double strand breaks on the DNA. In addition, we studied the protective effects of coffee extracts and how those appear to change from processes such as roasting the beans and removing the caffeine.

Thus, we observed the significant effect of PM_{2.5} on human health and stressed the importance of their study. However, further studies are needed to elucidate fully their mode of action and the protective effect of other foods in the DNA.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	4
Abstract	5
1. Εισαγωγή	8
1.1. Ατμοσφαιρική ρύπανση.....	8
1.2. Αιωρούμενα μικροσωματίδια	11
1.3. Ελεύθερες ρίζες	12
1.3.1. Πηγές Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου	13
1.4. Βιολογική Δράση Των ROS:.....	13
1.4.1. Θετικές επιδράσεις.....	13
1.4.2. Επιβλαβείς επιδράσεις.....	14
1.5. Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί.....	14
1.5.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί:.....	14
1.5.1.1. Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	14
1.5.1.2. Καταλάση (CAT).....	15
1.5.1.3. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)	15
1.5.1.4. Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)	15
1.5.2. Μη Ενζυμικοί Μηχανισμοί	16
1.5.2.1. Γλουταθειόνη	16
1.5.2.2. Βιταμίνη C.....	17
1.5.2.3. Β-καροτένιο	17
1.5.2.4. Βιταμίνη E.....	18
1.5.2.5. Συνένζυμο Q 10	18
1.5.2.6. Σελήνιο	18
1.6. Οξειδωτικό Στρες	18
1.6.1. Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες.....	19
1.6.2. Οξειδωτικό stress και αιωρούμενα μικροσωματίδια	20
1.7. Καφές.....	23
1.7.1. Γενικά.....	23
1.7.2. Χημική σύσταση	23
1.7.2.1. Πράσινος καφές.....	23
1.7.2.2. Καβουρδισμένος καφές	26
2. Σκοπός	28
3. Υλικά και μέθοδοι	29
3.1. Υλικά	29
3.1.1. Μέτρηση	29
3.1.2. Εκχυλίσματα μικροσωματιδίων PM 2.5	31
3.1.3. Εκχυλίσματα καφέ	33
3.1.4. Χημικά αντιδραστήρια	33
3.1.5. Θρεπτικά μέσα και υλικά πειράματος	34
3.2. Ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926	34
3.2.1. Πλασμιδιακό DNA	35
3.3. Μέθοδοι.....	35
3.3.1. Καλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926.....	35
3.3.2. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων PM 2.5 με τη μέθοδο ΧΤΤ.....	35
3.3.2.1. Αρχή της μεθόδου	35
3.3.2.2. Πειραματική διαδικασία	36

3.3.3.	Κυτταρομετρία Ροής.....	37
3.3.3.1.	Αρχή της μεθόδου	37
3.3.3.2.	Πειραματική διαδικασία	39
3.3.4.	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	40
3.3.5.	Χρήση πλασμιδιακού DNA για την εκτίμηση μεταλλαξιγόνου δράσης του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων και αναστολή αυτής από εκχυλίσματα καφέ	42
3.3.5.1.	Αρχή της μεθόδου	42
3.3.5.2.	Πειραματική διαδικασία	43
3.3.5.3.	Στατιστική ανάλυση.....	44
4.	Αποτελέσματα	46
4.1.	Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο του ΧΤΤ.....	46
4.2.	Προσδιορισμός των επιπέδων GSH με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής	46
4.3.	Προσδιορισμός των επιπέδων ROS με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής	49
4.4.	Προσδιορισμός της πρόκλησης βλαβών στο DNA και αναστολής της με χρήση εκχυλισμάτων καφέ 51	
5.	Συζήτηση	59
6.	Βιβλιογραφία.....	64

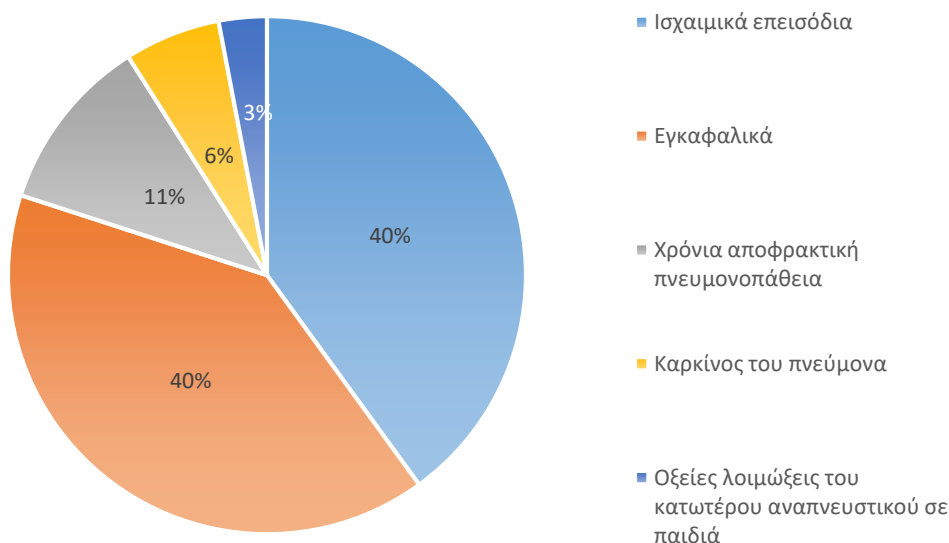
1. Εισαγωγή

1.1. Ατμοσφαιρική ρύπανση

Ατμοσφαιρική ρύπανση καλείται, η παρουσία στην ατμόσφαιρα κάθε είδους ουσιών, σε συγκέντρωση ή διάρκεια που μπορούν να προκαλέσουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία, στους ζωντανούς οργανισμούς και στα οικοσυστήματα και γενικά να καταστήσουν το περιβάλλον ακατάλληλο για τις επιθυμητές χρήσεις του. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, η ατμοσφαιρική ρύπανση μπορεί να φτάσει σε επίπεδα που μπορεί να δημιουργήσουν ανεπιθύμητες συνθήκες διαβίωσης. Συνήθως εμφανίζεται με δύο μορφές:

- Νέφος καπνομίχλης, σχηματίζεται όταν έχουμε υψηλή συγκέντρωση ρύπων, όπως μονοξειδίου του άνθρακα, διοξείδιο του θείου και αιωρούμενα σωματίδια, σε συνδυασμό με σχετικά χαμηλή θερμοκρασία και μεγάλη σχετική υγρασία.
- Φωτοχημικό νέφος, παρουσιάζεται όταν έχουμε υψηλές θερμοκρασίες, μεγάλη ηλιοφάνεια σε ένταση και διάρκεια, μικρή σχετική υγρασία και υψηλή συγκέντρωση οξειδίων του αζώτου, υδρογονανθράκων, και δευτερογενών προϊόντων τους

Η ατμοσφαιρική ρύπανση αποτελεί ένα πολύ σημαντικό και διεθνές πρόβλημα. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) κάθε χρόνο περίπου 2 εκατομμύρια άνθρωποι πεθαίνουν λόγω αυτής¹. Κύριοι στόχοι της ρύπανσης είναι το καρδιαγγειακό και το αναπνευστικό σύστημα ενώ η επίδραση της είναι ιδιαίτερα σοβαρή σε άτομα με βεβαρημένο ιστορικό προβλημάτων υγείας.



Εικόνα 1: Κύριες ασθένειες σε άτομα που εκτίθενται σε αέριους ρύπους

Ακόμα φαίνεται να υπάρχει και κοινωνικό υπόβαθρο καθώς οι φτωχότεροι άνθρωποι επηρεάζονται πιο συχνά είτε λόγω των περιοχών διαβίωσης τους είτε λόγω των συνθηκών εργασίας τους. Πρόσφατη μελέτη του ΟΟΣΑ μάλιστα υπολογίζει πως μέχρι το 2060 οι νεκροί από την ρύπανση θα είναι 6-9 εκατομμύρια και το κόστος για την παγκόσμια οικονομία θα ανέλθει στο 1% του παγκόσμιου ΑΕΠ ετησίως.

Υπάρχουν διάφορες πηγές ατμοσφαιρικής ρύπανσης, ανθρωπογενούς και φυσικής προέλευσης:

- καύση ορυκτών καυσίμων για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας, οι μεταφορές, η βιομηχανία και τα νοικοκυριά,
- βιομηχανικές διεργασίες και χρήση διαλυτών, για παράδειγμα σε βιομηχανίες χημικών και ορυκτών,
- γεωργία,
- διαχείριση αποβλήτων, και
- ηφαιστειογενείς εκρήξεις, κονιορτός, εκνέφωση θαλάσσιου άλατος και εκπομπές πτητικών οργανικών ενώσεων από εργοστάσια είναι παραδείγματα φυσικών πηγών εκπομπών.

Εξαιτίας αυτού γίνεται κατανοητό πως το μεγαλύτερο πρόβλημα υπάρχει σε αναπτυσσόμενες χώρες με έντονη βιομηχανοποίηση αλλά και σε μεγαλουπόλεις¹. Τα τελευταία χρόνια πολλές χώρες και πόλεις έχουν υιοθετήσει προγράμματα παρακολούθησης της ποιότητας του αέρα προκειμένου να συμβάλουν τόσο στην πληρέστερη κατανόηση του φαινομένου και των προεκτάσεων του στην δημόσια υγεία όσο και για να προσφέρουν καλύτερη ποιότητα αέρα στους πολίτες τους¹. Σε αυτό το πλαίσιο έχουν εγκατασταθεί μετρητές καθώς και παράμετροι που αφορούν την ποιότητα του αέρα. Οι σημαντικότερες παράμετροι είναι:

- Αιωρούμενα μικροσωματίδια PM 10 και PM 2.5

PM10: 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Μέση τιμή έτους 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Μέση τιμή 24-ώρου

PM2.5: 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Μέση τιμή έτους 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Μέση τιμή 24-ώρου

Φυσικές πηγές: ηφαιστειακή δραστηριότητα, θάλασσα, σκόνη από απογυμνωμένο έδαφος, γύρη. Ανθρωπογενείς πηγές: βιομηχανικές δραστηριότητες, παραγωγή τσιμέντου, γύψου, χυτήρια μεταλλεύματος, αυτοκίνητα (κυρίως πετρελαιοκίνητα οχήματα και δίκυκλα), πυρκαγιές, καύση βιομάζας, αγροτικές δραστηριότητες, κατασκευές. Η συμμετοχή του αυτοκινήτου οφείλεται στην καύση του καυσίμου, στη φθορά των ελαστικών και στην επαναιώρηση. Μικρότερα σε μέγεθος σωματίδια (δευτερογενή)

δημιουργούνται στην ατμόσφαιρα από αντιδράσεις αερίων ρύπων. Τα δευτερογενή αιωρούμενα σωματίδια μπορούν να διαχωριστούν σε ανόργανα (αμμώνιο, νιτρικά και θειικά έχοντας ως πρόδρομες ουσίες την αμμωνία, τα αζωτοξείδια και τα οξείδια του θείου) και οργανικά (έχοντας ως πρόδρομους τους πτητικούς υδρογονάνθρακες). Με μια σειρά αντιδράσεων μπορούν να παραχθούν οργανικές ουσίες που είτε συσσωματώνονται και παράγουν νέα σωματίδια είτε συμπυκνώνονται πάνω σε υπάρχοντα σωματίδια. Η παραγωγή όζοντος σχετίζεται με παραγωγή δευτερογενών σωματιδίων.

- Όζον (O₃)

100 μg/m³ Μέση τιμή 8-ώρου

Το όζον σχηματίζεται στην κατώτερη ατμόσφαιρα (τροπόσφαιρα) ως αποτέλεσμα αλυσίδας χημικών αντιδράσεων μεταξύ του οξυγόνου, πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs), και οξειδίων του αζώτου υπό συνθήκες έντονης ηλιακής ακτινοβολίας και υψηλών θερμοκρασιών. Πηγές των ρύπων που συντελούν στη δημιουργία του όζοντος είναι τα οχήματα, εργοστάσια, χωματερές, χημικά διαλυτικά και πολλές άλλες μικρές πηγές όπως βενζινάδικα, αγροτικός εξοπλισμός, κλπ.

- Διοξείδιο του αζώτου (NO₂)

40 μg/m³ Μέση τιμή έτους 200 μg/m³ Μέση ωριαία τιμή

Η χρήση καυσίμων κυρίως σε αυτοκίνητα αλλά και σε βιομηχανικούς καυστήρες ή σε σταθμούς ηλεκτροπαραγωγής παράγει μονοξείδιο του αζώτου. Αυτό με διάφορες χημικές αντιδράσεις που ενισχύονται με την παρουσία της ηλιακής ακτινοβολίας μετατρέπεται σε διοξείδιο του αζώτου.

- Διοξείδιο του θείου (SO₂)

20 μg/m³ Μέση τιμή 24-ώρου 500 μg/m³ Μέση τιμή 10-λέπτου

Εργοστάσια παραγωγής ενέργειας, βιομηχανίες, κεντρικές θερμάνσεις, διυλιστήρια πετρελαίου, χημικές βιομηχανίες, χαρτοβιομηχανίες.

Περίπου 90% του ευρωπαϊκού αστικού πληθυσμού εκτίθεται σε συγκεντρώσεις ρύπων που υπερβαίνουν τα όρια ποιότητας του αέρα τα οποία κρίνονται επιβλαβή για την ανθρώπινη υγεία. Στην Ελλάδα από το 2001 εγκαταστάθηκε από το Υπουργείο Περιβάλλοντος το Εθνικό Δίκτυο Παρακολούθησης Ατμοσφαιρικής Ρύπανσης (ΕΔΠΑΡ) με στόχο την υλοποίηση των Κοινοτικών Οδηγιών και την παρακολούθηση της ποιότητας του αέρα στην ελληνική επικράτεια. Ειδικότερα από το 2013 υπάρχει Κυβερνητική Υπουργική απόφαση που προβλέπει μια σειρά προδιαγραφών για τις συσκευές θέρμανσης (ΚΥΑ 6690/15-6-2012) καθώς και έκτακτα μέτρα (ΦΕΚ 3272B/23-12-13) για την προστασία, ενημέρωση των πολιτών

και μείωση των παρατηρούμενων επιπέδων ρύπων σε περιπτώσεις υπερβάσεων των ορίων.

1.2. Αιωρούμενα μικροσωματίδια

Τα αιωρούμενα μικροσωματίδια, ή PM, είναι ο όρος για τα σωματίδια που βρίσκονται στον αέρα, συμπεριλαμβανομένης της σκόνης, του χώματος, της αιθάλης, του καπνού καθώς και τα υγρά σταγονίδια. Τα σωματίδια μπορεί να αιωρούνται στον αέρα για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Μερικά σωματίδια είναι μεγάλα ή αρκετά μαύρα και γίνονται αντιληπτά σαν προϊόν καύσης. Άλλα είναι τόσο μικρά ώστε μπορούν να ανιχνευθούν μόνο με χρήση ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Πολλές ανθρωπογενείς δραστηριότητες αλλά και φυσικές πηγές εκπέμπουν PM άμεσα ή έμμεσα, εκπέμποντας άλλους ρύπους που αντιδρούν στην ατμόσφαιρα προς τον σχηματισμό PM. Τα PM σχετίζονται με παθήσεις του αναπνευστικού συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου²⁻⁵. Είναι επίσης γνωστό πως προκαλούν βλάβες στο DNA, στις πρωτεΐνες και απόπτωση μέσω του μονοπατιού των μιτοχονδρίων^{6,7}. Επιπλέον υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι τα μέταλλα που υπάρχουν στα PM μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA και στις πρωτεΐνες⁸. Παρόλαυτά ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός. Τα σωματίδια μπορούν να διαχωριστούν σύμφωνα με το μέγεθος τους. Τα PM₁₀ είναι σωματίδια με μέση αεροδυναμική διάμετρο <10 μm και τα PM_{2.5} είναι μικρότερα από 2,5 μm. Οι ομοιότητες μεταξύ των δύο κατηγοριών όσον αφορά χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά είναι λίγες⁹. Τα μεν PM₁₀ αποτελούνται από φυσικές πηγές υλικών (γύρη, σκόνη, βιολογικό υλικό), ενώ τα PM_{2.5} αποτελούνται από ανθρωπογενείς ρύπους. Λόγω του μικρότερου μεγέθους τα PM_{2.5} φτάνουν πιο βαθιά στον πνεύμονα. Τα PM₁₀ συσχετίστηκαν με αυξημένη συχνότητα χρόνιου βήχα, βρογχίτιδα και θνησιμότητα⁴. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως τα PM_{2.5} μπορούν να αποτελέσουν σοβαρό κίνδυνο για την υγεία¹⁰. Τα συγκεκριμένα σωματίδια έχουν την ικανότητα να απορροφούν τοξικούς ρύπους όπως πτητικές οργανικές ενώσεις, βαρέα μέταλλα και πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες^{11,12}. Εκτός από καρκίνο στον πνεύμονα και άλλες παθήσεις του αναπνευστικού αυτές οι ενώσεις αυξάνουν και τον κίνδυνο για καρδιαγγειακές παθήσεις μακροπρόθεσμα¹³⁻¹⁶. Αν και ο ακριβής μηχανισμός πρόκλησης δεν είναι γνωστός πιθανότατα όλα αυτά τα προβλήματα υγείας προκαλούνται από το οξειδωτικό stress που επάγουν τα σωματίδια και από την φλεγμονή που προκαλούν στους διάφορους ιστούς του πνεύμονα¹⁷. Στην επίδραση τους όμως παίζουν ρόλο και άλλοι παράγοντες όπως ο πλυθισμός που εξετάζεται, η τοποθεσία και οι πηγές της ρύπανσης.

Αυτό σημαίνει πως αν σε δύο περιοχές τα επίπεδα σωματιδίων PM2.5 είναι ίδια η παρατηρούμενη τοξικότητα μπορεί να διαφέρει λόγω διαφορετικής σύστασης και μηχανισμών¹⁸.

1.3. Ελεύθερες ρίζες

Με τον όρο “ελεύθερες ρίζες” αναφερόμαστε σε μόρια ή άτομα με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους¹⁹. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια πολύ ασταθή και πολύ δραστικά καθώς προσπαθούν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια ^{20,21}.

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό ^{19,22}. Για τις ελεύθερες ρίζες συχνά χρησιμοποιείται ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS). Ο όρος περιγράφει τις ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο, όπως το $O_2^{\cdot-}$, και το OH^{\cdot} . Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\cdot-}$), του υδροξυλίου (OH^{\cdot}), του αλκοξυλίου (RO^{\cdot}) και του υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}). Ωστόσο, στις ROS εντάσσονται και μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) οι ρίζες τριχλωρομεθυλίου (CCl_3^{\cdot}), οι θειούχες ρίζες (RS^{\cdot}) και το υποχλωριώδες οξύ ($COCl$).

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	
<u>Radicals</u>	<u>Non-radicals</u>
Ανιόν Σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)	Υπεροξείδιο Υδρογόνου (H_2O_2)
Ρίζα Υδροξυλίου (OH^{\cdot})	Υποχλωριώδες Οξύ ($HOCl$)
Ρίζα Υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot})	Υποβρωμιώδες Οξύ $HOBr$
Ρίζα Αλκοξειδίου (RO^{\cdot})	Όζον (O_3)
Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot})	Μονήρες Οξυγόνο (1O_2)

Πίνακας 1: Δραστικές μορφές οξυγόνου

Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και οι δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο όπως το μονοξειδίο του αζώτου NO^\bullet και το διοξειδίο του αζώτου NO_2^\bullet καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. το νιτρώδες οξύ HNO_2 και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου ONOO^- ^{19,22,23}).

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	
<u>Radicals</u>	<u>Non-radicals</u>
Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου (NO^\bullet)	Νιτρώδες Οξύ (HNO_2)
Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου (NO_2^\bullet)	Κατιόν Νιτροσυλίου (NO^+)
	Ανιόν Νιτροσυλίου (NO^-)

Πίνακας 2: Δραστικές μορφές αζώτου

1.3.1. Πηγές Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου

Υπάρχουν τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών. Οι ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν εκείνες που παράγονται στο εσωτερικό του κυττάρου ενεργώντας μέσα στο κύτταρο και εκείνες που σχηματίζονται στο εσωτερικό του κυττάρου και απελευθερώνονται στη γύρω περιοχή. Τέτοιες πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση^{24–28}, τα ουδετερόφιλα και η αναπνευστική «έκρηξη»^{29,30}, η οξειδάση της ξανθίνης^{31,32}, το κυτόχρωμα P450^{33–35} και η αυτοοξειδωση μορίων (φλαβόνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμογλοβίνη).

Στις εξωγενείς πηγές συμπεριλαμβάνονται η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία καθώς και το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα^{36,37}. Επίσης, ελεύθερες ρίζες παράγονται από τη δράση φαρμάκων^{38,39} και άλλων ξеноβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα αλλά και από το αλκοόλ^{40–43}. Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι επίσης η διατροφή^{44–46}.

1.4. Βιολογική Δράση Των ROS:

1.4.1. Θετικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες χρησιμεύουν ως κυτταρικοί αγγελιοφόροι, έχουν δηλαδή την ικανότητα να μεταφέρουν σήματα από τα σηματοδοτικά μονοπάτια μεταξύ των κυττάρων^{20,47–50}. Συνεισφέρουν και στο ανοσοποιητικό σύστημα, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη

διάρκεια της φαγοκύτωσης⁵¹. Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής.

Επιπλέον, οι ROS ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ενζυμική ενεργοποίηση, την αποτοξικοποίηση φαρμάκων και την αναπλήρωση του γλυκογόνου⁵². Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης.

1.4.2. Επιβλαβείς επιδράσεις

Παρά τις επωφελείς επιδράσεις, οι ROS έχουν και κάποιες αρνητικές επιδράσεις καθώς αλλάζουν το μέγεθος και το σχήμα των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρούν⁵³. Συνεπώς, οι ROS μπορούν να επάγουν την απόπτωση σε υγιή κύτταρα, να προκαλέσουν φλεγμονή και να αλλοιώσουν τις κυτταρικές λειτουργίες. Όλες οι παραπάνω αλλοιώσεις μπορούν να οδηγήσουν σε εκφυλιστικές ασθένειες, όπως καταρράκτης, καρκίνος, νόσος Parkinson, νόσος Alzheimer και καθώς και γήρανση⁵⁴. Επίσης, οι ROS προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια (τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και το DNA).

1.5. Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

Υπάρχουν τόσο ενζυμικοί όσο και μη ενζυμικοί μηχανισμοί που εξουδετερώνουν ή ελέγχουν τη δράση των ελευθέρων ριζών. Αυτό επιτυγχάνεται με τρεις τρόπους.

- Εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών
- Μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά μόρια
- Βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες

1.5.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί:

Περιλαμβάνουν ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR).

1.5.1.1. Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

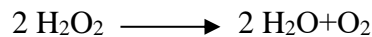
Είναι ίσως το πιο σημαντικό ένζυμο του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 :



Υπάρχουν διάφορες μορφές SOD στα βιολογικά συστήματα όπως η Cu-SOD στο κυτταρόπλασμα, η Mn-SOD στα μιτοχόνδρια, η Cu, Zn-SOD στο εξωκυττάριο υγρό και η Fe-SOD στα βακτήρια και τα φυτά.

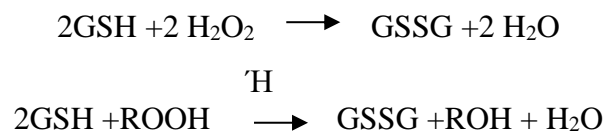
1.5.1.2. Καταλάση (CAT)

Εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα. Αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες, άνω των 500αα, καθεμία από τις οποίες περιέχει και μία ομάδα αίμης στην ενεργό περιοχή τους. Επίσης, κάθε υπομονάδα φέρει ένα μόριο NADPH, το οποίο συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου. Καταλύει την μετατροπή του H₂O₂ σε νερό και οξυγόνο σύμφωνα με την αντίδραση:



1.5.1.3. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

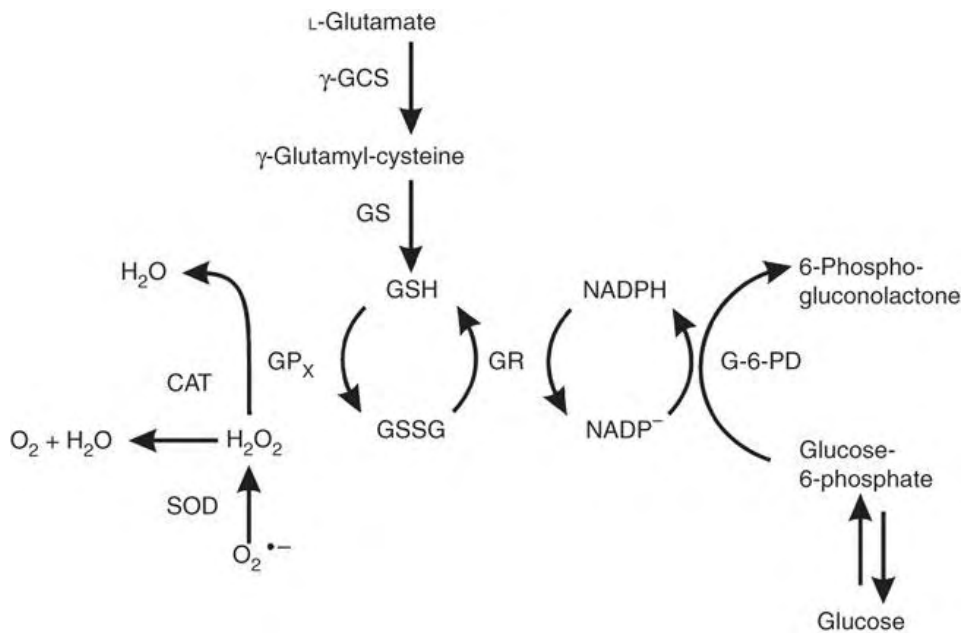
Εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα καθώς και στο εξωτερικό του κυττάρου και είναι άφθονη στην καρδιά, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ανάγει τα υδροϋπεροξειδία (ROOH) σε αλκοόλες (ROH) και επίσης ανάγει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό ενώ ταυτόχρονα προκαλεί την οξείδωση της ανηγμένης γλουταθειόνης.



1.5.1.4. Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)

Η αναγωγάση της γλουταθειόνης είναι υπεύθυνη για την αναγωγή της GSSG σε GSH και συνεπώς για τη διατήρηση της φυσιολογικής αναλογίας GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου.

Αποτελείται από δύο υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει στην ενεργό περιοχή της ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH.



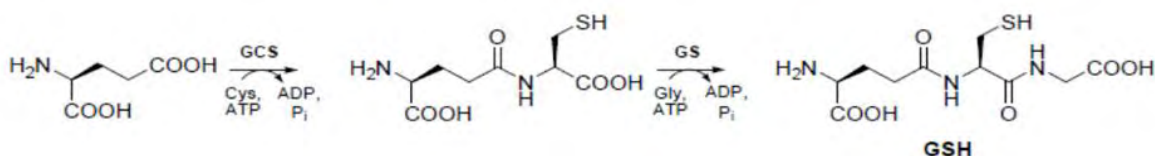
Εικόνα 2: Απεικόνιση δράσης των GR, GPx, SOD, CAT

1.5.2. Μη Ενζυμικοί Μηχανισμοί

Περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τη βιταμίνη E, τη βιταμίνη C, το β-καροτένιο, τη γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10 και το σελήνιο.

1.5.2.1. Γλουταθειόνη

Είναι η πιο άφθονη, μη πρωτεϊνική πηγή θειόλης στο κύτταρο και οι συγκεντρώσεις της στους περισσότερους ιστούς είναι στην κλίμακα των millimolar. Η GSH εξυπηρετεί πολλές λειτουργίες κατά την προστασία των ιστών από οξειδωτική βλάβη και τη διατήρηση του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος σε ανηγμένη κατάσταση⁵⁵. Η GSH ανάγει το υδρογόνο και τα οργανικά υπεροξειδία μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από την GPx, εξουδετερώνει την OH· και το ¹O₂ και ανάγει τις ρίζες τοκοφερόλης εμποδίζοντας επομένως τη λιπιδική υπεροξείδωση⁵⁶.



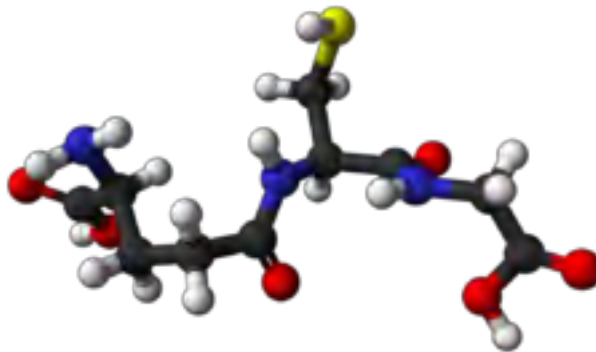
Εικόνα 3: Η βιοσύνθεση της γλουταθειόνης

Η GSH εκτός από αντιοξειδωτική δράση επιτελεί πολλαπλές λειτουργίες:

- Η GSH συζεύγνυται με το NO για να σχηματίσει S-νιτροζογλουταθειόνη, το οποίο διασπάται από το σύστημα θειορεδοξίνης για να απελευθερώσει GSH και NO²³.

- Χρησιμεύει ως υπόστρωμα για την αφυδρογονάση της φορμαλδεΐδης, η οποία μετατρέπει την φορμαλδεΐδη και την GSH σε S-φόρμυλο-γλουταθειόνη⁵⁷. Η απομάκρυνση της φορμαλδεΐδης (ένα καρκινογόνο) είναι φυσιολογικής σημασίας επειδή παράγεται από το μεταβολισμό της μεθειονίνης, της χολίνης, της μεθανόλης, της σαρκosίνης και των ξενοβιοτικών ουσιών.
- Η GSH είναι απαραίτητη για τη μετατροπή της προσταγλανδίνης H2 σε προσταγλανδίνες D2 και E2 από την ισομεράση του ενδοϋπεροξειδίου⁵⁸.
- Η GSH συμμετέχει στο σύστημα της γλυοξυλάσης, η οποία μετατρέπει την μεθυλογλυοξυλάση σε D-γαλακτικό, ένα μονοπάτι δραστικό σε μικροοργανισμούς.

Επαρκείς συγκεντρώσεις GSH είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου των λεμφοκυττάρων και των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων⁵⁹. Επιπλέον, η GSH είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων καθώς και την παραγωγή κυτοκινών. Η GSH μπορεί να συντεθεί τόσο από ενδογενή όσο και από αμινοξέα της διατροφής, αλλά μόνο το ήπαρ συμβάλει σε σημαντική *de novo* σύνθεση της.



Εικόνα 4: Η δομή της γλουταθειόνης

1.5.2.2. Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C είναι ένα απαραίτητο διατροφικό στοιχείο για τον άνθρωπο. Αποτελεί συμπράγοντα σε αρκετές ενζυμικές αντιδράσεις ενώ παράλληλα έχει και ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς είναι δότης ηλεκτρονίων με τα οποία εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες.

1.5.2.3. Β-καροτένιο

Εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες και μετατρέπεται σε βιταμίνη A, ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού. Το β-καροτένιο πιστεύεται ότι αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες και περιορίζει την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C και E καθώς και

με το σελήνιο. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω της αντιοξειδωτικής της δράσης.

1.5.2.4. Βιταμίνη E

Είναι μια ομάδα 8 λιποδιαλυτών βιταμινών με πιο δραστική την α-τοκοφερόλη. Απαντώνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις μεμβράνες των κυττάρων και των μιτοχονδρίων. Ειδικότερα, η α-τοκοφερόλη έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση καθώς προστατεύει τη βιταμίνη A από την οξείδωση και αναστέλλει την αλυσιδωτή αντίδραση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων.

1.5.2.5. Συνένζυμο Q 10

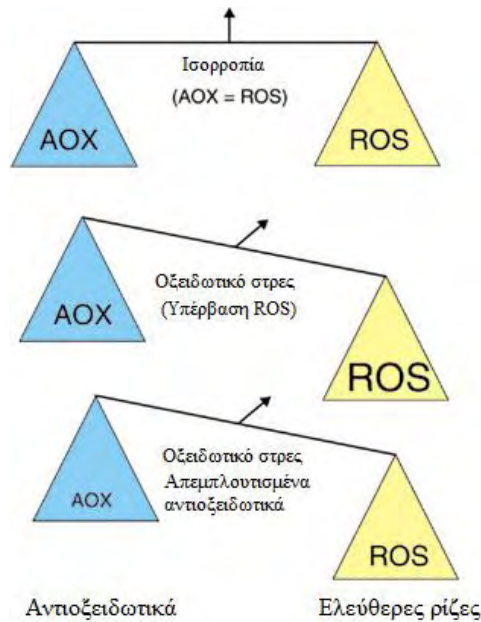
Το συνένζυμο Q 10 (ουβικινόνη) παίρνει μέρος στις λειτουργίες της αναπνευστικής αλυσίδας, όπου παράγεται ATP. Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση όταν βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή του προστατεύοντας τα λιπίδια και της πρωτεΐνες από υπεροξειδωση καθώς και το μιτοχονδριακό DNA. Παράλληλα είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση της α-τοκοφερόλης.

1.5.2.6. Σελήνιο

Το σελήνιο είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο, που συμμετέχει στη διατήρηση της υγείας και την πρόληψη ασθενειών στον άνθρωπο. Ως συμπαραγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης εμφανίζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

1.6. Οξειδωτικό Στρες

Πρόκειται για διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των ιστών, με αποτέλεσμα είτε να υπερπαραγονται ελεύθερες ρίζες είτε να παρατηρείται μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα.



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Η ανισορροπία στην οποία οφείλεται το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες:

Εξωγενείς πηγές:

- Περιβαλλοντική ρύπανση (μόλυνση νερού, αέρα, τροφής)
- Ακτινοβολία (ηλιακή, ηλεκτρομαγνητική)
- Βαριά σωματική άσκηση
- Κάπνισμα, αλκοόλ, κακή διατροφή
- Τοξικές ουσίες

Ενδογενείς πηγές:

- Μιτοχόνδρια
- Ενδοπλασματικό δίκτυο
- Κυτταρόπλασμα
- Βιολογικές μεμβράνες

1.6.1. Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες

Σε κυτταρικό επίπεδο, το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες σε όλα τα μακρομόρια (DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια), παράλληλα οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου, αλλοιώνοντας έτσι τη σηματοδότηση, ενώ αν οι βλάβες είναι εκτεταμένες οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, είτε με απόπτωση είτε με νέκρωση.

Οι πρωτεΐνες όπως αναφέρθηκε μπορεί να υποστούν αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, εκφυλισμό και γενικότερα άμεση και έμμεση καταστροφή. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής σχετίζονται συνήθως με την απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών.

Όσον αφορά το DNA, οι τροποποιήσεις των βάσεων, οι θραύσεις των αλυσίδων του, οι καταστροφές στο σάκχαρο της δεοξυριβόζης και οι βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσης του, είναι μερικές επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες που μπορεί να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις.

Ως προς τον κυτταρικό θάνατο το κύτταρο οδηγείται εκεί σε περίπτωση εκτεταμένων βλαβών είτε μέσω της νέκρωσης είτε μέσω της απόπτωσης. Κατά τη νέκρωση το κύτταρο διογκώνεται και διαρρηγνύεται απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του στο περιβάλλον επηρεάζοντας και τα γειτονικά κύτταρα. Στην απόπτωση τα κύτταρα δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και δεν προκαλούν βλάβες στα γειτονικά κύτταρα.

Σε επίπεδο οργάνων και οργανισμού, το οξειδωτικό στρες είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με πολλές παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες είναι αποτέλεσμα των κυτταρικών επιδράσεων του στρες. Στην παρακάτω εικόνα βλέπουμε αρκετές εξ αυτών:



Εικόνα 6: Ασθένειες που προκαλούνται από το οξειδωτικό stress⁶⁰

1.6.2. Οξειδωτικό stress και αιωρούμενα μικροσωματίδια

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την παρουσία PM στον αέρα με αναπνευστικά και καρδιαγγειακά νοσήματα και καρκίνο^{13,61}. Ο μηχανισμός πρόκλησης φαίνεται πως είναι

η επαγωγή οξειδωτικού stress και φλεγμονής^{6,62-66}. Η οξειδωτικές βλάβες του DNA μπορεί να ευθύνεται για την πρόκληση καρκίνου και μπορεί να αποτελεί και δείκτη για οξειδωτικό stress που σχετίζεται με άλλες ασθένειες που σχετίζονται με την ατμοσφαιρική ρύπανση. Η παραγωγή έχει προταθεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταροτοξική δράση σωματιδίων από την καύση πετρελαίου και από σωματίδια PM⁶⁵. Αυξημένη παραγωγή ριζών υδροξυλίου έχει εντοπιστεί με non-invasive electron spin resonance spectroscopy, με πειράματα με κύτταρα και σε πνεύμονες ποντικών μετά από ενδοτραχειακή χορήγηση σωματιδίων diesel^{8,67,68}. Το οξειδωτικό stress μπορεί να προκαλείται από τα PM με παλλούς τρόπους.

- Άμεση παραγωγή ROS από την επιφάνεια των σωματιδίων
- Διαλυτές ουσίες όπως μέταλλα μετάπτωσης και οργανικές ουσίες
- Μεταβολή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων ή της οξειδάσης του NADPH
- Ενεργοποίηση φλεγμονοδών κυττάρων με δυαντότητα παραγωγής ROS και δραστικών μορφών αζώτου

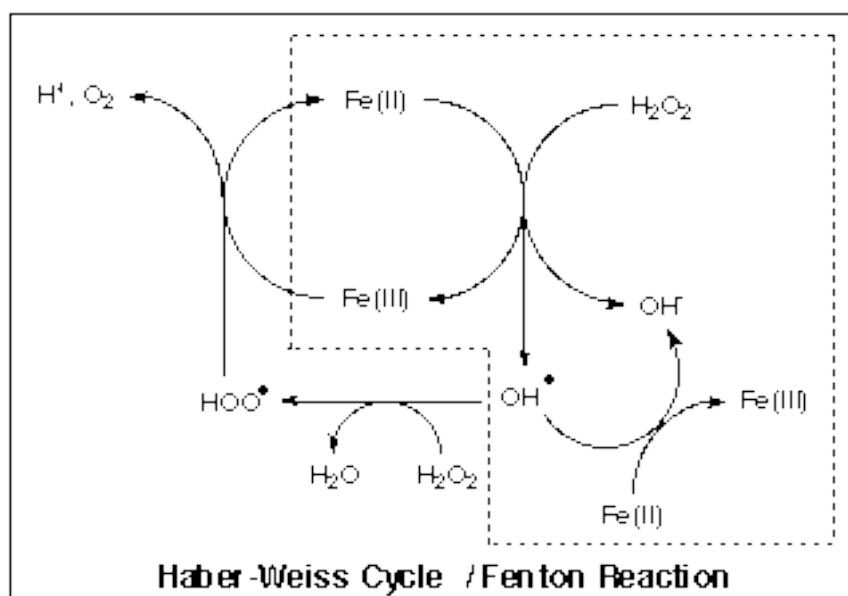
Η άμεση παραγωγή ROS μπορεί να προκύψει λόγω της παρουσίας στο σωματίδιο ελευθέρων ριζών και οξειδωτικών ουσιών. Αν και αυτός ο μηχανισμός θα μπορούσε να εξηγήσει την πρόκληση βλαβών στο DNA σε πειράματα με γυμνό γενετικό υλικό στην περίπτωση κυττάρων θα μπορούσε να εξηγηθεί με έναν από τους παρακάτω τρόπους:

- Τα σωματίδια εισέρχονται στον πυρήνα
- Εξωκυτταρικές ROS προκαλούν αλυσιδωτές αντιδράσεις οι οποίες τελικά φτάνουν στον πυρήνα και προκαλούν βλάβες στο DNA

Σε αυτές τις αλυσιδωτές αντιδράσεις μπορεί να συμμετέχουν ακόμα και άλλοι ρύποι που συνυπάρχουν στο αέρα όπως το όζον, το βενζένιο και άλλα.

Ακόμα όπως έχει ήδη αναφερθεί στην επιφάνεια των σωματιδίων μπορεί να υπάρχουν μέταλλα μετάπτωσης και αυτά μέσω αντιδράσεων Fenton μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή ROS και μέσω αντιδράσεων Haber-Weis στην παραγωγή ριζών υδροξυλίου¹⁹. Αυτή η ρίζα είναι ιδιαίτερα δραστική και έχει την δυνατότητα να προκαλέσει βλάβες σε οποιοδήποτε βιολογικό μόριο βρίσκεται σε κοντινή απόσταση που μπορεί να καλυφθεί με διάχυση. Πρόσφατα είχε προταθεί ότι τα σωματίδια από τις εξατμίσεις πετρελαιοκινητήρων έχουν στην επιφάνειά του λειτουργικές ομάδες που τους επιτρέπουν να συσσωρεύουν σίδηρο ο οποίος μετά μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή ελευθέρων ριζών^{68,69}. Αυτό

μάλιστα συμφωνεί και με πειραματικά δεδομένα που προτείνουν πως τα εν λόγω σωματίδια μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή ιοντων σουπεροξειδίου που με την σειρά τους μπορούν να παράξουν υπεροξειδιο του υδρογόνου και ρίζες υδροξυλίου.



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης Fenton και του κύκλου του Haber-Weiss

Επιπλέον μία πλειάδα υποκατεστημένων και μη πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων μπορούν να προσροφηθούν στην επιφάνεια σωματιδίων όπως τα PM. Αυτές οι ουσίες μπορούν να εκχυλιστούν με την χρήση οργανικών διαλυτών. Παράδειγμα τέτοιων ουσιών είναι το βενζο[α]πυρένιο το οποίο μπορεί να προκαλεί βλάβες στο DNA χωρίς την παραγωγή οξειδωτικών μορίων μέσω του σχηματισμού συμπλόκων με αυτό⁷⁰. Κατά την χορήγηση βενζο[α]πυρενίου από στόματος προκλήθηκε οξειδωτική του DNA σε όργανα στόχους όπως πνεύμονες και νεφροί. Σε πειράματα με ελεύθερο DNA σωματίδια UFP (με διάμετρο κάτω από 2,5 μm) προκάλεσαν την παραγωγή ROS ανάλογα με το περιεχόμενο τους σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες⁷¹. Ακόμα στον ατμοσφαιρικό αέρα υπάρχουν ρίζες κινονών που μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων παράγουν ρίζες υδροξυλίου⁶⁷. Παρόλαυτα είναι αβέβαιο το κατά πόσο εντός των κυττάρων αυτή η διεργασία συμβάλλει στην παραγωγή ROS ειδικά αν αναλογιστούμε πως το μεγαλύτερο ποσοστό ROS προέρχονται από τον μεταβολισμό των κυττάρων. Ειδικά στα κύτταρα του ήπατος και του πνεύμονα επάγονται ένζυμα του μεταβολισμού των ξеноβιοτικών παράγοντας ρίζες, κινόνες ακόμα και πρόκληση φλεγμονής^{72,73}.

1.7. Καφές

1.7.1. Γενικά

Ο καφές αποτελεί ένα από τα δημοφιλέστερα ροφήματα παγκοσμίως. Παρασκευάζεται από τους κόκκους του φυτού *Coffea*. Αρκετά είδη του γένους *Coffea* παράγουν τα μούρα από τα οποία προέρχονται οι κόκκοι του καφέ. Τα δύο κύρια είδη που καλλιεργούνται εμπορικά είναι ο *Coffea canephora* –γνωστότερο ως *robusta*- και *C. arabica*. Όλα τα φυτά καφέ προέρχονται από την τροπική Αφρική, τη Μαδαγασκάρη και άλλα νησιά του Ινδικού ωκεανού. Ωστόσο, ο καφές μεταφέρθηκε και σε άλλα μέρη του κόσμου και πλέον καλλιεργείται σε περισσότερες από 70 χώρες. Ο καρπός του φυτού συλλέγεται όταν ωριμάσει, επεξεργάζεται και αποξηραίνεται. Μετά την αποξήρανση οι κόκκοι καφέ συνήθως καβουρδίζονται για διαφορετικά χρονικά διαστήματα αναλόγως με την επιθυμητή τελική γεύση ⁷⁴. Ωστόσο, υπάρχει και η επιλογή μη καβουρδίσματος και τότε μιλάμε για τον πράσινο καφέ.

Με την κατανάλωση ροφημάτων καφέ παρατηρείται μία διεγερτική δράση που οφείλεται στο μόριο της καφεΐνης. Επιπρόσθετα, κλινικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η συνετή κατανάλωση ροφημάτων καφέ μπορεί να είναι ευεργετική σε υγιείς ενήλικες ^{75,76}.

Η πιο αξιόπιστη ιστορική αναφορά τοποθετεί την κατανάλωση ροφημάτων καφέ στα μέσα του 15^{ου} αιώνα από μουσουλμάνους Σούφι στην Υεμένη. Εκεί, στην Αραβία, οι κόκκοι του καφέ επεξεργάζονταν και ψήνονταν με παρόμοιο τρόπο με αυτόν που χρησιμοποιούμε σήμερα για την προετοιμασία ροφημάτων καφέ. Μέχρι τις αρχές του 16^{ου} αιώνα ο καφές είχε εξαπλωθεί σε όλο τον κόσμο.

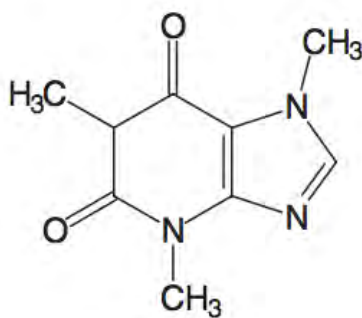
1.7.2. Χημική σύσταση

1.7.2.1. Πράσινος καφές

Ο πράσινος καφές αποτελείται κυρίως από νερό, υδατάνθρακες και ίνες, πρωτεΐνες και ελεύθερα αμινοξέα, λιπίδια, μέταλλα, οργανικά οξέα, χλωρογενικά οξέα, τριγονελλίνη και καφεΐνη. Από αυτά, τα χλωρογενικά οξέα, η τριγονελλίνη, η καφεΐνη, οι διαλυτές ίνες και τα διτερπένια των λιπιδίων είναι το πιο βιοενεργά και υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να παίζουν σημαντικό στη διαμόρφωση της γεύσης του ροφήματος μετά το καβούρδισμα.

Καφεΐνη: είναι μία μέθυλξανθίνη με πικρή γεύση που, μολαταύτα, συμβάλλει κατά λιγότερο από 10% της πικράδας του ροφήματος καφέ. Αυτό το αλκαλοειδές είναι ανθεκτικό στη θερμότητα και η συγκέντρωση του στο *C. canephora* είναι περίπου διπλάσια από αυτή στο

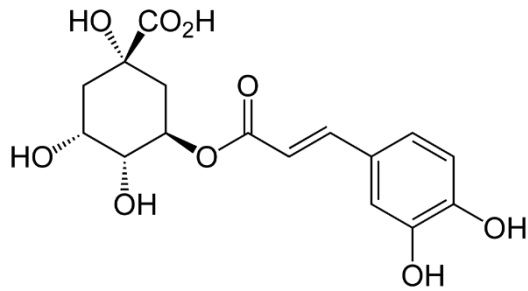
C. arabica. Η καφεΐνη διεγείρει το κεντρικό νευρικό σύστημα γιατί ανταγωνίζεται με την αδενοσίνη για πρόσδεση στους υποδοχείς της. Παρόλο που η πρόσληψη καφεΐνης έχει συσχετιστεί με υψηλή χοληστερόλη, στεφανιαίες νόσους και καρκίνο, άλλες έρευνες έχουν επιβεβαιώσει ευεργετικές επιδράσεις της στη υγεία όπως μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης κίρρωσης του ήπατος ⁷⁷. Επιπρόσθετα, κάποιοι μεταβολίτες της καφεΐνης (κυρίως 1-μεθυλξανθίνη και 1-μεθυλουρικό) έχουν παρουσιάσει αντιοξειδωτική ικανότητα *in vitro* ⁷⁸.



Εικόνα 8: Δομή μορίου καφεΐνης

Χλωρογενικά οξέα: περιλαμβάνουν μία κύρια κατηγορία φαινολικών ενώσεων, οι οποίες προέρχονται κυρίως από εστεροποίηση *trans*-κινναμωμικών οξέων με κινικό οξύ ⁷⁹. Τα χλωρογενικά οξέα συμβάλλουν στη γεύση των ροφημάτων καφέ προσδίδοντας στυφότητα, πικράδα και οξύτητα. Μολαταύτα, εάν είναι παρόντα σε υψηλές ποσότητες στο πράσινο καφέ, ενδέχεται να δημιουργήσει ανεπιθύμητη γεύση, πιθανόν λόγω του σχηματισμού προϊόντων οξειδωσης και αποικοδόμησης κατά το καβούρδισμα ⁸⁰. Η περιεκτικότητα σε χλωρογενικό οξύ στο φυτό *C. canephora* είναι περίπου δύο φορές υψηλότερη από αυτή του *C. arabica*, αν και γενικά αυτή η συγκέντρωση ποικίλλει σημαντικά στα δύο είδη.

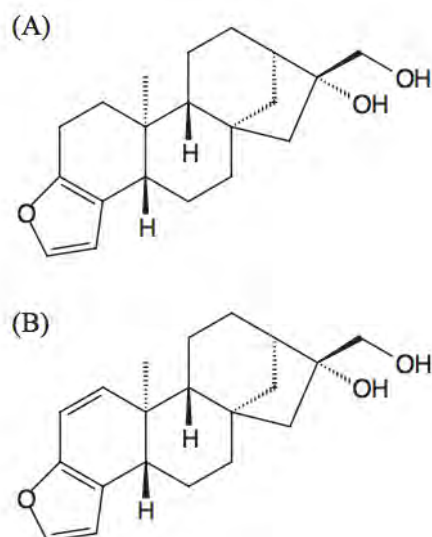
Τα τελευταία χρόνια, μια σειρά από επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η κατανάλωση καφέ, ανεξάρτητα από την πρόσληψη καφεΐνης, συνδέεται με οφέλη για την υγεία, όπως χαμηλότερο κίνδυνο διαβήτη τύπου 2 ^{81,82}, Parkinson και Alzheimer ⁸³, και καρκίνο του ήπατος ⁸⁴. Οι κύριες πηγές δεδομένων που αποδίδουν αυτές τις ευεργετικές ιδιότητες των χλωρογενικών οξέων είναι μελέτες *in vitro* και μελέτες σε ζώα ⁸⁵⁻⁸⁷.



Εικόνα 9: Βασική δομή χλωρογενικών οξέων

Καφεστόλη και καφεόλη: είναι πεντακυκλικά διτερπένια με σκελετό καουρενίου. Μεθυλιωμένες μορφές αυτών έχουν βρεθεί σε σπόρους Robusta. Αυτές οι βιοδραστικές ενώσεις και τα παράγωγά τους, τα οποία είναι κυρίως άλατα ή εστέρες λιπαρών οξέων, αντιπροσωπεύουν περίπου το 20% του λιπιδικού κλάσματος του καφέ ^{88,89}. Η καφεστόλη είναι το πρωτογενές συστατικό του μη σαπωνοποιητικού κλάσματος λιπιδίων καφέ που αντιπροσωπεύει περίπου το 0,2% -0,6% του βάρους του καφέ. Η καφεόλη είναι πιο ευαίσθητη στη θερμότητα, το οξυγόνο, το φως, και τα οξέα και συνεπώς είναι λιγότερο άφθονη. Το *C. arabica* έχει υψηλότερα επίπεδα διτερπενίων σε σχέση με το είδος *C. canephora*.

Τα διτερπένια του καφέ παρουσίασαν αντικαρκινικές και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες *in vitro* ^{88,89}. Από την άλλη πλευρά, όμως, η υψηλή κατανάλωση αυτών των ενώσεων έχει συσχετιστεί με αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης και λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) στο ανθρώπινο πλάσμα, γεγονός που μπορεί έμμεσα να αυξήσει τον κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων ⁹⁰. Αυτές οι ενώσεις είναι παρούσες κατά κύριο λόγο στον μη φιλτραρισμένο καφέ, αφού είναι δυσδιάλυτες στο νερό και ως εκ τούτου παγιδεύονται από τα φίλτρα χαρτιού.



Εικόνα 10: : Δομή μορίων (A) καφεστόλης και (B) καφεόλης

1.7.2.2. Καβουρδισμένος καφές

Η σύνθεση των κόκκων αλλάζει δραματικά κατά το καβούρδισμα, ως συνέπεια της πυρόλυσης, της καραμελοποίησης, και των αντιδράσεων Maillard. Η περιεκτικότητα σε υγρασία του καβουρδισμένου καφέ (1,5% - 5%) είναι πολύ χαμηλότερη από εκείνη του πράσινου καφέ, και ποικίλλει ανάλογα με το βαθμό καβουρδίσματος ⁹¹.

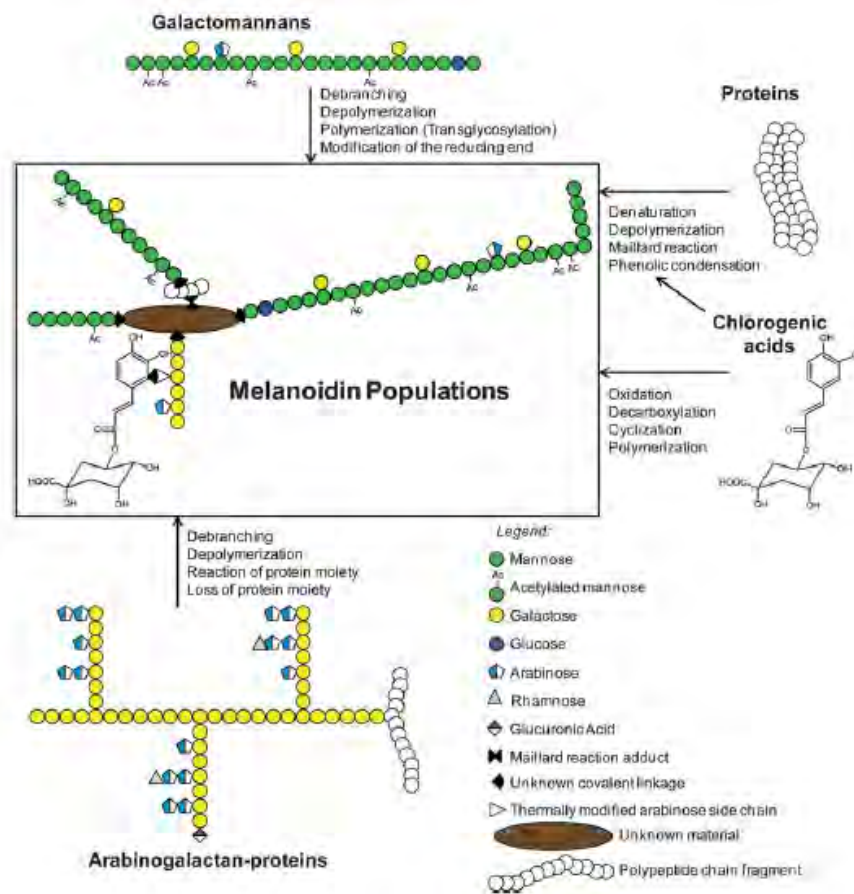
Ως προϊόν των αντιδράσεων Maillard παράγονται οι μελανοΐδινες οι οποίες ορίζονται ως πολυμερή υψηλού μοριακού βάρους και σκούρου χρώματος. Τα πολυμερή αυτά είναι υπεύθυνα για το καφέ χρώμα του καβουρδισμένου καφέ και σχηματίζουν το 25% περίπου της ξηρής μάζας του ⁹². Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι οι μελανοΐδινες είναι εν μέρει αρμόδιες για τις αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριακές ιδιότητες του καφέ και επομένως μπορούν να θεωρηθούν βιοδραστικές ενώσεις ^{92,93}.

Λόγω της θερμικής τους αστάθειας, τα χλωρογενικά οξέα υφίστανται πολλές αλλαγές κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος, όπως ισομερισμό, επιμερισμό, αποικοδόμηση σε ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους και ενσωμάτωση σε μελανοΐδινες, συμβάλλοντας στο χρώμα και στη γεύση.

Η καφεΐνη δεν μεταβάλλεται σημαντικά κατά τη διάρκεια του καβουρδίσματος, αλλά μπορεί να παρατηρηθούν μικρές απώλειες λόγω εξάχνωσης.

Το λιπιδιακό κλάσμα είναι θερμικά σταθερό. Όσον αφορά τα διτερπένια, παρά το γεγονός ότι είναι πιο ευαίσθητα στη θερμότητα, μπορούν ακόμα να βρεθούν στον καβουρδισμένο καφέ (ειδικά σε *C. arabica*) σε αξιοσημείωτες ποσότητες (0,2- 0,9g/100g ξηρού βάρους).

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, κατά τη διαδικασία του καβουρδίσματος, πραγματοποιούνται αντιδράσεις Maillard, δηλαδή αντιδράσεις μεταξύ αμινοξέων και αναγόντων σακχάρων. Μέσω αυτών των αντιδράσεων σχηματίζονται μεγάλοι μοριακού βάρους ουσίες που ονομάζονται μελανοΐδινες και προσδίδουν καφέ χρώμα στους κόκκους. Οι μελανοΐδινες περιέχουν πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και χλωρογενικά οξέα στο μόριό τους αλλά η ακριβής δομή τους δεν είναι γνωστή ούτε και οι μηχανισμοί που οδηγούν στο σχηματισμό τους. Έχει προταθεί η δομή ενός σκελετού που σχηματίζεται η οποία φαίνεται στη παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 11: Δομή σκελετού μελανοΐδινών που έχει προταθεί

Έχει βρεθεί σε πειράματα που έχουν διεξαχθεί in vitro ότι οι μελανοΐδινες διαθέτουν αντιοξειδωτική ικανότητα η οποία όπως έχει προταθεί οφείλεται σε χαμηλού μοριακού βάρους μόρια που είναι συνδεδεμένα μη ομοιοπολικά στο σκελετό, όπως χλωρογενικά οξέα^{94,95}

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων μικροσωματιδίων PM2.5 από την περιοχή της Λάρισας σε κύτταρα και DNA. Επιπλέον διερευνήθηκε η προστατευτική δράση εκχυλισμάτων καφέ στην πρόκληση βλαβών στο γενετικό υλικό. Για τον προσδιορισμό της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων έγινε χρήση μεθόδων ανάλυσης της κυτταροτοξικότητας του εκχυλίσματος και κυτταρομετρίας ροής. Για την μελέτη της επίδρασης στο DNA έγινε χρήση πλασμιδιακού DNA και παρατήρηση του σε πηκτή αγαρόζης.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Υλικά

3.1.1. Μέτρηση

Το εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μηχανικής του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του ΑΠΘ σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, πραγματοποίησε μια εκστρατεία δειγματοληψίας αιωρούμενων σωματιδίων αεροδυναμικής διαμέτρου 10 και 2.5 μm από τις 10 έως τις 22 Δεκεμβρίου 2015, ταυτόχρονα σε 2 επιλεγμένα σημεία της πόλης. Τα σημεία αυτά ήταν

1. στο μπαλκόνι του 2^{ου} ορόφου του Εργαστηρίου Φυσιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
2. στην οδό Ηλιοδώρου, αρ. 4 στην ταράτσα ενός φροντιστηρίου (ύψος ~10 m).

Στο σημείο δειγματοληψίας (α), τοποθετήθηκε μια αντλία δειγματοληψίας σωματιδίων αεροδυναμικής διαμέτρου 2.5 μm, ενώ στο σημείο δειγματοληψίας (β), τοποθετήθηκαν δύο αντλίες δειγματοληψίας σωματιδίων αεροδυναμικής διαμέτρου 10 και 2.5 μm αντίστοιχα. Παράλληλα, στο (β) σημείο δειγματοληψίας τοποθετήθηκε και ένας οπτικός μετρητής σωματιδίων (Grimm 11R), ο οποίος μας επέτρεψε την καταγραφή της ημερήσιας διακύμανσης των επιπέδων των αιωρούμενων σωματιδίων με αεροδυναμική διάμετρο από 0.25 έως τα 32 μm. Το σημείο (α) πρόκειται για μια πυκνοκατοικημένη συνοικία που οι στενοί της οδοί δεν επιτρέπουν τη διασπορά των ρύπων. Επιπλέον σε απόσταση 100m από το σημείο δειγματοληψίας διέρχεται η περιφερειακή οδός της πόλης. Οι δύο σταθμοί απέχουν απόσταση περίπου ίση με 1.7 km. Η μέση θερμοκρασία περιβάλλοντος ήταν 5.3 ± 1.3 °C ενώ η μέση σχετική υγρασία που καταγράφηκε ήταν 76.5 %. Για τα πειράματα μας χρησιμοποιήσαμε τα δείγματα της περιοχής (α).

Η δειγματοληψία και οι πειραματικές μετρήσεις των PM10 και των PM2.5 πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τα πρότυπα EN 12341:1998 («Ποιότητα του αέρα - προσδιορισμός του κλάσματος PM10 αιωρούμενων σωματιδίων- Μέθοδος αναφοράς και διαδικασία ελέγχου στο πεδίο για την απόδειξη της ισοδυναμίας αναφοράς των μεθόδων μέτρησης») και EN 14907:2005 («Πρότυπη σταθμική μέθοδος για τον προσδιορισμό του κλάσματος μάζας των PM2.5 των αιωρούμενων σωματιδίων»)

Για τις δειγματοληψίες των PM χρησιμοποιήθηκαν δειγματολήπτες μικρού όγκου αέρα (Low Volume Systems , LVS) τα οποία πληρούν τις προϋποθέσεις του προτύπου EN 14907:2005. Η μέθοδος αναφοράς περιλαμβάνει έναν εισαγωγέα συλλογής PM (TCR- Tecora) συνδεδεμένο απευθείας με ένα υπόστρωμα φίλτρου και μια συσκευή ρυθμιζόμενης ροής, ενώ ακολουθεί σταθμικός προσδιορισμός των PM που συλλέγονται στο φίλτρο. Η κεφαλή πρέπει να είναι ανθεκτική στις καιρικές συνθήκες, για αυτό το λόγο και κατασκευάζεται από ανοξείδωτο ατσάλι. Ο αέρας εισέρχεται με ταχύτητα 2.3 m³/h από το κενό που υπάρχει μεταξύ του κυλινδρικού σώματος της κεφαλής και του καλύμματος που υπάρχει πάνω από αυτό. Το κάλυμμα προστατεύει από την εισαγωγή των ατμοσφαιρικών κατακρημνίσεων, καθώς και από άλλες πηγές επιμόλυνσης. Ο εξωτερικός αέρας διέρχεται από την είσοδο (κεφαλή) του δειγματολήπτη με γνωστή και σταθερή ταχύτητα ροής. Στο εσωτερικό της κεφαλής, ο αέρας εισέρχεται σε οκτώ ακροφύσια και κατευθύνεται προς την επιφάνεια πρόσκρουσης και στη συνέχεια, οδηγείται στον υποδοχέα του φίλτρου. Τα φίλτρα πολυτετραφθοροαιθυλενίου (polytetrafluoroethylene, PTFE) που χρησιμοποιήθηκαν έχουν διαχωριστική ικανότητα 99.99% και διαθέτουν προστατευτικό δακτύλιο (SKC Inc.).



Εικόνα 12: Δειγματολήπτης LVS (TCR-Tecora) με κεφαλή υποδοχής για φίλτρο

Ο δειγματολήπτης διαθέτει σύστημα καταγραφής του χρόνου δειγματοληψίας, της ατμοσφαιρικής πίεσης, της θερμοκρασίας περιβάλλοντος, καθώς και της μείωσης της

πίεσης. Επιπλέον, το σύστημα δειγματοληψίας προστατεύεται από τα καιρικά φαινόμενα με αδιάβροχα καλύμματα. Το κλάσμα PM συλλέγεται σε φίλτρο για γνωστή χρονική περίοδο περίπου 24h.

3.1.2. Εκχυλίσματα μικροσωματιδίων PM 2.5

Για την αποθήκευση των φίλτρων, που βρισκόταν εντός πλαστικών τρυβλίων Petri, χρησιμοποιήθηκε γυάλινος αφυγραντήρας. Η θερμοκρασία στο χώρο αποθήκευσης ελεγχόταν σε συνεχή βάση ώστε να είναι $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Ο χρησιμοποιούμενος ζυγός (Mettler-Toledo AB265-S/fact) έχει διακριτική ικανότητα 1 μg . Όλα τα φίλτρα ελέγχονταν οπτικά πριν τη χρήση για ελαττώματα, όπως τρύπες και απορρίπτονται αν βρεθούν ελαττωματικά. Στο θάλαμο ζύγισης φυλάσσονταν 2 λευκά φίλτρα αναφοράς καθώς και 2 επιφορτισμένα για κάθε κλάσμα σωματιδίων. Τα βάρη τους καταγράφονταν σε κάθε σειρά ζυγίσεων ως μέτρο των κλιματικών συνθηκών που επηρεάζουν το βάρος των φίλτρων. Οι μάζες των λευκών φίλτρων αναφοράς δεν πρέπει να έχουν αλλάξει περισσότερο από 40 μg από την τελευταία σειρά ζυγίσεων διαφορετικά πρέπει να γίνει έλεγχος για πιθανό πρόβλημα. Στην έναρξη κάθε σειράς ζυγίσεων ελεγχόταν η σωστή λειτουργία του ζυγού με τη χρήση πρότυπων βαρών ανάλογων της μάζας των φίλτρων, ως μέτρο της ακρίβειας και του θορύβου του ζυγού. Η ένδειξη της ζύγισης των προτύπων βαρών δεν πρέπει να διαφέρει περισσότερο από 20 μg .

Πριν από κάθε δειγματοληψία, τα φίλτρα τοποθετούνται στον αφυγραντήρα επί 24h. Μετά την πάροδο των 24h ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό (1^η μέτρηση) και μετά από 48h ζυγίστηκαν άλλες δύο φορές (2^η και 3^η μέτρηση). Το βάρος του αφόρτιστου φίλτρου υπολογίστηκε από το μέσο όρο των τριών μετρήσεων. Αν τα βάρη διαφέρουν περισσότερο από 40 μg , το φίλτρο απορρίπτεται. Ακολούθως, το φίλτρο τοποθετήθηκε στον υποδοχέα φίλτρου του δειγματολήπτη και στη συνέχεια σε τρυβλίο Petri και έτσι μεταφερόταν στο σημείο της δειγματοληψίας.

Αφού ολοκληρώθηκε η δειγματοληψία και μετά την απομάκρυνσή τους από τους δειγματολήπτες, τα φίλτρα τοποθετήθηκαν σε πλαστικά τρυβλία Petri και ακολούθως μετακινήθηκαν στο γυάλινο αφυγραντήρα, όπου παρέμειναν για 48h. Τα φίλτρα ζυγίζονταν ανά 24 ώρες και με την πραγματοποίηση και της τρίτης ζύγισης, υπολογίστηκε η μάζα των επιφορτισμένων φίλτρων, ως μέσος όρος των τριών μετρήσεων. Μετά τις τρεις ζυγίσεις, τα τρυβλία καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -25°C .

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράζονται σε $\mu\text{g}/\text{m}^3$, όπου η συγκέντρωση υπολογίζεται ως η διαφορά της μάζας μεταξύ του φορτισμένου και του μη φορτισμένου φίλτρου, διαιρούμενη με τον όγκο του δείγματος που προσδιορίζεται από τον πολλαπλασιασμό της ταχύτητας ροής με το χρόνο δειγματοληψίας:

$$C = \frac{m_{(l)} - m_{(u)}}{F \cdot t}$$

Όπου

C : η συγκέντρωση, σε $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

$m_{(l)}$: η μάζα του επιφορτισμένου φίλτρου, σε μg .

$m_{(u)}$: η μάζα του λευκού φίλτρου, σε μg .

F : η ογκομετρική ροή σε συνθήκες περιβάλλοντος, σε m^3/h .

t : ο χρόνος δειγματοληψίας σε h.

Η εκχύλιση των δειγμάτων διενεργήθηκε από την ομάδα του κ. Σαρηγιάννη στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μηχανικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Τα φίλτρα κόπηκαν στην μέση με κεραμική λεπίδα. Το μισό φίλτρο μεταφερόταν σε Errendorf μαζί με 900ml απεσπγμένου νερού σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινές συνθήκες. Η εκχύλιση διαρκεί όλη τη νύχτα και το επόμενο πρωί τα δείγματα φυγοκεντρούταν στις 6600 RPM για 1 λεπτό. Τέλος το υπερκείμενο στη συνέχεια φιλτράρεται με ένα φίλτρο πολυπροπυλενίου 0,22 μm . Τα 8 εκχυλίσματα που μας παρασχέθηκαν ενοποιήθηκαν σε ένα ενιαίο εκχύλισμα τελικής συγκέντρωσης 1,65 $\mu\text{g}/\text{ml}$ όπως φαίνεται και στον πίνακα.

A/A	Συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Όγκος (μl)
1	1,17	730
2	1,17	520
3	2,52	800
4	3,10	790
5	2,37	800
6	2,32	330
7	1,47	700
8	0,99	600
Ενοποιημένο δείγμα	1,65	5270

Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις δειγμάτων

3.1.3. Εκχυλίσματα καφέ

Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από 9 δείγματα καφέ: πέντε Brazil, δυο Robusta και δυο ντεκαφεϊνέ οι οποίοι ήταν μίγμα διαφόρων Arabica.

Τα πέντε Brazil είναι τα εξής:

- 1) Brazil Green (άψητος)
- 2) Brazil Roasted 1 (7.15min, 215°C)
- 3) Brazil Roasted 2 (6.05min, 215°C)
- 4) Brazil Roasted 3 (5.32min, 215°C)
- 5) Brazil Roasted 4 (3.52min, 215°C)

Τα δύο Robusta:

- 6) Robusta Green (άψητος)
- 7) Robusta Roasted (12.30min, 218°C)

Και τα δυο Ντεκαφεϊνέ:

- 8) Espresso Swiss Water Decaf Green
- 9) Espresso Swiss Water Decaf Roasted (12min, 208°C)

Για την ετοιμασία των εκχυλισμάτων καφέ, από κάθε ποικιλία καφέ ζυγίζονται 2g κόκκοι καφέ οι οποίοι με τη βοήθεια υγρού αζώτου σπάζονται σε γουδί έως ότου γίνουν σκόνη. Στη συνέχεια, τοποθετούνται σε falcon το οποίο συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό μέχρι τα 20ml (10% w/v). Τα falcon τυλίγονται με αλουμινόχαρτο, ώστε να προστατευθούν οι φωτοευαίσθητες πολυφαινόλες που υπάρχουν στον καφέ, και στη συνέχεια τοποθετούνται σε πάγο. Έπειτα, το κάθε falcon μαζί με πάγο τοποθετείται σε sonicator για 20 λεπτά (0,7s κύκλος, 75% amplitude). Μετά το πέρας 10 λεπτών, γίνεται παύση, ανάδευση και ακολουθούν τα άλλα 10 λεπτά. Το περιεχόμενο του falcon μεταφέρεται σε beaker και ακολουθεί ανάδευση υπό θέρμανση για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο μεταφέρεται σε falcon καλυμμένο με αλουμινόχαρτο και αφού πέσει η θερμοκρασία του φυγοκεντρείται στα 3000rpm, στους 5°C για 10 λεπτά και έπειτα το υπερκείμενο μεταφέρεται σε erpendorf (aliquots των 200μl) και αυτά φυλάσσονται στους -80°C.

3.1.4. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των εταιρειών Gibco, Sigma-Aldrich, Scharlau Chemie και Becton-Dickinson.

3.1.5. Θρεπτικά μέσα και υλικά πειράματος

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των κυττάρων είχε ως πρώτες ύλες τα εξής:

Θρεπτικό μέσο Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5g/l Glucose, 1mM sodium pyruvate, Gibco)

2mM L-γλουταμίνη (Gibco)

Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη αντιβιοτικά (antibiotic-antimitotic solution, Gilbo)

Fetal Bovine Serum (Gibco)

Χρησιμοποιήθηκαν δύο θρεπτικά μέσα:

α) Θρεπτικό μέσο με 10% FBS, για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που περιείχε:

- i. 250ml DMEM
- ii. 25ml FBS
- iii. 2.5ml pen/str
- iv. 2.5ml Γλουταμίνη

β) Θρεπτικό μέσο χωρίς FBS, στο στάδιο της πρόσθεσης των διαφορετικών αραιώσεων των φυτικών εκχυλισμάτων που περιείχε:

- i. 250ml DMEM
- ii. 2.5ml pen/str
- iii. 2.5ml Γλουταμίνη

Τρυψίνη 0.25% (Gibco)

PBS pH 7,4 (Phosphate buffer saline 1x) (Gibco)

Χρωστική Orange mercury (Sigma)

Χρωστική DCF (Sigma)

FACS Clean (Becton-Dickinson)

FACS Sheath (Becton-Dickinson)

FACS Rinse (Becton-Dickinson)

Cell Proliferation kit II (XTT) (Trevigen)

3.2. Ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε στην παρακάτω μελέτη ήταν τα κύτταρα EA.hy926 (αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου), που αποτελούν υβριδική σειρά που προέκυψε

από τη σύντηξη ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας ανθρώπου (HUVECs) και επιθηλιακών κυττάρων από καρκίνωμα πνεύμονα του ανθρώπου (A549).

3.2.1. Πλασμιδιακό DNA

Πλασμίδιο Bluescript SK-(+) το οποίο απομονώθηκε από βακτηριακή καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα.

3.3. Μέθοδοι

3.3.1. Καλλιέργεια των ενδοθηλιακών κυττάρων EA.hy926

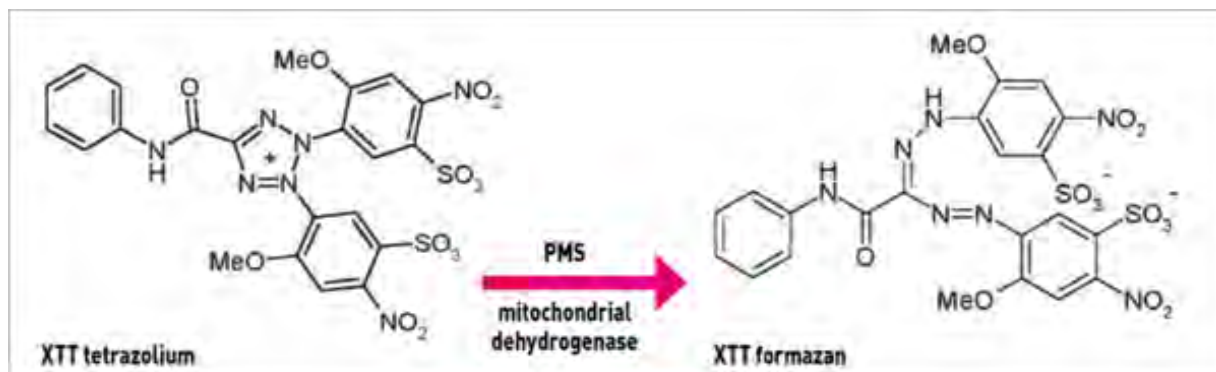
Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων 75cm² με θρεπτικό υλικό DMEM (10 ml) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα πενικιλίνης [(100 units/ml)/στρεπτομυκίνης (100μg/ml)] και σε επωαστικό κλίβανο, όπου η θερμοκρασία ήταν στους 37°C και το CO₂ 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν στο θρεπτικό υλικό μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλυφθεί περίπου κατά 70-80% με κύτταρα. Τότε κάναμε ανακαλλιέργεια των κυττάρων (split) αποκολλώντας τα από την φλάσκα με 1 ml τρυψίνης 0,25%. Ακολουθούσε επώαση με την τρυψίνη για 3 λεπτά στους 37°C στον κλίβανο επώασης και στη συνέχεια επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS. Οι χειρισμοί των κυττάρων γινόταν σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow).

3.3.2. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος

μικροσωματιδίων PM 2.5 με τη μέθοδο ΧΤΤ

3.3.2.1. Αρχή της μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της επίδρασης του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων PM 2.5 στα επιθηλιακά κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το kit ΧΤΤ assay της εταιρείας Trevigen. Η μέθοδος ΧΤΤ αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για την μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (ΧΤΤ) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή, έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομέτρηση. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση.



Εικόνα 13: Μεταβολισμός του ΧΤΤ σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα

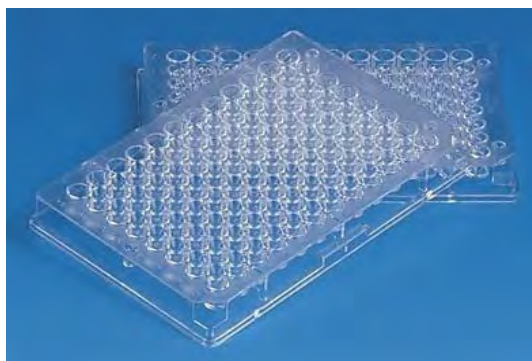
3.3.2.2. Πειραματική διαδικασία

Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γινόταν μέτρησή τους με τη βοήθεια αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 10.000 κύτταρα/θέση σε ένα «πιάτο» με 96 θέσεις (96-well plate). Στα κύτταρα προστέθηκε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και ακολουθούσε επώαση για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO₂ προκειμένου να προσκολληθούν στον πάτο του ειδικού «πιάτου» καλλιέργειας. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρούνταν και ακολουθούσε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με τα μικροσωματίδια) συνολικού όγκου 300 μl. Τα κύτταρα στα οποία είχαμε προσθέσει τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος (0.1, 0.3, 0.6 και 0.8 μg/μl), επάζονταν για 48 ώρες. Μετά την επώαση προσθέταμε 50 μl από το αντιδραστήριο ΧΤΤ σε κάθε θέση του 96-well plate και ακολουθούσε επώαση για 4 ώρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι το αντιδραστήριο ΧΤΤ πρέπει να έχει αναλογία 50:1 μεταξύ των αντιδραστηρίων Α και Β από τα οποία αποτελείται το kit. Η προετοιμασία του αντιδραστηρίου, προκειμένου να υπάρχει η επιθυμητή αναλογία μεταξύ των Α και Β, γίνεται πάντα πριν τη χρησιμοποίησή του. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν το εκχύλισμα και ΧΤΤ, χωρίς όμως να περιέχουν και κύτταρα, προκειμένου να παρατηρηθεί αν η συγκέντρωση του εκχυλίσματος επηρεάζει την τιμή της απορρόφησης. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η % αναστολή του εκχυλίσματος στην κυτταρική αύξηση των επιθηλιακών κυττάρων EA.hy926 υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = [(O.D.\text{αρνητικού μάρτυρα} - O.D.\text{δείγματος}) / O.D.\text{αρνητικού μάρτυρα}] \times 100$$



Εικόνα 14: αντικειμενοφόρος πλάκα Neubauer



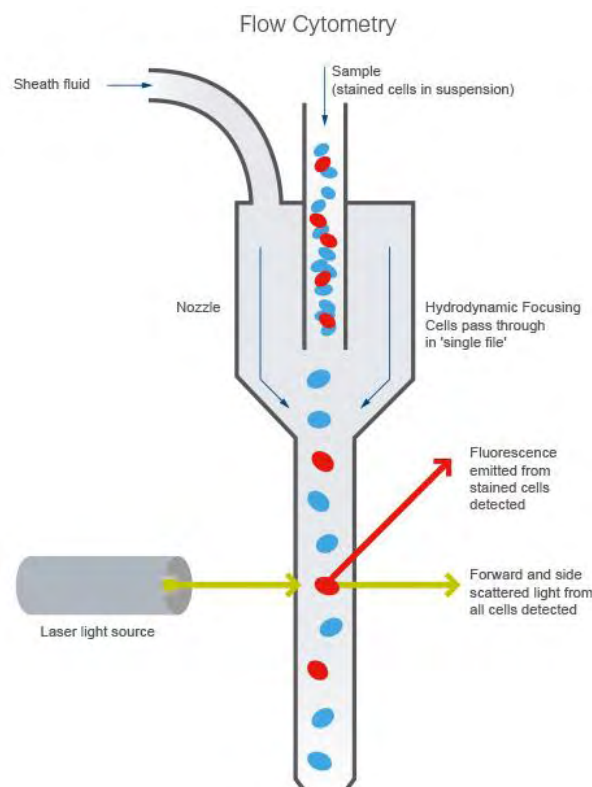
Εικόνα 15: 96-well plate

3.3.3. Κυτταρομετρία Ροής

3.3.3.1. Αρχή της μεθόδου

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτόχρονα πολλαπλά φυσικά ή/ και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου⁹⁶. Ένα άλλο χαρακτηριστικό πλεονέκτημα που δεν το έχει άλλη μέθοδος είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα της πολυπαραμετρικής ανάλυσης του δείγματος συμπεριλαμβανομένου και της θέσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται. Η δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή

κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Κάποιες συσκευές κυτταρομετρίας ροής στην αγορά δεν περιλαμβάνουν τους ανιχνευτές φθορισμού και χρησιμοποιούν μόνο τη σκέδαση του φωτός για τις μετρήσεις. Άλλες, παράγουν απεικονίσεις του φθορισμού, της σκέδασης και της έντασης του φωτός για κάθε κύτταρο.



Εικόνα 16: Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής

Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Στη συνέχεια ένα ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με δύο έως τέσσερις ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδιόδοι) μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση

της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απευθείας σκεδαζόμενο φως (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως (SSC), ο παραγόμενος φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο). Εκτός από τη μελέτη των διαφόρων κυτταρικών χαρακτηριστικών, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για διαλογή κυττάρων (cell sorting). Καθώς τα κύτταρα/σωματίδια του εναιωρήματος περνούν από την πηγή φωτός, δύναται εκλεκτικά να φορτισθούν και έτσι κατά την έξοδο τους διαχωρίζονται ανάλογα με το φορτίο τους, συλλέγοντας με αυτό τον τρόπο καθαρούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το αρχικό μείγμα, με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια.

Για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης χρησιμοποιείται η χρωστική Mercury Orange. Η εν λόγω χρωστική αντιδρά στοιχειομετρικά με τις σουλφυδρικές ομάδες της γλουταθειόνης. Το ποσό της χρωστικής που προσδέεται με προσμετράται μέσω κυτταρομετρίας ροής μετρώντας την εκπομπή της χρωστικής στα 570 nm.

Για τον προσδιορισμό των ελευθέρων ριζών χρησιμοποιείται η χρωστική DCF (διχλωροφθορεσκεΐνης). Η χρωστική αυτή παγιδεύεται μέσα στα κύτταρα και οξειδώνεται εύκολα αντιδρώντας με τις ROS σε φθορίζουσα διχλωροφθορεσκεΐνη. Η μέτρηση της εκπομπής γίνεται στα 529 nm.

3.3.3.2. Πειραματική διαδικασία

Τα κύτταρα επάζονται σε φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων 25cm² με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml) το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS για 24 h. Στη συνέχεια γίνεται αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και προστίθεται θρεπτικό υλικό DMEM απουσία ορού FBS. Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS (5 ml) ενώ στις φλάσκες των δειγμάτων προστίθεται και το εκχύλισμα μικροσωματιδίων στην

εξεταζόμενη συγκεντρώση (0.4 μg/μL). Τα κύτταρα επωάζονται μετά την προσθήκη της πρωτεΐνης για 24 h.

Ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με τρυψίνη 0,25%, επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (2 ml) και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί πλύση των κυττάρων με 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4) και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M με pH 7,4).

Μετά τη συλλογή των δειγμάτων ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 300g, στους 5°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται 150 μL PBS και 15 μL χρωστικής mercury orange (400 μM) ή 15 μL χρωστικής DCF (100 μM) για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης ή των ελευθέρων ριζών, αντίστοιχα. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στους 37°C. Έπειτα, ξεπλένουμε με 250 μL PBS και φυγοκεντρούμε στα 300g, στους 5°C για 10 λεπτά. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, προστίθεται 250 μL PBS και προχωράμε στην ανάλυση.

3.3.4. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ (Fermentas, USA) είχε εισαχθεί προηγουμένως σε δεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. Coli* DH5A.

Το πλασμιδιακό DNA Bluescript-SK+ απομονώθηκε από μεσαίας κλίμακας καλλιέργεια (100 mL) βακτηριακών κυττάρων *E. Coli* που περιείχαν μόνο το συγκεκριμένο πλασμίδιο (Bluescript-SK+). Αρχικά 3 mL θρεπτικού μέσου (1,5 gr LB broth, 1 gr NaCl, 100 μg/mL αμπικιλίνη) επιμολύνονται με μικρή ποσότητα των βακτηρίων *E. Coli* που φέρουν το πλασμίδιο Bluescript-SK+. Αφού αναπτύχθηκε αυτή η μικρή καλλιέργεια για 4 ώρες έγινε επιμόλυνση με αυτήν στο υπόλοιπο θρεπτικό μέσο, 100 mL. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε επωαστικό κλίβανο με ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C για 12-13 ώρες σε 210 στροφές. Ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.

Η συνολική καλλιέργεια χωρίζεται σε δύο επιμέρους καλλιέργειες των 50 mL. Οι καλλιέργειες φυγοκεντρούνται για 20 min στα 2057 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα των βακτηρίων προστίθενται 4 mL διαλύματος 1 [(100mL)-50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA, pH 8] και κατόπιν ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος. Τα δείγματα παραμένουν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου στα οποία στην συνέχεια

προστίθενται 8 mL διαλύματος 2 [(50mL) - 0,2 N NaOH, 1% SDS) και αναδεύονται 4-5 φορές πολύ απαλά για την αποφυγή απομόνωσης μαζί με το πλασμιδιακό DNA και χρωμοσωμικό DNA. Επειδή το διάλυμα είναι πολύ αλκαλικό, το πλασμιδιακό DNA μεταβαίνει από την υπερελικωμένη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση, γι' αυτό αμέσως μόλις διαυγάσει το διάλυμα προστίθεται 6 mL διαλύματος 3 [(100 mL)- 5 M οξικό κάλιο C₂H₃O₂K, 11,5 mL οξικού οξέος]. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 7-8 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min στα 3214g στους 4°C, στην συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και μεταφέρεται σε καινούριο σωλήνα με ταυτόχρονη μέτρηση του όγκου του και η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται.

Κατόπιν στο υπερκείμενο που συλλέγεται, προστίθενται διάλυμα προπανόλης (-20°C) σε όγκο ίσο με 60% του όγκου του υπερκείμενου. Τα δείγματα αναδεύονται και παραμένουν για 3-5min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούνται για 20 min στα 3214g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθενται διάλυμα αιθανόλης 70% v/v (σε συνθήκες -20°C) σε όγκο ίσο με 50% του όγκου του υπερκείμενου. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 20 min στα 3214 g στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα (πλασμιδιακό DNA) αφού στεγνώσει επαναδιαλύεται σε απεσταγμένο νερό.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε γίνεται με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 260 nm. Μία μονάδα οπτικής απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση DNA 50 µg/mL (1OD₂₆₀→50 µg/mL). Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πλασμιδιακού DNA γίνεται μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και στα 280nm και υπολογίζεται ο λόγος των τιμών της οπτικής απορρόφησης 260/280 (στα 280 nm απορροφούν οι πρωτεΐνες και στα 260 nm το DNA). Όταν ο λόγος είναι >1,8 η καθαρότητα του πλασμιδίου θεωρείται πολύ καλή. Για τον έλεγχο της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% στα 100 V. Στην συνέχεια το πήκτωμα χρωματίζεται σε διάλυμα 0,5 µg/mL βρωμιούχου αιθιδίου για 30 min και αποχρωματίζεται σε απιονισμένο H₂O για 30 min. Ακολουθεί έκθεση του πηκτώματος σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογράφιση του με το σύστημα ανάλυσης εικόνας MultiImage Light Cabinet της Alpha Innotech . Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Alpha View της Alpha Innotech γίνεται ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα. Το πλασμίδιο τελικά χωρίζεται σε aliquots και τοποθετείται στους -20°C.

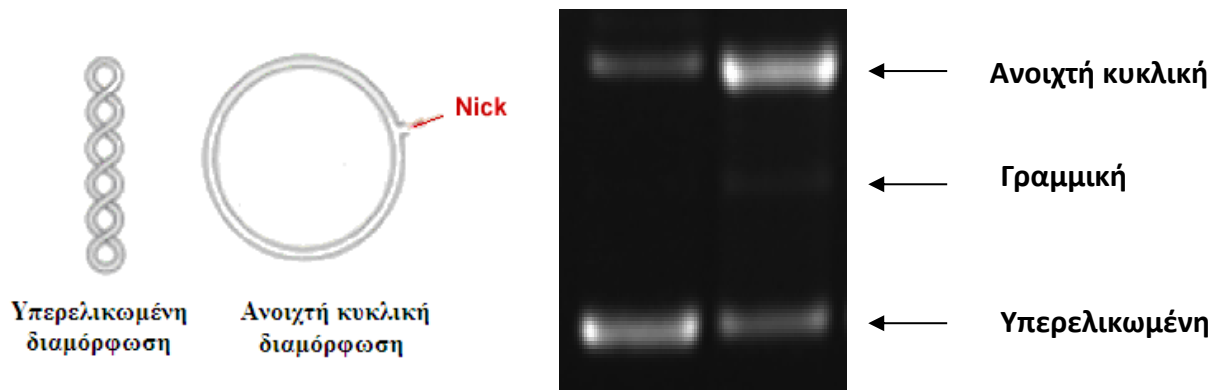
3.3.5. Χρήση πλασμιδιακού DNA για την εκτίμηση μεταλλαξιγόνου δράσης του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων και αναστολή αυτής από εκχυλίσματα καφέ

3.3.5.1. Αρχή της μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της μεταλλαξιγόνου/αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια είναι μικρά κυκλικά δίκλιωνα μόρια DNA που υπάρχουν στα βακτήρια και τις ζύμες, όπου και αντιγράφονται ως ανεξάρτητες μονάδες. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα αυτών, τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή τους σε αντίξοες συνθήκες, καθώς συνήθως φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Το πλασμιδιακό DNA πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να απομονωθεί πολύ εύκολα και σε μεγάλη ποσότητα. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα του είναι ότι όταν τρέχει σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις

- Την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπυκνωμένη του μορφή.
- Την ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλιωνα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν υπάρχουν και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν σπασίματα στο DNA.
- Την γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλιωνα σπασίματα.

Οι παραπάνω διαμορφώσεις τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα gel ηλεκτροφόρησης. Η τελευταία εξαρτάται από το μέγεθος της διαμόρφωσης και μάλιστα όσο πιο μικρή είναι αυτή τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αгарόζης. Άρα το πλασμιδιακό DNA με υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτο, δεύτερο εκείνο με τη γραμμική και τρίτο εκείνο με την ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση.



Εικόνα 17: Αριστερά: Σχηματική απεικόνιση της αλλαγής της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA μετά από την πρόκληση σε αυτό μονόκλωνων θραυσμάτων. Δεξιά: Φωτογραφία πηκτώματος αγαρόζης στο οποίο φαίνεται οι τρεις κύριες διαμορφώσεις του πλασμιδιακού DNA. Αριστερά χωρίς την επίδραση οξειδωτικού παράγοντα. Δεξιά μετά από επίδραση οξειδωτικού παράγοντα

Για την εκτίμηση αυτής της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης, μέσω αναστολής της πρόκλησης βλαβών στο DNA από ελεύθερες ρίζες, χρησιμοποιήθηκαν ως οξειδωτικός παράγοντας το εκχύλισμα μικροσωματιδίων PM 2.5 και ως ανασταλτικός παράγοντας διάφορα εκχυλίσματα καφέ.

Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων απέναντι στην δράση ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, βασίζεται στην παρεμπόδιση της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση

3.3.5.2. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το gel αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8 %, με διάλυση 0,8 g αγαρόζης σε 100 ml TBE 1x (10mM Tris-Cl, Boric Acid, 0,5M EDTA), και απόχυσή του στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Τα συστατικά της αντίδρασης (συνολικού όγκου 13μl) ήταν τα εξής: PBS, DNA Bluescript plasmid 3,2 μg, εκχύλισμα φίλτρων μικροσωματιδίων PM 2.5 (1,1 μg/μl) και τα εξεταζόμενα εκχύλιστα καφέ σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Η συγκέντρωση του εκχυλίσματος φίλτρων μικροσωματιδίων PM 2.5 επιλέχθηκε μετά από δοκιμή δράσης διάφορων συγκεντρώσεων (0,15-1,1 μg/μl) στα 45 min στους 37 °C. Η συγκέντρωση των 1,1 μg/μl προκαλεί μετάβαση του υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA σε γραμμική διαμόρφωση κατά 73% σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 4. Για την ανάδευση και ομογενοποίηση των συστατικών χρησιμοποιήθηκαν συσκευές ανάδευσης και στροβιλισμού (spin και vortex).

	PBS	Αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA	Εκχύλισμα PM 2.5
Control (-)	11 μl	-	2 μl	-
PM 2.5 (+)	2,4 μl	-	2 μl	8,6 μl
Εκχ. Καφέ 230 μg/ml	0,4 μl	2 μl	2 μl	8,6 μl
Εκχ. Καφέ 460 μg/ml	0,4 μl	2 μl	2 μl	8,6 μl
Εκχ. Καφέ 920 μg/ml	0,4 μl	2 μl	2 μl	8,6 μl
Εκχ. Καφέ 1840 μg/ml	0,4 μl	2 μl	2 μl	8,6 μl
Εκχ. Καφέ 3680 μg/ml	0,4 μl	2 μl	2 μl	8,6 μl
Εκχ. Καφέ 7360 μg/ml	0,4 μl	2 μl	2 μl	8,6 μl
Εκχ. Καφέ 7360 μg/ml (χωρίς φίλτρα)	9 μl	2 μl	2 μl	-

Πίνακας 4: Ποσότητες αντιδραστηρίων

Τα δείγματα τοποθετούνταν στο σκοτάδι στους 37°C για 45 min. Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 μl διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer - Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) και ακολούθουσε ηλεκτροφόρηση (5V/cm) σε πηκτή (gel) αγαρόζης 0,8%w/v στα 70 V για 60 min. Χρησιμοποιήθηκαν οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν TBE (10 mM Tris-HCl, 90 mM βορικό οξύ, 1mM EDTA, pH 8). Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/ml) για 30 min και ακολουθούσε αποχρωματισμός του σε απιονισμένο νερό επίσης για 30 min. Οι πηκτές μετά τον αποχρωματισμό τους τοποθετούνταν σε συσκευή εκπομπής UV και φωτογραφίζονταν με το σύστημα ανάλυσης εικόνας Multimage Light Cabinet της Alpha Innotech. Στη συνέχεια με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Alpha View της Alpha Innotech έγινε ποσοτικοποίηση των ζωνών του DNA με βάση την οπτική τους πυκνότητα.

3.3.5.3. Στατιστική ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης των εκχυλισμάτων μικροσωματιδίων PM 2.5 από τα εκχυλίσματα καφέ υπολογίστηκαν ως εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = [(S_0 - S)/(S_{\text{control}} - S_0)] \cdot 100$$

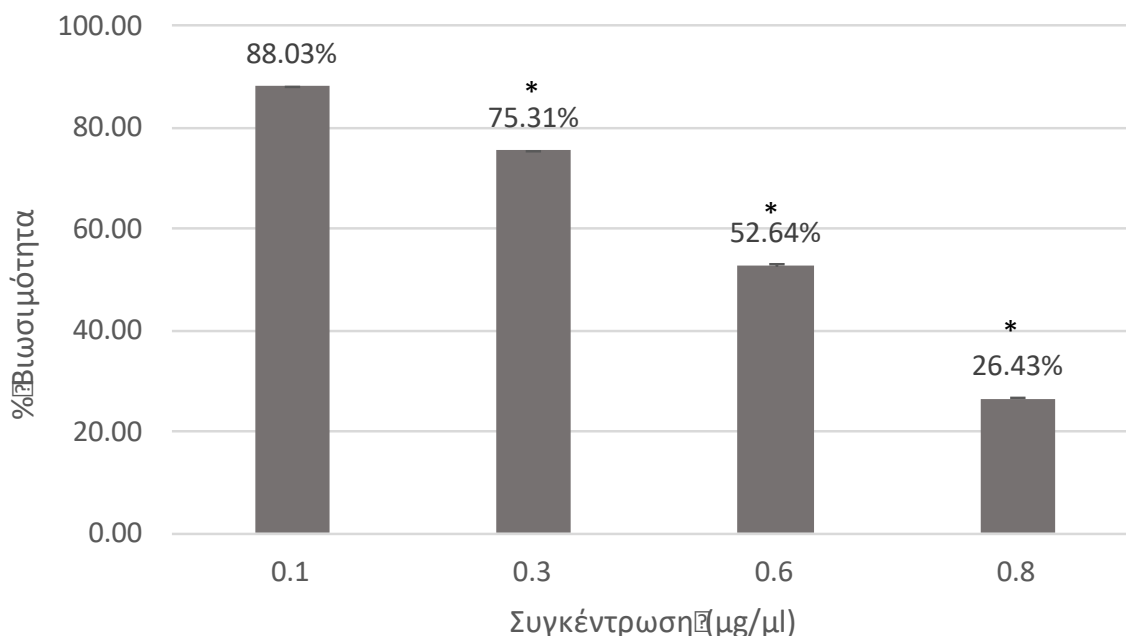
Όπου:

- S_{control}** το ποσοστό υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control,
- S₀** το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 1,1 μg/μl εκχύλισμα μικροσωματιδίων PM 2.5) και
- S** το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα καφέ) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα μικροσωματιδίων PM 2.5).

4. Αποτελέσματα

4.1. Προσδιορισμός κυτταροτοξικής δράσης της πρωτεΐνης με τη μέθοδο του ΧΤΤ.

Για την μέθοδο μέτρησης της κυτταροτοξικής δράσης ΧΤΤ χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων (0.1, 0.3, 0.6 και 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

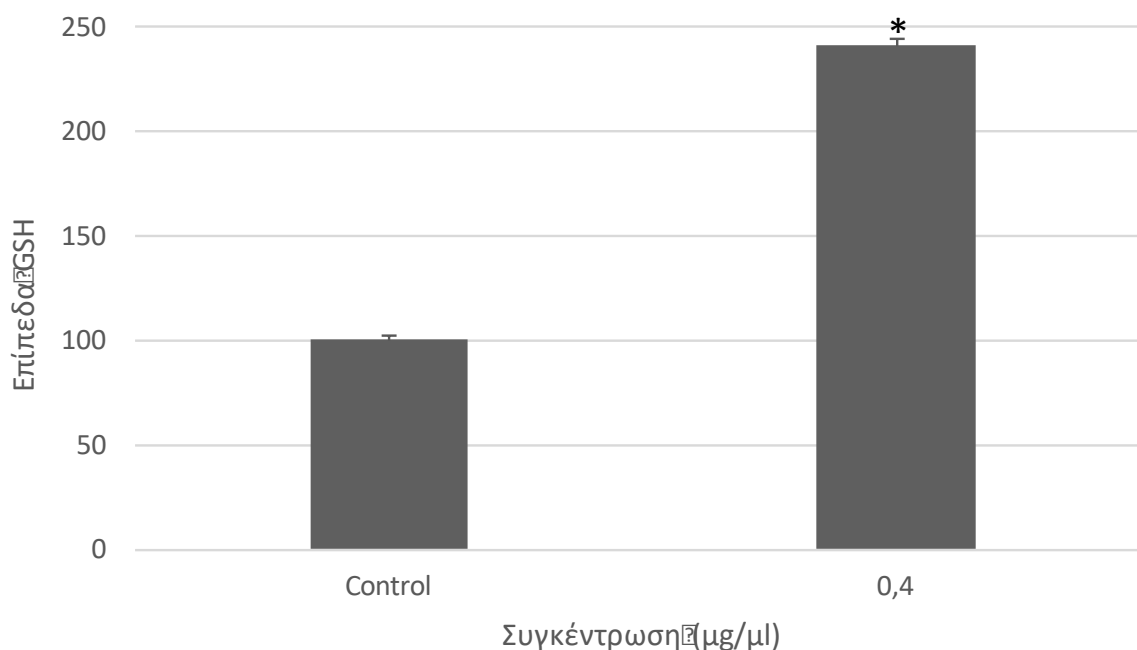


Γράφημα 1: Η % βιωσιμότητα των κυττάρων EA.hy926 από το εκχύλισμα μικροσωματιδίων (0.1, 0.3, 0.6 και 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). * Στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε σχέση με το Control ($P < 0,05$)

Όπως είναι φανερό από το γράφημα 1 παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα βιωσιμότητας καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στις συγκεντρώσεις 0.3, 0.6 και 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ κατά 25, 47 και 74 % αντίστοιχα. Προκειμένου να διερευνήσουμε τις επιπτώσεις του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων για τα επόμενα πειράματα επιλέχθηκε η συγκέντρωση 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ η οποία παρουσιάζει μια περιορισμένη τοξικότητα για τα κύτταρα και μας επιτρέπει να δούμε τις επιπτώσεις του εκχυλίσματος.

4.2. Προσδιορισμός των επιπέδων GSH με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής

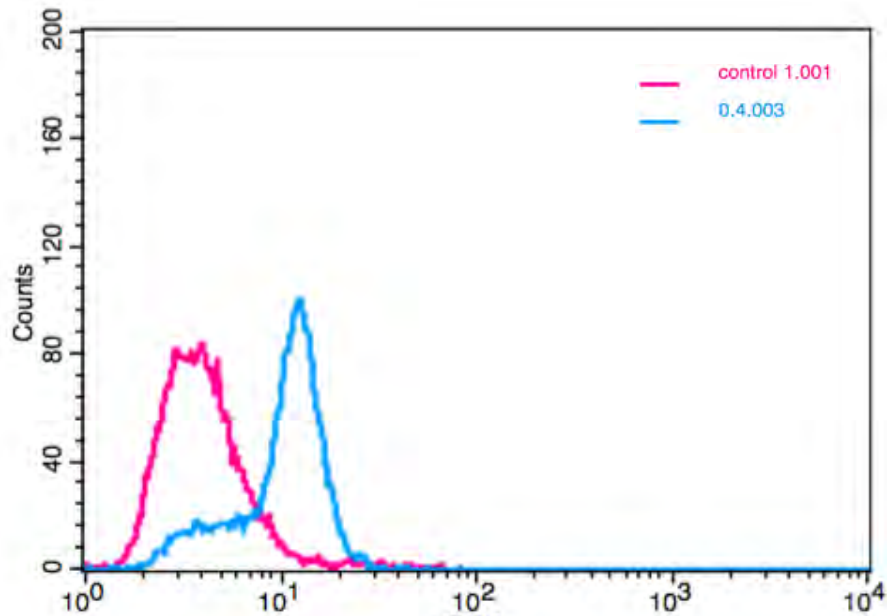
Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 έπειτα από επώαση με το εκχύλισμα μικροσωματιδίων PM 2.5 (0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) για 48 ώρες. Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα της γλουταθειόνης των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες (control).



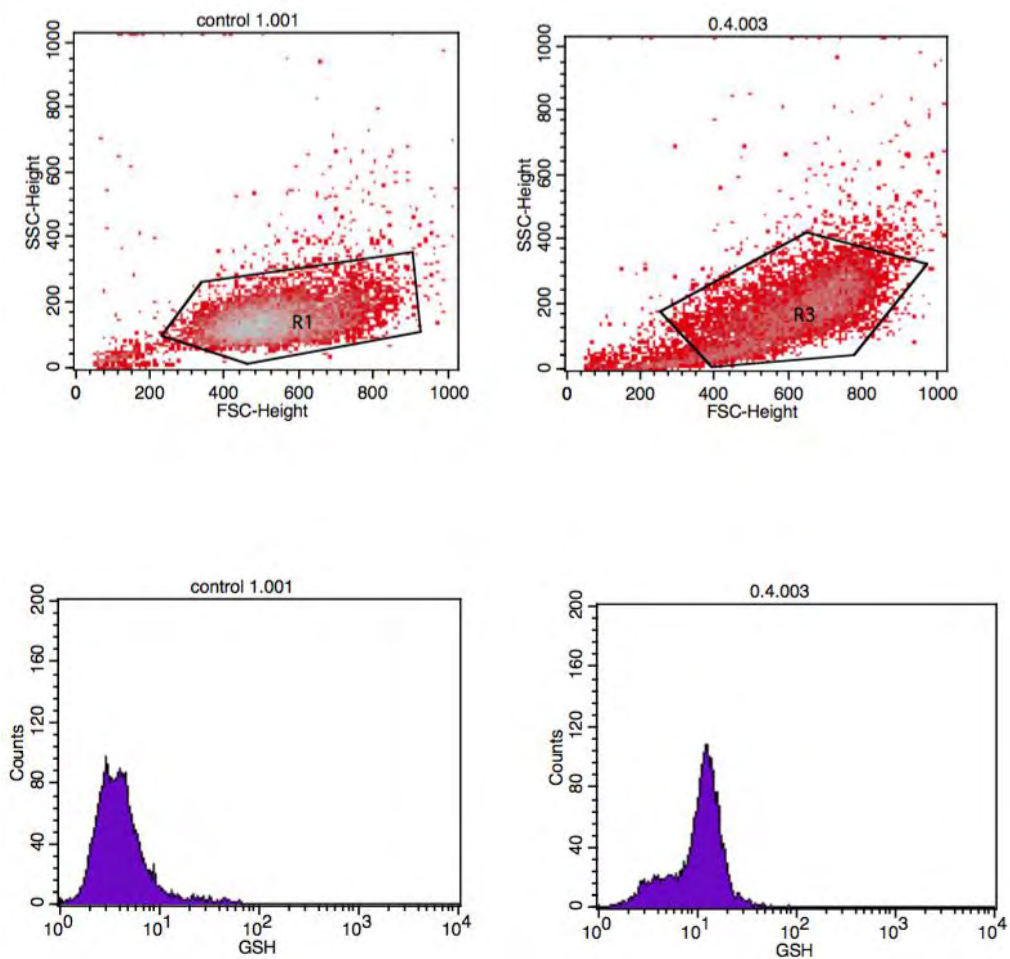
Γράφημα 2: : Επίπεδα GSH στα εωδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (Control) και υπο την επίδραση εκχυλίσματος μικροσωματιδίων PM 2.5 (0,4 μg/μl). * Στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σε σχέση με το Control (P<0,05)

Όπως φαίνεται στο γράφημα 2 τα επίπεδα της γλουταθειόνης μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος αυξήθηκαν κατά 141% σε σχέση με το control.

Στο γράφημα 3 φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων της γλουταθειόνης στα κύτταρα όπως μας το έδωσε το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής. Όπως παρατηρείται στο γράφημα στη συγκέντρωση του εκχυλίσματος έχουμε μετατόπιση της καμπύλης προς τα δεξιά. Αυτό υποδηλώνει αυξημένα επίπεδα γλουταθειόνης.

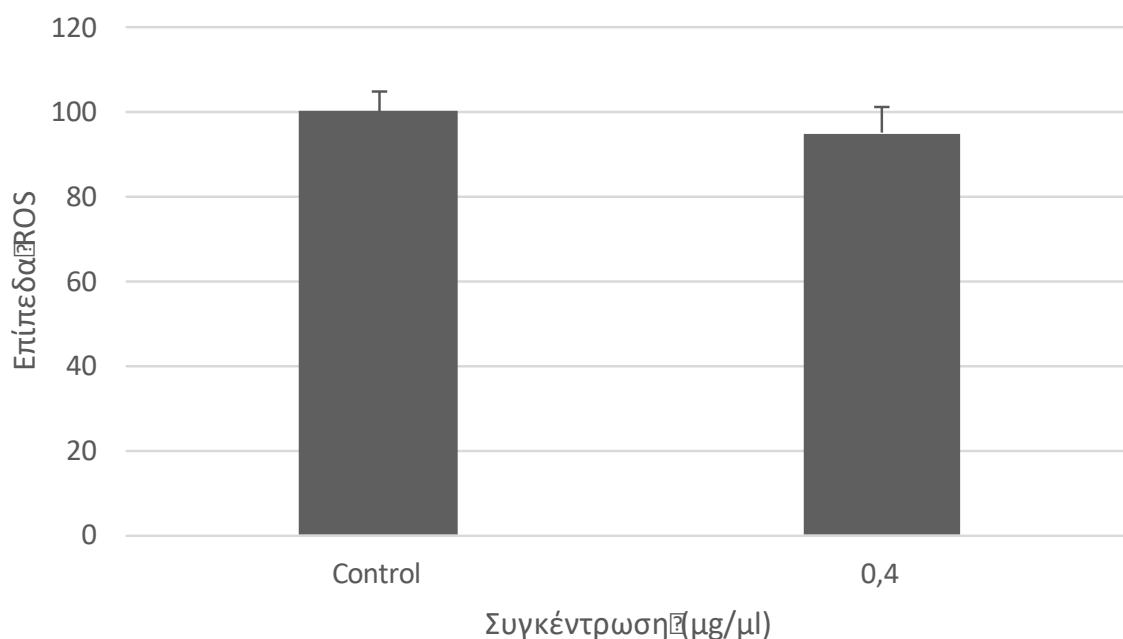


Γράφημα 3: Συγκεντρωτικό διάγραμμα των επιπέδων GSH από το κυτταρόμετρο ροής



Γράφημα 4: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων EA.hγ926 (πάνω σειρά γραφημάτων) καθώς και τη μεταβολή της γλουταθειόνης (GSH) στα κύτταρα EA.hγ926 (κάτω σειρά γραφημάτων) μετά από χρώση με Mercury Orange υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων PM 2.5 (0,4 μg/μl)

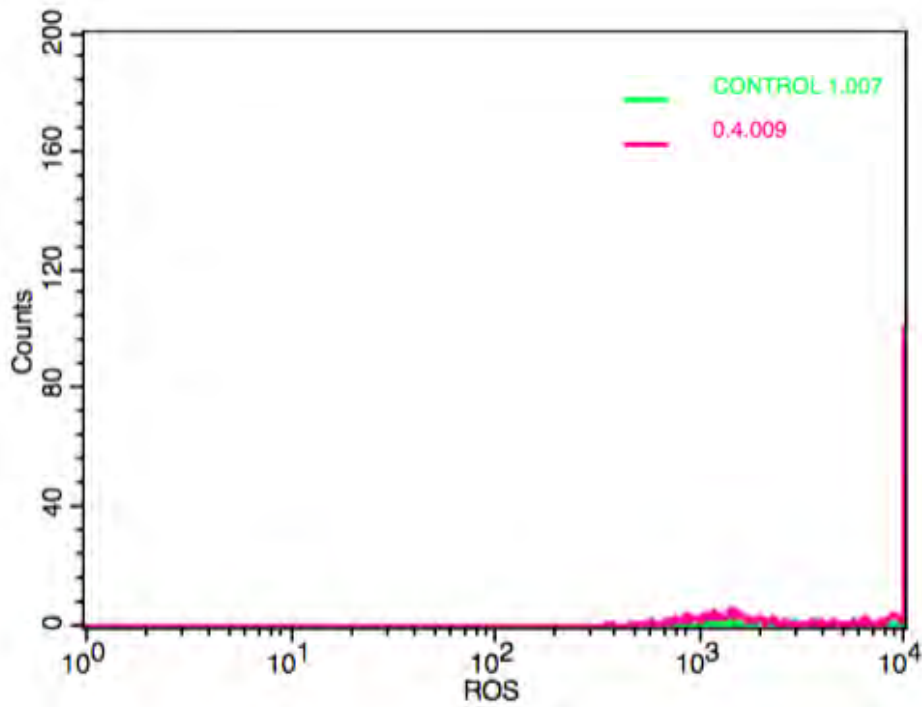
4.3. Προσδιορισμός των επιπέδων ROS με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής
Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής προσδιορίστηκαν επίσης τα επίπεδα ελευθέρων ριζών (ROS) στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 έπειτα από επώαση με το εκχύλισμα μικροσωματιδίων PM 2.5 για 48 ώρες. Προσδιορίστηκαν επίσης, τα επίπεδα ROS των κυττάρων υπό φυσιολογικές συνθήκες (control).



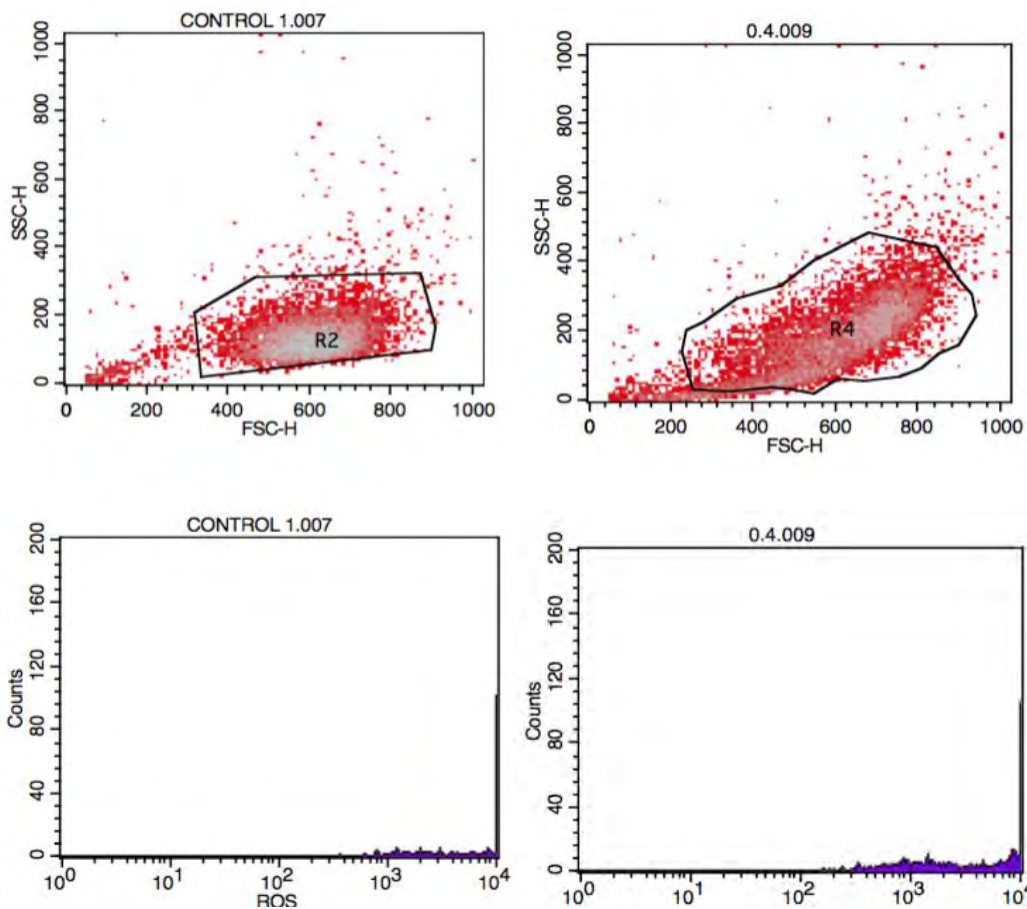
Γράφημα 5: Επίπεδα GSH στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 υπό φυσιολογικές συνθήκες (Control) και υπο την επίδραση εκχυλίσματος μικροσωματιδίων PM 2.5 (0,4 μg/ml).

Όπως φαίνεται στο γράφημα 4 τα επίπεδα των ROS μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος δεν επηρεάστηκαν σε σχέση με το control.

Στο γράφημα 6 φαίνεται η γραφική απεικόνιση των επιπέδων των ROS στα κύτταρα όπως μας το έδωσε το λογισμικό πρόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής.



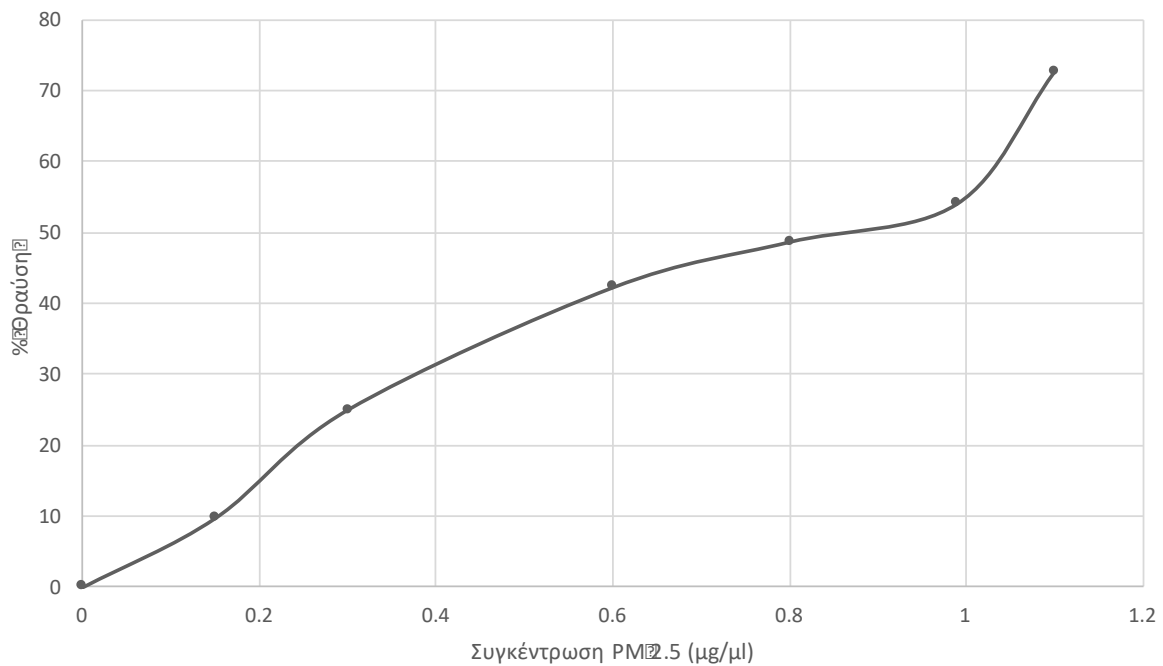
Γράφημα 6: Συγκεντρωτικό διάγραμμα των επιπέδων ROS από το κυτταρόμετρο ροής



Γράφημα 7: Αντιπροσωπευτικές εικόνες γραφημάτων που δείχνουν την κοκκίωση (SSC) και το μέγεθος (FSC) των κυττάρων EA.hy926 (πάνω σειρά γραφημάτων) καθώς και τη μεταβολή της γλουταθειόνης (GSH) στα κύτταρα EA.hy926 (κάτω σειρά γραφημάτων) μετά από χρώση με Mercury Orange υπό φυσιολογικές συνθήκες (control), υπό την επίδραση του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων PM 2.5 (0,4 μg/μl)

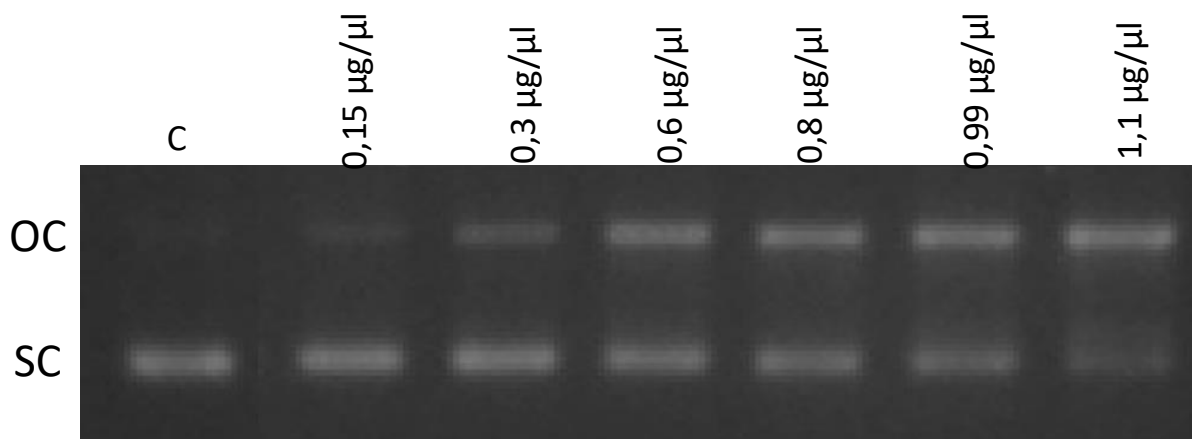
4.4. Προσδιορισμός της πρόκλησης βλαβών στο DNA και αναστολής της με χρήση εκχυλισμάτων καφέ

Μελετήθηκε αρχικά η δυνατότητα πρόκλησης βλαβών στο DNA από το εκχύλισμα μικροσωματιδίων PM 2.5. Για τον σκοπό αυτό έγινε δοκιμή διαφόρων συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος. Η βέλτιστη συγκέντρωση θα χρησιμοποιούταν και στα επόμενα πειράματα αναστολής των βλαβών.



Γράφημα 8: Διάγραμμα μετάβασης στην γραμμική κατάσταση σε σχέση με την συγκέντρωση του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων PM 2.5

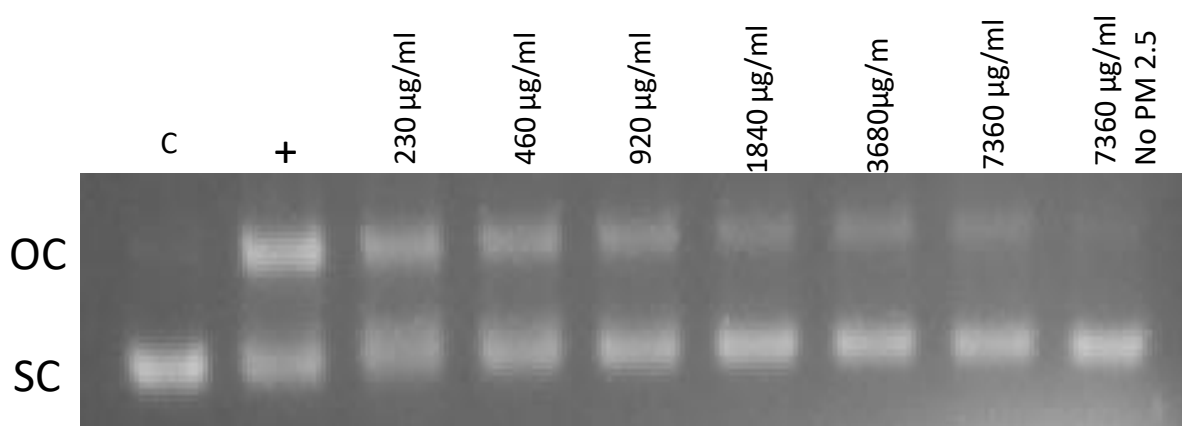
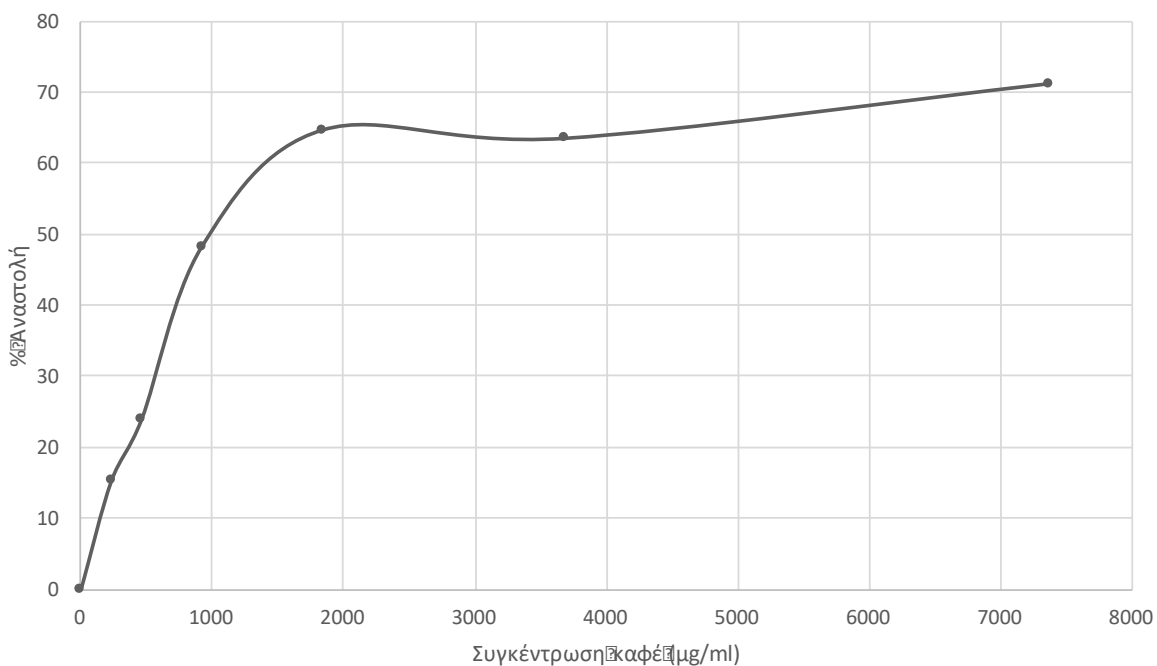
Όπως φαίνεται και στο γράφημα η πρόκληση θραύσεων στο DNA και η μετάβαση του σε γραμμική διαμόρφωση είναι αυξανόμενη με την αύξηση της συγκέντρωσης. Το ίδιο είναι κατανοητό και από την παρακάτω εικόνα του gel ηλεκτροφόρησης.



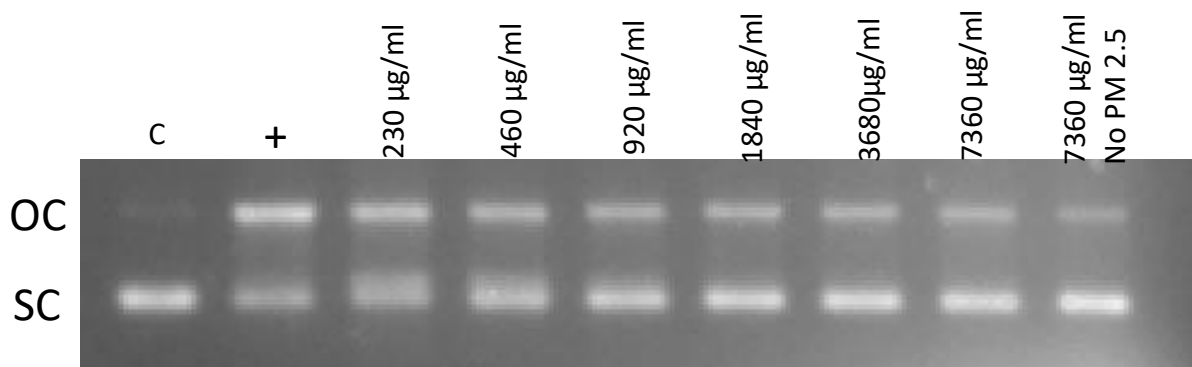
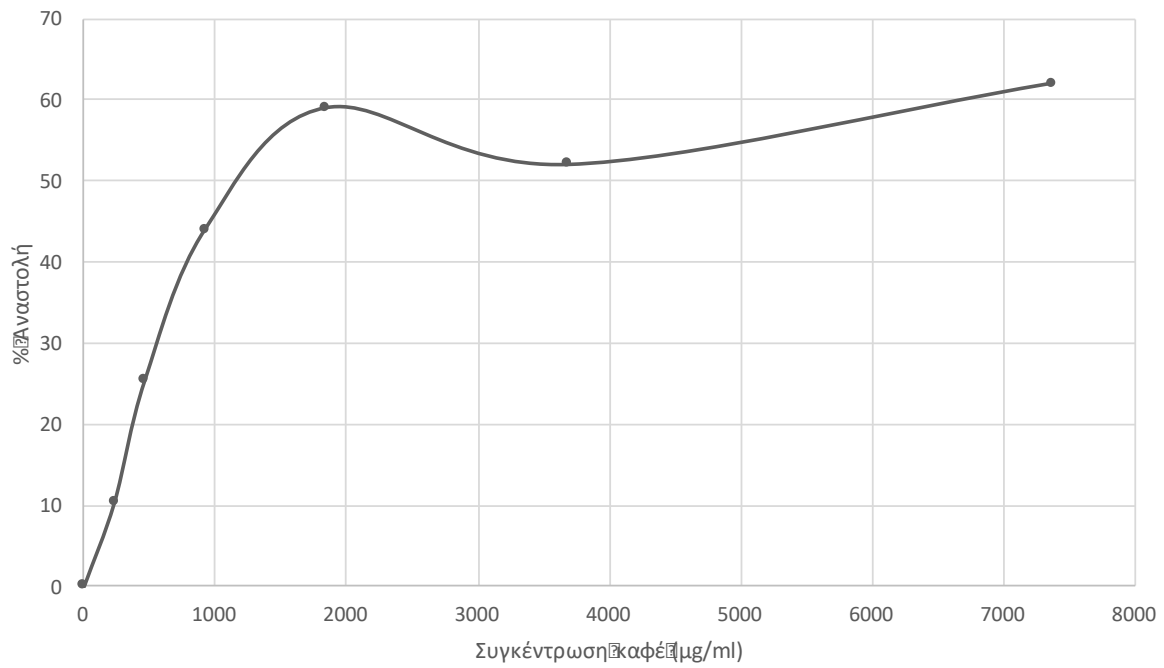
Από τα παραπάνω αποφασίστηκε η χρήση της συγκέντρωσης 1,1 µg/µl για την δοκιμή αναστολής της δράσης του εκχυλίσματος από εκχυλίσματα καφέ.

Έγινε δοκιμή με 9 ξεχωριστά εκχυλίσματα καφέ. Για όλα τα εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν και δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 230 µg/ml, 460 µg/ml, 920 µg/ml, 1840 µg/ml, 3680 µg/ml και 7360 µg/ml. Μόνο στο εκχύλισμα του Decaf Roasted δοκιμάστηκε και η συγκέντρωση 15384 µg/ml λόγω της ήπιας δράσης του.

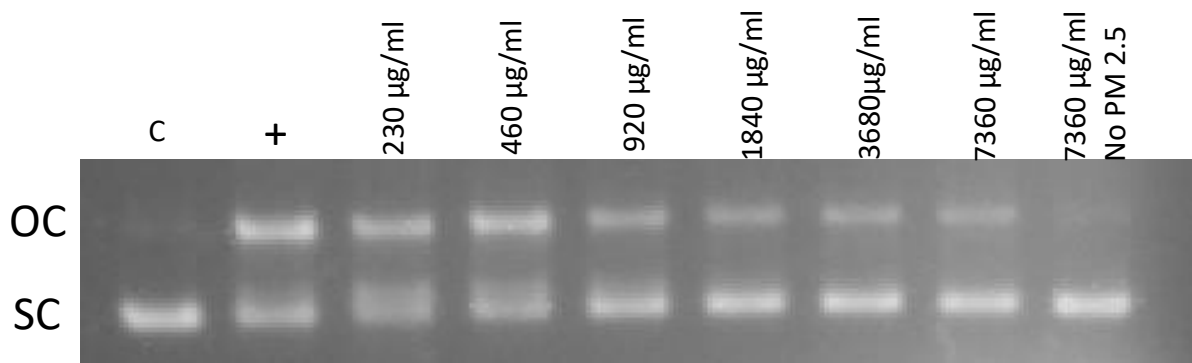
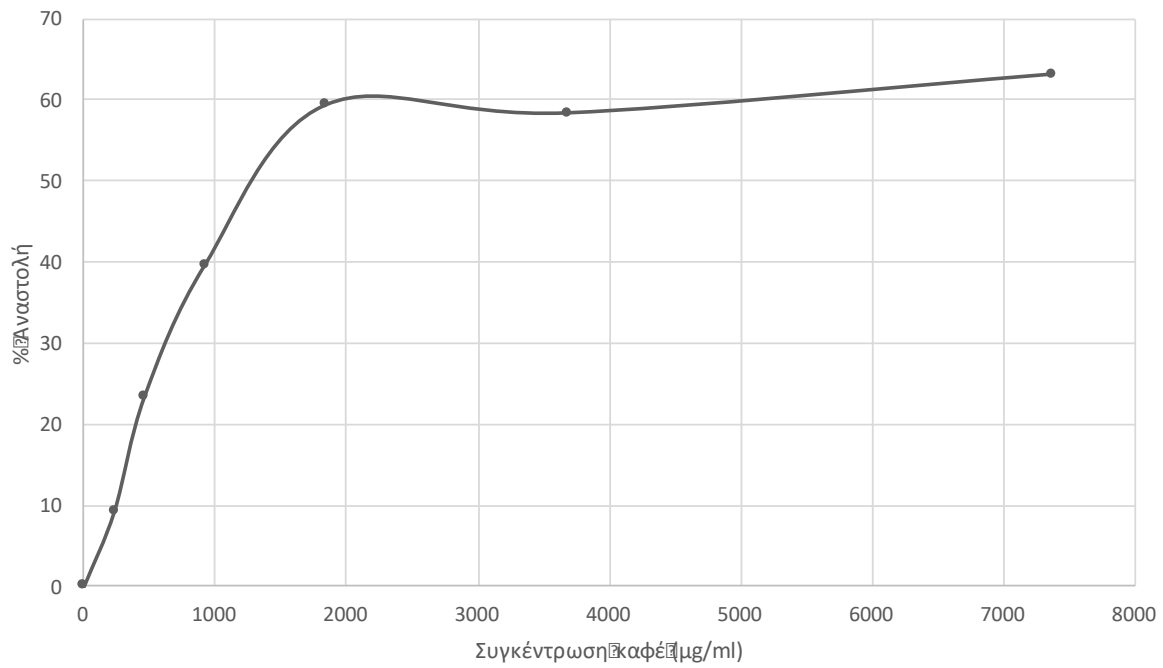
Από τα εκχυλίσματα που εξετάστηκαν προστατευτική δράση για το DNA παρουσίασαν τα 7 από τα 9. Συγκεκριμένα καμία δράση δεν είχαν οι Brazil Green και Robusta Green. Ο Decaf Green ήταν ο πλέον αδύναμος με διαφορά από τα άλλα εκχυλίσματα με $IC_{50} = 13000$ µg/ml. Οι υπόλοιποι εμφάνισαν σημαντική δράση με τα IC_{50} να κυμαίνονται από 960 έως και 2150 µg/ml.



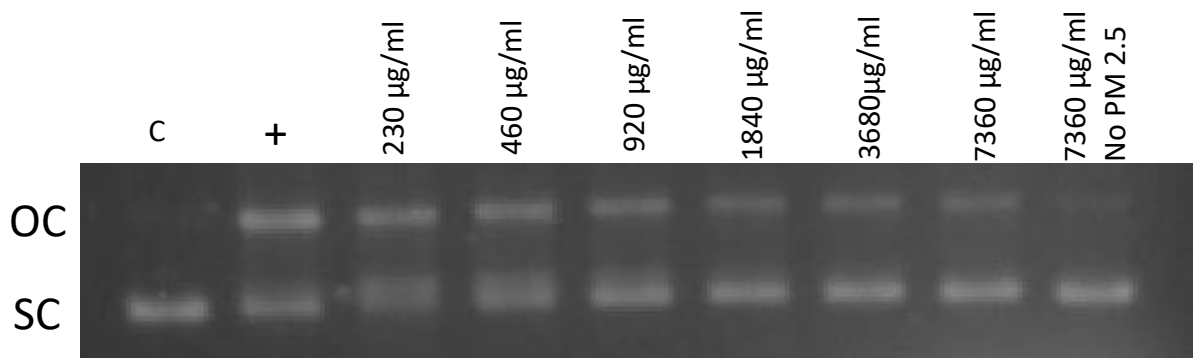
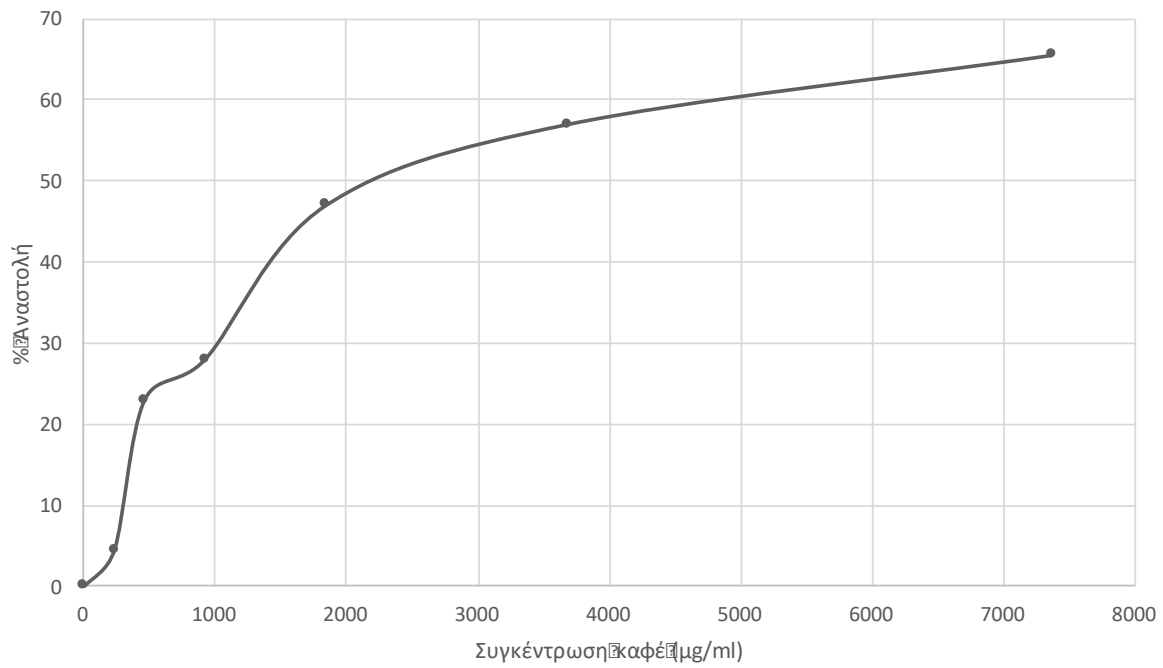
Γράφημα 9: Αναστολή της δράσης του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων PM 2.5 από το εκχύλισμα καφέ Brazil R4.



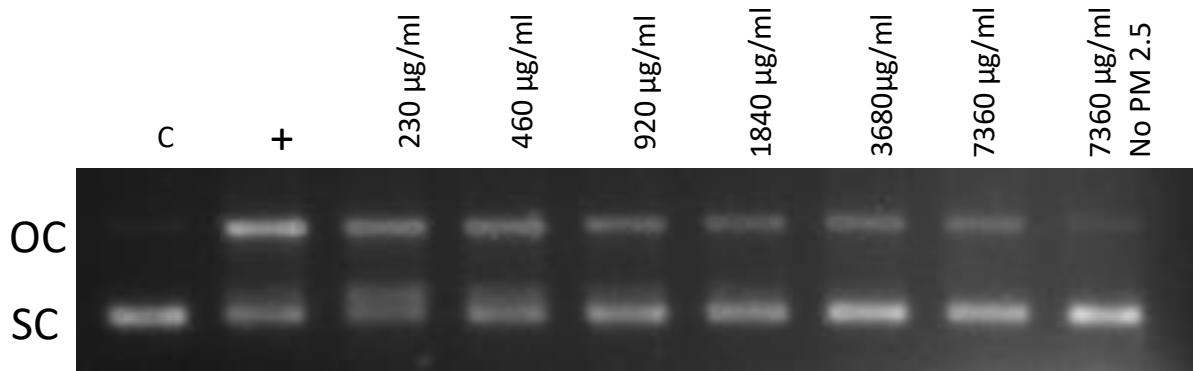
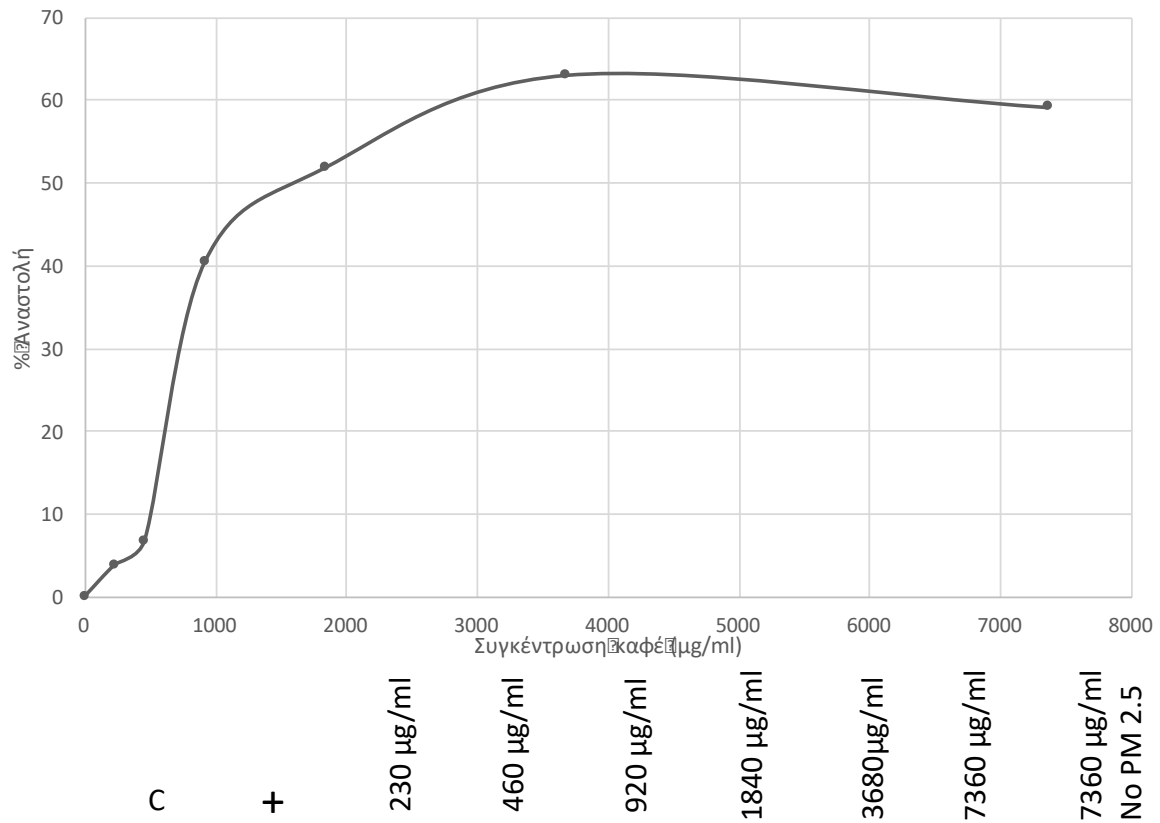
Γράφημα 10: Αναστολή της δράσης του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων PM 2.5 από το εκχύλισμα καφέ Brazil R3



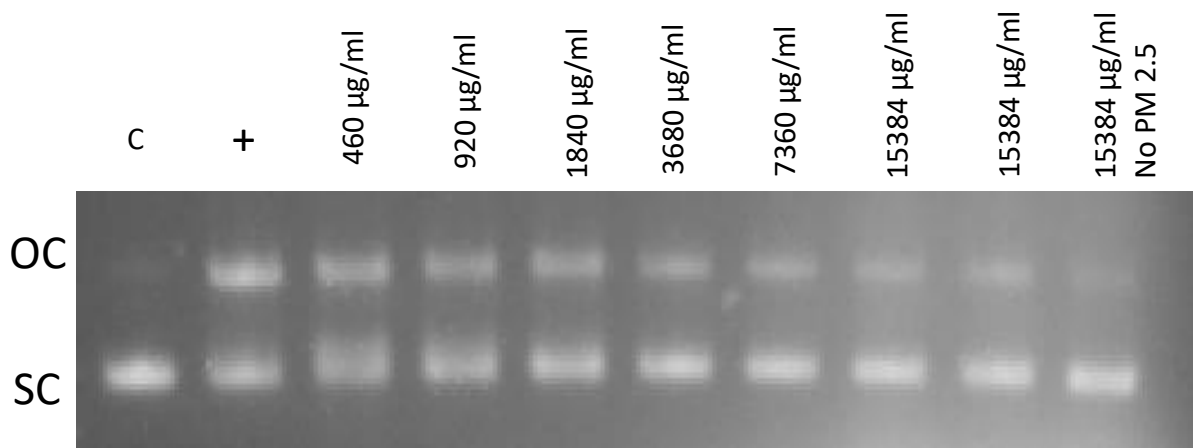
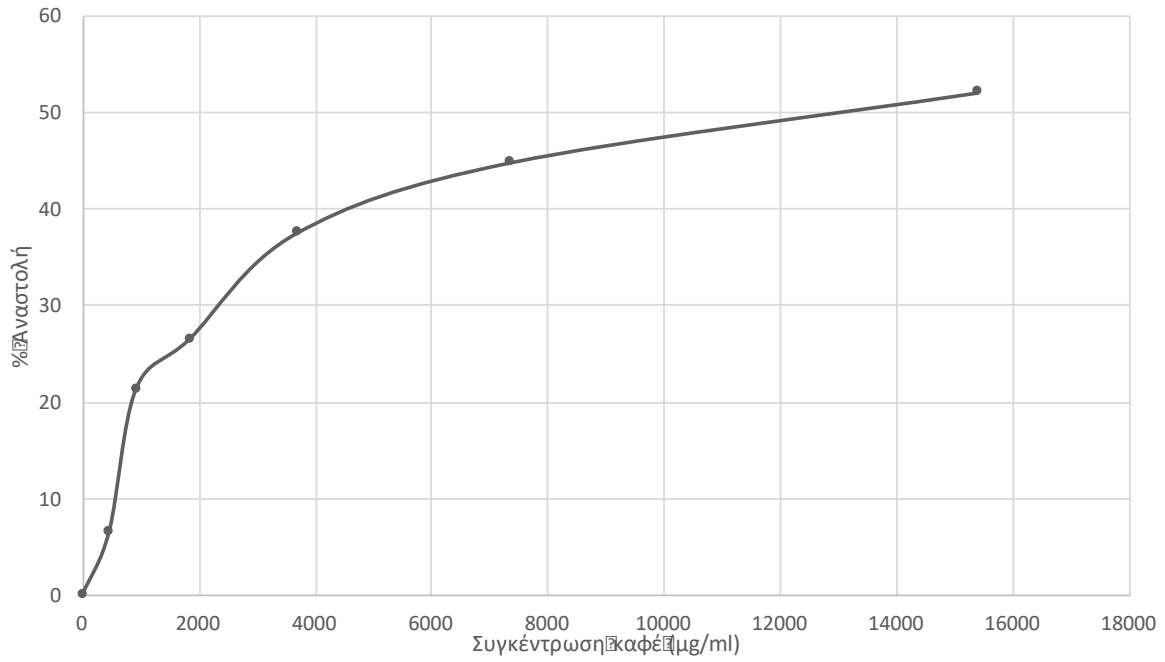
Γράφημα 11: Αναστολή της δράσης του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων PM 2.5 από το εκχύλισμα καφέ Brazil R2



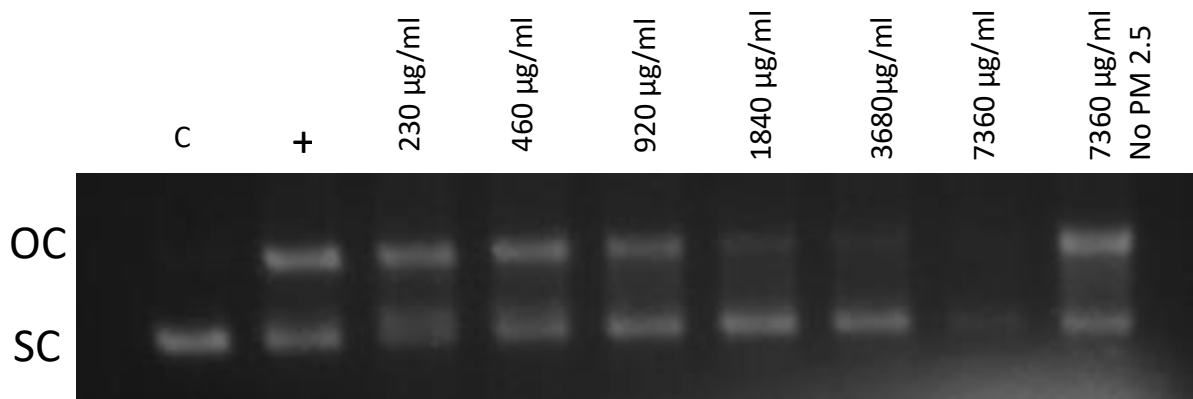
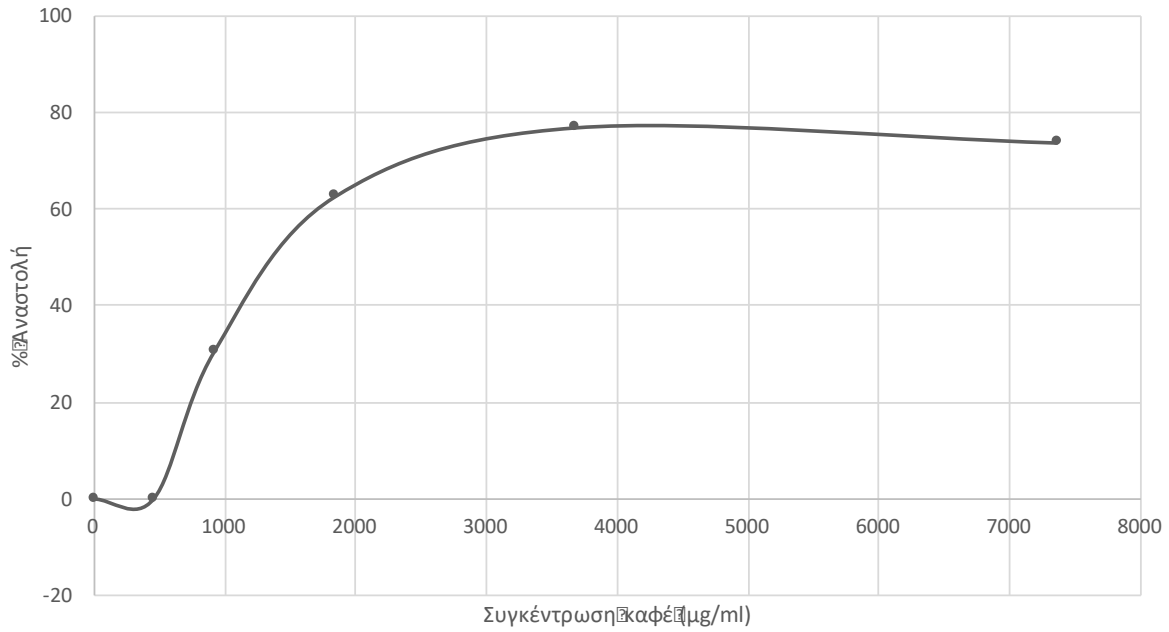
Γράφημα 12: Αναστολή της δράσης του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων PM 2.5 από το εκχύλισμα καφέ Brazil R1



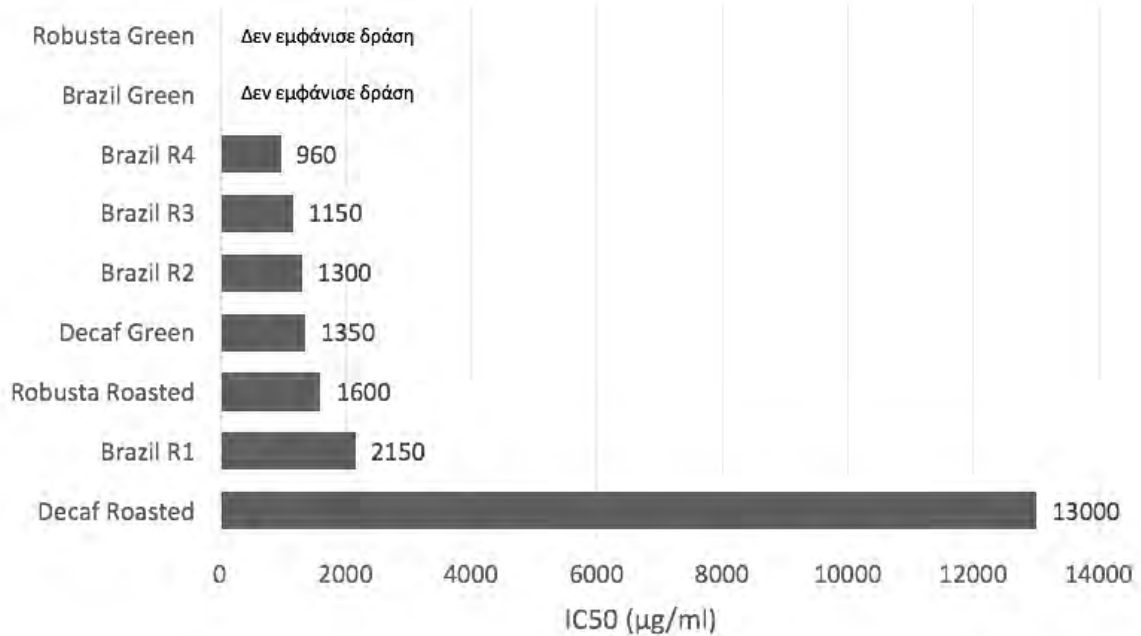
Γράφημα 13: Αναστολή της δράσης του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων PM 2.5 από το εκχύλισμα καφέ Robusta Roasted



Γράφημα 14: Αναστολή της δράσης του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων PM 2.5 από το εκχύλισμα καφέ Decaf Roasted



Γράφημα 15: Αναστολή της δράσης του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων PM 2.5 από το εκχύλισμα καφέ Decaf Green



Γράφημα 16: Συγκεντρωτικό γράφημα που απεικονίζει τις τιμές IC 50 που αντιστοιχούν σε κάθε ένα από τα εκχυλίσματα καφέ που δοκιμάστηκαν

5. Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια το ζήτημα της ποιότητας του αέρα που αναπνέουμε έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον τόσο διεθνών οργανισμών και κρατών όσο και του απλού πολίτη. Η ραγδαία βιομηχανοποίηση περιοχών καθώς και σχεδόν το σύνολο των ανθρωπίνων ενεργειών καθημερινά απελευθερώνει στην ατμόσφαιρα ουσίες που δεν γνωρίζουμε πόσο πολύ επηρεάζουν τον οργανισμό μας. Στην χώρα μας ειδικά τα τελευταία χρόνια στα πλαίσια της οικονομικής κρίσης οι άνθρωποι έχουν στραφεί σε πιο ρυπογόνες τεχνολογίες θέρμανσης συχνά λόγω κόστους. Η μεταβολή αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση έντονου νέφους κατά τους χειμερινούς μήνες πάνω από πολλές περιοχές. Σαν αποτέλεσμα μάλιστα θεσπίστηκαν από την πολιτεία και ειδικά έκτακτα μέτρα όπως η παροχή φτηνού ή ακόμα και δωρεάν ρεύματος προκειμένου να περιοριστεί η χρήση καύσιμων υλών. Το κυριότερο όμως όλων είναι πως άνοιξε και στην Ελλάδα μία συζήτηση γύρω από την ποιότητα του αέρα.

Επιστημονικά οι μετρήσεις που γίνονται από τους διάφορους οργανισμούς μελετούν τα επίπεδα διαφόρων ρύπων και όταν αυτοί ξεπεράσουν ορισμένα όρια τότε ο αέρας θεωρείται επιβαρυσμένος και προτείνεται η απαγόρευση κυκλοφορίας ειδικά των ευπαθών ομάδων. Τα όρια των ρύπων κατά καιρούς έχουν δεχθεί έντονη αμφισβήτηση κυρίως από ανθρώπους που τα θεωρούν υπερβολικά χαμηλά. Η αλήθεια είναι πως τα όρια αυτά προκύπτουν από συνεχείς μετρήσεις από οργανισμούς όπως ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας και αναθεωρούνται συχνά προκειμένου να ενσωματώνουν πάντα τις επιστημονικές εξελίξεις.

Γύρω από αυτό το θέμα αποφασίσαμε και εμείς να ερευνήσουμε τις επιπτώσεις που έχουν αυτοί οι ρύποι. Ασχοληθήκαμε με εκχυλίσματα μικροσωματιδίων PM 2.5 τα οποία θεωρούνται από τα πλέον επικίνδυνα αφού έχουν την δυνατότητα να εισχωρούν πολύ βαθιά στον πνεύμονα και να φτάνουν ακόμα και στα σημεία ανταλλαγής αερίων⁹⁷⁻⁹⁹. Βιβλιογραφικά τα σωματίδια αυτά θεωρούνται υπεύθυνα για μια σειρά αναπνευστικών προβλημάτων και όχι μόνο καθώς φαίνεται να επηρεάζουν και την λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος ιδιαίτερα σε άτομα που έχουν κάποια προδιάθεση. Θεωρούνται υπεύθυνα ακόμα για την αύξηση της θνησιμότητας και για την πρόκληση καρκίνου^{100,101}.

Για την μελέτη μας επιλέξαμε να παρατηρήσουμε τις επιπτώσεις εκχυλισμάτων μικροσωματιδίων PM 2.5 από την περιοχή της Λάρισας. Αυτό είχε για το εργαστήριο όχι μόνο ερευνητικό αλλά και τοπικό ενδιαφέρον καθώς η έδρα του βρίσκεται στην Λάρισα. Έγιναν

μετρήσεις για 12 μέρες σε δύο διαφορετικά σημεία της πόλης. Το ένα στο κέντρο και το άλλο στο κτήριο του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας το οποίο και βρίσκεται σε μία περιοχή κοντά στην περιφέρεια της πόλης. Από αυτές τις μετρήσεις λάβαμε 8 δείγματα από διαφορετικές μέρες. Αξίζει να σημειωθεί πως για 6 από τις 8 μετρήσεις τα επίπεδα PM 2.5 ήταν πάνω από το αποδεκτό όριο. Τέτοιου είδους υπερβάσεις δεν πρέπει να παρατηρούνται πάνω από 35 φορές το χρόνο. Το ανησυχητικό είναι πως κατά την μία μόλις περίπου εβδομάδα μέτρησης εμείς εντοπίσαμε 6 .

Για τα πειράματα μας επιλέξαμε την κυτταρική σειρά EA.hy926. Την θεωρήσαμε κατάλληλη καθώς πρόκειται για κυτταρική σειρά προερχόμενη από την σύντηξη ενδοθηλιακών κυττάρων με κύτταρα του πνευμονικού επιθηλίου. Το γεγονός πως οι κύριες επιδράσεις των σωματιδίων αυτών επικεντρώνονται στο αναπνευστικό και το καρδιαγγειακό σύστημα ανέδειξαν την χρησιμότητα των κυττάρων αυτών.

Η πρώτη μας προσέγγιση ήταν να εξετάσουμε την κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων των μικροσωματιδίων στα κύτταρα μας. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο ΧΤΤ. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (ΧΤΤ) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή, έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομέτρηση. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση. Παρατηρήσαμε πως υπήρχε μείωση της επιβίωσης των κυττάρων κατά τρόπο δόσοεξαρτώμενο. Ήδη από την μικρότερη συγκέντρωση ήταν εμφανής μία μικρή πτώση της τάξεως του 10%. Από αυτή την πειραματική προσέγγιση μας δόθηκε η δυνατότητα να επιλέξουμε μία κατάλληλη συγκέντρωση εκχυλίσματος για τα επόμενα πειράματα μας. Αυτή η συγκέντρωση εντοπίστηκε στα 0,4 μg/ml, σε αυτήν τα κύτταρα εμφανίζουν ένα ποσοστό βιωσιμότητας μεταξύ 70-60% . Σε αυτό το επίπεδο τα κύτταρα εμφανίζουν αρχικά σημάδια κυτταροτοξικότητας και έχουμε την δυνατότητα να μελετήσουμε την επίδραση του εκχυλίσματος στα ζωντανά κύτταρα.

Ακολούθως πραγματοποιήσαμε μετρήσεις για τα επίπεδα GSH και ROS με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής.

Για την GSH παρατηρήθηκε μια ραγδαία αύξηση 141% στα επίπεδα της στα ζωντανά κύτταρα. Αυτό συμβαίνει πιθανόν σαν απάντηση του κυττάρου στα αυξημένα επίπεδα ελευθέρων ριζών που γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία πως παράγουν τα σωματίδια. Αυτό

έρχεται σε αντίθεση με αποτελέσματα άλλων ερευνών από τη βιβλιογραφία που αναφέρουν καμία αλλαγή ή και μείωση των επιπέδων της GSH^{102,103}. Σε αυτές τις μελέτες έγινε χρήση 2 διαφορετικών μεθόδων για την μέτρηση της γλουταθειόνης σε κύτταρα. Η πρώτη αφορά την μέτρηση GSH με εμπορικό kit φωτομετρικά σε εναιώρημα κυττάρων με 5% μεταφωσφορικό οξύ. Στην δεύτερη μελέτη έγινε λύση των κυττάρων και προσδιορισμός των επιπέδων του λόγου GSSG/GSH με HPLC. Και στις δύο μελέτες η κυτταρική σειρά επιλογής ήταν η BEAS-2B. Ένας πιθανός δρόμος για την αύξηση της GSH καθώς και στην συνολικής αντιοξειδωτικής προστασίας του κυττάρου είναι το μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2. Ο παράγοντας αυτός αποτελεί τον κύριο ανιχνευτή αντιοξειδωτικής κατάστασης για το κύτταρο.

Στα επίπεδα των ROS δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή που να είναι στατιστικά σημαντική. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός πως με την κυτταρομετρία ροής τα γεγονότα που καταγράφονται αφορούν τα ζωντανά κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα επομένως φαίνεται να έχουν αναπτύξει όπως είδαμε και παραπάνω αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς σε μεγάλο βαθμό και να έχουν επιτύχει την επιβίωση τους κρατώντας υπό έλεγχο τα επίπεδα ROS στο εσωτερικό τους.

Στην συνέχεια εξετάσαμε την επίδραση του εκχυλίσματος σωματιδίων στο DNA. Στο ακολουθούμενο πρωτόκολλο το DNA εκτίθεται στο εκχύλισμα για περιορισμένο διάστημα και εμείς μετά μετρούμε το ποσοστό των βλαβών που προξένησε παρατηρώντας την μετάβαση του πλασμιδιακού γενετικού υλικού από την υπερελικωμένη στην γραμμική διαμόρφωση. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να τονίσουμε πως με την ανάπτυξη αυτού του πρωτοκόλου μπορέσαμε να παρατηρήσουμε την επίδραση των ρύπων άμεσα πάνω στο γενετικό υλικό καθώς και να αξιολογήσουμε την προστατευτική δράση εκχυλισμάτων. Αυτή η μέθοδος μας άνοιξε ακόμα νέους δρόμους καθώς απαιτεί ελάχιστες ποσότητες από το πολύτιμο εκχύλισμα των PM2.5. Ενδεικτικά χρειαζόμαστε ανά αντίδραση περίπου 8,6 μl σε αντίθεση με τα περίπου 1200 μl που απαιτούσαν τα πειράματα των κυτταροκαλλιεργειών. Πρόκειται για μία θεαματική μείωση που μας επέτρεψε να μελετήσουμε με μεγαλύτερη άνεση και πληρέστερα την δράση του εκχυλίσματος μας.

Παρατηρήσαμε μια σχεδόν γραμμική δόσοεξαρτώμενη αύξηση του ποσοστού βλαβών. Επιβεβαιώσαμε επομένως αυτό που είχε αναφερθεί και σε άλλη περίπτωση στην βιβλιογραφία, πως τα εκχυλίσματα αυτά έχουν την δυνατότητα πρόκλησης δίκλωνων ρήξεων στο DNA¹⁰¹. Η παρατήρηση αυτή γινόταν στην βιβλιογραφία με την μέτρηση των

επιπέδων φωσφορυλίωσης της ιστόνης 2AX με χρήση κυτταρομετρίας ροής σε κύτταρα BEAS-2B.

Στο επόμενο βήμα θέλαμε να εξετάσουμε την δυνατότητα που έχουν διάφορα εκχυλίσματα τροφών να αναστείλουν αυτήν την γενετοξική δράση. Στην διάθεση μας είχαμε 9 εκχυλίσματα καφέ. Η επιλογή του συγκεκριμένου ροφήματος είναι ιδανική καθώς αποτελεί ένα από τα πλέον διαδεδομένα ροφήματα παγκοσμίως. Για να εκτιμήσουμε την προσεκτική δράση επιλέξαμε την συγκέντρωση που προκαλούσε την μεγαλύτερη βλάβη στο γενετικό υλικό και προσθέσαμε στην αντίδραση διάφορες συγκεντρώσεις από τα εκχυλίσματα καφέ. Στην διάθεση μας είχαμε τόσο πράσινους όσο και καβουρδισμένους καφέδες. Σε γενικές γραμμές οι καβουρδισμένοι εμφάνισαν προστατευτική δράση. Μάλιστα όσο λιγότερος ο χρόνος καβουρδίσματος η προστασία φαίνεται να ήταν ισχυρότερη. Οι πράσινοι καφέδες όμως δεν επέδειξαν κάποια δράση με εξαίρεση τον Decaf Green ο οποίος ήταν πολύ πιο δυνατός από τον αντίστοιχο καβουρδισμένο. Είναι φανερό πως η επεξεργασία των κόκκων του καφέ είναι σημαντική και επηρεάζει την αντιοξειδωτική του ικανότητα. Ο σχηματισμός των μελανοιδινών και οι αλλαγές που παρατηρούνται σε άλλα συστατικά του καφέ κατά το καβούρδισμα πιθανόν να παίζουν ρόλο. Ακόμα υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν πως αν και με το καβούρδισμα υπάρχει μεγάλη μείωση των χλωρογενικών οξέων, τα οποία φαίνεται να είναι υπεύθυνα για τις αντιοξειδωτικές ικανότητες του πράσινου καφέ⁸⁵⁻⁸⁷, άλλες πολυφαινόλες ενσωματώνονται στα δίκτυα των μελανοιδινών είτε αυτούσιες είτε σε απλούστερες μορφές και προσδίδουν αντιοξειδωτικές ικανότητες στα μόρια αυτά⁹⁴.

Ακόμα είναι φανερό πως η διαδικασία για την αφαίρεση της καφεΐνης από τους κόκκους επηρεάζει και τα αντιοξειδωτικά μόρια του καφέ. Μάλιστα μετά το καβούρδισμα των επεξεργασμένων κόκκων η προστατευτική τους δράση μειώθηκε δραματικά. Πιθανότατα η διαδικασία της εκχύλισης της καφεΐνης συμπαρασύρει ορισμένες από τις πολυφαινόλες. Έτσι θα μπορούσαμε να εξηγήσουμε το γεγονός πως ο μόνος πράσινος που λειτούργησε ήταν ο Decaf.

Συμπερασματικά, κατά τα πειράματά μας παρατηρήσαμε την κυτταροτοξική δράση του εκχυλίσματος μικροσωματιδίων PM 2.5 από την περιοχή της Λάρισας. Επιπλέον μέσω της κυτταρομετρίας ροής παρατηρήσαμε πως τα κύτταρα είχαν αυξημένη GSH που αποτελεί έναν από τους δείκτες οξειδωτικού stress. Η επαγωγή της GSH μάλιστα ήταν ιδιαίτερα υψηλή. Ακόμα αποδείξαμε την πρόκληση βλαβών στο DNA και τον γενετοξικό χαρακτήρα

των σωματιδίων. Τέλος είδαμε την προστατευτική δράση που μπορεί να έχει ένα διαδεδομένο ρόφημα όπως ο καφές στην παρεμπόδιση αυτών των βλαβών.

Σε επόμενα βήματα θα μπορούσε να μετρηθεί η προστατευτική δύναμη και άλλων εκχυλισμάτων καθημερινών προϊόντων όπως φρούτα λαχανικά κ.α. Είναι σημαντικό να διερευνήσουμε σε βάθος τον τρόπο με τον οποίο δρουν τα σωματίδια μέσα στο κύτταρο και να εντοπίσουμε το μονοπάτι των διεργασιών που οδηγούν στην άμυνα του κυττάρου. Τέλος τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας επιτάσσουν την πληρέστερη και συστηματικότερη καταγραφή της ποιότητας του αέρα από τις αρμόδιες αρχές για την προστασία του κοινού από τις τοξικές επιδράσεις αυτών των ρύπων.

6. Βιβλιογραφία

1. World Health Organization. Air Quality & Health Questions and Answer. 1–3 (2006). Available at: http://www.who.int/phe/air_quality_q&a.pdf.
2. Becker, S., Soukup, J. M. & Gallagher, J. E. Differential particulate air pollution induced oxidant stress in human granulocytes, monocytes and alveolar macrophages. *Toxicol. In Vitro* **16**, 209–218 (2002).
3. Dockery, D. W., Schwartz, J. & Spengler, J. D. Air pollution and daily mortality: Associations with particulates and acid aerosols. *Environ. Res.* **59**, 362–373 (1992).
4. Pope, C. A., Bates, D. V. & Raizenne, M. E. Health effects of particulate air pollution: Time for reassessment? *Environ. Health Perspect.* **103**, 472–480 (1995).
5. Schwartz, J. Air pollution and hospital admissions for respiratory disease. *Epidemiology* **7**, 20–28 (1996).
6. Upadhyay, D., Panduri, V., Ghio, A. & Kamp, D. W. Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis role of free radicals and the mitochondria. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **29**, 180–187 (2003).
7. Kosugi, H., Kato, T. & Kikugawa, K. Formation of yellow, orange, and red pigments in the reaction of alk-2-enals with 2-thiobarbituric acid. *Anal. Biochem.* **165**, 456–464 (1987).
8. Knaapen, A. M., Shi, T., Borm, P. J. A. & Schins, R. P. F. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol. Cell. Biochem.* **234–235**, 317–326 (2002).
9. Monn, C. & Becker, S. Cytotoxicity and Induction of Proinflammatory Cytokines from Human Monocytes Exposed to Fine (PM_{2.5}) and Coarse Particles (PM_{10–2.5}) in Outdoor and Indoor Air. *Toxicol Appl Pharmacol* **15**, 3 (1999).
10. Choi, J. *et al.* Comparative study of PM_{2.5} - and PM₁₀ - induced oxidative stress in rat lung epithelial cells. *J. Vet. Sci.* **5**, 11–8 (2004).
11. Brüggemann, E., Gerwig, H., Gnauk, T., Müller, K. & Herrmann, H. Influence of seasons, air mass origin and day of the week on size-segregated chemical composition of aerosol particles at a kerbside. *Atmos. Environ.* **43**, 2456–2463 (2009).
12. Cassee, F. R., Héroux, M.-E., Gerlofs-Nijland, M. E. & Kelly, F. J. Particulate matter beyond mass: recent health evidence on the role of fractions, chemical constituents and sources of emission. *Inhal. Toxicol.* **25**, 802–12 (2013).
13. Brunekreef, B. & Holgate, S. T. Air pollution and health. *Lancet* **360**, 1233–1242 (2002).
14. Brook, R. D. *et al.* Air pollution and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the expert panel on population and prevention science of the American Heart Association. *Circulation* **109**, 2655–2671 (2004).
15. Franklin, B. A., Brook, R. & Arden Pope, C. Air pollution and cardiovascular disease. *Curr. Probl. Cardiol.* **40**, 207–238 (2015).
16. Brook, R. D. *et al.* Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* **121**, 2331–2378 (2010).
17. Lodovici, M. & Bigagli, E. Oxidative stress and air pollution exposure. *J. Toxicol.* **2011**, (2011).
18. Zhou, Z. *et al.* Transcriptomic analyses of the biological effects of airborne PM_{2.5}

- exposure on human bronchial epithelial cells. *PLoS One* **10**, 1–18 (2015).
19. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. *Free Radical Biology and Medicine* **10**, (1999).
 20. Sen, C. K. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med. Sci. Sports Exerc.* **33**, 368–370 (2001).
 21. Prior, R. L. & Cao, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* **27**, 1173–1181 (1999).
 22. Halliwell, B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. *Encycl. Life Sci.* 1–7 (2001). doi:10.1038/npg.els.0003913
 23. Fang, Y.-Z., Yang, S. & Wu, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **18**, 872–879 (2002).
 24. Di Meo, S. & Venditti, P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol. Signals Recept.* **10**, 125–40
 25. Sjödin, B., Hellsten Westing, Y. & Apple, F. S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.* **10**, 236–54 (1990).
 26. Lenaz, G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim. Biophys. Acta* **1366**, 53–67 (1998).
 27. Muller, F. L., Liu, Y. & Van Remmen, H. Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. *J. Biol. Chem.* **279**, 49064–49073 (2004).
 28. Lenaz, G. *et al.* Mitochondrial bioenergetics in aging. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 397–404 (2000).
 29. Meydani, M. *et al.* Antioxidant response to exercise-induced oxidative stress and protection by vitamin E. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **669**, 363–4 (1992).
 30. Petrone, W. F., English, D. K., Wong, K. & McCord, J. M. Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 1159–63 (1980).
 31. Downey, J. M. Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 487–504 (1990).
 32. Kuppusamy, P. & Zweier, J. L. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J. Biol. Chem.* **264**, 9880–4 (1989).
 33. Yu, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* **74**, 139–162 (1994).
 34. Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527–605 (1979).
 35. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. (Clarendon Press, 1989).
 36. Koren, H. S. Associations between criteria air pollutants and asthma. in *Environmental Health Perspectives* **103**, 235–242 (1995).
 37. Victorin, K. Review of the genotoxicity of nitrogen oxides. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* **317**, 43–55 (1994).
 38. Naito, Y., Yoshikawa, T., Yoshida, N. & Kondo, M. Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. *Dig. Dis. Sci.* **43**, 30S–34S (1998).
 39. Ray, R. S. *et al.* Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. *Drug Chem. Toxicol.* **24**, 191–200 (2001).
 40. Elsayed, N. M., Omaye, S. T., Klain, G. J. & Korte, D. W. Free radical-mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after

- subcutaneous injection. *Toxicology* **72**, 153–165 (1992).
41. Jones, D. P. *et al.* Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 625–635 (2000).
 42. Obata, T., Yamanaka, Y., Kinemuchi, H. & Oreland, L. Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. *Brain Res.* **906**, 170–5 (2001).
 43. Wormser, U., Sintov, A., Brodsky, B. & Nyska, A. Topical iodine preparation as therapy against sulfur mustard-induced skin lesions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **169**, 33–9 (2000).
 44. Ames, B. N. Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. *Prog. Clin. Biol. Res.* **206**, 3–32 (1986).
 45. Kanner, J. & Lapidot, T. The stomach as a bioreactor: Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1388–1395 (2001).
 46. Lijinsky, W. N-Nitroso compounds in the diet. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **443**, 129–138 (1999).
 47. Sen, C. K. & Packer, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* **10**, 709–20 (1996).
 48. Rimbach, G. *et al.* Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch. Anim. Nutr. Fur Tierernahrung* **52**, 203–222 (1999).
 49. Reid, M. B. Plasticity in Skeletal, Cardiac, and Smooth Muscle: Invited Review: Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* **90**, 724–731 (2001).
 50. Linnane, A. W. *et al.* Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **959**, 396-411-465 (2002).
 51. Finaud, J., Lac, G. & Filaire, E. Oxidative stress: Relationship with exercise and training. *Sports Medicine* **36**, 327–358 (2006).
 52. Jenkins, R. R. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sport. Med* **5**, 156–70. (1988).
 53. Cooper, C. E., Vollaard, N. B., Choueiri, T. & Wilson, M. T. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* **30**, 280–285 (2002).
 54. Golden, T. R., Hinerfeld, D. A. & Melov, S. Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell* **1**, 117–123 (2002).
 55. Meister, A. & Anderson, M. E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711–60 (1983).
 56. Niki, E. *et al.* Effect of phytyl side chain of vitamin E on its antioxidant activity. *J. Biol. Chem.* **260**, 2191–2196 (1985).
 57. Townsend, D. M., Tew, K. D. & Tapiero, H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **57**, 145–155 (2003).
 58. Lu, S. C. Regulation of glutathione synthesis. *Curr. Top. Cell. Regul.* **36**, 95–116 (2000).
 59. Aw, T. Y. Cellular redox: a modulator of intestinal epithelial cell proliferation. *News Physiol. Sci.* **18**, 201–204 (2003).
 60. NSIT. Oxidative stress.
 61. Pope, C. A. *et al.* Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama* **287**, 1132–41 (2002).
 62. Donaldson, K., Stone, V., Seaton, A. & MacNee, W. Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: Potential mechanisms. *Environ. Health Perspect.* **109**, 523–527 (2001).

63. Donaldson, K. & Tran, C. L. Inflammation caused by particles and fibers. *Sect. Title Toxicol.* **14**, 5–27 (2002).
64. Schins, R. P. F. *et al.* Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **195**, 1–11 (2004).
65. Knaapen, A. M., Borm, P. J. A., Albrecht, C. & Schins, R. P. F. Inhaled particles and lung cancer. Part A: Mechanisms. *International Journal of Cancer* **109**, 799–809 (2004).
66. Prahallad, A. K. *et al.* Air pollution particles mediated oxidative DNA base damage in a cell free system and in human airway epithelial cells in relation to particulate metal content and bioreactivity. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 879–887 (2001).
67. Dellinger, B. *et al.* Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 1371–1377 (2001).
68. Han, J. Y., Takeshita, K. & Utsumi, H. Noninvasive detection of hydroxyl radical generation in lung by diesel exhaust particles. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 516–525 (2001).
69. Ghio, A. J., Richards, J. H., Carter, J. D. & Madden, M. C. Accumulation of Iron in the Rat Lung after Tracheal Instillation of Diesel Particles. *Toxicol. Pathol.* **28**, 619–627 (2000).
70. Gerde, P., Muggenburg, B. A., Lundborg, M., Tesfaigzi, Y. & Dahl, A. R. Respiratory epithelial penetration and clearance of particle-borne benzo[a]pyrene. *Res Rep Heal. Eff Inst* 5–32 (2001).
71. Dellinger, B. *et al.* Role of Free Radicals in the Toxicity of Airborne Fine Particulate Matter. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 1371–1377 (2001).
72. Baulig, A. *et al.* Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **285**, L671-9 (2003).
73. Bonvallot, V. *et al.* Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**, 515–521 (2001).
74. Maurin, O. *et al.* Towards a Phylogeny for Coffea (Rubiaceae): Identifying Well-supported Lineages Based on Nuclear and Plastid DNA Sequences. *Ann. Bot.* **100**, 1565–1583 (2007).
75. Liu, J., Shen, B., Shi, M. & Cai, J. Higher Caffeinated Coffee Intake Is Associated with Reduced Malignant Melanoma Risk: A Meta-Analysis Study. *PLoS One* **11**, e0147056 (2016).
76. Nehlig, A. Effects of coffee/caffeine on brain health and disease: What should I tell my patients? *Pract. Neurol.* **16**, 89–95 (2016).
77. Farah, A., de Paulis, T., Moreira, D. P., Trugo, L. C. & Martin, P. R. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 374–381 (2006).
78. Lee, C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clin. Chim. Acta.* **295**, 141–154 (2000).
79. Clifford, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1033–1043 (2000).
80. Farah, A., Monteiro, M. C., Calado, V., Franca, A. S. & Trugo, L. C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chem.* **98**, 373–380

- (2006).
81. Salazar-Martinez, E. *et al.* Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* **140**, 1–8 (2004).
 82. Agardh, E. E. *et al.* Coffee consumption, type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in Swedish men and women. *J. Intern. Med.* **255**, 645–652 (2004).
 83. Lindsay, J. *et al.* Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am. J. Epidemiol.* **156**, 445–453 (2002).
 84. Larsson, S. C. & Wolk, A. Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology* **132**, 1740–1745 (2007).
 85. Johnston, K. L., Clifford, M. N. & Morgan, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**, 728–733 (2003).
 86. Herrera-Arellano, A., Aguilar-Santamaria, L., Garcia-Hernandez, B., Nicasio-Torres, P. & Tortoriello, J. Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. *Phytomedicine* **11**, 561–566 (2004).
 87. Pellegrini, N. *et al.* Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.* **133**, 2812–2819 (2003).
 88. Wattenberg, L. W. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res.* **43**, 2448s–2453s (1983).
 89. Cavin, C. *et al.* Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 1155–1163 (2002).
 90. Olthof, M. R., Hollman, P. C., Zock, P. L. & Katan, M. B. Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 532–538 (2001).
 91. Trugo, L. C. & Macrae, R. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chem.* **15**, 219–227 (1984).
 92. Nicoli, M. C., Anese, M., Manzocco, L. & Lerici, C. R. Antioxidant Properties of Coffee Brews in Relation to the Roasting Degree. *LWT - Food Sci. Technol.* **30**, 292–297 (1997).
 93. Daglia, M., Papetti, A., Gregotti, C., Berte, F. & Gazzani, G. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1449–1454 (2000).
 94. Perrone, D., Farah, A. & Donangelo, C. M. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 4265–4275 (2012).
 95. Moreira, A. S. P., Nunes, F. M., Domingues, M. R. & Coimbra, M. A. Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food Funct.* **3**, 903–915 (2012).
 96. Shapiro, H. M. in *Practical Flow Cytometry* 1–60 (2003). doi:10.1002/0471722731.ch1
 97. Cachon, B. F. *et al.* Proinflammatory effects and oxidative stress within human bronchial epithelial cells exposed to atmospheric particulate matter (PM_{2.5} and PM_{>2.5}) collected from Cotonou, Benin. *Environ. Pollut.* **185**, 340–351 (2014).
 98. Boubilil, L. *et al.* Development of a repeated exposure protocol of human bronchial epithelium in vitro to study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicol. Vitro.* **27**, 533–542 (2013).

99. Li, X., Wang, Y., Guo, X. & Wang, Y. Seasonal variation and source apportionment of organic and inorganic compounds in PM_{2.5} and PM₁₀ particulates in Beijing, China. *J. Environ. Sci. (China)* **25**, 741–750 (2013).
100. Chen, K.-Y. *et al.* Elevation of telomerase activity positively correlates to poor prognosis of patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* **240**, 148–156 (2006).
101. Borgie, M. *et al.* Genotoxic and epigenotoxic effects of fine particulate matter from rural and urban sites in Lebanon on human bronchial epithelial cells. *Environ. Res.* **136**, 352–362 (2015).
102. Yang, J.-Y. *et al.* Exposure and toxicity assessment of ultrafine particles from nearby traffic in urban air in seoul, Korea. *Environ. Health Toxicol.* **28**, e2013007 (2013).
103. Dieme, D. *et al.* Relationship between physicochemical characterization and toxicity of fine particulate matter (PM_{2.5}) collected in Dakar city (Senegal). *Environ. Res.* **113**, 1–13 (2012).