



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΝΑΝΟΎΛΙΚΩΝ ΣΕ
ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ
ΜΑΚΡΟΦΑΓΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΟΝΤΙΚΟΥ»**

ΠΕΡΚΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2022

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Αριστείδης Βεσκούκης (Επιβλέπων Καθηγητής)

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

Δημήτριος Κουρέτας

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

Κωνσταντίνος Χαριτίδης

Καθηγητής Νανομηχανικής και Νανοτεχνολογίας, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Τοξικολογία» του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στη Λάρισα, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Βεσκούκη Αριστείδη, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση του και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα για την εμπιστοσύνη, την ενθάρρυνση και την καθοδήγηση που μου παρείχε, καθώς και για την τιμή και τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετάσχω και να συμβάλλω στο επιστημονικό έργο που επιτελείται στο εργαστήριο και στην ερευνητική του ομάδα όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ πολύ επίσης τον Καθηγητή κ. Χαριτίδη Κωνσταντίνο και τους συνεργάτες του Δρ. Ιωάννη Καρτσωνάκη και Δρ. Παναγιώτη Γούλη για την παροχή των νανοϋλικών που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία, καθώς και για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα Περικλή Βαρδάκα για την πολύτιμη καθοδήγηση του, για τις συμβουλές, τον ενθουσιασμό και τον γενναιόδωρο χρόνο που μου παρείχε για οποιαδήποτε βοήθεια χρειαζόταν καθ' όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Αισθάνομαι επίσης την ανάγκη να ευχαριστήσω από καρδιάς όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τις γνώσεις, τις συμβουλές, την υποστήριξη, το κίνητρο και την καθοδήγηση που μου παρείχαν από την πρώτη στιγμή που εντάχθηκα στην ομάδα. Είμαι ειλικρινά ευγνώμων σε όλους και στον καθένα ξεχωριστά για τη φιλία και τις υπέροχες στιγμές που μοιραστήκαμε τόσο εντός όσο και εκτός του εργαστηρίου.

Ευχαριστώ τέλος την οικογένεια μου για την αγάπη και την ηθική και οικονομική στήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Πίνακας περιεχομένων

Κατάλογος εικόνων	6
Συντομογραφίες.....	7
Περίληψη	8
Abstract.....	9
1. Εισαγωγή	10
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	10
1.2 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	10
1.3 Δραστικές μορφές	11
1.4 Δραστικές μορφές οξυγόνου	11
1.5 Βιολογικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών	13
1.5.1 Θετικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών.....	13
1.5.2 Αρνητικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών.....	16
1.6 Αντιοξειδωτικά.....	21
1.6.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	23
1.6.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	26
1.7 Οξειδωτικό στρες	31
1.8 Νανοτεχνολογία	33
1.9 Νανοϋλικά.....	35
1.10 Έκθεση σε νανοϋλικά.....	37
1.11 Τοξικότητα νανοϋλικών	39
1.12 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την τοξικότητα	39
1.13 Αρνητικές επιδράσεις νανοϋλικών	41
2. Σκοπός της μελέτης.....	43
3. Υλικά και μέθοδοι.....	44
3.1 Υπεραπορροφητικά πολυμερή και πολυμερή τύπου πυρήνα-κελύφους.....	44
3.2 Διασπορά πολυμερών και προετοιμασία διαλυμάτων	45
3.3 Κυτταρική σειρά.....	46
3.4 Κυτταροκαλλιέργειες	46
3.5 Αξιολόγηση της επίδρασης των πολυμερών στην κυτταρική βιωσιμότητα	47
3.6 Εκτίμηση της επίδρασης των πολυμερών σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης με φασματοφωτομετρία	48
3.6.1 Προσδιορισμός των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) με φασματοφωτομετρία	50
3.6.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) με φασματοφωτομετρία.....	52

3.6.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PCARBS) με φασματοφωτομετρία.....	54
3.6.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	56
3.7 Εκτίμηση της επίδρασης των πολυμερών σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης με κυτταρομετρία ροής.....	57
3.7.1 Προσδιορισμός των ενδοκυτταρικών επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) με κυτταρομετρία ροής	59
3.7.2 Προσδιορισμός των ενδοκυτταρικών επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) με κυτταρομετρία ροής.....	60
3.8 Στατιστική ανάλυση	61
4. Αποτελέσματα	62
4.1 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας των πολυμερών στα RAW264.7	62
4.2 Προσδιορισμός της επίδρασης των πολυμερών σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στα RAW264.7	64
5. Συζήτηση	67
Βιβλιογραφία	75

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1.	Λειτουργίες των ROS στην ανοσολογική απόκριση έναντι περιβαλλοντικών παθογόνων	16
Εικόνα 2.	Σχηματική απεικόνιση μη ενζυματικής αυτοοξειδωσης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων	21
Εικόνα 3.	Το οξειδωτικό στρες και η σχέση του με την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση	32
Εικόνα 4.	Η δυναμική των ROS στα βιολογικά συστήματα	33
Εικόνα 5.	Η έννοια των προσεγγίσεων «από κάτω προς τα πάνω» (bottom-up) και «από πάνω προς τα κάτω» (top-down) και οι διαφορετικές μέθοδοι για τη σύνθεση νανοσωματιδίων	37
Εικόνα 6.	Χημική δομή του μεθακρυλικού μεθυλεστέρα και του πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα)	44
Εικόνα 7.	Μικροσκοπική απεικόνιση καλλιέργειας RAW264.7 σε χαμηλή και υψηλή πυκνότητα	46
Εικόνα 8.	Κυτταρομετρία ροής: κίνηση κυττάρων σε μονή σειρά περιβαλλόμενα από το διάλυμα κάλυψης καθώς αλληλεπιδρούν με την ακτίνα λέιζερ που συλλέγεται από ανιχνευτές	58

Συντομογραφίες

ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικές μορφές οξυγόνου
O₂^{•-}	Superoxide radical	Ρίζα σουπεροξειδικού ανιόντος
OH[•]	Hydroxyl radical	Ρίζα υδροξυλίου
RO[•]	Alkoxy radical	Ρίζα αλκοξυλίου
H₂O₂	Hydrogen peroxide	Υπεροξειδίο του υδρογόνου
¹O₂	Singlet oxygen	Μονήρες οξυγόνο
SOD	Superoxide dismutase	Υπεροξειδική δισμουτάση
CAT	Catalase	Καταλάση
GPx	Glutathione peroxidase	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GR	Glutathione reductase	Αναγωγή της γλουταθειόνης
GSH	Reduced form of glutathione	Ανηγγμένη γλουταθειόνη
GSSG	Oxidized form of glutathione	Οξειδωμένη γλουταθειόνη
O₃	Ozone	Όζον
MDA	Malondialdehyde	Μαλονδιαλδεΰδη
TAC	Total Antioxidant Capacity	Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances	Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ
PCARBS		
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2 διφαινυλ-1-πυκριλυδραζύλιο
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide	2,3-δισ-(2-μεθοξυ-4-νιτρο-5-σουλφοφαινυλ)-2H-τετραζόλιο-5-καρβοξαμίδιο
TCA	Trichloroacetic acid	Τριχλωροοξικό οξύ
DNPH	2,4-dinitrophenylhydrazine	2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline)-6-sulphonic acid	2,2-αζινοδισ-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	
PBS	Phosphate Buffered Saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
H₂DCFDA	2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate	Διοξική 2',7'-διχλωροδιυδροφθοροσκεΐνη
PMMA	Poly(methyl methacrylate)	Πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας)
PMAA	Poly(methacrylic acid)	Πολυ(μεθακρυλικό οξύ)
PnBMA	Poly(n-butyl methacrylate)	Πολυ(n-βουτυλ μεθακρυλικός μεθυλεστέρας)

Περίληψη

Τις τελευταίες δεκαετίες το ερευνητικό πεδίο της νανοτεχνολογίας έχει αναπτυχθεί ραγδαία. Αυτό η τεράστια δυναμική οδήγησε σε μια αυξανόμενη έρευνα και ανάπτυξη μιας ολόκληρης νέας κατηγορίας δομών στη νανοκλίμακα με μοναδικές φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες. Ωστόσο, αυτές οι καινοτόμες ιδιότητες και η αυξανόμενη βιομηχανική παραγωγή έχουν εγείρει έντονες ανησυχίες σχετικά με πιθανές δυσμενείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Επομένως, η καλύτερη κατανόηση των βιολογικών επιδράσεων των τεχνητών νανοϋλικών αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ασφαλή χρήση τους σε οποιαδήποτε εφαρμογή. Λαμβάνοντας υπόψη την ανάγκη αυτή, στην παρούσα εργασία έγινε μια προσπάθεια να διερευνηθεί η *in vitro* επίδραση τριών διαφορετικών, καινοτόμων πολυμερών νανοϋλικών, των πολυμερών τύπου πυρήνα-κελύφους PMMA@P(MAA-co-EGDMA) και P(nBMA-co-EGDMA)@PMMA, καθώς και του υπεραπορροφητικού πολυμερούς P(MAA-co-EGDMA)@SiO₂ στη βιωσιμότητα και στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μακροφάγων κυττάρων ποντικού RAW264.7. Εξετάστηκαν πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκάστοτε πολυμερούς (12.5, 25, 50, 100 και 200 μg/ml) για χρονικό διάστημα 8 ωρών, που αντιστοιχεί στο χρονικό διάστημα μίας τυπικής εργασιακής συνθήκης. Η κυτταροτοξικότητα εκτιμήθηκε με βάση τη χρωματομετρική μέθοδο XTT και οι βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης που μελετήθηκαν ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (PCARBS), η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) και οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Τα αποτελέσματα υπέδειξαν ότι η επώαση των κυττάρων με τα πολυμερή δεν προκάλεσε κυτταροτοξικότητα στο εξεταζόμενο εύρος συγκεντρώσεων. Σε ό,τι αφορά την εκτίμηση των βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης, το PMMA@P(MAA-co-EGDMA) δεν προκάλεσε καμία επίδραση, το P(nBMA-co-EGDMA)@PMMA προκάλεσε την επαγωγή οξειδωτικού στρες μέσω προαγωγής της λιπιδικής υπεροξειδωσης, ενώ το P(MAA-co-EGDMA)@SiO₂ επήγαγε την ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού προκειμένου να αποτραπεί η πρόκληση οξειδωτικής βλάβης.

Abstract

In recent decades, the scientific field of nanotechnology has developed rapidly. This enormous potential has led to a growing research and development of a whole new class of materials in the nanoscale with unique physicochemical and biological properties. However, these novel properties and the increasing industrial production have raised serious concerns regarding the potential adverse effects on human health. Therefore, the acquisition of a better understanding of the biological effects of engineered nanomaterials is a prerequisite for their safe use. Based on the above, in the present study we investigated the effects of core-shell polymers PMMA@P(MAA-co-EGDMA) and P(nBMA-co-EGDMA)@PMMA, as well as of the superabsorbent polymer P(MAA-co-EGDMA)@SiO₂ on cell viability and redox state of mouse macrophages RAW264.7. Five different concentrations of each polymer (12.5, 25, 50, 100 and 200 µg/ml) were tested over a period of 8 hours. Cytotoxicity was assessed using the colorimetric XTT assay and the redox biomarkers studied were total antioxidant capacity (TAC), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyls (PCARBS), reduced glutathione (GSH) and reactive oxygen species (ROS). The results showed that the incubation of RAW264.7 with each of the three polymers did not induce any cytotoxicity at the concentration range tested. Regarding the redox biomarkers, PMMA@P(MAA-co-EGDMA) did not cause any effects, P(nBMA-co-EGDMA)@PMMA induced oxidative stress via the promotion of lipid peroxidation, and P(MAA-co-EGDMA)@SiO₂ caused the activation of antioxidant mechanisms to prevent oxidative damage.

1. Εισαγωγή

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται οποιαδήποτε άτομο ή μόριο με ικανότητα αυτόνομης ύπαρξης που διαθέτει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους (Di Meo & Venditti, 2020). Η διαθέσιμη ενέργεια, λόγω της παρουσίας του ασύζευκτου ηλεκτρονίου, είναι υπεύθυνη για την υψηλή τους δραστηριότητα και αστάθεια, καθώς και για το σύντομο χρόνο ημιζωής τους (Lobo et al., 2010). Τα παραπάνω χαρακτηριστικά έχουν σαν αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες να προσβάλλουν άλλα μόρια, προκειμένου να συμπληρώσουν την εξωτερική στιβάδα σθένους τους, αποσπώντας ηλεκτρόνια και οδηγώντας σε αλυσιδωτές αντιδράσεις με τελική συνέπεια την πρόκληση κυτταρικής βλάβης (Rahman, 2007).

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν φυσιολογικά παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού (Phaniendra et al., 2015). Ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά στα βιολογικά συστήματα στα μέσα του προηγούμενου αιώνα και αρχικά θεωρήθηκαν ως πηγή αποκλειστικά επιβλαβών επιπτώσεων στους οργανισμούς. Τα επόμενα χρόνια, το ενδιαφέρον για την επίδραση των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά μακρομόρια αυξήθηκε και μια νέα εποχή ξεκίνησε όταν μερικές δεκαετίες αργότερα έγινε κατανοητή η απαραίτητη και ευεργετική τους δράση στα βιολογικά συστήματα. Στην εποχή μας είναι πλέον σαφές ότι οι οργανισμοί όχι μόνο έχουν προσαρμοστεί στη συνύπαρξη με τις ελεύθερες ρίζες, αλλά έχουν αναπτύξει και μηχανισμούς για την αξιοποίησή τους προς όφελος του εκάστοτε βιολογικού συστήματος (Dröge, 2002).

1.2 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς πηγές. Σε ότι αφορά τις ενδογενείς πηγές, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται διαρκώς στα κύτταρα μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, της φαγοκυττάρωσης, του συστήματος του κυτοχρώματος P-450, της λειτουργίας των υπεροξειδωσωμάτων και της αυτοοξειδωσης των μονοαμινών και της αιμοσφαιρίνης. Από την άλλη, οι εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν την έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως στην υπεριώδη ακτινοβολία και τις ακτίνες X και γάμμα, σε βιομηχανικούς διαλύτες και βαρέα μέταλλα, στον καπνό του τσιγάρου και το αλκοόλ, καθώς επίσης και διάφορους τρόπους μαγειρέματος

(καπνιστό κρέας, επανααρησιμοποιημένο λάδι, ψήσιμο σε κάρβουνα) και τη λήψη ορισμένων φαρμάκων (Pham-Huy et al., 2008).

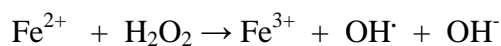
1.3 Δραστικές μορφές

Οι δραστικές μορφές αποτελούν μια ευρύτερη κατηγορία, η οποία περιλαμβάνει μόρια ή άτομα με οξειδωτική δράση ανεξαρτήτως του αν χημικά εμπíπτουν στις ελεύθερες ρίζες. Οι δραστικές μορφές μπορούν να διακριθούν σε κατηγορίες με βάση το κεντρικό τους άτομο και μεταξύ αυτών, οι σημαντικότερες είναι αυτές που προέρχονται από το οξυγόνο και ονομάζονται δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Ο συγκεκριμένος όρος περιλαμβάνει ριζικά αλλά και μη ριζικά παράγωγα οξυγόνου που είτε δρουν ως οξειδωτικά είτε μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε ελεύθερες ρίζες (Bedard & Krause, 2007). Οι ρίζες σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υδροξυλίου (OH^{\cdot}), περοξυλίου (ROO^{\cdot}), αλκοξυλίου (RO^{\cdot}) και υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}) αποτελούν παραδείγματα ριζικών παραγώγων οξυγόνου, ενώ το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), το όζον (O_3), το μονήρες οξυγόνο (1O_2) και τα ιόντα νιτροξυλίου (NO^+ , NO^-) περιλαμβάνονται στις μη ρίζες (Phaniendra et al., 2015). Πέραν των δραστικών μορφών οξυγόνου, στις δραστικές μορφές ανήκουν και οι δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS), οι δραστικές μορφές θείου (reactive sulphur species, RSS), οι δραστικές μορφές χλωρίου (reactive chlorine species, RCS) και οι δραστικές μορφές βρωμίου (reactive bromine species, RBS), οι οποίες προέρχονται από το άζωτο, το θείο, το χλώριο και το βρώμιο αντίστοιχα (Halliwell and Gutteridge, 2015).

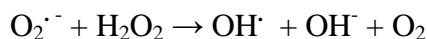
1.4 Δραστικές μορφές οξυγόνου

Ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot})

Η ρίζα υδροξυλίου αποτελεί την πιο δραστική μορφή οξυγόνου και τον τελικό διαμεσολαβητή των περισσότερων βλαβών στους οργανισμούς που σχετίζονται με αυτές. Έχει μικρό χρόνο ημιζωής και μπορεί να αντιδράσει μη ειδικά με όλα σχεδόν τα βιομόρια του κυττάρου (σάκχαρα, πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα), σε κοντινή απόσταση από το σημείο παραγωγής της. Η βασική οδός παραγωγής της ρίζας υδροξυλίου *in vivo* είναι μέσω της αντίδρασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου με ένα μέταλλο μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος ή ο χαλκός. Η αντίδραση με τον δισθενή σίδηρο περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1894 και είναι γνωστή ως αντίδραση Fenton:



Η ρίζα υδροξυλίου μπορεί επίσης να σχηματιστεί κατά την αντίδραση της ρίζας σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^\cdot^-$) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), γνωστή και ως αντίδραση Haber-Weiss, παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης (Young & Woodside, 2001; Chen & Schopfer, 1999):



Ρίζα σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^\cdot^-$)

Η ρίζα σουπεροξειδίου αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μορφές ROS και μπορεί να σχηματιστεί με διάφορους μηχανισμούς *in vivo*, συμπεριλαμβανομένων ενζυμικών αντιδράσεων, αντιδράσεων αυτοοξειδωσης και μη ενζυμικών αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων, αν και η δραστηκότητά της με τα βιομόρια είναι χαμηλή. Σε χαμηλό pH το σουπεροξείδιο βρίσκεται στη μορφή της ρίζας υδροπεροξυλίου (HO_2^\cdot), μορφή με την οποία μπορεί διαπεράσει τις φωσφολιπιδικές μεμβράνες. Υπό φυσιολογικές τιμές pH η επικρατέστερη μορφή είναι το σουπεροξείδιο, το οποίο λειτουργεί ως αναγωγικός παράγοντας για σύμπλοκα σιδήρου όπως το κυτόχρωμα c, ή ως οξειδωτικός παράγοντας για αντιοξειδωτικά μόρια, όπως η βιταμίνη C και η τοκοφερόλη.

Η ρίζα σουπεροξειδίου σχηματίζεται κατά την αναγωγή του οξυγόνου από ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο (e^-). Παράγεται κυρίως στα μιτοχόνδρια, ως αποτέλεσμα της διαρροής e^- προς το O_2 κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Το σύμπλοκο I απελευθερώνει σουπεροξείδιο στη μήτρα, ενώ το σύμπλοκο III τόσο στη μήτρα όσο και στον διαμεμβρανικό χώρο (Brand, 2010). Επίσης, σουπεροξείδιο μπορεί να παραχθεί και μέσω ενζυμικών αντιδράσεων, όπως μέσω της δράσης της λιποξυγενάσης και της κυκλοξυγενάσης (Phaniendra et al., 2015; Young & Woodside, 2001).

Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)

Όπως έχει αναφερθεί, το υπεροξείδιο του υδρογόνου δεν αποτελεί το ίδιο ρίζα, ωστόσο συμπεριλαμβάνεται στην κατηγορία των ROS. Μπορεί εύκολα να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες και να διαχυθεί σε μεγάλες αποστάσεις πριν αποικοδομηθεί προς σχηματισμό της ρίζας υδροξυλίου, δρώντας έτσι σαν

μεσολαβητής στη «μεταφορά» των επαγόμενων από δραστικές μορφές οξυγόνου βλαβών μεταξύ διαφορετικών κυττάρων και κυτταρικών διαμερισμάτων (Young & Woodside, 2001).

Το ίδιο το υπεροξειδίο του υδρογόνου έχει χαμηλή δραστηριότητα και δρα σαν ασθενής οξειδωτικός ή αναγωγικός παράγοντας. Δεν ασκεί άμεση επίδραση σε βιομόρια, όπως το DNA, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες, με εξαίρεση αυτές που περιέχουν σουλφυδρυλομάδες ή κατάλοιπα μεθειονίνης. Ωστόσο, μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο DNA μέσω της παραγωγής της ρίζας υδροξυλίου είτε μετά από την έκθεση σε ακτινοβολία UV, είτε παρουσία μετάλλων μετάπτωσης, κυρίως σιδήρου (Phaniendra et al., 2015).

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου σχηματίζεται από την αντίδραση δύο ριζών σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), η οποία καταλύεται από το αντιοξειδωτικό ένζυμο σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD) σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση (Halliwell et al., 2000):



1.5 Βιολογικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Σήμερα είναι πλέον καλά τεκμηριωμένο ότι οι ελεύθερες ρίζες, ανάλογα με το κυτταρικό περιβάλλον και τη συγκέντρωσή τους, μπορούν να έχουν τόσο ευεργετικές όσο και επιβλαβείς επιδράσεις στους οργανισμούς. Σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις, οι ROS και RNS ασκούν ευεργετικά αποτελέσματα σε πολλές κυτταρικές αποκρίσεις και στη λειτουργία του ανοσοποιητικού, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούν βλάβη στα μακρομόρια του κυττάρου και οξειδωτικό στρες, μια επιβλαβή κατάσταση με αρνητικές συνέπειες για τη δομή και τη λειτουργία των κυττάρων (Rahman, 2007; Pham-Huy et al., 2008). Έτσι, καθίσταται σαφές ότι η λεπτή ισορροπία μεταξύ αρνητικών και θετικών επιδράσεων των ROS αποτελεί μία σημαντική πτυχή της ζωής (Dröge, 2002).

1.5.1 Θετικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Ήδη από την προηγούμενη δεκαετία κατέστη σαφές στην επιστημονική κοινότητα ότι οι οργανισμοί δεν έχουν απλά προσαρμοστεί στη συνύπαρξη με τις

ελεύθερες ρίζες, αλλά έχουν αναπτύξει και μηχανισμούς για την χρησιμοποίησή τους προς όφελος τους (Dröge, 2002). Οι ROS λειτουργούν διεγερτικά σε διάφορες φυσιολογικές βιοχημικές διεργασίες εντός του κυττάρου, που περιλαμβάνουν την κυτταρική ανάπτυξη, την έκφραση γονιδίων και την άμυνα έναντι παθογόνων (Rani and Yadav, 2015). Πιο συγκεκριμένα, οι ROS και οι RNS ρυθμίζουν τη δράση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων, όπως των NF-κB (Nuclear factor kappa B) και Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) και την έκφραση γονιδίων και καταρρακτών σηματοδότησης πρωτεϊνικών κινασών. Ως εκ τούτου, ανάλογα με την κυτταρική τοποθέτηση, την ποσότητα και το είδος τους, να μπορούν να επάγουν ή να καταστέλλουν κυτταρικές διεργασίες, όπως η απόπτωση και η αυτοφαγία (Kaminsky & Zhivotovsky, 2014).

Επιπρόσθετα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και το μονοξειδίο του αζώτου (NO•) εμπλέκονται στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου. Συγκεκριμένα, οι δύο αυτές δραστικές μορφές φαίνεται να ενεργοποιούν το ένζυμο γουανυλική κυκλάση (guanylate cyclase, GC), η οποία καταλύει τον σχηματισμό της κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) που ρυθμίζει τη λειτουργία πλήθους πρωτεϊνικών κινασών, καναλιών ιόντων και άλλων κυτταρικών στόχων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου και την αναστολή της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων (Valko et al., 2007).

Οι ROS συμμετέχουν επίσης στην κυτταρική προσκόλληση, διαδικασία σημαντική για την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση και για την επούλωση πληγών, μεταξύ άλλων. Συγκεκριμένα, οι ROS επάγουν την προσκόλληση λευκοκυττάρων, όπως τα ουδετερόφιλα, σε ενδοθηλιακά κύτταρα, προκαλώντας για παράδειγμα τη φωσφορυλίωση της κινάσης εστιακής προσκόλλησης pp125^{FAK} η οποία εμπλέκεται στη διαδικασία (Dröge, 2002).

Σε ό,τι αφορά το ανοσοποιητικό σύστημα, η πρώτη αναφορά ότι οι ROS εμπλέκονται στην έμφυτη και επίκτητη ανοσία του οργανισμού έγινε το 1973 όταν οι Babior et al. παρατήρησαν ότι ενεργοποιημένα μακροφάγα και ουδετερόφιλα σε περιβάλλον φλεγμονής παράγουν μεγάλες ποσότητες O₂⁻ και άλλων ROS μέσω μιας ισομορφής του ενζύμου οξειδάση του φωσφορικού νικοτιναμινο-αδενινοδινουκλεοτιδίου (NADPH). Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως αναπνευστική ή οξειδωτική έκρηξη και αποτελεί βασικό όπλο των φαγοκυττάρων για την άμηση

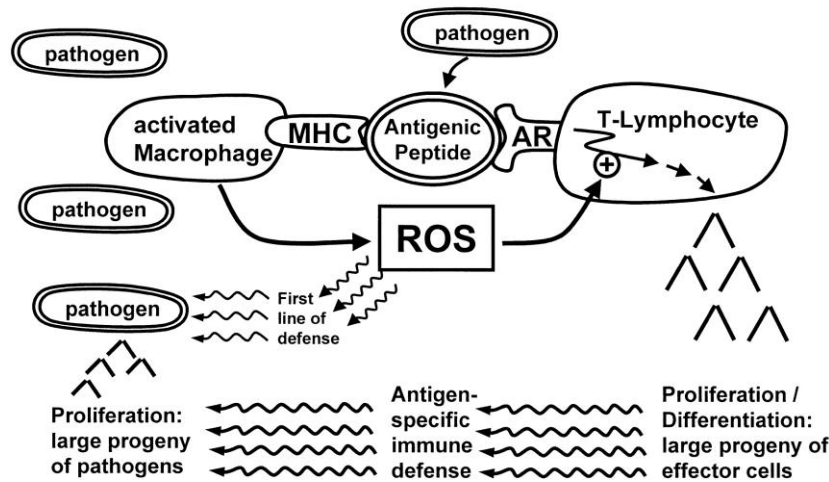
εξουδετέρωση των παθογόνων μικροοργανισμών μέσω οξειδωσης των μακρομορίων τους από τις παραγόμενες ROS. Πέραν του $O_2^{\cdot-}$, κατά την αναπνευστική έκρηξη παράγονται επίσης μεγάλες ποσότητες υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), μέσω του ενζύμου σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD), καθώς και υποχλωριώδους οξέος (HClO) και μονήρους οξυγόνου (1O_2) (Dröge, 2002; Yang et al., 2013).

Πέραν της άμεσης μικροβιοκτόνου δράσης τους, έχει πλέον καταστεί σαφές ότι οι ROS παίζουν πολλαπλούς ρόλους στη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως στην ενεργοποίηση και αλληλεπίδραση των ανοσοποιητικών κυττάρων και στην ανοσοκαταστολή (Yang et al., 2013). Επί παραδείγματι, έχει βρεθεί ότι η ενεργοποίηση των T- λεμφοκυττάρων ενισχύεται σημαντικά από τις ROS ή και από μια μετατόπιση στην ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση της γλουταθειόνης, δηλαδή τον λόγο ανηγμένης/οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH:GSSG). Η παραγωγή ιντερλευκίνης 2 από ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα έχει βρεθεί ότι αυξάνεται σημαντικά από υψηλές συγκεντρώσεις ριζών σουπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Οι παραγόμενες ROS σε περιβάλλον φλεγμονής δρουν ενισχύοντας καταρράκτες σηματοδότησης που ενεργοποιούν τα T-λεμφοκύτταρα. Η ενισχυτική δράση των ROS στον καταρράκτη σηματοδότησης, που ξεκινά με την παρουσίαση των αντιγονικών πεπτιδίων σε αντιγονικούς υποδοχείς των T-λεμφοκυττάρων, μειώνει το κατώφλι ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων και επιτρέπει την ενεργοποίηση του ανοσολογικού μηχανισμού ήδη από μικρές συγκεντρώσεις αντιγονικών πεπτιδίων, παρέχοντας πολύτιμο χρόνο στον οργανισμό για άμεση ανοσολογική απόκριση έναντι των πολλαπλασιαζόμενων παθογόνων (Dröge, 2002).

Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η κυτταροτοξικότητα των κυττάρων φυσικών φονέων (Natural Killers, NK) μπορεί να κατασταλεί από τις ROS, που εμπλέκονται επίσης στη ρύθμιση της ενεργοποίησης και απόπτωσης των T-κυττάρων (Yang et al., 2013).

Function of ROS in the immunological response against environmental pathogens



Εικόνα 1. Λειτουργίες των ROS στην ανοσολογική απόκριση έναντι περιβαλλοντικών παθογόνων (Πηγή: Dröge, 2002).

Επιπλέον, ελεύθερες ρίζες, και ειδικότερα το υπεροξειδίο του υδρογόνου έχει βρεθεί ότι επιδρά στη δραστικότητα ενζύμων όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες, μέσω αντιστρεπτής οξειδωσης της σουλφυδρυλομάδας καταλοίπων κυστεΐνης στο καταλυτικό κέντρο των ενζύμων, προς σουλφενικό οξύ. Τέτοιες τροποποιήσεις έχουν σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης (PTK) ή πρωτεϊνικών φωσφατασών τυροσίνης (PTP) που εμπλέκονται σε πλήθος κυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης (Yang et al., 2013). Καθίσταται έτσι σαφές ότι μέσω της ρύθμισης βασικών κυτταρικών ενζύμων, οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν σημαντικούς δευτέρους αγγελιαφόρους.

1.5.2 Αρνητικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Οι αυξημένες συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών και η επακόλουθη ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μορίων οδηγεί σε βλάβες στα βιολογικά μακρομόρια, όπως τα νουκλεϊκά οξέα, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια (Phaniendra et al., 2015). Από τις ROS, η ρίζα υδροξυλίου είναι εξαιρετικά δραστική καθότι προκαλεί χημικές μεταβολές στα βιολογικά μακρομόρια, ενώ η ρίζα σουπεροξειδίου και το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν συμμετέχουν άμεσα σε τέτοιες αντιδράσεις (Dizdaroglu & Jaruga, 2012).

Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA)

Σε σχέση με τα υπόλοιπα βιολογικά μακρομόρια, η οξειδωτική βλάβη στο DNA έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς μπορεί να οδηγήσει στην πρόκληση γενετικών μεταλλάξεων και την εμφάνιση καρκίνου (Santo et al., 2016). Σε σχέση με το πυρηνικό DNA, το μιτοχονδριακό DNA είναι αυτό που λόγω της εγγύτητας του με τη θέση παραγωγής των ROS, είναι περισσότερο ευάλωτο στην οξειδωτική βλάβη (Phaniendra et al., 2015).

Οι επαγόμενες από τις ελεύθερες ρίζες οξειδωτικές βλάβες στο DNA είναι διαφόρων ειδών και περιλαμβάνουν τροποποιήσεις των αζωτούχων βάσεων, διαγραφές βάσεων, μετατοπίσεις αναγνωστικού πλαισίου, θραύσεις της δίκλωνης αλυσίδας, διασυνδέσεις (cross links) DNA-πρωτεϊνών και αναδιατάξεις χρωμοσωμάτων (Valko et al., 2004). Είναι γνωστό ότι η ρίζα υδροξυλίου, η πιο δραστική ROS, μπορεί να αντιδράσει με το σύνολο των συστατικών ενός μορίου DNA, δηλαδή τόσο με τις βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης όσο και με τον σκελετό της δεοξυριβόζης (Valko et al., 2007).

Μεταξύ των βάσεων DNA, η γουανίνη είναι ο καλύτερος δότης ηλεκτρονίων και συνιστά τον προτιμότερο στόχο οξείδωσης από ROS (Dizdaroglu & Jaruga, 2012). Ο σχηματισμός της 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνης (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 8-OH-dG) αποτελεί την πιο ευρύτερα μελετημένη οξειδωτική βλάβη των ελευθέρων ριζών στο DNA και έχει χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την εκτίμηση κινδύνου για περιπτώσεις καρκίνου και εκφυλιστικών ασθενειών (Valavanidis et al., 2009). Η 8-OH-dG δημιουργείται κατόπιν επίδρασης της ρίζας υδροξυλίου στη θέση C-8 της γουανοσίνης. Περαιτέρω οξείδωση της μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό μιας πυριμιδίνης, όπως η θυμίνη. Δεδομένου όμως ότι κατά την αντιγραφή του DNA η θυμίνη ζευγαρώνεται με την αδενίνη, εάν το λάθος δεν επιδιορθωθεί, η μετάλλαξη μεταστροφής (GC → TA) που δημιουργείται στη θέση εκείνη μπορεί να οδηγήσει σε επιβλαβείς συνέπειες για τον οργανισμό και έχει σχετιστεί με διάφορους καρκίνους (Santo et al., 2016).

Πέραν της γουανοσίνης, η ρίζα υδροξυλίου επιδρά και στις υπόλοιπες βάσεις σχηματίζοντας τροποποιημένα προϊόντα πουρινών (8-υδροξυδεοξυ γουανοσίνη, 8-υδροξυ δεοξυ αδενοσίνη), πυριμιδινών (γλυκόλη της θυμίνης και της ουρακίλης, 5-υδροξυδεοξυ ουριδίνη, 5-υδροξυ δεοξυκυτιδίνη, υδαντοΐνη), αλλά και του σκελετού σακχάρου του DNA (γλυκολικό οξύ, ερυθρόζη). Πέραν των ROS και οι RNS, με

κυριότερο το υπεροξυνιτρώδες ανιόν (OONO^-), επιδρούν στις βάσεις του DNA σχηματίζοντας επιβλαβή προϊόντα (Phaniendra et al., 2015).

Εκτός από τις οξειδωτικές τροποποιήσεις των βάσεων, οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται και σε ευρύτερες τροποποιήσεις του γονιδιώματος σε επίπεδο χρωμοσωμάτων. Η λανθασμένη επιδιόρθωση των θραύσεων ή η λανθασμένη αντιγραφή οδηγούν σε μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, που μπορούν να προκαλέσουν την εμφάνιση καρκίνου (Valko et al., 2004).

Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες, όντας η μεγαλύτερη ομάδα βιολογικών μακρομορίων, αποτελούν τους συχνότερους στόχους οξειδωτικής βλάβης από τις ελεύθερες ρίζες και συνεπώς οι οξειδωτικές τροποποιήσεις τους, όπως η καρβονυλίωση τους, χρησιμοποιούνται συχνά ως βιοδείκτες για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες (Pajares et al., 2018). Οι οξειδωτικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών περιλαμβάνουν κατακερματισμό της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, οξείδωση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων και δημιουργία διασυνδέσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και προκαλούνται από ROS και RNS, όπως για παράδειγμα τις ρίζες σουπεροξειδίου, υδροξυλίου, περοξυλίου, αλκοξυλίου αλλά και μη ριζικά παράγωγα όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το μονήρες οξυγόνο και ο περοξυνιτρίτης. (Phaniendra et al., 2015; Santo et al., 2016).

Η οξείδωση του πολυπεπτιδικού σκελετού των πρωτεϊνών ξεκινά με την απόσπαση του α-ατόμου υδρογόνου ενός αμινοξέος από τη ρίζα υδροξυλίου, η οποία μπορεί να προέλθει από ραδιόλυση του νερού ή διάσπαση υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η ρίζα με επίκεντρο τον άνθρακα που δημιουργείται από την αντίδραση αυτή μπορεί είτε να αντιδράσει με μια αντίστοιχη ρίζα, προς δημιουργία ενός παραγώγου διασύνδεσης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, είτε να αντιδράσει με το οξυγόνο (O_2), προς τελικό σχηματισμό μιας αλκοξυλικής ρίζας ή και ενός παραγώγου υδροξυλ-πρωτεΐνης (Berlett & Stadtman, 1997). Η πρωτεϊνική αλκοξυλική ρίζα μπορεί να υποστεί διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού και τελικά να οδηγήσει σε κατακερματισμό της πολυπεπτιδικής αλυσίδας (Santo et al., 2016).

Σε ό,τι αφορά την οξείδωση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, η κυστεΐνη και η μεθειονίνη είναι τα δύο θειούχα αμινοξέα που σε σχέση με τα

υπόλοιπα αμινοξικά κατάλοιπα εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία σε οξειδωτική βλάβη από ελεύθερες ρίζες και μετατρέπονται σε δισουλφίδια και σουλφοξειδία αντίστοιχα (Santo et al., 2016). Αυτές είναι και οι μοναδικές οξειδωτικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών που μπορούν να επιδιορθωθούν από τα βιολογικά συστήματα με τη μεσολάβηση ενζύμων όπως αναγωγάσες δισουλφιδίων και σουλφοξειδίων (Phaniendra et al., 2015).

Επίσης, οξειδωτικές τροποποιήσεις υφίστανται και τα υπόλοιπα αμινοξέα προς σχηματισμό, για παράδειγμα, νιτροτροπτοφάνης και κινουρενίνης από την τροπτοφάνη, 2-αμινο-3-κετοβουτυρικού οξέος από τη θρεονίνη, οξοϊστιδίνης, ασπαραγίνης και ασπαρτικού οξέος από την ιστιδίνη, καταλοίπων υδροξυλίου από τη λευκίνη και τη βαλίνη κ.α. (Berlett & Stadtman, 1997). Ιδιαίτερη αναφορά αξίζει να γίνει στην τυροσίνη, η οποία με αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου μετατρέπεται στη ρίζα τυροσίνης που μπορεί να αντιδράσει με RNS προς σχηματισμό 3-νιτροτυροσίνης, μία μη αντιστρεπτή τροποποίηση. Η 3-νιτροτυροσίνη καθώς και άλλα προϊόντα της οξειδωτικής τροποποίησης της τυροσίνης, όπως η Ο-τυροσίνη, χρησιμοποιούνται ως βιοδείκτες για την εκτίμηση της οξειδωτικής τροποποίησης των πρωτεϊνών από ROS και RNS. (Phaniendra et al., 2015; Santo et al., 2016).

Τελικό αποτέλεσμα της οξειδωτικής τροποποίησης των πρωτεϊνών είναι η απώλεια της διαμόρφωσης και της δραστικότητάς τους, διευκολύνοντας τη δημιουργία συσσωματωμάτων και παραγώγων διασύνδεσης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, καθιστώντας τες ανθεκτικές στην πρωτεόλυση (Pajares et al., 2018). Η συσσώρευση λανθασμένα αναδιπλούμενων πρωτεϊνών που δεν είναι δυνατό να αποικοδομηθούν οδηγεί τελικά σε διαταραχή της κυτταρικής λειτουργίας και κυτταρικό θάνατο και έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση καρδιομυοπαθειών, της νόσου Alzheimer και αμυλοείδωσης (Santo et al., 2016).

Πέραν των οξειδωτικών τροποποιήσεων των πλευρικών αλυσίδων, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες οι πρωτεΐνες υφίστανται και καρβονυλίωση, μία μη αναστρέψιμη διαδικασία. Καρβονυλομάδες (αλδεΐδες, κετόνες και λακτάμες) μπορούν να προστεθούν στις πρωτεΐνες κατόπιν άμεσης οξείδωσης τους από ROS και οξειδωμένες πολυφαινόλες, καθώς και κατόπιν αντίδρασης με αλδεΐδες που παράγονται κατά την υπεροξείδωση των λιπιδίων ή με δραστικά καρβονυλικά παράγωγα (κετοαλδεΐδες, κετοαμίνες) τα οποία παράγονται μετά από αντίδραση

καταλοίπων λυσίνης με αναγωγικά σάκχαρα ή τα προϊόντα οξειδωσής τους (Berlett & Stadtman, 1997; Akagawa, 2021). Μπορεί επίσης να συμβεί ενζυματική καρβονυλίωση καταλοίπων λυσίνης από τη λυσουλ-οξειδάση (Akagawa, 2021). Ιδιαίτερα ευαίσθητα σε τέτοιες τροποποιήσεις φαίνεται ότι είναι τα κατάλοιπα λυσίνης, αργινίνης, προλίνης και θρεονίνης (Santo et al., 2016). Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια χρησιμοποιούνται ευρέως σαν δείκτης της διαμεσολαβούμενης από τις ROS πρωτεϊνικής οξειδωσής και έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι για την ανίχνευση τους (Berlett & Stadtman, 1997).

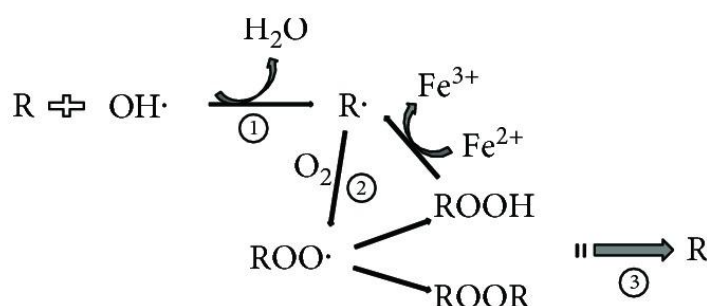
Λιπίδια

Λόγω της μεγάλης παραγωγής ROS στις κυτταρικές μεμβράνες ή τις μεμβράνες των οργανιδίων και των υψηλών επιπέδων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) που αυτές περιέχουν, οι βιολογικές μεμβράνες είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς στις βλάβες από ROS (Su et al., 2019). Η αντίδραση των ελευθέρων ριζών με λιπίδια που περιλαμβάνουν διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα, και ιδιαίτερα με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ονομάζεται λιπιδική υπεροξειδωση και μπορεί να συμβεί και ενζυματικά με τη μεσολάβηση της λιποξυγενάσης. Όσο περισσότερους διπλούς δεσμούς περιέχει ένα λιπαρό οξύ, τόσο πιο εύκολα μπορεί να υποστεί υπεροξειδωση. Μεταξύ των ROS, η ρίζα υδροξυλίου και ο περοξυνιτρίτης μπορούν να επηρεάσουν καταλυτικά τα λιπίδια (Santo et al., 2016).

Συνολικά, η διαδικασία της υπεροξειδωσης των λιπιδίων αποτελείται από τρία στάδια: την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό. Η διαδικασία εκκινεί με την μεσολαβούμενη από ελεύθερη ρίζα απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου από μεθυλομάδες (CH_2) λιπαρών οξέων προς σχηματισμό μιας λιπιδικής ελεύθερης ρίζας με επίκεντρο τον άνθρακα ($\text{R}\cdot$). Στο στάδιο της διάδοσης, η $\text{R}\cdot$ αντιδρά με μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα το σχηματισμό λιπιδικής ρίζας περοξυλίου ($\text{R-OO}\cdot$). Στο σημείο αυτό, η προκύπτουσα $\text{R-OO}\cdot$ μπορεί είτε να αντιδράσει με γειτονικά PUFA αφαιρώντας ένα άτομο υδρογόνου προς σχηματισμό λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων (R-OOH) είτε να προστεθεί σε άλλα φωσφολιπίδια προς σχηματισμό διμερών $\text{R-OO-R}\cdot$ (Su et al., 2019). Τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία μπορούν να υποστούν αναγωγική διάσπαση με αποτέλεσμα την παραγωγή ριζών αλκοξυλίου και υδροξυ-λιπαρών οξέων. Επιπλέον, ενδομοριακές αντιδράσεις μπορούν να παράξουν σύνθετα κυκλικά

μόρια που θα σχηματίσουν ενδοϋπεροξειδία, με τα ισοπροστάνια να είναι τα πιο μελετημένα εξ' αυτών (Santo et al., 2016). Γίνεται συνεπώς κατανοητό ότι η μετατροπή των PUFA σε λιπιδικές ελεύθερες ρίζες οδηγεί σε αλυσιδωτές αντιδράσεις υπεροξειδωσις. Η διαδικασία ολοκληρώνεται όταν στο τελευταίο στάδιο, τον τερματισμό, οι διάφορες ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τις αλυσιδωτές αντιδράσεις αντιδρούν μεταξύ τους προς σχηματισμό σταθερών μορίων ή εξουδετερώνονται από τα αντιοξειδωτικά (Su et al., 2019). Τελικό αποτέλεσμα της λιπιδικής υπεροξειδωσις είναι ο κατακερματισμός της ανθρακικής αλυσίδας των λιπαρών οξέων και η απελευθέρωση ενώσεων όπως η μαλονδιαλδεύδη (MDA), η ακρολεΐνη και η 4-υδροξυ-2-νονενάλη (HNE). Πρόκειται για ενώσεις με διάφορες βιολογικές λειτουργίες, που προκαλούν βλάβες στο DNA και τις πρωτεΐνες και εμπλέκονται στην καρκινογένεση και την εμφάνιση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων (Santo et al., 2016).

Αξίζει να αναφερθεί ότι πέραν της λιπιδικής υπεροξειδωσις από ROS, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μπορούν να υποστούν και λιπιδική νιτροζυλίωση από RNS, που οδηγεί στην παραγωγή λιπιδικών ελευθέρων ριζών και ενώσεων, όπως νιτροαλκένια και αλκυλικά νιτρώδη (Santo et al., 2016).



Εικόνα 2. Μη ενζυματική αυτοοξειδωσις πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. R: πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που περιέχουν φωσφολιπίδια, R·: ρίζα αλκοξυλίου, ROO·: ρίζα περοξυλίου, ROOH: λιπιδικό υδροϋπεροξειδίο. Οι αριθμοί ①, ②, ③ αναπαριστούν τα στάδια έναρξης, διάδοσης και τερματισμού αντίστοιχα (Πηγή: Su et al., 2019).

1.6 Αντιοξειδωτικά

Για τα περισσότερα ζωντανά όντα, το οξυγόνο είναι ένα μόριο απαραίτητο για τη ζωή, καθώς αποτελεί τη βάση για τις βιολογικές οξειδώσεις που συμμετέχουν στην παραγωγή ενέργειας στα μιτοχόνδρια των κυττάρων. Παρόλη την ανάγκη των οργανισμών για οξυγόνο, το αέριο αυτό είναι εγγενώς επικίνδυνο για την ύπαρξη

τους και μπορεί να δράσει τοξικά (Halliwell, 2006; Di Meo & Venditti, 2020). Ακριβώς αυτή η όψη της αερόβιας ζωής χαρακτηρίστηκε από τον Davies ως το «Παράδοξο του Οξυγόνου» (Davies, 1995). Για την επιβίωση τους λοιπόν παρουσία του οξυγόνου, οι οργανισμοί ανέπτυξαν εξειδικευμένους αμυντικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Di Meo & Venditti, 2020).

Ιστορικά, ο όρος «αντιοξειδωτικό» αναφερόταν σε οποιαδήποτε χημική ουσία απέτρεπε την κατανάλωση οξυγόνου (Lobo et al., 2010). Μία σύγχρονη προσέγγιση, ορίζει το αντιοξειδωτικό ως οποιαδήποτε ουσία ικανή να αποτρέψει, να καθυστερήσει ή να επιδιορθώσει την οξειδωτική βλάβη σε ένα μόριο-στόχο. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην εξουδετέρωση των δραστικών μορφών, στην αναστολή της παραγωγής ελευθέρων ριζών, στη δέσμευση μεταλλικών ιόντων που είναι απαραίτητα για την παραγωγή των οξειδωτικών μορίων και στη ρύθμιση της δραστηριότητας της αντιοξειδωτικής άμυνας (Santo et al., 2016). Θα μπορούσαμε λοιπόν να κατατάξουμε την δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών σε διάφορα επίπεδα. Στο πρώτο επίπεδο ανήκουν τα συστήματα που δρουν προληπτικά, καταστέλλοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσω αναγωγής υδροϋπεροξειδίων και απομάκρυνσης μεταλλικών ιόντων. Στο δεύτερο επίπεδο περιλαμβάνονται τα αντιοξειδωτικά που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες αποτρέποντας την έναρξη ή σταματώντας τη διάδοση των αλυσιδωτών αντιδράσεων στις οποίες αυτές εμπλέκονται. Το τρίτο επίπεδο αντιοξειδωτικής άμυνας αναφέρεται σε όλα τα συστήματα που αναγνωρίζουν, αποικοδομούν, απομακρύνουν και αποτρέπουν τη συσσώρευση όλων των οξειδωτικά τροποποιημένων παραγώγων (Lobo et al., 2010).

Τα αντιοξειδωτικά συστήματα μπορεί να είναι είτε ενδογενή μόρια και ένζυμα είτε ενώσεις που προσλαμβάνονται εξωγενώς από τη διατροφή (Santo et al., 2016). Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν διάφορες βιταμίνες, λιπόφιλες ενώσεις, αλλά και ενζυμικά συστήματα (Pajares et al., 2018).

Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριες ομάδες, τα ενζυμικά και τα μη ενζυμικά. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά μπορούν να διακριθούν περαιτέρω σε πρωτογενή και δευτερογενή. Τα πρωτογενή περιλαμβάνουν ένζυμα, όπως την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), την καταλάση (CAT), την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και τις υπεροξειρεδοξίνες που αποτρέπουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών ή τις εξουδετερώνουν, ενώ στα δευτερογενή ανήκουν

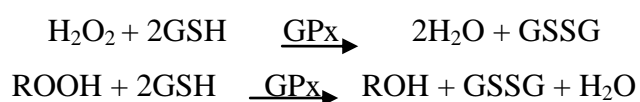
ένζυμα όπως η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD), που δεν εξουδετερώνουν άμεσα τις ελεύθερες ρίζες αλλά δρουν επικουρικά σε άλλα αντιοξειδωτικά (Aslani & Ghobadi, 2016).

Από την άλλη πλευρά, τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε μεταβολικά και θρεπτικά. Τα μεταβολικά παράγονται στον οργανισμό μέσω μεταβολικών μοναπατιών και περιλαμβάνουν τη γλουταθειόνη (GSH), τηθειορεδοξίνη (Trx), τη γλουταρεδοξίνη (Grx), το συνένζυμο Q10 (CoQ), τη μελατονίνη, το ουρικό οξύ, το λιποϊκό οξύ, τη χολερυθρίνη και τις μεταλλικές χηλικές πρωτεΐνες, μεταξύ άλλων. Τα θρεπτικά αντιοξειδωτικά είναι εξωγενή συστατικά που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής και σε αυτά ανήκουν βιταμίνες, όπως η C και η E, πολυφαινολικά συστατικά, καροτενοειδή, καθώς και ιχνοστοιχεία, όπως το σελήνιο και το θείο (Aslani & Ghobadi, 2016).

1.6.1 Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι μια οικογένεια ενζύμων (GPx1-8) που καταλύουν την αντίδραση αναγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου ή οργανικών υδροϋπεροξειδίων σε νερό ή αντίστοιχες αλκοόλες χρησιμοποιώντας την ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH) (Herbette et al., 2007; Sarıkaya & Doğan, 2020):



Πιο αναλυτικά σε ό,τι αφορά τον καταλυτικό κύκλο των GPx, η σεληνόλη (selenol, -SeH) οξειδώνεται από ένα υδροϋπεροξειδίο προς σεληνικό οξύ (-SeOH), το οποίο στη συνέχεια ανάγεται ξανά σε σεληνόλη από δύο μόρια ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), απελευθερώνοντας οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) και νερό (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013).

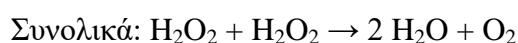
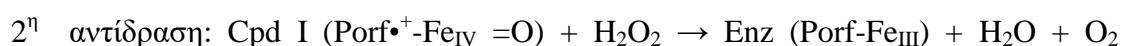
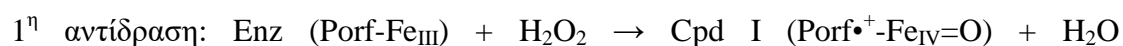
Στα θηλαστικά, η οικογένεια των ενζύμων GPx χωρίζεται σε 6 κλάδους ανάλογα με την αμινοξική τους αλληλουχία, την εξειδίκευση υποστρώματος και τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους. Σχεδόν όλες οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης των θηλαστικών περιέχουν στο καταλυτικό τους κέντρο το αμινοξύ σεληνοκυστεΐνη (Sec ή SeCys), από το οποίο και φαίνεται να εξαρτάται η αποδοτική αντιοξειδωτική τους ικανότητα (Herbette et al., 2007). Το καταλυτικό τους κέντρο είναι ένα τετραμερές

που περιέχει σεληνοκυστεΐνη (ή κυστεΐνη), γλουταμίνη, τρυπτοφάνη και ασπαραγίνη (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013). Έως και το 75% της ενζυμικής τους δραστηριότητας εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, και το 25-40% στα μιτοχόνδρια (Sarıkaya & Doğan, 2020).

Πέραν της εξαρτώμενης από το σελήνιο μορφής του ενζύμου, υπάρχει και μία ανεξάρτητη από το σελήνιο (S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης, glutathione-S-transferase, GST). Οι διαφορές τους έγκεινται στον αριθμό των υπομονάδων, τον καταλυτικό τους μηχανισμό και την πρόσδεση σεληνίου στο ενεργό τους κέντρο (Rahman, 2007). Η ανεξάρτητη από το σελήνιο μορφή εμφανίζει πιο περιορισμένη αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι των ROS σε σχέση με τις GPx, ενώ χρησιμοποιεί και διαφορετικά αναγωγικά υποστρώματα αντί της γλουταθειόνης (π.χ. θειορεδοξίνη) (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013).

Καταλάση

Η καταλάση είναι ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα και το πρώτο που χαρακτηρίστηκε για αυτή του τη δράση, ήδη από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα. Σχεδόν όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί εκφράζουν το ένζυμο αυτό (Glorieux & Calderon, 2017; Nandi et al., 2019). Η καταλάση καταλύει την αντίδραση διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο σε δύο βήματα. Στο πρώτο βήμα, μέσω αναγωγής ενός μορίου H₂O₂, σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο μόριο (Compound I, Cpd I), μία οξυσιδηρούχα κατιονική ρίζα πορφυρίνης (Porf^{•+}-Fe_{IV}=O). Στο δεύτερο βήμα το μόριο αυτό ανάγεται στην αρχική του κατάσταση μέσω μεταφοράς δύο ηλεκτρονίων από ένα δεύτερο μόριο H₂O₂, με ταυτόχρονη απελευθέρωση οξυγόνου και νερού. Οι αντιδράσεις έχουν ως εξής: (Glorieux & Calderon, 2017; Nandi et al., 2019)



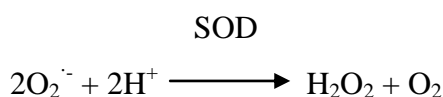
Η σταθερά ταχύτητας για τις παραπάνω αντιδράσεις είναι εξαιρετικά μεγάλη (~10⁷ M/sec), καθιστώντας τον κορεσμό του ενζύμου *in vivo* πρακτικά αδύνατο

(Young & Woodside, 2001). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει, κάθε λεπτό, περίπου 6 εκατομμύρια μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο (Rahman, 2007).

Το ένζυμο έχει πλέον μελετηθεί και χαρακτηριστεί σε πολλούς ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς οργανισμούς και έτσι οι καταλάσες μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις ομάδες με βάση τη δομή και λειτουργία τους. Στην πρώτη και δεύτερη ομάδα, τις τυπικές (ή πραγματικές) καταλάσες και τις καταλάσες-υπεροξειδάσες αντίστοιχα, ανήκουν τα ένζυμα που περιέχουν αίμη. Η τυπική καταλάση είναι μονολειτουργικό ένζυμο, αποτελείται από 4 πρωτεϊνικές υπομονάδες καθεμιά από τις οποίες περιέχει μία ομάδα αίμης και ένα μόριο NADPH και είναι η πιο διαδεδομένη. Στην τρίτη ομάδα ανήκουν οι καταλάσες που δεν περιέχουν αίμη, αλλά δύο ιόντα μαγγανίου στο ενεργό τους κέντρο (Young & Woodside, 2001; Glorieux & Calderon, 2017; Nandi et al., 2019). Σε ό,τι αφορά τον υποκυτταρικό εντοπισμό του ενζύμου, η καταλάση εντοπίζεται κατά βάση στα υπεροξειδισώματα και η υψηλότερη δραστηριότητα της εντοπίζεται στο ήπαρ και τα ερυθροκύτταρα (Young & Woodside, 2001).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η υπεροξειδική δισμουτάση είναι ένα από τα πιο αποτελεσματικά ενζυμικά αντιοξειδωτικά στον οργανισμό και μπορεί να θεωρηθεί η πρώτη γραμμή άμυνας εναντίον των ROS (Aslani & Ghobadi, 2016). Καταλύει την αντίδραση μετατροπής της ρίζας σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνο, μέσω διαδοχικών οξειδωτικών και αναγωγικών κύκλων των ιόντων μετάλλων μεταπτώσης στο ενεργό της κέντρο, ενώ η διαμοριακή σταθερά ταχύτητας της είναι αρκετά υψηλή (Chaudière & Ferrari-Iliou, 1999). Η αντίδραση έχει ως εξής (Aslani & Ghobadi, 2016):



Το παραγόμενο υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί στη συνέχεια να μετατραπεί από άλλα ένζυμα, όπως την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και την καταλάση, σε νερό και οξυγόνο (Islam et al., 2021).

Υπάρχουν διάφορες ισομορφές του ενζύμου οι οποίες διαφέρουν ως προς το ενεργό μεταλλικό τους κέντρο (χαλκός/ψευδάργυρος, μαγγάνιο, νικέλιο και σίδηρος), την αμινοξική τους σύσταση, τους συμπαράγοντες κ.α. (Islam et al., 2021). Στα θηλαστικά υπάρχουν 3 μορφές υπεροξειδικής δισμουτάσης: η υπεροξειδική δισμουτάση χαλκού/ψευδαργύρου (Cu/ZnSOD ή SOD1) που βρίσκεται στο κυτοσόλιο, η υπεροξειδική δισμουτάση μαγγανίου (MnSOD ή SOD2) στη μιτοχονδριακή μήτρα και η εξωκυτταρική υπεροξειδική δισμουτάση (EC-SOD ή SOD3), που συντίθεται μόνο από ορισμένους κυτταρικούς τύπους, όπως οι ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Young & Woodside, 2001).

Αναγωγή της γλουταθειόνης

Η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) είναι μία ομοδιμερής φλαβοπρωτεΐνη που καταλύει την μετατροπή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή (GSH), παρουσία NADPH. Διατηρώντας μία υψηλή αναλογία GSH/GSSG και ένα ενδοκυτταρικό αναγωγικό περιβάλλον, η αναγωγή της γλουταθειόνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική άμυνα έναντι των ελευθέρων ριζών (Kim et al, 2010). Για τον λόγο αυτό το ένζυμο εντοπίζεται σε κυτταρικές περιοχές με υψηλή ροή ηλεκτρονίων, όπως στο κυτταρόπλασμα αλλά και στον πυρήνα, τα μιτοχόνδρια και τα λυσοσώματα, όπου παράγονται τα οξειδωτικά μόρια (Couto et al., 2016). Παρατηρείται σε υψηλότερα επίπεδα στο έντερο και τους νεφρούς και σε χαμηλότερα στους μύες (Nok et al., 1995).

Η αναγωγή της γλουταθειόνης εντοπίζεται σε ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς και βακτήρια, είναι αρκετά συντηρημένη μεταξύ των οργανισμών και η τρισδιάστατη δομή της μεταξύ των *E. coli*, *S. cerevisiae* και *Homo sapiens* εμφανίζει αρκετές ομοιότητες (Couto et al., 2016; Nok et al., 1995).

1.6.2 Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη που συσσωρεύεται στην υδατική φάση του κυττάρου (Kaźmierczak-Barańska et al., 2020), θεωρείται ως ένα από τα πιο ισχυρά και λιγότερο τοξικά φυσικά αντιοξειδωτικά (Gulcin, 2020). Είναι μία λακτόνη με έξι άτομα άνθρακα, την οποία τα περισσότερα ζωικά και φυτικά είδη, όχι όμως ο άνθρωπος, μπορούν να συνθέσουν μέσω του μονοπατιού του

ουρονικού οξέος από τη γλυκόζη και τη γαλακτόζη (Chambial et al., 2013). Οι άνθρωποι και ορισμένα ακόμα πρωτεύοντα δεν διαθέτουν ένα λειτουργικό ένζυμο που είναι απαραίτητο για τη βιοσύνθεση της βιταμίνης, την οξειδάση της γουλονολακτόνης, λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο που το κωδικοποιεί (Padayatty et al., 2003). Έτσι, οι απαιτούμενες ποσότητες βιταμίνης C προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής, από φρούτα και λαχανικά όπως τα εσπεριδοειδή, τις πράσινες και κόκκινες πιπεριές, τις φράουλες, τις ντομάτες, το μπρόκολο και άλλα φυλλώδη λαχανικά (Chambial et al., 2013).

Ο βασικός βιολογικός ρόλος της βιταμίνης C είναι η προστασία του κυττάρου από τις ελεύθερες ρίζες, δρώντας ως δότης ηλεκτρονίων και άρα ως αναγωγικός παράγοντας. Εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση έναντι των δραστικών μορφών οξυγόνου, αζώτου και θείου και διακόπτει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών. Ως αντιοξειδωτικό το ασκορβικό οξύ μπορεί να μεταφέρει, διαδοχικά, δύο ηλεκτρόνια από τον διπλό δεσμό μεταξύ του δεύτερου και τρίτου άνθρακα στον δακτύλιο λακτόνης. Στο πρώτο στάδιο η απώλεια ενός ηλεκτρονίου οδηγεί στη δημιουργία μιας σταθερής, μη δραστικής ασκορβλικής ρίζας και στο δεύτερο στάδιο, με απώλεια και του δεύτερου ηλεκτρονίου, σχηματίζεται το δεϋδροασκορβικό οξύ, η οξειδωμένη μορφή της βιταμίνης C. Η αναγωγή του δεϋδροασκορβικού οξέος πίσω σε ασκορβικό μπορεί να συμβεί μέσω τουλάχιστον τριών ενζυμικών μονοπατιών, ενώ η ποσότητα του δεϋδροασκορβικού οξέος που δεν ανάγεται μεταβολίζεται μη αναστρέψιμα μέσω υδρόλυσης και χάνεται (Kazmierczak-Barańska et al., 2020; Padayatty et al., 2003)

Πέραν της δράσης της ως αντιοξειδωτικό, η βιταμίνη C είναι απαραίτητη για πολλές φυσιολογικές λειτουργίες. Συμμετέχει στη σύνθεση και το μεταβολισμό της τυροσίνης, του φολικού οξέος και της τρυπτοφάνης, διευκολύνει τη μετατροπή της χοληστερόλης σε χολικά οξέα μειώνοντας τα επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα, αυξάνει την απορρόφηση του σιδήρου στο έντερο και δρα με συνεργιστικό τρόπο με την βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη), αφού μετατρέπει την τοκοφεροξυλική ρίζα που παράγεται από την αλληλεπίδραση με τις ελεύθερες ρίζες στην ανηγμένη της μορφή. Το ασκορβικό οξύ δρα επίσης ως συμπαραγοντας και ηλεκτρονιοδότης για οκτώ διαφορετικά ένζυμα που συμμετέχουν στη σύνθεση κολλαγόνου, καρνιτίνης και διαφόρων νευροδιαβιβαστών. Η ανεπάρκεια αυτής σχετίζεται με αναιμία, λοιμώξεις,

αιμορραγία των ούλων, σκορβούτο, μυϊκό εκφυλισμό, αθηρωματικές πλάκες και νευρωτικές διαταραχές (Chambial et al., 2013; Padayatty et al., 2003).

Ωστόσο, πέραν της καλά τεκμηριωμένης δράσης της βιταμίνης C ως αντιοξειδωτικού παράγοντα, θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπό συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να δράσει και ως προ-οξειδωτικό. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι σε μεγάλες συγκεντρώσεις *in vitro* το ασκορβικό οξύ καταλύει την αναγωγή ελεύθερων μετάλλων μετάπτωσης, Fe^{3+} προς Fe^{2+} ή Cu^{3+} προς Cu^{2+} , τα οποία έπειτα αντιδρούν με το υπεροξείδιο του υδρογόνου προς σχηματισμό ριζών υδροξυλίου ή ιόντων υπεροξειδίου. (Kaźmierczak-Barańska et al., 2020; Gulcin, 2020).

Βιταμίνη E

Η συλλογική ονομασία βιταμίνη E αναφέρεται σε 8 φαινολικά συστατικά, 4 τοκοφερόλες και 4 τοκοτριενόλες, που συνιστούν λιποδιαλυτές βιταμίνες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Από αυτές, η α-τοκοφερόλη αποτελεί την πιο ισχυρή και άφθονη ισομορφή στα βιολογικά συστήματα (Gulcin, 2020). Λόγω της λιποδιαλυτής της φύσης συγκεντρώνεται στο υδρόφοβο εσωτερικό τμήμα των κυτταρικών μεμβρανών και τις προστατεύει από τις ελεύθερες ρίζες (Birben et al., 2012).

Η βιταμίνη E περιέχει έναν κεντρικό δακτύλιο χρωμανίου (χρωμανόλης) και μια μακριά πλευρική υδρόφοβη υδρογονοανθρακική αλυσίδα. Η ομάδα χρωμανίου διαθέτει μία υδροξυλομάδα (-OH) που μπορεί να μεταφέρει ένα άτομο υδρογόνου προς αναγωγή των ελευθέρων ριζών και, επομένως, είναι αυτή που παρέχει την αντιοξειδωτική ικανότητα στις τοκοφερόλες, ενώ η πλευρική αλυσίδα επιτρέπει τη διείσδυση του μορίου στις κυτταρικές μεμβράνες (Gulcin, 2020).

Η βασική δράση της βιταμίνης E είναι η προστασία έναντι της λιπιδικής υπεροξείδωσης, παγιδεύοντας τις ρίζες περοξυλίου και διακόπτοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις (Pham-Huy et al., 2008; Young & Woodside, 2001). Αυτό το επιτυγχάνει μεταφέροντας το φαινολικό της υδρογόνο στις ROO^{\cdot} σχηματίζοντας έτσι μία μη δραστική ρίζα που οδηγεί σε διακοπή της οξειδωτικής αλυσιδωτής αντίδρασης (Gulcin, 2020). Η αντίδραση αυτή οδηγεί στον σχηματισμό μίας α-τοκοφεροξυλικής ρίζας, η οποία μπορεί να αναγεννηθεί στην δραστική, ανηγμένη της μορφή μέσω αντίδρασης με αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό οξύ, την ανηγμένη γλουταθειόνη

και το ουρικό οξύ ή μέσω αντίδρασης δύο ριζών προς σχηματισμό ενός σταθερού διμερούς (Young & Woodside, 2001).

Οι τροφές με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε βιταμίνη E είναι τα φυτικά έλαια, οι ξηροί καρποί και σπόροι και τα δημητριακά ολικής αλέσεως αν και βρίσκεται, έστω και σε μικρές ποσότητες, σε όλες σχεδόν τις τροφές. Μεταξύ όλων των ισομορφών της βιταμίνης E, οι πιο άφθονες στη διατροφή και τους ιστούς είναι οι α- και γ- τοκοφερόλη (Gulcin, 2020).

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη αναφέρεται συχνά ως το κύριο αντιοξειδωτικό και αποτελεί την πιο άφθονηθειόλη στα κύτταρα, παρούσα σε όλους πρακτικά τους ιστούς των θηλαστικών σε μεγάλη συγκέντρωση (Teskey et al., 2018). Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από τα αμινοξέα γλυκίνη, κυστεΐνη και L-γλουταμινικό οξύ. Υπάρχει στα κύτταρα σε δύο καταστάσεις, ως ανηγμένη (GSH) και ως οξειδωμένη (GSSG) γλουταθειόνη. Η GSH αποτελεί την επικρατέστερη μορφή υπό φυσιολογικές συνθήκες σε ποσοστό μεγαλύτερο του 98%, ενώ η GSSG εντοπίζεται σε ποσοστό περίπου 1% (Lv et al., 2019). Η μεγαλύτερη ποσότητα GSH, σε ποσοστό 85-90%, βρίσκεται στο κυτοσόλιο όπου γίνεται και η σύνθεσή της και η υπόλοιπη στα μιτοχόνδρια, την πυρηνική μήτρα και τα υπεροξειδιοσώματα (Wu et al., 2004).

Η σύνθεση της GSH λαμβάνει χώρα με μία εξαρτώμενη από ATP διαδικασία δύο βημάτων, με τη μεσολάβηση των ενζύμων συνθετάση της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (GCL) και συνθετάση της γλουταμίνης (GSS) (Teskey et al., 2018). Στο πρώτο βήμα, δημιουργείται ένας γ-πεπτιδικός δεσμός μεταξύ της γ-καρβονυλομάδας του γλουταμινικού και της αμινομάδας της κυστεΐνης προς σχηματισμό γ-γλουταμυλοκυστεΐνης, η οποία στη συνέχεια συνδυάζεται με τη γλυκίνη για να παραχθεί η γλουταθειόνη (Lv et al., 2019; Wu et al., 2004). Η σουλφυδρυλομάδα της κυστεΐνης είναι αυτή που παρέχει στην γλουταθειόνη οξειδοαναγωγικές ιδιότητες, ενώ ο γ-δεσμός μεταξύ των δύο αμινοξέων την καθιστά ανθεκτική στην πρωτεόλυση (Gaucher et al., 2018).

Αν και η γλουταθειόνη συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, έχει βασικό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, καθώς εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες και τις ROS/RNS άμεσα ή έμμεσα μέσω αντιδράσεων στις οποίες

λειτουργεί ως απαραίτητος συμπάραγοντας αντιοξειδωτικών ενζύμων. Η σουλφωδρυλομάδα της κυστεΐνης λειτουργεί ως ισχυρό πυρηνόφιλο, που επιτρέπει στην γλουταθειόνη να δεσμεύει ηλεκτρόνια και να συζευγνύεται με κυτταροτοξικά δραστικά μόρια εξουδετερώνοντάς τα. Σε τέτοιες αντιδράσεις η ίδια η γλουταθειόνη μετατρέπεται από την ανηγμένη στην οξειδωμένη της μορφή με τη δημιουργία μιας δισουλφιδικής γέφυρας μεταξύ δύο μορίων GSH και ανάγεται ξανά σε GSH μέσω του ενζύμου αναγωγάση της γλουταθειόνης (Wu et al., 2004; Couto et al., 2016). Η συγκέντρωση της GSH και η αναλογία GSH:GSSG χρησιμοποιείται συχνά ως βιοδείκτης οξειδοαναγωγικής κατάστασης και αποτελεί τον βασικό οξειδοαναγωγικό ρυθμιστή του κυττάρου (Gaucher et al., 2018). Πέραν της δράσης της έναντι των ROS, η γλουταθειόνη ανάγει τις βιταμίνες C και E στην δραστική τους μορφή και αποτελεί δεξαμενή κυστεΐνης στα κύτταρα (Wu et al., 2004).

Μελατονίνη

Η μελατονίνη (N-ακετυλο-5-μεθοξυτρυπταμίνη) είναι μια νευροορμόνη που παράγεται κυρίως από την επίφυση των σπονδυλωτών και έχει ένα μεγάλο εύρος φυσιοπαθολογικών λειτουργιών (Rahman, 2007; Aslani & Ghobadi, 2016). Μπορεί να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Lobo et al., 2010). Σε ό,τι αφορά την αντιοξειδωτική της δράση, έχει βρεθεί ότι τόσο η μελατονίνη όσο και ορισμένοι μεταβόλιτες της μπορούν να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες και να προστατέψουν τα κύτταρα από τη λιπιδική υπεροξείδωση και μάλιστα πιο αποτελεσματικά σε σχέση με άλλα αντιοξειδωτικά, όπως οι βιταμίνες C και E και η γλουταθειόνη. Η μελατονίνη φαίνεται ακόμα να αυξάνει τα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η υπεροξειδική δισμουτάση, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και να τα προφυλάσσει έναντι οξειδωτικής βλάβης (Aslani & Ghobadi, 2016). Σε αντίθεση με άλλα αντιοξειδωτικά, η μελατονίνη δεν περνάει από επαναλαμβανόμενους κύκλους οξείδωσης και αναγωγής. Μετά την αντίδραση της με τις ελεύθερες ρίζες που θα οδηγήσει στην οξείδωση της σχηματίζει σταθερά τελικά προϊόντα και δεν μπορεί να αναχθεί ξανά στην προηγούμενη κατάστασή της (Lobo et al., 2010).

Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 είναι μία λιποδιαλυτή βενζοκινόννη με 10 μονάδες ισοπρενίου (Lee et al., 2012). Η κεντρική ομάδα κινόννης μπορεί να βρίσκεται σε

οξειδωμένη (ως κινόνη) ή ανηγμένη (ως κινόλη) κατάσταση. Αποτελεί ένα αποτελεσματικό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό που κατανέμεται σε όλες τις μεμβράνες του κυττάρου και σε κοντινή απόσταση από τις ακόρεστες λιπιδικές αλυσίδες, τις οποίες και προστατεύει από τις ελεύθερες ρίζες. Πέρα απ'το ότι στις μεμβράνες συναντάται κατά βάση στην ανηγμένη μορφή κινόλης, υπάρχουν τουλάχιστον τρία ένζυμα που μπορούν να ανάγουν την οξειδωμένη του μορφή μετά την αντίδραση του με ελεύθερες ρίζες. Πέραν της άμεσης αντιοξειδωτικής του δράσης, το συνένζυμο Q10 συμμετέχει στην αναγέννηση των τοκοφερολών μετατρέποντας τις αντίστοιχες τοκοφεροξυλικές ρίζες, που παράγονται μετά από αντίδραση με λιπιδικές ρίζες ή ρίζες οξυγόνου, στην ανηγμένη, δραστική τους μορφή (Crane, 2001).

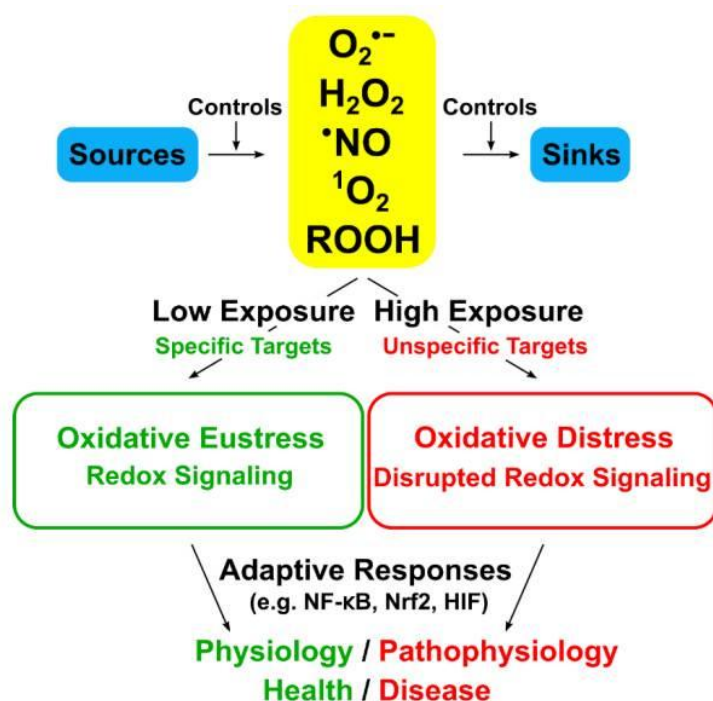
1.7 Οξειδωτικό στρες

Στους υγιείς οργανισμούς, η παραγωγή των ελευθέρων ριζών και των λοιπών δραστικών μορφών αντισταθμίζεται από την ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών που τις εξουδετερώνουν. Ωστόσο, η εξουδετέρωση δεν μπορεί να είναι πλήρης καθώς, όπως προαναφέρθηκε, οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σωστή λειτουργία του κυττάρου σε ελεγχόμενες, μικρές συγκεντρώσεις (Santo et al., 2016; Di Meo & Venditti, 2020). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου διατηρείται εντός ενός στενού εύρους και οποιαδήποτε διαταραχή αυτής της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας προς υψηλότερες ή χαμηλότερες τιμές οδηγεί σε στρες και σε ανάλογη απόκριση (Valko et al., 2007; Sies, 2020). Οι λόγοι που μπορεί να οδηγήσουν σε μία τέτοια ανισορροπία περιλαμβάνουν την αύξηση των επιπέδων των μορίων που υφίστανται αυτοοξείδωση σε συνδυασμό με την παραγωγή ROS, την εξάντληση των αντιοξειδωτικών μορίων χαμηλής μοριακής μάζας, την απενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, τη μείωση της παραγωγής αντιοξειδωτικών μορίων ή ενζύμων ή, τέλος, έναν συνδυασμό δύο ή περισσότερων από τους προαναφερθέντες παράγοντες (Lushchak, 2014).

Το οξειδωτικό στρες αποτελεί πλέον μια παγκόσμια έννοια στους τομείς της βιολογίας και της ιατρικής και η βιβλιογραφία γύρω από τον όρο είναι ογκώδης (Sies, 2020). Ορίστηκε για πρώτη φορά το 1985 ως η «διαταραχή της ισορροπίας προοξειδωτικών-αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων» (Sies, 1985), και στη συνέχεια εξελίχθηκε για να ενσωματώσει τη νέα γνώση αναφορικά με το ρόλο της

οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης. Έτσι, σύμφωνα με τον ανανεωμένο ορισμό, το οξειδωτικό στρες είναι η «διαταραχή της ισορροπίας προοξειδωτικών-αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων, που οδηγεί σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου, ή/και σε μοριακή βλάβη» (Sies, 2020).

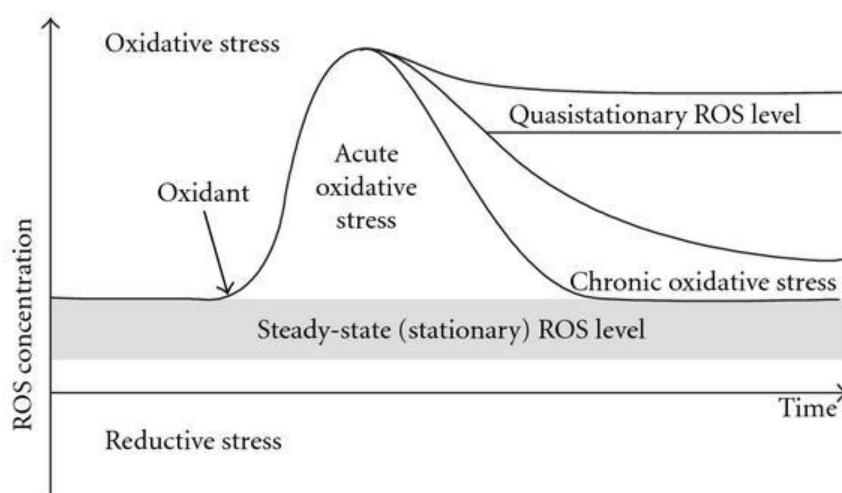
Έκτοτε, δεδομένης και της πληθώρας προ- και αντι-οξειδωτικών μορίων και μηχανισμών, έχουν γίνει προσπάθειες για την ταξινόμηση υπομορφών του οξειδωτικού στρες ανάλογα με τον τρόπο παραγωγής του και την εισαγωγή μιας κλίμακας έντασης, που κυμαίνεται από το φυσιολογικό οξειδωτικό στρες (oxidative eustress) ως το υπερβολικό τοξικό οξειδωτικό φορτίο (oxidative distress) που προκαλεί βλάβες στα βιομόρια (Sies et al., 2017).



Εικόνα 3. Το οξειδωτικό στρες και η σχέση του με την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση (Πηγή: Sies, 2020).

Όπως προαναφέρθηκε, υπό φυσιολογικές συνθήκες τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών και των υπόλοιπων δραστικών μορφών στα κύτταρα κυμαίνονται σε ένα συγκεκριμένο, στενό εύρος (Lushchak, 2014). Αυτή η οξειδοαναγωγική ισορροπία έχει περιγραφεί ως ο «χρυσός μέσος της υγιούς ζωής» (Sies et al., 2017). Εάν τα επίπεδα των ROS αυξηθούν απότομα, εκτός των φυσιολογικών ορίων, αλλά οι

αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του κυττάρου τα επαναφέρουν στα φυσιολογικά επίπεδα, ένα τέτοιο γεγονός μπορεί να χαρακτηριστεί ως «οξύ οξειδωτικό στρες». Σε περίπτωση που το κύτταρο δεν μπορεί να αντισταθμίσει τα αυξημένα επίπεδα ROS, αυτά θα διατηρηθούν προκαλώντας την τροποποίηση διαφόρων κυτταρικών συστατικών, διαταράσσοντας την ομοιόσταση. Μία τέτοια κατάσταση καλείται «χρόνιο οξειδωτικό στρες». Εναλλακτικά, μετά από ένα οξύ οξειδωτικό γεγονός τα επίπεδα των ROS μπορεί να μην επιστρέψουν στο αρχικό σταθερό εύρος, αλλά να σταθεροποιηθούν σε ένα νέο, «ψευδοσταθερό» επίπεδο, μία κατάσταση που απαιτεί αναδιοργάνωση ολόκληρης της ομοιόστασης (Lushchak, 2014). Τέλος, μία απόκλιση προς την αντίθετη πλευρά της ισορροπίας καλείται «αναγωγικό στρες» (Sies, 2020).



Εικόνα 4. Η δυναμική των ROS στα βιολογικά συστήματα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα επίπεδα των ROS κυμαίνονται σε ένα συγκεκριμένο εύρος. Ωστόσο, σε συνθήκες στρες, τα επίπεδα των ROS μπορεί να αυξηθούν ή να μειωθούν εκτός του φυσιολογικού εύρους με αποτέλεσμα οξύ ή χρόνιο οξειδωτικό ή αναγωγικό στρες. Υπό ορισμένες συνθήκες, τα επίπεδα των ROS ενδέχεται να μην επιστρέψουν στο αρχικό τους εύρος και να σταθεροποιηθούν σε ένα νέο «ψευδοσταθερό» επίπεδο (Πηγή: Lushchak, 2014).

1.8 Νανοτεχνολογία

Η νανοτεχνολογία αποτελεί μια από τις πλέον υποσχόμενες τεχνολογίες του 21^{ου} αιώνα (Bayda et al., 2019). Μπορεί να οριστεί ως η επιστήμη που εμπλέκεται στο σχεδιασμό, τη σύνθεση, το χαρακτηρισμό και την εφαρμογή υλικών και συσκευών, των οποίων η μικρότερη λειτουργική οργάνωση σε τουλάχιστον μία διάσταση είναι στην κλίμακα των νανομέτρων (nm), κυμαινόμενη από λίγα έως αρκετές εκατοντάδες νανόμετρα (Silva, 2004).

Η ιδέα της νανοτεχνολογίας εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1959, όταν ο Αμερικανός φυσικός Richard Feynman εισήγαγε την ιδέα διαχείρισης της ύλης σε μοριακό επίπεδο (Hulla et al., 2015). Ο Feynman πρότεινε ότι μέσω χειραγώγησης των ατόμων και μορίων θα καταστεί τελικά δυνατή η κατασκευή συσκευών στη νανοκλίμακα (Santamaria, 2012). Ο όρος «νανοτεχνολογία» ωστόσο χρησιμοποιήθηκε και ορίστηκε για πρώτη φορά 15 χρόνια αργότερα, το 1974, από τον Ιάπωνα επιστήμονα Norio Taniguchi που υποστήριξε ότι η νανοτεχνολογία αποτελείται από «την επεξεργασία, το διαχωρισμό, την ενοποίηση και την παραμόρφωση υλικών από ένα άτομο ή ένα μόριο». Τελικά, η καθιέρωση της νανοτεχνολογίας ως ένα νέο επιστημονικό πεδίο έγινε τη δεκαετία του 1980, όταν ο Eric Drexler δημοσίευσε το βιβλίο του *Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology* («Μηχανές Δημιουργίας: Η επερχόμενη εποχή της νανοτεχνολογίας») το 1986, που οδήγησε σε αύξηση του ενδιαφέροντος για τη λεγόμενη «μοριακή μηχανική». Εκεί, ο Drexler οραματίστηκε την κατασκευή σύνθετων μηχανών στη νανοκλίμακα, οι οποίες θα μπορούν να χειραγωγήσουν τα άτομα και τα μόρια και να δημιουργήσουν αντίγραφα του εαυτού τους ή άλλων αντικειμένων (Bayda et al., 2019; Hullu et al., 2015).

Την ίδια περίοδο, η ανάπτυξη του μικροσκοπίου σάρωσης σήραγγας (scanning tunneling microscope, STM) και αργότερα του μικροσκοπίου ατομικών δυνάμεων (Atomic Force Microscope, AFM) επέτρεψε για πρώτη φορά την παρατήρηση μεμονωμένων μορίων και ατόμων και άνοιξε το δρόμο για την ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας σε μια πιο ρεαλιστική βάση, μέσω της επιστημονικής μεθοδολογίας και όχι μέσω των εννοιολογικών οραμάτων επιστημόνων, όπως του Feynman και του Drexler (Santamaria, 2012). Τη δεκαετία του 1990, η νανοτεχνολογία έγινε ακόμα πιο δημοφιλής με την ανάπτυξη ποικίλων νανοϋλικών και την ενσωμάτωσή τους σε διάφορα καταναλωτικά προϊόντα, ενώ από τις αρχές του 2000 ξεκίνησε μία συζήτηση σε επιστημονικό επίπεδο αλλά και σε επίπεδο ρυθμιστικών αρχών σχετικά με την ασφάλεια και τους πιθανούς τοξικολογικούς κινδύνους των νανοϋλικών για τον άνθρωπο και το περιβάλλον, λόγω των φυσικοχημικών τους χαρακτηριστικών και της αυξημένης δραστηριότητάς τους (Santamaria, 2012; Colvin, 2003). Έτσι, την περίοδο αυτή η σχετική βιβλιογραφία επεκτείνεται με *in vitro* και *in vivo* μελέτες αναφορικά με την τοξικότητα των νανοϋλικών μετά από αναπνευστική ή δερματική χορήγηση, καθώς και αναφορικά με

την τοξικοκινητική και τοξικοδυναμική τους (Warheit, 2003; Shvedova et al., 2018; Bennat & Müller-Goymann, 2000; Riviere, 2008).

1.9 Νανοϋλικά

Τα νανοϋλικά στην εποχή μας αποτελούν ένα ενεργό πεδίο έρευνας και έναν τεχνο-οικονομικό τομέα με πληθώρα εφαρμογών και βιομηχανικών δυνατοτήτων (Jeevanandam et al., 2018). Αν και ο άνθρωπος έρχεται εδώ και αιώνες καθημερινά σε επαφή με πληθώρα νανοσωματιδίων που έχουν δημιουργηθεί με φυσικές διαδικασίες, πρόσφατα η σύγχρονη επιστήμη κατάφερε να κατασκευάσει μια σειρά από τεχνητά υλικά σε ατομική κλίμακα (Buzea et al., 2007). Τέτοια υλικά προσφέρουν το πλεονέκτημα για προσαρμόσιμα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, όπως σημείο τήξης, η ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα, η απορρόφηση και σκέδαση φωτός κ.α., προσφέροντας βελτιωμένη απόδοση (Jeevanandam et al., 2018).

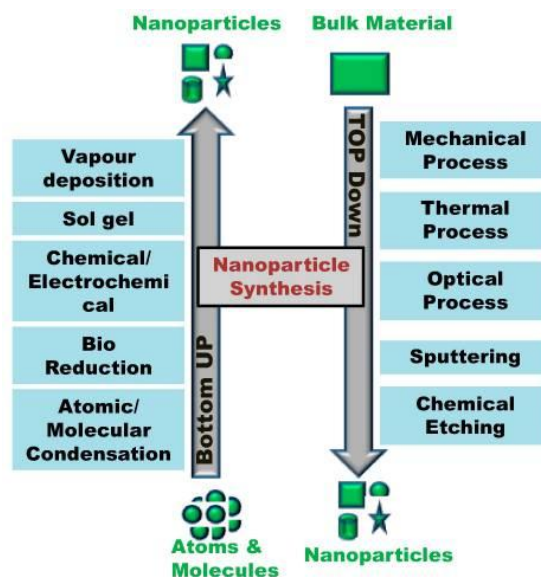
Καθολικά αποδεκτός ορισμός του νανοϋλικού δεν υπάρχει. Οι διάφοροι διεθνείς οργανισμοί και η βιομηχανία έχουν προτείνει και χρησιμοποιούν μια πληθώρα ορισμών και το ζήτημα εξακολουθεί να αποτελεί πεδίο επιστημονικής και πολιτικής συζήτησης. Ο Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (ISO) έχει ορίσει το νανοϋλικό ως ένα «υλικό με οποιαδήποτε εξωτερική διάσταση στη νανοκλίμακα ή με εσωτερική δομή ή δομή επιφάνειας στη νανοκλίμακα» και το νανοσωματίδιο ως ένα «νανο-αντικείμενο και με τις τρεις εξωτερικές διαστάσεις στη νανοκλίμακα», όπου ως νανοκλίμακα εννοείται το εύρος μεγέθους από περίπου 1–100 nm (Boverhof et al., 2015).

Τα νανοϋλικά, πέραν των τεχνητών (συνθετικών), μπορεί να είναι και φυσικά. Στα φυσικά περιλαμβάνονται τα νανοϋλικά που δημιουργούνται σε όλα τα επίπεδα της Γης (ατμόσφαιρα, λιθόσφαιρα, υδρόσφαιρα) μέσω χημικών, θερμικών και βιολογικών διαδικασιών ή συνδυασμό αυτών, καθώς και εκείνα που δημιουργούνται αυθόρμητα ως αποτέλεσμα ανθρωπογενούς δραστηριότητας, όπως εξορύξεων και παραγωγής λυμάτων και αποβλήτων από βιομηχανικές διεργασίες (Sharma et al., 2015).

Με βάση τη χημική τους φύση, τα νανοϋλικά μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις βασικές κατηγορίες. Αυτά που έχουν σαν βάση τον άνθρακα (carbon-based) μπορεί να έχουν σωληνοειδές, ελλειπτικό ή σφαιρικό σχήμα και περιέχουν άνθρακα.

Σε αυτήν την κατηγορία περιλαμβάνονται τα φουλερένια, οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) και οι νανοϊνες άνθρακα, μεταξύ άλλων. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν αυτά που έχουν κάποια ανόργανη βάση (inorganic-based), και περιλαμβάνουν τα νανοσωματίδια μετάλλων, οξειδίων των μετάλλων και ημιαγωγούς, όπως πυρίτιο και κεραμικά. Στα νανοϋλικά που έχουν κάποια οργανική βάση (organic-based) περιλαμβάνονται αυτά που παράγονται κυρίως από οργανική ύλη και μπορούν να μετασχηματιστούν σε επιθυμητές δομές όπως δενδριμερή, μικκύλια, λιποσώματα και πολυμερή. Τέλος, τα σύνθετα νανοϋλικά (composite-based) είναι πολυφασικά νανοσωματίδια με μία φάση στη νανοκλίμακα και μπορούν είτε να συνδυάζουν διαφορετικά νανοσωματίδια μεταξύ τους είτε να συνδυάζουν νανοσωματίδια με μεγαλύτερα υλικά ή πιο περίπλοκες δομές. Τέτοια σύνθετα υλικά μπορεί να είναι οποιοδήποτε συνδυασμοί νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα, κάποιο μέταλλο ή κάποια οργανική βάση με οποιαδήποτε μορφή μεγαλύτερων μεταλλικών, κεραμικών ή πολυμερών υλικών (Jeevanandam et al., 2018).

Για την ανάπτυξη των νανοσωματιδίων, ανάλογα με τη διεργασία που ακολουθείται για την παρασκευή των νανοδομών, οι κατασκευαστικές προσεγγίσεις είναι δύο ειδών: η προσέγγιση «από κάτω προς τα πάνω» (bottom-up) και η προσέγγιση «από πάνω προς τα κάτω» (top-down). Η προσέγγιση bottom-up αναφέρεται στην κατασκευή νανοδομών από τη βάση: άτομο προς άτομο ή μόριο προς μόριο. Αυτή πραγματοποιείται με φυσικές και χημικές μεθόδους που βρίσκονται σε εύρος νανοκλίμακας, με ελεγχόμενο χειρισμό της συναρμολόγησης των ατόμων και μορίων. Από την άλλη, η προσέγγιση top-down αποτελεί ουσιαστικά τη δημιουργία σωματιδίων στη νανοκλίμακα ξεκινώντας από τη διάσπαση υλικών με μεγαλύτερες διαστάσεις (bulk materials). Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση προηγμένων τεχνικών όπως η μηχανική ακριβείας και η λιθογραφία (Bayda et al., 2019).



Εικόνα 5. Η έννοια των προσεγγίσεων «από κάτω προς τα πάνω» (*bottom-up*) και «από πάνω προς τα κάτω» (*top-down*) και οι διαφορετικές μέθοδοι για τη σύνθεση νανοσωματιδίων (Πηγή: Bayda et al., 2019).

1.10 Έκθεση σε νανοϋλικά

Τα τελευταία χρόνια, η έρευνα σχετικά με την έκθεση των εργαζομένων και του καταναλωτικού κοινού στα τεχνητά νανοϋλικά έχει σημειώσει τεράστια πρόοδο. Σε ό,τι αφορά την έκθεση στον χώρο εργασίας, που αποτελεί και το επίκεντρο της συγκεκριμένης εργασίας, αυτή μπορεί να συμβεί σε περιοχές όπου τα νανοϋλικά παράγονται, χειρίζονται και επεξεργάζονται (Kuhlbusch et al., 2018). Παρ' όλα αυτά, μέχρι σήμερα, εξακολουθούν να υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες αναφορικά με τα όρια για την επαγγελματική έκθεση σε νανοϋλικά, με εξαίρεση μόνο για ορισμένους τύπους νανοσωματιδίων, όπως τα νανοσωματίδια οξειδίου του τιτανίου (TiO_2), οι νανοσωλήνες άνθρακα και οι νανοϊνες (Aznar Mollá et al., 2021).

Οι οδοί έκθεσης στα νανοϋλικά, οι συγκεντρώσεις και η διάρκεια έκθεσης διαφέρουν ανάλογα με τον πληθυσμό που εξετάζεται (Thomas et al., 2009). Η πρόσληψη δια της εισπνοής θεωρείται ως η πιο κρίσιμη οδός έκθεσης στα νανοϋλικά, ειδικά για τους εργαζόμενους, καθώς αυτά τα σωματίδια είναι σε θέση να διεισδύσουν σε βάθος στον πνεύμονα και να εναποτίθενται στην περιοχή ανταλλαγής αερίων (Kuhlbusch et al., 2018; Aznar Mollá et al., 2021). Από την άλλη, η έκθεση του γενικού πληθυσμού συμβαίνει κυρίως μέσω δερματικής επαφής ή κατάποσης, κατά τη χρήση προϊόντων νανοτεχνολογίας (Sharma et al., 2012). Γενικά, η οδός

έκθεσης και πρόσληψης εξαρτάται και από παράγοντες όπως το μέγεθος, το φορτίο, το εμβαδόν επιφάνειας και το σχήμα του νανοϋλικού (Yah et al., 2012).

Η έκθεση δια της εισπνοής αποτελεί, όπως προαναφέρθηκε, τη βασικότερη και πιο μελετημένη οδό έκθεσης στα νανοϋλικά και αφορά στην πρόσληψη αερομεταφερόμενων νανοσωματιδίων μέσω του αναπνευστικού συστήματος, η οποία μπορεί να συμβεί κατά την παραγωγή και επεξεργασία των νανοϋλικών σε μορφή σκόνης ή αεροζόλ (Sharma et al., 2012). Τα εισπνεόμενα νανοσωματίδια μπορούν να στοχεύσουν και τις τρεις περιοχές της ανθρώπινης αναπνευστικής οδού, τη ρινοφαρυγγική, την τραχειοβρογχική και την κυψελιδική. Οι μηχανισμοί κάθαρσης που διαθέτει το ανθρώπινο σώμα περιλαμβάνουν τον βλεννογόνο αλλά και τη φαγοκυττάρωση από μακροφάγα, κυρίως για τον εν τω βάθει πνεύμονα (Oberdörster et al., 2005). Από τις πνευμονικές θέσεις, τα νανοσωματίδια, ανάλογα και με το μέγεθος τους, μπορούν να εισαχθούν στην κυκλοφορία του αίματος και μέσω αυτής μπορούν να διανεμηθούν σε άλλα όργανα-στόχους (Yah et al., 2012).

Σε ό,τι αφορά τη δερματική έκθεση, αυτή μπορεί να αφορά τόσο τους εργαζόμενους στην παρασκευή νανοϋλικών όσο και τους τελικούς καταναλωτές, κυρίως μετά την ευρεία χρησιμοποίηση των νανοϋλικών σε καλλυντικά προϊόντα (Wiesenthal et al., 2011). Οι πιθανές οδοί για την είσοδο νανοσωματιδίων μέσω του δέρματος είναι η διακυτταρική, η ενδοκυτταρική και μέσω των ιδρωτοποιών αδένων ή των τριχοθυλακίων (Crosera et al., 2009). Μελέτες έχουν δείξει ότι νανοϋλικά, όπως οι κβαντικές κουκκίδες, εισχωρούν στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω δερματικών αμυχών, ενώ μελέτες σε ποντίκια έδειξαν ότι η διαδερμική ένεση κβαντικών κουκκίδων έχει σαν αποτέλεσμα να εντοπίζονται στους λεμφαδένες και από εκεί να μεταφέρονται σε άλλα όργανα (Kim et al., 2004). Επιπλέον, *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι νανοϋλικά όπως νανοσωματίδια οξειδίου του τιτανίου (TiO₂) και οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnO) μπορούν να διαπεράσουν το ανθρώπινο δέρμα, μετά από τοπική χορήγηση, ενώ και οι νανοσωλήνες άνθρακα μπορούν να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες και να προκαλέσουν την απελευθέρωση προφλεγμονωδών μορίων, με αποτέλεσμα την πρόκληση οξειδωτικού στρες και μειωμένη βιωσιμότητα (Yah et al., 2012; Monteiro-Riviere, 2004).

Η τρίτη σημαντικότερη οδός έκθεσης στα νανοϋλικά είναι μέσω της κατάποσης. Τα νανοϋλικά μπορούν να περάσουν στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω

κατάποσης όταν χρησιμοποιούνται στις τροφές και τις συσκευασίες τροφίμων, στη χορήγηση φαρμάκων και στα καλλυντικά. Ειδικότερα, για τους εργαζόμενους σε βιομηχανίες που σχετίζονται με τα νανοϋλικά, μπορεί να συμβεί ακούσια μεταφορά από τα χέρια στη στοματική κοιλότητα και έτσι να εισέλθουν τα νανοϋλικά στον οργανισμό. Επιπλέον, λόγω της ευρείας πλέον χρησιμοποίησης των νανοσωματιδίων σε χιλιάδες προϊόντα, όταν αυτά απορρίπτονται απελευθερώνονται στο περιβάλλον και διαμέσου της τροφικής αλυσίδας καταλήγουν στον άνθρωπο (Sharma et al., 2012). Βέβαια, θα πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση της έκθεσης από κατάποση, οι συνθήκες που επικρατούν κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα (όξινο pH στομάχου, ιοντική ισχύς γαστρεντερικών υγρών) αναμένεται να επηρεάσουν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των νανοϋλικών και τελικά την τοξικότητα τους (Bouwmeester et al., 2018).

1.11 Τοξικότητα νανοϋλικών

Καθώς ο αριθμός των παραγόμενων νανοϋλικών και νανοσωματιδίων που χρησιμοποιούνται εμπορικά αυξάνεται διαρκώς, παράλληλα αναπτύσσεται και ένας νέος τομέας έρευνας που αφορά τη διερεύνηση της πιθανότητας εμφάνισης επιβλαβών επιπτώσεων λόγω της έκθεσης σε αυτά. Το πεδίο αυτό ονομάζεται νανοτοξικολογία (Oberdörster et al., 2005). Για την εκτίμηση της πιθανής έκθεσης ανθρώπινων πληθυσμών σε νανοϋλικά, η πρώτη ομάδα που μελετάται είναι οι εργαζόμενοι σε εγκαταστάσεις που παράγουν τέτοια υλικά, καθώς αναμένεται να είναι οι πρώτοι που θα εκτεθούν και μάλιστα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Από την άλλη, η έκθεση του γενικού πληθυσμού πιθανότατα θα συμβεί κυρίως μέσω της χρήσης καταναλωτικών προϊόντων που περιέχουν νανοϋλικά, κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του προϊόντος (Thomas et al., 2009).

1.12 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την τοξικότητα

Όπως έχει προαναφερθεί, τα νανοϋλικά εμφανίζουν μοναδικές ιδιότητες σε σχέση με τα ομόλογα τους με μεγαλύτερες διαστάσεις, οι οποίες τους προσδίδουν ευεργετικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, μπορεί επίσης να τους προσδώσουν μοναδικούς μηχανισμούς τοξικότητας (Gatoo et al., 2014). Η τοξικότητα των νανοϋλικών εξαρτάται από τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά. Ορισμένα νανοϋλικά δεν εμφανίζουν καμία τοξικότητα, ενώ άλλα μπορεί να έχουν μέχρι και θετικές επιδράσεις στην υγεία (Jeevanandam et al., 2018).

Οι παράγοντες που καθορίζουν την τοξικότητα των νανοϋλικών είναι οι εξής (Lungu et al., 2015):

- Δόση και χρόνος έκθεσης: Η μοριακή συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στο παρακείμενο μέσο και ο χρόνος έκθεσης επηρεάζουν άμεσα τον αριθμό των νανοϋλικών που διεισδύουν στα κύτταρα.
- Συγκέντρωση και συσσωμάτωση: Η αύξηση της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων προάγει τη συσσωμάτωση τους. Οι έρευνες σχετικά με την τοξικότητα των νανοσωματιδίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις είναι γενικά αντιφατικές. Καθώς τα περισσότερα συσσωματώματα νανοϋλικών έχουν μέγεθος μικρομέτρων, μια σημαντική ποσότητα συσσωματωμένων νανοσωματιδίων μπορεί να μην διεισδύσει στα κύτταρα ελαττώνοντας έτσι την τοξικότητά τους.
- Μέγεθος: Τα νανοσωματίδια εμφανίζουν τοξικότητα η οποία εξαρτάται από το μέγεθος τους. Η μείωση του μεγέθους των υλικών έχει σαν αποτέλεσμα μια εκθετική αύξηση του εμβαδού της επιφάνειας σε σχέση με τον όγκο και συνεπώς η επιφάνεια του νανοϋλικού γίνεται πιο δραστική. Γενικά, η εξαρτώμενη από το μέγεθος τοξικότητα των νανοσωματιδίων αποδίδεται στην ικανότητά τους να εισέρχονται στα βιολογικά συστήματα και να τροποποιούν τη δομή διαφόρων μακρομορίων (Gatoo et al., 2014).
- Σχήμα και λόγος διαστάσεων. Τα νανοσωματίδια εμφανίζουν τοξικότητα η οποία εξαρτάται από το σχήμα τους, αλλά και από τον λόγο διαστάσεων. Το σχήμα των σωματιδίων επηρεάζει τις διαδικασίες εξουδετέρωσης των νανοϋλικών *in vivo*, δηλαδή την ενδοκυττάρωση ή φαγοκυττάρωση τους (Verma & Stellacci, 2010). Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί διαφορετικά επίπεδα τοξικότητας σε διαφορετικό λόγο διαστάσεων του ίδιου υλικού. Όσο μεγαλύτερος ο λόγος διαστάσεων, τόσο μεγαλύτερη είναι η τοξικότητα των σωματιδίων (Gatoo et al., 2014).
- Επιφάνεια: Τυπικά, όσο μικρότερο είναι το μέγεθος ενός σωματιδίου και όσο μεγαλύτερη η επιφάνεια του, τόσο μεγαλύτερη είναι και η τοξικότητα του. Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την τοξικολογική συμπεριφορά των νανοϋλικών είναι οι ιδιότητες της επιφάνειας τους, όπως τυχόν επιφανειακές επιστρώσεις ή η τραχύτητα, η υδροφοβικότητα και το φορτίο. Η επιφανειακή επίστρωση μπορεί να επηρεάσει τις κυτταροτοξικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων αλλάζοντας τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (μαγνητικές, ηλεκτρικές και οπτικές ιδιότητες και χημική αντιδραστικότητα). Η τραχύτητα της επιφάνειας επηρεάζει την ισχύ των

αλληλεπιδράσεων νανοσωματιδίων-κυττάρου και προάγει την κυτταρική προσκόλληση (Gatoo et al., 2014).

- Κρυσταλλική δομή: Η κρυσταλλική δομή των νανοϋλικών επηρεάζει την κυτταρική πρόσληψη, τους οξειδωτικούς μηχανισμούς και τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους και συνδέεται άμεσα με την εμφάνιση τοξικών επιδράσεων.
- Διαλυτής/μέσο: Η σύνθεση του μέσου/διαλύτη στο περιβάλλον των νανοσωματιδίων επηρεάζει τη διασπορά και την κατάσταση συσσωμάτωσης των νανοσωματιδίων και τελικά την τοξικότητα τους (Gatoo et al., 2014).

1.13 Αρνητικές επιδράσεις νανοϋλικών

Τα νανοϋλικά μπορούν να προκαλέσουν τοξικότητα μέσω διαφόρων μηχανισμών και ο καθένας μπορεί να οδηγήσει σε τοξικές επιδράσεις με διαφορετικό μοτίβο (Domb et al., 2021). Οι περισσότερες πάντως τοξικότητες από νανοϋλικά προκαλούνται από την παραγωγή υψηλών επιπέδων ROS και την πρόκληση οξειδωτικού στρες (Sharifi et al., 2012).

Η υπερβολική απελευθέρωση ROS μπορεί να συμβεί μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως η αλληλεπίδραση των νανοϋλικών με τα μιτοχόνδρια, η εμπλοκή με οξειδοαναγωγικά ενεργές πρωτεΐνες, οι χημικές αντιδράσεις των επιφανειακών ομάδων ή της επικάλυψης των νανοϋλικών στο όξινο περιβάλλον και τέλος η ενεργοποίηση διαφορετικών οδών σηματοδότησης μέσω αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς της επιφάνειας των κυττάρων (Nel et al., 2006).

Ένας μηχανισμός πρόκλησης οξειδωτικού στρες από νανοϋλικά, εμφανίζεται κατά τη διαρροή μεταλλικών ιόντων από νανοσωματίδια με βάση το σίδηρο, η οποία οδηγεί σε σχηματισμό ριζών OH^\bullet από το H_2O_2 μέσω της αντίδρασης Fenton (Sharifi et al., 2012). Σε γενικές γραμμές, η πλειονότητα των νανοϋλικών που έχουν σαν βάση κάποιο μέταλλο μπορεί να οδηγήσει σε τοξικότητα που προκαλείται από την απελευθέρωση ελευθέρων ριζών μέσω αντιδράσεων τύπου Fenton (Abdal Dayem et al., 2017). Επιπλέον, ορισμένα νανοϋλικά είναι ικανά να προκαλέσουν παραγωγή ROS, όχι αυθόρμητα, αλλά σε βιολογικές συνθήκες, με βάση την ικανότητά τους να στοχεύουν τα μιτοχόνδρια (Sharifi et al., 2012). Τα μιτοχόνδρια είναι βασικά οργανίδια που εμπλέκονται στη δημιουργία σχετιζόμενων με τα νανοϋλικά ROS. Τα νανοϋλικά έχουν την ικανότητα να εκπολώνουν τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και να παρεμβάλλονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, μέσω της ενεργοποίησης

ενζύμων που σχετίζονται με το NADPH. Η έκθεση σε νανοσωματίδια μπορεί να αποκλείσει την μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, αυξάνοντας έτσι τα κυτταρικά επίπεδα της ρίζας $O_2^{\bullet-}$ μέσω μεταφοράς ηλεκτρονίων από αναπνευστικούς φορείς στο O_2 Fenton (Abdal Dayem et al., 2017).

Πέραν του οξειδωτικού στρες, τα νανοϋλικά μπορούν μέσω της αλληλεπίδρασης τους με διάφορες μεμβράνες ή πρωτεΐνες να οδηγήσουν σε κυτταρικό θάνατο μέσω απόπτωσης, αυτοφαγίας ή νέκρωσης (Domb et al., 2021).

Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο τα νανοϋλικά μπορούν να επάγουν δυσμενείς κυτταρικές επιδράσεις είναι μέσω γενοτοξικότητας. Γενοτοξικότητα ονομάζουμε την καταστροφή του γενετικού υλικού του κυττάρου, είτε σε επίπεδο DNA είτε σε επίπεδο χρωμοσωμάτων (Cao et al., 2017). Τα νανοϋλικά μπορούν να προκαλέσουν γενοτοξικότητα είτε άμεσα (πρωτογενής) είτε έμμεσα (δευτερογενής). Η πρωτογενής γενοτοξικότητα μπορεί να συμβεί λόγω αλληλεπίδρασης των νανοϋλικών με το DNA ή τη μιτωτική συσκευή, ενώ η δευτερογενής μπορεί να προκληθεί από φλεγμονώδεις αντιδράσεις και οξειδωτικό στρες λόγω παραγωγής ROS. Οι προκύπτουσες ROS μπορεί να αλληλεπιδράσουν με το DNA, οδηγώντας σε οξείδωση ή θραύση του και άλλες βλάβες (Lindberg et al., 2009; Møller et al., 2010).

2. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της *in vitro* επίδρασης τριών διαφορετικών πολυμερών νανοϋλικών, των πολυμερών τύπου πυρήνα-κελύφους PMMA@P(MAA-co-EGDMA), P(nBMA-co-EGDMA)@PMMA και του υπεραπορροφητικού πολυμερούς P(MAA-co-EGDMA)@SiO₂ στην κυτταρική βιωσιμότητα, καθώς και σε πέντε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στην καρκινική κυτταρική σειρά μακροφάγων ποντικού RAW 264.7. Η επώαση των κυττάρων έγινε με ένα εύρος χαμηλών συγκεντρώσεων (12,5, 25, 50, 100 και 200 μg/ml) για 8 ώρες, προσομοιώνοντας ένα εργασιακό σενάριο έκθεσης. Η εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας έγινε με τη μέθοδο XTT. Οι βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης προσδιορίστηκαν με φασματοφωτομετρία και ειδικότερα η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (PCARBS), καθώς και με κυτταρομετρία ροής και πιο συγκεκριμένα οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH).

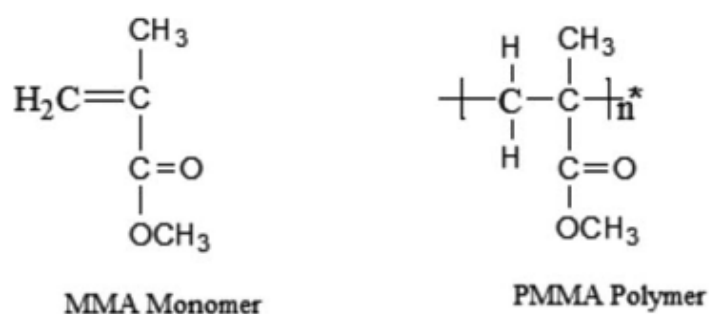
Μία τέτοια μελέτη έχει σημασία καθώς οι μοναδικές ιδιότητες που εμφανίζουν τα υλικά στη νανοκλίμακα, μπορούν να οδηγήσουν και σε ιδιαίτερους μηχανισμούς τοξικότητας. Η επιστημονική γνώση αναφορικά με την ασφάλεια των πολυμερών που εξετάστηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι ακόμη ελλιπής και δεν υπάρχουν πληροφορίες που να περιγράφουν την εκτίμηση του σχετικού κινδύνου για την υγεία. Επομένως, η συμπλήρωση των γνώσεων είναι απαραίτητη προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι κίνδυνοι και να οδηγήσουν σε βιώσιμες εφαρμογές.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Υπεραπορροφητικά πολυμερή και πολυμερή τύπου πυρήνα-κελύφους

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν οι βιολογικές επιδράσεις των πολυμερών τύπου πυρήνα-κελύφους PMMA@(PMAA-co-EGDMA) και P(nBMA-co-EGDMA)@PMMA, καθώς και του υπεραπορροφητικού πολυμερούς P(MAA-co-EGDMA)@SiO₂. Η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός τους πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Προηγμένων και Συνθέτων Υλικών, Νανοϋλικών, Νανοδιεργασιών και Νανοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Μέρος της χρηματοδότησης των αναλώσιμων αντιδραστηρίων για τη σύνθεση των μελετώμενων υλικών προήλθε από το Ευρωπαϊκό ερευνητικό πρόγραμμα HORIZON 2020-EU.2.1.2. “DECOAT” (‘Recycling of coated and painted textile and plastic materials’, Grant agreement no.: 814505).

Το PMMA είναι ένα διαφανές, ελαφρύ θερμοπλαστικό που εμφανίζει ανθεκτικότητα στα χημικά, στις κρούσεις και τις καιρικές συνθήκες και χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο του ανόργανου γυαλιού (Goseki & Ishizone, 2015). Έχει θερμοκρασία υαλώδους μεταπτώσεως (T_g) που κυμαίνεται από 100 °C έως 130 °C, καλή θερμική σταθερότητα και οπτικές ιδιότητες και αποτελεί ένα από τα πιο σκληρά θερμοπλαστικά με υψηλή αντοχή στις γρατσουνιές (Ali et al., 2015).



Εικόνα 6. Χημική δομή του μεθακρυλικού μεθυλεστέρα και του πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα). Πηγή: Ali et al., 2015

Το PMMA@(PMAA-co-EGDMA) είναι ένα πολυμερές τύπου πυρήνα-κελύφους, με πυρήνα πολυ(μεθακρυλικό μεθυλεστέρα) (PMMA) και κέλυφος ένα συμπολυμερές του πολυ(μεθακρυλικό οξέος) (PMAA) με το διμεθακρυλικό εστέρα της αιθυλενογλυκόλης (EGDMA). Το συγκεκριμένο υλικό διαθέτει σφαιρικό σχήμα

στη νανοκλίμακα, με ένα λεπτό κέλυφος P(MAA-co-EGDMA) γύρω από τον πυρήνα του PMMA. Η διάμετρος των σφαιρών κυμαίνεται από περίπου 160 έως 210 nm. Τα πολυμερή που σχηματίζουν τον πυρήνα και το κέλυφος εμφανίζουν διαφορετικές θερμοκρασίες υαλώδους μεταπτώσεως (T_g), με την T_g του κελύφους να είναι υψηλότερη από αυτήν του πυρήνα. Συγκεκριμένα, η T_g του πυρήνα PMMA είναι 104°C , ενώ του κελύφους P(MAA-co-EGDMA) είναι 228°C (Goulis et al., 2020).

Το P(nBMA-co-EGDMA)@PMMA είναι ένα πολυμερές τύπου πυρήνα-κελύφους με πυρήνα ένα συμπολυμερές του n-βουτυλ μεθακρυλικού μεθυλεστέρα P(nBMA) με τον διμεθακρυλικό εστέρα της αιθυλενογλυκόλης (EGDMA) και κέλυφος το πολυ(μεθακρυλικό μεθυλεστέρα) (PMMA). Σχηματίζουν σφαιρικά σωματίδια με διάμετρο περίπου 300nm.

Το P(MAA-co-EGDMA)@SiO₂ είναι ένα υβριδικό υπεραπορροφητικό πολυμερές (Superabsorbent polymer, SAP) που διαθέτει έναν οργανικό πυρήνα και ένα ανόργανο κέλυφος. Ο πυρήνας είναι ένα συμπολυμερές του μεθακρυλικού οξέος (MAA) με τον διμεθακρυλικό εστέρα της αιθυλενογλυκόλης (EGDMA), ο οποίος ενθυλακώνεται σε ένα ανόργανο κέλυφος από διοξείδιο του πυριτίου (SiO₂) προς σχηματισμό του P(MAA-co-EGDMA)@SiO₂. Είναι σφαιρικά με διάμετρο περίπου 300 nm και σχηματικά διαθέτουν έναν άμορφο πυρήνα και κρυσταλλική δομή κελύφους (Kanelloroulou et al., 2019; Kartsonakis et al., 2021).

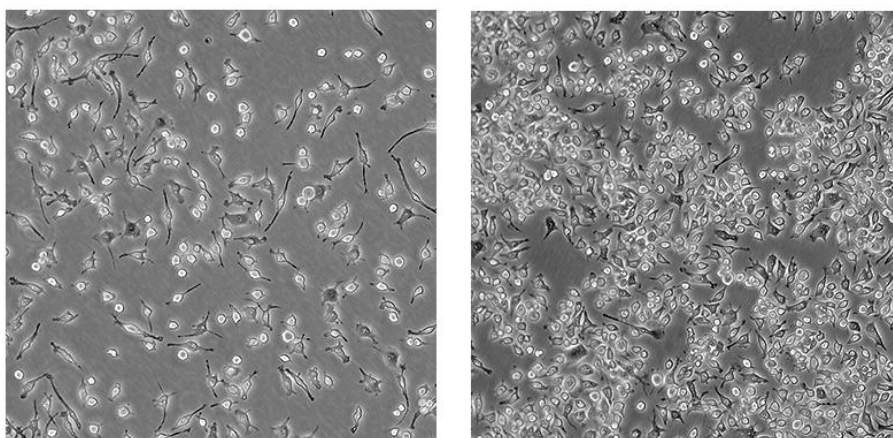
3.2 Διασπορά πολυμερών και παρασκευή διαλυμάτων

Για την εκτίμηση της επίδρασης των πολυμερών νανοϋλικών στη βιωσιμότητα και την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυτταρικού συστήματος της μελέτης, παρασκευάστηκαν stock διαλύματα συγκέντρωσης 2 mg/ml. Ειδικότερα, ζυγίστηκε σε ζυγό ακριβείας η ξηρά σκόνη και προστέθηκε κατάλληλος όγκος μείγματος διαλύτη σε dH₂O. Τα νανοσωματίδια P(nBMA-co-EGDMA)@PMMA και PMMA@(PMAA-co-EGDMA) ζυγίστηκαν στο ζυγό ακριβείας και προστέθηκε διάλυμα 5% ακετόνης σε dH₂O. Αντιθέτως, στην περίπτωση των υβριδικών υπεραπορροφητικών πολυμερών (SAPs) ενθυλακωμένων με SiO₂, P(MAA-co-EGDMA)@SiO₂, η ξηρά σκόνη ζυγίστηκε στο ζυγό ακριβείας και προστέθηκε διάλυμα 5% μεθανόλης σε dH₂O. Στη συνέχεια, όλα τα διαλύματα υποβλήθηκαν σε υπερήχους (70% πλάτος κύματος, 0,7 δευτερόλεπτα παλμικός κύκλος) σε συσκευή

υπερήχων (UP400S, Hielscher) για 5 λεπτά, προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη διασπορά.

3.3 Κυτταρική σειρά

Η κυτταρική σειρά που επελέγη για τη συγκεκριμένη εργασία ήταν τα RAW 264.7. Πρόκειται για μακροφάγα κύτταρα που προέρχονται από όγκο σε αρσενικό ποντίκι, ο οποίος προκλήθηκε από τον ιό της λευχαιμίας ποντικού Abelson. Η επιλογή της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς έγινε καθώς τα μακροφάγα γενικά προτιμώνται σε μελέτες νανοτοξικότητας. Ο λόγος είναι ότι αποτελούν τα πρώτα κύτταρα που αποκρίνονται μετά από την έκθεση στα τεχνητά νανοϋλικά, εμπλεκόμενα στην αναγνώριση, εσωτερίκευση και εκκαθάρισή τους.



Εικόνα 7. Μικροσκοπική απεικόνιση καλλιέργειας RAW264.7 σε χαμηλή και υψηλή πυκνότητα (Πηγή: <https://www.atcc.org/products/tib-71>).

3.4 Κυτταροκαλλιέργειες

Σε συμφωνία με τις διεθνείς οδηγίες σχετικά με την Καλή Πρακτική Καλλιέργειας Κυττάρων (Good Cell Culture Practice, GCCP) η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε ελέγχθηκε για μυκόπλασμα μέσω PCR. Επιπλέον, για την εξακρίβωση της γνησιότητας της κατάστασης των κυττάρων μέσω των φαινοτυπικών τους χαρακτηριστικών πραγματοποιήθηκε μορφολογικός έλεγχος με τη χρήση μικροσκοπίου.

Τα RAW264.7 καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες επιφάνειας 75cm² για 24 ώρες σε συνθήκες 37°C, 5% CO₂ και 80-95% υγρασία μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλύπτεται από 70% έως 80% από κύτταρα. Το μέσο καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) που περιείχε 4,5 g/L D-γλυκόζη, 4 mM L-γλουταμίνη, εμπλουτισμένο με 10% (v/v) βόειο εμβρυϊκό ορό (FBS), 100 μονάδες/ml πενικιλίνη και 100 μονάδες/ml στρεπτομυκίνη.

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, το μέσο κυτταροκαλλιέργειας απορρίφθηκε, οι φλάσκες ξεπλύθηκαν με 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (PBS) και προστέθηκαν 5 ml καλλιεργητικού θρεπτικού μέσου με FBS. Λόγω της ισχυρής προσκόλλησης των κυττάρων στην επιφάνεια της φλάσκας, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με μηχανικό τρόπο με τη χρήση ειδικού ξέστρου (cell scraper). Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με όσον το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής για την αποφυγή επιμολύνσεων. Επιπλέον, ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν έλεγχος των κυττάρων με σκοπό την διάγνωση πιθανών επιμολύνσεων.

Τα κύτταρα έπειτα μεταφέρθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα Neubauer, όπου και έγινε καταμέτρηση τους ώστε να υπολογιστεί ο όγκος (σε ml) από το κυτταρικό εναιώρημα που θα πρέπει να επιστρωθεί στην κάθε φλάσκα 75cm² ώστε να υπάρχουν περίπου 2.000.000 κύτταρα.

3.5 Αξιολόγηση της επίδρασης των πολυμερών στην κυτταρική βιωσιμότητα

Προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση των πολυμερών νανοϋλικών της μελέτης στη βιωσιμότητα των RAW264.7 χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος XTT. Το άλας τετραζολίου XTT ανάγεται από τις αφυδρογονάσεις των ζωντανών, μεταβολικά ενεργών κυττάρων σε ένα υδατοδιαλυτό προϊόν φορμαζάνης με έντονο πορτοκαλί χρώμα. Στη συνέχεια, το προϊόν φορμαζάνης μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτομετρία σε συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών στα 450 nm.

Η εκτίμηση της βιωσιμότητας του κυτταρικού συστήματος της μελέτης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός εμπορικά διαθέσιμου kit (R&D systems). Ειδικότερα, τα RAW264.7 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε πλήρες καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο σε τρυβλίο 96 κυψελίδων με 10.000 κύτταρα/κυψελίδα. Ο αριθμός

των κυττάρων μετρήθηκε σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Μετά το πέρας των 24 ωρών, όπου τα κύτταρα είχαν φτάσει σε ποσοστό πληρότητας 70%-80%, το πλήρες θρεπτικό μέσο απορρίφθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν για 8 ώρες με ένα εύρος χαμηλών συγκεντρώσεων (12.5, 25, 50, 100 και 200 µg/ml) των πολυμερών νανοϋλικών σε θρεπτικό μέσο απουσία FBS. Ακολούθως, 50 µl ενός διαλύματος XTT, αποτελούμενο από 49 µl αντιδραστηρίου XTT και 1 µl ενεργοποιητή XTT, προστέθηκαν σε κάθε κυψελίδα. Τα RAW264.7 επώαστηκαν για 4 ώρες και μετρήθηκαν οι τιμές της οπτικής απορρόφησης στα 450 nm και στα 630 nm (μήκος κύματος αναφοράς) σε συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών Bio-Tek ELx800 (Winooski, VT, USA). Τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο απουσία βόειου ορού με την αντίστοιχη ποσότητα διαλύτη σε αποστειρωμένο dH₂O αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης των πολυμερών νανοϋλικών σε θρεπτικό μέσο απουσία FBS και οι εξαγόμενες τιμές αφαιρέθηκαν από αυτές των κυττάρων που επώαστηκαν με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Οι τιμές της οπτικής απορρόφησης των κυττάρων της ομάδας ελέγχου και των κυττάρων που επώαστηκαν με τις διάφορες συγκεντρώσεις των πολυμερών νανοϋλικών χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας μέσω της εξίσωσης που ακολουθεί:

$$\text{Κυτταρική βιωσιμότητα (\% μεταβολή από την ομάδα ελέγχου)} = (\text{Οπτική απορρόφηση}_{\text{Δείγματος}} / \text{Οπτική απορρόφηση}_{\text{Ομάδα ελέγχου}}) \times 100$$

Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν εις τριπλούν και σε τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες περιπτώσεις.

3.6 Εκτίμηση της επίδρασης των πολυμερών σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης με φασματοφωτομετρία

Η εκτίμηση των επιδράσεων των πολυμερών νανοϋλικών σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης των RAW264.7 πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής και φασματοφωτομετρία. Για τους βιοδείκτες που προσδιορίστηκαν με φασματοφωτομετρία, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων 75 cm², ενώ για τους βιοδείκτες που προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 6 κυψελίδων.

Σε ότι αφορά τους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης που προσδιορίστηκαν μέσω φασματοφωτομετρίας, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από τη φλάσκα με τη χρήση ξέστρου και μετρήθηκαν στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, ώστε να μεταφερθεί σε κάθε νέα φλάσκα ποσότητα κυτταρικού εναιωρήματος που περιείχε περίπου 4.000.000 κύτταρα. Για το κάθε πολυμερές, από το αρχικό stock των 2 mg/ml πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις σε καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο χωρίς FBS ώστε να προκύψουν αραιωμένα διαλύματα με συγκέντρωση 125 μg/ml, 250 μg/ml, 500 μg/ml και 1 mg/ml. Στη συνέχεια, έγινε απόρριψη του πλήρους θρεπτικού μέσου από τις φλάσκες, ξεπλύθηκαν με 2 ml PBS και προστέθηκαν 9 ml καλλιεργητικού θρεπτικού μέσου χωρίς FBS και 1 ml από την κάθε συγκέντρωση σε ισάριθμες φλάσκες επιφάνειας 75cm², ώστε να προκύψουν οι τελικές συγκεντρώσεις 12.5 μg/ml, 25 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml και 200 μg/ml. Σημειώνεται ότι οι τελικές αυτές συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν ούτως ώστε να προσομοιάζουν τις χαμηλές συγκεντρώσεις στις οποίες οι εργαζόμενοι σε εγκαταστάσεις παραγωγής προϊόντων νανοτεχνολογίας μπορούν να εκτεθούν, καθώς και με βάση τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ελέγχου κυτταροτοξικότητας XTT, που υπέδειξαν ότι δεν είναι τοξικές.

Μετά τη χορήγηση των πολυμερών νανοϋλικών, τα κύτταρα επώαστηκαν για 8 ώρες σε συνθήκες 37°C, 5% CO₂ και 80-95% υγρασία. Ο χρόνος επώασης επιλέχθηκε ώστε να αντιστοιχεί σε ένα τυπικό πρόγραμμα πλήρους απασχόλησης για τους εργαζόμενους σε τέτοιες εγκαταστάσεις. Στη συνέχεια, το καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο απορρίφθηκε, έγινε ξέπλυμα με 2 ml PBS, προστέθηκαν 500 μl PBS με αναστολείς πρωτεασών και έγινε αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας με μηχανικό τρόπο με τη χρήση ξέστρου. Το κυτταρικό εναιώρημα από την κάθε φλάσκα συλλέχθηκε με πιπέτα και μεταφέρθηκε σε σωλήνες 1,5 ml. Στη συνέχεια, τα κυτταρικά εναιωρήματα τοποθετήθηκαν σε πάγο και υποβλήθηκαν σε υπερήχους σε περιοδικά διαστήματα των 10 δευτερολέπτων για 1 λεπτό προκειμένου να πραγματοποιηθεί λύση των κυττάρων. Έπειτα ακολούθησε φυγοκέντρηση (15000 g, 4°C, 20 λεπτά) και το υπερκείμενο που προέκυψε συλλέχθηκε σε ξεχωριστούς σωλήνες 1,5 ml ώστε να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των φασματοφωτομετρικών δεικτών.

3.6.1 Προσδιορισμός των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) με φασματοφωτομετρία

Αρχή της μεθόδου

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC) αναφέρεται στην αθροιστική ικανότητα όλων των συστατικών του κυτταρολύματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Επομένως, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αποτελεί ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του κυττάρου. Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιείται η εμπορικά διαθέσιμη ελεύθερη ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH[•]). Η ρίζα DPPH[•] είναι ένα σταθερό δραστικό κατιόν, μωβ χρώματος το οποίο παρουσία ενός δότη υδρογόνων ανάγεται προς την αντίστοιχη υδραζίνη (1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται φασματοφωτομετρικά με μέτρηση της απορρόφησης στα 520 nm.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων της TAC χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Janaszewska and Bartosz (2002), με ορισμένες τροποποιήσεις (Vardakas et al., 2021).

Αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (10 mM, pH = 7,4)

MB (KH₂PO₄): 136 g/mol

MB (Na₂HPO₄): 178 g/mol

Για την παρασκευή 500 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, απαιτείται η παρασκευή 100 ml KH₂PO₄ (10 mM) και 400 ml Na₂HPO₄ (10 mM). Για το διάλυμα KH₂PO₄ ζυγίστηκαν 0,136 g σκόνης και διαλύθηκαν σε 100 ml dH₂O (αρχικό pH ~ 4,57). Για το διάλυμα Na₂HPO₄ ζυγίστηκαν 0,712 g σκόνης και διαλύθηκαν σε 400 ml dH₂O (αρχικό pH ~ 9,11). Στη συνέχεια, τα δύο διαλύματα αναμείχθηκαν σε ένα γυάλινο ποτήρι ζέσεως. Εφόσον ήταν αναγκαίο, γινόταν διόρθωση του pH με NaOH ή HCl 2,5 N, μέχρι τιμή pH 7,4.

- Διάλυμα ρίζας DPPH[•] (0,1 mM)

MB: 394,32 g / mol

Αρχικά, διαλύθηκαν 0,02 g DPPH σε 5 ml μεθανόλης (MeOH) και αναδεύτηκαν (10 mM). Στη συνέχεια, το διάλυμα αραιώθηκε 100 φορές με μεθανόλη για τελική συγκέντρωση 0,1 mM. Τυπικά, αραιώνονται 200 μl του διαλύματος 10 mM DPPH σε 19,8 ml μεθανόλης. Τα γυάλινα σκεύη καλύφθηκαν με αλουμινοχαρτο προκειμένου να αποφευχθεί η φωτόλυση.

Μέθοδος

Αρχικά, προστέθηκαν σε σωλήνες 1,5 ml οι όγκοι που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Όπου X εννοείται ο όγκος του κυτταρολύματος που περιέχει περίπου 30 μg συνολικής πρωτεΐνης.

	Control	Δείγμα
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (10 mM, pH = 7.4)	500 μl	500-X μl
Διάλυμα ρίζας DPPH* (0.1 mM)	500 μl	500 μl
Κυτταρόλυμα	-	X μl

Οι σωλήνες 1,5 ml ανακινήθηκαν έντονα σε vortex και επώαστηκαν στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 15000 g, για 3 λεπτά στους 25 °C και, τέλος, το υπερκείμενο υγρό κάθε σωλήνα μεταφέρθηκε σε καθαρή πλαστική κυψελίδα και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 520 nm.

Υπολογισμοί

$$\text{mmol DPPH} / \text{ml δείγματος} = [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) * 50 * (1000 / X)] / 1000$$

Όπου η % Abs μείωση αντιστοιχεί στο $[(\text{Abs}_{\text{Control}} - \text{Abs}_{\text{Δείγματος}}) / \text{Abs}_{\text{Control}}] * 100$, διαιρούμενη κατά 100, ώστε να μετατραπεί η μείωση της απορρόφησης σε ποσοστό απορρόφησης και πολλαπλασιαζόμενη επί 50, επειδή η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 μmol / L κυψελίδας. Επίσης, πολλαπλασιάζεται με το πηλίκο 1000 / X, όπου 1000 μl ο τελικός όγκος της αντίδρασης και X τα μl του κυτταρολύματος που περιέχουν τουλάχιστον 30 μg συνολικής πρωτεΐνης. Τέλος, το γινόμενο διαιρείται με το 1000 για τη μετατροπή των L του δείγματος σε ml δείγματος.

3.6.2 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) με φασματοφωτομετρία

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος των TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) είναι μία φασματοφωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων. Σε αυτή προσδιορίζεται η μηλονική διαλδεΐδη (MDA), η οποία αποτελεί ένα από τα πολλά προϊόντα που σχηματίζονται, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, κατά τη διάσπαση ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων προερχόμενων από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η MDA αντιδρά με δύο μόρια θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) προς σχηματισμό ενός συμπλόκου που απορροφά μέγιστα στα 530 nm, με την τιμή της απορρόφησης να είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της MDA.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Η μέτρηση των TBARS βασίστηκε στη μέθοδο των Keles et al. (2001), με ορισμένες τροποποιήσεις (Vardakas et al., 2021).

Αντιδραστήρια

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (200 mM, pH = 7,4)

MB (Tris): 121,14 g / mol

MB (HCl): 36,46 g / mol (stock 37%) [10.1 N]

Για την παρασκευή 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, σε ένα ποτήρι ζέσεως προστέθηκαν αργά 42 ml διαλύματος HCl (0,1 N) σε 25 ml διαλύματος Tris (200 mM) και το διάλυμα που προέκυψε ογκομετρήθηκε με dH₂O μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Εφόσον ήταν αναγκαίο, γινόταν διόρθωση του pH με NaOH ή HCl, 1 N, μέχρι pH 7,4.

- Διάλυμα Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM)

MB (TBA): 144,1 g / mol

MB (Na₂SO₄): 142,04 g / mol

Για την παρασκευή 10 ml διαλύματος Na₂SO₄ -TBA ζυγίστηκαν 2,84 g Na₂SO₄ και 0,08 g TBA. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν σε ένα γυάλινο ποτήρι ζέσεως και

προστέθηκαν 10 ml dH₂O. Το διάλυμα αναδεύθηκε υπό θέρμανση μέχρι να διαλυτοποιηθεί πλήρως.

- Τριχλωροοξικό οξύ (TCA) 35%

Για την παρασκευή 100 ml διαλύματος TCA 35%, ογκομετρήθηκαν 35 ml από το TCA 100 % και συμπληρώθηκαν με dH₂O μέχρι τελικό όγκο 100 ml.

- Τριχλωροοξικό οξύ (TCA) 70%

Για την παρασκευή 100 ml διαλύματος TCA 70%, ογκομετρήθηκαν 70 ml από το TCA 100 % και συμπληρώθηκαν με dH₂O μέχρι τελικό όγκο 100 ml.

Μέθοδος

Πριν τη έναρξη του πειράματος, η θερμοκρασία του υδατόλουτρου ρυθμίστηκε στους 95°C. Αναλυτικά, σε δοκιμαστικούς σωλήνες falcon (15 ml) προστέθηκαν X μl κυτταρολύματος, όπου X ο όγκος του κυτταρολύματος που περιέχει τουλάχιστον 70 μg συνολικής πρωτεΐνης και 400-X μl PBS. Για το control προστέθηκαν μόνο 400 μl PBS. Έπειτα ακολούθησε προσθήκη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (200 mM) και 500 μl TCA 35%, ανάδευση στο vortex και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, προστέθηκε 1 ml διαλύματος Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM) και οι σωλήνες τοποθετήθηκαν στους 95 °C στο υδατόλουτρο για 45 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης τα δείγματα μεταφέρθηκαν για 5 λεπτά στον πάγο, προστέθηκε 1 ml διαλύματος TCA 70% και έγινε ανάδευση στο vortex. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε ποσότητα 1 ml από τον κάθε σωλήνα σε αντίστοιχους σωλήνες 1,5 ml και έγινε φυγοκέντρηση στα 11200 g στους 25 °C για 3 λεπτά. Τέλος, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση στα 530 nm με γυάλινη κυψελίδα.

Υπολογισμοί

$$\text{TBARS } (\mu\text{mol} / \text{ml}) = [(Abs_{\text{Δείγματος}} - Abs_{\text{Control}}) / 0,156 * (3400 / X)] / 1000$$

Όπου το 0,156 προκύπτει από τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA που είναι 156000 (mol / L), διαιρούμενο με 10⁻⁶, ώστε να μετατραπεί από mol / L σε μmol / L. Ο πολλαπλασιασμός με το πηλίκο 3400 / X γίνεται προκειμένου να ληφθεί υπόψη ο τελικός όγκος της αντίδρασης (3400 μl) και η ποσότητα του κυτταρολύματος (X μl) που προστίθεται στην αντίδραση ώστε να περιέχονται

τουλάχιστον 70 μg συνολικής πρωτεΐνης. Τέλος, η διαίρεση με το 1000 γίνεται προκειμένου να μετατραπούν τα μmol / L σε μmol / ml.

3.6.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων με φασματοφωτομετρία

Αρχή της μεθόδου

Σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, οι πρωτεΐνες υφίστανται οξειδωτικές τροποποιήσεις που συνήθως αφορούν είτε δομικές μεταβολές των καταλοίπων αμινοξέων είτε θραύση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Μία από αυτές τις τροποποιήσεις είναι η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών που αποτελεί μία μη αναστρέψιμη, μη ενζυμική διαδικασία. Οι βαριά καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σχηματίζουν συσσωματώματα μεγάλου μοριακού βάρους, τα οποία όχι μόνο δεν μπορούν να αποικοδομηθούν, αλλά επίσης μπορούν να αναστείλουν τη λειτουργία του πρωτεασώματος. Αυτά τα συσσωματώματα είναι χημικά σταθερά και επομένως θεωρούνται ευρέως ως αξιόπιστος δείκτης σοβαρής οξειδωτικής βλάβης και ως βιοδείκτης οξειδωτικού στρες. Η μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων βασίζεται στην παραγωγοποίηση της ομάδας καρβονυλίου των πρωτεϊνών με 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH), η οποία οδηγεί στο σχηματισμό του 2,4-δινιτροφαινυλίου (DNP), ενός έγχρωμου σταθερού προϊόντος υδραζόνης, το οποίο απορροφά στα 375 nm.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Patsoukis et al. (2004), με ορισμένες μικρές τροποποιήσεις (Vardakas et al., 2021).

Αντιδραστήρια

- Διάλυμα HCl 2,5 N

Για την παρασκευή 100 mL διαλύματος 2,5 N HCl, προστέθηκαν αργά 24,6 ml του 37% HCl (ίσο με 10,1 N HCl) σε 70 ml dH₂O και το διάλυμα ογκομετρήθηκε σε τελικό όγκο 100 ml με dH₂O.

- DNPH (14 mM)

MB: 198,1 g / mol

Για την παρασκευή 100 mL διαλύματος 14 mM DNPH διαλύουμε 0,2833 g DNPH σε 100 mL 2,5 N HCl. Το διάλυμα καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο.

- Τριχλωροοξικό οξύ (TCA) 10%

Ογκομετρήθηκαν 10 ml από το TCA 100 % και συμπληρώθηκαν με dH₂O μέχρι τελικό όγκο 100 ml.

- Ουρία (5 M, pH = 2,3)

MB: 60,06 g / mol

Για την παρασκευή 100 ml 5 M ουρίας διαλύθηκαν 30 g ουρίας σε 70 ml dH₂O και ογκομετρήθηκαν σε τελικό όγκο 100 ml με dH₂O. Το pH ρυθμίστηκε στο 2,3 με 2,5 N HCl.

Μέθοδος

Σε σωλήνες 1,5 ml προστέθηκαν X μl κυτταρολύματος, που αντιστοιχούν στον όγκο του κυτταρολύματος που περιέχει τουλάχιστον 80 μg συνολικής πρωτεΐνης και 400-X μl PBS. Έπειτα, προστέθηκαν 500 μl DNPH για τα δείγματα και 500 μl HCl (2,5 N) για τα τυφλά (κάθε δείγμα είχε το τυφλό του) και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στο σκοτάδι με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C, μετά το πέρας της οποίας το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και στο ίζημα προστέθηκε 1 ml TCA 10%. Οι σωλήνες ανακινήθηκαν με vortex και, εάν ήταν απαραίτητο, το ίζημα διαλυόταν χειροκίνητα με την άκρη της πιπέτας. Ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 λεπτά, στους 4°C, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και έγιναν 2 βήματα πλύσης με 1 ml διαλύματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (σε αναλογία 1:1 v/v) και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες με απόρριψη του υπερκειμένου. Μετά την δεύτερη πλύση, στο ίζημα προστέθηκε 1 ml ουρίας (5M, pH 2,3) και τα δείγματα επώαστηκαν σε κλίβανο στους 37°C για 15 λεπτά. Τέλος, φυγοκεντρήθηκαν (15000 g, 5 λεπτά, 4°C) και μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση στα 375 nm, σε γυάλινη κυψελίδα.

Υπολογισμοί

Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol / ml) = [(Abs_{Δείγματος} - Abs_{Τυφλού}) / 0,022 * (1000 / X)].

Το 0,022 προκύπτει από τον μοριακό συντελεστή απόσβεσης του DNPH και το πηλίκο 1000 / X αντιστοιχεί στον τελικό όγκο της αντίδρασης διαιρούμενο με τον όγκο του κυτταρολύματος που περιέχει τουλάχιστον 80 μg συνολικής πρωτεΐνης.

3.6.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Αρχή της μεθόδου

Για την εκτίμηση των βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης ήταν απαραίτητη η μέτρηση της συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης. Για την μέτρηση αυτή χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Bradford. Η χρωστική του διαλύματος, Coomassie Brilliant Blue, συνδέεται με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών δίνοντας ένα μπλε σύμπλοκο, με μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm (Bradford, 1976).

Αντιδραστήρια

- Αντιδραστήριο Bradford

Για την παρασκευή 1 L αντιδραστηρίου Bradford, ζυγίστηκαν 100 mg χρωστικής Coomassie Brilliant Blue και προστέθηκαν σε ένα γυάλινο ποτήρι ζέσεως επενδυμένο με αλουμινόχαρτο, καθώς το διάλυμα είναι φωτοευαίσθητο. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 50 ml 95% (v/v) αιθανόλης και 100 ml 85% (w/v) φωσφορικού οξέος και το διάλυμα αναδεύτηκε με μαγνήτη μέχρι να διαλυθεί πλήρως η σκόνη. Έπειτα, ογκομετρήθηκε μέχρι το 1 L με dH₂O, αναδεύτηκε και φιλτραρίστηκε.

Μέθοδος

Σε σωλήνες 1,5 ml προστέθηκαν διαδοχικά οι ακόλουθοι όγκοι:

	Control	Δείγμα
Κυτταρόλυμα (Αραίωση 1/10 σε PBS)	-	20 μl
PBS	20 μl	-
Αντιδραστήριο Bradford	1 ml	1 ml

Οι σωλήνες αναδεύτηκαν έντονα με vortex και επώαστηκαν στο σκοτάδι για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της επώασης, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm με πλαστική κυψελίδα.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης υπολογίστηκε με βάση τους συντελεστές (a, b), που προέκυψαν από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης βόειου ορού σε mg/ml, η οποία ήταν της μορφής $y = ax + b$.

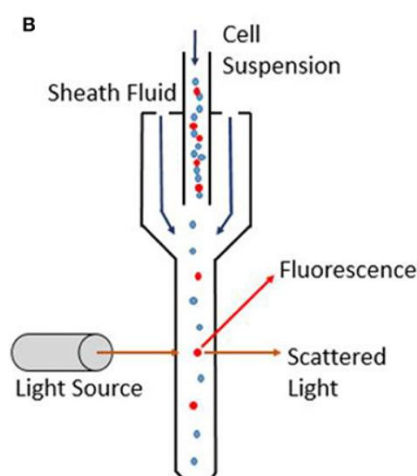
3.7 Εκτίμηση της επίδρασης των πολυμερών σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης με κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια τεχνική ανάλυσης μεμονωμένων σωματιδίων (π.χ. κυττάρων), τα οποία βρίσκονται υπό τη μορφή εναιωρήματος σε ένα διάλυμα. Το κάθε κύτταρο αναλύεται ως προς τον σκεδασμό της ακτινοβολίας που προκαλεί ή και ως προς μία ή περισσότερες παραμέτρους φθορισμού, καθώς μία δέσμη φωτός προσπίπτει επάνω στα κύτταρα ενώ αυτά ρέουν από ένα σταθερό σημείο υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Με την κυτταρομετρία ροής μπορούν λοιπόν να εκτιμηθούν το μέγεθος ενός κυττάρου, η εσωτερική του πολυπλοκότητα και η ένταση του φθορισμού του.

Η λειτουργία ενός κυτταρομέτρου ροής βασίζεται σε 3 κύρια μέρη, το ρευστό, το οπτικό και το ηλεκτρονικό. Το ρευστό σύστημα αποτελείται από το διάλυμα κάλυψης (sheath fluid) το οποίο περιβάλλει το διάλυμα των κυττάρων εστιάζοντας το δείγμα στο σημείο εξέτασης όπου το κάθε κύτταρο θα αναλυθεί από την ακτίνα φωτός. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται υδροδυναμική εστίαση και σ' αυτήν οφείλεται η κίνηση των κυττάρων σε μονή σειρά.

Το οπτικό σύστημα αποτελείται από το σύστημα οπτικής διέγερσης (excitation) και το σύστημα οπτικής συλλογής (collection). Το σύστημα οπτικής διέγερσης αποτελείται από την πηγή φωτός (λείζερ) και από τα εξαρτήματα (οπτικές ίνες, φακούς και πρίσματα) που κατευθύνουν τη δέσμη στα κύτταρα. Το σύστημα οπτικής συλλογής αποτελείται από φακούς που κατευθύνουν την εκπεμπόμενη από τα κύτταρα ακτινοβολία σε οπτικές ίνες. Οι οπτικές ίνες μεταδίδουν έπειτα την ακτινοβολία σε φίλτρα και κάτοπτρα που στη συνέχεια μεταδίδουν ακτινοβολίες συγκεκριμένου μήκους κύματος στους ανιχνευτές. Οι ανιχνευτές (φωτοδιόδοι ή φωτοπολλαπλασιαστές) είναι αισθητήρες φωτός που διεγείρονται από φωτόνια και

παράγουν ηλεκτρόνια. Κάθε σωματίδιο που περνά διαμέσου της δέσμης φωτός στο σημείο εξέτασης σκεδάζει το φως προς διάφορες κατευθύνσεις. Ο σκεδασμός που γίνεται σε κατεύθυνση παράλληλη ως προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία ονομάζεται εμπρόσθιος σκεδασμός (forward scattering, FSC) και σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου, ενώ ο σκεδασμός που γίνεται σε κατεύθυνση κάθετη ως προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία ονομάζεται πλευρικός σκεδασμός (side scattering, SSC) και σχετίζεται με την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ. σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Εκτός από το σκεδασμό, συμβαίνει και φθορισμός της ακτινοβολίας. Τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως διαφορετικού μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές. Το ηλεκτρονικό σύστημα μετατρέπει, τέλος, τα σήματα από τους ανιχνευτές σε ψηφιακά σήματα που μπορούν να διαβαστούν από έναν υπολογιστή, όπου μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσικοχημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου.



Εικόνα 8. Κίνηση κυττάρων σε μονή σειρά περιβαλλόμενα από το διάλυμα κάλυψης (sheath fluid), καθώς αλληλεπιδρούν με την ακτίνα λέιζερ που συλλέγεται από ανιχνευτές. Πηγή: Vembadi et al., 2019.

Στην παρούσα εργασία, τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) και της ανηγμένης γλουταθειόνης μορφής της γλουταθειόνης (GSH) προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τους ανιχνευτές διοξική 2',7'-διγλωροδιϋδροφθοροσκεΐνη (H₂DCFDA) και Thiol Green Dye, αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, η H₂DCFDA εισέρχεται στα κύτταρα όπου αποακετυλιώνεται από τις

κυτταρικές εστεράσες προς 2',7'-διχλωροδιϋδροφθοροσκεΐνη (H₂DCF), η οποία στη συνέχεια, παρουσία ROS, οξειδώνεται σε μία έντονα φθορίζουσα ένωση με μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής 488 nm και 530 nm, αντίστοιχα. Από την άλλη, η χρωστική Thiol Green προσδένεται στις σουλφυδρυλικές ομάδες, συμπεριλαμβανομένων της GSH, και φθορίζει έντονα, με μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής 490 nm και 525 nm, αντίστοιχα.

3.7.1 Προσδιορισμός των ενδοκυτταρικών επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) με κυτταρομετρία ροής

Αρχή της μεθόδου

Προκειμένου να προσδιοριστούν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSH) χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης Thiol Green. Η Thiol Green θεωρείται ως ένας από τους πιο ευαίσθητους ανιχνευτές για τη μέτρηση θειολικών ενώσεων στα ζωντανά κύτταρα. Κατά την αντίδρασή της με ενώσεις θειόλης, παράγεται ένα πράσινο φθορίζον προϊόν, το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί με μέτρηση της έντασης του φθορισμού στο μήκος κύματος διέγερσης/μήκος κύματος εκπομπής = 490/525 nm.

Αντιδραστήρια

- Thiol Green Indicator

Για την παρασκευή 10 ml του αντιδραστηρίου αναμείχθηκαν 0,05 ml του εμπορικά διαθέσιμου Thiol Green Indicator (Abcam) με 9,95 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (PBS).

Μέθοδος

Τα RAW264.7 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο 6 κυψελίδων με πλήρες καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο για 24 ώρες με 300.000 κύτταρα / κυψελίδα, ώστε να φτάσουν σε πληρότητα 70%-80%. Στη συνέχεια, το πλήρες θρεπτικό μέσο απομακρύνθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν για 8 ώρες με διάφορες συγκεντρώσεις (12.5 µg / ml – 200 µg / ml) των νανοϋλικών της μελέτης σε καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο απουσία βόειου ορού. Μετά το πέρας της επώασης έγινε αφαίρεση του καλλιεργητικού θρεπτικού μέσου και ξέπλυμα με 1 ml PBS. Στη συνέχεια προστέθηκαν 250 µl θρυψίνης σε κάθε κυψελίδα και τοποθετήθηκαν στον κλίβανο

για 30 δευτερόλεπτα. Έπειτα, προστέθηκε 1 ml καλλιεργητικού θρεπτικού μέσου με FBS, έγινε επαναιώρηση και μεταφορά των κυττάρων σε σωλήνες των 1,5 ml, οι οποίοι τοποθετήθηκαν σε πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 1500 g για 5 λεπτά στους 4°C, απομάκρυνση του υπερκείμενου, προσθήκη 1 ml PBS και διαλυτοποίηση με τη βοήθεια πιπέτας και ξανά φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Έπειτα αφαιρέθηκε και πάλι το υπερκείμενο, προστέθηκαν 1 ml PBS και 5 µl χρωστική Thiol Green στον κάθε σωλήνα και, τέλος, τα δείγματα επώαστηκαν στον κλίβανο για 30 λεπτά με μία ενδιάμεση ανάδευση στα 15 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 1500 g για 5 λεπτά στους 4°C, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 500 µl PBS και έγινε διαλυτοποίηση με τη βοήθεια πιπέτας. Τέλος, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε σωληνάκια κυτταρομέτρου και τοποθετήθηκαν στον πάγο μέχρι να ξεκινήσει η ανάλυση με το κυτταρόμετρο FACScan (Becton Dickinson, NJ, USA).

Για την εκτίμηση του μεγέθους και της εσωτερικής πολυπλοκότητας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ο εμπρόσθιος και ο πλευρικός σκεδασμός του φωτός, αντίστοιχα. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 10.000 κύτταρα / δείγμα, με ρυθμό ροής περίπου 500 συμβάντα / δευτερόλεπτο και η ένταση του φθορισμού μετρήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα.

3.7.2 Προσδιορισμός των ενδοκυτταρικών επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) με κυτταρομετρία ροής

Αρχή της μεθόδου

Η διοξική 2',7'-διχλωροδιϋδροφθοροσκεΐνη (H₂DCFDA) είναι μεταξύ των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων ανιχνευτών για τη μέτρηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Πιο συγκεκριμένα, η H₂DCFDA εισέρχεται εντός των κυττάρων, αποακετυλιώνεται από τις κυτταρικές εστεράσες προς σχηματισμό του ενδιάμεσου προϊόντος 2',7'-διχλωροδιϋδροφθοροσκεΐνη (H₂DCF). Υπό την παρουσία ROS το συγκεκριμένο προϊόν οξειδώνεται, με αποτέλεσμα την παραγωγή της 2',7'-διχλωροφλουορεσκεΐνης (DCF), ένα φθορίζον προϊόν, το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί με μέτρηση της έντασης του φθορισμού στα μήκος κύματος διέγερσης / μήκος κύματος εκπομπής = 488 / 530 nm.

Αντιδραστήρια

- H₂DCFDA (10 μM)

Για την παρασκευή 10 ml stock διαλύματος H₂DCFDA (20 mM), ζυγίστηκαν 1.94 mg H₂DCFDA και προστέθηκαν 10 ml DMSO. Ακολούθως, αραιώθηκαν 0.01 ml του παρασκευασθέντος stock διαλύματος σε 19.990 ml PBS, προκειμένου να προκύψει το τελικό διάλυμα H₂DCFDA (10 μM) το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία.

Μέθοδος

Τα RAW264.7 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο 6 κυψελίδων με πλήρες καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο για 24 ώρες με 300.000 κύτταρα/κυψελίδα, ώστε να φτάσουν σε πληρότητα 70%-80%. Έπειτα, το πλήρες θρεπτικό μέσο απορρίφθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν για 8 ώρες με διάφορες συγκεντρώσεις (12.5 μg / ml – 200 μg / ml) των νανοϋλικών της μελέτης σε καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο απουσία βόειου ορού. Αφού ολοκληρώθηκε η επώαση αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και έγινε πλύση με 1 ml PBS. Έπειτα, προστέθηκε 1,5 ml H₂DCFDA (10 μM) σε κάθε κυψελίδα και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στον επωαστήρα. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πιπετάρισμα εντός της κυψελίδας και μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος σε σωλήνες των 1,5 ml. Οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν στα 1500 g για 5 λεπτά στους 4°C, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 500 μl PBS. Το ίζημα διαλυτοποιήθηκε με τη βοήθεια πιπέτας και το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε σωληνάκια κυτταρομέτρου, τα οποία τοποθετήθηκαν στον πάγο μέχρι να ξεκινήσει η ανάλυση με το κυτταρόμετρο FACScan (Becton Dickinson, NJ, USA).

Για την εκτίμηση του μεγέθους και της εσωτερικής πολυπλοκότητας των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ο εμπρόσθιος και ο πλευρικός σκεδασμός του φωτός, αντίστοιχα. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 10.000 κύτταρα / δείγμα, με ρυθμό ροής περίπου 500 συμβάντα / δευτερόλεπτο και η ένταση του φθορισμού μετρήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα.

3.8 Στατιστική ανάλυση

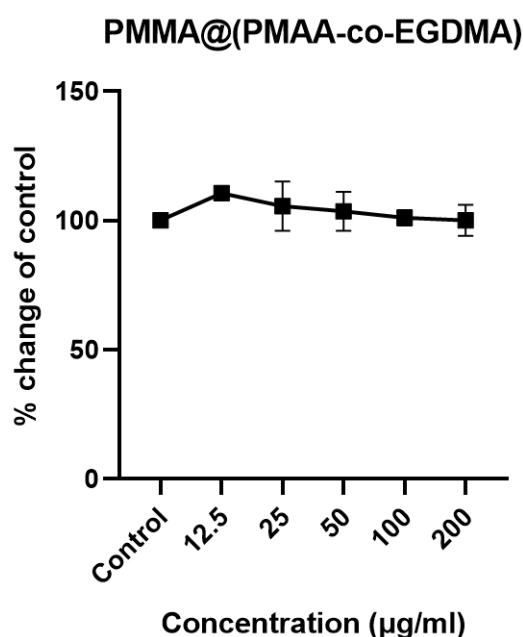
Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε Unpaired t-test με τη διόρθωση του Welch, προκειμένου να συγκριθούν οι μέσοι όροι κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης με τον μέσο όρο της ομάδας ελέγχου. Τα αποτελέσματα

εκφράζονται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM), που έχει προκύψει από 2 ή 3 ανεξάρτητα πειράματα και οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για $p < 0.05$. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της έκδοσης 8.0.1 GraphPad Prism για Windows, GraphPad Software, San Diego, California US.

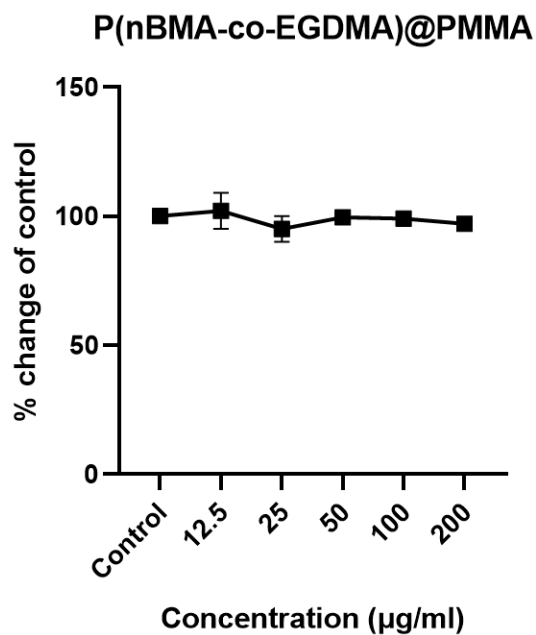
4. Αποτελέσματα

4.1 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας των πολυμερών στα RAW264.7

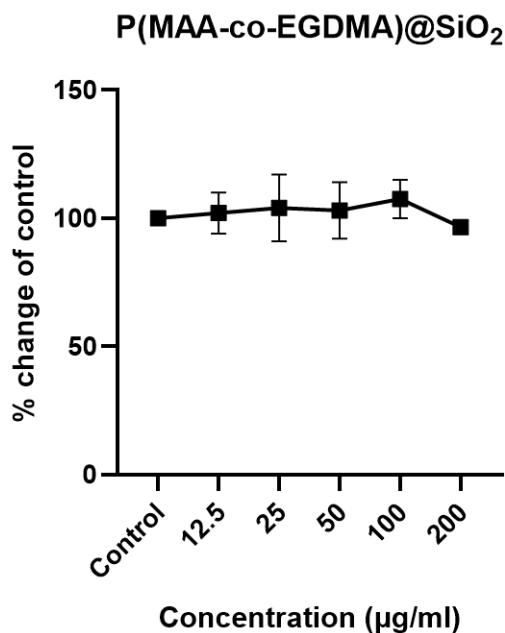
Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη χρωματομετρική μέθοδο XTT δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στη βιωσιμότητα των RAW264.7 έπειτα από τη χορήγηση οποιουδήποτε πολυμερούς νανοϋλικού στο εξεταζόμενο εύρος συγκεντρώσεων για 8 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα διαγράμματα που ακολουθούν.



Διάγραμμα 1. Επίδρασεις αυξανόμενων συγκεντρώσεων (12.5–200 µg/ml) του πολυμερούς PMMA@(PMAA-co-EGDMA) στη βιωσιμότητα των RAW264.7 μετά από 8 ώρες επώασης.



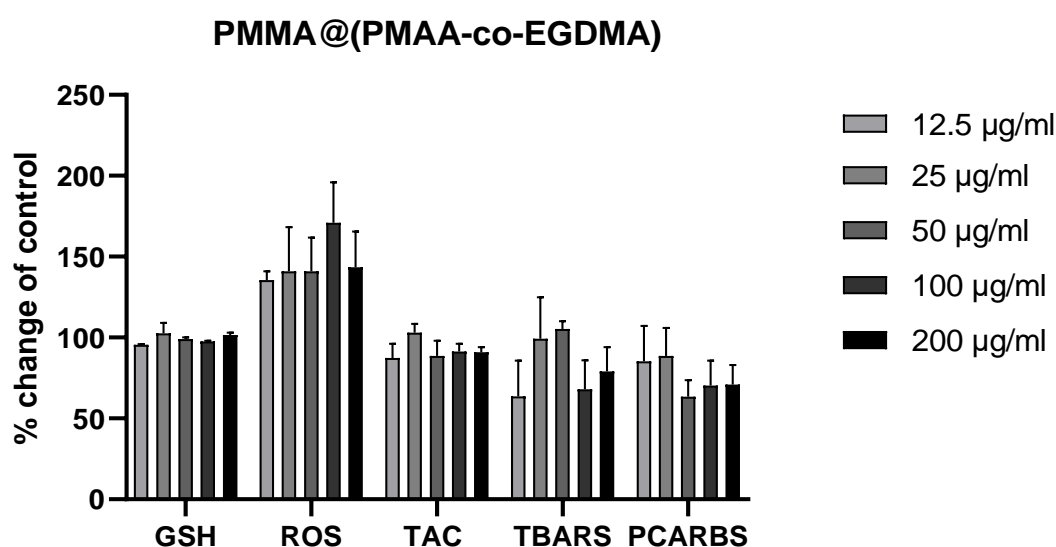
Διάγραμμα 2. Επιδράσεις αυξανόμενων συγκεντρώσεων (12.5–200 µg/ml) του πολυμερούς P(nBMA-co-EGDMA)@PMMA στη βιωσιμότητα των RAW264.7 μετά από 8 ώρες επώασης.



Διάγραμμα 3. Επιδράσεις αυξανόμενων συγκεντρώσεων (12.5–200 µg/ml) του υπεραπορροφητικού πολυμερούς P(MAA-co-EGDMA)@SiO₂ στη βιωσιμότητα των RAW264.7 μετά από 8 ώρες επώασης.

4.2 Προσδιορισμός της επίδρασης των πολυμερών σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στα RAW264.7

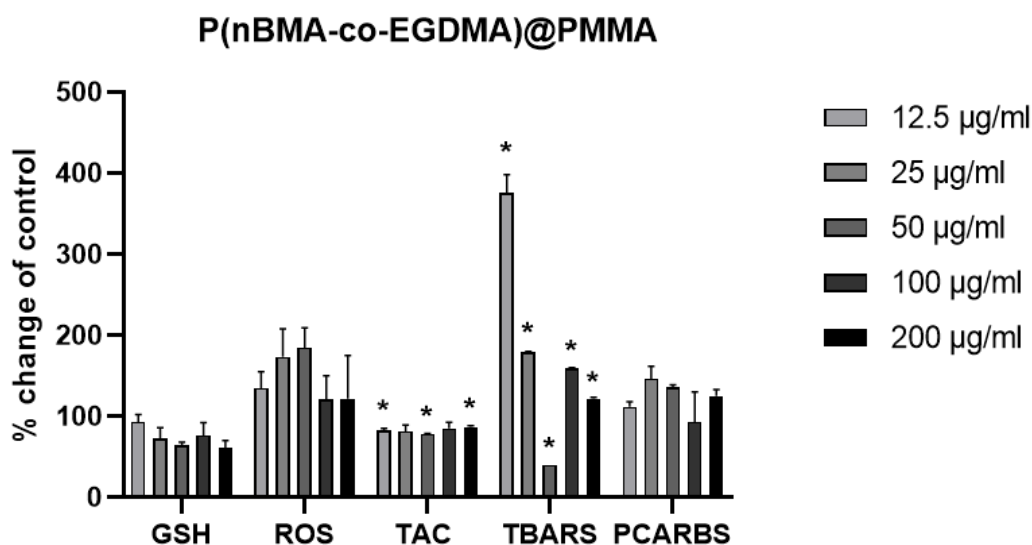
Η επώαση των κυττάρων για 8 ώρες με το πολυμερές τύπου πυρήνα-κελύφους PMMA@P(MAA-co-EGDMA) δεν προκάλεσε καμία επίδραση στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης των RAW264.7 στο εξεταζόμενο εύρος συγκεντρώσεων. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα των ROS παρουσίασαν μία ελαφριά αύξηση σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, χωρίς ωστόσο να προκύψει κάποια στατιστικά σημαντική μεταβολή.



*Διάγραμμα 4. Επιδράσεις αυξανόμενων συγκεντρώσεων (12.5-200 µg/ml) του πολυμερούς PMMA@(PMAA-co-EGDMA) στα επίπεδα βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης στα RAW264.7, έπειτα από 8 ώρες επώασης. *: Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0,05$).*

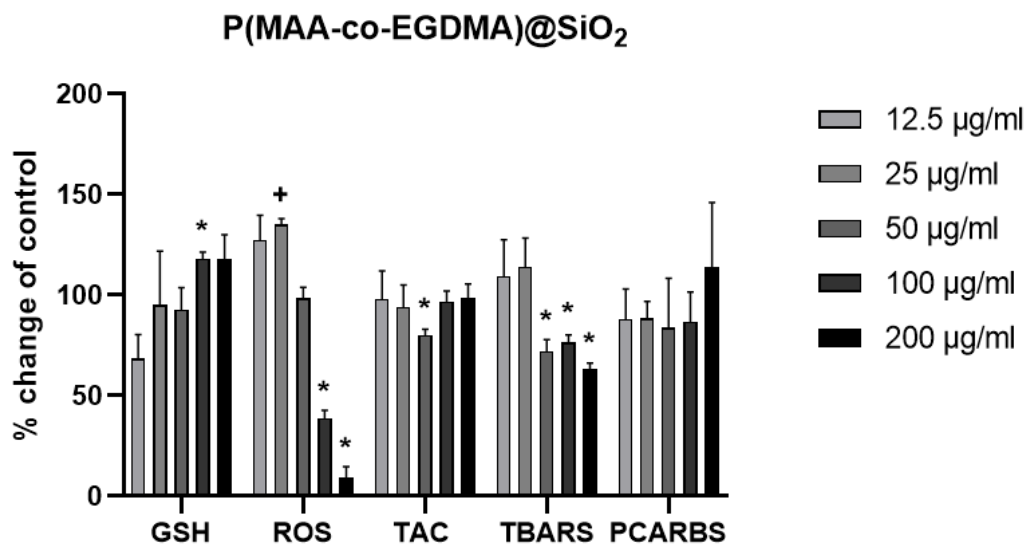
Σε ό,τι αφορά το πολυμερές P(nBMA-co-EGDMA)@PMMA, η χορήγηση του στα κύτταρα στο εξεταζόμενο εύρος συγκεντρώσεων για 8 ώρες προκάλεσε διαταραχές της οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων των φασματοφωτομετρικών βιοδεικτών υπέδειξε στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα της TAC (12,5, 50 και 200 µg/ml), σε συνδυασμό με στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα των TBARS (12,5, 25, 100 και 200 µg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη συγκέντρωση των 50 µg/ml τα επίπεδα

των TBARS παρουσίασαν μία στατιστικά σημαντική μείωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.



Διάγραμμα 5. Επιδράσεις αυξανόμενων συγκεντρώσεων (12.5-200 µg/ml) του πολυμερούς P(nBMA-co-EGDMA)@PMMA στα επίπεδα βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης στα RAW264.7, έπειτα από 8 ώρες επώασης. *: Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0,05$).

Τέλος, η επώαση των κυττάρων για 8 ώρες με το εξεταζόμενο εύρος συγκεντρώσεων του υβριδικού υπεραπορροφητικού πολυμερούς P(MAA-co-EGDMA)@SiO₂ προκάλεσε ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού στα RAW264.7. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα της GSH (100 µg/ml), παράλληλα με μια στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα των ROS (100 και 200 µg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, σε ό,τι αφορά τα επίπεδα των ROS, παρατηρήθηκε μια ισχυρή τάση αύξησης ($p = 0,058$) στα 25 µg/ml σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική μείωση των TBARS (50, 100 και 200 µg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Πέρα από τις προαναφερθείσες μεταβολές παρατηρήθηκε και μία στατιστικά σημαντική μείωση της TAC στα 50 µg/ml σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.



Διάγραμμα 6. Επιδράσεις αυξανόμενων συγκεντρώσεων (12.5-200 µg/ml) του υπεραπορροφητικού πολυμερούς P(MAA-co-EGDMA)@SiO₂ στα επίπεδα βιοδεικτών οξειδωαναγωγικής κατάστασης στα RAW264.7, έπειτα από 8 ώρες επώασης. *: Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0,05$). +: $p = 0.058$.

5. Συζήτηση

Η νανοτεχνολογία αποτελεί ένα ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο επιστημονικού ενδιαφέροντος σε ολόκληρο τον κόσμο. Ήδη από την δεκαετία του 1990 έχει σημειωθεί τεράστια αύξηση στην εφαρμογή προϊόντων νανοτεχνολογίας στη βιομηχανία και στην καθημερινή ζωή (Bystrzejewska-Piotrowska et al., 2009). Τα παραγόμενα τεχνητά νανοϋλικά διαθέτουν μοναδικές ιδιότητες, οι οποίες μάλιστα μπορούν να καθοριστούν, προσφέροντας έτσι πλεονεκτήματα που δεν διαθέτουν τα αντίστοιχα υλικά σε μεγαλύτερη κλίμακα διαστάσεων (Klebowski et al., 2018). Ως αποτέλεσμα, η πρόοδος προς την αξιοποίηση των καινοτόμων ιδιοτήτων των νανοϋλικών σε νέες εμπορικές και βιομηχανικές εφαρμογές αναπτύσσεται σε ένα ευρύ φάσμα τομέων, οι οποίοι περιλαμβάνουν την αυτοκινητοβιομηχανία, τις κατασκευές, την ενέργεια και την υγεία, μεταξύ άλλων (Read et al., 2014; Nowack et al., 2014)

Το μεθακρυλικό οξύ (methacrylic acid, MAA) είναι μία οργανική ένωση, ένα καρβοξυλικό οξύ, που εμφανίζεται σαν άχρωμο, παχύρρευστο υγρό. Διαλύεται σε ζεστό νερό και αναμιγνύεται με τους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Παράγεται σε μεγάλη κλίμακα βιομηχανικά ως πρόδρομος των εστέρων του, ιδιαίτερα του μεθακρυλικού μεθυλεστέρα (MMA) και του πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA). Τα συγκεκριμένα πολυμερή έχουν πολυάριθμες χρήσεις και είναι διαθέσιμα με διάφορες εμπορικές ονομασίες, όπως Lucite και Plexiglas. Ο μεθακρυλικός μεθυλεστέρας χρησιμοποιείται επίσης σαν πρώτη ύλη για την παρασκευή άλλων παραγώγων, όπως για παράδειγμα του μεθακρυλικού βουτυλεστέρα (BMA) (Kumar et al., 2014). Ο πολυ (μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) (PMMA) είναι ένα άμορφο θερμοπλαστικό, διαθέτει πολλές επιθυμητές ιδιότητες όπως υψηλή διαπερατότητα φωτός, χημική αντίσταση, αντοχή στη διάβρωση και στις καιρικές συνθήκες, καλές μονωτικές ιδιότητες, χαμηλή οπτική απορρόφηση και παράλληλα συντίθεται εύκολα και με χαμηλό κόστος (Gibelli et al., 2013; Ali et al., 2015). Το PMMA έχει γενικά υδρόφοβη φύση. Μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για τη βελτίωση της υδροφιλικότητας του είναι η εισαγωγή υδρόφιλων πολυμερών στη δομή του. Ένα από αυτά, είναι η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) και τα παράγωγά της, όπως για παράδειγμα ο διμεθακρυλικός εστέρας της αιθυλενογλυκόλης (EGDMA), η οποία μάλιστα έχει αποδειχθεί ότι είναι τόσο μη τοξική όσο και μη ανοσογονική (Pine et al., 2021).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκαν οι βιολογικές επιδράσεις δύο πολυμερών τύπου πυρήνα-κελύφους [PMMA@P(MAA-co-EGDMA) και P(nBMA-co-EGDMA)@PMMA], καθώς κι ενός υβριδικού υπεραπορροφητικού πολυμερούς [P(MAA-co-EGDMA)@SiO₂]. Η έρευνα για τον συγκεκριμένο τύπο πολυμερών υλικών έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια (Goulis et al., 2020). Τα πολυμερή τύπου πυρήνα-κελύφους αποτελούν μία κατηγορία πολυμερών νανοϋλικών που διαθέτουν τόσο υδρόφιλες όσο και υδρόφοβες ιδιότητες και μπορούν να κατασκευαστούν με διάφορες μεθόδους που επιτρέπουν την ενσωμάτωση πολλών λειτουργικών συστατικών. Ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους, τέτοια νανοσωματίδια έχουν εφαρμογή σε διάφορους τομείς, όπως σε χημικούς αισθητήρες, επικαλύψεις και καταλύτες, ενώ είναι ιδανικά και για πολλές βιολογικές εφαρμογές όπως η χορήγηση φαρμάκων, η γονιδιακή θεραπεία, κ.α. (Kook et al., 2016). Τα πολυμερή τύπου πυρήνα-κελύφους έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί σε ηλεκτρονικές και ενεργειακές εφαρμογές, όπως σε μπαταρίες και φωτοβολταϊκά, καθώς ενισχύουν την ηλεκτρική αγωγιμότητα και εν γένει τις ηλεκτρικές ιδιότητες. Πάντως, η πλειονότητα των πολυμερών πυρήνα-κελύφους σχετίζεται με εφαρμογές μηχανικής, όπου χρησιμοποιούνται για την υψηλή αντοχή και την εφελκυστική τους απόδοση (Goulis et al., 2020).

Όπως γίνεται κατανοητό, η ευρεία αυτή χρήση προϊόντων νανοτεχνολογίας αυξάνει την πιθανότητα ανεξέλεγκτης ανθρώπινης και περιβαλλοντικής έκθεσης σε νανοϋλικά με αποτέλεσμα την πρόκληση βιολογικών επιπτώσεων. Έτσι, η τοξικολογία των νανοϋλικών, η οποία αναφέρεται ως νανοτοξικολογία, έχει αναδειχθεί ως ένα νέο, απαιτητικό πεδίο έρευνας που φιλοδοξεί να καλύψει το κενό στη γνώση της τοξικότητας που προκαλείται από τα νανοϋλικά (van der Merwe & Pickrell, 2018; Ganguly et al., 2018). Η πρώτη πληθυσμιακή ομάδα που αναμένεται να εκτεθεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα και σε υψηλές συγκεντρώσεις τεχνητών νανοϋλικών είναι οι εργαζόμενοι σε εγκαταστάσεις που παράγουν τέτοια υλικά, και επομένως για την εκτίμηση της έκθεσης ανθρώπινων πληθυσμών σε νανοϋλικά αποτελούν την πρώτη ομάδα που μελετάται, σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό (Thomas et al., 2009).

Σε κάθε περίπτωση, για την αξιολόγηση της τοξικότητας των νανοϋλικών, οι *in vitro* προσεγγίσεις που βασίζονται σε κύτταρα μπορεί να είναι πιο ελκυστικές και απαραίτητες και αποτελούν ένα κοινό πρώτο βήμα για την αξιολόγηση των

σχετιζόμενων με τα τεχνητά νανοϋλικά κινδύνων για την υγεία, πριν την χορήγηση σε ζωικά μοντέλα (Jones & Grainger, 2009; Hillegass et al., 2010). Η αξιολόγηση της οξείας ή χρόνιας τοξικότητας των νανοϋλικών θα πρέπει να γίνει στο σημείο εισόδου τους, δηλαδή στον πνεύμονα, στο γαστρεντερικό σύστημα, στο δέρμα ή στον οφθαλμό (Tsatsakis et al., 2016). Ειδικότερα η πρόσληψη δια της εισπνοής θεωρείται ως η πιο κρίσιμη οδός έκθεσης στα νανοϋλικά, ειδικά για τους εργαζόμενους, καθώς αυτά τα σωματίδια είναι σε θέση να διεισδύσουν σε βάθος στον πνεύμονα (Kuhlbusch et al., 2018; Aznar Mollá et al., 2021).

Για το ανοσοποιητικό σύστημα, τα τεχνητά νανοϋλικά αντιπροσωπεύουν ξένα σώματα και ως εκ τούτου αναγνωρίζονται και επεξεργάζονται από τα κύτταρα που εμπλέκονται στην έμφυτη ανοσία (Brzicova et al., 2019). Τα μακροφάγα είναι μία από τις κατηγορίες κυττάρων που χρησιμοποιούνται ευρέως σε μελέτες νανοτοξικότητας καθώς αποτελούν, μαζί με τα επιθηλιακά κύτταρα, την πρώτη κρίσιμη κυτταρική ομάδα που εμπλέκεται στην αναγνώριση, επεξεργασία και αντιμετώπιση των εισπνεόμενων νανοσωματιδίων, λειτουργώντας ως πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των εισβολέων (Drasler et al., 2017; Figueiredo Borgognoni et al., 2018). Η ανταπόκριση τους περιλαμβάνει την τοπική απελευθέρωση φλεγμονωδών μεσολαβητών και την φαγοκυτταρική/ενδοκυτταρική πρόσληψη των σωματιδίων. (Breznan et al., 2017). Το βέλτιστο εύρος μεγέθους υλικού που φαγοκυτταρώνεται αποτελεσματικά από τα μακροφάγα είναι τα 2-3 μm (Champion et al., 2008), αλλά έχει βρεθεί ότι μακροφάγα κύτταρα RAW εσωτερικεύουν αποτελεσματικά σωματίδια σκόνης διαμέτρου 0,1 και 0,5 μm (Wang et al., 2020). Οι αλληλεπιδράσεις των νανοϋλικών με τα μακροφάγα κύτταρα μπορούν να καθορίσουν όχι μόνο την τύχη των νανοϋλικών, αλλά και τις τοξικές τους επιδράσεις (π.χ. πυροδοτώντας τη φλεγμονή και την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου) (Brzicova et al., 2019).

Για το λόγο αυτό, στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση των πολυμερών νανοϋλικών σε μία κυτταρική σειρά μακροφάγων κυττάρων ποντικού και συγκεκριμένα στα κύτταρα RAW264.7. Τα RAW264.7 είναι μακροφάγα μονοπύρρηνα λευχαιμικά κύτταρα ποντικού που παίζουν βασικό ρόλο στην ανοσία, τη φλεγμονή και τη φαγοκυττάρωση. Είναι άμεσα διαθέσιμα και η χρήση τους εγείρει λιγότερα ηθικά ζητήματα από τη χρήση ανθρώπινων μακροφάγων (Wang et al., 2020).

Αναφορικά με τη διάρκεια έκθεσης των κυττάρων στα νανοϋλικά, στη διεθνή βιβλιογραφία ανάλογα με το επιλεγμένο σενάριο έκθεσης (π.χ. βιομηχανικό ατύχημα, επαγγελματική έκθεση, έκθεση στην καθημερινή ζωή) επιλέγεται και η καταλληλότερη διάρκεια έκθεσης στο νανοϋλικό που μελετάται. Οι αναλύσεις που βασίζονται σε κυτταρικές σειρές τυπικά χρησιμοποιούνται για την προσομοίωση σεναρίων που αντιστοιχούν σε ημερήσια έκθεση και όχι σε χρόνια. Μια 24ωρη έκθεση σε χαμηλές συγκεντρώσεις του υπό μελέτη νανοϋλικού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της έκθεσης του γενικού πληθυσμού, ενώ μικρότερα χρονικά διαστήματα (30 λεπτά, 1 ώρα, 3 ώρες) έχουν χρησιμοποιηθεί για την προσομοίωση ενός εργασιακού σεναρίου, όπως ένα εργατικό ατύχημα (Vardakas et al., 2021). Στην παρούσα εργασία, η επώαση των κυττάρων έγινε με ένα εύρος χαμηλών συγκεντρώσεων για 8 ώρες, χρονικό διάστημα που προσομοιάζει μία τυπική εργασιακή συνθήκη σε βιομηχανίες παρασκευής τέτοιων υλικών.

Στην παρούσα μελέτη, μετά την επιλογή της κυτταρικής σειράς και του σεναρίου έκθεσης, αξιολογήθηκε η πιθανή κυτταροτοξική δράση των πολυμερών, καθώς και οι επιδράσεις τους σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στα RAW264.7. Για την αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας των πολυμερών, χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος ΧΤΤ. Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας υπέδειξαν ότι στο εξεταζόμενο εύρος συγκεντρώσεων (12,5-200 µg/ml) δεν προκλήθηκε καμία μεταβολή στην κυτταρική βιωσιμότητα έπειτα από 8 ώρες επώασης με οποιοδήποτε από τα πολυμερή της μελέτης.

Προηγούμενη μελέτη σε κυτταρική σειρά ινοβλαστών BHK-21 για το πολυμερές PMMA, έδειξε ότι η επίδραση στην κυτταρική βιωσιμότητα εξαρτάται τόσο από την συγκέντρωση του νανοϋλικού όσο και από τον χρόνο έκθεσης σε αυτό. Έκθεση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (25, 50, 100, 150 και 200 µg/ml) του πολυμερούς για αυξανόμενο χρονικό διάστημα (24, 48, 96, 120 ώρες) είχε σαν αποτέλεσμα σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας. Αξίζει πάντως να αναφερθεί ότι οι ερευνητές στη συγκεκριμένη μελέτη δεν παρατήρησαν καμία κυτταροτοξική επίδραση του PMMA σε καμία από τις συγκεντρώσεις, για έκθεση έως 24 ώρες (Mahadevan & Valiyaveetil, 2021).

Κατόπιν του ελέγχου της κυτταροτοξικότητας, τα κύτταρα εκτέθηκαν στις υποτοξικές συγκεντρώσεις του κάθε πολυμερούς και μελετήθηκε η επίδρασή τους σε

ένα καλά εδραιωμένο δίκτυο βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης, που αντικατοπτρίζουν επαρκώς την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρία και κυτταρομετρία ροής. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) με κυτταρομετρία ροής, καθώς και τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), η συγκέντρωση των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PCARBS) με φασματοφωτομετρία.

Η GSH αποτελεί την πιο άφθονη μη πρωτεϊνική θειόλη στα κύτταρα και συμμετέχει σε πολλές αντιδράσεις αποτοξίνωσης, προλαμβάνοντας την προκαλούμενη από οξειδωτικό στρες κυτταρική βλάβη (Teskey et al., 2018). Επομένως, η εκτίμηση των επιπέδων της GSH και της αναλογίας [GSH]:[GSSG] χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου (Gaucher et al., 2018). Παράλληλα, η απευθείας μέτρηση των κυτταρικών επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) είναι μία προσέγγιση που επιτρέπει την εκτίμηση των συνθηκών οξειδωτικού στρες, καθώς οι ROS αποτελούν βασικά μόρια υπεύθυνα για τις επιβλαβείς επιδράσεις του οξειδωτικού στρες (Katerji et al., 2019).

Σε ό,τι αφορά τις φασματοφωτομετρικές τεχνικές, αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) και της οξειδωτικής βλάβης στα βιολογικά μακρομόρια του κυττάρου (TBARS, PCARBS), μετά την επώαση με το καθένα από τα τρία πολυμερή που μελετήθηκαν.

Σε ό,τι αφορά το πολυμερές τύπου πυρήνα-κελύφους PMMA@P(MAA-co-EGDMA), τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν προκάλεσε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στο εξεταζόμενο εύρος συγκεντρώσεων στους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Εντούτοις, παρατηρήθηκε μία ελαφριά αύξηση στα επίπεδα των ROS, η οποία δεν φάνηκε να οδηγεί σε κάποια οξειδωτική βλάβη με βάση τους υπόλοιπους βιοδείκτες που εξετάστηκαν.

Σε ό,τι αφορά το πολυμερές τύπου πυρήνα-κελύφους P(nBMA-co-EGDMA)@PMMA, με πυρήνα ένα συμπολυμερές του n-βουτυλ μεθακρυλικού μεθυλεστέρα P(nBMA) με τον διμεθακρυλικό εστέρα της αιθυλενογλυκόλης (EGDMA) και κέλυφος το πολυ(μεθακρυλικό μεθυλεστέρα) (PMMA),

παρατηρήθηκαν διαταραχές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση και τελικά πρόκληση οξειδωτικού στρες στα RAW264.7. Πιο συγκεκριμένα, η σημαντική μείωση των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας συνοδεύτηκε στην πλειονότητα των περιπτώσεων (εξάιρεση τα 50 µg/ml) από σημαντική αύξηση των επιπέδων των TBARS. Τα κύτταρα υπόκεινται σε οξειδωτικό στρες, επιχείρημα που υποστηρίζεται από την εξάντληση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών και την επαγωγή οξειδωτικής βλάβης μέσω προαγωγής της υπεροξείδωσης των λιπιδίων.

Αναφορικά με το υβριδικό υπεραπορροφητικό πολυμερές P(MAA-co-EGDMA)@SiO₂ με πυρήνα ένα συμπολυμερές του μεθακρυλικού οξέος (MAA) με τον διμεθακρυλικό εστέρα της αιθυλενογλυκόλης (EGDMA) και ένα ανόργανο κέλυφος από διοξείδιο του πυριτίου (SiO₂), παρατηρήθηκε μία ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού προκειμένου να προλάβει την πρόκληση οξειδωτικής βλάβης. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της GSH παρουσίασαν αύξηση στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, παρότι στην περίπτωση της υψηλότερης εξεταζόμενης συγκέντρωσης (200 µg/ml) δεν ήταν στατιστικά σημαντική, οδηγώντας στη σημαντική μείωση των ROS μέσω εξουδετέρωσής τους. Η GSH συμβάλλει στην αποτοξίνωση ηλεκτρόφιλων μορίων και μετάλλων διατηρώντας το κυτταρικό περιβάλλον σε ανηγμένη κατάσταση και προστατεύοντας το κύτταρο από τοξικά προϊόντα (Du et al., 2009). Τελικά, η ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, μέσω αύξησης της GSH και η εξουδετέρωση των ROS είχε ως αποτέλεσμα να προληφθεί η οξειδωτική βλάβη, καθώς παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της λιπιδικής υπεροξείδωσης στις συγκεντρώσεις των 50, 100 και 200 µg/ml. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) δεν παρουσίασε κάποια σημαντική μεταβολή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, με μόνη εξαίρεση τη συγκέντρωση των 50 µg/ml όπου παρατηρήθηκε μία σημαντική μείωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ και στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική μεταβολή.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας υπέδειξαν ότι κανένα από τα τρία πολυμερή που εξετάστηκαν δεν προκάλεσε αρνητικές επιδράσεις στη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς μακροφάγων RAW264.7, για το σενάριο έκθεσης 8 ωρών και το εύρος συγκεντρώσεων που επιλέχθηκε. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με μεγάλο μέρος της διεθνούς βιβλιογραφίας η οποία υποστηρίζει ότι ο πολύ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας)

(PMMA) είναι γενικά ένας βιοσυμβατός πολυεστέρας που δεν προκαλεί τοξικότητα και μάλιστα χρησιμοποιείται ευρέως, μεταξύ των διαφορετικών τύπων υδρόφοβων πολυμερών, σε εφαρμογές στοχευμένης χορήγησης φαρμάκων, μεταξύ άλλων (Khan et al., 2019; Linan et al., 2018; Yip et al., 2022). Αντιθέτως, σε ό,τι αφορά τους βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης που μελετήθηκαν, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το καθένα από τα τρία πολυμερή παρουσίασε διαφορετικό μοτίβο επιδράσεων στα κύτταρα RAW264.7.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υπογραμμίζουν την ανάγκη αξιολόγησης του εκάστοτε τεχνητού νανοϋλικού ξεχωριστά, λόγω της μεγάλης ετερογένειας των ιδιοτήτων τους (επιφάνεια, πολικότητα, μέγεθος και μορφολογία νανοσωματιδίων, διαλυτότητα), η οποία μπορεί να επηρεάσει τη βιολογική τους δραστηριότητα (Breznan et al., 2017). Γενικά, για τα περισσότερα τεχνητά νανοϋλικά, δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα κυτταροτοξικότητας, ή τα υπάρχοντα δεδομένα δείχνουν αμφιλεγόμενα και ασαφή αποτελέσματα (Hartung, 2010; Bhadar et al., 2016). Το γεγονός αυτό οφείλεται στις διαφορετικές κυτταρικές σειρές και περιόδους έκθεσης, καθώς και στις διάφορες μεθόδους για την παρασκευή των διαλυμάτων των νανοϋλικών που χρησιμοποιούνται (Papas et al., 2022). Στην παρούσα διπλωματική εργασία, εξετάστηκε ένα καλά εδραιωμένο δίκτυο βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης, το οποίο περιελάμβανε βιοδείκτες που αντικατοπτρίζουν την ενδογενή αντιοξειδωτική ικανότητα, τις ROS, καθώς και βιοδείκτες που συσχετίζονται με την πρόκληση σοβαρής οξειδωτικής βλάβης στα βιολογικά μακρομόρια. Ωστόσο, περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη προκειμένου να διερευνηθεί αναλυτικότερα η επίδραση των συγκεκριμένων νανοϋλικών στο τεράστιο δίκτυο των κυτταρικών μηχανισμών που σχετίζονται με τη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης.

Επόμενες εργασίες θα μπορούσαν να εστιάσουν στη μελέτη επιπλέον αντιοξειδωτικών ενζύμων και μορίων που σχετίζονται με την διατήρηση της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, όπως για παράδειγμα, μεταξύ άλλων, της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), της καταλάσης (CAT), της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx), της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR), της θειορεδοξίνης (TRX), της οξειδοαναγωγάσης NAD(P)H:κινόνης 1 (NQO1), αλλά και του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 ως κύριου ρυθμιστή της έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων για την εκτίμηση της έκτασης της προσαρμοστικής κυτταρικής απόκρισης που είναι απαραίτητη για την αντιστάθμιση των αυξημένων επιπέδων ROS.

Επιπλέον, είναι γνωστό ότι προ-φλεγμονώδη γονίδια όπως τα COX-2, TNF- α και iNOS επάγονται μέσω των ευαίσθητων σε οξειδοαναγωγή μεταγραφικών παραγόντων. Ο NF- κ B είναι ένας τέτοιος μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζεται από την ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση, ενεργοποιείται από τις ROS και επάγει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το ανοσολογικό και το κυτταρικό αμυντικό σύστημα (Nishanth et al., 2022). Θα είχε λοιπόν ενδιαφέρον να μελετηθεί επίσης το κατά πόσο η έκθεση των μακροφάγων κυττάρων RAW264.7 στα εξεταζόμενα νανοϋλικά προκάλεσε μια φλεγμονώδη απόκριση όπως αυτή που παρατηρείται μετά από έκθεση σε παθογόνα. Για να διερευνηθεί η πιθανότητα αυτή, μπορεί να εκτιμηθεί η δραστηριότητα του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B, καθώς και η απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως οι ιντερλευκίνες και ο TNF- α .

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε, τέλος, να εξεταστεί με οπτική μικροσκοπία και μικροσκοπία φθορισμού η μορφολογία των κυττάρων ώστε να εκτιμηθεί εάν συνέβη φαγοκυττάρωση και εσωτερίκευση των πολυμερών και σε τι βαθμό. Σε μελέτες για την κυτταροτοξική επίδραση νανοϋλικών όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα, έχει αποδειχθεί ότι η μικροσκοπική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης του νανοϋλικού με τα κύτταρα είναι ζωτικής σημασίας καθώς το υλικό μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη μορφολογία των κυττάρων και να προκαλέσει βλάβη η οποία δεν μπορεί να εντοπιστεί με τις τυπικές δοκιμές κυτταροτοξικότητας (Kyriakidou et al., 2020).

Καθώς η χρήση των τεχνητών νανοϋλικών αυξάνεται συνεχώς και είναι πλέον ευρεία σε ποικίλους βιομηχανικούς τομείς και προϊόντα, η ανάγκη για έρευνα των επιδράσεων τους στην ανθρώπινη υγεία και ασφάλεια γίνεται ολοένα και πιο σημαντική και απαραίτητη για τη διασφάλιση του ασφαλούς χειρισμού και εφαρμογής των προϊόντων νανοτεχνολογίας. Η επιστημονική κοινότητα και οι ρυθμιστικές αρχές οφείλουν να ευθυγραμμίσουν τις προσπάθειες τους για την αντιμετώπιση των αναδυόμενων ζητημάτων υγείας και ασφάλειας τα οποία είναι μοναδικά για τα νανοϋλικά, ώστε να μεγιστοποιήσουν τις θετικές επιπτώσεις της νανοτεχνολογίας ελαχιστοποιώντας παράλληλα οποιονδήποτε και όλους τους σχετικούς κινδύνους.

Βιβλιογραφία

Abdal Dayem, A., Hossain, M. K., Lee, S. B., Kim, K., Saha, S. K., Yang, G. M., Choi, H. Y., & Cho, S. G. (2017). The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 120. <https://doi.org/10.3390/ijms18010120>

Akagawa M. (2021). Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. *Free radical research*, 55(4), 307–320. <https://doi.org/10.1080/10715762.2020.1851027>

Ali, U., Karim, K., & Buang, N. (2015). A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). *Polymer Reviews*, 55(4), 678-705. <https://doi.org/10.1080/15583724.2015.1031377>

Amir Aslani, B., & Ghobadi, S. (2016). Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life sciences*, 146, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.014>

Aznar Mollá, F., Fito-López, C., Heredia Alvaro, J. A., & Huertas-López, F. (2021). New Tools to Support the Risk Assessment Process of Nanomaterials in the Insurance Sector. *International journal of environmental research and public health*, 18(13), 6985. <https://doi.org/10.3390/ijerph18136985>

Bahadar, H., Maqbool, F., Niaz, K., & Abdollahi, M. (2016). Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iranian biomedical journal*, 20(1), 1–11. <https://doi.org/10.7508/ibj.2016.01.001>

Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(1), 112. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>

Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87(1), 245–313. <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>

- Bennat, C., & Müller-Goymann, C. C. (2000). Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter. *International journal of cosmetic science*, 22(4), 271–283. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2494.2000.00009.x>
- Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, 272(33), 20313–20316. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20313>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Bouwmeester, H., van der Zande, M., & Jepson, M. A. (2018). Effects of food-borne nanomaterials on gastrointestinal tissues and microbiota. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 10(1), e1481. <https://doi.org/10.1002/wnan.1481>
- Boverhof, D. R., Bramante, C. M., Butala, J. H., Clancy, S. F., Lafranconi, M., West, J., & Gordon, S. C. (2015). Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 73(1), 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.06.001>
- Brand M. D. (2010). The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Experimental gerontology*, 45(7-8), 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003>
- Breznan, D., Das, D., O'Brien, J., MacKinnon-Roy, C., Nimesh, S., & Vuong, N. et al. (2017). Differential cytotoxic and inflammatory potency of amorphous silicon dioxide nanoparticles of similar size in multiple cell lines. *Nanotoxicology*, 11(2), 223-235. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1287313>
- Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(5), 3289–3303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>

Brzicova, T., Javorkova, E., Vrbova, K., Zajicova, A., Holan, V., & Pinkas, D. et al. (2019). Molecular Responses in THP-1 Macrophage-Like Cells Exposed to Diverse Nanoparticles. *Nanomaterials*, 9(5), 687. <https://doi.org/10.3390/nano9050687>

Brzicova, T., Javorkova, E., Vrbova, K., Zajicova, A., Holan, V., Pinkas, D., Philimonenko, V., Sikorova, J., Klema, J., Topinka, J., Rossner, P., Jr., & Jr. (2019). Molecular Responses in THP-1 Macrophage-Like Cells Exposed to Diverse Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 9(5), 687. <https://doi.org/10.3390/nano9050687>

Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17–MR71. <https://doi.org/10.1116/1.2815690>

Bystrzejewska-Piotrowska, G., Golimowski, J., & Urban, P. L. (2009). Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste management (New York, N.Y.)*, 29(9), 2587–2595. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.04.001>

Cao, Y., Gong, Y., Liu, L., Zhou, Y., Fang, X., Zhang, C., Li, Y., & Li, J. (2017). The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an in vitro model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: a review. *Journal of applied toxicology : JAT*, 37(12), 1359–1369. <https://doi.org/10.1002/jat.3470>

Chambial, S., Dwivedi, S., Shukla, K. K., John, P. J., & Sharma, P. (2013). Vitamin C in disease prevention and cure: an overview. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 28(4), 314–328. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0375-3>

Champion, J. A., Walker, A., & Mitragotri, S. (2008). Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharmaceutical research*, 25(8), 1815–1821. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9562-y>

Chaudière, J., & Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 37(9-10), 949–962. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(99\)00090-3](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(99)00090-3)

Chen, S. X., & Schopfer, P. (1999). Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *European journal of biochemistry*, 260(3), 726–735. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00199.x>

Colvin V. L. (2003). The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature biotechnology*, 21(10), 1166–1170. <https://doi.org/10.1038/nbt875>

Couto, N., Wood, J., & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network. *Free radical biology & medicine*, 95, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028>

Crane F. L. (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(6), 591–598. <https://doi.org/10.1080/07315724.2001.10719063>

Crosera, M., Bovenzi, M., Maina, G., Adami, G., Zanette, C., Florio, C., & Filon Larese, F. (2009). Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature. *International archives of occupational and environmental health*, 82(9), 1043–1055. <https://doi.org/10.1007/s00420-009-0458-x>

Davies K. J. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society symposium*, 61, 1–31. <https://doi.org/10.1042/bss0610001>

Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 9829176. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>

Dizdaroglu, M., & Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free radical research*, 46(4), 382–419. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.653969>

Domb, A. J., Sharifzadeh, G., Nahum, V., & Hosseinkhani, H. (2021). Safety Evaluation of Nanotechnology Products. *Pharmaceutics*, 13(10), 1615. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101615>

Drasler, B., et al., (2017). In Vitro Approaches to Assess the Hazard of Nanomaterials. *NanoImpact*. Elsevier B.V., pp. 99–116. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.08.002>

Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>

Du, Z. X., Zhang, H. Y., Meng, X., Guan, Y., & Wang, H. Q. (2009). Role of oxidative stress and intracellular glutathione in the sensitivity to apoptosis induced by proteasome inhibitor in thyroid cancer cells. *BMC cancer*, 9, 56. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-56>

Figueiredo Borgognoni, C., et al., (2018). ‘Human macrophage responses to metal-oxide nanoparticles: a review’, *Artificial Cells. Nanomedicine, and Biotechnology* 46 (Suppl. 2), 694–703. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1468767>

Ganguly, P., Breen, A., & Pillai, S. C. (2018). Toxicity of Nanomaterials: Exposure, Pathways, Assessment, and Recent Advances. *ACS biomaterials science & engineering*, 4(7), 2237–2275. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00068>

Gatoo, M. A., Naseem, S., Arfat, M. Y., Dar, A. M., Qasim, K., & Zubair, S. (2014). Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. *BioMed research international*, 2014, 498420. <https://doi.org/10.1155/2014/498420>

Gaucher, C., Boudier, A., Bonetti, J., Clarot, I., Leroy, P., & Parent, M. (2018). Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7(5), 62. <https://doi.org/10.3390/antiox7050062>

Gibelli, E., Kai, J., Teotonio, E., Malta, O., Felinto, M., & Brito, H. (2013). Photoluminescent PMMA polymer films doped with Eu³⁺- β -diketonate crown ether complex. *Journal Of Photochemistry And Photobiology A: Chemistry*, 251, 154-159. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.10.015>

Glorieux, C. & Calderon, P. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*, 398(10), 1095-1108. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0131>

Goseki R., Ishizone T. (2015) Poly(methyl methacrylate) (PMMA). In: Kobayashi S., Müllen K. (eds) *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-29648-2_244

Goulis, P., Kartsonakis, I., & Charitidis, C. (2020). Synthesis and Characterization of a Core-Shell Copolymer with Different Glass Transition Temperatures. *Fibers*, 8(11), 71. <https://doi.org/10.3390/fib8110071>

Gulcin İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of toxicology*, 94(3), 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>

Halliwell B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>

Halliwell, B. and Gutteridge, J., (2015). *Free radicals in biology and medicine*. 5th ed. Oxford: Oxford University Press, p.23.

Halliwell, B., Clement, M. V., & Long, L. H. (2000). Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS letters*, 486(1), 10–13. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02197-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02197-9)

Hartung T. (2010). Food for thought ... on alternative methods for nanoparticle safety testing. *ALTEX*, 27(2), 87–95. <https://doi.org/10.14573/altex.2010.2.87>

Herbette, S., Roeckel-Drevet, P., & Drevet, J. R. (2007). Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *The FEBS journal*, 274(9), 2163–2180. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05774.x>

Hillegass, J. M., Shukla, A., Lathrop, S. A., MacPherson, M. B., Fukagawa, N. K., & Mossman, B. T. (2010). Assessing nanotoxicity in cells in vitro. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 2(3), 219–231. <https://doi.org/10.1002/wnan.54>

Hulla, J., Sahu, S., & Hayes, A. (2015). Nanotechnology: History and future. *Human & Experimental Toxicology*, 1318–1321. <https://doi.org/10.1177/0960327115603588>

Islam, M. N., Rauf, A., Fahad, F. I., Emran, T. B., Mitra, S., Olatunde, A., Shariati, M. A., Rebezov, M., Rengasamy, K., & Mubarak, M. S. (2021). Superoxide dismutase: an updated review on its health benefits and industrial applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1–19. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1913400>

Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein journal of nanotechnology*, 9, 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>

Jones, C., & Grainger, D. (2009). In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(6), 438–456. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.005>

Kaminsky, V. O., & Zhivotovsky, B. (2014). Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. *Antioxidants & redox signaling*, 21(1), 86–102. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5746>

Kanellopoulou, I., Karaxi, E., Karatza, A., Kartsonakis, I., & Charitidis, C. (2019). Effect of submicron admixtures on mechanical and self-healing properties of cement-based composites. *Fatigue & Fracture Of Engineering Materials & Structures*, 42(7), 1494–1509. <https://doi.org/10.1111/ffe.12998>

Kartsonakis, I. A., Goulis, P., & Charitidis, C. A. (2021). Triggerable Super Absorbent Polymers for Coating Debonding Applications. *Polymers*, 13(9), 1432. <https://doi.org/10.3390/polym13091432>

Katerji, M., Filippova, M., & Duerksen-Hughes, P. (2019). Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 1279250. <https://doi.org/10.1155/2019/1279250>

Kaźmierczak-Barańska, J., Boguszewska, K., Adamus-Grabicka, A., & Karwowski, B. T. (2020). Two Faces of Vitamin C-Antioxidative and Pro-Oxidative Agent. *Nutrients*, 12(5), 1501. <https://doi.org/10.3390/nu12051501>

Khan, F. A., Akhtar, S., Almohazey, D., Alomari, M., Almofty, S. A., Badr, I., & Elaissari, A. (2019). Targeted delivery of poly (methyl methacrylate) particles in colon cancer cells selectively attenuates cancer cell proliferation. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 1533–1542. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1577886>

Kim, S. J., Jung, H. J., Hyun, D. H., Park, E. H., Kim, Y. M., & Lim, C. J. (2010). Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells. *Biochimie*, 92(8), 927–932. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.03.007>

Kim, S., Lim, Y. T., Soltesz, E. G., De Grand, A. M., Lee, J., Nakayama, A., Parker, J. A., Mihaljevic, T., Laurence, R. G., Dor, D. M., Cohn, L. H., Bawendi, M. G., & Frangioni, J. V. (2004). Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nature biotechnology*, 22(1), 93–97. <https://doi.org/10.1038/nbt920>

Klębowski, B., Depciuch, J., Parlińska-Wojtan, M., & Baran, J. (2018). Applications of Noble Metal-Based Nanoparticles in Medicine. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 4031. <https://doi.org/10.3390/ijms19124031>

Kook, J., Lee, J., Hwang, K., Park, I., Kim, J., & Lee, J. (2016). Synthesis and Characterization of Poly (Methyl Methacrylate)/Polyethylenimine Grafting Core-Shell Nanoparticles for CO₂ Adsorption Using Soap-Free Emulsion Copolymerization. *Advances In Materials Physics And Chemistry*, 06(07), 220-229. <https://doi.org/10.4236/ampc.2016.67022>

Kuhlbusch, T., Wijnhoven, S., & Haase, A. (2018). Nanomaterial exposures for worker, consumer and the general public. *Nanoimpact*, 10, 11-25. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.11.003>

Kumar, G., Jagdish, SK., Nandagopal, S., Egan, J.D., (2014). Effect of Methyl Methacrylate and Methacrylic Acid on ROS Production and Cellular Antioxidants. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*

Kyriakidou, K., Brasinika, D., Trompeta, A., Bergamaschi, E., Karoussis, I. K., & Charitidis, C. A. (2020). In vitro cytotoxicity assessment of pristine and carboxyl-functionalized MWCNTs. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 141, 111374. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111374>

Lee, B. J., Lin, Y. C., Huang, Y. C., Ko, Y. W., Hsia, S., & Lin, P. T. (2012). The relationship between coenzyme Q10, oxidative stress, and antioxidant enzymes activities and coronary artery disease. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 792756. <https://doi.org/10.1100/2012/792756>

Linan, L., Lima, N., Benatti, C., Xavier, M., Rodrigues, A., & Manenti, F. et al. (2018). Cytotoxicity Assessment of a Poly(methyl methacrylate) Synthesized for the Direct Fabrication of Bone Tissues. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, 61(0). <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018160526>

Lindberg, H. K., Falck, G. C., Suhonen, S., Vippola, M., Vanhala, E., Catalán, J., Savolainen, K., & Norppa, H. (2009). Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells in vitro. *Toxicology letters*, 186(3), 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.11.019>

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118–126. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>

Lungu, M., Neculae, A., Bunoiu, M., & Biris, C. (2015). *Nanoparticles' promises and risks*. Springer.

Lushchak V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*, 224, 164–175.

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.016>

Lv, H., Zhen, C., Liu, J., Yang, P., Hu, L., & Shang, P. (2019). Unraveling the Potential Role of Glutathione in Multiple Forms of Cell Death in Cancer Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 3150145.

<https://doi.org/10.1155/2019/3150145>

Mahadevan, G., Valiyaveetil, S. (2021) Understanding the interactions of poly(methyl methacrylate) and poly(vinyl chloride) nanoparticles with BHK-21 cell line. *Sci Rep* 11, 2089. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80708-0>

Møller, P., Jacobsen, N. R., Folkmann, J. K., Danielsen, P. H., Mikkelsen, L., Hemmingsen, J. G., Vesterdal, L. K., Forchhammer, L., Wallin, H., & Loft, S. (2010). Role of oxidative damage in toxicity of particulates. *Free radical research*, 44(1), 1–46. <https://doi.org/10.3109/10715760903300691>

Monteiro-Riviere, N. (2004). *Anatomical Factors Affecting Barrier Function*.

Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 9613090. <https://doi.org/10.1155/2019/9613090>

Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5761), 622–627.

<https://doi.org/10.1126/science.1114397>

Nishanth, R., Jyotsna, R., Schlager, J., Hussain, S., & Reddanna, P. (2022). *Inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages upon exposure to nanoparticles: Role of ROS-NFκB signaling pathway*.

Nok, A. J., Onyenekwe, P. C., Ibrahim, S., Bature, A., & Ogbadoyi, E. (1995). Glutathione reductase (EC 1.6.4.2.) in experimental trypanosomiasis. *Cell biochemistry and function*, 13(2), 149–151. <https://doi.org/10.1002/cbf.290130212>

Nowack, B., Brouwer, C., Geertsma, R. E., Heugens, E. H., Ross, B. L., Toufektsian, M. C., Wijnhoven, S. W., & Aitken, R. J. (2013). Analysis of the occupational, consumer and environmental exposure to engineered nanomaterials used in 10 technology sectors. *Nanotoxicology*, 7(6), 1152–1156.

<https://doi.org/10.3109/17435390.2012.711863>

Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., Carter, J., Karn, B., Kreyling, W., Lai, D., Olin, S., Monteiro-Riviere, N., Warheit, D., Yang, H., & ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and fibre toxicology*, 2, 8.

<https://doi.org/10.1186/1743-8977-2-8>

Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*, 113(7), 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>

Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J. H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S. K., & Levine, M. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), 18–35. <https://doi.org/10.1080/07315724.2003.10719272>

Pajares, M., Cuadrado, A., Engedal, N., Jirsova, Z., & Cahova, M. (2018). The Role of Free Radicals in Autophagy Regulation: Implications for Ageing. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 2450748.

<https://doi.org/10.1155/2018/2450748>

Panas, A., Marquardt, C., Nalcaci, O., Bockhorn, H., Baumann, W., & Paur, H. et al. (2022). Screening of different metal oxide nanoparticles reveals selective toxicity and inflammatory potential of silica nanoparticles in lung epithelial cells and macrophages.

Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N. T., Georgiou, C. D., Angelatou, F., Matsokis, N. A., (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse

hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience Letters*, 357, 83-86.

Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science : IJBS*, 4(2), 89–96.

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

Pine, K. R., De Silva, K., Zhang, F., Yeoman, J., & Jacobs, R. (2021). Towards improving the biocompatibility of prosthetic eyes. *Heliyon*, 7(2), e06234. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06234>

Rahman K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*, 2(2), 219–236.

Rani, V. and Yadav, U., 2015. *Free Radicals in Human Health and Disease*. Springer India.

Read, S. A. K., Jiménez, A. S., Ross, B. L., Aitken, R. J., & van Tongeren, M. (2014). [Nanotechnology and Exposure Scenarios](#). In *Handbook of Nanosafety: Measurement, Exposure and Toxicology* (pp. 17-58). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416604-2.00002-0>

Riviere, J. (2008). Pharmacokinetics of nanomaterials: an overview of carbon nanotubes, fullerenes and quantum dots. *Wires Nanomedicine And Nanobiotechnology*, 1(1), 26-34. <https://doi.org/10.1002/wnan.24>

Santamaria A. (2012). Historical overview of nanotechnology and nanotoxicology. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 926, 1–12. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-002-1_1

Santo, A., Zhu, H., & Li, Y. (2016). Free Radicals: From Health to Disease. *Reactive Oxygen Species*. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.847>

- Sarkaya, E., & Doğan, S. (2020). Glutathione Peroxidase in Health and Diseases. In (Ed.), *Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91009>
- Sharifi, S., Behzadi, S., Laurent, S., Forrest, M. L., Stroeve, P., & Mahmoudi, M. (2012). Toxicity of nanomaterials. *Chemical Society reviews*, 41(6), 2323–2343. <https://doi.org/10.1039/c1cs15188f>
- Sharma, V., Filip, J., Zboril, R., & Varma, R. (2015). Natural inorganic nanoparticles – formation, fate, and toxicity in the environment. *Chemical Society Reviews*, 44(23), 8410–8423. <https://doi.org/10.1039/c5cs00236b>
- Sharma, V., Kumar, A., & Dhawan, A. (2012). Nanomaterials: Exposure, Effects and Toxicity Assessment. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 82(S1), 3–11. <https://doi.org/10.1007/s40011-012-0072-7>
- Shvedova, A. A., Kisin, E., Murray, A. R., Johnson, V. J., Gorelik, O., Arepalli, S., Hubbs, A. F., Mercer, R. R., Keohavong, P., Sussman, N., Jin, J., Yin, J., Stone, S., Chen, B. T., Deye, G., Maynard, A., Castranova, V., Baron, P. A., & Kagan, V. E. (2008). Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 295(4), L552–L565. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90287.2008>
- Sies, H. (1985) Introductory Remarks. In: Sies, H., Ed., *Oxidative Stress*, Academic Press, London, 1–8. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-642760-8.50005-3>
- Sies, H. (2020). Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(9), 852. <https://doi.org/10.3390/antiox9090852>
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Silva G. A. (2004). Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surgical neurology*, 61(3), 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.surneu.2003.09.036>

Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., & Peng, Z. Y. (2019). Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 5080843. <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>

Teskey, G., Abraham, R., Cao, R., Gyurjian, K., Islamoglu, H., Lucero, M., Martinez, A., Paredes, E., Salaiz, O., Robinson, B., & Venketaraman, V. (2018). Glutathione as a Marker for Human Disease. *Advances in clinical chemistry*, 87, 141–159. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.07.004>

Thomas, T., Bahadori, T., Savage, N., & Thomas, K. (2009). Moving toward exposure and risk evaluation of nanomaterials: challenges and future directions. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 1(4), 426–433. <https://doi.org/10.1002/wnan.34>

Valavanidis, A., Vlachogianni, T. and Fiotakis, C. (2009) 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health Part C Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 27, 120-139.

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., & Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and cellular biochemistry*, 266(1-2), 37–56. <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000049134.69131.89>

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

Van der Merwe, D., & Pickrell, J. (2018). Toxicity of Nanomaterials. *Veterinary Toxicology*, 319-326. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811410-0.00018-0>

Vardakas, P., Skaperda, Z., Tekos, F., Trompeta, A. F., Tsatsakis, A., Charitidis, C. A., & Kouretas, D. (2021). An integrated approach for assessing the in vitro and in

vivo redox-related effects of nanomaterials. *Environmental Research*, 197. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2021.111083>

Vembadi, A., Menachery, A., & Qasaimh, M. (2019). Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00147>

Verma, A., & Stellacci, F. (2010). Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 6(1), 12–21. <https://doi.org/10.1002/sml.200901158>

Wang, W., Li, T., Luo, X., Zhang, K., Cao, N., Liu, K., Li, X., & Zhu, Y. (2020). Cytotoxic effects of dental prosthesis grinding dust on RAW264.7 cells. *Scientific reports*, 10(1), 14364. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71485-x>

Warheit, D. (2003). Comparative Pulmonary Toxicity Assessment of Single-wall Carbon Nanotubes in Rats. *Toxicological Sciences*, 77(1), 117-125. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg228>

Wiesenthal, A., Hunter, L., Wang, S., Wickliffe, J., & Wilkerson, M. (2011). Nanoparticles: small and mighty. *International Journal Of Dermatology*, 50(3), 247-254. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2010.04815.x>

Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of nutrition*, 134(3), 489–492. <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489>

Yah, C. S., Simate, G. S., & Iyuke, S. E. (2012). Nanoparticles toxicity and their routes of exposures. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 25(2), 477–491.

Yang, Y., Bazhin, A. V., Werner, J., & Karakhanova, S. (2013). Reactive oxygen species in the immune system. *International reviews of immunology*, 32(3), 249–270. <https://doi.org/10.3109/08830185.2012.755176>

Yip, Y. J., Lee, S., Neo, M. L., Teo, S. L., & Valiyaveetil, S. (2022). A comparative investigation of toxicity of three polymer nanoparticles on acorn barnacle

(Amphibalanus amphitrite). *The Science of the total environment*, 806(Pt 4), 150965.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150965>

Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54(3), 176–186. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>