

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

«Μελέτη της επίδρασης υβριδικών πολυφλοϊικών νανοσωλήνων
άνθρακα σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης μακροφάγων
κυττάρων ποντικών»

Πτυχιακή Εργασία
Αικατερίνη Γιόλα του Αποστόλου
Λάρισα, 2022

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας

Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων Καθηγητής)

Αριστείδης Βεσκούκης

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

Κωνσταντίνος Χαριτίδης

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δημήτριου Κουρέτα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας, όπου ασχολήθηκα με ένα ενδιαφέρον θέμα που μου προσέφερε νέες και πολύτιμες γνώσεις και για το ενδιαφέρον του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Περικλή Βαρδάκα, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τις πολύτιμες συμβουλές και τις γνώσεις που μου μετέδωσε καθώς και για την καθοριστική βοήθειά του και στήριξη σε όλη την διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στον Επίκουρο Καθηγητή Αριστείδη Βεσκούκη και στον Καθηγητή Κωνσταντίνο Χαριτίδη για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας, την υπομονή τους και την προθυμία τους για να με βοηθήσουν τόσο στην διεξαγωγή της μελέτης μου, όσο και στο να μου μεταφέρουν νέες και ωφέλιμες γνώσεις.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές.....	8
1.2 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	9
1.3 Βιολογικοί ρόλοι ελευθέρων ριζών	10
1.4 Μεταγραφικός παράγοντας Nrf2.....	13
1.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	13
1.6 Οξείδωση και αναγωγή.....	18
1.7 Οξειδωτικό στρες.....	18
1.8 Νανοτεχνολογία.....	19
1.9 Νανοϋλικά.....	20
1.10 Νανοσωλήνες άνθρακα	22
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	25
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
3.1 Υβριδικοί πολυφλοϊκοί νανοσωλήνες άνθρακα	26
3.2 Διασπορά υβριδικών πολυφλοϊκών νανοσωλήνων άνθρακα και προετοιμασία διαλυμάτων	26
3.3 Κυτταρική σειρά.....	26
3.4 Κυτταροκαλλιέργειες.....	27
3.5 Εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης των υβριδικών πολυφλοϊκών νανοσωλήνων άνθρακα με τη μέθοδο ΧΤΤ.....	27
3.6 Εκτίμηση της επίδρασης των υβριδικών πολυφλοϊκών νανοσωλήνων άνθρακα σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης.....	28
3.6.1 Προσδιορισμός των ενδοκυτταρικών επιπέδων της GSH με κυτταρομετρία ροής	29
3.6.2 Προσδιορισμός των ενδοκυτταρικών επιπέδων των ROS με κυτταρομετρία ροής	30

3.6.3 Προσδιορισμός των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) με φασματοφωτομετρία.....	32
3.6.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) με φασματοφωτομετρία.....	34
3.6.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PCARBS) με φασματοφωτομετρία.....	36
3.6.6 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford	38
3.7 Στατιστική ανάλυση.....	39
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	40
4.1 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης των υβριδικών πολυφλοϊικών νανοσωλήνων άνθρακα στα RAW264.7	40
4.2 Προσδιορισμός της επίδρασης των υβριδικών πολυφλοϊικών νανοσωλήνων άνθρακα σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στα RAW264.7	41
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	49

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο άνθρωπος στην καθημερινότητα του έρχεται σε επαφή με ένα πλήθος ξеноβιοτικών ουσιών από διαφορετικές πηγές και μέσω διαφορετικών οδών. Τις τελευταίες δεκαετίες, η ανάπτυξη και η ενσωμάτωση των τεχνητών νανοϋλικών σε ένα πλήθος βιομηχανικών εφαρμογών, αλλά και σε πτυχές της καθημερινής ζωής, οδήγησε στην αυξημένη ανθρώπινη έκθεση, ιδίως στον εργασιακό χώρο. Ως εκ τούτου, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση δύο υβριδικών πολυφλοϊκών νανοσωλήνων άνθρακα, των CNTs@Fe₃O₄ και CNTs@ZnFe₂O₄, στη βιωσιμότητα, καθώς και σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης των μακροφάγων κυττάρων ποντικού RAW 264.7. Στο πλαίσιο της προσομοίωσης ενός εργασιακού σεναρίου έκθεσης, τα κύτταρα επώαστηκαν για 8 ώρες με χαμηλές συγκεντρώσεις (12.5, 25, 50, 100 και 200 μg/ml) των υβριδικών πολυφλοϊκών νανοσωλήνων άνθρακα. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν οι υβριδικοί πολυφλοϊκοί νανοσωλήνες άνθρακα προκάλεσαν σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση. Επιπροσθέτως, κατά την αξιολόγηση των βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης παρατηρήθηκαν επιδράσεις στην οξειδοαναγωγική ισορροπία. Πιο συγκεκριμένα, η έκθεση στους CNTs@Fe₃O₄ προκάλεσε την ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, η οποία συνέφερε στη μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), προστατεύοντας τελικά τα κύτταρα από την καρβονυλίωση των πρωτεϊνών. Από την άλλη, η έκθεση στους CNTs@ZnFe₂O₄ προκάλεσε την εξασθένιση της αντιοξειδωτικής άμυνας, η οποία, ωστόσο, φαίνεται να οφείλεται στην κατανάλωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) προκειμένου να εξουδετερωθούν τα υψηλά επίπεδα των ROS και να προληφθεί η οξειδωτική βλάβη.

ABSTRACT

Humans are exposed on a daily basis to a multitude of xenobiotic substances from different sources and through different routes. In recent decades, the development and integration of engineered nanomaterials in various industrial applications, but also in aspects of everyday life, have led to increased human exposure, especially in the occupational environment. Therefore, in the present study we examined the effects of hybrid multi-walled carbon nanotubes, i.e., CNTs@Fe₃O₄ and CNTs@ZnFe₂O₄, on cell viability and on redox biomarkers of RAW264.7 mouse macrophages. To simulate an occupational exposure scenario, the cells were incubated for 8h with low concentrations (12.5, 25, 50, 100 and 200 µg/ml) of hybrid multi-walled carbon nanotubes. According to our results, hybrid multi-walled carbon nanotubes caused a significant decrease in cell viability at the highest tested concentration. Additionally, the evaluation of redox biomarkers revealed that exposure to CNTs@Fe₃O₄ activated the antioxidant mechanisms, that contributed to the reduction of intracellular levels of reactive oxygen species (ROS), thus protecting the cells from protein carbonylation. On the other hand, exposure to CNTs@ZnFe₂O₄ caused the attenuation of cellular antioxidant defenses, which, however, seems to be due to the consumption of reduced glutathione (GSH) in order to neutralize the excessive levels of ROS and prevent from oxidative damage.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες & δραστικές μορφές

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια, ικανά για αυτόνομη ύπαρξη, που διαθέτουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους (Jenkins, 1988). Το άτομο του υδρογόνου, το οποίο αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο, αποτελεί την απλούστερη ελεύθερη ρίζα. Οι ελεύθερες ρίζες χαρακτηρίζονται από εξαιρετικά υψηλή δραστικότητα και αστάθεια, εξαιτίας της τάσης να δεσμεύουν ηλεκτρόνια για να συμπληρώσουν την εξωτερική στιβάδα σθένους. Οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μεγάλη ευκολία και ταχύτητα είτε μεταξύ τους είτε με άλλα κυτταρικά υποστρώματα, προκαλώντας την οξειδωσή τους (Jenkins, 1988). Όταν αντιδρούν μεταξύ τους σχηματίζουν μια μη ρίζα, η οποία είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Εξαιτίας του σύντομου χρόνου ζωής τους, οι ελεύθερες ρίζες ήταν ιδιαίτερα δύσκολο να απομονωθούν και κατ' επέκταση να επιβεβαιωθεί η ύπαρξή τους στα κύτταρα (Lushchak, 2014).

Οι δραστικές μορφές αποτελούν γενικότερη κατηγορία ατόμων ή μορίων με οξειδωτική δράση, τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν σε επιμέρους ομάδες με βάση το κεντρικό τους άτομο. Πιο συγκεκριμένα, διακρίνονται σε δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS), δραστικές μορφές θείου (reactive sulfur species, RSS) και δραστικές μορφές χλωρίου (reactive chlorine species, RCS). Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί ότι στον ορισμό δραστικές μορφές δεν περιλαμβάνονται αποκλειστικά ελεύθερες ρίζες (Veskoukis et al., 2012). Στις δραστικές μορφές οξυγόνου περιλαμβάνονται οι ρίζες σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υδροξυλίου (OH^{\cdot}), υπεροξυλίου (ROO^{\cdot}), αλκοξυλίου (RO^{\cdot}), υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}), καθώς και οι μη ρίζες υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), όζον (O_3) και μονήρες οξυγόνο (1O_2). Σχετικά με τις δραστικές μορφές αζώτου, αυτές περιλαμβάνουν το μονοξειδίο του αζώτου (NO^{\cdot}), το διοξειδίο του αζώτου (NO_2^{\cdot}), το υπεροξυνιτρώδες ανιόν ($ONOO^{\cdot}$) και το νιτρώδες/νιτρικό ανιόν. Οι δραστικές μορφές θείου περιλαμβάνουν τη ρίζαθειωλίου (RS^{\cdot}), το δισουλφίδιο ($RSSR$), τα σουλφοξειδία ($RS(O)SR'$ και $RS(O)_2SR'$), τοθειενικό (σουλφενικό) οξύ ($RSOH$) και τοθειϊνικό (σουλφινικό) οξύ (RSO_2H) (Giles et al., 2017). Τέλος, οι δραστικές μορφές χλωρίου περιλαμβάνουν το άτομο του χλωρίου (Cl^{\cdot}), το υποχλωριώδες ανιόν (OCL^{\cdot}), το υποχλωριώδες οξύ ($HClO$) και τις χλωραμίνες ($RNHCl$).

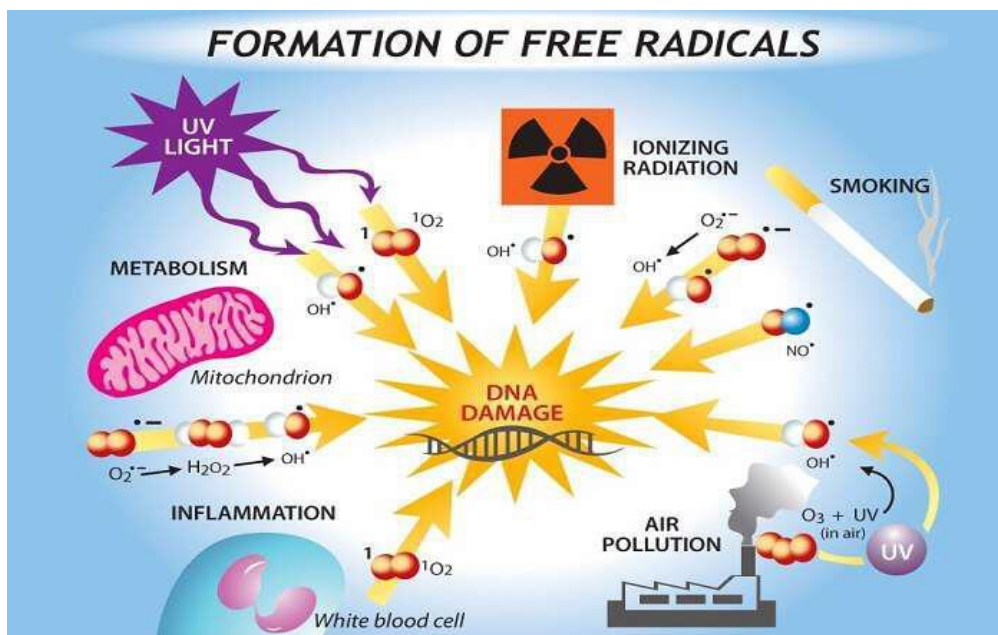
1.2 Πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών

Οι πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών διακρίνονται σε ενδογενείς και εξωγενείς. Στις ενδογενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών περιλαμβάνονται τα μιτοχόνδρια, η ενεργοποίηση των επαγγελματικών φαγοκυττάρων, η αυτοοξειδωση των μονοαμινών, καθώς και το σύστημα του κυτοχρώματος P-450. Ωστόσο, τη σημαντικότερη πηγή ενδογενούς παραγωγής ελεύθερων ριζών αποτελούν τα μιτοχόνδρια, καθώς σε αυτά λαμβάνει χώρα η διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Το σύστημα της παραπάνω αντίδρασης περιλαμβάνει μεταξύ άλλων τη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, η οποία αποτελεί τη βασική πηγή παραγωγής ATP, δηλαδή ενέργειας για τον οργανισμό (Valko et al., 2007). Ηλεκτρόνια που διαρρέουν από τις αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων μπορούν να αντιδράσουν με το μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα την παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ (Halliwell, 2015).

Επιπρόσθετα, η αντιμετώπιση των εισβαλλόντων παθογόνων αποτελεί και αυτή μια ενδογενή πηγή παραγωγής ελεύθερων ριζών. Έχει αποδειχθεί ότι τα επαγγελματικά φαγοκύτταρα μεσολαβούν στην έμφυτη ανοσολογική απόκριση, απελευθερώνοντας προϊόντα που απομακρύνουν και σκοτώνουν τα παθογόνα. Στα προϊόντα αυτά ανήκουν πρωτεΐνες, όπως η λυσοζύμη, οι υπεροξειδάσες και η ελαστάση, καθώς και δραστικές μορφές οξυγόνου, όπως το υπεροξείδιο. Η παραγωγή των τελευταίων έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει όταν μια μεγάλη ποικιλία μορίων προσδένονται στους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας των φαγοκυττάρων. Αυτό προκαλεί τη συγκρότηση του ενζύμου οξειδάση του φωσφορικού νικοτιναμινο αδενινο δινουκλεοτιδίου, το οποίο με την σειρά του, πραγματοποιεί την παραγωγή των ελεύθερων ριζών οι οποίες εκκρίνονται εξωκυτταρικά (Rosen et al., 1995).

Η ρίζα $O_2^{\cdot -}$ μπορεί να αναχθεί σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (MnSOD) (Veskoukis et al. , 2012). Το H_2O_2 δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά ανήκει στις δραστικές μορφές οξυγόνου, καθώς αποτελεί πρόδρομο μόριο εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών. Ειδικότερα, κατά τη δεκαετία του 1890, ο J. H.Fenton περιέγραψε μία αντίδραση μεταξύ αλάτων σιδήρου και H_2O_2 , που προκάλεσε οξειδωτική βλάβη σε οργανικά μόρια, όπως το τρυγικό οξύ (Gutteridge, 1995). Πιο συγκεκριμένα, στην αντίδραση Fenton, όπως ονομάστηκε, το H_2O_2 αντιδρά με μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο σίδηρος, ο χαλκός και το μαγγάνιο, προς σχηματισμό της εξαιρετικά δραστικής ρίζας υδροξυλίου.

Η παραγωγή ελεύθερων ριζών από εξωγενείς πηγές οφείλεται κυρίως στην επαφή με ξеноβιοτικές ουσίες και στην επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων. Σε αυτές ανήκουν η έκθεση σε ακτινοβολίες, η ραδιενέργεια, η ατμοσφαιρική ρύπανση, η έκθεση σε βαρέα μέταλλα, η δράση ορισμένων φάρμακων, καθώς και η έκθεση σε ξеноβιοτικές ουσίες όπως οι τοξίνες και τα εντομοκτόνα. Όταν αυτές οι εξωγενείς ενώσεις εισέλθουν στον οργανισμό, μέσω του μεταβολισμού παράγονται ελεύθερες ρίζες (Pizzino et al. , 2017). Επιπλέον, εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών αποτελούν η μη ισορροπημένη διατροφή, η έντονη άσκηση, η κατανάλωση αλκοολούχων ποτών και το κάπνισμα.



Εικόνα 1. Ενδογενείς και εξωγενείς πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών (πηγή: www.uafinfo.org.au/health-antioxidants/).

1.3 Βιολογικοί ρόλοι ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν διττό ρόλο στη βιολογία του κυττάρου, ο οποίος εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις τους στα κύτταρα. Η υψηλή και διαρκής παραγωγή ελευθέρων ριζών μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε διάφορα κυτταρικά βιομόρια, όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα (Young et al. , 2001). Στην περίπτωση που οι ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν με κάποιο βιομόριο σχηματίζονται νέες ελεύθερες ρίζες, οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια, οδηγώντας στη δημιουργία νέων ελευθέρων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί σε απώλεια της ρευστότητας και της ελαστικότητάς της, σε μειωμένη κυτταρική λειτουργία, ενώ μπορεί να προκαλέσει ακόμη και κυτταρική ρήξη που θα οδηγήσει τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Επιπρόσθετα, η υπεροξειδωση των λιπιδίων προκαλεί τον σχηματισμό της μαλονδιαλδεΐδης (MDA) και άλλων τελικών προϊόντων, τα οποία είναι γνωστό ότι είναι κυτταροτοξικά. Η MDA είναι μια οργανική ουσία που προκύπτει από την επίδραση των ROS στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η MDA είναι τοξική για τα κύτταρα καθώς σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς με διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες, ενώ έχει επίδραση και στο DNA του κυττάρου προκαλώντας μεταλλάξεις. Σημαντικό είναι και το γεγονός ότι ως μία αλυσιδωτή αντίδραση ριζών, η υπεροξειδωση των λιπιδίων εξαπλώνεται πολύ γρήγορα στο κύτταρο επηρεάζοντας μεγάλη ποσότητα λιπιδικών μορίων (Frei, 1997). Η οξειδωση των λιπιδίων έχει συσχετισθεί με διάφορες ασθένειες, όπως την αθηροσκλήρωση (Witztum & Steinberg, 2001), τη στεφανιαία νόσο (Clarke & Lewington, 2006), με διάφορα είδη νεοπλασιών, καθώς και με τη γήρανση.

Όσον αφορά την επίδραση των ελευθέρων ριζών στις πρωτεΐνες, η αλληλεπίδρασή τους οδηγεί σε αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή αλλά και απώλεια της πιθανής ενζυμικής τους λειτουργίας (Stadtman, 1986). Σημαντικό είναι να τονιστεί ότι η οξειδωση ορισμένων αμινοξικών κατάλοιπων και πιο συγκεκριμένα της αργινίνης, λυσίνης, προλίνης και θρεονίνης μπορεί να οδηγήσει στην καρβονυλίωση των πρωτεϊνών (Stadtman & Levine, 2006), μία μη αναστρέψιμη και μη ενζυμική τροποποίηση (Dalle-Donne et al., 2006). Παρότι οι μετρίως οξειδωμένες πρωτεΐνες μπορούν να αποικοδομηθούν από το πρωτεόσωμα, οι βαριά καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σχηματίζουν συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους, τα οποία όχι μόνο δεν μπορούν να αποικοδομηθούν, αλλά μπορούν μάλιστα να αναστείλουν και τη λειτουργία του πρωτεοσώματος (Veskoukis et al., 2016). Επιπρόσθετα, η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών όχι μόνο επηρεάζει τη δική τους λειτουργία, αλλά και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν και άλλα βιομόρια.

Σημαντική είναι και η επίδραση των ελευθέρων ριζών στα νουκλεϊκά οξέα. Σε ότι αφορά το DNA, πρόκειται για ένα ιδιαίτερα σταθερό, δίκλωνο γραμμικό μόριο που αποτελείται από τις νουκλεοτιδικές βάσεις αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη και κυτοσίνη στις οποίες συμβαίνει η οξειδωση. Κύρια οξειδωμένη βάση του DNA είναι η 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνη που προκύπτει από την επίδραση της ρίζας υδροξυλίου στη θέση C-8 της γουανίνης (Kohen & Nyska, 2002). Η παραπάνω αλλαγή αποτελεί μια ιδιαίτερα ολέθρια βλάβη για το DNA, η οποία είναι υπεύθυνη για την επαγωγή μεταλλαξιγένεσης

(Nishida et al., 2013). Μπορεί επίσης να προκαλέσει απώλεια της επιγενετικής πληροφορίας, εξαιτίας της μείωσης του στοιχείου μεθυλίωσης των νησίδων CpG στους υποκινητές γονιδίων (Yasui et al., 2014). Από την άλλη, οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικοί στην αντιμετώπιση της οξειδωσής του, μέσω εκτομής και εισαγωγής βάσεων (Pizzino et al., 2017).

Όσον αφορά το RNA, πρόκειται για ένα λιγότερο σταθερό και ιδιαίτερα ευάλωτο μονόκλωνο μόριο, αφού δεν επιδέχεται επιδιορθώσεις, βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και κατά επέκταση κοντά στα μιτοχόνδρια που αποτελούν πηγές παραγωγής ROS (Li et al., 2006). Συνέπεια οξειδωσης του RNA είναι η τροποποίηση της βάσης της γουανίνης σε 8-υδροξυγουανοσίνη, όπως συμβαίνει και στο DNA. Επιπλέον, μπορεί να μεταβάλλει τη δομή, τη λειτουργία και την αλληλεπίδραση του RNA με άλλα κυτταρικά συστατικά. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η περίπτωση οξειδωτικής βλάβης στο mRNA, η οποία οδηγεί σε προβλήματα και επιπλοκές στην μετάφρασή του (Fimognari, 2015).

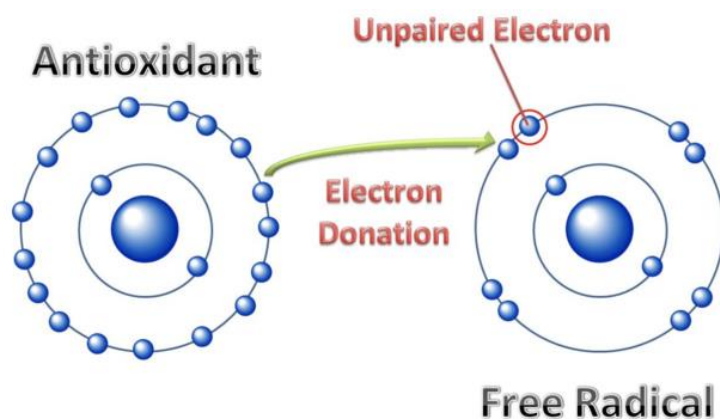
Ωστόσο, οι ελεύθερες ρίζες δεν είναι πάντα επικίνδυνες και μάλιστα, σε συγκεκριμένες χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις εμφανίζουν ευεργετικούς ρόλους στον οργανισμό. Σε πολλές περιπτώσεις, οι δραστικές μορφές και οι ελεύθερες ρίζες δρουν ως κυτταρικοί σηματοδότες και προκαλούν πλήθος χρήσιμων προσαρμογών μετά από έκθεση σε αυτές. Συνήθως παράγονται από ισομορφές του ενζύμου NADPH οξειδάση και διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Η πιο γνωστή ελεύθερη ρίζα που δρα ως σηματοδοτικό μόριο είναι το μονοξειδίο του αζώτου (NO). Το μονοξειδίο του αζώτου απαιτείται στην ορθή ρύθμιση της ροής του αίματος, σε περιπτώσεις θρόμβωσης και επιπλέον είναι ζωτικής σημασίας στη ρύθμιση της φυσιολογικής νευρικής δραστηριότητας (Pacher et al., 2007). Επιπρόσθετα, οι ROS ρυθμίζουν μηχανισμούς σχετικούς με την ανοσία, το μεταβολισμό του κυττάρου, τον πολλαπλασιασμό του, τη μυϊκή συστολή και την απόπτωση. Οι ελεύθερες ρίζες εμφανίζονται και στην εξάλειψη ενδοκυτταρικών παθογόνων. Στην περίπτωση αυτή, τα φαγοκύτταρα συνθέτουν και αποθηκεύουν ελεύθερες ρίζες, ώστε να είναι σε ετοιμότητα το σύστημα άμυνας σε κάθε πιθανή εισβολή παθογόνων (Dröge, 2002). Τέλος, μια άλλη φυσιολογική λειτουργία των ελεύθερων ριζών στον οργανισμό αποτελεί η επαγωγή της μιτοχόνδριου απόκρισης (Genestra, 2007).

1.4 Μεταγραφικός παράγοντας Nrf2

Αξιοσημείωτο επιστημονικό γεγονός αποτελεί η ανακάλυψη του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 (nuclearfactor-erythroid-2-related factor 2), το 1994 (Moi et al., 1994). Ο Nrf2 είναι ένας πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την κυτταρική άμυνα έναντι οξειδωτικών παραγόντων και τοξικών ουσιών μέσω της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στην απόκριση στο οξειδωτικό στρες και στην αποτοξίνωση από ξеноβιοτικές ουσίες. Εκτός από τις παραπάνω δράσεις, ο Nrf2 εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής (He et al., 2020). Ο μεταγραφικός παράγοντας Nrf2 επάγει την έκφραση κυτταροπροστατευτικών γονιδίων και σχηματίζει ένα δίκτυο συνεργαζόμενων ενζύμων που εμπλέκονται στις αντιδράσεις αποτοξίνωσης ξеноβιοτικών ουσιών και στην εξουδετέρωση των προοξειδωτικών, με σκοπό τη διατήρηση της κυτταρικής ομοιόστασης (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014). Η πρωτεΐνη Keap1 είναι υπεύθυνη για την ουβικιτινυλίωση και αποικοδόμηση του Nrf2 και επομένως σε αυτές τις συνθήκες ο Nrf2 έχει μικρό χρόνο ημιζωής (Cullinan et al., 2004). Σε αντίθετη περίπτωση, υπό αυξημένες συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών, η Keap1 οξειδώνεται, με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση της και έτσι ο Nrf2 απελευθερώνεται και μετατοπίζεται στον πυρήνα (Baird et al., 2014), όπου ετεροδιμερίζεται με μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών sMaf (Motohashi et al., 2002). Στη συνέχεια, το σύμπλοκο Nrf2-sMaf προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες στην περιοχή του υποκινητή, το στοιχείο αντιοξειδωτικής απόκρισης των γονιδίων-στόχων, επάγοντας τελικά τη μεταγραφή τους (Tonelli et al., 2018).

1.5 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις που όταν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, συγκριτικά με το προς οξείδωση υπόστρωμα, καθυστερούν ή αναστέλλουν την οξείδωση του συγκεκριμένου υποστρώματος (Gutteridge, 1995). Με βάση τα νεότερα επιστημονικά δεδομένα ο παραπάνω ορισμός έχει αναπροσαρμοστεί και πλέον ως αντιοξειδωτικό ορίζεται κάθε ουσία που προλαμβάνει, καθυστερεί ή απομακρύνει την οξειδωτική βλάβη (Gutteridge & Halliwell, 2010). Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών είναι να εξουδετερώνουν την περίσσεια των ελευθέρων ριζών, προσφέροντας το ηλεκτρόνιό τους, με αποτέλεσμα να μετατρέπονται τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες.



Εικόνα 2. Τρόπος δράσης των αντιοξειδωτικών (πηγή: Packirisamy & Subbulakshmi, 2013).

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να διακριθούν σε επιμέρους κατηγορίες με βάση την ενζυμική τους φύση και την πηγή προέλευσής τους. Σε ό,τι αφορά την πρώτη περίπτωση, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να διακριθούν σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά ανήκουν η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD). Από την άλλη, στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά ανήκουν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η θειορεδοξίνη (Trx), η γλουταρεδοξίνη (Grx), το λιποϊκό οξύ, η μελατονίνη, το συνένζυμο Q10, το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη και οι μεταλλικές χηλικές πρωτεΐνες (Shebis et al., 2013).

Σε ό,τι αφορά το δεύτερο κριτήριο διάκρισης, τα αντιοξειδωτικά μπορούν να ταξινομηθούν σε μεταβολικά και διατροφικά. Στην κατηγορία των μεταβολικών αντιοξειδωτικών ανήκουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, καθώς και μόρια χαμηλού μοριακού βάρους, ενώ στα διατροφικά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνονται εξωγενείς ενώσεις που προσλαμβάνονται από φυσικά τρόφιμα ή συμπληρώματα διατροφής, όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, τα καροτενοειδή, τα ιχνοστοιχεία και οι πολυφαινολικές ενώσεις (Amir Aslani & Ghobadi, 2016). Παρακάτω, αναλύονται ορισμένοι μη ενζυμικοί και ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί, αντίστοιχα.

Μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ανηγμένη Γλουταθειόνη (GSH)

Η ανηγμένη γλουταθειόνη αποτελεί το σημαντικότερο ενδογενές αντιοξειδωτικό. Δομικά αποτελείται από τρία αμινοξέα, το γλουταμινικό οξύ, την κυστεΐνη και τη γλυκίνη (Townsend et al., 2003). Η σύνθεση της πραγματοποιείται με διαδοχική προσθήκη, αρχικά, του αμινοξέος κυστεΐνη στο γλουταμινικό οξύ και στη συνέχεια του αμινοξέος γλυκίνη

(Meister, 1992). Ο ρόλος της είναι να ανάγει πλήθος οξειδωτικών, είτε ενζυμικά είτε αυθόρμητα μέσω της θειολικής της ομάδας. Με την παροχή ενός ηλεκτρονίου η ίδια η γλουταθειόνη καθίσταται δραστική, αλλά γρήγορα αντιδρά με ένα άλλο μόριο δραστικής γλουταθειόνης και σχηματίζει διθειούχο γλουταθειόνη (GSSG). Έπειτα, η GSSG μπορεί πάλι να αναχθεί στην GSH με τη διαμεσολάβηση του ενζύμου αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR) (Ribas et al., 2014). Η GSH εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόλυμα, όπου η συγκέντρωσή της κυμαίνεται μεταξύ 1-10 mM (Meister, 1988), ενώ στο εσωτερικό των περισσότερων κυττάρων η συγκέντρωση της είναι περίπου 1-2 mM. Εξαιρέση αποτελούν τα ηπατοκύτταρα που χαρακτηρίζονται από πιο υψηλή συγκέντρωση GSH, η οποία μπορεί να φτάσει περίπου τα 10 mM. Η GSH είναι εξαιρετικά απαραίτητη στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα. Για παράδειγμα, στα μιτοχόνδρια, τα οποία περιέχουν περίπου το 10% από τη συνολική ποσότητά της στο εσωτερικό του κυττάρου, ρυθμίζει την απόπτωση (Yuan & Karlowitz, 2009). Επιπρόσθετα, στον πυρήνα η γλουταθειόνη είναι βασικός ρυθμιστής της κυτταρικής διαίρεσης (Pallardó et al., 2009). Επομένως, είναι αντιληπτή η αναγκαιότητα της ύπαρξης της GSH ως αντιοξειδωτικό στον οργανισμό και για αυτό τον λόγο έχει προταθεί η αύξηση της GSH, ως χρήσιμη θεραπεία, σε περιπτώσεις ασθενειών που χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις ελεύθερων ριζών και οξειδωτικών.

Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C, γνωστή και ως ασκορβικό οξύ, ανήκει στην κατηγορία των διατροφικών αντιοξειδωτικών και συναντάται σχεδόν σε όλες τις τροφές φυτικής προέλευσης. Πρόκειται για ένα αντιοξειδωτικό που λαμβάνεται αποκλειστικά και μόνο από τη διατροφή, καθότι αρκετά είδη ζώων, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου και κατά επέκταση των πρωτευόντων θηλαστικών, δεν μπορούν να τη συνθέσουν λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί το τελευταίο ένζυμο στη βιοσυνθετική οδό του ασκορβικού οξέος (De Tullio, 2012). Πρόκειται για ένα από τα πιο αποτελεσματικά μη ενζυμικά υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά και εξουδετερώνει τις υδατικές ROS και RNS. Εκτός από αυτό, ανάγει στη φυσική της μορφή τη βιταμίνη E, η οποία επίσης αποτελεί διατροφικό αντιοξειδωτικό (Kawashima et al., 2015).

Βιταμίνη E

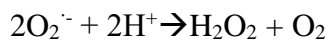
Η βιταμίνη E αποτελείται από μια ομάδα λιποδιαλυτών βιταμινών, όπου η α-τοκοφερόλη είναι η πιο δραστική. Η λιποπρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις

κυτταρικές μεμβράνες και στα μιτοχόνδρια. Η βιταμίνη E συντίθεται αποκλειστικά από τα φυτά και τα κυανοβακτήρια (Müller et al., 2010). Η ισχυρή αντιοξειδωτική της δράση περιλαμβάνει την προστασία της βιταμίνης A από την οξείδωση και την αποτροπή των αλυσιδωτών αντιδράσεων υπεροξειδωσίας των λιπιδίων στις κυτταρικές μεμβράνες, μέσω παρεμβολής της στη διάδοση των λιπιδικών ριζών (Ryan et al., 2010).

Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η SOD λειτουργεί ως η πρώτη γραμμή αντιοξειδωτικής άμυνας χάρη στην ικανότητά της να μετατρέπει τις εξαιρετικά δραστικές ρίζες υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και μοριακό οξυγόνο (Wang et al., 2016). Η αντίδραση έχει ως εξής :

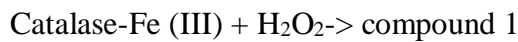


Το ένζυμο έχει 4 ισομορφές. Η SOD1 είναι μια μεταλλοπρωτεΐνη που δεσμεύει ιόντα χαλκού και ψευδαργύρου που εντοπίζονται στο κυτοσόλιο (McCord & Fridovich, 1969). Η SOD2 εντοπίζεται στη μιτοχονδριακή μήτρα και συνδέεται με τα ιόντα μαγγανίου ή σιδήρου (Weisiger & Fridovich, 1973). Η SOD3 είναι εξωκυτταρική, συνδέεται με το χαλκό και το ψευδάργυρο και έχει υψηλότερο μοριακό βάρος συγκριτικά με τις άλλες (Marklund, 1982). Τέλος, η SOD4 συνδέεται με το νικέλιο και βρίσκεται σε διάφορα αερόβια βακτήρια του γένους των στρεπτομυκήτων που βρίσκονται στο έδαφος (Anju et al., 2013). Αυτά τα μεταλλοένζυμα δρουν σε συνεργασία με τα ένζυμα υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και καταλάση, μετατρέποντας τη ρίζα υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (Aguilar et al., 2016).

Καταλάση (CAT)

Η CAT είναι ένα ομοτετραμερές ένζυμο, όπου η κάθε υπομονάδα έχει μοριακή μάζα 60 kDa και περιέχει μια αίμη, την πρωτοπορφυρίνη IX, στην ενεργό περιοχή του ενζύμου. Η πρωτοπορφυρίνη IX είναι εσωτερικά τοποθετημένη και προσιτή από μία στενή δίοδο. Επομένως η καταλάση χρησιμοποιεί μικρού μεγέθους υπόστρωμα (Kirkman & Gaetani, 2007). Η CAT χρησιμοποιεί ως συμπάραγοντα το σίδηρο ή το μαγγάνιο και καταλύει την αποικοδόμηση του H₂O₂ σε O₂ και H₂O (Francenia Santos-Sánchez et al., 2019). Το ένζυμο εντοπίζεται κυρίως στα υπεροξειδιοσώματα, με κύρια λειτουργία την αποικοδόμηση του H₂O₂ που παράγεται κατά την οξείδωση των λιπαρών οξέων (Francenia Santos-Sánchez et al., 2019). Μάλιστα, είναι ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό ένζυμο, καθώς έχει την ικανότητα

να αποικοδομεί εκατομμύρια μόρια H_2O_2 ανά δευτερόλεπτο (Goyal & Basak, 2010). Η μετατροπή του H_2O_2 σε νερό και μοριακό οξυγόνο πραγματοποιείται σε δύο στάδια (Chaudie et al., 1999) :



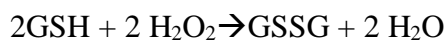
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Η GPx είναι ένα ενζυμο που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα και στον εξωκυττάριο χώρο. Οι βιολογικοί της ρόλοι περιλαμβάνουν την αναγωγή των υδροϋπεροξειδίων (ROOH) σε αλκοόλες (ROH) και του H_2O_2 σε H_2O , ενώ ταυτόχρονα προκαλεί την οξείδωση της GSH.

Οι αντιδράσεις έχουν ως εξής :



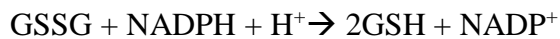
ή



Η GPx απαντάται σε δύο μορφές: την εξαρτώμενη από το σελήνιο και την ανεξάρτητη από το σελήνιο και η κάθε μορφή διαθέτει διαφορετικές υπομονάδες και διαφορετικές ενεργές περιοχές (Aguilar et al., 2016). Το ένζυμο παίζει σημαντικό ρόλο στην αναστολή της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και επομένως προστατεύει τα κύτταρα από το οξειδωτικό στρες. Στους ανθρώπους, υπάρχουν τουλάχιστον οκτώ ένζυμα GPx, οι GPx1 έως και GPx8.

Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH και διατηρεί σε φυσιολογικά επίπεδα την αναλογία GSH:GSSG στο εσωτερικό του κυττάρου, η οποία αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους δείκτες της ενδογενούς οξειδοαναγωγικής κατάστασης (Can et al., 2010). Η GR αποτελείται από δύο υπομονάδες, καθεμία εκ των οποίων περιέχει στην ενεργό περιοχή της ένα φλαβινο αδενο δινουκλεοτίδιο (FAD). Το φωσφορικό νικοτιναμινο αδενο δινουκλεοτίδιο (NADPH) ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα. Όπως φαίνεται στην ακόλουθη αντίδραση, οι δύο σουλφυδρυλομάδες αλληλεπιδρούν με τη GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH (Piggott & Karuso, 2007):



1.6 Οξείδωση και Αναγωγή

Οι όροι οξείδωση και αναγωγή μπορούν να εκφραστούν βάση της μεταφοράς οξυγόνου, υδρογόνου ή ηλεκτρονίου ή την μεταβολή του αριθμού οξείδωσης. Σύμφωνα με αυτά, η οξείδωση αναφέρεται ως η προσθήκη οξυγόνου, η απόσπαση υδρογόνου, η απόσπαση ηλεκτρονίων ή η αύξηση του αριθμού οξείδωσης. Απεναντίας, η αναγωγή ορίζεται ως η απόσπαση οξυγόνου, η προσθήκη υδρογόνου, η προσθήκη ηλεκτρονίων ή η μείωση του αριθμού οξείδωσης (Hudlický & Miloš, 1990). Κάθε αντίδραση οξείδωσης συνοδεύεται από μια αντίδραση αναγωγής. Επομένως, οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις είναι εκείνες στις οποίες παρατηρείται μεταβολή της οξειδωτικής κατάστασης ή του αριθμού οξείδωσης ενός ή περισσότερων στοιχείων. Ο ορισμός αυτός καλύπτει όλες τις δυνατές και πιθανές περιπτώσεις, ανεξάρτητα του μηχανισμού με τον οποίο πραγματοποιούνται και αποτελεί κριτήριο για την ταξινόμηση των χημικών αντιδράσεων σε οξειδοαναγωγικές και μη. Σύμφωνα με το τελευταίο, αντιδράσεις όπου παρατηρείται μεταβολή του αριθμού οξείδωσης ενός τουλάχιστον στοιχείου χαρακτηρίζονται ως οξειδοαναγωγικές και αντιδράσεις όπου δεν παρατηρείται μεταβολή του αριθμού οξείδωσης κανενός από τα στοιχεία που συμμετέχουν θεωρούνται μη οξειδοαναγωγικές. Επιπρόσθετα, σημαντικό είναι να τονιστεί ότι σε κάθε αντίδραση οξειδοαναγωγής μεταβάλλονται ταυτόχρονα οι αριθμοί οξείδωσης δύο διαφορετικών στοιχείων, με το ένα να οξειδώνεται και το άλλο να ανάγεται, όπως προαναφέρθηκε. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις, όπου το ίδιο στοιχείο μπορεί να υφίσταται ταυτόχρονα και οξείδωση και αναγωγή με χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτή του H_2O_2 . Το H_2O_2 υφίσταται αυτοοξειδοαναγωγή, η οποία πραγματοποιείται και μη ενζυμικά, αλλά στην περίπτωση αυτή η αντίδραση είναι εξαιρετικά αργή. Αντιθέτως, παρουσία του ενζύμου CAT ολοκληρώνεται συντομότερα.

1.7 Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες ορίστηκε για πρώτη φορά το 1985 από τον Sies για να περιγράψει τη διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων (Sies, 1997). Από τότε ο ορισμός έχει διαφοροποιηθεί και πλέον ως οξειδωτικό στρες αναφέρεται η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων, η οποία οδηγεί σε διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και δυνητικά σε πρόκληση μοριακής βλάβης (Sies, 2015). Σήμερα, καθίσταται εύκολη η αξιολόγηση αρκετών βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης, ωστόσο ο μεγάλος αριθμός

αντιοξειδωτικών και προοξειδωτικών που συμμετέχουν ενδογενώς στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής καθιστούν δύσκολη την εξαγωγή κάποιου βέβαιου συμπεράσματος σχετικά με τη διαταραχή της ισορροπίας. Όπως προαναφέρθηκε, οι δραστικές μορφές και οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν σε υψηλές συγκεντρώσεις στο κύτταρο οξειδωτικό στρες. Αντιθέτως, σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν θετικές επιδράσεις στα κύτταρα, καθώς ρυθμίζουν την κυτταρική σηματοδότηση και τη διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου (Sen & Packer, 1996). Επιπλέον, όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί παράγουν ATP με οξείδωση οργανικών μορίων με οξυγόνο. Ωστόσο, πρέπει να προστατεύονται από την υψηλή οξειδωτική ικανότητα του οξυγόνου και την ευκολία μετατροπής του σε δραστικές μορφές. Υπό αερόβιες συνθήκες, διάφορα μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων εκείνων για την παραγωγή ενέργειας, δημιουργούν ROS. Οι ROS, σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις είναι χρήσιμες, ενώ όταν δεν βρίσκονται κάτω από ομοιοστατικό έλεγχο προκύπτουν υψηλότερες συγκεντρώσεις που οδηγούν σε οξειδωτικό στρες και σε κυτταρικό θάνατο (Czarnocka & Karpiński, 2018).

1.8 Νανοτεχνολογία

Η Νανοτεχνολογία αποτελεί ένα διαρκώς εξελισσόμενο επιστημονικό πεδίο με πλήθος εφαρμογών και συμμετοχή σε πολλούς επιστημονικούς τομείς, όπως της Φυσικής, της Χημείας, της Βιολογίας, της Επιστήμης των Υλικών και της Μηχανικής. Η Νανοτεχνολογία ορίζεται ως η επιστήμη, η μηχανική και η τεχνολογία, η οποία ασχολείται με τον έλεγχο και την εκμετάλλευση της ύλης σε ατομικό και μοριακό επίπεδο, σε κλίμακα μεγέθους από 1-100 nm. Ιστορικά, πατέρας της Νανοτεχνολογίας θεωρείται ο νομπελίστας φυσικός Richard Feynman, ο οποίος το 1959 παρουσίασε τη διάλεξη «There's Plenty of Room at the Bottom», αναφερόμενος στην πιθανότητα χειραγώγησης της ύλης σε κλίμακα ατόμων. Στη συνέχεια, το 1974 ο Norio Taniguchi διατύπωσε για πρώτη φορά τον όρο "Νανοτεχνολογία", παραθέτοντας ότι «η Νανοτεχνολογία σχετίζεται κυρίως με την επεξεργασία, το διαχωρισμό, την ενοποίηση και την παραμόρφωση των υλικών από ένα άτομο ή ένα μόριο» (Taniguchi et al., 1974).

Παρά το γεγονός ότι η Νανοτεχνολογία αποτελεί μία από τις πιο ελπιδοφόρες τεχνολογίες του 21^{ου} αιώνα, η χρήση νανοϋλικών έχει την απαρχή της στην αρχαιότητα. Το κύπελλο του Λυκούργου, ένα Ρωμαϊκό κειμήλιο που χρονολογείται περίπου από τον 4^ο αιώνα μ.Χ., αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα. Πιο συγκεκριμένα, είναι το παλαιότερο παράδειγμα διχρωμικού γυαλιού, το οποίο αλλάζει χρώμα σε συγκεκριμένες συνθήκες φωτισμού

(Barber & Freestone, 1990). Η ανάλυση του κυπέλλου με ακτίνες X έδειξε την παρουσία νανοσωματιδίων αργύρου και χρυσού, με διάμετρο 50-100 nm, τα οποία οφείλονταν για το φαινόμενο του διχρωισμού. Επιπλέον, ένα ακόμη παράδειγμα εφαρμογής της νανοτεχνολογίας, είναι τα βιτρώ των εκκλησιών του ύστερου Μεσαίωνα, με την παρουσία νανοσωματιδίων χρυσού και αργύρου στο γυαλί, τα οποία προσέδιδαν τους χαρακτηριστικούς χρωματισμούς (Bayda et al., 2020).

Σήμερα η Νανοτεχνολογία βρίσκει πλήθος εφαρμογών στη βιοϊατρική έρευνα, την περιβαλλοντική προστασία, την πληροφορική, ακόμη και σε καταναλωτικά προϊόντα που απευθύνονται στο ευρύ κοινό. Σε ότι αφορά το πεδίο της βιοϊατρικής έρευνας, τα νανοϋλικά συνεισφέρουν στη μεταφορά φαρμάκων, πρωτεϊνών και άλλων χρήσιμων θεραπευτικών μορίων στο εσωτερικό των κυττάρων, χάρη στο εξαιρετικά μικρό τους μέγεθος (Weissig et al., 2014). Επίσης, συνεισφέρουν και στην ανάπτυξη ιατρικών συσκευών, όπως οι διαγνωστικοί βιοαισθητήρες (Hulla et al., 2015). Σε ότι αφορά την προστασία του περιβάλλοντος, η Νανοτεχνολογία συνεισφέρει στην παραγωγή πιο αποδοτικής και πιο οικονομικής ενέργειας με σκοπό τη μείωση ή/και αντικατάσταση της χρήσης μη ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Επιπλέον, όσον αφορά τις εφαρμογές της Νανοτεχνολογίας στην πληροφορική, απώτερος στόχος ήταν η μείωση του μεγέθους των ηλεκτρονικών υπολογιστών. Προς αυτή την κατεύθυνση, σχεδιάστηκαν πολύπλοκα ηλεκτρικά κυκλώματα σε επίπεδο νανοκλίμακας, τα οποία οδήγησαν σε τεράστια μείωση του μεγέθους από υπολογιστές ολόκληρου δωματίου σε μικρούς φορητούς υπολογιστές (Bayda et al., 2020). Τέλος, η Νανοτεχνολογία βρίσκει εφαρμογή και σε καταναλωτικά προϊόντα, μεταξύ των οποίων στην ανάπτυξη «έξυπνων υφασμάτων» αλλά και στην ενσωμάτωσή τους σε καλλυντικά. Τα «έξυπνα υφάσματα» παρέχουν μεταξύ άλλων τη δυνατότητα διαχείρισης της υγρασίας και της θερμότητας (Fang et al., 2021). Τέλος, η Νανοτεχνολογία χρησιμοποιείται στην ανάπτυξη ενυδατικών κρεμών, προϊόντων φροντίδας των μαλλιών, μακιγιάζ και αντηλιακών.

1.9 Νανοϋλικά

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, τα νανοϋλικά είναι «φυσικά, τυχαία συντιθέμενα ή τεχνητά υλικά που αποτελούνται από σωματίδια σε αδέσμευτη κατάσταση ή ως συσσωμάτωμα και στα οποία, για το 50% ή περισσότερο των σωματιδίων στην κατανομή μεγέθους αριθμού, μία ή περισσότερες εξωτερικές διαστάσεις βρίσκονται στην περιοχή μεγέθους 1-100 nm.». Πρόκειται για υλικά των οποίων τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

ποικίλουν και μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν. Τα χαρακτηριστικά αυτά περιλαμβάνουν το μέγεθος, τη μορφολογία, το σχήμα, τη χημική σύνθεση, τη διαλυτότητα και την κατάσταση συσσωμάτωσης (Vardakas et al., 2021).

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των νανοϋλικών προσδίδουν σημαντικά τεχνικά πλεονεκτήματα, αλλά παράλληλα εμπλέκονται και στην πρόκληση τοξικότητας κατά την επαφή των νανοϋλικών με τα βιολογικά συστήματα (Gatoo et al., 2014, Thomas et al., 2009). Επομένως, ο χαρακτηρισμός των νανοϋλικών έχει ως απώτερο στόχο την αξιολόγηση των πιθανών βιολογικών επιδράσεών τους. Ωστόσο, το προφίλ δράσης ενός νανοϋλικού σε έναν οργανισμό εξαρτάται και από άλλους παράγοντες εκτός των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, όπως η οδός και ο χρόνος έκθεσης.

Σε ότι αφορά τις οδούς έκθεσης, ο άνθρωπος μπορεί να εκτεθεί στα νανοϋλικά μέσω εισπνοής, δερματικής επαφής και κατάποσης (Kuhlbusch et al., 2018). Ωστόσο, η πιο επικίνδυνη οδός έκθεσης θεωρείται η εισπνοή. Κατά την εισπνοή τους, το πρώτο όργανο που προσβάλλεται είναι οι πνεύμονες και η έκθεση τους σε νανοϋλικά μπορεί να οδηγήσει από μια απλή φλεγμονή έως και σε πνευμονική ίνωση (Landsiedel, 2014). Στην αντίθετη πλευρά, η διαδερμική οδός χαρακτηρίζεται ως η λιγότερο ανησυχητική, διότι η διείσδυση μέσω του δέρματος είναι εξαιρετικά περιορισμένη (Nafisi & Maibach, 2018). Τέλος, σε περίπτωση κατάποσης και σχετικά με την πεπτική οδό οι επιπτώσεις είναι απρόβλεπτες. Αιτία αυτού αποτελούν οι διαφορετικές γαστρεντερικές συνθήκες, όπως η υψηλή ιοντική ισχύς και το όξινο pH του στομάχου. Το όξινο pH αναμένεται να επηρεάσει τις φυσικοχημικές ιδιότητες του νανοϋλικού, οδηγώντας πιθανώς σε παραγωγή διάφορων άλλων τοξικών προϊόντων (Bouwmeester et al., 2018).

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, είναι κατανοητό το πόσο σημαντικός είναι ο χαρακτηρισμός των νανοϋλικών και η αξιολόγηση των βιολογικών τους επιδράσεων. Επιστημονικές μελέτες έχουν φέρει στο προσκήνιο ότι τα διάφορα νανοϋλικά εμφανίζουν αντιοξειδωτικές ή προοξειδωτικές δράσεις, ακόμα και συνδυασμό αυτών όταν βρίσκονται σε διαφορετικές συνθήκες (Sims et al., 2017). Σε ότι αφορά τις προοξειδωτικές δράσεις των νανοϋλικών, αυτές περιλαμβάνουν την αύξηση της παραγωγής ROS με αποτέλεσμα το κύτταρο να υπόκειται σε οξειδωτικό στρες (Saifi et al., 2018). Τα νανοϋλικά έχουν τόσο άμεσες όσο και έμμεσες δράσεις που προκαλούν τοξικότητα. Για παράδειγμα, αρκετές είναι οι επιγενετικές τροποποιήσεις που μπορεί να επιφέρουν, επηρεάζοντας βασικές κυτταρικές διεργασίες, όπως η μεθυλίωση του DNA, η έκφραση των miRNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών, οδηγώντας το κύτταρο στην απόπτωση (Yu et al., 2020).

Επιπρόσθετα, τα νανοϋλικά επιδρούν έμμεσα σε κυτταρικά οργανίδια, με κύριο στόχο τους τα μιτοχόνδρια. Αρκετές μελέτες μέχρι σήμερα έχουν δείξει ότι τα νανοϋλικά προκαλούν μεταβολές στη μιτοχονδριακή μορφολογία, στο δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης, στους μιτοχονδριακούς πόρους, καθώς και στη δράση της αναπνευστικής αλυσίδας, προκαλώντας έτσι περαιτέρω παραγωγή ROS (Wu et al., 2020). Οι υψηλές συγκεντρώσεις ROS εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία διάφορων ασθενειών, μεταξύ των οποίων καρδιαγγειακά νοσήματα, αναπνευστικές παθήσεις, νευροεκφυλιστικές διαταραχές και διάφορες μορφές καρκίνου.

1.10 Νανοςωλήνες άνθρακα

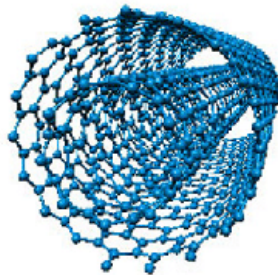
Οι νανοςωλήνες άνθρακα (carbon nanotubes, CNTs) ανήκουν στην κατηγορία των νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα. Ανακαλύφθηκαν από τον Iijima το 1991 και παράγονται από γραφίτη με διάφορες μεθόδους, όπως η μέθοδος του ηλεκτρικού-βολταϊκού τόξου, η παλμική εξάχνωση με λέιζερ και οι χημικές διεργασίες εναπόθεσης ατμών (Ando, 2004). Πέρα από την πολύ μικρή διάμετρό τους, οι CNTs διαθέτουν και μια ιδιαίτερη κρυσταλλική δομή (Liu et al., 2011). Η εξωτερική επιφάνεια των CNTs μπορεί να αλληλεπιδράσει με βιολογικά μακρομόρια, όπως οι πρωτεΐνες και το DNA (Zeinabad et al., 2016), σχηματίζοντας ομοιοπολικούς και μη δεσμούς. Σχετικά με τις μηχανικές τους ιδιότητες, οι CNTs είναι από τα ισχυρότερα υλικά στη φύση και το μέτρο ελαστικότητας του Young για αυτούς κυμαίνεται από 1,1 έως 1,3 TPa. Επιπλέον, σύμφωνα με τις ηλεκτρικές τους ιδιότητες παρατηρείται ότι δρουν είτε ως μέταλλα είτε ως ημιαγωγοί και αξιοσημείωτη είναι η ιδιαίτερα υψηλή θερμική αγωγιμότητά τους (Dresselhaus et al., 2004). Από άποψη διαμέτρου, οι CNTs μπορεί να είναι 50.000 φορές πιο λεπτοί από μια ανθρώπινη τρίχα αλλά είναι ιδιαίτερα ισχυροί ως υλικό (Ganesh, 2013).

Οι CNTs μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις κατηγορίες, τους νανοςωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος (single-walled carbon nanotubes, SWCNTs) με διάμετρο 0,4-2,5 nm, τους νανοςωλήνες άνθρακα διπλού τοιχώματος (double-walled carbon nanotubes, DWCNTs) με διάμετρο μικρότερη του 1 nm, τους νανοςωλήνες άνθρακα τριπλού τοιχώματος (triple-walled carbon nanotubes, TWCNTs) και τους νανοςωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs) με διάμετρο άνω των 10 nm (Iijima & Ichihashi, 1993). Οι κατηγορίες πέρα από τη διάμετρο διαφέρουν, όπως είναι αντιληπτό, ως προς την διάταξη και τον αριθμό των κυλίνδρων γραφενίου που διαθέτουν (Ganesh, 2013, Prajapati et al., 2022).

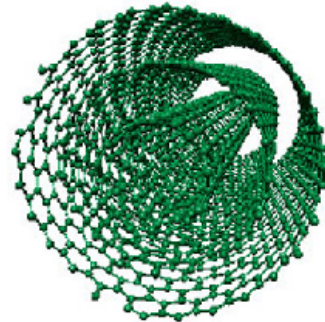
single-walled
carbon nanotube
(SWCNT)



double-walled
carbon nanotube
(DWCNT)



triple-walled
carbon nanotube
(TWCNT)



Εικόνα 3. Δομές νανοσωλήνων άνθρακα (πηγή : Khan et al., 2021).

Όσον αφορά τους SWCNTs, άρχισαν να έρχονται στην επιφάνεια της επιστημονικής κοινότητας το 1993 (Iijima & Ichihashi, 1993). Από άποψη χαρακτηριστικών και ιδιοτήτων είναι όμοιοι στα περισσότερα με τους MWCNTs, καθώς και αυτοί εμφανίζουν ιδιότητες άλλοτε μετάλλων και άλλοτε ημιαγωγών, υψηλή αντοχή αλλά και ελαστικότητα. Η κύρια διαχωριστική τους διαφορά είναι ότι διαθέτουν ένα μόνο κυλινδρικό φύλλο γραφενίου. Η μονοδιάστατη δομή τους και το μέγεθος τους, που κυμαίνεται σε νανόμετρα, προσδίδουν ασυνήθιστες ιδιότητες και έτσι πρόκειται για ένα πολλά υποσχόμενο υλικό (Yeung et al., 2009).

Όσον αφορά τους MWCNTs, αποτελούνται από μερικές δεκάδες κυλινδρικά φύλλα γραφενίου, κατά προσέγγιση πενήντα (Iijima & Ichihashi, 1993). Οι MWCNTs είναι δύσκαμπτοι σωλήνες άνθρακα (Treacy et al., 1996) που μοιάζουν με ίνες, δομικά πιο σταθεροί συγκριτικά με τους SWCNTs, λόγω της πολυστρωματικής αρχιτεκτονικής τους (Zhao et al., 2011). Σχετικά με την ηλεκτρική τους αγωγιμότητα, μέσω πειραμάτων των Y.Ando et al. (1999) παρατηρήθηκε ότι οι καθαροί MWCNTs είναι ηλεκτρικά αγωγοί. Εμφανίζουν μοναδικές φυσικοχημικές ιδιότητες και κατ' επέκταση έχουν μεγάλες δυνατότητες χρήσης και εφαρμογής σε μια ποικιλία βιοϊατρικών εφαρμογών (Vardharajula et al., 2012). Παράλληλα, αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχει πλήθος μελετών, όπως αυτή των Li και Cao (2018), οι οποίες υποδεικνύουν ότι παρά το ενδιαφέρον που φέρουν βάση των ιδιοτήτων τους εμφανίζουν κυτταροτοξική δράση, η οποία ποικίλλει ανάλογα το μήκος, τη διάμετρο, τη συσσωμάτωσή τους, τη τροποποίηση της επιφάνειάς τους και την καθαρότητα τους.

Λόγω της δομής και του εξαιρετικά μικρού μεγέθους τους, τα συγκεκριμένα νανοϋλικά έχουν προκαλέσει ποικίλες ανησυχίες σχετικά με το αν εισέρχονται εντός των κυττάρων, καθώς και το πώς επιδρούν σε αυτά. Η ενδοκυττάρωση τους έχει επιβεβαιωθεί από ένα πλήθος μελετών. Η τοξικότητα των CNTs αποτελεί πρωταρχική ανησυχία, καθότι έχει παρατηρηθεί τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μελέτες. Πιο συγκεκριμένα, οι Ji et al. (2005) παρατήρησαν την επαγωγή κυτταροτοξικότητας από ορισμένους CNTs σε μακροφάγα μετά από έκθεση 6 ωρών. Ειδικότερα, η κυτταροτοξικότητα έγινε εντονότερη, καθώς αυξήθηκε έως και 35%, όταν η δοσολογία αυξήθηκε κατά 11,30 $\mu\text{g}/\text{cm}$ και έτσι οι ερευνητές οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι η εισπνοή μικρών συσσωματωμάτων μπορεί να επιφέρει προβλήματα στην υγεία. Μια άλλη έρευνα που έγινε από τους Lam et al. (2004), υπέδειξε πάλι την τοξικότητα των CNTs σε χρονικό διάστημα 7 έως και 90 ημερών έπειτα από ενδοτραχειακή εμφύτευση τους στα κύτταρα. Η τοξικότητα που εμφανίζουν έχει αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες όπως η συγκέντρωση, η μέθοδος και η διάρκεια έκθεσης, η κατάσταση συσσωμάτωσης και το μήκος τους (Francis & Devasena, 2018).

Παρά τους πιθανούς κινδύνους που ίσως εμφανίζουν, οι CNTs χρησιμοποιούνται ευρέως στη διαστημική βιομηχανία, στην αυτοκινητοβιομηχανία και στην ηλεκτρονική βιομηχανία λόγω της σταθερότητας, των αποτελεσματικότερων μεταλλικών και ηλεκτρικών τους ιδιοτήτων. Επιπρόσθετα, βρίσκουν εφαρμογή και στη νανοϊατρική, στην παρασκευή ορθοπεδικών εμφυτευμάτων, βιοαισθητήρων για την ανίχνευση πρωτεϊνών και ενζύμων, σε αντικαρκινικές θεραπείες, στη μηχανική ιστών και ως υλικό υποστήριξης της οστικής ανάπτυξης που διευκολύνει την επούλωση καταγμάτων (Singh & Nalwa, 2007). Ωστόσο, οι εφαρμογές των CNTs περιορίζονται σε ορισμένους τομείς, λόγω της αδιαλυτότητας που εμφανίζουν σε διάφορους διαλύτες και της μικρής διασποράς τους. Η τελευταία, αφορά την ιδιαίτερη τάση των CNTs να συσσωματώνονται, λόγω της υψηλής επιφανειακής ενέργειας και της πολλαπλής αλληλεπίδρασης μεταξύ των ηλεκτρονίων εντός των σωλήνων. Το πρόβλημα της συσσωμάτωσης των CNTs μπορεί να ξεπεραστεί με την αξιοποίηση δύο διαφορετικών στρατηγικών, δηλαδή τη μηχανική και τη χημική. Οι μηχανικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την εφαρμογή υπερήχων και την υψηλή διάτμηση για το διαχωρισμό των CNTs (Bourdiol et al., 2013). Εντούτοις, αυτές είναι πιο χρονοβόρες και αναποτελεσματικές, συγκριτικά με τις χημικές, γεγονός που περιορίζει τη χρήση τους (Andrews, 2003). Από την άλλη πλευρά, οι χημικές μέθοδοι βελτιώνουν την αδιαλυτότητα τους και την τάση προσρόφησης και ως αποτέλεσμα τους καθιστούν πιο σταθερούς (Prajapati et al., 2022).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποσκοπεί στην εκτίμηση των επιδράσεων δύο υβριδικών πολυφλοϊικών νανοσωλήνων άνθρακα στην κυτταρική βιωσιμότητα και σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης των μακροφάγων κυττάρων ποντικού RAW264.7, στο πλαίσιο της προσομοίωσης ενός εργασιακού σεναρίου έκθεσης. Προς αυτή την κατεύθυνση, η επιλεγμένη κυτταρική σειρά εκτέθηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις (12.5, 25, 50, 100 και 200 $\mu\text{g/ml}$) των υβριδικών πολυφλοϊικών νανοσωλήνων άνθρακα για 8 ώρες. Το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα αντιστοιχεί σε μία τυπική εργασιακή συνθήκη. Ακολούθως, οι επιδράσεις στην κυτταρική σειρά προσδιορίστηκαν με τη χρήση μίας μεθοδολογικής προσέγγισης που έχει προταθεί από την ερευνητική μας ομάδα (Vardakas et al., 2021).

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υβριδικοί πολυφλοϊικοί νανοσωλήνες άνθρακα

Η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός των υβριδικών πολυφλοϊικών νανοσωλήνων άνθρακα της μελέτης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Προηγμένων και Συνθέτων Υλικών, Νανουλικών, Νανοδιεργασιών και Νανοτεχνολογίας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Τα νανοϋλικά της μελέτης περιλαμβάνουν πολυφλοϊικούς νανοσωλήνες άνθρακα, που έχουν αναπτυχθεί μέσω χημικής εναπόθεσης ατμών σε μαγνητικά νανοσωματίδια σιδήρου, που συνοπτικά αναφέρονται ως CNTs@Fe₃O₄, καθώς και πολυφλοϊικούς νανοσωλήνες άνθρακα, που έχουν αναπτυχθεί μέσω χημικής εναπόθεσης ατμών σε υβριδικά μαγνητικά νανοσωματίδια σιδήρου, που συνοπτικά αναφέρονται ως CNTs@ZnFe₂O₄. Επίσης, μετά από χαρακτηρισμό των υβριδικών πολυφλοϊικών νανοσωλήνων άνθρακα προέκυψε ότι τόσο οι CNTs@Fe₃O₄ όσο και οι CNTs@ZnFe₂O₄ έχουν διάμετρο 60-80 nm και μήκος >20 μm.

3.2 Διασπορά υβριδικών πολυφλοϊικών νανοσωλήνων άνθρακα και προετοιμασία διαλυμάτων

Οι υβριδικοί νανοσωλήνες άνθρακα, ευρισκόμενοι υπό τη μορφή ξηράς σκόνης, ζυγίστηκαν σε ζυγό ακριβείας και προστέθηκε ποσότητα μείγματος 5% διμεθυλοσουλφοξειδίου (dimethylsulfoxide, DMSO) σε αποστειρωμένο dH₂O, ώστε να δημιουργηθεί ένα stock διάλυμα με συγκέντρωση 2 mg/ml. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκαν υπέρηχοι (70% πλάτος κύματος, 0.7 δευτερόλεπτα παλμός υπερήχων) σε συσκευή υπερήχων (UP400S, Hielscher) για 10 λεπτά, προκειμένου να επιτευχθεί κατάλληλη διασπορά των νανοϋλικών εντός του διαλύτη. Ακολούθως, το stock διάλυμα αραιώθηκε σε καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο, απουσία βόειου ορού (Fetal Bovine Serum, FBS), με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων προκειμένου να δημιουργηθούν αραιωμένα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων. Οι επιδράσεις των CNTs@Fe₃O₄ και CNTs@ZnFe₂O₄ στην κυτταρική σειρά της μελέτης εκτιμήθηκαν σε ένα εύρος χαμηλών συγκεντρώσεων και πιο συγκεκριμένα 12.5, 25, 50, 100 και 200 μg/ml.

3.3 Κυτταρική σειρά

Προκειμένου να διερευνηθούν οι βιολογικές επιδράσεις των υβριδικών νανοσωλήνων άνθρακα, επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά RAW 264.7. Τα RAW 264.7 είναι μια κυτταρική σειρά μακροφάγων, προερχόμενη από όγκο σε αρσενικό μυ, ο οποίος προκλήθηκε από τον ιό της λευχαιμίας Abelson. Τα μακροφάγα κύτταρα χρησιμοποιούνται ευρύτατα σε μελέτες

εκτίμησης της νανοτοξικότητας, καθώς ως βασικά συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος εμπλέκονται στην αναγνώριση, τη φαγοκυττάρωση και την εκκαθάριση των νανοϋλικών μετά την είσοδό τους εντός του οργανισμού (Drasler et al., 2017).

3.4 Κυτταροκαλλιέργειες

Οι καλλιέργειες και οι χειρισμοί των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν βάσει των διεθνών κατευθυντήριων οδηγιών της Καλής Πρακτικής Καλλιέργειας Κυττάρων (Bal-Price and Coecke, 2011). Ειδικότερα, τα κύτταρα ελέγχθηκαν για την παρουσία μυκοπλάσματος με τη χρήση της τεχνικής PCR και πραγματοποιήθηκε μορφολογικός έλεγχος με τη χρήση ανεστραμμένου μικροσκοπίου.

Τα μακροφάγα κύτταρα RAW 264.7 καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων 75 cm² σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C και σε συνθήκες 5% CO₂, ώστε να φτάσουν σε πληρότητα 70%-80%. Το καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) της Gibco, το οποίο περιείχε 4.5 g/L D-γλυκόζη, 4 mM L-γλουταμίνη και συμπληρώθηκε με 10% (v/v) FBS, 100 units/ml πενικιλίνη και 100 units/ml στρεπτομυκίνη.

Για την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας κατά την ανακαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε ξέστρο κυττάρων. Μετά την αποκόλληση, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο, μετρήθηκαν στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και σε κάθε νέα φλάσκα μεταφέρθηκε συγκεκριμένη ποσότητα κυτταρικού εναιωρήματος που περιείχε περίπου 2×10^6 κύτταρα.

3.5 Εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης των υβριδικών πολυφλοϊκών νανοσωλήνων άνθρακα με τη μέθοδο XTT

Η επίδραση των υβριδικών πολυφλοϊκών νανοσωλήνων άνθρακα στην κυτταρική βιωσιμότητα αξιολογήθηκε με τη χρήση της μεθόδου XTT. Η μέθοδος βασίζεται στο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος XTT από τις αφυδρογονάσες των ζωντανών, μεταβολικά ενεργών κυττάρων σε ένα υδατοδιαλυτό προϊόν φορμαζάνης, με έντονο πορτοκαλί χρώμα. Το προϊόν φορμαζάνης μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά σε μια συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών στα 450 nm.

Για την αξιολόγηση της κυτταρικής βιωσιμότητας χρησιμοποιήθηκε ένα εμπορικά διαθέσιμο kit (R&D systems). Τα κύτταρα μετρήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και ακολούθως καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε πλήρες θρεπτικό μέσο εντός τρυβλίου 96

κυψελίδων με 1×10^4 κύτταρα/κυψελίδα. Στη συνέχεια, το πλήρες θρεπτικό μέσο απορρίφθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν για 8 ώρες με χαμηλές συγκεντρώσεις (12.5, 25, 50, 100 και 200 $\mu\text{g/ml}$) των υβριδικών νανοσωλήνων άνθρακα σε θρεπτικό μέσο, απουσία FBS. Μετά το πέρας της επώασης, σε κάθε κυψελίδα προστέθηκαν 50 μl ενός διαλύματος XTT, το οποίο παρασκευάστηκε από 49 μl αντιδραστηρίου XTT και 1 μl ενεργοποιητή και τα κύτταρα επώαστηκαν για 4 ώρες σύμφωνα με τις οδηγίες του kit. Τέλος, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση στα 450 nm και στα 630 nm (μήκος κύματος αναφοράς) σε συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών Bio-Tek ELx800 (Winooski, VT, USA). Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο, απουσία FBS, με 5% DMSO σε αποστειρωμένο dH_2O . Αξίζει να σημειωθεί ότι η οπτική απορρόφηση κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης των υβριδικών νανοσωλήνων άνθρακα σε θρεπτικό μέσο χωρίς FBS αφαιρέθηκε από τις τιμές των κυττάρων που επώαστηκαν με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Οι τιμές της οπτικής απορρόφησης της ομάδας ελέγχου και των κυττάρων που επώαστηκαν με τις συγκεντρώσεις των νανοϋλικών της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της μεταβολής της κυτταρικής βιωσιμότητας με βάση την εξίσωση που ακολουθεί:

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

Τα πειράματα διεξήχθησαν εις τριπλούν και σε τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες περιπτώσεις.

3.6 Εκτίμηση της επίδρασης των υβριδικών πολυφλοϊικών νανοσωλήνων άνθρακα σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης

Οι επιδράσεις των υβριδικών πολυφλοϊικών νανοσωλήνων άνθρακα σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης της κυτταρικής σειράς μακροφάγων RAW 264.7 αξιολογήθηκαν με τη χρήση φασματοφωτομετρίας και υγρής κυτταρομετρίας ροής. Σε ότι αφορά τους βιοδείκτες που αξιολογήθηκαν με φασματοφωτομετρία, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων 75 cm^2 . Από την άλλη, για τους βιοδείκτες που προσδιορίστηκαν με υγρή κυτταρομετρία ροής, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 6 κυψελίδων.

Για την εκτίμηση των βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης με φασματοφωτομετρία, τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από τη φλάσκα με τη χρήση ξέστρου, μετρήθηκαν σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και σε κάθε νέα φλάσκα μεταφέρθηκε ποσότητα κυτταρικού εναιωρήματος, η οποία περιείχε περίπου 4×10^6 κύτταρα. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε

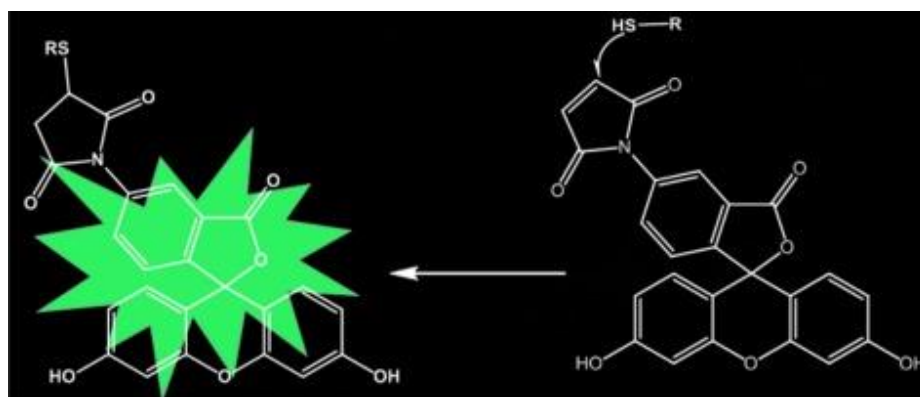
πλήρες θρεπτικό μέσο για 24 ώρες σε επωαστικό κλίβανο στους 37 °C και σε συνθήκες 5% CO₂. Στη συνέχεια, το πλήρες θρεπτικό μέσο απομακρύνθηκε, οι φλάσκες ξεπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (phosphate buffered-saline, PBS) και τα κύτταρα επώαστηκαν για 8 ώρες με χαμηλές συγκεντρώσεις των υβριδικών πολυφλοϊικών νανοσωλήνων άνθρακα σε θρεπτικό μέσο απουσία FBS.

Μετά το πέρας της επώασης, το θρεπτικό μέσο απομακρύνθηκε, οι φλάσκες ξεπλύθηκαν με PBS και σε κάθε φιάσκα προστέθηκε PBS με αναστολείς πρωτεασών. Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από την επιφάνεια της φιάσκας με χρήση ειδικού ξέστρου, επαναιωρήθηκαν με ήπιο πιπετάρισμα και το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε σωληνάκια φυγοκέντρησης 1.5 ml. Ακολούθως, εφαρμόστηκαν περιοδικοί υπέρηχοι (70% πλάτος κύματος, 0.7 δευτερόλεπτα παλμός υπερήχων) εντός πάγου σε συσκευή υπερήχων (UP400S, Hielscher) για 10 δευτερόλεπτα με 10 δευτερόλεπτα παύση για 5 φορές. Έπειτα, τα κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε (15,000 g, 20 λεπτά, 4°C) και το καθαρό υπερκείμενο, δηλαδή το κυτταρόλυμα, χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των βιοδεικτών με φασματοφωτομετρία.

3.6.1 Προσδιορισμός των ενδοκυτταρικών επιπέδων της GSH με κυτταρομετρία ροής

Αρχή της μεθόδου

Τα επίπεδα της GSH προσδιορίστηκαν με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής Thiol Green Indicator (Abcam). Ο συγκεκριμένος δείκτης αντιδρά με ενώσεις θειόλης προς σχηματισμό ενός πράσινου φθορίζοντος προϊόντος με μήκος κύματος διέγερσης/μήκος κύματος εκπομπής = 490/525 nm.



Εικόνα 4. Αντίδραση Thiol Green Indicator με ενώσεις θειόλης (πηγή: Huo et al., 2015).

Αντιδραστήρια

Thiol Green Indicator

Για την παρασκευή 10 ml αντιδραστηρίου 0.05 ml Thiol Green Indicator αναμείχθηκαν με 9.95 ml PBS.

Πειραματική διαδικασία

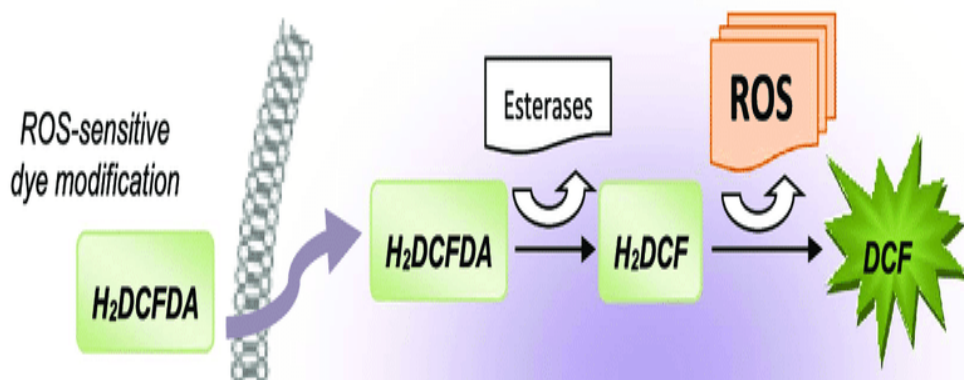
Τα RAW 264.7 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε τρυβλίο 6 κυψελίδων με πλήρες θρεπτικό μέσο με 3×10^5 κύτταρα/κυψελίδα, προκειμένου να φτάσουν σε πληρότητα 70%-80%. Στη συνέχεια, το πλήρες θρεπτικό μέσο απορρίφθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν για 8 ώρες με το προαναφερόμενο εύρος χαμηλών συγκεντρώσεων των υβριδικών πολυφλοϊκών νανοσωλήνων άνθρακα σε θρεπτικό μέσο απουσία FBS. Μετά το πέρας της επώασης, το θρεπτικό μέσο απορρίφθηκε και οι κυψελίδες ξεπλύθηκαν με 1 ml PBS. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 250 μl θρυψίνης σε κάθε κυψελίδα, τα κύτταρα επώαστηκαν στον κλίβανο για 30 δευτερόλεπτα και προστέθηκε 1 ml πλήρους θρεπτικού μέσου για την απενεργοποίηση της θρυψίνης. Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε σωλήνες φυγοκέντρησης 1.5 ml και φυγοκεντρήθηκε (1,500 g, 5 λεπτά, 4 °C). Ακολούθως, απορρίφθηκε το υπερκείμενο, το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με την προσθήκη 1 ml PBS και το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε (1,500 g, 5 λεπτά, 4 °C). Μετά την απόρριψη του υπερκειμένου προστέθηκε 1 ml διαλύματος Thiol Green Indicator και το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε. Ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στον εργαστηριακό κλίβανο και μετά το πέρας αυτής φυγοκέντρηση (1,500 g, 5 λεπτά, 4 °C). Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου προστέθηκαν 500 μl PBS στο ίζημα, το οποίο επαναδιαλυτοποιήθηκε και το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε σωλήνες κυτταρομετρίας ροής. Ο εμπρόσθιος και ο πλευρικός σκεδασμός του φωτός χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του μεγέθους και της εσωτερικής πολυπλοκότητας των κυττάρων, αντίστοιχα. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 1×10^4 κύτταρα/δείγμα, με ρυθμό ροής ≈ 500 συμβάντα/δευτερόλεπτο. Η ένταση του φθορισμού μετρήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα.

3.6.2 Προσδιορισμός των ενδοκυτταρικών επιπέδων των ROS με κυτταρομετρία ροής

Αρχή της μεθόδου

Η διοξική 2',7'-διχλωροδιϋδροφθοροσκεΐνη (H₂DCFDA) χρησιμοποιείται ευρύτατα για την εκτίμηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων των ROS. Η H₂DCFDA εισέρχεται στα κύτταρα μέσω παθητικής διάχυσης, όπου αποακετυλιώνεται από τις κυτταρικές εστεράσες προς σχηματισμό της 2',7'-διχλωροδιϋδροφθοροσκεΐνης (H₂DCF). Το προϊόν αυτό οξειδώνεται

ταχύτητα υπό την παρουσία των ROS με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός φθορίζοντος προϊόντος, της 2',7'-διχλωροφλουορεσκειΐνης (DCF), με μήκος κύματος διέγερσης/μήκος κύματος εκπομπής = 488/530 nm.



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση του τρόπου δράσης της H₂DCFDA (πηγή : Lyublinskaya et al., 2017).

Αντιδραστήρια

H₂DCFDA (10 μM)

Για την παρασκευή 10 ml διαλύματος H₂DCFDA (20 mM) ζυγίστηκαν 1.94 mg H₂DCFDA σε ζυγό ακριβείας και προστέθηκαν 10 ml DMSO. Στη συνέχεια, 10 ml του προαναφερόμενου διαλύματος αραιώθηκαν σε 19.990 ml PBS, ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα H₂DCFDA (10 μM).

Πειραματική διαδικασία

Τα RAW 264.7 καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε τρυβλίο 6 κυψελίδων με πλήρες θρεπτικό μέσο με 3×10^5 κύτταρα/κυψελίδα, προκειμένου να φτάσουν σε πληρότητα 70%-80%. Στη συνέχεια, το πλήρες θρεπτικό μέσο απορρίφθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν για 8 ώρες με το προαναφερόμενο εύρος χαμηλών συγκεντρώσεων των υβριδικών πολυφλοϊκών νανοσωλήνων άνθρακα σε θρεπτικό μέσο απουσία FBS. Μετά το πέρας της επώασης, το θρεπτικό μέσο απορρίφθηκε και η κάθε κυψελίδα ξεπλύθηκε με 1 ml PBS. Αφού απομακρύνθηκε το PBS, προστέθηκε 1.5 ml H₂DCFDA (10 μM) σε κάθε κυψελίδα και ακολούθησε επώαση για 30 λεπτά στον επωαστικό κλίβανο. Ακολούθως, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, οι κυψελίδες ξεπλύθηκαν με PBS, προστέθηκαν 250 μl θρυψίνης και τα κύτταρα επώαστηκαν για 30 δευτερόλεπτο στον επωαστικό κλίβανο. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1 ml πλήρες θρεπτικό μέσο, για την απενεργοποίηση της θρυψίνης, το

κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε σωλήνες φυγοκέντρησης 1.5 ml και φυγοκεντρήθηκε (1,500 g, 5 λεπτά, 4 °C). Έπειτα, το υπερκείμενο απορρίφθηκε, το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με 1 ml PBS και το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε (1,500 g, 5 λεπτά, 4 °C). Μετά την φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλυτοποιήθηκε με 500 μl PBS. Τέλος, το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρθηκε σε σωλήνες κυτταρομετρίας ροής και υποβλήθηκε σε ανάλυση. Ο εμπρόσθιος και ο πλευρικός σκεδασμός του φωτός χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση του μεγέθους και της εσωτερικής πολυπλοκότητας των κυττάρων, αντίστοιχα. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 1×10^4 κύτταρα/δείγμα, με ρυθμό ροής ≈ 500 συμβάντα/δευτερόλεπτο. Η ένταση του φθορισμού μετρήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα.

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

Αρχή της μεθόδου

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) είναι η αθροιστική ικανότητα των αντιοξειδωτικών συστατικών του κυτταρολύματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε αντιοξειδωτικό εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση αλλά συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του κυτταρολύματος. Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση της εμπορικής ελεύθερης ρίζας 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων, η παραπάνω ρίζα ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης. Η αναγωγή της ρίζας μπορεί να μετρηθεί με φωτομέτρηση στα 520 nm.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Η εκτίμηση των επιπέδων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) βασίστηκε στο πειραματικό πρωτόκολλο των Janaszewska και Bartosz (Janaszewska and Bartosz, 2002), με ορισμένες μικρές 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 αλάτων, παρασκευάστηκαν 100 ml διαλύματος KH₂PO₄ (10 mM) και 400 ml διαλύματος Na₂HPO₄

(10 mM). Για το διάλυμα KH_2PO_4 ζυγίστηκαν 0.136 g και διαλύθηκαν σε 100 ml dH_2O . Για το διάλυμα Na_2HPO_4 ζυγίστηκαν 0.712 g και διαλύθηκαν σε 400 ml dH_2O . Ακολούθως, τα δύο διαλύματα αναμείχθηκαν και το τελικό διάλυμα πεχαμετρήθηκε μέχρι $\text{pH} = 7.4$.

Διάλυμα ρίζας DPPH (0.1 mM)*

MB: 394.32 g/mol

Για την παρασκευή διαλύματος 10 mM ζυγίστηκαν 0.02 g DPPH και διαλύθηκαν σε 5 ml μεθανόλης. Στη συνέχεια, 200 μl του διαλύματος αραιώθηκαν με 19.8 ml μεθανόλης ώστε να παρασκευαστεί αραιωμένο διάλυμα (0.1 mM).

Πειραματική διαδικασία

1. Προσθήκη σε σωληνάκια φυγοκέντρησης 1.5 ml 500-X μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (10 mM, $\text{pH} = 7.4$) για τα δείγματα, όπου X η ποσότητα του κυτταρολύματος που απαιτείται για τουλάχιστον 30 μg συνολικής πρωτεΐνης και 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων για το control.
2. Προσθήκη 500 μl διαλύματος ρίζας DPPH* (0.1 mM).
3. Επώαση για 60 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Φυγοκέντρηση (15,000 g, 3 λεπτά, 25 °C).
5. Μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 520 nm.

Υπολογισμοί

Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων χρησιμοποιούνται οι εξής τύποι :

- i) $\text{H \% Abs μείωση} = [(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{δείγματος}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100$
- ii) Τα mmol DPPH που ανήχθησαν/ml δείγματος = $[(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \times 50 \times (1000/X)] / 1000$

Πιο συγκεκριμένα, διαιρείται κατά 100, ώστε να μετατραπεί η μείωση της απορρόφησης σε ποσοστό απορρόφησης και πολλαπλασιάζεται επί 50, επειδή η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 μmol / L κυψελίδας. Επίσης, πολλαπλασιάζεται με το πηλίκo 1000/X, όπου 1000 μl ο τελικός όγκος της αντίδρασης και X τα μl του κυτταρολύματος που περιέχουν τουλάχιστον 30 μg συνολικής πρωτεΐνης. Το γινόμενο διαιρείται με το 1000 για τη μετατροπή των L του δείγματος σε ml δείγματος.

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

Αρχή της μεθόδου

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον, που προκαλείται από τα υψηλά επίπεδα ελευθέρων ριζών, έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό δραστικών και ιδιαίτερα ασταθών λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η διάσπασή τους οδηγεί στην παραγωγή της μηλονικής διαλδεΐδης (MDA). Η μηλονική διαλδεΐδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της ελεγχόμενης αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Η μέτρηση των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), είναι μια καλά θεμελιωμένη μέθοδος για τον έλεγχο και την παρακολούθηση της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων. Τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της MDA, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το TBA σε αναλογία 1/2. Το προϊόν που προκύπτει είναι το σύμπλοκο MDA(TBA)₂, του οποίου η οπτική απορρόφηση μετριέται στα 530 nm.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Η εκτίμηση των επιπέδων των TBARS πραγματοποιήθηκε με βάση το πειραματικό πρωτόκολλο των Keles et al. (Keles et al., 2001), με ορισμένες μικρές 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 ζυγίστηκαν 0.61 g Tris και διαλύθηκαν σε 70 ml dH₂O. Ακολούθως, το διάλυμα πεχαμετρήθηκε με HCl 2.5 N μέχρι pH = 7.4 και ογκομετρήθηκε με dH₂O μέχρι τα 100 ml.

Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM)

MB (TBA): 144.1 g/mol

MB (Na₂SO₄): 142.04 g/mol

Για την παρασκευή 10 ml διαλύματος, ζυγίστηκαν 2.84 g Na₂SO₄ και 0.08 g TBA και προστέθηκαν 10 ml dH₂O. Το διάλυμα αναδεύτηκε υπό θέρμανση μέχρι να διαλυθούν πλήρως τα συστατικά.

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.

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.

Πειραματική διαδικασία

Σε σωλήνες falcon των 15 ml προστέθηκαν X μl κυτταρολύματος, τα οποία περιείχαν τουλάχιστον 70 μg ολικής πρωτεΐνης, με βάση τη μέθοδο Bradford. Έπειτα, προστέθηκαν 400-X μl PBS για τα δείγματα ή 400 μl PBS για το τυφλό. Κατόπιν, προστέθηκαν 500 μl TCA 35% και 500 μl Tris-HCl και ακολούθησε ανάδευση με vortex. Οι σωλήνες επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1 ml διαλύματος Na₂SO₄ - TBA σε όλους τους σωλήνες falcon και ακολούθησε επώαση στους 95 °C για 45 λεπτά στο υδατόλουτρο. Μετά την επώαση, οι σωλήνες μεταφέρθηκαν στον πάγο για 5 λεπτά. Ακολούθως, προστέθηκε 1 ml TCA 70% και έγινε ανάδευση με vortex. Το διάλυμα σε σωλήνες φυγοκέντρησης 1.5 ml και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (11,200 g, 3 λεπτά, 25 °C). Τέλος, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρή γυάλινη κυψελίδα και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 530 nm.

Υπολογισμοί

$$\text{TBARS } (\mu\text{mol/ml}) = [(Abs_{\text{Δείγματος}} - Abs_{\text{Control}}) / 0.156 \times (3400/X)] / 1000$$

Το 0.156 προκύπτει από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA που είναι 156000 (mol / L) διαιρούμενο με 10⁻⁶, προκειμένου να μετατραπεί από mol/L σε μmol/L.

Το πηλίκο 3400/X προκύπτει από τον τελικό όγκο της αντίδρασης (3400 μl) και την ποσότητα του κυτταρολύματος (X μl) που περιέχει τουλάχιστον 70 μg συνολικής πρωτεΐνης. Τέλος, η διαίρεση με το 1000 γίνεται προκειμένου να μετατραπούν τα μmol/L σε μmol/L.

3.6.5 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PCARBS) με φασματοφωτομετρία

Αρχή της μεθόδου

Ένα από τα βιολογικά μακρομόρια που επηρεάζονται από τις ελεύθερες ρίζες είναι οι πρωτεΐνες. Συνήθως, οι οξειδωτικές τροποποιήσεις αφορούν είτε δομικές μεταβολές ορισμένων αμινοξέων των πρωτεϊνών είτε θραύση των πολυπεπτιδικών αλυσίδων τους. Σε υψηλά επίπεδα ελευθέρων ριζών οι πρωτεΐνες καρβονυλιώνονται με αποτέλεσμα τον σχηματισμό πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Τα θειούχα αμινοξέα μεθειονίνη και κυστεΐνη, καθώς και τα αμινοξέα με αρωματικές πλευρικές αλυσίδες είναι πιο επιρρεπή σε οξειδωτική βλάβη. Οι καρβονυλικές ομάδες, αλδεΐδες και κετόνες, παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης, της αργινίνης, της λυσίνης και της θρεονίνης. Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών είναι μία μη αναστρέψιμη, μη ενζυμική διαδικασία και έχει αποδειχθεί ότι παρόλο που οι μετρίως οξειδωμένες πρωτεΐνες μπορούν να αποικοδομηθούν από το πρωτεάσωμα, οι βαριά καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σχηματίζουν συσσωματώματα μεγάλου μοριακού βάρους, τα οποία δεν μπορούν να αποικοδομηθούν. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, επειδή σχηματίζουν συσσωματώματα, είναι χημικά σταθερά και επομένως ορίζονται ως βιοδείκτης σοβαρής οξειδωτικής βλάβης. Η παρούσα μέθοδος περιλαμβάνει την παραγωγή της ομάδας καρβονυλίου με τη 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH), η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ενός σταθερού προϊόντος υδραζόνης, του 2,4-δινιτροφαινυλίου (DNP). Η ανίχνευση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων γίνεται φασματοφωτομετρικά μέσω μέτρησης του DNP που απορροφά στα 375 nm.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης των PCARBS πραγματοποιήθηκε με βάση το πειραματικό πρωτόκολλο των Patsoukis et al., (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 24.6 ml του 37% HCl σε 70 ml dH₂O και το διάλυμα ογκομετρήθηκε μέχρι τα 100 ml με dH₂O.

DNPH (14 mM)

MB: 198.1 g/mol

Για την παρασκευή 100 ml διαλύματος, ζυγίστηκαν 0.2833 g DNPH και διαλύθηκαν σε 100 ml 2.5 N HCl.

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, ζυγίστηκαν 30 g ουρίας και διαλύθηκαν σε 70 ml dH₂O. Το διάλυμα ογκομετρήθηκε σε τελικό όγκο 100 ml με dH₂O.

Πειραματική διαδικασία

Προστέθηκαν X ml κυτταρολύματος σε σωληνάκια φυγοκέντρησης 1.5 ml. Η ποσότητα αυτή προκύπτει ώστε να υπάρχουν τουλάχιστον 80 μg συνολικής πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 400-X ml PBS σε όλα τα δείγματα και 400 ml στα τυφλά και ακολούθησε ανάδευση με vortex. Έπειτα, προστέθηκαν 0.5 ml 14 mM DNPH (σε 2,5 N HCL) για τα δείγματα ή 0.5 ml (2.5N HCl) για τα τυφλά και αναδεύτηκαν με vortex. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση με vortex κάθε 15 λεπτά. Ακολούθως, έγινε φυγοκέντρηση στα 15,000 g για 5 λεπτά και σε θερμοκρασία 4 °C και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Στο ίζημα προστέθηκε 1 mL από το 10% TCA και έγινε πολύ καλή ανάδευση με vortex. Έπειτα, έγινε νέα φυγοκέντρηση στα 15,000 g για 5 λεπτά και σε θερμοκρασία 4 °C και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Προστέθηκε 1 mL από το μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα ακολούθησε καλή ανάδευση με vortex. Κατόπιν, έγινε φυγοκέντρηση στα 15,000 g για 5 λεπτά και σε θερμοκρασία 4 °C. Τα βήματα 8 και 9 επαναλήφθηκαν άλλη μία φορά. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και στο ίζημα προστέθηκε 1 mL 5M ουρίας, ακολούθησε ανάδευση με vortex και επώαση στον κλίβανο στους 37 °C για 15 λεπτά. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15,000 g για 5 λεπτά και σε θερμοκρασία 4 °C. Τέλος, μεταφέρθηκε το υπερκείμενο σε καθαρή γυάλινη κυψελίδα και γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης των τυφλών και των δειγμάτων έγινε στα 375 nm.

Υπολογισμοί

$$\text{PCARBS (nmol/ml)} = [(\text{Abs}_{\text{Δείγματος}} - \text{Abs}_{\text{Τυφλού}}) / 0.022 \times (1000/X)].$$

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι $22 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Το 0.022 υπολογίζεται ως εξής: $22 \text{ mmol} / \text{L}$ ισούται με $22 \text{ } \mu\text{mol} / \text{ml}$, ισούται με $0.022 \text{ nmol} / \text{ml}$.

Όπου $1000 / X$ είναι ο συντελεστής αραιώσης (1000 ml στην κυψελίδα / $X \text{ ml}$ του δείγματος).

3.6.6 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Αρχή της μεθόδου

Η εκτίμηση της συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976). Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G250 που περιέχεται εντός του αντιδραστηρίου αλληλεπιδρά με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός προϊόντος μπλε χρώματος με μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm .

Αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο Bradford

Για 100 ml αντιδραστηρίου, ζυγίστηκαν 100 mg της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G250 και διαλύθηκαν σε 50 ml αιθανόλης 95% (v/v) και 100 ml φωσφορικού οξέος 85% (w/v). Το διάλυμα αναδεύτηκε μέχρι την πλήρη διάλυση της σκόνης και ακολούθως ογκομετρήθηκε μέχρι το 100 ml με dH_2O . Πριν από τη χρήση το διάλυμα φιλτραρίστηκε.

Πειραματική διαδικασία

1. Σε σωληνάκια φυγοκέντρησης 1.5 ml προστέθηκαν $20 \text{ } \mu\text{l}$ κυτταρολύματος, αραιωμένο $1/10$ σε PBS, για τα δείγματα και $20 \text{ } \mu\text{l}$ PBS για τα controls.
2. Προσθήκη 1 ml αντιδραστηρίου Bradford και ανάδευση.
3. Επώαση για 15 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Μέτρηση οπτικής απορρόφησης στα 595 nm με πλαστική κυψελίδα.

Υπολογισμοί

Για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεΐνης κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης ως πρωτεΐνη αναφοράς. Η ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης υπολογίστηκε με βάση τους συντελεστές (a, b), που προέκυψαν από την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης σε mg/ml , η οποία ήταν της μορφής

$$y = ax + b.$$

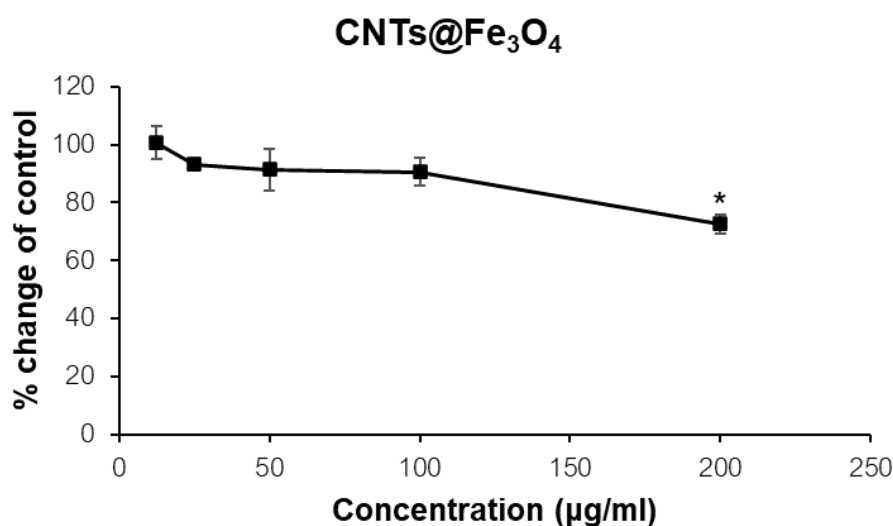
3.7 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε Unpaired t-test με τη διόρθωση του Welch, προκειμένου να συγκριθούν ο μέσος όρος κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης με το 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 Graph Pad Prism για Windows, Graph Pad Software, San Diego, California US.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης των υβριδικών πλολυφλοϊκών ανοσωλήνων άνθρακα στα RAW 264.7

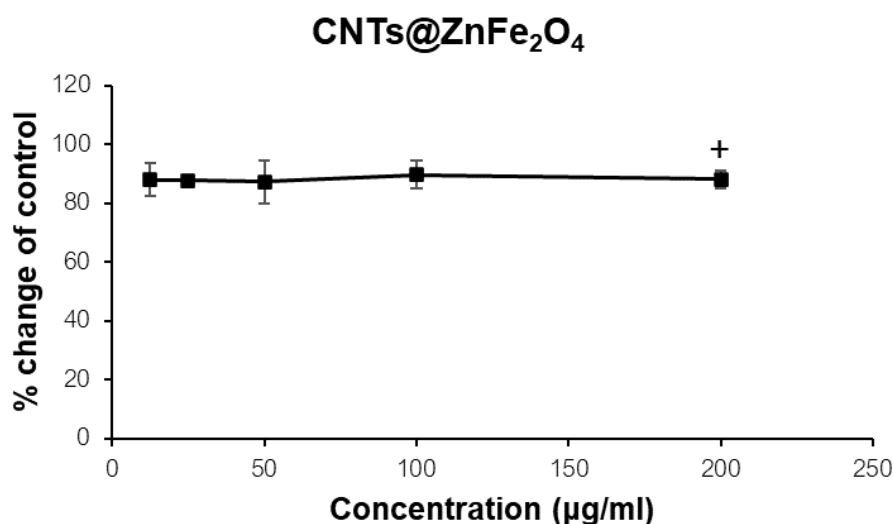
Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο XTT, η έκθεση των RAW 264.7 στους υβριδικούς νανοσωλήνες άνθρακα για 8 ώρες επήγαγε τοξικότητα. Σε ό,τι αφορά τους CNTs@Fe₃O₄, παρότι δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική επίδραση στα 12.5, 25, 50 και 100 µg/ml, η έκθεση στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση, δηλαδή τα 200 µg/ml, προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται στο **Διάγραμμα 1**.



Διάγραμμα 1. Οι επιδράσεις των CNTs@Fe₃O₄ (12.5–200 µg/ml) στην κυτταρική βιωσιμότητα των μακροφάγων κυττάρων ποντικού RAW 264.7 μετά από 8 ώρες επώασης.

*: Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$).

Επίσης, σε ό,τι αφορά τους CNTs@ZnFe₂O₄, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική επίδραση στην κυτταρική βιωσιμότητα μετά από 8 ώρες επώασης στα 12.5, 25, 50 και 100 µg/ml. Ωστόσο, μετά από 8 ώρες επώασης με την υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση και, πιο συγκεκριμένα, τα 200 µg/ml, παρατηρήθηκε μία ισχυρή τάση μείωσης ($p=0.06$) της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται στο **Διάγραμμα 2**.



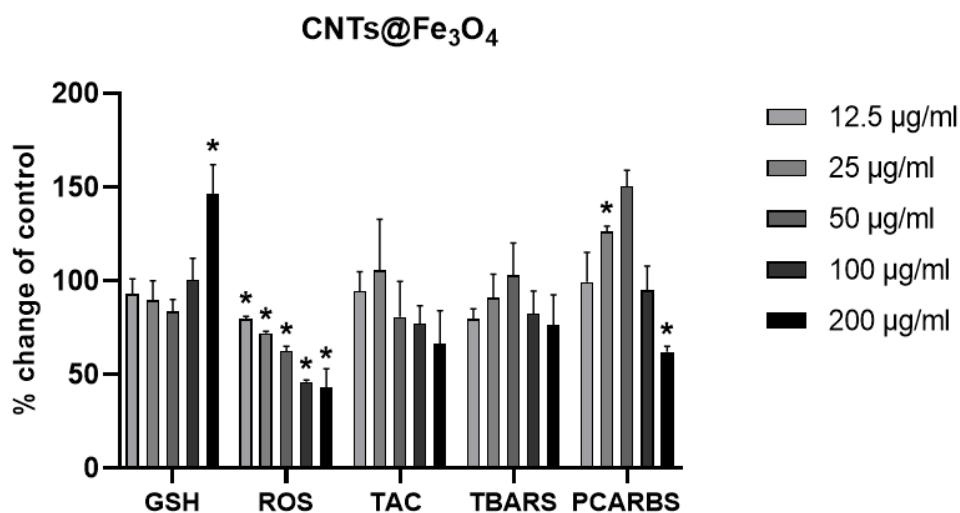
Διάγραμμα 2. Οι επιδράσεις των CNTs@ZnFe₂O₄ (12.5–200 µg/ml) στην κυτταρική βιωσιμότητα των μακροφάγων κυττάρων ποντικού RAW 264.7 μετά από 8 ώρες επώασης.

+: Ισχυρή τάση μεταβολής σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.06$).

4.2 Προσδιορισμός της επίδρασης των υβριδικών πολυφλοϊκών νανοσωλήνων άνθρακα σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης στα RAW 264.7

Αφού εκτιμήθηκε η κυτταροτοξικότητα των υβριδικών νανοσωλήνων άνθρακα, διερευνήθηκαν οι επιδράσεις τους σε ένα καλά εδραιωμένο δίκτυο βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης (Veskoukis et al., 2019). Προς αυτή την κατεύθυνση, αξιολογήθηκαν τα επίπεδα βιοδεικτών που είναι ενδεικτικοί του ενδογενούς αντιοξειδωτικού προφίλ, τα επίπεδα των σημαντικότερων δραστικών μορφών που εντοπίζονται εντός των κυττάρων, καθώς και τα επίπεδα βιοδεικτών που σχετίζονται με την πρόκληση σοβαρής οξειδωτικής βλάβης στα βιολογικά μακρομόρια.

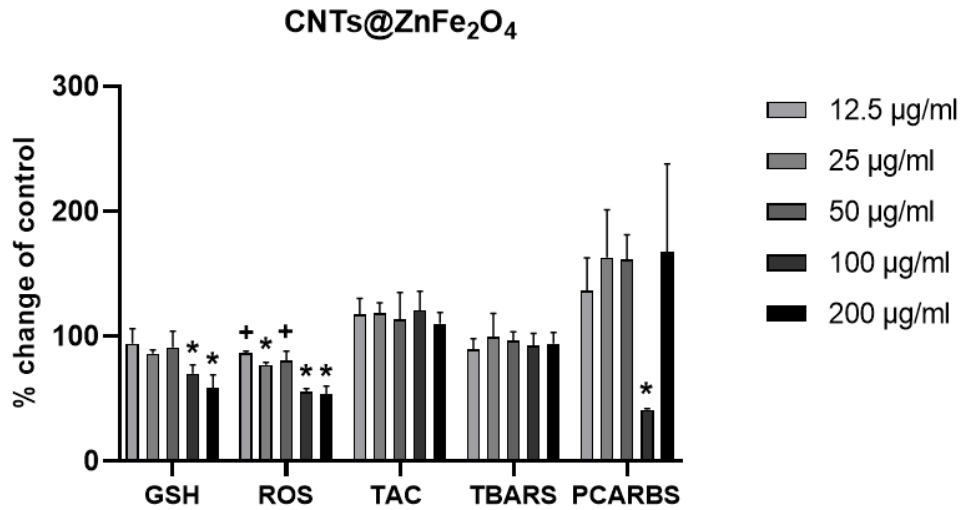
Σε ότι αφορά τους CNTs@Fe₃O₄, μετά από 8 ώρες επώασης με το εξεταζόμενο εύρος συγκεντρώσεων παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της GSH σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στα 200 µg/ml. Επίσης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των ROS σε όλες τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις (12.5–200 µg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπροσθέτως, στην περίπτωση των PCARBS, παρατηρήθηκε αρχικά στατιστικά σημαντική αύξηση στα 25 µg/ml, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ακολουθούμενη από στατιστικά σημαντική μείωση στα 200 µg/ml. Καμία άλλη επίδραση δεν παρατηρήθηκε κατά την αξιολόγηση των επιπέδων της TAC και των TBARS. Τα παραπάνω αποτελέσματα απεικονίζονται στο **Διάγραμμα 3**.



Διάγραμμα 3. Οι επιδράσεις των CNTs@Fe₃O₄ (12.5–200 µg/ml) σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης μακροφάγων κυττάρων ποντικού RAW 264.7 μετά από 8 ώρες επώασης.

*: Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$).

Σε ότι αφορά τους CNTs@ZnFe₂O₄, μετά από 8 ώρες επώασης με το εξεταζόμενο εύρος συγκεντρώσεων παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της GSH στις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις, δηλαδή στα 100 µg/ml και στα 200 µg/ml, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ακόμα, παρατηρήθηκε ισχυρή τάση μείωσης των ROS στα 12.5 µg/ml ($p=0.065$) και στα 50 µg/ml ($p=0.067$), σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, καθώς και στατιστικά σημαντική μείωση στα 25 µg/ml, 100 µg/ml και 200 µg/ml. Τέλος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των PCARBS στα 100 µg/ml σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η ελαφριά αύξηση των PCARBS που παρατηρήθηκε στις υπόλοιπες συγκεντρώσεις δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Καμία άλλη επίδραση δεν παρατηρήθηκε κατά την αξιολόγηση των επιπέδων της TAC και των TBARS. Τα προαναφερόμενα αποτελέσματα απεικονίζονται στο **Διάγραμμα 4**.



Διάγραμμα 4. Οι επιδράσεις των CNTs@ZnFe₂O₄ (12.5–200 µg/ml) σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης μακροφάγων κυττάρων ποντικού RAW 264.7 μετά από 8 ώρες επώασης.

*: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.05$).

+: Ισχυρή τάση μεταβολής σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0.07$).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ραγδαία ανάπτυξη του επιστημονικού κλάδου της Νανοτεχνολογίας και η επακόλουθη παραγωγή μιας πλειάδας τεχνητών νανοϋλικών έχει οδηγήσει στην αύξηση των επιπέδων της ανθρώπινης έκθεσης μέσω διαφορετικών οδών και από διαφορετικές πηγές. Οι νανοσωλήνες άνθρακα αποτελούν εξαιρετικά υποσχόμενα τεχνητά νανοϋλικά, καθότι παρέχουν σημαντικά τεχνικά πλεονεκτήματα, ωστόσο, οι επιπτώσεις τους στην ανθρώπινη υγεία είναι ελάχιστα κατανοητές και χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Σε αυτό το πλαίσιο, η παρούσα διπλωματική εργασία διερεύνησε τις επιδράσεις δύο υβριδικών υλικών με βάση τον άνθρακα, αποτελούμενων από πολυφλοϊικούς νανοσωλήνες άνθρακα και μαγνητικά νανοσωματίδια (CNTs@Fe₃O₄) και από πολυφλοϊικούς νανοσωλήνες άνθρακα και υβριδικά μαγνητικά νανοσωματίδια (CNTs@ZnFe₂O₄) στην κυτταρική βιωσιμότητα και σε βιοδείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης των μακροφάγων κυττάρων ποντικού RAW 264.7. Σκοπός της μελέτης ήταν η προσομοίωση ενός εργασιακού σεναρίου έκθεσης. Οι σκόνες αποτελούν παράγοντα κινδύνου στο εργασιακό περιβάλλον. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η πλειονότητα των τεχνητών νανοϋλικών εντοπίζεται κυρίως υπό τη μορφή ξηράς σκόνης, η έκθεση μέσω της εισπνοής εγείρει έντονες ανησυχίες για την ασφάλεια και την υγεία των εργαζομένων που αποτελούν την κύρια ομάδα ενδιαφέροντος (Vardakas et al., 2021).

Στη παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθηκε η προσομοίωση ενός σεναρίου έκθεσης που αντιστοιχεί σε μια τυπική εργασιακή συνθήκη. Πιο συγκεκριμένα, ο πειραματικός σχεδιασμός αφορούσε την έκθεση του κυτταρικού συστήματος σε ένα εύρος χαμηλών συγκεντρώσεων (12.5, 25, 50, 100 και 200 μg/ml) των υβριδικών πολυφλοϊικών νανοσωλήνων άνθρακα για 8 ώρες. Προηγούμενη μελέτη αξιολόγησε τις επιδράσεις παρθένων και χημικά τροποποιημένων, με την προσάρτηση καρβοξυλικών ομάδων, πολυφλοϊικών νανοσωλήνων άνθρακα στην κυτταρική βιωσιμότητα και στην επαγωγή απόπτωσης στα κύτταρα αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα A549, προσομοιώνοντας ένα εργασιακό ατύχημα. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν την επαγωγή χρονοεξαρτώμενης και δοσοεξαρτώμενης κυτταροτοξικότητας μετά από έκθεση των κυττάρων στα νανοϋλικά (12.5, 50 και 100 μg/ml) της μελέτης για σύντομα χρονικά διαστήματα (30 λεπτά, 1 ώρα, 3 ώρες) (Kyriakidou et al., 2020).

Σχετικά με τις επιδράσεις των CNTs@Fe₃O₄ και των CNTs@ZnFe₂O₄ στη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς μακροφάγων ποντικού RAW 264.7, τα αποτελέσματα της μελέτης

υπέδειξαν την επαγωγή τοξικότητας και στις δύο περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση της υψηλότερης εξεταζόμενης συγκέντρωσης, δηλαδή των 200μg/ml, προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας στην περίπτωση των CNTs@Fe₃O₄ και ισχυρή τάση μείωσης της κυτταρικής βιωσιμότητας στην περίπτωση των CNTs@ZnFe₂O₄ σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Η πλειονότητα των μελετών υποδεικνύει ότι οι CNTs επάγουν κυτταροτοξικότητα μέσω μείωσης της κυτταρικής βιωσιμότητας. Το 2012 πραγματοποιήθηκε μια *in vitro* έρευνα σε μακροφάγα κύτταρα RAW 264.7, με στόχο το χαρακτηρισμό της κυτταροτοξικότητας και των φλεγμονωδών αποκρίσεων των MWCNTs. Τα αποτελέσματα της έρευνας, τα οποία προέκυψαν μέσω διεξαγωγής της χρωματομετρικής μεθόδου MTT, έδειξαν ότι το ποσοστό της κυτταρικής βιωσιμότητας μειώνεται όταν τα κύτταρα επωάζονται σε συγκεντρώσεις 25, 50, 100, 200, 400 και 800 μg/mL (Zhang et al., 2012). Σε μια άλλη μελέτη, που πραγματοποιήθηκε σε RAW 264.7, η επώαση αυτών με MWCNTs για 48 ώρες και στις συγκεντρώσεις των 75 και 100 μg/ml προκάλεσε σημαντική μείωση του αριθμού των ζωντανών κυττάρων. Ο κυτταρικός θάνατος οφείλονταν σε διαταραχή του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης (Ye et al., 2012).

Η πρόσφατη βιβλιογραφία υποδεικνύει ότι οι νανοσωλήνες άνθρακα προκαλούν βλάβες στα κύτταρα και επάγουν μηχανισμούς τοξικότητας, όπως το οξειδωτικό στρες, που προκαλεί σοβαρή οξειδωτική βλάβη στις πρωτεΐνες, στα λιπίδια και στο DNA. Το μέγεθος, η δομή, η συγκέντρωση και ο χρόνος έκθεσης αποτελούν χαρακτηριστικά που επηρεάζουν σημαντικά τα επίπεδα της τοξικότητας (Jiang et al., 2021).

Αφού εκτιμήθηκαν οι επιδράσεις των CNTs@Fe₃O₄ και των CNTs@ZnFe₂O₄ στην κυτταρική βιωσιμότητα, μελετήθηκαν οι επιπτώσεις υποτοξικών και τοξικών συγκεντρώσεων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυτταρικού συστήματος της μελέτης χρησιμοποιώντας ένα καλά εδραιωμένο δίκτυο βιοδεικτών (Vardakas et al., 2021, Veskoukis et al., 2019). Ειδικότερα, εκτιμήθηκαν οι επιδράσεις τους στα ενδοκυτταρικά επίπεδα της GSH και των ROS με υγρή κυτταρομετρία ροής, καθώς και στα επίπεδα της TAC, των TBARS και των PCARBS με φασματοφωτομετρία.

Σε ότι αφορά τους CNTs/Fe₃O₄, η έκθεση για 8 ώρες στο εκτιμώμενο εύρος συγκεντρώσεων (12.5–200 μg/ml) προκάλεσε την ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού προκειμένου να αποφευχθεί η πρόκληση σοβαρής οξειδωτικής βλάβης. Πιο συγκεκριμένα, σε όλες τις εκτιμώμενες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων των

ROS, ακολουθούμενη από σημαντική αύξηση των επιπέδων της GSH στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση. Η GSH, το σημαντικότερο ενδογενές αντιοξειδωτικό μόριο, συνεισφέρει στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό είτε άμεσα εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες με την παροχή ενός ατόμου υδρογόνου είτε έμμεσα λειτουργώντας ως υπόστρωμα για την GPx που καταλύει τη μετατροπή του H_2O_2 σε H_2O (Kalinina et al., 2014). Σχετικά με τα PCARBS, στη συγκέντρωση των 25 $\mu\text{g/ml}$ παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση, η οποία υποδηλώνει την πρόκληση οξειδωτικής βλάβης στις πρωτεΐνες. Οι βαριά καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σχηματίζουν συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους, τα οποία δεν μπορούν να αποικοδομηθούν από το πρωτεάσωμα και μπορούν να οδηγήσουν ακόμη και σε κυτταρικό θάνατο (Fedorova et al., 2014). Αντιθέτως, παρατηρήθηκε μείωση των PCARBS στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, μέσω αύξησης της GSH, ήταν επαρκής για να προλάβει την οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών.

Σε ότι αφορά τους CNTs@ZnFe₂O₄, η έκθεση για 8 ώρες στο εκτιμώμενο εύρος συγκεντρώσεων (12.5–200 $\mu\text{g/ml}$) προκάλεσε διαταραχές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας. Ειδικότερα, στις συγκεντρώσεις των 12.5, 25 και 50 $\mu\text{g/ml}$ παρατηρήθηκε είτε ισχυρή τάση μείωσης είτε σημαντική στατιστικά μείωση των ROS, πιθανόν λόγω της ενεργοποίησης κάποιου αντιοξειδωτικού μηχανισμού που δεν μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία. Αντιθέτως, στα 100 $\mu\text{g/ml}$ παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων της GSH, ακολουθούμενη από σημαντική μείωση των ROS και των PCARBS. Η μείωση της GSH μπορεί να ερμηνεύσει και την αντίστοιχη μείωση των ROS, καθώς η GSH έχει καταναλωθεί και βρίσκεται πλέον στη μορφή GSSG. Συνεπώς, η κατανάλωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων της GSH φαίνεται να συνεισφέρει στη μείωση των επιπέδων των ROS, προστατεύοντας παράλληλα από την πρόκληση οξειδωτικής βλάβης στις πρωτεΐνες, επιχείρημα που υποστηρίζεται από τη μείωση των PCARBS.

Μια πληθώρα μελετών έχει διερευνήσει τις επιδράσεις των νανοσωλήνων άνθρακα στην οξειδοαναγωγική κατάσταση διάφορων κυτταρικών συστημάτων. Ωστόσο οι διαφορετικοί τύποι νανοσωλήνων άνθρακα, οι διαφορετικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε πείραμα, καθώς και η πολυπλοκότητα του αντιοξειδωτικού συστήματος καθιστούν απαραίτητη τη συνδυαστική ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Μια αξιολογη μελέτη είναι αυτή των Chen και των συνεργατών του (Chen et al., 2011), οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση πολυφλοϊικών νανοσωλήνων άνθρακα στην οξειδοαναγωγική κατάσταση μακροφάγων κυττάρων RAW 264.7. Πιο αναλυτικά, διερευνήθηκε η πρόκληση οξειδωτικού στρες που επάγουν οι

MWCNTs μέσω εκτίμησης των βιοδεικτών GSH, SOD και MDA, έπειτα από επώαση 24 ωρών, καθώς και των επιπέδων του H₂O₂, έπειτα από επώαση 1 ώρας. Οι συγκεντρώσεις που αξιολογήθηκαν, βάσει της χρωματομετρικής μεθόδου MTT, ήταν 2.5 μg/ml, 10 μg/ml, 25 μg/ml και 100 μg/ml. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης της GSH, παράλληλα με μείωση της δραστηριότητας της SOD σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, γεγονός που υποδηλώνει την εξασθένιση των ενδογενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του H₂O₂, η οποία συνοδεύτηκε από προαγωγή της λιπιδικής υπεροξειδωσης, επιχείρημα που υποστηρίζεται από τη σημαντική αύξηση της MDA. Μια άλλη μελέτη, που διεξήχθη από τον Sabido και τους συνεργάτες του (Sabido et al., 2019) αφορούσε τις επιδράσεις τριών διαφορετικών τύπων πολυφλοϊικών νανοσωλήνων άνθρακα σε μακροφάγα κύτταρα RAW 264.7, τα οποία εκτέθηκαν για 90 λεπτά ή 24 ώρες. Η μελέτη αποσκοπούσε στην εκτίμηση των επιπέδων του οξειδωτικού στρες και την καταγραφή πιθανών άλλων κυτταροτοξικών γεγονότων. Όλοι οι τύποι MWCNTs προκάλεσαν ελαφρά αύξηση των επιπέδων των ROS, παρά την αυξημένη δραστηριότητα της CAT, ειδικά κατά τα πρώτα 90 λεπτά της επώασης. Επιπροσθέτως, η περαιτέρω διερεύνηση αποκάλυψε βιολογικές βλάβες, όπως την κατάρρευση του μιτοχονδριακού μεμβρανικού δυναμικού, ακολουθούμενη από αποσυμπύκνωση της χρωματίνης. Αξιοσημείωτη είναι η μελέτη του Jiang και των συνεργατών του (Jiang et al., 2013), όπου διερευνήθηκε η τοξικότητα χημικά τροποποιημένων πολυφλοϊικών νανοσωλήνων άνθρακα με καρβοξυλικές ομάδες (MWCNTs-COOH) και πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (MWCNTs-PEG) σε μακροφάγα κύτταρα. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι οι MWCNTs-PEG ήταν λιγότερο κυτταροτοξικοί σε σχέση με τους MWCNTs-COOH, καθότι προκάλεσαν την παραγωγή χαμηλότερων επιπέδων ROS, που συνεπάγεται τη μικρότερη ενεργοποίηση της οξειδάσης του NADPH. Αυτή η διαφορά στην κυτταροτοξικότητα φαίνεται να οφείλεται στη μειωμένη κυτταρική απορρόφηση των MWCNTs-PEG σε σύγκριση με τους MWCNTs-COOH.

Περαιτέρω έρευνες που έγιναν με χρήση νανοσωλήνων άνθρακα που περιλάμβαναν προσμίξεις, όπως αυτές του σιδήρου, έδειξαν ότι αυτές πιθανόν να μειώνουν την βιοσυμβατότητά τους (Saleemi et al., 2020). Από την άλλη, οι μητρικοί νανοσωλήνες άνθρακα έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιούν διάφορους μηχανισμούς που σχετίζονται με την τοξικότητα, ωστόσο οι επιδράσεις αυτές ελαττώνονται όταν είναι συνδεδεμένοι με χημικές ομάδες (Kostarelos et al., 2009).

Μία άλλη παράμετρος που πρέπει να ληφθεί υπόψιν, είναι ο διαφορετικός τρόπος δράσης ορισμένων νανοϋλικών σε *in vitro* και *in vivo* συνθήκες. Επομένως, κρίνεται απαραίτητη η διεξαγωγή μελετών με καλά εγκαθιδρυμένα τοξικολογικά μοντέλα. Μια πρόσφατη μελέτη, των Saleh et al. (Saleh et al., 2022) αφορά την αξιολόγηση, μετά από μια έρευνα δύο ετών, των επιδράσεων νανοσωλήνων άνθρακα διπλού τοιχώματος (DWCNT) στον πνεύμονα και τον υπεζωκότα επίμυων μετά από έκθεση μέσω της αναπνευστικής οδού. Τα αποτελέσματά κατέδειξαν ότι οι DWCNTs που εξετάστηκαν ήταν βιοδιατηρητέοι στον πνεύμονα και προκάλεσαν χρόνια φλεγμονή. Οι αρουραίοι που εκτέθηκαν σε 0.5 mg των DWCNTs ανέπτυξαν ίνωση του υπεζωκότα και πνευμονικούς όγκους. Τα ευρήματα αυτά καταδεικνύουν ότι δεν μπορεί να αγνοηθεί η πιθανότητα ότι τουλάχιστον ορισμένοι τύποι DWCNT είναι τοξικοί και κατά επέκταση καρκινογόνοι. Επιπλέον έρευνα *in vivo* πραγματοποιήθηκε και σε αιμοφόρα αγγεία ποντικών, έπειτα από χορήγηση MWCNTs μέσω ένεσης 50 μg μία φορά την ημέρα για 5 ημέρες. Τα πειραματόζωα παρουσίασαν αυξημένο ποσοστό ουδετερόφιλων, μονοκυττάρων και βασεόφιλων. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε δυσλειτουργία της αυτοφαγίας, αποσύνδεση του eNOS, ενεργοποίηση αποπτωτικών πρωτεϊνών και μεταβολή των πρωτεϊνών KLF, πρωτεϊνών δηλαδή που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων (Wu et al, 2020).

Επιπρόσθετα, η ποικιλομορφία των ίδιων των νανοσωλήνων άνθρακα δυσχεραίνει την αξιολόγηση της τοξικότητάς τους. Πιο συγκεκριμένα, μία σειρά πειραμάτων έχει υποδείξει ότι το φορτίο, το σχήμα, το μήκος, η διάμετρος, η συσσωμάτωση και η καθαρότητα επηρεάζουν την τοξικότητά τους (Liu et al., 2012). Σύμφωνα με τα παραπάνω, είναι αναγκαίο η επιστημονική κοινότητα να καθιερώσει τυποποιημένες και αξιόπιστες μεθόδους για την αξιολόγηση της τοξικότητάς τους. Στο πλαίσιο αυτό, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση του κατά πόσον η έκθεση σε χαμηλά επίπεδα νανοϋλικού είναι ικανή να προκαλέσει τοξικότητα, προάγοντας έτσι την εμφάνιση ασθενειών που σχετίζονται με την ανισορροπία της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aguilar, T. A. F., Navarro, B. C. H., Pérez, J. A. M., 2016. Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress. A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2

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.

Ando, Y., Zhao, X., Sugai, T., & Kumar, M. (2004). Growing carbon nanotubes. *Materials Today*, 7(10), 22–29.

Andrews, R., Jacques, D., Qian, D., & Rantell, T. (2003). Multiwall Carbon Nanotubes: Synthesis and Application. *ChemInform*, 34(8).

Anju A., Jeswin J., Thomas P.C., Paulton M.P. and Vijayan K.K. (2013). Molecular cloning, characterization and expression analysis of cytoplasmic Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD) from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol.* 34: 943–950.

B. Frei, *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Vitamins*, Linus Pauling Institute, Oregon State University, 1997

Baird L, Swift S, Lleres D, and Dinkova-Kostova AT. Monitoring Keap1-Nrf2 interactions in single live cells. *Biotechnol Adv* 32: 1133–1144, 2014.

Bal-Price, A., & Coecke, S. (2011). Guidance on Good Cell Culture Practice (GCCP). *Cell Culture Techniques*, 1–25.

Barber D.J., Freestone I.C. An investigation of the origin of the colour of the *Lycurgus Cup* by analytical transmission electron microscopy. *Archaeometry*. 1990;32:33–45.

Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2019). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 112.

Bourdiol, F., Mouchet, F., Perrault, A., Fourquaux, I., Datas, L., Gancet, C., ... Flahaut, E. (2013). Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using *Xenopus laevis* amphibian larvae. *Carbon*, 54, 175–191.

Bouwmeester, H., van der Zande, M., & Jepson, M. A. (2017). Effects of food-borne nanomaterials on gastrointestinal tissues and microbiota. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 10(1), e1481.

Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254.

Can, B., KulaksizErkmen, G., Dalmizrak, O., Ogus, I. H., Ozer, N., 2010. Purification and Characterisation of Rat Kidney Glutathione Reductase. *The Protein Journal*, 29(4), 250-256.

CHEN Bo, LIU Ying, SONG Wei Ming, HAYASHI Yasuhiko, DING Xun Cheng, LI Wei Hua. In Vitro Evaluation of Cytotoxicity and Oxidative Stress Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Murine RAW 264.7 Macrophages and Human A549 Lung Cells[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2011, 24(6): 593-601.

Clarke, R., & Lewington, S. (2006). Trans fatty acids and coronary heart disease. *BMJ*, 333(7561), 214.

Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW, and Diehl JA. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Mol Cell Biol* 24: 8477–8486, 2004.

Czarnocka, W., &Karpínski, S. (2018). Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine*.

Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., 2006. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(2), 389-406.

De Tullio, M. C. (2011). Beyond the Antioxidant: The Double Life of Vitamin C. *Water Soluble Vitamins*, 49–65.

Dr.E.N.Ganesh. (2013). Single Walled and Multi Walled Carbon Nanotube Structure, Synthesis and Applications.

Dresselhaus M, Dresselhaus G, Charlier JC, et al. (2004) Electronic, thermal and mechanical properties of carbon nanotubes. *Philosophical Transactions of the Royal*

Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences 362(1823): 2065–2098

Fang, Yunsheng & Chen, Guorui & Bick, Michael. (2021). Smart textiles for personalized thermoregulation. *Chemical Society Reviews*. 50.

Fedorova, M., Bollineni, R. C., & Hoffmann, R. (2013). Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spectrometry Reviews*, 33(2), 79–97.

Fimognari, C., 2015. Role of Oxidative RNA Damage in Chronic-Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1-8.

Francenia Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., Hernández-Carlos, B., 2019. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. *Antioxidants*.

Francis AP, Ganapathy S, Palla VR, et al. (2015) One time nose-only inhalation of MWCNTs: exploring the mechanism of toxicity by intermittent sacrifice in Wistar rats. *Toxicology Reports* 2: 111–120.

Francis, A. P., & Devasena, T. (2018). Toxicity of carbon nanotubes: A review. *Toxicology and Industrial Health*, 34(3), 200–210.

Gatoo, M. A., Naseem, S., Arfat, M. Y., Mahmood Dar, A., Qasim, K., & Zubair, S. (2014). Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations. *BioMed Research International*, 2014, 1–8.

Giles, G., Nasim, M., Ali, W., Jacob, C., 2017. The Reactive Sulfur Species Concept: 15 Years On. *Antioxidants*, 6(2), 38.

Goyal, M. M., Basak, A., 2010. Human catalase: looking for complete identity. *Protein & Cell*, 1(10), 888-897.

Gutteridge, J. M. C., 1995. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical Chemistry*, 41(12), 1819-1828

Gutteridge, J. M. C., 1995. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical Chemistry*, 41(12), 1819-1828

Gutteridge, J. M. C., Halliwell, B., 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), 561-564

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. In: Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., Eds., Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford, 1-25.

Halliwell, B., 2015. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. eLS, 1-9.

Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. Trends Biochem. Sci. 2014;39:199–218.

He, F., Ru, X., & Wen, T. (2020). NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. International Journal of Molecular Sciences, 21(13), 4777.

Hudlický, Miloš (1990). Oxidations in Organic Chemistry. Washington, D.C.: American Chemical Society. p. 456. ISBN 978-0-8412-1780-5.

Hulla J., Sahu S., Hayes A. Nanotechnology. Hum. Exp. Toxicol. 2015;34:1318–1321.

Huo, F., Kang, J., Yin, C., Zhang, Y., & Chao, J. (2015). A turn-on green fluorescent thiol probe based on the 1,2-addition reaction and its application for bioimaging. Sensors and Actuators B: Chemical, 207, 139–143.

Huo, F., Kang, J., Yin, C., Zhang, Y., & Chao, J. (2015). A turn-on green fluorescent thiol probe based on the 1,2-addition reaction and its application for bioimaging. Sensors and Actuators B: Chemical, 207, 139–143.

Iijima, S., & Ichihashi, T. (1993). Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. Nature, 363(6430), 603–605.

Janaszewska, A., & Bartosz, G. (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 62(3), 231–236.

Janaszewska, A., Bartosz, G., 2002. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation, 62, 231-236.

Jenkins, R. R., 1988. Free radical chemistry: relationship to exercise. Sports Medicine, 5(3), 156-170.

Jia, G., Wang, H., Yan, L., Wang, X., Pei, R., Yan, T., ... Guo, X. (2005). Cytotoxicity of Carbon Nanomaterials: Single-Wall Nanotube, Multi-Wall Nanotube, and Fullerene. Environmental Science & Technology, 39(5), 1378–1383.

- Jiang, T., Lin, Y., Amadei, C. A., Gou, N., Rahman, S. M., Lan, J., ... Gu, A. Z. (2021). Comparative and mechanistic toxicity assessment of structure-dependent toxicity of carbon-based nanomaterials. *Journal of Hazardous Materials*, 418, 126282.
- Jiang, Y., Zhang, H., Wang, Y., Chen, M., Ye, S., Hou, Z., & Ren, L. (2013). Modulation of Apoptotic Pathways of Macrophages by Surface-Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes. *PLoS ONE*, 8(6), e65756.
- Kalinina, E. V., Chernov, N. N., & Novichkova, M. D. (2014). Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Moscow)*, 79(13), 1562–1583.
- Kawashima, A., Sekizawa, A., Koide, K., Hasegawa, J., Satoh, K., Arakaki, T., ... Matsuoka, R. (2014). Vitamin C Induces the Reduction of Oxidative Stress and Paradoxically Stimulates the Apoptotic Gene Expression in Extravillous Trophoblasts Derived From First-Trimester Tissue. *Reproductive Sciences*, 22(7), 783–790.
- Keles, MS., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., Akcay, F., 2001. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *The Canadian journal of neurological sciences*, 28, 141-143.
- Keles, MS., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., Akcay, F., 2001. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *The Canadian journal of neurological sciences*, 28, 141-143.
- Khan, Danish & Panjwani, Manoj & Khan, Idris. (2021). Incorporation of carbon nanotubes in photoactive layer of organic solar cells. *Ain Shams Engineering Journal*. 12. 897-900.
- Kirkman, H. N., Gaetani, G. F., 2007. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 44-50.
- Kohen, R., Nyska, A., 2002. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650.
- Kostarelos, K., Bianco, A., & Prato, M. (2009). Promises, facts and challenges for carbon nanotubes in imaging and therapeutics. *Nature Nanotechnology*, 4(10), 627–633.

Kyriakidou, K., Brasinika, D., Trompeta, A. F. A., Bergamaschi, E., Karoussis, I. K., & Charitidis, C. A. (2020). In vitro cytotoxicity assessment of pristine and carboxyl-functionalized MWCNTs. *Food and Chemical Toxicology*, 141, 111374.

Lam, C. W.; James, J. T.; McCluskey, R.; Hunter, R. L., Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Lett.*, 2004, 77(1), 126-134.

Li, Y., & Cao, J. (2018). The impact of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) on macrophages: contribution of MWCNT characteristics. *Science China Life Sciences*.

Li, Y., & Cao, J. (2018). The impact of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) on macrophages: contribution of MWCNT characteristics. *Science China Life Sciences*.

Li, Z., Wu, J., DeLeo, C., 2006. RNA damage and surveillance under oxidative stress. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 58(10), 581-588.

Liu, Y., Zhao, Y., Sun, B., & Chen, C. (2012). Understanding the Toxicity of Carbon Nanotubes. *Accounts of Chemical Research*, 46(3), 702–713.

Liu, Z., Robinson, J. T., Tabakman, S. M., Yang, K., & Dai, H. (2011). Carbon materials for drug delivery & cancer therapy. *Materials Today*, 14(7-8), 316–323.

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

M. Genestra, “Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants,” *Cellular Signalling*, vol. 19, pp. 1807–1819, 2007.

M. Yasui, Y. Kanemaru, N. Kamoshita, T. Suzuki, T. Arakawa, and M. Honma, “Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome,” *DNA Repair (Amst)*, vol. 15, pp. 11–20, 2014.

Marklund, S. L. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(24), 7634–7638.

McCord J.M. and Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 244 (22): 6049–6055.

Meister A. Biosynthesis and function of glutathione, an essential biofactor. *J. Nutrit. Sci. Vitaminol*. 1992 Spec No: 1–6

Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 1988;263:17205–17208

Moi P., Chan K., Asunis I., Cao A., Kan Y.W. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994;91:9926–9930.

Motohashi H, O'Connor T, Katsuoka F, Engel JD, and Yamamoto M. Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. *Gene* 294: 1–12, 2002.

Müller, L., Theile, K., & Böhm, V. (2010). In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(5), 731–742.

N. Nishida, T. Arizumi, M. Takita et al., “Reactive oxygen species induce epigenetic instability through the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in human hepatocarcinogenesis,” *Digestive Diseases*, vol. 31, no. 5-6, pp. 459–466, 2013.

Nafisi, S., Maibach, H.I., 2018. Skin penetration of nanoparticles. In: *Emerging Nanotechnologies in Immunology: the Design, Applications and Toxicology of Nanopharmaceuticals and Nanovaccines*. Elsevier, pp. 47–88.

Nieman TA, Skoog DA, Holler FJ (2006) *Principals of instrumental analysis*. Brooks/ Cole, Pacific Grove.

Nohynek, G. J., Dufour, E. K., & Roberts, M. S. (2008). Nanotechnology, Cosmetics and the Skin: Is There a Health Risk? *Skin Pharmacology and Physiology*, 21(3), 136–149.

Olga & Ivanova, Ju.S. & Pugovkina, N.A. & Kozhukharova, Irina & Kovaleva, Z.V. & Shatrova, A.N. & Aksenov, N.D. & Zenin, Valeriy & Kaulin, Yu.A. & Gamaley, I. & Nikolsky, N.N.. (2017). Redox Environment in Stem and Differentiated Cells: A Quantitative Approach. *Redox Biology*. 12.

P. Pacher, J. S. Beckman, and L. Liaudet, “Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease,” *Physiological Reviews*, vol. 87, pp. 315–424, 2007.

Packirisamy, Subbulakshmi. (2013). ANTIOXIDANTS IN PERIODONTAL DISEASES. CRITICAL REVIEW IN PHARMACEUTICAL SCIENCES. 2. 7-12.

Pallardó FV, Markovic J, et al. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Mol. Aspects Med.* 2008

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.

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.

Piggott, A. M., & Karuso, P. (2007). Fluorometric Assay for the Determination of Glutathione Reductase Activity. *Analytical Chemistry*, 79(22), 8769–8773.

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A., 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-13.

Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A., 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-13.

Prajapati, S. K., Malaiya, A., Kesharwani, P., Soni, D., & Jain, A. (2020). Biomedical applications and toxicities of carbon nanotubes. *Drug and Chemical Toxicology*, 1–16.

Ribas, V., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J. C., 2014. Glutathione and mitochondria. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 151.

Rosen, G. M., Pou, S., Ramos, C. L., Cohen, M. S., & Britigan, B. E. (1995). Free radicals and phagocytic cells. *The FASEB Journal*, 9(2), 200–209.

Ryan, M. J., Dudash, H. J., Docherty, M., Geronilla, K. B., Baker, B. A., Haff, G. G., ... Alway, S. E. (2010). Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats. *Experimental Gerontology*, 45(11), 882–895.

Sabido O, Figarol A, Klein J-P, Bin V, Forest V, Pourchez J, Fubini B, Cottier M, Tomatis M, Boudard D. Quantitative Flow Cytometric Evaluation of Oxidative Stress and

Mitochondrial Impairment in RAW 264.7 Macrophages after Exposure to Pristine, Acid Functionalized, or Annealed Carbon Nanotubes. *Nanomaterials*. 2020; 10(2):319.

Saifi, M.A., Khurana, A., Godugu, C., 2018b. Nanotoxicology: toxicity and risk assessment of nanomaterials. In: *Nanomaterials in Chromatography: Current Trends in Chromatographic Research Technology and Techniques*. Elsevier, pp. 437–465.

Saleemi, M. A., Hosseini Fouladi, M., Yong, P. V. C., Chinna, K., Palanisamy, N. K., & Wong, E. H. (2020). Toxicity of Carbon Nanotubes: Molecular Mechanisms, Signaling Cascades, and Remedies in Biomedical Applications. *Chemical Research in Toxicology*.

Saleh, D.M., Luo, S., Ahmed, O.H.M. et al. Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. *Part Fibre Toxicol* 19, 30 (2022).

Sen, C. K., & Packer, L. (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *The FASEB Journal*, 10(7), 709–720.

Shebis, Y., Iluz, D., Kinel-Tahan, Y., Dubinsky, Z., Yehoshua, Y., 2013. Natural Antioxidants: Function and Sources, *Food and Nutrition Sciences*, 4(6), 643-649

Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291–295.

Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180–183.

Sims, C. M., Hanna, S. K., Heller, D. A., Horoszko, C. P., Johnson, M. E., Montoro Bustos, A. R., ... Nelson, B. C. (2017). Redox-active nanomaterials for nanomedicine applications. *Nanoscale*, 9(40), 15226–15251.

Singh, S., & Nalwa, H. S. (2007). Nanotechnology and Health Safety – Toxicity and Risk Assessments of Nanostructured Materials on Human Health. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7(9), 3048–3070.

Singh, S., Vardharajula, S., Tiwari, P., ErdalEroğlu, Komal Vig, Dennis, V., & Ali. (2012). Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*, 5361.

- Stadtman, E. R. (1986). Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, ageing and neutrophil function. *Trends in Biochemical Sciences*, 11(1), 11–12.
- Stadtman, E., R., Levine, R., L., 2006. Protein Oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 191-208.
- Taniguchi N., Arakawa C., Kobayashi T. On the basic concept of nano-technology; Proceedings of the International Conference on Production Engineering; Tokyo, Japan. 26–29 August 1974.
- Thomas, T., et al., 2009. Moving toward exposure and risk evaluation of nanomaterials: challenges and future directions. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 1 (4), 426–433. Kuhlbusch, T.A.J., Wijnhoven, S.W.P., Haase, A., 2018. Nanomaterial Exposures for Worker, Consumer and the General Public. *NanoImpact*. Elsevier B.V., pp. 11–25.
- Tonelli, C., Chio, I. I. C., & Tuveson, D. A. (2017). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants & Redox Signaling*.
- Townsend, D. M., Tew, K. D., Tapiero, H., 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(3-4), 145-155
- Treacy, M. M. J., Ebbesen, T. W., & Gibson, J. M. (1996). Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes. *Nature*, 381(6584), 678–680.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.
- 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, 111083.
- Veskoukis, A. S., Kyparos, A., Paschalis, V., Nikolaidis, M. G., 2016. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood. *Biomarkers*, 21(3), 208-217.
- Veskoukis, A. S., Tsatsakis, A. M., Kouretas, D., 2012. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress and Chaperones*, 17(1), 11-21.

- W. Dröge “Free radicals in the physiological control of cell function,” *Physiological Reviews*, vol. 82, pp. 47–95, 2002.
- Wang, W., Xia, M. X., Chen, J., Yuan, R., Deng, F. N., & Shen, F. F. (2016). Gene expression characteristics and regulation mechanisms of superoxide dismutase and its physiological roles in plants under stress. *Biochemistry (Moscow)*, 81(5), 465–480.
- Weisiger R.A. and Fridovich I. (1973). Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem*. 248 (10): 3582–3592.
- Weissig V., Pettinger T.K., Murdock N. Nanopharmaceuticals (part 1): Products on the market. *Int. J. Nanomed*. 2014;9:4357–4373.
- Witztum, J.L. and Steinberg, D. (2001) The Oxidative Modification Hypothesis of Atherosclerosis: Does It Hold for Humans? *Trends in Cardiovascular Medicine*, 11, 93-102.
- Wu B, Jiang M, Liu X, Huang C, Gu Z, Cao Y. Evaluation of toxicity of halloysite nanotubes and multi-walled carbon nanotubes to endothelial cells in vitro and blood vessels in vivo. *Nanotoxicology*. 2020 Oct;14(8):1017-1038.
- Wu, D., Ma, Y., Cao, Y., & Zhang, T. (2019). Mitochondrial toxicity of nanomaterials. *Science of The Total Environment*, 134994.
- Yeung, C. S., Tian, W. Q., Liu, L. V., & Wang, Y. A. (2009). Chemistry of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, 6(6), 1213–1235.
- Young and J. Woodside, “Antioxidants in health and disease,” *Journal of Clinical Pathology*, vol. 54, pp. 176–186, 2001.
- Yu, J., Loh, X. J., Luo, Y., Ge, S., Fan, X., & Ruan, J. (2020). Insights into the epigenetic effects of nanomaterials on cells. *Biomaterials Science*.
- Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol. Aspects Med*. 2008 in press.
- Zeinabad, H. A., Zarrabian, A., Saboury, A. A., Alizadeh, A. M., & Falahati, M. (2016). Interaction of single and multi wall carbon nanotubes with the biological systems: tau protein and PC12 cells as targets. *Scientific Reports*, 6(1).

Zhao, Y., Allen, B.L., and Star, A. (2011). Enzymatic degradation of multiwalled carbon nanotubes. *J Phys Chem A* 115, 9536–9544.