



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΕΡΥΘΡΩΝ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΩΝ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ
ΝΑΝΟΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»



Συγγραφέας: Μαντούβαλου Λύμπερτη Δέσποινα

Αριθμός Μητρώου: 20678175

Email: bisc20678175@uniwa.gr

Επιβλέπων Καθηγητής: Σωτήριος Φόρτης

Email: sfortis@uniwa.gr

ΑΘΗΝΑ 2024



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF HEALTH AND WELFARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
DIVISION OF MEDICAL LABORATORIES



UNDERGRADUATE THESIS

«OXIDATION OF RED BLOOD CELLS UNDER THE INFLUENCE OF NANOSYSTEMS»



Writer: Mantouvalou Lymperti Despoina

Candidate number: 20678175

Email: bisc20678175@uniwa.gr

Supervisor: Sotirios Fortis

Email: sfortis@uniwa.gr

ATHENS 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΕΡΥΘΡΩΝ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΩΝ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΝΑΝΟΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΕΙΣΗΓΗΤΗ

Όνοματεπώνυμο	Βαθμίδα	Υπογραφή
Κριεμπάρδης Αναστάσιος	Καθηγητής	
Φόρτης Σωτήριος	Ακαδημαϊκός υπότροφος	
Δρύλλης Γεώργιος	Επίκουρος καθηγητής	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη ΜΑΝΤΟΥΒΑΛΟΥ ΛΥΜΠΕΡΤΗ ΔΕΣΠΟΙΝΑ του ΑΓΓΕΛΟΥ ΑΝΔΡΕΑ, με αριθμό μητρώου 20678175 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ του Τμήματος ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, δηλώνω υπεύθυνα ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η δηλούσα,

Λύμπερτη Δέσποινα Μαντούβαλου



Πρόλογος

Πρωτίστως , θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Κριεμπάρδη Αναστάσιο, διευθυντή του Ερευνητικού Εργαστηρίου Αξιοπιστίας και Ποιοτικού Ελέγχου στην Εργαστηριακή Αιματολογία και τον κ. Φόρτη Σωτήριο, επιβλέποντα καθηγητή για την πτυχιακή μου εργασία για την ευκαιρία που μου έδωσαν να πραγματοποιήσω την παρούσα μελέτη μαζί τους και την καθοδήγησή τους καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας καθώς και τον κ. Δρύλλη Γεώργιο για την συμμετοχή του στην εξεταστική επιτροπή.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του εργαστηρίου, Μαρία Ασπασία Κοσμά, για την βοήθειά της κατά το πειραματικό μέρος της μελέτης.

Ευχαριστώ, ακόμη, τους συμφοιτητές μου στο εργαστήριο, Ναταλία, Ειρήνη και Βαγγέλη για την συνεργασία μας. Χάρη σε εκείνους η καθημερινότητα έγινε πιο εύκολη και το ταξίδι αυτό πιο όμορφο.

Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς τους γονείς μου, Άγγελο και Μαρία και τον αδερφό μου, Παναγιώτη για την υποστήριξη, την κατανόηση και την ενθάρρυνση που μου πρόσφεραν όλο αυτόν τον καιρό.

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	6
ΣΥΧΝΕΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	9
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	11
ABSTRACT.....	12
Α ΜΕΡΟΣ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
A.1: Τα κύτταρα του αίματος	14
A.2: Ερυθροποίηση	15
A.3: Δομή και μορφολογία των RBCs.....	17
A4: Δομή και λειτουργία ερυθροκυτταρικής μεμβράνης	18
B ΜΕΡΟΣ: Νανοσωματίδια	20
B.1: Μορφολογικά χαρακτηριστικά νανοσωματιδίων.....	20
B.2: Ιδιότητες νανοσωματιδίων	20
B.3: Είδη νανοσωματιδίων	22
B.4: Πολυμερικά νανοσωματίδια	24
B.4.1: Πολυμερικά νανοσωματίδια.....	24
B.4.2: Τοξικότητα πολυμερικών νανοσωματιδίων	24
B.5: Αλγινικό οξύ στα νανοσυστήματα	25
B.5.1: Πολυσακχαρίτες	25
B.5.2: Αλγινικό οξύ	25
B.6: Χρυσίνη	27
B.6.1: Πηγές και δομή	27
B.6.2: Θεραπευτικές δράσεις χρυσίνης.....	28
B.6.3: Χρυσίνη εγκλωβισμένη σε NPs	28
B.7: Νανοσωματίδια σε Βιοϊατρικές Εφαρμογές	29
Γ ΜΕΡΟΣ: ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ROS	30
Γ.1: Ελεύθερες ρίζες.....	30
Γ.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου ROS	31
Γ.2 Πηγές ROS.....	32
Γ.2.1 Ενδογενείς πηγές ROS	32
Γ.2.2 Εξωγενείς πηγές ROS.....	34
Γ.3 Παραγωγή ROS στα RBCs	34
Γ.4 Αντιοξειδωτικά Συστήματα των RBCs	36
Δ ΜΕΡΟΣ: Υλικά και μέθοδοι.....	39
Δ.1: Σκοπός της εργασίας.....	39
Δ.2: Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων	39

Δ.2.1: Συλλογή δειγμάτων	39
Δ.2.2: Επεξεργασία δειγμάτων	39
Δ.3: Υλικά – αντιδραστήρια – όργανα	40
Δ.3.1: Πορεία πειράματος	40
Δ.4: ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΑΙΜΟΛΥΣΗ.....	40
Δ.4.1: Αρχή μεθόδου.....	40
Δ.4.2: Υλικά – αντιδραστήρια – όργανα.....	40
Δ.4.3: Πορεία πειράματος	41
Δ.5: Κυτταρομετρία ροής	41
Δ.5.1: Αρχή μεθόδου.....	41
Δ.5.2: Συστήματα που απαρτίζουν ένα κυτταρόμετρο ροής	42
Δ.5.2: Υλικά – αντιδραστήρια – όργανα.....	44
Δ.5.3: Προετοιμασία δείγματος αίματος για κυτταρομετρία ροής.....	44
Ε ΜΕΡΟΣ: Αποτελέσματα	45
Ε.1: Αιματολογικές παράμετροι.....	45
Ζ ΜΕΡΟΣ: Συζήτηση	52
Η ΜΕΡΟΣ: Συμπεράσματα	54
Κατάλογος Εικόνων.....	55
Κατάλογος Διαγραμμάτων	56
Κατάλογος Πινάκων	57
Κατάλογος Εξισώσεων	58
Βιβλιογραφία.....	59

ΣΥΧΝΕΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Cat	Catalase	Καταλάση
CNTs	Carbon nanotubes	Νανοσωλήνες άνθρακα
Epo	Erythropoietin	Ερυθροποιητίνη
ETC	Electron Transport Chain	Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων
GSH	Glutathione	Γλουταθειόνη
GPx	Glutathione peroxidase	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
Hb	Heamoglobin	Αιμοσφαιρίνη
LNPs	Lipid nanoparticles	Λιπιδικά νανοσωματίδια
MFI	Mean Fluorescence Intensity	Μέση ένταση φθορισμού
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate	Φωσφορικό Δινουκλεοτίδιο Νικοτιναμίδης Αδενίνης
NP	Nanoparticles	Νανοσωματίδια
PLT	Platelets	Αιμοπετάλια
PMT	Photomultiplier Tubes	Φωτοπολλαπλασιαστής
PNPS	Polymeric Nanoparticles	Πολυμερικά νανοσωματίδια
Prx	Peroxiredoxin	Υπεροξειρεδοξίνες
RBC	Red Blood Cells	Ερυθρά αιμοσφαίρια
RNS	Reactive Nitrogen species	Δραστικές Μορφές Αζώτου
ROS	Reactive oxygen species	Δραστικές Μορφές Οξυγόνου
SOD	Superoxide Dismutase	Δισμουτάση υπεροξειδίου
TR	Thioredoxin reductase	Αναγωγή της θειορεδοξίνης

Trx	Thioredoxin	Θειορεδοξίνη
WBC	White Blood Cells	Λευκά αιμοσφαίρια

Πίνακας 1: Πίνακας συχνών συντμήσεων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα νανοσωματίδια έρχονται πάντοτε σε επαφή με το αίμα ανεξάρτητα από την οδό που χρησιμοποιείται για την χορήγησή τους στο ταξίδι τους προς τους στόχους τους. Επομένως, ίσως προσβάλλουν τα συστατικά του, όπως είναι τα ερυθρά αιμοσφαίρια, έχοντας τοξικές επιδράσεις. Αυτό καθιστά απαραίτητη την διεξαγωγή ενδελεχή ελέγχου ώστε να εκμηδενιστούν οι σοβαρές αντενδείξεις και να προστατευτεί η δομή και η λειτουργία τους.

Το αλγινικό οξύ είναι ένα βιοπολυμερές με εκτεταμένη χρήση ως φορέας φαρμάκων για την παρασκευή πολυμερικών νανοσωματιδίων. Η χρυσίνη από την άλλη, είναι ένα φυσικό φλαβονοειδές με σπουδαίες θεραπευτικές ιδιότητες μπορεί να ενθυλακωθεί σε νανοσωματίδια και να δράσει στοχευμένα.

Στόχος της παρούσας έρευνας είναι να μελετηθεί η συμβατότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων με νανοσυστήματα αλγινικού και χρυσίνη. Αναλυτικότερα, εστιάζει στα επίπεδα ενδοκυττάρων οξειδωτικών ριζών με ή χωρίς εξωκυττάριο ερέθισμα καθώς και στην οξείδωση που μπορούν να υποστούν τα ερυθροκύτταρα υπό την επίδραση των NPs. Αρχικά, προσδιορίστηκαν μερικές βασικές αιματολογικές παράμετροι και ύστερα μετρήθηκε η οξειδωτική αιμόλυση και με την μέθοδο κυτταρομετρίας ροής μετρήθηκαν τα επίπεδα οξειδωτικών ριζών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης φαίνεται ότι η επίδραση των νανοσυστημάτων στα ερυθροκύτταρα είναι περιορισμένη και δεν υποδηλώνουν τοξικότητα ούτε ως προς την παραγωγή οξειδωτικών ριζών ούτε και ως προς την οξειδωτική αιμόλυση.

Λέξεις κλειδιά: Νανοσωματίδια, Αλγινικό Οξύ, Χρυσίνη, Δραστικές Μορφές Οξυγόνου, Οξείδωση, Ερυθρά Αιμοσφαίρια.

ABSTRACT

Nanoparticles always meet blood regardless of the administration route used on their journey to their targets. Therefore, they might affect blood components such as red blood cells, causing toxic effects. This makes thorough testing essential to eliminate serious contraindications and protect their structure and function.

Alginic acid is a biopolymer widely used as a drug carrier for the composing of polymeric nanoparticles. On the other hand, chrysin is a natural flavonoid with significant therapeutic properties and can be encapsulated in nanoparticles and act in a targeted manner. The aim of the present study is to examine the compatibility of red blood cells with alginate and chrysin nanosystems. In more detail, it focuses on the levels of intracellular oxidative radicals with or without extracellular stimulation, as well as the oxidation that red blood cells may undergo under the influence of nanoparticles. Initially, some basic hematological parameters were determined, and then oxidative hemolysis was measured. The levels of oxidative radicals were assessed using flow cytometry.

According to the results of the research it seems that the effect of nanosystems on red blood cells is limited and does not indicate toxicity either in terms of oxidative radical production or oxidative hemolysis.

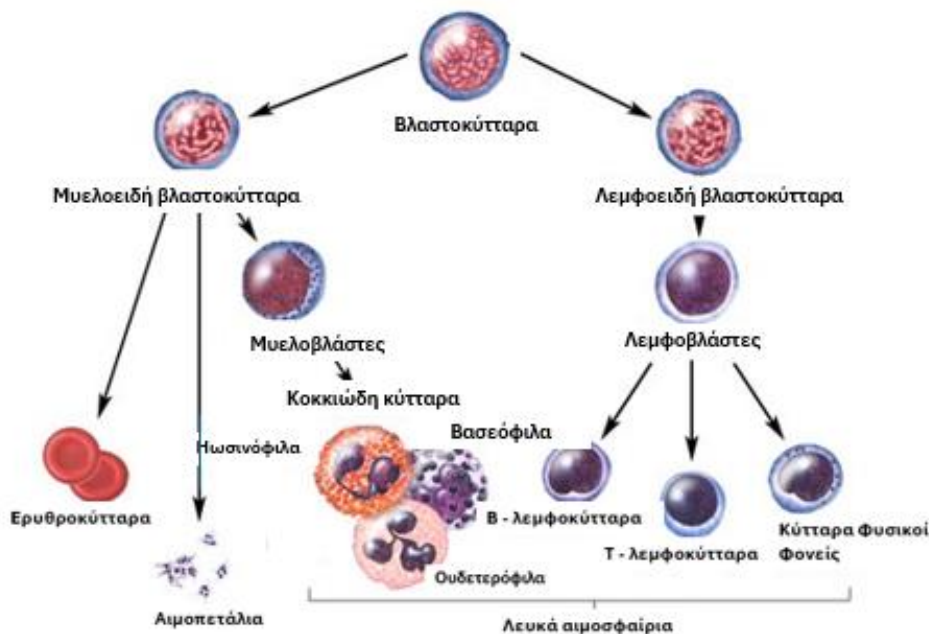
Keywords: Nanoparticles, Alginic Acid, Chrysin, Reactive Oxygen Species, Oxidation, Red Blood Cells.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α ΜΕΡΟΣ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1: Τα κύτταρα του αίματος

Το αίμα είναι ένας πολύπλοκος συνδετικός ιστός που κυκλοφορεί στο αγγειακό σύστημα μεταφέροντας οξυγόνο και άλλες σημαντικές ουσίες στα κύτταρα του οργανισμού, απομακρύνοντας μεταβολισμένες ουσίες όπως το διοξείδιο του άνθρακα και έχοντας αμυντική δράση κατά παθογόνων οργανισμών που έχουν εισβάλει στο σώμα. Απαρτίζεται από τα άμορφα συστατικά, δηλαδή το πλάσμα και έμμορφα συστατικά του ή αλλιώς από κύτταρα τριών ειδών: τα ερυθρά αιμοσφαίρια (RBCs), τα λευκά αιμοσφαίρια (WBCs) και τα αιμοπετάλια (PLTs). (Corrons, Casafont en Frasnedo, 2021) Στα λευκά αιμοσφαίρια συγκαταλέγονται οι υποκατηγορίες: κοκκιοκύτταρα, μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα. Στα κοκκιοκύτταρα ανήκουν τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα, τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα ενώ στα μονοκύτταρα ανήκουν τα T – λεμφοκύτταρα, τα B – λεμφοκύτταρα και τα Natural Killer (NK) ή αλλιώς κύτταρα Φυσικοί Φονείς. (Alyssa Tigner, Sherif A. Ibrahim, 2022)



Εικόνα 1: Ανατύπωση της παραγωγής των κυττάρων του αίματος. Από ένα αρχικό προγονικό κύτταρο δημιουργούνται τα διάφορα κυτταρικά προϊόντα του αίματος. (Buga Corbu, Glück en Arion, 2014)

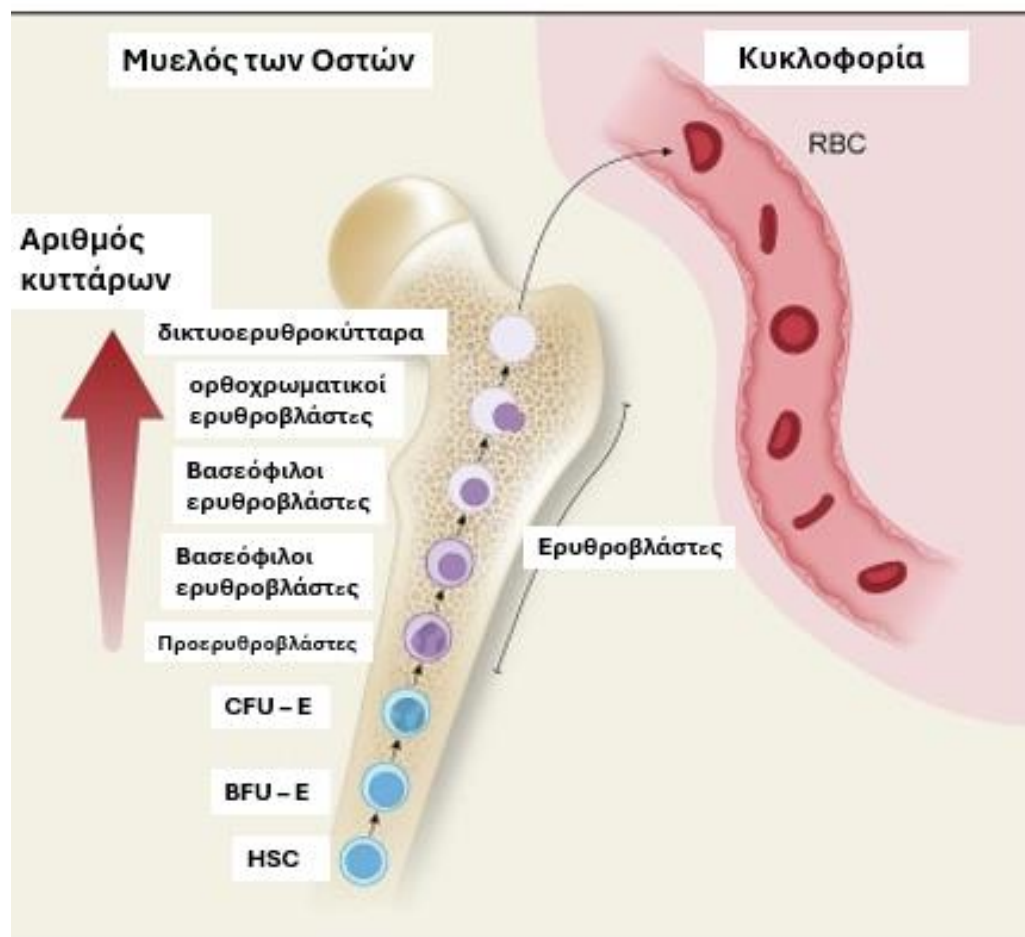
A.2: Ερυθροποίηση

Σε έναν υγιή ενήλικα, η διαδικασία της ερυθροποίησης εκτελείται καθημερινά στον μυελό των οστών, ο οποίος παρέχει μια πολύπλοκη θέση που συντελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα, οστεοβλάστες, αιμοποιητικά κύτταρα και την εξωκυτταρική μήτρα. Με αυτόν τρόπο, υπάρχει μία άμεση επαφή μεταξύ των κυττάρων και παράλληλα, τα αναπτυσσόμενα αιμοποιητικά κύτταρα εκτίθενται σε μόρια κυτταρικής προσκόλλησης, αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες. (Dzierzak en Philipsen, 2013) Το αποτέλεσμα της ερυθροποίησης είναι η παραγωγή περίπου 200 δισεκατομμυρίων RBCs. Έτσι, εξασφαλίζεται ότι τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης στο αίμα θα παραμείνουν σε φυσιολογικά επίπεδα και ότι όλοι οι ιστοί θα οξυγονωθούν επαρκώς. (Caulier en Sankaran, 2022). Μάλιστα, τα RBCs αποτελούν τα πολυπληθέστερα κύτταρα ξενιστές στον οργανισμό (Antonelou, D'Alessandro en Kriebardis, 2022) Για να αποφευχθεί, λοιπόν, η ελαττωματική ωρίμανση ή υπερπαραγωγή των RBC η διαδικασία της ερυθροποίησης ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από την ερυθροποιητίνη (Epo) η οποία είναι μία γλυκοπρωτεϊνική ορμόνη που παράγεται στην συσκευή ανίχνευσης οξυγόνου των νεφρών σε υποψία υποξίας και εκκρίνεται στο αίμα με ενδοκρινή τρόπο όπως μία κοινή ορμόνη. (Mario Cazzola, 2022) Η ανεπαρκής παραγωγή της, από την άλλη, αποτελεί κύριο αίτιο αναιμίας. (Antonelou *et al.*, 2011) Για να επιτύχει τα επιθυμητά αποτελέσματα, η Epo ταξιδεύει με την κυκλοφορία στο περιφερικό αίμα, μεταναστεύει στον μυελό των οστών και δεσμεύεται σε έναν υποδοχέα (EPOR) ο οποίος εντοπίζεται στις επιφάνειες των ερυθροειδών προγόνων και σε άλλες πρόδρομες ουσίες. (Bo Peng, Gangcheng Kong, 2020)

Το πρώτο κύτταρο της ερυθράς σειράς είναι το BFU-E (Burst Forming Unit Erythroid) και επέρχεται το CFU-E (Colony Forming Unit Erythroid). Αυτά τα δύο κύτταρα δεν είναι αναγνωρίσιμα μορφολογικά και αποτελούν τα πρόδρομα κύτταρα της ερυθράς σειράς. (Γ.Χ. Μελέτης, Ε. Τέρπος, 2004) Τα επόμενα κύτταρα της οδού είναι οι προερυθροβλάστες (Pr) και είναι αυτοί που ταυτοποιούνται πρώτοι χάρη στο αυξημένο μέγεθός τους (20 – 25 μm) και της πολύ μεγάλης αναλογίας (περίπου 80%) μεταξύ πυρήνα προς κυτταροπλάσματος. Σε αυτό το σημείο αρχίζει να συντίθεται η αιμοσφαιρίνη.

Αμέσως μετά, ακολουθούν οι βασεόφιλοι ερυθροβλάστες (Bs) οι οποίοι είναι λίγο μικρότεροι σε μέγεθος (16 – 18 μm) και φέρουν τον χαρακτηριστικό πυρήνα που λέγεται «πρόσωπο ρολογιού». Έπειτα, έχουν σειρά οι πολυχρωματικοί ερυθροβλάστες (Pos) που ξεχωρίζουν για την ροζ απόχρωσή τους και μετά οι ορθοχρωματικοί ερυθροβλάστες (O) που έχουν πυρήνες μεγάλης συμπύκνωσης οι οποίοι αποτελούν μόνο το ¼ του κυττάρου και το κυτταρόπλασμα είναι ακόμα περισσότερο ροζ. Τελικά, δημιουργούνται τα δικτυοερυθροκύτταρα (Rs) με την εξώθηση των πυρήνων και εισβάλουν στην κυκλοφορία του αίματος. Για τις επόμενες 24 ως 48 ώρες εξακολουθούν να ωριμάζουν και αφού μείνουν χωρίς μιτοχόνδρια και ριβοσώματα, τα ώριμα, πλέον RBC είναι ικανά να επιτελέσουν την δράση τους. (Klinken, 2002)

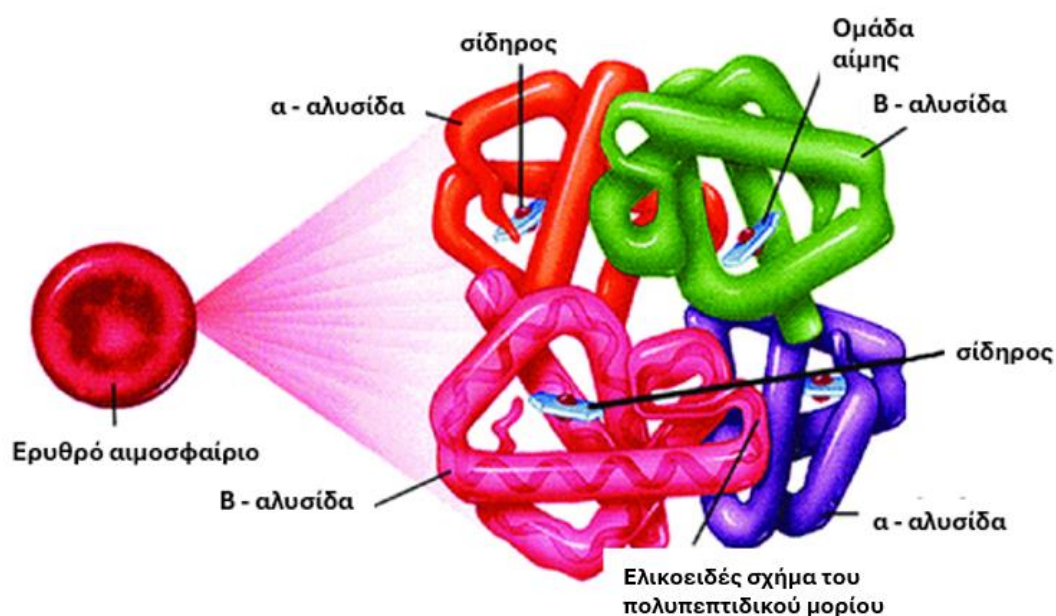
Φυσιολογική Ερυθροποίηση



Εικόνα 2: Ανατύπωση φυσιολογικής ερυθροποίησης. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια παράγονται από πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα στον μυελό των οστών και μετά από μια σειρά γεγονότων ωρίμανσης δημιουργούνται τελικά τα πλήρως λειτουργικά RBC. (Cappellini et al., 2023)

A.3: Δομή και μορφολογία των RBCs

Τα RBCs είναι ερυθρόχρωμα, απύρρηνα κύτταρα σε σχήμα αμφίκιουλου δίσκου που τους εξασφαλίζει μεγάλη κυτταρική επιφάνεια. Έχουν φυσιολογική διάμετρο 7.2 έως 8 μm , πάχος 2 μm , όγκο 90 fL και επιφάνεια 140 μm^2 (Möller *et al.*, 2023). Εκτός από τον πυρήνα, εκλείπουν και άλλα βασικά οργάνδια όπως τα ριβοσώματα και τα μιτοχόνδρια. Με αυτόν τον τρόπο, καταφέρνουν να μεταφέρουν υψηλές ποσότητες αιμοσφαιρίνης στους διάφορους ιστούς και τα όργανα μέσω της κυκλοφορίας. (Pretini *et al.*, 2019) Η αιμοσφαιρίνη είναι ένα τετραμερές μόριο που αποτελείται από δύο α -υπομονάδες και δύο β -υπομονάδες σφαιρίνης. Η κύρια λειτουργία της είναι η μεταφορά οξυγόνου από τον πνεύμονα προς τους ιστούς, δεσμεύοντας και απελευθερώνοντας το οξυγόνο. Η πρωτεΐνη αυτή είναι υπεύθυνη για την χαρακτηριστική ερυθρότητα των ερυθροκυττάρων. (Ahmed, Ghatge en Safo, 2020)

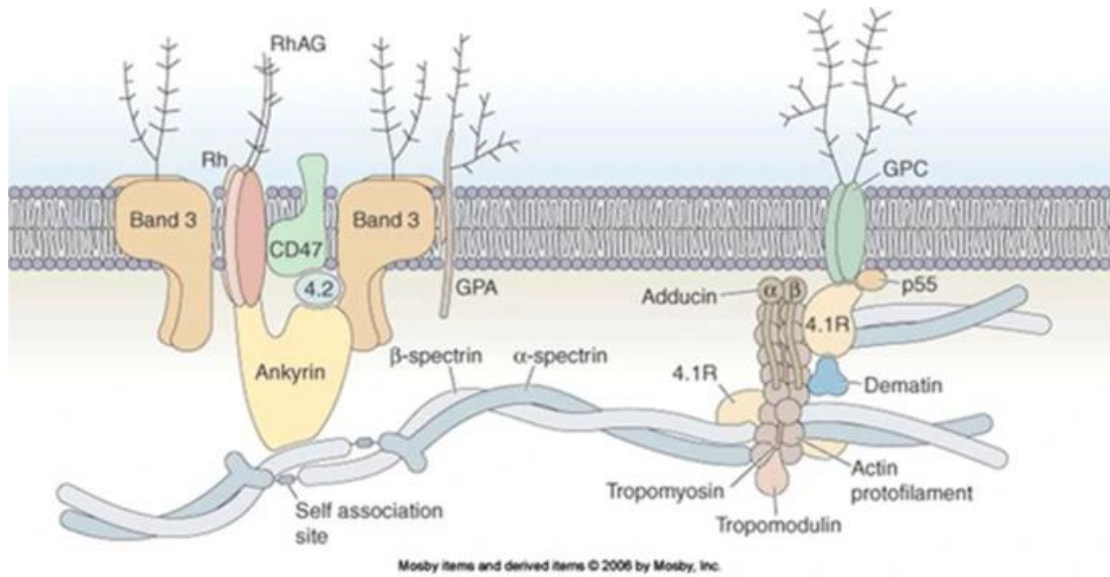


Εικόνα 3: Ανατύπωση της φυσιολογικής δομής της αιμοσφαιρίνης ενός ενήλικα. (Banerjee en Aniyery, 2017)

A4: Δομή και λειτουργία ερυθροκυτταρικής μεμβράνης

Η μεμβράνη των RBCs είναι ιδιαίτερα ελαστική και επιτρέπει στο κύτταρο να υποστεί σοβαρές αλλά αναστρέψιμες παραμορφώσεις, διατηρώντας την ακεραιότητά του και, παράλληλα, χωρίς να μειώνεται η διάρκεια ζωής του στην κυκλοφορία του αίματος. (Narla Mohandas and Patrick G. Gallagher, 2008) Αν και η μεμβράνη χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά μεγάλη ελαστικότητα, ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό της είναι ότι σημαντική παραμόρφωση στην επιφάνεια του ερυθρού αιμοσφαιρίου οδηγεί σε λύση του κυττάρου. Δηλαδή, παρόλο που ένα φυσιολογικό ερυθρό αιμοσφαίριο μπορεί να υποστεί γραμμική παραμόρφωση μέχρι και 250%, μία παραμόρφωση 3 – 4% στην επιφάνεια του θα προκαλέσει την λύση του. (Mohandas en Gallagher, 2008) Πρόκειται, επομένως, για μία πολύ σύνθετη δομή η οποία περιέχει 20 βασικές πρωτεΐνες και πάνω από 850 με δευτερεύων ρόλο. (Lux Samuel E. IV, 2016) Αναλυτικότερα, η ερυθροκυτταρική μεμβράνη αποτελείται από υδατάνθρακες που περιβάλλουν μία διπλή λιπιδική στιβάδα η οποία εσωτερικά διαθέτει μία επένδυση πρωτεϊνών. (Ιωάννης Σταμούλης, 2012) Η λιπιδική στιβάδα απαρτίζεται από ίσες ποσότητες χοληστερόλης και φωσφολιπιδίων διασκορπισμένων στην στιβάδα. (J Narla, 2017) Οι πρωτεΐνες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τις ενδογενείς ή αλλιώς διαμεμβρανικές και τις περιφερειακές ή αλλιώς δομικές. Οι διαμεμβρανικές μπορούν και εισχωρούν στην φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα. Σε αυτές ανήκουν οι γλυκοφορίνες A, B, C, D, E και η πρωτεΐνη 3. Αντίθετα, οι δομικές δεν διαπερνούν την διπλοστιβάδα και σε αυτές περιλαμβάνονται η σπεκτρίνη, η ανκυρίνη, η ακτίνη και πρωτεΐνες 4.1 και 4.2. Οι γλυκοφορίνες (Gf) είναι γλυκοπρωτεΐνες που σχετίζονται με το αρνητικό φορτίο που φέρει η μεμβράνη. Η σπεκτρίνη είναι υπεύθυνη για την προστασία του σχήματος των RBCs και της δομής της λιπιδικής στιβάδας. Αξίζει να αναφερθεί ότι περίπτωση μετάλλαξης σε γονίδιο κωδικοποίησης της πρωτεΐνης 3, της ακτίνης, της ανκυρίνης, ή των πρωτεϊνών 4.1 και 4.2 οδηγεί σε κληρονομικές διαταραχές της μεμβράνης. (Ιωάννης Σταμούλης, 2012) Τέλος, ο κυτταροσκελετός εντοπίζεται κάτω από το λιπιδικό φύλλο της μεμβράνης και πρόκειται για ένα σπουδαίο δίκτυο ακτίνης – σπεκτρίνης. Απαρτίζεται από

μακριές συνεστραμμένες ίνες άλφα και βήτα σπεκτρίνης και νημάτων ακτίνης.
(Corrons, Casafont en Frashedo, 2021)



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της μεμβράνης του ερυθροκυττάρου και του κυτταροσκελετού. (Corrons, Casafont en Frashedo, 2021)

B ΜΕΡΟΣ: Νανοσωματίδια

Πολλά υποψήφια φάρμακα για σοβαρές ασθένειες αποδίδουν εξαιρετικά *in vitro* αλλά η *in vivo* αποτελεσματικότητά τους χαρακτηρίζεται από κακή φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική. Αιτία μπορεί να αποτελεί η αναγνώρισή τους από τον οργανισμό ως ξένο σώμα, ή η απορρόφηση πρωτεϊνών ορού από τα φάρμακα και την επακόλουθη σηματοδότηση για την ανοσολογική απόκριση. Παράλληλα, όργανα όπως το συκώτι, ο σπλήνας, το δέρμα τείνουν να δεσμεύουν την φαρμακευτική ουσία δίχως να φτάνει η κατάλληλη ποσότητα στις θέσεις – στόχους. Λύση σε αυτό το πρόβλημα δίνουν τα νανοσωματίδια τα οποία μπορούν να λειτουργήσουν ως φορείς φαρμάκων και να προστατεύσουν το φάρμακο *in vivo*. (Sindhvani en Chan, 2021)

B.1: Μορφολογικά χαρακτηριστικά νανοσωματιδίων

Τα νανοσωματίδια (NPs) αποτελούν σωματίδια που έχουν μέγεθος από 1 ως 100 nm. Οι ιδιότητές τους ποικίλουν ανάλογα με το μέγεθος και τις επιφανειακές τους λειτουργίες. Χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω του μικρού τους μεγέθους σε συνδυασμό με την μεγάλη επιφάνειά τους. Τα NPs μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς φαρμάκων καθώς και να εφαρμοστούν κλινικά. Η εφαρμογή τους εξαρτάται από παράγοντες όπως τα φυσικοχημικά τους γνωρίσματα, η αποτελεσματικότητά τους όσον αφορά τον εγκλωβισμό και την απελευθέρωση του φαρμάκου και κυρίως από το επίπεδο τοξικότητας του φορέα. (Najahi-Missaoui, Arnold en Cummings, 2020)

B.2: Ιδιότητες νανοσωματιδίων

Τα νανοσωματίδια τα οποία προορίζονται για φορείς φαρμάκων εγκλωβίζουν τις θεραπευτικές ουσίες, προστατεύοντας τις από το περιβάλλον και τις μεταφέρουν στοχευμένα σε διάφορα σημεία του οργανισμού. Η ικανότητα ελέγχου του μεγέθους, του σχήματος και το επιφανειακό φορτίο είναι μερικά από τα βασικά πλεονεκτήματα των πολυμερικών νανοσωματιδίων που προορίζονται για χορήγηση φαρμάκου. (Beach *et al.*, 2024)

Με βάση κάθε χαρακτηριστικό τους, προκύπτουν και οι αντίστοιχες ιδιότητες.
Αναλυτικότερα:

- **Μέγεθος και εμβαδόν επιφάνειας:**
Τα NPs έχουν υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο. Έτσι, τα νανοσωματίδια έχουν υψηλό εμβαδόν αλληλεπίδρασης ανά μονάδα μάζας. Το μικρό και ελεγχόμενο μέγεθός τους τα καθιστά ικανά να εισβάλλουν στους ιστούς του οργανισμού. Επί της ουσίας, το χαρακτηριστικό αυτό, επηρεάζει τον τρόπο και τον ρυθμό που τα NPs ενδοκυτταρώνονται, διαμοιράζονται, συγκρατούνται και απομακρύνονται από το σύστημα του οργανισμού.
- **Σχήμα:**
Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, το σχήμα των NPs είναι ελεγχόμενο και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για την λειτουργία και την δράση τους. Στο τελικό στάδιο της δημιουργίας τους, λοιπόν, μπορεί να μεταβληθεί το σχήμα τους. Γενικότερα, αυτό το χαρακτηριστικό επηρεάζει την ευκολία με την οποία τα NPs μπορούν να ενδοκυτταρωθούν. Ενδεικτικότερα, τα ραβδοειδή NPs αντιμετωπίζουν μία δυσκολία σε σύγκριση με τα σφαιρικά NPs. Από την άλλη, τα NPs με μακριά ράβδο υπερτερούν στην ενθουλάκωση μεγαλύτερου αριθμού σωματιδίων και στην βιοδιαθεσιμότητα. (Yusuf *et al.*, 2023)
- **Χημεία επιφανειών:**
Η επιφανειακή χημεία των NPs ορίζει την αντιδραστικότητά και την λειτουργία τους. Για αυτό τον λόγο, πολλά NPs υπόκεινται τροποποίηση ώστε να μεταβληθεί η χημεία επιφάνειάς τους και κατ' επέκταση να αλλάξει ο τρόπος λειτουργίας τους. Παράλληλα, το περιβαλλοντικό pH στο οποίο εισέρχονται τα NPs είναι ένας παράγοντας που μπορεί, επίσης, να επιδράσει στην λειτουργία τους ανάλογα την επιφανειακή χημεία τους. Η επιφάνεια των NPs πρέπει να είναι υδρόφιλη ώστε να αποφεύγουν την οψωνινοποίηση και τα μακροφάγα. Αυτό μπορεί να γίνει με την επικάλυψη της επιφάνειας του NP με ένα υδρόφιλο πολυμερές. (Zhuo (Georgia) Chen, 2008)

B.3: Είδη νανοσωματιδίων

Τα NPs αποτελούνται από τρία στρώματα. Το επιφανειακό στρώμα, το στρώμα του κελύφους και τον πυρήνα, ο οποίος αποτελεί το κεντρικό τμήμα του NP και συνήθως αναφέρεται στο ίδιο το NP. (Shin *et al.*, 2016)

Τα NPs χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: NPs με λιπίδια, ανόργανα NPs και πολυμερή NPs.

Τα NPs με βάση τα λιπίδια είναι, κυρίως, πλατφόρμες με σφαιρικό σχήμα οι οποίες έχουν μια ή παραπάνω διπλοστοιβάδες λιπιδίων και περιβάλλουν ένα ή περισσότερα εσωτερικά υδατικά διαμερίσματα. Τα πλεονεκτήματά τους αφορούν την απλότητα παραγωγής τους, την ικανότητα αυτοσυναρμολόγησής τους και μετακίνησης μεγάλων ουσιών, την βιοσυμβατότητα και τέλος, την μεγάλη βιοδιαθεσιμότητά τους. Στα υποσύνολά τους ανήκουν τα λιποσώματα και τα λιπιδικά νανοσωματίδια (LNPs).

Τα ανόργανα NPs δημιουργούνται από υλικά όπως ο χρυσός, ο σίδηρος και το πυρίτιο και διαθέτουν ποικιλομορφία όσον αφορά το μέγεθος, την δομή και την γεωμετρία. Επίσης, χρησιμοποιείται αρκετά το οξειδίο του σιδήρου, το φωσφορικό ασβέστιο και τα NPs μεσοπορώδους πυριτίου ως φορείς φαρμάκων. Η πλειοψηφία των ανόργανων NPs ενώ παρουσιάζουν υψηλή βιοσυμβατότητα και σταθερότητα έχουν, ταυτόχρονα, μειωμένη διαλυτότητα και τοξική δράση σε περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται βαρέα μέταλλα.

Τα NPs με βάση πολυμερή (PNPS) συντίθενται είτε με φυσικά ή είτε με συνθετικά υλικά και αποτελούνται από μονομερή ή πολυμερή. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η δυνατότητα απόκτησης πολλών διαφορετικών δομών και, συνάμα, ιδιοτήτων. Οι βασικές κατηγορίες των PNPS είναι οι νανοκάψουλες και οι νανοσφαίρες. Οι πρώτες αποτελούν κοιλότητες τις οποίες περιβάλλει μια πολυμερική μεμβράνη ή αλλιώς κέλυφος και οι δεύτερες αφορούν σύστημα στερεάς μήτρας. Σε αυτές τις μορφές εντάσσονται τα πολυμεροσώματα που είναι τεχνητά κυστίδια, τα μικκύλια που σχηματίζουν νανοσφαιρίδια με υδρόφιλο πυρήνα και υδρόφοβο περίβλημα και τα

δενδριμερή τα οποία έχουν πολύπλοκες δομές και είναι ικανά να συνδέονται με βιομόρια και να εγκλωβίζουν φάρμακα εντός τους.

Συμπερασματικά, τα PNPs είναι κατάλληλα ως φορείς φαρμάκων λόγω της βιοαποικοδόμησης της υδατοδιαλυτότητας, της βιοσυμβατότητας, της ικανότητας βιομίμησης και της σταθερότητας στην αποθήκευση που τα χαρακτηρίζουν. (Mitchell *et al.*, 2021)



Εικόνα 5: Στην εικόνα παρουσιάζονται μορφολογικά οι τρεις κύριες κατηγορίες νανοσωματιδίων: Πολυμερικά, Ανόργανα και Λιπιδικά καθώς και οι υποκατηγορίες τους. (Mitchell *et al.*, 2021)

Στα NPs που έχουν βάση τον άνθρακα συγκαταλέγονται οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs), οι οποίοι χαρακτηρίζονται από αυξημένη σταθερότητα και ικανότητα μεταφοράς φορτίου φαρμάκων. Αν και έχουν εφαρμοστεί σε ασθενείς τα CNTs δεν είναι ιδιαίτερα ασφαλή αφού έχει αποδειχθεί ότι ύστερα από μακροχρόνια χρήση εμφανίζουν τοξικότητα. (Najahi-Missaoui, Arnold en Cummings, 2020)

B.4: Πολυμερικά νανοσωματίδια

B.4.1: Πολυμερικά νανοσωματίδια

Τα πολυμερή νανοσωματίδια υπερτερούν, σε σύγκριση με τα απλά φάρμακα, λόγω του χρόνου κύκλου τους, της σταθερότητας τους, της δομικής αποσύνθεσης τους, του ρυθμού ενθυλάκωσης, της πρόωρης απελευθέρωσης και της δυνατότητας καθορισμένης απεγκλώβισης του φαρμάκου. (Leming Sun, Hongmei Liu, Yanqi Ye, Yang Lei, Rehmat Islam, Sumin Tan, Rongsheng Tong, Yang-Bao Miao, 2023). Ως επί το πλείστον, τα νανοσωματίδια με βάση τα πολυμερή χρησιμοποιούνται ως φορείς ώστε η απελευθέρωση του φαρμάκου να γίνεται ελεγχόμενα και παρατεταμένα. Οι ουσίες αυτές μπορούν να είναι προσροφημένες στην επιφάνεια του πολυμερικού πυρήνα ή παγιδευμένες εντός του πολυμερικού σώματος. (Altammar, 2023) Δύο πολυμερή που είναι εγκεκριμένα από τον FDA είναι το πολυγαλακτικό γλυκολικό οξύ (PLGA) και η χιτοζάνη, επειδή είναι βιοσυμβατά και βιοαποδομήσιμα. (Najahi-Missaoui, Arnold en Cummings, 2020).

B.4.2: Τοξικότητα πολυμερικών νανοσωματιδίων

Σύμφωνα με την κοινή επιστημονική γνώμη, τα πολυμερικά νανοσωματίδια είναι τα πιο ασφαλή όσον αφορά την τοξικότητα, διότι βασίζονται σε βιοσυμβατά πολυμερή. Πιο συγκεκριμένα, τα φυσικά πολυμερή δεν αναγνωρίζονται ως ξένα από τον οργανισμό και μεταβολίζονται εύκολα. (Murthy, 2007) Ωστόσο, σύμφωνα με κάποιες έρευνες τα πολυμερή NPs είναι και αυτά τοξικά. Πιο συγκεκριμένα, έχει εντοπιστεί ότι τα NPs είναι ικανά να συσσωρεύονται στα κύτταρα προκαλώντας στα όργανα ειδική τοξικότητα. (Najahi-Missaoui, Arnold en Cummings, 2020) Ειδικά για τα πολυμερή νανοσωματίδια, υπάρχουν προβληματισμοί σχετικά με την ασφάλεια, την πιθανή τοξικότητα και την μη επαρκή βιοσυμβατότητα. Τα βασικότερα τους μειονεκτήματα είναι η τοξική αποσύνθεσή τους, η συσσώρευση μονομερών με τοξική δράση καθώς και τα υπολειπόμενα συστατικά τους τα οποία συνδέονται με τα μονομερή αυτά. Παράλληλα, χαρακτηρίζονται από αστάθεια στην κυκλοφορία του αίματος και από μη αποτελεσματική στόχευση. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι για την

τοξικότητά τους ευθύνονται επιδράσεις κβαντικού μεγέθους που σχετίζονται με οξειδωτικό στρες, κυτταροτοξικότητα και γονοτοξικότητα. (Sharma, Parveen en Chatterji, 2021)

B.5: Αλγινικό οξύ στα νανοσυστήματα

B.5.1: Πολυσακχαρίτες

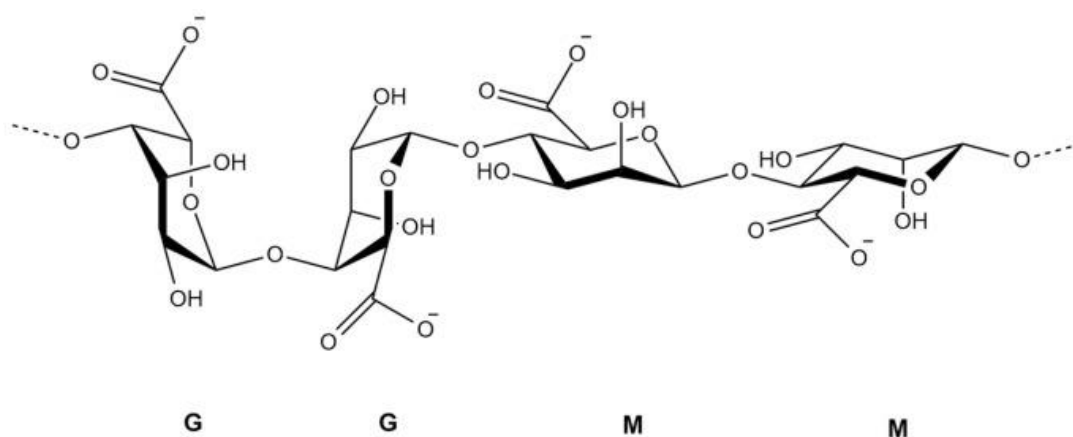
Πολυσακχαρίτης είναι μια μακριά αλυσίδα υδατανθράκων αποτελούμενη μονοσακχαρίτες που συνδέονται με γλυκοσιδικούς δεσμούς. Μέσα σε νερό που περιέχει σάκχαρα, υδρολύεται και παράγει την αμυλάση, μονοσακχαρίτες και ολιγοσακχαρίτες. Γενικά, ένας πολυσακχαρίτης έχει ευέλικτη δομή. Οι πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται σε πολλούς ιατρικούς τομείς λόγω της καλής τους βιοσυμβατότητας και προσρόφησης, της χαμηλής τους ανοσογονικότητας και τοξικότητας, αλλά και της δυνατότητας τους να αποικοδομούνται. (Sukhavattanakul *et al.*, 2023)

B.5.2: Αλγινικό οξύ

Το αλγινικό οξύ είναι ένα βιοπολυμερές με καλή βιοδιασπασιμότητα και βιοσυμβατότητα που δεν έχει τοξική δράση και χρησιμοποιείται ως φορέας για την παρασκευή πολυμερικών νανοσωματιδίων. Επιπλέον, τροποποιείται εύκολα και αποκτά διαφορετικές δομές με ποικίλες ιδιότητες και εφαρμογές. (Jana, Kumar Sen en Gandhi, 2016). Ακόμη, μερικά πλεονεκτήματα τα οποία χαρακτηρίζουν τον πολυσακχαρίτη αυτόν είναι η ασφάλεια, η αφθονία και το προσιτό κόστος ενώ αντίθετα η εύκολη μεταβλητότητά του αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την προσθήκη τους σε δισκία. (Sanchez-Ballester, Bataille en Soulairol, 2021) Το χαρακτηριστικό ζελατινοποίησης που το διακατέχει το καθιστά ιδανικό φορέα ουσιών στην φαρμακευτική, αφού μπορεί να ενθυλακώσει ουσίες όπως πρωτεΐνες και φάρμακα και να τις απελευθερώσει ελεγχόμενα και στοχευμένα. (Choukaife, Doolaanea en Alfatama, 2020)

Το αλγινικό οξύ αποτελεί έναν ιονικό πολυσακχαρίτη που επιλέγεται και χρησιμοποιείται ιδιαίτερα διότι είναι υδατοδιάλυτος, βιοδιασπόμενος βιοσυμβατός καθώς και διαθέτει κατάλληλη δομή (σχηματισμός σαν φιλμ). Σε γενικά πλαίσια προέρχεται είτε από καφέ φύκια (Kelp, Gulfweed, Ascophyllum και Macroalgae) είτε από μικροβιακή ζύμωση εξειδικευμένων βακτηρίων. Ωστόσο, βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και συμβάλλει στην ενδυνάμωση του κυτταρικού τοιχώματος συνήθως με την μορφή αλγινικού ασβεστίου, αλλά και πιο σπάνια ως αλγινικό μαγνήσιο, αλγινικό κάλιο και αλγινικό νάτριο. Το εκχύλισμα που λαμβάνεται από τα φύκια είναι συνήθως αλγινικό νάτριο το οποίο υφίσταται διήθηση και στην συνέχεια του προστίθεται χλωριούχο νάτριο ή ασβέστιο για την καταβύθιση του αλγινικού. Το αλγινικό αυτό άλας μετατρέπεται σε αλγινικό οξύ αφού επεξεργαστεί με αραιό υδροχλώριο (Lee en Mooney, 2012). Παράλληλα, το αλγινικό οξύ έχει αντιαναφυλαξική, ανοσοτροποποιητική, αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. Όσον αφορά συγκεκριμένα το αλγινικό οξύ προερχόμενο από καστανά φύκια αυτό έχει υποχοληστερολαιμική και αντιυπερτασική δράση (Guo *et al.*, 2020).

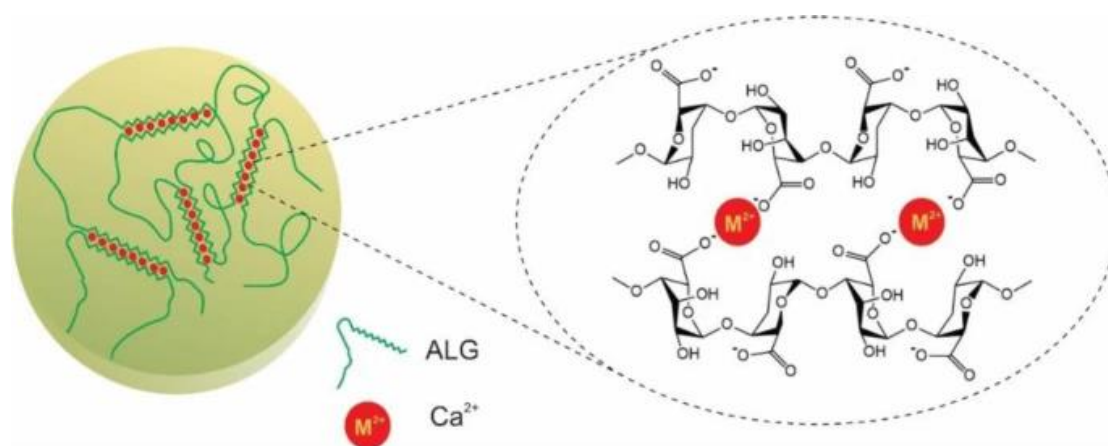
Η χημική δομή του αφορά ένα μη διακλαδισμένο, γραμμικό, συμπολυμερές με ομοπολυμερείς μονάδες του δ – μανουρονικού οξέος (M) και του λ – γουλουρονικού οξέος (G) οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με 1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς.(Lakkakula *et al.*, 2022)



Εικόνα 6: Η χημική δομή του αλγινικού. Φαίνεται χαρακτηριστικά ο σχηματισμός των μπλοκ G και M. (Choukaife, Doolaanea en Alfatama, 2020)

Γενικά, τα δισθενή κατιόντα, όπως είναι το βάριο (Ba^{2+}) και το ασβέστιο (Ca^{2+}), προκαλούν ταχύτατα τον σχηματισμό μπλοκ G, δημιουργώντας ισχυρά

πηκτώματα, γνωστά ως αλγινική υδρογέλη μέσω του φαινομένου ζελατινοποίησης που αναφέρθηκε και παραπάνω, μέσω του μοντέλου «αυγού». (Konstantin Bogolitsyn, Anastasia Parshina, Khurshed Mamatmyrodov, Daria Polomarchuck, 2023)

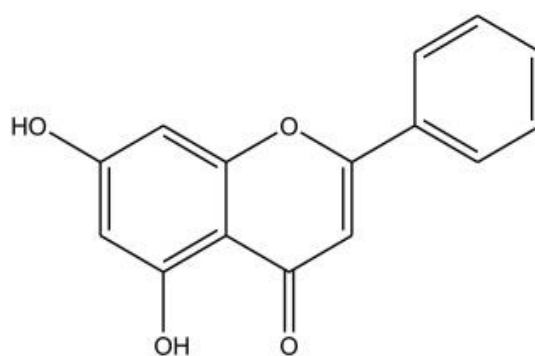


Εικόνα 7: Ζελατινοποίηση του αλγινικού μετά από ιοντική αλληλεπίδραση μεταξύ του αλγινικού και ενός δισθενούς κατιόντος. Πρατηρείται η δομή "αυγού". (Abasalizadeh et al., 2020)

B.6:Χρυσίνη

B.6.1: Πηγές και δομή

Η χρυσίνη είναι ένα φυσικό φυτοχημικό που ανήκει στις φλαβονοειδείς ενώσεις και συναντάται ευρέως στο μέλι, στην πρόπολη και στα φρούτα του πάθους. Έχει αποδειχθεί, ύστερα από *in vivo* και *in vitro* έρευνες ότι η ένωση αυτή έχει προ-αποπρωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενάντια στις ελεύθερες ρίζες ROS. (Li, Li en Deng, 2022). Όσον αφορά την δομή της, αυτή απαρτίζεται από τον δακτύλιο A και C που είναι ενωμένοι, και τον δακτύλιο B που αφορά



Εικόνα 8:Η χημική δομή της χρυσίνης (Saima Naz, 2019)

ένα φαινύλιο συνδεδεμένος με τον C στην δεύτερη θέση. (Mani en Natesan, 2018)

B.6.2: Θεραπευτικές δράσεις χρυσίνης

Η φλαβονοειδής αυτή ένωση είναι ιδιαίτερα χρήσιμη αφού έχει σπουδαίες θεραπευτικές επιδράσεις στην υγεία συμβάλλοντας στην αντιμετώπιση του καρκίνου, του οξειδωτικού στρες, των φλεγμονώδων διαταραχών, του σακχαρώδη διαβήτη, τις καρδιαγγειακές παθήσεις, την παχυσαρκία, τις αλλεργικές αντιδράσεις και του άσθματος. Πιο συγκεκριμένα, μέσω διάφορων ερευνών έχει αποδειχθεί ότι η χρυσίνη είναι ικανή να εμποδίσει διάφορες νεοπλασματικές οδούς σε πολυάριθμους διαφορετικούς τύπους καρκίνων, να καταστείλει τις μεταβολικές οδούς που μπορεί να σχετίζονται με την διαβητική νεφροπάθεια, την καρδιακή μυοπάθεια ή την δυσλιπιδαιμία, να αναστείλει τις οδούς του οξειδωτικού στρες, να περιορίσει τις οδούς που οδηγούν σε θρόμβωση και σε συσσώρευση αιμοπεταλίων, να σταματήσει την απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτοκινών, να αποφύγει ηπατικές βλάβες και ηπατοτοξικότητες, καθώς και μπορεί να καταστέλλει την απελευθέρωση ισταμίνης ορού αλλά και να διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα. (Naz *et al.*, 2019)

B.6.3: Χρυσίνη εγκλωβισμένη σε NPs

Παρά τις σπουδαίες θεραπευτικές της ιδιότητες, η χρυσίνη αντιμετωπίζει κάποιες δυσκολίες ως προς το επίπεδο αποτελεσματικότητάς της. Κι αυτό διότι, περιορίζεται από τον σύντομο χρόνο ημιζωής, τον ταχύ μεταβολισμό, τον μικρό ρυθμό απορρόφησης και την κακή βιοδιαθεσιμότητα της. Σε μία προσπάθεια να ξεπεραστούν αυτά τα εμπόδια, ακολουθούνται τεχνικές ενθυλάκωσης της χρυσίνης σε NPs και άλλα σκευάσματα. (Halevas *et al.*, 2021a) Υπάρχουν ποικίλες μέθοδοι ενθυλάκωσης χρυσίνης σε νανοσωματίδια. Ωστόσο, οι κυρίως παράγοντες ενθυλάκωσης βασίζονται σε πολυμερή. (Filho *et al.*, 2024)

B.7: Νανοσωματίδια σε Βιοϊατρικές Εφαρμογές

Διάφορα PNPs ελέγχονται σε μελέτες ως προς την χορήγηση φαρμάκων και την συγκεκριμένη διανομή τους στο σώμα. Αρκετά θεραπευτικά φάρμακα δεν έχουν καλή υδατική διαλυτότητα και, επομένως, ο εγκλωβισμός τους σε NPs αναβαθμίζει την σταθερότητά τους, μειώνει την καθίζηση και έτσι δεν είναι απαραίτητη η προσθήκη κάποιου τοξικού συνδιαλύτη. Επιπλέον, τα NPs αλλάζουν τον μεταβολικό ρυθμό καθώς και τον ρυθμό κάθαρσης της φαρμακευτικής ουσίας και συνεπώς συμβάλλουν στην επίτευξη στόχου του φαρμάκου.

Τα NPs συνδέονται σε διάφορα σημεία κάνοντας σύζευξη με σύμπλοκα που έχουν την ικανότητα αναγνώρισης και δέσμησης με μεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες υπερεκφράζονται σε παθολογικές περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα σε καρκίνο.

Ακόμη, τα NPs (γενικά) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παράδοση γονιδίων αντικαθιστώντας στοχευμένα γονίδια που ευθύνονται για γενετικές ασθένειες. Τέλος, έχουν εφαρμοστεί και σε κυτταρικές απεικονίσεις ανιχνεύοντας κυτταρικές αλλαγές είτε *in vitro* είτε *in vivo*.

Τα NPs συνδέονται με διάφορα σύμπλοκα όπως τα αντισώματα ώστε να είναι πιο αποτελεσματικά όσον αφορά την στοχευμένη δράση. (Najahi-Missaoui, Arnold en Cummings, 2020)

Γ ΜΕΡΟΣ: ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΡΙΖΕΣ ΚΑΙ ROS

Γ.1: Ελεύθερες ρίζες

Ελεύθερη ρίζα είναι ένα άτομο, μόριο ή ιόν το οποίο φέρει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και μπορεί να έχει ανεξάρτητη ύπαρξη. Με τον όρο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο ορίζεται ένα ηλεκτρόνιο που καταλαμβάνει ένα τροχιακό. Αυτό προκαλεί απόσπαση του ηλεκτρονίου, γεγονός που καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ασταθείς και στη συνέχεια, οι ίδιες επιχειρούν να εξασφαλίσουν σταθερότητα αποσπώντας ηλεκτρόνια από άλλες ενώσεις μέσω αναγωγής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να προκαλείται οξειδωση στην άλλη ένωση μεταβάλλοντας το σε μία καινούρια ελεύθερη ρίζα. (Τσατσάκης Αριστείδης, 2022) Έτσι, δημιουργείται μια αλυσιδωτή διαδικασία αντιδράσεων που οδηγεί σε διάλυση του κυττάρου λόγω της επικράτησης των ελεύθερων ριζών έναντι των αντιοξειδωτικών μέσων του εκάστου κυττάρου. (Fortis *et al.*, 2024)

Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν μεταξύ άλλων τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) καθώς και τα αντιδραστικά είδη αζώτου (RNS). Σε γενικές γραμμές οι πηγές παραγωγής ελεύθερων ριζών μπορεί να είναι ενδογενείς ή εξωγενείς. Στις ενδογενείς ανήκουν τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και φαγοκυτταρικά κύτταρα ενώ στις εξωγενείς συγκαταλέγεται το αλκοόλ, ο καπνός τσιγάρου, η ρύπανση, η ακτινοβολία και μερικές φαρμακευτικές ουσίες όπως είναι η αλοθάνη και η παρακεταμόλη. (Phaniendra, Jestadi en Periyasamy, 2015)

Σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις οι οξειδωτικές ρίζες όχι μόνο δεν είναι επιβλαβείς, αλλά είναι απαραίτητες για τον οργανισμό καθώς με την συμβολή τους επιτελούνται σημαντικές λειτουργίες όπως η αντιμετώπιση μικροβίων, η ρύθμιση οξειδοαναγωγής και η γονιδιακή έκφραση. (Τσατσάκης Αριστείδης, 2022). Ωστόσο, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, δημιουργούν οξειδωτικό ή και νιτροζωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες προκαλείται αν συμβαίνει υπερπαραγωγή ROS και παράλληλα επικρατεί έλλειψη ενζυματικών αντιοξειδωτικών. Ο πλεονασμός των ROS είναι βλαβερός προς τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. (Phaniendra, Jestadi en Periyasamy, 2015)

Γ.2 Δραστικές μορφές οξυγόνου ROS

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species - ROS) αποτελούν μόρια σηματοδότησης τα οποία απελευθερώνονται στα κύτταρα και έχουν την ικανότητα να κάνουν τροποποιήσεις στις πρωτεΐνες σηματοδότησης. Τα ROS αποτελούνται από ρίζες υπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$), υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), ρίζες υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), κ.λπ. (Yaxian Tian, Zhaoju Tian, Yanrong Dong, Xiaohui Wang, 2021) Τα ερυθροκύτταρα παίζουν μεγάλο ρόλο στην ισορροπία της οξειδοαναγωγής στο αίμα. Βασική κυτταροπλασματική πρωτεΐνη των ερυθροκυττάρων αποτελεί η αιμοσφαιρίνη (Hb) που εκπροσωπεί το 95-97%. Η πλειοψηφία των υπόλοιπων πρωτεϊνών σχετίζεται με την φύλαξη των έμμορφων συστατικών του αίματος από το οξειδωτικό στρες. Η Hb, λοιπόν, παίζει σπουδαίο ρόλο όσον αφορά την έναρξη του οξειδωτικού στρες στα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα οποία δύναται να τα καταστρέψουν εξωγενή οξειδωτικά. Η αυτοοξειδωση της αιμοσφαιρίνης προκαλεί την παραγωγή μιας ρίζας υπεροξειδίου, όπου η καταλυόμενη ή αυθόρμητη διάσπαση αυτής καταλήγει σε παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Επομένως, λόγω και των δύο οξειδωτικών προκαλείται ημιχρωμία, αποικοδόμηση της αίμης και απελευθέρωση ελεύθερου σιδήρου. Ο ελεύθερος σίδηρος λειτουργεί ως καταλύτης σε αντιδράσεις ελεύθερων ριζών. Σε περίπτωση ανισορροπίας της οξειδοαναγωγής προκαλείται οξειδωτικό στρες που μπορεί να συσχετίζεται με υπερπαραγωγή ROS καθώς και μη επαρκή ανικανότητα του αντιοξειδωτικού συστήματος. (Gwozdziński, Pieniazek en Gwozdziński, 2021)

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) αποτελούν μόρια σηματοδότησης που υπάρχουν ανεξάρτητα και εμπεριέχουν ένα ή περισσότερα άτομα οξυγόνου καθώς και τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Αυτό το σύνολο περιέχει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου. Υπό κανονικές συνθήκες, κατά την αερόβια αναπνοή ή κατά τις φλεγμονώδεις διεργασίες δημιουργούνται μικρές ποσότητες ROS στα κύτταρα του ήπατος και στα μακροφάγα. Τα ROS, επιπλέον, οδηγούν τα κύτταρα σε διαφοροποίηση και απόπτωση και, συνεπώς, συντελούν στην γήρανση. Παράλληλα, συμβάλλουν στους μυϊκού σπασμούς, στη ρύθμιση της τάσης προς τα τοιχώματα των αγγείων ή αλλιώς του αγγειακού

τόνου και τέλος, προσδιορίζει τόσο την βακτηριόσταση όσο και την βακτηριοκτόνο δράση. Η ιδιαίτερα αυξημένη έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, το μακροχρόνιο άγχος, η οξεία σωματική άσκηση, η ανθυγιεινή διατροφή και η κατανάλωση διεγερτικών είναι παράγοντες που οδηγούν σε υπερβολικό σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Φυσιολογικά, ισορροπεί η παραγωγή και η απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών από το οργανισμό. Η υπέρμετρη παραγωγή ελεύθερων ριζών συντείνει στο οξειδωτικό στρες και προκαλεί βλάβες τόσο σε μόρια όσο και σε κύτταρα. Τα ROS in vitro μπορούν να προκαλέσουν χημικές μεταλλάξεις καθώς και να επιδράσουν βλαπτικά στις πρωτεΐνες μέσω συσσωμάτωσης ή μετουσίωσης, στα λιπίδια μέσω υπεροξειδωσης, στους υδατάνθρακες και στα νουκλεοτίδια με μεταβολές στη δομή του DNA. Αυτές οι αλλοιώσεις ευθύνονται για διάφορες ασθένειες αφού το οξειδωτικό στρες έχει πολύ επιβλαβή επιρροή στο κυκλοφοριακό, το αναπνευστικό και το νευρικό σύστημα. (Jakubczyk *et al.*, 2020)

Γ.2 Πηγές ROS

Γ.2.1 Ενδογενείς πηγές ROS

Οι κύριες ενδοκυτταρικές πηγές ROS είναι η οξειδάση NADPH (NOX) και τα μιτοχόνδρια. Κάποιοι δευτερεύοντες πηγές είναι η οξειδάση της ξανθίνης (XO), η μη συζευγμένη συνθάση (NO), το κυτόχρωμα p450, οι υπεροξειδάσες και οι κυκλοοξυγενάσες.

Η οξειδάση NADPH (NOX) ή αλλιώς οξειδάση αναπνευστικής έκρηξης (RBOHs) αποτελεί την κυριότερη ενδογενή πηγή παραγωγής ROS. Οι επτά ισομορφές της οικογένειας NOX (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, Duox1 και Duox2) βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις και ενεργοποιούν διαφορετικούς τύπους ROS. Όλες οι ισομορφές αποτελούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το NADPH στον συμπαράγοντα FAD. Πιο συγκεκριμένα, η παραγωγή των ROS ξεκινά με το NADPH να δεσμεύεται στην περιοχή της αφυδρογονάσης. Εκείνη την στιγμή, τα ηλεκτρόνια ξεκινούν να μεταφέρονται πρώτα από το υπόστρωμα στον συμπαράγοντα FAD και

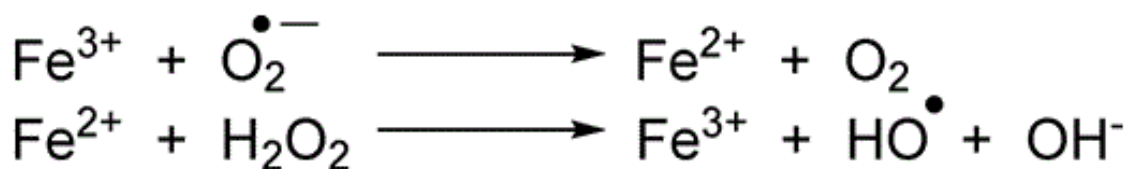
μετέπειτα στις δύο ομάδες αίμης της διαμεμβρανικής περιοχής. Ο δέκτης ηλεκτρονίων είναι το οξυγόνο, το οποίο υπόκειται αναγωγή ώστε να δημιουργηθεί υπεροξειδίο ή υπεροξειδίο του υδρογόνου. (de Almeida *et al.*, 2022)

Τα μιτοχόνδρια παράγουν και αυτά ελεύθερες ρίζες λόγω της μεγάλης προσβασιμότητας που έχει το οξυγόνο στο συγκεκριμένο οργανίδιο. Τα μιτοχονδριακά ROS παράγονται στην αναπνευστική αλυσίδα ή αλλιώς στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) με την διαφυγή ηλεκτρονίων και στην συνέχεια τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών που έχουν κυρίως την μορφή ρίζας υπεροξειδίου (O_2^-) και στην συνέχεια μετατρέπεται σε H_2O_2 . Αυτή η απελευθέρωση ηλεκτρονίων δύναται να προκληθεί από την αντίστροφη ροή ηλεκτρονίων και την λειτουργία των συμπλόκων I και II, τα οποία αποτελούν σημαντικά ένζυμα αναπνευστικής αλυσίδας, ως δότες ηλεκτρονίων καθώς και από την εν μέρει αναστολή των συμπλεγμάτων λόγω υπερπόλωσης της μεμβράνης του μιτοχονδρίου, από χημικές ενώσεις και από συνθήκες ισχαιμίας. Ακόμη, πρωτεΐνες και σύμπλοκα όπως είναι τα ένζυμα του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) μπορούν, επίσης, να παράγουν O_2^- . Επιπλέον, πρωτεΐνες που ανήκουν στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, όπως το κυτόχρωμα P450, παράγουν κι αυτές ROS. Τέλος, το ένζυμο μονοαμινοξειδάση (MAO) που βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη του οργανιδίου χρησιμοποιεί μονοαμίνες οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή αλδευδών και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Παραγωγή ROS προκαλεί και η αναγωγή του κυτοχρώματος b5 που ανήκει και αυτή στην εξωτερική μεμβράνη. (Angelova en Abramov, 2018)

Η οξειδάση της ξανθίνης (XO) συμμετέχει στον μεταβολισμό της πουρίνης. Συγκεκριμένα, στα δύο τελευταία στάδια καταλύεται η οξειδωτική υδροξυλίωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Το O_2 δέχεται ταχύτατα ηλεκτρόνια δημιουργώντας $O_2^{\cdot -}$ και H_2O_2 . Τα ηλεκτρόνια αυτά προέρχονται από την υποξανθίνη και την οξειδωση της ξανθίνης από την XO. (de Almeida *et al.*, 2022)

Εκτός από τα παραπάνω, άλλες ενδοκυτταρικές πηγές ROS αποτελούν μερικά ένζυμα όπως το φλαβοένζυμο ERO1 στο ενδοπλασματικό δίκτυο, οι κυκλοοξυγενάσες, η οξειδάση των πολυαμίνων και των αμινοξέων, οι συνθάσες

μονοξειδίου του αζώτου που παράγουν οξειδωτικά κατά την φυσιολογική τους ενζυμική δράση. Τα ελεύθερα ιόντα σιδήρου ή ιόντα χαλκού τα οποία απελευθερώνονται είναι ικανά να μεταβάλλουν το $O_2^{\bullet-}$ και το H_2O_2 σε OH^{\bullet} , διαδικασία γνωστή ως αντίδραση Fenton. (Krumova en Cosa, 2016)



Εξίσωση 1: Η αντίδραση Haber-Weiss συμβαίνει σε δύο στάδια, το δεύτερο στάδιο είναι γνωστό ως αντίδραση Fenton. (de Almeida *et al.*, 2022)

Γ.2.2 Εξωγενείς πηγές ROS

Εκτός των ενδογενών πηγών υπεύθυνες για την παραγωγή ROS είναι και κάποιες περιβαλλοντικές πηγές. Σε αυτές συγκαταλέγονται οι ρύποι, το υπεριώδες φως και η ιονίζουσα ακτινοβολία. (Krumova en Cosa, 2016)

Η ατμόσφαιρα περιέχει ποικίλες επιβλαβή σωματίδια μεταξύ των οποίων είναι μέταλλα (βαρέα μέταλλα όπως Fe, Cu, Co, Cr και μέταλλα μετάπτωσης όπως Cd, Hg, Pb, As) και χημικές ουσίες σαν τα ROS και τα RNS και μπορούν να οδηγήσουν σε οξειδωτικό στρες ή φλεγμονή αφού πρώτα εισαχθούν στον οργανισμό μέσω της αναπνοής ή της κατάποσης.

Συνάμα, τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα και η ακτινοβολία αυξάνουν τα ROS και μπορούν να ενισχύσουν την οξειδωτική βλάβη σε πρωτεΐνες, DNA και λιπίδια. (de Almeida *et al.*, 2022)

Ένας άλλος στρεσογόνος παράγοντας είναι το αλκοόλ. Για τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών ευθύνεται ο μεταβολισμός της αιθανόλης. Η κλασική οδός καταλύεται από την αλκοολική αφυδρογονάση και παράγει ακεταλδεΐδη με αποτέλεσμα την δημιουργία ελεύθερων ριζών. (Das en Vasudevan, 2007)

Γ.3 Παραγωγή ROS στα RBCs

Παρόλο που τα ερυθρά αιμοσφαίρια δεν έχουν οργανίδια όπως είναι τα μιτοχόνδρια που αποτελούν κύρια πηγή παραγωγής ROS, είναι ικανά να δημιουργούν οξειδωτικές ρίζες επειδή φέρουν μεγάλες ποσότητες σιδήρου και οξυγόνου ενωμένες με την αιμοσφαιρίνη τους.

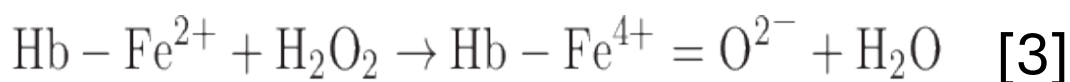
Φυσιολογικά, η Hb αυτοοξειδώνεται και παράγει μεθαιμοσφαιρίνη (metHb) και ανιόν ρίζας υπεροξειδίου (Εξίσωση 2). Η αυτοοξείδωση της Hb είναι η κυριότερη πηγή ROS στα RBCs.



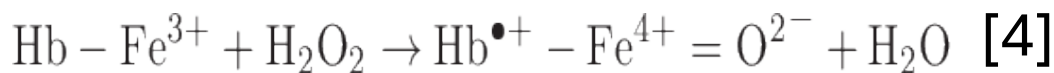
Εξίσωση 2: Αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης.

Παράλληλα, ο ελεύθερος σίδηρος (Fe^{3+}) είναι, επίσης, υπεύθυνος για την παραγωγή ROS και εντός των RBCs. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως πραγματοποιείται η αντίδραση Haber-Weiss, η οποία περιλαμβάνει και την αντίδραση Fenton.

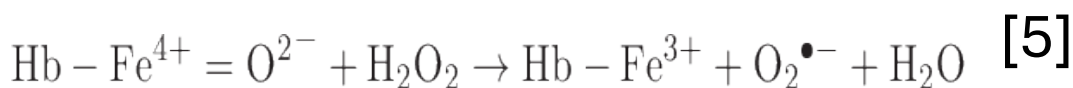
Μία άλλη σημαντική αντίδραση που οδηγεί στην δημιουργία ελεύθερων ριζών είναι η αντίδραση του H_2O_2 με την Hb και την metHb που προκαλεί αποικοδόμηση της αίμης και απελευθέρωση ελεύθερων μορίων σιδήρου (εξισώσεις 4, 5, 6) ή την παραγωγή της ισχυρά οξειδωτικής Hb- Fe^{4+} ως προϊόν της αντίδρασης (εξίσωση 3). (Kuhn *et al.*, 2017)



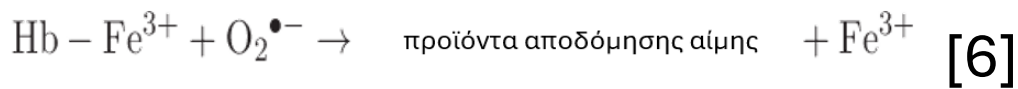
Εξίσωση 4



Εξίσωση 3



Εξίσωση 5



Εξίσωση 6

Γ.4 Αντιοξειδωτικά Συστήματα των RBCs

Τα RBCs έχουν πολυάριθμα αντιοξειδωτικά συστήματα ώστε να μπορούν να αντιμετωπίσουν το οξειδωτικό στρες και έτσι να καταφέρουν να επιβιώσουν 120 ημέρες στην κυκλοφορία του αίματος.

Αρχικά, η δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα και καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου σε οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου. (Möller *et al.*, 2023) Η δράση του ενζύμου αφορά τον έλεγχο των επιπέδων ROS με αποτέλεσμα τον περιορισμό της επιβλαβούς δράσης των μορίων αυτών. (Wang *et al.*, 2018)

Οι υπεροξειρεδοξίνες (Prx) είναι αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες που ελαττώνουν τα επίπεδα H_2O_2 και αποτρέπει την αυτοοξειδωση της αιμοσφαιρίνης. Στα RBCs υπάρχουν τρεις ισομορφές τους: Prx1, Prx2 και Prx6, με την Prx2 να είναι η αφθονότερη. (Orrico *et al.*, 2023)

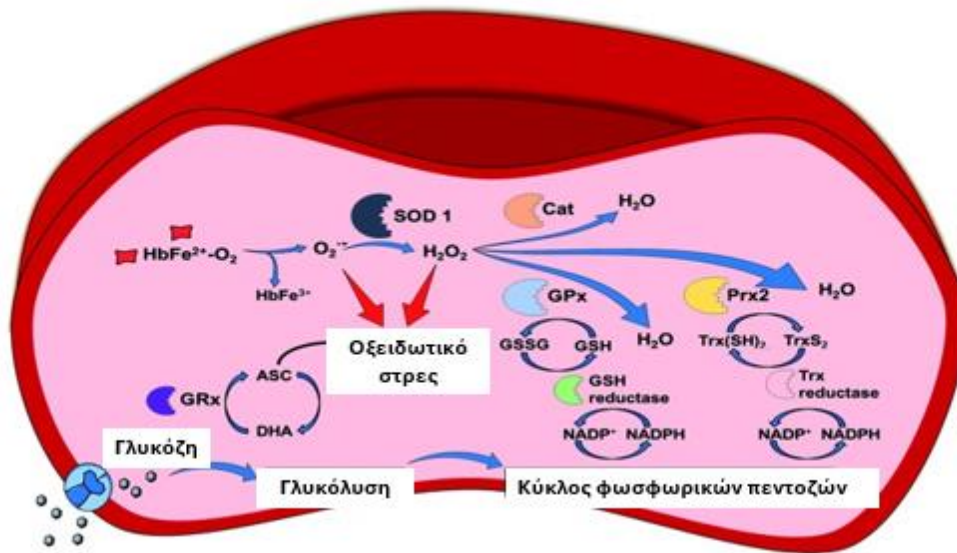
Η θειορεδοξίνη (Trx) είναι μία μονομερής πρωτεΐνη, μικρού μοριακού βάρους. Τα RBCs διαθέτουν Trx1 η οποία παίζει τον ρόλο του δότη ηλεκτρονίων σε διάφορα ένζυμα όπως είναι η Prx2 και έτσι συμβάλλει σημαντικά στην αντιοξειδωτική άμυνα.

Η (TR) και συγκεκριμένα η TR1 συμμετέχει στην δραστικά στην αντιοξειδωτική δράση των RBCs. Κάθε υπομονάδα της TR1 φέρει θέσεις δέσμησης FAD και NADPH. Το NADPH λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων προς το FAD.

Οι καταλάσες (CAT) λειτουργούν ως καταλύτες στην αποσύνθεση του H_2O_2 σε νερό και O_2 αποτρέποντας πιθανές οξειδωτικές βλάβες. (Möller *et al.*, 2023)

Μερικά άλλα σημαντικά αντιοξειδωτικά μόρια των RBCs είναι η γλουταθειόνη (GSH), το ασκορβικό οξύ γνωστό και ως βιταμίνη c, η α – τοκοφερόλη γνωστή

και ως βιταμίνη E, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και το ουρικό οξύ.
(Brieger *et al.*, 2012)



Εικόνα 9: Ανατύπωση αντιοξειδωτικών συστημάτων ερυθρού αιμοσφαιρίου. (Kuhn *et al.*, 2017)

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Δ ΜΕΡΟΣ: Υλικά και μέθοδοι

Δ.1: Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα εργασία στοχεύει στον υπολογισμό των επιπέδων ενδοκυττάρων οξειδωτικών ριζών με ή χωρίς εξωκυττάριο ερέθισμα καθώς και της οξειδωτικής αιμόλυσης των ερυθροκυττάρων έπειτα από την επώασή τους με νανοσυστήματα σχεδιασμένα ως φορείς φαρμάκων. Για τον σκοπό αυτό, αναλύθηκαν δείγματα από 15 διαφορετικούς αιμοδότες τα οποία αναλύθηκαν πριν και μετά από 4 ώρες επώαση σε 3 διαφορετικά διαλύματα νανοϋλικών. Πιο συγκεκριμένα, το NP1 περιέχει νανοσωματίδια αλγινικού με εγκλωβισμένη χρυσίνη, το NP2 περιέχει νανοσωματίδια αλγινικού χωρίς χρυσίνη και το NP3 περιέχει ελεύθερη χρυσίνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα με 20% αιματοκρίτη.

Δ.2: Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

Οι αιμοδότες που προσφέρθηκαν να συμμετάσχουν στην μελέτη είναι φοιτητές και καθηγητές του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής και ανήκουν σε ένα ηλικιακό εύρος μεταξύ 20 και 48 ετών.

Δ.2.1: Συλλογή δειγμάτων

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε σωληνάρια vacutainer με κιτρικό νάτριο. Για την παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε 1 σωληνάριο για κάθε αιμοδότη.

Δ.2.2: Επεξεργασία δειγμάτων

Αμέσως μετά την αιμοληψία, γίνεται ένας πρώτος γενικός έλεγχος στα δείγματα και παράλληλα κατασκευάζεται 20% αιματοκρίτης. Στην συνέχεια, προστίθενται τα διαλύματα νανοσυστημάτων και ακολουθούν 4 ώρες επώασης σε ξηρό

κλίβανο με κίνηση ο οποίος έχει ρυθμιστεί στους 37°C. Έτσι, σε κάθε αιμοδότη αντιστοιχούν 5 δείγματα: 1 control αρχικό με ολικό αίμα, 1 δείγμα που περιέχει το NP1, 1 δείγμα που περιέχει το NP2, 1 δείγμα που περιέχει το NP3 και 1 control που περιέχει αντίστοιχη ποσότητα PBS με την ποσότητα νανοϋλικών που προστέθηκαν. Τα 4 τελευταία αφορούν αίμα με 20% αιματοκρίτη και επωάζονται στον κλίβανο.

Δ.3: Υλικά – αντιδραστήρια – όργανα

- Φυγόκεντρος
- PBS

Δ.3.1: Πορεία πειράματος

Για την κατασκευή αιματοκρίτη 20% απαιτείται μία αρχική φυγοκέντρηση και η αραίωση των πακεταρισμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων $\frac{1}{4}$ σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

Δ.4: ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΑΙΜΟΛΥΣΗ

Δ.4.1: Αρχή μεθόδου

Στο πείραμα της οξειδωτικής αιμόλυσης προκαλείται αιμόλυση στα ερυθρά αιμοσφαίρια με την χρήση της φαινυλοδραζίνης.

Δ.4.2: Υλικά – αντιδραστήρια – όργανα

- Φυγόκεντρος
- Αυτόματες πιπέτες

- Tips
- PBS
- Επωαστικός κλίβανος
- φαινυλδραζίνη PHZ 17nM
- Eppendorfs
- Vortex
- Κυψελίδες UV
- Φωτόμετρο

Δ.4.3: Πορεία πειράματος

Αρχικά, γίνεται επώαση του δείγματος με φαινυλδραζίνη PHZ 17nM για 1 ώρα σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο στους 37 °C. Μετά την επώαση, πραγματοποιείται μία φυγοκέντρηση σε 1000g για 10 λεπτά και στη συνέχεια, το υπερκείμενο αραιώνεται 1/10 με PBS. Τέλος, γίνεται φωτομέτρηση σε 3 μήκη κύματος: 380, 415 και 450 nm.

Δ.5: Κυτταρομετρία ροής

Δ.5.1: Αρχή μεθόδου

Το κυτταρόμετρο ροής είναι ένα όργανο το οποίο αναλύει σε γρήγορο χρόνο πολλές παραμέτρους κυττάρων ή άλλων σωματιδίων τα οποία βρίσκονται σε ρυθμισμένο διάλυμα με βάση το άλας ρίχνοντας φως σε εκείνα όσο περνούν ένα - ένα μπροστά από μια πηγή φωτός λέιζερ. (Givan, 2011) Κάθε ένα κύτταρο αναλύεται ως προς την διασπορά φωτός που ανήκει στο ορατό φάσμα και ως προς έναν ή περισσότερους παράγοντες φθορισμού. Οι κατευθύνσεις στις οποίες μετρείται η σκέδαση του ορατού φωτός είναι δύο διαφορετικές. Η μία είναι η πρόσθια κατεύθυνση (FSC) και η άλλη η πλάγια σκέδαση, στις γωνία

90° (SSC). Η FSC σχετίζεται με το μέγεθος ενώ η SSC με την εσωτερική πολυπλοκότητα του κυττάρου.

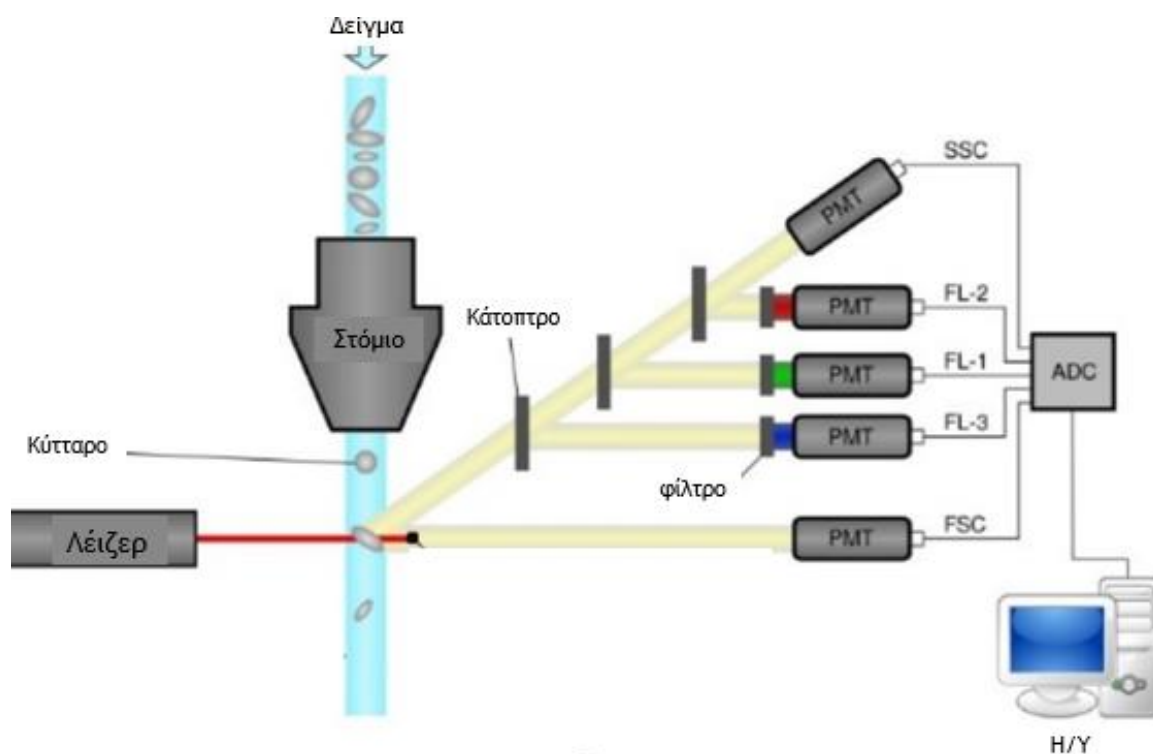
Στην τεχνική αυτή, χρησιμοποιούνται πολυάριθμα φθορίζοντα αντιδραστήρια όπως είναι τα αντισώματα συζευγμένα με φθορισμό, οι βαφές δέσμευσης DNA, οι βαφές βιωσιμότητας, οι χρώσεις δεικτών ιόντων καθώς και οι φθορίζουσες πρωτεΐνες έκφρασης (McKinnon, 2018).

Την στιγμή που μία ακτίνα λέιζερ προσπίπτει σε ένα σωματίδιο, είτε θα σκεδαστεί, είτε οι φθορίζουσες ενώσεις θα απορροφήσουν την ακτινοβολία και θα εκπέμψουν μία μεγαλύτερου μήκους κύματος και συνεπώς μικρότερης ενέργειας (Σταθοπούλου, 2020).

Δ.5.2: Συστήματα που απαρτίζουν ένα κυτταρόμετρο ροής

Τα συστήματα από τα οποία αποτελείται ένα κυτταρόμετρο ροής είναι τα εξής 5:

1. Υδραυλικό σύστημα, το οποίο διατηρεί την ομαλή νηματική ροή των σωματιδίων, έτσι ώστε να μπορούν να περνούν ένα – ένα μπροστά από την ακτίνα λέιζερ.
2. Σύστημα λέιζερ, με το οποίο εκπέμπονται στενές παράλληλες ακτίνες φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος κάθετα στην διεύθυνση ροής συναντώντας τα υπό μελέτη σωματίδια
3. Οπτικό σύστημα, στο οποίο ανήκουν τα κάτοπτρα και τα φίλτρα του οργάνου και με αυτά φτάνει η σκεδαζόμενη ακτινοβολία στους διάφορους φωτοπολλαπλασιαστές ανάλογα με το μήκος κύματος.
4. Σύστημα φωτοπολλαπλασιαστών (PMT), οι οποίοι μετασχηματίζουν το σήμα φωτός σε ηλεκτρικό και ενισχύουν την έντασή του.
5. Σύστημα επεξεργασίας σημάτων, στο οποίο ανήκει ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής όπου γίνεται επεξεργασία των σημάτων με γραφήματα. (Σταθοπούλου, 2020)



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού ενός κυτταρόμετρου ροής στην οποία διακρίνονται και τα 5 συστήματα που απαρτίζουν το όργανο. (O'Neill et al., 2013)

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων ROS με την κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο 2',7'-διοξική διχλωροφλουορεσκίνη (DCFDA). Το DCFDA είναι μια μη φθορίζουσα, λιπόφιλη και μη ιονική ένωση ικανή να διαπερνά τις ερυθροκυτταρικές μεμβράνες. Μόλις εισέλθει στα κύτταρα παράγει 2',7'-διχλωροφλουορεσκίνη (DCFH). Το DCFH μη φθορίζον, δεν μπορεί να διαπεράσει την μεμβράνη και αντιδρά με τις ενδοκυτταρικές ελεύθερες ρίζες ROS. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης αυτής είναι η παραγωγή φθορίζουσας 2', 7'-διχλωροφλουορεσκίνη (DCF). Ο φθορισμός αυτός ελέγχεται στο κυτταρόμετρο ροής και είναι ανάλογος των επιπέδων ROS στο κύτταρο. (Figuerola, Asaduzzaman en Young, 2018)

Δ.5.2: Υλικά – αντιδραστήρια – όργανα

- Φυγόκεντρος
- Eppendorfs
- PBS – glucose BSA 0,1%
- DCFDA
- PBS
- Σωληνάρια κυτταρομετρίας
- Επώαστικός κλίβανος
- Κυτταρόμετρο

Δ.5.3: Προετοιμασία δείγματος αίματος για κυτταρομετρία ροής

Αρχικά, κατασκευάζεται αιματοκρίτης 4%. Με αραιώση 1/5 χρησιμοποιώντας PBS. Σε ένα σωληνάριο για το αρνητικό (negative) τοποθετείται PBS – glucose BSA 0,1% και αιματοκρίτης 4%. Παράλληλα, σε άλλο σωληνάριο για το δείγμα τοποθετούνται PBS – glucose BSA 0,1%, αιματοκρίτης 4% και DCFDA το οποίο αποτελεί αντιδραστήριο που διαπερνά τις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων, οξειδώνεται από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) και φθορίζει. Ακολουθεί 1 ώρα επώασης σε κλίβανο με ανακίνηση στους 37°C. Μετά την επώαση τοποθετούνται σε ένα σωληνάριο κυτταρομετρίας PBS glucose BSA 0,1% και δείγμα και σε ένα άλλο σωληνάριο τοποθετούνται PBS glucose BSA 0,1% και το αρνητικό. Τέλος, πραγματοποιείται έλεγχος έντασης φθορισμού με κυτταρομετρία ροής.

Ε ΜΕΡΟΣ: Αποτελέσματα

Όλα τμήματα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά και έγινε κατασκευή γραφημάτων με τη χρήση του προγράμματος GraphPad Prism 8.0.3.

Ε.1: Αιματολογικές παράμετροι

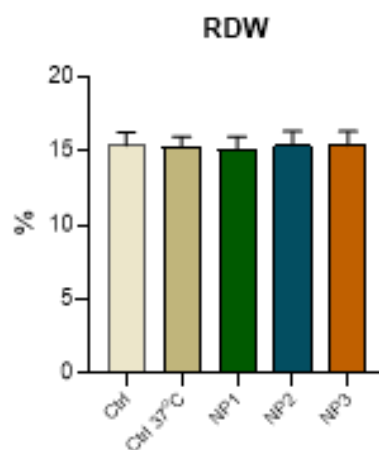
Πριν από κάθε διεξαγωγή πειράματος έγινε αιματολογική ανάλυση και έλεγχος των εξής παραμέτρων: αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs), αιμοσφαιρίνη (Hb), αιματοκρίτης (HCT), μέσος όγκος ερυθρών αιμοσφαιρίων (MCV), μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης (MCH), μέση πυκνότητα αιμοσφαιρίνης (MCHC) και εύρος κατανομής των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RDW). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων αναπαρίστανται αναλυτικά στα διαγράμματα παρακάτω (Διαγράμματα 1 – 7).

Το αιματολογικό προφίλ των ασθενών δεν έδειξε να είναι παθολογικό. Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός των RBCs φάνηκε να βρίσκεται εντός των φυσιολογικών ορίων με την μέση τιμή να είναι $4,41 \pm 0,52$ ($\times 10^6/\mu\text{l}$). Το ίδιο παρατηρείται και για την Hb με $13,11 \pm 1,56$ (gr/dl) αλλά και για τον Hct με $38,06 \pm 4,47\%$. Όσον αφορά τον MCV και τον MCH ήταν και αυτοί στα πλαίσια των φυσιολογικών τιμών με $86,54 \pm 2,40$ (fl) και $29,76 \pm 1,21$ (pg) αντίστοιχα. Ο MCHC ήταν, επίσης, στα φυσιολογικά επίπεδα με την μέση του τιμή να είναι $34,44 \pm 1,08$ (g/dl). Τέλος, το RDW ήταν ελαφρώς αυξημένο σε σύγκριση με τα φυσιολογικά όρια χωρίς να ξεπερνά σημαντικά τα επίπεδα που ορίζονται ως φυσιολογικά αφού οι μέση τιμή ήταν $15,39 \pm 0,88$ (CV%). (Πίνακας 2)

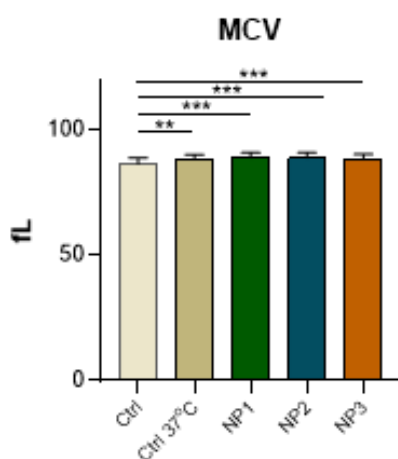
ΠΙΝΑΚΑΣ ΓΕΝΙΚΩΝ	ΔΟΤΕΣ	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ
RBCs (x 10⁶ / μl)	4,41 ± 0,52	♂ : 4,2 – 6,4
		♀ : 3,6 – 5
Hb (gr/dl)	13,11 ± 1,56	♂ : 14 – 17
		♀ : 12 – 16
Hct (%)	38,06 ± 4,47	♂ : 42 – 52
		♀ : 37 – 47
MCV (fl)	86,54 ± 2,40	82 – 98
MCH (pg)	29,76 ± 1,21	26 – 34
MCHC (g/dl)	34,44 ± 1,08	31 – 37
RDW (CV%)	15,39 ± 0,88	11,5 – 14,5

Πίνακας 2: Τα αποτελέσματα των γενικών αναλύσεων των δειγμάτων. Στην πρώτη στήλη βρίσκεται η τιμή που εξετάστηκε, στην δεύτερη στήλη φαίνονται οι μέσες τιμές και στην τρίτη στήλη τα φυσιολογικά όρια. Οι τιμές προέκυψαν από το μέσο όρο ± την τυπική απόκλιση.

Στο RDW δεν παρατηρούνται διαφορές σημαντικής στατιστικής σημασίας μεταξύ των μέσων τιμών για τα NP1, NP2, NP3, Ctr 37°C και Ctr. (Διάγραμμα 1) Οι μέσες τιμές είναι: Ctr=15,39 ± 0,8798%, Ctr 37°C = 15,29 ± 0,7112%, NP1 = 15,12 ± 0,8871%, NP2 = 15,40 ± 0,9755%, NP3 = 15,40 ± 0,9635%.



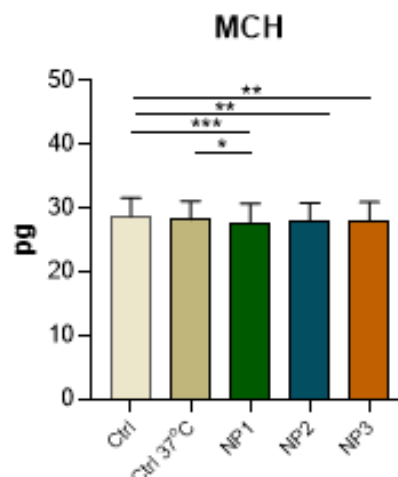
Διάγραμμα 1:Απεικόνιση των μέσων τιμών του εύρους κατανομής των ερυθρών αιμοσφαιρίων για το Ctr, το Ctr 37°C, το NP1, το NP2 και το NP3.



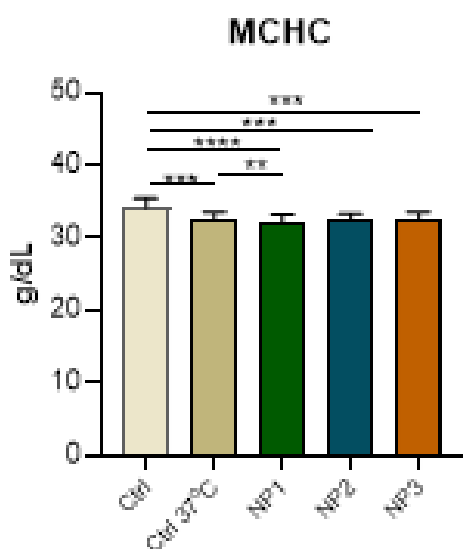
Διάγραμμα 2:Απεικόνιση των μέσων τιμών του μέσου όγκου των ερυθρών αιμοσφαιρίων για το Ctr, το Ctr 37°C, το NP1, το NP2 και το NP3. Με αστερίσκο (*) σημειώνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

Αντίθετα, στο MCV υπάρχουν στατιστικές διαφορές. Αναλυτικότερα, παρουσιάστηκε αύξηση σε παρουσία NPs καθώς και αύξηση στο Ctr 37°C σε σχέση με το Ctr. (Διάγραμμα 2) Πιο αναλυτικά τα p-value για Ctr και NP1, Ctr και NP2 και Ctr και Ctr 37°C είναι 0,0002 ενώ το p-value για Ctr και NP3 είναι 0,0005. Οι μέσες τιμές έχουν ως εξής: Ctr = 86,54 ± 2,402 fL, Ctr 37°C = 88,62 ± 1,710 fL, NP1 = 89,00 ± 2,041 fL, NP2 = 89,08 ± 2,060 fL, NP3 = 88,85 ± 1,625 fL. Μεταξύ των NPs δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές.

Από την άλλη, στο MCH παρατηρήθηκε μείωση σε παρουσία NPs. (Διάγραμμα 3) Ενδεικτικότερα, το p-value μεταξύ Ctr και NP1 είναι 0,008, μεταξύ Ctr και NP2 είναι 0,0055 και μεταξύ Ctr και NP3 είναι 0,0038. Τέλος, ακόμη μια σοβαρή διαφορά είναι αυτή μεταξύ NP1 και του Ctr 37°C, όπου το p-value είναι 0,0245. Οι μέσες τιμές είναι: Ctr= 28,75 ± 2,904 pg, Ctr 37°C = 28,21 ± 2,873 pg, NP1 = 27,75 ± 2,990 pg, NP2 = 28.01 ± 2,860 pg, NP3 = 27,98 ± 2,990 pg.



Διάγραμμα 3: Απεικόνιση των μέσων τιμών της μέσης περιεκτικότητας αιμοσφαιρίνης για το Ctr, το Ctr 37°C, το NP1, το NP2 και το NP3. Με αστερίσκο (*) σημειώνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

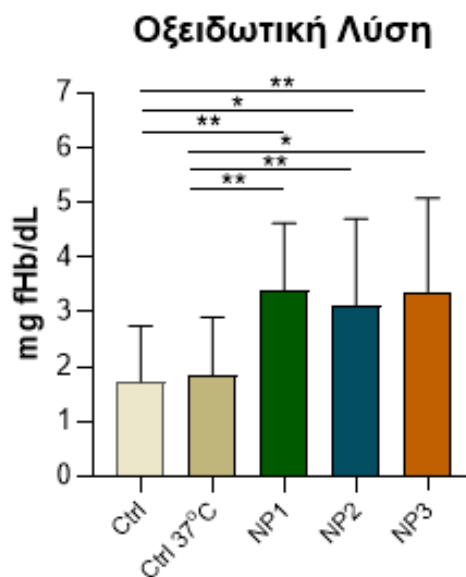


Διάγραμμα 4: Απεικόνιση των μέσων τιμών της μέσης πυκνότητας της αιμοσφαιρίνης για το Ctr, το Ctr 37°C, το NP1, το NP2 και το NP3. Με αστερίσκο (*) σημειώνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

Τέλος, στην μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων (MCHC) όταν γίνεται σύγκριση μεταξύ του Ctr με όλα τα NPs παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση. Πιο συγκεκριμένα το p-value μεταξύ Ctr και NP1 ισούται με μικρότερο του 0.0001, μεταξύ Ctr και NP2 ισούται με 0,0003 και μεταξύ Ctr και NP3 ίσο με 0,0004. Ταυτόχρονα, παρατηρείται μείωση του Ctr 37°C συγκριτικά με το Ctr, όπου το p-value είναι 0,0004. Ακόμη, στατιστική σημασία φάνηκε να έχει το NP1 σε σχέση με το Ctr 37°C με p-value ίσο με 0,0087. (Διάγραμμα 4)

Όσον αφορά τις μέσες τιμές αυτές είναι: Ctr = 34,17 ± 1,259 g/dL, Ctr 37°C = 32,63 ± 0,9184 g/dL, NP1 = 32,09 ± 1,086 g/dL, NP2 = 32,41 ± 0,8988 g/dL, NP3 = 32,38 ± 1,185 g/dL.

Στο πείραμα της οξειδωτικής λύσης παρατηρούνται αρκετές στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ NPS και Ctrs. Πιο συγκεκριμένα, στο Διάγραμμα 5, παρατηρείται αύξηση συγκρίνοντας το Ctr με τα NP1, NP2 και NP3 με τα p-value να είναι 0.0029, 0.0309 και 0.0020 αντίστοιχα. Παρομοίως, παρατηρείται αύξηση συγκρίνοντας και το Ctr 37°C με τα NPs με τις τιμές του p-value να είναι 0,0078 για το NP1, 0,0068 για το NP2 και 0,0195 για το NP3. Μεταξύ του Ctr και του Ctr 37°C δεν υπάρχει κάποια στατιστική διαφορά. Ούτε μεταξύ των NPs παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη διαφορά. Συγκεκριμένα, οι μέσες τιμές είναι οι εξής: Ctr = 1,731 ± 1,015 mg fHb/dL, Ctr 37°C = 1,837 ± 1,064 mg fHb/dL, NP1 = 3,387 ± 1,235 mg fHb/dL, NP2 = 3,107 ± 1,598 mg fHb/dL και για το NP3 = 3,366 ± 1,711 mg fHb/dL.

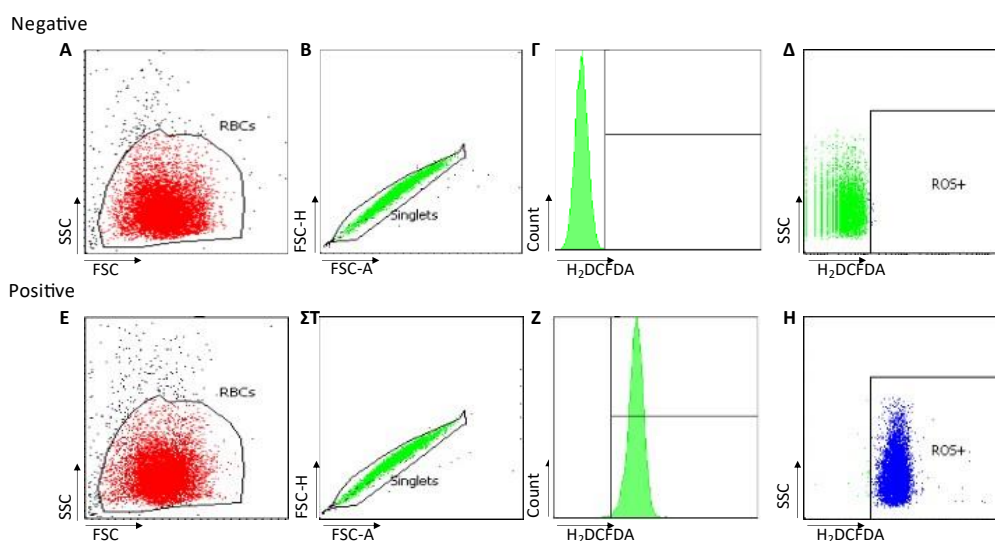


Διάγραμμα 5: Απεικόνιση των μέσων τιμών της οξειδωτικής λύσης για το Ctr, το Ctr 37°C, το NP1, το NP2 και το NP3. Με αστερίσκο (*) σημειώνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

Στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται η στρατηγική ανάλυσης των ερυθροκυττάρων που εφαρμόστηκε στην κυτταρομετρία ροής

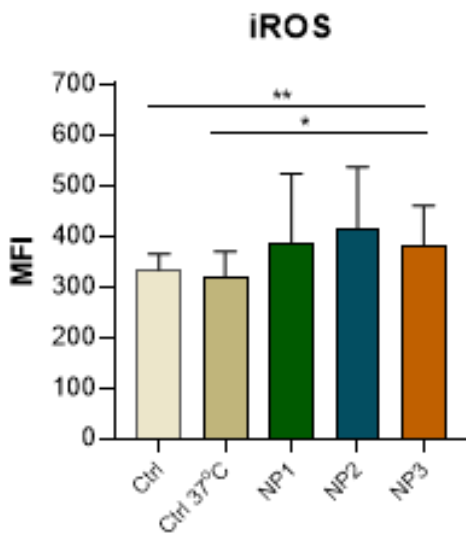
Στην πρώτη γραμμή (Α-Δ) φαίνονται τα διαγράμματα για το αρνητικό δείγμα (χωρίς προσθήκη αντιδραστήριου για τον εντοπισμό των ROS) το οποίο χρησιμοποιήθηκε ώστε να εντοπιστούν τα όρια θετικών-αρνητικών. Στη κάτω γραμμή παρουσιάζονται τα αντίστοιχα διαγράμματα (Ε-Η) για ένα θετικό δείγμα. Στα στικτογράμματα (dot plots) Α και Ε παρουσιάζεται η κατανομή των RBCs με βάση τον πρόσθιο (FSC) και πλάγιο (SSC) σκεδασμό ανάλογα με το μέγεθος και την κοκκίωση αντίστοιχα. Στα στικτογράμματα Β και ΣΤ παρατηρούνται τα μονήρη ερυθρά (singlets) σε πρόσθιο σκεδασμό ως προς το ύψος (FSC–Height) και την περιοχή (FSC–Area). Στο ιστόγραμμα Γ φαίνεται το όριο του αρνητικού δείγματος για το H₂DCFDA. Δεξιά της κάθετης γραμμής αναμένονται τα θετικά RBCs για H₂DCFDA. Στο ιστόγραμμα Ζ παρατηρείται η μετατοπισμένη

κορυφή των θετικών κυττάρων δεξιά από την κάθετη γραμμή που έχει τεθεί ως όριο και υπολογίζεται η μέση ένταση φθορισμού (Mean Fluorescence Intensity, MFI). Τέλος, στα στικτογράμματα Δ και Η παρουσιάζονται τα RBCs με βάση τον πλάγιο σκεδασμό (SSC) και το H₂DCFDA. Στο στικτόγραμμα Δ, από το αρνητικό δείγμα, φαίνεται η οριοθέτηση του πλαισίου για τα θετικά για H₂DCFDA RBCs. Στο στικτόγραμμα Η φαίνονται τα θετικά για H₂DCFDA RBCs εντός του πλαισίου (μπλε χρώμα).



Εικόνα 11: Στρατηγική ανάλυσης των ROS στα RBCs. Α και Ε) Στικτογράμματα (dot plots) κατανομής των RBCs με βάση τον πρόσθιο (FSC) και πλάγιο (SSC) σκεδασμό ανάλογα με το μέγεθος και την κοκκίωση αντίστοιχα. Β και Ζ) μονήρη ερυθρά (singlets) σε πρόσθιο σκεδασμό ως προς το ύψος (FSC-Height) και την περιοχή (FSC-Area). Γ) Στο ιστόγραμμα φαίνεται το όριο του αρνητικού δείγματος για το H₂DCFDA. Ζ) Ιστόγραμμα όπου παρατηρείται η μετατοπισμένη κορυφή των θετικών για H₂DCFDA κυττάρων δεξιά από την κάθετη γραμμή που έχει τεθεί ως όριο. Δ) Στικτόγραμμα του αρνητικού δείγματος, φαίνεται η οριοθέτηση του πλαισίου για τα θετικά για H₂DCFDA RBCs. Η) Στικτόγραμμα θετικού δείγματος όπου φαίνονται τα θετικά για H₂DCFDA RBCs εντός του πλαισίου (μπλε χρώμα).

Για τον προσδιορισμό των ROS, υπολογίσθηκε η μέση ένταση φθορισμού



Διάγραμμα 6: Απεικόνιση των μέσων τιμών της μηχανικής ευθραυστότητας για το Ctr, το Ctr 37°C, το NP1, το NP2 και το NP3. Με αστερίσκο (*) σημειώνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

(MFI: Mean Fluorescence Intensity).με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής. Στο Διάγραμμα 6, υπάρχουν μερικές στατιστικά σημαντικές διαφορές. Η μία είναι μεταξύ του Ctr και του NP3 στην οποία παρατηρείται αύξηση και το p-value είναι $0,0273 < 0,05$. Η μέση τιμή του Ctr είναι 333,9 ενώ του NP3 είναι 383,9. Η άλλη διαφορά είναι μεταξύ του Ctr 37°C και του NP3 όπου επίσης υπάρχει αύξηση με το p-value να είναι $0,0067 < 0,05$. Η μέση τιμή του Ctr 37°C είναι 318,7. Μεταξύ των υπολοίπων τιμών δεν παρατηρούνται στατικώς σημαντικές διαφορές εφόσον p-value $> 0,05$.

Z ΜΕΡΟΣ: Συζήτηση

Η παρούσα εργασία εστιάζει στην μελέτη των ενδοκυττάρων οξειδωτικών ριζών και της οξειδωτικής αιμόλυσης που υπόκεινται τα RBCs μετά από επώαση σε διαλύματα νανοϋλικών με βάση το αλγινικό οξύ και την παρουσία ή μη χρυσίνης. Αρχικά, ερευνηθήκαν σε αιματολογικό αναλυτή οι αιματολογικοί δείκτες για την παρατήρηση πιθανών επιδράσεων των νανοσυστημάτων σε αυτούς. Στη συνέχεια, έγινε πειραματικός έλεγχος ως προς το επίπεδο ελεύθερων οξειδωτικών ριζών με κυτταρομετρία ροής υπολογίζοντας τον MFI αλλά και ως προς την οξειδωτική αιμόλυση των RBCs.

Ως προς τις αιματολογικές παραμέτρους, αυτές δείχνουν ένα φυσιολογικό προφίλ δοτών χωρίς παθολογικά ευρήματα στις τιμές και καμία σοβαρή μεταβολή των δεικτών μετά την επώαση στα διαλύματα νανοσυστημάτων NP1, NP2 και NP3. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας φορείς με χρυσίνη και σε συνθήκες παρόμοιες με την παρούσα εργασία είχαν ίδια αποτελέσματα στο αιματολογικό προφίλ. Πιο συγκεκριμένα, οι παράμετροι RBC, HCT, MCV, MCH, MCHC και RDW ήταν όλοι εντός φυσιολογικών ορίων. (Halevas *et al.*, 2021b)

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της οξειδωτικής αιμόλυσης καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι παρόλο που υπάρχει αύξηση της οξειδωτικής λύσης σε παρουσία των NPs, αυτή δεν επιδεινώθηκε ιδιαίτερα. Παρατηρείται, επίσης, ότι το αλγινικό οξύ άνευ χρυσίνης προκαλεί μικρότερη οξειδωτική αιμόλυση από την παρουσία χρυσίνης. Παρόμοια αποτελέσματα είχε και έρευνα που έγινε πάνω σε πολυμερικά νανοσυστήματα όπου έδειξε ότι τα πολυμερή νανοσωματίδια προς τα ανθρώπινα RBCs δεν ενίσχυσαν την οξειδωτική αιμόλυση σε οποιαδήποτε αναλογία. (Pan *et al.*, 2016)

Ως προς τον προσδιορισμό των οξειδωτικών ριζών, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν πως δεν προκαλείται υπερπαραγωγή ROS ώστε να είναι βλαβερά προς τα RBCs. Τα επίπεδα ROS που παράχθηκαν δεν υποδεικνύουν τοξικότητα των NPs. Η έκθεση των κυττάρων σε NPs ενεργοποιεί την παραγωγή ROS. (Arathi, K. B. Megha, 2023) Ωστόσο, τα κύτταρα είναι ικανά να αποτοξινώνουν τις ελεύθερες ρίζες με το αντιοξειδωτικό τους σύστημα

που αναλύθηκε παραπάνω. Ταυτόχρονα, έχει αποδειχθεί πως το αλγινικό έχει σπουδαία αντιοξειδωτική δράση μέχρι και τους 50°C. (Nogueira *et al.*, 2022) Σε άλλη μελέτη, αποδείχτηκε ότι τα επικαλυμμένα συστήματα με σακχαρίτες προκαλούν αμελητέα παραγωγή ROS. (Wydra *et al.*, 2015)

Με τα παραπάνω δεδομένα, φαίνεται πως τόσο τα νανοσυστήματα με βάση το αλγινικό, όσο και η χρυσίνη είτε ελεύθερη είτε εγκλωβισμένη μπορούν να είναι συμβατά με τα ερυθρά αιμοσφαίρια και δεν έχουν τοξική επίδραση.

Η ΜΕΡΟΣ: Συμπεράσματα

Τα τελευταία χρόνια η χρήση των νανοϋλικών ως φορείς φαρμάκων ή αλλιώς των νανοφαρμάκων έχει αρχίσει να ερευνάται σε σημαντικό βαθμό και να δίνει ελπίδα τόσο στον επιστημονικό κλάδο όσο και στους ασθενείς ότι η νανοτεχνολογία θα βελτιώσει το μέλλον της θεραπείας. Πράγματι, φέρει ποικιλία πλεονεκτημάτων, όπως η στοχευμένη και η άμεση θεραπεία αποφεύγοντας παρενέργειες όπως αυτές στα κοινά φάρμακα. Ωστόσο, ο δρόμος είναι μακρύς καθώς απαιτείται περεταίρω και ενδελεχής έρευνα μέχρι να αποδειχθεί η πρωτίστως η ασφάλεια και μετέπειτα η αποτελεσματικότητα της τεχνικής αυτής. Η συγκεκριμένη εργασία έδειξε πως τα νανοϋλικά αλγινικού οξέος και η χρυσίνη είναι ασφαλή και συμβατά ως προς το αιματολογικό προφίλ, τα επίπεδα οξειδωτικών ριζών και την οξειδωτική αιμόλυση. Παρόλα αυτά, συστήνεται η μελέτη της τοξικότητας των υλικών σε συνθήκες μεγαλύτερης επώασης και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των NPs. Παράλληλα, υπάρχει έντονη ανάγκη για νέες τεχνολογίες ανάλυσης που θα αποκαλύπτουν εις βάθος όλες τις βιολογικές πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο που τα NPs επιδρούν στα βιολογικά συστήματα. Τέλος, η συνολική αξιολόγηση της ασφάλειας των NPs απαιτεί την πραγματοποίηση επιπλέον πειραμάτων και *in vivo* προσεγγίσεων σε εθελοντές ή σε πειραματόζωα.

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Ανατύπωση της παραγωγής των κυττάρων του αίματος. Από ένα αρχικό προγονικό κύτταρο δημιουργούνται τα διάφορα κυτταρικά προϊόντα του αίματος. (Buga Corbu, Glúck en Arion, 2014).....	14
Εικόνα 2: Ανατύπωση φυσιολογικής ερυθροποίησης. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια παράγονται από πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα στον μυελό των οστών και μετά από μια σειρά γεγονότων ωρίμανσης δημιουργούνται τελικά τα πλήρως λειτουργικά RBC. (Cappellini et al., 2023)	16
Εικόνα 3: Ανατύπωση της φυσιολογικής δομής της αιμοσφαιρίνης ενός ενήλικα. (Banerjee en Aniyery, 2017).....	17
Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση της μεμβράνης του ερυθροκυττάρου και του κυτταροσκελετού. (Corrons, Casafont en Frasnado, 2021).....	19
Εικόνα 5: Στην εικόνα παρουσιάζονται μορφολογικά οι τρεις κύριες κατηγορίες νανοσωματιδίων: Πολυμερικά, Ανόργανα και Λιπιδικά καθώς και οι υποκατηγορίες τους. (Mitchell et al., 2021)	23
Εικόνα 6: Η χημική δομή του αλγινικού. Φαίνεται χαρακτηριστικά ο σχηματισμός των μπλοκ G και M. (Choukaife, Doolaanea en Alfatama, 2020)	26
Εικόνα 7: Ζελατινοποίηση του αλγινικού μετά από ιοντική αλληλεπίδραση μεταξύ του αλγινικού και ενός δισθενούς κατιόντος. Πρατηρείται η δομή "αυγού". (Abasalizadeh et al., 2020).....	27
Εικόνα 8: Η χημική δομή της χρυσίνης (Saima Naz, 2019).....	27
Εικόνα 9: Ανατύπωση αντιοξειδωτικών συστημάτων ερυθρού αιμοσφαιρίου. (Kuhn et al., 2017)	37
Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού ενός κυτταρόμετρου ροής στην οποία διακρίνονται και τα 5 συστήματα που απαρτίζουν το όργανο. (O'Neill et al., 2013)	43
Εικόνα 11: Στρατηγική ανάλυσης των ROS στα RBCs. Α και Ε) Στικτογράμματα (dot plots) κατανομής των RBCs με βάση τον πρόσθιο (FSC) και πλάγιο (SSC) σκεδασμό ανάλογα με το μέγεθος και την κοκκίωση αντίστοιχα. Β και ΣΤ) μονήρη ερυθρά (singlets) σε πρόσθιο σκεδασμό ως προς το ύψος (FSC–Height) και την περιοχή (FSC–Area). Γ) Στο ιστόγραμμα φαίνεται το όριο του αρνητικού δείγματος για το H ₂ DCFDA. Ζ) Ιστόγραμμα όπου παρατηρείται η μετατοπισμένη κορυφή των θετικών για H ₂ DCFDA κυττάρων δεξιά από την κάθετη γραμμή που έχει τεθεί ως όριο. Δ) Στικτόγραμμα του αρνητικού δείγματος, φαίνεται η οριοθέτηση του πλαισίου για τα θετικά για H ₂ DCFDA RBCs. Η) Στικτόγραμμα θετικού δείγματος όπου φαίνονται τα θετικά για H ₂ DCFDA RBCs εντός του πλαισίου (μπλε χρώμα).	50

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1:Απεικόνιση των μέσων τιμών του εύρους κατανομής των ερυθρών αιμοσφαιρίων για το Ctr, το Ctr 37°C, το NP1, το NP2 και το NP3.	47
Διάγραμμα 2:Απεικόνιση των μέσων τιμών του μέσου όγκου των ερυθρών αιμοσφαιρίων για το Ctr, το Ctr 37°C, το NP1, το NP2 και το NP3. Με αστερίσκο (*) σημειώνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές.....	47
Διάγραμμα 3: Απεικόνιση των μέσων τιμών της μέσης περιεκτικότητας αιμοσφαιρίνης για το Ctr, το Ctr 37°C, το NP1, το NP2 και το NP3. Με αστερίσκο (*) σημειώνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές.....	48
Διάγραμμα 4: Απεικόνιση των μέσων τιμών της μέσης πυκνότητας της αιμοσφαιρίνης για το Ctr, το Ctr 37°C, το NP1, το NP2 και το NP3. Με αστερίσκο (*) σημειώνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές.....	48
Διάγραμμα 5: Απεικόνιση των μέσων τιμών της οξειδωτικής λύσης για το Ctr, το Ctr 37°C, το NP1, το NP2 και το NP3. Με αστερίσκο (*) σημειώνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές.....	49
Διάγραμμα 6: Απεικόνιση των μέσων τιμών της μηχανικής ευθραυστότητας για το Ctr, το Ctr 37°C, το NP1, το NP2 και το NP3. Με αστερίσκο (*) σημειώνονται οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές.....	51

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Πίνακας συχνών συντμήσεων	10
Πίνακας 2: Τα αποτελέσματα των γενικών αναλύσεων των δειγμάτων. Στην πρώτη στήλη βρίσκεται η τιμή που εξετάστηκε, στην δεύτερη στήλη φαίνονται οι μέσες τιμές και στην τρίτη στήλη τα φυσιολογικά όρια. Οι τιμές προέκυψαν από το μέσο όρο \pm την τυπική απόκλιση.....	46

Κατάλογος Εξισώσεων

Εξίσωση 1: Η αντίδραση Haber-Weiss συμβαίνει σε δύο στάδια, το δεύτερο στάδιο είναι γνωστό ως αντίδραση Fenton. (de Almeida et al., 2022)	34
Εξίσωση 2: Αυτοοξειδωση της αιμοσφαιρίνης.	35
Εξίσωση 4	35
Εξίσωση 3	35
Εξίσωση 5	35
Εξίσωση 6	36

Βιβλιογραφία

Abasalizadeh, F. *et al.* (2020) “Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting”, *Journal of Biological Engineering*, 14(1), bl 8. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13036-020-0227-7>.

Ahmed, M.H., Ghatge, M.S. en Safo, M.K. (2020) “Hemoglobin: Structure, Function and Allostery”, in, bll 345–382. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_14.

de Almeida, A.J.P.O. *et al.* (2022) “ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling, and its Implications in Aging Pathways”, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Onder redaksie van D. Giustarini, 2022, bll 1–23. Available at: <https://doi.org/10.1155/2022/1225578>.

Altammar, K.A. (2023) “A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges”, *Frontiers in Microbiology*, 14. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1155622>.

Alyssa Tigner, Sherif A. Ibrahim, I.V.M. (2022) “Histology, White Blood Cell”.

Angelova, P.R. en Abramov, A.Y. (2018) “Role of mitochondrial <sc>ROS</sc> in the brain: from physiology to neurodegeneration”, *FEBS Letters*, 592(5), bll 692–702. Available at: <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12964>.

Antonelou, M.H. *et al.* (2011) “Oxidative stress-associated shape transformation and membrane proteome remodeling in erythrocytes of end stage renal disease patients on hemodialysis.”, *Journal of proteomics*, 74(11), bll 2441–52. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.04.009>.

Antonelou, M.H., D’Alessandro, A. en Kriebardis, A.G. (2022) “In Sickness and in Health: Erythrocyte Responses to Stress and Aging.”, *International journal of molecular sciences*, 23(13). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23136957>.

Arathi, K. B. Megha, X.J.& P.V.M. (2023) “Biological Safety and Cellular

Interactions of Nanoparticles”, bll 559–587.

Banerjee, T. en Aniyery, R.B. (2017) “Thalassemia and its Management during Pregnancy”, *World Journal of Anemia*, 1(1), bll 5–17. Available at: <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10065-0002>.

Beach, M.A. *et al.* (2024) “Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery”, *Chemical Reviews*, 124(9), bll 5505–5616. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.3c00705>.

Bo Peng, Gangcheng Kong, C.Y. and Y.M. (2020) “Erythropoietin and its derivatives: from tissue protection to immune regulation”. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2276-8>.

Brieger, K. *et al.* (2012) “Reactive oxygen species: from health to disease”, *Swiss Medical Weekly* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>.

Buga Corbu, V., Glück, A. en Arion, C. (2014) “Actual biological diagnosis of acute myeloblastic leukemia in children.”, *Journal of medicine and life*, 7(2), bll 291–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25408742>.

Cappellini, M.D. *et al.* (2023) “Erythropoiesis in lower-risk myelodysplastic syndromes and beta-thalassemia”, *Blood Reviews*, 59, bl 101039. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2022.101039>.

Caulier, A.L. en Sankaran, V.G. (2022) “Molecular and cellular mechanisms that regulate human erythropoiesis”, *Blood*, 139(16), bll 2450–2459. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood.2021011044>.

Choukaife, H., Doolaanea, A.A. en Alfatama, M. (2020) “Alginate Nanoformulation: Influence of Process and Selected Variables”, *Pharmaceuticals*, 13(11), bl 335. Available at: <https://doi.org/10.3390/ph13110335>.

Corrons, J.L.V., Casafont, L.B. en Frasnado, E.F. (2021) “Concise review: how do red blood cells born, live, and die?”, *Annals of Hematology*, 100(10), bll 2425–2433. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04575-z>.

Das, S.K. en Vasudevan, D.M. (2007) “Alcohol-induced oxidative stress”, *Life*

Sciences, 81(3), bll 177–187. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.05.005>.

Dzierzak, E. en Philipsen, S. (2013) “Erythropoiesis: Development and Differentiation”, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(4), bll a011601–a011601. Available at:

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011601>.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011601>.

Figuroa, D., Asaduzzaman, M. en Young, F. (2018) “Real time monitoring and quantification of reactive oxygen species in breast cancer cell line MCF-7 by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay”, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 94, bll 26–33. Available at:

<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2018.03.007>.

Filho, C.B. *et al.* (2024) “Chrysin flavonoid encapsulation: a review about methodologies used and biological potential”, *Ciência Rural*, 54(3). Available at: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20230067>.

Fortis, S.P. *et al.* (2024) “Effect of silica-based mesoporous nanomaterials on human blood cells”, *Chemico-Biological Interactions*, 387, bl 110784.

Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110784>.

Givan, A.L. (2011) “Flow Cytometry: An Introduction”, in, bll 1–29. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-61737-950-5_1.

Guo, X. *et al.* (2020) “Structures, properties and application of alginic acid: A review”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, bll 618–628. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.180>.

Gwozdziński, K., Pieniasek, A. en Gwozdziński, L. (2021) “Reactive Oxygen Species and Their Involvement in Red Blood Cell Damage in Chronic Kidney Disease.”, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2021, bl 6639199.

Available at: <https://doi.org/10.1155/2021/6639199>.

Halevas, E. *et al.* (2021a) “Evaluation of the hemocompatibility and anticancer potential of poly(ϵ -caprolactone) and poly(3-hydroxybutyrate) microcarriers with encapsulated chrysin”, *Pharmaceutics*, 13(1), bll 1–22. Available at:

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010109>.

Halevas, E. *et al.* (2021b) “Evaluation of the Hemocompatibility and Anticancer Potential of Poly(ϵ -Caprolactone) and Poly(3-Hydroxybutyrate) Microcarriers with Encapsulated Chrysin”, *Pharmaceutics*, 13(1), bl 109. Available at: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010109>.

J Narla, N.M. (2017) “Red cell membrane disorders”. Available at: <https://doi.org/10.1111/ijlh.12657>.

Jakubczyk, K. *et al.* (2020) “Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage.”, *Polski merkurusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 48(284), bll 124–127. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32352946>.

Jana, S., Kumar Sen, K. en Gandhi, A. (2016) “Alginate Based Nanocarriers for Drug Delivery Applications”, *Current Pharmaceutical Design*, 22(22), bll 3399–3410. Available at: <https://doi.org/10.2174/1381612822666160510125718>.

Klinken, S.P. (2002) “Red blood cells”. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00087-0](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00087-0).

Konstantin Bogolitsyn, Anastasia Parshina, Khurshed Mamatmyrodov, Daria Polomarchuck, N.P. (2023) “Recent advances in biochemistry of marine phaeophyta: chemical analysis, structural studies and applications”, bll 435–486.

Krumova, K. en Cosa, G. (2016) “Chapter 1. Overview of Reactive Oxygen Species”, in, bll 1–21. Available at: <https://doi.org/10.1039/9781782622208-00001>.

Kuhn, V. *et al.* (2017) “Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia”, *Antioxidants & Redox Signaling*, 26(13), bll 718–742. Available at: <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6954>.

Lakkakula, J. *et al.* (2022) “Alginate-Based Nanosystems for Therapeutic Applications”, *Journal of Nanomaterials*. Onder redaksie van L. R, 2022(1). Available at: <https://doi.org/10.1155/2022/6182815>.

Lee, K.Y. en Mooney, D.J. (2012) “Alginate: Properties and biomedical applications”, *Progress in Polymer Science*, 37(1), bll 106–126. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>.

Leming Sun, Hongmei Liu, Yanqi Ye, Yang Lei, Rehmat Islam, Sumin Tan, Rongsheng Tong, Yang-Bao Miao, L.C. (2023) “Smart nanoparticles for cancer therapy.” Available at: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01642-x>.

Li, Xinning, Li, Xuelan en Deng, L. (2022) “Chrysin reduces inflammation and oxidative stress and improves ovarian function in D-gal-induced premature ovarian failure”, *Bioengineered*, 13(4), bll 8291–8301. Available at: <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2005991>.

Lux Samuel E. IV (2016) “Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions”, bll 187–199.

Mani, R. en Natesan, V. (2018) “Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action”, *Phytochemistry*, 145, bll 187–196. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.09.016>.

Mario Cazzola (2022) “Ineffective erythropoiesis and its treatment”. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood.2021011045>.

McKinnon, K.M. (2018) “Flow Cytometry: An Overview”. Available at: <https://doi.org/10.1002/cpim.40>.

Mitchell, M.J. *et al.* (2021) “Engineering precision nanoparticles for drug delivery”, *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(2), bll 101–124. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>.

Mohandas, N. en Gallagher, P.G. (2008) “Red cell membrane: past, present, and future”, *Blood*, 112(10), bll 3939–3948. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>.

Möller, M.N. *et al.* (2023) “Oxidants and Antioxidants in the Redox Biochemistry of Human Red Blood Cells”, *ACS Omega*, 8(1), bll 147–168. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06768>.

Murthy, S.K. (2007) “Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges.”, *International journal of nanomedicine*, 2(2), bll 129–41.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17722542>.

Najahi-Missaoui, W., Arnold, R.D. en Cummings, B.S. (2020) “Safe Nanoparticles: Are We There Yet?”, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), bl 385. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms22010385>.

Narla Mohandas and Patrick G. Gallagher (2008) “Red cell membrane: past, present, and future”. Available at: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-161166>.

Naz, S. *et al.* (2019) “Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties”, *Life Sciences*, 235, bl 116797. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116797>.

Nogueira, M.T. *et al.* (2022) “Optimal conditions for alkaline treatment of alginate extraction from the brown seaweed *Sargassum cymosum* C. Agardh by response surface methodology”, *Applied Food Research*, 2(2), bl 100141. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100141>.

O’Neill, K. *et al.* (2013) “Flow Cytometry Bioinformatics”, *PLoS Computational Biology* [Preprint]. Onder redaksie van S. Wodak. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003365>.

Orrico, F. *et al.* (2023) “Oxidative Stress in Healthy and Pathological Red Blood Cells”, *Biomolecules*, 13(8), bl 1262. Available at: <https://doi.org/10.3390/biom13081262>.

Pan, D. *et al.* (2016) “The Effect of Polymeric Nanoparticles on Biocompatibility of Carrier Red Blood Cells”, *PLOS ONE*. Onder redaksie van J.L. Rummer, 11(3), bl e0152074. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152074>.

Phaniendra, A., Jestadi, D.B. en Periyasamy, L. (2015) “Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases”, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), bll 11–26. Available at: <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>.

Pretini, V. *et al.* (2019) “Red Blood Cells: Chasing Interactions”, *Frontiers in Physiology*, 10. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00945>.

Sanchez-Ballester, N.M., Bataille, B. en Soulairol, I. (2021) “Sodium alginate and alginic acid as pharmaceutical excipients for tablet formulation: Structure-function relationship”, *Carbohydrate Polymers*, 270, bl 118399. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118399>.

Sharma, S., Parveen, R. en Chatterji, B.P. (2021) “Toxicology of Nanoparticles in Drug Delivery”, *Current Pathobiology Reports*, 9(4), bll 133–144. Available at: <https://doi.org/10.1007/s40139-021-00227-z>.

Shin, W.-K. *et al.* (2016) “Cross-linked Composite Gel Polymer Electrolyte using Mesoporous Methacrylate-Functionalized SiO₂ Nanoparticles for Lithium-Ion Polymer Batteries”, *Scientific Reports*, 6(1), bl 26332. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep26332>.

Sindhwani, S. en Chan, W.C.W. (2021) “Nanotechnology for modern medicine: next step towards clinical translation”, *Journal of Internal Medicine*, 290(3), bll 486–498. Available at: <https://doi.org/10.1111/joim.13254>.

Sukhavattanakul, P. *et al.* (2023) “Polysaccharides for Medical Technology: Properties and Applications”, *Macromolecular Bioscience*, 23(2). Available at: <https://doi.org/10.1002/mabi.202200372>.

Wang, Y. *et al.* (2018) “Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling”, *Journal of Cell Biology*, 217(6), bll 1915–1928. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>.

Wydra, R.J. *et al.* (2015) “The role of ROS generation from magnetic nanoparticles in an alternating magnetic field on cytotoxicity.”, *Acta biomaterialia*, 25, bll 284–90. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.037>.

Yaxian Tian, Zhaoju Tian, Yanrong Dong, Xiaohui Wang, L.Z. (2021) “Current advances in nanomaterials affecting morphology, structure, and function of erythrocytes”.

Yusuf, A. *et al.* (2023) “Nanoparticles as Drug Delivery Systems: A Review of the Implication of Nanoparticles’ Physicochemical Properties on Responses in Biological Systems”, *Polymers*, 15(7), bl 1596. Available at:

<https://doi.org/10.3390/polym15071596>.

Zhuo (Georgia) Chen, D.M.S.K.C.X.W.S.N. (2008) “Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer.”, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(5), bll 1310–6. Available at: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1441>.

Γ.Χ. Μελέτης, Ε. Τέρπος, Γ.Π. (2004) “Ερυθροποιητικοί παράγοντες: κλινικές εφαρμογές”, in. Αθήνα: Ιατρική Εταιρεία Αθηνών.

Ιωάννης Σταμούλης (2012) *Εργαστηριακή αιματολογία*.

Σταθοπούλου, Φ.Τ.- (2020) *Παιδιατρική Αιματολογία - Ογκολογία*. Broken Hill.

Τσατσάκης Αριστείδης (2022) *Τοξικολογία στον σύγχρονο κόσμο*. Νέον.