

# Επίδραση της νικοτίνης στο οξειδωτικό στρες των κυττάρων

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ



Τομέας: Τομέας Μηχανολογικών Κατασκευών  
& Αυτομάτου Ελέγχου

Επιβλέπων: Λεωνίδα Αλεξόπουλος, Καθηγητής ΕΜΠ

Αθήνα 2023

## Ευχαριστίες

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένα άτομα τα οποία είχαν καθοριστικό ρόλο, στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας αλλά και γενικότερα των σπουδών μου στη Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της εργασίας, Καθηγητή ΕΜΠ Λ. Αλεξόπουλο, καθώς μου ανέθεσε ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, μου έδωσε πρόσβαση στα απαραίτητα μηχανήματα του εργαστηρίου και στα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των απαραίτητων πειραμάτων αλλά και για την υπομονή που επέδειξε.

Φυσικά δε θα μπορούσα να παραλείψω το να ευχαριστήσω θερμά τον διδακτορικό φοιτητή Έξαρχο Κανέλλη. Χωρίς την καθοδήγηση και την βοήθεια του κατά την εκτέλεση των πειραμάτων και τις συμβουλές του, η παρούσα εργασία δεν θα μπορούσε να υλοποιηθεί.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τον αδερφό μου, για την υποστήριξη και την υπομονή που μου έδειξαν σε όλα τα μαθητικά και φοιτητικά μου χρόνια. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο για την συντροφιά τους, την υποστήριξή τους, καθώς και τις πολύωρες συζητήσεις επί της παρούσας εργασίας.

Υπεύθυνη δήλωση για λογοκλοπή και για κλοπή πνευματικής ιδιοκτησίας:

Έχω διαβάσει και κατανοήσει τους κανόνες για τη λογοκλοπή και τον τρόπο σωστής αναφοράς των πηγών που περιέχονται στον οδηγό συγγραφής Διπλωματικών Εργασιών. Δηλώνω ότι, από όσα γνωρίζω, το περιεχόμενο της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας είναι προϊόν δικής μου εργασίας και υπάρχουν αναφορές σε όλες τις πηγές που χρησιμοποίησα.

Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτή τη Διπλωματική εργασία είναι του συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις της Σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών ή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Παναγιώτης Λάσπας

## Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη.....	5
Abstract.....	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Το φυτό <i>Nicotiana tabacum</i> .....	10
1.2 Το κάπνισμα σε αριθμούς.....	13
1.2.1 Κάπνισμα στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ).....	15
1.2.2 Το κάπνισμα στην Ελλάδα.....	18
1.3 Η νικοτίνη.....	18
1.4 Οξειδωτικό στρες και δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS).....	21
1.4.1 Η ιστορία του τοξικού οξυγόνου.....	21
1.4.2 Κύριες μορφές οξειδωτικών βλαβών.....	23
1.4.3 Αντιοξειδωτική Άμυνα.....	24
1.5 Επίδραση της Νικοτίνης στα κύτταρα του πνεύμονα.....	25
2. Μεθοδολογία.....	27
2.1 Τα κύτταρα NCI-H292.....	27
2.2 Κυτταροκαλλιέργεια.....	28
2.3 Επίστρωση τρυβλίου 96 φρεατίων.....	29
2.4 Επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις νικοτίνης σε διαφορετικούς χρόνους.....	29
2.5 Μέτρηση ATP.....	30
2.6 Μέτρηση ROS.....	31
2.7 Επεξεργασία αποτελεσμάτων-Δημιουργία γραφικών παραστάσεων.....	32
3. Αποτελέσματα της Έρευνας.....	34
3.1 Μετρήσεις για συγκεντρώσεις Νικοτίνης μεταξύ 0-10 mg/ml (Μέτρηση 1 <sup>η</sup> ).....	34
3.2 Μετρήσεις για συγκεντρώσεις Νικοτίνης μεταξύ 0-0,7 mg/ml (Μέτρηση 2 <sup>η</sup> ).....	42
3.3 Υπολογισμός IC50.....	45
4. Συζήτηση.....	49
5. Συμπεράσματα.....	51
Κατάλογος Εικόνων.....	52
Κατάλογος Πινάκων.....	54
Βιβλιογραφία.....	55

## Περίληψη

---

Ο καπνός είναι η δεύτερη πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ψυχοδραστική ουσία στον πλανήτη, με περισσότερους από ένα δισεκατομμύριο καπνιστές παγκοσμίως. Η επανειλημμένη έκθεση στη νικοτίνη που παρέχεται ταχέως από τα τσιγάρα, προκαλεί ψυχολογική και σωματική εξάρτηση, ενώ η διακοπή μπορεί να οδηγήσει σε στερητικό σύνδρομο. Αρκετά από τα παραπροϊόντα της καύσης του καπνού είναι καλά χαρακτηρισμένα ως προς τις επιβλαβείς τους επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, στη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία υπάρχουν ασάφειες ως προς το ρόλο της νικοτίνης στην ανάπτυξη οξειδωτικού στρες στα κύτταρα. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η δοσοεξαρτώμενη επίδραση της νικοτίνης ως προς τη βιωσιμότητα και τη δημιουργία Δραστικών Μορφών Οξυγόνου-ROS σε κύτταρα πνευμονικού ενδοθηλίου, από τους πρώτους ιστούς που έρχονται σε επαφή με τη νικοτίνη όταν αυτή εισπνέεται είτε από τα καίγόμενα τσιγάρα είτε από τα ηλεκτρονικά μέσα χορήγησης. Ως προς τη βιωσιμότητα, βρέθηκε το ήμισυ της μέγιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (IC50) είναι τα 0,45 mg/ml για τα κύτταρα NCI-H292, ενώ τα αποτελέσματα σχετικά με την παραγωγή ROS/κύτταρο δείχνουν να έχουν σχέση ανάλογη με τη συγκέντρωση της νικοτίνης.



## Abstract

---

Tobacco is the second most commonly used psychoactive substance on the planet, with more than a billion smokers worldwide. Repeated exposure to the nicotine delivered rapidly by cigarettes causes psychological and physical dependence, and cessation can lead to withdrawal syndrome. Several of the by-products of tobacco combustion are well characterized in terms of their harmful effects on the human body; in the international scientific literature there are ambiguities as to the role of nicotine in the development of oxidative stress in cells. The present study investigated the dose-dependent effect of nicotine on viability and generation of Reactive Oxygen Species-ROS in pulmonary endothelial cells, the first tissues to come into contact with nicotine when inhaled either from burning cigarettes or electronic delivery devices. In terms of viability, half of the maximum inhibitory concentration (IC50) was found to be 0.45 mg/ml for NCI-H292 cells, and the results on ROS production/cell appear to have a relationship proportional to nicotine concentration.

## 1. Εισαγωγή

Ο καπνός είναι η δεύτερη πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ψυχοδραστική ουσία στον πλανήτη, με περισσότερους από ένα δισεκατομμύριο καπνιστές παγκοσμίως (Reitsma et al., 2021). Παρόλο που ο επιπολασμός του καπνίσματος έχει μειωθεί σε πολλές χώρες υψηλού εισοδήματος (High Income Countries- HIC), η χρήση καπνού εξακολουθεί να είναι πολύ διαδεδομένη στις χώρες χαμηλού και μεσαίου εισοδήματος (Low/Medium Income Countries-LMIC). Η πλειονότητα των καπνιστών είναι εθισμένοι στη νικοτίνη που παρέχεται από τα τσιγάρα. Ως αποτέλεσμα των νευροπροσαρμογών και των ψυχολογικών μηχανισμών που προκαλούνται από την επανειλημμένη έκθεση στη νικοτίνη που παρέχεται ταχέως από τα τσιγάρα, η διακοπή μπορεί επίσης να οδηγήσει σε ένα καλά χαρακτηρισμένο στερητικό σύνδρομο, που συνήθως εκδηλώνεται ως ευερεθιστότητα, άγχος, χαμηλή διάθεση, δυσκολία συγκέντρωσης, αυξημένη όρεξη, αϋπνία και ανησυχία, και το οποίο συμβάλλει στη δυσκολία διακοπής της χρήσης καπνού (West, 2017, West, 2009, Fagerström, 2011).

Ιστορικά, ο καπνός χρησιμοποιούνταν σε ορισμένους πολιτισμούς ως μέρος παραδοσιακών τελετών, αλλά η χρήση του ήταν σπάνια και δεν ήταν ευρέως διαδεδομένη στον πληθυσμό. Ωστόσο, από τις αρχές του εικοστού αιώνα, η χρήση εμπορικών τσιγάρων αυξήθηκε δραματικά (Le Foll et al., 2022) λόγω των αυτοματοποιημένων πρακτικών παραγωγής που επιτρέπουν την παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα φθηνών προϊόντων που προωθούνται έντονα από τα μέσα μαζικής ενημέρωσης και τη διαφήμιση. Η χρήση του καπνού έγινε ιδιαίτερα διαδεδομένη τον περασμένο αιώνα και ακολουθήθηκε από σημαντική αύξηση του επιπολασμού των ασθενειών που προκαλούνται από τον καπνό δεκαετίες αργότερα. Χρειάστηκαν δεκαετίες για να διαπιστωθεί η σχέση μεταξύ της χρήσης καπνού και των συναφών επιπτώσεων στην υγεία (Doll and Hill, 1950) και για να ανακαλυφθεί ο εθιστικός ρόλος της νικοτίνης στη διατήρηση του καπνίσματος (Henningfield et al., 2016, Foll and Goldberg, 2009) αλλά και για να ενημερωθούν οι άνθρωποι σχετικά με αυτές τις επιπτώσεις. Πρέπει να σημειωθεί ότι η καπνοβιομηχανία αμφισβήτησε αυτά τα στοιχεία για να επιτρέψει τη συνέχιση των πωλήσεων καπνού (Proctor, 2012). Η επέκταση των εκστρατειών δημόσιας υγείας για τη μείωση του καπνίσματος μείωσε σταδιακά τη χρήση καπνού στις HIC, με αξιοσημείωτες αυξήσεις στη διακοπή του καπνίσματος από τους ενήλικες, αλλά λιγότερη πρόοδος έχει επιτευχθεί στις LMIC (Reitsma et al., 2021).

Η νικοτίνη είναι η εθιστική ένωση του καπνού και ευθύνεται για τη συνεχή χρήση του καπνού παρά τις βλάβες και την επιθυμία διακοπής του καπνίσματος, αλλά η νικοτίνη δεν



ευθύνεται άμεσα για τις βλαβερές συνέπειες της χρήσης προϊόντων καπνού. Άλλα συστατικά στον καπνό μπορεί να διαμορφώνουν το εθιστικό δυναμικό του καπνού (για παράδειγμα, αρώματα και ενώσεις που δεν περιέχουν νικοτίνη) (Hall et al., 2014). Οι σημαντικότερες βλάβες που σχετίζονται με τη χρήση καπνού, συνδέονται με ένα πλήθος ενώσεων που εμφανίζονται κατά την καύση του καπνού (όπως καρκινογόνα, τοξικά, αιωρούμενα σωματίδια και μονοξείδιο του άνθρακα). Στους ενήλικες, οι δυσμενείς επιπτώσεις της χρήσης καπνού στην υγεία περιλαμβάνουν καρκίνο σε όλα σχεδόν τα περιφερειακά όργανα που εκτίθενται στον καπνό και χρόνιες ασθένειες όπως οφθαλμικές παθήσεις, περιοδοντικές παθήσεις, καρδιαγγειακές παθήσεις, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, εγκεφαλικό επεισόδιο, σακχαρώδη διαβήτη, ρευματοειδή αρθρίτιδα και διαταραχές που επηρεάζουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Le Foll et al., 2022). Επιπλέον, το κάπνισμα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο δυσμενών επιπτώσεων στην αναπαραγωγή, όπως η έκτοπη κύηση, το χαμηλό βάρος γέννησης και ο πρόωρος τοκετός (Le Foll et al., 2022). Η έκθεση των παιδιών στο παθητικό κάπνισμα έχει συνδεθεί με το σύνδρομο αιφνίδιου βρεφικού θανάτου, τη μειωμένη πνευμονική λειτουργία και τις αναπνευστικές παθήσεις, εκτός από γνωστικές και συμπεριφορικές διαταραχές (Le Foll et al., 2022). Οι μακροχρόνιες αναπτυξιακές επιπτώσεις της νικοτίνης οφείλονται πιθανώς σε δομικές και λειτουργικές αλλαγές στον εγκέφαλο κατά τη διάρκεια αυτής της πρώιμης αναπτυξιακής περιόδου (Musso et al., 2007, Goriounova and Mansvelde, 2012).

Η νικοτίνη που χορηγείται μόνη της σε διάφορα σκευάσματα υποκατάστασης νικοτίνης (όπως αυτοκόλλητα, τσίχλες και παστίλιες) είναι ασφαλής και αποτελεσματική ως τεκμηριωμένο βοήθημα για τη διακοπή του καπνίσματος. Έχουν επίσης εμφανιστεί νέες μορφές συστημάτων χορήγησης νικοτίνης (που ονομάζονται ηλεκτρονικά συστήματα χορήγησης νικοτίνης ή ηλεκτρονικά τσιγάρα), τα οποία μπορούν ενδεχομένως να μειώσουν τις βλαβερές συνέπειες του καπνίσματος για όσους μεταπηδούν πλήρως από τα καιγόμενα στα ηλεκτρονικά τσιγάρα (Fagerström and Bridgman, 2014, Hartmann-Boyce et al., 2021).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνήσει την δοσοεξαρτώμενη επίδραση της νικοτίνης ως προς τη βιωσιμότητα και τη δημιουργία Δραστικών Μορφών Οξυγόνου-ROS σε κύτταρα πνευμονικού ενδοθηλίου, από τους πρώτους ιστούς που έρχονται σε επαφή με τη νικοτίνη όταν αυτή εισπνέεται είτε από τα καιγόμενα τσιγάρα είτε από τα ηλεκτρονικά μέσα χορήγησης.

## 1.1 Το φυτό *Nicotiana tabacum*

Το *Nicotiana tabacum* (Εικόνα 1), ή ο καλλιεργήσιμος καπνός, είναι ένα ποώδες φυτό του γένους *Nicotiana* που καλλιεργείται ετησίως. Το φυτό είναι τροπικής προέλευσης, εμφανίζεται σχεδόν σε όλο τον κόσμο και απαντάται συχνά στην καλλιέργεια. Αναπτύσσεται σε ύψη μεταξύ 1 και 2 μέτρων (3' έως 6'). Η έρευνα βρίσκεται σε εξέλιξη για την καταγωγή του μεταξύ των άγριων ειδών *Nicotiana*, αλλά πιστεύεται ότι είναι ένα υβρίδιο των *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tomentosiformis* και πιθανώς *Nicotiana otophora*. Το *Nicotiana tabacum* είναι το πιο συχνά καλλιεργούμενο φυτό στο γένος *Nicotiana*, στο οποίο τα φύλλα του φυτού καλλιεργούνται εμπορικά για να μεταποιηθούν σε καπνό για κατανάλωση (Ren and Timko, 2001).



**Εικόνα 1 Το φυτό *Nicotiana tabacum***

πηγή: Joachim Müllerchen, GNU Free Documentation License

Το φυτό προέρχεται από την Καραϊβική, όπου οι Ταίνο ήταν οι πρώτοι καταγεγραμμένοι λαοί που το χρησιμοποίησαν και το καλλιεργήσαν. Το 1560, ο Jean Nicot de Villemain, τότε πρεσβευτής της Γαλλίας στην Πορτογαλία, έφερε σπόρους και φύλλα καπνού ως "θαυματουργό φάρμακο" στη γαλλική αυλή. Το 1586 ο βοτανολόγος Jaques Dalechamps

έδωσε στο φυτό το όνομα *Herba nicotiana*, το οποίο υιοθετήθηκε και από τον Linné. Στην αρχή θεωρήθηκε διακοσμητικό φυτό, στη συνέχεια πανάκεια, πριν γίνει κοινό ταμπάκο και φυτό καπνού.

Ο καπνός έφτασε στην Αφρική στις αρχές του 17ου αιώνα. Το εκχύλισμα των φύλλων του ήταν μια δημοφιλής μέθοδος καταπολέμησης παρασίτων μέχρι τις αρχές του 20ού αιώνα. Το 1851, ο Βέλγος χημικός Jean Stas κατέγραψε τη χρήση του εκχυλίσματος καπνού ως δηλητήριο δολοφονίας. Ο Βέλγος κόμης Hippolyte Visart de Bocarmé είχε δηλητηριάσει τον κουνιάδο του με εκχύλισμα φύλλων καπνού προκειμένου να αποκτήσει κάποια χρήματα που χρειαζόταν επείγοντως. Αυτή ήταν η πρώτη ακριβής απόδειξη των αλκαλοειδών στην ιατροδικαστική (Wennig, 2009).

Σήμερα καλλιεργείται εμπορικά σε όλο τον κόσμο. Όλα τα μέρη του φυτού περιέχουν νικοτίνη, η οποία μπορεί να εξαχθεί και να χρησιμοποιηθεί ως εντομοκτόνο. Τα αποξηραμένα φύλλα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν- παραμένουν αποτελεσματικά για 6 μήνες μετά την αποξήρανση. Ο χυμός των φύλλων μπορεί να τρίβεται στο σώμα ως εντομοαπωθητικό. Τα φύλλα μπορούν να αποξηραθούν και να μασηθούν ως μεθυστικό. Τα αποξηραμένα φύλλα χρησιμοποιούνται επίσης ως ταμπάκο ή καπνίζονται. Αυτό είναι το κύριο είδος που χρησιμοποιείται για την παρασκευή τσιγάρων, πούρων και άλλων προϊόντων για τους καπνιστές. Από τον σπόρο λαμβάνεται ένα λάδι για ξήρανση. Άλλες ποικιλίες καλλιεργούνται ως καλλωπιστικά φυτά.

Μετά τη συγκομιδή του καπνού, αυτός αποξηραίνεται και στη συνέχεια παλαιώνεται για να βελτιωθεί η γεύση του. Υπάρχουν τέσσερις συνήθεις μέθοδοι ωρίμανσης του καπνού: ωρίμανση στον αέρα, ωρίμανση στη φωτιά, ωρίμανση στην καμινάδα και ωρίμανση στον ήλιο. Η μέθοδος ωρίμανσης που χρησιμοποιείται εξαρτάται από τον τύπο του καπνού και την προοριζόμενη χρήση του. Ο καπνός που ωριμάζει στον αέρα προστατεύεται από τον άνεμο και τον ήλιο σε έναν καλά αεριζόμενο αχυρώνα, όπου στεγνώνει στον αέρα για έξι έως οκτώ εβδομάδες. Ο καπνός που ωριμάζει στον αέρα έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, η οποία προσδίδει στον καπνό ελαφριά, γλυκιά γεύση, και υψηλή περιεκτικότητα σε νικοτίνη. Τα πούρα και τα καπνά burley ωριμάζουν στον αέρα.

Στην ωρίμανση με φωτιά, ο καπνός από μια χαμηλής καύσης φωτιά στο πάτωμα του αχυρώνα διαπερνά τα φύλλα. Αυτό προσδίδει στα φύλλα ένα χαρακτηριστικό καπνιστό άρωμα και γεύση. Η ωρίμανση στη φωτιά διαρκεί τρεις έως δέκα εβδομάδες και παράγει

έναν καπνό με χαμηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και υψηλή περιεκτικότητα σε νικοτίνη. Ο καπνός πίπας, ο καπνός μάσησης και ο καπνός ταμπάκου ωριμάζουν στη φωτιά.

Ο καπνός που ωριμάζει με καπνοδόχο διατηρείται σε κλειστό αχυρώνα που θερμαίνεται με καπνοδόχους (σωλήνες) θερμού αέρα, αλλά ο καπνός δεν εκτίθεται άμεσα στον καπνό. Αυτή η μέθοδος παράγει καπνό τσιγάρων που έχει υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα και μεσαία έως υψηλά επίπεδα νικοτίνης. Είναι η ταχύτερη μέθοδος ωρίμανσης, που απαιτεί περίπου μία εβδομάδα. Ο καπνός Βιρτζίνια που έχει ωριμάσει με καπνογόνο ονομάζεται επίσης λαμπρός καπνός, επειδή η ωρίμανση με καπνογόνο μετατρέπει τα φύλλα του σε χρυσά, πορτοκαλί ή κίτρινα.

Ο καπνός που ωριμάζει στον ήλιο στεγνώνει ακάλυπτος στον ήλιο (Εικόνα 2). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται στην Ελλάδα, την Τουρκία και άλλες μεσογειακές χώρες για την παραγωγή ανατολίτικου καπνού. Ο καπνός που ωριμάζει στον ήλιο έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε ζάχαρη και νικοτίνη και χρησιμοποιείται στα τσιγάρα.



**Εικόνα 2 Φύλα καπνού που αποξηραίνονται**

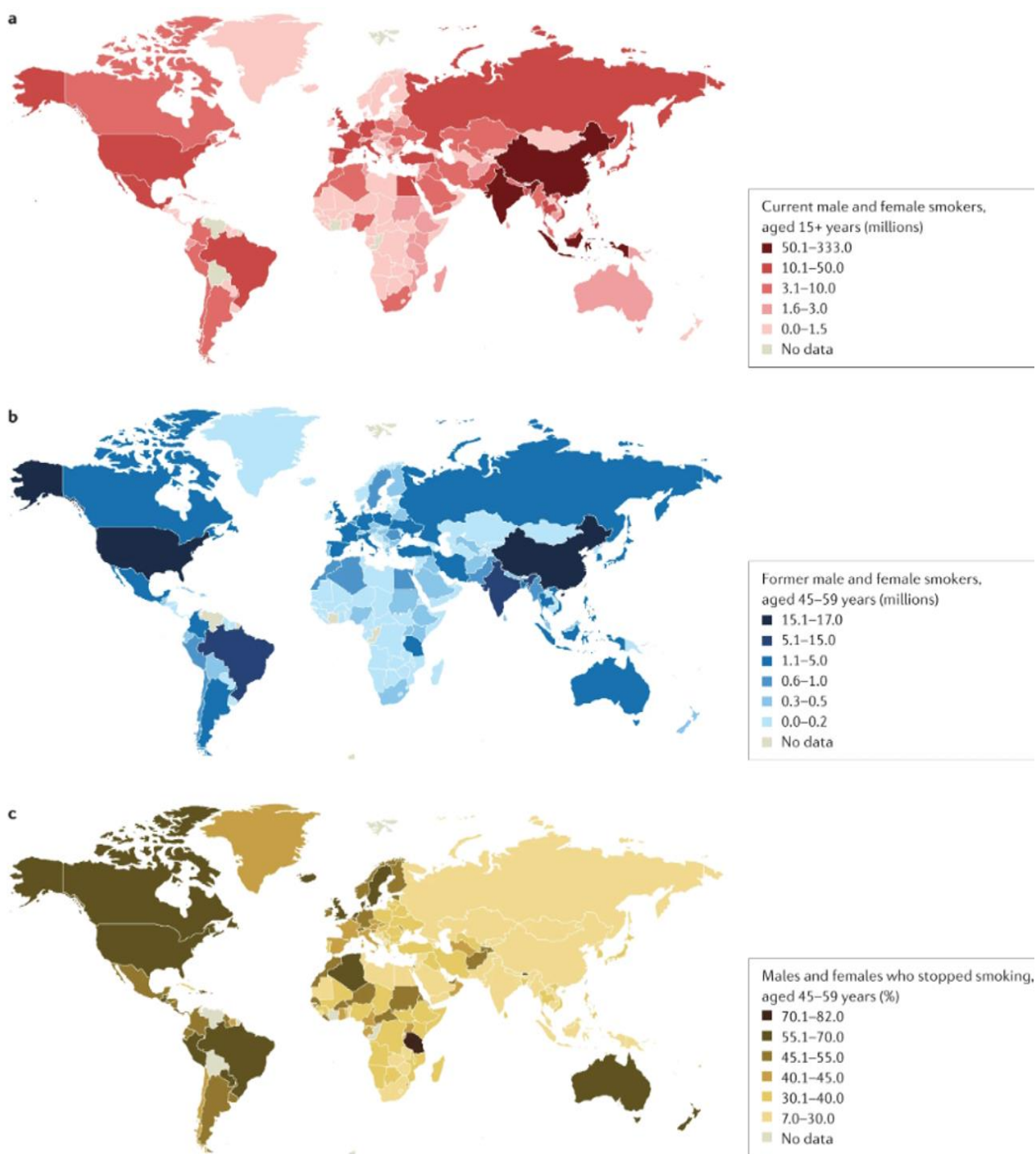
πηγή: *TANDEMICH/SHUTTERSTOCK*

Μόλις ο καπνός ωριμάσει, οι εργάτες τον δένουν σε μικρές δεσμίδες των 20 περίπου φύλλων, που ονομάζονται χέρια, ή χρησιμοποιούν μηχανή για να φτιάξουν μεγάλα μπλοκ, που ονομάζονται δεμάτια. Τα χέρια ή οι μπάλες παλαιώνουν για ένα έως τρία χρόνια για να βελτιώσουν τη γεύση και να μειώσουν την πικράδα. (contributors, 2023)

## 1.2 Το κάπνισμα σε αριθμούς

Περίπου 1,14 δισεκατομμύρια άνθρωποι κάπνιζαν παγκοσμίως το 2019. Αν και ο επιπολασμός του καπνίσματος μειώθηκε σημαντικά μεταξύ 1990 και 2019, οι αυξήσεις στον ενήλικο πληθυσμό σήμαιναν ότι ο συνολικός αριθμός των καπνιστών παγκοσμίως αυξήθηκε (Εικόνα 3). Ένας θάνατος που σχετίζεται με το κάπνισμα συμβαίνει περίπου για κάθε 0,8-1,1 εκατομμύρια τσιγάρα που καπνίζονται, γεγονός που υποδηλώνει ότι η εκτιμώμενη παγκόσμια κατανάλωση περίπου 7,4 τρισεκατομμυρίων τσιγάρων το 2019 οδήγησε σε περίπου 7 εκατομμύρια θανάτους (Le Foll et al., 2022).

Στους περισσότερους πληθυσμούς, ο επιπολασμός του καπνίσματος είναι πολύ υψηλότερος μεταξύ ομάδων με χαμηλότερο επίπεδο εκπαίδευσης ή εισοδήματος (Palipudi et al., 2012) και μεταξύ ατόμων με διαταραχές ψυχικής υγείας και άλλες συν-εξαρτήσεις (Weinberger et al., 2018, Goodwin et al., 2011). Το κάπνισμα είναι επίσης συχνότερο μεταξύ των ανδρών από ό,τι μεταξύ των γυναικών. Τα άτομα που ανήκουν σε σεξουαλικές ή/και έμφυλες μειονότητες έχουν δυσανάλογα υψηλά ποσοστά καπνίσματος και άλλων εξαρτήσεων (Palipudi et al., 2012, Evans-Polce et al., 2020). Επιπλέον, ο επιπολασμός του καπνίσματος διαφέρει σημαντικά μεταξύ περιοχών και εθνοτήτων- τα ποσοστά καπνίσματος είναι υψηλά σε ορισμένες περιοχές της Ασίας, όπως η Κίνα και η Ινδία, αλλά είναι χαμηλότερα στη Βόρεια Αμερική και την Αυστραλία. Σημειωτέον, ο επιπολασμός των διαταραχών ψυχικής υγείας και άλλων συν-εξαρτήσεων είναι υψηλότερος στα άτομα που καπνίζουν σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (Goodwin et al., 2011, Weinberger et al., 2018, Hassan and Le Foll, 2021). Για παράδειγμα, οι πιθανότητες καπνίσματος σε άτομα με οποιαδήποτε διαταραχή χρήσης ουσιών είναι περισσότερο από πέντε φορές υψηλότερες από τις πιθανότητες σε άτομα χωρίς διαταραχή χρήσης ουσιών (Hassan and Le Foll, 2021). Ομοίως, οι πιθανότητες καπνίσματος σε άτομα με οποιαδήποτε ψυχιατρική διαταραχή είναι περισσότερο από τρεις φορές υψηλότερες από τις πιθανότητες καπνίσματος σε άτομα χωρίς ψυχιατρική διάγνωση (Smith et al., 2014). Σε μια μελέτη στις ΗΠΑ, σε σύγκριση με έναν πληθυσμό καπνιστών χωρίς ψυχιατρική διάγνωση, τα άτομα με άγχος, κατάθλιψη και φοβία εμφάνισαν περίπου διπλάσιο επιπολασμό καπνίσματος, ενώ τα άτομα με αγοραφοβία, μανία ή υπομανία, ψύχωση και αντικοινωνικές διαταραχές προσωπικότητας ή συμπεριφοράς εμφάνισαν τουλάχιστον τριπλάσιο επιπολασμό καπνίσματος (Smith et al., 2014). Οι συνυπάρχουσες διαταραχές σχετίζονται επίσης με υψηλότερα ποσοστά καπνίσματος (Smith et al., 2014, Bourgault et al., 2022).



Εικόνα 3 Το κάπνισμα παγκόσμια το 2019

πηγή: *le Foll, 2022*

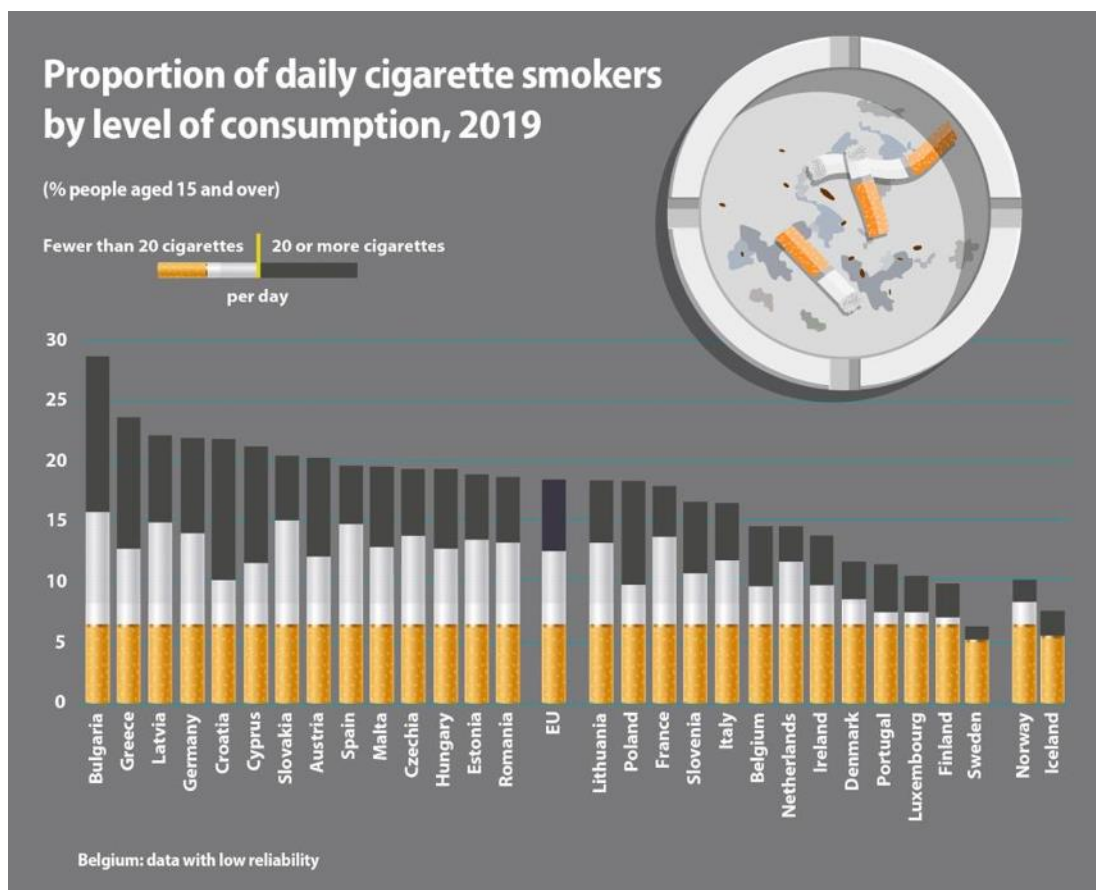
### 1.2.1 Κάπνισμα στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ)

Το 2019, το 18,4 % των ατόμων ηλικίας 15 ετών και άνω στην ΕΕ ήταν καθημερινοί καπνιστές. Μεταξύ των κρατών μελών της ΕΕ, το ποσοστό των καθημερινών καπνιστών κυμαινόταν από 6,4 % στη Σουηδία και 9,9 % στη Φινλανδία έως 23,6 % στην Ελλάδα και 28,7 % στη Βουλγαρία.

Μεταξύ των ανδρών, το ποσοστό των καθημερινών καπνιστών κυμαινόταν από 5,9 % στη Σουηδία, 11,7 % στη Δανία και το Λουξεμβούργο και 12,1 % στη Φινλανδία έως 37,6 % στη Βουλγαρία, ενώ μεταξύ των γυναικών, το ποσοστό κυμαινόταν από 6,8 % στη Σουηδία (και επίσης λιγότερο από 10,0 % στην Πορτογαλία, τη Ρουμανία, τη Φινλανδία, το Λουξεμβούργο και τη Λιθουανία) έως 20,7 % στη Βουλγαρία. Η Δανία και η Σουηδία ήταν τα μόνα κράτη μέλη όπου το ποσοστό των καθημερινών καπνιστών ήταν υψηλότερο μεταξύ των γυναικών από ό,τι μεταξύ των ανδρών, αν και οι διαφορές στα ποσοστά ήταν αρκετά μικρές, ιδίως στη Δανία. Οι μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ των δύο φύλων, σε όρους ποσοστιαίων μονάδων, παρατηρήθηκαν στη Ρουμανία και τη Λετονία, όπου τα μερίδια των καθημερινών καπνιστών μεταξύ των ανδρών ήταν 23,1 και 22,3 ποσοστιαίες μονάδες αντίστοιχα υψηλότερα από τα μερίδια που καταγράφηκαν μεταξύ των γυναικών.

Για το σύνολο της ΕΕ, το ηλικιακό προφίλ των καθημερινών καπνιστών ήταν παρόμοιο για τους άνδρες και τις γυναίκες, με το ποσοστό να αυξάνεται μεταξύ των ηλικιακών ομάδων 15-24 και 25-34 ετών, για τις ηλικιακές ομάδες από 25-34 έως 55-64 ετών το ποσοστό των καθημερινών καπνιστών παραμένει γενικά υψηλό, στη συνέχεια, τα ποσοστά μειώνονται, με μακράν το χαμηλότερο ποσοστό καθημερινών καπνιστών μεταξύ της μεγαλύτερης ηλικιακής ομάδας (Εικόνα 4).

Η διαφορά μεταξύ των δύο φύλων στο καθημερινό κάπνισμα το 2019 ήταν μεγαλύτερη σε ποσοστιαίες μονάδες στις ηλικιακές ομάδες με τον υψηλότερο επιπολασμό καπνιστών, ενώ σε σχετικούς όρους ήταν αρκετά ομοιόμορφη σε όλες τις ηλικιακές ομάδες.



ec.europa.eu/eurostat

#### Εικόνα 4 Ποσοστό καπνιστών ανάλογα με τη χρήση καπνού

πηγή: Eurostat

Το ποσοστό των καθημερινών καπνιστών τσιγάρων ήταν γενικά χαμηλότερο μεταξύ των ατόμων με τριτοβάθμιο επίπεδο εκπαίδευσης, αν και υπήρχαν αρκετά διαφορετικά πρότυπα για τους άνδρες και τις γυναίκες. Το 2019, τα χαμηλότερα ποσοστά καθημερινών καπνιστών μεταξύ των ανδρών καταγράφηκαν γενικά για τα άτομα με τριτοβάθμιο επίπεδο εκπαίδευσης, ενώ η μόνη εξαίρεση μεταξύ των κρατών μελών της ΕΕ καταγράφηκε στη Ρουμανία. Για τις γυναίκες, το μοτίβο ήταν κάπως διαφορετικό, καθώς σχετικά χαμηλά μερίδια καθημερινών καπνιστών αναφέρθηκαν όχι μόνο για τις γυναίκες με τριτοβάθμιο επίπεδο εκπαίδευσης, αλλά και για τις γυναίκες που είχαν ολοκληρώσει, το πολύ, κατώτερη δευτεροβάθμια εκπαίδευση. Ως εκ τούτου, σε 18 κράτη μέλη της ΕΕ το υψηλότερο ποσοστό καθημερινών καπνιστών μεταξύ των γυναικών καταγράφηκε μεταξύ εκείνων που είχαν



ολοκληρώσει την ανώτερη δευτεροβάθμια ή μεταδευτεροβάθμια μη τριτοβάθμια εκπαίδευση.

Για τα ηλεκτρονικά τσιγάρα ή παρόμοιες ηλεκτρονικές συσκευές, η δραστηριότητα μπορεί να αναφέρεται ως άτμισμα αντί για κάπνισμα. Στο σύνολο της ΕΕ, το 2019, το 3,6 % των ατόμων ηλικίας 15 ετών και άνω άτμιζαν, μεταξύ των οποίων ελαφρώς περισσότεροι το έκαναν περιστασιακά και όχι καθημερινά. Ένα μεγαλύτερο ποσοστό, το 4,8 %, είχε ατμίσει στο παρελθόν. Με άλλα λόγια, οι πρώην ατμιστές ήταν περισσότεροι από τους νυν ατμιστές, και μεταξύ των νυν ατμιστών ήταν περισσότεροι αυτοί που το έκαναν περιστασιακά παρά καθημερινά, με το καθημερινό άτμισμα να είναι πιο συχνό στους άνδρες από ό,τι στις γυναίκες για τα άτομα ηλικίας 15 ετών και άνω

Ως παθητικό κάπνισμα ορίζεται η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου σε εσωτερικούς χώρους, για παράδειγμα η παραμονή σε ένα δωμάτιο όπου καπνίζουν ή έχουν καπνίσει άλλα άτομα. Αυτή η έκθεση στον καπνό μπορεί να λάβει χώρα σε διάφορους κλειστούς χώρους, όπως στο σπίτι ή στην εργασία, σε δημόσιους χώρους ή σε μπαρ και εστιατόρια.

Το 2019, το 69,1 % των ατόμων ηλικίας 15 ετών και άνω στην ΕΕ ανέφεραν ότι εκτίθενται σε καπνό σε εσωτερικούς χώρους είτε σπάνια είτε ποτέ. Από το 30,9 % που εκτέθηκαν στον καπνό, περίπου οι μισοί (15,4 % του πληθυσμού αναφοράς) εκτέθηκαν σε καθημερινή βάση και οι υπόλοιποι λιγότερο συχνά. Μεταξύ των ατόμων που εκτίθενται σε καθημερινή βάση, περίπου τα δύο τρίτα εκτίθενται στον καπνό για μία ή περισσότερες ώρες ημερησίως.

Μεταξύ των κρατών μελών της ΕΕ, τα υψηλότερα ποσοστά ατόμων που εκτίθενται σε καπνό σε καθημερινή βάση το 2019 παρατηρήθηκαν στην Κροατία (34,7 %), τη Βουλγαρία (29,3 %) και την Ελλάδα (28,0 %)- υψηλό ποσοστό (49,0 %) αναφέρθηκε επίσης για τη Σερβία.

Σχεδόν σε όλα τα κράτη μέλη της ΕΕ, το ποσοστό των ατόμων που εκτίθενται σε καπνό σε καθημερινή βάση για μία ή περισσότερες ώρες ήταν μεγαλύτερο από το ποσοστό των ατόμων που εκτίθενται καθημερινά σε καπνό για λιγότερο από μία ώρα: στη Φινλανδία, τα ποσοστά αυτά ήταν τα ίδια (όπως συνέβη και στην Ισλανδία), ενώ στην Εσθονία, την Πορτογαλία και τη Σουηδία το ποσοστό ήταν ελαφρώς υψηλότερο για τα άτομα που εκτίθενται καθημερινά σε καπνό για λιγότερο από μία ώρα- στη Νορβηγία το ποσοστό ήταν σημαντικά μεγαλύτερο για τα άτομα που εκτίθενται σε καπνό σε καθημερινή βάση για λιγότερο από μία ώρα. Στο άλλο άκρο της κατάταξης, στην Ιρλανδία, τη Γερμανία και την Κροατία, περίπου τα τρία τέταρτα των ατόμων που εκτίθενται καθημερινά στον καπνό εκτίθενται για μία ώρα ή περισσότερο.

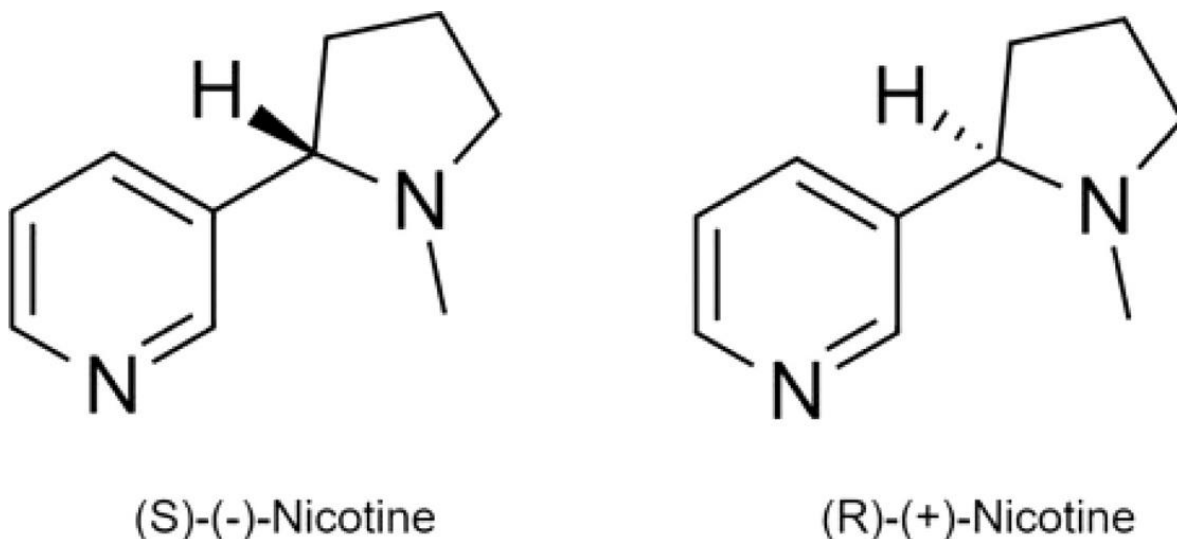
Στην ΕΕ, η καθημερινή έκθεση στον καπνό ήταν πιο συχνή στους άνδρες από ό,τι στις γυναίκες. Το 2019, αυτό το μοτίβο παρατηρήθηκε μεταξύ των ατόμων ηλικίας 15 ετών και άνω για όλα τα κράτη μέλη της ΕΕ (Eurostat, 2022).

### 1.2.2 Το κάπνισμα στην Ελλάδα

Παρά την απαγόρευση του καπνίσματος σε εσωτερικούς χώρους, η Ελλάδα παραμένει μεταξύ των χωρών με τα υψηλότερα ποσοστά καπνίσματος στον κόσμο, αν και έχει σημειωθεί σημαντική μείωση σε σχέση με μερικά χρόνια πριν. Το 2020, ο επιπολασμός του καπνίσματος ήταν 29%- 25% καθημερινοί και 4% περιστασιακοί καπνιστές. Το κάπνισμα παρατηρήθηκε περισσότερο στους άνδρες (36%) από ό,τι στις γυναίκες (22%) και στις ηλικίες 35-64 ετών (34-38% έναντι <32% στις άλλες ηλικιακές ομάδες). Ο διάμεσος αριθμός τσιγάρων που καπνίζονταν ημερησίως ήταν 15 τσιγάρα (Karetanstrataki et al., 2021).

## 1.3 Η νικοτίνη

Η νικοτίνη είναι ένα φυσικό αλκαλοειδές που ανακαλύφθηκε στο *Nicotiana tabacum* από τους Posselt και Reimann το 1828 και συντέθηκε για πρώτη φορά από τους Pictet και Rotschy το 1904. Παράγεται στις ρίζες του φυτού και συσσωρεύεται στα φύλλα, ενώ βρίσκεται σε μικρότερες ποσότητες και σε άλλα μέλη της οικογένειας των ανθοφόρων φυτών Solanaceae, όπως οι πατάτες, οι ντομάτες, οι μελιτζάνες και οι πιπεριές (Saitoh et al., 1985). Η νικοτίνη είναι ένα μικρό μόριο που αποτελείται από πυριδίνη και έναν δακτύλιο πυρρολιδίνης και υπάρχει σε δύο εναντιομερείς μορφές (Εικόνα 5). Η νικοτίνη αποτελεί το 0,6% - 3% του ξηρού βάρους του καπνού και είναι το κύριο εθιστικό συστατικό του καπνού και άλλων προϊόντων που περιέχουν νικοτίνη. Η χρονική διάρκεια της έκθεσης στη νικοτίνη και η επίδρασή της στον εγκέφαλο και σε άλλα όργανα του σώματος ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό εάν παρέχεται με τη χρήση προϊόντων καπνού ή με θεραπεία υποκατάστασης νικοτίνης, όπως διαδερμικά επιθέματα ή τσίχλες (Hukkanen et al., 2005).



**Εικόνα 5 Εναντιομερή της νικοτίνης**

Ανάλογα με τις οδούς χορήγησης, η νικοτίνη μπορεί να απορροφηθεί μέσω της τοιχωματικής επένδυσης των κυψελίδων στους πνεύμονες, μέσω των βλεννογόνων της μύτης ή του στόματος, μέσω του πεπτικού σωλήνα ή μέσω του δέρματος. Στη συνέχεια κυκλοφορεί μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε όλο το σώμα και διασχίζει εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό για να φτάσει στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Συνεπώς, θεωρείται συστηματικό φάρμακο. Όταν καπνίζεται ένα τσιγάρο, η νικοτίνη είναι ανιχνεύσιμη στον εγκέφαλο μόλις επτά δευτερόλεπτα μετά την εισπνοή του καπνού και φτάνει στο μέγιστο επίπεδο 4-5 λεπτά αργότερα (Berridge et al., 2010). Καθώς η νικοτίνη είναι προσδέτης για τους νικοτινικούς υποδοχείς ακετυλοχολίνης (nAChRs) (Powledge, 2004), δεσμεύεται στους nAChRs που εκφράζονται στους ιστούς του εγκεφάλου με υψηλή συγγένεια. Αυτή η ικανότητα πρόσδεσης των υποδοχέων είναι μάλιστα αυξημένη στους καπνιστές σε σύγκριση με τους μη καπνιστές (Perry et al., 1999) λόγω του υψηλότερου επιπέδου έκφρασης των nAChR στους εγκεφάλους των καπνιστών (50% υψηλότερη από εκείνη των μη καπνιστών) (Benwell and Balfour, 1985). Η απορρόφηση της νικοτίνης μέσω των κυτταρικών μεμβρανών είναι δυνατή λόγω της αμφίφιλης φύσης της, αλλά εξαρτάται επίσης από το pH του περιβάλλοντος ( $pK_a$  νικοτίνης = 7,9). Σε χαμηλό pH, η νικοτίνη δεν διαπερνά εύκολα τις μεμβράνες, αλλά στο αίμα, όπου το φυσιολογικό pH είναι περίπου 7,4, το 31% της νικοτίνης είναι μη ιονισμένο και μπορεί εύκολα να περάσει μέσα από τις κυτταρικές μεμβράνες (Le Houezec, 2003).

Στον άνθρωπο, η νικοτίνη έχει μεταβολικό χρόνο ημιζωής δύο ώρες. Ένα μικρό μέρος της (10-20%) αποβάλλεται άμεσα με τα ούρα. Το άλλο μέρος μεταβολίζεται από το κυτόχρωμα P450 2A6 (CYP2A6), κυρίως στο ήπαρ (και σε μικρότερο βαθμό επίσης στον πνεύμονα, τους νεφρούς, το ρινικό βλεννογόνο και τον εγκέφαλο). Ο πρωταρχικός μεταβολίτης της νικοτίνης είναι η κοτινίνη (70-80%), ενώ μικρά κλάσματα της ένωσης μετατρέπονται σε νικοτίνη-N-οξειδίο (4%), νορνικοτίνη και 4-(3-πυριδυλ)-4-υδροξυβουτανικό οξύ ή συζεύγνυνται σε γλυκουρονίδιο της νικοτίνης (Hukkanen et al., 2005, Benowitz et al., 2009).

Η έκθεση στη νικοτίνη επηρεάζει πολυάριθμα συστήματα οργάνων (νευρολογικά, νευρομυϊκά, καρδιαγγειακά, αναπνευστικά, ανοσολογικά και γαστρεντερικά) και η πλειονότητα των επιδράσεων της νικοτίνης διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση των nAChRs σε μια ευρεία ποικιλία νευρωνικών και μη νευρωνικών ιστών (Lee and Fariss, 2017). Σημειωτέον, οι επιδράσεις της νικοτίνης επηρεάζονται από την παρουσία διαφορετικών τύπων nAChRs και από τον τρόπο ρύθμισης και λειτουργίας αυτών των υποδοχέων (Lam et al., 2016, Marks et al., 1987, Renda and Nashmi, 2014). Πράγματι, εκτός από την άμεση φαρμακολογική ενεργοποίηση των nAChRs, η νικοτίνη δρα επίσης ως φαρμακολογικός συνοδός των nAChRs, ευνοώντας τη συναρμολόγησή τους μέσω της διαμόρφωσης του επιπέδου έκφρασης του ρυθμιστή συνοδού του νικοτινικού υποδοχέα ακετυλοχολίνης (NACHO), ενός σημαντικού ρυθμιστή της ωρίμανσης και της επιφανειακής έκφρασης των nAChRs (Wichern et al., 2017).

Η χρόνια έκθεση στη νικοτίνη έχει συνδεθεί με διάφορες επιδράσεις στην υγεία που έχουν περιγραφεί τόσο σε μελέτες σε ανθρώπους όσο και σε ζωικά μοντέλα. Η ασφάλεια της χρήσης νικοτίνης εξακολουθεί να βρίσκεται υπό εξέταση, ιδίως με τον μεγάλο αριθμό ατόμων που εκτίθενται καθημερινά σε αυτήν σε μια προσπάθεια διακοπής του καπνίσματος (Lee and Fariss, 2017). Το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας και Αριστείας Φροντίδας του Ηνωμένου Βασιλείου κατέληξε το 2013 στο συμπέρασμα ότι "υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία από μελέτες με παρακολούθηση έως και 5 ετών, τα οποία υποδεικνύουν ότι η "καθαρή" νικοτίνη, στη μορφή που διατίθεται στα προϊόντα θεραπείας υποκατάστασης νικοτίνης (NRT), δεν ενέχει σημαντικό κίνδυνο για την υγεία", μια δήλωση που βρίσκεται ακόμη υπό συζήτηση και δεν λαμβάνει υπόψη τις πιθανές αρνητικές επιπτώσεις της νικοτίνης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (England et al., 2017). Οι Hausmann και Fariss αξιολόγησαν τα διαθέσιμα επιδημιολογικά και *in vivo* στοιχεία για να καθορίσει εάν η νικοτίνη έχει καρκινογόνες ιδιότητες (Hausmann and Fariss, 2016) και κατέληξαν στο

συμπέρασμα ότι τα αποδεικτικά στοιχεία ήταν ανεπαρκή για την εξαγωγή σαφούς απάντησης.

Διάφορες επιστημονικές εκθέσεις πρότειναν επίσης ότι η νικοτίνη θα μπορούσε να είναι ευεργετική. Πράγματι, υπάρχουν ενδείξεις ότι η νικοτίνη έχει αντιφλεγμονώδεις και αντι-αποπτωτικές ιδιότητες (Benowitz, 2010, Copeland et al., 2007, de Jonge and Ulloa, 2007, Ricciotto et al., 2008, Quik et al., 2012). Ειδικότερα, διάφορες μελέτες ανέφεραν ευεργετική επίδραση της έκθεσης στη νικοτίνη στην παχυσαρκία και την ελκώδη κολίτιδα, που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση μιας χολινεργικής οδού μέσω του  $\alpha 7$  nAChR στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (Lakhan and Kirchgessner, 2011). Περιγράφηκε μια κατασταλτική επίδραση στην έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών σε κύτταρα που εκτέθηκαν στη νικοτίνη μέσω της διαμόρφωσης του σηματοδοτικού μονοπατιού NF- $\kappa$ B (Cui and Li, 2010). Κλινικές δοκιμές και μελέτες σε ζώα έδειξαν επίσης ότι η έκθεση στη νικοτίνη μπορεί να βελτιώσει τη γνωστική λειτουργία (Barr et al., 2008) και ότι μπορεί να προσφέρει μερική ανακούφιση των συμπτωμάτων σε ασθενείς που πάσχουν από νευροεκφυλιστικές νόσους. Ένας αυξανόμενος όγκος στοιχείων υποδεικνύει ότι τα μιτοχόνδρια διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην παθοφυσιολογία της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (IBD) (Lykhmus et al., 2017) και διαφόρων νευροεκφυλιστικών νόσων, συμπεριλαμβανομένων των νόσων Alzheimer, Huntington, Parkinson και αμυοτροφικής πλευρικής σκλήρυνσης (Lykhmus et al., 2017, Uspenska et al., 2018).

## 1.4 Οξειδωτικό στρες και δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS)

### 1.4.1 Η ιστορία του τοξικού οξυγόνου

Η αντιδραστικότητα επιτρέπει στο οξυγόνο να συμμετέχει σε μεταφορές ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας και, ως εκ τούτου, να υποστηρίζει την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων 5-τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Αυτό είναι απαραίτητο για να επιτραπεί η εξέλιξη πολύπλοκων πολυκύτταρων οργανισμών, αλλά το καθιστά επίσης ικανό να προσβάλει οποιοδήποτε βιολογικό μόριο, είτε πρόκειται για πρωτεΐνη, λιπίδιο ή DNA. Κατά συνέπεια, το σώμα μας βρίσκεται υπό συνεχή οξειδωτική επίθεση από δραστικά είδη οξυγόνου (ROS). Έχει εξελιχθεί ένα πολύπλοκο σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας που γενικά κρατά αυτή την επίθεση σε ισορροπία. Ενίοτε, ωστόσο, η ισορροπία αυτή μπορεί να διαταραχθεί, οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες. Εξαιτίας των πολλαπλών και ποικίλων επιδράσεων που μπορεί να έχει η τοξικότητα του οξυγόνου σε ένα κύτταρο, το οξειδωτικό στρες ορίζεται καλύτερα σε γενικές γραμμές ως μια μεταβολή της

ισορροπίας προ-οξειδωτικών-αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων, η οποία οδηγεί σε δυνητική βλάβη. Το οξειδωτικό στρες αναγνωρίζεται πλέον ότι διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθοφυσιολογία πολλών διαφορετικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένων των επιπλοκών της εγκυμοσύνης.

Η έννοια της προ-οξειδωτικής/αντιοξειδωτικής ισορροπίας είναι κεντρική για την κατανόηση του οξειδωτικού στρες για διάφορους λόγους. Πρώτον, υπογραμμίζει ότι η διαταραχή μπορεί να προκληθεί μέσω αλλαγών και στις δύο πλευρές της ισορροπίας (π.χ. ασυνήθιστα υψηλή παραγωγή ROS ή ανεπάρκεια στην αντιοξειδωτική άμυνα). Δεύτερον, υπογραμμίζει τις ομοιοστατικές συγκεντρώσεις των ROS. Παρόλο που οι ROS έγιναν για πρώτη φορά αντιληπτές από τους βιολόγους ως δυνητικά επιβλαβή παραπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού, αναγνωρίζεται πλέον ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως δευτερογενείς αγγελιοφόροι σε πολλά ενδοκυτταρικά μονοπάτια σηματοδότησης. Τέλος, η έννοια της ισορροπίας εφιστά την προσοχή στο γεγονός ότι θα υπάρξει διαβαθμισμένη απόκριση στο οξειδωτικό στρες. Ως εκ τούτου, μικρές διαταραχές της ισορροπίας είναι πιθανό να οδηγήσουν σε ομοιοστατικές προσαρμογές ως απόκριση στις αλλαγές του άμεσου περιβάλλοντος, ενώ πιο σημαντικές διαταραχές μπορεί να οδηγήσουν σε ανεπανόρθωτες βλάβες και κυτταρικό θάνατο. Το όριο μεταξύ φυσιολογικών φυσιολογικών μεταβολών και παθολογικών προσβολών είναι επομένως αναπόφευκτα δυσδιάκριτο.

Ο ορισμός του οξειδωτικού στρες που δόθηκε παραπάνω είναι αναγκαστικά ευρύς επειδή το αποτέλεσμα εξαρτάται εν μέρει από το κυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο παράγονται οι ROS. Υπάρχουν πολλές πιθανές πηγές ROS και η σχετική συμβολή τους εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν. Καθώς οι αντιδράσεις των ROS είναι συχνά περιορισμένες στη διάχυση, οι επιπτώσεις στη λειτουργία των κυττάρων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τα βιομόρια που βρίσκονται σε άμεση γειτνίαση. Επομένως, διαφορετικές προσβολές θα δημιουργήσουν διαφορετικά αποτελέσματα.

Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό του οξειδωτικού στρες που επηρεάζει την κλινική του παρουσίαση είναι ότι σπάνια εμφανίζεται μεμονωμένα. Εκτιμάται πλέον ότι λαμβάνουν χώρα πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του οξειδωτικού και άλλων μορφών κυτταρικού στρες, όπως το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (ER). Συνεπώς, η κλινική εκδήλωση εξαρτάται από την ισορροπία των μεταβολικών δραστηριοτήτων σε έναν συγκεκριμένο τύπο κυττάρου ή οργάνου, και έτσι μπορεί να διαφέρει από σύστημα σε σύστημα.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η πιο κοινή ελεύθερη ρίζα οξυγόνου είναι το ανιόν υπεροξειδίου ( $O_2\bullet$ ) και τα μιτοχόνδρια θεωρούνται η κύρια πηγή. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων κατά μήκος των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας δεν είναι απόλυτα αποτελεσματική και η διαρροή ηλεκτρονίων προς το μοριακό οξυγόνο, ιδίως από τα σύμπλοκα I και III, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του  $O_2\bullet$ . Ο ρυθμός σχηματισμού

καθορίζεται από τον αριθμό των ηλεκτρονίων που υπάρχουν στην αλυσίδα και έτσι είναι αυξημένος σε συνθήκες υπεροξίας και αυξημένης γλυκόζης, όπως στον διαβήτη. Παραδόξως, αυξάνεται επίσης σε συνθήκες υποξίας, όταν η μειωμένη διαθεσιμότητα οξυγόνου που δρα ως τελικός δέκτης ηλεκτρονίων για το σύμπλοκο IV προκαλεί συσσώρευση ηλεκτρονίων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το 2% του οξυγόνου που καταναλώνεται μετατρέπεται σε  $O_2\bullet$  στα μιτοχόνδρια αντί να αναχθεί σε νερό. Λόγω του φορτίου του, το  $O_2\bullet$  είναι αδιαπέραστο από τη μεμβράνη και έτσι παραμένει εντός της μιτοχονδριακής μήτρας (Halliwell & Gutteridge, 1999).

#### 1.4.2 Κύριες μορφές οξειδωτικών βλαβών

Οι ROS εξαιτίας την δραστικότητάς τους προσβάλλουν τα μικρο- και μακρο-μόρια των κυττάρων σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες. Η πιο γνωστή συνέπεια των οξειδωτικών βλαβών θεωρείται η διαδικασία της υπεροξειδωσης λιπιδίων που συνδέεται άμεσα με την κυτταρική βλάβη και τον κυτταρικό θάνατο (Hermes-Lima, 2005). Πρόκειται για μια αλυσιδωτή αντίδραση, τις περισσότερες φορές καταλυόμενη από μέταλλα μετάπτωσης, όπου ισχυρά οξειδωτικά προκαλούν την καταστροφή μεμβρανικών φωσφολιπιδίων που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η βλάβη των βιολογικών μεμβρανών λόγω υπεροξειδωσης μπορεί να ποικίλει στην έντασή της ανάλογα με την φύση και την συγκέντρωση του οξειδωτή, κυμαινόμενη από τοπική μείωση της ρευστότητας της μεμβράνης έως πλήρη διαταραχή της ακεραιότητας της διπλοστιβάδας. Τα LDL σωματίδια αποτελούν επίσης κύριο στόχο της υπεροξειδωσης λιπιδίων. Η υπεροξειδωση λιπιδίων στο ενδοπλασματικό ή σαρκοπλασματικό δίκτυο μπορεί να προκαλέσει ανεξέλεγκτη ροή  $Ca^{2+}$  στο κυτταρόπλασμα που μπορεί να είναι καταστροφικό για κυτταρικές μεταβολικές διεργασίες μιας και το  $Ca^{2+}$  μπορεί να ενεργοποιήσει/απενεργοποιήσει ένζυμα (π.χ.  $Ca^{2+}$  - εξαρτώμενες πρωτεάσες, φωσφολιπάσες και ενδονουκλεάσες) σε ακατάλληλες στιγμές. Επίσης, υπεροξειδωση των μιτοχονδριακών μεμβρανών αλλάζει την λειτουργία των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας προκαλώντας ανεπαρκή παραγωγή ATP και εξάντληση της ενέργειας του κυττάρου, ενώ η υπεροξειδωση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης μπορεί να επηρεάσει την διαπερατότητα και την φυσιολογική λειτουργία ορμονικών υποδοχέων και μεμβρανικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος.

Τα νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA) των κυττάρων αποτελούν μια άλλη κατηγορία μακρομορίων που υφίστανται οξειδωτικές βλάβες. Σε διάφορους κυτταρικούς τύπους από τα ασπόνδυλα ως και τα θηλαστικά έχουν παρατηρηθεί βλάβες στο DNA εξαιτίας οξειδωτικού στρες ως αποτέλεσμα διαφόρων επιδράσεων π.χ. από το όζον, την ιονίζουσα ακτινοβολία, τις ρίζες

υδροξυλίου καθώς και από μεταβολικά παραπροϊόντα ξενοβιοτικών ουσιών. Οι τροποποιημένες βάσεις (ή νουκλεοτίδια με κατεστραμμένες βάσεις) απομακρύνονται από το DNA από τα επιδιορθωτικά ένζυμα, αλλά υπάρχουν και σοβαρότερες βλάβες όπως θραύσεις στις αλυσίδες του DNA που δεν επιδιορθώνονται (Hermes-Lima, 2005).

Μια άλλη κατηγορία οξειδωτικής βλάβης αποτελεί η οξείδωση των πρωτεϊνών. Πρωτεϊνικά μόρια που υφίστανται οξειδωτικές βλάβες δεν επιδιορθώνονται, αλλά αντίθετα αναγνωρίζονται προς αποικοδόμηση, εμποδίζοντας τη συσσώρευση δυσλειτουργικών πρωτεϊνών. Είναι ενδιαφέρον πως η βιοσύνθεση πρωτεασών είναι αυξημένη κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες. Οι πρωτεΐνες μπορεί να υποστούν βλάβες από διάφορους μηχανισμούς που επάγουν τον σχηματισμό ελευθέρων ριζών όπως η ακτινοβολήση, τα προϊόντα της υπεροξειδωσίας λιπιδίων και τα μεταλλο-καταλυόμενα οξειδωτικά συστήματα.

### 1.4.3 Αντιοξειδωτική Άμυνα

Οι ενζυματικές και μη ενζυματικές άμυνες αναστέλλουν την οξειδωτική επίθεση. Όλες οι ενζυματικές άμυνες έχουν στον πυρήνα τους ένα μέταλλο μετάπτωσης, ικανό να παίρνει διαφορετικές τιμές καθώς μεταφέρει ηλεκτρόνια κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αποτοξίνωσης. Δύο ισομορφές της δισμουτάσης του υπεροξειδίου μετατρέπουν την  $O_2^{\bullet-}$  σε υπεροξειδίο του υδρογόνου, η μορφή μαγγανίου που περιορίζεται στα μιτοχόνδρια και η μορφή χαλκού και ψευδαργύρου που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου διασπάται στη συνέχεια σε νερό με τη δράση της καταλάσης ή της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, μιας τετραμερούς σεληνοπρωτεΐνης.

Η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης εξαρτάται από την παρουσία ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) ως δότη υδρογόνου. Η γλουταθειόνη είναι ο κύριος κυτταρικός οξειδοαναγωγικός ρυθμιστής θειόλης στα κύτταρα και συντίθεται στο κυτταρόλυμα από το L-γλουταμικό, την L-κυστεΐνη και τη γλυκίνη. Η GSH συμμετέχει σε μεγάλο αριθμό αποτοξινωτικών αντιδράσεων σχηματίζοντας δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, το οποίο μετατρέπεται ξανά σε GSH με τη δράση της αναγωγάσης της γλουταθειόνης σε βάρος του NADPH. Η τελευταία παράγεται μέσω της οδού της φωσφορικής πεντόζης, της οποίας η αφυδρογονάση της γλυκόζης-6-φωσφορικού άλατος είναι το πρώτο ένζυμο. Το ένζυμο αυτό υπόκειται σε κοινούς πολυμορφισμούς και η μειωμένη δραστηριότητα μπορεί να θέσει σε κίνδυνο τις συγκεντρώσεις της GSH και να οδηγήσει σε εμβρυοπάθεια.

Οι μη ενζυματικές άμυνες περιλαμβάνουν το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) και την α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E). Αυτές δρουν και πάλι από κοινού, με το ασκορβικό να είναι απαραίτητο για την αναγέννηση της μειωμένης α-τοκοφερόλης. Επιπλέον, οι θειολικές



ενώσεις, όπως η θειορεδοξίνη, είναι ικανές να αποτοξινώνουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου, αλλά με τη σειρά τους απαιτούν τη μετατροπή τους πίσω στην ανηγμένη μορφή από την αναγωγή της θειορεδοξίνης. Η τρανσφερρίνη διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο δεσμεύοντας τα ελεύθερα ιόντα σιδήρου και αναστέλλοντας έτσι την αντίδραση Fenton και την παραγωγή  $\text{OH}\cdot$ .

## 1.5 Επίδραση της Νικοτίνης στα κύτταρα του πνεύμονα

Οι υποδοχείς nAChRs εκφράζονται στα περισσότερα μη νευρωνικά ή σωματικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των πνευμονικών κυττάρων, και, όταν ενεργοποιούνται με τη δέσμευση νικοτίνης, μπορούν να προκαλέσουν ποικίλες αλλαγές στην κυτταρική φυσιολογία υποκινώντας/διαμορφώνοντας τις κατιούσες ενδοκυτταρικές οδούς σηματοδότησης (Heusch and Maneckjee, 1998, Scherl et al., 2016, Dang et al., 2016). Η νικοτίνη αυξάνει τα επίπεδα της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης και του κυψελιδικού μεταφορέα ακετυλοχολίνης (ACh) σε ανθρώπινα κύτταρα βρογχοκυψελιδικού καρκινώματος για να αυξήσει την παραγωγή ACh και να προωθήσει δραστηριότητες που σχετίζονται με την ανάπτυξη (Grando, 1997, Grando et al., 2006). Η νικοτίνη μπορεί επίσης να μεταβάλει τη σηματοδότηση της ACh σε κύτταρα του πνεύμονα, η οποία με τη σειρά της επηρεάζει τις δραστηριότητες που ελέγχονται από μιτογόνες ουσίες μέσω μουσκαρινικών υποδοχέων (Grando et al., 2006, Grando, 1997). Επιπλέον, η μεσολαβούμενη από τους nAChR σηματοδότηση είναι ένας κρίσιμος προαγωγός της ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού, έτσι ώστε ο αποκλεισμός των nAChR να καταργεί την μεσολαβούμενη από τη νικοτίνη προώθηση της ανάπτυξης *in vitro* και *in vivo* (Nishioka et al., 2011). Η νικοτίνη είναι ικανή να κινητοποιεί τα μονοπάτια src, Raf/MEK/ERK και PI3K/Akt για να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην προώθηση της κυτταρικής ανάπτυξης στον πνεύμονα. (Nishioka et al., 2011, Dasgupta et al., 2006, Guo et al., 2005). Επηρεάζοντας τη μιτοχονδριακή μεταφορά ηλεκτρονίων, η νικοτίνη μπορεί επίσης να μετριάσει την απόπτωση που προκαλείται από χημειοθεραπεία (Nishioka et al., 2014, Xin and Deng, 2005, Zhang et al., 2009, Jia et al., 2016). Συνολικά, τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η έκθεση στη νικοτίνη μπορεί να μετριάσει την αναστολή της ανάπτυξης σε μη νευρωνικά κύτταρα.

Στα καρκινικά κύτταρα ανιχνεύονται συχνά επίμονες αυξήσεις των ROS, οι οποίες προκαλούν στρες στο κυτταρόπλασμα ή το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) (Tu and Weissman, 2004, Wang et al., 2014). Οι συνοδές πρωτεΐνες εντός του αυλού του ER βοηθούν τις πρωτεΐνες να διπλώνονται σωστά και να μεταφέρονται σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα, ενώ παράλληλα αποτρέπουν τη συσσώρευση ελλαττωματικών μορίων εντός του

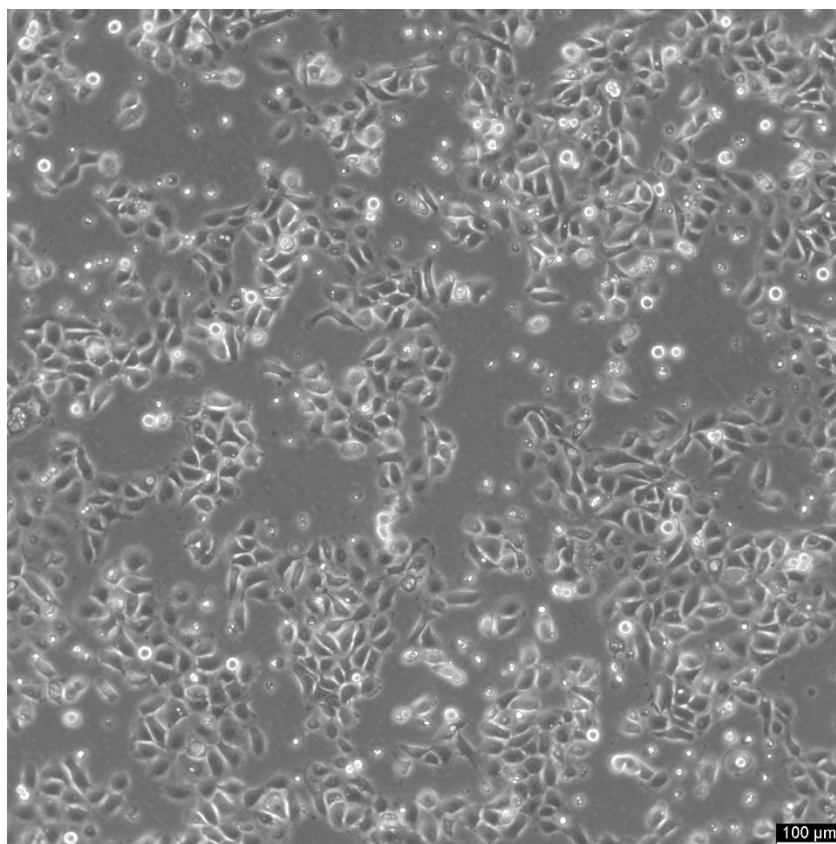
οργανιδίου (Aridor and Balch, 1999, Federonitch et al., 2005). Η BiP είναι μια τέτοια συνοδός στο ER, η σύνθεση της οποίας διεγείρεται μετά από κυτταρικές καταπονήσεις (Tu and Weissman, 2004, Wang et al., 2014). Κατά συνέπεια, η αυξημένη έκφραση της BiP αποτελεί δείκτη στρες στο ER. Αν και το ER μπορεί να ανεχτεί απότομη αύξηση μερικώς αναδιπλωμένων πρωτεϊνών σε υψηλά επίπεδα, η επίμονη συσσώρευση μη κανονικά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών ενεργοποιεί την UPR και αυξάνει την έκφραση της PERK και άλλων "αισθητήρων στρες" (Schroder and Kaufman, 2005).

Έχει δειχθεί πως η μακροχρόνια έκθεση στη νικοτίνη αυξάνει τις ROS σε επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα ποντικού και ανθρώπου και πυροδοτεί ενεργοποίηση της απόκρισης του ER στο στρες και μπορεί να συμπίπτει με εξασθενημένη λειτουργία του p53. Η επίμονη έκθεση στη νικοτίνη οδήγησε τα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα σε μετασχηματισμό όταν η p53 είχε χαθεί. Τα δεδομένα αυτά αποκαλύπτουν το καρκινογόνο δυναμικό της νικοτίνης και την αποδίδουν σε κίνδυνο καρκίνου όταν διακυβεύονται τα συστήματα επιτήρησης των όγκων (Zhang et al., 2020).

## 2. Μεθοδολογία

### 2.1 Τα κύτταρα NCI-H292

Τα κύτταρα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων είναι της κυτταρικής σειράς NCI-H292. Η σειρά αυτή προέρχεται από μεταστατικά κύτταρα πνευμονικού βλεννοεπιδερμοειδούς καρκινώματος από γυναίκα 32 ετών. Τα κύτταρα διατηρούν βλεννοεπιδερμοειδή χαρακτηριστικά στην καλλιέργεια και υποστηρίζουν την αναπαραγωγή του ιού της ηπατίτιδας Β. Αυτή η κυτταρική σειρά έχει επιλεγεί ως πρωτότυπο για τη διαμόλυνση θραυσμάτων υπογονιδιώματος σε ανθρώπινα κύτταρα για τη μελέτη του ρόλου του HBV και των επιμέρους γονιδίων του στην παθογένεια της ιογενούς ηπατίτιδας και του καρκίνου του ήπατος. Η μορφολογία των κυττάρων φαίνεται στην Εικόνα 6.



**Εικόνα 6** Τα κύτταρα NCI-H292

πηγή: *Cell Lines Service*

## 2.2 Κυτταροκαλλιέργεια

Όλες οι σειρές των ανώτερων ευκαρυωτικών κυττάρων διατηρούνται σε 90% v/v FBS/10% v/v DMSO για μικρό χρονικό διάστημα στους  $-80^{\circ}\text{C}$  και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε δοχείο που περιέχει υγρό άζωτο. Η διαδικασία επαναφοράς τους στη θερμοκρασία όπου αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται ( $37^{\circ}\text{C}$ ) είναι αρκετά στρεσογόνα και γίνεται με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ταχύτητα και προθερμασμένα υλικά.

Στην παρούσα έρευνα, το φιαλίδιο αποψύχθηκε με ήπια ανάδευση σε υδατόλουτρο στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Για να μειωθεί η πιθανότητα μόλυνσης, ο χρωματιστός δακτύλιος και το καπάκι διατηρήθηκαν έξω από το νερό. Η απόψυξη ήταν γρήγορη (περίπου 2 λεπτά). Το φιαλίδιο αφαιρέθηκε από το υδατόλουτρο μόλις αποψύχθηκε το περιεχόμενο και απολυμάνθηκε με εμβάπτιση ή ψεκασμό με αιθανόλη 70%. Όλες οι επεμβάσεις από αυτό το σημείο και μετά εκτελέστηκαν υπό αυστηρές άσηπτες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής. Ακολούθησε η άμεση αφαίρεση του κρυοπροστατευτικού παράγοντα (DMSO). Αυτό έγινε με φυγοκέντρηση του εναιωρήματος σε περίπου 125 x g για 5 έως 10 λεπτά, απόρριψη του υπερκειμένου και επαναιώρηση το κυτταρικού ιζήματος σε κατάλληλη ποσότητα φρέσκου θρεπτικού υλικού.

Τα κύτταρα NCI-H292 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI εμπλουτισμένο με 10% v/v FBS, NEA (Nonessential amino acids-μη απαραίτητα αμινοξέα), L-γλουταμίνη και αντιβιοτικά (0.1 mg/ml στρεπτομυκίνη, 1 U/ml πενικιλίνη). Μετά από εμβολιασμό του θρεπτικού με κύτταρα εντός ειδικής πλαστικής φλάσκας, τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας  $37^{\circ}\text{C}$ , σε ατμόσφαιρα 5%  $\text{CO}_2$ .

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, αρχικά αφαιρέθηκε και απορρίφθηκε το θρεπτικό υπερκείμενο της καλλιέργειας. Στη συνέχεια το στρώμα των κυττάρων ξεπλύθηκε με διάλυμα 0,25% (w/v) Trypsin- 0,53 mM EDTA για να αφαιρεθούν όλα τα ίχνη ορού που περιέχει αναστολέα θρυψίνης. Κατόπιν, έγινε προσθήκη διαλύματος Trypsin-EDTA στη φιάλη και τα κύτταρα παρατηρήθηκαν κάτω από ένα ανεστραμμένο μικροσκόπιο μέχρι να διασπαρεί το στρώμα των κυττάρων (συνήθως εντός 5 έως 15 λεπτών). Όταν τα κύτταρα βρίσκονταν πλέον σε εναιώρημα έγινε προσθήκη θρεπτικού μέσου (που απενεργοποιεί τη θρυψίνη) και το κυτταρικό εναιώρημα προστέθηκε σε νέα δοχεία καλλιέργειας. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν ξανά στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Συνιστάται αναλογία ανακαλλιέργειας 1:3 έως 1:8 και ανανέωση κάθε 2 έως 3 ημέρες.

### 2.3 Επίστρωση τρυβλίου 96 φρεατίων

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, μετά από την επανεναιώρηση των κυττάρων με διάλυμα θρυψίνης έγινε μέτρηση των κυττάρων σε αιματοκυτταρόμετρο και υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων ώστε σε κάθε φρεάτιο να υπάρχουν 15.000 κύτταρα. Στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά προστέθηκαν σε επιπλέον φρέσκο θρεπτικό υλικό, υπολογίζοντας έτσι ώστε τα 15.000 κύτταρα που αντιστοιχούν σε κάθε φρεάτιο να βρίσκονται σε 100μl θρεπτικού υλικού. Με πιπέτα ακριβείας το εναιώρημα των κυττάρων διαμοιράστηκε στα φρεάτια και επωάστηκε στους 37°C, ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα.

### 2.4 Επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις νικοτίνης σε διαφορετικούς χρόνους

Οι συγκεντρώσεις της νικοτίνης και του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, που χρησιμοποιήθηκε ως control, προετοιμάστηκαν με διαδοχικές αραιώσεις και φαίνονται στον Πίνακας 1. Έγιναν επώσεις για χρονικά διαστήματα όπως φαίνονται στον Πίνακας 2. Κάθε συγκέντρωση είτε νικοτίνης είτε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> προστέθηκε σε 6 φρεάτια για κάθε χρονική στιγμή, 3 για τις μετρήσεις ATP (βιωσιμότητα) και 3 για τις μετρήσεις ROS.

Πίνακας 1 Συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

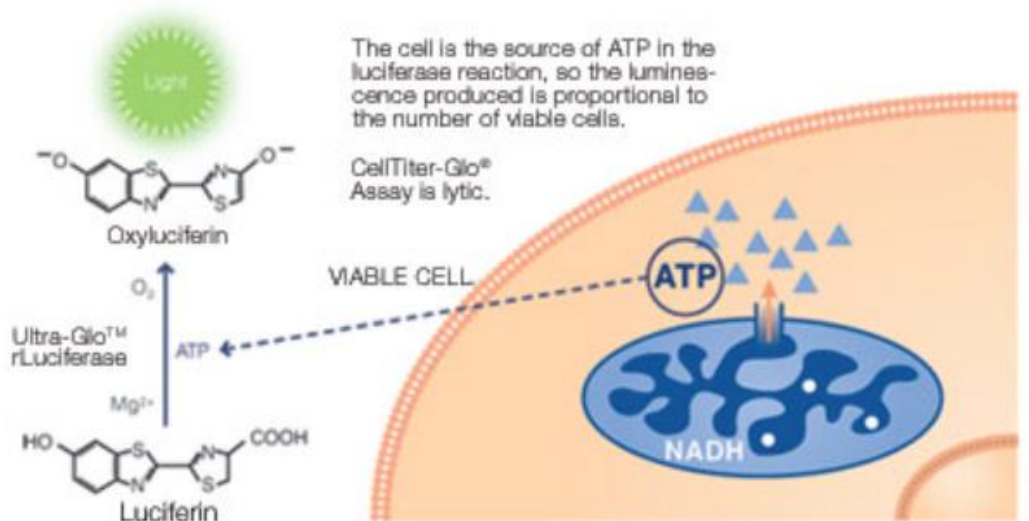
Συγκεντρώσεις Νικοτίνης (mg/ml) 1 <sup>η</sup> Μέτρηση	Συγκεντρώσεις Νικοτίνης (mg/ml) 2 <sup>η</sup> Μέτρηση	Συγκεντρώσεις H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)
0,07	0,2	0,016
0,15	0,26	0,031
0,3	0,32	0,063
0,6	0,38	0,125
1,25	0,45	0,25
2,5	0,5	0,5
5	0,55	1
10	0,6	2
	0,7	

Πίνακας 2 Χρόνοι επώασης με Νικοτίνη και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Χρόνοι επώασης
30 λεπτά
2 ώρες
24 ώρες
48 ώρες

## 2.5 Μέτρηση ATP

Ο προσδιορισμός βιωσιμότητας κυττάρων με έκθεση στο ένζυμο λουσιφεράση και καταγραφή από λουμινόμετρο της βιοφωταύγειας που παράγεται είναι μια πολύ ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταροτοξικότητας. Η μέθοδος CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay βασίζεται στην ανίχνευση βιοφωταύγειας που παράγεται παρουσία τριφωσφορικής αδενοσίνης ATP δείκτη του κυτταρικού μεταβολισμού, μέσω του συστήματος λουσιφεράσης – λουσιφερίνης (Εικόνα 7). Συγκεκριμένα, το ένζυμο λουσιφεράση δρα επί της λουσιφερίνης παρουσία Mg(II) και ATP για να παραχθεί οξυλουσιφερίνη και να απελευθερωθεί ενέργεια με τη μορφή φωταύγειας. Δεδομένου ότι το ένζυμο χρησιμοποιεί το κυτταρικό ATP για να καταλύσει την αντίδραση, η ένταση του φωτός που παράγεται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ATP που υπάρχει στα κύτταρα, παρέχοντας έτσι έναν δείκτη της κυτταρικής μεταβολικής δραστηριότητας. Η παραγόμενη βιοφωταύγεια (φως) προσδιορίζεται μετά από μέτρηση των δειγμάτων σε λουμινόμετρο και εκφράζεται σε μονάδες RLU. Η μέτρηση του ATP είναι ο πιο ακριβής, αποτελεσματικός και άμεσος τρόπος προσδιορισμού του αριθμού των ζωντανών κυττάρων στην καλλιέργεια με πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων μεθόδων (Kleijn et al., 2016).

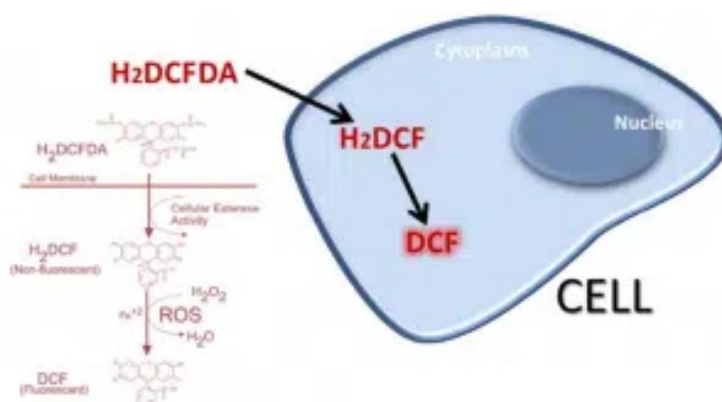


**Εικόνα 7 Μηχανισμός ανίχνευσης ATP από το CellTiter-Glo**

Μετά τη χορήγηση των ουσιών και το πέρας του επιθυμητού χρονικού διαστήματος, σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στο κιτ, ίσοι όγκοι του αντιδραστηρίου και των κυττάρων αναμίχθηκαν σε λευκό αδιαφανές τρυβλίο 96 φρεατίων με επίπεδο πυθμένα και αναδεύτηκαν για περίπου 2 λεπτά μέχρι να προκληθεί λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια το τρυβλίο εισήχθη σε λουμινόμετρο και έγινε μέτρηση του φωτός.

## 2.6 Μέτρηση ROS

Το πρωτόκολλο DCFDA βασίζεται στη διάχυση του DCFDA / H<sub>2</sub>DCFDA / DCFH-DA / DCFH στο κύτταρο όπως φαίνεται στην Εικόνα 8. Στη συνέχεια αποακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε μια μη φθορίζουσα ένωση, η οποία αργότερα οξειδώνεται από ROS σε 2', 7'-διχλωροφθοροσεΐνη (DCF). Η DCF είναι εξαιρετικά φθορίζουσα και ανιχνεύεται με φασματοσκοπία φθορισμού με διέγερση/εκπομπή στα 485 nm/535 nm.



### Εικόνα 8 Μηχανισμός ανίχνευσης ROS με H<sub>2</sub>DCFDA

Τα προσκολλημένα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε τυπικά μέσα κυτταροκαλλιέργειας την ημέρα πριν από το πείραμα. Τα κύτταρα ανακαλλιεργήθηκαν και ένα σκουρόχρωμο τρυβλίο 96 φρεατίων με διαφανή πυθμένα. Αφού αφέθηκαν τα κύτταρα να προσκολληθούν κατά τη διάρκεια της νύχτας, το μέσο απομακρύνθηκε και προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 1X. Στη συνέχεια, το ρυθμιστικό διάλυμα αντικαταστάθηκε με το αραιωμένο διάλυμα DCFDA και τα κύτταρα επώαστηκαν στο σκοτάδι στους 37°C για 45 λεπτά. Στη συνέχεια, το διάλυμα DCFDA απομακρύνθηκε και αντικαταστάθηκε με πλήρες μέσο με 10% FBS χωρίς κόκκινο φαινόλης. Σε αυτό το στάδιο προστέθηκαν η νικοτίνη και το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για τον επιθυμητό χρόνο. Μετά την επεξεργασία δεν έγινε πλύση. Τέλος, η πλάκα μετρήθηκε αμέσως σε φθορισμόμετρο σε Ex/Em = 485/535 nm σε λειτουργία τελικού σημείου παρουσία ενώσεων, μέσων ή ρυθμιστικού διαλύματος.

### 2.7 Επεξεργασία αποτελεσμάτων-Δημιουργία γραφικών παραστάσεων

Η επεξεργασία των τιμών που λήφθηκαν από το λουμιόμετρο και το φθορισμόμετρο αναλύθηκαν στο πρόγραμμα Microsoft Excel για τη δημιουργία X-Y διαγραμμάτων. Οι τιμές των ROS κανονικοποιήθηκαν με βάση τις αντίστοιχες τιμές βιωσιμότητας ώστε να υπολογιστεί το ποσό ROS/ κύτταρο.

Αρχικά για κάθε συγκέντρωση (συμπεριλαμβανομένου το only cells και το only media) βρέθηκε ο Μέσος Όρος από τα 3 φρεάτια που αποτελούν βιολογική και τεχνική επανάληψη της ίδιας συνθήκης. Αν κάποια από τις 3 τιμές διέφερε από τις άλλες δεν λήφθηκε υπόψιν. Για διόρθωση των τιμών σε σχέση με την παρουσία του θρεπτικού υλικού στα φρεάτια



αφαιρέθηκε η τιμή φρεατίων που περιείχαν μόνο θρεπτικό υλικό. Τέλος, υπολογίστηκε το ποσοστό βιωσιμότητας σε σχέση με αρνητικό μάρτυρα, φρεάτια με ίδιο αριθμό κυττάρων δηλαδή όπου δεν είχε προστεθεί νικοτίνη  $H_2O_2$ . Αυτές οι τιμές κυμαίνονται μεταξύ του 0 (καθόλου βιωσιμότητα) και του 1 (ίδια βιωσιμότητα με το μάρτυρα) και πολλαπλασιαζόμενες με τον παράγοντα 100 % μπορεί να προκύψει το % ποσοστό.

### 3. Αποτελέσματα της Έρευνας

Κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας ακολουθήθηκε η επεξεργασία των κυττάρων NCI-H292 για την μελέτη της παραγωγής ROS κατά την επώασή τους με νικοτίνη. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το  $H_2O_2$ , γνωστός παράγοντας οξειδωτικού στρες.

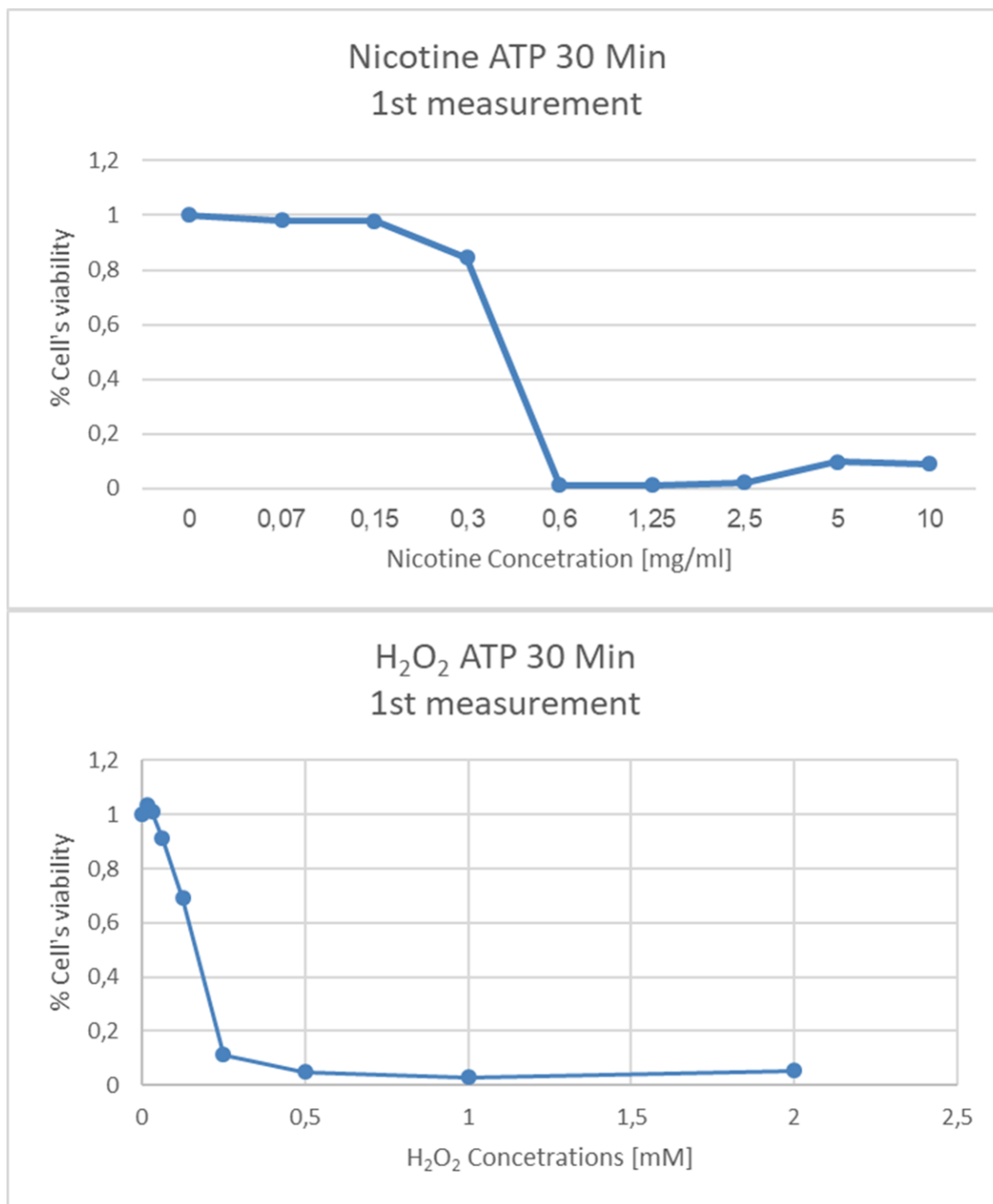
#### 3.1 Μετρήσεις για συγκεντρώσεις Νικοτίνης μεταξύ 0-10 mg/ml (Μέτρηση 1<sup>η</sup>)

Για την πρώτη μέτρηση (βλ. Παράγραφο 2.4) χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις νικοτίνης μεταξύ 0-10 mg/ml στους χρόνους 30 λεπτά, 2 ώρες, 24 ώρες, 48 ώρες.

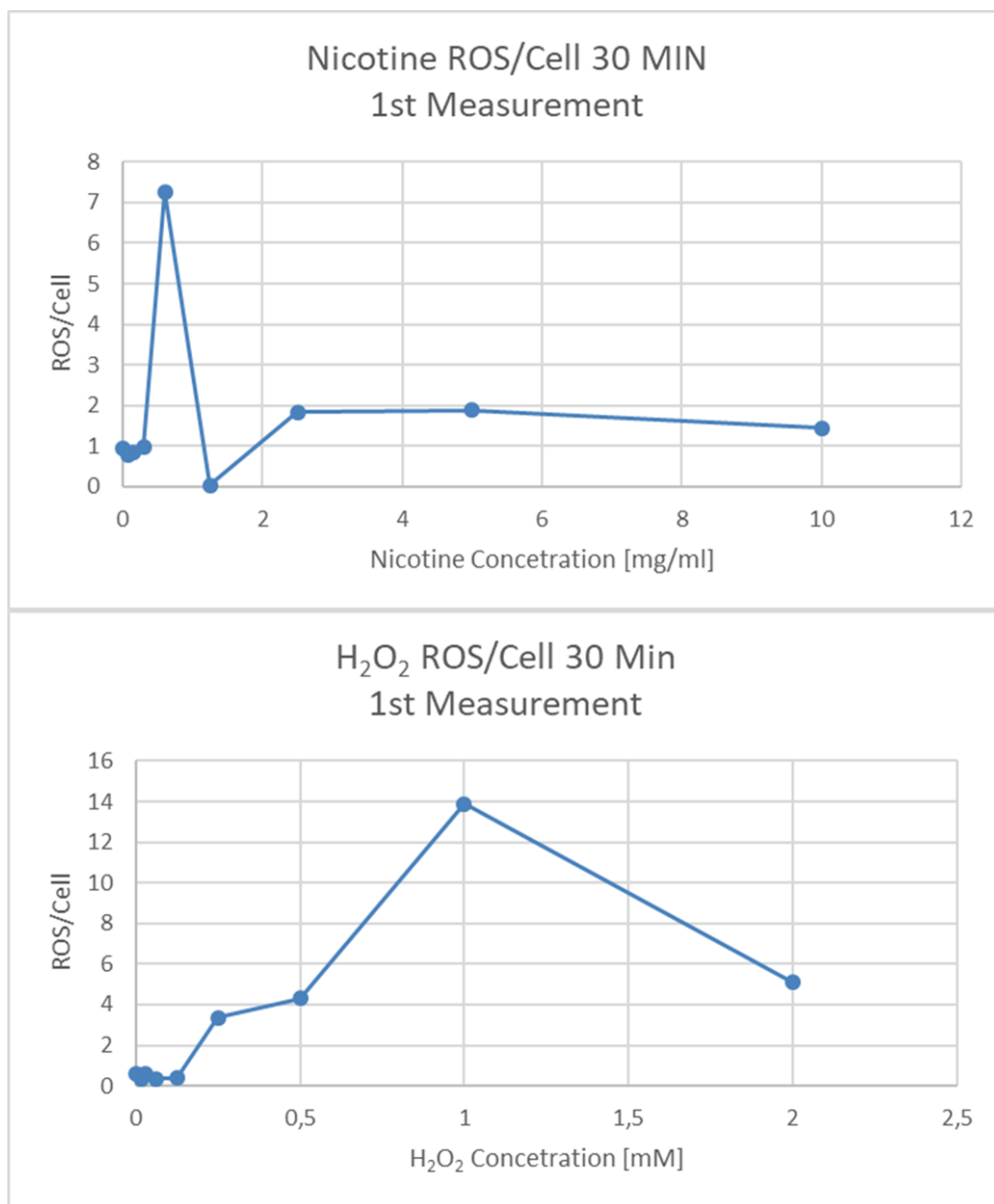
Για τα 30 λεπτά παρατηρούμε στην Εικόνα 9 Εικόνα 9 Μέτρηση ATP μετά από 30 λεπτά επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και  $H_2O_2$  πως η βιωσιμότητα των κυττάρων μειώνεται απότομα μεταξύ των συγκεντρώσεων 0,3 mg/ml και 0,6 mg/ml. Οι τιμές των ROS φαίνεται στην Εικόνα 10 να παραμένουν σταθερές σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων νικοτίνης με εξαίρεση τις τιμές 0,6 και 1,25 που εμφανίζουν μεγάλη απόκλιση από τις συγκεντρώσεις εκατέρωθέν τους. Για το  $H_2O_2$ , παρουσιάζεται μια σταδιακή μείωση της βιωσιμότητας μεταξύ των τιμών 0 και 0,25 mM και στη συνέχεια σταθερά πολύ μικρό ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων. Η παραγωγή ROS ακολουθεί αύξηση ανάλογη της αύξησης της συγκέντρωσης  $H_2O_2$ .

Τα αποτελέσματα για τη βιωσιμότητα μετά τις 2 ώρες επώασης παρουσιάζονται στην Εικόνα 11, όπου παρατηρείται μείωση της βιωσιμότητας στις συγκεντρώσεις που είναι χαμηλότερες του 0,3 mg/ml σε σχέση με τα 30 λεπτά, κάτι που φαίνεται να έχει ίδιο μοτίβο και στη βιωσιμότητα παρουσία του  $H_2O_2$ . Για τη Νικοτίνη, παραμένει η απότομη κλίση της καμπύλης στις συγκεντρώσεις μεταξύ 0,3 και 0,6 mg/ml, ενώ για το  $H_2O_2$ , η βιωσιμότητα φτάνει κοντά στο 0 για τη συγκέντρωση 0,25 mM. Η αναλογία ROS/κύτταρο (Εικόνα 12) παρουσιάζει μια μικρή μείωση στις συγκεντρώσεις ως 0,6 mg/ml Νικοτίνης, αυξάνεται ξανά στα επίπεδα που είχαν τα κύτταρα που δεν είχαν υποστεί επώαση, και μια πολύ μεγάλη αύξηση στα 2,5 mg/ml, που μειώνεται στη συνέχεια.

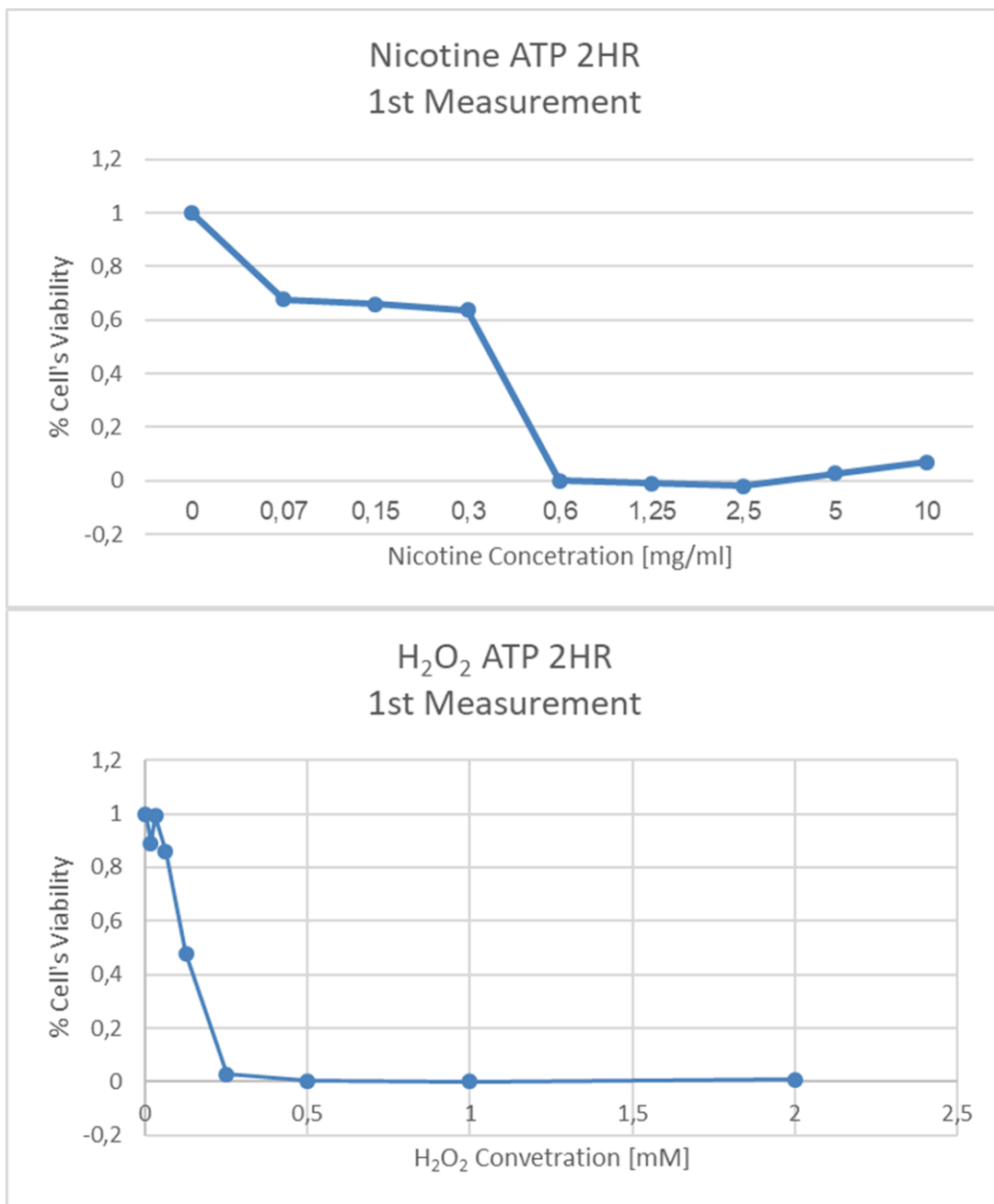
Το μοτίβο στη βιωσιμότητα δεν αλλάζει για τις 24 και 48 ώρες επώασης (Εικόνα 13 και Εικόνα 15 αντίστοιχα), ενώ για την παραγωγή ROS/κύτταρο παρατηρήθηκε μια μεγάλη αύξηση για τη συγκέντρωση 1,25 mg/ml (Εικόνα 14 και Εικόνα 16).



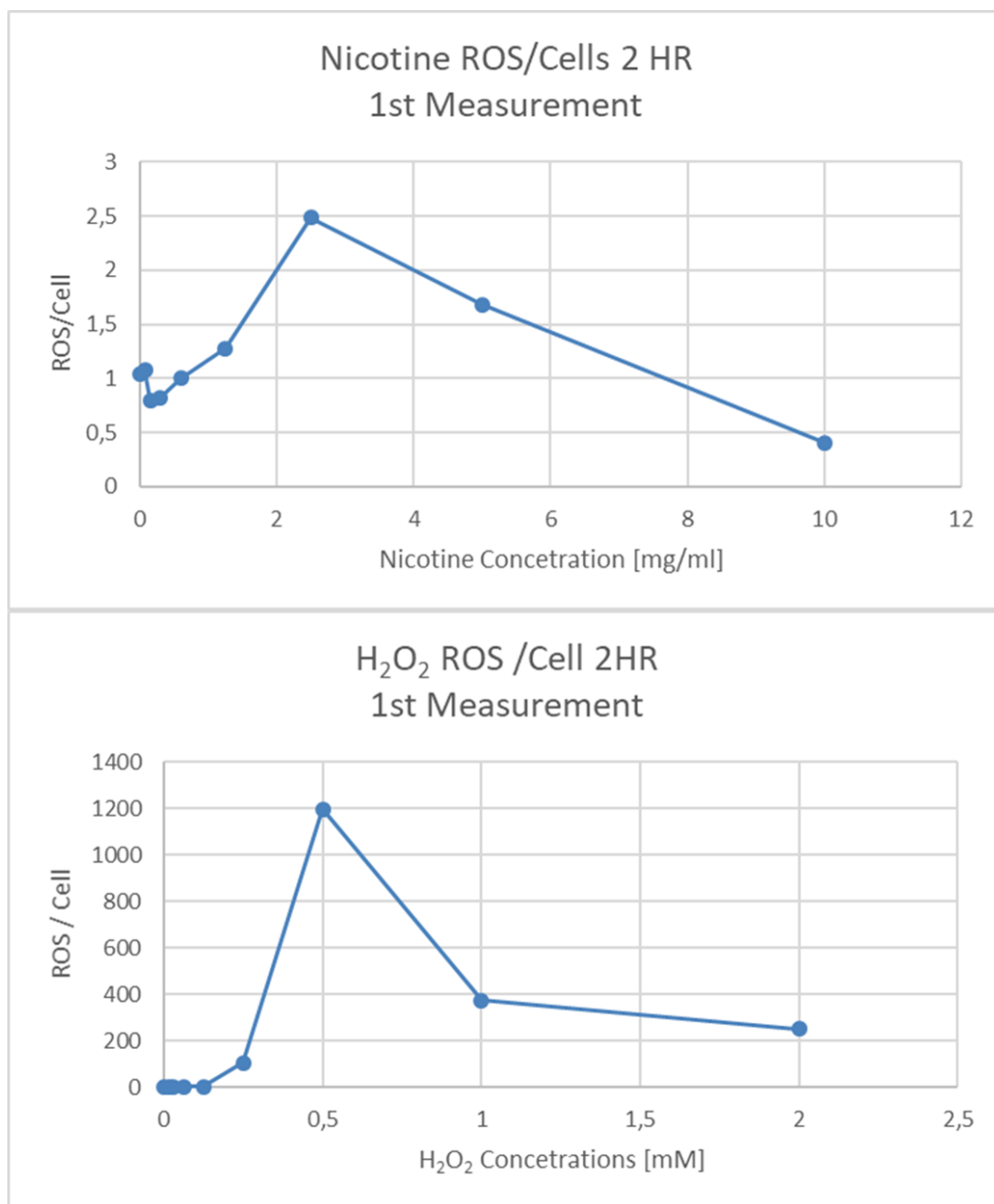
**Εικόνα 9 Μέτρηση ATP μετά από 30 λεπτά επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**



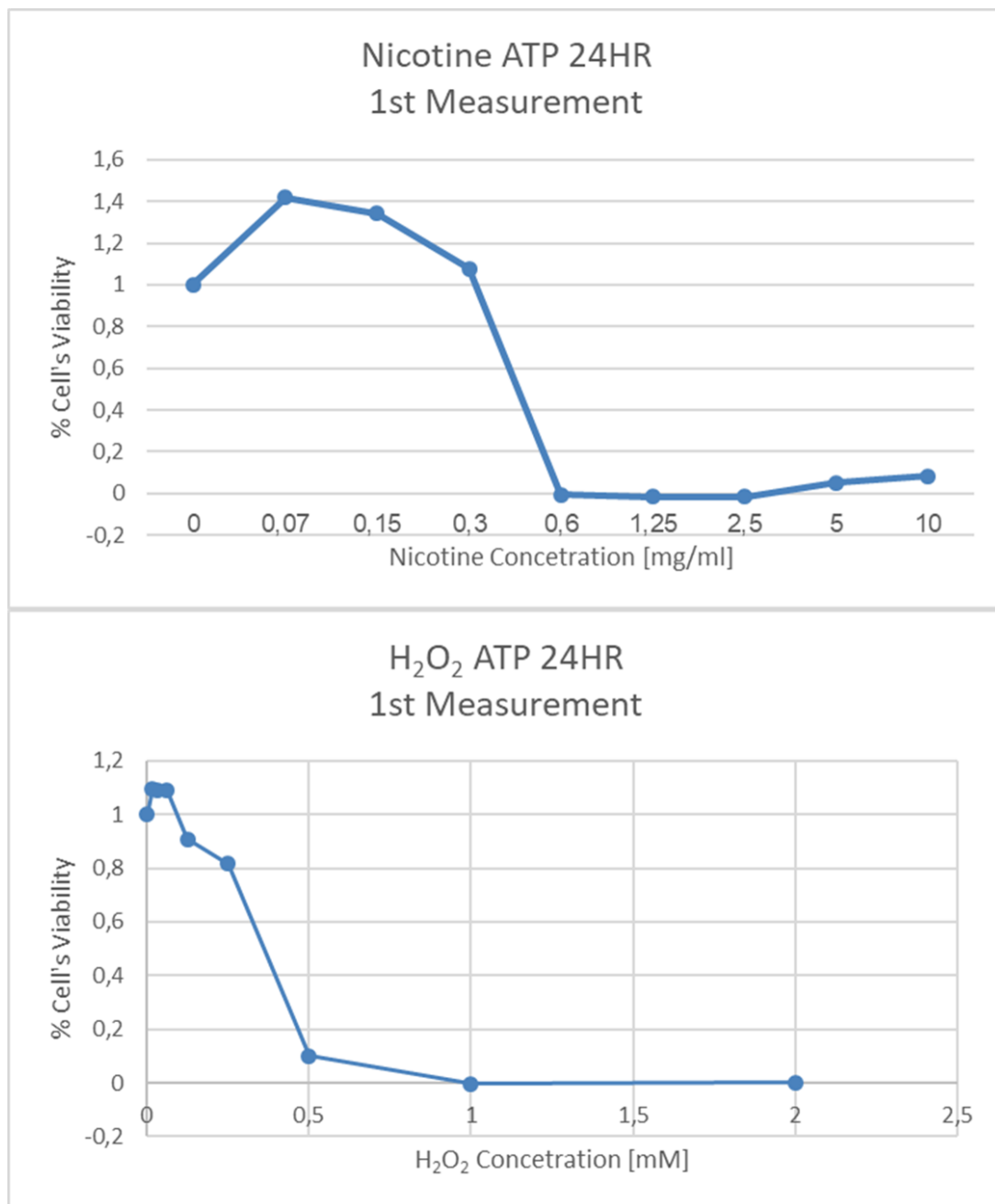
**Εικόνα 10** Μέτρηση ROS/κύτταρο μετά από 30 λεπτά επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



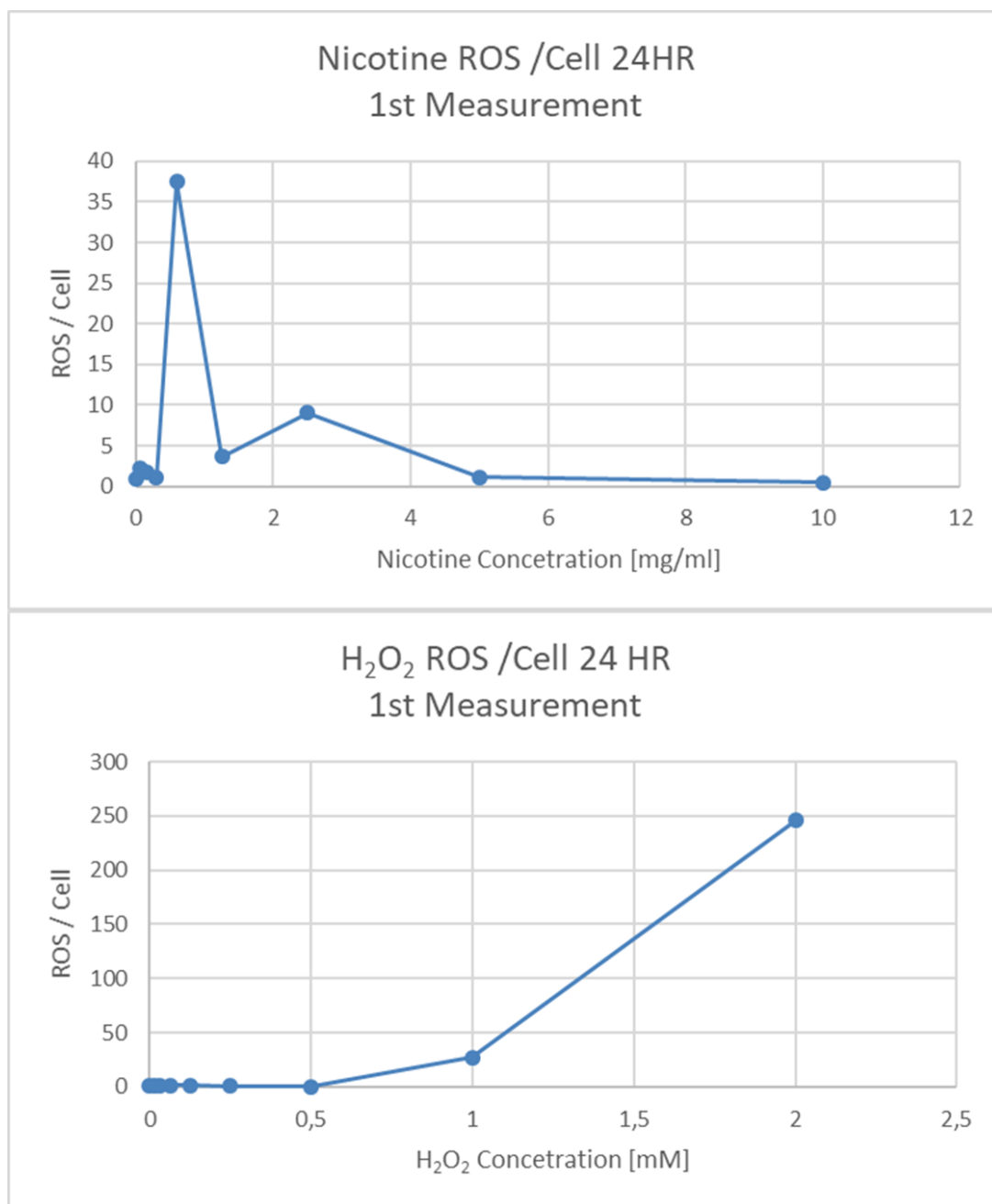
Εικόνα 11 Μέτρηση ATP μετά από 2 ώρες επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



**Εικόνα 12 Μέτρηση ROS/κύτταρο μετά από 2 ώρες επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

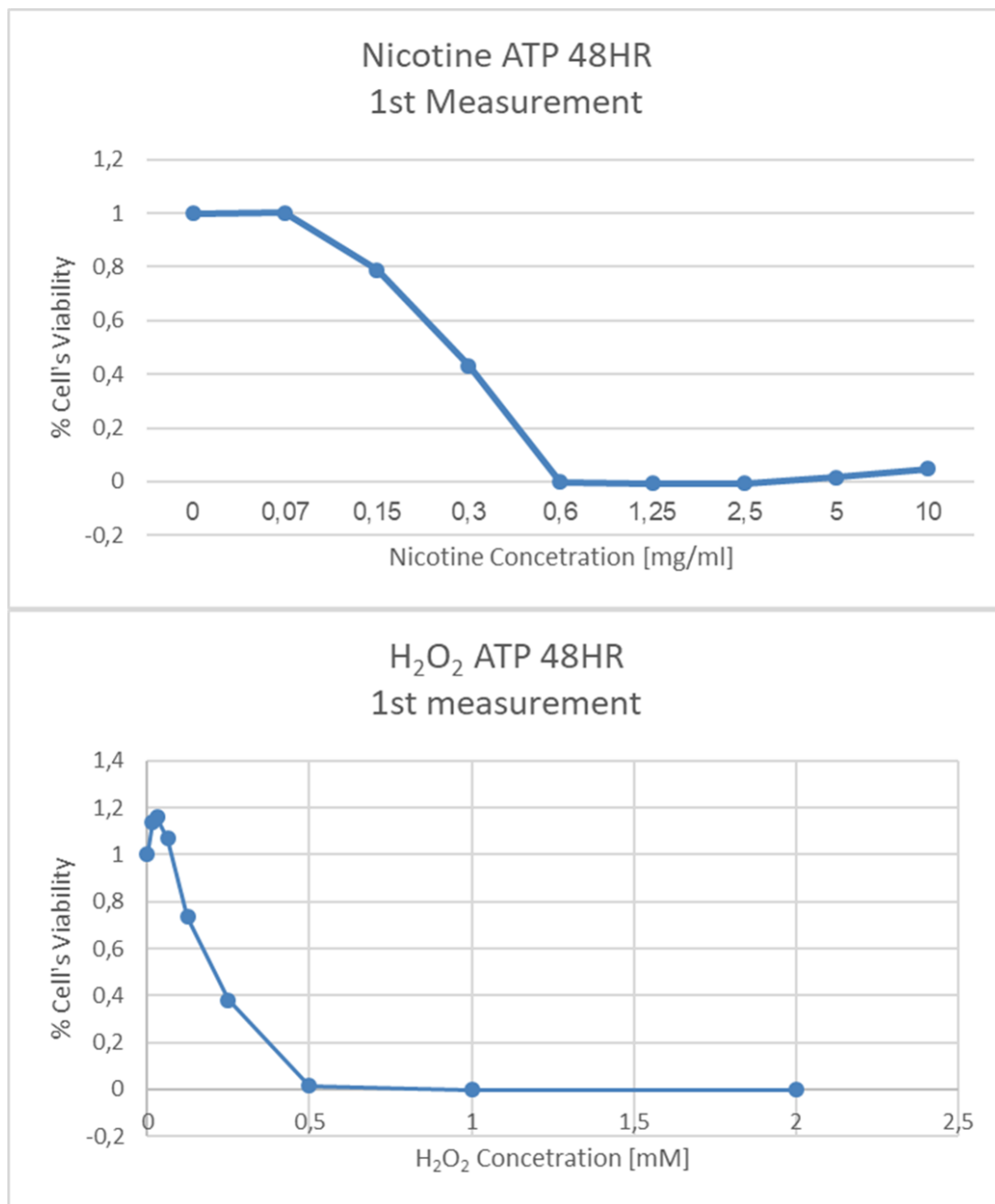


Εικόνα 13 Μέτρηση ATP μετά από 24 ώρες επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

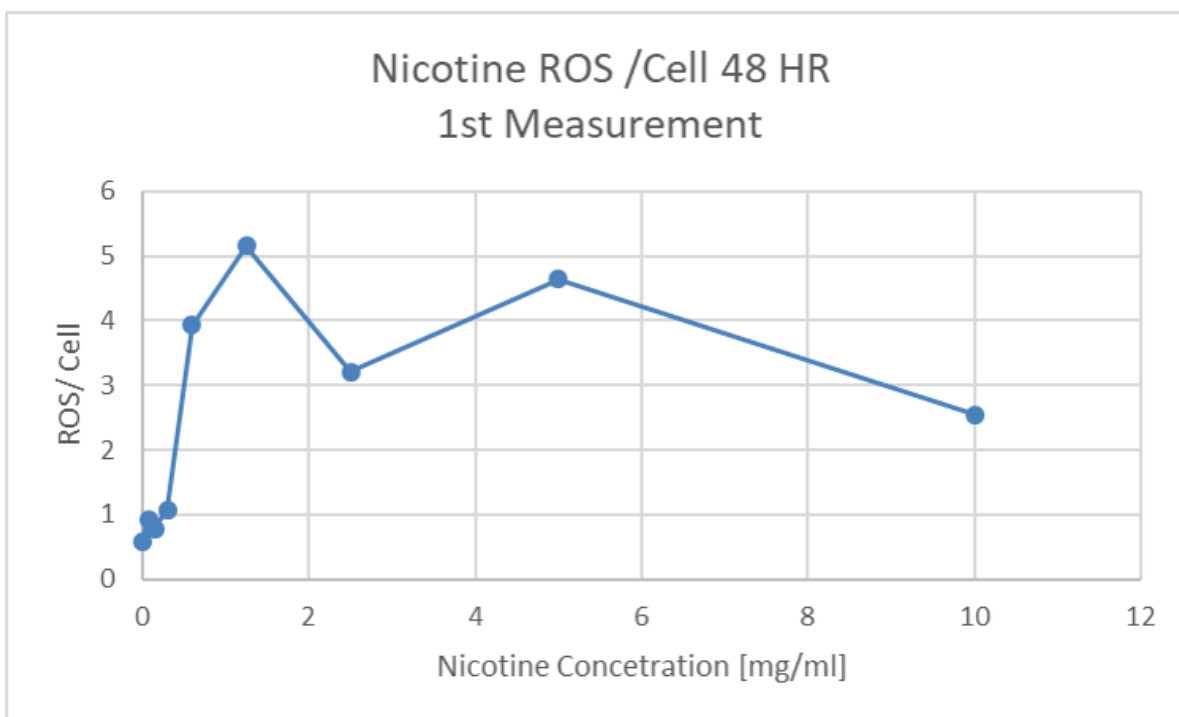


**Εικόνα 14 Μέτρηση ROS/κύτταρο μετά από 24 ώρες επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**





**Εικόνα 15 Μέτρηση ATP μετά από 48 ώρες επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**



Εικόνα 16 Μέτρηση ROS/κύτταρο μετά από 48 ώρες επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης

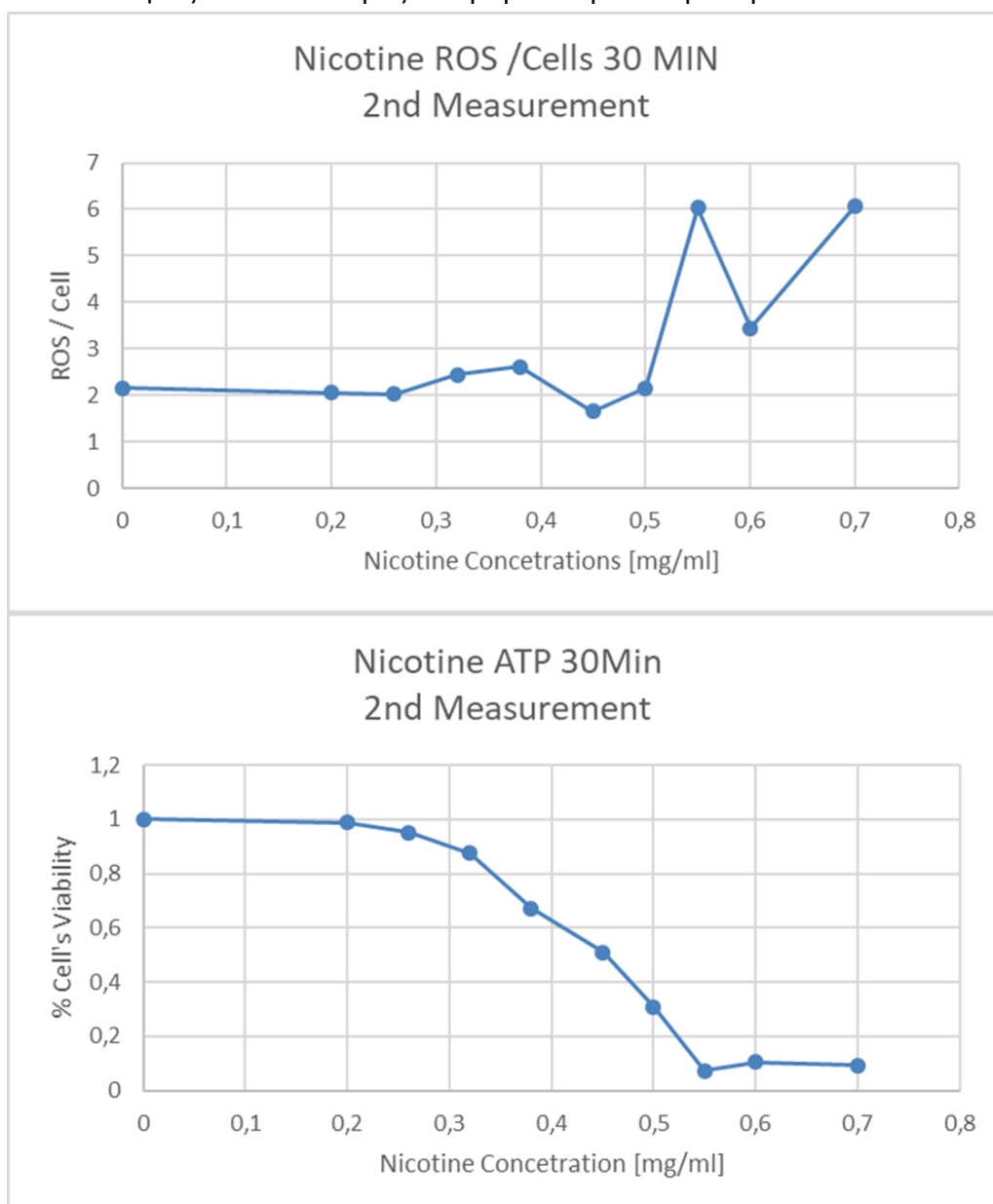
### 3.2 Μετρήσεις για συγκεντρώσεις Νικοτίνης μεταξύ 0-0,7 mg/ml (Μέτρηση 2<sup>η</sup>)

Λόγω της απότομης κλίσης στα διαγράμματα βιωσιμότητας των κυττάρων που παρουσιάστηκαν στην Παράγραφο 3.1, πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων με συγκεντρώσεις νικοτίνης μεταξύ 0 και 0,7 mg/ml για 30 λεπτά επώασης (Εικόνα 17) και 2 ώρες (Εικόνα 18).

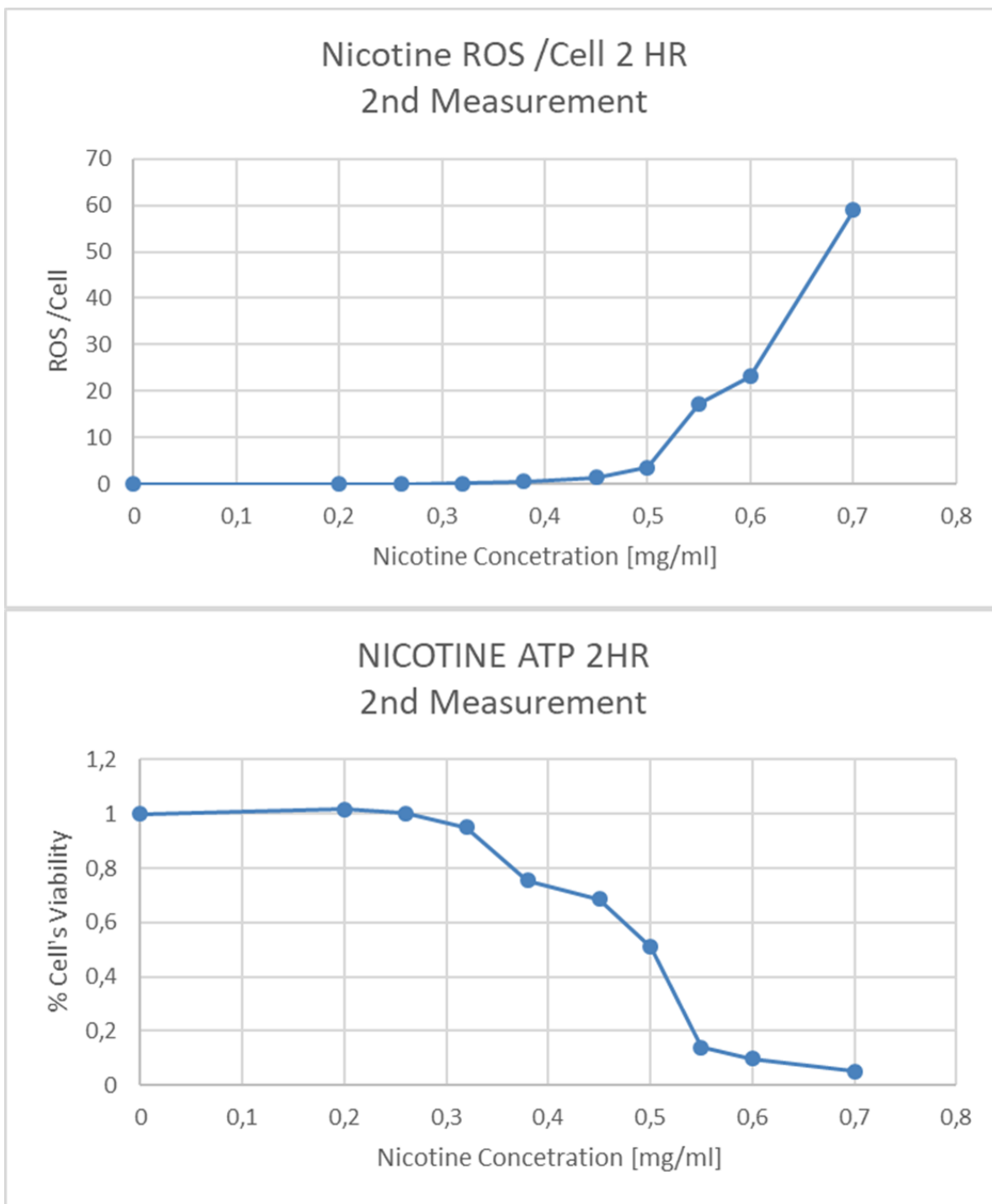
Παρατηρήθηκε πως στα 30 λεπτά επώασης, η βιωσιμότητα αρχίζει να μειώνεται από τα 0,25 mg/ml περίπου, φτάνοντας το κατώτερο όριο στα 0,55 mg/ml. Ως προς την παραγωγή ROS ανά κύτταρο, ανοδική πορεία εμφανίζεται από το 0,33 mg/ml, και, με την εξαίρεση των τιμών 0,45, 0,5 και 0,6 mg/ml, παρατηρείται αύξηση ανάλογη της αύξησης της ποσότητας.

Αντίστοιχη παρατήρηση ως προς τη βιωσιμότητα γίνεται για τις 2 ώρες επώασης, δηλαδή η βιωσιμότητα αρχίζει να μειώνεται από τα 0,25 mg/ml περίπου, φτάνοντας το κατώτερο όριο στα 0,55 mg/ml. Ως προς την παραγωγή ROS ανά κύτταρο, η ανοδική πορεία

εμφανίζεται από το 0,45 mg/ml, και παρατηρείται αύξηση ανάλογη της αύξησης της ποσότητας σε όλο το εύρος των μεγαλύτερων συγκεντρώσεων.



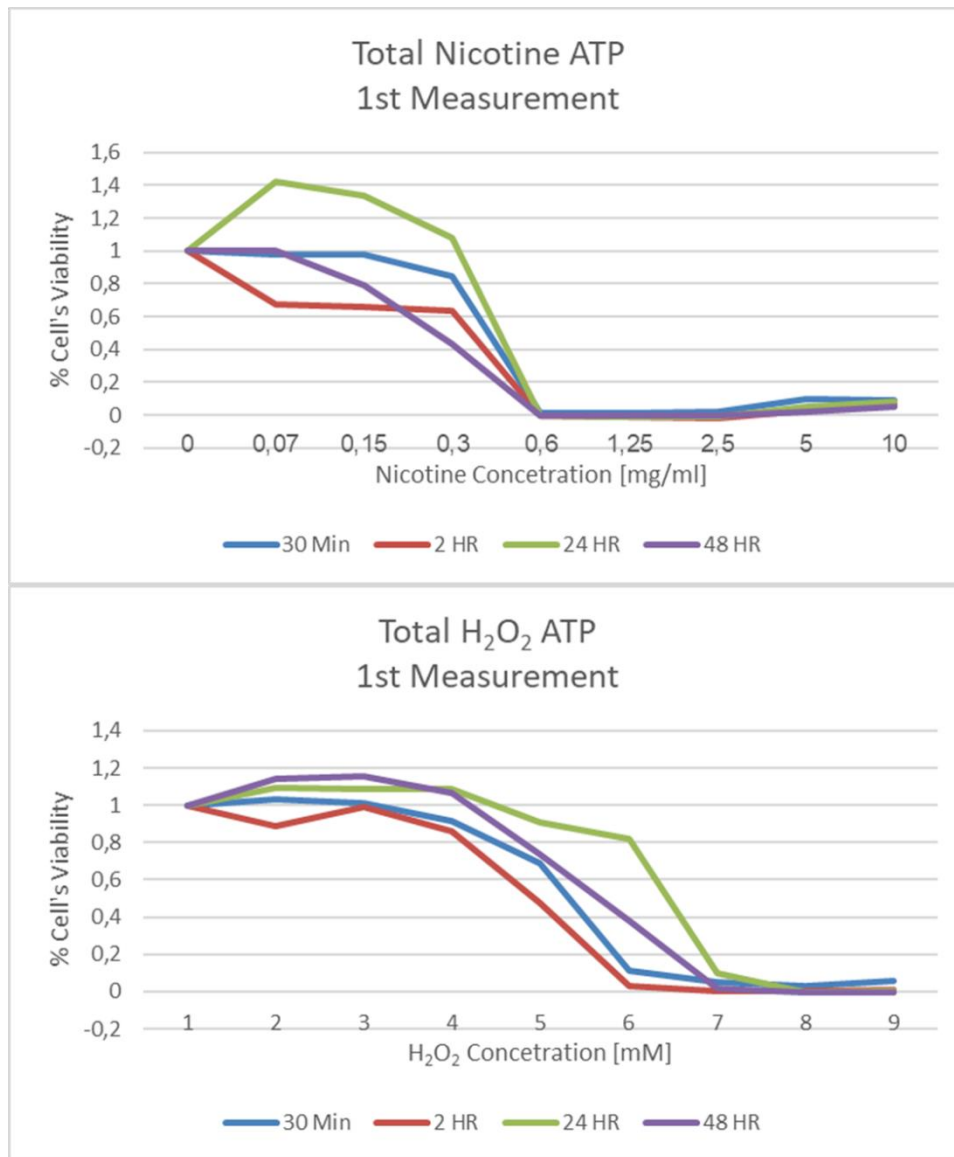
Εικόνα 17 Μετρήσεις ROS/κύτταρο και βιωσιμότητας μετά από 30 λεπτά επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης



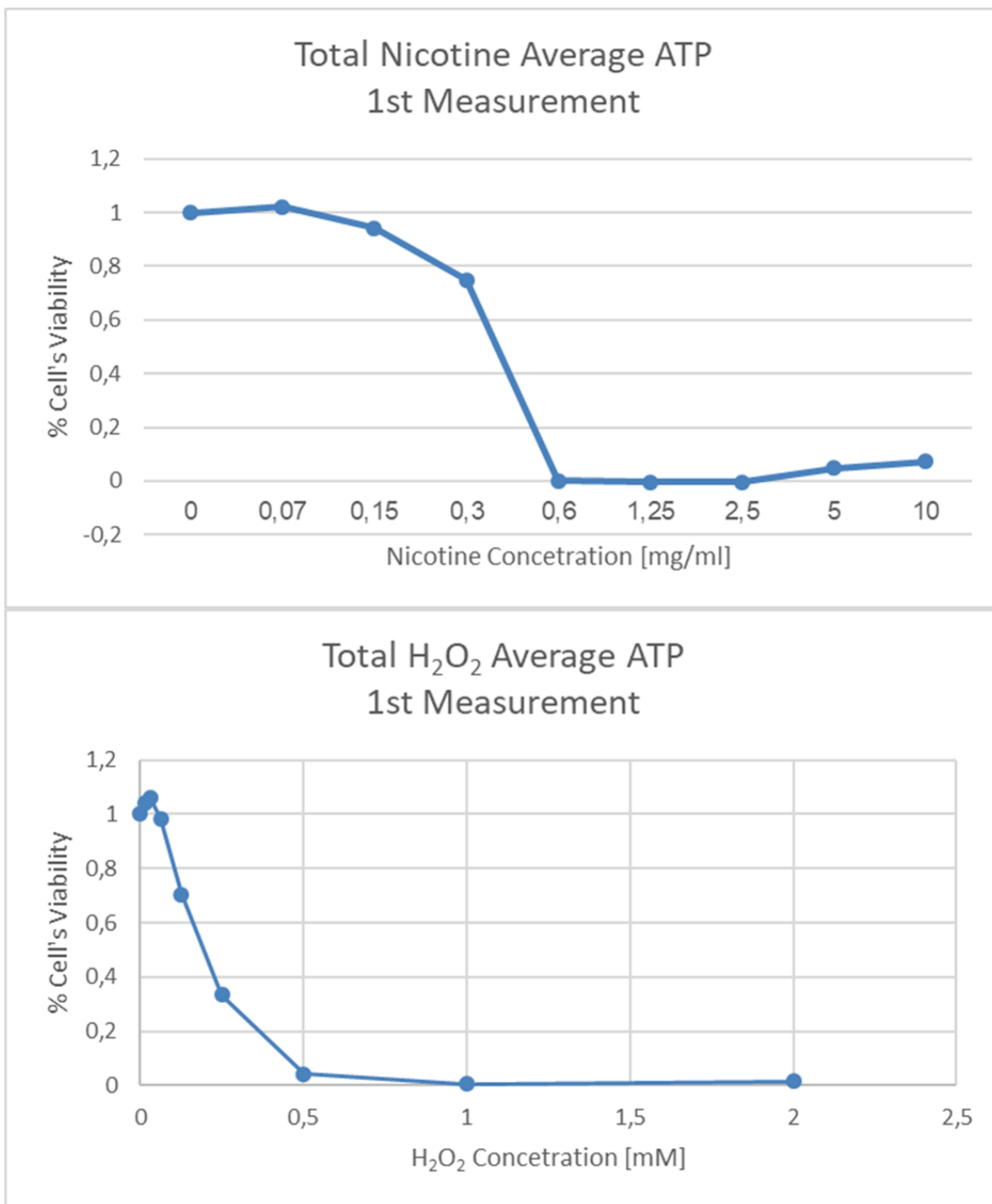
Εικόνα 18 Μετρήσεις ROS/κύτταρο και βιωσιμότητας μετά από 2 ώρες επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης

### 3.3 Υπολογισμός IC50

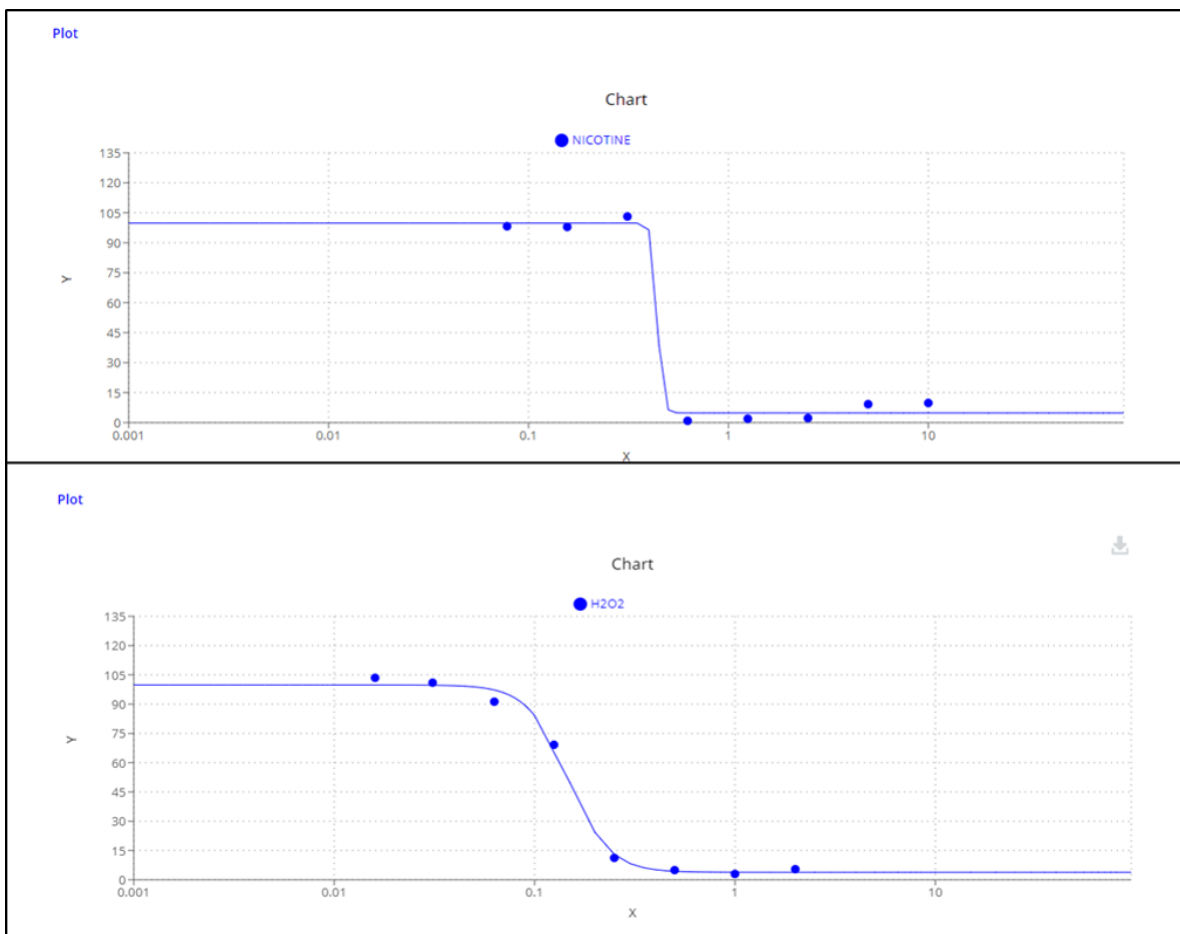
Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα για τη βιωσιμότητα των κυττάρων παρουσία Νικοτίνης και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, καθώς και ο μέσος όρος τους παρουσιάζονται στις Εικόνα 19 και Εικόνα 20. Ο υπολογισμός του IC50 παρουσιάζεται στην Εικόνα 21, και υπολογίστηκε ως 0,45mg/ml για τη Νικοτίνη και 0,15 mM για το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



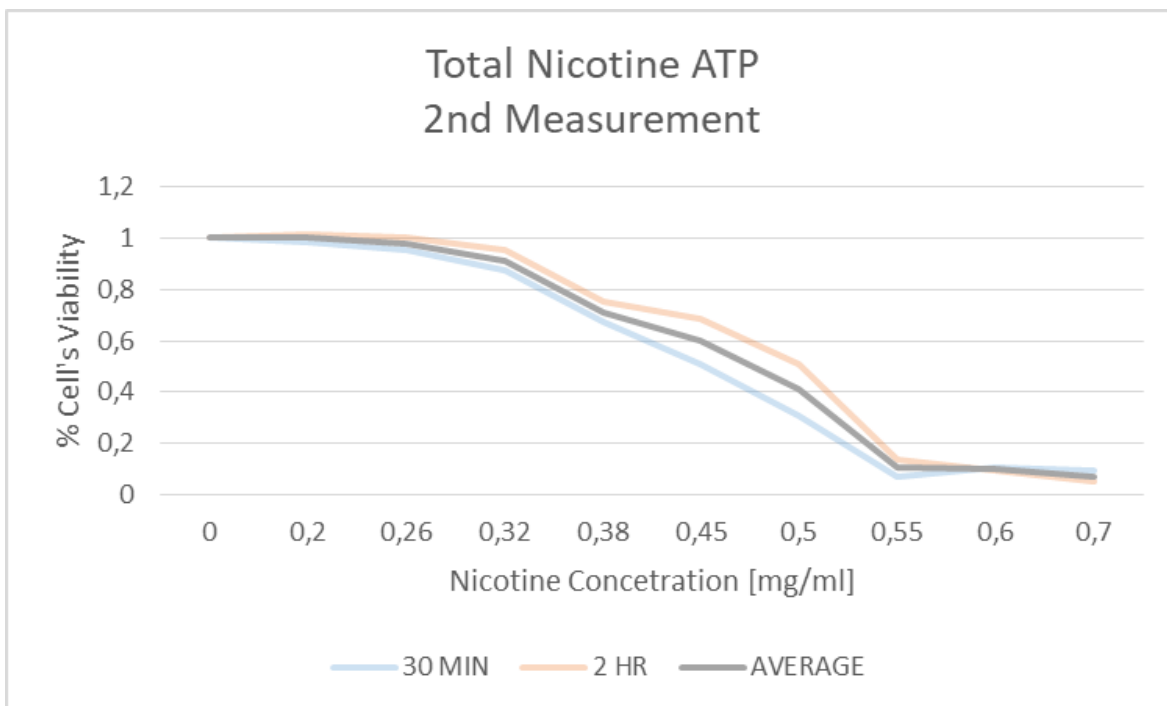
Εικόνα 19 Μέτρηση ATP μετά από επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και διαφορετικό χρονικό διάστημα



Εικόνα 20 Απεικόνιση των μέσων όρων της μέτρησης ATP μετά από επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και διαφορετικό χρονικό διάστημα



Εικόνα 21 Υπολογισμός IC50 για τη Νικοτίνη και το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



**Εικόνα 22** Απεικόνιση των μέσων όρων της μέτρησης ATP μετά από επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης για διαφορετικό χρονικό διάστημα 2<sup>ης</sup> μέτρησης



## 4. Συζήτηση

Ο καπνός είναι η δεύτερη πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ψυχοδραστική ουσία στον πλανήτη, με περισσότερους από ένα δισεκατομμύριο καπνιστές παγκοσμίως. Εκτός από τα καιγόμενα τσιγάρα που είναι το πιο διαδεδομένο μέσω χορήγησης της νικοτίνης και έχει καλά χαρακτηρισμένες επιπτώσεις στον οργανισμό λόγω των τοξικών και καρκινογόνων παραπροϊόντων της καύσης, πλέον υπάρχουν και άλλα μέσα χορήγησης της νικοτίνης μέσω της αναπνευστικής οδού.

Η νικοτίνη είναι επίσης ο κύριος ένοχος που επηρεάζει την υγεία των πνευμόνων και την ανοσία. Ενισχύει τη φλεγμονώδη απόκριση των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων, αλλά καταστέλλει τη φαγοκυτταρική ικανότητα καθώς και την απελευθέρωση ROS και από τους δύο αυτούς τύπους κυττάρων. Ο πολλαπλασιασμός των λεμφοκυττάρων καθώς και η κυτταροτοξική δραστηριότητά τους αναστέλλονται αμφότερα παρουσία νικοτίνης. Επιπλέον, η νικοτίνη έχει επίσης βαθιά επίδραση στις λειτουργίες των επιθηλιακών κυττάρων. Τα αναπνευστικά επιθηλιακά κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα των πνευμόνων. Σχηματίζουν έναν φραγμό που εμποδίζει την είσοδο βλαβερών και παθογόνων ουσιών. Επιπλέον, τα επιθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν βλέννα και αντιμικροβιακά πεπτίδια για την άμυνα του ξενιστή. Η διατήρηση της υγείας των επιθηλιακών κυττάρων αποτελεί ολοκληρωμένο μέρος της πνευμονικής ευεξίας. Η χρόνια έκθεση στη νικοτίνη έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει την αύξηση της υπερπλασίας των κυττάρων των βλεννογόνων. Η ενισχυμένη φλεγμονή των πνευμόνων και η καταστολή της απόπτωσης από τη νικοτίνη είναι η κύρια αιτία βλάβης του αναπνευστικού επιθηλίου, καθώς ενισχύει τον κυτταρικό μετασχηματισμό και την επιβίωση των κυττάρων που οδηγούν σε καρκίνο (Nguyen et al., 2020).

Παραμένει το ερώτημα κατά πόσο επιδρά η ίδια η νικοτίνη στην καρκινογόνα δυναμική που αναπτύσσεται λόγω της χρήσης της στα κύτταρα. Υπό αυτή την έννοια, η καταπόνηση λόγω οξειδωτικού στρες παίζει μεγάλο ρόλο. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνήσει την δόσοεξαρτώμενη επίδραση της νικοτίνης ως προς τη βιωσιμότητα και τη δημιουργία ROS σε κύτταρα πνευμονικού ενδοθηλίου, από τους πρώτους ιστούς που έρχονται σε επαφή με τη νικοτίνη όταν αυτή εισπνέεται είτε από τα καιγόμενα τσιγάρα είτε από τα ηλεκτρονικά μέσα χορήγησης.

Ως θετικό μάρτυρα των μεθόδων χρησιμοποιήθηκε το  $H_2O_2$  και βρέθηκε πως το IC50 με τα μέσα του εργαστηρίου είναι 0,15 mM (150  $\mu$ M) γεγονός που συνάδει με τη βιβλιογραφία για άλλους τύπους κυττάρων (Park, 2013).

Η νικοτίνη παρουσιάζει στην παρούσα μελέτη IC50 0,45 mg/ml, 2,8mM, εντός του εύρους των τιμών που εμφανίζονται για κύτταρα του στοματοφαρυγγικού επιθηλίου (Holliday et al., 2019)

Ως προς την παραγωγή των ROS ανά κύτταρο, προχωρήσαμε σε αυτή την ανάλυση όπως έχει προταθεί και από τη βιβλιογραφία (Caruso et al., 2021), ώστε να μπορούν να συγκριθούν τα αποτελέσματα μεταξύ τους, καθώς τα νεκρά κύτταρα δεν παράγουν ούτε μεταβολίζουν ROS. Αναμενόταν στο διάγραμμα ROS/κύτταρο να αυξάνεται η καμπύλη καθώς αύξηση της συγκέντρωσης οδηγεί σε αύξηση του ROS. Σε ορισμένα σημεία που η καμπύλη εμφανίζει απότομες αλλαγές ενδεχομένως αυτό να οφείλεται είτε σε λάθος κατά την προετοιμασία των δειγμάτων για τις μετρήσεις ROS (πιπετάρισμα, αριθμός κυττάρων κλπ) είτε σε λάθος μέτρηση του ATP στα αντίστοιχα κύτταρα. Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα είναι πως σε μερικές μετρήσεις ATP όπου είναι με ποσοστά υπάρχουν σε κάποιες μετρήσεις τιμές μεγαλύτερες της μονάδας.

Το λάθος αυτό φαίνεται και από το γεγονός πως αν και στις μετρήσεις ATP δεν υπάρχουν σημαντικές αλλαγές (καθώς είναι όλα σε ποσοστά), στα ROS που είναι με τιμές οι αποκλίσεις είναι εμφανείς.

Σημαντικό είναι να σημειωθεί πως σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα μιτοχόνδρια αποτελούν στόχο της νικοτίνης (Malińska et al., 2019), επηρεάζοντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων στις αντιδράσεις της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Συνεπώς, η μέτρηση ATP ως δείκτης της βιωσιμότητας των κυττάρων ενδέχεται να μην ενδείκνυται για την ασφαλή και ακριβή εκτίμηση του ποσοστού της βιωσιμότητας. Υπάρχουν διαφορετικά συστήματα (Chan et al., 2017), όπως η τριπλή χρώση με Calcein/ Propidium Iodide και Hoechst που θα μπορούσαν να δώσουν μια καλύτερη εκτίμηση του πραγματικού αριθμού των ζωντανών κυττάρων σε κάθε συνθήκη.

## 5. Συμπεράσματα

Τα IC50 που βρέθηκαν στην παρούσα εργασία επιβεβαιώνουν τα ευρήματα της βιβλιογραφίας, υποδεικνύοντας πως οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν είναι κατάλληλες για τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν.

Χρειάζεται βελτιστοποίηση της επαναληψιμότητας για τα συγκεκριμένα πειράματα και βιολογικές επαναλήψεις των ίδιων συνθηκών σε διαφορετικές ημέρες για τη στατιστική τους ανάλυση.

## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1 Το φυτό <i>Nicotiana tabacum</i> πηγή: Joachim Müllerchen, GNU Free Documentation License .....	10
Εικόνα 2 Φύλα καπνού που αποξηραίνονται πηγή:TANDEMICH/SHUTTERSTOCK.....	12
Εικόνα 3 Το κάπνισμα παγκόσμια το 2019 πηγή: le Foll, 2022 .....	14
Εικόνα 4 Ποσοστό καπνιστών ανάλογα με τη χρήση καπνού πηγή: Eurostat .....	16
Εικόνα 5 Εναντιομερή της νικοτίνης .....	19
Εικόνα 6 Τα κύτταρα NCI-H292 πηγή: Cell Lines Service.....	27
Εικόνα 7 Μηχανισμός ανίχνευσης ATP από το CellTiter-Glo.....	31
Εικόνα 8 Μηχανισμός ανίχνευσης ROS με H2DCFDA .....	32
Εικόνα 9 Μέτρηση ATP μετά από 30 λεπτά επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	35
Εικόνα 10 Μέτρηση ROS/κύτταρο μετά από 30 λεπτά επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	36
Εικόνα 11 Μέτρηση ATP μετά από 2 ώρες επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	37
Εικόνα 12 Μέτρηση ROS/κύτταρο μετά από 2 ώρες επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	38
Εικόνα 13 Μέτρηση ATP μετά από 24 ώρες επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	39
Εικόνα 14 Μέτρηση ROS/κύτταρο μετά από 24 ώρες επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	40
Εικόνα 15 Μέτρηση ATP μετά από 48 ώρες επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	41
Εικόνα 16 Μέτρηση ROS/κύτταρο μετά από 48 ώρες επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης.....	42
Εικόνα 17 Μετρήσεις ROS/κύτταρο και βιωσιμότητας μετά από 30 λεπτά επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης.....	43
Εικόνα 18 Μετρήσεις ROS/κύτταρο και βιωσιμότητας μετά από 2 ώρες επώασης με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης.....	44
Εικόνα 19 Μέτρηση ATP μετά από επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> και διαφορετικό χρονικό διάστημα .....	45
Εικόνα 20 Απεικόνιση των μέσων όρων της μέτρησης ATP μετά από επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης και H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> και διαφορετικό χρονικό διάστημα.....	46

Εικόνα 21 Υπολογισμός IC50 για τη Νικοτίνη και το H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	47
Εικόνα 22 Απεικόνιση των μέσων όρων της μέτρησης ATP μετά από επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις Νικοτίνης για διαφορετικό χρονικό διάστημα 2 <sup>ης</sup> μέτρησης.....	48

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Συγκεντρώσεις Νικοτίνης και $H_2O_2$ .....	29
Πίνακας 2 Χρόνοι επώασης με Νικοτίνη και $H_2O_2$ .....	30

## Βιβλιογραφία

- ARIDOR, M. & BALCH, W. E. 1999. Integration of endoplasmic reticulum signaling in health and disease. *Nat Med*, 5, 745-51.
- BARR, R. S., CULHANE, M. A., JUBELT, L. E., MUFTI, R. S., DYER, M. A., WEISS, A. P., DECKERSBACH, T., KELLY, J. F., FREUDENREICH, O., GOFF, D. C. & EVINS, A. E. 2008. The effects of transdermal nicotine on cognition in nonsmokers with schizophrenia and nonpsychiatric controls. *Neuropsychopharmacology*, 33, 480-90.
- BENOWITZ, N. L. 2010. Nicotine addiction. *New England Journal of Medicine*, 362, 2295-2303.
- BENOWITZ, N. L., HUKKANEN, J. & JACOB, P., 3RD 2009. Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol*, 29-60.
- BENWELL, M. & BALFOUR, D. 1985. Central nicotine binding sites: a study of post-mortem stability. *Neuropharmacology*, 24, 1135-1137.
- BERRIDGE, M. S., APANA, S. M., NAGANO, K. K., BERRIDGE, C. E., LEISURE, G. P. & BOSWELL, M. V. 2010. Smoking produces rapid rise of [11 C] nicotine in human brain. *Psychopharmacology*, 209, 383-394.
- BOURGAULT, Z., RUBIN-KAHANA, D. S., HASSAN, A. N., SANCHES, M. & LE FOLL, B. 2022. Multiple substance use disorders and self-reported cognitive function in US Adults: associations and sex-differences in a nationally representative sample. *Frontiers in Psychiatry*, 12, 797578.
- CARUSO, M., EMMA, R., DISTEFANO, A., RUST, S., POULAS, K., ZADJALI, F., GIORDANO, A., VOLAREVIC, V., MESIAKARIS, K., AL TOBI, M., BOFFO, S., ARSENIJEVIC, A., ZUCCARELLO, P., GIALLONGO, C., FERRANTE, M., POLOSA, R., LI VOLTI, G., PULVIRENTI, R., CAROTA, G., SPAMPINATO, M. R., CARUSO, T., KARANASIOS, G., ALBALUSHI, N., CANCELLO, A., ILIC, A. & THE REPLICA PROJECT, G. 2021. Electronic nicotine delivery systems exhibit reduced bronchial epithelial cells toxicity compared to cigarette: the Replica Project. *Scientific Reports*, 11, 24182.

- CHAN, L. L., MCCULLEY, K. J. & KESSEL, S. L. 2017. Assessment of Cell Viability with Single-, Dual-, and Multi-Staining Methods Using Image Cytometry. *Methods Mol Biol*, 1601, 27-41.
- CONTRIBUTORS, W. 2023. *Nicotiana tabacum* [Online]. Wikipedia, The Free Encyclopedia. Available: [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Nicotiana\\_tabacum&oldid=1160269335](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Nicotiana_tabacum&oldid=1160269335) [2023].
- COPELAND, R. L., DAS, J. R., KANAAN, Y. M., TAYLOR, R. E. & TIZABI, Y. 2007. Antiapoptotic effects of nicotine in its protection against salsolinol-induced cytotoxicity. *Neurotoxicity research*, 12, 61-69.
- CUI, W. Y. & LI, M. D. 2010. Nicotinic modulation of innate immune pathways via alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *J Neuroimmune Pharmacol*, 5, 479-88.
- DANG, N., MENG, X. & SONG, H. 2016. Nicotinic acetylcholine receptors and cancer. *Biomed Rep*, 4, 515-518.
- DASGUPTA, P., RASTOGI, S., PILLAI, S., ORDONEZ-ERCAN, D., MORRIS, M., HAURA, E. & CHELLAPPAN, S. 2006. Nicotine induces cell proliferation by beta-arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways. *J Clin Invest*, 116, 2208-2217.
- DE JONGE, W. J. & ULLOA, L. 2007. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. *Br J Pharmacol*, 151, 915-29.
- DOLL, R. & HILL, A. B. 1950. Smoking and carcinoma of the lung. *British medical journal*, 2, 739.
- ENGLAND, L. J., AAGAARD, K., BLOCH, M., CONWAY, K., COSGROVE, K., GRANA, R., GOULD, T. J., HATSUKAMI, D., JENSEN, F. & KANDEL, D. 2017. Developmental toxicity of nicotine: a transdisciplinary synthesis and implications for emerging tobacco products. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 72, 176-189.
- EUROSTAT 2022. Health in the European Union – facts and figures.
- EVANS-POLCE, R. J., KCOMT, L., VELIZ, P. T., BOYD, C. J. & MCCABE, S. E. 2020. Alcohol, tobacco, and comorbid psychiatric disorders and associations with sexual identity and stress-related correlates. *American Journal of Psychiatry*, 177, 1073-1081.



- FAGERSTRÖM, K. 2011. Determinants of tobacco use and renaming the FTND to the Fagerström Test for Cigarette Dependence. *Nicotine & tobacco research*, 14, 75-78.
- FAGERSTRÖM, K. O. & BRIDGMAN, K. 2014. Tobacco harm reduction: the need for new products that can compete with cigarettes. *Addictive behaviors*, 39, 507-511.
- FEDEROVITCH, C. M., RON, D. & HAMPTON, R. Y. 2005. The dynamic ER: experimental approaches and current questions. *Curr Opin Cell Biol*, 17, 409-14.
- FOLL, B. L. & GOLDBERG, S. R. 2009. Effects of nicotine in experimental animals and humans: an update on addictive properties. *Nicotine Psychopharmacology*, 335-367.
- GOODWIN, R. D., PAGURA, J., SPIWAK, R., LEMESHOW, A. R. & SAREEN, J. 2011. Predictors of persistent nicotine dependence among adults in the United States. *Drug and alcohol dependence*, 118, 127-133.
- GORIOUNOVA, N. A. & MANSVELDER, H. D. 2012. Short-and long-term consequences of nicotine exposure during adolescence for prefrontal cortex neuronal network function. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2, a012120.
- GRANDO, S. A. 1997. Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2, 41-8.
- GRANDO, S. A., PITTELKOW, M. R. & SCHALLREUTER, K. U. 2006. Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol*, 126, 1948-65.
- GUO, J., CHU, M., ABBEYQUAYE, T. & CHEN, C. Y. 2005. Persistent nicotine treatment potentiates amplification of the dihydrofolate reductase gene in rat lung epithelial cells as a consequence of Ras activation. *J Biol Chem*, 280, 30422-31.
- HALL, B. J., WELLS, C., ALLENBY, C., LIN, M. Y., HAO, I., MARSHALL, L., ROSE, J. E. & LEVIN, E. D. 2014. Differential effects of non-nicotine tobacco constituent compounds on nicotine self-administration in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 120, 103-108.
- HALLIWELL, B. 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*, 31, 261-72.

- HARTMANN-BOYCE, J., BUTLER, A. & LINDSON, N. 2021. Electronic cigarettes for smoking cessation: September 2021.
- HASSAN, A. N. & LE FOLL, B. 2021. Survival probabilities and predictors of major depressive episode incidence among individuals with various types of substance use disorders. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 82, 35506.
- HAUSSMANN, H.-J. & FARISS, M. W. 2016. Comprehensive review of epidemiological and animal studies on the potential carcinogenic effects of nicotine per se. *Critical reviews in toxicology*, 46, 701-734.
- HENNINGFIELD, J. E., SMITH, T. T., KLEYKAMP, B. A., FANT, R. V. & DONNY, E. C. 2016. Nicotine self-administration research: the legacy of Steven R. Goldberg and implications for regulation, health policy, and research. *Psychopharmacology*, 233, 3829-3848.
- HERMES-LIMA, M. & NAVAS, C. A. 2006. The face of Latin American comparative biochemistry and physiology. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 142, 157-162.
- HEUSCH, W. L. & MANECKJEE, R. 1998. Signalling pathways involved in nicotine regulation of apoptosis of human lung cancer cells. *Carcinogenesis*, 19, 551-6.
- HOLLIDAY, R. S., CAMPBELL, J. & PRESHAW, P. M. 2019. Effect of nicotine on human gingival, periodontal ligament and oral epithelial cells. A systematic review of the literature. *Journal of Dentistry*, 86, 81-88.
- HUKKANEN, J., JACOB, P., 3RD & BENOWITZ, N. L. 2005. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev*, 57, 79-115.
- JIA, Y., SUN, H., WU, H., ZHANG, H., ZHANG, X., XIAO, D., MA, X. & WANG, Y. 2016. Nicotine Inhibits Cisplatin-Induced Apoptosis via Regulating alpha5-nAChR/AKT Signaling in Human Gastric Cancer Cells. *PLoS One*, 11, e0149120.
- KAPETANSTRATAKI, M., TZORTZI, A., EVANGELOPOULOU, V. & BEHRAKIS, P. 2021. Profiling smokers in Greece in 2020. *Tobacco Prevention & Cessation*, 7.
- KLEIJN, A., KLOEZEMAN, J. J., BALVERS, R. K., VAN DER KAAIJ, M., DIRVEN, C. M., LEENSTRA, S. & LAMFERS, M. L. 2016. A Systematic Comparison Identifies an ATP-Based Viability Assay as Most Suitable Read-Out for Drug Screening in Glioma Stem-Like Cells. *Stem Cells Int*, 2016, 5623235.

- LAKHAN, S. E. & KIRCHGESSNER, A. 2011. Anti-inflammatory effects of nicotine in obesity and ulcerative colitis. *J Transl Med*, 9, 129.
- LAM, D. C.-L., LUO, S. Y., FU, K.-H., LUI, M. M.-S., CHAN, K.-H., WISTUBA, I. I., GAO, B., TSAO, S.-W., IP, M. S.-M. & MINNA, J. D. 2016. Nicotinic acetylcholine receptor expression in human airway correlates with lung function. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 310, L232-L239.
- LE FOLL, B., PIPER, M. E., FOWLER, C. D., TONSTAD, S., BIERUT, L., LU, L., JHA, P. & HALL, W. D. 2022. Tobacco and nicotine use. *Nature Reviews Disease Primers*, 8, 19.
- LE HOUEZEC, J. 2003. Role of nicotine pharmacokinetics in nicotine addiction and nicotine replacement therapy: a review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 7, 811-819.
- LEE, P. N. & FARISS, M. W. 2017. A systematic review of possible serious adverse health effects of nicotine replacement therapy. *Archives of toxicology*, 91, 1565-1594.
- LYKHMUS, O., VOYTENKO, L. P., LIPS, K. S., BERGEN, I., KRASTEVA-CHRIST, G., VETTER, D. E., KUMMER, W. & SKOK, M. 2017. Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha9 and alpha10 Subunits Are Expressed in the Brain of Mice. *Front Cell Neurosci*, 11, 282.
- MALIŃSKA, D., WIĘCKOWSKI, M. R., MICHALSKA, B., DRABIK, K., PRILL, M., PATALAS-KRAWCZYK, P., WALCZAK, J., SZYMAŃSKI, J., MATHIS, C., VAN DER TOORN, M., LUETTICH, K., HOENG, J., PEITSCH, M. C., DUSZYŃSKI, J. & SZCZEPANOWSKA, J. 2019. Mitochondria as a possible target for nicotine action. *J Bioenerg Biomembr*, 51, 259-276.
- MARKS, M. J., STITZEL, J. A. & COLLINS, A. C. 1987. Influence of kinetics of nicotine administration on tolerance development and receptor levels. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 27, 505-512.
- MUSSO, F., BETTERMANN, F., VUCUREVIC, G., STOETER, P., KONRAD, A. & WINTERER, G. 2007. Smoking impacts on prefrontal attentional network function in young adult brains. *Psychopharmacology*, 191, 159-169.

- NGUYEN, H. M.-H., TORRES, J. A., AGRAWAL, S. & AGRAWAL, A. 2020. Nicotine Impairs the Response of Lung Epithelial Cells to IL-22. *Mediators of Inflammation*, 2020, 6705428.
- NISHIOKA, T., KIM, H. S., LUO, L. Y., HUANG, Y., GUO, J. & CHEN, C. Y. 2011. Sensitization of epithelial growth factor receptors by nicotine exposure to promote breast cancer cell growth. *Breast Cancer Res*, 13, R113.
- NISHIOKA, T., LUO, L. Y., SHEN, L., HE, H., MARIYANNIS, A., DAI, W. & CHEN, C. 2014. Nicotine increases the resistance of lung cancer cells to cisplatin through enhancing Bcl-2 stability. *Br J Cancer*, 110, 1785-92.
- PALIPUDI, K. M., GUPTA, P. C., SINHA, D. N., ANDES, L. J., ASMA, S., MCAFEE, T. & GROUP, G. C. 2012. Social determinants of health and tobacco use in thirteen low and middle income countries: evidence from Global Adult Tobacco Survey. *PloS one*, 7, e33466.
- PARK, W. H. 2013. The effects of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on cell death, reactive oxygen species and glutathione levels in calf pulmonary artery and human umbilical vein endothelial cells. *Int J Mol Med*, 31, 471-6.
- PERRY, D. C., DÁVILA-GARCÍA, M. I., STOCKMEIER, C. A. & KELLAR, K. J. 1999. Increased nicotinic receptors in brains from smokers: membrane binding and autoradiography studies. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289, 1545-1552.
- PICCIOTTO, M. R., ADDY, N. A., MINEUR, Y. S. & BRUNZELL, D. H. 2008. It is not "either/or": activation and desensitization of nicotinic acetylcholine receptors both contribute to behaviors related to nicotine addiction and mood. *Prog Neurobiol*, 84, 329-42.
- POWLEDGE, T. M. 2004. Nicotine as therapy. *PLoS Biology*, 2, e404.
- PROCTOR, R. N. 2012. The history of the discovery of the cigarette–lung cancer link: evidentiary traditions, corporate denial, global toll. *Tobacco control*, 21, 87-91.
- QUIK, M., PEREZ, X. A. & BORDIA, T. 2012. Nicotine as a potential neuroprotective agent for Parkinson's disease. *Mov Disord*, 27, 947-57.
- REITSMA, M. B., KENDRICK, P. J., ABABNEH, E., ABBAFATI, C., ABBASI-KANGEVARI, M., ABDOLI, A., ABEDI, A., ABHILASH, E., ABILA, D. B. & ABOYANS, V. 2021. Spatial, temporal, and demographic patterns in prevalence of smoking tobacco use

- and attributable disease burden in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 397, 2337-2360.
- REN, N. & TIMKO, M. P. 2001. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome*, 44, 559-71.
- RENDA, A. & NASHMI, R. 2014. Chronic nicotine pretreatment is sufficient to upregulate  $\alpha 4^*$  nicotinic receptors and increase oral nicotine self-administration in mice. *BMC neuroscience*, 15, 1-15.
- SAITOH, F., NOMA, M. & KAWASHIMA, N. 1985. The alkaloid contents of sixty *Nicotiana* species. *Phytochemistry*, 24, 477-480.
- SCHERL, C., SCHAFFER, R., SCHLABRAKOWSKI, A., TZIRIDIS, K., IRO, H. & WENDLER, O. 2016. Nicotinic Acetylcholine Receptors in Head and Neck Cancer and Their Correlation to Tumor Site and Progression. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 78, 151-8.
- SCHRODER, M. & KAUFMAN, R. J. 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, 74, 739-89.
- SMITH, P. H., MAZURE, C. M. & MCKEE, S. A. 2014. Smoking and mental illness in the US population. *Tobacco control*, 23, e147-e153.
- TU, B. P. & WEISSMAN, J. S. 2004. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol*, 164, 341-6.
- USPENSKA, K., LYKHMUS, O., OBOLENSKAYA, M., PONS, S., MASKOS, U., KOMISARENKO, S. & SKOK, M. 2018. Mitochondrial Nicotinic Acetylcholine Receptors Support Liver Cells Viability After Partial Hepatectomy. *Front Pharmacol*, 9, 626.
- WANG, J., PAREJA, K. A., KAISER, C. A. & SEVIER, C. S. 2014. Redox signaling via the molecular chaperone BiP protects cells against endoplasmic reticulum-derived oxidative stress. *Elife*, 3, e03496.
- WEINBERGER, A. H., GBEDEMAH, M., WALL, M. M., HASIN, D. S., ZVOLENSKY, M. J. & GOODWIN, R. D. 2018. Cigarette use is increasing among people with illicit substance use disorders in the United States, 2002–14: emerging disparities in vulnerable populations. *Addiction*, 113, 719-728.

- WENNIG, R. 2009. Back to the roots of modern analytical toxicology: Jean Servais Stas and the Bocarmé murder case. *Drug Test Anal*, 1, 153-5.
- WEST, R. 2009. The multiple facets of cigarette addiction and what they mean for encouraging and helping smokers to stop. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 6, 277-283.
- WEST, R. 2017. Tobacco smoking: Health impact, prevalence, correlates and interventions. *Psychology & health*, 32, 1018-1036.
- WICHERN, F., JENSEN, M. M., CHRISTENSEN, D. Z., MIKKELSEN, J. D., GONDRÉ-LEWIS, M. C. & THOMSEN, M. S. 2017. Perinatal nicotine treatment induces transient increases in NACHO protein levels in the rat frontal cortex. *Neuroscience*, 346, 278-283.
- XIN, M. & DENG, X. 2005. Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. *J Biol Chem*, 280, 10781-9.
- ZHANG, J., KAMDAR, O., LE, W., ROSEN, G. D. & UPADHYAY, D. 2009. Nicotine induces resistance to chemotherapy by modulating mitochondrial signaling in lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 40, 135-46.
- ZHANG, Q., GANAPATHY, S., AVRAHAM, H., NISHIOKA, T. & CHEN, C. 2020. Nicotine exposure potentiates lung tumorigenesis by perturbing cellular surveillance. *Br J Cancer*, 122, 904-911.