



**Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών**  
**Τμήμα Φαρμακευτικής**  
**Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας**  
**Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης**  
**«Βιομηχανική Φαρμακευτική»**

# **Η ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΠΝΟΥ ΤΟΥ ΤΣΙΓΑΡΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΣΤΑ ΚΕΡΑΤΙΝΟΚΥΤΤΑΡΑ: ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΕΙΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΑ**

Κιοσέ Βασιλική

Χημικός Μηχανικός

Αθήνα 2011

A.M. 2705-10

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΟ ΔΕΡΜΑ	2
1.1 Γενικά	3
1.2 Επιδερμίδα και κερατινοποιητικό σύστημα	4
1.2.1 Στοιβάδες της επιδερμίδας	4
1.2.2 Κερατινοποίηση - Απολέπιση	6
1.2.3 Χρωστικές ουσίες της επιδερμίδας	7
1.3 Κυρίως δέρμα	8
1.4 Νεύρα και αισθητήρια όργανα	10
1.5 Αιμοφόρα αγγεία – Μικροκυκλοφορία	11
1.6 Απεκκριτικοί ιδρωτοποιοί αδένες	12
1.7 Θυλάκια τριχών	13
1.8 Σμηγματογόνοι αδένες	13
1.9 Γήρανση του δέρματος	14
1.10 Οι ελεύθερες ρίζες στο δέρμα και το οξειδωτικό στρες	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ο ΚΑΠΝΟΣ ΤΟΥ ΤΣΙΓΑΡΟΥ	21
2.1 Χημική σύσταση του καπνού του τσιγάρου	22
2.2 Επίδραση του καπνού του τσιγάρου στην ανθρώπινη υγεία	25
2.3 Επίδραση του καπνού του τσιγάρου στο δέρμα	26
2.4 Επίδραση της νικοτίνης στο δέρμα	29
2.5 Καπνός του τσιγάρου, ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Η ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ	32
3.1 Εισαγωγή	33
3.2 Υπεριώδης ακτινοβολία	34
3.3 Η καταστρεπτική δράση των UVA και UVB στο δέρμα	34

3.4 Η επίδραση στο δέρμα της οξείας και χρόνιας έκθεσης σε UV ακτινοβολία	36
3.5 Ηλιακή ακτινοβολία, ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες	39
3.6 Συνεργική δράση της ηλιακής ακτινοβολίας και του καπνού του τσιγάρου	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	41
4.1 Αντιοξειδωτικές ουσίες και αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	42
4.2 Ελεύθερες ρίζες και αντιοξειδωτικά	43
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	44
Σκοπός Μελέτης	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
5.1 Υλικά	48
5.2 Μέθοδοι	50
5.2.1 Παρασκευή αντιδραστηρίων	50
5.2.1.1 Παρασκευή φυσιολογικού ορού με αντιβιοτικό	50
5.2.1.2 Παρασκευή διαλύματος Dispase	50
5.2.2 Πρωτόκολλο λήψης κερατινοκυττάρων από δέρμα νεογνών άτριχων μυών τύπου SKH-HR1 & SKH-HR2	50
5.2.3 Πρωτόκολλο τοποθέτησης κερατινοκυττάρων σε πλακίδια	52
5.2.4 Πρωτόκολλο καπνίσματος θρεπτικού μέσου κερατινοκυττάρων	53
5.2.5 Πρωτόκολλο μέτρησης φθορισμού και λήψης εικόνων φθορισμού	53
5.3 Πειραματική διαδικασία	55
5.3.1 Δοκιμαστικοί έλεγχοι	55
5.3.1.1 Φάση I: Εκτίμηση της χρησιμοποιούμενης δόσης εκχυλίσματος μούρων	55
5.3.1.2 Φάση II: Εκτίμηση της χρησιμοποιούμενης δόσης απόνερων ελαιοτριβείου	56
5.3.2 Τελικοί έλεγχοι	56
5.3.2.1 Πείραμα I: Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης αντιφλεγμονώδων ουσιών έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται μετά την επώαση αυτών για 2h με 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο, μετά την επώαση αυτών για 2h αφού ακτινοβοληθούν με υπεριώδη ακτινοβολία UVA και UVB, μετά την επώαση αυτών για 2h με 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο και ταυτόχρονη ακτινοβόληση με υπεριώδη ακτινοβολία UVA και UVB – μέτρηση φθορισμού για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες	56
5.3.2.2 Πείραμα II: Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλίσματος μούρων και απόνερων ελαιοτριβείου κερατινοκύτταρα μετά την επώαση αυτών για 2h με 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο, μετά την επώαση αυτών για 2h αφού ακτινοβοληθούν με υπεριώδη ακτινοβολία UVA και UVB, μετά την επώαση αυτών για 2h με 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο και ταυτόχρονη ακτινοβόληση με	58

υπεριώδη ακτινοβολία UVA και UVB – μέτρηση φθορισμού για την εκτίμηση του  
οξειδωτικού στρες

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	60
6.1 Δοκιμαστικοί έλεγχοι	61
6.2 Τελικοί έλεγχοι	62
6.2.1 Πειραματική διαδικασία	62
6.2.2 Αποτελέσματα	63
6.2.3 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	71
6.2.4 Μικροσκοπική παρατήρηση	74
6.2.5 Συζήτηση αποτελεσμάτων	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	78
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79

## Περίληψη

Η επίδραση του καπνού του τσιγάρου στην υγεία αποτελεί ένα αντικείμενο μείζονος ενδιαφέροντος ιδιαίτερα τις τελευταίες δεκαετίες, τόσο λόγω της αύξησης του αριθμού των καπνιστών παγκοσμίως, όσο και λόγω της γνώσης πλέον των βλαβερών επιπτώσεων αυτού στην ανθρώπινη υγεία. Ο καπνός του τσιγάρου πέρα από τις πολλές παθολογικές καταστάσεις και ασθένειες με τις οποίες συνδέεται, φαίνεται να σχετίζεται και με πολλές δερματικές παθολογικές καταστάσεις, όπως με την πρόωρη γήρανση του δέρματος, τη μειωμένη επούλωση των πληγών, καρκίνος του δέρματος κ.τ.λ.

Ο καπνός του τσιγάρου σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει είναι φωτοτοξικός, και υπάρχουν ενδείξεις πως η φωτοτοξικότητα ίσως είναι ο μηχανισμός με τον οποίο ο καπνός του τσιγάρου προκαλεί πρόωρη γήρανση του δέρματος και εντείνει τη φωτοκαρκινογένεση. Ειδικά, η UVA ακτινοβολία σχετίζεται με την οξειδωτική καταστροφή που συνδέεται με τη φωτογήρανση. Έρευνες έχουν δείξει πως η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου που ακολουθείται από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, συνεργικά αυξάνει το σπάσιμο των κλώνων του DNA και τη λιπιδική υπεροξειδωση των ανθρωπίνων λευκών αιμοσφαιρίων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκε η επίδραση του καπνού του τσιγάρου και της υπεριώδους ακτινοβολίας UVA και UVB σε καλλιέργεια κερατινοκυττάρων. Ακόμα, εξετάστηκε η προστασία που προσφέρουν έναντι της ακτινοβολίας (με UVA και UVB) καλλιέργειας κερατινοκυττάρων, καινοτόμες αντιφλεγμονώδεις ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον, εξετάστηκε η πιθανή προστατευτική δράση δύο αντιοξειδωτικών εκχυλισμάτων, του εκχυλίσματος μούρων και των απόνερων από ελαιοτριβείο. Χρησιμοποιήθηκαν κερατινοκύτταρα πρώτης γενιάς από δέρμα νεογέννητων άτριχων μυών τύπου SKH-HR1 και SKH-HR2 και πραγματοποιήθηκε εκτίμηση του οξειδωτικού στρες με μέτρηση φθορισμού με φλουορεσκεΐνη.

Με τις μετρήσεις και τη μικροσκοπία φθορισμού διαπιστώθηκε η ιδιαίτερα τοξική δράση τόσο της υπεριώδους ακτινοβολίας όσο και του καπνού του τσιγάρου με την εκτίμηση του παραγόμενου οξειδωτικού στρες. Παρουσία του καπνού του τσιγάρου, η απώλεια κυττάρων λόγω θανάτωσης τους ήταν ιδιαίτερα μεγάλη. Όσον αφορά στις αντιοξειδωτικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν, η παρουσία των απόνερων ελαιοτριβείου φάνηκε να παρέχει προστασία στα κερατινοκύτταρα παρουσία των οξειδωτικών παραγόντων που μελετήθηκαν. Τέλος, αναφορικά με τις αντιφλεγμονώδεις ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, η ένωση AK89 φαίνεται να εμφανίζει φαίνεται να εμφανίζει τη μεγαλύτερη προστατευτική δράση έναντι της ακτινοβολίας.

## ABSTRACT

The effect of tobacco smoke on health is a subject of major concern particularly in the last decades, because of the increasing number of smokers worldwide and of the knowledge of its harmful effects on human health. Cigarette smoke over many pathological conditions and diseases with it is connected, seems to be associated with many skin pathologies such as premature ageing of skin, impaired wound healing, skin cancer, etc.

Cigarette smoke, according to studies made is phototoxic, and there are conditions that the photo toxicity may be the mechanism by which cigarette smoke causes premature skin ageing and enhances photo carcinogenicity. Especially, UVA radiation is associated with oxidative damage associated with photoageing. Studies have shown that exposure to cigarette smoke followed by exposure to ultraviolet radiation synergistically increases the breaking of DNA strands and lipid peroxidation in human white blood cells.

In our study, the toxic effect of tobacco smoke and of ultraviolet radiation UVA and UVB is examined on cultured keratinocytes. Additional, it is examined the protection afforded against irradiation (with UVA and UVB) on keratinocytes culture, of innovative anti-inflammatory compounds with antioxidant activity. Further, it is examined the possible protective effect of two antioxidants, extracts of cranberry and mill wastewater. Keratinocytes were obtained from newborn hairless mice type SKH-HR1 and SKH-HR2. The oxidative stress was evaluated by fluorescense microscopy and fluorescence measurements.

The tobacco smoke and the ultraviolet radiation produce oxidative stress, which is estimated by fluorescence microscopy and measurements. In the presence of cigarette smoke, the loss of cells was very high. Regarding the antioxidants used, the presence of mill effluents seemed to provide protection to keratinocytes in the presence of oxidants studied. Finally, with regard to anti-inflammatory compounds used, the compound AK89 appears to have the greatest protective effect against irradiation.

### **Τριμελής Επιτροπή**

Μ. Ράλλης, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Φαρμακευτικής του Ε.Κ.Π.Α. (επιβλέπων καθηγητής)

Γ. Δεληκωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος της Ιατρικής του Ε.Κ.Π.Α.

Π. Δάλλας, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Φαρμακευτικής του Ε.Κ.Π.Α.

# ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΟ ΔΕΡΜΑ

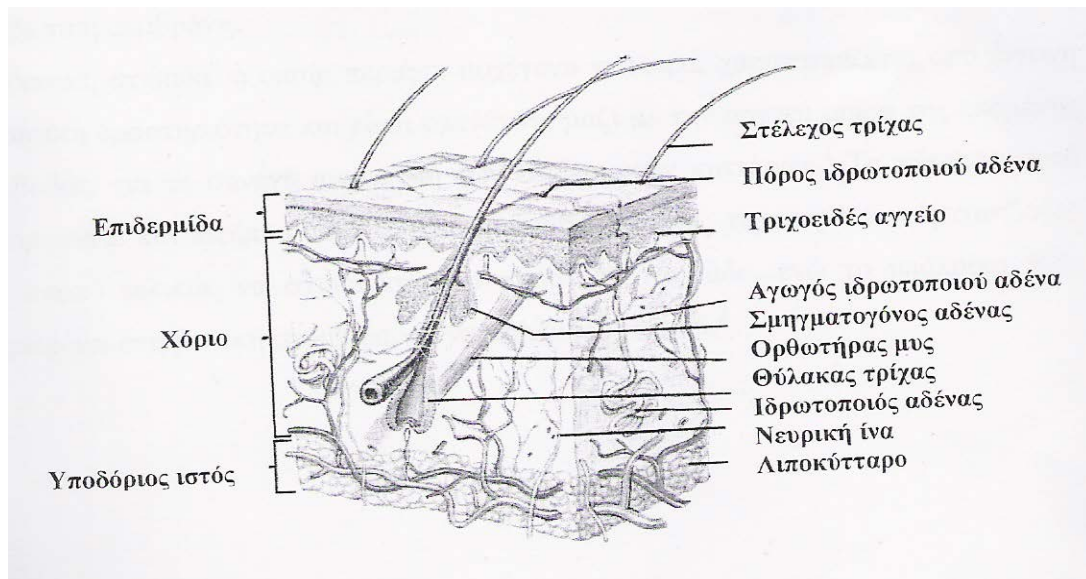
## 1.1 Γενικά

Το δέρμα δεν είναι ένα απλό προστατευτικό κάλυμμα για το σώμα. Αποτελεί ένα φραγμό που παρεμβάλλεται ενεργά μεταξύ του οργανισμού και του περιβάλλοντος. Δεν ελέγχει μόνο την απώλεια πολύτιμων υγρών από το σώμα, αλλά παρεμποδίζει τη διείσδυση βλαβερών ξένων ουσιών και ακτινοβολίας και προστατεύει από μηχανικά χτυπήματα. Επίσης ρυθμίζει την απώλεια θερμότητας και μορφοποιεί τα εισερχόμενα ερεθίσματα.

Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο όργανο του σώματος και αποτελεί το 16% του ολικού του βάρους. Καλύπτει ολόκληρο το σώμα και μεταπίπτει στους βλεννογόνους στα σημεία όπου υπάρχει φυσική κοιλότητα. Η συνολική επιφάνεια του δέρματος κυμαίνεται από 2500 cm<sup>2</sup> στα νεογνά, μέχρι 18000 cm<sup>2</sup> στους ενήλικες. Το πάχος του δέρματος ποικίλει από περιοχή και κυμαίνεται από 0,25 mm στα βλέφαρα μέχρι 2,5 mm στην πλάτη. Το χρώμα του διαφέρει τόσο στις διάφορες φυλές, όσο και στα δύο φύλα και τέλος και στις διάφορες ανατομικές θέσεις του σώματος. Το δέρμα περιέχει θυλάκια τριχών με τους σμηγματογόνους αδένες τους, εκτός από τα πέλματα και τις παλάμες. Βέβαια, η ποσότητα των τριχών στο σώμα ποικίλλει. Έτσι στο δέρμα του κεφαλιού υπάρχουν θυλάκια τριχών μεγάλου μήκους, σε αντίθεση με το δέρμα του γυναικείου προσώπου, που έχει μεγάλους σμηγματογόνους αδένες με πολύ μικρά θυλάκια που παράγουν ένα βελούδινο τρίχωμα. Οι διάφορες στοιβάδες που αποτελούν την επιδερμίδα, δημιουργούν το φράγμα που επιτρέπει ή όχι τη διαπερατότητα των διαφόρων ουσιών. Τέλος, επιτυγχάνεται μηχανική προστασία από την παχύτερη υποκείμενη στοιβάδα που αποτελεί το κυρίως δέρμα. [1]

Το δέρμα σε κάθετη τομή, χωρίζεται μικροσκοπικά σε τρεις (3) στοιβάδες:

- i. Την επιδερμίδα
- ii. Το χόριο ή κυρίως δέρμα
- iii. Το υπόδερμα ή υποδόριο ιστό



Εικ.1.1 Ανατομία του δέρματος

## 1.2 Επιδερμίδα και κερατινοποιητικό σύστημα

Η επιδερμίδα αποτελείται από στοιβάδες σε διάταξη. Η διάταξη αυτή κατά στρώματα, είναι αποτέλεσμα μεταβολών στα κερατινοκύτταρα καθώς αυτά μετακινούνται από τη βασική στοιβάδα, προς την επιφάνεια του δέρματος όπου και κερατινοποιούνται. Υπάρχουν ακόμη τριών ειδών κύτταρα: τα μελανοκύτταρα, τα κύτταρα του Langerhans, που είναι άχρωμα και τα κύτταρα του Merkel, που σχετίζονται με την αίσθηση.

### 1.2.1 Στοιβάδες της επιδερμίδας

Στην επιδερμίδα, από το χόριο εκ των έσω προς τα έξω, διακρίνονται οι παρακάτω στοιβάδες:

**Βασική ή βλαστική στοιβάδα.** Η στοιβάδα αυτή που λέγεται και στοιβάδα αναπτύξεως, είναι μια συνεχής στοιβάδα από την οποία προέρχονται όλα τα κερατινοκύτταρα.

Μεταξύ δύο διαδοχικών διαιρέσεων, το κύτταρο υποβάλλεται στον εξής κύκλο: αμέσως μετά τη μίτωση, ακολουθεί η φάση αναπτύξεως, την οποία διαδέχεται μια περίοδος ενεργούς σύνθεσης DNA του πυρήνα και ακολουθεί μια σύντομη προμιτωτική φάση ανάπτυξης. Τον κύκλο αυτό δεν υποβάλλονται, όμως όλα τα κύτταρα. Στην πραγματικότητα, υπάρχει ένα σημαντικό τμήμα κυττάρων, τα οποία δεν ακολουθούν τον αναφερθέντα κύκλο.

Η διάρκεια του κυτταρικού κύκλου έχει υπολογιστεί για την μέση ανθρώπινη επιδερμίδα σε 163 ώρες, 308 ώρες, 457 ώρες και 213 ώρες, και για την επιδερμίδα που έχει υποστεί ψωρίαση, σε 37 ώρες. Οι μετρήσεις αυτές, ωστόσο προϋποθέτουν ότι στην κανονική επιδερμίδα όλα τα κύτταρα υφίστανται συνεχή κύκλωση.

Ο χρόνος αντικατάστασης των κυττάρων για όλη την επιδερμίδα είναι 15-30 ημέρες, ανάλογα με την περιοχή του σώματος, την ηλικία και άλλους παράγοντες. Η ανανέωση της επιδερμίδας γίνεται κυρίως στην βασική (ή βλαστική) και στην ακανθωτή στοιβάδα. Η μίτωση είναι πιο έντονη στη διάρκεια ανάπαυσης ή ύπνου και έχει σχέση με την επινεφρίνη (ισχυρός μιτωτικός αναστολέας) που υπάρχει σε μικρά ποσοστά σε φάση μη δραστηριότητας.

Τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας έχουν μεγάλους πυρήνες. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, το κυτταρόπλασμά τους παρουσιάζει πολλά ριβοσώματα, μιτοχόνδρια και μερικές φορές λείες μεμβράνες. Ειδικότερα περιέχουν λεπτές ίνες με διάμετρο περίπου 5 nm που βρίσκονται με τη μορφή χαλαρών δεσμίδων τα τονοϊνίδια.

**Ακανθώδης στοιβάδα.** Ονομάζεται έτσι γιατί τα κύτταρά της έχουν ακανθώδη εμφάνιση, λόγω του μεγάλου αριθμού των δεσμοσωμάτων στην επιφάνειά τους. Περιέχει μεγάλο αριθμό ινιδίων που σχηματίζουν τα τονοϊνίδια όπως και στη βασική στοιβάδα. Σε συνδυασμό με τη βασική στοιβάδα ονομάζονται *μαλπιγιανή στοιβάδα*.

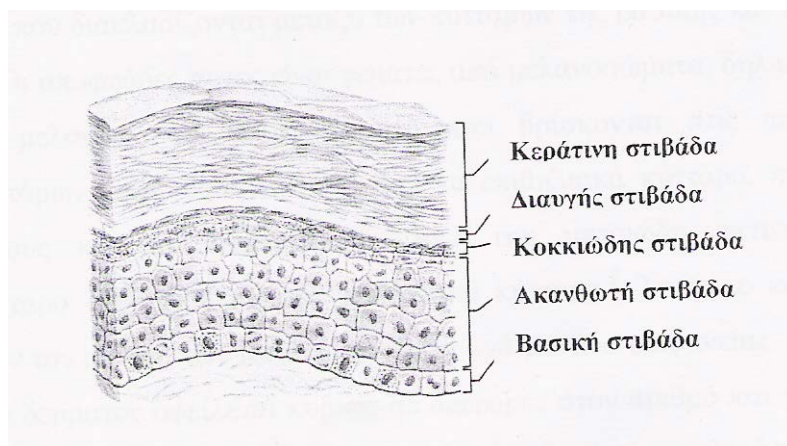
**Κοκκιώδης στοιβάδα.** Την ακανθώδη στοιβάδα διαδέχεται η ενδιάμεση ή κοκκιώδης. Περιέχει πλατιά πολυγωνικά κύτταρα, με βασεόφιλα κοκκία που περιέχουν κερατουαλίνη, μια πρωτεΐνη πλούσια σε ιστιδίνη. Υπάρχουν επίσης στα κύτταρά της τα μεμβρανικά κοκκία που περιέχουν όξιους βλεννοπολυσακχαρίτες και φωσφολιπίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία φραγμού στην είσοδο ξένων υλικών.

**Διαυγής στοιβάδα.** Αυτή αποτελείται από επίπεδα, ηωσινόφιλα, απύρρηνα κύτταρα και είναι διαφανής.

**Κεράτινη στοιβάδα.** Στη στοιβάδα αυτή τα κύτταρα έχουν χάσει τους πυρήνες τους και σχεδόν όλα τα κυτταροπλασματικά όργανα καθώς και στοιχεία, όπως τα κοκκία κερατουαλίνης. Τα κύτταρα είναι επίπεδα και γεμάτα με κερατίνη, και εμφανίζονται με τη μορφή δεσμίδων από ίνες, ενσωματωμένα σε ένα αδιαφανές νηματοειδές συστατικό.

Τα κερατινοποιημένα κύτταρα της επιδερμίδας (με εξαίρεση αυτά της λείας) είναι τοποθετημένα σε τακτικές κάθετες στοιβάδες, που αντανακλούν την υποκείμενη δυναμική

οργάνωση. Τα κύτταρα της στοιβάδας αυτής συνεχώς αποβάλλονται από την επιφάνεια του δέρματος. Όταν το δέρμα είναι καλυμμένο και προστατευμένο για μεγάλο χρονικό διάστημα τα κύτταρα που αποβάλλονται παγιδούνται, αλλά το πάχος της κεράτινης στοιβάδας παραμένει αμετάβλητο. Έτσι η στοιβάδα αυτή αποκτά ένα τελικό πάχος, που δεν επηρεάζεται από εξωτερικές δυνάμεις.



Εικ.1.2 Στοιβάδες της επιδερμίδας

### 1.2.2 Κερατινοποίηση – Απολέπιση

Είναι το φαινόμενο κατά το οποίο τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας γίνονται κύτταρα της κεράτινης στοιβάδας και αποπίπτουν. Η κερατινοποίηση περιλαμβάνει τρία ταυτόχρονα και σημαντικά στάδια: την εξαφάνιση των πυρήνων, την εξαφάνιση των ενδοκυτταροπλασματικών οργανιδίων και τη δημιουργία του άμορφου ενδοπλασματικού συμπλόκου φιλλαγκρίνης – κερατίνης. Η απολέπιση είναι αποτέλεσμα διπλού μηχανισμού όπου ο πρώτος περιλαμβάνει την αποδόμηση των λιποπρωτεϊνικής φύσεως μεμβρανών των κερατινοκυττάρων καθώς και την ενζυματική εκφύλιση των κερατινο-δεσμοσωμάτων.

Το φαινόμενο της κερατινοποίησης είναι φαινόμενο συνεχές το οποίο έχει σαν σκοπό την ανανέωση της επιφάνειας του δέρματος με την ανανέωση της προστατευτικής στοιβάδας η οποία αποτελείται από κερατινοποιημένα κερατινοκύτταρα και η οποία καλείται κεράτινη στοιβάδα. Από τα επιθηλιακά κύτταρα της βασικής στοιβάδας όπου γίνονται οι μιτώσεις των κερατινοκυττάρων ξεκινά το φαινόμενο της κερατινοποίησης όπου τα κύτταρα ξεκολλούν από το δερματοεπιδερμικό σύνδεσμο και περνώντας από την ακανθωτή και κοκκιώδη στοιβάδα μετατρέπονται σε κερατινοποιημένα νεκρά κύτταρα. Σημαντικό ρόλο στο φαινόμενο φαίνεται να παίζουν και τα σωμάτια του Odland τα οποία έχουν σχέση με τα

σχηματιζόμενα φυλλίδια λιπιδίων γύρω από τα κερατινοκύτταρα της κεράτινης στοιβάδας καθώς και τα κοκκία κερατουαλίνης από τα οποία δημιουργείται τελικά η κερατίνη.

### 1.2.3 Χρωστικές ουσίες επιδερμίδας

Αν και το δέρμα οφείλει ένα μέρος του χρώματός του στην αιμοσφαιρίνη των αιμοφόρων αγγείων και στα καροτενοειδή του υποδερμικού λίπους, ο κύριος καθοριστικός παράγοντας του χρώματος είναι μια σκούρα χρωστική, η μελανίνη, που είναι προϊόν ειδικών κυττάρων γνωστών σαν *μελανοκύτταρα*.

Τα μελανοκύτταρα είναι κύτταρα νευρογενούς προέλευσης, και μεταναστεύουν σε διάφορους ιστούς του σώματος περιλαμβανομένης και της βασικής στοιβάδας της επιδερμίδας και το βολβό της τρίχας. Διαφέρουν από άλλα κύτταρα της βασικής στοιβάδας επειδή έχουν δενδριτικές αποφύσεις με τις οποίες μεταφέρουν τη χρωστική σε μια ομάδα κερατινοκυττάρων. Δεν έχουν δεσμοσώματα και έχουν μικρή ποσότητα τονοϊνιδίων. Το χαρακτηριστικό στοιχείο των μελανοκυττάρων είναι ένα ειδικό κυτταροπλασματικό οργανίδιο γνωστό σαν μελανόσωμα στο οποίο η μελανίνη σχηματίζεται με τη δράση του ενζύμου τυροσινάση. Τα μελανοσώματα εμφανίζονται στα στοιχεία του Golgi σαν σφαιρικά κυστίδια που περικλείονται από μεμβράνη. Στην αρχή είναι ορατά σαν ινίδια, αλλά στη συνέχεια ο σχηματισμός της μελανίνης δημιουργεί μια συνεχή υφή.

Οι μελανίνες είναι κινουοειδή πολυμερή δύο ειδών: οι φαιομελανίνες που είναι κίτρινες ή κόκκινες και οι ευμελανίνες, που είναι καφέ ή μαύρες. Τα δύο παραπάνω είδη μελανινών σχηματίζονται με τα ίδια αρχικά στάδια, που περιλαμβάνουν οξειδωση της τυροσίνης σε 3,4-διυδροξυφαινυλαλαμίνη και την μετατροπή της στην αντίστοιχη κινόνη. Ο σχηματισμός ευμελανίνης, περιλαμβάνει μερικά ακόμη στάδια για το σχηματισμό ινδολο-5,6-κινόνης που στη συνέχεια πολυμερίζεται και συνδέεται με πρωτεΐνη. Οι φαιομελανίνες σχηματίζονται με άλλο τρόπο: η ντοπα-κινόνη αντιδρά με κυστεΐνη για να σχηματίσει 5-S και 2-S κυστεΐνυλοντόπα. Τα ισομερή αυτά στη συνέχεια οξειδώνονται σε ενδιάμεσα προϊόντα, που πολυμερίζονται.

Το χρώμα του δέρματος διαφέρει ανάλογα με την εθνικότητα. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στην ποσότητα της μελανίνης που παράγεται και όχι στον αριθμό των μελανοκυττάρων που υπάρχουν. Η παραγωγή της χρωστικής μπορεί να αυξηθεί με έκθεση στον ήλιο, ή από ενδοκρινικούς παράγοντες. Η μελανογένεση επηρεάζεται από συγκεκριμένες πολυπεπτιδικές ορμόνες της υπόφυσης και από στεροειδείς ορμόνες.

Η κύρια λειτουργία της μελανίνης είναι αναμφισβήτητα η προστασία από την ηλιακή ακτινοβολία. Γενικά η ποσότητα χρωστικής εξαρτάται από την ηλιακή ένταση και είναι μεγαλύτερη στα τροπικά κλίματα, ελαττώνεται στα εύκρατα και αυξάνεται εκ νέου, μερικώς σε περιοχές που ακτινοβολεί το χιόνι.

**Κύτταρα του Langerhans.** Αυτά βρίσκονται κυρίως στην ακανθωτή στοιβάδα, είναι δένδριτικά, όμοια σε σχήμα με τα μελανοκύτταρα, αλλά στερούνται χρωστικής και δεν μπορούν να τη σχηματίσουν. Τα κύτταρα αυτά είναι ικανά για περιορισμένη φαγοκυττάρωση, αλλά δεν πρέπει να θεωρούνται σαν λειτουργικά μακροφάγα κύτταρα. Είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος τα οποία “συλλαμβάνουν” το αντιγόνο και διεγείρουν τα λεμφοκύτταρα. Είναι πολύ αποτελεσματικά σε συνεχή διέγερση, έτοιμα πάντοτε να ειδοποιήσουν τα ανοσοποιητικό σύστημα για τα αντιγόνα τα οποία εισέρχονται στο δέρμα ή στους βλεννογόνους. Παρεμβαίνουν σε πολλές δερματοπάθειες όπως είναι η δερματίτιδα εξ επαφής. Πολλές φλεγμονώδεις δερματοπάθειες δείχνουν αλλοιώσεις στη λειτουργία και τον αριθμό των κυττάρων του Langerhans.

**Κύτταρα του Merkel.** Αυτά μοιάζουν με επιδερμικά επιθηλιακά κύτταρα. Έχουν στο κυτταρόπλασμά τους μικρά κοκκία και η λειτουργία τους είναι ελάχιστα γνωστή. Διαθέτουν νευρο-εκκρινή κοκκία, δεσμοσώματα και ίνες κερατίνης. Παράγουν ουσίες οι οποίες δρουν σαν νευροδιαβιβαστές. Βρίσκονται τοποθετημένα στη βασική στοιβάδα της επιδερμίδας στα εξαρτήματα του δέρματος (τριχικά θυλάκια, εκκρινείς ιδρωτοποιοί αδένες) και στους βλεννογόνους. Είναι διασπαρμένα ή συγκροτημένα σε συσσωματώματα οπότε και καλούνται σωματίδια του Merkel. Κατ’ εξαίρεση κύτταρα του Merkel βρέθηκαν και στο χόριο όπου δημιουργούν σύμπλοκα με τις νευρικές ίνες. [1]

### 1.3 Κυρίως δέρμα

Το κυρίως δέρμα ή χόριο, είναι ένας ιστός ανθεκτικός και ελαστικός που στηρίζει την επιδερμίδα και τη συνδέει με τη γειτονική στοιβάδα, δηλαδή τον υποδόριο ιστό. Προστατεύει, επίσης, το σώμα έναντι των μηχανικών τραυματισμών και προσφέρει τροφή στην επιδερμίδα και τα δερμικά στοιχεία.

Η εξωτερική επιφάνεια του χορίου, έχει πολλές προεκβολές που ακολουθούν τις αναδιπλώσεις της επιδερμίδας και είναι περισσότερες σε δέρμα που βρίσκεται σε συχνή πίεση. Στο χόριο έχουν περιγραφεί δύο στοιβάδες. Η θηλώδης που είναι λεπτή και αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό. Σ' αυτόν υπάρχουν άφθονα ιστοκύτταρα και κολλαγόνα ινίδια. Η άλλη στοιβάδα είναι η δικτυωτή, που αποτελείται από ακανόνιστο πυκνό συνδετικό ιστό με περισσότερες ίνες και λιγότερα κύτταρα από τη θηλώδη.

Τα συστατικά του χορίου είναι τα εξής:

**Κολλαγόνο:** Είναι το κύριο ινώδες συστατικό του χορίου και αποτελεί το 75% του ξηρού βάρους και το 18-30% του όγκου του. Το κολλαγόνο αποτελείται από μόρια τροποκολλαγόνου που είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους με αναδίπλωση κατά το ένα τέταρτο του μήκους της αλυσίδας τους. Το κολλαγόνο του δέρματος περιέχει μεγάλη ποσότητα γλυκίνης, προλίνης και υδροξυπρολίνης. Τα μόρια του τροποκολλαγόνου αποτελούνται από τρεις πεπτιδικές αλυσίδες που καθεμιά περιέχει 1000 περίπου αμινοξέα.

Στο δέρμα όλοι οι τύποι κολλαγόνου, με εξαίρεση τον τύπο II, μπορούν να ευρεθούν. Αποτελούν το προϊόν διάφορων γονιδίων και η μικροανατομική τους τοποθέτηση είναι ειδική. Η βιοσύνθεση του κολλαγόνου γίνεται στους ινοβλάστες, στα κύτταρα του ενδοθηλίου και σε ορισμένα κύτταρα του επιθηλίου.

**Ελαστίνη:** Αποτελεί το 4% του ξηρού βάρους και το 1% του όγκου του χορίου. Είναι ίνες λεπτές και ευθείες, διακλαδίζονται ελεύθερα και μπορούν να επιμηκυνθούν κατά 100% και περισσότερο, αλλά επανέρχονται στο αρχικό τους μήκος, όταν απομακρυνθεί το αίτιο που προκάλεσε την επιμήκυνση.

Η ελαστίνη αποτελεί ένα από τα συστατικά των ελαστικών ινών. Η πρωτεΐνη αυτή είναι λίγο πολική και εκκρίνεται από τους ινοβλάστες υπό τη μορφή μονομερούς, της προελαστίνης με μοριακό βάρος περίπου 70000 daltons. Σε σχέση με την ελαστίνη, το πρόδρομο αυτό μόριο περιλαμβάνει μια περίσσεια υπολειμμάτων λυσίνης οι οποίες μετατρέπονται σε αλδεΐδη από το ένζυμο οξειδάση της λυσίνης. Οι αλδεΐδες αυτές της λυσίνης συμβάλλουν στη σύνδεση των μορίων της προελαστίνης.

Οι ελαστικές ίνες είναι μίγματα πολυμερών οι οποίες αποτελούνται από ένα σκελετό γλυκοπρωτεϊνών κατά μήκος του οποίου ευρίσκεται τοποθετημένη η ελαστίνη. Σε σχέση με την ποσότητα της ελαστίνης η οποία ευρίσκεται στις ίνες αυτές ονομάζονται ελαστικές εάν η ποσότητα είναι σημαντική, ελωνή εάν είναι μέτρια και οξυταλάνη εάν είναι πολύ μικρή ή



μηδενική. Η κατανομή των τριών αυτών τύπων των ινών είναι χαρακτηριστική των ιστών. Οι γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες αποτελούν το στήριγμα των ινών εκκρίνονται από τους ινοβλάστες.

**Ρετικουλίνη:** Συνίσταται από λεπτές διακλαδισμένες ίνες, που αποτελούν το 0,4% του ξηρού βάρους του χορίου. Δίκτυο ινών ρετικουλίνης συναντάται στο επιφανειακό χόριο, γύρω από τα εξαρτήματα, από τα αγγεία και από τα λιπώδη κύτταρα. Είναι οι πρώτες οι οποίες εμφανίζονται στην εμβρυϊκή ζωή και σε περιπτώσεις κοκκιωμάτων και επουλώσεως. Κατόπιν αντικαθίστανται από ίνες κολλαγόνου τύπου I.

**Θεμέλια ουσία:** Είναι η άμορφη ουσία μέσα στην οποία βρίσκονται οι ίνες και τα κύτταρα και αποτελείται από ποικιλία υδατανθράκων και πρωτεϊνών που ονομάζονται γλυκοπρωτεΐνες και γλυκοζαμονιγλυκάνες, κυριότερος από τους οποίους στο δέρμα είναι το υαλουρονικό οξύ και η θειική δερματίνη.

**Ινοβλάστες:** Είναι ο κύριος κυτταρικός πληθυσμός του χορίου και θεωρούνται σαν το μικρό εργοστάσιο του χορίου αφού παράγουν πρόδρομες ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης (τροποκολλαγόνο και τροποελαστίνη) συμβάλλοντας, συνεπώς, ουσιαστικά στη σύνθεση των βασικών ινών του χορίου, δηλαδή στο κολλαγόνο και την ελαστίνη. Η σύνθεση των ουσιών αυτών γίνεται στο κυτταρόπλασμα των ινοβλαστών.

Οι ινοβλάστες πολλαπλασιάζονται σε μικρό ποσοστό στον ενήλικα, αλλά μπορούν να επανακτήσουν εύκολα την μιτωτική ικανότητά τους όταν παραστεί ανάγκη, όπως παραδείγματος χάριν κατά το στάδιο της επουλώσεως. Η δομή τους είναι ατρακτοειδής.

**Ιστοκύτταρα:** Αυτά προέρχονται από το μεσέγχυμα και χαρακτηρίζονται από κυτταρόπλασμα γεμάτο με κοκκία. Περιέχουν και έχουν την ικανότητα να αποδεσμεύουν ηπαρίνη και ισταμίνη. Σε πολλές περιπτώσεις καταστροφής του δέρματος, παρατηρείται ρήξη των κυττάρων αυτών με απελευθέρωση των κοκκίων και ισταμίνης που είναι υπεύθυνη για φλεγμονές, ερεθισμούς και άλλες δερματικές διαταραχές που δημιουργούνται. [1]

## 1.4 Νεύρα και αισθητήρια όργανα

Το δέρμα είναι εφοδιασμένο με ένα εκατομμύριο περίπου απολήξεις νευρικών ινών. Οι περισσότερες καταλήγουν στο πρόσωπο και τα άκρα. Πολύ λίγες βρίσκονται στην πλάτη. Οι

αισθητήριες απολήξεις, διακρίνονται σε δύο κύριες ομάδες: τις σωματιδιακές, που έχουν ενσωματωμένα μη νευρικά στοιχεία και τις ελεύθερες που δεν έχουν. Οι ελεύθερες αισθητήριες απολήξεις βρίσκονται και στο δέρμα και στην επιδερμίδα. Τα θυλάκια των τριχών έχουν αισθητήριες απολήξεις διαφόρων βαθμίδων πολυπλοκότητας.

Τα νεύρα του δέρματος αποτελούνται από άξονες οι οποίοι περιβάλλονται από κύτταρα του Schwann και όχι σε όλες τις περιπτώσεις φέρουν έλυτρα μυελίνης. Η φυγόκεντρος νεύρωση του δέρματος οφείλεται στο συμπαθητικό σύστημα. Πρόκειται για αμυελινικές ίνες οι οποίες ενεργοποιούν την αγγειοσύσπαση, την αππέκριση του ιδρώτα και την ανατριχίλα. Η κεντρομόλος νεύρωση οφείλεται σε ευαίσθητα νεύρα του εγκεφαλο-νωτιαίου συστήματος τα οποία φέρουν μυελίνη. Τα νεύρα αυτά είναι ελεύθερα, απομονωμένα ή σε επαφή με τα κύτταρα του Merkel ή σαν εξαρτήματα των τριχών και των αππικών σωματίων. [1]

## 1.5 Αιμοφόρα αγγεία - Μικροκυκλοφορία

Όλη η διατροφή των επιδερμικών κυττάρων γίνεται μέσω της σύνδεσης του δέρματος με την επιδερμίδα. Δεν υπάρχουν αιμοφόρα αγγεία στην επιδερμίδα. Η συνολική ποσότητα του αίματος στο δέρμα, ρυθμίζεται από τη συστολή και τη διαστολή των αγγείων του και επιτρέπει την ύπαρξη αποθέματος αίματος, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα για ζωτικές λειτουργίες σε καταστάσεις έντασης.

Το αίμα και τα συστατικά του, μεταφέρουν όλα τα στοιχεία που είναι απαραίτητα για την παραγωγή των θυλακίων των τριχών και σχετικών με αυτά αδένων. Μεταφέρουν επίσης ορμόνες που επηρεάζουν την παραπάνω παραγωγή αδένων και τα συστατικά που εκκρίνονται από τους ιδρωτοποιούς αδένες.

Η κατάσταση των αγγείων σχετίζεται, εν μέρει, με το χρώμα του δέρματος. Η μικροκυκλοφορία είναι οργανωμένη σε δύο οριζόντια πλέγματα στο χόριο. Ένα λίγο κάτω από την επιδερμίδα και ένα στο μέρος όπου ενώνεται το χόριο με το υπόδερμα. Ανιόντα αρτηρίδια και κατιόντα φλεβίδια ζεύγνυνται συνδέοντας τα δύο πλέγματα. Στο άνω μέρος του χορίου, το γεινιάζον με την επιδερμίδα, ανέρχονται αρτηριακά τριχοειδή τα οποία σχηματίζουν τους θηλώδεις βρόγχους του χορίου οι οποίοι αποτελούν το μέρος αυτό της αιματικής κυκλοφορίας από το οποίο διατρέφεται η επιδερμίδα. Υπάρχουν μυϊκά κύτταρα τα

οποία δρουν σαν σφικτήρες στο σημείο όπου τα ανιόντα αρτηρίδια διαιρούνται για να σχηματίσουν το αρτηριδιακό μέρος του άνω οριζόντιου πλέγματος. Στην ένωση του χορίου με το υπόδερμα, υπάρχουν συλλεκτικές φλέβες με δύο βαλβίδες οι οποίες είναι προσανατολισμένες για να προλαμβάνουν πιθανή επιστροφή της ροής του αίματος.

Με τη βοήθεια του οργάνου μετρήσεως κυτταρικής ροής Laser Doppler εδείχθη η κίνηση μέσα στα αγγεία των ερυθρών αιμοσφαιρίων τα οποία εντοπίζονται στα μέρη των ανιόντων αρτηριδίων. Η ταυτόχρονη καταγραφή με τη βοήθεια του ανωτέρω οργάνου της ροής των ερυθρών αιμοσφαιρίων από διάφορα ανατομικά σημεία επιτρέπει την τοπογράφηση και κατασκευή χαρτών οι οποίοι αφορούν τις δύο αυτές τιμές. Σε βιοψίες του δέρματος με τη βοήθεια των δύο αυτών χαρτών μπορεί κανείς να προσδιορίσει εάν το δέρμα αποτελείται κυρίως από αρτηρίδια ή φλεβίδια ή ουσιαστικά λείπουν και τα δύο και συνεπώς δεν υπάρχει η μικροκυκλοφορία. [1]

## 1.6 Απεκκριτικοί ιδρωτοποιοί αδένες

Οι αδένες αυτοί αποτελούν τα πλέον πολυάριθμα στοιχεία του δέρματος και καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του σώματος. Έχουν ένα κυλινδρικό σπειροειδή πόρο, που συνορεύει με τα επιδερμικά κύτταρα, επεκτεινόμενο από τα ορατά ανοίγματά τους βαθιά στην επιδερμίδα, στο κυρίως δέρμα, όπου ο πόρος συσπειρώνεται σε σφαίρα. Ένα μέρος του πόρου εκκρίνει και παράγει τον άοσμο ιδρώτα που ανέρχεται σ' αυτόν και απελευθερώνεται στην επιφάνεια του δέρματος. Ο πόρος αυτός πιστεύεται ότι έχει την ικανότητα να μορφοποιεί των ιδρώτα, καθώς ανέρχεται, μεταφέροντας νερό ή άλατα. Αν και συνορεύει με την επιδερμίδα δεν είναι πολύ κεχρωσμένος ακόμη και σε άτομα με σκούρο δέρμα.

Η σύνθεση του ιδρώτα που εκκρίνεται ποικίλλει. Κυρίως, όμως, αποτελείται από ιόντα ηλεκτρολυτών, ουρία, αμινοξέα, μικρές ποσότητες σακχάρου και πιθανόν μερικά λιποειδή. Η συνήθης συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου κυμαίνεται μεταξύ 10 και 100 meq/L. Οι ιδρωτοποιοί αδένες του σώματος σχετίζονται με τη ρύθμιση της θερμοκρασίας (η εξάτμιση του ιδρώτα προκαλεί ψύξη του δέρματος) και την εναπόθεση στην κεράτινη στοιβάδα βασικών συστατικών όπως η ουρία και τα αμινοξέα, τα οποία αποτελούν τους φυσικούς ενυδατικούς παράγοντες. Άλλες πιθανές λειτουργίες του συστήματος εφιδρώσεως είναι η βοήθεια στο

βάδισμα και στην αφή των αντικειμένων από τα χέρια καθώς και οι αντισηπτικές και αντιμηκυττσιακές ιδιότητες του ιδρώτα λόγω του όξινου pH του.

Η εφίδρωση βρίσκεται κάτω από την επίδραση νευρικών κυττάρων, και τη συμμετοχή διαφόρων νευρικών ινών. [1]

## 1.7 Θυλάκια τριχών

Τα θυλάκια των τριχών είναι σωληνοειδείς εγκολπώσεις της επιδερμίδας. Οι τρίχες παράγονται από την κερατινοποίηση των κυττάρων που προέρχονται από διαίρεση της μεσοκυττάρου ουσίας στη βάση του θυλακίου. Υπάρχουν 120.000 περίπου τέτοια θυλάκια στο τριχωτό μέρος του κεφαλιού του ενήλικα. Καθένα από τα θυλάκια υποβάλλεται σ' έναν ενεργό κύκλο, που περιλαμβάνει μια ενεργή φάση που διαρκεί 1-3 χρόνια ή και περισσότερο, ακολουθεί μια σύντομη μεταβατική φάση και καταλήγει σε μια φάση ηρεμίας. Η πορεία αυτή συνεπάγεται μια διακοπή της μίτωσης στη μεσοκυττάρια ουσία και την κερατινοποίηση της ανεπτυγμένης βάσης της τρίχας για το σχηματισμό μιας ομάδας που διατηρείται μέχρι να ενεργοποιηθεί εκ νέου το θυλάκιο, όταν αυτή αποβάλλεται. Με τον τρόπο αυτό πέφτουν (φυσιολογικά) περίπου 100 τρίχες την ημέρα. [1]

## 1.8 Σμηγματογόνοι αδένες

Οι αδένες αυτοί εκκρίνουν σμήγμα, από το οποίο προέρχεται το μεγαλύτερο μέρος του λίπους που καλύπτει το δέρμα και τα μαλλιά. Βρίσκονται σχεδόν σ' όλο το σώμα και οι πόροι τους συνήθως καταλήγουν στο πάνω μέρος, σε ένα τριχοθυλάκιο. Οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τους βρίσκονται στο δέρμα του κεφαλιού, στο πρόσωπο, στο στήθος, στους ώμους ενώ δεν υπάρχουν στις παλάμες και τα πέλματα. Η δραστηριότητά τους βρίσκεται κάτω από ορμονικό έλεγχο και ειδικότερα η λειτουργία τους διεγείρεται από ανδρογόνα.

Το ανθρώπινο σμήγμα αποτελείται από γλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα, εστέρες κηρών, σκουαλένιο, εστέρες χοληστερόλης και χοληστερόλη. Το λίπος που προέρχεται από την επιφανειακή επιδερμίδα διαφέρει στο ότι στερείται εστέρων κηρών και σκουαλένιο και έχει μεγαλύτερη ποσότητα χοληστερόλης και εστέρων της. [1]

## 1.9 Γήρανση του δέρματος

Η γήρανση είναι εξ' ορισμού η απώλεια της ομοιόστασης και αναμφίβολα η γήρανση του δέρματος συμβάλλει πολύ σε αυτήν. Είναι ένα φαινόμενο φυσιολογικό, μη αναστρέψιμο, που εξελίσσεται αργά και ξεκινάει μετά την περίοδο της ανάπτυξης του οργανισμού.

Το δέρμα με την πάροδο της ηλικίας ακολουθεί κυρίως μια πορεία ξήρανσης. Το ξηραμένο δέρμα με την τραχεία επιφάνειά του, τη λεπιώδη εμφάνισή του, καθώς και την υψηλότερη άδηλη απώλεια του νερού, προκαλεί κνησμό που αυξάνεται με τις εκδορές και τις μικροαμυχές που δημιουργούνται. Ο Helfard παρατήρησε ότι το 80% των ασθενών άνω των 65 ετών υπέφερε στα πόδια από σοβαρή ξήρανση. Με τη γήρανση του δέρματος αυξάνεται και η συχνότητα εμφάνισης δερματικών παθήσεων με χαρακτηριστικότερη την σμηγματορροϊκή δερματίτιδα. Ο Klisman υπολογίζει ότι το 67% των ατόμων άνω των 70 ετών παρουσιάζουν αυτή την ασθένεια, κυρίως στο πρόσωπο και στο τριχωτό της κεφαλής.

Εκτός από τα παραπάνω, η γήρανση του δέρματος γίνεται κλινικά εμφανής με την υποκίτρινη έως ημιδιάφανη χρώση του, με την κατά τόπους κηλιδώδη υπέρχρωση ή αχρωμία, τη λέππυνση, τις ρυτίδες, τις ακτινικές βλάβες, τα εύθραυστα και βραδέως αναπτυσσόμενα νύχια, με τη μείωση της παραγωγής σμήγματος και ιδρώτα, τη μείωση της ελαστικότητας του δέρματος και τον υπερτριχισμό του άνω χείλους στις γυναίκες.

Ιστολογικές και βιοχημικές μελέτες δείχνουν ότι η "φυσιολογική" φθορά κατά τη γήρανση, επιδρά τόσο στο κυρίως δέρμα όσο και στην επιδερμίδα.

Οι κυριότερες αλλοιώσεις στο κυρίως δέρμα, οι οποίες δημιουργούνται από τις ηλικίες των 30 και 40 ετών είναι: α) εκφυλιστικές μεταβολές στις ίνες ελαστίνης, κολλαγόνου και στη θεμελιώδη ουσία. Το μόριο της ελαστίνης χάνει τις ιδιότητες της εκτατότητας και της συστολής. Το φαινόμενο αυτό ξεκινάει πολύ νωρίς, με το τέλος της εφηβείας. Συσσωρεύονται ακόμη λιπίδια γύρω από την ελαστίνη με αποτέλεσμα τη μείωση της ελαστικότητάς της και την

αύξηση της ταχύτητας ελαστολύσεως. Ταυτόχρονα μπορεί να παρατηρήσει κανείς ποσοτική αύξηση της ελαστίνης, η οποία παρατηρείται κυρίως σε ζώνες, που είναι εκτεθειμένες στην υπεριώδη ακτινοβολία (εκφύλιση του ελαστικού ιστού). Ένα από τα σημαντικότερα φαινόμενα είναι η ολοκληρωτική σχεδόν εξαφάνιση του κολλαγόνου από το δικτυωτό δέρμα. Με την πάροδο της ηλικίας αυξάνει το αδιάλυτο κολλαγόνο. Εμφανίζονται με αυξανόμενο αριθμό στην αρχή κινητοί και αργότερα σταθεροί ενδομοριακοί δεσμοί. Οι ίνες κολλαγόνου οργανώνονται, γίνονται συμπαγείς. Κατά τη γήρανση συντίθεται κολλαγόνο “διαφορετικής ποιότητας”, το οποίο σκληραίνει το δέρμα και το κάνει άκαμπτο σαν τους ασθενείς ιστούς. Η αραίωση των γλυκοζαμινογλυκανών προκαλεί απώλεια τονικότητας του δέρματος, επιπύδωση των δερμο-επιδερμικών θηλών, μείωση του υαλουρονικού οξέος, μείωση του αριθμού των ινοβλαστών. Οι ινοβλάστες χάνουν την ικανότητα αναπαραγωγής τους, όπως συμβαίνει στην προγηρία ή στην ασθένεια του Werner.

Στην επιδερμίδα μπορεί να παρατηρήσει κανείς ότι ο ρυθμός ανανέωσης των κυττάρων (φαινόμενο κερατινοποίησης) έχει μειωθεί, ενώ το μέγεθος των κυττάρων της κεράτινης στοιβάδας έχει αυξηθεί. Ο αριθμός των μελανοκυττάρων μειώνεται δέκα (10) με είκοσι τις εκατό (20%) κάθε δέκα (10) χρόνια ενώ μειώνεται και η παραγωγή μελανίνης. Η επιδερμίδα λεπταίνει ενώ η μείωση του υδατολιπιδικού υμενίου της επιφάνειας του δέρματος συμβάλλει στη θαμπή και ωχρή εμφάνιση της επιδερμίδας. Στο υπόδερμα, το λίπος ανακατανέμεται αναλόγως, εάν η ηλικία κάνει κάποιον να φαίνεται πιο λεπτός ή πιο παχύς.

Με την πάροδο της ηλικίας η ροή του αίματος μειώνεται, καθώς και η πυκνότητα των τριχοειδών αγγείων. Ίσως αυτός να είναι και ο λόγος της πλέον χλωμής όψης μετά την ηλικία των 70 και 80 ετών. Μειώνεται η ικανότητα της επούλωσης των τραυμάτων και της ανάπτυξης φλεγμονωδών αντιδράσεων σε ερεθισμούς. Επιπλέον, αδυνατίζει το ανοσοποιητικό σύστημα με αποτέλεσμα μολύνσεις από ιούς, βακτήρια και μύκητες. Ακόμη αναπτύσσονται όγκοι πιθανόν λόγω απώλειας σημαντικών γονιδίων, ιδίως αυτού που επιδρά στο t-RNA.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι το δέρμα των γυναικών γερνάει νωρίτερα από των ανδρών. Πράγματι μετά την ενηλικίωση το δέρμα τους γίνεται λεπτότερο από αυτό των ανδρών, καθώς επίσης μειώνεται και η πυκνότητα του κολλαγόνου. Οι πρώτες ενδείξεις γήρανσης του δέρματος εμφανίζεται στη γυναίκα αμέσως μετά την εμμηνόπαυση που συμβαίνει περίπου στα 50, όπου η λειτουργία των σμηγματογόνων αδένων μειώνεται. Αντίθετα, στον άνδρα κάτι τέτοιο σημειώνεται περίπου μια δεκαετία αργότερα.

Η βιολογική γήρανση δεν αντιστοιχεί πάντοτε με την ηλικία του ατόμου, αλλά εξαρτάται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η κληρονομικότητα και κυρίως η ηλιακή ακτινοβολία είναι οι σπουδαιότεροι παράγοντες γήρανσης του δέρματος. Η κληρονομικότητα είναι βέβαιον ότι επιδρά στις χρωματικές αλλοιώσεις των μαλλιών, στην εμφάνιση των ρυτίδων και προσδιορίζει το χρόνο, στον οποίο το άτομο θα αρχίσει να δείχνει τα πρώτα σημάδια γήρανσης. Γενικώς, κατέχει σημαντικό ρόλο στην πρόωρη γήρανση του δέρματος.

Η επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας, κυρίως των υπεριωδών ακτινών UVB αλλά και των UVA, εκδηλώνεται με ερυθρήματα, με καταστροφή του κολλαγόνου, με εκφύλιση της ελαστίνης, με αύξηση των γλυκοζαμινογλυκανών, με αλλοίωση του DNA, με μερική καταστροφή της μικροκυκλοφορίας.

Η αντίδραση του οργανισμού με το “μαύρισμα”, δηλαδή η παραγωγή μελανίνης που είναι το καλύτερο αντηλιακό φίλτρο είναι μεν χρήσιμη προφυλακτική αντίδραση, αλλά δεν είναι τόσο αποτελεσματική. Τέλος, η μακροχρόνια έκθεση στον ήλιο, εκτός από την γήρανση, μπορεί εν δυνάμει να προκαλεί και καρκίνο του δέρματος.

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη γήρανση του δέρματος είναι η μείωση με το χρόνο των φυσιολογικών λειτουργιών των κυττάρων, η λειτουργία του κυκλοφορικού συστήματος και των ενδοκρινών αδένων, ψυχοκοινωνικοί παράγοντες, οι τροφικές συνήθειες, η χρήση κορτικοειδών, το κλίμα, τυχόν τραυματισμοί και κατά την άποψη ορισμένων ερευνητών το κάπνισμα.

Η αντιμετώπιση της γήρανσης του δέρματος μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις τρόπους.

Ο πρώτος τρόπος είναι αμυντικός και συνίσταται στην εφαρμογή σκευασμάτων, που προστατεύουν από την ηλιακή ακτινοβολία (βενζοφενόνες) με δείκτη όμως προστασίας τουλάχιστον ανώτερο του 15, που κρατούν το δέρμα ενυδατωμένο και συντηρούν όσο είναι δυνατό τις βιο-μηχανικές ιδιότητές του, όπως η ελαστικότητα (υαλουρονικό οξύ), που προστατεύουν από τις κλιματικές συνθήκες και κυρίως από την υπερβολική θερμότητα και το κρύο (*aloe vera*, λιπαρές ουσίες).

Ο δεύτερος είναι επιθετικός, έχει αναπτυχθεί πρόσφατα και συνίσταται στη χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών όπως: ουρικό οξύ, διθειοθειαιζόλη, θειαζολιδίνη, βιταμίνη E, καρροτενοειδή, βιταμίνη C.

Στο δεύτερο τρόπο ανήκει και η πλέον ενδιαφέρουσα, για την καταπολέμηση της γήρανσης του δέρματος ουσία, που είναι το οξύ της βιταμίνης A (retinoic acid – retinoid), αλλά και γενικότερα τα ρητινοειδή. Η χρήση π.χ. της τρετινοΐνης σε δόση 0,05% δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Οι μικρές ρυτίδες μειώνονται, το δέρμα λαμβάνει ελαφρά κοκκινωπή απόχρωση και οι φακίδες σχεδόν αποχρωματίζονται, ενώ ο αριθμός τους παραμένει σταθερός. Στις βαθιές πάντως ρυτίδες η καλύτερευση είναι πολύ μικρή. Η θεραπεία όμως με ρητινοειδή παρουσιάζει και αρκετά μειονεκτήματα, μεταξύ των οποίων προβλήματα τοξικότητας, φωτοτοξικότητας, τερατογένεσης, μακρά διάρκεια και εύκολη οξειδωση του προϊόντος.

Έρευνες γίνονται και για την εν δυνάμει χρήση των ανδρογόνων και των οιστρογόνων για την καταπολέμηση της γήρανσης. Οι ορμόνες αυτές μοιάζουν να είναι αποτελεσματικές στην περίπτωση που η γήρανση οφείλεται σε ορμονικές διαταραχές όπως πολλές φορές παρατηρείται στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται 17-β-εστραδιόλη σε γέλη ή σε patch. Η χρήση και αυτών των ουσιών είναι απαγορευμένη στα καλλυντικά.

Η προστασία από την ηλιακή ακτινοβολία είναι το ισχυρότερο όπλο για τη μάχη εναντίον της γήρανσης. Παράλληλα είναι απαραίτητα η χρήση των καλλυντικών, που σίγουρα, αν μη τι άλλο, επιβραδύνουν τις διαδικασίες γήρανσης.

Ο τρίτος τρόπος είναι η πρόσκαιρη αντιμετώπιση της γήρανσης με χημική αποφωλίδωση (peeling), με ένεση υλικών, όπως κολλαγόνου και σιλικόνης, με χρήση ειδικών make-up για τις ρυτίδες. [2]

## 1.10 Οι Ελεύθερες ρίζες στο δέρμα και το οξειδωτικό στρες

Ελεύθερες ρίζες καλούνται τα μόρια με μονά, ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα. Είναι ασταθή και εμφανίζουν μεγάλη χημική δραστηριότητα. Ειδικότερα έχουν τη τάση να συμμετέχουν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις με καταστρεπτικές για τον οργανισμό συνέπειες, εφόσον δε γίνει δυνατός ο έλεγχός τους.

Προέρχονται κατά κύριο λόγο από το μοριακό οξυγόνο, που βρίσκεται είτε στην τριπλή κατάσταση, που είναι και η θεμελιώδης, είτε στην απλή κατάσταση με διαδοχική μονοσθενή



αναγωγή, η οποία οδηγεί διαδοχικά στο σχηματισμό ριζών υπεροξειδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου, ριζών υδροξυλίου και τέλος νερού.

Γενικά το 98% του μοριακού οξυγόνου, που εισέρχεται στον οργανισμό, χρησιμοποιείται για την αναπνοή, ενώ το υπόλοιπο 2% μετατρέπεται στις τοξικές ελεύθερες ρίζες. Σπανιότερα ελεύθερες ρίζες μπορούν να προέλθουν και από την ομολυτική διάσπαση δεσμού μορίου.

Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν πολλές και σημαντικές αλλοιώσεις στα μακρομόρια, αλλά και στα κύτταρα του δέρματος. Μεταξύ αυτών μπορούμε να διακρίνουμε:

- Υπεροξείδωση των λιπιδίων του δέρματος που επηρεάζουν τις φυσιολογικές λειτουργίες και τη δομή του δέρματος.
- Επίδραση στις χιαστές συνδέσεις που συναντώνται στο κολλαγόνο.
- Ικανότητα καταστροφής κυττάρων όπως π.χ. ινοβλαστών και κυττάρων Langerhans.
- Τεμαχισμό του DNA.
- Πολυμερισμό των πολυσακχαριτών.
- Αλλοιώσεις στην ενζυματική δραστηριότητα των κυττάρων.

Οι ελεύθερες ρίζες με τις βλάβες που προκαλούν στα κύτταρα συμβάλλουν στη γήρανση, φωτοευαισθητοποίηση, πρόκληση φλεγμονωδών αντιδράσεων αλλεργικής ή μη αιτιολογίας και στην καρκινογένεση του δέρματος.

Οι κυριότεροι παράγοντες, που βοηθούν στην πρόκληση των ελευθέρων ριζών, είναι:

- Η ηλιακή ακτινοβολία επηρεάζει σημαντικά το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών, σε ορισμένες περιπτώσεις μάλιστα ο χρόνος της ηλιακής ακτινοβολίας είναι ανάλογος του ποσοστού σχηματισμού των ελευθέρων ριζών.

Είναι γνωστό ότι το δέρμα, που είναι εκτεθειμένο στην ηλιακή ακτινοβολία, υπόκειται σε διάφορες αλλοιώσεις και σε τοξικά φαινόμενα που οφείλονται και στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η γήρανση του δέρματος (που είναι εντονότερη στα ακάλυπτα μέρη του σώματος, όπως το πρόσωπο) και η φωτοκαρκινογένεση.

Πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι όχι μόνο η υπεριώδης ακτινοβολία UVB, αλλά και η UVA είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία ελευθέρων ριζών, γεγονός που δείχνει και την αναγκαιότητα προστασίας από όλο το φάσμα των υπεριωδών ακτινών.

- Τα διάφορα φάρμακα είτε από μόνα τους, είτε ενεργοποιούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία, βοηθούν στην πρόκληση ελευθέρων ριζών.
- Η ακτινοβολία, η οποία προέρχεται είτε από τεχνητές πηγές είτε από την ατμόσφαιρα, είναι δυνατόν να συμβάλλει στη δημιουργία ελευθέρων ριζών.
- Η μόλυνση της ατμόσφαιρας με τους πολλούς οξειδωτικούς παράγοντες που περιέχει, όπως κατά κύριο λόγο είναι το  $O_3$ , το οποίο είναι παράγοντας γήρανσης του δέρματος, διότι είναι δυνατόν να συμβάλλει στην έναρξη αυτό-οξειδωσης των λιπαρών οξέων, αλλά και κατά δεύτερον τα οξειδία του αζώτου (μονοξειδίο, διοξειδίο) μπορούν να αντιδράσουν με βιολογικά μόρια και να προκαλέσουν αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Η αντιμετώπιση των ελευθέρων ριζών γίνεται με τη χρήση ουσιών δεσμευτών των ελευθέρων ριζών ή/και με αντιοξειδωτικές ουσίες ή/και με τη χρήση αντιηλιακών φίλτρων.

Η κατάσταση κατά την οποία παρατηρείται πλεόνασμα ελευθέρων ριζών και τα αντιοξειδωτικά του οργανισμού δεν μπορούν να το αντιμετωπίσουν καλείται οξειδωτικό στρες.

Κατά τη φυσιολογική μεταβολική δραστηριότητα σε νεαρές και μεσαίες ηλικίες οι βιολογικοί οργανισμοί, σε συνεργασία με ορισμένα δομικά συστήματα του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος, είναι ικανοί να αντιμετωπίσουν και να προστατεύσουν τα βιομόρια και τους ιστούς από τις βλαβερές επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες με αμυντικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Με τη γήρανση όμως των οργανισμών, οι αμυντικοί αυτοί μηχανισμοί δεν λειτουργούν ικανοποιητικά. Κατά πόσο ένα όργανο ή σύστημα οργάνων ενός βιολογικού οργανισμού υπόκειται σε οξειδωτικό στρες εξαρτάται από την ολική ισορροπία μεταξύ παραγόντων με οξειδωτικές δράσεις και αμυντικών αντιοξειδωτικών συστημάτων, ενζυμικών και μη ενζυμικών. Επιπρόσθετα υπάρχουν και εξωγενείς παράγοντες, στους οποίους εκτίθενται καθημερινά οι βιολογικοί οργανισμοί (διατροφή, τοξικές και καρκινογόνες χημικές ουσίες, ακτινοβολία, όζον, ατμοσφαιρικοί ρύποι, καπνός του τσιγάρου κ.τ.λ.), οι οποίοι συμβάλλουν στη δημιουργία οξειδωτικού στρες και πρέπει να αντιμετωπιστούν με επιπρόσθετες αντιοξειδωτικές ουσίες. Το οξειδωτικό στρες έχει

συσχετισθεί με μεγάλο αριθμό βλαβών σε βιολογικούς ιστούς και με οξείες και χρόνιες ασθένειες.

Οι κυριότερες βλάβες από το οξειδωτικό στρες στους βιολογικούς οργανισμούς, και μάλιστα στα βιομόρια αυτών, είναι η λιπιδική υπεροξείδωση σε λιπίδια των μεμβρανών των κυττάρων και άλλες λιποπρωτεΐνες, οι αλλοιώσεις στη δομή των πρωτεϊνών, που επηρεάζουν ή αναστέλλουν τη δράση των ενζύμων, οξειδωτικές βλάβες στα νουκλεϊκά οξέα και βλάβες σε υδατάνθρακες.

Η γήρανση του οργανισμού προκαλεί αύξηση των οξειδωτικών βλαβών, οι οποίες δεν μπορούν να προληφθούν ή να επισκευαστούν από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. [2]

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ο ΚΑΠΝΟΣ ΤΟΥ ΤΣΙΓΑΡΟΥ**

## 2.1 Χημική σύσταση του καπνού του τσιγάρου

Ο καπνός του τσιγάρου περιλαμβάνει οξειδωτικές και προ-οξειδωτικές ουσίες, που δημιουργούν ελεύθερες ρίζες. Το κάδμιο στον καπνό δημιουργεί βιοαναστολή του σελενίου και δρα ανταγωνιστικά στον ψευδάργυρο, κατεβάζει τα επίπεδα της βιταμίνης C και της β-καροτίνης στο πλάσμα, μπορεί επίσης να δημιουργήσει χαμηλά επίπεδα της βιταμίνης E και αρκετών βιταμινών του συμπλέγματος B.

Κύρια συστατικά του τσιγάρου είναι οι οργανικές ουσίες, τα αλκαλοειδή της νικοτίνης και προσθετικά που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή του. Ο καπνός του τσιγάρου είναι ένα μίγμα περίπου 6000 χημικών ουσιών, οι οποίες στην πλειονότητα τους παράγονται από την καύση των 4000 συστατικών των φύλλων του καπνού. Στον καπνό του τσιγάρου περιέχονται πτητικές ουσίες, ουσίες σε αέρια μορφή, αρωματικές ουσίες, πολυκυκλικά αρωματικά υδροκαρβονικά οξέα, νιτροζαμίνες, καρβονυλικά οξέα και αζα-αρένες.

Ο καπνός του τσιγάρου αποτελείται από δύο ρεύματα: το κύριο ρεύμα, που εισπνέει ο καπνιστής κατά τη διάρκεια του καπνίσματος, και το παράπλευρο ρεύμα, που είναι ο καπνός που αναδύεται κατά τα διαλείμματα εισρόφησης από το φλεγόμενο άκρο του τσιγάρου.

Το κύριο ρεύμα του καπνού του τσιγάρου χωρίζεται στη στερεά φάση, που περιέχει πίσσα και διάφορα αιωρούμενα σωματίδια καμένων υλικών, βαριά μέταλλα και ραδιενεργά στοιχεία, και την αέρια φάση, που αποτελείται από αερολύματα πτητικών χημικών ουσιών, τοξικά αέρια και πολυάριθμες αέριες ελεύθερες ρίζες. Στη στερεά – σωματιδιακή φάση (πίσσα), η διάμετρος των σωματιδίων είναι εξαιρετικά μικρή (0.1 – 1.0μm), σε ποσότητα 10-20 mg ανάλογα με τον τύπο του τσιγάρου, ώστε να μπορούν τα σωματίδια να εισχωρήσουν στις κυψελίδες των πνευμόνων. Μέσα στο πορώδες – απανθρακωμένο υλικό της πίσσας είναι εγκλωβισμένες πολυάριθμες σταθερές οργανικές ελεύθερες ρίζες και σημαντικός αριθμός καρκινογόνων και μεταλλαξιογόνων ουσιών, ιδιαίτερα πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, πυρένια, χλωριωμένες ενώσεις, N-αλκυλοκαρβαζόλες, φλουορανθένια, νιτροενώσεις κ.τ.λ. Η αέρια φάση (υπολογίζεται σε 400-500 mg/τσιγάρο) αποτελείται κατά 70% από 400-500 πτητικές οργανικές ενώσεις (58% αζωτούχες, 12% οξυγονούχες), 13% διοξείδιο του άνθρακα και 3.5% μονοξείδιο του άνθρακα και του υπόλοιπο από άλλα αέρια συστατικά σε εξαιρετικά μικρές ποσότητες. Στην αέρια φάση παράγονται συνεχώς ασταθείς ελεύθερες ρίζες που εξουδετερώνονται και ανακυκλώνονται με τη «γήρανση» του καπνού.

Το δευτερεύον ή παράπλευρο ρεύμα του καπνού του τσιγάρου αποτελείται επίσης από στερεά και αέρια φάση και έχει παρόμοια σύσταση με το κύριο ρεύμα, η περιεκτικότητά του όμως σε ορισμένα συστατικά (π.χ. καρκινογόνες ουσίες) είναι υψηλότερη. Αυτό συμβαίνει λόγω της έλλειψης οξυγόνου στο φλεγόμενο άκρο του τσιγάρου, καθώς η θερμοκρασία μειώνεται στους 450-600°C και αναπτύσσονται συνθήκες τέτοιες που αυξάνουν τις αναγωγικές και μειώνουν τις οξειδωτικές αντιδράσεις. Κατά την εισρόφιση καπνού από τον καπνιστή, η θερμοκρασία του φλεγόμενου άκρου ανέρχεται λόγω εισροής του οξυγόνου του αέρα σε υψηλότερες θερμοκρασίες κατά 200-300°C και οι αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα σε χαμηλότερα pH (6.0-6.2).

Οι χημικές ουσίες, τα βαριά μέταλλα και τα ραδιενεργά ιχνοστοιχεία στον καπνό του τσιγάρου έχουν προσδιοριστεί, οι ποσοτικές εκτιμήσεις όμως διαφέρουν για το είδος του καπνού, τσιγάρα με φίλτρα, τον τρόπο του καπνίσματος και την περιεκτικότητα του καπνού σε πίσσα και νικοτίνη. Μια αναφορά των συστατικών στα δύο ρεύματα και οι ποσότητες ανά τσιγάρο παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πιν.2.1). [3, 4, 5]

Χημική ένωση	Δραστικότητα	Κύριο ρεύμα	Δευτερεύον ρεύμα
Μονοξειδίο του άνθρακα	Τοξικό	10-23mg	2.5-4.7mg
Οξειδία αζώτου (NO <sub>x</sub> )	Τοξικά	100-600mg	4-10mg
Ακεταλδεΐδη	Καρκινογόνο	0.5-1.2mg	
Βενζόλιο	Καρκινογόνο	20-50μg	10-15μg
Φορμαλδεΐδη	Καρκινογόνο	70-100μg	0.1-50μg
2-Νιτροπροπάνιο	Καρκινογόνο	0.2-2.2mg	
Βινυλοχλωρίδιο	Καρκινογόνο	1.3-16ng	
Βενζοαπυρένιο	Καρκινογόνο	20-40ng	2.5-3.5ng
2-Ναφθυλαμίνη	Ισχυρό καρκινογόνο	4.3-27ng	30ng
Νικέλιο	Καρκινογόνο	0.5μg	13-30ng
Κάδμιο	Καρκινογόνο	0.007-0.35μg	7.2ng
Ράδιο	Καρκινογόνο	0.01pCi	
Θόριο, πλουτώνιο	Καρκινογόνο	0.1pCi	
Πολώνιο	Καρκινογόνο	0.03-1.0pCi	1.4pCi
Υδροκυάνιο	Τοξικό	1.3-16pCi	
Βενζοανθρακένιο	Καρκινογόνο	40-70ng	2-4ng
Νιτροδοαμίνες	Μεταλλαξιγόνα	90-700ng	5-50ng
Κατεχόλες	Καρκινογόνα, μεταλλαξιγόνα	21-500mg	88-212μg

<b>Φλουορανθένια</b>	Καρκινογόνα	30-50μg	
mg = 10 <sup>-3</sup> g, μg = 10 <sup>-6</sup> g, ng = 10 <sup>-9</sup> g, pCi = [0,1 Bq] ακτινοβολία			

**Πιν.2.1** Χημική σύσταση του καπνού του τσιγάρου στα δύο ρεύματα: κύριο ρεύμα και δευτερεύον ρεύμα, για ένα τσιγάρο με 20mg πίσσα, 1-2.5mg νικοτίνη, χωρίς φίλτρο [27]

## 2.2 Επίδραση του καπνού του τσιγάρου στην ανθρώπινη υγεία

Το κάπνισμα είναι ισχυρά συνδεδεμένο με πάρα πολλές ασθένειες και παθολογικές καταστάσεις, όπως με τον καρκίνο των πνευμόνων και διάφορους άλλους τύπους καρκίνου, με το εμφύσημα, τη χρόνια βρογχίτιδα, καρδιαγγειακές ασθένειες, δερματικές παθήσεις κ.τ.λ.

Η ετήσια πρόωρη θνησιμότητα από το κάπνισμα σε διεθνή κλίμακα υπολογίζεται σε 3.1 εκατομμύρια (1995), λόγω των βλαβερών συνεπειών του καπνού του τσιγάρου στους πνεύμονες, στο κυκλοφορικό σύστημα και σε άλλα όργανο. Σύμφωνα μάλιστα με στατιστικά στοιχεία του παγκόσμιου οργανισμού υγείας, κατά την τελευταία δεκαετία 1.9 εκατομμύρια άνθρωποι στις αναπτυγμένες χώρες και 1.2 εκατομμύρια στις αναπτυσσόμενες πεθαίνουν ετησίως πρόωρα λόγω του καπνίσματος. Στις αναπτυγμένες χώρες το 20% όλων των θανάτων έχουν ως πρωτογενή αιτία το κάπνισμα.

Οι καπνιστές παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλό κίνδυνο να νοσήσουν και να πεθάνουν πρόωρα από καρκίνο του πνεύμονα και άλλα είδη καρκίνου. Ο καρκίνος του πνεύμονα έχει αποδειχθεί από πολυάριθμες έρευνες ότι οφείλεται κατά 85-90% στο κάπνισμα. Σε παγκόσμια κλίμακα, 1 εκατομμύριο άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο από το θανατηφόρο αυτό είδος καρκίνου. Άλλοι τύποι καρκίνου που έχουν ως πρωταρχική αιτία τον καπνό του τσιγάρου είναι οι καρκίνοι των οργάνων του αναπνευστικού συστήματος, της ουροδόχου κύστης, του παγκρέατος, του ήπατος, του αιμοποιητικού συστήματος, του οισοφάγου, του τραχήλου της μήτρας κ.τ.λ. Υπολογίζεται ότι το 25% όλων των καρκίνων στους άνδρες και το 4% στις γυναίκες οφείλεται στο κάπνισμα. Πολυετής έρευνα με 35.000 γιατρούς στη Μ. Βρετανία έδειξε ότι ο σχετικός κίνδυνος για τους καπνιστές, σε σχέση με τους μη καπνιστές, ήταν 15 φορές μεγαλύτερος για καρκίνο του πνεύμονα, 24 φορές για άλλους καρκίνους του αναπνευστικού συστήματος, 13 φορές για χρόνιες αποφρακτικές πνευμονοπάθειες, ενώ



αυξημένος κίνδυνος παρουσιάστηκε και για άλλες 20 θανατηφόρες ασθένειες. Το κάπνισμα είναι επίσης υπεύθυνο για σημαντικό ποσοστό καρδιαγγειακών ασθενειών.

Το παθητικό κάπνισμα έχει επίσης αποδειχθεί από πολλές έρευνες ότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα ασθενειών και κακοήθων νεοπλασιών για άτομα που δεν είναι καπνιστές αλλά ζουν ή εργάζονται επί πολλά χρόνια σε κλειστούς χώρους με καπνιστές. Οι έρευνες αυτές δείχνουν ότι ένας παθητικός καπνιστής, που ζει σε σπίτι ή γραφείο με καπνιστές, μπορεί να «καπνίζει» παθητικά τον καπνό από 1 έως 4 τσιγάρα ημερησίως. Τα τελευταία χρόνια, το παθητικό κάπνισμα έχει αναγνωρισθεί ως πρωτογενής αιτία ασθενειών και θανάτων. Ιδιαίτερα βλαβερό είναι για τα παιδιά προσχολικής ηλικίας και για τα νήπια. Αν και οι ποσότητες καπνού διαφέρουν σημαντικά μεταξύ παθητικών καπνιστών, τα παιδιά, οι ηλικιωμένοι με αναπνευστικά προβλήματα, τα νήπια των οποίων η μητέρα καπνίζει κ.τ.λ. μπορούν να νοσήσουν και να αναπτύξουν άσθμα και διάφορα αναπνευστικά νοσήματα, ενώ για μακροχρόνια έκθεση ενδέχεται να παρουσιάσουν καρκίνο των αναπνευστικών οργάνων.

Είναι προφανές λοιπόν ότι ο καπνός του τσιγάρου, τόσο για τον ενεργό όσο και για τον παθητικό καπνιστή, είναι εξαιρετικά επιβλαβής και μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις, σοβαρές ασθένειες και σε θάνατο. [6]

### 2.3 Επίδραση του καπνού του τσιγάρου στο δέρμα

Το κάπνισμα επηρεάζει την εμφάνιση του δέρματος λόγω των διαταραχών που προκαλεί στην κυκλοφορία του αίματος, την επίδραση του στο κολλαγόνο και στις ίνες ελαστικής και στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οι οποίες δρουν βλαπτικά σε αυτό. Ήδη από το 1856 ο Sholly είχε συνδέσει το κάπνισμα με την εμφάνιση ρυτίδων στο πρόσωπο ενώ ο Iren το 1965 περιέγραψε το προσωπείο του καπνιστή.

Το κάπνισμα προκαλεί τις εξής διαταραχές στο δέρμα:

- Αγγειοσυστολή (Το κάπνισμα προκαλεί αγγειοσυστολή στα αγγεία για περίπου 90 min. Για την αγγειοσυσταλτική δράση του καπνίσματος ενοχοποιείται κυρίως η νικοτίνη).
- Διαταραχές των ορμονών του δέρματος

Η ροή του αίματος μειώνεται περίπου κατά 24% μετά το κάπνισμα του πρώτου τσιγάρου και κατά 29% μετά το κάπνισμα ενός δεύτερου τσιγάρου.

Στους καπνιστές και καπνίστριες διαταράσσεται η λειτουργία του δερματικού φραγμού με πρόωρα λεπτές γραμμές και ρυτίδες ανάλογες του αριθμού των ετών του καπνίσματος.

Σχεδόν σταθερά ευρήματα είναι:

- Η ξηρότητα του δέρματος
- Η πάχυνση του δέρματος
- Η μείωση της ελαστικότητάς του
- Το σταχτί χρώμα του δέρματος
- Η θαμπή όψη
- Η μείωση της δερματικής κυκλοφορίας

Πιθανοί μηχανισμοί:

- Διαταραχές της σύνθεσης της ελαστίνης
- Ισχαιμικές διαταραχές του δέρματος
- Μείωση της βιταμίνης α του δέρματος
- Μείωση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού άμυνας του δέρματος
- Μείωση της ενυδάτωσης του δέρματος
- Υδροξυλίωση της οιστραδιόλης με αποτέλεσμα υποοιστρογοναιμία, ξηρότητα και ατροφία του δέρματος
- Γενετικοί παράγοντες

Ο μηχανισμός επίδρασης του καπνού του τσιγάρου στο δέρμα περιλαμβάνει τη συμμετοχή των μεταλλοπρωτεϊνών MMPs (matrix metalloproteinases). Πιο συγκεκριμένα, *in vitro* στοιχεία δείχνουν ότι ο καπνός του τσιγάρου αυξάνει τα επίπεδα των MMPs, οι οποίες οδηγούν στην υποβάθμιση του κολλαγόνου, των ελαστικών ινών και των πρωτεογλυκανών προκαλώντας τελικά μια ανώμαλη παραγωγή του υλικού της ελαστώσης και γήρανση του δέρματος. Ο καπνός του τσιγάρου ασκεί τη δηλητηριώδη δράση του στο δέρμα άμεσα μέσω των ερεθιστικών συστατικών του πάνω στην επιδερμίδα και έμμεσα στο χόριο μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Η μείωση της υγρασίας στην κεράτινη στοιβάδα συμβάλλει στη ξηρότητα του δέρματος και στην εμφάνιση ρυτίδων.

Ο καπνός επηρεάζει την επούλωση πληγών του δέρματος λόγω του ότι μειώνεται η λειτουργία των ινοβλαστών με αποτέλεσμα την ανικανότητά τους να μεταναστεύουν στην πληγή. Επιπλέον με το κάπνισμα μειώνεται σημαντικά η ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος με συνέπεια τη φτωχή επούλωση των πληγών.

Αρκετές μελέτες συνδέουν τον καπνό του τσιγάρου με την απώλεια των μαλλιών και την αλωπεκία. Ο τρόπος που δρα ο καπνός του τσιγάρου στην απώλεια των μαλλιών είναι ιδιαίτερα πολύπλοκος, ενώ ορισμένες έρευνες αποδεικνύουν ότι σχετίζεται και με το πρόωρο γκριζάρισμα των μαλλιών. Επίσης, μελέτες συνδέουν την εμφάνιση του ακανθοκυτταρικού και του βασεοκυτταρικού καρκίνου του δέρματος με το κάπνισμα. Η μείωση των επιπέδων της βιταμίνης α στους καπνιστές ίσως συμβάλλει στη μειωμένη προστασία από τις ελεύθερες ρίζες, ενώ η κατάσταση επιδεινώνεται παρουσία ενός ακόμα οξειδωτικού παράγοντα, του ήλιου.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η σχέση του καπνίσματος με την ψωρίαση. Η ψωρίαση είναι μια κοινή, χρόνια, φλεγμονώδης δερματική διαταραχή που οφείλεται στο συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Μελέτες έχουν δείξει πως το κάπνισμα είναι δυνατό να αυξήσει τον κίνδυνο ψωρίασης ή στην περίπτωση ατόμων που έχουν ήδη ψωρίαση, να επιδεινώσει τα συμπτώματα. Μεγαλύτερο κίνδυνο φαίνεται να εμφανίζουν οι γυναίκες και οι καπνίζοντες πάνω από 20 τσιγάρα ημερησίως. Σύμφωνα μάλιστα με έρευνα, για να μειωθεί για έναν πρώην καπνιστή ο κίνδυνος ψωρίασης τόσο ώστε να φτάσει αυτόν των μη καπνιστών απαιτούνται 20 ολόκληρα έτη μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Επίσης, η εμβρυϊκή και παιδική έκθεση στον παθητικό καπνό έχει συνδεθεί με έναν αυξανόμενο κίνδυνο εμφάνισης ψωρίασης.

Η ακροφυλκταίνωση εμφανίζεται συχνότερα στους καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνίζοντες, ενώ έρευνες δείχνουν πως ο καπνός αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του στόματος. Πολυάριθμες βλάβες δημιουργούνται στα δόντια και ούλα, ενώ το κάπνισμα φαίνεται να συνδέεται με την λευκοπλακία, μια προκαρκινική κατάσταση.

Αξίζει να αναφερθεί ότι έρευνες κατά τις οποίες απομονώθηκαν κερατινοκύτταρα από δέρμα καπνιστών και καλλιεργήθηκαν παρατηρήθηκε ότι αυτά παρουσιάζουν πιο στρογγυλεμένο σχήμα και μικρότερο μέγεθος, χάνουν τη δυνατότητα της μεταξύ τους σύνδεσης, εμφανίζουν χαμηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού και απαιτείται περισσότερος χρόνος για να επιτευχθεί πληρότητα στην καλλιέργεια της τάξης του 70-80%. Τα παραπάνω

χαρακτηριστικά επιβεβαιώνουν ότι τα κύτταρα αυτά έχουν υποστεί οξειδωτικό στρες λόγω του καπνού του τσιγάρου.

Συμπερασματικά, ο καπνός του τσιγάρου έχει συνδεθεί με πολλές δερματολογικές καταστάσεις. Δρα αυξάνοντας το οξειδωτικό στρες στα κύτταρα και προκαλεί βλάβες που οδηγούν σε διαταραχές και παθήσεις του δέρματος ή επιδείνωση των ήδη υπαρχόντων δερματολογικών προβλημάτων. [7, 11, 14]

## 2.4 Επίδραση της νικοτίνης στο δέρμα

Η νικοτίνη ασκεί ένα πολύ συγκεκριμένο ρόλο στην πρόωρη γήρανση του δέρματος. Προκαλεί αλλαγές στα ρεολογικά χαρακτηριστικά του αίματος, αυξάνει την αγγειοσυστολή και καταστρέφει το επιθηλιακό στρώμα των αγγείων. Αλληλεπιδράσεις με το μεταβολισμό του κολλαγόνου και τη διαφοροποίηση και μετανάστευση των κερατινοκυττάρων ίσως συνεπάγονται την πρόωρη γήρανση.

Η νικοτίνη προκαλεί αγγειοσυστολή και μειώνει τη ροή του αίματος στο δέρμα, περιορίζοντας την ικανότητα επούλωσης του δέρματος. Ακόμη αυξάνει τη συγκόλληση αιμοπεταλίων αυξάνοντας τον κίνδυνο μικροαγγειακής θρόμβωσης και ισχαιμίας του ιστού. Επιπλέον ο πολλαπλασιασμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των ινοβλαστών και των φαγοκυττάρων μειώνεται με τη νικοτίνη. Τέλος η νικοτίνη εμπλέκεται στην επούλωση του δέρματος με την αναστολή της μετανάστευσης και της διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων.

Η νικοτίνη και η αυξημένη χοληνεργική δραστηριότητα που προκαλεί έχει αποδειχθεί ότι εμποδίζει την απόπτωση, έναν μηχανισμό ο οποίος καταστρέφει τα ανεπιθύμητα κύτταρα. Η αδυναμία αποβολής των μεταλλαγμένων ή απλά κατεστραμμένων κυττάρων μπορεί να αποβεί καρκινογόνα. [9, 10]

## 2.5 Καπνός του τσιγάρου, ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες

Κατά την καύση του καπνού του τσιγάρου παράγονται μεγάλες ποσότητες ελευθέρων ριζών και δραστικών οξειδωτικών ουσιών, τόσο στην πίσσα όσο και στην αέρια φάση των δύο ρευμάτων του καπνού. Η δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών του καπνού και η ισχυρή τοξική και καρκινογόνος δράση τους τις καθιστά ιδιαίτερα επιβλαβείς για τον άνθρωπο που είναι ενεργός ή παθητικός καπνιστής.

Στην πίσσα, σύμφωνα με μελέτες, υπάρχουν ρίζες που διασπώνται βραδέως, παραμένουν δηλαδή στον οργανισμό για μερικές ημέρες. Οι ελεύθερες ρίζες στην πίσσα του καπνού είναι πιθανόν πέντε: ελεύθερη ρίζα με το μονήρες ηλεκτρόνιο σε ανόργανο φώσφορο, ελεύθερη ρίζα άγνωστης δομής, μάλλον ανθρακικού σκελετού, ελεύθερη ρίζα με μονήρες ηλεκτρόνιο σε άτομο θείου, ελεύθερη ρίζα άγνωστης δομής (πιθανόν αζωτούχο υλικό φύλλων καπνού) και η ελεύθερη ρίζα, μίγμα κινόνης-ημικινόνης-υδροκινόνης ( $Q-QH\cdot-QH_2$ ). Η τελευταία μάλιστα είναι η κύρια ρίζα μακράς διάρκειας ζωής και είναι εγκλωβισμένη μέσα στους πόρους του απανθρακωμένου πολυμερούς της πίσσας.

Οι κινόνες σχηματίζονται εύκολα κατά την καύση του καπνού του τσιγάρου. Μπορούν να αντιδράσουν με το οξυγόνο και να το μετατρέψουν σε υπεροξειδικό ανιόν ( $O_2^{\cdot-}$ ) και στη συνέχεια σε υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Το  $H_2O_2$ , με την επίδραση μεταλλικών ιόντων, π.χ. του σιδήρου, παράγει ρίζες υδροξυλίου ( $HO\cdot$ ), οι οποίες είναι ιδιαίτερα τοξικές και μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε διάφορα βιομόρια (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες).

Η τοξική δράση της πίσσας σε ευαίσθητες κυψελιδικές περιοχές των πνευμόνων ξεκινάει με την έντονη οξειδωτική δράση λόγω της παραγωγής  $H_2O_2$  και άλλων οξυγονούχων ελευθέρων ριζών και έχει ως αποτέλεσμα να καταστρέφονται αντιοξειδωτικές βιταμίνες (π.χ. C και E) και ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες. Το γεγονός αυτό σημαίνει δραστική μείωση των ενδογενών αμυντικών μηχανισμών που προστατεύουν βιομόρια και ενζυμικές λειτουργίες και ανάπτυξη οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, η προστασία του DNA είναι μειωμένη και μπορούν εύκολα να συμβούν οξειδωτικές βλάβες στις νουκλεοβάσεις, ενώ οι επιδιορθωτικοί μηχανισμοί δεν μπορούν να λειτουργήσουν αποτελεσματικά.

Η οξειδωτική-αναγωγική δράση του καπνού του τσιγάρου στους πνεύμονες προκαλεί ακόμη μια σημαντική βλαβερή αντίδραση, την απελευθέρωση σιδήρου από τη φερριτίνη

(πρωτεΐνη που κυκλοφορεί συμπλοκοποιημένο δισθενή σίδηρο σε φυσιολογικά κυτταρικά διαμερίσματα) στα υγρά των πνευμόνων. Η απελευθέρωση σιδήρου με το  $H_2O_2$  της πίσσας δημιουργεί ιδανικές συνθήκες για την παραγωγή των τοξικών ριζών υδροξυλίου. Η συγκέντρωση σιδήρου στους πνεύμονες των καπνιστών έχει προσδιοριστεί κατά τις εγχειρίσεις του θώρακα και των πνευμόνων, όπου συγκεντρώνονται υδαρή άλατα σιδήρου. Παρόμοια, οι εγχειρίσεις πνευμόνων δείχνουν ένα απανθρακωμένο στρώμα πίσσας που καλύπτει τους πνεύμονες. Οι ελεύθερες ρίζες της πίσσας παραμένουν ενεργές στον πνεύμονα του καπνιστή προκαλώντας βλαβερές επιπτώσεις στο ευαίσθητο αυτό όργανο.

Στην αέρια φάση του καπνού του τσιγάρου, οι ελεύθερες ρίζες βρίσκονται σε μικρότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με την πίσσα και οι περισσότερες είναι αρκετά ασταθείς. Στη φάση αυτή έχει διαπιστωθεί, εκτός των άλλων, και η παρουσία υπεροξυνιτρώδους ανιόντος ( $O=NOO^-$ ), το οποίο πιθανόν σχηματίζεται από τη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου ( $NO\cdot$ ) και το υπεροξειδικό ανιόν ( $O_2\cdot^-$ ). Το  $O=NOO^-$  είναι γνωστό για την ισχυρή τοξική και καρκινογόνο δράση του. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η αέρια φάση έχει ισχυρή οξειδωτική δράση και έχει, όπως και η πίσσα, την ικανότητα να προκαλεί χρωμοσωμικές βλάβες στο DNA των κυττάρων, να υπεροξειδώνει τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών και να επαυξάνει το οξειδωτικό στρες.

Συμπερασματικά, οι ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται από την καύση του καπνού του τσιγάρου είναι ιδιαίτερα επιβλαβείς και προκαλούν αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα σε καπνιστές και παθητικούς καπνιστές. Οι κυριότερες βλάβες από την καπνό του τσιγάρου προκαλούνται στο αναπνευστικό σύστημα. Το κάπνισμα αυξάνει τον κίνδυνο βλαβών στα όργανα του αναπνευστικού συστήματος και ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα και άλλων ειδών καρκίνου, ενώ μαζί με τη διατροφή αποτελούν σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας από τις ασθένειες του κυκλοφορικού συστήματος (καρδιαγγειακές ασθένειες), μέσω μηχανισμών υπεροξειδωσης λιποπρωτεϊνών και πρόκληση αθηρωματικών πλάκων.

Όταν στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχει ανισορροπία μεταξύ των ελευθέρων ριζών και της ικανότητας του βιολογικού συστήματος να τις αδρανοποιήσει ή να επιδιορθώσει την καταστροφή που αυτές προκαλούν, παρουσιάζεται οξειδωτικό στρες.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει νέκρωση του κυττάρου, ενώ συμβάλλει στη γήρανση των οργανισμών και σε ένα μεγάλο φάσμα ασθενειών. [15, 19, 21, 25]

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Η ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ**

### 3.1 Εισαγωγή

Ο ήλιος είναι ένας τεράστιος σταθμός παραγωγής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Οι ακτινοβολίες που επηρεάζουν το δέρμα μας, είναι ένα μόνο μικρό τμήμα του ηλιακού φάσματος. Οι ακτινοβολίες αυτές είναι οι :

- Υπέρυθρη ακτινοβολία (InfraRed)
- Ορατό φως (Visible Light)
- Υπεριώδης ακτινοβολία (UltraViolet)

Ο ήλιος είναι επίσης πηγή ενέργειας για τον πλανήτη μας, χωρίς την ηλιακή ακτινοβολία του οποίου, δεν θα υπήρχε και ζωή. Όμως, η αλόγιστη έκθεση σε αυτήν, συσσωρεύει κυτταρικές βλάβες στο δέρμα και από ένα σημείο και μετά οι επιδράσεις της είναι αρκετά επιβλαβείς.

Το πλέον γνωστό **άμεσο** ανεπιθύμητο αποτέλεσμα της υπερβολικής έκθεσης στον ήλιο, είναι το γνωστό *ερύθημα*, γνωστό και σαν ηλιακό έγκαυμα. Επιπροσθέτως, μετά από λίγες ημέρες από την έκθεση, η διέγερση από την UV της παραγωγής μελανίνης από τα μελανοκύτταρα, θα γίνει αντιληπτή σαν «μαύρισμα». Και οι δύο αλλαγές αυτές, είναι σημάδι βλάβης του δέρματος. Η έκτασή της εξαρτάται βέβαια και από το χρώμα του δέρματος του ατόμου (φωτότυπος) με τα ανοιχτότερα δέρματα να είναι πιο ευαίσθητα στην UV από ότι τα σκούρα δέρματα. Ομοίως, η ικανότητα να προσαρμοζόμαστε στην UV ακτινοβολία (να «μαυρίζουμε») εξαρτάται και αυτή από τον φωτότυπο του δέρματος.

**Μακροχρόνια**, η έκθεση στην UV ακτινοβολία προκαλεί εκφυλιστικές βλάβες στα κύτταρα, τον ινώδη ιστό και τα αγγεία του δέρματος. Αυτές, μπορεί αδρά να ταξινομηθούν σε πρόωρη γήρανση (φωτογήρανση), δερματικούς καρκίνους και άλλες βλάβες. [29]



## 3.2 Υπεριώδης ακτινοβολία

Ο ήλιος εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία την οποία διακρίνουμε σε 3 κατηγορίες, ανάλογα με το μήκος κύματός της.

- UVC, 200 - 290 nm
- UVB, 290 - 320 nm
- UVA, 320 - 400 nm

Αναλυτικότερα:

- **UVC Ακτινοβολία:** Η UVC απορροφάται τελείως από την στοιβάδα του όζοντος στην στρατόσφαιρα και δεν φτάνει στην επιφάνεια της γης. Είναι πολύ επικίνδυνη και καρκινογόνος για το δέρμα.
- **UVB Ακτινοβολία:** Η UVB διεισδύει στις εξωτερικές στοιβάδες του δέρματος (επιδερμίδα) και είναι το πρωταρχικό αίτιο πρόκλησης εγκαυμάτων από τον ήλιο. Στην επιφάνεια της γης φτάνει σε μικρότερα ποσά λόγω της απορρόφησης μεγάλου μέρους της από τη στοιβάδα του όζοντος. Και πάλι όμως αρκεί για να προκαλέσει ζημιά.
- **UVA Ακτινοβολία:** Η UVA εθεωρείτο παλαιότερα ότι δεν είχε ιδιαίτερη επίδραση στο δέρμα. Τα τελευταία χρόνια όμως αποδείχθηκε ότι συνεισφέρει τα μέγιστα στις δερματικές βλάβες, αφού είναι ασθενώς καρκινογόνα και προκαλεί γήρανση και ρυτίδες στο δέρμα. Διεισδύει βαθύτερα στο δέρμα, φτάνοντας μέχρι το χόριο όπου πολλές διαδικασίες φωτογήρανσης λαμβάνουν χώρα. [29]

## 3.3 Η καταστρεπτική δράση των UVA και UVB στο δέρμα

Και τα δύο είδη της ακτινοβολίας, προκαλούν ρυτίδωση, μειωμένη ανοσία έναντι των λοιμώξεων, βλάβες γήρανσης του δέρματος και καρκίνους. Πιθανοί μηχανισμοί για τα βλαπτικά αυτά αποτελέσματα είναι η διάσπαση του κολλαγόνου, ο σχηματισμός ελεύθερων

ριζών, η αλληλεπίδραση με μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA και η ανασταλτική τους δράση σε ανοσολογικούς μηχανισμούς.

**Διάσπαση Κολλαγόνου:** Στο χόριο, η UV ακτινοβολία προκαλεί διάσπαση του κολλαγόνου σε ρυθμούς μεγαλύτερους από αυτούς της χρονολογικής γήρανσης. Το ηλιακό φως καταστρέφει τις κολλαγόνες ίνες με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ελαττωματικής ελαστίνης. Όταν αυτή η ελαστίνη αυξάνεται σε ποσότητα, παράγονται μεταλλοπρωτεϊνάσες (ένζυμα) σε μεγάλες ποσότητες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα ένζυμα αυτά επιδιορθώνουν το «πληγωμένο» από τον ήλιο δέρμα κατασκευάζοντας και ανασυνθέτοντας κολλαγόνο. Όμως αυτή η διαδικασία δεν είναι πάντα 100% επιτυχής και μερικές μεταλλοπρωτεϊνάσες στην πραγματικότητα διασπούν κολλαγόνο, παράγοντας αποσυντεθειμένες κολλαγόνες ίνες, τις «ηλιακές ουλές». Όταν το δέρμα επαναλαμβάνει αυτή την ατελή διαδικασία ξανά και ξανά, σχηματίζονται οι ρυτίδες.

**Ελεύθερες Ρίζες:** Η UV ακτινοβολία είναι ένα από τα κυριότερα αίτια παραγωγής ελεύθερων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθή μόρια οξυγόνου που έχουν μόνο ένα ηλεκτρόνιο αντί των δύο. Επειδή τα ηλεκτρόνια ευρίσκονται ανά ζεύγη, το κάθε μόριο πρέπει να ψάξει άλλα μόρια για να συμπληρώσει το ζεύγος ηλεκτρονίων. Με τη σειρά του, όταν το δεύτερο μόριο, χάσει το ηλεκτρόνιό του (το δώσει στο πρώτο μόριο), πρέπει να βρει ένα τρίτο μόριο για να επαναληφθεί η διαδικασία. Αυτή ακριβώς η διαδικασία όμως προκαλεί βλάβες στην κυτταρική λειτουργία (ενεργοποίηση μεταλλοπρωτεϊνών → διάσπαση κολλαγόνου) και αλλαγές στο γενετικό υλικό (DNA και RNA) των κυττάρων.

**Επιδιόρθωση DNA:** Η UV επηρεάζει ένζυμα που παίζουν ρόλο στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA. Μελέτες γίνονται για τον ρόλο που διαδραματίζει ένα ειδικό ένζυμο, η T4 ενδονουκλεάση-5 (T4N5) στην επιδιόρθωση του DNA.

**Επίδραση στο Ανοσολογικό Σύστημα:** Ο οργανισμός έχει ένα αμυντικό σύστημα που επιτίθεται στα πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα. Σε αυτό περιλαμβάνονται τα T-λεμφοκύτταρα (είδος λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος), αλλά και εξειδικευμένα κύτταρα του χορίου, τα κύτταρα Langerhans. Όταν το δέρμα προσλαμβάνει υπεριώδη ακτινοβολία, απελευθερώνονται ειδικές χημικές ουσίες που καταστέλλουν τα κύτταρα αυτά. Επιπλέον, ιδίως στον αναπτυσσόμενο κόσμο, υψηλά επίπεδα υπεριώδους ακτινοβολίας, μπορούν δυνητικά να μειώσουν την αποτελεσματικότητα των εμβολίων και επομένως επειδή πολλά νοσήματα που προλαμβάνονται με εμβολιασμούς είναι εξαιρετικά μεταδοτικά, οποιοσδήποτε

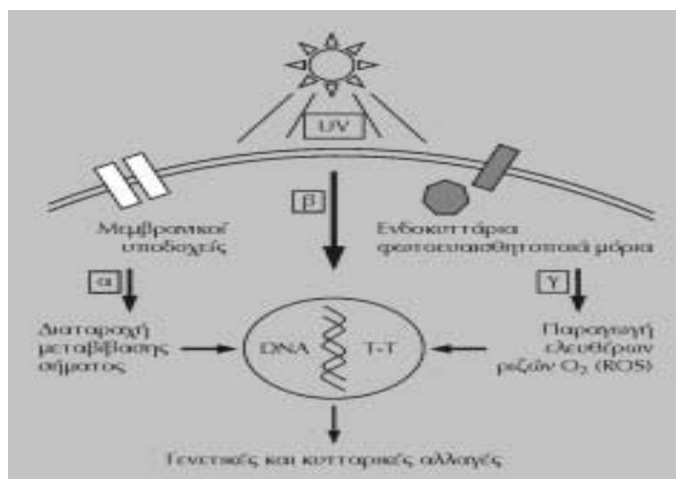
παράγοντας που μειώνει έστω και κατ' ελάχιστον την αποτελεσματικότητά τους, μπορεί να αποτελέσει κίνδυνο για τη δημόσια υγεία.

**Κυτταρικός Θάνατος:** Η τελευταία αμυντική γραμμή του ανοσολογικού μας συστήματος, είναι μια διαδικασία που λέγεται **απόπτωση**. Η απόπτωση είναι μια διαδικασία, κατά την οποία, κύτταρα που έχουν υποστεί σοβαρή βλάβη, «αυτοκτονούν», έτσι ώστε να μην γίνουν καρκινικά. Αυτή τη διαδικασία την βλέπουμε όταν «ξεφλουδίζουμε» μετά από ένα ηλιακό έγκαυμα. Υπάρχουν λοιπόν ορισμένοι παράγοντες, μεταξύ των οποίων και η UV ακτινοβολία, οι οποίοι προλαμβάνουν αυτόν το κυτταρικό θάνατο, επιτρέποντας στα κύτταρα να συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται με πιθανότητα να γίνουν καρκινικά. [29]

### 3.4 Η επίδραση στο δέρμα της οξειάς και χρόνιας έκθεσης σε UV ακτινοβολία

Η έκθεση του ανθρωπίνου δέρματος στην υπεριώδη ακτινοβολία προκαλεί ένα ευρύ φάσμα από κυτταρικές, βιοχημικές και κλινικές μεταβολές, που συντελούνται σε άμεση ή μακροχρόνια βάση. Οι αλλαγές αυτές οφείλονται σε σύνθετους και πολύπλευρους μοριακούς μηχανισμούς, με κοινή αφετηρία την απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας από διάφορα χρωμοφόρα μόρια και κυτταρικούς στόχους του δέρματος. Οι φωτοχημικές μεταβολές ενός τέτοιου χρωμοφόρου, του κυτταρικού DNA, οδηγούν στο σχηματισμού σύμπλοκων χημικών ενώσεων μεταξύ των νουκλεοτιδίων, που ονομάζονται φωτοπροϊόντα και απαρτίζονται κυρίως από τα διμερή κυκλοβουτανίου και τις ενώσεις 6-4 πυριμιδίνης-πυριμιδόνης. Η παρουσία των φωτοπροϊόντων αυτών και οι συνεπαγόμενες μεταβολές στη λειτουργία των δερματικών κυττάρων συμμετέχουν στην εκδήλωση των οξειών και χρόνιων επιδράσεων της υπεριώδους ακτινοβολίας, όπως το ηλιακό ερύθημα, η μελάγχρωση, ανοσοκαταστολή και ο καρκίνος του δέρματος. [28]

Η καρκινογενετική επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στο δέρμα εξασκείται μέσω πολλών και σύνθετων κυτταρικών μηχανισμών, που αφορούν στη διαταραχή της μεταβίβασης σήματος από την κυτταρική μεμβράνη στον πυρήνα, το σχηματισμό ελευθέρων ριζών οξυγόνου με κυτταροτοξική δράση και, κυρίως, την άμεση βλαπτική δράση των υπεριωδών ακτινών στο κυτταρικό DNA, με το σχηματισμό φωτοπροϊόντων.



**Εικ.3.1** Οι κυριότεροι μηχανισμοί δράσης της υπεριώδους ακτινοβολίας στα κύτταρα του δέρματος [28]

Έπειτα από οξεία έκθεση σε UV ακτινοβολία, τα κλινικά συμπτώματα του ανθρώπινου δέρματος περιλαμβάνουν ηλιακό έγκαυμα και ανοσοκαταστολή. Παρά την ικανότητα των κυττάρων να επιδιορθώνουν τις βλάβες που προκαλούνται στο DNA από την UV ακτινοβολία, κάποιες παραμένουν. Ωστόσο, οι μηχανισμοί των κυττάρων του δέρματος δεν επιτρέπουν οι βλάβες αυτές να οδηγήσουν σε καρκίνο του δέρματος. Ένας από αυτούς τους μηχανισμούς είναι η διακοπή του κυτταρικού κύκλου που ακολουθείται από επιδιόρθωση του DNA και ένας δεύτερος ο κυτταρικός θάνατος μέσω της απόπτωσης. Και οι δύο παραπάνω μηχανισμοί προλαμβάνουν τη μεταβίβαση των μεταλλάξεων στα θυγατρικά κύτταρα που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση. Το γονίδιο p53 αποτελεί ένα σημαντικό ογκοκατασταλτικό μηχανισμό, που συσχετίζεται άμεσα με την αποκατάσταση των βλαβών του DNA και την προστασία των κυττάρων από διάφορες γενοτοξικές βλάβες.

Εάν οι βλάβες του DNA που προκαλούνται από την έκθεση στη UV ακτινοβολία είναι πολύ σοβαρές και δεν μπορούν να επιδιορθωθούν, ενεργοποιείται ο μηχανισμός της απόπτωσης για να περιορίσει τα κατεστραμμένα κύτταρα. Το γονίδιο p53 διαδραματίζει επίσης κυρίαρχο ρόλο στο μηχανισμό της απόπτωσης.

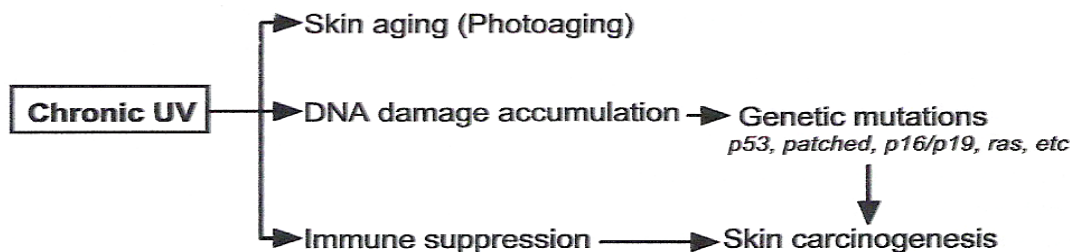
Το γονίδιο p53, επίσης συνεισφέρει στη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας προωθώντας τη σωστή αντιγραφή του DNA και την επιδιόρθωση μέσω του γονιδίου GADD45, καθώς και αναστέλλοντας την αγγειοσυστολή μέσω των γονιδίων TSP1 και BAI1, η οποία αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την εξέλιξη σε κακοήθεια. Με αυτό τον τρόπο το γονίδιο p53 διαδραματίζει καίριο ρόλο στην προστασία του γονιδιώματος, των κυττάρων και των ιστών του δέρματος από την υπεριώδη ακτινοβολία.

Η υπερπλασία της κεράτινης στοιβάδας, της επιδερμίδας και του χορίου είναι το αποτέλεσμα της αύξησης της δόσης της UV ακτινοβολίας (Matsumura, 2003). 24 με 48 ώρες μετά την οξεία έκθεση σε UV ακτινοβολία αυξάνονται οι μιτωτικές δραστηριότητες της επιδερμίδας και του χορίου, καθώς και η σύνθεση του DNA, του RNA και των πρωτεϊνών. Όλες αυτές οι ιστολογικές αλλαγές είναι προσωρινές και απουσία περαιτέρω έκθεσης σε UV ακτινοβολία, τα κύτταρα του δέρματος επανέρχονται μέσα σε μία με δύο εβδομάδες.

Τα κύτταρα Langerhans "συλλαμβάνουν" το αντιγόνο και διεγείρουν τα λεμφοκύτταρα T. Επιπλέον, τα κερατινοκύτταρα παράγουν αρκετές κυτταροκίνες που ίσως επίσης συμμετέχουν στο ανοσοποιητικό σύστημα του δέρματος. Η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί ανοσοκαταστολή του παραπάνω συστήματος και οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του δέρματος. [22]

Η χρόνια και επαναλαμβανόμενη έκθεση στο ηλιακό φως προκαλεί σταδιακή αλλοίωση της δερματικής δομής και λειτουργίας. Αυτό συμβαίνει προφανώς σαν αποτέλεσμα των συσσωρευμένων βλαβών του DNA και της επίδρασης της χρόνιας φλεγμονής. Αυτές οι συσσωρευμένες βλάβες μπορούν τελικά να οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος, μια διαδικασία πολλαπλών βημάτων που περιλαμβάνει την επαγωγή μεταλλάξεων και τη διαφυγή από την επιτήρηση του ανοσοποιητικού.

Η φωτογήρανση του δέρματος είναι αποτέλεσμα της χρόνιας έκθεσης στο ηλιακό φως. Τα κλινικά συμπτώματα περιλαμβάνουν ξηρότητα (τραχύτητα), ακανόνιστο χρωματισμό (φακίδες, εφηλίδες), ρυτίδες και ελάσση. Τα χαρακτηριστικά αυτά παρατηρούνται εντονότερα σε ανοιχτόχρωμα, λευκά δέρματα με ιστορικό σε χρόνια έκθεση στο ηλιακό φως, και εμφανίζονται στο πρόσωπο, στο λαιμό καθώς και στην εξωτερική επιφάνεια των άνω άκρων. Αν και τα φωτόνια της UVB ακτινοβολίας είναι πιο ενεργητικά από αυτά της UVA ακτινοβολίας και είναι τα κυρίως υπεύθυνα για το ηλιακό έγκαυμα, το μαύρισμα και τη φωτοκαρκινογένεση, η UVA ακτινοβολία επίσης ενοχοποιείται για τη φωτογήρανση. Η UVA ακτινοβολία προκαλεί το σχηματισμό δραστικών ειδών οξυγόνου που εύκολα αντιδρούν με τις μεμβράνες των λιπιδίων και των αμινοξέων. [22]



**Εικ. 3.2** Επιδράσεις στο δέρμα λόγω χρόνιας έκθεσης σε UV ακτινοβολία. [skin aging: γήρανση του δέρματος, photoaging: φωτογήρανση, DNA damage accumulation: συσσώρευση βλαβών του DNA, genetic mutations: γενετικές μεταλλάξεις, immune suppression: ανοσοκαταστολή, skin carcinogenesis: καρκινογένεση] [22]

### 3.5 Ηλιακή ακτινοβολία, ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες.

Η επιφάνεια του δέρματος είναι ευάλωτη και μπορεί υποστεί καταστροφή από τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται από τη UVA και UVB ακτινοβολία, καθώς και από τα δραστικά είδη οξυγόνου που παράγονται από φωτοχημικές αντιδράσεις με ενδογενή φωτοευαισθητοποιητές, όπως φλαβίνες και πορφυρίνες. Οι ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται από τη UVA ακτινοβολία μπορούν να προκαλέσουν τη δημιουργία δεσμών μεταξύ των μακρομορίων και την υποβάθμιση του κολλαγόνου και άλλων πρωτεϊνών των συνδετικών ιστών. Ακόμα, μπορούν να προκαλέσουν την οξείδωση των sulfhydryl ομάδων, προκαλώντας δεσμούς δισουλφιδίων και την οξειδωτική αδρανοποίηση πολλών άλλων ενζύμων, τα οποία ενδέχεται να εμποδίζουν τη διάχυση θρεπτικών. Αυτές οι αντιδράσεις μπορούν να οδηγήσουν σε λειτουργικές διαταραχές των κερατινοκυττάρων, των μελανοκυττάρων, των κυττάρων Langerhans και των ινοβλαστών, ενώ απελευθερώνουν οξυγόνο. Οι επιζήμιες επιδράσεις της UV ακτινοβολίας στο δέρμα, προκαλούνται από φωτοδυναμικές αντιδράσεις, στις οποίες συμμετέχει το οξυγόνο, και στις οποίες η UVA ακτινοβολία με τη παρουσία ενδογενών φωτοευαισθητοποιητών παράγει μονήρη οξυγόνου, ανιόντα υπεροξειδίου και ρίζες υδροξυλίου. Η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία (οξεία και χρόνια) επιπλέον, προκαλεί μείωση των κυτταρικών αντιοξειδωτικών α-τοκοφερόλη, γλουταθειόνη, β-καροτένιο και ασκορβικό οξύ, περιορίζοντας τον ρόλο τους ως δεσμευτές των ελευθέρων ριζών και σταθεροποιώντας τις αλλαγές που προκαλούνται στη φωτογήρανση. Ως εκ τούτου οι βιταμίνες A, C και E καθώς και τα παράγωγα αυτών μπορεί να είναι

αποτελεσματικά στην πρόληψη των βλαβών του δέρματος που προκαλούνται από τα δραστικά είδη οξυγόνου που παράγονται από την υπεριώδη ακτινοβολία. [ 19, 21]

### **3.6 Συνεργική δράση της ηλιακής ακτινοβολίας και του καπνού του τσιγάρου**

Έρευνες έχουν δείξει πως τα λεμφοκύτταρα των καπνιστών παρουσιάζουν μεγαλύτερη καταστροφή του DNA ή μειωμένη ικανότητα διόρθωσης των βλαβών του DNA. Η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία προκαλεί τοξικά φαινόμενα στα κύτταρα, τα οποία συνεργικά ενισχύονται από τον καπνό του τσιγάρου.

Μελέτες δείχνουν πως ο καπνός του τσιγάρου είναι φωτοτοξικός, αφού φαίνεται να αυξάνει σημαντικά την αιμολυσία των ανθρωπίνων ερυθρών αιμοσφαιρίων *in vitro* και η φωτοτοξικότητα ίσως είναι ο μηχανισμός με τον οποίο ο καπνός του τσιγάρου προκαλεί πρόωρη γήρανση του δέρματος και εντείνει την φωτοκαρκινογένεση. Ειδικά, η UVA ακτινοβολία σχετίζεται με την οξειδωτική καταστροφή που συνδέεται με τη φωτογήρανση.

Οι C. Cluang και M. Hu (2006) περιγράφουν πως η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου που ακολουθείται από έκθεση σε UVA ακτινοβολία, συνεργικά αυξάνει το σπάσιμο του κλώνου του DNA και τη λιπιδική υπεροξείδωση των ανθρωπίνων λευκών αιμοσφαιρίων. Ακόμα φαίνεται να αυξάνουν τα ενδοκυτταρικά δραστικά είδη οξυγόνου, υπονοώντας την εμπλοκή τους στην οξειδωτική καταστροφή των λευκών αιμοσφαιρίων. [20, 26]

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ**



## 4.1 Αντιοξειδωτικές ουσίες και αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Αντιοξειδωτική είναι κάθε ουσία, η οποία έχει την ικανότητα, όταν είναι παρούσα σε μικρές συγκεντρώσεις συγκριτικά με ένα οξειδωτικό υπόστρωμα, να καθυστερεί ή να αναστέλλει την οξείδωση του υποστρώματος. Στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν πολλά αντιοξειδωτικά, τα οποία παράγονται από τον ίδιο τον οργανισμό, ενώ άλλα λαμβάνονται εξωγενώς.

Η δράση των αντιοξειδωτικών ενζυμικών και μη ενζυμικών ουσιών διακρίνεται στις παρακάτω κατηγορίες:

- I. Καταλυτική απομάκρυνση ελευθέρων ριζών και δραστικών ειδών οξυγόνου από ενδοκυττάρια περιοχές (ένζυμα υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση, υπεροξειδάσες, κτλ.).
- II. Πρωτεϊνικής φύσης δέσμευση δραστικών μεταλλικών ιόντων (ιδιαίτερα σιδήρου, χαλκού) για τον περιορισμό προ-οξειδωτικών μηχανισμών και παραγωγή ελευθέρων ριζών (π.χ. τρανσφερίνες, απτοαιμοσφαιρίνες, αιμοπηξίνη, μεταλλοθειόνες, σερουλοπλασμίνη ή χαλκοπλασμίνη κτλ.).
- III. Εκκαθάριση ή εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών μέσω αντιοξειδωτικών μηχανισμών, όταν σχηματίζονται στα βιολογικά διαμερίσματα και μείωση των αλυσιδωτών δράσεων οξειδωτικών βλαβών σε βιομόρια.
- IV. Αποσύνθεση υπεροξειδίων και άλλων δραστικών μορίων ώστε να περιορισθούν οι οξειδωτικές δράσεις και μείωση των συγκεντρώσεων οξυγόνου. [23]

## 4.2 Ελεύθερες ρίζες και αντιοξειδωτικά

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο καπνός του τσιγάρου και η υπεριώδης ακτινοβολία αυξάνουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών στα κύτταρα ή αλλιώς το οξειδωτικό στρες σε αυτά. Για την αντιμετώπιση και την αποτροπή παραγωγής ελευθέρων ριζών αναζητούνται συνεχώς από τους επιστήμονες ουσίες ή εκχυλίσματα που παρέχουν προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες.

Η αναζήτηση ουσιών και εκχυλισμάτων από τη φύση και η έρευνα της προστατευτικής τους δράσης είναι αρκετά διαδεδομένες. Ιδιαίτερα σύνηθες είναι να ελέγχονται για τη προστατευτική τους δράση εκχυλίσματα πλούσια σε φαινολικές ενώσεις. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι παρασκευάζονται εκχυλίσματα από φύλλα και κουκούτσια ελιάς που εμφανίζουν έντονη αντιοξειδωτική δράση, ενώ και το εκχύλισμα μούρων του είδους *morus alba* περιέχει σε υψηλή συγκέντρωση φαινολικές ενώσεις. [18]

Στις περιπτώσεις ελέγχου της αντιοξειδωτικής δράσης ουσιών ή εκχυλισμάτων σημαντική είναι η μελετώμενη δόση. Η ίδια ουσία ή εκχύλισμα σε κάποια δόση μπορεί να έχει προστατευτική δράση, ενώ σε κάποια άλλη να μην έχει καθόλου ή να έχει τοξική δράση. Υπάρχουν ουσίες που ανάλογα με τη δόση μπορούν να δρουν ως αντιοξειδωτικά ή ως προ-οξειδωτικά. Για αυτό το λόγο έχει μεγάλη σημασία να αναφέρεται κάθε φορά ότι κάποια ουσία ή εκχύλισμα εμφανίζει την οποιαδήποτε προστατευτική δράση όταν χορηγείται σε συγκεκριμένη δόση.

# **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## Σκοπός Μελέτης

Η επίδραση του καπνού του τσιγάρου στην υγεία αποτελεί ένα αντικείμενο μείζονος ενδιαφέροντος ιδιαίτερα τις τελευταίες δεκαετίες, τόσο λόγω της αύξησης του αριθμού των καπνιστών παγκοσμίως, όσο και λόγω της γνώσης πλέον των βλαβερών επιπτώσεων αυτού στην ανθρώπινη υγεία. Όλο και η επιστημονική κοινότητα ασχολείται με τις επιπτώσεις του καπνού του τσιγάρου στον ανθρώπινο οργανισμό και τη σύνδεση αυτού με παθολογικές καταστάσεις και ασθένειες. Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την εκτίμηση των βλαβερών συνεπειών του σε διάφορα όργανα, με ιδιαίτερη έμφαση στους πνεύμονες, ενώ ελάχιστες μελέτες έχουν γίνει για την επίδραση αυτού στο δέρμα. Ο καπνός τους τσιγάρου φαίνεται να σχετίζεται με πολλές δερματικές παθολογικές καταστάσεις, όπως με την πρόωρη γήρανση του δέρματος, τη μειωμένη επούλωση των πληγών, τον καρκίνο του δέρματος κ.τ.λ.

Σημαντικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια εμφανίζει η συνέργεια του καπνού του τσιγάρου με την υπεριώδη ακτινοβολία. Είναι γνωστές οι βλαβερές συνέπειες της υπεριώδους ακτινοβολίας. Το μελάνωμα αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου. Έρευνες έχουν δείξει πως η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου που ακολουθείται από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία, συνεργικά αυξάνει το σπάσιμο των κλώνων του DNA και τη λιπιδική υπεροξειδωση των ανθρωπίνων λευκών αιμοσφαιρίων. Ακόμα φαίνεται να αυξάνουν τα ενδοκυτταρικά δραστικά είδη οξυγόνου υπονοώντας την εμπλοκή τους στην οξειδωτική καταστροφή των λευκών αιμοσφαιρίων.

Ο καπνός του τσιγάρου σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει είναι φωτοτοξικός, και υπάρχουν ενδείξεις πως η φωτοτοξικότητα ίσως είναι ο μηχανισμός με τον οποίο ο καπνός του τσιγάρου προκαλεί πρόωρη γήρανση του δέρματος και εντείνει τη φωτοκαρκινογένεση. Ειδικά, η UVA ακτινοβολία σχετίζεται με την οξειδωτική καταστροφή που συνδέεται με τη φωτογήρανση. Ωστόσο, λόγω της πολυπλοκότητας του συγκεκριμένου θέματος, αναμένονται ακόμα πολλές μελέτες που θα ξεκαθαρίσουν τους μηχανισμούς που λαμβάνουν δράση κατά την ταυτόχρονη έκθεση σε καπνό τσιγάρου και υπεριώδη ακτινοβολία και την επίδραση αυτής της συνεργικής δράσης στο δέρμα.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να εξεταστεί η επίδραση του καπνού του τσιγάρου, της υπεριώδους ακτινοβολίας UVA και UVB καθώς και της συνέργειας της

υπεριώδους ακτινοβολίας και του καπνού του τσιγάρου σε καλλιέργεια κερατινοκυττάρων. Ακόμα, σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας αποτελεί η μελέτη της προστασίας που πιθανόν να προσφέρουν έναντι της ακτινοβολίας (με UVA και UVB) και του καπνού του τσιγάρου σε καλλιέργεια κερατινοκυττάρων, καινοτόμων αντιφλεγμονώδων ενώσεων με αντιοξειδωτική δράση. Επιπλέον, εξετάστηκε η πιθανή προστατευτική δράση δύο αντιοξειδωτικών εκχυλισμάτων, του εκχυλίσματος μούρων και των απόνερων από ελαιοτριβείο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 5.1 Υλικά

**Κύτταρα:** Χρησιμοποιηθήκαν κερατινοκύτταρα πρώτης γενιάς που απομονώθηκαν από δέρμα νεογέννητων άτριχων μυών τύπου SKH-HR1 και SKH-HR2.

**Θρεπτικό μέσο κερατινοκυττάρων:** Το θρεπτικό μέσο των κερατινοκυττάρων αποτελείται από 50% θρεπτικό μέσο κερατινοκυττάρων με ασβέστιο (Keratinocytes SFM 0.09mM Calcium, Gibco) και 50% θρεπτικό μέσο χωρίς ασβέστιο (Keratinocytes SFM without Calcium, Gibco), έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του ασβεστίου στο μέσο να είναι 0.045mM.

**Καλλιέργειες κερατινοκυττάρων:** Οι καλλιέργειες κερατινοκυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε πλακίδια των 96 πηγαδιών (96 cell well plates, Costar). Χρησιμοποιηθήκαν μαύρα πλακίδια με διάφανους πυθμένες για τις μετρήσεις φθορισμού.

**Καπνός τσιγάρου:** Χρησιμοποιήθηκαν τσιγάρα της ελληνικής καπνοβιομηχανίας ASSOS Παπαστράτος χωρίς φίλτρο, με συγκέντρωση σε πίσσα 10mg και νικοτίνη 0.7mg, τα οποία διατηρούνται στην ψύξη στους 4°C.

### Αντιδραστήρια:

- Φυσιολογικός ορός με αντιβιοτικό Garamycin Gentamicin sulfate (80mg/vial, Schering-Plough)
- Διάλυμα ισοπροπανόλης: απιονισμένου νερού (70:30) για απολύμανση
- Phosphate Buffer Saline – PBS (Sigma): ρυθμιστικό διάλυμα
- Foetal Bovine Serum – FBS (Gibco): παράγοντας αύξησης
- Dispase (Gibco/Invitrogen): ένζυμο για την αποκόλληση των κερατινοκυττάρων από τον ιστό του δέρματος
- Η CM-H<sub>2</sub>DCFDA[5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate,acetyl ester] για τη μέτρηση των ελευθέρων ριζών με τη μέθοδο φθορισμού της φλουορεσκεΐνης.

Από τα παραπάνω, ο φυσιολογικός ορός με το αντιβιοτικό, το PBS και η Dispase διατηρούνται στη ψύξη στους 4°C, ενώ το FBS, τα διαλύματα αντιοξειδωτικών και η φλουορεσκεΐνη στην κατάψυξη στους -20 °C.

#### **Αντιοξειδωτικές ουσίες:**

- Απόνερα ελαιοτριβείου
- Εκχύλισμα μούρων (είδος *morus alba*)
- Ένωση Α: κωδικός δείγματος AK408α, μοριακό βάρος: 392.9, ιδιότητες: αντιοξειδωτικό και αντιφλεγμονώδες,
- Ένωση Β: κωδικός δείγματος AK37α, μοριακό βάρος 404.35, μοριακός τύπος  $C_{12}H_{25}Br_2NO_2$ , ιδιότητες: αντιοξειδωτικό, αντιφλεγμονώδες, αντιυπερλιπιδαιμικό, αντιαθηροσκληρωτικό, SQS αναστολέας.
- Ένωση Γ: κωδικός δείγματος AK89, μοριακό βάρος 453.336, μοριακός τύπος  $C_{20}H_{25}Br_2N_2O_5$ , ιδιότητες: αντιοξειδωτικό, αντιφλεγμονώδες, αντιυπερλιπιδαιμικό, αντιαθηροσκληρωτικό, SQS αναστολέας.

#### **Όργανα:**

- Κλίβανος CO<sub>2</sub> Memmert (Γερμανία) για την επώαση των κυττάρων
- Μικροσκόπιο φθορισμού Zeiss (Ελβετία) για την παρατήρηση των κυττάρων και τη λήψη φωτογραφιών
- Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Canon G5 με ειδικό εξάρτημα σύνδεσης στο μικροσκόπιο
- Φυγόκεντρος Hettich Roto Silenta III (Αυστρία) για τη φυγοκέντρηση των διαλυμάτων
- Fluostar BMG (Γερμανία) για τη μέτρηση της έντασης φθορισμού
- Θάλαμος με προσαρμοσμένη συσκευή καπνίσματος Ismatec SA, model CH8152, type MCF (Glattbrugg-Zurich)



## 5.2 Μέθοδοι

### 5.2.1 Παρασκευή αντιδραστηρίων

#### 5.2.1.1 Παρασκευή φυσιολογικού ορού με αντιβιοτικό

Σε 1000ml φυσιολογικού ορού προστίθενται 175μl αντιβιοτικού Garamycin Gentamicin sulfate για την Παρασκευή διαλύματος συγκέντρωσης 7μg/ml.

#### 5.2.1.2 Παρασκευή διαλύματος Dispase

Σε δοκιμαστικό σωλήνα των 50ml ζυγίζονται 45mg Dispase και προστίθεται φυσιολογικός ορός με αντιβιοτικό μέχρι τα 50ml. Το διάλυμα φιλτράρεται με φίλτρο διήθησης (0.22μm, Millipore) και στη συνέχεια αναδεύεται με τη χρήση vortex σε 2200 rpm για 1 με 2 λεπτά. Έτσι σχηματίζεται διάλυμα Dispase 1U/ml. Από το διάλυμα αυτό, με αραιώσεις 1:5 και 1:10, παρασκευάζουμε διαλύματα Dispase 0.2U/ml και 0.1U/ml αντίστοιχα.

### 5.2.2 Πρωτόκολλο λήψης κερατινοκυττάρων από δέρμα νεογνών άτριχων μυών τύπου SKH-HR1 & SKH-HR2

Επιλέγονται 5 με 7 νεογνά ηλικίας 0 έως 48 ωρών. Κάθε νεογνό τοποθετείται σε ηθμό φιάλης που περιέχει διάλυμα αιθέρα και αφήνεται περίπου για 10 min σε αυτόν, με κλειστό το πώμα της φιάλης, προκειμένου να θανατωθεί. Μόλις διαπιστωθεί ο θάνατος του, το νεογνό απομακρύνεται από τη φιάλη αιθέρα και εμβαπτίζεται στιγμιαία σε πολύ αραιό διάλυμα cetanion προκειμένου να απομακρυνθούν με πολύ ελαφριά τριβή από το δέρμα ακαθαρσίες. Ακολούθως πλένεται με νερό βρύσης για περίπου 1 λεπτό. Η ροή του νερού κατά το πλύσιμο αυτό, καθώς και για όλα τα πλυσίματα που ακολουθούν, πρέπει να είναι σχετικά χαμηλή γιατί το δέρμα των νεογνών είναι πάρα πολύ ευαίσθητο. Στη συνέχεια κόβονται τα άκρα του και η ουρά του και πλένεται πάλι με νερό βρύσης προκειμένου να απομακρυνθεί το αίμα. Εμβαπτίζεται στιγμιαία σε δύο μικρά

τριβλία με διάλυμα ισοπροπανόλης – νερού 70:30, διαδοχικά στο ένα μετά το άλλα, και ακολούθως σε διάλυμα φυσιολογικού ορού – Gentamicin (7μg/ml). Η προαναφερόμενη πορεία επαναλαμβάνεται και το σώμα καταλήγει σε διάλυμα φυσιολογικού ορού – Gentamicin (7μg/ml). Το δέρμα πλέον είναι έτοιμο προς απομάκρυνση από το σώμα του νεογνού.

Το δέρμα αφαιρείται με χειρουργικά εργαλεία και εμβαπτίζεται σε καθαρό διάλυμα φυσιολογικού ορού – Gentamicin (7μg/ml), όπου καθαρίζεται με πολύ προσοχή από λιπώδη ιστό και τυχόν αγγεία που έχουν παραμείνει καθώς τα δέρματα είναι πολύ ευαίσθητα στις τριβές. Εμβαπτίζεται πάλι σε καθαρό διάλυμα φυσιολογικού ορού – Gentamicin (7μg/ml).

Όταν καθαριστούν τα δέρματα όλων των ζώων εμβαπτίζονται σε μικρό τριβλίο το οποίο περιέχει 7ml διαλύματος Dispase 0.2U/ml, όπου και τεμαχίζονται σε όσο το δυνατό μικρότερα κομμάτια με χειρουργικό ψαλίδι. Τα δέρματα παραμένουν σε αυτό το διάλυμα 30 λεπτά χωρίς ανάδευση. Το διάλυμα Dispase απορρίπτεται περνώντας μέσα από πολύ λεπτό μεταλλικό ηθμό. Τα δέρματα επανέρχονται στο τριβλίο με διαδοχικά χτυπήματα του ηθμού στο τριβλίο, και όχι με τη χρήση λαβίδας για να μην καταστραφούν τα κύτταρα, και προστίθενται ξανά 7ml Dispase 0.2U/ml. Το τριβλίο με τους ιστούς και το διάλυμα Dispase αναδεύεται στις 250rpm σε vortex για 30 λεπτά. Και αυτό το διάλυμα Dispase απορρίπτεται με τον ίδιο τρόπο. Στο τριβλίο προστίθενται 7ml νέου διαλύματος Dispase 0.2U/ml. Το περιεχόμενο του τριβλίου αναδεύεται στις 250rpm σε vortex για 30 λεπτά. Και αυτό το διάλυμα Dispase απορρίπτεται με τον ίδιο τρόπο.

Στο τριβλίο προστίθενται 5ml νέου διαλύματος Dispase 0.1U/ml. Το περιεχόμενο του τριβλίου αναδεύεται στις 250rpm σε vortex για 2 λεπτά. Αυτή τη φορά το διάλυμα Dispase μεταγγίζεται με τον ίδιο τρόπο (με τη βοήθεια δηλαδή του μεταλλικού ηθμού) σε ένα σωλήνα φυγοκέντρησης των 50ml στον οποίο προηγουμένως έχουν προστεθεί 15ml φυσιολογικού ορού-Gentamicin (7μg/ml) και 700μl FBS. Οι ιστοί επιστρέφονται στο τριβλίο και προστίθενται σ' αυτούς 5ml νέου διαλύματος Dispase 0.1U/ml. Το περιεχόμενο του τριβλίου αναδεύεται στις 250rpm σε vortex για 2 λεπτά και μεταγγίζεται στον πλαστικό σωλήνα της φυγοκέντρησης. Τα δύο παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται μέχρι ο συνολικός όγκος του διαλύματος στο σωλήνα φυγοκέντρησης να γίνει 35ml. Η ίδια

διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου και το περιεχόμενο ενός δεύτερου σωλήνα φυγοκέντρησης φτάσει τα 35ml.

Οι δύο σωλήνες τοποθετούνται στη φυγόκεντρο στις 1000rpm για 8 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται με τη βοήθεια κενού. Στους σωλήνες προστίθενται διάλυμα φυσιολογικού ορού-Gentamicin (7μg/ml) μέχρι ο όγκος του διαλύματος στους σωλήνες να φτάσει τα 7.5ml. Οι σωλήνες φυγοκεντρούνται στις 1000rpm για 2 με 3 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρείται με τη βοήθεια κενού.

Μετά από τις δύο αυτές φυγοκεντρήσεις, τα ζωντανά κερατινοκύτταρα, τα οποία θέλουμε να συλλέξουμε, έχουν κατακαθίσει σαν ίζημα στον πυθμένα του κάθε σωλήνα. Προσθέτουμε σε αυτά μικρή ποσότητα θρεπτικού μέσου κερατινοκυττάρων (το οποίο βρίσκεται στον κλίβανο) και συλλέγουμε τα κύτταρα σε ένα σωλήνα των 50ml.

Η διαδικασία γίνεται ανά δύο σωλήνες φυγοκέντρησης καθώς το μέσο είναι ευαίσθητο και δεν πρέπει να παραμείνει εκτός κλιβάνου για μεγάλο χρονικό διάστημα. Συνολικά χρησιμοποιούνται 8 σωλήνες φυγοκέντρησης και πραγματοποιούνται 8 φυγοκεντρήσεις. Τελικά προκύπτει ένας σωλήνας φυγοκέντρησης όπου έχουμε συλλέξει όλα τα κερατινοκύτταρα μέσα σε μικρή ποσότητα θρεπτικού μέσου κερατινοκυττάρων.

### 5.2.3 Πρωτόκολλο τοποθέτησης κερατινοκυττάρων σε πλακίδια

Όπως αναφέρθηκε στην §5.2.2, τα κύτταρα, που λαμβάνονται από τις φυγοκεντρήσεις σύμφωνα με το πρωτόκολλο λήψης κερατινοκυττάρων από δέρμα νεογνών άτριχων μυών τύπου SKH-HR1 & SKH-HR2, συλλέγονται σε σωλήνα των 50ml με θρεπτικό μέσο. Το διάλυμα αυτό κυττάρων-μέσου διηθείται μέσω του μεταλλικού ηθμού και συλλέγεται σε αποστειρωμένο σωλήνα. Στη συνέχεια ανακινείται με το χέρι καλά αλλά με απαλές κινήσεις και ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο με τη χρήση πλάκας Neubauer Improved Poly-Optic GmbH (Γερμανία). Ο αριθμός των κυττάρων που τοποθετείται σε κάθε πηγαδάκι είναι 40600. Επομένως στο διάλυμα κυττάρων-μέσου θα πρέπει να γίνουν οι κατάλληλοι χειρισμοί ώστε τελικά να μπαίνουν σε κάθε πηγαδάκι μέχρι 300μl διαλύματος κυττάρων-μέσου που θα περιέχουν 40600 κύτταρα.

Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται κατά την τοποθέτηση του διαλύματος κυττάρων-μέσου στο κάθε πηγαδάκι για να μην υποστούν σοκ τα κύτταρα ή συγκεντρωθούν στην περιφέρειά του. Έτσι το άκρο του tip της πιπέτας κόβεται για να μεγαλώσει η διατομή του και να πέφτει πιο εύκολα το διάλυμα. Επίσης το διάλυμα πρέπει να εγχέεται με πολύ απαλές και ελεγχόμενες και όχι με απότομες κινήσεις. Συμπληρώνεται τέλος και η ανάλογη ποσότητα μέσου ώστε τελικά σε κάθε πηγαδάκι να υπάρχουν 300μl μέσου και 40600 κύτταρα. Τα κύτταρα επωάζονται στον κλίβανο στους 37°C σε συγκέντρωση 5% CO<sub>2</sub>.

Για τη μέτρηση φθορισμού χρησιμοποιούνται μαύρα πλακίδια με διάφανους πυθμένες στα πηγαδάκια. Προτιμάται ο διάφανος πυθμένας έναντι του μαύρου για την ευκολότερη και σαφέστερη μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων.

#### 5.2.4 Πρωτόκολλο καπνίσματος θρεπτικού μέσου κερατινοκυττάρων

Σε 2 τριβλία Petri επιφάνειας 12.5 cm<sup>2</sup> τοποθετούνται 5ml θρεπτικό μέσο κερατινοκυττάρων, το οποίο έχει παρασκευαστεί από 50% θρεπτικό μέσο κερατινοκυττάρων με ασβέστιο και 50% θρεπτικό μέσο κερατινοκυττάρων χωρίς ασβέστιο (Gibco). Έπειτα από τη μικροσκοπική παρατήρηση του θρεπτικού μέσου και τη διαπίστωση της καθαρότητας αυτού (απουσία μικροβίων), τα τριβλία μεταφέρονται σε ειδικό θάλαμο, ο οποίος έχει προηγουμένως απολυμανθεί με διάλυμα ισοπροπανόλης: απιονισμένου νερού 70: 30.

Εντός του θαλάμου έχει προσαρμοστεί ειδική συσκευή καπνίσματος (Ismatec SA, model CH8152, type MCF, Glattbrugg-Zurich), η οποία είναι ρυθμισμένη σε όγκο puff 35ml, διάρκεια puff 2sec και συχνότητα puff 1 ανά λεπτό. Καπνίζονται 8 τσιγάρα και μετά το κάπνισμα αυτών τα τριβλία παραμένουν στο θάλαμο για ακόμη 45 λεπτά.

Και στα 2 τριβλία παρατηρείται αλλαγή του χαρακτηριστικού για το pH χρώματος του θρεπτικού μέσου λόγω της διάλυσης σε αυτό των συστατικών του καπνού του τσιγάρου, η οποία αναστέλλεται μετά από λίγες ώρες.

#### 5.2.5 Πρωτόκολλο μέτρησης φθορισμού και λήψης εικόνων φθορισμού

Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται η CM-H<sub>2</sub>DCFDA[5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester]. Η (CM-

H<sub>2</sub>DCFDA) είναι μη φθορίζον χλωρομεθυλοπαράγωγο της φλουορεσκεΐνης και έτσι είναι πιο αποδοτικό στη μέτρηση ελευθέρων ριζών. Η φλουορεσκεΐνη είναι υδατοδιαλυτή συνθετική οργανική ένωση που χρησιμοποιείται ως φθορίζουσα χρωστική με πολύ μεγάλη απόδοση. Σε αλκαλικά διαλύματα αποκτά έντονο πράσινο χρώμα και δύναται να φθορίζει (εκπέμπει φως) σε μεγαλύτερο μήκος κύματος από αυτό που απορροφά (σε μπλε φως). Όταν η CM-H<sub>2</sub>DCFDA εισέλθει στο κύτταρο, όπου οι εστερομάδες της λύνονται από ενδοκυττάρειες εστέρες δίνοντας το αντίστοιχο παράγωγο, αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες δίνοντας το αντίστοιχο φθορίζον μόριο.

Για την παρασκευή διαλύματος φλουορεσκεΐνης 2μM προστίθενται σε κάθε φιαλίδιο, το οποίο περιέχει 50μg φλουορεσκεΐνης σε μορφή σκόνης, 150μl αιθανόλης (Ethos) κι αυτό αναδεύεται πολύ καλά. Σε κάθε πηγαδάκι προστίθενται 3μl διαλύματος φλουορεσκεΐνης. Ακολουθεί επώαση για 30 λεπτά στο κλίβανο και μέτρηση στο Fluostar, στους 37°C (φίλτρο διέγερσης: 485nm και φίλτρο εκπομπής: 520nm). Πριν την τοποθέτηση του πλακιδίου στο μηχάνημα δεν πραγματοποιούνται ξεπλύματα με ορό καθώς υπάρχει κίνδυνος απομάκρυνσης μεγάλου αριθμού κυττάρων. Οι τιμές που λαμβάνονται από το Fluostar είναι ενδεικτικές του σήματος φθορισμού και το σήμα φθορισμού είναι ανάλογο του ποσού ελευθέρων ριζών που υπάρχει σε κάθε πηγαδάκι. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως όσο μεγαλύτερες είναι οι τιμές που δίνει το μηχάνημα τόσο εντονότερο το οξειδωτικό στρες που έχουν υποστεί τα κύτταρα άρα και η ύπαρξη ελευθέρων ριζών.

Επιπρόσθετα, γίνεται αξιολόγηση της έντασης φθορισμού που δίνει το κάθε πηγαδάκι στο μικροσκόπιο. Το συγκεκριμένο μικροσκόπιο διαθέτει ενσωματωμένη λάμπα φθορισμού με ειδικό φίλτρο φθορισμού για τη φλουορεσκεΐνη. Για να λειτουργήσει πρέπει να πατηθεί η ένδειξη ON της συσκευής που βρίσκεται δίπλα από το μικροσκόπιο, ενώ παράλληλα ρυθμίζεται το μικροσκόπιο ώστε να έρχεται στον προσοφθάλμιο φακό η αντίστοιχη φθορίζουσα εικόνα. Έπειτα, προσαρμόζεται η φωτογραφική μηχανή, η οποία τοποθετείται με ειδικό προσαρμογές στην κάτω μπροστινή πλευρά του μικροσκοπίου (από την οποία πρέπει να αφαιρεθεί το ειδικό κούμπωμα). Πατώντας ένα κουμπί στη δεξιά πλευρά του μικροσκοπίου μεταφέρεται η εικόνα από τους προσοφθάλμιους φακούς στη φωτογραφική μηχανή. Στις φωτογραφίες

αυτές, η ένταση φθορισμού που γίνεται διακριτή με πράσινο χρώμα, είναι ανάλογη του ποσού των ελευθέρων ριζών.

Για να πραγματοποιηθεί η λήψη φωτογραφιών πραγματοποιούνται δύο εκπλεύσεις με 150ml διαλύματος φυσιολογικού ορού-Gentamicin (7μg/ml) σε όλα τα πηγαδάκια, προκειμένου να απομακρυνθεί η φλουορεσκεΐνη και να ξεκαθαρίσει η εικόνα των φθορίζουσών κυττάρων. Η έκλυση πραγματοποιείται ως εξής: το πλακίδιο αναποδογυρίζεται σε διηθητικό χαρτί και τινάζεται πολύ ελαφρά ώστε να απομακρυνθεί το υπάρχον θρεπτικό μέσο, προστίθενται 150ml φυσιολογικού ορού με αντιβιοτικό σε κάθε πηγαδάκι και αφήνονται για 1 λεπτό, το πλακίδιο αναποδογυρίζεται ξανά, τινάζεται και προστίθενται ακόμα 150ml φυσιολογικού ορού με αντιβιοτικό σε κάθε πηγαδάκι. Το διάλυμα απομακρύνεται με τον ίδιο τρόπο και τέλος προστίθενται 150ml φυσιολογικού ορού με αντιβιοτικό και λαμβάνονται οι εικόνες φθορισμού.

## 5.3 Πειραματική Διαδικασία

### 5.3.1 Δοκιμαστικοί έλεγχοι

#### 5.3.1.1 Φάση I: Εκτίμηση της χρησιμοποιούμενης δόσης εκχυλίσματος μούρων

Στην πρώτη φάση πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικά πειράματα για τον καθορισμό της δόσης εκχυλίσματος μούρων που θα χρησιμοποιηθεί στους τελικούς μας ελέγχους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 1μl/ml, 10μl/ml και 50μl/ml. Σε τέσσερα (4) μικρά τριβλία τοποθετήθηκαν περίπου 150000 κερατινοκύτταρα και 2,5ml θρεπτικού μέσου. Τα τριβλία τοποθετήθηκαν στον κλίβανο και παρέμειναν για επώαση στους 37°C, σε 5% συγκέντρωση CO<sub>2</sub>. Σε 24 ώρες πραγματοποιήθηκε αλλαγή θρεπτικού μέσου. Το ένα (1) τριβλίο χρησιμοποιήθηκε ως control. Στα υπόλοιπα τρία (3) έγινε προσθήκη 2,5μl, 25μl και 125μl εκχυλίσματος μούρων ούτως ώστε η τελική συγκέντρωση του εκχυλίσματος στο κάθε τριβλίο να συμπίπτει με τις τιμές που αναφέρονται παραπάνω. Ο έλεγχος έγινε με μικροσκοπική παρατήρηση των κερατινοκυττάρων για πέντε ημέρες, διάστημα ικανό

για να βγουν τα απαραίτητα συμπεράσματα για τη χρήση της ουσίας αυτής στους τελικούς ελέγχους.

### 5.3.1.2 Φάση II: Εκτίμηση της χρησιμοποιούμενης δόσης απόνερων ελαιοτριβείου

Στη δεύτερη φάση πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικά πειράματα για τον καθορισμό της δόσης απόνερων ελαιοτριβείου που θα χρησιμοποιηθεί στους τελικούς μας ελέγχους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0.5μl/ml, 2μl/ml, 10μl/ml και 50μl/ml. Σε μαύρο πλακίδιο από το οποίο χρησιμοποιήθηκαν πέντε (5) στήλες με πέντε (5) πηγαδάκια η καθεμιά, τοποθετήθηκαν περίπου 40600 κερατινοκύτταρα και 250μl θρεπτικού μέσου σε κάθε πηγαδάκι. Το πλακίδιο τοποθετήθηκε στον κλίβανο και παρέμεινε για επώαση στους 37°C, σε 5% συγκέντρωση CO<sub>2</sub>. Σε 24 ώρες πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού μέσου. Η πρώτη στήλη χρησιμοποιήθηκε ως control. Στις τέσσερις (4) επόμενες στήλες έγινε προσθήκη 0,125μl, 0,5μl, 2,5μl και 12,5μl απόνερων ελαιοτριβείου ούτως ώστε η τελική συγκέντρωση της ουσίας σε κάθε στήλη να συμπίπτει με τις τιμές που αναφέρονται παραπάνω. Σε 24 ώρες πραγματοποιήθηκε δεύτερη αλλαγή του θρεπτικού μέσου και προσθήκη των ίδιων συγκεντρώσεων της ουσίας. Ο έλεγχος έγινε με μικροσκοπική παρατήρηση των κερατινοκυττάρων για τρεις ημέρες, διάστημα ικανό για να βγουν τα απαραίτητα συμπεράσματα για τη χρήση της ουσίας αυτής στους τελικούς ελέγχους.

## 5.3.2 Τελικοί έλεγχοι

5.3.2.1 Πείραμα I: Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης αντιφλεγμονώδων ουσιών έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται σε κερατινοκύτταρα μετά την επώαση αυτών για 2h με 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο, μετά την επώαση αυτών για 2h αφού ακτινοβοληθούν με υπεριώδη ακτινοβολία UVA και UVB, μετά την επώαση αυτών για 2h με 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο και

### **ταυτόχρονη ακτινοβολήση με υπεριώδη ακτινοβολία UVA και UVB – Μέτρηση φθορισμού για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες**

Σε μαύρο πλακίδιο χρησιμοποιούνται έξι (6) στήλες (στήλες 1 έως 6) με επτά (7) πηγαδάκια η καθεμία και έξι (6) στήλες (στήλες 7 έως 12) με έξι (6) πηγαδάκια η καθεμία. Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνται κατά προσέγγιση 40600 κερατινοκύτταρα και θρεπτικό μέσο συνολικού όγκου 290μl. Το πλακίδιο τοποθετείται στον κλίβανο για επώαση στους 37°C, σε 5% συγκέντρωση CO<sub>2</sub>. Μετά από 24h, πραγματοποιούνται δύο (2) ξεπλύματα με 200μl φυσιολογικού ορού με αντιβιοτικό. Τα ξεπλύματα γίνονται ως εξής: με την κατάλληλη πιπέτα αφαιρείται από το πηγαδάκι η ποσότητα του θρεπτικού μέσου που περιέχει. Το άκρο του tip της πιπέτας δεν πρέπει να έρθει σε επαφή με τον πυθμένα γιατί υπάρχει κίνδυνος απομάκρυνσης κερατινοκυττάρων μαζί με το θρεπτικό μέσο. Στη συνέχεια πάλι με τη χρήση της κατάλληλης πιπέτας εγχέεται το διάλυμα του φυσιολογικού ορού στο πηγαδάκι. Το άκρο του tip της πιπέτας κόβεται για να μεγαλώσει η διατομή του και να πέφτει πιο εύκολα το διάλυμα χωρίς να υπάρχει κίνδυνος να σοκαριστούν τα κερατινοκύτταρα. Ο φυσιολογικός ορός αφήνεται για 2 με 3 λεπτά και απομακρύνεται με τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω. Προστίθενται νέο διάλυμα φυσιολογικού ορού με την ίδια τεχνική και τέλος αφού απομακρυνθεί προστίθενται 250μl θρεπτικού μέσου. Το πλακίδιο επιστρέφει στον κλίβανο όπου παραμένει για άλλες 24h. Μετά τις 48h επώασης τα δείγματα κερατινοκυττάρων που τελικώς λαμβάνουμε για έλεγχο θα επεξεργαστούν ως εξής (με έξι πηγαδάκια σε κάθε κατηγορία):

- 1) Ένωση AK408a και υπεριώδης ακτινοβολία
- 2) Ένωση AK37a και υπεριώδης ακτινοβολία
- 3) Ένωση AK89 και υπεριώδης ακτινοβολία
- 4) Υπεριώδης ακτινοβολία
- 5) Ένωσης AK408a, καπνισμένο μέσο 1:5 και υπεριώδης ακτινοβολία
- 6) Ένωσης AK437a, καπνισμένο μέσο 1:5 και υπεριώδης ακτινοβολία
- 7) Ένωσης AK89, καπνισμένο μέσο 1:5 και υπεριώδης ακτινοβολία
- 8) Καπνισμένο μέσο 1:5 και υπεριώδης ακτινοβολία



- 9) Ένωση AK408a και καπνισμένο μέσο 1:5
- 10) Ένωση AK37a και καπνισμένο μέσο 1:5
- 11) Ένωση AK89 και καπνισμένο μέσο 1:5
- 12) Καπνισμένο μέσο 1:5
- 13) Μάρτυρες.

Τα δείγματα που αποτελούν τους μάρτυρες δεν υπόκειται σε άλλη επεξεργασία. Για τις κατηγορίες από την 5 έως και την δωδέκατη, αφού τα πηγαδάκια ξεπλυθούν μία φορά με 200μl φυσιολογικού ορού με αντιβιοτικό σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω, προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι 250μl 1:5 καπνισμένου μέσου. Στη συνέχεια, στις κατηγορίες 1 έως 3, 5 έως 7 και 9 έως 11 προστίθενται η κατάλληλη ποσότητα της αντιφλεγμονώδης ουσίας ούτως ώστε η τελική συγκέντρωση αυτής στο κάθε πηγαδάκι να είναι 1μg/ml. Τέλος οι κατηγορίες 1 έως 8 ακτινοβολούνται για 3 δευτερόλεπτα σε UVA και UVB υπεριώδη ακτινοβολία. Το πλακίδιο επιστέφει στον κλίβανο και μετά από επώαση 2h εφαρμόζεται το πρωτόκολλο της μέτρησης φθορισμού με φλουορεσκεΐνη (§5.2.5).

#### 5.3.2.2 Πείραμα II: Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλίσματος μούρων και απόνερων ελαιοτριβείου σε κερατινοκύτταρα μετά την επώαση αυτών για 2h με 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο, μετά την επώαση αυτών για 2h αφού ακτινοβοληθούν με υπεριώδη ακτινοβολία UVA και UVB, μετά την επώαση αυτών για 2h με 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο και ταυτόχρονη ακτινοβολήση με υπεριώδη ακτινοβολία UVA και UVB – Μέτρηση φθορισμού για την εκτίμηση του αντιοξειδωτικού στρες

Σε μαύρο πλακίδιο χρησιμοποιούνται δέκα (10) στήλες (στήλες 1 έως 10) με έξι (6) πηγαδάκια η καθεμία. Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετούνται κατά προσέγγιση 40600 κερατινοκύτταρα και θρεπτικό μέσο συνολικού όγκου 290μl. Τα δείγματα κερατινοκυττάρων θα επεξεργαστούν ως εξής (με έξι πηγαδάκια σε κάθε κατηγορία):

- 1) Εκχύλισμα μούρων και υπεριώδης ακτινοβολία
- 2) Εκχύλισμα μούρων, καπνισμένο μέσο 1:5 και υπεριώδης ακτινοβολία
- 3) Απόνερα ελαιοτριβείου και υπεριώδης ακτινοβολία

- 4) Απόνερα ελαιοτριβείου, καπνισμένο μέσο 1:5 και υπεριώδης ακτινοβολία
- 5) Υπεριώδης ακτινοβολία
- 6) Καπνισμένο μέσο 1:5 και υπεριώδης ακτινοβολία
- 7) Μάρτυρες
- 8) Καπνισμένο μέσο 1:5 και εκχύλισμα μούρων
- 9) Καπνισμένο μέσο 1:5 και απόνερα ελαιοτριβείου
- 10) Καπνισμένο μέσο 1:5

Στις κατηγορίες 1, 2 και 8 προστίθενται 0,25μl εκχυλίσματος μούρων και στις κατηγορίες 3, 4 και 9 προστίθενται 0,125μl απόνερων ελαιοτριβείου. Το πλακίδιο τοποθετείται στο κλίβανο για επώαση στους 37°C, σε 5% συγκέντρωση CO<sub>2</sub>. Μετά από 24h, πραγματοποιούνται δύο (2) ξεπλύματα με 200μl φυσιολογικού ορού με αντιβιοτικό. Τα ξεπλύματα πραγματοποιούνται όπως περιγράφεται στην παράγραφο §5.3.2.1. Σε κάθε πηγαδάκι προστίθενται 250μl θρεπτικού μέσου και προσθήκη των ίδιων ποσοτήτων των αντιοξειδωτικών ουσιών όπως αναφέρονται παραπάνω. Τα πλακίδια επιστρέφει στον κλίβανο. Λόγω της επιθυμητής πληρότητας των κερατινοκυττάρων στα πηγαδάκια (περίπου της τάξης του 80%) λαμβάνεται η απόφαση η επεξεργασία με καπνισμένο μέσο και υπεριώδη ακτινοβολία να πραγματοποιηθεί στις 28h επώασης. Τα δείγματα που αποτελούν τους μάρτυρες δεν υπόκειται σε άλλη επεξεργασία. Για τις κατηγορίες 2, 4, 6, 8, 9 και 10, αφού τα πηγαδάκια ξεπλυθούν μία φορά με 200μl φυσιολογικού ορού με αντιβιοτικό σύμφωνα με την προαναφερθείσα διαδικασία, προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι 250μl 1:5 καπνισμένου μέσου. Στη συνέχεια, προστίθενται η ίδια ποσότητα αντιοξειδωτικών ουσιών. Τέλος οι κατηγορίες 1 έως 6 ακτινοβολούνται για 3 δευτερόλεπτα σε UVA και UVB υπεριώδη ακτινοβολία. Το πλακίδιο επιστρέφει στον κλίβανο και μετά από επώαση 2h εφαρμόζεται το πρωτόκολλο της μέτρησης φθορισμού με φλουορεσκεΐνη (§5.2.5).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## 6.1 Δοκιμαστικοί Έλεγχοι

### Φάση I: Εκτίμηση της χρησιμοποιούμενης δόσης εκχυλίσματος μούρων

Για τον καθορισμό της δόσης του εκχυλίσματος μούρων που θα χρησιμοποιηθεί στους τελικούς ελέγχους, πραγματοποιήθηκε το πείραμα που περιγράφεται στη παράγραφο §5.3.1.1. Τα κερατινοκύτταρα παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά για πέντε (5) ημέρες. Από την δεύτερη ημέρα ο αριθμός των κερατινοκυττάρων σε κάθε τριβλίο φάνηκε να ευνοείται από την παρουσία του εκχυλίσματος μούρων. Τα κερατινοκύτταρα είχαν πολλαπλασιαστεί και αρκετές αποικίες είχαν δημιουργηθεί. Η εικόνα ήταν καλύτερη στις 2 χαμηλότερες συγκεντρώσεις της ουσίας, 1μl/ml και 10μl/ml. Στους τελικούς έλεγχοι λοιπόν αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί η μικρότερη συγκέντρωση (1μl/ml). Αντί όμως του ίδιου εκχυλίσματος μούρων που χρησιμοποιήθηκε στη Φάση I, προτιμήθηκε η παρασκευή φρέσκου εκχυλίσματος που προέκυψε από πολτοποίηση μούρων και διήθηση του πολτού.

### Φάση II: Εκτίμηση της χρησιμοποιούμενης δόσης απόνερων ελαιοτριβείου

Για τον καθορισμό της δόσης του εκχυλίσματος απόνερων ελαιοτριβείου που θα χρησιμοποιηθεί στους τελικούς ελέγχους, πραγματοποιήθηκε το πείραμα που περιγράφεται στην παράγραφο §5.3.1.2. Τα κερατινοκύτταρα παρατηρήθηκαν μικροσκοπικά για τρεις ημέρες. Οι δόσεις 2μl/ml, 10μl/ml και 50μl/ml φάνηκαν από την δεύτερη ημέρα επώασης να εμφανίζουν τοξική φράση έναντι των κερατινοκυττάρων. Η πλειοψηφία των κερατινοκυττάρων θανατώθηκε και ελάχιστα παρέμειναν ζωντανά στις συγκεντρώσεις 10 και 50μl/ml. Η εικόνα ήταν σαφώς καλύτερη στη συγκέντρωση 10μl/ml αφού τα κύτταρα που βρίσκονταν σε απόπτωση ήταν περίπου τα μισά. Στη συγκέντρωση 2μl/ml φαίνονται να ευνοούνται οι μιτώσεις και η εικόνα των κερατινοκυττάρων είναι καλύτερη από τους μάρτυρες. Πιο συγκεκριμένα, σε κάποια πηγαδάκια εμφανίστηκε πληρότητα μεγαλύτερη του 100%, παρατηρήθηκε δηλαδή μέσα στα πηγαδάκια και δεύτερη στρώση κερατινοκυττάρων πάνω από την πρώτη. Στους τελικούς ελέγχους λοιπόν αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί η μικρότερη συγκέντρωση (0.5μl/ml).

## 6.2 Τελικοί Έλεγχοι

### 6.2.1 Πειραματική διαδικασία

i) Πείραμα I: Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης αντιφλεγμονώδων ουσιών έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται σε κερατινοκύτταρα μετά την επώαση αυτών για 2h με 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο, μετά την επώαση αυτών για 2h αφού ακτινοβοληθούν με υπεριώδη ακτινοβολία UVA και UVB, μετά την επώαση αυτών για 2h με 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο και ταυτόχρονη ακτινοβολία με υπεριώδη ακτινοβολία UVA και UVB – Μέτρηση φθορισμού για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες.

Η πειραματική διαδικασία, η οποία περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο §5.3.2.1, σχεδιάστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να διαπιστωθεί η επίδραση του 1:5 καπνισμένου : μη καπνισμένου μέσου, της υπεριώδους ακτινοβολίας UVA και UVB , καθώς και της ταυτόχρονης επίδρασης 1:5 καπνισμένου : μη καπνισμένου μέσου και υπεριώδους ακτινοβολίας στα κερατινοκύτταρα μετά από επώαση 2h. Παράλληλη μελετήθηκε η δράση αντιφλεγμονώδων ουσιών με αντιοξειδωτική δράση έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τον καπνό του τσιγάρου και την υπεριώδη ακτινοβολία. Πραγματοποιείται μέτρηση φθορισμού με φλουορεσκεΐνη σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο §5.2.5.

ii) Πείραμα II: Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλίσματος μούρων και απόνερων ελαιοτριβείου σε κερατινοκύτταρα μετά την επώαση αυτών για 2h με 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο, μετά την επώαση αυτών για 2h αφού ακτινοβοληθούν με υπεριώδη ακτινοβολία UVA και UVB, μετά την επώαση αυτών για 2h με 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο και ταυτόχρονη ακτινοβολία με υπεριώδη ακτινοβολία UVA και UVB – Μέτρηση φθορισμού για την εκτίμηση του αντιοξειδωτικού στρες

Η πειραματική διαδικασία, η οποία περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο §5.3.2.2, σχεδιάστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να διαπιστωθεί η αντιοξειδωτική

δράση εκχυλίσματος μούρων και απόνερων ελαιοτριβείου σε κερατινοκύτταρα μετά την επώαση για 2h σε 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένου μέσο, σε υπεριώδη ακτινοβολία UVA και UVB , καθώς και σε ταυτόχρονη έκθεση σε 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσου και υπεριώδη ακτινοβολία. Πραγματοποιείται μέτρηση φθορισμού με φλουορεσκεΐνη σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο §5.2.5.

## 6.2.2 Αποτελέσματα

### i) Πείραμα I

Οι ληφθείσες τιμές από τη μέτρηση φθορισμού παρατίθενται στους πίνακες 6.1, 6.2, 6.3, και 6.4 μαζί με το μέσο όρο των τιμών για την κάθε κατηγορία και την τυπική απόκλιση.

	Control	UV	1:5 καπνισμένο μέσο	1:5 καπνισμένο μέσο + UV
1	385	541	447	869
2	449	390	432	609
3	178	379	482	579
4	220	1159	301	368
5	185	1096	285	342
6	249	862	339	350
M.O	<b>277</b>	<b>737</b>	<b>381</b>	<b>519</b>
STD	<b>112</b>	<b>349</b>	<b>83</b>	<b>208</b>

**Πιν.6.1** Ένταση σήματος φθορισμού για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες σε κερατινοκύτταρα κατόπιν έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία και σε 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο.

	Ένωση AK408α + UV	Ένωση AK408α + 1:5 καπνισμένο μέσο	Ένωση AK408α + 1:5 καπνισμένο μέσο + UV

1	998	498	533
2	983	462	495
3	896	391	510
4	868	330	525
5	593	259	552
6	454	338	498
M.O	<b>798</b>	<b>379</b>	<b>518</b>
STD	<b>223</b>	<b>89</b>	<b>21</b>

**Πιν.6.2** Ένταση σήματος φθορισμού για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες σε κερατινοκύτταρα παρουσία της αντιφλεγμονώδους ένωσης με κωδικό AK408α

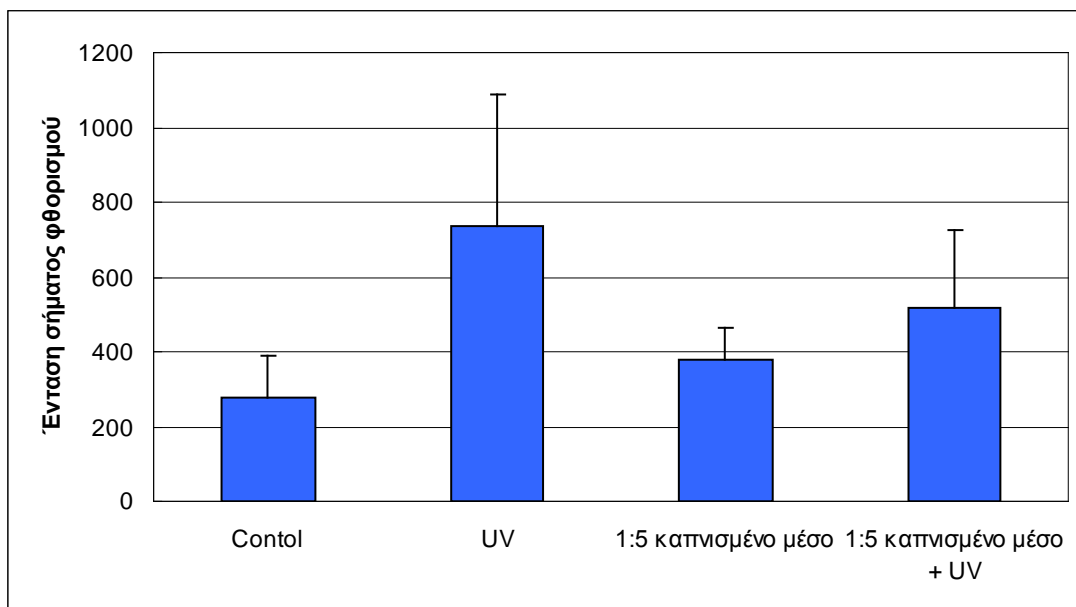
	Ένωση AK37α + UV	Ένωση AK37α + 1:5 καπνισμένο μέσο	Ένωση AK37α + 1:5 καπνισμένο μέσο + UV
1	681	442	644
2	1231	544	598
3	1352	454	544
4	1060	367	532
5	663	351	374
6	708	443	578
M.O	<b>949</b>	<b>433</b>	<b>545</b>
STD	<b>305</b>	<b>69</b>	<b>92</b>

**Πιν.6.3** Ένταση σήματος φθορισμού για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες σε κερατινοκύτταρα παρουσία της αντιφλεγμονώδους ένωσης AK37α

	Ένωση AK89 + UV	Ένωση AK89 + 1:5 καπνισμένο μέσο	Ένωση AK89 + 1:5 καπνισμένο μέσο + UV
1	477	601	470
2	532	409	417
3	987	369	381
4	803	247	372
5	890	214	295
6	592	266	342
M.O	<b>713</b>	<b>351</b>	<b>379</b>
STD	<b>305</b>	<b>143</b>	<b>60</b>

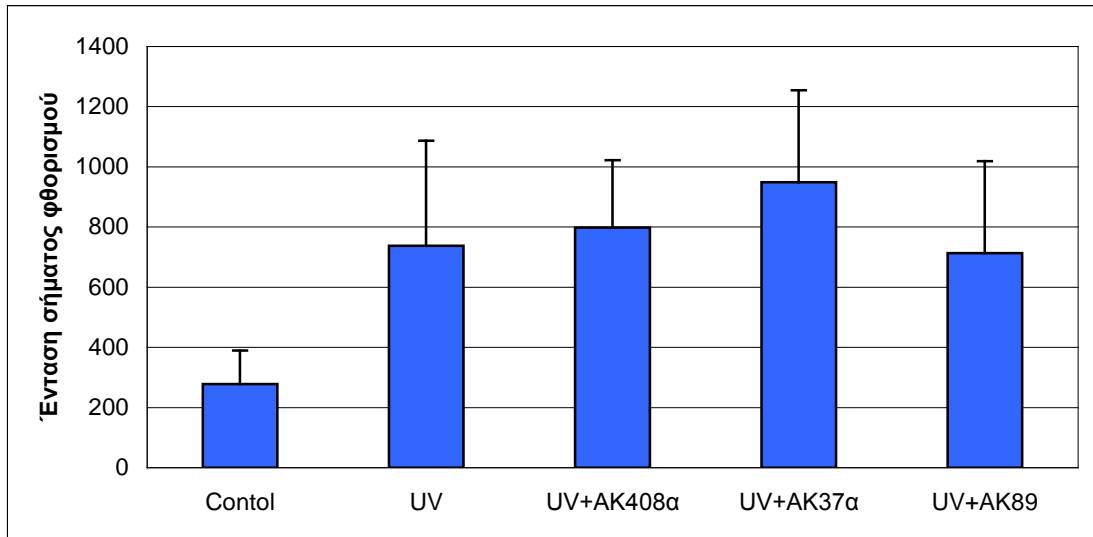
**Πιν.6.4** Ένταση σήματος φθορισμού για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες σε κερατινοκύτταρα παρουσία της αντιφλεγμονώδους ένωσης με κωδικό AK89

Από τις τιμές των πινάκων 6.1, 6.2, 6.3 και 6.4 προκύπτουν τα ακόλουθα διαγράμματα (Διάγραμμα 6.1, 6.2, 6.3, 6.4 και 6.5).

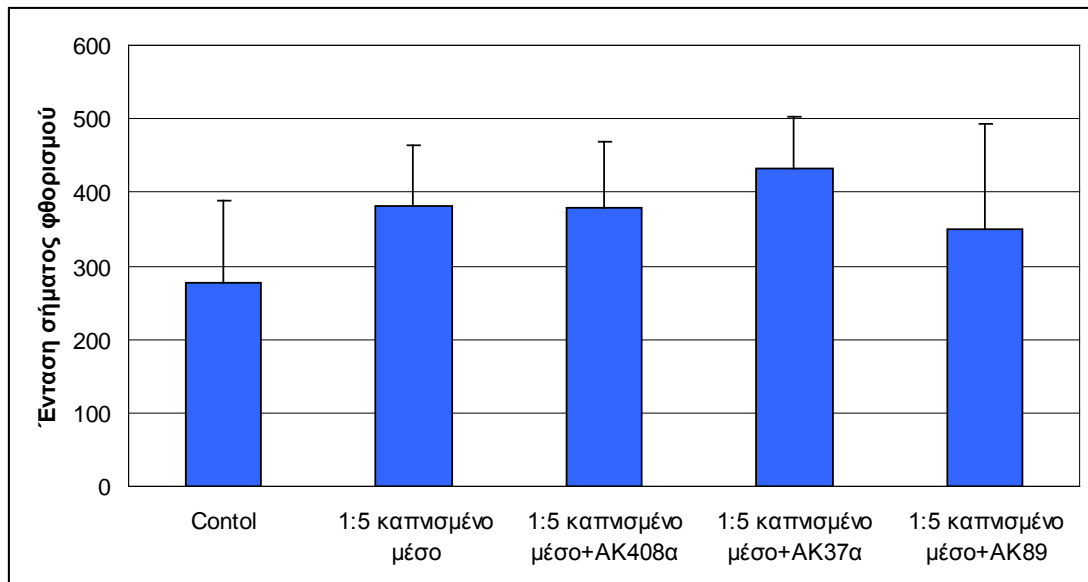


**Διάγραμμα 6.1** Ένταση σήματος φθορισμού της επίδρασης της υπεριώδους ακτινοβολίας και του 1:5 καπνισμένου : μη καπνισμένου μέσου σε κερατινοκύτταρα.

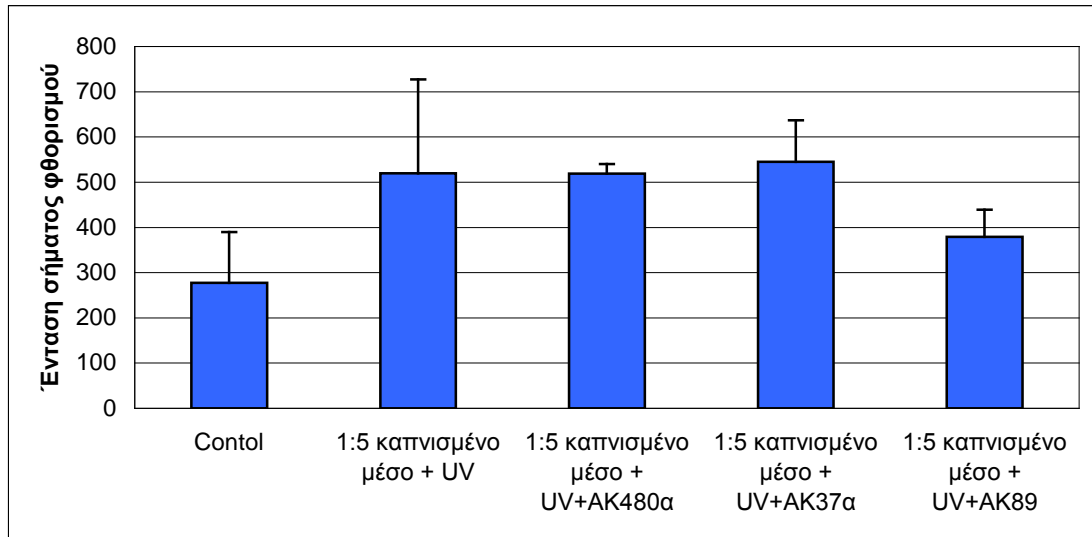




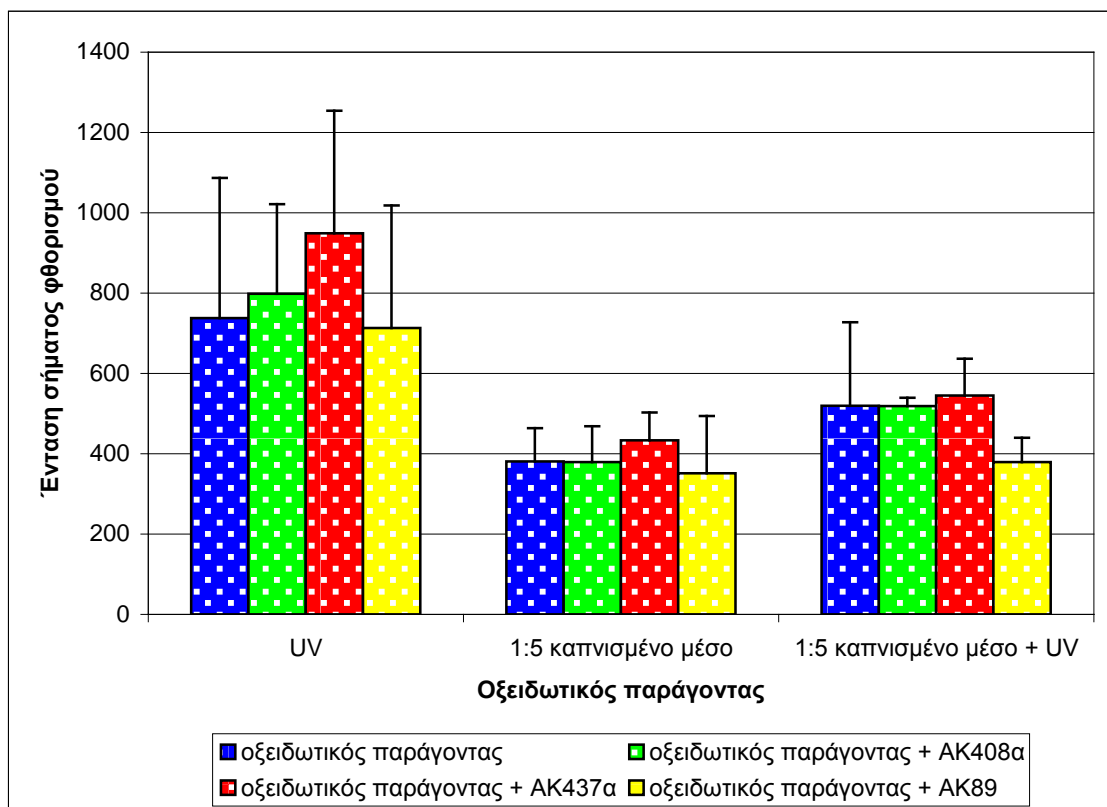
**Διάγραμμα 6.2** Ένταση σήματος φθορισμού ουσιών με αντιφλεγμονώδη δράση έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από υπεριώδη ακτινοβολία.



**Διάγραμμα 6.3** Ένταση σήματος φθορισμού ουσιών με αντιφλεγμονώδη δράση έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τον καπνό του τσιγάρου.



**Διάγραμμα 6.4** Ένταση σήματος φθορισμού ουσιών με αντιφλεγμονώδη δράση έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τον καπνό του τσιγάρου και την υπεριώδη ακτινοβολία.



**Διάγραμμα 6.5** Συγκριτική παρουσίαση της έντασης του σήματος φθορισμού των αντιφλεγμονώδων ουσιών έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τον καπνό του τσιγάρου και την υπεριώδη ακτινοβολία.

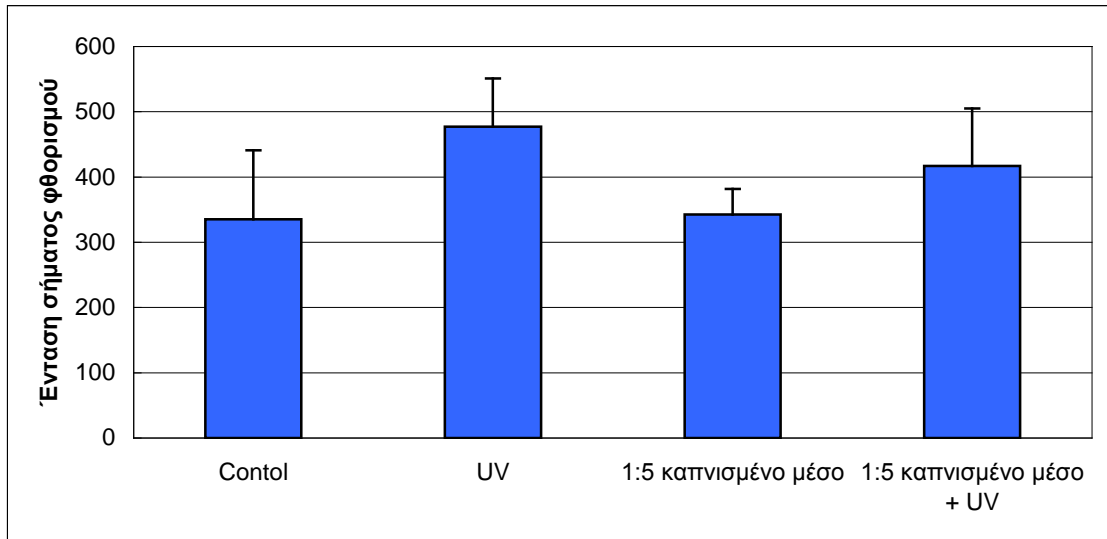
## ii) Πείραμα II

Οι ληφθείσες τιμές από τη μέτρηση φθορισμού παρατίθενται στον πίνακα 6.5 μαζί με το μέσο όρο των τιμών για την κάθε κατηγορία και την τυπική απόκλιση.

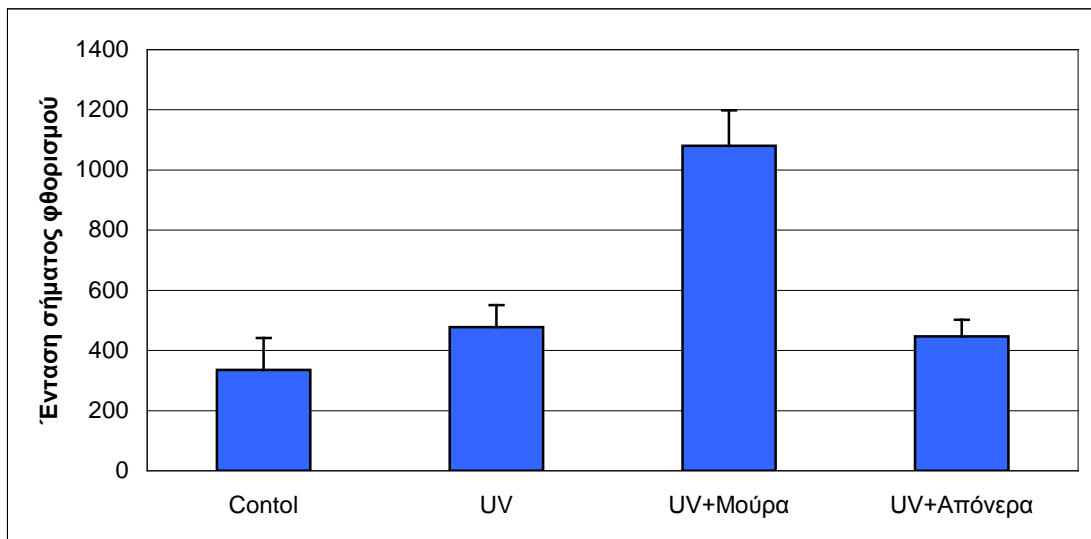
	Control	UV	UV+ Μούρα	UV+ Απόνερα	1:5 καπνισμένο μέσο	1:5 καπνισμένο μέσο + Μούρα	1:5 καπνισμένο μέσο + Απόνερα	1:5 καπνισμένο μέσο + UV	1:5 καπνισμένο μέσο + UV + Μούρα	1:5 καπνισμένο μέσο + UV + Απόνερα
1	447	577	1079	472	371	671	295	502	912	428
2	473	560	1096	491	386	960	366	504	1290	470
3	338	460	1234	487	277	660	340	462	1229	488
4	300	449	1059	470	327	625	320	410	1075	491
5	238	425	875	352	331	941	395	315	1629	464
6	215	392	1140	409	363	1033	328	310	1231	405
<b>M.O.</b>	<b>335</b>	<b>477</b>	<b>1080</b>	<b>446</b>	<b>342</b>	<b>815</b>	<b>340</b>	<b>417</b>	<b>1227</b>	<b>457</b>
<b>STD</b>	<b>106</b>	<b>74</b>	<b>118</b>	<b>55</b>	<b>39</b>	<b>181</b>	<b>35</b>	<b>88</b>	<b>239</b>	<b>34</b>

**Πιν.6.5** Ένταση σήματος φθορισμού παρουσία εκχυλίσματος μούρων και απόνερων ελαιολιβερίου για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από καπνό τσιγάρου και υπεριώδη ακτινοβολία.

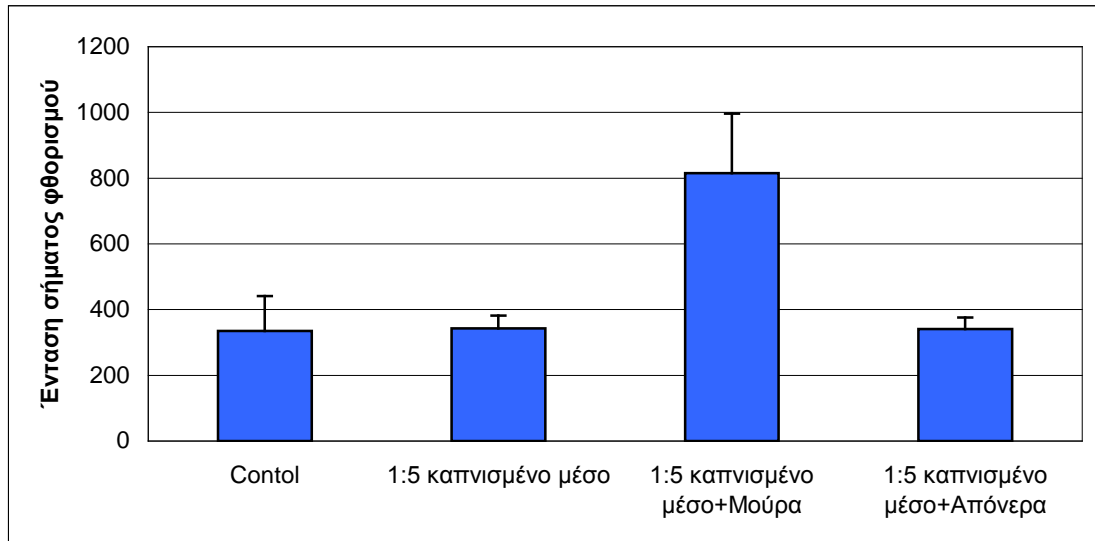
Από τις τιμές που παρουσιάζονται στον πίνακα 6.5 προκύπτουν τα διαγράμματα 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 και 6.10.



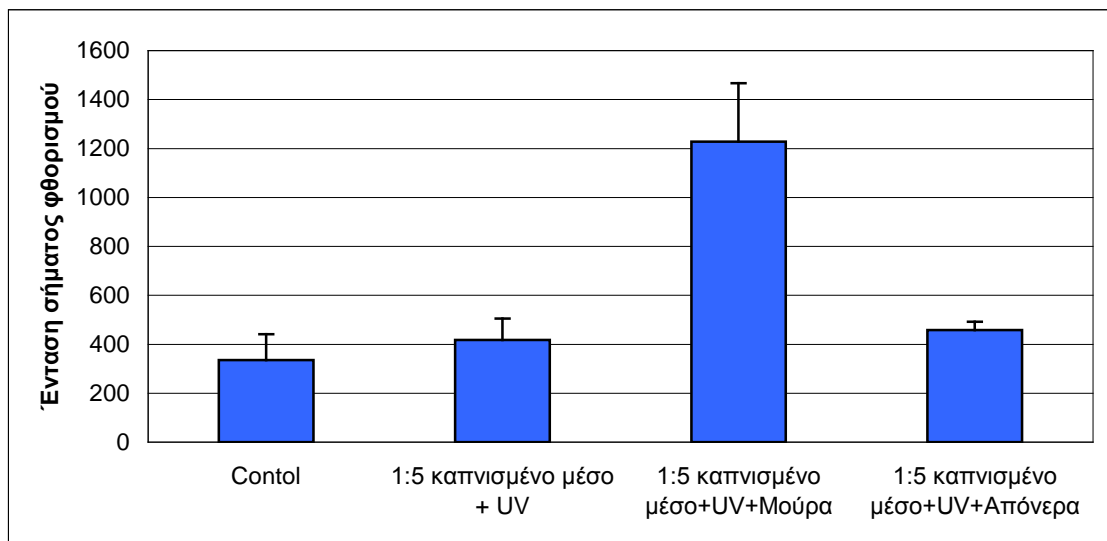
**Διάγραμμα 6.6** Ένταση σήματος φθορισμού της επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας και του 1:5 καπνισμένου : μη καπνισμένου μέσου σε κερατινοκύτταρα.



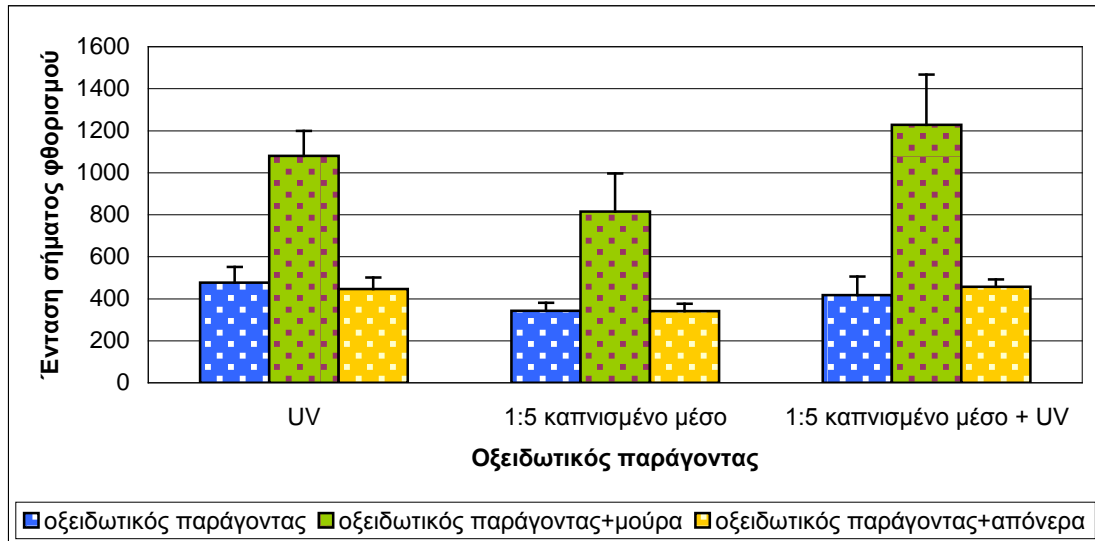
**Διάγραμμα 6.7** Ένταση σήματος φθορισμού παρουσία του εκχυλίσματος μούρων και απόνερων ελαιολιβερίου έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από υπεριώδη ακτινοβολία.



**Διάγραμμα 6.8** Ένταση σήματος φθορισμού παρουσία του εκχυλίσματος μούρων και απόνερων ελαιολιτριβείου έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τον καπνό του τσιγάρου.



**Διάγραμμα 6.9** Ένταση σήματος φθορισμού παρουσία του εκχυλίσματος μούρων και απόνερων ελαιολιτριβείου έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τον καπνό του τσιγάρου και την υπεριώδη ακτινοβολία.



**Διάγραμμα 6.10** Συγκριτική παρουσίαση της έντασης του σήματος φθορισμού παρουσία των αντιοξειδωτικών εκχυλισμάτων έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τον καπνό του τσιγάρου και την υπεριώδη ακτινοβολία.

### 6.2.3 Στατιστική Ανάλυση Αποτελεσμάτων

#### i) Πείραμα I

Πραγματοποιήθηκε one-way ANOVA με δοκιμασία Bonferroni και Dunnett σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Οι ομάδες που συγκρίθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

	<b>Ομάδες</b>	<b>Τιμή P<sub>(Bonferroni)</sub></b>	<b>Τιμή P<sub>(Dunnett)</sub></b>
1	Control – UV	0,043	0,142
2	Control – UV+AK408α	0,015	0,010
3	Control – UV+AK37α	0,001	0,015
4	Control – UV+AK89	0,064	0,018
5	UV – UV+AK408α	1,000	1,000
6	UV – UV + AK37α	1,000	0,931
7	UV – UV+AK89	1,000	1,000
8	UV+AK408α – UV+AK37α	1,000	0,967
9	UV+AK408α – UV+AK89	1,000	0,997
10	UV+AK37α – UV+AK89	1,000	0,712
11	Control – 1:5 καπνισμένο μέσο	0,943	0,562
12	Control – 1:5 καπνισμένο μέσο+AK408α	0,984	0,603
13	Control – 1:5 καπνισμένο μέσο+AK37α	0,146	0,142
14	Control – 1:5 καπνισμένο μέσο+AK89	1,000	0,965
15	1:5 καπνισμένο μέσο – 1:5 καπνισμένο μέσο+AK408α	1,000	1,000
16	1:5 καπνισμένο μέσο – 1:5 καπνισμένο μέσο+AK37α	1,000	0,905
17	1:5 καπνισμένο μέσο – 1:5 καπνισμένο μέσο+AK89	1,000	1,000
18	1:5 καπνισμένο μέσο+AK408α – 1:5 καπνισμένο μέσο+AK37α	1,000	0,912
19	1:5 καπνισμένο μέσο+AK408α – 1:5 καπνισμένο μέσο+AK89	1,000	1,000
20	1:5 καπνισμένο μέσο+AK37α – 1:5 καπνισμένο μέσο+AK89	1,000	0,865
21	Control – 1:5 καπνισμένο μέσο+UV	0,015	0,249
22	Control – 1:5 καπνισμένο μέσο+UV+AK408α	0,015	0,021
23	Control – 1:5 καπνισμένο μέσο+UV+AK37α	0,006	0,011
24	Control – 1:5 καπνισμένο μέσο+UV+AK89	1,000	0,488
25	1:5 καπνισμένο μέσο+UV – 1:5 καπνισμένο μέσο+UV+AK408α	1,000	1,000
26	1:5 καπνισμένο μέσο+UV – 1:5 καπνισμένο μέσο+UV+AK37α	1,000	1,000
27	1:5 καπνισμένο μέσο+UV – 1:5 καπνισμένο μέσο+UV+AK89	0,493	0,701
28	1:5 καπνισμένο μέσο+UV+AK408α – 1:5 καπνισμένο μέσο+UV+AK37α	1,000	0,996
29	1:5 καπνισμένο μέσο+UV+AK408α – 1:5 καπνισμένο μέσο+UV+AK89	0,503	0,012
30	1:5 καπνισμένο μέσο+UV+AK37α – 1:5 καπνισμένο μέσο+UV+AK89	0,220	0,045
31	UV – 1:5 καπνισμένο μέσο	0,056	0,225
32	UV – 1:5 καπνισμένο μέσο+UV	0,563	0,716
33	1:5 καπνισμένο μέσο – 1:5 καπνισμένο μέσο+UV	1,000	0,603

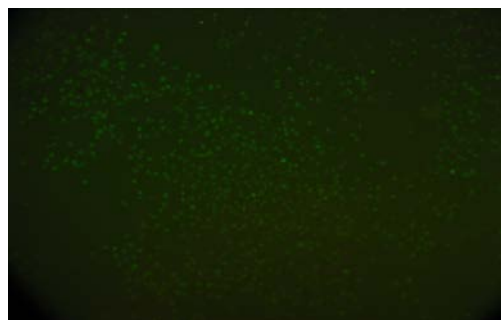
## ii) Πείραμα II

Πραγματοποιήθηκε one-way ANOVA με δοκιμασία Bonferroni και Dunnett σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Οι ομάδες που συγκρίθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:

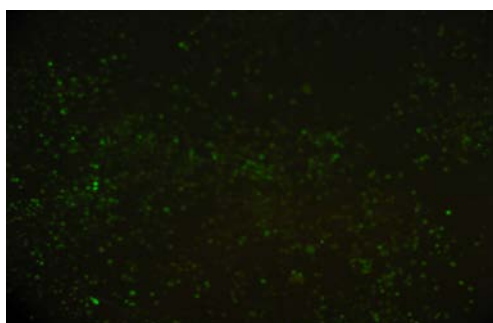
	<b>Ομάδες</b>	<b>Τιμή P (Bonferroni)</b>	<b>Τιμή P (Dunnett)</b>
1	Control – UV	0,039	0,125
2	Control – 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο	1,000	1,000
3	Control – 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+UV	0,568	0,630
4	UV – 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο	0,055	0,026
5	UV – 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+UV	1,000	0,741
6	1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο – 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+UV	0,755	0,397
7	Control – UV+μούρα	0,000	0,000
8	Control – UV+απόνερα	0,292	0,239
9	UV – UV+μούρα	0,000	0,000
10	UV – UV+απόνερα	1,000	0,953
11	UV+μούρα – UV+απόνερα	0,000	0,000
12	Control – 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+μούρα	0,000	0,003
13	Control – 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+απόνερα	1,000	1,000
14	1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο – 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+μούρα	0,000	0,006
15	1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο – 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+απόνερα	1,000	1,000
16	1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+μούρα – 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+απόνερα	0,000	0,006
17	Control – 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+UV+μούρα	0,000	0,000
18	Control – 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+UV+απόνερα	0,863	0,160
19	1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+UV – 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+UV+μούρα	0,000	0,001
20	1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+UV – 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+UV+απόνερα	1,000	0,857
21	1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+UV+μούρα – 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+UV+απόνερα	0,000	0,002



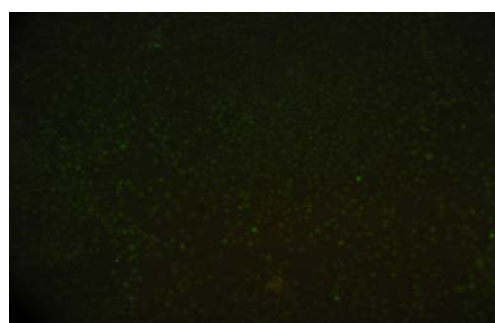
### 6.2.4 Μικροσκοπική Παρατήρηση



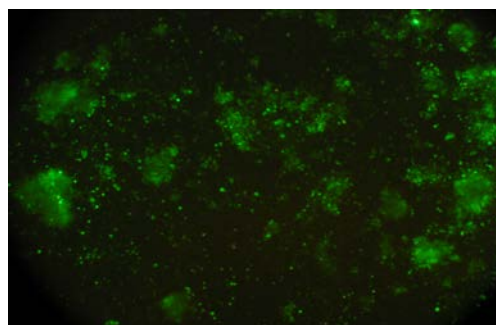
Control



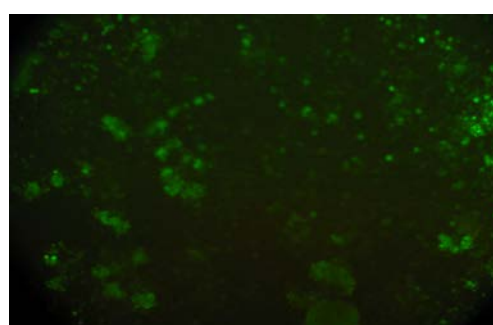
1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο



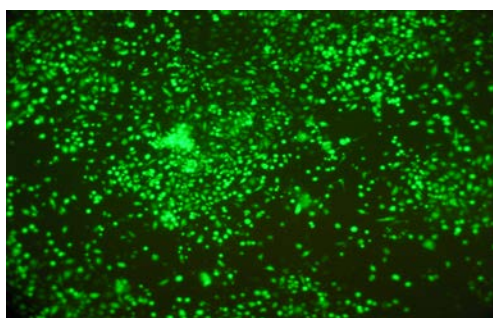
1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο + AK89



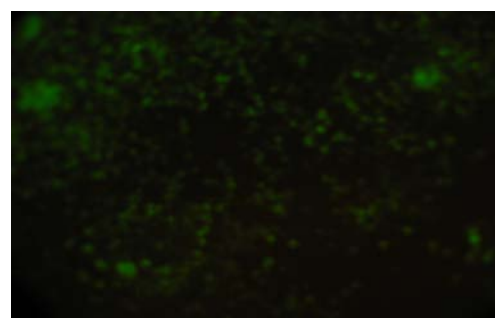
1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο + UV



1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο+UV+AK89



UV



UV+AK89

Εικόνα 6.1 Φωτογραφίες φθορισμού από μικροσκόπιο φθορισμού όπου παρατηρείται η επίδραση της επώασης για 2h σε διάφορους οξειδωτικούς παράγοντες καθώς και η προστατευτική δράση της αντιφλεγμονώδους ένωσης AK89 έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τους οξειδωτικούς παράγοντες.

Στις φωτογραφίες φθορισμού, η ένταση του σήματος φθορισμού (πράσινο χρώμα) είναι ανάλογη της ποσότητας των ελευθέρων ριζών. Από τις φωτογραφίες φθορισμού της εικόνας 1 παρατηρούμε ότι το control δίνει το μικρότερο σήμα φθορισμού, εμφανίζει δηλαδή το μικρότερο οξειδωτικό στρες. Το μεγαλύτερο σήμα φθορισμού, δηλαδή το μεγαλύτερο οξειδωτικό στρες εμφανίζει το δείγμα που έχει ακτινοβοληθεί με UVA και UVB υπεριώδη ακτινοβολία. Ωστόσο, και στους τρεις διαφορετικούς οξειδωτικούς παράγοντες που έχουν εκτεθεί τα κερατινοκύτταρα (υπεριώδης ακτινοβολία, 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο, υπεριώδης ακτινοβολία και 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο) η ένωση AK89, φαίνεται να προστατεύει τα κύτταρα μέσω αντιοξειδωτικής δράσης, δηλαδή δέσμευση των ελευθέρων ριζών που παράγονται.

#### 6.2.5 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα των πινάκων 6.1, 6.2, 6.3 και 6.4, καθώς και την απεικόνιση αυτών στα διαγράμματα 6.1 έως 6.5, διαπιστώνουμε ότι η ακτινοβολία των κερατινοκυττάρων με UVA και UVB ακτινοβολία επάγει τη δημιουργία ελευθέρων ριζών. Πιο αναλυτικά, παρατηρείται μεγαλύτερη ένταση του σήματος φθορισμού σε σχέση με το control, δηλαδή εμφανίζεται μεγαλύτερο οξειδωτικό στρες. Από τη στατική ανάλυση μάλιστα φαίνεται πως η διαφορά μεταξύ της τιμής του control με το UV [ομάδα 1 (§6.2.3,i)] είναι στατιστικά σημαντική. Μεγαλύτερη ένταση του σήματος φθορισμού σε σχέση με το control εμφανίζεται και στην περίπτωση που χρησιμοποιείται 1:5 καπνισμένο : μη καπνισμένο μέσο καθώς και στην περίπτωση της ταυτόχρονης ακτινοβολίας του καπνισμένου μέσου με την υπεριώδη ακτινοβολία. Στην περίπτωση μάλιστα της ταυτόχρονης ακτινοβολίας του 1:5 καπνισμένου : μη καπνισμένου μέσου υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά [ομάδα 21 (§6.2.3,i)]. Ωστόσο παρατηρώντας τα αποτελέσματα του πίνακα 6.1 καθώς και την απεικόνιση αυτών στο διάγραμμα 6.1, όπως και τις φωτογραφίες φθορισμού στην εικόνα 6.1, διαπιστώνουμε ότι το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται μικρότερο σε αυτές τις δύο περιπτώσεις σε σύγκριση με το οξειδωτικό στρες που παράγεται μόνο από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία. Αυτό πρακτικά μπορεί να είναι αποτέλεσμα της απώλειας κυττάρων λόγω θανάτωσης τους κατά την υποβολή τους στον καπνό του τσιγάρου και επακόλουθη αποκόλληση και διαφυγή τους από το

δείγμα κατά τις διάφορες διαδικασίες αλλαγών του θρεπτικού μέσου και των ουσιών που χρησιμοποιούνταν.

Αναφορικά με τις τρεις αντιφλεγμονώδεις ουσίες που μελετήθηκαν ως προς την προστασία που μπορούν να προσφέρουν έναντι έκθεσης κερατινοκυττάρων σε οξειδωτικούς παράγοντες μπορούν να διεξαχθούν τα παρακάτω συμπεράσματα: Η ένωση AK89 φαίνεται να παρέχει τη μεγαλύτερη προστασία στα κερατινοκύτταρα αφού όπως φαίνεται στο διάγραμμα 6.5 και στις φωτογραφίες της εικόνας 6.1 οι τιμές που έδωσε η μέτρηση φθορισμού είναι χαμηλότερες από τις τιμές των δειγμάτων που έχουν υποστεί έκθεση στους οξειδωτικούς χωρίς την παρουσία κάποιας αντιφλεγμονώδους ουσίας. Επιπροσθέτως, η ένωση AK89 φαίνεται να παρέχει τη μεγαλύτερη προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες που παράγεται από τον καπνό του τσιγάρου και την υπεριώδη ακτινοβολία σε σχέση με τις δύο άλλες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Από το διάγραμμα 6.5 φαίνεται οι τιμές που έδωσε η μέτρηση φθορισμού για την ένωση AK89 να είναι χαμηλότερες από τις τιμές που έχουν δώσει οι δύο άλλες ενώσεις, Σημαντική στατιστική διαφορά εμφανίζεται στην περίπτωση ακτινοβολημένου με υπεριώδη ακτινοβολία καπνισμένου μέσου παρουσίας της ένωσης AK89 σε σύγκριση με τις ενώσεις AK408a και AK37 [ομάδες 29 & 30 (§6.2.3,i)]. Η ένωση AK408a έχει δώσει τιμές σχεδόν όμοιες με τις τιμές των δειγμάτων που έχουν υποστεί έκθεση στους οξειδωτικούς παράγοντες χωρίς την παρουσία κάποιας αντιφλεγμονώδους ουσίας, ενώ η ένωση AK37a φαίνεται να αυξάνει το οξειδωτικό στρες που προκαλείται στα κερατινοκύτταρα από τους οξειδωτικούς παράγοντες αφού οι τιμές από τη μέτρηση φθορισμού είναι οι μεγαλύτερες που παρατηρήθηκαν.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του πίνακα 6.5, καθώς και το διάγραμμα 6.6, καταλήγουμε και εδώ στο συμπέρασμα πως ότι η ακτινοβολία των κερατινοκυττάρων με UVA και UVB ακτινοβολία επάγει τη δημιουργία περισσότερων ελευθέρων ριζών από την περίπτωση που σαν οξειδωτικός παράγοντας χρησιμοποιείται ο καπνός του τσιγάρου καθώς και η ταυτόχρονη ακτινοβολία σε υπεριώδη ακτινοβολία καπνισμένου μέσου. Μάλιστα, σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση υπάρχει στατικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων που έχουν ακτινοβοληθεί με υπεριώδη ακτινοβολία σε σχέση με τους μάρτυρες και τα δείγματα που έχουν μόνο επωαστεί για 2h σε 1:5 καπνισμένο :

μη καπνισμένο μέσο [ομάδες 1 & 4 (§6.2.3, ii)]. Αυτό, όπως ήδη αναφέρθηκε, πρακτικά μπορεί να είναι αποτέλεσμα της απώλειας κυττάρων λόγω θανάτωσης τους κατά την υποβολή τους στον καπνό του τσιγάρου και επακόλουθη αποκόλληση και διαφυγή τους από το δείγμα κατά τις διάφορες διαδικασίες αλλαγών του θρεπτικού μέσου και των ουσιών που χρησιμοποιούνταν.

Αναφορικά με τις δύο αντιοξειδωτικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ η παρουσία τους φάνηκε να ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (σε 28 ώρες παρατηρήθηκε πληρότητα της τάξης του 80%), παρουσίασαν διαφορετική συμπεριφορά παρουσία των οξειδωτικών παραγόντων. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 6.5, καθώς και από το διάγραμμα 5.10, οι τιμές της μέτρησης φθορισμού για τα δείγματα που υπήρχε το εκχύλισμα μούρων ήταν μεγαλύτερες από όλες τις τιμές που ληφθήκαν. Μάλιστα σε όλες τις ομάδες που εμφανίζεται το εκχύλισμα των μούρων υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά [ομάδες 7, 9, 11, 12, 14, 16, 17, 19 & 21 (§6.2.3, iii)]. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως στη δόση που χρησιμοποιήθηκε το εκχύλισμα των μούρων (1μl/ml) δεν μπορεί να παρέχει αντιοξειδωτική προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες που παράγεται από τον καπνό του τσιγάρου και την υπεριώδη ακτινοβολία, αλλά αντιθέτως εμφανίζει προ-οξειδωτική δράση. Αντίθετα η παρουσία των απόνερων ελαιοτριβείου φάνηκε να παρέχει μια ελάχιστη προστασία στα κερατινοκύτταρα παρουσία των οξειδωτικών παραγόντων που μελετήσαμε αφού οι τιμές της μέτρησης φθορισμού ήταν μικρότερες από τα δείγματα που είχαν υποστεί μόνο το οξειδωτικό στρες χωρίς παρουσία αντιοξειδωτικού παράγοντα. Βέβαια, αυτό αποτελεί μια ένδειξη, αφού καμιά από τις διαφορές στις τιμές που παρατηρήθηκε δεν είναι, σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, στατιστικώς σημαντική.

## ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ☞ Ο καπνός του τσιγάρου είναι ιδιαίτερα επιβλαβής για τα κύτταρα. Παρουσία του καπνού του τσιγάρου, η μιτωτική δραστηριότητα των κερατινοκυττάρων μειώνεται σημαντικά και τα κύτταρα οδηγούνται σε πρόωρο κυτταρικό θάνατο. Επιδημιολογικές μελέτες βεβαιώνουν τη συμβολή του στην πρόωρη γήρανση του δέρματος. [12, 30]
- ☞ Η υπεριώδης ακτινοβολία επάγει τη δημιουργία μεγάλου αριθμού ελευθέρων ριζών προκαλώντας έντονο οξειδωτικό στρες. Επιδημιολογικές μελέτες επιβεβαιώνουν την καταστρεπτική δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας στο δέρμα. [22]
- ☞ Η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία προκαλεί τοξικά φαινόμενα στα κερατινοκύτταρα δημιουργώντας έντονο οξειδωτικό στρες. Συνεργικά, ο καπνός του τσιγάρου οδηγεί τα κερατινοκύτταρα σε πρόωρο κυτταρικό θάνατο. [20, 26]
- ☞ Η αντιφλεγμονώδης ένωση AK89 παρέχει προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και στον καπνό του τσιγάρου, μειώνοντας το επίπεδο του οξειδωτικού στρες και εξασφαλίζοντας μεγαλύτερη βιωσιμότητα για τα κύτταρα.
- ☞ Τα απόνερα ελαιοτριβείου συγκέντρωσης 0,5μl/ml εμφανίζουν προστατευτική δράση έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και στον καπνό του τσιγάρου, φανερώνοντας την αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων που περιέχουν φαινολικά συστατικά. [31]
- ☞ Η συγκέντρωση του εκχυλίσματος μούρων (1μl/ml) που χρησιμοποιήθηκε εμφανίζει προ-οξειδωτική δράση.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Γεώργιος Θ. Παπαϊωάννου (2006), Κοσμητολογία: Συστατικά – Παρασκευή – Χρήση καλλυντικών, Δ' Έκδοση, 1 - 12
2. Γεώργιος Θ. Παπαϊωάννου, Μιχάλης Χρ. Ράλλης (1998), Έλεγχος και αξιολόγηση καλλυντικών προϊόντων, 168 – 175
3. Michael Borgerding & Hubert Klus (2005), Analysis of complex mixtures – Cigarette smoke, *Experimental and Toxicologic Pathology* 57, 43 – 73
4. Richard R. Baker, Eian D. Massey & Graham Smith (2004), An overview of the effects of tobacco ingredients on smoke chemistry and toxicity, *Food and chemical toxicology* 42S, S53 – S83
5. David M. DeMarini (2004), Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: an overview, *Mutation research* 567, 447 – 474
6. David M. Burns (2003), Tobacco – related diseases, *Seminars in oncology nursing*, Vol 19, No 4 (November), 244 – 249
7. Anatoli Freiman et al (2004), Cutaneous effects of smoking, *Journal of cutaneous medicine and surgery*, 415 - 423
8. David Bernhard, Christina Moser, Aleksandar Backovic & Georg Wick (2007), Cigarette smoke – an aging accelerator?, *Experimental gerontology* 42, 160 – 165
9. Laurent Misery (2004), Nicotine effects on skin: Are they positive or negative, *Experimental Dermatology*, 13, 665 – 670
10. Conti-Fine et al, (2000), Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity, *European journal of pharmacology*, 393, 279 - 294
11. Anina Raito, Comparison of clinical and computerized image analyses in the assessment of skin aging in smokers and non-smokers, *Acta Derm Venereol* 84, 422 – 427
12. Lei Yin, Akimichi Morita & Takuo Tsuji (2001), Skin premature aging induced by tobacco smoking: the objective evidence of skin replica analysis, *Journal of dermatological science* 27 Suppl. 1, S26 – S31
13. Anita Knuutinen (2002), Smoking and skin: A study of the physical qualities and histology of skin in smokers and non – smokers, *Acta Derm Venereol* 82, 36 – 40
14. Akimichi Morita, Tobacco smoke causes premature skin aging, *Journal of dermatological science* 48, 169 – 175
15. Alberto Izzotti, Francesco D' Agostini, Roumen Balansky, Paolo Degan, Tanya M. Pennisi, Vermon E. Steele & Silvio De Flora (2008), Exposure of mice to cigarette smoke and/or light causes DNA Alterations in heart and aorta, *Mutation research* 644, 38-42
16. Amber V. Osborne-Hereford, Scott W. Rogers & Lorise C. Gahring (2008), Neuronal nicotinic alpha7 receptors modulate inflammatory cytokine production in the skin following ultraviolet radiation, *Journal of Neuroimmunology* 193, 130 – 139
17. Alan S. Boyd et al (1999), Cigarette smoking – associated elastotic changes in the skin, *American academy of dermatology* 41, 23 – 26
18. Mohammad Imran et al (2010), Chemical composition and antioxidant activity of certain Morus species, *Journal of Zhejiang university – science B* 11 (12), 973 – 980
19. Anthony V. Benedetto (1998), The environment and skin aging, *Clinics in dermatology* 16, 129 – 139

20. M. Placzek et al (2004), Tobacco smoke is phototoxic, *British journal of dermatology* 150, 991 – 99
21. Gail Jenkins (2002), Molecular mechanisms of skin aging, *Mechanisms of aging and development* 123, 801 – 810
22. Yasuhiro Matsumura & Honnavara N. Ananthaswamy (2004), Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin, *Toxicology and applied pharmacology* 195, 298 – 30
23. Sies H. (1996), Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *experimental physiology* 82, 291 – 295
24. Sohal R. (2002), Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process, *Free radical biology and medicine* 33, 37 – 44
25. Vaart H. (2004), Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review, *Thorax*, 59, 713 – 721
26. C. Chuang & M. Lu (2006), Synergistic DNA Damage and Lipid Peroxidation in Cultured Human White Blood Cells Exposed to 4-(Methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and Ultraviolet A, *Environmental and molecular mutagenesis*, 47, 73 – 81
27. K. Brunnemann & Huffmann D (1974), The pH of tobacco smoke, *Journal of Food and Cosmetic toxicology*, 12, 115 – 124
28. Α. Ι. Στρατηγός και Χ. Αντωνίου (2002), Οι φωτοχημικές βλάβες του DNA και ο ρόλος τους στις βιολογικές επιδράσεις της υπεριώδους ακτινοβολίας στο δέρμα, 19 (2), 141 – 152
29. Κ.Δ. Βέρρος, Η βλαπτική επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στο δέρμα.
30. Lei Yin, Akimichi Morita & Takuo Tsuji (2001), Skin aging induced by ultraviolet exposure and tobacco smoking: evidence from epidemiological and molecular studies, *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine*, 17, 178 – 183
31. Rice-Evans C. (2001), Flavonoid antioxidants, *Current medical chemistry*, 8, 797 – 807
32. Sakae Arimoto-Kobayashi, Hiroko Sakata, Kanayo Mitsu, Hiroyuki Tanoue (2007), A possible photosensitizer: Tobacco-specific nitrosamine, 4-(N-methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), induced mutations, DNA strand breaks and oxidative and methylative damage with UVA, *Mutation research*, 632, 111 – 120
33. Jens Lykkesfeldt (2007), Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking, *Clinica Chimica Acta*, 380, 50 – 58
34. Alberto Izzotti, Francesco D'Agostini, Roumen Balansky, Paolo Degan, Tanya M. Pennisi, Vernon E. Steele, Silvio De Flora (2008), Exposure of mice to cigarette smoke and/or light causes DNA alterations in heart and aorta, *Mutation research*, 644, 38 - 42