



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Διερεύνηση του ρόλου βιοδραστικών ενώσεων της
διατροφής σε μοριακούς μηχανισμούς που έχουν
σχέση με το οξειδωτικό στρες και την υγεία.**

ΓΕΡΟΓΙΑΝΝΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Διερεύνηση του ρόλου βιοδραστικών ενώσεων της
διατροφής σε μοριακούς μηχανισμούς που έχουν
σχέση με το οξειδωτικό στρες και την υγεία.**

ΓΕΡΟΓΙΑΝΝΗ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης της κ Γερογιάννη Παρασκευής: 18-4-2013

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 752^α/16-5-2013

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γαλάρης Δημήτριος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Αστρεϊνίδης Αριστοτέλης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τζάκος Ανδρέας, Λέκτορας Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 23-5-2013

«Διερεύνηση του ρόλου βιοδραστικών ενώσεων της διατροφής σε μοριακούς μηχανισμούς που έχουν σχέση με το οξειδωτικό στρες και την υγεία»

Ημερομηνία ανασυγκρότησης της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 771^α/28-11-2014

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γαλάρης Δημήτριος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Παππάς Περικλής Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τζάκος Ανδρέας, Λέκτορας Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 859/21-6-2018

Αγγελίδης Χαράλαμπος	Καθηγητής Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γκλαντζούνης Γεώργιος	Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παππάς Περικλής	Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χριστοφορίδης Σάββας	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπαρμπούτη Αλεξάνδρα	Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τζάκος Ανδρέας	Επίκουρος Καθηγητής Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 13-7-2018

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

Μ. Καπιτοπούλου

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

**Στους γονείς μου,
Σωτήρη και Άννα**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής θα ήθελα να απευθύνω ένα βαθύ και ολόψυχο ευχαριστώ σε όσους στάθηκαν δίπλα μου σ' αυτή την επίπονη προσπάθεια και με βοήθησαν να τη φέρω σε πέρας.

Από την αρχή της περιπέτειας αυτής, μεγάλος συμπαραστάτης υπήρξε ο Καθηγητής μου κ. Δημήτριος Γαλάρης, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέσα από την καθοδήγηση, τις συμβουλές και την ηθική παρότρυνση. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπό μου, αναθέτοντάς μου το ενδιαφέρον θέμα της παρούσας εργασίας.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ανδρέα Τζάκο, Επίκουρο Καθηγητή Οργανικής Χημείας του τμήματος Χημείας και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής, κ. Περικλή Παππά για τις σημαντικές συμβουλές και την άμεση ανταπόκριση κάθε φορά που χρειαζόμουν τη βοήθειά τους.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής: τον κ. Αγγελίδη Χαράλαμπο, Καθηγητή Γενικής Βιολογίας του τμήματος Ιατρικής, τον κ. Γεώργιο Γκλαντζούνη, Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής - Μεταμοσχεύσεων του τμήματος Ιατρικής, τον κ. Σάββα Χριστοφορίδη, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογικής Χημείας του τμήματος Ιατρικής και την κ. Αλεξάνδρα Μπαρμπούτη, Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του τμήματος Ιατρικής για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην κρίση της διδακτορικής μου διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ δεν θα μπορούσα να μην απευθύνω σε όλους τους συναδέλφους μου από το εργαστήριο Βιολογικής Χημείας για όλα αυτά τα χρόνια που βρισκόμασταν στο ίδιο εργαστήριο, για τη συνεργασία και το αρμονικό κλίμα.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ, αν θα μπορούσα να το εκφράσω έτσι, ανήκει στην οικογένειά μου, στους γονείς μου, Σωτήρη και Άννα, οι οποίοι ήταν η δύναμή μου, όλα αυτά τα χρόνια. Η αγάπη τους, η αμείωτη συμπαράσταση, η ενθάρρυνση, η κατανόηση και η πολύπλευρη στήριξη κατά την διάρκεια των σπουδών μου, μου έδινε δύναμη να συνεχίσω. Η διατριβή είναι αφιερωμένη σε εκείνους, γιατί από μικρή ηλικία με έμαθαν να πιστεύω στον εαυτό μου και να προσπαθώ πάντα για το καλύτερο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΚΟΝΕΣ.....	6
ΠΙΝΑΚΕΣ.....	9
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	10
 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	 13
 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	 14
 1.1 Ελεύθερες ρίζες και Οξειδωτικό στρες.....	 14
1.1.1 Ιστορική αναδρομή.....	14
1.1.2 Ελεύθερες ρίζες.....	15
1.1.3 Δραστικές μορφές οξυγόνου.....	16
1.1.4 Οξειδωτικό στρες.....	19
1.1.4.1 <i>Βλαπτικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά μακρομόρια.....</i>	<i>20</i>
1.1.5 Σίδηρος και οξειδωτικό στρες.....	20
1.1.5.1 <i>Καταλυτικά ενεργός σίδηρος.....</i>	<i>22</i>
 1.2 Διατροφή και υγεία.....	 23
1.2.1 Η Μεσογειακή Διατροφή.....	24
1.2.1.1 <i>Συστατικά της Μεσογειακής διατροφής.....</i>	<i>25</i>
1.2.1.2 <i>Ελληνική παραδοσιακή διατροφή.....</i>	<i>27</i>
1.2.2 Μελέτες της Μεσογειακής διατροφής.....	28
 1.3 Αρωματικά φυτά.....	 31
1.3.1 Φασκόμηλο - <i>Salvia officinalis</i> L. (οικ. Lamiaceae).....	32
1.3.2 Ρίγανη - <i>Origanum vulgare</i> L. (οικ. Lamiaceae).....	34
1.3.3 Δεντρολίβανο - <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (οικ. Lamiaceae).....	35
 1.4 Φαινολικές ενώσεις – Πολυφαινόλες.....	 38
1.4.1 Φαινολικά οξέα και υγεία.....	41
1.4.2 Απορρόφηση και μεταβολισμός φαινολικών οξέων.....	42

1.4.3 Βιολογική δράση φαινολικών οξέων.....	44
1.4.4 Αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών οξέων.....	45
1.4.5 Φαινολικά οξέα και απόπτωση.....	46
1.4.6 Ικανότητα των φαινολικών οξέων να δεσμεύουν μέταλλα.....	47
1.5 Λειτουργικά τρόφιμα.....	49
1.6 Ο ρόλος δέσμευσης σιδήρου σε παθολογικές καταστάσεις.....	51
1.6.1 Ισχαιμία – επαναιμάτωση ήπατος και οξειδωτικό στρες.....	52
1.6.2 Δεσφεριοξαμίνη (DFO).....	55
1.6.3 Δεφεριπρόνη (DFP).....	57
1.6.4 Συνδυασμένη χορήγηση δεσφεριοξαμίνης και δεφεριπρόνης.....	58
Σκοπός.....	60
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	61
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	62
2.1 Υλικά.....	62
2.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ.....	64
2.2.1 Διατήρηση κυτταρικών σειρών.....	64
2.2.2 Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας.....	65
2.2.3 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων.....	66
2.2.4 Επώαση των κυττάρων.....	66
2.3 Μέθοδοι.....	67
2.3.1 Σύνθεση παραγώγων ροσμαρινικού οξέος.....	67
2.3.2 Ηλεκτροφόρηση του DNA μεμονωμένων κυττάρων (Single Cell Gel Electrophoresis/Comet assay).....	70
2.3.3 Μέτρηση της ενδοκυττάριας δέσμευσης του καταλυτικά ενεργού Σιδήρου (LIP).....	73
2.3.4 Προσδιορισμός απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής.....	77
2.3.5 Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.....	80

2.3.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE).....	81
2.3.7 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κατά Western.....	83
2.3.8 Υπολογισμός κυτταρικής πρόσληψης του ροσμαρινικού οξέος και των ανάλογων μορίων του μέσω UHPLC-MS/MS.....	85
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	89
ΕΝΟΤΗΤΑ Α.....	89
3.1 Διερεύνηση του μηχανισμού της προστατευτικής δράσης εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών σε κύτταρα που εκτίθενται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.....	89
3.1.1 Προστατευτική ικανότητα ολικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών ενάντια στις βλάβες που προκαλεί το H ₂ O ₂ στο πυρηνικό DNA.....	90
3.1.2 Προστατευτική ικανότητα των φαινολικών οξέων, καφεϊκού και ροσμαρινικού, τα οποία απομονώθηκαν από εκχυλίσματα αρωματικών φυτών.....	95
3.1.3 Συνθετικά παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος.....	99
3.1.3.1 Προστατευτική ικανότητα εστερικών και αμιδικών παραγώγων του ροσμαρινικού οξέος σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.....	99
3.1.3.2 Ενδοκυττάρια δέσμευση των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου και συσχέτισή τους με την προστασία του πυρηνικού DNA μετά από έκθεση των κυττάρων σε H ₂ O ₂	105
3.1.4 Τα παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος αναστέλλουν την επαγωγή της έκφρασης της βαριάς αλυσίδας της φερριτίνης (FHC) μετά από έκθεση των κυττάρων σε H ₂ O ₂	107
3.1.5 Ικανότητα του ροσμαρινικού οξέος και των παραγώγων του να εισέρχονται στον ενδοκυττάριο χώρο.....	109
3.1.6 Αναστολή της πρόκλησης απόπτωσης από παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος μετά από έκθεση κυττάρων σε H ₂ O ₂	113

ΕΝΟΤΗΤΑ Β.....118

3.2 Πρακτικές εφαρμογές σε γαλακτοκομικά προϊόντα.....118

3.2.1 Πρακτικές εφαρμογές: Παραγωγή τύπων φέτας, εμπλουτισμένων με εκχυλίσματα αρωματικών φυτών και διερεύνηση της προστατευτικής τους ικανότητας σε κύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2118

3.2.2 Πρακτικές εφαρμογές: Παραγωγή τύπων γιαουρτιού, εμπλουτισμένων με εκχυλίσματα αρωματικών φυτών και φρούτων και διερεύνηση της προστατευτικής τους ικανότητας σε κύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2120

3.2.3 Διερεύνηση της προστατευτικής ικανότητας εκχυλισμάτων από γιαούρτι, σε διαφορετικό pH, εμπλουτισμένων με αρωματικά φυτά και φρούτα, σε κύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2124

ΕΝΟΤΗΤΑ Γ.....128

3.3 Προκαταρκτικά πειράματα για μια in vivo μελέτη χορήγησης συνδυασμού σιδηροδεσμευτικών ενώσεων για την αντιμετώπιση του συνδρόμου ισχαιμίας – επαναιμάτωσης.....128

3.3.1 Διερεύνηση της συνδυασμένης χρήσης δεσφεριοξαμίνης και δεφεριπρόνης σε συνθήκες οξειδωτικού στρες σε ηπατικά κύτταρα.....129

3.3.2 In vivo μοντέλο.....132

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....133

4.1 Σχέσεις διατροφής και οξειδωτικού στρες.....133

4.2 Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών.....135

4.3 Μηχανισμός προστατευτικής ικανότητας των φαινολικών οξέων.....136

4.4 Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης γαλακτοκομικών λειτουργικών τροφίμων.....142

4.5 Προστατευτική δράση σιδηροδεσμευτικών σκευασμάτων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.....	144
5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	147
6. SUMMARY.....	150
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	153
8. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	182

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1. Διαγραμματική απεικόνιση των διαδοχικών βημάτων αναγωγής του οξυγόνου σε νερό με μονά ηλεκτρόνια.

Εικόνα 2. Η πυραμίδα της Μεσογειακής διατροφής.

Εικόνα 3. Φασκόμηλο (*Salvia officinalis*).

Εικόνα 4. Ρίγανη (*Origanum vulgare*).

Εικόνα 5. Δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*).

Εικόνα 6. Χημικές δομές γνωστών (α) υδροξυβενζοϊκών και (β) υδροξυκινναμικών οξέων.

Εικόνα 7. Μοριακή δομή του ροσμαρινικού οξέος (RA).

Εικόνα 8. Μοριακή δομή του μέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος (RAME).

Εικόνα 10. Η μοριακή δομή της δεσφεριοξαμίνης (DFO).

Εικόνα 11. Μοριακή δομή της δεφεριπρόνης (DFP).

Εικόνα 12. Χημική δομή του πρόπυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος.

Εικόνα 13. Χημική δομή του φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος.

Εικόνα 14. Χημική δομή του πρόπυλο-αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος.

Εικόνα 15. Χημική δομή του φαινέθυλο-αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος.

Εικόνα 16. (Α) Καταγραφή των σταδίων της πειραματικής διαδικασίας της τεχνικής “comet assay” και (Β) μορφολογική κατάταξη των σχηματισμών του DNA στις πέντε τάξεις.

Εικόνα 17. Δομή της καλσεΐνης.

Εικόνα 18. Διαγραμματική απεικόνιση δράσης καλσεΐνης.

Εικόνα 19. (Α) Διαγραμματική αναπαράσταση της μέτρησης της δέσμευσης των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου με τη μέθοδο της καλσεΐνης. (Β) Μεταβολή της έντασης του φθορισμού της καλσεΐνης μετά την προσθήκη SIH.

Εικόνα 20. Διάταξη κυψελίδας σε κυτταρομετρητή ροής.

Εικόνα 21. Διαγραμμική απεικόνιση της δράσης της χρωστικής φλουορεσκεΐνη (FITC).

Εικόνα 22. Διαγραμματική απεικόνιση της δράσης της χρωστικής ιουδιούχο προπίδιο (Propidium iodide, PI).

Εικόνα 23. Διαχωρισμός των κυττάρων με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής.

Εικόνα 24. Διαγραμματική απεικόνιση των σταδίων της τεχνικής Western blot.

Εικόνα 25. Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων από φασκόμηλο ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο DNA των κυττάρων.

Εικόνα 26. Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων από δεντρολίβανο ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο DNA των κυττάρων.

Εικόνα 27. Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων από ρίγανη ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο DNA των κυττάρων.

Εικόνα 28. Χημικές δομές (Α) του καφεϊκού και (Β) του ροσμαρινικού οξέος που συναντώνται σε αφθονία στη διατροφή και μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Εικόνα 29. Προστατευτική δράση του καφεϊκού και του ροσμαρινικού οξέος ενάντια στη βλάβη του DNA.

Εικόνα 30. Προστασία του ροσμαρινικού οξέος ενάντια στη βλάβη του DNA ανάλογα με το χρόνο προεπεώσεως.

Εικόνα 31. Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης του μέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος.

Εικόνα 32. Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης του πρόπυλο- και φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος.

Εικόνα 33. Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης του πρόπυλο- και φαινέθυλο-αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος.

Εικόνα 34. Συγκεντρωτικά διαγράμματα δράσης του ροσμαρινικού οξέος και των παραγώγων του, πρόπυλο- και φαινέθυλο-εστέρων και -αμιδίων.

Εικόνα 35. Συσχέτιση της ικανότητας προστασίας του πυρηνικού DNA από τα πρόπυλο- και φαινέθυλο-παραγώγα του ροσμαρινικού οξέος και της ικανότητας δέσμευσης των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου.

Εικόνα 36. Επαγωγή της έκφρασης της βαριάς αλυσίδας της φερριτίνης σε κύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2 και αναστολή της αύξησης από συνθετικά παραγώγα του ροσμαρινικού οξέος.

Εικόνα 37. Προστατευτική δράση του ροσμαρινικού οξέος και των παραγώγων του έναντι της βλάβης του DNA που προκαλείται από την έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 σε σχέση με τη θερμοκρασία επώσεως.

Εικόνα 38. Εκτίμηση της κυτταρικής πρόσληψης του ροσμαρινικού οξέος και των συνθετικών παραγώγων του με τη χρήση UHPLC-MS/MS.

Εικόνα 39. Τα πρόπυλο- παραγώγα του ροσμαρινικού οξέος προστατεύουν από την απόπτωση κύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2 .

Εικόνα 40. Τα φαινέθυλο- παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος προστατεύουν από την απόπτωση κύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2 .

Εικόνα 41. Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων τυριού ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο DNA των κυττάρων.

Εικόνα 42. Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων γιαουρτιού ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο DNA των κυττάρων.

Εικόνα 43. Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων γιαουρτιού ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο DNA των κυττάρων.

Εικόνα 44. Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων γιαουρτιού με αρωματικά φυτά σε διαφορετικό pH, ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο DNA των κυττάρων.

Εικόνα 45. Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων γιαουρτιού με φρούτα σε διαφορετικό pH, ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο DNA των κυττάρων.

Εικόνα 46. Χημικές δομές των σκευασμάτων (Α) δεσφεριοξαμίνη (DFO) και (Β) δεφεριπρόνη (DFP).

Εικόνα 47. Προστασία της δεσφεριοξαμίνης (DFO) και της δεφεριπρόνης (DFP) ενάντια στη βλάβη του κυτταρικού DNA, ανάλογα με τη συγκέντρωση και το χρόνο επώασης.

Εικόνα 48. Προστασία της δεσφεριοξαμίνης (DFO), της δεφεριπρόνης (DFP) και του συνδυασμού τους ενάντια στη βλάβη του DNA.

Εικόνα 49. Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών διάχυσης και συσσώρευσης του ροσμαρινικού οξέος (RosA) και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων του.

Πίνακες

Πίνακας 1. Αντιπροσωπευτικές Δραστικές Μορφές Οξυγόνου.

Πίνακας 2. Συνοπτική παρουσίαση των προοπτικών μελετών αξιολόγησης του ρόλου της Μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ) στην επιδημιολογία του καρκίνου.

Πίνακας 3. Συγκεντρωτικός πίνακας των IC_{50} των εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών φασκόμηλο, δεντρολίβανο και ρίγανη από τους διαλύτες νερό, οξικό αιθυλεστέρα, βουτανόλη και εξάνιο.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Ach: Acetylcholine

AchE: Acetylcholinesterase

AP sites: Apurinic / Apyrimidinic sites

APS: Ammonium persulfate

AREs / EpREs: antioxidant response elements / electrophile response elements

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BSA: Bovine Serum Albumin

Calcein-AM: Calcein acetoxymethyl

CAT: Catalase

CDK1: Cyclin-dependent kinase 1

DFO: Desferrioxamine

DFP: Deferiprone

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMF: DiMethylFormamide

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DQI: Diet Quality Index

DTPA: Diethylene triamine pentaacetic acid

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EPR / ESR: Electron paramagnetic resonance / Electron spin resonance

ERK: Extracellular signal-regulated kinases

ESI: Electrospray ionization

FBS: Fetal Bovine Serum

FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy

FHC: Ferritin heavy chain

FITC: Fluorescein Isothiocyanate

FT-NMR : Fourier-Transform Nuclear Magnetic Resonance

G.O.: Glucose Oxidase

GP: Glutathione Peroxidase

HDI: Healthy Diet Indicator

HEI: Healthy Eating Index

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid

HO-1: Heme Oxygenase-1

HRP: Hoseradish Peroxidase

IC₅₀: Half Maximal Inhibitory Concentration

JNK: c-Jun N-terminal kinase

LC / MSD: Liquid Chromatography / Mass Selective Detector

LIP: Labile Iron Pool

MAPs: Medicinal and Aromatic Plants

MDS: Mediterranean Diet Score

MRM: Magnetic Resonance Microscopy

NAD(P)H: Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate)

NF- κ B: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NK cells: Natural Killer cells

Nrf2: Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2

PBS-T: Phosphate Buffered Saline with Tween

PI: Propidium Iodide

Prx: PeroxiRedoxin

ROS: Reactive Oxygen Species

RosA: Rosmarinic Acid

RosA-Ph A: Rosmarinic Acid Phenethyl Amide

RosA-Ph E: Rosmarinic Acid Phenethyl Ester

RosA-Pr A: Rosmarinic Acid Propyl Amide

RosA-Pr E: Rosmarinic Acid Propyl Ester

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SIH: Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone

SOD: Superoxide Dismutase

T cells: T lymphocyte

TEMED: Tetramethylethylenediamine

TGF- β 1 : Transforming Growth Factor beta 1

TLC: Thin-layer Chromatography

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha

UHPLC-MS/MS: Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometer

Δ .M.O.: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

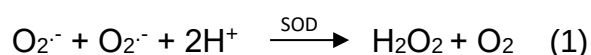
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες και Οξειδωτικό στρες

1.1.1 Ιστορική αναδρομή

Ο κλάδος της χημείας των ελευθέρων ριζών (free radicals), ήταν από παλιά αναπτυγμένος σε τομείς όπως η οργανική χημεία, οι βιομηχανίες χρωμάτων και πλαστικών, η συντήρηση τροφίμων κ.ά. Στις επιστήμες ζωής όμως, όπως η βιολογία και η ιατρική, η σπουδαιότητα των ελευθέρων ριζών, και ειδικά αυτών που προέρχονται από το οξυγόνο, εκτιμήθηκε μετά την ανακάλυψη ότι συμμετέχουν σε πάνω από 100 παθοφυσιολογικές καταστάσεις σε ανθρώπους, ζώα και φυτά (Halliwell and Gutteridge, 2007). Παραδείγματα αποτελούν οι αυτοάνοσες ασθένειες, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος και η ρευματοειδής αρθρίτιδα, οι ασθένειες Αλτσχάιμερ και Πάρκινσον, η επανοξυγόνωση μετά από μια περίοδο ισχαιμίας και πολλές ακόμα.

Η ανακάλυψη της οικογένειας των ενζύμων “δισμουτάσες του σουπεροξειδίου” (Superoxide Dismutase, SOD) από τους McCord και Fridovich το 1969, απέδειξε ότι η αναγωγή του οξυγόνου με ένα ηλεκτρόνιο και ο σχηματισμός του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) (αντίδραση 1) είναι αναμφισβήτητα συνδεδεμένα με τον αερόβιο καταβολισμό και οδήγησε σε ραγδαία αύξηση του ενδιαφέροντος για τη μελέτη των ελευθέρων ριζών στη Βιολογία και την Ιατρική (McCord and Fridovich, 1969).



Σημαντική συμβολή στην αναγνώριση του ρόλου των ελευθέρων ριζών στις βιοϊατρικές επιστήμες είχε και η χρήση ειδικών οργάνων (ηλεκτρονικοί

παραμαγνητικοί συντονιστές, EPR ή ESR), με τα οποία κατέστη δυνατή η άμεση ανίχνευσή τους.

Ο οργανισμός διαθέτει τόσο προοξειδωτικούς, όσο και αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Σε περιπτώσεις όπου διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ των εις βάρος του δεύτερου σκέλους, λόγω εξωγενών ή ενδογενών παραγόντων, προκαλείται το λεγόμενο Οξειδωτικό Στρες (Oxidative Stress), το οποίο συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις (Sies et al., 2015). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει γνωστό ότι εκτός από την τοξική τους δράση, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δράσουν και ως δεύτεροι διαμεσολαβητές σε πορείες μεταγωγής σημάτων (redox signaling). Όπως είναι εμφανές, είναι διττός λοιπόν ο ρόλος των ελευθέρων ριζών και αυτό που πρέπει να γίνει είναι να κατανοηθούν σε βάθος οι μηχανισμοί που διέπουν τη δράση τους και οδηγούν σε παθολογικές καταστάσεις, προκειμένου να γίνει θεραπεία ή αποτροπή εμφάνισής τους (Jones et al., 2015).

1.1.2 Ελεύθερες ρίζες

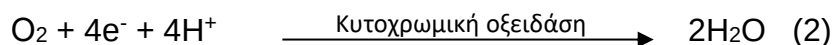
Ελεύθερη ρίζα (free radical) ονομάζεται κάθε άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στις εξωτερικές του στιβάδες, σε αντίθεση με τις μη-ελεύθερες ρίζες, οι εξωτερικές στιβάδες των οποίων καλύπτονται από ζεύγη ηλεκτρονίων με αντίθετη στροφορμή (spin). Η προέλευση των ελευθέρων ριζών μπορεί να είναι είτε από αντιδράσεις οξειδοαναγωγής (ανταλλαγή ηλεκτρονίων), είτε από ομολυτική διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού. Οι σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες, λόγω της τάσης που έχουν τα ασύζευκτα ηλεκτρόνιά τους να αποσπούν ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο προκειμένου να συμπληρώσουν την ηλεκτρονιακή τους στιβάδα, είναι συνήθως εξαιρετικά δραστικές και αντιδρούν με οτιδήποτε βρεθεί δίπλα τους τη στιγμή του σχηματισμού τους. Παραδείγματα αποτελούν οι ρίζες του υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) και του χλωρίου ($\text{Cl}\cdot$), οι οποίες είναι πάρα πολύ δραστικές. Υπάρχουν όμως και ελεύθερες ρίζες που είναι λιγότερο δραστικές, όπως οι περόξυ ($\text{R-COO}\cdot$) και οι αλκόξυ-ρίζες ($\text{R-CO}\cdot$), ενώ το ανιόν του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$) και το μονοξειδίο

του αζώτου ($\text{NO}\cdot$) είναι ακόμα λιγότερο δραστικές. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι μία από τις σταθερές ρίζες.

1.1.3 Δραστικές μορφές οξυγόνου

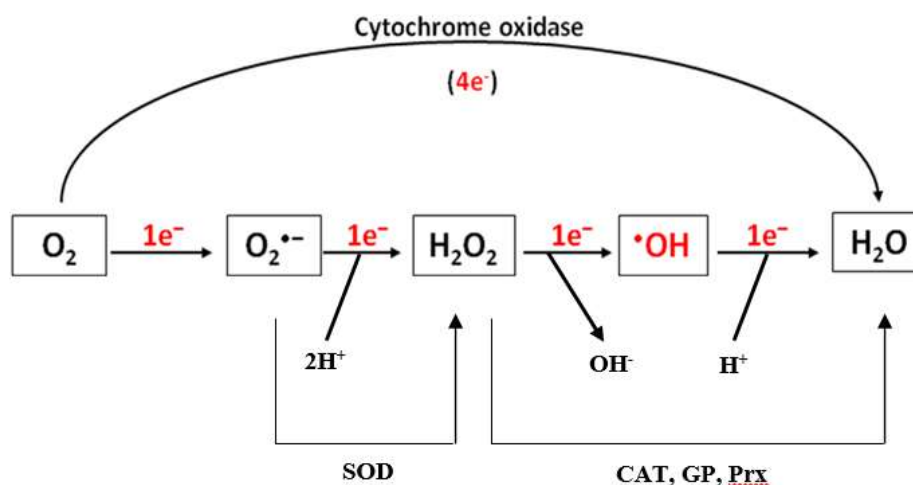
Με την εμφάνιση του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα, πριν από περίπου 2,5 δισεκατομμύρια χρόνια, υπήρξε σταδιακή μετατροπή των αναερόβιων συνθηκών σε αερόβιες, γεγονός το οποίο είχε ως συνέπεια την εξελικτική ανάπτυξη μηχανισμών προστασίας απέναντι στην τοξικότητα του O_2 . Η χρησιμοποίησή του από τους οργανισμούς ως τελικό αποδέκτη των ηλεκτρονίων από τις οξειδωτικές διαδικασίες του καταβολισμού, επέτρεψε την αποδέσμευση και εκμετάλλευση της μέγιστης δυνατής ενέργειας από τις τροφές. Ωστόσο, παρά την αναγκαιότητά του για την ύπαρξη της ζωής, το οξυγόνο λόγω της ικανότητας του να ανάγεται με μονά ηλεκτρόνια σε συνδυασμό με την αφθονία στην οποία βρίσκεται, το καθιστούν τον πιο σημαντικό παράγοντα δημιουργίας ελευθέρων ριζών στις αερόβιες μορφές ζωής (Bruyninckx et al., 1978, Shigenaga et al., 1994).

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το μοριακό οξυγόνο (O_2) με την πρόσληψη 4 ηλεκτρονίων ανάγεται σε δύο μόρια ύδατος, μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο «κυτοχρωμική οξειδάση», ένζυμο που αποτελεί το τελευταίο σύμπλοκο στην ακολουθία των πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας (αντίδραση 2):



Το ενζυμικό σύμπλοκο της κυτοχρωμικής οξειδάσης λόγω της ειδικής δομής που έχει (2 μόρια αίμης και 2 άτομα χαλκού στο ενεργό του κέντρο), μεταφέρει ταυτόχρονα και τα τέσσερα ηλεκτρόνια στο οξυγόνο, πριν ακόμα τα τελικά προϊόντα της αντίδρασης (δύο μόρια ύδατος), αφεθούν ελεύθερα. Κατά τη μεταφορά των ηλεκτρονίων δια μέσου της αναπνευστικής αλυσίδας σχηματίζεται ένα ηλεκτροχημικό δυναμικό, λόγω της μεταφοράς των πρωτονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα στο διαμεμβρανικό χώρο. Μια ειδική

πρωτεΐνη, η λεγόμενη ΑΤΡάση των μιτοχονδρίων (σύμπλοκο V), χρησιμοποιεί το δυναμικό αυτό για τη φωσφορυλίωση του ADP και το σχηματισμό ATP. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται η κατανάλωση του μεγαλύτερου ποσοστού, περίπου 85% με 90%, του προσλαμβανόμενου οξυγόνου από τον οργανισμό. Το μεγαλύτερο μέρος του οξυγόνου που δε χρησιμοποιείται στα μιτοχόνδρια (10-15%), συμμετέχει σε αντιδράσεις οι οποίες καταλύονται από τις οξειδάσες (D-άμινο-οξειδάση, οξειδάση της ξανθίνης κ.ά.), τις υδροξυλάσες (λυσίνης, προλίνης και τυροσίνης), καθώς και από διάφορες μονοξυγονάσες (κυτοχρώματα P-450). Ένα μικρό ποσοστό του οξυγόνου όμως, περίπου 0,2% έως 2%, που καταναλώνεται στα μιτοχόνδρια, ανάγεται ακόμα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες με διαδοχικά μονά ηλεκτρόνια, δίνοντας μια σειρά από παραπροϊόντα (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Διαγραμματική απεικόνιση των διαδοχικών βημάτων αναγωγής του οξυγόνου σε νερό με μονά ηλεκτρόνια.

Το αναγωγικό περιβάλλον, το οποίο επικρατεί στα κύτταρα, προσφέρει αρκετές δυνατότητες δημιουργίας αυτών των παραπροϊόντων, δηλαδή του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$), του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και της εξαιρετικά δραστηκής ρίζας του υδροξυλίου ($\cdot OH$). Και οι τρεις αυτές ενώσεις του οξυγόνου είναι δυνατόν να συμμετέχουν σε τοξικές για το κύτταρο αντιδράσεις και για το λόγο αυτό ονομάζονται Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Δ.Μ.Ο.) (Reactive Oxygen Species, ROS). Οι Δ.Μ.Ο. μπορούν να θεωρηθούν

κανονικά προϊόντα της καθημερινής αερόβιας ζωής. Ωστόσο, αυξημένη παραγωγή αυτών των ενδιάμεσων μορφών της αναγωγής του οξυγόνου θεωρείται η αιτία της δημιουργίας πολλών παθολογικών καταστάσεων στους αερόβιους οργανισμούς (McCord, 1974, Fridovich, 1999, Ames et al., 1983, Griendling et al., 1999). Στον πίνακα 1 αναφέρεται μια σειρά από ενώσεις του O_2 , οι οποίες κατατάσσονται στην κατηγορία των Δ.Μ.Ο.. Θα πρέπει να σημειωθεί όμως, ότι μόνο μερικές από αυτές είναι ελεύθερες ρίζες, σύμφωνα με το ορισμό που αναφέρθηκε παραπάνω.

Ένωση	Όνομα
Ελεύθερες ρίζες	
$O_2^{\cdot -}$	Ανιόν σουπεροξειδίου
$HO_2^{\cdot}$	Υδροϋπεροξειδική ρίζα
$\cdot OH$	Ρίζα υδροξυλίου
$RO^{\cdot}$	Ρίζα αλκοξειδίου
$ROO^{\cdot}$	Ρίζα υπεροξειδίου
Μη-ελεύθερες ρίζες	
H_2O_2	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
$ROOH$	Οργανικά υπεροξείδια
1O_2	Μονήρες οξυγόνο
O_3	Όζον
$HOCl$	Υποχλωριώδες οξύ

Πίνακας 1. Αντιπροσωπευτικές Δραστικές Μορφές Οξυγόνου.

Επίσης, θα πρέπει να τονιστεί ότι η συνεχής συσσώρευση Δ.Μ.Ο. θα ήταν καταστρεπτική για τα κύτταρα και κατ' επέκταση για κάθε μορφή ζωής. Για να μπορέσουν να επιβιώσουν οι οργανισμοί, χρειάζονται ενζυμικά συστήματα, ικανά να απομακρύνουν συνεχώς τις σχηματιζόμενες Δ.Μ.Ο.. Οι διάφορες

δισμουτάσες του σουπεροξειδίου (SOD), οι οποίες απαντώνται σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς, αποτελούν ένα σύστημα απομάκρυνσης του ανιόντος του σουπεροξειδίου (McCord et al., 1969). Η απομάκρυνση, όμως, του ανιόντος του σουπεροξειδίου συνεπάγεται τη δημιουργία H_2O_2 , το οποίο πρέπει επίσης να απομακρυνθεί. Αυτό επιτυγχάνεται με τρεις οικογένειες ενζύμων: α) τις καταλάσες (CAT), β) τις υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GP) και γ) τις περόξυ-ρεδοξίνες (Prx). Όλα αυτά τα ένζυμα έχουν τη δυνατότητα, να ανάγουν το H_2O_2 με δύο ηλεκτρόνια σε H_2O , παρακάμπτοντας με αυτόν τον τρόπο τη δημιουργία των εξαιρετικά δραστικών ριζών του υδροξυλίου (Chance et al., 1979, Wood et al., 2003).

1.1.4 Οξειδωτικό στρες

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, τα ενδοκυττάρια αντιοξειδωτικά συστήματα, που αναφέρθηκαν και πιο πάνω, εξισορροπούν κατά κανόνα την παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου στους αερόβιους οργανισμούς. Όταν η ισορροπία ανάμεσα στους οξειδωτικούς παράγοντες και την αντιοξειδωτική άμυνα διαταράσσεται σημαντικά υπέρ του πρώτου σκέλους, προκαλείται βλάβη των κυτταρικών συστατικών και το κύτταρο εισέρχεται σε μια κατάσταση την οποία ονομάζουμε «οξειδωτικό στρες» (Oxidative Stress) (Sies, 2015). Ανάλογα με την ένταση του οξειδωτικού στρες, οι επιδράσεις που μπορεί να έχει στις διάφορες λειτουργίες του κυττάρου μπορεί να διαφέρουν, οδηγώντας ακόμα και στον κυτταρικό θάνατο, όταν τα επίπεδα αυτής της έντασης είναι πολύ υψηλά.

Σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει, το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε πληθώρα ασθενειών. Οι ελεύθερες ρίζες, οι οποίες δημιουργούνται, δρουν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως οι ασθένειες Parkinson και Alzheimer (Coyle et al., 1993, Lyras et al., 1997), η δημιουργία αθηρωματώδους πλάκας (Parthasarathy et al., 1992, Steinberg, 1997), η επανοξυγόνωση μετά από μια περίοδο ισχαιμίας (McCord et al., 1994) κ.ά. Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στις διαδικασίες μεταγωγής του σήματος στα κύτταρα, ως δεύτεροι αγγελιοφόροι (signal

transduction) και με αυτόν τον τρόπο έχουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση (Kensler et al., 1986, Gower, 1998) στο AIDS (Westendorp et al., 1995), καθώς και στη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Chandra et al., 2000).

1.1.4.1 Βλαπτικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στα βιολογικά μακρομόρια

Όταν στο κύτταρο επικρατεί η κατάσταση του οξειδωτικού στρες, τότε δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν τροποποιήσεις σε όλα τα βασικά κυτταρικά συστατικά. Οξειδωτικές τροποποιήσεις βασικών κυτταρικών συστατικών όπως είναι το DNA, οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια κ.ά. μπορεί να έχουν τόσο σοβαρές επιπτώσεις, ώστε να επιφέρουν ακόμα και τον θάνατο.

Η πρώτη δραστική μορφή οξυγόνου που δημιουργείται συνήθως είναι το ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), που μετατρέπεται σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), μέσω της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου (SOD). Επίσης, αρκετά ένζυμα, όπως η μονοάμινο οξειδάση στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, οι οξειδάσες του ουρικού και των D-αμινοξέων παράγουν απευθείας H_2O_2 με μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο οξυγόνο. Η ποσότητα του H_2O_2 στα κύτταρα κυμαίνεται μεταξύ 10^{-8} - 10^{-7} M (Boveris et al., 1973). Ωστόσο, ούτε το ανιόν του σουπεροξειδίου, ούτε το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι ισχυρά οξειδωτικά μέσα, δηλαδή οξειδώνουν μικρό ποσοστό ενδοκυττάρων συστατικών.

1.1.5 Σίδηρος και οξειδωτικό στρες

Ο H.J.H. Fenton περιέγραψε για πρώτη φορά το 1894 την αντίδραση μεταξύ του H_2O_2 και του δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) και τη δημιουργία ενός ισχυρού οξειδωτικού παράγοντα. Αργότερα αποσαφηνίστηκε ότι ο παράγοντας αυτός

ήταν η ρίζα του υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) και η όλη αντίδραση ονομάστηκε «αντίδραση Fenton» (3) (Fenton, 1894):



Στην αντίδραση αυτή εμπλέκονται και άλλα ενδιάμεσα στάδια, αλλά τελικά καταλήγει στη δημιουργία της εξαιρετικά δραστικής ρίζας του υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$). Οι ρίζες υδροξυλίου, λόγω της μεγάλης δραστικότητας που έχουν, αντιδρούν μη εξειδικευμένα με οτιδήποτε βρεθεί δίπλα τους τη στιγμή του σχηματισμού τους. Κατ' αυτόν τον τρόπο, μπορούν να οξειδώσουν οποιοδήποτε ενδοκυττάριο κυτταρικό συστατικό και να προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες στο DNA, λιπιδιακή υπεροξείδωση σε λιπίδια (Chevion, 1988, Halliwell et al., 1990, Meneghini, 1997, Stohs et al., 1995) και αν η παραγωγή τους είναι συνεχής μπορούν να οδηγήσουν ακόμα και στον κυτταρικό θάνατο (Chandra et al., 2000, Antunes et al., 2001). Ένα παράδειγμα αποτελεί η πρόκληση των σχάσεων του DNA λίγα λεπτά μετά την προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου. Το DNA είναι γνωστό ότι έχει την ικανότητα δέσμευσης ιόντων σιδήρου, όπως και χαλκού (Halliwell et al., 1999). Έτσι, με την προσθήκη H_2O_2 , αυτό αλληλεπιδρά με τα ιόντα σιδήρου που βρίσκονται συνδεδεμένα στο DNA, με αποτέλεσμα την παραγωγή $\cdot\text{OH}$, οι οποίες στη συνέχεια προκαλούν οξειδωτικές βλάβες στο DNA (Chevion et al., 1988, Henle et al., 1999).

Παρόλα αυτά, υπάρχουν και άλλα μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο χαλκός που μπορούν να καταλύσουν την αντίδραση Fenton. Ωστόσο, ο ενδοκυττάριος καταλυτικά ενεργός σίδηρος έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί τον βασικό καταλύτη της παραπάνω αντίδρασης. Αυτό το συμπέρασμα στηρίζεται και από έρευνες που έχουν γίνει, όπου δέσμευση των ενδοκυττάρων ιόντων σιδήρου οδηγεί σε προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου (Barbouti et al., 2001, Doulias et al., 2003, Melidou et al., 2005).

1.1.5.1 Καταλυτικά ενεργός σίδηρος

Ο σίδηρος αποτελεί ένα στοιχείο απαραίτητο για τη ζωή, καθώς αποτελεί βασικό παράγοντα για την πραγματοποίηση πολλών βασικών κυτταρικών λειτουργιών στον ανθρώπινο οργανισμό. Ωστόσο, είναι ικανός να οδηγήσει και σε πολύ βλαπτικές επιδράσεις για το κύτταρο. Ο διπλός αυτός ρόλος που έχει οφείλεται στην ιδιότητά του να μεταβάλλει με ευκολία την οξειδωτική του κατάσταση μέσω πρόσληψης ή απόδοσης ηλεκτρονίων.

Ο όρος «καταλυτικά ενεργός σίδηρος» (Labile Iron, LI) προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Greenberg και Wintrobe το 1946 (Greenberg and Wintrobe, 1946). Έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης και άλλοι όροι, όπως «ελεύθερος σίδηρος», «σίδηρος χαμηλού μοριακού βάρους» κ.ά.

Ο καταλυτικά ενεργός σίδηρος φυσιολογικά βρίσκεται χαλαρά συνδεδεμένος σε διάφορες ακαθόριστες θέσεις μέσα στο κύτταρο. Ο εντοπισμός του είναι δύσκολος, η ύπαρξη του όμως έχει αποδειχθεί μέσω δέσμευσης από διάφορα φθορίζοντα σιδηροδεσμευτικά, όπως η καλσεΐνη. Ο καταλυτικά ενεργός σίδηρος, τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί πολύ και έχει αποδειχθεί ότι βρίσκεται και στα μιτοχόνδρια, στα λυσοσωμάτια, καθώς και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Eaton et al., 2002, Tenopoulou et al., 2007). Η ρύθμισή του αποτελεί βασικό μέλημα του κυττάρου, καθώς η συνεισφορά του στην παραγωγή των εξαιρετικά δραστικών ριζών του υδροξυλίου μπορεί να οδηγήσει ακόμα και στον θάνατο του κυττάρου (Gutteridge et al., 2000). Για το λόγο αυτό, το κύτταρο έχει αναπτύξει μοριακούς μηχανισμούς ρύθμισης της ομοιόστασης του σιδήρου, τόσο σε συστημικό (μέσω της ηπατιδίνης), όσο και σε κυτταρικό επίπεδο (μέσω των πρωτεϊνών-ρυθμιστών του σιδήρου, IRPs) (Kakhlon et al., 2002, Petrat et al., 2002).

Υπάρχουν παθολογικές καταστάσεις υπερσιδήρωσης, όπου ο καταλυτικά ενεργός σίδηρος βρίσκεται σε πολύ υψηλό επίπεδο. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η δέσμευσή του είναι αποφασιστικής σημασίας για την προστασία των κυτταρικών συστατικών από ανεξέλεγκτες οξειδώσεις. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται διάφορες σιδηροδεσμευτικές ενώσεις, οι οποίες μπορούν να δεσμεύσουν τον σίδηρο ή ακόμα και να τον απομακρύνουν από την αρχική τους θέση. (Barbouti et al., 2001, Melidou et al., 2005).

1.2 Διατροφή και υγεία

Ο όρος διατροφή αναφέρεται στη διαδικασία με την οποία το σώμα προσλαμβάνει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά μέσω των τροφίμων, προκειμένου να διατηρηθεί τόσο η δομική όσο και η λειτουργική του ακεραιότητα (Walsh et al., 2007). Ήδη από την αρχαιότητα είχε καταστεί σαφές ότι η διατροφή κατέχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ανθρώπινης υγείας. Αρκετοί Έλληνες ιατροί όπως ο Ιπποκράτης, ο Γαληνός και ο Διοσκουρίδης προσπάθησαν να καταδείξουν τη σπουδαιότητα της σχέσης μεταξύ της διαίτας και της υγείας στον άνθρωπο.

Η ανθρώπινη υγεία καθορίζεται από την αλληλεπίδραση της γενετικής προδιάθεσης του εκάστοτε ατόμου και από την πληθώρα των παραγόντων που σχετίζονται με το περιβάλλον και τον τρόπο ζωής. Μπορεί το ανθρώπινο γενετικό προφίλ να μην έχει αλλάξει ιδιαίτερα τα τελευταία 10.000 χρόνια, οι διατροφή όμως και η φυσική δραστηριότητα των ανθρώπων έχουν αλλάξει δραματικά. Ο σύγχρονος τρόπος ζωής, ιδιαίτερα όσον αφορά τα αστικά κέντρα, χαρακτηρίζεται κυρίως από την αύξηση της προσλαμβανόμενης τροφής, την αύξηση της καθιστικής ζωής, τη μείωση της φυσικής δραστηριότητας, την αυξημένη πρόσληψη κεκορεσμένων λιπαρών οξέων, καθώς και τη μειωμένη κατανάλωση υδατανθράκων, φυτικών ινών, ασβεστίου, φρούτων και λαχανικών (Eaton, et al, 1985, Simopoulos, et al, 1991, Simopoulos, et al, 2001). Για την καλύτερη κατανόηση της σχέσης που υπάρχει ανάμεσα στην ανθρώπινη διατροφή και την εμφάνιση πολλών ασθενειών πραγματοποιούνται για δεκαετίες πολλές μελέτες από πολλές ομάδες επιστημόνων.

Μία από τις πρώτες επιστημονικές μελέτες της συσχέτισης μεταξύ διατροφής και υγείας που έγιναν είναι η λεγόμενη μελέτη των «επτά χωρών». Ονομάστηκε έτσι γιατί η συγκεκριμένη μελέτη έγινε σε 18 περιοχές επτά χωρών (Ηνωμένες Πολιτείες, Ιταλία, Ιαπωνία, Ολλανδία, Ελλάδα, πρώην Γιουγκοσλαβία και Φιλανδία) από τον Αμερικανό φυσιολόγο Ancel Keys και την επιστημονική του ομάδα. Στη μελέτη αυτή, η οποία διήρκεσε από το 1958 έως το 1964, συμμετείχαν περίπου 13000 άνδρες, ηλικίας 40-59 ετών. Η έρευνα αυτή απέβλεπε στη μελέτη της σχέσης της διατροφής με τη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και εγκεφαλικών (Keys, et al, 1986). Τα

αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι οι κάτοικοι των χωρών που βρέχονταν από τη Μεσόγειο, και ιδιαίτερα της Κρήτης και της νότιας Ιταλίας, παρουσίαζαν τα μικρότερα ποσοστά συνολικής νοσηρότητας και θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα και καρκίνο. Επίσης, μέσω της έρευνας αυτής κατέστη για πρώτη φορά γνωστή τόσο η ύπαρξη όσο και η σπουδαιότητα της μεσογειακής δίαιτας. Έκτοτε, πληθώρα μελετών έχουν συσχετίσει τη διατροφή με την ανθρώπινη θνησιμότητα, καθώς και την εμφάνιση ασθενειών όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο διαβήτης, ο καρκίνος κ.α. (Willet et al., 1993, Trichopoulou et al., 1995, Jacques et al., 2001, Riboli et al., 2002).

1.2.1 Η Μεσογειακή Διατροφή

Ως Μεσογειακή διατροφή ορίζονται οι διατροφικές συνήθειες των πληθυσμών των ελαιοπαραγωγικών περιοχών της μεσογειακής λεκάνης κατά τη δεκαετία του 1960. Η παραδοσιακή Μεσογειακή διατροφή δημιουργήθηκε σε βάθος χρόνου στη Μεσόγειο, μέσω των κλιματικών και κοινωνικο-οικονομικών συνθηκών που επικρατούσαν. Στην πραγματικότητα δεν υπάρχει μία, αλλά πολλές Μεσογειακές Δίαιτες, οι οποίες αποτελούν το εκάστοτε διατροφικό μοντέλο που ακολουθούσαν οι πληθυσμοί που κατοικούσαν σε περιοχές γύρω από τη Μεσόγειο στις αρχές της δεκαετίας του 1960, όπως είναι η Κρήτη, άλλες περιοχές της Ελλάδας, η Ισπανία και η Νότια Ιταλία, περιοχές δηλαδή όπου ευδοκιμούν άφθονα ελαιόδεντρα (Simopoulos, 2001, Trichopoulou et al, 2000, Willet, 2006). Αν και υπάρχουν αρκετές διαφορές στις διατροφικές συνήθειες των Μεσογειακών λαών, υπάρχουν κάποια ιδιαίτερα γνωρίσματα τα οποία προσδίδουν ένα κοινό χαρακτήρα, ένα κεντρικό διατροφικό πρότυπο, τη Μεσογειακή διατροφή (Trichopoulou, et al, 1995).

Τα γενικά χαρακτηριστικά της μεσογειακής διατροφής αποτελούν η υψηλή κατανάλωση ελαιολάδου, μη επεξεργασμένων δημητριακών, λαχανικών, όσπριων και φρούτων, η μέτρια με υψηλή κατανάλωση ψαριών, η μέτρια κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων και αλκοόλ (κυρίως κόκκινου κρασιού) και η χαμηλή κατανάλωση κόκκινου κρέατος (Willett et al., 1993, Trichopoulou et al., 1995, 2003).

1.2.1.1 Συστατικά της Μεσογειακής διατροφής

Στη μεσογειακή δίαιτα έχει διαμορφωθεί ένα πρότυπο κατανάλωσης των διάφορων τροφών, μία “πυραμίδα”, που πρέπει να ακολουθείται για να υπάρχουν οι ευεργετικές ιδιότητες του συγκεκριμένου προτύπου διατροφής (Εικόνα 2). Σημαντική θέση στην πυραμίδα της μεσογειακής διατροφής κατέχουν τροφές με υψηλές ποσότητες φυτικών ινών, δηλαδή τα αμυλούχα τρόφιμα, τα φρούτα, τα λαχανικά και τα όσπρια. Επίσης, τα φρούτα και τα λαχανικά είναι πλούσια σε βιταμίνες, όπως η βιταμίνη C και η βιταμίνη E. Η κατανάλωση αυτών των τροφίμων συσχετίζεται αντίστροφα με την εκδήλωση καρδιαγγειακών παθήσεων. (Anderson et al., 1994, Koushik, et al, 2007, WCRF, 2007).

Το ελαιόλαδο αποτελεί το κύριο συστατικό την μεσογειακής διατροφής. Χαρακτηρίζεται από την υψηλή του περιεκτικότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και σε φαινολικές ενώσεις, οι οποίες έχει προταθεί ότι έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την εξέλιξη του κύκλου ζωής και την απόπτωση (Corona, et al, 2009).

Το τρόφιμο με τη μικρότερη κατανάλωση μηνιαίως, που βρίσκεται στην υψηλότερη θέση της πυραμίδας, είναι το κρέας με τα προϊόντα που παράγονται από αυτό. Η υψηλή κατανάλωση κόκκινου κρέατος μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε χοληστερόλη και κορεσμένα λιπαρά οξέα. Επίσης, υπάρχει αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου. Για το λόγο αυτό, ενδείκνυται η κατανάλωση ψαριών, τα οποία είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα ω-3 λιπαρά οξέα. (Kushi et al., 1995).

Επίσης, στη μεσογειακή διατροφή ενδείκνυται η κατανάλωση μέτριας ποσότητας αλκοόλ, όπως κρασί, μπίρα κ.ά. Το κρασί συγκεκριμένα, περιέχει υψηλό ποσοστό πολυφαινολών και κατ' επέκταση φαινολικών οξέων, τα οποία έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. (Moore & Pearson, 1986).



Εικόνα 2. Η πυραμίδα της Μεσογειακής διατροφής.

Συμπερασματικά, η μεσογειακή δίαιτα χαρακτηρίζεται από χαμηλή περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα και πρόσληψη λίπους, ενώσεις που σε υψηλή κατανάλωση οδηγούν τον ανθρώπινο οργανισμό σε παθολογικές καταστάσεις, όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, καρκίνο κ.ά. (Simopoulos, et al, 2001, Trichoroulou, et al, 2000, Willet, et al, 2006; Tyrovolas, et al, 2010). Μελέτες αποκαλύπτουν ότι η υιοθέτηση της Μεσογειακής διαίτας μπορεί να μειώσει σε σημαντικό βαθμό το κίνδυνο συνολικής θνησιμότητας και

νοσηρότητας από καρκίνο, γεγονός που αποδεικνύει τη σπουδαιότητα του συγκεκριμένου προτύπου διατροφής (Sofi, et al, 2008). .

1.2.1.2 Ελληνική παραδοσιακή διατροφή

Η ελληνική παραδοσιακή διατροφή, σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει, αποτελεί χαρακτηριστικό πρότυπο της Μεσογειακής διατροφής. Πιο συγκεκριμένα, σε μία από τις πρώτες κύριες μελέτες που έχουν γίνει, προκειμένου να αποτυπωθούν οι διατροφικές συνήθειες των Ελλήνων που κατοικούσαν στην Κρήτη, τη μελέτη του Ιδρύματος Rockefeller, αποδείχτηκε ότι για περίπου τέσσερις χιλιετίες, τα δημητριακά, οι ελιές, τα φρούτα, τα άγρια χόρτα , και σε πιο μικρές ποσότητες, το γάλα, τα ψάρια και το κρέας ήταν οι κυριότερες πηγές διατροφής (Allbaugh, et al, 1953). Επίσης, το ψωμί και το ελαιόλαδο κατέχουν κυρίαρχη θέση, ενώ η ενσωμάτωση της τομάτας και των διάφορων εσπεριδοειδών έγινε αργότερα. Η κατανάλωση των γλυκών γινόταν πολύ σπάνια.

Η Ορθόδοξη Χριστιανική νηστεία επηρέαζε τη διατροφή των πληθυσμών, σε πολύ σημαντικό βαθμό, από τη στιγμή που μόνο τα Χριστούγεννα, το Πάσχα και τον Αύγουστο, οι ημέρες της νηστείας έφταναν τις 100. Σε αυτές τις περιόδους, τα τρόφιμα τα οποία καταναλώνονταν συνήθως ήταν οι ελιές, το ψωμί, τα όσπρια, τα λαχανικά, ο χαλβάς, τα μαλακόστρακα, το μέλι, τα φρούτα, το πετιμέζι και ο χαλβάς. Οι συνηθέστεροι μέθοδοι μαγειρέματος ήταν το βράσιμο και το μαγείρεμα σε κατσαρόλα και ο αριθμός των γευμάτων κυμαινόταν σε τρία έως τέσσερα, κατά μέσο όρο την ημέρα.

Οι μεταπολεμικές διατροφικές συνήθειες των κατοίκων της Κρήτης έχουν προταθεί από πολλούς μελετητές ως πρότυπο μελέτης της Μεσογειακής διατροφής, καθώς κατά την περίοδο εκείνη το προσδόκιμο ζωής αυτών των πληθυσμών ήταν πολύ υψηλό και η εμφάνιση χρόνιων ασθενειών όπως η στεφανιαία νόσος και ο καρκίνος σε πολύ χαμηλά ποσοστά (Nestle, et al, 1995, Willett, et al, 1995, Renaud, et al, 1995).

1.2.2 Μελέτες της Μεσογειακής διατροφής

Με την πάροδο των χρόνων μετά και την μελέτη των “επτά χωρών”, η οποία κατέδειξε τη σπουδαιότητα της Μεσογειακής διατροφής, πληθώρα μελετών έχουν γίνει, προκειμένου να διερευνηθεί η σχέση της Μεσογειακής διατροφής με τη μάστιγα των τελευταίων αιώνων, τον καρκίνο. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα κυριότερα ευρήματα των πιο σημαντικών μελετών που έχουν γίνει προς αυτή την κατεύθυνση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που έχουν εξαχθεί από τις μελέτες της σχέσης της Μεσογειακής διατροφής με τον καρκίνο, είναι εμφανές ότι πολλά χρόνια νοσήματα μπορούν να προληφθούν. Επίσης, δεν υπάρχει καμία αρνητική επίδραση της Μεσογειακής διατροφής κατά την ύπαρξη καρκίνου, ενώ αντιθέτως παρατηρείται προστατευτική επίδραση στη συνολική επίπτωση και θνησιμότητά του. Εξού και το γεγονός ότι οι μελέτες για την πρόληψη του καρκίνου έχουν τη βάση τους πια στη μελέτη διατροφικών προτύπων και όχι μεμονωμένων θρεπτικών συστατικών ή μεμονωμένων τροφίμων, όπως παλαιότερα (Markaki et al, 2003, WCRF, 2007).

Μελέτη	Χώρα	Έτος	N	Εύρος ηλικιών	Κύρια ευρήματα
Seven Countries study (Jansen et al, 1999; Panagiotakos et al, 2005)	Η.Π.Α., Ιταλία, Ιαπωνία, Κάτω Χώρες, Ελλάδα, Πρώην Γιουγκοσλαβία, Φιλανδία	1958-1964	12763, 100% άνδρες	40-59	Αύξηση της ημερήσιας κατανάλωσης διαιτητικών ινών συσχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο θνησιμότητας από κολοορθικό καρκίνο στην 25ετία, ενώ αύξηση της ημερήσιας κατανάλωσης κορεσμένων λιπών συσχετίστηκε με υψηλότερο κίνδυνο θνησιμότητας από καρκίνο του πνεύμονα στην 25ετία.
European trial for the risk of colorectal adenoma recurrence (Cottet et al, 2005)	Ευρώπη	1991-1994	442, 62,7% άνδρες	35-75	Μείωση της επανεμφάνισης αδενωμάτων.
EPIC study (Trichopoulou et al, 2002; Benetou et al, 2008; Buckland et al, 2010; Cottet et al, 2005)	Ευρώπη	1992-2000	519978, 27,8% άνδρες	20+	Συσχέτιση της ΜΔ με μειωμένη θνησιμότητα και νοσηρότητα από καρκίνο στην ελληνική μελέτη της EPIC. Συνολικά υπήρχε αντίστροφη συσχέτιση της ΜΔ με τον καρκίνο του στομάχου, ενώ στη γαλλική μελέτη σχετίστηκε αντίστροφα με την εμφάνιση καρκίνου του μαστού.
Minnesota Breast Cancer Family study (Tseng et al, 2008)	Η.Π.Α.	1990	1286, 0% άνδρες	45-69	Η ΜΔ και το ποσοστό πυκνότητας του μαστού σχετίζονται αντίστροφα σε καπνιστές, αλλά όχι σε μη καπνιστές.
NIH-AARP Diet and Health Study (Reedy et al, 2008; Mitrou et al, 2007)	Η.Π.Α.	1995	492382, 59,6% άνδρες	50-69	Συσχέτιση ΜΔ με μειωμένη συνολική θνησιμότητα από καρκίνο και μειωμένη επίπτωση κολοορθικού καρκίνου.

Πίνακας 2. Συνοπτική παρουσίαση των προοπτικών μελετών αξιολόγησης του ρόλου της Μεσογειακής διαίτας (ΜΔ) στην επιδημιολογία του καρκίνου.

Μειονέκτημα τέτοιου μεγέθους κλίμακας ερευνών αποτελεί τόσο η ετερογένεια των πληθυσμών, όσο και η ετερογένεια των διατροφικών δεικτών που χρησιμοποιούνται. Υπάρχουν τέσσερις βασικοί διατροφικοί δείκτες, από τους οποίους προκύπτουν οι υπόλοιποι πραγματοποιώντας κάποιες τροποποιήσεις σε αυτούς (Waijers et al, 2007). Οι δείκτες αυτοί είναι: ο Diet Quality Index (DQI) (Patterson et al, 1994), ο Healthy Eating Index (HEI) (Kennedy et al, 1995), ο Mediterranean Diet Score (MDS) (Trichopoulou et al, 1995) και ο Healthy Diet Indicator (HDI) (Huijbregts et al, 1997). Στους δείκτες αυτούς οι διαφορές που παρατηρούνται αφορούν τον αριθμό και τα τρόφιμα που περιέχουν, καθώς και το εύρος τιμών της συνολικής βαθμολόγησης (Waijers et al, 2007, Fransen and Ocké, 2008, Kourlaba and Panagiotakos, 2009).

Το γεγονός ότι δεν υπάρχει μόνο μία, αλλά πολλές παραλλαγμένες “εκδοχές” της Μεσογειακής διατροφής, αποτελεί έναν περιορισμό στην προσπάθεια μιας συνολικής μελέτης του συγκεκριμένου τύπου διατροφής. Επίσης, η ύπαρξη των πολλών διατροφικών δεικτών είναι ικανή να αλλάζει την ισχύ των συσχετίσεων που γίνονται από τους διάφορες μελετητές. Για το λόγο αυτό, απώτατο στόχο θα αποτελούσε η δημιουργία ενός αξιόπιστου διατροφικού δείκτη για την πρόβλεψη της εμφάνισης καρκίνου σε συγκεκριμένη περιοχή.

Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να γίνει προσπάθεια για πραγματοποίηση μελετών διερεύνησης της επίδρασης της Μεσογειακής διατροφής, με την προϋπόθεση ότι λαμβάνονται υπόψη όλες οι επιμέρους παράμετροι και ο σωστός ανά περίπτωση διατροφικός δείκτης, προκείμενου να λαμβάνονται έγκυρα και αξιόπιστα συμπεράσματα για την επίδραση της Μεσογειακής διατροφής στην επιδημιολογία παθολογικών καταστάσεων και ιδιαίτερα του καρκίνου.

Επίσης, προς το παρόν δεν είναι γνωστός ακόμα ο ακριβής μηχανισμός των βιοδραστικών ενώσεων που περιέχονται στη Μεσογειακή διατροφή μέσω του οποίου ασκούν την ευεργετική τους δράση. Οι βιοδραστικές ενώσεις όπως είναι πολύ πιθανό, δρουν συνεργιστικά μέσω ίσως ενός κοινού μηχανισμού, ο οποίος πρέπει να ανακαλυφθεί και να μελετηθεί διεξοδικά.

1.3 Αρωματικά φυτά

Στη Μεσογειακή δίαιτα τα αρωματικά φυτά κατέχουν σημαντικό ρόλο. Ο αριθμός τους φθάνει περίπου τα 18.000 από τα 350.000 διαφορετικά είδη φυτών που υπάρχουν παγκόσμια. Αποτελούν μία ομάδα, την αποκαλούμενη «Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά –ΑΦΦ» (Medicinal and Aromatic Plants – MAPs) (Schippmann et al., 2002). Ταξινομούνται σε πενήντα οικογένειες, παραδείγματος χάριν, Pinaceae, Geraniaceae, Asteraceae, Rutaceae, Apiaceae, Iridaceae, Lamiaceae, Rosaceae κ.ά. Στην Ελλάδα, από τα 6.000 διαφορετικά είδη φυτών που υπάρχουν τα 600, μεγάλος αριθμός σε σύγκριση με την υπόλοιπη Ευρώπη, ανήκουν στην κατηγορία ΑΦΦ. Αυτός ο μεγάλος αριθμός ΑΦΦ οφείλεται τόσο στη γεωγραφική θέση της χώρας μας, όσο και στις ευνοϊκές κλιματικές συνθήκες που επικρατούν.

Όλα τα ΑΦΦ περιέχουν αιθέρια έλαια, χαρακτηριστικό που τα ξεχωρίζει από τις άλλες κατηγορίες φυτών, προσδίδοντάς τους χαρακτηριστική οσμή. Η πρώτη ολοκληρωμένη μελέτη στην Ελλάδα, όσον αφορά τα ΑΦΦ, ανήκει στον Ιπποκράτη, ο οποίος το 400 π.Χ. περίπου, έγραψε μία λίστα με περισσότερα από 420 φυτά αυτής της κατηγορίας, που χρησιμοποιούνταν ως φάρμακα. Τα αρωματικά φυτά είναι γνωστό ότι από το παρελθόν χρησιμοποιούνταν σε φάρμακα, στο φαγητό ως καρυκεύματα, σε συμπληρώματα διατροφής, στο σπίτι ως εντομοαπωθητικά, σε βαφές, σε καλλυντικά, στην κτηνιατρική, στην ιατρική, στη γεωργία κ.ά. Έχει βρεθεί ότι περιέχουν πολλές πρωτεΐνες, βιταμίνες, μέταλλα και αντιοξειδωτικά συστατικά. Επίσης περιέχουν πληθώρα βιοδραστικών συστατικών σε μικρές ποσότητες, που αθροιστικά είναι ιδιαίτερα δραστικά. Συγκριτικά μεταξύ αυτών των βιοδραστικών συστατικών, οι φαινολικές ενώσεις έχει βρεθεί ότι ασκούν υψηλή βιολογική δράση (Carvalho Costa et al., 2015). Ωστόσο, όπως σε κάθε περίπτωση υπάρχει πάντα εκτός από την θετική και μία αρνητική πλευρά, έτσι και τα αρωματικά φυτά δεν είναι σωστά να καταναλώνονται σε πολύ υψηλές ποσότητες. Δεν πρέπει, δηλαδή, να γίνεται υπερκατανάλωσή τους. Για τον λόγο αυτό, από την 1η Μαΐου 2011 έχει τεθεί σε εφαρμογή η οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης με το όνομα Traditional Herbal Medicinal Products, THMPD Directive, η οποία θέτει όρους

και κανόνες για την απόκτηση άδειας κυκλοφορίας στην αγορά των φυτικών παραδοσιακών φαρμάκων.

Στην κατηγορία των αρωματικών φυτών ανήκουν και τα τρία φυτά που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία, το φασκόμηλο (*Salvia fruticosa*) η ρίγανη (*Origanum vulgare*) και το δενδρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*). Και τα τρία αυτά αρωματικά φυτά ανήκουν στην οικογένεια Lamiaceae (Labiatae), η οποία περιλαμβάνει περίπου 235 γένη και 7173 είδη και ευδοκιμούν κυρίως στη Μεσόγειο (Harley et al., 2004). Ερευνητικές μελέτες που έχουν γίνει, υποδεικνύουν ότι τα αιθέρια έλαια όπως και τα εκχυλίσματα των φυτών αυτής της οικογένειας έχουν αξιόλογη βιολογική δραστηριότητα (Scalbert et al., 2000) η οποία αποδίδεται κυρίως στις πολυφαινόλες (Stagos et al., 2012) που περιέχονται σε αυτά.

1.3.1 Φασκόμηλο - *Salvia officinalis* L. (οικ. Lamiaceae)

Το φασκόμηλο (Εικόνα 3) ανήκει στο γένος *Salvia* και είναι ένα από τα 23 είδη που υπάρχουν (Kintzios, 2000). Αποτελεί έναν μικρό, πολυετή, αειθαλή θάμνος. Το ύψος του συνήθως δεν ξεπερνά τα 70 cm και έχει βλαστό πολύκλαδο, με τετράγωνο σχήμα και χνουδωτό.



Εικόνα 3. Φασκόμηλο (*Salvia officinalis*).

Ανθίζει από το Μάιο έως τον Ιούνιο και απαντάται στην Ελλάδα, κατά μήκος των ακτών της Αδριατικής, στη Γαλλία, στη βόρεια και κεντρική Ισπανία, και στην Ιταλία. (Hedge, 1972, Wichtl, 1994, Mabberley, 1997, Οικονομίδη & Τζάκου, 2015).

Από το λατινικό ρήμα *salvare* που σημαίνει, θεραπεύω, σώζω, προέρχεται και η ονομασία *salvia* αυτού του γένους και ουσιαστικά περιγράφει την πληθώρα των θεραπευτικών του ιδιοτήτων (Blumenthal, 2000, Dweck, 2000). Το φασκόμηλο θεωρείται ότι καλλιεργήθηκε πρώτη φορά στην αρχαία Ελλάδα, θεωρούνταν το φυτό του Δία, και χρησιμοποιούνταν ως ιερό βότανο για τόνωση πνευματική και σωματική, καθώς και για την επούλωση πληγών και την αύξηση της γυναικείας γονιμότητας. Οι Λατινικές χώρες το θεωρούσαν φυτό της αθανασίας και το χρησιμοποιούσαν σε θρησκευτικές τελετές (Blumenthal, 2000). Ο Διοσκουρίδης και ο Γαληνός χρησιμοποιούσαν παρασκευάσματά του ως εμμηναγωγά, αιμοστατικά, τονωτικά και διουρητικά (Dweck, 2000). Το φασκόμηλο υποβοηθά την εξασθενημένη μνήμη και έχει αντιφλεγμονώδη δράση. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δρα ενάντια στη νόσο του Alzheimer και της φυσικής γήρανσης με αναστολή του ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση (AChE) που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα ακετυλοχολίνης (ACh) στον εγκέφαλο, βελτιώνοντας με αυτόν τον τρόπο τη λειτουργία του εγκεφάλου και τη μνήμη (Scholey et al., 2008, Engels, 2011 Wu et al., 2011, Obulescu et al., 2011). Επίσης, έχει την ικανότητα να αντιμετωπίζει τις λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού, καθώς και τα εξωτερικά εξανθήματα του επιχείλιου έρπητα (Scharowal et al., 2009, Engels, 2011).

Όσον αφορά τις βιοδραστικές ενώσεις που περιέχονται στο φασκόμηλο, σε αιθανολικά και ακετονικά εκχυλίσματά έχει βρεθεί σημαντική ποσότητα ροσμαρινικού οξέος καθώς και καφεϊκό οξύ, χλωρογενικό οξύ, λουτεολίνη, καρνοσικό οξύ, απιγενίνη, σινναμικό οξύ, φερουλικό οξύ, και κερκετίνη (Zimmermann et al., 2011, Cvetkovijk et al., 2013, Roby et al., 2013, Kaliora et al., 2014, Martins et al., 2015).

1.3.2 Ρίγανη - *Origanum vulgare* L. (οικ. Lamiaceae)

Η ρίγανη (Εικόνα 4) ανήκει στην ίδια οικογένεια με το φασκόμηλο, την Lamiaceae. Αποτελεί ένα πολυετές φυτό με ύψος που κυμαίνεται από 20 έως 50 εκατοστά και είναι φρυγανώδες φυτό με πολύ εύθραυστο, σκληρό και λεπτό βλαστό. Ανθίζει από το Μάιο έως τον Οκτώβριο και απαντάται στα Κανάρια νησιά, την Ευρώπη, τη Μαδέρα, τις Αζόρες και στη Δυτική και Κεντρική Ασία φθάνοντας μέχρι την Ταϊβάν. Τα ασβεστούχα κυρίως εδάφη είναι τα κατάλληλα για να μπορέσει να ευδοκιμήσει η ρίγανη, από τη θάλασσα έως τα ορεινά εδάφη. Υπάρχουν 6 υποείδη του, αλλά μόνο τα τρία ευδοκιμούν στην Ελλάδα. Η κατανομή τους στη χώρα μας εξαρτάται από τις κλιματικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε περιοχή (Kokkini, 1996).



Εικόνα 4. Ρίγανη (*Origanum vulgare*).

Από τις λέξεις «όρος» και «γάνος» προέρχεται η ονομασία του γένους *Origanum* και μεταφράζεται ως «ανανέωση του βουνού». Ο Διοσκουρίδης, ο οποίος είχε μελετήσει τη δράση της ρίγανης ανέφερε ότι διέθετε θερμαντικές και μαλακτικές ιδιότητες και την χρησιμοποιούσε ως αντίδοτο στο δηλητήριο από δαγκώματα ζώων. Επίσης, θεωρούσε ότι δρα ευεργετικά στο βήχα, σε στομαχικές διαταραχές, στην αντιμετώπιση αδυναμίας από κάποια ίωση κ.ά. (Wellman, 1958).

Η ευεργετική δράση της ρίγανης, η οποία δεν χρησιμοποιούνταν μόνο στο φαγητό, αλλά και ως συντηρητικό, οφείλεται τόσο στα εκχυλίσματά της, όσο και

στο αιθέριο έλαιό της, καθώς έχει βρεθεί ότι έχουν την ικανότητα να αναστέλουν την ανάπτυξη και τη δράση πολλών στελεχών μυκήτων και βακτηρίων, όπως *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula rubra*, κ.ά. και *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocitogenes*, κ.ά, αντίστοιχα. (Orhan et al., 2008, Sarikurkcu et al., 2015, De Sousa et al., 2013, Martins et al. 2014). Ιδιότητες που έχουν αποδοθεί στη ρίγανη περιλαμβάνουν αντιρευματικές, διουρητικές, αντιφλεγμονώδης, αντιεπιληπτικές, καθαρτικές, αντιψωριακές, εντεροχολαρωτικές, εμμηναγωγικές, ευστομαχικές, νημαδοκτόνες, και αντιαθηροσκληρωτικές ιδιότητες (Vanaclocha and Canigueral, 2003, Bakkali et al., 2008). Έχοντας όλες αυτές τις ευεργετικές για την υγεία του ανθρώπου ιδιότητες, η ρίγανη αποτελεί ένα από τα αρωματικά φυτά που παγκοσμίως έχει προσελκύσει ερευνητικά το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων, με αποτέλεσμα να ερευνάται σε μεγάλο επίπεδο.

Οι βιοδραστικές ενώσεις που έχουν βρεθεί σε εκχυλίσματα ρίγανης με οργανικούς διαλύτες είναι κυρίως το ροσμαρινικό οξύ, το ουρσουλικό οξύ, το φερουλικό οξύ, η απιγενίνη, το χλωρογενικό οξύ, η ταξιφολίνη, η ναρινγενίνη, το ολεανολικό οξύ, η εριοδικτυόλη κ.ά. (Agiomyrgianaki & Dais, 2012). Σε υδατικά εκχυλίσματα ρίγανης έχουν βρεθεί κυρίως οι ενώσεις ροσμαρινικό οξύ, πρωτοκατεχουικό οξύ, p-υδροβενζοϊκό οξύ, καφεϊκό οξύ, ολεανολικό οξύ, βανιλικό οξύ, φερουλικό οξύ, συρινγικό οξύ, p-κουμαρικό κξύ, ουρσουλικό οξύ, γλυκοζίτης της λουτεολίνης και της απιγενίνης κ.ά. (Martins et al., 2014).

1.3.3 Δεντρολίβανο - *Rosmarinus officinalis* L. (οικ. Lamiaceae)

Το δεντρολίβανο (Εικόνα 5) ανήκει όπως και τα δύο παραπάνω αρωματικά φυτά στην οικογένεια Lamiaceae. Αποτελεί έναν αειθαλή θάμνο, με ύψος που κυμαίνεται από μισό έως 2 μέτρα και ο βλαστός του είναι πολύκλαδος, ορθόκλαδος, με τετράγωνο σχήμα. Βγάζει πολλά άνθη μαζί όταν (Πολυσίου, 2002). Αποτελεί κοινό και πολύ γνωστό είδος φυτού της Μεσογείου και αναπτύσσεται πολύ εύκολα στο εύκρατο κλίμα πολλών περιοχών τόσο της Ευρώπης όσο και της Αμερικής, όπως και στη χώρα μας. Οι αρχαίοι Έλληνες

το χρησιμοποιούσαν ως θυμίαμα, σε θρησκευτικές τελετές, για να στολίζουν κτίρια και ναούς, καθώς και σε γιορτές. Η λατινική λέξη από την οποία προέρχεται το όνομά του είναι η λέξη *Rosmarinus* που σημαίνει «δροσιά από τη θάλασσα».



Εικόνα 5. Δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*).

Βιολογικές ιδιότητες που σχετίζονται με το δεντρολίβανο περιλαμβάνουν αντιφλεγμονώδεις, αντισηπτικές, αντισπασμωδικές και αντιρρευματικές ιδιότητες (Bult et al., 1985, Makino et al., 2000, Juhas et al., 2009, Beninca et al., 2011). Επίσης, έχει διερευνηθεί για αντικαταθλιπτικές, αντιδιαβητικές και ηπατοπροστατευτικές ιδιότητες με ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Sotelo-Felix et al., 2002, Bakirel et al., 2008, Machado et al., 2009). Κυρίως είναι γνωστό ότι δρα ως τονωτικό, διουρητικό, σπασμολυτικό, εμμηναγωγό και χολαγωγό.

Οι βιοδραστικές ενώσεις που έχουν βρεθεί σε εκχυλίσματα του φυτού με οργανικούς διαλύτες, ανήκουν κυρίως στα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα (Madsen και Bertelsen, 1995, Cuvelier et al., 1996, Zheng και Wang, 2001) και συγκεκριμένα, σε μεγαλύτερη ποσότητα βρίσκονται το ροσμαρινικό οξύ, το καρνοσικό οξύ, η ροσμαρόλη, η καρνοσόλη (Madsen και Bertelsen, 1995, Rice-Evans et al., 1997, Almela et al., 2006).

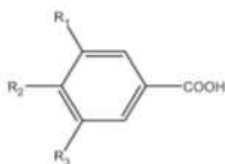
Και τα τρία παραπάνω αρωματικά φυτά, φασκόμηλο, ρίγανη και δεντρολίβανο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, όπως αναφέρθηκε, έχουν πολλές προστατευτικές βιολογικές ιδιότητες. Ωστόσο, ο ακριβής βιοχημικός μηχανισμός δράσης τους δεν είναι ακόμα γνωστός. Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν τα εκχυλίσματα των παραπάνω φυτών, καθώς και μεμονωμένα συστατικά τους, προκειμένου να διαλευκανθεί οι μοριακοί μηχανισμοί που θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στην προστατευτική τους δράση.

1.4 Φαινολικές ενώσεις - Πολυφαινόλες

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια μεγάλη και πολύπλοκη ομάδα χημικών συστατικών που έχουν βρεθεί στα φυτά και παράγονται από αυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες (Manach et al., 2004). Οι γνωστές πολυφαινόλες υπολογίζονται σήμερα σε περισσότερες από 8000. Βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ο αρωματικός δακτύλιος του βενζολίου στον οποίο συνδέονται μία ή περισσότερες υδροξυλικές ομάδες. Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς. (Manach et al., 2004).

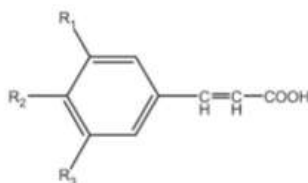
Τα φαινολικά οξέα, μία βασική κατηγορία των πολυφαινολών, βρίσκονται σε αφθονία στα φυτά. Υπάρχουν δύο κατηγορίες φαινολικών οξέων, τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και τα παράγωγα του κινναμικού οξέος (Εικόνα 6).

(a) Benzoic acids



Benzoic acid derivatives	Substitutions		
	R ₁	R ₂	R ₃
p-Hydroxybenzoic	H	OH	H
Protocatechuic	H	OH	OH
Vannilic	CH ₃ O	OH	H
Syringic	CH ₃ O	OH	H
Gallie	OH	OH	OH

(b) Cinnamic acids



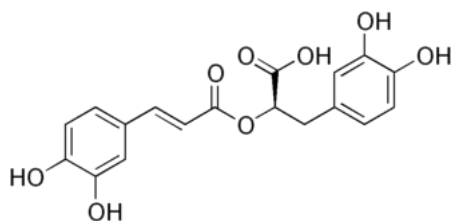
Cinnamic acid derivatives	Substitutions		
	R ₁	R ₂	R ₃
p-Coumaric	H	OH	H
Caffeic	OH	OH	H
Ferulic	CH ₃ O	OH	H
Sinapic	CH ₃ O	OH	CH ₃ O

Εικόνα 6. Χημικές δομές γνωστών (α) υδροξυβενζοϊκών και (β) υδροξυκινναμικών οξέων (Wang et al., 2013).

Στην κατηγορία των υδροξυβενζοϊκών οξέων ανήκουν το πρωτοκατεχοϊκό οξύ και το γαλλικό οξύ. Στην κατηγορία των υδροξυκινναμικών οξέων ανήκει το p-κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό, το φερουλικό, το ροσμαρινικό και τα σιναπικά οξέα. Τα υδροξυκινναμικά οξέα συναντούνται πιο συχνά από τα υδροξυβενζοϊκά οξέα. Εντοπίζονται σε πολλά φυτά, τόσο σε ελεύθερη μορφή, όσο και ως εστέρες, αλλά και ως γλυκοζίτες. Επίσης, εντοπίζονται και σε πολλά φρούτα και λαχανικά (Manach et al., 2004, Wang et al., 2013).

Τα τελευταία χρόνια οι πολυφαινόλες προσέλκυσαν το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών, καθώς επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν μία αρνητική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων ημερήσιας πρόσληψης των ενώσεων αυτών και εμφάνισης καρκίνου (Kaur et al., 2001). Μελέτες, όσο και κλινικές έρευνες τελευταίων ετών δείχνουν πως η χρήση φαρμακευτικών και διαφόρων φυτών, η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην πρόληψη καρκίνου και καρδιαγγειακών παθήσεων κυρίως λόγω της προστατευτικής δράσης των παραπάνω προϊόντων (Kinsella et al., 1993, Rice-Evans et al., 1996, Lionis et al., 1998, Trichopoulou et al., 2000, Moure et al., 2001). Η ικανότητά τους να προστατεύουν έναντι ασθενειών αποδίδεται σε ένα πλήθος δράσεων, οι οποίες βασίζονται στη χημική δομή τους. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν συσχετιστεί με τις ιδιότητες των παραπάνω είναι φαινολικά συστατικά (Pokorny, 1991, Rice-Evans et al., 1997). Λόγω λοιπόν της παρατηρούμενης ευεργετικής τους επίδρασης, αποφασίσαμε να μελετήσουμε ενώσεις που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία και οδηγηθήκαμε σε μια λεπτομερή μελέτη των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους έχουν την ικανότητα να δρουν οι ενώσεις αυτές, σε κύτταρα που εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες.

Συγκεκριμένα, για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ένα από τα πιο σημαντικά φαινολικά οξέα, το ροσμαρινικό οξύ (RA, Rosmarinic acid) (Εικόνα 7), το οποίο αποτελεί ένα υδροξυκινναμικό οξύ (Rossi et al., 2012).



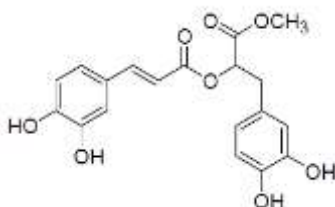
Εικόνα 7. Μοριακή δομή του ροσμαρινικού οξέος (RA).

Αποτελεί τον εστέρα του καφεϊκού οξέος με το 3,4-διϋδροξυφαινυλακτικό οξύ. Απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε πρώτη φορά από τους Scarpati και Oriente το 1958 στο δεντρολίβανο (*Rosmarinus officinalis*) (Scarpati and Oriente, 1958). Το ροσμαρινικό οξύ αποτελεί την κύρια ένωση στα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*, και κατ' επέκταση στο φασκόμηλο, τη ρίγανη και το δεντρολίβανο που μελετώνται στην παρούσα εργασία, με το μεγαλύτερο ποσοστό του να βρίσκεται στο δεντρολίβανο (Shan et al., 2005). Αποτελεί την ένωση του καφεϊκού οξέος με το 3,4-διϋδροξυφαινυλακτικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ προέρχεται από τη φαινυλαλανίνη ενώ το 3,4-διϋδροξυφαινυλακτικό οξύ από την τυροσίνη.

Το ροσμαρινικό οξύ αποτελεί μια ένωση υψηλής λιποφιλικότητας και μικρής υδροφιλικότητας με υψηλή διαλυτότητα σε οργανικούς διαλύτες (Petersen et al., 2009). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει βιολογικές δραστηριότητες και προστατευτικές επιδράσεις του ροσμαρινικού οξέος, συμπεριλαμβανομένης αντιβακτηριακής, αντιοξειδωτικής, αντικαρκινικής, αντι-φλεγμονώδους, ανοσορυθμιστικής δράσης κ.ά. (Chun et al., 2014, Alagawany et al., 2015). Υπάρχουν πολλά παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος που έχουν απομονωθεί από διάφορα φυτά (Satake et al., 1999). Τα πιο γνωστά αποτελούν το λιθοσπερμικό οξύ το οποίο σχηματίζεται από την ένωση του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος, και το λιθοσπερμικό οξύ B, το οποίο είναι ουσιαστικά ένα διμερές του ροσμαρινικού οξέος (Kelley et al., 1975, Tanaka et al., 1989). Και τα δύο έχουν αντιαποπρωτικές, αντιβακτηριακές και αντικαρκινικές ιδιότητες (Li et al., 2001, Luo et al., 2008, Yao et al., 2009, Hao et al., 2009).

Μια άλλη γνωστή για τη δράση της φυσική φαινολική ένωση του ροσμαρινικού οξέος είναι ο μέθυλο-εστέρας του ροσμαρινικού οξέος (RAME) (Εικόνα 8), ο οποίος συναντάται κυρίως στα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* και κυρίως στο δεντρολίβανο με αντιαλλεργικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες

(Amin et al., 2013, Zhu et al., 2015). Επίσης, αναστέλλει την παραγωγή προ-φλεγμονώδων κυτοκινών στον πνεύμονα (Lim et al., 2014).



Εικόνα 8. Μοριακή δομή του μέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος (RAME).

1.4.1 Φαινολικά οξέα και υγεία

Τα φαινολικά οξέα είναι δευτερογενείς μεταβολίτες με φαρμακολογική δράση και έχουν αποτελέσει αντικείμενο ενός μεγάλου αριθμού βιολογικών, χημικών και ιατρικών μελετών. Το ενδιαφέρον αυτό οφείλεται στη μεγάλη αφθονία τους στην ανθρώπινη διατροφή και του πιθανού ρόλου τους στην πρόληψη ποικίλων παθολογικών καταστάσεων που σχετίζονται κυρίως με το οξειδωτικό στρες, όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Manach et al., 2004, Willet, 2006). Συγκεκριμένα, το ροσμαρινικό οξύ έχει προταθεί ότι έχει ευεργετική επίδραση έναντι στον διαβήτη και στην ασθένεια του Αλτσχάιμερ, στο μεταβολικό σύνδρομο, καθώς και στην γονιμότητα (Karthik et al., 2011, Ferreira et al., 2013, Uyeturk et al., 2014). Επίσης, αποτελεί θεραπευτικό παράγοντα για την αυτοάνοση ασθένεια ρευματοειδή αρθρίτιδα, όπως και για την ατοπική δερματίτιδα και την θεραπεία της ρετινοπάθειας (Ito et al., 1998, Kim et al., 2009, Jang et al., 2011). Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι αρκετά μοντέλα πιθανών μοριακών μηχανισμών της βιολογικής τους δράσης έχουν προταθεί, μέχρι σήμερα ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους παραμένει άγνωστος.

1.4.2 Απορρόφηση και μεταβολισμός φαινολικών οξέων

Για την κατανόηση των επιδράσεων των φυτικών πολυφαινολών στην ανθρώπινη υγεία, είναι απαραίτητο να μελετηθεί ο τρόπος με τον οποίο απορροφώνται και μεταβολίζονται. Ίσως για παράδειγμα, ορισμένες από τις πολυφαινόλες που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις διάφορες τροφές να μην είναι ιδιαίτερα δραστικές μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό ή να απορροφώνται σε μικρό βαθμό από το έντερο ή να αποβάλλονται πολύ γρήγορα. Πιστεύεται ότι η μέση πρόσληψη πολυφαινολών σε άτομα που καταναλώνουν καθημερινά φυτικές τροφές είναι περίπου 1gr ανά ημέρα (Kuhnau 1976, Radtke et al., 1998, Santos-Buelga et al., 2000). Τα δύο τρίτα αυτής της ημερήσιας πρόσληψης πιστεύεται ότι είναι φλαβονοειδή και το ένα τρίτο φαινολικά οξέα (Scalbert et al., 2000). Η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στο πλάσμα του αίματος μετά την κατανάλωση τροφών πλούσιων σε αυτές, ποικίλλει ανάλογα με την φαινολική ένωση και το είδος της τροφής. Γενικά όμως τα επίπεδα των φαινολικών ενώσεων στο πλάσμα κυμαίνονται από μερικές δεκάδες nM έως και 10 μ M, ενώ η μέγιστη συγκέντρωση επιτυγχάνεται από 30 λεπτά έως και 24 ώρες μετά την κατανάλωση των τροφών (Lee et al., 1995, Bell et al., 2000, Rein et al., 2000, Graefe et al., 2001, Manach et al., 2004). Η διάρκεια ημιζωής των φαινολικών ενώσεων στο πλάσμα έχει υπολογιστεί από 2 έως 11 ώρες ανάλογα με τον τύπο της ένωσης, γεγονός που δείχνει ότι στο πλάσμα θα μπορούσαν να διατηρηθούν οι φαινολικές ενώσεις σε σημαντικές συγκεντρώσεις μετά από τακτική κατανάλωση φυτικών τροφών (Bell et al., 2000, Cao et al., 2001, Graefe et al., 2001).

Συγκεκριμένα, τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και τα ελευθέρα απλά φαινολικά συστατικά απορροφώνται απευθείας από το βλεννογόνο του λεπτού εντέρου (King et al., 1996, Karakaya, 2004). Ωστόσο, τα υδροξυκιναμικά οξέα συνήθως βρίσκονται εστεροποιημένα με σάκχαρα, λιπίδια ή οργανικά οξέα κάνοντας δύσκολη την απορρόφησή τους, διότι τα ανθρώπινα κύτταρα σε ιστούς όπως το ήπαρ και το εντερικό βλεννογόνο δεν διαθέτουν εστεράσες. Μπορούν να υδρολυθούν μόνο από τη μικροχλωρίδα στο κόλον (Manach et al., 2004).

Για το ροσμαρινικό οξύ που μελετάται στην παρούσα εργασία, λίγες μελέτες έχουν γίνει όσον αφορά τα μεταβολικά χαρακτηριστικά του. Μελέτες φαρμακοκινητικής του ροσμαρινικού οξέος έχουν γίνει κυρίως σε ζωικά μοντέλα. Σε πειράματα με αρουραίους έχει βρεθεί ότι ο χρόνος ημιζωής του είναι 0,75 ώρες και ότι αποβάλλεται μέσω των ούρων στα νεφρά, ενώ δεν διέρχεται τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Li et al., 2007). Όσον αφορά την απορρόφηση, έχει βρεθεί σε αρουραίους ότι το ροσμαρινικό οξύ απορροφάται καλά από το γαστρεντερικό σωλήνα και από το δέρμα. Με τοπική χορήγησή του στο δέρμα αρουραίων απορροφήθηκε διαδερμικά και διανεμήθηκε στο αίμα, το δέρμα, τα οστά και τους μυς, ενώ η ενδοφλέβια χορήγηση σε αυτά τα ζώα οδήγησε στην ανίχνευσή του σε διάφορους ιστούς, όπως πνεύμονα, σπλήνα, καρδιά και συκώτι (Ritschel et al., 1989). Σε πειράματα σε ανθρώπους προτάθηκε ένας υποθετικός μεταβολισμός για το ροσμαρινικό οξύ με βάση τη δράση της μικροβιακής εστεράσης στην πεπτική οδό, με υδρόλυση του εστερικού δεσμού του ροσμαρινικού οξέος. Σε αυτή τη μελέτη, το ροσμαρινικό οξύ αποδείχτηκε ότι απορροφήθηκε, συζεύχθηκε ή / και μεθυλιώθηκε σε ιστούς όπως η πεπτική οδός και το ήπαρ, με ένα μικρό ποσοστό του να αποικοδομείται σε διάφορα συστατικά, όπως γλυκουρονιδιωμένο ή θειωμένο ροσμαρινικό οξύ συζευγμένο με καφεϊκό οξύ, φερουλικό οξύ και m-κουμαρικό οξύ, που στη συνέχεια απεκκρίνεται γρήγορα από τα ούρα (Baba et al., 2005). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι οι βακτηριακές εστεράσες του εντέρου είναι σε θέση να υδρολύσουν τον εστερικό του δεσμό σε υδροξυκινναμωμικά (Couteau et al., 2001, Gonthier et al., 2006). Οι Couteau et al. (2001), έδειξαν ότι το ροσμαρινικό οξύ υδρολύεται είτε χημικά (θερμοκρασία, pH και χολικά άλατα) είτε μέσω εκκριτικής ενζυμικής δραστηριότητας (λιπάση και παγκρεατικά ένζυμα).

Συμπερασματικά, είναι φανερό ότι η χημική δομή των φαινολικών ενώσεων επηρεάζει το ρυθμό απορρόφησής τους από το έντερο, τον μεταβολισμό τους και τη μορφή με την οποία θα βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος. Η βιοδιαθεσιμότητα τους επηρεάζεται, επίσης, από τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλα συστατικά των τροφίμων (πολυσάκχαρες, πρωτεΐνες), που μπορεί να επηρεάσουν την απορρόφησή τους. Σημαντικό ρόλο επίσης έχει αν η ένωση είναι εστεροποιημένη, καθώς η απορρόφησή της από το έντερο είναι διαφορετική.

1.4.3 Βιολογική δράση φαινολικών οξέων

Τα φαινολικά οξέα από πολλές ερευνητικές μελέτες που έχουν γίνει καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων. Σε πολλές από τις ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία αυτή τους έχουν αποδοθεί αντιμεταλλαξιγόνες, αντιοξειδωτικές, κυτταροτοξικές, νευροτροφικές, χημειοπροστατευτικές, αναλγητικές, νευροπροστατευτικές, αντιακές, αντικαταθλιπτικές, αντιβακτηριδιακές, αντιμικροβιακές, αντισηπτικές ή και αντινεοπλασματικές ιδιότητες (Pugazhendhi et al., 2005, Ferreira et al., 2013, Alves et al., 2013, Yip et al., 2006, An et al., 2006, Itoh et al., 2010, Kong et al., 2008, Ashidate et al., 2005, Heleno et al., 2014, Xu et al., 2012, Shen et al., 2012, Xu et al., 2013; Zeni et al., 2012, Butt and Sultan, 2011, Kalonia et al., 2009, Kang et al., 2009, Oboh et al., 2013).

Το ροσμαρινικό οξύ έχει μελετηθεί σε αρκετά μεγάλο βαθμό για τις βιολογικές του δράσεις. Του έχουν αποδοθεί αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιαλλεργικές, αντιοαγγειογενετικές, αντικαρκινικές, καρδιοπροστατευτικές και νευροπροστατευτικές ιδιότητες (Osakabe et al., 2002, Li et al., 2010, Bulgakov et al., 2012, Petersen et al., 2013, Hossan et al., 2014, Kim et al., 2005, Karthik et al., 2011, Kim et al., 2015, Nabavi et al., 2015). Επίσης, έχει προστατευτικό ρόλο σε ασθένειες του ήπατος και του πνεύμονα μέσω μείωσης του παράγοντα TGF- β 1 και του mRNA του TNF- α , καθώς και αναστολή της δημιουργίας νιτροτυροσίνης (Osakabe et al., 2002, Sanbongi et al., 2003, Li et al., 2010). Έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη δράση των λιποξυγενασών και κυκλοξυγενασών (Parnham et al., 1985, Ferrandez et al., 2003), καθώς και της ιντερφερόνης- γ και των ιντερλευκινών 8, 1 β , 6 και 12 (Tsai et al., 2013, Ghasemzadeh et al., 2017). Επιπρόσθετα, το ροσμαρινικό οξύ έχει βρεθεί ότι έχει αντικαρκινικές ιδιότητες, ενάντια στον καρκίνο του παχέος εντέρου, στον καρκίνο του στήθους, στον στοματικό καρκίνο και στο μελάνωμα (Roland et al., 2010, Anusuya et al., 2011, Sharmila et al., 2012, Venkatachalam et al., 2013, Lin et al., 2014, Karthikkumar et al., 2015). Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι στον καρκίνο του παχέος εντέρου μειώνει την έκφραση της p65 πρωτεΐνης και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω του NF-kB (Karyhikkumar et al., 2015). Επίσης, μειώνει την έκφραση του p53 και του bcl-2 (Anusuya et al., 2011). Ο

μέθυλο-εστέρας του ροσμαρινικού οξέος έχει βρεθεί ότι έχει καλύτερη αντιβακτηριδιακή δράση σε σχέση με το ροσμαρινικό οξύ έναντι τουλάχιστον 8 παθογόνων Gram-θετικών βακτηρίων (Amin et al., 2013). Ο ακριβής ωστόσο μοριακός μηχανισμός αυτών των δράσεων των φαινολικών οξέων δεν είναι γνωστός και είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθεί περαιτέρω διερεύνηση.

1.4.4 Αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών οξέων

Οι φαινολικές ενώσεις, και κατ' επέκταση τα φαινολικά οξέα, εμφανίζουν, όπως αναφέρθηκε, πολλές ευεργετικές βιολογικές δράσεις. Η ιδιότητα που έχουν, η λεγόμενη ως «αντιοξειδωτική», πιστεύεται από την επιστημονική κοινότητα ότι οφείλεται στην ικανότητά τους να δρουν ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών. Η θεωρία που έχει επικρατήσει, η “θεωρία των αντιοξειδωτικών”, σύμφωνα με την οποία, φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στη Μεσογειακή δίαιτα, δρουν ως αντιοξειδωτικά και μπορούν να εξουδετερώνουν τις δραστικές ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται στον οργανισμό, έγινε γρήγορα καθολικά αποδεκτή, χωρίς όμως να έχει τη βάση της σε επαρκή πειραματικά δεδομένα (Halliwell et al, 2007). Ωστόσο, όλες οι μεγάλες προοπτικές μελέτες οι οποίες σχεδιάστηκαν για την επαλήθευσή της έδειξαν αρνητικά αποτελέσματα (Warnholtz et al, 2000). Επομένως, ο μόνος αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης των δραστικών ελευθέρων ριζών είναι η αναστολή της δημιουργίας τους. Πράγματι, με αναστολή της ομολυτικής διάσπασης των υπεροξειδίων και με ενίσχυση των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την απομάκρυνση των υπεροξειδίων, αυτό θα μπορούσε να συμβεί (Ursini et al, 1995, Forman, Davies et al, 2014). Επομένως, οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται σε πληθώρα τροφίμων στη Μεσογειακή διατροφή θα μπορούσαν πιθανόν να δράσουν κατ' αυτόν τον τρόπο, για την αντιμετώπιση των δραστικών ελευθέρων ριζών.

Στο εργαστήριό μας, έχει μελετηθεί αυτός ο τρόπος δράσης των φαινολικών ενώσεων, με μόνο θετικά αποτελέσματα (Melidou et al., 2005, Kitsati et al., 2012, Kitsati et al., 2016). Όσον αφορά συγκεκριμένα το ροσμαρινικό οξύ, έχει βρεθεί ότι αυξάνει την έκφραση της καταλάσης, της οξυγονάσης της αίμης 1 και

της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου (Fadel et al., 2011, Fernando et al., 2016). Σε πειραματικές μελέτες που έχουν γίνει, έχει βρεθεί ότι μειώνει την παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του ανιόντος του σουπεροξειδίου, καθώς επίσης και ότι αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και σε συνθήκες ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (Fallarini et al., 2009, Fadel et al., 2011, Fernando et al., 2016). Ο μέθυλο-εστέρας του ροσμαρινικού οξέος σύμφωνα με την ερευνητική ομάδα So et al. (So et al., 2016) εμπλέκεται στην αναστολή παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου μέσω του MyD88 μονοπατιού, αναστέλλοντας την ενεργοποίηση του NF-kB και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών. Επιπρόσθετα, στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2, ο οποίος σε συνθήκες οξειδωτικού στρες συνδέεται σε ειδικές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων στο DNA (AREs, antioxidant response elements ή EpREs, electrophile response elements) επάγοντας την έκφραση γονιδίων σχετικά με την άμυνα και την επιβίωση του κυττάρου. Συγκεκριμένα μέσω του μονοπατιού Nrf2, ο μέθυλο-εστέρας του ροσμαρινικού οξέος έχει την ικανότητα να επάγει την έκφραση της οξυγονάσης της αίμης (HO-1) (So et al., 2016).

1.4.5 Φαινολικά οξέα και απόπτωση

Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος εμπλέκεται σε ποικίλες καταστάσεις που έχουν σχέση με την ομοιοστασία των κυττάρων. Αποτελεί αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητικών ομάδων η μελέτη του μηχανισμού προστασίας της απόπτωσης καρκινικών κυττάρων από τις φαινολικές ενώσεις και πιο συγκεκριμένα, τα φαινολικά οξέα. Ωστόσο, δεν έχει ακόμα βρεθεί ο ακριβής μοριακός μηχανισμός δράσης τους. Είναι πάντως πολύ πιθανό, αυτή η προστατευτική τους ικανότητα να αποτελεί τη βάση της αντικαρκινικής τους δράσης (Chen et al., 1996, Kampa et al., 2004).

Όσον αφορά τη μελετώμενη ένωση, το ροσμαρινικό οξύ, πρόσφατα ευρήματα έχουν δείξει ότι ενισχύει την απόπτωση μέσω TNF-α ενισχύοντας τη δράση του NF-kB σε λευχαιμικά U937 κύτταρα, καθώς και σε T και NK κύτταρα, μέσω πρόκλησης δυσλειτουργίας των μιτοχονδρίων (Hur et al., 2003, Moon et

al., 2010). Ωστόσο, όταν υπάρχει συνεχής έκθεση των κυττάρων σε υψηλή συγκέντρωση TNF- α , τότε τα κύτταρα δεν οδηγούνται σε απόπτωση (Tay et al., 2010). Επίσης, σε H9c2 καρδιομυοβλαστικά κύτταρα ποντικού αναστέλλει την ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών JNK και ERK που οδηγούν τα κύτταρα σε απόπτωση (Kim et al., 2005). Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η χορήγηση του ροσμαρινικού οξέος μπορεί να επιφέρει διαφορετικά αποτελέσματα σε διαφορετικά είδη κυττάρων. Ο μέθυλο-εστερας του σε πειράματα *in vitro* οδηγεί σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου στην φάση G₀/G₁, καθώς και στην αναστολή της δραστηριότητας της CDK1 στον πολλαπλασιασμό των λείων μυικών αγγειακών κυττάρων, διαδικασία που περιλαμβάνεται στο σχηματισμό της αθηροσκληρωματικής πλάκας (Liu et al., 2018).

Η πραγματική ωστόσο βιοχημική δράση των μηχανισμών αυτών δεν ακόμα πλήρως κατανοητή και πολλές φορές πολλά πειραματικά αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα αμφιλεγόμενα, εμφανίζοντας, όπως παρατηρείται τόσο προστασία όσο και τοξικότητα που ασκείται από την ίδια ένωση σε διαφορετικές συνθήκες.

1.4.6 Ικανότητα των φαινολικών οξέων να δεσμεύουν μέταλλα

Κατά την εξήγηση των βιολογικών δράσεων των φαινολικών ενώσεων, η ικανότητά τους να δεσμεύουν ιόντα μετάλλων, κυρίως σιδήρου, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες δε λαμβάνεται υπόψιν. Ωστόσο, η ικανότητα ορισμένων φαινολικών ενώσεων να σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με μέταλλα, είναι σημαντική, καθώς ο σίδηρος και ο χαλκός συμμετέχουν στην αντίδραση Fenton, η οποία είναι μια σημαντική πηγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Cook και Samman, 1996, Mylonas et al., 1999, Rice-Evans et al., 2001). Οι φαινολικές ενώσεις που διαθέτουν όρθο-διυδρόξυ ομάδα, μπορούν να δημιουργήσουν σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου (Cook και Samman, 1996, Mira et al., 2002, Khokhar et al., 2003, Le Nest et al., 2004, Andjelkovic et al., 2006). Πιθανώς, η δέσμευση των ιόντων σιδήρου μπορεί να εμποδίσει τη συμμετοχή τους στην αντίδραση Fenton και επακολούθως την παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου από το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Επίσης, είναι πιθανό, ακόμα

και αν ο σίδηρος παραμένει οξειδοαναγωγικά ενεργός, μετά τη δέσμευσή του από τα φαινολικά οξέα, οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από τον καταλυτικά ενεργό σίδηρο να μπορούν να εκκαθαριστούν απευθείας από τα παρακείμενα μόρια των φαινολικών οξέων, αντιδρώντας με αυτά. Παρά, όμως, την έντονη ερευνητική μελέτη που έχει γίνει σε αυτό το πεδίο, η σημασία της δέσμευσης των ιόντων σιδήρου δεν έχει διευκρινιστεί μέχρι σήμερα.

1.5 Λειτουργικά τρόφιμα

Με τον όρο λειτουργικά τρόφιμα ονομάζουμε εκείνα τα τρόφιμα ή τα συστατικά που πέραν της βασικής διατροφικής αξίας τους προάγουν την υγεία των ανθρώπων και μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών. Ο σχεδιασμός τους γίνεται με βάση τρεις προϋποθέσεις: α) αλλαγή του ενεργειακού περιεχομένου των αντίστοιχων μη λειτουργικών τροφίμων, β) αποφυγή χρήσης συστατικών που θεωρούνται μη φυσικά και γ) αναζήτηση πηγών φυσικών συστατικών τα οποία έχουν ευεργετική επίδραση στην αναστολή εμφάνισης ασθενειών. Φυσικά, εκτός από τη διατροφή, στην εμφάνιση ανθρώπινων χρόνιων ασθενειών, εμπλέκονται και άλλοι παράγοντες, όπως είναι το στρες και η κληρονομικότητα ((Hasler et al., 1998, Diplock et al., 1999, Schneeman et al., 2000, Pennington et al., 2002, Young et al., 2003, Webb et al., 2006).

Τα συστατικά των λειτουργικών τροφίμων, τα οποία είναι ωφέλιμα για την υγεία, ονομάζονται λειτουργικά συστατικά, αλλά και βιοδραστικές ενώσεις. Τα συστατικά αυτά συνήθως απαντούν σε μικρές ποσότητες στα λειτουργικά τρόφιμα. Ωστόσο, έχουν ποικίλες δράσεις, όπως καταστροφή βακτηρίων, αναστολή δράσης διαφόρων ενζύμων, επιβράδυνση συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων οδηγώντας στην αναστολή της εμφάνισης ασθενειών κ.ά. Αποτελούν κυρίως δευτερογενείς μεταβολίτες που βρίσκονται σε διάφορα φυτά και τα οποία δεν είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του ανθρώπινου οργανισμού, δεν αποτελούν δηλαδή μικροθρεπτικά συστατικά (Harborne and Williams, 2000, Parr and Boldwell, 2000, Johnson et al., 2001, IFT, 2005, Webb et al., 2006). Εδώ και πολλά χρόνια έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης των περισσότερων ερευνητών στο πεδίο της επιστήμης των τροφίμων, καθώς εμφανίζουν πολλές φυσικές και χημικές ιδιότητες όπως και προστασία των φυτικών ιστών και των βιολογικών συστημάτων από οξειδωτικές αντιδράσεις (Schneeman et al., 2000). Συνήθως οι τερπενοειδείς και οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν και τις βιοδραστικές ενώσεις στα λειτουργικά τρόφιμα (Webb, 2006).

Στη συγκεκριμένη εργασία, έγινε μία προσπάθεια αξιολόγησης της βιολογικής δράσης λειτουργικών γαλακτοκομικών προϊόντων, τα οποία παρασκευάστηκαν με την ενσωμάτωση σε αυτά εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών. Το πειραματικό μοντέλο αξιολόγησης που χρησιμοποιήσαμε

αποτελείται από ζωντανά κύτταρα σε καλλιέργειες, τα οποία εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες υπό τη μορφή H_2O_2 και η καταγραφή των επιπτώσεων στο DNA παρουσία ή απουσία των συγκεκριμένων συστατικών.

1.6 Ο ρόλος δέσμευσης σιδήρου σε παθολογικές καταστάσεις

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, το επίπεδο της συγκέντρωσης διαθέσιμων προς αντίδραση ιόντων σιδήρου (labile iron) ελέγχεται αποτελεσματικά και, κατ' αυτόν τον τρόπο, μειώνεται στο ελάχιστο η πιθανότητα συμμετοχής τους σε αντιδράσεις σχηματισμού δραστικών ελευθέρων ριζών. Ο έλεγχος αυτός μπορεί να ανατραπεί σε παθολογικές καταστάσεις, είτε τοπικά (π.χ., σε ισχαιμικό ιστό), είτε σε επίπεδο οργανισμού (π.χ., ιδιοπαθής αιμοχρωμάτωση), είτε σε υπερσιδήρωση λόγω συνεχών μεταγγίσεων. Σ' αυτές τις περιπτώσεις, η περίσσεια σιδήρου μπορεί να έχει βλαπτικές συνέπειες, και είναι επιθυμητή η δέσμευση και η απομάκρυνσή του από τον οργανισμό με τη βοήθεια ειδικών σιδηροδεσμευτικών ενώσεων για την προστασία των κυτταρικών συστατικών από ανεξέλεγκτες οξειδώσεις (Pietrangelo, 2007, Hower et al., 2009). Τέτοιες ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη είναι η δεσφερριοξαμίνη (DFO), η δεφεριπρόνη (DFP) και άλλες. Οι σιδηροδεσμευτικές ενώσεις μπορεί να δεσμεύουν τον σίδηρο από δύο, από τρία ή και από τα έξι σημεία σύνδεσής του (το άτομο του σιδήρου έχει οκταεδρική ατομική διαμόρφωση στην οποία υπάρχουν έξι σημεία δέσμευσης). Κατά συνέπεια, οι σιδηροδεσμευτικές ενώσεις είναι σε θέση να εμποδίσουν την αντίδραση του σιδήρου με υπεροξειδία μέσω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Για την ολική κάλυψη του σιδήρου απαιτούνται ένα, δύο ή τρία μόρια, ανάλογα με το πόσες θέσεις δέσμευσης διαθέτει η κάθε σιδηροδεσμευτική ένωση.

Επομένως, το μεγαλύτερο πλεονέκτημα από τη δέσμευση των ιόντων σιδήρου (αλλά και άλλων μετάλλων) είναι η αναστολή της ικανότητάς τους να καταλύουν αντιδράσεις που οδηγούν στον σχηματισμό δραστικών ελευθέρων ριζών (αντιδράσεις τύπου Fenton). Πειράματα με κύτταρα σε καλλιέργειες έχουν δείξει ότι η ευαισθησία στο H_2O_2 και σε άλλα οργανικά υπεροξειδία αυξάνεται παράλληλα με την ύπαρξη ιόντων σιδήρου, ενώ μειώνεται παρουσία χημικών ενώσεων, όπως η δεσφερριοξαμίνη (DFO), η δεφεριπρόνη (DFP), η φαινανθρολίνη και άλλες, οι οποίες δεσμεύουν, αδρανοποιούν ή, απλώς, απομακρύνουν τα ιόντα σιδήρου από την αρχική τους θέση (Barbouti, Doulias et al., 2001, Melidou, Riganakos et al., 2005, Βλάχου, 2010). Απαραίτητη

προϋπόθεση για την προστατευτική δράση αυτών των ενώσεων είναι η ικανότητά τους να διαπερνούν με κάποιον τρόπο την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων και να δρουν εντός των διαφόρων κυτταρικών διαμερισμάτων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η δράση τους περιορίζεται στα ενδοσωμάτια και στα λυσοσωμάτια όπου φθάνουν μέσω της ενδοκύττωσης. Σε πολλές περιπτώσεις, μπορεί να παρέχεται προστασία και από ενώσεις οι οποίες, ενώ δεσμεύουν σίδηρο, δεν αναστέλλουν την αντίδραση Fenton. Σ' αυτήν την περίπτωση, οι δραστικές ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται μετά την αντίδραση Fenton οξειδώνουν το ίδιο το σιδηροδεσμευτικό μόριο, προστατεύοντας έτσι έμμεσα την αρχική θέση στην οποία ήταν δεσμευμένος ο σίδηρος. Τέτοιες ενώσεις καλούνται συνήθως "αντιοξειδωτικά αυτοκτονίας". Είναι σημαντικό ότι ένας μεγάλος αριθμός τέτοιων σιδηροδεσμευτικών ενώσεων έχει ανιχνευτεί στα φρούτα και τα λαχανικά, και έχει προταθεί ότι τα ωφέλιμα αποτελέσματα που έχει η κατανάλωσή τους στην υγεία των ανθρώπων οφείλεται σ' αυτά τα μόρια.

1.6.1 Ισχαιμία – επαναιμάτωση ήπατος και οξειδωτικό στρες

Κατά την διαδικασία ισχαιμίας – επαναιμάτωσης ήπατος παρατηρείται το λεγόμενο «παράδοξο της επαναιμάτωσης», μία περίπτωση παθολογικής κατάστασης, η οποία προκαλείται γενικά μετά από μία περίοδο ισχαιμίας και οφείλεται κατά κύριο ρόλο στον σίδηρο. Παρόλη την πληθώρα μελετών που έχουν γίνει, ο μηχανισμός πρόκλησης των βλαβών κατά την ισχαιμία και επαναιμάτωση δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Ωστόσο, έχει γίνει από τους ερευνητές η διάκριση δύο φάσεων κατά την βλάβη στην ισχαιμία – επαναιμάτωση στο ήπαρ, οι οποίες καθορίστηκαν τόσο από το χρόνο πρόκλησης των βλαβών, όσο και από την κατηγοριοποίηση των διαδικασιών που συμβαίνουν καθώς και των παραγόντων που συμμετέχουν στην εκάστοτε φάση:

Α) Η χρονική περίοδος όπου λαμβάνει χώρα η ισχαιμία, καθώς και οι 2 πρώτες ώρες επαναιμάτωσης, η οποία ονομάζεται πρώιμη βιοχημική φάση και

παρατηρείται πρόκληση οξειδωτικού στρες με επακόλουθη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου, και

Β) η χρονική περίοδος 6 έως 48 ώρες μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης, η οποία ονομάζεται όψιμη φλεγμονώδη φάση και παρατηρείται ενεργοποίηση των αμυντικών παραγόντων του οργανισμού (ουδετερόφιλα και άλλα φλεγμονώδη κύτταρα), καθώς και κυτταρικός θάνατος (Lentsch et al., 2000).

Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας – επαναιμάτωσης, σύμφωνα με πολλές πειραματικές μελέτες που έχουν γίνει, υπάρχει παραγωγή του ανιόντος του σουπεροξειδίου από πολλές διαφορετικές πηγές, μέσω μιας μεγάλης ποικιλίας μηχανισμών. Ωστόσο, η ισχύουσα άποψη, σύμφωνα με πληθώρα πειραματικών δεδομένων, είναι ότι η μεγαλύτερη παραγωγή του ανιόντος του σουπεροξειδίου και επακόλουθα των δραστικών μορφών οξυγόνου, λαμβάνει χώρα τη στιγμή ακριβώς που συμβαίνει η επαναιμάτωση, ενώ κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας παρατηρείται ότι η παραγωγή του δεν είναι σε μεγάλο βαθμό αισθητή (Zweier et al., 1987, Togashi et al., 2000). Παρόλα αυτά, υπάρχει ένας αρκετά μεγάλος αριθμός πειραματικών αναφορών ότι τα ανιόντα του σουπεροξειδίου παράγονται σε σημαντικό βαθμό και κατά τη χρονική διάρκεια της ισχαιμίας, φαινόμενο το οποίο μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι ενώ ο ιστός είναι ισχαιμικός, μπορεί παράλληλα να μην είναι σε όλο το ποσοστό του ανοξικός, κατάσταση η οποία αφήνει ελεύθερη την πρόσβαση σε ένα μέρος του μοριακού οξυγόνου, το οποίο μπορεί σε αυτή την περίπτωση να είναι προσβάσιμο. Επακόλουθα, μπορεί να αναχθεί με μονά ηλεκτρόνια μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας, λόγω της πολύ χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου που επικρατεί και να οδηγήσει στην παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου, επηρεάζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη σωστή λειτουργία του κυττάρου. (Nohl et al., 1993, Kevin et al., 2003). Ωστόσο, όπως είναι γνωστό, χαμηλά επίπεδα τόσο του υπεροξειδίου του υδρογόνου, όσο και του ανιόντος του σουπεροξειδίου, μπορούν να ενεργοποιήσουν σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην προσαρμογή και επιβίωση του κυττάρου.

Παρόλο που έχουμε έστω και μικρή, παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, η μεγαλύτερη παραγωγή αυτών συμβαίνει κατά τη χρονική διάρκεια της επαναιμάτωσης, όπου λαμβάνει χώρα η εκ νέου εισαγωγή του οξυγόνου. Σ αυτήν την περίπτωση όμως, δεν είναι γνωστές οι πηγές παραγωγής των ηλεκτρονίων, που είναι υπεύθυνα για την

αναγωγή του οξυγόνου, καθώς οι αναστολείς που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια αδυνατούν να αναστείλουν αυτήν την ξαφνική έκρηξη παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου. Η υπόθεση που γίνεται είναι ότι λόγω της ξαφνικής αυξημένης παραγωγής οξυγόνου και επακόλουθα της αύξησης των επιπέδων του, συμβαίνει μετακίνηση ηλεκτρονίων και σε άλλα οξειδοαναγωγικά συστήματα που ρυθμίζονται από αυτό, εκτός των μιτοχονδρίων, όπου εστιάζεται κυρίως η δράση του. Παραδείγματος χάριν, κατά την επαναιμάτωση στο ήπαρ, δραστικές μορφές οξυγόνου μπορούν να παραχθούν από την οξειδάση της ξανθίνης, τα φαγοκύτταρα και κυρίως τα ουδετερόφιλα, τα κύτταρα Kupffer, καθώς και NAD(P)H οξειδάσες (Togashi et al., 2000, Becker, 2004).). Επιπρόσθετα, εκτός από τα επίπεδα οξυγόνου, μία πρόσφατη έρευνα σε αρουραίους αποδεικνύει ότι κατά την περίοδο της ισχαιμίας τα επίπεδα του ηλεκτρικού οξέος αυξάνουν πάρα πολύ, με αποτέλεσμα να συμβεί η επαναιμάτωση, η ροή της αναπνευστικής αλυσίδας να αλλάξει ροή προς την αντίθετη κατεύθυνση, προς το σύμπλεγμα I και έτσι να παραχθούν από αυτό δραστικές μορφές οξυγόνου (Chouchani et al., 2014). Όσο για τα βλαπτικά αποτελέσματα που προκύπτουν από την αυξημένη παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου, η αύξηση της συγκολλητικότητας και της προσκολλητικότητας των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων, η αλλαγή του σχήματος των κυττάρων, η καταστροφή των συστατικών τους, αφορούν μερικά από αυτά (Marzi et al., 1989).

Σ αυτές τις περιπτώσεις, η χορήγηση σιδηροδεσμευτικών σκευασμάτων μπορεί να μετριάσει τις αρνητικές επιπτώσεις από την παραγωγή των δραστικών ελευθέρων ριζών, καθώς οι ενώσεις αυτές είναι ικανές να δεσμεύουν τον οξειδοαναγωγικά ενεργό σίδηρο που είναι υπεύθυνος για την αντίδραση Fenton και την επακόλουθη παραγωγή των δραστικών ανιόντων υδροξυλίου. Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα σκευάσματα, που χρησιμοποιούνται και στην παρούσα εργασία, αποτελούν η δεσφεριοξαμίνη (DFO) και η δεφεριπρόνη (DFP).

1.6.2 Δεσφεριοξαμίνη (DFO)

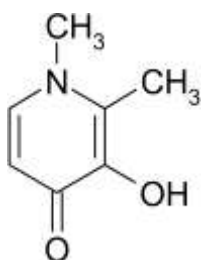
σίδηρο (Link et al., 1989). Επιπρόσθετα, η δεσφεριοξαμίνη έχει πρωταγωνιστικό ρόλο σε περιπτώσεις που άλλες σιδηροδεσμευτικές ενώσεις αδυνατούν να εισέλθουν στον ενδοκυττάριο χώρο, όπως στην περίπτωση του DTPA (Diethylene triamine pentaacetic acid) και επομένως δεν μπορούν να δεσμεύσουν τον σίδηρο. Οπότε, τελικά η ικανότητα της δέσμευσης σιδήρου είναι ο παράγοντας ο οποίος καθορίζει την πρόληψη της τοξικότητας που προκαλεί και όχι η αποβολή του με τη μορφή συμπλέγματος (Whitten et al., 1965).

Όσον αφορά το πεδίο των ελευθέρων ριζών, η δεσφεριοξαμίνη χρησιμοποιείται επίσης για την αναστολή της αντίδρασης Fenton. Χορήγηση της δεσφεριοξαμίνης σε πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας – επαναιμάτωσης στο ήπαρ αλλά και σε καλλιέργειες ηπατικών κυττάρων είχε σαν αποτέλεσμα μειωμένη παραγωγή δραστικών ελευθέρων ριζών οξυγόνου, μείωση της απόπτωσης και της βλάβης των ηπατικών κυττάρων, πτώση των δεικτών φλεγμονής και οξειδωτικού στρες (Omar et al., 1989, Zhao et al., 1998, Arkadopoulos et al., 2010). Επίσης, η δεσφεριοξαμίνη έχει ευεργετικά αποτελέσματα και σε άλλα όργανα στα οποία έχουν πραγματοποιηθεί πειραματικές μελέτες κατά την πρόκληση ισχαιμίας – επαναιμάτωσης, όπως στην καρδιά, στους πνεύμονες, στους νεφρούς, στους μύες, στον εγκέφαλο και στον γαστρικό βλεννογόνο (Qayumi AK et al., 1992, Fantini et al., 1993, Hiraishi et al., 1993, Groenendaal et al., 2000, Dendorfer et al., 2005, Bartels-Stringer et al., 2007, Arkadopoulos et al., 2008). Η δεσφεριοξαμίνη φαίνεται να έχει επίσης σημαντικό προστατευτικό ρόλο στις περιπτώσεις καρδιοαναπνευστικής αναζωογόνησης και αιμορραγικής καταπληξίας, λόγω της δέσμευσης σιδήρου (Babbs et al., 1985, Hedlund et al., 1991).

Ωστόσο, απαιτούνται επιπλέον μελέτες για την επιβεβαίωση και πλήρη κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων η δεσφεριοξαμίνη ασκεί τη θετική επίδραση, αλλά και για την ποσότητα της δόσης με την οποία πρέπει να χορηγείται για την επίτευξη των καλύτερων αποτελεσμάτων, τόσο σε πειραματικό αλλά και, τελικά, σε κλινικό επίπεδο.

1.6.3 Δεφεριπρόνη (DFP)

Η δεφεριπρόνη (Εικόνα 11) αποτελεί, σαν τη δεσφериοξαμίνη, ένα πολύ γνωστό σιδηροδεσμευτικό φάρμακο.



Εικόνα 11. Μοριακή δομή της δεφεριπρόνης (DFP).

Η δεφεριπρόνη είναι ικανή να δεσμεύει το σίδηρο σε αναλογία 3:1, έχει δηλαδή μεγάλη ικανότητα δέσμευσης. Επίσης, είναι ικανή να δεσμεύει και άλλα μέταλλα, όπως το χαλκό, το αλουμίνιο, τον ψευδάργυρο και το γάλλιο. Διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη πολύ εύκολα, καθώς είναι ένα αρκετά μικρό και ουδέτερο μόριο και μπορεί να αποσπάσει το σίδηρο κατευθείαν από τη φερριτίνη, πιο αποτελεσματικά σε σχέση με τη δεσφериοξαμίνη. Η δεφεριπρόνη μεταβολίζεται στο ήπαρ και έχει χρόνο ημίσειας ζωής περίπου 1-2,5 ώρες, όπως έχει μετρηθεί σε ασθενείς με β-θαλασσαιμία (Al-Refaie et al., 1994, Barman Balfour et al., 1999, Hoffbrand et al., 2003, Victor Hoffbrand et al., 2005).

Η χρήση της δεφεριπρόνης έχει εγκριθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για ασθενείς που είτε δεν ανέχονται τη δεσφериοξαμίνη, είτε σ αυτούς η δεσφериοξαμίνη είναι αναποτελεσματική, αδυνατώντας να δεσμεύσει το σίδηρο. Μετά από πειραματικές μελέτες έχει αποδειχθεί ότι είναι το ίδιο αποτελεσματική με τη δεσφериοξαμίνη στα κύτταρα του ήπατος και πιο πολύ στα καρδιακά κύτταρα (Olivieri et al., 1995, Pennell et al., 2006). Η αποτελεσματικότητά της, όσον αφορά την απέκκριση σιδήρου καθορίζεται από την ποσότητα σιδήρου που μετράται στα ούρα μετά από ένα εικοσιτετράωρο, καθώς και από τα μετρούμενα επίπεδα φερριτίνης στο ορό και σίδηρο στο ήπαρ. Είναι προφανές ότι η δοσολογία της δεφεριπρόνης, καθώς και ο βαθμός υπερφόρτωσης με

σίδηρο έχουν κύριο ρόλο στην αποτελεσματικότητά της (Al-Refaie et al., 1994, Olivieri et al., 1995, Barman Balfour et al., 1999, Hoffbrand et al., 2003, Victor Hoffbrand et al., 2005, Piga et al., 2005, Sajid et al., 2009).

Σε *in vitro* συνθήκες, έχει βρεθεί ότι μικρές συγκεντρώσεις δεφεριπρόνης ενισχύουν τη βλάβη του οξειδωτικού στρες, ενώ μεγαλύτερες ασκούν κυτταρική προστασία. Επίσης, όπως και η δεσφεριοξαμίνη, έχει βρεθεί ότι αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό πολλών κυτταρικών σειρών, με μικρότερη τοξικότητα από τη δεσφεριοξαμίνη, τουλάχιστον στα αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών και πως επάγει την απόπτωση (Barman Balfour et al., 1999).

Συμπερασματικά, η χορήγηση δεφεριπρόνης μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα τη διατήρηση ή την ελάττωση της ποσότητας σιδήρου στον οργανισμό των ασθενών. Ωστόσο, σημαντικές αποκλίσεις παρατηρούνται μεταξύ τους, όσον αφορά την δόση που θα πρέπει να τους χορηγηθεί για να επιτευχθεί αυτό το αποτέλεσμα και για το λόγο αυτό, κάθε κλινική περίπτωση είναι ξεχωριστή.

1.6.4 Συνδυασμένη χορήγηση δεσφεριοξαμίνης και δεφεριπρόνης

Μελέτες που έγιναν από τους Giardina et al. το 2000, απέδειξαν υψηλότερα θεραπευτικά αποτελέσματα κατά την ταυτόχρονη χορήγηση δεφεριπρόνης και δεσφεριοξαμίνης. Σύμφωνα με τη θεωρία "shuttle", η οποία αναφέρεται στη σύγχρονη χορήγηση των δύο αυτών χηλικών ενώσεων, υποστηρίζεται στην εν λόγω εργασία ότι η δεφεριπρόνη, λόγω του χαμηλού μοριακού βάρους της, εισβάλλει πιο γρήγορα και εύκολα στα κύτταρα από τη δεσφεριοξαμίνη, αποσπτά σίδηρο και τον μεταφέρει στα πιο σταθερά μόρια της δεσφεριοξαμίνης προς αποβολή μέσω των ούρων και κοπράνων. Η αρχή της συγκεκριμένης θεωρίας στηρίζεται στο γεγονός ότι με το συνδυασμό χηλικών ουσιών επιτυγχάνεται καλύτερη αποσιδήρωση, καθώς οι διαφορετικοί χημικοί τύποι χηλικών ουσιών με διαφορετικό τρόπο δράσης στη μεταφορά σιδήρου, δρουν αθροιστικά και συνεργικά με αποτέλεσμα να αυξάνουν περισσότερο την αποβολή του σιδήρου σε αντίθεση με τη δράση της έκαστης ουσίας.

Συγκεκριμένα, στη συγκεκριμένη εργασία, σε 2/3 των πασχόντων που έλαβαν συνδυαστική αγωγή, αυξήθηκε η αποβολή του σιδήρου από τα ούρα, γεγονός που καταδεικνύει τη συνεργική δράση των δύο παραγόντων. Επίσης, η παρατεταμένη χρήση του συνδυασμού της δεσφεριοξαμίνης και της δεφεριπρόνης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των τιμών της φερριτίνης σε ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με σοβαρή αιμοσιδήρωση (Giardina et al, 2000).

Στην παρούσα εργασία, βασιζόμενοι στη βιβλιογραφία ως σήμερα, μελετήσαμε τη δράση των σιδηροδεσμευτικών ενώσεων δεσφεριοξαμίνη και δεφεριπρόνη, δύο ενώσεων με διαφορετική λιποφιλικότητα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, *in vitro* αρχικά, σε ζωντανά ηπατικά καρκινικά κύτταρα, και στη συνέχεια *in vivo* σε συνθήκες ισχαιμίας – επαναιμάτωσης στο ήπαρ κουνελιών, προκειμένου να ερευνηθεί αν η χορήγησή τους, μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, προστατεύει τα κύτταρα και τους ιστούς από τις βλαπτικές επιδράσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου, καθώς και τον μηχανισμό δράσης τους, βασιζόμενοι σε προηγούμενα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Σκοπός

Κύριος στόχος της παρούσας μελέτης αποτελεί η διερεύνηση του ρόλου βιοδραστικών ενώσεων της διατροφής σε μοριακούς μηχανισμούς που έχουν σχέση με το οξειδωτικό στρες και την υγεία.

Το αρχικό στάδιο της συγκεκριμένης μελέτης πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού προγράμματος «Συνεργασία II», που είχε ως στόχο την αξιολόγηση της ικανότητας εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών Ελληνικής προέλευσης και των βιοδραστικών συστατικών τους να προστατεύουν το πυρηνικό DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες από την πρόκληση ανεξέλεγκτων οξειδώσεων. Στη συνέχεια της εργασίας μας θέσαμε ως στόχο τη διαλεύκανση των βιοχημικών μηχανισμών, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την προστατευτική δράση βασικών βιοδραστικών παραγόντων της διατροφής.

Σε ένα δεύτερο στάδιο, έγινε αξιολόγηση της προστατευτικής δράσης γαλακτοκομικών προϊόντων εμπλουτισμένων με εκχυλίσματα αρωματικών φυτών και με φρούτα. Έγινε, δηλαδή, προσπάθεια αξιολόγησης της προστατευτικής δράσης βιομηχανικά παρασκευασμένων γαλακτοκομικών «λειτουργικών τροφίμων».

Σε ένα τρίτο στάδιο, προσπαθήσαμε να ελέγξουμε εάν τα συμπεράσματα από το πρώτο μέρος της εργασίας θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε παθολογικές καταστάσεις σε ανθρώπους. Γι' αυτό το λόγο, μελετήθηκε η προστατευτική δράση σιδηροδεσμευτικών φαρμάκων με διαφορετική λιποφιλικότητα, όταν χορηγούνται είτε μεμονωμένα, είτε σε συνδυασμό μεταξύ τους, σε *in vitro*, αλλά και σε *in vivo* πειράματα σε κουνέλια, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες μετά από μία περίοδο ισχαιμίας - επαναιμάτωσης στο ήπαρ.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προμηθεύτηκαν από τις παρακάτω εταιρείες:

Abcam (Cambridge, MA, USA)

Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της φερριτίνης (ab75973).

BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA

Ανεξίγη-V συνδεδεμένη με φλουορεσκεΐνη.

BioRad Laboratories Company, Richmond, CA, USA

Ακρυλαμίδιο, υπερεθειϊκό αμμώνιο (APS), N-N' μεθυλένο-δισ-ακρυλαμίδιο, N,N,N',N'-τετραμέθυλοαιθυλοδιαμίνη (TEMED), αντιδραστήριο για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης πρωτεΐνης (Protein Assay Dye Reagent Concentrate).

Carbosynth, Berkshire, UK

Ροσμαρινικό οξύ.

Gibco BRL Company, Grand Island, NY, USA

Ορός από έμβρυο βοός (Fetal Bovine Serum, FBS), πλαστικά για τις κυτταροκαλλιέργειες, πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, αγαρόζη χαμηλού σημείου τήξεως.

Jackson Immunoresearch, Baltimore Pike, West Grove, USA

Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι ανοσοσφαιρινών κουνελιού (111-035-144) συνδεδεμένο με ραφανδική υπεροξειδάση (HRP).

Menzel-Glaset Company, Menzel, Germany

Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου (Microscope superfrosted glass slides).

Merck Company, Darmstadt, Germany

Κυανό του τροπανίου (trypan blue) και υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂).

Molecular Probes, Eygene, OR, USA

Ιωδιούχο Προπίδιο (PI), ακετομεθόξυ-εστέρας της καλσεΐνης (Calcein-AM).

Novartis Company, Basle, Switzerland

Δεσφερριοξαμίνη (Desferrioxamine mesilate, DFO).

Roche (Mannheim, Germany)

Κοκτέιλ αναστολέων πρωτεασών.

Schleicher and Schuell Company, Dassel, Germany

Μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (Optitran BA-S 85).

Serva GmbH, Heidelberg, Germany

Αγαρόζη κανονικού σημείου τήξεως.

Sigma Company, St. Luis, MO, USA

Καλλιεργητικά υλικά (RPMI, DMEM εμπλουτισμένο με L-γλουταμίνη), DMSO (Dimethyl Sulfoxide), οξειδάση της γλυκόζης (G.O.) (Aspergillus niger, 18000 units/g), λευκωματίνη ορού βοός (BSA), δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS), Triton X-100, διθειοθρεϊτόλη (DTT), χρωστική Hoechst 33342, μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της β-ισομορφής της ακτίνης (A5441), δεφεριπρόνη (3-Hydroxy-1,2-dimethyl-4(1H)-pyridone).

Thermo Scientific Company, Rockford, USA

Αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (SuperSignal Reagent Kit).

Ο εξειδικευμένος σιδηροδεσμευτής SIH (Salicyldehyde Isonicotinoyl Hydrazone) ήταν μια ευγενική χορηγία του Καθηγητή Prem Ponka (McGill University, Montreal, Canada). Όλες οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή διαλυμάτων ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας.

2.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

2.2.1 Διατήρηση κυτταρικών σειρών

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές, η κυτταρική σειρά Jurkat, η οποία προέρχεται από T-λεμφοκύτταρα ασθενούς με οξεία λευχαιμία και η κυτταρική σειρά HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line), η οποία προέρχεται από ηπατοκύτταρα ασθενούς με καρκίνο του ήπατος. Η μακροχρόνια διατήρηση της κάθε κυτταρικής σειράς έγινε σε δοχεία τα οποία περιέχουν υγρό άζωτο (-196°C). Η διαδικασία κατάψυξης που ακολουθήθηκε, ήταν η εξής: κύτταρα στην εκθετική φάση ανάπτυξης τους συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα $250 \times g$ (Heraeus egafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Hanau, Germany) για 10 λεπτά. Ακολούθησε επαναιώρηση σε 5 ml PBS και φυγοκέντρηση όπως προηγουμένως. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε στο διάλυμα κατάψυξης, που αποτελείται από 90% εμβρυϊκό ορό μόσχου (FCS) και 10% διμέθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Ένα ml του μίγματος αυτού ($5-7,5 \times 10^6$ κύτταρα) μεταφέρθηκε σε ειδικά σωληνάρια κατάψυξης (cryotubes), τα οποία ψύχθηκαν σταδιακά. Αρχικά τοποθετήθηκαν στους 4°C για 10 λεπτά, στη συνέχεια σε καταψύκτη στους -80°C για 48 ώρες και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο υγρό άζωτο, όπου και διατηρήθηκαν μέχρι τη χρήση τους.

Για την επανακαλλιέργεια της κυτταρικής σειράς, τα επιθυμητά κύτταρα μεταφέρθηκαν γρήγορα από το υγρό άζωτο σε θερμοκρασία 37°C . Το

περιεχόμενο του σωληναρίου μεταφέρθηκε σε φυγοκεντρικό σωλήνα με 9 ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 250 x g. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 10 ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας όπου και καλλιεργήθηκε στις συνθήκες συνθήκες καλλιέργειας για 24 ώρες.

2.2.2 Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας

Τα κύτταρα Jurkat αναπτύσσονται ως εναιώρημα σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% ορό FBS (Fetal Bovine Serum, FBS), απενεργοποιημένο με θέρμανση, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη για εξασφάλιση στείρων συνθηκών.

Αντίθετα, τα κύτταρα HepG2 έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται σε σταθερό υπόστρωμα και αναπτύσσονται μέχρι τη δημιουργία πλήρους ταπήτη, σχηματίζοντας αποφυάδες, σε πλήρες καλλιεργητικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), με L-γλουταμίνη, το οποίο περιέχει 10% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Bovine Serum, FBS), 100 U/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη για εξασφάλιση στείρων συνθηκών.

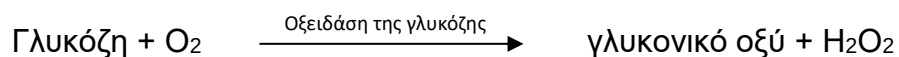
Ο χειρισμός των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε σε εστία κάθετης νηματικής ροής, ώστε να εξασφαλίζεται περιβάλλον απομονωμένο από την ατμόσφαιρα για αποφυγή μολύνσεων. Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε επωαστικό κλίβανο (Forma Scientific), που παρείχε σταθερή θερμοκρασία 37 °C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂, για να διατηρείται σταθερό το pH στο καλλιεργητικό υλικό. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν περισσότερες από μία φορές αποστειρώθηκαν στους 120 °C για μία ώρα. Για την κυτταρική σειρά HepG2, όταν τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, γινόταν διασπορά των κυττάρων σε αραιώση 1 προς 6.

2.2.3 Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων

Η μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο του αποκλεισμού της χρωστικής κυανού του τροπανίου (trypan blue dye exclusion) από τα ζωντανά κύτταρα, η οποία δεν διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 0,25% χρωστικής σε 0,15 M NaCl. Σε ένα μέρος εναιωρήματος κυττάρων προστέθηκε ένα μέρος διαλύματος της χρωστικής, το μίγμα μεταφέρθηκε σε αιματοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer και παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο. Τα ζωντανά κύτταρα φαίνονταν φωτεινά και διάφανα, ενώ τα νεκρά εμφανίζονταν βαθύ μπλε. Η βιωσιμότητα είναι το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων στο σύνολο αυτών που μετρήθηκαν.

2.2.4 Επώαση των κυττάρων

Κύτταρα στην εκθετική φάση ανάπτυξης συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (250 x g, 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου), επαναιωρήθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό σε συγκέντρωση $1,5 \times 10^6$ κύτταρα/ml και αφέθηκαν για 1,5 ώρα σε σταθερές συνθήκες καλλιέργειας. Στη συνέχεια, τα κύτταρα προεπώαστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων, ροσμαρινικού οξέος και παραγώγων του, διαλυμένα σε DMSO, δεσφεριοξαμίνης και δεφεριπρόνης, διαλυμένα σε δισαπτεσταγμένο νερό, για τα ενδεικνυόμενα σε κάθε περίπτωση χρονικά διαστήματα. Στο τελικό μίγμα προεπώασης η μέγιστη συγκέντρωση του διαλύτη δεν ξεπερνούσε το 3%. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχτηκε, ούτως ώστε να μην επηρεάζει την εκάστοτε μέθοδο, που χρησιμοποιήθηκε παρακάτω. Στην περίπτωση της μελέτης της βλάβης στο DNA ακολούθησε έκθεση των κυττάρων σε οξειδάση της γλυκόζης. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα τη γλυκόζη του θρεπτικού υλικού (5 mM) και O_2 και παράγει γλυκονικό οξύ και H_2O_2 σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,6 μg/ml, η οποία παράγει 12 μM H_2O_2 ανά λεπτό και ο χρόνος έκθεσης ήταν 10 λεπτά. Για τη μελέτη της

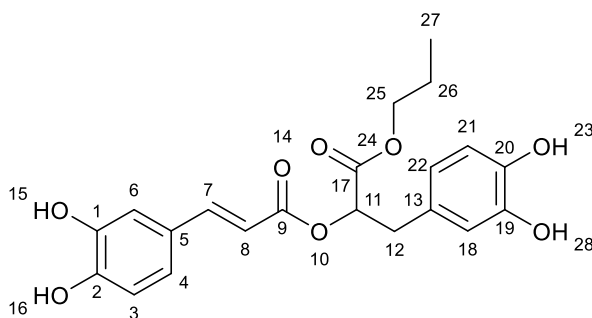
απόπτωσης τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 250 μM H_2O_2 , το οποίο προστέθηκε άμεσα στην κυτταρική καλλιέργεια για 7 ώρες.

2.3 Μέθοδοι

2.3.1 Σύνθεση παραγώγων ροσμαρινικού οξέος

Σύνθεση πρόπυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος

Σε ένα διάλυμα ροσμαρινικού οξέος (100 mg, 0,277 mmol) σε προπανόλη (2ml) πραγματοποιήθηκε σταγονομετρική προσθήκη στους 0 °C τριμεθυλοσιλανίου (105,6 μl , 0,83 mmol), και το μείγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε για 16 ώρες. Στη συνέχεια, αφού επιβεβαιώθηκε μέσω χρωματογραφίας TLC ο πλήρης μετασχηματισμός των αρχικών ενώσεων στο επιθυμητό προϊόν, το διάλυμα της αντίδρασης συμπυκνώθηκε υπό ελαττούμενη πίεση και καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης, όπου λάβαμε τον προπυλεστέρα του ροσμαρινικού οξέος (Εικόνα 12) ως αχνό κίτρινο στερεό σε απόδοση 85 % (95 mg).

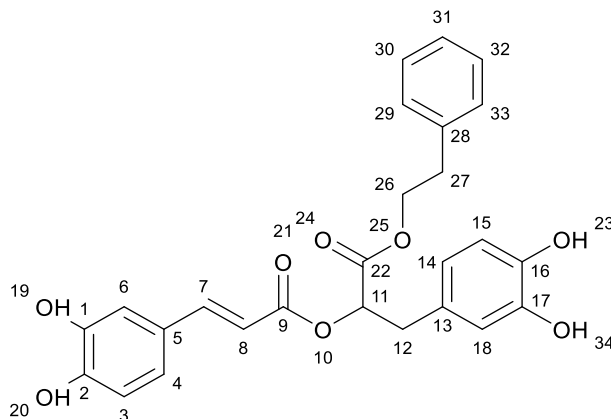


Εικόνα 12. Χημική δομή του πρόπυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος.

Σύνθεση φαιnéθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος

Συντέθηκε με παρόμοιο τρόπο με τον πρόπυλο-εστέρα του εστέρα του ροσμαρινικού οξέος από ροσμαρινικό οξύ και 1-φαιναιθυλόλη. Απομονώθηκε

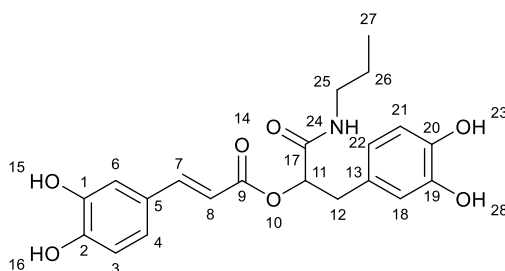
με χρωματογραφία στήλης σαν καστανό στερεό σε απόδοση 90% (116 mg) (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Χημική δομή του φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος.

Σύνθεση πρόπυλο-αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος

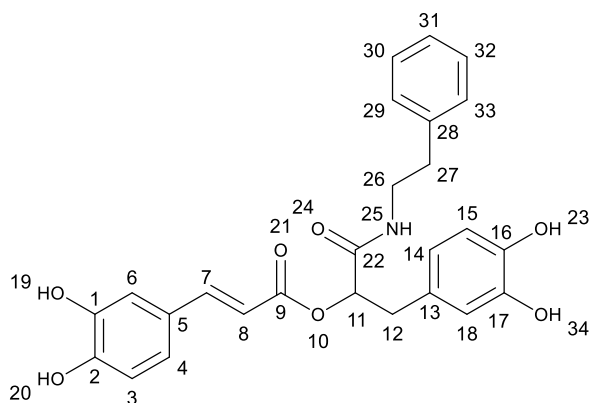
Σε διάλυμα ροσμαρινικού οξέος (30 mg, 0,083 mmol) και υδροξυβενζοτρίαζολίου (16,95 mg, 0,1254 mmol), σε 3 ml DMF πραγματοποιήθηκε σταγονομετρική προσθήκη στους 0 °C του N,N'-διισοπροπυλοκαρβομιιδίου (19.5 μ l, 0.124 mmol), υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Αφού το μείγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε για 30 λεπτά, ακολούθησε σταγονομετρική προσθήκη της προπυλαμίνης (13,5 μ l, 0,143mmol) και το μείγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε περαιτέρω σε θερμοκρασία δωματίου για 16 ώρες. Στην συνέχεια, αφού επιβεβαιώθηκε μέσω χρωματογραφίας TLC ο πλήρης μετασχηματισμός των αρχικών ενώσεων στο επιθυμητό προϊόν, στο διάλυμα προστέθηκε νερό (50 ml) και ακολούθησε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (2 $\times$ 10 ml). Αφού οι οργανικές φάσεις ξηράθηκαν υπό θειϊκό νάτριο, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό ελαττούμενη πίεση, όπου και λάβαμε το φαινέθυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος (Εικόνα 14) σαν υποκίτρινο στερεό σε απόδοση 70% (23,35 mg).



Εικόνα 14. Χημική δομή του πρότυλο-αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος.

Σύνθεση φαινέθυλο-αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος

Συντέθηκε με παρόμοιο τρόπο με το πρότυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος από ροσμαρινικό οξύ και φαιαιθυλαμίνη. Απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης σαν κίτρινο στερεό σε απόδοση 58,3% (75 mg) (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Χημική δομή του φαινέθυλο-αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος.

Όλες οι εμπορικά διαθέσιμες χημικές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με ξηρούς άνυδρους διαλύτες υπό άνυδρες συνθήκες, εκτός αν σημειώθηκε διαφορετικά. Το διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) αγοράστηκε σε άνυδρη μορφή και χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Τα ευαίσθητα στην ατμόσφαιρα και στην υγρασία υγρά μεταφέρθηκαν μέσω σύριγγας υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Τα οργανικά διαλύματα συμπυκνώθηκαν με περιστροφική εξάτμιση στους 36 °C υπό ελαττούμενη πίεση. Η χρωματογραφία στήλης πραγματοποιήθηκε με πυριτική πηκτή 60 (230-400 mesh) ενώ η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) εκτελέστηκε με προ-επικαλυμμένες πλάκες πυριτικής πηκτής 60 F254.

Οι πλάκες TLC οπτικοποιήθηκαν με έκθεση σε υπεριώδες φως (UV-vis) ή / και βύθιση σε υδατικό διάλυμα υπερμαγγανικού καλίου ($\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$). Τα φάσματα ^1H και ^{13}C NMR καταγράφηκαν σε φασματοφωτόμετρο Bruker Avance FT-NMR με συχνότητα 400 MHz. Τα φάσματα μάζας ESI (ιονισμού ψεκασμού ηλεκτρονίων) καταγράφηκαν με όργανο LC / MSD της σειράς Agilent 1100 (Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων) (Παράρτημα).

Η σύνθεση των παραγώγων του ροσμαρινικού οξέος πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας, του τμήματος Χημείας του πανεπιστημίου Ιωαννίνων, από τον Μεταπτυχιακό Φοιτητή κ. Δημήτριο Διαμαντή.

2.3.2 Ηλεκτροφόρηση του DNA μεμονωμένων κυττάρων (Single Cell Gel Electrophoresis/Comet assay)

Η εκτίμηση των βλαβών στο κυτταρικό DNA από το H_2O_2 έγινε χρησιμοποιώντας την τεχνική της «ηλεκτροφόρησης μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης», η οποία είναι γνωστή και ως «comet assay». Η comet assay είναι μία απλή, εύχρηστη και ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης σχάσεων στη μία αλυσίδα του DNA. Η μέθοδος αυτή διαθέτει το πλεονέκτημα ότι δίνει τη δυνατότητα να μελετηθεί η βλάβη του κάθε κυττάρου ξεχωριστά. Η πρώτη περιγραφή της «comet assay» πραγματοποιήθηκε από τους Ostling και Johanson, οι οποίοι δημοσίευσαν μία μέθοδο για την ανίχνευση των βλαβών στο κυτταρικό DNA μετά από έκθεση των κυττάρων σε ιονίζουσα ακτινοβολία (Ostling and Johanson, 1984). Λίγα χρόνια αργότερα, ο Singh και οι συνεργάτες του (Singh et al., 1988), τροποποίησαν την αρχική μορφή των Ostling και Johanson και έβαλαν τη βάση για τη μετέπειτα εξέλιξη της μεθόδου. Από τη στιγμή που εμφανίστηκε μέχρι σήμερα, η μέθοδος έχει υποστεί διάφορες αλλαγές, με τις οποίες αυξήθηκαν σημαντικά τόσο η ευαισθησία όσο και η χρησιμότητά της. Έτσι, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες, η comet assay ανιχνεύει σχάσεις στις μονές ή διπλές αλυσίδες του DNA, αλλά και οξειδωμένες βάσεις του DNA, οι οποίες μετά από επώαση με κατάλληλα ένζυμα, που τις αναγνωρίζουν, απομακρύνονται και με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται σχάσεις στο DNA, οι οποίες στη συνέχεια ανιχνεύονται με την τεχνική αυτή.

Με την παραλλαγή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, εκτιμήθηκαν οι σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA. Προκειμένου να γίνει αυτό, το DNA ηλεκτροφορήθηκε κάτω από ισχυρά αλκαλικές συνθήκες ($\text{pH} > 13$), με αποτέλεσμα τη μετουσίωσή του (λύση των δεσμών υδρογόνου και αποδιάταξη του δίκλωνου DNA προς μονόκλωνο). Η παρουσία σχάσεων στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA επιτρέπει τη μετατόπιση του αρνητικά φορτισμένου DNA προς την άνοδο κατά την ηλεκτροφόρηση, με αποτέλεσμα να προκύπτουν διάφοροι σχηματισμοί του DNA που μοιάζουν με κομήτες. Μάλιστα, το ποσοστό του DNA που μετατοπίζεται είναι ανάλογο με τον αριθμό των σχάσεών του. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ανιχνεύονται επίσης και απουρινικές ή απυριμινιδικές περιοχές (AP sites), οι οποίες σε υψηλό pH μετατρέπονται σε σχάσεις (alkali labile sites). Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι δίκλωνες αλυσίδες του DNA, που δεν έχουν μετατοπιστεί την ηλεκτροφόρηση, επανασχηματίζονται. Έτσι, οι σχηματισμοί που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο μετά από τη χρώση του DNA, είναι στην πράξη «θηλιές» του DNA, που απελευθερώνονται από ένα υψηλά υπερελικομένο σύμπλοκο DNA-πρωτεϊνών (nucleoids).

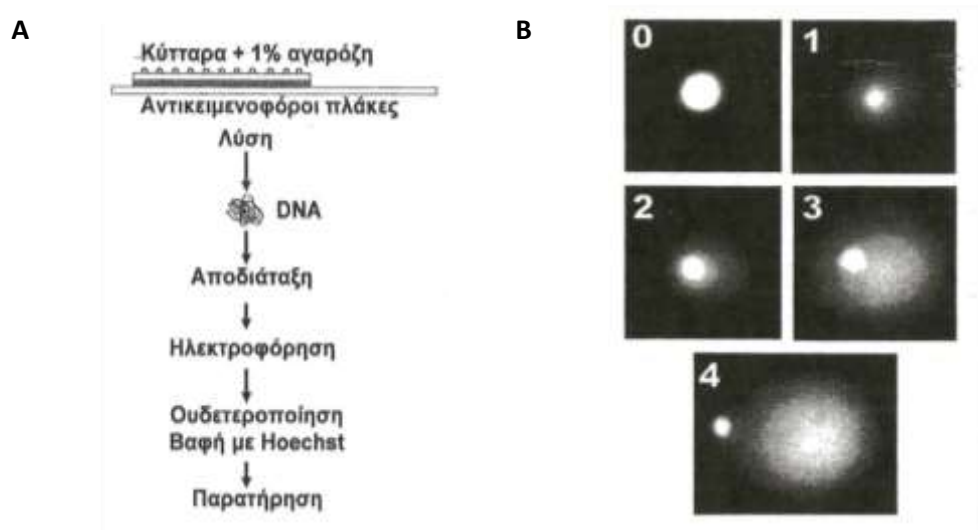
Πειραματική διαδικασία

Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6/\text{ml}$) τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 96 φρεατίων και αφέθηκαν να ηρεμήσουν για 1 ώρα. Ομοίως, κύτταρα HepG2 (80.000/φρεάτιο) τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 24 φρεατίων και αφέθηκαν να ηρεμήσουν για 24 ώρες. Στη συνέχεια, μετά την προεπώαση των κυττάρων με την επιθυμητή ένωση ή την/τις επιθυμητή/ες ένωση/εις, ακολούθησε έκθεση των κυττάρων για 10 λεπτά, παρουσία ή απουσία 0,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ οξειδάση της γλυκόζης (G.O.), ποσότητα ικανή να παράγει 10 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Έπειτα, τα κύτταρα συλλέχθηκαν, και αφού αναμίχθηκαν με κρύο PBS (με αναλογία 1:10), φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 400 x g (centrifuge 5415D, erppendorf). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl διαλύματος αγαρόζης χαμηλού σημείου πήξεως (1% σε PBS) και μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου, οι οποίες προηγουμένως είχαν επιστρωθεί με αγαρόζη κανονικού σημείου πήξεως (1 % σε PBS), και καλύφθηκε με καλυπτρίδα 2 x 2 cm. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν στους 4 °C για 10 λεπτά, ώστε να σχηματιστεί η

πηκτή και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν για 60 λεπτά σε διάλυμα λύσης (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 μ M Tris σε pH 10 και 1 % Triton-X 100 κατά όγκο) στους 4°C. Στο στάδιο αυτό, οι μεμβράνες, οι πρωτεΐνες και τα περισσότερα κυτταρικά συστατικά απομακρύνονται και παραμένει μόνο το πυρηνικό DNA εγκλωβισμένο στην πηκτή της αγαρόζης, υπερελικωμένο και συσκευασμένο σε μια πυρηνοειδή (nucleus-like) δομή. Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε μια οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, που περιείχε ψυχρό διάλυμα αποδιάταξης (Unwinding: 0,3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) για 40 λεπτά, έτσι ώστε να ξεδιπλωθούν οι αλυσίδες του κυτταρικού DNA. Η μετέπειτα ηλεκτροφόρηση του DNA πραγματοποιήθηκε στο ίδιο διάλυμα (30 V, 300 mA) για 30 λεπτά και ακολούθησε ουδετεροποίηση σε PBS, τρεις φορές από 5 λεπτά η κάθε μία (Panagiotidis et al., 1999).

Αξιολόγηση των σχάσεων

Για την αξιολόγηση των σχάσεων πραγματοποιήθηκε χρώση του κυτταρικού DNA με προσθήκη 20 μ l διαλύματος της φθορίζουσας χρωστικής Hoechst 33342 (25 μ g/ml σε PBS) ανά πλάκα και παραμονή στο σκοτάδι για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, οι πλάκες εμβαπτίστηκαν σε PBS και η πηκτή καλύφθηκε με καλυπτρίδα. Οι πλάκες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρο διέγερσης 490 nm και σε μεγέθυνση 400 x. Η βλάβη δεν είναι ομοιογενής και η οπτική της εκτίμηση για κάθε δείγμα, βασίζεται στο χαρακτηρισμό 100 τυχαίων σχηματισμών. Οι σχηματισμοί του πυρηνικού DNA που έχουν υποστεί βλάβη, παρουσιάζουν χαρακτηριστική μορφολογία, η οποία μοιάζει με την κεφαλή και την ουρά ενός κομήτη. Κάθε σχηματισμός κατατάχθηκε σε μια από τις 5 τάξεις (0-4), ανάλογα με τα μορφολογικά του γνωρίσματα (Εικόνα 16).



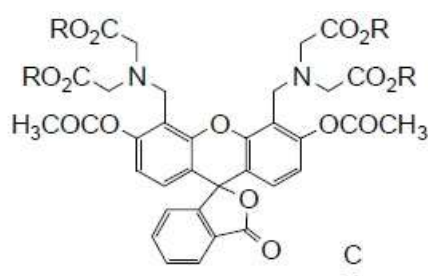
Εικόνα 16. (Α) Καταγραφή των σταδίων της πειραματικής διαδικασίας της τεχνικής “comet assay” και (Β) μορφολογική κατάταξη των σχηματισμών του DNA στις πέντε τάξεις.

Η βλάβη σε κάθε δείγμα εκφράστηκε αθροιστικά, πολλαπλασιάζοντας το ποσοστό των σχηματισμών ανά τάξη με τον αριθμό της τάξης που ανήκε και εκφράζοντας τη βλάβη σε αυθαίρετες μονάδες. Έτσι, η βλάβη του DNA μπορεί να λάβει τιμές από 0 (όταν όλοι οι σχηματισμοί ανήκουν στην τάξη 0) έως 400 (όταν όλοι οι σχηματισμοί ανήκουν στην τάξη 4) αυθαίρετες μονάδες (Panagiotidis et al., 1999). Με αυτόν τον τρόπο η ολική βλάβη στο DNA ενός κυτταρικού πληθυσμού μπορεί να εκφραστεί σε αυθαίρετες μονάδες. Η οπτική καταμέτρηση συσχετίζεται σχεδόν γραμμικά με άλλες παραμέτρους, όπως το επί τοις εκατό ποσοστό του DNA που βρίσκεται στην «ουρά», το οποίο καθορίζεται με ανάλυση σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη χρήση ενός εξειδικευμένου προγράμματος (Collins et al., 1995, Ross et al., 1995, Jornot et al., 1998, Duthie et al., 1998).

2.3.3 Μέτρηση της ενδοκυττάριας δέσμευσης του καταλυτικά ενεργού σιδήρου (LIP)

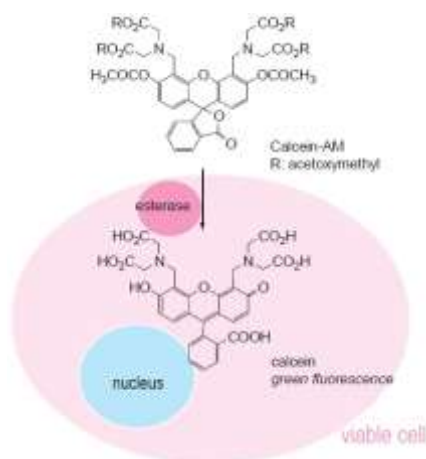
Για την εκτίμηση των επιπέδων του LIP σε ανέπαφα κύτταρα, πρόσφατες μελέτες επικεντρώθηκαν στη χρησιμοποίηση εξειδικευμένων χηλικών παραγόντων με δυνατότητα φθορισμού (Epsztejn et al., 1997, Kakhlon and

Cabantchik, 2002). Οι παράγοντες αυτοί, έχουν την ικανότητα να εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων και να λειτουργούν ως «ανιχνευτές» των επιπέδων του LIP, χωρίς να επηρεάζουν την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μιας τέτοιας ευαίσθητης φθορίζουσας ουσίας που χρησιμοποιείται εκτενώς την τελευταία δεκαετία για τον προσδιορισμό των επιπέδων του LIP, κυρίως σε κύτταρα σε καλλιέργειες, αποτελεί η καλσεΐνη (Glickstein et al., 2005, Cabantchik, 2014) (Εικόνα 171).



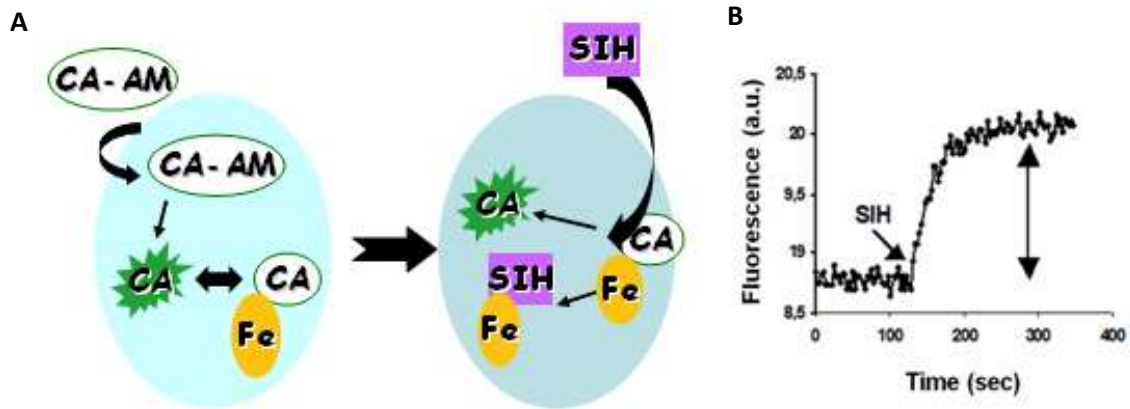
Εικόνα 17. Δομή της καλσεΐνης.

Η καλσεΐνη, λόγω των αρνητικών φορτίων που φέρουν οι καρβοξυλομάδες της σε φυσιολογικό pH, δεν έχει τη δυνατότητα να εισέλθει μέσα στα κύτταρα. Η δυσκολία αυτή, μπορεί να παρακαμφθεί με τη χρήση της εστεροποιημένης της μορφής, που την καθιστά λιπόφιλη (καλσεΐνη-AM, ακετομεθόξυ εστέρας της καλσεΐνης). Η καλσεΐνη-AM αποτελείται από ένα μόριο φλουοροσκεΐνης συνδεδεμένο με ένα μόριο EDTA. Η παρουσία των ακετομεθόξυ-εστερικών ομάδων στο μόριο της καλσεΐνης-AM επιτρέπει τη διάχυσή της μέσω της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων. Στο εσωτερικό του κυττάρου οι εστερικές ομάδες υδρολύονται από μη-εξειδικευμένες εστεράσες. Επομένως, η καλσεΐνη αποκτά αρνητικό φορτίο και με αυτόν τον τρόπο αναστέλλεται η ικανότητά της να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες, με αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια συσσώρευσή της. Επίσης, με την απομάκρυνση των εστερικών ομάδων επαναδιατάσσονται οι διπλοί δεσμοί που υπάρχουν στο μόριό της, γεγονός που την καθιστά ικανή να φθορίζει (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Διαγραμματική απεικόνιση δράσης καλσεΐνης.

Ένα μέρος της καλσεΐνης δεσμεύει ενδοκυττάρια ιόντα μετάλλων, κυρίως δισθενή (π.χ. ασβεστίου σιδήρου), γεγονός που έχει ως συνέπεια τη μείωση του φθορισμού της. Συγκεκριμένα, έχει τη δυνατότητα να δεσμεύει τόσο δισθενή, όσο και τρισθενή ιόντα σιδήρου, με σταθερές συγγένειας 10^{14} και 10^{24} M^{-1} , αντίστοιχα, που βρίσκονται χαλαρά συνδεδεμένα σε διάφορα μόρια στο εσωτερικό του κυττάρου. Σε ένα δεύτερο στάδιο, η προσθήκη, σε περίσσεια, ισχυρότερων εξειδικευμένων δεσμευτών σιδήρου με ικανότητα διάχυσης μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, όπως του παράγοντα SIH (Salicylaldehyde Isonicotonoyl Hydrazone) (Kakhlon and Cabantchik, 2002), που παρουσιάζει σταθερά συγγένειας για το Fe^{3+} 10^{31} M^{-1} , οδηγεί στην απομάκρυνση του σιδήρου από την καλσεΐνη και κατά συνέπεια, στην αύξηση του φθορισμού της, σε ποσοστό ανάλογο με το ποσό του σιδήρου που ήταν συνδεδεμένο σε αυτή (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. (Α) Διαγραμματική αναπαράσταση της μέτρησης της δέσμευσης των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου με τη μέθοδο της καλσεΐνης. (Β) Μεταβολή της έντασης του φθορισμού της καλσεΐνης μετά την προσθήκη SIH.

Πειραματική διαδικασία

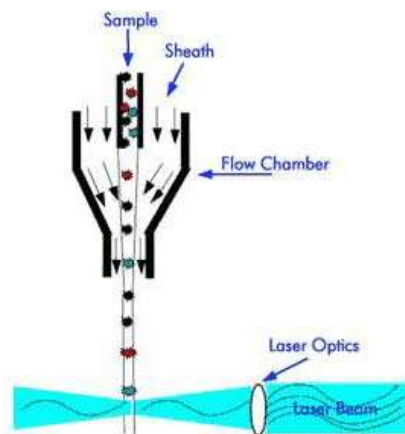
Ο προσδιορισμός των «οξειδοαναγωγικά ενεργών» ιόντων σιδήρου, που ονομάζεται και LIP (Labile Iron Pool) στην κυτταρική σειρά Jurkat, πραγματοποιήθηκε φθορισμομετρικά με τη μέθοδο της ευαίσθητης φθορίζουσας ουσίας καλσεΐνης. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^5/\text{ml}$) συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα $250 \times g$. Το ίζημα που συλλέχθηκε με τη φυγοκέντρηση επαναιωρήθηκε σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος, που περιείχε PBS, 1 mg/ml ορού βοός αλβουμίνης και 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος HEPES με pH 7,3. Ακολούθως, τα κύτταρα επωάστηκαν με $0,15 \mu\text{M}$ καλσεΐνης-AM για 10 λεπτά στους 37°C και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα $250 \times g$. Στο επόμενο στάδιο της διαδικασίας, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2,2 ml του προηγούμενου ρυθμιστικού διαλύματος και τοποθετήθηκε σε θερμοστατούμενη κυβέτα (37°C), υπό ανάδευση, όπου ο φθορισμός της καλσεΐνης (μήκος κύματος διέφευξης, $\lambda_{\delta} = 488 \text{ nm}$ και μήκος κύματος εκπομπής, $\lambda_{\epsilon} = 517 \text{ nm}$) καταγράφηκε σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού (F-2500 Hitachi). Τέλος, προστέθηκε για 5 λεπτά ο εξειδικευμένος σιδηροδεσμευτής SIH ($4 \mu\text{M}$) που έχει την ικανότητα να διαπερνά την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων και να αποσπά σίδηρο που είναι δεσμευμένος με την καλσεΐνη, προκαλώντας έτσι την αύξηση του φθορισμού της. Η διαφορά του φθορισμού της καλσεΐνης πριν και

μετά την προσθήκη του SIH, εκφρασμένη σε αυθαίρετες μονάδες, αντιπροσωπεύει τον ενδοκυττάριο σίδηρο που δεσμεύει η καλσεΐνη.

Το ροσμαρινικό οξύ και τα παράγωγά του προστέθηκαν σε κύτταρα φορτωμένα με καλσεΐνη, πριν την προσθήκη του εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή SIH και παρατηρήθηκε μεταβολή στην ένταση του φθορισμού της καλσεΐνης (ΔF), επιτρέποντας έτσι την ποσοτικοποίηση των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου.

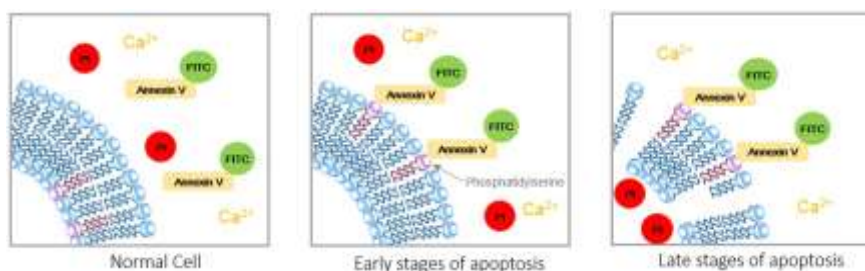
2.3.4 Προσδιορισμός απόπτωσης με κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής είναι μια αυτοματοποιημένη τεχνική μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η μέτρηση ορισμένων βιοχημικών και βιοφυσικών παραμέτρων των κυττάρων, μεμονωμένα, όταν αυτά βρίσκονται σε εναιώρημα εντός υγρού που ρέει σε νηματοειδή ροή (Shapiro, 2003, Longobardi, 2001) (Εικόνα 20). Η ανάλυση, η οποία γίνεται με βάση τον εκπεμπόμενο φθορισμό και τη σκέδαση του φωτός, μπορεί να αφορά το μέγεθος, τον όγκο, την κοκκίωση, καθώς και χημικές ιδιότητες όπως την περιεκτικότητα σε DNA και RNA, πρωτεΐνες και ένζυμα. Παρουσιάζει μοναδικά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες συμβατικές τεχνικές, όπως υψηλή ταχύτητα ανάλυσης, υψηλή ευαισθησία, επαναληψιμότητα, μεγάλη ποικιλία υλικών που μπορούν να αναλυθούν και δυνατότητα ταυτοποίησης σπάνιων πληθυσμών.



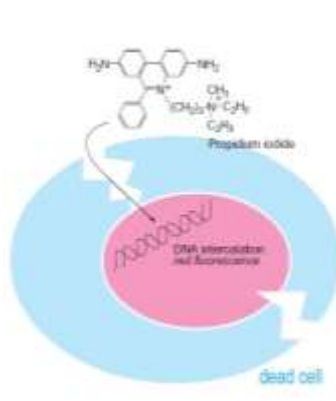
Εικόνα 20. Διάταξη κυψελίδας σε κυτταρομετρητή ροής. Διακρίνεται η κεντρική ροή του δείγματος, η περιβάλλουσα ροή (sheath), η προερχόμενη από laser φωτεινή δέσμη ακτινοβολίας και η σκέδαση της ακτινοβολίας μετά από πρόσπτωση ανά κύτταρο (<http://slideplayer.gr/slide/11831812/>).

Για τον προσδιορισμό της επαγωγής της απόπτωσης σε καρκινικά κύτταρα από αντικαρκινικούς παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν οι χρωστικές ανεξίνη (Annexin V-FITC) και ιωδιούχο προπιδίο (Propidium Iodide, PI) για τη χρώση των πρώιμων αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων αντίστοιχα (Wlodkowic et al., 2009). Η ανεξίνη είναι μια πρωτεΐνη που συνδέεται με τη φωσφατιδυλσερίνη. Η φωσφατιδυλσερίνη είναι ένα φωσfolιπίδιο της εσωτερικής δομής των κυτταρικών μεμβρανών. Στα αποπτωτικά κύτταρα η φωσφατιδυλσερίνη μεταφέρεται στην επιφάνειά τους. Εκεί, μπορεί να συνδεθεί με την ανεξίνη, η οποία είναι μια εξαρτώμενη από ιόντα Ca^{+2} πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 35-36 kDa, με ιδιαίτερα υψηλή εξειδίκευση. Η σύνδεση αυτή εξαρτάται από την παρουσία ιόντων Ca^{+2} . Η ανεξίνη είναι συζευγμένη με τη χρωστική φλουορεσκεΐνη (fluorescein, FITC) προκειμένου να γίνει ανίχνευση των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 21).



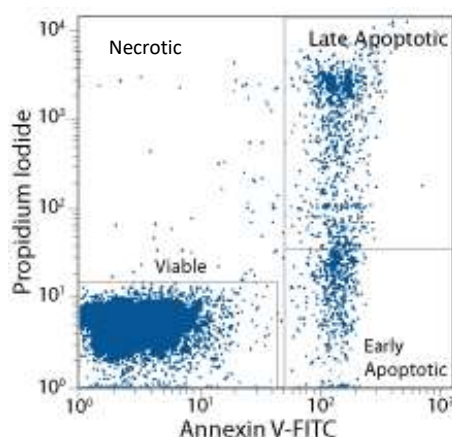
Εικόνα 21. Διαγραμματική απεικόνιση της δράσης της χρωστικής φλουορεσκεΐνη (FITC).

Το ιωδιούχο προπιδίο είναι μια φθορίζουσα χρωστική η οποία συνδέεται με το DNA. Μπορεί να εισέλθει μόνο σε νεκρωτικά κύτταρα όπου έχει γίνει λύση της κυτταρικής τους μεμβράνης, για αυτό και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των νεκρωτικών κυττάρων (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Διαγραμματική απεικόνιση της δράσης της χρωστικής ιωδιούχο προπιδίο (Propidium iodide, PI).

Με αυτόν τον τρόπο, είναι εφικτός ο διαχωρισμός των κυττάρων σε 4 κατηγορίες: ζωντανά κύτταρα, πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα, όψιμα αποπτωτικά κύτταρα και νεκρά κύτταρα (Εικόνα 23).



Εικόνα 23. Διαχωρισμός των κυττάρων με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής.

Πειραματική διαδικασία

Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6/\text{ml}$) τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων και μετά τις αντίστοιχες επωάσεις, συλλέχθηκαν και καταμετρήθηκαν. Σε κάθε δείγμα 1×10^5 κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος ασβεστίου (0,1 M HEPES/NaOH pH 7,4, 140mM NaCl, 25mM CaCl_2) και επωάστηκαν με 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Annexin-V FITC και 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ιοδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide) για 20 λεπτά, στους 4 °C, στο σκοτάδι (Vermes et al., 1995). Ακολούθησε προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος ασβεστίου και ανάλυση σε κυτταρομετρητή ροής (CyFlow ML, Partec).

2.3.5 Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Ολικό εκχύλισμα πρωτεϊνών

Για την απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, κύτταρα Jurkat 3×10^6 ($1,5 \times 10^6/\text{ml}$), μετά την έκθεσή τους επαναιωρήθηκαν σε ψυχρό διάλυμα λύσης που περιείχε 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0,5 % sodium deoxycholate, 0,1 % SDS, 1 x αναστολείς πρωτεασών και αναστολείς φωσφατασών (2 mM sodium orthovanadate, 20 mM β-φωσφορική γλυκερόλη και 10 mM NaF). Μετά από επώαση στον πάγο για 30 λεπτά, τα δείγματα αναδεύτηκαν ισχυρά και φυγοκεντρήθηκαν στα $14000 \times g$ στους 4 °C

για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο, που αποτελεί το ολικό πρωτεϊνικό εκχύλισμα, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των πρωτεϊνών με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα παραπάνω εκχυλίσματα προσδιορίστηκε με την μέθοδο “protein microassay” της Bio-Rad, που βασίζεται στη μέθοδο Bradford. Η μέθοδος στηρίζεται στη μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης από τα 465 nm στα 595 nm όταν το Coomassie Brilliant Blue G-250 δεσμευτεί σε πρωτεΐνες κάτω από όξινες συνθήκες. Αναλυτικά η μέθοδος έχει ως εξής: Σε 800 μl υδατικού διαλύματος από τα άγνωστα δείγματα πρωτεΐνης προστέθηκαν 200 μl του αντιδραστηρίου της Bio-Rad. Μετά από έντονη ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα άγνωστα δείγματα προσδιορίστηκε με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την οποία χρησιμοποιήθηκε διάλυμα γνωστής συγκέντρωσης αλβουμίνης από ορό βοός (BSA).

2.3.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν, διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από συνθήκες αποδιάταξης της φυσικής δομής τους. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου αποτελεί προϊόν συνπολυμερισμού του ακρυλαμιδίου και του N,N-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμιδίου, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ηλεκτρικά ουδέτερων, τρισδιάστατων πλεγμάτων, που το μέγεθος των πόρων τους εξαρτάται από την ολική συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου. Ο πολυμερισμός επιτυγχάνεται μέσω της απελευθέρωσης ελεύθερων ριζών από το υπερθειικό αμμώνιο ((NH₄)₂S₂O₈, APS) με καταλύτη την N, N, N', N'-τετραμέθυλο-αιθυλοδιαμίνη (TEMED), που καταλύει τη διάδοση των ελεύθερων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού. Ο αποδιατακτικός

παράγοντας είναι το ανιοντικό απορρυπαντικό δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS), γι' αυτό και η ηλεκτροφόρηση χαρακτηρίζεται ως ηλεκτροφόρηση σε πηκτή δωδεκυλοθειϊκού νατρίου–πολυακρυλαμιδίου (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE).

Πειραματική διαδικασία

Το σύστημα της πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου αποτελείται από δύο διαφορετικές πηκτές, την πηκτή διαχωρισμού (resolving gel ή running gel) και την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel). Στη πηκτή επιστοίβαξης γίνεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του δείγματος, πριν εισέλθουν στην πηκτή διαχωρισμού, και περιέχει 5 % ακρυλαμίδιο (w/v), 0,125 M Tris pH 6,8 και 0,1 % (w/v) SDS και APS. Οι πρωτεΐνες εισέρχονται στη συνέχεια, στην πηκτή διαχωρισμού, που έχει την απαιτούμενη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Η πηκτή διαχωρισμού περιέχει 15 % ακρυλαμίδιο (w/v), 0,375 M Tris pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS και APS.

Τα δείγματα των πρωτεϊνών (30 μg), μεταφέρθηκαν στο σύστημα της πηκτής, αφού πρώτα μετουσιώθηκαν με βρασμό επί 5 λεπτά στους 100 °C με το διάλυμα δείγματος Laemmli Buffer και DTT. Το διάλυμα δείγματος αναμίχθηκε σε αναλογία 1:3 (v/v) με το πρωτεϊνικό δείγμα και ο βρασμός διευκόλυνε την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών: το DTT ανήγαγε τους δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες, σε αναλογία περίπου 1,4 g SDS ανά g πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα όλες οι πρωτεΐνες του δείγματος να εμφανίζουν περίπου το ίδιο αρνητικό φορτίο ανά μονάδα μάζας. Έτσι, η ταχύτητα μετατόπισης της πρωτεΐνης στην πηκτή, κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου, εξαρτάται μόνο από το μοριακό της βάρος. Εκτός από τα δείγματα, τοποθετήθηκε στην πηκτή και μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, οι οποίες έφεραν συνδεδεμένη χρωστική, εξυπηρετώντας τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης ανάμεσα στο μοριακό βάρος και την απόσταση που διανύει η κάθε πρωτεΐνη στην πηκτή ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα που περιέχει 0,025 M Tris, 0,198 M γλυκίνη και 0,1 % SDS, στα 125 Volt για περίπου 135 λεπτά (συσκευή MINI – PROTEAN II, BIO-RAD).

2.3.7 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κατά Western

Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση

Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Scheicher & Schuell) υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες που αναφέρονται στο Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Maniatis et al., 1989). Η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης, η πηκτή και το διηθητικό χαρτί Whatman παρέμειναν για 5 λεπτά στο διάλυμα μεταφοράς (0,025 mM Tris, 0,19 M γλυκίνη, 20 % μεθανόλη). Στη συνέχεια, η μεμβράνη μεταφέρθηκε πάνω από την πηκτή, τοποθετήθηκαν ανάμεσα από το χαρτί Whatman και όλα μαζί μεταφέρθηκαν σε συσκευή μεταφοράς (MINI TRANS-BLOT ELECTROPHORETIC TRANSFER CELL 1, BIO-RAD), σχηματίζοντας ένα σάντουιτς, με τη μεμβράνη να βρίσκεται προς το θετικό πόλο. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στο διάλυμα μεταφοράς, στα 250 mAmp για 80 λεπτά. Το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,45 μm . Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αποτύπωσης, οι πρωτεΐνες που βρίσκονταν στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βάφτηκαν με Ponceau (0,1 % σε οξικό οξύ) για 4 λεπτά και ακολούθησε πλύση με νερό. Η μεμβράνη επώαστηκε με το διάλυμα δέσμευσης που περιείχε 5 % άπαχο γάλα σκόνη σε διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 και 0,1 % Tween 20 (PBS-T 0,1 %) σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες με ήπια ανακίνηση προκειμένου να δεσμευτούν οι ελεύθερες, μη ειδικές θέσεις πάνω στην νιτροκυτταρίνη. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης υπό ανακίνηση με αντίσωμα έναντι της φερριτίνης, σε κατάλληλη αραίωση και σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες ή ολονύκτια στους 4 °C. Στη συνέχεια ακολούθησαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών σε διάλυμα PBS-T 0,1 %. Τέλος, η μεμβράνη επώαστηκε με αντίσωμα συζευγμένο με ραφινική υπεροξειδάση (Horseradish Peroxidase, HRP, Jackson Immunoresearch) για 2 ώρες σε 5 % άπαχο γάλα σε PBS-T 0,1 % υπό ανακίνηση. Στη συνέχεια ακολούθησαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών σε διάλυμα PBS-T 0,1 % και η εμφάνιση του σήματος

έγινε με το εμπορικό αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, SuperSignal).

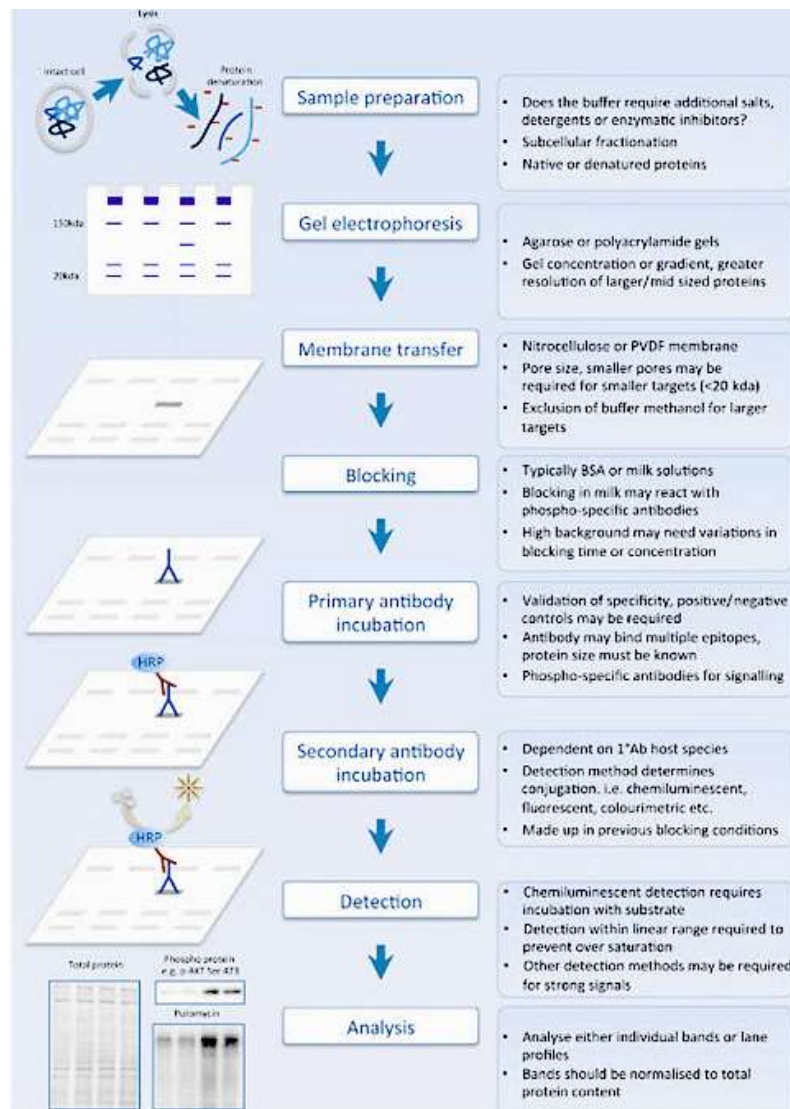
Ανίχνευση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας

Η τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας στηρίζεται στην ανίχνευση της ακτινοβολίας που εκπέμπεται κατά την αποδιέγερση ενός παραγώγου της λουμινόλης. Η υπεροξειδάση, παρουσία H_2O_2 σε αλκαλικό περιβάλλον, οξειδώνει τη λουμινόλη, σύμφωνα με την αντίδραση:



Αμέσως μετά την αντίδραση, η λουμινόλη βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση και επιστρέφοντας στη θεμελιώδη της κατάσταση εκπέμπει ακτινοβολία. Η ακτινοβολία ενισχύεται σε ένταση περίπου 1000 φορές και σε διάρκεια, εξαιτίας της παρουσίας χημικών ενισχυτικών (όπως φαινόλες) κάνοντας δυνατή την αποτύπωσή της σε φιλμ. Η μέγιστη ακτινοβολία, η οποία παρατηρείται 5-20 λεπτά μετά την αντίδραση, έχει μήκος κύματος 428 nm και ενισχύεται μετά από έκθεση σε φιλμ αυτοραδιογραφίας.

Για την ανίχνευση του σήματος με την τεχνική της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας, η μεμβράνη μετά την επεξεργασία με τα αντισώματα, επωάστηκε με το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης (0,125 ml υποστρώματος/cm² μεμβράνης) για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, η μεμβράνη τοποθετήθηκε σε κασέτα εμφάνισης και εκτέθηκε σε φωτογραφικό φιλμ (Kodak X-OMAT/AR) για διάφορους χρόνους από μερικά δευτερόλεπτα μέχρι και λίγα λεπτά, ώστε να ληφθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα. Η εμφάνιση του φιλμ έγινε με τοποθέτησή του στο διάλυμα εμφάνισης (Kodak LX24, x-ray developer) για 2 λεπτά, ενώ το σήμα σταθεροποιήθηκε με τοποθέτηση του φιλμ στο διάλυμα σταθεροποίησης τουλάχιστον για 1 λεπτό (Kodak AL 4, X-ray fixer) (Εικόνα 24).



Εικόνα 24. Διαγραμματική απεικόνιση των σταδίων της τεχνικής Western blot (Bass, J.J. et al., 2017).

2.3.8 Υπολογισμός κυτταρικής πρόσληψης του ροσμαρινικού οξέος και των ανάλογων μορίων του μέσω UHPLC-MS/MS

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα κυτταρικής πρόσληψης είναι η χρωματογραφία υπέρυψης απόδοσης σε συνδυασμό με την φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου (Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled with triple quadrupole Mass Spectrometry, UHPLC-MS/MS). Η εν λόγω τεχνική χρησιμοποιείται εκτενώς στην ανάπτυξη και αξιολόγηση των φαρμάκων, λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας και ευαισθησίας

της, αλλά και της αξιοπιστίας στην εξαγωγή αποτελεσμάτων. Αποτελεί βασικό εργαλείο για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μορίων σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα όπως πλάσμα του αίματος, εκχυλίσματα κυττάρων και ιστούς.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (UHPLC), είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ουσιών από ένα μίγμα και αποτελείται από τρία βασικά μέρη: το δείγμα που βρίσκεται σε υγρή κατάσταση, την κινητή φάση (mobile phase) και την στατική φάση (stationary phase). Η στατική φάση αναφέρεται στην στήλη διαχωρισμού, όπου πραγματοποιείται κατακράτηση των μορίων του δείγματος και η κινητή φάση είναι το σύστημα διαλυτών που διαπερνά την στήλη και παρασύρει τα διάφορα μόρια έξω από αυτήν. Η υγρή χρωματογραφία ως αναλυτική τεχνική εισήχθη το 1905 από τον βοτανολόγο Tswett, ο οποίος χρησιμοποίησε μία στήλη «φορτωμένη» με σωματίδια για τον διαχωρισμό μορίων από εκχυλίσματα φυτών (L. S. Ettre, 1993).

Η φασματομετρία μαζών είναι επίσης, μια σύγχρονη αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση ουσιών. Κατά την εφαρμογή της σε ένα δείγμα, προκύπτουν μοριακά ιόντα σε αέρια φάση της υπό μελέτη ουσίας, τα οποία στη συνέχεια αναλύονται βάσει του λόγου m/z (mass to charge ratio). Οι βασικές δομικές μονάδες ενός φασματομέτρου μαζών είναι: 1) η πηγή ιονισμού (ionization source), όπου παράγονται τα ιόντα του αναλύτη, 2) ο αναλυτής (analyzer), όπου τα ιόντα διαχωρίζονται βάσει του λόγου m/z , 3) ο ανιχνευτής (detector), όπου τα ιόντα ανιχνεύονται βάσει της αφθονίας τους και του λόγου m/z και 4) ένα υπολογιστικό σύστημα (computer), με το οποίο επεξεργάζονται τα δεδομένα. Το 1978 κατασκευάστηκε το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο τριπλό τετράπολο από τους Enke και Yost στο Πανεπιστήμιο του Μίσιγκαν (Yost, 1978).

Πειραματική διαδικασία

Για την προετοιμασία των δειγμάτων, 3×10^6 κύτταρα Jurkat/φρεάτιο στρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 6 φρεατίων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων με 50 μM της εξεταζόμενης ένωσης για 5, 10, 20, 30 και 60 min. Με το πέρας του χρόνου, τα κύτταρα συλλέχθηκαν

και ακολούθησαν 3 πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS). Έπειτα, προστέθηκε διάλυμα ακετονιτριλίου/απιονισμένου νερού σε αναλογία 3:1 και όγκο 600 μl, έτσι ώστε να επέλθει η λύση των κυττάρων. Ακολούθησε ανακίνηση και περαιτέρω λύση με χρήση υπερήχων (τρεις κύκλοι για 10 sec). Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min με ταχύτητα 14000 rpm. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και ακολούθησε εξάτμιση υπό κενό χρησιμοποιώντας το Speedvac SPD1010 (Thermoscientific, USA) για περίπου 2,5 ώρες. Έπειτα, έλαβε χώρα η ανασύσταση των δειγμάτων σε διάλυμα ακετονιτριλίου/απιονισμένου νερού (25 %:75 % v/v) και το φιλτράρισμα κάθε δείγματος με φίλτρα RC μεμβρανών (Phenomenex, USA). Τέλος, με αυτόματη ένεση από το σύστημα PAL (CTC Analytics AG, Switzerland), 2 μl από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν στο σύστημα χρωματογραφίας για την έναρξη της ανάλυσης. Για να εκτιμηθεί το ολοκλήρωμα της κορυφής στην θεωρητική περίπτωση όπου κάθε μόριο εισέρχεται εντός των κυττάρων σε ποσοστό 100 %, 50 μM κάθε ουσίας προστέθηκαν σε κύτταρα που ήδη είχαν υποστεί λύση.

Για το χρωματογραφικό διαχωρισμό των αναλυτών χρησιμοποιήθηκε το σύστημα χρωματογραφίας υπέρυψης απόδοσης (Bruker Advance UHPLC system, Germany). Η αναλυτική στήλη (Kinetex, Phenomenex, USA) που επιλέχθηκε ως στατική φάση είναι τύπου C18 με μήκος 100 mm, διαμέτρου 2,1 mm και διαμέτρου σωματιδίων 2,6 μm και η θερμοκρασία της ρυθμίστηκε στους 40 °C. Επίσης, για την προστασία της στήλης από τυχόν ανεπιθύμητα σωματίδια που περιέχονται στο πλάσμα, εφαρμόζεται μια προστήλη διαμέτρου 2,1 mm. Ως κινητή φάση, επιλέχθηκε μίγμα ακετονιτριλίου-απιονισμένου νερού εμπλουτισμένο με μυρμηκικό οξύ (0,1 %). Οι κινητές φάσεις παρασκευάζονται πριν από κάθε ανάλυση και διηθούνται σε σύστημα διήθησης εφαρμογής κενού (Millipore) και φίλτρα διηθήσεως 0,22 μm. Ως διαλύματα έκπλυσης της σύριγγας του αυτόματου δειγματολήπτη και της βαλβίδας χρησιμοποιήθηκε μίγμα απιονισμένου νερού-ακετονιτριλίου-μυρμηκικού οξέος (50:50:0,1, %v/v) και μίγμα ισοπροπανόλης-ακετονιτριλίου-μεθανόλης-απιονισμένου νερού (30:30:30:10, %v/v). Ο διαχωρισμός προέκυψε με βαθμιδωτή έκλυση με σταθερή ταχύτητα ροής (250 μl/λεπτό), ξεκινώντας με αναλογία 5 %:95 % v/v ακετονιτριλίου-απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια, η ποσότητα του ακετονιτριλίου αυξήθηκε σταδιακά μέχρι 100 % εντός 2 λεπτών, παρέμεινε στο

100% για επιπλέον 2 λεπτά και έπειτα μειώθηκε ξανά στο 5 % μέχρι το τέλος της ανάλυσης. Ο χρόνος κάθε ανάλυσης ήταν 5 λεπτά και ο χρόνος ανάκτησης για το ροσμαρινικό οξύ, τον πρόπυλο-εστέρα, τον φαινέθυλο-εστέρα το πρόπυλο-αμίδιο και το φαινέθυλο-αμίδιο, του ροσμαρινικού οξέος ήταν 2,3, 2,58, 2,69, 2,38 και 2,51 λεπτά, αντίστοιχα.

Το σύστημα φασματομετρίας μαζών τριπλού τετραπόλου (EVOQ Elite ER, Bruker Daltonics, Germany) επιστρατεύτηκε για την ανίχνευση των πέντε μορίων. Η θερμοκρασία του κώνου ρυθμίστηκε στους 350 °C (cone temperature) και η ροή αερίου εκνέφωσης (N_2) στις 20 μονάδες. Η ροή αερίου αποδιαλύτωσης (N_2) ρυθμίστηκε στις 50 μονάδες. Όσον αφορά την πηγή ιονισμού, ορίστηκε ηλεκτρικό δυναμικό -5000 V και θερμοκρασία 300 °C. Ως πηγή ιονισμού επιλέχθηκε ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI, Electrospray Ionization).

Με τη βοήθεια της επιλεκτικής παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων θραυσμάτωσης ιόντων (MRM, Multiple Reaction Monitoring) απομονώθηκαν τα θυγατρικά ιόντα μέσω της θραυσμάτωσης του πρόδρομου ιόντος κάθε ουσίας. Η θραυσματοποίηση του πρόδρομου ιόντος ενός αναλύτη σε θυγατρικό, αυξάνει την εκλεκτικότητα στην ανίχνευση της υπό μελέτη ουσίας, συμβάλλοντας στην ασφαλή διάκριση της από άλλες που μπορεί να υπάρχουν στο ίδιο δείγμα. Τα πρόδρομα και θυγατρικά ιόντα για κάθε μόριο ήταν: ροσμαρινικό οξύ (m/z 359→161), -εστέρας (m/z 401→179), φαινέθυλο-εστέρας (m/z 463.1→179), πρόπυλο-αμίδιο (m/z 400→178.9), και φαινέθυλο-αμίδιο (m/z 462→179) του ροσμαρινικού οξέος. Όλα τα δεδομένα συλλέχθηκαν και επεξεργάστηκαν μέσω του λογισμικού MSWS 8.2 (Bruker Daltonics, Germany).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΕΝΟΤΗΤΑ Α

3.1 Διερεύνηση του μηχανισμού της προστατευτικής δράσης εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών σε κύτταρα που εκτίθενται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες

Το πρώτο στάδιο της μελέτης αυτής έγινε στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος “Συνεργασία II”, που είχε στόχο τη διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους τα βιοδραστικά συστατικά των αρωματικών φυτών μπορούν να εμπλέκονται στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων. Για τον σκοπό αυτό, εξετάστηκε η ικανότητα εκχυλισμάτων τριών αρωματικών φυτών, του φασκόμηλου, του δεντρολίβανου και της ρίγανης, να προστατεύουν το DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 . Χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες κυττάρων Jurkat (T-λεμφοκυτταρική καρκινική σειρά), που προεπώαστηκαν για 20 λεπτά με διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων και στη συνέχεια εκτέθηκαν για 10 λεπτά στο ένζυμο Οξειδάση της Γλυκόζης (Glucose Oxidase, G.O.), το οποίο σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό, παράγει συνεχώς σταθερές ποσότητες H_2O_2 (χρησιμοποιήθηκε ποσότητα ίση με 0,6 mg/ml ικανή να παράγει περίπου 12 μM H_2O_2 ανά λεπτό). Στη συνέχεια, αξιολογήθηκαν οι σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA, με τη χρήση της ευαίσθητης τεχνικής της ηλεκτροφόρησης DNA μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης ή αλλιώς comet assay, όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

Συνολικά εξετάστηκαν 12 εκχυλίσματα από τα τρία αρωματικά φυτά. Και στα τρία φυτά έγινε εκχύλιση με τέσσερις διαφορετικούς διαλύτες, εξάνιο, οξικός αιθυλεστέρας, βουτανόλη και νερό, με τη μέθοδο της διαδοχικής εκχύλισης. Οι εκχυλίσσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν από το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας της Φαρμακολογικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Van den Dool et al., 1963, Massada, 1976, Adams, 2007). Πιο συγκεκριμένα, από το αρχικό υδατικό εκχύλισμα του εκάστοτε αρωματικού φυτού ακολούθησε αρχικά εκχύλιση με το διαλύτη εξάνιο. Μετά την παραλαβή του οργανικού διαλύτη

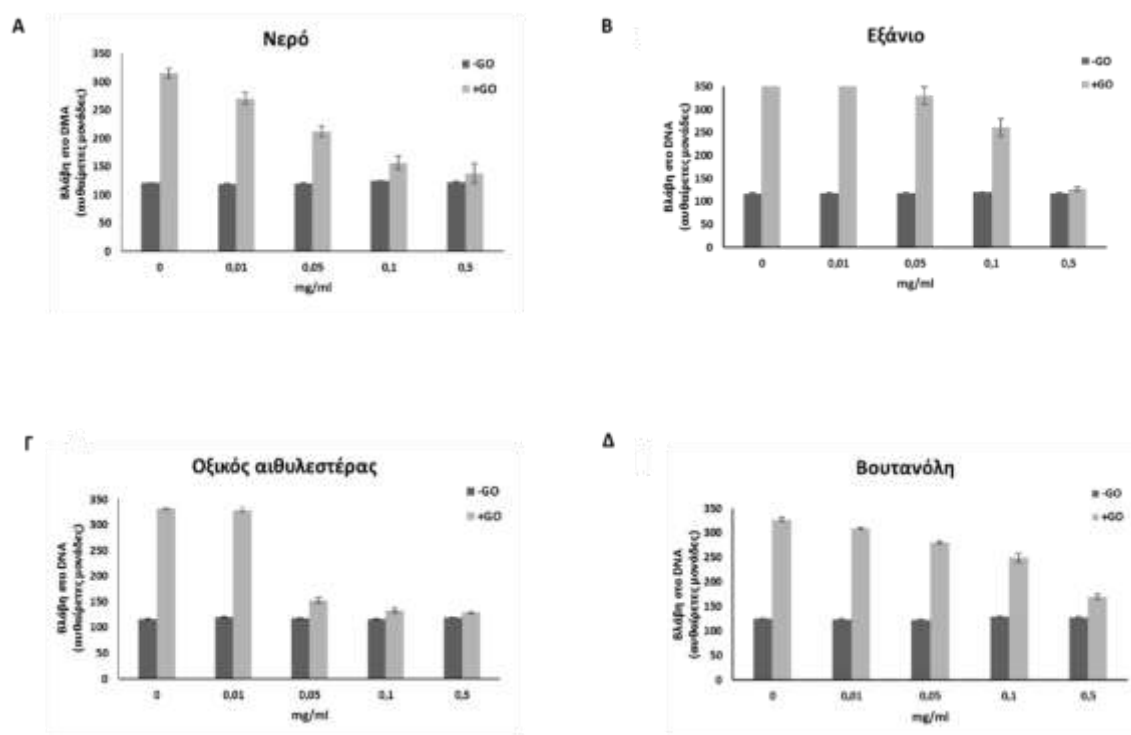
ακολούθησε εκχύλιση με το διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα. Τέλος, αφού παραλήφθηκε το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα ακολούθησε εκχύλιση με το διαλύτη βουτανόλη. Έτσι, συγκεντρώθηκαν 4 κλάσματα από κάθε αρωματικό φυτό.

3.1.1 Προστατευτική ικανότητα ολικών εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών ενάντια στις βλάβες που προκαλεί το H₂O₂ στο πυρηνικό DNA

Ακολούθησε αξιολόγηση της προστατευτικής δράσης των κλασμάτων από το κάθε εκχύλισμα. Συγκεκριμένα σε κάθε περίπτωση, η προστατευτική δράση αξιολογήθηκε με τον υπολογισμό επί τοις εκατό μείωσης της βλάβης, που προκλήθηκε μετά από προεπώαση 20 λεπτών με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του εκάστοτε εκχυλίσματος (0,01, 0,05, 0,1 και 0,5 mg/ml). Ως εκατό τοις εκατό ορίστηκε η βλάβη που προκαλείται στο DNA όταν τα κύτταρα εκτεθούν για 10 λεπτά σε 0,6 mg/ml οξειδάση της γλυκόζης απουσία εκχυλίσματος. Η υψηλότερη τιμή που μπορεί να πάρει η βλάβη που προκαλείται στο DNA των κυττάρων είναι 400 αυθαίρετες μονάδες, που αντιστοιχεί στην περίπτωση που σε όλα τα κύτταρα η βλάβη στο DNA η μέγιστη (Panagiotidis et al., 1999). Αντίστοιχα η μικρότερη τιμή είναι 0, αν σε όλα τα κύτταρα δεν υπάρχει καθόλου βλάβη στο DNA. Με βάση αυτόν τον τρόπο αξιολόγησης αξιολογήθηκε η βλάβη στο DNA σε κάθε περίπτωση.

Στην εικόνα 25 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις επιπτώσεις της προεπώασης των κυττάρων με αυξανόμενες συγκεντρώσεις διαφορετικών διαδοχικών εκχυλισμάτων του φασκόμηλου. Το υδατικό εκχύλισμα αρχίζει να προστατεύει ήδη από τη συγκέντρωση των 0,01 mg/ml, ενώ στη συγκέντρωση των 0,5 mg/ml, έχουμε σχεδόν πλήρη προστασία, της τάξης του 95 % (IC₅₀ = 0,045 mg/ml) (Εικόνα 25Α). Στο εκχύλισμα από το εξάνιο παρατηρούμε μια μικρή προστασία από τη συγκέντρωση των 0,05 mg/ml, η οποία σταδιακά αυξάνεται μέχρι τη συγκέντρωση των 0,5 mg/ml (IC₅₀ = 0,098 mg/ml) (Εικόνα 25Β). Στο εκχύλισμα από τον οξικό αιθυλεστέρα παρατηρούμε μια απότομη σχεδόν πλήρη προστασία από τη συγκέντρωση των 0,05 mg/ml (IC₅₀ = 0,038

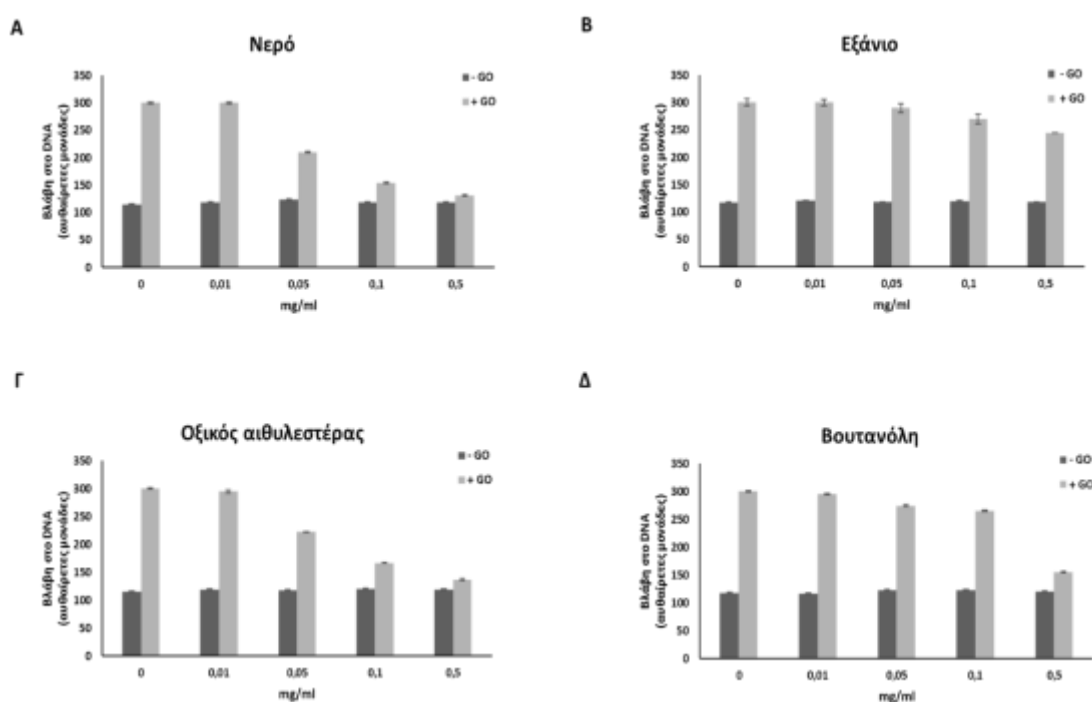
mg/ml) (Εικόνα 25Γ). Τέλος, στο βουτανολικό εκχύλισμα παρατηρούμε μια σταδιακή αύξηση της προστασίας, όπως προηγουμένως, αυτή τη φορά όμως από τα 0,01 mg/ml ($IC_{50} = 0,12$ mg/ml) (Εικόνα 25Δ). Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε, όλα τα κλάσματα προστατεύουν από τη βλάβη στο DNA των κυττάρων στην υψηλότερη συγκέντρωση των 0,5 mg/ml.



Εικόνα 25. Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων από φασκόμηλο ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο DNA των κυττάρων. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) επωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5 mg/ml) των εκχυλισμάτων από (Α) νερό, (Β) εξάνιο, (Γ) οξικό αιθυλεστέρα και (Δ) βουτανόλη και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε ή δεν εκτέθηκαν σε ποσότητα οξειδάσης της γλυκόζης, ικανή να παράγει περίπου 12 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

Το επόμενο αρωματικό φυτό που εξετάστηκε ήταν το δεντρολίβανο. Το υδατικό του εκχύλισμα προσέφερε προστασία από τα 0,05 mg/ml, σχεδόν της τάξης του 50 % ($IC_{50} = 0,056$ mg/ml) (Εικόνα 26Α). Στο εκχύλισμα από το εξάνιο, παρατηρείται μόνο μια μικρή προστασία της τάξης του 25 % στα 0,5

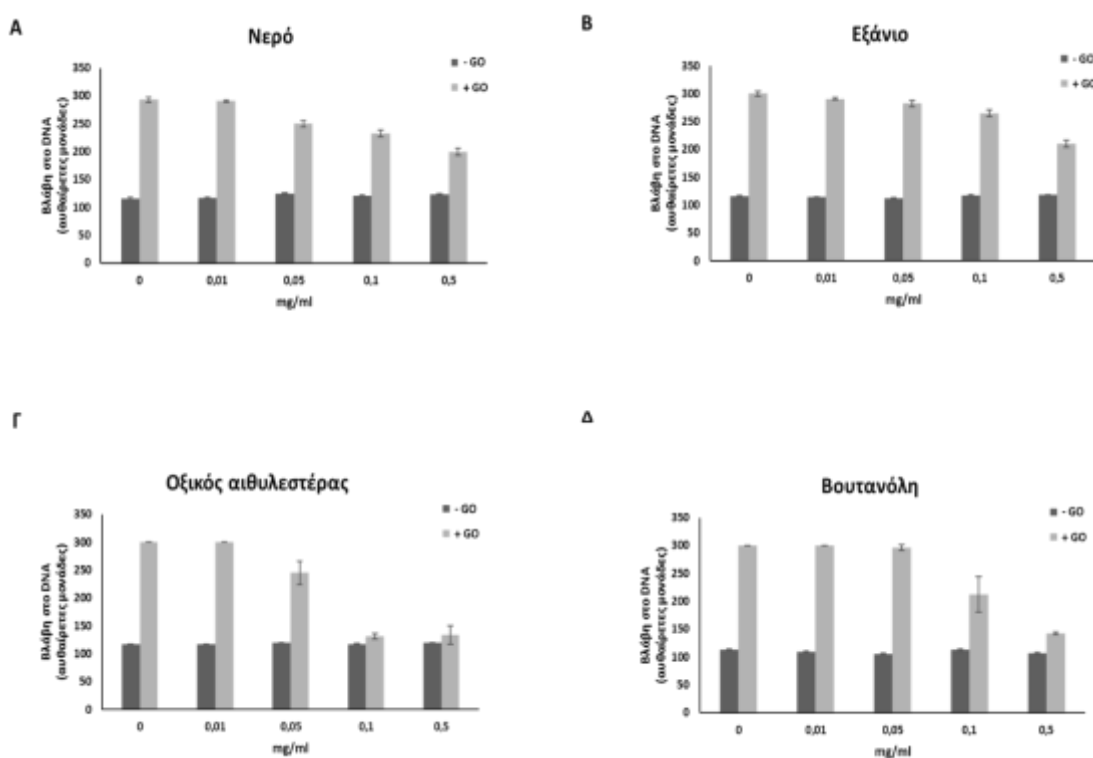
mg/ml ($IC_{50} = 0,17$ mg/ml) (Εικόνα 26B), ενώ στο εκχύλισμα από τον οξικό αιθυλεστέρα παρατηρείται σταδιακή αύξηση της προστασίας από τα 0,05 mg/ml ($IC_{50} = 0,065$ mg/ml) (Εικόνα 26Γ). Τέλος, στο εκχύλισμα από βουτανόλη παρατηρείται πολύ μικρή προστασία στα 0,05 και 0,1 mg/ml, ενώ στα 0,5 mg/ml έχουμε προστασία της τάξης του 90 % ($IC_{50} = 0,245$ mg/ml) (Εικόνα 26Δ). Από τα πειράματα αυτά, φαίνεται ότι τα εκχυλίσματα από δεντρολίβανο προσφέρουν υψηλότερο βαθμό προστασίας σε όλα τα κλάσματα, εκτός από το εξάνιο, μέχρι τη συγκέντρωση των 0,5 mg/ml.



Εικόνα 26. Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων από δεντρολίβανο ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο DNA των κυττάρων. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) επωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5 mg/ml) των εκχυλισμάτων από (Α) νερό, (Β) εξάνιο, (Γ) οξικό αιθυλεστέρα και (Δ) βουτανόλη και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε ή δεν εκτέθηκαν σε ποσότητα οξειδάση της γλυκόζης, ικανή να παράγει περίπου 12 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

Το τελευταίο αρωματικό φυτό που εξετάστηκε ήταν η ρίγανη. Στο υδατικό εκχύλισμα υπάρχει σταδιακή αύξηση της προστασίας που φτάνει περίπου στο 45 %, στα 0,5 mg/ml ($IC_{50} = 0,055$ mg/ml) (Εικόνα 27Α). Στο εκχύλισμα από το

εξάνιο παρατηρούμε παρόμοια εικόνα με σταδιακή αύξηση της προστασίας μέχρι τα 0,5 mg/ml όπου φτάνει στο 40 % περίπου ($IC_{50} = 0,145$ mg/ml) (Εικόνα 27B). Στο εκχύλισμα από τον οξικό αιθυλεστέρα έχουμε αύξηση της προστασίας από τα 0,05 mg/ml, η οποία φτάνει περίπου στο 95 % στα 0,5 mg/ml ($IC_{50} = 0,06$ mg/ml) (Εικόνα 27Γ). Στο εκχύλισμα από τη βουτανόλη παρατηρούμε προστασία από τα 0,1 mg/ml, που φτάνει περίπου στο 85 % στα 0,5 mg/ml ($IC_{50} = 0,085$ mg/ml) (Εικόνα 27Δ). Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε, στα εκχυλίσματα από τον οξικό αιθυλεστέρα και την βουτανόλη έχουμε υψηλό επίπεδο προστασίας, ενώ στο υδατικό και αυτό από το εξάνιο έχουμε περίπου 40 % λιγότερη προστασία σε σχέση με αυτά στα 0,5 mg/ml, την υψηλότερη συγκέντρωση που εξετάστηκε.



Εικόνα 27. Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων από ρίγανη ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο DNA των κυττάρων. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) επωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5 mg/ml) των εκχυλισμάτων από (Α) νερό, (Β) εξάνιο, (Γ) οξικό αιθυλεστέρα και (Δ) βουτανόλη και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή δεν εκτέθηκαν σε ποσότητα οξειδάσης της γλυκόζης, ικανή να παράγει περίπου 12 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

Συμπερασματικά, το υδατικό εκχύλισμα προστατεύει σε σημαντικό βαθμό στο φασκόμηλο και το δεντρολίβανο (Εικόνες 25Α και 26Α), ενώ σε κάθε περίπτωση το εκχύλισμα από τον διάλυτη οξικό αιθυλεστέρα (Εικόνες 25Γ, 26Γ και 27Γ) μετά από προεπώαση μειώνει με δόσοεξαρτώμενο τρόπο την βλάβη στο πυρηνικό DNA. Το εκχύλισμα από εξάνιο προστατεύει σε μεγάλο βαθμό στο φασκόμηλο (Εικόνα 25Β) και σε πολύ μικρότερο βαθμό στα άλλα δύο αρωματικά φυτά, δεντρολίβανο και ρίγανη (Εικόνες 26Β και 27Β), ενώ το εκχύλισμα από βουτανόλη προστατεύει, σε μικρότερο βαθμό από τον οξικό αιθυλεστέρα, πάλι με δόσοεξαρτώμενο τρόπο και στις 3 περιπτώσεις (Εικόνες 25Δ, 26Δ, 27Δ). Παρατίθεται και ένας συγκεντρωτικός πίνακας με τα IC_{50} και των 12 εκχυλισμάτων (Πίνακας 3).

Αρωματικό φυτό	IC_{50} (mg/ml)			
	Διαλύτης			
	Νερό	Οξικός αιθυλεστέρας	Βουτανόλη	Εξάνιο
Φασκόμηλο	0,045	0,038	0,12	0,098
Δεντρολίβανο	0,056	0,065	0,245	0,17
Ρίγανη	0,055	0,06	0,085	0,145

Πίνακας 3. Συγκεντρωτικός πίνακας των IC_{50} των εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών φασκόμηλο, δεντρολίβανο και ρίγανη από τους διαλύτες νερό, οξικό αιθυλεστέρα, βουτανόλη και εξάνιο.

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε, σε κάθε αρωματικό φυτό, τα εκχυλίσματα από το νερό και τον οξικό αιθυλεστέρα έχουν μικρότερο IC_{50} από τα εκχυλίσματα από το εξάνιο και τη βουτανόλη, όπως ήταν και το αναμενόμενο, εφόσον προστατεύουν σε μεγαλύτερο βαθμό τα 2 πρώτα από τα δεύτερα σε κάθε περίπτωση.

Παρατηρούμε ότι σε ορισμένα εκχυλίσματα υπάρχει μεγάλη προστατευτική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα. Αυτό οφείλεται τόσο στο είδος των ουσιών που εκχυλίζονται σε κάθε περίπτωση, όσο και στα συστατικά που περιέχονται σε κάθε αρωματικό φυτό, καθώς το καθένα περιέχει τις δικές του, διαφορετικές,

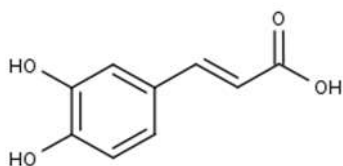
δραστικές ενώσεις. Γι' αυτό στο επόμενο στάδιο, θα μελετηθούν συγκεκριμένες ενώσεις, απομονωμένες από τα παραπάνω εκχυλίσματα.

3.1.2 Προστατευτική ικανότητα των φαινολικών οξέων, καφεϊκού και ροσμαρινικού, τα οποία απομονώθηκαν από εκχυλίσματα αρωματικών φυτών

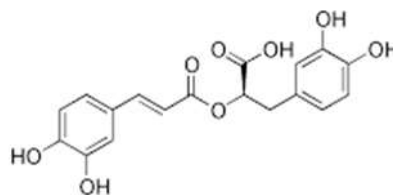
Από τα παραπάνω αποτελέσματα τέθηκε το ερώτημα ποια μπορεί να είναι τα βιοδραστικά συστατικά που περιέχονται στα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών και ευθύνονται για την προστατευτική δράση τους. Για το σκοπό αυτό, από τα παραπάνω εκχυλίσματα απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή και ταυτοποιήθηκαν διάφορες ενώσεις. Από προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας έχουν διερευνηθεί διάφορα φλαβονοειδή και άλλες φαινολικές ενώσεις φυτικής προέλευσης για το αν προστατεύουν το DNA των κυττάρων που εκτίθενται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες υπό τη μορφή H_2O_2 (Kitsati et al., 2012, Melidou et al., 2005, Nousis et al., 2005).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν αρχικά δύο φαινολικά οξέα, τα οποία βρίσκονται σε αφθονία στη διατροφή, το καφεϊκό οξύ και το ροσμαρινικό οξύ (Εικόνα 28).

A



B

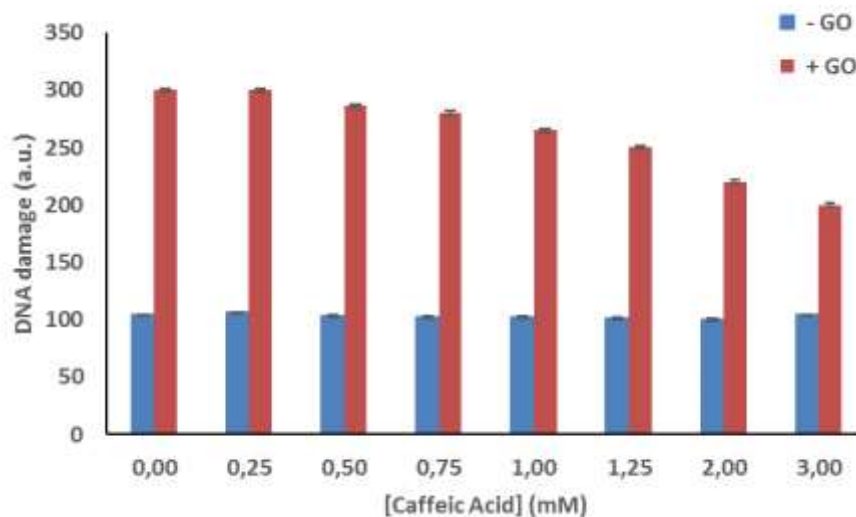


Εικόνα 28. Χημικές δομές (A) του καφεϊκού και (B) του ροσμαρινικού οξέος που συναντώνται σε αφθονία στη διατροφή και μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

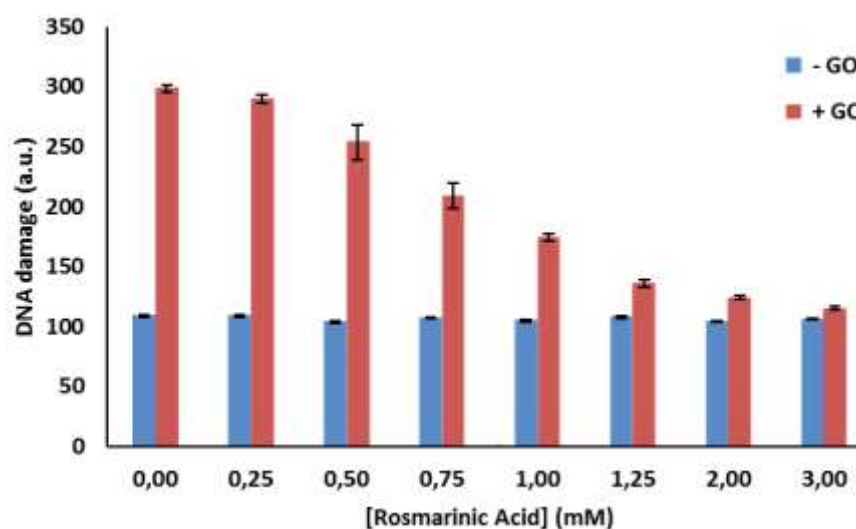
Και οι δύο ενώσεις που μελετήθηκαν, απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή από το φασκόμηλο από το κλάσμα του οξικού αιθυλεστέρα και ταυτοποιήθηκαν από το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας της Φαρμακολογικής Σχολής του

Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Μελετήθηκε η ικανότητά τους να προστατεύουν το DNA των κυττάρων Jurkat από το H_2O_2 , με τη μέθοδο της comet assay, στο σύστημα που προαναφέρθηκε.

A



B



Εικόνα 29. Προστατευτική δράση του καφεϊκού και του ροσμαρινικού οξέος ενάντια στη βλάβη του DNA. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) επωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις (A) του καφεϊκού και (B) του ροσμαρινικού οξέος και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε ή δεν εκτέθηκαν σε ποσότητα οξειδάσης της γλυκόζης, ικανή να παράγει περίπου 12 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε, προεπώαση των κυττάρων με το καφεϊκό οξύ προσέφερε προστασία από τις σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA, από τη συγκέντρωση των 0,5 mM, της τάξης του 12 % ($IC_{50} = 1,12 \text{ mM}$) (Εικόνα 29A). Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί και με τα πειραματικά δεδομένα που έχουν προκύψει από την ερευνητική μας ομάδα σε προηγούμενες μελέτες (Kitsati et al., 2012). Το ροσμαρινικό οξύ προσέφερε και αυτό από τη συγκέντρωση των 0,5 mM προστασία, μεγαλύτερη από αυτή του καφεϊκού οξέος, της τάξης του 20 % ($IC_{50} = 0,698 \text{ mM}$) (Εικόνα 29B).

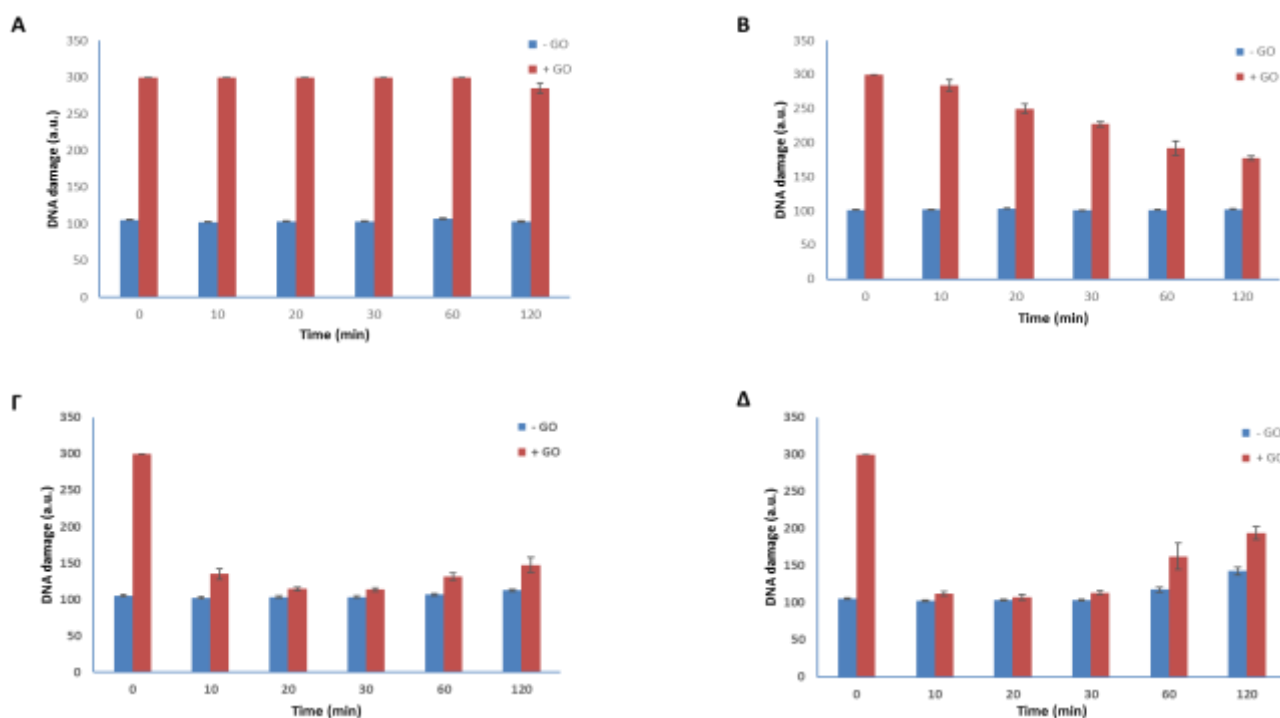
Και τα δύο φαινορικά οξέα προσφέρουν προστασία από τις σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, δηλαδή όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της ένωσης, αυξάνεται και η προστασία. Πιθανόν, η προστασία αυτή οφείλεται στην ύπαρξη των όρθο-διϋδρόξυ ομάδων που διαθέτουν και οι δύο ενώσεις, μία το καφεϊκό οξύ και δύο το ροσμαρινικό οξύ, καθώς από προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας σε φλαβονοειδή έχει προκύψει ότι ένα από τα δομικά χαρακτηριστικά που ευνοούν την προστατευτική τους δράση είναι η παρουσία της όρθο-διϋδρόξυ ομάδας (Melidou et al., 2005). Αξιοσημείωτο είναι ότι για την προστασία του κυτταρικού DNA απαιτούνται υψηλές, μη φυσιολογικές συγκεντρώσεις των δύο φαινολικών οξέων.

Τα ίδια ακριβώς πειράματα πραγματοποιήθηκαν επίσης με τις ίδιες χημικές ενώσεις, τις οποίες προμηθευτήκαμε από το εμπόριο, χωρίς να παρατηρηθεί κάποια διαφορά στατιστικά σημαντική. Οπότε, τα υπόλοιπα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με χημικές ενώσεις προμηθευόμενες από το εμπόριο.

Για να κατανοήσουμε καλύτερα το μηχανισμό δράσης των φαινολικών οξέων μελετήσαμε τις επιπτώσεις του χρόνου προεπώασης και της συγκέντρωσης στην παρεχόμενη κυτταρική προστασία από τα φαινορικά οξέα.

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στην εικόνα 30A, η προεπώαση των κυττάρων με 0,25 mM ροσμαρινικού οξέος, δεν επιφέρει σχεδόν καμία μείωση της βλάβης (περίπου 10%) έως και το μεγαλύτερο χρόνο επώασης (120 λεπτά). Στη συγκέντρωση, όμως, των 0,5 mM, παρατηρείται σταδιακή αύξηση της προστασίας, που αρχίζει από τα πρώτα 20 λεπτά, της τάξης του 30%, η οποία βαίνει αυξανόμενη έως τα 120 λεπτά (Εικόνα 30B). Στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (1 και 2 mM), παρατηρείται πολύ μεγάλη προστασία, της τάξης

του 92% από τα πρώτα 10 λεπτά, ενώ από τα 60 λεπτά και μετά η παρεχόμενη προστασία μειώνεται. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, προεπώαση μόνο με το ροσμαρινικό οξύ (μπλε στήλες), χωρίς την προσθήκη του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης, το ροσμαρινικό οξύ στις συγκεντρώσεις 1 και 2 mM προκαλεί από μόνο του βλάβη στο πυρηνικό DNA, χωρίς την έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 (Εικόνα 30Γ και 30Δ).



Εικόνα 30. Προστασία του ροσμαρινικού οξέος ενάντια στη βλάβη του DNA ανάλογα με το χρόνο προεπώασης. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) επωάστηκαν για τα ενδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα με (Α) 0,25 mM, (Β) 0,5 mM, (Γ) 1 mM και (Δ) 2 mM ροσμαρινικού οξέος. Στη συνέχεια εκτέθηκαν ή δεν εκτέθηκαν σε ποσότητα οξειδάση της γλυκόζης, ικανή να παράγει περίπου 12 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

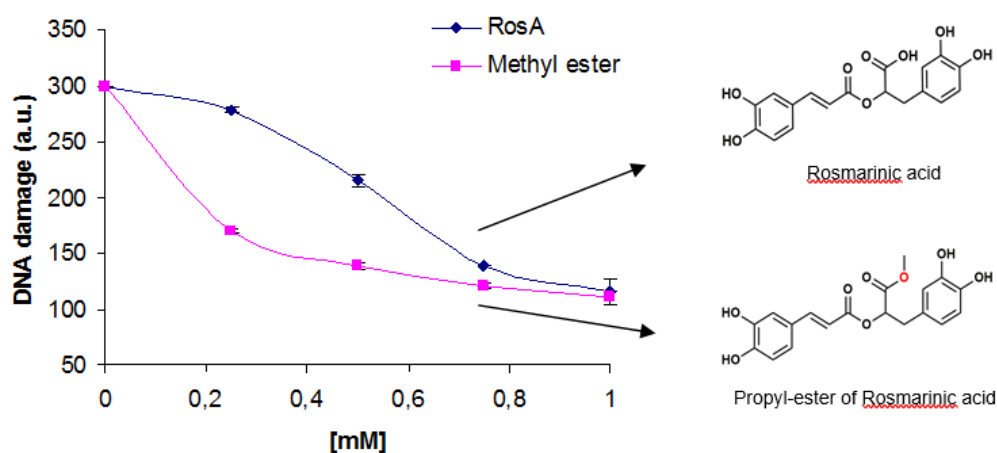
Από τα παραπάνω αποτελέσματα προέκυψε το συμπέρασμα ότι με αύξηση της συγκέντρωσης των δύο ενώσεων, του καφεϊκού και του ροσμαρινικού οξέος, υπάρχει και ανάλογη αύξηση της προστασίας του πυρηνικού DNA από το H_2O_2 . Υφίσταται δηλαδή μια δόσοεξαρτώμενη προστατευτική ικανότητα. Επίσης, η προστατευτική ικανότητα του ροσμαρινικού οξέος εξαρτάται όχι μόνο

από τη συγκέντρωση, αλλά και από το χρόνο επώασης της ένωσης, όπως και του καρκινικού οξέος που έχει μελετηθεί στο εργαστήριό μας (Kitsati et al., 2012).

3.1.3 Συνθετικά παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος

3.1.3.1 Προστατευτική ικανότητα εστερικών και αμιδικών παραγώγων του ροσμαρινικού οξέος σε συνθήκες οξειδωτικού στρες

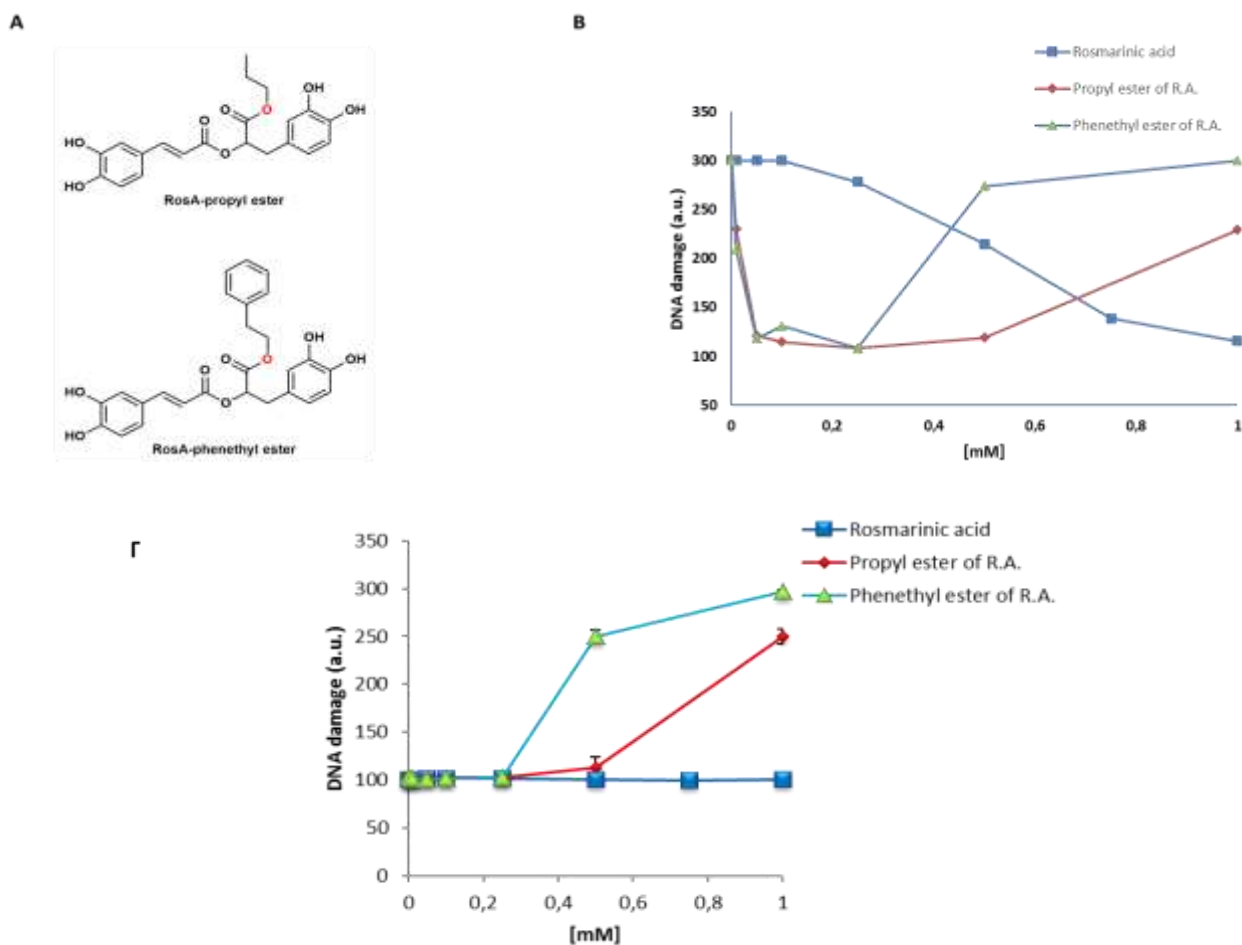
Από τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι εμφανές ότι το ροσμαρινικό οξύ έχει την ικανότητα να προστατεύσει το πυρηνικό DNA, αλλά σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις. Έγινε η υπόθεση ότι αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το ροσμαρινικό οξύ δεν μπορεί να διαπεράσει την μεμβράνη του κυττάρου με ευκολία, ώστε να εισέλθει στο εσωτερικό του και να δράσει, από τη στιγμή που η καρβοξυλομάδα είναι αρνητικά φορτισμένη στο ουδέτερο pH. Για το λόγο αυτό, έγινε προσπάθεια να «καλυφθεί» αυτό το αρνητικό φορτίο, έτσι ώστε να μπορέσει η ένωση να διαχυθεί διά μέσου της μεμβράνης του κυττάρου. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φυσικών και συνθετικών εστέρων του ροσμαρινικού οξέος, οι οποίοι δεν διαθέτουν κάποιο αρνητικό φορτίο, καθώς στη θέση της αρνητικά φορτισμένης καρβοξυλομάδας βρίσκεται ένας εστέρας. Αρχικά, έγινε διερεύνηση της ικανότητας ενός φυσικού παραγώγου του ροσμαρινικού οξέος, το οποίο απομονώθηκε από τα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών, του μέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος να προστατεύει τα κύτταρα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, με την τεχνική της comet assay, στις ίδιες συνθήκες που έχουν περιγραφεί προηγουμένως (Εικόνα 31). Η ένωση αυτή απομονώθηκε σε καθαρή μορφή από τα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών που έχουν προαναφερθεί και ταυτοποιήθηκε από το Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας της Φαρμακολογικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.



Εικόνα 31. Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης του μέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) επωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις του μέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε ποσότητα οξειδάση της γλυκόζης, ικανή να παράγει περίπου $12 \mu\text{M}$ H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε, ο μέθυλο-εστέρας του ροσμαρινικού οξέος προστατεύει σταδιακά με δόσοεξαρτώμενο τρόπο από τη βλάβη το πυρηνικό DNA, σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με το ροσμαρινικό οξύ στις ίδιες συγκεντρώσεις. Έχει πολύ μεγαλύτερη κυτταροπροστατευτική ικανότητα από το ροσμαρινικό οξύ και το IC_{50} του είναι μειωμένο κατά 20 φορές περίπου ($\text{IC}_{50} = 34 \mu\text{M}$) σε σχέση με του ροσμαρινικού οξέος ($\text{IC}_{50} = 698 \mu\text{M}$).

Στη συνέχεια, έγινε σύνθεση, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, χημικών παραγώγων του ροσμαρινικού οξέος, στα οποία η αρνητικά φορτισμένη καρβοξυλομάδα έχει εστεροποιηθεί με πρόπυλο- και φαινέθυλο-ομάδες (Εικόνα 32Α). Έπειτα, μελετήθηκε η προστατευτική τους ικανότητα, όπως και παραπάνω (Εικόνα 32Β).



Εικόνα 32. Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης του πρόπυλο- και φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος. (Α) Χημική δομή του πρόπυλο και φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) επωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις του πρόπυλο και φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος και στη συνέχεια (Β) εκτέθηκαν (Γ) ή όχι σε ποσότητα οξειδάσης της γλυκόζης, ικανή να παράγει περίπου 12 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

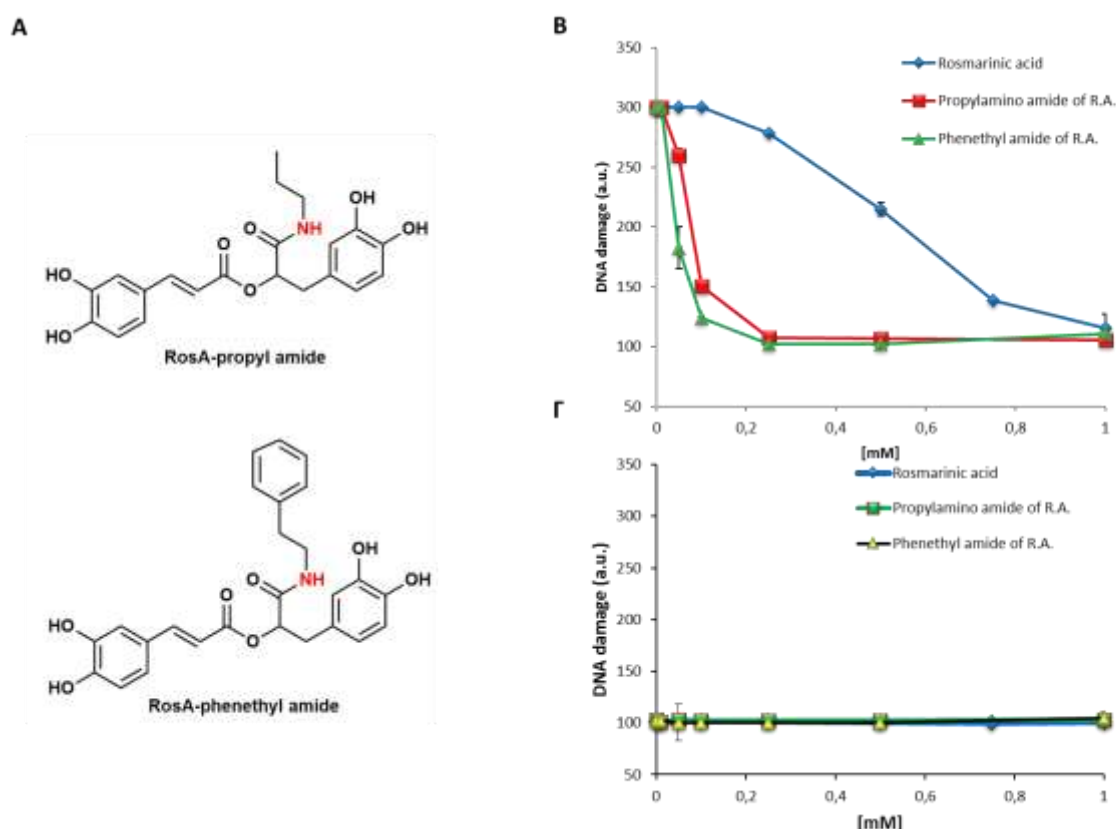
Παρατηρείται ότι και αυτοί οι εστέρες του ροσμαρινικού οξέος έχουν μεγαλύτερη κυτταροπροστατευτική ικανότητα από το ροσμαρινικό οξύ, και μάλιστα η ικανότητα προστασίας αυξάνεται προοδευτικά, από τον μέθυλο-εστέρα ($\text{IC}_{50} = 34 \mu\text{M}$) στον πρόπυλο-εστέρα ($\text{IC}_{50} = 12 \mu\text{M}$) και στη συνέχεια στον φαινέθυλο-εστέρα ($\text{IC}_{50} = 8 \mu\text{M}$).

Παράλληλα, παρατηρήθηκε ότι η προστασία που προσφέρεται από τον πρόπυλο- και φαινέθυλο-εστέρα χάνεται στις υψηλότερες συγκεντρώσεις >500 μM . Για αυτόν τον λόγο, εξετάστηκαν τα αποτελέσματα των ενώσεων αυτών απουσία του εξωγενώς προστιθέμενου H_2O_2 στις ίδιες συγκεντρώσεις με πριν (Εικόνα 32Γ). Όπως είναι εμφανές, οι εστέρες του ροσμαρινικού οξέος, σε υψηλές συγκεντρώσεις, $>0,5$ mM για τον πρόπυλο-εστέρα και $>0,25$ mM για τον φαινέθυλο-εστέρα, προκαλούν βλάβη στο DNA απουσία H_2O_2 .

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι αύξηση της λιποφιλικότητας του ροσμαρινικού οξέος μέσω της εστεροποίησής του, οδήγησε στην αύξηση της προστασίας του πυρηνικού DNA από συνθήκες οξειδωτικού στρες. Ωστόσο, οδήγησε και στην αύξηση της τοξικότητάς του. Αυτό το αποτέλεσμα πιθανώς μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι εισερχόμενοι οι εστέρες στο εσωτερικό του κυττάρου υδρολύονται από μη ειδικές εστεράσες. Το ροσμαρινικό οξύ που δημιουργείται μετά την υδρόλυση είναι αρνητικά φορτισμένο στο ουδέτερο pH που βρίσκεται μέσα στο εσωτερικό του κυττάρου, οπότε δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη, με αποτέλεσμα να εγκλωβίζεται και να συσσωρεύεται μέσα στο κύτταρο προκαλώντας τοξικότητα. Ο μηχανισμός πρόκλησης τοξικότητας από αυτές τις ενώσεις δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα υποθέσαμε ότι ένα αμίδιο θα διαπερνά με ευκολία την κυτταρική μεμβράνη, δεν θα υδρολύεται ή θα υδρολύεται σε πολύ μικρό βαθμό από μη ειδικές αμιδάσες και ως εκ τούτου δεν θα συσσωρεύεται μέσα στο κύτταρο. Για το λόγο αυτό, έγινε σύνθεση των αντίστοιχων αμιδίων του ροσμαρινικού οξέος, δηλαδή το πρόπυλο- και το φαινέθυλο-αμίδιο (Εικόνα 33Α). Η μόνη διαφορά με τους αντίστοιχους εστέρες είναι η αντικατάσταση του οξυγόνου με άζωτου στην κετόξυ-ομάδα. Όπως παραπάνω, ελέγχθηκε η κυτταροπροστατευτική τους δράση σε κύτταρα Jurkat σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, με τη μέθοδο της comet assay.

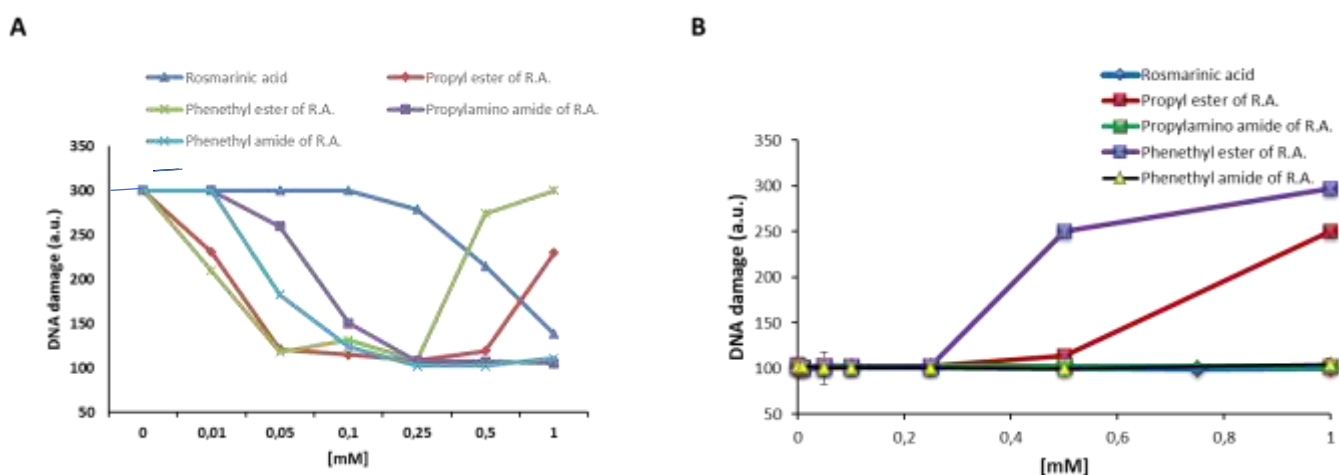
Όπως παρατηρείται, και τα δύο αμίδια έχουν υψηλή προστασία, με το φαινέθυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος να έχει πιο γρήγορη και πιο υψηλή προστασία ($\text{IC}_{50} = 81$ μM) σε σχέση με το πρόπυλο-αμίδιο ($\text{IC}_{50} = 40$ μM) (Εικόνα 33Β). Και οι δύο ενώσεις δεν εμφανίζουν τοξικότητα απουσία H_2O_2 , έως τη συγκέντρωση του 1 mM που εξετάστηκε (Εικόνα 33Γ).



Εικόνα 33. Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης του πρόπυλο- και φαινέθυλο-αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος. (Α) Χημική δομή του πρόπυλο και φαινέθυλο-αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) επωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις του πρόπυλο και φαινέθυλο-αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος και στη συνέχεια (Α) εκτέθηκαν ή (Γ) δεν εκτέθηκαν σε ποσότητα οξειδάσης της γλυκόζης, ικανή να παράγει περίπου $12 \mu\text{M}$ H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε, το ροσμαρινικό οξύ προστατεύει το πυρηνικό DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, σε πολύ μεγάλες όμως συγκεντρώσεις σε σχέση με τα παράγωγά του πρόπυλο- και φαινέθυλο-εστέρες και -αμίδια (Εικόνα 34Α). Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι σε ουδέτερο pH, η καρβοξυλομάδα του είναι αρνητικά φορτισμένη, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να διαπεράσει εύκολα την κυτταρική μεμβράνη. Αντιθέτως, οι εστέρες και τα αμίδια, τα οποία δεν έχουν ηλεκτρικό φορτίο, διαπερνούν με

ευκολία την κυτταρική μεμβράνη και εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου. Σε σχέση με τους εστέρες, τα αμίδια έχουν μικρότερη κυτταροπροστατευτική προστασία σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, οι εστέρες όμως εμφανίζουν τοξικότητα από κάποια συγκέντρωση και μετά, ενώ τα αμίδια όχι (Εικόνα 34B). Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι οι εστέρες εισερχόμενοι μέσα στο κύτταρο υδρολύονται από μη ειδικές εστεράσες, με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους λόγω της δημιουργίας αρνητικού φορτίου και την επακόλουθη εμφάνιση τοξικότητας, της οποίας ο μηχανισμός δεν έχει ακόμα διερευνηθεί. Τα αμίδια υδρολύονται σε πολύ μικρότερο βαθμό ή και καθόλου από αμιδάσες και για αυτό το λόγο δεν συσσωρεύονται μέσα στο κύτταρο.



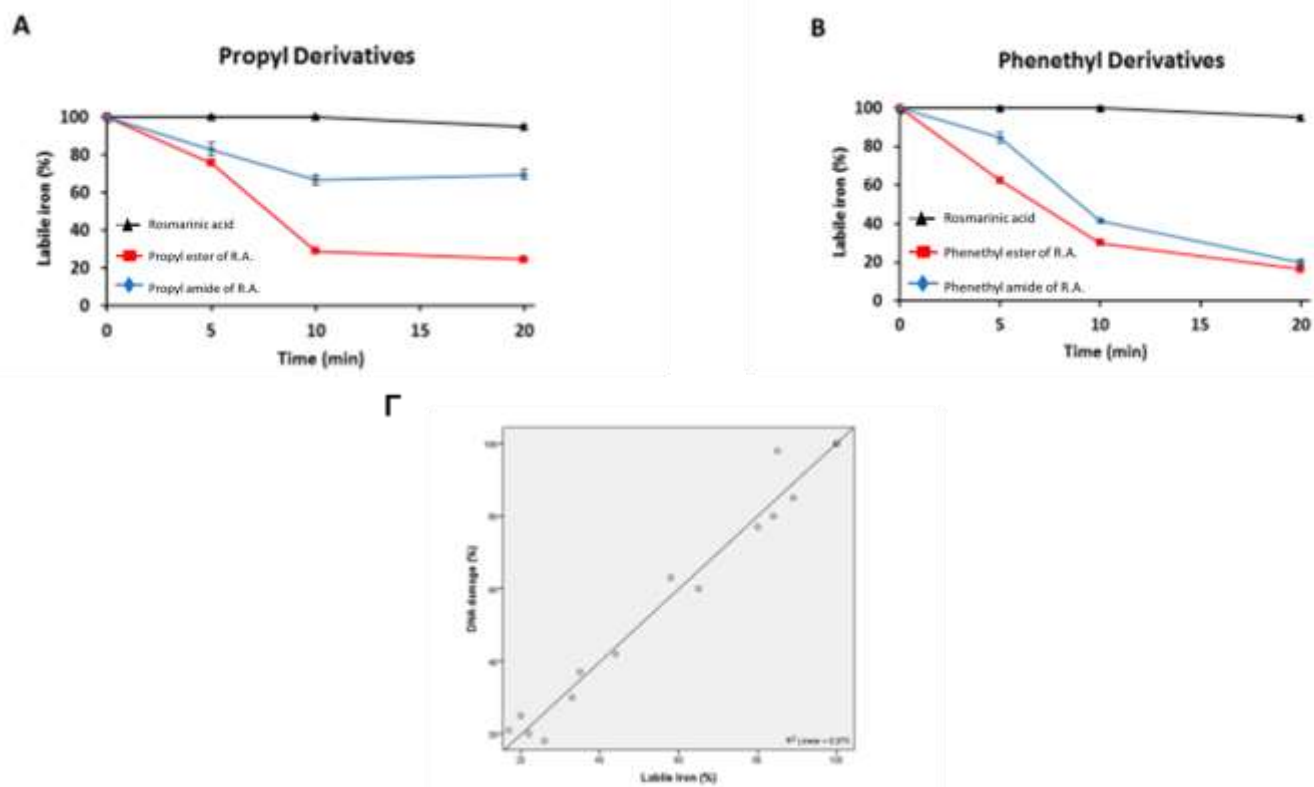
Εικόνα 34. Συγκεντρωτικά διαγράμματα δράσης του ροσμαρινικού οξέος και των παραγώγων του, πρόπυλο- και φαινέθυλο-εστέρων και -αμιδίων. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) επωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις του ροσμαρινικού οξέος και των πρόπυλο και φαινέθυλο-εστέρων και αμιδίων του ροσμαρινικού οξέος και στη συνέχεια εκτέθηκαν (A) ή δεν εκτέθηκαν (B) σε ποσότητα οξειδάσης της γλυκόζης, ικανή να παράγει περίπου $12 \mu\text{M}$ H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

3.1.3.2 Ενδοκυττάρια δέσμευση των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου και συσχέτισή τους με την προστασία του πυρηνικού DNA μετά από έκθεση κυττάρων σε H_2O_2

Με σκοπό να αποδειχθεί ο ρόλος της σιδηροδέσμευσης στο μηχανισμό προστασίας και να πραγματοποιηθεί η σύγκριση της ικανότητας δέσμευσης του σιδήρου και της προστατευτικής δράσης ενάντια στις βλάβες του DNA, προσδιορίστηκε η ενδοκυττάρια δέσμευση του σιδήρου στις ίδιες ακριβώς συνθήκες με αυτές, στις οποίες παρατηρήθηκε η προστασία. Αυτό πραγματοποιήθηκε φθορισμομετρικά, με την τεχνική της καλσεΐνης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Αρχικά μετρήθηκε ο φθορισμός που έχει η καλσεΐνη, μια ένωση που είναι ικανή να δεσμεύει δισθενή μέταλλα. Στη συνέχεια, προστέθηκε η εκάστοτε ένωση σε κύτταρα ήδη φορτωμένα με καλσεΐνη. Έπειτα, προστέθηκε ο εξειδικευμένος σιδηροδεσμευτής SIH και παρατηρήθηκε η μεταβολή στην ένταση του φθορισμού της καλσεΐνης, η οποία επέτρεψε και την ποσοτικοποίηση των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου.

Θεωρώντας ως 100% την αύξηση του φθορισμού που προκαλείται με την προσθήκη του SIH, υπολογίστηκε η επί τοις εκατό αύξηση του φθορισμού από τις διάφορες συγκεντρώσεις του ροσμαρινικού οξέος και των παραγώγων του. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε (Εικόνα 35Α και 35Β), με την πάροδο του χρόνου, μετά από προεπώαση με τους πρόπυλο- και φαινέθυλο-εστέρες και -αμίδια, μειώνονται τα ενδοκυττάρια καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου, ενώ με το ροσμαρινικό οξύ δε μειώνονται. Όπως είναι εμφανές στην Εικόνα 35Γ, υπάρχει στατιστική συσχέτιση της προστατευτικής ικανότητας των παραγώγων του ροσμαρινικού οξέος με την ικανότητά τους να δεσμεύουν ενδοκυττάρια ιόντα σιδήρου.

Συμπερασματικά, η προστατευτική ικανότητα των πρόπυλο- και φαινέθυλο-εστέρων και -αμιδίων να προστατεύουν από βλάβες στο πυρηνικό DNA των κυττάρων, πιθανώς οφείλεται στην ικανότητά τους να δεσμεύουν καταλυτικά ιόντα σιδήρου, μέσω των όρθο-διυδρόξυ ομάδων που διαθέτουν.

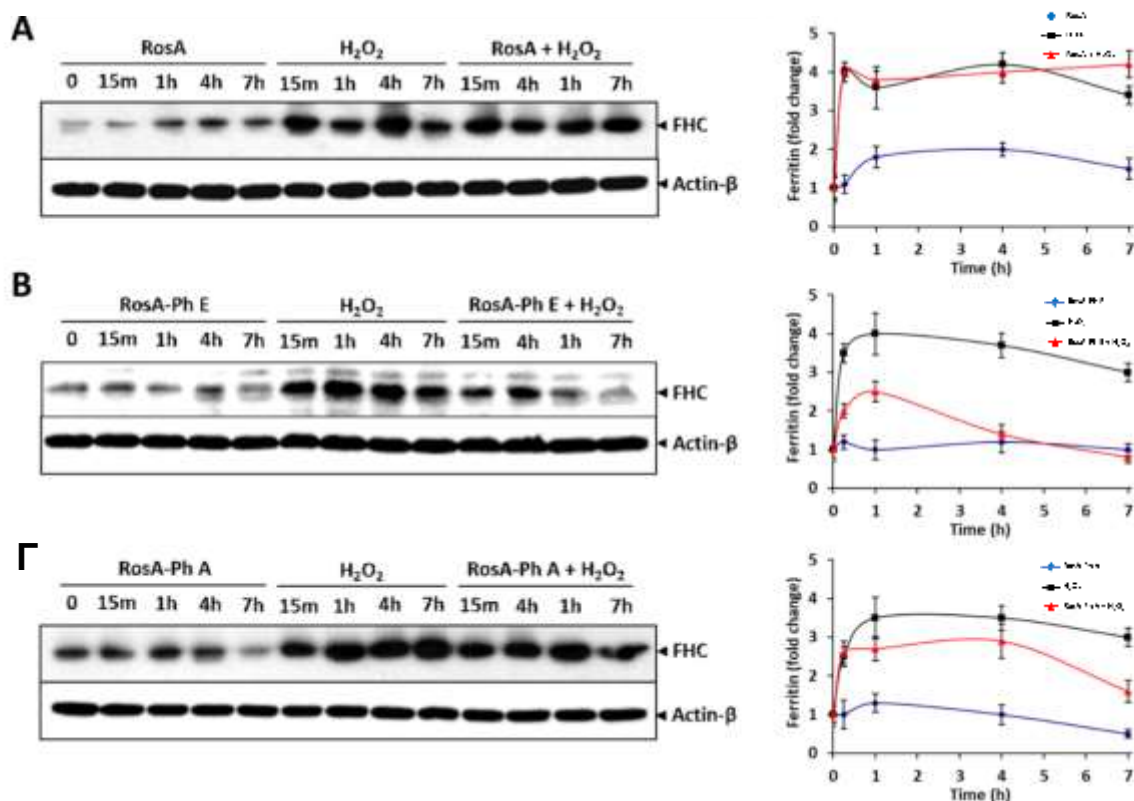


Εικόνα 35. Συσχέτιση της ικανότητας προστασίας του πυρηνικού DNA από τα πρόπυλο- και φαινέθυλο-παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος και της ικανότητας δέσμευσης των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) επωάστηκαν με καλσεΐνη-AM για 15 λεπτά στους 37°C. Το ποσό του ενδοκυττάριου σιδήρου που ήταν δεσμευμένος στην καλσεΐνη αποκαλύφθηκε με την προσθήκη του εξειδικευμένου σιδηροδεσμευτή SIH. Το ροσμαρινικό οξύ και τα παράγωγά του (Α) πρόπυλο- και (Β) φαινέθυλο- εστέρες και αμίδια προστέθηκε απευθείας στην κυψελίδα για τα ενδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα και η αλλαγή στο φθορισμό καταγράφηκε. Οι τιμές εκφράζονται ως % μείωση του ενδοκυττάριου σιδήρου που δεσμεύεται στην καλσεΐνη, παρουσία του ροσμαρινικού οξέος. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα. (Γ) Συσχέτιση στατιστικά σημαντική της προστασίας του πυρηνικού DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και της ικανότητας δέσμευσης των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου.

3.1.4 Τα παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος αναστέλλουν την επαγωγή της έκφρασης της βαριάς αλυσίδας της φερριτίνης (FHC) μετά από έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2

Η πρωτεΐνη φερριτίνη αποτελεί την κύρια αποθήκη σιδήρου στα κύτταρα, με επακόλουθο η έκφρασή της να επηρεάζεται από την ομοιόσταση του σιδήρου. Γι' αυτόν τον λόγο, εκτός από την άμεση παρατήρηση της ικανότητας δέσμευσης των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου από το ροσμαρινικό οξύ και τα παράγωγά του που έγινε προηγουμένως, εξετάστηκαν και τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης φερριτίνης, σαν δείκτης των επιπέδων των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου.

Παρατηρήθηκε ότι η έκθεση των κυττάρων στο H_2O_2 για τις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές (0, 15 λεπτά, 1, 4 και 7 ώρες) προκάλεσε αύξηση της έκφρασης της βαριάς αλυσίδας της φερριτίνης, ήδη από τα πρώτα 15 λεπτά (Εικόνα 13). Επώαση των κυττάρων μόνο με το ροσμαρινικό οξύ (Εικόνα 36Α) ή τα παράγωγά του, φαινέθυλο-εστέρας (Εικόνα 36Β) και φαινέθυλο-αμίδιο (Εικόνα 36Γ) για τα ίδια χρονικά διαστήματα, δεν είχε σημαντική επίδραση στην έκφραση της φερριτίνης, η οποία παρέμεινε στο ίδιο σχεδόν επίπεδο. Προεπώαση των κυττάρων με το ροσμαρινικό οξύ για 30 λεπτά και στη συνέχεια έκθεση για τα ενδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα σε H_2O_2 δεν είχε κάποιο αποτέλεσμα στα επίπεδα της έκφρασης της φερριτίνης σε σχέση με τις αλλαγές που παρατηρήθηκαν όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν μόνο σε H_2O_2 (Εικόνα 36Α). Αντιθέτως, προεπώαση με τον φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος και στη συνέχεια έκθεση σε H_2O_2 , είχε σαν αποτέλεσμα μείωση της έκφρασης της φερριτίνης, ήδη από τα πρώτα 15 λεπτά, σε σχέση με την έκφραση των επιπέδων φερριτίνης παρουσία μόνο H_2O_2 (Εικόνα 36Β). Προεπώαση με το αντίστοιχο αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος και στη συνέχεια έκθεση σε H_2O_2 οδήγησε σε μια μικρότερη σε σχέση με τον εστέρα μείωση της έκφρασης της φερριτίνης (Εικόνα 36Γ).



Εικόνα 36. Επαγωγή της έκφρασης της βαριάς αλυσίδας της φερριτίνης σε κύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2 και αναστολή της αύξησης από συνθετικά παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) προεπώαστηκαν για 30 λεπτά απουσία (μεσαίο τμήμα του τζελ) ή παρουσία 20 μM των εξεταζόμενων ενώσεων (Α) ροσμαρινικό οξύ, (Β) φαινέθυλο-εστέρας και (Γ) –αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος και στη συνέχεια εκτέθηκαν (δεξί τμήμα του τζελ) ή όχι (αριστερό μέρος του τζελ) σε 250 μM H_2O_2 για τις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ετοιμάστηκαν ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Η έκφραση της φερριτίνης ελέγχθηκε με την τεχνική της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, με τη χρήση ενός αντισώματος που ανιχνεύει τη βαριά αλυσίδα της φερριτίνης (FHC). Ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης της φερριτίνης παρουσιάζεται στα γραφήματα στο δεξί μέρος. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm SEM$ τριών διαφορετικών πειραμάτων.

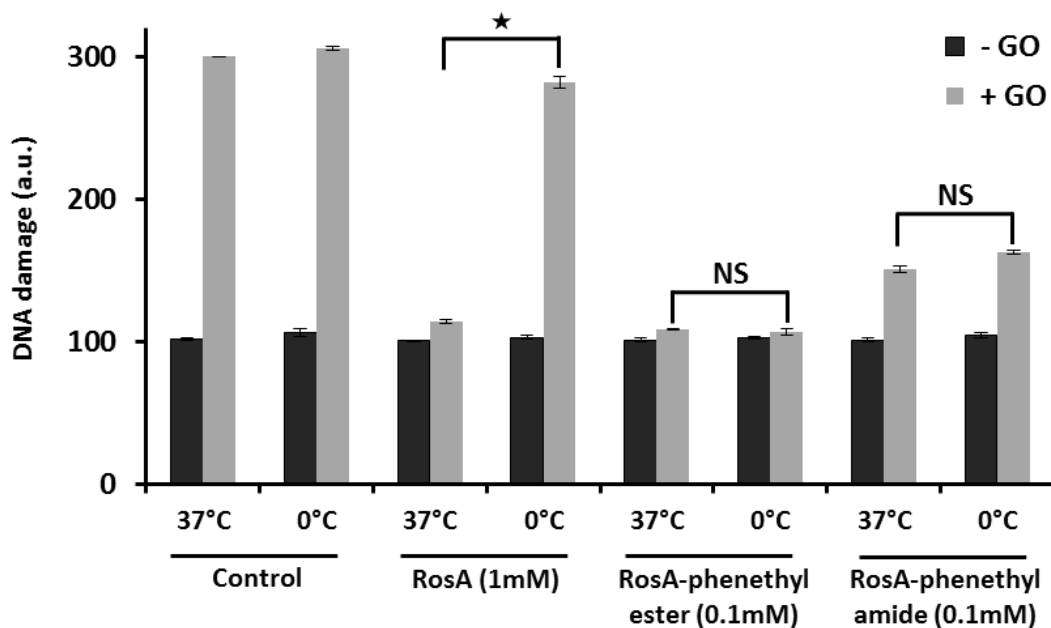
Από τα αποτελέσματα αυτά, συμπεραίνεται ότι τόσο ο φαινέθυλο-εστέρας, όσο και το φαινέθυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος, σε αντίθεση με το ροσμαρινικό οξύ που δεν μπορεί να εισέλθει με ευκολία δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης, έχουν την ικανότητα να διαχέονται στο εσωτερικό του κυττάρου και να δεσμεύουν τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου μέσω των όρθο-διϋδρόξυ ομάδων τους, με αποτέλεσμα να μειώνονται σημαντικά τα επίπεδα της φερριτίνης.

3.1.5 Ικανότητα του ροσμαρινικού οξέος και των παραγώγων του να εισέρχονται στον ενδοκυττάριο χώρο

Είναι γνωστό πως οι ενζυμικές λειτουργίες, καθώς και οι μηχανισμοί ενεργητικής μεταφοράς των κυττάρων, διακόπτονται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Με σκοπό λοιπόν να μελετηθεί, αν στο μηχανισμό εισόδου των μελετούμενων ενώσεων εμπλέκεται κάποια ενζυμική διαδικασία, μελετήθηκε το αποτέλεσμα τους σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 37 °C και στους 4 °C.

Τα κύτταρα προεπώαστηκαν με ροσμαρινικό οξύ (1 mM) και τα παράγωγά του, φαινέθυλο-εστέρα και φαινέθυλο-αμίδιο (0,1 mM) για 20 λεπτά σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 37 °C και στους 4 °C και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή όχι σε H₂O₂, μέσω του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης (G.O.) για 10 λεπτά. Παρατηρήθηκε ότι το ροσμαρινικό οξύ προστάτευσε το DNA των κυττάρων στους 37 °C, αλλά όχι στους 4 °C. Αντιθέτως, τόσο ο φαινέθυλο-εστέρας, όσο και το φαινέθυλο-αμίδιο διατήρησαν την ίδια προστατευτική ικανότητα και στις δύο θερμοκρασίες (Εικόνα 37).

Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το ροσμαρινικό οξύ χρειάζεται κάποιον ενεργητικό μηχανισμό, κάποιο/α ένζυμο/α για να μπορέσει να εισέλθει στο εσωτερικό των κυττάρων. Αντιθέτως, τα παράγωγά του, φαινέθυλο-εστέρας και αμίδιο, έχουν την ικανότητα να διαπερνούν παθητικά την κυτταρική μεμβράνη, εφόσον έχουν την ίδια προστατευτική ικανότητα και στις δύο θερμοκρασίες. Άρα, συμπεραίνεται ότι η προστατευτική ικανότητα τέτοιου είδους ενώσεων, εξαρτάται από τη θερμοκρασία και κατ' επέκταση από την ικανότητά τους να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και να εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων.



Εικόνα 37. Προστατευτική δράση του ροσμαρινικού οξέος και των παραγώγων του έναντι της βλάβης του DNA που προκαλείται από την έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 σε σχέση με τη θερμοκρασία επώασης. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) προεπώαστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις του ροσμαρινικού οξέος και του φαινέθυλο-εστέρα και αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή δεν εκτέθηκαν σε ποσότητα οξειδάσης της γλυκόζης, ικανή να παράγει περίπου 12 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

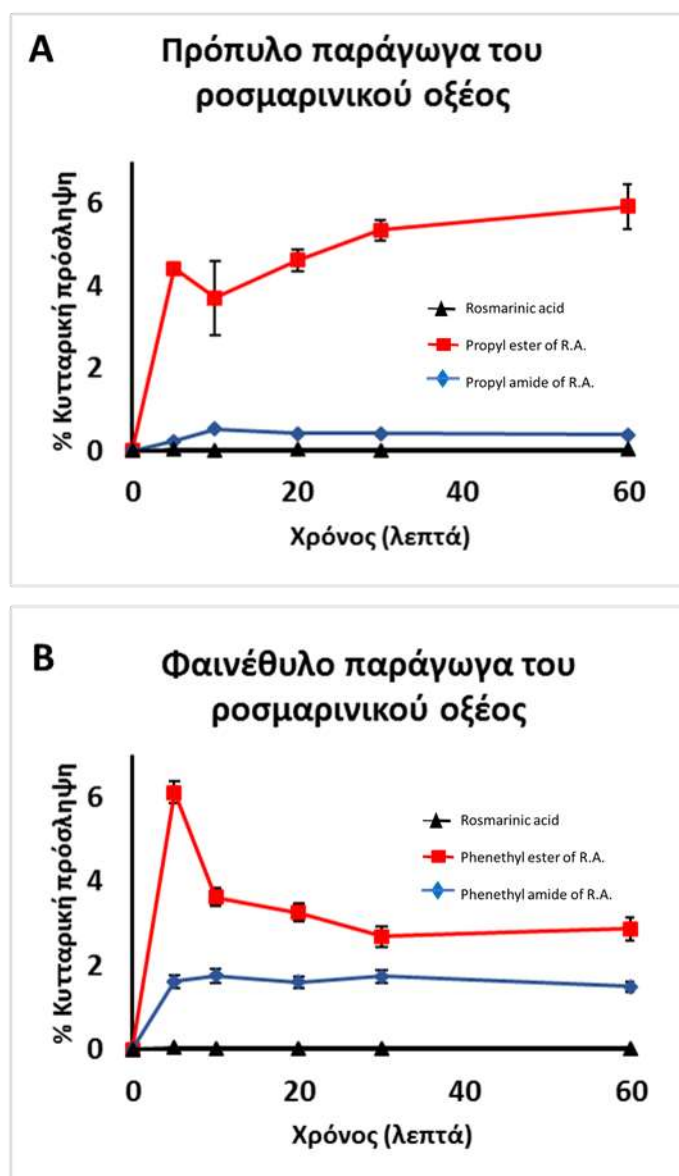
Στη συνέχεια, για περαιτέρω διερεύνηση του τρόπου εισόδου των ενώσεων μέσα στο κύτταρο, έγινε η ακριβής εκτίμηση του ποσοστού της κυτταρικής πρόσληψης και της πιθανής συσσώρευσης των εξεταζόμενων ενώσεων, με τη χρήση μιας υψηλής ευαισθησίας αναλυτική τεχνική, τη χρωματογραφία υπερύψηλης απόδοσης σε συνδυασμό με την φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου (Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled with triple quadruple Mass Spectrometry, UHPLC-MS/MS).

Τα κύτταρα επώαστηκαν για τις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές (0, 20, 40 και 60 λεπτά) με ροσμαρινικό οξύ ή τα συνθετικά παράγωγά του πρόπυλο-εστέρα, πρόπυλο-αμίδιο, φαινέθυλο-εστέρα και φαινέθυλο αμίδιο και στη συνέχεια έγινε εκτίμηση της κυτταρικής πρόσληψης στο κάθε κυτταρικό

εκχύλισμα με την τεχνική UHPLC-MS/MS, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

Παρατηρήθηκε ότι το ροσμαρινικό οξύ στη συγκέντρωση των 50 μM δεν βρίσκεται σε σημαντική ποσότητα στα κύτταρα στις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές (Εικόνα 38). Αντιθέτως, η πρόσληψη και των δύο εστέρων, πρόπυλο- και φαινέθυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος, ήταν γρήγορη φτάνοντας σε ένα μέγιστο στα πρώτα 5 λεπτά (Εικόνες 38Α και 38Β). Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε αύξηση του πρόπυλο-εστέρα (Εικόνα 38Α), ενώ στον φαινέθυλο-εστέρα παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού της κυτταρικής πρόσληψης (Εικόνα 38Β). Το ποσοστό της πρόσληψης και της ενδοκυττάριας συσσώρευσης ήταν σημαντικά χαμηλότερο για τα αμιδικά παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος, πρόπυλο- και φαινέθυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους εστέρες, ιδιαίτερα στις πρώτες χρονικές στιγμές (Εικόνες 38Α και 38Β).

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με την πρόταση που έγινε παραπάνω, ότι το ροσμαρινικό οξύ δεν μπορεί να εισέλθει εύκολα μέσα στο κύτταρο, ενώ οι εστέρες και τα αμίδια εισέρχονται παθητικά μέσα στο κύτταρο και μάλιστα πολύ γρήγορα. Επίσης, είναι φανερό ότι υπάρχει κάποια διαφορά στην διαδικασία πρόσληψης ή/και συσσώρευσης των εστερικών παραγώγων σε σχέση με τα αμιδικά παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος, η οποία θα πρέπει να συνδέεται με το γεγονός ότι οι εστέρες, σε αντίθεση με τα αμίδια, πιθανώς εισερχόμενοι μέσα στο κύτταρο υδρολύονται από μη ειδικές εστεράσες, με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους λόγω της δημιουργίας αρνητικού φορτίου.



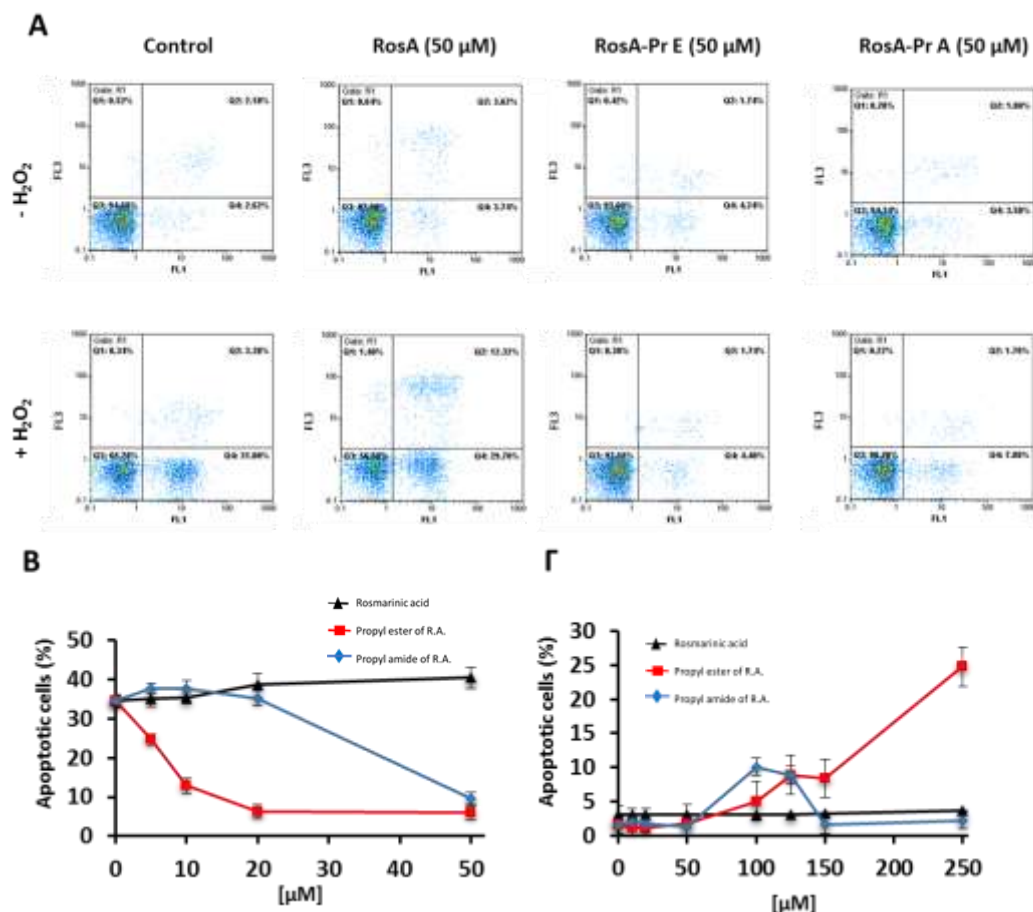
Εικόνα 38. Εκτίμηση της κυτταρικής πρόσληψης του ροσμαρινικού οξέος και των συνθετικών παραγώγων του με τη χρήση UHPLC-MS/MS. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) καλλιεργήθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 6 φρεατίων και επωάστηκαν για 20 λεπτά με 50 μ M ροσμαρινικού οξέος, πρότυλο-εστέρα και –αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος και ροσμαρινικού οξέος (A), φαινέθυλο-εστέρα και –αμιδίου του ροσμαρινικού οξέος (B) για τις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές (5, 10, 20, 30, και 60 λεπτά). Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ετοιμάστηκαν για ανάλυση, η οποία και έγινε με τη χρήση UHPLC-MS/MS, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Οι τιμές εκφράζονται σαν το ποσοστό των εξεταζόμενων ποσοτήτων των ενώσεων που ανιχνεύονται στα κυτταρικά δείγματα, προς την συνολική ποσότητα των ενώσεων που προστίθεται στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας των κυττάρων. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

3.1.6 Αναστολή της πρόκλησης απόπτωσης από παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος μετά από έκθεση κυττάρων σε H_2O_2

Σε προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, έχει προκύψει το συμπέρασμα ότι τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου έχουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό μεταγωγής σήματος και κυρίως στην πρόκληση αποπτωτικού θανάτου σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Tenopoulou et al., 2005, Barbouti et al., 2007, Kitsati et al., 2016). Για το λόγο αυτό το ροσμαρινικό οξύ και τα συνθετικά παράγωγά του εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα να προστατεύουν τα κύτταρα Jurkat από την απόπτωση σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

Τα κύτταρα, επωάστηκαν με ροσμαρινικό οξύ ή τα συνθετικά παράγωγά του για 30 λεπτά και μετά εκτέθηκαν σε 250 μM H_2O_2 για 7 ώρες. Η απόπτωση εκτιμήθηκε με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής, μέσω της σήμανσης των κυττάρων με δύο δείκτες, την ανεξίνη και το ιωδιούχο προπύδιο. Η πρώτη δεσμεύεται στην φωσφατιδύλοσερίνη που βρίσκεται φυσιολογικά στην εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ γυρίζει στην εξωτερική πλευρά όταν το κύτταρο υφίσταται προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Το ιωδιούχο προπύδιο, είναι μια ένωση που μπορεί και δεσμεύεται στο DNA μόνο όταν η κυτταρική μεμβράνη έχει πλέον αποδιαταχθεί, και έτσι μπορεί να φθάσει στον πυρήνα.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 39A, στο δείγμα με κύτταρα μάρτυρες, τα κύτταρα που βρίσκονται στο κάτω αριστερά τεταρτημόριο (Q3), με ποσοστό 94,68 %, είναι ανέπαφα κύτταρα που δεν προσλαμβάνουν ούτε ανεξίνη ούτε ιωδιούχο προπύδιο. Όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν σε H_2O_2 για 7 ώρες, ένα ποσοστό του πληθυσμού των κυττάρων της τάξης του 31 %, οδηγήθηκε στη φάση της πρώιμης απόπτωσης, όπως φαίνεται στο κάτω δεξιά τεταρτημόριο (Q4, πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα που προσλαμβάνουν ανεξίνη, αλλά όχι ιωδιούχο προπύδιο). Η συνολική απόπτωση, δηλαδή το άθροισμα των πληθυσμών στο Q2 (αποπτωτικά κύτταρα που προσλαμβάνουν ανεξίνη και ιωδιούχο προπύδιο) και στο Q4 (νεκρά κύτταρα που προσλαμβάνουν μόνο ιωδιούχο προπύδιο), είναι της τάξης του 34,38 % των κυττάρων.



Εικόνα 39. Τα πρότυπο- παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος προστατεύουν από την απόπτωση κύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2 . (Α) Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) προεπώαστηκαν με 50 μ M των ενδεικνυόμενων ενώσεων για 30 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν (πάνω πλαίσια) ή όχι (κάτω πλαίσια) σε H_2O_2 για 7 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και σημάνθηκαν με ανεξίνη (οριζόντιος άξονας) και ιωδιούχο προπύδιο (κατακόρυφος άξονας), για την εκτίμηση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου μέσω κυταρομετρίας ροής, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. (Β) Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν όπως στο (Α), εκτός από το ότι αυξανόμενες συγκεντρώσεις της εκάστοτε ένωσης (5, 10, 20 και 50 μ M) προστέθηκαν 30 λεπτά πριν την προσθήκη H_2O_2 για 7 ώρες. (Γ) Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν όπως στο (Α), με αυξανόμενες συγκεντρώσεις της εκάστοτε ένωσης (5, 10, 20, 50, 100, 125, 150 και 250 μ M) χωρίς όμως προσθήκη H_2O_2 . Ποσοτικοποίηση των συνολικών αποπτωτικών κυττάρων (εκφραζόμενη ως % του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού), παρουσία των τριών ενώσεων πραγματοποιήθηκε αθροίζοντας τους πληθυσμούς των πρώιμων αποπτωτικών (Q4) και αποπτωτικών (Q2) κυττάρων. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SEM σε τρία διαφορετικά πειράματα.

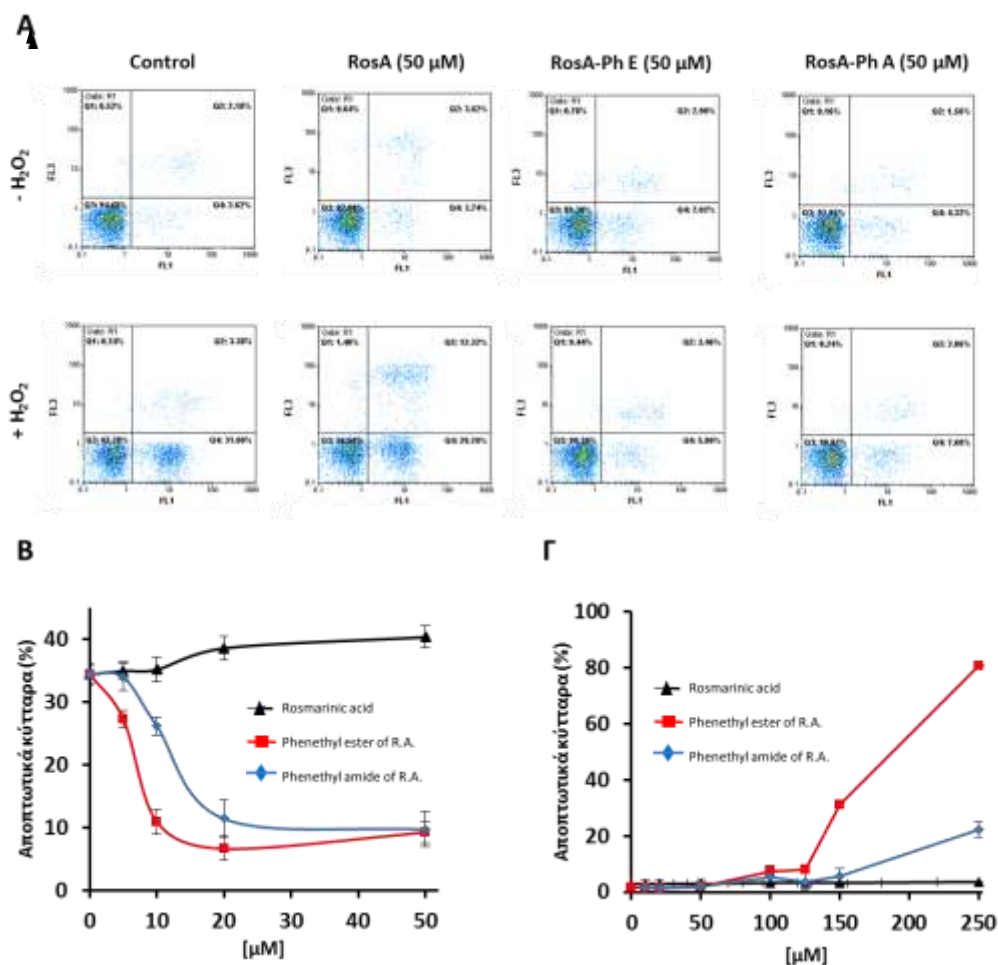
Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε, μετά από προεπώαση των κυττάρων με ροσμαρινικό οξύ και στη συνέχεια έκθεση σε H_2O_2 , δεν παρατηρείται κάποια προστασία από την απόπτωση (Εικόνα 39Α και 39Β).

Όταν τα κύτταρα προεπώαστηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του πρότυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος, όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στην εικόνα 16Β, αρχίζει να εμφανίζεται προστασία στα κύτταρα Jurkat από την απόπτωση, ήδη από τα 5 μM , καθώς το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων μειώνεται στο 25,61 %. Σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 50 μM , ο πρότυλο-εστέρας του ροσμαρινικού οξέος προκαλεί από μόνος του απόπτωση στα κύτταρα, χωρίς την έκθεσή τους σε H_2O_2 (Εικόνα 39Γ).

Το πρότυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος, αντίστοιχα, είναι ικανό να προστατεύει τα κύτταρα από τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, αλλά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από τον αντίστοιχο πρότυλο-εστέρα, καθώς η προστασία από την απόπτωση εμφανίζεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 20 μM (Εικόνα 39Β). Αντιθέτως με τον πρότυλο-εστέρα, το πρότυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος δεν εμφανίζει τοξικότητα στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν (Εικόνα 39Γ).

Αντίστοιχα πειράματα, κάτω από τις ίδιες συνθήκες, πραγματοποιήθηκαν και με τον φαινέθυλο-εστέρα και φαινέθυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε (Εικόνα 40Β), και ο φαινέθυλο-εστέρας του ροσμαρινικού οξέος είναι ικανός να προστατεύει τα κύτταρα Jurkat από την απόπτωση σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 5 μM . Παρομοίως με τον πρότυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος και ο φαινέθυλο-εστέρας εμφανίζει τοξικότητα από τη συγκέντρωση των 125 μM .

Κατ' αντιστοιχία με το πρότυλο-αμίδιο, το φαινέθυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος μπορεί να προστατεύσει από τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, αλλά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τον αντίστοιχο εστέρα. Εδώ, αρχίζει να εμφανίζει προστασία από τη συγκέντρωση των 10 μM (Εικόνα 40Β). Επίσης, όπως και το πρότυλο-αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος, δεν εμφανίζει τοξικότητα στις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις (Εικόνα 40Γ).



Εικόνα 40. Τα φαινέθυλο- παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος προστατεύουν από την απόπτωση κύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2 . (Α) Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) προεπώαστηκαν με 50 μ M των ενδεικνυόμενων ενώσεων για 30 λεπτά και στη συνέχεια εκτέθηκαν (πάνω πλαίσια) ή όχι (κάτω πλαίσια) σε H_2O_2 για 7 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και σημάνθηκαν με ανεξίνη (οριζόντιος άξονας) και ιωδιούχο προπύδιο (κατακόρυφος άξονας), για την εκτίμηση του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου μέσω κυταρομετρίας ροής, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. (Β) Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν όπως στο (Α), εκτός από το ότι αυξανόμενες συγκεντρώσεις της εκάστοτε ένωσης (5, 10, 20 και 50 μ M) προστέθηκαν 30 λεπτά πριν την προσθήκη H_2O_2 για 7 ώρες. (Γ) Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν όπως στο (Α), με αυξανόμενες συγκεντρώσεις της εκάστοτε ένωσης (5, 10, 20, 50, 100, 125, 150 και 250 μ M) χωρίς όμως προσθήκη H_2O_2 . Ποσοτικοποίηση των συνολικών αποπτωτικών κυττάρων (εκφραζόμενη ως % του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού), παρουσία των τριών ενώσεων πραγματοποιήθηκε αθροίζοντας τους πληθυσμούς των πρώιμων αποπτωτικών (Q4) και αποπτωτικών (Q2) κυττάρων. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SEM σε τρία διαφορετικά πειράματα.

Συμπερασματικά, οι εστέρες έχουν την ικανότητα να προστατεύουν τα κύτταρα από την απόπτωση, όπως και τα αντίστοιχα αμίδια, αλλά τα τελευταία σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Επίσης, οι εστέρες μετά από κάποια συγκέντρωση εμφανίζουν τοξικότητα, προκαλώντας απόπτωση χωρίς έκθεση σε H_2O_2 . Ωστόσο, ο φαινέθυλο-εστέρας του ροσμαρινικού οξέος εμφανίζει τοξικότητα σε μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τον πρόπυλο-εστέρα του ροσμαρινικού οξέος. Η διαφορετική δράση των εστερικών και αμιδικών παραγώγων που παρατηρείται, οφείλεται πιθανώς στις διαφορετικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν στην κάθε ένωση εντός των κυττάρων. Όπως έχει αναφερθεί, οι εστέρες μπορούν εύκολα να υδρολυθούν από μη ειδικές εστεράσες και να συσσωρευτούν μέσω στο κύτταρο λόγω του αρνητικού φορτίου τους. Αντιθέτως τα αμίδια δεν υδρολύονται και δεν εγκλωβίζονται εντός των κυττάρων. Η παρατήρηση ότι ο πρόπυλο-εστέρας του ροσμαρινικού οξέος εμφανίζει τοξικότητα σε μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με τον φαινέθυλο-εστέρα πιθανώς οφείλεται στο βαθμό λιποφιλικότητας της εκάστοτε ένωσης, καθώς αυτό καθορίζει και την ευκολία εισόδου της μέσα στο κύτταρο.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι για να μπορεί μια ένωση να προστατεύσει τα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες, θα πρέπει να είναι ικανή να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Σημαντικό ρόλο έχει όπως φαίνεται, και αν η ένωση συσσωρεύεται εντός του κυττάρου, καθώς και ο βαθμός λιποφιλικότητας της κάθε ένωσης. Περαιτέρω διερεύνηση χρειάζεται να πραγματοποιηθεί, προκειμένου να διαλευκανθούν οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στις παραπάνω διαδικασίες.

ΕΝΟΤΗΤΑ Β

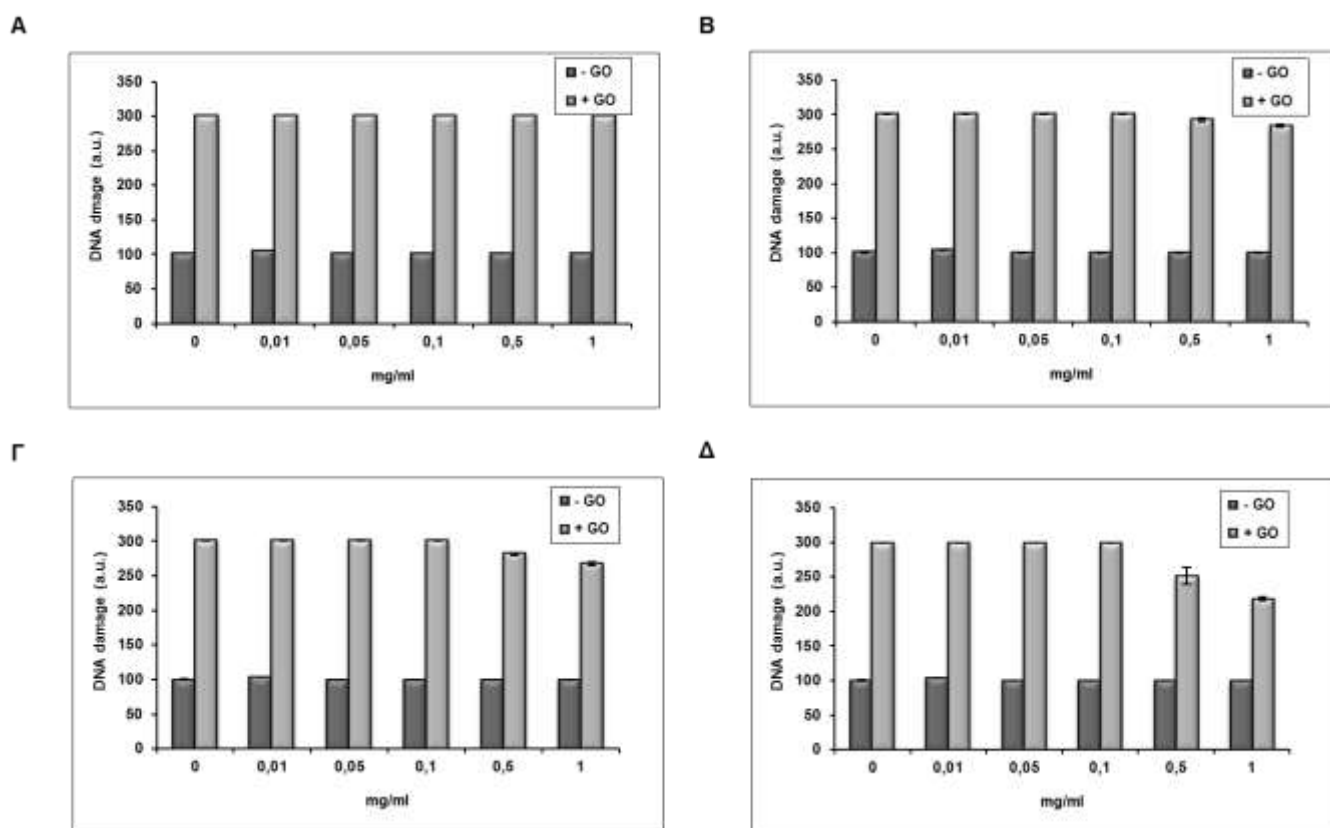
3.2 Πρακτικές εφαρμογές σε γαλακτοκομικά προϊόντα

Σε ένα δεύτερο στάδιο της μελέτης αυτής, βασιζόμενοι στο γεγονός ότι τα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών προστατεύουν τα κύτταρα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, έγινε η υπόθεση ότι τα εκχυλίσματα αυτά ίσως είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή «λειτουργικών τροφίμων», δηλαδή τροφίμων που θα έχουν τη δυνατότητα να παρέχουν επιπλέον όφελος στην υγεία, πέρα από το όφελος της φυσικής, θρεπτικής αξίας που προσφέρουν. Για το λόγο αυτό, σε συνεργασία με Βιομηχανία Τυροκομικών Προϊόντων, “Κουρέλλας Α.Ε.”, παρασκευάστηκε λευκό τυρί από πρόβειο γάλα τύπου φέτας, το οποίο περιείχε εκχύλισμα από φασκόμηλο, δεντρολίβανο ή ρίγανη. Η εκχύλιση των τυριών πραγματοποιήθηκε από το Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Επίσης, σαν δείγμα μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε και λευκό τυρί το οποίο δεν ήταν εμπλουτισμένο με κάποιο εκχύλισμα.

3.2.1 Πρακτικές εφαρμογές: Παραγωγή τύπων φέτας, εμπλουτισμένων με εκχυλίσματα αρωματικών φυτών και διερεύνηση της προστατευτικής τους ικανότητας σε κύτταρα που εκτίθενται σε H_2O_2

Κατά την πειραματική διαδικασία, καλλιέργειες κυττάρων Jurkat προεπώσθηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων από τη φέτα (0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 και 1 mg/ml) και στη συνέχεια εκτέθηκαν για 10 λεπτά στο ένζυμο Οξειδάση της Γλυκόζης (Glucose Oxidase, G.O.). Έπειτα, αξιολογήθηκαν οι σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA, με τη χρήση της ευαίσθητης τεχνικής της ηλεκτροφόρησης DNA μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης ή αλλιώς comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

Παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα από λευκό τυρί δεν προστατεύει από τη βλάβη στο DNA των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Εικόνα 41Α). Παρόμοια εικόνα παρουσιάζει και το τυρί που είναι εμπλουτισμένο με φασκόμηλο (Εικόνα 41Β). Το εκχύλισμα από τυρί εμπλουτισμένο με δεντρολίβανο προστατεύει σε μικρό βαθμό από τη συγκέντρωση των 0,5 mg/ml (Εικόνα 41Γ), ενώ στο εκχύλισμα από τυρί εμπλουτισμένο με ρίγανη παρατηρείται σταδιακή αύξηση της προστασίας από τη συγκέντρωση των 0,5 mg/ml (Εικόνα 41Δ).



Εικόνα 41. Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων τυριού ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο DNA των κυττάρων. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) επωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5 και 1 mg/ml) των υδατικών εκχυλισμάτων λευκού τυριού (Α) και προϊόντων που είναι εμπλουτισμένα με εκχύλισμα από φασκόμηλο (Β), δεντρολίβανο (Γ) και ρίγανη (Δ) και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή δεν εκτέθηκαν σε ποσότητα οξειδάσης της γλυκόζης, ικανή να παράγει περίπου 12 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

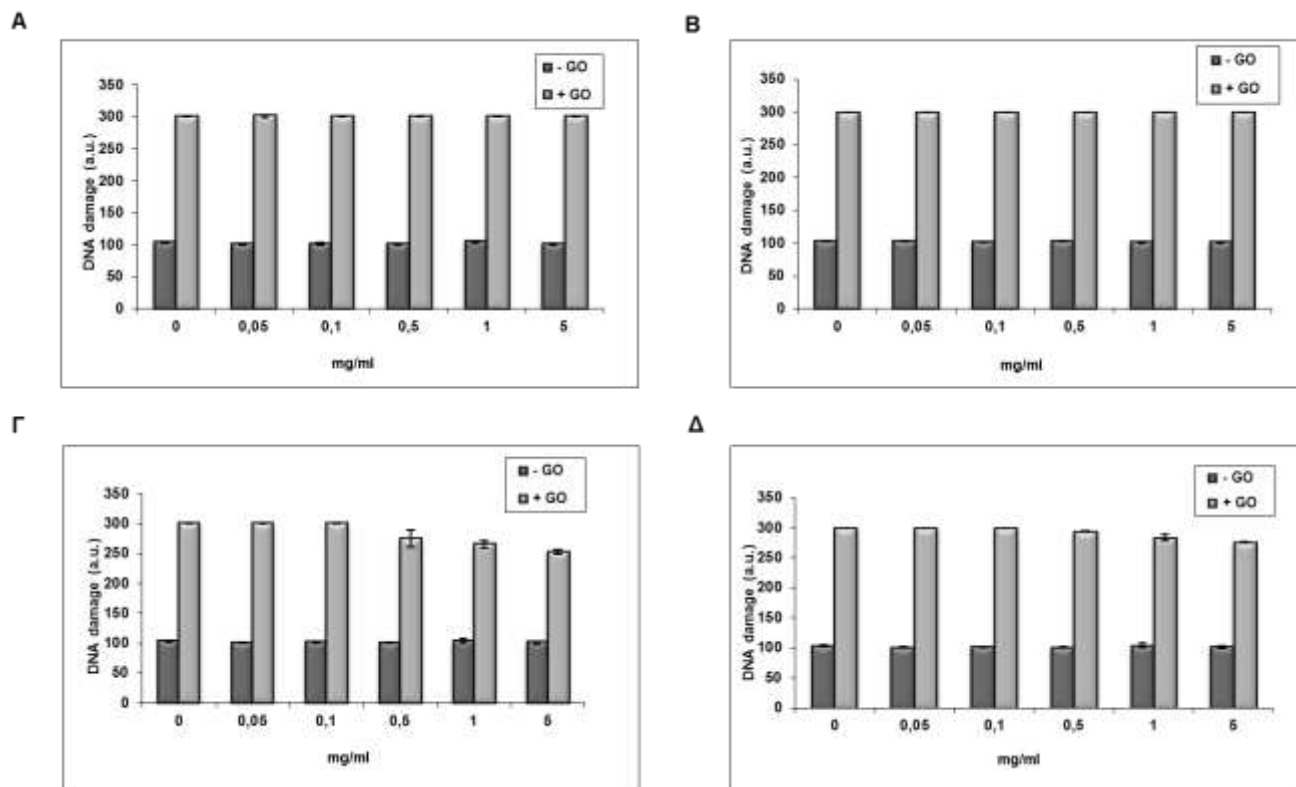
Συμπερασματικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι εμφανές ότι ορισμένα εκχυλίσματα μπορούν να προστατεύσουν από τη βλάβη στο κυτταρικό DNA, όταν είναι ενσωματωμένα σε κάποιο τρόφιμο, όπως το τυρί στην προκειμένη περίπτωση. Από τα τρία παραπάνω εκχυλίσματα, το τυρί που είναι εμπλουτισμένο με ρίγανη εμφανίζει τη μεγαλύτερη προστασία σε σχέση με τα άλλα δύο. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι περιέχει περισσότερα ή σε υψηλότερα ποσοστά δραστικές ουσίες, όπως τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή, που μπορούν να προστατεύουν από τη βλάβη στο DNA των κυττάρων.

3.2.2 Πρακτικές εφαρμογές: Παραγωγή τύπων γιαουρτιού, εμπλουτισμένων με εκχυλίσματα αρωματικών φυτών και φρούτων και διερεύνηση της προστατευτικής τους ικανότητας σε κύτταρα που εκτίθενται σε H₂O₂

Σε συνέχεια της προσπάθειας μελέτης εμπλουτισμένων λειτουργικών τροφίμων, έγινε σε συνεργασία με την ίδια, όπως προηγουμένως, Βιομηχανία Τυροκομικών Προϊόντων, “Κουρέλλας Α.Ε.”, παρασκευή γιαουρτιού από πρόβειο γάλα, το οποίο περιείχε εκχυλίσματα από φασκόμηλο, δεντρολίβανο ή ρίγανη. Επιπρόσθετα, έγινε παρασκευή πρόβειων γιαουρτιών με διάφορα φρούτα, όπως μήλο, μανταρίνι, ακτινίδιο, πορτοκάλι, φράουλα και μύρτιλο. Η εκχύλιση των γιαουρτιών πραγματοποιήθηκε από το Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τα εκχυλίσματα των γιαουρτιών εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να προστατεύουν το DNA των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, με την τεχνική comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

Παρατηρήθηκε ότι το εκχύλισμα από πρόβειο κανονικό γιαούρτι, χωρίς την προσθήκη εκχυλισμάτων, δεν το DNA των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (Εικόνα 42Α). Παρόμοια εικόνα παρουσιάζει και το πρόβειο γιαούρτι που είναι εμπλουτισμένο με φασκόμηλο (Εικόνα 42Β). Το εκχύλισμα από πρόβειο γιαούρτι εμπλουτισμένο με ρίγανη προστατεύει σταδιακά από τη συγκέντρωση

των 0,5 mg/ml (Εικόνα 42Γ), ενώ στο εκχύλισμα από πρόβειο γιαούρτι εμπλουτισμένο με δεντρολίβανο παρατηρείται μικρή σταδιακή αύξηση της προστασίας από τη συγκέντρωση των 0,5 mg/ml (Εικόνα 42Δ).

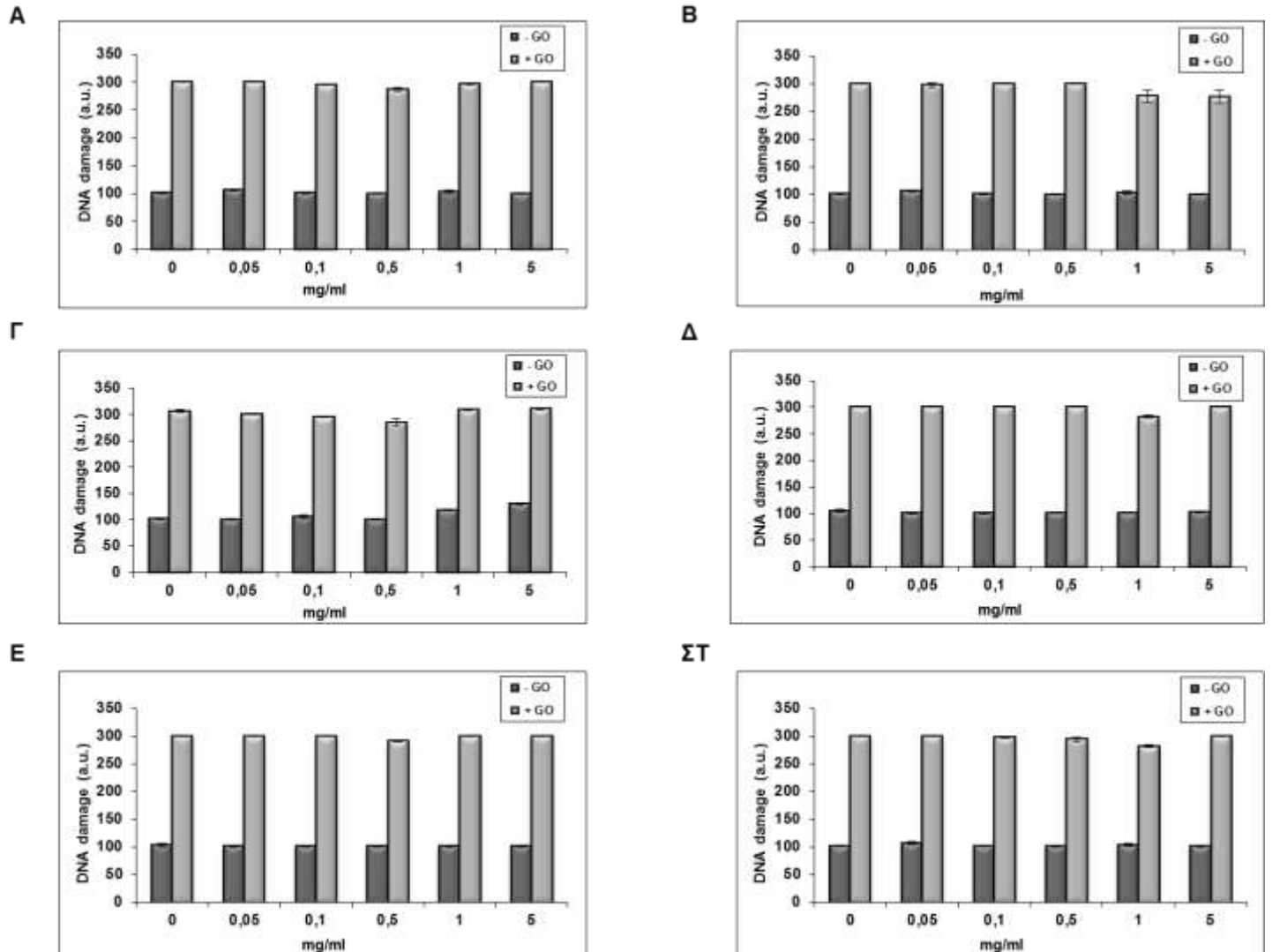


Εικόνα 42. Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων γιαουρτιού ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο DNA των κυττάρων. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) επωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5, 1 και 5 mg/ml) των υδατικών εκχυλισμάτων γιαουρτιού (A) και γιαουρτιών που είναι εμπλουτισμένα με εκχύλισμα από φασκόμηλο (B), ρίγανη (Γ) και δεντρολίβανο (Δ) και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή δεν εκτέθηκαν σε ποσότητα οξειδάσης της γλυκόζης, ικανή να παράγει περίπου 12 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

Στα γιαούρτια εμπλουτισμένα με φρούτα, παρατηρήθηκε ότι το γιαούρτι με μήλο και φράουλα δεν προστατεύει από τη βλάβη στο κυτταρικό DNA (Εικόνα 43A και 43E), ενώ στο γιαούρτι με μανταρίνι, παρατηρείται μια μικρή μείωση στη συγκέντρωση των 0,5 mg/ml (Εικόνα 43B). Στο γιαούρτι με ακτινίδιο παρατηρείται μια μικρή μείωση της βλάβης στη συγκέντρωση των 0,5 mg/ml

(Εικόνα 43Γ). Τέλος στα γιαούρτια με κομμάτια από πορτοκάλι ή μύρτιλο παρατηρείται μια μικρή επίσης μείωση της βλάβης στη συγκέντρωση των 1 mg/ml (Εικόνα 43Δ και 43ΣΤ).

Συμπερασματικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται ότι από τα γιαούρτια εμπλουτισμένα με αρωματικά φυτά, το γιαούρτι με ρίγανη εμφανίζει προστασία απέναντι στη βλάβη στο κυττάρικο DNA. Από τα γιαούρτια εμπλουτισμένα με κομμάτια φρούτων εκτός από αυτό με μανταρίνι, σε κανένα άλλο δείγμα δεν παρατηρείται αξιόλογη μείωση της βλάβης, η οποία να αυξάνεται ή έστω να παραμένει σταθερή. Για το λόγο αυτό, έγινε η υπόθεση ότι ίσως κάποιος παράγοντας κατά την διαδικασία της εκχύλισης επηρεάζει τη δράση των δραστικών ουσιών που υπάρχουν στα αρωματικά φυτά και στα φρούτα και ως εκ τούτου δεν μπορούν να ασκήσουν την ευεργετική τους δράση.

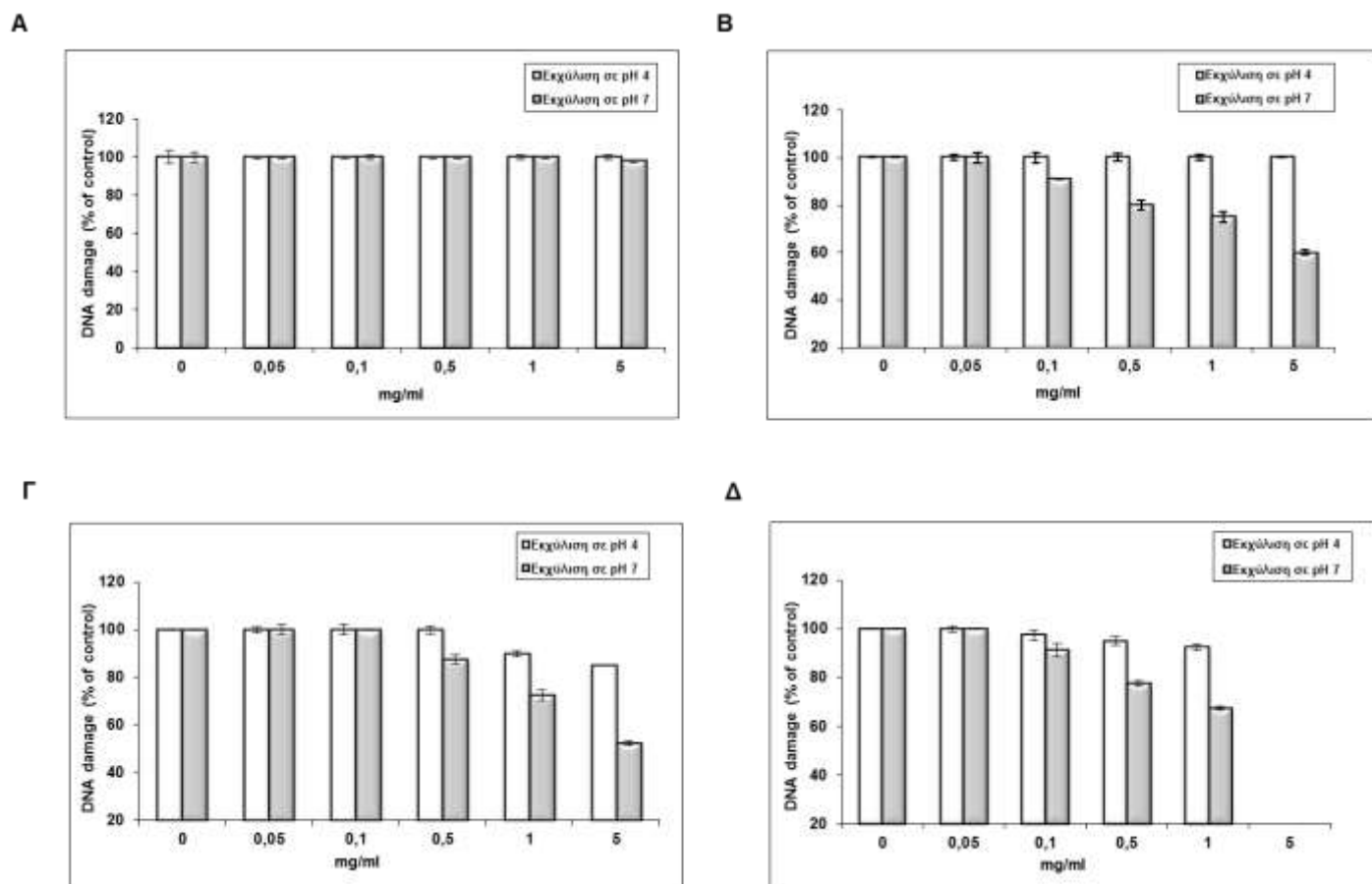


Εικόνα 43. Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων γιαουρτιού ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο DNA των κυττάρων. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) επωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5, 1 και 5 mg/ml) των υδατικών εκχυλισμάτων γιαουρτιών που είναι εμπλουτισμένα με κομμάτια από μήλο (Α), μανταρίνι (Β), ακτινίδιο (Γ), πορτοκάλι (Δ), φράουλα (Ε) και μύρτιλο (ΣΤ) και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή δεν εκτέθηκαν σε ποσότητα οξειδάσης της γλυκόζης, ικανή να παράγει περίπου 12 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

3.2.3 Διερεύνηση της προστατευτικής ικανότητας εκχυλισμάτων από γιαούρτι, σε διαφορετικό pH, εμπλουτισμένων με αρωματικά φυτά και φρούτα, σε κύτταρα που εκτίθενται σε H₂O₂

Προκειμένου να διερευνηθεί αν ο τρόπος εκχύλισης των γιαουρτιών επηρεάζει τη δράση των δραστικών ουσιών που περιέχονται στα αρωματικά φυτά και στα φρούτα, ελέγχθηκε το pH κατά τη διαδικασία της εκχύλισης. Αυτό που βρέθηκε μετά από μέτρηση, είναι ότι κατά τη διαδικασία της εκχύλισης το pH είναι όξινο, γύρω στα 4,2. Εξετάστηκε λοιπόν, η δράση των εκχυλισμάτων των γιαουρτιών σε εκχύλιση που έχει γίνει σε pH 4 και σε pH 7, προκειμένου να ελεγχθεί αν η δράση τους είναι διαφορετική. Η εκχύλιση των γιαουρτιών πραγματοποιήθηκε από το Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τα παραπάνω δείγματα εξετάστηκαν, όπως περιγράφεται προηγουμένως, ως προς την ικανότητά τους να προστατεύουν το DNA του κυττάρου σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, με την τεχνική comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

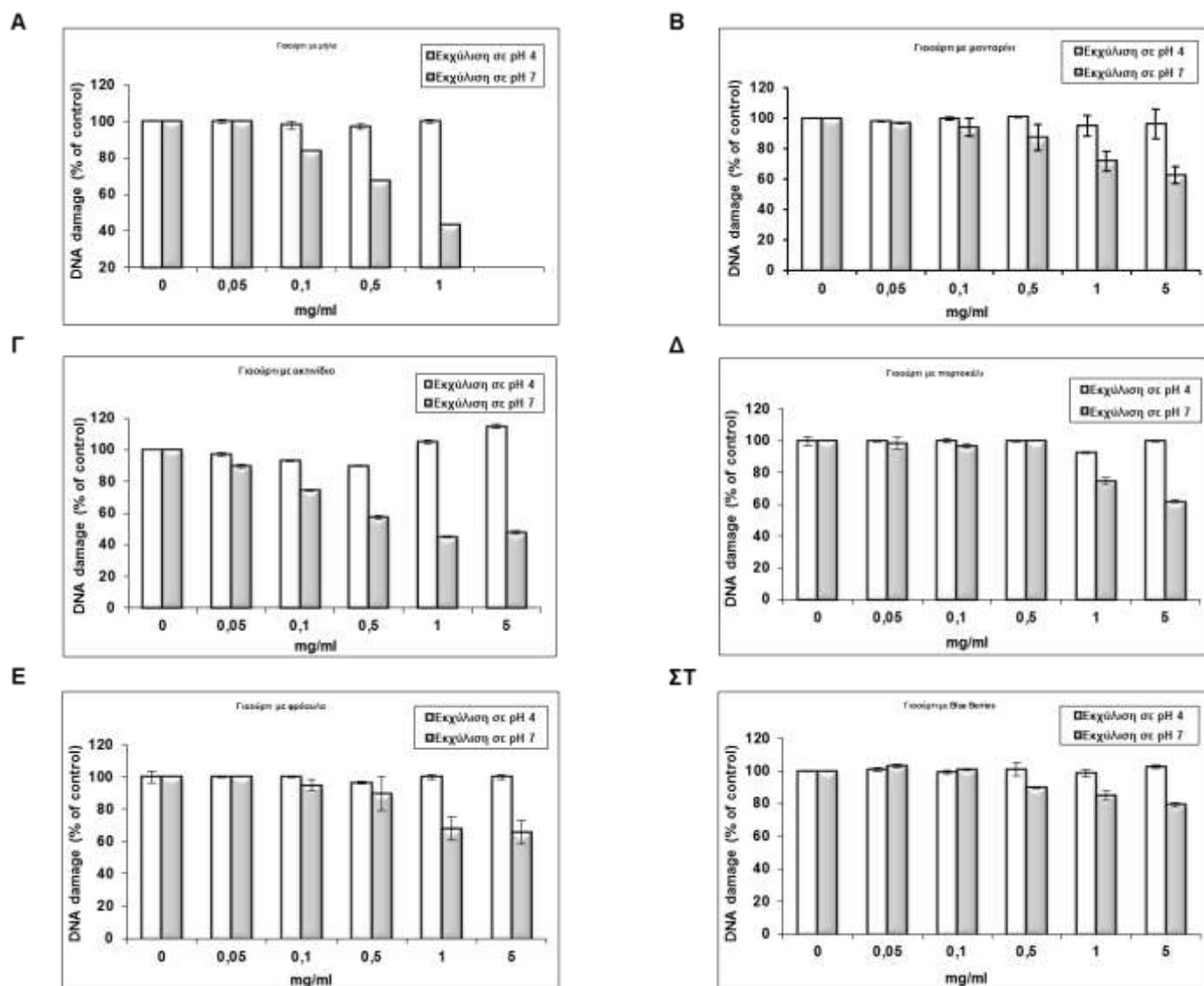
Όπως παρατηρείται, εκτός από το κανονικό γιαούρτι, που χρησιμοποιήθηκε σαν δείγμα μάρτυρας (Εικόνα 44Α), σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα από τα γιαούρτια με αρωματικά φυτά, φασκόμηλο, ρίγανη και δεντρολίβανο, υπάρχει στο pH 7, σταδιακή αύξηση της προστασίας από τη βλάβη των κυττάρων στο πυρηνικό DNA, στο φασκόμηλο και στο δεντρολίβανο από τη συγκέντρωση των 0,1 mg/ml και στη ρίγανη από τη συγκέντρωση των 0,5 mg/ml (Εικόνα 44Β, 44Γ και 44Δ). Όπως είναι εμφανές, το γιαούρτι με ρίγανη εμφανίζει τη μεγαλύτερη σταδιακή αύξηση της προστασίας στο pH 7. Αντιθέτως, όπως και προηγουμένως, στο pH 4, δεν υπάρχει προστασία από τη βλάβη στο DNA στα δείγματα. Εξαίρεση αποτελεί η ρίγανη, η οποία εμφανίζει σε αυτό το pH μια μικρή σταδιακή αύξηση της προστασίας από τη συγκέντρωση των 1 mg/ml.



Εικόνα 44. Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων γιαουρτιού με αρωματικά φυτά σε διαφορετικό pH, ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο DNA των κυττάρων. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) επωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5, 1 και 5 mg/ml) των υδατικών εκχυλισμάτων γιαουρτιού 2 % (Α) και γιαουρτιών που είναι εμπλουτισμένα με εκχύλισμα από φασκόμηλο (Β), ρίγανη (Γ) και δεντρολίβανο (Δ) σε pH 4 (ανοιχτόχρωμες μπάρες) και σε pH 7 (σκουρόχρωμες μπάρες) και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή δεν εκτέθηκαν σε ποσότητα οξειδάσης της γλυκόζης, ικανή να παράγει περίπου 12 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

Παρόμοια εικόνα εμφανίζουν και τα γιαούρτια με εκχυλίσματα φρούτων, στα οποία στην εκχύλιση που πραγματοποιήθηκε σε pH 4 δεν υπάρχει προστασία των κυττάρων από τη βλάβη στο DNA, όπως και προηγουμένως, ενώ σε pH 7 παρατηρείται σταδιακή αύξηση της προστασίας, από τα 0,05 mg/ml στο γιαούρτι με ακτινίδιο (Εικόνα 45Γ), από τα 0,1 mg/ml στο γιαούρτι με μήλο, ή με μανταρίνι ή με φράουλα (Εικόνα 45Α, 45Β και 45Ε), από τα 0,5 mg/ml στο

γιαούρτι με μύρτιλο (Εικόνα 45ΣΤ) και από τα 1 mg/ml στο γιαούρτι με πορτοκάλι (Εικόνα 45Δ).



Εικόνα 45. Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων γιαουρτιού με φρούτα σε διαφορετικό pH, ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο DNA των κυττάρων. Κύτταρα Jurkat ($1,5 \times 10^6$ /ml) επωάστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις (0, 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5, 1 και 5 mg/ml) των υδατικών εκχυλισμάτων γιαουρτιών που είναι εμπλουτισμένα με κομμάτια από μήλο (Α), μανταρίνι (Β), ακτινίδιο (Γ), πορτοκάλι (Δ), φράουλα (Ε) και μύρτιλο (ΣΤ) σε pH 4 (ανοιχτόχρωμες μπάρες) και σε pH 7 (σκουρόχρωμες μπάρες) και στη συνέχεια εκτέθηκαν ή δεν εκτέθηκαν σε ποσότητα οξειδάσης της γλυκόζης, ικανή να παράγει περίπου 12 μM H_2O_2 ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα δείγματα των οποίων οι εκχυλίσσεις πραγματοποιήθηκαν σε pH 4 δεν εμφάνισαν προστασία από τη βλάβη των κυττάρων στο πυρηνικό DNA τους. Αντιθέτως, τα δείγματα των οποίων οι εκχυλίσσεις πραγματοποιήθηκαν σε pH 7 εμφάνισαν σταδιακή αύξηση της προστασίας. Μάλιστα, τα γιαούρτια με ρίγανη ή με ακτινίδιο εμφάνισαν τη μεγαλύτερη προστασία σε σχέση με τα υπόλοιπα. Αυτό που μπορεί να συμβαίνει είναι ότι στο όξινο pH που λαμβάνουν χώρα οι εκχυλίσσεις, υπάρχει πιθανότητα οι εστέρες, οι οποίοι υπάρχουν και στα αρωματικά φυτά και στα φρούτα, και οι οποίοι μελετήθηκαν και στην προηγούμενη ενότητα, υδρολύονται και δεν είναι δυνατό να ασκήσουν την ευεγερτική τους δράση. Περαιτέρω όμως μελέτη χρειάζεται να γίνει, προκειμένου να επιβεβαιωθεί αυτός ο ισχυρισμός.

ΕΝΟΤΗΤΑ Γ

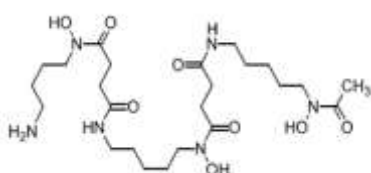
3.3 Προκαταρκτικά πειράματα για μια *in vivo* μελέτη χορήγησης συνδυασμού σιδηροδεσμευτικών ενώσεων για την αντιμετώπιση του συνδρόμου ισχαιμίας - επαναιμάτωσης

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που έχουμε παρατηρήσει έως τώρα, δύο είναι τα κύρια χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει μια ένωση για να μπορεί να προστατεύσει αποτελεσματικά τα συστατικά των κυττάρων από την οξειδωση σε συνθήκες οξειδωτικού στρες: α) Η ευκολία με την οποία μπορεί να εισέλθει μέσα στο κύτταρο και β) η ικανότητά της να δεσμεύει σίδηρο (Kitsati et al., 2012). Στην παρούσα ενότητα έγινε μία προσπάθεια να εξεταστεί εάν η ταυτόχρονη χορήγηση δύο ενώσεων που συνδυάζουν τα παραπάνω χαρακτηριστικά θα βελτιστοποιούσε τις προστατευτικές επιπτώσεις, και εάν τα αποτελέσματα είναι θετικά να ελέγξουμε την προστατευτική τους ικανότητα σε ένα *in vivo* μοντέλο οξειδωτικού στρες, όπως είναι αυτό της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης ήπατος σε κουνέλια. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν εγκεκριμένα σκευάσματα, τα οποία χορηγούνται σε ασθενείς κυρίως για να απομακρύνουν το σίδηρο από τον οργανισμό σε περιπτώσεις υπερσιδήρωσης. Για παράδειγμα, η δεσφεριοξαμίνη (DFO) αποτελεί τον κύριο σιδηροδεσμευτικό παράγοντα που χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη. Η ένωση αυτή δεσμεύει σταθερά τα ιόντα σιδήρου, αλλά δεν μπορεί να διαπεράσει με ευκολία τις βιολογικές μεμβράνες (Doulas et al., 2003). Αντιθέτως, μία άλλη ένωση, η οποία χρησιμοποιείται στις παθήσεις που υπάρχουν αυξημένα επίπεδα σιδήρου, η δεφεριπρόνη, δεσμεύει πιο χαλαρά τα ιόντα σιδήρου, αλλά μπορεί και διαχέεται δια μέσου των μεμβρανών. Πριν την *in vivo* μελέτη εξετάστηκε η δράση των δύο αυτών ενώσεων *in vitro*, σε καρκινικά ηπατικά κύτταρα HepG2.

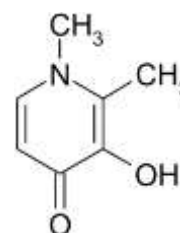
3.3.1 Διερεύνηση της συνδυασμένης χρήσης δεσφεριοξαμίνης και δεφεριπρόνης σε συνθήκες οξειδωτικού στρες σε ηπατικά κύτταρα

Πριν τα *in vivo* πειράματα, εξετάστηκε η ικανότητα της δεσφεριοξαμίνης και της δεφεριπρόνης αυτόνομα και σε συνδυασμό μεταξύ τους, να προστατεύουν το DNA κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 .

A



B

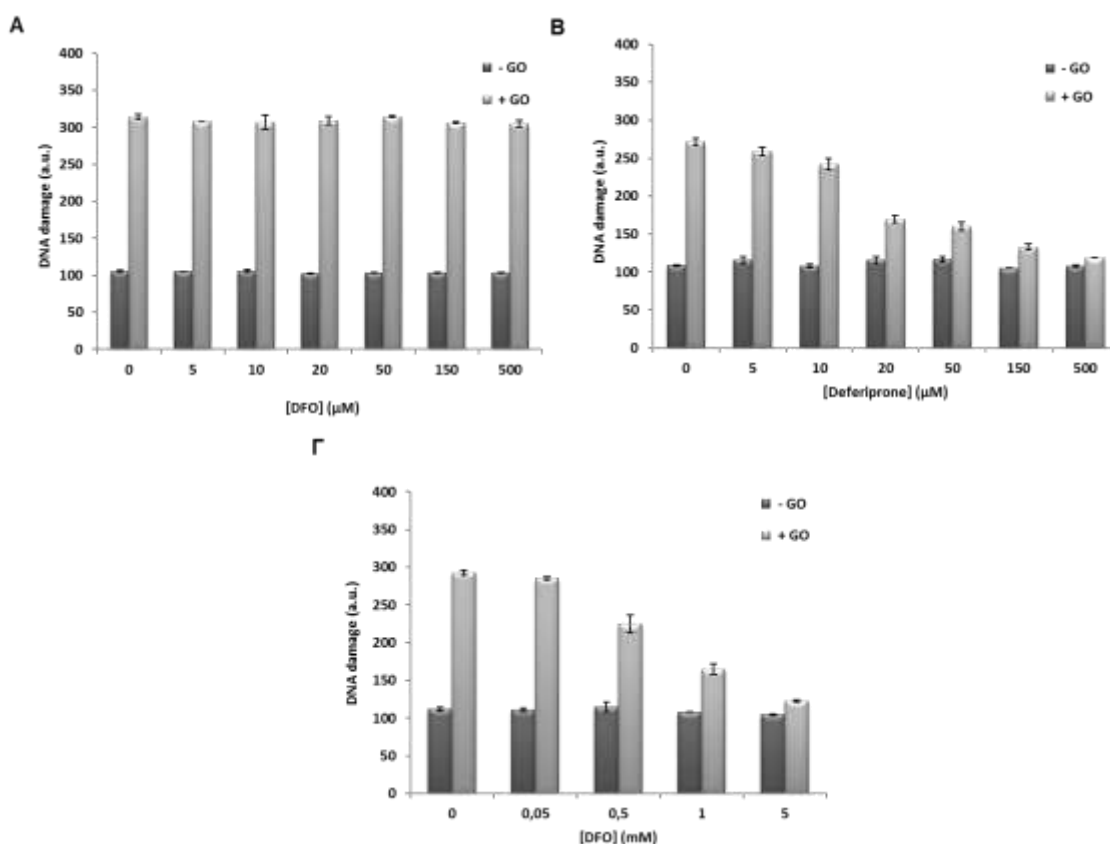


Εικόνα 46. Χημικές δομές των σκευασμάτων (A) δεσφεριοξαμίνη (DFO) και (B) δεφεριπρόνη (DFP).

Ηπατικά κύτταρα HepG2 προεπώαστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις της δεσφεριοξαμίνης και της δεφεριπρόνης (0, 5, 10, 20, 50, 150 και 500 μM) και στη συνέχεια εκτέθηκαν για 10 λεπτά στο ένζυμο Οξειδάση της Γλυκόζης (Glucose Oxidase, G.O.), το οποίο σε πλήρες καλλιεργητικό υλικό, παράγει συνεχώς σταθερές ποσότητες H_2O_2 . Στη συνέχεια, αξιολογήθηκαν οι σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA, με τη χρήση της ευαίσθητης τεχνικής της ηλεκτροφόρησης DNA μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης ή αλλιώς comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

Όπως παρατηρήθηκε, όταν τα κύτταρα προεπώαστηκαν για 20 λεπτά με δεσφεριοξαμίνη στις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκε κάποια προστασία από τη βλάβη των κυττάρων στο πυρηνικό DNA (Εικόνα 47A). Αντιθέτως, όταν τα κύτταρα προεπώαστηκαν για 20 λεπτά με δεφεριπρόνη παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση της βλάβης, η οποία έγινε πιο έντονη μεταξύ 10 και 20 μM δεφεριπρόνης ($IC_{50} = 16,4 \mu M$) (Εικόνα 47B).

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η δεφεριπρόνη, σε αντίθεση με τη δεσφεριοξαμίνη, μπορεί να εισέρχεται εύκολα εντός των κυττάρων και να τα προστατεύει. Όπως φαίνεται στην εικόνα 47Γ, η δεσφεριοξαμίνη για να προσφέρει προστασία, χρειάζεται υψηλότερες συγκεντρώσεις (0,5 έως 5 mM) και μεγαλύτερο χρόνο επώασης (2 ώρες). Αυτό εξηγείται από το γεγονός, ότι όπως έχει προαναφερθεί, η δεσφεριοξαμίνη εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων μέσω της ενδοκυττάρωσης υγρής φάσης, διαδικασία που απαιτεί υψηλές συγκεντρώσεις και κάποιο χρονικό διάστημα προκειμένου να διεκπεραιωθεί και να ασκήσει μετέπειτα την προστατευτική δράση της (Doulias et al., 2003).

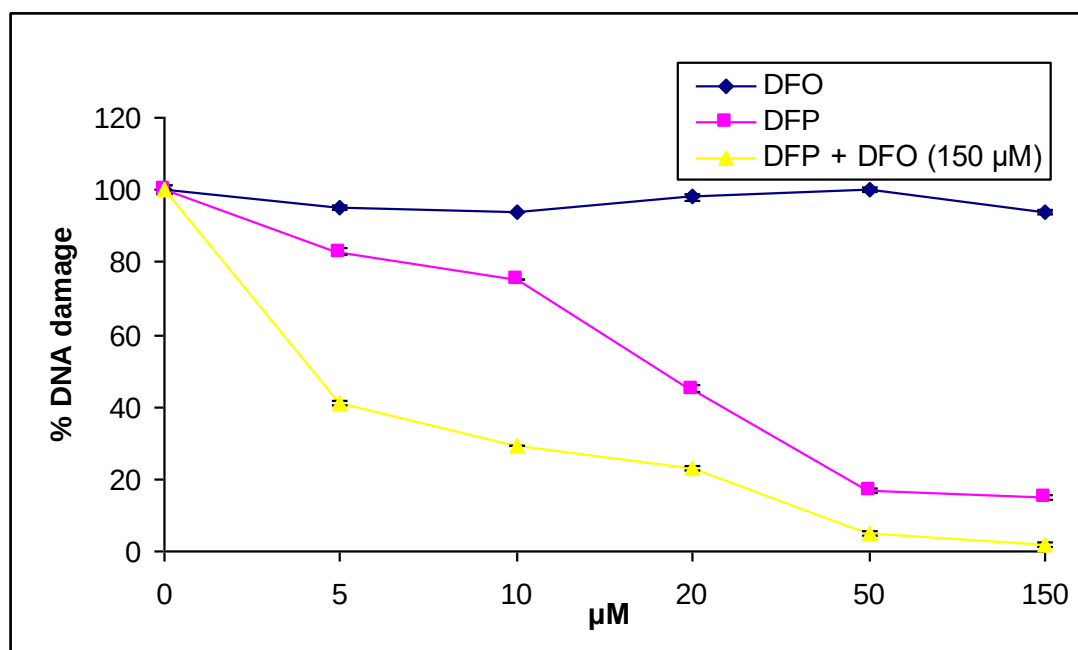


Εικόνα 47. Προστασία της δεσφεριοξαμίνης (DFO) και της δεφεριπρόνης (DFP) ενάντια στη βλάβη του κυτταρικού DNA, ανάλογα με τη συγκέντρωση και το χρόνο επώασης. Κύτταρα HepG2 (50.000 /ml) επώαστηκαν για 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις δεσφεριοξαμίνης (Α) ή δεφεριπρόνης (Β) ή για 2 ώρες με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις δεσφεριοξαμίνης (Γ). Στη συνέχεια, εκτέθηκαν ή δεν εκτέθηκαν σε ποσότητα οξειδάσης της γλυκόζης, ικανή να παράγει περίπου 12 μM H₂O₂ ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ικανότητα του συνδυασμού των δύο ενώσεων, της δεσφεριοξαμίνης και της δεφεριπρόνης, να προσφέρουν προστασία σε κύτταρα τα οποία εκτίθενται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, κύτταρα HepG2, προεπώαστηκαν για 2 ώρες με 150 μM δεσφεριοξαμίνης και στη συνέχεια προστέθηκε δεφεριπρόνη στις ενδεικνυόμενες αυξανόμενες συγκεντρώσεις (5, 10 20, 50 ΚΑΙ 100 μM). Έπειτα, προστέθηκε για 10 λεπτά το ένζυμο Οξειδάση της Γλυκόζης (Glucose Oxidase, G.O.) και αξιολογήθηκαν οι σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA, με τη χρήση της comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι.

Όπως παρατηρείται στην εικόνα 48, προεπώαση των κυττάρων για 2 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεσφεριοξαμίνης (0 έως 150 μM), δεν έδειξε καμία προστασία του DNA. Προεπώαση των κυττάρων για 20 λεπτά με τις ίδιες συγκεντρώσεις δεφεριπρόνης, προκάλεσε σημαντική αύξηση της προστασίας. Είναι όμως ενδιαφέρον, ότι η συνδυασμένη προεπώαση των κυττάρων αρχικά με 150 μM δεσφεριοξαμίνης για 2 ώρες και στη συνέχεια με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεφεριπρόνης, προκάλεσε μεγαλύτερη αύξηση της προστασίας από το άθροισμα των δύο ενώσεων ξεχωριστά, ειδικά στις χαμηλότερες δόσεις δεφεριπρόνης (5 και 10 μM).

Τα πειράματα αυτά υποδηλώνουν ότι η συνδυασμένη χορήγηση δεσφεριοξαμίνης με δεφεριπρόνη προσφέρει μεγαλύτερη προστασία από αυτή που προκαλεί η κάθε ένωση όταν προστίθεται μόνη της. Η συνδυασμένη δράση των ενώσεων δεσφεριοξαμίνη και δεφεριπρόνη μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η δεφεριπρόνη μπορεί να διαχέεται δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης, να συνδέει ενδοκυττάριο σίδηρο, να τον μεταφέρει έξω από τα κύτταρα και να τον αποδίδει στην δεσφεριοξαμίνη. Ως τελικό αποτέλεσμα της δράσης του συνεχούς αυτού κύκλου, θα ήταν η μείωση του ενδοκυττάρου οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου (labile iron) και κατά συνέπεια, η προστασία των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Περαιτέρω πειράματα όμως, χρειάζεται να πραγματοποιηθούν, προκειμένου να αποδειχθεί αυτή η υπόθεση.



Εικόνα 48. Προστασία της δεσφεριοξαμίνης (DFO), της δεφεριπρόνης (DFP) και του συνδυασμού τους ενάντια στη βλάβη του DNA. Κύτταρα HepG2 (50.000 /ml) επωάστηκαν για 2 ώρες με δεσφεριοξαμίνη στις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις (μπλε γραμμή), ή 20 λεπτά με τις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις δεφεριπρόνης (ροζ γραμμή), ή με 150 μM δεσφεριοξαμίνης για 2 ώρες και στη συνέχεια με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεφεριπρόνης για 20 λεπτά (κίτρινη γραμμή). Στη συνέχεια εκτέθηκαν ή δεν εκτέθηκαν σε ποσότητα οξειδάση της γλυκόζης, ικανή να παράγει περίπου 12 μM H₂O₂ ανά λεπτό. Μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα συλλέχθηκαν και αξιολογήθηκε ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA με τη μέθοδο comet assay, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD διπλών μετρήσεων σε δύο διαφορετικά πειράματα.

3.3.2 In vivo μοντέλο

Τα πειράματα αυτά έχουν πραγματοποιηθεί ήδη σε συνεργασία με την Χειρουργική Κλινική του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Αναπληρωτής Καθηγητής Γεώργιος Γκλαντζούνης και Υποψήφια Διδάκτωρ Αθηνά Μαντέλου) και τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά και επιβεβαιώνουν τις παραπάνω προτάσεις. Τα αποτελέσματα αυτά θα παρουσιαστούν σύντομα στη Διδακτορική Διατριβή της κας Μαντέλου.

4. Συζήτηση

4.1 Σχέσεις διατροφής και οξειδωτικού στρες

Η διατροφή αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της επιβίωσης όλων των οργανισμών. Η λαϊκή έκφραση «είμαστε ότι τρώμε», έχει υπόβαθρο, δεδομένου ότι ήδη εδώ και πολλές δεκαετίες έχουν γίνει πολλές μελέτες οι οποίες συνδέουν την διατροφή με την επίδρασή της στην υγεία. Η Μεσογειακού τύπου διατροφή έχει αναδειχθεί ως ένας από τους καλύτερους τύπους διατροφής, καθώς σύμφωνα με μακροχρόνιες επιδημιολογικές μελέτες είναι ευεργετική για την διατήρηση της υγείας των ανθρώπων, προστατεύοντας και προλαμβάνοντας σοβαρές παθολογικές καταστάσεις (βλέπε Πίνακα 2).

Τα συστατικά της Μεσογειακής διατροφής σε κάθε περίπτωση είναι αυτά που της προσδίδουν τις προστατευτικές της ιδιότητες. Για το λόγο αυτό, πολλοί ερευνητές έχουν εστιάσει την προσοχή τους στην «αποκωδικοποίηση» των δράσεων και των μηχανισμών δράσης αυτών των συστατικών. Ο όρος «αντιοξειδωτικά» χρησιμοποιείται κατά κόρον για τον χαρακτηρισμό συστατικών φυτικής προέλευσης της Μεσογειακής δίαιτας, καθώς έχει βρεθεί ότι διαθέτουν ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα, προστατεύοντας από τις οξειδώσεις που προκαλούν οι δραστικές ελεύθερες ρίζες. Πιστεύεται ότι έχουν την ικανότητα να εκκαθαρίζουν τις ελεύθερες ρίζες όταν δημιουργούνται, δρουν δηλαδή ως «εκκαθαριστές» των ελευθέρων ριζών, σύμφωνα με τη λεγόμενη «θεωρία των αντιοξειδωτικών». Ωστόσο, η υπόθεση αυτή αποδείχτηκε τελικά λανθασμένη (Warnholtz et al., 2000).

Η ερευνητική μας ομάδα εδώ και περίπου 20 χρόνια ασχολείται με την έρευνα βιοδραστικών ενώσεων που περιέχονται στη Μεσογειακή διατροφή ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δημιουργία των δραστικών ελευθέρων ριζών. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί μέσω της ενδοκυττάριας δέσμευσης ιόντων σιδήρου, καθώς ο σίδηρος έχει βρεθεί ότι είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία των εξαιρετικά δραστικών ελευθέρων ριζών υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton (Fenton, 1894).

Ο σίδηρος ο οποίος είναι ικανός να καταλύει την αντίδραση Fenton βρίσκεται στην οξειδοαναγωγικά ενεργή μορφή του, δηλαδή είναι ικανός να συμμετέχει

σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, με αποτέλεσμα την παραγωγή των εξαιρετικά δραστικών ελευθέρων ριζών υδροξυλίου, οι οποίες επιτίθενται και εξουδετερώνουν οποιοδήποτε κυτταρικό συστατικό βρίσκεται δίπλα τους τη στιγμή του σχηματισμού τους (Cadenas, 1989, Galaris and Pantopoulos, 2008, Weinberg, 2010, Kurz et al., 2010). Τα φυσιολογικά επίπεδα αυτού του καταλυτικά ενεργού σιδήρου βρίσκονται σε ποσοστό κάτω από 5 % του συνολικού σιδήρου και ονομάζεται «καταλυτικά ενεργός ή οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος» (Labile Iron, LI), και ενώ κατανέμεται σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα, η ακριβής φύση του παραμένει άγνωστη (Kakhlon et al., 2002, Petrat et al., 2002, Tenopoulou et al., 2007).

Η ερευνητική μας ομάδα έχει φθάσει στο συμπέρασμα ότι βιοδραστικές ενώσεις οι οποίες περιέχουν όρθο – διυδρόξυ ομάδα είναι ικανές να δεσμεύσουν ιόντα σιδήρου (Melidou et al., 2005, Nousis et al., 2005). Βιοδραστικές επομένως, ενώσεις της διατροφής που περιέχουν τη συγκεκριμένη ομάδα μπορούν και δεσμεύουν ιόντα σιδήρου, αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την αντίδραση Fenton και επακόλουθα τη δημιουργία των εξαιρετικά δραστικών ριζών υδροξυλίου (Barbouti et al., 2001, Doulias et al., 2003, Melidou et al., 2005, Nousis et al., 2005). Με αυτόν τον τρόπο, εμποδίζεται η δημιουργία των δραστικών ελευθέρων ριζών, ενώ με τη θεωρία της εκκαθάρισης των δραστικών ελευθέρων ριζών αναστέλλεται η τοξική τους δράση, ενώ όμως πρώτα έχουν ήδη δημιουργηθεί.

Συμπερασματικά, είναι λογικό να γίνει η υπόθεση ότι βιοδραστικές ενώσεις οι οποίες προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής, μπορούν να δεσμεύσουν τα οξειδοαναγωγικά ενεργά ιόντα σιδήρου, εισερχόμενες στα κύτταρα, προστατεύοντάς τα σε περιπτώσεις απότομης έκθεσής τους σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.

4.2 Προστατευτική δράση εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών

Η παρούσα μελέτη ξεκίνησε στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού προγράμματος «Συνεργασία II», που είχε ως στόχο την αξιολόγηση της ικανότητας εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών Ελληνικής προέλευσης, να προστατεύουν το κυτταρικό DNA από τις σχάσεις που προκαλούνται μετά από έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 . Και τα τρία φυτά που χρησιμοποιήθηκαν, φασκόμηλο, ρίγανη και δεντρολίβανο, συστατικά της Μεσογειακής διατροφής, έχουν μελετηθεί εκτενώς για τις προστατευτικές βιολογικές ιδιότητες τους. Ωστόσο, οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί δράσης των συστατικών τους παραμένουν άγνωστοι.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε για πρώτη φορά η ικανότητα εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών φασκόμηλο, ρίγανη και δεντρολίβανο να προστατεύουν από τη βλάβη που προκαλείται στο DNA κυττάρων που εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες. Η μελέτη αυτή αποκάλυψε, πως ορισμένα από τα εκχυλίσματα μπορούσαν να προσφέρουν ισχυρή προστασία ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H_2O_2 στο κυτταρικό DNA (βλέπε εικόνες 25, 26 και 27). Ξεχώρισαν τα υδατικά εκχυλίσματα και τα εκχυλίσματα από οξικό αιθυλεστέρα, τα οποία και στα τρία αρωματικά φυτά μπορούσαν να δράσουν προστατευτικά. Πιθανώς αυτό οφείλεται στο είδος των ουσιών που εκχυλίζονται σε κάθε περίπτωση, καθώς ανάλογα με την πολικότητα του διαλύτη εκχυλίζονται και οι αντίστοιχες ενώσεις. Το ερώτημα το οποίο προκύπτει, είναι ο προσδιορισμός αυτών των ουσιών και η εύρεση του ακριβούς μοριακού μηχανισμού δράσης τους. Γνωρίζοντας ότι τα υδατικά και τα εκχυλίσματα από οξικό αιθυλεστέρα είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις και γνωρίζοντας τις ευεργετικές τους ιδιότητες από τη βιβλιογραφία, κατευθύναμε την έρευνά μας σε αυτού του είδους τις ενώσεις και συγκεκριμένα στα φαινολικά οξέα.

4.3 Μηχανισμός προστατευτικής ικανότητας των φαινολικών οξέων

Ένας σημαντικός αριθμός φυσικών ενώσεων στα παραπάνω εκχυλίσματα ήταν φαινολικά οξέα ή ενώσεις που περιέχουν έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους στον πυρήνα τους. Τα φαινολικά οξέα αποτελούν βιοδραστικές ενώσεις στις οποίες έχουν αποδοθεί προστατευτικές ιδιότητες σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Manach et al., 2004, Willet, 2006). Οι πραγματικοί, όμως, μοριακοί μηχανισμοί δράσης τους παραμένουν ακόμα άγνωστοι. Επιπρόσθετα, πειραματικές μελέτες που έχουν γίνει δείχνουν τόσο κυτταροπροστατευτικά όσο και κυτταροτοξικά αποτελέσματα. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε πιο διεξοδικά το μηχανισμό κυτταροπροστασίας ενός χαρακτηριστικού φαινολικού οξέως, του ροσμαρινικού οξέος.

Μεταξύ των φαινολικών οξέων υπάρχουν πολλά που περιέχουν όρθο – διυδροξύ (κατεχολική) ομάδα στη δομή τους και έτσι έχουν την ικανότητα να δεσμεύσουν σίδηρο σε αυτή τη θέση. Ωστόσο, απαραίτητη προϋπόθεση για την προστατευτική δράση αυτών των ενώσεων είναι η ικανότητα να μπορούν να διέλθουν μέσω των βιολογικών μεμβρανών, ώστε να έχουν πρόσβαση στο εσωτερικό του κυττάρου. Τα περισσότερα από αυτά τα οξέα είναι ανίκανα να επηρεάσουν τις ενδοκυττάριας επαγόμενες από το υπεροξειδίο οξειδώσεις, επειδή δεν είναι ικανά να διαχυθούν μέσω της πλασματικής μεμβράνης, λόγω του αρνητικού φορτίου που έχουν στην καρβοξυλική τους ομάδα. Γι αυτό το λόγο, επεξεργασία των κυττάρων με υψηλές (μη φυσιολογικές) συγκεντρώσεις τόσο καφεϊκού όσο και ροσμαρινικού οξέος απαιτούνταν για την παρατήρηση μικρής έστω προστασίας έναντι της προκαλούμενης από το υπεροξειδίο του υδρογόνου βλάβης του DNA (βλέπε εικόνα 29). Επιπρόσθετα, η προστατευτική ικανότητά τους, φαίνεται να εξαρτάται εκτός από τη συγκέντρωση και από το χρόνο επώασης των κυττάρων με το ροσμαρινικό οξύ, στην προκειμένη περίπτωση (βλέπε εικόνα 30).

Με σκοπό να εξουδετερώσουμε το αρνητικό φορτίο του ροσμαρινικού οξέος, το οποίο το εμποδίζει από το να εισέλθει μέσα στο κύτταρο και να δράσει, συντέθηκαν χημικά παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος, μέσω εστερικών

δεσμών, ο πρόπυλο – και ο φαινέθυλο εστέρας του ροσμαρινικού οξέος (βλέπε εικόνα 32Α). Έγινε η υπόθεση ότι με την αλλαγή αυτή, θα αυξηθεί η λιποφιλικότητα των συνθετικών παραγώγων του ροσμαρινικού οξέος και επακολούθως, θα διευκολυνθεί η διάχυση αυτών των παραγώγων μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτό το οποίο παρατηρήθηκε ήταν ότι πράγματι, η κυτταροπροστατευτική δράση των εστέρων του καφεϊκού οξέος ήταν κατά πολύ μεγάλο βαθμό αυξημένη σε σχέση με τη μητρική ένωση (βλέπε εικόνα 32Β).

Ωστόσο, εκτός από την κυτταροπροστατευτική ικανότητα των εστέρων του ροσμαρινικού οξέος, παρατηρήθηκε και τοξικότητα αυτών των ενώσεων σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις απουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (βλέπε εικόνα 32Γ). Υποθέσαμε ότι αυτή η τοξικότητα πιθανόν οφείλεται στην υδρόλυση των εστερικών δεσμών στο εσωτερικό του κυττάρου από μη ειδικές εστεράσες. Οι ενώσεις οι οποίες στη συνέχεια προκύπτουν από αυτή την υδρόλυση είναι αρνητικά φορτισμένες στο ουδέτερο pH του κυτταροπλάσματος, με αποτέλεσμα να αδυνατούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη, και με αυτόν τον τρόπο να συσσωρεύονται με το πέρασμα του χρόνου, γεγονός που οδηγεί σε τοξικά αποτελέσματα για το κύτταρο. Για να ελέγξουμε αυτή την υπόθεση, έγινε χημική σύνθεση δύο άλλων παραγώγων του ροσμαρινικού οξέος, των αντίστοιχων αμιδίων, δηλαδή του πρόπυλο – και φαινέθυλο – αμιδίου (βλέπε εικόνα 33Α). Τα δύο αυτά συνθετικά παράγωγα, εφόσον απουσιάζει το αρνητικό φορτίο, είναι ικανά να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη και δεν υδρολύονται εντός των κυττάρων, έτσι ώστε να συσσωρεύονται. Αυτό το οποίο πράγματι παρατηρήσαμε ήταν ότι μπορεί τα δύο αμίδια να προσέφεραν μικρότερη σχετικά προστασία σε σχέση με τους αντίστοιχους εστέρες (βλέπε εικόνες 33Β και 33Β), ωστόσο δεν παρουσίασαν καθόλου τοξικότητα (βλέπε εικόνα 33Γ). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και όταν μελετήθηκε η ικανότητα αυτών των ενώσεων να προστατεύουν τα κύτταρα από την απόπτωση. Και τα τέσσερα συνθετικά παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος ήταν ισχυροί αναστολείς της επαγόμενης από H_2O_2 απόπτωσης σε μικρές συγκεντρώσεις (βλέπε εικόνες 39Β και 40Β), προκαλώντας την ερώτηση σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία. Πρόσφατα αναφέρθηκε από την ερευνητική μας ομάδα ότι ο ενδοκυττάριος καταλυτικά ενεργός σίδηρος ρυθμίζει την παρατεταμένη φωσφορυλίωση των JNK και p-38 MAP κινασών, οι οποίες

καθορίζουν τελικά την απόφαση των κυττάρων για επιβίωση ή θάνατο (Mantzaris et al., 2016, Kitsati et al., 2016). Ωστόσο, το ακριβές σημείο της παρέμβασης του σιδήρου εξακολουθεί να είναι άγνωστο και χρειάζεται περισσότερη έρευνα για να διασαφηνιστεί το συγκεκριμένο σημείο. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις οι δύο εστέρες ο πρότυπο - και ο φαινέθυλο - εστέρας του ροσμαρινικού οξέος παρουσίασαν τοξικότητα σε σχέση με τα δύο αμίδια (βλέπε εικόνες 39Γ και 40Γ). Όπως παρατηρήθηκε, η δράση των εστερικών και αμιδικών παραγώγων διαφέρει, ανάλογα με το είδος της τροποποίησης που έχει υποστεί η κάθε ένωση. Οι εστέρες δηλαδή, υδρολύονται από μη ειδικές εστεράσες και συσσωρεύονται εντός των κυττάρων ως ροσμαρινικό, εξαιτίας του αρνητικού φορτίου στο ουδέτερο pH του κυτταροπλάσματος, ενώ τα αμίδια δεν υδρολύονται και δεν εγκλωβίζονται εντός των κυττάρων.

Η ερευνητική μας ομάδα έχει κάνει την υπόθεση εδώ και πολλά χρόνια ότι η δέσμευση του ενδοκυττάριου οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου, αποτελεί μηχανισμό προστασίας ενάντια στην βλάβη του DNA που προκαλείται από το H_2O_2 (Barbouti et al., 2001, Doulias et al., 2003, Melidou et al., 2005). Γι' αυτό το λόγο αξιολογήσαμε την ικανότητα των εξεταζόμενων ενώσεων, του ροσμαρινικού οξέος και των συνθετικών παραγώγων του, να δεσμεύουν τον ενδοκυττάριο οξειδοαναγωγικά ενεργό σίδηρο (βλέπε εικόνες 35Α και 35Β) και διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της προστασίας του πυρηνικού DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες από τα συνθετικά παράγωγα και της ικανότητας δέσμευσης των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου (βλέπε εικόνα 35Γ).

Ένας ακόμα δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των επιπέδων των καταλυτικά ενεργών ιόντων σιδήρου ήταν τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης φερριτίνη, της κύριας αποθήκης σιδήρου στα κύτταρα. Οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει εξελιγμένους μοριακούς μηχανισμούς για τη ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου σε κυτταρικό και συστημικό επίπεδο (Andrews et al., 2008). Γι' αυτό το λόγο, η ταχεία αύξηση της έκφρασης της φερριτίνης μετά την έκθεση των κυττάρων σε H_2O_2 (βλέπε εικόνα 36), αντιπροσωπεύει μια απόκριση άμυνας των κυττάρων, καθώς οδηγεί σε μειωμένα ενδοκυττάρια επίπεδα καταλυτικά ενεργού σιδήρου. Αυτή η μορφή σιδήρου πιστεύεται ότι συνδέεται χαλαρά με κυτταρικά συστατικά σε θέσεις που

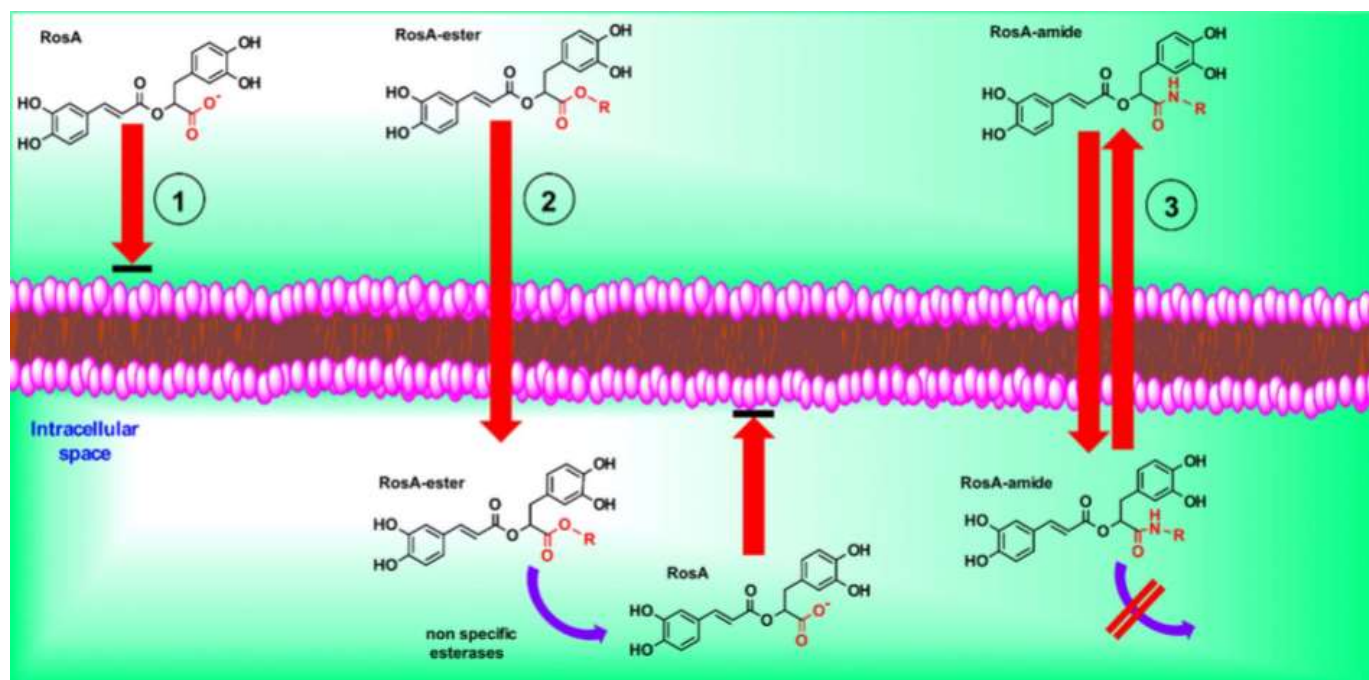
περιέχουν οξυγόνο, άζωτο ή θείο. Είναι προφανές ότι οι θέσεις στις οποίες συνδέεται ο καταλυτικά ενεργός σίδηρος αποτελούν τους κύριους στόχους των παραγόμενων δραστικών ελευθέρων ριζών σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, οποιοσδήποτε παράγοντας που μπορεί να ρυθμίσει το ενδοκυτταρικό επίπεδο ή την κατανομή του καταλυτικά ενεργού σιδήρου επηρεάζει τα σημεία οξείδωσης στην περίπτωση αυξημένου επιπέδου οξειδωτικού στρες. Η σημαντική μείωση των επιπέδων της φερριτίνης από τον φαινέθυλο – εστέρα και το φαινέθυλο – αμίδιο (σε μικρότερο βαθμό) του ροσμαρινικού οξέος, δείχνει ότι οι πολυφαινόλες της διατροφής που περιέχουν την ομάδα της κατεχόλης μπορούν να προστατεύσουν τα κύτταρα και τους οργανισμούς από ανεξέλεγκτες οξειδώσεις, εμποδίζοντας τη δημιουργία δραστικών ελευθέρων ριζών κοντά στα βασικά κυτταρικά συστατικά. Πρέπει να τονιστεί ωστόσο, ότι αυτή η πρόταση είναι σε αντίθεση με την επικρατούσα άποψη ότι οι αντιοξειδωτικές βιοδραστικές ενώσεις εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες μετά την παραγωγή τους. Άρα, είναι προφανές ότι η κυτταροπροστατευτική ικανότητα των συνθετικών παραγώγων του ροσμαρινικού οξέος οφείλεται στην παρουσία των όρθο – διυδρόξυ ομάδων τους, οι οποίες, όπως προαναφέρθηκε, μπορούν και δεσμεύουν ιόντα σιδήρου, προστατεύοντας το πυρηνικό DNA από το H_2O_2 .

Σύμφωνα με πειράματα που έχουν γίνει στο εργαστήριό μας, ένας ισχυρός σιδηροδεσμευτής, η δεσφεριοξαμίνη, εισέρχεται στα κύτταρα σε μεγάλο χρονικό διάστημα, με τη διαδικασία της ενδοκύτωσης (Doulias et al., 2005, Tenopoulou et al., 2005). Με την ίδια διαδικασία είναι πιθανό να εισέρχεται στα κύτταρα και το ροσμαρινικό οξύ, καθώς σύμφωνα με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στους 0 °C και στους 37 °C, το ροσμαρινικό οξύ προστάτευσε μόνο στους 37 °C και όχι στους 0 °C (βλέπε εικόνα 37). Αντιθέτως, ο φαινέθυλο – εστέρας και το φαινέθυλο – αμίδιο του ροσμαρινικού οξέος είχαν την ίδια προστατευτική ικανότητα και στις δύο θερμοκρασίες, καθώς διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη με απλή διάχυση. Επιπρόσθετα, αξιολογήθηκε για πρώτη φορά άμεσα το ποσοστό της κυτταρικής πρόσληψης και της πιθανής συσσώρευσης του ροσμαρινικού οξέος και των τεσσάρων συνθετικών παραγώγων του με τη χρήση χρωματογραφίας υπερύψηλης απόδοσης σε συνδυασμό με την φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπλού (Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled with triple quadruple

Mass Spectrometry, UHPLC-MS/MS). Όπως παρατηρήθηκε, το ροσμαρινικό οξύ δεν προσλήφθηκε από τα κύτταρα στις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές, ενώ αντιθέτως τα συνθετικά παράγωγά του, και ιδιαίτερως οι εστέρες, προσλήφθηκαν σε μεγάλο ποσοστό στη συγκεκριμένη συγκέντρωση (βλέπε εικόνα 38). Το ροσμαρινικό οξύ συναντά δηλαδή, δυσκολία προκειμένου να μπορέσει να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη. Επομένως, η δράση του ροσμαρινικού οξέος εξαρτάται από την ικανότητά του να εισέρχεται στα κύτταρα με τη διαδικασία της ενδοκύτωσης υγρής φάσης στα ενδοσωμάτια και λυσοσωμάτια. Η λιποφιλικότητά του μπορεί να αυξηθεί με πρωτονίωση της καρβοξυλικής ομάδας στο όξινο pH που υπάρχει στα λυσοσωμάτια, εξουδετερώνοντας έτσι το αρνητικό του φορτίο και διευκολύνοντάς το να διαχυθεί στο κυτταρόπλασμα. Με αυτόν τον τρόπο, στον ενδοκυττάριο χώρο στη συνέχεια, δεσμεύει το οξειδοαναγωγικά ενεργό σίδηρο μέσω των όρθο – διυδρόξυ ομάδων του, προστατεύοντας το πυρηνικό DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Επίσης, από τα πειραματικά αποτελέσματα της αξιολόγησης της κυτταρικής πρόσληψης, προκύπτει ότι οι δύο εστέρες συσσωρεύονται μέσα στα κύτταρα ενώ τα αντίστοιχα αμίδια δεν συσσωρεύονται (βλέπε εικόνα 38). Επιβεβαιώνεται, δηλαδή, η υπόθεση ότι οι εστέρες εισερχόμενοι μέσα στο κύτταρο υδρολύονται από μη ειδικές εστεράσες και εγκλωβίζονται στο εσωτερικό του, ενώ τα αμίδια δεν υδρολύονται και δεν συσσωρεύονται.

Οι μηχανισμοί διάχυσης και συσσώρευσης του ροσμαρινικού οξέος και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων του στο κύτταρο απεικονίζονται σχηματικά στην εικόνα 49: (1) Το αρνητικό φορτίο στην καρβοξυλική ομάδα παρεμποδίζει τη διάχυση του ροσμαρινικού οξέος διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. (2) Τα λιποφιλικά εστερικά παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος διαχέονται διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης και υδρολύονται ταχέως από μη - ειδικές εστεράσες στο εσωτερικό των κυττάρων. Το παραγόμενο ροσμαρινικό οξύ δεν είναι σε θέση να εξέλθει από τα κύτταρα λόγω του φορτίου του και επομένως παγιδεύεται και συσσωρεύεται στον ενδοκυττάριο χώρο. (3) Τα λιπόφιλα αμιδικά παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος διαχέονται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά δεν υδρολύονται (ή υδρολύονται αργά), παρέχοντας αρκετό χρόνο για να διαχυθούν ξανά έξω από τα κύτταρα. Όλες οι ενώσεις μπορούν να δεσμεύσουν τον ενδοκυττάριο καταλυτικά ενεργό σίδηρο στις κατεχολικές

ομάδες τους όταν βρίσκονται εντός των κυττάρων. Δηλαδή μια ένωση προκειμένου να προστατεύει θα πρέπει: α) να μπορεί να διαχέεται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης και β) να έχει την ικανότητα να δεσμεύει τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου μέσω της όρθο – διυδροξύ ομάδας της.



Εικόνα 49. Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών διάχυσης και συσσώρευσης του ροσμαρινικού οξέος (RosA) και των εστερικών και αμιδικών παραγώγων του.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υπογραμμίζουν τη σημασία της εστεροποίησης ή αμιδίου των φαινολικών οξέων για την πρόσληψή τους από τα κύτταρα και τις ενδοκυτταρικές τους δράσεις. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα φαινολικά οξέα είναι συχνά παρόντα στη φύση ως εστέρες, σε συνδυασμό με μια ποικιλία συστατικών, ενώ τα αμιδικά παράγωγά τους είναι λιγότερο άφθονα στη φύση και πιο δύσκολο να αναγνωριστούν και να απομονωθούν. Γι' αυτό το λόγο, τα τελευταία έχουν προσελκύσει λιγότερη προσοχή και έχουν μελετηθεί λιγότερο εκτενώς. Πράγματι, πολλά πρέπει ακόμη να ανακαλυφθούν για το ρόλο της παραγοντοποίησης των φαινολικών οξέων στην πρόσληψη, βιομετατροπή και την κατανομή τους στους ιστούς. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι επαγόμενες από το οξειδωτικό στρες και διαμεσολαβούμενες από τον καταλυτικά ενεργό σίδηρο επιδράσεις στα κύτταρα εμπλέκονται σε μοριακούς μηχανισμούς που σχετίζονται με σοβαρές ασθένειες, ειδικά λιπόφιλα

παράγωγα των φαινολικών οξέων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη καινοτόμων στρατηγικών για τη διατήρηση της ανθρώπινης υγείας.

4.4 Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης γαλακτοκομικών λειτουργικών τροφίμων

Δεδομένων των θετικών αποτελεσμάτων που είχαμε από τα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών, όσον αφορά την προστατευτική τους δράση σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, αποφασίσαμε να κατευθύνουμε στη συνέχεια την έρευνά μας σε αξιολόγηση της δράσης τους όταν χρησιμοποιούνται σε βιομηχανική κλίμακα, σε προϊόντα ευρείας κατανάλωσης. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει επιτυχείς προσπάθειες παρασκευής των λεγόμενων «λειτουργικών τροφίμων», τροφίμων δηλαδή που περιέχουν βιοδραστικές ενώσεις, όπως οι πολυφαινόλες, οι οποίες είναι ευεργετικές για τη υγεία του ανθρώπου (Schneeman, 2000, Young, 2003). Στην παρούσα μελέτη, έγινε προσπάθεια αξιολόγησης της προστατευτικής δράσης των συστατικών βιομηχανικά παρασκευασμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, συγκεκριμένα τυριού και γιαουρτιού, εμπλουτισμένων με εκχυλίσματα αρωματικών φυτών και με φρούτα. Η αξιολόγηση της προστατευτικής δράσης αυτών των εκχυλισμάτων έγινε με το ίδιο σύστημα μελέτης που χρησιμοποιήθηκε και για τα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών.

Αρχικά, δεν παρατηρήσαμε να υπάρχει κάποια προστασία στα κύτταρα από εκχυλίσματα τόσο τυριών, όσο και γιαουρτιών εμπλουτισμένων με αρωματικά φυτά και φρούτα (βλέπε εικόνες 41, 41 και 43). Ο παράγοντας ο οποίος ήταν διαφορετικός πειραματικά σε σχέση με τις εκχυλίσσεις που είχαν γίνει από τα αρωματικά φυτά προηγουμένως, ήταν ότι το pH κατά τη διαδικασία της εκχύλισης ήταν συνεχώς όξινο, κοντά στο 4. Για το λόγο αυτό, συγκριτικά με τα προηγούμενα αποτελέσματα των εστέρων του ροσμαρινικού οξέος, έγινε η υπόθεση ότι στο χαμηλό pH οι εστέρες οι οποίοι περιέχονται στα αρωματικά φυτά και στα φρούτα και κατ' επέκταση στο κάθε εκχύλισμα, υδρολύονται, και με αυτόν τον τρόπο οι ενώσεις που προκύπτουν, όντας αρνητικά φορτισμένες, δεν μπορούν να διαχυθούν διαμέσου την κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό

των κυττάρων και να προστατεύσουν το πυρηνικό DNA από τις οξειδωτικές βλάβες που προκαλούνται από το H_2O_2 . Αυτή η υπόθεση ταυτίζεται με την περίπτωση του ροσμαρινικού οξέος, όπου οι εστέρες υδρολύονται στο εσωτερικό των κυττάρων, ενζυμικά στην προκειμένη περίπτωση, από μη – ειδικές εστεράσες και εγκλωβίζονται προκαλώντας τοξικότητα. Επακόλουθα, αλλάξαμε το pH κατά τη διαδικασία της εκχύλισης από 4 σε 7, όπου οι εστέρες δεν θα υδρολύονται και πραγματοποιήσαμε τα ίδια πειράματα και στα δύο pH. Αυτό που παρατηρήσαμε είναι ότι πράγματι τα εκχυλίσματα που προέρχονται από εκχύλιση σε pH 7 είχαν την ικανότητα να προστατεύουν το πυρηνικό DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και μάλιστα σε πολλές περιπτώσεις σε μεγάλο βαθμό, της τάξης του 70 % (βλέπε εικόνες 44 και 45). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε η δημιουργία συσσωματωμάτων κατά τη διάρκεια των υδατικών εκχυλίσεων που πραγματοποιήθηκαν, στο pH 7, που δυσκόλεψαν τη διάλυση των δειγμάτων για τη χρησιμοποίησή τους στα μετέπειτα πειράματα. Υποθέσαμε ότι είναι μη πολικά μόρια, δηλαδή στην προκειμένη περίπτωση εστέρες, οι οποίοι δημιουργούν αυτά τα συσσωματώματα λόγω της πολικής φύσης της εκχύλισης.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτής της ενότητας θα μπορούσαν να έχουν προεκτάσεις και όσον αφορά την υγεία του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, και στον ανθρώπινο στόμαχο το pH που επικρατεί είναι όξινο, κάτω του 4. Βιοδραστικές ενώσεις που φθάνουν εκεί μέσω της διατροφής όπως είναι οι εστέρες ή ακόμα και φάρμακα, υδρολύονται και στη συνέχεια, όπως και στην περίπτωση των εστέρων του ροσμαρινικού οξέος, όντας φορτισμένα αρνητικά, δεν μπορούν να διαχυθούν διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών στα κύτταρα και να ασκήσουν την ευεργετική τους δράση. Για το λόγο αυτό, αν μπορούσαν με κάποιο τρόπο να «προστατευτούν» από το όξινο pH του στομάχου και να απελευθερωθούν στη συνέχεια τον αυλό του εντέρου, θα μπορούσαν εισέλθουν στον οργανισμό και να προστατεύσουν επακόλουθα τα κύτταρα από τις οξειδώσεις βασικών κυτταρικών τους συστατικών. Μία λύση σε αυτό θα ήταν η δημιουργία κάποιου περιβλήματος, το οποίο θα απελευθερωνόταν ή θα αποικοδομούταν στο έντερο, προκειμένου να μπορέσει η βιοδραστική ένωση να απελευθερωθεί και να διαχυθεί διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης και να προστατεύσει τα βασικά κυτταρικά συστατικά. Οι εστέρες του ροσμαρινικού οξέος, οι οποίοι μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, θα μπορούσαν να

αποτελέσουν παράδειγμα βιοδραστικών ενώσεων που θα δρούσαν με αυτόν τον τρόπο. Προσπάθειες αξιολόγησης της δράσης εγκαψυλλιωμένων φυσικών βιοδραστικών ενώσεων γίνονται τα τελευταία χρόνια και η ερευνητική μας ομάδα πρόσφατα συμμετείχε σε μια τέτοια μελέτη (Diamantis et al., 2018). Αν μπορούσε να συμβεί και να λειτουργήσει κάτι τέτοιο *in vivo*, θα ήταν δυνατό να αναπτυχθούν νέες στρατηγικές αντιμετώπισης και βελτίωσης πολλών παθολογικών καταστάσεων που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες, με χρήση φυσικών βιοδραστικών ενώσεων.

4.5 Προστατευτική δράση σιδηροδεσμευτικών σκευασμάτων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, δύο χαρακτηριστικά είναι απαραίτητα για να μπορέσει μία ένωση να προστατεύει σε συνθήκες οξειδωτικού στρες: 1) να μπορεί να διαπερνάει την κυτταρική μεμβράνη και 2) να μπορεί να δεσμεύει τον καταλυτικά ενεργό σίδηρο. Έχοντας αυτή τη γνώση, προσπαθήσαμε στη συνέχεια να αξιολογήσουμε σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*, την δράση του συνδυασμού δύο φαρμακευτικών σκευασμάτων, της δεσφεριοξαμίνης και της δεφεριπρόνης, που συνδυάζουν τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Η δεσφεριοξαμίνη και η δεφεριπρόνη αποτελούν γνωστά σιδηροδεσμευτικά φαρμακευτικά σκευάσματα, με διαφορετική λιποφιλικότητα και διαφορετική ικανότητα στην δέσμευση σιδήρου, με τη δεσφεριοξαμίνη να είναι πιο ισχυρός σιδηροδεσμευτής από τη δεφεριπρόνη. Χρησιμοποιούνται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, δεσμεύοντας τον σίδηρο, όπου η περίσσεια σιδήρου προκαλεί ανεξέλεγκτες οξειδώσεις σε κυτταρικά συστατικά (Pietrangelo, 2007, Hower et al., 2009). Στην παρούσα μελέτη έγινε αρχικά αξιολόγηση της προστατευτικής δράσης αυτών των δύο ενώσεων πρώτα μεμονωμένα, και στη συνέχεια σε συνδυασμό μεταξύ τους, σε συνθήκες οξειδωτικού στρες σε ηπατικά κύτταρα. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν και πειράματα *in vivo* σε κουνέλια μετά από μία περίοδο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης στο ήπαρ, όπου

είναι γνωστό ότι επικρατούν συνθήκες οξειδωτικού στρες (Zweier et al., 1987, Togashi et al., 2000).

Σύμφωνα με πειράματα που έχουν γίνει στο εργαστήριό μας, η δεσφεριοξαμίνη, εισέρχεται στα κύτταρα με τη διαδικασία της ενδοκυττάρωσης υγρής φάσης. Για τη δράση της, όμως, χρειάζεται μεγάλο χρονικό διάστημα και υψηλές συγκεντρώσεις (Doulas et al., 2005). Αυτό επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματά μας και στα ηπατικά κύτταρα HepG2 που μελετήσαμε, όπου με προεπώαση 20 λεπτών με δεσφεριοξαμίνη δεν παρατηρείται προστασία του DNA σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (βλέπε εικόνα 47Α), σε αντίθεση με την περίπτωση όπου η προεπώαση αυξάνεται στις 2 ώρες (βλέπε εικόνα 47Γ). Από την άλλη πλευρά, η δεφεριπρόνη έχει την ικανότητα να προστατεύει τα ηπατικά κύτταρα από πολύ μικρές συγκεντρώσεις σε μικρό χρονικό διάστημα (βλέπε εικόνα 47Β), καθώς ως μικρή και μη φορτισμένη ένωση είναι λιπόφιλη και μπορεί να διαχέεται εύκολα διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Επομένως, μπορεί να δεσμεύει αποτελεσματικά τον καταλυτικά ενεργό σίδηρο με την είσοδό της μέσα στο κύτταρο, αποτρέποντας έτσι την οξείδωση των βασικών κυτταρικών συστατικών, μετά από έκθεση στο H_2O_2 .

Στη συνέχεια, υποθέσαμε ότι η ταυτόχρονη χορήγηση της δεσφεριοξαμίνης και της δεφεριπρόνης θα έφερνε μεγαλύτερα προστατευτικά αποτελέσματα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Πράγματι, όταν προεπωάστηκαν ηπατικά κύτταρα ταυτόχρονα και με αυτές τις δύο σιδηροδεσμευτικές ενώσεις, παρατηρήσαμε εντυπωσιακά μεγαλύτερη προστασία του πυρηνικού DNA, σε σχέση με τις περιπτώσεις όπου τα κύτταρα προεπωάζονταν μεμονωμένα με την κάθε μία από τις δύο ενώσεις (βλέπε εικόνα 48). Παρόμοια αποτελέσματα, αλλά *in vivo* σε ασθενείς με αιμοσιδήρωση, έχουν παρατηρηθεί στο παρελθόν (Grady et al, 2000), χωρίς όμως να έχει διερευνηθεί ο μηχανισμός δράσης τους. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, υποθέτουμε ότι η δεφεριπρόνη η οποία μπορεί και διαχέεται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, εισερχόμενη δεσμεύει τον καταλυτικά ενεργό σίδηρο, που βρίσκεται χαλαρά συνδεδεμένος σε κυτταρικά συστατικά, μεταφέροντάς τον έξω από το κύτταρο. Εκεί τον αποδίδει στην δεσφεριοξαμίνη, ή οποία έχει μεγαλύτερη σταθερά δέσμευσης σιδήρου ή ακόμα και στην τρανσφερρίνη, τον κύριο μεταφορέα σιδήρου στα κύτταρα. Στη συνέχεια, η δεφεριπρόνη εισέρχεται πάλι μέσα στο κύτταρο δεσμεύοντας καταλυτικά ενεργό σίδηρο και εξέρχεται έξω από αυτό,

επαναλαμβάνοντας αυτόν τον κύκλο. Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνεται ο καταλυτικά ενεργός σίδηρος που είναι υπεύθυνος για τις κυτταρικές βλάβες λόγω της παραγωγής δραστικών ριζών υδροξυλίου.

Η υπόθεση αυτή θεωρήσαμε ότι ισχύει επακόλουθα και στην περίπτωση της ισχαιμίας – επαναιμάτωσης, όπου κατά την επαναιμάτωση παρατηρείται αυξημένη οξειδωτική βλάβη λόγω του οξειδωτικού στρες που δημιουργείται. Γι' αυτό το λόγο, αξιολογήσαμε για πρώτη φορά τη δράση αυτών των δύο σιδηροδεσμευτικών ενώσεων, της δεσφεριοξαμίνης και της δεφεριπρόνης, τόσο μεμονωμένα, όσο και σε συνδυασμό μεταξύ τους *in vivo*, σε κουνέλια κατά την επαναιμάτωση μετά από μία περίοδο ισχαιμίας. Τα αποτελέσματα είναι θετικά, δηλαδή η συνδυασμένη χρήση των δύο ενώσεων φαίνεται να προστατεύει καλύτερα το ήπαρ από ότι η κάθε ένωση ξεχωριστά, σύμφωνα με μετρήσεις δεικτών που υποδηλώνουν βλάβη του ήπατος. Τα αποτελέσματα αυτά στο σύνολό του, θα παρουσιασθούν στην επικείμενη διατριβή της υποψήφιας διδάκτορος κας Αθηνάς Μαντέλου υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Γεωργίου Γκλαντζούνη.

Συμπερασματικά, η εύρεση του μηχανισμού δράσης και κατ' επέκταση η απόδειξη της ευεργετικής δράσης του συνδυασμού σιδηροδεσμευτικών ενώσεων με διαφορετική λιποφιλικότητα και διαφορετική ικανότητα δέσμευσης του καταλυτικά ενεργού σιδήρου κατά τη διαδικασία της ισχαιμίας – επαναιμάτωσης, θα συνεισφέρει πολλά για τη βελτίωση των αρνητικών επιπτώσεων του οξειδωτικού στρες, σε αυτή την περίπτωση. Εν κατακλείδι, είναι εμφανές ότι το ρόλο αυτών των σιδηροδεσμευτικών σκευασμάτων θα μπορούσαν να έχουν βιοδραστικές ενώσεις της διατροφής, οι οποίες έχουν την ικανότητα να διαχέονται εύκολα διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης και μπορούν να δεσμεύουν τον καταλυτικά ενεργό σίδηρο και να τον μεταφέρουν έξω από τα κύτταρα. Ένα παράδειγμα αποτελούν τα αμύδια του ροσμαρινικού οξέος που μελετήσαμε στην παρούσα εργασία. Μια τέτοια ανακάλυψη θα άλλαζε τον τρόπο με τον οποίο προσπαθούμε να αντιμετωπίσουμε πολλές χρόνιες παθολογικές καταστάσεις και θα βελτίωνε την υγεία και της συνθήκες διαβίωσης πολλών ασθενών που πάσχουν από αυτές.

5. Περίληψη

Διερεύνηση του ρόλου βιοδραστικών ενώσεων της διατροφής σε μοριακούς μηχανισμούς που έχουν σχέση με το οξειδωτικό στρες και την υγεία.

Η Μεσογειακή διατροφή έχει αποτελέσει αντικείμενο μεγάλου αριθμού μελετών, κυρίως όσον αφορά το ρόλο της στην ανθρώπινη υγεία. Η παρούσα μελέτη ξεκίνησε με στόχο την αξιολόγηση της ικανότητας εκχυλισμάτων τριών αρωματικών φυτών, φασκόμηλου, ρίγανης και δεντρολίβανο, που αποτελούν συστατικά της, να προστατεύουν το κυτταρικό DNA μετά από έκθεση των κυτάρων σε H_2O_2 . Η διαπίστωση ότι τα υδατικά εκχυλίσματα καθώς και αυτά από οξικό αιθυλεστέρα προσέφεραν προστασία, οδήγησε στην απομόνωση και τον έλεγχο του μηχανισμού δράσης μιας βιοδραστικής ένωσης που περιέχεται σε αυτά, του ροσμαρινικού οξέος.

Παρατηρήσαμε ότι για να μπορέσει το ροσμαρινικό οξύ να προστατεύσει το πυρηνικό DNA απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα και υψηλές συγκεντρώσεις. Υποθέσαμε ότι αυτό οφείλεται στο ότι δεν μπορεί να διαπεράσει με ευκολία την κυτταρική μεμβράνη ώστε να μπορέσει να εισέλθει και να δράσει εντός των κυτάρων, λόγω του αρνητικού του φορτίου. Με στόχο λοιπόν, την εξουδετέρωση του αρνητικού φορτίου, συντέθηκαν αρχικά χημικά παράγωγα του ροσμαρινικού οξέος και συγκεκριμένα εστέρες, οι οποίοι παρουσίαζαν αυξημένη λιποφιλικότητα. Η προστατευτική τους δράση ήταν πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με το ροσμαρινικό οξύ, ωστόσο σε υψηλότερες συγκεντρώσεις παρουσίαζαν τοξικότητα, απουσία H_2O_2 . Πιθανολογώντας ότι η τοξικότητα αυτή οφείλεται στην υδρόλυση των εστέρων στο εσωτερικό των κυτάρων από μη - ειδικές εστεράσες, με επακόλουθο τη συσσώρευσή τους εντός των κυτάρων, συνθέσαμε χημικά και τα αντίστοιχα αμίδια του ροσμαρινικού οξέος, τα οποία δεν υδρολύονται και κατά συνέπεια δεν εγκλωβίζονται στο εσωτερικό των

κυτάρων. Παρατηρήθηκε ότι τα αμιδία δεν είχαν τοξικότητα στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις απουσία H_2O_2 . Στη συνέχεια, ελέγχθηκε άμεσα η συσσώρευση του ροσμαρινικού οξέος και των παραγώγων του με τη χρήση χρωματογραφίας υπερύψηλης απόδοσης σε συνδυασμό με την φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπλού. Τα αποτελέσματα με αυτή τη μεθοδολογία επιβεβαίωσαν την προηγούμενη υπόθεση και οδήγησαν στα ίδια συμπεράσματα. Επίσης, παρατηρήθηκε μια ισχυρή συσχέτιση της ικανότητας δέσμευσης καταλυτικά ενεργών ενδοκυττάρων ιόντων σιδήρου και της προστατευτικής δράσης των ενώσεων αυτών όσον αφορά τις βλάβες του πυρηνικού DNA από το H_2O_2 . Συμπερασματικά, από τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύεται η σημασία της εστεροποίησης ή αμιδίωσης των φαινολικών οξέων για την πρόσληψή τους από τα κύτταρα και τις ενδοκυτταρικές τους δράσεις, όπως επίσης και ότι για να μπορεί μια ένωση να είναι βιολογικά ενεργή θα πρέπει: α) να μπορεί να διαχέεται στο εσωτερικό των κυτάρων και β) να έχει την ικανότητα να δεσμεύει τα καταλυτικά ενεργά ιόντα σιδήρου.

Στη συνέχεια, προσπαθήσαμε να αξιολογήσουμε την προστατευτική δράση εκχυλισμάτων από βιομηχανικά παρασκευασμένα λειτουργικά γαλακτοκομικά τρόφιμα (τυριά και γιαούρτια), τα οποία είχαν προηγουμένως εμπλουπιστεί με εκχυλίσματα αρωματικών φυτών και με φρούτα. Αρχικά, τα εκχυλίσματα αυτών των προϊόντων δεν προστάτευαν το πυρηνικό DNA μετά από έκθεση των κυτάρων σε H_2O_2 , ωστόσο, όταν σταθεροποιήσαμε το pH κατά τη διαδικασία της εκχύλισης, από 4 σε 7, παρατηρήσαμε μεγάλη αύξηση της προστασίας του πυρηνικού DNA. Από αυτά τα αποτελέσματα, συμπεράναμε ότι οι εστέρες που περιέχονται στα εκχυλίσματα των αρωματικών φυτών και στα φρούτα υδρολύονται στο όξινο pH της εκχύλισης των γαλακτοκομικών προϊόντων και κατά συνέπεια, τα φορτισμένα συστατικά τους δεν μπορούν να εισέλθουν εντός των κυτάρων. Αντίθετα, στο ουδέτερο pH εκχύλισης έχουμε λιγότερες ή καθόλου υδρολύσεις, με αποτέλεσμα τα συστατικά των εκχυλισμάτων να μην είναι αρνητικά φορτισμένα και να μπορούν να διαχυθούν εντός των κυτάρων και να προστατεύσουν τα κυτταρικά συστατικά.

Σε ένα τελευταίο στάδιο, στρέψαμε την προσοχή μας σε *in vivo* δράσεις σιδηροδεσμευτικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, προσπαθήσαμε να αξιολογήσουμε τη δράση δύο σιδηροδεσμευτικών φαρμακευτικών σκευασμάτων, της δεσφεριοξαμίνης και της δεφεριπρόνης, που έχουν

διαφορετική λιποφιλικότητα και ικανότητα δέσμευσης σιδήρου, όταν αυτά χορηγούνται πριν την επαναιμάτωση μετά από μία περίοδο ισχαιμίας, Παρατηρήσαμε ότι η προστασία του πυρηνικού DNA ηπατικών κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες ήταν εντυπωσιακά μεγαλύτερη από το συνδυασμό των ενώσεων σε σχέση με την προστασία που προσέφερε κάθε μία ένωση ξεχωριστά. Η εξήγηση για αυτό το αποτέλεσμα είναι ότι η δεφεριπρόνη, όντας πιο λιπόφιλη ένωση, εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων, δεσμεύει τον καταλυτικά ενεργό σίδηρο και στη συνέχεια, τον μεταφέρει έξω από το κύτταρο αποδίδοντάς τον στην δεσφεριοξαμίνη, που έχει μεγαλύτερη σταθερά δέσμευσης σιδήρου. Στη συνέχεια, ακολούθησε η χορήγηση του συνδυασμού των δύο ενώσεων, σε *in vivo* πειράματα, σε ήπαρ κουνελιών, κατά την επαναιμάτωση μετά από μία περίοδο ισχαιμίας, όπου είναι γνωστό ότι δημιουργούνται δραστικές ελεύθερες ρίζες. Τα αποτελέσματα ήταν πολύ θετικά και θα παρουσιασθούν σε μία επικείμενη διδακτορική διατριβή.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω, προκύπτει ότι η λιποφιλικότητα και η ικανότητα δέσμευσης σιδήρου καθορίζουν την ικανότητα των ενώσεων να προστατεύουν τα ενδοκυτάρια συστατικά σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Τέλος, από τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής θα μπορούσε να βγει το συμπέρασμα ότι πολλά από τα συστατικά της διατροφής με συγκεκριμένα χημικά χαρακτηριστικά, θα μπορούσαν να ασκήσουν ευεγερτική δράση στην αντιμετώπιση και βελτίωση πολλών παθολογικών καταστάσεων, συμβάλλοντας στη διατήρηση της ανθρώπινης υγείας.

6. Summary

Investigation of the role of bioactive compounds contained in the diet in molecular mechanisms related to oxidative stress and human health

Mediterranean diet has been the subject of a large number of studies, particularly with regard to its role in human health. The present study started with the aim of evaluating the ability of extracts of three aromatic plants, sage, oregano and rosemary, to protect the cellular DNA, after exposure of cells to H_2O_2 . The finding that aqueous extracts from these plants, as well as extracts from ethyl acetate, provided protection, led us to the isolation of some bioactive compounds and the investigation of their mechanisms of action.

One of the investigated compounds was rosmarinic acid. It was observed that long-time incubations and high concentrations of rosmarinic acid, were required in order to be able to protect nuclear DNA. We hypothesized that rosmarinic acid due to its negative charge, can't easily penetrate through cell membrane and act inside the cells. In order to neutralize its negative charge, we synthesized ester derivatives of rosmarinic acid which have higher lipophilicity. It was observed that their protective effects were much greater than that of the mother compound, rosmarinic acid. However, both esters examined, showed toxicity at high concentrations, in the absence of H_2O_2 . Hypothesizing that this toxicity was due to the hydrolysis of esters within the cells of non – specific esterases, resulting in their accumulation in the cells, we then, chemically synthesized the corresponding amides of rosmarinic acid, which are not hydrolysed and subsequently are not entrapped inside the cells. It was observed that the amides had no toxicity in the absence of H_2O_2 . Next, the accumulation of rosmarinic acid and its derivatives was evaluated directly by

the use of Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled with triple quadruple Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS). The results confirmed the previous hypothesis and corroborated our conclusions. Also, a strong correlation was observed between the capacity of binding intracellular redox active iron and the protective activity of these compounds. In conclusion, the above results demonstrate the importance of the esterification or amidation of phenolic acids in general, in order to be uptaken by the cells and act intracellularly. Thus, in order for a compound to be biologically active, it should: a) be able to be diffused into the cell interior and b) have the ability to bind the redox active iron ions.

Then, we tried to evaluate the protective effects of extracts from industrially prepared functional dairy foods (cheese and yogurt), which were already enriched with extracts from aromatic plants and fruits. The extracts of these products did not show any protective capacity. However, when we changed the pH during the extraction process, from 4 (which was normally) to 7, we observed a large increase in the protection capacity of the extracts. From these results, we concluded that the esters contained in the aromatic plant extracts and fruits extracts, are hydrolysed at the acid pH of the extraction of the dairy products and therefore, their constituents lose their protective capacity. In contrast, when the extraction is performed at neutral pH, ester hydrolysis is inhibited.

In a final step, we turned our attention to *in vivo* actions of iron-binding compounds. In particular, we tried to evaluate the protection generated by two iron-binding pharmaceuticals, desferrioxamine and deferiprone, which have different lipophilicity and iron binding capacity, against reperfusion after a period of ischemia in liver. Initially, we observed that the protection of nuclear DNA in hepatic cells, in conditions of oxidative stress, was dramatically greater when the two compounds were combined, compared to that offered by each compound individually. To explain this effect, we hypothesized that deferiprone, being a more lipophilic compound, enters into the cells and binds redox active iron. Then, it transfers it out of the cell, delivering it to desferrioxamine, which has a much higher iron binding affinity. Administration of the combination of the two compounds, in *in vivo* experiments in rabbits during reperfusion after a period of liver-ischemia, was much more protective than each compound alone.

It is concluded that a plethora of components of the diet with specific chemical characteristics, can exert beneficial effects on many pathological conditions, contributing to the preservation of human health.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams, R., (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing, Carol Stream, IL.

Agiomyrgianaki, A., Dais, P. (2012). Simultaneous determination of phenolic compounds and triterpenic acids in oregano growing wild in Greece by ³¹P NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **50**, 739-748.

Alagawany, M. and Abd El-Hack, M.E. (2015). The effect of rosemary herb as a dietary supplement on performance, egg quality, serum biochemical parameters, and oxidative status in laying hens. *Journal of Animal and Feed Science*, **24**, 341–347.

Almela, L., Sánchez-Muñoz, B., Fernández-López, J.A., Roca, M.J., Rabe, V. (2006). Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, **1120**, 221-229.

Al-Refaie, F.N., Hoffbrand, A.V. (1994). Oral iron-chelating therapy: the L1 experience. *Baillieres Clin Haematol*, **7**, 941-63.

Alves, M.J., Ferreira, I.C.F.R., Froufe, H.J.C., Abreu, R.M.V., Martins, A., Pintado, M., (2013). Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of Applied Microbiology*, **115**, 346–357.

Ames, B.N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, **221**, 1256-1264.

Amin, A., Vincent, R., Séverine, M., Murielle, B., Annie, S.V., Céline, R., Sevser, S., François, B., Christel, N., Thierry, H. (2013). Rosmarinic Acid and Its Methyl Ester as Antimicrobial Components of the Hydromethanolic Extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). ECAM 2013.

An, L.J., Guan, S., Shi, G.F., Bao, Y.M., Duan, Y.L., Jiang, B. (2006). Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP⁺-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Food and Chemical Toxicology*, **44**, 436–443.

Anderson, J.W., Smith, B.M. and Gustafson, N.J. (1994). Health benefits and practical aspects of high fiber diets. *Amer J Clin Nutr*, **59**, 1242.

Andjelkovic, M., Van Camp, J., De Meulenaer, B., *et al.* (2006). Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chem*, **98**, 23-31.

Antunes, F. and Cadenas, E. (2001). Cellular titration of apoptosis with steady state concentrations of H₂O₂: submicromolar levels of H₂O₂ induce apoptosis through Fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free Radic Biol Med*, **30**, 1008-1018.

Anusuya, C. and Manoharan, S. (2011). Antitumor initiating potential of rosmarinic acid in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **30**, 199–211.

Arkadopoulos, N., Nastos, C., Kalimeris, K., Economou, E., Theodoraki, K., Kouskouni, E., Pafiti, A., Kostopanagiotou, G., Smyrniotis, V. (2010). Iron chelation for amelioration of liver ischemia-reperfusion injury. *Hemoglobin*, **34**, 265-77.

Arkadopoulos, N., Vlahakos, D., Kostopanagiotou, G., Panagopoulos, D., Karvouni, E., Routsis, C., Kalimeris, K., Andreadou, I., Kouskouni, E., Smyrniotis, V. (2008). Iron chelation attenuates intracranial pressure and improves survival in a swine model of acute liver failure. *Liver Transpl*, **14**, 1116-24.

Ashidate, K., Kawamura, M., Mimura, D., Tohda, H., Miyazaki, S., Teramoto, T. *et al.*, (2005). Gentisic acid, an aspirin metabolite, inhibits oxidation of low-density lipoprotein and the formation of cholesterol ester hydroperoxides in human plasma. *Eur J Pharm*, **513**, 173–179.

Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Yasuda, A., Muto, Y., Hiyoshi, K., Takano, H., Yoshikawa, T. and Terao, J. (2005). Absorption, metabolism degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans. *Eur J Nutr*, **44**, 1–9.

Babbs, C.F. (1985). Role of iron ions in the genesis of reperfusion injury following successful cardiopulmonary resuscitation: preliminary data and a biochemical hypothesis. *Ann Emerg Med*, **14**, 777-83.

Bakirel, T., Bakirel, U., Keleş, O.U., Ülgen, S.G., Yardibi, H. (2008). In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *J Ethnopharm*, **116**, 64-73.

Bakkali, F., Averbecka, S., Averbecka, D., Idaomarb, M., (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxic*, **46**, 446–475.

Barbouti, A., Doulias, P.T., Zhu, B.Z., *et al.* (2001). Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA damage. *Free Radic Biol Med*, **31**, 490-498.

Barbouti, A., Amorgianiotis, C., Kolettas, E., Kanavaros, P., Galaris D. (2007). Hydrogen peroxide inhibits caspase-dependent apoptosis by inactivating procaspase-9 in an iron-dependent manner. *Free Radic Biol Med*, **43**, 1377-87.

Barman Balfour, J.A., Foster, R.H. (1999). Deferiprone: a review of its clinical potential in iron overload in beta-thalassaemia major and other transfusion-dependent diseases. *Drugs*, **58**, 553-78.

Bartels-Stringer, M., Verpalen, J.T., Wetzels, J.F., Russel, F.G., Kramers, C. (2007). Iron chelation or anti-oxidants prevent renal cell damage in the rewarming phase after normoxic, but not hypoxic cold incubation. *Cryobiology*, **54**, 258-64.

Bass, J.J., Wilkinson, D.J., Rankin, D., Phillips, B.E., Szewczyk, N.J., Smith, K., Atherton, P.J. (2017). An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports*, **27**, 4-25.

Becker, L.B. (2004). New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res*, **61**(3), 461-70.

Bell, J.R., Donovan, J.L., Wong, R., Waterhouse, A.L., German, J.B., Walzem, R.L., Kasim-Karakas, S.E. ((2000). (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *Am J Clin Nutr*, **71**, 103–108.

Benetou, V., Trichopoulou, A., Orfanos, P., Naska, A., Lagiou, P., Boffetta, P., Trichopoulos, D., Greek EPIC cohort. (2008) Conformity to traditional Mediterranean diet and cancer incidence: the Greek EPIC cohort. *Br J Cancer*, **99**, 191-5.

Beninca, J.P. Dalmarco, J.B, Pizolatti, M.G., Frode, T.S. (2011). Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. *Food Chemistry*, **124**, 468-475.

Blumenthal, M. (ed.), (2000). Sage leaf. Herbal Medicine expanded Commission E Monographs. *American Botanical Council*, Austin, 330-334.
 Boveris, A., Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*, **134**, 707-716.

Bruyninckx, W., Mason, H.S., and Morse, S.A. (1978). Are physiological oxygen concentrations mutagenic? *Nature*, **274**, 606-607.

Buckland, G., Agudo, A., Luján, L., et al. (2010). Adherence to a Mediterranean diet and risk of gastric adenocarcinoma within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort study. *Am J Clin Nutr*, **91**, 381-90.

Bulgakov, V., Inyushkina, Y., and Fedoreyev, S. (2012). Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications. *Crit Rev Biotech*, **32**, 203–217.

Bult, H., Herman, A.G., Rampart, M. (1985). Modification of endotoxin induced haemodynamic and hematological changes in the rabbit by methylpendnisome, F(ab')₂ fragnants and rosmarinic acid. *British Journal of Pharmacology*, **84**, 317-327.

Butt, M.S., Sultan, M.T., (2011). Coffee and its consumption: Benefits and risks. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **51**, 363–373.

Cabantchik, Z.I. (2014). Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology. *Front Pharmacol*, **5**, 45.

Cadenas, E., (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*, **58**, 79-110.

Cao, G., Muccitelli, H.U., Sanchez-Moreno, C., Prior, R.L. (2001). Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Am J Clin Nutr*, **73**, 920-926.

Carvalho-Costa, T.M., Mendes, M.T., da Silva, M.V., da Costa, T.A., Tiburcio, M.G., Anhê, A.C., Rodrigues, V. Jr., Oliveira, C.J. (2015). Immunosuppressive effects of *Amblyomma cajennense* tick saliva on murine bone marrow-derived dendritic cells. *Parasit Vectors*, **8**, 22.

Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, **59**, 527-605.

Chandra, J., Samali, A. and Orrenius, S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **29**, 323-333.

Chen, Y.R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R.J., Tan, TH. (1996). The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem*, **271**, 31929-36.

Chevion, M. (1988). A site-specific mechanism for free radical induced biological damage: the essential role of redox-active transition metals. *Free Radic Biol Med*, **5**, 27-37.

Chouchani, E.T., Pell, V.R., Gaude, E., Aksentijević, D., Sundier, S.Y., Robb, E.L., Logan, A., Nadtochiy, S.M., Ord, E.N.J., Smith, A.C., Eyassu, F., Shirley, R., Hu, C.H., Dare, A.J., James, A.M., Rogatti, S., Hartley, R.C., Eaton, S., Costa, A.S.H., Brookes, P.S., Davidson, S.M., Duchon, M.R., Saeb-Parsy, K., Shattock, M.J., Robinson, A.J., Work, L.M., Frezza, C., Krieg, T., Murphy, M.P. (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. **515**, 431-435.

Chun, K.S., Kundu, J., Chae, I.G, and Kundu, J.K. (2014). Carnosol: a phenolic diterpene with cancer chemopreventive potential. *J Can Prev*, **19**, 103–110.

Collins, A.R., Ma, A.G., Duthie, S.J. (1995). The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res*, **336**, 69-77.

Cook, N.C. and Samman, S. (1996) Flavonoids-Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects, and Dietary Sources. *J Nutr Biochem*, **7**, 66-76.

Corona, G., Spencer, J.P.E., Dessì, M.A. (2009) Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract. *Toxicol And Health*, **25**, 285-293.

Cottet, V., Bonithon-Kopp, C., Kronborg, O., Santos, L., Andreatta, R., Boutron-Ruault, M.C., Faivre, J. (2005). European Cancer Prevention Organisation Study Group.

Couteau, D., McCartney, A. L., Gibson, G. R., Williamson, G. and Faulds, C. B. (2001). Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *J Appl Microbiol*, **90**, 873–881.

Coyle, J.T., Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*, **262**, 689-692.

Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C. (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilotplant and commercial extracts of sage and rosemary. *J Am Oil Ch Soc*, **73**, 645-652.

Cvetkovikj, I., Stefkov, G., Acevska, J., Petreska Stanoeva, J., Karapandzova, M., Stefova, M., Dimitrovska, A., Kulevanova, S. (2013). Polyphenolic characterization and chromatographic methods for fast assesment of culinary *Salvia* species from South East Europe. *J Chr A*, **1282**, 3845.

De Sousa, L.L., de Andrade, S.C.A., Athayde, A.J.A.A., de Oliveira, C.E.V., de Sales, C.V., Madruga, M.S., de Souza, E.L. (2013). Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic *Aspergilli* and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes). *Int J Food Micr*, **165**, 312-318.

Dendorfer, A., Heidbreder, M., Hellwig-Bürgel, T., Jöhren, O., Qadri, F., Dominiak, P. (2005). Deferoxamine induces prolonged cardiac preconditioning via accumulation of oxygen radicals. *Free Radic Biol Med*, **38**, 117-24.

Diamantis, D.A., Ramesova, S., Chatzigiannis, C.M., Degano, I., Gerogianni, P.S., Karadima, K.E., Perikleous, S., Rekkas, D., Gerothanassis, I.P., Galaris, D., Mavromoustakos, T., Valsami, G., Sokolova, R., Tzakos, A.G. (2018). Exploring the oxidation and iron binding profile of a cyclodextrin encapsulated quercetin complex unveiled a controlled complex dissociation through a chemical stimulus. *Biochim Biophys Acta*, **1862**, 1913-1924.

Dias Ferreira, F., Kemmelmeier, C., Arrotéia, C.C., da Costa, C.L., Mallmann, C.A., Janeiro, V., Dias Ferreira, F.M., Mossini, S.A.G., Silva, E.L., Machinski Jr., M. (2013). Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. *Food Ch*, **136**, 789–793.

Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B., Roberfroid, M.B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe, Consensus document. *Br J Nutr*, **81**, S1-S27.

Donovan, J.L. (2004). Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic Res*, **38**, 771-85.

Dos Santos-Neto, L.L., de Vilhena Toledo, M.A., Medeiros-Souza, P., de Souza, G.A., (2006). The use of herbal medicine in Alzheimer's disease. A systematic Review. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, **3**, 441- 445.

Doulias PT, Christoforidis S, Brunk UT, Galaris D. (2003). Endosomal and lysosomal effects of desferrioxamine: protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell-cycle arrest. *Free Radic Biol Med*, **35**, 719-28.

Doulias, P.T. Nousis, L., Zhu, B.Z., Frei, B., Galaris, D. (2005). Protection by tropolones against H₂O₂-induced DNA damage and apoptosis in cultured Jurkat cells. *Free Radic Res*, **39**, 125-135.

Duthie, S.J., Hawdon, A. (1998). DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro. *FASEB J*, **12**, 1491-1497.

Dweck, A. (2000). The folklore and cosmetic use of various *Salvia* species, in: acid sensitizes cell death through suppression of TNF- α -induced NF- κ B activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. *Cancer Lett*, **288**, 183–191.

Eaton, J.W. and Quian, M. (2002). Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic Biol Med*, **32**, 833-840.

Eaton, S.B., Konner, M. (1985). Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. *N Engl J Med*, **312**, 283-289.

Engels, G., (2011). Sage. *HerbalGram*, **89**, 1-4.

Epsztejn, S., Kakhlon, O., Glickstein, H., Breuer, W, Cabantchik, I. (1997). Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal Biochem*, **248**, 31-40.

Ettre, L.S., Tswett, M.S. (1993). The discovery of chromatography I: Early work (1899–1903). *Chromatographia*, **35**, 223-231.

Fadel, O., El Kirat, K and Morandat, S. (2011). The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. *Bioch Bioph Acta*, **1808**, 2973-2980.

Fallarini, S., Miglio, G. and Paoletti, T. (2009). Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in in vitro models of neuronal death. *Brit J Pharm*, **157**, 1072–1084.

Fantini, G.A., Yoshioka, T. (1993). Deferoxamine prevents lipid peroxidation and attenuates reoxygenation injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol*, **264**, 1953-1959.

Fenton, H.J.H. (1894). LXXIII.-Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc*, **65**, 899-910.

Fernando, P.M., Piao, M.J., Kang, K.A., Ryu, Y.S., Hewage, S.R., Chae, S.W. and Hyun, J.W. (2016). Rosmarinic acid attenuates cell damage against UVB radiation-induced oxidative stress via enhancing antioxidant effects in human HaCaT cells. *Biomol & Ther (Seoul)*, **24**, 75–84.

Ferrández, A., Prescott, S. and Burt, RW. (2003). COX-2 and colorectal cancer. *Curr Pharm Des*, **9**, 2229–2251.

Ferreira, L.G., Celotto, A.C., Capellini, V.K., Albuquerque, A.A., Nadai, T.R., Carvalho, M.T. and Evora, P.R. (2013). Is rosmarinic acid underestimated as an experimental cardiovascular drug? *Acta Cirurg Bras*, **28**, 83 –87.

Forman, H.J., Davies, K.J., Ursini, F. (2014). How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. *Free Radic Biol Med*, **66**, 24-35.

Fransen, H.P., Ocké, M.C. (2008). Indices of diet quality. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **11**, 559-565.

Fridovich, I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci*, **893**, 13-18.

Galaris, D. and Pantopoulos, K. (2008). Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Critic Rev Clin Lab Sci*, **45**, 1-23.

Ghasemzadeh Rahbardar, M., Amin, B., Mehri, S., Mirnajafi-Zadeh, S.J. and Hosseinzadeh, H. (2017). Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. and rosmarinic acid in a rat model of neuropathic pain. *Biom Pharm*, **86**, 441–449.

Giardina, P.J., Grady, R.W. (2000). Chelation therapy in beta-thalassemia: an optimistic update. *Semin Hematol*, **38**, 360-6.

Glickstein, H., El, R.B., Shvartsman, M., Cabantchik, Z.I.. (2005). Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells. *Blood*, **106**, 3242-3250.

Gonthier, M. P., Remesy, C., Scalbert, A., Cheynier, V., Souquet, J. M., Poutanen, K. and Aura, A.M. (2006). Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota in vitro. *Biomed Pharmacother*, **60**, 536–540.

Gower, J.D. (1998) A role for dietary lipids and antioxidants in the activation of carcinogens. *Free Rad Biol Med*, **5**, 95-100.

Graefe, E.U., Wittig, J., Mueller, S., et al. (2001). Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*, **41**, 492–499.

Greenberg, G.R. and Wintrobe, M.M. (1946). A labile iron pool. *J Biol Chem*, **165**, 397.

Griendling, K.K. and Harrison, D.G. (1999). Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. *Circ Res*, **85**, 562-563.

Groenendaal, F., Shadid, M., McGowan, J.E., Mishra, O.P., van Bel, F. (2000). Effects of deferoxamine, a chelator of free iron, on NA(+), K(+)-ATPase activity of cortical brain cell membrane during early reperfusion after hypoxia-ischemia in newborn lambs. *Pediatr Res*, **48**, 560-4.

Gutteridge, J.M. and Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*, **899**, 136-147.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. (2007) Free Radicals in Biology and Medicine. Fourth ed. Oxford U.K.: Oxford University Press.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. Clarendon Press, Oxford 500pp.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, **186**, 1-85.

Hao, Y., Xie, T., Korotcov, A., Zhou, Y., Pang, X., Shan, L., Ji, H., Sridhar, R., Wang, P., Califano, J., Gu, X. (2009). Salvianolic acid B inhibits growth of head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in vivo via cyclooxygenase-2 and apoptotic pathways. *Int J Cancer*, **124**, 2200–2209.

Harborne, J.B., Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem*, **55**, 481-504.

Harley, R. M., S. Atkin, A. L. Budansteve, P. D. Cantino, B. J. Conn, R. Grayer, M. M. Harley, R. 660 de Tok, T. Krestovskaja, R. Morales, A. J. Paton, O. Ryding, and T. Upson. (2004). 661 Flowering plants, dicotyledons. In K. Kubitzki (eds.) The families and genera of vascular 662 plants. *Berlin: Springer Verlag*, **6**, 167–275.

Hasler, C. (1998). Functional foods, Their role in disease prevention and health promotion. *Instit Food Technol expert panel on food safety and nutr*, **52**, 63.

Hedge, I.C. (1972). Salvia, L., in: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M, Webb, D.A (Eds.), *Flora Europaea III*, 289-290.

Hedlund, B.E., Hallaway, P.E. (1991). Role of iron and oxygen radicals in hemorrhage and shock. *Klin Wochenschr*, **69**, 1113-1117.

Heleno, S.A., Ferreira, I.C.F.R., Esteves, A.P., Ćirić, A., Glamočlija, J., Martins, A. et al, (2013). Antimicrobial and demelanizing activity of Ganoderma lucidum extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food Chem Toxic*, **58**, 95–100.

Henle, E.S., Han, Z., Tang, N., et al. (1999). Sequence-specific DNA cleavage by Fe²⁺- mediated fenton reactions has possible biological implications. *J Biol Chem*, **274**, 962-971.

Hershko, C., Weatherall, D.J. (1988). Iron-chelating therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci*, **26**, 303-345.

Hiraishi, H., Yajima, N., Yamaguchi, N., Ishida, M., Katoh, Y., Harada, T., Terano, A., Ivey, K.J. (1993). Antioxidant protection against oxidant-induced damage in cultured gastric mucosal cells. *Gastroenterol Jpn*, **28**, 132-8.

Hoffbrand, A.V., Cohen, A., Hershko, C. (2003). Role of deferiprone in chelation therapy for transfusional iron overload. *Blood*, **102**, 17-24.

Hossan, M.S., Rahman, S., Anwarul Bashar, A.B.M., Jahan, R., Al-Nahain, A. and Rahmatullah, M. (2014). Rosmarinic acid: a review of its anticancer action. *World J Pharm Sc*, **3**, 57–70.

Houghton, P. (2004). Activity and constituents of Sage relevant to the potential treatment of symptoms of Alzheimer's disease. *HerbalGram*, **61**, 49-53.

Hower, V., Mendes, P., Torti, F.M., Laubenbacher, R., Akman, S., Shulaev, V. and Torti, S.V. (2009). A general map of iron metabolism and tissue-specific subnetworks. *Mol Biosyst*, **5**, 422-443.

Huijbregts, P., Feskens, E., Räsänen, L., Fidanza, F., Nissinen, A., Menotti, A., Kromhout, D. (1997) Dietary pattern and 20 year mortality in elderly men in Finland, Italy, and The Netherlands: longitudinal cohort study. *BMJ*, **315**, 13-17.

Hur, Y.G., Yun, Y. and Won, J. (2003). Rosmarinic acid induces p56lck-dependent apoptosis in Jurkat and peripheral T cells via mitochondrial pathway independent from Fas/Fas ligand interaction. *J Immun*, **172**, 79–87.

Institute of Food Technologists. Expert Report. (2005). Functional foods, Opportunities and challenges. *IFT*, 6.

Ito, H., Miyazaki, T., Ono, M., Sakurai, H. (1998). Antiallergic activities of rabdosiin and its related compounds: Chemical and biochemical evaluations. *Bioorg Med Chem*, **6**, 1051–1056.

Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Watari, A., Kobayashi, M., et al. (2010). Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl₄-induced liver injury. *Biol Pharm Bull*, **33**, 983–987.

Jacques, P.F. and Tucker, K.L. (2001). Are dietary patterns useful for understanding the role of diet in chronic disease? *Am J Clin Nutr*, **73**, 1-2.

Jang, A.H., Kim, T.H., Kim, G.D., Kim, J.E., Kim, H.J., Kim, S.S., Jin, Y.H., Park, Y.S., Park, C.S. (2011). Rosmarinic acid attenuates 2,4-dinitrofluorobenzeneinduced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Int Immunopharmacol*, **11**, 1271-1277.

Jansen, M.C., Bueno-de-Mesquita, H.B., Buzina, R., Fidanza, F., Menotti, A., Blackburn, H., Nissinen, A.M., Kok, F.J., Kromhout, D. (1999). Dietary fiber and plant foods in relation to colorectal cancer mortality: the seven countries study. *Int J Cancer*, **81**, 174-9.

Johnson, I.T. (2001). Antioxidants and antitumour properties In Antioxidants in food. *Woodhead Pbs Ltd*, **4**, 108-114.

Jones, D.P. and Sies, H. (2015). The Redox Code. *Antioxid Redox Signal*, **23**, 734-746.

Jornot, L., Petersen, H., Junod, A.F. (1998). Hydrogen peroxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. *Biochem J*, **335**, 85-94.

Juhas, S., Bukovska, A., Cikos, S., Czikkova, S., Fabian, D., Koppel, J. (2009). Anti-inflammatory effects of Rosmarinus officinalis essential oil in mice. *Acta Veterinaria Brno*, **78**, 121-127.

Kakhlon, O., Cabantchik, Z.I. (2002). The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic Biol Med*, **33**, 1037-1046.

Kaliora, A., Kogiannou, D., Kefalas, P., Papassideri, I., Kalogeropoulos, N. (2014). Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention? *Food Chemistry*, **142**, 233-241.

Kalonia, H., Kumar, P., Kumar, A., Nehru, B., (2009). Effect of caffeic acid and rofecoxib and their combination against intrastriatal quinolinic acid induced oxidative damage, mitochondrial and histological alterations in rats. *Inflammopharmacology*, **17**, 211–219.

Kampa, M., Alexaki, V.I., Notas, G., Nifli, A.P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtzoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., Gravanis, A., Castanas, E. (2004). Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res*, **6**, 63-74.

Kang, N.J., Lee, K.W., Shin, B.J., Jung, S.K., Hwang, M.K., Bode, A.M., et al. (2009). Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis*, **30**, 321–330.

Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Crit Rev Food Sc Nutr*, **44**, 453-464.

Karthik, D., Viswanathan, P. and Anuradha, C.V. (2011). Administration of rosmarinic acid reduces cardiopathology and blood pressure through inhibition of p22phox NADPH oxidase in fructose-fed hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, **58**, 514–521.

Karthikkumar, V., Sivagami, G., Viswanathan, P., Nalini, N. (2015). Rosmarinic acid inhibits DMH-induced cell proliferation in experimental rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, **26**, 185-200.

Kaur, C. and Kapoor, H. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. *Int J Food Sci Tech*, **36**, 703-725.

Keberle, H. (1964). The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, **119**, 758-68.

Kelley, C.J., Mahajan, J.R., Brooks, L.C., Neubert, L.A., Breneman, W.R., Carmack, M. (1975). Polyphenolic acids of *Lithospermum ruderales*. Dougl ex Lehm. (Boraginaceae). 1. Isolation and structure determination of lithospermic acid. *J Org Chem*, **40**, 1804-1815.

Kennedy, D.O., Pace, S., Haskell, C., Okello, E.J., Milne, A., Scholey, A.B. (2006). Effects of cholinesterase inhibiting sage (*Salvia officinalis*) on mood, anxiety and performance on a psychological stressor battery. *Neuropsychopharmacology*, **31**, 845-852.

Kennedy, E.T., Ohls, J., Carlson, S., Fleming, K. (1995) The Healthy Eating Index: design and applications. *J Am Diet Assoc*, **95**, 1103-1108.

Kensler, T.W., Teffe, B.G. (1986). Free radicals in tumour promotion. *Free Rad Biol Med*, **2**, 347-351.

Kevin, L.G., Camara, A.K., Riess, M.L., Novalija, E., Stowe, D.F. (2003). Ischemic preconditioning alters real-time measure of O₂ radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **284**, 566-74.

Keys, A., Menotti, A., Karvonen, M.J., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Djordjevic, B.S., Dontas, A.S., Fidanza, F., Keys, M.H., et al. (1986). The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol*, **124**, 903-915.

Khokhar, S. and Apenten, R.K.O. (2003). Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure-activity relations. *Food Chem*, **81**, 133-140.

Kim, D.S., Kim, H.R., Woo, E.R., Hong, S.T., Chae, H.J. and Chae, S.W. (2005). Inhibitory effects of rosmarinic acid on adriamycin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells by inhibiting reactive oxygen species

and the activations of c-Jun N-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase. *Biochem Pharmacol*, **70**, 1066–1078.

Kim, G.D., Park, Y.S., Jin, Y.H. and Park, C.S. (2015). Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. *Appl Micr Biot*, **99**, 2083–2092.

Kim, J.H., Lee, B.J., Kim, J.H., Yu, Y.S., Kim, M.Y., Kim, K.W. (2009). Rosmarinic acid suppresses retinal neovascularization via cell cycle arrest with increase of p21(WAF1) expression. *Eur J Pharmacol*, **615**, 150–154.

King, R.A., Broadbent, J.L., Head, R.J. (1996). Absorption of the soy isoflavonone genistein in rats. *J Nutr*, **126**, 176-182.

Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B., Kanner, J. (1993). Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, **47**, 85-89.

Kintzios, S. (Ed), Sage the genus *Salvia*. Harwood Academic Publishers, *The Netherlands*, 1-25.

Kintzios, S. Sage. (2000). In *Medical and Aromatic Plants-Industrial Profiles*. Taylor & Francis, NY.

Kitsati N, Mantzaris MD, Galaris D. (2016). Hydroxytyrosol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptotic signaling via labile iron chelation. *Redox Biol*, **10**, 233-242.

Kitsati, N., Fokas, D., Ouzouni, M.D., Mantzaris, M.D., Barbouti, A., Galaris, D. (2012). Lipophilic caffeic acid derivatives protect cells against H₂O₂-Induced DNA damage by chelating intracellular labile iron. *J Agric Food Chem*, **60**, 7873-7879.

Kitsati, N., Mantzaris, M.D., Galaris, D. (2016). Hydroxytyrosol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptotic signaling via labile iron chelation. *Redox Biol*, **10**, 233-242.

Kokkini, S. (1996). Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano.

Kong, W.K., Zhao, Y.L., Shan, L.M., Xiao, X.H., Guo, W.Y. (2008). Thermochemical studies on the quantity-antibacterial effect relationship of four organic acids from *Radix isatidis* on *Escherichia coli* growth. *Biol Pharm Bull*, **31**, 1301–1305.

Kourlaba, G., Panagiotakos, D.B. (2009) The number of index components affects the diagnostic accuracy of a diet quality index: the role of intracorrelation and intercorrelation structure of the components. *Ann Epidemiol*, **19**, 692-700.

Koushik, A., Hunter, D.J., Spiegelman, D., Beeson, W.L., van den Brandt, P.A., Buring, J.E., Calle, E.E., Cho, E., Fraser, G.E., Freudenheim, J.L., Fuchs, C.S., Giovannucci, E.L., Goldbohm, R.A., Harnack, L., Jacobs, D.R.Jr., Kato, I., Krogh, V., Larsson, S.C., Leitzmann, M.F., Marshall, J.R., McCullough, M.L., Miller, A.B., Pietinen, P., Rohan, T.E., Schatzkin, A., Sieri, S., Virtanen, M.J., Wolk, A., Zeleniuch-Jacquotte, A., Zhang, S.M., Smith-Warner, S.A. (2007). Fruits, vegetables, and colon cancer risk in a pooled analysis of 14 cohort studies. *J Natl Cancer Inst*, **99**, 1471-83.

Kuhnau, J. (1976). The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*, **24**, 117–191.

Kurz, T., Eaton, J.W. and Brunk, U.T. (2010). Redox activity within the lysosomal compartment: implications for aging and apoptosis. *Antioxid Redox Signal*, **13**, 511-523.

Kushi, L., Lenart, E. and Willet, W. (1995). Health implications of Mediterranean diets in light of contemporary Knowledge. 2. Meat, Wine, Fats and Oils. *Amer J Clin Nutr*, **61**, 1416.

Le Nest, G., Caille, O., Woudstra, M., et al. (2004). Zn-polyphenol chelation: complexes with quercetin. *In Chem Akta*, **357**, 2027-2037.

Lee, M.J., Wang, Z.Y., Li, H., et al. (1995). Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Canc Epid Biom Prev*, **4**, 393–399.

Lee, P., Mohammed, N., Marshall, L., et al. (1993). Intravenous infusion pharmacokinetics of desferrioxamine in thalassaemic patients. *Drug Metab Dispos*, **21**, 640–644.

Leland G. Allbaugh, Princeton (1953). Crete: A Case Study of an Underdeveloped Area. *Am J Agr Ec*, **35**, 461-462.

Lentsch, A.B., Kato, A., Yoshidome, H., McMasters, K.M., Edwards, M.J. (2000). Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*, **32**, 169-73.

Li, G.S., Jiang, W.L., Tian, J.W., Qu, G.W., Zhu, H.B., Fu, F.H.. (2010). In vitro and in vivo antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis. *Phytomedicine*, **17**, 282–288.

Li, H.R., Lee, H.C., Jung, M., Shah, S.V. (2001). Treatment of diabetic nephropathy and microalbuminuria. A61K 031/36 Appl. No. 666623.

Li, X., Yu, C., Lu, Y., Gu, Y., Lu, J., Xu, W., Xuan, L. and Wang, Y. (2007). Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of depside salts from *Salvia miltiorrhiza* in rats. *Drug Metab. Dispos*, **35**, 234–239.

Lim, H.J., Woo, K.W., Lee, K.R., Lee, S.K., Kim, H.P. (2014). Inhibition of Proinflammatory Cytokine Generation in Lung Inflammation by the Leaves of *Perilla frutescens* and Its Constituents. *Biomol Ther*, **22**, 62–67.

Lin, M., Zhang, B.X., Zhang, C., Shen, N., Zhang, Y.Y., Wang, A.X. and Tu, C.X. (2014). Ginsenosides Rb1 and Rg1 stimulate melanogenesis in human epidermal melanocytes via PKA/CREB/MITF signaling. *Evid Based Complement Alternat Med*, **2014**, 892073.

Link, G., Athias, P., Grynberg, A., Pinson, A., Hershko, C. (1989). Effect of iron loading on transmembrane potential, contraction, and automaticity of rat ventricular muscle cells in culture. *J Lab Clin Med*, **113**, 103-11.

Lionis, C., Faresjo, A., Skoula, M., Kapsokefalou, M., Faresjo, T. (1998). Antioxidant effects of herbs in Crete. *Lancet*, **352**, 1987-1988.

Longobardi-Givan, A., (2001). Flow cytometry: First Principles, second ed. John Wiley & Sons, New York.

Luo, P., Tan, Z., Zhang, Z., Li, H., Mo, Z. (2008). Inhibitory effects of salvianolic acid B on the high glucose-induced mesangial proliferation via NF- κ B-dependent pathway. *Biol Pharm Bull*, **31**, 1381–1386.

Lyras, L., Cairns, N.J., Jenner, A., Jenner, P., Halliwell, B. (1997). An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem*, **68**, 2061-2067.

Mabberlay, D.J. (1997). The Plant Book, 2nd edition, Cambridge University Press, Cambridge.

Machado, D.G., Bettio, L.E.B., Cunha, M.P., Capra, J.C., Dalmarco, J.B., Pizzolatti, M.G., Rodrigues, A.L.S. (2009). Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. *Progr Neuro-Psychopharm Biol Psych*, **33**, 642-650.

Madsen, H.L. & Bertelsen, G. (1995). Review: Spices as antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, **64**, 271-277.

Makino, T., Ono, T., Muso, E., Yoshida, H., Honda, G., Sasayama, S. (2000). Inhibitory effects of rosmarinic acid on the proliferation of cultured murine mesangial cells. *Nephrol Dial Transpl*, **15**, 1140-1145.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, **79**, 727-747.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, L. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Mantzaris MD, Bellou S, Skiada V, Kitsati N, Fotsis T, Galaris D. (2016). Intracellular labile iron determines H₂O₂-induced apoptotic signaling via sustained activation of ASK1/JNK-p38 axis. *Free Radic Biol Med*, **9**, 454-465.

Mantzaris, M.D., Bellou, S., Skiada, V., Kitsati., N., Fotsis, T. and Galaris, D. (2016). Intracellular labile iron determines H₂O₂-induced apoptotic signaling via sustained activation of ASK1/JNK-p38 axis. *Free Radic Biol Med*, **97**, 454-465.

Markaki I., Linos D., & Linos A. (2003). The influence of dietary patterns on the development of thyroid cancer. *Eur J Canc*, **39**, 1912-1919.

Martins, N., Barros, L., Santos Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I. (2014). Decoction, infusion, and hydralcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food Chemistry*, **158**, 73-80.

Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I. (2015). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chem*, **170**, 378-385.

Marzi, I., Zhi, Z.N., Zimmermann, F.A., Lemasters, J.J., Thurman, R.G. (1989). Xanthine and hypoxanthine accumulation during storage may contribute to reperfusion injury following liver transplantation in the rat. *Transplant Proc*, **21**, 1319-1320.

Massada, Y. (1976). Analysis of essential oils by gas chromatography and spectrometry. Wiley & Sons, New York.

McCord, J. (1974). Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, **185**, 529-531.

McCord, J.M. and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, **244**, 6049-6055.

McCord, J.M., Turrens, J.F. (1994) Mitochondrial injury by ischemia and reperfusion. *Curr Top Bioenerg*, **17**, 173-179.

Melidou, M., Riganakos, K., Galaris, D. (2005). Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: the role of iron chelation. *Free Radic Biol Med*, **39**, 1591-600.

Meneghini, R. (1997). Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic Biol Med*, **23**, 783-792.

Mira, L., Fernandez, M.T., Santos, M., Rocha, R., Florêncio, M.H., Jennings, K.R. (2002). Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res*, **36**, 1199-1208.

Mitrou, P.N., Kipnis, V., Thiébaud, A.C., Reedy, J., Subar, A.F., Wirfält, E., Flood, A., Mouw, T., Hollenbeck, A.R., Leitzmann, M.F., Schatzkin, A. (2007) Mediterranean dietary pattern and prediction of all-cause mortality in a US population. *Arch Intern Med*, **167**, 2461-2468.

Moon, D.O., Kim, M.O., Lee, J.D., Choi, Y.H., Kim, G.Y. (2010). Rosmarinic sensitizes cell death through suppression of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. *Cancer Lett*, **288**, 183-91.

Moore, R. and Pearson, T. (1986). Moderate alcohol consumption and CHD: a review. *Medicine*, **65**, 242.

Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Manuel Dominguez J., Sineiro J., Dominguez H., Núñez, M.J., Carlos Parajó, J. (2001). *Natural antioxidants from residual sources Food Chemistry*, **72**, 145- 171.

Mylonas, C., Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*, **13**, 295-309.

Nabavi, S.F., Tenore, G.C., Daglia, M., Tundis, R., Loizzo, M.R. and Nabavi, S.M. (2015). The cellular protective effects of rosmarinic acid: from bench to bedside. *Current Neurovasc Res*, **2**, 98–105.

Nestle, M. (1995). Mediterranean diets: historical and research overview. *Am J Clin Nutr*, **61**, 1313S-1320S.

Nohl, H., Koltover, V., Stolze, K. (1993). Ischemia/reperfusion impairs mitochondrial energy conservation and triggers O₂.- release as a byproduct of respiration. *Free Radic Res Commun*, **18**, 127-37.

Nousis, L., Doulias, P.T., Aligiannis, N., Bazios, D., Agalias, A., Galaris, D., Mitakou, S. (2005). DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide. *Free Radic Res*, **39**, 787-795.

Oboh, G., Agunloye, O.M., Akinyemi, A.J., Ademiluyi, A.O., Adefegha, S.A. (2013). Comparative study on the inhibitory effect of caffeic and chlorogenic acids on key enzymes linked to Alzheimer's disease and some pro-oxidant induced oxidative stress in rats' brain-in vitro. *Neurochem Res*, **38**, 413–419.

Obulesu, M., Rao, D.M. (2011). Effect of plant extracts on Alzheimer's Disease: An insight into therapeutic avenues. *J Neurosc Rural Pract*, **2**, 56-61.

Olivieri, N.F., Brittenham, G.M., Matsui, D., Berkovitch, M., Blendis, L.M., Cameron, R.G., et al. (1995). Iron-chelation therapy with oral deferiprone in patients with thalassemia major. *N Engl J Med*, **332**, 918-922.

Omar, R., Nomikos, I., Piccorelli, G., Savino, J., Agarwal, N. (1989). Prevention of postischaemic lipid peroxidation and liver cell injury by iron chelation. *Gut*, **30**, 510-514.

Orhan, I., Aslan, M. (2009). Appraisal of scopolamine-induced anti-amnesic effect in mice and in vitro antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used Lamiaceae plants. *J Ethnopharm*, **122**, 327- 332.

Orhan, I., Kartal, M., Kan, Y., Sener, B. (2008). Activity of essential oils and individual components against acetyl and butyrylcholinesterase. *Z Naturforsch C*, **63**, 547-553.

Osakabe, N., Yasuda, A., Natsume, M., Sanbongi, C., Kato, Y., Osawa, T. and Yoshikawa, T. (2002). Rosmarinic acid, a major polyphenolic

component of *Perilla frutescens*, reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in D-galactosamine (D-GalN)-sensitized mice. *Free Radic Biol Med*, **33**, 798–806.

Ostling, O., Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **123**, 291-298.

Panagiotakos, D.B., Polychronopoulos, E. (2005) The role of Mediterranean diet in the epidemiology of metabolic syndrome; converting epidemiology to clinical practice. *Lipids Health Dis*, **12**, 4-7.

Panagiotidis, M., Tsolas, O. and Galaris, D. (1999). Glucose oxidase produced H₂O₂ induces Ca²⁺-dependent DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Free Radic Biol Med*, **26**, 548-556.

Panayiotidis, M., Tsolas, O., Galaris, D. (1999). Glucose oxidase-produced H₂O₂ induces Ca²⁺-dependent DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Free Radic Biol Med*, **26**, 548-556.

Parnham, M.J., Kesselring, K. (1985). Rosmarinic acid. *Drugs of the Future*, **10**, 756–757.

Parr, A.J., Boldwell, G.P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile, *J Sci Food Agric*, **80**, 985-1012.

Parthasarathy, S., Steinberg, D., Witztum, J.L. (1992) The role of oxidized LDL in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annu Rev Med*, **43**, 219-225.

Patterson, R.E., Haines, P.S., Popkin, B.M. (1994) Diet quality index: capturing a multidimensional behavior. *J Am Diet Assoc*, **94**, 57-64.

Pennell, D.J., Berdoukas, V., Karagiorga, M., Ladis, V., Piga, A., Aessopos, A., et al. (2006). Randomized controlled trial of deferiprone or deferoxamine in beta-thalassemia major patients with asymptomatic myocardial siderosis. *Blood*, **107**, 3738-3744.

Pennington, J.A.T. (2002). Food composition databases for bioactive food components *J Food Comp Anal*, **15**, 419–434.

Perry, N.S.L., Houghton, P.J., Theobald, A.E., Jenner, P., Perry, E.K. (2000). In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholine esterase by

Salvia lavandulifolia essential oil and constituent terpenes. *J Pharm Pharmacol*, **52**, 895-902.

Petersen, M. (2013). Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochem*, **12**, 207–227.

Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hücherig, S., Janiak, V., Kim, K.H., Sander, M., Weitzel, C., Wolters, S. (2009). Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochem*, **70**, 1663-79.

Petrat, F., De Groot, H., Sustmann, R. and Rauen, U. (2002). The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol Chem*, **383**, 489-502.

Pietrangelo, A. (2007). Iron chelation beyond transfusion iron overload. *Am J Hematol*, **82**, 1142-1146.

Piga, A., Roggero, S., Vinciguerra, T., Sacchetti, L., Gallo, V., Longo, F. (2005). Deferiprone: New insight. *Ann N Y Acad Sci*, **1054**, 169-74.

Pokorny, J. (1991). Natural antioxidants for food use. *Trends Food Sci Technol*, **9**, 223- 227.

Pugazhendhi, D., Pope, G.S., Darbre, P.D., (2005). Oestrogenic activity of p-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines. *J Appl Toxicol*, **25**, 301-309.

Qayumi, A.K., Jamieson, W.R., Poostizadeh, A., Germann, E., Gillespie, K.D. (1992). Comparison of new iron chelating agents in the prevention of ischemia/reperfusion injury: a swine model of heart-lung transplantation. *J Invest Surg*, **5**, 115-127.

Radtke, J., Linseisen, J., Wolfram, G. (1998). Phenolic acid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food composition survey. *Z Ernährungswiss*, **37**, 190–197.

Reedy, J., Mitrou, P.N., Krebs-Smith, S.M., Wirfält, E., Flood, A., Kipnis, V., Leitzmann, M., Mouw, T., Hollenbeck, A., Schatzkin, A., Subar, A.F. (2008) Index-based dietary patterns and risk of colorectal cancer, the NIH-AARP Diet and Health study. *Am J Epidemiol*, **168**, 38-48.

Rein, D., Lotito, S., Holt, R.R., Keen, C.L., Schmitz, H.H., Fraga, C.G. (2000). Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr*, **130**, 2109S–2114S.

Renaud, S., de Lorgeril, M., Delaye, J., Guidollet, J., Jacquard, F., Mamelle, N., Martin, J.L., Monjaud, I., Salen, P., Toubol, P. (1995). Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *Am J Clin Nutr*, **61**, 1360S-1367S.

Reuter J., Jocher A., Hornstein S. Mönning J.C., Schempp C.M., (2007). Sage extract rich in phenolic diterpenes inhibits ultraviolet-induced erythema in vivo. *Planta Medica*, **73**, 1190-1191.

Riboli, E., Hunt, K.J., Slimani, N., Ferrari, P., Notat, T., Fahey, M. (2002). European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC): study populations and data collection. *Public Health Nutr*, **5**, 1113-1124.

Rice-Evans, C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem*, **8**, 797-807.
Rice-Evans, C.A., Millew, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med*, **20**, 933-956.

Rice-Evans, C.A., Millew, N.J., Paganga, G. 7). Review: Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, **2**, 152- 159.

Ritschel, W.A., Starzacher, A., Sabouni, A., Hussain, A.S. and Koch, H.P. (1989). Percutaneous absorption of rosmarinic acid in the rat. *Methods Find Experim Clin Pharm*, **11**, 345–352.

Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A., Khalel, K.I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and total phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Ind crops Products*, **43**, 827-831.

Rongxia, L., Elke, H., Waltenberger, B., et al. (2018). Constituents of Mediterranean Spices Counteracting Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation: Identification and Characterization of Rosmarinic Acid Methyl Ester as a Novel Inhibitor. *Mol Nutr Food Res*, **62**, 1700860.

Ross, G.M., McMillan, T.J., Wilcox, P., Collins, A.R. (1995). The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, *Mutat Res*, **337**, 57-60.

Rossi, F., Jullian, V., Pawlowicz, R., Kumar-Roiné, S., Haddad, M., Darius, H.T., Gaertner-Mazouni, N., Chinain, M. and Laurent, D. (2012). Protective effect of *Heliotropium foertherianum* (Boraginaceae) folk remedy and its

active compound, rosmarinic acid, against a Pacific ciguatoxin. *J Ethnopharm*, **143**, 33-40.

Sajid, R., Ghani, F., Adil, S., Khurshid, M. (2009). Oral iron chelation therapy with deferiprone in patients with Thalassemia Major. *J Pak Med Assoc*, **59**, 388-390.

Salevev, S.U., Okello, E.J., Perry, E.K. (2004). Butyryl- and acetylcholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytoth Res*, **18**, 315-324.

Sanbongi, C., Takano, H., Osakabe, N., Sasa, N., Natsume, M., Yanagisawa, R., Inoue, K., Kato, Y., Osawa, T. and Yoshikawa, T. (2003). Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles. *Free Radic Biol Med*, **34**, 1060–1069.

Santos-Buelga, C., Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric*, **80**, 1094–1117.

Sarikurkcü, C., Zengin, G., Oskay, M., Uysal, S., Ceylan, R., Aktumsek, A. (2015). Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *Vulgare* and *hirtum*) essential oils. *Ind Crops Prod*, **70**, 178-184.

Satake, T., Kamiya, K., Saiki, Y., Hama, T., Fujimoto, Y., Kitanaka, S., Kimura, Y., Uzawa, J., Endang, H., Umar, M. (1999). Studies on the constituents of fruits of *Helicteres isora*. *J Chem Pharm Bull*, **47**, 1444-1447.

Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*, **130**, 2073S-2085S.

Scarpati, M.L. and Oriente, G. (1958). Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *Rosmarinus* off.). *Ricerca Science*, **28**, 2329-2333.

Schapowal, A., Berger, D., Klein, P., Suter, A. (2009). Echinacea/sage or chlorhexidine/lidocaine for treating acute sore throats: a randomized doubleblind trial. *Eur J Med Res*, **14**, 406-412.

Schneeman, B.O. (2000). Relationship of food, nutrition and health. In, *Essentials of functional foods*. *Aspen Publishers*, **1**, 3-7.

Scholey, A.B., Tildesley, N.T.J., Ballard, C.G., et al. (2008). An extract of *Salvia* (sage) with anticholinesterase properties improves memory and attention in healthy volunteers. *Psychopharm*, **198**, 127-139.

Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J Agric Food Chem*, **53**, 7749-7759.

Shapiro, H.M. (2003). Practical flow cytometry. Wiley-Liss, New York, 3rd ed.

Sharmila, R. and Manoharan, S. (2012). Anti-tumor activity of rosmarinic acid in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Indian J Exp Biol*, **50**, 187–194.

Shen, W., Qi, R., Zhang, J., Wang, Z., Wang, H., Hu, C. et al. (2012). Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons. *Brain Res Bull*, **88**, 487-494.

Shinenaga, M., Hagen, T., and Ames, B. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging, *Proc Natl Acad Sci*, **91**, 10771-10778.

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

Simopoulos, A. (2001). The Mediterranean Diets: What is so special about the diet of Greece? The Scientific Evidence. *J Nutr*, **11**, 3065-3073.

Simopoulos, A., P. (1991). Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr*, **54**, 438-463.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, **175**, 184-191.

Sofi, F., Cesari, F., Abbate, R., Gensini, G.F., Casini, A. (2008). Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ*, **337**, 1344.

Sotelo-Felix, J.I., Martinez-Fong, D., Muriel, P., Santillan, R.L., Castillo, D., Yahuaca, P. (2002). Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *J Ethnopharm*, **81**, 145-154.

Stagos, D., Portesis, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., Chaita, E., Panagoulis, C., Reri, E., Skaltsounis, L., Tsatsakis, A.M., Kouretas, D. (2012). Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food Chem Toxicol*, **50**, 4115-24.

Steinberg, D. (1997). Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem*, **272**, 20963-20966.

Stohs, S.J. and Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*, **18**, 321-336.

Tanaka, T., Morimoto, S., Nonaka, G., Nishioka, I., Yokozawa, T., Chung, H.Y., Oura, H. (1989). Magnesium and ammonium-potassium lithospermates B, the active principles having a uremia-preventive effect from *Salvia miltiorrhiza*. *Chem Pharm Bull*, **37**, 340– 344.

Tay, S., Hughey, J.J., Lee, T.K., Lipniacki, T., Quake, S.R., Covert, M.W. (2010). Single-cell NF- κ B dynamics reveal digital activation and analogue information processing. *Nature*, **466**, 267–271.

Tenopoulou, M., Doulias, P.T., Barbouti, A., Brunk, U. and Galaris, D. (2005). Role of compartmentalised redox-active iron in hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem J*, **387**, 703-710.

Tenopoulou, M., Kurz, T., Doulias, P.T., *et al.* (2007). Does the calcein-AM method assay the total cellular “labile iron pool” or only a fraction of it? *Biochem J*, **403**, 261-266.

Togashi, H., Matsuo, T., Shinzawa, H., Takada, Y., Watanabe, H., Saito, T., Oikawa, K., Kamada, H., Takahashi, T. (2000). In vivo imaging of increased oxidative stress in the liver by electron spin resonance-computed tomography. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, **107**, 197-217.

Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C. and Trichopoulos D. (2003). Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek Population. *N Engl J Med*, **348**, 2599-2608.

Trichopoulou, A., Kouris-Blazos, A., Wahlqvist, M.L. (1995) Diet and overall survival in elderly people. *BMJ*, **311**, 1457-60.

Trichopoulou, A., Lagiou, P., Kuper, H., Trichopoulos, D. (2000) Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **9**, 869-873.

Trichopoulou, A., Naska, A., Costacou, T., DAFNE III Group. (2002). Disparities in food habits across Europe. *Proc Nutr Soc*, **61**, 553-558.

Trichopoulou, A., Vasilopoulou, E., Hollman, P., Chamalides, Ch., Foufa, E., Kaloudis, Tr., Kromhout, D., et al. (2000). Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: A potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet. *Food Chem*, **70**, 319-323.

Tsai, T.H., Chuang, L.T., Lien, T.J., Liing, Y.R., Chen, W.Y. and Tsai, P.J. (2013). Rosmarinus officinalis extract suppresses Propionibacterium acnes-induced inflammatory responses. *J Medic Food*, **16**, 324–333.

Tseng, M., Sellers, T.A., Vierkant, R.A., Kushi, L.H., Vachon, C.M. (2008) Mediterranean diet and breast density in the Minnesota Breast Cancer Family study. *Nutr Cancer*, **60**, 703-709.

Tyrovolas, S., Panagiotakos, D.B. (2010) The role of Mediterranean type of diet on the development of cancer and cardiovascular disease, in the elderly: a systematic review. *Maturitas*, **65**, 122-130.

Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohé, R., Aumann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D., Flohé, L. (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*, **252**, 38-53.

Uyeturk, U., Firat, T., Cetinkaya, A., Kin Tekce, B. and Cakir, S. (2014). Protective effects of rosmarinic acid on doxorubicin-induced testicular damage. *Chemotherapy*, **60**, 7–12.

Van den Dool, H., Kratz, P.D.J. (1963). *Chromatography*, **11**, 463-471.

Vanaclocha, B., Canigueral, S. (2003). Fitoterapia: Vademecum de Prescripcion (4oEd. ed.), Barcelona Venkatachalam, K., Gunasekaran, S., Jesudoss, V.A. and Namasivayam, N. (2013). The effect of rosmarinic acid on 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Experim Tox Pathol*, **65**, 409–418.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, **184**, 39-51.

Victor Hoffbrand, A. (2005). Deferiprone therapy for transfusional iron overload. *Best Pract Res Clin Haematol*, **18**, 99-317.

Waijers, P.M., Feskens, E.J., Ocké, M.C. (2007) A critical review of predefined diet quality scores. *Br J Nutr*, **97**, 219-231.

Walsh, M.C., Brennan, L., Pujos-Guillot, E., Sébédio, J.L., Scalbert, A., Fagan, A., Higgins, D.G., Gibney, M.J. (2007). Influence of acute phytochemical intake on human urinary metabolomic profiles. *Am J Clin Nutr*, **86**, 1687-1693.

Wang, Y., Dhahidi, F. and Ho, C.T. (2013). Metabolism of dietary phenolic acids. *Nutritional and Functional Properties of food*, 178-204.

Warnholtz, A., Münzel, T. (2000). Why do antioxidants fail to provide clinical benefit? *Curr Control Trials Cardiovasc Med*, **1**, 38-40.

Webb, G.P. (2006). Dietary supplements and functional foods. *Blackwell Publishing*, **8**, 165-166.

Weinberg, E.D. (2010). The hazards of iron loading. *Metallomics*, **2**, 732-740.

Wellmann, M., (1958). Pedanios Dioscuridis "De Materia Medica". Berlin, III, **32**, 1.

Westendorp, M.O., Shatrov, V.A., Schulze-Osthoff, K., Frank, R., Kraft, M., Los, M., Krammer, P.H., Droge, W., Lehmann, V. (1995) HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *EMBO J*, **3**, 546-554.

Whitten, C.F., Gibson, G.W., Good, M.H., Goodwin, J.F., Brough, A.J. (1965). Studies in acute iron poisoning. I. Desferrioxamine in the treatment of acute iron poisoning: clinical observations, experimental studies, and theoretical considerations. *Pediatrics*, **36**, 322-35.

Wichtl, M., Bisset, N.G. (1994). Herbal drugs and phytopharmaceuticals. *Medpharm GmbH Scientific Publishers*, 440-443.

Willett, W.C. (2006) The Mediterranean diet: science and practice. *Public Health Nutr*, **9**, 105-110.

Willett, W.C., Sacks, F., Trichopoulou, A., Drescher, G., Ferro-Luzzi, A., Helsing, E., Trichopoulos, D. (1995). Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr*, **61**, 1402S-1406S.

Willett, W.C., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Colditz, G.A., Speizer, F.E., Rosner, B.A. (1993). Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *Lancet*, **341**, 581-585.

Wlodkowic, D., Skommer, J., Darzynkiewicz, Z. (2009). Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods Mol Biol*, **559**, 19-32.

Wood, Z.A., Poole, L.B., Karplus, P.A. (2003). Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signalling. *Science*, **300**, 650-653.

Wu, T.Y., Chen, C.P., Jinn, T.Y. (2011). Traditional Chinese medicines and Alzheimer's disease. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, **50**, 131-135.

Xu, J.G., Hu, Q.P., Liu, Y. (2012). Antioxidant and DNA-protective activities of chlorogenic acid isomers. *J Agric Food Chem*, **60**, 11625–11630.

Xu, Y., Zhang, L., Shao, T., Ruan, L., Wang, L., Sun, J. et al. (2013). Ferulic acid increases pain threshold and ameliorates depression-like behaviors in reserpine-treated mice: Behavioral and neurobiological analyses. *Metab Brain Dis*, **28**, 571-583.

Yangkang, S., Seung, L., Ah-Reum H., Jin-Baek, K., Hye Gwang, J. and Chang Hyun, J. (2016). Rosmarinic Acid Methyl Ester Inhibits LPS-Induced NO Production via Suppression of MyD88- Dependent and -Independent Pathways and Induction of HO-1 in RAW264.7 Cells *Molecules*, **21**, 1083.

Yao, G., Xu, L., Wu, X., Xu, L., Yang, J., Chen, H. (2009). Preventive effects of salvianolic acid B on transforming growth factor- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition of human kidney cells. *Biol Pharm Bull*, **32**, 882–886.

Yip, E.C.H., Chan, A.S.L., Pang, H., Tam, Y.K., Wong, Y.H. (2006). Protocatechuic acid induces cell death in HepG2 hepatocellular carcinoma cells through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Cell Biol Toxic*, **22**, 293–302.

Yost, R. A., et al. (1978). Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer. *J Am Chem Soc*, **100**, 2274–2275.

Young, J. (2003). Introduction In, Lipids for functional foods and nutraceuticals. *The Oily Press*, Bridgwater, UK, 2-3.

Zeni, A.L.B., Zomkowski, A.D.E., Maraschin, M., Rodrigues, A.L.S., Tasca, C.I. (2012). Ferulic acid exerts effect in the tail suspension test in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic system. *Eur J Pharmacol*, **679**, 68–74.

Zhao, Z.S., Khan, S., O'Brien, P.J. (1998). Catecholic iron complexes as cytoprotective superoxide scavengers against hypoxia: reoxygenation injury in isolated hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, **56**, 825-30.

Zheng, W. and Wang S. Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J Agric*, **49**, 5165- 5170.

Zhu, F., Xu, Z., Yonekura, L., Yang, R., Tamura, H. (2015). Antiallergic activity of rosmarinic acid esters is modulated by hydrophobicity, and bulkiness of alkyl side chain. *Biosc Biotechnol Biochem*, **79**, 1178–1182.

Zimmermann, B., Walch, S., Ngaba Tinzoh, L., Stuhlinger, W., Lachenmeier, D., (2011). Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). *J Chrom B*, **879**, 2459-2464.

Zweier, J.L., Flaherty, J.T., Weisfeldt, M.L. (1987). Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**, 1404-1407.

Zweier, J.L., Rayburn, B.K., Flaherty, J.T., Weisfeldt, M.L. (1987). Recombinant superoxide dismutase reduces oxygen free radical concentrations in reperfused myocardium. *J Clin Invest*, **80**, 1728-1734.

Βλάχου, Χ. (2010). Διερεύνηση του ρόλου του οξειδωτικού στρες και της ομοιοστασίας του σιδήρου σε παθολογικές καταστάσεις. Σχολή Ιατρικής. Ιωάννινα, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. 155.

8. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Δημοσιεύσεις της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής

Gerogianni, P.S., Chatziathanasiadou, M.V., Diamantis, D.A., Tzakos, A.G., Galaris, D. (2018). Lipophilic ester and amide derivatives of rosmarinic acid protect cells against H₂O₂-induced DNA damage and apoptosis: The potential role of intracellular accumulation and labile iron chelation. *Redox Biol*, **15**, 548-556.

Diamantis, D.A., Ramesova, S., Chatzigiannis, C.M., Degano, I., **Gerogianni, P.S.**, Karadima, K.E., Perikleous, S., Rekkas, D., Gerothanassis, I.P., Galaris, D., Mavromoustakos, T., Valsami, G., Sokolova, R., Tzakos, A.G. (2018). Exploring the oxidation and iron binding profile of a cyclodextrin encapsulated quercetin complex unveiled a controlled complex dissociation through a chemical stimulus. *Biochim Biophys Acta*, **1862**, 1913-1924.