



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**«Ανάπτυξη καινοτόμων μεθοδολογιών για την αξιοποίηση φυτοχημικών από
φαρμακευτικά φυτά της Ηπείρου, με στόχο την αναστολή της δράσης των ενζύμων
ελαστάσης, υαλουρονιδάσης και τυροσινάσης με σκοπό την ανάπτυξη καλλυντικού
προϊόντος»**

ΠΑΠΑΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

2021

ΙΩΑΝΝΙΝΑ



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
**Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



«Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ)»

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών
Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του
συγγραφέα Ν. 5343/32,
άρθρο 202, παράγραφος 2»

Creative Commons Αναφορά Όχι Παράγωγα Έργα Μη Εμπορική Χρήση (CC BY-NC-ND): Η άδεια αυτή επιτρέπει στο χρήστη να χρησιμοποιεί και μοιράζεται το αδειοδοτούμενο περιεχόμενο με την προϋπόθεση να κάνει αναφορά στο δημιουργό (π.χ. το συγγραφέα), το δικαιούχο (π.χ. τον εκδότη) και το φορέα που κάνει το περιεχόμενο διαθέσιμο (π.χ. το ΕΚΤ). Δεν επιτρέπει στο χρήστη να χρησιμοποιεί ή μοιράζεται το πρωτότυπο περιεχόμενο για εμπορικούς σκοπούς. Τέλος δεν επιτρέπει στο χρήστη να δημιουργεί νέα έργα βασισμένα στο πρωτότυπο περιεχόμενο.

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Συνέλευση: 961/ 22-12-2017

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Ανδρέας Τζάκος- Αναπληρωτής Καθηγητής

Μέλη:

Χαράλαμπος Σταμάτης- Καθηγητής

Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα- Καθηγήτρια

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 30-03-2018

Θέμα: «Ανάπτυξη καινοτόμων μεθοδολογιών για την αξιοποίηση φυτοχημικών από φαρμακευτικά φυτά της Ηπείρου, με στόχο την αναστολή της δράσης των ενζύμων ελαστάσης, υαλουρονιδάσης και τυροσινάσης με σκοπό την ανάπτυξη καλλυντικού προϊόντος»

Ορισμός Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής από τη Συνέλευση: 1041/19-07-2021

1. **Ανδρέας Τζάκος** (Επιβλέπων Καθηγητής), Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. **Χαράλαμπος Σταμάτης**, Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. **Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα**, Καθηγήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης
4. **Μιχαήλ Σίσκος**, Καθηγητής του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. **Βασίλειος Τσίκαρης**, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. **Θωμάς Μαυρομούστακος**, Καθηγητής του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
7. **Νικόλαος Κουρκουμέλης**, Αναπληρωτής Καθηγητής, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 15-12-2021

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας

Λουλούδη Μαρία, Καθηγήτρια

Η
Γραμματέας του
Τμήματος
Ξανθή

Τουτουτζόγλου

Creative Commons Αναφορά Όχι Παράγωγα Έργα Μη Εμπορική Χρήση (CC BY-NC-ND): Η άδεια αυτή επιτρέπει στο χρήστη να χρησιμοποιεί και μοιράζεται το αδειοδοτούμενο περιεχόμενο με την προϋπόθεση να κάνει αναφορά στο δημιουργό (π.χ. το συγγραφέα), το δικαιούχο (π.χ. τον εκδότη) και το φορέα που κάνει το περιεχόμενο διαθέσιμο (π.χ. το ΕΚΤ). Δεν επιτρέπει στο χρήστη να χρησιμοποιεί ή μοιράζεται το πρωτότυπο περιεχόμενο για εμπορικούς σκοπούς. Τέλος δεν επιτρέπει στο χρήστη να δημιουργεί νέα έργα βασισμένα στο πρωτότυπο περιεχόμενο.

Creative Commons Αναφορά Όχι Παράγωγα Έργα Μη Εμπορική Χρήση (CC BY-NC-ND): Η άδεια αυτή επιτρέπει στο χρήστη να χρησιμοποιεί και μοιράζεται το αδειοδοτούμενο περιεχόμενο με την προϋπόθεση να κάνει αναφορά στο δημιουργό (π.χ. το συγγραφέα), το δικαιούχο (π.χ. τον εκδότη) και το φορέα που κάνει το περιεχόμενο διαθέσιμο (π.χ. το ΕΚΤ). Δεν επιτρέπει στο χρήστη να χρησιμοποιεί ή μοιράζεται το πρωτότυπο περιεχόμενο για εμπορικούς σκοπούς. Τέλος δεν επιτρέπει στο χρήστη να δημιουργεί νέα έργα βασισμένα στο πρωτότυπο περιεχόμενο.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας, της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ανδρέα Τζάκου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Ανδρέα Τζάκο για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και τη στήριξη που μου έχει προσφέρει όλο το χρονικό διάστημα της συνεργασίας μας. Επίσης τον ευχαριστώ για την καθοδήγησή του και τις γνώσεις που μου προσέφερε καθώς και για το κίνητρο που μου έδινε κάθε φορά ώστε να βελτιώνομαι συνέχεια και να κατακτώ τους στόχους μου. Τον ευχαριστώ επίσης πολύ για την ηθική και υλική υποστήριξη που μου έχει προσφέρει κατά την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Χαράλαμπο Σταμάτη, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την όμορφη και θερμή συνεργασία, την υποστήριξη και τη βοήθεια που μου παρείχε όποτε τη χρειάστηκα. Επίσης, τον ευχαριστώ πολύ για την φιλοξενία του στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, όπου πραγματοποίησα ένα μέρος των πειραμάτων μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κ. Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την ευχάριστη συνεργασία, την θερμή υποστήριξη και τη βοήθεια που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά και όλα τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Μιχάλη Σίσκο, για την ευχάριστη συνεργασία και τις συμβουλές του όποτε τις χρειαζόμουν. Τον Καθηγητή κ. Βασίλειο Τσίκαρη, επίσης για την όμορφη συνεργασία, την υποστήριξη και τη βοήθειά του. Τον Καθηγητή κ. Θωμά Μαυρομούστακο για τη θερμή συνεργασία, την υποστήριξη και την βοήθειά του όποτε τη χρειαζόμουν. Και, τέλος τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νικόλαο Κουρκουμέλη για την υπέροχη συνεργασία, την υποστήριξη και τη βοήθειά του.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Ιωάννη Γεροθανάση για την πολύτιμη καθοδήγηση και τις γνώσεις που μου μετέδωσε στο αντικείμενο της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού. Τον ευχαριστώ επίσης για την προσοδοφόρα και ευχάριστη συνεργασία καθώς και για την υπομονή του και τον χρόνο που αφιέρωσε στο να μου εξηγεί οποιαδήποτε απορία και να μου διευκολύνει οποιαδήποτε δυσκολία είχα. Η συμβολή του στην εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής ήταν ιδιαίτερα σημαντική.

Επίσης, ένα θερμό ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω στο Δρ. κ. Ράμπια Θεόδωρο της Ακαδημίας Αθηνών, για την άψογη συνεργασία που έχουμε συνάψει. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα επίσης να δώσω και στον καθηγητή κ. Horacio Perez Sanchez του Πανεπιστημίου UCAM της Ισπανίας, για τη θερμή συνεργασία και για τη σημαντική συμβολή του στην ανάπτυξη της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων που έχουμε σχεδιάσει. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά

και την κ. Simona Golic-Grdaldonik, καθηγήτρια του τμήματος Μοριακής Δομής Βιομορίων του Εθνικού Ινστιτούτου Χημείας της Σλοβενίας, για την άψογη συνεργασία και την όμορφη και ζεστή φιλοξενία που μου προσέφερε στα πλαίσια συνεργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τον Καθηγητή Βιοχημείας κ. Αλέξανδρο Τσελέπη και τους συνεργάτες του Γιάννη Κουτσαλιάρη και Ηρακλή Μοσχονά για την όμορφη και άψογη συνεργασία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κ. Ελένη Σκαλτά, του Τμήματος Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και την κ. Κατερίνα Τόμου για τη θερμή, ευχάριστη και φιλική συνεργασία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Κέντρο NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη βοήθειά του στη λήψη των φασμάτων NMR.

Θα ήθελα ιδιαίτερα να δώσω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην Αλεξάνδρα Χατζηκωνσταντίνου, φίλη και συνεργάτη, για την ανεκτίμητη βοήθειά της και στήριξη όλα αυτά τα χρόνια. Κυρίως θα ήθελα να την ευχαριστήσω για όλο το χρόνο που αφιέρωσε όποτε χρειαζόμουν τη βοήθειά της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αλεξάνδρα Πριμικήρη για την υπέροχη συνεργασία, τις συμβουλές και τη στήριξη που μου έχει δώσει όλα αυτά τα χρόνια. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την Ελένη Αλεξανδρή, φίλη και συνεργάτη, για την άψογη συνεργασία, τη θερμή υποστήριξη και τις μοναδικές συζητήσεις και στιγμές που έχουμε μοιραστεί.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω στα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας και κυρίως τους: Μαρία Χατζηαθανασιάδου, Δημήτρη Διαμαντή, Σταυρούλα Κύρκου, Παναγιώτα Τσιγάρα, Ανδρονίκη Κωσταγιάννη, Βίκυ Παπακανάκη, Ιωάννα Παπαδοπούλου και Σπύρο Κατσάκο για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Μαρία Χατζηαθανασιάδου για την ανεκτίμητη συνεργασία της και τη θερμή υποστήριξή της και τις συμβουλές της όλα αυτά τα χρόνια. Ένα πολύ μεγάλο και θερμό ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω και στο Δημήτρη Διαμαντή για την πολύτιμη και άψογη συνεργασία του, την ανεξάντλητη βοήθειά του όποτε τη χρειαζόμουν, την εμπιστοσύνη και τη στήριξή του όλα αυτά τα χρόνια. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ξεχωριστά την Ανδρονίκη Κωσταγιάννη, τη Σταυρούλα Κύρκου και τη Γεωργία Παππά για την πολύτιμη βοήθεια και στήριξη που μου έχουν προσφέρει όλο αυτό τον καιρό. Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω και στα μέλη του Βιοϊατρικού και Αναλυτικού Κέντρου του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας, Νίκο Παρίση, Βασιλική Αναγνώστου και Βασίλη Γκάλπινο για τη θερμή και άψογη συνεργασία και στήριξη.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ θα ήθελα να πω σε όλους τους φίλους μου που έχουν σταθεί δίπλα μου όλο αυτόν τον καιρό, για την πολύτιμη φιλία τους, την εμπύχωση σε επαγγελματικό αλλά και σε προσωπικό επίπεδο, και κυρίως για την κατανόηση που έχουν δείξει σε δύσκολες περιόδους, όπου δεν σταματάνε να με υποστηρίζουν και να με βοηθάνε.

Το πιο μεγάλο, πιο θερμό και πιο πολύτιμο ευχαριστώ θέλω να το πω στην οικογένειά μου, στους γονείς μου Δημήτρη και Ελένη, και στην αδερφή μου Μαρίλλη, για την ανεξάντλητη αγάπη τους, την πολύτιμη υποστήριξή τους σε κάθε μου βήμα, αλλά κυρίως για το ήθος, τις

αξίες, και το σεβασμό που μου έχουν καλλιεργήσει από την παιδική μου ηλικία, ώστε πιστεύω στον εαυτό μου και να στηρίζομαι στις δικές μου δυνατότητες ώστε να αντιμετωπίζω οποιαδήποτε δυσκολία συναντήσω. Η οικογένειά μου πάντα θα αποτελεί πηγή έμπνευσης και δύναμης σε όλους τους τομείς της ζωής μου αλλά και κίνητρο για να ακολουθώ τα όνειρά μου και να πραγματοποιώ τους στόχους μου. Γι αυτό και αφιερώνω τη διδακτορική μου διατριβή στην οικογένεια μου!

Creative Commons Αναφορά Όχι Παράγωγα Έργα Μη Εμπορική Χρήση (CC BY-NC-ND): Η άδεια αυτή επιτρέπει στο χρήστη να χρησιμοποιεί και μοιράζεται το αδειοδοτούμενο περιεχόμενο με την προϋπόθεση να κάνει αναφορά στο δημιουργό (π.χ. το συγγραφέα), το δικαιούχο (π.χ. τον εκδότη) και το φορέα που κάνει το περιεχόμενο διαθέσιμο (π.χ. το ΕΚΤ). Δεν επιτρέπει στο χρήστη να χρησιμοποιεί ή μοιράζεται το πρωτότυπο περιεχόμενο για εμπορικούς σκοπούς. Τέλος δεν επιτρέπει στο χρήστη να δημιουργεί νέα έργα βασισμένα στο πρωτότυπο περιεχόμενο.

Creative Commons Αναφορά Όχι Παράγωγα Έργα Μη Εμπορική Χρήση (CC BY-NC-ND): Η άδεια αυτή επιτρέπει στο χρήστη να χρησιμοποιεί και μοιράζεται το αδειοδοτούμενο περιεχόμενο με την προϋπόθεση να κάνει αναφορά στο δημιουργό (π.χ. το συγγραφέα), το δικαιούχο (π.χ. τον εκδότη) και το φορέα που κάνει το περιεχόμενο διαθέσιμο (π.χ. το ΕΚΤ). Δεν επιτρέπει στο χρήστη να χρησιμοποιεί ή μοιράζεται το πρωτότυπο περιεχόμενο για εμπορικούς σκοπούς. Τέλος δεν επιτρέπει στο χρήστη να δημιουργεί νέα έργα βασισμένα στο πρωτότυπο περιεχόμενο.

Περίληψη

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει σκοπό τη μελέτη και ανάπτυξη εκχυλισμάτων από επιλεγμένα φαρμακευτικά φυτά και βότανα με πλούσιο αντιοξειδωτικό προφίλ και ισχυρή αντιγηραντική και αντιμελανογενετική δράση, με στόχο την αξιοποίησή τους από φαρμακευτικές εταιρείες για την ανάπτυξη καλλυντικών προϊόντων βασισμένων σε φυσικά προϊόντα. Τα φαρμακευτικά φυτά έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον αρκετά, λόγω των ποικίλων βιολογικών δράσεων που παρουσιάζουν και χρησιμοποιούνται ως θεραπεία για την αντιμετώπιση αρκετών παθοφυσιολογικών καταστάσεων και ασθενειών. Όλα τα φαρμακευτικά φυτά αφθονούν σε δευτερογενείς μεταβολίτες (ο αριθμός των οποίων ξεπερνάει το 1.000.000), στους οποίους οφείλουν τις υψηλές αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές και πολλές άλλες ιδιότητές τους. Από την άλλη, οι δομές μεγάλου αριθμού δευτερογενών μεταβολιτών έχουν χρησιμοποιηθεί σαν πρόδρομα μόρια για την ανάπτυξη και σύνθεση καινούριων φαρμάκων με ενισχυμένη δράση. Η συμβολή τους στην ανάπτυξη φαρμάκων, τροφίμων και καλλυντικών είναι καίριας σημασίας για τη συνεχή αναζήτηση καινούριων φαρμακευτικών προϊόντων με σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας και του προσδόκιμου ζωής.

Τα προβλήματα που προκαλούνται στην υγεία του δέρματος και τα οποία αποτελούν κυρίως αποτέλεσμα της υπερβολικής έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία, απασχολούν πλέον όλο και περισσότερο τους ερευνητές. Τα αποτελέσματα που επιφέρει η απορρόφηση της UVA ακτινοβολίας από το δέρμα αφορούν κυρίως την ανάπτυξη βλαβών στο DNA και την υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών. Ομοίως, η απορρόφηση της UVB ακτινοβολίας από την επιδερμίδα προκαλεί ηλιακά εγκαύματα, χρωματισμούς του δέρματος καθώς και ανάπτυξη ερυθήματος. Όλα αυτά, οδηγούν στην ανάπτυξη μελανώματος (καρκίνου του δέρματος) το οποίο αποτελεί έναν από τους βασικούς τύπους καρκίνου. Από την άλλη, η “υποβάθμιση” της ακεραιότητας του δέρματος πραγματοποιείται και ενδογενώς από πολλούς ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες, οδηγώντας σταδιακά στην απώλεια της υγείας του, με αποτέλεσμα τη σταδιακή γήρανσή του. Η πρόωρη γήρανση του δέρματος και η ανάπτυξη μελανώματος ενδιαφέρουν αρκετά τις φαρμακευτικές εταιρείες αλλά και τις εταιρείες καλλυντικών οι οποίες προσπαθούν συνεχώς να βρίσκουν αποτελεσματικούς παράγοντες για την προστασία της υγείας του δέρματος.

Σε αυτόν τον προβληματισμό την απάντηση την έχει δώσει η φύση, καθώς περιέχει αρκετούς φυσικούς θησαυρούς οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά σε καλλυντικά προϊόντα λόγω του υψηλού αντιοξειδωτικού και βιοδραστικού προφίλ τους. Ωστόσο, η συνεχής αναζήτηση καινούριων φυσικών πηγών παραμένει αέναη.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν φυτά από την ευρύτερη περιοχή της Ηπείρου, με σκοπό τη χρήση τους ως φαρμακευτικοί παράγοντες στην ανάπτυξη καλλυντικών προϊόντων. Τα φυτά που επιλέχθηκαν για μελέτη είναι τα: *Melissa Officinalis* (Μελισσόχορτο), *Rosmarinus Officinalis* (Δεντρολίβανο), *Salvia Officinalis* (Φασκόμηλο), *Thymus Vulgaris* (Θυμάρι), *Origanum Vulgare* (Ρίγανη), *Cistus Albidus* (Λαδανιά), και *Hypericum Perforatum*

(Βαλσαμόχορτο). Συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν εκχυλίσματα των φυτών αυτών, τα οποία μελετήθηκαν για τις αντιοξειδωτικές τους δράσεις, αλλά και για τις ανασταλτικές τους ιδιότητες έναντι τριών ενζύμων που σχετίζονται με την πρόωρη γήρανση του δέρματος και την ανάπτυξη μελανώματος: ελαστάση, υαλουρονιδάση και τυροσινάση. Για τη μελέτη των εκχυλισμάτων εφαρμόστηκαν μεθοδολογίες οι οποίες βασίζονται κυρίως στην φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance-NMR).

Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε λεπτομερής μελέτη της διερεύνησης των συνθηκών εκχύλισης που εφαρμόστηκαν για την παραγωγή εκχυλισμάτων με πλούσιο φυτοχημικό προφίλ. Επίσης, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών ομάδων και η αντιοξειδωτική τους ικανότητα με εφαρμογή βασικών *in vitro* μεθοδολογιών.

Προκειμένου να γίνει αποτελεσματικός και σαφής προσδιορισμός της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών ομάδων που περιέχονται στα πολύπλοκα φυτικά εκχυλίσματα, αναπτύχθηκε στη συνέχεια η μεθοδολογία NMR-TotPhe. Τα αποτελέσματα της μεθοδολογίας NMR-TotPhe συνεκρίθησαν με τα αντίστοιχα αποτελέσματα της *in vitro* μεθοδολογίας Folin-Ciocalteu, η αποτελεσματικότητα της οποίας έχει τεθεί αρκετά υπό αμφισβήτηση. Επιπλέον μελέτες ενίσχυσαν την αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας NMR-TotPhe. Στη συνέχεια, η μεθοδολογία NMR-TotPhe αξιοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών των αιθανολικών εκχυλισμάτων μέσω του χαρακτηρισμού των φαινολικών (-OH) ομάδων. Επίσης, πραγματοποιήθηκε και ποσοτικός προσδιορισμός των επιμέρους βιοδραστικών συστατικών με συνδυασμό μεθοδολογιών NMR, χωρίς να προηγηθεί διαχωρισμός των μειγμάτων στα συστατικά του.

Αφού συλλέχθηκαν όλα τα δεδομένα για την παραγωγή εκχυλισμάτων πλούσιων σε αντιοξειδωτικές ουσίες, στη συνέχεια έγινε λεπτομερής μελέτη των τριών ενζύμων-στόχων: ελαστάση, υαλουρονιδάση και τυροσινάσης όπου αποτέλεσε βάση για την ανάπτυξη της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων ANTIAGE-DB, η οποία παρέχει πληροφορίες από *in silico* υπολογισμούς για την περιγραφή του προφίλ αλληλεπίδρασης φυσικών προϊόντων και με τα τρία ένζυμα-στόχους. Η ανάπτυξη της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων ANTIAGE-DB βασίστηκε στη συλλογή πληροφοριών που αφορούν όλους τους φυσικούς δευτερογενείς μεταβολίτες και τις φυσικές πηγές τους που έχουν ήδη μελετηθεί για τις ανασταλτικές ιδιότητές τους ως προς τα τρία ένζυμα-στόχους.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται λεπτομερής μελέτη των ενζυμικών αντιδράσεων των τριών ενζύμων-στόχων, καθώς και της αναστολής τους από τα παραγόμενα εκχυλίσματα. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε κυρίως με εφαρμογές της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), όπου και αναπτύχθηκε και η μεθοδολογία NMR-Cosmetube για την *in situ* μελέτη των ενζυμικών αντιδράσεων σε πραγματικό χρόνο, όπως αυτές εξελίσσονται σε ένα σωληνάκι NMR. Πραγματοποιήθηκε επίσης ταυτοποίηση των ενδιάμεσων και των προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων, όπου αυτό ήταν εφικτό, χωρίς να διακοπεί η ενζυμική αντίδραση, ή να γίνει διαχωρισμός του μείγματος στα συστατικά του. Ακόμη, στα πλαίσια της ανάπτυξης της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη των ενζυμικών αντιδράσεων, πραγματοποιήθηκε μελέτη της αναστολής της κάθε ενζυμικής αντίδρασης από

φυσικό προϊόν και από φυτικό εκχύλισμα, προκειμένου να προσδιοριστεί το ποσοστό της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία αναστολέα, με άμεση μέτρηση της συγκέντρωσης του προϊόντος που παράγεται κάθε φορά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη της αλληλεπίδρασης ενός φυσικού προϊόντος και ενός φυτικού εκχυλίσματος με το κάθε ένζυμο σε ατομικό επίπεδο μέσω μεθοδολογιών της Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Αυτή η μελέτη πραγματοποιήθηκε προκειμένου να προσδιοριστεί το ενδεχόμενο στερεοεκλεκτικότητας κάθε ενζύμου, έτσι ώστε να ξεχωρίσουν εκείνοι οι αναστολείς που βρίσκονται σε πολύπλοκα φυτικά μείγματα και που αλληλεπιδρούν με το ενεργό κέντρο των ενζύμων, επηρεάζοντας την δραστηριότητά τους.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη των ενζυμικών αντιδράσεων, αποτέλεσαν βασικό βήμα για την ενίσχυση της λειτουργικότητας της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube. Αυτό επιτεύχθη με τη δοκιμή μιας *in situ* μελέτης και των τριών ενζυμικών αντιδράσεων (τυροσινάση, υαλουρονιδάση και ελαστάση), όταν αυτές πραγματοποιούνται ταυτόχρονα σε ένα κοινό υδατικό περιβάλλον, μέσα στο ίδιο σωληνάκι NMR. Η προσπάθεια αυτή έγινε με σκοπό η μεθοδολογία NMR-Cosmetube να μπορεί να εφαρμόζεται στη μελέτη και ανάπτυξη φυσικών προϊόντων και πολύπλοκων μειγμάτων που θα στοχεύουν ταυτόχρονα σε περισσότερους από έναν ενζυμικούς στόχους. Η ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube αποτελεί πρωταρχικό στάδιο μελετών, με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στο πεδίο ανάπτυξης όχι μόνο καλλυντικών, αλλά και φαρμάκων που θα στοχεύουν σε περισσότερους από έναν στόχους, όχι μόνο ενζυμικούς αλλά και πρωτεϊνικούς με σκοπό την αντιμετώπιση ασθενειών και διάφορων άλλων παθοφυσιολογικών καταστάσεων.

Λέξεις-Κλειδιά: Τυροσινάση, Ελαστάση, Υαλουρονιδάση, NMR-Cosmetube, Φαρμακευτικά Φυτά, φυτικά εκχυλίσματα, *In situ* NMR, Ενζυμική αντίδραση, αναστολείς, φυσικά προϊόντα, αντιγηραντική δράση, μελάνωμα, πρόωρη γήρανση

Abstract

The present PhD thesis aims at studying and developing highly antioxidant, antiaging and antimelanogenic plant extracts, deriving from various medicinal plants and herbs, in order to be fully exploited from pharmaceutical and cosmetic companies for the development of cosmetic products based on natural substances. Medicinal plants have been the center of interest for so many years, due to their various biological properties against many diseases or other pathophysiological conditions, including neoplasia. All medicinal plants are abundant in secondary metabolites (the number of which exceeds 1.000.000), to which they owe their high antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, anti-cancer, as well as various other biological properties. On the other hand, the majority of the natural secondary metabolites have been used as structural scaffolds for the development and synthesis of new drugs with enhanced properties. The contribution of the natural secondary metabolites to the development of drugs, food agents, as well as cosmetic agents is of crucial importance for the continuous search of new medicinal agents in order to improve both the quality and life expectancy.

Skin health disfunction, which is mainly the result of the excessive exposure to sunlight, is increasingly of concern to researchers. The effects occurring from the absorption of UVA radiation by the skin are mainly related to the development of DNA damage and excessive production of free radicals. Similarly, the absorption of UVB radiation by the skin can lead to sunburn, skin discoloration, as well as development of erythema. All these lead to the development of melanoma (skin cancer), which is one of the main types of cancer. On the other hand, the “degradation” of the skin is carried out through endogenous and exogenous factors, leading to the gradual loss of its health, resulting in its gradual aging. Premature skin aging as well as the development of melanoma are of great interest to pharmaceutical and cosmetic companies which are constantly trying to find effective factors for the beneficial protection of skin health.

Regarding this general concern, nature has consisted a very effective solution, as it contains several natural treasures that have been used effectively as agents in cosmetic products, due to their high antioxidant and bioactive profile. However, there is an endless search for the discovery and development of new natural resources.

In the present PhD thesis, a number of medicinal plants, originated from the wider region of Epirus were studied, in order to be used as medicinal and cosmetic agents in the development of new cosmetic products. The selected plants are the following: *Melissa Officinalis* (Lemon Balm), *Rosmarinus Officinalis* (Rosemary), *Salvia Officinalis* (Sage), *Thymus Vulgaris* (Thyme), *Origanum Vulgare* (Oregano), *Cistus Albidus* (Rock flower) and *Hypericum Perforatum* (St. John’s Wort). Specifically, different plant extracts were prepared and studied for their antioxidant properties, as well as for their inhibitory properties against three enzymes associated with premature skin aging and melanoma development: elastase, hyaluronidase and tyrosinase. The study of the plant extracts was mainly based on Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy.

Firstly, a detailed study was carried out in order to investigate the extraction conditions which were applied to the production of plant extracts with a rich phytochemical profile. In addition, the concentration of the total phenolic content as well as the antioxidant capacity of the developed extracts were determined by applying established *in vitro* assays.

In order to be a sufficient and clear determination of the concentration of the total phenolic content of complicated crude plant extracts, a new methodology termed NMR-TotPhe was developed. The results of the NMR-TotPhe methodology were compared with the corresponding results of the *in vitro* Folin-Ciocalteu assay, the effectiveness of which has been widely set under many doubts. The results proved the effectiveness and accuracy of the NMR-TotPhe protocol for the precise determination of the concentration of the total phenolic content in complicated crude plant extracts. Additional *in vitro* experiments for the study of the effect of H₂O₂ in DNA damage of U2OS cells also proved the effective function of the NMR-TotPhe protocol. In a next step, the NMR-TotPhe protocol has been exploited for the identification of various phenolic components included in ethanolic extracts, through the determination of the phenolic (-OH) groups. In addition, the identified bioactive components were quantified using a series of methodologies based on NMR spectroscopy, without any previous derivatization of the mixtures into their components.

After collecting all the data for the development of plant extracts highly abundant in antioxidants, a detailed study of the three targeted enzymes (elastase, hyaluronidase and tyrosinase) was conducted. This study included the basis for the development of the ANTIAGE database, which provides information producing through *in silico* calculations for the description of the interaction profile of natural products with all the three enzyme targets. The ANTIAGE database was built using as scaffold all the information related to all the natural secondary metabolites as well as their natural sources that have already been studied for their inhibitory properties towards the three targeted enzymes.

In a next step, a detailed study of the enzymatic reactions of the three targeted enzymes is then performed, as well as their inhibition by the developed plant extracts. This study was mainly carried out through a developed methodology based on the Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy, for the *in situ* study of the enzymatic reactions in real time, as they evolve in an NMR tube. This methodology is termed NMR-Cosmetube. In addition, the occurring intermediates, as well as the enzymatic products were also identified, where possible, without interrupting the enzymatic reaction or even without separating the enzymatic mixture into its constituents. Furthermore, regarding the development of the NMR-Cosmetube for the study of enzymatic reactions, a detailed study of the inhibition of each enzymatic reaction by a natural product or a plant extract was performed in order to determine the rate of efficiency of the enzymatic reaction in presence of an inhibitor. A study on the interaction of a natural product or a plant extract with each targeted enzyme at an atomic level was then performed, through Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR). This specific study was performed in order to determine the potential of stereoselectivity regarding each targeted enzyme, so as to distinguish those inhibitors that are in complex plant mixtures and interact with the active site of

the enzymes, affecting their activity. The results showed that there could be an effective distinction of the specific components of complicated mixtures which interact with the selected enzyme.

The results obtained from the study of the enzymatic reactions constituted a key step regarding the enhancement of the functionality of the NMR-Cosmetube methodology. This fact was achieved through the application of an *in situ* study of all the three enzymatic reactions (tyrosinase, hyaluronidase and elastase), when they were performed simultaneously in a common aqueous medium, sharing the same NMR tube. This effort was made in order to enhance the effectiveness of the NMR-Cosmetube methodology, which could be applied to the study and development of natural products as well as complex mixtures that would all at once target more than one enzymes. The development of the NMR-Cosmetube includes a primary set of studies, yet with promising results in the field of development not only of cosmetics, but also of drugs that will target not only more than one enzymes, but also other proteinic targets for the effective treatment of diseases as well as various other pathophysiological conditions.

Creative Commons Αναφορά Όχι Παράγωγα Έργα Μη Εμπορική Χρήση (CC BY-NC-ND): Η άδεια αυτή επιτρέπει στο χρήστη να χρησιμοποιεί και μοιράζεται το αδειοδοτούμενο περιεχόμενο με την προϋπόθεση να κάνει αναφορά στο δημιουργό (π.χ. το συγγραφέα), το δικαιούχο (π.χ. τον εκδότη) και το φορέα που κάνει το περιεχόμενο διαθέσιμο (π.χ. το ΕΚΤ). Δεν επιτρέπει στο χρήστη να χρησιμοποιεί ή μοιράζεται το πρωτότυπο περιεχόμενο για εμπορικούς σκοπούς. Τέλος δεν επιτρέπει στο χρήστη να δημιουργεί νέα έργα βασισμένα στο πρωτότυπο περιεχόμενο.

Συντμήσεις – Συμβολισμοί

Arg	Αργινίνη
Asp	Ασπαρτικό οξύ
BSA	Αλβουμίνη από ορό βοός
Cu²⁺	Ιόντα χαλκού
Cys	Κυστεΐνη
D₂O	Δευτεριωμένο νερό
DCI	Δευτεριωμένο υδροχλωρικό οξύ
DHI	5,6-διυδροξυινδόλη
DHICA	5,6-διυδροξυκαρβοξυλικό οξύ
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DOSY	Φασματοσκοπία Διάχυσης
DPPH	2,2-Διφαινυλο-1-πικρυλυδραζίδιο
ER	Ενδοπλασματικό Δίκτυο
ES	Σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος
GAG	Γλυκοζαμινογλυκάνη
GlcA	D-Γλυκουρονικό οξύ
GlcNAc	N-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνη
Glu	Γλουταμικό οξύ
Gly	Γλυκίνη
H₂O₂	Υπεροξειδίο του υδρογόνου
HA	Υαλουρονικό οξύ
His	Ιστιδίνη
Hyal	Υαλουρονιδάση
HNE	Ανθρώπινη ουδετερόφιλη ελαστάση
HSQC	Ετεροπυρηνική συσχέτιση μέσω απλού κβάντου
HMBC	Ετεροπυρηνική συσχέτιση μέσω πολλαπλών δεσμών
kDa	kiloDaltons
K_m	Σταθερά Michaelis-Menten
L-Dopa	L-3,4-Διυδροξυφαινυλαλανίνη
Leu	Λευκίνη
NaOD	Δευτεριωμένο υδροξείδιο του νατρίου
Na₂CO₃	Ανθρακικό νάτριο
NMR	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
NMR-TotPhe	Συνολικά φαινορικά μέσω NMR
p-NA	παρα-νιτροανιλίνη

Phe	Φαινυλαλανίνη
PPE	Παγκρεατική ελαστάση χοίρου
RNS	Δραστικές ελεύθερες ρίζες αζώτου
ROS	Δραστικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου
Ser	Σερίνη
SC₅₀	Δείκτης ικανότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών
STD	Διαφορά μεταφοράς κορεσμού
STD_{AMP}	Παράγοντας αλληλεπίδρασης
TMSP-d₄	Δευτεριωμένο τριμεθυλσιλυπτροπιονικό-3- νάτριο
TFA	Τριφθοροξικό οξύ
TOCSY	Ομοπυρηνική Συσχέτιση μέσω Πολλαπλών Δεσμών
Tris-HCl	Τρις (υδροξυμεθυλ) αμινομεθάνιο υδροχλώριο
Tris-DCI	Δευτεριωμένο τρις (υδροξυμεθυλ) αμινομεθάνιο υδροχλώριο
Trp	Τρυπτοφάνη
Tyr	Τυροσίνη
UVA	Υπεριώδης ακτινοβολία Α
UVB	Υπεριώδης ακτινοβολία Β
UV-Vis	Υπεριώδες-ορατό
V_{max}	Μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης
Val	Βαλίνη

Creative Commons Αναφορά Όχι Παράγωγα Έργα Μη Εμπορική Χρήση (CC BY-NC-ND): Η άδεια αυτή επιτρέπει στο χρήστη να χρησιμοποιεί και μοιράζεται το αδειοδοτούμενο περιεχόμενο με την προϋπόθεση να κάνει αναφορά στο δημιουργό (π.χ. το συγγραφέα), το δικαιούχο (π.χ. τον εκδότη) και το φορέα που κάνει το περιεχόμενο διαθέσιμο (π.χ. το ΕΚΤ). Δεν επιτρέπει στο χρήστη να χρησιμοποιεί ή μοιράζεται το πρωτότυπο περιεχόμενο για εμπορικούς σκοπούς. Τέλος δεν επιτρέπει στο χρήστη να δημιουργεί νέα έργα βασισμένα στο πρωτότυπο περιεχόμενο.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή.....	8
A. Θεωρητικό μέρος	8
1.1 Φαρμακευτικά φυτά	8
1.1.1 <i>Melissa Officinalis L.</i> (Lemon Balm-Μελισσόχορτο):	10
1.1.2 <i>Rosmarinus Officinalis L.</i> (Rosemary-Δεντρολίβανο):.....	11
1.1.3 <i>Salvia Officinalis L.</i> (Sage-Φασκόμηλο):.....	11
1.1.4 <i>Thymus Vulgaris L.</i> (Thyme-Θυμάρι):	12
1.1.5 <i>Origanum Vulgare L.</i> (Oregano-Ρίγανη):.....	13
1.1.6 <i>Cistus Albidus L.</i> (Rock flower-Λαδανιά ή λάδανο):.....	14
1.1.7 <i>Hypericum Perforatum L.</i> (St. John's wort-Βαλσαμόχορτο):	15
1.2 Οι πολυφαινόλες και η σημασία τους.....	15
1.2.1 Φλαβονοειδή και ελεύθερες ρίζες	19
1.3 Το δέρμα και οι μηχανισμοί γήρανσής του	20
1.3.1 Η γήρανση του δέρματος	22
1.3.2 Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών στη γήρανση του δέρματος	22
1.3.3 Μηχανισμός δράσης των ελεύθερων ριζών (ROS) στη γήρανση	24
1.3.4 Μηχανισμοί δράσης της υπεριώδους ακτινοβολίας στην καταστροφή/γήρανση του δέρματος	25
1.4 Ένζυμα που εμπλέκονται στην πρόωρη γήρανση του δέρματος	26
1.4.1 Σερινοπρωτεάσες (Ουδετερόφιλη Ελαστάση).....	27
1.4.2 Ελαστίνη: Το φυσικό υπόστρωμα των ελαστών και η βιολογική της σημασία... ..	27
1.4.3 Γλυκοσιδάσες (Υαλουρονιδάσες)	29
1.4.4 Το υαλουρονικό οξύ: το φυσικό υπόστρωμα των υαλουρονιδασών και η βιολογική του σημασία	29
1.4.5 Οξειδάσες (Τυροσινάση).....	31
1.4.6 Η μελανίνη: Το φυσικό προϊόν της δράσης της τυροσινάσης.....	32
B. Περιγραφή μεθοδολογιών	32
1.5 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων	32
1.5.1 Εξίσωση Michaelis-Menten	33
1.5.2 Μελέτη αναστολής ενζύμων	35
1.6. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)	35
1.6.1 Αρχή Μεθόδου	36
1.6.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Δύο Διαστάσεων	36
1.6.3 Το πείραμα επιλεκτικής ολικής συσχέτισης μιας διάστασης (Selective 1D TOCSY).....	39
1.6.4 Εφαρμογή της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού στη μελέτη του φυτοχημικού προφίλ και των δευτερογενών μεταβολιτών των φαρμακευτικών φυτών	40
1.6.5 NMR και ενζυμική κατάλυση.....	41
1.6.6 Φασματοσκοπία Διάχυσης (Diffusion Ordered Spectroscopy- DOSY NMR) στη μελέτη των ενζυμικών αντιδράσεων.....	41
1.6.7 Φασματοσκοπία Διαφοράς Μεταφοράς Κορεσμού (Saturation Transferred Difference Spectroscopy-STD NMR).....	42
1.6.8 Δομική πληροφορία του υποκαταστάτη: Χαρτογράφηση του επιτόπου πρόσδεσης..	44
1.6.9 Το πυρηνικό φαινόμενο Overhauser (The Nuclear Overhauser Effect)	45
1.7 Θεωρία Συναρτησιακών της Πυκνότητας (Density Functional Theory-DFT)	46

1.8	<i>In vitro</i> μεθοδολογίες προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης.....	47
1.8.1	Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ομάδων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu	47
1.8.2	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο μελέτης σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH*	47
Γ.	Σκοπός	49
	Κεφάλαιο 2: Παραγωγή εκχυλισμάτων από φαρμακευτικά φυτά και μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης.....	52
2.1	Βελτιστοποίηση συνθηκών εκχύλισης	52
2.2.	Πειραματικό μέρος.....	53
2.2.A	Υλικά.....	53
2.2.A.1	Φαρμακευτικά Φυτά	53
2.2.B	Μέθοδοι.....	53
2.2.B.1	Προετοιμασία δείγματος.....	53
2.2.B.1.1	Επίδραση της μηχανικής κατεργασίας του φυτού πριν από την εκχύλιση (κονιοποίηση/μη κονιοποίηση).....	53
2.2.B.1.2	Επίδραση του διαλύτη εκχύλισης.....	53
2.2.B.1.3	Επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου εκχύλισης.....	53
2.2.B.2	Ανάλυση (σάρωση) των εκχυλισμάτων με φασματοσκοπία NMR	54
2.2.B.3	Τιτλοδοτήσεις με δευτεριωμένο τριφθοροξικό οξύ (TFA-d)	55
2.2.B.4	<i>In vitro</i> προσδιορισμός των συνολικών φαινολικών συστατικών, με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu	55
2.2.B.5	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με δέσμευση της ρίζας DPPH:.....	55
2.3	Αποτελέσματα-Συζήτηση	56
2.3.1	Αποτελέσματα από τη διερεύνηση των συνθηκών εκχύλισης των παραγόμενων εκχυλισμάτων, με εφαρμογή 1D ¹ H φασματοσκοπίας NMR	56
2.3.1.1	Διερεύνηση του διαλύτη εκχύλισης	57
2.3.1.2	Διερεύνηση της μηχανικής κατεργασίας του φυτού πριν από την εκχύλιση	62
2.3.1.3	Διερεύνηση του χρόνου και της θερμοκρασίας εκχύλισης.....	70
2.3.2	Αποτελέσματα <i>in vitro</i> μεθοδολογιών προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης.....	78
2.3.2.1	Αποτελέσματα από τον <i>in vitro</i> προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών ομάδων των παραγόμενων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	78
2.3.2.2	Αποτελέσματα από την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο μελέτης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH:	79
	Γενικά Συμπεράσματα Κεφαλαίου.....	82
	Κεφάλαιο 3: Ανάπτυξη νέας μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό του συνολικού φαινολικού περιεχομένου στα φυτά και σύγκριση με τη μεθοδολογία Folin-Ciocalteu (FC)- Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός των φυτοχημικών συστατικών των εκχυλισμάτων με εφαρμογές φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance-NMR)	84
3.1.1	Προσδιορισμός συνολικού φαινολικού περιεχομένου σε πολύπλοκα δείγματα	84
3.1.2	Ανάπτυξη μεθοδολογίας που βασίζεται στη Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) για τον προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών υδροξυλομάδων	85
3.2.	Υλικά και Μέθοδοι	87
3.2.A	Υλικά.....	87
3.2.A.1	Φαρμακευτικά φυτά	87
3.2.A.2	Πρότυπες ουσίες	87
3.2.B	Μέθοδοι.....	87

3.2.B.1 Παραγωγή εκχυλισμάτων	87
3.2.B.2 Παρασκευή των διαλυμάτων των πρότυπων ουσιών και των μειγμάτων τους και των φυτικών εκχυλισμάτων.....	87
3.2.B.3 <i>In vitro</i> προσδιορισμός της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών ομάδων, με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu	88
3.2.B.4 Προετοιμασία των δειγμάτων των πρότυπων ουσιών για την εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-TotPhe.....	88
3.2.B.5 Εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-TotPhe	88
3.2.B.6 Τιτλοδοτήσεις των δειγμάτων με διαλύτη δευτεριωμένο νερό (D ₂ O).....	88
3.2.B.7 Αξιοποίηση της μεθοδολογίας NMR-TotPhe για τον ποιοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών σε μελετούμενα εκχυλίσματα	89
3.3.3. Αποτελέσματα-Συζήτηση	89
3.3.1 Σύγκριση των μεθοδολογιών NMR-TotPhe και Folin-Ciocalteu σε πρότυπες ενώσεις ...	89
3.3.2 Σύγκριση των μεθοδολογιών NMR-TotPhe και Folin Ciocalteu σε φυτικά εκχυλίσματα ..	92
3.3.3 <i>In vitro</i> βιολογική αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των μελετούμενων πρότυπων ουσιών και εκχυλισμάτων σε κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη στο DNA	94
3.3.4 Σύγκριση των μεθοδολογιών NMR-TotPhe και Folin-Ciocalteu για τον προσδιορισμό του συνολικού περιεχομένου των φαινολικών (-OH) ομάδων στα παραγόμενα εκχυλίσματα	98
3.3.5 Ποιοτική ανάλυση του φυτοχημικού προφίλ των αιθανολικών εκχυλισμάτων μέσω της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	99
3.3.5.1 Ταυτοποίηση φαινολικών συστατικών αιθανολικών εκχυλισμάτων με χαρακτηρισμό των φαινολικών (-OH) ομάδων με εφαρμογή 1D ¹ H NMR φασματοσκοπίας	99
3.3.5.2 Ταυτοποίηση των περιεχόμενων φαινολικών συστατικών με χαρακτηρισμό των - OH ομάδων με εφαρμογή 2D ¹ H- ¹³ C HMBC NMR φασματοσκοπίας.....	103
3.3.5.3 Ποιοτική ανάλυση περιεχόμενων συστατικών των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο προσθήκης πρότυπης ουσίας (spiking)	109
3.3.5.4 Ποιοτική ανάλυση περιεχόμενων συστατικών των εκχυλισμάτων με συνδυασμό μεθόδων προσθήκης πρότυπης ουσίας (spiking)- Selective 1D TOCSY.....	110
3.3.5.5 Ποσοτικός προσδιορισμός των δευτερογενών μεταβολιτών στα αιθανολικά φυτικά εκχυλίσματα μέσω μεθοδολογιών της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)	118
Γενικά Συμπεράσματα Κεφαλαίου.....	120
Κεφάλαιο 4: Φυσικά προϊόντα που στοχεύουν την ελαστάση, την υαλουρονιδάση και την τυροσινάση: Ανάπτυξη της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων ANTIAGE-DB για την πρόβλεψη συστατικών με αντιγηραντική δράση.....	121
4.1.1 Ένζυμα που σχετίζονται με την πρόωρη γήρανση του δέρματος.....	123
4.1.1.1 Ανθρώπινη Ουδετερόφιλη Ελαστάση (Human Neutrophil Elastase-HNE)-Μια σερινοπρωτεάση.....	123
4.1.1.2 Δομή της ελαστάσης	123
4.1.1.3 Φυτοχημικά ως φυσικοί αναστολείς της ελαστάσης.....	125
4.1.2.1 Υαλουρονιδάση (Hyal)- Μια γλυκοσιδάση.....	127
4.1.2.2. Η δομή των υαλουρονιδασών	129
4.1.2.3 Φυτοχημικά ως φυσικοί αναστολείς της υαλουρονιδάσης	130
4.1.3.1 Τυροσινάση- Μια πολυφαινολοξειδάση	131
4.1.3.2 Η δομή της τυροσινάσης.....	132
4.1.3.3 Δράση της τυροσινάσης.....	132
4.1.3.4 Φυτοχημικά ως φυσικοί αναστολείς της τυροσινάσης.....	133
4.3 Η ηλεκτρονική βάση δεδομένων ANTIAGE-DB	134
4.3.1. Εισαγωγή στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων ANTIAGE-DB	134

4.3.2. Μέθοδοι	135
4.3.3 Σχεδιασμός της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων ANTIAGE-DB	136
Γενικά Συμπεράσματα Κεφαλαίου.....	145
Κεφάλαιο 5: Ένζυμα που σχετίζονται με τη γήρανση και την ανάπτυξη μελανώματος. Ανάπτυξη μεθοδολογιών για τη μελέτη ενζυμικών αντιδράσεων και της αναστολής τους από φυσικά προϊόντα και φυτικά εκχυλίσματα	146
Κεφάλαιο 5.1: Ανάπτυξη μεθοδολογίας για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης και αναστολής της τυροσινάσης από φυσικά προϊόντα και φυτικά εκχυλίσματα	146
5.1.1.1 Η δομή της τυροσινάσης.....	146
5.1.1.2 Μηχανισμός δράσης της τυροσινάσης	146
5.1.1.3 Μηχανισμός παραγωγής μελανίνης-Μελανογένεση	147
5.1.2 Πειραματικό Μέρος	149
5.1.2.A. Υλικά	149
5.1.2.A.1 Ένζυμα	149
5.1.2.A.2 Χημικά αντιδραστήρια	149
5.1.2.B Μέθοδοι	149
5.1.2.B.1 <i>In vitro</i> μελέτη αναστολής της τυροσινάσης από φυτικά εκχυλίσματα μέσω φασματοσκοπίας UV	149
5.1.2.B.2 Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης.....	150
5.1.2.B.3 Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της αναστολής της τυροσινάσης	151
5.1.2.B.4 Ταυτοποίηση των ενδιάμεσων και προϊόντων της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης με το πείραμα επιλεκτικής διέγερσης μιας διάστασης (Selective 1D TOCSY).....	152
5.1.2.B.5 Μελέτη αλληλεπίδρασης των φυτικών εκχυλισμάτων με την τυροσινάση, με τη μεθοδολογία Saturation Transfer Difference (STD) NMR-Χαρτογράφηση των επίτοπων πρόσδεσης.....	152
5.1.2.B.6 NMR-Cosmetube: Μελέτη της αντίδρασης της τυροσινάσης με πολυφαινόλες	153
5.1.2.B.7 NMR-Cosmetube: Μελέτη της συμπεριφοράς των πολυφαινολών στην ενζυμική αντίδραση της τυροσινάσης.....	154
5.1.2.B.8 Ταυτοποίηση των οξειδωμένων προϊόντων του καφεϊκού οξέος που προέρχονται από την αντίδραση της τυροσινάσης με φασματοσκοπία 2D ¹ H- ¹ H TOCSY NMR	154
5.1.2.B.9 Θεωρητικοί Υπολογισμοί (Density Functional Theory-DFT)	155
5.1.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση	155
5.1.3.1 Αποτελέσματα από την <i>in vitro</i> μελέτη της ανασταλτικής δράσης των μελετούμενων εκχυλισμάτων ως προς τη δράση της τυροσινάσης μέσω φασματοσκοπίας UV.....	155
5.1.3.2 Μελέτη ενζυμικής δράσης της τυροσινάσης με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)- Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube	157
5.1.3.2.1 Αποτελέσματα από την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης.....	157
5.1.3.2.2 NMR-Cosmetube: Μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης στους 20°C	160
5.1.3.3 Αποτελέσματα του πειράματος Selective 1D TOCSY για τον προσδιορισμό των ενδιάμεσων προϊόντων	162
5.1.3.4 Αποτελέσματα Θεωρητικών Υπολογισμών (DFT)	163
5.1.3.5 Αποτελέσματα της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της αντίδρασης της τυροσινάσης με πολυφαινόλες	165
5.1.3.5.1 NMR-Cosmetube: Αποτελέσματα από τη μελέτη της συμπεριφοράς των φαινολικών οξέων ως υποστρώματα ή αναστολείς της τυροσινάσης.....	166

5.1.3.6 Εφαρμογή του NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης με το καφεϊκό οξύ.....	172
5.1.3.7 Αποτελέσματα από την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης, παρουσία εκχυλισμάτων.....	176
5.1.3.7.1 NMR-Cosmetube: Μελέτη της αναστολής της τυροσινάσης από εκχύλισμα του μελισσόχορτου (<i>Melissa Officinalis</i>).....	176
5.1.3.7.3 NMR-Cosmetube: Μελέτη της αναστολής της τυροσινάσης από αιθανολικό εκχύλισμα του δεντρολίβανου (<i>Rosmarinus Officinalis</i>).....	182
5.1.3.7.4 NMR-Cosmetube: Μελέτη της αναστολής της τυροσινάσης από εκχύλισμα του θυμαριού (<i>Thymus Vulgaris</i>).....	184
5.1.3.7.5 NMR-Cosmetube: Μελέτη της αναστολής της τυροσινάσης από υδατικό εκχύλισμα της λαδανιάς (<i>Cistus Albidus</i>).....	186
5.1.3.8 Μελέτη αλληλεπίδρασης φυσικών υποστρωμάτων με την τυροσινάση, με τη μέθοδο Saturation Transfer Difference (STD) NMR-Χαρτογράφηση των επίτοπων πρόσδεσης.....	188
5.1.3.9 Μελέτη αλληλεπίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων με την τυροσινάση, με τη μεθοδολογία Saturation Transfer Difference (STD) NMR-Χαρτογράφηση των επίτοπων πρόσδεσης.....	191
5.1.3.10 NMR-Cosmetube: Μελέτη συνθετικών παραγώγων ουρίας ως αναστολείς της τυροσινάσης.....	194
Γενικά συμπεράσματα του Κεφαλαίου 5.1.....	198
Κεφάλαιο 5.2: Ανάπτυξη μεθοδολογίας για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης και της αναστολής της από φυτικά εκχυλίσματα.....	200
5.2.1.1 Η δομή των υαλουρονιδασών-Καταλυτική δράση.....	200
5.2.1.2 Μηχανισμός Κατάλυσης Υαλουρονιδάσης: Αποικοδόμηση του υαλουρονικού οξέος.....	202
5.2.1.3 Βιοχημική σύνθεση του υποστρώματος υαλουρονικό οξύ ¹³³	205
5.2.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	208
5.2.2.A Υλικά.....	208
5.2.2.A.1 Ένζυμα.....	208
5.2.2.A.2 Χημικά αντιδραστήρια.....	208
5.2.2.B Μέθοδοι.....	208
5.2.2.B.1 Καμπύλη Michaelis-Menten της υαλουρονιδάσης από ιστό βοός σε $\theta=37^{\circ}\text{C}$ και τιμή $\text{pH}=3,5$	208
5.2.2.B.2 <i>In vitro</i> μελέτη αναστολής της υαλουρονιδάσης από φυσικό προϊόν και φυτικό εκχύλισμα μέσω φασματοσκοπίας UV.....	209
5.2.2.B.3 Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης.....	210
5.2.2.B.4 Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη αναστολής της υαλουρονιδάσης από φυσικό προϊόν και φυτικό εκχύλισμα.....	210
5.2.2.B.5 Πειράματα διάχυσης NMR [Diffusion Ordered Spectroscopy- (DOSY) NMR].....	211
5.2.2.B.6 Ταυτοποίηση ολιγοσακχαριτών του υποστρώματος υαλουρονικού οξέος με το πείραμα επιλεκτικής διέγερσης μιας διάστασης (Selective 1D TOCSY).....	211
5.2.2.B.7 Ταυτοποίηση μορίων ολιγοσακχαριτών του υποστρώματος υαλουρονικού οξέος με φασματοσκοπία 2D $^1\text{H}-^1\text{H}$ TOCSY NMR.....	212
5.2.2.B.8 Μελέτη αλληλεπίδρασης των φυσικών προϊόντων και των φυτικών εκχυλισμάτων με την υαλουρονιδάση, με τη μεθοδολογία Saturation Transfer Difference (STD) NMR-Χαρτογράφηση των επιτόπων πρόσδεσης.....	212
5.2.2.B.9 Χαρτογράφηση των επίτοπων πρόσδεσης- Ο συντελεστής απόδοσης πρόσδεσης.....	213
5.2.2.B.10 Πειράματα tr-NOESY.....	213
5.2.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	213

5.2.3.1	Κινητική μελέτη της υαλουρονιδάσης από ιστό βοός.....	213
5.2.3.2	Αποτελέσματα από την <i>in vitro</i> μελέτη αναστολής της υαλουρονιδάσης από φυσικό προϊόν και φυτικό εκχύλισμα μέσω φασματοσκοπίας UV	214
5.2.3.2.1	Αποτελέσματα από τη μελέτη αναστολής της υαλουρονιδάσης από το φυσικό προϊόν ροσμαρινικό οξύ	214
5.2.3.2.2	Αποτελέσματα από τη μελέτη αναστολής της υαλουρονιδάσης από φυσικά προϊόντα.....	215
5.2.3.2.3	Αποτελέσματα από τη μελέτη αναστολής υαλουρονιδάσης από φυτικά εκχυλίσματα.....	216
5.2.3.3	Αποτελέσματα από την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης.....	219
5.2.3.4	Ανωμερικά πρωτόνια ολιγοσακχαριτών υαλουρονικού οξέος: βελτιστοποίηση διαχωρισμού των κορυφών στα 1D ¹ H φάσματα NMR	224
5.2.3.5	Ο ρόλος της BSA στην ενζυμική αντίδραση της υαλουρονιδάσης	226
5.2.3.6	Ταυτοποίηση ολιγοσακχαριτών υαλουρονικού οξέος με εφαρμογή της μεθοδολογίας Selective 1D TOCSY NMR	227
5.2.3.7	Αποτελέσματα από την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη αναστολής της υαλουρονιδάσης από φυσικό προϊόν και φυτικό εκχύλισμα	233
5.2.3.7.1	NMR-Cosmetube: μελέτη αναστολής της υαλουρονιδάσης από φυσικό προϊόν ..	233
5.2.3.7	NMR-Cosmetube: μελέτη της αναστολής της υαλουρονιδάσης από το φυτικό εκχύλισμα	235
5.2.3.8	Μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης με το πείραμα διάχυσης DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy).....	239
5.2.3.8	Μελέτη αλληλεπίδρασης των φυσικών προϊόντων και των φυτικών εκχυλισμάτων με την υαλουρονιδάση, με τη μεθοδο Saturation Transfer Difference (STD) NMR-Χαρτογράφηση των επιτόπων πρόσδεσης	240
5.2.3.8.1	Μελέτη αλληλεπίδρασης της υαλουρονιδάσης με φυσικό προϊόν	240
5.2.3.8.2	Μελέτη αλληλεπίδρασης της υαλουρονιδάσης με μείγμα φυσικών προϊόντων	244
5.2.3.8.3	Μελέτη αλληλεπίδρασης της υαλουρονιδάσης με φυτικό εκχύλισμα.....	245
	Γενικά συμπεράσματα Κεφαλαίου 6.2	249
	Κεφάλαιο 5.3: Ανάπτυξη μεθοδολογίας για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης και της αναστολής της από φυτικά εκχυλίσματα	250
5.3.1.	Εισαγωγή	250
5.3.1.1	Η οικογένεια των σερινοπρωτεασών και η ελαστάση.....	250
5.3.1.2	Η δομή της ελαστάσης.....	250
5.3.1.3	Μηχανισμός δράσης ελαστάσης.....	253
5.3.1.4	Βιολογική σημασία της δράσης της ελαστάσης.....	256
5.3.2	Υλικά και Μέθοδοι	257
5.3.2.A	Υλικά	257
5.3.2.A.1	Ένζυμα	257
5.3.2.A.2	Χημικά αντιδραστήρια	257
5.3.2.B.	Μέθοδοι	258
5.3.2.B.1	<i>In vitro</i> μελέτη αναστολής της ελαστάσης από φυσικό προϊόν και φυτικό εκχύλισμα με φασματοσκοπία UV	258
5.3.2.B.2	Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης με φασματοσκοπία 1D ¹ H NMR	259
5.3.2.B.3	Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη αναστολής της ελαστάσης από φυσικό αναστολέα και φυτικό εκχύλισμα με φασματοσκοπία 1D ¹ H NMR	259

5.3.2.B.4 Μελέτη αλληλεπίδρασης των φυσικών προϊόντων και των φυτικών εκχυλισμάτων με την ελασάση, με τη μεθοδολογία Saturation Transfer Difference (STD) NMR-Χαρτογράφηση των επίτοπων πρόσδεσης.....	260
5.3.2.B.5 Χαρτογράφηση των επίτοπων πρόσδεσης- Ο συντελεστής απόδοσης πρόσδεσης	260
5.3.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση	261
5.3.3.1 Αποτελέσματα από την <i>in vitro</i> μελέτη αναστολής της ελασάσης από φυσικό προϊόν και φυτικό εκχύλισμα μέσω φασματοσκοπίας UV	261
5.3.3.1.1 Αποτελέσματα από την <i>in vitro</i> μελέτη αναστολής της ελασάσης από το φυσικό προϊόν κερκετίνη.....	261
5.3.3.1.2 Αποτελέσματα από την <i>in vitro</i> μελέτη αναστολής ελασάσης από φυτικά εκχυλίσματα	261
5.3.3.2 Αποτελέσματα από την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της ελασάσης.....	264
5.3.3.3 Αποτελέσματα από την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της αναστολής της ελασάσης.....	267
5.3.3.3.1 NMR-Cosmetube: Μελέτη αναστολής της ελασάσης από φυσικό προϊόν.....	267
5.3.3.3.2 NMR Cosetube: Μελέτη αναστολής της ελασάσης από φυσικό εκχύλισμα	269
5.3.3.4 Μελέτη αλληλεπίδρασης των φυσικών προϊόντων και των φυτικών εκχυλισμάτων με την ελασάση, με τη μέθοδο Saturation Transfer Difference (STD) NMR-Χαρτογράφηση των επίτοπων πρόσδεσης.....	280
5.3.3.4.1 Μελέτη αλληλεπίδρασης της ελασάσης με μείγμα φυσικών προϊόντων	280
5.3.3.4.2 Μελέτη αλληλεπίδρασης της ελασάσης με φυτικό εκχύλισμα	282
Γενικά Συμπεράσματα Κεφαλαίου 6.3.....	284
Κεφάλαιο 6: Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για την ταυτόχρονη <i>in situ</i> μελέτη του μείγματος των τριών ενζυμικών αντιδράσεων (τυροσινάσης-υαλουρονιδάσης-ελασάσης)	285
6.2 Υλικά και Μέθοδοι	285
6.2.A Υλικά.....	285
6.2.A.1 Ένζυμα	285
6.2.A.2 Χημικά αντιδραστήρια.....	286
6.2.B Μέθοδοι.....	286
6.2.B.1 Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη και των τριών ενζυμικών αντιδράσεων (τυροσινάση-υαλουρονιδάση-ελασάση) στο ίδιο περιβάλλον....	286
6.2.B.2 Ταυτοποίηση των προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων με φασματοσκοπία 2D ¹ H- ¹ H TOCSY NMR	287
6.2.B.3 Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ταυτόχρονης αναστολής των τριών ενζυμικών αντιδράσεων από φυσικό προϊόν και φυτικό εκχύλισμα	287
6.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση	288
6.3.1 Αποτελέσματα από την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για την ταυτόχρονη μελέτη και των τριών ενζυμικών αντιδράσεων (τυροσινάση-υαλουρονιδάση-ελασάση) στο ίδιο υδατικό περιβάλλον	288
6.3.2 Αποτελέσματα από την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη και των τριών ενζυμικών αντιδράσεων παρουσία φυσικού προϊόντος ή φυτικού εκχυλίσματος	299
6.3.2.1 NMR-Cosmetube: Μελέτη και των τριών ενζυμικών αντιδράσεων παρουσία φυσικού προϊόντος.....	300
Γενικά Συμπεράσματα Κεφαλαίου.....	303
Γενικά Συμπεράσματα	305
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	312
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	335

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

A. Θεωρητικό μέρος

1.1 Φαρμακευτικά φυτά

Το φυτικό βασίλειο χαρακτηρίζεται ως η μεγαλύτερη φυσική βιβλιοθήκη που αποτελείται από περισσότερους από ένα εκατομμύριο φυσικούς μεταβολίτες. Από την αρχαιότητα ακόμη, αρκετές ιατρικές θεραπείες βασισμένες στη φύση είχαν αναπτυχθεί σε πολλές περιοχές παγκοσμίως. Η λεγόμενη “παραδοσιακή” ιατρική χρησιμοποιούσε για την αντιμετώπιση διαφόρων μολύνσεων και ασθενειών είτε ολόκληρο το φυτό και το βότανο, είτε κάποια μέρη του.¹⁻⁷ Επίσης, αρκετά φυτά και βότανα χρησιμοποιούνται και ως ενισχυτές της γεύσης, του αρώματος, ακόμη και του χρώματος ενός τροφίμου, καθώς διαθέτουν χαρακτηριστική γεύση και άρωμα. Η χρήση φυτών και βοτάνων, έχει προκαλέσει επίσης αρκετά μεγάλο ενδιαφέρον στην ανάπτυξη καλλυντικών προϊόντων για τη φροντίδα του δέρματος, βασισμένων σε φυσικά προϊόντα. Αυτά τα καλλυντικά προϊόντα έχουν ως στόχο την αντιμετώπιση αρκετών δυσλειτουργιών του δέρματος που οδηγούν στην πρόωρη γήρανση του δέρματος και στην ανάπτυξη μελανώματος.

Ακόμη και στη σημερινή εποχή, η οποία έχει στιγματιστεί από την έξαρση της πανδημίας του κορωνοϊού (COVID19), πολλοί επιστήμονες έστρεψαν το ενδιαφέρον τους στη φύση, προκειμένου να βρουν κάποιο φυσικό “όπλο” για την καταπολέμηση της νόσου SARS-CoV-2 ανάμεσα σε επιλεγμένα φυτά αλλά και τους δευτερογενείς μεταβολίτες τους, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση του ανοσοποιητικού, αλλά και για την παρασκευή στοχευμένων φαρμάκων.^{8,9}

Τα φαρμακευτικά αλλά και τα αρωματικά φυτά, αποτελούν σημαντικές πηγές βιοδραστικών ουσιών, οι οποίες τους προσδίδουν όλες αυτές τις βιολογικές δράσεις και χρησιμοποιούνται για περισσότερο από 5000 χρόνια ως αντιβιοτικά, αναλγητικά, αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακά φάρμακα για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών και μολύνσεων. Επίσης, μεγάλος αριθμός φαρμακευτικών φυτών έχει χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική θεραπεία για την αντιμετώπιση καρδιοπαθειών αλλά και διαφόρων νεοπλασιών, ενώ έχουν συμβάλλει αποτελεσματικά ως πρώτη ύλη στην ανάπτυξη και σύνθεση νέων φαρμάκων. Από την άλλη, τα αρωματικά φυτά αποτελούν πλούσια πηγή αιθέριων ελαίων τα οποία χρησιμοποιούνται για το άρωμα και τη γεύση που προσδίδουν σε φάρμακα, καλλυντικά και τρόφιμα. Μια άλλη πρόσφατη εφαρμογή των φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών είναι στον τομέα της νανοτεχνολογίας, για την παραγωγή νανοσωματιδίων με σκοπό να χρησιμοποιηθούν σε βιοϊατρικές και βιομηχανικές εφαρμογές.¹⁰ Στη βιομηχανία των καλλυντικών, τα φαρμακευτικά φυτά χρησιμοποιούνται εδώ και πολύ καιρό για την ανάπτυξη φυσικών καλλυντικών, με ενισχυμένη φυσική δράση.

Μεγάλος αριθμός φαρμακευτικών φυτών και βοτάνων έχει μελετηθεί εκτεταμένα για τις βιολογικές τους δράσεις στην αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών. Ο Πίνακας 1.1 περιέχει αντιπροσωπευτικά παραδείγματα τέτοιων φυτών.

Πίνακας 1.1: Φαρμακευτικά και αρωματικά φυτά και οι βιολογικές δράσεις που παρουσιάζουν.

Φυτό/ Βότανο (επιστημονική ονομασία)	Κοινή ονομασία	Ιατρική χρήση
<i>Melissa officinalis</i> L. ¹¹	Μελισσόχορτο	Υπογλυκαιμικές/ηπατοπροστατευτικές/αντιμικροβιακές/ αντικαταθλιπτικές/ υπνωτικές/ηρεμιστικές ιδιότητες, θεραπεία κατά του καρκίνου του μαστού και του καρκίνου του παχέος εντέρου, χρησιμοποιείται ως ενισχυτής γεύσης αλλά και στην αρωματοθεραπεία
<i>Rosmarinus Officinalis</i> L. ¹²	Δεντρολίβανο	Αντιβακτηριακές/αντιοξειδωτικές/αντιμυκητιστακές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Χρησιμοποιείται ως ενισχυτής γεύσης αλλά και στα καλλυντικά
<i>Salvia Officinalis</i> L. ¹³	Φασκόμηλο	Αντιοξειδωτικές/αντιφλεγμονώδεις/υπογλυκαιμικές/ αντιβακτηριακές/αντικαρκινικές ιδιότητες, θεραπεία κατά της νόσου Αλτσχάιμερ. Χρησιμοποιείται ως ενισχυτικό γεύσης, αλλά και στα καλλυντικά.
<i>Majorana hortensis Moench</i> ¹⁴	Ματζουράνα	Αντιοξειδωτικές/ αντιμικροβιακές/ αντιμυκητιστακές/αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες. Ελέγχει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, θεραπεύει τον βήχα, τους ρευματισμούς, τη δυσπεψία, τον πονόδοντο, τους ρευματισμούς, τις γαστρικές και καρδιαγγειακές διαταραχές.
<i>Thymus Vulgaris</i> ¹⁵	Θυμάρι	Αντιοξειδωτικές/αντιμικροβιακές/αντιφλεγμονώδεις/ αντιμυκητιστακές ιδιότητες. Θεραπεία κατά της ακμής και άλλων δερματικών διαταραχών, του άγχους, της λαρυγγίτιδας, του βήχα, της ηπατικής δυσλειτουργίας, της εμμηνόρροιας, των συμπτωμάτων του προεμμηνορροϊκού συνδρόμου και των λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος.
<i>Aloe vera</i> ¹⁶	Αλόη	Αντιφλεγμονώδεις/αντιικές/αντιβακτηριακές/αντικαρκινικές/ αντιδιαβητικές/αντιαλλεργικές ιδιότητες. Χρησιμοποιείται ευρέως στα καλλυντικά προϊόντα.

Τα παραπάνω παραδείγματα αποτελούν ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα από το μεγάλο κατάλογο των φυτών που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες φαρμάκων, τροφίμων και καλλυντικών για τη σύνθεση και παραγωγή φαρμάκων και καλλυντικών με ενισχυμένη δράση και κυρίως φιλικών προς την υγεία του οργανισμού, αλλά και τροφίμων με βελτιωμένη υφή, άρωμα και γεύση. Για το λόγο αυτό, είναι πολύ σημαντική η συνεχής μελέτη και

ανακάλυψη νέων φυσικών πηγών για την ανάπτυξη καινούριων προϊόντων βασισμένων στη φύση.

Τα φαρμακευτικά φυτά που έχουν επιλεγεί για μελέτη στην παρούσα διδακτορική διατριβή είναι τα παρακάτω:

1.1.1 *Melissa Officinalis* L. (Lemon Balm-Μελισσόχορτο): Το μελισσόχορτο αποτελεί μέλος της οικογένειας των Χειλανθών και ευδοκίμει σε αρκετές περιοχές της υψηλίου, όπως στην Ανατολική Μεσόγειο, στη Δυτική Ασία, στην Ανατολική Ευρώπη, στον Καύκασο και στο Βόρειο Ιράν. Το μελισσόχορτο είναι ένα αειθαλές βότανο με αρωματικά φύλλα, το οποίο χρησιμοποιείται ως γευστικός παράγοντας εξαιτίας του χαρακτηριστικού αρώματος λεμονιού που έχει. Η χρήση του στην παραδοσιακή ιατρική είναι αρκετά μεγάλη, καθώς έχει αρκετές ευεργετικές ιδιότητες: **(1)** Παρουσιάζει αντικαταθλιπτικές και χαλαρωτικές ιδιότητες, για αυτό και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση της κατάθλιψης και του άγχους,^{11,17,18} **(2)** είναι αποτελεσματικό εναντίον των ασθενειών του κεντρικού νευρικού συστήματος, και παρουσιάζει σπασμολυτικές ιδιότητες,^{11,19} **(3)** χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση καρδιαγγειακών και αναπνευστικών προβλημάτων,^{11,19} **(4)** παρουσιάζει αντικαρκινικές ιδιότητες έναντι αρκετών τύπων καρκίνου,^{11,17,18} **(5)** είναι αντιπαρασιτικό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντίδοτο για την αντιμετώπιση μολύνσεων,^{11,19} **(6)** επιδρά ευεγερτικά στην ενίσχυση της μνήμης,^{11,19} **(7)** παρουσιάζει αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις και αντιικές ιδιότητες,^{11,17,18} **(8)** μπορεί να δράσει ως υπογλυκαιμικός, υπολιπιδαιμικός, αντιγονικός και αντιεπιληπτικός παράγοντας,^{11,17,18} **(9)** δρα ως αντικαταθλιπτικό,^{11,17,18} **(10)** χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση των δυσλειτουργιών του γαστρεντερικού συστήματος,^{11,17,18} **(11)** μπορεί να αναστείλει τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης.^{11,19} **(12)** Χάρη στον υψηλό αντιοξειδωτικό χαρακτήρα και στην ικανότητα του να δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες, μελέτες έχουν δείξει ότι το μελισσόχορτο μπορεί να προστατέψει το δέρμα από φλεγμονές που προκαλούνται από την ηλιακή ακτινοβολία, και για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φυσικό συστατικό στα καλλυντικά.²⁰ Τα φύλλα του μελισσόχορτου παρουσιάζουν ιδιαίτερο άρωμα και χρησιμοποιούνται ως ενισχυτικό γεύσης. Το φυτοχημικό προφίλ του μελισσόχορτου είναι πλούσιο τόσο σε αιθέρια έλαια, όσο και σε δευτερογενείς μεταβολίτες. Κύρια αιθέρια έλαια του μελισσόχορτου είναι η γερανιάλη, η νεράλη και η κιτρονελλάλη, τα οποία προσδίδουν στο φυτό το χαρακτηριστικό άρωμα του λεμονιού.^{11,21} Σε μικρότερο ποσοστό, υπάρχουν και άλλα αιθέρια έλαια όπως η δεκαδιενάλη, η καρβακρόλη, το κιτρονεθυλικό μεθύλιο, το β-καριοφυλλένιο, το β-πινένιο και άλλα. Ωστόσο, η σύσταση και το περιεχόμενο των αιθέριων ελαίων, όπως και των δευτερογενών μεταβολιτών ποικίλλει ανάλογα με τη χώρα προέλευσης του φυτού, το κλίμα, τη σύσταση του εδάφους και την εποχή ανάπτυξης του φυτού. Ως προς τους δευτερογενείς μεταβολίτες, το μελισσόχορτο αποτελείται από τερπενοειδή (μονοτερπένια, τριτερπένια και σесκιτερπένια), φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή (φλαβανόνες, φλαβονόλες, φλαβονόλες και γλυκοσιδικά παράγωγα αυτών) και ταννίνες. Οι πολλές ευεργετικές δράσεις του μελισσόχορτου οφείλονται κυρίως στην παρουσία βιοδραστικών συστατικών όπως το ουρσολικό οξύ, το ολεανολικό οξύ, σουλφονυλιωμένα παράγωγα των δύο αυτών τερπενίων,^{11,22} το ροσμαρινικό οξύ και τα *cis* και *trans* ισομερή του, το καφεϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ, διάφορα παράγωγα βενζοϊκού οξέος,^{11,23} τη λουτεολίνη και τους γλυκοζίτες της, την

απιγενίνη, την εσπεριδίνη, τη ναρινγίνη, τη ναρινγενίνη, την εριοδικτυόλη και τα γλυκοσιδικά παράγωγά της, τη ρουτίνη, την κατεχίνη, την επικατεχίνη και άλλα.^{11,24}

1.1.2 *Rosmarinus Officinalis* L. (Rosemary-Δεντρολίβανο): Το δεντρολίβανο, γνωστό και ως δεντρολίβανο το φαρμακευτικό, ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών και ευδοκιμεί κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου, αλλά μπορεί να ευδοκιμήσει και σε άλλες περιοχές. Το δεντρολίβανο είναι ένας αρωματικός θάμνος περίπου δύο μέτρων, με ιδιαίτερο άρωμα και γεύση, γι' αυτό και χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων για να δώσει μια ιδιαίτερη επίγευση στο φαγητό. Μεγάλη εφαρμογή βρίσκει και στη βιομηχανία των καλλυντικών, λόγω του ιδιαίτερου αρώματος που παρουσιάζει αλλά και εξαιτίας του πλούσιου βιοδραστικού χαρακτήρα του, ως συστατικό καλλυντικών καθημερινής περιποίησης.²⁵⁻²⁹ Το δεντρολίβανο έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον πολλών μελετών λόγω των ποικίλων βιολογικών δράσεων που παρουσιάζει: **(1)** χάρη στον υψηλό αντιοξειδωτικό χαρακτήρα του μπορεί να συμβάλλει στην προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες, δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS), **(2)** παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της φυσικής κόπωσης,^{30,31} **(3)** παρουσιάζει αποτελεσματική δράση ως προς διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως είναι: το άσθμα, η αθηροσκλήρωση, ισχαιμικά επεισόδια, καταρράκτης^{32,33} κ.α., **(4)** παρουσιάζει υψηλό αντικαρκινικό χαρακτήρα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αντιμετώπιση του καρκίνου του πεπτικού συστήματος, **(5)** παρουσιάζει αποτελεσματική δράση εναντίον του πεπτικού έλκους,³⁴ **(6)** διαθέτει την ικανότητα να ρυθμίζει τα επίπεδα υπερχοληστερολαιμίας και να μειώνει τη συγκέντρωση του αίματος του μυοκαρδίου, εξαιτίας της παρουσίας ροσμαρινικού οξέος, το οποίο αποτελεί τον κύριο δευτερογενή μεταβολίτη του δεντρολίβανου,³¹ **(7)** διαθέτει την ικανότητα να μειώνει την υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων που συσσωρεύονται στην καρδιά και στον εγκέφαλο,³⁵ **(8)** μπορεί να δράσει ως αντιαγγειογονικός και νευροπροστατευτικός παράγοντας, εξαιτίας της παρουσίας των τερπενοειδών, καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη, τα οποία παρουσιάζουν εξαιρετικές βιοδραστικές ιδιότητες,³⁴ **(9)** παρουσιάζει αντιπολλαπλασιαστικό χαρακτήρα^{12,36-38}, **(10)** παρουσιάζει αντιική και αντιμικροβιακή δράση,^{39,40} **(11)** παρουσιάζει ηπατοπροστατευτικές, νεφροπροστατευτικές και αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες,⁴¹⁻⁴³ **(12)** μειώνει τα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος,⁴⁴ **(13)** μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μυοχαλαρωτικός και αντι-αλλεργικός παράγοντας,⁴⁵ **(14)** δρα ως αντικαταθλιπτικός παράγοντας.⁴⁶ Ως προς τον αντιμικροβιακό του χαρακτήρα, το δεντρολίβανο έχει μελετηθεί αρκετά για τη δράση του εναντίον ορισμένων βακτηρίων, όπως το *L. monocytogenes*.⁴⁷ Το φυτοχημικό προφίλ του δεντρολίβανου είναι αρκετά πλούσιο και αποτελείται από πολυφαινόλες, φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, γλυκοζίτες φλαβονοειδών, τερπένια, αλκαλοειδή κ.α, αν και διαφέρει ως προς τη σύστασή του ανάλογα με το γένος του φυτού, την εποχή ευδοκίμησης του, το κλίμα και τη σύσταση του εδάφους. Τα κυριότερα βιοδραστικά συστατικά του είναι το ροσμαρινικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, η λουτεολίνη και τα παράγωγά της, το καρνοσικό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το ολεανολικό οξύ, και το ουρσολικό οξύ. Στα αιθέρια έλαιά του ανήκουν το α-πινένιο, η καμφορά, η καρνοσόλη, η ευκαλυπτόλη, η ροσμαδιάλη, η ροσμαρόνη, η ροσμακινόνη Α, η ροσμακινόνη Β και η ευγενόλη.⁴⁸⁻⁵¹

1.1.3 *Salvia Officinalis* L. (Sage-Φασκόμηλο): το φασκόμηλο ανήκει και αυτό στην οικογένεια των Χειλανθών και είναι ένα ιθαγενές φυτό που ευδοκιμεί σε περιοχές της Μεσογείου

και της Μέσης Ανατολής αν και τα τελευταία χρόνια μπορεί να βρεθεί και σε άλλες περιοχές της υφελίου, κυρίως στην Ευρώπη και στη Βόρεια Αμερική,⁵²⁻⁵⁴ καθώς αποτελείται από περίπου 900 είδη παγκοσμίως. Τα εναέρια μέρη του φυτού χρησιμοποιούνται εδώ και αρκετά χρόνια στην διατροφή και στην παραδοσιακή ιατρική. Το φασκόμηλο παρουσιάζει έντονη γεύση και άρωμα, και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ευρέως ως παράγοντας ενίσχυσης και βελτίωσης της γεύσης των φαγητών. Στην παραδοσιακή ιατρική το φασκόμηλο είναι αρκετά διαδεδομένο για τις εκπληκτικές βιοδραστικές του ιδιότητες: **(1)** χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση του έλκους, της ουρικής αρθρίτιδας, των ρευματισμών, της υπεργλυκαιμίας και της διάρροιας,^{55,56} **(2)** παρουσιάζει αντικαρκινικές, αντιμεταλαξιόγόνες, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες,⁵⁶ **(3)** χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της δυσπεψίας,⁵² **(4)** χρησιμοποιείται για την επούλωση των δυσλειτουργιών του δέρματος, και για το λόγο αυτό, η χρήση του στα καλλυντικά είναι συχνή,⁵⁷ **(5)** λόγω του χαρακτηριστικού και έντονου αρώματος, το φασκόμηλο χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του στρες και της κατάθλιψης,⁵⁸ **(6)** επεμβαίνει σε κάποιες βιοχημικές λειτουργίες, όπως στην ενεργοποίηση των υποδοχέων βενζοδιαζεπίνης και στην αναστολή των επιληπτικών κρίσεων που προκαλούνται από την πεντυλενοτετραζόλη.⁵² Το φυτοχημικό προφίλ του φασκόμηλου είναι αρκετά πλούσιο και αποτελείται κυρίως από βασικές οικογένειες δευτερογενών μεταβολιτών, όπως φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή και γλυκοζίτες αυτών, πολυφαινόλες, σάκχαρα και τερπένια, αν και διαφέρει ως προς τη σύσταση ανάλογα με το κλίμα, τη χρονική περίοδο, τη σύσταση του εδάφους και το ποσοστό του νερού στο φυτό. Βασικά βιοδραστικά συστατικά αποτελούν το ροσμαρινικό οξύ, το ελλαγικό οξύ, ο γλυκοζίτης της λουτεολίνης, η ρουτίνη, η κερκετίνη και το χλωρογενικό οξύ. Ως προς τους περιεχόμενους υδατάνθρακες, το φασκόμηλο περιέχει αραβινόζη, γαλακτόζη, γλυκόζη, μανόζη, ξυλόζη, ραμνόζη και ουρονικά οξέα.⁵⁹⁻⁶¹ Τα διάφορα μέρη του φυτού, αφθονούν επίσης σε αιθέρια έλαια: στον βλαστό του φασκόμηλου υπάρχει σε μεγάλο ποσοστό η λιναλοόλη, ενώ τα άνθη αφθονούν σε α-πινένιο και κινεόλη. Από την άλλη, τα φύλλα του φασκόμηλου είναι πλούσια σε καμφένιο, καμφορά, λιμονένιο, χουλουένιο και οξικό βορνυλεστέρα.⁶²

1.1.4 *Thymus Vulgaris* L. (Thyme-Θυμάρι): Το θυμάρι καλλιεργείται σε πολλές περιοχές της Ευρώπης (κυρίως στην Ελλάδα, στη Γαλλία, στην Ελβετία, στην Ισπανία, στην Ιταλία, στη Βουλγαρία, και στην Πορτογαλία). Έχουν γίνει πολλές μελέτες για τις ευεγερτικές δράσεις του θυμαριού οι οποίες έχουν δείξει ότι το θυμάρι έχει έντονες αντιοξειδωτικές, αντισηπτικές, αντιμικροβιακές, αντιικές, στυπτικές και ανθελμινθικές δράσεις. Χάρη στην ιδιαίτερη γεύση και άρωμα χρησιμοποιείται και ως μπαχαρικό.⁶³ Το θυμάρι δρα επίσης ως τονωτικό και βρίσκει αρκετές εφαρμογές ως φάρμακο καθώς παρουσιάζει τις εξής ιδιότητες: **(1)** διαλύει τα αέρια του στομάχου, **(2)** είναι αντισηπτικό και χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση του πονόλαιμου και του βήχα,⁶⁴ **(3)** παρουσιάζει αντιμικροβιακό και αντιμυκητιασικό χαρακτήρα), **(4)** χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση του διαβήτη και διαφόρων λοιμώξεων στο στήθος, **(5)** χρησιμοποιείται ως σιρόπι για την καταπολέμηση πεπτικών διαταραχών,⁶⁴ **(6)** χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της λαρυγγίτιδας και της φλεγμονής, **(7)** χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση εντερικών λοιμώξεων που προκαλούνται από αγκυλοσκόληκες, ασκαρίδες, gram-θετικά και gram-αρνητικά βακτήρια, μύκητες, ζύμες καθώς και από το βακτήριο *Candida*

Albicans. Τα αιθέρια έλαια του θυμαριού που περιέχονται κυρίως στα φύλλα του φυτού εφαρμόζονται τοπικά, για την επούλωση του δέρματος από φλεγμονές και πληγές, γεγονός που κάνει τη χρήση του θυμαριού στα καλλυντικά αρκετά σημαντική. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τη φροντίδα των δοντιών.⁶⁵ Το θυμάρι έχει αρκετά πλούσιο φυτοχημικό προφίλ που αποτελείται από φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα και γλυκοζίτες αυτών, τερπενοειδή και αιθέρια έλαια. Τα πιο σημαντικά βιοδραστικά συστατικά, στα οποία αποδίδεται ο υψηλός αντιοξειδωτικός χαρακτήρας του φυτού και των εκχυλισμάτων του είναι το ροσμαρινικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το ολεανολικό οξύ, η λουτεολίνη, η εριοδικτυόλη, η απιγενίνη, η θυμόλη και η καρβακρόλη.⁶⁶

1.1.5 *Origanum Vulgare L. (Oregano-Ρίγανη)*: Η ρίγανη είναι ένα βότανο, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών. Η ρίγανη είναι ένας αειθαλής θάμνος, με χαρακτηριστικό έντονο άρωμα, το οποίο ευδοκιμεί κυρίως στη Μεσόγειο, αλλά μπορεί να βρεθεί επίσης και στην δυτική και βόρεια Ευρασία. Η ρίγανη είναι από τα φυτά που μπορούν επίσης να καλλιεργηθούν. Εξαιτίας της έντονης και χαρακτηριστικής οσμής και της πικρής της γεύσης, η χρήση της ρίγανης ως μπαχαρικό είναι αρκετά διαδεδομένη. Αυτά τα έντονα χαρακτηριστικά οφείλονται στην παρουσία καρβακρόλης και ασκορβικού οξέος. Η ρίγανη παρουσιάζει υψηλό αντιοξειδωτικό και αντιμικροβιακό χαρακτήρα και χρησιμοποιείται στην “παραδοσιακή ιατρική” από τα αρχαία χρόνια. Το μεθανολικό εκχύλισμα της ρίγανης έχει βρεθεί ότι έχει πλούσιο φυτοχημικό προφίλ, και, μαζί με τα αιθέρια έλαια του φυτού έχουν μελετηθεί εκτεταμένα, καθώς παρουσιάζουν εξαιρετικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Επίσης, τα αιθέρια έλαια της ρίγανης έχουν μελετηθεί για την αντιμικροβιακή τους δράση, ως προς τα gram-αρνητικά βακτήρια: *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter spp.*, *E. aerogenes*, *E. Coli*, *Flavobacterium spp.*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *S. Paratyphi B.*, *Serratia marcescens* και *Shigella dysenteriae*. Ωστόσο, πρέπει να χρησιμοποιούνται σε μικρές δόσεις, καθώς η καρβακρόλη και η θυμόλη που αφθονούν στη ρίγανη, σε μεγάλες συγκεντρώσεις παρουσιάζουν τοξικότητα.⁶⁷ Άλλες δράσεις που παρουσιάζει η ρίγανη είναι οι εξής: **(1)** Είναι αντιβακτηριακή και χρησιμοποιείται αποτελεσματικά για την καταπολέμηση της ακμής που προκαλείται από το βακτήριο *Propionibacterium acnes*,⁶⁸ **(2)** χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση ρευματικών, πεπτικών και αναπνευστικών παθήσεων,⁶⁸ **(3)** μειώνει τα επίπεδα της χοληστερόλης και της γλυκόζης στο αίμα⁶⁸ **(4)** χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των προβλημάτων της εμηνόρροιας,⁶⁸ **(5)** ελέγχει και ρυθμίζει την ανάπτυξη συγκεκριμένων τύπων καρκίνου,⁶⁸ **(6)** παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιμυκητιασικές, αντιδιαβητικές, αντιαποπρωτικές και ηπατοπροστατευτικές δράσεις.⁶⁸ Το φυτοχημικό προφίλ της ρίγανης είναι αρκετά πλούσιο σε φαινολικά οξέα (πρωτοκατεχουϊκό οξύ, 5-Ο-δικαφεουλκινικό οξύ, ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ και τα εστερικά του παράγωγα και χλωρογενικό οξύ), φλαβονοειδή (κερκετίνη, απιγενίνη, μυρισετίνη, ταξιφολίνη, εριοδικτυόλη, καμφερόλη, λουτεολίνη, ναρινγενίνη) και τα γλυκοσιδικά παράγωγά τους, τερπένια (ολεανολικό οξύ, ουρσολικό οξύ), μονοτερπένια (καρβακρόλη, θυμόλη),⁶⁸ ταννίνες και στερόλες.⁶⁹ Η υψηλή αντιοξειδωτική δράση της ρίγανης και η ικανότητά της να δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται οφείλονται κατά κύριο λόγο στο μεγάλο ποσοστό ροσμαρινικού οξέος και καρβακρόλης.⁶⁶ Επίσης, η ρίγανη

περιέχει μεγάλο αριθμό αιθέριων ελαίων, όπως είναι το p-κυμένιο, το γ-τερπινένιο, το λιμονένιο, το β-φελανδρένιο, τη λιναλοόλη, την α-τερπινεόλη και άλλα.

1.1.6 *Cistus Albidus* L. (Rock flower-Λαδανιά ή λάδανο): Η λαδανιά ή λάδανο είναι ένα ιθαγενές αιθαλές δικοτυλίδο βότανο, το οποίο ανήκει στην οικογένεια των κιστοειδών. Ο όρος “*cistus*” προέρχεται από την ελληνική λέξη “κίστος”. Η οικογένεια των Κιστοειδών αποτελείται από διαφορετικά είδη, τα οποία ευδοκιμούν κυρίως σε βραχώδεις περιοχές στην περιοχή της Μεσογείου, ενώ δεν έχουν μελετηθεί ακόμη όλοι οι εκπρόσωποι αυτής της οικογένειας.⁷⁰ Μελέτες που έχουν γίνει σε αυτά τα είδη, έχουν αποδείξει ότι η λαδανιά αποτελείται από μεγάλο αριθμό βιοδραστικών ουσιών και ως εκ τούτου παρουσιάζει πολλές εφαρμογές στην “παραδοσιακή ιατρική”: **(1)** μπορεί να καταναλωθεί ως αφέψημα για την καταπολέμηση του κρυολογήματος, του πονοκεφάλου, της δύσπνοιας, της δυσεντερίας και της διάρροιας,⁷⁰ **(2)** παρουσιάζει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιβακτηριακές, αντιμυκητιστακές και αντιικές ιδιότητες,^{71,72} **(3)** μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση του άγχους, **(4)** χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της οστεαρθρίτιδας, του άσθματος, της βρόγχωσης, διαφόρων καρδιαγγειακών παθήσεων, όπως επίσης και διαφόρων τύπων καρκίνου,⁷² **(5)** χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση της ηπατίτιδας, της γαστρίτιδας, της αϋπνίας, της μυαλγίας και της νευραλγίας, **(6)** μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αλλεργιογόνος, αντιπολλαπλασιαστικός, αντιλευχαιμικός, αντισηπτικός και δερμοπροστατευτικός παράγοντας και **(7)** δρα ως αναστολέας της διπεπτυλπεπτιδάσης-IV και της αλανυλ-αμινοπεπτιδάσης.⁷³ Η λαδανιά επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επούλωση των πληγών του δέρματος και για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως βασικό συστατικό σε καλλυντικές κρέμες. Από την άλλη, αρκετά ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι το λάδανο αποτελεί ένα από τα 57 συστατικά του Άγιου Μύρου που παρασκευάζεται από το Οικουμενικό Πατριαρχείο κάθε 10 χρόνια.⁷⁴ Κάποια είδη της οικογένειας των Κιστοειδών έχουν την ικανότητα να συμμετέχουν σε μεταβολικές οδούς που οδηγούν στην παραγωγή σημαντικών δευτερογενών μεταβολιτών και κυρίως τερπενίων λαβδανικού τύπου.⁷⁵ Το φυτοχημικό προφίλ της λαδανιάς αποτελείται από φλαβονοειδή και γλυκοζίτες φλαβονοειδών, ελαγιταννίνες, φαινολικά οξέα και παράγωγα φαινολικών οξέων, τερπενοειδή (μονοτερπένια και διτερπένια με κύριους εκπροσώπους τα τερπένια λαβδανικού τύπου), αλκαλοειδή, σεσκιτερπένια, υδατάνθρακες και λιπαρά οξέα. Όσον αφορά τις βιοδραστικές ουσίες των μελών της οικογένειας των Κιστοειδών, οι πιο σημαντικές είναι: κερκετίνη και γλυκοσιδικά παράγωγα, γαλλοκατεχίνη και παράγωγα, διμερές (-)-(επι)γαλλοκατεχίνης-(επι)γαλλοκατεχίνης, το γαλλικό οξύ, και η καμφερόλη. Όσον αφορά τα διτερπένια λαβδανικού τύπου, τα πιο γνωστά που έχουν ταυτοποιηθεί ως συστατικά της λαδανιάς είναι το οξειδίο του μανουλίου και το 13-επι-οξειδίο του μανουλίου. Συγκεκριμένα, το φυτοχημικό προφίλ της λαδανιάς αποτελείται από 140 τερπένια (34 μονοτερπένια, 5 διτερπένια και 101 σεσκιτερπένια), 24 φαινυλοπροπανοειδή (18 φλαβονοειδή, 2 φαινολικά οξέα και 4 ταννίνες), 9 υδατάνθρακες, 7 καρβονυλικά συστατικά, 24 λιπαρά οξέα και 18 φυτοορμόνες και βιταμίνες.⁷⁰ Στα μονοτερπένια αντιστοιχούν το α-πινένιο, το λιμονένιο, η θυμόλη και η καρβακρόλη. Στα σεσκιτερπένια αντιστοιχούν το γερμακρένιο D, το αγ-κουρκουμένιο και η αλλο-αρωμαδενδρίνη.⁷⁶ Στα διτερπένια ανήκει το 13-επι-οξειδίο του μανουλίου.⁷⁷

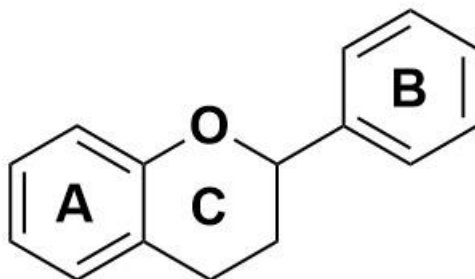
1.1.7 *Hypericum Perforatum L. (St. John's wort-Βαλσαμόχορτο)*: Το βάλαμο είναι ένα ανθοφόρο φυτό του γένους Υπερικό (*Hypericum*) και είναι το πιο διαδεδομένο φυτό από την οικογένεια των Υπερικών, στην οποία ανήκουν περισσότερα από 500 είδη, τα οποία χωρίζονται σε 36 υποκατηγορίες.^{78,79} Στην Αρχαία Ελλάδα ήταν γνωστό ως «Υπερικόν», ενώ στη νεότερη Ελλάδα είναι επίσης γνωστό και ως βαλσαμόχορτο ή σπαθόχορτο. Το βάλαμο χρησιμοποιείται ευρέως στην “παραδοσιακή ιατρική”, καθώς παρουσιάζει σημαντικές δράσεις: **(1)** παρουσιάζει αντιοξειδωτικές, αντιικές, αντιμυκητιστακές, και αντιβακτηριακές ιδιότητες, **(2)** το υδατικό και υδατο-αλκοολικό εκχύλισμα του φυτού χρησιμοποιείται ως αντικαταθλιπτικό,^{80,81} **(3)** παρουσιάζει εξαιρετικές ιδιότητες ως προς την επούλωση τραυμάτων,⁸² **(4)** τα αιθέρια έλαια του χρησιμοποιούνται για τοπική εξωτερική χρήση, για την επάλειψη της εξωτερικής στοιβάδας του δέρματος, για την αντιμετώπιση διαφόρων δυσλειτουργιών του,^{80,81} **(5)** μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως αφέψημα για την καταπολέμηση των διαταραχών της χολής, του στομάχου, των φλεγμονών του αναπνευστικού και ουροποιητικού συστήματος, της ημικρανίας, του διαβήτη και άλλων παθήσεων,^{80,81} **(6)** τα υδατοαλκοολικά εκχυλίσματα του υπερικού μπορούν να αναστείλουν τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE), γεγονός που δείχνει ότι το βάλαμο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση της νόσου Alzheimer's,^{83,84} **(7)** μελέτες έχουν δείξει ότι το βάλαμο παρουσιάζει ανασταλτική δράση ως προς την α-γλυκοσιδάση και την α-αμυλάση, γεγονός το οποίο οδηγεί στη μείωση της απορρόφησης της γλυκόζης και, συνεπώς, στη μείωση των επιπέδων γλυκόζης του αίματος.⁸³ Το βάλαμο έχει αρκετά πλούσιο φυτοχημικό προφίλ, το οποίο περιέχει μεγάλο ποσοστό φλορογλυκινολών (υπερφορίνη, αντιυπερφορίνη, φουρανοϋπερφορίνη), ναφθοδιανθρονών (υπερικήνη, ψευδοϋπερικήνη, πρωτοϋπερικήνη, πρωτοψευδοϋπερικήνη), φλαβονοειδών (ρουτίνη, κερκετίνη, κερκιτρίνη, ισοκερκιτρίνη, και υπεροσίδη), διφλαβονών (I3, II8-διαπιγενίνη, αμεντοφλαβόνη), προκυανιδινών (προκυανιδίνη B2, ταννίνες με σκελετό κατεχίνης), ξανθονών και φαινολικών οξέων (χλωρογενικό οξύ, καφεουλ-κινικά οξέα και p-κουμαρουλ-κινικά οξέα), ενώ σ' ένα μικρό ποσοστό (0,1-0,25%) υπάρχουν και αιθέρια έλαια (α-πινένιο, καριοφυλλένιο, οξικό γερανύλιο και νονάνιο). Η σύσταση των δευτερογενών μεταβολιτών διαφέρει και εξαρτάται από οικολογικούς παράγοντες, όπως το κλίμα και η σύσταση του εδάφους. Το βάλαμο συνήθως δεν καλλιεργείται, αλλά ευδοκιμεί μόνο του στη φύση, και για το λόγο αυτό το φυτοχημικό του προφίλ ποικίλει αρκετά ως προς τη σύστασή του.

1.2 Οι πολυφαινόλες και η σημασία τους

Κάθε φυτό χαρακτηρίζεται από ένα μοναδικό φυτοχημικό προφίλ, το οποίο αποτελείται από πολλές οικογένειες δευτερογενών μεταβολιτών, με τις κυριότερες να είναι τα αλκαλοειδή, τα τερπενοειδή και οι πολυφαινόλες (φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα). Η κύρια λειτουργία των δευτερογενών μεταβολιτών είναι η προστασία των φυτικών ιστών από εξωτερικούς παθογόνους μικροοργανισμούς και βακτήρια, καθώς και η συμβολή τους στη μείωση του οξειδωτικού στρες.⁸⁵ Δεύτερη βασική λειτουργία των δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί η συμβολή τους σε πολλές σημαντικές βιοχημικές οδούς, καθιστώντας τους σημαντικούς παράγοντες στην ανάπτυξη θεραπειών εναντίον διαφόρων ασθενειών.¹¹⁻¹⁵ Επίσης, ο

ενισχυμένος αντιοξειδωτικός χαρακτήρας των φυσικών δευτερογενών μεταβολιτών εμποδίζει την ανάπτυξη του οξειδωτικού στρες στους ζωντανούς οργανισμούς, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην προστασία του οργανισμού από την ανάπτυξη νεοπλασματικών παθήσεων.

Από τις τρεις κύριες οικογένειες των μεταβολιτών, οι πολυφαινόλες έχουν κεντρίσει σημαντικά το ερευνητικό ενδιαφέρον. Οι πολυφαινόλες είναι φυτικά, μη θρεπτικά φυσικά μόρια και αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα της καθημερινής μας ζωής, καθώς βρίσκονται σε αφθονία στα φρούτα, στα λαχανικά και στους σπόρους που καταναλώνουμε. Οι πολυφαινόλες στην ουσία αποτελούν μια αρκετά μεγάλη οικογένεια ενώσεων που προέρχονται κυρίως από δευτερογενή μεταβολισμό. Οι περισσότερες από αυτές προκύπτουν από την L-φαινυλαανίνη, μέσω της μεταβολικής πορείας των φαινυλοπροπανοειδών. Επίσης, μπορούν να παραχθούν και από άλλες μεταβολικές πορείες όπως αυτή του σικιμικού οξέος ή των πολυκετιδίων, όπου παράγονται μόρια με περισσότερες από μία φαινολικές ομάδες, αλλά στερούνται λειτουργίες που βασίζονται στο άζωτο.⁸⁶ Κύριο χαρακτηριστικό των πολυφαινολών είναι η παρουσία τουλάχιστον δύο φαινολικών (-OH) ομάδων σε απλές ή πιο πολύπλοκες σκελετικές δομές, συνήθως μεγάλου μοριακού βάρους. Στην οικογένεια των πολυφαινολών ανήκουν επίσης και οι απλές φαινολικές δομές (οι οποίες είναι γνωστές ως φαινολικά οξέα) και αποτελούν πρόδρομα μόρια αρκετών πολυφαινολών. Σημαντικοί εκπρόσωποι των πολυφαινολών αποτελούν οι οικογένειες των φαινολικών οξέων, των κουμαρινών, των φλαβονοειδών, των στυλβενίων, των λιγνανών, των λιγνινών και των ταννινών.

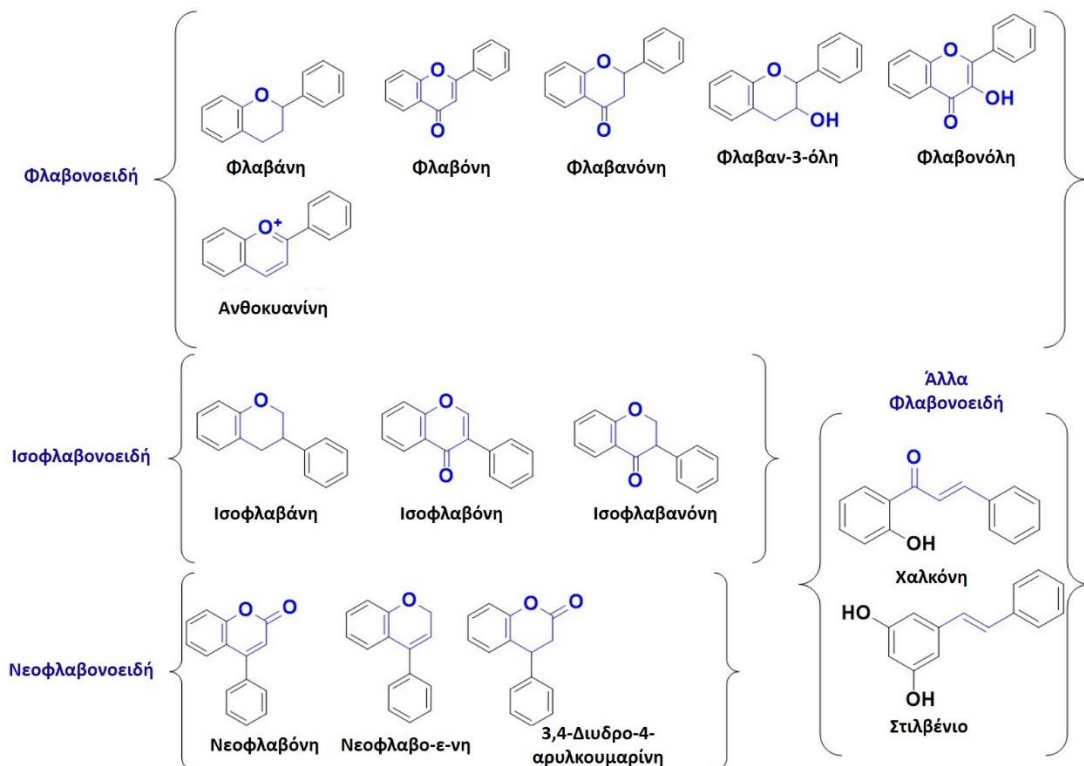


Σχήμα 1.1: Βασική δομή φλαβονοειδών

Η παρουσία αυτών των ουσιών στα φρούτα, στα λαχανικά, στους σπόρους και στους ξηρούς καρπούς ευθύνεται για το ιδιαίτερο άρωμα και χρώμα που χαρακτηρίζει καθένα ξεχωριστά, ενώ το βασικότερο χαρακτηριστικό τους είναι ο υψηλός αντιοξειδωτικός τους χαρακτήρας. Τόσο τα φλαβονοειδή όσο και τα φαινολικά οξέα, και αρκετά παράγωγά τους, έχουν μελετηθεί εκτεταμένα για τις αποτελεσματικές βιολογικές τους δράσεις: παρουσιάζουν ισχυρές αντιοξειδωτικές, αντι-φλεγμονώδεις, αντιδιαβητικές, αντικαρκινικές, αντιβακτηριακές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Επίσης, έχουν παρουσιάσει και εξαιρετικές καρδιοπροστατευτικές δράσεις. Επίσης, προστατεύουν ισχυρά το ανοσοποιητικό σύστημα από διάφορες ασθένειες ή άλλες παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Επίσης προστατεύουν και το δέρμα από την υπεριώδη UV ακτινοβολία.⁸⁷⁻⁸⁹ Η δομή όλων αυτών των μορίων έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον ως προς τον τρόπο που οι φλαβονοειδείς ουσίες αλληλεπιδρούν με διάφορους υποδοχείς, είτε ενζυμικής είτε πρωτεϊνικής φύσεως καθώς και για το αποτέλεσμα που επιφέρει αυτή η αλληλεπίδραση ως προς τη βιολογική δράση του

εκάστοτε μελετούμενου στόχου. Όλες οι παραπάνω ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά αυτών των ενώσεων τις έχουν καταστήσει ωφέλιμους παράγοντες για τη χρήση τους σε φάρμακα, τρόφιμα, καλλυντικά, αλλά και στην “παραδοσιακή ιατρική”, η οποία εδώ και πάρα πολλά χρόνια έχει δώσει απαντήσεις στην αντιμετώπιση οποιασδήποτε πάθησης, από το απλό κρυολόγημα, έως την ανάπτυξη νεοπλασιών.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, βασικό χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών και των φαινολικών ενώσεων είναι η σκελετική δομή τους, καθώς μπορούν να χωριστούν σε πολλές κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών (–OH) ομάδων, τη θέση υποκατάστασής τους, τη θέση του δεύτερου αρωματικού δακτυλίου και τον κορεσμό του ετεροκυκλικού δακτυλίου. Στα φλαβονοειδή, ο δακτύλιος C υφίσταται τις περισσότερες τροποποιήσεις: μπορεί να υδροξυλιωθεί, να μεθυλιωθεί, να μεθοξυλιωθεί, να αλκυλιωθεί, να οξειδωθεί, να γλυκοζυλιωθεί στις θέσεις C και O, αλλά και να υποστεί μετάθεση στις θέσεις των υποκαταστατών, σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο περισσότερα από 9000 παράγωγα φλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε τρεις μεγάλες οικογένειες, ανάλογα με τη θέση του δεσμού μεταξύ των δακτυλίων B και C: φλαβονοειδή, ισοφλαβονοειδή και νεοφλαβονοειδή. Επίσης, τα φλαβονοειδή διακρίνονται περαιτέρω σε υπο-οικογένειες, με βάση τις διάφορες αλλαγές που γίνονται στη δομή τους: τροποποιήσεις στον δακτύλιο C (αφυδρογόνωση του άνθρακα C2, υδροξυλίωση στις θέσεις C3 και C4 και οξείδωση στη θέση C4) σε: φλαβάνες, φλαβόνες, φλαβανόνες, φλαβανόλες, φλαβονόλες και ανθοκυανίνες (Σχήμα 1.2).⁹⁰



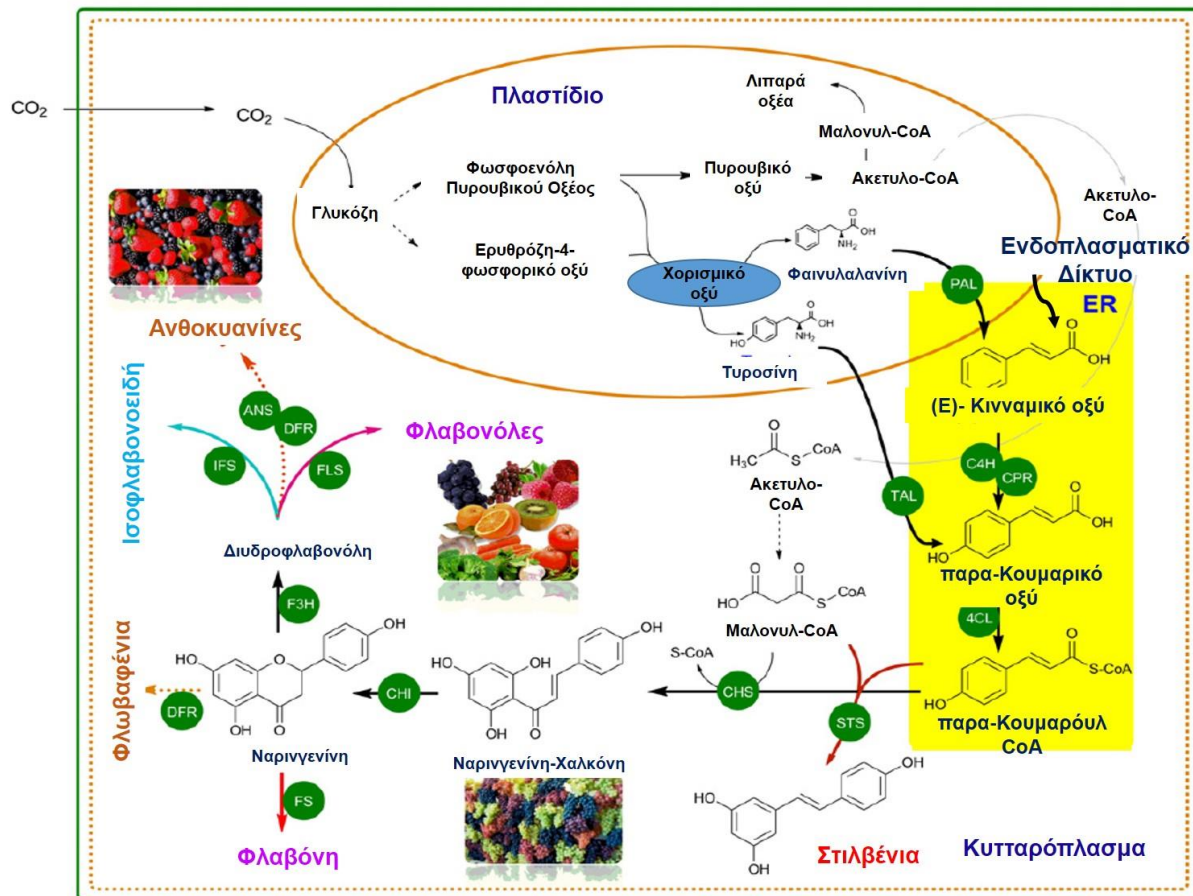
Σχήμα 1.2: Δομές οικογενειών φλαβονοειδών.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα φλαβονοειδή (μαζί με τα κουρκουμινοειδή και τις ανθοκυανίνες) συντίθενται βιοχημικά μέσα από δευτερογενείς μεταβολισμούς. Η βιοσύνθεση των φλαβονοειδών πραγματοποιείται στο κυτοσόλιο του ενδοπλασματικού δικτύου, όπου υπάρχουν πάρα πολλά ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεσή τους. Όλα τα φλαβονοειδή

συντίθενται από τη μεταβολική οδό των φαινυλοπροπανοειδών, χρησιμοποιώντας τρία μόρια μαλόνυλ-CoA και ένα μόριο φαινυλπροπανούλ-CoA. Το μεγαλύτερο ποσοστό των φλαβονοειδών βιοσυντίθεται έχοντας ως πρόδρομο μόριο τη χαλκόνη. Η χαλκόνη μετατρέπεται σ' έναν τεράστιο αριθμό παραγώγων φλαβονοειδών (>9000), με τη συμμετοχή ενός μεγάλου αριθμού διαφορετικών ενζύμων: υδρολάσες, ισομεράσες, οξειδοοξειδοκτάσες, γλυκοζυλοτρανσφεράσες, μεθυλοτρανσφεράσες και ακυλοτρανσφεράσες.^{91,92}

Η βιοχημική σύνθεση των φλαβονοειδών, όπως και τα ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στις διάφορες βιοχημικές συνθέσεις, έχουν μελετηθεί αρκετά εκτεταμένα στα φυτά.^{93,94} Πρόδρομα μόρια του βιοχημικού μεταβολισμού των φαινυλοπροπανοειδών είναι η L-φαινυλαλανίνη και η L-τυροσίνη, οι οποίες παράγονται μέσω της μεταβολικής οδού του σικιμικού οξέος και άλλων αερόβιων μεταβολικών αντιδράσεων (**Σχήμα 1.3**). Δύο ένζυμα, η αμμωνιακή λυάση της τυροσίνης (TAL) και η αμμωνιακή λυάση της φαινυλαλανίνης (PAL) μετατρέπουν την L-τυροσίνη και την L-φαινυλαλανίνη στα καρβοξυλικά τους παράγωγα, p-κουμαρικό οξύ και κινναμικό οξύ αντίστοιχα. Στη συνέχεια, το κινναμικό οξύ μετατρέπεται σε p-κουμαρικό οξύ με τη δράση της 4-υδροξυλάσης του κινναμικού οξέος (C4H). Στο επόμενο βήμα, γίνεται ενεργοποίηση του p-κουμαρικού οξέος σε 4-κουμαρούλ-CoA, με την αντίδραση μεταξύ ενός μορίου τριφοσφορικής αδενοσίνης (ATP) και ενός μορίου συνενζύμου-A και τη δράση της λιγάσης του 4-κουμαρούλ-CoA (4CL). Το 4-κουμαρούλ-CoA αποτελεί πρόδρομο μόριο στη βιοσύνθεση του σκελετού C6-C3-C6 (χαλκόνη-ναρινγενίνη) αρκετών φλαβονοειδών. Άλλο πρόδρομο μόριο του σκελετού C6-C3-C6 είναι το μαλόνυλο-CoA, το οποίο παράγεται από την αντίστροφη δράση της καρβοξυλάσης του ακέτυλο-CoA (ACC), στο ακέτυλο-CoA. Τρία μόρια μαλόνυλο-CoA και ένα μόριο 4-κουμαρούλ-CoA συμπυκνώνονται με τη δράση της συνθάσης της χαλκόνης (CHS) σχηματίζοντας τον σκελετό C6-C3-C6 σε όλα τα φλαβονοειδή. Η ναρινγενίνη-χαλκόνη υφίσταται ενδομοριακή ισομερείωση και μετατρέπεται σε ναρινγενίνη, με τη δράση της ισομεράσης της χαλκόνης (CHI). Το ίδιο παράγωγο χαλκόνης, με τη δράση άλλων ενζύμων, μετατρέπεται επίσης σε διάφορα άλλα παράγωγα φλαβονοειδών. Αυτά τα παράγωγα, μπορούν να μετατραπούν στα αντίστοιχα γλυκοζυλιωμένα παράγωγά τους, με τη δράση γλυκοζυλοτρανσφερασών.⁹⁵ Από την άλλη, τα στιλβένια συντίθενται σ' ένα στάδιο από τη συμπύκνωση του 4-κουμαρούλ-CoA και του μαλόνυλο-CoA με τη δράση της συνθετάσης του στιλβενίου (STS), χωρίς το σχηματισμό της ενδιάμεσης χαλκόνης. Όλα τα άγλυκα μόρια φλαβονοειδών που σχηματίζονται μετατρέπονται στα υπόλοιπα παράγωγά τους με τη δράση άλλων ενζύμων: μεθυλοτρανσφεράσες, υδροξυλάσες, ακυλοτρανσφεράσες και άλλα.⁹⁶ Άλλα φλαβονοειδή συντίθενται από πρόδρομα μόρια (2S)-φλαβανονών, οι οποίες προκύπτουν από στερεοεκλεκτική ισομερείωση των χαλκονών από την ισομεράση της χαλκόνης (CHI). Η υδροξυλίωση των (2S)-φλαβανονών στην θέση C-3 από την 3b-υδροξυλάση της φλαβανόνης (F3H) παράγει διυδροφλαβανόλες, οι οποίες ανάγονται από την 4-ρεδοκτάση της διυδροφλαβανόλης (DFR) στη θέση C-4, παράγοντας λευκοανθοκυανιδίνες. Αυτά τα μόρια είναι ασταθή και ανάγονται σε φλαβαν-3-όλες (ή κατεχίνες) από τη ρεδοκτάση της λευκοανθοκυανιδίνης (LAR). Οι ανθοκυανιδίνες συντίθενται από τις λευκοανθοκυανιδίνες και τις φλαβαν-3-όλες από το ένζυμο συνθάση της ανθοκυανιδίνης (ANS). Οι λευκοανθοκυανιδίνες γλυκοζυλιώνονται στη συνέχεια στη θέση C-3 από το ένζυμο UDP-γλυκόζη: 3-O-γλυκοζυλοτρανσφεράση των φλαβονοειδών (3GT), παράγοντας τις

ανθοκυανίνες.⁹⁷ Άλλα παράγωγα φλαβονοειδών, όπως είναι τα ισοφλαβονοειδή, οι συμπυκνωμένες ταννίνες και τα στιλβένια παράγονται από τη δράση ποικίλων ενζύμων που καταλύουν την προσθήκη διαφόρων λειτουργικών ομάδων. Η παρουσία αυτών των λειτουργικών ομάδων συνδέεται άμεσα με τις διαφορετικές βιολογικές δράσεις που παρουσιάζουν τα φλαβονοειδή.

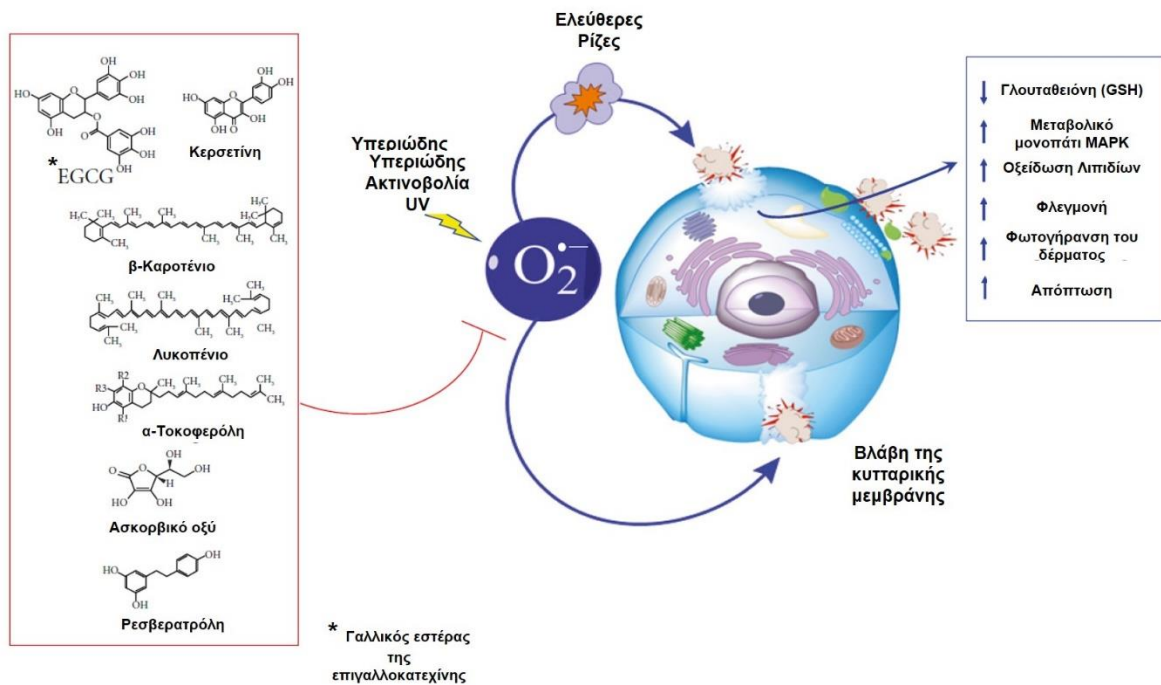


Σχήμα 1.3: Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων βιοχημικών οδών σύνθεσης των φλαβονοειδών που πραγματοποιούνται στα φυτά. [Τα ένζυμα που συμμετέχουν στις διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις και απεικονίζονται εδώ είναι τα εξής: **PAL:** λυάση φαινυλ-αμμωνίας, **TAL:** λυάση τυροσινο-αμμωνίας, **C4H:** κινναμική 4-υδροξυλάση, **4CL:** 4-κουμαρικό: CoA λιγάση, **CHS:** συνθάση της χαλκόνης, **CHI:** συνθάση της χαλκόνης, **IFS:** συνθάση της ισοφλαβονόλης, **FS:** διαλυτή συνθάση της φλαβονόλης, **F3H:** 3β-υδροξυλάση της φλαβονόλης, **FLS:** συνθάση φλαβονόλης, **CHR:** ρεδοκτάση χαλκόνης, **DFR:** 4-ρεδοκτάση διυδροφλαβονόλης, **STS:** Συνθετάση του στιλβενίου, **ANS:** συνθάση ανθοκυανιδίνης, **CPR:** Ρεδοκτάση του κυτοχρώματος P450].^{90,98}

1.2.1 Φλαβονοειδή και ελεύθερες ρίζες

Τα φλαβονοειδή έχουν προκαλέσει αρκετά το ενδιαφέρον, λόγω της δράσης τους ως αντιοξειδωτικοί παράγοντες, καθώς έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, συμβάλλοντας σε πολλά οφέλη για την υγεία. Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών βασίζεται στη δομή τους, στη διαμόρφωση και τον αριθμό των λειτουργικών ομάδων τους, και κυρίως στον αριθμό των φαινολικών (-OH) ομάδων, στη θέση και το είδος των υποκαταστατών, καθώς από αυτούς τους παράγοντες εξαρτάται η ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών αλλά και η δέσμευση μεταλλικών ιόντων. Τα φλαβονοειδή δικαίως θεωρούνται φυσικά αντιοξειδωτικά, καθώς επιδρούν στη δράση των ελεύθερων ριζών με διάφορους τρόπους: (1)

αναστέλλουν ένζυμα, ή αναπτύσσουν χηλικούς δεσμούς με τα ιχνοστοιχεία που είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη ελεύθερων ριζών, οδηγώντας σε μείωση της παραγωγής τους, (2) δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, (3) αναστέλλουν τη δράση των ελευθέρων ριζών που παράγονται στα κύτταρα από την υπεριώδη ακτινοβολία, (4) απορροφούν την ακτινοβολία UV και (5) διαμορφώνουν τα ενδογενή αντιοξειδωτικά και αντιφλεγμονώδη συστήματα, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην προστασία του δέρματος^{99,100} (**Σχήμα 1.4**).



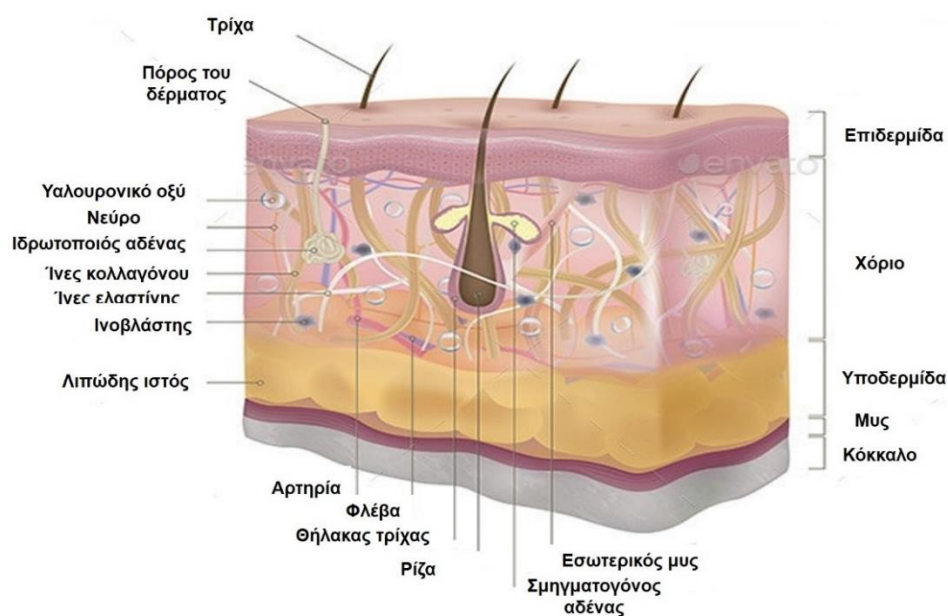
Σχήμα 1.4: Σχηματική απεικόνιση δράσης επιλεγμένων φλαβονοειδών ενώσεων στις διάφορες δυσλειτουργίες που παραγματοποιούνται από την ηλιακή ακτινοβολία στα κύτταρα του δέρματος.¹⁰¹

Πολλά φαινολικά και φλαβονοειδή μόρια έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποστρώματα για τη σύνθεση και ανακάλυψη νέων φαρμάκων, πιο αποτελεσματικών έναντι πολλών παθογενειών και νεοπλασιών. Αυτός ο κατάλογος ολοένα και αυξάνεται, καθώς συνεχώς ανακαλύπτονται καινούριοι δευτερογενείς μεταβολίτες από φαρμακευτικά φυτά και βότανα. Στην περίπτωση των καλλυντικών, η χρήση φυτικών ουσιών είναι αρκετά σημαντική, καθώς γίνονται πολλές προσπάθειες για την αντικατάσταση των συνθετικών παραγόντων από φυσικά προϊόντα μέσα στο παρασκεύασμα, προκειμένου να μην επιβαρύνεται περισσότερο η υγεία του δέρματος. Για το σκοπό αυτό, οι φαρμακευτικές βιομηχανίες αναζητούν συνεχώς καινούρια υποστρώματα με αξιόλογες βιολογικές δράσεις καθώς και τεχνικές που θα μπορέσουν να εφαρμοστούν αυτά τα φυτικά προϊόντα, χωρίς να επιβαρύνουν τον οργανισμό. Η συνεχής ανακάλυψη καινούριων δραστικών μορίων, αλλά και η τροποποίηση των ήδη υπαρχόντων που έχει σκοπό την ενισχυμένη δράση τους, είναι μια συνεχής αναζήτηση των επιστημόνων για την παρασκευή νέων φαρμάκων και καλλυντικών προϊόντων.

1.3 Το δέρμα και οι μηχανισμοί γήρανσής του

Το δέρμα αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος, καθώς περιβάλλει ολόκληρη την επιφάνειά του και είναι υπεύθυνο για αρκετές φυσιολογικές και ζωτικές λειτουργίες οι κυριότερες από τις οποίες είναι η ρύθμιση της θερμοκρασίας του σώματος, η προστασία του

από την προσβολή ξένων μικροοργανισμών και η σημαντική συμβολή του στην παραγωγή της βιταμίνης D. Αποτελείται από τρία βασικά στρώματα: την επιδερμίδα, το χόριο και την υποδερμίδα (**Σχήμα 1.5**). Η επιδερμίδα αποτελεί το εξωτερικό στρώμα του δέρματος και λειτουργεί ως φραγμός. Αποτελείται από την κεράτινη στιβάδα, μέσα στην οποία βρίσκονται τα μελανοκύτταρα και τα κερατινοκύτταρα. Τα κερατινοκύτταρα συνθέτουν την κερατίνη, η οποία αποτελεί την κύρια πρωτεϊνική δομή της επιδερμίδας, και τις κυτοκίνες οι οποίες δρουν ως χημικοί σηματοδότες και ενεργοποιούν τις κυτταρικές διεργασίες.^{102,103} Το χόριο είναι το στρώμα του δέρματος που περιέχει πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους όπως είναι τα νεύρα, τα αιμοφόρα αγγεία, και τα λέμφη. Όλα αυτά περιβάλλονται από ένα συνδετικό ιστό ο οποίος σχηματίζεται από ινοβλάστες, και ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης. Η υποδερμίδα είναι το πιο εσωτερικό και βαθύ στρώμα του δέρματος, το οποίο συνδέει το δέρμα με βαθύτερα οργάνδια όπως είναι οι μύες και τα οστά. Η υποδερμίδα αποτελείται από ένα λιπώδη μανδύα που λειτουργεί ως θρεπτική και θερμομονωτική μηχανή, και προστατεύει το δέρμα από τραυματισμούς, ενώ επιτρέπει τη δυναμική κίνηση του δέρματος.¹⁰⁴



Σχήμα 1.5: Δομή του ανθρώπινου δέρματος.

Εκτός από τα τρία βασικά του στρώματα, το δέρμα αποτελείται και από κύτταρα (κυρίως κερατινοκύτταρα, ινοβλάστες και μελανοκύτταρα), ένζυμα και άλλες ουσίες οι οποίες διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στους αμυντικούς μηχανισμούς που αυτό εκτελεί. Αρκετές οικογένειες ενζύμων συμβάλλουν σημαντικά στην αμυντική λειτουργία του δέρματος, απομακρύνοντας τις εξωγενείς ουσίες που εκκρίνονται από τα παθογόνα βακτήρια, τους τραυματισμούς αλλά και την υπεριώδη ακτινοβολία. Αυτές οι εξωγενείς ουσίες είναι οι λεγόμενες ελεύθερες ρίζες (ROS) και είναι αρκετά επιβλαβείς τόσο για το δέρμα, όσο και για τον ανθρώπινο οργανισμό. Ωστόσο, το δέρμα αναπτύσσει ισχυρούς αμυντικούς μηχανισμούς προκειμένου να καταστρέψει αυτές τις ελεύθερες ρίζες. Το δέρμα είναι αρκετά ευαίσθητο όργανο, καθώς εκτίθεται καθημερινά σε εξωτερικούς περιβαλλοντικούς κινδύνους, οι κυριότεροι από τους οποίους είναι η υπεριώδης ακτινοβολία, οι τραυματισμοί και η προσβολή από παθογόνους μικροοργανισμούς. Αυτή η συνεχής έκθεση του δέρματος σε εξωτερικούς κινδύνους, αλλά και οι λειτουργίες που επιτελεί, συμβάλλουν σημαντικά στη σταδιακή καταπόνηση των ιστών του, που συνεπάγεται την σταδιακή γήρανσή του, η οποία πραγματοποιείται εσωτερικά και εξωτερικά. Ως προς την

εσωτερική γήρανση του δέρματος, οι πιο σημαντικές μεταβολές συμβαίνουν στους ιστούς του βασικού κυτταρικού στρώματος. Όσο ενηλικιώνεται ο άνθρωπος, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων του βασικού κυτταρικού στρώματος μειώνεται. Αυτό συνεπάγεται τη μείωση του πάχους της επιδερμίδας, και της επιφάνειας επαφής μεταξύ του δέρματος και της επιδερμίδας, το οποίο οδηγεί στη μείωση της μεταφοράς θρεπτικών συστατικών στην επιδερμίδα.

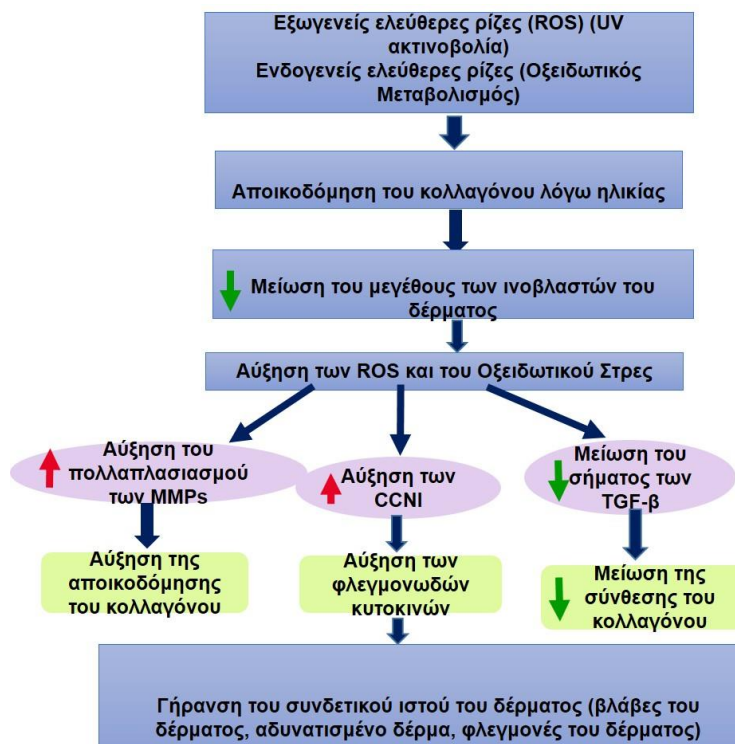
1.3.1 Η γήρανση του δέρματος

Η γήρανση του δέρματος χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση λεπτών ρητίδων, την απώλεια ελαστικότητας, την παρουσία πληγών που δεν έχουν επουλωθεί, και τη σταδιακή απώλεια του στρώματος του δέρματος, που αποτελούν τα χαρακτηριστικά σημάδια ηλικίας. Η ηλικιακή γήρανση του δέρματος οδηγεί σε αραίωση των επιδερμικών και των δερματικών στρωμάτων καθώς και στην απώλεια της ευαισθησίας, λόγω της μείωσης της παραγωγής των φυλετικών ορμονών και του αριθμού των νευρικών απολήξεων. Από την άλλη, το δέρμα που έχει υποστεί φωτογήρανση, χαρακτηρίζεται από την παρουσία βαθύτερων ρητίδων, μεγαλύτερου ποσοστού απώλειας της ελαστικότητας, καθώς και από την απόκτηση μιας τραχιάς υφής.¹⁰⁵ Η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία (UVA και UVB), σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου του δέρματος. Στην ενδογενή γήρανση του δέρματος εμπλέκονται αρκετοί κυτταρικοί στρεσογόνοι παράγοντες, οι κυριότεροι από τους οποίους είναι: (α) η μείωση της αλληλουχίας (shortening) των τελομερών, (β) αλλαγές στη δομή της χρωματίνης, (γ) η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων, (δ) η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, (ε) το οξειδωτικό στρες και (στ) οι επιγενετικοί παράγοντες.¹⁰⁶ Τα κυριότερα γεγονότα που συμβάλλουν στην ενδογενή και στην εξωγενή γήρανση (ή φωτογήρανση), είναι επίσης και η επαγωγή φλεγμονής και η διαταραχή της ομοιόστασης της εξωκυτταρικής μεμβράνης. Όλοι αυτοί οι παράγοντες αποτελούν σοβαρές συνέπειες του οξειδωτικού στρες.^{107,108} Στην ενδογενή γήρανση οι δραστικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) παράγονται μέσω του οξειδωτικού μεταβολισμού των κυττάρων. Η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, επίσης αυξάνει την παραγωγή των ROS και είναι δυνατό να προκαλέσει βλάβη στο DNA, στις πρωτεΐνες και στα λιπίδια, με αποτέλεσμα να μειώνονται τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ουσιών στο δέρμα.¹⁰⁸

1.3.2 Ο ρόλος των ελεύθερων ριζών στη γήρανση του δέρματος

Η ενδογενής γήρανση είναι ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο, στο οποίο συνεργούν διάφοροι γενετικοί και μεταβολικοί παράγοντες.^{109,110} Στο δέρμα περίπου το 1.5-5% του οξυγόνου που καταναλώνεται μετατρέπεται σε ROS μέσω εγγενών διεργασιών,¹⁰⁹ που αποτελούν βασικούς παράγοντες της ενδογενούς γήρανσης. Κύριες πηγές των ελεύθερων ριζών που παράγονται στα μιτοχόνδρια του δέρματος είναι τα κερατινοκύτταρα και οι ινοβλάστες. Οι ελεύθερες ρίζες και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) παράγονται επίσης και κατά τη μελανογένεση, προκαλώντας με τη σειρά τους υψηλό οξειδωτικό στρες στα μελανοκύτταρα.^{111,112} Η παραγωγή των ελεύθερων ριζών στα μιτοχόνδρια των κερατινοκυττάρων πραγματοποιείται στα εσωτερικά κύτταρα της επιδερμίδας, και κυρίως στα

βλαστικά κύτταρα του βασικού στρώματος της επιδερμίδας. Στο τελικό στάδιο της κυτταρικής διαφοροποίησης, τα κερατινοκύτταρα του βασικού στρώματος χάνουν τα οργανίδια τους. Από την άλλη, οι ελεύθερες ρίζες (ROS), παράγονται επίσης και στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), κυρίως από μέλη της οικογένειας του κυτοχρώματος P450, ο βασικός ρόλος της οποίας είναι η απομάκρυνση τοξινών από εξωτερικές λιπόφιλες ενώσεις.¹¹³ Ελεύθερες ρίζες παράγονται επίσης και στο κυτοσόλιο, καθώς αποτελούν προϊόν της μεταβολικής πορείας του αραχιδονικού οξέος. Ένζυμα όπως η λιποξυγονάση και η κυκλοοξυγονάση χρησιμοποιούν το αραχιδονικό οξύ για να συνθέσουν αντίστοιχα προσταγλανδίνη (PG) και λευκοτριένια. Και τα δύο ένζυμα παράγουν H₂O₂ παρουσία του νικοτιναμιδο αδένινο δινουκλεοτιδίου (NADH) και NADPH. Αν και τα επίπεδα του αραχιδονικού οξέος είναι σχετικά χαμηλά στο δέρμα, κατά τη γήρανση του δέρματος αυξάνονται.¹¹³ Καθώς το δέρμα γερνά, και εξαιτίας της διαταραχής στην παραγωγή των ελεύθερων ριζών, ο αριθμός των κερατινοκυττάρων και των ινοβλαστών μειώνεται λόγω της μείωσης του στρώματος της επιδερμίδας με επακόλουθη μείωση της συγκέντρωσης του κολλαγόνου και των πρωτεογλυκανών αντίστοιχα, γεγονός που οδηγεί σε ατροφία και συμβάλλει σε φαινόμενα ίνωσης. Αυτές οι αλλαγές μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών.¹¹³ Ένας άλλος κρίσιμος παράγοντας που συμβάλλει στη γήρανση του δέρματος είναι η υπερέκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών της εξωκυτταρικής στιβάδας (Matrix Metalloproteinases- MMPs) και η μειωμένη έκφραση των αναστολέων αυτών των μεταλλοπρωτεϊνών (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases- TIMPs). Αυτές οι αλλαγές είναι πιθανό να σχετίζονται με την παραγωγή ελεύθερων ριζών. Η αύξηση των ελεύθερων ριζών ενισχύει τη ρύθμιση της ενεργοποιητικής πρωτεΐνης-1 (Activator Protein-1-, AP-1), η οποία καταστέλλει το μετασχηματισμό των υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα β (Transforming Growth Factor- TGF-β), οι οποίοι με τη σειρά τους εμποδίζουν τη σύνθεση του κολλαγόνου.¹¹⁰ Η ενεργοποίηση της AP-1 διεγείρει την αποικοδόμηση του κολλαγόνου από τις μεταλλοπρωτεϊνάσες και ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα κΒ (Nuclear Factor- NF-κΒ), ο οποίος αποτελεί ενεργοποιητή της φλεγμονώδους απόκρισης.¹⁰⁹ Η αύξηση των ελεύθερων ριζών επάγει επίσης την αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης CCN1, μίας κυτοκίνης, η οποία σχετίζεται άμεσα με φλεγμονώδεις αποκρίσεις που προκαλούνται στο δέρμα λόγω της γήρανσης. Η αυξανόμενη φλεγμονώδης απόκριση σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη υπερέκφραση των κυτοκινών και των ιντερλευκινών διεγείρει την παραγωγή των ελεύθερων ριζών¹¹⁰ (Σχήμα 1.6).

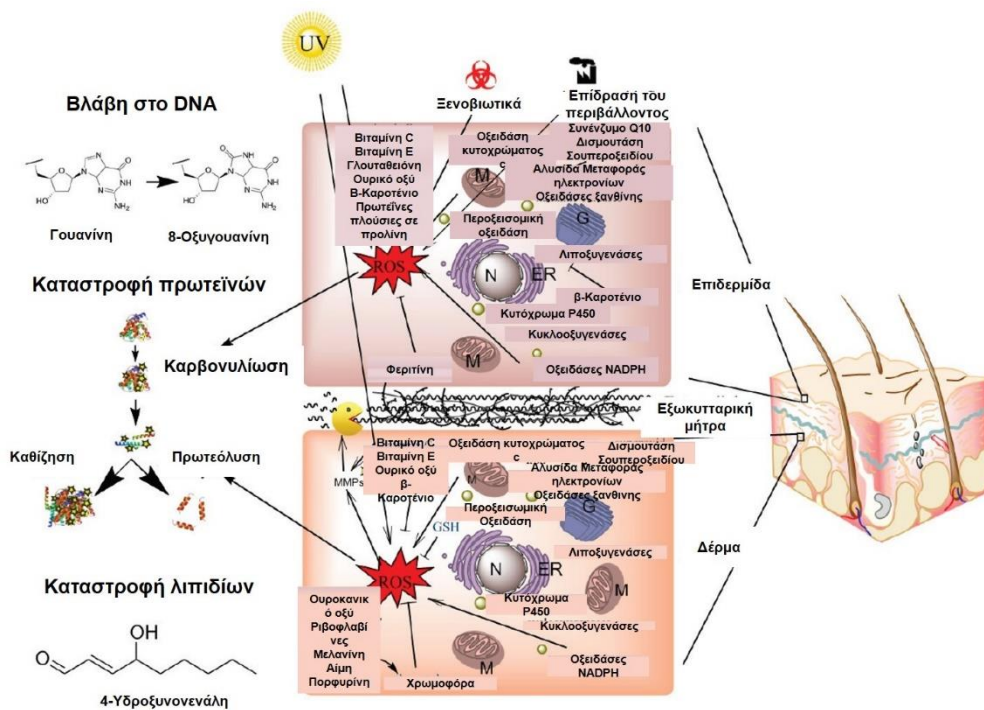


Σχήμα 1.6: Σχηματική απεικόνιση ενός μοντέλου γήρανσης του συνδετικού ιστού του ανθρώπινου δέρματος.

1.3.3 Μηχανισμός δράσης των ελεύθερων ριζών (ROS) στη γήρανση

Κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, σχηματίζονται κυρίως στα μιτοχόνδρια ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS), οι οποίες είναι ασταθείς και πολύ δραστικές. Εκτός από τη βιοχημική παραγωγή τους, αυτές οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται και από την επίδραση διαφόρων άλλων ενδογενών και εξωγενών παραγόντων. Ένα δίκτυο ενδογενών και εξωγενών αντιοξειδωτικών μπορεί να εξουδετερώσει ένα μέρος των ελεύθερων ριζών, αν και ένα ποσοστό αυτών των ριζών είναι δυνατό να παρακάμψει αυτά τα αμυντικά συστήματα. Σε μικρή συγκέντρωση, οι ROS διατηρούν την ομοιόσταση, συμβάλλουν σε αρκετές κυτταρικές λειτουργίες, ενώ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, όπως είναι η ενδοκυτταρική καταστροφή των βακτηρίων από τα φαγοκύτταρα, ειδικά από τα κοκκιοκύτταρα και τα μακροφάγα.^{114,115} Συμβάλλουν επίσης και σε ορισμένες κυτταρικές σηματοδοτικές οδούς, όπως είναι η οξειδοαναγωγική σηματοδότηση.¹¹⁶ Η ανεξέλεγκτη παραγωγή των ROS επάγει την τροποποίηση των κυτταρικών πρωτεϊνών και την αλλαγή στον τρόπο λειτουργίας τους, οδηγώντας σε δυσλειτουργία των κυττάρων και στη διαταραχή των ζωτικών κυτταρικών διεργασιών.¹¹⁶ Τα υψηλά επίπεδα των ROS προκαλούν βλάβες στη δομή των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA. Συγκεκριμένα, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να διαταράξουν την ακεραιότητα της μεμβράνης των λιπιδίων και να αυξήσουν τη ρευστότητα και τη διαπερατότητα της μεμβράνης. Στις πρωτεΐνες, οι ROS μπορούν να τροποποιήσουν τα αμινοξέα, να επέμβουν στην ακεραιότητα της δομής της πεπτιδικής αλυσίδας, να δημιουργήσουν παραπροϊόντα από παράπλευρες αντιδράσεις, να αλλάξουν το ηλεκτρικό φορτίο τους, να αναστείλλουν τη δράση ενζύμων και να πρωτεολύσουν τη δομή τους.¹¹⁷ Όσον αφορά το DNA, οι ROS οξειδώνουν τη δεοξυριβόζη με αποτέλεσμα τη διάσπαση του κλώνου του DNA, την

αφαίρεση νουκλεοτιδίων, την τροποποίηση των αζωτούχων βάσεων, και τη δημιουργία σταυροειδών δεσμών μεταξύ DNA-πρωτεΐνης^{114,118} (Σχήμα 1.7).



Σχήμα 1.7: Σχηματική απεικόνιση μεταξύ διαφορετικών πηγών ROS και των αντιοξειδωτικών συστημάτων του δέρματος.¹¹³

1.3.4 Μηχανισμοί δράσης της υπεριώδους ακτινοβολίας στην καταστροφή/γήρανση του δέρματος

Η έκθεση του δέρματος στην υπεριώδη ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει πολλές μοριακές και κυτταρικές αντιδράσεις που οδηγούν σε εσωτερικές διαταραχές.¹¹⁹ Μεταξύ άλλων, το DNA είναι ένα από τα κύρια μόρια που απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία προκαλώντας χημικές τροποποιήσεις στο μόριό του και οδηγώντας μελλοντικά σε πολλές μεταλλάξεις. Η ακτινοβολία UVB δρα άμεσα σχηματίζοντας κυκλοβουτανικά διμερή πυριμιδίνης και φωτοχημικών παραπροϊόντων.¹²⁰ Αυτό παρεμβαίνει στη διαδικασία της αντιγραφής του DNA, διακόπτει τη μεταγραφή και προκαλεί μεταλλάξεις κυρίως μέσα στο γονίδιο p53 το οποίο σχετίζεται με την καταστολή των όγκων, διαταρράσσοντας τον κυτταρικό κύκλο. Αυτές οι διαταραχές μπορούν να προκαλέσουν μετασχηματισμό στη δομή των κερατινοκυττάρων και των μελανοκυττάρων, οι οποίες εμφανίζονται ως όγκοι του δέρματος.¹²¹ Από την άλλη πλευρά, η ακτινοβολία UVA δρα έμμεσα διεγείροντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η συσσώρευση των ελεύθερων ριζών είναι αρκετά σημαντική, καθώς συμβάλλει στις παρακάτω κυτταρικές αλλοιώσεις:

- Μεταλλάξεις στο DNA του πυρήνα και των μιτοχονδρίων, λόγω της τροποποίησης της γουανίνης (8-υδροξυ-2''-δεοξυ-γουανίνη), της διάσπασης του κλώνου και της οξειδωσης των πυριμιδικών βάσεων.
- Καρβονυλίωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών και υπεροξειδωση των λιπιδίων.
- Απόπτωση των κερατινοκυττάρων της επιδερμίδας που έχουν καταστραφεί από ηλιακά εγκαύματα.

- Απελευθέρωση των κερατινοκυτταρικών προφλεγμονωδών κυτοκινών (κυρίως IL-1, IL-6, TNF-α) και των διαφόρων υποδοχέων, όπως ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor-EGFR), του παράγοντα νέκρωσης όγκου α (Tumor Necrosis Factor- TNF-α) και του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor-PAF), προσταγλανδινών και ινσουλίνης. Η υπεριώδης ακτινοβολία ενεργοποιεί επίσης τον πυρηνικό παράγοντα-κβ (NF-κβ), ο οποίος διεγείρει τη μεταγραφή των φλεγμονωδών κυτοκινών οι οποίες υπερεκφράζουν τις μεταλλοπρωτεΐνες της εξωκυτταρικής στοιβάδας (κυρίως τις MMP-8), μέσω των ουδετερόφιλων, ενώ ταυτόχρονα αποικοδομούν άλλες πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής στοιβάδας. Η μεταγραφή των μεταλλοπρωτεϊνών εξαρτάται από τον παράγοντα μεταγραφής AP1, ο οποίος εξαρτάται από την ενεργοποίηση της μεταβολικής οδού MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) που προκαλείται από τη δράση των ROS στα κερατινοκύτταρα.¹²² Από την άλλη, η υπερέκφραση των MMPs διεγείρει την παραγωγή των ενζύμων κολλαγόναση, ζελατινάση και στρομελυσίνη-1 στους ινοβλάστες και στα κερατινοκύτταρα, οδηγώντας στην αποικοδόμηση του κολλαγόνου, της ελαστίνης και άλλων συστατικών της εξωκυτταρικής στοιβάδας του δέρματος, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται η δράση των αναστολέων αυτών των ενζύμων.^{122,123}
- Ελάττωση της έκφρασης του παράγοντα TGF-β (Transforming Growth Factor-β), ο οποίος μειώνει την τροποποιημένη παραγωγή κολλαγόνου, ενώ ενισχύει την παραγωγή ελαστίνης, προκαλώντας αλλαγές στη δομή του δέρματος. Αυτές οι αλλαγές γίνονται εμφανείς με βαθιές ρητίδες, τραχιά υφή, και μελάγχρωση.
- Τοπική και συστηματική ανοσοκαταστολή μέσω της ενεργοποίησης ανοσοκατασταλτικών μορίων όπως τα IL-4, IL-10, IL-1β, TNF-α και PGE2 (Prostaglandin E2), ή μέσω τροποποίησης στην κυτταρική μορφολογία, λειτουργία ή αριθμό των κυττάρων Langerhans και T λεμφοκυττάρων.
- Καταστολή της έκφρασης μορίων όπως το MHC-II (Major Histocompatibility Complex Class-II), το αντιγόνο LFA-3 που σχετίζεται με τη λειτουργία των λεμφοκυττάρων, το ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1), το ICAM-3 (Intercellular Adhesion Molecule-1), το B7, το CD1a (Cluster of Differentiation-1a) και το CD4017 (Cluster of Differentiation-4017), με αποτέλεσμα να μειώνεται η συγκέντρωση των αντίστοιχων αντιγόνων στο δέρμα.

Όλες αυτές οι αλλοιώσεις συμβάλλουν στην ανάπτυξη διαφόρων δερματικών παθήσεων (φωτοδερματίτιδες, φωτοτοξική δερματίτιδα, φωτοαλλεργική δερματίτιδα, φωτοευαισθησία που προκαλείται από φάρμακα, μελάνωμα, λεύκη, ερυθρηματώδης λύκος, σμηγματορροϊκή δερματίτιδα, ψωρίαση) αλλά και διάφορες νεοπλασίες του δέρματος.

1.4 Ένζυμα που εμπλέκονται στην πρόωρη γήρανση του δέρματος

Σημαντικό χαρακτηριστικό του δέρματος που έχει υποστεί φωτογήρανση είναι η ανάπτυξη ενός παθολογικού φαινότυπου που ονομάζεται ηλιακή ελαστοποίηση και είναι η συσσώρευση του ακανόνιστου ιστού μέσα στο χόριο. Η υπεριώδης ακτινοβολία τετραπλασιάζει

την υπερέκφραση της ελαστίνης προκαλώντας ελαστόλυση. Κατά την ελαστόλυση διασπώνται οι ελαστικές ίνες από διάφορες πρωτεάσες, οι σημαντικότερες από τις οποίες είναι οι μεταλλοπρωτεάσες (κολλαγονάσες: MMP-1, MMP-8, MMP-13,) και οι ουδετερόφιλες σερινοπρωτεάσες (καθεψίνη G και λευκοκυτταρική ελαστάση) η βασική δράση των οποίων είναι η αποικοδόμηση της ελαστίνης. Η φωτογήρανση αποδυναμώνει το κεντρικό τμήμα και το αμινοτελικό άκρο της τροποελαστίνης, κάνοντάς την πιο ευαίσθητη στη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων, με αποτέλεσμα να επιταχύνεται η αποικοδόμηση της ελαστίνης. Στη φωτογήρανση αλλά και στην ενδογενή γήρανση διαδραματίζουν ρόλο βασικά ένζυμα που ανήκουν στις οικογένειες των σερινοπρωτεασών, των γλυκοσιδασών και των οξειδασών.

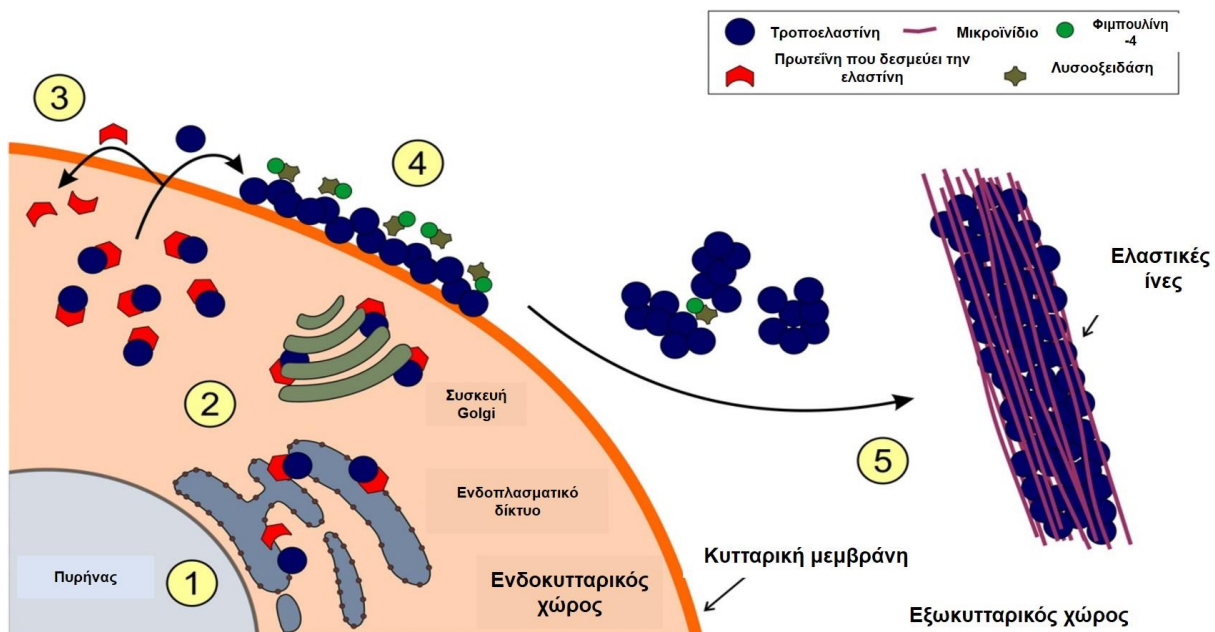
1.4.1 Σερινοπρωτεάσες (Ουδετερόφιλη Ελαστάση)

Κύριοι εκπρόσωποι των σερινοπρωτεασών που διασπούν την ελαστίνη είναι η ανθρώπινη ουδετερόφιλη ελαστάση και η παγκρεατική ελαστάση. Η ουδετερόφιλη ελαστάση βρίσκεται στους πυκνούς κόκκους των πολυμορφικών πυρηνικών λευκοκυττάρων και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φαγοκυττάρωση και στην άμυνα του ανοσοποιητικού συστήματος εναντίον των λοιμώξεων που προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς. Η παγκρεατική ελαστάση είναι αποθηκευμένη στο πάγκρεας, κυρίως με τη μορφή ανενεργού ζυμογόνου και εκκρίνεται στο έντερο. Μετά την έκκρισή της, ενεργοποιείται από τη δράση της θρυψίνης και συμμετέχει στη διαδικασία της πέψης. Και οι δύο ελαστάσες παρουσιάζουν εκλεκτική δράση και διασπούν υποστρώματα με συγκεκριμένους πεπτιδικούς δεσμούς, όπου συνήθως το αμινοξύ P1 περιέχει μικρή αλκυλική πλευρική αλυσίδα. Τόσο η παγκρεατική, όσο και η ουδετερόφιλη ελαστάση χρησιμοποιούν και άλλα υποστρώματα, φυσιολογικά ή μη, εκτός από την ελαστίνη. Συγκεκριμένα, η ουδετερόφιλη ελαστάση διαθέτει ισχυρή πρωτεολυτική δράση, η οποία είναι απαραίτητη για τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων του συνδετικού ιστού, καθώς και για την καταστροφή ξένων βακτηρίων που εισβάλλουν στον ανθρώπινο οργανισμό, οι οποίοι δε διαθέτουν καθόλου ελαστίνη στο περίβλημά τους.¹²⁴

1.4.2 Ελαστίνη: Το φυσικό υπόστρωμα των ελαστασών και η βιολογική της σημασία

Η ελαστίνη είναι μια από τις πρωτεΐνες που αποτελούν βασικά συστατικά της εξωκυτταρικής μεμβράνης του δέρματος. Επίσης, υπάρχει σε πολλούς συνδετικούς ιστούς και είναι υπεύθυνη για την ελαστικότητά τους. Η ελαστίνη συντίθεται από τους ινοβλάστες και τα κερατινοκύτταρα από το πρόδρομο μόριό της, την τροποελαστίνη, και παρέχει υποστήριξη στους ιστούς των αιμοφόρων αγγείων, των αρτηριών, των πνευμόνων και του δέρματος. Παρόλο που αποτελεί μόνο το 2% του συνόλου των πρωτεϊνών του δέρματος (μαζί με το κολλαγόνο, την ινιδίνη, το ινωδογόνο, την ινονεκτίνη, τη φιβουλίνη, τη λαμινίνη, την τενασκίνη και τη θρομβοσποδίνη αποτελούν δομικά συστατικά της εξωκυτταρικής μεμβράνης), η ελαστίνη συμβάλλει σημαντικά στη διατήρηση της ομοιόστασης του δέρματος. Η δομή της ελαστίνης αποτελείται κυρίως από αμινοξέα με μικρές πλευρικές αλυσίδες, όπως είναι η γλυκίνη, η προλίνη, η αλανίνη, η λευκίνη και η βαλίνη, ενώ στερείται βασικά αρωματικά αμινοξέα και είναι

οργανωμένη σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 3-9 αμινοξέων, σχηματίζοντας έτσι εύκαμπτες και εξαιρετικά δυναμικές δομές της ελαστίνης (**Σχήμα 1.8**).¹²⁵ Η ελαστίνη στην ουσία είναι μια πρωτεΐνη με αρκετά ευέλικτη δομή, η οποία συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με ασυνήθιστα αμινοξέα, όπως είναι η δεσμοσίνη και η ισοδεσμοσίνη, τα οποία αποτελούνται από πυριδινικούς δακτυλίους. Κύριοι εκπρόσωποι των σερινοπρωτεασών που διασπούν την ελαστίνη είναι η ουδετερόφιλη ελαστάση (HNE) και η παγκρεατική ελαστάση (PPE). Εκτός από τις σερινοπρωτεάσες, η ελαστίνη μπορεί να διασπαστεί και από πολλές άλλες πρωτεάσες, όπως είναι οι θειολικές πρωτεάσες, με κύριο εκπρόσωπο την παπαΐνη, μεταλλοπρωτεάσες, όπως είναι η ελαστάση από το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa*, καθώς και από άλλα παρόμοια ένζυμα που εκκρίνονται από αρκετούς μολυσματικούς παθογόνους μικροοργανισμούς (π.χ. *Schistosoma mansoni*).¹²⁶



Σχήμα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση των κύριων σταδίων σύνθεσης και απελευθέρωσης της ελαστίνης: **(1)** Σύνθεση της τροποελαστίνης στο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου στη συνέχεια δεσμεύεται στην πρωτεΐνη-υποδοχέα EBP. **(2)** Το σύμπλοκο τροποελαστίνη-EBP μεταφέρεται μέσω της συσκευής Golgi και εκκρίνεται στην κυτταρική μεμβράνη. **(3)** Η τροποελαστίνη απελευθερώνεται από την πρωτεΐνη-υποδοχέα EBP και σχηματίζει σφαιρίδια στην επιφάνεια του κυττάρου. Η EBP διασπάται λόγω της αλληλεπίδρασής της με τις γλυκοζαμινογλυκάνες του κυττάρου και ανακυκλώνεται πίσω στο κύτταρο. **(4)** Η τροποελαστίνη συμπυκνώνεται σε μόρια μικρότερου μεγέθους με τη βοήθεια της φιβουλίνης-4. **(5)** Μετά το σχηματισμό μικρών ομάδων μορίων της τροποελαστίνης, αυτά μετακινούνται έξω από την πλασματική μεμβράνη, μέσω της εξωκυτταρικής στιβάδας (ECM) και συσσωματώνονται στα μικροϊνίδια προκειμένου να σχηματίσουν την ελαστίνη (ελαστική ίνα).⁵³

Η ελαστίνη είναι αρκετά ευαίσθητη στην υπεριώδη ακτινοβολία UV. Η εκτεταμένη έκθεση του δέρματος στην ηλιακή ακτινοβολία προκαλεί ένα φαινόμενο που ονομάζεται ηλιακή ελαστοποίηση και αποτελεί βασικό παράγοντα της φωτογήρανσης. Η ηλιακή ελαστοποίηση προκαλείται από έναν κύκλο στον οποίο αποικοδομούνται οι ελαστικές ίνες, εξέρχονται από την εξωκυτταρική μεμβράνη και επανασυναρμολογούνται με διαφορετική δομή, με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται στο χόριο. Η ελαστίνη αποικοδομείται σε μεγάλο βαθμό από μεταλλοπρωτεάσες όπως είναι η μεταλλοελαστάση των ανθρώπινων μακροφάγων (MMP12), η οποία εκκρίνεται από τα κερατινοκύτταρα, τους ινοβλάστες και διάφορα φλεγμονώδη κύτταρα.¹²⁷

1.4.3 Γλυκοσιδάσες (Υαλουρονιδάσες)

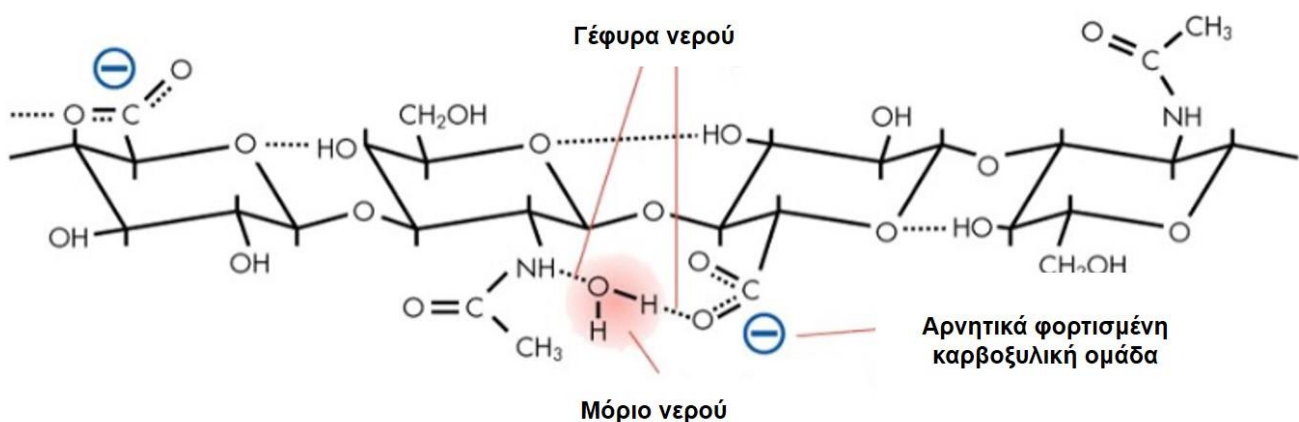
Οι γλυκοσιδάσες είναι ένζυμα που βρίσκονται και στο ενδοκυτταρικό και στο εξωκυτταρικό περιβάλλον του κυττάρου και ο βασικός τους ρόλος είναι η υδρόλυση των γλυκοσιδικών δεσμών. Υπάρχουν δύο τύποι γλυκοσιδασών: (α) οι εξω-γλυκοσιδάσες οι οποίες απελευθερώνουν ένα μόνο μονοσακχαρίτη από το μη αναγωγικό άκρο ενός ολιγοσακχαρίτη και (β) οι ενδο-γλυκοσιδάσες, οι οποίες διασπούν τους εσωτερικούς γλυκοσιδικούς δεσμούς. Οι γλυκοσιδάσες ως ένζυμα παρουσιάζουν ποικίλες λειτουργικές δράσεις. Η βασικότερη δράση τους είναι η αποικοδόμηση των υδατανθράκων της εξωκυτταρικής στιβάδας σε μονοσακχαρίτες και η αποικοδόμηση πολλών ενδοκυτταρικών συστατικών. Οι γλυκοσιδάσες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καταβολισμό των πολυσακχαριτών που πραγματοποιούνται στις διάφορες μεταβολικές οδούς (όπως είναι η αποικοδόμηση του γλυκογόνου ως πηγή ενέργειας) και στους διάφορους βιοχημικούς κύκλους (όπως είναι η λυσοσωμική αποικοδόμηση των κυτταρικών συστατικών). Από την άλλη, υπάρχουν κάποιες ενδοκυτταρικές γλυκοσιδάσες, οι οποίες βρίσκονται σε μικρό ποσοστό (α-μαννοσιδάσες, *N*-ακετυλογλυκοσαμινιδάσες) οι οποίες απαιτούνται για την ωρίμανση των ολιγοσακχαριτών που συνδέονται με ασπαραγίνη (*N*-γλυκάνες ή *N*-συνδεδεμένοι ολιγοσακχαρίτες) σε εκκριτικές και μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες.

Μία οικογένεια γλυκοσιδασών που συμμετέχει ενεργά στη σταδιακή αποικοδόμηση του δερματικού ιστού είναι η οικογένεια των υαλουρονιδασών. Οι υαλουρονιδάσες (Hyal) (E.C.3.2.1.35) αποτελούν μια οικογένεια ενδο-γλυκοσιδασών βασικός ρόλος των οποίων είναι η αποικοδόμηση των πολυμερικών υποστρωμάτων όπως είναι το υαλουρονικό οξύ (HA) και η χονδροϊτίνη.¹²⁸ Η βασική τους δράση είναι η διάσπαση των β-1→4 γλυκοσιδικών δεσμών του υαλουρονικού οξέος (HA). Οι πρώτες μελέτες αυτών των ενζύμων έγιναν το 1971 από τον Karl Meyer¹²⁹, ο οποίος τα διαχώρισε σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με το μηχανισμό δράσης που ακολουθούν: (1) βακτηριακές υαλουρονιδάσες (E.C.4.2.99.1), γνωστές και ως ενδο-β-ακετυλοεξοζαμινιδάσες, (2) υαλουρονιδάσες (E.C. 3.2.1.36) γνωστές και ως ενδο-β-γλυκουρονιδάσες και (3) υαλουρονιδάσες των θηλαστικών (E.C. 3.2.1.35) γνωστές και ως υδρολάσες, οι οποίες παράγουν κυρίως τετρασακχαρίτες και εξασακχαρίτες των πολυμερικών υποστρωμάτων τους.

1.4.4 Το υαλουρονικό οξύ: το φυσικό υπόστρωμα των υαλουρονιδασών και η βιολογική του σημασία

Το υαλουρονικό οξύ (HA) είναι μια γλυκοζαμινογλυκάνη (GAG), το μόριο της οποίας είναι μη διακλαδισμένο και μη θειωμένο και αποτελεί τη μοναδική γλυκοζαμινογλυκάνη που παράγεται έξω από το σύστημα Golgi. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από το υαλώδες σώμα του οφθαλμού το 1934 από το Meyer¹³⁰ και έχει σημαντικές ιατρικές εφαρμογές. Το HA είναι ένα πολυμερές μόριο το οποίο αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες δισακχαριτών που συντίθενται από τα μόρια D-γλυκουρονικό οξύ (GlcA) και *N*-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνη (GlcNAc). Μεταξύ των GlcA και της GlcNAc αναπτύσσονται β-1,3 δεσμοί, ενώ μεταξύ των GlcNAc και GlcA αναπτύσσονται β-1,4 δεσμοί (**Σχήμα 1.9**). Η β-διαμόρφωση είναι αρκετά σημαντική για τη μεγάλη σταθερότητα του μορίου, καθώς οι βασικές λειτουργικές ομάδες –OH

και $-COOH$ του μορίου, καθώς και τα ανωμερικά πρωτόνια, βρίσκονται σε ισημερινές θέσεις, ενώ τα υδρογόνα καταλαμβάνουν τις αξονικές θέσεις.¹³¹ Οι δισακχαρίτες επαναλαμβάνονται περίπου 25000 φορές, προκειμένου να δημιουργηθεί το πολυμερές HA με μοριακό βάρος μεγαλύτερο του ενός εκατομμυρίου και κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 10^6-10^7 .¹³² Σε υδατικό διάλυμα, το HA αποκτά δευτεροταγή δομή, και ακαμψία, κυρίως λόγω της παρουσίας δεσμών υδρογόνου, ενώ συμπεριφέρεται ως διογκωμένο πηγίο με διάμετρο 500 nm (**Σχήμα 1.9**). Η αλυσίδα του μορίου συσπειρώνεται σε συγκεντρώσεις της τάξης του 1 g/L.¹³³ Στο ανθρώπινο σώμα το υαλουρονικό οξύ βρίσκεται με τη μορφή άλατος και ανιχνεύεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στους χόνδρους και σε αρκετούς μαλακούς συνδετικούς ιστούς, όπως είναι το δέρμα, ο ομφάλιος λώρος, το αρθρικό υγρό και το υαλώδες υγρό του ματιού. Σημαντικά ποσοστά του υαλουρονικού οξέος βρίσκονται επίσης στους πνεύμονες, στους νεφρούς, στον εγκέφαλο και στους μυικούς ιστούς. Η χημική δομή του HA είναι απλή, χωρίς πολλές αλλαγές όπως σε άλλες γλυκοζαμινογλυκάνες, οι οποίες περιέχουν διακλαδισμένες αλυσίδες ή θειούχα αμινοξέα. Αυτή η απλή και αμετάβλητη γραμμική δομή δηλώνει ότι το μέγεθος του HA περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό όλης της βιολογικής πληροφορίας που το χαρακτηρίζει. Πολλά βακτήρια περιέχουν επίσης υψηλές συγκεντρώσεις HA. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι εμφανίζεται αργότερα εξελικτικά, σε σύγκριση με άλλα υδαταναθρακικά πολυμερή όπως οι γλυκοζαμινογλυκάνες, η χιτίνη και η κυτταρίνη.¹³⁴



Σχήμα 1.9: Μοριακή δομή του HA το οποίο σχηματίζει γέφυρα με το νερό. Το υδρόφιλο μέρος του HA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητά του να συνδέεται με το νερό πολύ πιο αποδοτικά, από ότι πολλά από τα υπόλοιπα πολυμερή. Σε υδατικό διάλυμα, μία γέφυρα νερού σχηματίζεται μεταξύ της αμινομάδας και της καρβοξυλομάδας του HA και του νερού, όπως φαίνεται στο σχήμα. Αυτή η γέφυρα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα της δομής του HA.¹³¹

Το HA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε αρκετές βιολογικές διαδικασίες όπως είναι η ανάπτυξη των κυττάρων, η επούλωση των τραυμάτων στο δέρμα, η μετανάστευση των κυττάρων και ο πολλαπλασιασμός τους. Από την άλλη, εμπλέκεται σε πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως είναι η ανάπτυξη καρκίνου, αγγειακές παθήσεις και ο διαβήτης. Το HA βρίσκει σημαντικές ιατρικές εφαρμογές, καθώς χρησιμοποιείται ως δείκτης ανίχνευσης αρκετών ασθενειών όπως όγκος, ρευματοειδής αρθρίτιδα και διάφορες ηπατικές παθήσεις.¹³¹ Επιπλέον σε ασθενείς με παθήσεις των αρθρώσεων γίνονται ενέσεις HA, ενώ χρησιμοποιείται σε οφθαλμολογικές και ωτολογικές χειρουργικές επεμβάσεις. Έχει βρεθεί επίσης ότι το HA μπορεί να δεσμεύσει τις ελεύθερες ρίζες.¹³³ Ο διπλός δεσμός που σχηματίζεται στον πυρανοζικό δακτύλιο του ολιγοσακχαρίτη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μείωση της τοξικότητας από τις

ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται στο δέρμα από την ακτινοβολία UV.¹³⁵ Επομένως, ο χαρακτηρισμός της δομής του HA μετά τη διάσπασή του από ένζυμα είναι πολύ σημαντικός. Το HA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την προστασία του δέρματος από τις ελεύθερες ρίζες. Το HA το οποίο διασπάται ενζυμικά είναι αυτό που διαθέτει τη μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών, από ότι το ακέραιο μόριο. Ακόμη, παρουσιάζει σημαντική βιοτεχνολογική σημασία, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θεραπευτική χρήση ως συστατικό καλλυντικών προϊόντων καθώς και στην ιατρική χειρουργική ως παράγοντας κατά της προσκόλλησης. Προϊόντα HA χρησιμοποιούνται επίσης και σε οφθαλμολογικά και ωτολογικά προϊόντα. Ωστόσο, η βιοδιαθεσιμότητα του HA χαμηλού μοριακού βάρους φαίνεται να είναι μεγαλύτερη από το πολυμερές HA.

1.4.5 Οξειδάσες (Τυροσινάση)

Οι οξειδάσες ανήκουν στην οικογένεια των οξειδοαναγωγασών (E.C.1) οι οποίες καταλύουν την ανταλλαγή ηλεκτρονίων ή ισοδύναμων οξειδοαναγωγής μεταξύ ενός μορίου δότη και ενός μορίου δέκτη, σε αντιδράσεις που περιλαμβάνουν μεταφορά ηλεκτρονίων, αφαίρεση πρωτονίων, αφαίρεση υδρογόνου, μεταφορά υδριδίου, εισαγωγή οξυγόνου κ.α. Συγκεκριμένα, οι οξειδάσες καταλύουν αντιδράσεις οξειδωτικής ή αναγωγικής χρησιμοποιώντας το μοριακό οξυγόνο (O₂) ως δέκτη ηλεκτρονίων. Αυτές οι αντιδράσεις είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την ανάπτυξη του οξειδωτικού στρες των κυττάρων, που αποτελεί βασικό παράγοντα της γήρανσης του δέρματος. Στην οικογένεια των οξειδασών ανήκει και η τυροσινάση. Η τυροσινάση είναι ένα μεμβρανικό μεταλλοένζυμο που ανήκει στην οικογένεια των ενζύμων που περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο ιόντα χαλκού τύπου 3 (EC 1. 14. 18.1).¹³⁶ Το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης περιέχει δύο ιόντα χαλκού. Το κυριότερο χαρακτηριστικό αυτού του ενζύμου είναι ο διπλός λειτουργικός του χαρακτήρας: η τυροσινάση μπορεί να δράσει είτε ως μονοφαινόλαση (ή κρεσολάση), υδροξυλιώνοντας μονοφαινόλες σε ο-διφαινόλες, είτε ως διφαινόλαση (ή κατεχολάση), οξειδώνοντας ο-διφαινόλες σε ο-κινόνες. Η τυροσινάση μπορεί να βρεθεί σε μεγάλο ποσοστό στη φύση, καθώς βρίσκεται στους φλοιούς φρούτων και λαχανικών, αλλά και στους ζωντανούς οργανισμούς (π.χ. θηλαστικά, ζώα, αρθρόποδα, φυτά, φύκη και βακτήρια). Το ένζυμο αυτό καταλύει μία από τις πιο σημαντικές μεταβολικές οδούς: τη μελανοσύνθεση. Στα θηλαστικά, η τυροσινάση καταλύει τα πρώτα στάδια της μελανοσύνθεσης, η οποία είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη του χρώματος στο δέρμα, στις τρίχες των μαλλιών και στην ίριδα του ματιού. Παρόλα αυτά, σε συνθήκες μη ελεγχόμενης υπερέκφρασης της τυροσινάσης, η παραγόμενη χρωστική μελανίνη, μπορεί να προκαλέσει μη επιθυμητές καφέ κηλίδες στο ανθρώπινο δέρμα, φακίδες, καθώς και ανάπτυξη μελανώματος. Από την άλλη όμως, υπάρχουν και κάποιες δερματικές παθήσεις, όπως είναι η λεύκη και ο αλμπινισμός, όπου η παραγωγή μελανίνης πραγματοποιείται σε μικρό ποσοστό ή καθόλου. Σε αυτή την περίπτωση, η ενίσχυση της δράσης της τυροσινάσης είναι πολύ σημαντική. Στα φυτά, στα αρθρόποδα και στα βακτήρια, η τυροσινάση δρα ως φυσική ασπίδα, καθώς προστατεύει τους ιστούς τους από εξωτερικές βλάβες και τραύματα. Η τυροσινάση μπορεί επίσης να βρεθεί στους ιστούς των φρούτων και των λαχανικών, όπου αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο και προκαλεί την ενζυμική αμαύρωση της

σάρκας τους, ένα σημαντικό κριτήριο για την καταστροφή της ποιότητας, του αρώματος και της γεύσης τους. Έτσι, ο έλεγχος της δράσης της τυροσινάσης είναι αρκετά σημαντικός τόσο για την πρόληψη του μελανώματος, όσο και για τη βελτίωση της ποιότητας των φρούτων και των λαχανικών.

1.4.6 Η μελανίνη: Το φυσικό προϊόν της δράσης της τυροσινάσης

Η μελανίνη είναι ένας ευρύς όρος που περιγράφει τις φυσικές χρωστικές που συντίθενται στους περισσότερους οργανισμούς. Η μελανίνη παράγεται μέσα από την πολύπλοκη χημική διαδικασία της μελανογένεσης, όπου αρχικά γίνεται οξειδωση της τυροσίνης, η οποία στη συνέχεια πολυμερίζεται. Οι φυσικές χρωστικές παράγονται αποκλειστικά στα μελανοκύτταρα. Υπάρχουν πέντε βασικοί τύποι μελανίνης: (1) ευμελανίνη, (2) φαιομελανίνη, (3) νευρομελανίνη, (4) αλλομελανίνη και (5) πυομελανίνη. Ο πιο συνηθισμένος τύπος είναι η ευμελανίνη, η οποία διακρίνεται σε μαύρη και καφέ. Η φαιομελανίνη συντίθεται όταν υπάρχει κυστεΐνη και ευθύνεται για το κόκκινο χρώμα των μαλλιών. Η νευρομελανίνη βρίσκεται στον εγκέφαλο και ευθύνεται για νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος Parkinson. Η αλλομελανίνη και η πυομελανίνη είναι μελανίνες που δεν περιέχουν άζωτο στη δομή τους. Στο ανθρώπινο σώμα, η μελανογένεση προκαλείται από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, οδηγώντας σε καρκίνο του δέρματος. Η μελανίνη απορροφά αποτελεσματικά το ηλιακό φως, καθώς μπορεί να εξαφανίσει μεγαλύτερο από 99.9% ποσοστό της υπεριώδους ακτινοβολίας που απορροφάται από το δέρμα. Εξαιτίας αυτής της ιδιότητας, η μελανίνη θεωρείται ότι προστατεύει τα κύτταρα του δέρματος από βλάβες που προκαλούνται από την ηλιακή ακτινοβολία UVB, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο τον κίνδυνο μείωσης του φυλλικού οξέος και, συνεπώς, της καταστροφής του δέρματος. Η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθους καρκίνου των μελανοκυττάρων (μελάνωμα). Μελέτες έχουν δείξει ότι άτομα με πιο συμπυκνωμένη μορφή μελανίνης, δηλαδή πιο σκούρο τόνο δέρματος, έχουν χαμηλότερη πιθανότητα να εμφανίσουν καρκίνο του δέρματος, αν και αυτή η σχέση μεταξύ χρώματος και προστασίας από την ηλιακή ακτινοβολία είναι ακόμη αβέβαιη.¹²⁷

B. Περιγραφή μεθοδολογιών

1.5 Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Η **Ενζυμική Κινητική**, ως τμήμα της Ενζυμολογίας, μελετά τους ενζυμικούς μηχανισμούς, τις συνθήκες και τις ταχύτητες των ενζυμικών αντιδράσεων και κατατάσσεται συστηματικά στην κινητική των καταλυόμενων χημικών αντιδράσεων. Οι ιδιαιτερότητές της προκύπτουν μόνο από τη μακρομοριακή φύση του καταλύτη, που είναι φυσική πρωτεΐνη από διάφορους οργανισμούς (ένζυμο).

Έχει βρεθεί ότι η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης εξαρτάται από τους εξής παράγοντες:¹³⁷

(α) Τη συγκέντρωση του υποστρώματος

(β) Τη συγκέντρωση του ενζύμου

(γ) Τη θερμοκρασία στην οποία γίνεται η ενζυμική αντίδραση

(δ) Την τιμή του pH του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης

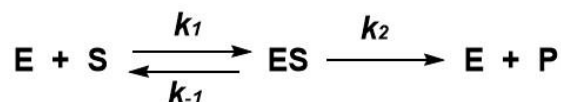
(ε) Την παρουσία διαφόρων ενζυμικών ή μη ενζυμικών τροποποιητών (όπως π.χ. αναστολέων, ενεργοποιητών κτλ.)

Η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης, ως συνάρτηση πολλών παραμέτρων είναι η μαθηματική έκφραση της καταλυτικής διεργασίας σε όρους σταθερών ταχύτητας και συγκεντρώσεων των αντιδρώντων. Η ενζυμική κινητική αποτελεί μερική περίπτωση της χημικής κινητικής. Επομένως, η επίδραση των ενζύμων μειώνει την απαιτούμενη ενέργεια ενεργοποίησης κατά τη μετατροπή των αντιδρώντων σε προϊόντα. Η διαφορά των επιπέδων της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ αντιδρώντων και προϊόντων μιας αντίδρασης έχει μια τιμή ΔG^0 , που δεν αλλάζει με την παρουσία του ενζύμου. Εκείνο που αλλάζει είναι η ενέργεια ενεργοποίησης ΔG^\ddagger .

1.5.1 Εξίσωση Michaelis-Menten

Η πρώτη γενική εξίσωση ταχύτητας για ενζυμικές αντιδράσεις διατυπώθηκε από τον Henri, το 1902.¹³⁷ Πρώτος αυτός παρατήρησε ότι η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση του ενζύμου $[E]_0$ και αυξάνεται μη γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος $[S]$ ως μια μέγιστη τιμή.

Ο Henri βασίστηκε στην υπόθεση ότι μια ενζυμική αντίδραση πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Στο πρώτο, σχηματίζεται ένα σύμπλοκο μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος, το οποίο στη συνέχεια (δεύτερο στάδιο) διασπάται προς ελεύθερο ένζυμο και προϊόντα κατά το **Σχήμα** αντίδρασης 1.10. Έτσι, έγινε μια πρώτη προσπάθεια να παραχθεί μια εξίσωση που να δίνει τη μεταβολή της ταχύτητας συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος, η οποία αποτελεί σημαντικό παράγοντα που καθορίζει την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.



Σχήμα 1.10: Περιγραφή της εξίσωσης Michaelis-Menten.

όπου **E** είναι το ένζυμο

S το υπόστρωμα

ES το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος

P το προϊόν ή τα προϊόντα της ενζυμικής αντίδρασης

k₁, **k₋₁**, και **k₂** οι σταθερές ταχύτητας των στοιχειωδών αντιδράσεων

Λίγα χρόνια αργότερα, οι Michaelis και Menten¹³⁷ επιβεβαίωσαν πειραματικά τις θεωρητικές προτάσεις του Henri. Μάλιστα, πρότειναν μια νέα ελαφρώς τροποποιημένη εξίσωση

η οποία δίνει τη μεταβολή της ταχύτητας σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος και έγινε γνωστή ως εξίσωση Michaelis-Menten ή εξίσωση Henri-Michaelis-Menten. Από τότε, η εξίσωση των Michaelis-Menten έγινε ευρέως αποδεκτή και μέχρι σήμερα αποτελεί τη βασική εξίσωση της ενζυμικής κινητικής. Η θεωρητική βάση στην οποία στηρίχθηκαν οι Michaelis και Menten για την παραγωγή της εξίσωσής τους είναι ίδια με αυτήν στην οποία στηρίχθηκε ο Henri και ονομάστηκε “**θεωρία της σταθερής κατάστασης**”. Σύμφωνα με αυτήν, αμέσως μόλις αρχίζει η αντίδραση, δημιουργείται μια σταθερή κατάσταση (steady state) τέτοια ώστε ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης του συμπλόκου **ES**, σε συνάρτηση με το χρόνο, να είναι στην ουσία μηδέν όταν συγκρίνεται με το ρυθμό μεταβολής της συγκέντρωσης των ενώσεων που αντιδρούν αλλά και των προϊόντων που προκύπτουν, δηλαδή $\frac{d[ES]}{dt} \approx 0$.¹³⁷

Η εξίσωση (1) είναι η μαθηματική εξίσωση, που περιγράφει τη σχέση μεταξύ της ταχύτητας **v** μιας ενζυμικής αντίδρασης και της συγκέντρωσης **[S]** του υποστρώματος και είναι γνωστή ως **εξίσωση Michaelis-Menten (Εξίσωση 1.1)**.

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1.1)$$

όπου **V_{max}** είναι η μέγιστη ταχύτητα στην οποία μπορεί να φθάσει θεωρητικά η ενζυμική αντίδραση, και **K_m** μια παράμετρος που καλείται σταθερά Michaelis-Menten.

Η παραγωγή της εξίσωσης Michaelis-Menten βασίστηκε στο **Σχήμα** αντίδρασης **1.10** και στις υποθέσεις:

Στη διάρκεια της αντίδρασης ισχύουν οι σχέσεις **[E]₀ << [S]** και **[E]₀ = [E] + [ES]**, (όπου **[E]** η συγκέντρωση του μη δεσμευμένου ενζύμου).

Λίγο μετά την έναρξη της αντίδρασης, αποκαθίσταται η σταθερή κατάσταση ($\frac{d[ES]}{dt} = 0$)

Η ταχύτητα της αντίδρασης δίνεται από τη σχέση **v = k₂ [ES]**

Με βάση τα παραπάνω μπορούμε να γράψουμε τις εξισώσεις (α) και (β), από όπου με αντικατάσταση στις σχέσεις **[E]₀ = [E] + [ES]** και **v = k₂ [ES]** καταλήγουμε στην εξίσωση (γ),

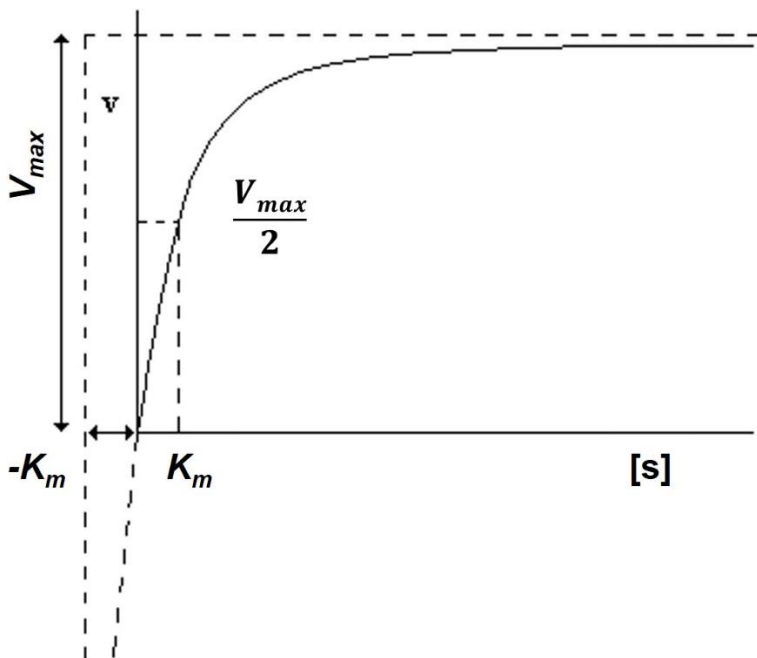
όπου **K_m = $\frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1}$** και **V_{max} = k₂[E]₀**. Η σταθερά ταχύτητας **k₂**, στον προηγούμενο τύπο,

αναφέρεται και ως **k_{cat}**.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E] [S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] = 0 \quad (\alpha) \quad [E] = \frac{(k_{-1} + k_2)[ES]}{k_1[S]} \quad (\beta)$$

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]}{\frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} + [S]} \quad \text{ή} \quad v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m} \quad (\gamma)$$

Πρόκειται για την εξίσωση μιας ορθογώνιας υπερβολής. Οι τιμές των παραμέτρων V_{max} και K_m αντιστοιχούν προς τις αποστάσεις των αξόνων V και $[S]$ από τις ασύμπτωτες της υπερβολής, αντίστοιχα (Σχήμα 11).



Σχήμα 1.11: Γραφική απεικόνιση της εξίσωσης Michaelis-Menten.

1.5.2 Μελέτη αναστολής ενζύμων

Υπάρχουν πολλές ουσίες οι οποίες έχουν την ικανότητα να μειώνουν τη δραστηριότητα μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης και είναι γνωστές ως αναστολείς των ενζύμων. Οι αναστολείς ενεργούν είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο, και επεμβαίνουν στις καταλυτικές ιδιότητες του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Οι αναστολείς μπορεί να είναι φυσικά συστατικά του κυττάρου, είτε ουσίες ξένες προς αυτό. Ως προς τη δράση τους, μπορούν να λειτουργήσουν εκλεκτικά, καθώς μπορούν να αλληλεπιδράσουν με λίγες και συγκεκριμένες θέσεις πρόσδεσης που υπάρχουν στο ένζυμο. Οι αναστολείς διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: στους αντιστρεπτούς και στους μη αντιστρεπτούς. Η κλασσική ενζυμική κινητική μελετάει διάφορα είδη αναστολής, τα κυριότερα από τα οποία είναι: η αντιστρεπτή αναστολή, όπου οι αναστολείς δεσμεύονται αντιστρεπτά με το ένζυμο είτε μη αντιστρεπτά. Στην πρώτη περίπτωση, το ένζυμο μπορεί να ανακτήσει πλήρως τη δραστηριότητά του όταν αφαιρεθεί ο αναστολέας, ενώ στη δεύτερη περίπτωση οι αναστολείς δεσμεύονται μόνιμα ισχυρά πάνω στο ένζυμο με αποτέλεσμα αυτό να αδρανοποιείται συνήθως οριστικά.

1.6. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)

Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) υψηλής διακριτικής ικανότητας είναι μία ευρέως αναγνωρισμένη και αξιόπιστη μεθοδολογία προσδιορισμού δομών οργανικών μορίων και βιολογικών μακρομορίων σε κατάσταση διαλύματος και σε στερεή κατάσταση.¹³⁸

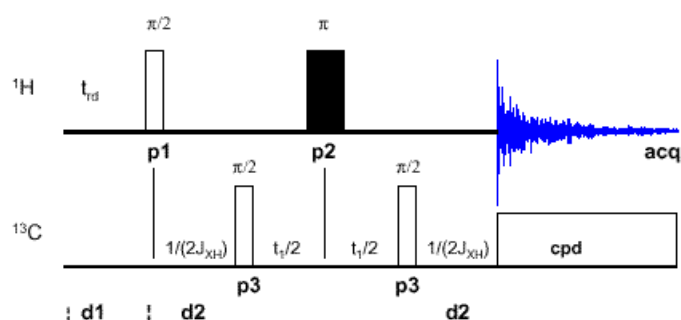
1.6.1 Αρχή Μεθόδου

Η σπουδαιότητα της φασματοσκοπίας NMR βασίζεται στη δυνατότητα διαφοροποίησης κάθε πυρήνα ανάλογα με το χημικό του περιβάλλον. Αυτό σημαίνει ότι η συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα επηρεάζεται από την κατανομή των ηλεκτρονίων στους χημικούς δεσμούς του μορίου. Ο πυρήνας δηλαδή υφίσταται τη λεγόμενη ηλεκτρονιακή προστασία του που είναι τόσο μεγαλύτερη όσο μεγαλύτερη είναι η ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από τον πυρήνα του υδρογόνου.¹³⁹ Η συνειφορά των τοπικών διαμαγνητικών ρευμάτων στην τιμή της χημικής μετατόπισης εξαρτάται από αυτή την ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Ο παράγοντας αυτός έχει ιδιαίτερη σημασία στην κλίμακα των χημικών μετατοπίσεων του πρωτονίου. Το φαινόμενο της χημικής μετατόπισης προκύπτει από την προστασία των πυρήνων όταν αυτά βρεθούν μέσα στο εξεταζόμενο μαγνητικό πεδίο. Το ηλεκτρονιακό περιβάλλον των πυρήνων προκαλεί διακυμάνσεις στη χημική μετατόπιση. Οποιοσδήποτε παράγοντας που θα προκαλέσει αλλαγή στην πυκνότητα των ηλεκτρονίων του πυρήνα, θα αλλάξει και τη χημική μετατόπιση.¹⁴⁰ Η δεύτερη παράμετρος είναι η σταθερά σύζευξης s_i-s_j ή κλιμακούμενης σύζευξης J , που εμφανίζεται μεταξύ δύο πυρήνων που έχουν spin I_i και I_j . Οι σταθερές σύζευξης εξαρτώνται από το περιβάλλον του μορίου και το σχετικό προσανατολισμό ή τη μοριακή γεωμετρία των πυρήνων και για το λόγο αυτό διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της δομής. Οι σταθερές σύζευξης δεν εξαρτώνται από το μαγνητικό πεδίο. Όσο πιο μικρή απόσταση έχουν οι πυρήνες μεταξύ τους, τόσο μεγαλύτερη είναι η σταθερά σύζευξης. Η κλίμακα χημικών μετατοπίσεων του ^1H εκτείνεται σε μια περιοχή ~ 20 ppm η οποία μπορεί να χωριστεί σε μικρότερα τμήματα, τα οποία διαχωρίζονται στην κλίμακα του NMR, με βάση το διαφορετικό χημικό περιβάλλον που τα χαρακτηρίζει.

1.6.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Δύο Διαστάσεων

1.6.2.1 Τεχνική Ετεροπυρηνικής Φασματοσκοπίας Συσχέτισης Πολλαπλού Κβάντου (^1H - ^{13}C (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, HMQC ^1H - ^{13}C))

Αρχή Μεθόδου: Η φασματοσκοπία HMQC ^1H - ^{13}C συσχετίζει τους πυρήνες του ^{13}C που βρίσκονται σε άμεση σύζευξη με τους πυρήνες ^1H ($^1J_{\text{HC}}$). Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMQC ^1H - ^{13}C μπορεί, περιγραφικά, να διακριθεί σε δύο στάδια (**Σχήμα 1.12**). Στο πρώτο στάδιο (**A**) επιτυγχάνεται η μεταφορά μαγνήτισης από τον πυρήνα του ^1H στον πυρήνα του ^{13}C , μέσω της εφαρμογής 90° παλμών και στους δύο πυρήνες. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται και η καταστολή των σημάτων συντονισμού των ^1H πυρήνων που δε συζευγνύονται με πυρήνες ^{13}C . Στο δεύτερο στάδιο (**B**) η μαγνήτιση μεταφέρεται από τον πυρήνα του ^{13}C στον πυρήνα του ^1H και στη συνέχεια ανιχνεύεται. Η παλμική ακολουθία έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός διδιάστατου χάρτη που αποτελείται μόνο από τις κορυφές που αντιστοιχούν στους πυρήνες ^1H - ^{13}C , και συσχετίζονται μεταξύ τους μέσω της σταθεράς σύζευξης $^1J_{\text{CH}}$.¹⁴¹



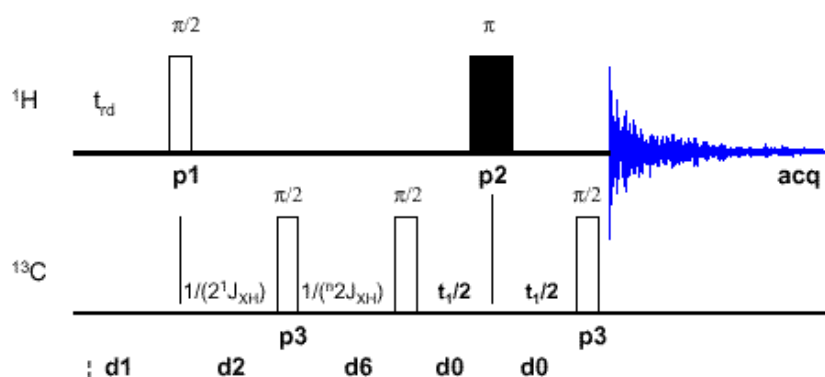
Σχήμα 1.12: Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMQC ^1H - ^{13}C .¹⁴¹

Οποιαδήποτε παλμική ακολουθία που χρησιμοποιείται στην τεχνική HMQC ^1H - ^{13}C , είναι δυνατό να τροποποιηθεί ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα σε κάθε περίπτωση. Έτσι, εναλλακτικά της τεχνικής HMQC ^1H - ^{13}C μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης απλού κβάντου ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Single Quantum Coherence, HSQC ^1H - ^{13}C), στην οποία εμφανίζονται τελικά μόνο οι μεταπτώσεις απλού κβάντου. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται συνήθως σε συνδυασμό με την τεχνική βαθμίδωσης πεδίου (Gradient-enhanced Heteronuclear Single Quantum Coherence, ^1H - ^{13}C , (GE-HSQC ^1H - ^{13}C) με αποτέλεσμα την εμφάνιση κορυφών που οφείλονται σε απευθείας συζεύξεις.¹⁴¹

Με τη χρήση της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας συσχέτισης είναι δυνατή η μελέτη του τρόπου σύνδεσης μεταξύ μαγνητικών πυρήνων (π.χ. ^1H - ^{13}C). Το μειονέκτημα της ετεροπυρηνικής φασματοσκοπίας ^1H - ^{13}C είναι η πολύ μικρή φυσική αφθονία του ^{13}C (~1.11%) και η μικρή τιμή του γυρομαγνητικού του λόγου. Αυτοί οι παράγοντες έχουν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη ευαισθησία του πυρήνα του ^{13}C (η σχετική ευαισθησία ως προς το ^1H είναι ίση με 1/400). Η αύξηση της ευαισθησίας του πυρήνα του ^{13}C επιτυγχάνεται όταν η μελέτη της συμπεριφοράς του γίνεται διαμέσου της επίδρασης που ασκεί στον πυρήνα του πρωτονίου που έχει μεγαλύτερη ευαισθησία. Με τον τρόπο αυτό ο πυρήνας του πρωτονίου χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και την καταγραφή του σήματος. Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόζεται τόσο στην τεχνική HMQC όσο και στην τεχνική HMBC ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Multiple Bond Coherence ^1H - ^{13}C).¹⁴¹

1.6.2.2 Τεχνική Συσχέτισης μέσω Πολλαπλών Δεσμών ^1H - ^{13}C (Heteronuclear Multiple Bond Coherence HMBC ^1H - ^{13}C)

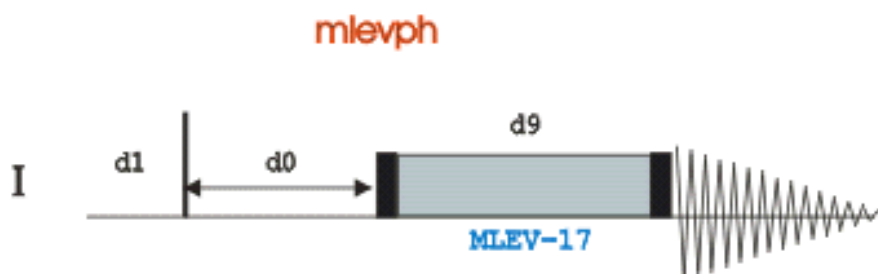
Αρχή Μεθόδου: Σε αντίθεση με τη φασματοσκοπία HMQC ^1H - ^{13}C , η τεχνική HMBC ^1H - ^{13}C παρέχει πληροφορίες σχετικά με την αλληλεπίδραση πυρήνων ^{13}C που συζευγνύονται με πυρήνες πρωτονίου, οι οποίοι βρίσκονται σε απόσταση μεγαλύτερη του ενός δεσμού (συνήθως δύο έως τέσσερις δεσμούς- $^{2-4}J_{\text{CH}}$).¹⁴¹ Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMBC ^1H - ^{13}C (Σχήμα 1.13), περιλαμβάνει αρχικά ένα 90° παλμό με τη βοήθεια του οποίου απομακρύνονται οι ανεπιθύμητες συζεύξεις $^1J_{\text{CH}}$, έτσι ώστε οι κορυφές που τελικά θα προκύπτουν, να αντιστοιχούν σε συζεύξεις $^nJ_{\text{CH}}$ (όπου $n > 1$). Ο δεύτερος 90° παλμός του ^{13}C δημιουργεί μεταπτώσεις μηδενικού και διπλού κβάντου, οι οποίες ανταλλάσσονται με την επίδραση του παλμού ^1H 180° που ακολουθεί.



Σχήμα 1.13: Η παλμική ακολουθία του πειράματος HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$.¹⁴¹

1.6.2.3 Τεχνική της Ομοπυρηνικής Φασματοσκοπίας Ολικής Συσχέτισης μέσω Πολλαπλών Δεσμών $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (Total Correlated Spectroscopy, 2D TOCSY, $^1\text{H} - ^1\text{H}$)

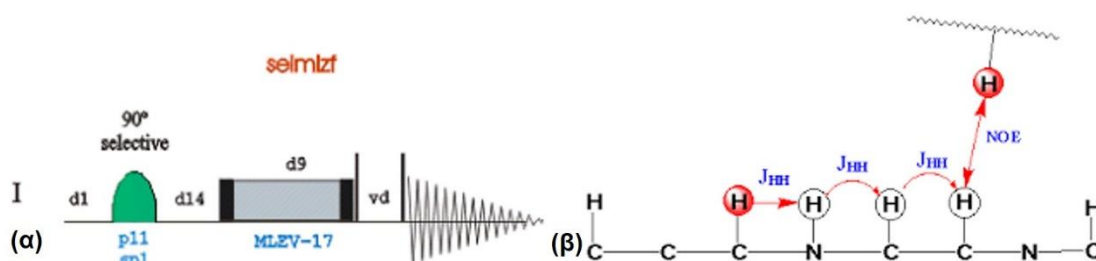
Αρχή Μεθόδου: Με την χρήση της ομοπυρηνικής φασματοσκοπίας ολικής συσχέτισης, είναι δυνατή η μελέτη του τρόπου σύνδεσης μεταξύ ομοειδών μαγνητικών πυρήνων ($^1\text{H} - ^1\text{H}$). Η φασματοσκοπία αυτή είναι χρήσιμη για τη διαίρεση των σημάτων πρωτονίου σε ομάδες ή δίκτυα σύζευξης, ειδικά όταν πολλαπλές κορυφές του φάσματος αλληλεπικαλύπτονται, λόγω παρόμοιων χημικών μετατοπίσεων, ή όταν υπάρχει εκτεταμένο σύστημα σύζευξης. Ένα φάσμα TOCSY παρουσιάζει συσχετίσεις που δημιουργούνται μέσω σύζευξης spin-spin. Οι συσχετίσεις εκτείνονται σε όλο το δίκτυο σύζευξης αν και η ένταση δεν σχετίζεται με απλό τρόπο με τον αριθμό των δεσμών που συνδέουν τα πρωτόνια. Ως εκ τούτου, μία κορυφή συσχέτισης πέντε δεσμών μπορεί να είναι ισχυρότερη ή όχι, σε σχέση με μια συσχέτιση τριών δεσμών διότι εξαρτάται και από τον πειραματικό χρόνο ανάμειξης t_m . Η φασματοσκοπία 2D TOCSY χρησιμοποιείται συνήθως σε μόρια μεγάλου μοριακού βάρους (πεπτίδια, πρωτεΐνες, λιπίδια, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες), στα οποία δημιουργούνται πολλαπλά συστήματα σύζευξης μέσω διαδοχικών δεσμών. Η φασματοσκοπία 2D TOCSY NMR, σε συνδυασμό με τη φασματοσκοπία COSY NMR παρέχει τη δυνατότητα ταυτοποίησης του αριθμού των δεσμών που συνδέουν τα πρωτόνια, σε συνδυασμό με την αλληλουχία με την οποία αυτά συνδέονται (Σχήμα 1.14)¹⁴².



Σχήμα 1.14: Σχηματική απεικόνιση της παλμικής ακολουθίας του πειράματος $^1\text{H} - ^1\text{H}$ TOCSY.¹⁴²

1.6.3 Το πείραμα επιλεκτικής ολικής συσχέτισης μιας διάστασης (Selective 1D TOCSY)

Το πείραμα επιλεκτικής ολικής συσχέτισης μιας διάστασης (Selective 1D TOCSY) χρησιμοποιείται για την απομόνωση ενός φάσματος, από ολόκληρο το φάσμα ενός μείγματος, που προκύπτει από τη διέγερση ενός συγκεκριμένου πρωτονίου, μεταφέροντας τη μαγνήτιση σε όλο το spin-σύστημα αυτού του πρωτονίου. Αυτή η διεργασία πραγματοποιείται μέσω σύνδεσης των πυρήνων πρωτονίων ^1H μέσω σύζευξης (J), επιτρέποντας την εκλεκτική διέγερση πυρήνων πρωτονίων ^1H σε δεδομένη συχνότητα συντονισμού που πραγματοποιείται πριν από τη δημιουργία ισότροπης ανάμειξης. Με αυτόν τον τρόπο επιτρέπεται η μεταφορά πόλωσης στο συγκεκριμένο σύστημα spin του πρωτονίου που διεγείρεται, μέσω βαθμιδωτής σύζευξης¹⁴³. Ως εκ τούτου, το πείραμα επιλεκτικής διέγερσης Selective 1D TOCSY αποτελεί αρκετά χρήσιμο εργαλείο για την αντιμετώπιση προβλημάτων που σχετίζονται με την αδυναμία διάκρισης ενός σήματος. Αυτό σημαίνει ότι η ένταση των κορυφών ενός 1D TOCSY φάσματος εξαρτάται σημαντικά από βασικές παραμέτρους όπως είναι ο χρόνος ανάμειξης, οι χρόνοι εφησυχασμού και οι σταθερές σύζευξης μεταξύ του πρωτονίου που πρόκειται να διεγερθεί και όλου του συστήματος spin στο οποίο συμμετέχει¹⁴⁴ (Σχήμα 1.15). Σε μικρό χρόνο διέγερσης (<50 ms), εμφανίζονται μόνο τα πρωτόνια που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση μεταξύ τους (μέσω ενός ή δύο δεσμών), ενώ σε μεγαλύτερους χρόνους διέγερσης (80-300 ms), αποκαλύπτεται όλο το σύστημα spin του πρωτονίου, οδηγώντας στην ακριβή ταυτοποίηση και στο χαρακτηρισμό των επιμέρους συστατικών. Η εφαρμογή του πειράματος Selective 1D TOCSY με συνδυασμό διαφορετικών χρόνων διέγερσης μπορεί να οδηγήσει στο διαχωρισμό του φάσματος πρωτονίου του συστατικού που μελετάται, ακόμη και αν αυτό βρίσκεται σ' ένα πολύπλοκο μείγμα.



Σχήμα 1.15: Σχηματική απεικόνιση της ακολουθίας του πειράματος 1D Selective TOCSY.

Το πείραμα Selective 1D TOCSY χρησιμοποιείται αποτελεσματικά για το χαρακτηρισμό και το διαχωρισμό συνθετικών μορίων, και συστατικών τα οποία απομονώνονται από φυσικά προϊόντα. Επίσης, το πείραμα αυτό έχει σημαντική εφαρμογή στη μεταβολομική ανάλυση, για τον αποτελεσματικό χαρακτηρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό μεταβολιτών (είτε βρίσκονται σε υψηλό είτε σε χαμηλό ποσοστό) από πολύπλοκα μείγματα, όπως είναι βιολογικά υγρά, φάρμακα, τρόφιμα και ποτά.¹⁴⁵⁻¹⁴⁸ Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι μπορεί να γίνει απευθείας διαχωρισμός και χαρακτηρισμός των επιμέρους συστατικών ενός πολύπλοκου μείγματος, χωρίς να προηγηθούν στάδια κλασμάτωσης και καθαρισμού του μείγματος. Το δείγμα δεν υφίσταται καμία προηγούμενη κατεργασία, αλλά διαλύεται στον κατάλληλο δευτεριωμένο διαλύτη και μελετάται μέσω της λήψης φασμάτων.

1.6.4 Εφαρμογή της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού στη μελέτη του φυτοχημικού προφίλ και των δευτερογενών μεταβολιτών των φαρμακευτικών φυτών

Όλα τα φυτά χαρακτηρίζονται από το πολύπλοκο φυτοχημικό προφίλ τους, το οποίο αποτελείται από πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες και αποτελεί μοναδική ταυτότητα για κάθε είδος και γένος φυτού ξεχωριστά. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατροφή, ενώ οι δευτερογενείς μεταβολίτες χαρακτηρίζονται από τις ποικίλες βιολογικές δράσεις τους και τις διάφορες φυσικοχημικές ιδιότητες που παρουσιάζουν. Η μελέτη του φυτοχημικού προφίλ ενός φυτού και η περαιτέρω ανάλυση των μεταβολιτών του είναι μια πολύπλοκη διεργασία, η οποία απαιτεί πολλά στάδια διαχωρισμού και καθαρισμού των διαφόρων μεταβολιτών που βρίσκονται στα φυτικά κύτταρα, στους ιστούς, στα διάφορα μέρη του φυτού, αλλά και στα φυτικά εκχυλίσματα τα οποία παράγονται από τα διάφορα μέρη του φυτού. Ο καθαρισμός και ο διαχωρισμός των μεταβολιτών είναι αρκετά χρονοβόρες διαδικασίες μέχρι να γίνει η ταυτοποίηση των μεταβολιτών, ο προσδιορισμός της δομής τους και η μελέτη των βιολογικών τους δράσεων¹⁴⁹. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται από τα φυτά είναι πάρα πολλοί και μέχρι στιγμής έχει γίνει αναφορά σε περισσότερους από δύο εκατομμύρια. Παρ' όλα αυτά, η μελέτη των δευτερογενών μεταβολιτών είναι αρκετά συστηματική και πολλοί δευτερογενείς μεταβολίτες αποτελούν χαρακτηριστικό δακτυλικό αποτύπωμα του φυτού από το οποίο προέρχονται, καθώς και από την κυτταρική διεργασία στην οποία συμμετέχει. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι σημαντικό για τη μελέτη των πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών που βρίσκονται στο κύτταρο, στον ιστό και στα υπόλοιπα μέρη του φυτού. Οι αναλυτικές μέθοδοι που εφαρμόζονται για τη μελέτη του χημικού προφίλ τους προσθέτουν συνέχεια καινούριους και κάποιες φορές σπάνιους μεταβολίτες στους ήδη υπάρχοντες, ενώ μεγάλος αριθμός παραμένει άγνωστος. Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί μια αποτελεσματική τεχνική για τη μελέτη του φυτοχημικού προφίλ των φυτών, λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει: (α) δεν απαιτεί την καταστροφή του δείγματος, (β) υπάρχει δυνατότητα ανάκτησης του δείγματος, (γ) στις περισσότερες περιπτώσεις τα δεδομένα χρειάζονται περίπου 5-10 λεπτά για να παραχθούν, (δ) σ' ένα δείγμα φυτικού εκχυλίσματος μπορούν να ταυτοποιηθούν 20-40 μεταβολίτες και (ε) επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των μελετούμενων μεταβολιτών.^{150,151} Η φασματοσκοπία NMR δίνει μια μακροσκοπική εικόνα του φυτοχημικού προφίλ και δεν απαιτεί πολύπλοκη προετοιμασία του δείγματος.¹⁵² Άλλο πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας NMR στη μελέτη των φυτών είναι ότι σ' ένα φάσμα πρωτονίου οι εντάσεις των κορυφών είναι αποκλειστικά ανάλογες της μοριακής συγκέντρωσης των συστατικών του φυτικού μείγματος, και ο προσδιορισμός τους μπορεί να γίνει απλά, χωρίς να απαιτούνται πρότυπες καμπύλες για κάθε συστατικό. Ωστόσο, ένα μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η χαμηλή της ευαισθησία, η οποία όμως μπορεί να αντιμετωπιστεί με χρήση φασματομέτρου υψηλής συχνότητας και χρήση κρυογενικού αισθητήρα.¹⁵³ Η εφαρμογή 1D ¹H NMR πειραμάτων για τη μελέτη του φυτοχημικού προφίλ μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τις ομοιότητες και τις διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ενός φυτού, ή να δείξει τις διαφορές μεταξύ καλλιεργούμενου και άγριου φυτού καθώς και τη σύσταση των δειγμάτων που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές ή χρονικές περιόδους.

1.6.5 NMR και ενζυμική κατάλυση

Οι ενζυμικές αντιδράσεις περιλαμβάνουν πολλών ειδών ενδιάμεσα στάδια που χαρακτηρίζονται από χημικές μετατροπές, δεσμεύσεις των υποστρωμάτων, και σχηματισμό ή απελευθέρωση των προϊόντων. Αυτές οι διεργασίες χαρακτηρίζονται ως δυναμικές.¹⁵⁴ Η δυναμική φύση των ενζύμων κατά τη διάρκεια της καταλυτικής τους δράσης μπορεί να μελετηθεί με φασματοσκοπία NMR, καθώς η καταλυτική δράση των ενζύμων πραγματοποιείται σε χρονικό εύρος που κυμαίνεται από μικροδευτερόλεπτα έως χιλιοστά του δευτερολέπτου. Οι ενζυμικές αντιδράσεις αποτελούν περίπλοκα συστήματα, και ο συνδυασμός μεθοδολογιών για τη μελέτη τους είναι αναγκαίος. Επίσης, υπάρχουν ένζυμα που χρησιμοποιούν υποστρώματα αρκετά μεγάλου μοριακού βάρους, όπως είναι ο πολυσακχαρίτης υαλουρονικό οξύ στην περίπτωση της υαλουρονιδάσης. Σε αυτή την περίπτωση, το μεγάλο ιξώδες του υποστρώματος είναι ένας λόγος που καθιστά τον προσδιορισμό του παραγόμενου προϊόντος μια όχι τόσο απλή διεργασία όσο οι περισσότερες μελέτες που γίνονται με φασματοσκοπία UV. Αντίθετα, ο συνδυασμός μεθόδων 1D ¹H NMR, DOSY NMR και UV καθιστά τη μελέτη τέτοιας φύσεως αντιδράσεων, αρκετά αποτελεσματική. Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού είναι μια ευέλικτη, μη επεμβατική αναλυτική μέθοδος με την οποία μπορεί να γίνει παρακολούθηση μιας βιοκατάλυσης. Στο κύτταρο υπάρχουν συστατικά τα οποία αποτελούνται από μαγνητικά ενεργούς πυρήνες, οι οποίοι επιτρέπουν την παρατήρηση ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων με φασματοσκοπία NMR. Τέτοιοι πυρήνες αποτελούν κυρίως οι ¹H και ³¹P, οι οποίοι βρίσκονται σε φυσική αφθονία. Αλλά υπάρχουν και άλλοι όπως ¹³C, ¹⁵N, ²³Na και ³⁹K¹⁵⁵. Η μελέτη μιας ενζυμικής αντίδρασης με *in situ* NMR φασματοσκοπία αποτελεί ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την άντληση πληροφοριών σχετικά με την κινητική της αντίδρασης και το μηχανισμό που ακολουθείται κατά τη βιομετατροπή των συμμετεχόντων μορίων. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι ότι επιτρέπει τη συνεχή μελέτη των αλλαγών που πραγματοποιούνται σε μια ενζυμική αντίδραση, όσο η αντίδραση εξελίσσεται, χωρίς να χρειάζεται να διακοπεί η αντίδραση, ή να γίνει κλασμάτωση και διαχωρισμός του μείγματος των προϊόντων με άλλες τεχνικές. Επίσης, επιτρέπει τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό των σχηματιζόμενων προϊόντων και ενδιάμεσων σε πραγματικό χρόνο. Από την άλλη, η μεθοδολογία STD NMR (Saturation Transfer Difference NMR, που θα αναλυθεί παρακάτω), αποτελεί ακόμη ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη του προφίλ αλληλεπίδρασης μεταξύ του υποστρώματος και του ενζύμου, όπως επίσης και του προσδιορισμού της θέσης του ενζύμου όπου προσδένεται ο υποκαταστάτης. Ο συνδυασμός αυτών των δύο τεχνικών αποτελεί σημαντική πηγή πληροφοριών για το μηχανισμό που ακολουθείται σε μια ενζυμική αντίδραση.

1.6.6 Φασματοσκοπία Διάχυσης (Diffusion Ordered Spectroscopy- DOSY NMR) στη μελέτη των ενζυμικών αντιδράσεων

Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Διάχυσης (Diffusion Ordered Spectroscopy-DOSY), έχει καθιερωθεί τα τελευταία χρόνια, ως ακριβής μέθοδος μέτρησης μορίων μεγάλου μοριακού βάρους με πολύ μεγάλο ιξώδες, πρωτεϊνών και πολυμερών. Το

πείραμα DOSY NMR εφαρμόζει παλμικές κλίσεις πεδίου για επισήμανση μορίων στο χώρο, για τη μελέτη της κίνησης που έχει το καθένα ξεχωριστά μέσα σ' ένα διάλυμα. Τα μόρια διαχωρίζονται μεταξύ τους λόγω των διαφορετικών τιμών διάχυσης που έχει το καθένα, οι οποίες εξαρτώνται κυρίως από το μέγεθος του κάθε μορίου.¹⁵⁶ Σ' ένα πείραμα διάχυσης DOSY NMR γίνεται προσδιορισμός των σταθερών διάχυσης του συστατικού ή των επιμέρους συστατικών, αν πρόκειται για ένα μείγμα. Το πείραμα διάχυσης βασίζεται κυρίως στη διάκριση των συστατικών ανάλογα με το μέγεθος και το σχήμα τους, προσδιορίζοντας με αυτόν τον τρόπο το βαθμό πολυμερισμού τους, ακόμη και το βαθμό διάλυσής τους. Το πείραμα διάχυσης DOSY μπορεί να θεωρηθεί ως χρωματογραφία διαχωρισμού ανάλογα με το μοριακό βάρος των μελετούμενων συστατικών. Οι σταθερές διάχυσης προσδιορίζονται από την εξίσωση Einstein-Stokes (**Εξίσωση 1.2**) και είναι αντιστρόφως ανάλογες του μοριακού βάρους κάθε συστατικού. Όσο πιο μεγάλο το μοριακό βάρος, τόσο μικρότερη η σταθερά διάχυσης.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_s} \quad (1.2)$$

Όπου: **D:** η σταθερά διάχυσης, **k_B:** η σταθερά Boltzmann, **T:** η απόλυτη θερμοκρασία, **η:** το δυναμικό ιξώδες, **r:** η ακτίνα του σφαιρικού σωματιδίου,

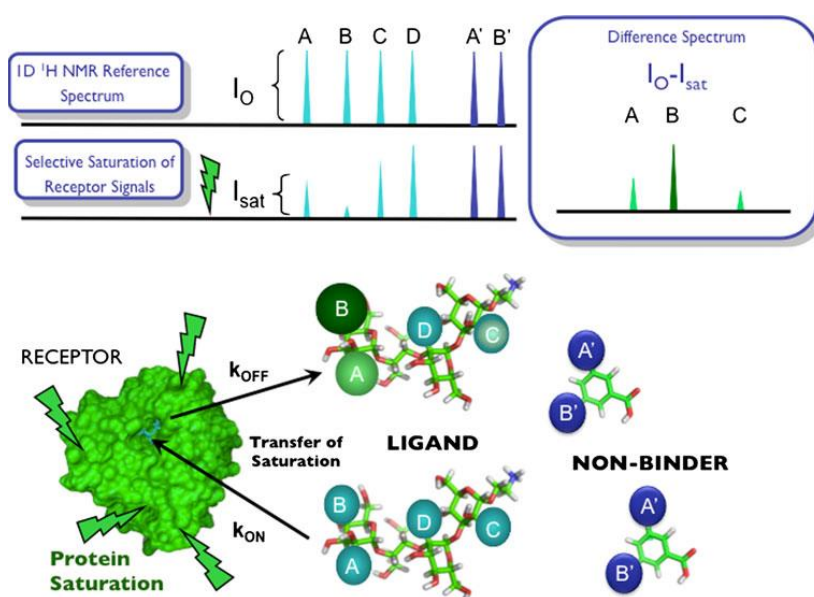
Ένα από τα πλεονεκτήματα των πειραμάτων διάχυσης με φασματοσκοπία NMR, είναι ότι δε χρειάζεται να προηγηθεί διαχωρισμός των επιμέρους συστατικών ενός μείγματος. Επομένως, μια ενζυμική αντίδραση μπορεί να μελετηθεί *in situ* με πειράματα διάχυσης απευθείας στο σωληνάκι NMR. Μέσω του συνδυασμού των πειραμάτων διάχυσης και των μετρήσεων απορρόφησης μέσω φασματοσκοπίας UV είναι δυνατή η καταγραφή μιας ενζυμικής αντίδρασης ανά χρονικό διάστημα, η ταυτόχρονη παρακολούθηση του σχηματισμού των προϊόντων της καθώς και η επιλογή του χρονικού διαστήματος διακοπής της αντίδρασης. Για παράδειγμα, στην περίπτωση της υαλουρονιδάσης, καθώς το υαλουρονικό οξύ διασπάται σε μόρια ολιγοσακχαριτών, η αντίδραση μπορεί να μελετηθεί για αρκετό χρονικό διάστημα, μέχρι να προκύψουν τα πιο απλά μόρια των δισακχαριτών. Ο προσδιορισμός των σταθερών διάχυσης επιτρέπει τη διάκριση των επιμέρους προϊόντων.

1.6.7 Φασματοσκοπία Διαφοράς Μεταφοράς Κορεσμού (Saturation Transferred Difference Spectroscopy-STD NMR)

Η φασματοσκοπία NMR έχει αποδειχθεί κατάλληλη για τον προσδιορισμό πληροφοριών που σχετίζονται με τη δομή σε ατομικό επίπεδο, και πολλά πειράματα έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί, και πιο συγκεκριμένα, για αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός υποδοχέα και ενός υποκαταστάτη, σε βιολογικά συστήματα.¹⁵⁷⁻¹⁶⁰ Η φασματοσκοπία διαφοράς μεταφοράς κορεσμού (STD NMR) αποτελεί μία από τις πιο ισχυρές και ευέλικτες τεχνικές, στη μελέτη υποκαταστατών με αναπτυσσόμενες εφαρμογές τόσο στην έρευνα όσο και στις φαρμακευτικές βιομηχανίες, ως βασική μέθοδος στην ανακάλυψη, στο σχεδιασμό και στη βελτιστοποίηση νέων φαρμάκων.^{158,161-163} Αρχικά, η μεταφορά κορεσμού της μαγνήτισης εφαρμόστηκε σε συστήματα με μέτρια ανταλλαγή για τον προσδιορισμό σημάτων μορίων μικρού μοριακού βάρους που

βρίσκονται σε δεσμευμένη κατάσταση, μέσω των αντίστοιχων αλλαγών στις εντάσεις που γίνονται λόγω της μεταφοράς μαγνήτισης από την ελεύθερη κατάσταση.^{164,165} Γενικά, στις μελέτες που γίνονται με NMR, μπορούν να διακριθούν δύο προσεγγίσεις: **(α)** Μελέτη και ανάλυση των σημάτων του υποδοχέα (για περιπτώσεις ισχυρής αλληλεπίδρασης της τάξης με σταθερά $k_{off} < 1$ Hz) και **(β)** Καταγραφή των σημάτων που προκύπτουν από υποκαταστάτες μικρού μοριακού βάρους (κυρίως με ασθενείς αλληλεπιδράσεις με σταθερά $k_{off} > 1$ Hz).^{162,163}

Φασματοσκοπικά, το πείραμα STD NMR είναι σχετικά απλό.¹⁶¹ Σ' ένα δείγμα, το οποίο περιέχει τον υποδοχέα (μεγάλου μοριακού βάρους $MW > 15$ kDa) σε μικρή συγκέντρωση (10^{-7} - 10^{-8} M) και σε μεγάλη μοριακή περίσσεια (1:10- μέχρι 1:1000) μιας ομάδας μορίων μικρού μοριακού βάρους, καταγράφονται δύο πειράματα (**Σχήμα 1.16**): **(α)** Ένα 1D 1H NMR φάσμα σε συνθήκες θερμικής ισορροπίας, το οποίο καλείται εκτός συντονισμού (off-resonance) και **(β)** Ένα δεύτερο φάσμα πρωτονίου (1D 1H NMR), το οποίο καλείται εντός συντονισμού (on-resonance), στο οποίο κάποια πρωτόνια του υποδοχέα διεγείρονται επιλεκτικά, με ραδιοσυχνότητα χαμηλής ισχύος για μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο (χρόνος διέγερσης), η οποία κυμαίνεται σ' ένα εύρος λίγων δευτερολέπτων. Εάν οι συνθήκες διέγερσης που επιλέγονται είναι επαρκείς, είναι δυνατό να διεγερθούν επιτυχώς μόνο τα πρωτόνια της πρωτεΐνης, και όχι αυτά του υποκαταστάτη. Σε αυτή την περίπτωση, αν έχει επιτευχθεί δέσμευση του υποκαταστάτη στον υποδοχέα, η μαγνήτιση από τα πρωτόνια του υποδοχέα μεταφέρεται στα πρωτόνια του υποκαταστάτη, τα οποία βρίσκονται σε κοντινές αποστάσεις, στη δεσμευμένη κατάσταση. Όπως στη δεσμευμένη κατάσταση, οι υδροδυναμικές ιδιότητες τόσο του υποκαταστάτη όσο και του υποδοχέα διέπονται από το μόριο που έχει το μεγαλύτερο μοριακό βάρος (τυπικά αυτό είναι ο υποδοχέας). Έτσι, η μεταφορά της μαγνήτισης στο πείραμα εντός συντονισμού (on resonance) οδηγεί σε μια σημαντική μείωση στις εντάσεις των σημάτων που οφείλονται στην παρουσία του υποκαταστάτη (αρνητικά ενδομοριακά NOE σήματα για μεγάλα μόρια τα οποία βρίσκονται σε αργή κίνηση).¹⁶⁶



Σχήμα 1.16: Σχηματική απεικόνιση των πειραμάτων STD NMR.¹⁶⁷

1.6.8 Δομική πληροφορία του υποκαταστάτη: Χαρτογράφηση του επιτόπου πρόσδεσης

Σ' ένα συγκεκριμένο υποκαταστάτη, ο οποίος μελετάται για την αλληλεπίδρασή του με μία πρωτεΐνη, δεν λαμβάνουν όλα τα πρωτόνια του στο STD φάσμα το ίδιο ποσοστό κορεσμού. Θεωρητικά η μαγνήτιση μεταφέρεται από τα πρωτόνια του υποδοχέα στα πρωτόνια του υποκαταστάτη με ενδομοριακά NOEs και είναι αντιστρόφως ανάλογη της έκτης δύναμης των αποστάσεων τους στη δεσμευμένη κατάσταση.¹⁶⁶ Έτσι, η κατανομή του κορεσμού που μεταφέρεται ανάμεσα σε διαφορετικά πρωτόνια του υποκαταστάτη, υποδηλώνει χωρικές εγγύτητες μεταξύ των πρωτονίων του υποκαταστάτη και της πρωτεΐνης στη δεσμευμένη κατάσταση.¹⁶⁸ Ποιοτικά, μπορεί να υποτεθεί ότι η ισχυρότερη ένταση ενός σήματος του υποκαταστάτη στο STD NMR φάσμα δηλώνει μια πολύ κοντινή ενδοπρωτονιακή απόσταση μεταξύ του πρωτονίου του υποκαταστάτη και της επιφάνειας του υποδοχέα στη δεσμευμένη κατάσταση.

Η διαφορά της έντασης του σήματος ενός υποκαταστάτη στο STD φάσμα μπορεί να προσδιοριστεί με έναν πολύ άμεσο τρόπο, τουλάχιστον ημιποιοτικά, συγκρίνοντας τα σχετικά ποσοστά κορεσμού που λαμβάνονται από τα διαφορετικά πρωτόνια του υποκαταστάτη. Αυτό επιτυγχάνεται, κανονικοποιώντας όλα τα μετρούμενα (measured) STD σήματα ($I_o - I_{sat}/I_o$) ως προς το πιο έντονο σήμα, το οποίο αυθαίρετα δηλώνεται ως 100%.¹⁶⁸ Με αυτόν τον τρόπο, οι ποσοστιαίες STD τιμές που προκύπτουν αναπαριστούν ένα είδος χάρτη που περιγράφει την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεΐνης-υποκαταστάτη στη δεσμευμένη κατάσταση, οριοθετώντας με αυτόν τον τρόπο ποιες χημικές μονάδες στο μόριο του υποκαταστάτη αποτελούν κλειδί για μοριακή αναγνώριση από τον υποκαταστάτη (group epitope mapping). Ποιοτικά, μπορεί να προκύψει το συμπέρασμα ότι τα πρωτόνια με σχετικές STD τιμές κοντά στο 100% αντιστοιχούν σε τμήματα του υποκαταστάτη τα οποία βρίσκονται πολύ κοντά στη θέση πρόσδεσης του υποδοχέα (receptor binding-pocket), και ως εκ τούτου πρέπει να θεωρηθεί σημαντικό για την αλληλεπίδραση. Όλες οι εντάσεις των σημάτων στο STD φάσμα εξαρτώνται από τη διάρκεια της ραδιοσυχνότητας της διέγερσης της πρωτεΐνης (χρόνος διέγερσης), και από την έκταση του μεταφερόμενου κορεσμού στα πρωτόνια του υποκαταστάτη που γενικά αυξάνεται με αυτόν τον τρόπο.^{161,168} Ο επίτοπος πρόσδεσης συνολικά όλων των πρωτονίων του υποκαταστάτη (ligand group epitope mapping), ο οποίος προσδιορίζεται από τις εντάσεις των σημάτων στο STD φάσμα, προσδιορίζεται για ένα συγκεκριμένο χρόνο κορεσμού (της τάξης των δευτερολέπτων). Ίδανικά, οι πληροφορίες που λαμβάνονται για τον επίτοπο πρόσδεσης δεν θα έπρεπε να εξαρτώνται από τον επιλεγόμενο χρόνο εφησυχασμού αν και σημαντικά διαφορετικοί ρυθμοί εφησυχασμού (R_1) των πρωτονίων του υποκαταστάτη μπορούν να παράγουν εσφαλμένα αποτελέσματα στον προσδιορισμό του επίτοπου. Το τελικό αποτέλεσμα που προκύπτει για τις πληροφορίες που αντλούνται σχετικά με τη δομή εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως: διαφορές στους ρυθμούς εφησυχασμού (R_1) των πρωτονίων του υποκαταστάτη, στην έκταση του κορεσμού που λαμβάνει σε πρώτη φάση, και από την κινητική της μοριακής αλληλεπίδρασης. Επειδή αυτά τα εσφαλμένα αποτελέσματα αποτελούν συνέπειες των διαφορών στην ικανότητα να συσσωρεύουν κορεσμό στην ελεύθερη κατάσταση, ένας τρόπος να ακυρωθούν αυτά είναι με το να διαιρεθούν οι STD εντάσεις που έχουν γίνει σε μηδενικό χρόνο

εφησυχασμού, όπου στην πραγματικότητα δεν συμβαίνει καμία συσσώρευση του κορεσμού. Επιπρόσθετα, ένα άλλο λανθασμένο φαινόμενο το οποίο μπορεί να ελαχιστοποιηθεί μέσω της χρήσης γραφικών παραστάσεων (build-up rates) είναι η ενδομοριακή διάχυση του spin που γίνεται εντός της δεσμευμένης κατάστασης.

Ο παράγοντας αλληλεπίδρασης (STD amplification factor)

Η ένταση του STD NMR σήματος ουσιαστικά υποδηλώνει τη συγκέντρωση του συμπλέγματος υποκαταστάτη-υποδοχέα που βρίσκονται στο διάλυμα.^{161,163} Οι Mayer και Meyer εξήγαν μια εξίσωση η οποία μετατρέπει τις παρατηρούμενες εντάσεις που προκύπτουν από το STD πείραμα, προς τον παράγοντα αλληλεπίδρασης (STD amplification factor) (**Εξίσωση 1.3**).

$$\text{STD}_{\text{AMP}} = \epsilon (I_0 - I_{\text{sat}}) / I_0 \quad (1.3)$$

Όπου: **STD_{AMP}**: STD παράγοντας αλληλεπίδρασης (STD amplification factor), **I₀**: το ολοκλήρωμα της κορυφής ενός συγκεκριμένου πρωτονίου στο φάσμα αναφοράς (reference), **I_{sat}**: το ολοκλήρωμα της κορυφής του ίδιου πρωτονίου στο φάσμα συντονισμού (on resonance), το οποίο μπορεί είτε να αυξηθεί είτε να μειωθεί, **ε**: η μοριακή περίσσεια (η συγκέντρωση που βρίσκεται στο διάλυμα) του υποκαταστάτη ως προς την πρωτεΐνη.

Η παραπάνω σχέση μετατρέπει την ένταση που προκύπτει από το STD φάσμα, η οποία εξαρτάται από το κλάσμα/τμήμα του υποκαταστάτη που βρίσκεται σε δεσμευμένη κατάσταση, σ' έναν παράγοντα (**STD_{AMP}**), ο οποίος αποτελεί τη λειτουργία του τμήματος της δεσμευμένης πρωτεΐνης.

1.6.9 Το πυρηνικό φαινόμενο Overhauser (The Nuclear Overhauser Effect)

1.6.9.1 Ανάλυση της δομής και της δυναμικής

Το πυρηνικό φαινόμενο Overhauser (NOE) είναι ο διασταυρούμενος εφησυχασμός (cross-relaxation) της πόλωσης του spin, από το ένα spin στο άλλο, το οποίο προκαλείται από αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου. Το φαινόμενο NOE έχει χαρακτηριστεί ως το πιο σημαντικό φαινόμενο στη μελέτη των βιομορίων μέσω της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.

Το πείραμα Transferred-NOESY (tr-NOESY) αποτελεί μια επέκταση δύο διαστάσεων NOE σημάτων που δημιουργούνται σε συστήματα ανταλλαγής, όπως είναι τα συμπλέγματα υποκαταστάτη-πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, το πείραμα tr-NOESY δίνει πληροφορίες για τη διαμόρφωση που μπορεί να αποκτήσει ένας υποκαταστάτης όταν δεσμεύεται σε μια πρωτεΐνη.¹⁵⁵ Το πείραμα tr-NOESY είναι αρκετά σημαντικό για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης φαρμάκων με οποιαδήποτε πρωτεΐνη-στόχο, με σκοπό την ανακάλυψη καινούριων φαρμάκων.

Ο βασικός προσδιορισμός της δομής ενός μορίου μέσω φασματοσκοπίας NMR, χρησιμοποιεί ένα μεγάλο αριθμό πειραματικά δυνατών ρυθμών NOE- τυπικά περίπου μέχρι 20 ανά αμινοξύ σε μικρές πρωτεΐνες. Καθώς ο ρυθμός των NOEs είναι αντιστρόφως ανάλογος της

έκτης δύναμης της απόστασης μεταξύ των δύο διπολικών spin που αλληλεπιδρούν, η ισχύς των NOEs καθορίζεται από ένα μεγάλο αριθμό περιορισμών διαμέσου του χώρου και της απόστασης. Συνήθως, αυτοί οι περιορισμοί χρησιμοποιούνται περισσότερο κατά ημιποσοτικό τρόπο επειδή ο υπολογισμός των NOEs καθορίζεται από την κινητικότητα, τη διάχυση του spin, το χαμηλό λόγο σήματος/θορύβου (S/N ratio) καθώς και από διάφορους τεχνικούς περιορισμούς.

1.7 Θεωρία Συναρτησιακών της Πυκνότητας (Density Functional Theory-DFT)

Η Θεωρία Συναρτησιακών της Πυκνότητας (DFT) βασίζεται στη συσχέτιση της συνάρτησης της ηλεκτρονιακής πυκνότητας πιθανότητας $P(r)$ με την ενέργεια και άλλες ιδιότητες ηλεκτρονιακών καταστάσεων. Αυτό έχει ως συνέπεια τη μετάθεση του προβλήματος της πλήρους επίλυσης της κυματοσυνάρτησης ενός πολυηλεκτρονιακού μορίου στον προσδιορισμό της συνάρτησης της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, απλοποιώντας με αυτόν τον τρόπο την υπολογιστική διαδικασία.

Η Θεωρία Συναρτησιακών της Πυκνότητας (DFT) βασίζεται στο θεώρημα των Kohn-Hohenberg το οποίο αναφέρει ότι: «η ενέργεια της κυματοσυνάρτησης μιας βασικής κατάστασης, δύναται να ορισθεί ακριβώς μόνο με βάση την $P(r)$, καθώς όταν η πυκνότητα είναι ίση με την πραγματική ηλεκτρονιακή πυκνότητα, τότε η ενέργεια αντιστοιχεί σ' ένα ελάχιστο».

Οι συναρτησιακές (functional) DFT διανέμουν την ηλεκτρονιακή ενέργεια σε διάφορες συνιστώσες, που υπολογίζονται ξεχωριστά. Αυτές περιλαμβάνουν την κινητική ενέργεια των ηλεκτρονίων (E_K), την έλξη πυρήνα-ηλεκτρονίων (E_E), τη δυναμική ενέργεια που οφείλεται στην άπωση μεταξύ των πυρήνων (E_D), την ενέργεια των απώσεων μεταξύ των ηλεκτρονίων (E_A) και την ενέργεια συσχέτισης-ανταλλαγής των ηλεκτρονίων (E_X).

Η τελευταία συνιστώσα αφορά στην ενέργεια ανταλλαγής η οποία προέρχεται από την αντισυμμετρία της κυματοσυνάρτησης και τη δυναμική συσχέτιση, εξαιτίας των κινήσεων των επιμέρους ηλεκτρονίων. Αναφέρεται δηλαδή και στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα των δύο τύπων spin, P_α και P_β και διαιρείται σε δύο μέρη, αυτό της ανταλλαγής $E_{xc}(P)$ και αυτό της συσχέτισης, $E_c(P)$, τα οποία εάν είναι συνάρτηση μόνο της ηλεκτρονιακής πυκνότητας P , τότε πρόκειται για τις τοπικές συναρτησιακές. Στην περίπτωση που εκτός από την πυκνότητα αυτό αποτελεί και συνάρτηση της κλίσης της, τότε γίνεται λόγος για τις διορθωμένες ως προς την κλίση συναρτησιακές.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, για τη μελέτη των διαμορφομερών του ενδιάμεσου Leucodorachrome και του προϊόντος 5,6-διυδροξυινδόλη, χρησιμοποιήθηκε η συναρτησιακή B3LYP. Η συναρτησιακή B3LYP¹⁶⁹ αποτελεί μία υβριδική τριπαραμετρική συναρτησιακή που παρέχει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η συναρτησιακή B3LYP βασίζεται στην εξίσωση:

$$E^{xcB3lyp} = E^{XLD} + co(E^{XHF} - E^{XLD}) + cx\Delta E^{XB88} + E^{CVWN} + cc(E^{CLYP} - E^{CVWN}) \quad (1.4)$$

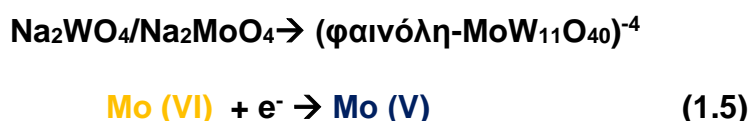
Όπου: **b3lyp**, **LD**, **HF**, **B88**, **VWN**, και **LYP**: διαφορετικές συναρτησιακές, παράμετρος **co**= 0,20, παράμετρος **cx**= 0,72 και παράμετρος **cc**= 0,81.

1.8 In vitro μεθοδολογίες προσδιορισμού αντιοξειδωτικής δράσης

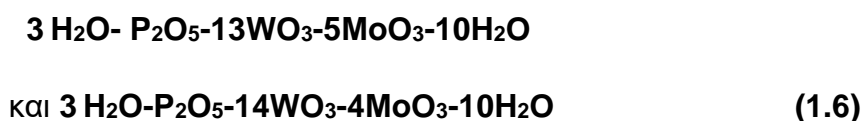
1.8.1 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ομάδων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Αρχή μεθόδου

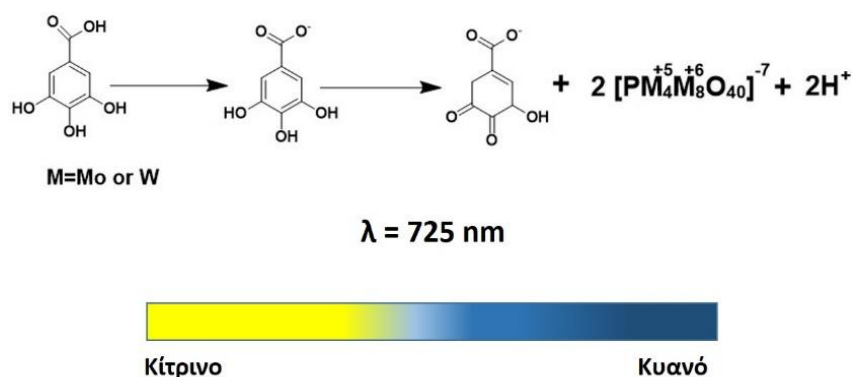
Ο προσδιορισμός των συνολικών φαινολικών ομάδων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu βασίζεται στην οξείδωση των φαινολικών συστατικών από ένα μείγμα φωσφοβολφραμικού και φωσφομολυβδαινικού οξέος σε αλκαλικό περιβάλλον.¹⁷⁰⁻¹⁷² Η πρώτη χημική αντίδραση Folin-Ciocalteu αναπτύχθηκε το 1927 και δίνεται από την παρακάτω εξίσωση (1.5)^{172,173}:



Παρόλο που η αντίδραση αυτή ανάγει όλες τις φαινόλες ενός δείγματος από το μείγμα βολφραμικού-μολυβδαινικού αντιδραστήριου, σε όξινο pH είναι αργή και στερείται εκλεκτικότητας. Για το λόγο αυτό, οι Singleton και Rossi βελτιστοποίησαν την αντίδραση αυτή, χρησιμοποιώντας ένα φωσφορυλιωμένο μείγμα βολφραμικού-μολυβδαινικού αντιδραστήριου που αποτελείται από τα επιμέρους συστατικά:^{171,173}



Προκύπτει έτσι η ακόλουθη βελτιστοποιημένη αντίδραση (Σχήμα 1.17)^{171,174}:



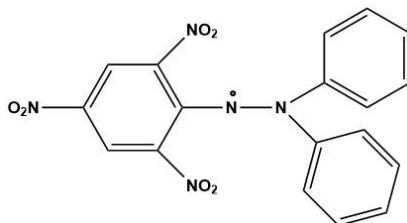
Σχήμα 1.17: Απεικόνιση της αντίδρασης οξειδοαναγωγής με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu.

Γενικό αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης είναι ο σχηματισμός κυανών προϊόντων. Η συγκέντρωση των κυανών προϊόντων που προκύπτουν προσδιορίζεται φωτομετρικά με φασματοσκοπία UV, με μέτρηση της απορρόφησης με λ_{max} στα 725 nm και είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών.

1.8.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο μελέτης σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH•

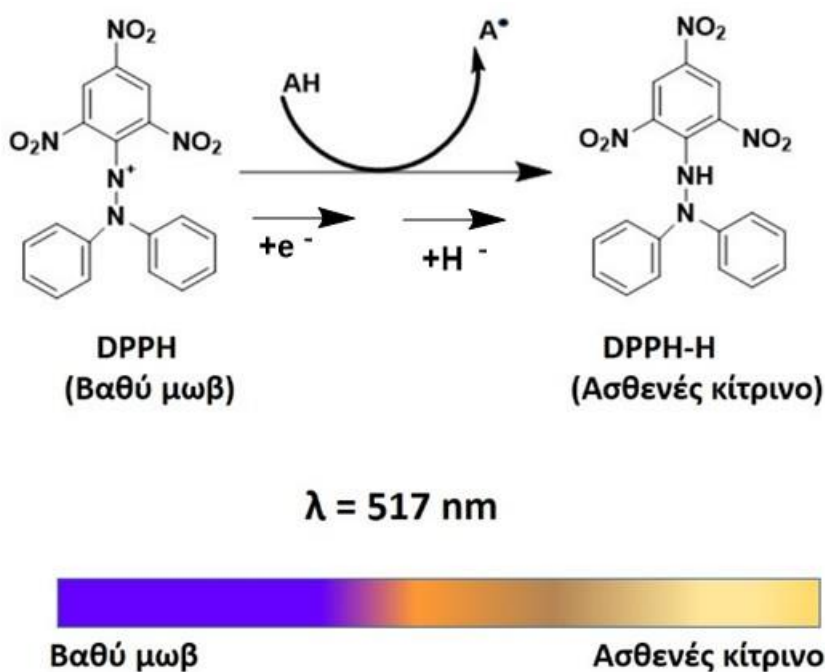
Η ρίζα DPPH• (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλιο) (Σχήμα 1.18) είναι μια σταθερή οργανική ρίζα που περιέχει άζωτο και έχει ένα βαθύ μωβ χρώμα. Η μέθοδος της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο μελέτης σταθερής ελεύθερης ρίζας

DPPH• βασίζεται στη μέτρηση της αναγωγικής δραστηριότητας της υπό μελέτη ένωσης-αντιοξειδωτικό ως προς τη ρίζα DPPH•. Η δραστηριότητα μπορεί να αξιολογηθεί μετρώντας τη μείωση της απορρόφησης της ρίζας DPPH•. Η δοκιμασία αποχρωματισμού αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Brand Williams και τους συνεργάτες.¹⁷⁵



Σχήμα 1.18: Δομή του 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζυλίου (DPPH•).

Αρχή Μεθόδου: Οι δοκιμές αντιοξειδωτικών βασίζονται στη μέτρηση της απώλειας του χρώματος της ρίζας DPPH• στα 517 nm, μετά την αντίδρασή της με τα υπό μελέτη εκχυλίσματα. Το διάλυμα αλλάζει από ένα βαθύ μωβ διάλυμα σε απαλό κίτρινο και η αντίδραση καταγράφεται φασματοσκοπικά στα 517 nm.¹⁷⁶ Η μέθοδος μελέτης της ρίζας DPPH• θεωρείται ότι βασίζεται σε συνδυασμό αντιδράσεων που χρησιμοποιούν μεταφορά ηλεκτρονίων αλλά και μεταφορά ατόμων υδρογόνου. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 1.19**, η σταθερή ρίζα DPPH• αντιδρά με το (AH), το αντιοξειδωτικό μόριο, για να σχηματίσει το μόριο DPPH-H. Η ικανότητα μεταφοράς του ατόμου H, αξιολογείται με τον προσδιορισμό του δείκτη SC₅₀ (Scavenging Capacity), ο οποίος προσδιορίζει τη συγκέντρωση που απαιτείται για τη μείωση του 50% της ρίζας DPPH•.



Σχήμα 1.19: Μηχανισμός αντίδρασης δέσμευσης της ρίζας DPPH• από αντιοξειδωτικό μόριο.

Γ. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη επιλεγμένων φαρμακευτικών φυτών από την ευρύτερη περιοχή της Ηπείρου ως προς τη βιολογική τους δράση έναντι των ενζύμων ελαστάση, υαλουρονιδάση και τυροσινάση που συμβάλλουν στην πρόωρη γήρανση του δέρματος ενώ η τυροσινάση συμβάλλει επίσης και στην ανάπτυξη μελανώματος. Η μελέτη που γίνεται για το φυτοχημικό προφίλ των παραγόμενων εκχυλισμάτων που έχουν παραχθεί από τα φαρμακευτικά φυτά γίνεται με βάση την ανάπτυξη μεθοδολογίας που βασίζεται στη φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance-NMR) και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών συστατικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα. Όσον αφορά τη μελέτη των τριών ενζύμων-στόχων, έχει αναπτυχθεί μια άλλη μεθοδολογία, η οποία επίσης βασίζεται στη φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού και έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των ενζυμικών αντιδράσεων όσο αυτές εξελίσσονται σε πραγματικό χρόνο μέσα σε ένα σωληνάκι NMR, 5 mm, αλλά και για τη μελέτη της αναστολής των τριών ενζύμων-στόχων από φυσικά προϊόντα και πολύπλοκα φυτικά εκχυλίσματα.

Στο **Κεφάλαιο 2** περιγράφονται τα φαρμακευτικά φυτά που έχουν επιλεγεί για μελέτη στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Επίσης περιγράφεται η λεπτομερής μελέτη των συνθηκών εκχύλισης (μηχανική κατεργασία, διαλύτης, χρόνος και θερμοκρασία) που έχουν εφαρμοστεί για την παραγωγή εκχυλισμάτων με πλούσιο φυτοχημικό προφίλ και κυρίως πλούσια σε φλαβονοειδείς ενώσεις και φαινολικά οξέα. Τα παραγόμενα φυτικά εκχυλίσματα μελετώνται στη συνέχεια ως προς το σύνολο του φαινολικού περιεχομένου τους αλλά και ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση, μέσω της μεθοδολογίας Folin-Ciocalteu και της μεθόδου δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH^{*} αντίστοιχα.

Στο **Κεφάλαιο 3** περιγράφεται η ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-TotPhe [**Tot:** Total=ολικό, **Phe:** Phenolics= φαινολικά] για τον ακριβή προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών σε πολύπλοκα φυτικά εκχυλίσματα μέσω Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Η μεθοδολογία NMR-TotPhe συγκρίνεται επίσης με την *in vitro* μεθοδολογία Folin-Ciocalteu ως προς την αποτελεσματικότητά της. Η αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας NMR-TotPhe περιγράφεται επίσης και μέσω *in vitro* αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των μελετούμενων ουσιών σε κύτταρα U2OS που έχουν υποστεί οξειδωτικό στρες. Στη συνέχεια, η μεθοδολογία NMR-TotPhe αξιοποιείται για την ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών των αιθανολικών εκχυλισμάτων μέσω του χαρακτηρισμού των φαινολικών (-OH) ομάδων. Τέλος, πραγματοποιείται και ποσοτικός προσδιορισμός των επιμέρους βιοδραστικών συστατικών με συνδυασμό μεθοδολογιών NMR, χωρίς να προηγηθεί διαχωρισμός των μειγμάτων στα συστατικά του.

Στο επόμενο Κεφάλαιο (**Κεφάλαιο 4**) γίνεται εισαγωγή στα τρία ένζυμα-στόχους (ελαστάση, υαλουρονιδάση και τυροσινάση) που μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή και που αποτέλεσαν βάση για την ανάπτυξη της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων ANTIAGE-DB. Συγκεκριμένα, περιγράφεται η ηλεκτρονική βάση δεδομένων ANTIAGE-DB η

οποία περιλαμβάνει τη μελέτη του προφίλ αλληλεπίδρασης των τριών ενζύμων-στόχων με φυσικά προϊόντα που λειτουργούν ως αναστολείς των ενζύμων αυτών. Η ανάπτυξη της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων βασίστηκε σε όλη τη διαθέσιμη πληροφορία που υπάρχει στη βιβλιογραφία για τους φυσικούς δευτερογενείς μεταβολίτες και τις φυσικές πηγές τους (τα φαρμακευτικά φυτά από τα οποία προέρχονται) που έχουν μελετηθεί για τις ανασταλτικές τους ιδιότητες σε αυτά τα ένζυμα.

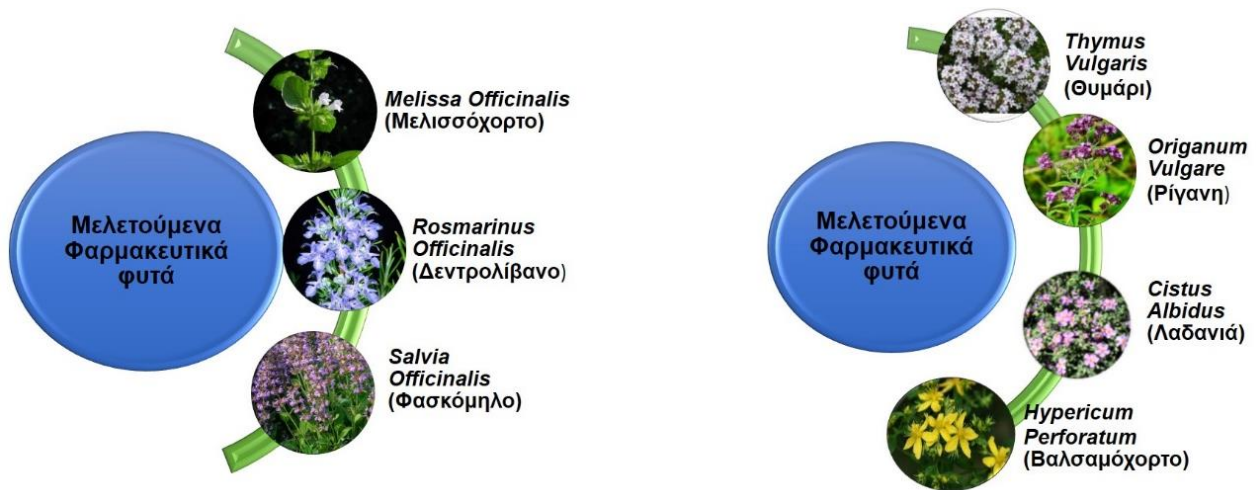
Το **Κεφάλαιο 5** περιγράφει τη μελέτη των ενζυμικών αντιδράσεων: της τυροσινάσης, της υαλουρονιδάσης και της ελαστάσης, καθώς και την αναστολή τους από φυσικά προϊόντα και φυτικά εκχυλίσματα, χρησιμοποιώντας *in vitro* μεθοδολογίες που βασίζονται στη φασματοσκοπία UV αλλά και αναπτύσσοντας *in situ* μεθοδολογία που βασίζεται στη φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), η οποία έχει ονομαστεί NMR-Cosmetube. Επίσης περιγράφεται η ανάπτυξη μεθοδολογίας για την ταυτοποίηση των ενδιάμεσων και των προϊόντων που προκύπτουν σε κάθε ενζυμική αντίδραση. Τέλος, περιγράφεται και η δυνατότητα μελέτης της αλληλεπίδρασης των συστατικών των φυτικών εκχυλισμάτων με κάθε ένα από τα ένζυμα-στόχους, μέσω της μεθόδου φασματοσκοπίας μεταφοράς διαφοράς κορεσμού (Saturation Transfer Difference-STD NMR). Αυτή η μελέτη πραγματοποιήθηκε προκειμένου να προσδιοριστεί το ενδεχόμενο στερεοεκλεκτικότητας κάθε ενζύμου, έτσι ώστε να ξεχωρίσουν εκείνοι οι αναστολείς που βρίσκονται σε πολύπλοκα φυτικά μείγματα και που αλληλεπιδρούν με το ενεργό κέντρο των ενζύμων, επηρεάζοντας τη δραστηριότητά τους. Το **Κεφάλαιο 5** χωρίζεται σε τρία (υπο)κεφάλαια: **Κεφάλαιο 5.1:** εδώ περιγράφεται η ανάπτυξη μεθοδολογίας για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης και της αναστολής της με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκε μεθοδολογία για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των ενδιάμεσων προϊόντων που σχηματίζονται κατά την αντίδραση της τυροσινάσης. Επίσης, διερευνήθηκε η ικανότητα αναστολής της τυροσινάσης από φυτικά εκχυλίσματα, *in vitro* με φασματοσκοπία UV και φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού. Στη συνέχεια διερευνήθηκε η επίδραση φαινολικών μορίων στην αντίδραση της τυροσινάσης. Επίσης, μελετήθηκε η ανασταλτική δράση συνθετικών παραγώγων της ουρίας στην τυροσινάση, ενώ έγιναν και *in vivo* μελέτες μελανογένεσης σε έμβρυα zebrafish για ένα συνθετικό ανάλογο της ουρίας που έδειξε καλή ανασταλτική δράση, για ένα φυσικό προϊόν και για ένα εκχύλισμα. Τέλος, μελετήθηκε η δυνατότητα αλληλεπίδρασης των επιμέρους συστατικών των εκχυλισμάτων με την τυροσινάση. **Κεφάλαιο 5.2:** εδώ περιγράφεται η μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης καθώς και η αναστολή της από φυσικά προϊόντα και φυτικά εκχυλίσματα, χρησιμοποιώντας *in vitro* μεθοδολογία μέσω φασματοσκοπίας UV αλλά και *in situ* μελέτη μέσω φασματοσκοπίας NMR, όπου αναπτύχθηκε η μεθοδολογία NMR-Cosmetube για την ενζυμική αντίδραση της υαλουρονιδάσης. Η *in situ* ενζυμική αντίδραση και αναστολή της υαλουρονιδάσης περιγράφεται επίσης και με εφαρμογή πειράματος διάχυσης DOSY NMR. Επίσης, περιγράφεται η αλληλεπίδραση φυσικών προϊόντων και επιλεγμένων φυτικών εκχυλισμάτων με το πείραμα Saturation Transfer Difference (STD) NMR. **Κεφάλαιο 5.3:** Σε αυτό το Κεφάλαιο περιγράφεται η ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης και

αναστολής της ελαστάσης από φυσικά προϊόντα και φυτικά εκχυλίσματα. Επίσης, περιγράφεται η αναστολή της ελαστάσης από διάφορα φυτικά εκχυλίσματα με *in vitro* μεθοδολογία βασισμένη στη φασματοσκοπία UV. Επιπλέον, μελετάται η αλληλεπίδραση του ενζύμου με φυσικά προϊόντα και με φυτικά εκχυλίσματα, με εφαρμογή της μεθόδου Saturation Transfer Difference (STD) NMR.

Τέλος, στο **Κεφάλαιο 6** περιγράφεται η προσπάθεια που έχει γίνει για την εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube στη μελέτη ενός μείγματος που αποτελείται και από τις τρεις ενζυμικές αντιδράσεις (τυροσινάση, υαλουρονιδάση και ελαστάση), όταν αυτές εξελίσσονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάκι NMR. Ακόμη, περιγράφεται και ο προσδιορισμός της μεταβολής των συγκεντρώσεων κάθε προϊόντος που σχηματίζεται σε κάθε ενζυμική αντίδραση. Επίσης, σε αυτό το Κεφάλαιο περιγράφεται και η προσπάθεια μελέτης της εξέλιξης κάθε μιας από τις τρεις ενζυμικές αντιδράσεις παρουσία ενός φυσικού προϊόντος ή φυτικού εκχυλίσματος, το οποίο ενδεχομένως να συμπεριφέρεται ως ενισχυτής ή αναστολέας κάθε μεμονωμένης ενζυμικής αντίδρασης. Η προσπάθεια αυτή έγινε με σκοπό η μεθοδολογία NMR-Cosmetube να μπορεί να εφαρμόζεται στη μελέτη και ανάπτυξη φυσικών προϊόντων και πολύπλοκων μειγμάτων που θα στοχεύουν ταυτόχρονα σε περισσότερους από έναν ενζυμικούς στόχους. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης θα συμβάλλουν στην ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη πολύπλοκων μειγμάτων, σ' ένα μείγμα ενζυμικών αντιδράσεων.

Κεφάλαιο 2: Παραγωγή εκχυλισμάτων από φαρμακευτικά φυτά και μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράσης.

Για την παρούσα διδακτορική διατριβή έχουν επιλεγθεί προς μελέτη τα παρακάτω φαρμακευτικά φυτά, τα οποία ευδοκιμούν στην ευρύτερη περιοχή της Ηπείρου (Σχήμα 2.1), τα οποία έχουν περιγραφεί λεπτομερώς προηγουμένως στις Παραγράφους 1.1.1-1.1.7:



Σχήμα 2.1: Σχηματική απεικόνιση των μελετούμενων φαρμακευτικών φυτών.

2.1 Βελτιστοποίηση συνθηκών εκχύλισης

Ο τρόπος παραγωγής ενός εκχυλίσματος από ένα φαρμακευτικό φυτό, διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ποιότητα του φυτοχημικού του προφίλ και κατ' επέκταση στη βιολογική δράση που αυτό θα παρουσιάσει. Βασικό χαρακτηριστικό όλων των εκχυλισμάτων είναι ο αντιοξειδωτικός τους χαρακτήρας, επομένως είναι πολύ σημαντικό το φυτοχημικό προφίλ των εκχυλισμάτων να είναι πλούσιο σε βιοδραστικές ουσίες που θα ενισχύουν την αντιοξειδωτική του δράση. Για το λόγο αυτό, οι συνθήκες εκχύλισης που θα επιλεγούν (διαλύτης, χρόνος εκχύλισης και θερμοκρασία) πρέπει να είναι τέτοιες που να ευνοούν την παραγωγή όσο περισσότερων φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων είναι δυνατόν. Είναι πολύ σημαντικό επόμενως, να διερευνηθούν οι συνθήκες της εκχύλισης που θα εφαρμοστεί. Η επιλογή μιας κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης εξαρτάται άμεσα από τη φύση του φυτού, το διαλύτη που χρησιμοποιείται, το pH του διαλύτη, τη θερμοκρασία και το βαθμό απόδοσης διαλύτη:εκχυλίσματος.¹⁷⁷

Οι πιο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα ενός εκχυλίσματος είναι κυρίως: (α) ο διαλύτης εκχύλισης, (β) η θερμοκρασία εκχύλισης, (γ) ο χρόνος εκχύλισης και (δ) η κατεργασία του φυτού πριν από την εκχύλιση. Είναι πολύ σημαντικό να γίνονται αρκετές δοκιμές εκχύλισης, προκειμένου να παραχθεί ένα εκχύλισμα με πλούσιο φυτοχημικό προφίλ το οποίο θα παρουσιάζει όχι μόνο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, αλλά και άλλες ενισχυμένες βιοδραστικές ιδιότητες.

2.2. Πειραματικό μέρος

2.2.A Υλικά

2.2.A.1 Φαρμακευτικά Φυτά

Τα φυτά, και συγκεκριμένα τα υπέργεια τμήματά τους που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες είναι τα ακόλουθα: *Melissa Officinalis* (Μελισσόχορτο), *Rosmarinus Officinalis* (Δεντρολίβανο), *Salvia Officinalis* (Φασκόμηλο), *Thymus Vulgaris* (Θυμάρι), *Origanum Vulgare* (Ρίγανη), *Cistus Albidus* (Λαδανιά), και *Hypericum Perforatum* (Βαλσαμόχορτο) και η προμήθειά τους έγινε από τοπικό παραγωγό της ευρύτερης περιοχής της Ηπείρου.

2.2.B Μέθοδοι

2.2.B.1 Προετοιμασία δείγματος

2.2.B.1.1 Επίδραση της μηχανικής κατεργασίας του φυτού πριν από την εκχύλιση (κονιοποίηση/μη κονιοποίηση)

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της κονιοποίησης του φυτού πριν από την εκχύλιση, κάθε φυτό χωρίστηκε σε δύο ομάδες: η μία ομάδα κατεργάστηκε με υγρό άζωτο και υπέστη κονιοποίηση, μέχρι να προκύψει πλήρης σκόνη του δείγματος. Η δεύτερη ομάδα δεν υπέστη καμία κατεργασία. Ακολούθησε διαδοχική εκχύλιση των δύο ομάδων των δειγμάτων με διαλύτη αιθανόλη, στους 25°C και για χρονικό διάστημα 72 ωρών. Ο διαλύτης αντικαθιστόταν κάθε 24 ώρες με καινούριο όγκο διαλύτη. Τα παραγόμενα αιθανολικά εκχυλίσματα συμπυκνώθηκαν σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Στη συνέχεια, ακολούθησε εξάτμιση υπό κενό για πλήρη απομάκρυνση του διαλύτη. Τέλος, το εκχύλισμα πέρασε από αέριο άζωτο και αποθηκεύτηκε στους 4°C, σε σκουρόχρωμο δοχείο.

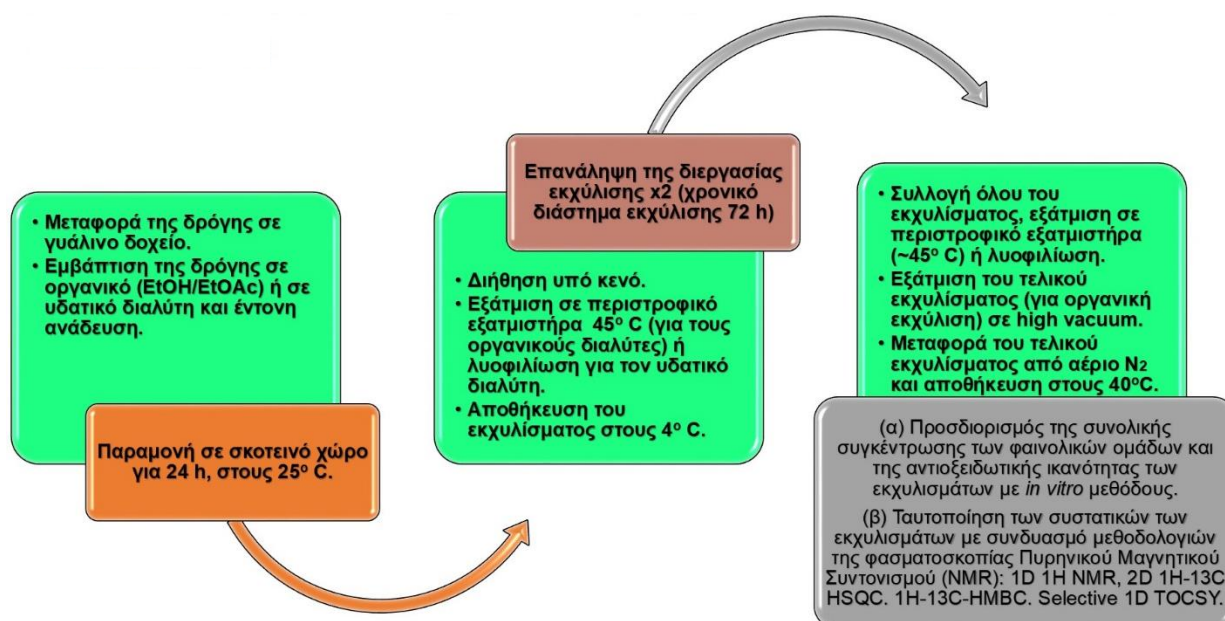
2.2.B.1.2 Επίδραση του διαλύτη εκχύλισης

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση του διαλύτη εκχύλισης, δοκιμάστηκαν τρεις διαλύτες: αιθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας και νερό. Η εκχύλιση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε κονιοποιημένο φυτό και σε συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες στους 25°C, με τον τρόπο που περιγράφηκε στην **Παράγραφο 2.2.B.1.1**.

2.2.B.1.3 Επίδραση της θερμοκρασίας και του χρόνου εκχύλισης

Η μελέτη της επίδρασης των συνθηκών εκχύλισης πραγματοποιήθηκε σε κονιοποιημένα δείγματα, ενώ προτιμήθηκε η αιθανόλη ως διαλύτης εκχύλισης. Τα υπέργεια τμήματα όλων των φυτών εκχυλίστηκαν με τρεις διαφορετικούς τρόπους εκχύλισης: **(α) Διαδοχική εκχύλιση με αιθανόλη, στους 25°C για 3 ημέρες**. Συγκεκριμένα, ποσότητα δείγματος (κονιοποιημένου και

μη κονιοποιημένου) μεταφέρθηκε σε γυάλινο περιέκτη και προστέθηκε διαλύτης αιθανόλη, σε αναλογία w/v 1:10. Ακολούθησε έντονη ανάδευση, και τα δείγματα φυλάχθηκαν σε σκοτεινό χώρο για 24 ώρες, με τακτική ανάδευση. Μετά το πέρας των 24 ωρών, πραγματοποιήθηκε διήθηση του εκχυλίσματος και απομάκρυνση της αιθανόλης σε περιστροφικό εξατμιστήρα, με μέγιστη θερμοκρασία 45°C, ώστε να μην υπάρξει καταστροφή των περιεχόμενων φαινολικών ενώσεων και φλαβονοειδών. Τα υπέργεια τμήματα του φυτού εμβαπτίστηκαν ξανά σε αντίστοιχο όγκο διαλύτη, και αποθηκεύτηκε για άλλες 24 ώρες. Το στερεό υπόλειμμα που έμεινε μετά την εξάτμιση φυλάχθηκε στους 4°C. Όλη αυτή η διεργασία πραγματοποιήθηκε 3 φορές, σε συνολικό χρονικό διάστημα 72 ωρών. Τα στερεά υπολείμματα που προέκυψαν συγχωνεύτηκαν και στο τέλος έγινε εξάτμιση υπό κενό ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη, και το παραγόμενο εκχύλισμα πέρασε από αέριο άζωτο και αποθηκεύτηκε σε σκουρόχρωμο δοχείο, στους 4°C. **(β) Εκχύλιση με αιθανόλη στους 45°C για 6 ώρες.** Συγκεκριμένη ποσότητα κονιοποιημένου φυτού μεταφέρθηκε σε σφαιρική φιάλη και προστέθηκε αιθανόλη σε αναλογία w/v 1:10. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα, σε θερμοκρασία 45°C, για 6 ώρες, υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη και αποθήκευση του παραγόμενου εκχυλίσματος, με τον τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως. **(γ) Εκχύλιση με αιθανόλη στους 60°C για 2 ώρες.** Η εκχύλιση έγινε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στο β, με μόνη διαφορά την θερμοκρασία και τον χρόνο εκχύλισης (Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης περιγράφεται στο **Σχήμα 2.2**).



Σχήμα 2.2: Σχηματική απεικόνιση της διεργασίας εκχύλισης σε θερμοκρασία εκχύλισης 25° C και συνολικό χρόνο εκχύλισης 72h.

2.2.B.2 Ανάλυση (σάρωση) των εκχυλισμάτων με φασματοσκοπία NMR

Τα 1D ¹H NMR φάσματα καταγράφηκαν σε φασματόμετρο Bruker AV500 MHz (Bruker, Rheinstetten, Germany), χρησιμοποιώντας τα λογισμικά Topspin 2.1 και 3.2. Συγκεκριμένη ποσότητα όλων των εκχυλισμάτων διαλύθηκε σε δευτεριωμένο διμεθυσουλφοξείδιο (DMSO-*d*₆), σε τελικό όγκο 500 μL, χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό πρότυπο δευτεριωμένο τριμεθυλσιλυλπροπανοϊκό οξύ (TMSP-*d*₄), γνωστής συγκέντρωσης.

2.2.B.3 Τιτλοδοτήσεις με δευτεριωμένο τριφθοροξικό οξύ (TFA-d)

Μετά την καταγραφή του πρώτου 1D ^1H NMR φάσματος κάθε δείγματος, ακολούθησε τιτλοδότηση με διάλυμα δευτεριωμένου τριφθοροξικού οξέος (TFA-d). Οι όγκοι TFA-d που χρησιμοποιούνται κάθε φορά, εξαρτώνται από τη φύση και το pH του εκχυλίσματος, ώστε να εμφανιστούν αρκετά εκλεπτυσμένες οι κορυφές των φαινολικών (-OH) ομάδων. Κάθε εκχύλισμα τιτλοδοτείται σταδιακά με διάλυμα TFA-d γεγονός που σημαίνει ότι δεν τιτλοδοτείται ο ίδιος όγκος TFA-d σε όλα τα εκχυλίσματα. Ακολουθεί καταγραφή 1D ^1H NMR φασμάτων μετά την κάθε προσθήκη δείγματος TFA-d, προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη εκλέπτυνση των κορυφών των φαινολικών (-OH) ομάδων.

2.2.B.4 *In vitro* προσδιορισμός των συνολικών φαινολικών συστατικών, με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, εφαρμόστηκε η κλασσική διεργασία, μετά από βελτιστοποίηση της μεθόδου¹⁷⁸: Αρχικά προετοιμάζονται πυκνά διαλύματα των εκχυλισμάτων σε διαλύτη αιθανόλη, συγκέντρωσης 1 mg ξηρού βάρους εκχυλίσματος/ mL. Σε σωληνάριο Eppendorf των 1,5 mL φέρονται 20 μL του δείγματος του εκχυλίσματος και στη συνέχεια προστίθενται 480 μL απεσταγμένου νερού. Ακολουθεί προσθήκη 50 μL διαλύματος Folin-Ciocalteu και το μείγμα αναδεύεται και αφήνεται σε αναμονή για 3 min. Μετά από 3 min, στο μείγμα προστίθενται 100 μL κορεσμένου διαλύματος 20% w/v Na_2CO_3 , και συμπληρώνεται ο όγκος με νερό, ώστε να φτάσει σε τελικό όγκο 1 mL. Το μείγμα αφήνεται για επώαση για διάστημα 1 h, σε σκοτεινό χώρο στους 25°C. Μετά από το τέλος της 1 h, μετράται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 725 nm. Τα δείγματα μελετήθηκαν εις τριπλούν.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών συστατικών που περιέχονται στα μελετούμενα εκχυλίσματα, κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη αναφοράς, με πρότυπη ένωση γαλλικού οξέος. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεταξύ 25-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων εφαρμόστηκε η παραπάνω διεργασία. Τα δείγματα μελετήθηκαν εις τριπλούν. Το συνολικό περιεχόμενο των φαινολικών ομάδων εκφράστηκε ως mg γαλλικού οξέος/ g εκχυλίσματος.

2.2.B.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων με δέσμευση της ρίζας DPPH $^{\cdot}$.

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των παραγόμενων αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων έγινε με τη δοκιμή της σταθερής ελεύθερης ρίζας, DPPH $^{\cdot}$, με ορισμένες τροποποιήσεις.¹⁷⁹ Αρχικά, παρασκευάστηκαν διαλύματα των αιθανολικών και υδατικών

εκχυλισμάτων, σε συγκέντρωση 1,0 mg/mL σε διαλύτη αιθανόλη. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλυμάτων για το κάθε εκχύλισμα: 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150 και 200 µg/mL. Σε σωληνάριο Eppendorf των 1,5 mL φέρονται με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας, 0,3 mM αιθανολικού διαλύματος της ρίζας DPPH^{*} και η κατάλληλη συγκέντρωση των αιθανολικών διαλυμάτων των εκχυλισμάτων. Ο όγκος του μείγματος συμπληρώνεται με διαλύτη αιθανόλη. Τα δείγματα αφήνονται να αντιδράσουν σε θερμοκρασία δωματίου (25°C), και μετά από 30 λεπτά μετράται η απορρόφηση στα 517 nm.

Η αντιοξειδωτική δράση υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{Αντιοξειδωτική δράση \% (scavenging capacity)} = 100 - [(A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}}) * 100 / A_{\text{μάρτυρα}}]$$

Όπου $A_{\text{δείγματος}}$ = η απορρόφηση του δείγματος στα 517 nm

Για τον τυφλό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε η κατάλληλη συγκέντρωση του εκχυλίσματος κάθε φορά, και ο όγκος συμπληρώθηκε με διαλύτη αιθανόλη. Για το μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ρίζας DPPH^{*} και αιθανόλη αντίστοιχα. Για την έκφραση της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιείται η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού ή του εκχυλίσματος στην οποία παρατηρείται το 50% της δέσμευσης της ρίζας, όπως μετράται από τη μείωση της απορρόφησης στα 517 nm (SC_{50}). Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν εις τριπλούν.

Για τον υπολογισμό της τιμής SC_{50} έγιναν αραιώσεις ενός πυκνού διαλύματος εκχυλίσματος, στις οποίες προστέθηκε σταθερή ποσότητα διαλύματος ρίζας, μετρήθηκε η απορρόφηση αυτών μετά από 30 λεπτά και οι τιμές απορρόφησης με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις τοποθετήθηκαν σε διάγραμμα από το οποίο υπολογίστηκε η τιμή SC_{50} . Όλα τα δείγματα μετρήθηκαν εις τριπλούν.

2.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

2.3.1 Αποτελέσματα από τη διερεύνηση των συνθηκών εκχύλισης των παραγόμενων εκχυλισμάτων, με εφαρμογή 1D ¹H φασματοσκοπίας NMR

Αρχικά πραγματοποιήθηκε σάρωση όλων των παραγόμενων εκχυλισμάτων με καταγραφή φασμάτων πρωτονίου, προκειμένου να γίνει μια γρήγορη μελέτη των φυτοχημικών προφίλ τους, ώστε να πραγματοποιηθεί βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης. Η σύγκριση των φασμάτων έγινε κυρίως στην περιοχή 6,00-13,00 ppm, όπου συντονίζεται η περιοχή των φαινολικών (-OH) ομάδων (8,00-13,00 ppm) και των αρωματικών πρωτονίων (6,00-8,00 ppm) των флаβονοειδών ουσιών. Η εμφάνιση μεγάλων ευρείων κορυφών στην περιοχή 8,00-13,00 ppm είναι δυνατόν να οφείλεται στην ανταλλαγή των πρωτονίων μεταξύ των πολλών -OH ομάδων, με άλλες -OH και -COOH ομάδες, κυρίως λόγω της διαμοριακής αλληλεπίδρασης των διαλυμένων μορίων, και ειδικά όταν αυτά είναι διαλυμένα σε οργανικούς διαλύτες χαμηλής

πολικότητας και μικρής διηλεκτρικής σταθεράς. Όσον αφορά τις φαινολικές (-OH) ομάδες, ένα μικρό ποσοστό της ανταλλαγής των ^1H μπορεί να επιτευχθεί ανάλογα με τη σύσταση του διαλύτη και το pH του διαλύματος.⁴³ Αυτό μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας ως διαλύτη διμεθυλοσουλφοξείδιο ($\text{DMSO-}d_6$) και τιτλοδοτώντας κάθε δείγμα με τριφθοροξικό οξύ ($\text{TFA-}d$), το οποίο είναι ένα ισχυρό οργανικό οξύ με σταθερά ιονισμού $\text{pK}_a=0,23$. Το $\text{DMSO-}d_6$ χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης για δύο λόγους: **(1)** αποτελεί εξαιρετικό διαλύτη στην ανάλυση μειγμάτων, λόγω της υψηλής διηλεκτρικής σταθεράς του και της ικανότητάς του να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου και **(2)** παρουσία του, η πλειοψηφία των χημικών μετατοπίσεων των φαινολικών (-OH) ομάδων βρίσκεται αρκετά μακριά από την πολύπλοκη και υπερπληθής φασματική περιοχή των αρωματικών πρωτονίων.

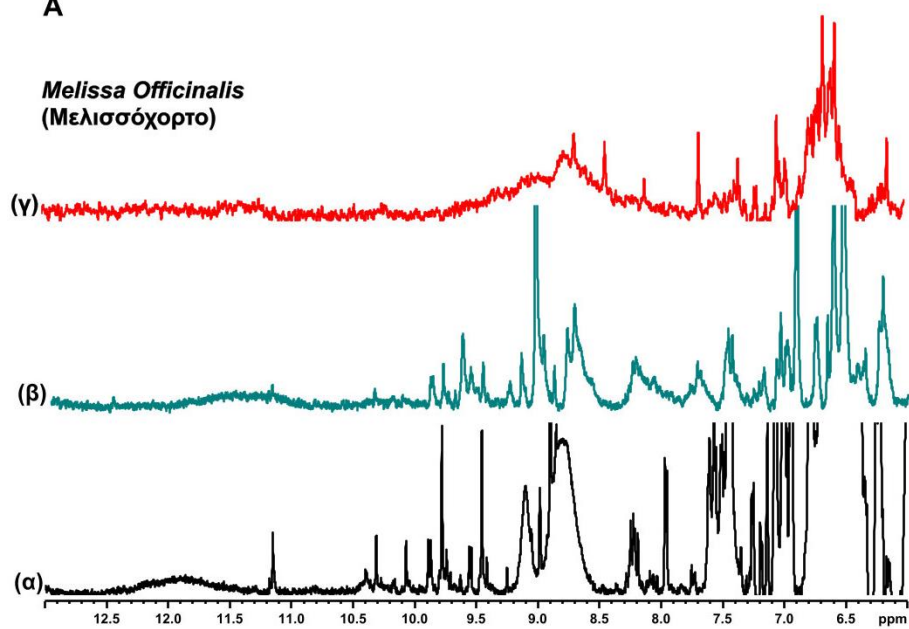
2.3.1.1 Διερεύνηση του διαλύτη εκχύλισης

Το είδος του διαλύτη που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση, επηρεάζει το φυτοχημικό προφίλ του εκχυλίσματος. Η επιλογή του διαλύτη εξαρτάται από το είδος του φυτού, το μέρος του φυτού που πρόκειται να εκχυλιστεί, τη φύση των επιλεγμένων βιοδραστικών ουσιών που πρόκειται να εκχυλιστούν, αλλά και από το κόστος και τη διαθεσιμότητα του διαλύτη. Γενικά, πολικοί διαλύτες όπως είναι το νερό, η μεθανόλη και η αιθανόλη, χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση πολικών συστατικών, ενώ μη πολικοί διαλύτες όπως είναι το εξάνιο και το διχλωρομεθάνιο χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση μη πολικών συστατικών.^{180,181} Κατά τη συμβατική εκχύλιση υγρού-υγρού, προτιμότερη είναι η επιλογή δύο αναμειγμένων διαλυτών, με το νερό να είναι ένας από αυτούς. Σε όλους τους συνδυασμούς, το νερό υπάρχει λόγω της υψηλής πολικότητας και της ανάμειξής του με τον οργανικό διαλύτη. Η ένωση που πρόκειται να εκχυλιστεί χρησιμοποιώντας υγρή-υγρή εκχύλιση, θα πρέπει να είναι διαλυτή σε οργανικό διαλύτη και όχι μόνο σε νερό, έτσι ώστε να διευκολυνθεί ο διαχωρισμός.¹⁷⁷

Για τα μελετούμενα φυτά πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με τρεις διαφορετικούς διαλύτες. Ως προς τον τρόπο εκχύλισης, πραγματοποιήθηκε συμβατική εκχύλιση στους 25°C , για τρεις ημέρες, με διαδοχική αλλαγή του εκάστοτε διαλύτη, προκειμένου να παραχθεί επαρκής ποσότητα εκχυλίσματος. Καθώς τα φυτικά εκχυλίσματα που θα παραχθούν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για καλλυντική χρήση, επιτρεπόμενοι οργανικοί διαλύτες είναι μόνο η αιθανόλη και ο οξικός αιθυλεστέρας. Επιλέχθηκαν επομένως τρεις διαλύτες εκχύλισης, η αιθανόλη, ο οξικός αιθυλεστέρας και το νερό **(Σχήμα 2.3)**.

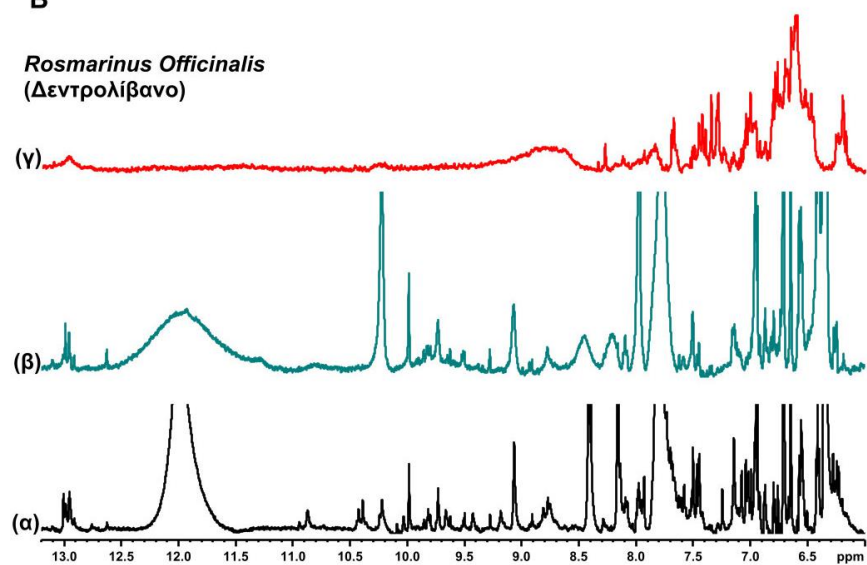
A

Melissa Officinalis
(Μελισσόχορτο)



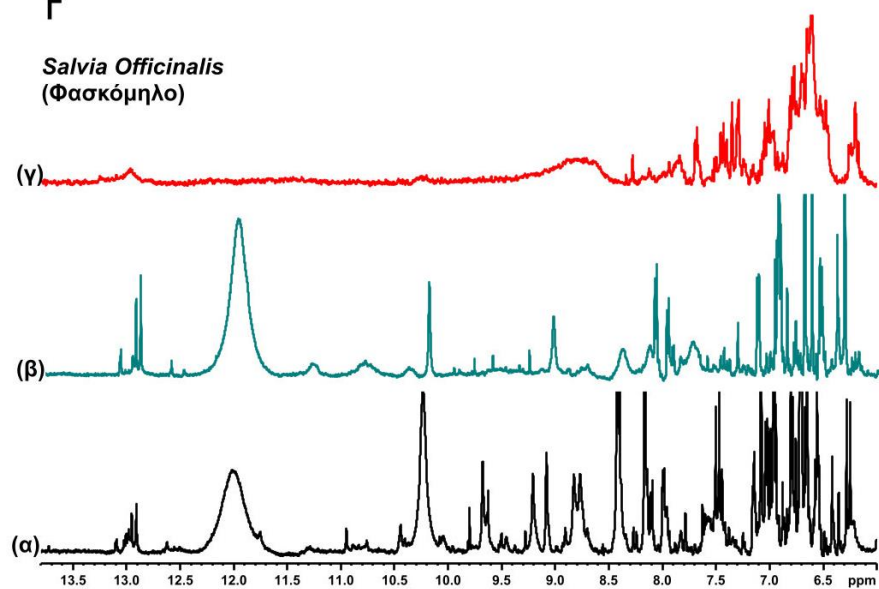
B

Rosmarinus Officinalis
(Δεντρολίβανο)



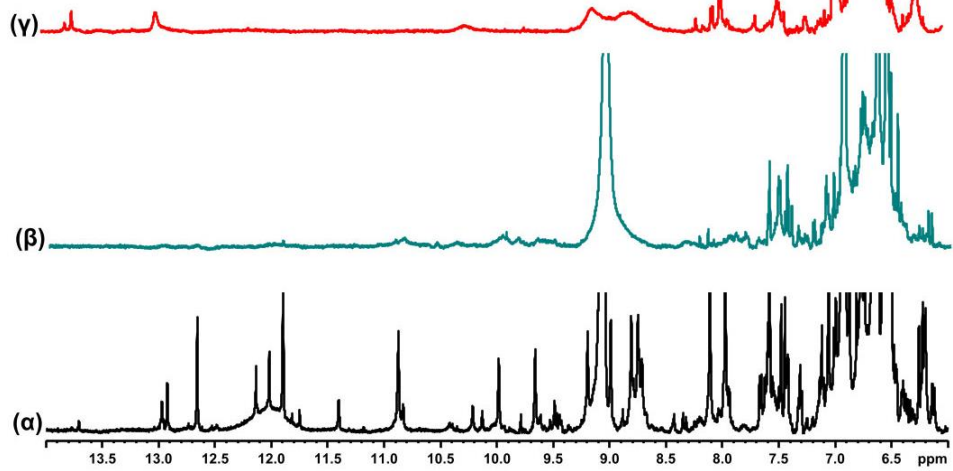
Γ

Salvia Officinalis
(Φασκόμηλο)



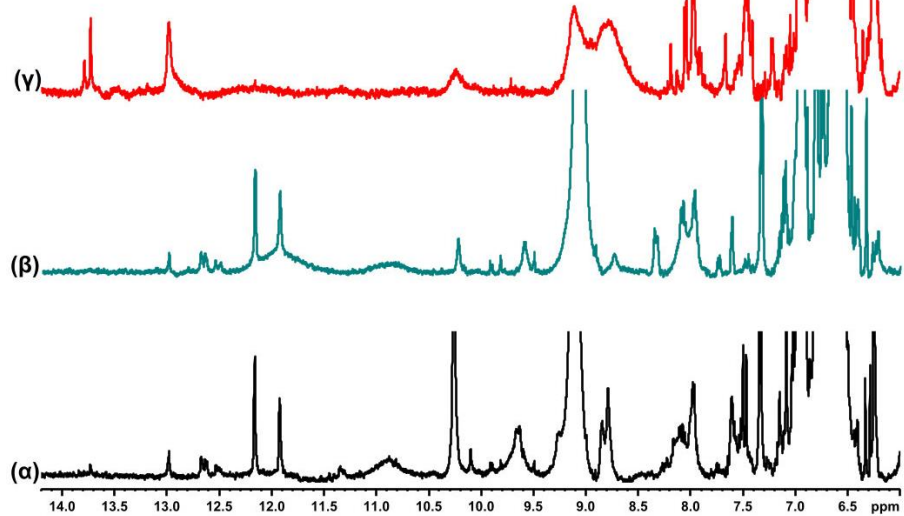
Δ

Thymus Vulgaris
(Θυμάρι)



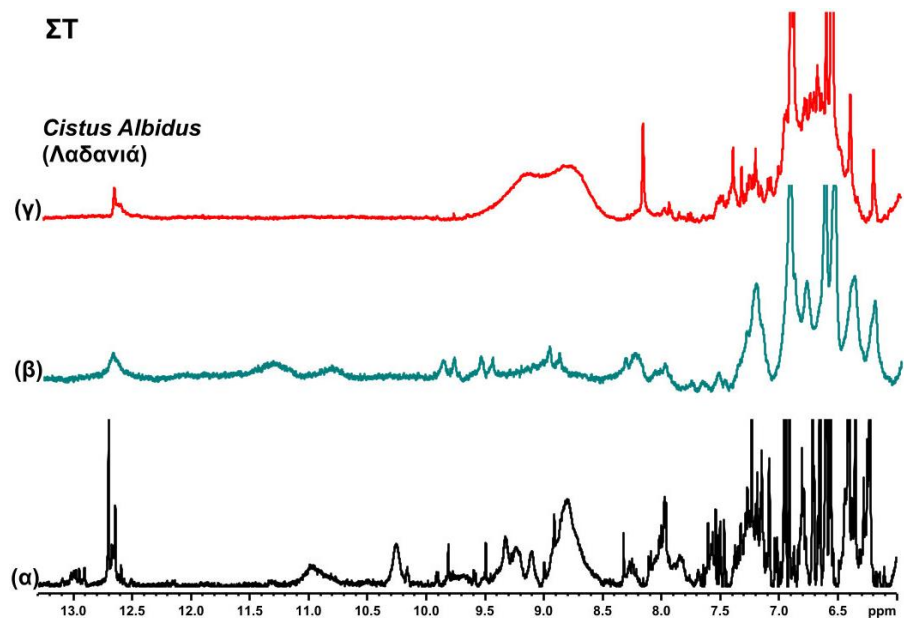
Ε

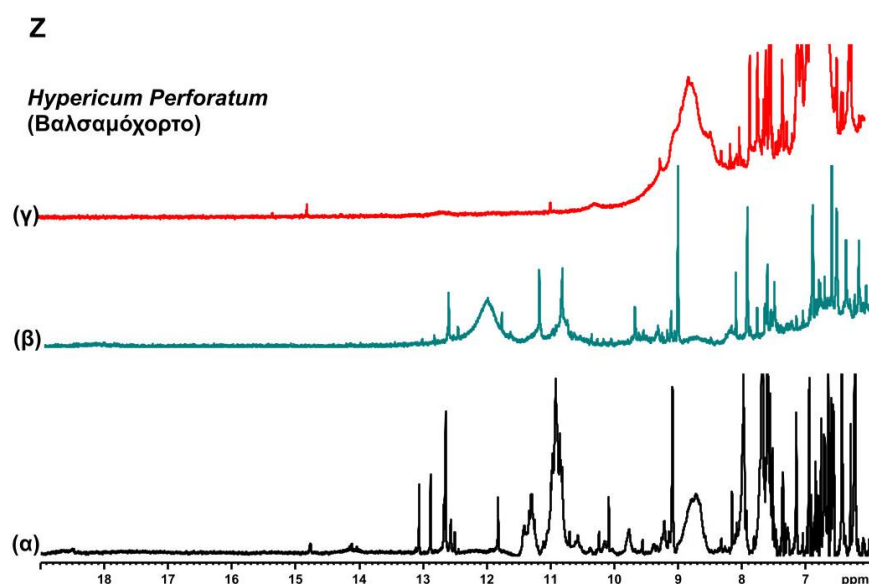
Origanum Vulgare
(Ρίγανη)



ΣΤ

Cistus Albidus
(Λαδανιά)

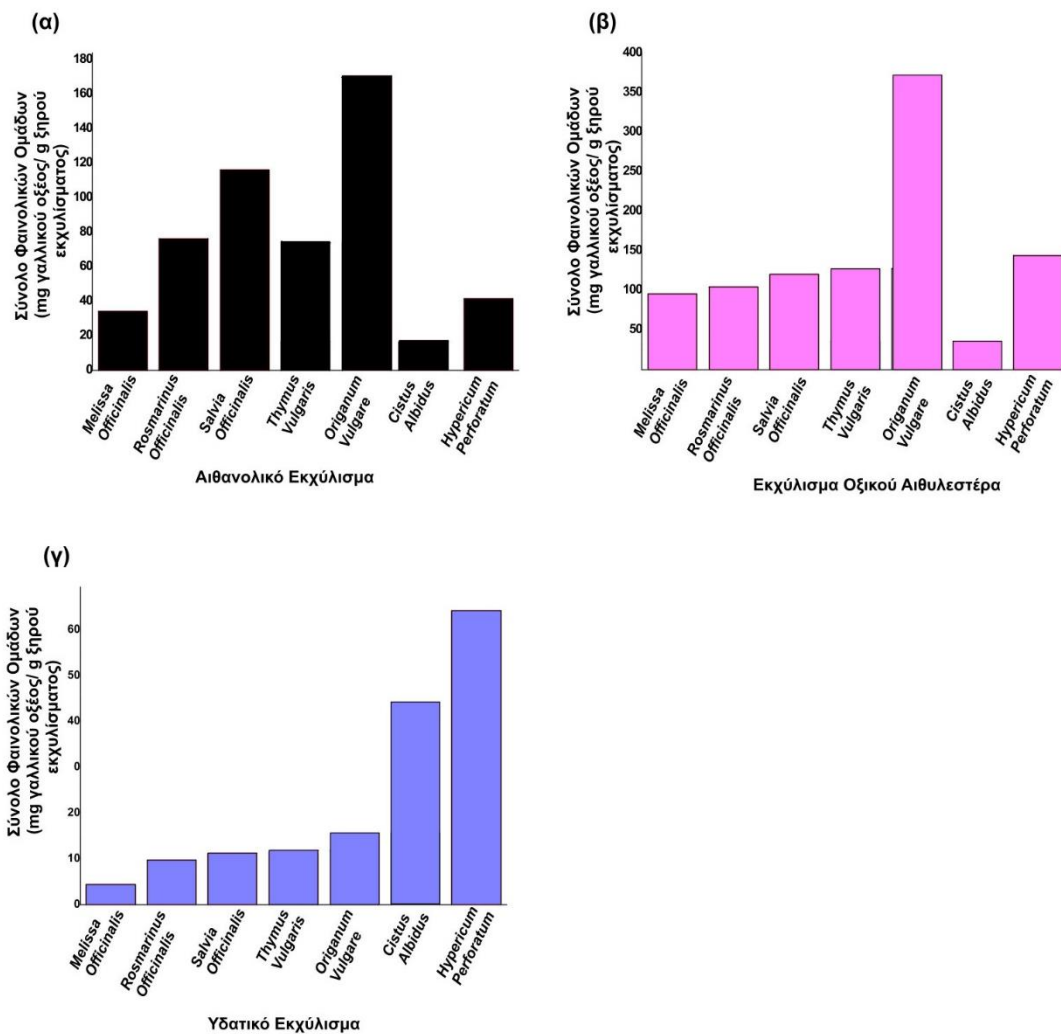




Σχήμα 2.3: A-Z: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00) ppm για τα A-ΣΤ και (6,00-20,00 για το Z) 1D ¹H NMR φασμάτων των εκχυλισμάτων όλων των μελετούμενων φυτών **A: *Melissa Officinalis*, **B:** *Rosmarinus Officinalis*, **Γ:** *Salvia Officinalis*, **Δ:** *Thymus Vulgaris*, **E:** *Origanum Vulgare*, **ΣΤ:** *Cistus Albidus*, **Z:** *Hypericum Perforatum* σε τρεις διαφορετικούς διαλύτες εκχύλισης: **(α)** αιθανόλη, **(β)** οξικός αιθυλεστέρας και **(γ)** νερό με την κατάλληλη προσθήκη διαλύματος TFA κάθε φορά: **A:** **(α)** 1 μL TFA, **(β)** 1 μL TFA και **(γ)** 15 μL TFA, **B:** **(α)** 3,5 μL TFA, **(β)** 1,5 μL TFA και **(γ)** 12 μL TFA, **Γ:** **(α)** 6,5 μL TFA, **(β)** 2 μL TFA και **(γ)** 8 μL TFA, **Δ:** **(α)** 3 μL TFA, **(β)** 2 μL TFA και **(γ)** 15 μL TFA, **E:** **(α)** 4,5 μL TFA, **(β)** 1,5 μL και **(γ)** 12 μL TFA, **ΣΤ:** **(α)** 1 μL TFA **(β)** 1 μL TFA και **(γ)** 13 μL TFA, και **Z:** **(α)** 5 μL TFA, **(β)** 2,5 μL TFA και **(γ)** 14 μL TFA.**

Στο **Σχήμα 2.3** απεικονίζονται τα φάσματα πρωτονίων των εκχυλισμάτων που έχουν παραχθεί από τα επτά φυτά, μετά από εκχυλίσεις με τρεις διαφορετικούς διαλύτες: **(α)** αιθανόλη, **(β)** οξικός αιθυλεστέρας και **(γ)** νερό. Όπως προκύπτει από τη σάρωση των φασμάτων πρωτονίων των εκχυλισμάτων, το υδατικό εκχύλισμα δε φαίνεται να περιέχει μεγάλο αριθμό φλαβονοειδών και φαινολικών ενώσεων και ως εκ τούτου, η περιοχή των φαινολικών ομάδων (8,00-13,00 ppm) περιέχει το μικρότερο αριθμό σημάτων, ακόμη και μετά την προσθήκη TFA-*d*, με εξαίρεση τη ρίγανη που το υδατικό της εκχύλισμα παρουσιάζει έντονες κορυφές στην περιοχή 12,00-14,00 ppm. Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς με το νερό γενικά παρασύρεται ένα μικρό ποσοστό διαλυτών φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων. Από την άλλη, η εκχύλιση των φυτών με οργανικό διαλύτη, είναι πιο αποτελεσματική, καθώς εκχυλίζεται μεγάλο ποσοστό φλαβονοειδών ενώσεων. Συγκρίνοντας τα φάσματα πρωτονίων των εκχυλισμάτων που προέκυψαν μετά από εκχύλιση με αιθανόλη και οξικό αιθυλεστέρα, και συγκεκριμένα την περιοχή των αρωματικών πρωτονίων, παρατηρείται ότι το φυτοχημικό προφίλ τους είναι πλουσιότερο σε αντιοξειδωτικές ουσίες, συγκριτικά με τα αντίστοιχα υδατικά εκχυλίσματα. Ωστόσο και οι δύο εκχυλίσεις διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το ποσοστό των φυτοχημικών στα παραγόμενα εκχυλίσματα. Όσον αφορά την απόδοση του κάθε διαλύτη εκχύλισης, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ομάδων (**Σχήμα 2.4**). Οι μη παρατηρήσιμες κορυφές στην περιοχή των φαινολικών (-OH) ομάδων, εμφανίστηκαν προσθέτοντας TFA-*d* σε κάθε δείγμα εκχυλίσματος. Η όξυνση των κορυφών ευνόησε την ολοκλήρωσή τους, κανονικοποιώντας πάντα ως προς εσωτερικό πρότυπο γνωστής συγκέντρωσης (TMSP-*d*₄), προκειμένου να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των συνολικών

φαινολικών ομάδων και να προσδιοριστεί η απόδοση του κάθε διαλύτη εκχύλισης, ώστε να παραχθεί ένα εκχύλισμα με φυτοχημικό προφίλ πλούσιο σε αντιοξειδωτικές ουσίες.

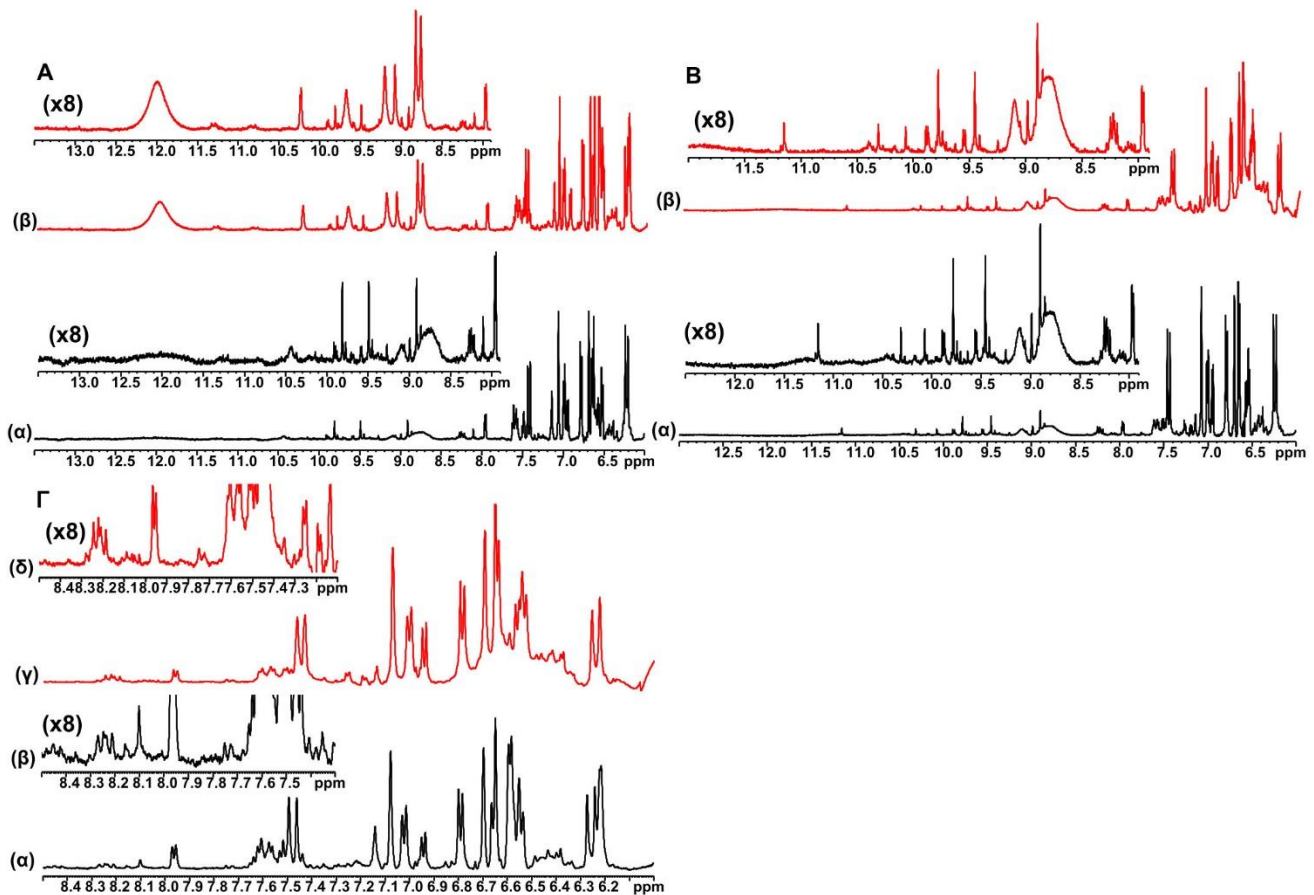


Σχήμα 2.4: Γραφικές απεικονίσεις της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών ομάδων για κάθε εκχύλισμα, για εκχύλιση που έχει γίνει: **(α)** με διαλύτη αιθανόλη, **(β)** με διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα και **(γ)** με διαλύτη νερό.

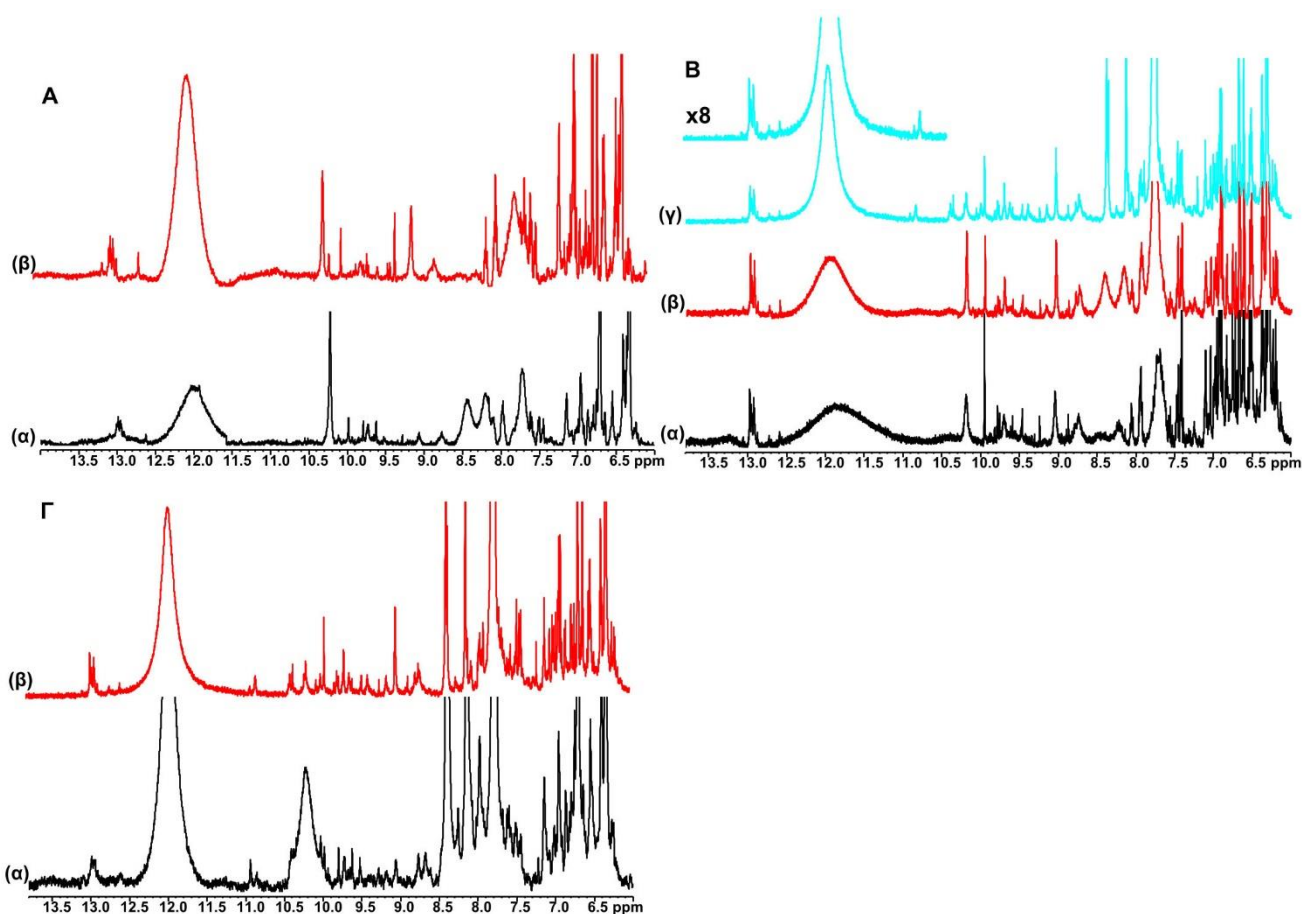
Κάθε φυτό παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά σε κάθε διαλύτη εκχύλισης και αυτό οφείλεται στη διαφορετική σύσταση των φυσικών δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχει. Όπως παρατηρείται στο **Σχήμα 2.4**, τα αιθανολικά εκχυλίσματα περιέχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών ομάδων, συγκριτικά με τα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα και τα υδατικά. Επομένως, βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, από τους οργανικούς διαλύτες επιλέχθηκε η αιθανόλη ως βασικός διαλύτης εκχύλισης συγκριτικά με τον οξικό αιθυλεστέρα. Τα υδατικά εκχυλίσματα ωστόσο μελετήθηκαν και αυτά, για τη βιολογική τους δράση ως προς τα τρία ένζυμα-στόχους, λόγω του διαφορετικού φυτοχημικού προφίλ που παρουσιάζουν σε σχέση με τα αιθανολικά.

2.3.1.2 Διερεύνηση της μηχανικής κατεργασίας του φυτού πριν από την εκχύλιση

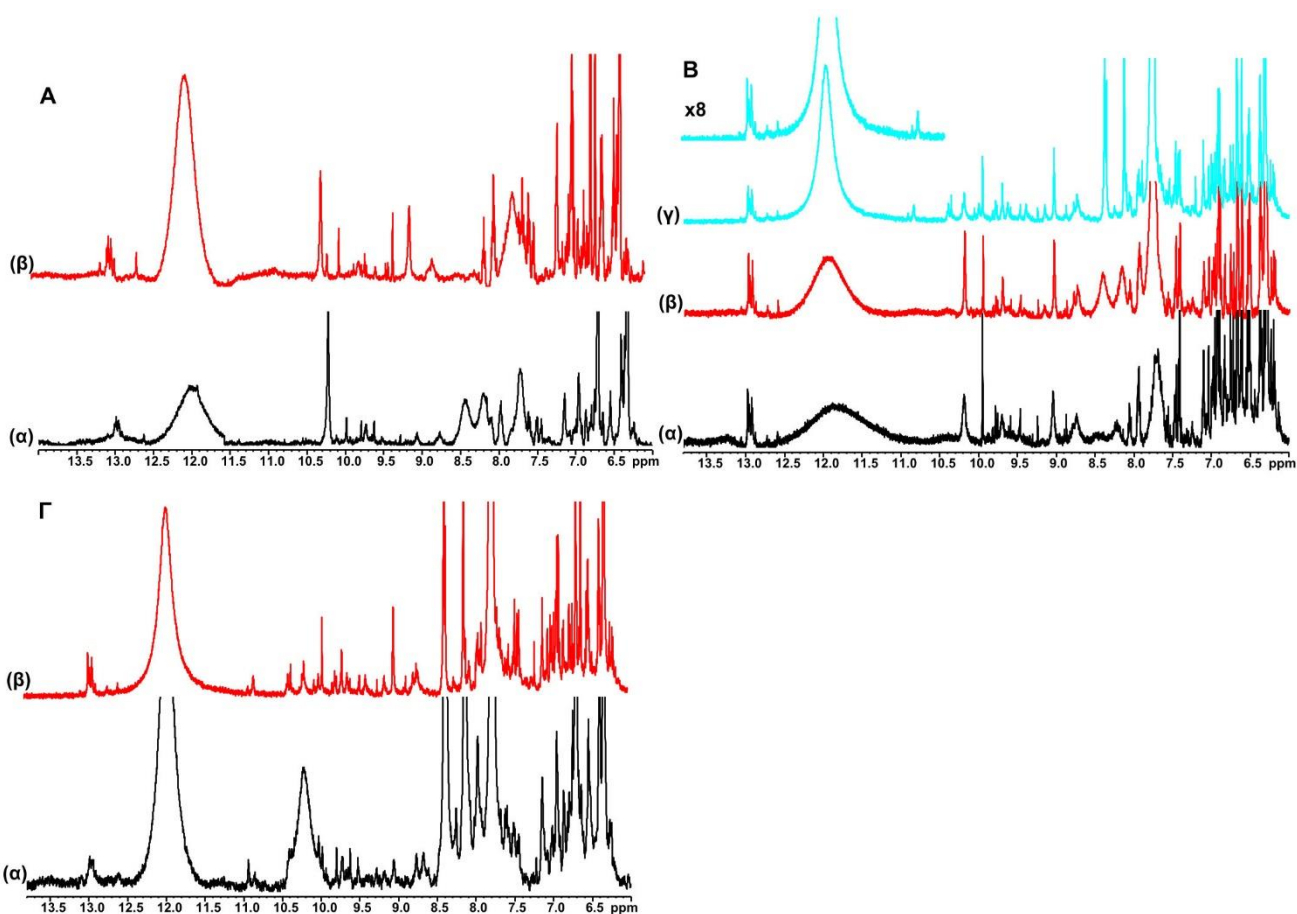
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της μηχανικής κατεργασίας του φυτού πριν από την εκχύλιση. Καθώς είναι σημαντικό για ένα εκχύλισμα να έχει πλούσιο φυτοχημικό προφίλ, πρέπει να ληφθεί υπόψιν και ο τρόπος κατεργασίας του φυτού πριν την εκχύλιση, και κυρίως αν αυτό έχει υποστεί κονιοποίηση ή όχι. Η πλήρης κονιοποίηση του φυτού πριν από την εκχύλιση μεγαλώνει την επιφάνεια επαφής, με αποτέλεσμα να γίνεται καλύτερη “απελευθέρωση” των φυτοχημικών συστατικών. Η διερεύνηση αυτής της μηχανικής κατεργασίας πραγματοποιήθηκε σε εκχύλιση που έχει γίνει με διαλύτη αιθανόλη και με συμβατική εκχύλιση που έχει γίνει για 3 ημέρες στους 25°C, προκειμένου να παραχθεί μεγαλύτερη ποσότητα εκχυλίσματος. Για όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές τιτλοδοτήσεις με δευτεριωμένο διάλυμα τριφθοροξικού οξέος (TFA-*d*), γνωστής συγκέντρωσης (100 mM), προκειμένου να εμφανιστούν όλες οι μη παρατηρήσιμες κορυφές των φαινολικών (-OH) ομάδων που υπάρχουν σε κάθε δείγμα, και ελήφθησαν τα φάσματα πρωτονίου (Σχήματα 2.5-2.11).



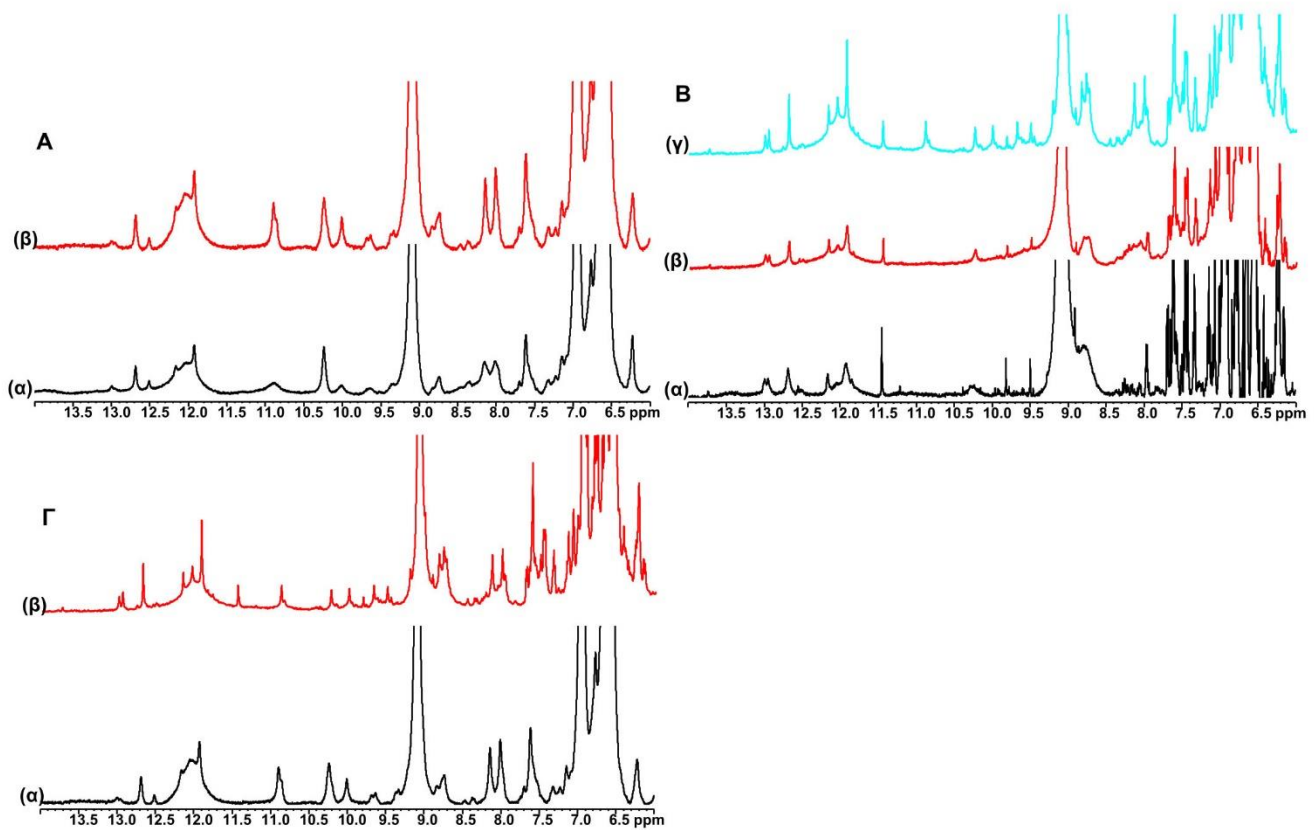
Σχήμα 2.5: A: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-13,50 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis*. Κατεργασία φυτού: Χωρίς κονιοποίηση. Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες στους 25°C, διαδοχική αλλαγή διαλύτη α) Πριν την προσθήκη TFA-*d* β) μετά την προσθήκη 1 μL TFA-*d*. B: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-13,00 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis*. Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C, αλλαγή διαλύτη (α) πριν την προσθήκη TFA-*d*, (β) μετά την προσθήκη 0,5 μL TFA-*d*, (γ) μετά την προσθήκη 1 μL TFA-*d*. Γ: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-13,00 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis*. Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C, διαδοχική αλλαγή διαλύτη. (α) χωρίς κονιοποίηση του φυτού, μετά την προσθήκη 1 μL TFA-*d* (β) κονιοποίηση του φυτού, μετά την προσθήκη 1 μL TFA-*d*.



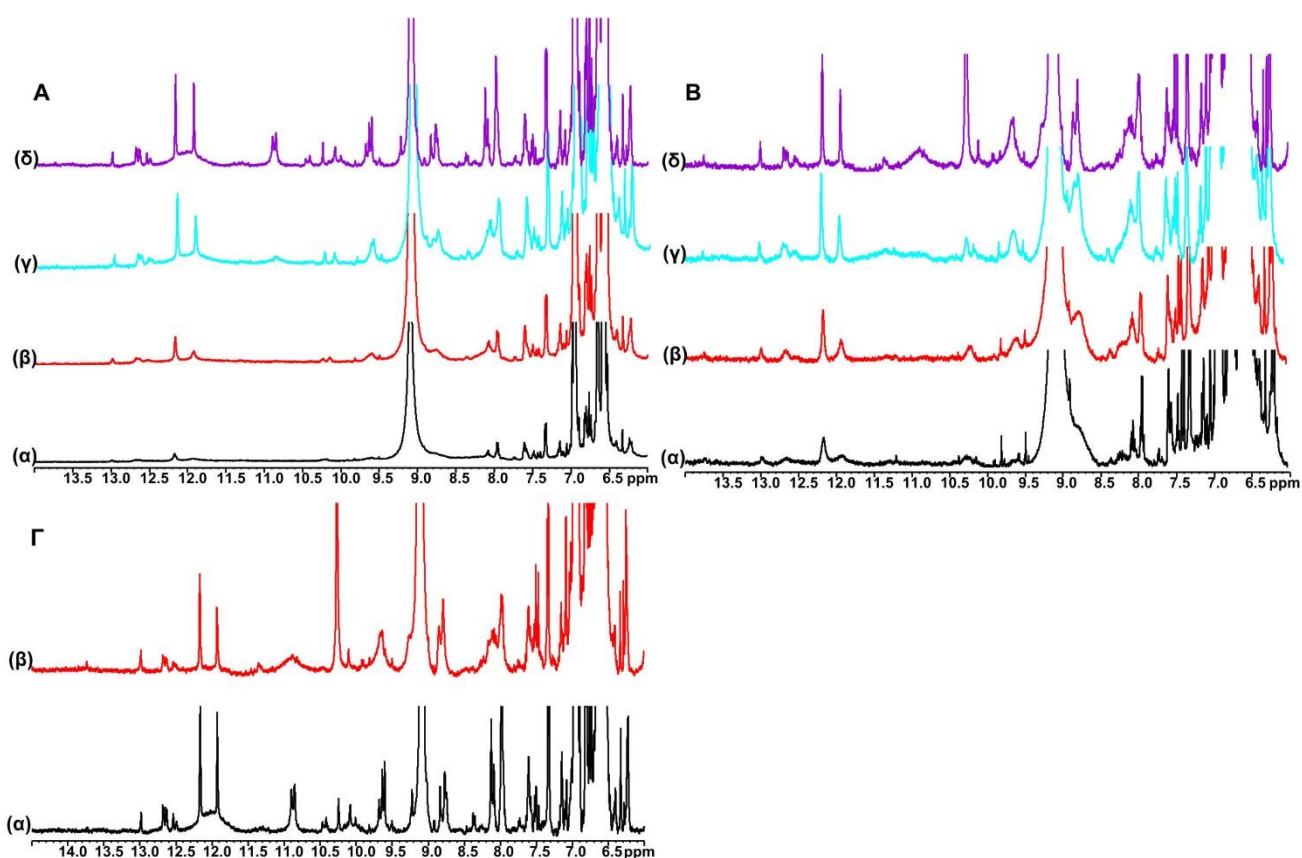
Σχήμα 2.6: **A:** Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Rosmarinus Officinalis*. Κατεργασία φυτού: Χωρίς κονιοποίηση. Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες στους 25°C, διαδοχική αλλαγή διαλύτη α) Πριν την προσθήκη TFA-d β) μετά την προσθήκη 1 μL TFA-d. **B:** Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Rosmarinus Officinalis*. Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C, αλλαγή διαλύτη (α) πριν την προσθήκη TFA-d, (β) μετά την προσθήκη 2 μL TFA-d, (γ) μετά την προσθήκη 3,5 μL TFA-d. **Γ:** Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Rosmarinus Officinalis* Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C, διαδοχική αλλαγή διαλύτη. (α) χωρίς κονιοποίηση του φυτού, μετά την προσθήκη 1 μL TFA-d (β) κονιοποίηση του φυτού, μετά την προσθήκη 3,5 μL TFA-d.



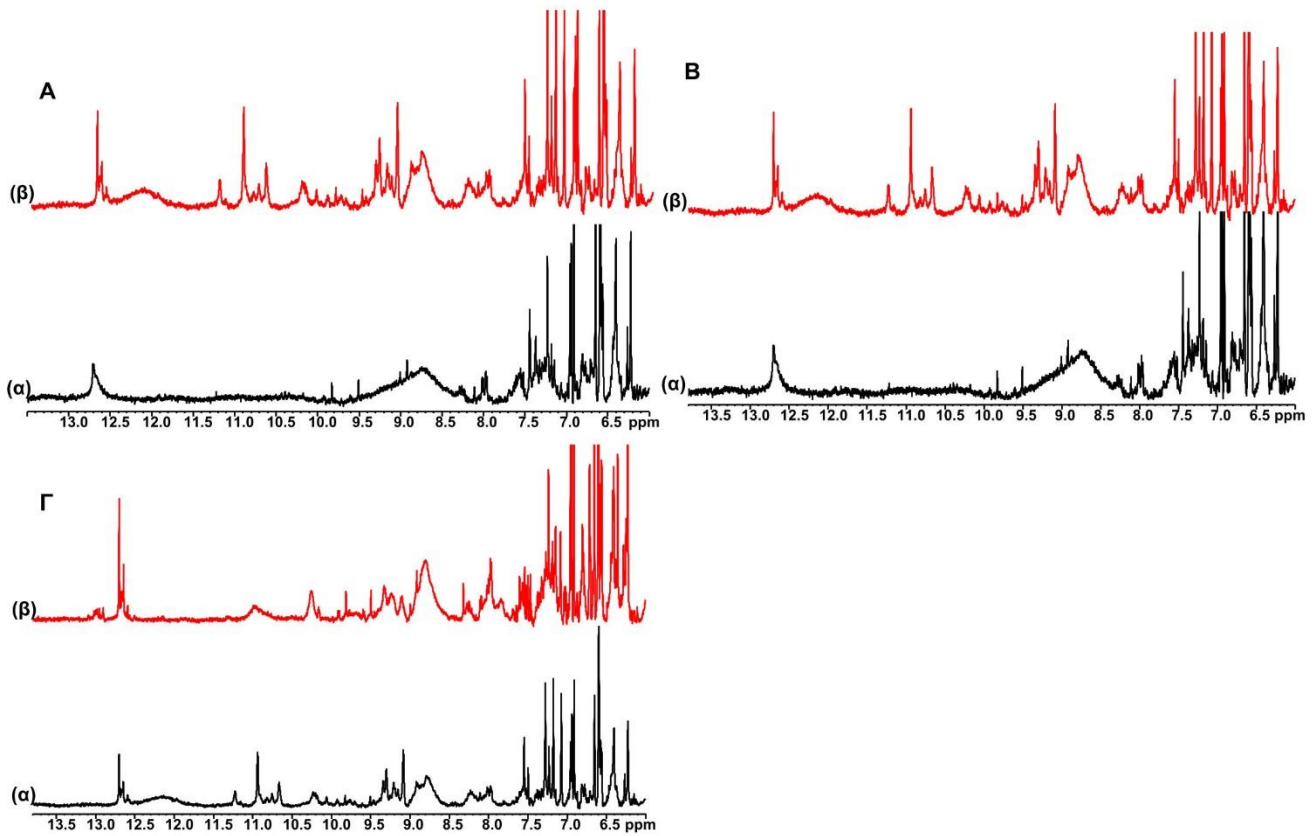
Σχήμα 2.7: A: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Salvia Officinalis*. Κατεργασία φυτού: Χωρίς κονιοποίηση. Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες στους 25°C , διαδοχική αλλαγή διαλύτη α) Πριν την προσθήκη TFA-*d* β) μετά την προσθήκη 1 μL TFA-*d*. B: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Salvia Officinalis*. Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C , αλλαγή διαλύτη (α) πριν την προσθήκη TFA-*d*, (β) μετά την προσθήκη 1 μL TFA-*d*, (γ) μετά την προσθήκη 6,5 μL TFA-*d*. Γ: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Salvia Officinalis*. Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C , διαδοχική αλλαγή διαλύτη. (α) χωρίς κονιοποίηση του φυτού, μετά την προσθήκη 1 μL TFA-*d* (β) κονιοποίηση του φυτού, μετά την προσθήκη 6,5 μL TFA-*d*.



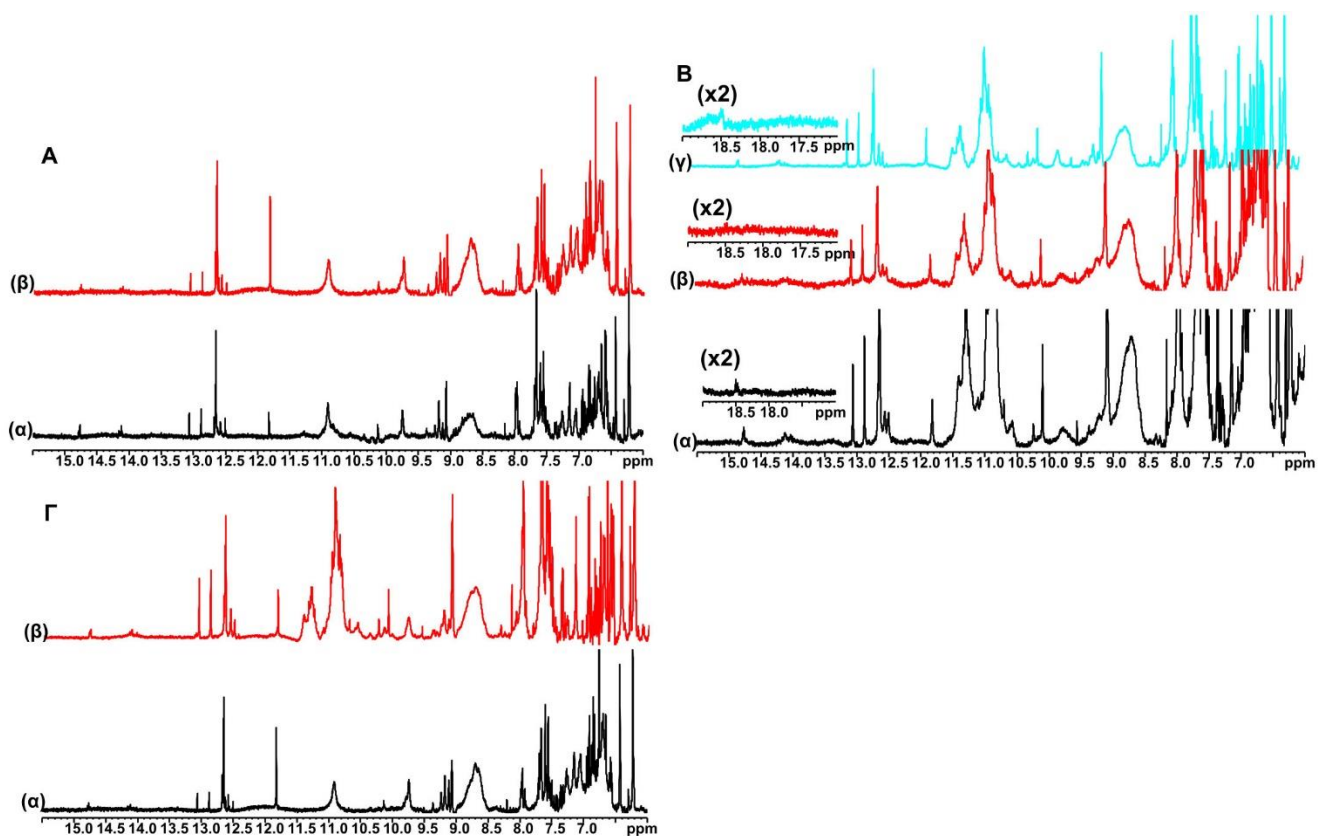
Σχήμα 2.8: A: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Thymus Vulgaris*. Κατεργασία φυτού: Χωρίς κονιοποίηση. Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες στους 25°C , διαδοχική αλλαγή διαλύτη α) Πριν την προσθήκη TFA-*d* β) μετά την προσθήκη 1 μL TFA-*d*. B: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Thymus Vulgaris*. Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C , αλλαγή διαλύτη (α) πριν την προσθήκη TFA-*d*, (β) μετά την προσθήκη 1 μL TFA-*d* (γ) μετά την προσθήκη 3 μL TFA-*d*. Γ: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Thymus Vulgaris*. Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C , διαδοχική αλλαγή διαλύτη. (α) χωρίς κονιοποίηση του φυτού, μετά την προσθήκη 1 μL TFA-*d* (β) κονιοποίηση του φυτού, μετά την προσθήκη 3 μL TFA-*d*.



Σχήμα 2.9: A: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-13,50 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Origanum Vulgare*. Κατεργασία φυτού: Χωρίς κονιοποίηση. Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες στους 25°C , διαδοχική αλλαγή διαλύτη (α) Πριν την προσθήκη TFA-*d* (β) μετά την προσθήκη 0,76 μL TFA-*d* (γ) μετά την προσθήκη 1,5 μL TFA-*d*, (δ) μετά την προσθήκη 2,56 μL TFA-*d*. B: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-13,50 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Origanum Vulgare*. Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C , αλλαγή διαλύτη (α) πριν την προσθήκη TFA-*d*, (β) μετά την προσθήκη 1,5 μL TFA-*d* (γ) μετά την προσθήκη 3 μL TFA-*d* (δ) μετά την προσθήκη 4,5 μL TFA-*d*. Γ: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,50 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Origanum Vulgare*. Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C , διαδοχική αλλαγή διαλύτη. (α) χωρίς κονιοποίηση του φυτού, μετά την προσθήκη 2,56 μL TFA-*d* (β) κονιοποίηση του φυτού, μετά την προσθήκη 4,5 μL TFA-*d*.

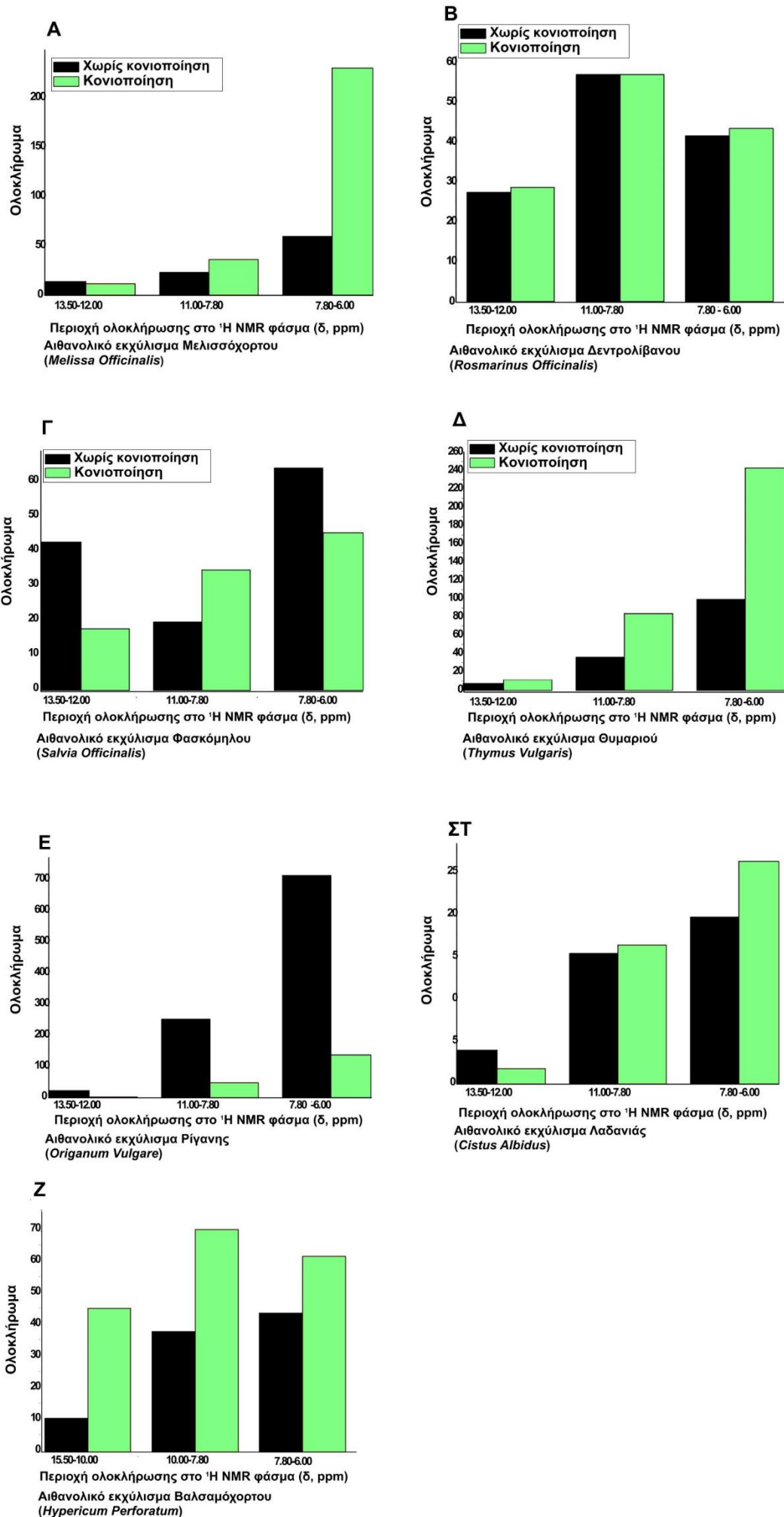


Σχήμα 2.10: A: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-13,50 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus Albidus*. Κατεργασία φυτού: Χωρίς κονιοποίηση. Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες στους 25°C, διαδοχική αλλαγή διαλύτη α) Πριν την προσθήκη TFA-*d* β) μετά την προσθήκη 1 μL TFA-*d*. B: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,50 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus Albidus*. Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C, αλλαγή διαλύτη (α) πριν την προσθήκη TFA-*d*, (β) μετά την προσθήκη 3 μL TFA-*d*. Γ: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus Albidus*. Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C, διαδοχική αλλαγή διαλύτη. (α) χωρίς κονιοποίηση του φυτού, μετά την προσθήκη 1 μL TFA-*d* (β) κονιοποίηση του φυτού, μετά την προσθήκη 3 μL TFA-*d*.



Σχήμα 2.11: A: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-15,50 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Hypericum Perforatum*. Κατεργασία φυτού: Χωρίς κονιοποίηση. Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες στους 25°C , διαδοχική αλλαγή διαλύτη (α) Πριν την προσθήκη TFA-d (β) μετά την προσθήκη 6 μL TFA-d. B: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-15,50 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Hypericum Perforatum*. Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C , αλλαγή διαλύτη (α) πριν την προσθήκη TFA-d, (β) μετά την προσθήκη 5 μL TFA-d. Γ: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-15,50 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Hypericum Perforatum*. Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C , διαδοχική αλλαγή διαλύτη. (α) χωρίς κονιοποίηση του φυτού, μετά την προσθήκη 6 μL TFA-d (β) κονιοποίηση του φυτού, μετά την προσθήκη 5 μL TFA-d.

Όπως φαίνεται στη σειρά των **Σχημάτων 2.5-2.11**, η κατεργασία του κάθε φυτού πριν από την εκχύλιση επηρεάζει τη σύσταση του παραγόμενου εκχυλίσματος. Μεταξύ και των επτά φυτών παρατηρούνται διαφορές ως προς το πώς επηρέασε ή όχι η κονιοποίηση του φυτού το παραγόμενο εκχύλισμα. Προκειμένου να γίνει σαφής διάκριση μεταξύ της συγκέντρωσης των φυτοχημικών που εκχυλίζονται κάθε φορά, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των αρωματικών και φαινολικών πρωτονίων για κάθε κατεργασία ή μη σε όλα τα φυτά (**Σχήμα 2.12**).



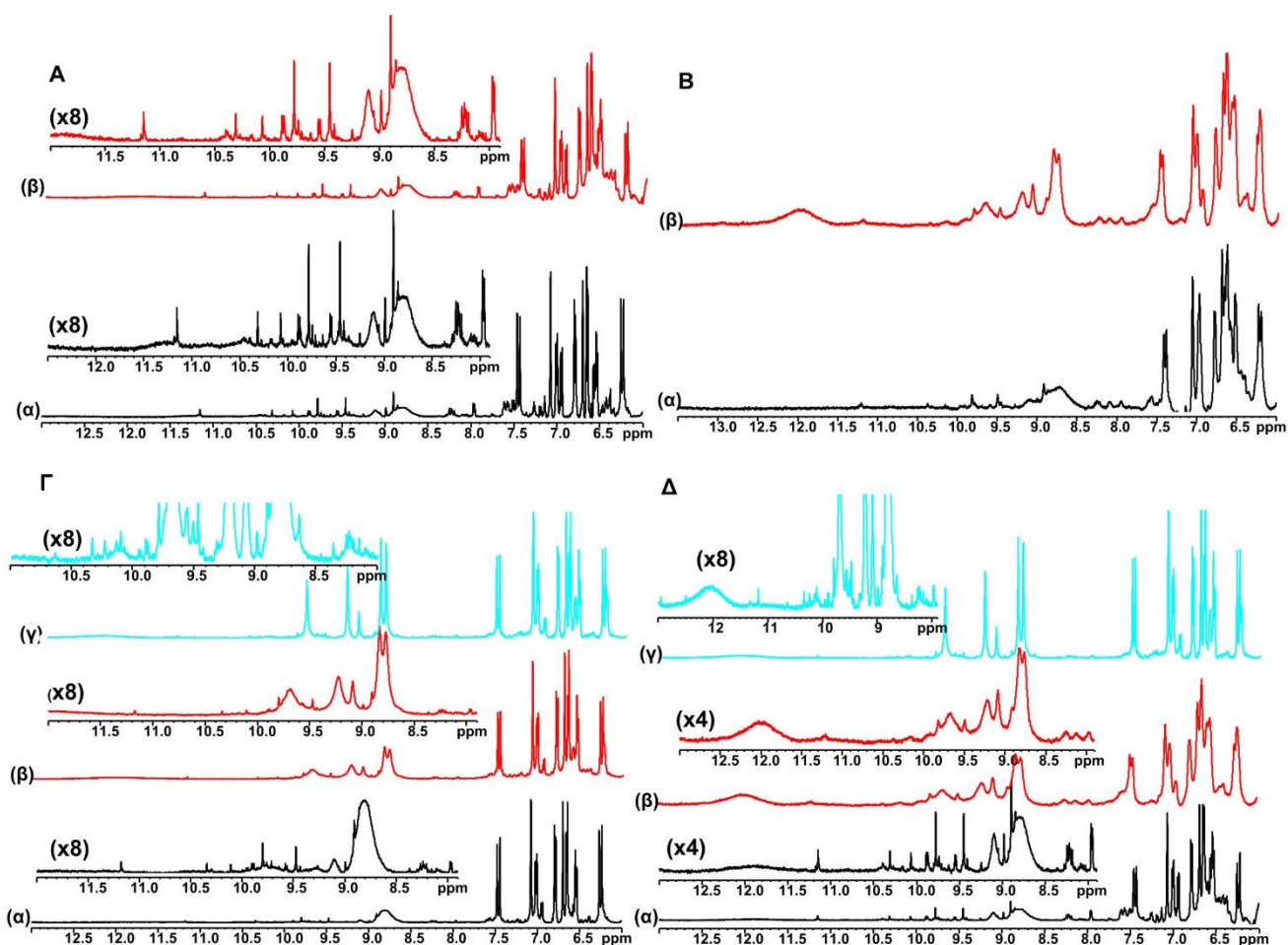
Σχήμα 2.12: Γραφικές απεικονίσεις υπό μορφή ραβδογραμμάτων των ολοκληρωμάτων των περιοχών των φασμάτων πρωτονίου για κατεργασία μη κονιοποίησης (ράβδοι με μαύρο χρώμα) και κονιοποίησης (ράβδοι με ανοιχτό πράσινο χρώμα) του φυτού πριν από την εκχύλιση για τα αιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών: **A:** *Melissa Officinalis* (Μελισσόχορτο), **B:** *Rosmarinus Officinalis* (Δεντρολίβανο), **Γ:** *Salvia*

Officinalis (Φασκόμηλο), **Δ:** *Thymus Vulgaris* (Θυμάρι), **Ε:** *Origanum Vulgare* (Ρίγανη), **ΣΤ:** *Cistus Albidus* (Λαδανιά) και **Ζ:** *Hypericum Perforatum* (Βαλσαμόχορτο).

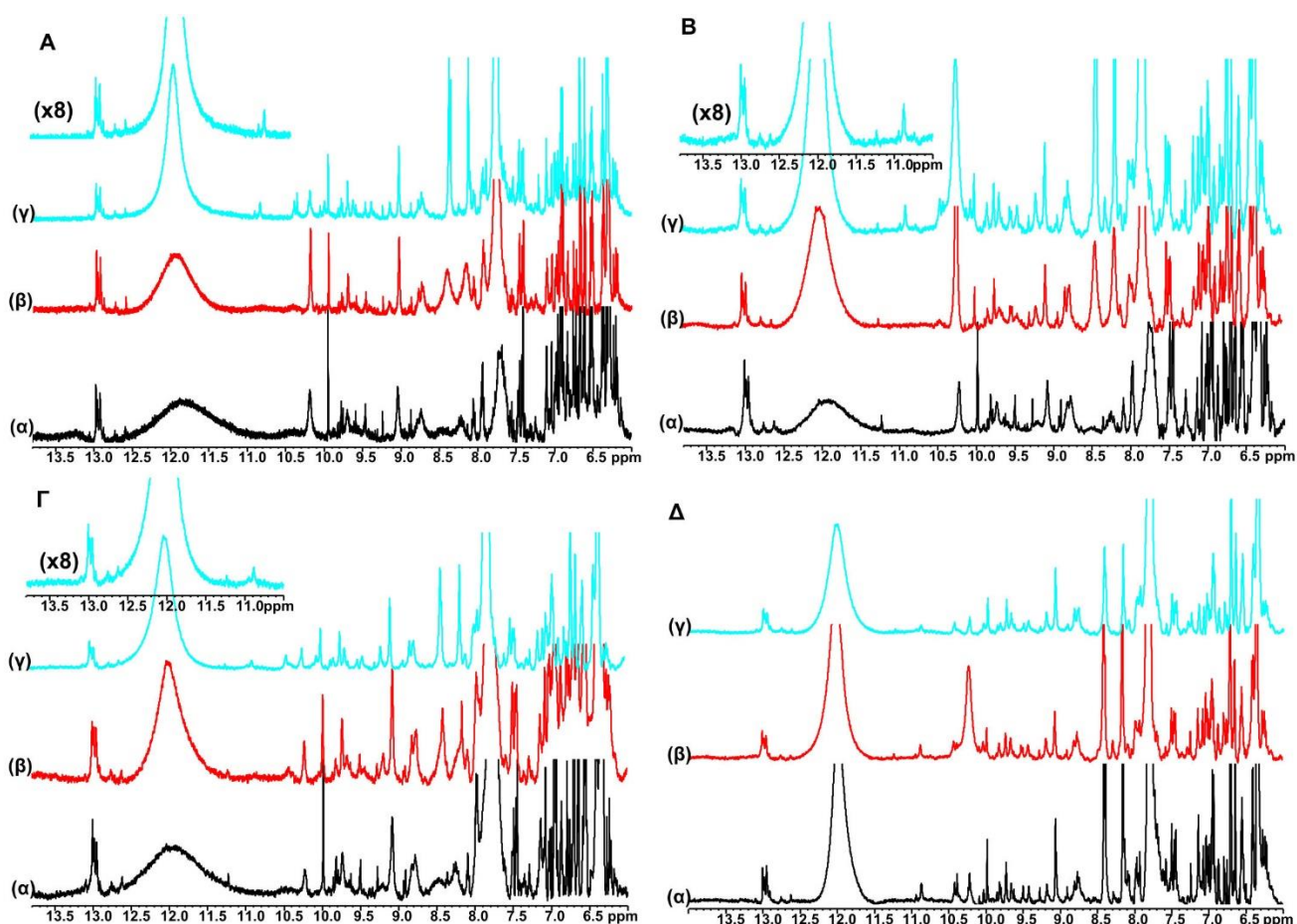
Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 2.12**, η κατεργασία του φυτού πριν από την εκχύλιση επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα και το περιεχόμενο του φυτοχημικού προφίλ των παραγόμενων εκχυλισμάτων. Στα περισσότερα φυτά, η κονιοποίηση οδήγησε στην παραγωγή μεγάλου ποσοστού φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων και αυτό μπορεί να εξηγηθεί ότι λόγω της ισχυρής δύναμης που εφαρμόστηκε έσπασε το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών, με αποτέλεσμα να απελευθερωθούν περισσότερα φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα. Από την άλλη, η κονιοποίηση δεν ήταν αρκετά αποτελεσματική στην περίπτωση της ρίγανης (*Origanum Vulgare*) και του φασκόμηλου (*Salvia Officinalis*). Σε αυτά τα δύο φυτά, η μη κονιοποίηση του δείγματος οδήγησε στην παραγωγή καλύτερου φυτοχημικού προφίλ. Αυτό δείχνει ότι κάθε φυτό συμπεριφέρεται διαφορετικά στις μηχανικές κατεργασίες τις οποίες υφίσταται.

2.3.1.3 Διερεύνηση του χρόνου και της θερμοκρασίας εκχύλισης

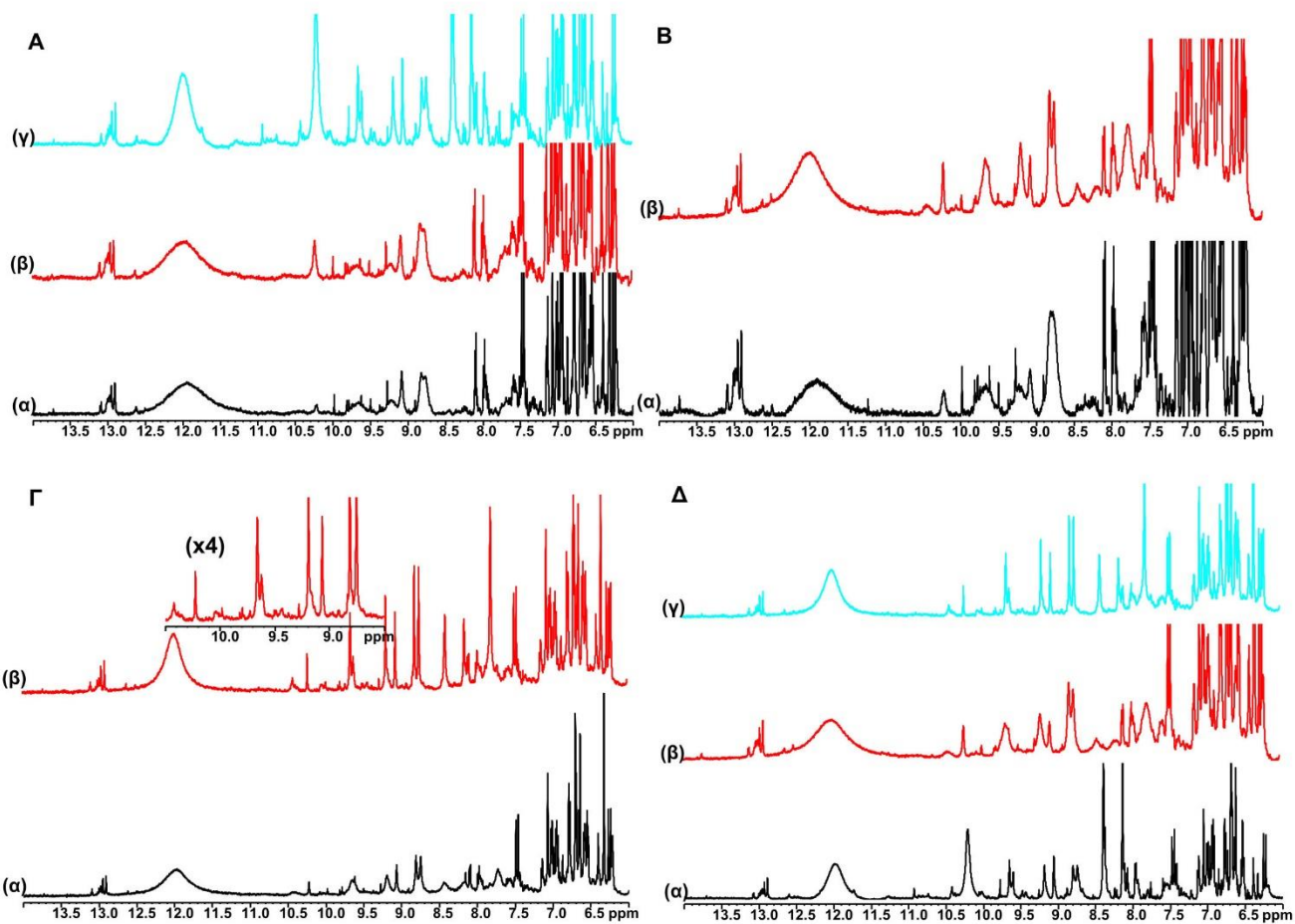
Η θερμοκρασία και ο χρόνος εκχύλισης επηρεάζουν σημαντικά την ποιότητα του φυτοχημικού προφίλ των παραγόμενων εκχυλισμάτων. Τα περισσότερα φυτά παρουσιάζουν ευαισθησία σε υψηλές θερμοκρασίες (άνω των 45°C) με αποτέλεσμα να καταστρέφεται η δομή αρκετών βιοδραστικών ενώσεων, γεγονός που οδηγεί σε “φτωχότερο” φυτοχημικό προφίλ. Κάθε φυτό παρουσιάζει διαφορετικά χαρακτηριστικά, επομένως συμπεριφέρεται διαφορετικά στις διάφορες συνθήκες εκχύλισης. Για κάθε φυτό πραγματοποιήθηκε εκχύλιση σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, με διαφορετικό χρόνο κάθε φορά, προκειμένου να βελτιστοποιηθεί τόσο η θερμοκρασία όσο και ο χρόνος της εκχύλισης. Για κάθε δείγμα καταγράφηκε φάσμα πρωτονίου 1D ¹H NMR, αφού έχει προηγηθεί τιτλοδότηση με διάλυμα TFA-*d* για την εμφάνιση των κορυφών των φαινολικών (-OH) ομάδων (**Σχήματα 2.13-2.18**). Ωστόσο, για το βαλσαμόχορτο, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας που έχει στις υψηλές θερμοκρασίες, δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω διερεύνηση της θερμοκρασίας εκχύλισης.



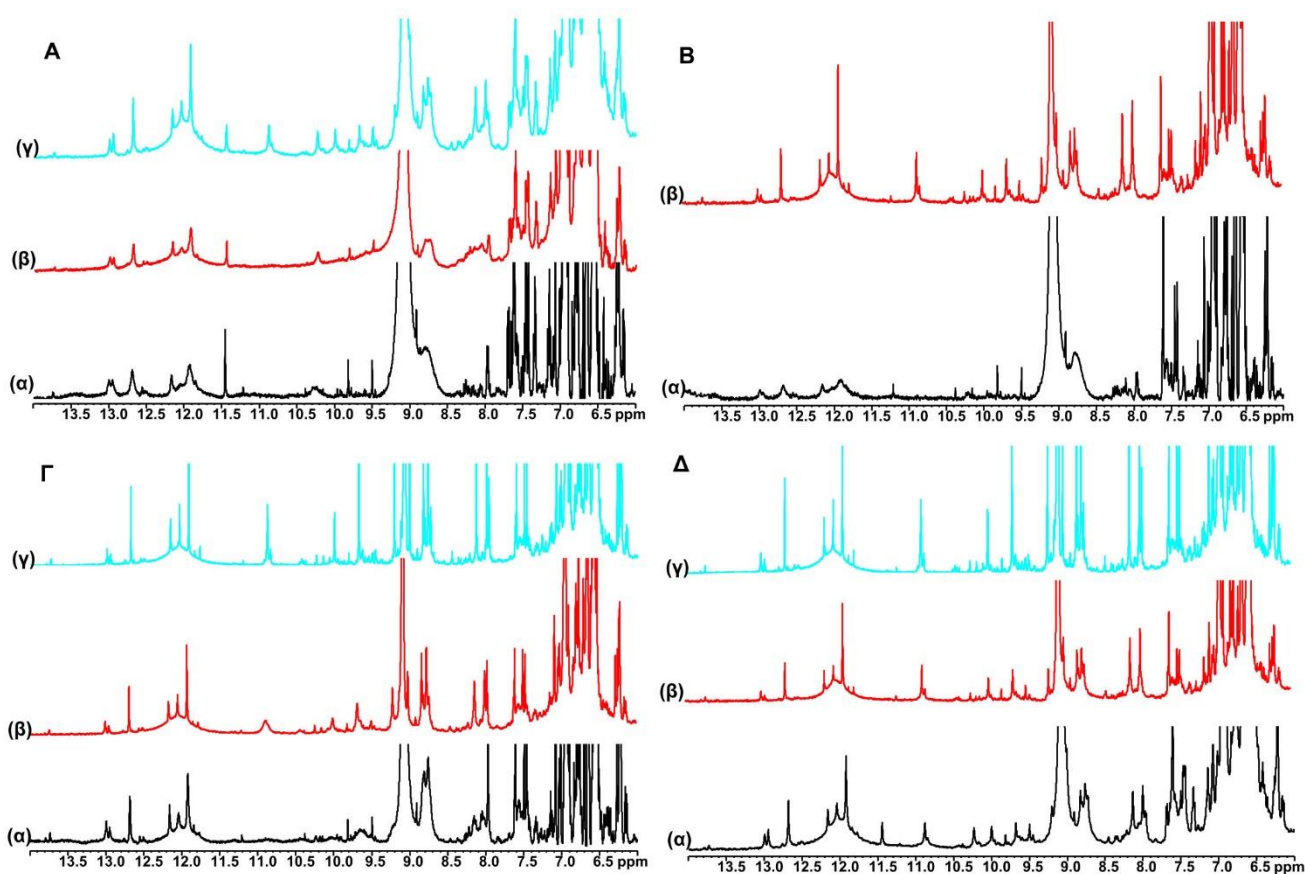
Σχήμα 2.13:A: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-13,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis*. Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C, αλλαγή διαλύτη (α) πριν την προσθήκη TFA-d, (β) μετά την προσθήκη 0,5 μL TFA-d, (γ) μετά την προσθήκη 1 μL TFA-d. **B:** Επιλεγμένη περιοχή (6,00-13,50 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis*. Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 6 ώρες, 45°C, (α) πριν την προσθήκη TFA-d, (β) μετά την προσθήκη 1 μL TFA-d. **Γ:** Επιλεγμένη περιοχή (6,00-13,50 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis*. Κατεργασία δείγματος: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 2 ώρες, 60°C (α) πριν την προσθήκη TFA-d, (β) μετά την προσθήκη 3 μL TFA-d. (γ) μετά την προσθήκη 5 μL TFA-d. **Δ:** Επιλεγμένη περιοχή (6,00-13,00 ppm)) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis*. (α) Εκχύλιση 3 ημέρες, 25°C μετά την προσθήκη 1 μL TFA-d (β) εκχύλιση 6 ώρες στους 45°C, μετά την προσθήκη 1 μL TFA-d, (γ) εκχύλιση 2 ώρες στους 60°C, μετά την προσθήκη 5 μL TFA-d.



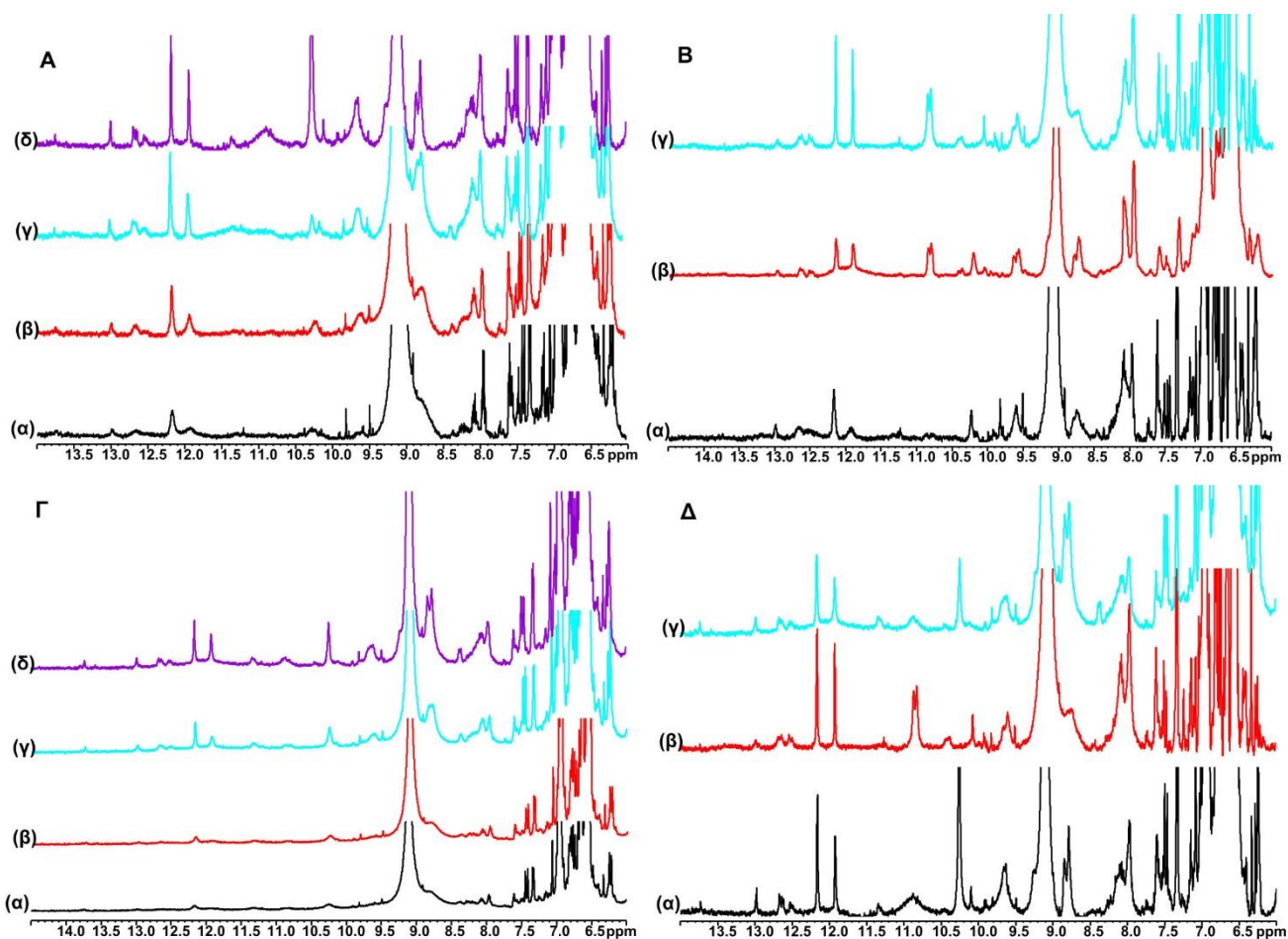
Σχήμα 2.14:A: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Rosmarinus Officinalis*. Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C, αλλαγή διαλύτη (α) πριν την προσθήκη TFA-d, (β) μετά την προσθήκη 2 μL TFA-d, (γ) μετά την προσθήκη 3,5 μL TFA-d. **B:** Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,50 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Rosmarinus Officinalis*. Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 6 ώρες, 45°C, (α) πριν την προσθήκη TFA-d, (β) μετά την προσθήκη 0,5 μL TFA-d (γ) μετά την προσθήκη 1 μL TFA-d. **Γ:** Επιλεγμένη περιοχή (14.0-6.0 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Rosmarinus Officinalis*. Κατεργασία δείγματος: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 2 ώρες, 60°C (α) πριν την προσθήκη TFA-d, (β) μετά την προσθήκη 3 μL TFA-d. (γ) μετά την προσθήκη 5 μL TFA-d. **Δ:** Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Rosmarinus Officinalis*. (α) Εκχύλιση 3 ημέρες, 25°C μετά την προσθήκη 3,5 μL TFA-d (β) εκχύλιση 6 ώρες στους 45°C, μετά την προσθήκη 1 μL TFA-d, (γ) εκχύλιση 2 ώρες στους 60°C, μετά την προσθήκη 5 μL TFA-d.



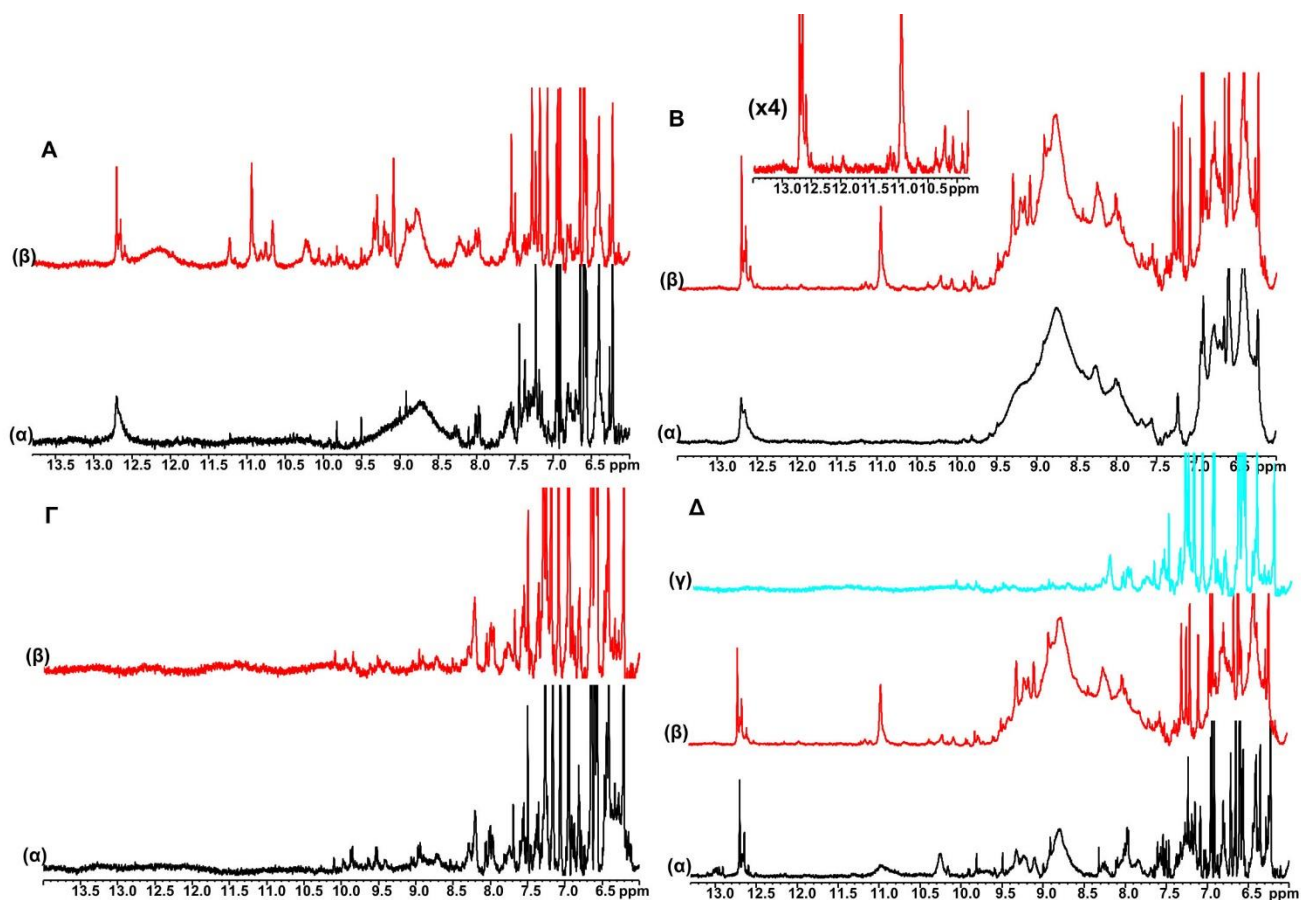
Σχήμα 2.15:A: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Salvia Officinalis* Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C, αλλαγή διαλύτη (α) πριν την προσθήκη TFA-d, (β) μετά την προσθήκη 1 μL TFA-d, (γ) μετά την προσθήκη 6,5 μL TFA-d. B: Επιλεγμένη περιοχή (14,5-6,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Salvia Officinalis* Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 6 ώρες, 45°C, (α) πριν την προσθήκη TFA-d, (β) μετά την προσθήκη 1 μL TFA-d. Γ: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Salvia Officinalis* Κατεργασία δείγματος: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 2 ώρες, 60°C (α) πριν την προσθήκη TFA-d, (β) μετά την προσθήκη 1 μL TFA-d. Δ: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Salvia Officinalis*. (α) Εκχύλιση 3 ημέρες, 25°C μετά την προσθήκη 6,5 μL TFA-d (β) εκχύλιση 6 ώρες στους 45°C, μετά την προσθήκη 1 μL TFA-d, (γ) εκχύλιση 2 ώρες στους 60°C, μετά την προσθήκη 1 μL TFA-d.



Σχήμα 2.16:A: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Thymus Vulgaris*. Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C, αλλαγή διαλύτη (α) πριν την προσθήκη TFA-d, (β) μετά την προσθήκη 1 μL TFA (γ) μετά την προσθήκη 3 μL TFA-d. **B:** Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Thymus Vulgaris*. Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 6 ώρες, 45°C, (α) πριν την προσθήκη TFA-d, (β) μετά την προσθήκη 0,5 μL TFA-d. **Γ:** Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Thymus Vulgaris*. Κατεργασία δείγματος: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 2 ώρες, 60°C (α) πριν την προσθήκη TFA-d, (β) μετά την προσθήκη 1 μL TFA-d (γ) μετά την προσθήκη 1,5 μL TFA-d. **Δ:** Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Thymus Vulgaris*. (α) Εκχύλιση 3 ημέρες, 25° C μετά την προσθήκη 1 μL TFA-d (β) εκχύλιση 6 ώρες στους 45° C, μετά την προσθήκη 0,5 μL TFA-d, (γ) εκχύλιση 2 ώρες στους 60° C, μετά την προσθήκη 1,5 μL TFA-d.

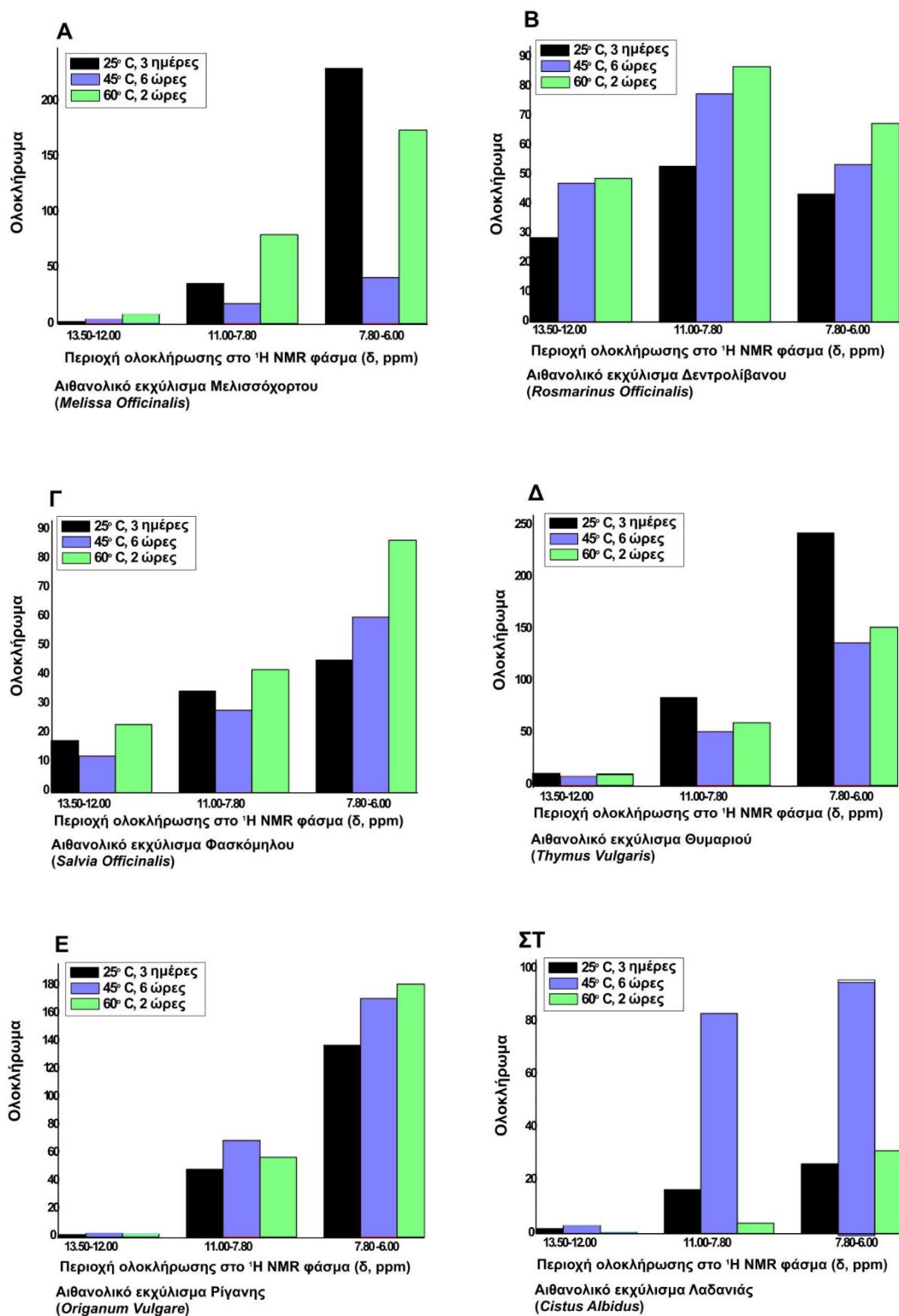


Σχήμα 2.17:A: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Origanum Vulgare*: Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C, αλλαγή διαλύτη (α) πριν την προσθήκη TFA-*d*, (β) μετά την προσθήκη 1,5 μL TFA-*d* (γ) μετά την προσθήκη 3 μL TFA-*d* (δ) μετά την προσθήκη 4,5 μL TFA-*d*. **B:** Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,50 ppm) ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Origanum Vulgare*. Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 6 ώρες, 45°C, αλλαγή διαλύτη, (α) πριν την προσθήκη TFA-*d*, (β) μετά την προσθήκη 1 μL TFA-*d* (γ) μετά την προσθήκη 1,5 μL TFA-*d*. **Γ:** Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,50 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Origanum Vulgare*. Κατεργασία δείγματος: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 2 ώρες, 60°C. (α) πριν την προσθήκη TFA-*d*, (β) μετά την προσθήκη 0,5 μL TFA-*d* (γ) μετά την προσθήκη 2,5 μL TFA-*d* (δ) μετά την προσθήκη 3,5 μL TFA-*d*. **Δ:** Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Origanum Vulgare* (α) Εκχύλιση 3 ημέρες, 25°C μετά την προσθήκη 4,5 μL TFA-*d* (β) εκχύλιση 6 ώρες στους 45°C, μετά την προσθήκη 1,5 μL TFA-*d*, (γ) εκχύλιση 2 ώρες στους 60°C, μετά την προσθήκη 3,5 μL TFA-*d*.



Σχήμα 2.18: A: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus Albidus* Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 3 ημέρες, 25°C, αλλαγή διαλύτη (α) πριν την προσθήκη TFA-d, (β) μετά την προσθήκη 3 μL TFA-d. B: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus Albidus* Κατεργασία φυτού: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 6 ώρες, 45°C, αλλαγή διαλύτη: (α) πριν την προσθήκη TFA-d, (β) μετά την προσθήκη 2,5 μL TFA-d. Γ: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus Albidus*. Κατεργασία δείγματος: Κονιοποίηση, Συνθήκες εκχύλισης: 2 ώρες, 60°C (α) πριν την προσθήκη TFA-d, (β) μετά την προσθήκη 1,5 μL TFA-d. Δ: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-14,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus Albidus* (α) Εκχύλιση 3 ημέρες, 25°C μετά την προσθήκη 3 μL TFA-d (β) εκχύλιση 6 ώρες στους 45°C, μετά την προσθήκη 2,5 μL TFA-d, (γ) εκχύλιση 2 ώρες στους 60°C, μετά την προσθήκη 1,5 μL TFA-d.

Όπως φαίνεται στη σειρά των **Σχημάτων 2.13-2.18**, οι διαφορετικές συνθήκες εκχύλισης επηρεάζουν τη σύσταση του παραγόμενου εκχυλίσματος. Σε κάποια φυτά φαίνεται ότι η θέρμανση είναι καταστροφική για την ποιότητα του φυτοχημικού τους προφίλ, ενώ σε κάποια άλλα, η θέρμανση βοηθάει στην παραγωγή εκχυλίσματος πλουσιότερου σε флаβονοειδείς ενώσεις και φαινολικά οξέα. Προκειμένου να γίνει σαφής διάκριση μεταξύ της συγκέντρωσης των φυτοχημικών που εκχυλίζονται κάθε φορά, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός για κάθε διαφορετική συνθήκη σε όλα τα φυτά (**Σχήμα 2.19**).



Σχήμα 2.19: Γραφικές απεικονίσεις υπό μορφή ραβδογραμμάτων των ολοκληρωμάτων των περιοχών των 1D ^1H NMR φασμάτων για διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους εκχύλισης: **3 ημέρες, 25°C**, αλλαγή διαλύτη (ράβδοι με μαύρο χρώμα), **6 ώρες 45° C**, αλλαγή διαλύτη (ράβδοι με γκρι χρώμα) και **2 ώρες, 60° C** (ράβδοι με ροζ χρώμα) για τα αιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών: **A:** *Melissa Officinalis* (Μελισσόχορτο), **B:** *Rosmarinus Officinalis* (Δεντρολίβανο), **Γ:** *Salvia Officinalis* (Φασκόμηλο), **Δ:** *Thymus Vulgaris* (Θυμαρί), **Ε:** *Origanum Vulgare* (Ρίγανη), **ΣΤ:** *Cistus Albidus* (Λαδανιά) και **Z:** *Hypericum Perforatum* (Βαλσαμόχορτο).

Αυτό που παρατηρείται και στο **Σχήμα 2.19**, είναι ότι η κάθε συνθήκη εκχύλισης επηρεάζει διαφορετικά το κάθε φυτό. Το μελισσόχορτο (*Melissa Officinalis*) και το θυμάρι (*Thymus Vulgaris*) φαίνονται πιο ευαίσθητα ως προς τη θερμοκρασία. Το εκχύλισμα που παράχθηκε στους 25°C είχε μεγαλύτερο ποσοστό φλαβονειδών ενώσεων και φαινολικών οξέων από τα αντίστοιχα εκχύλιστα που παράχθηκαν στους 45°C και στους 60°C. Από την άλλη, το

δεντρολίβανο (*Rosmarinus Officinalis*), το φασκόμηλο (*Salvia Officinalis*) και η ρίγανη (*Origanum Vulgare*) παρήγαγαν εκχύλισμα πλουσιότερο σε φλαβονοειδείς ενώσεις και φαινολικά οξέα στους 60°C. Ωστόσο, η λαδανιά (*Cistus Albidus*) είχε εκχύλισμα πλουσιότερο σε φλαβονοειδείς ενώσεις και φαινολικά οξέα μετά από εκχύλιση στους 45°C. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι το κάθε φυτό συμπεριφέρεται διαφορετικά στη θερμοκρασία και στο χρόνο εκχύλισης. Επομένως, είναι πολύ σημαντικό να γίνεται λεπτομερής διερεύνηση του τρόπου και των συνθηκών εκχύλισης για το κάθε φυτό, προκειμένου να ληφθεί όσο καλύτερη ποιότητα εκχυλίσματος είναι δυνατόν.

2.3.2 Αποτελέσματα *in vitro* μεθοδολογιών προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης

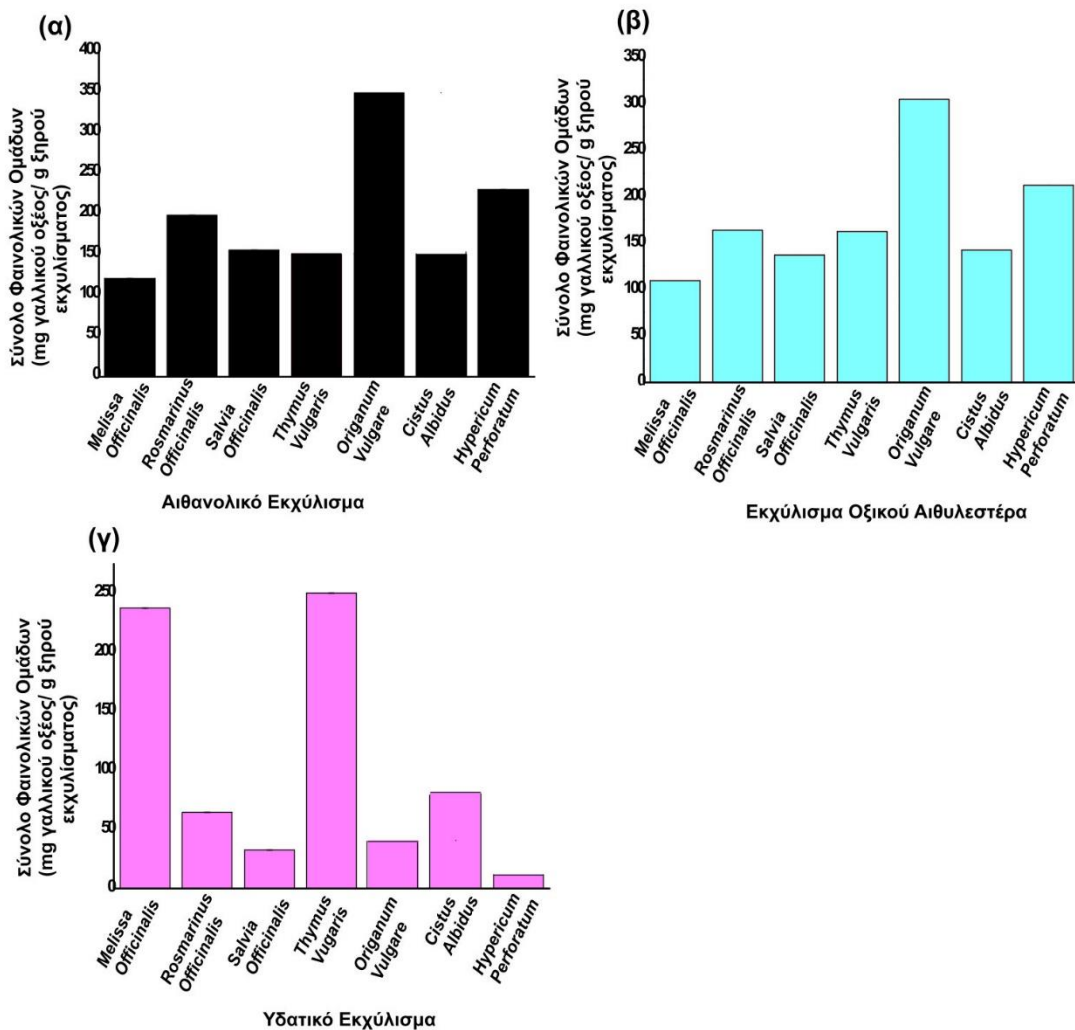
2.3.2.1 Αποτελέσματα από τον *in vitro* προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών ομάδων των παραγόμενων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

Για όλα τα παραγόμενα εκχυλίσματα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών ομάδων *in vitro*, με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, ενώ για κάθε εκχύλισμα εφαρμόστηκε η βέλτιστη συνθήκη εκχύλισης.

Το σύνολο των φαινολικών ομάδων των μελετούμενων εκχυλισμάτων που προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu εκφράστηκε σε mg γαλλικού οξέος /g ξηρού εκχυλίσματος (**Πίνακας 2.1 και Σχήμα 2.20**).

Πίνακας 2.1: Προσδιορισμός συνολικών φαινολικών ομάδων των παραγόμενων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

A/A	Φυτό	Συγκέντρωση φαινολικών ομάδων (mg γαλλικού οξέος/ g ξηρού εκχυλίσματος) για το αιθανολικό εκχύλισμα	Συγκέντρωση φαινολικών ομάδων (mg γαλλικού οξέος/ g ξηρού εκχυλίσματος) για το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα	Συγκέντρωση φαινολικών ομάδων (mg γαλλικού οξέος/ g ξηρού εκχυλίσματος) για το υδατικό εκχύλισμα
1.	<i>Melissa Officinalis</i> (Μελισσόχορτο)	120,06±0,01	109,54±0,05	237,42±0,04
2.	<i>Rosmarinus Officinalis</i> (Δεντρολίβανο)	197,62±0,01	163,87±0,04	64,39±0,03
3.	<i>Salvia Officinalis</i> (Φασκόμηλο)	154,91±0,02	137,21±0,02	32,82±0,01
4.	<i>Thymus Vulgaris</i> (Θυμάρι)	150,33±0,02	162,45±0,06	251,00±0,06
5.	<i>Origanum Vulgare</i> (Ρίγανη)	348,09±0,06	304,76±0,08	40,86±0,12
6.	<i>Cistus Albidus</i> (Λαδανιά)	150,00±0,01	142,21±0,07	80,70±0,07
7.	<i>Hypericum Perforatum</i> (Βαλσαμόχορτο)	229,60±0,01	212,39±0,05	11,83±0,24



Σχήμα 2.20: Γραφική απεικόνιση των τιμών υπό μορφή ραβδογραμμάτων των φαινολικών συστατικών που έχουν προσδιοριστεί με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu για: **(α)** τα αιθανολικά εκχυλίσματα, **(β)** τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα, **(γ)** τα υδατικά εκχυλίσματα.

Όπως προκύπτει από το **Σχήμα 2.20**, τα αιθανολικά εκχυλίσματα και τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση συνολικών φαινολικών ομάδων, λόγω της παρουσίας υψηλότερης συγκέντρωσης φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων. Ωστόσο, και ορισμένα υδατικά εκχυλίσματα, όπως είναι το μελισσόχορτο (*Melissa Officinalis*) και η ρίγανη (*Origanum Vulgare*) έχουν μεγάλη συγκέντρωση φαινολικών, συγκριτικά με τα υπόλοιπα.

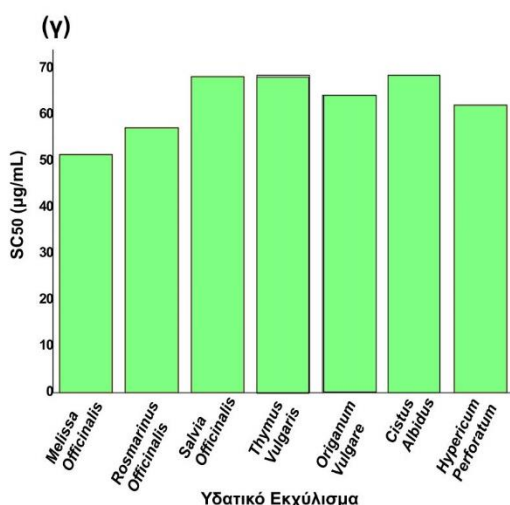
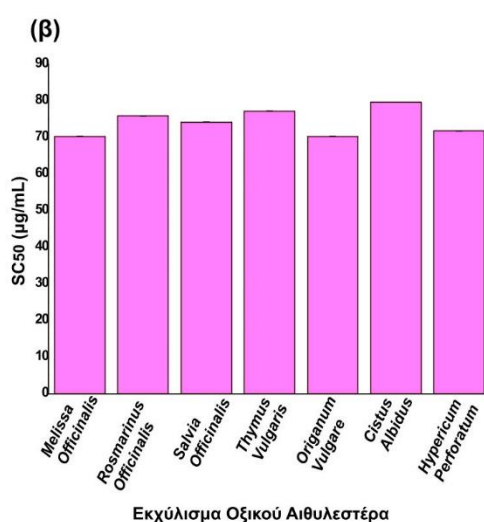
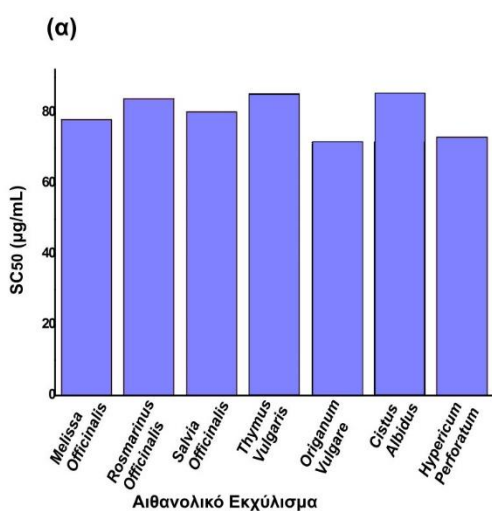
2.3.2.2 Αποτελέσματα από την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο μελέτης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH[•]

Η αντιοξειδωτική δράση των παραγόμενων εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε μέσω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH[•]. Οι φαινόλες που υπάρχουν στα εκχυλίσματα, λόγω του αρωματικού τους δακτυλίου συμβάλλουν στη σταθεροποίηση και τη μετατόπιση του μη δεσμικού ζεύγους ηλεκτρονίων, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταφορά ατόμων υδρογόνου και ηλεκτρονίων από τις υδροξυλικές τους ομάδες προς την ελεύθερη ρίζα DPPH[•].^{182,183} Τα παραγόμενα εκχυλίσματα μελετήθηκαν για την ικανότητά τους

να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH^{*}, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, προκειμένου να προσδιοριστούν οι τιμές SC₅₀ (Πίνακας 2.2 και Σχήμα 2.21).

Πίνακας 2.2: Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των παραγόμενων εκχυλισμάτων μέσω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH^{*}.

A/A	Φυτό	SC ₅₀ (μg/mL) για το αιθανολικό εκχύλισμα	SC ₅₀ (μg/mL) για το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα	SC ₅₀ (μg/mL) για το υδατικό εκχύλισμα
1.	<i>Melissa Officinalis</i> (Μελισσόχορτο)	78,14±0,03	70,32±0,05	51,43±0,06
2.	<i>Rosmarinus Officinalis</i> (Δεντρολίβανο)	84,03±0,05	75,84±0,07	57,28±0,02
3.	<i>Salvia Officinalis</i> (Φασκόμηλο)	80,25±0,01	74,21±0,03	68,30±0,08
4.	<i>Thymus Vulgaris</i> (Θυμάρι)	85,04±0,07	77,22±0,05	68,34±0,01
5.	<i>Origanum Vulgare</i> (Ρίγανη)	71,77±0,02	70,32±0,02	64,14±0,04
6.	<i>Cistus Albidus</i> (Λαδανιά)	85,47±0,04	79,55±0,01	68,58±0,03
7.	<i>Hypericum Perforatum</i> (Βαλσαμόχορτο)	73,16±0,01	71,76±0,02	62,17±0,05



Σχήμα 2.21: Γραφική απεικόνιση της εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας όπως έχει προσδιοριστεί με τη μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH^{*} για (α) τα αιθανολικά εκχυλίσματα, (β) τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα και (γ) τα υδατικά εκχυλίσματα.

Όπως δείχνουν τα αποτελέσματα της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH^{*}, τα αιθανολικά εκχυλίσματα παρουσιάζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από αυτά του οξικού αιθυλεστέρα και τα υδατικά. Ωστόσο, μεταξύ των αιθανολικών εκχυλισμάτων, η αντιοξειδωτική τους ικανότητα είναι παρόμοια. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να εξηγηθεί βάσει του φυτοχημικού προφίλ των εκχυλισμάτων. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα, λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητάς τους σε φλαβονοειδείς ενώσεις παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα να δεσμεύουν τη ρίζα DPPH^{*}. Πέντε από τα επτά φυτά, το μελισσόχορτο (*Melissa Officinalis*), το δεντρολίβανο (*Rosmarinus Officinalis*), το φασκόμηλο (*Salvia Officinalis*), το θυμάρι (*Thymus Vulgaris*) και η ρίγανη (*Origanum Vulgare*) ανήκουν στην ίδια οικογένεια, των Χειλανθών. Αυτό σημαίνει ότι έχουν παρόμοια σύσταση ως προς τα φυτοχημικά συστατικά τους, επομένως δικαιολογείται η ομοιότητα στην αντιοξειδωτική τους δράση. Από την άλλη, αν και το φυτοχημικό προφίλ της λαδανιάς (*Cistus Albidus*) και του βαλσαμόχορτου (*Hypericum Perforatum*) είναι αρκετά διαφορετικό από τα υπόλοιπα, τα βασικά συστατικά των φυτοχημικών τους χαρακτηρίζονται από τον έντονο αντιοξειδωτικό χαρακτήρα τους. Όπως έχει προκύψει από τα αποτελέσματα ταυτοποίησης με φασματοσκοπία 1D ¹H και 2D ¹H-¹³C HSQC-HMBC NMR (θα συζητηθεί παρακάτω), και τα οποία έχουν επιβεβαιωθεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, βασικά συστατικά του φυτοχημικού προφίλ της λαδανιάς (*Cistus Albidus*) είναι η κερκετίνη και το γαλλικό οξύ με τα αντίστοιχα παράγωγά τους. Όσον αφορά το γαλλικό οξύ, τα φυτά της οικογένειας των Κιστοειδών αποτελούνται σε μεγάλο ποσοστό από εστέρες γαλλικού οξέος, τις κατεχίνες, οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτεταμένα για τις υψηλές αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους.¹⁸²⁻¹⁸⁶ Από την άλλη το βαλσαμόχορτο (*Hypericum Perforatum*) περιέχει σε μεγάλο ποσοστό τη φλορογλυκινόλη υπερυκίνη και τα παράγωγά της (ψευδοϋπερυκίνη και υπεροσίδη),¹⁸⁷ ενώ από τα φλαβονοειδή περιέχει κυρίως κερκετίνη (και παράγωγα) και ρουτίνη. Δικαιολογείται επομένως το γεγονός ότι και αυτά τα δύο εκχυλίσματα παρουσιάζουν παρόμοια αντιοξειδωτική δράση με τα υπόλοιπα. Ομοίως, τα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα παρουσιάζουν αντίστοιχη συμπεριφορά με τα αιθανολικά ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, αν και συγκριτικά εμφανίζεται λίγο πιο μειωμένη, λόγω του ότι υπάρχει μεγάλη ομοιότητα στη σύσταση των φυτοχημικών τους προφίλ. Παρ' όλα αυτά, για τις επόμενες μελέτες επιλέχθηκαν κυρίως τα αιθανολικά εκχυλίσματα, λόγω της ισχυρότερης δράσης τους. Όσον αφορά τα υδατικά εκχυλίσματα, αυτά παρουσίασαν λίγο πιο χαμηλή αντιοξειδωτική δράση, η οποία οφείλεται στο χαμηλότερο ποσοστό φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων που περιέχουν. Ωστόσο, στο νερό μπορούν να διαλυθούν οι αντίστοιχοι γλυκοζίτες των φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων καθώς και τερπενοειδή μόρια, τα οποία επίσης έχουν μελετηθεί για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητές τους.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό του συνολικού περιεχομένου των φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu και του προσδιορισμού

της αντιοξειδωτικής ικανότητας, μέσω της ελεύθερης ρίζας DPPH* για όλα τα παραγόμενα εκχυλίσματα, παρατηρείται μια αντίθεση ως προς τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει από τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Τα υδατικά εκχυλίσματα των φυτών *Rosmarinus Officinalis*, *Salvia Officinalis*, *Origanum Vulgare*, *Cistus Albidus* και *Hypericum Perforatum* παρουσιάζουν τη χαμηλότερη συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών συστατικών και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH* έδειξαν ότι παρουσιάζουν παρόμοια αντιοξειδωτική ικανότητα με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα. Επίσης, η αντιοξειδωτική ικανότητα όλων των εκχυλισμάτων ήταν περίπου παρόμοια, παρόλο τη διαφορετική συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών τους. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν το γενικό προβληματισμό που επικρατεί γενικά ως προς την ακρίβεια και την αποτελεσματικότητα της μεθόδου Folin-Ciocalteu σχετικά με το ακριβές σύνολο των φαινολικών ομάδων που περιέχονται σ' ένα εκχύλισμα, καθώς αυτή η οικογένεια δευτερογενών μεταβολιτών συνδέεται άρρηκτα με τον αντιοξειδωτικό χαρακτήρα του εκχυλίσματος.

Προκειμένου να παρακαμφεί αυτή η αναποτελεσματικότητα της μεθόδου Folin-Ciocalteu, στοιχειοθετήθηκε μια άλλη μεθοδολογία, η οποία βασίζεται κυρίως στη Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) και οδηγεί στον ακριβή προσδιορισμό του συνόλου των φαινολικών ομάδων πολύπλοκων μειγμάτων, όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα, αλλά και στο διαχωρισμό του αριθμού των φαινολικών συστατικών που περιέχονται σ' ένα εκχύλισμα. Αυτή η μεθοδολογία, η οποία ονομάστηκε NMR-TotPhe, περιγράφεται στο επόμενο Κεφάλαιο και εκτός από τον προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών, αποτέλεσε χρήσιμο εργαλείο για την ταυτοποίηση τους στα παραγόμενα αιθανολικά εκχυλίσματα.

Γενικά Συμπεράσματα Κεφαλαίου

Σε αυτό το κεφάλαιο πραγματοποιήθηκε διερεύνηση των μεθόδων εκχύλισης των μελετούμενων φυτών με έμφαση στο διαλύτη εκχύλισης, στην κατεργασία του φυτού πριν την εκχύλιση, και στις συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου εκχύλισης. Ως διαλύτες εκχύλισης επιλέχθηκαν η αιθανόλη, ο οξικός αιθυλεστέρας και το νερό, λόγω του περιορισμού των οργανικών διαλυτών, καθώς τα εκχυλίσματα προορίζονται για εφαρμογή σε καλλυντικά προϊόντα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αιθανόλη είναι πιο αποδοτικός διαλύτης εκχύλισης, καθώς παράγονται εκχυλίσματα με πλουσιότερο φυτοχημικό προφίλ από τα αντίστοιχα υδατικά. Ως προς την κατεργασία του φυτού και τις συνθήκες εκχύλισης, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κάθε φυτό συμπεριφέρεται διαφορετικά σε κάθε συνθήκη. Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν μέσω φασματοσκοπίας NMR, όπου έγινε βελτιστοποίηση των φασμάτων κάθε δείγματος με προσθήκη διαλύματος τριφθοροξικού οξέος (TFA-d), προκειμένου να μειωθεί η διεύρυνση των κορυφών που βρίσκονται στην περιοχή 8,00-13,00 ppm και αντιστοιχούν στις φαινολικές (-OH) ομάδες. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του συνολικού περιεχομένου των φαινολικών (-OH) ομάδων και η αντιοξειδωτική ικανότητα των παραγόμενων εκχυλισμάτων *in vitro*, εφαρμόζοντας τη μεθοδολογία Folin-Ciocalteu και την ικανότητα δέσμευσης της σταθερής

ελεύθερης ρίζας DPPH[•] αντίστοιχα. Αποδείχτηκε ότι τα αιθανολικά εκχυλίσματα παρουσιάζουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, αν και υπάρχουν και υδατικά εκχυλίσματα με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Λόγω της ασάφειας που παρουσιάζουν τα αποτελέσματα από τις δύο *in vitro* μεθοδολογίες, Folin-Ciocalteu και δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH[•] έγινε προσπάθεια στοιχειοθέτησης μιας άλλης μεθοδολογίας, με την οποία θα είναι εφικτός ο ακριβής προσδιορισμός των φαινολικών (-OH) ομάδων, η οποία περιγράφεται στο **Κεφάλαιο 3**.

Κεφάλαιο 3: Ανάπτυξη νέας μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό του συνολικού φαινολικού περιεχομένου στα φυτά και σύγκριση με τη μεθοδολογία Folin-Ciocalteu (FC)- Ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός των φυτοχημικών συστατικών των εκχυλισμάτων με εφαρμογές φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance-NMR)

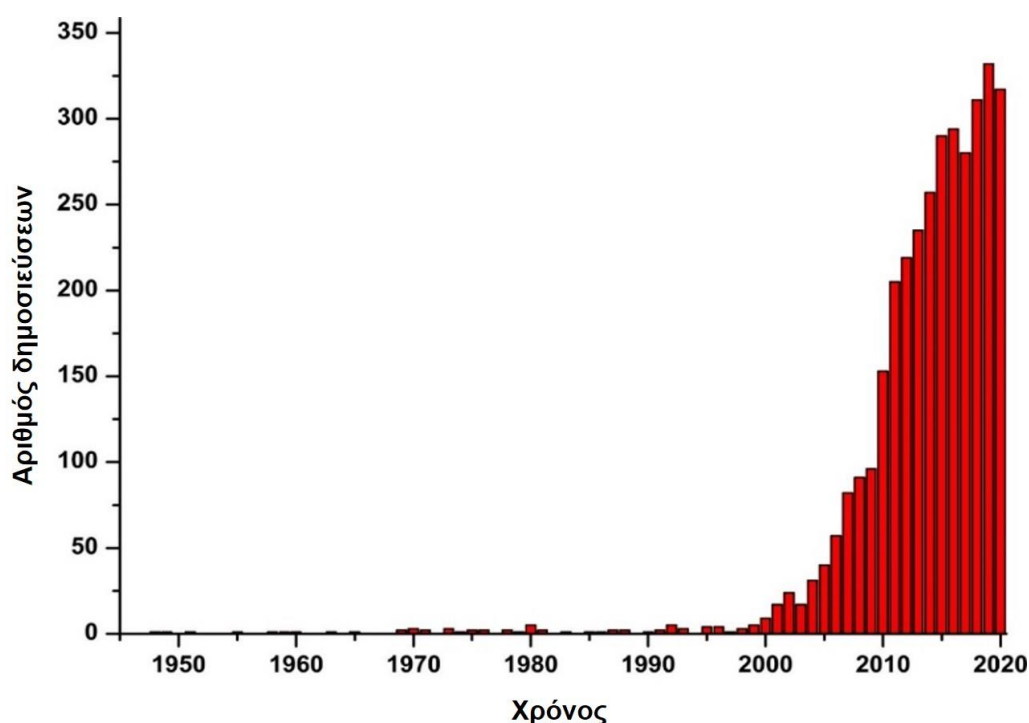
3.1 Εισαγωγή

3.1.1 Προσδιορισμός συνολικού φαινολικού περιεχομένου σε πολύπλοκα δείγματα

Το κυριότερο χαρακτηριστικό των φαινολικών ενώσεων είναι η παρουσία ενός ή περισσότερων (-OH) ομάδων στη δομή τους, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση των φυτών και των φυτικών εκχυλισμάτων τους καθώς η παρουσία των φαινολικών ομάδων σ' ένα μόριο έχει συσχετιστεί αρκετά με την ενισχυμένη αντιοξειδωτική δράση ή άλλες βιολογικές δράσεις του συγκεκριμένου μορίου. Επομένως, ο ακριβής προσδιορισμός της συνολικής συγκέντρωσης των φαινολικών ομάδων ενός μορίου ή μείγματος έχει πολύ μεγάλη σημασία, καθώς έχει βρεθεί ότι αποτελούν σημαντικό δείκτη της συνολικής αντιοξειδωτικής τους ικανότητας. Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα πολύπλοκων μειγμάτων προσδιορίζεται κυρίως με τη χρήση φασματοφωτομετρικών μεθόδων όπως είναι η ικανότητα απορρόφησης της ρίζας οξυγόνου (Oxygen Radical Absorbance Capacity-ORAC), η μέθοδος Folin-Ciocalteu (FC) και η ισοδύναμη αντιοξειδωτική ικανότητα Trolox (TEAC).¹⁷³

Από όλες αυτές τις μεθόδους, η μέθοδος Folin-Ciocalteu είναι αρκετά διαδεδομένη και χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του συνολικού περιεχομένου των φαινολικών ενώσεων σε πολύπλοκα φυσικά και βιολογικά μείγματα, κυρίως λόγω της εύκολης και γρήγορης χρήσης της μεθοδολογίας, καθώς και λόγω του χαμηλού κόστους της.¹⁹⁻²⁸ Η μέθοδος Folin-Ciocalteu αναπτύχθηκε αρχικά το 1927 για τον προσδιορισμό των αμινοξέων τυροσίνης και τρυπτοφάνης στις πρωτεΐνες,¹⁷² και αργότερα τροποποιήθηκε από τον Lowry,³⁰ για τη μέτρηση του συνολικού φαινολικού περιεχομένου στις πρωτεΐνες. Η εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιείται με χρήση του ειδικού αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu (FC).²⁴ Το αντιδραστήριο FC αποτελείται από ένα μείγμα φωσφομολυβδαινικού-φωσφοβολφραμικού συμπλόκου, καθώς και από έναν αριθμό αλάτων νατρίου.^{29,31} Η αντίδραση βασίζεται κυρίως στην αναγωγική ικανότητα που παρουσιάζουν τα φαινολικά συστατικά σε αλκαλικό περιβάλλον, όπου σχηματίζουν ένα σύμπλοκο μπλε χρώματος, το οποίο απορροφά στο ορατό, με λ_{\max} που κυμαίνεται σ' ένα εύρος τιμών 725-750 nm.¹⁸ Καθώς το χρωμοφόρο σύμπλοκο που παράγεται αποτελεί προϊόν αναγωγής, μπορεί να παραχθεί όχι μόνο από φαινολικά συστατικά, αλλά και από αρκετές άλλες αναγωγικές ομάδες, όπως είναι οι θειόλες, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα διάφορα νιτρο παράγωγα, τα αμινοξέα, οι βιταμίνες, τα νουκλεοσίδια και τα ανόργανα ιόντα.^{26,31} Συνεπώς, ο ακριβής προσδιορισμός της “συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας” των περίπλοκων δειγμάτων με τη μέθοδο FC είναι μη ακριβής. Παρόλο που υπάρχουν αυτά τα μειονεκτήματα, η μέθοδος FC χρησιμοποιείται συνεχώς και ευρέως και, σύμφωνα με τη μηχανή

αναζήτησης βιβλιογραφικών αναφορών, Scopus, αναφέρεται σε περισσότερες από 4622 δημοσιεύσεις από το 1948 (**Σχήμα 3.1**), σε αρκετά επιστημονικά πεδία: γεωργικές και βιολογικές επιστήμες (1543), χημεία (839), φαρμακολογία, τοξικολογία και φαρμακευτική (941), βιοχημεία, γενετική και μοριακή βιολογία (731) και ιατρική (568). Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκαν αυτές οι πληροφορίες από το Scopus ήταν για να δοθεί έμφαση στην ευρύτερη χρήση της μεθόδου Folin-Ciocalteu από πολλές ερευνητικές ομάδες διαφόρων ερευνητικών αντικειμένων για το γρήγορο προσδιορισμό της συγκέντρωσης του συνολικού περιεχομένου των φαινολικών συστατικών. Όπως φαίνεται, οι πολυάριθμες αναφορές που προσλαμβάνει το συγκεκριμένο πρωτόκολλο παγκοσμίως (π.χ. 481 αναφορές για την περίοδο 2020-2021), αξιοποιεί τη σημασία και την εφαρμογή του από ένα ευρύ κοινό, καθώς επίσης και την ανάγκη που έχει ένα τέτοιο πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό του συνολικού περιεχομένου των φαινολικών ενώσεων. Ωστόσο, λόγω των εγγενών μειονεκτημάτων που διαθέτει αυτή η τεχνική, τα οποία θα περιγραφούν παρακάτω, απαιτείται μια πιο ακριβής εναλλακτική λύση για την παρακολούθηση αυτών των πολύ σημαντικών πληροφοριών.



Σχήμα 3.1: Αριθμός αναφορών ανά έτος της μεθόδου Folin-Ciocalteu, για την περίοδο 1948-2020, σύμφωνα με τη μηχανή αναζήτησης βιβλιογραφικών αναφορών Scopus.

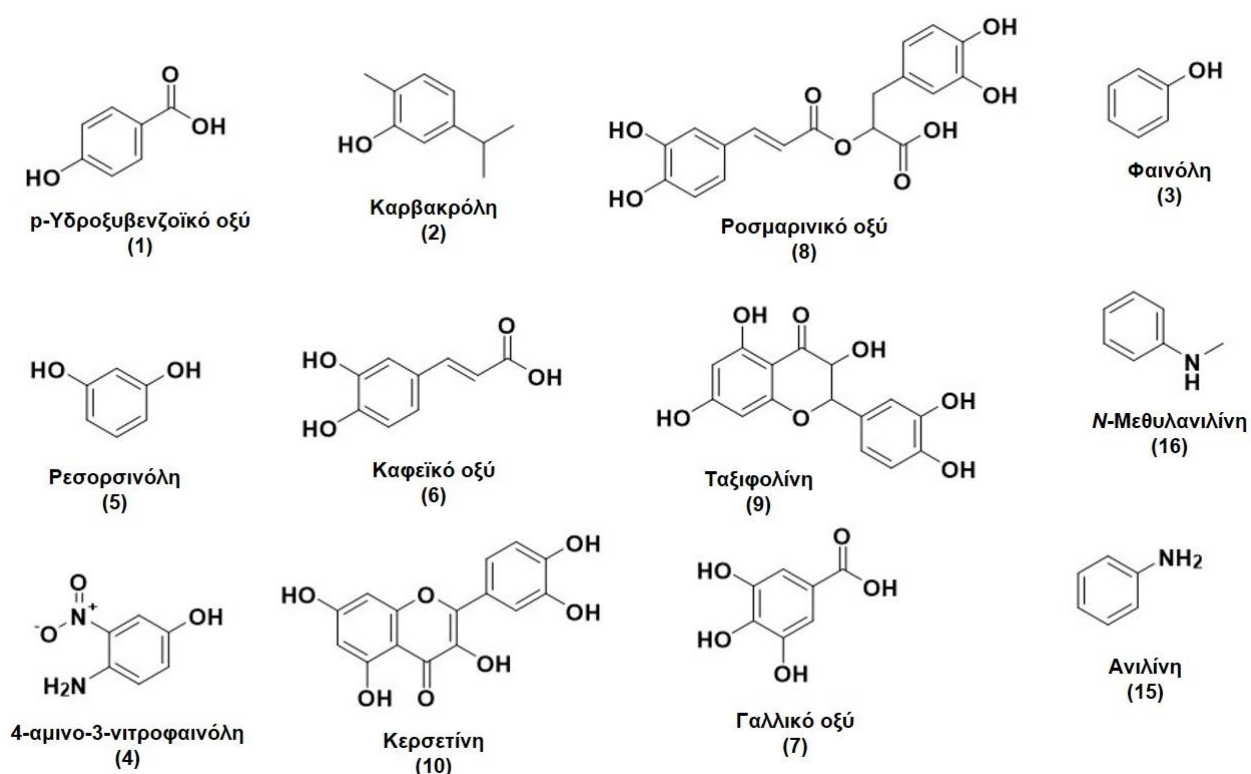
3.1.2 Ανάπτυξη μεθοδολογίας που βασίζεται στη Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) για τον προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών υδροξυλομάδων

Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) αποτελεί ισχυρό εργαλείο για τη διερεύνηση πολύπλοκων φυσικών φυτικών εκχυλισμάτων, λιπιδικών κλασμάτων και πολύπλοκων βιολογικών μειγμάτων. Η ανάπτυξη πολυάριθμων πειραματικών μεθόδων όπως είναι οι ομοπυρηνικές και ετεροπυρηνικές διδιάστατες (2D) μεθοδολογίες: ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C HSQC και ^1H - ^{13}C HMBC, όπως επίσης και μονοδιάστατα επιλεκτικά πειράματα, επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό πολυάριθμων μεταβολιτών σε πολύπλοκα φυτικά εκχυλίσματα.³²⁻³⁵ Ένα άλλο πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας NMR, είναι η ποσοτική φύση της

μεθόδου, ακόμη και για τα δευτερεύοντα συστατικά πολύπλοκων μειγμάτων.³⁶⁻³⁸ Τα δείγματα για τα πειράματα NMR δεν απαιτούν περαιτέρω επεξεργασία, καθώς μπορούν να μελετηθούν μόνο με μια διαλυτοποίηση σ' έναν κατάλληλο δευτεριωμένο διαλύτη.

Παρόλο που μπορεί να θεωρηθεί ότι το σύνολο των φαινολικών ομάδων μπορεί να προσδιοριστεί εύκολα με φασματοσκοπία NMR, αυτό είναι δύσκολο να επιτευχθεί, καθώς λόγω των φαινομένων χημικής ανταλλαγής τα φαινολικά υδροξύλια δεν είναι παρατηρήσιμα στην κλίμακα του NMR.

Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφεται η ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-TotPhe [Tot: Total=ολικό, Phe: Phenolics= φαινολικά], η οποία είναι μια μεθοδολογία μεγάλης ακριβείας, γρήγορη και μικρής κλίμακας για την εμφάνιση της μη παρατηρήσιμης φαινολικής περιοχής του NMR, για την ακριβή ποσοτικοποίηση των συνολικών φαινολικών ομάδων, η οποία βασίζεται στην καταγραφή 1D ¹H NMR φασμάτων, χρησιμοποιώντας φασματόμετρο ενδιάμεσης ισχύος, 500 MHz. Προκειμένου να στοιχειοθετηθεί η μεθοδολογία NMR-TotPhe, αρχικά εφαρμόστηκε: (α) σ' έναν αριθμό πρότυπων ουσιών που διαφέρουν ως προς τον αριθμό των φαινολικών (-OH) ομάδων αλλά και άλλων λειτουργικών ομάδων όπως -COOH και -NH και που επιλέχθηκαν για μελέτη στην παρούσα διδακτορική διατριβή (Σχήμα 3.2), καθώς επίσης και σε μείγματά τους, (β) σε δύο ακατέργαστα αιθανολικά εκχυλίσματα δύο διαφορετικών φυτών, των *Hypericum Perforatum* (βαλσαμόχορτο)³⁹⁻⁴¹ και *Silibum Marianum* (γαϊδουράγκαθο),^{17,42} των οποίων το φυτοχημικό προφίλ είναι πλούσιο σε φαινολικές (-OH) ομάδες, με σκοπό να επιβεβαιωθεί η λειτουργικότητα της μεθόδου. Στη συνέχεια, η μεθοδολογία NMR-TotPhe αξιοποιήθηκε για την ταυτοποίηση φαινολικών συστατικών στα μελετούμενα αιθανολικά εκχυλίσματα, μέσω της διάκρισης των φαινολικών (-OH) ομάδων.



Σχήμα 3.2: Δομές των πρότυπων ενώσεων οι οποίες επιλέχθηκαν για μελέτη στην παρούσα διδακτορική διατριβή με τις μεθοδολογίες Folin-Ciocalteu και NMR-TotPhe.

3.2. Υλικά και Μέθοδοι

3.2.A Υλικά

3.2.A.1 Φαρμακευτικά φυτά

Για όλα τα φαρμακευτικά φυτά που μελετήθηκαν σε αυτό το Κεφάλαιο, ισχύουν οι ίδιες πληροφορίες που περιγράφονται στην παράγραφο **2.2.A.1**.

3.2.A.2 Πρότυπες ουσίες

Όλες οι πρότυπες ουσίες και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν έχουν τις παρακάτω επισημάνσεις: φαινόλη (Merck, Cas No: 108-95-2), καρβακρόλη (98%, Sigma-Aldrich, Cas No.: 499-75-2), ρεσορσινόλη ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Cas No.: 108-46-3), ταξιφολίνη ($\geq 85\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich, Cas No.: 480-18-2), κερκετίνη ($\geq 95\%$ (HPLC), Sigma-Aldrich, Cas No.: 117-39-5), παρα-υδροξυβενζοϊκό οξύ ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Cas No.: 202-804-9), καφεϊκό οξύ (Carbosynth, Cas No: 331-39-5), γαλλικό οξύ (97%, Sigma-Aldrich, Cas No.: 149-91-7), ροσμαρινικό οξύ (Carbosynth, Cas No: 20283-92-5), 4-αμινο-3-νιτροφαινόλη (Fluorochem, Cas No: 610-81-1), ανιλίνη ($\geq 99\%$, Fluka, Cas No.: 62-53-3), *N*-μεθυλανιλίνη, αιθανόλη (99.8%, denaturated with IPA, MEK, and Bitrex pure, Panreac Applichem, Cas No: 64-17-5), μεθανόλη ($\geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich, Cas No: 67-56-1), αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu (Carbosynth, MDL No: MFCD00132625), ανθρακικό νάτριο (Riedel de Haen, Cas No: 497-19-8), δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO- d_6) (99.80%, Euroisotop, Cas No: 2206-27-1), δευτεριωμένο νερό D₂O (D₂O) (99.90%, Eurisotop, Cas No.: 7789-20-0), 2,2,3,3-τριμεθυλσιλυλπροπιονικό νάτριο- d_4 (TMSP- d_4) (98,00 atom % D, Sigma-Aldrich, Cas No: 24493-21-8)

3.2.B Μέθοδοι

3.2.B.1 Παραγωγή εκχυλισμάτων

Η παραγωγή των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με την ίδια διεργασία που περιγράφεται στην ενότητα **2.4.B.1.3. (α)**.

3.2.B.2 Παρασκευή των διαλυμάτων των πρότυπων ουσιών και των μειγμάτων τους και των φυτικών εκχυλισμάτων

Αρχικά παρασκευάστηκαν πυκνά διαλύματα, συγκέντρωσης 1 mM, των πρότυπων ουσιών σε διαλύτη μεθανόλη. Τα μείγματα των πρότυπων ουσιών παρασκευάστηκαν με προσθήκη ισομοριακής συγκέντρωσης (1 mM) του αντίστοιχου προτύπου σε διαλύτη μεθανόλη. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν πυκνά διαλύματα των αιθανολικών εκχυλισμάτων των φυτών

Hypericum Perforatum (Βαλσαμόχορτο) και *Silibum Marianum* (Γαΐδουράγκαθο) σε συγκέντρωση 1 mg/mL σε διαλύτη αιθανόλη.

3.2.B.3 *In vitro* προσδιορισμός της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών ομάδων, με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο Folin-Ciocalteu

Για τον προσδιορισμό των συνολικών φαινολικών συστατικών των εκχυλισμάτων και των προτύπων ουσιών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, πραγματοποιήθηκε η κλασσική διεργασία, μετά από βελτιστοποίηση της μεθόδου,⁴⁴ η οποία περιγράφηκε και στην παράγραφο **2.2.B.4**.

3.2.B.4 Προετοιμασία των δειγμάτων των πρότυπων ουσιών για την εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-TotPhe

Αρχικά παρασκευάζονται πυκνά διαλύματα των πρότυπων ουσιών και των αντίστοιχων μειγμάτων σε διαλύτη DMSO-*d*₆ και στη συνέχεια μεταφέρονται σε σωληνάκι NMR διαμέτρου 5 mm έχοντας συνολικό όγκο 500 μ L και συγκέντρωση 1 mM, συμπεριλαμβανομένου εσωτερικού προτύπου TMSP-*d*₄ γνωστής συγκέντρωσης. Όσον αφορά τα αιθανολικά εκχυλίσματα ζυγίζεται ποσότητα περίπου 20-25 mg και διαλύεται σε 500 μ L διαλύματος δευτεριωμένου DMSO-*d*₆, το οποίο περιέχει εσωτερικό πρότυπο TMSP-*d*₄ γνωστής συγκέντρωσης. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι το TMSP-*d*₄ δεν επηρέασε την ποιότητα του δείγματος, ούτε αντέδρασε με κάποια από τις μελετούμενες ουσίες, καθώς σε πειράματα που επαναλήφθηκαν απουσία και παρουσία του εσωτερικού προτύπου δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά στα φάσματα πρωτονίου. Προκειμένου να επιτευχθεί ομογενοποίηση, το δείγμα φυγοκεντρείται για δέκα λεπτά στους 25°C και στις 10.000 στροφές. Στη συνέχεια, κάθε δείγμα μεταφέρεται σ' ένα σωληνάκι NMR διαμέτρου 5 mm.

3.2.B.5 Εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-TotPhe

Μετά την καταγραφή του πρώτου φάσματος πρωτονίου κάθε δείγματος, ακολουθεί τιτλοδότηση με διάλυμα TFA-*d*, γνωστής συγκέντρωσης. Ακολουθεί καταγραφή 1D ¹H NMR φασμάτων μετά την κάθε προσθήκη διαλύματος TFA-*d*, προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη όξυνση των κορυφών των φαινολικών (-OH) ομάδων. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για το χρόνο εφαρμογής και για το χρόνο εφησυχασμού ήταν 12,5 s και 5xT₁ s αντίστοιχα. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ποσοτική φύση της μεθόδου, αρχικά προσδιορίστηκαν οι τιμές T₁, εφαρμόζοντας χρονικό παλμό αντίστροφης ανάκτησης. Συγκεκριμένα, οι τιμές T₁, υπολογίστηκαν εφαρμόζοντας τη μέθοδο μηδενικού σημείου και προσδιορίστηκαν μεταξύ ενός εύρους 0,2-0,28 s για τις κορυφές των φαινολικών πρωτονίων των προτύπων ενώσεων.

3.2.B.6 Τιτλοδοτήσεις των δειγμάτων με διαλύτη δευτεριωμένο νερό (D₂O)

Μόλις ολοκληρωθεί η τιτλοδότηση του κάθε εκχυλίσματος με διάλυμα TFA-*d*, ακολουθούν τιτλοδοτήσεις με διάλυμα δευτεριωμένου νερού (D₂O), προκειμένου να διακριθεί η παρουσία

των φαινολικών (-OH) ομάδων. Η τιτλοδότηση γίνεται προσθέτοντας κάθε φορά 5 μL , διαλύματος D_2O και γίνεται καταγραφή του φάσματος πρωτονίου. Η “επιβεβαίωση” της παρουσίας των φαινολικών (-OH) ομάδων γίνεται με την εμφάνιση των αντίστοιχων κορυφών του φάσματος με μειωμένη ένταση μετά από την τιτλοδότηση με D_2O . Η ανάλυση των φασμάτων NMR γίνεται με ολοκλήρωση των κορυφών, κανονικοποιώντας ως προς το εσωτερικό πρότυπο $\text{TMSP-}d_4$.

3.2.B.7 Αξιοποίηση της μεθοδολογίας NMR-TotPhe για τον ποιοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών σε μελετούμενα εκχυλίσματα

Αρχικά, ολοκληρώνεται η περιοχή των φαινολικών ομάδων (8,00-13,00 ppm), και αυτό εκφράζεται ως συγκέντρωση (mM) του γαλλικού οξέος (ο αριθμός των -OH ομάδων είναι 3). Στη συνέχεια τα αποτελέσματα μετατρέπονται σε μονάδες μάζας, εκφρασμένες σε mg. Το σύνολο των φαινολικών ομάδων εκφράζεται έπειτα σε ισοδύναμα γαλλικού οξέος (εκφρασμένα σε mg) ανά γραμμάριο (g) φυτικού εκχυλίσματος.

3.3.3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

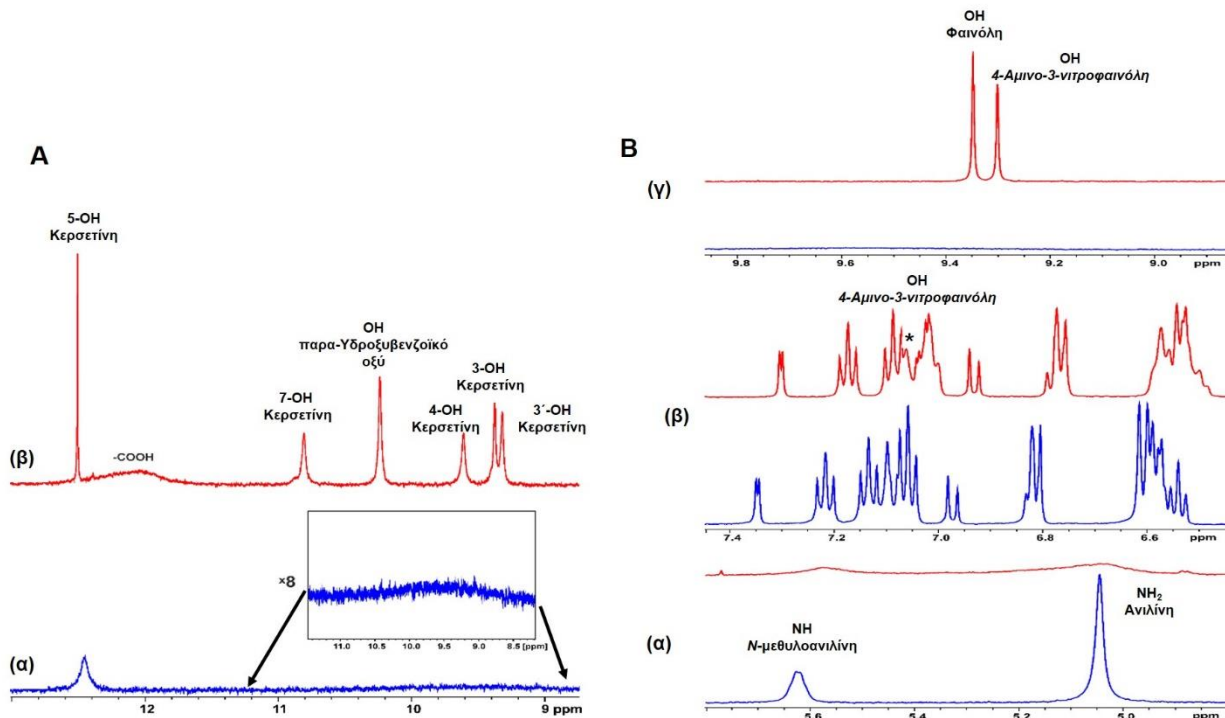
3.3.1 Σύγκριση των μεθοδολογιών NMR-TotPhe και Folin-Ciocalteu σε πρότυπες ενώσεις

Το πιο σημαντικό σημείο της μεθοδολογίας NMR-TotPhe είναι η ακριβής ολοκλήρωση των κορυφών που αντιστοιχούν στις φαινολικές (-OH) ομάδες. Οι φαινολικές (-OH) ομάδες σε θερμοκρασία δωματίου εμφανίζουν ευρείες κορυφές, εξαιτίας της διαμοριακής ανταλλαγής των πρωτονίων των φαινολικών (-OH) ομάδων με τα πρωτόνια των πρωτικών διαλυτών, ή με τα πρωτόνια του υπολειπόμενου H_2O που παραμένει στους απρωτικούς διαλύτες.

Η εμφάνιση μεγάλων ευρείων κορυφών είναι δυνατόν να οφείλεται στην ανταλλαγή των πρωτονίων μεταξύ των πολλών φαινολικών (-OH) ομάδων, άλλων -OH και -COOH ομάδων, κυρίως λόγω της διαμοριακής συσχέτισης των διαλυμένων μορίων, κυρίως όταν αυτά είναι διαλυμένα σε οργανικούς διαλύτες χαμηλής πολικότητας και μικρής διηλεκτρικής σταθεράς. Όσον αφορά τις φαινολικές (-OH) ομάδες, ένα μικρό ποσοστό της ανταλλαγής των ^1H μπορεί να επιτευχθεί ανάλογα με τη σύσταση του διαλύτη και το pH του διαλύματος.⁴³

Το **Σχήμα 3.3A** απεικονίζει την επιλεγμένη περιοχή των φαινολικών (-OH) ομάδων (8,90-13,00 ppm) του φάσματος ^1H NMR ενός μείγματος που αποτελείται από ισομοριακή συγκεντρώση (1 mM) κερκετίνης και παρα-υδροξυβενζοϊκού οξέος. Στο φάσμα εμφανίζεται μόνο η ευρεία κορυφή που αντιστοιχεί στο 5-OH πρωτόνιο της κερκετίνης, λόγω σχηματισμού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου, ο οποίος μειώνει το βαθμό των διαμοριακών ανταλλαγών των πρωτονίων. Οι κορυφές των υπόλοιπων -OH ομάδων δε μπορούν να διακριθούν από τη βασική γραμμή. Με την προσθήκη 6 μL διαλύματος TFA-*d* το εύρος των κορυφών που αντιστοιχούν στις υπόλοιπες φαινολικές -OH ομάδες μειώθηκε σημαντικά, και μπορούν με αυτόν τον τρόπο να ολοκληρωθούν χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό πρότυπο διάλυμα 2,2,3,3-

τριμεθυλοσιλυλπροπιονικού-3-νατρίου- d_4 (TMSP- d_4), γνωστής συγκέντρωσης. Επίσης, με αυτόν τον τρόπο, μπορεί να εφαρμοστούν με επιτυχία πειράματα 2D ^1H - ^{13}C HSQC και 2D ^1H - ^{13}C HMBC για την ταυτοποίηση των επιμέρους φαινολικών (-OH) ομάδων.^{43,44}



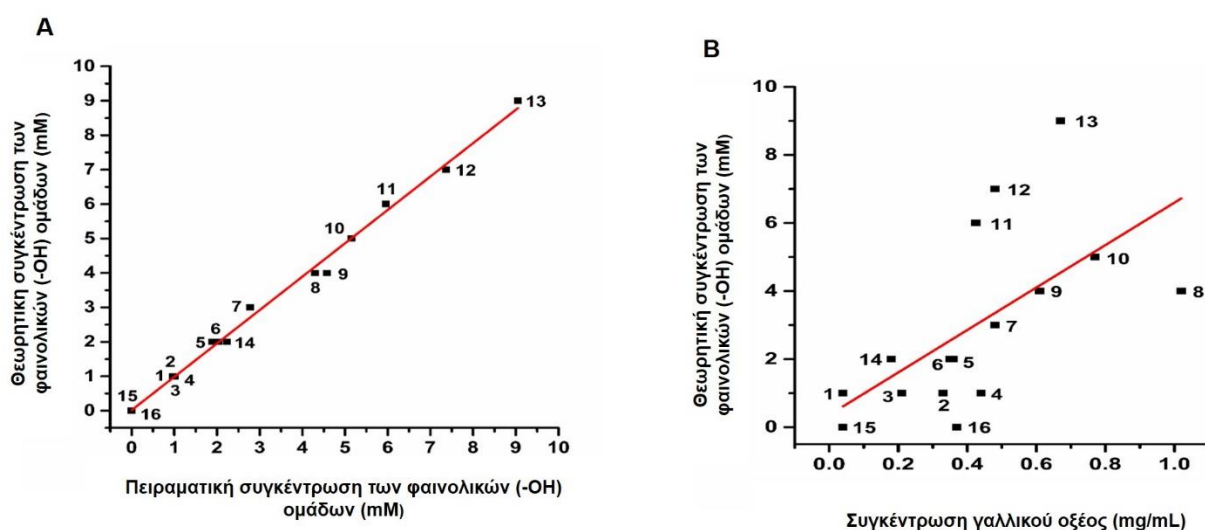
Σχήμα 3.3: A: Επιλεγμένη περιοχή των φαινολικών (-OH) ομάδων (8,90-13,00 ppm), 1D ^1H NMR φασμάτων από το μείγμα ισομοριακής συγκέντρωσης (1 mM) κερκετίνης και παρα-υδροξυβενζοϊκού οξέος: (α) πριν και (β) μετά την εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-TotPhe σε διαλύτη DMSO- d_6 , με την αντίστοιχη ταυτοποίηση των -OH ομάδων. Με την εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-TotPhe είναι ξεκάθαρο ότι η μη παρατηρήσιμη φαινολική περιοχή (α) γίνεται παρατηρήσιμη, αφού καταγράφονται διακριτά σήματα (κορυφές) (β) B: (α), (β) και (γ): Επιλεγμένες περιοχές 1D ^1H NMR φασμάτων μείγματος ισομοριακής ποσότητας (1 mM) φαινόλης, 4-αμινο-3-νιτροφαινόλης, ανιλίνης και N-μεθυλανιλίνης, πριν (μπλε) και μετά (κόκκινο) την εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-TotPhe σε διαλύτη DMSO- d_6 , με την ταυτοποίηση των -OH και -NH ομάδων.

Στο **Σχήμα 3.3B** απεικονίζονται τα 1D ^1H NMR φάσματα ενός μείγματος ισομοριακής ποσότητας φαινόλης, 4-αμινο-3-νιτροφαινόλης, ανιλίνης και N-μεθυλανιλίνης. Οι χημικές μετατοπίσεις των αμινομάδων βρίσκονται εκτός της περιοχής των φαινολικών (-OH) ομάδων, συμπεριλαμβανομένης και της χημικής μετατόπισης της NH_2 ομάδας της 4-αμινο-3-νιτροφαινόλης, η οποία είναι ισχυρά αποπροστατευμένη ($\delta = 7,08$ ppm), εξαιτίας της δημιουργίας ενός ισχυρού ενδομοριακού δεσμού. Χωρίς την προσθήκη του διαλύματος TFA- d , δε μπορεί να διακριθεί καμία κορυφή των φαινολικών ομάδων. Μετά την προσθήκη 6 μL TFA- d , εμφανίστηκαν δύο οξείες κορυφές που αντιστοιχούν στις -OH ομάδες της φαινόλης και της 4-αμινο-3-νιτροφαινόλης, οι οποίες μπορούν να ολοκληρωθούν με ακρίβεια ως προς το εσωτερικό πρότυπο TMSP- d_4 . Αντίθετα, οι κορυφές των -NH ομάδων είναι σημαντικά διευρυμένες και μπορούν να διακριθούν πολύ εύκολα από τις αντίστοιχες κορυφές που ανήκουν στις φαινολικές (-OH) ομάδες, στα αρωματικά πρωτόνια και στα αλειφατικά πρωτόνια.

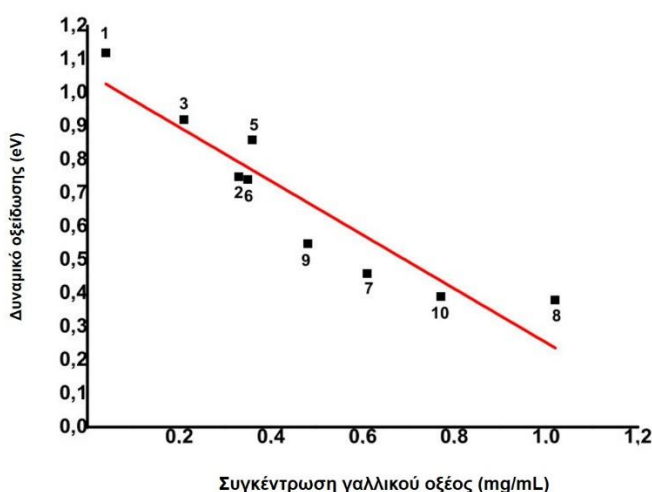
Στο **Σχήμα 3.4** απεικονίζεται η γραφική συσχέτιση της θεωρητικής συγκέντρωσης των φαινολικών (-OH) ομάδων (εκφρασμένης σε mM), ως προς τις πειραματικές συγκεντρώσεις, όπως έχουν προσδιοριστεί από τις μεθοδολογίες NMR-TotPhe και Folin-Ciocalteu (FC). Χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία NMR-TotPhe, παρατηρείται άριστη γραμμική συσχέτιση με

σταθερές: $R^2= 0,995$, μέσο τετραγωνικό σφάλμα= $0,035$, κλίση= $0,969$ και σφάλμα= $0,016$. Αντίθετα, με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu δεν υπήρξε γραμμική συσχέτιση ($R^2=0,329$, μέσο τετραγωνικό σφάλμα = $4,656$, κλίση= $6,237$ και σφάλμα = $0,359$).

Στο **Σχήμα 3.5** απεικονίζεται μια άριστη γραμμική συσχέτιση μεταξύ των χαμηλότερων τιμών δυναμικού οξειδωσης⁴⁶⁻⁵³ (εκφρασμένες σε eV) ως προς τις πειραματικές συγκεντρώσεις, όπως έχουν προσδιοριστεί με τη μέθοδο FC, διαφόρων προτύπων που περιέχουν φαινολικές (-OH) ομάδες. Είναι προφανές ότι για τα φυσικά προϊόντα που έχουν πολλαπλές φαινολικές ομάδες, στη μέθοδο FC αντιδρά πρώτα η -OH ομάδα με το χαμηλότερο δυναμικό οξειδωσης. Έτσι, η έκφραση των αποτελεσμάτων ως απλός αριθμός, όπως είναι η ισοδυναμία mg γαλλικού οξέος/mL διαλύματος, ουσιαστικά είναι αυθαίρετη.



Σχήμα 3.4: Γραφικές απεικονίσεις των θεωρητικών συγκεντρώσεων των φαινολικών (-OH) ομάδων (εκφρασμένες σε mM) ως προς τις πειραματικές συγκεντρώσεις όπως έχουν προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας **(A)** τη μεθοδολογία NMR-TotPhe και **(B)** τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (FC) των παρακάτω πρότυπων ουσιών και των μειγμάτων τους: **(1)** παρα-υδροξυβενζοϊκό οξύ (1 OH, 1 COOH), **(2)** καρβακρόλη (1 OH), **(3)** φαινόλη (1 OH), **(4)** 4-αμινο-3-νιτροφαινόλη (1 OH, 1 NH), **(5)** ρεσορσινόλη (2 OH), **(6)** καφεϊκό οξύ (2 OH, 1 COOH), **(7)** γαλλικό οξύ (3 OH, 1 COOH), **(8)** ροσμαρινικό οξύ (4 OH, 1 COOH), **(9)** ταξιφολίνη (4 OH), **(10)** κερκετίνη (5 OH), **(11)** ισομοριακό μείγμα κερκετίνης και παρα-υδροξυβενζοϊκού οξέος (6 OH, 1 COOH), **(12)** ισομοριακό μείγμα φαινόλης, ρεσορσινόλης και ταξιφολίνης (7 OH), **(13)** ισομοριακό μείγμα καφεϊκού οξέος, γαλλικού οξέος και ροσμαρινικού οξέος (9 OH, 3 COOH), **(14)** ισομοριακό μείγμα φαινόλης, 4-αμινο-3-νιτροφαινόλης, ανιλίνης και *N*-μεθυλανιλίνης (2 OH and 2 NH), **(15)** ανιλίνη (1 NH₂) και **(16)** *N*-μεθυλανιλίνη (1 NH).

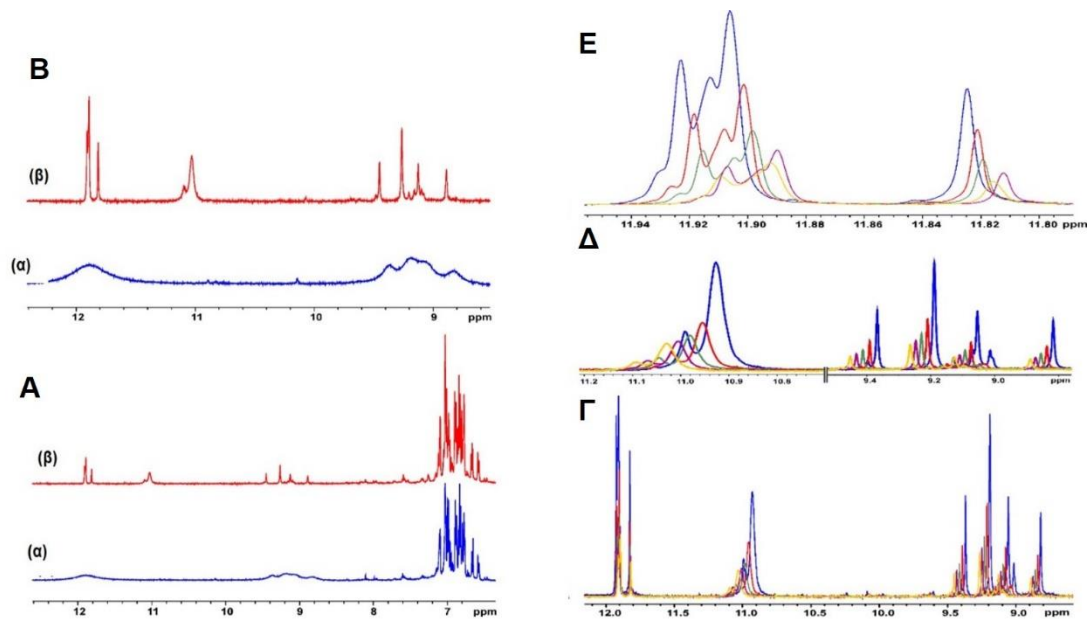


Σχήμα 3.5: Γραμμική συσχέτιση ($R^2=0,85$, κλίση=-1,07, σφάλμα=1,20) των χαμηλότερων τιμών των δυναμικών οξειδοαναγωγής (εκφρασμένες ως eV) ως προς τις πειραματικές συγκεντρώσεις που έχουν προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία Folin-Ciocalteu (FC) (εκφρασμένες ως mg γαλλικού οξέος/mL) των ακόλουθων πρότυπων ενώσεων: **(1)** παρα-υδροξυβενζοϊκό οξύ (1 OH, 1 COOH), **(2)** καρβακρόλη (1 OH), **(3)** φαινόλη (1 OH), **(5)** ρεσορσινόλη (2 OH), **(6)** καφεϊκό οξύ (2 OH, 1 COOH), **(7)** γαλλικό οξύ (3 OH, 1 COOH), **(8)** ροσμαρινικό οξύ (4 OH, 1 COOH), **(9)** ταξιφολίνη (4 OH), και **(10)** κερκετίνη (5 OH).

3.3.2 Σύγκριση των μεθοδολογιών NMR-TotPhe και Folin Ciocalteu σε φυτικά εκχυλίσματα

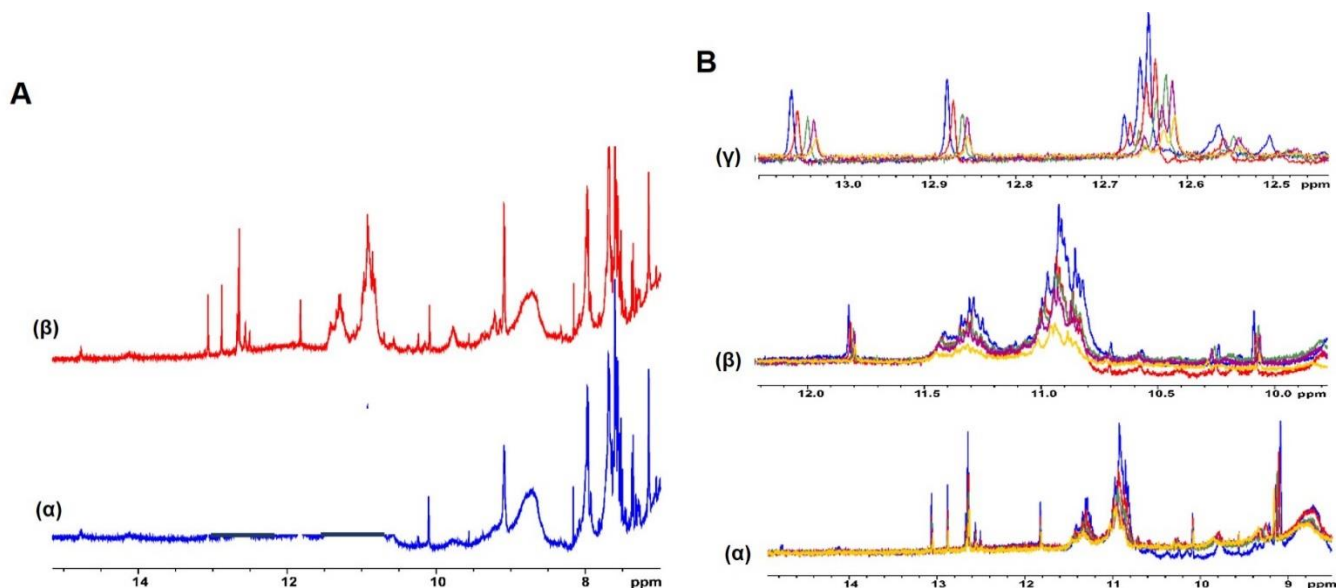
Η μεθοδολογία NMR-TotPhe αποτελεί μια άριστη μέθοδο για την ποσοτικοποίηση των συνολικών φαινολικών ομάδων σε εκχυλίσματα φυτικών ιστών, λόγω της εκλεκτικότητας που έχει ως προς την ταυτοποίηση των -OH ομάδων, όπως επίσης και λόγω της άριστης γραμμικότητας που παρουσιάζει. Το **Σχήμα 3.6A** απεικονίζει τυπικά 1D ^1H NMR φάσματα του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Silibum Marianum* (Γαϊδουράγκαθο), το οποίο έχει ληφθεί με την εφαρμογή της μεθοδολογίας, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Η περιοχή του φάσματος που αντιστοιχεί στις φαινολικές -OH ομάδες και στα αρωματικά C-H πρωτόνια (6,5-12,5 ppm), δείχνει υπερβολικά ευρείες κορυφές των -OH ομάδων. Η εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-TotPhe μέσω της προσθήκης 14 μL διαλύματος TFA-*d* σε διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$ (σε συγκέντρωση 100 mM) έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κορυφών που στην πραγματικότητα είναι μη παρατηρήσιμες, λόγω της σημαντικής μείωσης που γίνεται στα εύρη των κορυφών που αντιστοιχούν στις φαινολικές (-OH) ομάδες, και μπορούν να ολοκληρωθούν με υψηλή ακρίβεια ως προς το ολοκλήρωμα του εσωτερικού προτύπου $\text{TMS-}d_4$.⁴⁵ Ωστόσο, σε περίπλοκα μείγματα, όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα, οι κορυφές που αντιστοιχούν στα αρωματικά και στα αλδεϋδικά πρωτόνια, C-H, μπορεί να βρίσκονται και αυτές στην περιοχή 8,00-10,00 ppm με αποτέλεσμα τα ολοκληρώματα αυτών των κορυφών να οδηγούν σε λανθασμένα αποτελέσματα. Η διάκριση αυτών των κορυφών μπορεί να επιτευχθεί με διαδοχική τιτλοδότηση με διαλύτη δευτεριωμένο νερό (D_2O). Θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι η ολοκλήρωση των κορυφών πραγματοποιείται στο φάσμα πρωτονίου που έχει ληφθεί πριν πραγματοποιηθεί η τιτλοδότηση με D_2O . Η προσθήκη του D_2O οδηγεί σε μείωση της έντασης των κορυφών που αντιστοιχούν στα φαινορικά (-OH) πρωτόνια, καθώς επίσης και σε μια μικρή μεταβολή στη χημική μετατόπιση λόγω της ανταλλαγής αυτών των πρωτονίων με τα μόρια του νερού. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει τις κορυφές που αντιστοιχούν σε φαινορικά (-OH) πρωτόνια. Το **Σχήμα 3.6(Γ-Δ-Ε)** απεικονίζει την άριστη αποτελεσματικότητα και ανάλυση αυτής της μεθοδολογίας στην ταυτοποίηση των κορυφών που αντιστοιχούν στα ανταλλάξιμα -OH πρωτόνια, οι οποίες εμφανίζονται με μειωμένη ένταση, λόγω της προσθήκης D_2O , και, έτσι, το περιεχόμενο των συνολικών φαινολικών ομάδων του αιθανολικού εκχυλίσματος του γαϊδουράγκαθου (*Silibum Marianum*) υπολογίστηκε ίσο με 314,24 mg/g ξηρού εκχυλίσματος. Αντίθετα, το σύνολο των φαινολικών ομάδων (Total Phenolic Content- TPC) που υπολογίστηκε με τη μέθοδο FC, υπολογίστηκε ίσο με 70 mg/g ξηρού εκχυλίσματος. Το αυξημένο ποσό των φαινολικών (-OH) ομάδων που προσδιορίστηκε με τη μεθοδολογία NMR-TotPhe μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός

ότι δεν αντιδρούν όλες οι -OH ομάδες του αιθανολικού εκχυλίσματος του γαϊδουράγκαθου με το αντιδραστήριο FC.



Σχήμα 3.6: A: Επιλεγμένη περιοχή (6,5-12,5 ppm) των φαινολικών (-OH) και των αρωματικών πρωτονίων C-H των 1D ¹H φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Silibum Marianum* (Γαϊδουράγκαθο) (α) πριν και (β) μετά την εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-TotPhe. B: Επιλεγμένη περιοχή των φαινολικών (-OH) ομάδων (8,5-12,5 ppm) του Σχήματος 2.6A. Γ-Δ-Ε: Επιλεγμένες περιοχές (Γ:8,5-12,20 ppm, Δ:8,40-11,20 ppm, Ε:11,78-11,96 ppm) των 1D ¹H φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Silibum Marianum* (Γαϊδουράγκαθο): πριν την τιτλοδότηση με δευτεριωμένο νερό (D₂O) (μπλε φάσμα), μετά την προσθήκη 5 μL δευτεριωμένου νερού (D₂O) (κόκκινο φάσμα), 10 μL δευτεριωμένου νερού (D₂O) (πράσινο φάσμα), 15 μL δευτεριωμένου νερού (D₂O) (μωβ φάσμα) και 20 μL δευτεριωμένου νερού (D₂O) (κίτρινο φάσμα). Η μεταβολή στη χημική μετατόπιση των κορυφών που αντιστοιχούν στα φαινολικά (-OH) πρωτόνια δείχνει ότι υπάρχει ανταλλαγή με τα πρωτόνια του νερού.

Διαφορετικοί φυτικοί ιστοί συμπεριφέρονται διαφορετικά όταν τιτλοδοτηθούν με διάλυμα TFA-*d*. Το **Σχήμα 3.7 A** απεικονίζει το 1D ¹H NMR φάσμα του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Hypericum Perforatum* (Βαλσαμόχορτο). Με εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-TotPhe μέσω της προσθήκης 5 μL TFA-*d* πραγματοποιείται βελτιστοποίηση και μείωση του εύρους των κορυφών που αντιστοιχούν στις φαινολικές (-OH) ομάδες, πιθανόν λόγω του γεγονότος ότι το κύριο συστατικό του εκχυλίσματος, η υπερικίνη, έχει πολύ όξινο χαρακτήρα, με τιμή pK_a=1. Παρ' όλα αυτά, η διαδοχική τιτλοδότηση με διαλύτη D₂O ήταν πολύ επιτυχής ως προς τη διάκριση των φαινολικών (-OH) ομάδων (**Σχήμα 3.7 B**), και η ποσοτικοποίηση του συνολικού περιεχομένου των φαινολικών ομάδων βρέθηκε ίση με 144,73 mg/g ξηρού εκχυλίσματος. Αντίθετα, ο προσδιορισμός των συνολικών φαινολικών (-OH) ομάδων με τη μέθοδο FC υπολογίστηκε ίσο με 229,60 mg/g ξηρού εκχυλίσματος. Η αυξημένη τιμή της συγκέντρωσης του συνόλου των φαινολικών ομάδων (TPC) που υπολογίστηκε με την FC μέθοδο, μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία αρκετών αναγωγικών παραγόντων μέσα στο εκχύλισμα, τα οποία μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το αντιδραστήριο FC, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα.



Σχήμα 3.7: A: Επιλεγμένη περιοχή (7,5-14,5 ppm) 1D ^1H φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Hypericum Perforatum* (Βαλσαμόχορτο): (α) πριν και (β) μετά την εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-TotPhe. B: Επιλεγμένες περιοχές ((α) 8,8-14,5 ppm, (β) 9,8-12,2 ppm, (γ) 12,2-13,5 ppm) των 1D ^1H φασμάτων του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Hypericum Perforatum* (Βαλσαμόχορτο) πριν την τιτλοδότηση με δευτεριωμένο νερό (D_2O) (μπλε φάσμα), μετά την προσθήκη 5 μL δευτεριωμένου νερού (D_2O) (κόκκινο φάσμα), 10 μL δευτεριωμένου νερού (D_2O) (μωβ φάσμα), και 20 μL δευτεριωμένου νερού (D_2O) κίτρινο φάσμα. Η μείωση στην ένταση των κορυφών όσο προστίθεται D_2O , δείχνει ότι υπάρχει ανταλλαγή των φαινολικών (-OH) πρωτονίων με τα πρωτόνια του νερού.

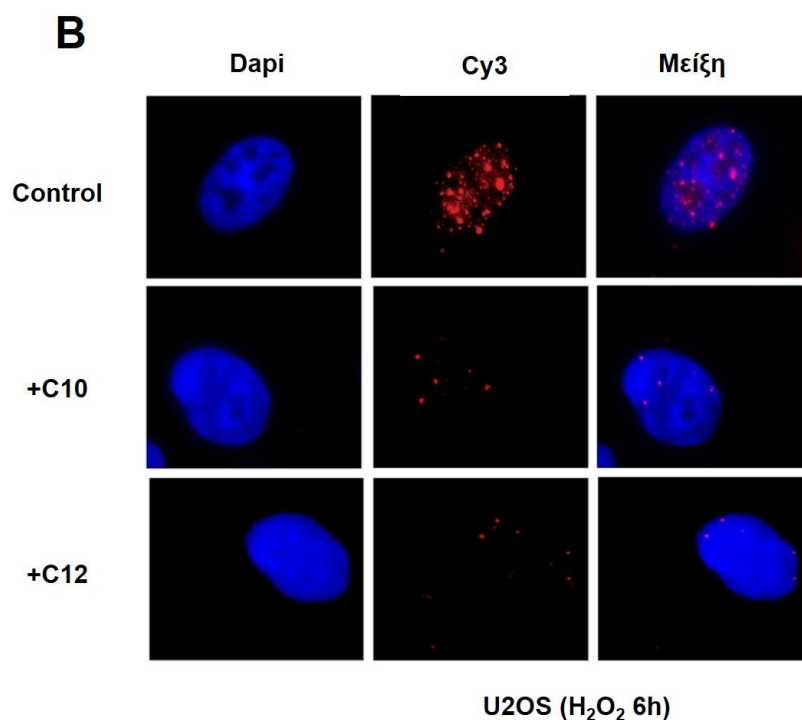
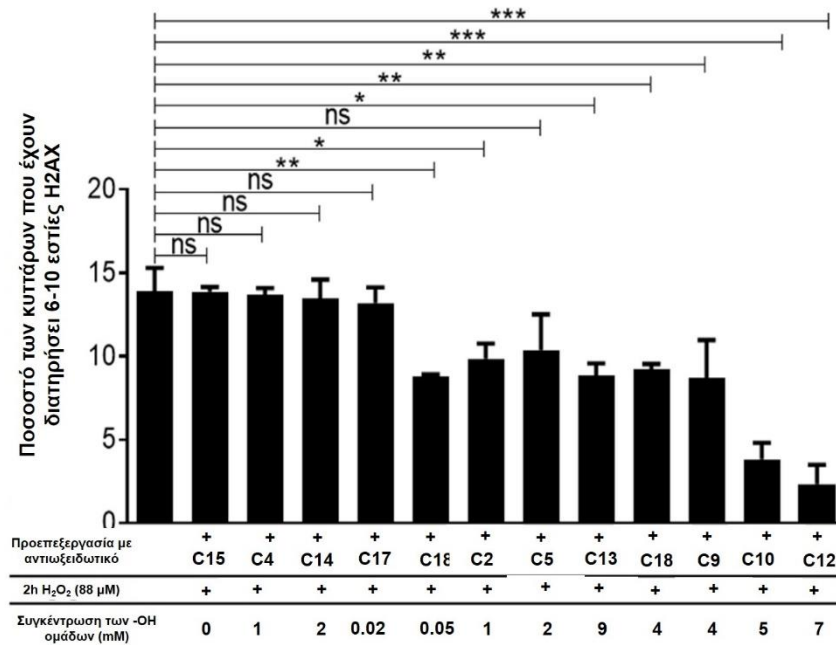
3.3.3 *In vitro* βιολογική αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των μελετούμενων πρότυπων ουσιών και εκχυλισμάτων σε κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη στο DNA

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας NMR-TotPhe, πραγματοποιήθηκαν και *ex vivo* πειράματα, έτσι ώστε να συσχετιστεί και σε αυτή την περίπτωση η συγκέντρωση των φαινολικών -OH ομάδων που περιέχονται στις πρότυπες ουσίες και στα δύο εκχυλίσματα, με την αντιοξειδωτική τους δράση σε κύτταρα που έχουν υποστεί οξειδωτικό στρες. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της γονοπροστατευτικής δράσης των πρότυπων ενώσεων που περιέχουν διαφορετικό αριθμό φαινολικών (-OH) ομάδων ως προς το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την επίδραση υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε κύτταρα U2OS. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια συνεργασίας με το Δρ. Ράμπια Θεόδωρο της Ακαδημίας Αθηνών.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε προκατεργασία των κυττάρων U2OS με τις αντιοξειδωτικές ουσίες, ενώ αντίστοιχα υπήρχαν και κύτταρα, τα οποία δεν υπέστησαν καμία προκατεργασία με κάποιο αντιοξειδωτικό μόριο. Στη συνέχεια όλα τα κύτταρα εκτέθηκαν σε H_2O_2 για 2 ώρες. Μετά το διάστημα των 2 ωρών, προσδιορίστηκε η επαγόμενη βλάβη του DNA η οποία έγινε με τη μορφή σπασίματος του διπλού κλώνου (DSBs) εφαρμόζοντας ανίχνευση με ανοσοφθορισμό και ποσοτικοποίηση των εστιών H2AX. Η έκθεση των κυττάρων U2OS σε 88 μM H_2O_2 για το χρονικό διάστημα των 2 ωρών συσχετίστηκε με την αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που φιλοξενούν 6-10 εστίες H2AX κατά περίπου 3.5 φορές, γεγονός που αποτέλεσε βασική συνθήκη για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των μελετούμενων ουσιών και εκχυλισμάτων. Τα αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων έδειξαν ότι η συγκέντρωση των φαινολικών (-OH)

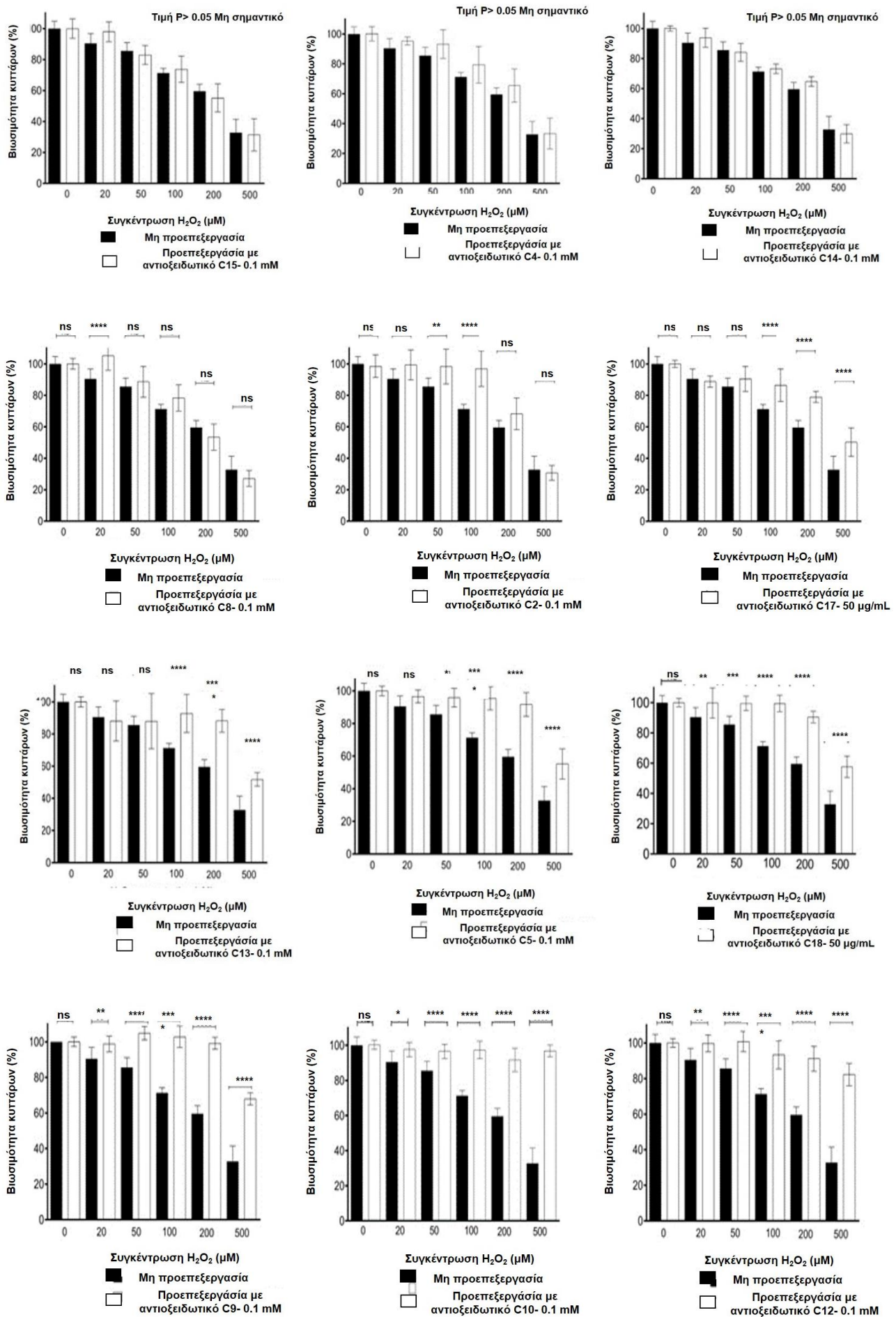
ομάδων που έχουν προσδιοριστεί από τη μεθοδολογία NMR-TotPhe εμφανίζει αντίστροφη συσχέτιση με τα επίπεδα βλάβης του DNA που προκαλείται από την επίδραση του οξειδωτικού στρες (Σχήμα 3.8A).

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι υπάρχει γραμμικότητα της μεθοδολογίας NMR-TotPhe με την προστασία που προσφέρουν στη βλάβη του DNA, αλλά αύξησαν επίσης τη βιωσιμότητά τους υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο τη συμβολή της μεθοδολογίας NMR-TotPhe στην προστασία του DNA από την επίδραση του οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα, η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων που παρουσιάζουν υψηλή συγκέντρωση φαινολικών (-OH) ομάδων επαληθεύτηκε επίσης σε συνθήκες ακόμη υψηλότερου οξειδωτικού στρες, καθώς η προκατεργασία των κυττάρων με το ισομοριακό μείγμα φαινόλης-ρεσορσινόλης-ταξιφολίνης (C12) ή την κερκετίνη (C10) μπόρεσε να προστατεύσει τη χρωματίνη από την ανάπτυξη μεγάλης βλάβης στο DNA (Σχήμα 3.8 B).



Σχήμα 3.8: Γονοπροστατευτική δράση των ενώσεων με υψηλή συγκέντρωση φαινολικών (-OH) ομάδων ως προς τη βλάβη στο DNA που προκαλείται από την επίδραση H₂O₂ στα κύτταρα U2OS. **(A)** Γραφική απεικόνιση της συγκέντρωσης των φαινολικών (-OH) ομάδων σε διαφορετικές πρότυπες ουσίες, μείγματα και εκχυλίσματα και η επίδρασή τους στην προστασία της χρωματίνης των κυττάρων U2OS που προκαλούνται από την επίδραση H₂O₂. Τα δεδομένα έχουν συλλεχθεί από τρία ανεξάρτητα πειράματα και εκφράζονται ως μέσος όρος ±SD. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων U2OS που έχουν υποστεί προκατεργασία με αντιοξειδωτικό μόριο και των κυττάρων που δεν έχουν υποστεί καμία προκατεργασία (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$), ενώ το ns δείχνει πολύ μικρή απόκλιση ($p > 0,05$). **(B)** Ανίχνευση με ανοσοφθορισμό των εστιών H2AX σε κύτταρα U2OS υπό συνθήκες υψηλού οξειδωτικού στρες (88 μM H₂O₂ για 6 ώρες) που είτε έχουν υποβληθεί σε προκατεργασία με αντιοξειδωτικές ενώσεις που έχουν υψηλή συγκέντρωση σε φαινολικές (-OH) ομάδες.

Σε επόμενο βήμα διερευνήθηκε αν η γονοπροστατευτική δράση των ενώσεων που έχουν υψηλή συγκέντρωση φαινολικών (-OH) ομάδων, όπως έχει προσδιοριστεί από τη μεθοδολογία NMR-TotPhe, συσχετίζεται με την κυτταρική βιωσιμότητα υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα U2OS, τα οποία υπέστησαν προεπεξεργασία με τις μελετούμενες αντιοξειδωτικές ενώσεις και αυτά που δεν υπέστησαν, εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις H₂O₂ για 72 ώρες, και η επίδραση του οξειδωτικού στρες που προκλήθηκε από την επίδραση του H₂O₂ μετρήθηκε με πειράματα MTT. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.9**, αυτές οι δοκιμασίες έδειξαν ότι η προεπεξεργασία των κυττάρων U2OS με τις αντιοξειδωτικές ενώσεις πλούσιες σε φαινολικές (-OH) ομάδες προκάλεσε μεγαλύτερη βιωσιμότητα στα κύτταρα που είχανε υψηλότερη συγκέντρωση H₂O₂, σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.



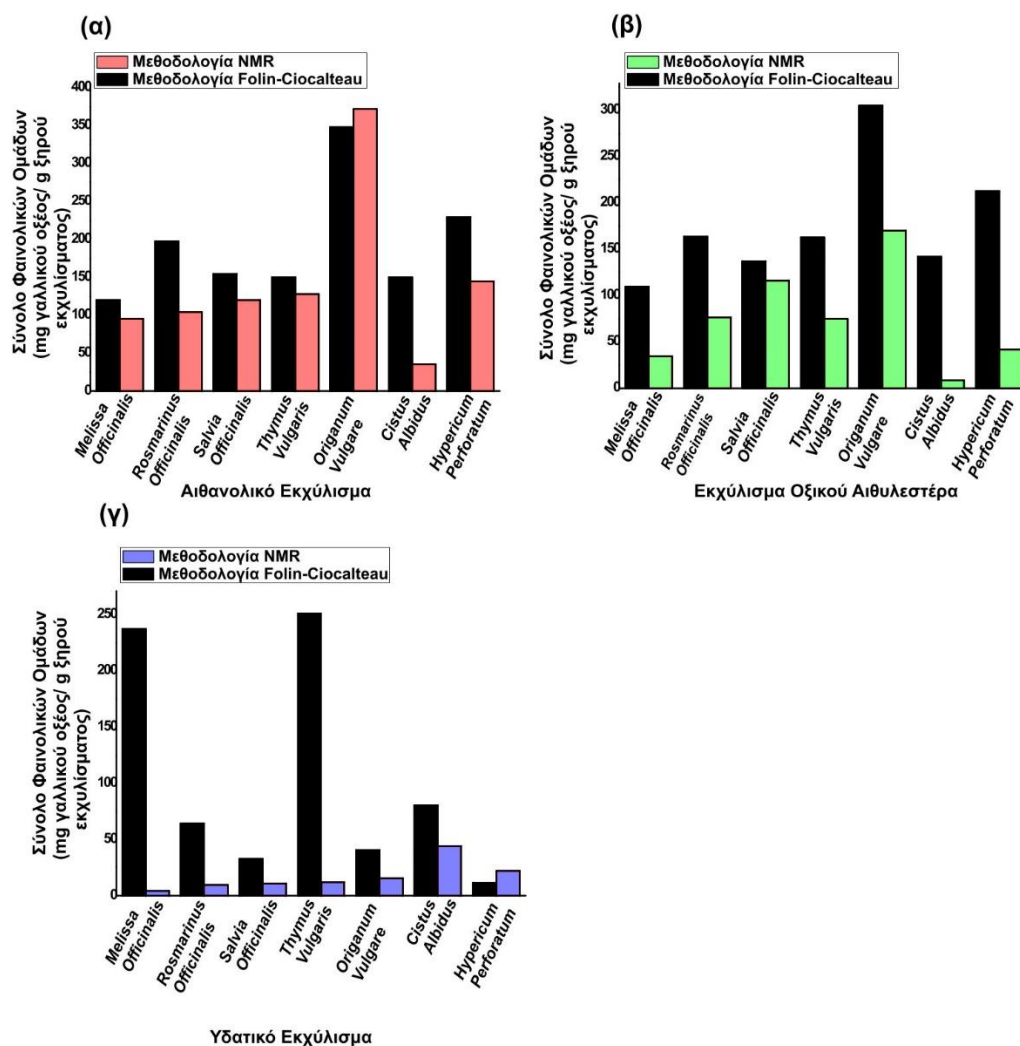
Σχήμα 3.9. Απόκριση των κυττάρων U2OS στο οξειδωτικό στρες όταν αυτά υποβλήθηκαν σε προεπεξεργασία με ενώσεις που περιέχουν διαφορετική συγκέντρωση φαινολικών (-OH) ομάδων. Τα δεδομένα της βιωσιμότητας των MTT πειραμάτων προέκυψαν από τρία ανεξάρτητα πειράματα, και οι

γραμμές του σφάλματος εμφανίζονται με μέσες τιμές \pm SE. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν σημαντική διαφορά στη βιωσιμότητα των κυττάρων USO2 που έχουν υποστεί προεπεξεργασία με αντιοξειδωτικά μόρια (ράβδοι μαύρου χρώματος) και των κυττάρων που δεν έχουν υποστεί προεπεξεργασία (ράβδοι λευκού χρώματος) όταν εκτίθενται στις ίδιες οξειδωτικές συνθήκες (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$), ενώ το ns δείχνει αμελητέο σφάλμα ($p > 0,05$).

3.3.4 Σύγκριση των μεθοδολογιών NMR-TotPhe και Folin-Ciocalteu για τον προσδιορισμό του συνολικού περιεχομένου των φαινολικών (-OH) ομάδων στα παραγόμενα εκχυλίσματα

Η σύγκριση μεταξύ των μεθοδολογιών NMR-TotPhe και Folin-Ciocalteu πραγματοποιήθηκε και στα υπόλοιπα αιθανολικά εκχυλίσματα, καθώς και στα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα αλλά και στα υδατικά εκχυλίσματα. Ωστόσο, στην περίπτωση των υδατικών εκχυλισμάτων, οι κορυφές των -OH ομάδων ήταν σχετικά δύσκολο να διακριθούν παρόλο που προστέθηκε αρκετή ποσότητα διαλύματος TFA-d.

Η συγκέντρωση των συνολικών φαινολικών ομάδων προσδιορίστηκε και μέσω της φασματοσκοπίας NMR, για όλα τα παραγόμενα εκχυλίσματα (Σχήμα 3.10).



Σχήμα 3.10: Συγκριτικές γραφικές απεικονίσεις της συγκέντρωσης του συνολικού περιεχομένου των φαινολικών (OH) ομάδων, όπως έχουν προσδιοριστεί με τις μεθοδολογίες Folin-Ciocalteu και NMR για (α) τα αιθανολικά εκχυλίσματα, (β) τα εκχυλίσματα οξικού αιθυλεστέρα και (γ) τα υδατικά εκχυλίσματα.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.10, υπάρχει απόκλιση ως προς τις τιμές της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών ομάδων που προσδιορίζονται με τη μεθοδολογία Folin-Ciocalteu και

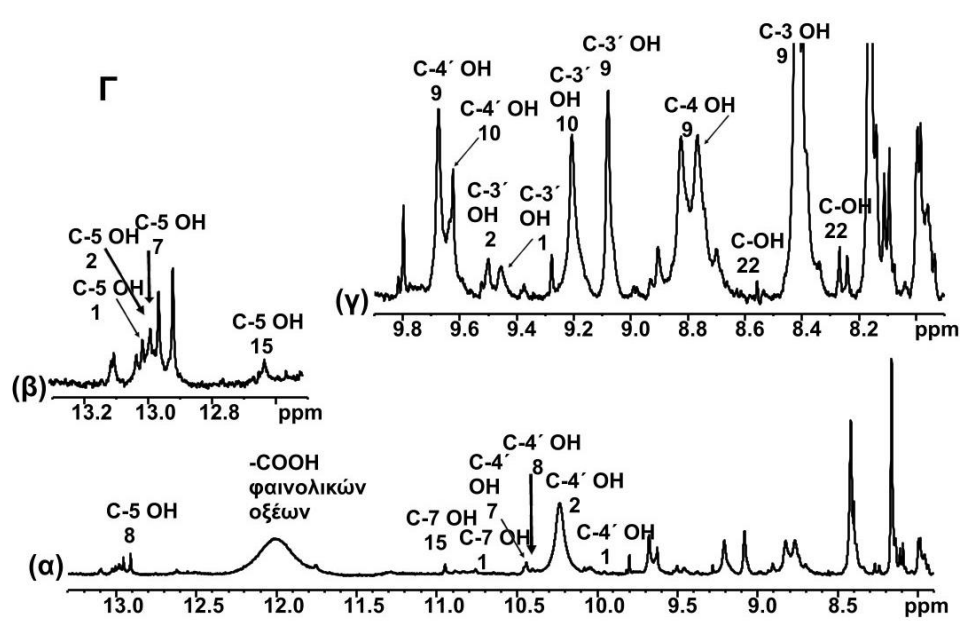
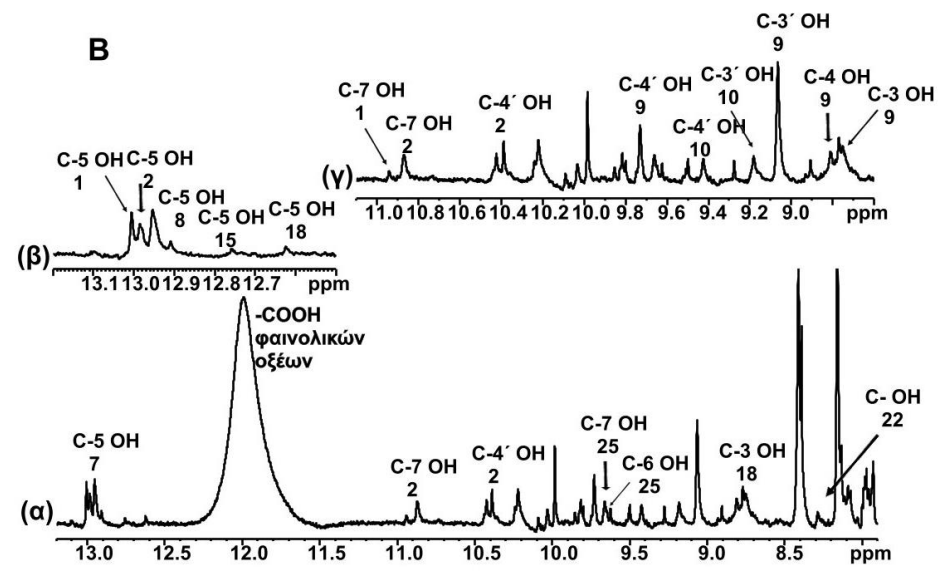
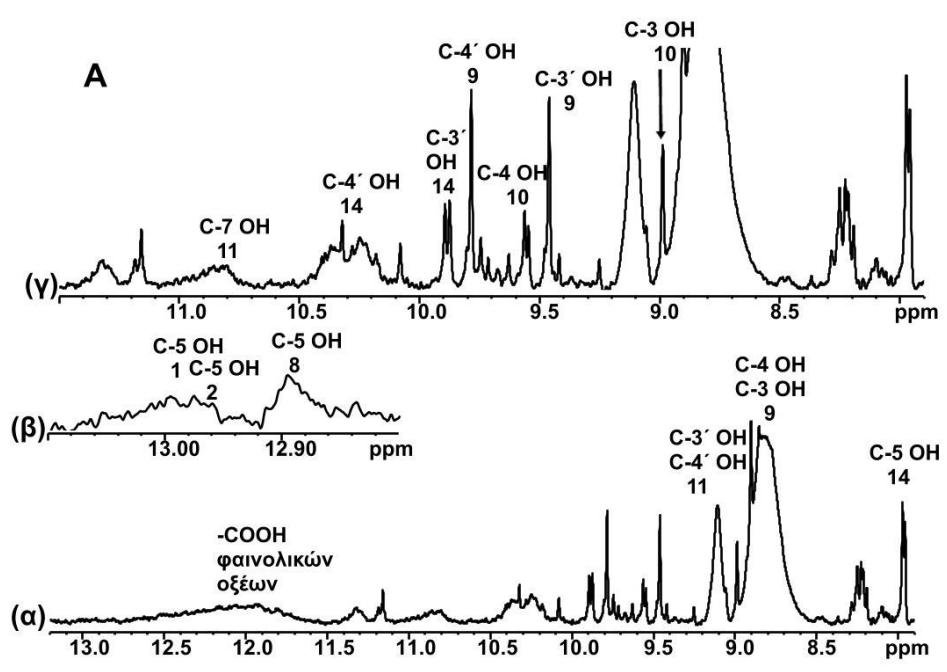
με τη μεθοδολογία NMR. Συγκρίνοντας τις δύο μεθοδολογίες, για κάποια εκχυλίσματα φαίνεται ότι με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu προσδιορίζεται μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικών (-OH) ομάδων σε σχέση με την αντίστοιχη μεθοδολογία NMR, ενώ σε άλλα εκχυλίσματα η αντίστοιχη συγκέντρωση είναι μικρότερη. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει τη μη προβλεψιμότητα της μεθοδολογίας Folin-Ciocalteu, όπως διερευνήθηκε και στο προηγούμενο Κεφάλαιο, καθώς με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu που, όπως έχει λεχθεί, είναι το βασικό στοιχείο της μεθόδου, είναι πιθανό να αντιδράσουν και άλλες ομάδες που είναι δυνατό να αναχθούν, εκτός από τις φαινολικές. Αντίθετα, με τη μεθοδολογία NMR, προσδιορίζεται η ακριβής συγκέντρωση των φαινολικών (-OH) ομάδων που περιέχονται στα εκχυλίσματα.

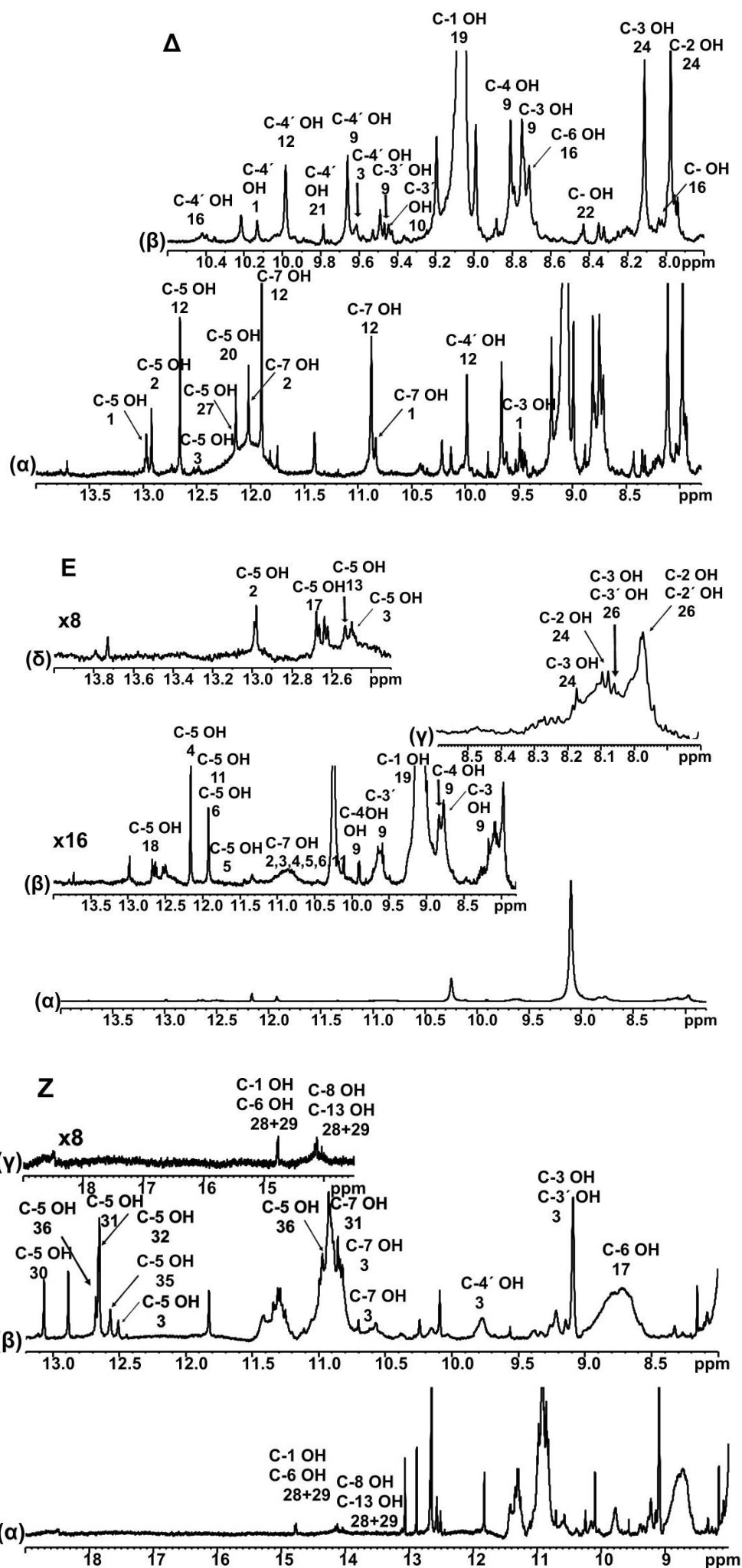
3.3.5 Ποιοτική ανάλυση του φυτοχημικού προφίλ των αιθανολικών εκχυλισμάτων μέσω της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

3.3.5.1 Ταυτοποίηση φαινολικών συστατικών αιθανολικών εκχυλισμάτων με χαρακτηρισμό των φαινολικών (-OH) ομάδων με εφαρμογή 1D ¹H NMR φασματοσκοπίας

Επόμενο βήμα για τη μελέτη των εκχυλισμάτων είναι ο χαρακτηρισμός και η ταυτοποίηση των φαινολικών συστατικών τους, με εφαρμογή της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), αξιοποιώντας σε μεγάλο βαθμό τη μεθοδολογία NMR-TotPhe. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η περιοχή 8,00-13,00 ppm είναι μια αρκετά χαρακτηριστική περιοχή για την ταυτοποίηση των χαρακτηριστικών φαινολικών (-OH) ομάδων των περιεχόμενων φυτοχημικών συστατικών. Ο λόγος που επιλέχθηκε αυτή η συγκεκριμένη περιοχή είναι επειδή η περιοχή των αρωματικών πρωτονίων (6,00-8,00 ppm) του φάσματος πρωτονίου είναι αρκετά πολύπλοκη, λόγω της έντονης αλληλεπικάλυψης των κορυφών όλων των αρωματικών πρωτονίων. Από την άλλη, οι φαινολικές (-OH) ομάδες λόγω του ιδιαίτερου χημικού περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται, παρουσιάζουν χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις, γεγονός που αποτελεί το “δακτυλικό αποτύπωμά” τους σ’ ένα φάσμα πρωτονίου NMR. Όπως περιγράφηκε και προηγουμένως, η προσθήκη διαλύματος TFA-*d* εμφάνισε τις μη παρατηρήσιμες φαινολικές (-OH) ομάδες, με αποτέλεσμα η ταυτοποίησή τους να γίνεται εύκολα.

Για την ταυτοποίηση των περιεχόμενων φυτοχημικών συστατικών επιλέχθηκαν κυρίως τα αιθανολικά εκχυλίσματα, λόγω του ότι περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό φλαβονοειδών και φαινολικών συστατικών και η διάκριση τους στα φάσματα NMR ήταν εφικτή. Για την ταυτοποίηση των περιεχόμενων φυτοχημικών συστατικών εφαρμόστηκε ένας συνδυασμός των μεθοδολογιών 1D ¹H NMR, 2D ¹H-¹³C HSQC, 2D ¹H-¹³C HMBC, και Selective 1D TOCSY NMR, και κατέστη εφικτή η ταυτοποίηση ενός αριθμού συστατικών (**Σχήμα 3.11**).





Σχήμα 3.11: Επιλεγμένη περιοχή (8,00-20,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων στην περιοχή των φαινολικών (-OH) ομάδων, των αιθανολικών εκχυλισμάτων όλων των μελετούμενων φυτών: **(A)** *Melissa Officinalis*, **(B)** *Rosmarinus Officinalis*, **(Γ)** *Salvia Officinalis*, **(Δ)** *Thymus Vulgaris*, **(E)** *Origanum Vulgare*, **(ΣΤ)** *Cistus Albidus*, **(Z)** *Hypericum Perforatum*, όπου έχει γίνει χαρτογράφηση των κορυφών που

αντιστοιχούν στις φαινολικές βιοδραστικές ενώσεις, όπως έχουν ταυτοποιηθεί μέσω συνδυασμού μεθοδολογιών NMR και έχουν συγκριθεί με βάση τη βιβλιογραφία. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις βιοδραστικές ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.11**, η περιοχή των φαινολικών (-OH) ομάδων αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για τη διάκριση και ταυτοποίηση των φαινολικών ουσιών, ακόμη και για την ποσοτικοποίησή τους. Η προσθήκη διαλύματος TFA-*d*, μειώνει το pH κάθε δείγματος περίπου στο 4-4,5, με αποτέλεσμα η εμφάνιση των απαραίτητων κορυφών που αντιστοιχούν στις φαινολικές (-OH) ομάδες να είναι επιτυχής. Ο συνδυασμός πειραμάτων 1D (¹H NMR, Selective 1D TOCSY και πιπλοδότησης (spiking) με πρότυπες ενώσεις γνωστής συγκέντρωσης-spiking) και 2D (¹H-¹³C HSQC-¹H-¹³C HMBC NMR), κατέστησε εφικτή την ταυτοποίηση αρκετών φλαβονοειδών ουσιών, λόγω της χαρακτηριστικής χημικής μετατόπισης που παρουσιάζει κάθε φαινολική ομάδα (-OH). Η ταυτοποίηση όλων των βιοδραστικών ενώσεων διασταυρώθηκε με βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου οι χημικές μετατοπίσεις των φαινολικών (-OH) πρωτονίων για κάθε ένωση συνέπιπτε αρκετά με τις πειραματικές τιμές. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η σύγκριση των πειραματικών με τις θεωρητικές τιμές των χημικών μετατοπίσεων έγινε σε διαλύτη DMSO-*d*₆. Από τα φάσματα πρωτονίου του **Σχήματος 3.11**, ήταν δυνατή η ταυτοποίηση **36** βιοδραστικών ουσιών, στο σύνολο των 7 αιθανολικών εκχυλισμάτων: **(1)** λουτεολίνη, **(2)** απιγενίνη, **(3)** κερκετίνη, **(4)** ναρινγενίνη, **(5)** ταξιφολίνη, **(6)** αρωμαδενδρίνη, **(7)** γλυκοζίτης λουτεολίνης, **(8)** γλυκοζίτης απιγενίνης, **(9)** ροσμαρινικό οξύ, **(10)** καφεϊκό οξύ, **(11)** εριοδικτυόλη, **(12)** καμφερόλη, **(13)** 4',5,6-τριυδροξυ-7,8-διμεθοξυφλαβόνη, **(14)** υδροξυλιωμένη φλαβόνη, **(15)** 3,5,7-τριυδροξυ-3',4',5'-τριμεθοξυφλαβόνη, **(16)** 4',5,6-τριυδροόξυ-7-μεθοξυφλαβόνη, **(17)** 5,6-διυδροξυ-4',7-διμεθοξυφλαβόνη, **(18)** 5,6-διυδροξυ-3',4',7-τριμεθοξυφλαβόνη, **(19)** καρβακρόλη, **(20)** παρα-κουμαρικό οξύ, **(21)** θυμόλη, **(22)** καρνοσικό οξύ, **(23)** γαλλικό οξύ, **(24)** παρα-κυμενιο-2,3-διόλη, **(25)** ροσμαδιάλη, **(26)** 5'-διμερες-παρα-κυμενιο-2,3-διόλη, **(27)** εσπεριδίνη, **(28)** υπερουκίνη, **(29)** ψευδοϋπερουκίνη, **(30)** ισπιδουλίνη, **(31)** ισοκερκιτρίνη, **(32)** κερκιτρίνη, **(33)** 3',4',5,7'-τετραϋδροξυ-3-μεθοξυφλαβόνη, **(34)** μυρισετίνη, **(35)** ρουτίνη, **(36)** υπεροσίδη. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ταυτοποίηση των περισσότερων βιοδραστικών ουσιών, με βάση τη βιβλιογραφία, έγινε κυρίως με σύγκριση των θεωρητικών και πειραματικών τιμών των χημικών μετατοπίσεων του ζεύγους C-5 OH και C-7 OH, καθώς για κάθε χημική δομή παρουσιάζει χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις, λόγω του χημικού περιβάλλοντος που τις χαρακτηρίζει. Όσον αφορά τις χημικές μετατοπίσεις των C-4' OH, C-3' OH ομάδων των φλαβονοειδών, υπάρχει ισχυρή αλληλεπικάλυψη στην περιοχή των 9-10 ppm, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η διάκριση των περισσότερων.

Όπως δείχνουν τα αποτελέσματα, για τα φυτά *Melissa Officinalis*, *Rosmarinus Officinalis*, *Salvia Officinalis*, *Thymus Vulgaris* και *Origanum Vulgare*, υπάρχει σ' ένα ποσοστό μία ομοιότητα στο φυτοχημικό τους προφίλ, λόγω του ότι ανήκουν όλα στην οικογένεια των Χειλανθών. Υπάρχουν δηλαδή κάποιες βιοδραστικές ενώσεις που βρίσκονται σε μεγάλο ποσοστό και είναι χαρακτηριστικές για κάθε φυτό. Από τα φαινολικά οξέα, κύριος εκπρόσωπος είναι το ροσμαρινικό οξύ **(9)**, ενώ και το καφεϊκό οξύ **(10)** βρίσκεται σε σημαντικό ποσοστό και στα πέντε φυτά. Όσον αφορά τις φλαβονοειδείς ενώσεις, η λουτεολίνη **(1)** και η απιγενίνη **(2)**

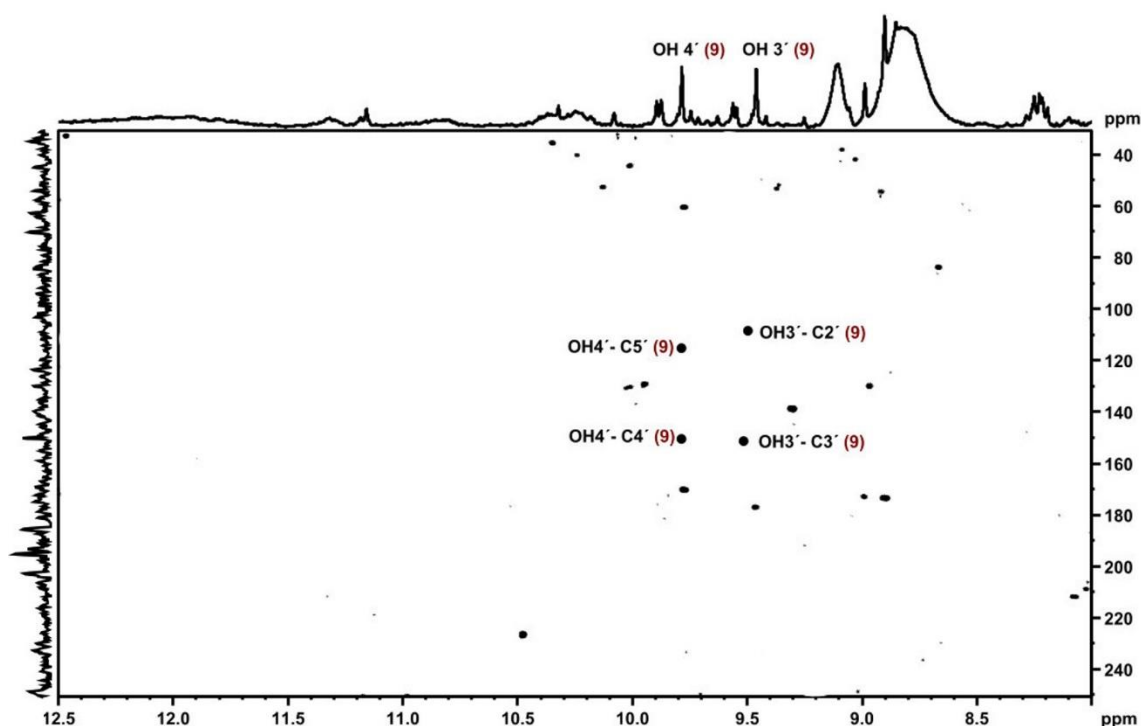
υπάρχουν και στα πέντε εκχυλίσματα, καθώς και οι γλυκοζίτες αυτών **(7)-(8)**. Επίσης, σε όλα τα εκχυλίσματα υπάρχουν και άλλες υποκατεστημένες φλαβόνες, όπως οι **(14)-(18)**. Υπάρχουν όμως και συστατικά, τα οποία βρίσκονται σε μεγάλο ποσοστό σε συγκεκριμένα εκχυλίσματα, και είναι αυτά που τα χαρακτηρίζουν ιδιαίτερα. Τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η καρβακρόλη **(19)**, η θυμόλη **(21)** και η καμφερόλη **(12)**, βασικά συστατικά της ρίγανης και του θυμαριού. Στη ρίγανη, όπως και στο μελισσόχορτο υπάρχει και η εριοδουκτούλη **(11)**, ενώ η αρωμαδενδρίνη **(6)** είναι χαρακτηριστικό συστατικό του δεντρολίβανου. Από όλα τα εκχυλίσματα, η ρίγανη φαίνεται να περιέχει και άλλα φλαβονοειδή, όπως είναι η μυρισετίνη **(34)**, η ναρινγενίνη **(4)** και η ταξιφολίνη **(5)**. Αντίθετα, το θυμάρι, εκτός των άλλων, περιέχει κερκετίνη, αλλά και τις χαρακτηριστικές ουσίες παρα-κυμενιο-2,3-διόλη **(24)**, 5'-διμερες-παρα-κυμενιο-2,3-διόλη **(26)**, όπως και το παρα-κουμαρικό οξύ **(20)**. Όσον αφορά το εκχύλισμα της λαδανιάς, αυτό παρουσιάζει διαφορετικό φυτοχημικό προφίλ. Η λαδανιά (*Cistus Albidus*) ανήκει στην οικογένεια των Κιστοειδών, και η σύστασή της χαρακτηρίζεται από την παρουσία ταννινών, και κυρίως κατεχινών (εστέρες του γαλλικού οξέος). Χαρακτηριστική κατεχίνη που υπάρχει στο συγκεκριμένο εκχύλισμα, όπως έχει ταυτοποιηθεί από σύγκριση με πρότυπη ουσία, είναι ο γαλλικός εστέρας της κατεχίνης (ECG-epicatechin gallate). Επίσης, η λαδανιά αποτελείται από σημαντικό ποσοστό γαλλικού οξέος **(23)**, το οποίο, μαζί με τα παράγωγά του, αποτελεί βασικό συστατικό των εκπροσώπων της οικογένειας των Κίστοειδών. Όσον αφορά τις φλαβονοειδείς ουσίες, σε σημαντικό ποσοστό περιέχεται κερκετίνη **(3)** και τα παράγωγά της κερκιτρίνη **(32)** και ισοκερκιτρίνη **(31)**. Η κερκετίνη ταυτοποιήθηκε με σύγκριση πρότυπης ουσίας μέσω πειραμάτων προσθήκης πρότυπης ουσίας γνωστής συγκέντρωσης (spiking), όπως επίσης και με εφαρμογή Selective 1D TOCSY. Για το εκχύλισμα του βαλσαμόχορτου (*Hypericum Perforatum*), χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές που αντιστοιχούν στην υπερυκίνη **(28)**, στην ψευδοϋπερυκίνη **(29)** και στην υπεροσίδη **(36)**, κύρια συστατικά του βαλσαμόχορτου. Από την άλλη, το συγκεκριμένο εκχύλισμα περιέχει σημαντικό ποσοστό κερκετίνης **(3)** και των παραγώγων της κερκιτρίνη **(32)** και ισοκερκιτρίνη **(31)**, ενώ υπάρχουν και κορυφές που αντιστοιχούν στο ζεύγος των C-5 OH και C-7 OH ομάδων της ρουτίνης.

3.3.5.2 Ταυτοποίηση των περιεχόμενων φαινολικών συστατικών με χαρακτηρισμό των -OH ομάδων με εφαρμογή 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR φασματοσκοπίας

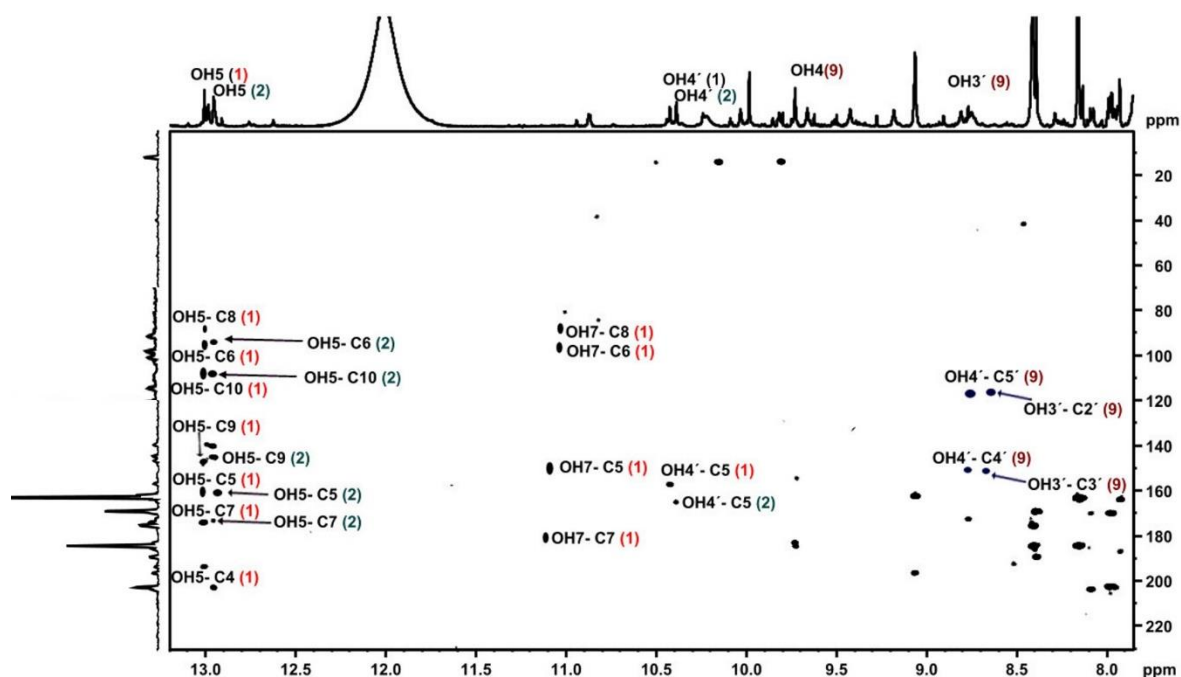
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία των βιοδραστικών ουσιών που αναφέρθηκαν προηγουμένως, καταγράφηκαν και φάσματα 2D NMR, και συγκεκριμένα 2D ^1H - ^{13}C HSQC και 2D ^1H - ^{13}C HMBC, έτσι ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός της συσχέτισης των πρωτονίων των φαινολικών (-OH) ομάδων με τους αντίστοιχους άνθρακες. Καθώς η περιοχή των φαινολικών (-OH) ομάδων ξεχωρίζει αισθητά από την πολυπληθή περιοχή των αρωματικών πρωτονίων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό των περιεχόμενων συστατικών και στις δύο διαστάσεις. Μαζί με το γεγονός ότι η προσθήκη διαλύματος TFA-*d* έχει μειώσει αισθητά το πλάτος των κορυφών (2,0-2,5 Hz), η καταγραφή φασμάτων 2D ^1H - ^{13}C NMR με τους χαρακτηριστικούς χημικούς συντονισμούς στην περιοχή των φαινολικών (-OH) ομάδων ήταν επιτυχής. Ωστόσο, επειδή οι περισσότερες βιοδραστικές ουσίες βρίσκονται σε μικρή

συγκέντρωση, δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευσή τους στο δυδιάστατο φάσμα, παρόλο που δοκιμάστηκαν διάφορες παράμετροι βελτιστοποίησης. Παρ' όλα αυτά, ορισμένα φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα που βρίσκονται σε μεγάλο ποσοστό ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς μέσα στο πολύπλοκο εκχύλισμα. Το σύστημα spin ενός μορίου αποτελεί χαρακτηριστικό “δακτυλικό αποτύπωμα” για το μόριο αυτό, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η ταυτοποίησή του, ακόμη και όταν αυτό βρίσκεται σ' ένα πολύπλοκο μείγμα, όπως ένα φυτικό εκχύλισμα. Το ίδιο φαινόμενο ισχύει και για το σύστημα spin μιας φαινολικής (-OH) ομάδας. Οι κορυφές συσχετισμού που εμφανίζονται σ' ένα δυδιάστατο φάσμα 2D ^1H - ^{13}C HMBC, καθρεφτίζουν το σύστημα spin ενός συγκεκριμένου μορίου. Καθώς ο πυρήνας μιας φαινολικής (-OH) ομάδας παρουσιάζει ιδιαίτερη προστασία λόγω των ενδομοριακών και διαμοριακών δεσμών που αναπτύσσονται σε κάθε περίπτωση, το σύστημα αυτό έχει αυξημένη ευαισθησία ως προς αυτές τις αλλαγές, με αποτέλεσμα η διάκριση μεταξύ πρωτονίων και ανθράκων που αντιστοιχούν σε διαφορετικά φλαβονοειδή να είναι χαρακτηριστική.^{178,199} Όπως φαίνεται στα **Σχήματα 3.12-3.16**, η λουτεολίνη, η απιγενίνη, η ναρινγενίνη, η ταξιφολίνη, η κερκετίνη, το ροσμαρινικό οξύ και η καρβακρόλη είναι οι ενώσεις που μπόρεσαν να εμφανίσουν το δικό τους σύστημα spin σ' ένα φάσμα 2D ^1H - ^{13}C HMBC: Ξεκινώντας από τη χαρακτηριστική κορυφή του πρωτονίου C-5 OH της λουτεολίνης η οποία συντονίζεται στα 13,00 ppm, παρατηρείται ότι εκτός από την κορυφή που αντιστοιχεί στο δικό της άνθρακα (C5) στα 162,0 ppm, συσχετίζεται με άλλες δύο κορυφές, μία στα 164,8 ppm και μία στα 182,20 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στους άνθρακες C-7 και C-4 αντίστοιχα. Επίσης, εμφανίζονται και οι συσχετίσεις στα 99,6 ppm, και στα 94,30 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στους άνθρακες C-6 και C-8 αντίστοιχα, με τις οποίες συσχετίζεται το πρωτόνιο OH-5 του μορίου. Όσον αφορά το πρωτόνιο της C-7 OH ομάδας της λουτεολίνης το οποίο συσχετίζεται στα 10,87 ppm, εκτός από το δικό του άνθρακα (164,8 ppm), εμφανίζει συσχετίσεις με τους άνθρακες στα 99,8 ppm (C-6) και 94,30 ppm (C-8), αλλά και με τον άνθρακα στα 158 ppm (C-9). Στην περίπτωση της απιγενίνης, το πρωτόνιο της C-5 OH ομάδας της που έχει χημική μετατόπιση στα 12,99 ppm, δίνει τη χαρακτηριστική κορυφή συσχέτισης στα 161,70 ppm που ανήκει στον άνθρακα C-5 και εμφανίζει συσχετίσεις και με την κορυφή στα 165,00 ppm που ανήκει στον C-7, στα 100 ppm, που ανήκει στον C-6 και στα 104.30 ppm που ανήκει στον C-10 και που συσχετίζονται με το πρωτόνιο OH-5. Αυτό το μοτίβο επαναλαμβάνεται στα 2D ^1H - ^{13}C HMBC φάσματα των εκχυλισμάτων του δεντρολίβανου (*Rosmarinus Officinalis*) (**Σχήμα 3.13**), του φασκόμηλου (*Salvia Officinalis*) (**Σχήμα 3.14**) και του θυμαριού (*Thymus Vulgaris*) (**Σχήμα 3.15**). Στο 2D ^1H - ^{13}C HMBC φάσμα της ρίγανης (*Origanum Vulgare*) (**Σχήμα 3.16**) παρατηρείται ένα διαφορετικό μοτίβο στην περιοχή των φλαβονοειδών: Η χαρακτηριστική κορυφή του πρωτονίου της C-5 OH ομάδας για τη ναρινγενίνη εμφανίζεται στα 12,15 ppm και δίνει συσχέτιση, εκτός από το δικό της άνθρακα στα 164,00 ppm (C-5), με τους άνθρακες C-7 (167,50 ppm), C-10 (103,60 ppm) και C-6 (96,40 ppm) αντίστοιχα. Όσον αφορά την ταξιφολίνη, το πρωτόνιο της C-5 OH ομάδας της (11,96 ppm) εμφανίζει τις ακόλουθες κορυφές συσχετισμού: 164,20 ppm (C-5), 167,60 ppm (C-7), 199,10 ppm (C-4), 101,30 ppm (C-10) και 96,8 ppm (C-6). Από την άλλη, η κερκετίνη ταυτοποιήθηκε στο 2D ^1H - ^{13}C HMBC φάσμα του βαλσαμόχορτου (**Σχήμα 3.18**). Το πρωτόνιο της ομάδας OH-5 της κερκετίνης παρουσιάζει χαρακτηριστική χημική μετατόπιση στα 12,5 ppm. Στο 2D ^1H - ^{13}C HMBC φάσμα του εκχυλίσματος του βαλσαμόχορτου, εμφανίζονται οι συσχετίσεις του πρωτονίου της ομάδας C-5 OH, αρχικά με τον

άνθρακα C-5 στα 160,90 ppm. Εκτός από τον άνθρακα C-5, το C-5 OH πρωτόνιο της κερκετίνης εμφανίζει σήματα συσχετισμού με την κορυφή στα 103,50 ppm, η οποία αντιστοιχεί στον άνθρακα C-10, με την κορυφή στα 164,20 ppm, η οποία αντιστοιχεί στην κορυφή C-7, με την κορυφή στα 156,70 ppm, η οποία αντιστοιχεί στον άνθρακα C-9, με την κορυφή στα 176,10 ppm, η οποία αντιστοιχεί στον άνθρακα C-4 και με την κορυφή στα 93,80 ppm, η οποία αντιστοιχεί στον άνθρακα C-8. Από τα φαινολικά οξέα, το ροσμαρινικό οξύ είναι αυτό που παρουσιάζει ένα συγκεκριμένο μοτίβο σε όλα τα φάσματα των εκχυλισμάτων που ανήκουν στην οικογένεια των Χειλανθών, δηλαδή σε αυτά του μελισσόχορτου, του δεντρολίβανου, του φασκόμηλου, του θυμαριού και της ρίγανης. Η κορυφή στα 9,66 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της ομάδας C-4' OH του ροσμαρινικού οξέος, εμφανίζει συσχέτιση με την κορυφή στα 145,00 ppm, που ανήκει στον C-4', καθώς και με την κορυφή στα 117,50 ppm, η οποία ανήκει στον άνθρακα C-5'. Το ίδιο ισχύει για το πρωτόνιο της C-3'OH ομάδας, το οποίο εμφανίζει συσχέτιση με τις κορυφές στα 145,00 ppm (C-3') και 116,10 (C-2') αντίστοιχα. Ξεχωριστό μοτίβο παρουσιάζει επίσης και η καρβακρόλη, στα αντίστοιχα φάσματα της ρίγανης και του θυμαριού. Εδώ υπάρχει μία χαρακτηριστική φαινολική ομάδα, στα 9,05 ppm, η οποία εμφανίζει κορυφές συσχετισμού εκτός από την κορυφή στα 155,90 ppm, που αντιστοιχεί στον άνθρακα της (C-1), αλλά και στα σημεία 121,70 ppm (C-2), 131,60 ppm (C-3) και 113,00 ppm (C-6) αντίστοιχα. Χαρακτηριστικό μοτίβο παρουσιάζει και η υπερυκίνη στο 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR φάσμα του εκχυλίσματος του βαλσαμόχορτου, η οποία ωστόσο έχει παρόμοιο προφίλ με την ψευδοϋπερυκίνη. Η κορυφή στα 14,95 ppm, η οποία ανήκει στα δύο ισοδύναμα πρωτόνια της ομάδας, C-1 OH και C-6 OH του μορίου, εμφανίζει συσχέτιση με την κορυφή στα 162,00 ppm, η οποία αντιστοιχεί στους άνθρακες C-1 και C-6, οι οποίοι είναι ισοδύναμοι. Ωστόσο, εμφανίζονται και άλλες κορυφές συσχετισμού ανθράκων με τα συγκεκριμένα πρωτόνια, όπως είναι η κορυφή στα 99,10 ppm, η οποία αντιστοιχεί στον άνθρακα C-2, η κορυφή στα 185,10 ppm, η οποία αντιστοιχεί στον άνθρακα C-14 αλλά και η κορυφή στα 178 ppm, η οποία αντιστοιχεί στον άνθρακα C-3. Στο 2D ^1H - ^{13}C HMBC φάσμα του βαλσαμόχορτου εμφανίζονται επίσης οι χαρακτηριστικές συσχετίσεις του πρωτονίου της ομάδας C-5 OH της ισπιδουλίνης με τους άνθρακες C-5 (159,0 ppm), C-7 (161,10 ppm) και C-4 (174,50 ppm) του μορίου. Στο ίδιο φάσμα εμφανίζονται και οι χαρακτηριστικές συσχετίσεις του πρωτονίου της ομάδας C-5 OH της ισοκερκιτρίνης με τους άνθρακες C-5 (158,70 ppm), C-7 (160,20 ppm) και C-4 (173,80 ppm) του μορίου (**Σχήμα 3.18**).

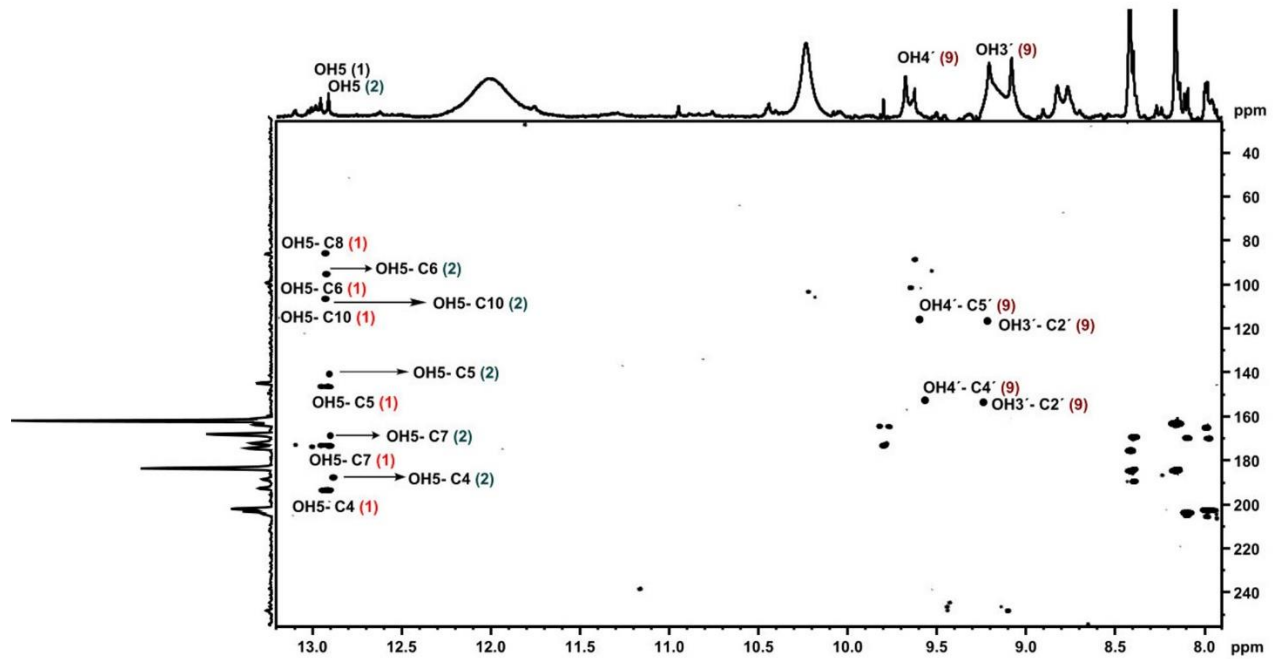


Σχήμα 3.12: Επιλεγμένη περιοχή (8,00-12,50 ppm) 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR φάσματος στην περιοχή των φαινολικών (-OH) ομάδων, του αιθανολικού εκχυλίσματος του μελισσόχορτου (*Melissa Officinalis*) (18,0 mg σε 500 μL δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο- $\text{DMSO}-d_6$), σε $T=298\text{K}$, αριθμός σαρώσεων:88 και πειραματικός χρόνος: 12h. Τα πειράματα βελτιστοποιήθηκαν ως προς το εύρος των κορυφών ($^nJ_{(1\text{H}, 13\text{C})} = 2,0-2,5 \text{ Hz}$). Έχει γίνει χαρτογράφηση των κορυφών που αντιστοιχούν στις φαινολικές βιοδραστικές ενώσεις, όπως έχουν ταυτοποιηθεί μέσω συνδυασμού μεθοδολογιών NMR και έχουν συγκριθεί με βάση τη βιβλιογραφία. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις βιοδραστικές ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί.

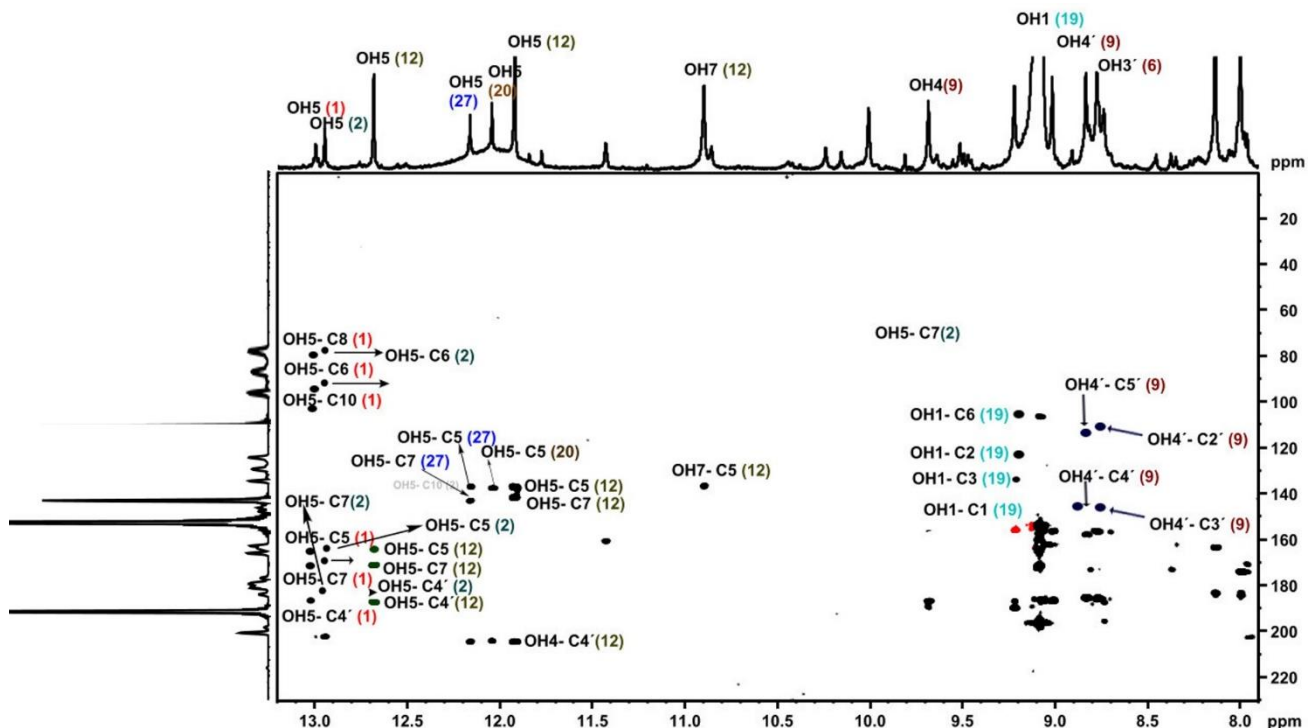


Σχήμα 3.13: Επιλεγμένη περιοχή (8,00-13,00 ppm) 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR φάσματος στην περιοχή των φαινολικών (-OH) ομάδων, του αιθανολικού εκχυλίσματος του δεντρολίβανου (*Rosmarinus Officinalis*) (19,5 mg σε 500 μL δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο- $\text{DMSO}-d_6$), σε $T=298\text{K}$, αριθμός σαρώσεων:88 και πειραματικός χρόνος: 12h. Τα πειράματα βελτιστοποιήθηκαν ως προς το εύρος των κορυφών ($^nJ_{(1\text{H}, 13\text{C})} = 2,0-2,5 \text{ Hz}$). Έχει γίνει χαρτογράφηση των κορυφών που αντιστοιχούν στις φαινολικές βιοδραστικές ενώσεις, όπως έχουν ταυτοποιηθεί μέσω συνδυασμού μεθοδολογιών NMR και

έχουν συγκριθεί με βάση τη βιβλιογραφία. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις βιοδραστικές ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί.

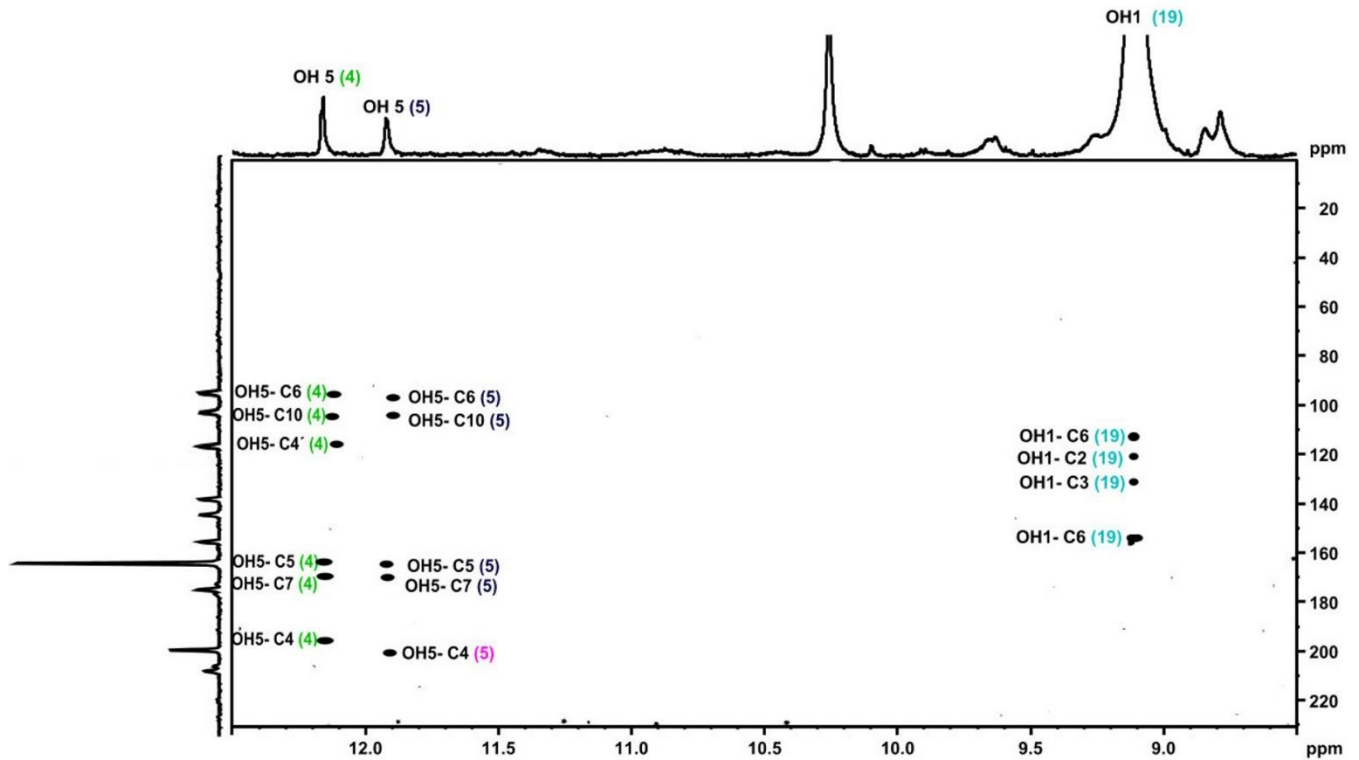


Σχήμα 3.14: Επιλεγμένη περιοχή (8,00-13,00ppm) 2D ¹H-¹³C HMBC NMR φάσματος στην περιοχή των φαινολικών (-OH) ομάδων, του αιθανολικού εκχυλίσματος του φασκόμηλου (*Salvia Officinalis*) (20,50 mg σε 500 μL δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο- DMSO-*d*₆), σε T=298K, αριθμός σαρώσεων:88 και πειραματικός χρόνος: 12h. Τα πειράματα βελτιστοποιήθηκαν ως προς το εύρος των κορυφών (ⁿJ_(1H, 13C)= 2,0-2,5 Hz). Έχει γίνει χαρτογράφηση των κορυφών που αντιστοιχούν στις φαινολικές βιοδραστικές ενώσεις, όπως έχουν ταυτοποιηθεί μέσω συνδυασμού μεθοδολογιών NMR και έχουν συγκριθεί με βάση τη βιβλιογραφία. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις βιοδραστικές ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί.

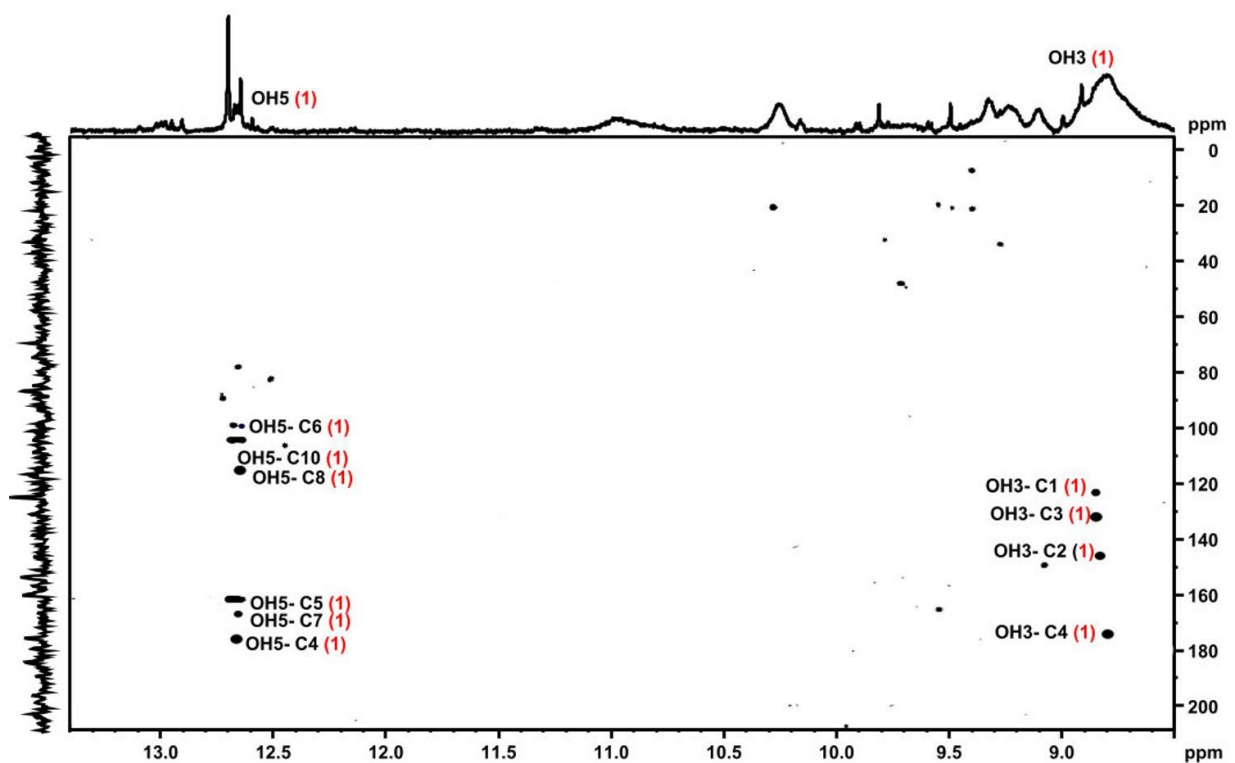


Σχήμα 3.15: Επιλεγμένη περιοχή (8,00-13,00 ppm) 2D ¹H-¹³C HMBC NMR φάσματος στην περιοχή των φαινολικών (-OH) ομάδων, του αιθανολικού εκχυλίσματος του θυμαριού (*Thymus Vulgaris*) (19,40 mg σε 500 μL δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο- DMSO-*d*₆), σε T=298K, αριθμός σαρώσεων:88 και πειραματικός χρόνος: 12h. Τα πειράματα βελτιστοποιήθηκαν ως προς το εύρος των κορυφών (ⁿJ_(1H, 13C)= 2,0-2,5 Hz). Έχει γίνει χαρτογράφηση των κορυφών που αντιστοιχούν στις φαινολικές βιοδραστικές

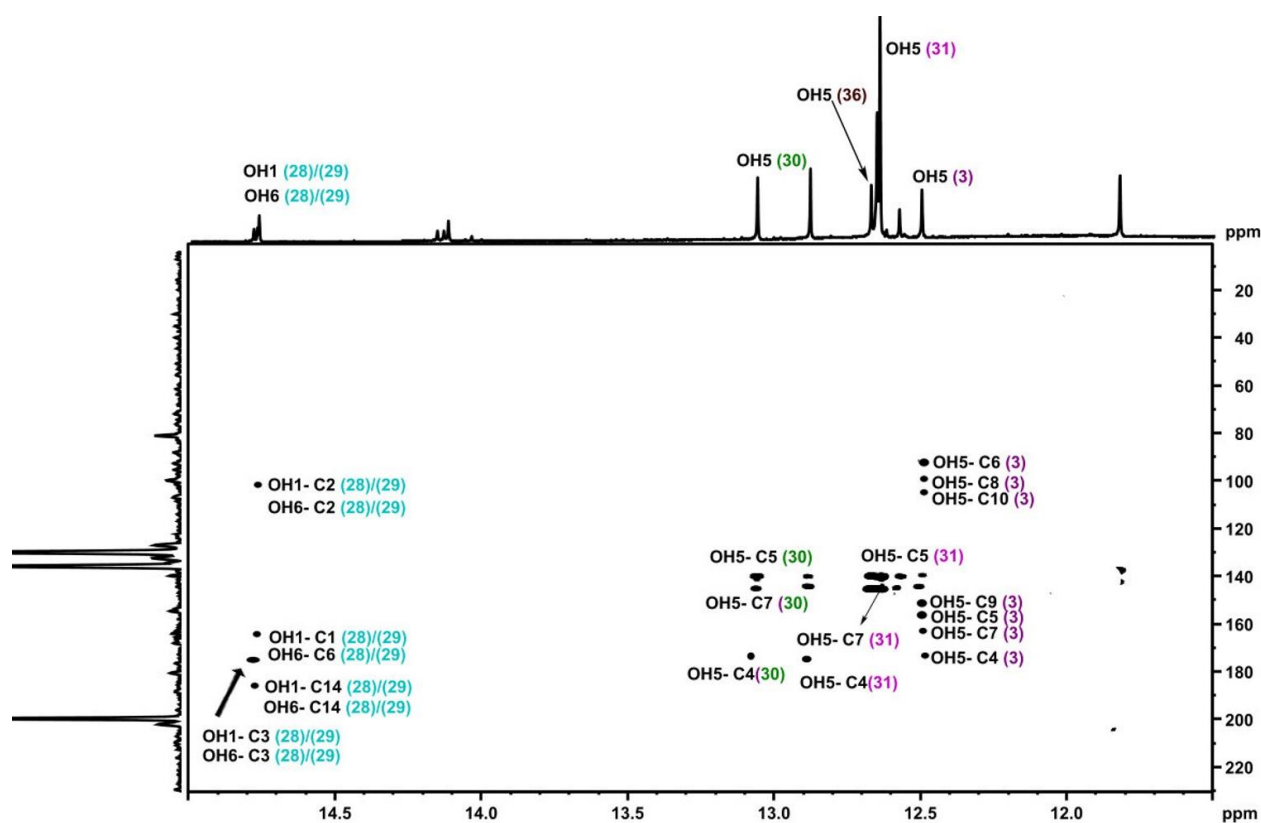
ενώσεις, όπως έχουν ταυτοποιηθεί μέσω συνδυασμού μεθοδολογιών NMR και έχουν συγκριθεί με βάση τη βιβλιογραφία. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις βιοδραστικές ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί.



Σχήμα 3.16: Επιλεγμένη περιοχή (8,00-13,00 ppm) 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR φάσματος στην περιοχή των φαινολικών (-OH) ομάδων, του αιθανολικού εκχυλίσματος της ρίγανης (*Origanum Vulgare*) (20,70 mg σε 500 μL δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο- $\text{DMSO-}d_6$), σε $T=298\text{K}$, αριθμός σαρώσεων:88 και πειραματικός χρόνος: 12h. Τα πειράματα βελτιστοποιήθηκαν ως προς το εύρος των κορυφών ($^nJ_{(1\text{H}, 13\text{C})} = 2,0-2,5 \text{ Hz}$). Έχει γίνει χαρτογράφηση των κορυφών που αντιστοιχούν στις φαινολικές βιοδραστικές ενώσεις, όπως έχουν ταυτοποιηθεί μέσω συνδυασμού μεθοδολογιών NMR και έχουν συγκριθεί με βάση τη βιβλιογραφία. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις βιοδραστικές ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί.



Σχήμα 3.17: Επιλεγμένη περιοχή (8,00-13,00ppm) 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR φάσματος στην περιοχή των φαινολικών (-OH) ομάδων, του αιθανολικού εκχυλίσματος της λαδανιάς (*Cistus Albidus*) (18,70 mg σε 500 μL δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο- $\text{DMSO}-d_6$), σε $T=298\text{K}$, αριθμός σαρώσεων:88 και πειραματικός χρόνος: 12h. Τα πειράματα βελτιστοποιήθηκαν ως προς το εύρος των κορυφών ($^nJ_{(1\text{H}, 13\text{C})}= 2,0-2,5 \text{ Hz}$). Έχει γίνει χαρτογράφηση των κορυφών που αντιστοιχούν στις φαινολικές βιοδραστικές ενώσεις, όπως έχουν ταυτοποιηθεί μέσω συνδυασμού μεθοδολογιών NMR και έχουν συγκριθεί με βάση τη βιβλιογραφία. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις βιοδραστικές ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί.



Σχήμα 3.18: Επιλεγμένη περιοχή (8,00-20,00 ppm) 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR φάσματος στην περιοχή των φαινολικών (-OH) ομάδων, του αιθανολικού εκχυλίσματος του βαλσαμόχορτου (*Hypericum Perforatum*) (25 mg σε 500 μL δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο- $\text{DMSO}-d_6$), σε $T=298\text{K}$, αριθμός σαρώσεων:88 και πειραματικός χρόνος: 12h. Τα πειράματα βελτιστοποιήθηκαν ως προς το εύρος των κορυφών ($^nJ_{(1\text{H}, 13\text{C})}= 2,0-2,5 \text{ Hz}$). Έχει γίνει χαρτογράφηση των κορυφών που αντιστοιχούν στις φαινολικές βιοδραστικές ενώσεις, όπως έχουν ταυτοποιηθεί μέσω συνδυασμού μεθοδολογιών NMR και έχουν συγκριθεί με βάση τη βιβλιογραφία. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις βιοδραστικές ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί.

3.3.5.3 Ποιοτική ανάλυση περιεχομένων συστατικών των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο προσθήκης πρότυπης ουσίας (spiking)

Τα πειράματα προσθήκης πρότυπης ουσίας γνωστής συγκέντρωσης (spiking) έγιναν σε διάλυμα του κάθε εκχυλίσματος σε διαλύτη δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο ($\text{DMSO}-d_6$), προσθέτοντας, τις παρακάτω πρότυπες ουσίες: ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ, ουρσολικό οξύ, ολεανολικό οξύ για τα αιθανολικά εκχυλίσματα του δεντρολίβανου (*Rosmarinus Officinalis*), του φασκόμηλου (*Salvia Officinalis*) και του μελισσόχορτου (*Melissa Officinalis*), ενώ οι παραπάνω

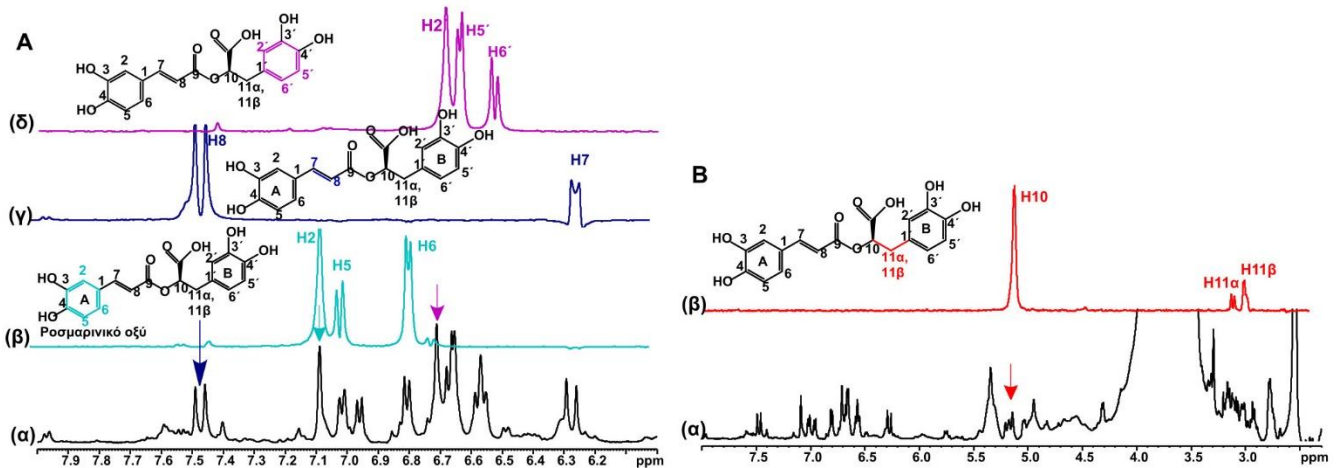
πρότυπες μαζί με την καρβακρόλη εφαρμόστηκαν για τα αιθανολικά εκχυλίσματα της ρίγανης (*Origanum Vulgare*) και του θυμαριού (*Thymus Vulgaris*). Για τη λαδανιά (*Cistus Albidus*) χρησιμοποιήθηκαν η κερκετίνη και το γαλλικό οξύ, ενώ για το βαλσαμόχορτο (*Hypericum Perforatum*) κερκετίνη. Για κάθε εκχύλισμα πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση με την κάθε πρότυπη ένωση, σε συγκεντρώσεις α, και 2α, όπου α είναι η συγκέντρωση του εκάστοτε αναλύτη που έχει προσδιοριστεί από το 1D ¹H NMR φάσμα κάθε εκχυλίσματος, χρησιμοποιώντας ως σημείο αναφοράς εσωτερικό πρότυπο TMS-*d*₄ γνωστής συγκέντρωσης. Η γραμμικότητα της μεθόδου επιβεβαιώθηκε μέσω της κατασκευής γραφικών παραστάσεων μεταξύ της συγκέντρωσης και του λόγου S/N για κάθε ουσία, όπου επιβεβαιώθηκε.

3.3.5.4 Ποιοτική ανάλυση περιεχόμενων συστατικών των εκχυλισμάτων με συνδυασμό μεθόδων προσθήκης πρότυπης ουσίας (spiking)- Selective 1D TOCSY

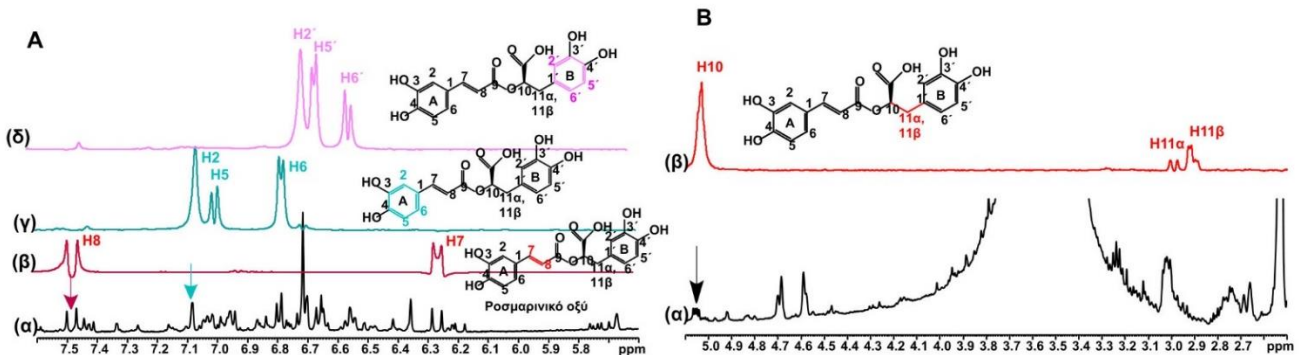
Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται παραδείγματα εφαρμογής των μεθόδων προσθήκης πρότυπης ουσίας γνωστής συγκέντρωσης (spiking) και Selective 1D TOCSY, οι οποίες συνδυάστηκαν για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φυτοχημικών συστατικών, όπου αυτό ήταν εφικτό. Το πλεονέκτημα του πειράματος Selective 1D TOCSY είναι ότι μπορεί να γίνει “απομόνωση” ενός μεμονωμένου φάσματος που ανήκει σ’ ένα συγκεκριμένο σύστημα spin, ακόμη και αν αυτό βρίσκεται σ’ ένα πολύπλοκο μείγμα. Ωστόσο, δύο μειονεκτήματα καθιστούν αυτή τη μεθοδολογία δύσκολη για την ταυτοποίηση όλων των περιεχόμενων συστατικών: **(1)** η έντονη αλληλεπικάλυψη των κορυφών στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων. Αυτό σημαίνει ότι διεγείροντας μια κορυφή που βρίσκεται σε περιοχή που αλληλεπικαλύπτεται με άλλες κορυφές, είναι πιθανή η ταυτόχρονη διέγερση και των άλλων κορυφών, με αποτέλεσμα στο παραγόμενο φάσμα του πειράματος Selective 1D TOCSY, να εμφανίζονται παραπάνω από ένα συστήματα spin. Για το λόγο αυτό, είναι προτιμότερο να διεγείρονται κορυφές που είναι “απομονωμένες” ή σε υπολογίσιμη απόσταση από μια πολυπληθή κορυφή. **(2)** Το πείραμα Selective 1D TOCSY επιτυγχάνεται μεταξύ ομοπυρηνικών ατόμων. Αν το σύστημα spin διακόπτεται από ένα ετεροάτομο ή και από έναν αρωματικό δακτύλιο, η μεταφορά της μαγνήτισης από την κορυφή που διεγέρθηκε διακόπτεται. Ωστόσο, αυτό το μειονέκτημα μπορεί να παρακαμφθεί με επιλεκτική διέγερση σε χαρακτηριστικές κορυφές ενός μορίου που έχουν συγκεκριμένο σύστημα spin, και, αθροίζοντας τα φάσματα, να προκύπτει η ολοκληρωμένη ταυτοποίηση του μελετούμενου μορίου.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ταυτοποίηση του ροσμαρινικού οξέος. Στα **Σχήματα 3.19** και **3.20** απεικονίζεται το πείραμα Selective 1D TOCSY για το ροσμαρινικό οξύ από το εκχύλισμα του μελισσόχορτου. Εφαρμόζοντας αρχικά διέγερση στην κορυφή στα 7,10 ppm, που αντιστοιχεί στο H₂ πρωτόνιο του Α αρωματικού δακτυλίου, προκύπτει το σύστημα spin του Α αρωματικού δακτυλίου. Στη συνέχεια, διεγείροντας το βινυλικό H₈ πρωτόνιο στα 7,50 ppm, εμφανίζεται το σύστημα spin του διπλού δεσμού του μορίου του ροσμαρινικού οξέος. Διεγείροντας έπειτα το H₂’ πρωτόνιο του Β αρωματικού δακτυλίου, εμφανίζεται το αρωματικό σύστημα αυτού του δακτυλίου. Τέλος, διεγείροντας το αλειφατικό H₁₀ πρωτόνιο που βρίσκεται

σε α-θέση ως προς την καρβοξυλομάδα, εμφανίζονται τα διπλανά του πρωτόνια H11α και H11β. Επιβεβαιώνεται με αυτόν τον τρόπο η παρουσία του ροσμαρινικού οξέος στο εκχύλισμα. Με τον ίδιο τρόπο επιβεβαιώθηκε η παρουσία του ροσμαρινικού οξέος και στο εκχύλισμα του δεντρολίβανου, του φασκόμηλου, της ρίγανης και του θυμαριού.



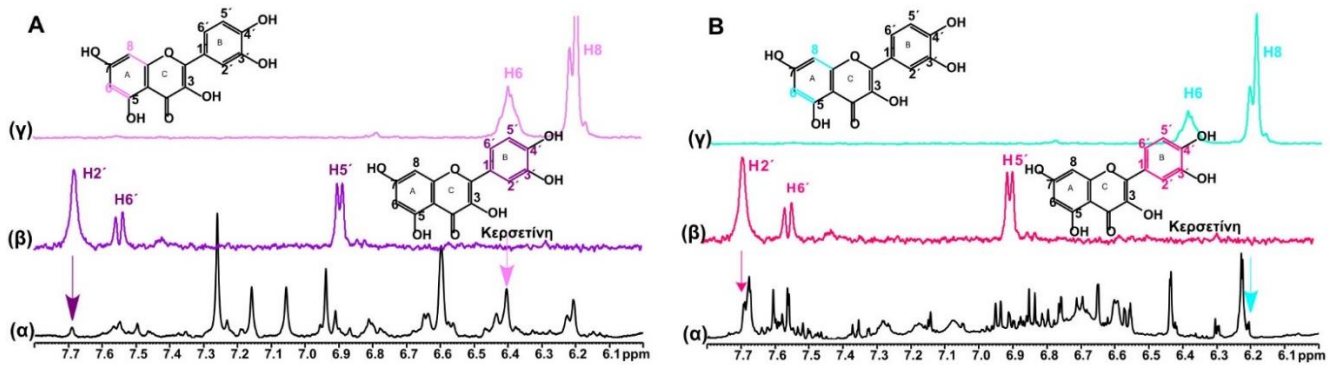
Σχήμα 3.19: A: Επιλεγμένη περιοχή (7,00-8,00 ppm): (α) 1D ^1H NMR φάσματος του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis* σε διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$, **(β)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 7,10 ppm, **(γ)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 7,50 ppm, **(δ)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 6,75 ppm. **B: Επιλεγμένη περιοχή (2,50-8,00 ppm) (α)** 1D ^1H NMR φάσματος του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis* σε διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$, **(β)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση στην κορυφή στα 5,05 ppm. Σε όλα τα 1D Selective TOCSY φάσματα έχει εφαρμοστεί χρόνος ανάμειξης (t_m) =200 ms. Τα βέλη δείχνουν τις κορυφές των πρωτονίων που έχουν διεγερθεί.



Σχήμα 3.20: A: Επιλεγμένη περιοχή (7,00-8,00 ppm): (α) 1D ^1H NMR φάσματος του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Rosmarinus Officinalis* σε διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$, **(β)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 7,10 ppm, **(γ)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 7,50 ppm, **(δ)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 6,75 ppm. **B: Επιλεγμένη περιοχή (2,5-8,00 ppm) (α)** 1D ^1H NMR φάσματος του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Rosmarinus Officinalis* σε διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$, **(β)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 5,05 ppm. Σε όλα τα 1D Selective TOCSY πειράματα έχει εφαρμοστεί χρόνος ανάμειξης (t_m) =200 ms και αριθμός σαρώσεων:64. Τα βέλη δείχνουν τις κορυφές των πρωτονίων που έχουν διεγερθεί.

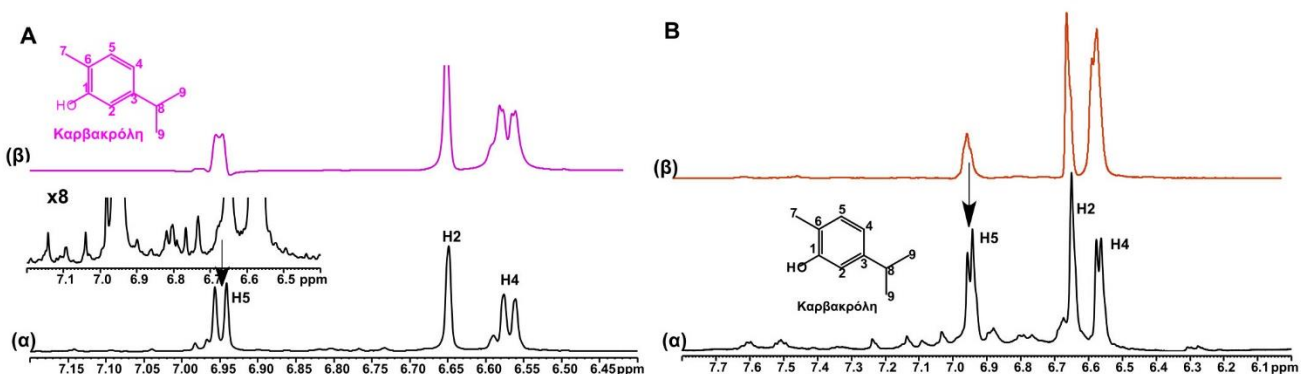
Ένα άλλο παράδειγμα εφαρμογής του πειράματος Selective 1D TOCSY είναι η περίπτωση της κερκετίνης για το αιθανολικό εκχύλισμα της λαδανιάς και του βαλσαμόχορτου. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.21**, με διέγερση του H2' πρωτονίου στα 7,75 ppm, ξετυλίγεται το

σύστημα spin του αρωματικού δακτυλίου B. Αντίστοιχα, με επιλεκτική διέγερση του πρωτονίου H6, εμφανίζεται το σύστημα spin του πρωτονίου αυτού, που ανήκει στον αρωματικό δακτύλιο C.



Σχήμα 3.21: A: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-7,80 ppm): (α) 1D ^1H NMR φάσματος του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus Albidus* σε διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$, **(β)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 7,75 ppm, **(γ)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 6,45 ppm. **B: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-7,80 ppm) (α)** 1D ^1H NMR φάσματος του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Hypericum Perforatum* σε διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$, **(β)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 7,75 ppm, **(β)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 6,45 ppm. Σε όλα τα 1D Selective TOCSY πειράματα έχει εφαρμοστεί χρόνος ανάμειξης (t_m) = 200 ms και αριθμός σαρώσεων:64. Τα βέλη δείχνουν τις κορυφές των πρωτονίων που έχουν διεγερθεί.

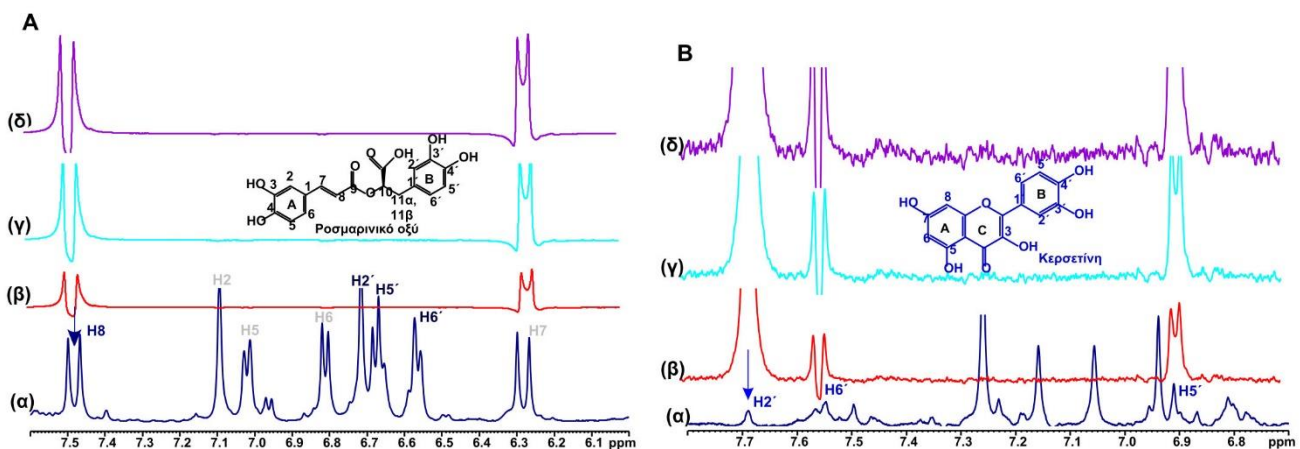
Το ίδιο φαινόμενο ισχύει και στην περίπτωση της καρβακρόλης, όπως δοκιμάστηκε για τα αιθανολικά εκχυλίσματα του θυμαριού και της ρίγανης (**Σχήμα 3.17**). Επιλεκτική διέγερση του H5 πρωτονίου, εμφάνισε όλο το σύστημα spin του, το οποίο αντιστοιχεί στο φάσμα της καρβακρόλης. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα των πειραμάτων Selective 1D TOCSY επιβεβαιώθηκαν με φάσματα προτύπων ουσιών, προκειμένου να επαληθευτεί η ταυτοποίηση τους.



Σχήμα 3.22: A: Επιλεγμένη περιοχή (6,40-7,20 ppm): (α) 1D ^1H NMR φάσματος του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Thymus Vulgaris* σε διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$, **(β)** Εφαρμογή Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 6,95 ppm. **B: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-7,80 ppm) (α)** 1D ^1H NMR φάσματος του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Origanum Vulgare* σε διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$, **(β)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 6,95 ppm. Σε όλα τα 1D Selective TOCSY πειράματα έχει εφαρμοστεί χρόνος ανάμειξης (t_m) = 200 ms και αριθμός σαρώσεων:64. Τα βέλη δείχνουν τις κορυφές των πρωτονίων που έχουν διεγερθεί.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα του πειράματος Selective 1D TOCSY για τις φλαβονοειδείς ενώσεις που επιλέχθηκαν για να μελετηθούν, πραγματοποιήθηκαν πειράματα πιλοδότησης με διαλύματα πρότυπων ουσιών σε συγκεντρώσεις α και 2α αντίστοιχα, και επαληθεύτηκε κάθε φορά το πείραμα Selective 1D TOCSY.

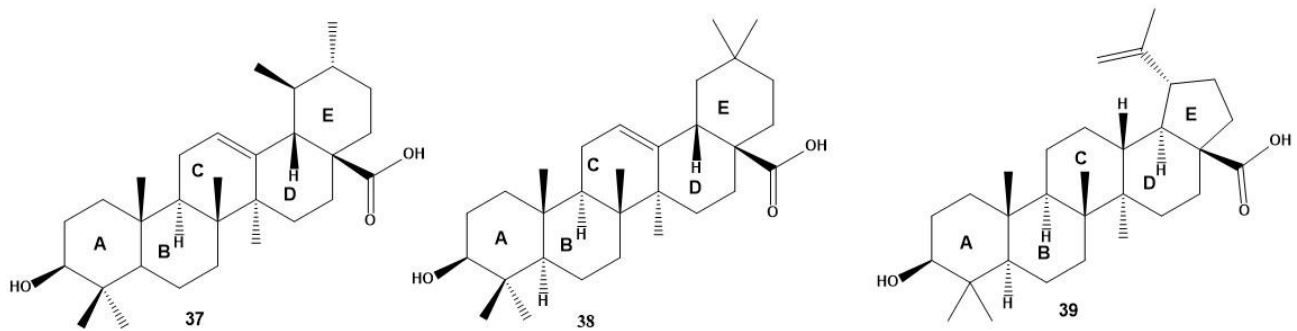
Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι υπάρχει μια αύξηση στην ένταση της κορυφής του πρωτονίου που διεγείρεται, κάθε φορά που αυξάνεται η συγκέντρωση της πρότυπης ουσίας. Στο **Σχήμα 3.23** παρατίθεται αντιπροσωπευτικό παράδειγμα του συνδυασμού των μεθόδων Selective 1D TOCSY και spiking για δύο διαφορετικές ενώσεις και δύο διαφορετικά εκχυλίσματα: το ροσμαρινικό οξύ για το μελισσόχορτο και η κερκετίνη για τη λαδανιά.



Σχήμα 3.23: A: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-7.60 ppm): (α) 1D ^1H NMR φάσματος του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis* σε διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$, **(β)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 7,50 ppm, **(γ)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 7,50 ppm όταν έχει προστεθεί α συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος και **(δ)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 7,50 ppm, όταν έχει προστεθεί 2α συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος. **B: Επιλεγμένη περιοχή (6.30-7.80 ppm) (α)** 1D ^1H NMR φάσματος του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus Albidus* σε διαλύτη $\text{DMSO-}d_6$, **(β)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 7,70 ppm. **(γ)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 7,70 ppm όταν έχει προστεθεί α συγκέντρωση κερκετίνης, **(δ)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 7,70 ppm όταν έχει προστεθεί 2α συγκέντρωση κερκετίνης. Σε όλα τα 1D Selective TOCSY πειράματα έχει εφαρμοστεί χρόνος ανάμειξης=200 ms και αριθμός σαρώσεων:64. Τα βέλη δείχνουν τις κορυφές των πρωτονίων που έχουν διεγερθεί.

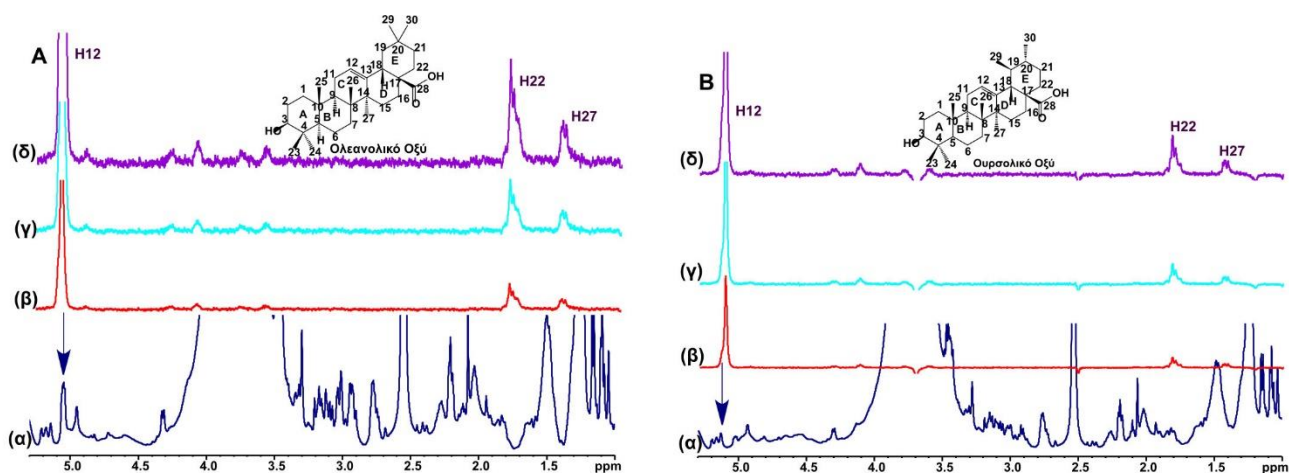
Όπως προκύπτει από το **Σχήμα 3.23**, σε κάθε περίπτωση υπάρχει μια αύξουσα συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης της πρότυπης ουσίας που προστίθεται κάθε φορά και της έντασης της κορυφής του πρωτονίου που διεγείρεται κάθε φορά. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι το πείραμα Selective 1D TOCSY ήταν επιτυχές σε αυτές τις περιπτώσεις.

Ο συνδυασμός αυτών των μεθοδολογιών εφαρμόστηκε επίσης με επιτυχία και στην περίπτωση της ταυτοποίησης των τριτερπενίων ολεανολικό οξύ και ουρσολικό οξύ για τα εκχυλίσματα στα οποία περιέχονται (**Σχήμα 3.24**). Πρόκειται για δύο τριτερπένια τα οποία παρουσιάζουν ισομέρεια θέσης στον δακτύλιο E, όπου διαφέρουν κατά μία μεθυλομάδα και έχουν μελετηθεί εκτεταμένα για τις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές και άλλες βιολογικές ιδιότητές τους.



Σχήμα 3.24: Δομές των τριτερπενοειδών ενώσεων: **(37)** ουρσολικό οξύ, **(38)** ολεανολικό οξύ, **(39)** μππετουλινικό οξύ, που έχουν ταυτοποιηθεί στα αιθανολικά εκχυλίσματα.

Καθώς πρόκειται για ισομερή θέσης, τα πρωτόνια τους εμφανίζουν παρόμοιες μεν αλλά χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις. Ωστόσο, σε δείγματα φυτικών εκχυλισμάτων που έχουν έντονο το φαινόμενο της αλληλεπικάλυψης, υπάρχει πολλές φορές ο κίνδυνος να μην είναι δυνατή η ταυτοποίησή τους. Η χαρακτηριστική διαφορά που παρουσιάζουν είναι η χημική μετατόπιση του αλλυλικού πρωτονίου H18, όπου για το ολεανολικό οξύ εμφανίζεται στα 2,93 ppm, ενώ για το ουρσολικό οξύ εμφανίζεται στα 2,18 ppm, σε διαλύτη DMSO- d_6 . Άλλη χαρακτηριστική χημική μετατόπιση είναι αυτή του πρωτονίου H12, το οποίο εμφανίζεται στα 5,17 ppm για το ολεανολικό οξύ και στα 5,15 ppm για το ουρσολικό οξύ. Εφαρμόζοντας συνδυασμό των δύο μεθόδων για τα αιθανολικά εκχυλίσματα του μελισσόχορτου, του δεντρολίβανου, του φασκόμηλου, του θυμαριού και της ρίγανης, τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί ότι περιέχουν σημαντικές ποσότητες ολεανολικού και ουρσολικού οξέος, και διεγείροντας το πρωτόνιο H12 στα 5,17 και 5,15 ppm κάθε φορά, ήταν δυνατή η διάκριση του συστήματος spin για κάθε μόριο ξεχωριστά (**Σχήμα 3.25**).

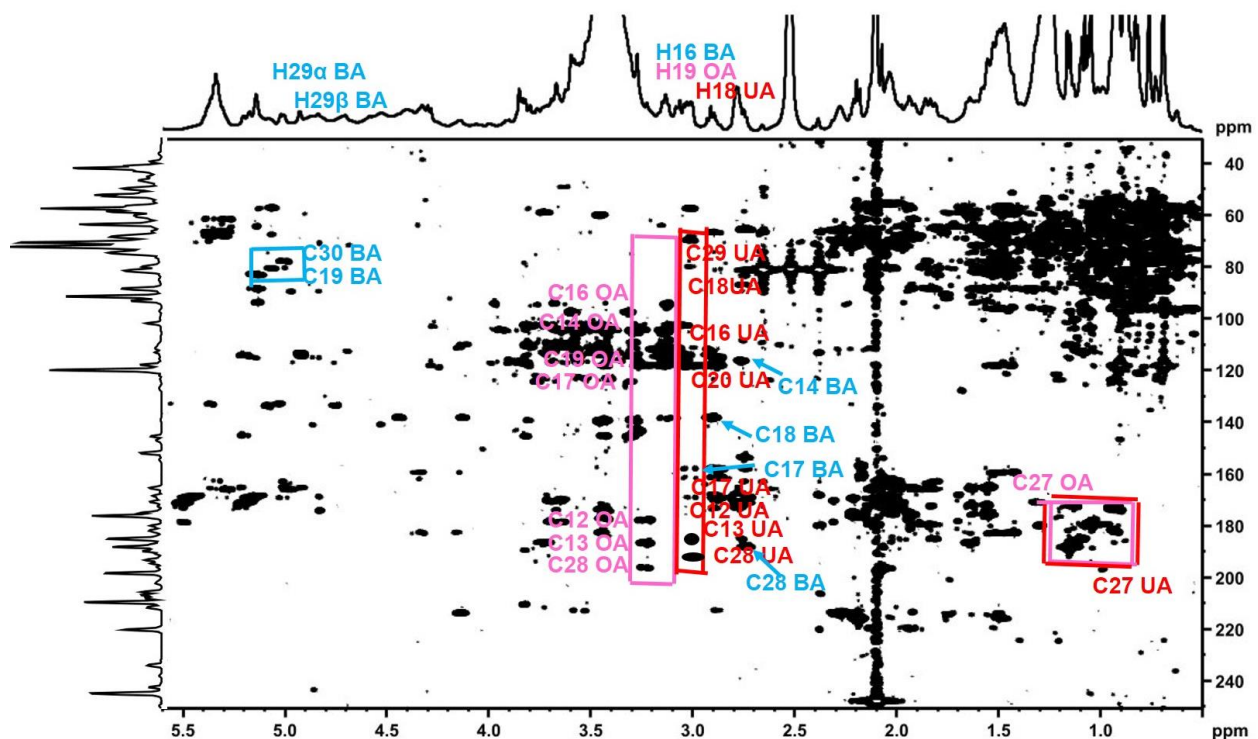


Σχήμα 3.25: A: Επιλεγμένη περιοχή (1,00-5,30 ppm): (α) 1D ^1H NMR φάσματος του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis* σε διαλύτη DMSO- d_6 , **(β)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 5,17 ppm, **(γ)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 5,17 ppm όταν έχει προστεθεί α συγκέντρωση ολεανολικού οξέος και **(δ)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 5,17 ppm, όταν έχει προστεθεί 2 α συγκέντρωση ολεανολικού οξέος. **B: Επιλεγμένη περιοχή (1,00-5,30 ppm) (α)** 1D ^1H NMR φάσματος του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis* σε διαλύτη DMSO- d_6 , **(β)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 5,15 ppm, **(γ)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 5,15 ppm όταν έχει προστεθεί α συγκέντρωση ουρσολικού οξέος, **(δ)** Selective 1D TOCSY φάσμα με διέγερση της κορυφής στα 5,15 ppm όταν έχει προστεθεί 2α συγκέντρωση ουρσολικού οξέος. Σε όλα τα 1D Selective TOCSY

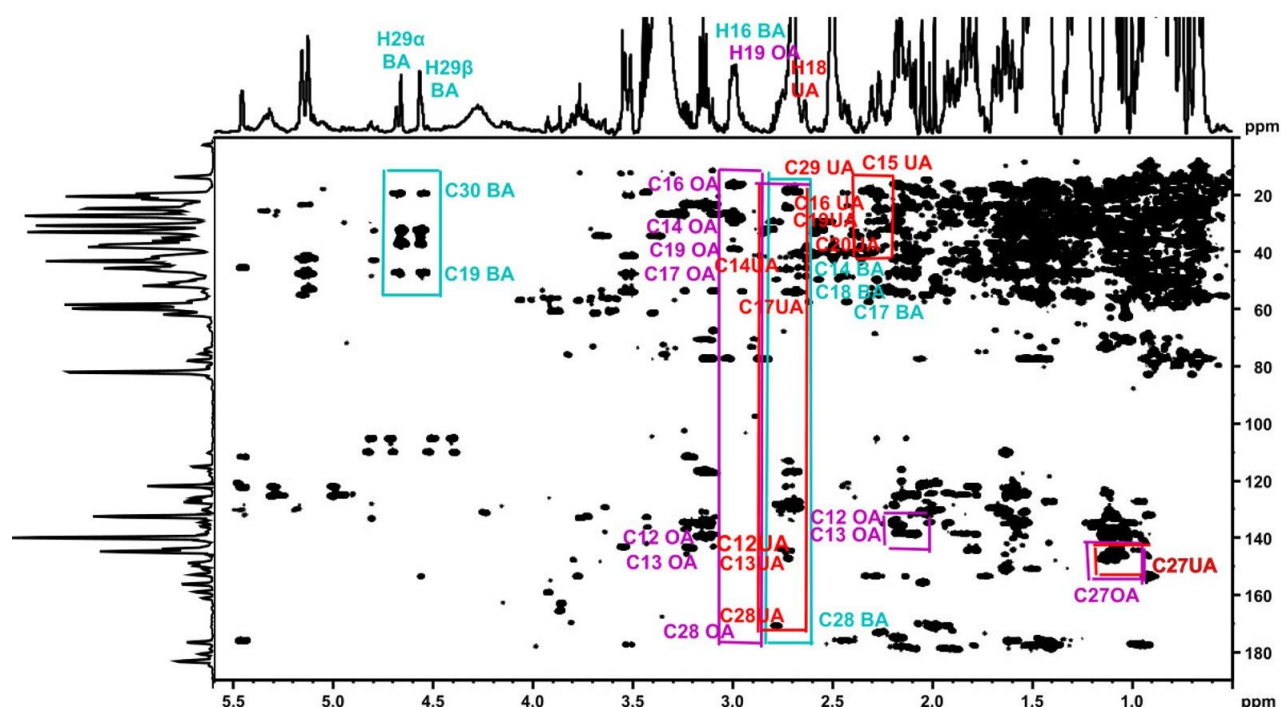
πειράματα έχει εφαρμοστεί χρόνος ανάμειξης=200 ms και αριθμός σαρώσεων:64. Τα βέλη δείχνουν τις κορυφές των πρωτονίων που έχουν διεγερθεί.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.25** υπάρχει συσχέτιση της αύξησης της έντασης της κορυφής όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της πρότυπης ουσίας που προστίθεται κάθε φορά.

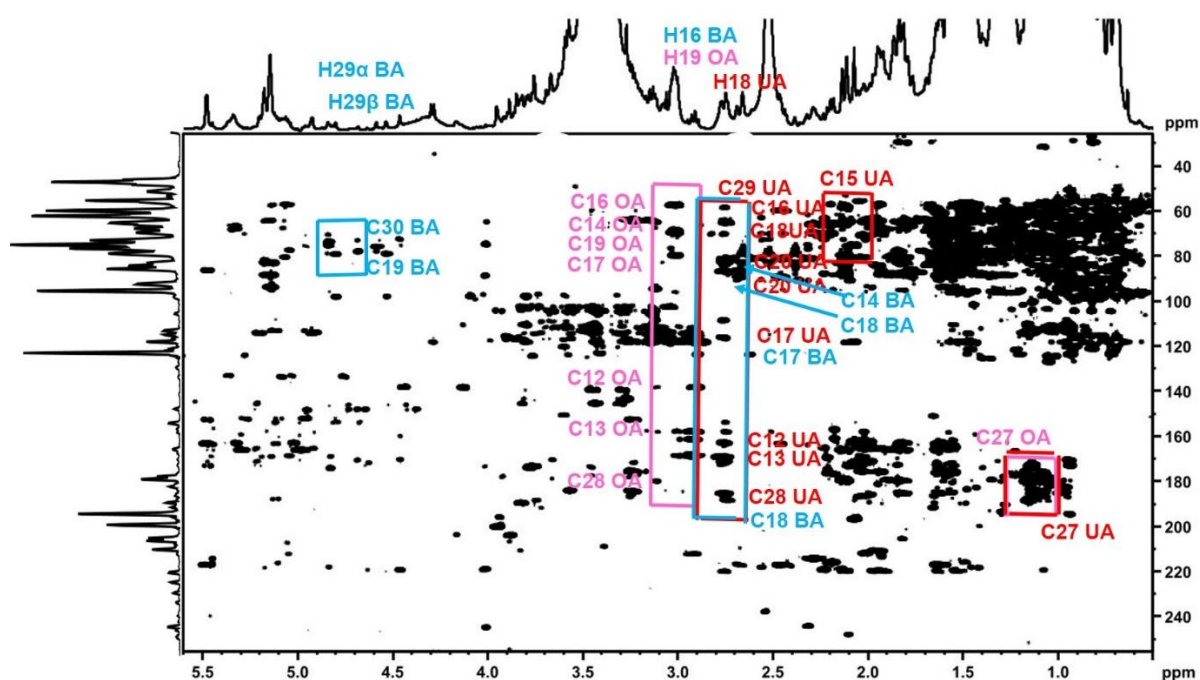
Από την άλλη, εκτός από τα δύο τριτερπένια, σε μεγάλο ποσοστό υπάρχει και το μπετουλινικό οξύ, το οποίο παρουσιάζει επίσης χαρακτηριστικές μετατοπίσεις. Στο ^1H - ^{13}C HMBC φάσμα, η ταυτοποίηση των ανθράκων που βρίσκονται μέσα στο σύστημα spin των πρωτονίων H18 για κάθε μόριο, ήταν επιτυχής για τα εκχυλίσματα του μελισσόχορτου, του δεντρολίβανου, του φασκόμηλου, του θυμαριού και της ρίγανης (**Σχήματα 3.26-3.30**).



Σχήμα 3.26: Επιλεγμένη περιοχή (0,5-5,05 ppm) 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR φάσματος όπου διακρίνεται η ταυτοποίηση και των τριών τριτερπενίων: ουρσολικό οξύ, ολεανολικό οξύ και μπετουλινικό οξύ του αιθανολικού εκχυλίσματος του μελισσόχορτου (*Melissa Officinalis*) (18,0 mg) σε 500 μL δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο- $\text{DMSO-}d_6$), σε $T=298\text{K}$, αριθμός σαρώσεων:88 και πειραματικός χρόνος: 12h. Τα πειράματα βελτιστοποιήθηκαν ως προς το εύρος των κορυφών ($^nJ_{(H,^{13}C)}= 2,0-2,5$ Hz). Έχει γίνει χαρτογράφηση των κορυφών που αντιστοιχούν στις τρεις τερπενοειδείς ενώσεις, όπως έχουν ταυτοποιηθεί μέσω συνδυασμό μεθοδολογιών NMR και έχουν συγκριθεί με βάση τη βιβλιογραφία. Όπου: **OA:** Ολεανολικό οξύ, **UA:** Ουρσολικό οξύ και **BA:** Μπετουλινικό οξύ.

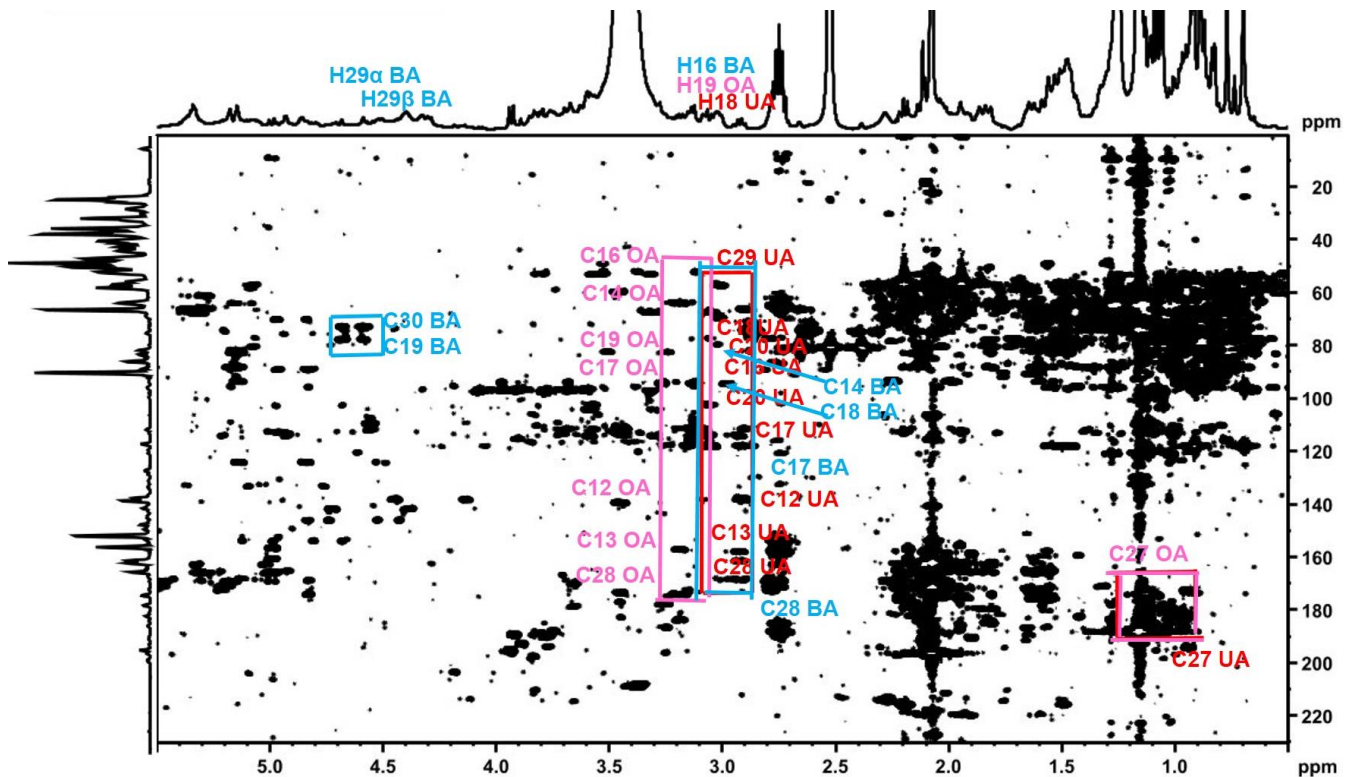


Σχήμα 3.27: Επιλεγμένη περιοχή (0,5-5,05 ppm) 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR φάσματος όπου διακρίνεται η ταυτοποίηση και των τριών τριτερπενίων: ουρσολικό οξύ, ολεανολικό οξύ και μπετουλινικό οξύ του αιθανολικού εκχυλίσματος του δεντρολίβανου (*Rosmarinus Officinalis*) (19,50 mg) σε 500 μL δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο- $\text{DMSO-}d_6$), σε $T=298\text{K}$, αριθμός σαρώσεων:88 και πειραματικός χρόνος: 12h. Τα πειράματα βελτιστοποιήθηκαν ως προς το εύρος των κορυφών ($^nJ_{(H,^{13}O)}=2,0\text{-}2,5\text{ Hz}$). Έχει γίνει χαρτογράφηση των κορυφών που αντιστοιχούν στις τρεις τερπενοειδείς ενώσεις, όπως έχουν ταυτοποιηθεί μέσω συνδυασμό μεθοδολογιών NMR και έχουν συγκριθεί με βάση τη βιβλιογραφία. Όπου: **OA:** Ολεανολικό οξύ, **UA:** Ουρσολικό οξύ και **BA:** Μπετουλινικό οξύ.

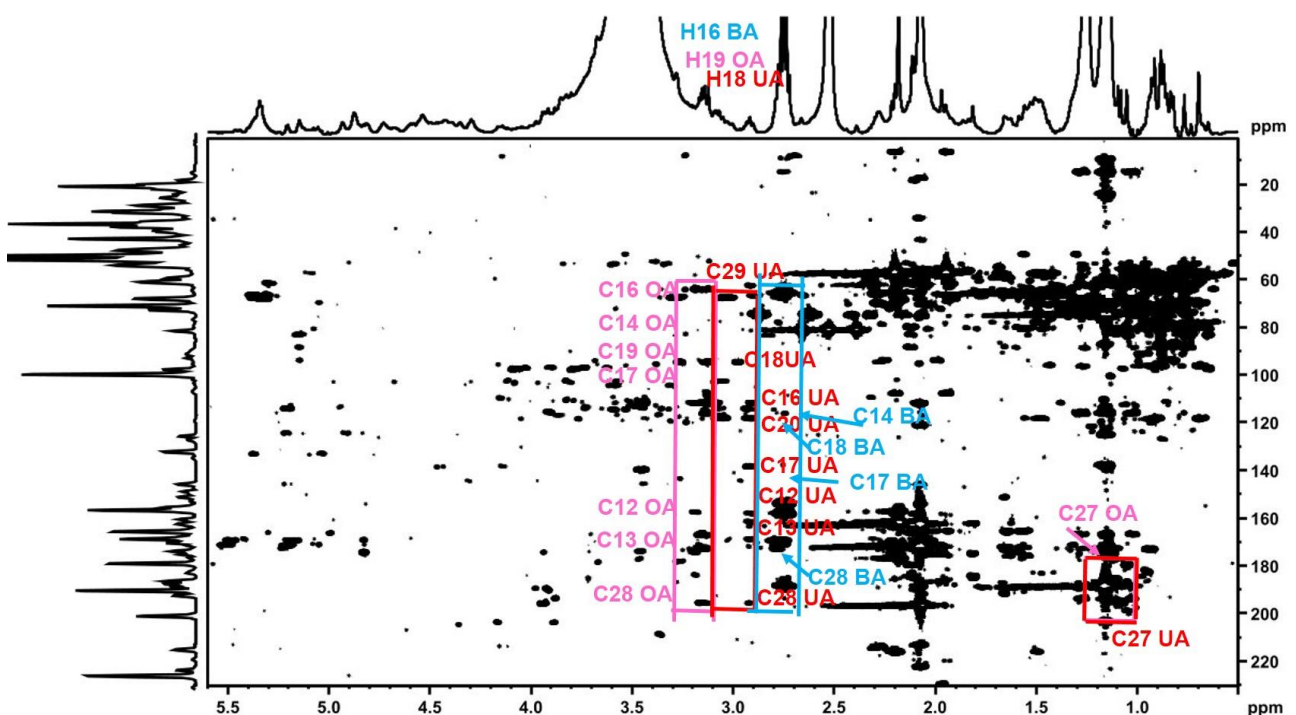


Σχήμα 3.28: Επιλεγμένη περιοχή (0,5-5,05 ppm) 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR φάσματος όπου διακρίνεται η ταυτοποίηση και των τριών τριτερπενίων: ουρσολικό οξύ, ολεανολικό οξύ και μπετουλινικό οξύ του αιθανολικού εκχυλίσματος του φασκόμηλου (*Salvia Officinalis*) (20,50 mg) σε 500 μL δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο- $\text{DMSO-}d_6$), σε $T=298\text{K}$, αριθμός σαρώσεων:88 και πειραματικός χρόνος: 12h. Τα πειράματα βελτιστοποιήθηκαν ως προς το εύρος των κορυφών ($^nJ_{(H,^{13}O)}=2,0\text{-}2,5\text{ Hz}$). Έχει γίνει χαρτογράφηση των κορυφών που αντιστοιχούν στις τρεις τερπενοειδείς ενώσεις, όπως έχουν

ταυτοποιηθεί μέσω συνδυασμό μεθοδολογιών NMR και έχουν συγκριθεί με βάση τη βιβλιογραφία. Όπου: **OA**: Ολεανολικό οξύ, **UA**: Ουρσολικό οξύ και **BA**: Μπετουλινικό οξύ.



Σχήμα 3.29: Επιλεγμένη περιοχή (0,5-5,05 ppm) 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR φάσματος όπου διακρίνεται η ταυτοποίηση και των τριών τριτερπενίων: ουρσολικό οξύ, ολεανολικό οξύ και μπετουλινικό οξύ του αιθανολικού εκχυλίσματος του θυμαριού (*Thymus Vulgaris*) (19,40 mg) σε 500 μL δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο- $\text{DMSO}-d_6$, σε $T=298\text{K}$, αριθμός σαρώσεων:88 και πειραματικός χρόνος: 12h. Τα πειράματα βελτιστοποιήθηκαν ως προς το εύρος των κορυφών ($^nJ_{(H,^{13}C)}=2,0-2,5\text{ Hz}$). Έχει γίνει χαρτογράφηση των κορυφών που αντιστοιχούν στις τρεις τερπενοειδείς ενώσεις, όπως έχουν ταυτοποιηθεί μέσω συνδυασμό μεθοδολογιών NMR και έχουν συγκριθεί με βάση τη βιβλιογραφία. Όπου: **OA**: Ολεανολικό οξύ, **UA**: Ουρσολικό οξύ και **BA**: Μπετουλινικό οξύ.



Σχήμα 3.30: Επιλεγμένη περιοχή (0,5-5,05 ppm) 2D ^1H - ^{13}C HMBC NMR φάσματος όπου διακρίνεται η ταυτοποίηση και των τριών τριτερπενίων: ουρσολικό οξύ, ολεανολικό οξύ και μπετουλινικό οξύ του αιθανολικού εκχυλίσματος της ρίγανης (*Origanum Vulgare*) (20,70 mg) σε 500 μL δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο- $\text{DMSO-}d_6$), σε $T=298\text{K}$, αριθμός σαρώσεων:88 και πειραματικός χρόνος: 12h. Τα πειράματα βελτιστοποιήθηκαν ως προς το εύρος των κορυφών ($^nJ_{(H,^{13}O)}= 2,0-2,5 \text{ Hz}$). Έχει γίνει χαρτογράφηση των κορυφών που αντιστοιχούν στις τρεις τερπενοειδείς ενώσεις, όπως έχουν ταυτοποιηθεί μέσω συνδυασμό μεθοδολογιών NMR και έχουν συγκριθεί με βάση τη βιβλιογραφία. Όπου: **OA**: Ολεανολικό οξύ, **UA**: Ουρσολικό οξύ και **BA**: Μπετουλινικό οξύ.

3.3.5.5 Ποσοτικός προσδιορισμός των δευτερογενών μεταβολιτών στα αιθανολικά φυτικά εκχυλίσματα μέσω μεθοδολογιών της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Ο χαρακτηρισμός του φυτοχημικού προφίλ πολύπλοκων μειγμάτων και ο προσδιορισμός των δευτερογενών μεταβολιτών τους αποτελεί το ενδιαφέρον αρκετών αναλυτικών τεχνικών, οι οποίες έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία όχι μόνο σε φάρμακα, αλλά και σε φυτικά εκχυλίσματα, αλλά και σε αιθέρια έλαια. Η φασματοσκοπία 1D ^1H NMR μπορεί να θεωρηθεί ως ένα ακριβές εργαλείο ποσοτικοποίησης των φυσικών προϊόντων. Χρησιμοποιώντας εσωτερικό πρότυπο γνωστής συγκέντρωσης, είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση των επιμέρους συστατικών, όπου αυτό είναι εφικτό λόγω της έντονης αλληλεπικάλυψης των κορυφών. Επιπλέον, η διάκριση των κορυφών που αντιστοιχούν στις φαινολικές (-OH) ομάδες, λόγω της τιτλοδότησης των εκχυλισμάτων με διάλυμα TFA-*d*, συνέβαλε στη διάκριση και στον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών. Εκτός από τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή, έγινε ποσοτικός προσδιορισμός και των τριτερπενίων ολεανολικό οξύ, ουρσολικό οξύ και μπετουλινικό οξύ. Οι συγκεντρώσεις των συστατικών για κάθε αιθανολικό εκχύλισμα, παρατίθενται στον **Πίνακα 3.1** και έχουν εκφραστεί σε mg ουσίας/g εκχυλίσματος.

Πίνακας 3.1: Φυσιικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν ταυτοποιηθεί στα αιθανολικά εκχυλίσματα των μελετούμενων φυτών.

A/A	Δευτερογενής Μεταβολίτης	<i>Melissa Officinalis</i> *	<i>Rosmarinus Officinalis</i> *	<i>Salvia Officinalis</i> *	<i>Thymus Vulgaris</i> *	<i>Origanum Vulgare</i> *	<i>Cistus Albidus</i> *	<i>Hypericum Perforatum</i> *
ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΛΙΚΑ ΟΞΕΑ								
1	Λουτεολίνη	-	4,32	1,58	0,29	0,71	0,33	-
2	Απιγενίνη	0,88	3,58	1,83	2,72	1,32	0,41	-
3	Κερκετίνη	-	-	-	0,39	2,32	0,35	1,97
4	Ναρινγενίνη	-	-	-	-	3,87	-	-
5	Ταξιφολίνη	-	-	-	-	3,68	-	-
6	Αρωμαδεन्द्रίνη	-	-	-	-	4,68	-	-
7	Γλυκοζιτής Λουτεολίνης	-	8,64	7,93	5,19	-	-	-
8	Γλυκοζιτής Απιγενίνης	5,21	1,35	6,00	5,19	-	0,92	-
9	Ροσμαρινικό Οξύ	129,67	20,82	29,05	26,83	35,38	-	-
10	Καφεϊκό οξύ	32,82	5,74	7,61	6,99	0,61	-	-
11	Εριοδικτυόλη	218,29	-	-	-	5,56	-	-
12	Καμφερόλη	-	-	-	0,85	2,34	-	-
13	4',5,6-τριυδροξυ-7,8-διμεθοξυφλαβόνη	-	-	-	-	1,87	-	-
14	Υδροξυλιωμένη φλαβόνη	1,83	-	-	-	-	-	-
15	3,5,7-τριυδροξυ-3',4',5'-τριμεθοξυφλαβόνη,	-	1,12	0,075	-	-	-	-
16	4',5,6-τριυδροξυ-7-μεθοξυφλαβόνη,	-	-	-	0,79	-	-	-
17	5,6-διυδροξυ-4',7-διμεθοξυφλαβόνη	-	-	-	-	2,50	-	-
18	5,6-διυδροξυ-3',4',7-τριμεθοξυφλαβόνη	-	1,13	-	-	2,59	1,07	-
19	Καρβακρόλη	-	-	-	218,15	153,92	-	--
20	παρα-κουμαρικό οξύ	-	-	-	6,91	-	-	-
21	Θυμόλη	-	-	-	0,36	1,02	-	-
22	Καρνοσικό οξύ	-	42,32	28,22	1,22	-	-	-
23	Γαλλικό οξύ	-	-	-	-	-	7,26	-
24	παρα-κυμενιο-2,3-διόλη	-	-	-	12,75	1,89	-	-
25	Ροσμαδιάλη	-	1,24	-	-	-	-	-
26	5'-διμερες-παρα-κυμενιο-2,3-διόλη	-	-	-	4,84	3,80	-	-
27	Εσπεριδίνη	-	-	-	29,21	-	-	-
28	Υπερικήνη	-	-	-	-	-	-	1,48
29	Ψευδοϋπερικήνη	-	-	-	-	-	-	0,71
30	Ισπιδουλίνη	-	-	-	-	-	-	4,58
31	Ισοκερκιτρίνη	-	-	-	-	-	-	9,91
32	Κερκπρίνη	-	-	-	-	-	1,73	12,90
33	3',4',5',7'-τετραϋδροξυ-3-μεθοξυφλαβόνη	-	-	-	-	-	3,87	-
34	Μυρισετίνη	-	-	-	-	-	-	-
35	Ρουτίνη	-	-	-	-	-	4,83	-
36	Υπεροσίδη	-	-	-	-	-	-	9,49
ΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΗ								
37	Ουρσολικό οξύ	122,28	76,93	169,27	23,64	18,57	-	-
38	Ολεανολικό οξύ	91,87	191,63	94,33	4,20	6,67	-	-
39	Μπετουλινικό οξύ	326,79	45,27	18,52	3,05	13,83	-	-

*Οι συγκεντρώσεις εκφράζονται σε mg/g ξηρού εκχυλίσματος

Όλα τα παραπάνω δεδομένα, αποδεικνύουν τη σημαντική συνεισφορά που έχει η φασματοσκοπία NMR στο χαρακτηρισμό και στον ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων, όταν αυτές περιέχονται σε πολύπλοκα μείγματα, όπως τα φυτικά εκχυλίσματα. Με το συνδυασμό της μεθοδολογίας NMR-TotPhe και 2D NMR μεθοδολογιών είναι δυνατή η διάκριση ουσιών που έχουν παρόμοιες δομές, καθώς για κάθε ουσία υπάρχει ένα πρωτόνιο που έχει χαρακτηριστική χημική μετατόπιση που την κάνει να ξεχωρίζει από τις υπόλοιπες. Τέτοιο πρωτόνιο είναι και το πρωτόνιο της φαινολικής (-OH) ομάδας, το οποίο έχει χαρακτηριστικό σύστημα spin για κάθε φλαβονοειδές ή φαινολικό οξύ.

Γενικά Συμπεράσματα Κεφαλαίου

Σε αυτό το Κεφάλαιο περιγράφηκε η ανάπτυξη και εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-TotPhe για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών ομάδων των φυτικών εκχυλισμάτων. Η στοιχειοθέτηση αυτής της μεθοδολογίας έγινε αρχικά σ' ένα σύνολο πρότυπων ενώσεων και μειγμάτων και στη συνέχεια σε δύο πολύπλοκα φυτικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεθοδολογία NMR-TotPhe παρουσιάζει γραμμικότητα ως προς τις θεωρητικές και πειραματικές συγκεντρώσεις των φαινολικών ομάδων, κάτι που δεν ισχύει στη μεθοδολογία Folin-Ciocalteu. Περαιτέρω πειράματα που εκτελέστηκαν *in vitro* σε κύτταρα U2OS, για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας αυτών των ουσιών, όταν τα κύτταρα έχουν υποστεί επίδραση με H₂O₂, επιβεβαίωσε τη γραμμικότητα της αντιοξειδωτικής δράσης με τη συγκέντρωση των φαινολικών (-OH) ομάδων. Στην περίπτωση των φυτικών εκχυλισμάτων, οι δύο μεθοδολογίες παρουσιάζουν διαφορετικά αποτελέσματα ως προς το συνολικό περιεχόμενο των φαινολικών (-OH) ομάδων. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι το ειδικό αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu μπορεί να ανάγει οποιαδήποτε λειτουργική ομάδα μπορεί να αναχθεί, με αποτέλεσμα να μην περιορίζεται μόνο στις φαινολικές ενώσεις. Στη συνέχεια, η μεθοδολογία NMR-TotPhe συνδυάστηκε και με άλλες μεθοδολογίες της φασματοσκοπίας NMR, προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση των επιμέρους φαινολικών συστατικών στα επτά αιθανολικά εκχυλίσματα. Στο σύνολο των επτά αιθανολικών εκχυλισμάτων προσδιορίστηκαν 39 ενώσεις (φλαβονοειδή, γλυκοζίτες αυτών, φαινολικά οξέα και τερπενοειδή). Χρησιμοποιώντας εσωτερικό πρότυπο TMSP-*d*₄ γνωστής συγκέντρωσης, και αξιοποιώντας τη μεθοδολογία NMR-TotPhe πραγματοποιήθηκε και ποσοστικός προσδιορισμός αυτών των ενώσεων στα εκχυλίσματα.

Κεφάλαιο 4: Φυσικά προϊόντα που στοχεύουν την ελαστικότητα, την υαλουρονιδάση και την τυροσινάση: Ανάπτυξη της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων ANTIAGE-DB για την πρόβλεψη συστατικών με αντιγηραντική δράση

4.1 Εισαγωγή

Το δέρμα αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο που περιβάλλει το ανθρώπινο σώμα. Ο βασικότερος ρόλος του είναι να λειτουργεί ως βασική ασπίδα για το ανθρώπινο σώμα, καθώς το προστατεύει από την ακτινοβολία UV και από την εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών. Αρκετά ένζυμα, ανάμεσά στα οποία βρίσκονται η ελασάση, η υαλουρονιδάση και η τυροσινάση διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του δέρματος. Μεταξύ των συστατικών του συνδετικού ιστού, οι πρωτεΐνες ελαστίνη και κολλαγόνο, καθώς επίσης και το πολυμερές υαλουρονικό οξύ και η χρωστική μελανίνη, διαδραματίζουν πολύ ζωτικό ρόλο στη ρύθμιση της ελαστικότητας και της απαλότητας του δέρματος. Συγκεκριμένα, η ελαστίνη είναι μια ελαστική πρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους και μπορεί να βρεθεί σε αφθονία στον συνδετικό ιστό, ενώ στον ανθρώπινο οργανισμό εκφράζεται στο γονίδιο ELN²⁰⁰. Ο βασικός ρόλος της είναι η διατήρηση του φυσικού σχήματος των ιστών μετά από διάταση ή συστολή τους. Το υαλουρονικό οξύ είναι ένα γραμμικό μόριο μακριάς αλυσίδας, αρνητικά φορτισμένο. Αποτελείται από πολλές ομάδες σακχάρων, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με επαναλαμβανόμενους γλυκοσιδικούς δεσμούς [(1→3)-β-D] και [(1→4)-β-D].²⁰¹ Ο κύριος ρόλος του είναι η ενίσχυση της ελαστικότητας του μαλακού συνδετικού ιστού και των αρθρώσεων, η ρύθμιση των επιπέδων υγρασίας ανάμεσα στους ιστούς, στους μύες και στην εξωκυτταρική στοιβάδα, καθώς και η διατήρηση του υγρού του υαλώδους μέρους του ματιού στα φυσιολογικά επίπεδα²⁰¹. Το υαλουρονικό οξύ συμμετέχει επίσης σε πολλές κυτταρικές μεταβολικές οδούς, όπως είναι η αποκόλληση των κυττάρων, η μίτωση και η μετανάστευσή τους. Η μελανίνη είναι μία πολυμερική χρωστική σκούρου χρώματος που σχηματίζεται στα μελανοκύτταρα μέσω χημικών αντιδράσεων που προκαλούνται από την οξειδάση τυροσινάση.²⁰² Ο βασικός ρόλος της μελανίνης είναι η προστασία του δέρματος από την ακτινοβολία UV και η ενίσχυση του σχηματισμού της βιταμίνης D₃. Ωστόσο, η μη ελεγχόμενη παραγωγή της μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό κηλίδων, φακίδων ακόμη και στην ανάπτυξη καρκίνου του δέρματος.

Η γήρανση του δέρματος παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον και έχει μελετηθεί εκτεταμένα από τους επιστήμονες, καθώς και από πολλές βιομηχανίες καλλυντικών. Τα καλλυντικά αποτελούν μια σημαντική πτυχή στην καθημερινή διαδικασία περιποίησης του δέρματος, καθώς όχι μόνο προσφέρουν προστατευτικά αποτελέσματα ως προς την υπεριώδη ακτινοβολία, αλλά αποτελούν επίσης αναπόσπαστο τμήμα στην καθημερινή περιποίηση, φροντίδα και καλλωπισμό του δέρματος. Η εκμετάλλευση των φυσικών προϊόντων ως ισχυρών βιοδραστικών ενώσεων έχει πολύ μεγάλη σημασία και το ποσοστό επιτυχίας στην ανακάλυψη καινούριων συστατικών είναι αρκετά σημαντικό. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα στις περιπτώσεις ενζύμων των οποίων η υπερέκφραση οδηγεί όχι μόνο στην πρόωμη γήρανση του δέρματος, αλλά και σε ισχυρές

αλλαγές σε πολλές μεταβολικές οδούς όπου συμμετέχουν και που οδηγούν στην ανάπτυξη φλεγμονωδών διαταραχών και καρκίνου. Σε αυτούς τους πρωτεϊνικούς στόχους ανήκει η ανθρώπινη ουδετερόφιλη ελαστάση (HNE), η υαλουρονιδάση (Hyal) και η τυροσινάση (Tyr). Έχει αναφερθεί ήδη ένας αρκετά μεγάλος αριθμός μελετών σχετικά με την αναστολή αυτών των ενζύμων από φυσικά προϊόντα. Συγκεκριμένα, διάφορα φυτικά εκχυλίσματα μαζί με τους απομονωμένους δευτερογενείς μεταβολίτες τους έχουν μελετηθεί και αξιοποιηθεί εκτενώς ως πιθανοί αντιγηραντικοί και αντιμελανογενετικοί παράγοντες από το 1965. Η ελαστάση, η υαλουρονιδάση και η τυροσινάση συμμετέχουν στην ομαλή ομοιόσταση του ανθρώπινου σώματος. Ωστόσο, η μη ελεγχόμενη υπερέκφρασή τους μπορεί να προκαλέσει αρκετές δυσλειτουργίες. Πιο συγκεκριμένα, η ελαστάση αποικοδομεί την ελαστίνη, η υαλουρονιδάση αποικοδομεί το υαλουρονικό οξύ και η τυροσινάση υπερεκφράζει τη μελανίνη, οδηγώντας στο σχηματισμό καφέ κηλίδων, ρητίδων, στην πρόωρη γήρανση του δέρματος, καθώς και στην ανάπτυξη μελανώματος, και αρκετών νευροεκφυλιστικών παθήσεων. Ο συνδυασμός με άλλους παράγοντες (π.χ. οξειδωτικό στρες, γενετικοί παράγοντες, περιβαλλοντικές συνθήκες, κάπνισμα, μη ισορροπημένη διατροφή κ.α.) οδηγεί στη διαταραχή της ομοιόστασης του δέρματος από πολύ μικρή ηλικία.

Οι αναστολείς της ελαστάσης, της υαλουρονιδάσης και της τυροσινάσης έχουν αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικοί αντιγηραντικοί και αντιρυτιδικοί παράγοντες. Η φύση αποτελεί μια πολύ μεγάλη βιβλιοθήκη φυσικών προϊόντων όπως είναι οι πολυφαινόλες, τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα (παράγωγα υδροξυκιναμικών και υδροξυβενζοϊκών οξέων), τα λιπαρά οξέα, τα σεσκιτερπένια και πολλές άλλες οικογένειες που έχουν μελετηθεί επιτυχώς για την αποτελεσματική τους δράση ως προς αυτά τα τρία ένζυμα. Η μοριακή τους δομή, καθώς και οι υποκαταστάσεις τους έχουν πολύ μεγάλη σημασία, καθώς μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το ενεργό κέντρο των ενζύμων, προκαλώντας την αναστολή τους. Οι πηγές αυτών των αναστολέων είναι κυρίως φυτά, δέντρα ή βότανα και έχουν χρησιμοποιηθεί παγκοσμίως στην παραδοσιακή ιατρική για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Αυτό είναι ένα πεδίο με πολλές ανησυχίες και ήδη έχει επιτευχθεί πολλή ερευνητική εργασία ως προς τη μελέτη των φυτών προέλευσης, των εκχυλισμάτων τους, των απομονωμένων βιοενεργών ενώσεων τους και κυρίως των ανασταλτικών ιδιοτήτων τους έναντι των τριών ενζύμων-στόχων. Από την άλλη πλευρά, οι βιομηχανίες καλλυντικών ενδιαφέρονται για την ανάπτυξη νέων προϊόντων περιποίησης του δέρματος από φυσικά συστατικά, και όχι συνθετικά, έτσι ώστε να παράγουν ένα προϊόν φιλικό προς το περιβάλλον, γεμάτο φυσικούς αντιοξειδωτικούς, αντιφλεγμονώδεις και αντιγηραντικούς παράγοντες, ώστε να μην επιβαρύνουν περισσότερο την ανθρώπινη υγεία.

Όλη αυτή η πληροφορία που υπάρχει στη βιβλιογραφία για την αναστολή αυτών των ενζύμων από φυσικούς δευτερογενείς μεταβολίτες και φυσικές πηγές, αποτέλεσε βάση για την ανάπτυξη της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων ANTIAGE-DB η οποία αποτελεί μια βιβλιοθήκη πληροφοριών για τα φυσικά προϊόντα, το μηχανισμό αναστολής τους, την εκλεκτικότητα της δράσης τους καθώς και το προφίλ αλληλεπίδρασης αυτών των ενώσεων με τα τρία ένζυμα-στόχους. Μέσα από αυτή τη βάση δεδομένων, ο χρήστης μπορεί να αντλήσει πληροφορίες σχετικά με τους φυσικούς αναστολείς της ελαστάσης, της υαλουρονιδάσης και της τυροσινάσης, αλλά και να ανακαλύψει καινούριους πιθανούς αναστολείς και των τριών ενζύμων-στόχων. Η

ηλεκτρονική βάση δεδομένων αναπτύχθηκε σε συνεργασία με τον καθηγητή Horacio Perez Sanchez του Πανεπιστημίου UCAM της Ισπανίας, στα πλαίσια ερευνητικής συνεργασίας.

4.1.1 Ένζυμα που σχετίζονται με την πρόωρη γήρανση του δέρματος

4.1.1.1 Ανθρώπινη Ουδετερόφιλη Ελαστάση (Human Neutrophil Elastase-HNE)-Μια σερινοπρωτεάση

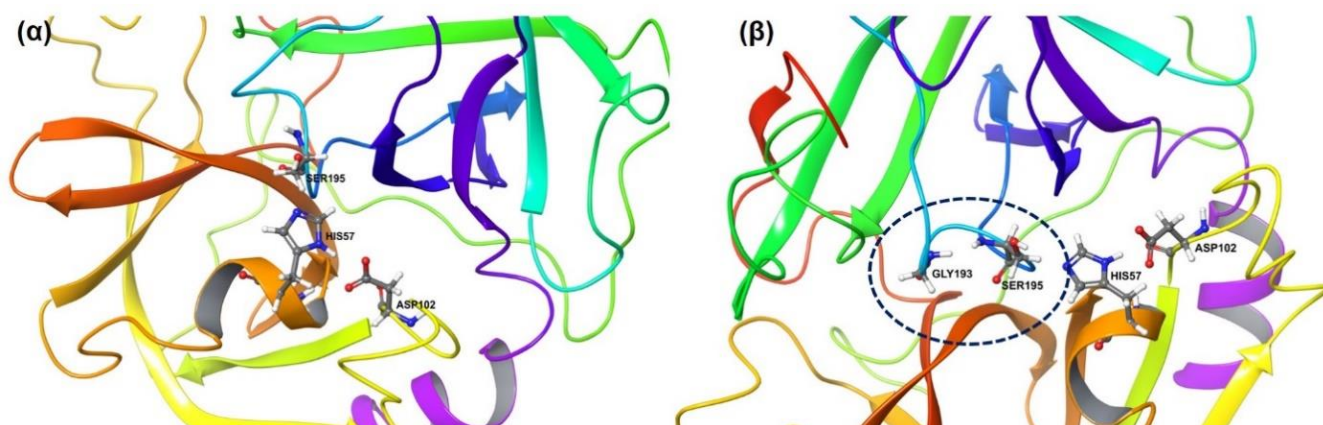
Η ελαστάση είναι μια σερινοπρωτεάση, η κύρια δράση της οποίας είναι η διάσπαση των πρωτεϊνών²⁰³. Η ουδετερόφιλη ελαστάση (E.C. 3.4.21.37) η οποία είναι επίσης γνωστή και ως ανθρώπινη λευκοκυτταρική ελαστάση (HLE) ή ελαστάση 2, είναι μια γλυκοπρωτεΐνη η οποία ανήκει στην οικογένεια των πρωτεασών που μοιάζουν με τη χυμοθρυψίνη. Η ουδετερόφιλη ελαστάση βρίσκεται σε συγκέντρωση 5 mM στα ουδετερόφιλα λυσοσώματα, τα οποία είναι γνωστά και ως αζουρόφιλοι κόκκοι,²⁰⁴ και λειτουργούν ως φορείς της ελαστάσης.²⁰⁵ Αυτό το ένζυμο παρουσιάζει εξειδίκευση στην υδρόλυση των πρωτεϊνών και ευθύνεται για την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών που βρίσκονται στα ουδετερόφιλα λυσοσώματα, όπως επίσης και των πρωτεϊνών της εξωκυτταρικής μεμβράνης.²⁰⁴ Η ελαστάση υδρολύει όλες τις πρωτεΐνες που αποτελούν κύρια δομικά συστατικά του συνδετικού ιστού, όπως είναι το κολλαγόνο-IV, η ελαστίνη, η ινονεκτίνη, οι πρωτεογλυκάνες, οι κερατίνες και άλλες πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής μεμβράνης^{206,207}. Επίσης, η ελαστάση παρουσιάζει μεγάλη εξειδίκευση στην αποικοδόμηση της ελαστίνης, η οποία αποτελεί ζωτικό δομικό λίθο του συνδετικού ιστού του δέρματος, των τενόντων, των αρτηριών, των πνευμόνων και των διαφόρων συνδέσμων μεταξύ τους. Κύριος ρόλος της ελαστίνης είναι η διατήρηση της ελαστικότητας των αρτηριών, των πνευμόνων, των διαφόρων συνδέσμων και του δέρματος.^{206,208,209} Η δράση της ελαστάσης είναι μεγάλης ζωτικής σημασίας για τον ιστό του δέρματος, καθώς σε περιπτώσεις φλεγμονωδών διαταραχών, τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα εκκρίνουν την ουδετερόφιλη ελαστάση, λόγω της ικανότητάς της να συμμετέχει στη φαγοκυττάρωση και να διασπά τις πρωτεΐνες που εισέρχονται από τα βακτήρια και τους μικροοργανισμούς που “εισβάλλουν” στην εξωκυτταρική μεμβράνη μέσω των τραυμάτων. Με αυτόν τον τρόπο αποκαθίσταται η σύσταση και η ομοιοστάση του προσβεβλημένου ιστού.^{209,210} Η ελαστάση σε συνδυασμό με την κολλαγενάση, ρυθμίζουν την ομοιοστάση του ιστού του δέρματος. Αντίθετα, σε μη ελεγχόμενες ομοιοστατικές συνθήκες, η ελαστάση μπορεί να διασπάσει μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών του συνδετικού ιστού²¹¹, γεγονός που οδηγεί στην πρόωρη γήρανση του δέρματος. Επίσης, η ελαστάση διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στην καταστροφή των ιστών των πνευμόνων, γεγονός το οποίο οδηγεί στην ανάπτυξη πολλών φλεγμονωδών διαταραχών, όπως είναι το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσφορίας (ARDS), το πνευμονικό εμφύσημα, διάφορες φλεγμονές των πνευμόνων, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, και άλλες φλεγμονές.

4.1.1.2 Δομή της ελαστάσης

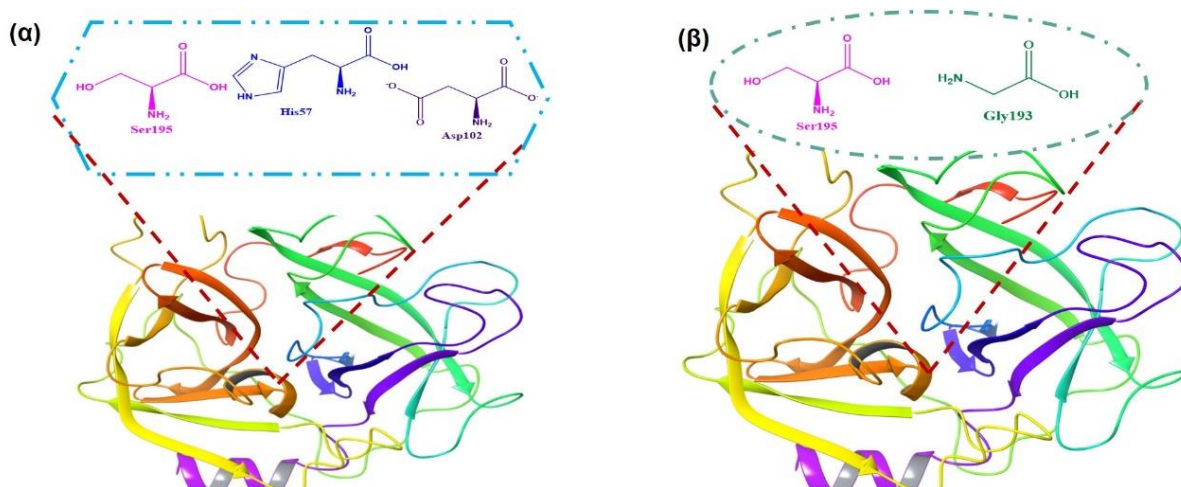
Η ελαστάση είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 30 kDa, η οποία αποτελείται από 218 αμινοξέα και 4 δισουλφιδικές γέφυρες (Cys: 42-58, 136-201, 168-182, και 191-220),

σχηματίζοντας δύο αντιπαράλληλες κυλινδρικές δομές β-βαρελιού, αυξημένης σταθερότητας.²¹¹ Η ελασάση παρουσιάζει εξειδίκευση ως προς τη διάσπαση συγκεκριμένων πεπτιδικών δεσμών μεταξύ υδρόφοβων αμινοξέων μικρού μοριακού βάρους. Τέτοια αμινοξέα είναι η γλυκίνη, η βαλίνη και η αλανίνη. Η καταλυτική δράση της ελασάσης βασίζεται στην παρουσία μιας καταλυτικής τριάδας, η οποία είναι χαρακτηριστική σε όλες τις σερινοπρωτεάσες. Αυτή η τριάδα αποτελείται από τα αμινοξέα Asp102, His57 και Ser195 και βρίσκεται σε μια κοιλότητα ανάμεσα στις δύο δομικές κοιλότητες της πρωτεΐνης (**Σχήματα 4.1 και 4.2**).

Ο μηχανισμός δράσης της ελασάσης είναι παρόμοιος με αυτόν της ομόλογης σερινοπρωτεάσης της, της χυμοθυρυψίνης: Το πρώτο βήμα είναι μια πυρηνόφιλη προσβολή του Ογ ατόμου του αμινοξέος Ser195, στην καρβονυλική ομάδα του υποστρώματος,^{212,213} μέσω ομοιοπολικού δεσμού, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου. Αυτό το τετραεδρικό ενδιάμεσο σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τις αμιδικές ομάδες των αμινοξέων Gly193 και Ser195, που βρίσκονται στο βασικό σκελετό της πρωτεΐνης, σταθεροποιώντας με αυτόν τον τρόπο, το φορτίο του.^{214,215} Αυτοί οι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζουν μια ξεχωριστή δομή μέσα στο πρωτεϊνικό μόριο, το οποίο καλείται “οπή οξυανιόντος” (oxyanion hole).²¹⁶ Οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων His57 και Asp102 σχηματίζουν ένα είδος ασθενούς δεσμού υδρογόνου, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα της Ser195. Το πρωτόνιο της His57 απωθεί την αποχωρούσα ομάδα του τετραεδρικού ενδιάμεσου, σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο ακυλο-ενζύμου.

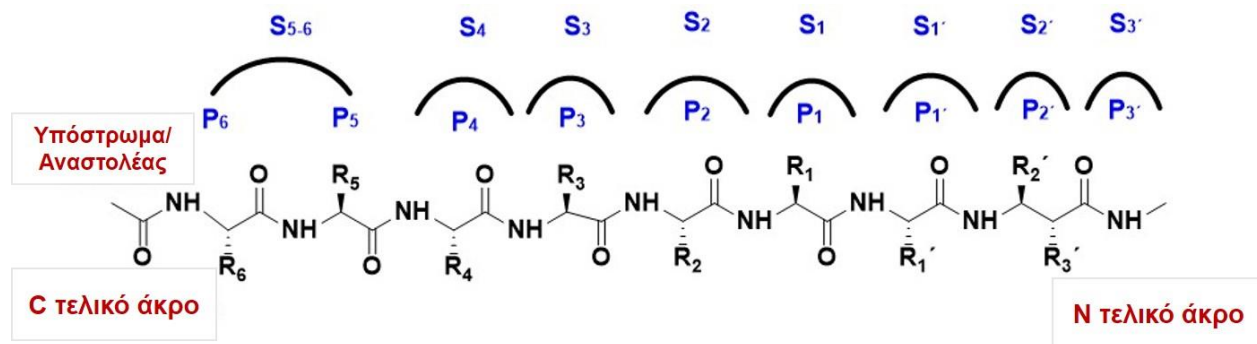


Σχήμα 4.1: (α) Κρυσταλλική δομή της ανθρώπινη ουδετερόφιλης ελασάσης (PDB ID: 1B0F) και της καταλυτικής της τριάδας: **Ser195-His57-Asp102** (β) Κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης ουδετερόφιλης ελασάσης (PDB ID: 1B0F) με έμφαση στους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ της **Ser195** και της **Gly131**, σχηματίζοντας την “οπή οξυανιόντος”.



Σχήμα 4.2: (α) Απεικόνιση των αμινοξέων της καταλυτικής τριάδας της ανθρώπινης ουδετερόφιλης ελαστάσης (PDB ID: 1B0F) **(β)** Απεικόνιση των αμινοξέων της “οπής οξυανιόντος” της ανθρώπινης ουδετερόφιλης ελαστάσης (PDB ID:1B0F)

Η δομή της ανθρώπινης ουδετερόφιλης ελαστάσης αποτελείται από 5 διακριτές υδρόφοβες θέσεις, από τις οποίες οι τέσσερις αποτελούν θέσεις δέσμησης του υποστρώματος και λέγονται S2, S3, S4 και S5, ενώ μία θέση είναι η καταλυτική και ονομάζεται S1 (**Σχήμα 4.3**).^{217,218} Η θέση S1 είναι υδρόφοβη, έχει ημισφαιρικό σχήμα και αλληλεπιδρά περισσότερο με αλειφατικά αμινοξέα μεσαίου μεγέθους, όπως είναι η λευκίνη (Le) και η ισολευκίνη (Ile). Η θέση S2 παρουσιάζει σφαιρικό σχήμα και αλληλεπιδρά και αυτή περισσότερο με αλειφατικά αμινοξέα μεσαίου μεγέθους, όπως είναι η προλίνη (Pro). Οι άλλες τρεις θέσεις S3, S4 και S5 αποτελούν θέσεις δέσμησης του ενζύμου με τον εκάστοτε υποκαταστάτη.



Σχήμα 4.3: Απεικόνιση των κύριων πλευρικών αλληλεπιδράσεων ενός πεπτιδίου (υπόστρωμα ή αναστολέας) με τις θέσεις δέσμησης (S1-S5) της ανθρώπινης ουδετερόφιλης ελαστάσης.

Η ενεργοποίηση του ενζύμου επιτυγχάνεται μέσω δύο ξεχωριστών βημάτων στα οποία συμμετέχουν τα αμινοτελικά άκρα, σε βέλτιστο pH=8,0-8,5. Η ελαστάση είναι θετικά φορτισμένη, ενώ το ισοηλεκτρικό σημείο της είναι βασικό²¹⁹. Ο υψηλός βασικός χαρακτήρας της ελαστάσης οφείλεται στην παρουσία 19 αργινινών, ενώ σταθεροποιείται μέσω των 9 ασπαρτικών οξέων, που προσδίδουν όξινο χαρακτήρα. Από αυτά, το Asp102, το Asp194 και το Asp226 βρίσκονται στην εσωτερική πλευρά του σκελετού του ενζύμου²¹⁷. Όλες οι αργινίνες, εκτός από το Arg80 βρίσκονται στην επιφάνεια του ενζύμου, γύρω από το ενεργό κέντρο, σχηματίζοντας μικρά συμπλέγματα από δύο, τρεις ή τέσσερις αργινίνες. Αυτός είναι και ο λόγος που η ελαστάση μπορεί να αλληλεπιδρά αποτελεσματικά με γραμμικά μόρια θειωμένων πολυσακχαριτών^{217,220}. Επίσης, περισσότερο από το 40% των αμινοξέων που συγκροτούν τη δομή του ενζύμου είναι υδρόφοβα, για αυτό και αλληλεπιδρούν ευκολότερα με ισχυρά λιπόφιλα μόρια.^{217,218}

Μελέτες που έχουν γίνει στην κρυσταλλική δομή της ελαστάσης έδειξαν ότι έχει την ίδια ομολογία με την παγκρεατική ελαστάση χοίρου (Porcine Pancreatic Elastase-PPE), μία παγκρεατική σερινοπρωτεάση που επίσης αποικοδομεί την ελαστίνη. Η παγκρεατική ελαστάση βρίσκεται στα κύτταρα του παγκρέατος ως μη ενεργό ζυμογόνο και ενεργοποιείται στο έντερο και συμμετέχει επίσης στην αποικοδόμηση της ελαστίνης.

4.1.1.3 Φυτοχημικά ως φυσικοί αναστολείς της ελαστάσης

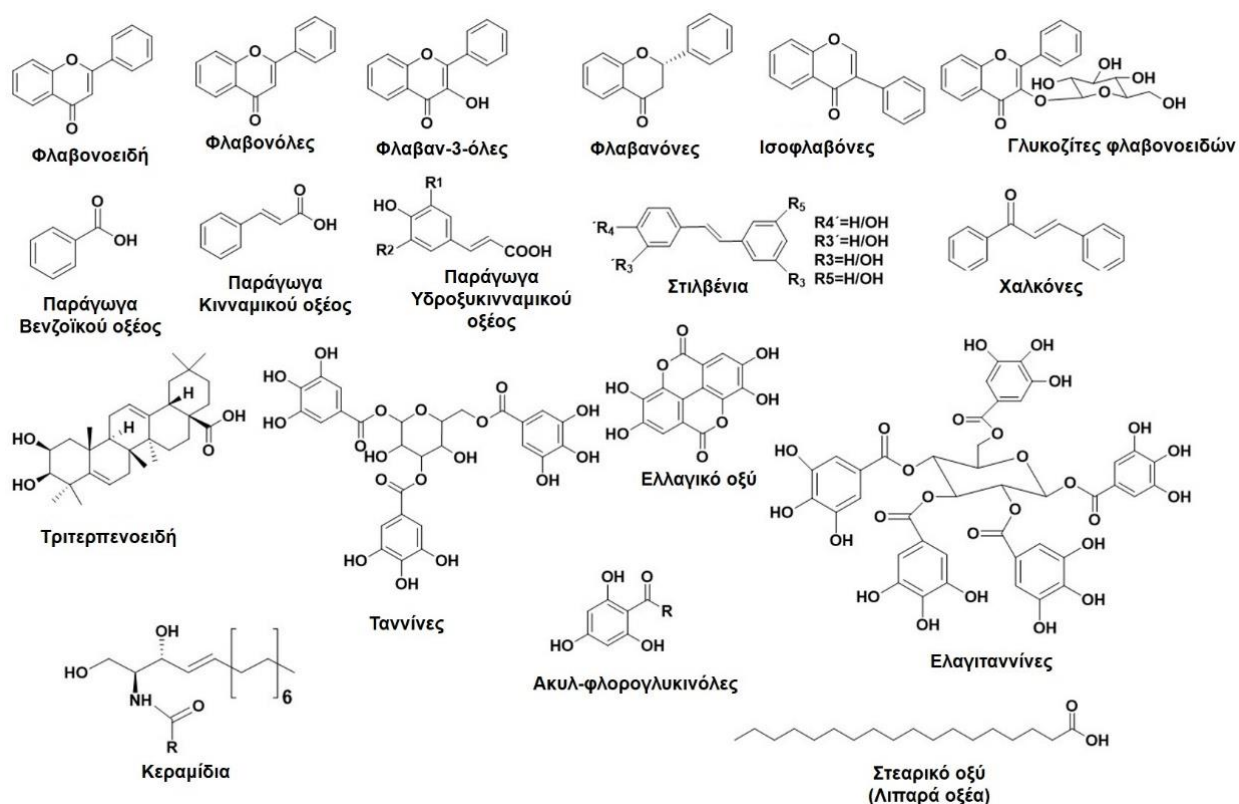
Η φύση είναι μια τεράστια βιβλιοθήκη βιομορίων με πάρα πολλές πληροφορίες σχετικά με θεραπείες κατά διαφόρων ασθενειών. Επίσης, πολλές φυσικές ενώσεις χρησιμοποιούνται

στα καλλυντικά για την αντιμετώπιση διαφόρων δερματικών παθήσεων αλλά και ως αντιγηραντικοί παράγοντες. Έχει γίνει μεγάλος αριθμός μελετών για φυτά από πολλές περιοχές ανά τον κόσμο και τα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι τα ίδια, αλλά και οι δευτερογενείς μεταβολίτες τους αποτελούν ισχυρά όπλα κατά της πρόωρης γήρανσης και των δερματικών παθήσεων.

Ο βασικός ρόλος της ελαστάσης είναι η διάσπαση πρωτεϊνών, και για το λόγο αυτό αποτελεί ζωτικό ένζυμο για τη λειτουργία του οργανισμού, καθώς τον προστατεύει από την εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών. Ωστόσο, η ανεξέλεγκτη δράση της, μπορεί να οδηγήσει στη διάσπαση και των υγιών ιστών, προκαλώντας σοβαρές ασθένειες όπως είναι το πνευμονικό εμφύσημα, η κυστική ίνωση και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Η ανακάλυψη επομένως καινούριων αναστολέων είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη αντιφλεγμονωδών φαρμάκων.^{221,222}

Μεγάλος αριθμός μελετών που έχει γίνει σχετικά με την αναστολή της ελαστάσης, έχει αποκαλύψει την άρρηκτη σχέση μεταξύ της δομής ενός αναστολέα και της ανασταλτικής δράσης του ως προς το ένζυμο.^{206,214,219} Ο τρόπος που αλληλεπιδρά ένας αναστολέας με το ενεργό κέντρο του ενζύμου, καθώς και οι δυνάμεις που αναπτύσσει με τα αμινοξέα του επηρεάζει σε πολύ μεγάλο βαθμό την ικανότητα του ενζύμου να αλληλεπιδράσει με το φυσικό του υπόστρωμα, συμβάλλοντας έτσι στην αναστολή του ενζύμου. Για το λόγο αυτό, κάποιες χημικές ομάδες έχουν αποδειχτεί πιο ισχυροί αναστολείς, συγκριτικά με άλλες. Στο **Σχήμα 4.4**, απεικονίζονται όλες οι δομικές οικογένειες που έχουν μελετηθεί ως αποτελεσματικοί αναστολείς της ελαστάσης, ενώ αναλυτικά οι φυσικοί αναστολείς της ελαστάσης που έχουμε συλλέξει από όλη τη βιβλιογραφία, περιγράφονται στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων ANTIAGE-DB στον σύνδεσμο που έχουμε αναπτύξει αποκλειστικά γι' αυτή την πληροφορία στα πλαίσια συνεργασίας με τον καθηγητή κ. Horacio Perez Sanchez του Πανεπιστημίου UCAM της Ισπανίας: <https://bio-hpc.ucam.edu/anti-age-db/web/Info/Info.php#TableS2>.

Οι πολυφαινόλες²⁰⁷ (φλαβονοειδή και όλες οι υποκατηγορίες τους), τα φαινολικά οξέα (παράγωγα υδροξυκιναμικού και βενζοϊκού οξέος), κινναμικά οξέα και τα παράγωγά τους, παράγωγα καφεϊκού οξέος^{206,223-225}, στιλβένια, χαλκόνες, ελαγγιτανίνες, ελλαγικό οξύ²²⁶, πεντακυκλικά τριτερπένια²¹⁸, λιπαρά οξέα²²⁷, κεραμίδια²²⁸ και ακυλοφλορογλυκινόλες έχουν μελετηθεί εκτεταμένα για τις ανασταλτικές τους ιδιότητες ως προς την ελαστάση. Επίσης, έχει πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός κρυσταλλογραφικών μελετών, όπως επίσης μελέτες μοριακής πρόσδεσης για τη μελέτη του προφίλ αλληλεπίδρασης οποιουδήποτε πιθανού αναστολέα με την ουδετερόφιλη ελαστάση. Σημαντικό ρόλο στην αναστολή της ελαστάσης διαδραματίζει επίσης και ο αριθμός και η θέση των φαινολικών (-OH) ομάδων που υπάρχουν στη δομή του αναστολέα, οι οποίες ενισχύουν την ανασταλτική τους δράση.



Σχήμα 4.4: Απεικόνιση των βασικών δομών των φυτοχημικών που έχουν μελετηθεί ως αναστολείς της ελαστάσης.

Επίσης, μεγάλος αριθμός φαρμακευτικών φυτών και βοτάνων που αποτελούν κύριες πηγές των δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν ανακαλυφθεί, έχει μελετηθεί για την ανασταλτική τους δράση ως προς την ελαστάση. Όλα τα φυτά που έχουν μελετηθεί έχουν συλλεχθεί και περιγράφονται ως επιπρόσθετη πληροφορία στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων ANTIAGE-DB αποκλειστικά στο σύνδεσμο που έχει αναπτυχθεί για τις συγκεκριμένες πληροφορίες: <https://bio-hpc.ucam.edu/anti-age-db/web/Info/Info.php#TableS1>.

4.1.2.1 Υαλουρονιδάση (Hyal)- Μια γλυκοσιδάση

Οι υαλουρονιδάσες (Hyls) (E.C.3.2.1.35) αποτελούν μια οικογένεια ενζύμων τα οποία διαδραματίζουν ως βασικό ρόλο την αποικοδόμηση πολυμερικών υποστρωμάτων όπως είναι το υαλουρονικό οξύ και η χονδροϊτίνη.¹²⁸ Ανήκουν στην οικογένεια των γλυκοσιδασών και διασπούν τους β-1→4 γλυκοσιδικούς δεσμούς του υαλουρονικού οξέος. Οι πρώτες μελέτες αυτών των ενζύμων έγιναν το 1971 από τον Karl Meyer¹²⁹, ο οποίος τα διαχώρισε σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με το μηχανισμό δράσης που ακολουθούν: (1) βακτηριακές υαλουρονιδάσες (E.C.4.2.99.1), γνωστές και ως ενδο-β-ακετυλ-εξοζαμινιδάσες, (2) υαλουρονιδάσες (E.C. 3.2.1.36) γνωστές και ως ενδο-β-γλυκουρονιδάσες και (3) υαλουρονιδάσες των θηλαστικών (E.C. 3.2.1.35) γνωστές και ως υδρολάσες, οι οποίες παράγουν κυρίως τετρασακχαρίτες και εξασακχαρίτες. Συγκεκριμένα, οι υαλουρονιδάσες διακρίνονται σε πέντε ενζυμικά μόρια με μεγάλη ομολογία στις αλληλουχίες τους, και μπορούν να εκφραστούν στο ανθρώπινο γονιδίωμα: Hyal-1, Hyal-2, Hyal-3, Hyal-4 και Hyal-5, η οποία είναι περισσότερο γνωστή ως SPAM-1 ή PH-20 ή ως το ψευδογονίδιο (PHYAL1)¹²⁸. Οι υαλουρονιδάσες Hyal-1, Hyal-2 και Hyal-3 υπάρχουν στο χρωμόσωμα 3p21.3,²²⁹ ενώ οι Hyal-4, PHYAL1 και SPAM1 υπάρχουν στο χρωμόσωμα 7q31.3. Και οι έξι υαλουρονιδάσες διασπούν

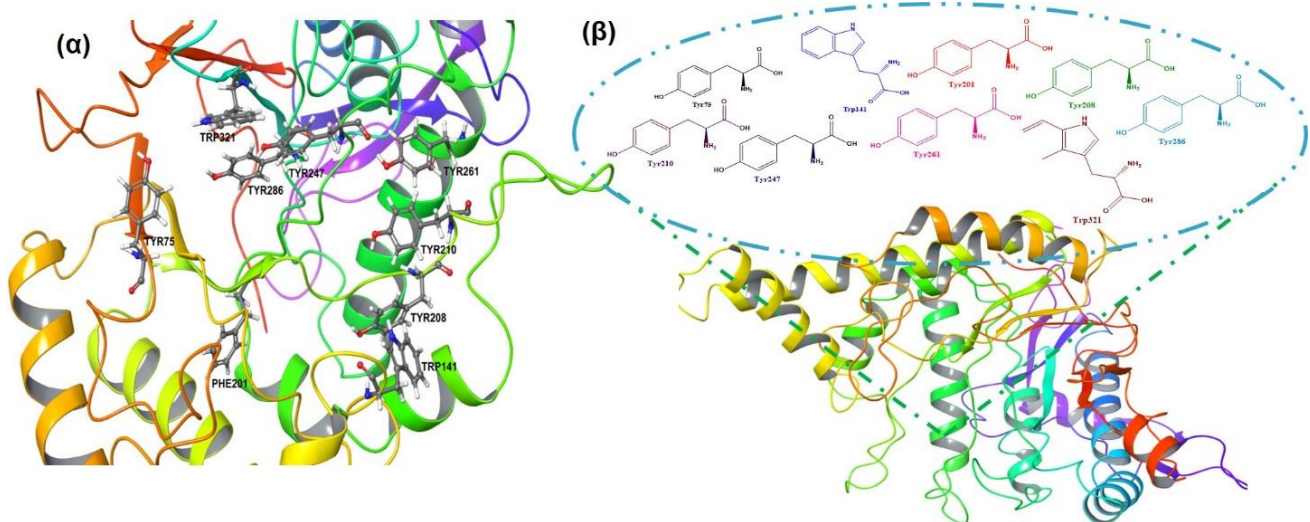
κατά κύριο λόγο το υαλουρονικό οξύ σε μικρότερα θραύσματα ολιγοσακχαριτών²³⁰. Οι Hyal-1, Hyal-2 και PH-20 παρουσιάζουν την ικανότητα να ρυθμίζουν τη σταθερότητα του υαλουρονικού οξέος²³¹. Αντίθετα, οι ανθρώπινες υαλουρονιδάσες Hyal-1, Hyal-3, Hyal-4 και pHYAL1, δεν επιδρούν καθόλου στο μεταβολισμό του υαλουρονικού οξέος.²³² Στο σύνολο όλων των υαλουρονιδασών, η ανθρώπινη Hyal-1 βρίσκεται σε αφθονία στους ιστούς αλλά και στον ορό του αίματος (σε συγκέντρωση περίπου 60 ng/mL), όπως επίσης στο συκώτι, στους νεφρούς, στην καρδιά, στη σπλήνα, στο πλάσμα του αίματος και στα ούρα. Η Hyal-1 είναι ένα λυσοσωμικό ένζυμο, το οποίο περιέχει τρεις *N*-γλυκοζυλιωμένες πλευρικές ομάδες στις θέσεις *N*-99, *N*-216 και *N*-350²³³ της αλληλουχίας του και αποικοδομεί το υαλουρονικό οξύ σε μόρια τετρασακχαριτών με αλληλουχία GlcA-GlcNAc-GlcA-GlcNAc²³⁴. Μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι η Hyal-1 εκφράζεται σ' ένα μεγάλο αριθμό καρκινικών κυττάρων όπως του προστάτη, της ουροδόχου κύστεως καθώς και σε καρκινικά κύτταρα του εγκεφάλου.^{235,236} Η ανθρώπινη Hyal-1 συσχετίζεται επίσης με τις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές MCF-7 και MDA-MB-231.²³⁷ Η υαλουρονιδάση εμπλέκεται σε αρκετές μεταβολικές οδούς που επάγουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις, και για το σκοπό αυτό, η μελέτη της δράσης της καθώς και η μελέτη της αναστολής της από φυσικά, ημισυνθετικά ή συνθετικά μόρια, αποτελεί μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον τόσο για τη χρήση των αναστολέων σε φάρμακα, όσο και τη χρήση του ίδιου του ενζύμου σε φάρμακα. Μεγάλο ενδιαφέρον επίσης έχει αποκτήσει η μελέτη της συμμετοχής της υαλουρονιδάσης στις ασθένειες της αρθρίτιδας και της ουλίτιδας, καθώς και της ανακάλυψης και ανάπτυξης μορίων με σκοπό την αναστολή της.^{238,239}

Η Hyal-2 βρίσκεται σε αρκετά υψηλό ποσοστό στο συνδετικό ιστό και έχει την ικανότητα να αποικοδομεί το υαλουρονικό οξύ σε μικρότερα μόρια αποτελούμενα από 50 σακχαρούχες μονάδες, συνολικού βάρους 20kDa.²⁴⁰ Το pH του εκάστοτε περιβάλλοντος επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη δραστηριότητα των υαλουρονιδασών. Η Hyal-2 έχει βέλτιστη δραστηριότητα σ' ένα εύρος τιμών pH, ενώ η βέλτιστη δραστηριότητα των Hyal-1 και Hyal-3 βρίσκεται σε όξινες συνθήκες. Η Hyal-4 συμπεριφέρεται επίσης ως χονδροϊτίνάση, χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα τη χονδροϊτίνη (Ch) και τη θειική χονδροϊτίνη (ChS). Επίσης, υπάρχει και η μορφή SPAM1, η οποία βρίσκεται στο ακρόσωμα των σπερματοζωαρίων και διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στην αναπαραγωγή, καθώς επιτρέπει το σπερματοζωάριο να προσκολληθεί πάνω στη σωρευτική μάζα που προστατεύει το ωάριο^{240,241}.

Οι υαλουρονιδάσες μπορούν να βρεθούν στη φύση, σε πολλούς ζωντανούς οργανισμούς, όπως τα θηλαστικά, τα έντομα, οι βδέλλες και τα βακτήρια.^{129,234,242} Τα τελευταία διαθέτουν επίσης την ικανότητα να παράγουν υαλουρονιδάσες. Οι υαλουρονιδάσες που παράγονται από τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς δρουν και ως υδρολάσες και ως τρανσγλυκοσιδάσες, ενώ οι υαλουρονιδάσες που παράγονται από τα βακτήρια συμμετέχουν σε αντιδράσεις διάσπασης β-δεσμών.²⁴³ Επίσης, μπορούν να διασπάσουν τη χονδροϊτίνη, τη θειική χονδροϊτίνη και τη θειική δερματάνη. Το υαλουρονικό οξύ βρίσκεται σε αφθονία στο υγρό των αρθρώσεων, στους χόνδρους (κυρίως στο μαλακό μέρος του συνδετικού ιστού), καθώς και στο υαλώδες μέρος του ματιού.²³⁴ Επίσης, το υαλουρονικό οξύ μπορεί να βρεθεί και στην εξωκυτταρική στιβάδα, ως συνδετικό υγρό των πρωτεϊνικών νημάτων, των ινών κολλαγόνου και των κυττάρων του συνδετικού ιστού²⁴⁴.

4.1.2.2. Η δομή των υαλουρονιδασών

Η καταλυτική δράση των υαλουρονιδασών οφείλεται στην παρουσία ενός αμινοξέος **Glu131** στο ενεργό κέντρο, το οποίο παρουσιάζει όξινο χαρακτήρα και είναι δότης Η.¹²⁸ Τα υπόλοιπα αμινοξέα που απαρτίζουν το ενεργό κέντρο της υαλουρονιδάσης είναι τα: **Tyr75**, **Trp141**, **Tyr201**, **Tyr208**, **Tyr210**, **Tyr247**, **Tyr261**, **Tyr286** και **Trp321** και συμβάλλουν σημαντικά στην καταλυτική δράση της υαλουρονιδάσης (**Σχήμα 4.5**). Τα αμινοξέα που είναι θετικά φορτισμένα και υδρόφοβα επιτρέπουν την άριστη αλληλεπίδραση της υαλουρονιδάσης όχι μόνο με το υαλουρονικό οξύ, αλλά και με τη χονδροϊτίνη και τη θειική χονδροϊτίνη, οι οποίες είναι αρνητικά φορτισμένες.²⁴⁰ Επίσης, στην αλληλουχία του ενζύμου υπάρχουν δύο αργινίνες (**Arg134** και **Arg265**), οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση της υαλουρονιδάσης με τις καρβοξυλικές ομάδες του υαλουρονικού οξέος. Επίσης, υπάρχει και ένα αμινοξύ **Ser245** το οποίο είναι σταθερό και επιτρέπει τον σχηματισμό δεσμών με την υδροξυλική (-OH) ομάδα της **Tyr202**.^{233,234,240} Η Hyal-4 αντί για την **Tyr247** περιέχει την **Cys263**, η οποία συμβάλλει στην αλληλεπίδρασή της με τη χονδροϊτίνη και τη θειική χονδροϊτίνη.²⁴⁰



Σχήμα 4.5: (α) Κρυσταλλική δομή της υαλουρονιδάσης (PDB ID: 2PE4), και των αμινοξέων του ενεργού κέντρου. (β) Απεικόνιση των αμινοξέων του ενεργού κέντρου της υαλουρονιδάσης (PDB ID: 2PE4).

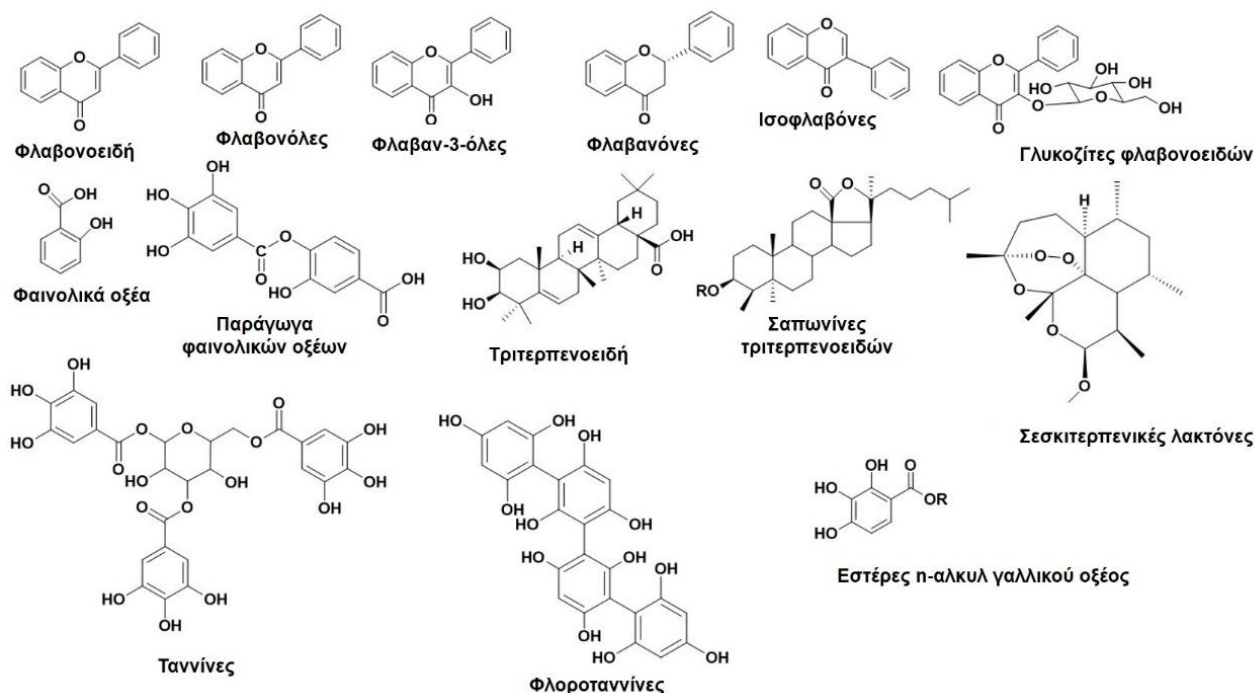
Η δομή όλων των υαλουρονιδασών είναι παρόμοια με τη δομή της υαλουρονιδάσης του δηλητηριού της μέλισσας (BVHyal), το οποίο έχει δομή $(\beta/\alpha)_8$ TIM βαρελιού αν και διαφέρουν στον αριθμό των φύλλων. Μια περιοχή αυτού του βαρελιού σχηματίζει μια μεγάλη επιμήκη σχισμή. Σε αυτή την περιοχή τα αμινοξέα είναι διατεταγμένα σε συγκεκριμένες θέσεις, οι οποίες επιτρέπουν την πρόσδεση του υαλουρονικού οξέος. Από τους έξι τύπους υαλουρονιδασών, η Hyal-1 έχει τη μικρότερη αλληλουχία με 435 αμινοξέα. Η PH-20 έχει τη μεγαλύτερη αλληλουχία με 510 αμινοξέα.²⁴⁰ Η αμινοτελική περιοχή της Hyal-1 αποτελείται από 28 αμινοξέα, ενώ η αμινοτελική περιοχή της PH-20 αποτελείται από 41 αμινοξέα. Επίσης, οι Hyal-1 και Hyal-2 περιέχουν μια περιοχή απλής έλικας, ενώ οι Hyal-3, Hyal-4 και PH-20 περιέχουν δύο περιοχές έλικας. Όλες οι έλικες βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά της TIM δομής βαρελιού.

Σε όλα τα στελέχη των ανθρώπινων υαλουρονιδασών, τα καταλυτικά καρβοξυτελικά άκρα γειτνιάζουν με μια δεύτερη περιοχή, μικρότερη από την καταλυτική περιοχή, αλλά μεγαλύτερη από την αμινοτελική ακολουθία και είναι διαφορετική σε όλες τις υαλουρονιδάσεις (68 αμινοξέα

στην Hyal-1, 122 στην RH-20). Αυτή η περιοχή διαφέρει επίσης ως προς τη δομή της, στα διαφορετικά στελέχη υαλουρονιδασών: στην Hyal-1 η δομή αυτή έχει τη μορφή ενός τριπλού αντιπαράλληλου β-φύλλου, το οποίο περιβάλλεται από μία έλικα. Στην Hyal-2 η δομή αυτή αποτελείται από δύο έλικες, ενώ στην Hyal-3 περιέχει δύο έλικες οι οποίες αλληλεπικαλύπτονται με την καταλυτική περιοχή. Στην Hyal-4 η δομή αυτή περιέχει τρεις έλικες, οι οποίες καλύπτονται από ένα αντιπαράλληλο διπλό β-φύλλο. Από την άλλη, στο RH-20, η δομή αυτή περιέχει 8 έλικες, από τις οποίες οι πέντε έχουν πολύ μεγάλο μήκος. Από την άλλη, όλες οι υαλουρονιδάσες έχουν ένα πεπτιδικό συνδέτη, ο οποίος διαχωρίζει το καρβοξυτελικό άκρο από όλη την περιοχή.²³¹ Οι Hyal-2, Hyal-4 και RH-20 ανήκουν στις γλυκοσυλφωσφατίδυλοϊνοσιτολικές (GPI) πρωτεΐνες και περιέχουν μια ακολουθία όμοια με αυτή των GPI πρωτεϊνών στην αλληλουχία του καρβοξυτελικού άκρου. Αυτή η διαφορετική ακολουθία των καρβοξυλικών αμινοξέων, ρυθμίζει τις διαφορετικές μηχανιστικές ιδιότητες που έχει κάθε ένζυμο.

4.1.2.3 Φυτοχημικά ως φυσικοί αναστολείς της υαλουρονιδάσης

Μεγάλος αριθμός φυσικών δευτερογενών μεταβολιτών, αλλά και των φυσικών πηγών τους (φυτά και φυτικά εκχυλίσματα) έχουν μελετηθεί για τις ανασταλτικές τους ιδιότητες ως προς την υαλουρονιδάση. Οι μελέτες έχουν δείξει ότι οι πιο αποτελεσματικοί αναστολείς του ενζύμου ανήκουν στην οικογένεια των τερπενίων, των флаβονοειδών και των αλκαλοειδών²⁴⁵ (Σχήμα 4.6).



Σχήμα 4.6: Απεικόνιση των βασικών δομών των φυτοχημικών που έχουν μελετηθεί ως αναστολείς της υαλουρονιδάσης.

Όπως και με την ελαστάση, έτσι και με την υαλουρονιδάση, η δομή του μελετούμενου αναστολέα επηρεάζει αρκετά την ισχύ της αναστολής του ενζύμου. Πολλά τερπένια έχουν αποδειχτεί ισχυροί αναστολείς της υαλουρονιδάσης, καθώς αλληλεπιδρούν με ισχυρούς δεσμούς σε μια περιοχή έξω από το ενεργό κέντρο του ενζύμου, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη δέσμευση του υποστρώματος.²⁴⁶ Η γλυκυριζίνη και το γλυκυρετινικό οξύ έχουν αποδειχτεί πολύ ισχυροί αναστολείς της υαλουρονιδάσης (IC_{50} = 0.440 mM και 0.060 mM

αντίστοιχα). Άλλοι αποτελεσματικοί αναστολείς του ενζύμου ανήκουν στους γλυκοζίτες των τερπενοειδών αλλά και στις σεσκιτερπενικές λακτόνες.²⁴⁷ Πολλά αιθέρια έλαια επίσης αναστέλλουν αποτελεσματικά την υαλουρονιδάση, καθώς έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν χηλικούς δεσμούς με τα ιόντα Cu^{2+} τα οποία αποτελούν συμπαράγοντα του ενζύμου.

Σημαντικό ρόλο στην ανασταλτική δράση των φλαβονοειδών ενώσεων δίνει η παρουσία μιας ή περισσότερων φαινολικών (-OH) ομάδων στη δομή τους. Συγκεκριμένα, η παρουσία φαινολικών (-OH) ομάδων στις θέσεις C-3, C-3' (όπως π.χ. στην κερκετίνη) και C-5 (όπως στη μυρισετινη), ενισχύουν την ανασταλτική δράση των φλαβονοειδών. Αποτελεσματική ανασταλτική δράση έχουν και οι γλυκοζίτες των φλαβονοειδών, παρόλο που έχουν λιγότερες φαινολικές (-OH) ομάδες. Ωστόσο, αλληλεπιδρούν με το ενεργό κέντρο της υαλουρονιδάσης μέσω δεσμών υδρογόνου, υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τα καταλυτικά αμινοξέα Tyr75, Tyr202, Tyr247, Tyr286, Trp321 και Glu131. Η παρουσία διπλού δεσμού στις θέσεις C-2 ή C-3, όπως επίσης και η παρουσία -OH ομάδων στις θέσεις C-5 και C-7 ενισχύουν την ανασταλτική δράση της υαλουρονιδάσης.^{238,248} Τα φαινολικά οξέα, επίσης έχουν δείξει αποτελεσματική ανασταλτική δράση στο ένζυμο. Η παρουσία κατεχολικής δομής στο μόριο ενισχύει την αναστολή τους. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το καφεϊκό και το γαλλικό οξύ, καθώς και τα παράγωγά τους.²⁴⁹ Τέλος, αποτελεσματικοί αναστολείς είναι επίσης και οι ταννίνες.²⁴⁵ Όλα τα φυσικά προϊόντα που έχουν μελετηθεί ως αναστολείς της υαλουρονιδάσης συγκεντρώθηκαν περιγράφονται στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων ANTIAGE-DB, στο σύνδεσμο που έχουμε αναπτύξει αποκλειστικά γι' αυτές τις πληροφορίες: <https://bio-hpc.ucam.edu/anti-age-db/web/Info/Info.php#TableS4>.

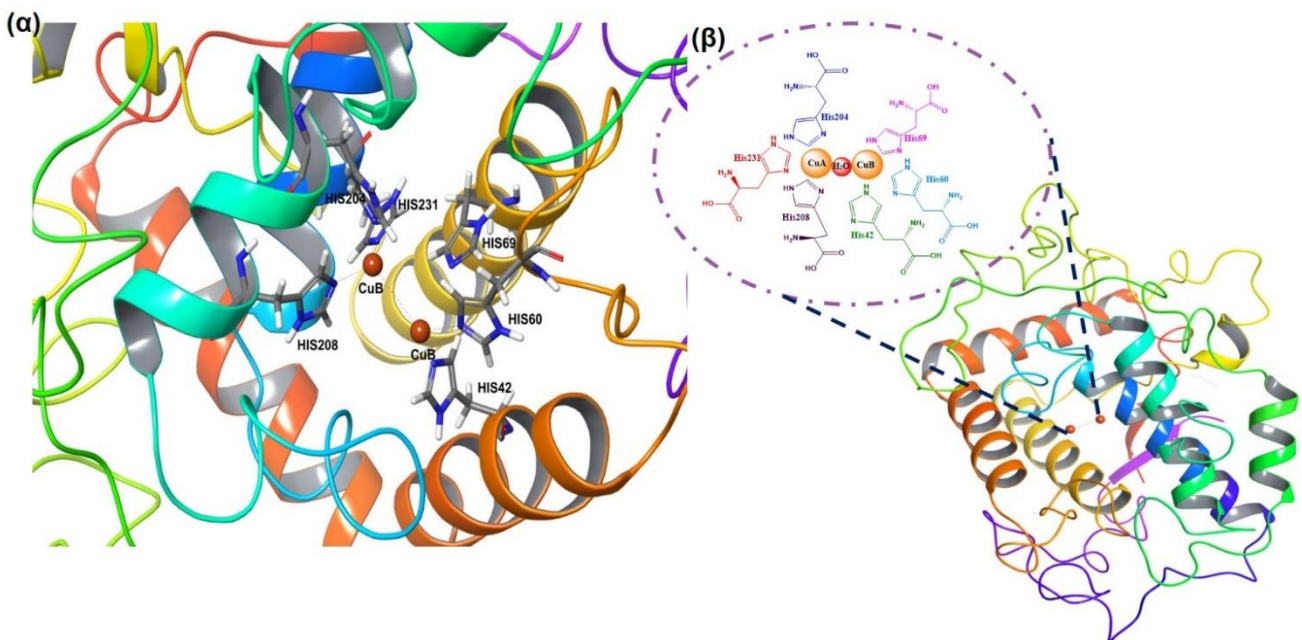
Πολλές μελέτες έχουν γίνει επίσης και σε φυτά αλλά και στα εκχυλίσματά τους, ως προς την ανασταλτική τους δράση στην υαλουρονιδάση. Όλες οι φυσικές πηγές έχουν συγκεντρωθεί και περιγράφονται στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων ANTIAGE-DB, αποκλειστικά στο σύνδεσμο που έχουμε αναπτύξει για αυτές τις πληροφορίες: <https://bio-hpc.ucam.edu/anti-age-db/web/Info/Info.php#TableS3>.

4.1.3.1 Τυροσινάση- Μια πολυφαινολοξειδάση

Οι τυροσινάσες (οι οποίες είναι γνωστές ως κατεχολικές οξειδάσες, κατεχολάσες, διφαινολοξειδάσες, ο-διφαινολάσες, φαινολάσες και πολυφαινολοξειδάσες) (EC 1.14.18.1), ανήκουν στην οικογένεια των οξειδασών. Οι τυροσινάσες είναι μεταλλικές γλυκοπρωτεΐνες και χαρακτηρίζονται από την παρουσία ιόντων Cu^{2+} στο ενεργό τους κέντρο. Μπορούν να βρεθούν σε διάφορες ενεργές μορφές σε ζωντανούς οργανισμούς, όπως είναι τα θηλαστικά, τα φυτά, οι μύκητες και διάφοροι ζωικοί ιστοί σε διαφορετικές λανθάνουσες ισομορφές, οι οποίες όμως δεν έχουν μελετηθεί ακόμη.²⁵⁰ Στον ανθρώπινο οργανισμό, η τυροσινάση βρίσκεται στα μελανοσώματα, τα οποία συντίθενται στα μελανοκύτταρα του δέρματος. Η πιο σημαντική λειτουργία των τυροσινασών είναι η συμμετοχή τους στην παραγωγή της μελανίνης και άλλων χρωστικών πολυμερικών ουσιών, καθώς επίσης και στην ανάπτυξη καφέ χρώματος στα φρούτα και τα λαχανικά, το οποίο προκαλείται από την οξειδωτική δράση της τυροσινάσης στον φλοιό τους με το μοριακό οξυγόνο της ατμόσφαιρας.

4.1.3.2 Η δομή της τυροσινάσης

Κύριο χαρακτηριστικό της δομής της τυροσινάσης είναι η παρουσία δύο ιόντων χαλκού στο ενεργό της κέντρο.²⁵⁰ Συγκεκριμένα, η δομή της τυροσινάσης αποτελείται από τρεις κύριες περιοχές: (α) μία κεντρική περιοχή που περιλαμβάνει τα ιόντα Cu^{2+} τα οποία σχηματίζουν χηλικούς δεσμούς με το μοριακό οξυγόνο, καθώς επίσης και με τις φαινολικές ($-\text{OH}$) ομάδες του υποστρώματος²⁵¹ και (β) άλλες δύο περιοχές που περιέχουν έξι αμινοξέα ιστιδίνης (**His42, His60, His69, His204, His208, His231**), τα οποία σχηματίζουν δεσμούς με το ζεύγος των ιόντων Cu^{2+} στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, σταθεροποιώντας με αυτόν τον τρόπο το μόριο (**Σχήμα 4.7**). Η δομή της τυροσινάσης σταθεροποιείται μέσω δισουλφιδικών γεφυρών, οι οποίες σχηματίζονται από τα αμινοξέα κυστεΐνης που υπάρχουν γύρω από το ενεργό κέντρο. Οι τυροσινάσες που προέρχονται από διαφορετικά φυτά διαφέρουν ως προς το ποσοστό των κυστεϊνικών αμινοξέων που περιέχουν. Για παράδειγμα, στην ανθρώπινη τυροσινάση και στην τυροσινάση μύος υπάρχουν 17 κυστεϊνικά αμινοξέα, ενώ οι φυτικές τυροσινάσες περιέχουν 11 κυστεϊνικά αμινοξέα. Επίσης, οι φυτικές τυροσινάσες περιέχουν ένα κυστεϊνικό αμινοξύ στο καρβοξυτελικό άκρο, ενώ οι τυροσινάσες που προέρχονται από τους οργανισμούς *N. crassa*, *A. Bisporus* καθώς και οι πρωκαρυωτικές τυροσινάσες περιέχουν 0-1 κυστεϊνικά αμινοξέα. Από την άλλη, το καρβοξυτελικό άκρο της τυροσινάσης από μανιτάρι περιέχει δύο κυστεϊνικά αμινοξέα.²⁵²



Σχήμα 4.7: (α) Κρυσταλλική δομή τυροσινάσης (PDB ID: 3NM8) με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου. (β) Απεικόνιση των αμινοξέων στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης (PDB ID: 3NM8).

4.1.3.3 Δράση της τυροσινάσης

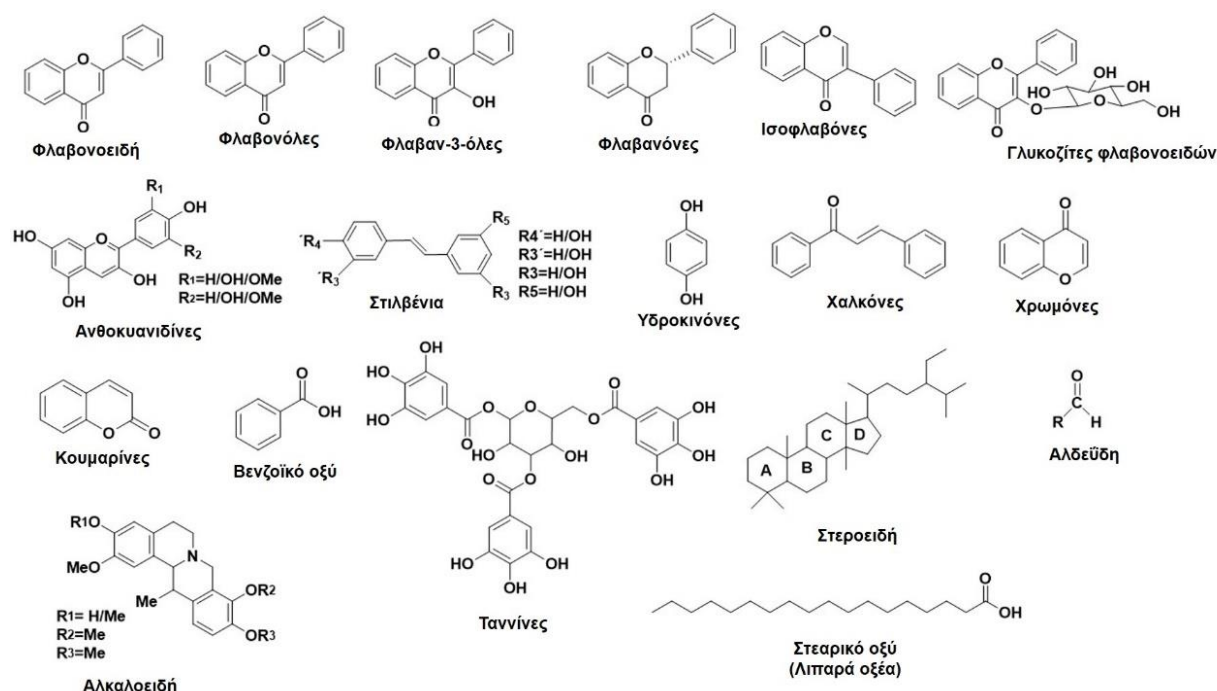
Ως προς τη δράση της, η τυροσινάση έχει διπλό ρόλο παρουσία του ατμοσφαιρικού οξυγόνου (O_2): (1) μπορεί να δράσει ως μονοφαινολάση (γνωστή και ως κρεσολάση) και να υδροξυλιώσει τις μονοφαινόλες σε όρθο θέση και (2) μπορεί να δράσει ως διφαινολάση (γνωστή και ως κατεχολάση) και να οξειδώσει τις ο-διφαινόλες σε ο-κινόνες. Ως προς το υπόστρωμα, η τυροσινάση προτιμάει περισσότερο υποστρώματα με L-στερεοχημεία, όπως είναι η L-Dopa και η L-τυροσίνη. Η κύρια αντίδραση της τυροσινάσης είναι η οξείδωση της L-τυροσίνης σε

ντοπακινόνη, ένα προϊόν που οδηγεί στο σχηματισμό ευμελανίνης (μαύρη ή καφέ πολυμερής χρωστική) και φαιομελανίνης (κίτρινη ή κόκκινη πολυμερής χρωστική). Η ανασταλτική δράση του ενζύμου πραγματοποιείται με διάφορους τρόπους: (α) Αναγωγή του ενδιάμεσου ο-ντοπακινόνη προς L-Dopa. Υπάρχουν πολλοί αναγωγικοί παράγοντες με τον πιο γνωστό να είναι το ασκορβικό οξύ. (β) Σύνθεση παραγώγων ο-ντοπακινόνης, τα οποία όταν αντιδρούν με τη ντοπακινόνη παράγουν άχρωμα προϊόντα. Παράδειγμα αποτελούν οι αλκυλοθειόλες που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τη ντοπακινόνη. (γ) Χρήση υποστρωμάτων που σχηματίζουν προϊόντα τα οποία εμποδίζουν την αντίδραση. (δ) Χρήση όξινων, βασικών ή άλλων αναστολέων της τυροσινάσης, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η δράση της.²⁵⁰

4.1.3.4 Φυτοχημικά ως φυσικοί αναστολείς της τυροσινάσης

Και στην περίπτωση της τυροσινάσης, έχει πραγματοποιηθεί μεγάλος αριθμός μελετών σε διάφορα φυσικά προϊόντα ως προς την αναστολή τους στην τυροσινάση (**Σχήμα 4.8**). Όλη η οικογένεια των флаβονοειδών (φλαβανόλες, флаβόνες, флаβονόλες, флаβανόνες, ισοφλαβόνες και ανθοκυανιδίνες), των φαινολικών οξέων αλλά και τα γλυκοσιδικά παράγωγά τους έχουν μελετηθεί εκτεταμένα για τις ανασταλτικές τους ιδιότητες ως προς την τυροσινάση. Η παρουσία των –OH ομάδων στον αρωματικό δακτύλιο ευθύνεται για τη δημιουργία χηλικών δεσμών με τα ιόντα Cu^{2+} του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Ωστόσο, τα περισσότερα флаβονοειδή έχουν δείξει ότι μπορούν να δράσουν είτε ως αναστολείς είτε ως υποστρώματα της τυροσινάσης. Η θέση και ο αριθμός των –OH ομάδων στους δακτύλιους των флаβονοειδών, όπως επίσης και η παρουσία ή η απουσία του διπλού δεσμού, καθώς και η παρουσία γερανυλίου στη δομή των флаβονοειδών, επηρεάζει την ισχύ της αναστολής της τυροσινάσης. Σημαντικοί αναστολείς της τυροσινάσης είναι οι ταννίνες και κυρίως οι κατεχίνες (κατεχίνη, γαλλικός εστέρας της κατεχίνης, γαλλικός εστέρας της επιγαλλοκατεχίνης κ.α), οι οποίες βρίσκονται σε αφθονία στο πράσινο τσάι.²⁵³ Άλλα флаβονοειδή που έχουν απομονωθεί από φυτά όπως είναι η στεπογενίνη και η νοραρτοσερπετίνη που έχουν απομονωθεί από το φυτό *Artocarpus xanthocarpus Merr.*²⁵⁴ έχουν δείξει ισχυρή ανασταλτική δράση στην τυροσινάση.

Όλη η πληροφορία για τους φυσικούς αναστολείς της τυροσινάσης έχει συλλεχθεί από τη βιβλιογραφία και βρίσκεται στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων ANTIAGE-DB, στο σύνδεσμο που έχουμε αναπτύξει αποκλειστικά γι' αυτή την πληροφορία: <https://bio-hpc.ucam.edu/anti-age-db/web/Info/Info.php#TableS6>.



Σχήμα 4.8: Απεικόνιση των βασικών δομών των φυτοχημικών που έχουν μελετηθεί ως αναστολείς της τυροσινάσης.

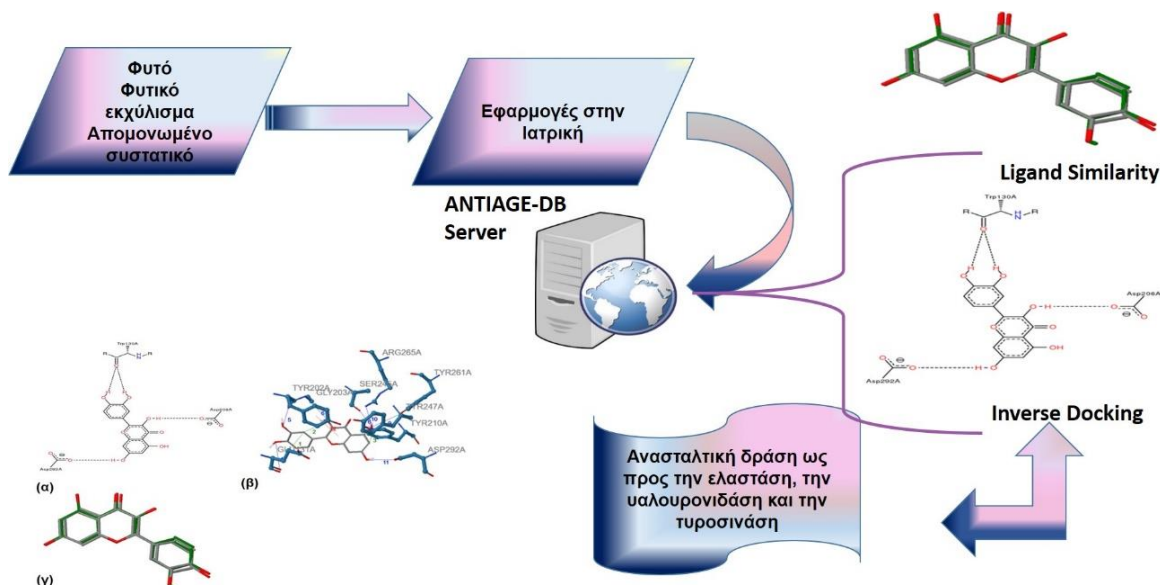
Αντίστοιχα, οι φυσικές πηγές των δευτερογενών μεταβολιτών, τα φυτά και τα εκχυλίσματά τους έχουν συγκεντρωθεί και αυτά από τη βιβλιογραφία και περιγράφονται λεπτομερώς στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων στο σύνδεσμο που έχει αναπτυχθεί αποκλειστικά γι' αυτόν το σκοπό: <https://bio-hpc.ucam.edu/anti-age-db/web/Info/Info.php#TableS5>.

4.3 Η ηλεκτρονική βάση δεδομένων ANTIAGE-DB

4.3.1. Εισαγωγή στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων ANTIAGE-DB

Η ανάπτυξη της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων ANTIAGE-DB βασίστηκε στην προσπάθεια να υπάρξει μια ολοκληρωμένη “εξερεύνηση” στο χώρο των φυσικών προϊόντων, και κυρίως εκείνων που παρουσιάζουν ανασταλτικές ιδιότητες και αλληλεπιδρούν με τα τρία ένζυμα- στόχους: ελαστάση, υαλουρονιδάση και τυροσινάση, με πλήρη περιγραφή των προφίλ της αλληλεπίδρασης κάθε φυσικού προϊόντος με το ένζυμο-στόχο και αναπτύχθηκε στα πλαίσια συνεργασίας με το Πανεπιστήμιο UCAM της Ισπανίας και τον Καθηγητή κ. Horacio Perez Sanchez. Αυτή η προσπάθεια αποτέλεσε επίσης έμπνευση για την ανάπτυξη όχι μόνο μιας απλής ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων σχετικά με τα φυσικά προϊόντα, αλλά και κάποια πρόσθετα εργαλεία με τα οποία αυτή η εξερεύνηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους: (α) με μια προσέγγιση που βασίζεται στη δομή κάθε μελετούμενου φυσικού προϊόντος και (β) με μια προσέγγιση που βασίζεται στην ομοιότητα με τη δομή των γνωστών υποκαταστατών που αλληλεπιδρούν με τα ένζυμα-στόχους. Μέσω αυτής της προσέγγισης, κάθε φυσικό προϊόν που μελετάται “σαρώνεται” με βάση γνωστούς αναστολείς κάθε ενζύμου. Βάσει αυτού, η δομή της εκάστοτε ένωσης που έχει μελετηθεί, είτε είναι φυσικό προϊόν, είτε ημισυνθετικό, είτε συνθετικό και έχει γνωστή ανασταλτική δράση για κάθε ένα από τα ένζυμα-στόχους, μπορεί να αποτελέσει βάση για την εύρεση παρόμοιων δομικών μοριών που ενδεχομένως να παρουσιάσουν και αυτά

ανασταλτική δράση ως προς τα ένζυμα-στόχους. Το γεγονός αυτό, δεδομένου ότι δύο ισοστερικά μόρια (τα οποία διατηρούν τον ίδιο όγκο και σχήμα), θα μπορούσαν να θεωρηθούν βιοϊσοστερομερή, δεδομένης της πιθανότητας να αναγνωρίσουν το ίδιο περιβάλλον της πρωτεΐνης που μελετάται, ή κάποιο άλλο παρόμοιο με αυτό. Η ύπαρξη αυτού του βιοϊσοστερομερισμού στα χημικά μόρια θα μπορούσε να παρέχει για κάθε μελετούμενη ένωση, την ικανότητα πρόβλεψης μιας ενδεχόμενης ανασταλτικής δράσης ως προς την ελαστάση, την υαλουρονιδάση και την τυροσινάση. Προκειμένου ο χρήστης να έχει εύκολη πρόσβαση στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων, αυτό το συγκεκριμένο εργαλείο μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέσω της υποβολής των αντίστοιχων κωδικών SMILES, είτε μέσω της σχεδίασης της δομής (στο κατάλληλο πλαίσιο) για την ένωση που θέλει να μελετήσει κάθε φορά, και να το υποβάλλει στον κατάλληλο σύνδεσμο, ώστε να του αποσταλλούν τα αποτελέσματα από τους αντίστοιχους υπολογισμούς. Επιπλέον, η βάση δεδομένων προσφέρει ένα εργαλείο το οποίο μπορεί να εισάγει απευθείας το όνομα της ένωσης που πρόκειται να μελετηθεί. Η συγκεκριμένη βάση δεδομένων δημιουργήθηκε και επιμελήθηκε χειροκίνητα για ενώσεις με γνωστές ανασταλτικές ιδιότητες ως προς την ελαστάση, την υαλουρονιδάση και την τυροσινάση (**Σχήμα 4.9**).



Σχήμα 4.9: Διάγραμμα ροής το οποίο απεικονίζει το σκοπό της λειτουργίας της ANTIAGE-DB [όπου: **Ligand Similarity:** Προσέγγιση με βάση την ομοιότητα της δομής των μελετούμενων μορίων, **Inverse Docking:** Προσέγγιση με βάση μελέτη μοριακής πρόσδεσης].

4.3.2. Μέθοδοι

4.3.2.1 Προσέγγιση εικονικής σάρωσης μορίων (Ligand based virtual screening (LBVS))

Η λειτουργία της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων ANTIAGE-DB με την προσέγγιση της εικονικής σάρωσης μορίων, βασίστηκε σε δύο μεθόδους. Μέσω της εφαρμογής του λογισμικού WEGA²⁵⁵ πραγματοποιείται μια τριδιάστατη αναζήτηση ομοιότητας σχήματος, μέσω λειτουργίας σύγκρισης της ευνοϊκότερης τιμής αλληλεπίδρασης, όπου όλες οι παράμετροι είναι προεπιλεγμένες από το σύστημα. Η δεύτερη μέθοδος είναι μια μέθοδος αναζήτησης μέσω υβριδικής ομοιότητας, η οποία βασίζεται σ' ένα 3D σχήμα και μπορεί να εφαρμοστεί χρησιμοποιώντας το εργαλείο SHAFTS.²⁵⁶ Όλοι οι υποκαταστάτες που χρησιμοποιήθηκαν για

την ανάπτυξη της εφαρμογής LBVS, σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας εργαλείο μετατροπής για την ανάπτυξη των διαμορφώσεων (molconvert tool) (ChemAxon, Budapest, Hungary). Οι μοριακές παράμετροι που είναι απαραίτητες για τον χαρακτηρισμό των υποκαταστατών στη βάση δεδομένων υπολογίστηκαν υπό συγκεκριμένες συνθήκες: απομάκρυνση αλάτων, ρύθμιση του pH σε ουδέτερο περιβάλλον, ώστε η κατάσταση πρωτονίωσης του κάθε υποκαταστάτη να παραμένει ουδέτερη, υπολογισμός μεμονωμένων φορτίων με εφαρμογή του δυναμικού πεδίου MMFF94, προσθήκη ατόμων υδρογόνου και ελαχιστοποίηση της ενέργειας (με τις προκαθορισμένες παραμέτρους),²⁵⁷ χρησιμοποιώντας τα εργαλεία AmberTools.²⁵⁸ Για κάθε δομή που έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη της ANTIAGE βάσης δεδομένων, έχει αναπαραχθεί μια βέλτιστη διαμόρφωση ανάμεσα σε 100 διαμορφώσεις, οι οποίες έχουν σχεδιαστεί με το λογισμικό Omega,²⁵⁹ χρησιμοποιώντας τις προκαθορισμένες παραμέτρους του συστήματος.

4.3.2.2 Εικονική σάρωση βάσει της δομής (Structure Based Virtual Screening-(SBVS))

Μέσω του συγκεκριμένου εργαλείου της βάσης δεδομένων, ένας χρήστης μπορεί να υποβάλλει υπολογισμούς που βασίζονται στη δομή της ενώσης που επιθυμεί να μελετηθεί, προκειμένου να πραγματοποιηθούν υπολογιστικά πειράματα μοριακής πρόσδεσης για τα τρία ένζυμα-στόχους: (α) Ελαστάση (Human Neutrophil Elastase) (PDB ID: 1B0F)²⁶⁰, (β) Υαλουρονιδάση (Hyaluronidase) (PDB ID: 2PE4)²⁶¹ και (γ) Τυροσινάση (PDB ID: 3NM8)²⁶². Οι υπολογισμοί από τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης (docking) πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Autodock Vina, και ορίζοντας ένα πλέγμα απόστασης 25 Å³ στη θέση πρόσδεσης κάθε πρωτεΐνης-στόχου, και ρυθμίζοντας τις προεπιλεγμένες παραμέτρους από το σύστημα. Οι πρωτεΐνες-στόχοι και οι υποκαταστάτες που μελετήθηκαν με μοριακή πρόσδεση ορίστηκαν με τα εργαλεία του προγράμματος AutoDock, όπως το εργαλείο Forli²⁶³.

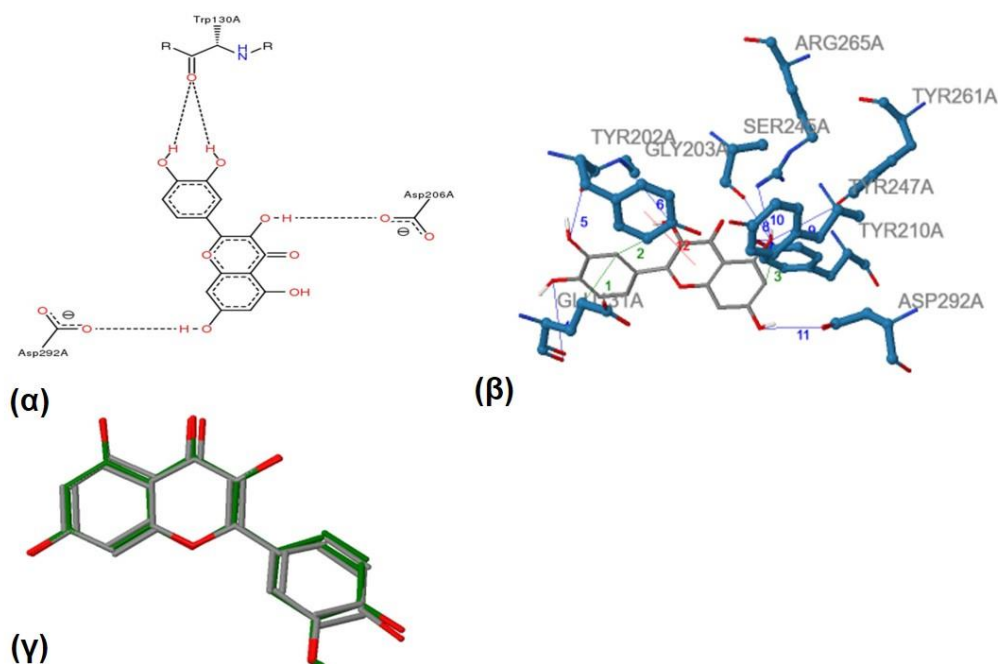
4.3.3 Σχεδιασμός της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων ANTIAGE-DB

Σε αυτή την ενότητα περιγράφεται η ηλεκτρονική βάση δεδομένων ANTIAGE-DB και του περιεχομένου της, τα βήματα που απαιτούνται για την πρόσβαση σε αυτή, καθώς και ο τρόπος που υποβάλλονται οι υπολογισμοί στην ιστοσελίδα.

4.4.3.1 Δομή και περιεχόμενο της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων

Η ηλεκτρονική βάση δεδομένων ANTIAGE-DB αποτελείται από δύο αλληλένδετα πλαίσια, τα οποία ονομάζονται Ενώσεις και Πειράματα που αντιπροσωπεύονται από ένα σύνολο πινάκων. Ο πρώτος πίνακας αποθηκεύει πληροφορίες σχετικά με φυσικά προϊόντα και περιέχει τις εξής πληροφορίες: όνομα, δομή, κωδικοί SMILES (Simplified Molecular-Input Line-Entry System) κ.α. Οι πίνακες των Πειραμάτων αποθηκεύουν πληροφορίες σχετικά με τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης (docking) και τα αποτελέσματα από τις συγκρίσεις μεταξύ των ομοιοτήτων των μελετούμενων δομών. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων μοριακής πρόσδεσης και των

πειραμάτων σύγκρισης της δομής εξηγούν τα δεδομένα που περιέχονται στον πίνακα Ενώσεις (Σχήμα 4.10: α, β, γ).



Σχήμα 4.10: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της υαλουρονιδάσης (PDB ID: 2PE4) και της κερκετίνης: **(α)** Απεικόνιση δεσμών υδρογόνου μεταξύ της κερκετίνης και των αμινοξέων Trp130A, Asp206A και Asp292A του ενεργού κέντρου της υαλουρονιδάσης, όπως έχει υπολογιστεί από την ANTIAGE-DB. **(β)** Απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου, των π-π αλληλεπιδράσεων και των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ της κερκετίνης και της υαλουρονιδάσης, όπως έχει υπολογιστεί από την ANTIAGE-DB. **(γ)** Υπολογισμοί με βάση την ομοιότητα δομής μεταξύ της κερκετίνης (πράσινο χρώμα) και της ναρινγενίνης (γκρι χρώμα) όπως έχουν προσδιοριστεί από την ANTIAGE-DB.

4.3.3.2 Διαθέσιμες πληροφορίες

Οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την ANTIAGE-DB είναι προσβάσιμες στην οθόνη πληροφοριών. Όλες οι πληροφορίες είναι οργανωμένες σε 8 πίνακες, των οποίων το περιεχόμενο συνοψίζεται στον **Πίνακα 4.1**.

Πίνακας 4.1: Κατάλογος πινάκων που είναι διαθέσιμη στην ιστοσελίδα της βάσης δεδομένων.

ΠΙΝΑΚΑΣ	ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ	ΣΥΝΔΕΣΜΟΣ
S1	Φυτά, εκχυλίσματα και απομονωμένα συστατικά που έχουν μελετηθεί για τις ανασταλτικές τους ιδιότητες ως προς την ελασάση (HNE).	https://bio-hpc.ucam.edu/anti-age-db/web/Info/Info.php#TableS1
S2	Φυσικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν μελετηθεί για την ανασταλτική τους δράση ως προς την ελασάση (HNE).	https://bio-hpc.ucam.edu/anti-age-db/web/Info/Info.php#TableS2
S3	Φυτά, εκχυλίσματα και απομονωμένα συστατικά που έχουν μελετηθεί για τις ανασταλτικές τους ιδιότητες ως προς την υαλουρονιδάση.	https://bio-hpc.ucam.edu/anti-age-db/web/Info/Info.php#TableS3

S4	Φυσικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν μελετηθεί για την ανασταλτική τους δράση ως προς την υαλουρονιδάση.	https://bio-hpc.ucam.edu/anti-age-db/web/Info/Info.php#TableS4
S5	Φυτά, εκχυλίσματα και απομονωμένα συστατικά που έχουν μελετηθεί για τις ανασταλτικές τους ιδιότητες ως προς την τυροσινάση.	https://bio-hpc.ucam.edu/anti-age-db/web/Info/Info.php#TableS5
S6	Φυσικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν μελετηθεί για την ανασταλτική τους δράση ως προς την τυροσινάση.	https://bio-hpc.ucam.edu/anti-age-db/web/Info/Info.php#TableS6
S7	Απεικόνιση των αποτελεσμάτων που έχουν προκύψει από τα δύο λογισμικά (ANTIAGE-DB και Maestro) α) Ελαστάση με καφεϊκό οξύ, β) Υαλουρονιδάση με κερκετίνη και γ) Τυροσινάση με μπετουλινικό οξύ.	https://bio-hpc.ucam.edu/anti-age-db/web/Info/Info.php#TableS7
S8	Απεικόνιση των αποτελεσμάτων που έχουν προκύψει από τα δύο λογισμικά (ANTIAGE-DB και Maestro) για την ένωση αουρικουλασίνη ²⁶⁴ , ισχυρό αναστολέα της ελαστάσης.	https://bio-hpc.ucam.edu/anti-age-db/web/Info/Info.php#TableS8

Ειδικά, οι αποθηκευμένες πληροφορίες σχετικά με τις πρωτεΐνες-στόχους είναι ύψιστης σημασίας, καθώς χρησιμοποιούνται για πειράματα μοριακής πρόσδεσης. Για το λόγο αυτό, έχουν επιλεγεί τρεις πρωτεΐνες που λειτουργούν ως φαρμακολογικοί στόχοι: (α) Ουδετερόφιλη Ελαστάση (PDB ID: 1B0F), (β) Υαλουρονιδάση (PDB ID: 2PE4) και (γ) Τυροσινάση (PDB ID: 3NM8).

4.3.3.3 Υποβολή υπολογισμών

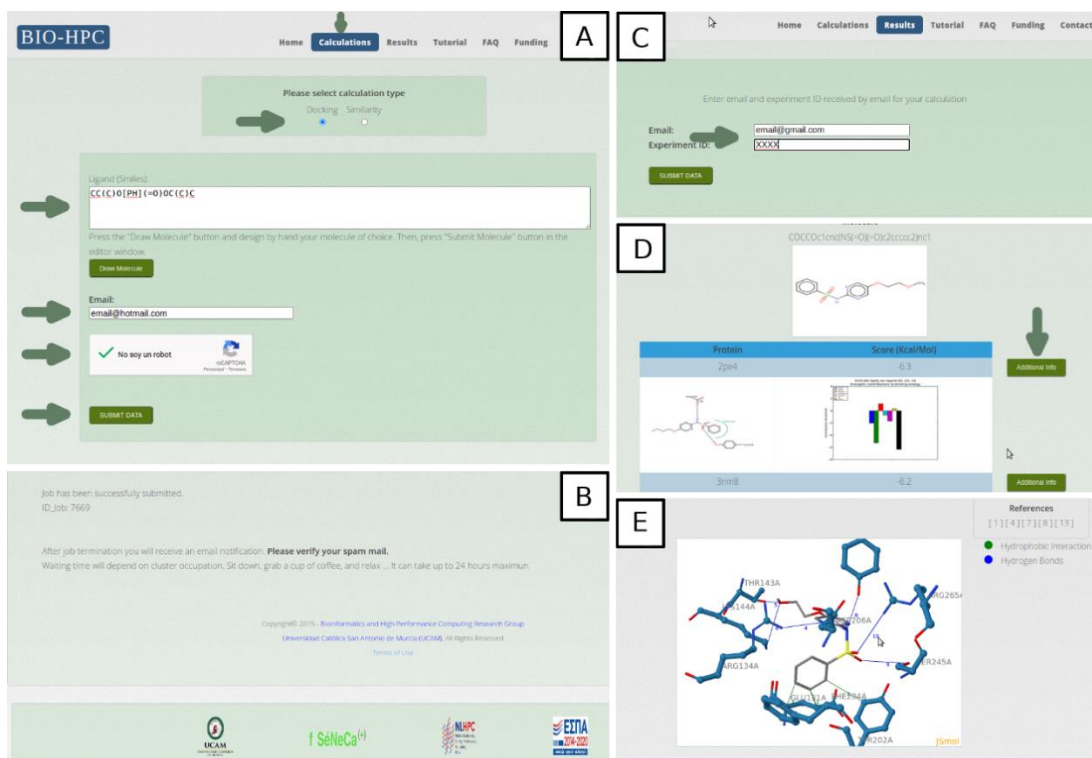
Μία από τις πιο σημαντικές πτυχές του διακομιστή της ANTIAGE-DB είναι η αναπαράσταση των διαθέσιμων πληροφοριών σχετικά με τα φυσικά προϊόντα που έχουν μελετηθεί για τις καλλυντικές και θεραπευτικές τους ιδιότητες καθώς και της ικανότητας που έχουν να αλληλεπιδρούν με τον χρήστη, καθώς προσφέρει δύο βασικά εργαλεία εικονικής σάρωσης, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της βιολογικής τους δράσης. Η εφαρμογή μιας πρόβλεψης χρησιμοποιώντας την ANTIAGE-DB είναι πολύ απλή διαδικασία η οποία αναπαρίσταται γραφικά στα **Σχήματα 4.11 και 4.12**.

Η ANTIAGE-DB διαθέτει δύο διαφορετικούς τρόπους υπολογισμών: πειράματα μοριακής πρόσδεσης και σύγκριση ομοιότητας δομής (**βέλος A1**). Στην πρώτη περίπτωση, προσδιορίζεται η αλληλεπίδραση μεταξύ της επιθυμητής ένωσης και μιας σειράς τριών πρωτεϊνικών στόχων, ενώ στη δεύτερη περίπτωση η επιθυμητή ένωση θα συγκρίνεται με άλλες ενώσεις γνωστές για τις καλλυντικές και θεραπευτικές τους δράσεις και θα μετράται η συνολική ομοιότητα μεταξύ τους. Αφού τελειώσει το επιλεγμένο πείραμα, ο χρήστης θα λάβει ένα e-mail το οποίο θα περιέχει έναν κωδικό πρόσβασης για το συγκεκριμένο πείραμα. Εισάγοντας τη διεύθυνση του ηλεκτρονικού ταχυδρομείου και τον κωδικό που έλαβε στην αντίστοιχη σελίδα

Results (βέλος C1), ο χρήστης θα μπορεί να έχει πρόσβαση στα αποτελέσματα. Ο χρήστης θα παρατηρήσει μια περίληψη των αποτελεσμάτων συνεπτυγμένη σε πίνακα, αλλά μπορεί να λάβει πιο λεπτομερείς πληροφορίες κάνοντας κλικ στην επιλογή Πρόσθετες Πληροφορίες (βέλος D1).



Σχήμα 4.11: Σχηματική αναπαράσταση του πρώτου βήματος για τον προσδιορισμό των υπολογισμών από την ANTIAGE-DB, εισάγοντας τον αντίστοιχο κωδικό SMILES της μελετούμενης ένωσης.



Σχήμα 4.12: Αναλυτική σχηματική αναπαράσταση ολόκληρης της διαδικασίας για την υποβολή υπολογισμών στην ANTIAGE-DB. Για κάθε περίπτωση, τα αντίστοιχα βέλη εξηγούνται παραπάνω στην ενότητα C.2.3.

4.3.3.4 Επαλήθευση της λειτουργίας της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ορθή λειτουργία της βάσης δεδομένων, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον *in silico* πειράματα μοριακής πρόσδεσης μέσω του προγράμματος Maestro. Για τις μελέτες μοριακής πρόσδεσης των δομών ορισμένων επιλεγμένων ενώσεων (κερκετίνη, μπετουλινικό οξύ και καφεϊκό οξύ) μέσω του Maestro, οι δομές αυτών των ενώσεων σχεδιάστηκαν στο βοηθητικό πρόγραμμα Maestro 10.2, μέσω του προγράμματος LigPrep, με βαθμό ιοντισμού σε pH=7,0, και ελαχιστοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το πεδίο δυνάμεων OPLS3,²⁶⁵ ενώ χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ConfGen σε πλήρη λειτουργία για τη δημιουργία πιθανών βιοδραστικών διαμορφώσεων.²⁶⁶ Οι κρυσταλλικές δομές της υαλουρονιδάσης (PDB ID: 2PE4), της ελαστάσης (PDB ID: 1BF0) και της τυροσινάσης (PDB ID: 3NM8) σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το βοηθητικό πρόγραμμα Protein Preparation Wizard²⁶⁷. Το πλέγμα των υποδοχέων δημιουργήθηκε επικεντρώνοντας τη δομή του στο καταλυτικό κέντρο κάθε ενζύμου. Για τις μελέτες μοριακής πρόσδεσης των υποκαταστατών εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος GlideXP²⁶⁸. Όλες οι πιθανές θέσεις πρόσδεσης που δημιουργήθηκαν ελαχιστοποιήθηκαν μετά την αντίστοιχη μελέτη της μοριακής πρόσδεσης (Σχήμα 4.13, Πίνακας 4.2). Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε περαιτέρω την ορθή λειτουργία της βάσης δεδομένων, ένα φυτοχημικό συστατικό που μελετήθηκε σχετικά πρόσφατα για την ανασταλτική του δράση στην ελαστάση²⁶⁴ μελετήθηκε και με τα δύο λογισμικά (ANTIAGE-DB και Maestro), ενώ συγκρίθηκαν τα προφίλ των αλληλεπιδράσεων που προέκυψαν από τα δύο λογισμικά (Σχήμα 4.14, Πίνακας 4.3).

Πίνακας 4.2: Περιγραφή των αποτελεσμάτων, όπως έχουν υπολογιστεί από τα δύο λογισμικά (ANTIAGE-DB και Maestro) για τις μελέτες: α) ελαστάση με καφεϊκό οξύ, β) υαλουρονιδάση με κερκετίνη και γ) τυροσινάση με μπετουλινικό οξύ.

α) Ελαστάση-Καφεϊκό οξύ

Αποτελέσματα από την ANTIAGE-DB			Αποτελέσματα από το πρόγραμμα Maestro		
<u>Υδρόφοβες</u>	<u>Δεσμοί</u>	<u>π-π-</u>	<u>Υδρόφοβες</u>	<u>Δεσμοί</u>	<u>π-π-</u>
<u>αλληλεπιδράσεις</u>	<u>Υδρογόνου</u>	<u>Αλληλεπιδρ</u>	<u>αλληλεπιδρ</u>	<u>Υδρογόνου</u>	<u>Αλληλεπι</u>
		<u>άσεις</u>	<u>άσεις</u>		<u>δράσεις</u>
PHE192	PHE41	PHE192	PHE192	VAL41	HIS57
	GLY193			GLY193	
	VAL216			LEU216	

β) Υαλουρονιδάση-Κερκετίνη

Αποτελέσματα από την ANTIAGE-DB			Αποτελέσματα από το πρόγραμμα Maestro		
<u>Υδρόφοβες</u>	<u>Δεσμοί</u>	<u>π-π-</u>	<u>Υδρόφοβες</u>	<u>Δεσμοί</u>	<u>π-π-</u>
<u>αλληλεπιδράσεις</u>	<u>Υδρογόνου</u>	<u>Αλληλεπιδράσεις</u>	<u>αλληλεπιδράσεις</u>	<u>Υδρογόνου</u>	<u>Αλληλεπιδράσεις</u>
GLU131	GLU131	TYR202	TYR202	GLU131	TYR247
TYR202	TYR202	TYR261	TYR247	ASP292	ARG134
TYR247	GLY203	ARG265		ARG134	ARG265
	TYR210	ASP292			
	SER245				

γ) Τυροσινάση-Μπετουλινικό οξύ

Αποτελέσματα από την ANTIAGE-DB				Αποτελέσματα από το πρόγραμμα Maestro			
Χηλικοί δεσμοί	Χηλικοί δεσμοί	Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις	Δεσμοί Υδρογόνου	Χηλικοί δεσμοί	Χηλικοί δεσμοί	Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις	Δεσμοί Υδρογόνου
HIS42	HIS204	PHE197	VAL218	42 HIS	204 HIS	VAL217	ASN205
HIS60	HIS208	HIS231	PRO201	60 HIS	208 HIS	PHE197	
			ASN205		231 HIS	ASN205	
			VAL217			VAL218	
			VAL218				
			PRO219				

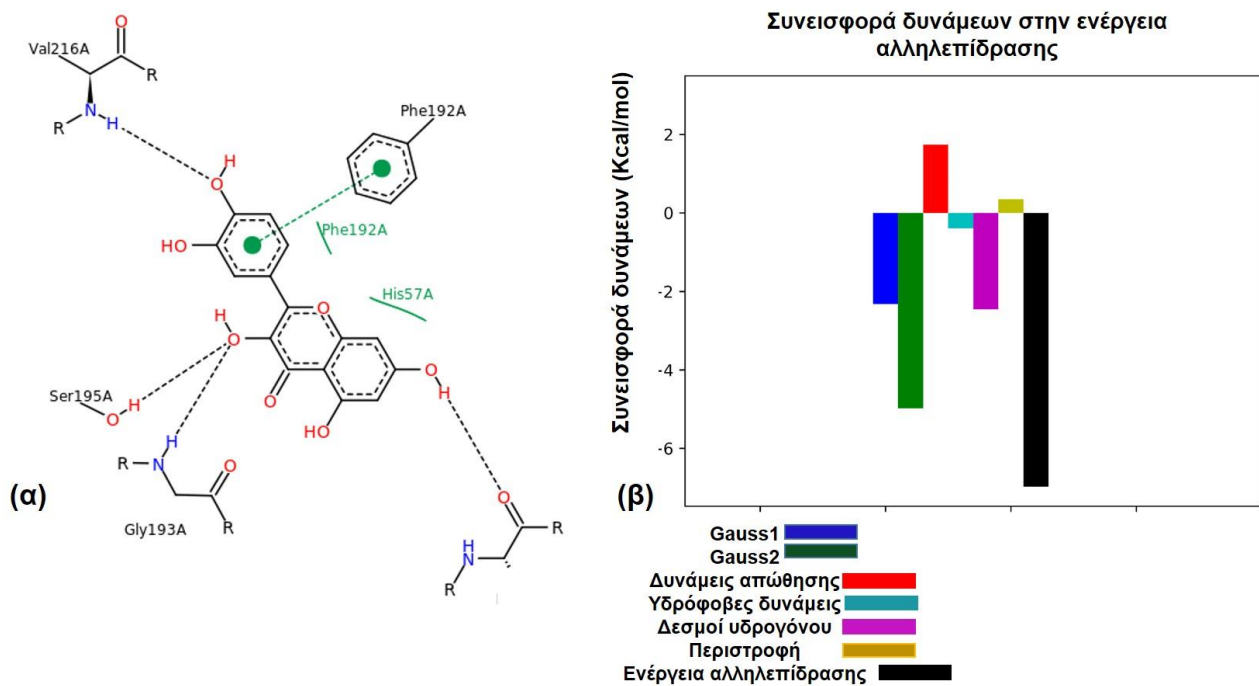
Πίνακας 4.3 Περιγραφή των αποτελεσμάτων, όπως έχουν υπολογιστεί από τα δύο λογισμικά (ANTIAGE-DB και Maestro) για τη μελέτη του προφίλ αλληλεπίδρασης της ελαστάσης με τον υποδοχέα Αουρικουλασίνη.

Αποτελέσματα από την ANTIAGE-DB			Αποτελέσματα από το πρόγραμμα Maestro		
Υδρόφοβες Αλληλεπιδράσεις	Δεσμοί Υδρογόνου	π-π- Αλληλεπιδράσεις	Υδρόφοβες Αλληλεπιδράσεις	Δεσμοί Υδρογόνου	π-π- Αλληλεπιδράσεις
LEU143	PHE41	HIS57	143 LEU	41 PHE	57 HIS
PHE192	SER195		192 PHE	195 SER	
	SER214		41 PHE	214 SER	

4.3.3.5 Αξιοποίηση της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων ANTIAGE-DB

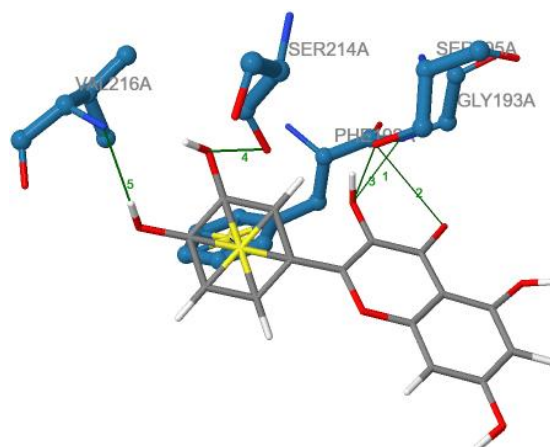
Ακολουθούν παραδείγματα από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από την ηλεκτρονική βάση δεδομένων ANTIAGE-DB για την κερκετίνη, το ροσμαρινικό οξύ και το ουρσολικό οξύ, και για το προφίλ αλληλεπίδρασής τους και με τα τρία ένζυμα-στόχους;

(4.4.3.5.1) Κερκετίνη-Ανθρώπινη ουδετερόφιλη ελαστάση



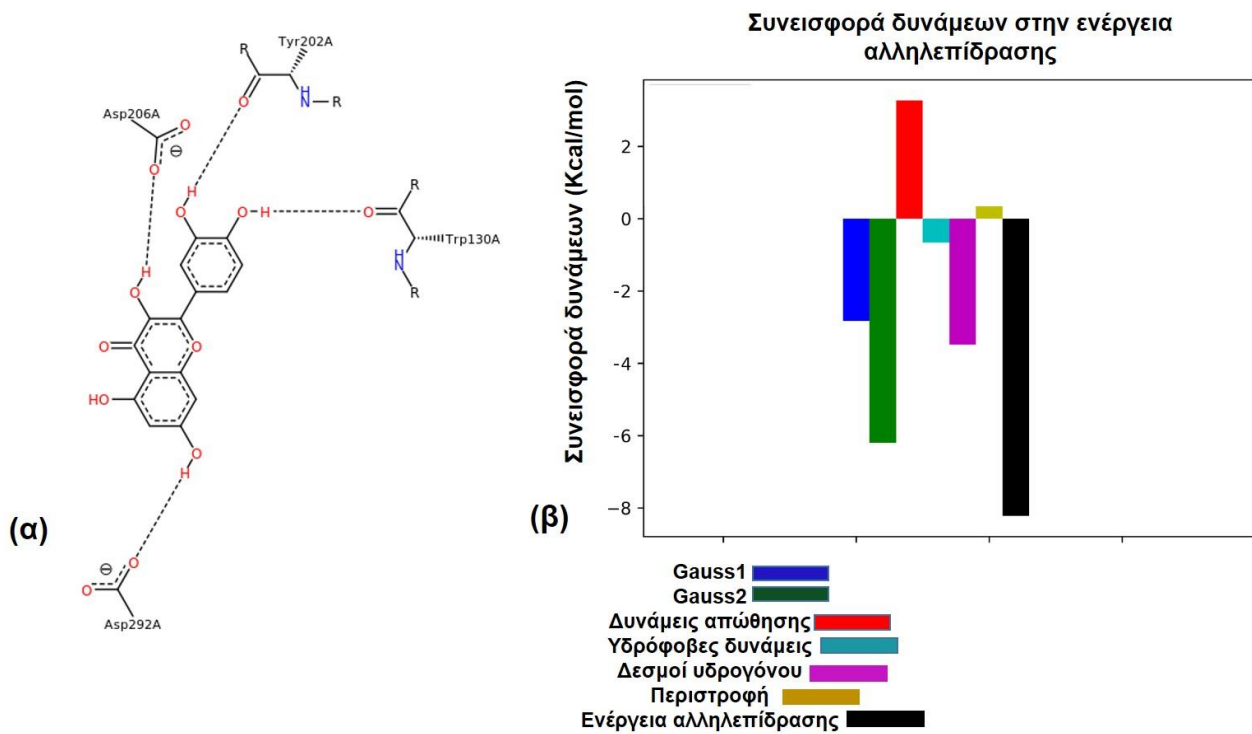
Σχήμα 4.14: (α) Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της κερκετίνης με την ανθρώπινη ουδετερόφιλη ελαστάση. (β) Διάγραμμα ενέργειας της αλληλεπίδρασης.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 4.14**, η κερκετίνη αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο της ελαστάσης, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου μεταξύ της $-OH$ που βρίσκεται σε α -θέση ως προς το καρβονύλιο του μορίου της και της $-OH$ του αμινοξέος Ser195, ενώ ταυτόχρονα συνδέεται και με την $-NH$ ομάδα της Gly193. Επίσης, αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου και μεταξύ της $-OH$ του άλλου αρωματικού δακτυλίου και του $-O$ της His57. Δεσμοί υδρογόνου αναπτύσσονται επίσης και με τη Val216, ενώ ο αρωματικός δακτύλιος της κερκετίνης αναπτύσσει ελκτικές δυνάμεις λόγω π-π επιστίβαξης με τον αρωματικό δακτύλιο της Phe192 (**Σχήμα 4.15**). Σύμφωνα με το αντίστοιχο διάγραμμα, η ενέργεια αλληλεπίδρασης υπολογίστηκε ίση με -7 kcal/mol.



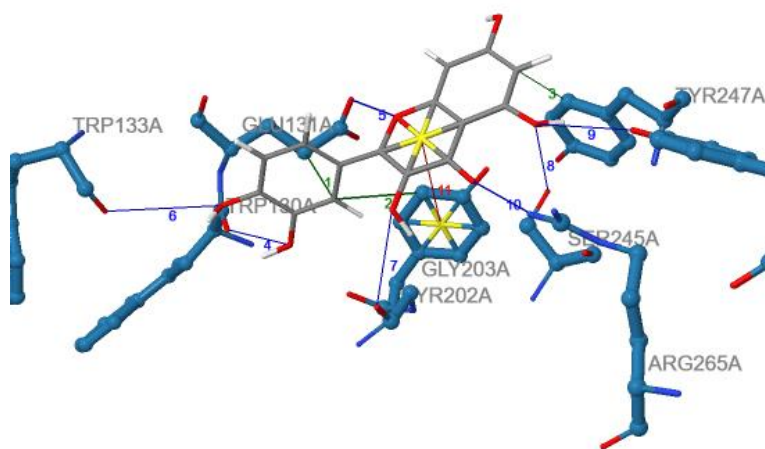
Σχήμα 4.15: Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της κερκετίνης με την ελαστάση (καλύτερη θέση), όπου διακρίνονται οι δεσμοί υδρογόνου (πράσινο χρώμα) και οι π-π αλληλεπιδράσεις (μπλε χρώμα).

(4.4.3.5.2) Κερκετίνη-Υαλουρονιδάση



Σχήμα 4.16: (α) Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της κερκετίνης με την υαλουρονιδάση. (β) Διάγραμμα ενέργειας της αλληλεπίδρασης.

Η κερκετίνη αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο της υαλουρονιδάσης, μέσω των -OH ομάδων του μορίου της, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Tyr130, Tyr202, Asp206 και Asp292. Ωστόσο, υπάρχουν και άλλες αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ της κερκετίνης και του μορίου και φαίνονται στο επόμενο σχήμα:

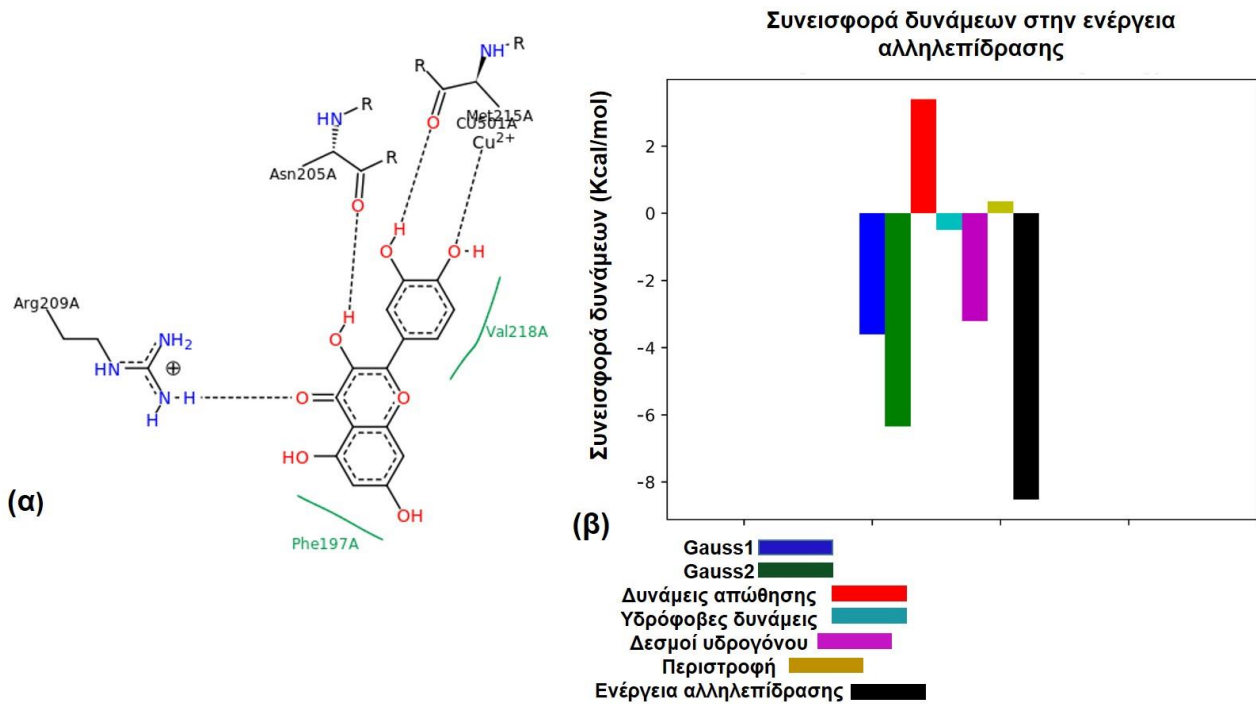


Σχήμα 4.17: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της κερκετίνης και της υαλουρονιδάσης (καλύτερη θέση), όπου διακρίνονται οι δεσμοί υδρογόνου (μπλε χρώμα), οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (πράσινο χρώμα), και οι π-π αλληλεπιδράσεις.

Όπως παρατηρείται, δεσμοί υδρογόνου αναπτύσσονται και μεταξύ των αμινοξέων Trp133, Gly203, Ser245, Tyr261 και Arg265. Η αλληλεπίδραση ενισχύεται με δυνάμεις π-π αλληλεπίδρασης μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων και των αμινοξέων Phe197 και His208.

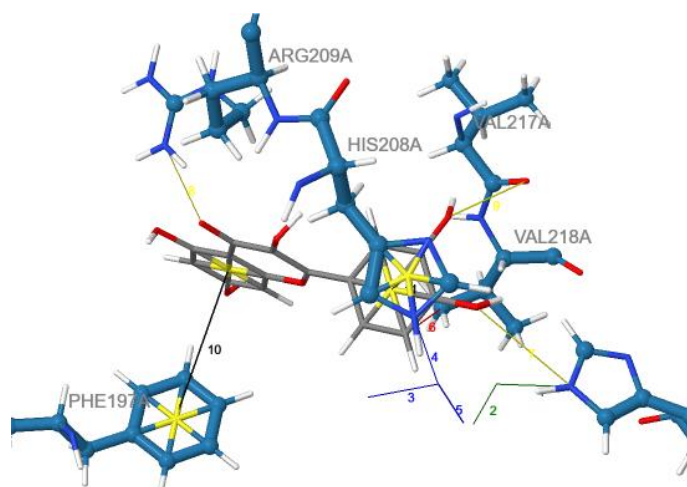
Επίσης, αναπτύσσονται και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με το αμινοξύ Val218. Η ενέργεια αλληλεπίδρασης της κερκετίνης με την υαλουρονιδάση υπολογίστηκε ίση με -8.2 kcal/mol.

(4.4.3.5.3) Κερκετίνη-Τυροσινάση



Σχήμα 4.18: (α) Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της κερκετίνης με την τυροσινάση. (β) Διάγραμμα ενέργειας της αλληλεπίδρασης.

Στην περίπτωση της τυροσινάσης, η κερκετίνη σχηματίζει χηλικούς δεσμούς με τα ιόντα Cu^{2+} του ενεργού της κέντρου, μέσω των -OH ομάδων. Στη σταθεροποίηση αυτής της αλληλεπίδρασης συμβάλλουν και τα αμινοξέα της ιστοιδίνης που περιβάλλουν τα μεταλλικά ιόντα: His42, His60, His204, His208 και His231. Αναπτύσσονται επίσης δεσμοί OH μεταξύ των -OH ομάδων του μορίου και των αμινοξέων His42, Arg209 και Val217 (**Σχήμα 4.18**). Από την άλλη, αναπτύσσονται επίσης υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αρωματικού δακτυλίου της κερκετίνης και του αμινοξέος Val218. Επιπλέον δυνάμεις π-π αλληλεπίδρασης αναπτύσσονται μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων και των αμινοξέων Phe197 και His208 (**Σχήμα 4.19**). Η ενέργεια αλληλεπίδρασης της κερκετίνης με την τυροσινάση υπολογίστηκε ίση με -8.5 kcal/mol.



Σχήμα 4.19: Απεικόνιση της αλληλεπίδρασης της κερκετίνης με την τυροσινάση, όπου διακρίνονται οι χηλικοί δεσμοί (πράσινο και μπλε χρώμα), οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (κόκκινο χρώμα), οι δεσμοί υδρογόνου (κίτρινο χρώμα) και οι αλληλεπιδράσεις π-π επιστίβαξης (μαύρο χρώμα).

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα, η ηλεκτρονική βάση δεδομένων ANTIAGE-DB μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη του προφίλ αλληλεπίδρασης ενός φυσικού προϊόντος και με τα τρία ένζυμα-στόχους. Επίσης, μπορεί να γίνει απευθείας σύγκριση των ενεργειών αλληλεπίδρασης μεταξύ του φυσικού προϊόντος και των τριών ενζύμων, έτσι ώστε να αξιοποιηθεί αποτελεσματικά για την παραγωγή καινούριων φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων. Η ηλεκτρονική βάση δεδομένων ANTIAGE-DB μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για την άμεση σάρωση των συστατικών που περιέχονται σ' ένα εκχύλισμα, έτσι ώστε ο χρήστης να αποκτήσει μια πρώτη εικόνα για τον τρόπο που θα μπορούσε ένα εκχύλισμα να επηρεάσει τη δράση αυτών των ενζύμων.

Γενικά Συμπεράσματα Κεφαλαίου

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η ανάπτυξη της ηλεκτρονική βάσης δεδομένων ANTIAGE-DB, η οποία έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και στα πλαίσια συνεργασίας με τον Καθηγητή κ. Horacio Perez Sanchez του Πανεπιστημίου UCAM της Ισπανίας. Πηγή των πληροφοριών στις οποίες βασίστηκε αυτή η ηλεκτρονική βάση δεδομένων είναι όλα τα φυτά και βότανα καθώς και τα παραγόμενα εκχυλίσματά τους αλλά και τα απομονωμένα συστατικά τους, τα οποία έχουν μελετηθεί για τις βιολογικές τους δράσεις έναντι της ελαστάσης, της υαλουρονιδάσης και της τυροσινάσης. Η ANTIAGE-DB δίνει την ικανότητα πρόβλεψης του προφίλ αλληλεπίδρασης ενός συστατικού με ένα από τα τρία ένζυμα-στόχους και την απευθείας σύγκριση αυτών των προφίλ μεταξύ των ενζύμων και του μελετούμενου υποκαταστάτη. Επίσης, η ANTIAGE-DB παρέχει την πληροφορία για την ύπαρξη δομών που είναι ομόλογες με ήδη μελετούμενους υποκαταστάτες, και που θα μπορούσαν να αποτελέσουν καινούρια μόρια για την ανάπτυξη καινούριων φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων με αντιγηραντική και αντιμελανογενετική δράση.

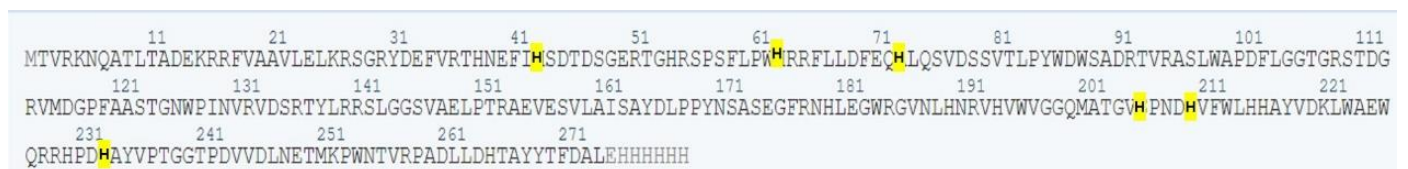
Κεφάλαιο 5: Ένζυμα που σχετίζονται με τη γήρανση και την ανάπτυξη μελανώματος. Ανάπτυξη μεθοδολογιών για τη μελέτη ενζυμικών αντιδράσεων και της αναστολής τους από φυσικά προϊόντα και φυτικά εκχυλίσματα

Κεφάλαιο 5.1: Ανάπτυξη μεθοδολογίας για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης και αναστολής της τυροσινάσης από φυσικά προϊόντα και φυτικά εκχυλίσματα

5.1.1 Εισαγωγή

5.1.1.1 Η δομή της τυροσινάσης

Κύριο χαρακτηριστικό της δομής της τυροσινάσης είναι η παρουσία δύο ιόντων χαλκού (Cu^{2+}) στο ενεργό της κέντρο.²⁵⁰ Συγκεκριμένα, η δομή της τυροσινάσης αποτελείται από τρεις κύριες περιοχές: (**α**) μία κεντρική περιοχή που περιλαμβάνει τα ιόντα Cu^{2+} τα οποία σχηματίζουν χηλικούς δεσμούς με το μοριακό οξυγόνο, καθώς επίσης και με τις φαινολικές ($-\text{OH}$) ομάδες του υποστρώματος²⁵¹ και (**β**) άλλες δύο περιοχές που περιέχουν έξι αμινοξέα ιστιδίνης (**His42, His60, His69, His204, His208, His231**), τα οποία σχηματίζουν δεσμούς με το ζεύγος των ιόντων Cu^{2+} στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, σταθεροποιώντας με αυτόν τον τρόπο το μόριο (**Σχήμα 5.1.1**). Η δομή της τυροσινάσης σταθεροποιείται μέσω δισουλφιδικών γεφυρών, οι οποίες σχηματίζονται από τα αμινοξέα κυστεΐνης που υπάρχουν γύρω από το ενεργό κέντρο²⁵².

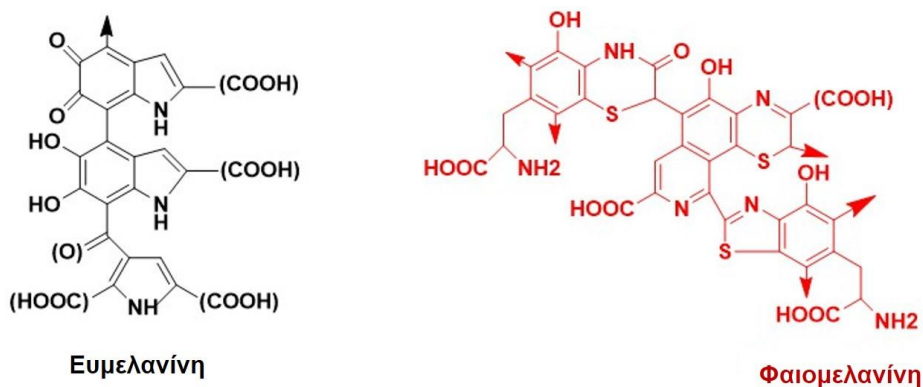


Σχήμα 5.1.1: Αμινοξική αλληλουχία της τυροσινάσης. Με κίτρινη επισήμανση απεικονίζονται τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου.

5.1.1.2 Μηχανισμός δράσης της τυροσινάσης

Στον ανθρώπινο οργανισμό, η τυροσινάση παράγεται στα μελανοκύτταρα και εκφράζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο σύστημα Golgi. Μετά την έκφρασή της, η τυροσινάση μεταφέρεται στα μελανοσώματα της επιδερμίδας, όπου ξεκινάει το πρώτο στάδιο της μεταβολικής οδού της μελανογένεσης που οδηγεί στην παραγωγή της μελανίνης, μιας πολυμερικής βιοχημικής χρωστικής. Η μελανίνη είναι κυρίως υπεύθυνη για τη μελάγχρωση του ανθρώπινου δέρματος, της ίριδας του ματιού και των τριχών και παράγεται στα μελανοκύτταρα της επιδερμίδας, σε μια αναλογία 1:36 ως προς τα βασικά κερατινοκύτταρα.²⁶⁹ Τα μελανοκύτταρα, όταν εκτεθούν σε εξωγενείς παράγοντες, όπως είναι η υπεριώδης UVB ακτινοβολία, ενεργοποιούνται προς τη σύνθεση της μελανίνης. Αφού παραχθεί η μελανίνη, μεταφέρεται και αυτή στα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας. Δύο είναι οι βασικές μελανίνες που

παράγονται: η ευμελανίνη (αδιάλυτη χρωστική μαύρου χρώματος) (**Σχήμα 5.1.2**) και η φαιομελανίνη (διαλυτή χρωστική κίτρινου-κόκκινου χρώματος) (**Σχήμα 5.1.2**). Η διαφορά μεταξύ των δύο ειδών μελανίνης, είναι ότι η δεύτερη συντίθεται παρουσία κυστεΐνης ή γλουταθειόνης στη μεταβολική οδό της μελανοσύνθεσης (**Σχήμα 5.1.3**). Επίσης, κατά τη μελανογένεση, είναι δυνατή και η παραγωγή νευρομελανινών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη νευροεκφυλιστικών παθήσεων όπως είναι η νόσος Πάρκινσον και η νόσος Χάντινγκτον. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η παραγωγή μελανίνης δρα ως φωτοπροστατευτικός παράγοντας, έναντι της UVB ηλιακής ακτινοβολίας που οδηγεί στον καρκίνο του δέρματος (μελάνωμα). Ωστόσο, υπό συνθήκες ανεξέλεγκτης παραγωγής της μελανίνης, εκτός από την ανάπτυξη κηλίδων και μελάνωματος, δημιουργούνται διάφορες δερματικές παθήσεις και δυσλειτουργίες όπως: ποικιλοδερμία Civate, μελάνωμα, λεύκη, μελανίζουσα ακάνθωση (*Acanthosis nigricans*), μελάγχρωση του περιοφθαλμικού δέρματος, καρκίνος του δέρματος και νευροεκφυλισμός που οδηγεί στη νόσο Πάρκινσον.²⁷⁰⁻²⁷²



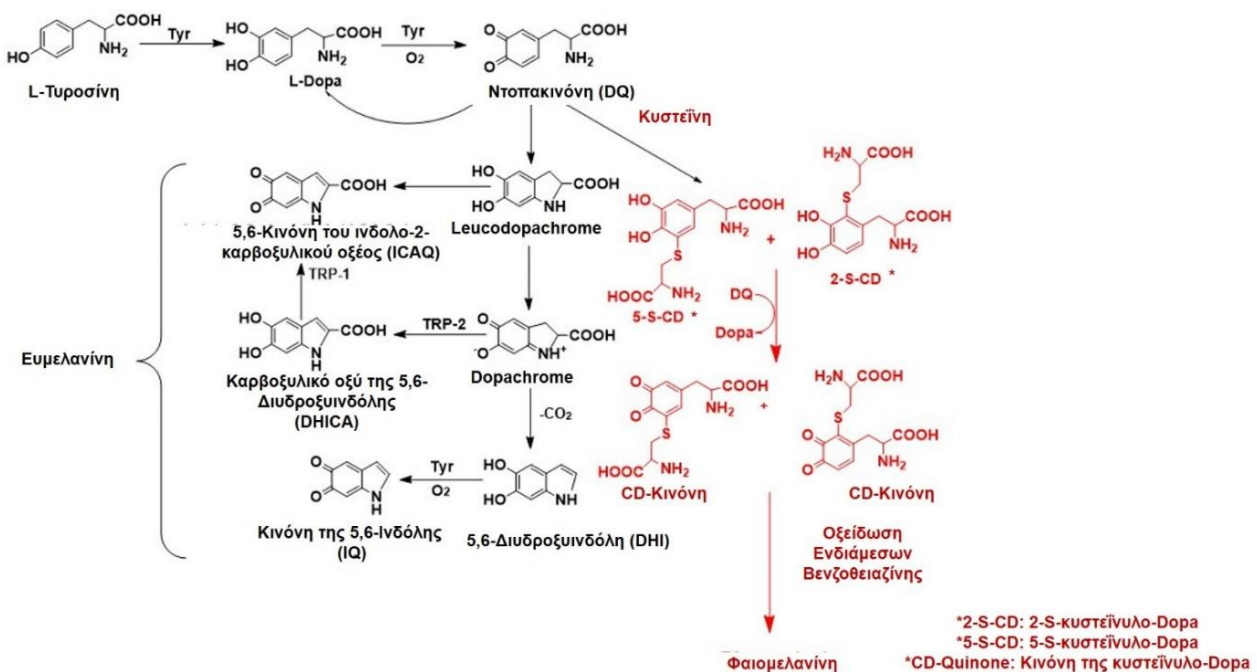
Σχήμα 5.1.2: Δομή ευμελανίνης και φαιομελανίνης. Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις του μορίου που πολυμερίζονται.

5.1.1.3 Μηχανισμός παραγωγής μελανίνης-Μελανογένεση

Η μελανογένεση, η μεταβολική οδός της μελανοσύνθεσης καταλύεται από ένα συνδυασμό ενζυμικών και χημικών αντιδράσεων, σε φυσιολογικό pH. Το πρώτο βήμα της μελανογένεσης είναι η υδροξυλίωση της L-τυροσίνης σε L-3,4-διυδροξυφαινοϋλαλανίνη (γνωστή και ως λεβοντόπα ή L-Dopa), η οποία καταλύεται από τη δράση της μονοφαινολάσης και λειτουργεί και αυτή ως υπόστρωμα της τυροσινάσης. Στη συνέχεια, η τυροσινάση δρα ως διφαινολάση, οξειδώνοντας την L-Dopa σε ο-κινόνη (ντοπακινόνη). Η ντοπακινόνη είναι ένα αρκετά δραστικό και ασταθές ενδιάμεσο με χρόνο ημιζωής περίπου 30 δευτερόλεπτα και μετατρέπεται μέσω ενδομοριακής 1,4-κυκλοπροσθήκης της αμινομάδας στο βενζολικό δακτύλιο, στη χρωστική ένωση leucodopachrome. Επίσης, η ντοπακινόνη μπορεί να αντιδράσει και με μόρια του νερού. Το σχηματιζόμενο leucodopachrome υφίσταται στη συνέχεια μια οξειδοαναγωγική ανταλλαγή με την ποσότητα της ντοπακινόνης που δεν έχει αντιδράσει, οδηγώντας στο σχηματισμό της χρωστικής dopachrome και της L-Dopa.^{136,270,273,274} Σε επόμενο στάδιο, η παραγόμενη χρωστική dopachrome αποκαρβοξυλιώνεται είτε χημικά με σχηματισμό 5,6-διυδροξυινδόλης (DHI) ή μετασχηματίζεται ενζυμικά σε 5,6-διυδροξυκαρβοξυλικό οξύ (DHICA) με το ένζυμο ταυτομεράση του dopachrome. Αξίζει να σημειωθεί ότι μέχρι στιγμής δεν

υπάρχει κάποια βιβλιογραφική αναφορά που να έχει δείξει ότι έχει γίνει ταυτοποίηση του leucodopachrome και της 5,6-διυδροξυινδόλης με φασματοσκοπία 1D ¹H NMR, όταν αυτά βρίσκονται στο διάλυμα της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης. Η ταυτοποίηση αυτών των μορίων μέσα στο διάλυμα της ενζυμικής αντίδρασης, όσο βρίσκεται σε εξέλιξη, περιγράφεται για πρώτη φορά στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Η DHI και το DHICA είναι τα πρόδρομα μόρια στην παραγωγή των μελανινών, καθώς η DHI οξειδώνεται στη συνέχεια, σε κινόνη της 5,6-διυδροξυινδόλης και το DHICA οξειδώνεται σε κινόνη του 5,6-διυδροξυινδόλη-2-καρβοξυλικού οξέος. Στα επόμενα βήματα της μελανογένεσης, μέσω της δράσης των πρωτεϊνών TRP1 (Tyrosinase Related Protein-1) και TRP2 (Tyrosinase Related Protein-2), το dopachrome σχηματίζεται σε DHICA (από τη δράση της TRP2), ενώ το DHICA οξειδώνεται σε ευμελανίνη (από τη δράση της TRP1).

Παρουσία κυστεΐνης ή γλουταθειόνης, η ντοπακινόνη μετατρέπεται σε 5-S-κυστεΐνυλο-ντόπα ή γλουταθειόνυλο-ντόπα αντίστοιχα. Τα θειόνυλο ενδιάμεσα που προκύπτουν, μετατρέπονται στη συνέχεια με τον ίδιο τρόπο, οδηγώντας στην παραγωγή της φαιομελανίνης (Σχήμα 5.1.3). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι κατά τη μελανοσύνθεση συμμετέχουν τρεις ισομορφές της τυροσινάσης (μία μεθοξυ- και δύο δεοξυ-τυροσινάσες).^{275,276} Η μεθοξυτυροσινάση περιλαμβάνει δύο ιόντα Cu²⁺, τα οποία σχηματίζουν εσωτερικούς δεσμούς γέφυρας, ενώ οι εξωτερικοί υποκαταστάτες αλληλεπιδρούν με τα μεταλλικά ιόντα.²⁷⁷ Η άλλη ισομορφή, η δεοξυτυροσινάση, περιλαμβάνει τη χαρακτηριστική περιοχή Cu(I)-Cu(I). Η οξυτυροσινάση προκύπτει από αναγωγή της δεοξυτυροσινάσης. Η οξυτυροσινάση περιέχει δύο άτομα ιόντων Cu²⁺ και έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά τόσο με μονοφαινολικά όσο και με διφαινολικά υποστρώματα.²⁷⁷



Σχήμα 5.1.3: Σχηματική αναπαράσταση της μεταβολικής οδού της μελανοσύνθεσης προς σχηματισμό ευμελανίνης (μαύρο χρώμα) και φαιομελανίνης (κόκκινο χρώμα).

Η δράση της τυροσινάσης σχετίζεται άμεσα με διάφορες δερματικές δυσλειτουργίες, συνεπώς τόσο η ενισχυμένη δράση της, όσο και η αναστολή της διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση δερματικών παθήσεων. Ασθένειες όπως ο αλμπινισμός και η λεύκη, όπου η παραγωγή μελανίνης γίνεται σε χαμηλά έως μηδενικά επίπεδα, χρειάζονται ενισχυτικούς παράγοντες της τυροσινάσης για την αντιμετώπισή τους. Από την άλλη, η συνεχόμενη και μη

ελεγχόμενη παραγωγή μελανίνης, οδηγεί στην εμφάνιση κηλίδων και κυρίως καρκίνου του δέρματος. Καθώς η μελανίνη δρα ως φωτοπροστατευτικός παράγοντας, το μαύρο χρώμα που εμφανίζεται στο δέρμα, μετά από πολύωρη έκθεση στον ήλιο, ουσιαστικά σηματοδοτεί την αρχή της καταστροφής των μελανοκυττάρων της επιδερμίδας. Για το σκοπό αυτό, είναι αρκετά σημαντική η παραγωγή καλλυντικών προϊόντων και αντηλιακών για την προστασία της επιδερμίδας από την UV ακτινοβολία. Όσον αφορά τα τρόφιμα, είναι επιτακτική η αντιμετώπιση της ενζυμικής αμαύρωσης που δημιουργείται κατά την παραμονή τους, η οποία υποβαθμίζει την ποιότητα, τη γεύση και το άρωμα των τροφίμων. Έχουν γίνει εκτεταμένες μελέτες για την εύρεση αναστολέων της τυροσινάσης, τόσο συνθετικών όσο και φυσικών. Η μελέτη των φυτών και των βοτάνων ως προς τη χρήση τους ως αναστολείς της δράσης της τυροσινάσης έχει γνωρίσει μεγάλη εφαρμογή. Τεράστιος αριθμός φυτών, και των επιμέρους δευτερογενών μεταβολιτών τους έχει μελετηθεί για την ανασταλτική τους ικανότητα, με σκοπό τη χρήση τους σε καλλυντικά προϊόντα.

5.1.2 Πειραματικό Μέρος

5.1.2.A. Υλικά

5.1.2.A.1 Ένζυμα

Για το ενζυμικό παρασκεύασμα της τυροσινάσης από μανιτάρι που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, η προμήθειά του έγινε από την εταιρεία Sigma (Tyrosinase from mushroom, ≥ 1000 units/mg protein, T3824).

5.1.2.A.2 Χημικά αντιδραστήρια

Η προμήθεια όλων των διαλυτών και των δευτεριωμένων διαλυτών διμεθυλοσουλφοξειδίου- d_6 (DMSO- d_6) και δευτεριωμένο νερό (D_2O) έγινε από την εταιρεία Sigma. Για το υπόστρωμα της τυροσινάσης L-Dopa, η προμήθειά του έγινε από την εταιρεία Sigma. Για τα φυσικά προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν, η προμήθεια του ροσμαρινικού οξέος έγινε από την εταιρεία Sigma, ενώ η προμήθεια του καφεϊκού οξέος και του γαλλικού οξέος έγινε από την εταιρεία Carbosynth. Η προμήθεια των μελετούμενων φαρμακευτικών φυτών έγινε από τοπικό παραγωγό της περιοχής της Ηπείρου.

5.1.2.B Μέθοδοι

5.1.2.B.1 *In vitro* μελέτη αναστολής της τυροσινάσης από φυτικά εκχυλίσματα μέσω φασματοσκοπίας UV

Αρχή Μεθόδου: Η ενζυμική αντίδραση της τυροσινάσης πραγματοποιήθηκε παρουσία των επτά αιθανολικών και των επτά υδατικών εκχυλισμάτων, ώστε να μελετηθεί η συμπεριφορά

τους ως αναστολείς ή ενισχυτές της τυροσινάσης. Αρχικά, η δραστηριότητα της τυροσινάσης παρουσία των μελετούμενων εκχυλισμάτων μελετήθηκε φωτομετρικά με φασματοσκοπία UV παρακολουθώντας την εμφάνιση του προϊόντος οξειδωσης του υποστρώματος L-Dopa, που είναι η χρωστική Dopachrome, στα 492 nm. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατός ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της τυροσινάσης, παρακολουθώντας την εμφάνιση της παραπάνω χρωστικής στα 492 nm, και υπολογίζοντας την ταχύτητα σχηματισμού του Dopachrome από το υπόστρωμα L-Dopa, καθώς η τυροσινάση ακολουθεί κινητική συμπεριφορά που υπακούει στο νόμο Michaelis-Menten.

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της τυροσινάσης, η αντίδραση πραγματοποιείται σε φασματοφωτόμετρο με χρήση γυάλινης κυψελίδας 1 mL. Η ενζυμική αντίδραση διεξάγεται σε θερμοκρασία δωματίου (25° C) και σε τελικό όγκο 800 μ L και αποτελείται από: 0,05 U/mL τυροσινάση από μανιτάρι, 2 mM υπόστρωμα L-Dopa, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pH=7,0 και 10% DMSO, ποσοστό το οποίο έχει προσδιοριστεί ότι δεν αλλοιώνει την ενζυμική αντίδραση της τυροσινάσης. Αρχικά, σε κυψελίδα φέρονται 0,05 U/mL διαλύματος τυροσινάσης από μανιτάρι, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pH=7,0 και 10% DMSO. Το δείγμα επωάζεται για 10 λεπτά στους 25° C. Στη συνέχεια προστίθενται 2 mM διαλύματος L-Dopa σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, συγκέντρωσης 15 mM. Η αντίδραση παρακολουθείται στα 492 nm ανά 1 λεπτό, για συνολικό χρονικό διάστημα 5 λεπτών.

Ο έλεγχος αναστολής της τυροσινάσης από ένα εκχύλισμα βασίζεται στην πραγματοποίηση της αντίδρασης με την παραπάνω σύσταση, παρουσία του εκχυλίσματος σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και μετά από προ-επώαση με το ένζυμο για 10 λεπτά στους 25° C. Μέσω της σύγκρισης της ταχύτητας της αντίδρασης στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος με την ταχύτητα απουσία του εκχυλίσματος, υπολογίζεται η υπολειπόμενη δραστηριότητα της τυροσινάσης, στις διάφορες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος, και ακολούθως εξάγεται το ποσοστό αναστολής ή ενεργοποίησης του ενζύμου στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

Για τον έλεγχο της ικανότητας αναστολής των εκχυλισμάτων, παρασκευάζονται πυκνά διαλύματα των στερεών εκχυλισμάτων σε DMSO, από τα οποία προστίθενται διαφορετικές ποσότητες στο μείγμα της αντίδρασης κάθε φορά, έτσι ώστε να λαμβάνονται τελικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος στην αντίδραση μεταξύ 50-3000 μ g/mL. Σε κάθε περίπτωση, η συγκέντρωση του DMSO παραμένει 10%.

5.1.2.B.2 Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης

Η *in situ* μελέτη της αντίδρασης της τυροσινάσης πραγματοποιήθηκε σ' ένα σωληνάκι NMR 5 mm στους 25° C, σε συνολικό όγκο αντίδρασης 500 μ L. Η αντίδραση αποτελείται από 0,05 U/mL τυροσινάσης από μανιτάρι, 2 mM L-Dopa, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM σε 100% D₂O, pH=7,2 και 10% DMSO-*d*₆. Αρχικά, σε σωληνάριο Eppendorf των 1,5 mL φέρονται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, το οποίο περιέχει εσωτερικό πρότυπο (TMSP-*d*₄) γνωστής συγκέντρωσης, 10% DMSO-*d*₆, και 0,05 U/mL διαλύματος τυροσινάσης στο ίδιο

ρυθμιστικό διάλυμα. Το δείγμα επωάζεται για 10 λεπτά στους 25° C. Στη συνέχεια προστίθενται 2 mM διαλύματος L-Dopa σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, το μείγμα ανακινείται έντονα και μεταφέρεται σε σωληνάκι NMR 5 mm. Το δείγμα τοποθετείται σε όργανο NMR συχνότητας 500 MHz, Bruker Avance (Bruker Rheinstetten, Germany), χρησιμοποιώντας το λογισμικό Topspin 3.2 και πραγματοποιείται καταγραφή φασμάτων πρωτονίου NMR ανά δέκα λεπτά, για χρονικό διάστημα 3 ωρών, στους 25° C. Όλα τα δεδομένα έχουν συλλεχθεί χρησιμοποιώντας παλμικές ακολουθίες που βρίσκονται στις βιβλιοθήκες παλμών της Bruker. Όλα τα φάσματα καταγράφηκαν με τις ακόλουθες παραμέτρους: αριθμός σαρώσεων:64, χρόνος ανάκτησης: 2,05 s, χρόνος εφησυχασμού: 8,00 s ($1-5 \cdot T_1$), εύρος φάσματος: 6009 Hz και μήκος παλμού:90°. Στη συνέχεια τα δεδομένα κανονικοποιήθηκαν ως προς 32k σημεία δεδομένων, ενώ το εύρος των κορυφών ρυθμίστηκε στα 1,50 Hz. Ακολούθησε χειροκίνητη διόρθωση της φάσης και της γραμμής μηδενισμού των φασμάτων, προκειμένου να ληφθούν τα ολοκληρώματα των κορυφών. Όλα τα 1D ^1H φάσματα κανονικοποιήθηκαν ως προς εσωτερικό πρότυπο TMSP- d_4 , στα $\delta=0,00$ ppm.

5.1.2.B.3 Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της αναστολής της τυροσινάσης

Η *in situ* μελέτη της αντίδρασης της τυροσινάσης παρουσία φυτικού εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε σ' ένα σωληνάκι NMR 5 mm στους 25° C, σε συνολικό όγκο αντίδρασης 500 μL . Η αντίδραση αποτελείται από 0,05 U/mL τυροσινάσης από μανιτάρι, 2 mM L-Dopa, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM σε 100% D_2O , $\text{pD}=7,2$, 10% $\text{DMSO-}d_6$ και την κατάλληλη ποσότητα εκχυλίσματος, ώστε στην αντίδραση να έχει συγκέντρωση 1000 $\mu\text{g/mL}$ και 3000 $\mu\text{g/mL}$. Αρχικά, σε σωληνάριο Eppendorf των 1,5 mL φέρονται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, το οποίο περιέχει εσωτερικό πρότυπο TMSP- d_4 γνωστής συγκέντρωσης, 0,05 U/mL διαλύματος τυροσινάσης στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, φυτικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 1000 $\mu\text{g/mL}$ και 3000 $\mu\text{g/mL}$ διαλυμένο σε $\text{DMSO-}d_6$ και συμπληρώνεται ο όγκος με $\text{DMSO-}d_6$, προκειμένου να διατηρηθεί σταθερή αναλογία 10% στο μείγμα της αντίδρασης. Το δείγμα επωάζεται για 10 λεπτά στους 25° C. Στη συνέχεια προστίθενται 2 mM διαλύματος L-Dopa σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, το μείγμα ανακινείται έντονα και μεταφέρεται σε σωληνάκι NMR 5 mm. Ακολουθεί καταγραφή 1D ^1H NMR φασμάτων, σε τρία διαφορετικά χρονικά σημεία: 20 λεπτά, 60 λεπτά και 180 λεπτά. Μετά την καταγραφή του πρώτου φάσματος, το σωληνάκι NMR μεταφέρεται σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα, όπου πραγματοποιείται έντονη ανάδευση στις 800 στροφές/μίν και σε θερμοκρασία 37° C, μέχρις ότου να συμπληρωθεί το επόμενο χρονικό σημείο. Η καταγραφή των φασμάτων NMR έγινε με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 5.1.2.B.2.

5.1.2.B.4 Ταυτοποίηση των ενδιάμεσων και προϊόντων της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης με το πείραμα επιλεκτικής διέγερσης μιας διάστασης (Selective 1D TOCSY)

Τα πειράματα επιλεκτικής διέγερσης μιας διάστασης (Selective One-dimensional TOCSY) καταγράφηκαν στους 25° C σε φασματόμετρο Bruker Avance 500 MHz, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Topspin 3.2. Για την εφαρμογή των πειραμάτων ρυθμίστηκαν οι ακόλουθες παράμετροι: αριθμός σαρώσεων: 128, χρόνος ανάκτησης: 2,5 s, χρόνος εφησυχασμού: 2-5 s ($1-5 \cdot T_1$) και χρόνοι ανάμειξης: 80 and 200 ms. Για καλύτερη ακρίβεια, ο χρόνος εφησυχασμού ρυθμίστηκε με βάση τον προσδιορισμό του διαμήκους χρόνου εφησυχασμού (T_1) για κάθε πρωτόνιο που διεγείρεται. Επιτεύχθηκε επιλεκτική διέγερση των κορυφών που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του leucodopachrome, της 5,6-διυδροξυνδόλης και των οξειδωμένων προϊόντων του καφεϊκού οξέος. Για το πρωτόνιο του leucodopachrome και της 5,6-διυδροξυνδόλης ο χρόνος εφησυχασμού υπολογίστηκε ίσος με 0,22 s και 0,25 s αντίστοιχα.

5.1.2.B.5 Μελέτη αλληλεπίδρασης των φυτικών εκχυλισμάτων με την τυροσινάση, με τη μεθοδολογία Saturation Transfer Difference (STD) NMR-Χαρτογράφηση των επίτοπων πρόσδεσης

Για τα πειράματα STD NMR τα δείγματα των εκχυλισμάτων παρασκευάστηκαν σε διάλυμα δευτεριωμένου διμεθυλοσουλφοξειδίου- d_6 (DMSO- d_6). Τα δείγματα NMR προετοιμάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM με 100% δευτεριωμένο νερό (D_2O). Το pH ρυθμίστηκε στο 7,4 με την προσθήκη κατάλληλου όγκου DCI ή NaOD. Η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων στο σωληνάκι NMR (συνολικός όγκος 500 μ L) ήταν 1000 μ g/mL και 3000 μ g/mL, ενώ η συγκέντρωση του ενζύμου στο σωληνάκι NMR ήταν 1 μ M, με τελική αναλογία του συμπλόκου υποκαταστάτης-πρωτεΐνη 1000:1. Το DMSO- d_6 στο μείγμα ήταν 10%. Τα πειράματα STD καταγράφηκαν σε θερμοκρασία 25° C, σε φασματόμετρο Bruker AV 500 MHz (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany), χρησιμοποιώντας το λογισμικό Topspin 3.2. Τα φάσματα καταγράφηκαν με τις ακόλουθες παραμέτρους: εύρος φάσματος: 6009,615 Hz, σημεία δεδομένων: 16,384, αριθμός σαρώσεων: 640 ενώ χρησιμοποιήθηκαν παλμικές ακολουθίες που υπάρχουν στις βιβλιοθήκες προγραμμάτων της Bruker. Ο χρόνος εφησυχασμού ρυθμίστηκε στα 2.5 s, ενώ ο χρόνος κορεσμού στα 2s, και στις 90° ο παλμός διέγερσης. Εφαρμόστηκε ο σύντομος χρόνος κορεσμού των πρωτεϊνών, ο οποίος υπολογίστηκε ίσος με 0,26 s και επιλέχθηκε με βάση το μικρότερο χρόνο εφησυχασμού του πρωτονίου (1H) που προσδένεται στην πρωτεΐνη (T_1). Ο χρόνος αυτός προσδιορίστηκε παρουσία της πρωτεΐνης, έτσι ώστε να αποφευχθεί η χαλάρωση που επηρεάζει τους παράγοντες αλληλεπίδρασης (STD amplification factors- STD_{AMP}).²⁷⁸ Η επιλεκτική διέγερση επιτεύχθηκε με μια σειρά σαρώσεων διάρκειας 50 ms, που υπακούν στο φαινόμενο Gauss και χωρίζονται μεταξύ τους με μία καθυστέρηση 2 ms. Η διάρκεια της επιλεκτικής ακτινοβόλησης της κορυφής του νερού, η οποία διήρκεσε 2 λεπτά προσαρμόστηκε χρησιμοποιώντας $n=16$ κύκλους. Η μείωση της έντασης της κορυφής του νερού επιτεύχθηκε μέσω διαβαθμωτής διέγερσης. Η επιλεκτική διέγερση της πρωτεΐνης εντός συντονισμού (on resonance) ρυθμίστηκε στα 0,81 ppm, απόσταση μεγαλύτερη

από 1000 Hz, μακριά από τις χημικές μετατοπίσεις που αντιστοιχούν σε κορυφές των πρωτονίων των υποκαταστατών. Αντίθετα, η επιλεκτική διέγερση εκτός συντονισμού (off resonance) ρυθμίστηκε στα 20 ppm. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αφαίρεση των δύο φασμάτων (εντός και εκτός συντονισμού) μέσω κυκλικής φάσης. Τα φάσματα κανονικοποιήθηκαν εις διπλούν και ομαλοποιήθηκαν μέσω διεύρυνσης της γραμμής των κορυφών κατά 5 Hz.

Ο παράγοντας αλληλεπίδρασης (STD amplification factor) υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας το λόγο της έντασης του σήματος (I_{STD}) ως προς την ένταση του αντίστοιχου σήματος στο φάσμα αναφοράς (I_0), με τη μοριακή αναλογία της περίσσειας της συγκέντρωσης του υποκαταστάτη ως προς την πρωτεΐνη ($[L]_T/[P]$) και προσδιορίζεται από την ακόλουθη εξίσωση²⁷⁸:

$$STD_{AMP} = \frac{I_0 - I_{STD}}{I_0} \times [L]_T/[P]$$

Όσον αφορά την ομαδική χαρτογράφηση των επιτόπων πρόσδεσης, αυτοί οι παράγοντες αλληλεπίδρασης (STD_{AMP}) προκειμένου να υπολογιστούν κανονικοποιήθηκαν ως προς το μέγιστο παρατηρούμενο STD_{AMP} που παρατηρείται για κάθε υποκαταστάτη. Έτσι, το 100% αντιστοιχεί στο σήμα με το μεγαλύτερο STD φαινόμενο.

5.1.2.B.6 NMR-Cosmetube: Μελέτη της αντίδρασης της τυροσινάσης με πολυφαινόλες

Η *in situ* μελέτη της οξειδωσης των φαινολικών οξέων από την τυροσινάση πραγματοποιήθηκε απευθείας σ' ένα σωληνάκι NMR 5 mm, στους 25° C, με προεπώαση του μείγματος στους 37° C, σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα, στις 800 στροφές/min, σε χρονικά σημεία 20, 60 και 180 λεπτά. Αρχικά, παρασκευάστηκαν πυκνά διαλύματα ροσμαρινικού οξέος, καφεϊκού οξέος και γαλλικού οξέος σε διαλύτη δευτεριωμένο DMSO- d_6 . Στο σωληνάκι NMR περιέχονται 500 μ L διαλύματος αντίδρασης που αποτελείται από 2 mM κάθε φαινολικού οξέος, 0,05 U/mL διαλύματος τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, $pD=7,2$, σε 100% δευτεριωμένο νερό, με γνωστή συγκέντρωση εσωτερικού προτύπου (TMS- d_4) και 10% διαλύματος DMSO- d_6 . Αρχικά έγινε προεπώαση του μείγματος τυροσινάσης με το αντίστοιχο φαινολικό οξύ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με 10% DMSO- d_6 , στους 25°C σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα με ανάδευση στις 800 στροφές/min για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια καταγράφηκε το πρώτο φάσμα 1D 1H NMR. Σε δεύτερο βήμα, μετά την καταγραφή του πρώτου φάσματος, το διάλυμα της αντίδρασης επωάστηκε στους 37° C σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα με συνεχή ανάδευση στις 800 στροφές/min για 60 και 180 λεπτά, όπου ακολούθησε καταγραφή φασμάτων πρωτονίου για κάθε μελετούμενο χρονικό σημείο. Η καταγραφή των φασμάτων NMR έγινε με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 5.1.2.B.2.

5.1.2.B.7 NMR-Cosmetube: Μελέτη της συμπεριφοράς των πολυφαινολών στην ενζυμική αντίδραση της τυροσινάσης

Η *in situ* μελέτη της αντίδρασης της τυροσινάσης παρουσία φαινολικών οξέων πραγματοποιήθηκε απευθείας σε σωληνάκι NMR 5 mm στους 25° C, με προεπώαση του μείγματος στους 37° C σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα με συνεχόμενη ανάδευση στις 800 στροφές/min, σε χρονικά διαστήματα 20, 60 και 180 λεπτών. Αρχικά, παρασκευάστηκαν πυκνά διαλύματα ροσμαρινικού οξέος, καφεϊκού οξέος και γαλλικού οξέος, σε διάλυμα δευτεριωμένου διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO-*d*₆). Το σωληνάκι NMR περιέχει 500 μL διαλύματος αντίδρασης, η οποία αποτελείται από: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pH=7,2, 10% διάλυμα DMSO-*d*₆, 2 mM από κάθε φαινολικό υπόστρωμα, 2 mM του υποστρώματος L-Dopa, 0,05 U/mL τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pH=7,2 με 100% D₂O, συμπεριλαμβανομένου εσωτερικού προτύπου TMS-*d*₄ γνωστής συγκέντρωσης. Αρχικά, σε σωληνάριο Eppendorf των 1,5 mL πραγματοποιήθηκε προεπώαση της τυροσινάσης με κάθε ένα από τα μελετούμενα φαινολικά οξέα, στο ρυθμιστικό διάλυμα, με 10% DMSO-*d*₆, στους 25° C, σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα με συνεχή ανάδευση στις 800 στροφές/min, για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2 mM L-Dopa, και μετά από έντονη ανάδευση το μείγμα μεταφέρθηκε σε σωληνάκι NMR 5 mm, όπου έγινε η λήψη του πρώτου φάσματος πρωτονίου. Στη συνέχεια η αντίδραση επωάστηκε στους 37° C σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα υπό ανάδευση για 60 και 180 λεπτά. Ακολούθησε λήψη φασμάτων πρωτονίου μετά από το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η λήψη των φασμάτων NMR έγινε με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 5.1.2.B.2.

5.1.2.B.8 Ταυτοποίηση των οξειδωμένων προϊόντων του καφεϊκού οξέος που προέρχονται από την αντίδραση της τυροσινάσης με φασματοσκοπία 2D ¹H-¹H TOCSY NMR

Τα πειράματα 2D ¹H-¹H TOCSY NMR καταγράφηκαν σε όργανο Bruker Avance 500 MHz, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Topspin 3.2. Για την ταυτοποίηση των προϊόντων οξείδωσης του καφεϊκού οξέος από την τυροσινάση, το δείγμα της αντίδρασης του καφεϊκού οξέος παρουσία τυροσινάσης μελετήθηκε στους 20° C. Το δείγμα της αντίδρασης αποτελείται από: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pH=7,2, 10% DMSO-*d*₆, 2 mM διαλύματος καφεϊκού οξέος και 0,05 U/mL τυροσινάσης, σε συνολικό όγκο αντίδρασης 500 μL. Αρχικά έγινε προεπώαση του μείγματος σε διαφορετικούς χρόνους της 37° C, προκειμένου να επιτευχθεί μέγιστη παραγωγή του οξειδωμένου προϊόντος, ώστε να μελετηθούν με τη μέθοδο 2D ¹H-¹H TOCSY NMR της 20° C. Για το 2D ¹H-¹H TOCSY NMR πείραμα, ρυθμίστηκαν οι ακόλουθοι παράμετροι: εύρος φάσματος: 4000 Hz, αριθμός σαρώσεων: 24 (πειραματικός χρόνος: ~ 5 ώρες), χρόνος κορεσμού: 0,25 s, με 90° παλμό διέγερσης, αριθμός σημείων: 2048 σημεία στην άμεση διάσταση (F2) και 256 σημεία στην έμμεση διάσταση (F1), χρόνος ανάμειξης: 80 ms, χρόνος εφησυχασμού: 2 s (1-5*T₁). Τα φάσματα κανονικοποιήθηκαν εις διπλούν και ομαλοποιήθηκαν μέσω διεύρυνσης της γραμμής των κορυφών κατά 1,5 Hz.

5.1.2.B.9 Θεωρητικοί Υπολογισμοί (Density Functional Theory-DFT)

Οι θεωρητικοί υπολογισμοί για τις διαμορφώσεις του ενδιάμεσου leucodopachrome και του προϊόντος 5,6-διυδροξυινδόλη πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με τον Αναπληρωτή Καθηγητή Οργανικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Μιχάλη Σίσκο. Όλοι οι θεωρητικοί υπολογισμοί που αναφέρονται στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τη συναρτησιακή θεωρία της πυκνότητας (Density functional theory-DFT), όπως εφαρμόστηκε στο πρόγραμμα Gaussian09. Για τον προσδιορισμό των διαμορφομερών των προϊόντων της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης χρησιμοποιήθηκε η συναρτησιακή B3LYP, με το σύνολο βάσης 6-31G+(d). Όλες οι δομές υπολογίστηκαν με την ελάχιστη υπολογιζόμενη δυνητική επιφάνεια, και επαληθεύτηκαν από την έλλειψη φανταστικών συχνοτήτων. Οι χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR, όπως επίσης και οι σταθερές σύζευξης $J_{(H,H)}$ υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα GIAO (Gauge-Independent Atomic Orbital) χρησιμοποιώντας την ακολουθία B3LYP/6-311+G(2d,p) στο επίπεδο του νερού (IEFPCM=water).

5.1.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

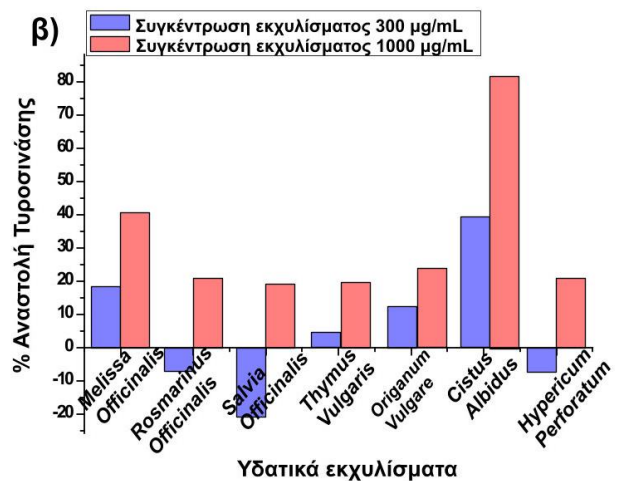
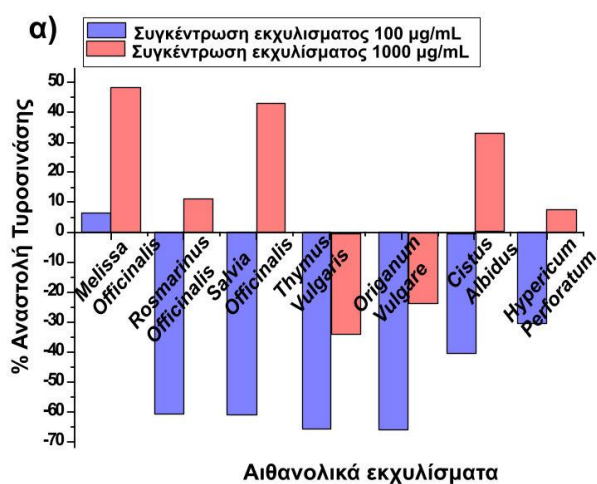
5.1.3.1 Αποτελέσματα από την *in vitro* μελέτη της ανασταλτικής δράσης των μελετούμενων εκχυλισμάτων ως προς τη δράση της τυροσινάσης μέσω φασματοσκοπίας UV

Τα επτά αιθανολικά και τα επτά υδατικά εκχυλίσματα από τα μελετούμενα φυτά: *Melissa Officinalis*, *Rosmarinus Officinalis*, *Salvia Officinalis*, *Thymus Vulgaris*, *Origanum Vulgare*, *Cistus Albidus* και *Hypericum Perforatum*, μελετήθηκαν ως προς τη δράση τους στην ενζυμική αντίδραση της τυροσινάσης. Η δράση των εκχυλισμάτων μελετήθηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για κάθε ομάδα εκχυλισμάτων. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα μελετήθηκαν σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/mL}$ και 1000 $\mu\text{g/mL}$, ενώ τα υδατικά εκχυλίσματα μελετήθηκαν σε συγκέντρωση 300 $\mu\text{g/mL}$ και 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Πίνακας 5.1.1 και Διάγραμμα 5.1.1).

Πίνακας 5.1.1: Τιμές αναστολής των αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων ως προς τη δράση της τυροσινάσης σε συγκεντρώσεις 100 $\mu\text{g/mL}$ /1000 $\mu\text{g/mL}$ και 300 $\mu\text{g/mL}$ /1000 $\mu\text{g/mL}$ αντίστοιχα, όπως προέκυψαν από τη μελέτη με φασματοσκοπία UV.

A/A	Φυτό/Αιθανολικό Εκχύλισμα	% Αναστολή σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g/ml}$	% Αναστολή σε συγκέντρωση 1000 $\mu\text{g/ml}$	Φυτό/Υδατικό Εκχύλισμα	% Αναστολή σε συγκέντρωση 300 $\mu\text{g/ml}$	% Αναστολή σε συγκέντρωση 1000 $\mu\text{g/ml}$
1.	<i>Melissa Officinalis</i> (Μελισσόχορτο)	6,48	48,16	<i>Melissa Officinalis</i> (Μελισσόχορτο)	18,4	40,58
2.	<i>Rosmarinus Officinalis</i> (Δεντρολίβανο)	-60,64	11,18	<i>Rosmarinus Officinalis</i> (Δεντρολίβανο)	-7,2	20,8

3.	<i>Salvia Officinalis</i> (Φασκόμηλο)	-60,96	42,98	<i>Salvia Officinalis</i> (Φασκόμηλο)	-20,96	19,22
4.	<i>Thymus Vulgaris</i> (Θυμάρι)	-65,68	-33,6	<i>Thymus Vulgaris</i> (Θυμάρι)	4,64	19,68
5.	<i>Origanum Vulgare</i> (Ρίγανη)	-66,08	-23,68	<i>Origanum Vulgare</i> (Ρίγανη)	12,48	23,52
6.	<i>Cistus Albidus</i> (Λαδανιά)	-39,92	32,8	<i>Cistus Albidus</i> (Λαδανιά)	39,00	81,74
7.	<i>Hypericum Perforatum</i> (Βαλσαμόχορτο)	-30,4	7,4	<i>Hypericum Perforatum</i> (Βαλσαμόχορτο)	-7,25	20,88



Διάγραμμα 5.1.1: Απεικόνιση των πειραματικών τιμών αναστολής των αιθανολικών εκχυλισμάτων (σε συγκέντρωση 100 µg/mL και 1000 µg/mL) και των υδατικών εκχυλισμάτων (σε συγκέντρωση 300 µg/mL και 1000 µg/mL) ως προς τη δράση της τυροσινάσης, όπως προέκυψαν από τη μελέτη με φασματοσκοπία UV.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της αναστολής, τόσο τα αιθανολικά όσο και τα υδατικά εκχυλίσματα παρουσιάζουν διπλή δράση ως προς την αντίδραση της τυροσινάσης. Οι “αρνητικές” φαινομενικά τιμές που αναπαρίστανται στο **Διάγραμμα 5.1.1** και που έχουν υπολογιστεί από τα *in vitro* πειράματα αναστολής, στην πραγματικότητα δηλώνουν ότι ενισχύουν τη δράση της τυροσινάσης. Σε συγκέντρωση 100 µg/mL, τα αιθανολικά εκχυλίσματα δρουν ως ενισχυτές της τυροσινάσης, ενώ, αντίθετα σε συγκέντρωση 1000 µg/mL αρχίζουν να συμπεριφέρονται ως αναστολείς. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών *Melissa Officinalis*, *Rosmarinus Officinalis*, *Salvia Officinalis* και *Cistus Albidus* παρουσιάζουν αυξημένη ανασταλτική δράση στα 1000 µg/mL, με τιμές αναστολής $48,16 \pm 0,03\%$, $11,8 \pm 0,05\%$, $42,98 \pm 0,02\%$ και $32,80 \pm 0,03\%$ αντίστοιχα. Αντίθετα, τα αιθανολικά εκχυλίσματα των φυτών *Thymus Vulgaris* και *Origanum Vulgare* ακόμη και σε συγκέντρωση 1000 µg/mL, ενισχύουν τη δράση της τυροσινάσης κατά $33,06 \pm 0,01\%$ και $23,68 \pm 0,06\%$ αντίστοιχα. Παρόλο που στα εκχυλίσματα υπάρχει έντονο συνεργιστικό φαινόμενο λόγω των επιμέρους συστατικών τους, η καρβακρόλη που αποτελεί κύριο συστατικό αυτών των εκχυλισμάτων, αλλά και η θυμόλη, έχει αποδειχτεί ότι δεν έχουν κάποια ανασταλτική επίδραση στην τυροσινάση.^{279,280} Σε συμπληρωματικά πειράματα μελέτης της ανασταλτικής τους δράσης, σε συγκέντρωση 3000

μg/mL αυτά τα εκχυλίσματα έδειξαν ενίσχυση κατά $26,08 \pm 0,02\%$ και $18,68 \pm 0,05\%$ αντίστοιχα. Το χαμηλότερο ποσοστό αναστολής σε αυτή τη συγκέντρωση, συγκριτικά με το αντίστοιχο ποσοστό σε συγκέντρωση 1000 μg/mL, δείχνει ότι υπάρχει εξάρτηση της δράσης των εκχυλισμάτων από τη συγκέντρωσή τους. Αντίθετα, τα υδατικά εκχυλίσματα παρουσίασαν κάποια ανασταλτική δράση και σε συγκέντρωση 300 μg/mL, με το υδατικό εκχύλισμα των φυτών *Melissa Officinalis* και *Cistus Albidus* να δίνουν τιμές αναστολής $18,4 \pm 0,01\%$ και $39,00 \pm 0,04\%$ αντίστοιχα. Σε συγκέντρωση 1000 μg/mL, το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Cistus Albidus* παρουσίασε ανασταλτική δράση κατά $89,00 \pm 0,06\%$, ενώ δεύτερο έρχεται το εκχύλισμα του φυτού *Melissa Officinalis* με ανασταλτική δράση κατά $40,58 \pm 0,03\%$. Το φυτοχημικό προφίλ των αιθανολικών εκχυλισμάτων είναι πλούσιο σε φλαβονοειδείς ενώσεις και φαινολικά οξέα. Ωστόσο, οι χημικές δομές των ενώσεων αυτών, οι οποίες στο μεγαλύτερο ποσοστό διαθέτουν μια κατεχολική δομή, μπορούν να δράσουν ως φυσικά υποστρώματα της τυροσινάσης και να οξειδώνονται σε διάφορα προϊόντα οξειδωσης, με αποτέλεσμα να συμβάλλουν στην ενίσχυση της δράσης της.^{281,282} Αντίθετα, το φυτοχημικό προφίλ των υδατικών εκχυλισμάτων χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων και μικρότερο αριθμό άγλυκων φλαβονοειδών. Στις δομές των γλυκοζιτών, οι φαινολικές (-OH) ομάδες έχουν υποκατασταθεί από τις δομές των σακχάρων, με αποτέλεσμα να χάνεται ο λειτουργικός τους χαρακτήρας, που τους κάνει να συμπεριφέρονται ως υποστρώματα της τυροσινάσης. Η αρκετά υψηλή ανασταλτική δράση των υδατικών εκχυλισμάτων των φυτών *Melissa Officinalis* και *Cistus Albidus*, δείχνει ότι τα δύο αυτά εκχυλίσματα διαθέτουν συστατικά τα οποία μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το ενεργό κέντρο του ενζύμου, χωρίς να προκληθεί κάποια αντίδραση μεταξύ τους, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα L-Dopa, με αποτέλεσμα να μειώνεται η δράση της τυροσινάσης ως προς την L-Dopa. Το υδατικό εκχύλισμα του *Melissa Officinalis* αποτελείται κυρίως από ροσμαρινικό οξύ, γλυκοζυλιωμένα παράγωγά του και τερπενοειδείς δομές, ενώ το υδατικό εκχύλισμα του *Cistus Albidus* αποτελείται σε μεγαλύτερο ποσοστό από γαλλικό οξύ και παράγωγά του, καθώς και από κερκετίνη με τα αντίστοιχα παράγωγά της, τα οποία έχουν μελετηθεί για την ανασταλτική τους δράση ως προς την τυροσινάση και έχουν αποδειχτεί αποτελεσματικοί αναστολείς.^{283,284}

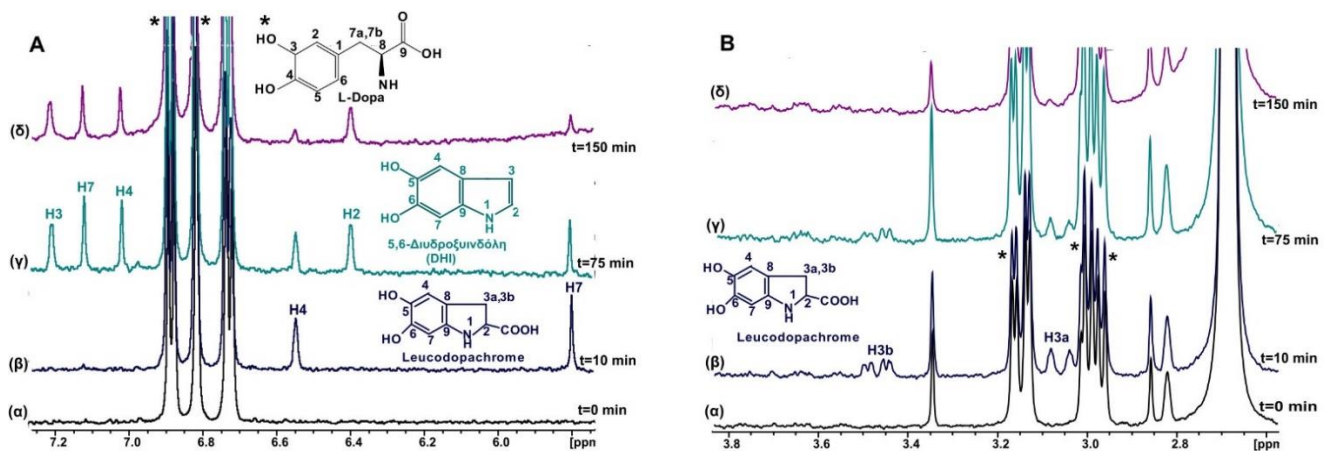
5.1.3.2 Μελέτη ενζυμικής δράσης της τυροσινάσης με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)- Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube

5.1.3.2.1 Αποτελέσματα από την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης

Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την ακριβή εκτίμηση και περιγραφή οποιασδήποτε μεταβολής που πραγματοποιείται σε πραγματικό χρόνο σ' ένα περίπλοκο σύστημα. Μέσω της καταγραφής ενός απλού φάσματος πρωτονίου, μπορεί να γίνει αποτελεσματικός προσδιορισμός των αλλαγών που συμβαίνουν σε πραγματικό χρόνο σ' ένα σύστημα αντίδρασης.²⁸⁵⁻²⁸⁷ Παρ' όλο που η φασματοσκοπία UV είναι αποτελεσματική για τον προσδιορισμό του παραγόμενου προϊόντος, καθώς μετράται η απορρόφησή του σ' ένα

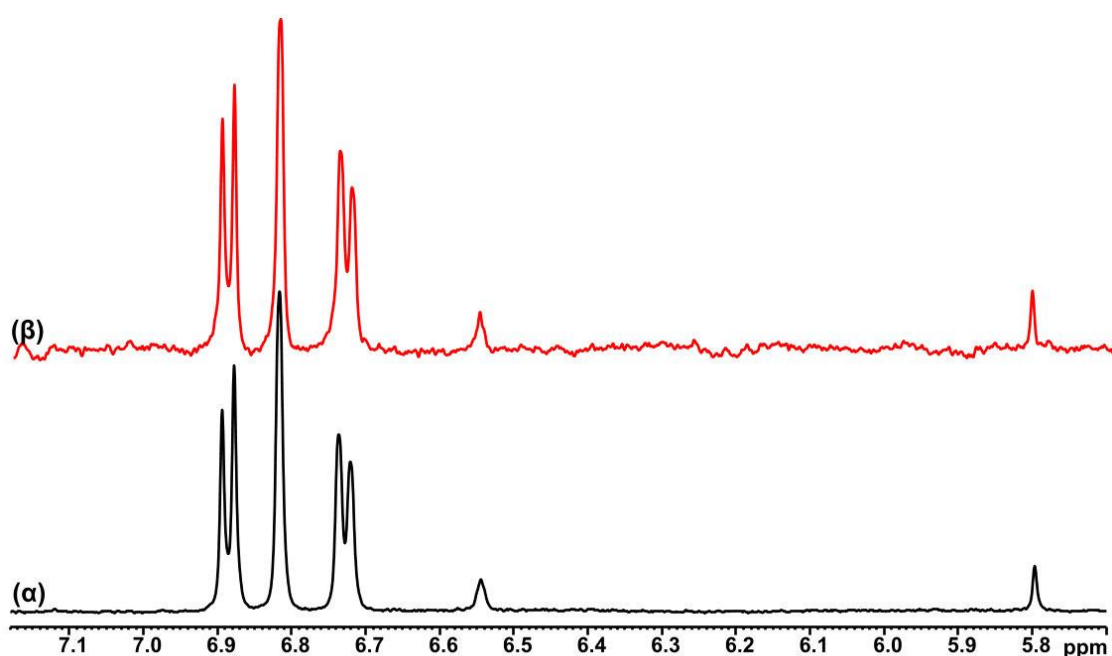
συγκεκριμένο μήκος κύματος, κάποιες φορές μπορεί να παρουσιάσει εσφαλμένα αποτελέσματα λόγω διαφόρων παραγόντων. Στην φασματοσκοπία UV, αυτό που μετράται είναι η απορρόφηση της σχηματιζόμενης χρωστικής dopachrome (492 nm), το οποίο έχει πορτοκαλί χρώμα. Ωστόσο, πολλά προϊόντα οξειδωσης φλαβονοειδών από την τυροσινάση απορροφούν επίσης σε εκείνη την περιοχή, με αποτέλεσμα οι απορροφήσεις τους να επηρεάζουν την τιμή της απορρόφησης του dopachrome.²⁸⁸ Από την άλλη, μέσω της φασματοσκοπίας NMR, είναι δυνατό να μελετηθεί η εξέλιξη μιας ενζυμικής αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο και να γίνεται ταυτόχρονα άμεσος ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των ενδιάμεσων και των προϊόντων που σχηματίζονται ή καταναλώνονται, ανάλογα με το είδος της αντίδρασης που λαμβάνει χώρα, χωρίς να προηγηθούν περαιτέρω στάδια κλασματοποίησης της αντίδρασης.

Η ενζυμική αντίδραση της τυροσινάσης χαρακτηρίζεται από αρκετά ενδιάμεσα βήματα που είναι είτε ενζυμικά είτε χημικά, και οδηγούν στο σχηματισμό ενός αριθμού ενδιάμεσων. Κάποια από αυτά τα ενδιάμεσα (όπως είναι η ντοπακινόνη που σχηματίζεται στα πρώτα δευτερόλεπτα της αντίδρασης), είναι πάρα πολύ δραστικά με χρόνο ημιζωής περίπου 30 δευτερόλεπτα, με αποτέλεσμα να μετατρέπονται αμέσως στο επόμενο ενδιάμεσο. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση της παραγόμενης ντοπακινόνης είναι δύσκολο να προσδιοριστεί και με τη φασματοσκοπία UV, λόγω της μεγάλης αστάθειάς της. Παρόλα αυτά, μέσω της καταγραφής φασμάτων πρωτονίου (¹H) NMR για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα, δίνεται η δυνατότητα παρακολούθησης του ρυθμού παραγωγής των υπόλοιπων ενδιάμεσων προϊόντων, καθώς εξελίσσεται η αντίδραση μέσα στο σωληνάκι NMR. Όσον αφορά τα δραστικά ενδιάμεσα, λόγω της αστάθειας της δομής τους, δεν είναι εφικτό να γίνει η χαρτογράφησή τους με NMR. Ωστόσο, με την *in situ* μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης που εφαρμόστηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή, κατέστη εφικτός ο προσδιορισμός του ενδιάμεσου leucodopachrome κατά την εξέλιξη της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης (θα αναλυθεί παρακάτω), με 1D ¹H NMR φάσμα, κάτι που δεν έχει περιγραφεί μέχρι στιγμής στη βιβλιογραφία. Στο **Σχήμα 5.1.1 (Α και Β)** απεικονίζεται η αντίδραση της τυροσινάσης για ορισμένα χρονικά διαστήματα. Μετά από 10 λεπτά αντίδρασης, έχουν ήδη εμφανιστεί οι κορυφές που αντιστοιχούν στο leucodopachrome. Οι δύο απλές κορυφές στα 6,56 ppm και 5,80 ppm αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια H4 και H7 αντίστοιχα ενώ οι δύο πολλαπλές κορυφές στα 3,47 ppm και 3,06 ppm αντιστοιχούν στα πρωτόνια CH (H3b και H3a αντίστοιχα) που βρίσκονται στη β θέση ως προς την καρβοξυλική ομάδα του leucodopachrome. Τα δύο πρωτόνια H3a και H3b έχουν διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις, λόγω της μεγάλης ανομοιογένειας του χημικού περιβάλλοντος που παρουσιάζουν. Σύμφωνα με τους θεωρητικούς υπολογισμούς, το πρωτόνιο H3b είναι το λιγότερο προστατευμένο, με αποτέλεσμα να είναι αρκετά μετατοπισμένο σε χαμηλότερη θέση από το H3a. Η παραγωγή του leucodopachrome φτάνει σε μια μέγιστη ένταση μετά από 60 λεπτά αντίδρασης, ενώ στη συνέχεια αρχίζει και μειώνεται σταδιακά. Μετά από 25 λεπτά αντίδρασης, αρχίζει και παράγεται η 5,6-διυδροξυινδόλη, το πρόδρομο μόριο της ευμελανίνης. Οι καινούριες κορυφές εμφανίζονται στην αρωματική περιοχή και συγκεκριμένα στα 7,21 ppm, 7,10 ppm, 7,01 ppm και 6,40 ppm, τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια H2, H7, H4 και H3 αντίστοιχα. Μετά από 150 λεπτά αντίδρασης, οι εντάσεις των κορυφών της 5,6-διυδροξυινδόλης μειώνονται λόγω του σχηματισμού του αδιάλυτου πολυμερούς ευμελανίνης.



Σχήμα 5.1.4: (Α) Επιλεγμένη αρωματική περιοχή (5,70-7,25 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων: (α) 1D ^1H NMR φάσμα του υποστρώματος L-Dopa σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 15 mM σε 100% D_2O , $\text{pD}=7,2$ στους 25°C . Το υπόστρωμα δηλώνει το μηδενικό χρόνο της αντίδρασης. (β-δ): 1D ^1H NMR φάσματα της αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 15 mM σε 100% D_2O , $\text{pD}=7,2$ στους 25°C για: (β) $t=10$ min, (γ) $t=75$ min, (δ) $t=150$ min. Οι αστερίσκοι δείχνουν τις κορυφές που αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια του υποστρώματος L-Dopa: 6,89 ppm (d, $J=7,98$ Hz, H6), 6,81 ppm (s, H2), 6,72 ppm (d, $J=7,91$ Hz, H5). (Β) Επιλεγμένη αλειφατική περιοχή (2,50-3,80 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων: (α) του υποστρώματος L-Dopa σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 15 mM σε 100% D_2O , $\text{pD}=7,2$ στους 25°C . Το υπόστρωμα δηλώνει το μηδενικό χρόνο της αντίδρασης. (β-δ): 1D ^1H NMR φάσματα της αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 15 mM σε 100% D_2O , $\text{pD}=7,2$ στους 25°C για: (β) $t=10$ min, (γ) $t=75$ min, (δ) $t=150$ min αντίδρασης. Οι αστερίσκοι δείχνουν τις κορυφές που αντιστοιχούν στα αλειφατικά πρωτόνια του υποστρώματος L-Dopa: 3.15 ppm (dd, $J=3.83$ Hz, H7a), 2.98 ppm (dd, $J=8.07$ Hz, H7b).

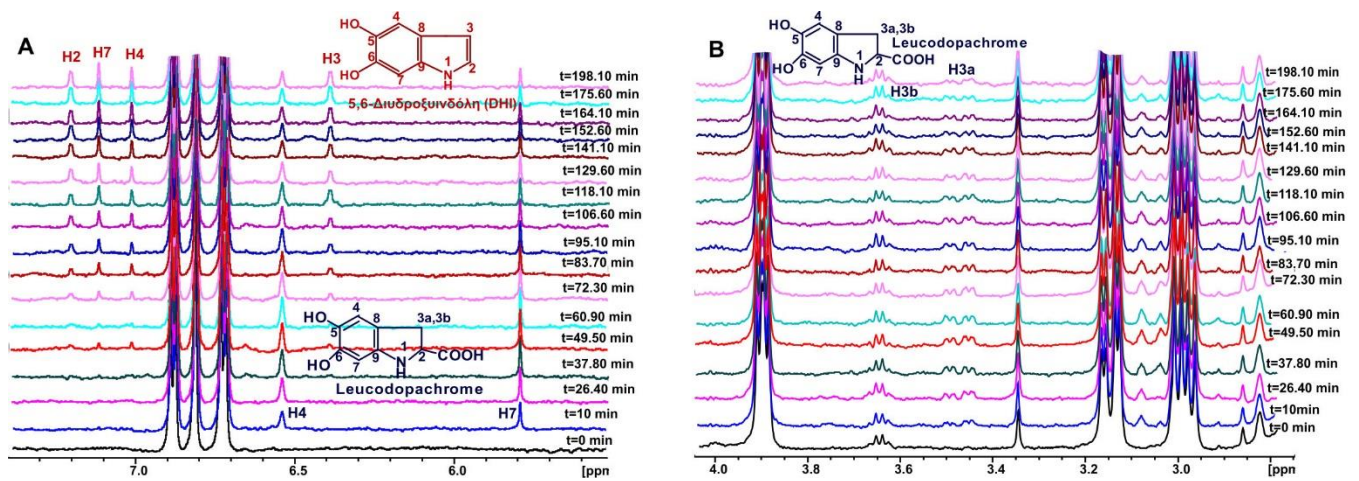
Αρκετά σημαντικό είναι το γεγονός ότι η κορυφή του πρωτονίου H4 του leucodopachrome είναι αρκετά διευρυμένη, συγκριτικά με την απλή κορυφή του πρωτονίου H7. Προκειμένου να διερευνηθεί αν η διεύρυνση των κορυφών οφείλεται σε φαινόμενα χημικής ανταλλαγής στα φάσματα 1D ^1H NMR της ενζυμικής αντίδρασης, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε και σε σύστημα διαλυτών 90% H_2O :10% D_2O και καταγράφηκε το αντίστοιχο φάσμα πρωτονίου (**Σχήμα 5.1.5**). Αποδείχτηκε ότι τα δύο φάσματα είναι σχεδόν πανομοιότυπα. Αυτό σημαίνει ότι η διεύρυνση της κορυφής του πρωτονίου H4 μπορεί να αποδοθεί σε μία απροσδιόριστη σύζευξη J .



Σχήμα 5.1.5: Επιλεγμένη περιοχή (5,70-7,20 ppm): (α) 1D ^1H NMR φάσμα της αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, $\text{pD}=7,2$ σε 100% D_2O . **(β)** 1D ^1H NMR φάσμα της αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, $\text{pD}=7,2$ σε σύστημα διαλυτών 90%: 10% H_2O : D_2O , στους 25°C .

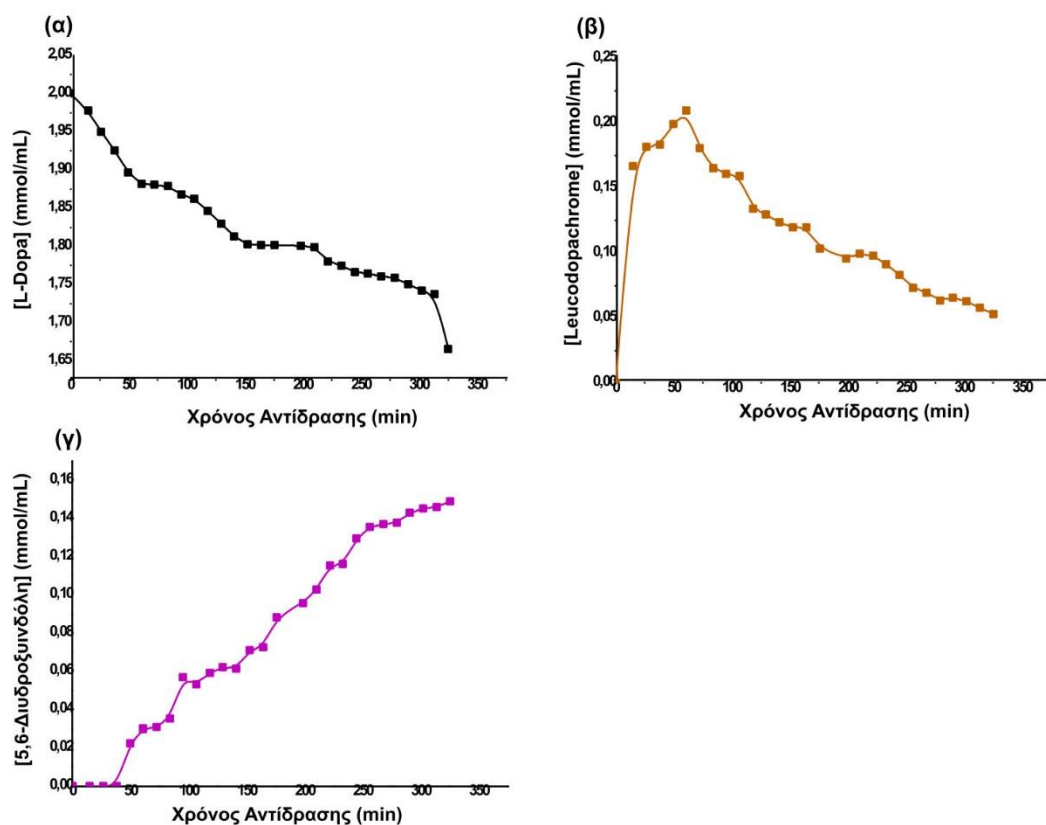
5.1.3.2.2 NMR-Cosmetube: Μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης στους 20°C

Η ενζυμική αντίδραση της τυροσινάσης γενικά εξελίσσεται με γρήγορο ρυθμό, για αυτό και η μελέτη της μπορεί να γίνει εύκολα στους 25°C . Ωστόσο, η ίδια αντίδραση μελετήθηκε και σε χαμηλότερη θερμοκρασία (20°C) για χρονικό διάστημα 300 λεπτών, με διαδοχική καταγραφή 1D ^1H NMR φασμάτων ανά δέκα λεπτά, μέσα στο σωληνάκι NMR. Σε αυτή τη θερμοκρασία η αντίδραση πραγματοποιείται με πιο αργό ρυθμό και είναι πιο εύκολη η μελέτη της μεταβολής των συγκεντρώσεων των ενδιάμεσων που παράγονται, αλλά και εμμέσως του υποστρώματος που καταναλώνεται. Αν και η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της τυροσινάσης είναι 37°C , στη θερμοκρασία αυτή, οι κορυφές των πρωτονίων που βρίσκονται κοντά στην περιοχή του νερού, αλληλεπικαλύπτονται με την κορυφή του νερού, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολος ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση τους. Επίσης, λόγω της γρήγορης εξέλιξής της, η κατανάλωση του υποστρώματος ή η παραγωγή των διαφόρων ενδιάμεσων γίνεται με μεγαλύτερη ταχύτητα, με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν αρκετά σημεία για τον προσδιορισμό των αντίστοιχων συγκεντρώσεων (**Σχήμα 5.1.6**).



Σχήμα 5.1.6: A και B: Επιλεγμένη περιοχή (5,70-7,30 ppm και 2,5-4,10 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων της εξέλιξης της αντίδρασης της τυροσινάσης στους 20°C , για χρονικό διάστημα 0-300 min, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 15 mM, $\text{pD}=7,2$, σε 100% D_2O .

Καθώς στη θερμοκρασία αυτή η αντίδραση πραγματοποιείται με πιο αργό ρυθμό, το Leucodopachrome διατηρείται σε διάστημα μεγαλύτερο της μίας ώρας. Από τη συλλογή των δεδομένων για το χρονικό διάστημα 0-300 λεπτών της αντίδρασης, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του καταναλώμενου Leucodopachrome και της παραγόμενης 5,6-διυδροξυινδόλης (**Διάγραμμα 5.1.2**). Επίσης, προσδιορίστηκε έμμεσα και η μεταβολή της συγκέντρωσης του υποστρώματος L-Dopa.



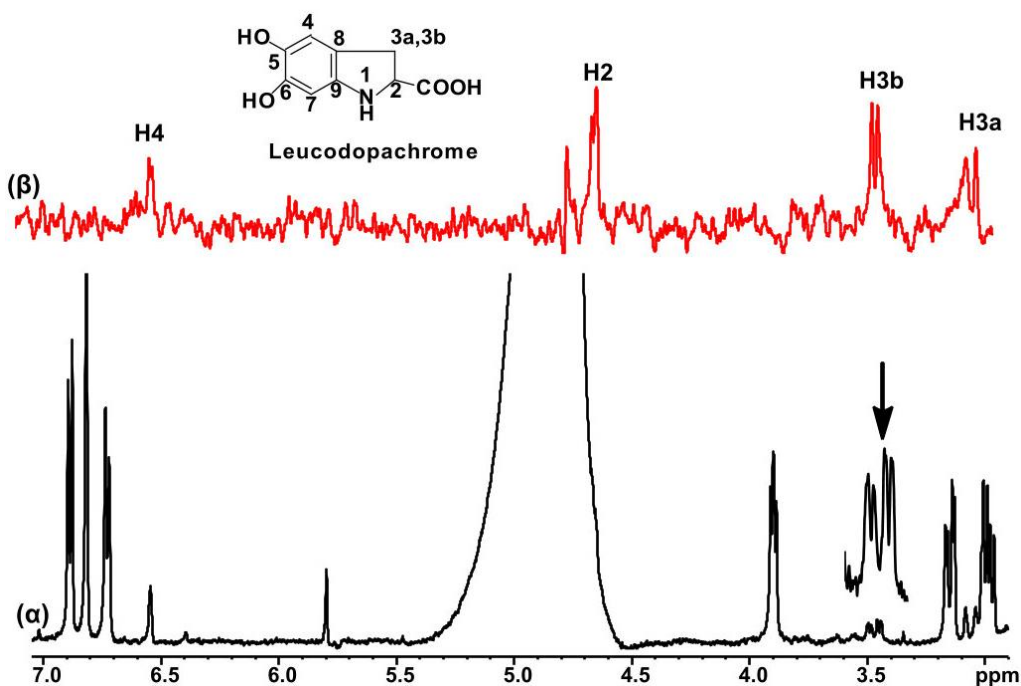
Διάγραμμα 5.1.2: Γραφικές απεικονίσεις της μεταβολής της συγκέντρωσης: (α) του υποστρώματος L-Dopa, (β) του ενδιάμεσου προϊόντος Leucodopachrome, (γ) του παραγόμενου προϊόντος, 5,6-διυδροξυινδόλη (DHI), σε χρονικό διάστημα 0-300 min, από την *in situ* μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης στο σωληνάκι NMR, στους 20°C .

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.1.6**, στα 10 λεπτά της αντίδρασης έχει ήδη παραχθεί το ενδιάμεσο Leucodopachrome, το οποίο φτάνει σε μία μέγιστη συγκέντρωση στα 60 λεπτά αντίδρασης. Μετά από 60 λεπτά αντίδρασης αρχίζει και μειώνεται η συγκέντρωσή του, ενώ μετά από 300 λεπτά αντίδρασης, έχει εξαφανιστεί. Από την άλλη, η 5,6-διυδροξυινδόλη αρχίζει να

σχηματίζεται σταδιακά μετά από τα 37 λεπτά αντίδρασης και συνεχίζει να αυξάνεται. Μετά τα 300 λεπτά αντίδρασης η αύξηση γίνεται με πολύ αργό ρυθμό, όπου φτάνει σ' ένα πλάτω. Καθώς η παραγόμενη 5,6-διυδροξυινδόλη αποτελεί πρόδρομο μόριο για την παραγωγή μελανίνης, μετά την παραγωγή της αρχίζει και πολυμερίζεται προς ευμελανίνη. Λόγω όμως της αδιάλυτης φύσης της μελανίνης, σχηματίζεται ίζημα, το οποίο δε μπορεί να καταγραφεί στο φάσμα πρωτονίου.

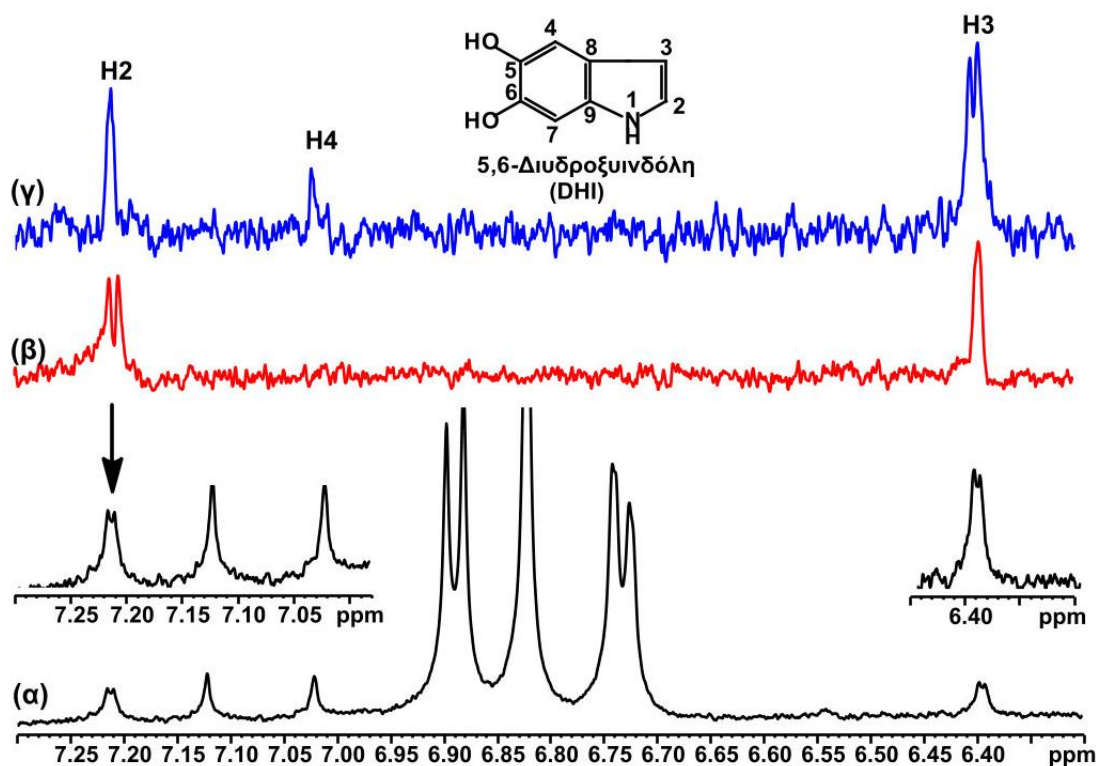
5.1.3.3 Αποτελέσματα του πειράματος Selective 1D TOCSY για τον προσδιορισμό των ενδιάμεσων προϊόντων

Το πείραμα Selective 1D TOCSY αποτελεί μια αποτελεσματική μεθοδολογία της φασματοσκοπίας NMR, κατά την οποία ένα μείγμα, είτε απλό είτε πιο περίπλοκο, μπορεί να διαχωριστεί στα επιμέρους συστατικά του, μέσω μεταφοράς της μαγνήτισης ενός συγκεκριμένου συστήματος spin, χωρίς να απαιτούνται άλλα στάδια διαχωρισμού. Με το πείραμα Selective 1D TOCSY είναι εφικτός ο διαχωρισμός ενός μείγματος στα συστατικά του, χωρίς κάποια περίπλοκη κατεργασία του δείγματος. Στο μείγμα της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε επιλεκτική διέγερση στην κορυφή στα 3,46 ppm που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H3b (dd) του leucodopachrome. Χρησιμοποιώντας χρόνο ανάμειξης 80 ms, εμφανίστηκε η διπλή κορυφή στα 3,05 ppm που αντιστοιχεί στο H3a πρωτόνιο, αλλά και η διπλή κορυφή στα 4,56 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο CH (H2) πρωτόνιο που βρίσκεται σε α-θέση ως προς την καρβοξυλομάδα. Αυτή η κορυφή στο 1D ^1H NMR φάσμα “κρύβεται” κάτω από τη διευρυμένη κορυφή του νερού. Επίσης, στο σύστημα spin του διεγερόμενου πρωτονίου ανήκει και η απλή κορυφή του αρωματικού πρωτονίου στα 6,54 ppm, η οποία είναι αρκετά διευρυμένη, λόγω της μεγάλης σταθεράς (4J) σύζευξης που έχει με τα πρωτόνια H3b και H3a (Σχήμα 5.1.7). Όσον αφορά το αρωματικό πρωτόνιο H7, λόγω της μικρής μαγνήτισης που έχει εξαιτίας της σταθεράς σύζευξης 5J , δεν πραγματοποιήθηκε διέγερση της κορυφής του στα 5,80 ppm.



Σχήμα 5.1.7: Επιλεγμένη περιοχή (3,20-7,10 ppm): (α) 1D ^1H NMR φάσματος της αντίδρασης της τυροσινάσης σε 15 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών σε 100% D_2O , $\text{pD}=7,2$, στους 298K. (β) Selective 1D TOCSY φάσμα της αντίδρασης της τυροσινάσης με χρόνο ανάμειξης 80 ms (αριθμός σαρώσεων: 128, χρόνος ανάκτησης: 2,5 s, χρόνος εφησυχασμού: 5 s και πειραματικός χρόνος~16,30 min). Το βέλος δηλώνει τη χημική μετατόπιση ($\delta= 3,48$ ppm) του πρωτονίου που έχει διεγερθεί.

Στο **Σχήμα 5.1.8** απεικονίζεται η ταυτοποίηση του προϊόντος 5,6-διυδροξυινδόλη με την εφαρμογή του πειράματος Selective 1D TOCSY. Επιλεκτική διέγερση στη διπλή κορυφή στα 7,21 ppm που αντιστοιχεί στο ολεφινικό πρωτόνιο H2, εμφάνισε το δεύτερο ολεφινικό πρωτόνιο H3. Χρησιμοποιώντας μεγαλύτερο χρόνο ανάμειξης (200 ms), εμφανίστηκε και το αρωματικό πρωτόνιο H4 στα 7,01 ppm, το οποίο ανήκει και αυτό στο σύστημα spin του πρωτονίου H2. Όσον αφορά το αρωματικό πρωτόνιο H7, λόγω της μικρής σταθεράς σύζευξης (5J) που παρουσιάζει, δεν ήταν δυνατό να διεγερθεί.



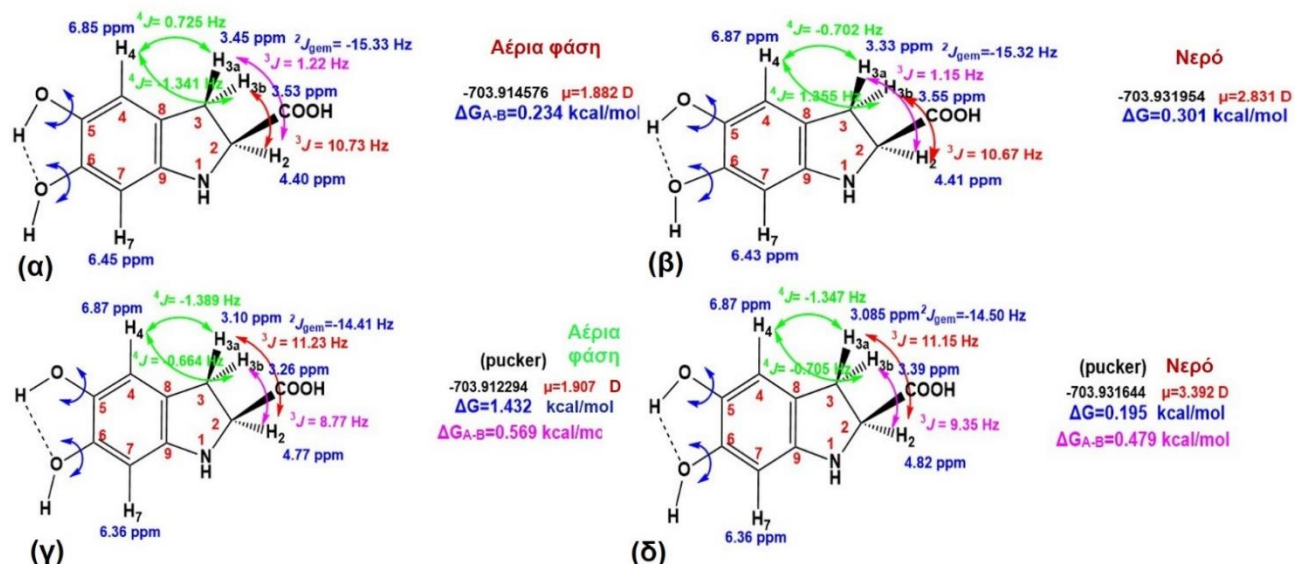
Σχήμα 5.1.8: Επιλεγμένη περιοχή (6,20 -7,30 ppm): (α) 1D ^1H NMR φάσματος της αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 15 mM, $\text{pD}=7,2$ με 100% D_2O , στους 25° C. (β) Selective 1D TOCSY φάσμα της αντίδρασης της τυροσινάσης. με χρόνο ανάμειξης: 80 ms (αριθμός σαρώσεων=128, χρόνος κορεσμού=2,5 s, χρόνος εφησυχασμού=5 s, και πειραματικός χρόνος~16,30 min). (γ) Selective 1D TOCSY φάσμα της αντίδρασης της τυροσινάσης με χρόνο ανάμειξης: 200 ms (αριθμός σαρώσεων=128, χρόνος κορεσμού=2,5 s, χρόνος εφησυχασμού=5 s, και πειραματικός χρόνος~16,30 min). Το βέλος δηλώνει την χημική μετατόπιση ($\delta= 7,21$ ppm) του πρωτονίου που έχει διεγερθεί.

5.1.3.4 Αποτελέσματα Θεωρητικών Υπολογισμών (DFT)

Μέσω των θεωρητικών υπολογισμών πραγματοποιήθηκε η μελέτη της διαμόρφωσης του ενδιάμεσου Leucodorachrome και του προϊόντος 5,6-διυδροξυινδόλη που

έχουν αποκτήσει στο διάλυμα της ενζυμικής αντίδρασης, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο **B3LYP** και ως βάση την **G31+ G(d)** στην αέρια φάση ή σε υδατικό διάλυμα, του οποίου η προσομοίωση έγινε με το μοντέλο επιδιαλύτωσης **IEFPCM**. Στη συνέχεια, ο υπολογισμός των χημικών μετατοπίσεων με NMR και των spin-spin συζεύξεων σε επίπεδο CM/AO/B3LYP χρησιμοποιώντας ως βάση την **6-311 + G (2d, p)** σε νερό (IEFPCM= Νερό).

Όπως φαίνεται στα αντίστοιχα **Σχήματα 5.1.9** και **5.1.10** αντίστοιχα, για κάθε δομή προέκυψαν διάφορες διαμορφώσεις.



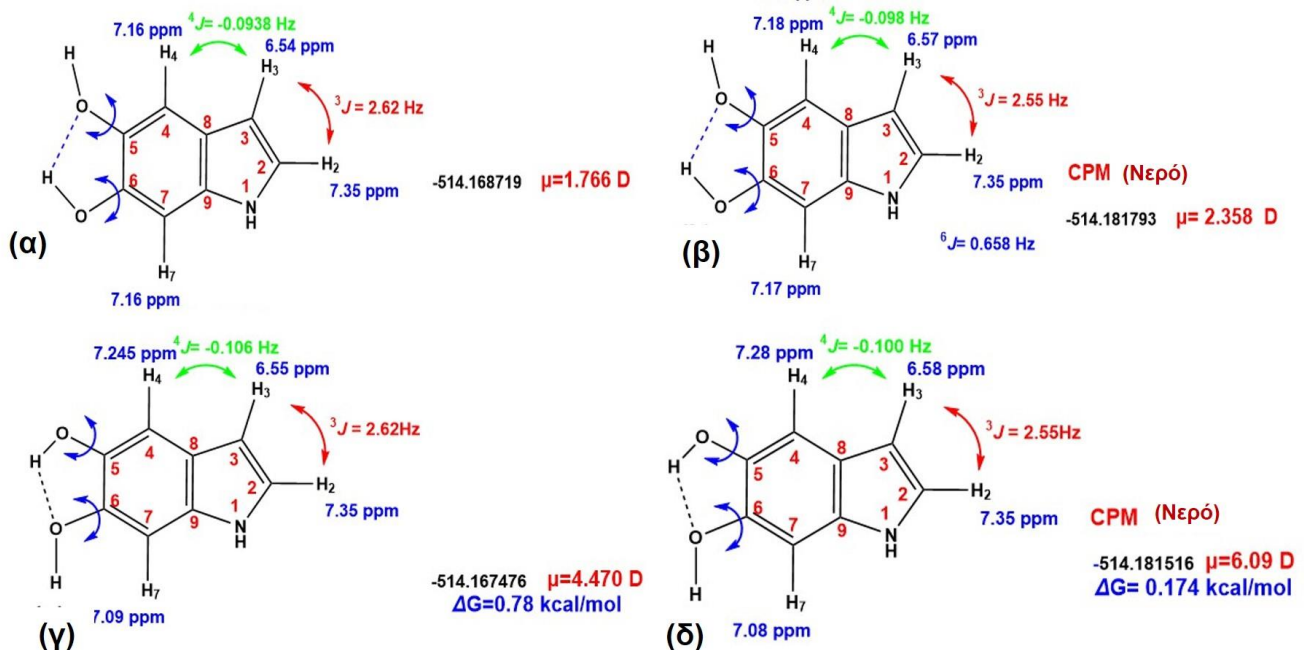
Σχήμα 5.1.9: Απεικονίσεις των διαφόρων διαμορφώσεων της δομής του Leucodorachrome και θεωρητικές τιμές των χημικών μετατοπίσεων (ppm), με βάση τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει από τους θεωρητικούς υπολογισμούς.

Από τη σύγκριση των τιμών των χημικών μετατοπίσεων που έχουν υπολογιστεί θεωρητικά, με τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές, όπως έχουν προσδιοριστεί από τα φάσματα πρωτονίου, προκύπτουν αρκετές ομοιότητες, γεγονός που επιβεβαιώνει τη δομή της κάθε μελετούμενης ένωσης (**Πίνακας 5.1.2** και **5.1.3**).

Πίνακας 5.1.2: Απεικόνιση των πειραματικών και θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων (δ) και των σταθερών σύζευξης για το leucodorachrome με βάση τα πειράματα 1D ^1H NMR και τους θεωρητικούς υπολογισμούς.

Πρωτόνιο	$\delta_{\text{πειρ.}}$ (ppm)	$\delta_{\text{θεωρ.}}$ (α) (ppm)	$\delta_{\text{θεωρ.}}$ (β) (ppm)	$\delta_{\text{θεωρ.}}$ (γ) (ppm)	$\delta_{\text{θεωρ.}}$ (δ) (ppm)	J _{H-H} πειρ. (Hz)	J _{H-H} θεωρ. (α) (Hz)	J _{H-H} θεωρ. (β) (Hz)	J _{H-H} θεωρ. (γ) (Hz)	J _{H-H} θεωρ. (δ) (Hz)
H2	4,59	4,40	4,41	4,77	4,82	d, 9,56	$^3J=10,7$ 3	$^3J=10,6$ 7	$^3J=8,77$	$^3J=9,35$
H3a	3,06	3,45	3,33	3,10	3,085	dd, 20,67/ 2,45	$^2J(\text{H3}_a\text{H}$ $3_b)=-$ 15,33	$^2J(\text{H3}_a\text{H3}$ $b)=-15,32$	$^2J(\text{H3}_a\text{H3}$ $b)=-14,41$	$^2J(\text{H3}_a\text{H3}_b)$ $=-14,5$
							$^3J(\text{H3}_a\text{H}$ 2)=1,22	$^3J(\text{H3}_a\text{H}$ 2)=1,15	$^3J(\text{H3}_a\text{H2})=$ 11,23	$^3J(\text{H3}_a\text{H2})$ $= 11,15$
							$^4J(\text{H3}_a\text{H}$ 4)=0,72	$^4J(\text{H3}_a\text{H}$ 4)=-	$^4J(\text{H3}_a\text{H4})=$ -1,389	$^4J(\text{H3}_a\text{H4})$ $= -1,347$
							5	0,702		
H3b	3,47	3,53	3,55	3,26	3,39	dd, 21,43/ 8,68	$^2J(\text{H3}_b\text{H}$ $3_a)=-$ 15,33	$^2J(\text{H3}_b\text{H}$ $3_a)=-$ 15,32	$^2J(\text{H3}_b\text{H3}_a)$ $=-14,41$	$^2J(\text{H3}_b\text{H3}_a)$ $=-14,5$
							$^3J(\text{H3}_b\text{H}$ 2)=10,7	$^3J(\text{H3}_b\text{H}$ 2)=10,6	$^3J(\text{H3}_b\text{H2})=$ 8,77	$^3J(\text{H3}_b\text{H2})$ $= 9,35$
							3	7		

H4	6,54	6,85	6,87	6,87	6,87	s broad	$^4J(H3_b, H4) = -1,341$	$^4J(H3_b, H4) = 1,35$	$^4J(H3_b, H4) = -0,664$	$^4J(H3_b, H4) = -0,705$
H7	5,80	6,45	6,43	6,36	6,36	s	s	s	s	s



Σχήμα 5.1.10: Απεικονίσεις των διαφόρων διαμορφώσεων της δομής του προϊόντος 5,6-διυδροξινδόλη και θεωρητικές τιμές των χημικών μετατοπίσεων (ppm), με βάση τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει από τους θεωρητικούς υπολογισμούς.

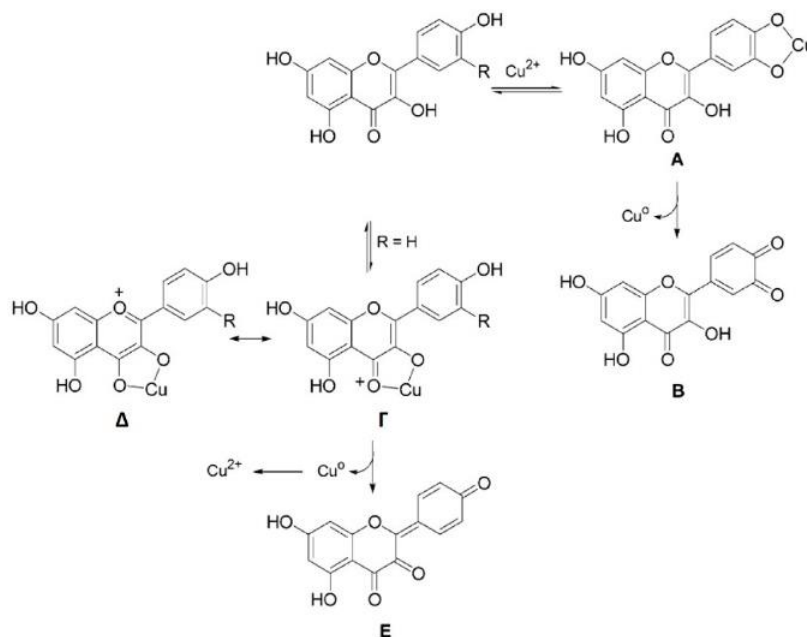
Πίνακας 5.1.3 Απεικόνιση των πειραματικών και θεωρητικών χημικών μετατοπίσεων (δ) και των σταθερών σύζευξης για την 5,6-διυδροξινδόλη, με βάση τα πειράματα 1D 1H NMR και τους θεωρητικούς υπολογισμούς.

Πρωτόνιο	$\delta_{πειρ.}$ (ppm)	$\delta_{θεωρ.}$ (α) (ppm)	$\delta_{θεωρ.}$ (β) (ppm)	$\delta_{θεωρ.}$ (γ) (ppm)	$\delta_{θεωρ.}$ (δ) (ppm)	J_{H-H} (πειρ.) (Hz)	J_{H-H} θεωρ. (α) (Hz)	J_{H-H} θεωρ. (β) (Hz)	J_{H-H} θεωρ. (γ) (Hz)	J_{H-H} θεωρ. (δ) (Hz)
H2	7,21	7,35	7,35	7,35	7,35	d, 2,81	$^4J = -0,93$ 8	$^4J = 0,098$	$^4J = -0,1$ 0,1 06	$^4J = 0,1$
H3	6,39	6,54	6,57	6,55	6,58	d, 2,85	$^3J = 2,6$ 2	$^3J = 2,55$	$^3J = 2,$ 62	$^3J = 2,5$ 5
H4	7,02	7,16	7,18	7,24	7,28	s	s	$^6J = -0,658$	s	s
H7	7,12	7,16	7,17	7,09	7,08	s	s	s	s	s

5.1.3.5 Αποτελέσματα της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της αντίδρασης της τυροσινάσης με πολυφαινόλες

Οι φυτικές πολυφαινόλες αποτελούν βασικό χαρακτηριστικό των φυτών, των βοτάνων, των φρούτων και των λαχανικών. Όπως προαναφέρθηκε, απ' όλα τα συστατικά, τα φλαβονοειδή

και τα φαινολικά οξέα αποτελούν τους κυριότερους εκπροσώπους αυτής της οικογένειας, καθώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα συστήματα άμυνας των φυτών από ξένους μικροοργανισμούς.^{289,290} Τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και τα πολυάριθμα παράγωγά τους έχουν μελετηθεί εκτεταμένα για τις πολυλειτουργικές και βιοδραστικές ιδιότητές τους: μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικοί και αντικαρκινικοί παράγοντες,^{290,291} έχουν αποτελεσματικό αντιμικροβιακό και αντιφλεγμονώδη χαρακτήρα, αναπτύσσουν ισχυρούς χηλικούς δεσμούς με μεταλλικά ιόντα, αναπτύσσουν ομοιοπολικούς δεσμούς, δυνάμεις διπόλου ή ιοντικές δυνάμεις με πολλά υποστρώματα, και έχουν την ικανότητα να μειώνουν τη συγκέντρωση των δραστικών ριζών οξυγόνου και αζώτου στο ανθρώπινο σώμα. Μεγάλο ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή που έχουν κατεχολικές ή πυρογαλλολικές υπομονάδες στη δομή τους, αναπτύσσουν ισχυρό αντιοξειδωτικό δυναμικό. Έτσι, αυτά τα βιοδραστικά μόρια έχουν κεντρίσει αρκετά το ενδιαφέρον, καθώς αποτελούν αποτελεσματικά πρόδρομα μόρια για την ανάπτυξη φαρμάκων, καλλυντικών, όπως επίσης και συμπληρωμάτων διατροφής, εξαιτίας του υψηλού αντιοξειδωτικού τους χαρακτήρα, οδηγώντας σε πολλά οφέλη για την υγεία. Από την άλλη, η οξείδωση πολλών φαινολικών μορίων μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην υγεία, κυρίως λόγω του σχηματισμού κινονών που οδηγεί στο σχηματισμό πολλών πολυμερικών προϊόντων που ενδεχομένως να συμβάλλουν στην ανάπτυξη νεοπλασιών (**Σχήμα 5.1.11**).²⁹²



Σχήμα 5.1.11: Μηχανισμός οξείδωσης πολυφαινολών από ιόντα Cu⁺.²⁹³

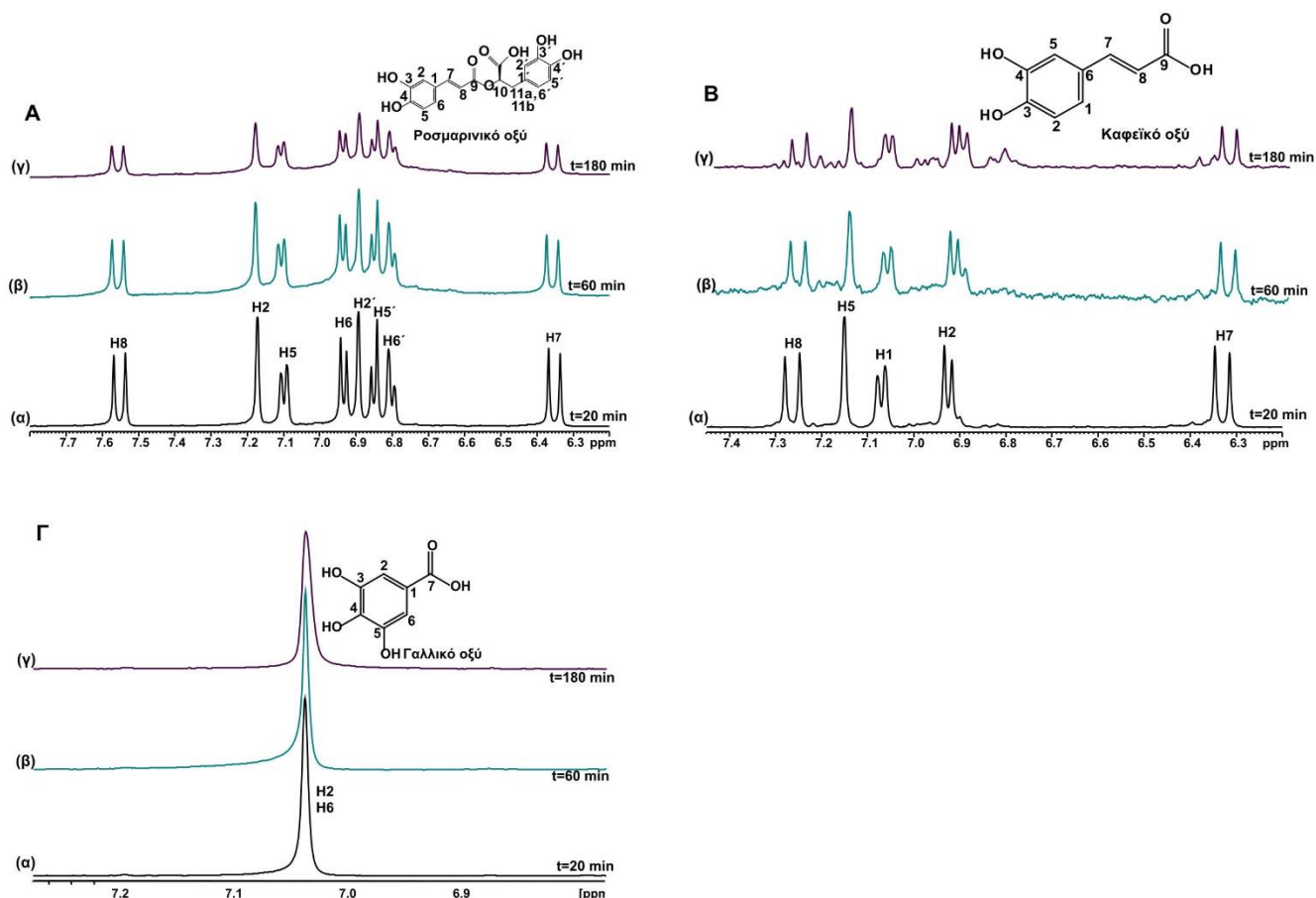
5.1.3.5.1 NMR-Cosmetube: Αποτελέσματα από τη μελέτη της συμπεριφοράς των φαινολικών οξέων ως υποστρώματα ή αναστολείς της τυροσινάσης

Μεγάλος αριθμός φαινολικών οξέων, φλαβονοειδών αλλά και των γλυκοζυλιωμένων παραγώγων τους, που βρίσκονται στα φυτά, έχουν μελετηθεί εκτεταμένα για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της τυροσινάσης. Τα φυσικά προϊόντα έχουν μελετηθεί για τη χρήση τους ως λευκαντικοί παράγοντες προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε καλλυντικά για τη φροντίδα του δέρματος, με μεγάλη αποτελεσματικότητα. Καθώς τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα αναπτύσσουν χηλικούς δεσμούς με τα μέταλλα, αλληλεπιδρούν με την τυροσινάση,

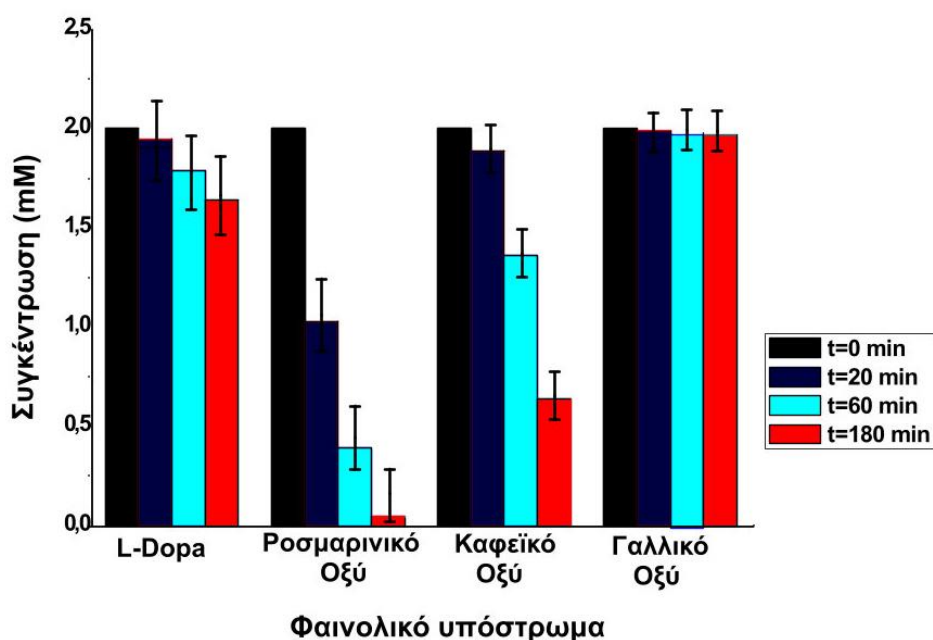
δεσμεύοντας τα ιόντα Cu^{2+} του ενεργού της κέντρου, οδηγώντας έτσι στην αναστολή της. Οι χαλκόνες, οι φλαβονόνες, η ρεσβερατρόλη και τα παράγωγα της κουμαρίνης έχουν δείξει υψηλή αναστολή ως προς την τυροσινάση.²⁶⁹ Από τα φαινολικά οξέα, το καφεϊκό οξύ, το ροσμαρινικό οξύ και το γαλλικό οξύ έχουν δείξει καλή ανασταλτική δράση μονοφαινολάσης ή διφαινολάσης όσον αφορά την τυροσινάση. Παρόλα αυτά, μεγάλο ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η κατεχολική δομή του ροσμαρινικού και του καφεϊκού οξέος, όπως επίσης και η πυρογαλλολική δομή στο γαλλικό οξύ, μπορούν να δράσουν ως υποστρώματα της τυροσινάσης, και να οξειδώνονται τα ίδια προς διάφορα προϊόντα οξείδωσης. Ωστόσο, και τα τρία φαινολικά οξέα έχουν μελετηθεί για την ανασταλτική τους δράση ως προς την τυροσινάση, όπως δείχνουν τα βιβλιογραφικά δεδομένα που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5.1.4**. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ανασταλτική δράση αυτών των μορίων ως προς την τυροσινάση, πραγματοποιήθηκαν τα αντίστοιχα πειράματα, χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία NMR-Cosmetube, όπου μελετήθηκε η επίδραση του ροσμαρινικού, του καφεϊκού και του γαλλικού οξέος στη δράση της τυροσινάσης, όπως επίσης και ο ρυθμός κατανάλωσης της L-Dopa παρουσία αυτών των τριών φαινολικών οξέων.

Πίνακας 5.1.4: Ανασταλτική δράση των φαινολικών οξέων ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ και γαλλικό οξύ, ως προς την τυροσινάση, με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Πολυφαινόλη	Αναστολή ως προς την τυροσινάση	Βιβλιογραφία
Ροσμαρινικό οξύ	Δυνατή αναστολή	294
	Δυνατή αναστολή	295
	Μέτρια αναστολή ως προς την τυροσινάση από μανιτάρι, σε συγκέντρωση 0.4 mM	296
	IC₅₀=1.40 mM	297
	Ενίσχυση της μελανογένεσης	298
Καφεϊκό οξύ	Ενίσχυση μελανοσύνθεσης-παραγωγή αλλομελανινών	299
	Δράση ως υπόστρωμα “αυτοκτονίας” ως προς την τυροσινάση	300
	Καμία αναστολή ως προς την ανθρώπινη τυροσινάση	301
Γαλλικό οξύ	IC₅₀=3.5 mM στην τυροσινάση από μανιτάρι	302
	IC₅₀=4.5 mM	303
	Μείωση της δράσης της τυροσινάσης και της παραγωγής της κυτταρικής μελανίνης εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση	304
	Επαγωγή της απόπτωσης στα B16F10 κύτταρα σε συγκέντρωση >200 μM	305
	Επαγωγή της απόπτωσης στα ανθρώπινα μελανοκύτταρα A375.S2	306



Σχήμα 5.1.12: Α: Επιλεγμένη περιοχή (6,20-7,80 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων του μείγματος ροσμαρινικό οξύ (2 mM) και τυροσινάση (0.05 U/mL) σε 500 μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, ρD=7,20 σε διάφορα χρονικά σημεία: (α) t=20 min, (β) t=60 min και (γ) t=180 min. Β: Επιλεγμένη περιοχή (6,20-7,30 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων του μείγματος καφεϊκό οξύ (2 mM) και τυροσινάση (0,05 U/mL) σε 500 μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, ρD=7,20 σε διάφορα χρονικά σημεία: (α) t=20 min, (β) t= 60 min και (γ) t= 180 min. Γ: Επιλεγμένη περιοχή (6,70-7,30 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων του μείγματος γαλλικό οξύ (2 mM) και τυροσινάση (0,05 U/mL) σε 500 μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, ρD=7,20 σε διάφορα χρονικά σημεία: (α) t=20 min, (β) t= 60 min και (γ) t= 180 min.

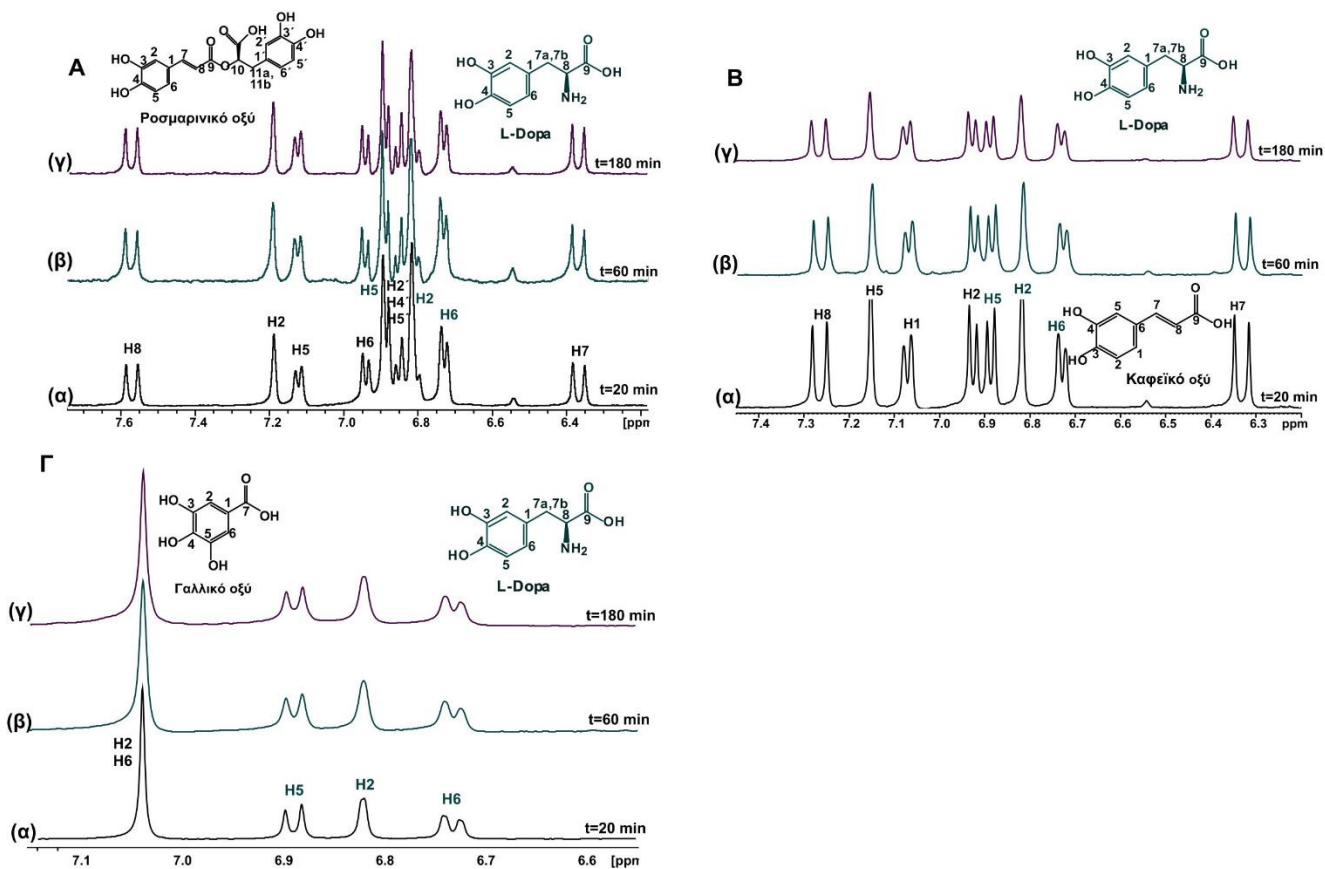


Διάγραμμα 5.1.3: Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης της L-Dopa (2 mM), του ροσμαρινικού οξέος (2 mM), του καφεϊκού οξέος (2 mM) και του γαλλικού οξέος (2 mM) από την τυροσινάση για χρονικό διάστημα 0-180 min.

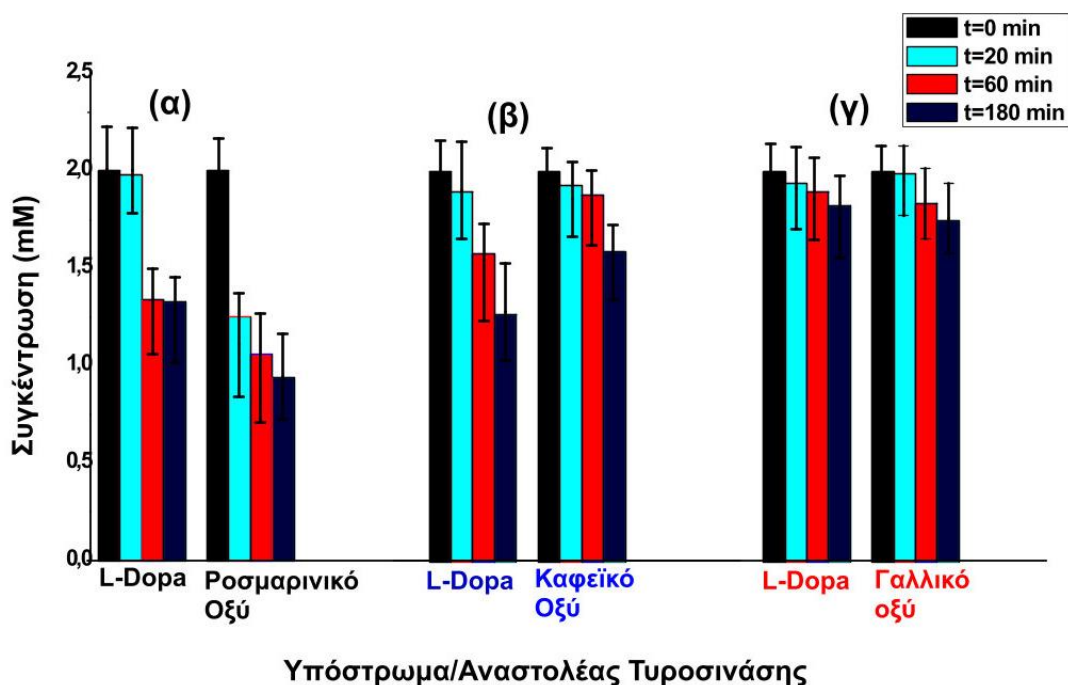
Όπως απεικονίζεται στο **Διάγραμμα 5.1.3**, η μεθοδολογία NMR-Cosmetube έδειξε ότι το ροσμαρινικό οξύ καταναλώνεται με πολύ μεγάλο ρυθμό παρουσία τυροσινάσης, που σημαίνει

ότι δρα περισσότερο ως υπόστρωμα του ενζύμου παρά ως αναστολέας. Την ίδια συμπεριφορά έχει και το καφεϊκό οξύ, το οποίο επίσης καταναλώνεται αλλά με μικρότερο ρυθμό σε σχέση με το ροσμαρινικό οξύ. Αντίθετα, το γαλλικό οξύ παρουσιάζει μια ελάχιστη μείωση στη συγκέντρωσή του ($1,5 \pm 0,5\%$ σε χρονικό διάστημα 180 λεπτών), που βρίσκεται στα όρια του στατιστικού σφάλματος. Συγκρίνοντας το ροσμαρινικό και το καφεϊκό οξύ, μετά από 180 λεπτά αντίδρασης με την τυροσινάση στους 37°C , η συγκέντρωσή τους μειώθηκε κατά $97,5 \pm 0,4\%$ και $68,00 \pm 0,32\%$ αντίστοιχα. Από την άλλη, το βασικό υπόστρωμα της τυροσινάσης, η L-Dopa, μειώθηκε κατά $18,00 \pm 0,3\%$ στον ίδιο χρόνο αντίδρασης. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι πιθανόν η κατεχολική δομή του ροσμαρινικού οξέος και του καφεϊκού οξέος ενισχύει τη δράση της τυροσινάσης, η οποία τα οξειδώνει. Η διπλή κατεχολική δομή που έχει το ροσμαρινικό οξύ είναι πιθανό να ευθύνεται για τη μεγαλύτερη μεταβολή της συγκέντρωσής του, συγκριτικά με το καφεϊκό οξύ. Η οξείδωση του ροσμαρινικού οξέος στο αντίστοιχο οξειδωμένο προϊόν γίνεται τόσο γρήγορα με αποτέλεσμα στο φάσμα πρωτονίου να είναι αδύνατη η εμφάνιση των σημάτων που αντιστοιχούν στις κορυφές των πρωτονίων του οξειδωμένου προϊόντος του (**Σχήμα 5.1.12 Α**). Από την άλλη, η οξείδωση του καφεϊκού οξέος από την τυροσινάση γίνεται με χαμηλότερο ρυθμό, συγκριτικά με την αντίστοιχη αντίδραση του ροσμαρινικού οξέος, με αποτέλεσμα στο φάσμα πρωτονίου να διακρίνονται τα σήματα των κορυφών που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του οξειδωμένου προϊόντος του καφεϊκού οξέος (**Σχήμα 5.1.12 Β**). Η οξείδωση του καφεϊκού οξέος μελετήθηκε σε διαφορετικούς χρόνους αντίδρασης με την τυροσινάση, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.1.15**. Όσον αφορά το γαλλικό οξύ, αυτό που το ξεχωρίζει από τα άλλα δύο φαινολικά οξέα είναι η δομή πυρογαλλόλης που έχει, η οποία φαίνεται να διατηρεί τον αντιοξειδωτικό χαρακτήρα των $-\text{OH}$ ομάδων παρεμβαίνοντας με αυτόν τον τρόπο στο ρυθμό της οξείδωσης του γαλλικού οξέος από το ένζυμο, ο οποίος είναι αρκετά μικρός (**Σχήμα 5.1.12 Γ**).

Σε επόμενο βήμα, μελετήθηκε η ενζυμική αντίδραση της τυροσινάσης παρουσία κάθε φαινολικού οξέος, προκειμένου να διερευνηθεί το πώς συμπεριφέρονται τα ίδια ως προς το ρυθμό μεταβολής της L-Dopa, που χρησιμοποιήθηκε ως το βασικό υπόστρωμα της τυροσινάσης (**Σχήμα 5.1.13**).



Σχήμα 5.1.13: A: Επιλεγμένη περιοχή (6,20-7,65 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων του μείγματος ροσμαρινικό οξύ (2 mM), L-Dopa (2 mM) και τυροσινάση (0,05 U/mL) σε 500 μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, ρD=7,20 σε διάφορα χρονικά σημεία: (α) t=20 min, (β) t= 60 min και (γ) t= 180 min. B: Επιλεγμένη περιοχή (6,20-7,45 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων του μείγματος καφεϊκό οξύ (2 mM), L-Dopa (2 mM) και τυροσινάση (0,05 U/mL) σε 500 μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, ρD=7,2 σε διάφορα χρονικά σημεία: (α) t=20 min, (β) t= 60 min και (γ) t= 180 min. Γ: Επιλεγμένη περιοχή (6,50-7,20 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων του μείγματος γαλλικό οξύ (2 mM), L-Dopa (2 mM) και τυροσινάση (0,05 U/mL) σε 500 μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, ρD=7,2 σε διάφορα χρονικά σημεία: (α) t=20 min, (β) t= 60 min και (γ) t= 180 min.



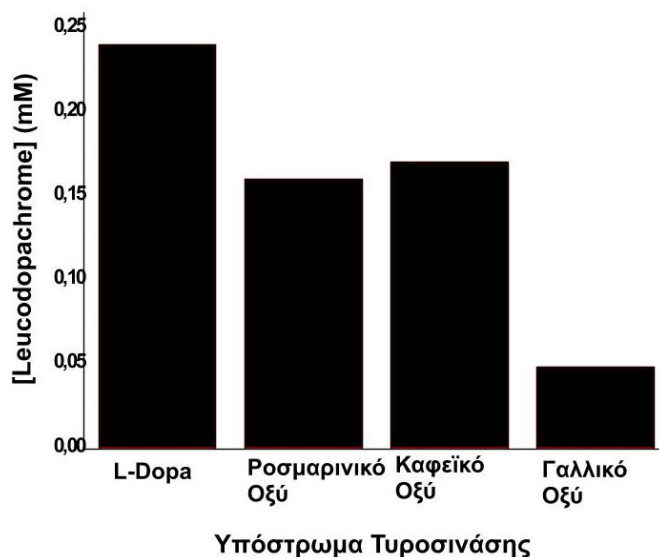
Διάγραμμα 5.1.4: Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης των συστατικών των μειγμάτων: (α) ροσμαρινικό οξύ (2 mM)-L-Dopa (2 mM) (β) καφεϊκό οξύ (2 mM)- L-Dopa (2 mM) και (γ)

γαλλικό οξύ-L-Dopa (2 mM) κατά την ενζυμική αντίδραση της τυροσινάσης σε χρονικό διάστημα 0-180 min, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pH=7,2 σε 100% δευτεριωμένο νερό.

Όπως απεικονίζεται στο **Διάγραμμα 5.1.4**, η τυροσινάση αντιδρά και με τα δύο υποστρώματα σε κάθε μείγμα αντίδρασης. Στο μείγμα ροσμαρινικό οξύ-L-Dopa, μετά από 180 λεπτά αντίδρασης, η συγκέντρωση του ροσμαρινικού οξέος μειώνεται κατά $53,00 \pm 0,02\%$, ενώ της L-Dopa μειώνεται κατά $33,5 \pm 0,12\%$. Αυτό δείχνει το ροσμαρινικό οξύ δρα ανταγωνιστικά ως προς τη δέσμευσή τους στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση, η αντίδραση της τυροσινάσης επαναλήφθηκε με προεπώαση του ενζύμου με την L-Dopa για δέκα λεπτά, ενώ στη συνέχεια προστέθηκε ισομοριακή συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι μετά από 180 λεπτά αντίδρασης η συγκέντρωση της L-Dopa μειώθηκε κατά $31,03 \pm 0,12\%$ ενώ του ροσμαρινικού οξέος μειώθηκε κατά $25,96 \pm 0,08\%$. Αυτό το αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο, καθώς το ροσμαρινικό οξύ ανταγωνίζεται την L-Dopa ως προς την πρόσδεσή του στο ενεργό κέντρο. Προεπώαζοντας την τυροσινάση με την L-Dopa, πραγματοποιείται κανονικά η αντίδραση της τυροσινάσης. Ωστόσο, λόγω της πρόσδεσης του υποστρώματος, το ροσμαρινικό οξύ δεν προσδέεται με το ίδιο ποσοστό που προσδέθηκε όταν επώαστηκε πρώτο αυτό με το ένζυμο.

Στο μείγμα αντίδρασης καφεϊκό οξύ-L-Dopa, μετά από 180 λεπτά αντίδρασης, η συγκέντρωση του καφεϊκού οξέος μειώνεται κατά $20,5 \pm 0,3\%$, ενώ η συγκέντρωση της L-Dopa μειώνεται κατά $36,5 \pm 0,22\%$. Σε αυτή την περίπτωση τόσο το καφεϊκό οξύ όσο και η L-Dopa συμπεριφέρονται ως υποστρώματα. Από την άλλη, στο μείγμα γαλλικό οξύ-L-Dopa, μετά από 180 λεπτά αντίδρασης, η συγκέντρωση του γαλλικού οξέος μειώνεται κατά $12,5 \pm 0,18\%$, ενώ η συγκέντρωση της L-Dopa μειώνεται κατά $8,5 \pm 0,24\%$. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι παρόλο που το γαλλικό οξύ συμπεριφέρεται ως υπόστρωμα της τυροσινάσης, οι τρεις -OH ομάδες διατηρούν τον αντιοξειδωτικό χαρακτήρα τους και επηρεάζουν το ρυθμό οξειδωσης του γαλλικού οξέος από την τυροσινάση. Παρουσία L-Dopa, το γαλλικό οξύ συμπεριφέρεται και ως υπόστρωμα και ως αναστολέας, καθώς η οξειδωση της L-Dopa γίνεται με χαμηλότερο ρυθμό.

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση του ροσμαρινικού οξέος, του καφεϊκού οξέος και του γαλλικού οξέος, υπολογίστηκε ο ρυθμός παραγωγής του leucodopachrome στα πρώτα 20 λεπτά της αντίδρασης, προκειμένου να διερευνηθεί η συμπεριφορά τους στην παραγωγή της μελανίνης (**Διάγραμμα 5.1.5**).

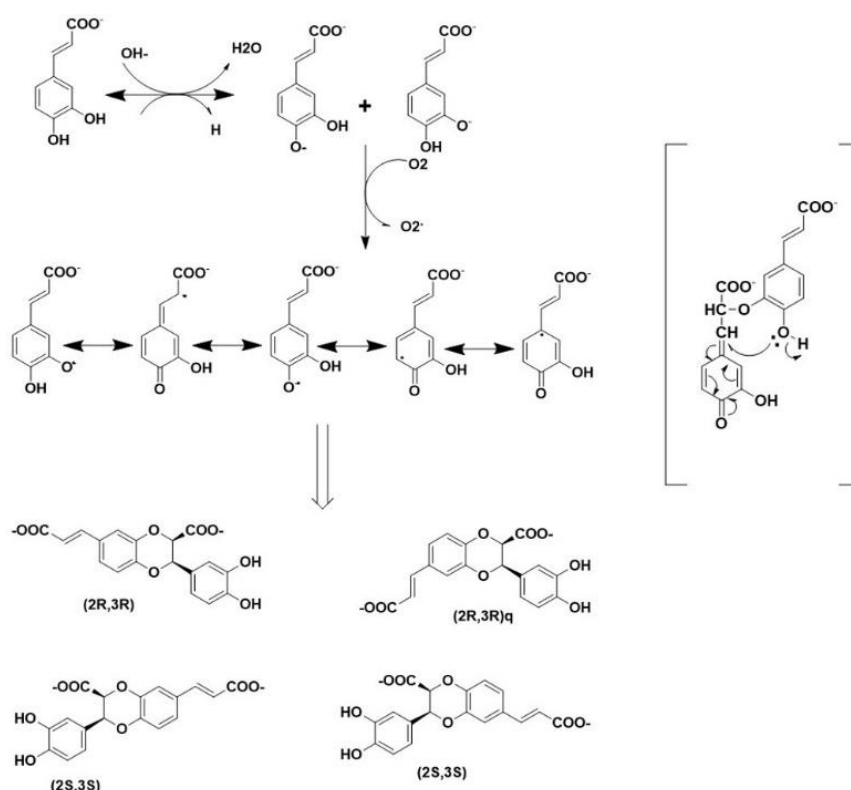


Διάγραμμα 5.1.5: Γραφική απεικόνιση της συγκέντρωσης του σχηματιζόμενου ενδιάμεσου leucodopachrome στα πρώτα 20 λεπτά της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης και παρουσία καθενός από τα φαινολικά οξέα (ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ και γαλλικό οξύ).

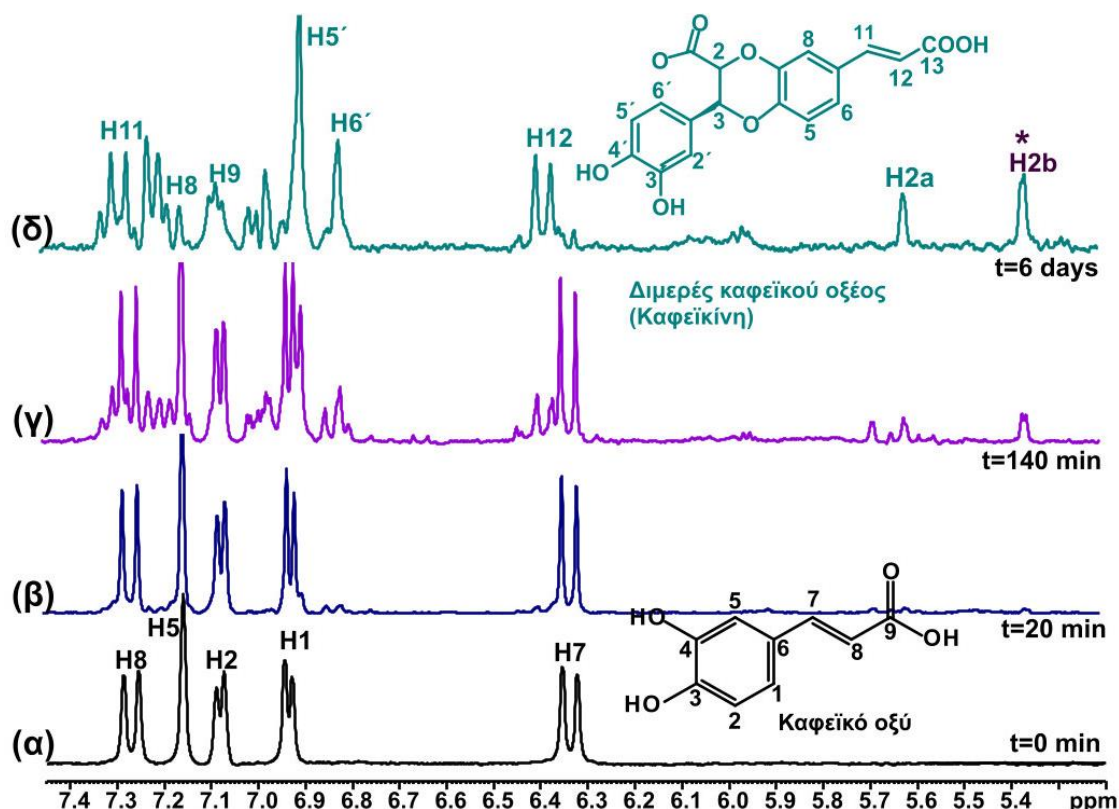
Όπως απεικονίζεται και στο **Διάγραμμα 5.1.5**, στην ενζυμική αντίδραση, στα πρώτα 20 λεπτά, υπάρχει μια γρήγορη αύξηση στο σχηματισμό του leucodopachrome. Παρουσία ροσμαρινικού και καφεϊκού οξέος, η συγκέντρωση του leucodopachrome που παράχθηκε είναι επίσης μεγάλη. Από την άλλη, παρουσία γαλλικού οξέος, το leucodopachrome παράγεται με μικρότερο βαθμό, επιβεβαιώνοντας την αντιοξειδωτική δράση του γαλλικού οξέος στην αντίδραση της τυροσινάσης. Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει ότι μεταξύ των τριών μελετούμενων φαινολικών οξέων, το γαλλικό οξύ έδειξε πιο αποτελεσματική δράση στην αντίδραση της τυροσινάσης. Ωστόσο, ο όρος “αναστολέας της τυροσινάσης” για αυτά τα τρία φαινολικά οξέα, δεν είναι δόκιμος, καθώς τα ίδια συμπεριφέρονται και ως υποστρώματα.

5.1.3.6 Εφαρμογή του NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης με το καφεϊκό οξύ

Μεταξύ των τριών φαινολικών οξέων που μελετήθηκαν, το καφεϊκό οξύ αντέδρασε με την τυροσινάση με ρυθμό που το οξειδωμένο προϊόν εμφάνισε σήματα που αντιστοιχούν στις κορυφές των πρωτονίων του στο φάσμα πρωτονίου NMR. Προκειμένου να ταυτοποιηθεί το προϊόν οξείδωσης, το καφεϊκό οξύ επωάστηκε με την τυροσινάση σε διαφορετικά χρονικά σημεία, στους 37°C και καταγράφηκαν τα αντίστοιχα 1D ¹H NMR φάσματα (**Σχήμα 5.1.15**). Σε τιμή ρD=7,2, η οξείδωση του καφεϊκού οξέος από την τυροσινάση μανιταριού γίνεται με χαμηλό ρυθμό και είναι εφικτή η διάκριση των οξειδωμένων παραγώγων του καφεϊκού οξέος.³⁰⁷



Σχήμα 5.1.14: Μηχανισμός οξειδωσης του καφεϊκού οξέος από την τυροσινάση.³⁰⁸

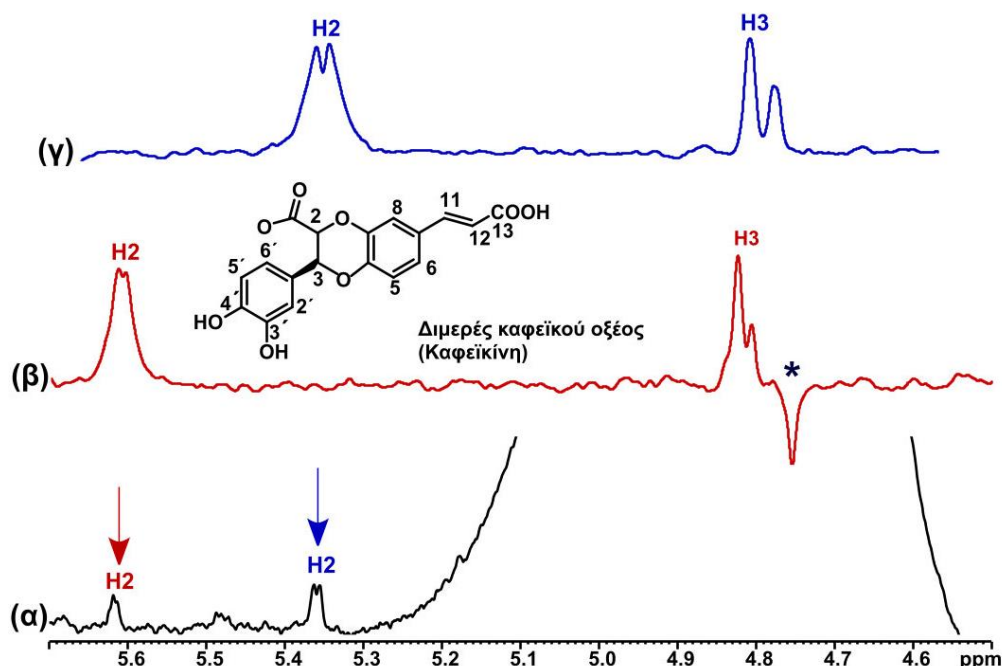


Σχήμα 5.1.15: Μελέτη της οξειδωσης του καφεϊκού οξέος από την τυροσινάση σε διαφορετικούς χρόνους αντίδρασης στους 37°C, για (α) t= 0 min, (β) t=20 min, (γ) t=140 min και (δ) t= 6 days σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pD=7,2, σε 100% δευτεριωμένο νερό (D₂O).

Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 5.1.15, μετά τα πρώτα είκοσι λεπτά της αντίδρασης αρχίζει και παράγεται το οξειδωμένο προϊόν, ενώ μετά από 140 λεπτά αντίδρασης στους 37°C, οι κορυφές του οξειδωμένου προϊόντος εμφανίζονται με μεγαλύτερη ένταση. Ο αρωματικός δακτύλιος του καφεϊκού οξέος έχει τις χαρακτηριστικές κατεχολικές –OH ομάδες στις θέσεις C-3 και C-4, και είναι δυνατή η αλληλεπίδραση με τα ιόντα Cu²⁺ του ενεργού κέντρου της τυροσινάσης, οδηγώντας στο σχηματισμό του οξειδωμένου πολυμερικού προϊόντος. Όσον αφορά το προϊόν, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.1.15 (γ), εμφανίζεται μια χαρακτηριστική διπλή

κορυφή, η οποία είναι ίδια με τη μεγάλη κορυφή του ολεφινικού πρωτονίου H7 του καφεϊκού οξέος στα 6,42 ppm, με πειραματική τιμή σταθεράς σύζευξης J_{H-H} ίση με 16 Hz. Ομοίως, εμφανίζεται ακόμη μία διπλή κορυφή στα 7,39 ppm, η οποία είναι ελαφρώς μετατοπισμένη από τη χαρακτηριστική διπλή κορυφή του ολεφινικού πρωτονίου H8 του καφεϊκού οξέος. Αυτό επιβεβαιώνει το γεγονός ότι το οξειδωμένο παράγωγο έχει τη χαρακτηριστική υπομονάδα των ολεφινικών πρωτονίων του καφεϊκού οξέος. Μετά από εξέλιξη της αντίδρασης για 6 ημέρες, καταγράφηκε το αντίστοιχο φάσμα πρωτονίου. Το καφεϊκό οξύ οξειδώνεται σε παράγωγα καφεϊκίνης. Η παρουσία του χειρικού άνθρακα στις θέσεις C-2 και C-3 του διοξανικού δακτυλίου της καφεϊκίνης οδηγεί στο σχηματισμό τεσσάρων διαστερεομερών παραγώγων. Προκειμένου να διακριθούν τα παράγωγα που προέκυψαν από αυτή την αντίδραση, εφαρμόστηκε πείραμα Selective 1D TOCSY και 2D 1H - 1H TOCSY.

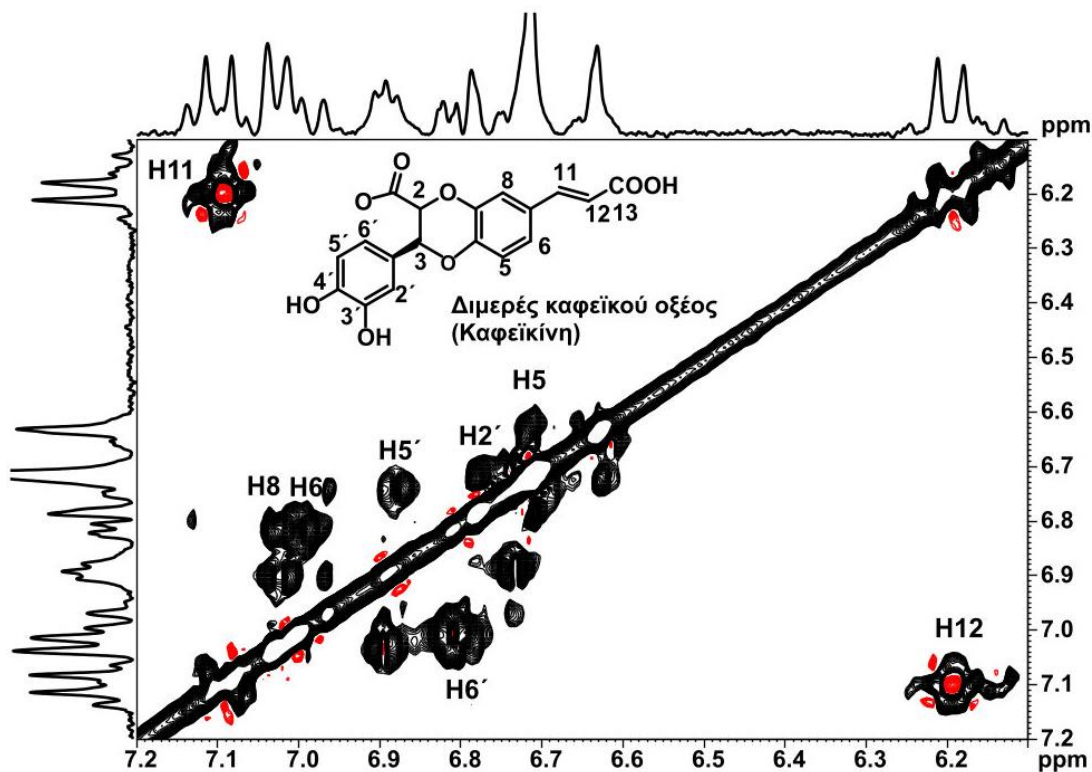
Για την εφαρμογή του πειράματος 1D TOCSY επιλέχθηκαν τα πρωτόνια H2 και H3, τα οποία έχουν χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις, εξαιτίας του χημικού περιβάλλοντός τους, το οποίο επηρεάζεται από την παρουσία της δεύτερης καρβοξυλικής ομάδας στο διοξανικό δακτύλιο. Εφαρμόζοντας επιλεκτική διέγερση στο πρωτόνιο H2 στα 5,61 ppm (**Σχήμα 5.1.16 (β)**), εμφανίστηκε η συσχέτισή του με το πρωτόνιο H3, με εμφάνιση της κορυφής του στα 4,82 ppm, η οποία στο φάσμα πρωτονίου NMR κρύβεται κάτω από την κορυφή του νερού. Ομοίως, εφαρμόζοντας επιλεκτική διέγερση στην διπλή κορυφή στα 5,34 ppm, εμφανίστηκε συσχέτιση με μια δεύτερη κορυφή στα 4,76 ppm, η οποία επίσης κρύβεται κάτω από την κορυφή του νερού, και αντιστοιχεί σ' ένα δεύτερο πρωτόνιο τύπου H3 (**Σχήμα 5.1.16 (γ)**). Αυτό το πείραμα δείχνει ότι υπάρχουν δύο διαφορετικά ζεύγη πρωτονίων H2-H3 και επιβεβαιώνει την παρουσία δύο κύριων διαστερεομερών καφεϊκίνης.



Σχήμα 5.1.16: Επιλεγμένη περιοχή (4,50-5,70 ppm): (α) 1D 1H NMR φασμάτων του διαλύματος του οξειδωμένου προϊόντος καφεϊκού οξέος, μετά από αντίδραση 6 ημερών, σε ρυθμιστικό διάλυμα 15 mM, pH=7,2, σε 100% δευτεριωμένο νερό. **(β)** Selective 1D TOCSY φάσμα της αντίδρασης με τις ακόλουθες παραμέτρους: χρόνος ανάμειξης: 200 ms, αριθμός σαρώσεων:128, χρόνος ανάκτησης: 2.5 s, χρόνος εφησυχασμού: 5s και πειραματικός χρόνος~16.30 min. Το βέλος δείχνει τη χημική μετατόπιση (δ =5,61 ppm), όπου αντιστοιχεί στο διεγερόμενο πρωτόνιο. **(γ)** Selective 1D TOCSY φάσμα της αντίδρασης με

τις ακόλουθες παραμέτρους: χρόνος ανάμειξης: 200 ms, αριθμός σαρώσεων: 128, χρόνος ανάκτησης: 2.5 s, χρόνος εφησυχασμού: 5 s και πειραματικός χρόνος ~16.30 min. Το βέλος δείχνει τη χημική μετατόπιση ($\delta=5,34$ ppm), όπου αντιστοιχεί στο διεγερόμενο πρωτόνιο.

Η παρουσία των δύο διαστερομερών παραγώγων της καφεΐκίνης επιβεβαιώθηκε περαιτέρω και με εφαρμογή του πειράματος 2D ^1H - ^1H TOCSY NMR (Σχήμα 5.1.17).



Σχήμα 5.1.17: Επιλεγμένη περιοχή (6,00-7,20 ppm) φάσματος 2D ^1H - ^1H TOCSY του οξειδωμένου προϊόντος του καφεϊκού οξέος από την τυροσινάση, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, $\text{pD}=7,2$, στους 20°C .

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.1.17, στο 2D ^1H - ^1H TOCSY φάσμα της αντίδρασης οξείδωσης του καφεϊκού οξέος από την τυροσινάση, φαίνονται οι συσχετίσεις των ολεφινικών πρωτονίων H11 και H12 της παραγόμενης καφεΐκίνης. Επίσης, διακρίνονται οι συσχετίσεις μεταξύ των πρωτονίων H8, H5 και H6 του αρωματικού δακτυλίου που βρίσκεται δίπλα στο διπλό δεσμο του μορίου. Από την άλλη, φαίνεται επίσης η συσχέτιση των πρωτονίων H5' και H6' του άλλου αρωματικού δακτυλίου. Ωστόσο, αυτό που παρατηρείται επίσης στο 2D ^1H - ^1H TOCSY φάσμα της αντίδρασης είναι και τα υπόλοιπα σήματα, τα οποία έχουν μικρότερη ένταση από αυτά που έχουν ήδη περιγραφεί, και που βρίσκονται σε παραπλήσιες χημικές μετατοπίσεις με τα αντίστοιχα πρωτόνια που περιγράφηκαν προηγουμένως, ενώ και αυτά συσχετίζονται μεταξύ τους. Αυτό δείχνει το ενδεχόμενο ότι υπάρχει σίγουρα και δεύτερο μόριο με παρόμοιο αρωματικό σύστημα. Σε συνδυασμό με τα πειράματα Selective 1D TOCSY για το ζεύγος πρωτονίων H2-H3, επιβεβαιώνεται ο σχηματισμός τουλάχιστον δύο ισομερών μορίων καφεΐκίνης.

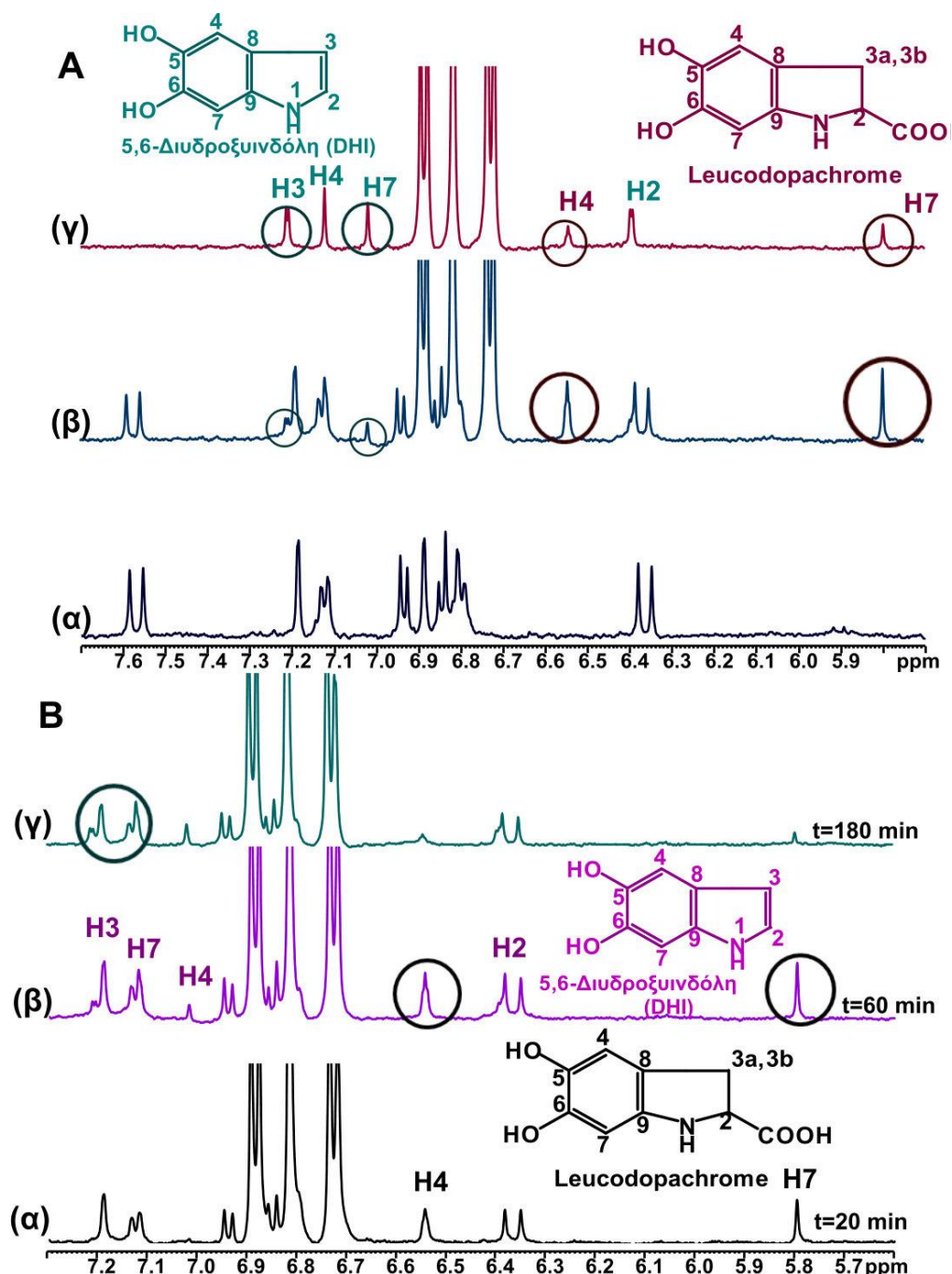
5.1.3.7 Αποτελέσματα από την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης, παρουσία εκχυλισμάτων

Μετά τον προσδιορισμό της συμπεριφοράς των εκχυλισμάτων ως αναστολείς ή ενισχυτές της τυροσινάσης, επιλέχθηκαν συγκεκριμένα εκχυλίσματα, ώστε να μελετηθεί η αντίδραση της τυροσινάσης παρουσία αυτών των εκχυλισμάτων με φασματοσκοπία 1D ^1H NMR. Τα εκχυλίσματα τα οποία επιλέχθηκαν για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube προέρχονται από τα φυτά: *Melissa Officinalis* (αιθανολικό και υδατικό), *Rosmarinus Officinalis* (αιθανολικό), *Thymus Vulgaris* (υδατικό) και *Cistus Albidus* (υδατικό). Αυτά τα εκχυλίσματα επιλέχθηκαν κυρίως λόγω της βιολογικής δράσης που παρουσιάζουν είτε ως αναστολείς είτε ως ενισχυτές του ενζύμου, αλλά και επειδή στα φάσματα πρωτονίου τους δεν εμφάνισαν κάποια χαρακτηριστική κορυφή στις περιοχές που εμφανίζονται οι κορυφές των προϊόντων της ενζυμικής αντίδρασης, έτσι ώστε να μπορεί να γίνει εκτίμηση της επίδρασής τους στο ρυθμό της ενζυμικής αντίδρασης.

5.1.3.7.1 NMR-Cosmetube: Μελέτη της αναστολής της τυροσινάσης από εκχύλισμα του μελισσόχορτου (*Melissa Officinalis*)

5.1.3.7.1 Αιθανολικό εκχύλισμα

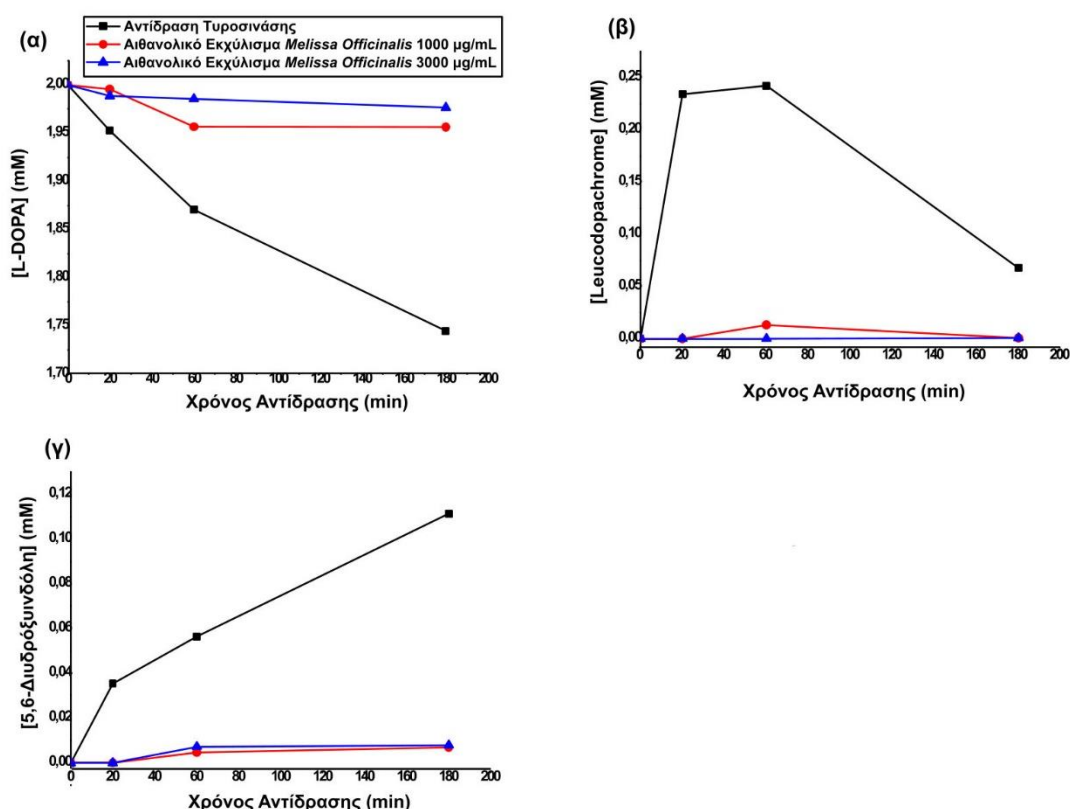
Το αιθανολικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου (*Melissa Officinalis*) μελετήθηκε ως προς τη συμπεριφορά του στην αντίδραση της τυροσινάσης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την L-Dopa, σε συγκέντρωση 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, όπου από τα πειράματα αναστολής με UV, έδειξε $48,16 \pm 0.03\%$ αναστολή σε συγκέντρωση 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Η αντίδραση της τυροσινάσης παρουσία του εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε σε χρονικό διάστημα 0-3 ωρών. Ωστόσο, προκειμένου να μελετηθεί η αντιοξειδωτική δράση του μελισσόχορτου, η μελέτη της αντίδρασης της τυροσινάσης επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ του ίδιου εκχυλίσματος.



Σχήμα 5.1.18: A: Επιλεγμένη περιοχή (5,70-7,70 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων: (α) του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis* (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (β) της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης παρουσία 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis* (γ) της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, $\text{pD}=7,2$, σε 100% δευτεριωμένο D_2O . B: Επιλεγμένη περιοχή (5,60-7,30 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης παρουσία 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis* για (α) $t=20$ min, (β) $t=60$ min και (γ) $t=180$ min.

Όπως φαίνεται από το **Σχήμα 5.1.18**, παρουσία του εκχυλίσματος, εμφανίζονται οι κορυφές των πρωτονίων του leucodopachrome με χημικές μετατοπίσεις στα 6,56 ppm και 5,80 ppm για τα πρωτόνια H4 και H7 αντίστοιχα. Επίσης, σχηματίζεται και η 5,6-διυδροξινδόλη, αφού εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές των πρωτονίων H2 και H7 στα 7,21 και 7,01 ppm αντίστοιχα. Συγκρίνοντας τα φάσματα (α) και (β) του **Σχήματος 5.1.18A**, σε αυτή την περιοχή δεν υπάρχει κάποια κορυφή του εκχυλίσματος που να αλληλεπικαλύπτεται με τις κορυφές των σχηματιζόμενων προϊόντων της αντίδρασης. Στο **Σχήμα 5.1.18B** απεικονίζεται η εξέλιξη της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία του εκχυλίσματος, και η παραγωγή των προϊόντων. Είναι σημαντικό το ότι και μετά από 180 λεπτά αντίδρασης, το leucodopachrome δεν έχει εξαφανιστεί τελείως. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο ρόλος των εκχυλισμάτων στην αντίδραση

είναι αρκετά σημαντικός, λόγω του αντιοξειδωτικού τους χαρακτήρα που αποδίδεται στην παρουσία φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων. Μπορούν να επέμβουν επομένως στην αντίδραση με διάφορους τρόπους, δεσμεύοντας κυρίως τα ιόντα Cu^{2+} του ενεργού κέντρου της τυροσινάσης μέσω χηλικών δεσμών, ή δεσμεύοντας τις ο-κινόνες που σχηματίζονται κατά τα πρώτα στάδια της αντίδρασης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρεμβαίνουν στην ταχύτητα της αντίδρασης. Στο **Διάγραμμα 5.1.6** απεικονίζονται οι μεταβολές των συγκεντρώσεων του υποστρώματος L-Dopa (έμμεση μέτρηση), του leucodopachrome και της 5,6-διυδροξυινδόλης, παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου σε συγκεντρώσεις 1000 $\mu\text{g/mL}$ και 3000 $\mu\text{g/mL}$ για χρονικό διάστημα αντίδρασης 0-180 λεπτών. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι παρουσία του εκχυλίσματος, ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης του υποστρώματος αλλά και της παραγωγής των προϊόντων είναι πιο μικρός από ό,τι ο αντίστοιχος ρυθμός μείωσης των αντίστοιχων συγκεντρώσεων στην αντίδραση της τυροσινάσης. Αυτό δείχνει ότι το εκχύλισμα επιδρά ανασταλτικά σ' ένα βαθμό στην αντίδραση της τυροσινάσης.

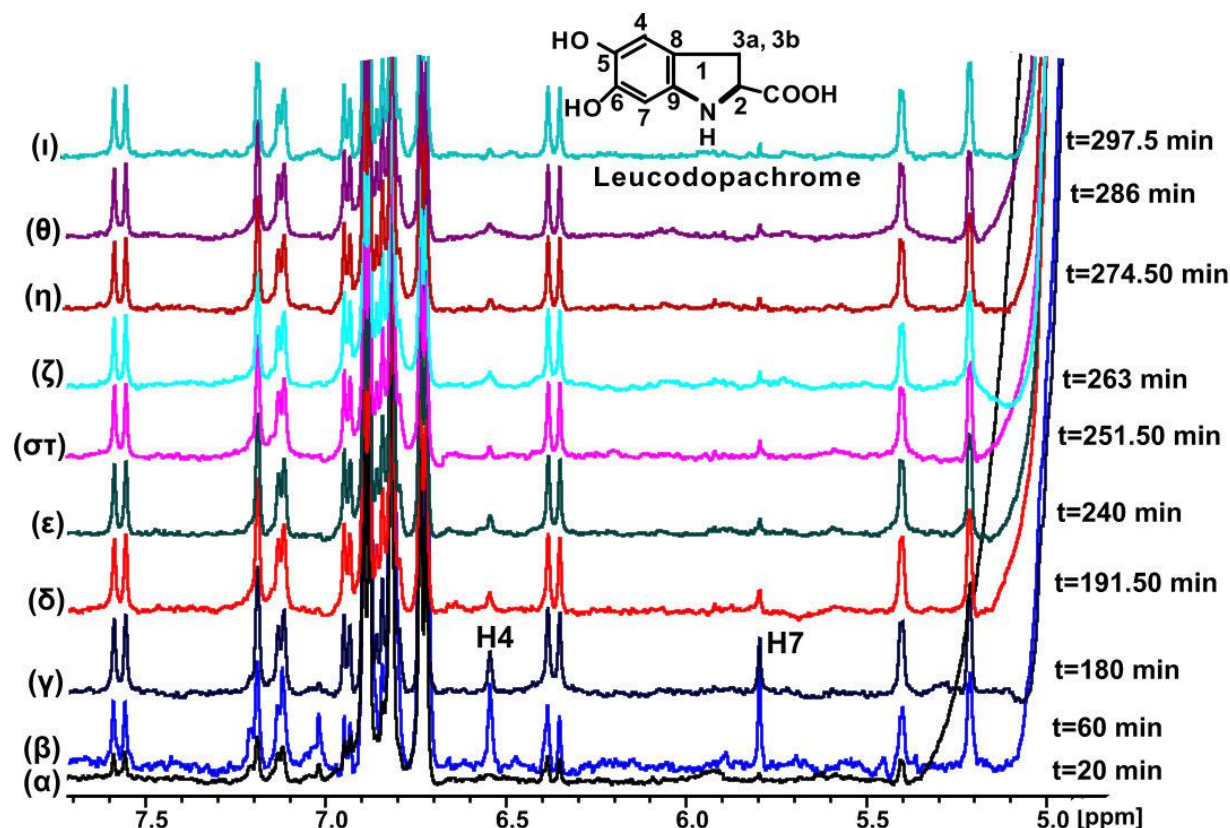


Διάγραμμα 5.1.6: (α) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης του υποστρώματος L-Dopa παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου σε συγκεντρώσεις 1000 $\mu\text{g/mL}$ και 3000 $\mu\text{g/mL}$. (β) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης του Leucodopachrome παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου σε συγκεντρώσεις 1000 $\mu\text{g/mL}$ και 3000 $\mu\text{g/mL}$. (γ) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης της 5,6-διυδροξυινδόλης παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου σε συγκεντρώσεις 1000 $\mu\text{g/mL}$ και 3000 $\mu\text{g/mL}$.

Όπως φαίνεται και στο **Διάγραμμα 5.1.6**, παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου, υπάρχει διαφορά στη μεταβολή της συγκέντρωσης τόσο του υποστρώματος του ενζύμου, όσο και των παραγόμενων προϊόντων. Στην ενζυμική αντίδραση η κατανάλωση της L-Dopa γίνεται με μεγαλύτερο ρυθμό από ό,τι στην αντίδραση που γίνεται παρουσία εκχυλίσματος. Το ίδιο ισχύει και για το ρυθμό παραγωγής του leucodopachrome και της 5,6-διυδροξυινδόλης. Η διαφορετική συγκέντρωση του εκχυλίσματος επηρεάζει επίσης το ρυθμό παραγωγής των

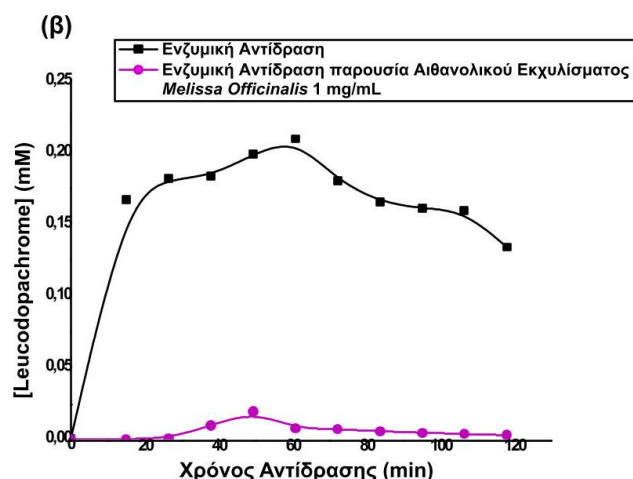
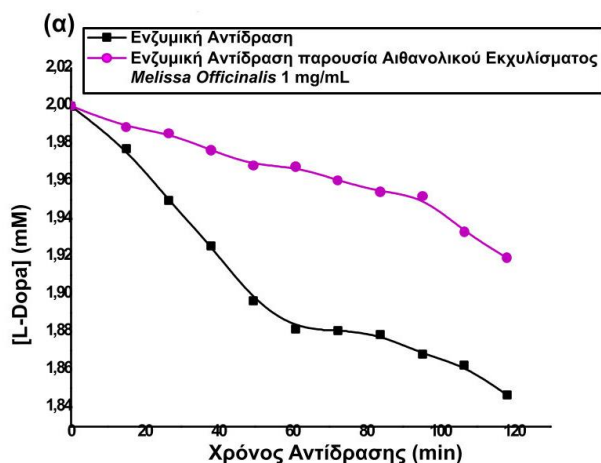
προϊόντων αλλά και της κατανάλωσης του υποστρώματος συγκριτικά με την αντίδραση της τυροσινάσης.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε *in situ* μελέτη της αναστολής της τυροσινάσης από 3000 µg/mL αιθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου, για ένα χρονικό διάστημα αντίδρασης 300 λεπτών, η οποία εξελίχθηκε στο σωληνάκι NMR (Σχήμα 5.1.19).



Σχήμα 5.1.19: Επιλεγμένη περιοχή (4,80-7,65 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis* σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pD=7.2 για (α) t=20 min, (β) t=60 min, (γ) t=180 min, (δ) t=191,50 min, (ε) t=240 min, (στ) t=251,50 min, (ζ) t=263 min, (η) t=274,50 min, (θ) t=286 min, (ι) t=297,5 min αντίδρασης.

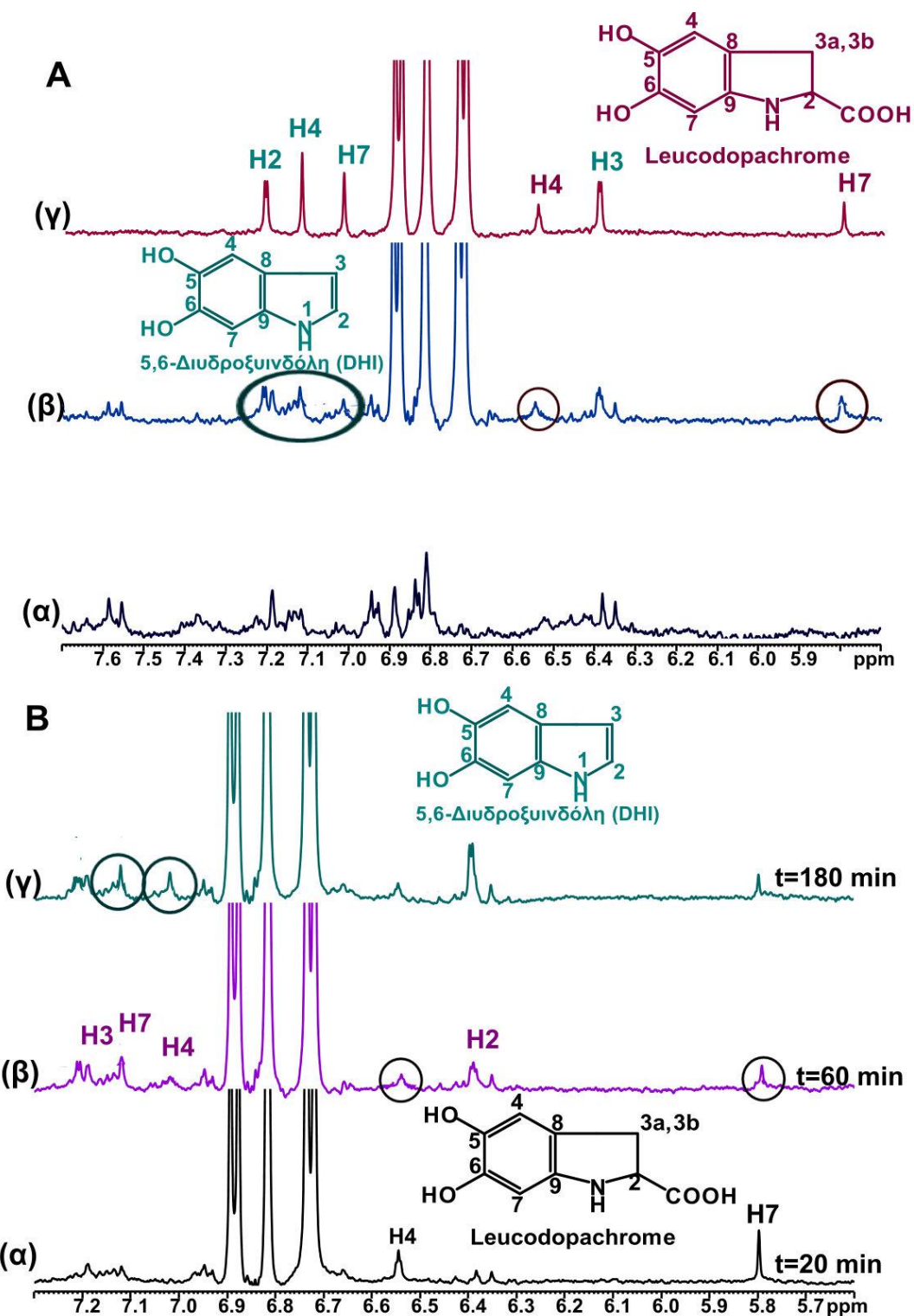
Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι μπορεί να γίνει παρακολούθηση της παραγωγής και καταλάνωσης του ενδιάμεσου leucodopachrome, καθώς οι κορυφές των αρωματικών πρωτονίων H4 και H7 είναι χαρακτηριστικές και διακρίνονται από τις υπόλοιπες κορυφές που αντιστοιχούν σε συστατικά του εκχυλίσματος. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι στα πρώτα 20 λεπτά της αντίδρασης, η ένταση των αντίστοιχων κορυφών είναι πολύ μικρή, γεγονός που δηλώνει τη μικρή συγκέντρωση του ενδιάμεσου που παράγεται σε αυτό το χρόνο αντίδρασης, όταν στον ίδιο χρόνο της ενζυμικής αντίδρασης, η παραγωγή του leucodopachrome είναι πολύ μεγαλύτερη (Διάγραμμα 5.1.7). Μετά από 60 λεπτά αντίδρασης, το leucodopachrome φτάνει σε μία μέγιστη συγκέντρωση, ενώ στη συνέχεια αρχίζει και καταναλώνεται σταδιακά. Μετά από 297,5 λεπτά αντίδρασης, το leucodopachrome υπάρχει ακόμη στο διάλυμα της αντίδρασης, αλλά σε πολύ μικρή συγκέντρωση. Αυτή η σταδιακή μείωση του ενδιάμεσου, μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι το εκχύλισμα μπορεί να συμβάλλει σε κάποιο από τα στάδια της ενζυμικής αντίδρασης, κυρίως ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, μειώνοντας το ρυθμό κατανάλωσης του ενδιάμεσου. Σχετικά με το προϊόν 5,6-διυδροξυινδολή, η περιοχή των αρωματικών πρωτονίων του προϊόντος αλληλεπικαλύπτεται εν μέρει με κορυφές των συστατικών του εκχυλίσματος, με αποτέλεσμα να υπάρχει μία δυσκολία στην διάκρισή της.



Διάγραμμα 5.1.7: (α) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης του υποστρώματος L-Dopa παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου σε συγκέντρωση 1000 μg/mL. (β) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης του Leucodopachrome παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου σε συγκεντρώσεις 1000 μg/mL.

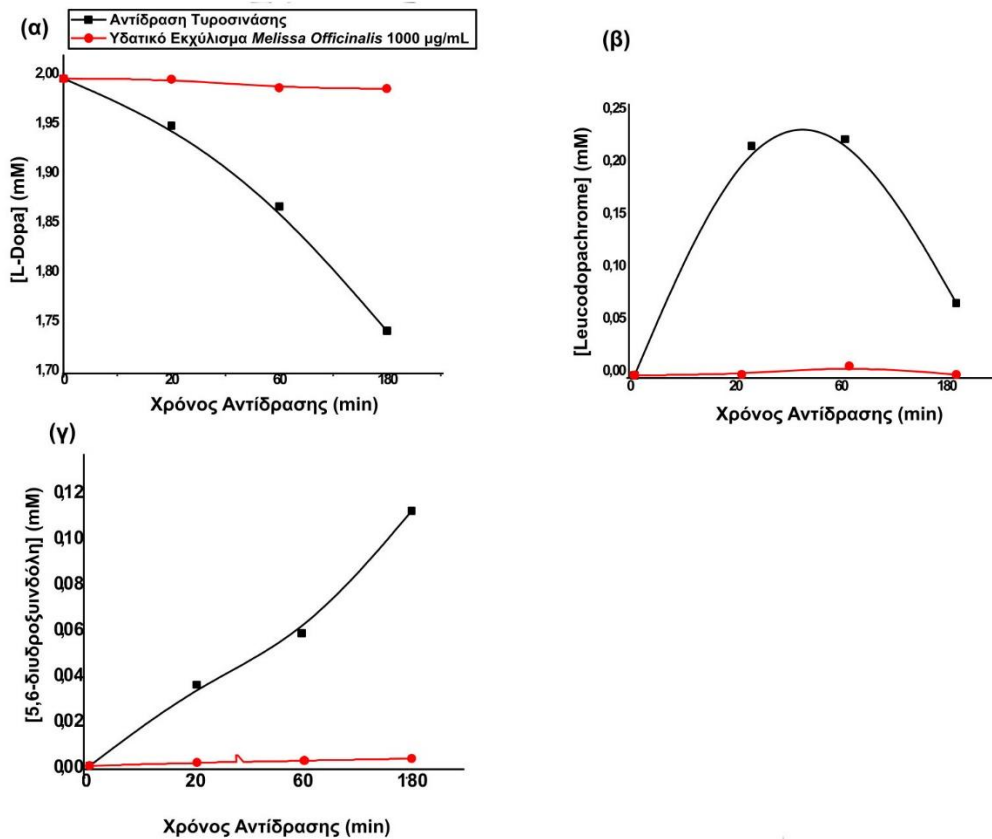
5.1.3.7.2 Υδατικό εκχύλισμα μελισσόχορτου

Για τη μελέτη της αναστολής της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία υδατικού εκχυλίσματος από το φυτό *Melissa Officinalis*, χρησιμοποιήθηκε η ίδια συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε και στα πειράματα αναστολής με φασματοσκοπία UV (1000 μg/mL) (Σχήμα 5.1.20).



Σχήμα 5.1.20: A: Επιλεγμένη περιοχή (5,70-7,70 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων: (α) του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis* (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (β) της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης παρουσία 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis* (γ) της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, $\text{pD}=7,2$, σε 100% δευτεριωμένο D_2O . **B: Επιλεγμένη περιοχή (5,65-7,30 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων** της αντίδρασης της τυροσινάσης παρουσία υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis* συγκέντρωσης 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 15 mM, $\text{pD}=7,2$, σε 100% δευτεριωμένο νερό για χρονικά σημεία (α) $t=20$ min, (β) $t=60$ min και (γ) $t=180$ min αντίδρασης.

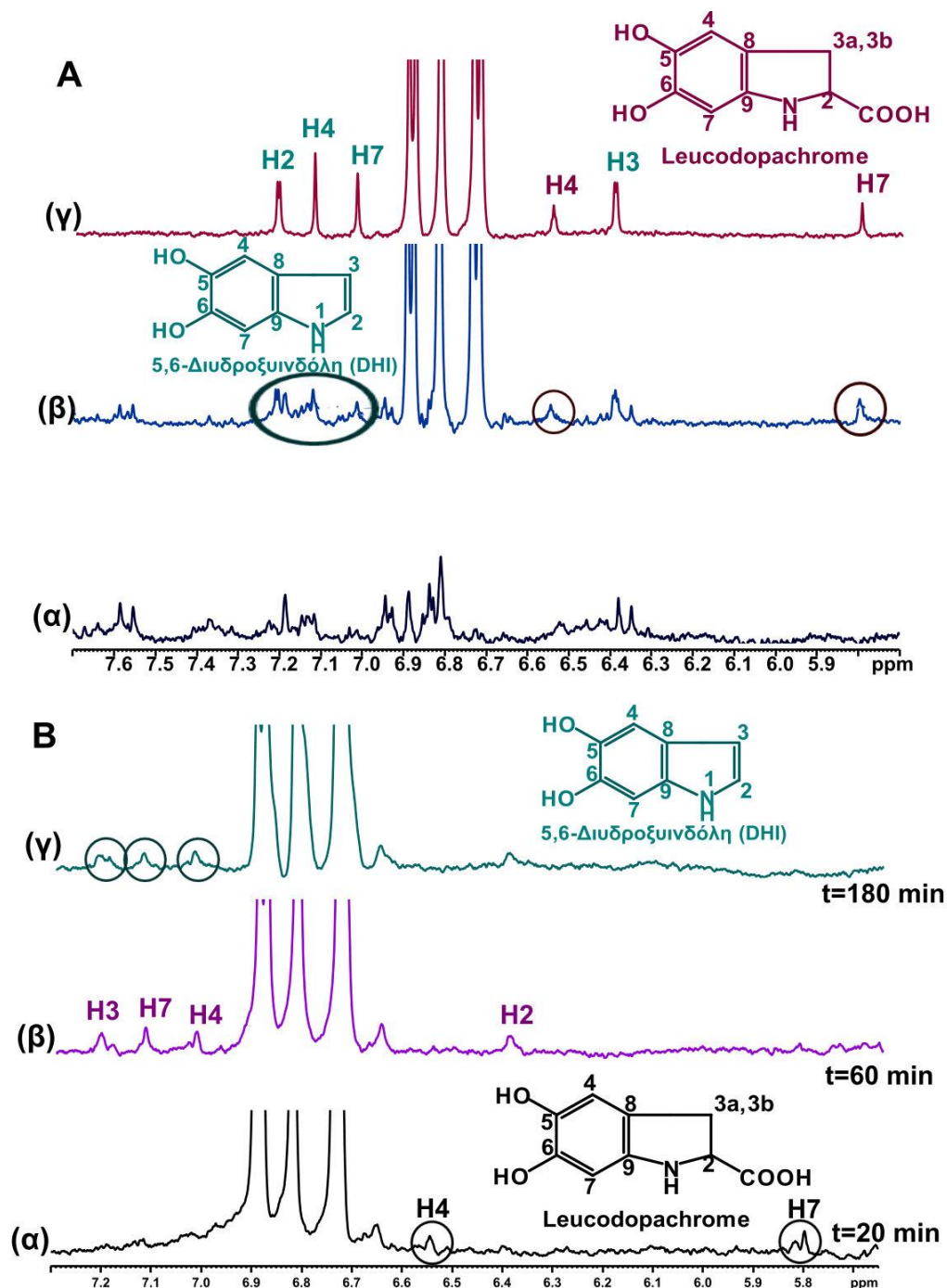
Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.1.20**, είναι εμφανής η διάκριση των κορυφών του leucodopachrome και της 5,6-διυδροξυινδόλης από αυτές του εκχυλίσματος. Επίσης, παρουσία του υδατικού εκχυλίσματος, η ένταση των κορυφών των παραγόμενων προϊόντων είναι χαμηλή, γεγονός που δείχνει την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος στην ενζυμική αντίδραση. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα από τη μεταβολή της συγκέντρωσης της L-Dopa και των παραγόμενων leucodopachrome και 5,6-διυδροξυινδόλη απεικονίζονται στο **Διάγραμμα 5.1.8**.



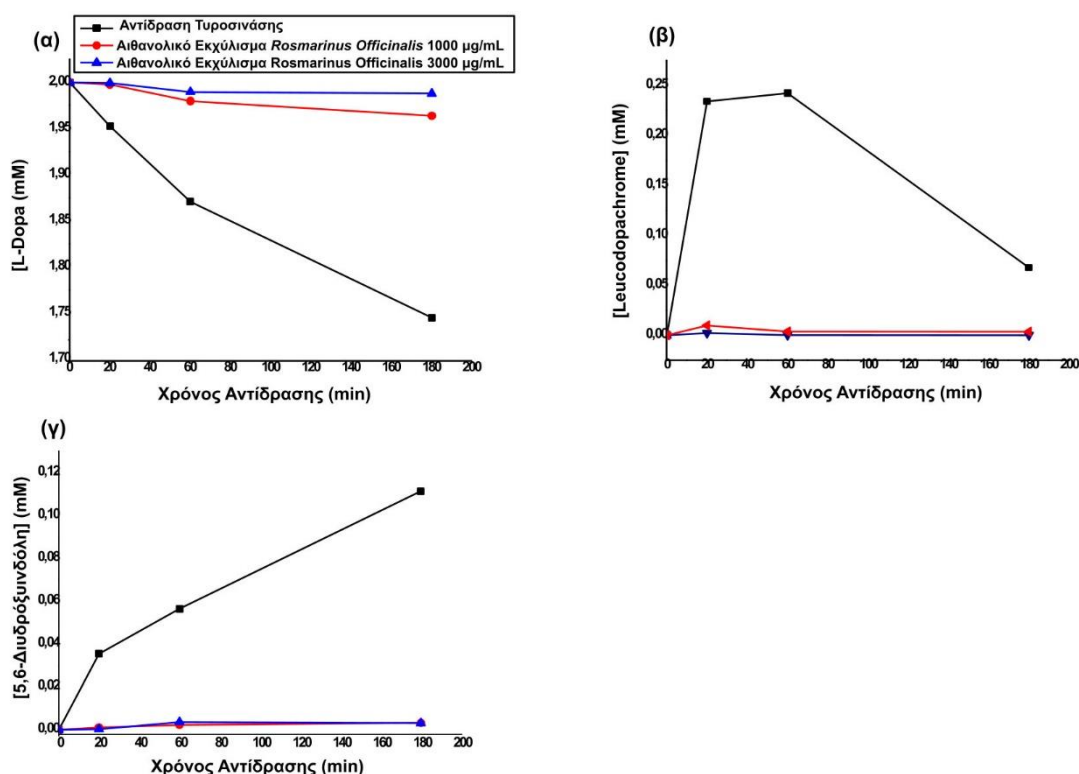
Διάγραμμα 5.1.8: (α) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης του υποστρώματος L-Dopa παρουσία υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis* σε συγκέντρωση 1000 µg/mL. (β) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης του Leucodopachrome παρουσία υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis* σε συγκέντρωση 1000 µg/mL. (γ) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης της 5,6-διυδροξυινδόλης παρουσία υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis* σε συγκέντρωση 1000 µg/mL.

5.1.3.7.3 NMR-Cosmetube: Μελέτη της αναστολής της τυροσινάσης από αιθανολικό εκχύλισμα του δεντρολίβανου (*Rosmarinus Officinalis*)

Το αιθανολικό εκχύλισμα του δεντρολίβανου μελετήθηκε και αυτό για την ανασταλτική του δράση ως προς την τυροσινάση, σε συγκεντρώσεις 1000 µg/mL και 3000 µg/mL (Σχήμα 5.1.21).



Σχήμα 5.1.21: A: Επιλεγμένη περιοχή (5,70-7,70 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων: (α) του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Rosmarinus Officinalis* (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (β) της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης παρουσία 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Rosmarinus Officinalis* (γ) της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, $\text{pD}=7,2$, σε 100% δευτεριωμένο D_2O . B: Επιλεγμένη περιοχή (5,60-7,30 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης παρουσία 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Rosmarinus Officinalis* για (α) $t=20$ min, (β) $t=60$ min και (γ) $t=180$ min.

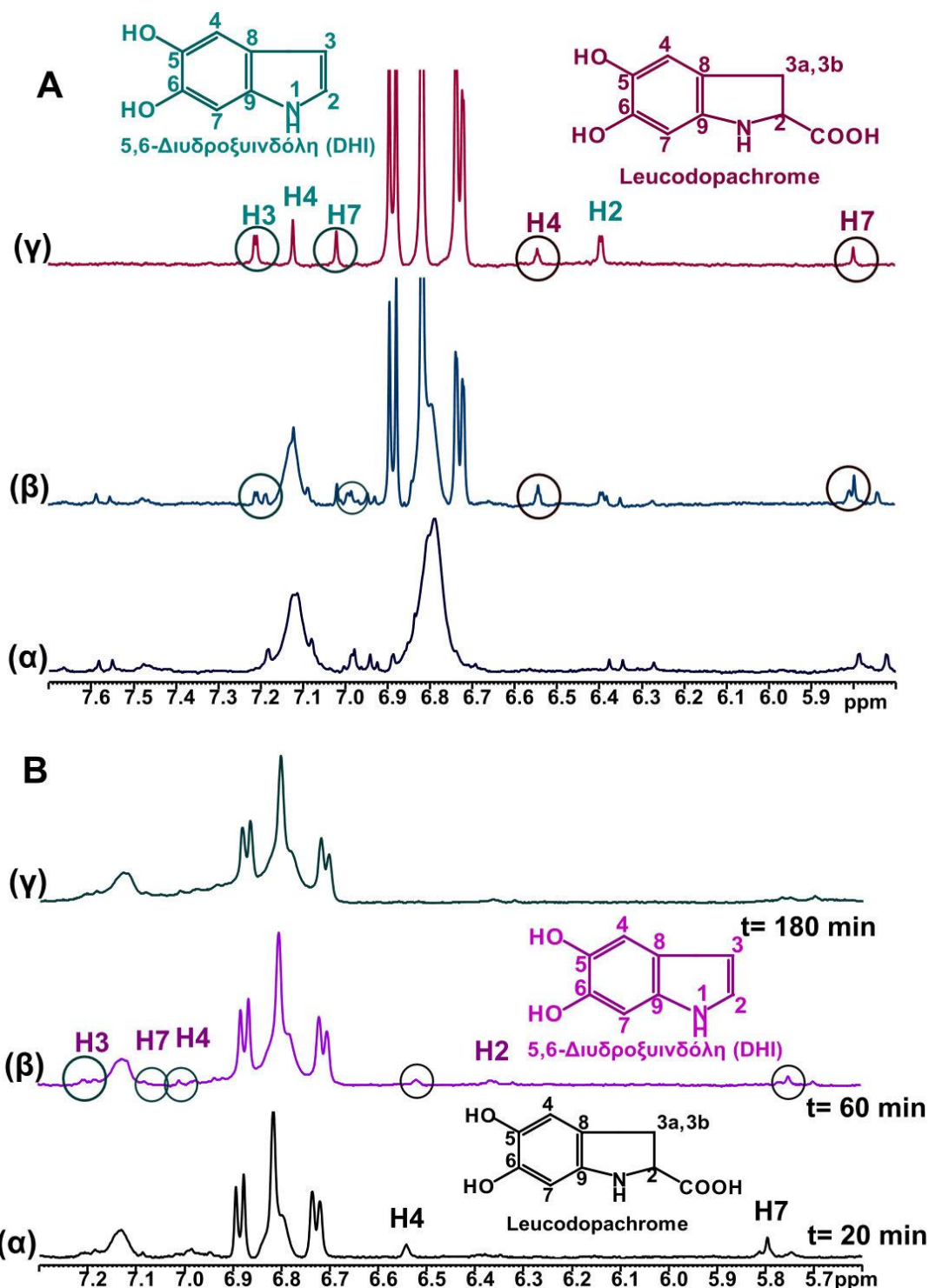


Διάγραμμα 5.1.9: (α) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης του υποστρώματος L-Dopa παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου σε συγκεντρώσεις 1000 µg/mL και 3000 µg/mL. (β) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης του leucodopachrome παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου σε συγκεντρώσεις 1000 µg/mL και 3000 µg/mL. (γ) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης της 5,6-διυδροξυινδόλης παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου σε συγκεντρώσεις 1000 µg/mL και 3000 µg/mL.

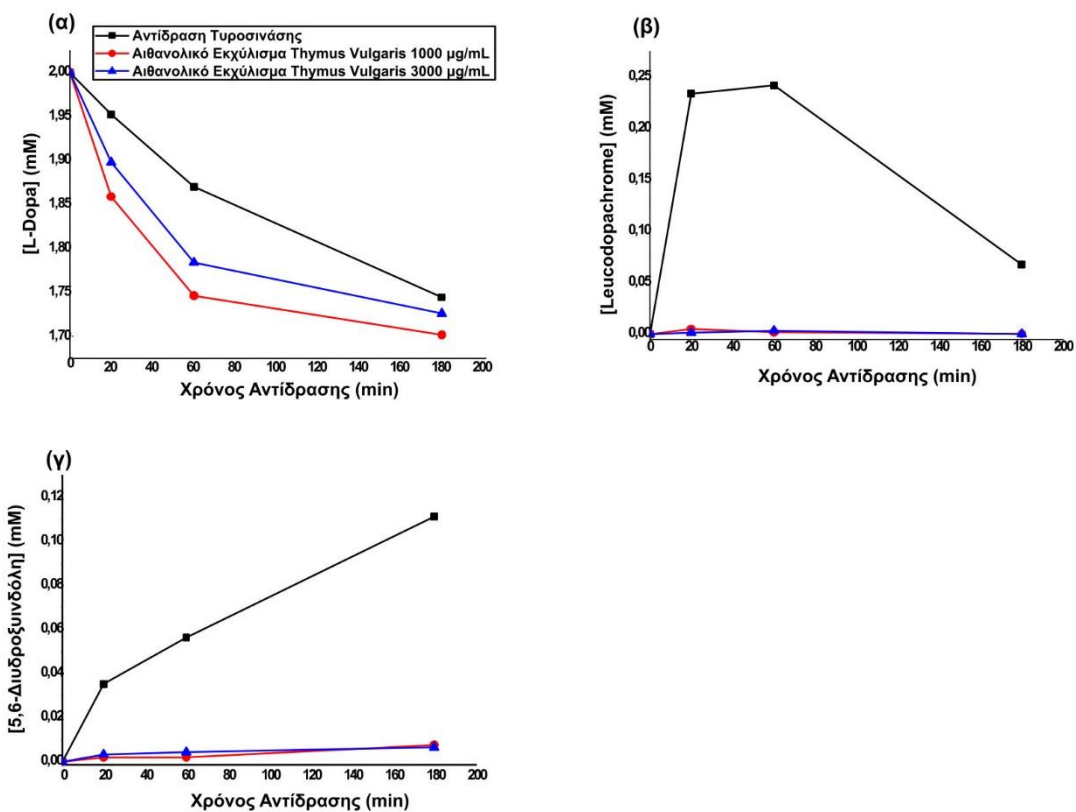
Όπως προκύπτει από το **Διάγραμμα 5.1.9**, παρουσία του αιθανολικού εκχυλίσματος του δεντρολίβανου ο ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος L-Dopa είναι πιο χαμηλός από ό,τι ο αντίστοιχος της αντίδρασης. Επίσης, ο ρυθμός παραγωγής του leucodopachrome και της 5,6-διυδροξυινδόλης είναι πιο χαμηλός από τον αντίστοιχο της αντίδρασης, επιβεβαιώνοντας τον αντιοξειδωτικό χαρακτήρα του εκχυλίσματος στην αντίδραση της τυροσινάσης.

5.1.3.7.4 NMR-Cosmetube: Μελέτη της αναστολής της τυροσινάσης από εκχύλισμα του θυμαριού (*Thymus Vulgaris*)

Όπως έδειξαν και τα αποτελέσματα από τα πειράματα αναστολής με φασματοσκοπία UV, κάθε εκχύλισμα συμπεριφέρεται διαφορετικά στην αντίδραση της τυροσινάσης. Το αιθανολικό εκχύλισμα του θυμαριού είναι χαρακτηριστικό παράδειγμα ενίσχυσης της δράσης της τυροσινάσης. Το πρωτονιακό του φάσμα, επίσης εμφανίζει διακριτές χημικές μετατοπίσεις από τις κορυφές των πρωτονίων του leucodopachrome και της 5,6-διυδροξυινδόλης (**Σχήμα 5.1.22**). Το θυμάρι μελετήθηκε και αυτό σε συγκεντρώσεις 1000 µg/mL και 3000 µg/mL, προκειμένου να διερευνηθεί αν η επίδραση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος στην αντίδραση της τυροσινάσης μπορεί να διακριθεί και με το NMR.



Σχήμα 5.1.22: A: Επιλεγμένη περιοχή (5,70-7,70 ppm): (α) 1D ¹H NMR φάσματος του αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Thymus Vulgaris* (1000 μg/mL) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pD=7,2. **(β)** 1D ¹H NMR φάσμα της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Thymus Vulgaris* (1000 μg/mL) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pD=7,2. **(γ)** 1D ¹H NMR φάσμα της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pD=7,2. **B: Επιλεγμένη περιοχή (5,60-7,30 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων** της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης παρουσία 1000 μg/mL αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Thymus Vulgaris* για **(α)** t=20 min, **(β)** t=60 min και **(γ)** t= 180 min

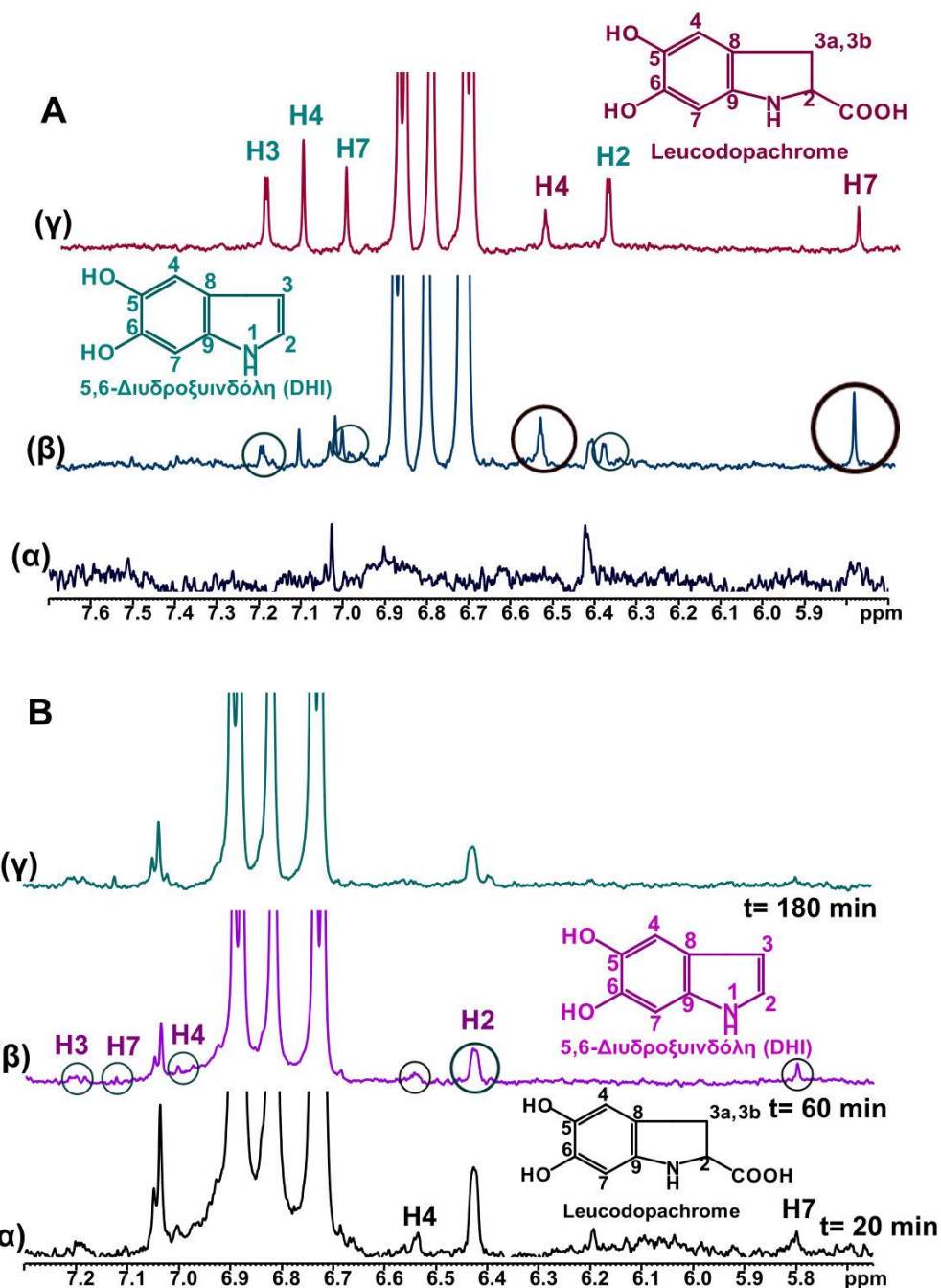


Διάγραμμα 5.1.10: (α) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης του υποστρώματος L-Dopa παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος θυμαριού σε συγκεντρώσεις 1000 µg/mL και 3000 µg/mL. (β) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης του Leucodopachrome παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος θυμαριού σε συγκεντρώσεις 1000 µg/mL και 3000 µg/mL. (γ) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης της 5,6-διυδροξυινδόλης παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος θυμαριού σε συγκεντρώσεις 1000 µg/mL και 3000 µg/mL.

Όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 5.1.10**, παρουσία του αιθανολικού εκχυλίσματος του θυμαριού, ο ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος είναι μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο της αντίδρασης της τυροσινάσης, γεγονός που δείχνει ότι το θυμάρι ενισχύει τη δράση της τυροσινάσης. Ωστόσο, υπάρχει το φαινόμενο εξάρτησης της δράσης του εκχυλίσματος από τη συγκέντρωση, καθώς, όπως φαίνεται στο **Διάγραμμα 5.1.10 (α)**, η L-Dopa καταναλώνεται με μεγαλύτερο ρυθμό παρουσία 1000 µg/mL εκχυλίσματος, συγκριτικά με τα 3000 µg/mL. Επίσης, υπάρχει και διαφορά στη μεταβολή της συγκέντρωσης του παραγόμενου Leucodopachrome και της 5,6-διυδροξυινδόλης. Αν και η συγκέντρωση των αντίστοιχων προϊόντων της αντίδρασης είναι μεγαλύτερη, ωστόσο, ο ρυθμός παραγωγής και των δύο εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος κάθε φορά.

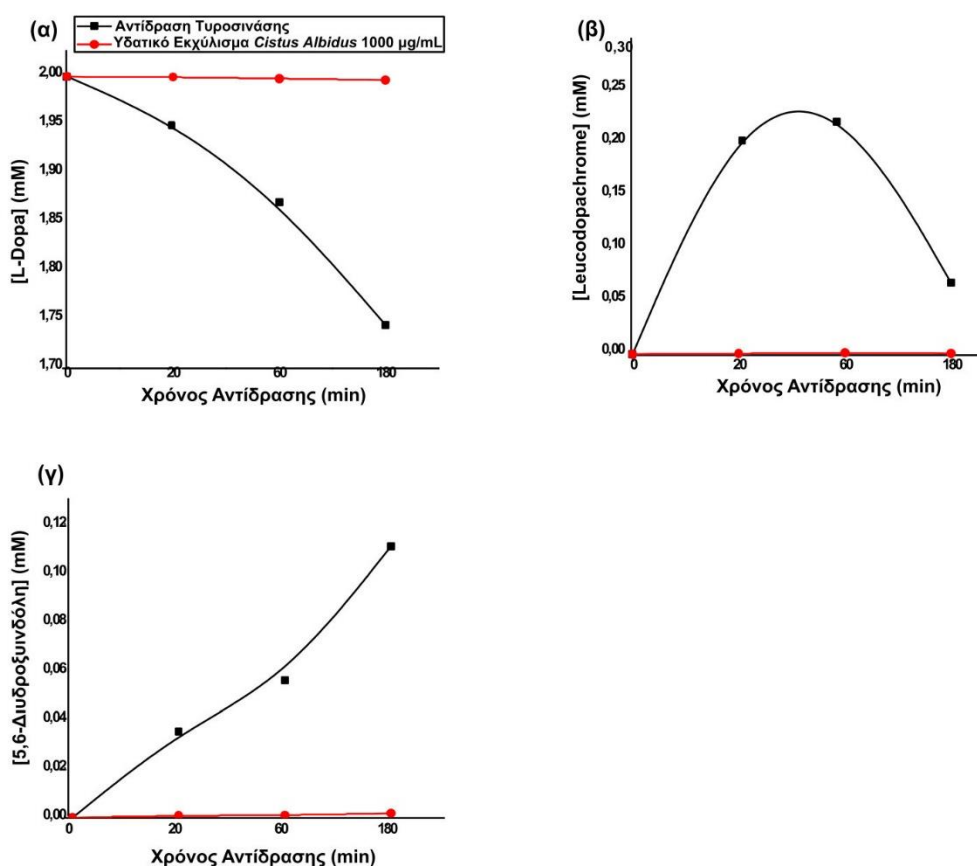
5.1.3.7.5 NMR-Cosmetube: Μελέτη της αναστολής της τυροσινάσης από υδατικό εκχύλισμα της λαδανιάς (*Cistus Albidus*)

Επόμενο εκχύλισμα που μελετήθηκε *in situ* ήταν το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Cistus Albidus* (Λαδανιά), σε συγκέντρωση 1000 µg/mL. Το υδατικό εκχύλισμα της λαδανιάς έδειξε καλή ανασταλτική δράση στα πειράματα αναστολής με φασματοσκοπία UV. Η πολύ καλή ανασταλτική δράση του εκχυλίσματος οφείλεται κυρίως στην παρουσία γαλλικού οξέος και των παραγώγων του, που είναι χαρακτηριστικά συστατικά του φυτού (**Σχήμα 5.1.23**).



Σχήμα 5.1.23: A: Επιλεγμένη περιοχή (5,70-7,70 ppm): (α) 1D ¹H NMR φάσματος του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus Albidus* (1000 μg/mL) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH=7,2. **(β)** 1D ¹H NMR φάσμα της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης παρουσία υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus Albidus* (1000 μg/mL) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH=7,2. **(γ)** 1D ¹H NMR φάσμα της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH=7,2. **B: Επιλεγμένη περιοχή (5,60-7,30 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων** της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης παρουσία 1000 μg/mL υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus Albidus* για **(α)** t=20 min, **(β)** t=60 min και **(γ)** t= 180 min

Όπως φαίνεται και από την *in situ* μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία του υδατικού εκχυλίσματος της λαδανιάς, η παραγωγή των ενδιάμεσων leucodopachrome και 5,6-διυδροξυινδόλης είναι πολύ χαμηλότερη από την αντίστοιχη αντίδραση. Ακόμη και μετά από χρονικό διάστημα 180 λεπτών, η παραγόμενη 5,6-διυδροξυινδόλη παραμένει σε χαμηλά επίπεδα.



Διάγραμμα 5.1.11: (α) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης του υποστρώματος L-Dopa παρουσία υδατικού εκχυλίσματος λαδανιάς σε συγκέντρωση 1000 µg/mL. (β) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης του leucodopachrome παρουσία υδατικού εκχυλίσματος λαδανιάς σε συγκέντρωση 1000 µg/mL. (γ) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της συγκέντρωσης της 5,6-διυδροξυινδόλης παρουσία υδατικού εκχυλίσματος λαδανιάς σε συγκέντρωση 1000 µg/mL.

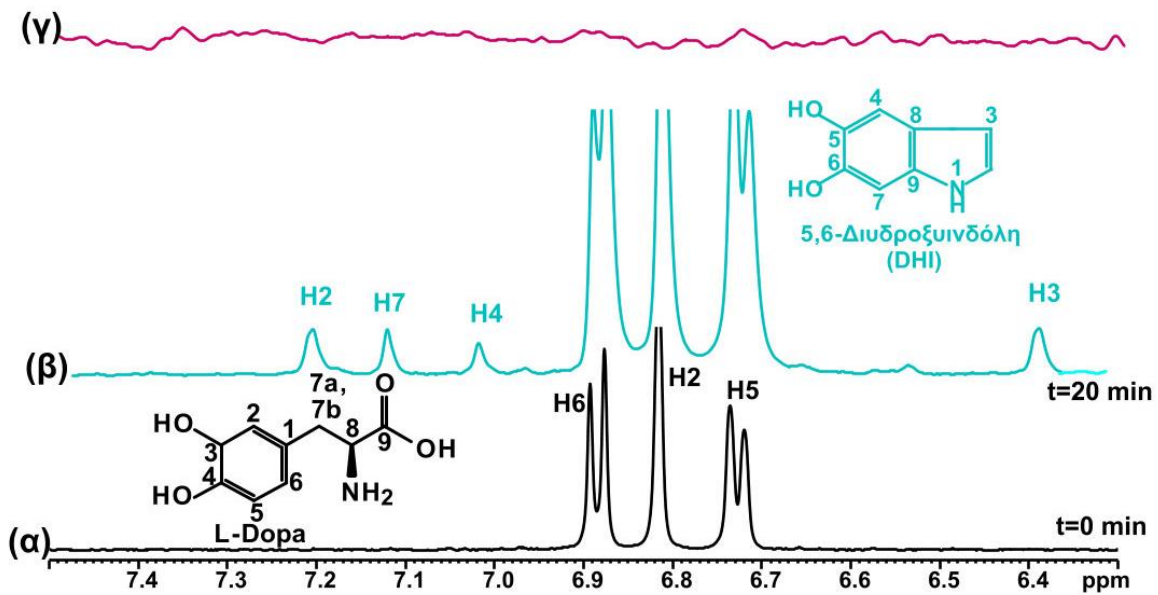
Η ανασταλτική δράση του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Cistus Albidus* φαίνεται και στις αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις του **Διαγράμματος 5.1.11**. Παρουσία του εκχυλίσματος, η συγκέντρωση της L-Dopa μειώνεται με πάρα πολύ αργό ρυθμό συγκριτικά με την ενζυμική αντίδραση. Ομοίως, η παραγωγή των δύο προϊόντων είναι πολύ μικρή.

5.1.3.8 Μελέτη αλληλεπίδρασης φυσικών υποστρωμάτων με την τυροσινάση, με τη μέθοδο Saturation Transfer Difference (STD) NMR-Χαρτογράφηση των επίτοπων πρόσδεσης

Η ικανότητα μιας ένωσης να συμπεριφέρεται είτε ως υπόστρωμα, είτε ως ενισχυτής είτε ως αναστολέας ενός ενζύμου, είναι ένα αρκετά σημαντικό χαρακτηριστικό για την εκάστοτε μελετούμενη ένωση. Επίσης, είναι αρκετά σημαντική η μελέτη της αλληλεπίδρασης της ένωσης αυτής με το ένζυμο που μελετάται. Μέσω της μεθόδου STD NMR, μπορεί να διερευνηθεί η ικανότητα αλληλεπίδρασης μιας ένωσης, είτε μεμονωμένης είτε αν αυτή βρίσκεται σε μείγμα, με το μελετούμενο ένζυμο. Στην περίπτωση της τυροσινάσης, μελετήθηκε η δυνατότητα αλληλεπίδρασης της με επιλεγμένα εκχυλίσματα.

Αρχικά, διερευνήθηκε το αν είναι δυνατό να ανιχνευθεί η αλληλεπίδραση του υποστρώματος L-Dopa με την τυροσινάση. Η L-Dopa σχηματίζει ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου και χηλικούς δεσμούς με τα ιόντα Cu^{2+} του ενεργού κέντρου της τυροσινάσης και έχει πολύ

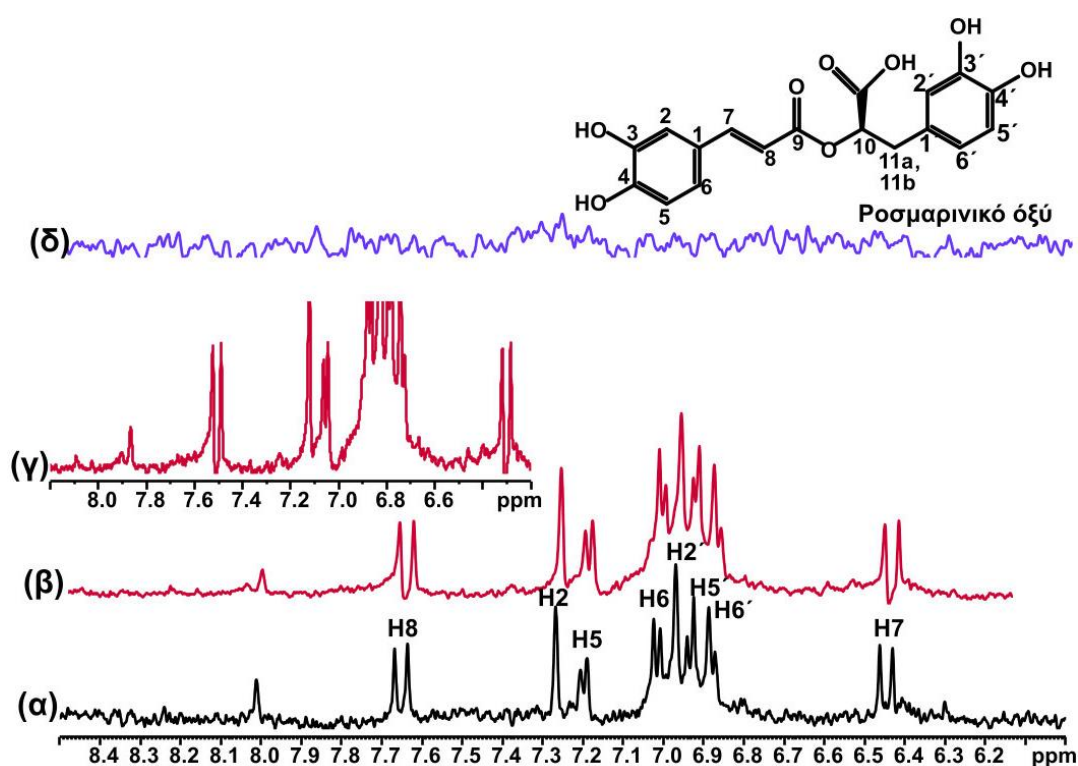
υψηλή συγγένεια με το ένζυμο ($K_d=1$). Αυτό σημαίνει ότι στο φάσμα STD δεν μπορούν να εμφανιστούν τα σήματα που να δείχνουν ότι η L-Dopa αλληλεπιδρά με το ένζυμο (**Σχήμα 5.1.24**).



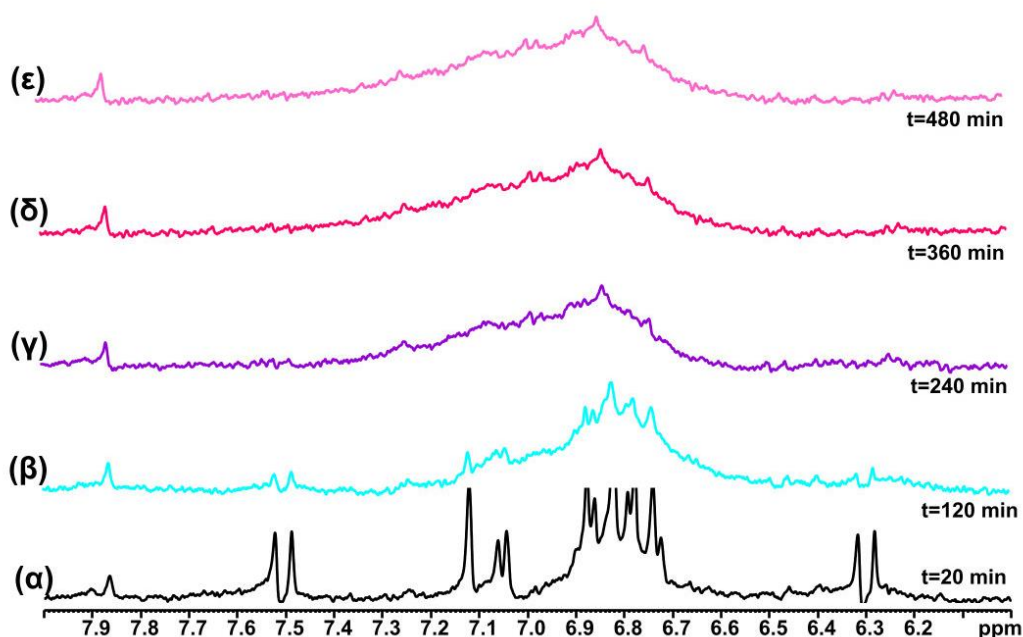
Σχήμα 5.1.24: Επιλεγμένη περιοχή (6,30-7,50 ppm): (α) 1D ^1H NMR του υποστρώματος L-Dopa, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pH=7,2 με 100% διαλύτη D_2O . **(β)** 1D ^1H NMR της αντίδρασης της τυροσινάσης, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pH=7,2 με 100% διαλύτη D_2O . **(γ)** STD φάσμα διαφοράς της αντίδρασης της τυροσινάσης, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pH=7,2 με 100% διαλύτη D_2O .

Όπως φαίνεται από το **Σχήμα 5.1.24 (γ)** το STD NMR φάσμα δεν εμφανίζει κανένα σήμα, γεγονός που επιβεβαιώνει την ισχυρή αλληλεπίδραση της L-Dopa με την τυροσινάση.

Η ισχυρή αλληλεπίδραση των φαινολικών ενώσεων με την τυροσινάση, επιβεβαιώνεται και στην περίπτωση του ροσμαρινικού οξέος (**Σχήμα 5.1.25**). Όπως προκύπτει από το αντίστοιχο πείραμα STD, δεν εμφανίζεται κανένα σήμα που να δείχνει την αλληλεπίδραση του ροσμαρινικού οξέος με την τυροσινάση. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι το ροσμαρινικό οξύ σχηματίζει ισχυρούς χηλικούς δεσμούς με τα ιόντα Cu^{2+} του ενεργού κέντρου της τυροσινάσης, και λειτουργεί ως υπόστρωμά της, καθώς το ίδιο οξειδώνεται από την τυροσινάση. Η αντίδραση του ροσμαρινικού οξέος από την τυροσινάση επιβεβαιώνεται και από το **Σχήμα 5.1.26**, όπου το ροσμαρινικό οξύ καταναλώνεται από την τυροσινάση, όσο περνάει ο χρόνος της αντίδρασης.



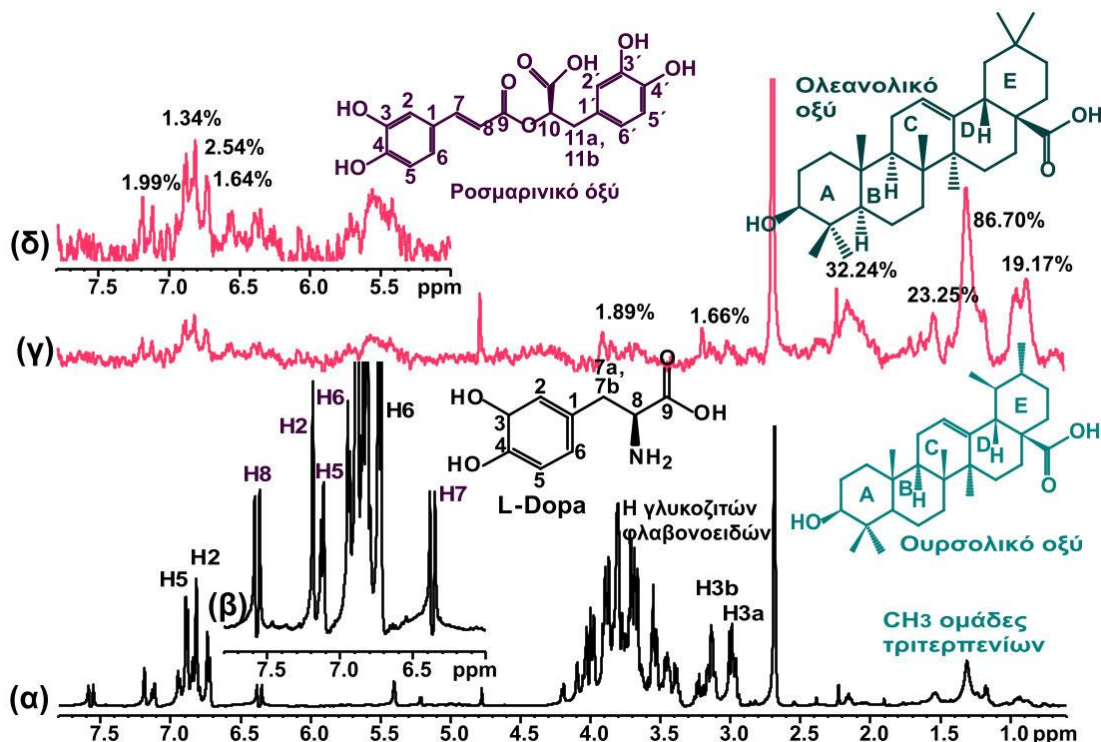
Σχήμα 5.1.25: Επιλεγμένη περιοχή (6,0-8,5 ppm): (α) 1D ^1H NMR του ροσμαρινικού οξέος, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, $\text{pD}=7,2$ με 100% διαλύτη D_2O . (β) 1D ^1H NMR του συμπλέγματος ροσμαρινικό οξύ (1 mM)-τυροσινάση (1 μM), σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, $\text{pD}=7,2$ με 100% διαλύτη D_2O . (γ) Μεγεθυμένη περιοχή (6,40-8,10 ppm) 1D ^1H NMR του συμπλέγματος ροσμαρινικό οξύ (1 mM)-τυροσινάση (1 μM), σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, $\text{pD}=7,2$ με 100% διαλύτη D_2O . (δ) Φάσμα διαφοράς STD του συμπλέγματος ροσμαρινικό οξύ-τυροσινάση, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, $\text{pD}=7,2$ με 100% διαλύτη D_2O .



Σχήμα 5.1.26: Επιλεγμένη περιοχή (6,10-8,00 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων: του συμπλέγματος ροσμαρινικό οξύ (1 mM)-τυροσινάση (1 μM), σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, $\text{pD}=7,2$ με 100% διαλύτη D_2O μετά από χρόνο επώασης: (α) $t=20$ min, (β) $t=120$ min, (γ) $t=240$ min, (δ) $t=360$ min, (ε) $t=480$ min.

5.1.3.9 Μελέτη αλληλεπίδρασης φυτικών εκχυλισμάτων με την τυροσινάση, με τη μεθοδολογία Saturation Transfer Difference (STD) NMR-Χαρτογράφηση των επίτοπων πρόσδεσης

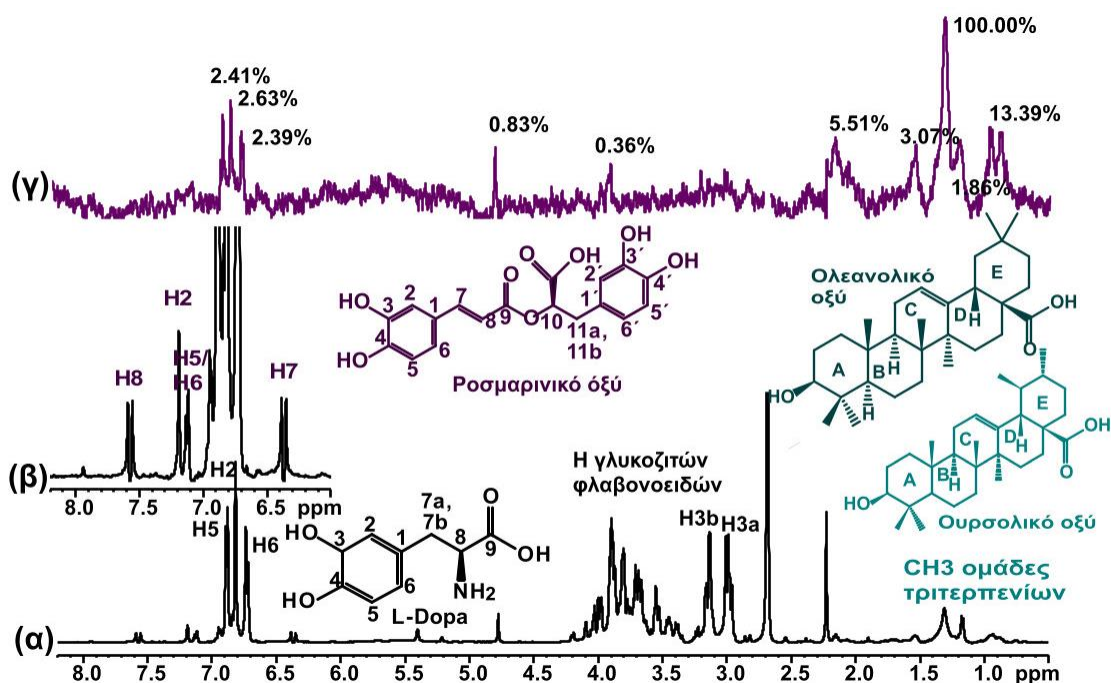
Επόμενο βήμα είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης των εκχυλισμάτων, που αποτελούν πολύπλοκα μείγματα βιοδραστικών ενώσεων με την τυροσινάση. Αρχικά μελετήθηκε η αλληλεπίδραση του αιθανολικού εκχυλίσματος του μελισσόχορτου (*Melissa Officinalis*) με την τυροσινάση, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.1.27**.



Σχήμα 5.1.27: Επιλεγμένη περιοχή (0-8,00 ppm): (α) 1D ^1H NMR φάσματος αντίδρασης της τυροσινάσης παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa officinalis*, σε συγκέντρωση 3000 $\mu\text{g/mL}$. (β) Μεγεθυμένη περιοχή του (α), (γ) STD NMR φάσμα διαφοράς του αιθανολικού εκχυλίσματος του μελισσόχορτου, (δ) Μεγεθυμένη περιοχή του (γ).

Όπως φαίνεται από το **Σχήμα 5.1.27**, το εκχύλισμα του μελισσόχορτου παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά, συγκριτικά με το ροσμαρινικό οξύ και την L-Dopa, καθώς εμφανίζει σήμα στο αντίστοιχο STD NMR φάσμα. Όπως προκύπτει και από τον προσδιορισμό των παραγόντων αλληλεπίδρασης (STD_{AMP}), υπάρχουν πρωτόνια, τα οποία αλληλεπιδρούν με την τυροσινάση, με διαφορετική ένταση. Μεγαλύτερη ένταση παρουσιάζουν οι κορυφές των κύριων τερπενοειδών του εκχυλίσματος, ουρσολικό και ολεανολικό οξύ, με τη μεγαλύτερη ένταση να τη δίνει η κορυφή των μεθυλομάδων (CH_3) στα 1,46 ppm (86,70%), ενώ και στα 2,18 ppm, που εμφανίζεται το χαρακτηριστικό πρωτόνιο του ουρσολικού οξέος, η κορυφή που εμφανίζεται στο STD φάσμα δείχνει αλληλεπίδραση ίση με 32,24%. Από την άλλη, στην αρωματική περιοχή, στο STD φάσμα εμφανίζονται κορυφές που αντιστοιχούν στα H2, H5 και H6 πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου του ροσμαρινικού οξέος αν και με μικρό ποσοστό (1,34-2,54%). Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό που παρατηρείται σε αυτή την περίπτωση είναι ότι το εκχύλισμα αποτελείται από μικρές συγκεντρώσεις των επιμέρους συστατικών, με αποτέλεσμα η αναλογία αλληλεπίδρασης μεταξύ υποκαταστάτη και πρωτεΐνης να είναι μέσα στο όριο ανίχνευσης της αλληλεπίδρασής τους στο φάσμα STD. Από την άλλη, ένα εκχύλισμα αποτελείται από αρκετά

επιμέρους συστατικά, καθένα από τα οποία εν δυνάμει μπορεί να αντιδράσει με την τυροσινάση, με αποτέλεσμα να μειώνεται η συγγένεια αλληλεπίδρασης με οποιοδήποτε υποστρώμα με το οποίο αλληλεπιδρά ισχυρά, όπως και με την L-Dopa. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση, το πείραμα STD NMR επαναλήφθηκε και σε μείγμα της αντίδρασης της τυροσινάσης, το οποίο περιέχει 2 mM L-Dopa, παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου, συγκέντρωσης 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Σχήμα 5.1.28).

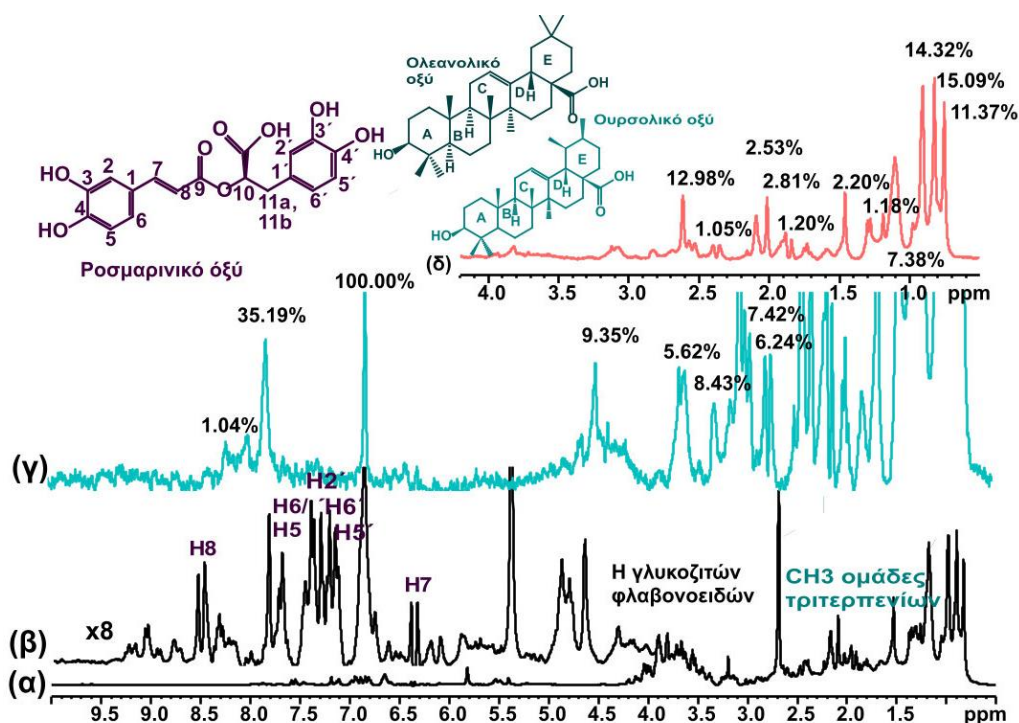


Σχήμα 5.1.28: Επιλεγμένη περιοχή (0-8,00 ppm): (α) 1D ^1H NMR φάσματος αντίδρασης της τυροσινάσης παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa Officinalis*, σε συγκέντρωση 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **(β)** Μεγεθυμένη περιοχή του **(α)**, **(γ)** STD NMR φάσμα διαφοράς του μείγματος αντίδρασης-εκχυλίσματος.

Όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 5.1.28**, το STD φάσμα της αντίδρασης της τυροσινάσης παρουσία του εκχυλίσματος, εμφανίζει σήματα πρωτονίων που αλληλεπιδρούν με το ένζυμο. Είναι οι χαρακτηριστικές κορυφές των τερπενίων ολεανολικό και ουρσολικό οξύ, οι οποίες αλληλεπιδρούν με μεγαλύτερη συγγένεια, όπως προκύπτει από τους παράγοντες αλληλεπίδρασης (STD_{AMP}). Η πιο έντονη κορυφή (100% αλληλεπίδραση) φαίνεται να ανήκει στις μεθυλομάδες (CH_3) των τερπενίων. Από την άλλη, σημαντικό είναι το φαινόμενο που παρατηρείται στην αρωματική περιοχή. Το φάσμα STD εμφανίζει κορυφές του υποστρώματος L-Dopa και όχι του ροσμαρινικού οξέος, όπως φάνηκε προηγουμένως, αν και υπάρχει η περίπτωση οι κορυφές του ροσμαρινικού οξέος να εμφανίζονται με πολύ μικρότερη ένταση. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.1.28 (γ)**, τα αρωματικά πρωτόνια της L-Dopa, αλληλεπιδρούν με την τυροσινάση, αν και οι τιμές των STD_{AMP} τους είναι μικρές (2,41% για το H5, 2,63% για το H2 και 2,39% για το H6 αντίστοιχα). Η ταυτόχρονη παρουσία φαινολών (στην περίπτωσή μας ροσμαρινικό οξύ, το οποίο βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση) και της L-Dopa φαίνεται να προκαλεί ένα ανταγωνιστικό φαινόμενο ως προς τη σύνδεσή τους με το ενεργό κέντρο της τυροσινάσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το ροσμαρινικό οξύ να “εκτοπίζει” σ’ ένα βαθμό την L-Dopa, με αποτέλεσμα να αντιδρά το ίδιο και να επιβραδύνει την κατανάλωση του υποστρώματος. Αυτό το γεγονός μπορεί να επιβεβαιωθεί και από την παράγραφο **5.1.3.5.2**

όπου όταν στην αντίδραση της τυροσινάσης υπάρχουν ταυτόχρονα ροσμαρινικό οξύ και L-Dopa, το ένζυμο αντιδρά σε μεγαλύτερο βαθμό με το ροσμαρινικό οξύ, οξειδώνοντάς το.

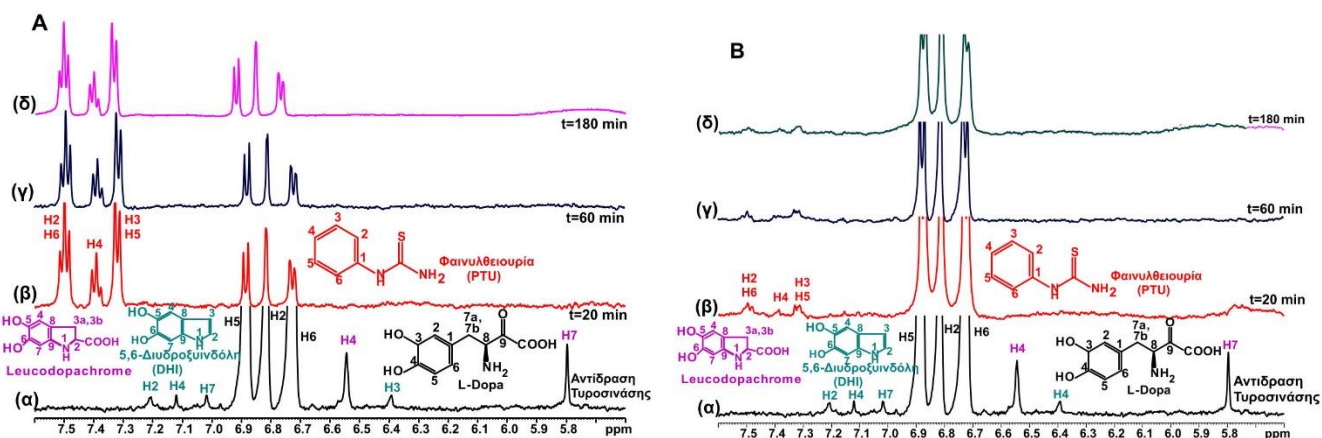
Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στην εφαρμογή του πειράματος STD NMR για το αιθανολικό εκχύλισμα του δεντρολίβανου με την τυροσινάση. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.1.29**, το STD φάσμα αυτής της αλληλεπίδρασης, εμφανίζει έντονες κορυφές στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων (στα 7,00 ppm το πρωτόνιο του ροσμαρινικού οξέος δίνει τιμή STD_{AMP} ίση με 100%), αλλά και στην περιοχή των αλειφατικών πρωτονίων όπου κατά το μεγαλύτερο ποσοστό τους ανήκουν στα πρωτόνια των τερπενοειδών του εκχυλίσματος.



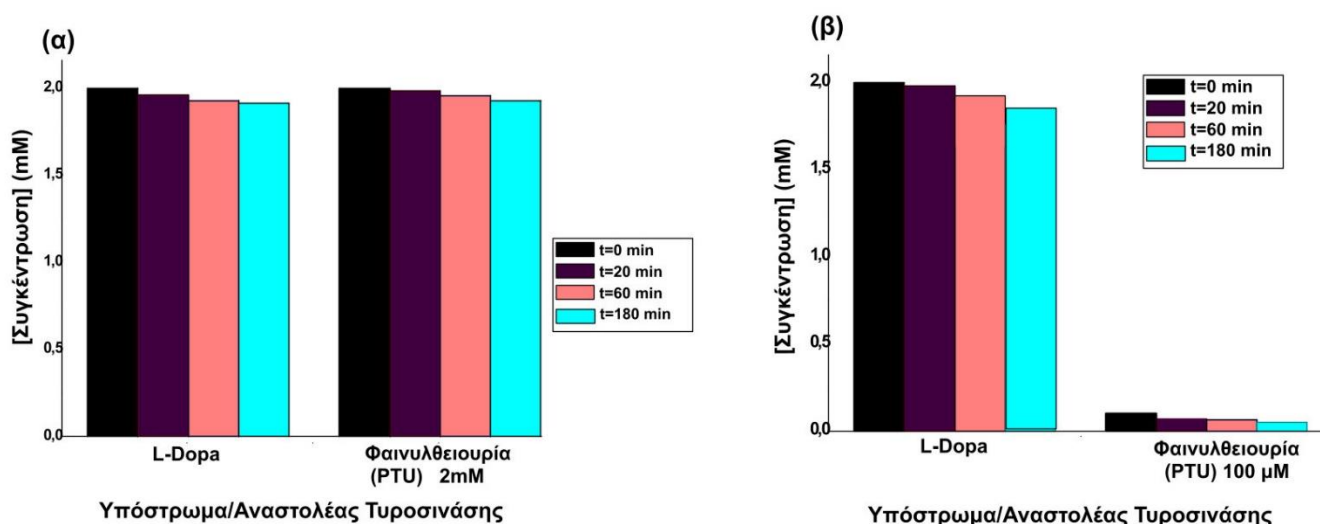
Σχήμα 5.1.29: Επιλεγμένη περιοχή (0-10,00 ppm): (α) 1D ¹H NMR φάσματος αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Rosmarinus Officinalis* σε συγκέντρωση 3000 μg/mL, παρουσία 33 nM τυροσινάσης. **(β)** Μεγεθυμένη περιοχή (x8) του (α), **(γ)** STD NMR φάσμα του αιθανολικού εκχυλίσματος του δεντρολίβανου, **(δ)** Επιλεγμένη περιοχή (0-4,20 ppm) του STD NMR φάσματος του αιθανολικού εκχυλίσματος του δεντρολίβανου.

Ομοίως, όταν εφαρμοστεί το πείραμα STD NMR στο μείγμα της αντίδρασης παρουσία του αιθανολικού εκχυλίσματος του δεντρολίβανου σε συγκέντρωση 3000 μg/mL, εμφανίζονται σήματα που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του υποστρώματος L-Dopa. Λόγω της παρουσίας των διαφόρων συστατικών στο εκχύλισμα, μειώνεται η χημική συγγένεια του υποστρώματος με το ένζυμο ($K_d < 1$), με αποτέλεσμα στο STD φάσμα να μπορεί να ανιχνευθεί η αλληλεπίδραση του υποστρώματος με την τυροσινάση. Τα αρωματικά πρωτόνια της L-Dopa H5, H2 και H6 αλληλεπιδρούν με την τυροσινάση με τιμές STD_{AMP} ίσες με 25,60%, 31,94% και 48,01% αντίστοιχα. Επίσης, τα μεθυλικά πρωτόνια των τερπενίων ολεανολικό και ουρσολικό οξύ φαίνεται να αλληλεπιδρούν και αυτά με την τυροσινάση. Από την άλλη, στην περιοχή των φαινολικών ενώσεων, το ροσμαρινικό οξύ δίνει σήμα στο STD NMR φάσμα μέσω του ολεφινικού πρωτονίου H8 και του αρωματικού πρωτονίου H5' με τιμή STD_{AMP} ίση με 7,70% και 52,13% αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας τα STD NMR φάσματα των δύο εκχυλισμάτων, παρατηρείται ότι στην περίπτωση του μελισσόχορτου, το ανταγωνιστικό φαινόμενο μεταξύ ροσμαρινικού οξέος και L-



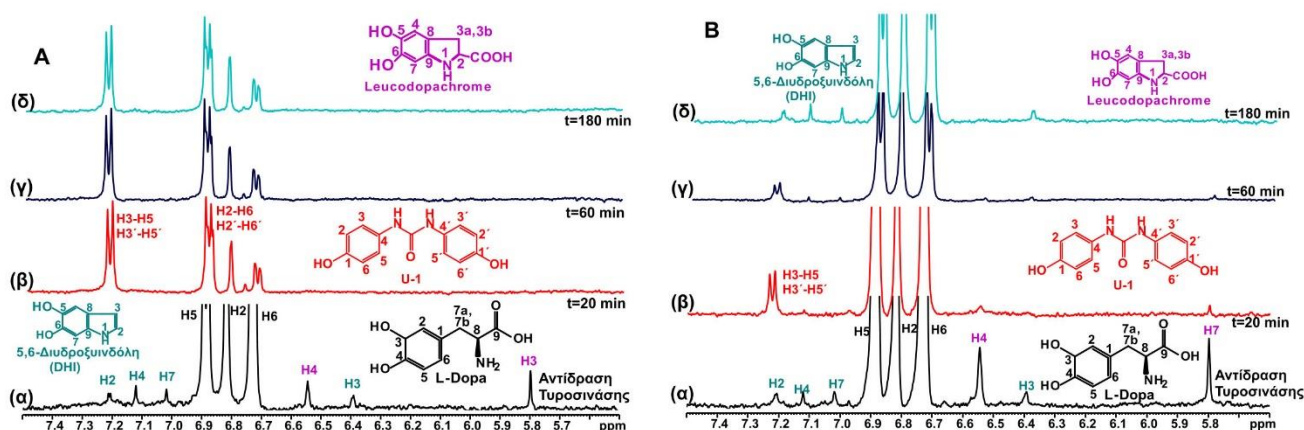
Σχήμα 5.1.31: Επιλεγμένη περιοχή (5,60-7,60 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων: (A) (α) της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pD=7,2 σε 100% D₂O, (β-δ) της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pD=7,2 σε 100% D₂O, παρουσία 2 mM φαινυλθειουρίας για (β) t= 20 min, (γ) t=60 min, (δ) t= 180 min αντίδρασης. (B) (α) της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pD=7.2 σε 100% D₂O, (β-δ) της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pD=7.2 σε 100% D₂O, παρουσία 100 μM φαινυλθειουρίας για (β) t= 20 min, (γ) t=60 min, (δ) t= 180 min αντίδρασης.



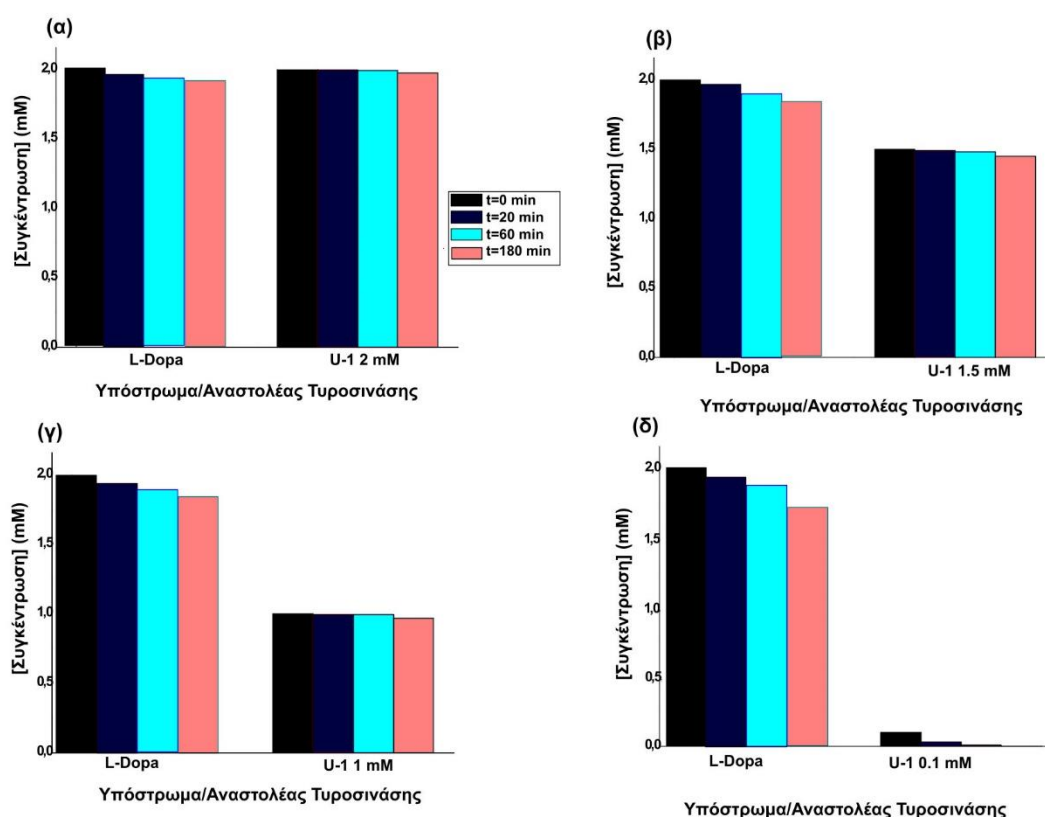
Διάγραμμα 5.1.13: Γραφικές απεικονίσεις της μεταβολής της συγκέντρωσης της φαινυλθειουρίας (PTU) και της L-Dopa κατά την ενζυμική αντίδραση της τυροσινάσης παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων φαινυλθειουρίας, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pD=7,2, σε 100% D₂O, σε χρονικό διάστημα αντίδρασης (0-180 min) για (α) 2 mM φαινυλθειουρίας, (β) 100 μM φαινυλθειουρίας.

Όπως προκύπτει από το **Σχήμα 5.1.31** και το **Διάγραμμα 5.1.13**, η φαινυλθειουρία έδειξε αποτελεσματική αναστολή στη δράση της τυροσινάσης. Παρουσία 100 μM φαινυλθειουρίας, η συγκέντρωση της L-Dopa μειώθηκε κατά 4,0%, ενώ παρουσία 2 mM φαινυλθειουρίας, η συγκέντρωση της L-Dopa μειώθηκε κατά 2,5%. Από την άλλη, η συγκέντρωση της φαινυλθειουρίας μειώθηκε κατά 3,0% και 1,0% στις αντίστοιχες συνθήκες αντίδρασης.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε ένα συνθετικό ανάλογο της ουρίας, το οποίο ονομάστηκε U-1, ως προς την αναστολή του στην τυροσινάση, προκειμένου να διερευνηθεί αν η δομή του επηρεάζει την πρόσδεση της L-Dopa στο ενεργό κέντρο της τυροσινάσης (**Σχήμα 5.1.32** και **Διάγραμμα 5.1.14**).



Σχήμα 5.1.32: Επιλεγμένη περιοχή (5,60-7,50 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων: (A) (α) της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, $\text{pD}=7,2$ σε 100% D_2O , (β-δ) της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, $\text{pD}=7,2$ σε 100% D_2O , παρουσία 2 mM U-1 για (β) $t=20$ min, (γ) $t=60$ min, (δ) $t=180$ min αντίδρασης. (B) (α) της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, $\text{pD}=7,2$ σε 100% D_2O , (β-δ) της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, $\text{pD}=7,2$ σε 100% D_2O , παρουσία 0.1 mM U-1 για (β) $t=20$ min, (γ) $t=60$ min, (δ) $t=180$ min αντίδρασης.



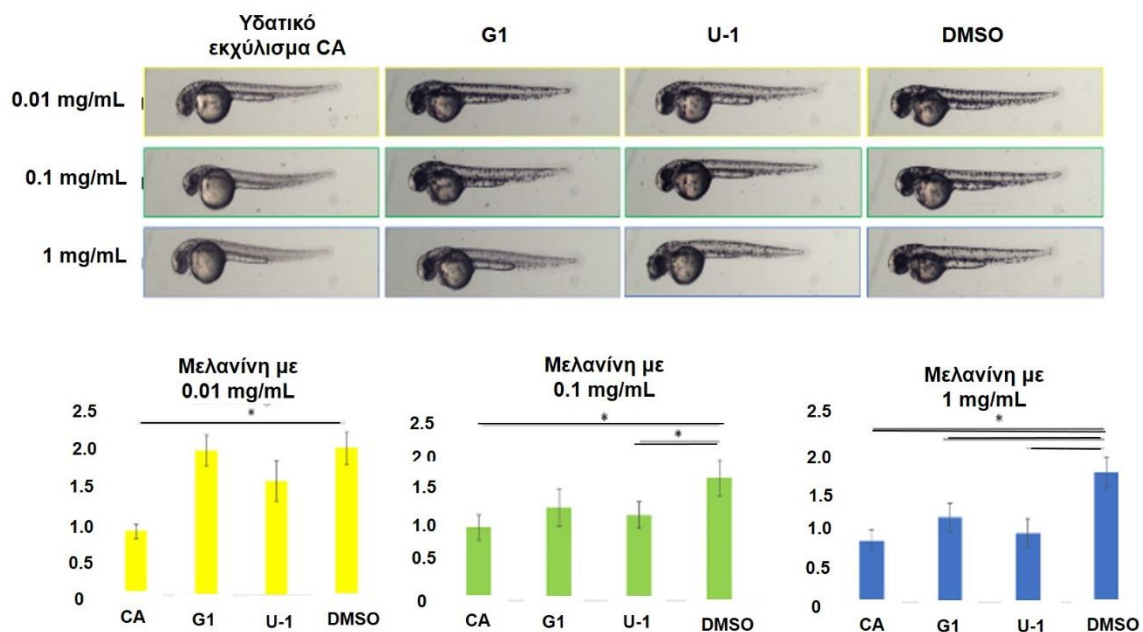
Διάγραμμα 5.1.14: Γραφικές απεικονίσεις της μεταβολής της συγκέντρωσης του αναλόγου U-1 και της L-Dopa κατά την ενζυμική αντίδραση της τυροσινάσης παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων U-1, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, $\text{pD}=7,2$, σε 100% D_2O , σε χρονικό διάστημα αντίδρασης (0-180 min) για (α) 2 mM U-1, (β) 1,5 mM U-1, (γ) 1 mM (U-1) και (δ) 0.1 mM U-1.

Σύμφωνα με το **Σχήμα 5.1.32** και το αντίστοιχο **Διάγραμμα 5.1.14**, το U-1 φαίνεται να δρα ως αναστολέας της τυροσινάσης από μανιτάρι. Στην ενζυμική αντίδραση παρουσία 100 μM U-1, η συγκέντρωση της L-Dopa μειώθηκε κατά 6,0%, ενώ το U-1 φαίνεται πως σε αυτή τη συγκέντρωση φαίνεται να αντιδρά και αυτό με την τυροσινάση, καθώς η συγκέντρωσή του μειώθηκε κατά 79,6% μετά από 180 λεπτά αντίδρασης. Από την άλλη, στην ενζυμική αντίδραση

παρουσία 2 mM U-1, η συγκέντρωση της L-Dopa μειώθηκε κατά 3,0%, ενώ στον αντίστοιχο χρόνο η συγκέντρωση του U-1 μειώθηκε κατά 1,5%.

5.1.3.11 *In vivo* πειράματα μελέτης παραγωγής μελανίνης σε έμβρυα zebrafish

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ικανότητα αναστολής της μελανογένεσης *in vivo* από τα U1, γαλλικό οξύ (G1) και το εκχύλισμα CA (υδατικό εκχύλισμα λαδανιάς), πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική μελέτη σε έμβρυα zebrafish³⁰⁹ και αξιολογήθηκε η ικανότητα αυτών των δειγμάτων να επηρεάζουν τη μελανογένεση στην ανάπτυξη εμβρύων. Αυτές οι μελέτες έγιναν σε συνεργασία με τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Μπέη, του Ιδρύματος Βιοϊατρικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών. Αρχικά οι μελετούμενες ενώσεις ελέγχθηκαν για πιθανή τοξικότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρξαν εμφανείς μορφολογικές και αναπτυξιακές ανωμαλίες σε συγκεντρώσεις έως και 0,5 mg/mL. Στη συνέχεια, έμβρυα zebrafish άγριου τύπου μετά από 4h γονιμοποίηση (hpf) επωάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις των ουσιών U1, G1 και CA, και μελετήθηκαν μετά από 48 ώρες επώασης (hpf) (Σχήμα 5.1.33).



Σχήμα 5.1.33: Αναστολή της μελανογένεσης από τα δείγματα U1, G1 και CA σε έμβρυα zebrafish. Τα έμβρυα zebrafish κατεργάστηκαν με 0,1 και 0,5 mg/mL των δειγμάτων U1, G1 και το εκχύλισμα του CA για 4h, ενώ ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το DMSO. Η ανάπτυξη χρώματος στα έμβρυα εκτιμήθηκε στις 48 hpf, χρησιμοποιώντας στερεομικροσκόπιο. Η περιεκτικότητα σε μελανίνη ποσοτικοποιήθηκε με φωτομετρική μέθοδο. Οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν (* $p < 0,01$ έναντι ελέγχου, Κλίμακα: 0,5 mm).

Από τη σύγκριση με την αντίστοιχη επώαση με το πρότυπο DMSO, το U1 και το υδατικό εκχύλισμα της λαδανιάς (CA) παρουσίασε αποτελεσματική αναστολή της μελάγχρωσης στις προνύμφες zebrafish σε συγκεντρώσεις 0,1 mg/mL και 0,5 mg/mL. Επιπλέον, από τον προσδιορισμό της περιεχόμενης μελανίνης ο οποίος έγινε χρησιμοποιώντας ολόκληρα εκχυλίσματα από έμβρυα zebrafish, επιβεβαιώθηκε το γεγονός ότι η κατεργασία των εμβρύων με αυτές τις ουσίες μετά από 48h, μείωσε το ποσό της παραγόμενης μελανίνης. Το γαλλικό οξύ

(G1) μείωσε σημαντικά τη μελάγχρωση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (0,5 mg/mL), ενώ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις δεν παρουσίασε σημαντική αναστολή.

Γενικά συμπεράσματα του Κεφαλαίου 5.1

Στο υποκεφάλαιο αυτό μελετήθηκε η αναστολή της τυροσινάσης από τα αιθανολικά και τα υδατικά εκχυλίσματα των φυτών *Melissa Officinalis*, *Rosmarinus Officinalis*, *Salvia Officinalis*, *Thymus Vulgaris*, *Origanum Vulgare*, *Cistus Albidus*, και *Hypericum Perforatum*, με φασματοσκοπία UV. Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα, τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν διπλό ρόλο ως προς τη δράση της τυροσινάσης. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ενισχύουν τη δράση της, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δρουν ως αναστολείς της τυροσινάσης. Εκχυλίσματα όπως είναι το θυμάρι και η ρίγανη, ακόμη και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δρουν ως ενισχυτές της δράσης της τυροσινάσης. Μεταξύ αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων, τα υδατικά εκχυλίσματα είναι πιο αποδοτικά ως προς την ανασταλτική τους δράση έναντι της τυροσινάσης. Το φυτοχημικό προφίλ των εκχυλισμάτων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε αυτό. Οι πολυφαινόλες που υπάρχουν στο εκχύλισμα αντιδρούν και αυτές με την τυροσινάση, σχηματίζοντας τα δικά τους προϊόντα οξειδωσης. Σε επόμενο βήμα, η ενζυμική αντίδραση της τυροσινάσης μελετήθηκε *in situ* με φασματοσκοπία NMR, στα πλαίσια της ανάπτυξης της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube, όπου έγινε προσδιορισμός των ενδιάμεσων και των προϊόντων της αντίδρασης, όπου ήταν δυνατό αυτά να ταυτοποιηθούν. Η ταυτοποίηση αυτών έγινε με το πείραμα Selective 1D TOCSY NMR, ενώ με μελέτη της κινητικής της αντίδρασης στους 20°C, έγινε η μελέτη της μεταβολής των συγκεντρώσεων του υποστρώματος και των παραγόμενων προϊόντων του. Με εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube, μελετήθηκε επίσης και η συμπεριφορά των φαινολικών ενώσεων με την τυροσινάση, παρουσία και απουσία του υποστρώματος L-Dopa. Ως παράδειγμα οξειδωσης των φαινολικών οξέων επιλέχθηκε το καφεϊκό οξύ, καθώς ήταν δυνατός ο προσδιορισμός των οξειδωμένων προϊόντων του. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η συμπεριφορά των εκχυλισμάτων στην αντίδραση της τυροσινάσης, μέσω της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube. Διερευνήθηκε κυρίως η παραγωγή των ενδιάμεσων και προϊόντων της αντίδρασης, αλλά έγινε και έμμεσος προσδιορισμός της μεταβολής της συγκέντρωσης του υποστρώματος, σε χρονικό διάστημα 0-180 λεπτών. Τέλος, με εφαρμογή της μεθόδου STD NMR μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της L-Dopa και του ροσμαρινικού οξέος με την τυροσινάση, καθώς και η αλληλεπίδραση ενός εκχυλίσματος με το ένζυμο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρουσία του εκχυλίσματος, μειώνεται η χημική συγγένεια του υποστρώματος με την τυροσινάση, λόγω της ταυτόχρονης αλληλεπίδρασης των επιμέρους συστατικών του εκχυλίσματος με το ένζυμο. Επίσης, συντέθηκε ένα ανάλογο ουρίας, το οποίο μελετήθηκε ως προς την ανασταλτική του δράση ως προς την τυροσινάση. Μελετήθηκε επίσης και η φαινυλθειουρία (PTU) για την ανασταλτική της δράση ως προς την τυροσινάση. Στο ανάλογο της ουρίας (U1), στο γαλλικό οξύ (G1) και στο υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Cistus Albidus* (CA), πραγματοποιήθηκαν *in vivo* μελέτες μελανογένεσης σε έμβρυα zebrafish. Το U1 και το εκχύλισμα CA παρουσίασε αποτελεσματική αναστολή της μελάγχρωσης στις προνύμφες zebrafish σε συγκεντρώσεις 0,1 mg/mL και 0,5 mg/mL. Το G1 μείωσε σημαντικά τη μελάγχρωση

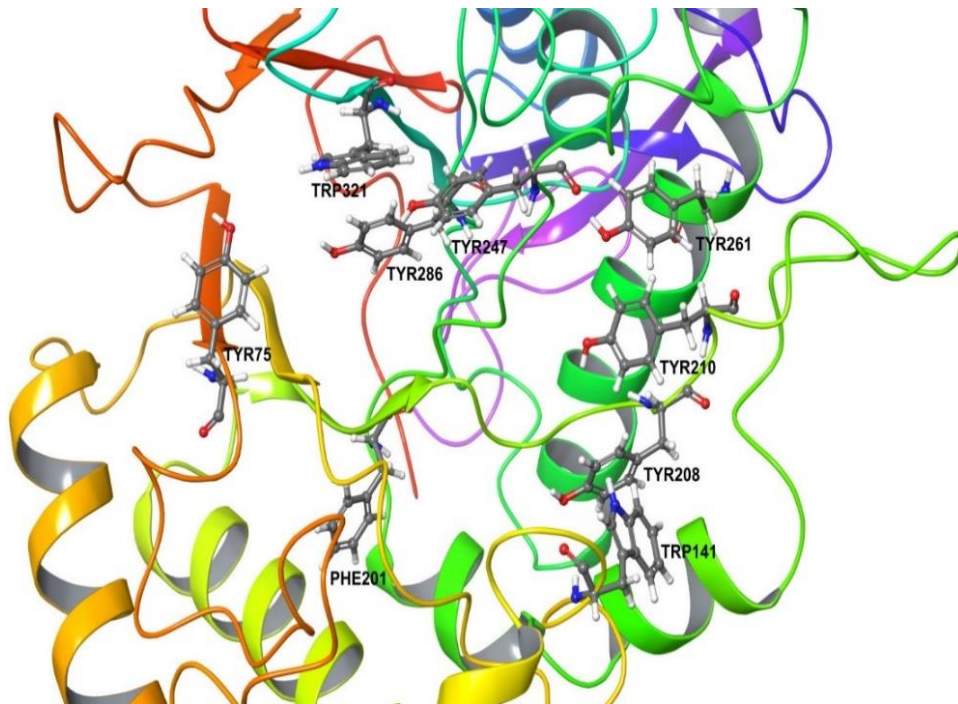
με υψηλότερες συγκεντρώσεις (0,5 mg/mL), ενώ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις δεν παρουσίασε σημαντική αναστολή.

Κεφάλαιο 5.2: Ανάπτυξη μεθοδολογίας για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης και της αναστολής της από φυτικά εκχυλίσματα

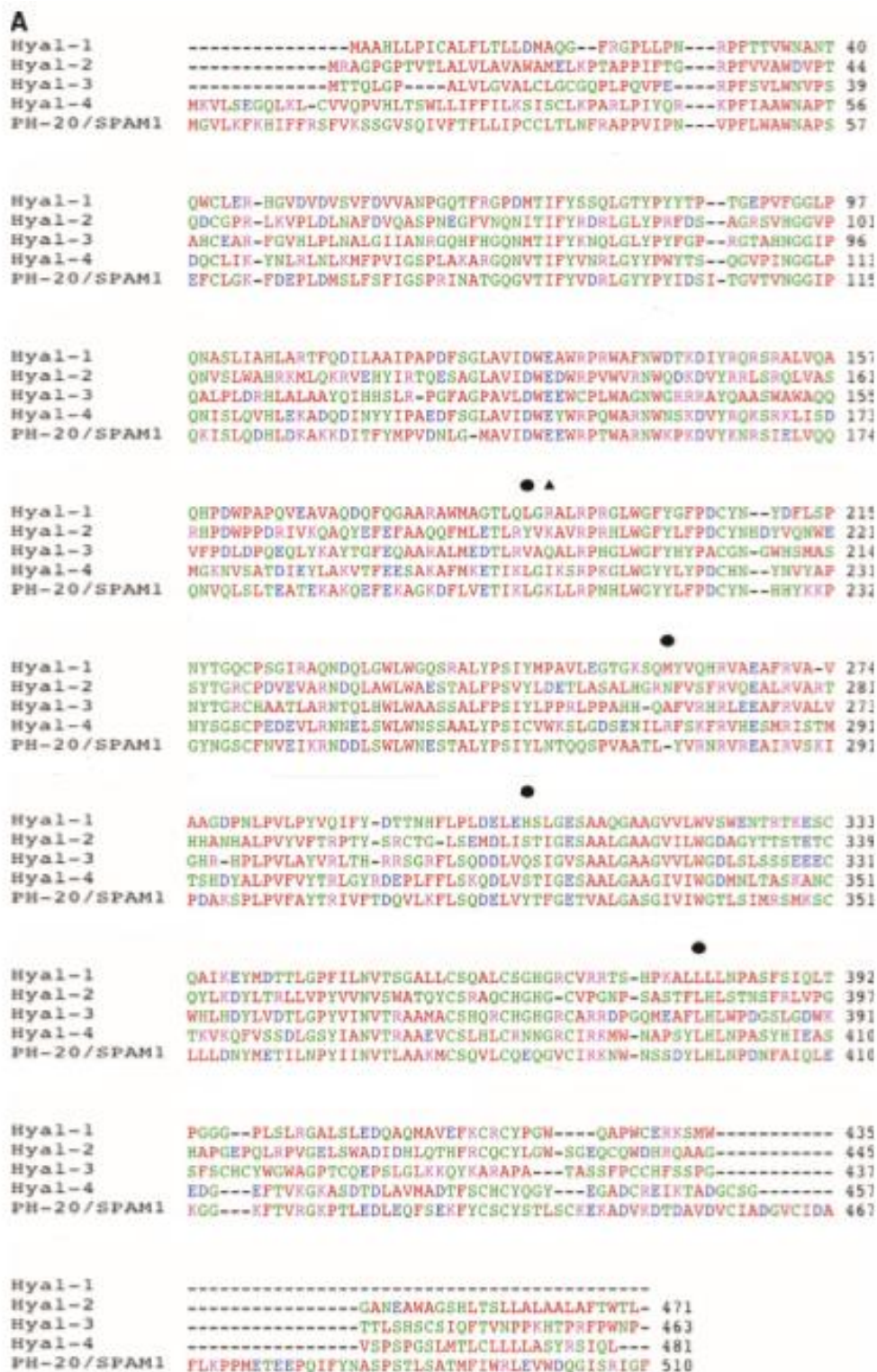
5.2.1 Εισαγωγή

5.2.1.1 Η δομή των υαλουρονιδασών-Καταλυτική δράση

Η καταλυτική δράση των υαλουρονιδασών οφείλεται στην παρουσία ενός αμινοξέος **Glu131** στο ενεργό της κέντρο, το οποίο έχει όξινο χαρακτήρα και είναι δότης πρωτονίου. Τα υπόλοιπα αμινοξέα που απαρτίζουν το ενεργό κέντρο της υαλουρονιδάσης είναι τα: **Tyr75**, **Trp141**, **Tyr201**, **Tyr208**, **Tyr210**, **Tyr247**, **Tyr261**, **Tyr286** και **Trp321** και συμβάλλουν σημαντικά στην καταλυτική δράση του ενζύμου (**Σχήμα 5.2.1**). Τα αμινοξέα που είναι θετικά φορτισμένα και υδρόφοβα επιτρέπουν την ισχυρή αλληλεπίδραση της υαλουρονιδάσης όχι μόνο με το υαλουρονικό οξύ, αλλά και με τη χονδροϊτίνη και τη θειική χονδροϊτίνη, οι οποίες είναι αρνητικά φορτισμένες. Επίσης, στην αλληλουχία του ενζύμου υπάρχουν δύο αργινίνες (**Arg134** και **Arg265**), οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση της υαλουρονιδάσης με τις καρβοξυλικές ομάδες του υαλουρονικού οξέος. Ακόμη, υπάρχει και το αμινοξύ **Ser245** το οποίο είναι σταθερό και επιτρέπει το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με την υδροξυλική (-OH) ομάδα της **Tyr202**. Αντίθετα, η Hyal-4 αντί για το αμινοξύ Tyr247 έχει το αμινοξύ Cys263, το οποίο συμβάλλει στην αλληλεπίδραση του ενζύμου με τη χονδροϊτίνη και τη θειική χονδροϊτίνη (**Σχήμα 5.2.2**).



Σχήμα 5.2.1: Απεικόνιση του ενεργού κέντρου της υαλουρονιδάσης και των καταλυτικών αμινοξέων.



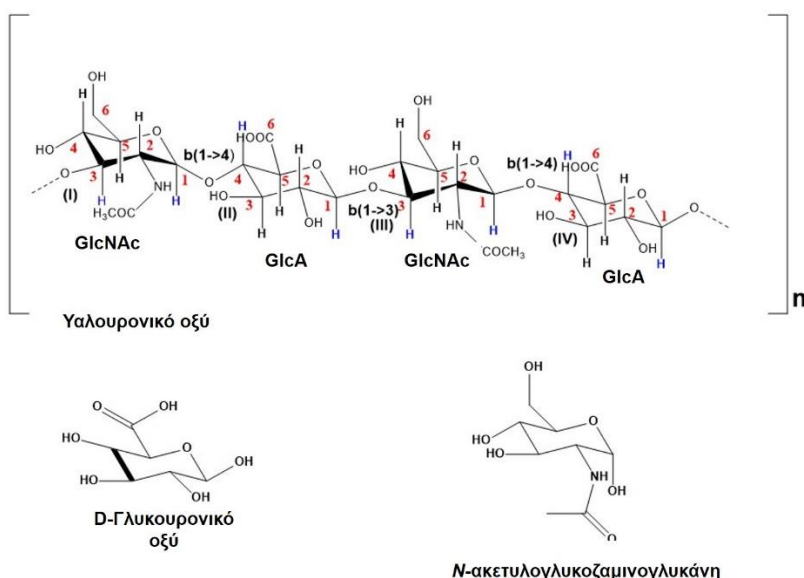
Σχήμα 5.2.2: Ανάλυση της αλληλουχίας των αμινοξέων των ανθρώπινων υαλουρονιδασών. Σειρά ακολουθίας των ανθρώπινων υαλουρονιδασών Hyal-1, Hyal-2, Hyal-3, Hyal-4 και PH-20/ SPAM1 (με βάση τη γνωστή δομή ακτίνων X της Hyal του δηλητηρίου μέλισσας). Η ομοιότητα μεταξύ όλων των αλληλουχιών κυμαίνεται από 33,1% μεταξύ Hyal-3 και Hyal-4 έως 41,2% μεταξύ Hyal-4 και PH-20.

Σε όλα τα στελέχη των ανθρώπινων υαλουρονιδασών, τα καταλυτικά καρβοξυτελικά άκρα έχουν δίπλα τους μια δεύτερη περιοχή, μικρότερη από την καταλυτική περιοχή, αλλά μεγαλύτερη από την αμινοτελική ακολουθία και είναι διαφορετική σε όλες τις υαλουρονιδάσες (68 αμινοξέα στην Hyal-1, 122 στην PH-20). Αυτή η περιοχή διαφέρει επίσης ως προς τη δομή της, στα διαφορετικά στελέχη υαλουρονιδασών: στην Hyal-1 η δομή αυτή έχει τη μορφή ενός τριπλού αντιπαράλληλου β-φύλλου, το οποίο περιβάλλεται από μία έλικα. Στην Hyal-2 η δομή αυτή αποτελείται από δύο έλικες, ενώ στην Hyal-3 περιέχει δύο έλικες οι οποίες αλληλεπικαλύπτονται με την καταλυτική περιοχή. Στην Hyal-4 η δομή αυτή έχει τρεις έλικες, οι οποίες καλύπτονται από ένα αντιπαράλληλο διπλό β-φύλλο. Από την άλλη, στο PH-20, η δομή αυτή περιέχει 8 έλικες,

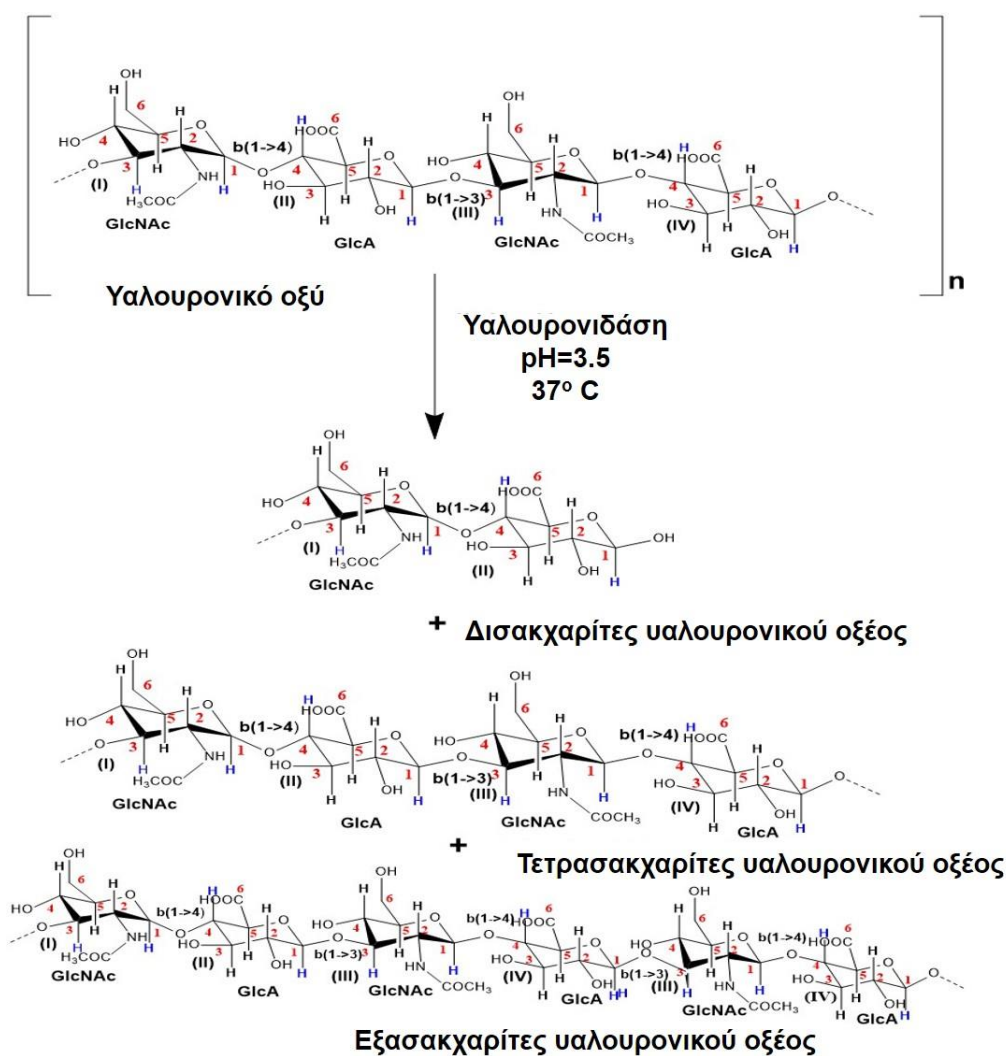
από τις οποίες οι πέντε έχουν πολύ μεγάλο μήκος. Όλες οι υαλουρονιδάσες έχουν ένα πεπτιδικό συνδέτη, ο οποίος διαχωρίζει το καρβοξυτελικό άκρο από όλη την περιοχή. Οι Hyal-2, Hyal-4 και RH-20 ανήκουν στις γλυκοσυλφωσφατιδυλοϊνοσιτολικές (GPI) πρωτεΐνες και έχουν μια ακολουθία όμοια με αυτή των GPI πρωτεϊνών στην αλληλουχία του καρβοξυτελικού άκρου. Αυτή η διαφορετική ακολουθία των καρβοξυλικών αμινοξέων, ρυθμίζει τις διαφορετικές μηχανιστικές ιδιότητες που έχει κάθε ένζυμο.

5.2.1.2 Μηχανισμός Κατάλυσης Υαλουρονιδάσης: Αποικοδόμηση του υαλουρονικού οξέος

Η διάσπαση του υαλουρονικού οξέος (HA) σε μόρια ολιγοσακχαριτών (όπως εξασακχαριτών, τετρασακχαριτών και δισακχαριτών υαλουρονικού οξέος) που αποτελούνται από εναλλασσόμενες υπομονάδες D-γλυκουρονικού οξέος (GlcA) και N-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης (GlcNAc) (Σχήμα 5.2.3 και 5.2.4), πραγματοποιείται κυρίως από τις Hyal-1 και Hyal-2 σε όξινες συνθήκες.



Σχήμα 5.2.3: Δομή του υποστρώματος υαλουρονικό οξύ και των επιμέρους δομικών μορίων, D-γλυκουρονικό οξύ και N-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνη.

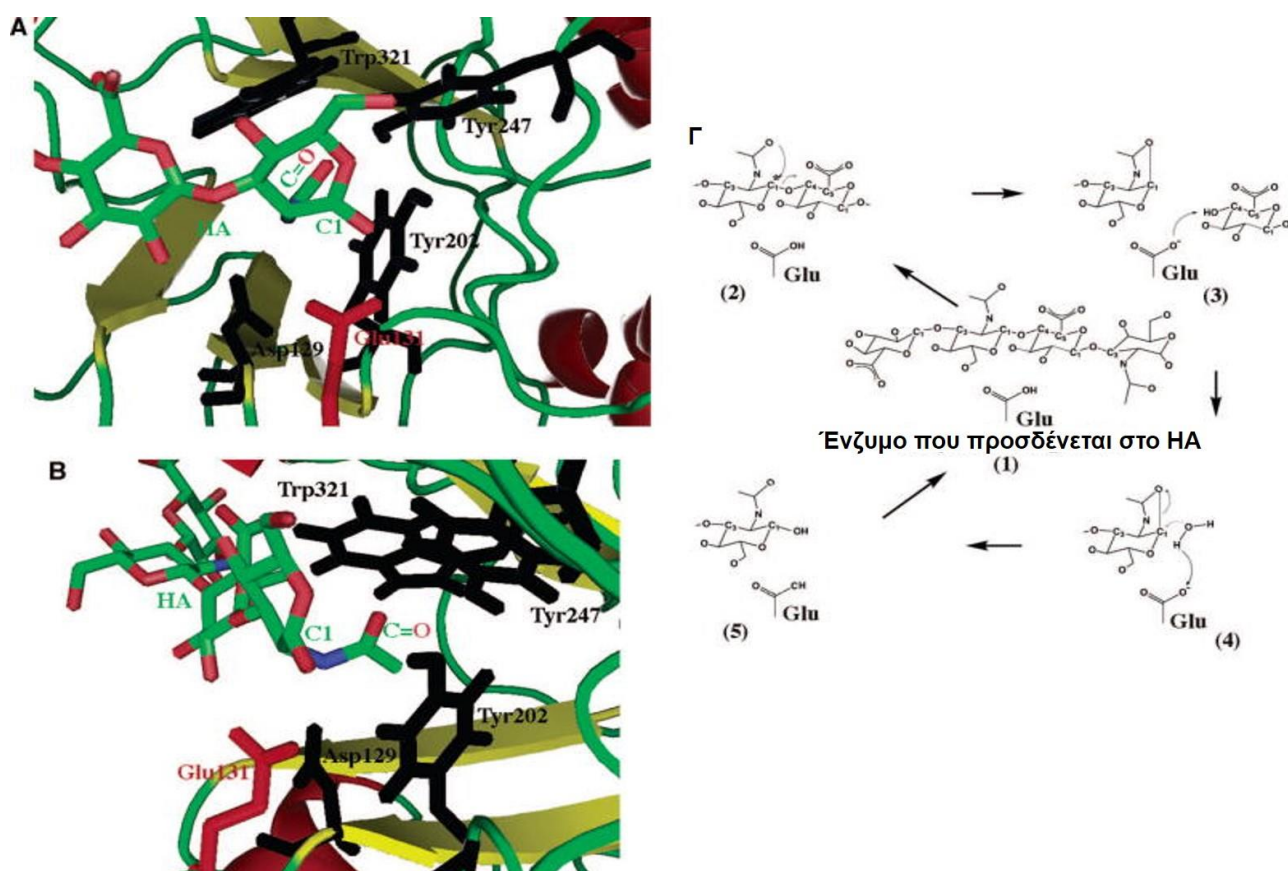


Σχήμα 5.2.4: Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης της υαλουρονιδάσης.

Η καταλυτική δράση των ανθρώπινων υαλουρονιδάσεων πραγματοποιείται μέσω ενός μηχανισμού διπλής μετατόπισης, όπου διατηρείται η διαμόρφωση του υποστρώματος HA, όπως αποδείχτηκε από μελέτες που έχουν γίνει στην πρωτοταγή, δευτεροταγή και τριτοταγή δομή της υαλουρονιδάσης από το δηλητήριο της μέλισσας (BVHyal), η οποία έχει την ίδια ομολογία με τις ανθρώπινες υαλουρονιδάσεις, καθώς και από τη στοχευμένη μετάλλαξη θέσης του ενζύμου BPH-20. Σε αυτό το μηχανισμό συμμετέχει το γλουταμικό οξύ και συγκεκριμένα το **Glu131**, που λειτουργεί ως δότης πρωτονίου (αντίστοιχο αμινοξύ στο BPH-20 είναι το Glu149), και ένα καρβονυλικό οξυγόνο που ανήκει στη *N*-ακέτυλο ομάδα του HA, η λειτουργικότητα της οποίας αποδίδεται σε άλλο καρβοξυλικό αμινοξύ. Ο συνηθισμένος μηχανισμός περιλαμβάνει δύο καρβοξυλικά οξέα και μπορεί να τροποποιηθεί ώστε να περιγράψει τα διαφορετικά πυρηνόφιλα αμινοξέα. Τα βήματα που εμπλέκονται σε αυτό το μηχανισμό είναι: **(1)** σύνδεση της υαλουρονιδάσης στο υπόστρωμα υαλουρονικό οξύ, **(2)** τα αμινοξέα που βρίσκονται γύρω από το ενεργό κέντρο τοποθετούν το πυρηνόφιλο καρβονυλικό οξυγόνο της *N*-ακέτυλο ομάδας του HA δίπλα στο γλυκοσιδικό δεσμό β-1,4 που είναι έτοιμος να αποκοπεί, και το στρέφουν προς τον άνθρακα C1 του ίδου σακχάρου, έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα ομοιοπολικό ενδιάμεσο ανάμεσά τους. Αυτό οδηγεί σε διάσπαση του γλυκοσιδικού δεσμού στη μη αναγωγική πλευρά του γλυκοσιδικού οξυγόνου. Αυτή η διαδικασία οδηγεί επίσης στην αντιστροφή της διαμόρφωσης του ανωμερικού ατόμου άνθρακα C1 **(3)**. Ταυτόχρονα, το πρωτονιωμένο **Glu131** δίνει το πρωτόνιό του (αποπρωτονίωση, οξύ κατά Lewis) στο γλυκοσιδικό οξυγόνο, αφήνοντας ένα μέρος του HA στην αναγωγική πλευρά του διασπασμένου γλυκοσιδικού δεσμού. **(4)** Υδρόλυση

του ενδιάμεσου δεσμού του καρβονυλικού οξυγόνου του άνθρακα C1 από ένα μόριο νερού στο ενεργό κέντρο, οδηγώντας σε επαναπρωτονίωση του **Glu131**, προετοιμάζοντάς το για το επόμενο καταλυτικό στάδιο και τη δεύτερη αντιστροφή της διαμόρφωσης του άνθρακα C1. **(5)** Απελευθέρωση του προϊόντος διάσπασης του HA, από το ενεργό κέντρο της υαλουρονιδάσης.³¹⁰

Η ανωμερική διαμόρφωση του ατόμου άνθρακα C1 του υποστρώματος διατηρείται επειδή πραγματοποιεί διπλή στροφή κατά την κατάλυση (όπως περιγράφεται στα στάδια **2** και **4**). Κατά τη διεργασία του σταδίου **2**, εμπλέκεται ο σχηματισμός ενός ενδιάμεσου οξυκαρβονίου. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει πάνω στη δομή του συμπλόκου BVHyal- τετρασακχαρίτη HA έχει προκύψει ότι: **(1)** καθώς το πυρηνόφιλο καρβονύλιο παίρνει την κατάλληλη θέση ώστε να αλληλεπιδράσει με τον άνθρακα C1 του HA, αυτό οδηγεί **(2)** σε αλλαγή στη συσσώρευση (ruckerig) του πυρανοζικού δακτυλίου της *N*-ακετυλο-D-γλυκοζαμινογλυκάνης στη μη αναγωγική πλευρά του δεσμού που πρόκειται να αποκοπεί, από ανάκλιντρο σε λουτήρα και **(3)** κατά συνέπεια στη μετάθεση γλυκοσιδικού δεσμού σε σχεδόν ισημερινή θέση, με αποτέλεσμα **(4)** η θέση του κοντά στο Glu149 (αρίθμηση BVHyal) να επιτρέπει τη μεταφορά του πρωτονίου του στο συγκεκριμένο γλυκοσιδικό O, καθώς ο δεσμός διασπάται **(Σχήμα 5.2.5)**.³¹¹



Σχήμα 5.2.5: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού κατάλυσης της υαλουρονιδάσης Hyal-1.³¹⁰ **(1)** Σύνδεση της υαλουρονιδάσης στο HA **(2)** Τοποθέτηση του πυρηνόφιλου καρβονυλικού οξυγόνου της *N*-ακέτυλο ομάδας του HA δίπλα στο γλυκοσιδικό δεσμό β-1,4 **(3)** Αποπρωτονίωση του **Glu131** και μεταφορά του πρωτονίου στο γλυκοσιδικό οξυγόνο **(4)** Υδρόλυση του ενδιάμεσου δεσμού του καρβονυλικού οξυγόνου του άνθρακα C1 από ένα μόριο νερού στο ενεργό κέντρο, οδηγώντας σε επαναπρωτονίωση του **Glu131** **(5)** Απελευθέρωση του προϊόντος διάσπασης του HA, από το ενεργό κέντρο της υαλουρονιδάσης.

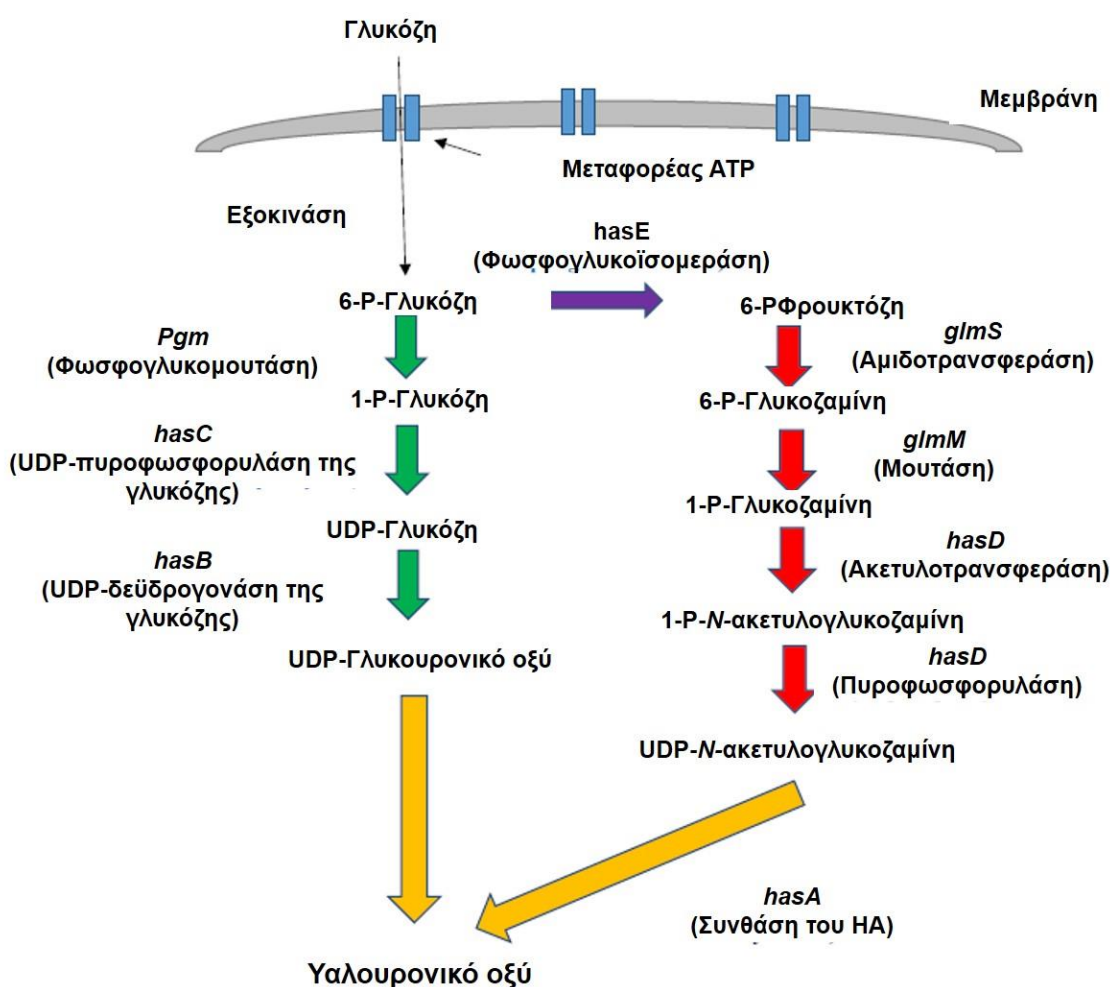
Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το αμινοξύ που αποτελεί το λειτουργικό πυρηνόφιλο και βρίσκεται στο υπόστρωμα HA, και είναι το καρβονυλικό οξυγόνο (λέγεται και ακεταμιδο οξυγόνο) της *N*-ακετυλο-D-γλυκοζαμινογλυκάνης. Για να μπορέσει αυτό το καρβονύλιο να συμμετάσχει στην κατάλυση, πρέπει να πάρει τέτοια θέση ώστε να μπορέσει να αλληλεπιδράσει με τον άνθρακα C1 του HA. Αυτή η θέση επιτυγχάνεται χάρη στην παρουσία ενός αριθμού αμινοξέων, που βρίσκονται σε σταθερή θέση, στην κοιλότητα του ενζύμου: **Asp147, Tyr220, Tyr265** και **Trp341** (για την BPH-20 τα αντίστοιχα αμινοξέα είναι τα Asp111, Tyr184, Tyr227 και η Trp301). Με βάση τη δομή της BVHyal, τέτοιες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος προκαλούν αλλαγή στη διαμόρφωση του πυρανοζικού δακτυλίου της *N*-ακετυλο-D-γλυκοζαμινογλυκάνης.³¹¹ Στη δομή του συμπλέγματος BVHyal- μονάδα τετρασακχαρίτη του HA, το καρβονυλικό οξυγόνο βρίσκεται σε απόσταση περίπου 2,9 Å από τον ανωμερικό άνθρακα C1.

Η δραστηριότητα των υαλουρονιδασών ρυθμίζεται από πολλούς παράγοντες, οι πιο σημαντικοί από τους οποίους είναι το pH και η συγκέντρωση του υποστρώματος. Η υαλουρονιδάση έχει διπλή καταλυτική δράση, η οποία εξαρτάται από το pH της αντίδρασης. Σε όξινο pH (3,5-5,0) η υαλουρονιδάση καταλύει τη διάσπαση των β-1,4 δεσμών του HA και των άλλων υποστρωμάτων. Αντίθετα, σε ουδέτερο pH (7,0), η υαλουρονιδάση καταλύει αντιδράσεις μεταγλυκοζυλίωσης, χρησιμοποιώντας τα διάφορα μόρια των ολιγοσακχαριτών ως δότες και δέκτες των γλυκοζυλιωμένων υπομονάδων της. Επίσης, σημαντικό παράγοντα αποτελεί και ένα ενεργοποιητικό ιόν το οποίο υπάρχει στο μείγμα της αντίδρασης και είναι συνήθως ιόντα Ca²⁺ (ή Na²⁺). Στο βαθμό της αντίδρασης της υαλουρονιδάσης επιδρούν σημαντικά η δομή του ενζύμου, το υπόστρωμα, η βέλτιστη συγκέντρωση του ενζύμου και το pH. Ως γλυκοσιδάση, η υαλουρονιδάση παρουσιάζει βέλτιστη δραστηριότητα σε όξινο pH. Σε αυτό, σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η παρουσία δύο καρβοξυλικών αμινοξέων στο ενεργό της κέντρο: **Glu35 (-COOH)** και **Asp192 (Asp52) (-COO⁻)**. Το **Glu35** συμπεριφέρεται ως οξύ και επάγει την πρωτονίωση του γλυκοσιδικού οξυγόνου, ευνοώντας σε μεγάλο βαθμό τη διάσπαση των δεσμών. Το **Asp52** δρα ως πυρηνόφιλο και σχηματίζει ομοιοπολικό δεσμό με τον άνθρακα C1 του γλυκοσιδικού υποστρώματος. Και τα δύο αμινοξέα βρίσκονται στην ίδια πλευρά του ενεργού κέντρου ενώ και οι δύο -COOH συμπεριφέρονται με διαφορετικό τρόπο: το **Glu35** έχει διπλό οξεοβασικό χαρακτήρα, ενώ το **Asp52** συμπεριφέρεται ως πυρηνόφιλο. Η pKa της καρβοξυλικής ομάδας του αμινοξέος **Glu35-cooh** έχει τιμή 6,0 (αντί για την αναμενόμενη 4,3). Η αποπρωτονίωση της καρβοξυλικής ομάδας του αμινοξέος **Asp52-coo⁻** σταθεροποιεί το σχηματιζόμενο καρβανιόν στον ανωμερικό άνθρακα C1.

5.2.1.3 Βιοχημική σύνθεση του υποστρώματος υαλουρονικό οξύ¹³³

Το HA βιοσυντίθεται στους ζωντανούς οργανισμούς. Για τη μέλετη της βιοχημικής σύνθεσης του HA στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, πραγματοποιήθηκε κυρίως μελέτη στο βακτήριο *S. Zooepidemicus*, η οποία χρησιμοποιεί δύο ξεχωριστές βιοχημικές πορείες για τη σύνθεση των πρόδρομων μορίων του HA.^{312,313} Η βιοσύνθεση του HA ξεκινά με τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης από την εξοκινάση προς σχηματισμό της 6-φωσφορικής γλυκόζης, που αποτελεί το κύριο πρόδρομο μόριο. Στη συνέχεια, η βιοσύνθεση του HA χωρίζεται

σε δύο διαφορετικές μεταβολικές οδούς, στην κάθε μία από τις οποίες παράγονται τα δύο δομικά μόρια του HA, το γλυκουρονικό οξύ και η *N*-ακετυλο-γλυκοζαμινογλυκάνη (**Σχήμα 5.2.6**). Οι δύο βιοχημικές οδοί ξεκινούν με τη μετατροπή της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε 1-φωσφορική γλυκόζη από την α -φωσφογλυκομουτάση (PGM). Κατά τη μετατροπή αυτή, μια φωσφορική ομάδα μεταφέρεται από την τριφωσφορική αδενοσίνη (UTP) στην 1-φωσφορική γλυκόζη με την UDP-πυροφωσφορυλάση της γλυκόζης, προς παραγωγή της UDP-γλυκόζης. Σε τελευταίο βήμα, η UDP-γλυκόζη οξειδώνεται από την UDP-διυδρογονάση της γλυκόζης προς παραγωγή του πρώτου δομικού μορίου, UDP-γλυκουρονικό οξύ (UDPGlcUA). Σε επόμενο βήμα, η 6-φωσφορική γλυκόζη μετατρέπεται σε 6-φωσφορική φρουκτόζη με τη δράση της φωσφογλυκοϊσομεράσης (*hasE*). Πραγματοποιείται προσθήκη μιας αμιδικής ομάδας στην 6-φωσφορική φρουκτόζη, η οποία μεταφέρεται από το αμινοξύ γλουταμικό οξύ με τη δράση της αμιδοτρανσφεράσης (*glmS*), προς παραγωγή της 6-φωσφορικής γλυκοζαμίνης. Στη συνέχεια, η 6-φωσφορική γλυκοζαμίνη μετατρέπεται στην 1-φωσφορική γλυκοζαμίνη με τη δράση της μουτάσης. Το παραγόμενο ενδιάμεσο στη συνέχεια ακυλιώνεται και φωσφορυλιώνεται από την ακετυλοτρανσφεράση και τη φωσφορυλάση αντίστοιχα, προς παραγωγή του δεύτερου δομικού μορίου, της UDP-*N*-ακετυλο-γλυκοζαμινογλυκάνης (UDP-GlcNAc). Μόλις συντεθούν τα δύο πρόδρομα μόρια, αρχίζουν να πολυμερίζονται εναλλάξ με τη δράση της συνθάσης του HA, προς παραγωγή του πολυμερούς HA. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η βιοσύνθεση του HA είναι μια διεργασία που καταλανώνει αρκετή ενέργεια για το επίπεδο των βακτηρίων, καθώς πολλά ενδιάμεσα προϊόντα χρησιμοποιούνται επίσης στη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, στο σχηματισμό της βιομάζας και στη σύνθεση του γαλακτικού οξέος μέσω της γλυκόλυσης.³¹⁴



Σχήμα 5.2.6: Βιοχημική σύνθεση του HA μέσα στο βακτήριο *S. Zooepidemicus*. Αρχικά η γλυκόζη μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη από τη δράση της εξοκινάσης. Η 6-φωσφορική γλυκόζη στη συνέχεια συμμετέχει σε μία από τις δύο μεταβολικές οδούς για να σχηματίσει το UDP-γλυκουρονικό οξύ (pgm, hasC και hasB) ή τη UDP-N-ακετυλο-γλυκοζαμινογλυκάνη (hasE, glmS, glmM και hasD). Αυτά τα πρόδρομα μόρια συνδέονται στη συνέχεια με τη βοήθεια του ενζύμου συνθάση του HA, προς σχηματισμό του HA.¹³³

Τα ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στη σύνθεση του HA βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη του πλάσματος και έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν το πολυμερές έξω από το κύτταρο στην εξωκυτταρική μεμβράνη (ECM). Στα θηλαστικά υπάρχουν τρία ένζυμα που συμμετέχουν στη σύνθεση του HA και είναι οι συνθάσες του HA 1, 2 και 3 (HAS1, 2 και 3). Τα γονίδια κάθε ενζύμου βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, και πιθανόν αποτελούν προϊόντα διπλασιασμού ενός αρχαιότερου γονιδίου.¹³³ Όλα αυτά τα ένζυμα βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη, όπου παράγουν και μεταφέρουν το HA χρησιμοποιώντας τα σάκχαρα UDP του κυτταροπλάσματος: UDP-GlcUA και UDP-GlcNAc. Το παράδοξο που έχουν αυτά τα ένζυμα είναι η παρουσία μιας διπλής καταλυτικής περιοχής στη δομή τους, η οποία τα καθιστά ικανά να αλληλεπιδρούν με δύο διαφορετικά υποστρώματα και να παράγουν μονάδες των δομικών διασακχαριτών του πολυμερούς. Αν και δεν είναι πλήρως ξεκάθαρο γιατί η φύση παρήγαγε τρία ένζυμα προς παραγωγή HA, έχει προταθεί ότι τα διαφορετικά ένζυμα είναι ικανά να παράγουν πολυμερή με διαφορετικό μήκος, καθώς οι HAS1 και 2 παράγουν πολυμερή μακριάς αλυσίδας, ενώ η HAS3 παράγει πολυμερή μικρότερης αλυσίδας. Επίσης, τα τρία ένζυμα διαφέρουν μεταξύ τους και ως προς τον τρόπο ρύθμισης της καταλυτικής τους δράσης: Η HAS2 ρυθμίζεται από διαδικασίες όπως η φωσφορυλίωση, η γλυκοζαμινοακυλίωση και η ουβικιτίωση. Αντίθετα, η δράση των HAS3 ρυθμίζεται με τη μεταφορά της στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της πρωτεΐνης Rab10. Η ρύθμιση της HAS1 δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, καθώς το ποσοστό έκφρασής της στους ιστούς είναι πολύ χαμηλό.¹³³

Το ποσοστό διαθεσιμότητας του HA στο ανθρώπινο σώμα είναι αξιοσημείωτο. Στην πραγματικότητα, το συνολικό ποσό του HA σε όλους τους ιστούς ζυγίζει περίπου 15 g και βρίσκεται κυρίως στο σώμα, με περίπου 30% του πολυμερούς να αντικαθίσταται κάθε μέρα. Η γρήγορη αναδίπλωση του μορίου στους ανθρώπινους ιστούς πραγματοποιείται μέσω της δράσης των υαλουρονιδασών. Τα θραύσματα του HA έχουν μοριακό βάρος μερικών χιλιάδων Dalton και εισέρχονται μέσα στα κύτταρα όπου αποικοδομούνται από τα λυσοσώματα.¹³¹ Το ποσό του HA στους ιστούς ρυθμίζεται αυστηρά από μια άριστη ισορροπία μεταξύ αναβολικών και καταβολικών δραστηριοτήτων. Ένα μέρος του πολυμερούς απομακρύνεται από τους ιστούς μέσω του λεμφικού συστήματος, το οποίο οδηγεί το HA στο συκώτι όπου αποικοδομείται πλήρως. Εκτός από τη δράση των υαλουρονιδασών, υπάρχουν και άλλες συνθήκες που καταστρέφουν την δομή του HA. Τέτοιες συνθήκες είναι οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από φλεγμονές καθώς και από την ακτινοβολία UV, διασπώντας το HA σε ολιγοσακχαρίτες ποικίλου μοριακού βάρους. Η βιβλιογραφία αναφέρει πολλές περιπτώσεις όπου αυτοί οι ολιγοσακχαρίτες αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς Tool (Toll Like Receptors-TLR), επάγοντας συγκεκριμένα μονοπάτια φλεγμονής. Το HA μπορεί να αντιδράσει με το σύμπλοκο inter-alpha trypsin inhibitor (I-alpha-I). Το I-alpha-I φέρει δύο βαριές αλυσίδες (HC), οι οποίες είναι ενωμένες μέσω εστερικού

δεσμού με τη σουλφυλιωμένη χονδροϊτίνη (CS), η οποία με τη σειρά της βρίσκεται πάνω στη μπικουνίνη (bikunin). Μέσω αντίδρασης τρανσεστεροποίησης, η HC μπορεί να μεταφερθεί μέσα στο πολυμερές HA. Αυτή η διαδικασία καταλύεται από τον TSG6 και είναι σημαντική σε αρκετές περιπτώσεις, καθώς συμβάλλει στη σταθεροποίηση του HA στην ECM.

5.2.2. Υλικά και Μέθοδοι

5.2.2.A Υλικά

5.2.2.A.1 Ένζυμα

Η προμήθεια του ενζυμικού παρασκευάσματος της υαλουρονιδάσης από ιστό βοός που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη έγινε από την εταιρεία Sigma (Hyaluronidase from bovine testes, Type I-S 400-1000 units/mg protein, H3506). Η προμήθεια του πρωτεϊνικού παρασκευάσματος της αλβουμίνης βοός που χρησιμοποιήθηκε και αυτό στην παρούσα μελέτη έγινε από την εταιρεία Sigma.

5.2.2.A.2 Χημικά αντιδραστήρια

Η προμήθεια όλων των διαλυτών και του δευτεριωμένου υδατικού διαλύτη (D₂O) έγινε από την εταιρεία Sigma. Η προμήθεια του υποστρώματος της υαλουρονιδάσης, Sodium Hyaluronate, έγινε από την εταιρεία Sigma. Από τα φυσικά προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν, η προμήθεια του ροσμαρινικού οξέος έγινε από την εταιρεία Sigma, ενώ του καφεϊκού οξέος, της κερκετίνης, της ρουτίνης, του γαλλικού οξέος, του ουρσολικού οξέος και του ολεανολικού οξέος έγινε από την εταιρεία Carbosynth. Η προμήθεια των φαρμακευτικών φυτών που μελετήθηκαν έγινε από τοπικό παραγωγό της περιοχής της Ηπείρου.

5.2.2.B Μέθοδοι

5.2.2.B.1 Καμπύλη Michaelis-Menten της υαλουρονιδάσης από ιστό βοός σε $\theta=37^\circ\text{C}$ και τιμή $\text{pH}=3,5$

Αρχή μεθόδου: Το HA αποτελείται από τα επιμέρους μόρια D-γλυκουρονικό οξύ και N-ακετυλο-γλυκοζαμινογλυκάνη, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με εναλλασσόμενους β -1,3 και β -1,4 δεσμούς. Η υαλουρονιδάση έχει εκλεκτική δράση ως προς τη διάσπαση των β -1,4 δεσμών του HA, δημιουργώντας μόρια ολιγοσακχαριτών με 2,4 και 6 μόρια, τα οποία έχουν ελεύθερα N-αμινοτελικά άκρα. Η μελέτη της δράσης της υαλουρονιδάσης με φασματοσκοπία UV, πραγματοποιείται με βάση τη μέθοδο των Morgan-Elson.³¹⁵

Για τον υπολογισμό των παραμέτρων Michaelis-Menten της υαλουρονιδάσης από ιστό βοός (Hyaluronidase from bovine testes) πραγματοποιήθηκαν κινητικές μετρήσεις με τη μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος $[S]=$

{0.0029-2.57 μM }, σε τιμή $\text{pH}=3,5$ και θερμοκρασία 37°C του μέσου αντίδρασης και βασίστηκαν στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ελεύθερης *N*-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης των ελεύθερων άκρων των ολιγοσακχαριτών του HA, στη μονάδα του χρόνου ($\Delta\text{Abs}_{590\text{ nm}}/\text{min}$), κατά την υδρόλυση του υποστρώματος HA. Τα πειραματικά δεδομένα από τις κινητικές μετρήσεις ($[\text{S}]_i, v_i$), προσαρμόστηκαν με την εξίσωση Michaelis-Menten $v = \frac{k_{\text{cat}}[\text{E}]_0[\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$ (εξορισμού $V_{\text{max}} = k_{\text{cat}}[\text{E}_0]$), υπολογίστηκαν οι παράμετροι K_{cat}/K_m , k_{cat} και K_m , ενώ ο υπολογισμός τους έγινε με τη χρήση του προγράμματος **GraphpadPrism**. Σε όλες τις προσαρμογές, ως κριτήριο σύγκλησης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων με στατιστικά βάρη.

5.2.2.B.2 *In vitro* μελέτη αναστολής της υαλουρονιδάσης από φυσικό προϊόν και φυτικό εκχύλισμα μέσω φασματοσκοπίας UV

Η αντίδραση της υαλουρονιδάσης μελετήθηκε παρουσία φυσικών προϊόντων καθώς και των επτά οργανικών και επτά υδατικών εκχυλισμάτων, ώστε να διερευνηθεί η συμπεριφορά τους ως αναστολείς ή ενισχυτές της υαλουρονιδάσης. Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της υαλουρονιδάσης, η αντίδραση πραγματοποιείται σε σωληνάρια Eppendorfs των 1.5 mL. Η αντίδραση της υαλουρονιδάσης πραγματοποιείται με βάση τη μέθοδο των Morgan και Elson,³¹⁵ με ελάχιστες τροποποιήσεις: Αρχικά, παρασκευάζεται στοκ ενζύμου συγκέντρωσης 2 U/mL και υποστρώματος 5,71 μM , σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1 M, $\text{pH}=3,5$. Η ενζυμική αντίδραση διεξάγεται στους 37°C και σε τελικό όγκο 200 μL και αποτελείται από: 0,01 U/mL υαλουρονιδάσης από ιστό βοός, 710 μM υποστρώματος, 110 $\mu\text{g}/\text{mL}$ υδατικού διαλύματος αλβουμίνης βοός, και ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1 M, $\text{pH}=3,5$. Αρχικά πραγματοποιείται επώαση του μείγματος χωρίς την αλβουμίνη βοός και το υπόστρωμα για δέκα λεπτά στους 37°C . Μετά τα 10 λεπτά προστίθεται διάλυμα αλβουμίνης βοός και υποστρώματος και η αντίδραση πραγματοποιείται για 60 λεπτά στους 37°C . Μετά τα 60 λεπτά, μεταφέρονται 148 μL αντίδρασης σε καινούριο σωληνάριο Eppendorf και προστίθενται 32,8 μL υδατικού διαλύματος βορικού οξέος. Ακολουθεί βρασμός του μείγματος στους 100°C για 5 λεπτά, προκειμένου να σταματήσει η αντίδραση. Στη συνέχεια, το μείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου, και αφού επανέλθει η θερμοκρασία του, προστίθενται 820 μL διαλύματος παρα-διμεθυλαμινοβενζαλδεΐδης. Το μείγμα θερμαίνεται στους 37°C για 20 λεπτά, όπου αναπτύσσεται το χρώμα της παραγόμενης *N*-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης των ελεύθερων άκρων των ολιγοσακχαριτών του HA που διασπάται. Η απορρόφηση της παραγόμενης *N*-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης μετράται στα 590 nm, με χρήση φασματοφωτομέτρου UV. Μελετήθηκε επίσης και η επίδραση του χρόνου ενεργοποίησης του ενζύμου σε διάφορα χρονικά διαστήματα (0-20 min). Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν κάποια σημαντική επίδραση στην ενεργότητα της υαλουρονιδάσης με την αύξηση του χρόνου επώασης, και για το λόγο αυτό ο χρόνος επώασης του ενζύμου πριν από την αντίδραση επιλέχθηκε στα δέκα λεπτά.

Προκειμένου να εξεταστεί η ανασταλτική ικανότητα των εκχυλισμάτων/πρότυπων ενώσεων, τα στοκ των οποίων παρασκευάστηκαν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, πραγματοποιείται 10λεπτη προεπώαση του ενζύμου με το ρυθμιστικό διάλυμα απουσία του

δείγματος αλλά και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του στους 37°C. Τα φυσικά προϊόντα μελετήθηκαν σε συγκεντρώσεις 0-100 µg/mL, ενώ τα εκχυλίσματα σε συγκεντρώσεις 10-4000 µg/mL. Μετά το πέρας των 10 λεπτών, προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος διαλύματος αλβουμίνης βοός και υποστρώματος, και πραγματοποιείται η αντίδραση, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Ο ρόλος της αλβουμίνης στην αντίδραση της υαλουρονιδάσης είναι αρκετά σημαντικός και θα συζητηθεί παρακάτω. Μέσω της σύγκρισης της ταχύτητας της αντίδρασης στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του δείγματος, με την ταχύτητα της αντίδρασης απουσία του, υπολογίζεται η υπολειπόμενη δραστηριότητα του ενζύμου στις διάφορες συγκεντρώσεις του δείγματος και ακολούθως εξάγεται το ποσοστό αναστολής ή ενεργοποίησης του ενζύμου στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Όλα τα δείγματα μελετήθηκαν εις τριπλούν.

5.2.2.B.3 Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης

Η *in situ* μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης πραγματοποιήθηκε σ' ένα σωληνάκι NMR 5 mm στους 37°C, σε συνολικό όγκο αντίδρασης 500 µL. Η ενζυμική αντίδραση αποτελείται από: 0,01 U/mL υαλουρονιδάσης από ιστό βοός, 710 µM υποστρώματος, 110 µg/mL υδατικού διαλύματος αλβουμίνης βοός, και ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1 M, pH=3,5 σε 100% D₂O. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε προσθέτοντας τον κατάλληλο όγκο διαλύματος DCI ή NaOD. Αρχικά, ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1 M, το οποίο περιέχει εσωτερικό πρότυπο γνωστής συγκέντρωσης, 0,01 U/mL διαλύματος υαλουρονιδάσης στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, 110 µg/mL υδατικού διαλύματος αλβουμίνης βοός και ο όγκος συμπληρώνεται με δευτεριωμένο νερό (D₂O). Το δείγμα επωάζεται για δέκα λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια προστίθενται 710 µM υδατικού διαλύματος υαλουρονικού οξέος. Το μείγμα ανακινείται έντονα και μεταφέρεται σε σωληνάκι NMR 5 mm. Το δείγμα τοποθετείται σε όργανο NMR συχνότητας 500 MHz, Bruker Avance (Bruker Rheinstetten, Germany), χρησιμοποιώντας το λογισμικό Topspin 3.2 και πραγματοποιείται καταγραφή φασμάτων πρωτονίου NMR ανά δέκα λεπτά, για χρονικό διάστημα 4 ωρών, στους 37°C. Όλα τα δεδομένα έχουν συλλεχθεί χρησιμοποιώντας παλμικές ακολουθίες που βρίσκονται στις βιβλιοθήκες παλμών της Bruker. Όλα τα φάσματα καταγράφηκαν με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στην **Παράγραφο 5.1.2.B.2**.

5.2.2.B.4 Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη αναστολής της υαλουρονιδάσης από φυσικό προϊόν και φυτικό εκχύλισμα

Η *in situ* μελέτη της αντίδρασης της υαλουρονιδάσης μελετήθηκε αρχικά για φυσικό προϊόν που είναι γνωστός αναστολέας, το ροσμαρινικό οξύ, αλλά και για διάφορα φυτικά εκχυλίσματα. Η *in situ* μελέτη πραγματοποιήθηκε σ' ένα σωληνάκι NMR 5 mm στους 37°C, σε συνολικό όγκο αντίδρασης 500 µL. Η αντίδραση αποτελείται από: 0,01 U/mL υαλουρονιδάσης από ιστό βοός, 710 µM υποστρώματος, 110 µg/mL υδατικού διαλύματος αλβουμίνης βοός, και ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1 M, pH=3,5 σε 100% D₂O, και την κατάλληλη ποσότητα φυσικού προϊόντος ή εκχυλίσματος, ώστε στην αντίδραση να έχει συγκέντρωση (10 µg/mL και 100 µg/mL (για το φυσικό προϊόν) και 100 µg/mL για τα εκχυλίσματα. Το pH του διαλύματος

ρυθμίστηκε προσθέτοντας τον κατάλληλο όγκο διαλύματος DCI ή NaOD. Αρχικά, σε σωληνάριο Eppendorf των 1,5 mL φέρονται 137,5 μ L ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος 0,1M, το οποίο περιέχει εσωτερικό πρότυπο γνωστής συγκέντρωσης, 0,01 U/mL διαλύματος υαλουρονιδάσης στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, και η κατάλληλη συγκέντρωση του φυσικού προϊόντος ή του εκχυλίσματος. Το δείγμα επωάζεται για 10 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια προστίθενται 110 μ L υδατικού διαλύματος BSA και 62,5 μ L υδατικού διαλύματος υαλουρονικού οξέος, το μείγμα ανακινείται έντονα και μεταφέρεται σε σωληνάκι NMR 5 mm. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 60 min στους 37°C με συνεχή ανάδευση στις 800 στροφές/min. Μετά τα 60 λεπτά γίνεται καταγραφή των φασμάτων NMR για κάθε εκχύλισμα με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε παράγραφο 5.1.2.B.2.

5.2.2.B.5 Πειράματα διάχυσης NMR [Diffusion Ordered Spectroscopy- (DOSY) NMR]

Τα πειράματα διάχυσης DOSY NMR πραγματοποιήθηκαν σε φασματόμετρο Bruker AV 500 MHz (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany), χρησιμοποιώντας το λογισμικό Topspin 3.2. Για την καταγραφή των πειραμάτων DOSY εφαρμόστηκε μαγνητικό πεδίο παλμού ικανό να παράγει μαγνητικούς παλμούς διαβαθμισμένης σειράς ως προς την κατεύθυνση του άξονα-z τιμής ίσης με 53 Gcm⁻¹. Για τα πειράματα DOSY NMR παρασκευάστηκαν διαλύματα της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης απουσία και παρουσία αναστολέα, σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1 M, ρ D=3,5. Τα πειράματα DOSY πραγματοποιήθηκαν σε δύο θερμοκρασίες, 37°C και 15°C. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για το χρόνο εφαρμογής και για το χρόνο εφησυχασμού ήταν 2,5 s και 5xT₁ s αντίστοιχα. Για το σκοπό αυτό, αρχικά προσδιορίστηκαν οι τιμές T₁, εφαρμόζοντας χρονικό παλμό αντίστροφης ανάκτησης. Συγκεκριμένα, οι τιμές T₁, υπολογίστηκαν εφαρμόζοντας τη μέθοδο μηδενικού σημείου και προσδιορίστηκαν μεταξύ ενός εύρους 0,2-0,25 s για τις κορυφές των ανωμερικών πρωτονίων των ολιγοσακχαριτών του HA. Έτσι, η τιμή T₁ που χρησιμοποιήθηκε για όλα τα πειράματα 1D ¹H NMR και DOSY ορίστηκε σε μια μέση τιμή 0,22 s. Τα φάσματα συλλέχθηκαν με 16 σημεία δεδομένων, με χρονική καθυστέρηση 5 ms (Te). Η διάρκεια του παλμού του μαγνητικού πεδίου βελτιστοποιήθηκε προκειμένου να ληφθεί 5% σήμα από τα υπολείμματα που προκύπτουν όταν εφαρμοστεί κλίση με τη μέγιστη δύναμη. Η ισχύς της κλίσης του παλμού αυξήθηκε γραμμικά μεταξύ 5-95%. Η διάσταση της διάχυσης που προέκυψε μετά το μετασχηματισμό Fourier και η βασική διόρθωση προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας την κατάλληλη επιλογή του λογισμικού Topspin 3.2. Οι τιμές των συντελεστών διάχυσης για κάθε ανωμερικό πρωτόνιο αλλά και για κάθε κορυφή υπολογίστηκαν βάσει του λογισμικού Topspin 3.2.

5.2.2.B.6 Ταυτοποίηση ολιγοσακχαριτών του υποστρώματος υαλουρονικού οξέος με το πείραμα επιλεκτικής διέγερσης μιας διάστασης (Selective 1D TOCSY)

Τα πειράματα επιλεκτικής διέγερσης μιας διάστασης (Selective One-dimensional TOCSY) καταγράφηκαν σε δύο θερμοκρασίες, στους 15°C και 37°C σε φασματόμετρο Bruker Avance 500 MHz, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Topspin 3.2. Για την καταγραφή των πειραμάτων ρυθμίστηκαν οι ακόλουθες παράμετροι: αριθμός σαρώσεων: 256 (πειραματικός

χρόνος~ 50 min), χρόνος ανάκτησης: 2,5 s, χρόνος εφησυχασμού: 2-5 s ($1-5 \cdot T_1$) και χρόνους ανάμειξης: 80 και 200 ms. Για καλύτερη ακρίβεια, ο χρόνος εφησυχασμού ρυθμίστηκε με βάση τον προσδιορισμό του διαμήκους χρόνου εφησυχασμού (T_1) για κάθε πρωτόνιο που διεγείρεται. Επιτεύχθηκε επιλεκτική διέγερση των κορυφών που αντιστοιχούν στα ανωμερικά πρωτόνια των άκρων των ολιγοσακχαριτών του HA που παράγονται. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε σε αντίδραση που εξελισσόταν για 10 ημέρες στους 37°C, όπου είχε προχωρήσει σε μεγάλο βαθμό η διάσπαση του υποστρώματος από την υαλουρονιδάση.

5.2.2.B.7 Ταυτοποίηση μορίων ολιγοσακχαριτών του υποστρώματος υαλουρονικού οξέος με φασματοσκοπία 2D ^1H - ^1H TOCSY NMR

Τα πειράματα 2D ^1H - ^1H TOCSY NMR καταγράφηκαν σε όργανο Bruker Avance 500 MHz, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Topspin 3.2. Για την ταυτοποίηση των ολιγοσακχαριτών του HA που προκύπτουν, επιλέχτηκε η θερμοκρασία των 37°C, όπου το φάσμα είχε καλύτερη διακριτική ικανότητα. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε σε αντίδραση που εξελισσόταν για 10 ημέρες στους 37°C, όπου είχε προχωρήσει σε μεγάλο βαθμό η διάσπαση του υποστρώματος HA από την υαλουρονιδάση. Για το 2D ^1H - ^1H TOCSY NMR πείραμα, ρυθμίστηκαν οι ακόλουθοι παράμετροι: εύρος φάσματος: 4000 Hz, αριθμός σαρώσεων: 24 (πειραματικός χρόνος:~ 5 ώρες), χρόνος κορεσμού: 0,25 s, με 90° παλμό διέγερσης, αριθμός σημείων: 2048 σημεία στην άμεση διάσταση (F2) και 256 σημεία στην έμμεση διάσταση (F1), χρόνος ανάμειξης: 80 ms, χρόνος εφησυχασμού: 2 s ($1-5 \cdot T_1$). Τα φάσματα κανονικοποιήθηκαν εις διπλούν και ομαλοποιήθηκαν μέσω διεύρυνσης της γραμμής των κορυφών κατά 1,5 Hz.

5.2.2.B.8 Μελέτη αλληλεπίδρασης των φυσικών προϊόντων και των φυτικών εκχυλισμάτων με την υαλουρονιδάση, με τη μεθοδολογία Saturation Transfer Difference (STD) NMR-Χαρτογράφηση των επιτόπων πρόσδεσης

Για τα πειράματα STD NMR τα δείγματα των φυσικών προϊόντων και των εκχυλισμάτων παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M σε 100% D_2O , pD=3,5. Τα δείγματα NMR προετοιμάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M με 100% δευτεριωμένο νερό (D_2O). Το pD ρυθμίστηκε στο 3,5 με την προσθήκη κατάλληλου όγκου DCl ή NaOD. Η συγκέντρωση των φυσικών προϊόντων στο σωληνάκι NMR (συνολικός όγκος 500 μL) ήταν 1 mM, ενώ η συγκέντρωση του ενζύμου στο σωληνάκι NMR ήταν 50 μM , με τελική αναλογία του συμπλέγματος υποκαταστάτης:πρωτεΐνη 20:1. Η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων στο σωληνάκι NMR (συνολικός όγκος 500 μL) ήταν 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ενώ η συγκέντρωση του ενζύμου στο σωληνάκι NMR ήταν 50 μM , με τελική αναλογία του συμπλόκου υποκαταστάτης-πρωτεΐνη 65:1. Τα πειράματα STD καταγράφηκαν σε θερμοκρασία 37°C, σε φασματόμετρο Bruker AV 500 MHz (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany), χρησιμοποιώντας το λογισμικό Topspin 3.2. Όλα τα φάσματα καταγράφηκαν με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στην **Παράγραφο 5.1.2.B.5**.

5.2.2.B.9 Χαρτογράφηση των επίτοπων πρόσδεσης- Ο συντελεστής απόδοσης πρόσδεσης

Ο συντελεστής απόδοσης πρόσδεσης (STD amplification factor- STD_{AMP}) προσδιορίστηκε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στην **Παράγραφο 5.1.2.B.5**.

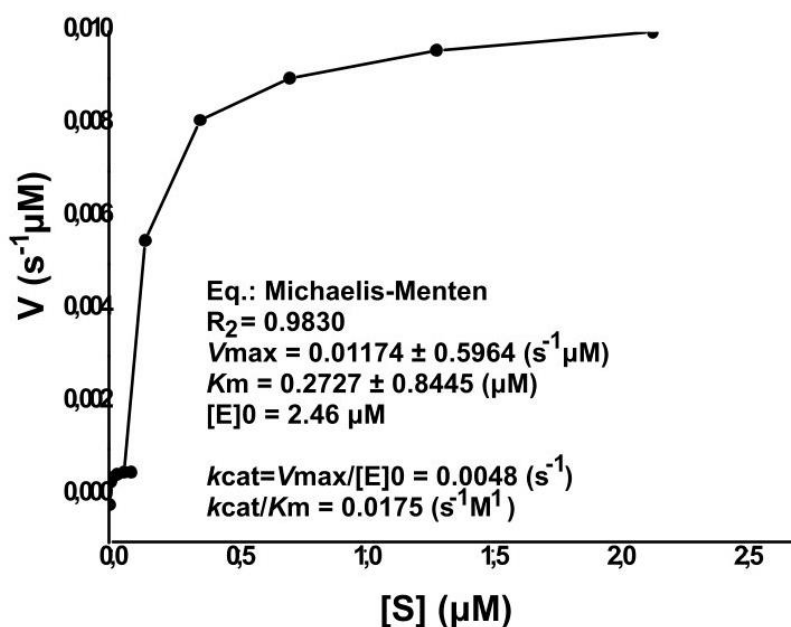
5.2.2.B.10 Πειράματα tr-NOESY

Τα πειράματα NOESY καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας ένα φασματόμετρο Bruker AV 500 MHz (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany), χρησιμοποιώντας το λογισμικό Topspin 3.2. Για την καταγραφή των πειραμάτων NOESY, όλα τα δείγματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M, pD=3,5 με 100% δευτεριωμένο νερό (D_2O). Το pH ρυθμίστηκε στο 3,5 με την προσθήκη κατάλληλου όγκου DCl ή NaOD. Αρχικά, πυκνά διαλύματα των φυσικών προϊόντων που χρησιμοποιήθηκαν για αυτά τα πειράματα, παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M. Η συγκέντρωση των φυσικών προϊόντων στο σωληνάκι NMR (συνολικός όγκος 500 μ L) ήταν 1 mM, ενώ η συγκέντρωση του ενζύμου στο σωληνάκι NMR ήταν 50 μ M, με τελική αναλογία του συμπλέγματος υποκαταστάτης:πρωτεΐνη 20:1. Στη συνέχεια, τα δείγματα NMR υποβλήθηκαν σε NOESY πειράματα στους 37°C, ρυθμίζοντας τις ακόλουθες παραμέτρους: χρόνοι ανάμειξης: 0,1 s και 0,8 s, εύρος φάσματος ίσο με 6009,615 Hz, 2048 σημεία (data points), αριθμός σαρώσεων: 56 (πειραματικός χρόνος:12 h), προκειμένου να ληφθεί φάσμα όπου τα σήματα NOE του ελεύθερου υποκαταστάτη να διακρίνονται εύκολα.

5.2.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

5.2.3.1 Κινητική μελέτη της υαλουρονιδάσης από ιστό βοός

Έχει αποδειχτεί ότι η ενζυμική αντίδραση της υαλουρονιδάσης ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten. Η εξίσωση Michaelis-Menten προσαρμόστηκε με βάση τις πειραματικές τιμές των αρχικών ταχυτήτων της αντίδρασης της υαλουρονιδάσης από ιστό βοός επί του υποστρώματος HA, σε θερμοκρασία 37°C, και τιμή pH=3,5 του μέσου της αντίδρασης (**Διάγραμμα 6.2.1**). Επίσης υπολογίστηκαν οι παράμετροι k_{cat}/K_m , K_{cat} και K_m . Τα αποτελέσματα αυτά δίνονται στον ένθετο πίνακα μέσα στο **Διάγραμμα 5.2.1**.

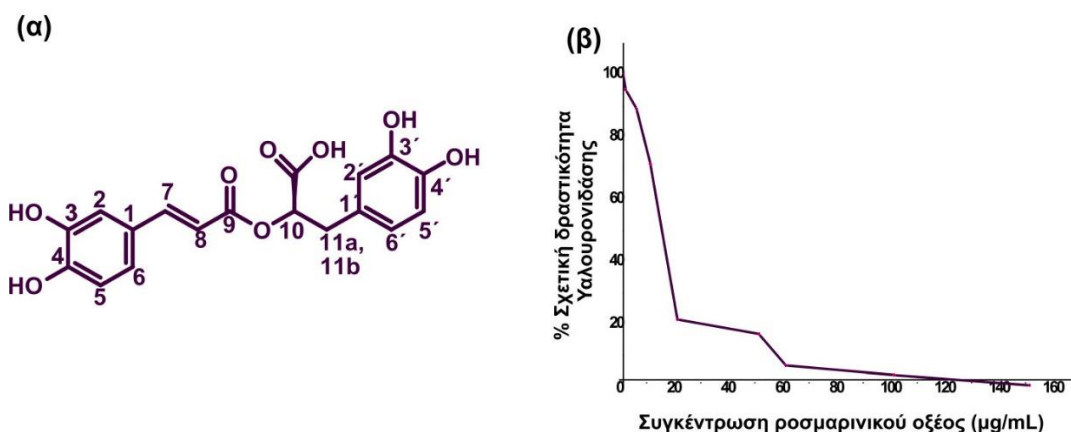


Διάγραμμα 5.2.1: Καμπύλη Michaelis-Menten της υαλουρονιδάσης από ιστό βοός με το υπόστρωμα HA. Στον ένθετο πίνακα φαίνονται οι υπολογιζόμενες τιμές των παραμέτρων V_{max} , K_m , k_{cat} και k_{cat}/K_m .

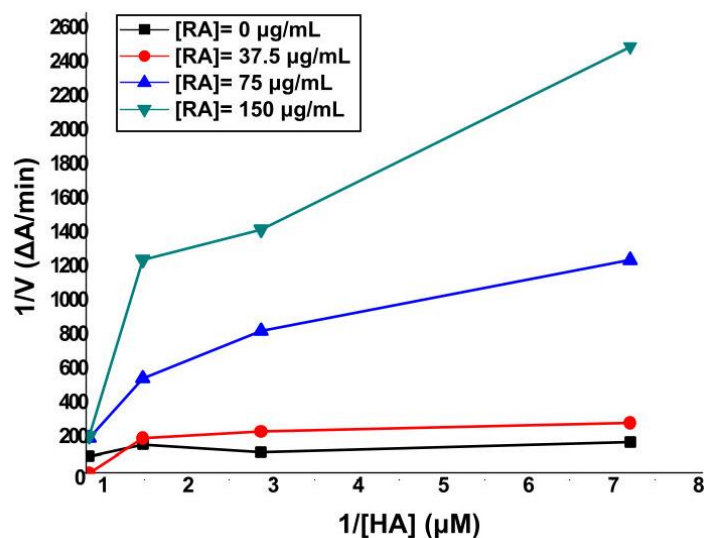
5.2.3.2 Αποτελέσματα από την *in vitro* μελέτη αναστολής της υαλουρονιδάσης από φυσικό προϊόν και φυτικό εκχύλισμα μέσω φασματοσκοπίας UV

5.2.3.2.1 Αποτελέσματα από τη μελέτη αναστολής της υαλουρονιδάσης από το φυσικό προϊόν ροσμαρινικό οξύ

Το ροσμαρινικό οξύ αποτελεί φαινολικό εστέρα του καφεϊκού οξέος και βρίσκεται σε αφθονία σε πάρα πολλά φυτά, όπως στο μελισσόχορτο, στο δεντρολίβανο, στο φασκόμηλο, στη ρίγανη, στο θυμάρι και σε άλλα. Μελέτες που έγιναν ως προς την αναστολή της υαλουρονιδάσης από το ροσμαρινικό οξύ, έδειξαν πως πρόκειται για έναν ισχυρό αναστολέα.³¹⁶ Σύμφωνα με το **Σχήμα 5.2.7**, η αναστολή της υαλουρονιδάσης από το ροσμαρινικό οξύ είναι φαινόμενο που εξαρτάται από τη συγκέντρωση. Για παράδειγμα στις συγκεντρώσεις 5, 10, 50 και 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, η ανασταλτική δράση του ροσμαρινικού οξέος είναι $10,96 \pm 0,02\%$, $28,52 \pm 0,01\%$, $82,93 \pm 0,01$ και $96,04 \pm 0,03\%$ αντίστοιχα, ενώ το IC_{50} του ροσμαρινικού οξέος προσδιορίστηκε ίσο με $13,67 \mu\text{M}$.



Σχήμα 5.2.7: (α) Δομή του ροσμαρινικού οξέος. (β) Γραφική απεικόνιση της % σχετικής δραστηριότητας της υαλουρονιδάσης, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ροσμαρινικού οξέος.



Διάγραμμα 5.2.2: Γραφικές απεικονίσεις Lineweaver-Burk του ροσμαρινικού οξέος με την υαλουρονιδάση από ιστό βοός.

Προκειμένου να προσδιοριστεί το είδος της αναστολής, πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω μελέτες κινητικής όπου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ροσμαρινικού οξέος (0,75 και 150 μg/mL) και διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (0,140 μM, 0,357 μM, 0,710 μM και 1,29 μM) (Πίνακας 5.2.1). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σταθερά Michaelis αυξανόταν σταδιακά με την αύξηση της συγκέντρωσης του ροσμαρινικού οξέος, γεγονός που δείχνει ότι η διαφορετική συγκέντρωση του ροσμαρινικού οξέος επηρέασε την αλληλεπίδραση της δέσμευσης του ενζύμου στο υπόστρωμά του. Ωστόσο, η τιμή της V_{max} παρέμεινε σταθερή (Πίνακας 5.2.1). Τα δεδομένα που προέκυψαν δείχνουν ότι το ροσμαρινικό οξύ δρα ανταγωνιστικά στην ενζυμική αντίδραση της υαλουρονιδάσης.

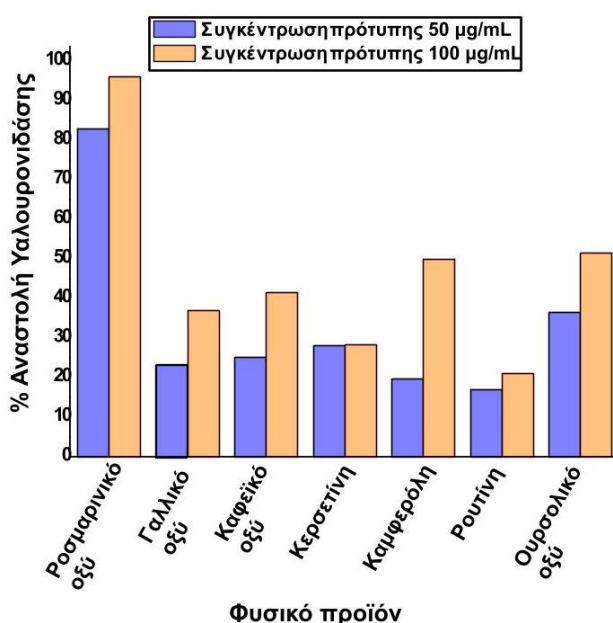
Πίνακας 5.2.1: Πειραματικές τιμές K_M και V_{max} , για διαφορετικές συγκεντρώσεις ροσμαρινικού οξέος.

Συγκέντρωση Ροσμαρινικού οξέος (μg/mL)	K_m (mM)	V_{max} (ΔA/min)	Κλίση	R^2
0	0,920	0,010	0,789	0,9865
37,5	3,321	0,009	0,897	0,9498
75	5,44	0,009	1,068	0,9896
150	7,94	0,010	1,084	0,9923

5.2.3.2.2 Αποτελέσματα από τη μελέτη αναστολής της υαλουρονιδάσης από φυσικά προϊόντα

Πολλοί φυσικοί δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν μελετηθεί εκτεταμένα για την ανασταλτική τους επίδραση στην υαλουρονιδάση. Πολλές ουσίες που έχουν απομονωθεί από φυτά, έχει βρεθεί ότι είναι πολύ καλοί αναστολείς της υαλουρονιδάσης, και έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε καλλυντικά προϊόντα.^{317,318} Ο ισχυρός αντιοξειδωτικός και αντιφλεγμονώδης χαρακτήρας που έχουν τα φλαβονοειδή και άλλες οικογένειες μεταβολιτών, επιδρά αποτελεσματικά στην αναστολή της υαλουρονιδάσης. Στην παρούσα μελέτη της αναστολής της υαλουρονιδάσης από φυσικά προϊόντα, επιλέχθηκαν ουσίες που έχουν ταυτοποιηθεί στα φυτά που μελετούνται, προκειμένου να προσδιοριστεί η επίδραση που έχει κάθε ουσία στη δράση της

υαλουρονιδάσης. Ωστόσο, σημαντικό είναι το γεγονός ότι στα φυτά κυριαρχεί και το συνεργιστικό φαινόμενο των δραστικών ουσιών, κάτι που μπορεί να μην ταυτίζεται με την δράση που παρουσιάζουν οι μεμονωμένες ουσίες. Οι πρότυπες ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι τα φαινολικά οξέα ροσμαρινικό οξύ, γαλλικό οξύ και καφεϊκό οξύ, τα φλαβονοειδή κερκετίνη, καμφερόλη και ρουτίνη, και το τριτερπένιο ουρσολικό οξύ, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως καλοί αναστολείς της υαλουρονιδάσης.^{316,319–321} Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε δύο συγκεντρώσεις, στα 50 µg/mL και στα 100 µg/mL, όπου παρατηρήθηκε το φαινόμενο εξάρτησης της ανασταλτικής δράσης από τη συγκέντρωση του αναστολέα. Καλύτερη ανασταλτική δράση έδωσε το ροσμαρινικό οξύ (82,93±0,01% στα 50 µg/mL και 96,04±0,03% στα 100 µg/mL), ενώ ακολουθούν η καμφερόλη (19,54±0,01 στα 50 µg/mL και 49,93±0,02% στα 100 µg/mL) και το ουρσολικό οξύ (35,64±0,01 στα 50 µg/mL και 51,43±0,01 στα 100 µg/mL). Ωστόσο, και τα υπόλοιπα φυσικά προϊόντα ανέστειλαν τη δράση της υαλουρονιδάσης σε ποσοστό μεγαλύτερο από 20% (Σχήμα 5.2.8).



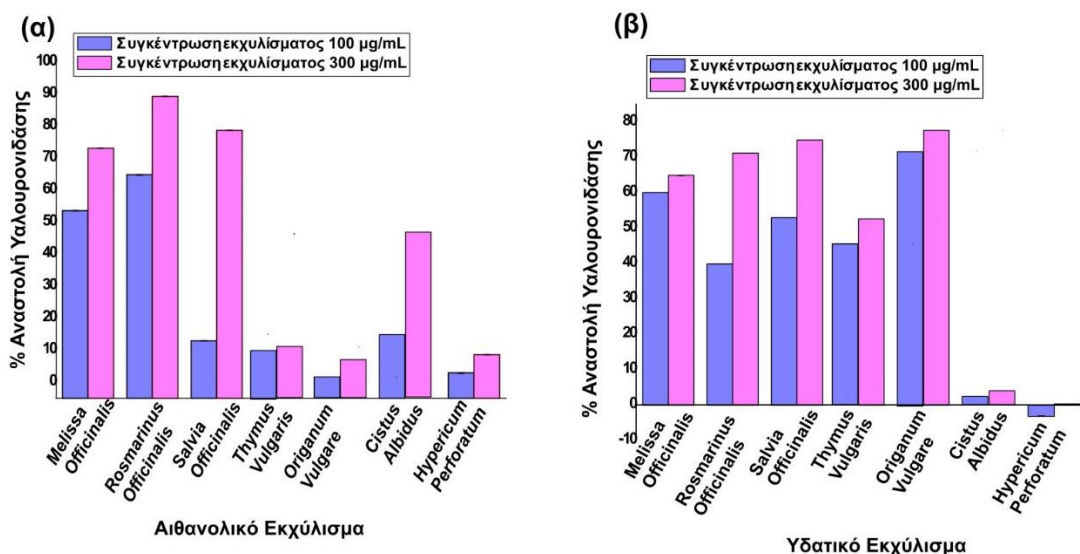
Σχήμα 5.2.8: Γραφική απεικόνιση των πειραματικών τιμών της ανασταλτικής δράσης των επιλεγμένων φυσικών προϊόντων ως προς την υαλουρονιδάση.

5.2.3.2.3 Αποτελέσματα από τη μελέτη αναστολής υαλουρονιδάσης από φυτικά εκχυλίσματα

Τα επτά αιθανολικά και τα επτά υδατικά εκχυλίσματα από τα μελετούμενα φυτά: *Melissa Officinalis*, *Rosmarinus Officinalis*, *Salvia Officinalis*, *Thymus Vulgaris*, *Origanum Vulgare*, *Cistus Albidus* και *Hypericum Perforatum*, έχουν μελετηθεί ως προς τη συμπεριφορά τους όταν εμπλέκονται στην αντίδραση της υαλουρονιδάσης. Η δράση των εκχυλισμάτων μελετήθηκε σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις για κάθε ομάδα εκχυλισμάτων. Τόσο τα αιθανολικά, όσο και τα υδατικά εκχυλίσματα μελετήθηκαν σε συγκέντρωση 100 µg/mL και 300 µg/mL (Πίνακας 5.2.2 και Διάγραμμα 5.2.3). Στον Πίνακα 5.2.2, παρουσιάζονται οι τιμές αναστολής των αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων, ως προς τη δράση της υαλουρονιδάσης.

Πίνακας 5.2.2: Τιμές αναστολής των αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων ως προς τη δράση της υαλουρονιδάσης σε συγκεντρώσεις 100 µg/mL και 300 µg/mL, όπως προέκυψαν από τη μελέτη με φασματοσκοπία UV.

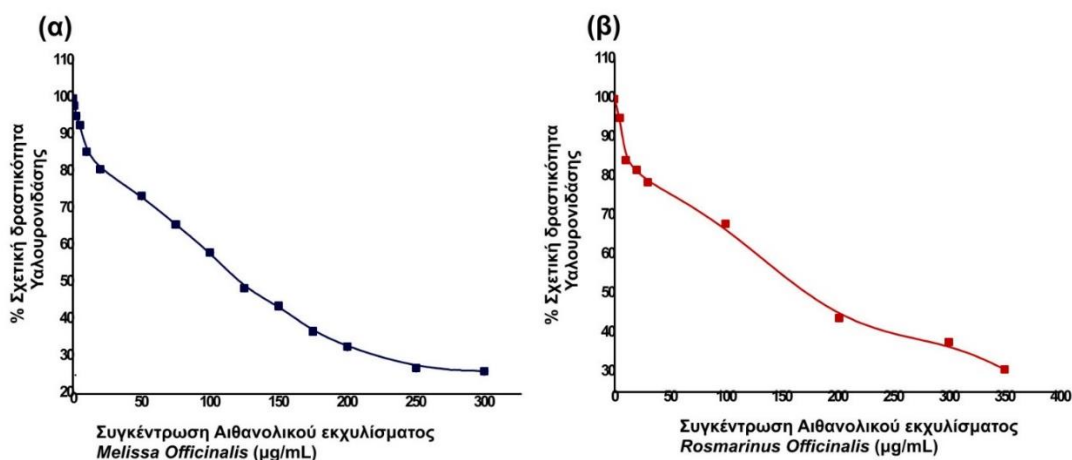
A/A	Φυτό/Αιθανολικό Εκχύλισμα	% Αναστολή σε συγκέντρωση 100 µg/ml	% Αναστολή σε συγκέντρωση 300 µg/ml	Φυτό/Υδατικό Εκχύλισμα	% Αναστολή σε συγκέντρωση 100 µg/ml	% Αναστολή σε συγκέντρωση 300 µg/ml
1.	<i>Melissa Officinalis</i> (Μελισσόχορτο)	53,66±0,01	73,17±0,02	<i>Melissa Officinalis</i> (Μελισσόχορτο)	60,09±0,01	64,88±0,01
2.	<i>Rosmarinus Officinalis</i> (Δεντρολίβανο)	64,80±0,01	89,40±0,01	<i>Rosmarinus Officinalis</i> (Δεντρολίβανο)	39,91±0,01	71,29±0,01
3.	<i>Salvia Officinalis</i> (Φασκόμηλο)	12,93±0,02	21,48±0,01	<i>Salvia Officinalis</i> (Φασκόμηλο)	53,00±0,02	74,92±0,01
4.	<i>Thymus Vulgaris</i> (Θυμάρι)	10,16±0,03	10,90±0,02	<i>Thymus Vulgaris</i> (Θυμάρι)	45,45±0,02	52,68±0,02
5.	<i>Origanum Vulgare</i> (Ρίγανη)	1,56±0,05	6,84±0,04	<i>Origanum Vulgare</i> (Ρίγανη)	71,77±0,01	77,76±0,04
6.	<i>Cistus Albidus</i> (Λαδανιά)	15,00±0,05	46,40±0,02	<i>Cistus Albidus</i> (Λαδανιά)	2,21±0,01	3,79±0,01
7.	<i>Hypericum Perforatum</i> (Βαλσαμόχορτο)	2,87±0,03	8,59±0,01	<i>Hypericum Perforatum</i> (Βαλσαμόχορτο)	-3,10±0,02	0,27±0,05



Διάγραμμα 5.2.3: Γραφική απεικόνιση των πειραματικών τιμών αναστολής των αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων (σε συγκέντρωση 100 µg/mL και 300 µg/mL) ως προς τη δράση της υαλουρονιδάσης, όπως προέκυψαν από την *in vitro* μελέτη μέσω φασματοσκοπίας UV.

Όπως προκύπτει από τα πειράματα αναστολής, από τα αιθανολικά εκχυλίσματα καλύτερη ανασταλτική δράση παρουσίασε το αιθανολικό εκχύλισμα των *Rosmarinus Officinalis* (δεντρολίβανο) και *Melissa Officinalis* (μελισσόχορτο). Σε συγκέντρωση 100 µg/mL, το αιθανολικό εκχύλισμα του δεντρολίβανου έδωσε αναστολή ίση με 64,80±0,01%, ενώ στα 300 µg/mL έδωσε αναστολή ίση με 89,40±0,01%. Ομοίως, το αιθανολικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου σε συγκέντρωση 100 µg/mL έδωσε αναστολή ίση με 53,66±0,01% ενώ στα 300 µg/mL έδωσε αναστολή ίση με 73,17±0,02%. Αυτά τα δύο εκχυλίσματα μελετήθηκαν και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και αποδείχτηκε ότι η ανασταλτική τους δράση εξαρτάται κάθε φορά

από τη συγκέντρωση του εκχυλίσματος (**Σχήμα 5.2.9**). Ως control του πειράματος χρησιμοποιήθηκε το ροσμαρινικό οξύ ($IC_{50}=13.67 \mu\text{g/mL}$).



Σχήμα 5.2.9: (α) Γραφική απεικόνιση της % σχετικής δραστηριότητας της υαλουρονιδάσης, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος από το φυτό *Melissa Officinalis* (μελισσόχορτο). (β) Γραφική απεικόνιση της % σχετικής δραστηριότητας της υαλουρονιδάσης, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του αιθανολικού εκχυλίσματος από το φυτό *Rosmarinus Officinalis* (δεντρολίβανο).

Το ροσμαρινικό οξύ υπάρχει σε αφθονία σε πολλά φυτά, και κατ' επέκταση στα παραγόμενα εκχυλίσματα τους και έχει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς βιοσυντίθεται φυσικά, και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του φλοιού των φυτών από διάφορους εξωγενείς παράγοντες. Στα αιθανολικά εκχυλίσματα του δεντρολίβανου και του μελισσόχορτου, το ροσμαρινικό οξύ αποτελεί τον κύριο δευτερογενή μεταβολίτη, επομένως η ανασταλτική ικανότητα των δύο αυτών εκχυλισμάτων είναι πιθανό να οφείλεται στο μεγαλύτερο ποσοστό, στην παρουσία ροσμαρινικού οξέος. Από την άλλη, σε σημαντικά ικανοποιητικό ποσοστό υπάρχουν στα εκχυλίσματα αυτά και εκπρόσωποι της οικογένειας των τερπενοειδών, και κυρίως το ουρσολικό, το ολεανολικό και σε μικρότερο βαθμό το μπετουλινικό οξύ. Τα τερπένια αυτά έχουν μελετηθεί για τη σημαντική αναστολή που παρουσιάζουν ως προς τη δράση της υαλουρονιδάσης.³²⁰ Ο συνδυασμός επομένως αυτών των δευτερογενών μεταβολιτών, καθιστά τα εκχυλίσματα αυτά καλούς αναστολείς της υαλουρονιδάσης.

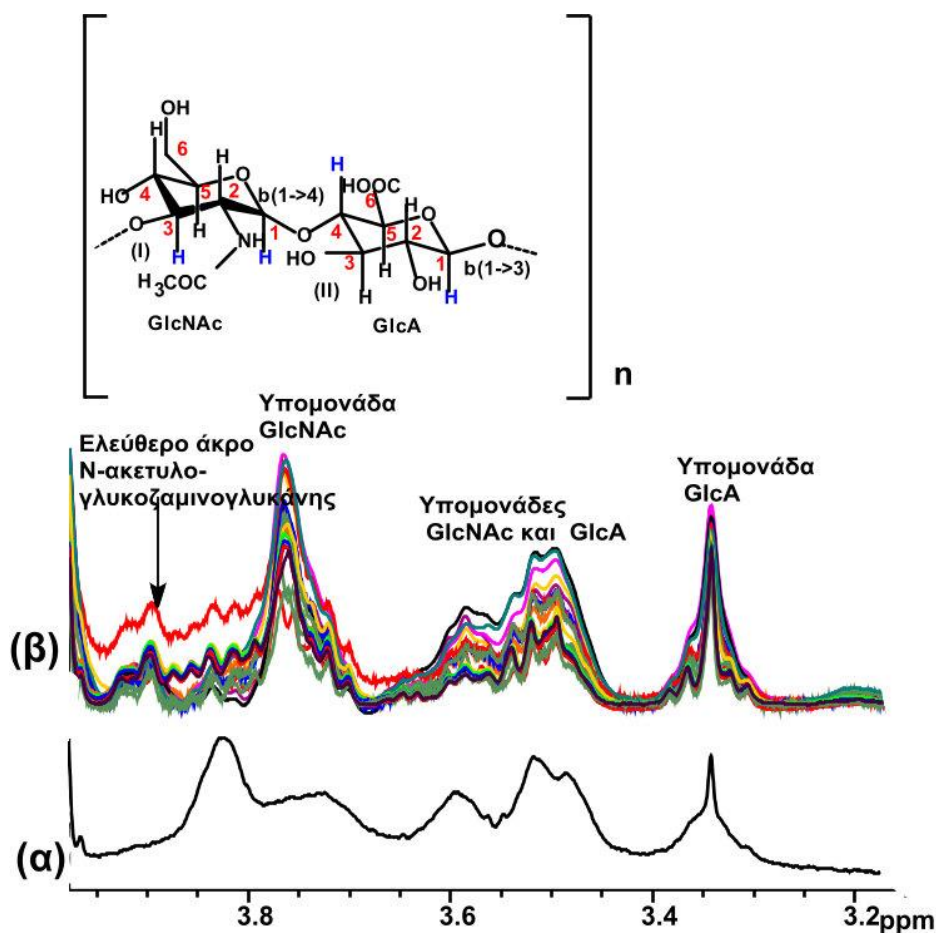
Όσον αφορά τα υδατικά εκχυλίσματα, σημαντικά ποσοστά αναστολής και στις δύο μελετούμενες συγκεντρώσεις έδωσαν τα ακόλουθα: *Melissa Officinalis* ($60,09 \pm 0,01\%$ και $64,88 \pm 0,01\%$ σε συγκεντρώσεις $100 \mu\text{g/mL}$ και $300 \mu\text{g/mL}$ αντίστοιχα), *Rosmarinus Officinalis* ($39,91 \pm 0,01\%$ και $71,29 \pm 0,01\%$ σε συγκεντρώσεις $100 \mu\text{g/mL}$ και $300 \mu\text{g/mL}$ αντίστοιχα), *Salvia Officinalis* ($53,00 \pm 0,02\%$ και $74,92 \pm 0,01\%$ σε συγκεντρώσεις $100 \mu\text{g/mL}$ και $300 \mu\text{g/mL}$ αντίστοιχα), *Thymus Vulgaris* ($45,45 \pm 0,02\%$ και $52,68 \pm 0,02\%$ σε συγκεντρώσεις $100 \mu\text{g/mL}$ και $300 \mu\text{g/mL}$ αντίστοιχα) και *Origanum Vulgare* ($71,77 \pm 0,01\%$ και $77,76 \pm 0,04\%$ σε συγκεντρώσεις $100 \mu\text{g/mL}$ και $300 \mu\text{g/mL}$ αντίστοιχα). Όλα τα φυτά ανήκουν στην ίδια οικογένεια των Χειλανθών (*Lamiaceae*), συνεπώς το φυτοχημικό προφίλ τους παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες. Καθώς το ροσμαρινικό οξύ αποτελεί βασικό δευτερογενή μεταβολίτη αυτών των φυτών, περιέχεται επίσης και στα υδατικά εκχυλίσματα των αντίστοιχων φυτών. Συνεπώς, η ανασταλτική δράση αυτών των εκχυλισμάτων οφείλεται σε μεγάλο ποσοστό στην παρουσία ροσμαρινικού οξέος, αν και

επικρατούν και συνεργιστικά φαινόμενα των βιοδραστικών ουσιών που περιέχονται στα εκχυλίσματα.

5.2.3.3 Αποτελέσματα από την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης

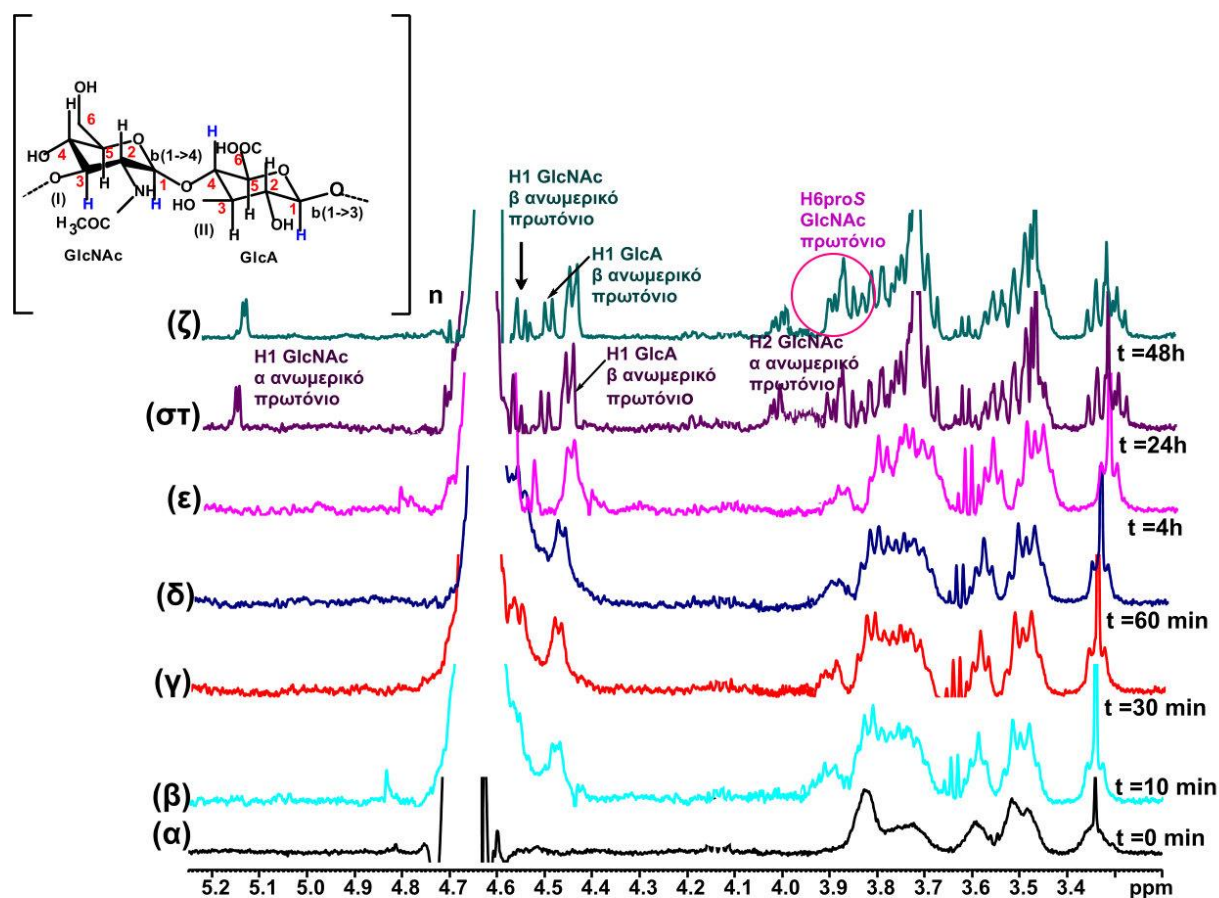
Όπως έχει αναφερθεί, η υαλουρονιδάση διασπά τους β-1,4 δεσμούς του HA, σχηματίζοντας μόρια ολιγοσακχαριτών κυρίως με 2, 4 και 6 εναλασσόμενες υπομονάδες γλυκουρονικού οξέος και N-ακετυλο-γλυκοζαμινογλυκάνης, με ελεύθερα N-αμινοτελικά άκρα. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, με τη φασματοσκοπία UV, μετράται η απορρόφηση των ελεύθερων N-αμινοτελικών άκρων των παραγόμενων ολιγοσακχαριτών στα 590 nm, αφού σχηματιστεί το έγχρωμο σύμπλοκο με την 2,4-διμεθυλαμινο βενζαλδεΐδη. Εναλλακτικά, μπορεί να μετρηθεί η απορρόφηση της θολερότητας που δημιουργείται στο διάλυμα της αντίδρασης της υαλουρονιδάσης, λόγω των μορίων των ολιγοσακχαριτών που δημιουργούνται. Αυτό το γεγονός θα μπορούσε να οδηγήσει σε εσφαλμένη μέτρηση της απορρόφησης με φασματοσκοπία UV. Για το λόγο αυτό, η ενζυμική αντίδραση της υαλουρονιδάσης μελετήθηκε εναλλακτικά με τη φασματοσκοπία 1D ¹H NMR, όπου ήταν δυνατή η *in situ* μελέτη της διάσπασης του HA από την υαλουρονιδάση σε πραγματικό χρόνο. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι δε χρειάστηκε να διακοπεί η ενζυμική αντίδραση με προσθήκη βορικού οξέος, ούτε να γίνει προσθήκη της 2,4-διμεθυλαμινο βενζαλδεΐδης, προκειμένου να σχηματιστεί το έγχρωμο σύμπλοκο με τα ελεύθερα άκρα της N-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης. Επίσης, τυχόν “θολερότητα” του δείγματος, δεν επηρέασε την καταγραφή των φασμάτων NMR.

Το HA, λόγω του πολύ μεγάλου μοριακού βάρους ($1-2 \times 10^6$ Da), και του μεγάλου ιξώδους που έχει, στο φάσμα πρωτονίου 1D ¹H NMR, εμφανίζεται ένα σύστημα συμπαγών κορυφών (στην περιοχή 3,30-3,90 ppm). Στο 1D ¹H NMR φάσμα του HA, οι κορυφές του στην περιοχή 3,30-3,90 ppm εμφανίζονται αρκετά συμπαγείς, με αποτέλεσμα η διάκριση των επιμέρους πρωτονίων του να είναι δύσκολη (**Σχήμα 5.2.10**). Ωστόσο, εμφανίζονται χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις όπως π.χ. στα 3,30 ppm, η οποία αντιστοιχεί στην υπομονάδα του D-γλυκουρονικού οξέος και στην περιοχή των 3,70 ppm, η οποία αντιστοιχεί στην υπομονάδα της N-ακετυλο-γλυκοζαμινογλυκάνης. Αντίθετα, στην περιοχή των 3,45-3,65 ppm, εμφανίζονται πρωτόνια που ανήκουν και στις δύο υπομονάδες του μορίου του HA.



Σχήμα 5.2.10: Επιλεγμένη περιοχή (3,20-3,90 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων: (α) του υποστρώματος HA, (β) διαδοχικών φασμάτων της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης που πραγματοποιείται στο σωληνάκι NMR 5 mM, σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, 0,1M σε 100% διαλύτη (D_2O), $\text{pD}=3,5$, στους 37°C .

Η ενζυμική αντίδραση της υαλουρονιδάσης μελετήθηκε *in situ* μέσω της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σ' ένα σωληνάκι NMR, 5 mm, χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες που εφαρμόστηκαν για τη μελέτη της αντίδρασης της υαλουρονιδάσης με φασματοσκοπία UV. Προηγήθηκε επώαση της υαλουρονιδάσης σε σωληνάριο Eppendorf των 1.5 mL, σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών μαζί με την αλβουμίνη βοός, στους 37°C για δέκα λεπτά, με έντονη ανάδευση. Μετά τα δέκα λεπτά επώασης, προστέθηκε το υπόστρωμα σε δευτεριωμένο D_2O , το διάλυμα μεταφέρθηκε σ' ένα σωληνάκι NMR και ακολούθησε καταγραφή του φάσματος της αντίδρασης. Μετά το πρώτο φάσμα, το διάλυμα της αντίδρασης επώασε στο σωληνάκι NMR στους 37°C , για διάφορα χρονικά σημεία: 30 min, 60 min, 4h και 24h (Σχήμα 5.2.11).



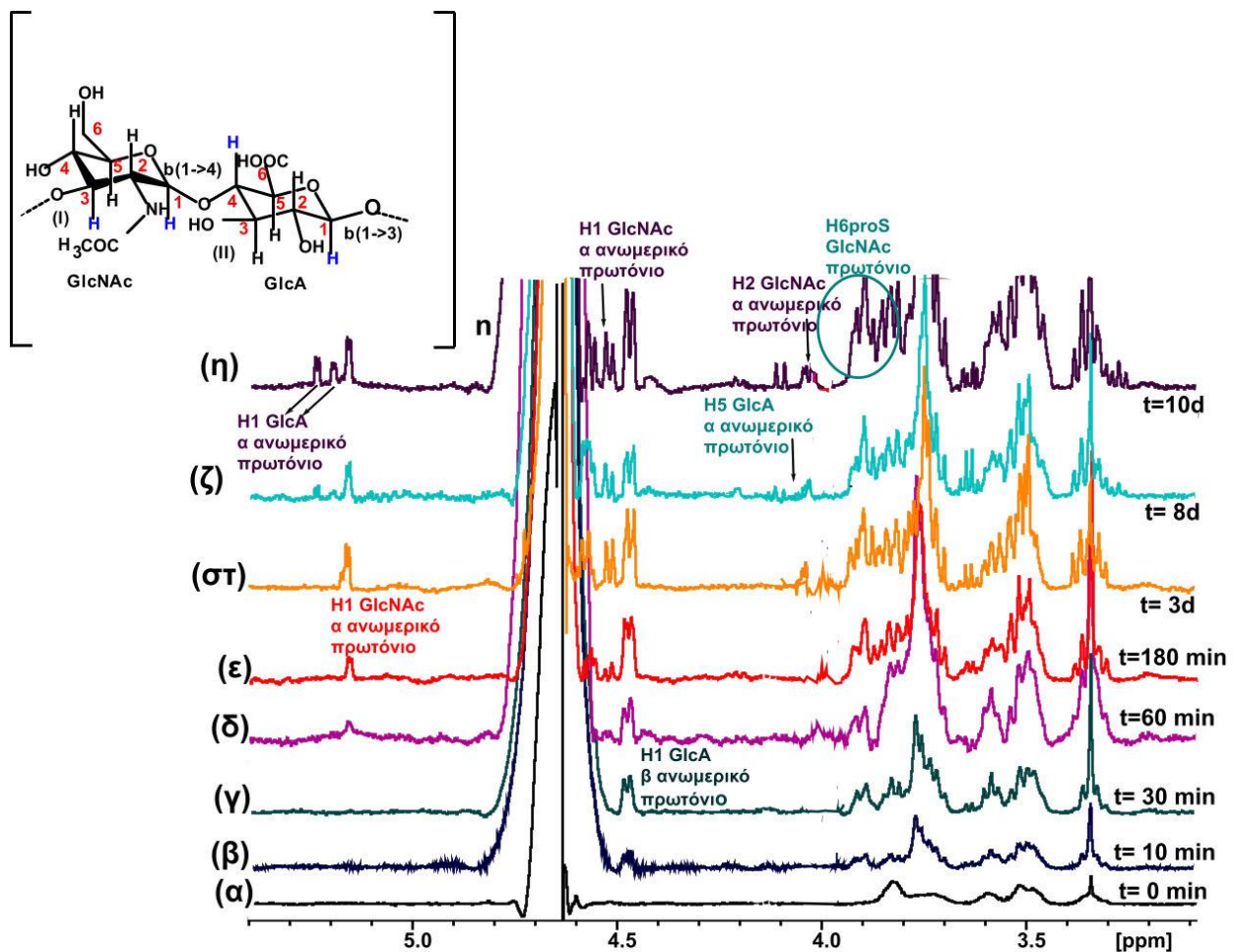
Σχήμα 5.2.11: Επιλεγμένη περιοχή (3,20-5,25 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M σε διαλύτη 100% D_2O , $\text{pD}=3,5$, στους 37°C για: (α) $t=0$ min, (β) $t=10$ min, (γ) $t=30$ min, (δ) $t=60$ min, (ε) $t=4\text{h}$, (στ) $t=24\text{h}$, και (ζ) $t=48\text{h}$ αντίδρασης.

Βασικό χαρακτηριστικό των ολιγοσακχαριτών του HA είναι ότι περιέχουν στο μόριο τους ένα αμιδικό πρωτόνιο ανά μία μονάδα δισακχαρίτη, που βρίσκεται στο μόριο της *N*-ακέτυλο-γλυκοζαμινογλυκάνης. Αυτό το αμιδικό πρωτόνιο εμφανίζει δύο χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στην κλίμακα του NMR, που αντιστοιχούν στα ελεύθερα α και β ανωμερικά πρωτόνια της GlcNAc υπομονάδας. Ωστόσο, αυτό ισχύει μόνο για τα ανωμερικά πρωτόνια των ελεύθερων άκρων των ολιγοσακχαριτών. Τα εσωτερικά αμιδικά πρωτόνια, αυτά που βρίσκονται δεσμευμένα στα μόρια των ολιγοσακχαριτών, λόγω των χημικών δεσμών που αναπτύσσουν, δεν μπορούν να διακριθούν στην κλίμακα του NMR. Αυτά τα ανωμερικά πρωτόνια, καθώς σχηματίζονται σε μεγάλο ποσοστό, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της δράσης της υαλουρονιδάσης πάνω στο HA.

Παρακολουθώντας την εξέλιξη της αντίδρασης της υαλουρονιδάσης στο **Σχήμα 5.2.11**, από τα πρώτα δέκα λεπτά της αντίδρασης, παρατηρείται εμφάνιση μιας κορυφής στα 3,90 ppm, η οποία ανήκει στο πρωτόνιο H6proS του ελεύθερου *N*-αμινοτελικού άκρου των παραγόμενων ολιγοσακχαριτών που προκύπτουν από τη διάσπαση του HA. Όπως παρατηρείται στο **Σχήμα 5.2.11**, καθώς εξελίσσεται η αντίδραση της υαλουρονιδάσης, η σχηματιζόμενη κορυφή στα 3,90 ppm αυξάνεται. Επίσης, συγκρίνοντας το φάσμα πρωτονίου του υαλουρονικού οξέος με τα φάσματα της ενζυμικής αντίδρασης, είναι φανερό η διαφορά στην εμφάνιση των κορυφών. Ενώ στο φάσμα πρωτονίου του HA, οι κορυφές που αντιστοιχούν στις μεμονωμένες μονάδες των σακχάρων D-γλυκουρονικό οξύ και *N*-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνη εμφανίζονται συγκεχυμένες, στα αντίστοιχα φάσματα της ενζυμικής αντίδρασης, οι κορυφές αρχίζουν να εμφανίζονται με αλλαγές ως προς το σχήμα τους, ενώ όσο εξελίσσεται η αντίδραση, αυτές διαχωρίζονται μεταξύ

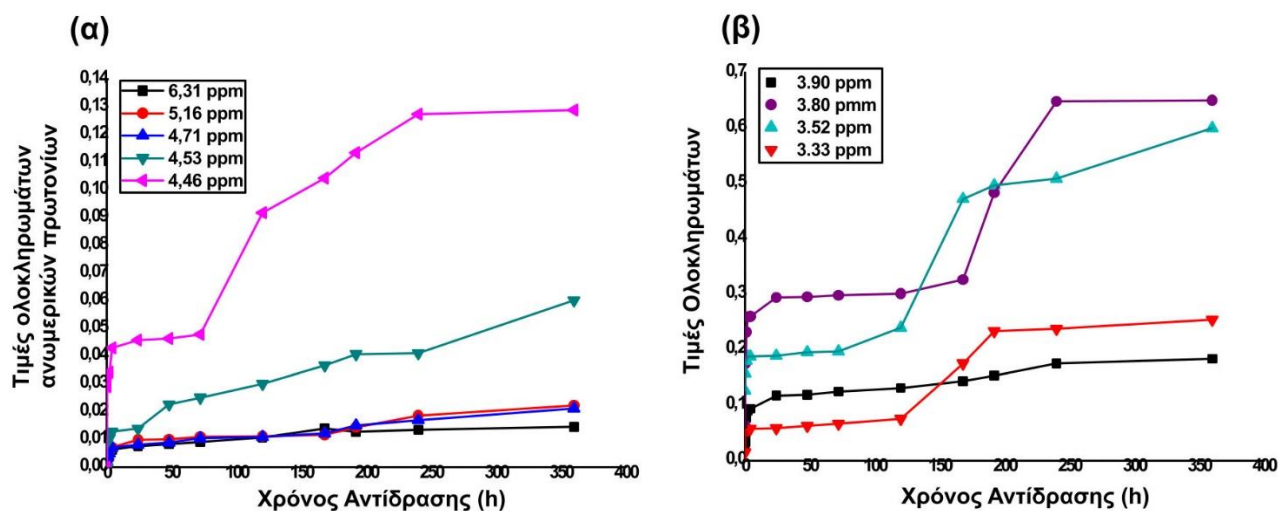
τους, γεγονός που σημαίνει ότι το ιξώδες του HA μειώνεται, λόγω της διάσπασης του μορίου σε μικρότερα μόρια ολιγοσακχαριτών. Άλλη χαρακτηριστική κορυφή που εμφανίζεται στα δέκα πρώτα λεπτά της αντίδρασης είναι αυτή στα 4,50 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο ελεύθερο H1 β ανωμερικό πρωτόνιο της υπομονάδας GlcA. Όπως παρατηρείται στην αλληλουχία των φασμάτων του **Σχήματος 5.2.11**, η περιοχή μεταξύ 4,00-5,20 ppm είναι χαρακτηριστική περιοχή κυρίως των H1 ελεύθερων ανωμερικών πρωτονίων των σακχάρων. Όσο εξελίσσεται η αντίδραση, εμφανίζονται και άλλες κορυφές σε αυτή την περιοχή, γεγονός που δηλώνει την εμφάνιση και άλλων χαρακτηριστικών πρωτονίων. Μετά τις 24h αντίδρασης, εμφανίζεται ακόμη μία χαρακτηριστική κορυφή στα 4,55 ppm, η οποία ανήκει και αυτή σε ελεύθερο H1 β ανωμερικό πρωτόνιο της GlcA υπομονάδας. Η διαφορά στην ένταση των κορυφών εξηγεί το γεγονός ότι αυτά τα πρωτόνια ανήκουν σε διαφορετικό μόριο του σχηματιζόμενου ολιγοσακχαρίτη. Επίσης, μετά από 24h ώρες αντίδρασης εμφανίζονται άλλες δύο χαρακτηριστικές κορυφές στα 4,00 ppm, 4,60 ppm και 5,15 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα ελεύθερα H2, H1 β και α ανωμερικά πρωτόνια της υπομονάδας GlcNAc αντίστοιχα.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.2.11**, και όπως αποδείχθηκε και από τη μικρή τιμή της ταχύτητας V_{max} , η ενζυμική αντίδραση της υαλουρονιδάσης πραγματοποιείται με μικρή ταχύτητα, ενώ μετά και από επώασή της στους 37°C για 48h, η διάσπαση του υποστρώματος συνεχίζεται. Προκειμένου να διερευνηθεί περισσότερο η δράση της υαλουρονιδάσης πάνω στο υπόστρωμά της, η ενζυμική αντίδραση συνέχισε να εξελίσσεται στο σωληνάκι NMR για χρονικό διάστημα 3, 8 και 10 ημερών, και καταγράφηκαν τα αντίστοιχα φάσματα 1D ^1H NMR στους 37°C (**Σχήμα 5.2.12**). Όπως φαίνεται στα καινούρια πρωτονιακά φάσματα NMR της ενζυμικής αντίδρασης, μετά από 8 ημέρες στο σωληνάκι NMR στους 37°C, εμφανίζεται μια χαρακτηριστική κορυφή στα 5,19 ppm, ενώ μετά από 10 ημέρες, στην ίδια περιοχή (5,23 ppm) εμφανίζεται ακόμη μία χαρακτηριστική κορυφή. Όπως προκύπτει και από τα βιβλιογραφικά δεδομένα, αυτές οι χημικές μετατοπίσεις αντιστοιχούν στα ελεύθερα H1 α ανωμερικά πρωτόνια της υπομονάδας GlcNAc. Επίσης, παρατηρώντας την περιοχή 3,30-3,90 ppm, υπάρχει μια δυναμική αλλαγή στην εμφάνιση των κορυφών, γεγονός που επιβεβαιώνει τη διάσπαση του υποστρώματος από το ένζυμο.



Σχήμα 5.2.12: Επιλεγμένη περιοχή (3,10-5,40 ppm) 1D ^1H φασμάτων NMR της μελέτης της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης που πραγματοποιείται στο σωληνάκι NMR στους 37°C για: **(α)** $t=0$ min, **(β)** $t=10$ min, **(γ)** $t=30$ min, **(δ)** $t=60$ min, **(ε)** $t=180$ min, **(στ)** $t=3\text{d}$, **(ζ)** $t=8\text{d}$ και **(η)** $t=10\text{d}$ αντίδρασης σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, $\text{pD}=3,5$ σε $100\% \text{D}_2\text{O}$.

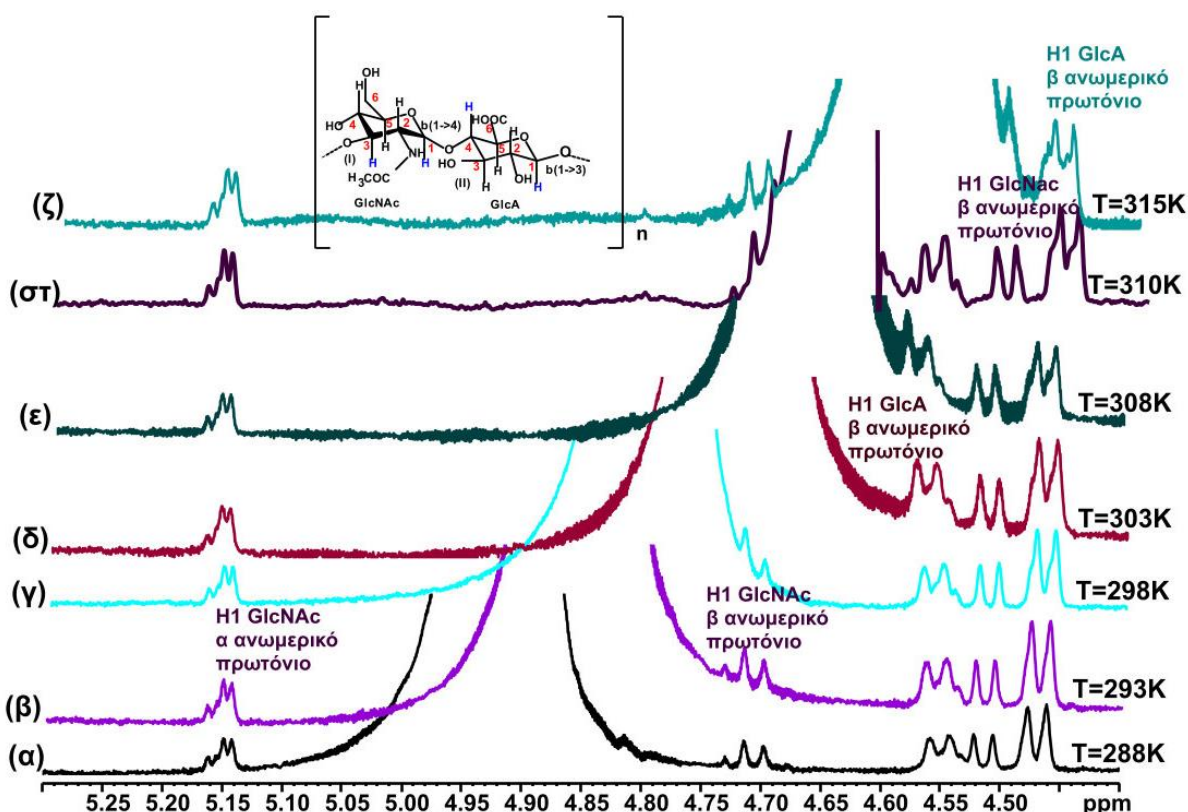
Η *in situ* μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης μπορεί να προσδιοριστεί και ποσοτικά. Η συνεχής αύξηση της έντασης των κορυφών στα φάσματα πρωτονίου NMR, προσδιορίστηκε υπολογίζοντας κάθε φορά το ολοκλήρωμα της αντίστοιχης κορυφής. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.2.13**, η ολοκλήρωση των κορυφών των χαρακτηριστικών ανωμερικών πρωτονίων με χημικές μετατοπίσεις 4,46 ppm, 4,53 ppm, 4,71 ppm, 5,16 ppm και 6,31 ppm, ήταν επιτυχής, ενώ παρατηρείται αύξηση του ολοκληρώματός τους, όσο εξελίσσεται η αντίδραση. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και από την ολοκλήρωση των κορυφών της περιοχής (3,30 -3,90 ppm) (**Σχήμα 5.2.13 β**), οι οποίες αυξάνονται σταδιακά. Ωστόσο, μετά τις 250h αντίδρασης, η αύξησή τους είναι μικρή, πλησιάζοντας πλατώ, δηλώνοντας τον κορεσμό της διάσπασης του υποστρώματος.



Σχήμα 5.2.13: (α) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής των ολοκληρωμάτων των κορυφών που αντιστοιχούν στα ανωμερικά πρωτόνια όσο εξελίσσεται η αντίδραση της υαλουρονιδάσης. (β) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής των ολοκληρωμάτων των κορυφών που αντιστοιχούν στα υπόλοιπα πρωτόνια των σακχαρούχων μονάδων του HA όσο εξελίσσεται η αντίδραση της υαλουρονιδάσης.

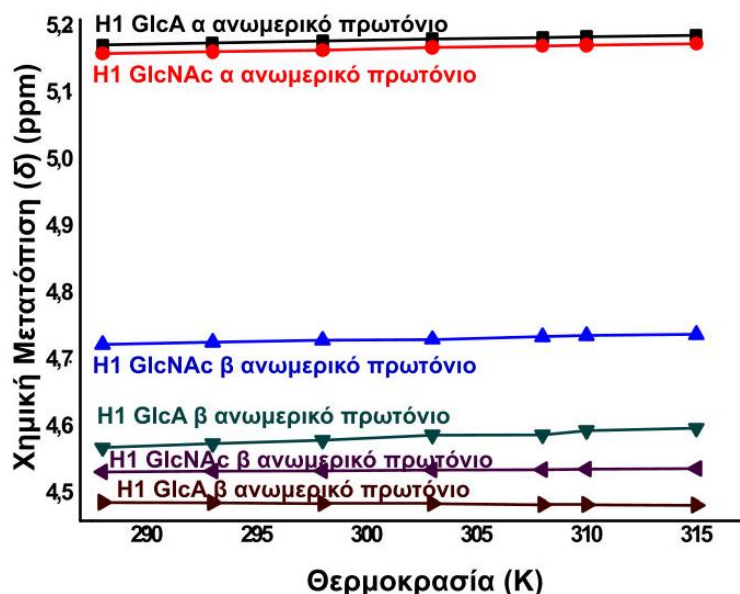
5.2.3.4 Ανωμερικά πρωτόνια ολιγοσακχαριτών υαλουρονικού οξέος: βελτιστοποίηση διαχωρισμού των κορυφών στα 1D ^1H φάσματα NMR

Ένα βασικό χαρακτηριστικό των ολιγοσακχαριτών που προκύπτουν από τη διάσπαση του HA κατά την ενζυμική αντίδραση, είναι ότι αποτελούνται από ελεύθερα ανωμερικά πρωτόνια, τα οποία εμφανίζονται σε χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στο φάσμα NMR, και κυρίως στην περιοχή 4,2-6,30 ppm. Λόγω της ευρείας κορυφής του νερού στην περιοχή αυτή, η διάκριση και ταυτοποίηση των ανωμερικών πρωτονίων είναι δύσκολη. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης σ' ένα εύρος θερμοκρασιών 15-40°C, προκειμένου να διαχωριστούν οι κορυφές των ανωμερικών πρωτονίων από την κορυφή του νερού. Προκειμένου να διερευνηθεί ο αριθμός των ελεύθερων ανωμερικών πρωτονίων που προκύπτουν, μελετήθηκε η αντίδραση της υαλουρονιδάσης που πραγματοποιήθηκε για 10 ημέρες στο σωληνάκι NMR (**Σχήμα 5.2.14**).



Σχήμα 5.2.14: Επιλεγμένη περιοχή (4,40-5,30 ppm) 1D ^1H φασμάτων NMR: των ανωμερικών πρωτονίων των ολιγοσακχαριτών που προκύπτουν από τη διάσπαση του HA από την υαλουρονιδάση, μετά από αντίδραση 10 ημερών, σε διαφορετικές θερμοκρασίες: **(α)** $T=288\text{K}$, **(β)** $T=293\text{K}$, **(γ)** $T=298\text{K}$, **(δ)** $T=303\text{K}$, **(ε)** $T=308\text{K}$, **(στ)** $T=310\text{K}$ και **(ζ)** $T=315\text{K}$, σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος, $0,1\text{M}$, $\text{pD}=3,5$, σε 100% διαλύτη D_2O .

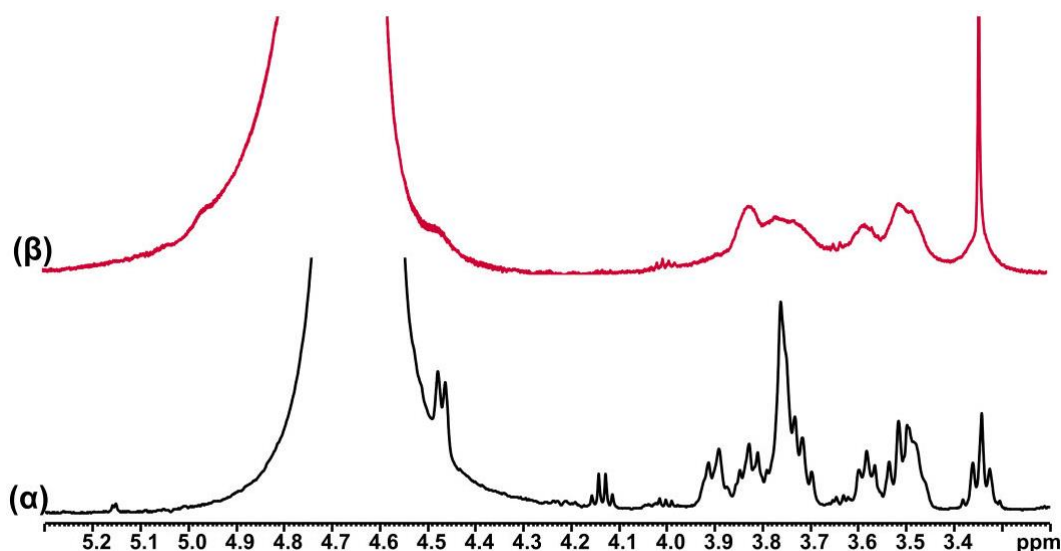
Όπως προκύπτει από τα πειράματα μεταβλητής θερμοκρασίας, υπάρχει μικρή μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία (**Σχήμα 5.2.14**). Όσο πιο χαμηλή είναι η θερμοκρασία, τόσο καλύτερος είναι ο διαχωρισμός των κορυφών στην περιοχή 4,50-4,70 ppm, από την κορυφή του νερού. Αντίθετα, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, οι κορυφές των ανωμερικών πρωτονίων που βρίσκονται στην περιοχή 4,50-4,70 ppm αλληλεπικαλύπτονται από την κορυφή του νερού, ενώ οι κορυφές στην περιοχή 5,10-5,20 ppm απομακρύνονται από την κορυφή του νερού. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, η βελτιστοποιημένη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης έγινε σε δύο θερμοκρασίες, στους 15°C και στους 37°C , προκειμένου να υπάρξει μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της εξέλιξης της ενζυμικής αντίδρασης και της ταυτοποίησης των ανωμερικών πρωτονίων που παράγονται.



Σχήμα 5.2.15: Γραφικές απεικονίσεις της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων των ανωμερικών πρωτονίων ως προς τη μεταβολή της θερμοκρασίας, όπως έχει προσδιοριστεί από τα 1D ^1H NMR φάσματα.

5.2.3.5 Ο ρόλος της BSA στην ενζυμική αντίδραση της υαλουρονιδάσης

Στον ανθρώπινο οργανισμό, η δράση της υαλουρονιδάσης ενισχύεται από την παρουσία πρωτεϊνών του πλάσματος.³²² Άλλες πρωτεΐνες που ενισχύουν τη δράση της υαλουρονιδάσης είναι η υαλουρονεκτίνη, η οποία αλληλεπιδρά και αυτή με το HA, η αιμογλοβίνη και οι ανοσοσφαιρίνες.^{323,324} Λόγω της ικανότητάς τους να ενισχύουν τη δράση της υαλουρονιδάσης, αυτές οι πρωτεΐνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ανίχνευσης της αυξημένης δράσης της υαλουρονιδάσης σε διάφορες παθολογικές περιπτώσεις. Από όλες τις πρωτεΐνες, η αλβουμίνη του πλάσματος (HSA) έχει αποδειχθεί πως ενισχύει περισσότερο τη δράση του ενζύμου,³²² για αυτό και η παρουσία της είναι σημαντική. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της συμμετοχής της αλβουμίνης εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την τιμή του pH και τη συγκέντρωση της υαλουρονιδάσης.³²⁵ Με βάση μελέτες που έχουν γίνει, η βέλτιστη δραστηριότητα της αλβουμίνης στην αντίδραση της υαλουρονιδάσης είναι σε συνθήκες pH=3,8, συγκέντρωση αλβουμίνης μεταξύ 0,02-0,2 g/L, ενώ σε αυτή την τιμή pH δεν επηρεάζεται καθόλου από τη συγκέντρωση της υαλουρονιδάσης.³²⁵ Το ισοηλεκτρικό σημείο της αλβουμίνης είναι μεταξύ PI=4,5-5,0, με αποτέλεσμα, στο pH της αντίδρασης της υαλουρονιδάσης (pH=3,8), η αλβουμίνη να φορτίζεται θετικά και να αναπτύσσει ισχυρές ηλεκτροστατικές δυνάμεις με τις αρνητικά φορτισμένες περιοχές του HA, αφήνοντας εκτεθειμένες τις περιοχές των δεσμευμένων β-1,4 σακχάρων στο HA, που κόβονται αποκλειστικά από την υαλουρονιδάση.³²⁵ Αυτό επιβεβαιώθηκε και με τη φασματοσκοπία NMR, όπου έγινε μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης παρουσία και απουσία της αλβουμίνης βοός (BSA). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι απουσία της BSA, δεν προχώρησε η διάσπαση του HA (**Σχήμα 5.2.16**).



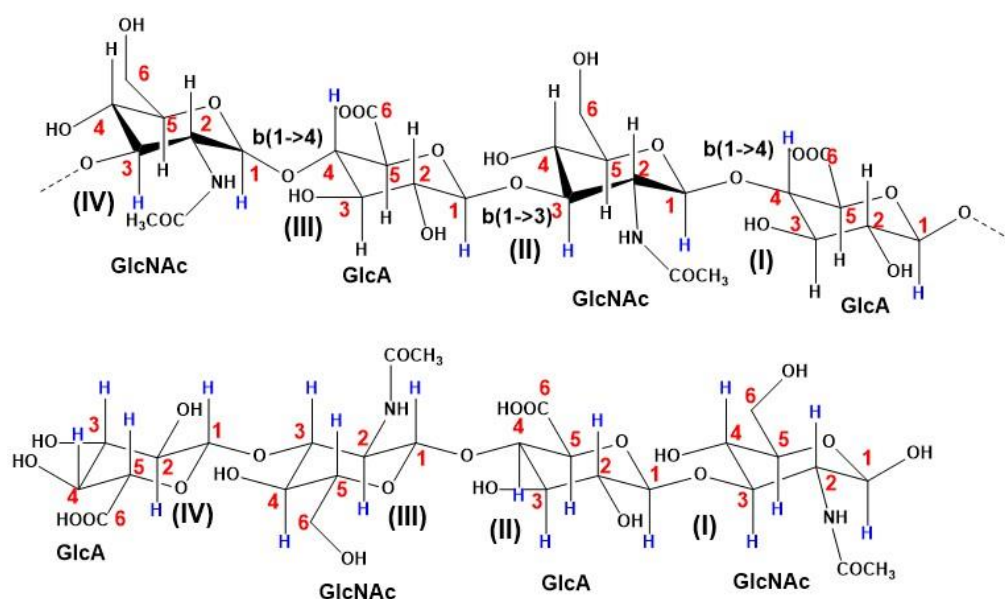
Σχήμα 5.2.16: Επιλεγμένη περιοχή (3,20-5,30 ppm) 1D ^1H φασμάτων NMR της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης με επώαση στο σωληνάκι NMR στους 37°C για 60 λεπτά (α) παρουσία BSA (β) απουσία BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος, pH=3,5, σε διαλύτη 100% D_2O .

Όπως φαίνεται και από τη σύγκριση των φασμάτων της αντίδρασης της υαλουρονιδάσης του **Σχήματος 5.2.16**, απουσία της BSA, το υποστρώμα δε διασπάται. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός, ότι, καθώς δε σχηματίζονται συμπλέγματα μεταξύ BSA- HA, η υαλουρονιδάση είναι πιθανό να αλληλεπιδρά και με τις περιοχές των σακχάρων που συνδέονται με β -1,3 δεσμούς, με αποτέλεσμα να μην παρουσιάζει δράση ως προς τη διάσπαση του υποστρώματος.

5.2.3.6 Ταυτοποίηση ολιγοσακχαριτών υαλουρονικού οξέος με εφαρμογή της μεθοδολογίας Selective 1D TOCSY NMR

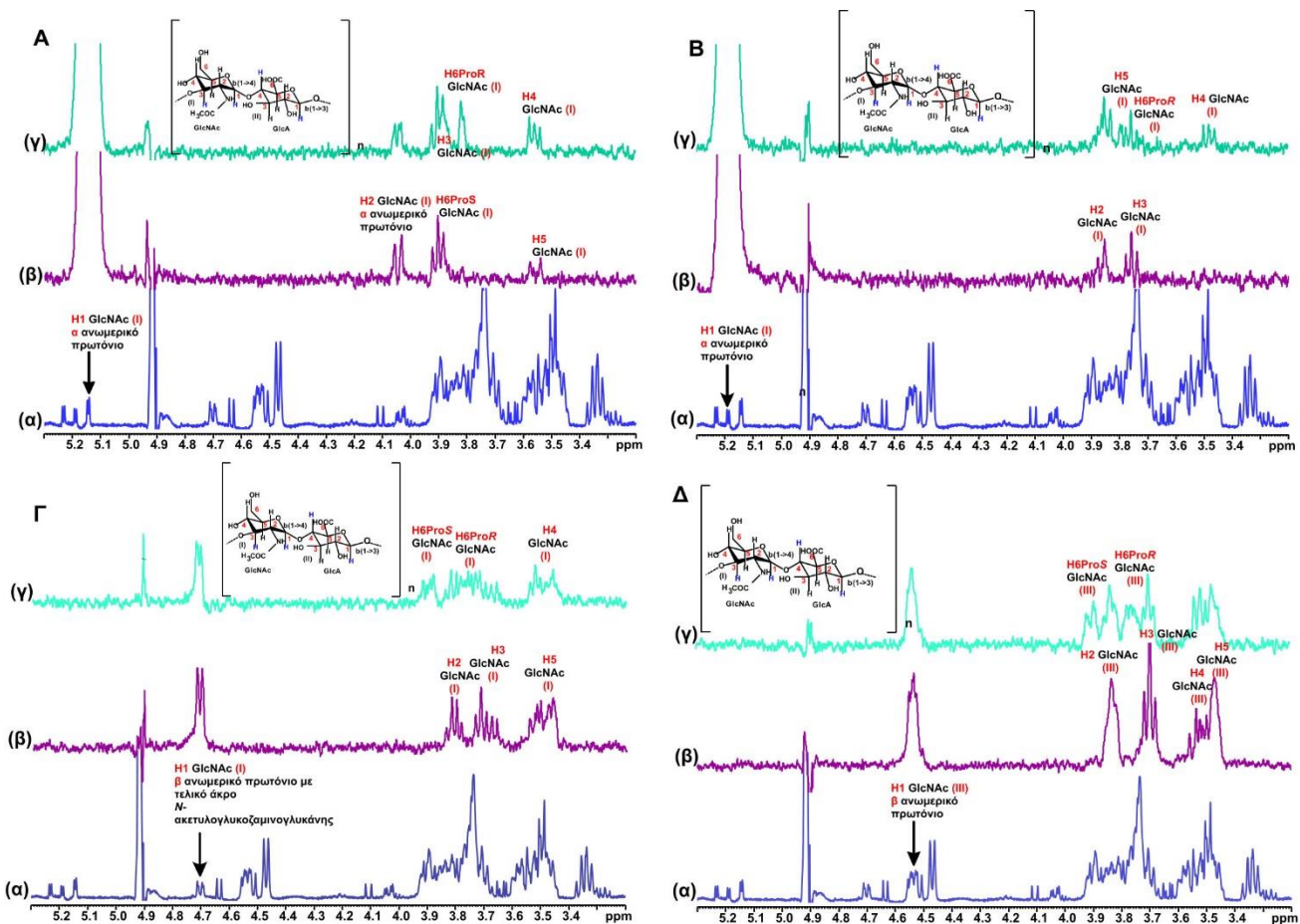
Η υαλουρονιδάση διασπά το HA σε ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από διαφορετικό αριθμό του ζεύγους των δισακχαριτών [D-γλυκουρονικού οξέος-N-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης]. Όσο προχωράει η διάσπαση του HA, προκύπτουν κυρίως μόρια εξασακχαριτών, τετρασακχαριτών και δισακχαριτών. Ο χαρακτηρισμός των ολιγοσακχαριτών του HA μπορεί να γίνει με εφαρμογή φασματοσκοπικών μεθόδων, και κυρίως με φασματοσκοπία NMR και IR. Με τη δράση του ενζύμου σε διαφορετικό χρόνο, το μοριακό βάρος, η δομή και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όπως είναι η διαλυτότητα και το ιξώδες του HA, ποικίλουν. Η διάσπαση των β -1,4 δεσμών του υποστρώματος οδηγεί σε μικρότερα μόρια με ελεύθερα τα ανωμερικά τους άκρα, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την αλληλουχία των δομικών σακχάρων και τη διαμόρφωσή τους. Η διαμόρφωση των παραγόμενων μορίων επηρεάζεται κυρίως από τις διάφορες δυναμικές κινήσεις που προκαλούνται στο υδατικό περιβάλλον της αντίδρασης, αλλά και από τα μόρια του νερού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχει διαφορά στις χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων των επιμέρους δομικών μορίων.³²⁶⁻³³⁰ Η μελέτη της αλληλουχίας των ολιγοσακχαριτών έχει μελετηθεί εκτεταμένα με διάφορες μεθοδολογίες όπως UV-Vis, IR, Raman, αλλά και με διάφορες μεθοδολογίες NMR και κυρίως ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC, και COSY, ενώ τα αμιδικά πρωτόνια των ολιγοσακχαριτών έχουν μελετηθεί και με πειράματα ^{15}N -NMR.^{326,331-337}

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε μελέτη της αλληλουχίας των ολιγοσακχαριτών που προκύπτουν με εφαρμογή του πειράματος Selective 1D TOCSY. Για το συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκαν κυρίως τα ανωμερικά πρωτόνια που έχουν “εμφανιστεί” όσο εξελίσσεται η αντίδραση, προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο ολιγοσακχαρίτης που παράγεται σε μεγαλύτερο ποσοστό. Μέσω του πειράματος Selective 1D TOCSY, γίνεται επιλεκτική διέγερση ενός πρωτονίου, η οποία μεταφέρεται εντός του συστήματος spin του συγκεκριμένου πρωτονίου. Με αυτόν τον τρόπο, μπορούν να “απομονωθούν” οι κορυφές για κάθε επιμέρους δομικό μόριο, από ολόκληρο το φάσμα πρωτονίου της ενζυμικής αντίδρασης. Το μειονέκτημα του συγκεκριμένου πειράματος είναι ότι η μεταφερόμενη μαγνήτιση του διεγερόμενου πρωτονίου της υπομονάδας του σακχάρου ενός δισακχαρίτη δεν μπορεί να μεταφερθεί στη δεύτερη υπομονάδα του σακχάρου, καθώς το σύστημα spin διακόπτεται από την παρουσία ενός ετεροατόμου (στην περίπτωση μας του οξυγόνου). Η υαλουρονιδάση από ιστό βοός παρουσιάζει κυρίως εκλεκτικότητα ως προς τη διάσπαση του HA σε μόρια τετρασακχαριτών, τα οποία αποτελούνται από την αλληλουχία του **Σχήματος 5.2.17**:



Σχήμα 5.2.17: Αλληλουχίες των παραγόμενων ολιγοσακχαριτών οι οποίοι προκύπτουν από τη δράση της υαλουρονιδάσης από ιστό βοός.

Λόγω της δομής των παραγόμενων προϊόντων, τόσο τα ελεύθερα α και β ανωμερικά πρωτόνια των άκρων, όσο και τα ενδιάμεσα πρωτόνια είναι δυνατό να εμφανιστούν σε συγκεκριμένες χημικές μετατοπίσεις. Επομένως, επιλέχθηκαν για διέγερση κυρίως οι κορυφές των ελεύθερων ανωμερικών πρωτονίων των παραγόμενων ολιγοσακχαριτών, προκειμένου να ταυτοποιηθούν τα επιμέρους κλάσματα του κάθε ολιγοσακχαρίτη. Το πείραμα Selective 1D TOCSY εφαρμόστηκε στην ενζυμική αντίδραση μετά από επώαση για 10 ημέρες, ενώ επιλέχθηκε η θερμοκρασία των 15°C, όπου γίνεται καλύτερη διάκριση των κορυφών των ανωμερικών πρωτονίων (**Σχήμα 5.2.18** και **Σχήμα 5.2.19**).



Σχήμα 5.2.18: A-Δ: Επιλεγμένη περιοχή (3,20-4,30 ppm): (α) 1D ^1H NMR φάσματος της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M, pH=3,5, μετά από χρονικό διάστημα 10 ημερών στο σωληνάκι NMR. Τα βέλη δηλώνουν τις κορυφές των πρωτονίων στα οποία εφαρμόστης επιλεκτική διέγερση σε κάθε περίπτωση: **(A) 5,15 ppm: (β)** Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 80 ms, **(γ)** Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 200 ms, **B: 5,19 ppm: (β)** Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 80 ms, **(γ)** Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 200 ms, **Γ: 4,71 ppm: (β)** Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 80 ms, **(γ)** Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 200 ms, **Δ: 4,55 ppm (β)** Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 80 ms, **(γ)** Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 200 ms.

Το πείραμα επιλεκτικής διέγερσης Selective 1D TOCSY, αποτελεί ένα αρκετά χρήσιμο εργαλείο για την ταυτοποίηση μορίων, ή υπομονάδων μορίων που βρίσκονται σ' ένα πολύπλοκο μείγμα, όπως για παράδειγμα, μία ενζυμική αντίδραση. Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 5.2.18** διεγείροντας διαφορετικά πρωτόνια, εμφανίζεται το χαρακτηριστικό σύστημα spin στο οποίο αντιστοιχεί το μελετούμενο πρωτόνιο.

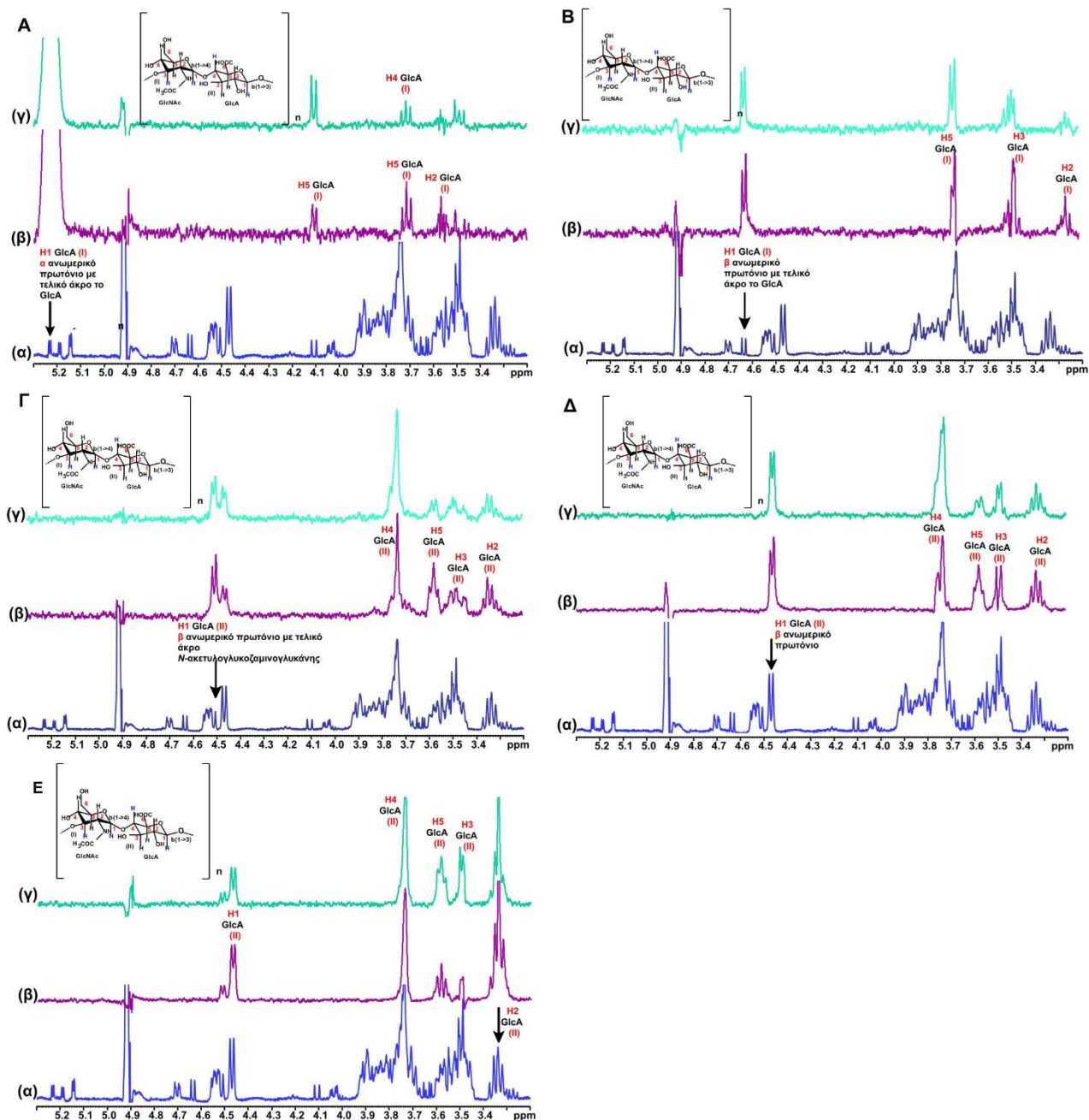
Εφαρμόζοντας επιλεκτική διέγερση στη διπλή κορυφή (d, $J=2,86$ Hz) στα 5,15 ppm (**Σχήμα 5.2.18 A**) που ανήκει στο α-αξονικό H1 ανωμερικό πρωτόνιο της υπομονάδας *N*-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης (GlcNAc), η οποία, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα αντιστοιχεί στο πρώτο δομικό σάκχαρο της αλληλουχίας του σχηματιζόμενου ολιγοσακχαρίτη, με χρόνο ανάμειξης ίσο με 80 ms, εμφανίζεται το σύστημα spin αυτού του πρωτονίου, το οποίο αποτελείται από τις εξής κορυφές: 4,03 ppm (d) που αντιστοιχεί στο H2 πρωτόνιο της υπομονάδας GlcNAc, 3,90 ppm (t), το οποίο αντιστοιχεί στο H6proS πρωτόνιο, καθώς και στα 3,57 ppm η οποία αντιστοιχεί στο H5 πρωτόνιο του μορίου. Αυξάνοντας τον χρόνο ανάμειξης στα 200 ms, εμφανίζεται στα 3,88 ppm η κορυφή του H3 πρωτονίου της υπομονάδας GlcNAc, αλλά και το πρωτόνιο H6ProR (3,82 ppm). Τέλος, στα 3,57 ppm εμφανίζεται και κορυφή του H4

πρωτονίου του μορίου, “ξετυλίγοντας” με αυτόν τον τρόπο όλο το σύστημα spin αυτού του δομικού σακχάρου.

Δεύτερη κορυφή που διεγέρθηκε επιλεκτικά είναι η διπλή κορυφή (d, $J=3,07$ Hz) στα 5,19 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο α-αξονικό πρωτόνιο H1 της υπομονάδας GlcNAc, η οποία αποτελεί το πρώτο δομικό μόριο του ολιγοσακχαρίτη με ελεύθερο άκρο την υπομονάδα GlcNAc (**Σχήμα 5.2.18 Β**). Εφαρμόζοντας το πείραμα Selective 1D TOCSY αρχικά με χρόνο διέγερσης ίσο με 80 ms, εμφανίζονται τα πρωτόνια που βρίσκονται σε κοντινή απόσταση με το H1 πρωτόνιο: το H2 πρωτόνιο της GlcNAc στα 3,84 ppm και το H6proR πρωτόνιο στα 3,76 ppm. Αυτές οι χημικές μετατοπίσεις είναι χαρακτηριστικές για το μόριο της GlcNAc που βρίσκεται δεύτερο στην αλληλουχία του παραγόμενου ολιγοσακχαρίτη. Αυξάνοντας το χρόνο ανάμειξης στα 200 ms, εμφανίζεται και το υπόλοιπο spin σύστημα αυτού του πρωτονίου, με τις κορυφές στα 3,79 ppm και 3,66 ppm που αντιστοιχούν στα H3 και H2 πρωτόνια της υπομονάδας GlcA του πρώτου μορίου της αλληλουχίας του ολιγοσακχαρίτη. Επίσης, εμφανίζεται και η χαρακτηριστική τριπλή κορυφή στα 3,47 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο H5 πρωτόνιο της υπομονάδας GlcNAc που βρίσκεται δεύτερο στην αλληλουχία του ολιγοσακχαρίτη.

Επόμενο πρωτόνιο που διεγέρθηκε επιλεκτικά είναι το β ανωμερικό πρωτόνιο H1 του μορίου της GlcNAc με ελεύθερο άκρο, η οποία αποτελεί το πρώτο δομικό μόριο της αλληλουχίας του σχηματιζόμενου ολιγοσακχαρίτη στα 4,71 ppm (**Σχήμα 5.2.18 Γ**). Εφαρμόζοντας αρχικά το πείραμα με χρόνο ανάμειξης ίσο με 80 ms, εμφανίζεται η κορυφή του H2 πρωτονίου στα 3,80 ppm, του H3 πρωτονίου στα 3,71 ppm, του H4 πρωτονίου στα 3,51 ppm και του H5 πρωτονίου στα 3,47 ppm. Αυξάνοντας το χρόνο ανάμειξης στα 200 ms, εμφανίζονται και οι χαρακτηριστικές κορυφές των πρωτονίων H6proS και H6proR στα 3,91 ppm και 3,75 ppm αντίστοιχα.

Στην περιοχή 4,50-4,55 ppm εμφανίζονται τρεις διπλές κορυφές (d) στη σειρά, η κάθε μία από τις οποίες αντιστοιχεί σ’ ένα από τα H1 β ανωμερικά πρωτόνια της υπομονάδας της N-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης που αποτελεί το τρίτο δομικό μόριο στην αλληλουχία του σχηματιζόμενου ολιγοσακχαρίτη. Εφαρμόζοντας το πείραμα Selective 1D TOCSY με διέγερση της διπλής κορυφής στα 4,55 ppm (d, $J=5,47$ Hz) (**Σχήμα 5.2.18 Δ**) με χρόνο ανάμειξης 80 ms, εμφανίζονται αρχικά μία κορυφή στα 3,85 ppm, που αντιστοιχεί στο H2 πρωτόνιο του μορίου, μία στα 3,70 ppm, που αντιστοιχεί στο H3 πρωτόνιο του μορίου, ενώ εμφανίζονται επίσης κορυφές στα 3,54 ppm (H4 πρωτόνιο) και στα 3,45 ppm (H5 πρωτόνιο). Με εφαρμογή μεγαλύτερου χρόνου ανάμειξης (200 ms), εμφανίζεται η κορυφή στα 3,90 ppm που αντιστοιχεί στο H6ProS πρωτόνιο του μορίου. Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι με χρόνο ανάμειξης 200 ms, εμφανίζεται και η κορυφή στα 3,76 ppm. Δεδομένου ότι στην περιοχή αυτή υπάρχουν και άλλα ανωμερικά πρωτόνια, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να μεταφέρθηκε μαγνήτιση και σε κάποιο άλλο σύστημα spin ενός άλλου πρωτονίου.



Σχήμα 5.2.19: A-E: Επιλεγμένη περιοχή (3,20-4,30 ppm): (α) 1D ^1H NMR φάσματος της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M, pH=3,5, μετά από χρονικό διάστημα 10 ημερών στο σωληνάκι NMR. Τα βέλη δηλώνουν τις κορυφές των των πρωτονίων στα οποία εφαρμόστηκε επιλεκτική διέγερση σε κάθε περίπτωση: **(A) 5,23 ppm: (β) Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 80 ms, (γ) Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 200 ms, **B: 4,62 ppm:** (β) Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 80 ms, (γ) Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 200 ms, **Γ: 4,50 ppm** (β) Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 80 ms, (γ) Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 200 ms, **Δ: 4,46 ppm:** (β) Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 80 ms, (γ) Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 200 ms, **E: 3,34 ppm:** (β) Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 80 ms, (γ) Selective 1D TOCSY φάσμα με χρόνο ανάμειξης 200 ms.**

Το πείραμα Selective 1D TOCSY συνεχίστηκε με διέγερση της διπλής κορυφής (d, $J=4,28$ ppm) στα 5,23 ppm (**Σχήμα 5.2.19 A**), η οποία αντιστοιχεί στο H1 ανωμερικό πρωτόνιο της υπομονάδας GlcA του πρώτου δομικού μορίου της αλληλουχίας του ολιγοσακχαρίτη. Εφαρμόζοντας αρχικά χρόνο ανάμειξης ίσο με 80 ms, εμφανίζονται οι εξής χημικές μετατοπίσεις: 4,09 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο H5 πρωτόνιο, 3,71 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο H4 πρωτόνιο,

και 3,56 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο H2 πρωτόνιο. Αυξάνοντας τον χρόνο διέγερσης στα 200 ms, εμφανίζεται και η κορυφή του H4 πρωτονίου στα 3,50 ppm.

Στη συνέχεια, διεγέρθηκε επιλεκτικά η διπλή κορυφή στα 4,62 ppm ($d, J=7,64$ Hz) (**Σχήμα 5.2.19 Β**), η οποία αντιστοιχεί στο β H1 ανωμερικό πρωτόνιο της υπομονάδας GlcA του πρώτου δομικού μορίου της αλληλουχίας του ολιγοσακχαρίτη που έχει την υπομονάδα GlcA στο ελεύθερο τελικό του άκρο. Εφαρμόζοντας αρχικά χρόνο ανάμειξης ίσο με 80 ms, εμφανίζεται το αντίστοιχο spin σύστημα, το οποίο αποτελείται από μία διπλή κορυφή στα 3,75 ppm που αντιστοιχεί στο H5 πρωτόνιο, στα 3,49 ppm που ανήκει στο πρωτόνιο H3, αλλά και η χαρακτηριστική τριπλή κορυφή στα 3,27 ppm η οποία αντιστοιχεί στο H2 πρωτόνιο. Αυξάνοντας το χρόνο διέγερσης στα 200 ms, βλέπουμε πιο ευδιάκριτη την κορυφή στα 3,49 ppm, ενώ έχει εμφανιστεί και η κορυφή στα 3,52 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο H4 πρωτόνιο αυτής της υπομονάδας.

Στη συνέχεια επιλέχθηκε για διέγερση η διπλή κορυφή στα 4,50 ppm ($d, J=7,40$ Hz), η οποία αντιστοιχεί στο β ανωμερικό H1 πρωτόνιο της υπομονάδας GlcA, η οποία αποτελεί το δεύτερο δομικό μόριο της αλληλουχίας που ανήκει σε ολιγοσακχαρίτη με ελεύθερη *N*-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνη στο τελικό άκρο (**Σχήμα 5.2.19 Γ**). Με εφαρμογή χρόνου ανάμειξης ίσο με 80 ms, εμφανίζεται μεν η κορυφή στα 4,46 ppm, που ανήκει στο β ανωμερικό H1 πρωτόνιο, αλλά υπάρχει το ενδεχόμενο να εμφανίστηκε λόγω αλληλεπικάλυψης των κορυφών. Εμφανίζονται επίσης οι κορυφές στα 3,74 ppm, στα 3,58 ppm, στα 3,48 ppm και στα 3,34 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια H4, H5, H3, και H2 αντίστοιχα.

Εφαρμόζοντας, έπειτα το πείραμα στη διπλή κορυφή ($d, J=7,5$ Hz) στα 4,46 ppm η οποία ανήκει στο β H1 ανωμερικό πρωτόνιο της υπομονάδας GlcA, του δεύτερου δομικού μορίου της αλληλουχίας του ολιγοσακχαρίτη (**Σχήμα 5.2.19 Δ**), με χρόνο ανάμειξης ίσο με 80 ms, ξεδιπλώνεται το σύστημα spin αυτού του πρωτονίου, με την εμφάνιση κορυφών στα 3,75 ppm, 3,74 ppm, 3,58 ppm, 3,49 ppm και τη χαρακτηριστική τριπλή κορυφή στα 3,34 ppm. Στα 3,58 ppm εμφανίζεται το H3 πρωτόνιο του μορίου, ενώ η τριπλή κορυφή στα 3,34 ppm αντιστοιχεί στο H2 πρωτόνιο του μορίου. Στα 3,75 ppm και 3,74 ppm εμφανίζονται οι κορυφές των πρωτονίων των H4 και H5 αντίστοιχα.

Στα 3,34 ppm εμφανίζεται η χαρακτηριστική κορυφή που αντιστοιχεί στο H2 πρωτόνιο της υπομονάδας GlcA, η οποία αποτελεί τρίτο δομικό μόριο της αλληλουχίας του ολιγοσακχαρίτη (**Σχήμα 5.2.19 Ε**). Με εφαρμογή χρόνου ανάμειξης ίσο με 80 ms εμφανίζονται οι κορυφές που έχουν χημικές μετατοπίσεις στα 3,58 ppm (H3 πρωτόνιο), 3,73 ppm (H4 πρωτόνιο), 4,46 ppm (β ανωμερικό H1 πρωτόνιο) και 4,51 ppm (H5 πρωτόνιο) του μορίου.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα του πειράματος Selective ID TOCSY, διεγείροντας επιλεκτικά τα ανωμερικά πρωτόνια των ελεύθερων άκρων των παραγόμενων ολιγοσακχαριτών, μπορούν να διαχωριστούν οι κορυφές κάθε δομικού μορίου που έχει διαφορετική θέση στην αλληλουχία των ολιγοσακχαριτών. Το γεγονός αυτό αποτελεί πλεονέκτημα αυτής της μεθοδολογίας, καθώς μπορεί να γίνει διάκριση των δομικών μορίων των παραγόμενων ολιγοσακχαριτών, απευθείας μέσα στο μείγμα της ενζυμικής αντίδρασης, χωρίς να προηγηθεί κάποιο στάδιο διαχωρισμού των συστατικών του. Τα αποτελέσματα αυτού του

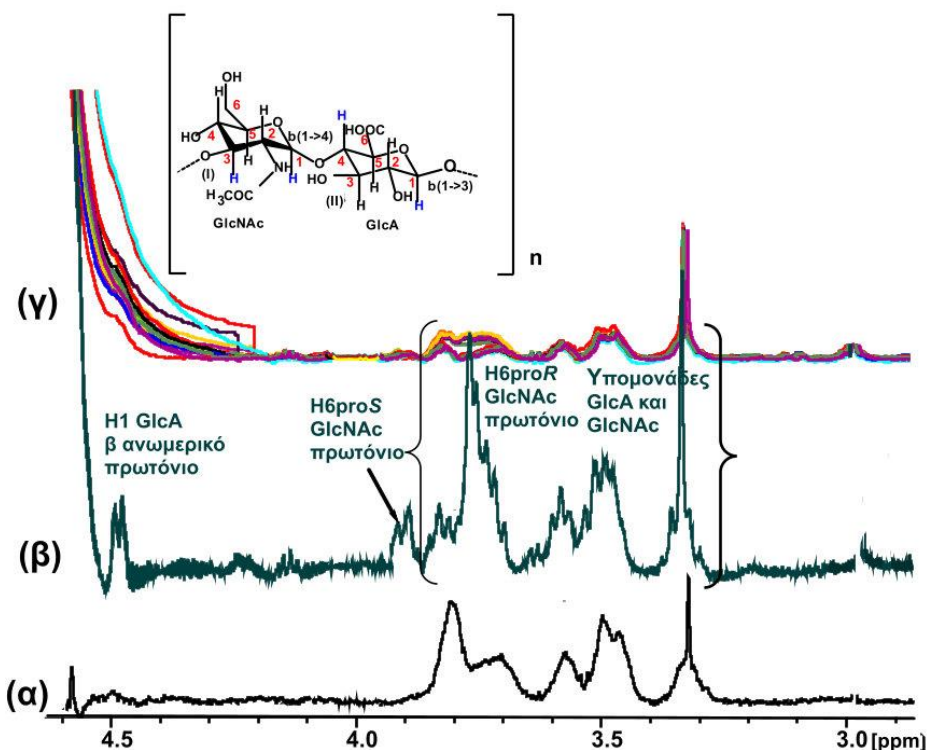
πειράματος συμφωνούν και με το αντίστοιχο πείραμα 2D ^1H - ^1H TOCSY που πραγματοποιήθηκε για την επιβεβαίωση των συζεύξεων των πρωτονίων.

5.2.3.7 Αποτελέσματα από την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη αναστολής της υαλουρονιδάσης από φυσικό προϊόν και φυτικό εκχύλισμα

5.2.3.7.1 NMR-Cosmetube: μελέτη αναστολής της υαλουρονιδάσης από φυσικό προϊόν

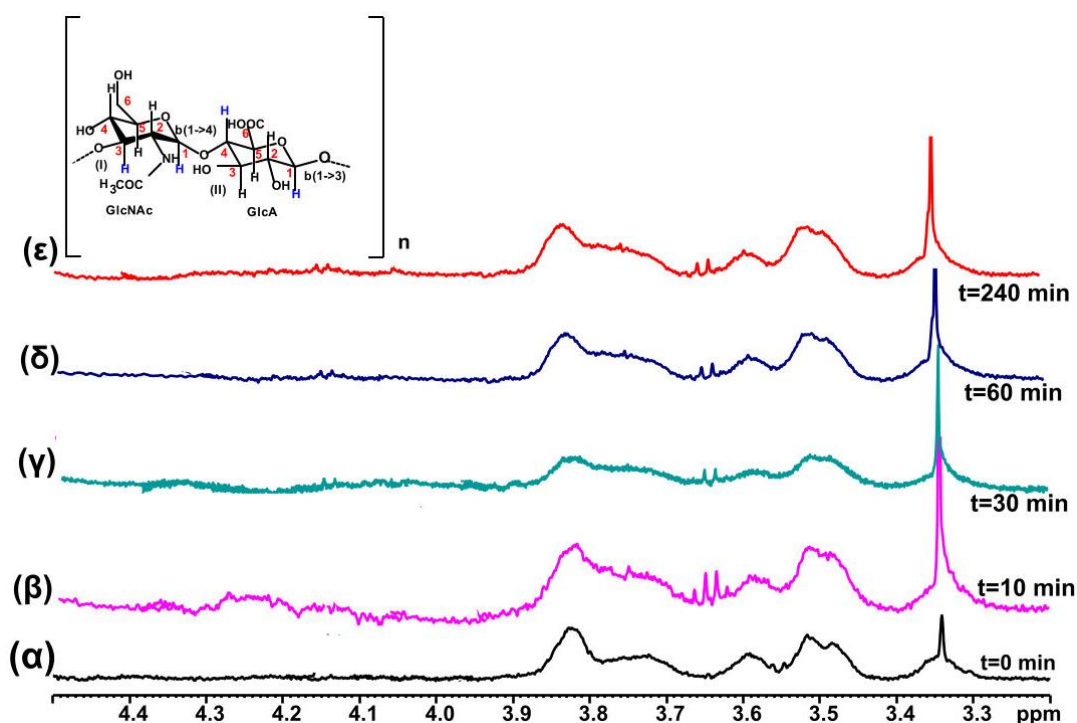
Στα πλαίσια της ανάπτυξης της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης, σε επόμενο βήμα έγινε μελέτη της αναστολής της από τον φυσικό αναστολέα ροσμαρινικό οξύ, που, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, βρίσκεται σε αφθονία σε αρκετά φυτά όπως στα *Melissa Officinalis*, *Salvia Officinalis*, *Rosmarinus Officinalis*, *Thymus Vulgaris*, *Origanum Vulgare*, ενώ έχει αποδειχθεί ότι είναι πολύ καλός αναστολέας της υαλουρονιδάσης.^{321,338,339} Στα πειράματα αναστολής της υαλουρονιδάσης με φασματοσκοπία UV στην παρούσα διδακτορική διατριβή, το ροσμαρινικό οξύ έδειξε πολύ καλή αναστολή στην υαλουρονιδάση με $\text{IC}_{50}=13.67 \mu\text{g/mL}$.

Για την εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για την αναστολή της υαλουρονιδάσης, αρχικά μελετήθηκε η κινητική της αντίδρασης παρουσία 100 $\mu\text{g/mL}$ ροσμαρινικού οξέος. Για το σκοπό αυτό, 100 $\mu\text{g/mL}$ ροσμαρινικού οξέος επωάστηκαν με την υαλουρονιδάση σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, 0,1M, $\text{pD}=3,5$, στους 37°C, σε σωληνάριο Eppendorf των 1.5 mL, σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα, υπό έντονη ανάδευση για 10 λεπτά. Μετά τα δέκα λεπτά, προστέθηκε το διάλυμα HA, το δείγμα μεταφέρθηκε σε σωληνάκι NMR και καταγράφηκε η κινητική της αντίδρασης στους 37°C, για χρονικό διάστημα 0-4 ωρών (Σχήμα 5.2.20 και 5.2.21).



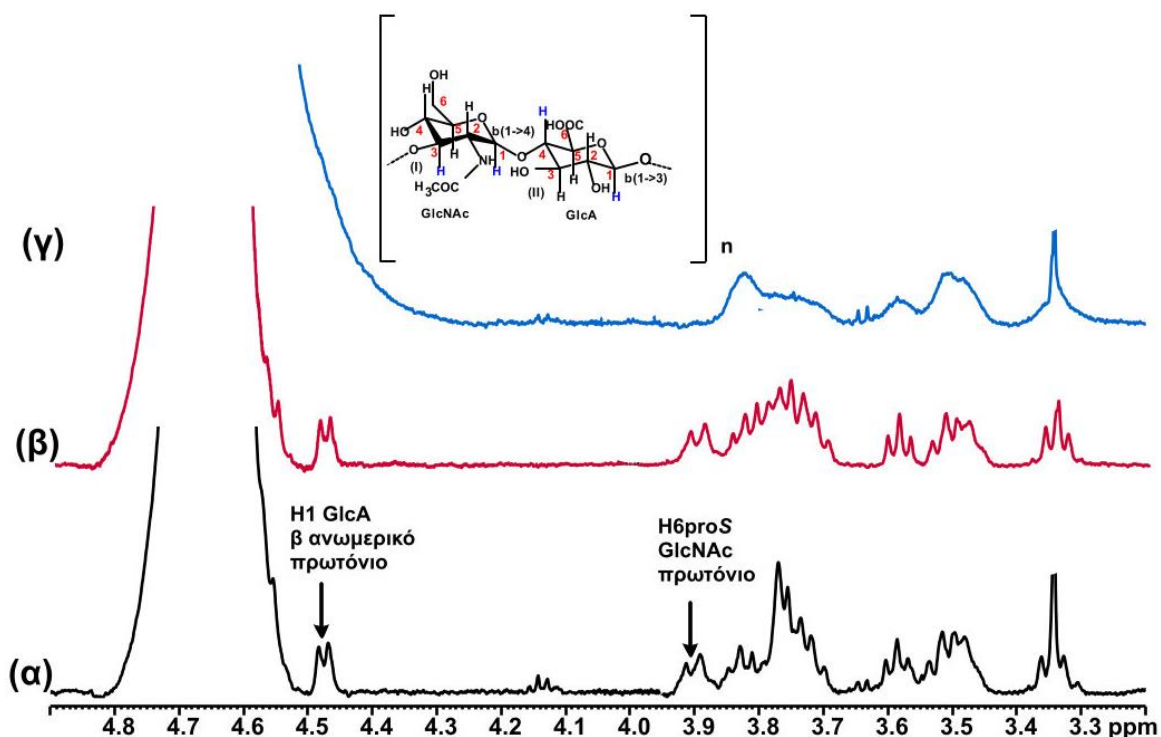
Σχήμα 5.2.20: Επιλεγμένη περιοχή (2.90-4.60 ppm) 1D ^1H φασμάτων NMR: (α) του υποστρώματος HA, (β) της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης μετά από χρονικό διάστημα 60 λεπτών, (γ) αλληλεπικάλυψη φασμάτων της αντίδρασης της αναστολής της υαλουρονιδάσης από 100 $\mu\text{g/mL}$ ροσμαρινικού οξέος με επώαση στο σωληνάκι NMR σε χρονικό διάστημα 0-4 ωρών, σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M, $\text{pD}=3,5$, σε 100% διαλύτη D_2O .

Όπως παρατηρείται στο **Σχήμα 5.2.20**, παρουσία 100 µg/mL ροσμαρινικού οξέος το ποσοστό διάσπασης του υποστρώματος είναι πολύ μικρό, ακόμη και μετά από χρόνο αντίδρασης 4h. Η χαρακτηριστική κορυφή του H₆proS πρωτονίου του μορίου της *N*-ακετυλο-γλυκοζαμινογλυκάνης στα 3,90 ppm εμφανίζεται με πολύ μικρή ένταση, ενώ και ο διαχωρισμός των κορυφών στην περιοχή 3,30-3,90 ppm είναι πολύ μικρός. Αυτό επιβεβαιώνει την ανασταλτική δράση του ροσμαρινικού οξέος ως προς την υαλουρονιδάση. Η ελάχιστη μεταβολή του σχήματος των κορυφών της περιοχής 3,30-3,90 ppm, στο χρονικό διάστημα 0-240 min, φαίνεται και στο **Σχήμα 5.2.21**, όπου, παρουσία 100 µg/mL ροσμαρινικού οξέος δε διασπάται το HA.



Σχήμα 5.2.21: Επιλεγμένη περιοχή (3,20-4,50 ppm) 1D ¹H φασμάτων NMR της κινητικής της αναστολής της υαλουρονιδάσης από 100 µg/mL ροσμαρινικού οξέος, με επώαση στο σωληνάκι NMR στους 37°C για: (α) t= 0 min, (β) t= 10 min, (γ) t= 30 min, (δ) t=60 min, (ε) t=240 min σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, ρD=3,5 σε 100% D₂O.

Προκειμένου να διερευνηθεί ο βαθμός της αναστολής της υαλουρονιδάσης, παρουσία διαφορετικής συγκέντρωσης αναστολέα, με τη μεθοδολογία NMR-Cosmetube, μελετήθηκε και η αναστολή της υαλουρονιδάσης παρουσία 10 µg/mL ροσμαρινικού οξέος. Πραγματοποιήθηκε επώαση του μείγματος υαλουρονιδάση-ροσμαρινικό οξύ στους 37°C για 10 min, στη συνέχεια προστέθηκε το υπόστρωμα και η αντίδραση επώαστηκε για 60 min στους 37°C. Στη συνέχεια, το δείγμα μεταφέρθηκε σε σωληνάκι NMR και λήφθηκε το αντίστοιχο φάσμα πρωτονίου. Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 5.2.22 β**, παρουσία 10 µg/mL ροσμαρινικού οξέος, η διάσπαση του υποστρώματος πραγματοποιείται κανονικά, αλλά σε μικρότερο βαθμό, όπως προκύπτει από τα ολοκληρώματα των κορυφών στα 3,90 ppm (H₆proS πρωτόνιο της υπομονάδας GlcNAc) και στα 4,50 ppm (H1 πρωτόνιο της υπομονάδας GlcA). Στη συγκέντρωση αυτή, η υαλουρονιδάση βρίσκεται στο 72,00% της δραστηρότητάς της (**Πίνακας 5.2.3**). Αντίθετα, παρουσία 100 µg/mL ροσμαρινικού οξέος η ένταση της κορυφής του H₆proS πρωτονίου είναι πάρα πολύ μικρή, ενώ όπως προέκυψε από τον υπολογισμό των αντίστοιχων ολοκληρωμάτων, η δραστηρότητα της υαλουρονιδάσης παρουσία 100 µg/mL ροσμαρινικού οξέος βρίσκεται στο 4,00% (**Πίνακας 5.2.3**).



Σχήμα 5.2.22: Επιλεγμένη περιοχή (3,20-4,90 ppm) 1D ¹H φασμάτων NMR: (α) της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης μετά από χρονικό διάστημα 60 λεπτών, (β) της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης με επώαση με ροσμαρινικό οξύ συγκέντρωσης 10 μg/mL, μετά από χρονικό διάστημα 60 λεπτών, (γ) της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης με επώαση με ροσμαρινικό οξύ συγκέντρωσης 100 μg/mL, μετά από χρονικό διάστημα 60 λεπτών σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M, pH=3,5, σε 100% διαλύτη D₂O.

Πίνακας 5.2.3: Τιμές ανασταλτικής δράσης ροσμαρινικού οξέος ως προς την υαλουρονιδάση, όπως προέκυψε από τη μελέτη με φασματοσκοπία 1D ¹H NMR.

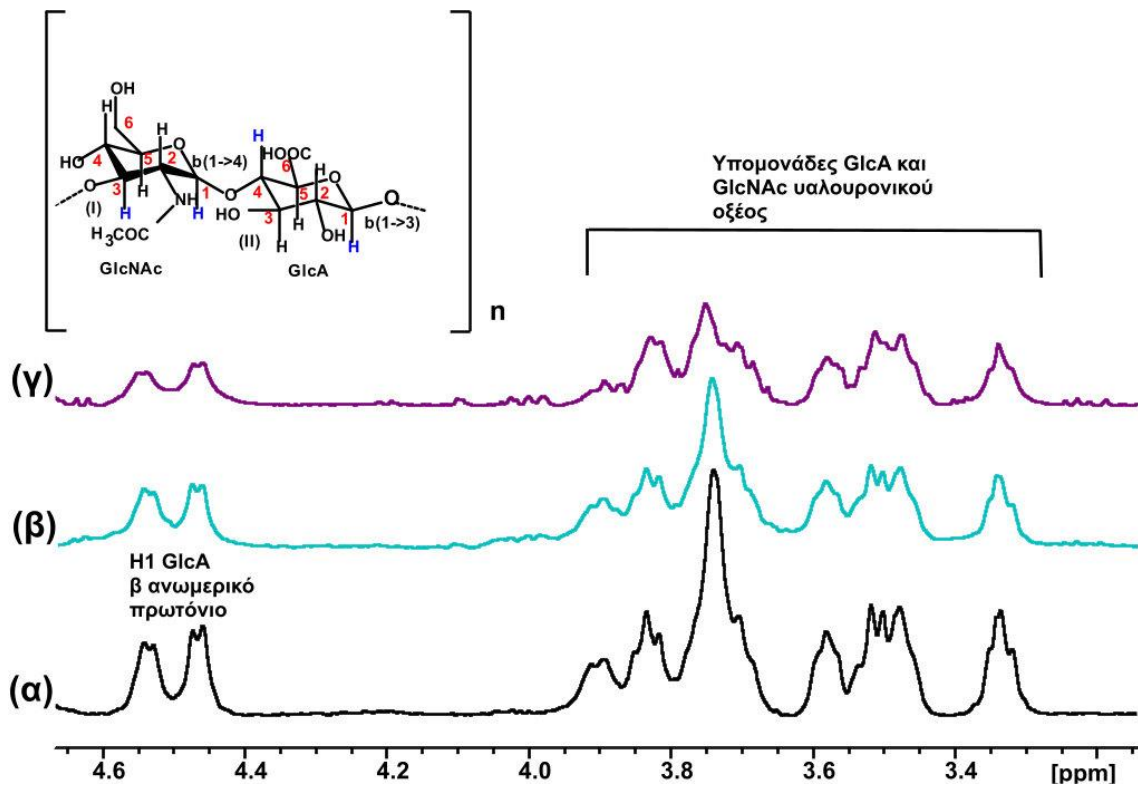
Συγκέντρωση ροσμαρινικού οξέος (μg/mL)	Αντίδραση Υαλουρονιδάσης [H6proS GlcNAc πρωτόνιο]	Αναστολή Υαλουρονιδάσης [H6proS GlcNAc πρωτόνιο]	% Δραστικότητα	% Αναστολή
10	2,2754	1,6382	72	28
100	2,2754	0,091	4	96

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την αποτελεσματική λειτουργία της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της δράσης και αναστολής της υαλουρονιδάσης με φυσικό αναστολέα.

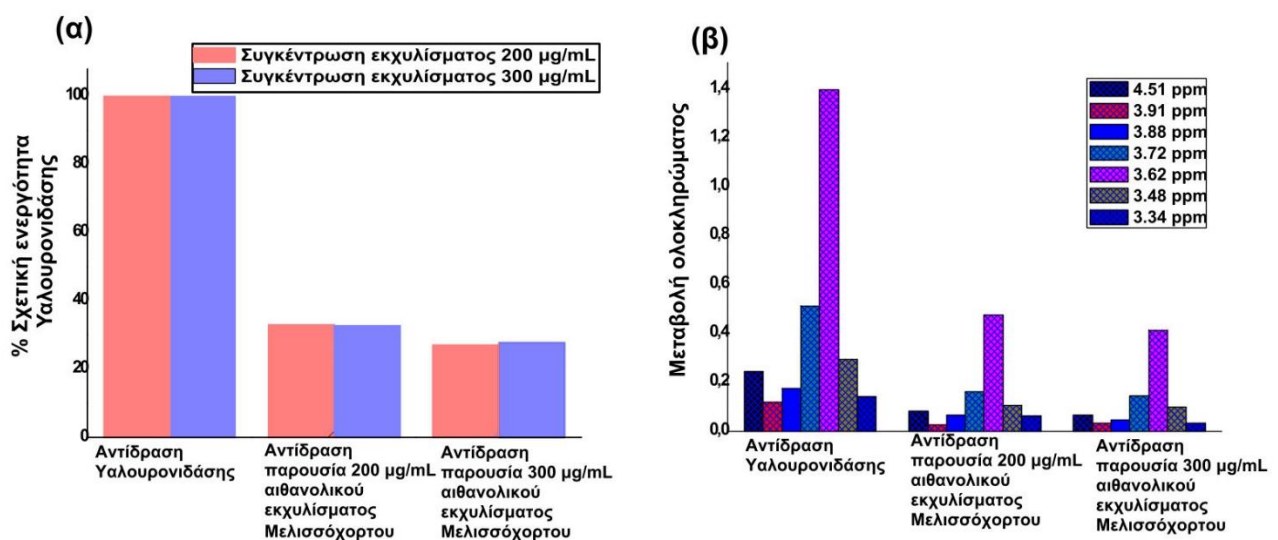
5.2.3.7 NMR-Cosmetube: μελέτη της αναστολής της υαλουρονιδάσης από το φυτικό εκχύλισμα

Στα πλαίσια της ανάπτυξης της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube, μελετήθηκε η ενζυμική αντίδραση της υαλουρονιδάσης παρουσία φυτικού εκχυλίσματος. Για να επιτευχθεί αυτό, εφαρμόστηκαν οι ίδιες συνθήκες που εφαρμόστηκαν και για τη μελέτη της αναστολής της υαλουρονιδάσης με φασματοσκοπία UV. Αρχικά, προηγήθηκε προεπώαση της υαλουρονιδάσης με αιθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου, στους 37°C, για δέκα λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκε

στο μείγμα το διάλυμα της αλβουμίνης βοός και του υποστρώματος HA, και το μείγμα επωάστηκε στους 37°C για 60 λεπτά, σε θερμοστατούμενο όργανο υπό συνεχή ανάδευση. Μετά τη μία ώρα, το μείγμα μεταφέρθηκε σ' ένα σωληνάκι NMR, και ακολούθησε καταγραφή του φάσματος πρωτονίου. Ως control, χρησιμοποιήθηκε η ενζυμική αντίδραση της υαλουρονιδάσης, χωρίς την παρουσία κάποιου αναστολέα. Το εκχύλισμα δοκιμάστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Σχήμα 5.2.23).



Σχήμα 5.2.23: Επιλεγμένη περιοχή (3,20-4,70 ppm) 1D ¹H φασμάτων NMR: (α) της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης, (β) της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου σε συγκέντρωση 200 μg/mL (γ) της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου σε συγκέντρωση 300 μg/mL.



Σχήμα 5.2.24: (α) Γραφική απεικόνιση της % σχετικής ενεργότητας της υαλουρονιδάσης παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου συγκέντρωσης 200 μg/mL και 300 μg/mL, (β) Γραφική απεικόνιση της μεταβολής των ολοκληρωμάτων των χαρακτηριστικών κορυφών που μεταβάλλονται κατά την ενζυμική αντίδραση παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου συγκέντρωσης 200 μg/mL και 300 μg/mL.

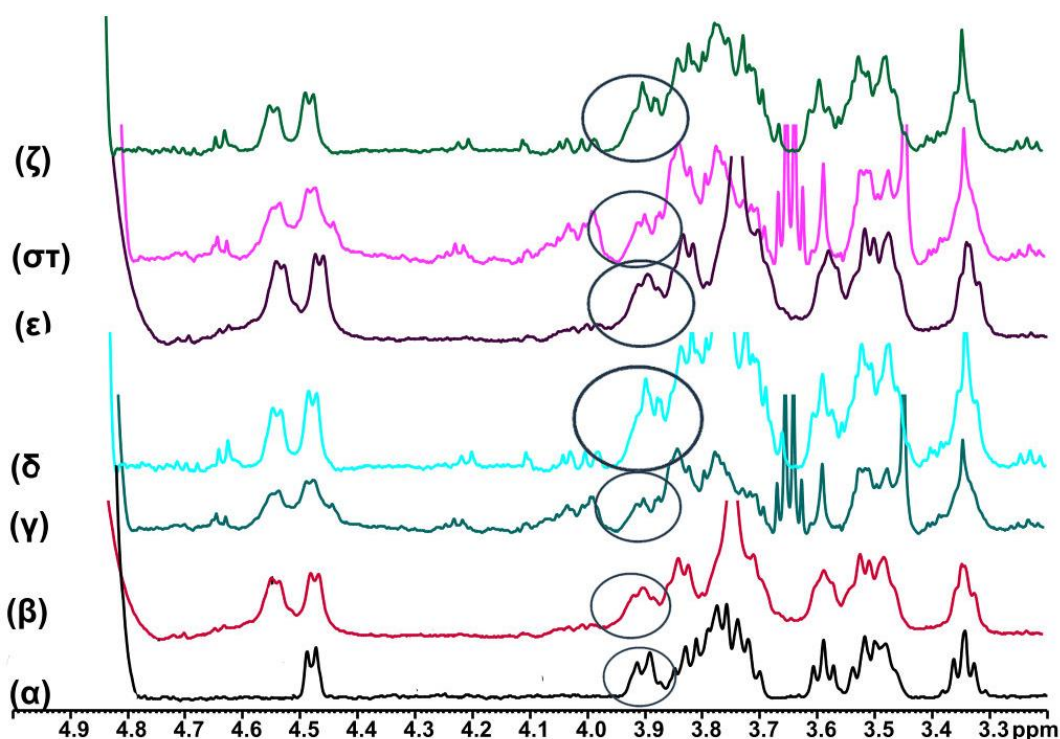
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.2.24, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου, οι κορυφές που αντιστοιχούν στο ελεύθερο β ανωμερικό

πρωτόνιο της υπομονάδας GlcA του ολιγοσακχαρίτη που παράγεται εμφανίζονται με διαφορετική ένταση. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τον προσδιορισμό των ολοκληρωμάτων για όλες τις κορυφές του υποστρώματος απουσία και παρουσία του εκχυλίσματος, γεγονός που επιβεβαιώνει την αναστολή της αντίδρασης από το εκχύλισμα. Ως προς την απόδοση της αντίδρασης, ο Πίνακας 5.2.4, παρουσιάζει την % απόδοση της αντίδρασης απουσία και παρουσία εκχυλίσματος.

Πίνακας 5.2.3: Τιμές ανασταλτικής δράσης του αιθανολικού εκχυλίσματος του μελισσόχορτου ως προς τη δράση της υαλουρονιδάσης, όπως προέκυψε από τη μελέτη με φασματοσκοπία 1D ¹H NMR.

Συγκέντρωση αιθανολικού εκχυλίσματος του φυτού <i>Melissa Officinalis</i> (μg/mL)	Αντίδραση Υαλουρονιδάσης [H6proS GlcNAc πρωτόνιο]	Αναστολή Υαλουρονιδάσης [H6proS GlcNAc πρωτόνιο]	% Δραστικότητα	% Αναστολή
200	2,2845	0,9110	39,88	60,12
300	2,2845	0,6191	27,10	72,90

Η μεθοδολογία NMR-Cosmetube, για τη μελέτη της αναστολής της υαλουρονιδάσης, δοκιμάστηκε και σε άλλα εκχυλίσματα, ώστε να επιβεβαιωθεί η λειτουργικότητά της. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα αιθανολικά εκχυλίσματα από τα φυτά *Melissa Officinalis*, *Rosmarinus Officinalis* και *Cistus Albidus* σε συγκέντρωση 300 μg/mL. Αυτό που παρατηρείται είναι η διαφορά της έντασης της κορυφής που αντιστοιχεί στο H6proS πρωτόνιο της υπομονάδας GlcNAc, γεγονός που συσχετίζεται με το βαθμό αναστολής που προκαλεί το εκάστοτε εκχύλισμα στην αντίδραση της υαλουρονιδάσης (Σχήμα 5.2.25 και Πίνακας 5.2.4).



Σχήμα 5.2.25: Επιλεγμένη περιοχή (3,20-4,90 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων: (α) της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης μετά από 60 λεπτά, (β) της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία 300 μg/mL αιθανολικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου (t=60 min), (γ) της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία 300 μg/mL αιθανολικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου (t=60 min), (δ) της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία 300 μg/mL

αιθανολικού εκχυλίσματος λαδανιάς (t=60 min), **(ε)** της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία 300 µg/mL υδατικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου (t=60 min), **(στ)** της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία 300 µg/mL υδατικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου (t=60 min), **(ζ)** της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία 300 µg/mL υδατικού εκχυλίσματος λαδανιάς σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M, pH=3,5, σε 100% D₂O.

Πίνακας 5.2.4: Προσδιορισμός του ολοκληρώματος του παραγόμενου H₆proS πρωτονίου του ελεύθερου άκρου της GlcNAc υπομονάδας του ολιγοσακχαρίτη του υαλουρονικού οξέος στην αντίδραση της υαλουρονιδάσης, και στην αντίδραση της υαλουρονιδάσης παρουσία φυτικών εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 300 µg/mL.

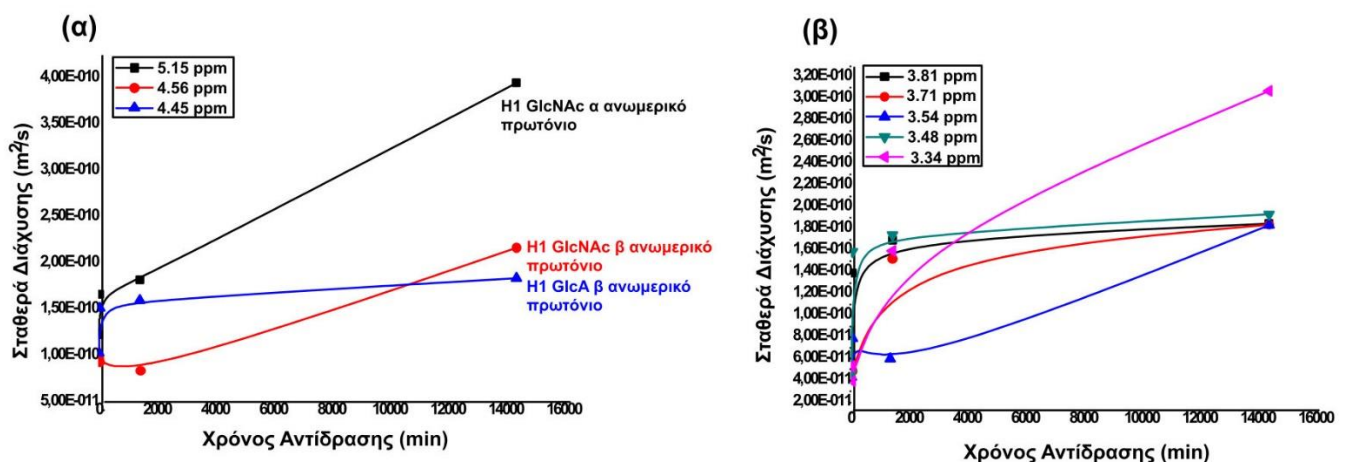
Εκχύλισμα	Αντίδραση Υαλουρονιδάσης [H ₆ proS GlcNAc πρωτόνιο]	Αντίδραση αναστολής της Υαλουρονιδάσης [H ₆ proS GlcNAc πρωτόνιο]	%Δραστικότητα	%Αναστολή
Melissa Officinalis Αιθανολικό	0	0	100	0
	2,2835	0,5868	25,70	74,30
Rosmarinus Officinalis αιθανολικό	0	0	100	0
	2,2835	0,3928	17,20	82,80
Cistus Albidus Αιθανολικό	0	0	100	0
	2,2835	1,2354	54,10	45,90
Melissa Officinalis Υδατικό	0	0	100	0
	2,2835	0,6526	28,58	71,42
Rosmarinus Officinalis Υδατικό	0	0	100	0
	2,2835	0,6266	27,44	72,56
Cistus Albidus Υδατικό	0	0	100	0
	2,2835	2,2013	96,40	3,60

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα, η μεθοδολογία NMR-Cosmetube για τη μελέτη της αναστολής της υαλουρονιδάσης είναι αποδοτική, καθώς μπορεί να προσδιοριστεί η % απόδοση της αντίδρασης, ακόμη και σε περιπτώσεις που μελετάται ένα φυτικό εκχύλισμα ως αναστολέας. Η % απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται με βάση το ολοκληρωμα της κορυφής που αντιστοιχεί στο H₆proS πρωτόνιο της ελεύθερης GlcNAc υπομονάδας, χωρίς να απαιτείται το στάδιο τερματισμού της αντίδρασης, ούτε το στάδιο προσθήκης της 2,4-διμεθυλαμινοβενζαλδεΰδης. Τα ολοκληρώματα που προκύπτουν από τα φάσματα της αναστολής συγκρίνονται με το αντίστοιχο ολοκλήρωμα της ενζυμικής αντίδρασης.

5.2.3.8 Μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης με το πείραμα διάχυσης DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy)

Η κύρια δυσκολία που υπάρχει στη μελέτη της αντίδρασης της υαλουρονιδάσης είναι ότι δεν υπάρχει ένα καθαρό προϊόν που να μπορεί να ταυτοποιηθεί. Αντίθετα, το μεγάλο μοριακού βάρους υπόστρωμα, HA, διασπάται συνεχώς σε ολιγοσακχαρίτες μικρότερου μοριακού βάρους, που αποτελούνται κυρίως από 2,4, ή έξι μόρια ολιγοσακχαριτών με εναλλασόμενες μονάδες D-γλυκουρονικού οξέος και N-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης. Μία εναλλακτική μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιβεβαίωση ότι η αντίδραση έχει πραγματοποιηθεί είναι το πείραμα διάχυσης DOSY NMR.

Όπως παρατηρείται στο **Σχήμα 5.2.26**, καθώς εξελίσσεται η αντίδραση της υαλουρονιδάσης, αρχίζουν και εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στα 5,15 ppm, 4,56 ppm και 4,45 ppm, όπου αντιστοιχούν στο H1 α ανωμερικό πρωτόνιο της υπομονάδας GlcNAc, στο H1 β ανωμερικό πρωτόνιο της υπομονάδας GlcNAc και στο H1 β ανωμερικό πρωτόνιο της υπομονάδας GlcA αντίστοιχα. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι καθώς η αντίδραση προχωράει, οι συντελεστές διάχυσης για όλες τις κορυφές που αντιστοιχούν στα μελετούμενα πρωτόνια αυξάνονται. Αυτό δείχνει ότι οι ολιγοσακχαρίτες που προκύπτουν διασπώνται συνεχώς σε μικρότερα μόρια, αυξάνοντας την κινητικότητά τους μέσα στο διάλυμα της αντίδρασης. Για το α και β ανωμερικό πρωτόνιο της υπομονάδας GlcNAc, το οποίο στα πρώτα λεπτά της αντίδρασης δεν είχε σχηματιστεί, μετά από δέκα μέρες που είχε εμφανιστεί, ο συντελεστής διάχυσής του προσδιορίστηκε ίσος με $3,95 \times 10^{-10}$ και $2,17 \times 10^{-10}$ m²/s αντίστοιχα. Ομοίως, και για το β ανωμερικό πρωτόνιο της υπομονάδας GlcA, ενώ στα πρώτα λεπτά της αντίδρασης δεν είχε σχηματιστεί, μετά από δέκα μέρες αντίδρασης ήταν ίσος με $1,84 \times 10^{-10}$ m²/s. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και για τους συντελεστές διάχυσης των υπόλοιπων πρωτονίων, οι οποίοι αυξάνονται σταδιακά, όσο προχωράει η διάσπαση του HA.



Σχήμα 5.2.26: Μεταβολή σταθερών διάχυσης (**α**) των ανωμερικών πρωτονίων και (**β**) των πρωτονίων που βρίσκονται στην περιοχή 3,30-3,90 ppm, κατά την εξέλιξη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης σε χρονικό διάστημα 0 min-10 ημερών.

Όσον αφορά τα υπόλοιπα ανωμερικά πρωτόνια που εμφανίζονται στο διάλυμα μετά από δέκα μέρες αντίδρασης, αυτά είχαν τις παρακάτω τιμές των σταθερών διάχυσης μετά από 10 μέρες αντίδρασης (**Πίνακας 5.2.5**):

Πίνακας 5.2.5: Τιμές σταθερών διάχυσης των κορυφών που αντιστοιχούν σε όλα τα παραγόμενα ανωμερικά πρωτόνια που προκύπτουν μετά από επώαση της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης για 10 ημέρες.

Χημική Μετατόπιση (δ)	5,23 ppm	5,19 ppm	5,14 ppm	4,71 ppm	4,56 ppm	4,54 ppm	4,50 ppm	4,48 ppm
Σταθερά Διάχυσης (m ² /s)	8,1020x 10 ⁻¹¹	3,95 x10 ⁻¹⁰	8,017x 10 ⁻¹¹	7,584x 10 ⁻¹¹	2,17 x10 ⁻¹⁰	5,959x 10 ⁻¹¹	8,156x 10 ⁻¹¹	7,571x 10 ⁻¹¹

Με τη μεθοδολογία DOSY ήταν δυνατός και ο προσδιορισμός της αναστολής της αντίδρασης της υαλουρονιδάσης από το ροσμαρινικό οξύ. Αυτό επιτεύχθηκε με σύγκριση των σταθερών διάχυσης των πρωτονίων του HA σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: (α) χωρίς την παρουσία ενζύμου, (β) παρουσία ενζύμου και μετά από αντίδραση 1h στους 37°C και (γ) παρουσία ροσμαρινικού οξέος και μετά από αντίδραση 1h στους 37°C (**Πίνακας 5.2.6**).

Πίνακας 5.2.5: Τιμές σταθερών διάχυσης των πρωτονίων του HA, όπως προέκυψαν από την αντίδραση της υαλουρονιδάσης και την αντίστοιχη αναστολή από το ροσμαρινικό οξύ.

Χημική Μετατόπιση (δ)	Ενζυμική Αντίδραση	Αναστολή
4,54 ppm	9,34x10 ⁻¹⁰	6,23x10 ⁻¹¹
3,81 ppm	1,39x10 ⁻¹⁰	8,59x10 ⁻¹¹
3,73 ppm	1,52x10 ⁻¹⁰	5,90x10 ⁻¹¹
3,55 ppm	7,88x10 ⁻¹⁰	8,30x10 ⁻¹¹
3,48 ppm	1,59x10 ⁻¹⁰	5,41x10 ⁻¹¹
3,34 ppm	1,60x10 ⁻¹⁰	1,27x10 ⁻¹¹

5.2.3.8 Μελέτη αλληλεπίδρασης των φυσικών προϊόντων και των φυτικών εκχυλισμάτων με την υαλουρονιδάση, με τη μεθοδο Saturation Transfer Difference (STD) NMR-Χαρτογράφηση των επιτόπων πρόσδεσης

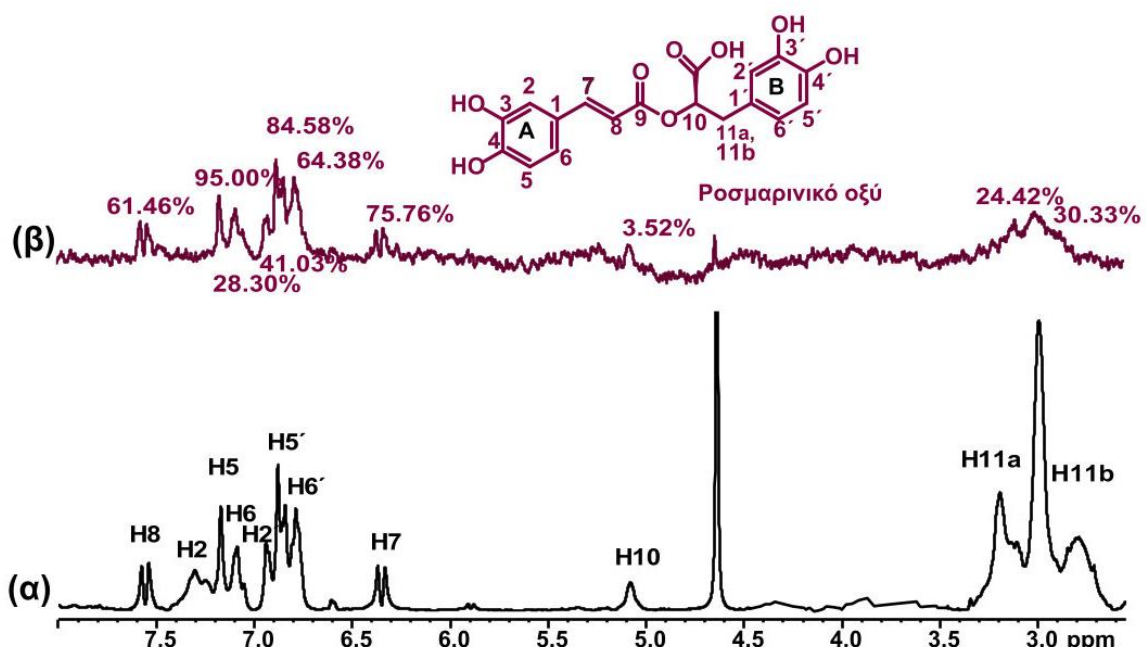
5.2.3.8.1 Μελέτη αλληλεπίδρασης της υαλουρονιδάσης με φυσικό προϊόν

Παρόλο που τα ένζυμα είναι μόρια πρωτεϊνικής φύσεως, δεν έχουν την ίδια συμπεριφορά με μία πρωτεΐνη. Προκειμένου να δράσει ένα ένζυμο, πρέπει να αλληλεπιδράσει με το κατάλληλο υπόστρωμα, σε κατάλληλη θέση. Αυτή η θέση είναι το ενεργό κέντρο ή και περιοχές που συμμετέχουν στην κατάλυση. Αντίθετα, μια πρωτεΐνη, όπως είναι η αλβουμίνη πλάσματος, έχει περισσότερες από μία θέσεις πρόσδεσης, ανάλογα με το είδος του υποκαταστάτη που αλληλεπιδρά. Η αλληλεπίδραση ενός υποκαταστάτη με ένα ένζυμο ή μια πρωτεΐνη αποτελεί καίρια σημασία για την ανάπτυξη καινούριων φαρμάκων. Μελετώντας το προφίλ αλληλεπίδρασης ενός συστατικού με το μελετούμενο υποδοχέα, μπορούν να αντληθούν πληροφορίες για τον τρόπο αλληλεπίδρασης του μορίου με τον πρωτεϊνικό υποδοχέα, την

διαμόρφωση που αποκτά το μόριο κατά την αλληλεπίδραση, αλλά και το μέρος του πρωτεϊνικού υποδοχέα που προσδένεται ο υποκαταστάτης. Η μέθοδος διαφοράς μεταφοράς κορεσμού (Saturation Transfer Difference NMR) αποτελεί σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης ενός υποκαταστάτη με τον πρωτεϊνικό υποδοχέα. Ακόμη και σ' ένα μείγμα, μέσω της μεθόδου STD NMR μπορούν να αντληθούν πληροφορίες μόνο για εκείνα τα μόρια που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη- στόχο.

Η υαλουρονιδάση διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη παθήσεων όπως είναι η αρθρίτιδα και η ουλίτιδα ενώ επάγει αρκετές φλεγμονώδεις αντιδράσεις και για το σκοπό αυτό η μελέτη της είναι σημαντική. Η αναζήτηση ισχυρών αναστολέων της υαλουρονιδάσης αλλά και η μελέτη του προφίλ αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός υποκαταστάτη και της υαλουρονιδάσης μπορεί να βοηθήσει αρκετά στην ανάπτυξη φαρμάκων και καλλυντικών προϊόντων που θα δρουν στοχεύοντας την υαλουρονιδάση, όχι μόνο επιβραδύνοντας την πρόωρη γήρανση του δέρματος, αλλά συμβάλλοντας επίσης και στην αντιμετώπιση των άλλων παθοφυσιολογικών καταστάσεων που ενεργοποιούνται από την υαλουρονιδάση. Το ενεργό κέντρο της υαλουρονιδάσης αποτελείται από αρκετά αμινοξέα: **Glu131, Tyr75, Trp141, Tyr201, Tyr208, Tyr210, Tyr247, Tyr261, Tyr286 και Trp321**, τα οποία μπορούν να συνδέονται με τους μελετούμενους υποκαταστάτες μέσω δεσμών υδρογόνου και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Επομένως είναι σημαντικό να μελετηθεί αν η υαλουρονιδάση παρουσιάζει στερεοεκλεκτικότητα ή τοποεκλεκτικότητα ως προς την αλληλεπίδρασή της με περισσότερους από έναν υποκαταστάτες. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των μελετούμενων υποκαταστατών (είτε πρόκειται για φυσικό προϊόν, είτε για μείγμα φυσικών προϊόντων είτε για φυτικό εκχύλισμα) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο STD NMR, όπου πραγματοποιήθηκε και χαρτογράφηση των επιτόπων πρόσδεσης. Ως προς το βαθμό αλληλεπίδρασης, υπολογίστηκαν οι παράγοντες αλληλεπίδρασης (STD amplification factors- STD_{AMP}).

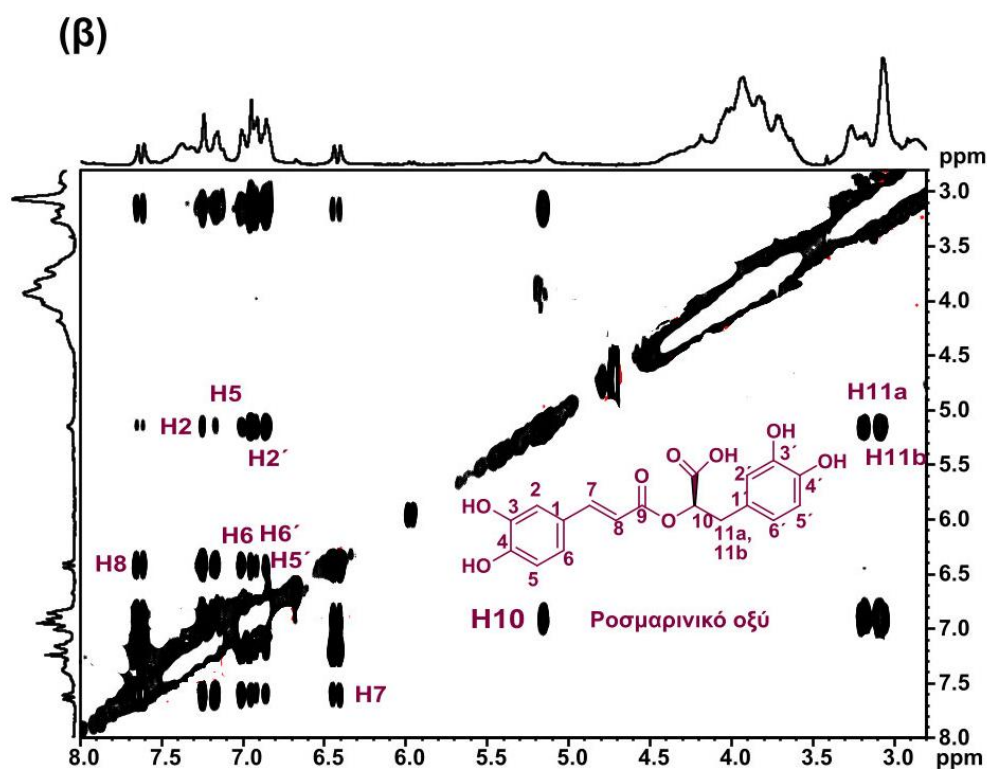
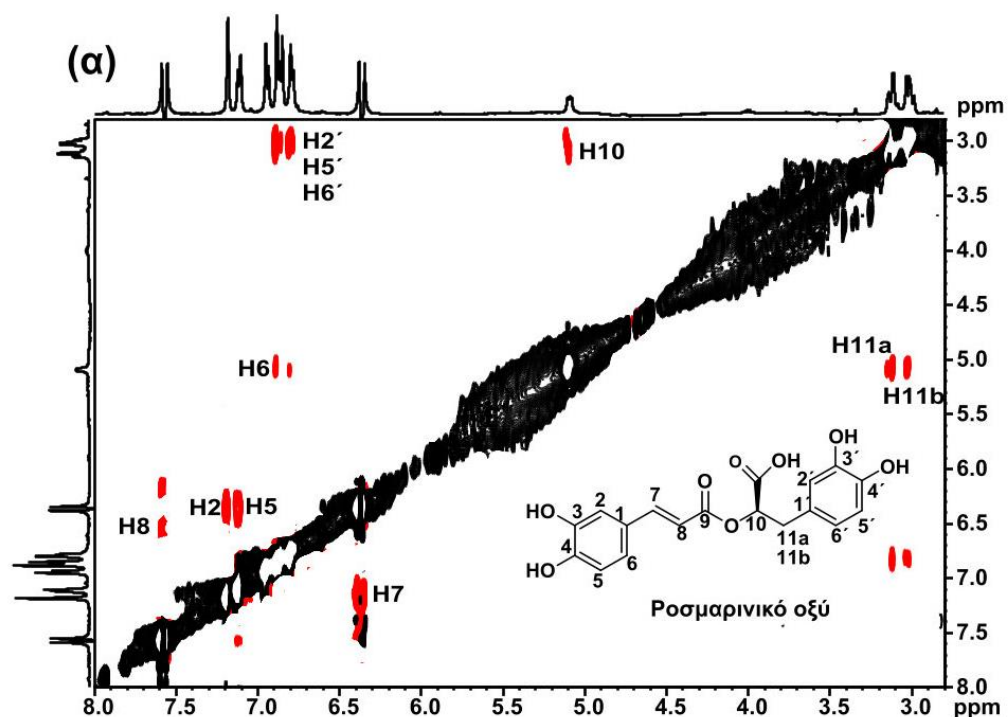
Αρχικά, η μέθοδος STD NMR εφαρμόστηκε για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του ροσμαρινικού οξέος με την υαλουρονιδάση, προκειμένου να επιβεβαιωθεί το γεγονός ότι το ροσμαρινικό οξύ αλληλεπιδρά με το ένζυμο (**Σχήμα 5.2.27**).



Σχήμα 5.2.27: Επιλεγμένη περιοχή (2,5-8,0 ppm) (α) 1D ^1H NMR φάσματος ροσμαρινικού οξέος σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M, $\rho\text{D}=3,5$, σε διαλύτη D_2O **(β)** STD φάσμα διαφοράς του συμπλέγματος ροσμαρινικό οξύ-υαλουρονιδάση. Τα ποσοστά δηλώνουν τις τιμές του παράγοντα αλληλεπίδρασης (STD amplification factor- STD_{AMP}) των πρωτονίων του ροσμαρινικού οξέος.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.2.27**, το ροσμαρινικό οξύ αλληλεπιδρά ισχυρά με την υαλουρονιδάση. Σε πιο κοντινή απόσταση με το ένζυμο βρίσκεται το πρωτόνιο H5 του αριστερού δακτυλίου (δακτύλιος A) με ποσοστό αλληλεπίδρασης 95,00%, ενώ ακολουθούν το $\text{H5}'$ και $\text{H6}'$ πρωτόνιο του B δακτυλίου με ποσοστό αλληλεπίδρασης 84,58% και 64,38% αντίστοιχα. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα δύο αυτά πρωτόνια βρίσκονται σε α-θέση ως προς την κατεχολική δομή των δύο δακτυλίων. Καθώς μπορούν να αναπτυχθούν δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των $-\text{OH}$ ομάδων του ροσμαρινικού οξέος και των αμινοξέων του ενεργού κέντρου, αυτά τα δύο πρωτόνια μπορούν να πλησιάσουν πιο κοντά στην πρωτεΐνη. Τα βινυλικά πρωτόνια του ροσμαρινικού οξέος, H8 και H7 , επίσης αλληλεπιδρούν ισχυρά με την υαλουρονιδάση με ποσοστό αλληλεπίδρασης 61,46% και 75,76% αντίστοιχα. Συνεπώς, το ροσμαρινικό οξύ αλληλεπιδρά με την υαλουρονιδάση μέσω των αρωματικών δακτυλίων και του διπλού δεσμού. Μικρότερη συνεισφορά στην αλληλεπίδραση του μορίου με το ένζυμο έχουν και τα αλειφατικά πρωτόνια H11a και H11b με ποσοστό αλληλεπίδρασης 24,42% και 30,33% αντίστοιχα.

Προκειμένου να αποκτηθεί μία βαθύτερη εικόνα της διαμόρφωσης του ροσμαρινικού οξέος, όταν δεσμεύεται στην υαλουρονιδάση, καταγράφηκε πείραμα transferred NOESY (**Σχήμα 5.2.28**).



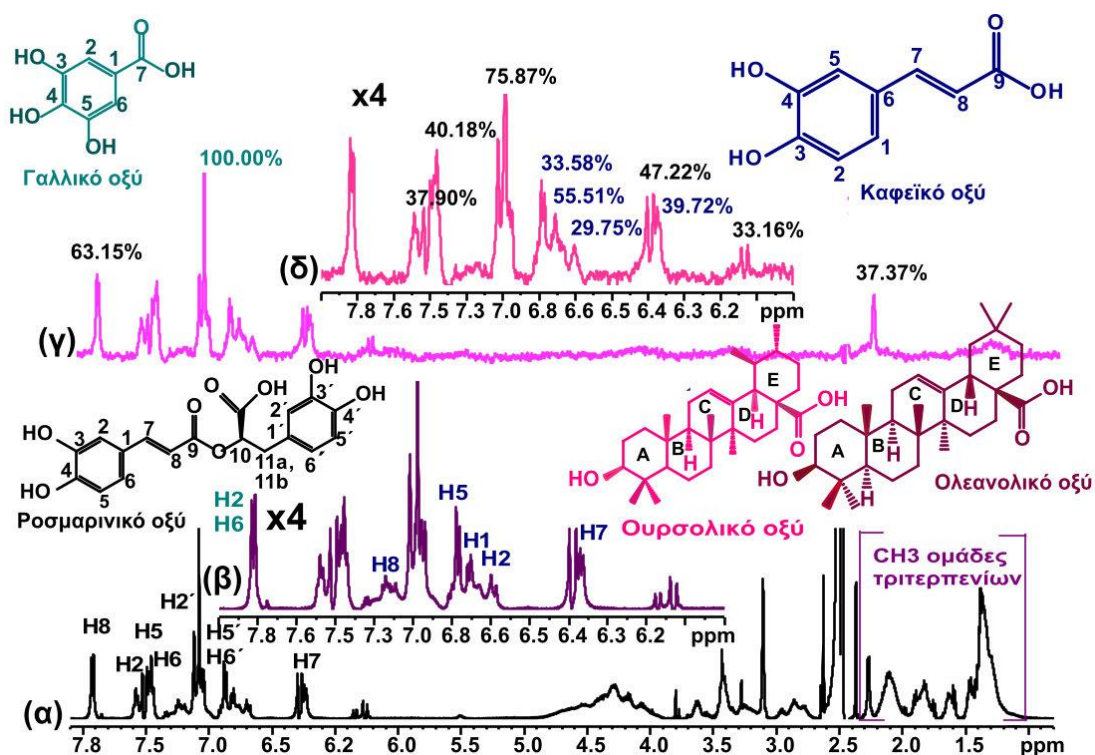
Σχήμα 5.2.28: (α) Επιλεγμένη περιοχή (2,5-8,0 ppm) του NOESY φάσματος του ελεύθερου ροσμαρινικού οξέος σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, 0,1M, pH=3,5 σε 100% D₂O, το οποίο έχει καταγραφεί με χρόνο ανάμειξης 300 ms σε φασματόμετρο συχνότητας 500 MHz, δείχνοντας την παρουσία αρνητικών NOEs του δεσμευμένου υποκαταστάτη. (β) Επιλεγμένη περιοχή (2,50-8,00 ppm) του tr-NOESY φάσματος του συμπλέγματος ροσμαρινικό οξύ-υαλουρονιδάση, σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M, pH=3,5 σε 100% D₂O, το οποίο έχει καταγραφεί με χρόνο ανάμειξης 300 ms σε φασματόμετρο συχνότητας 500 MHz, δείχνοντας την παρουσία αρνητικών NOEs, τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια του ροσμαρινικού οξέος.

Το πείραμα tr-NOESY αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για τον προσδιορισμό της γεωμετρικής διαμόρφωσης που αποκτά ένας υποκαταστάτης, όταν αυτός προσδεθεί στον επιθυμητό στόχο.^{340,341} Μέσω αυτής της μεθόδου είναι δυνατή η επιβεβαίωση οποιασδήποτε αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός υποκαταστάτη και ενός υποδοχέα που βρίσκονται σε κατάσταση ισορροπίας, και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ευρέως σε τεχνικές σύνθεσης φαρμάκων, για

τον προσδιορισμό οποιασδήποτε αλλαγής στη διαμόρφωση οποιουδήποτε μορίου.³⁴² Καταγράφηκαν πειράματα NOESY για το ροσμαρινικό, απουσία και παρουσία του ενζύμου. Απουσία του ενζύμου, καταγράφηκαν θετικά σήματα NOE, εξαιτίας του γεγονότος ότι ο ελεύθερος υποκαταστάτης βρίσκεται σε κατάσταση γρήγορης κίνησης (**Σχήμα 5.2.28 α**). Μετά την προσθήκη της υαλουρονιδάσης στο διάλυμα του υποκαταστάτη, τα σήματα NOE του ροσμαρινικού οξέος άλλαξαν σήμα, δίνοντας αυτή τη φορά αρνητικά σημεία διασταύρωσης NOE, οδηγώντας στο γεγονός ότι υπάρχει επιτυχής αλληλεπίδραση μεταξύ των υποκαταστατών και της υαλουρονιδάσης (**Σχήμα 5.2.28 β**). Στο tr-NOESY φάσμα, τα μόνα σήματα NOE που παρατηρούνται, είναι αυτά μεταξύ των ζευγών πρωτονίων, τα οποία βρίσκονται σε κοντινή απόσταση στον χώρο, εξαιτίας της μοριακής δομής του ροσμαρινικού οξέος. Αυτό σημαίνει ότι εμφανίζονται μόνο NOEs μεταξύ των δύο υπομονάδων του ροσμαρινικού οξέος. Το εκτεταμένο συζυγικό σύστημα του ροσμαρινικού οξέος παρεμποδίζει την περιστροφή του μορίου, με αποτέλεσμα να μη μπορούν να παρατηρηθούν NOEs μεταξύ των δύο διαφορετικών υπομονάδων. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στο γεγονός ότι το ροσμαρινικό οξύ αλληλεπιδρά με την υαλουρονιδάση, αλλά διατηρεί την επίπεδη διαμόρφωσή του, όπως έχει παρατηρηθεί και για τον ελεύθερο υποκαταστάτη στο διάλυμα.

5.2.3.8.2 Μελέτη αλληλεπίδρασης της υαλουρονιδάσης με μείγμα φυσικών προϊόντων

Προηγουμένως διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση του ροσμαρινικού οξέος με την υαλουρονιδάση μέσω της εφαρμογής της μεθοδολογίας STD NMR. Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω αν διάφορα άλλα φυσικά προϊόντα αλληλεπιδρούν με την υαλουρονιδάση, και κυρίως αν υπάρχει εκλεκτικότητα μεταξύ της υαλουρονιδάσης και των διαφόρων φυσικών προϊόντων, η μεθοδολογία STD NMR εφαρμόστηκε και μεταξύ της υαλουρονιδάσης και ενός μείγματος φυσικών προϊόντων που αποτελείται από ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ, γαλλικό οξύ, και τα τριτερπενοειδή ουρσολικό οξύ και ολεανολικό οξύ (**Σχήμα 5.2.29**).



Σχήμα 5.2.29: Επιλεγμένη περιοχή (1,00-8,50 ppm): (α) 1D ¹H NMR φάσματος του μείγματος φυσικών προϊόντων-υαλουρονιδάση σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1M σε 100% D₂O, ρD=3,5, (β)

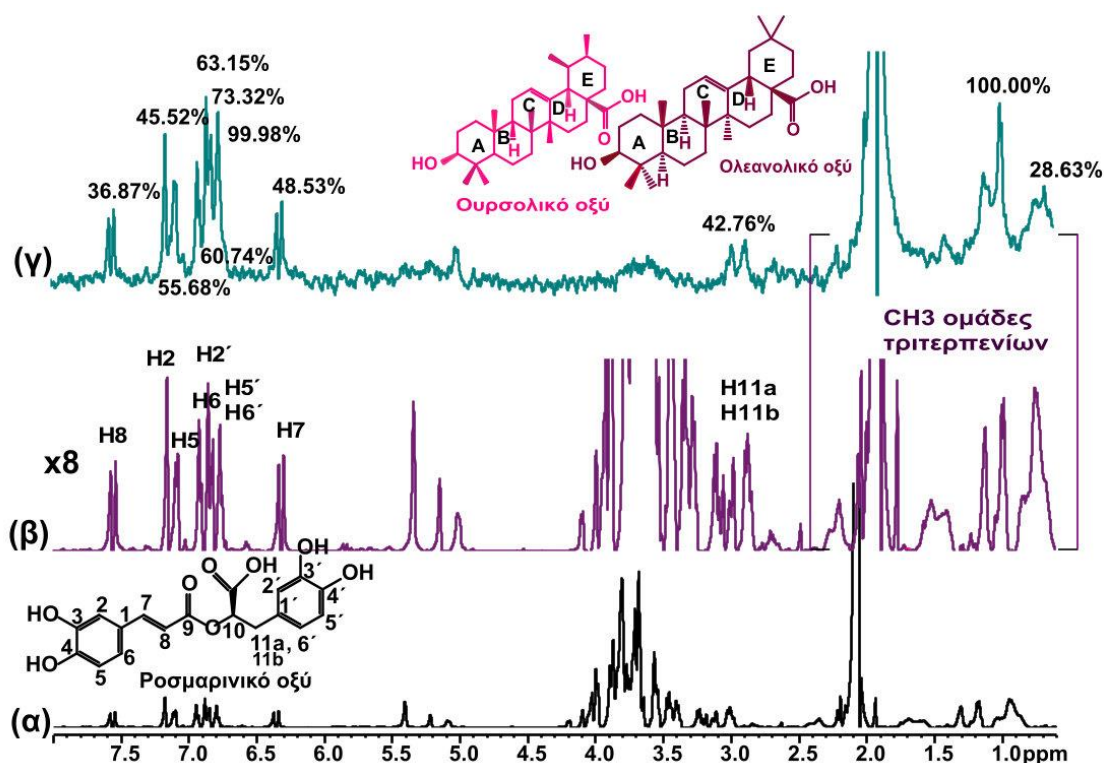
Μεγεθυμένη περιοχή (**x4**) του (**α**), (**γ**) STD φάσμα διαφοράς της αλληλεπίδρασης του μείγματος των φυσικών προϊόντων με την υαλουρονιδάση, (**δ**) Μεγεθυμένη περιοχή (**x4**) του (**γ**). Τα ποσοστά δηλώνουν τις τιμές των παραγόντων αλληλεπίδρασης (STD amplification factors) των φυσικών προϊόντων με την υαλουρονιδάση.

Όπως προκύπτει από τα STD NMR φάσματα του **Σχήματος 5.2.29**, η υαλουρονιδάση δεν παρουσιάζει κάποια στερεοεκλεκτικότητα ως προς τα φαινολικά οξέα, καθώς αλληλεπιδρά με όλα. Αυτό σημαίνει ενδεχομένως ότι λόγω της ύπαρξης αρκετών αμινοξέων στο ενεργό κέντρο της υαλουρονιδάσης να αλληλεπιδρούν περισσότεροι από ένας υποκαταστάτες. Σύμφωνα με τα STD NMR φάσματα του **Σχήματος 5.2.29 γ**, μεγαλύτερη ένταση έχει η κορυφή στα 7,05 ppm, η οποία ανήκει στα πρωτόνια H2 και H6 του γαλλικού οξέος. Λόγω της μεγαλύτερης έντασης της κορυφής, ο STD_{AMP} προσδιορίστηκε ίσος με 100%. Δεύτερο φαινολικό οξύ που αλληλεπιδρά στη σειρά με την υαλουρονιδάση είναι το ροσμαρινικό οξύ. Ως προς τη χαρτογράφηση των επιτόπων πρόσδεσης, το ροσμαρινικό οξύ αλληλεπιδρά με την υαλουρονιδάση μέσω των ολεφινικών πρωτονίων H8 και H7 αλλά και μέσω των αρωματικών πρωτονίων και των δύο δακτυλίων. Σε μικρότερη απόσταση από το ενεργό κέντρο της υαλουρονιδάσης βρίσκεται το H2', για το οποίο υπολογίστηκε ο παράγοντας αλληλεπίδρασης ίσος με 75,87%, ενώ και το ολεφινικό πρωτόνιο H8 βρίσκεται κοντά στο ένζυμο ($STD_{AMP}=63,15\%$). Κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται επίσης και το δεύτερο ολεφινικό πρωτόνιο H7 του ροσμαρινικού οξέος ($STD_{AMP}=47,22\%$) αλλά και τα αρωματικά πρωτόνια H2 και H5 με τιμή παράγοντα αλληλεπίδρασης 37,90% και 40,18% αντίστοιχα. Η παρουσία των 4 –OH ομάδων στο μόριο του ροσμαρινικού οξέος ευνοεί την ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Από την άλλη, και το καφεϊκό οξύ φαίνεται να αλληλεπιδρά με το ένζυμο. Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 5.2.29 γ και δ**, όλα τα πρωτόνια του καφεϊκού οξέος, και τα αρωματικά και τα βινυλικά αλληλεπιδρούν με το ένζυμο. Για όλα τα πρωτόνια, οι τιμές των παραγόντων αλληλεπίδρασης υπολογίστηκαν ως εξής: H5 ($STD_{AMP}=33,58\%$), H1 ($STD_{AMP}=55,51\%$), H2 ($STD_{AMP}=29,75\%$) και H7 ($STD_{AMP}=39,72\%$), ενώ το H8 δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά με το ένζυμο, ενδεχομένως λόγω στερικής παρεμπόδισης. Η παρουσία των δύο –OH ομάδων του μορίου ευνοεί την αλληλεπίδραση με τα αμινοξέα μέσω δεσμών υδρογόνου. Το καφεϊκό οξύ, όπως και το γαλλικό οξύ, έχει μικρότερο μοριακό βάρος από το ροσμαρινικό οξύ, επομένως μπορεί να καταλάβει ευκολότερα τον χώρο μέσα στην κοιλότητα του ενεργού κέντρου. Ωστόσο, είναι δυνατόν η ισχύς της αλληλεπίδρασης να μη σχετίζεται με το βαθμό αναστολής του ενζύμου, καθώς, όπως προέκυψε και από τα πειράματα αναστολής, το ροσμαρινικό οξύ είναι ισχυρότερος αναστολέας του ενζύμου, συγκριτικά με τα άλλα δύο φαινολικά οξέα. Όσον αφορά τα δύο τριτερπένια, παρουσία των φαινολικών οξέων, δε φαίνεται να υπήρξε μεγάλη αλληλεπίδραση αυτών με το ένζυμο. Το μόνο σήμα που φάνηκε στο STD NMR φάσμα αντιστοιχεί σε μια κορυφή στα 2,18 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο H18 πρωτόνιο του ουρσολικού οξέος και φαίνεται να αλληλεπιδρά με το ένζυμο.

5.2.3.8.3 Μελέτη αλληλεπίδρασης της υαλουρονιδάσης με φυτικό εκχύλισμα

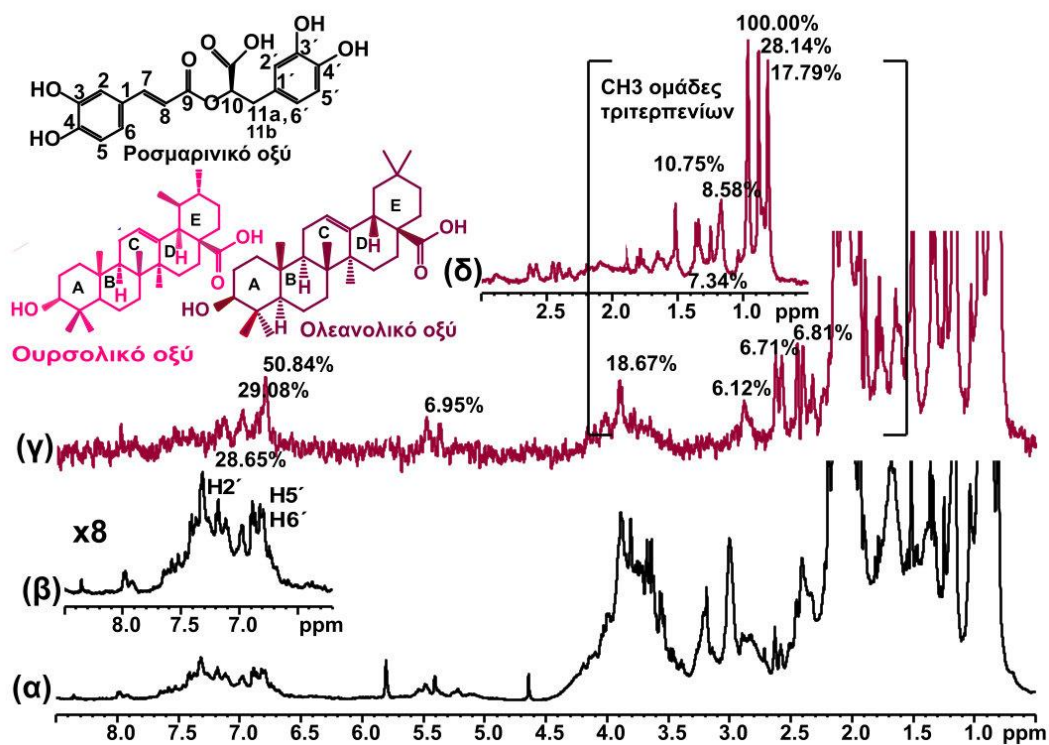
Στη συνέχεια, μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της υαλουρονιδάσης με πιο πολύπλοκο δείγμα, όπως είναι ένα φυτικό εκχύλισμα. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε η μεθοδολογία STD

NMR για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της υαλουρονιδάσης με το αιθανολικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου (**Σχήμα 5.2.30**). Στο αντίστοιχο STD NMR φάσμα εμφανίστηκαν κορυφές διαφορετικών εντάσεων, που δηλώνουν την επιτυχή αλληλεπίδραση της υαλουρονιδάσης με συστατικά του εκχυλίσματος. Πιο ισχυρή αλληλεπίδραση έδειξε το ροσμαρινικό οξύ, το οποίο βρίσκεται και σε μεγαλύτερο ποσοστό. Όπως φαίνεται και από τους παράγοντες αλληλεπίδρασης, τα αρωματικά πρωτόνια και των δύο αρωματικών δακτυλίων, H2, H5, H6 και H2', H5' και H6', όπως και τα πρωτόνια H7 και H8 του διπλού δεσμού αλληλεπιδρούν με το ενεργό κέντρο της υαλουρονιδάσης, με παράγοντες αλληλεπίδρασης 45,52%, 55,68%, 60,74%, 63,15%, 73,32%, 99,98%, 48,53% και 36,87% αντίστοιχα. Ακόμη και τα αλειφατικά πρωτόνια H11a και H11b φαίνεται πως αλληλεπιδρούν με το μόριο (STD_{AMP}=42,76%). Επίσης, στο STD NMR φάσμα εμφανίζονται κορυφές και στην αλειφατική περιοχή που αντιστοιχούν στις CH₃ ομάδες των τερπενοειδών ουρσολικό και ολεανολικό οξύ. Το πείραμα αυτό δείχνει ότι είναι δυνατή η μελέτη αλληλεπίδρασης ενός εκχυλίσματος (που είναι ένα αρκετά πολύπλοκο δείγμα) με την υαλουρονιδάση.



Σχήμα 5.2.30: Επιλεγμένη περιοχή (0,80-8,00 ppm): (α) 1D ¹H NMR φάσματος του μείγματος αιθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου-υαλουρονιδάση σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M σε 100% D₂O, ρD=3,5, **(β)** Μεγεθυμένη περιοχή (**x8**) του **(α)**, **(γ)** STD NMR φάσμα διαφοράς της αλληλεπίδρασης του συμπλέγματος αιθανολικό εκχύλισμα μελισσόχορτου-υαλουρονιδάση σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M σε 100% D₂O, ρD=3,5. Τα ποσοστά δηλώνουν τις τιμές των παραγόντων αλληλεπίδρασης (STD amplification factors) των φυσικών προϊόντων με την υαλουρονιδάση.

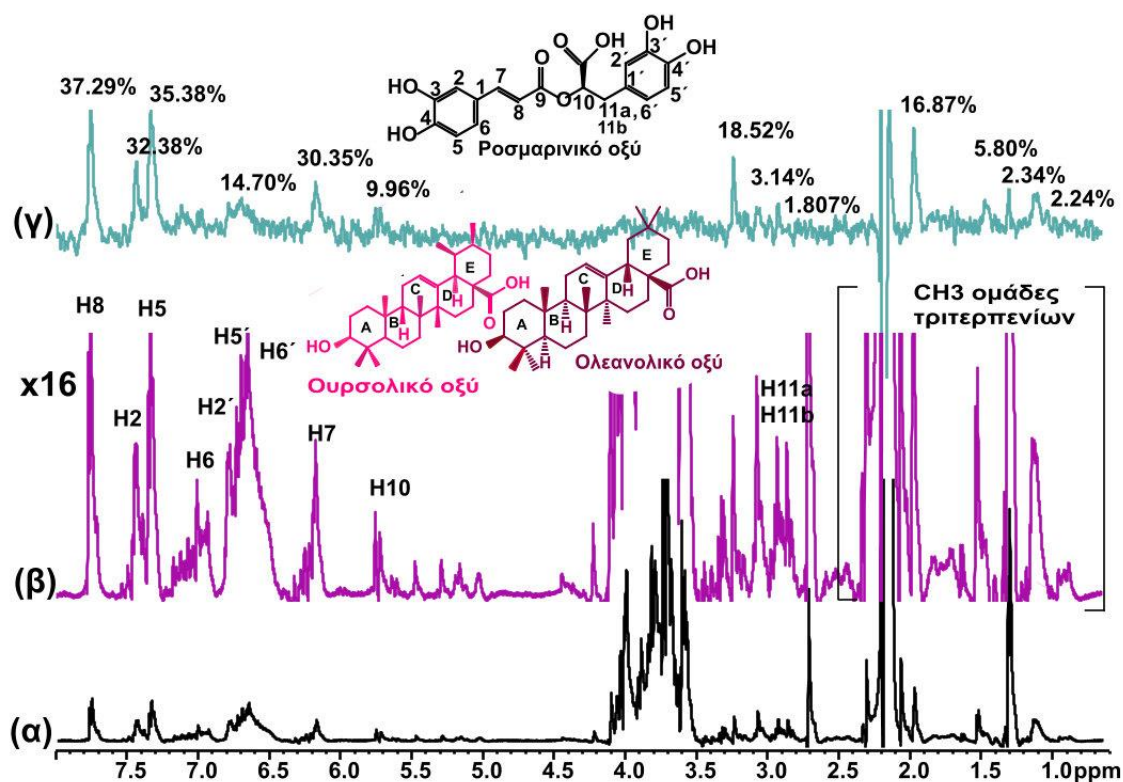
Δεύτερο εκχύλισμα που μελετήθηκε με τη μεθοδολογία STD NMR είναι το αιθανολικό εκχύλισμα του δεντρολίβανου (**Σχήμα 5.2.31**).



Σχήμα 5.2.31: Επιλεγμένη περιοχή (0,80-8,00 ppm): (α) 1D ¹H NMR φάσματος του μείγματος αιθανολικό εκχύλισμα δεντρολίβανου-υαλουρονιδάση σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M σε 100% D₂O, ρD=3,5, **(β)** Μεγεθυμένη περιοχή (**x8**) του **(α)**, **(γ)** STD NMR φάσμα διαφοράς της αλληλεπίδρασης του μείγματος αιθανολικό εκχύλισμα δεντρολίβανου-υαλουρονιδάση σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M σε 100% D₂O, ρD=3,5. Τα ποσοστά δηλώνουν τις τιμές των παραγόντων αλληλεπίδρασης (STD amplification factors) των φυσικών προϊόντων με την υαλουρονιδάση.

Αν και το φυτοχημικό προφίλ του δεντρολίβανου είναι ίδιο με αυτό του μελισσόχορτου, το STD NMR φάσμα έδειξε διαφορετική εικόνα. Εκτός από το ροσμαρινικό οξύ, το οποίο παρουσίασε αλληλεπίδραση κυρίως μέσω των αρωματικών πρωτονίων H2', H5' και H6' με παράγοντες αλληλεπίδρασης ίσους με 28,65%, 29,08% και 50,84% αντίστοιχα, ένα βαθμό αλληλεπίδρασης έδειξαν και τα τριτερπένια ουρσολικό και ολεανολικό οξύ μέσω των CH₃ ομάδων του.

Η μεθοδολογία STD NMR, εφαρμόστηκε επίσης και για ένα υδατικό εκχύλισμα. Συγκεκριμένα, επιλέχτηκε το υδατικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου, το οποίο έδωσε καλή ανασταλτατική δράση, σύμφωνα με τα πειράματα UV (64,88±0,01 % σε συγκέντρωση 300 μg/mL) (**Σχήμα 5.2.31**).



Σχήμα 5.2.31: Επιλεγμένη περιοχή (0,80-8,00 ppm): (α) 1D ^1H NMR φάσματος του μείγματος υδατικό εκχύλισμα μελισσόχορτου-υαλουρονιδάση σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 0,1M σε 100% D_2O , $\text{pD}=3,5$, **(β)** Μεγεθυμένη περιοχή (**x8**) του **(α)**, **(γ)** STD NMR φάσμα διαφοράς της αλληλεπίδρασης του μείγματος υδατικό εκχύλισμα μελισσόχορτου-υαλουρονιδάση σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος 0,1M σε 100% D_2O , $\text{pD}=3,5$. Τα ποσοστά δηλώνουν τις τιμές των παραγόντων αλληλεπίδρασης (STD_{AMP}) των φυσικών προϊόντων με την υαλουρονιδάση.

Σύμφωνα με το STD NMR φάσμα του **Σχήματος 5.2.31**, το κυριότερο συστατικό του υδατικού εκχυλίσματος, το ροσμαρινικό οξύ, αλληλεπιδρά επιτυχώς με την υαλουρονιδάση, όπως επίσης και οι μεθυλομάδες των τριτερπενίων. Σύμφωνα με την χαρτογράφηση των επιτόπων πρόσδεσης, το ροσμαρινικό οξύ αλληλεπιδρά αποτελεσματικά με την υαλουρονιδάση μέσω όλων των πρωτονίων του. Μεγαλύτερο STD σήμα δίνουν το βινυλικό πρωτόνιο H8 και τα αρωματικά πρωτόνια H5 και H2, με παράγοντες αλληλεπίδρασης ίσους με 37,29%, 35,38% και 32,38% αντίστοιχα. Από την άλλη, χαμηλότερο STD σήμα δίνει το H7 βινυλικό πρωτόνιο ($\text{STD}_{\text{AMP}}=30,35\%$) όπως επίσης και τα αρωματικά πρωτόνια H5'/H6' ($\text{STD}_{\text{AMP}}=14,70\%$) αλλά και το H10 πρωτόνιο που βρίσκεται σε α-θέση ως προς την καρβοξυλομάδα ($\text{STD}_{\text{AMP}}=9,96\%$). Από την άλλη, μικρή ένταση STD NMR σήματος ($\text{STD}_{\text{AMP}}<20\%$) δίνουν και οι μεθυλομάδες των τριτερπενίων.

Συγκρίνοντας τα STD NMR πειράματα όλων των εκχυλισμάτων με το μείγμα των φυσικών αναστολέων, παρατηρείται το ίδιο μοτίβο, ως προς το προφίλ της αλληλεπίδρασης. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου STD NMR για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της υαλουρονιδάσης με φυτικό εκχύλισμα, όπου μπορεί να ταυτοποιηθούν εκείνα τα συστατικά που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το ένζυμο, χωρίς να χρειάζονται περαιτέρω βήματα διαχωρισμού.

Γενικά συμπεράσματα Κεφαλαίου 6.2

Στο υποκεφάλαιο αυτό πραγματοποιήθηκε *in vitro* μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης με φασματοσκοπία UV και προσδιορίστηκαν οι σταθερές Michaelis-Menten της αντίδρασης. Στη συνέχεια μελετήθηκε η αναστολή του ενζύμου από φυσικά προϊόντα και φυτικά εκχυλίσματα. Ισχυρότερος αναστολέας βρέθηκε να είναι το ροσμαρινικό οξύ, για το οποίο πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω πειράματα κινητικής τα οποία έδειξαν ότι είναι ανταγωνιστικός αναστολέας. Από τα φυτικά εκχυλίσματα, το αιθανολικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου και του δεντρολίβανου έδωσαν την καλύτερη ανασταλτική δράση ενώ από τα υδατικά η ρίγανη, το μελισσόχορτο, το δεντρολίβανο και η λαδανιά. Τα φυτικά εκχυλίσματα μελετήθηκαν σε συγκεντρώσεις 100 μg/mL και 300 μg/mL, όπου παρατηρήθηκε αύξηση της αναστολής ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε *in situ* μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης με φασματοσκοπία 1D ¹H NMR, στα πλαίσια της ανάπτυξης της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube. Τα ελεύθερα ανωμερικά πρωτόνια των ολιγοσακχαριτών που προκύπτουν, όπως επίσης και το H₆proS πρωτόνιο του ελεύθερου άκρου της *N*-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης, έχουν χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις και επομένως ήταν εφικτή η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους. Μέσω πειραμάτων μεταβλητής θερμοκρασίας έγινε διαχωρισμός των κορυφών των ανωμερικών πρωτονίων των σχηματιζόμενων ολιγοσακχαριτών, ενώ με την εφαρμογή του πειράματος Selective 1D TOCSY έγινε ταυτοποίηση των επιμέρους τμημάτων των μορίων D-γλυκουρονικό οξύ και *N*-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνη των καινούριων ολιγοσακχαριτών. Στη συνέχεια, μέσω φασματοσκοπίας 1D ¹H NMR μελετήθηκε η αναστολή της υαλουρονιδάσης από επιλεγμένα φυσικά προϊόντα και φυτικά εκχυλίσματα, όπου προσδιορίστηκε η % απόδοση της αντίδρασης. Τα δεδομένα αυτά συνέβαλαν στην ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης και αναστολής της υαλουρονιδάσης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα αλληλεπίδρασης και χαρτογράφησης του επιτόπου πρόσδεσης μέσω της μεθοδολογίας STD NMR, τόσο από το φυσικό προϊόν ροσμαρινικό οξύ, όσο και από μείγμα φυσικών προϊόντων. Το πείραμα transferred-NOESY επιβεβαίωσε την επιτυχή πρόσδεση του ροσμαρινικού οξέος στην υαλουρονιδάση. Η μεθοδολογία STD NMR και η χαρτογράφηση του επιτόπου πρόσδεσης εφαρμόστηκε επίσης και στα αιθανολικά εκχυλίσματα του μελισσόχορτου και του δεντρολίβανου και στο υδατικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μέσω της μεθοδολογίας STD NMR είναι δυνατή η μελέτη της υαλουρονιδάσης μπορεί να μελετηθεί η αλληλεπίδραση του ενζύμου με συστατικά τα οποία βρίσκονται σε πολύπλοκα συστήματα.

Κεφάλαιο 5.3: Ανάπτυξη μεθοδολογίας για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης και της αναστολής της από φυτικά εκχυλίσματα

5.3.1. Εισαγωγή

5.3.1.1 Η οικογένεια των σερινοπρωτεασών και η ελαστάση

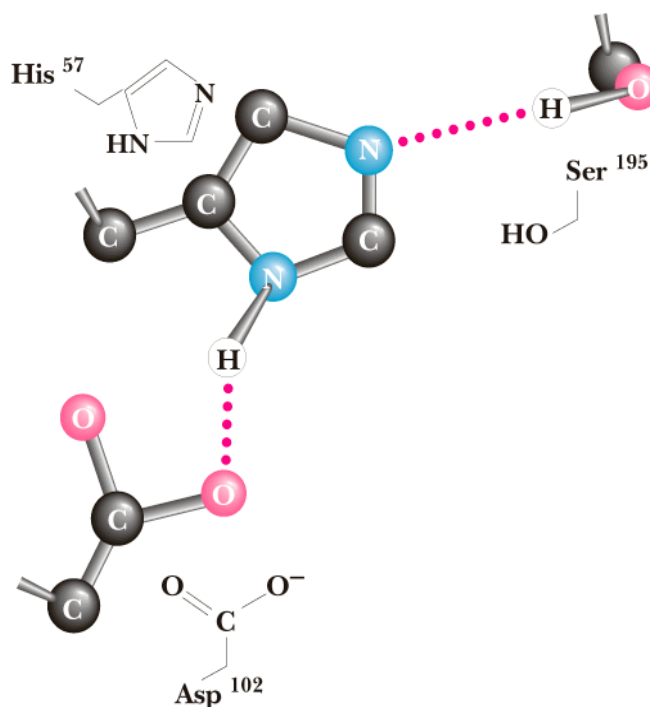
Η οικογένεια των σερινοπρωτεασών αποτελεί μία από τις πιο ευρέως μελετούμενες οικογένειες ενζύμων και αυτό έχει αποδειχτεί κυρίως από το γεγονός ότι υπάρχουν διαθέσιμες αρκετές κρυσταλλικές δομές από διάφορους εκπροσώπους αυτής της οικογένειας. Κύριοι εκπρόσωποι αυτής της οικογένειας που έχουν μελετηθεί αρκετά είναι η Χυμοθρυψίνη (EC 3.4.21.1), η Θρυψίνη (EC 3.4.21.4), η Θρομβίνη (EC 3.4.21.5), η Πλασμίνη (EC 3.4.21.7), η α-Λυτική ενδοπεπτιδάση (EC 3.4.21.12), η Καθεψίνη G (EC 3.4.21.20), η Σουμπιλισίνη (EC 3.4.21.62) καθώς και η υποοικογένεια των Ελαστασών, με κύριους εκπροσώπους την ουδετερόφιλη Ελαστάση (E.C. 3.4.21.37), και την Παγκρεατική Ελαστάση (EC 3.4.21.71).³⁴³

Η ουδετερόφιλη ελαστάση βρίσκεται στους πυκνούς κόκκους των πολυμορφικών πυρηνικών λευκοκυττάρων και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φαγοκυττάρωση και στην άμυνα του ανοσοποιητικού συστήματος εναντίον των λοιμώξεων που προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς. Η παγκρεατική ελαστάση είναι αποθηκευμένη στο πάγκρεας, κυρίως με τη μορφή ανενεργού ζυμογόνου και εκκρίνεται στο έντερο. Μετά την έκκρισή της, ενεργοποιείται από τη δράση της θρυψίνης και συμμετέχει στη διαδικασία της πέψης. Και οι δύο ελαστάσες παρουσιάζουν εκλεκτική δράση και διασπούν υποστρώματα με συγκεκριμένους πεπτιδικούς δεσμούς, όπου συνήθως το P1 είναι αμινοξύ με μικρή αλκυλική πλευρική αλυσίδα. Τόσο η παγκρεατική, όσο και η ουδετερόφιλη ελαστάση χρησιμοποιούν και άλλα υποστρώματα, φυσιολογικά ή μη, εκτός από την ελαστίνη.

5.3.1.2 Η δομή της ελαστάσης

Η αλληλουχία αρκετών ελαστασών έχει μελετηθεί μέσω συνδυασμών πεπτιδικών ακολουθιών και κρυσταλλογραφικών μεθόδων. Η αλληλουχία της Λευκοκυτταρικής Ελαστάσης (HLE) έχει ταυτοποιηθεί από το Sinha και τους συνεργάτες (1987)³⁴⁴ αλλά και από τον Bode και τους συνεργάτες (1986b),³⁴⁵ μέσω συνδυασμού πεπτιδικών ακολουθιών και κρυσταλλογραφικών μεθόδων αντίστοιχα. Η HLE είναι μια γλυκοπρωτεΐνη με μια μονή πεπτιδική αλυσίδα που αποτελείται από 218 αμινοξέα και τέσσερις δισουλφιδικές γέφυρες. Ανάλυση της αλληλουχίας cDNA της HLE^{346,347} επιβεβαίωσε αυτή την ακολουθία με την προσθήκη μιας επεκτεινόμενης αλληλουχίας 20 καρβοξυτελικών αμινοξέων. Αυτή η επέκταση είναι πιθανό να έχει απομακρυνθεί κατά το στάδιο της μετάφρασης και να αποκόπηκε κατά τη συσσωμάτωση της HLE στους κόκκους των λυσοσωμάτων. Η HLE παρουσιάζει ομολογία και με άλλες ελαστολυτικές σερινοπρωτεάσες, όπως είναι η Παγκρεατική Ελαστάση Χοίρου (PPE) με

ομολογία 40%, η Παγκρεατική Ελαστάση Μυός ΙΙ με ομολογία 40%, η Ανθρώπινη Παγκρεατική Ελαστάση Ι με ομολογία 37% και η Ανθρώπινη Παγκρεατική Ελαστάση Ε με ομολογία 36%. Αντίθετα, η ΡΡΕ παρουσιάζει ομολογία με την Παγκρεατική Χυμοθρυψίνη Βοός (39% ομολογία) και τη Θρυψίνη (37% ομολογία), ενώ σε μεγαλύτερο ποσοστό η αλληλουχία της είναι ίδια με τις παγκρεατικές ελαστάσες των θηλαστικών, όπως είναι η Ανθρώπινη Ελαστάση Ι (90% ομολογία), η Ανθρώπινη Ελαστάση Ε (57% ομολογία), η Ελαστάση Μυός Ι (85% ομολογία) και η Ελαστάση Μυός ΙΙ (85% ομολογία). Η ΡΡΕ αποτελείται από μια πεπτιδική αλυσίδα 240 αμινοξέων. Η πεπτιδική αλληλουχία ξεκινάει από το αμινοξύ Val216, ενώ στο τέλος βρίσκεται το αμινοξύ Asn245 ενώ αποτελείται από τέσσερις δισουλφιδικές γέφυρες. Η ΗΛΕ σχηματίζει μικρούς κρυστάλλους, ενώ η ΡΡΕ σχηματίζει πιο μεγάλους κρυστάλλους, επομένως ήταν πιο εύκολη η μελέτη της κρυσταλλικής δομής της ΡΡΕ. Επίσης, η αλληλουχία της ΡΡΕ έχει μεγαλύτερη ομολογία με την ΗΛΕ, οπότε μπορούμε εύκολα να μελετήσουμε τις δομές και των δύο. Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες των ΡΡΕ και ΗΛΕ οργανώνονται ως δύο δομικές αντιπαράλληλες κυλινδρικές περιοχές, οι οποίες παίρνουν τη μορφή β-βαρελιού. Αυτή η δομή απαντάται γενικά και σε άλλες σερινοπρωτεάσες. Μέσα σε αυτή τη δομή υπάρχει ένα ενδιάμεσο τμήμα το οποίο είναι οργανωμένο με τη μορφή έλικας. Δομή έλικας σχηματίζει επίσης και το καρβοξυτελικό άκρο της πεπτιδικής αλληλουχίας. Όπως σε όλες τις πρωτεάσες, έτσι και στις ελαστάσες, το ενεργό τους κέντρο αποτελείται από μια καταλυτική τριάδα, που απαρτίζεται από τα αμινοξέα **Σερίνη195 (Ser195)**, **Ιστιδίνη57 (His57)** και **Ασπαρτικό102 (Asp102)** (Σχήμα 5.3.1). Η αρίθμηση των αμινοξέων στην αλληλουχία της ελαστάσης είναι ίδια με αυτή της Χυμοθρυψίνης. Τα περισσότερα αμινοξέα, και κυρίως τα καταλυτικά αμινοξέα **Ser195**, **His57** και **Asp102** βρίσκονται σε μια κοιλότητα που σχηματίζεται μεταξύ των δύο περιοχών. Αυτή η κοιλότητα, που περιλαμβάνει τμήματα και των δύο περιοχών, αποτελεί και τη θέση δέσμευσης του υποστρώματος.



Σχήμα 5.3.1: Αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου της ελαστάσης.



Σχήμα 5.3.2: Αμινοξική αλληλουχία της ανθρώπινης ουδετερόφιλης ελαστάσης³⁴⁴ (με κίτρινο χρώμα επισημαίνονται τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου του ενζύμου).

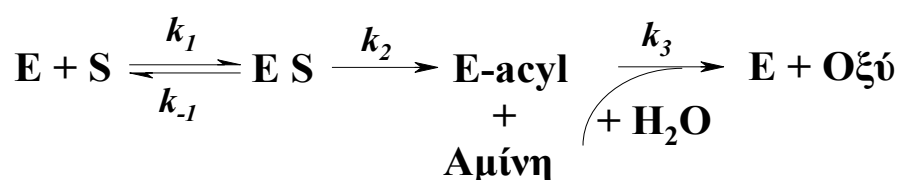
Τόσο στην Παγκρεατική, όσο και στη Λευκοκυτταρική Ελαστάση, η καταλυτική τριάδα και τα αμινοξέα που σχηματίζουν τον κεντρικό σκελετό της πλευράς του ενζύμου που αλληλεπιδρά (όπως για παράδειγμα τα πεπτιδικά τμήματα 189-Ser195, 213-216, 226-228, και το αμινοξύ 41), είναι δομικά παρόμοια, με τα άτομα των α-ανθράκων τους να παρουσιάζουν απόκλιση μόνο κατά 0,35 Å. Όταν τα άτομα του πεπτιδικού σκελετού βρίσκονται σε υπέρθεση, 55 άτομα από αυτά παρουσιάζουν απόκλιση κατά 0,26 Å, ενώ η μεγαλύτερη απόκλιση εμφανίζεται στα αμινοξέα 192 και 226.¹²⁴ Μεταξύ των δύο ελαστασών υπάρχουν σημαντικές διαρθρωτικές διαφορές, οι οποίες περιλαμβάνουν 10 διαγραφές (αποτελούνται από 27 αμινοξέα) και από 2 προσθήκες (αποτελούνται από 5 αμινοξέα). Επίσης, μεγαλύτερες χωρικές αποκλίσεις μεταξύ των πεπτιδικών αλυσίδων γίνονται στα αμινοξέα 25, 75-79, 88, 130-133, 147-150, 177-180 και 240-243. Από την άλλη, οι μεγαλύτερες δομικές διαφορές παρατηρούνται γύρω από μια περιοχή που λέγεται “βρόχος μεθειονίνης” και βρίσκεται σε διαφορετικό σημείο για κάθε πρωτεάση: στην PPE και στην α-χυμοθρυψίνη βρίσκεται γύρω από το αμινοξύ Met180, ενώ στην HLE βρίσκεται γύρω από το αμινοξύ Asn. Διαφορά επίσης παρουσιάζει και ένα από τα τέσσερα δισουλφιδικά ζεύγη, το Cys168-Cys182, το οποίο διαφέρει σε μέγεθος και έχει διαφορετική διαμόρφωση εξαιτίας της μεγάλης διαγραφής που γίνεται στην HLE. Σε κάποιες πρωτεάσες των σπονδυλωτών, όπως και στην PPE παρατηρείται μια δομή ενδιάμεσου έλικα γύρω από το

αμινοξικό κατάλοιπο Cys168, κάτι που δεν υπάρχει στην HLE. Τα υπόλοιπα τρία δισουλφιδικά ζεύγη (42-58, 136-201 και 191-220) είναι γεωμετρικά παρόμοια και στις δύο ελαστάσες. Η παγκρεατική ελαστάση και τα πεπτικά ένζυμα θρυψίνη³⁴⁸ και α-χυμοθρυψίνη³⁴⁹ διαθέτουν επίσης ένα βρόχο δέσμωσης ασβεστίου που αποτελείται από το πεπτιδικό τμήμα Glu70-Glu80, με τα αμινοξέα Glu να λειτουργούν ως συνδετήρες. Η δέσμωση του ασβεστίου σε αυτό το βρόχο συμβάλλει στη σταθερότητα του μορίου, αλλά δεν επηρεάζει την καταλυτική του δράση.³⁴⁸ Το αντίστοιχο πεπτιδικό τμήμα της HLE παρουσιάζει χωρική ομοιότητα με τον βρόχο ασβεστίου της παγκρεατικής ελαστάσης και της θρυψίνης. Η μόνη διαφορά είναι ότι το αμινοξύ Glu80 της παγκρεατικής ελαστάσης και της θρυψίνης, στη Λευκοκυτταρική ελαστάση αντικαθίσταται από το αμινοξύ Arg. Η τελική γουανιδινο-ομάδα της Arg80 της HLE, καταλαμβάνει την αντίστοιχη θέση ασβεστίου στην PPE και στη θρυψίνη. Έτσι, η HLE φέρει το δικό της σταθεροποιητικό θετικό φορτίο και δεν εξαρτάται από τα ιόντα Ca²⁺ για τη σταθερότητά της.

5.3.1.3 Μηχανισμός δράσης ελαστάσης

Ο μηχανισμός δράσης της ελαστάσης παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με το μηχανισμό δράσης όλων των σερινοπρωτεασών, αν και σε κάποια ένζυμα διαφέρουν οι αρχές εξέλιξής τους. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των σερινοπρωτεασών, και μεταξύ τους και της ελαστάσης, είναι η καταλυτική τριάδα αμινοξέων, **Asp102- His57- Ser195**. Βασικό χαρακτηριστικό της δράσης των σερινοπρωτεασών είναι η παρουσία της ενεργής σερίνης στο καταλυτικό τους κέντρο, το οποίο συμπεριφέρεται ως πυρηνόφιλο. Ο γεωμετρικός προσανατολισμός των δραστικών αυτών αμινοξέων, ανεξάρτητα από τη συγκεκριμένη σερινοπρωτεΐνάση, είναι παρόμοιος και δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τις επιμέρους δευτεροταγείς δομές, αλλά ούτε και από την τριτοταγή δομή τους.³⁵⁰

Ένα κοινά αποδεκτό γενικό σχήμα δράσης των σερινοπρωτεΐνασών, το οποίο ισχύει και για τις κυστεΐνοπρωτεάσες, είναι το ακόλουθο (**Σχήμα 5.4.3.3**).³⁵¹



Σχήμα 5.3.3: Γενικό σχήμα δράσης “τριών σταδίων” για σερινοπρωτεΐνάσες και για κυστεΐνοπρωτεΐνάσες.

Είναι κοινά αποδεκτό ότι οι σερινοπρωτεΐνάσες (όπως και οι κυστεΐνοπρωτεΐνάσες) χρησιμοποιούν ένα μηχανισμό διπλής αντικατάστασης, στον οποίο η δραστική **Ser** (ή αντίστοιχα η Cys) του καταλυτικού κέντρου ακυλιώνεται με ταυτόχρονη απομάκρυνση μιας αμίνης, ενώ σχηματίζεται το ενδιάμεσο ακυλο-ένζυμο, το οποίο με τη σειρά του υδρολύεται για να δώσει το καρβοξυλικό προϊόν (οξύ). Η αποακυλίωση είναι ένα στάδιο μηχανιστικά ανάλογο της ακυλίωσης.³⁵² Συγκεκριμένα, το οξυγόνο του H₂O (του διαλύτη), που λαμβάνει μέρος στην αντίδραση, γίνεται αρκετά πυρηνόφιλο εξαιτίας της δημιουργίας δεσμού υδρογόνου με το άζωτο της δραστικής **His**, με αποτέλεσμα να μπορεί να διασπά το ακυλοένζυμο μέσω σχηματισμού

ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου και να παράγει το δεύτερο προϊόν (οξύ).³⁵¹ Αρκετά δομικά και άλλα χαρακτηριστικά, τα οποία διαφέρουν από ένζυμο σε ένζυμο (όπως τα αμινοξέα του πρωτεϊνικού σκελετού που απαρτίζουν της υποπεριοχές της ενεργού περιοχής (S1, S2 κλπ), φαίνεται ότι επηρεάζουν τόσο την ακυλίωση όσο και την αποακυλίωση.

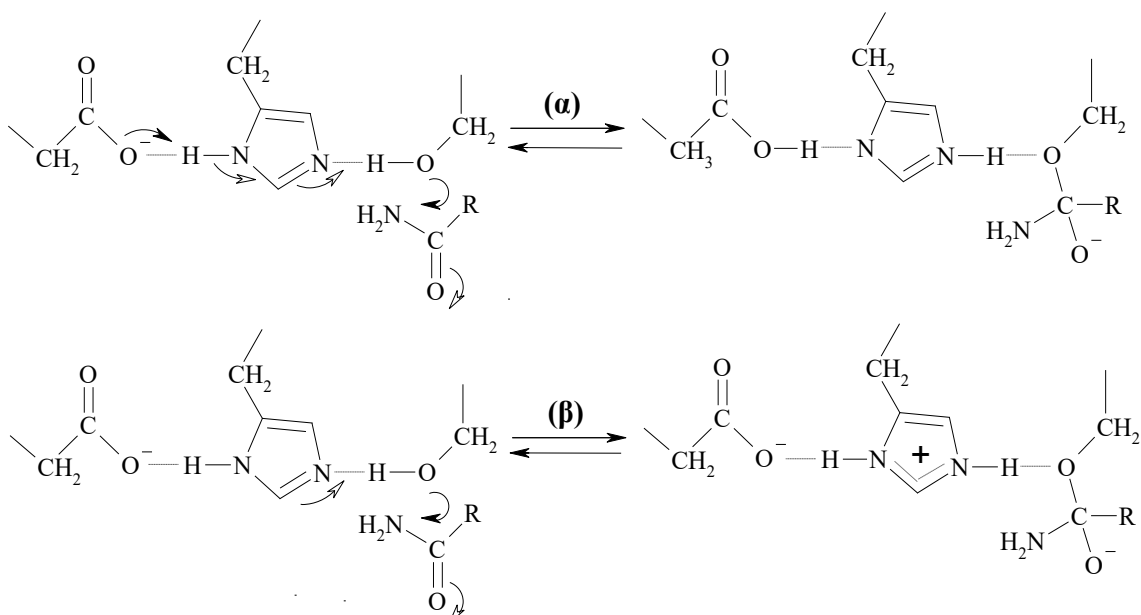
Έως σήμερα, έχουν προταθεί διάφοροι πιθανοί τρόποι δράσης της καταλυτικής τριάδας των σερινοπρωτεϊνών (**Asp102/His57/Ser195**, αρίθμηση Χυμοθρυψίνης) από τους οποίους οι περισσότεροι αποδοκτοί είναι οι εξής:

(α) Το “σύστημα ή σύμπλοκο μεταφοράς φορτίου” (Σ.Μ.Φ.) και

(β) Η “κατάλυση γενικού οξέος-γενικής βάσης”^{352,353}

(α) Το σύστημα μεταφοράς φορτίου (**Charge Relay System**)³⁵³ συνίσταται από αλυσίδες δεσμών υδρογόνου μεταξύ της πυρηνόφιλης **Ser195** και του ιμιδαζολίου της **His57**, αλλά και μεταξύ του α-καρβοξυλίου του **Asp102** και του ιμιδαζολίου της **His57**. Δεσμοί υδρογόνου έχουν βρεθεί επίσης και μεταξύ των καταλυτικών αμινοξέων και άλλων ομάδων του σκελετού των σερινοπρωτεϊνών.³⁵⁴ Ονομάστηκε σύστημα μεταφοράς φορτίου, επειδή το αρνητικό φορτίο μεταφέρεται, μέσω δεσμών υδρογόνου, χωρίς να εντοπίζεται σ’ ένα συγκεκριμένο αμινοξύ, οδηγώντας σε αύξηση του πυρηνόφιλου χαρακτήρα της καταλυτικής **Ser**, με ταυτόχρονη αύξηση της καταλυτικής ικανότητας του ενζύμου. Αυτό δεν θα συνέβαινε αν το αρνητικό φορτίο ήταν εντοπισμένο σε μια γειτονική θέση της καταλυτικής **Ser**. Το **Asp** της καταλυτικής τριάδας, εκτός από τη διατήρηση του κατάλληλου προσανατολισμού του ιμιδαζολίου της καταλυτικής **His**, δρα και ως τελική βάση δεσμεύοντας ένα πρωτόνιο, κατά την κατάλυση, ενώ η καταλυτική **His** λειτουργεί ως ενδιάμεσο για τη μεταφορά του πρωτονίου¹²⁶ (**Σχήμα 5.3.4 (α)**).

(β) Στην κατάλυση γενικού οξέος-γενικής βάση (**General Acid-Base Catalysis**),^{352,353} το **Asp** της καταλυτικής τριάδας σταθεροποιεί ηλεκτροστατικά, με το αρνητικό φορτίο του, τη θετικά φορτισμένη **His** κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Στην περίπτωση αυτή, κανένα πρωτόνιο δε μεταφέρεται προς το **Asp**, ενώ η **His** λειτουργεί ως δότης ενός πρωτονίου (ακυλίωση) και στη συνέχεια ως δέκτης ενός πρωτονίου (αποακυλίωση) ώστε να είναι δυνατή η κατάλυση γενικού οξέος-γενικής βάσης³⁵² (**Σχήμα 5.3.4 (β)**).

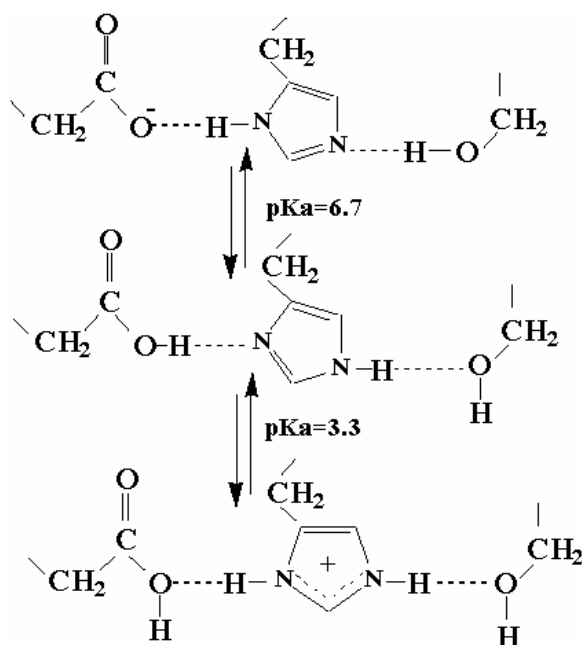


Σχήμα 5.3.4: Ακυλίωση σερινοπρωτεΐναισών: **(α)** Μεταφορά δύο πρωτονίων (σύστημα συμπλόκου μεταφοράς φορτίου) και **(β)** Μεταφορά ενός πρωτονίου (κατάλυση γενικού οξέος-γενικής βάσης).

Χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με τον αριθμό και το είδος των πρωτονίων που μεταφέρονται κατά την πορεία από την αρχική στη μεταβατική κατάσταση των σταδίων ακυλίωσης και αποακυλίωσης των σερινοπρωτεΐναισών προκύπτουν με εφαρμογή της μεθοδολογίας καταμέτρησης πρωτονίων.³⁵⁰ Για παράδειγμα εφαρμόζοντας αυτή τη μεθοδολογία και έχοντας ως πρότυπο ένζυμο την ελαστάση από ανθρώπινα λευκοκύτταρα (HLE), έχει βρεθεί ότι συνθετικά πεπτιδικά υποστρώματά της με περισσότερα από τέσσερα αμινοξέα και με σχετικά μικρές K_m , έδειξαν μεταφορά δύο πρωτονίων κατά την πορεία από την αρχική στη μεταβατική κατάσταση του σταδίου ακυλίωσης του ενζύμου (κατάλυση με σύστημα μεταφοράς φορτίου). Όμως, συνθετικά πεπτιδικά υποστρώματά της με λιγότερα από τρία αμινοξέα και με σχετικά μεγάλες K_m , έδειξαν μεταφορά ενός πρωτονίου κατά την ίδια πορεία (κατάλυση γενικού οξέος - γενικής βάσης)⁴, όπως φαίνεται ενδεικτικά στο **Σχήμα 5.3.4**.

Κατά τη διαδικασία της ακυλίωσης των σερινοπρωτεΐναισών η καταλυτική **Ser**, η οποία έχει δώσει το πρωτόνιο της στην καταλυτική **His** και έχει ήδη γίνει αρκετά πυρηνόφιλη ώστε να προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα του υπό υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού του υποστρώματος. Η πυρηνόφιλη προσβολή από τη **Ser** οδηγεί στην δημιουργία του ακυλοενζύμου μέσω ενός τετραεδρικού **οξυανιόντος**, το οποίο σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου με συγκεκριμένη περιοχή του ενζύμου, μέσω της **οπής του οξυανιόντος**.^{3,9,10} Ο σχηματισμός της οπής του οξυανιόντος είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την κατάλυση από τις σερινοπρωτεΐνάσες. Το τετραεδρικό **οξυανιόν** μπορεί να ανιχνευθεί, κάτω από κατάλληλες συνθήκες, και μάλιστα σε ειδικές περιπτώσεις γίνεται διακριτό ενδιάμεσο το οποίο έχει μικρό χρόνο ημιζωής.⁹

Στην περίπτωση των σερινοπρωτεΐναισών το κατάλοιπο της καταλυτικής **His** χάνει το πρωτόνιο του σε τιμή $pH \approx 3,30$, ενώ για το ελεύθερο αμινοξύ έχει βρεθεί μια τιμή $pK_a = 6,40$. Το κατάλοιπο του καταλυτικού **Asp** χάνει το πρωτόνιο του σε τιμή $pH = 6,70$, ενώ για το ελεύθερο **Asp** έχει βρεθεί μια τιμή $pK_a = 3,60$. Επομένως σε ρυθμιστικά διαλύματα αντίδρασης με τιμές pH μεταξύ 3,30 και 6,70, και τα δύο αμινοξέα είναι ουδέτερα, ενώ σε μέσα (διαλύματα) τιμών $pH > 6,70$ το ένζυμο αποκτά τη μέγιστη καταλυτική του δραστηριότητα, αφού τότε το καταλυτικό **Asp** υφίσταται στην αρνητικά ιονισμένη μορφή **Asp**(COO^-)³, σύμφωνα με το **Σχήμα 5.3.5**.



Σχήμα 5.3.5: Υπόδειγμα ιονισμού του καταλυτικού κέντρου των σερινοπρωτεϊνών (σύμπλοκο μεταφοράς φορτίου), σε διαλύματα αντίδρασης με τιμές pH μεταξύ 3,30 και 6,70 (α-Λυτική ενδοπεπτιδάση - EC 3.4.21.12).

Τα παραπάνω συμπεράσματα προέκυψαν μετά από εκλεκτικό εμπλουτισμό με ^{13}C του **C2** της μοναδικής καταλυτικής **His** της βακτηριακής σερινοπρωτεΐνάσης α-Λυτική ενδοπεπτιδάση (EC 3.4.21.12)¹¹. Έτσι, μελετήθηκε απ' ευθείας η καταλυτική τριάδα **Ser/His/Asp** του ενζύμου αυτού με φασματοσκοπία NMR. Βρέθηκε ότι σε διάλυμα αντίδρασης τιμών pH < 3,30 το ιμιδαζόλιο της καταλυτικής **His** προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο και αποκτά θετικό φορτίο, ενώ σε τιμές pH > 6,70 το καταλυτικό **Asp** χάνει, αντίστοιχα ένα πρωτόνιο. Άρα, σε διαλύματα αντίδρασης τιμών 3,30 < pH < 6,70, τα καταλυτικά κατάλοιπα **His** και **Asp** δεν κατέχουν ηλεκτρικό φορτίο, ενώ η καταλυτική **His** διαδραματίζει έναν επιπλέον ρόλο¹². Θωρακίζει το αρνητικά φορτισμένο **Asp** από τα μόρια του διαλύτη - H₂O εξασφαλίζοντας στο ανιόν αυτό ένα υδρόφοβο περιβάλλον έτσι ώστε να μπορεί να δεχθεί ένα κατιόν υδρογόνου μόνο από την καταλυτική **His** και όχι από κάποιο μόριο H₂O.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι παρόλο που ο μηχανισμός δράσης των σερινοπρωτεϊνών που περιγράφηκε είναι ο γενικότερα αποδεκτός, ωστόσο υπάρχουν μέλη της υποομάδας αυτής τα οποία διαφοροποιούνται ως προς τα ενεργά κατάλοιπα του καταλυτικού κέντρου και το μηχανισμό δράσης.

5.3.1.4 Βιολογική σημασία της δράσης της ελαστάσης

Η ουδετερόφιλη ελαστάση διαθέτει ισχυρή πρωτεολυτική δράση, η οποία είναι απαραίτητη για τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων του συνδετικού ιστού, καθώς και για την καταστροφή ξένων βακτηρίων που εισβάλλουν στον ανθρώπινο οργανισμό, οι οποίοι δε διαθέτουν καθόλου ελαστίνη στο περίβλημά τους.¹²⁴ Παρά το σημαντικό τους ρόλο, οι ελαστάσες μπορεί να είναι αρκετά καταστροφικές σε περίπτωση ανεξέλεγκτης και μη ελεγχόμενης δράσης, καθώς μπορούν να καταστρέψουν πολλές πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού. Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι ελαστάσες ρυθμίζονται προσεκτικά με διαμερισματοποίηση, ή αναστέλλονται από φυσικούς αναστολείς που αναστέλλουν την κυκλοφορία της πρωτεάσης στο πλάσμα. Κάθε είδος

ελαστάσης που εισέρχεται στο πλάσμα συμπλοκοποιείται με γρήγορο ρυθμό με φυσικούς αναστολείς όπως είναι οι α- αναστολείς πρωτεασών (όπως είναι η αντιθρυψίνη) και η cy2-μακροσφαιρίνη. Τα σύμπλοκα που σχηματίζονται καθαρίζονται από το πλάσμα μέσω του ήπατος και/ή των μακροφάγων και αποικοδομούνται. Όταν υπάρχει διαταραχή της ισορροπίας που προκαλείται από την έλλειψη ενός αποτελεσματικού αναστολέα ή από ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα ελαστάσης, μπορεί να προκληθεί σοβαρή μόνιμη βλάβη στους ιστούς. Η παγκρεατική ελαστάση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της παγκρεατίτιδας, η οποία προκαλείται όταν τα παγκρεατικά ζυμογόνα ενεργοποιούνται και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος. Αντίθετα, η μη ελεγχόμενη δράση της ουδετερόφιλης ελαστάσης έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη δαφόρων ασθενειών όπως είναι το πνευμονικό εμφύσημα, το σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας, διάφορες φλεγμονές των πνευμόνων, η σπειραματονεφρίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, καθώς και άλλες φλεγμονώδεις διαταραχές.¹²⁴ Η ελαστάση διαδραματίζει ζωτικό ρόλο και στην ενδογενή γήρανση του δέρματος, καθώς η δράση της σχετικά με τη διάσπαση της ελαστίνης αυξάνεται με το πέρασμα της ηλικίας.³⁵⁵ Από την άλλη, λόγω της ενεργοποίησής της από την ακτινοβολία UVB, αποτελεί σημαντικό παράγοντα και της εξωγενούς γήρανσης. Για το λόγο αυτό, είναι σημαντική η μελέτη και η ανάπτυξη αναστολέων ως προς τη δράση της ελαστάσης.

5.3.2 Υλικά και Μέθοδοι

5.3.2.A Υλικά

5.3.2.A.1 Ένζυμα

Η προμήθεια του ενζυμικού παρασκευάσματος της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη έγινε από την εταιρεία SIGMA (Elastase from porcine pancreas, Type I, ≥ 4.0 units/mg protein, E1250).

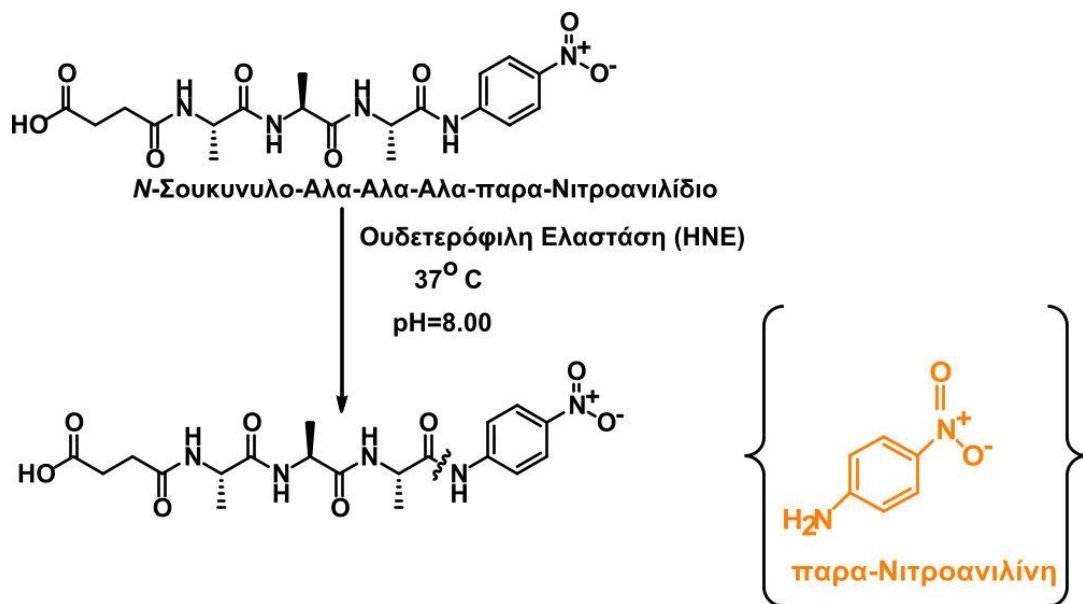
5.3.2.A.2 Χημικά αντιδραστήρια

Η προμήθεια όλων των διαλυτών και του δευτεριωμένου υδατικού διαλύτη (D₂O) έγινε από την εταιρεία SIGMA. Η προμήθεια του υποστρώματος της ελαστάσης *N*-Σουκουυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-Νιτροανιλιδιο έγινε από την εταιρεία Carbosynth. Από τα φυσικά προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν, η προμήθεια του ροσμαρινικού οξέος έγινε από την εταιρεία SIGMA, ενώ του καφεϊκού οξέος, της κερκετίνης, του γαλλικού οξέος, του ουρσολικού οξέος και το ολεανολικού οξέος έγινε από την εταιρεία Carbosynth. Η προμήθεια των μελετούμενων φαρμακευτικών φυτών έγινε από τοπικό παραγωγό της περιοχής της Ηπείρου.

5.3.2.B. Μέθοδοι

5.3.2.B.1 *In vitro* μελέτη αναστολής της ελαστάσης από φυσικό προϊόν και φυτικό εκχύλισμα με φασματοσκοπία UV

Αρχή Μεθόδου: Για τη διερεύνηση της δραστικότητας της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου, πραγματοποιείται φωτομετρική μελέτη με φασματοσκοπία UV, της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης χρησιμοποιώντας ως υποστρώμα το πεπτίδιο *N*-Σουκουυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-νιτροανιλίδιο (*N*-Succ-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide ή Suc-AAA-pNA) (**Σχήμα 5.3.6**). Συγκεκριμένα, μελετάται η ανάπτυξη χρώματος που οφείλεται στο προϊόν παρα-Νιτροανιλίνη (pNA) που προκύπτει από τη διάσπαση του υποστρώματος από την ελαστάση. Η ελεύθερη παρα-Νιτροανιλίνη έχει κίτρινο χρώμα και η ανάπτυξη του χρώματος παρακολουθείται με καταγραφή της απορρόφησης στα 405 nm για πέντε λεπτά, στους 37° C.



Σχήμα 5.3.6: Σχηματική απεικόνιση της ενζυμικής διάσπασης του υποστρώματος *N*-Σουκουυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-Νιτροανιλίδιο από την παγκρεατική ελαστάση χοίρου (PPE).

Η αντίδραση της ελαστάσης μελετήθηκε παρουσία επτά αιθανολικών και επτά υδατικών εκχυλισμάτων, αλλά και γνωστού αναστολέα, της κερκετίνης, ώστε να διερευνηθεί η συμπεριφορά τους ως αναστολείς ή ενισχυτές της ελαστάσης. Για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της ελαστάσης, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε πηγαδάκια μικροπλάκας ELISA. Η μελέτη της ελαστάσης πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο UV στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Καθηγητή κ. Χαράλαμπου Σταμάτη, του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Αρχικά, παρασκευάζονται στοκ ενζύμου συγκέντρωσης 2 U/mL και υποστρώματος 2,5 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 25 mM, pH 8,0. Η ενζυμική αντίδραση διεξάγεται στους 37°C και σε τελικό όγκο 200 μL που αποτελείται από: 0,01 U/mL ελαστάσης, 0,75 mM υποστρώματος και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 25 mM, pH 8,0. Η παραγωγή του προϊόντος παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά στα 405 nm ανά 1 λεπτό για 5 λεπτά συνολικά. Προκειμένου να εξεταστεί η ανασταλτική ικανότητα των εκχυλισμάτων/πρότυπων ενώσεων, τα στοκ των οποίων διαλυτοποιούνται στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, πραγματοποιείται 10-λεπτη προ-επώαση ενζύμου και ρυθμιστικού διαλύματος απουσία του δείγματος αλλά και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του στους 37°C. Τα

εκχυλίσματα μελετήθηκαν σ' ένα εύρος συγκεντρώσεων 100-4000 µg/mL. Μετά το πέρας των 10 λεπτών, προστίθεται ο αντίστοιχος όγκος υποστρώματος και η αντίδραση παρακολουθείται στα 405 nm ανά 1 λεπτό, για συνολικό χρονικό διάστημα 5 λεπτών. Μέσω της σύγκρισης της ταχύτητας της αντίδρασης στις διαφορετικές συγκεντρώσεις του δείγματος, με την ταχύτητα της αντίδρασης απουσία του, υπολογίζεται η υπολειπόμενη δραστηριότητα του ενζύμου στις διάφορες συγκεντρώσεις του δείγματος και ακολούθως εξάγεται το ποσοστό αναστολής ή ενεργοποίησης το ενζύμου στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Όλα τα δείγματα μελετήθηκαν εις διπλούν.

5.3.2.B.2 Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης με φασματοσκοπία 1D ¹H NMR

Η *in situ* μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης πραγματοποιήθηκε σ' ένα σωληνάκι NMR 5 mm στους 37°C, σε συνολικό όγκο αντίδρασης 500 µL. Η ενζυμική αντίδραση αποτελείται από 0,01 U/mL παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου (Porcine Pancreatic Elastase-PPE), 0,75 mM υποστρώματος και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCI 25 mM σε 100% D₂O, pD=8,0. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε προσθέτοντας τον διάλυμα Tris-DCI, το οποίο περιέχει εσωτερικό πρότυπο γνωστής συγκέντρωσης και 0,01 U/mL διαλύματος PPE στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Το δείγμα επωάζεται για δέκα λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια προστίθενται 0,75 mM διαλύματος Succ-AAA-p-NA σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCI. Το μείγμα ανακινείται έντονα και μεταφέρεται σε σωληνάκι NMR 5 mm. Το δείγμα τοποθετείται σε όργανο NMR συχνότητας 500 MHz, Bruker Avance (Bruker Rheinstetten, Germany), χρησιμοποιώντας το λογισμικό Topspin 3.2 και πραγματοποιείται καταγραφή φασμάτων πρωτονίου NMR ανά δέκα λεπτά, για χρονικό διάστημα 3 ωρών, στους 37°C. Όλα τα δεδομένα έχουν συλλεχθεί χρησιμοποιώντας παλμικές ακολουθίες που βρίσκονται στις βιβλιοθήκες παλμών της Bruker. Όλα τα φάσματα καταγράφηκαν με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στην **Παράγραφο 5.1.2.B.2**.

5.3.2.B.3 Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη αναστολής της ελαστάσης από φυσικό αναστολέα και φυτικό εκχύλισμα με φασματοσκοπία 1D ¹H NMR

Η *in situ* μελέτη της αναστολής της ελαστάσης μελετήθηκε αρχικά για την κερκετίνη που είναι γνωστός φυσικός αναστολέας, αλλά και για φυτικά εκχυλίσματα. Η *in situ* μελέτη πραγματοποιήθηκε σ' ένα σωληνάκι NMR 5 mm στους 37°C, σε συνολικό όγκο αντίδρασης 500 µL. Η αντίδραση αποτελείται από 0,01 U/mL PPE, 0,75 mM Suc-AAA-pNA, ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCI 25 mM σε 100% D₂O, pD=8,0 και την κατάλληλη ποσότητα αναστολέα ή εκχυλίσματος, ώστε στην αντίδραση να έχει συγκέντρωση 100 µg/mL. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε προσθέτοντας τον κατάλληλο όγκο διαλύματος DCI ή NaOD. Αρχικά, σε σωληνάριο Eppendorf των 1.5 mL φέρονται ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCI 25 mM, pD=8,0, το οποίο περιέχει εσωτερικό πρότυπο γνωστής συγκέντρωσης, 0,01 U/mL διαλύματος PPE στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, αναστολέας στην τιμή IC₅₀ που προέκυψε από τις μετρήσεις με φασματοφωτομετρία UV, ή

φυτικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 100 µg/mL διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα. Το δείγμα επωάζεται για 10 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια προστίθενται 0,75 mM διαλύματος *N*-Suc-AAA-pNA σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCI 25 mM, pH=8,0, το μείγμα ανακινείται έντονα και μεταφέρεται σε σωληνάκι NMR 5 mm. Ακολουθεί καταγραφή 1D ¹H NMR φασμάτων, σε διαφορετικά χρονικά σημεία: 20 λεπτά, 60 λεπτά και 120 λεπτά. Μετά την καταγραφή του πρώτου φάσματος, το σωληνάκι NMR μεταφέρεται σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα, όπου ανακινείται στις 800 στροφές/μίν και σε θερμοκρασία 37°C, μέχρις να συμπληρωθεί το επόμενο χρονικό σημείο. Η καταγραφή των φασμάτων NMR έγινε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στην παράγραφο **5.1.2.B.2**.

5.3.2.B.4 Μελέτη αλληλεπίδρασης των φυσικών προϊόντων και των φυτικών εκχυλισμάτων με την ελασάση, με τη μεθοδολογία Saturation Transfer Difference (STD) NMR-Χαρτογράφηση των επίτοπων πρόσδεσης

Για τα πειράματα STD NMR τα δείγματα των φυσικών προϊόντων και των εκχυλισμάτων παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCI 25 mM, pH=8,0, σε 100% D₂O. Τα δείγματα NMR προετοιμάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCI 25 mM με 100% δευτεριωμένο νερό (D₂O). Το pH ρυθμίστηκε στο 8,0 με την προσθήκη κατάλληλου όγκου DCI ή NaOD. Η συγκέντρωση των φυσικών προϊόντων στο σωληνάκι NMR (συνολικός όγκος 500 µL) ήταν 1 mM, ενώ η συγκέντρωση του ενζύμου στο σωληνάκι NMR ήταν 49,5 µM, με τελική αναλογία του συμπλέγματος υποκαταστάτης:πρωτεΐνη 20:1. Η συγκέντρωση των εκχυλισμάτων στο σωληνάκι NMR (συνολικός όγκος 500 µL) ήταν 3000 µg/mL, ενώ η συγκέντρωση του ενζύμου στο σωληνάκι NMR ήταν 49,5 µM, με τελική αναλογία του συμπλέγματος υποκαταστάτης-πρωτεΐνη 65:1. Τα πειράματα STD καταγράφηκαν σε θερμοκρασία 37°C, σε φασματομέτρο Bruker AV 500 MHz (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany), χρησιμοποιώντας το λογισμικό Topspin 3.2. Τα φάσματα καταγράφηκαν με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στην **Παράγραφο 5.1.2.B.5**.

5.3.2.B.5 Χαρτογράφηση των επίτοπων πρόσδεσης- Ο συντελεστής απόδοσης πρόσδεσης

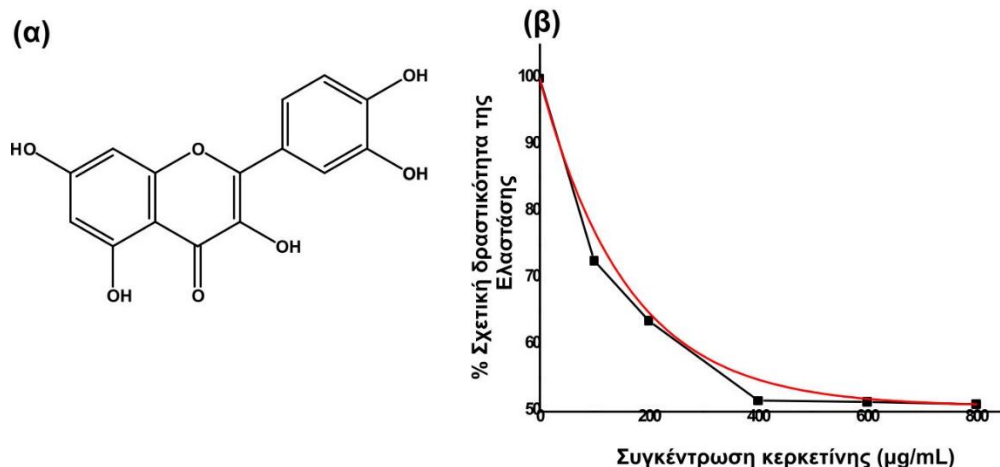
Ο συντελεστής απόδοσης πρόσδεσης (STD amplification factor) υπολογίστηκε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στην **Παράγραφο 5.1.2.B.5**.

5.3.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

5.3.3.1 Αποτελέσματα από την *in vitro* μελέτη αναστολής της ελαστάσης από φυσικό προϊόν και φυτικό εκχύλισμα μέσω φασματοσκοπίας UV

5.3.3.1.1 Αποτελέσματα από την *in vitro* μελέτη αναστολής της ελαστάσης από το φυσικό προϊόν κερκετίνη

Η ελαστάση διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη φλεγμονών, και για το λόγο αυτό έχει μελετηθεί εκτεταμένα η εύρεση αναστολέων, τόσο φυσικών όσο και συνθετικών. Ως προς τους φυσικούς αναστολείς, έχει μελετηθεί μεγάλος αριθμός φυσικών προϊόντων για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της ελαστάσης. Μεταξύ άλλων, οι φλαβονοειδείς ενώσεις, και κυρίως αυτές που έχουν κατεχολική δομή έχουν αποδειχτεί ισχυροί αναστολείς της ελαστάσης. Η κερκετίνη είναι ένα από τα φλαβονοειδή που έχουν μελετηθεί ως προς την ανασταλτική τους δράση ως προς την ελαστάση και έχει αποδειχθεί πολύ καλός αναστολέας.^{356–358} Η κατεχολική δομή της, όπως και ο αριθμός των φαινολικών (-OH) ομάδων στο μόριό της, ευνοεί την αλληλεπίδρασή της με το καταλυτικό κέντρο της ελαστάσης, μειώνοντας την ενεργότητά της. Η ανασταλτική δράση της κερκετίνης ως προς την ελαστάση μελετήθηκε σ' ένα εύρος συγκεντρώσεων 0-800 µg/mL (**Σχήμα 5.3.7**).



Σχήμα 5.3.7: (α) Δομή της κερκετίνης (β) Γραφική απεικόνιση της % σχετικής δραστηριότητας της ελαστάσης, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις κερκετίνης.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα του **Σχήματος 5.3.7**, η % σχετική δραστηριότητα της ελαστάσης, φτάνει στο 50% σε συγκέντρωση κερκετίνης ίση με 400 µg/mL, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, η ανασταλτική της δράση έχει φτάσει σε πλάτω.

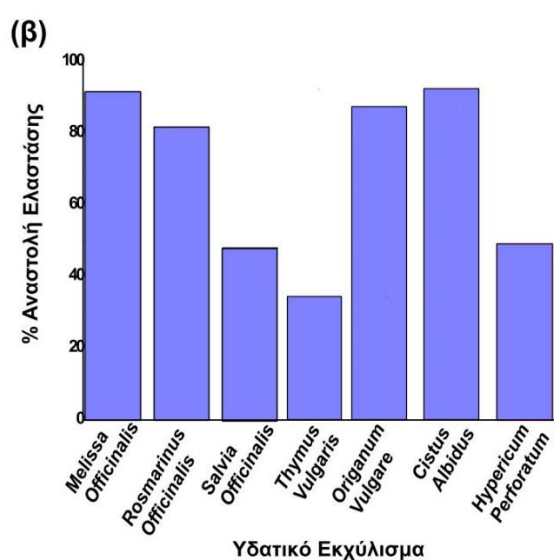
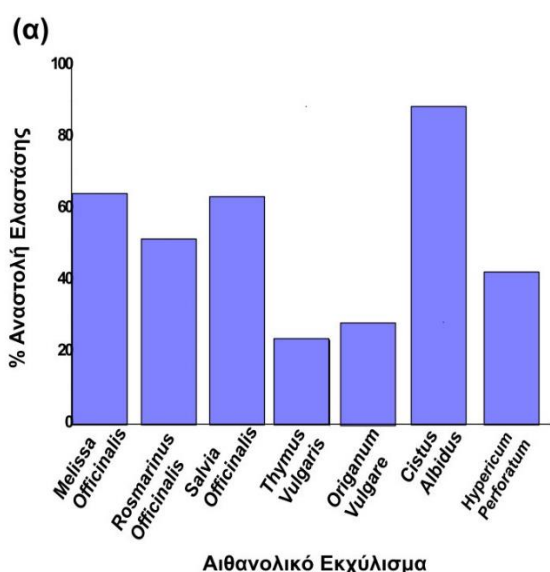
5.3.3.1.2 Αποτελέσματα από την *in vitro* μελέτη αναστολής ελαστάσης από φυτικά εκχυλίσματα

Τα επτά αιθανολικά και τα επτά υδατικά εκχυλίσματα από τα μελετούμενα φυτά: *Melissa Officinalis*, *Rosmarinus Officinalis*, *Salvia Officinalis*, *Thymus Vulgaris*, *Origanum Vulgare*,

Cistus Albidus και *Hypericum Perforatum*, μελετήθηκαν ως προς τη συμπεριφορά τους όταν συμμετέχουν στην αντίδραση της ελαστάσης. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε “σάρωση” της ανασταλτικής δράσης των εκχυλισμάτων σε συγκεντρώσεις 100 µg/mL και 1000 µg/mL. Στον παρακάτω Πίνακα και στο αντίστοιχο Διάγραμμα 5.3.1 παρουσιάζονται οι τιμές αναστολής των αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων ως προς τη δράση της ελαστάσης σε συγκέντρωση 100 µg/mL.

Πίνακας 5.3.1: Τιμές ανασταλτικής δράσης αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων ως προς την δράση της ελαστάσης σε συγκέντρωση 100 µg/mL, όπως προσδιορίστηκαν από τη μελέτη με φασματοσκοπία UV.

A/A	Φυτό/Αιθανολικό Εκχύλισμα	% Αναστολή σε συγκέντρωση 100 µg/ml	Φυτό/Υδατικό Εκχύλισμα	% Αναστολή σε συγκέντρωση 100 µg/ml
1.	<i>Melissa Officinalis</i> (Μελισσόχορτο)	64.56±0.0006	<i>Melissa Officinalis</i> (Μελισσόχορτο)	91.65±0.0003
2.	<i>Rosmarinus Officinalis</i> (Δεντρολίβανο)	51.73±0.0002	<i>Rosmarinus Officinalis</i> (Δεντρολίβανο)	81.87±0.0010
3.	<i>Salvia Officinalis</i> (Φασκόμηλο)	63.62±0.0013	<i>Salvia Officinalis</i> (Φασκόμηλο)	48.09±0.001
4.	<i>Thymus Vulgaris</i> (Θυμάρι)	24.03±0.0003	<i>Thymus Vulgaris</i> (Θυμάρι)	34.22±0.0003
5.	<i>Origanum Vulgare</i> (Ρίγανη)	28.59±0.0007	<i>Origanum Vulgare</i> (Ρίγανη)	87.32±0.0004
6.	<i>Cistus Albidus</i> (Λαδανιά)	88.91±0.0003	<i>Cistus Albidus</i> (Λαδανιά)	92.34±0.0001
7.	<i>Hypericum Perforatum</i> (Βαλσαμόχορτο)	42.53±0.000	<i>Hypericum Perforatum</i> (Βαλσαμόχορτο)	49.29±0.0010



Διάγραμμα 5.3.1: Γραφική απεικόνιση των πειραματικών τιμών αναστολής των αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων (σε συγκέντρωση 100 μg/mL) ως προς την παγκρεατική ελαστάση χοίρου, όπως προέκυψαν από τη μελέτη με φασματοσκοπία UV.

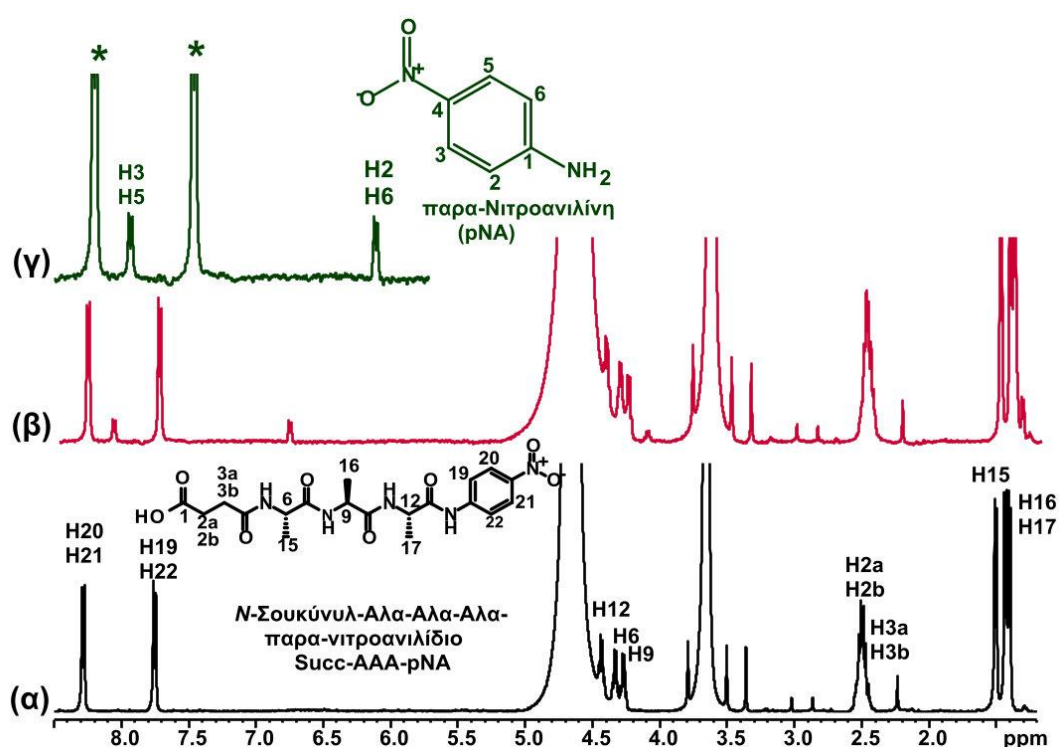
Οι φυσικοί δευτερογενείς μεταβολίτες και οι φυσικές πηγές προέλευσής τους έχουν μελετηθεί εκτεταμένα για τις βιολογικές τους δράσεις, κυρίως λόγω του υψηλού αντιοξειδωτικού τους χαρακτήρα, ενώ πολλοί από αυτούς παρουσιάζουν και υψηλές αντιφλεγμονώδεις δράσεις, για αυτό και ο ρόλος τους στην αναστολή της ελαστάσης είναι πολύ σημαντικός. Κυριότερες οικογένειες δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν αποδειχτεί αποτελεσματικοί αναστολείς της ελαστάσης είναι τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα (υδροξυκιναμικά και βενζοϊκά οξέα, τα κινναμικά οξέα και τα παράγωγά τους,³⁵⁹ τα στυλβένια, οι χαλκόνες, οι ελλαγιταννίνες, τα πεντακυκλικά τριτερπένια, τα λιπαρά οξέα, τα κεραμίδια και οι ακυλοφλορογλυκινόλες.³⁶⁰

Όπως προκύπτει από τα πειράματα αναστολής, όλα τα εκχυλίσματα, και τα αιθανολικά και τα υδατικά, παρουσιάζουν ικανοποιητική αναστολή (> 30%) ως προς την PPE σε συγκέντρωση 100 μg/mL. Από τα αιθανολικά εκχυλίσματα, το εκχύλισμα του *Cistus Albidus* (λαδανιά) παρουσιάζει βέλτιστη αναστολή κατά 88,91%, ενώ ακολουθούν τα εκχυλίσματα των *Melissa Officinalis* (μελισσόχορτο), *Salvia Officinalis* (φασκόμηλο) και *Rosmarinus Officinalis* (δεντρολίβανο) με ανασταλτική δράση ίση με 64,56%, 63,62% και 51,72% αντίστοιχα. Χαμηλότερη αναστολή παρουσιάζει το εκχύλισμα των *Hypericum Perforatum* (βαλσαμόχορτο) (42,53%), *Origanum Vulgare* (ρίγανη) (28,59%) και *Thymus Vulgaris* (θυμάρι) (24,03%). Όσον αφορά τα υδατικά εκχυλίσματα, βέλτιστη ανασταλτική δράση σε συγκέντρωση 100 μg/mL παρουσιάζουν τα εκχυλίσματα των *Cistus Albidus* (λαδανιά) (92,34%), *Melissa Officinalis* (μελισσόχορτο) (91,65%), *Origanum Vulgare* (ρίγανη) (87,32%) και το *Rosmarinus Officinalis* (δεντρολίβανο) (81,87%). Από τα υπόλοιπα εκχυλίσματα, το *Hypericum Perforatum* (βαλσαμόχορτο), το *Salvia Officinalis* (φασκόμηλο) και το *Thymus Vulgaris* (θυμάρι) παρουσιάζουν μέτρια αναστολή με τιμές 49,29%, 48,09% και 34,22% αντίστοιχα. Στο μεγαλύτερο ποσοστό, η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων οφείλεται σε φαινόμενα συνέργειας μεταξύ των δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχονται στο καθένα. Ωστόσο, υπάρχουν συστατικά τα οποία βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό και είναι πιθανό να επηρεάζουν τη βιολογική δράση του εκάστοτε εκχυλίσματος. Η παρόμοια δράση που παρουσιάζουν τα αιθανολικά εκχυλίσματα του μελισσόχορτου, του φασκόμηλου και του δεντρολίβανου, μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα φυτά αυτά ανήκουν στην ίδια οικογένεια, των Χειλανθών, με αποτέλεσμα το φυτοχημικό προφίλ τους να είναι παρόμοιο. Κύρια συστατικά των εκχυλισμάτων είναι το ροσμαρινικό οξύ, η λουτεολίνη, η απιγενίνη και τα τριτερπένια ουρσολικό οξύ, ολεανολικό οξύ και μπετουλινικό οξύ, για τα οποία έχει αποδειχτεί ότι είναι πολύ καλοί αναστολείς της ελαστάσης.³⁶⁰ Επίσης, τα τερπενοειδή καρνοσικό οξύ και καρνοσόλη που περιέχονται σε αυτά τα φυτά έχουν μελετηθεί για την αποτελεσματική τους δράση έναντι φλεγμονών των κυττάρων.³⁶¹ Από την άλλη, το φυτοχημικό προφίλ της λαδανιάς (*Cistus Albidus*) είναι τελείως διαφορετικό από τα υπόλοιπα, καθώς ανήκει σε άλλη οικογένεια, στα Κιστοειδή. Βασικά συστατικά του εκχυλίσματος είναι το γαλλικό οξύ, η κερκετίνη και τα παράγωγά τους, κυρίως κατεχίνες (εστέρες του γαλλικού οξέος) και γλυκοζυλιωμένα παράγωγα της κερκετίνης, όπως είναι η κερκιτρίνη και η ισοκερκιτρίνη, τα οποία έχουν μελετηθεί για την ανασταλτική τους

δράση ως προς την ελαστάση, και έχει βρεθεί ότι έχουν ικανοποιητική αναστολή.^{356,362} Χαμηλότερη ανασταλτική δράση παρουσίασαν τα αιθανολικά εκχυλίσματα του βαλσαμόχορτου, της ρίγανης και του θυμαριού. Το βασικό συστατικό των εκχυλισμάτων της ρίγανης και του θυμαριού, το μονοτερπένιο καρβακρόλη έχει δείξει αποτελεσματική αναστολή του ενζύμου.³⁶³ Όσον αφορά τα υδατικά εκχυλίσματα, η παρόμοια δράση του μελισσόχορτου, του δεντρολίβανου και της ρίγανης, μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι ανήκουν στην ίδια οικογένεια, και στο φυτοχημικό τους προφίλ ανήκουν συστατικά όπως το ροσμαρινικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, και ορισμένα φλαβονοειδή τα οποία είναι πολύ καλοί αναστολείς της ελαστάσης.³⁶⁰ Από την άλλη, η αυξημένη ανασταλτική δράση του υδατικού εκχυλίσματος της λαδανιάς οφείλεται στην παρουσία του γαλλικού οξέος και των παραγώγων του, όπως και στα παράγωγα της κερκετίνης.^{356,357}

5.3.3.2 Αποτελέσματα από την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης

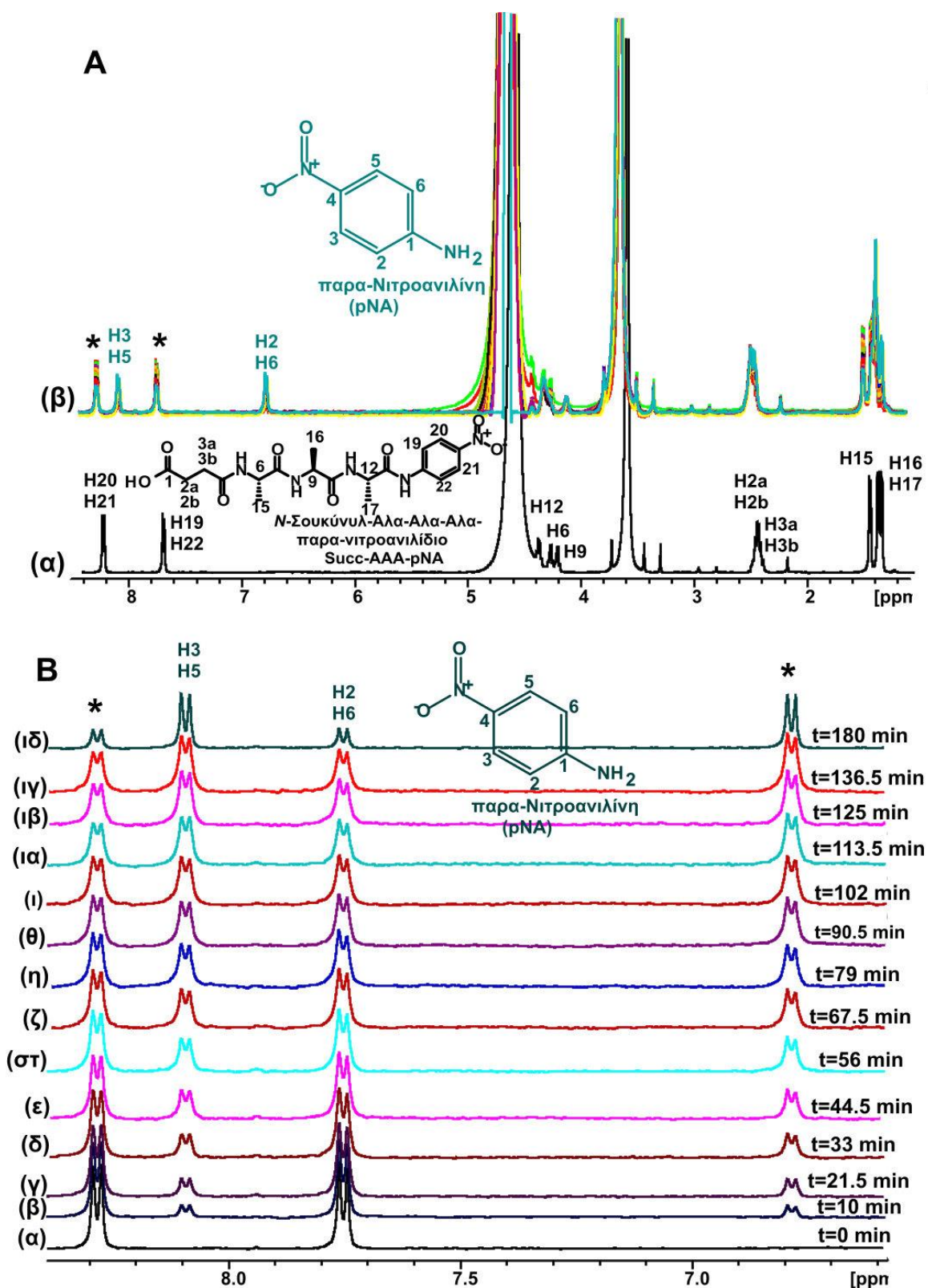
Η δράση της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου (PPE) στη διάσπαση του υποστρώματος *N*-Σουκύνυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-νιτροανιλίνιο μελετήθηκε με φασματοσκοπία 1D ¹H NMR. Η εξέλιξη της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε σε σωληνάκι NMR 5 mm, ενώ καταγράφηκε η πορεία της ανά δέκα λεπτά, σε χρονικό διάστημα 180 λεπτών στους 37°C. Μέσω της φασματοσκοπίας NMR ήταν δυνατή η ταυτόχρονη μελέτη της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής του προϊόντος. Στο **Σχήμα 5.3.8** απεικονίζεται το φάσμα πρωτονίου NMR της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης.



Σχήμα 5.3.8: 1D ¹H NMR φάσματα: (α) του υποστρώματος της ελαστάσης, *N*-Σουκύνυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-νιτροανιλίνιο σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pD=8,0 στους 37°C. (β) της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης σε χρόνο 10 λεπτά σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pD=8,0 στους 37°C. (γ) Επιλεγμένη περιοχή

(8,5-6,5 ppm) του 1D ¹H NMR φάσματος (β) όπου διακρίνεται το προϊόν, παρα-Νιτροανιλίνη, που παράγεται σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pD=8,0 στους 37°C.

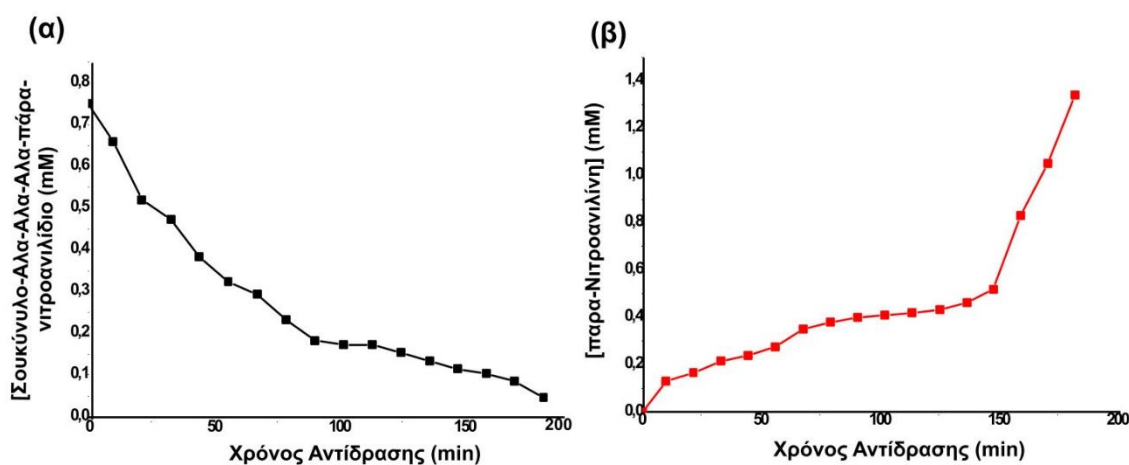
Όπως προκύπτει από τη σύγκριση των φασμάτων του υποστρώματος (**Σχήμα 5.3.8 α**) και της αντίδρασης της ελαστάσης (**Σχήμα 5.3.8 β και γ**), η παραγόμενη παρα-Νιτροανιλίνη εμφανίζει χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις στην αρωματική περιοχή του φάσματος. Τα 4 αρωματικά πρωτόνια της παρα-Νιτροανιλίνης εμφανίζονται ως μία διπλή κορυφή στα 8,09 ppm, που αντιστοιχεί στα πρωτόνια H3 και H5 και άλλη μία στα 6,78 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια H2 και H6 οι οποίες είναι αρκετά μετατοπισμένες από τις αντίστοιχες κορυφές των αρωματικών πρωτονίων H19, H20, H21 και H22 της υπομονάδας του παρα-Νιτροανιλιδίου του υποστρώματος. Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 5.3.9**, όσο εξελίσσεται η αντίδραση, αρχίζουν να εμφανίζονται οι δύο διπλές κορυφές των αρωματικών πρωτονίων από τα δέκα πρώτα λεπτά της αντίδρασης, ενώ σταδιακά αυξάνεται η έντασή τους, υποδεικνύοντας τη συνεχόμενη παραγωγή της παρα-Νιτροανιλίνης. Από την άλλη, η ένταση των κορυφών της αρωματικής περιοχής που αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια της μονάδας του παρα-Νιτροανιλιδίου του υποστρώματος μειώνεται, όσο προχωράει η αντίδραση, υποδεικνύοντας τη συνεχή διάσπαση του υποστρώματος από το ένζυμο.



Σχήμα 5.3.9: 1D ¹H NMR φάσματα: **A:(α)** του υποστρώματος της ελαστάσης, *N*-Σουκύνυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-νιτροανιλίδιο σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pH=8,0 στους 37°C. **(β)** της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR σε συνολικό χρόνο αντίδρασης 3 ώρες με διαδοχική καταγραφή φασμάτων ανά δέκα λεπτά, σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pH=8,0 στους 37°C. **B:(α) Επιλεγμένη περιοχή (6,5-8,5 ppm) 1D ¹H φασμάτων:** της εξέλιξης της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR, σε συνολικό χρόνο αντίδρασης 3 ώρες, με διαδοχική καταγραφή φασμάτων ανά δέκα λεπτά, όπου διακρίνεται η αύξηση της συγκέντρωσης του προϊόντος, **παρα-Νιτροανιλίνη**, που παράγεται σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pH=8,0 στους 37°C. Ο αστερίσκος δηλώνει τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του υποστρώματος.

Η μεταβολή της έντασης των κορυφών του υποστρώματος και του προϊόντος μπορεί να προσδιοριστεί και ποσοτικά. Όπως φαίνεται στα διαγράμματα του **Σχήματος 5.3.10**, υπάρχει μια σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης του υποστρώματος, ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται η συγκέντρωση του προϊόντος, σε χρονικό διάστημα 0-180 λεπτών. Αυτό δείχνει ότι η ενζυμική

αντίδραση της ελαστάσης εξελίσσεται επιτυχώς στο σωληνάκι NMR, και είναι δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος, για κάθε επιθυμητό χρονικό σημείο.

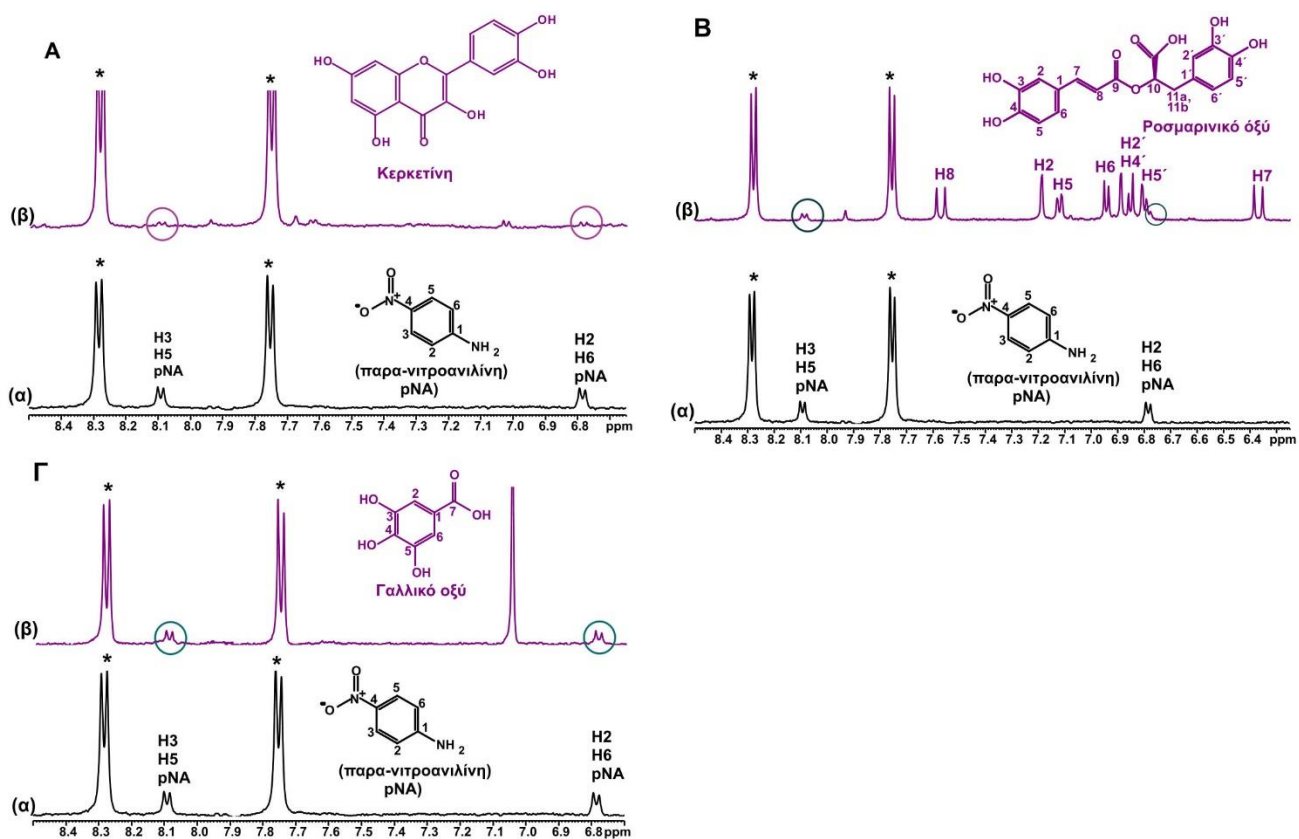


Σχήμα 5.3.10: Γραφικές απεικονίσεις (α) της μεταβολής της συγκέντρωσης κατά την κατανάλωση του υποστρώματος, (β) της μεταβολής της συγκέντρωσης κατά την παραγωγή του προϊόντος, κατά την εξέλιξη της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR, σε συνολικό χρόνο αντίδρασης 3 ώρες με διαδοχική καταγραφή φασμάτων ανά δέκα λεπτά, σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pH=8,0 στους 37°C.

5.3.3.3 Αποτελέσματα από την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της αναστολής της ελαστάσης

5.3.3.3.1 NMR-Cosmetube: Μελέτη αναστολής της ελαστάσης από φυσικό προϊόν

Επόμενο στάδιο για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου, είναι η μελέτη της αναστολής της, όταν αυτή πραγματοποιείται μέσα στο σωληνάκι NMR. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε η αναστολή της PPE από τρία φυσικά προϊόντα: την κερκετίνη, το ροσμαρινικό οξύ και το γαλλικό οξύ. Και τα τρία φυσικά προϊόντα έχουν μελετηθεί για τη δράση τους ως προς την ελαστάση.^{356,357} Επίσης αποτελούν κύρια συστατικά των εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή και η παρουσία τους συμβάλλει στην αναστολή της ελαστάσης. Η ανασταλτική δράση της κερκετίνης μελετήθηκε και με φασματοσκοπία UV. Από την άλλη, το ροσμαρινικό οξύ και το γαλλικό οξύ, μελετήθηκαν σε συγκέντρωση 0.5 mM, προκειμένου να διερευνηθεί αν η ανασταλτική τους δράση στο ένζυμο μπορεί να μελετηθεί με NMR φασματοσκοπία, καθώς επίσης και αν μπορεί να προσδιοριστεί η % απόδοση της αντίδρασης, παρουσία αυτών των αναστολέων (**Σχήμα 5.3.11**).



Σχήμα 5.3.11: A: Επιλεγμένη περιοχή (6,5-8,5 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων: (α) της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR στα δέκα πρώτα λεπτά αντίδρασης, σε Tris-DCI buffer, 25 mM, $\text{pD}=8,0$ στους 37°C , (β) της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR στα δέκα πρώτα λεπτά αντίδρασης, παρουσία κερκετίνης συγκέντρωσης 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, σε Tris-DCI buffer, 25 mM, $\text{pD}=8,0$ στους 37°C . **B: Επιλεγμένη περιοχή (6,25-8,5 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων:** (α) της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR στα δέκα πρώτα λεπτά αντίδρασης, σε Tris-DCI buffer, 25 mM, $\text{pD}=8,0$ στους 37°C , (β) της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR στα δέκα πρώτα λεπτά αντίδρασης, παρουσία ροσμαρινικού οξέος συγκέντρωσης 0.5 mM, σε Tris-DCI buffer, 25 mM, $\text{pD}=8,0$ στους 37°C . **Γ: Επιλεγμένη περιοχή (6,5-8,5 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων:** (α) της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR στα δέκα πρώτα λεπτά αντίδρασης, σε Tris-DCI buffer, 25 mM, $\text{pD}=8,0$ στους 37°C , (β) της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR στα δέκα πρώτα λεπτά αντίδρασης, παρουσία γαλλικού οξέος συγκέντρωσης 0,5 mM, σε Tris-DCI buffer, 25 mM, $\text{pD}=8,0$ στους 37°C . Ο αστερίσκος δηλώνει τα πρωτόνια που αντιστοιχούν στις κορυφές του υποστρώματος.

Το **Σχήμα 5.3.11** απεικονίζει τα 1D ^1H NMR φάσματα της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης και της αναστολής της παρουσία κερκετίνης (**A**), ροσμαρινικού οξέος (**B**) και γαλλικού οξέος (**Γ**) στα δέκα πρώτα λεπτά της ενζυμικής αντίδρασης. Όπως παρατηρείται, οι χημικές μετατοπίσεις των κορυφών που αντιστοιχούν στα πρωτόνια της παραγόμενης παρα-Νιτροανιλίνης είναι αρκετά ευδιάκριτες από τα αντίστοιχα πρωτόνια των αναστολέων. Ακόμη και στην περίπτωση του ροσμαρινικού οξέος όπου υπάρχει αλληλεπικάλυψη της κορυφής των πρωτονίων H3 και H5 της παρα-Νιτροανιλίνης με το πρωτόνιο H5' του ροσμαρινικού οξέος, στα 6,78 ppm, υπάρχει διαχωρισμός μεταξύ τους. Συγκρίνοντας το φάσμα πρωτονίου της ενζυμικής αντίδρασης με τα αντίστοιχα φάσματα της αναστολής σε κάθε περίπτωση, παρατηρείται ότι παράγεται η παρα-Νιτροανιλίνη αλλά με διαφορετική ένταση. Παρουσία κερκετίνης, η ένταση της παραγόμενης κορυφής της παρα-Νιτροανιλίνης είναι μικρότερη από την ένταση της ίδιας κορυφής στο αντίστοιχο φάσμα της αντίδρασης. Και στην περίπτωση του ροσμαρινικού οξέος,

στα δέκα πρώτα λεπτά της αντίδρασης παράγεται η παρα-Νιτροανιλίνη επίσης με πολύ μικρή ένταση, συγκριτικά με την ενζυμική αντίδραση. Από την άλλη, παρουσία γαλλικού οξέος, υπάρχει μεν μειωμένη παραγωγή της παρα-Νιτροανιλίνης συγκριτικά με την ενζυμική αντίδραση, αλλά συγκριτικά με την κερκετίνη και το ροσμαρινικό οξύ η ένταση της κορυφής του είναι μεγαλύτερη. Από τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της παραγόμενης παρα-Νιτροανιλίνης είναι δυνατό να προσδιοριστεί η % απόδοση της αντίδρασης. Παρουσία κερκετίνης, η αναστολή της αντίδρασης έχει ποσοστό 98,46%, ενώ παρουσία ροσμαρινικού οξέος, η αναστολή της αντίδρασης είναι στο 97,62%. Από την άλλη, το γαλλικό οξύ παρουσιάζει μέτρια ανασταλτική δράση ως προς την ελαστάση με ποσοστό αναστολής 52,31% (Πίνακας 5.3.2).

Πίνακας 5.3.2: Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος, της παρα-Νιτροανιλίνης, στην αντίδραση της ελαστάσης, και στην αντίδραση της ελαστάσης παρουσία κερκετίνης, ροσμαρινικού οξέος και γαλλικού οξέος.

Φυσικός Αναστολέας	Χρόνος Αντίδρασης (λεπτά)	[παρα-Νιτροανιλίνη] στην αντίδραση ελαστάσης	[παρα-Νιτροανιλίνη] στην αντίδραση αναστολής ελαστάσης	%Δραστητικότητα	%Αναστολή
Κερκετίνη	0	0	0	100	0
	10	0,13	0,0020	1,53	98,46
Ροσμαρινικό οξύ	0	0	0	100	0
	10	0,13	0,0031	2,38	97,62
Γαλλικό οξύ	0	0	0	100	0
	10	0,13	0,062	47,69	52,31

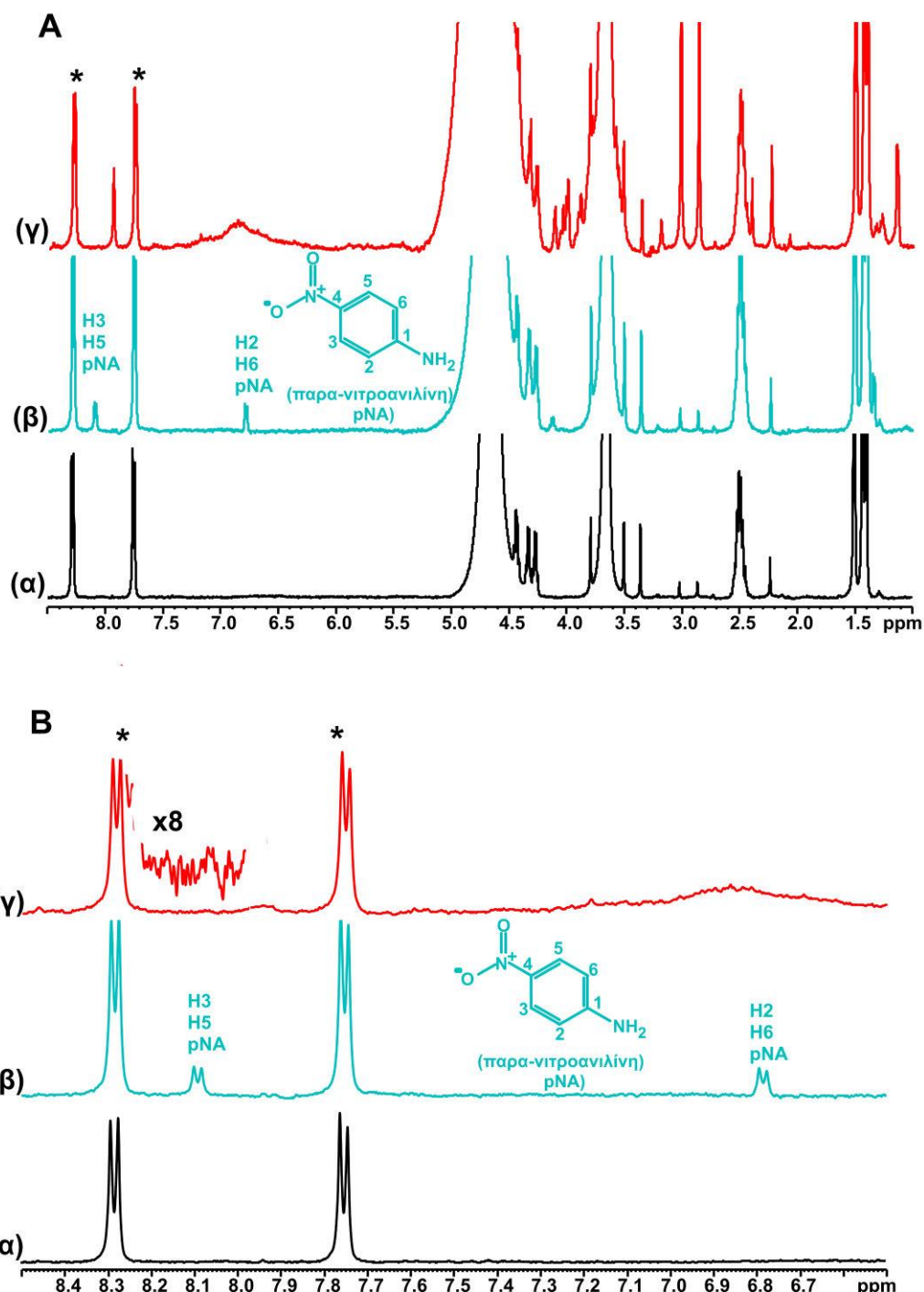
5.3.3.3.2 NMR Cosetube: Μελέτη αναστολής της ελαστάσης από φυσικό εκχύλισμα

Μετά τη μελέτη της ανασταλτικής δράσης διαφόρων φυσικών προϊόντων ως προς την ελαστάση, δοκιμάστηκε η ανασταλτική δράση διαφόρων εκχυλισμάτων στην ενζυμική αντίδραση που πραγματοποιείται στο σωληνάκι NMR. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν διαφορετικά εκχυλίσματα, τόσο υδατικά όσο και αιθανολικά, τα οποία έδωσαν διαφορετικές τιμές αναστολής στις μελέτες που έγιναν με φασματοσκοπία UV, προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα αυτής της μεθοδολογίας και στην περίπτωση του προσδιορισμού του % ποσοστού αναστολής. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν αιθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα από τα φυτά *Melissa Officinalis* (μελισσόχορτο), *Rosmarinus Officinalis* (δεντρολίβανο), *Cistus Albidus* (λαδανιά) και *Thymus Vulgaris* (θυμάρι). Κύριο κριτήριο της επιλογής των συγκεκριμένων εκχυλισμάτων είναι κυρίως η δυνατότητα διάκρισης των κορυφών που αντιστοιχούν στην παραγόμενη παρα-νιτροανιλίνη, και να μην αλληλεπικαλύπτονται από κορυφές που αντιστοιχούν σε κάποιο περιεχόμενο συστατικό του εκχυλίσματος, ώστε να είναι εφικτή η ποσοτικοποίηση του προϊόντος

της αντίδρασης που παράγεται. Αρχικά πραγματοποιήθηκε προεπώαση της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου με κάθε εκχύλισμα για δέκα λεπτά στους 37°C, όπως έγινε αντίστοιχα και στη μελέτη με φασματοσκοπία UV. Η προεπώαση έγινε σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα, υπό συνεχή ανάδευση. Μετά τα δέκα λεπτά προεπώασης, προστέθηκε το υπόστρωμα, και το μείγμα της αντίδρασης μεταφέρθηκε σε σωληνάκι NMR, 5 mm. Ακολούθησε καταγραφή φάσματος πρωτονίου στους 37°C. Η αντίδραση της ελαστάσης παρουσία κάθε εκχυλίσματος καταγράφηκε σε τρεις διαφορετικούς χρόνους (10, 60 και 120 min), προκειμένου να μελετηθεί ο ρυθμός κατανάλωσης του υποστρώματος και παραγωγής του προϊόντος. Όλα τα εκχυλίσματα μετρήθηκαν σε συγκέντρωση 100 µg/mL, ενώ για το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Melissa Officinalis* (μελισσόχορτο), πραγματοποιήθηκε και μια ακόμη μελέτη αναστολής σε συγκέντρωση 1000 µg/mL.

5.3.3.3.2.α NMR-Cosmetube: Μελέτη της αναστολής της ελαστάσης από υδατικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου (*Melissa Officinalis*)

Στο **Σχήμα 5.3.12** απεικονίζονται τα πρωτονιακά φάσματα της ενζυμικής αντίδρασης της PPE απουσία και παρουσία 1000 µg/mL υδατικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου. Όπως φαίνεται (**Σχήμα 5.3.12 A**), είναι ευδιάκριτες οι κορυφές, τόσο των αρωματικών πρωτονίων του υποστρώματος, όσο και της παραγόμενης παρα-Νιτροανιλίνης. Στη συγκέντρωση αυτή η αναστολή του ενζύμου από το εκχύλισμα είναι πάρα πολύ υψηλή, καθώς οι κορυφές του προϊόντος της αντίδρασης διακρίνονται μετά από μεγέθυνση του φάσματος πρωτονίου **x8** (**Σχήμα 5.3.12 B**). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της παραγόμενης παρα-Νιτροανιλίνης έδειξε 96,00% αναστολή ως προς το ένζυμο (**Πίνακας 5.3.3**).

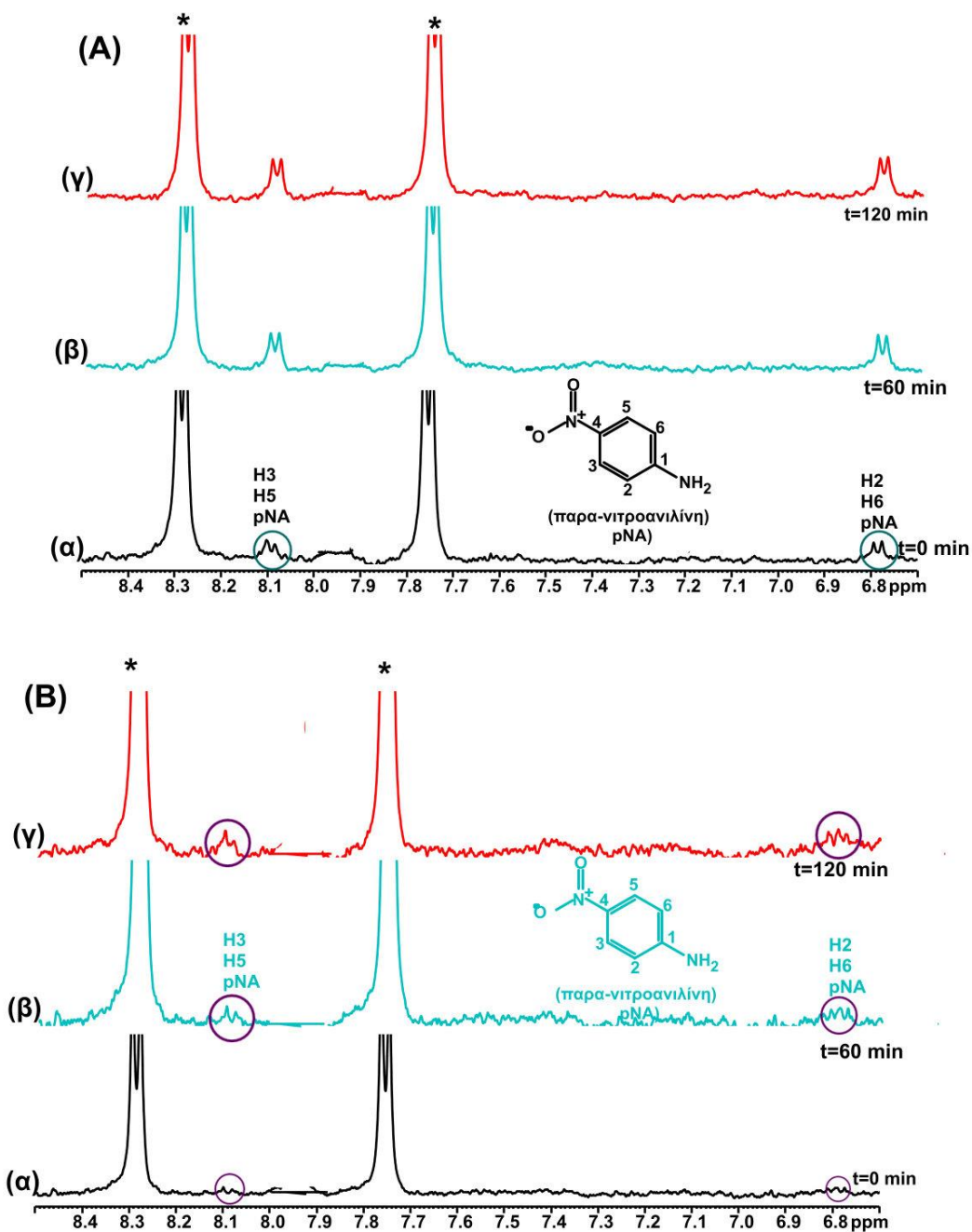


Σχήμα 5.3.12: (A) 1D ^1H NMR φάσματα: (A) (α) του υποστρώματος της ελαστάσης, *N*-Σουκύνυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-νιτροαλινίδιο σε Tris-DCl buffer, 25 mM, $\rho\text{D}=8,0$ στους 37°C . **(β)** της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR στα δέκα πρώτα λεπτά αντίδρασης, σε Tris-DCl buffer, 25 mM, $\rho\text{D}=8,0$ στους 37°C . **(γ)** της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR στα δέκα πρώτα λεπτά αντίδρασης, παρουσία υδατικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου σε συγκέντρωση 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, σε Tris-DCl buffer, 25 mM, $\rho\text{D}=8,0$ στους 37°C . **(B) Επιλεγμένη περιοχή (6,5-8,5 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων: (α)** του υποστρώματος της ελαστάσης, *N*-Σουκύνυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-νιτροαλινίδιο σε Tris-DCl buffer, 25 mM, $\rho\text{D}=8,0$ στους 37°C . **(β)** της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR στα δέκα πρώτα λεπτά αντίδρασης, σε Tris-DCl buffer, 25 mM, $\rho\text{D}=8,0$ στους 37°C . **(γ)** της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR στα δέκα πρώτα λεπτά αντίδρασης, παρουσία υδατικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου σε συγκέντρωση 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, σε Tris-DCl buffer, 25 mM, $\rho\text{D}=8,0$ στους 37°C . Ο αστερίσκος δηλώνει τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του υποστρώματος.

Πίνακας 5.3.3: Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος, της παρα-Νιτροανιλίνης, στην αντίδραση της ελαστάσης, και στην αντίδραση της ελαστάσης παρουσία υδατικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου σε συγκέντρωση 1000 µg/mL.

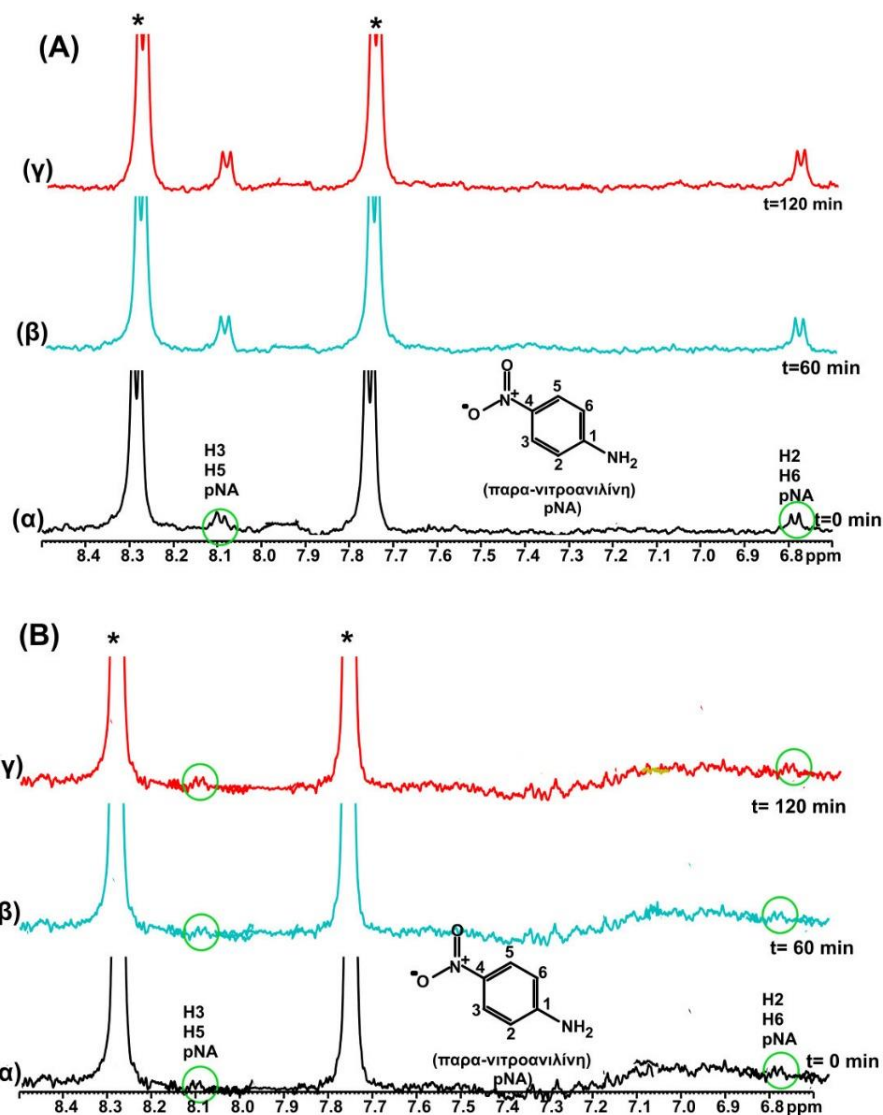
Χρόνος Αντίδρασης (λεπτά)	Αντίδραση Ελαστάσης [παρα-Νιτροανιλίνη] (mM)	Αναστολή Ελαστάσης [παρα-Νιτροανιλίνη] (mM)	% Δραστικότητα	% Αναστολή
0	0	0	100	0
10	0,05	0,0020	4	96

Η ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της αναστολής της PPE από διάφορα εκχυλίσματα, απεικονίζεται στα **Σχήματα 5.3.13-5.3.19**.

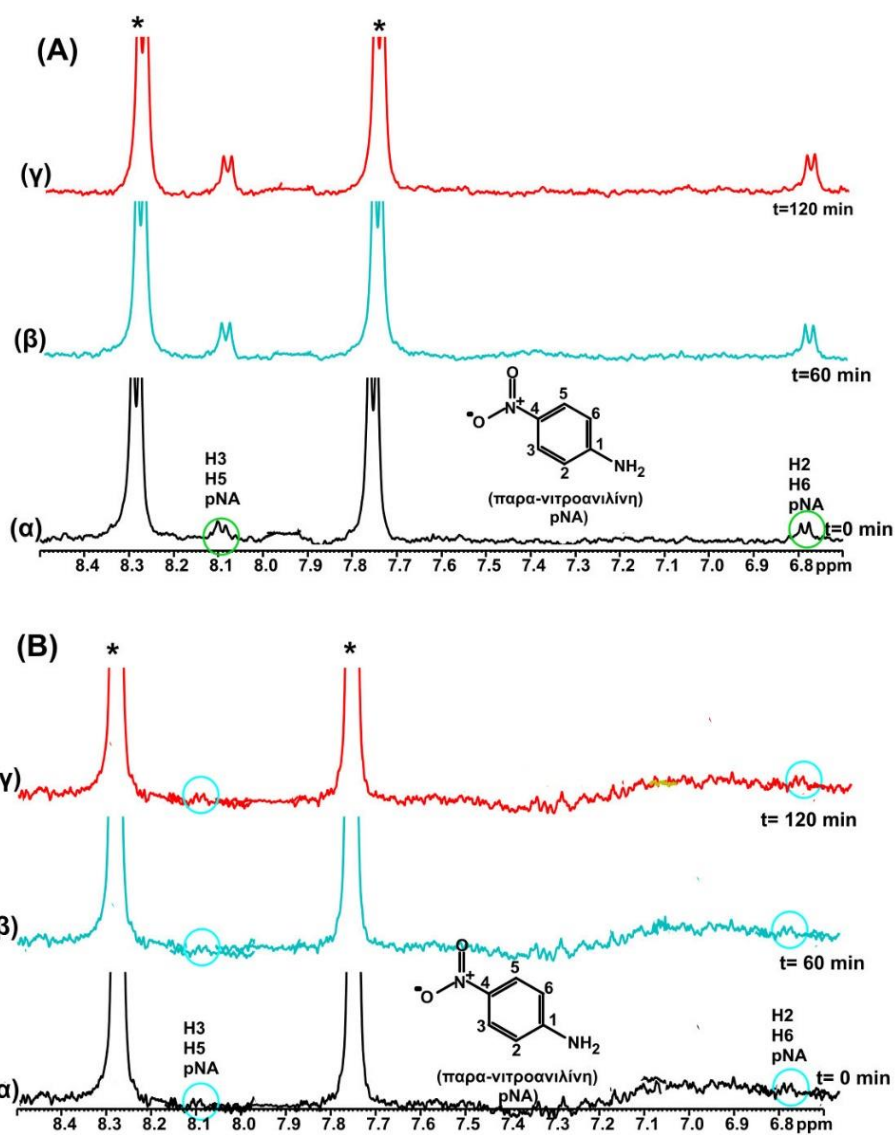


Σχήμα 5.3.13: Επιλεγμένη περιοχή (6,5-8,5 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων: **(A)** της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pD=8,0 στους 37°C, σε χρονικά σημεία **(α)** t= 10 min, **(β)** t= 60 min, **(γ)** t= 120 min αντίδρασης. **(B)** της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης παρουσία υδατικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου σε συγκέντρωση 100 µg/mL στο σωληνάκι

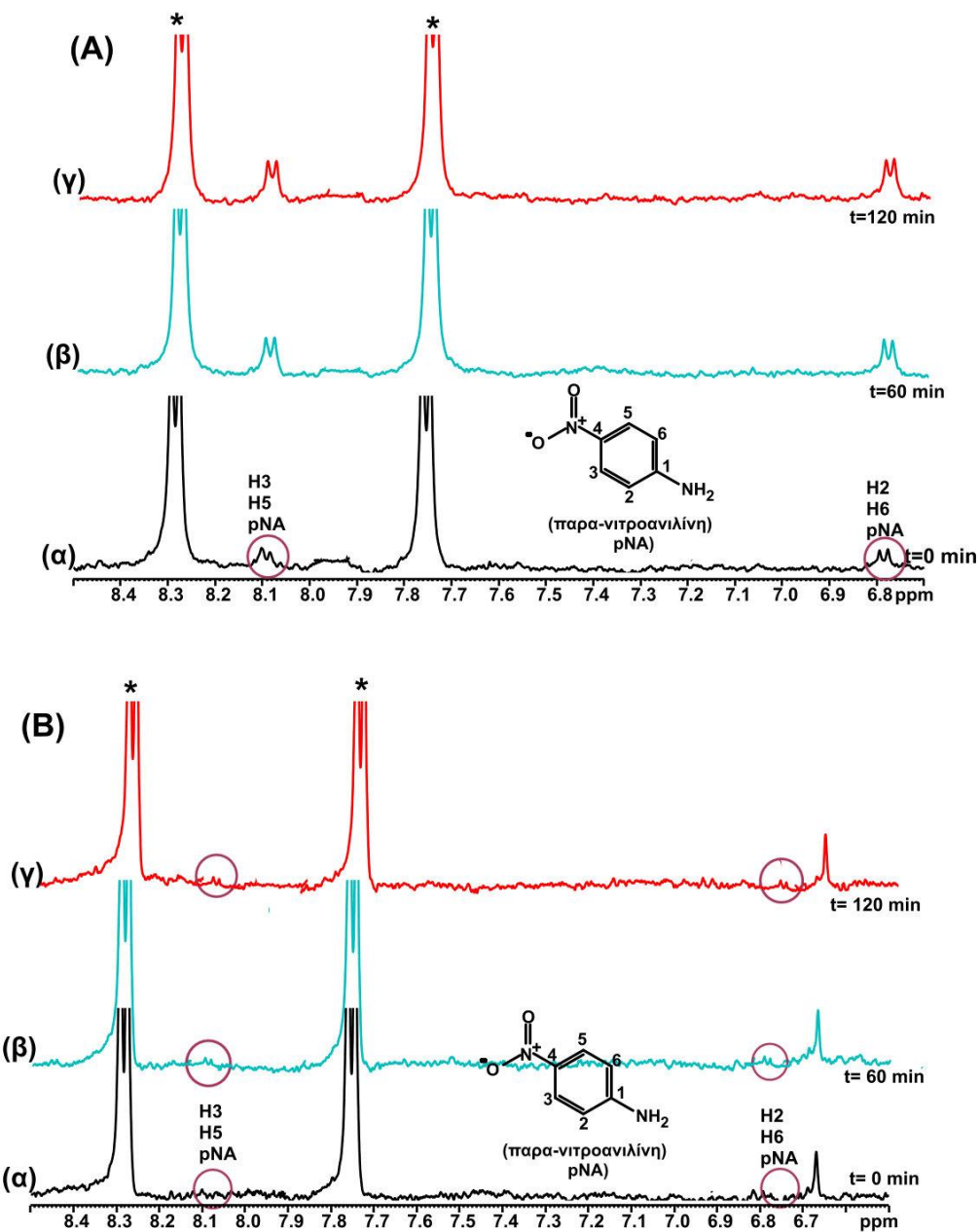
NMR σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pD=8,0 στους 37°C, σε χρονικά σημεία (α) t= 10 min (β) t= 60 min (γ) t= 120 min αντίδρασης. Ο αστερίσκος δηλώνει τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του υποστρώματος.



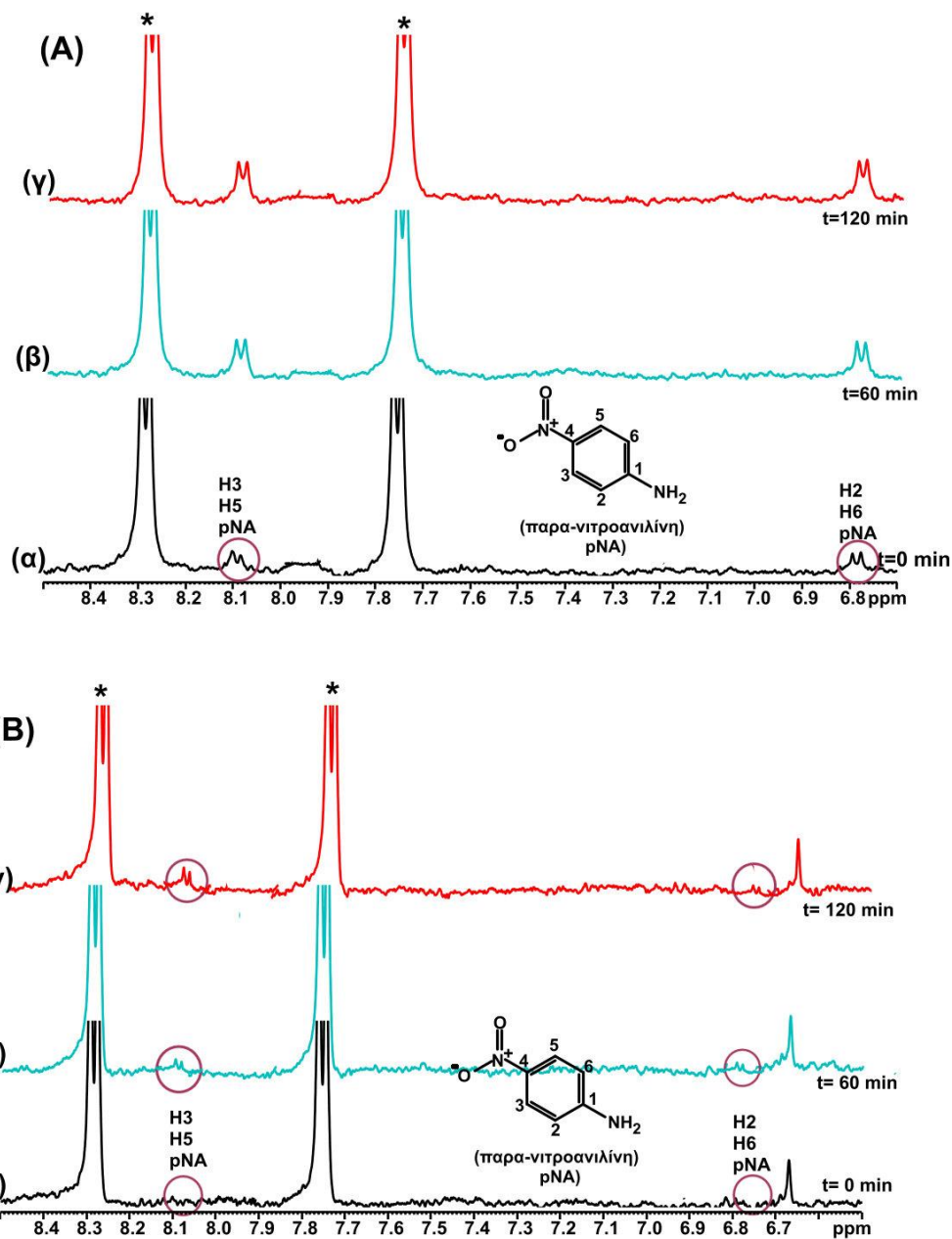
Σχήμα 5.3.14: Επιλεγμένη περιοχή (6,5-8,5 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων: (A) της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pD=8,0 στους 37°C, σε χρονικά σημεία (α) t=10 min, (β) t= 60 min, (γ) t= 120 min αντίδρασης. (B) της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος λαδανιάς σε συγκέντρωση 100 µg/mL στο σωληνάκι NMR σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pD=8,0 στους 37°C, σε χρονικά σημεία (α) t=10 min (β) t=20 min (γ) t=120 min αντίδρασης. Ο αστερίσκος δηλώνει τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του υποστρώματος. Ο αστερίσκος δηλώνει τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του υποστρώματος.



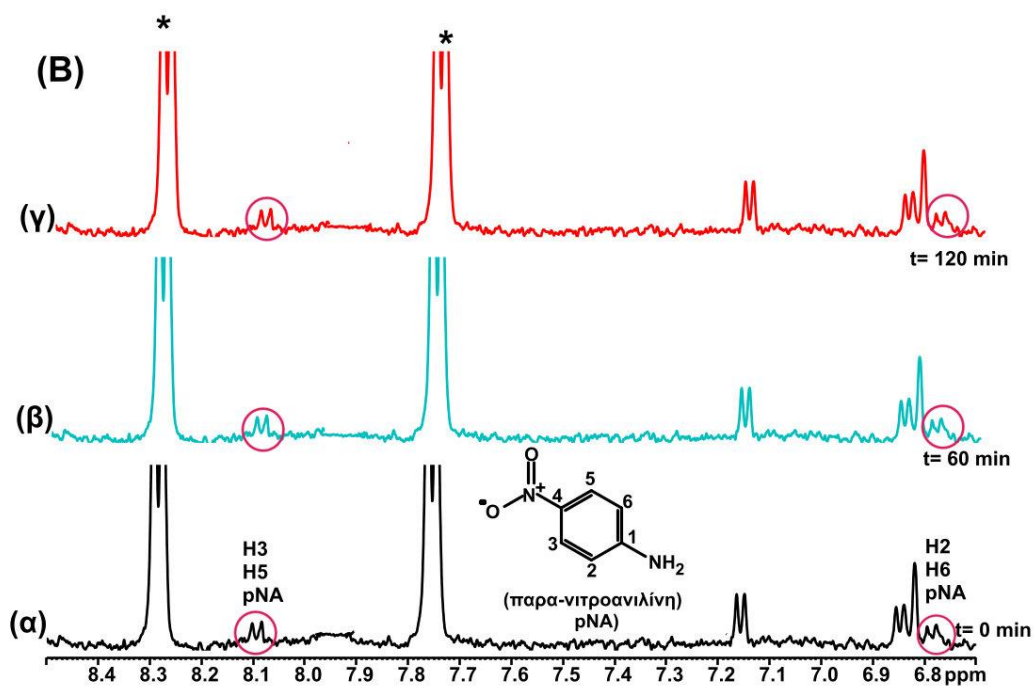
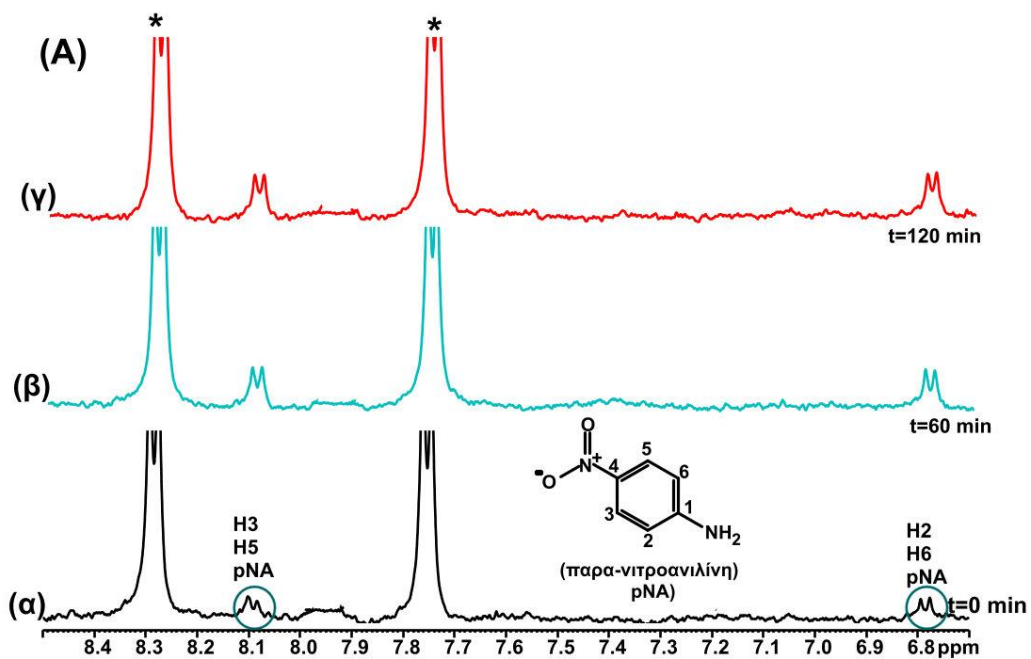
Σχήμα 5.3.15: Επιλεγμένη περιοχή (6,5-8,5 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων: (A) της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pD=8,0 στους 37°C, σε χρονικά σημεία (α) t= 10 min, (β) t= 60 min, (γ) t= 120 min αντίδρασης. **(B)** της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης παρουσία υδατικού εκχυλίσματος λαδανιάς σε συγκέντρωση 100 μg/mL στο σωληνάκι NMR σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pD=8,0 στους 310K, σε χρονικά σημεία (α) t=10 min (β) t=60 min (γ) t= 120 min αντίδρασης. Ο αστερίσκος δηλώνει τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του υποστρώματος.



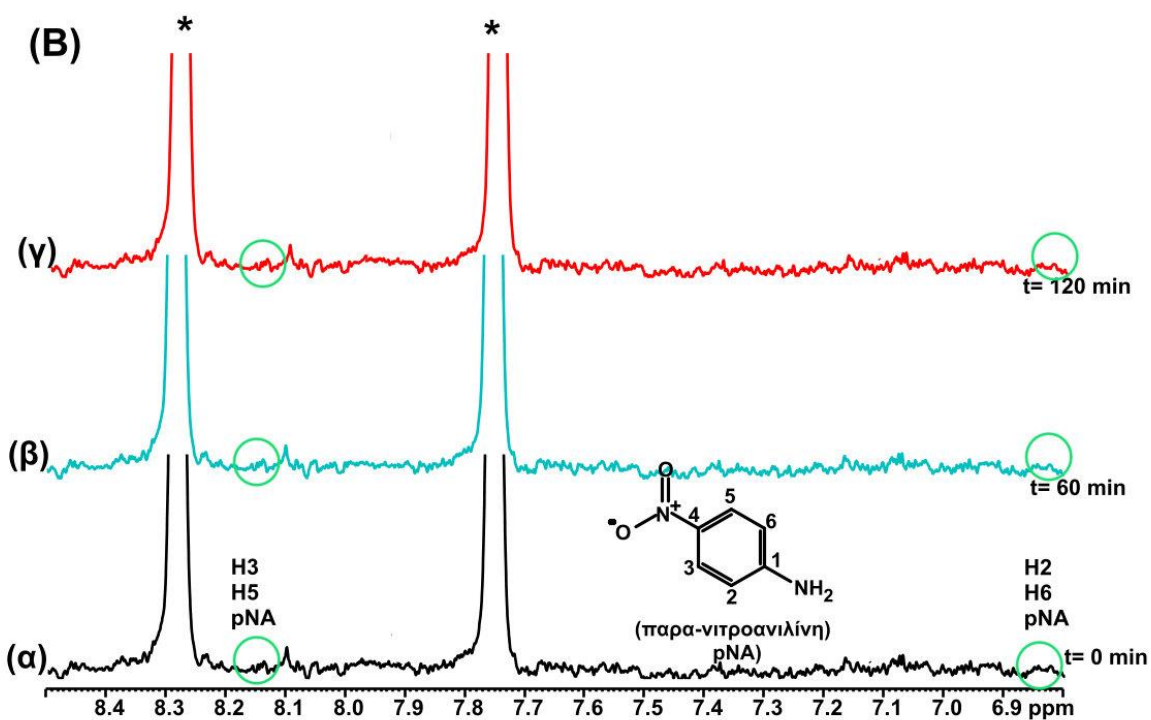
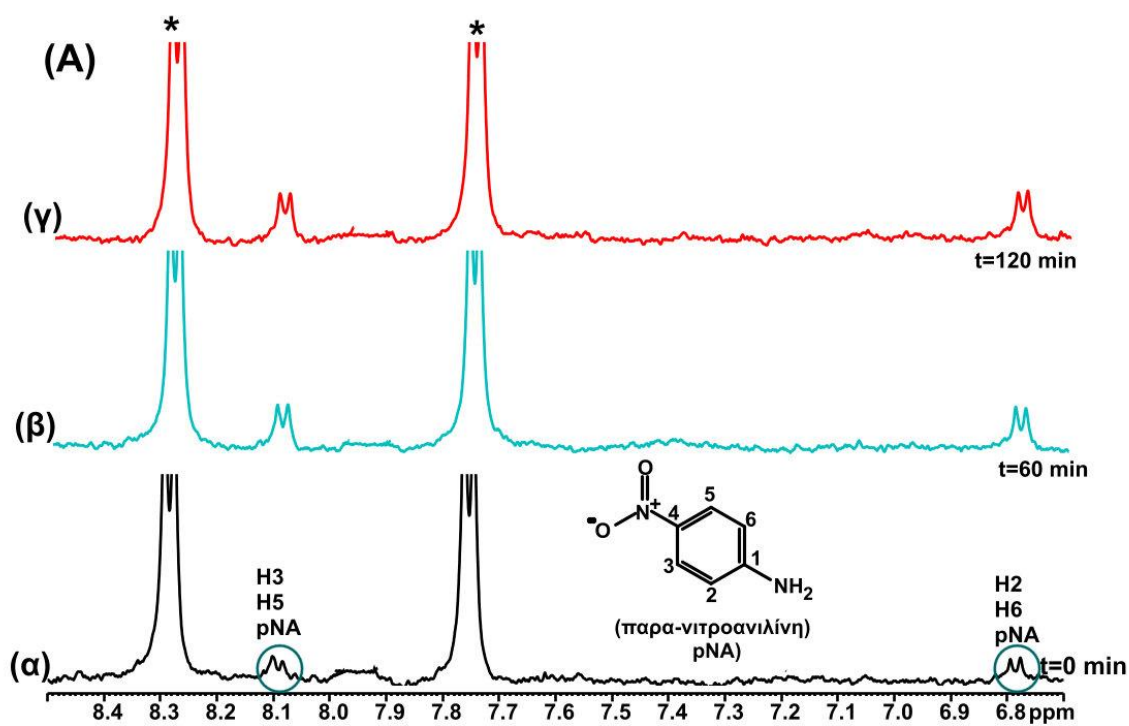
Σχήμα 5.3.16: Επιλεγμένη περιοχή (6,5-8,5 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων: (A) της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR σε Tris-DCI buffer, 25 mM, ρD=8,0 στους 37°C, σε χρονικά σημεία (α) t= 10 min, (β) t= 60 min, (γ) t= 120 min αντίδρασης. **(B)** της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου σε συγκέντρωση 100 μg/mL στο σωληνάκι NMR σε Tris-DCI buffer, 25 mM, ρD=8,0 στους 37°C, σε χρονικά σημεία (α) t= 10 min (β) t= 60 min (γ) t= 120 min αντίδρασης. Ο αστερίσκος δηλώνει τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του υποστρώματος.



Σχήμα 5.3.17: Επιλεγμένη περιοχή (6,5-8,5 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων: (A) της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pD=8,0 στους 37°C, σε χρονικά σημεία (α) t= 10 min, (β) t= 60 min, (γ) t= 120 min αντίδρασης. **(B)** της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης παρουσία υδατικού εκχυλίσματος δεντρολίβανου σε συγκέντρωση 100 μg/mL στο σωληνάκι NMR σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pD=8,0 στους 37°C, σε χρονικά σημεία (α) t= 10 min (β) t= 60 min (γ) t= 120 min αντίδρασης. Ο αστερίσκος δηλώνει τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του υποστρώματος.



Σχήμα 5.3.18: Επιλεγμένη περιοχή (6,5-8,5 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων: (A) της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pD=8,0 στους 37°C, σε χρονικά σημεία (α) $t=10$ min, (β) $t=60$ min, (γ) $t=120$ min αντίδρασης. (B) της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης παρουσία αιθανολικού εκχυλίσματος θυμαριού σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ στο σωληνάκι NMR σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pD=8,0 στους 37°C, σε χρονικά σημεία (α) $t=10$ min (β) $t=60$ min (γ) $t=120$ min αντίδρασης. Ο αστερίσκος δηλώνει τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του υποστρώματος.



Σχήμα 5.3.19: Επιλεγμένη περιοχή (6,5-8,5 ppm) 1D ^1H NMR φασμάτων: (A) της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης στο σωληνάκι NMR σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pD=8,0 στους 37°C, σε χρονικά σημεία (α) $t=10$ min, (β) $t=60$ min, (γ) $t=120$ min αντίδρασης. (B) της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης παρουσία υδατικού εκχυλίσματος θυμαριού σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ στο σωληνάκι NMR σε Tris-DCI buffer, 25 mM, pD=8,0 στους 37°C, σε χρονικά σημεία (α) $t=10$ min (β) $t=60$ min (γ) $t=120$ min αντίδρασης. Ο αστερίσκος δηλώνει τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του υποστρώματος.

Σε κάθε περίπτωση, οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονίων της παραγόμενης παρα-Νιτροανιλίνης είναι ευδιάκριτες από τις κορυφές του εκχυλίσματος. Επίσης, είναι ευδιάκριτη και η ένταση με την οποία παράγεται σε κάθε ενζυμική αντίδραση παρουσία διαφορετικού εκχυλίσματος. Χαρακτηριστική είναι η περίπτωση του υδατικού εκχυλίσματος του φυτού *Melissa*

Officinalis (μελισσόχορτο) (Σχήμα 5.3.13) και του *Cistus Albidus* (λαδανιά) (Σχήμα 5.3.15), όπου η ένταση των κορυφών της παρα-Νιτροανιλίνης είναι πολύ μικρή. Από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της παραγόμενης παρα-Νιτροανιλίνης σε κάθε περίπτωση, προέκυψε η % απόδοση της αντίδρασης σε κάθε περίπτωση εκχυλίσματος (Πίνακας 5.3.4).

Πίνακας 5.3.4: Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος, της παρα-Νιτροανιλίνης, στην αντίδραση της ελαστάσης, και στην αντίδραση της ελαστάσης παρουσία φυτικών εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 100 µg/mL.

Εκχύλισμα	Χρόνος Αντίδρασης (min)	[παρα-Νιτροανιλίνη] (mM) στην αντίδραση ελαστάσης	[παρα-Νιτροανιλίνη] (mM) στην αντίδραση αναστολής ελαστάσης	% Δραστηκότητα	% Αναστολή
<i>Melissa Officinalis</i> Υδατικό	0	0	0	100	0
	10	0,15	0,0114	7,60	92,40
<i>Melissa Officinalis</i> Αιθανολικό	0	0	0	100	0
	10	0,15	0,0956	36,24	63,76
<i>Cistus Albidus</i> Υδατικό	0	0	0	100	0
	10	0,15	0,1398	6,80	93,20
<i>Cistus Albidus</i> Αιθανολικό	0	0	0	100	0
	10	0,15	0,1309	12,76	87,24
<i>Rosmarinus Officinalis</i> Αιθανολικό	0	0	0	100	0
	10	0,15	0,0763	49,13	50,87
<i>Rosmarinus Officinalis</i> Υδατικό	0	0	0	100	0
	10	0,15	0,1210	19,27	80,73
<i>Thymus Vulgaris</i> Αιθανολικό	0	0	0	100	0
	10	0,15	0,1122	74,80	25,20
<i>Thymus Vulgaris</i> Υδατικό	0	0	0	100	0
	10	0,15	0,04713	68,58	31,42

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα, η φασματοσκοπία 1D ¹H NMR αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της αναστολής της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης από φυτικό εκχύλισμα καθώς και ο προσδιορισμός της απόδοσης της αντίδρασης σε κάθε περίπτωση.

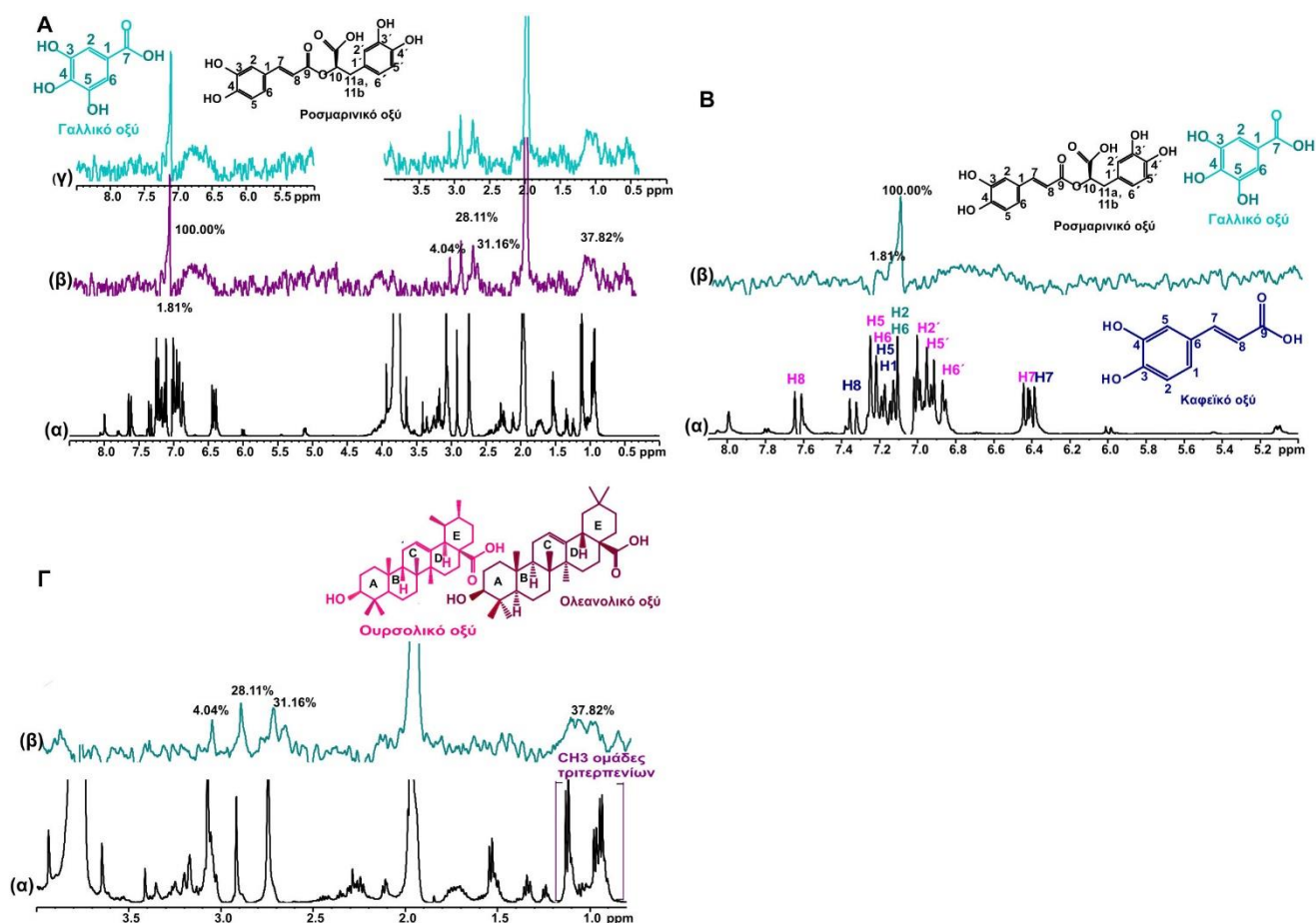
5.3.3.4 Μελέτη αλληλεπίδρασης των φυσικών προϊόντων και των φυτικών εκχυλισμάτων με την ελαστάση, με τη μέθοδο Saturation Transfer Difference (STD) NMR-Χαρτογράφηση των επίτοπων πρόσδεσης

5.3.3.4.1 Μελέτη αλληλεπίδρασης της ελαστάσης με μείγμα φυσικών προϊόντων

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η πρόβλεψη της θέσης αλληλεπίδρασης μιας πρωτεΐνης με έναν υποκαταστάτη έχει πολύ μεγάλη σημασία για την αναζήτηση υποκαταστατών με φαρμακευτική δράση για τη μελετούμενη πρωτεΐνη, γεγονός που οδηγεί στην ανάπτυξη και παραγωγή περισσότερων φαρμάκων. Συνεπώς, η μελέτη υποκαταστατών ως αναστολείς των ενζύμων είναι πολύ σημαντική για την ανάπτυξη και σύνθεση καινούριων παραγόντων με φαρμακευτική δράση, και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η μελέτη του προφίλ αλληλεπίδρασης των υποκαταστατών με οποιοδήποτε ένζυμο. Στην περίπτωση της ελαστάσης (όπως και στα άλλα δύο ένζυμα, υαλουρονιδάση και τυροσινάση), η μελέτη του προφίλ αλληλεπίδρασης διαφόρων υποκαταστατών με το κάθε ένζυμο μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη παραγόντων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά σε καλλυντικά προϊόντα με σκοπό την προστασία του δέρματος από την πρόωρη γήρανση και το μελάνωμα.

Μία πρόκληση μπορεί να αποτελέσει η περίπτωση που η ελαστάση αλληλεπιδρά με ένα μείγμα υποκαταστατών, όπως συμβαίνει παρουσία ενός φυτικού εκχυλίσματος. Σ' ένα φυτικό εκχύλισμα, που είναι ένα αρκετά περίπλοκο μείγμα, υπάρχουν πολλά συστατικά που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την ελαστάση, όχι μόνο στο ενεργό της κέντρο, αλλά και στις άλλες πιθανές θέσεις πρόσδεσης. Είναι σημαντικό επομένως να διερευνηθεί η ικανότητα αυτών των συστατικών να αλληλεπιδρούν με την ελαστάση, αν παρουσιάζουν ανταγωνισμό ως προς τη θέση δέσμευσης, καθώς και την ισχύ της αλληλεπίδρασης αυτών των ουσιών. Πολύ σημαντική είναι επίσης και η διερεύνηση της εκλεκτικότητας της ελαστάσης ως προς αυτές τις ουσίες. Η παρουσία των αμινοξέων Asp102, His57 και Ser195 στην καταλυτική τριάδα, ευνοεί κυρίως την πρόσδεση με φαινολικές -OH ομάδες και κατεχολικές δομές, κυρίως λόγω της ανάπτυξης δεσμών υδρογόνου. Η δομή κάθε συστατικού, διαδραματίζει επομένως βασικό ρόλο στην αλληλεπίδρασή του με την ελαστάση. Όσον αφορά την αναστολή του ενζύμου θα πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψιν το φαινόμενο της συνεργιστικής δράσης των συστατικών του εκχυλίσματος ως προς την ελαστάση.

Προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα αλληλεπίδρασης των εκχυλισμάτων με την ελαστάση, αρχικά παρασκευάστηκε ένα μείγμα φυσικών προϊόντων (φλαβονοειδών και τερπενοειδών), γνωστών για την ανασταλτική τους δράση ως προς την ελαστάση αλλά και βασικών συστατικών των μελετούμενων εκχυλισμάτων. Το μείγμα περιείχε τα ακόλουθα 5 φυσικά προϊόντα: κερκετίνη, ροσμαρινικό οξύ, γαλλικό οξύ, ουρσολικό οξύ και ολεανολικό οξύ. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των συστατικών του μείγματος με την ελαστάση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο STD NMR. Ως προς τον βαθμό αλληλεπίδρασης, υπολογίστηκαν οι παράγοντες αλληλεπίδρασης (STD amplification factors-STD_{AMP}) (**Σχήμα 5.3.20**).



Σχήμα 5.3.20: A: Επιλεγμένη περιοχή (0,00-8,50 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων: (α) μείγματος φυσικών προϊόντων σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCl, 25 mM, pD=8,0 παρουσία 49,5 μM παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου. **(β)** STD NMR φάσμα του μείγματος των φυσικών προϊόντων, **(γ)** Επιλεγμένες περιοχές (5,00-8,20 ppm) και (0,00-3,60 ppm). **B: Επιλεγμένη περιοχή (5,10-8,20 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων: (α)** μείγματος φυσικών προϊόντων σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCl, 25 mM, pD=8,0 παρουσία 49,5 μM παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου. **(β)** STD NMR φάσμα του μείγματος των φυσικών προϊόντων. **Γ: Επιλεγμένη περιοχή (0,50-4,00 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων: (α)** μείγματος φυσικών προϊόντων σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCl, 25 mM, pD=8,0 παρουσία 49,5 μM παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου. **(β)** STD NMR φάσμα του μείγματος των φυσικών προϊόντων. Τα ποσοστά υποδεικνύουν τις τιμές του συντελεστή αλληλεπίδρασης για κάθε συστατικό που αλληλεπιδρά (STD_{AMP}).

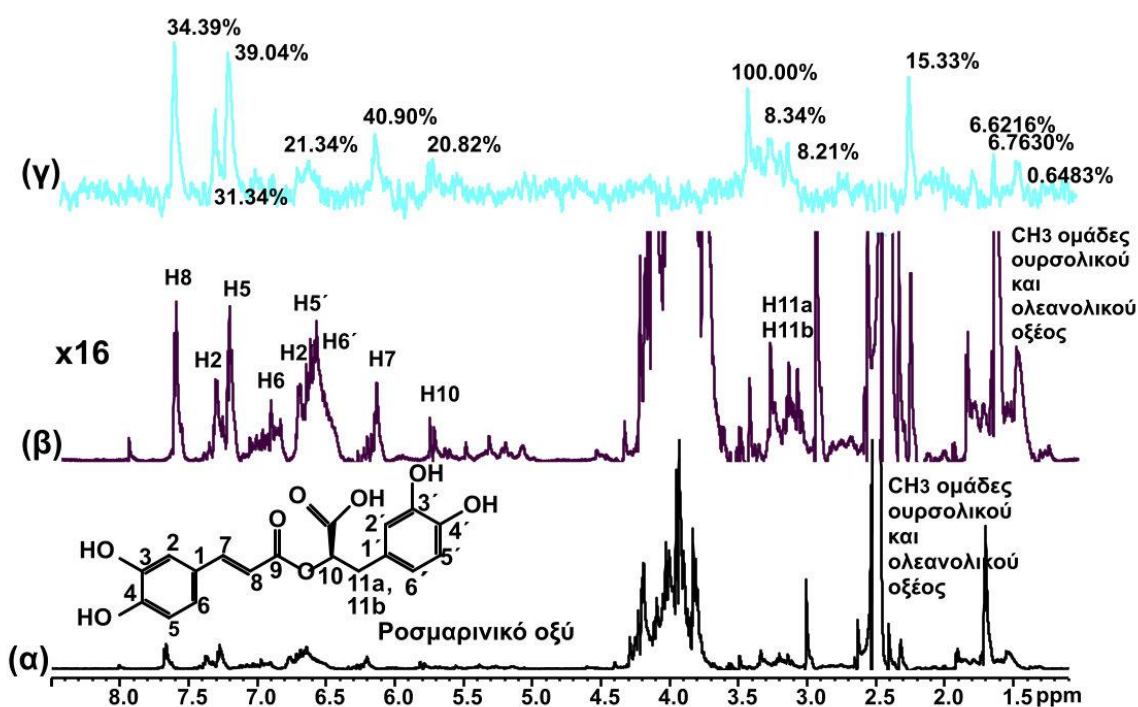
Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 5.3.20**, η εφαρμογή της μεθοδολογίας STD NMR αποτελεί ένα εξαιρετικό εργαλείο για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μορίων με την ελαστάση, ακόμη και αν αυτά βρίσκονται σ' ένα μείγμα, καθώς είναι δυνατός ο προσδιορισμός όχι μόνο των μορίων που αλληλεπιδρούν, αλλά και του τμήματος του μορίου που αλληλεπιδρά, χωρίς να χρειάζεται προηγούμενος διαχωρισμός των συστατικών του μείγματος.³⁶⁴ Μέσω της χαρτογράφησης του επιτόπου πρόσδεσης, είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ των μορίων και των τμημάτων τους που αλληλεπιδρούν με την ελαστάση. Με βάση τα STD φάσματα του **Σχήματος 5.3.20**, παρατηρείται ότι η ελαστάση παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς την αλληλεπίδραση της με ένα μείγμα συστατικών. Παρατηρώντας την αρωματική περιοχή του STD φάσματος, παρατηρείται μια έντονη κορυφή στα 7,05 ppm, με τιμή παράγοντα αλληλεπίδρασης (STD_{AMP}) ίση με 100%, η οποία ανήκει στα αρωματικά πρωτόνια H2 και H6 του γαλλικού οξέος. Η παρουσία των τριών υδροξυλομάδων (-OH) στο μόριο του γαλλικού οξέος, από τις οποίες οι δύο έχουν κατεχολική θέση, φαίνεται ότι ευνοεί περισσότερο την ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αμινοξέων της καταλυτικής τριάδας και των πρωτονίων H2 και H6 του γαλλικού οξέος. Από την άλλη, στο

φάσμα STD της αρωματικής περιοχής, εμφανίζεται ακόμη μία κορυφή μικρότερης έντασης ($STD_{AMP}=1,81\%$), στα 7,10 ppm, η οποία αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο H5 του αρωματικού δακτυλίου του ροσμαρινικού οξέος, που δείχνει ότι το συγκεκριμένο πρωτόνιο αλληλεπιδρά και αυτό στην ίδια θέση της ελαστάσης. Καθώς το H5 πρωτόνιο του ροσμαρινικού οξέος βρίσκεται σε α- θέση ως προς την κατεχολική ομάδα του δακτυλίου, αυτό μπορεί να εξηγήσει την ικανότητά να προσδεθεί στο καταλυτικό κέντρο της ελαστάσης. Παρατηρώντας την αλειφατική περιοχή του STD φάσματος του **Σχήματος 5.3.20**, εμφανίζονται κορυφές μέτριας έντασης 0,90-1,10 ppm, οι οποίες αντιστοιχούν στις αλειφατικές ομάδες των τριτερπενίων ουρσολικό οξύ και ολεανολικό οξύ.

Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι αρχικά το πείραμα STD NMR δοκιμάστηκε για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης της ελαστάσης με κερκετίνη και ροσμαρινικό οξύ, μεμονωμένα. Ωστόσο, λόγω των ισχυρών δεσμών υδρογόνου που ενδεχομένως να σχηματίζονται μεταξύ του ενζύμου και των αναστολέων, το STD NMR φάσμα δεν έδωσε κανένα σήμα. Αντίθετα, στο μείγμα των εκχυλισμάτων, λόγω της παρουσίας αρκετών υποκαταστατών, η ενέργεια αλληλεπίδρασης του κάθε υποκαταστάτη με το ένζυμο είναι πιθανό να μειώθηκε, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται σήματα αλληλεπίδρασης στο αντίστοιχο STD NMR φάσμα.

5.3.3.4.2 Μελέτη αλληλεπίδρασης της ελαστάσης με φυτικό εκχύλισμα

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης της ελαστάσης με εφαρμογή της μεθοδολογίας STD NMR μελετήθηκε στη συνέχεια και για ένα φυτικό εκχύλισμα, το οποίο αποτελείται από περισσότερα συστατικά. Ως φυτικό εκχύλισμα, επιλέχθηκε το υδατικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου, το οποίο ήταν από αυτά που παρουσίασαν υψηλή αναστολή στην ελαστάση. Βασικά συστατικά του υδατικού εκχυλίσματος του μελισσόχορτου αποτελούν το ροσμαρινικό οξύ, και τα τερπένια ουρσολικό και ολεανολικό οξύ (**Σχήμα 5.3.21**).



Σχήμα 5.3.21: A: Επιλεγμένη περιοχή (1,00-8,50 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων: (α) υδατικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCl, 25 mM, pH=8,0 παρουσία 49,5 μM παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου. **(β)** μεγεθυμένη περιοχή **(x8)** υδατικού εκχυλίσματος μελισσόχορτου σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCl, 25 mM, pH=8,0 παρουσία 49,5 μM παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου. **(γ)** STD NMR φάσμα.

Όπως παρατηρείται στο **Σχήμα 5.3.21**, η εφαρμογή της μεθόδου STD NMR για το υδατικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου με την ελαστάση ήταν επιτυχής. Στο STD NMR φάσμα υπάρχουν κορυφές που ξεχωρίζουν από όλες τις κορυφές του μείγματος. Στην αρωματική περιοχή εμφανίζονται με μεγάλη ένταση κορυφές με χημικές μετατοπίσεις στα 7,60 ppm, 7,46 ppm, 7,38 ppm και 6,35 ppm που αντιστοιχούν στο ολεφινικό πρωτόνιο H8 και στα αρωματικά πρωτόνια H2, H5 και H7 του ροσμαρινικού οξέος. Όσον αφορά τους παράγοντες αλληλεπίδρασης, STD_{AMP}, οι τιμές τους έχουν προσδιοριστεί ως 34,39%, 31,34%, 39,04% και 40,90% αντίστοιχα. Χαμηλότερη τιμή STD_{AMP} (~ 20%) παρουσίασαν τα πρωτόνια H2', H5' και H6' του αρωματικού δακτυλίου, καθώς και το αλειφατικό H10 πρωτόνιο του ροσμαρινικού οξέος. Χαμηλότερη ένταση παρουσίασαν τα πρωτόνια H11a και H11b του ροσμαρινικού οξέος, με τιμές STD_{AMP} ίσες με 8,24% και 8,21%. Από την άλλη, στο STD NMR φάσμα εμφανίστηκαν και σήματα στην αλειφατική περιοχή, αν και με μικρή ένταση (~6.0 %). Οι κορυφές αυτές αντιστοιχούν στα αλειφατικά πρωτόνια CH₃ των τριτερπενίων ουρσολικό οξύ και ολεανολικό οξύ.

Τα αποτελέσματα του πειράματος STD NMR για το μείγμα των φυσικών προϊόντων και το υδατικό εκχύλισμα με την ελαστάση, δείχνει ότι η εφαρμογή της μεθοδολογίας STD NMR σε πολύπλοκο μείγμα μπορεί να προσδιορίσει την εκλεκτική αλληλεπίδραση των επιμέρους συστατικών με την ελαστάση. Το γεγονός ότι εμφανίζονται κορυφές που αντιστοιχούν σε περισσότερα από ένα συστατικά, αποδίδεται στο ότι τα συστατικά αυτά ενδεχομένως να μην ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την πρόσδεσή τους στο ενεργό κέντρο. Το ενεργό κέντρο, εκτός από την καταλυτική τριάδα, αλληλεπιδρά και με την περιοχή της "οπής οξυανιόντος", μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ της Ser195 και της Gly131. Επομένως, είναι φυσικό να υπάρχουν υποκαταστάτες που αλληλεπιδρούν και με εκείνη την περιοχή. Από την άλλη, η ελαστάση έχει συνολικά 5 διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης (μαζί με το ενεργό κέντρο), οπότε δεν αποκλείεται το γεγονός κάποιοι υποκαταστάτες να προσδένονται σε εκείνες της θέσεις. Η διαφορά στις εντάσεις των κορυφών δείχνει και τη διαφορά στις αποστάσεις των συγκεκριμένων πρωτονίων που αλληλεπιδρούν με την ελαστάση, λόγω της διαμόρφωσης που έχουν στον χώρο. Η χαρτογράφηση των επιτόπων πρόσδεσης ενός πολύπλοκου μείγματος με κάποιο ένζυμο, ή πρωτεΐνη είναι πολύ σημαντική για τη μελέτη ενώσεων που μπορούν να παρουσιάσουν στερεοεκλεκτική και τοποεκλεκτική αλληλεπίδραση με το μελετούμενο ένζυμο. Επίσης, μπορεί να γίνει και μελέτη των πιθανών νέων προϊόντων που μπορεί να προκύψουν από την αντίδραση των υποκαταστατών με την ελαστάση. Αυτό μπορεί να οδηγήσει και σε συμπεράσματα για το πώς συνδέεται το περιεχόμενο ενός φυτικού εκχυλίσματος με τη βιολογική δράση που παρουσιάζει ως προς το μελετούμενο ένζυμο ή πρωτεΐνη.

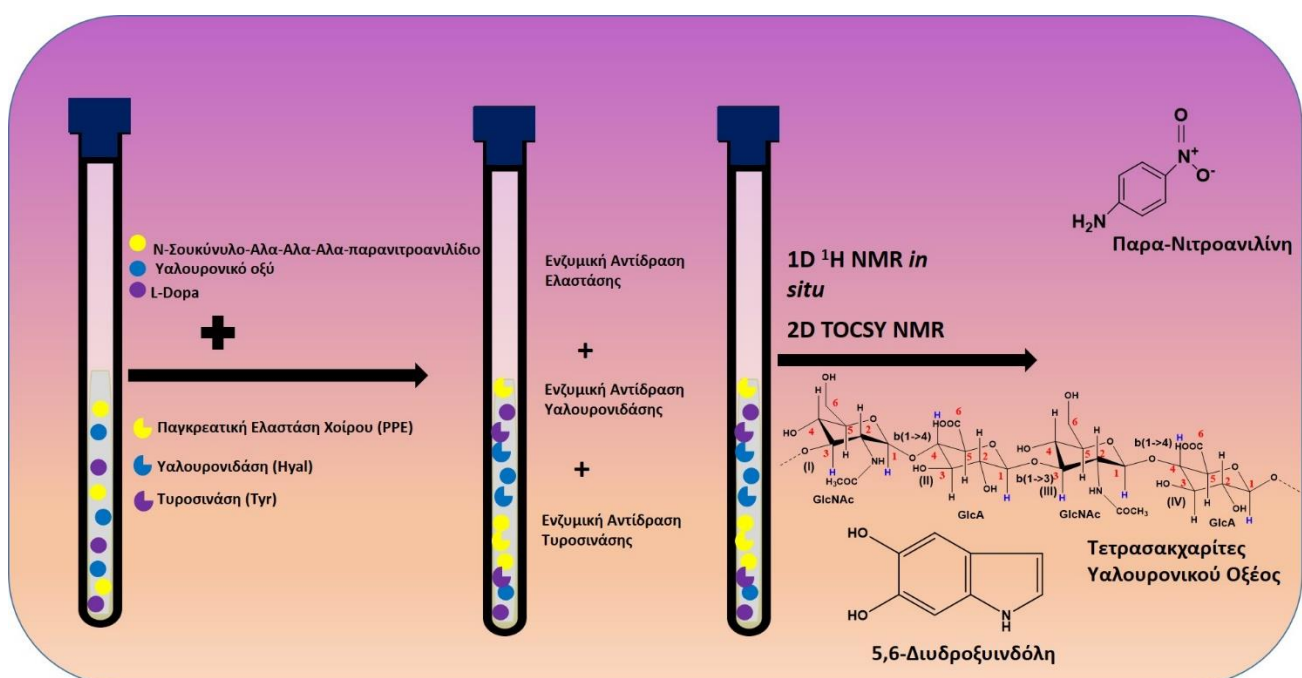
Γενικά Συμπεράσματα Κεφαλαίου 6.3

Σε αυτό το υποκεφάλαιο μελετήθηκε η ανασταλτική δράση των αιθανολικών και υδατικών εκχυλισμάτων από τα φυτά *Melissa Officinalis*, *Rosmarinus Officinalis*, *Salvia Officinalis*, *Thymus Vulgaris*, *Origanum Vulgare*, *Cistus Albidus* και *Hypericum Perforatum* στην ελαστάση. Πραγματοποιήθηκε σάρωση των εκχυλισμάτων σε συγκέντρωση 100 µg/mL με φασματοφωτομετρία UV, παρακολουθώντας την ανάπτυξη του χρώματος που οφείλεται στην παραγόμενη παρα-νιτροανιλίνη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα αιθανολικά και τα υδατικά εκχυλίσματα έδειξαν πολύ καλή ανασταλτική δράση στην ελαστάση σε συγκέντρωση 100 µg/mL με ποσοστό αναστολής μεγαλύτερο από 60,00%. Εξαιρεση αποτελούν το αιθανολικό εκχύλισμα του θυμαριού, της ρίγανης και του βαλσαμόχορτου που έδωσαν μέτρια αναστολή στην ελαστάση με ποσοστό μικρότερο του 50,00%. Από τα υδατικά εκχυλίσματα, αναστολή μικρότερη από 50,00% έδωσαν το φασκόμηλο, η ρίγανη και το βαλσαμόχορτο. Η μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης μελετήθηκε *in situ* με φασματοσκοπία NMR, όπου αναπτύχθηκε και η μεθοδολογία NMR-Cosmetube για τη μελέτη της αντίδρασης της ελαστάσης μέσα στο σωληνάκι NMR. Μελετήθηκε η ταυτόχρονη παραγωγή του υποστρώματος και η κατανάλωση του προϊόντος μέσα στο σωληνάκι NMR. Η μεθοδολογία NMR-Cosmetube εφαρμόστηκε και για την περίπτωση της μελέτης της αναστολής της ελαστάσης από φυσικό προϊόν και από φυτικό εκχύλισμα, όπου προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της παραγόμενης παρα-Νιτροανιλίνης και η % απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης. Τα αποτελέσματα της % απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης που προσδιορίστηκαν με την φασματοσκοπία NMR είναι ταυτόσημα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αναστολή της ελαστάσης με φασματοσκοπία UV, γεγονός που επιβεβαιώνει την αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για την αντίδραση της ελαστάσης. Σε επόμενο βήμα μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της ελαστάσης με μείγμα φυσικών προϊόντων και με υδατικό εκχύλισμα μελισσόχορτου, μέσω της μεθοδολογίας STD NMR, προκειμένου να διερευνηθεί η εκλεκτική ή όχι αλληλεπίδραση των επιμέρους συστατικών με την ελαστάση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ελαστάση μπορεί να αλληλεπιδράσει τοποεκλεκτικά και στερεοεκλεκτικά με τα περιεχόμενα συστατικά ενός πολύπλοκου μείγματος, ενώ από τη χαρτογράφηση του επιτόπου πρόσδεσης προσδιορίστηκε η ισχύς της αλληλεπίδρασης των μορίων, καθώς και το τμήμα του μορίου που αλληλεπιδρά με την ελαστάση. Η ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για την ενζυμική μελέτη της αντίδρασης αλλά και της αναστολής της ελαστάσης μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της συμπεριφοράς πολύπλοκων μειγμάτων και με αυτό το ένζυμο. Όσον αφορά τα πολύπλοκα μείγματα που μπορούν να μελετηθούν, αυτά μπορεί να είναι και φάρμακα ή καλλυντικά.

Κεφάλαιο 6: Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για την ταυτόχρονη *in situ* μελέτη του μείγματος των τριών ενζυμικών αντιδράσεων (τυροσινάσης-υαλουρονιδάσης-ελαστάσης)

6.1 Εισαγωγή

Επόμενο βήμα για την ενίσχυση της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη των ενζυμικών αντιδράσεων είναι η προσπάθεια της *in situ* μελέτης και των τριών ενζυμικών αντιδράσεων (της τυροσινάσης, της ελαστάσης και της υαλουρονιδάσης), οι οποίες εξελίχθηκαν ταυτόχρονα σ' ένα κοινό υδατικό περιβάλλον στο ίδιο σωληνάκι NMR. Η δυσκολία που χαρακτηρίζει αυτή την προσπάθεια βρίσκεται κυρίως στην ταυτοποίηση του αντίστοιχου φάσματος πρωτονίου, καθώς το μείγμα των τριών ενζυμικών αντιδράσεων περιλαμβάνει εκτός από τα πρωτόνια του κάθε υποστρώματος, και τα πρωτόνια των σχηματιζόμενων ενζυμικών προϊόντων από κάθε αντίδραση. Ωστόσο, η μεθοδολογία NMR Cosmetube εφαρμόστηκε και στο μείγμα των τριών αντιδράσεων προκειμένου να επιβεβαιωθεί το αν μπορεί να γίνει σαφής διάκριση της εξέλιξης κάθε ενζυμικής αντίδρασης που βρίσκεται μέσα στο μείγμα.



Σχήμα 6.1: Σχηματική αναπαράσταση των τριών ενζυμικών αντιδράσεων (τυροσινάσης από μανιτάρι, υαλουρονιδάσης από ιστό βοός και παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου) που πραγματοποιούνται στο σωληνάκι NMR.

6.2 Υλικά και Μέθοδοι

6.2.A Υλικά

6.2.A.1 Ένζυμα

Η προμήθεια των ενζυμικών παρασκευασμάτων της τυροσινάσης από μανιτάρι, της υαλουρονιδάσης από ιστό βοός και της παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου έγινε από την εταιρεία Sigma: (Tyrosinase from mushroom, lyophilized powder, ≥ 1000 unit/mg solid, T3824, Hyaluronidase from bovine testes, Type I-S 400-1000 units/mg protein, H3506, Elastase from porcine pancreas, Type I, ≥ 4.0 units/mg protein, E1250). Η προμήθεια του πρωτεϊνικού παρασκευάσματος της αλβουμίνης βοός που χρησιμοποιήθηκε και αυτό στην παρούσα μελέτη έγινε από την εταιρεία Sigma.

6.2.A.2 Χημικά αντιδραστήρια

Η προμήθεια όλων των διαλυτών και των δευτεριωμένων διαλυτών νερό (D_2O) και διμεθυλοσουλφοξειδίου- d_6 ($DMSO-d_6$) έγινε από την εταιρεία Sigma. Η προμήθεια του υποστρώματος της τυροσινάσης L-Dopa και της υαλουρονιδάσης Sodium Hyaluronate (άλας υαλουρονικού οξέος) έγινε από την εταιρεία Sigma, ενώ του υποστρώματος της ελαστάσης, *N*-Σουκινυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-Νιτροανιλίδιο (*N*-Succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-Nitroanilide) έγινε από την εταιρεία Carbosynth. Από τα φυσικά προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν, η προμήθεια του ροσμαρινικού οξέος έγινε από την εταιρεία Sigma, ενώ του γαλλικού οξέος έγινε από την εταιρεία Carbosynth. Η προμήθεια των μελετούμενων φαρμακευτικών φυτών έγινε από τοπικό παραγωγό της περιοχής της Ηπείρου.

6.2.B Μέθοδοι

6.2.B.1 Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη και των τριών ενζυμικών αντιδράσεων (τυροσινάση-υαλουρονιδάση-ελαστάση) στο ίδιο περιβάλλον

Η *in situ* μελέτη του μείγματος των ενζυμικών αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε σ' ένα σωληνάκι NMR 5 mm στους $37^\circ C$, σε συνολικό όγκο αντίδρασης 500 μL . Το μείγμα των ενζυμικών αντιδράσεων αποτελείται από: 0,05 U/mL τυροσινάσης από μανιτάρι, 2 mM του υποστρώματος L-Dopa, 0,01 U/mL υαλουρονιδάσης από ιστό βοός, 710 μM του υποστρώματος HA, 110 $\mu g/mL$ υδατικού διαλύματος αλβουμίνης βοός, 0,01 U/mL παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου (Porcine Pancreatic Elastase-PPE), 0,75 mM υποστρώματος *N*-Σουκινυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-νιτροανιλίδιο, και ρυθμιστικό διάλυμα. Ως προς τις συνθήκες του pH, το μείγμα των αντιδράσεων μελετήθηκε σε δύο διαφορετικές τιμές pH: (α) pH=7,4 με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος Tris-DCI 25 mM, και (β) pH=5,0 με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος οξικών 50 mM. Και στις δύο περιπτώσεις το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε προσθέτοντας τον κατάλληλο όγκο διαλύματος DCI ή NaOD. Αρχικά, σε σωληνάριο Eppendorf των 1,5 mL φέρονται ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο περιέχει εσωτερικό πρότυπο TMS- d_4 γνωστής συγκέντρωσης, 0,05 U/mL διαλύματος τυροσινάσης, 0,01 U/mL διαλύματος υαλουρονιδάσης και 0,01 U/mL διαλύματος ελαστάσης. Όλα τα διαλύματα των ενζύμων έχουν παρασκευαστεί στο αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα (Tris-DCI ή οξικών) σε κάθε περίπτωση. Το δείγμα επωάζεται για δέκα λεπτά στους $37^\circ C$. Στη συνέχεια προστίθενται 110 $\mu g/mL$ υδατικού διαλύματος αλβουμίνης βοός, 2 mM διαλύματος L-Dopa, 710 μM διαλύματος υαλουρονικού οξέος και 0,75 mM διαλύματος *N*-

Σουκουυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-Νιτροανιλίδιο. Το μείγμα ανακινείται έντονα και μεταφέρεται σε σωληνάκι NMR 5 mm. Το δείγμα τοποθετείται σε όργανο NMR συχνότητας 500 MHz, Bruker Avance (Bruker Rheinstetten, Germany), χρησιμοποιώντας το λογισμικό Topspin 3.2 και πραγματοποιείται καταγραφή φασμάτων πρωτονίου NMR ανά δέκα λεπτά, για χρονικό διάστημα 4 ωρών, στους 37° C. Όλα τα δεδομένα έχουν συλλεχθεί χρησιμοποιώντας παλμικές ακολουθίες που βρίσκονται στις βιβλιοθήκες παλμών της Bruker. Όλα τα φάσματα καταγράφηκαν με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στην **Παράγραφο 5.1.2.B.2**.

6.2.B.2 Ταυτοποίηση των προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων με φασματοσκοπία 2D ¹H-¹H TOCSY NMR

Τα πειράματα 2D ¹H-¹H TOCSY NMR καταγράφηκαν σε όργανο Bruker Avance 500 MHz, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Topspin 3.2. Για την ταυτοποίηση των ενζυμικών προϊόντων, το μείγμα των τριών αντιδράσεων μελετήθηκε στους 37° C, μετά από 4 ώρες εξέλιξης των ενζυμικών αντιδράσεων στο σωληνάκι NMR. Το μείγμα των ενζυμικών αντιδράσεων αποτελείται από: 0,05 U/mL τυροσινάσης από μανιτάρι, 2 mM του υποστρώματος L-Dopa, 0,01 U/mL υαλουρονιδάσης από ιστό βοός, 710 μM υποστρώματος υαλουρονικό οξύ, 110 μg/mL υδατικού διαλύματος αλβουμίνης βοός, 0,01 U/mL παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου (Porcine Pancreatic Elastase-PPE), 0,75 mM υποστρώματος *N*-Σουκουυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-Νιτροανιλίδιο, και ρυθμιστικό διάλυμα σε συνολικό όγκο αντίδρασης 500 μL. Για το πείραμα 2D ¹H-¹H TOCSY NMR, ρυθμίστηκαν οι ακόλουθοι παράμετροι: εύρος φάσματος: 5000 Hz, αριθμός σαρώσεων: 24 (πειραματικός χρόνος: ~ 5 ώρες), χρόνος κορεσμού: 0,25 s, με 90° παλμό διέγερσης, αριθμός σημείων: 2048 σημεία στην άμεση διάσταση (F2) και 256 σημεία στην έμμεση διάσταση (F1), χρόνος ανάμειξης: 80 ms, χρόνος εφησυχασμού: 2 s (1-5*T₁). Τα φάσματα κανονικοποιήθηκαν εις διπλούν και η γραμμή των κορυφών διευρύνθηκε κατά 1,5 Hz.

6.2.B.3 Ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ταυτόχρονης αναστολής των τριών ενζυμικών αντιδράσεων από φυσικό προϊόν και φυτικό εκχύλισμα

Η *in situ* μελέτη της ταυτόχρονης αναστολής του μείγματος των ενζυμικών αντιδράσεων μελετήθηκε αρχικά για δύο φυσικά προϊόντα, το ροσμαρινικό οξύ και το γαλλικό οξύ και στη συνέχεια για επιλεγμένα φυτικά εκυλίσματα. Η *in situ* μελέτη πραγματοποιήθηκε σ' ένα σωληνάκι NMR 5 mm στους 37° C, σε συνολικό όγκο αντίδρασης 500 μL. Το μείγμα των ενζυμικών αντιδράσεων αποτελείται από: 0,01 U/mL υαλουρονιδάσης από ιστό βοός, 710 μM υποστρώματος υαλουρονικό οξύ, 110 μg/mL υδατικού διαλύματος αλβουμίνης βοός, 0,01 U/mL παγκρεατικής ελαστάσης χοίρου (Porcine Pancreatic Elastase-PPE), 0,75 mM υποστρώματος *N*-Σουκουυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-Νιτροανιλίδιο, ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 50 mM, pD=5,0 και την κατάλληλη ποσότητα αναστολέα ή εκχυλίσματος, ώστε στην αντίδραση να έχει συγκέντρωση 4 mM και 4000 μg/mL αντίστοιχα. Ο λόγος που η αναστολή των ενζυμικών αντιδράσεων μελετήθηκε σε pD=5,0 θα εξηγηθεί παρακάτω. Το pD του διαλύματος ρυθμίστηκε προσθέτοντας τον κατάλληλο όγκο διαλύματος DCI ή NaOD. Αρχικά, σε σωληνάκι Eppendorf των 1,5 mL

φέρονται ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 50 mM, $pD=5,0$, το οποίο περιέχει εσωτερικό πρότυπο TMS- d_4 γνωστής συγκέντρωσης, 0,05 U/mL διαλύματος τυροσινάσης, 0,01 U/mL διαλύματος υαλουρονιδάσης συγκέντρωσης, 0,01 U/mL διαλύματος ελαστάσης και φυσικός αναστολέας σε συγκέντρωση 4 mM ή φυτικό εκχύλισμα σε συγκέντρωση 4000 $\mu g/mL$, διαλυμένο στο ρυθμιστικό διάλυμα. Το δείγμα επωάζεται για 10 λεπτά στους 37° C. Στη συνέχεια προστίθενται 110 $\mu g/mL$ υδατικού διαλύματος αλβουμίνης βοός, 2 mM διαλύματος L-Dopa, 710 μM διαλύματος υαλουρονικού οξέος, 0,75 mM διαλύματος *N*-Σουκουυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-νιτροανιλίδιο και το μείγμα ανακινείται έντονα και μεταφέρεται σε σωληνάκι NMR 5 mm. Ακολουθεί καταγραφή 1D 1H NMR φασμάτων, σε διαφορετικά χρονικά σημεία: 20 λεπτά, 60 λεπτά και 180 λεπτά. Μετά την καταγραφή του πρώτου φάσματος, το σωληνάκι NMR μεταφέρεται σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα, όπου ανακινείται στις 800 στροφές/min και σε θερμοκρασία 37° C, μέχρις ότου να συμπληρωθεί το επόμενο χρονικό σημείο. Η καταγραφή των φασμάτων NMR έγινε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στην **Παράγραφο 5.1.2.B.2**.

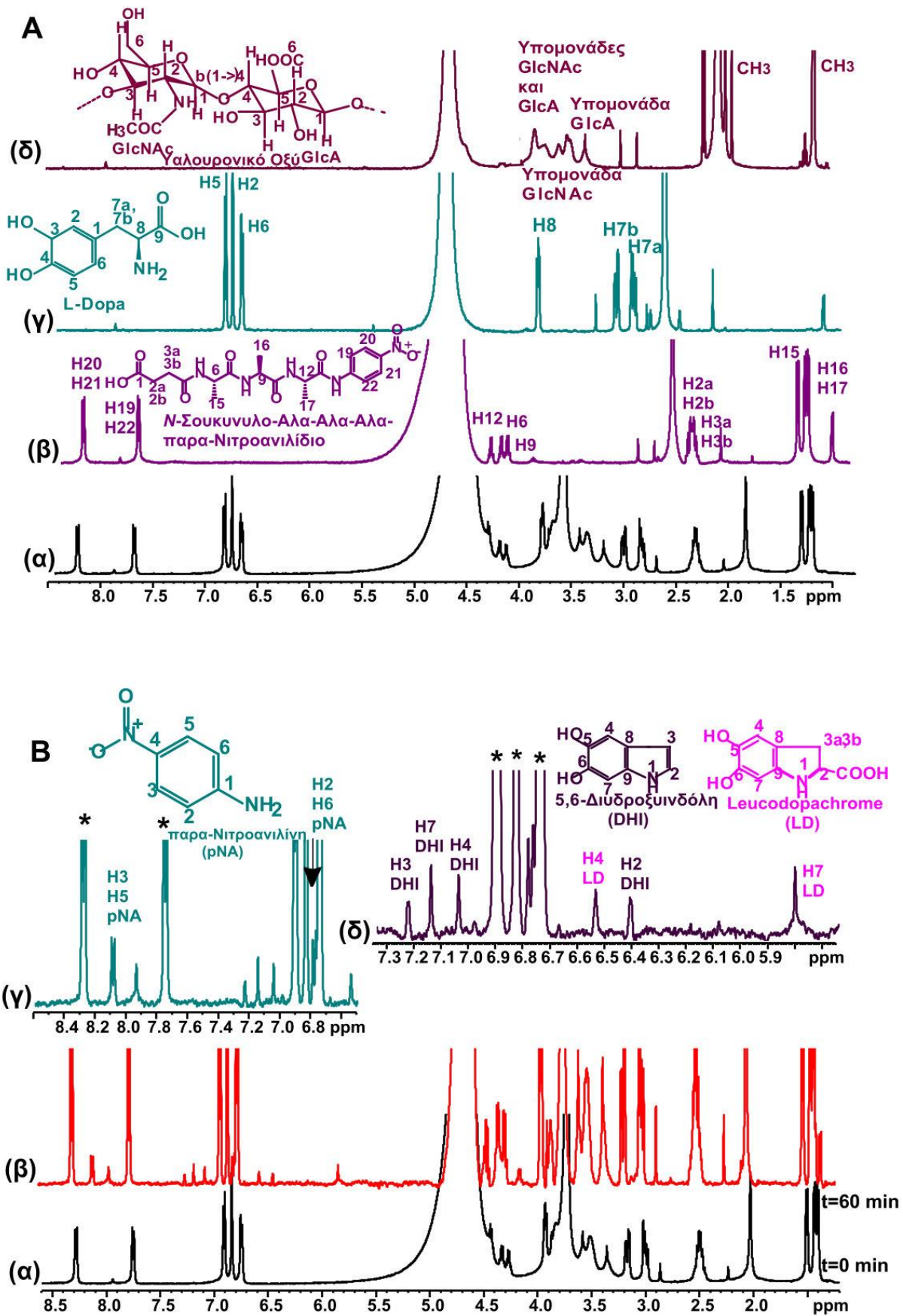
6.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

6.3.1 Αποτελέσματα από την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για την ταυτόχρονη μελέτη και των τριών ενζυμικών αντιδράσεων (τυροσινάση-υαλουρονιδάση-ελαστάση) στο ίδιο υδατικό περιβάλλον

Η μεθοδολογία NMR-Cosmetube για τη μελέτη και των τριών ενζυμικών αντιδράσεων στο ίδιο σωληνάκι NMR, φαίνεται να παρουσιάζει σημαντικό πλεονέκτημα, καθώς μπορεί να γίνει παρακολούθηση της ταυτόχρονης ανάπτυξης των ενδιάμεσων και προϊόντων που αντιστοιχούν σε κάθε μία αντίδραση ξεχωριστά, σε πραγματικό χρόνο, χωρίς προηγούμενη κλασμάτωση ή διαχωρισμό των επιμέρους συστατικών, ενώ μπορεί να γίνει και έμμεση εκτίμηση της κατανάλωσης του κάθε υποστρώματος, όσο οι ενζυμικές αντιδράσεις βρίσκονται σε εξέλιξη. Κύριο πλεονέκτημα αυτής της μεθοδολογίας είναι ότι τα πρωτόνια των κορυφών που αντιστοιχούν σε κάθε υπόστρωμα, εμφανίζονται σε χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις, οι οποίες διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους, με αποτέλεσμα να είναι εύκολη η μεταξύ τους διάκριση (**Σχήμα 6.2**). Πλεονέκτημα επίσης αποτελεί και το γεγονός ότι και τα παραγόμενα ενδιάμεσα και προϊόντα που προκύπτουν από κάθε αντίδραση, εμφανίζουν τα πρωτόνια τους σε διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις, με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η παρακολούθηση της ανάπτυξης τους, καθώς και ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσής του καθενός (**Διάγραμμα 6.1**).

Η συγκεκριμένη *in situ* μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα, ένα με $pD=7,4$ και ένα δεύτερο με $pD=5,0$, λόγω της διπλής δράσης που έχει η υαλουρονιδάση. Σε $pD=7,4$, η υαλουρονιδάση καταλύει αντίδραση μεταγλυκοζυλίωσης, ενώ η

καταλυτική της δράση (δηλαδή η ενζυμική διάσπαση του υαλουρονικού οξέος) πραγματοποιείται σε όξινες συνθήκες (pD=3,5-5,0), με αποτέλεσμα να υπάρχει διαφορά στο φάσμα πρωτονίου στην περιοχή των πρωτονίων του υαλουρονικού οξέος σε κάθε μια περίπτωση. Η εξέλιξη των αντιδράσεων μελετήθηκε σε πραγματικό χρόνο μέσα στο σωληνάκι NMR στους 37° C. 1D ¹H NMR φάσματα, καταγράφηκαν διαδοχικά, για ένα χρονικό διάστημα από 0-3 ώρες, ενώ το σύστημα παρέμεινε για επώαση για χρονικό διάστημα 7 ημερών. Εκτός από φάσματα πρωτονίου, καταγράφηκαν πειράματα 2D ¹H-¹H TOCSY για την ταυτοποίηση των προϊόντων που αντιστοιχούν σε κάθε αντίδραση ξεχωριστά.



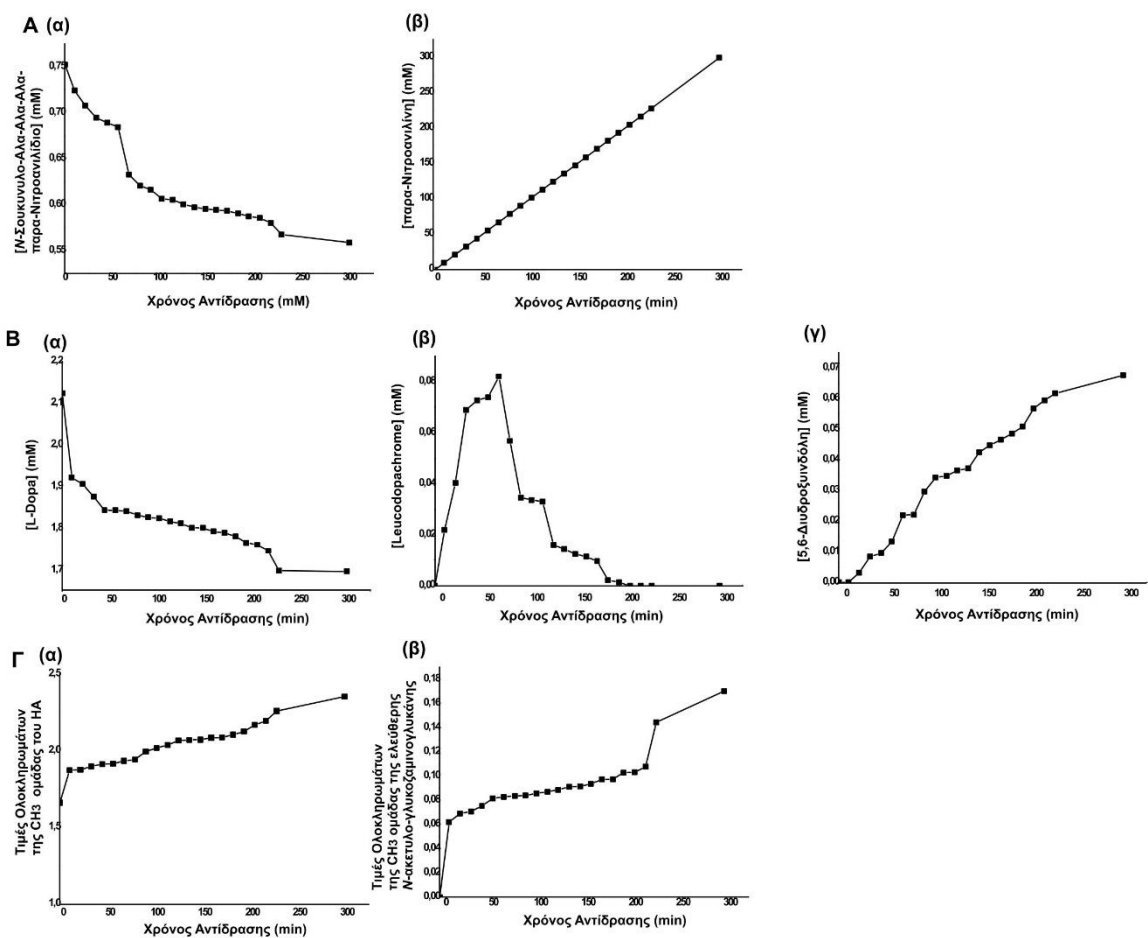
Σχήμα 6.2: A: Επιλεγμένη περιοχή (1,00-8,5 ppm) 1D ¹H φασμάτων NMR: (α) του μείγματος των υποστρωμάτων (*N*-Σουκουυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-Νιτροανιλίδιο, L-Dopa και Υαλουρονικό οξύ) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCI, 25 mM, pD=7,4, σε 100% D₂O, στους 37° C, (β) *N*-Σουκουυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-Νιτροανιλίδιο, (γ) L-Dopa και (δ) Υαλουρονικό οξύ, σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCI, 25 mM, pD=7,4, σε 100% D₂O στους 37° C. **B: Επιλεγμένη περιοχή (1,50-8,50 ppm) 1D ¹H φασμάτων NMR:** (α) του μείγματος των υποστρωμάτων (*N*-Σουκουυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-Νιτροανιλίδιο, L-Dopa και Υαλουρονικό οξύ), (β) των τριών ενζυμικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται ταυτόχρονα στο σωληνάκι NMR, μετά από 60 λεπτά αντίδρασης, (γ) **Επιλεγμένη περιοχή (6,70-8,50 ppm) 1D ¹H φασμάτων NMR:** όπου παρατηρείται η παραγωγή του προϊόντος, παρα-Νιτροανιλίνη από την ενζυμική αντίδραση της ελαστάσης σε χρόνο αντίδρασης 60 λεπτών, (δ) **Επιλεγμένη περιοχή (5,70-7,40 ppm) 1D ¹H φασμάτων NMR:** όπου παρατηρείται η παραγωγή του ενδιάμεσου προϊόντος Leucodopachrome αλλά και η παραγωγή του προϊόντος 5,6-διυδροξυινδόλη, από την αντίδραση της τυροσινάσης σε χρόνο αντίδρασης 60 λεπτών, σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCI, 25 mM, pD=7,4, σε 100% D₂O, στους 37° C. Ο αστερίσκος δηλώνει τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του υποστρώματος.

Όπως παρατηρείται στο **Σχήμα 6.2**, μέσα στο σωληνάκι NMR εξελίσσονται και οι τρεις ενζυμικές αντιδράσεις ταυτόχρονα, σ' ένα κοινό περιβάλλον pD (pD=7,4) και θερμοκρασίας (θ=37 °C). Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 6.2 A (β)**, μετά από 60 λεπτά αντίδρασης έχουν εμφανιστεί οι κορυφές που αντιστοιχούν στο προϊόν διάσπασης του υποστρώματος *N*-Σουκουυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-Νιτροανιλίδιο από την ελαστάση, της παρα-Νιτροανιλίνης (**Σχήμα 6.2 A (γ)**) αλλά και οι κορυφές που αντιστοιχούν στα προϊόντα της αντίδρασης της τυροσινάσης, Leucodopachrome και 5,6-διυδροξυινδόλη (**Σχήμα 6.2 A (δ)**). Σχετικά με την αντίδραση της υαλουρονιδάσης, το υπόστρωμά της φαίνεται να μην έχει διασπαστεί, καθώς στο φάσμα της αντίδρασης, οι αντίστοιχες κορυφές του υποστρώματος δεν έχουν αλλάξει καθόλου ως προς το σχήμα τους. Αυτό πιθανόν εξηγείται από το γεγονός (το οποίο και θα περιγραφεί παρακάτω) ότι σε ουδέτερο pD η υαλουρονιδάση πραγματοποιεί μεταγλυκοζυλίωση³⁶⁵ χρησιμοποιώντας στη δική μας περίπτωση το υπόστρωμά της ταυτόχρονα ως δότη και ως δέκτη. Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί ότι η παρουσία της ελαστάσης στο μείγμα των ενζυμικών αντιδράσεων μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργικότητα των άλλων δύο ενζύμων, καθώς ως πρωτεάση μπορεί να διασπάσει τα δύο άλλα πρωτεϊνικά μόρια. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη περίπτωση, λόγω της υψηλότερης χημικής συγγένειας που έχει η ελαστάση με το υπόστρωμά της, δεν φαίνεται να επηρέασε αισθητά τη δράση των άλλων δύο ενζύμων.

Το μείγμα των τριών ενζυμικών αντιδράσεων μελετήθηκε με διαδοχική καταγραφή 1D ¹H φασμάτων NMR, ανά δέκα λεπτά, για χρονικό διάστημα 3 ωρών, ενώ εξελίσσεται μέσα στο σωληνάκι NMR. Από τα δεδομένα που έχουν συλλεχθεί, είναι εφικτός ο έμμεσος προσδιορισμός της μεταβολής της συγκέντρωσης του κάθε υποστρώματος που καταναλώνεται αλλά και ο άμεσος προσδιορισμός του αντίστοιχου ενδιάμεσου ή προϊόντος που παράγεται σε κάθε ενζυμική αντίδραση. Στην περίπτωση της υαλουρονιδάσης, επειδή σε pDH=7,4 το υπόστρωμα δεν διασπάται, και επομένως στο 1D ¹H φάσμα η εμφάνιση των κορυφών που αντιστοιχούν στα ανωμερικά πρωτόνια δεν είναι εύκολη, καθώς υπάρχει έντονη αλληλεπικάλυψη από τη διευρυμένη κορυφή του νερού, μπορεί να ληφθεί υπόψιν η περιοχή των μέθυλο ομάδων του υαλουρονικού οξέος και της ελεύθερης *N*-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης που παράγεται, στην περιοχή των 2,00-2,10 ppm, όπου εμφανίζεται ως απλή (s). Από τα πρώτα λεπτά της

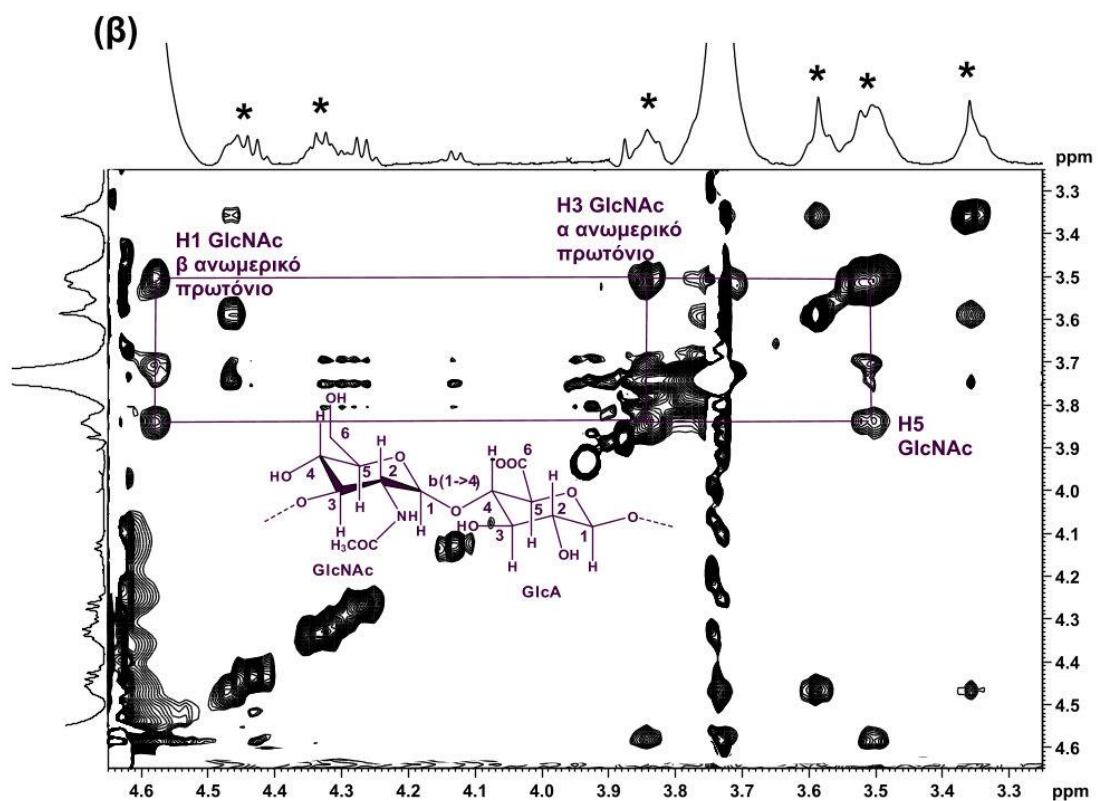
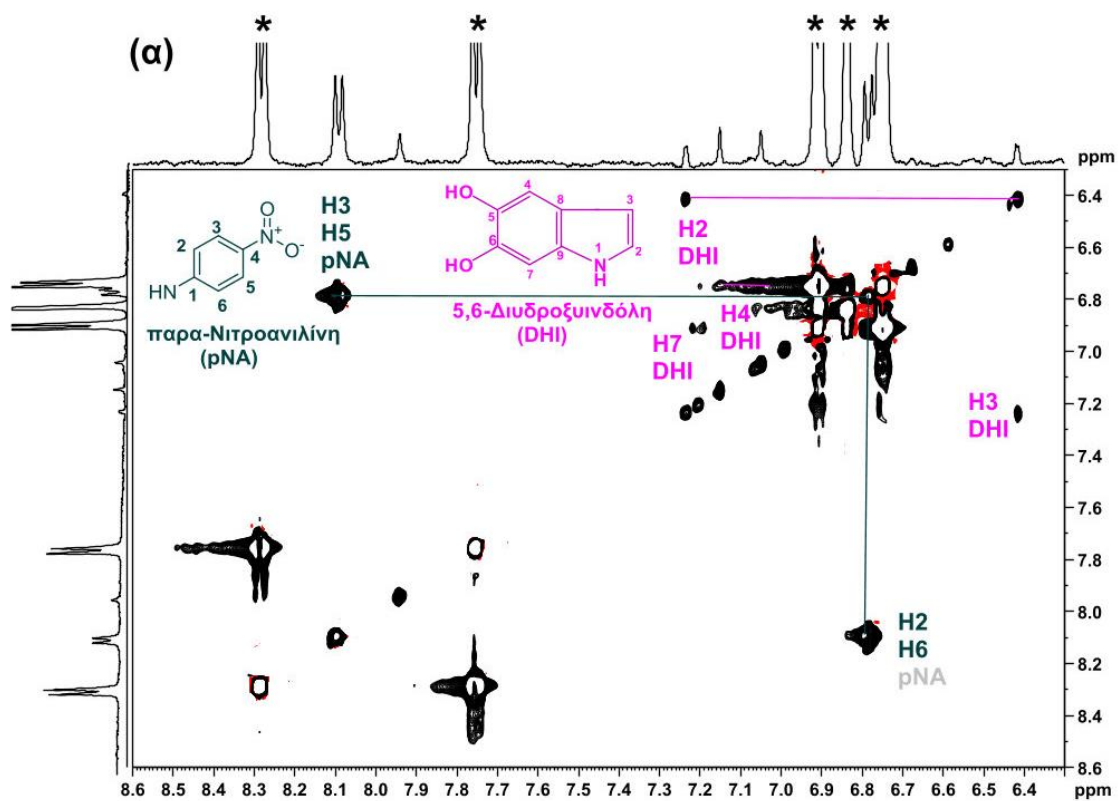
αντίδρασης, αρχίζει να εμφανίζεται ακόμη μία απλή κορυφή (s) μικρότερης έντασης, στα 2,07 ppm, η οποία αντιστοιχεί στην CH₃ ομάδα του άκρου της *N*-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης που παράγεται.

Όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 6.3 (A-B)**, η ταυτόχρονη εξέλιξη των τριών ενζυμικών αντιδράσεων στο σωληνάκι NMR, σε pD=7,4 πραγματοποιήθηκε επιτυχώς, καθώς φαίνεται η παραγωγή του κάθε ενζυμικού προϊόντος, όσο αυξάνεται ο χρόνος της αντίδρασης. Με βάση αυτά τα φάσματα πρωτονίου, ήταν δυνατός ο προσδιορισμός της μεταβολής της συγκέντρωσης τόσο των υποστρωμάτων που καταναλώνονται όσο και των προϊόντων που παράγονται. Το **Διάγραμμα 6.1 (A-Γ)** απεικονίζει τις γραφικές παραστάσεις των συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων *N*-Σουκουυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-Νιτροανιλίδιο και L-Dopa για τις αντιδράσεις της ελαστάσης και της τυροσινάσης, όπως επίσης και τις συγκεντρώσεις των παραγόμενων προϊόντων, παρα-Νιτροανιλίνη (προϊόν αντίδρασης ελαστάσης), Leucodopachrome (ενδιάμεσο προϊόν αντίδρασης τυροσινάσης) και 5,6-διυδροξυινδόλη (προϊόν αντίδρασης τυροσινάσης). Όσον αφορά την υαλουρονιδάση, η αντίστοιχη γραφική παράσταση περιέχει τη μεταβολή του ολοκληρώματος των μεθυλομάδων του υαλουρονικού οξέος και της παραγόμενης *N*-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης στην περιοχή 2,00-2,10 ppm.



Διάγραμμα 6.1: Γραφικές απεικονίσεις της μεταβολής των συγκεντρώσεων: A: (α) κατανάλωσης του υποστρώματος *N*-Σουκινυλ-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-Νιτροανιλίνη και **(β)** παραγωγής του προϊόντος παρα-Νιτροανιλίνη, κατά την ενζυμική αντίδραση της ελαστάσης. **B: (α)** κατανάλωσης του υποστρώματος L-Dopa, **(β)** παραγωγής και κατανάλωσης του ενδιάμεσου Leucodopachrome και **(γ)** παραγωγής της 5,6-διυδροξυινδόλης κατά την ενζυμική αντίδραση της τυροσινάσης. **Γ: Μεταβολή των ολοκληρωμάτων: (α)** της κατανάλωσης του υποστρώματος HA, **(β)** της παραγωγής του προϊόντος *N*-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης, κατά την ενζυμική αντίδραση της υαλουρονιδάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCI, 25 mM, pD=7,4, σε 100% D₂O, στους 37° C.

Σε pD=7,0 η υαλουρονιδάση καταλύει σε μεγαλύτερο ποσοστό μεταγλυκοζυλίωση περισσότερο από την υδρόλυση του HA. Στην αντίδραση αυτή, το HA συμπεριφέρεται ταυτόχρονα ως δότης και ως δέκτης. Ωστόσο, με εφαρμογή 2D ¹H-¹H TOCSY πειράματος (**Σχήμα 6.4**), είναι δυνατή η διάκριση των σημείων που αντιστοιχούν στα ελεύθερα ανωμερικά πρωτόνια της μονάδας της *N*-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης, που “κρύβονται” κάτω από την κορυφή του νερού.



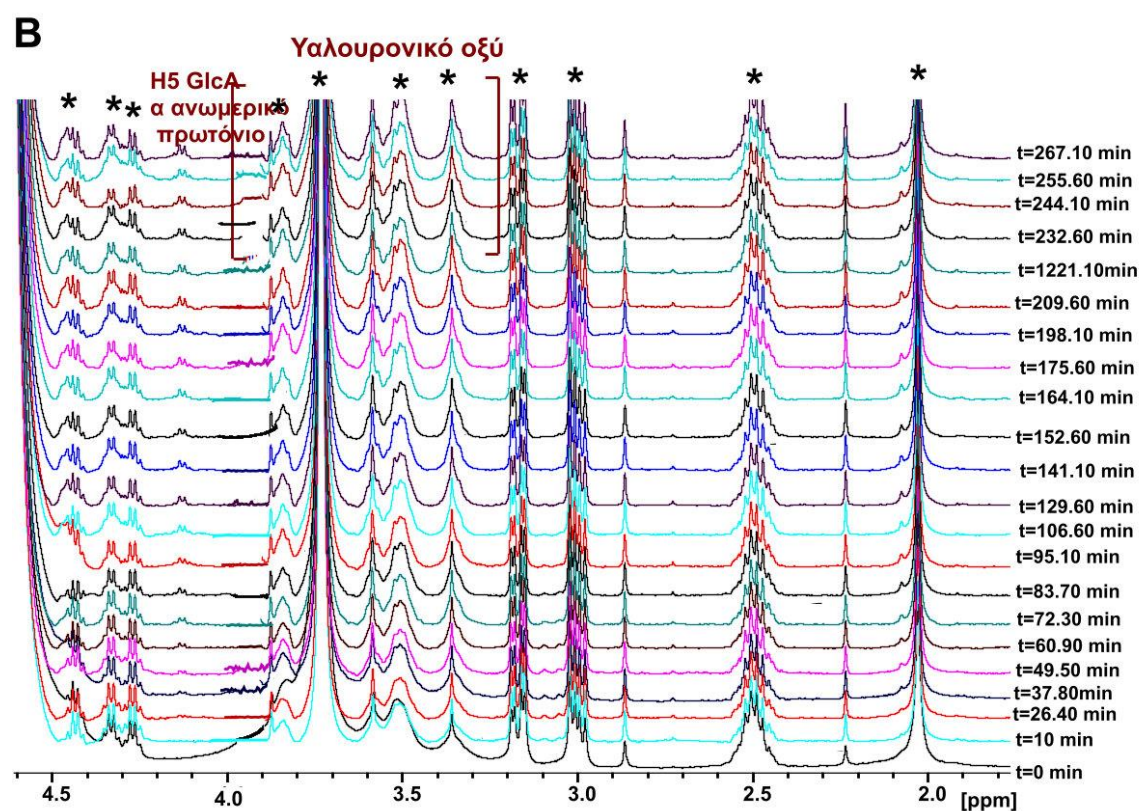
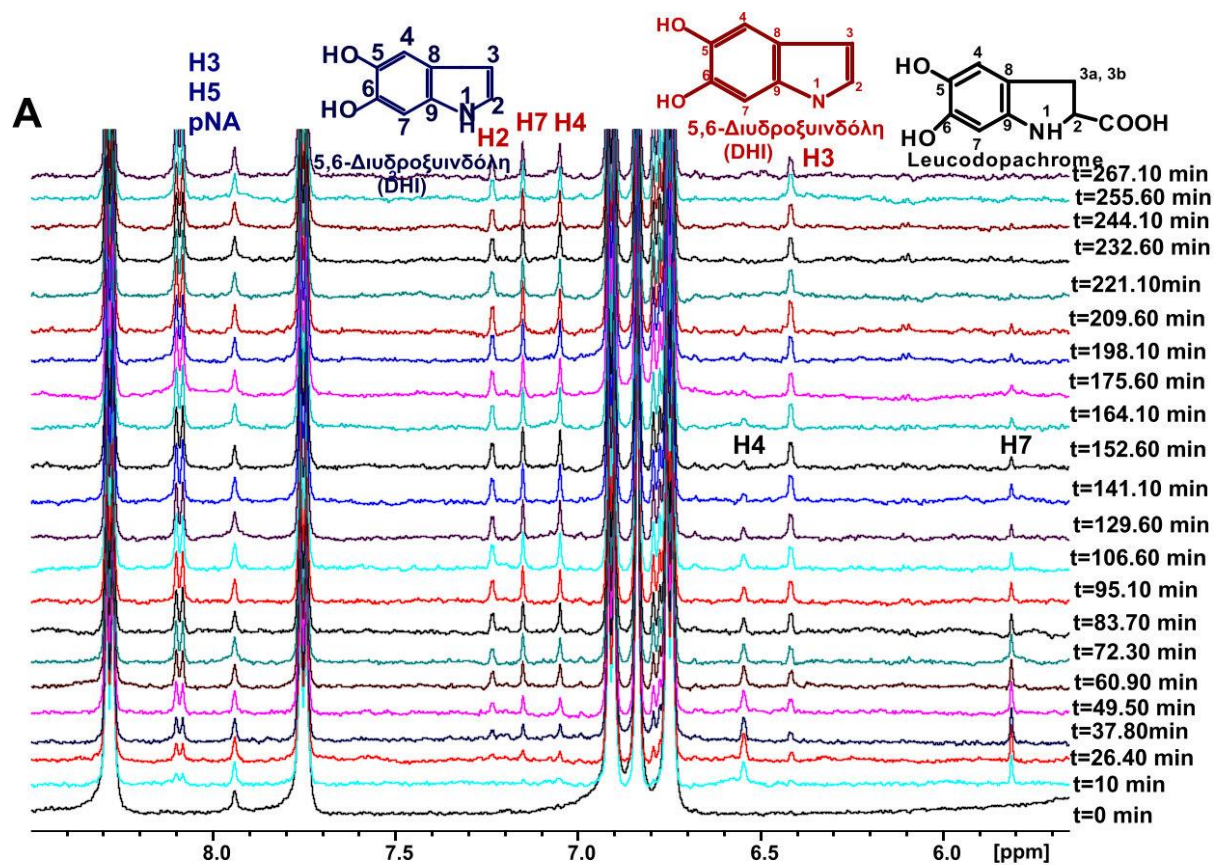
Σχήμα 6.4: (α) Επιλεγμένη περιοχή (6,30-8,60 ppm) του 2D ^1H - ^1H TOCSY φάσματος του μείγματος των τριών ενζυμικών αντιδράσεων μετά από 4 ώρες αντίδραση μέσα στο σωληνάκι NMR, σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCl, 25 mM, pD=7,4, στους 37°C, σε διαλύτη 100% D_2O . Υπάρχει διάκριση και διαχωρισμός των προϊόντων παρα-Νιτροανιλίνη και 5,6-διυδροξυινδόλη που παράγονται από την ενζυμική αντίδραση της ελαστάσης και τυροσινάσης, ταυτόχρονα. (β) Επιλεγμένη περιοχή (3,35-4,65 ppm) του 2D ^1H - ^1H TOCSY φάσματος του μείγματος των τριών ενζυμικών αντιδράσεων μετά από 4 ώρες αντίδραση στο σωληνάκι NMR, σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCl, 25 mM, pD=7,54, στους 37°C, σε διαλύτη 100% D_2O , όπου διακρίνονται το β H1 ανωμερικό πρωτόνιο της υπομονάδας GlcNAc και το α H3 ανωμερικό πρωτόνιο της υπομονάδας GlcNAc. Οι αστερικοί δείχνουν τις κορυφές των υποστρωμάτων κάθε ενζύμου.

Όπως παρατηρείται στα 2D ^1H - ^1H TOCSY φάσματα του **Σχήματος 6.4 (α)**, η διάκριση των παραγόμενων ενζυμικών προϊόντων για κάθε αντίδραση είναι επιτυχής. Η συσχέτιση των αρωματικών πρωτονίων H3 και H5 της παρα-Νιτροανιλίνης που βρίσκονται στα 8,06 ppm, με τα άλλα δύο αρωματικά πρωτόνια H2 και H6 είναι ευκρινής, αν και η κορυφή αυτή αλληλεπικαλύπτεται με την έντονη κορυφή της L-Dopa. Από την άλλη, είναι ευδιάκριτη και η συσχέτιση των πρωτονίων της 5,6-διυδροξυινδόλης. Όσον αφορά την περίπτωση της υαλουρονιδάσης, κατά την τρανσγλυκοζυλίωση πραγματοποιείται μεταφορά των σακχαρούχων υπομονάδων, με αποτέλεσμα να προκύπτουν ελεύθερα *N*-αμινοτελικά άκρα, λόγω της *N*-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης, με ελεύθερο το ανωμερικό πρωτόνιο H1 αυτής της υπομονάδας, το οποίο έχει χαρακτηριστική χημική μετατόπιση στα 4,55 ppm. Ωστόσο, στο φάσμα πρωτονίου του μείγματος των αντιδράσεων, η κορυφή αυτού του ανωμερικού H1 πρωτονίου δεν είναι παρατηρήσιμη καθώς βρίσκεται κάτω από τη διευρυμένη κορυφή του νερού. Παρόλα αυτά, στο 2D TOCSY φάσμα της τριπλής αντίδρασης του **Σχήματος 6.4 (β)**, ήταν δυνατή η εμφάνιση αυτής της κορυφής, η οποία έδωσε συσχέτιση με το πρωτόνιο H3 της υπομονάδας της *N*-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης. Αξίζει να σημειωθεί, ότι στο 2D TOCSY φάσμα, το οποίο καταγράφηκε μετά από τρεις ώρες αντίδρασης στο σωληνάκι NMR, δεν εμφανίστηκε η χαρακτηριστική κορυφή του ελεύθερου H6proS πρωτονίου της *N*-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνης, γεγονός που δηλώνει ότι δεν πραγματοποιείται διάσπαση του υαλουρονικού οξέος σε αυτές τις συνθήκες pH.

Σε επόμενο βήμα η *in situ* μελέτη και των τριών ενζυμικών αντιδράσεων επαναλήφθηκε και σε pH=5,0, χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, συγκέντρωσης 50 mM. Σε τιμή pH=5,0, η ενζυμική αντίδραση της υαλουρονιδάσης διατηρεί τις βέλτιστες συνθήκες της, και μπορεί να προχωρήσει προς τη διάσπαση του υαλουρονικού οξέος σε ολιγοσακχαρίτες. Αντίθετα, η ενζυμική αντίδραση της τυροσινάσης, η οποία έχει βέλτιστη δράση σε pH=6,8-7,0, μπορεί να πραγματοποιηθεί, αλλά με μικρή ταχύτητα. Το ίδιο ισχύει και για την ενζυμική αντίδραση της ελαστάσης, η οποία έχει βέλτιστη δράση σε pH=8,0, ωστόσο, σε συνθήκες pH=5,0, η αντίδραση πραγματοποιείται αλλά με μικρότερο ρυθμό ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζει τη λειτουργικότητα των άλλων δύο ενζύμων (**Σχήμα 6.5**).

αντίδραση της ελαστάσης σε χρόνο αντίδρασης 60 λεπτών, σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος, 50 mM, pD=5,00, σε 100% D₂O στους 37° C **(δ) Επιλεγμένη περιοχή (5,70-7,40 ppm)** όπου παρατηρείται η παραγωγή του ενδιάμεσου προϊόντος Leucodopachrome, αλλά και η παραγωγή του προϊόντος 5,6-διυδροξυινδόλη, από την αντίδραση της τυροσινάσης σε χρόνο αντίδρασης 60 λεπτών, σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος, 50 mM, pD=5,00, σε 100% D₂O στους 37° C **(ε) Επιλεγμένη περιοχή (4,00-5,25 ppm)** όπου παρατηρείται η εμφάνιση των ανωμερικών πρωτονίων του ελεύθερου άκρου της N-ακέτυλο γλυκοζαμινογλυκάνης των ολιγοσακχαριτών του υαλουρονικού οξέος από την αντίδραση της υαλουρονιδάσης, σε χρόνο αντίδρασης 60 λεπτών, σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος, 50 mM, pD=5,00, σε 100% D₂O στους 37° C. Ο αστερίσκος δηλώνει τις κορυφές των υποστρωμάτων.

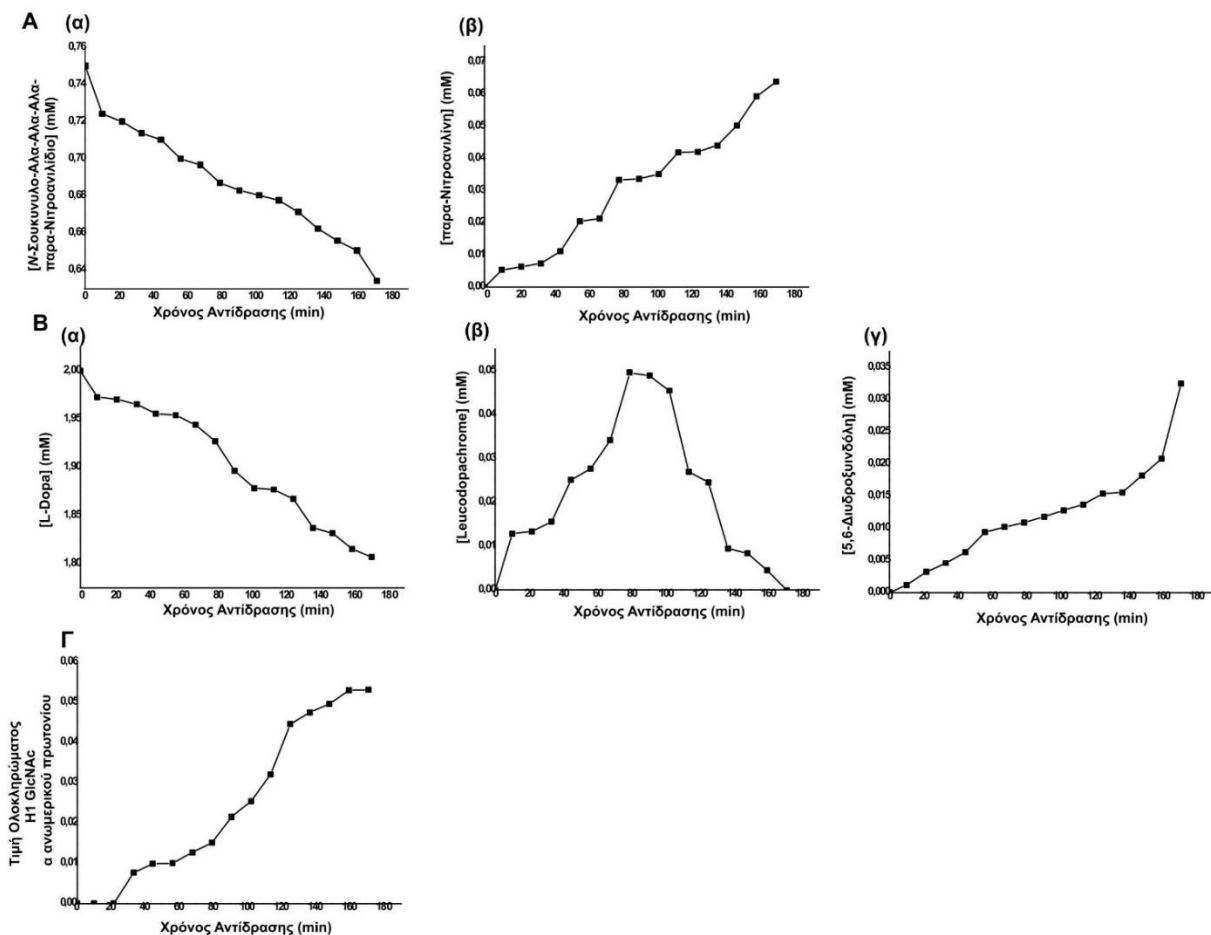
Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 6.5**, η *in situ* μελέτη και των τριών ενζυμικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάκι NMR είναι επιτυχής. Οι χημικές μετατοπίσεις των υποστρωμάτων κάθε ενζύμου, αλλά και των προϊόντων που σχηματίζονται είναι χαρακτηριστικές και μπορούν εύκολα να διακριθούν μεταξύ τους. Το πιο σημαντικό γεγονός είναι ότι σε pD=5,0 η υαλουρονιδάση καταλύει τη διάσπαση του υαλουρονικού οξέος, και αρχίζει να εμφανίζεται η χαρακτηριστική κορυφή που αντιστοιχεί στο β ανωμερικό πρωτόνιο H1 της υπομονάδας GlcNAc, ενώ στην περιοχή 3,20-3,90 ppm, όσο εξελίσσεται η αντίδραση, οι κορυφές του υποστρώματος αλλάζουν σχήμα, γεγονός το οποίο οφείλεται στη διάσπασή τους από την υαλουρονιδάση. Όσον αφορά την ενζυμική αντίδραση της ελαστάσης και της τυροσινάσης, σε pD=5, πραγματοποιούνται και οι δύο, αλλά με πιο χαμηλό ρυθμό. Αυτό φαίνεται και στο **Σχήμα 6.6**, όπου, οι κορυφές της παραγόμενης παρα-Νιτροανιλίνης και του Leucodopachrome εμφανίζονται με χαμηλότερη ένταση, συγκριτικά με τα αντίστοιχα φάσματα της αντίδρασης που πραγματοποιείται σε pD=7,0.



Σχήμα 6.6: A: Επιλεγμένη περιοχή (5,70-8,5 ppm) 1D ^1H φασμάτων NMR: της εξέλιξης των τριών ενζυμικών αντιδράσεων σε χρονικό διάστημα (0-270 min), σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCI, 50 mM, $\text{pD}=5,0$, σε 100% D_2O , στους 37°C . **B: Επιλεγμένη περιοχή (1,0-4,5 ppm) 1D ^1H φασμάτων NMR:** της εξέλιξης των τριών ενζυμικών αντιδράσεων σε χρονικό διάστημα (0-270 min), σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-DCI, 50 mM, $\text{pD}=5,0$, σε 100% D_2O , στους 37°C . Ο αστερίσκος δηλώνει τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των υποστρωμάτων.

Ομοίως με προηγουμένως, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της μεταβολής των συγκεντρώσεων για κάθε υπόστρωμα που καταναλώνεται και για κάθε αντίστοιχο προϊόν που παράγεται. Στην περίπτωση της υαλουρονιδάσης, λόγω της αδυναμίας του προσδιορισμού του

μοριακού βάρους των ολιγοσακχαριτών που προκύπτουν, υπολογίστηκε η μεταβολή του ολοκληρώματος του H1 β ανωμερικού πρωτονίου της υπομονάδας GlcNAc (**Διάγραμμα 6.2**).



Διάγραμμα 6.2: Γραφικές παραστάσεις Α: της μεταβολής των συγκεντρώσεων (α) του υποστρώματος *N*-Σουκυνυλο-Αλα-Αλα-Αλα-παρα-Νιτροανιλίδιο και (β) του προϊόντος παρα-Νιτροανιλίνης κατά την ενζυμική αντίδραση της ελαστάσης, **Β:** της μεταβολής των συγκεντρώσεων (α) του υποστρώματος *L*-Dopa, (β) του ενδιάμεσου Leucodopachrome και (γ) του προϊόντος 5,6-διυδροξυινδόλη κατά την ενζυμική αντίδραση της τυροσινάσης και **Γ:** της μεταβολής του ολοκληρώματος του παραγόμενου H1 ανωμερικού πρωτονίου της υπομονάδας GlcNAc κατά την ενζυμική αντίδραση της υαλουρονιδάσης.

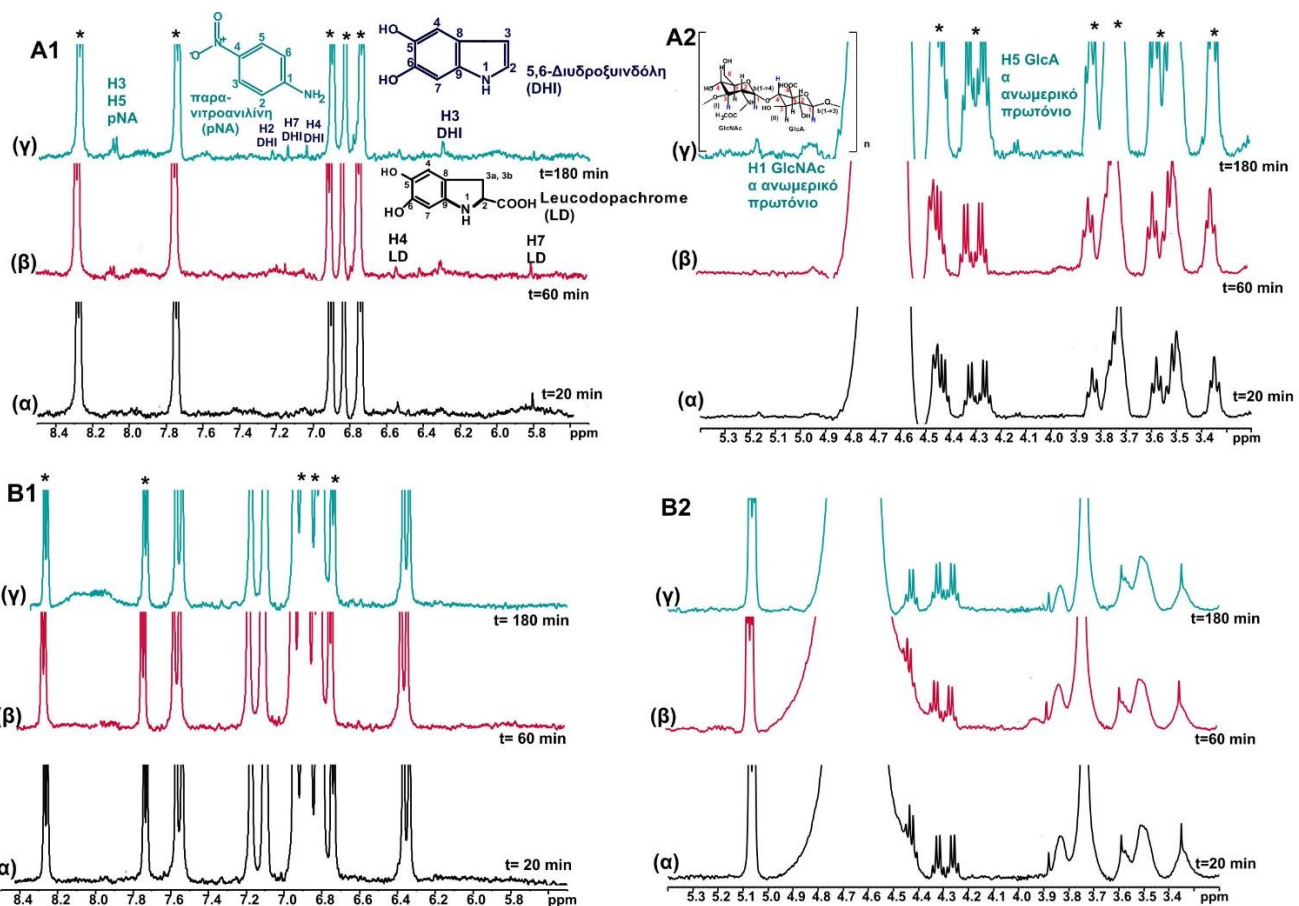
6.3.2 Αποτελέσματα από την ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη και των τριών ενζυμικών αντιδράσεων παρουσία φυσικού προϊόντος ή φυτικού εκχυλίσματος

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε αν μπορεί να πραγματοποιηθεί πρόβλεψη της συμπεριφοράς ενός μορίου (δηλαδή αν θα δράσει ως αναστολέας ή ως ενισχυτής) σε κάθε μία από τις τρεις αντιδράσεις, όταν αυτές πραγματοποιούνται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάκι NMR. Για τη μελέτη αυτή επιλέχθηκαν κυρίως οι συνθήκες $pD=5,0$, κυρίως για τον λόγο ότι σε αυτή την τιμή pH πραγματοποιείται διάσπαση του HA από την υαλουρονιδάση και όχι μεταγλυκοζυλίωση. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε για φυσικά μόρια με ανασταλτική δράση, αλλά και για φυτικό εκχύλισμα. Προτίμηθηκε μεγάλη σχετικά συγκέντρωση για τους φυσικούς αναστολείς (4 mM) και για το φυτικό εκχύλισμα (4000 $\mu g/mL$), κυρίως για να πραγματοποιηθεί επιτυχής στόχευση και στα τρία ένζυμα-στόχους. Ως φυσικά προϊόντα επιλέχθηκαν το ροσμαρινικό οξύ και το γαλλικό

οξύ επειδή έχουν ήδη αποδειχτεί αποτελεσματικοί αναστολείς ως προς την ελασάση και την υαλουρονιδάση ενώ ως προς την τυροσινάση το ένα έδρασε ως ενισχυτής και το άλλο ως αναστολέας αντίστοιχα.

6.3.2.1 NMR-Cosmetube: Μελέτη και των τριών ενζυμικών αντιδράσεων παρουσία φυσικού προϊόντος

Το πρώτο φυσικό προϊόν που επιλέχθηκε για τη μελέτη της αναστολής είναι το ροσμαρινικό οξύ. Αρχικά, έγινε προεπώαση του μείγματος των ενζύμων με 4 mM ροσμαρινικού οξέος για 10 λεπτά στους 37°C, και στη συνέχεια προστέθηκαν και τα τρία υποστρώματα. Το μείγμα των ενζυμικών αντιδράσεων μεταφέρθηκε σε σωληνάκι NMR 5 mm και καταγράφηκαν πρωτονιακά φάσματα για διάφορα χρονικά σημεία (**Σχήμα 6.7**).

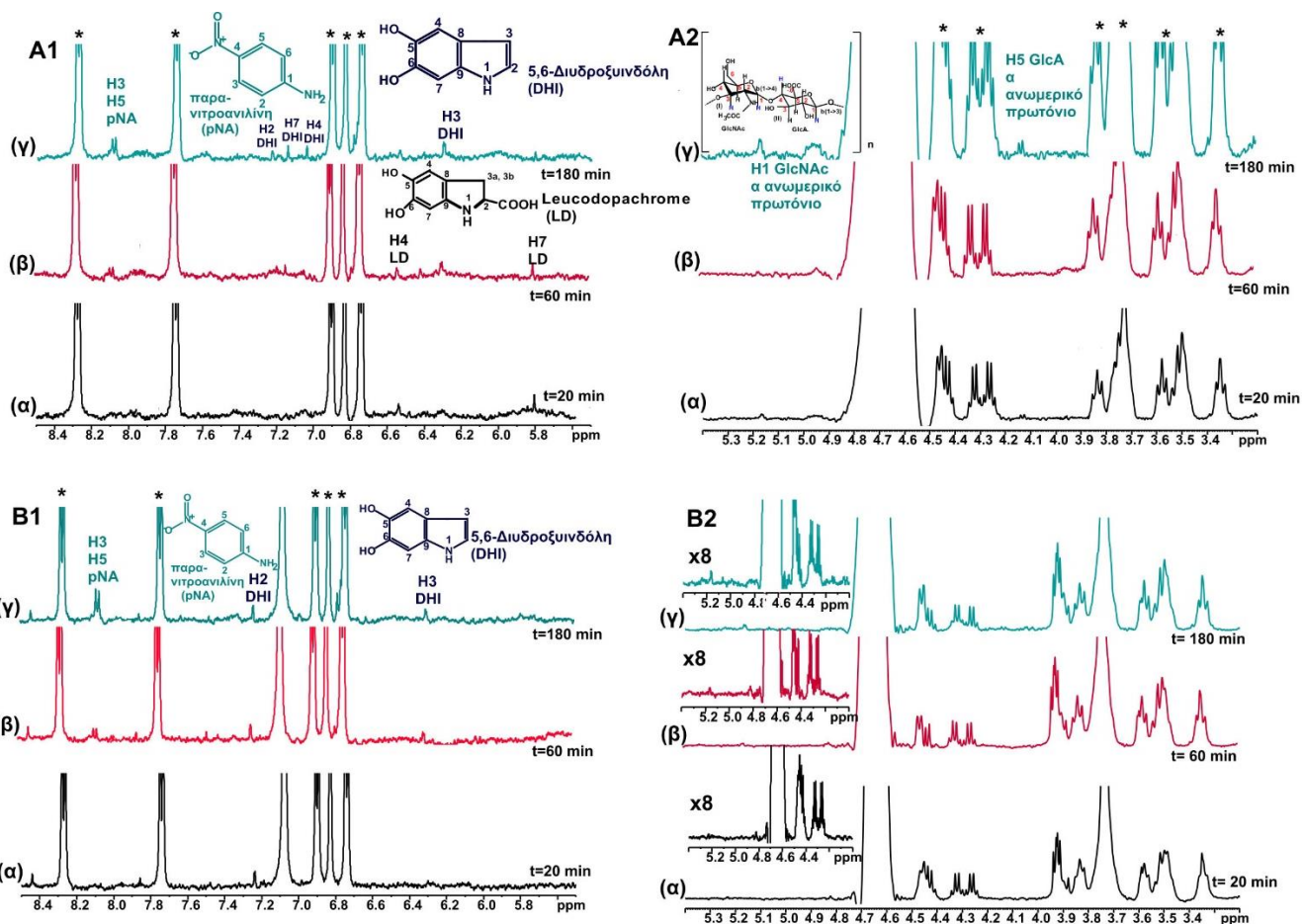


Σχήμα 6.7: A1: Επιλεγμένη περιοχή (5,50-8,50 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων: του μείγματος των τριών ενζυμικών αντιδράσεων σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, 50 mM, ρD=5,00, σε 100% D₂O στους 37°C για χρόνο αντίδρασης (α) t=20 min, (β) t= 60 min, (γ) t= 180 min. **A2: Επιλεγμένη περιοχή (3,20-5,40 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων:** του μείγματος των τριών ενζυμικών αντιδράσεων σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, 50 mM, ρD=5,00, σε 100% D₂O στους 37°C για χρόνο αντίδρασης (α) t=20 min, (β) t= 60 min, (γ) t= 180 min. **B1: Επιλεγμένη περιοχή (5,50-8,50 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων:** του μείγματος των τριών ενζυμικών αντιδράσεων παρουσία 4 mM ροσμαρινικού οξέος σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, 50 mM, ρD=5,00, σε 100% D₂O στους 37°C για χρόνο αντίδρασης (α) t=20 min, (β) t= 60 min, (γ) t= 180 min. **B2: Επιλεγμένη περιοχή (3,20 -5,40 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων:** του μείγματος των τριών ενζυμικών αντιδράσεων παρουσία 4 mM ροσμαρινικού οξέος σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, 50 mM, ρD=5,00, σε 100% D₂O στους 37°C για χρόνο αντίδρασης (α) t=20 min, (β) t= 60 min, (γ) t= 180 min. Ο αστερίσκος δηλώνει τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των υποστρωμάτων.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 6.7**, η μεθοδολογία NMR-Cosmetube για την ταυτόχρονη πρόβλεψη της δράσης μιας ουσίας ως αναστολέας ή ενισχυτής ενός ενζύμου φαίνεται να είναι

λειτουργική. Το ροσμαρινικό οξύ, έδειξε ταυτόχρονη αναστολή στη δράση της ελαστάσης και της υαλουρονιδάσης, καθώς δεν παρατηρείται εμφάνιση των κορυφών των αρωματικών πρωτονίων της παρα-Νιτροανιλίνης, ακόμη και μετά από 180 λεπτά αντίδρασης. Όσον αφορά την αναστολή της υαλουρονιδάσης, όπως παρατηρείται στο **Σχήμα 6.7 B2**, οι κορυφές του HA δεν παρουσίασαν καμία μεταβολή στο σχήμα τους, ούτε έχει εμφανιστεί κάποιο ελεύθερο ανωμερικό πρωτόνιο, που σημαίνει ότι το ροσμαρινικό οξύ ανέστειλε ταυτόχρονα και την ελαστάση και την υαλουρονιδάση. Αντίθετα, στην περίπτωση της τυροσινάσης, η αντίδραση προχώρησε κανονικά και μετά από 20 λεπτά αντίδρασης παράχθηκε η 5,6-διυδροξυινδόλη, όπως ήταν αναμενόμενο αφού το ροσμαρινικό οξύ δεν λειτουργεί ως αναστολέας της τυροσινάσης. Σε αυτή την περίπτωση, το ροσμαρινικό οξύ έδρασε ως ενισχυτής της δράσης της τυροσινάσης, αυξάνοντας την παραγωγή της 5,6-διυδροξυινδόλης κατά ένα ποσοστό ίσο με 5%.

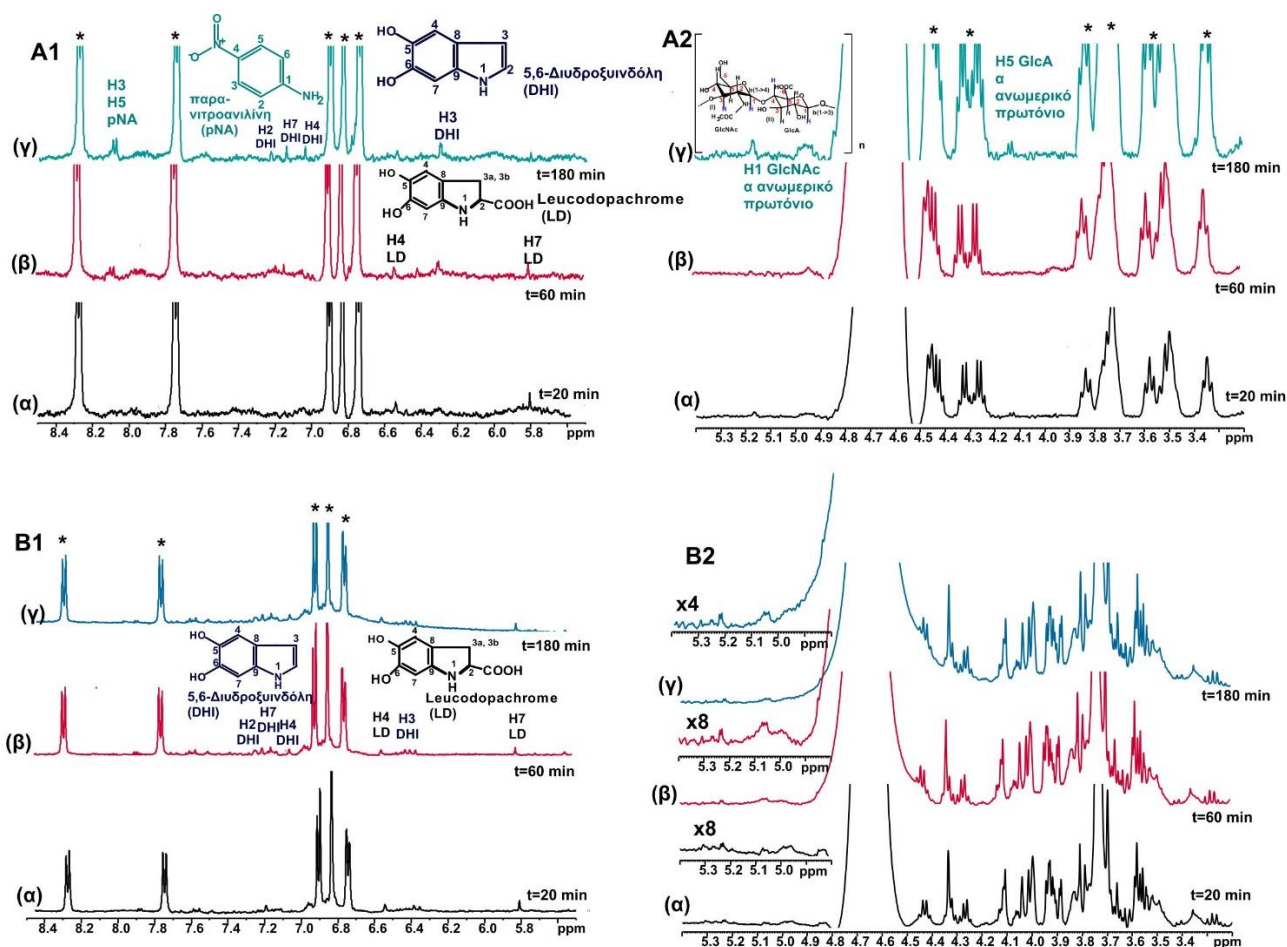
Στην περίπτωση του γαλλικού οξέος, παρατηρείται μια διαφορετική συμπεριφορά στο μείγμα των ενζυμικών αντιδράσεων (**Σχήμα 6.8**). Και οι τρεις ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν κανονικά, παρουσία του γαλλικού οξέος. Στην περίπτωση της ελαστάσης, η % απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης παρουσία του αναστολέα υπολογίστηκε ίση με 56,91%. Από την άλλη, στην αντίδραση της υαλουρονιδάσης, η διάσπαση του υποστρώματος έγινε με μικρότερο ρυθμό, οδηγώντας σε 29,24% απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης. Τέλος, στην περίπτωση της τυροσινάσης, η συγκέντρωση της παραγόμενης 5,6-διυδροξυινδόλης ήταν κατά 35,72% πιο μειωμένη από την αντίστοιχη ενζυμική αντίδραση.



Σχήμα 6.8: A1: Επιλεγμένη περιοχή (5,50-8,50 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων: του μείγματος των τριών ενζυμικών αντιδράσεων σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, 50 mM, pD=5,00, σε 100% D₂O στους 37°C για χρόνο αντίδρασης (α) t=20 min, (β) t= 60 min, (γ) t= 180 min. **A2: Επιλεγμένη περιοχή (3,20-5,40 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων:** του μείγματος των τριών ενζυμικών αντιδράσεων σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, 50 mM, pD=5,00, σε 100% D₂O στους 37°C για χρόνο αντίδρασης (α) t=20 min, (β) t= 60 min, (γ) t= 180

min. **B1: Επιλεγμένη περιοχή (5,50-8,50 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων:** του μείγματος των τριών ενζυμικών αντιδράσεων παρουσία 4 mM γαλλικού οξέος σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος, 50 mM, ρD=5,00, σε 100% D₂O στους 37°C για χρόνο αντίδρασης (**α**) t=20 min, (**β**) t= 60 min, (**γ**) t= 180 min. **B2: Επιλεγμένη περιοχή (3,20 -5,40 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων:** του μείγματος των τριών ενζυμικών αντιδράσεων παρουσία 4 mM γαλλικού οξέος σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος, 50 mM, ρD=5,00, σε 100% D₂O στους 37°C για χρόνο αντίδρασης (**α**) t=20 min, (**β**) t= 60 min, (**γ**) t= 180 min. Ο αστερίσκος δηλώνει τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των υποστρωμάτων.

Επόμενη περίπτωση που μελετήθηκε είναι η πιθανότητα να πραγματοποιείται ταυτόχρονη πρόβλεψη της εξέλιξης των ενζυμικών αντιδράσεων, παρουσία ενός φυτικού εκχυλίσματος. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκε ένα υδατικό εκχύλισμα, προκειμένου να αποφευχθούν προβλήματα διαλυτότητας. Συγκεκριμένα επιλέχθηκε το υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Melissa Officinalis*, το οποίο έδειξε καλή αναστολή και για τα τρία ένζυμα, στις μετρήσεις που έγιναν με φασματοσκοπία UV (**Σχήμα 6.9**).



Σχήμα 6.9: A1 Επιλεγμένη περιοχή (5,50-8,50 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων: του μείγματος των τριών ενζυμικών αντιδράσεων σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, 50 mM, ρD=5,00, σε 100% D₂O στους 37°C για χρόνο αντίδρασης (**α**) t=20 min, (**β**) t= 60 min, (**γ**) t= 180 min. **A2: Επιλεγμένη περιοχή (3,20-5,40 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων:** του μείγματος των τριών ενζυμικών αντιδράσεων σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, 50 mM, ρD=5,00, σε 100% D₂O στους 37°C για χρόνο αντίδρασης (**α**) t=20 min, (**β**) t= 60 min, (**γ**) t= 180 min. **B1: Επιλεγμένη περιοχή (5,50-8,50 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων:** του μείγματος των τριών ενζυμικών αντιδράσεων παρουσία υδατικού διαλύματος του φυτού *Melissa Officinalis* σε συγκέντρωση 4000 μg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, 50 mM, ρD=5,00, σε 100% D₂O στους 37°C για χρόνο αντίδρασης (**α**) t=20 min, (**β**) t= 60 min, (**γ**) t= 180 min. **B2: Επιλεγμένη περιοχή (3,20 -5,40 ppm) 1D ¹H NMR φασμάτων:** του μείγματος των τριών ενζυμικών αντιδράσεων παρουσία υδατικού διαλύματος του φυτού *Melissa Officinalis* σε συγκέντρωση 4000 μg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, 50 mM,

pD=5,00, σε 100% D₂O στους 37°C για χρόνο αντίδρασης (**α**) t=20 min, (**β**) t= 60 min, (**γ**) t= 180 min. Ο αστερίσκος δηλώνει τις κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια των υποστρωμάτων.

Όπως παρατηρείται στα 1D ¹H φάσματα του **Σχήματος 6.9**, η μεθοδολογία NMR-Cosmetube για την πρόβλεψη της συμπεριφοράς των τριών αντιδράσεων, φαίνεται να είναι αποτελεσματική και στην περίπτωση φυτικού εκχυλίσματος. Στην περίπτωση του υδατικού εκχυλίσματος του μελισσόχορτου, δεν παράχθηκε καθόλου παρα-Νιτροανιλίνη, που σημαίνει ότι το εκχύλισμα ανέστειλε αποτελεσματικά την ελαστάση (100% αναστολή της δράσης της ελαστάσης). Στην περίπτωση της υαλουρονιδάσης, εμφανίστηκε η κορυφή του ελεύθερου ανωμερικού πρωτονίου, αλλά με χαμηλότερη ένταση από την αντίστοιχη κορυφή της αντίδρασης. Η % απόδοση της αντίδρασης σε αυτήν την περίπτωση υπολογίστηκε ίση με 20,78%. Το εκχύλισμα φαίνεται να ανέστειλε σε μικρό βαθμό και την τυροσινάση, καθώς εμφανίζονται οι κορυφές των πρωτονίων της 5,6-διυδροξυινδόλης αλλά με χαμηλότερη ένταση από την ενζυμική αντίδραση, οδηγώντας σε 15% απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης. Αυτή η μελέτη μπορεί να αποτελέσει πλεονέκτημα για την ανακάλυψη παραγόντων με ταυτόχρονη ανασταλτική δράση τριών ενζύμων που σχετίζονται με την πρόωρη γήρανση και το μελάνωμα. Με τη μεθοδολογία αυτή θα μπορούσε να γίνει μελέτη της αποτελεσματικότητας ενός καλλυντικού προϊόντος ως προς τη δράση αυτών των ενζύμων.

Η ενίσχυση της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για την ταυτόχρονη πρόβλεψη της συμπεριφοράς τριών ενζυμικών αντιδράσεων παρουσία μιας ουσίας που μπορεί να δράσει ως αναστολέας ή ενισχυτής φαίνεται να είναι αποτελεσματική. Η εφαρμογή της μεθοδολογίας αυτής θα μπορούσε να αποτελέσει πλεονέκτημα όχι μόνο στην περίπτωση της ανάπτυξης καλλυντικών προϊόντων. Θα μπορούσε να αποτελέσει επίσης σημαντικό οδηγό και στη μελέτη και ανάπτυξη καινούριων φαρμάκων για τα οποία θα μπορεί να διερευνηθεί αν στοχεύουν και επηρεάζουν ταυτόχρονα τη δράση περισσότερων από ένα πρωτεϊνικών στόχων.

Γενικά Συμπεράσματα Κεφαλαίου

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκαν *in situ* ταυτόχρονα και οι τρεις ενζυμικές αντιδράσεις, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σ' ένα κοινό υδατικό περιβάλλον, στο σωληνάκι NMR, με φασματοσκοπία 1D ¹H NMR. Βασικός στόχος αυτής της μελέτης ήταν να χρησιμοποιηθεί ένα σωληνάκι NMR στο οποίο να εξελίσσονται ταυτόχρονα και οι τρεις ενζυμικές αντιδράσεις, προκειμένου να ενισχυθεί η μεθοδολογία NMR-Cosmetube έτσι ώστε να μελετούνται ταυτόχρονα περισσότερες από μία ενζυμικές αντιδράσεις. Το μείγμα των αντιδράσεων μελετήθηκε σε pD=5 και σε pD=7,4. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η υαλουρονιδάση σε διαφορετικές συνθήκες pH παρουσιάζει διαφορετική δράση (σε όξινες συνθήκες δρα ως υδρολάση και διασπά το HA, ενώ σε βασικές συνθήκες δρα ως γλυκοσιδάση και μεταγλυκοζυλιώνει το υπόστρωμά της). Και οι δύο διαφορετικές δράσεις της υαλουρονιδάσης προσδιορίστηκαν μέσω αυτής της μεθοδολογίας. Όσον αφορά τις άλλες δύο ενζυμικές αντιδράσεις, τόσο η ελαστάση όσο και η τυροσινάση έδρασαν πάνω στα υποστρώματά τους. Αυτό είναι σημαντικό κυρίως για την ελαστάση, που, παρόλο που είναι πρωτεάση, δεν φαίνεται

να επηρέασε τη δραστηριότητα των άλλων δύο ενζύμων. Η διάκριση των προϊόντων επιτεύχθηκε και μέσω του πειράματος 2D ^1H - ^1H TOCSY. Σε δεύτερο βήμα, μελετήθηκε η πιθανότητα αναστολής των επιμέρους ενζυμικών αντιδράσεων του μείγματος από φυσικό προϊόν και φυτικό εκχύλισμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ της μεμονωμένης ενζυμικής αντίδρασης και της αναστολής που υφίσταται από τον εκάστοτε αναστολέα, καθώς είναι εφικτός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του προϊόντος που παράγεται κάθε φορά ή έμμεσα μπορεί να προσδιοριστεί και η μεταβολή της συγκέντρωσης του κάθε υποστρώματος. Η μεθοδολογία αυτή ενδεχομένως να μπορεί να επεκταθεί και στη μελέτη της αναστολής μειγμάτων ενζυμικών αντιδράσεων και από άλλα πολύπλοκα εκχυλίσματα. Επίσης, η μεθοδολογία NMR-Cosmetube θα μπορούσε να εφαρμοστεί για την ανάπτυξη καλλυντικών προϊόντων και συγκεκριμένα ως προς τον εντοπισμό δραστικών ουσιών που έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν ταυτόχρονα και τα τρία ένζυμα-στόχους.

Γενικά Συμπεράσματα

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή περιγράφεται η ανάπτυξη μεθοδολογίας για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης των συνολικών φαινολικών ομάδων, το χαρακτηρισμό του φυτοχημικού προφίλ και τον προσδιορισμό της σύστασης επιλεγμένων φαρμακευτικών φυτών. Επίσης περιγράφεται και η ανάπτυξη μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό της βιολογικής δράσης των παραγόμενων εκχυλισμάτων των επιλεγμένων φαρμακευτικών φυτών στα ένζυμα τυροσινάση, υαλουρονιδάση και ελαστάση. Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η ανακάλυψη φυτικών εκχυλισμάτων με βέλτιστη αντιγηραντική δράση, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία των καλλυντικών, για την ανάπτυξη καλλυντικών προϊόντων, βασισμένων σε φυσικά προϊόντα. Οι μεθοδολογίες που αναπτύχθηκαν βασίστηκαν κυρίως στη φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), η οποία έχει αρκετά πλεονεκτήματα στη μελέτη πολύπλοκων μειγμάτων, χωρίς να χρειάζεται προηγούμενη επεξεργασία καθαρισμού ή διαχωρισμού των μειγμάτων στα συστατικά τους.

Αρχικά έγινε περιγραφή του τρόπου παραγωγής των εκχυλισμάτων ως προς τη μηχανική κατεργασία του φυτού (κονιοποίηση ή όχι), το διαλύτη εκχύλισης (αιθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας και νερό), τη θερμοκρασία και το χρόνο εκχύλισης, προκειμένου να παραχθούν εκχυλίσματα με πλούσιο φυτοχημικό προφίλ. Καθώς η πρόωρη γήρανση του δέρματος αλλά και η ανάπτυξη μελανώματος αποτελούν βασικές συνέπειες του οξειδωτικού στρες, είναι σημαντικό να παραχθούν εκχυλίσματα πλούσια σε αντιοξειδωτικές ενώσεις. Για τη διερεύνηση όλων των συνθηκών κατεργασίας και εκχύλισης, εφαρμόστηκε η φασματοσκοπία 1D ^1H NMR όλων των παραγόμενων εκχυλισμάτων για τη “σάρωση” της περιοχής των φαινολικών (-OH) ομάδων και των αρωματικών πρωτονίων των περιεχόμενων συστατικών. Προκειμένου να μελετηθεί η μη παρατηρήσιμη περιοχή των φαινολικών (-OH) ομάδων, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση κάθε δείγματος με διάλυμα τριφθοροξικού οξέος (TFA-*d*), όπου ο όξινος χαρακτήρας του TFA-*d* προκάλεσε την εκλέπτυνση των κορυφών των φαινολικών (-OH) ομάδων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση του διαλύτη εκχύλισης έδειξαν ότι η αιθανόλη είναι πιο αποδοτικός διαλύτης ως προς την παραγωγή εκχυλισμάτων πλούσιων σε φλαβονοειδείς ενώσεις και φαινολικά οξέα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση της μηχανικής κατεργασίας του φυτού πριν από την εκχύλιση έδειξαν ότι κάθε φυτό συμπεριφέρεται διαφορετικά. Στα περισσότερα φυτά, η κονιοποίηση οδήγησε στην παραγωγή μεγάλου ποσοστού φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων και αυτό μπορεί να εξηγηθεί με το γεγονός ότι με την ισχυρή δύναμη που εφαρμόστηκε έσπασε το κυτταρικό τοίχωμα των φυτών, με αποτέλεσμα να απελευθερωθούν περισσότερες φλαβονοειδείς ενώσεις και φαινολικά οξέα. Εξαίρεση αποτέλεσαν το φασκόμηλο (*Salvia Officinalis*) και η ρίγανη (*Origanum Vulgare*), τα οποία παρήγαγαν καλύτερο εκχύλισμα χωρίς να προηγηθεί κονιοποίηση. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη διερεύνηση των συνθηκών εκχύλισης έδειξαν ότι η θερμοκρασία και ο χρόνος εκχύλισης επηρεάζουν σημαντικά την ποιότητα του φυτοχημικού προφίλ των παραγόμενων εκχυλισμάτων. Τα περισσότερα φυτά παρουσίασαν ευαισθησία σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 45°C, με αποτέλεσμα να καταστρέφεται η δομή αρκετών βιοδραστικών ενώσεων, γεγονός

που οδηγεί στην παραγωγή εκχυλισμάτων με μικρή συγκέντρωση φλαβονοειδών και φαινολικών οξέων.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* μελέτες για τον προσδιορισμό του συνολικού περιεχομένου των φαινολικών ομάδων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu αλλά και της αντιοξειδωτικής ικανότητας όλων των παραγόμενων εκχυλισμάτων με τη μέθοδο δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH[•]. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα αιθανολικά εκχυλίσματα έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση φαινολικού περιεχομένου, ενώ όλα τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση.

Στο τρίτο Κεφάλαιο περιγράφεται η μεθοδολογία NMR-TotPhe, η οποία αναπτύχθηκε για την εμφάνιση της μη παρατηρήσιμης φαινολικής περιοχής του NMR και για την ακριβή ποσοτικοποίηση των συνολικών φαινολικών ομάδων και συνεκρίθη με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, η οποία χρησιμοποιείται κατά κόρον για τον προσδιορισμό του συνολικού περιεχομένου των φαινολικών ομάδων. Η μεθοδολογία NMR-TotPhe βασίστηκε στην καταγραφή 1D ¹H NMR φασμάτων και αποδείχτηκε μέθοδος μεγάλης ακριβείας, γρήγορη και μικρής κλίμακας. Η μεθοδολογία NMR-TotPhe εφαρμόστηκε αρχικά σε διάφορες πρότυπες ενώσεις, οι οποίες διέφεραν ως προς τον αριθμό των φαινολικών (-OH) ομάδων, αλλά και σε διάφορα μείγματα αυτών. Στη συνέχεια, μελετήθηκαν δύο φυτικά εκχυλίσματα, του βαλσαμόχορτου (*Hypericum Perforatum*) και του γαϊδουράγκαθου (*Silibum Marianum*) προκειμένου να επιβεβαιωθεί η εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-TotPhe στην ανάλυση πολυπλοκότερων συστημάτων. Όλα τα δείγματα μελετήθηκαν και με τις δύο μεθοδολογίες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεθοδολογία NMR-TotPhe παρουσιάζει αποτελεσματικότητα ως προς τη συσχέτιση του αριθμού των φαινολικών (-OH) ομάδων που περιέχονται σ' ένα δείγμα, με τη συγκέντρωσή τους, κάτι που δεν ισχύει με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που έχουν προκύψει από τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Βασικό χαρακτηριστικό της μεθόδου Folin-Ciocalteu είναι η αντίδραση οξειδοαναγωγής που πραγματοποιείται με το ειδικό αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, το οποίο στην ουσία μπορεί να αντιδράσει με όσες λειτουργικές ομάδες μπορούν να αναχθούν. Η σύγκριση αυτή επιβεβαιώνει την ακρίβεια της μεθοδολογίας NMR-TotPhe, συγκριτικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, ως προς τον προσδιορισμό του περιεχομένου των συνολικών φαινολικών (-OH) ομάδων. Στη συνέχεια, η σύγκριση των δύο μεθοδολογιών πραγματοποιήθηκε και στη μελέτη των δύο φυτικών εκχυλισμάτων. Τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων διέφεραν αισθητά μεταξύ τους, επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu δεν αντιδρά μόνο με τις φαινολικές (-OH) ομάδες ενός μείγματος. Στη συνέχεια, προκειμένου να ενισχυθεί η ακρίβεια της μεθοδολογίας NMR-TotPhe, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* πειράματα αντιοξειδωτικής δράσης σε κυτταρικές σειρές U2OS με επίδραση συγκεκριμένης συγκέντρωσης H₂O₂, όπου προσδιορίστηκε ο βαθμός της βλάβης του DNA των κυττάρων, απουσία και παρουσία των αντιοξειδωτικών μορίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση της αντιοξειδωτικής δράσης των μελετούμενων συστατικών, με τη συγκέντρωση των φαινολικών (-OH) ομάδων, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας NMR-TotPhe. Επιπλέον, πειράματα που έχουν γίνει για τη βιωσιμότητα των κυττάρων U2OS, έδειξαν ότι τα αντιοξειδωτικά με μεγάλη συγκέντρωση –

ΟΗ ομάδων αυξάνουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Σε επόμενο βήμα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των δύο μεθοδολογιών για όλα τα παραγόμενα εκχυλίσματα (αιθανολικά, οξικού αιθυλεστέρα και υδατικά), προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας NMR-TotPhe. Στη συνέχεια, η μεθοδολογία NMR-TotPhe αξιοποιήθηκε για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των αιθανολικών εκχυλισμάτων ως προς τα συστατικά τους με εφαρμογή μεθοδολογιών της φασματοσκοπίας NMR: 1D ^1H NMR (με έμφαση στην περιοχή των φαινολικών –OH ομάδων), 2D ^1H - ^{13}C NMR (^1H - ^{13}C HSQC- ^1H - ^{13}C HMBC), Selective 1D TOCSY NMR και συνδυασμός μεθοδολογιών Selective 1D TOCSY NMR και προσθήκης πρότυπης ουσίας γνωστής συγκέντρωσης (spiking). Στο σύνολο των 7 αιθανολικών εκχυλισμάτων ταυτοποιήθηκαν 36 φαινολικές ενώσεις και γλυκοζίτες αυτών, και 3 τερπένια.

Στο τέταρτο Κεφάλαιο περιγράφεται η ανάπτυξη της ηλεκτρονικής βάσης δεδομένων ANTIAGE-DB, η οποία περιέχει πληροφορίες για όλα τα φυτά και τα βότανα αλλά και για τα παραγόμενα εκχυλίσματά τους και τα απομονωμένα συστατικά τους, τα οποία έχουν μελετηθεί για τις βιολογικές τους δράσεις ως προς την ελαστάση, την υαλουρονιδάση και την τυροσινάση. Η ANTIAGE-DB δίνει την ικανότητα πρόβλεψης του προφίλ αλληλεπίδρασης ενός συστατικού με ένα από τα τρία ένζυμα και την απευθείας σύγκριση αυτών των προφίλ μεταξύ των ενζύμων και του υποκαταστάτη που μελετάται κάθε φορά. Η ανάπτυξη της ANTIAGE-DB δίνει την ικανότητα πρόβλεψης του προφίλ αλληλεπίδρασης ενός συστατικού με κάθε ένα από τα τρία ένζυμα και την απευθείας σύγκριση αυτών των προφίλ μεταξύ των ενζύμων και του μελετούμενου υποκαταστάτη. Επίσης, η ANTIAGE-DB παρέχει την πληροφορία για την ύπαρξη δομών που είναι ομόλογες με ήδη μελετούμενους υποκαταστάτες, και που θα μπορούσαν να αποτελέσουν καινούρια μόρια για την ανάπτυξη καινούριων φαρμακευτικών και καλλυντικών προϊόντων με αντιγηραντική δράση.

Το πέμπτο Κεφάλαιο περιγράφει τη μελέτη που έχει γίνει στα τρία ένζυμα-στόχους και χωρίζεται σε τρία υποκεφάλαια. Στο πρώτο υποκεφάλαιο περιγράφεται η μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της τυροσινάσης, με ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube όπου έγινε προσδιορισμός σε πραγματικό χρόνο του ενδιάμεσου Leucodopachrome και του προϊόντος 5,6-διυδροξυινδόλη, η οποία αποτελεί πρόδρομο μόριο της μελανίνης. Για την ταυτοποίησή τους εφαρμόστηκε το πείραμα Selective 1D TOCSY NMR. Η μεθοδολογία NMR-Cosmetube χρησιμοποιήθηκε επίσης και για τη μελέτη της αναστολής της τυροσινάσης από διάφορα φυτικά εκχυλίσματα, παρατηρώντας κάθε φορά το ρυθμό μεταβολής της συγκέντρωσης τόσο του υποστρώματος L-Dopa, όσο και των ενδιάμεσων και προϊόντων που παράγονται. Τα αιθανολικά και τα υδατικά εκχυλίσματα μελετήθηκαν επίσης για την ανασταλτική τους αποτελεσματικότητα ως προς τη δράση της τυροσινάσης με UV φασματοσκοπία, όπου μελετήθηκε η απορρόφηση του παραγόμενου dopachrome στα 492 nm. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα παρουσιάζουν διπλή δράση ως προς την τυροσινάση: σε μικρή συγκέντρωση (<1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) σχεδόν όλα τα εκχυλίσματα ενισχύουν τη δράση της τυροσινάσης, ενώ σε συγκέντρωση >1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αρχίζουν να παρουσιάζουν ανασταλτική δράση. Εξαιρεση αποτέλεσε το θυμάρι και η ρίγανη, όπου σε συγκέντρωση 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ παρουσιάζουν ακόμη ενισχυτική δράση.

Σε επόμενο βήμα, η μεθοδολογία NMR-Cosmetube εφαρμόστηκε για τη μελέτη της συμπεριφοράς τριών φαινολικών οξέων (ροσμαρινικό οξύ, καφεϊκό οξύ και γαλλικό οξύ) με την τυροσινάση, παρουσία και απουσία του υποστρώματος L-Dopa. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα φαινολικά οξέα συμπεριφέρονται ως υποστρώματα της τυροσινάσης και οξειδώνονται προς πολυμερικά προϊόντα. Η απουσία ή η παρουσία του υποστρώματος L-Dopa σε κάθε περίπτωση επηρεάζει το ρυθμό μεταβολής της συγκέντρωσης τόσο του κάθε φαινολικού οξέος, όσο και της L-Dopa. Στη συνέχεια η μεθοδολογία NMR-Cosmetube εφαρμόστηκε και για τη μελέτη της οξειδωσης του καφεϊκού οξέος από την τυροσινάση, όπου και προσδιορίστηκαν δύο οξειδωμένα προϊόντα.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη του προφίλ αλληλεπίδρασης της L-Dopa, του ροσμαρινικού οξέος αλλά και φυτικού εκχυλίσματος με την τυροσινάση, με εφαρμογή της μεθόδου STD-NMR. Στην περίπτωση της L-Dopa και του ροσμαρινικού οξέος, δεν παρατηρήθηκε καθόλου STD σήμα, γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται στην ισχυρή αλληλεπίδραση που έχουν αυτά τα μόρια με το ένζυμο, λόγω των χηλικών δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ των -OH και των ιόντων Cu^{2+} του ενεργού κέντρου. Αντίθετα, στην περίπτωση του εκχυλίσματος παρατηρήθηκε σήμα στο STD NMR φάσμα. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ότι παρουσία του εκχυλίσματος μειώνεται η χημική συγγένεια του υποστρώματος με την τυροσινάση, λόγω της ταυτόχρονης αλληλεπίδρασης των επιμέρους συστατικών του εκχυλίσματος με το ένζυμο, είτε ότι υπάρχει κάποιο συστατικό στο εκχύλισμα που δεσμεύεται σε μικρή συγκέντρωση (της τάξης των μM) με την τυροσινάση, που να μπορεί να γίνει αισθητή στο φάσμα STD NMR.

Στη συνέχεια, συντέθηκε ένα ανάλογο ουρίας (U1), το οποίο μελετήθηκε ως προς την ανασταλτική του δράση ως προς την τυροσινάση. Μελετήθηκε επίσης και η φαινολθειουρία για την ανασταλτική της δράση ως προς την τυροσινάση. Στο ανάλογο της ουρίας, στο γαλλικό οξύ (G1) και στο υδατικό εκχύλισμα του φυτού *Cistus Albidus* (CA), πραγματοποιήθηκαν *in vivo* μελέτες μελανογένεσης σε έμβρυα zebrafish. Το U1 και το εκχύλισμα CA παρουσίασαν αποτελεσματική αναστολή της μελάγχρωσης στις προνύμφες zebrafish σε συγκεντρώσεις 0,1 mg/mL και 0,5 mg/mL. Το G1 μείωσε σημαντικά τη μελάγχρωση με υψηλότερες συγκεντρώσεις (0,5 mg/mL), ενώ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις δεν παρουσίασε σημαντική αναστολή.

Στη δεύτερη υποενότητα του πέμπτου Κεφαλαίου περιγράφεται η μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης, αρχικά με φασματοσκοπία UV όπου προσδιορίστηκαν οι σταθερές Michaelis-Menten της αντίδρασης ενώ στη συνέχεια μελετήθηκε η αναστολή του ενζύμου από φυσικούς αναστολείς και φυτικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ροσμαρινικό οξύ είναι πολύ καλός αναστολέας της υαλουρονιδάσης, ενώ περαιτέρω μελέτες κινητικής έδειξαν ότι κάνει αναταγωνιστική αναστολή. Από τα αιθανολικά φυτικά εκχυλίσματα καλύτερη ανασταλτική δράση παρουσίασε το μελισσόχορτο (*Melissa Officinalis*) και το δεντρολίβανο (*Rosmarinus Officinalis*), ενώ από τα υδατικά η ρίγανη (*Origanum Vulgare*), το μελισσόχορτο (*Melissa Officinalis*), το δεντρολίβανο (*Rosmarinus Officinalis*) και η λαδανιά (*Cistus Albidus*).

Στη συνέχεια αναπτύχθηκε η μεθοδολογία NMR-Cosmetube για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της υαλουρονιδάσης με φασματοσκοπία 1D ^1H NMR, όπου ήταν εφικτή η ταυτοποίηση των ανωμερικών πρωτονίων των ελεύθερων άκρων των ολιγοσακχαριτών που προκύπτουν, καθώς και ο προσδιορισμός της % απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης. Για την ταυτοποίηση των ελεύθερων ανωμερικών πρωτονίων, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της θερμοκρασίας προκειμένου να γίνει διαχωρισμός των αντίστοιχων κορυφών από την κορυφή του νερού. Η ταυτοποίηση των επιμέρους τμημάτων των μορίων D-γλυκουρονικό οξύ και N-ακετυλογλυκοζαμινογλυκάνη έγινε με εφαρμογή του πειράματος Selective 1D TOCSY. Στη συνέχεια, η μεθοδολογία NMR-Cosmetube χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της αναστολής της υαλουρονιδάσης από επιλεγμένα φυσικά προϊόντα και φυτικά εκχυλίσματα, όπου προσδιορίστηκε η % απόδοση της αντίδρασης. Η μεθοδολογία NMR-Cosmetube στην περίπτωση της υαλουρονιδάσης ενισχύθηκε με το πείραμα διάχυσης DOSY, όπου προσδιορίστηκε η μεταβολή των σταθερών διάχυσης των ανωμερικών πρωτονίων, αλλά και των υπόλοιπων πρωτονίων του υποστρώματος, όσο εξελισσόταν η αντίδραση. Το πείραμα DOSY NMR εφαρμόστηκε με επιτυχία και στη μελέτη της αναστολής της υαλουρονιδάσης από το ροσμαρινικό οξύ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρουσία του ροσμαρινικού οξέος, η σταθερά διάχυσης του υποστρώματος παρέμεινε αμετάβλητη επιβεβαιώνοντας την αναστολή του ενζύμου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα αλληλεπίδρασης και χαρτογράφησης του επιτόπου πρόσδεσης μέσω της μεθόδου STD NMR, τόσο από το φυσικό προϊόν ροσμαρινικό οξύ, όσο και από μείγμα φυσικών προϊόντων. Μέσω του πειράματος transferred-NOESY επιβεβαιώθηκε η επιτυχής πρόσδεση του ροσμαρινικού οξέος στην υαλουρονιδάση. Η μέθοδος STD NMR και η χαρτογράφηση του επιτόπου πρόσδεσης εφαρμόστηκε επίσης και στα αιθανολικά εκχυλίσματα του μελισσόχορτου και του δεντρολίβανου και στο υδατικό εκχύλισμα του μελισσόχορτου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μέσω της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της υαλουρονιδάσης μπορεί να μελετηθεί η αλληλεπίδραση του ενζύμου με συστατικά τα οποία βρίσκονται σε πολύπλοκα δείγματα.

Στο τρίτο υποκεφάλαιο του πέμπτου Κεφαλαίου αναπτύχθηκε η μεθοδολογία NMR-Cosmetube και για τη μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης και αναστολής της ελαστάσης από τα φυτικά εκχυλίσματα. Αρχικά πραγματοποιήθηκε μελέτη της αναστολής της ελαστάσης με φασματοσκοπία UV, όπου όλα τα εκχυλίσματα μελετήθηκαν σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα αιθανολικά και τα υδατικά εκχυλίσματα έδειξαν πολύ καλή ανασταλτική δράση στην ελαστάση σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ με ποσοστό αναστολής μεγαλύτερο από 60%. Εξάιρεση αποτελούν το αιθανολικό εκχύλισμα του θυμαριού (*Thymus Vulgaris*), της ρίγανης (*Origanum Vulgare*) και του βαλσαμόχορτου (*Hypericum Perforatum*) που έδωσαν αναστολή στην ελαστάση με ποσοστό μικρότερο του 50%. Από τα υδατικά εκχυλίσματα, αναστολή μικρότερη από 50% έδωσαν το φασκόμηλο (*Salvia Officinalis*), η ρίγανη (*Origanum Vulgare*) και το βαλσαμόχορτο (*Hypericum Perforatum*). Η μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης μελετήθηκε και μέσω της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube μέσα στο σωληνάκι NMR, όπου πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος ποσοτικός προσδιορισμός της μεταβολής της συγκέντρωσης του υποστρώματος και του παραγόμενου προϊόντος. Η μεθοδολογία NMR-

Cosmetube χρησιμοποιήθηκε επίσης και στην περίπτωση της μελέτης της αναστολής της ελαστάσης από φυσικό προϊόν και από φυτικό εκχύλισμα, όπου προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της παραγόμενης παρα-Νιτροανιλίνης και η % απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης. Τα αποτελέσματα της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης της ελαστάσης που προσδιορίστηκαν με τη φασματοσκοπία NMR είναι ταυτόσημα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αναστολή της ελαστάσης με φασματοσκοπία UV, γεγονός που επιβεβαιώνει την αποτελεσματικότητα της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για την αντίδραση της ελαστάσης. Σε επόμενο βήμα μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της ελαστάσης με μείγμα φυσικών προϊόντων και με υδατικό εκχύλισμα μελισσόχορτου, μέσω της μεθόδου STD NMR, προκειμένου να διερευνηθεί η εκλεκτική ή όχι αλληλεπίδραση των επιμέρους συστατικών με την ελαστάση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ελαστάση μπορεί να αλληλεπιδράσει τοποεκλεκτικά και στερεοεκλεκτικά με τα περιεχόμενα συστατικά ενός πολύπλοκου μείγματος, ενώ από τη χαρτογράφηση του επιτόπου πρόσδεσης προσδιορίστηκε η ισχύς της αλληλεπίδρασης των μορίων, καθώς και το τμήμα του μορίου που αλληλεπιδρά με την ελαστάση. Η ανάπτυξη της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για την ενζυμική μελέτη της αντίδρασης και της αναστολής της ελαστάσης αλλά και τα αποτελέσματα από τα πειράματα STD μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της συμπεριφοράς πολύπλοκων μειγμάτων με το ένζυμο.

Στο έκτο Κεφάλαιο η μεθοδολογία NMR-Cosmetube εφαρμόστηκε για την ταυτόχρονη *in situ* μελέτη και των τριών ενζυμικών αντιδράσεων, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σ' ένα κοινό υδατικό περιβάλλον, στο ίδιο σωληνάκι NMR. Αυτή η εφαρμογή είχε ως σκοπό να επιβεβαιώσει τη λειτουργικότητα της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube έτσι ώστε να μελετούνται ταυτόχρονα περισσότερες από μία ενζυμικές αντιδράσεις. Η βέλτιστη δράση και των τριών ενζύμων ταυτόχρονα επιτεύχθηκε σε pH=5,0. Η επιτυχής διάκριση των προϊόντων επιτεύχθηκε και μέσω του πειράματος 2D ^1H - ^1H TOCSY. Σε δεύτερο βήμα, διερευνήθηκε η δυνατότητα της συμπεριφοράς ενός φυσικού προϊόντος και ενός φυτικού εκχυλίσματος στην εξέλιξη κάθε αντίδρασης ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ της μεμονωμένης ενζυμικής αντίδρασης και του προσδιορισμού της % απόδοσης παρουσία του εκάστοτε μελετούμενου αναστολέα, υπολογίζοντας τη μεταβολή της συγκέντρωσης του προϊόντος που παράγεται κάθε φορά. Η μεθοδολογία αυτή θα μπορούσε ενδεχομένως να επεκταθεί και στη μελέτη της ανασταλτικής δράσης και άλλων πολύπλοκων μειγμάτων, όταν αυτά βρίσκονται σ' ένα μείγμα ενζυμικών αντιδράσεων. Ακόμη, η μεθοδολογία NMR-Cosmetube θα μπορούσε να εφαρμοστεί και για τη μελέτη της αποτελεσματικής δράσης ενός καλλυντικού προϊόντος, ως προς ένα μείγμα διαφορετικών ενζυμικών αντιδράσεων που προκαλούν πρόωρη γήρανση του δέρματος.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής μπορούν να συμβάλλουν αποτελεσματικά στη μελέτη και ανάπτυξη φυτικών εκχυλισμάτων με δραστικές αντιγηραντικές ιδιότητες, που μπορούν να βρουν εφαρμογή τόσο στη βιομηχανία των καλλυντικών όσο και στις βιομηχανίες φαρμάκων και τροφίμων. Η ανάπτυξη και εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-TotPhe μπορεί να αποτελέσει αρκετά χρήσιμο και αποδοτικό εργαλείο για τον ακριβή διαχωρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό των περιεχόμενων φαινολικών συστατικών σ' ένα

πολύπλοκο φυτικό εκχύλισμα, γεγονός που μπορεί να δείξει με ακρίβεια τη συνολική συγκέντρωση των αντιοξειδωτικών συστατικών του. Η ανάπτυξη και εφαρμογή της μεθοδολογίας NMR-Cosmetube για τη μελέτη της αντίδρασης και αναστολής των ενζυμικών αντιδράσεων αλλά και μείγματος αυτών, μπορεί να συμβάλλει αποτελεσματικά στη μελέτη και ανάπτυξη φυσικών αναστολέων που μπορούν να στοχεύσουν ταυτόχρονα περισσότερους από ένα στόχους, επομένως είναι δυνατό η εφαρμογή της να αναπτυχθεί και στην ανακάλυψη καινούριων φαρμακευτικών παραγόντων. Τέλος, η ηλεκτρονική βάση ANTIAGE-DB μπορεί να αποτελέσει ένα αρκετά χρήσιμο εργαλείο για την αναζήτηση καινούριων φυσικών προϊόντων που έχουν κάποια ανασταλτική δράση και στα τρία ένζυμα-στόχους, τα οποία μπορούν να αποτελέσουν πρόδρομα μόρια για την ανάπτυξη καινούριων αντιγηραντικών παραγόντων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε καλλυντικά προϊόντα βασισμένα σε φυσικά προϊόντα.

BIBΛIOΓPAΦIA

1. Drews, J. Drug discovery: A historical perspective. *Science*. **287**, 1960–1964 (2000).
2. Clardy, J. & Walsh, C. Lessons from natural molecules. *Nature*. **432**, 829–837 (2004).
3. Tobert, J. A. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 517–526 (2003).
4. Dückert, H. et al. Natural product–inspired cascade synthesis yields modulators of centrosome integrity. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 179–184 (2012).
5. Li, J.W.-H. & Vederas, J. C. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? *Science*. **325**, 161–165 (2009).
6. Newman, D.J. & Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **79**, 629–661 (2016).
7. Harvey, A.L. Edrada-Ebel, R.A. & Quinn, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **14**, 111–129 (2015).
8. Kanjanasirirat, P., Suksatu, A. & Manopwisedjaroen, S. High - content screening of Thai medicinal plants reveals *Boesenbergia rotunda* extract and its component Panduratin A as anti - SARS - CoV - 2 agents. *Sci. Rep.* 1–12 (2020) doi:10.1038/s41598-020-77003-3.
9. Puttaswamy, H. et al. In silico studies evidenced the role of structurally diverse plant secondary metabolites in reducing SARS - CoV - 2 pathogenesis. *Sci. Rep.* 1–24 (2020) doi:10.1038/s41598-020-77602-0.
10. Fierascu RC, Fierascu I, Baroi AM, O. A. Selected Aspects Related to Medicinal and Aromatic Plants as Alternative Sources of Bioactive Compounds. *Int J Mol Sci.* **22**, 1521 (2021).
11. Shakeri, A., Sahebkar, A. & Javadi, B. *Melissa officinalis* L. - A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* **188**, 204–228 (2016).
12. Kontogianni VG, Tomic G, Nikolic I, Nerantzaki AA, Sayyad N, S.-G. & S, et al. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chem.* **136**, 120–9 (2013).
13. Kontogianni, V. G. et al. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chem.* **136**, 120–129 (2013).
14. Yanishlieva, N. V., Marinova, E. & Pokorný, J. Natural antioxidants from herbs and spices. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **108**, 776–793 (2006).
15. Chizzola, R., Michitsch, H. & Franz, C. Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: Comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 6897–6904 (2008).
16. Brewer, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **10**, 221–247 (2011).
17. Lopez, V., Martin, S., Gomez-Serranillos, M.P., et al. Neuroprotective and neurological properties of *Melissa officinalis*. *Neurochem. Res.* **34**, 1955–1961 (2009).

18. Weidner, C., Wowro, S.J., Freiwald, A., et al. Lemon balm extract causes potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects in insulin-resistant obese mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **58**, 903–907 (2014).
19. Dastmalchi, K., Ollilainen, V., Lackman, P., et al. Acetylcholinesterase inhibitory guided fractionation of *Melissa officinalis* L. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 867–871 (2009).
20. Skin, P. et al. In Vitro Cultured *Melissa officinalis* Cells as Effective. (2021).
21. Dawson, B.S., Franich, R.A., Meder, R. Essential oil of *Melissa officinalis* L. subsp. *altissima* (Sibth. et Smith). *Arcang. Flavour frag. J.* **3**, 167–170 (1988).
22. Mencherini, T., Picerno, P., Scesa, C., et al. Triterpene, antioxidant, and antimicrobial compounds from *Melissa officinalis*. *J. Nat. Prod.* **70**, 1889–1894 (2007).
23. Dai, J., Mumper, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313–7352 (2010).
24. Testai, L. Flavonoids and mitochondrial pharmacology: A new paradigm for cardioprotection. *Life Sci.* **15**, 68–76 (2015).
25. Oliveira, J. R. De, Esteves, S. & Camargo, A. *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *J. Biomed. Sci.* **8**, 1–22 (2019).
26. González-Trujano ME, Peña EI, Martínez AL, Moreno J, G.-F. P. & Déciga-Campos M, et al. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol.* **111**, 476–82 (2007).
27. Pérez-Fons L, Garzón MT, M. V. Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *J Agric Food Chem.* **58**, 161–71 (2010).
28. MS., B. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* **10**, 221–47 (2011).
29. Rašković A, Milanović I, Pavlović N, Čebović T, Vukmirović S, M. M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement Altern Med.* **14**, 225 (2014).
30. Scheckel KA, Degner SC, R. D. Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1-dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer and nonmalignant cell lines. *J Nutr.* **138**, 2098–105 (2008).
31. Karthik D, Viswanathan P, A. C. Administration of rosmarinic acid reduces cardiopathology and blood pressure through inhibition of p22phox NADPH oxidase in fructose-fed hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* **58**, 514–21 (2011).
32. al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, S. P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J Exp Biol.* **37**, 124–30 (1999).
33. Hsieh CL, Peng CH, Chyau CC, Lin YC, Wang HE, P. R. Low-density lipoprotein, collagen, and thrombin models reveal that *Rosmarinus officinalis* L. exhibits potent antiglycative effects. *J Agric Food Chem.* **55**, 2884–91 (2007).
34. Amaral GP, de Carvalho NR, Barcelos RP, Dobrachinski F, Portella Rde L, D. & Silva MH, et al.

- Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. *Food Chem Toxicol.* **55**, 48–55 (2013).
35. Posadas SJ, Caz V, Largo C, De la Gándara B, Matallanas B, Reglero G, et al. Protective effect of supercritical fluid rosemary extract, *Rosmarinus officinalis*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Exp Gerontol.* **44**, 383–9 (2009).
 36. Cheung S, T. J. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary *Rosmarinus officinalis*. *Oncol Rep.* **17**, 1525–31 (2007).
 37. Yesil-Celiktas O, Sevimli C, Bedir E, V.-S. F. Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant Foods Hum Nutr.* **65**, 158–63 (2010).
 38. Menghini L, Genovese S, Epifano F, Tirillini B, Ferrante C, L. L. Antiproliferative, protective and antioxidant effects of artichoke, dandelion, turmeric and rosemary extracts and their formulation. *Int J Immunopathol Pharmacol.* **23**, 601–10 (2010).
 39. Nolkemper S, Reichling J, Stintzing FC, Carle R, S. P. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Planta Med.* **72**, 1378–82 (2006).
 40. Bernardes WA, Lucarini R, Tozatti MG, Flauzino LG, Souza MG, Turatti IC, E. & Al. Antibacterial activity of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* and its major components against oral pathogens. *Z Naturforsch C.* **65**, 588–93 (2010).
 41. Ramadan KS, Khalil OA, Danial EN, Alnahdi HS, A. N. Hypoglycemic and hepatoprotective activity of *Rosmarinus officinalis* extract in diabetic rats. *J. Physiol Biochem.* **69**, 779–83 (2013).
 42. A., E. S. A. Nephro-protective effects of curcumin, rosemary, and propolis against gentamicin-induced toxicity in Guinea pigs: morphological and biochemical study. *Am J Clin Exp Med.* **2**, 28 (2014).
 43. Del Baño MJ, Castillo J, Benavente-García O, Lorente J, Martín-Gil R, A. & C, et al. Radioprotective-antimutagenic effects of rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by gamma-rays. *J. Agric Food Chem.* **54**, 2064–8 (2006).
 44. al-Hader AA, Hasan ZA, A. M. Hyperglycemic and insulin release inhibitory effects of *Rosmarinus officinalis*. *J. Ethnopharmacol.* **43**, 217–21 (1994).
 45. Tabassum N, H. M. Plants used to treat skin diseases. *Pharmacogn Rev.* **8**, 52–60 (2014).
 46. Machado DG, Cunha MP, Neis VB, Balen GO, Colla AR, Grando J, et al. *Rosmarinus officinalis* L. hydroalcoholic extract, similar to fluoxetine, reverses depressive-like behavior without altering learning deficit in olfactory bulbectomized mice. *J. Ethnopharmacol.* **143**, 158–69 (2012).
 47. Cocan, I. et al. Phytochemical screening and biological activity of lamiaceae family plant extracts. *Exp. Ther. Med.* **15**, 1863–1870 (2018).
 48. Borges RS, Ortiz BLS, Pereira ACM, Keita H, C. J. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *J Ethnopharmacol.* **229**, 29–45 (2019).
 49. Martínez AL, González-Trujano ME, Pellicer F, López-Muñoz FJ, N. A. Antinociceptive effect and

- GC/MS analysis of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from its aerial parts. *Planta Med.* **75**, 508–11 (2009).
50. Gonçalves GA, Corrêa RCG, Barros L, Dias MI, Calhelha RC, Correa VG, et al. Effects of in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation on a rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) extract rich in rosmarinic acid. *Food Chem.* **271**, 393–400 (2019).
 51. Einbond LS, Wu HA, Kashiwazaki R, He K, Roller M, Su T, et al. Carnosic acid inhibits the growth of ER-negative human breast cancer cells and synergizes with curcumin. *Fitoterapia* **83**, 1160–8 (2012).
 52. Ghorbani, A. & Esmaeilzadeh, M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J. Tradit. Complement. Med.* **7**, 433–440 (2017).
 53. Miura K, Kikuzaki H, N. N. Apianane terpenoids from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* **58**, 1171–1175 (2001).
 54. Montvale, N. T. *Physicians' Desk Reference (PDR) for Herbal Medicines. 3rd ed.* (2004).
 55. A., Z. *Medicinal Plants. 4th ed. Tehran: Tehran University Press;* (1990).
 56. Garcia CSC, Menti C, Lambert APF, et al. Pharmacological perspectives from Brazilian *Salvia officinalis* (Lamiaceae): antioxidant, and antitumor in mammalian cells. *An Acad Bras Cienc.* **88**, 281–292 (2016).
 57. Adams M, Gmünder F, H. M. Plants traditionally used in age related brain disordersea survey of ethnobotanical literature. *J Ethnopharmacol.* **113**, 363–381 (2007).
 58. Jasicka-Misiak, I. et al. Antioxidant Phenolic Compounds in *Salvia officinalis* L. and *Salvia sclarea* L. *Ecol. Chem. Eng. S* **25**, 133–142 (2018).
 59. Capek P, H. a V. Water-soluble polysaccharides from *Salvia officinalis* L. possessing immunomodulatory activity. *Phytochemistry* **65**, 1983–1992 (2004).
 60. Lima CF, Andrade PB, Seabra RM, Fernandes-Ferreira M, P.-W. C. The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. *J.Ethnopharmacol.* **97**, 383–389 (2005).
 61. Hernandez-Saavedra D, Perez-Ramirez IF, Ramos-Gomez M, M.-D. S. & Loarca-Pina G, R.-C. R. Phytochemical characterization and effect of *Calendula officinalis*, *Hypericum perforatum*, and *Salvia officinalis* infusions on obesity associated cardiovascular risk. *Med Chem Res.* **25**, 163–172 (2016).
 62. Velickovic DT, RanCelovic NV, Ristic MS, Velickovic AS, S. A. Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis* L. *J. Serb. Chem. Soc.* **68**, 17–24 (2003).
 63. Rouatbi, M.; Duquenoy, A.; Giampaoli, P. Extraction of the Essential Oil of Thyme and Black Pepper by Superheated Steam. *J. Food Engineering* **78**, 708–714 (2007).
 64. Sökmen, A.; Gulluce, M.; Akpulat, H.A.; Daferera, D.; Tepe, B.; Polissiou, M.; Sokmen, M.; Sahin, F. The in Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils and Methanol Extracts of Endemic *Thymus Spathulifolius*. *Food Control* **15**, 627–634 (2004).
 65. Al-Saleh, I.A.; Billedeu, G.; El-Doush, I. I. Levels of Selenium, DL- α -Tocopherol, DL- γ -

- Tocopherol, All-Trans- Retinol, Thymoquinone and Thymol in Different Brands of Nigella Sativa Seeds. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 167–175 (2006).
66. Silaghi-dumitrescu, R. *et al.* Origanum vulgare ssp. vulgare : Chemical Composition and Biological Studies 2,† ,. (2018) doi:10.3390/molecules23082077.
 67. Martins, N. *et al.* Decoction , infusion and hydroalcoholic extract of Origanum vulgare L .: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. **158**, 73–80 (2014).
 68. Chuang, L. Te *et al.* Ethanolic extract of origanum vulgare suppresses propionibacterium acnes-induced inflammatory responses in human monocyte and mouse ear edema models. *Molecules* **23**, 1–11 (2018).
 69. Król, B., Kołodziej, B. & Bogdan, K. Date of harvesting affects yields and quality of Origanum vulgare ssp . hirtum (Link) letswaard b. (2019) doi:10.1002/jsfa.9805.
 70. Papaefthimiou, D. *et al.* Genus Cistus: A model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front. Chem.* **2**, 1–19 (2014).
 71. Attaguile, G., Russo, A., Campisi, A., Savoca, F., Acquaviva, R., Ragusa, N., E. Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from Cistus incanus L. and Cistus monspeliensis L. *Cell Biol. Toxicol.* **16**, 83–90 (2000).
 72. Chinou, I., Demetzos, C., Harvala, C., Roussakis, C., and Verbist, J. F. Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts of Cistus incanus subsp. creticus. *Planta Med.* **60**, 34–36 (1994).
 73. Duke, J., Duke, P.-A., and du Cellier, J. *Duke's Handbook of Medicinal Plants of the Bible*. Boca Raton, FL: CRC Press. (2008).
 74. https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%86%CE%B3%CE%B9%CE%BF_%CE%9C%CF%8D%CF%81%CE%BF#cite_note-0-1.
 75. Pateraki, I., and Kanellis, A. K. Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in Cistus creticus subsp. creticus. *Plant Cell Rep.* **29**, 629–641 (2010).
 76. Ormeño, E., Fernandez, C., and Mévy, J.-P. Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species. *Phytochemistry* **68**, 840–852 (2007).
 77. Paolini, J., Tomi, P., Bernardini, A.-F., Bradesi, P., Casanova, J., A. K. & J. Detailed analysis of the essential oil from Cistus albidus L. by combination of GC/RI, GC/MS and ¹³C-NMR spectroscopy. *Nat. Prod. Res.* **2**, 1270–1278 (2008).
 78. Kladar, N. *et al.* Hypericum perforatum: Synthesis of Active Principles during Flowering and Fruitification - Novel Aspects of Biological Potential. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2017**, (2017).
 79. N. K. B. Robson. "Studies in the genus Hypericum L. Guttiferae,". *Bull. Br. Museum Natl. Hist.* **8**, 55– 226, (1981).
 80. B. Božin, N. Kladar, N. G. *et al.* "Impact of origin and biological source on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant properties of some St. John's wort species (Hypericum spp.,

- hypericaceae) from the central Balkans,”. *Molecules* **18**, 11733–11750 (2013).
81. A. Brattström. “Long-term effects of St. John’s wort (*Hypericum perforatum*) treatment: A 1-year safety study in mild to moderate depression,”. *Phytomedicine* **16**, 277–283 (2009).
 82. N. Kladar, B. Srđenović, N. G. et al. “St. John’s Wort (*Hypericum* Spp.) - Relation between the biological source and medical properties,”. *Hypericum Bot. Sources, Medical Prop. Heal. Eff.* 53–80, (2015).
 83. N. Kladar, B. Srđenović, N. G. et al. “Ecologically and ontogenetically induced variations in phenolic compounds and biological activities of *Hypericum maculatum* subsp. *maculatum*, Hypericaceae,”. *Rev. Bras. Botânica* **38**, 703–715 (2015).
 84. M. L. Altun, B. S. Yilmaz, I. E. Orhan, and G. S. C. “Assessment of cholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant effects of *Hypericum perforatum* L. (St. John’s wort),”. *Ind. Crops Prod.* **43**, 87–92 (2013).
 85. Pichersky, E. & Gang, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: An evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* **5**, 439–445 (2000).
 86. Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységu, L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 586–621 (2011).
 87. Kumar, S.; Pandey, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Sci. World J.* **2013**, 162750 (2013).
 88. Ahmed, S.I.; Hayat, M.Q.; Tahir, M.; Mansoor, Q.; Ismail, M.; Keck, K.; Bates, R. B. Pharmacologically active flavonoids from the anticancer, antioxidant and antimicrobial extracts of *Cassia angustifolia* Vahl. *BMC Complement. Altern. Med.* **16**, 460 (2016).
 89. Działo, M.; Mierziak, J.; Korzun, U.; Preisner, M.; Szopa, J.; Kulma, A. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 160 (2016).
 90. Pandey, R. P., Parajuli, P., Koffas, M. A. G. & Sohng, J. K. Microbial production of natural and non-natural flavonoids: Pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology. *Biotechnol. Adv.* **34**, 634–662 (2016).
 91. Veitch, N. C., and Grayer, R. J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 1626–1695 (2011).
 92. Iwashina, T. Contribution of flower colors of flavonoids including anthocyanins: a review. *Nat. Prod. Commun.* **10**, 529–544 (2015).
 93. Winkel-Shirley, B. S. J. *The biosynthesis of flavonoids*. In: Grotewold, E. (Ed.), *The Science of Flavonoids*. Springer, New York (2006).
 94. Pandey, R.P., Sohng, J. K. *Genetics of flavonoids*. In: Ramawat, K.G., Merillon, J.M. (Eds.). *Natural Products*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin (2013).
 95. Ono, E., Fukuchi-Mizutani, M., Nakamura, N., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K. & Yamaguchi, M., et al. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11075–11080 (2006).
 96. Cao, H., Chen, X., Jassbi, A.R., Xiao, J. Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. *Biotechnol. Adv.* **33**, 214–223 (2014).

97. Davies, K. M., and Schwinn, K. E. "Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis," in *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Application* eds Ø. M. Andersen and K. R. Markham (Boca Raton: CRC Press). (2005).
98. Chouhan, S., Sharma, K., Zha, J., Guleria, S. & Koffas, M. A. G. Recent advances in the recombinant biosynthesis of polyphenols. *Front. Microbiol.* **8**, 1–16 (2017).
99. Jia, Z., Anandh Babu, P. V., Chen, W. & Sun, X. Natural Products Targeting on Oxidative Stress and Inflammation: Mechanisms, Therapies, and Safety Assessment. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, (2018).
100. Kostyuk, V. *et al.* Natural Substances for Prevention of Skin Photoaging: Screening Systems in the Development of Sunscreen and Rejuvenation Cosmetics. *Rejuvenation Res.* **21**, 91–101 (2018).
101. Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M. K., Trost, A. & Richter, K. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules* **5**, 545–589 (2015).
102. EH., C. Changes of skin barrier with aging. In: Quan T. Molecular mechanisms of skin aging and age related diseases. *Boca Rat. Taylor Fr. Gr. Cap 3*, 61– 89 (2016).
103. Nikolakis G, et al. Aging Skin: A window to the body. In: Quan T. Molecular mechanisms of skin aging and age related diseases. *Boca Rat. Taylor Fr. Group, 1*, 200–227 (2016).
104. Roberts MS, Dancik Y, Prow TW, T. & CA, Lin LL, Grice JE, et al. Non-invasive imaging of skin physiology and percutaneous penetration using fluorescence spectral and lifetime imaging with multiphoton and confocal microscopy. *Eur J Pharm Biopharm.* **77**, 469–88.
105. Montagna, W., Kirchner, S., and Carlisle, K. Histology of sundamaged human skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* **21**, 907–918 (1989).
106. Wang, A. S., and Dreesen, O. Biomarkers of cellular senescence and skin aging. *Front. Genet.* **9**, 247 (2018).
107. Lephart, E. D. Skin aging and oxidative stress: equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Res. Rev.* **31**, 36–54 (2016).
108. Kammeyer, A., and Luiten, R. M. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res. Rev.* **21**, 16–29 (2015).
109. Poljšak, B., and Dahmane, R. Free radicals and extrinsic skin aging. *Dermatol. Res. Pr.* **2012**, 135206 (2012).
110. Quan, C., Cho, M. K., Perry, D., and Quan, T. Age-associated reduction of cell spreading induces mitochondrial DNA common deletion by oxidative stress in human skin dermal fibroblasts: implication for human skin connective tissue aging. *J. Biomed. Sci.* **2822**, 62 (2015).
111. Slominski, A., Zmijewski, M. A., and Pawelek, J. L-tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions. *Pigment Cell Melanoma Res.* **25**,.
112. Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S., and Wortsman, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* **84**, 1155–1228 (2004).
113. Rinnerthaler, M., Bischof, J., Streubel, M. K., Trost, A., and Richter, K. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules* **5**, 545–589 (2015).

114. Liang, X., Wang, S., Wang, L., Ceylan, A. F., Ren, J., and Zhang, Y. Mitophagy inhibitor liensinine suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity through inhibition of drp1-mediated maladaptive mitochondrial fission. *Pharmacol. Res.* **157**, 104846 (2020).
115. Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., and Crowe, S. E. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol. Rev.* **94**, 329–354 (2014).
116. Finkel, T., and Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239–247 (2000).
117. Ayala, A., Munoz, M. F., and Arguelles, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 360438 (2014).
118. Cadet, J., Davies, K. J. A., Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P., and Wagner, J. R. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free Radic. Biol. Med.* **107**, 13–34 (2017).
119. McCallion R, L. W. P. A. Dry and photo-aged skin: manifestations and management. *J Clin Pharm Ther.* **18**, 15–32 (1993).
120. Makrantonaki E, Zouboulis CC, W. J. Cunliffe Scientific Awards. Characteristics and pathomechanisms of endogenously aged skin. *Dermatology* **214**, 352–60 (2007).
121. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature.* **372**, 773–6 (1994).
122. Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, V. J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med.* **337**, 1419–28.
123. Millis AJ, Hoyle M, McCue HM, M. H. Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts. *Exp Cell Res.* **201**, 373–9.
124. Bode, W., Meyer, E. & Powers, J. C. Human Leukocyte and Porcine Pancreatic Elastase: X-ray Crystal Structures, Mechanism, Substrate Specificity, and Mechanism-Based Inhibitors. *Biochemistry* **28**, 1951–1963 (1989).
125. Weihermann, A. C., Lorencini, M., Brohem, C. A. & de Carvalho, C. M. Elastin structure and its involvement in skin photoageing. *Int. J. Cosmet. Sci.* **39**, 241–247 (2017).
126. Hunkapiller M, Forgac M, & R. J. Mechanism of action of serine protease: Tetrahedral intermediate and concerted proton transfer. *Biochemistry* **15**, 5581–5588 (1976).
127. Ryu, J., Park, S., Kim, I., Choi, Y. H. and & Nam, T. Protective effect of porphyra-334 on UVA-induced photoaging in human skin fibroblasts. *Int. J. Mol. Med.* **34**, 796–803 (2014).
128. Załuski, D.; Cieśla, Ł.; Janeczko, Z. Chapter 7 – The Structure–Activity Relationships of Plant Secondary Metabolites with Antimicrobial, Free Radical Scavenging and Inhibitory Activity toward Selected Enzymes. in (2015). doi:<https://doi.org/10.1016/B978->
129. Meyer, K. Hyaluronidases. in *In The Enzymes.* (New York Acad. Press. 307–320 (1971).
130. Meyer, K. and Palmer, J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* **107**, 629–634 (1934).

131. Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P. & Kolar, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Vet. Med. (Praha)*. **53**, 397–411 (2008).
132. Laurent, T. C. Biochemistry of Hyaluronan. *Acta Otolaryngol Suppl* **442**, 7–24 (1987).
133. Sze, J. H., Brownlie, J. C. & Love, C. A. Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech* **6**, 1–9 (2016).
134. Csoka, A.B., Stern, R. . Hypotheses on the evolution of hyaluronan: a highly ironic acid. *Glycobiology* **23**, 398–411 (2013).
135. Walter, P. *Lehrbuch der Organische Chemie*,. (1988).
136. Agarwal, P., Singh, M., Singh, J. & Singh, R. P. *Microbial Tyrosinases: A Novel Enzyme, Structural Features, and Applications. Applied Microbiology and Bioengineering* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/b978-0-12-815407-6.00001-0.
137. Punekar, N. S. *ENZYMES : Catalysis , Kinetics and*.
138. Neil.E.Jacobsen. *Explained, N M R Spectroscopy*. (2007).
139. Gerothanassis, I. P., Troganis, A., Exarchou, V. & Barbarossou, K. Nuclear Magnetic Resonance (Nmr) Spectroscopy: Basic Principles and Phenomena, and Their Applications To Chemistry, Biology and Medicine. *Chem. Educ. Res. Pract.* **3**, 229 (2002).
140. Monasterio, O. Nomenclature for the applications of nuclear magnetic resonance to the study of enzymes. *Perspect. Sci.* **1**, 88–97 (2014).
141. Atta-ur-Rahman, Muhammad Iqbal Choudhary, A.-W. Chapter 7 - Important 2D NMR Experiments. in *Solving Problems with NMR Spectroscopy (Second Edition)*, Academic Press (ed. Atta-ur-Rahman, Muhammad Iqbal Choudhary, A.-W.) 265–386 (2016).
142. Alfred Ross, Goetz Schlotterbeck, Frank Dieterle, H. S. Chapter 3 - NMR Spectroscopy Techniques for Application to Metabonomics. in *Metabolomics, The Handbook of Metabonomics and B.V.* (ed. John C. Lindon, Jeremy K. Nicholson, E. H.) 55–112 (Elsevier Science, 2007).
143. MacKinnon, N., While, P. T. & Korvink, J. G. Novel selective TOCSY method enables NMR spectral elucidation of metabolomic mixtures. *J. Magn. Reson.* **272**, 147–157 (2016).
144. Sandusky, P. & Raftery, D. Use of selective TOCSY NMR experiments for quantifying minor components in complex mixtures: Application to the metabonomics of amino acids in honey. *Anal. Chem.* **77**, 2455–2463 (2005).
145. Akhmedov, N.G., Gannett, P.M., Wu, B., Cummings, M.M., Train, B. C. A conformational NMR analysis of methymycin aglycones: complete and unambiguous assignments of stereochemically diverse glycosylated methymycin analogs by 1D and 2D NMR techniques and molecular modeling. *Magn. Reson. Chem.* **51**, 156–167 (2013).
146. Graniel-Sabido, M.J., Miron-Lopez, G., Leon-Deniz, L.V., Moo-Puc, R.E., Q.-N. & C.J., Quijano, L., Mena-Rejon, G. J. Total NMR assignment of a new antiproliferative triterpene oligoglycoside from the sea cucumber *Astichopus multifidus*. *Tetrahedron Lett.* **57**, 4375–4378 (2016).
147. Sandusky, P., Appiah-Amponsah, E., Raftery, D. Use of optimized 1D TOCSY NMR for improved quantitation and metabolomic analysis of biofluids. *J. Biomol. NMR* **49**, 281–290 (2011).

148. Papaemmanouil, C., Tsiafoulis, C.G., Alivertis, D., Tzamaloukas, O., Miltiadou, D. & Tzakos, A.G., Gerothanassis, I. P. Selective one-dimensional total correlation spectroscopy nuclear magnetic resonance experiments for a rapid identification of minor components in the lipid fraction of milk and dairy products: toward spin chromatography? *J. Agric. Food Chem.* **63**, 5381–5387 (2015).
149. Hubert, J.; Nuzillard, J. M.; Purson, S.; Hamzaoui, M.; Borie, N.; Reynaud, R.; Renault, J. H. Identification of natural metabolites in mixture: a pattern recognition strategy based on ¹³C NMR. *Anal Chem.* **86**, 2955–2962 (2014).
150. Wishart, D. S. Quantitative metabolomics using NMR. *Trends Anal Chem* **27**, 228–237 (2008).
151. Fairhurst, D.; Prescott, S. The use of nuclear magnetic resonance as an analytical tool in the characterization of dispersion behavior. *Spectrosc. Eur.* **23**, 13–16 (2011).
152. Ward, J. L.; Baker, J. M.; Beale, M. H. Recent applications of NMR spectroscopy in plant metabolomics. *FEBS J* **274**, 1126–1131 (2007).
153. Kim, H. K., Choi, Y. H. & Verpoorte, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nat. Protoc.* **5**, 536–549 (2010).
154. Boehr, D. D., Dyson, H. J. & Wright, P. E. An NMR perspective on enzyme dynamics. *Chem. Rev.* **106**, 3055–3079 (2006).
155. A P Campbell, and, B. D. S. The Two-Dimensional Transferred Nuclear Overhauser Effect: Theory and Practice. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22:1**, 99–122 (1993).
156. Rosenboom, J. G., Roo, J. De, Storti, G. & Morbidelli, M. Diffusion (DOSY) ¹H NMR as an Alternative Method for Molecular Weight Determination of Poly(ethylene furanoate) (PEF) Polyesters. *Macromol. Chem. Phys.* **218**, 1–10 (2017).
157. Roldo's V, Canãda FJ, J.-B. J. Carbohydrate– protein interactions: a 3D view by NMR. *ChemBioChem* **12**, 990–1005 (2011).
158. Pellecchia M, Bertini I, Cowburn D, Dalvit C, Giralt E, J. W., James TL, Homans SW, Kessler H, Luchinat C, M. B. & Oschkinat H, Peng J, Schwalbe H, S. G. Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 738–745 (2008).
159. Pellecchia M, Sem DS, W. K. NMR in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 211–219 (2002).
160. Calle LP, Canada FJ, J.-B. J. Application of NMR methods to the study of the interaction of natural products with biomolecular receptors. *Nat Prod Rep* **28**, 1118–1125 (2011).
161. Mayer M, M. B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew. Chemie-Int Ed* **38**, 1784–1788 (1999).
162. Lepre CA, Moore JM, P. J. Theory and applications of NMR-based screening in pharmaceutical research. *Chem Rev* **104**, 3641–3675 (2004).
163. Meyer B, P. T. NMR Spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew. Chemie-Int Ed* **42**, 864–890 (2003).
164. Forsen S, H. R. Study of moderately rapid chemical exchange reactions by means of nuclear magnetic double resonance. *J. Chem. Phys.* **39**, 2892 –2901 (1963).

165. Hyde EI, Birdsall B, Roberts GCK, Feeney J, B. A. Proton nuclear magnetic resonance saturation transfer studies of coenzyme binding to lactobacillus-casei dihydrofolate-reductase. *Biochemistry* **19**, 3738–3746 (1980).
166. Neuhaus D, W. M. The nuclear overhauser effect in structural and conformational analysis. *Wiley-VCH, New York* (2000).
167. Angulo, J. & Nieto, P. M. STD-NMR: Application to transient interactions between biomolecules-a quantitative approach. *Eur. Biophys. J.* **40**, 1357–1369 (2011).
168. Mayer M, M. B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc* **123**, 6108–6117 (2001).
169. Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Physics*, **98**, 5648–5652 (1993).
170. Gillespie, K. M. & Ainsworth, E. A. Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plants. *Nat. Protoc.* **2**, 871–874 (2007).
171. Singleton, V., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Oxid. Antioxidants* **299**, 152–178 (1999).
172. Folin, O. & Ciocalteu, V. Tyrosine and Tryptophane in Proteins. *J. Biol. Chem.* **73**, 627–648 (1927).
173. Prior, R. L., Wu, X. & Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4290–4302 (2005).
174. Munteanu, I. G. & Apetrei, C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, (2021).
175. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT, Food Sci. Technol.* **28**, 25–30 (1995).
176. Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. *LWT - Food Sci. Technol.* **30**, 609–615 (1997).
177. Abubakar AR, H. M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *J Pharm Bioallied Sci.* **12**, 1–10.
178. Charisiadis, P., Kontogianni, V. G., Tsiafoulis, C. G., Tzakos, A. G. & Gerothanassis, I. P. Determination of Polyphenolic Phytochemicals using Highly Deshielded –OH 1H-NMR Signals. *Phytochem. Anal.* **28**, 159–170 (2017).
179. Kontogianni, Vassiliki G, Charisiadis, P., Margianni, E., Lamari, F.N., Gerothanassis, I.P., Tzakos, A. G. Olive leaf extracts are a natural source of advanced glycation end product inhibitors. *J. Med. Food* **16**, 817–22 (2013).
180. Pandey A, T. S. Concept of standardization, extraction, and pre-phytochemical screening strategies for herbal drug. *J Pharmacogn Phytochem.* **2**, 115–9 (2014).
181. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, L. D. Phytochemicals: Extraction, isolation,

- and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants* **6**, 42 (2017).
182. Rice-Evans, C.; Miller, N.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **2**, 152–159 (1997).
 183. Cömert, E.D.; Gökmen, V. Antioxidants bound to an insoluble food matrix: Their analysis, regeneration behavior, and physiological importance. *Compr. Rev. Food Sci.* **16**, 382–399 (2017).
 184. Murakami Y, Kawata A, Ito S, Katayama T, F. S. Radical-scavenging and Anti-inflammatory Activity of Quercetin and Related Compounds and Their Combinations Against RAW264.7 Cells Stimulated with Porphyromonas gingivalis Fimbriae. Relationships between Anti-inflammatory Activity and Quantum Chemical Par. *In Vivo (Brooklyn)*. **29**, 701–10.
 185. K., S. Dependence of DPPH radical scavenging activity of dietary flavonoid quercetin on reaction environment. *Mini Rev Med Chem.* **14**, 494–504 (2014).
 186. Alavi Rafiee, S., Farhoosh, R. and Sharif, A. Antioxidant Activity of Gallic Acid as Affected by an Extra Carboxyl Group than Pyrogallol in Various Oxidative Environments. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **120**, 1800319 (2018).
 187. Orčić DZ, Mimica-Dukić NM, Francišković MM, Petrović SS, J. E. Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. *Chem Cent J.* **25**, 34.
 188. Gillespie, K. M., Chae, J. M. & Ainsworth, E. A. Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants. *Nat. Protoc.* **2**, 867–870 (2007).
 189. Ainsworth, E. A. & Gillespie, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* **2**, 875–877 (2007).
 190. Choi, Y. M. *et al.* Isoflavones, anthocyanins, phenolic content, and antioxidant activities of black soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill) as affected by seed weight. *Sci. Rep.* **10**, 1–13 (2020).
 191. Lamuela-Raventós, R. M. Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. *Meas. Antioxid. Act. Capacit. Recent Trends Appl.* 107–115 (2017) doi:10.1002/9781119135388.ch6.
 192. Blainski, A., Lopes, G. C. & De Mello, J. C. P. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *limonium brasiliense* L. *Molecules* **18**, 6852–6865 (2013).
 193. Li, A. N. *et al.* Total phenolic contents and antioxidant capacities of 51 edible and wild flowers. *J. Funct. Foods* **6**, 319–330 (2014).
 194. Everette, J. D. *et al.* Thorough study of reactivity of various compound classes toward the folin-Ciocalteu reagent. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 8139–8144 (2010).
 195. McDonald, S., Prenzler, P. D., Antolovich, M. & Robards, K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chem.* **73**, 73–84 (2001).
 196. Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L. & Jacobo-Velázquez, D. A. The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods* **5**, 5990–5999 (2013).
 197. Vázquez, C. V. *et al.* Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an

- extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method. *Food Chem.* **176**, 480–486 (2015).
198. Charisiadis, P. *et al.* ¹H-NMR as a Structural and Analytical Tool of Intra- and Intermolecular Hydrogen Bonds of Phenol-Containing Natural Products and Model Compounds. *Molecules* **19**, 13643–13682 (2014).
 199. Kontogianni, V. G. *et al.* Biomolecular Chemistry. 1013–1025 (2013) doi:10.1039/c2ob27117f.
 200. Curran, M. E.; Atkinson, D. L.; Ewart, A. K.; Morris, C. A.; Leppert, M. F.; Keating, M. T. The Elastin Gene Is Disrupted by a Translocation Associated with Supravalvular Aortic Stenosis. *Cell* **73**, 159–168 (1993).
 201. Necas, J.; Bartosikova, L.; Brauner, P.; Kolar, J. Hyaluronic Acid (Hyaluronan): A Review. *Vet. Med.* **53**, 397–411 (2008).
 202. Chang, T. S. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 2440–2475 (2009).
 203. Bieth, J. G. [The Elastases]. *J. Soc. Biol.* **195**, 173–179 (2001).
 204. Takahashi, H.; Nukiwa, T.; Yoshimura, K.; Quick, C. D.; States, D. J.; Holmes, M. D.; Whang-Peng, J.; Knutsen, T.; Crystal, R. G. Structure of the Human Neutrophil Elastase Gene. *J. Biol. Chem.* **263**, 14739–14747 (1988).
 205. Takahashi, H. *et al.* Structure of the human neutrophil elastase gene. *J. Biol. Chem.* **263**, 14739–14747 (1988).
 206. Melzig, M. F.; Löser, B.; Ciesielski, S. Inhibition of Neutrophil Elastase Activity by Phenolic Compounds from Plants. *Pharmazie* **56**, 967–970 (2001).
 207. Siedle, B.; Ciesielski, S.; Murillo, R.; Lo, B.; Castro, V.; Klaas, C. A.; Hucke, O.; Labahn, A.; Melzig, M. F.; Merfort, I.; Rica, C.; Quimica, E. De; Rica, U. D. C.; Jose, S. Sesquiterpene Lactones as Inhibitors of Human Neutrophil Elastase. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 2855–2861 (2002).
 208. Kim, Y.-J.; Uyama, H.; Kobayashi, S. Inhibition Effects of (+)-Catechin-Aldehyde Polycondensates on Proteinases Causing Proteolytic Degradation of Extracellular Matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 256–261 (2004).
 209. Thring, T. S.; Hili, P.; Naughton, D. P. Anti-Collagenase, Anti-Elastase and Anti-Oxidant Activities of Extracts from 21 Plants. *BMC Complement. Altern. Med.* **9**, 27 (2009).
 210. Belaaouaj, A.; Kim, K. S.; Shapiro, S. D. Degradation of Outer Membrane Protein A in *Escherichia Coli* Killing by Neutrophil Elastase. *Science (80-.).* **289**, 1185–1188 (2000).
 211. Ying, Q. L.; Rinehart, a R.; Simon, S. R.; Cheronis, J. C. Inhibition of Human Leucocyte Elastase by Ursolic Acid. Evidence for a Binding Site for Pentacyclic Triterpenes. *Biochem. J.* **277**, 521–526 (1991).
 212. Hess, G. P.; McConn, J.; Ku, E.; McConkey, G. Studies of the Activity of Chymotrypsin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **257**, 89–104 (1970).
 213. Tamada, T.; Kinoshita, T.; Kurihara, K.; Adachi, M.; Ohhara, T.; Imai, K.; Kuroki, R.; Tada, T. Combined High-Resolution Neutron and X-Ray Analysis of Inhibited Elastase Confirms the Active-Site Oxyanion Hole but Rules against a Low-Barrier Hydrogen Bond. *J. Am. Chem. Soc.*

- 131**, 11033–11040 (2009).
214. Siedle, B.; Hrenn, A.; Merfort, I. Natural Compounds as Inhibitors of Human Neutrophil Elastase. *Planta Med.* **73**, 401–420 (2007).
215. Lee, W. L.; Downey, G. P. Leukocyte Elastase: Physiological Functions and Role in Acute Lung Injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 896–904 (2001).
216. Henderson, R. Structure of Crystalline Alpha-Chymotrypsin. IV. The Structure of Indoleacryloyl-Alpha-Chyotrypsin and Its Relevance to the Hydrolytic Mechanism of the Enzyme. *J. Mol. Biol.* **54**, 341–354 (1970).
217. Wolfram Bode, Edgar Meyer Jr., J. C. P. Perspectives in Biochemistry. Human Leukocyte and PorcinePancreatic Elastase: X-Ray Crystal Structures,. Mechanism, Substrate Specificity . *Biochemistry* **28**, 1951–1963 (1989).
218. Feng, L.; Liu, X.; Zhu, W.; Guo, F.; Wu, Y.; Wang, R.; Chen, K.; Huang, C.; Li, Y. Inhibition of Human Neutrophil Elastase by Pentacyclic Triterpenes. *PLoS One* **8**, 1–11 (2013).
219. Tsai, Y.-F.; Hwang, T.-L. Neutrophil Elastase Inhibitors: A Patent Review and Potential Applications for Inflammatory Lung Diseases (2010 - 2014). *Expert Opin. Ther. Pat.* **25**, 1145–1158 (2015).
220. Löser, B.; Kruse, S. O.; Melzig, M. F.; Nahrstedt, A. Inhibition of Neutrophil Elastase Activity by Cinnamic Acid Derivatives from Cimicifuga Racemosa. *Planta Med.* **66**, 751–753 (2000).
221. Bernstein, P. R.; Edwards, P. D.; Williams, J. C. Inhibitors of human leukocyte elastase. *Prog. Med. Chem.* **31**, 59–120 (1994).
222. Doring, G. The role of neutrophil elastase in chronic inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **150**, S114–S117 (1994).
223. Löser, B.; Kruse, S. O.; Melzig, M. F.; Nahrstedt, A. Inhibition of Neutrophil Elastase Activity by Cinnamic Acid Derivatives from Cimicifuga Racemosa. *Planta Med.* **66**, 751–753 (2000).
224. Melzig, M. F.; Löser, B.; Lobitz, G. O.; Tamayo-Castillo, G.; Merfort, I. Inhibition of Granulocyte Elastase Activity by Caffeic Acid Derivatives. *Pharmazie* **54**, 712 (1999).
225. Hamburger, M.; Riese, U.; Graf, H.; Melzig, M. F.; Ciesielski, S.; Baumann, D.; Dittmann, K.; Wegner, C. Constituents in Evening Primrose Oil with Radical Scavenging, Cyclooxygenase, and Neutrophil Elastase Inhibitory Activities. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5533–5538 (2002).
226. Xing, X.; Yang, X.; Cao, Y. Study of Ellagic Acid as a Natural Elastase Inhibitor by Spectroscopic Methods. *J. Appl. Spectrosc.* **83**, 149–155. (2016).
227. Rennert, B.; Melzig, M. F. Free Fatty Acids Inhibit the Activity of Clostridium Histolyticum Collagenase and Human Neutrophil Elastase. *Planta Med.* **68**, 767–769 (2002).
228. Bizot-Foulon Godeau, G.; Guessous, F.; Lati, E.; Rousset, G.; Roch-Arveillier, Me.; and Hornebeck, W., V. Inhibition of Human Neutrophil Elastase by Wheat Ceramides. *Int. J. Cosmet. Sci.* **17**, 255–264 (1995).
229. Stern, R. Devising a Pathway for Hyaluronan Catabolism: Are We There Yet? *Glycobiology* **13**, 105–115 (2003).

230. Orlando, Z.; Lengers, I.; Melzig, M. F.; Buschauer, A.; Hensel, A.; Jose, J. Autodisplay of Human Hyaluronidase Hyal-1 on Escherichia Coli and Identification of Plant-Derived Enzyme Inhibitors. *Molecules* **20**, 15449–15468 (2015).
231. Jedrzejewski, M. J.; Stern, R. Structures of Vertebrate Hyaluronidases and Their Unique Enzymatic Mechanism of Hydrolysis. *Proteins* **61**, 227–238 (2005).
232. Csoka, A. B.; Frost, G. I.; Stern, R. The Six Hyaluronidase-like Genes in the Human and Mouse Genomes. *Matrix Biol.* **20**, 499–508 (2001).
233. Chao, K. L.; Muthukumar, L.; Herzberg, O. Structure of Human Hyaluronidase-1, a Hyaluronan Hydrolyzing Enzyme Involved in Tumor Growth and Angiogenesis. *Biochemistry* **46**, 6911–6920 (2007).
234. Marković-Housley, Z.; Miglierini, G.; Soldatova, L.; Rizkallah, P. J.; Müller, U.; Schirmer, T. Crystal Structure of Hyaluronidase, a Major Allergen of Bee Venom. *Structure* **8**, 1025–1035 (2000).
235. Lokeshwar, V. B.; Rubinowicz, D.; Schroeder, G. L.; Forgacs, E.; Minna, J. D.; Block, N. L.; Nadji, M.; Lokeshwar, B. L. Stromal and Epithelial Expression of Tumor Markers Hyaluronic Acid and HYAL1 Hyaluronidase in Prostate Cancer. *J. Biol. Chem.* **276**, 11922–11932 (2001).
236. Lokeshwar, V. B.; Obek, C.; Pham, H. T.; Wei, D.; Young, M. J.; Duncan, R. C.; Soloway, M. S.; Block, N. L. Urinary Hyaluronic Acid and Hyaluronidase: Markers for Bladder Cancer Detection and Evaluation of Grade. *J. Urol.* **163**, 348–356 (2000).
237. Tan, J. X.; Wang, X.Y.; Li, H. Y.; Su, X. L.; Wang, L.; Ran, L.; Zheng, K.; Ren, G. S. HYAL1 Overexpression Is Correlated with the Malignant Behavior of Human Breast Cancer. *Int. J. Cancer* **128**, 1303–1315 (2011).
238. Mio, K.; Stern, R. Inhibitors of the Hyaluronidases. *Matrix Biol.* **21**, 31–37 (2002).
239. Jentsch, H.; Pomowski, R.; Kundt, G.; Göcke, R. Treatment of Gingivitis with Hyaluronan. *J. Clin. Periodontol.* **30**, 159–164 (2003).
240. Stern, R.; Jedrzejewski, M. J. Hyaluronidases: Their Genomics, Structures, and Mechanisms of Action. *Chem. Rev.* **106**, 818–839 (2006).
241. Hunnicutt, G. R.; Primakoff, P.; Myles, D. G. Sperm Surface Protein PH-20 Is Bifunctional: One Activity Is a Hyaluronidase and a Second, Distinct Activity Is Required in Secondary Sperm-Zona Binding. *Biol. Reprod.* **55**, 80–86 (1996).
242. Kreil, G. Hyaluronidases - a Group of Neglected Enzymes. *Protein Sci.* **4**, 1666–1669 (1995).
243. Nawy, S. S.; Csóka, A. B.; Mio, K.; Stern, R. Hyaluronidase Activity and Hyaluronidase Inhibitors. Assay Using a Microtiter-Based System. *Methods Mol. Biol.* **171**, 383–389 (2001).
244. Laurent, T. C.; Fraser, J. R. Hyaluronan. *FASEB J.* **6**, 2397–2404 (1992).
245. Załuski, D.; Cieśla, Ł.; Janeczko, Z. Chapter 7 – The Structure–Activity Relationships of Plant Secondary Metabolites with Antimicrobial, Free Radical Scavenging and Inhibitory Activity toward Selected Enzymes; **Vol. 45**, (2015).
246. Choi, S.; Lee, S.-K.; Kim, J.-E.; Chung, M.-H.; Park, Y.-I. Aloesin Inhibits Hyperpigmentation Induced by UV Radiation. *Clin. Exp. Dermatol.* **27**, 513–515 (2002).

247. Orlando, Z.; Lengers, I.; Melzig, M. F.; Buschauer, A.; Hensel, A.; Jose, J. Autodisplay of Human Hyaluronidase Hyal-1 on Escherichia Coli and Identification of Plant-Derived Enzyme Inhibitors. *Molecules* **20**, 15449–15468. (2015).
248. Pessini, A. C.; Takao, T. T.; Cavalheiro, E. C.; Vichnewski, W.; Sampaio, S. V; Giglio, J. R.; Arantes, E. C. A. Hyaluronidase from Tityus Serrulatus Scorpion Venom: Isolation, Characterization and Inhibition by Flavonoids. *Toxicon* **39**, 1495–1504 (2001).
249. Barla, F.; Higashijima, H.; Funai, S.; Sugimoto, K.; Harada, N.; Yamaji, R.; Fujita, T.; Nakano, Y.; Inui, H. Inhibitive Effects of Alkyl Gallates on Hyaluronidase and Collagenase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 2335–2337 (2009).
250. Lee, S. Y.; Baek, N.; Nam, T. G. Natural, Semisynthetic and Synthetic Tyrosinase Inhibitors. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **31**, 1–13 (2016).
251. Jackman, M. P.; Hajnal, A.; Lerch, K. Albino Mutants of Streptomyces Glaucescens Tyrosinase. *Biochem. J.* **274**, 707–713 (1991).
252. van Gelder, C. W.; Flurkey, W. H.; Wichers, H. J. Sequence and Structural Features of Plant and Fungal Tyrosinases. *Phytochemistry* **45**, 1309–1323 (1997).
253. Tang, H.; Cui, F.; Li, H.; Huang, Q.; Li, Y. Understanding the Inhibitory Mechanism of Tea Polyphenols against Tyrosinase Using Fluorescence Spectroscopy, Cyclic Voltammetry, Oximetry, and Molecular Simulations. *RSC Adv.* **8**, 8310–8318 (2018).
254. Jin, Y. J.; Lin, C. C.; Lu, T. M.; Li, J. H.; Chen, I. S.; Kuo, Y. H.; Ko, H. H. Chemical Constituents Derived from Artocarpus Xanthocarpus as Inhibitors of Melanin Biosynthesis. *Phytochemistry* **117**, 424–435 (2015).
255. Yan, X. *et al.* Enhancing Molecular Shape Comparison by Weighted Gaussian Functions. (2013).
256. Liu, X., Jiang, H. & Li, H. SHAFTS : A Hybrid Approach for 3D Molecular Similarity Calculation . 1 . Method and Assessment of Virtual Screening. 2372–2385 (2011).
257. Halgren, T. A. Potential energy functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 205–210 (1995).
258. Case, D.; Cerutti, D.S.; Cheatham, T.; Darden, T.; Duke, R.; Giese, T.J.; Gohlke, H.; Götz, A.; Greene, D.; Homeyer, N.; Izadi, S.; Kovalenko, A.; Lee, T.-S.; LeGrand, S.; Li, P.; Lin, C.; Liu, J.; Luchko, T.; Luo, R.; Kollman, P.A., Case, D.; Cerutti, D., P. A. Amber 2017. (2017) doi:10.13140/RG.2.2.36172.41606.
259. Hawkins, P. C. D., Skillman, A. G., Warren, G. L., Ellingson, B. A. & Stahl, M. T. Conformer Generation with OMEGA : Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. **11**, 572–584 (2010).
260. Cregge RJ, Durham SL, Farr RA, et al. Inhibition of Human Neutrophil Elastase. 4. Design, Synthesis, X-Ray Crystallographic Analysis, and Structure-Activity Relationships for a Series of P2-Modified, Orally Active Peptidyl Pentafluoroethyl Ketones. *J Med Chem.* **41**, 2461–2480 (1998).
261. Chao, K.L.; Muthukumar, L.; Herzberg, O. Structure of Human Hyaluronidase-1, a Hyaluronan Hydrolyzing Enzyme Involved in Tumor Growth and Angiogenesis. *Biochemistry* **46**, 6911–6920 (2007).

262. Sendovski M, Kanteev M, Ben-Yosef VS, Adir N, F. A. First Structures of an Active Bacterial Tyrosinase Reveal Copper Plasticity. *J Mol Biol.* **405**, 227–237 (2011).
263. Forli, S. *et al.* HHS Public Access. **11**, 905–919 (2016).
264. Kim, J. Y. *et al.* Competitive neutrophil elastase inhibitory isoflavones from the roots of *Flemingia philippinensis*. *Bioorg. Chem.* **78**, 249–257 (2018).
265. Harder, E., *et al.* OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* **12**, 281–296 (2016).
266. Watts, K.S., *et al.* ConfGen: A Conformational Search Method for Efficient Generation of Bioactive Conformers. *J. Chem. Inf. Model.* **50**, 534–546 (2010).
267. Madhavi Sastry, G., *et al.* Protein and Ligand Preparation: Parameters, Protocols, and Influence on Virtual Screening Enrichments. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **27**, 221–234 (2013).
268. Friesner, R.A., *et al.* Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *J. Med. Chem.* **49**, 6177–6196 (2006).
269. Pillaiyar, T., Manickam, M. & Namasivayam, V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **32**, 403–425 (2017).
270. Cestari TF, Dantas LP, B. J. Acquired hyperpigmentations. *An Bras Dermatol* 11–25. (2014).
271. Nouveau S, Agrawal D, Kohli M, *et al.* Skin hyperpigmentation in Indian population: insights and best practice. *Indian J Dermatol* **61**, 487–95 (2016).
272. Dorga S, S. R. Pigmentary disorders: an insight. *Pigment Int* **1**, 5–7 (2014).
273. Kim, Y. J. & Uyama, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1707–1723 (2005).
274. Zolghadri, S. *et al.* A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **34**, 279–309 (2019).
275. Wilcox, D. E.; Porras, A. G.; Hwang, Y. T.; Lerch, K.; Winkler, M. E.; Solomon, E. I. Substrate Analog Binding to the Coupled Binuclear Copper Active Site in Tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 4015–4027 (1985).
276. Sánchez-Ferrer A.; Rodríguez-López J.N.; García-Cánovas F.; García-Carmona, F. Tyrosinase: A Comprehensive Review of Its Mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1247**, 1–11 (1995).
277. Himmelwright R.S.; Eickman N.C.; Lu Bien C.D.; Lerch K.; Solomon, E. Chemical and Spectroscopic Studies of the Binuclear Copper Active Site of *Neurospora* Tyrosinase: Comparison to Hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7339–7344 (1980).
278. Mayer M, M. B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J Am Chem Soc* **123**, 6108–17 (2001).
279. Ullah, S. *et al.* Tyrosinase inhibitors: A patent review (2011-2015). *Expert Opin. Ther. Pat.* **26**, 347–362 (2016).
280. Oba T, Kikuchi M, H. A. Tyrosinase Inhibitor. (2014).

281. Liu, W. yu *et al.* Kinetic Characterization of Tyrosinase-catalyzed Oxidation of Four Polyphenols. *Curr. Med. Sci.* **40**, 239–248 (2020).
282. Bai, R., Yu, Y., Wang, Q., Fan, X. & Wang, P. Polymerization of Caffeic Acid for Functionalization of Wool Fabrics. *J. Clean. Prod.* **191**, 48–56 (2018).
283. Isao Kubo, Ikuyo Kinst-Hori, Yumi Kubo, Yoshiro Yamagiwa, Tadao Kamikawa, and H. H. Molecular Design of Antibrowning Agents. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1393–1399 (2000).
284. Momtaz S, Mapunya BM, Houghton PJ, Edgerly C, H. & A, Naidoo S, L. N. Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. *J Ethnopharmacol* **119**, 507–12.
285. Decagny, B. *et al.* ¹H-NMR on line monitoring of water activity during lipase catalysed esterification. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1387**, 129–135 (1998).
286. Werner, R. M. & Johnson, A. ³¹P NMR of the pyruvate kinase reaction: An undergraduate experiment in enzyme kinetics. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **45**, 509–514 (2017).
287. Eicher, J. J., Snoep, J. L. & Rohwer, J. M. Determining enzyme kinetics for systems biology with nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Metabolites* **2**, 818–843 (2012).
288. Gasowska-Bajger, B. & Wojtasek, H. Reactions of flavonoids with o-quinones interfere with the spectrophotometric assay of tyrosinase activity. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 5417–5427 (2016).
289. Dai, J. & Mumper, R. J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313–7352 (2010).
290. Behboodi-sadabad, F. *et al.* UV-Triggered Polymerization , Deposition , and Patterning of Plant Phenolic Compounds.
291. Pandey, K. B. & Rizvi, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2**, 270–278 (2009).
292. Kim, Y.-J. & Uyama, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1707–1723 (2005).
293. Desentis-Mendoza, R. M. *et al.* Enzymatic polymerization of phenolic compounds using laccase and tyrosinase from *Ustilago maydis*. *Biomacromolecules* **7**, 1845–1854 (2006).
294. Devkota, H. P., Tsushiro, K. & Watanabe, T. Bioactive phenolic compounds from the flowers of *Farfugium japonicum* (L.) Kitam. var. *giganteum* (Siebold et Zucc.) Kitam. (Asteraceae). *Nat. Prod. Res.* **0**, 1–4 (2021).
295. Sarikurkcü, C. *et al.* LC-MS/MS profiles and interrelationships between the enzyme inhibition activity, total phenolic content and antioxidant potential of *Micromeria nervosa* extracts. *Food Chem.* **328**, 126930 (2020).
296. Lin, L. *et al.* Comparative evaluation of rosmarinic acid, methyl rosmarinate and pedalitin isolated from *Rabdosia serra* (MAXIM.) HARA as inhibitors of tyrosinase and α -glucosidase. *Food Chem.* **129**, 884–889 (2011).
297. Fujimoto, A. *et al.* A novel ring-expanded product with enhanced tyrosinase inhibitory activity from classical Fe-catalyzed oxidation of rosmarinic acid, a potent antioxidative Lamiaceae polyphenol. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **20**, 7393–7396 (2010).

298. Lee, J., Kim, Y. S. & Park, D. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 960–968 (2007).
299. Ahn, S. Y., Jang, S., Sudheer, P. D. V. N. & Choi, K. Y. Microbial production of melanin pigments from caffeic acid and l-tyrosine using streptomyces glaucescens and fcs-ech-expressing escherichia coli. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–15 (2021).
300. Garcia-Jimenez, A. *et al.* Action of tyrosinase on caffeic acid and its n-nonyl ester. Catalysis and suicide inactivation. *Int. J. Biol. Macromol.* **107**, 2650–2659 (2018).
301. Micillo, R. *et al.* Conjugation with dihydrolipoic acid imparts caffeic acid ester potent inhibitory effect on dopa oxidase activity of human tyrosinase. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
302. Nam, S. H. *et al.* Transglycosylation of gallic acid by using Leuconostoc glucansucrase and its characterization as a functional cosmetic agent. *AMB Express* **7**, (2017).
303. Kubo, I. *et al.* Molecular design of antibrowning agents. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1393–9 (2000).
304. Su, T. R. *et al.* Inhibition of melanogenesis by gallic acid: Possible involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/ β -catenin signaling pathways in B16F10 cells. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 20443–20458 (2013).
305. Liu, C. *et al.* Proteomic study reveals a Co-occurrence of gallic acid-induced apoptosis and glycolysis in B16F10 melanoma cells. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 11672–11680 (2014).
306. Chyi Lo, Tung-Yuan Lai, Jen-Hung Yang, Jai-Sing Yang, Y.-S. M. & Shy-Wen Weng, Ya-Yin Chrn, J.-G. L. and J.-G. C. Gallic acid induces apoptosis in A375.S2 human melanoma cells through caspase-dependent and -independent pathways. *Int. J. Oncol.* **37**, 377–385 (2010).
307. Cilliers, J. J. L.; Singleton, V. L. Nonenzymic autoxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 890–896 (1989).
308. Singleton, V. L. & Cilliers, J. J. L. Characterization of the Products of Nonenzymic Autoxidative Phenolic Reactions in a Caffeic Acid Model System. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1298–1303 (1991).
309. Agalou A, Thrapsianiotis M, Angelis A, Papakyriakou A, Skaltsounis AL, Aligiannis N, B. D. Identification of Novel Melanin Synthesis Inhibitors From *Crataegus pycnoloba* Using an in Vivo Zebrafish Phenotypic Assay. *Front Pharmacol.* **26**, 265 (2018).
310. Stern, R. & Jedrzejewski, M. J. Hyaluronidases: Their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem. Rev.* **106**, 818–839 (2006).
311. Marković-Housley, Z. *et al.* Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure* **8**, 1025–1035 (2000).
312. PL, D. Enzymological characterization of the Pasteurella multocida hyaluronic acid synthase. *Biochem* **35**, 9768–9771 (1996).
313. Chong BF, Blank LM, Mclaughlin R, N. L. Microbial hyaluronic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**, 341–351 (2005).
314. Shah MV, Badle SS, R. K. Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway. *Biochem Eng J* **80**, 53–60 (2013).

315. Thomas, W. & Morgan, J. Determination of Glucosamine. (1933).
316. Ippoushi, K., Yamaguchi, Y., Itou, H., Azuma, K. & Higashio, H. Evaluation of Inhibitory Effects of Vegetables and Herbs on Hyaluronidase and Identification of Rosmarinic Acid as a Hyaluronidase Inhibitor in Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.). *Food Sci. Technol. Res.* **6**, 74–77 (2000).
317. Scotti, L. *et al.* Recent Advancement in Natural Hyaluronidase Inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **16**, 2525–2531 (2016).
318. Mohamed, E. M. *et al.* Bioassay-guided isolation, metabolic profiling, and docking studies of hyaluronidase inhibitors from *ravenala madagascariensis*. *Molecules* **25**, (2020).
319. Kim, M. Y., Kim, Y. C. & Chung, S. K. Identification and in vitro biological activities of flavonols in garlic leaf and shoot: Inhibition of soybean lipoxygenase and hyaluronidase activities and scavenging of free radicals. *J. Sci. Food Agric.* **85**, 633–640 (2005).
320. Michel, P. *et al.* Metabolite profiling of eastern teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) lipophilic leaf extracts with hyaluronidase and lipoxygenase inhibitory activity. *Molecules* **22**, 1–16 (2017).
321. Ippoushi, K., Yamaguchi, Y., Itou, H., Azuma, K. & Higashio, H. Evaluation of Inhibitory Effects of Vegetables and Herbs on Hyaluronidase and Identification of Rosmarinic Acid as a Hyaluronidase Inhibitor in Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.). *Food Sci. Technol. Res.* **6**, 74–77 (2000).
322. Gacesa, P., Savitsky, M.J., Dodgson, K.S., Olavesen, A. H. A recommended procedure for the estimation of bovine testicular hyaluronidase in the presence of human serum. *Anal. Biochem.* **118**, 76–84 (1981).
323. Maingonnat, C., Victor, R., Bertrand, P., Courel, M.-N., Maunoury, R., Delpech, B. Activation and inhibition of human cancer cell hyaluronidase by proteins. *Anal. Biochem.* **268**, 30–34 (1999).
324. Delpech, B., Girard, N., Olivier, A., Maingonnat, C., van Driessche, G., van Beeumen, J. & Bertrand, P., Duval, C., Delpech, A., Bourguignon, J. The origin of hyaluronectin in human tumors. *Int. J. Cancer* **72**, 942–948.
325. Lenormand, H., Tranchepain, F., Deschrevel, B. & Vincent, J. C. The hyaluronan-protein complexes at low ionic strength: How the hyaluronidase activity is controlled by the bovine serum albumin. *Matrix Biol.* **28**, 365–372 (2009).
326. Blundell, C. D., Reed, M. A. C. & Almond, A. Complete assignment of hyaluronan oligosaccharides up to hexasaccharides. *Carbohydr. Res.* **341**, 2803–2815 (2006).
327. Kvam B.J., Atzori M., Toffanin R., Paoletti S., B. F. ¹H- and ¹³C-NMR studies of solutions of hyaluronic acid esters and salts in methyl sulfoxide: comparison of hydrogen-bond patterns and conformational behaviour. *Carbohydr. Res.* **230**, 1–13.
328. Cowman, M. K.; Hittner, D. M.; FederDavis, J. ¹³C-NMR studies of hyaluronan: Conformational sensitivity to varied environments. *Macromolecules* **29**, 2894–2902 (1996).
329. Livant P, Rodén L, K. N. NMR studies of a tetrasaccharide from hyaluronic acid. *Carbohydr Res.* **237**, 271–81.
330. Sicinska W, Adams B, L. L. A detailed ¹H and ¹³C NMR study of a repeating disaccharide of

- hyaluronan: the effects of temperature and counterion type. *Carbohydr Res.* **242**, 29–51.
331. Alkrad, J. A., Mrestani, Y., Stroehl, D., Wartewig, S. & Neubert, R. Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **31**, 545–550 (2003).
 332. Blundell, C. D., DeAngelis, P. L., Day, A. J. & Almond, A. Use of ¹⁵N-NMR to resolve molecular details in isotopically-enriched carbohydrates: Sequence-specific observations in hyaluronan oligomers up to decasaccharides. *Glycobiology* **14**, 999–1009 (2004).
 333. Pomin, V. H. NMR chemical shifts in structural biology of glycosaminoglycans. *Anal. Chem.* **86**, 65–94 (2014).
 334. Cowman, M. K., Hittner, D. M. & Feder-davis, J. Studies of Hyaluronan : Conformational Sensitivity to. *Macromolecules* **29**, 2894–2902 (1996).
 335. Cowman, M. K., Cozart, D., Nakanishi, K. & Balazs, E. A. ¹H NMR of glycosaminoglycans and hyaluronic acid oligosaccharides in aqueous solution: The amide proton environment. *Arch. Biochem. Biophys.* **230**, 203–212 (1984).
 336. Scott, J. E., Heatley, F., Moorcroft, D. & Olavesen, A. H. Secondary structures of hyaluronate and chondroitin sulphates. A ¹H n.m.r. study of NH signals in dimethyl sulphoxide solution. *Biochem. J.* **199**, 829–832 (1981).
 337. Toffanin, R. *et al.* NMR studies of oligosaccharides derived from hyaluronate: complete assignment of ¹H and ¹³C NMR spectra of aqueous di- and tetra-saccharides, and comparison of chemical shifts for oligosaccharides of increasing degree of polymerisation. *Carbohydr. Res.* **245**, 113–120 (1993).
 338. Murata, T., Miyase, T. & Yoshizaki, F. Hyaluronidase inhibitory rosmarinic acid derivatives from *Meehania urticifolia*. *Chem. Pharm. Bull.* **59**, 88–95 (2011).
 339. Iwanaga, A., Kusano, G., Warashina, T. & Miyase, T. Hyaluronidase inhibitors from 'cimicifugae Rhizoma' (a mixture of the rhizomes of *cimicifuga dahurica* and *C. heracleifolia*). *J. Nat. Prod.* **73**, 573–578 (2010).
 340. Guercia E, Forzato C, Navarini L, B. F. Interaction of coffee compounds with serum albumins. Part II: diterpenes. *Food Chem* **199**, 502–8 (2016).
 341. Simcic M, Hodosek M, Humljan J, *et al.* NMR and molecular dynamics study of the binding mode of naphthalene-N-sulfonyl- D-glutamic acid derivatives: novel MurD ligase inhibitors. *J Med Chem* **52**, 2899–908 (2009).
 342. CB, P. Exchange-transferred NOE spectroscopy and bound ligand structure determination. *Curr Opin Struct Biol* **13**, 581–8.
 343. Rawlings, B. N. D. & Barrett, A. J. Families of Cysteine Peptidases. **244**, (1994).
 344. Sinha, S. *et al.* Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 2228–32 (1987).
 345. Bode, W. *et al.* X-ray crystal structure of the complex of human leukocyte elastase (PMN elastase) and the third domain of the turkey ovomucoid inhibitor. *EMBO J.* **5**, 2453–2458 (1986).
 346. Takahashi, H. *et al.* Structure of the human neutrophil elastase gene. *J. Biol. Chem.* **263**, 14739–

- 14747 (1988).
347. Farley D, Salvesen G, T. J. Molecular cloning of human neutrophil elastase. *Biol Chem Hoppe Seyler*. **369**, Suppl:3-7 (1988).
348. Bode W, S. P. The refined crystal structure of bovine beta-trypsin at 1.8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0. *J Mol Biol*. **98**, 693–717.
349. Jon D. Robertus, Joseph Kraut, Richard A. Alden, and J. J. B. Subtilisin. Stereochemical mechanism involving transition-state stabilization. *Biochemistry* **11**, 4293–4303 (1972).
350. RL., V. K. & S. The Proton Inventory Technique. *CRC Crit. Rev. Biochem*. **17**, 1–4 (1985).
351. Stein RL, Strimpler AM, H. H. & P. J. Catalysis by human leukocyte elastase: proton inventory as a mechanistic probe. *Biochemistry* **26**, 1305–1314 (1987).
352. Polgár L, Asboth B, & K. I. “*Cysteine Proteinases and their inhibitors*” Ed. Vito Turk, Walter De Gruyter and Co, New York. (1986).
353. RL., S. Catalysis by human leukocyte elastase: substrate structural dependence of rate-limiting protolytic catalysis and operation of the charge relay system. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 5111–5116 (1983).
354. Blow D, B. J. & H. B. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nat.* **221**, 337–340 (1969).
355. Lee, K. K., Kim, J. H., Cho, J. J. & Choi, J. D. Inhibitory Effects of 150 Plant Extracts on Elastase Activity, and Their Anti-inflammatory Effects. *Int. J. Cosmet. Sci.* **21**, 71–82 (1999).
356. Danihelová, M., Veverka, M. & Šturdík, E. Inhibition of pathophysiological proteases with novel quercetin derivatives. *Acta Chim. Slovaca* **6**, 115–122 (2013).
357. Melzig MF, Löser B, C. S. Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. *Pharmazie* **56**, 967–70.
358. Kanashiro A, Souza JG, Kabeya LM, Azzolini AE, L.-V. Y. Elastase release by stimulated neutrophils inhibited by flavonoids: importance of the catechol group. *Z Naturforsch C J Biosci.* **62**, 357–61.
359. Melzig, M. F., Löser, B. & Ciesielski, S. Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. *Pharmazie* **56**, 967–70 (2001).
360. Siedle, B., Hrenn, A. & Merfort, I. Natural compounds as inhibitors of human neutrophil elastase. *Planta Med.* **73**, 401–420 (2007).
361. Poeckel D, Greiner C, Verhoff M, Rau O, Tausch L, Hörnig C, Steinhilber D, Schubert-Zsilavecz M, W. O. Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol.* **76**, 91–7.
362. Saleem, M. *et al.* Natural Phenolics as Inhibitors of the Human Neutrophil Elastase (HNE) Release: An Overview of Natural Anti-inflammatory Discoveries during Recent Years. *Antiinflamm. Antiallergy. Agents Med. Chem.* **17**, 70–94 (2018).

363. Kacem, R. & Meraihi, Z. Effects of Essential Oil Extracted from *Nigella sativa* (L.) Seeds and Its Main Components on Human Neutrophil Elastase Activity. *Yakugaku Zasshi* **126**, 301–305 (2006).
364. Chatzikonstantinou, A. V. *et al.* *The NMR tube bioreactor. Methods in Enzymology* vol. 633 (Elsevier Inc., 2020).
365. Hofinger, E. S. A., Bernhardt, G. & Buschauer, A. Kinetics of Hyal-1 and PH-20 hyaluronidases: Comparison of minimal substrates and analysis of the transglycosylation reaction. *Glycobiology* **17**, 963–971 (2007).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- 1. Molecular investigation of artificial and natural sweeteners as potential anti-inflammatory agents.**
Chontzopoulou E, **Papaemmanouil CD**, Chatziathanasiadou MV, Kolokouris D, Kiriakidi S, Konstantinidi A, Gerogianni I, Tselios T, Kostakis IK, Chrysina ED, Hadjipavlou-Litina D, Tzeli D, Tzakos AG, Mavromoustakos T. *J Biomol Struct Dyn*. **2021** Sep 9:1-13. doi: 10.1080/07391102.2021.1973565. Online ahead of print. PMID: 34499023
- 2. Anti-Ageing Potential of *S. euboea* Heldr. Phenolics.**
Tomou EM, **Papaemmanouil CD**, Diamantis DA, Kostagianni AD, Chatzopoulou P, Mavromoustakos T, Tzakos AG, Skaltsa H. *Molecules*. **2021** May 25;26(11):3151. doi: 10.3390/molecules26113151. PMID: 34070495
- 3. Interplay of cholesterol, membrane bilayers and the AT1R: A cholesterol consensus motif on AT1R is revealed.**
Kiriakidi S, Chatzigiannis C, **Papaemmanouil C**, Tzakos AG, Cournia Z, Mavromoustakos T. *Comput Struct Biotechnol J*. **2020** Dec 3;19:110-120. doi: 10.1016/j.csbj.2020.11.042. eCollection 2021. PMID: 33384858
- 4. Bioinspired tailoring of fluorogenic thiol responsive antioxidant precursors to protect cells against H₂O₂-induced DNA damage.**
Diamantis DA, Oblukova M, Chatziathanasiadou MV, Gemenetzi A, **Papaemmanouil C**, Gerogianni PS, Syed N, Crook T, Galaris D, Deligiannakis Y, Sokolova R, Tzakos AG. *Free Radic Biol Med*. **2020** Nov 20;160:540-551. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.08.025. Epub 2020 Aug 29. PMID: 32871232
- 5. Valorisation of stachysetin from cultivated *Stachys iva* Griseb. as anti-diabetic agent: a multi-spectroscopic and molecular docking approach.**
Pritsas A, Tomou EM, Tsitsigianni E, **Papaemmanouil CD**, Diamantis DA, Chatzopoulou P, Tzakos AG, Skaltsa H. *J Biomol Struct Dyn*. **2021** Oct;39(17):6452-6466. doi: 10.1080/07391102.2020.1799864. Epub 2020 Jul 31. PMID: 32731792
- 6. Charting the structural and thermodynamic determinants in phenolic acid natural product - cyclodextrin encapsulations.**
Andreadelis I, Chatziathanasiadou MV, Ntountaniotis D, Valsami G, **Papaemmanouil C**, Christodoulou E, Mitropoulou G, Kourkoutas Y, Tzakos AG, Mavromoustakos T. *J Biomol Struct Dyn*. **2021** Apr;39(7):2642-2658. doi: 10.1080/07391102.2020.1751716. Epub 2020 Apr 16. PMID: 32249691
- 7. Unveiling the interaction profile of rosmarinic acid and its bioactive substructures with serum albumin.**
Papaemmanouil C, Chatziathanasiadou MV, Chatzigiannis C, Chontzopoulou E, Mavromoustakos T, Grdadolnik SG, Tzakos AG. *J Enzyme Inhib Med Chem*. **2020** Dec;35(1):786-804. doi: 10.1080/14756366.2020.1740923. PMID: 32200650
- 8. Exploring the role of the membrane bilayer in the recognition of candesartan by its GPCR AT1 receptor.**
Kiriakidi S, Chatzigiannis C, **Papaemmanouil C**, Tzakos AG, Mavromoustakos T. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2020 Mar 1;1862(3):183142. doi: 10.1016/j.bbamem.2019.183142. Epub 2019 Dec 9. PMID: 31830465